

발간등록번호

11-1543000-000169-01

호염성 질소고정균을 이용한 헤어리베치 생육촉진 및
이를 통한 간척지 녹비화 기술 개발

(Development of hairy vetch inoculant and green manure
technology for reclaimed land)

한국생명공학연구원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “호염성 질소고정균을 이용한 헤어리베치 생육촉진 및 이를 통한 간척지 녹비화 기술 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 9월 30일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 김 창 진

연 구 원 : 박 동 진

연 구 원 : 이 재 찬

연 구 원 : 권 미 경

연 구 원 : 주 윤 정

연 구 원 : 강 혜 영

연 구 원 : 임 지 민

연 구 원 : 김 판 경

연 구 원 : 장 종 옥

연 구 원 : 김 민 구

요 약 문

I. 제 목

호염성 질소고정균을 이용한 헤어리베치 생육촉진 및 이를 통한 간척지 녹비화 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내 간척지 중 80% 이상인 32만 ha가 벼와 같은 수도작에 한하여 활용되고 있고, 우리나라 식량자급율이 27%로 OECD 국가들 중 최하위권이다. 사료를 포함한 곡물의 73% 이상을 해외에 의존하며, 특히 쌀 이외 곡물의 자급률은 5% 미만에 불과하고, 그마저도 경지면적이 지속적으로 감소중이어서 식량안보 및 식량자원 확보를 위한 발작물 재배 면적 확대가 국가적으로 필요한 실정이다. 이에 대한 대안으로 기존에 개발된 서해안 간척지와 현재 개발 진행 중인 새만금 간척지를 활용하면 식량기지화를 할 수 있을 것이며, 이를 위해서는 간척지와 같이 고염 및 유기물함량이 낮은 지역에서도 발작물을 재배할 수 있는 새로운 기술개발이 절실하다. 그러나 간척지 토양은 높은 염농도와 매우 낮은 유기물 함량으로 인하여 작물 재배에 어려움이 있고 제염작업에는 오랜 기간과 막대한 경비, 그리고 제염시 지하수나 강물을 사용함으로써 친환경적 과정을 거칠 수밖에 없다. 이에 대한 해결방안으로 질소고정활성 및 내염특성을 가진 미생물을 활용하는 신기술 적용을 제안하고자 하였다.

따라서 본 연구에서는 콩과 녹비작물인 헤어리베치를 재배하기 위하여 숙주에 친화적이며 호염성인 미생물을 선발하고, 이를 간척지 토양에서 실제로 적용하므로써 고염 환경에서의 식물 스트레스 극복 기술과 간척지 토양 유기물 함량 제고 기술을 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 헤어리베치로부터 호염성 질소고정활성 균주의 분리 및 탐색
- 근류형성능 및 질소고정능 우수균주 선발
- 선발균주의 분류 및 동정(형태학적, 분자계통분류학적 분석)
- 선발균주에 대한 간척지 토양 정착력 및 안정성 시험
- 토양 시용 방법에 따른 헤어리베치 생육촉진 효과 검정
- 선발균주의 배양최적화 및 소규모 발효조 배양 기술 개발
- 선발균주의 종자 코팅 기술 개발
- 선발균주와 ACC deaminase 활성 균주의 복합 처리
- 토양 환경별 소포장 적용 시험

IV. 연구개발결과

-활성 우수 균주 선발

헤어리베치의 뿌리혹으로부터 호염성 균주를 선발하기 위하여 2010년 1차로 헤어리베치가 균집 전국 7개 지역에서 헤어리베치 근류를 수집하여 뿌리혹으로부터 107개 균주를 확보하였고, 2011년 2차로 헤어리베치 농가실증시험포 및 지역적응 시험포 10개 지역에서 약 200개의 균주를 확보하였다. 전체 약 300여개의 세균 중 약 250여개의 *Rhizobium* sp. 균주를 분리하였고, 그 중 균주 33개를 호염성 헤어리베치 근류균으로 선발하였다.

-근류형성능 및 질소고정능 우수 균주 선발

선발한 33개의 호염성 균주들을 헤어리베치 종자에 접종한 후 뿌리혹 형성 유무를 관찰하였다. 질석을 이용한 pot test와 질석과 상토를 동량으로 섞은 pot test에서 호염성 균주들에 의한 헤어리베치의 뿌리혹 형성 유무를 관찰한 결과 23개의 균주가 접종된 헤어리베치만 뿌리혹이 형성되었고, 각각 접종된 균주에 따라 형성된 뿌리혹의 숫자, 색깔, 모양, 크기가 다른것을 확인하였다. 또한 질석 혹은 질석과 상토가 동량으로 섞인 pot의 조건에 따라 뿌리혹 형성 정도가 달랐다. 뿌리혹을 형성하는 것으로 확인된 23개의 근류균 중 질소고정능이 우수한 균주를 선발하고자 상토와 질석을 동량으로 섞은 pot 환경에서 뿌리혹이 충분히 자랄 때 까지 헤어리베치를 생육시켰고, 이때 형성된 뿌리로 gas chromatography를 이용해 ethylene양을 측정 결과 RH84, RH93, RH11098, RH11171 균주가 질소고정능이 우수한 근류균임을 확인하였다.

-선발 균주의 분류 및 동정

생육 속도, colony의 색깔, 점액질 유무, bromothymol blue test를 통한 산 생성 유무, TEM 촬영에 의해 형태 및 생리학적 특성을 분석하였고, 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 RH84, RH93, RH11098은 *Rhizobium fabae* CCBAU 33202^T(DQ835306) 균주에 가장 근연한 것으로 확인되었으며, RH11171은 *Rhizobium pisi* DSM 30132^T(AY509899)균주에 가장 근연한 것으로 확인되었다. 이 중 RH84와 RH93 균주는 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였고 각각 KCTC12024BP, KCTC12025BP의 기탁번호를 부여받았으며, 특히 출원하였다. 「“헤어리베치 근류 호염성 리조비움속 균주”-출원번호 10-2011-0106981호」

-선발 균주의 간척지 토양 적용 시험

선발 균주로 코팅된 종자를 간척지 흙에 파종하여 헤어리베치의 뿌리혹 형성 유무를 확인하였다. 일반 토양과 비교해 상대적으로 유기물 함량이 적고 염 농도가 높은 간척지 흙은 헤어리베치가 정상적으로 생육하기에 부적절한 토양이지만, 본 연구에서 선발한 균주처리 및 토양개량제의 효과로 0.3%의 염 농도까지 헤어리베치가 생육 가능한 것을 임의로 확인하였다. 또한 선발 균주의 처리 및 토양의 개량에 의한 간척지 토양 환경 변화는 직접적으로 헤어리베치의 생육에 긍정적인 영향을 미칠 것이라는 가능성을 확인하였다.

-시용 방법에 따른 생육촉진 효과

간척지와 같이 척박한 토양에서 헤어리베치의 생육을 증대시키기 위해서 화학비료의 시용, 토양개량제의 시용에 따른 헤어리베치 생육 촉진 효과를 확인한 결과 화학비료를 시용할 경우에는 헤어리베치의 생육 촉진 효과가 없었다. 토양개량제 중 석고와 왕겨에 의한 생육 촉진 확인 결과 염 농도가 0.3% 미만일 때는 선발 균주의 처리와 토양개량제 동시 시용에 의해 뿌리와 줄기의 무게가 무처리구 보다 증가하는 것으로 확인되었다. 간척지 토양에 단기간 유기물 보충과 용적밀도를 낮추기 위해 간척지 흙에 상토를 비율별로 시용한 결과 최종적으로 0.5%의 염 농도에서도 헤어리베치의 발아가 70%까지 증가하는 것을 확인하였다.

-배양 최적화

선발 균주의 배양 최적화를 위해서 여러 가지 탄소원을 이용하여 생육 변화를 확인한 결과 mannitol, sorbitol, galactose, mannose에 의한 생육 증가가 확인되었다. 또한 경제적 측면과 농가 보급시의 활용성을 고려하여 식품 10가지에 대한 선발 균주의 생육 정도를 확인해 본 결과 상업적 탄소원 보다 콩(대두)을 배지원으로 사용하였을 때 높은 생육 증가를 보였다. 2.0%의 콩을 배지원으로 하여 5 L 발효조 배양 결과 3일에서 7일까지 10^8 CFU/ml의 생육 수준을 유지하였다.

-종자 코팅제 기술 개발

헤어리베치 종자에 코팅된 선발 균주의 안정성을 위해서 제제(혹은 종자 코팅제)에 대한 안정성을 확인하였다. 1% CMC를 전착제로 사용할 때 피복제에 대한 접착효과가 좋았으며, perlite에 선발 균주를 섞어 제제화하였을 때 선발 균주는 약 6개월간 4℃, 실온, 28℃에서 안정하였고, 헤어리베치 종자에 코팅하였을 때 발아력에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

-복합 균주 이용

헤어리베치가 받는 간척지 토양의 환경적 스트레스를 낮추기 위하여 ACC deaminase 활성 균주를 선발 균주인 RH84와 함께 복합 처리하고자 하였다. ACC deaminase 활성 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에 확보되어 있는 780여 균주 중 ACC deaminase 활성 값이 높은 균주를 임의로 5개 선발하였다. 두 가지 균주를 동시에 헤어리베치 종자에 접종하기 위해서 종자 코팅 방법을 설정하였고, pot test를 통해 염 환경에 따른 복합 균주 처리의 효과를 확인하여 높은 염 농도에서도 헤어리베치 발아를 증가시키는 균주를 확보하였다.

-소포장 적용 시험

헤어리베치의 파종시기에 맞춰 1년에 한번씩, 2년에 걸쳐 선발 균주가 접종된 헤어리베치 종자를 일반토양과 간척지 토양에 직접 파종하여 토양환경별 효능을 검증하였다. 일반토양에서의 소포장 효능평가 실험 결과 무처리구보다 선발 균주 처리구에서 45-50%의 생육 증가를 확인하였으며, 간척지 토양에서도 약 45%의 생육 증가를 확인하였다. 1년차에는 각각의 생육 증가가 확연하게 차이가 났지만, 2년차에는 예년에 비해 길어진 추위와 서리에 의해 1년차 보다 높은 생육 증가는 기대하기 어려웠다. 그러나 뿌리혹 단면의 색깔에 의한 무처리구와 처리구의 확연한 차이, 일정 구간의 유의적인 생육 촉진 현상은 앞으로의 균주 개량, 종자 코팅의 방법 확립, 복합 균주의 이용 방법 개선 등에 의해 더욱 좋은 결과를 얻을 것이라 사료된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

가. 특허 성과

출원년도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록번호
2011	헤어리베치 근류 내염성 리조비움 속 균주	한국생명공학 연구원	대한민국	10-2011-010 6981	
2012	스트렙토마이 세스 에룸펜스 KRB-001 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 잡초 방제용 제초제 조성물	한국화학 연구원, 한국생명공학 연구원	대한민국	10-2012-014 1838	

나. 논문 및 포스터 게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Screening of Rhizobium, Hairy Vetch Root Nodule Bacteria, with Promotion of Nodulation and Nitrogen Fixation	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Mi-Kyung Kwon, Dong-Jin Park, Chang-Keun Sung	Korean Journal of Microbiology	49(2)	국내	SCIE
2012	Hairy Vetch Growth-Promoting <i>Rhizobium</i> sp. RH84and Application to Reclaimed Land	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Mi-Kyung Kwon, Dong-Jin Park, Chang-Keun Sung	The Korean Society for Applied Biological Chemistry	accepted	국내	SCIE

게재 연도	포스터명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Isolation and Identification of Halophilic Hairy Vetch Root Nodule Bacteria for Application on Newly Reclaimed Land	Mi-Kyung Kwon	Chang-Jin Kim	Jong-Ok Jang, Dong-Jin Park	한국 식물병리 학회		국내	
2011	Screening of Halophilic Hairy Vetch Root Nodule Bacteria with Effective Biological Nitrogen Fixation Ability	Mi-Kyung Kwon	Chang-Jin Kim	Jong-Ok Jang, Zion Kang, Dong-Jin Park	한국 식물병리 학회		국내	
2012	Development of Green Manure Technology Using Halophilic Hairy Vetch Root Nodule Bacteria on Newly Reclaimed Land	Mi-Kyung Kwon	Chang-Jin Kim	Jong-Ok Jang, Dong-Jin Park	녹색기술 포럼		국내	
2012	Apply to New Reclaimed Land of Salt Stress Using Halophilic Rhizobium and Hairy Vetch	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Jae-Chan Lee, Chang-Keun Sung, Seon-Woong Hwang	한국 미생물 연합회		국내	
2013	Growth Promoting of Hairy vetch (<i>Viciavillosa</i> Roth) Using <i>Rhizobium</i> sp. RH84 under the Reclaimed Soil Condition	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Chang-Keun Sung, Seon-Woong Hwang	한국 미생물 학회		국내	
2013	Increased Growth of Hairy vetch (<i>Vicia Villosa</i> Roth) by Seed Treatment with Rhizobacteria in Field Test	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Dong-Jin Park, Chang-Keun Sung, Seon-Woong Hwang	한국 미생물 연합회		국내	

게재 연도	포스터명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Rhizobacteria and ACC Deaminase Producing Bacteria Confer Resistance in Hairy vetch (<i>Vicia Villosa</i> Roth) to Salt Stress	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Dong-Jin Park, Chang-Keun Sung	한국 미생물 연합회		국내	

다. 활용 계획

일차적으로 간척지에서 화학비료 없이 헤어리베치의 생육을 촉진하며, 이차적으로 생육이 끝난 헤어리베치를 간척지에 환원함으로써 척박한 토양에 유기물을 공급할 수 있다. 더 나아가 유기물의 함량이 높아진 간척지에서 새로운 식량 자원 생산이 가능하게 될 것이며, 친환경 및 지속가능한 농업을 통한 농업생태계 보호 및 환경 오염 방지의 실천이 가능할 것이다.

SUMMARY

Newly reclaimed land has high salinity and low organic matter soil content as a result of crop productivity fall. Hairy vetch is strong in the cold and can thus be grown on idle agricultural land in winter as a green manure crop. This is made possible by nitrogen fixation by the hairy vetch root nodule bacteria, especially for crops grown without the use of chemical fertilizers.

This study was conducted to select rhizobia from hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) with nodulation and excellent nitrogen-fixing ability. Hairy vetch root was collected from 17 of cultivation region of all over the country, rhizobia were isolated from the root nodules. Isolates were re-inoculated in to a hairy vetch separately and studied nodulation and nitrogen-fixing ability. As a result, total of 252 *Rhizobium* sp. isolates were isolated from the hairy vetch root nodules, among these, 33 isolates were *Rhizobium* sp. which show good growth at more than 0.5% NaCl concentration. These 33 isolates were re-inoculated separately, 6-8 weeks after, good root nodule formation was observed from *Rhizobium* sp. 33 strains treated samples. 23 isolates were positive for nitrogen fixing ability, the highest acetylene reduction activity was shown by RH84, RH93, RH11098, RH11171. A comparative 16S rRNA gene sequence analysis revealed that three strains are most closely related to *Rhizobium fabae* CCBAU 33202^T(DQ835306), and one strain is closely related to *Rhizobium pisi* DSM 30132^T(AY509899). With the treatment of RH84 to hairy vetch showed good grow that 0.3% salty reclaimed soil and 0.5% salty reclaimed soil + peat moss. And the production yield was increased up to 56% at field test. From these results, it was confirmed that the *Rhizobium* sp. RH84 would be used as a green manure for hairy vetch under the salty condition of reclaimed land. Results suggest that the *Rhizobium* sp. RH84 can be use the possibility of its application as a green manure crop of hairy vetches in nonuniform salt distribution reclaimed land.

CONTENTS

Chapter 1. INTRODUCTION	13
Section 1. Objectives and importance of the project	13
Section 2. Contents and scope of the project	13
Chapter 2. STATE OF THE ART	14
Chapter 3. RESULT OF THE PROJECT	17
Section 1. Screening and isolating of halophilic bacteria of hairy vetch	17
1. Root nodule collection and isolation of hairy vetch	17
2. Screen of halophilic bacteria from hairy vetch	20
Section 2. Selection of excellent nodulation and nitrogen fixing bacteria	22
1. Selection of excellent nodulation bacteria	22
2. Selection of excellent nitrogen-fixing bacteria	26
Section 3. Classification and identification	28
1. Morphological and physiological characteristics	28
2. Molecular phylogenetic characteristic	29
Section 4. Apply of selection bacteria	32
1. Apply a small pot test	32
A. Nodulation test of reclaimed soil	32
B. Plant growth promoting under salt concentrations of reclaimed soil	32
2. Apply a large pot test	35
3. Application of the growth promoting effect	36
A. Growth promoting effect of chemical fertilizer treatment	36
B. Growth promoting effect of soil treatment	39
(1) Treatment of gypsum and rice hull	39
(2) Treatment of peat moss	45
Section 5. Optimization of culture condition	48
1. Control of pH	48
2. Growth in carbon source	49
3. Growth in food source	50
4. Fermentation of small scale	53
Section 6. Formulation and seed coating technology	54
1. Formulation of hairy vetch seed	54
A. Selecting of spreader	54

B. Selecting of cover	55
C. Ratio of spreader and cover	56
D. Technology of seed coating	58
2. Formulation of selected bacteria	59
A. Spreader selection and stability	59
B. Growth promoting by formulated bacteria	60
Section 7. Mixed use of <i>Rhizobium</i> sp. RH84 and strain of ACC deaminase active strain	61
A. Screening of ACC deaminase active strain	61
B. Formulation	62
C. Effect of mixed strains under salt concentrations	63
Section 8. Field test	64
A. Field test of fertile soil	64
B. Field test of reclaimed land	69
Chapter 4. ACHIVEMENT AND CONTRIBUTION OF THE PROJECT	76
Chapter 5. PRODUCT AND APPLICATION PLAN OF THE PROJECT	78
Chapter 6. SCIENCE AND TECHNOLOGY INFORMATION	101
Chapter 7. REFERENCE	102

목차

제 1 장 연구개발과제의 개요	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	17
제 1 절 헤어리베치 유래 질소 고정 활성균 분리 및 탐색	17
1. 헤어리베치 근류 수집 및 근류균 분리	17
2. 호염성 헤어리베치 근류균 선발	20
제 2 절 근류형성능 및 질소고정능 우수 균주 선발	22
1. 근류형성능 우수 균주 선발	22
2. 질소고정능 우수 균주 선발	26
제 3 절 선발 균주의 분류 및 동정	28
1. 형태 및 생리학적 특성	28
2. 분자계통분류학적 특성	29
제 4 절 선발균주 적용 시험	32
1. 소규모 포트 적용 시험	32
가. 간척지 토양에서의 뿌리혹 형성능 조사	32
나. 염 농도별 간척지 토양에서의 생육촉진 효과 검정	32
2. 대규모 포트 적용 시험	35
3. 시용 방법에 따른 생육촉진 효과 검정	36
가. 화학비료 처리에 따른 생육촉진 효과	36
나. 토양개량제 처리에 따른 생육촉진 효과	39
(1) 석고, 왕겨 처리에 따른 효과	39
(2) 상토 처리에 따른 효과	45
제 5 절 배양 최적화	48
1. pH 조절에 의한 생육 조사	48
2. 탄소원에 따른 생육 조사	49
3. 식품 유래의 배지조성에 따른 생육 조사	50
4. 소규모 발효조 배양	53
제 6 절 제제화 및 종자 코팅 기술 개발	54
1. 헤어리베치 종자 제제 기술 개발	54
가. 전착제 선발 및 처리 농도의 설정	54
나. 피복제 선발	55
다. 전착제와 피복제 혼합 비율 설정	56
라. 종자코팅제 기술 개발	58
2. 선발균주 제제 기술 개발	59
가. 선발균주 제제의 피복제 선발 및 안정성	59
나. 선발균주 제제에 의한 생육 촉진능 검정	60
제 7 절 <i>Rhizobium</i> sp. RH84와 ACC deaminase 활성 균주의 복합 이용	61

1. ACC-deaminase 활성 균주의 선발	61
2. 제제화	62
3. 염 환경에 따른 복합 균주 처리의 효과	63
제 8 절 토양 환경별 소포장 적용 시험	64
1. 일반토양에서의 소포장 효능평가	64
2. 간척지에서의 소포장 효능평가	69
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	76
제 1 절 연구개발의 최종 목표	76
제 2 절 연차별 연구개발 목표내용 및 달성도	76
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	78
제 1 절 연구개발 성과	78
제 2 절 성과활용 계획	88
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	101
제 7 장 참고문헌	102

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

국내 간척지 중 80% 이상인 32만 ha가 벼와 같은 수도작에 한하여 활용되고 있고, 우리나라 식량자급율이 27%로 OECD 국가들 중 최하위권이다. 사료를 포함한 곡물의 73%이상을 해외에 의존하며, 특히 쌀 이외 곡물의 자급률은 5% 미만에 불과하고, 그마저도 경지면적이 지속적으로 감소중이어서 식량안보 및 식량자원 확보를 위한 밭작물 재배 면적 확대가 국가적으로 필요한 실정이다. 이에 대한 대안으로 기존에 개발된 서해안 간척지와 현재 개발 진행 중인 새만금 간척지를 활용하면 식량기지화를 할 수 있을 것이며, 이를 위해서는 간척지와 같이 고염 및 유기물함량이 낮은 지역에서도 밭작물을 재배할 수 있는 새로운 기술개발이 절실하다. 그러나 간척지 토양은 높은 염농도와 매우 낮은 유기물 함량으로 인하여 작물 재배에 어려움이 있고 제염작업에는 오랜 기간과 막대한 경비, 그리고 제염시 지하수나 강물을 사용함으로써 친환경적 과정을 거칠 수밖에 없다. 이에 대한 해결방안으로 질소고정활성 및 내염특성을 가진 미생물을 활용하는 신기술 적용을 제안하고자 하였다.

따라서 본 연구에서는 콩과 녹비작물인 헤어리베치를 재배하기 위하여 숙주에 친화적이며 호염성인 미생물을 선발하고, 이를 간척지 토양에서 실제로 적용함으로써 고염 환경에서의 식물 스트레스 극복 기술과 간척지 토양 유기물 함량 제고 기술을 개발하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 범위

- 헤어리베치로부터 호염성 질소고정활성 균주의 분리 및 탐색
- 근류형성능 및 질소고정능 우수균주 선발
- 선발균주의 분류 및 동정 (형태학적, 분자계통분류학적 분석)
- 선발균주에 대한 간척지 토양 정착력 및 안정성 시험
- 토양 시용 방법에 따른 헤어리베치 생육촉진 효과 검정
- 선발균주의 배양최적화 및 소규모 발효조 배양 기술 개발
- 선발균주의 종자 코팅 기술 개발
- 선발균주와 ACC deaminase 활성 균주의 복합 처리
- 토양 환경별 소포장 적용 시험

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 현재 새만금 간척지는 2020년 완공을 목표로 공사가 진행 중이며, 완공될 경우 28,300 ha의 새로운 토지가 탄생되며, 이중 30.3%에 해당되는 8,570 ha가 농지로 활용될 전망이다 (농촌진흥청 보도자료 2008년 9월). 따라서 이곳에 적절하게 식물을 재배할 수 있다면 지구온난화 가스 발생량을 상당히 줄일 수 있으며 북한을 위한 식량 공급기지로도 이용가능 하다고 하겠다 (농촌진흥청 보도자료 2008년 10월), 또한 신간척지 조기 숙전화 기술, 바이오에너지 작물생산 기술 개발, 간척지 농업의 부가가치 증대 등을 통하여 간척지를 저탄소 녹색성장의 원동력으로 활용해 나가겠다고 하였다 (농촌진흥청 보도자료 2008년 11월). 또한 농업진흥청에서는 화학비료 대체용으로 hairy vetch를 녹비작물로 선정하고 최근 국산 신품종 “보라”를 개발하였는데, 2012년까지는 종자 소요량 전량을 안정적으로 보급함으로써 농민들이 보다 더 쉽게 친환경적 농업이 가능할 것이라고 하였다 (농촌진흥청 보도자료 2010년 2월).
- 지금까지 일반적 환경에서 서식하는 질소고정 미생물에 대한 연구는 많이 보고되었지만, 호염성 질소고정 미생물과 관련해서는 거의 연구된 바가 없다[직접 문헌 검색 확인한 결과 및 질소고정 미생물 분야 세계적 전문가인 Michael Sadowsky (Minnesota 대학) 교수로부터 확인].
- 미생물은 종다양성이 풍부할 뿐만 아니라 그 기능이 다양하여, 보건의료, 정밀화학, 생물산업 및 농업 등 이미 여러 산업분야에서 많이 이용되고 있다. 그중 농업분야에 있어서는 크게 질소고정균과 같은 생물비료로서 작물생산에 이용하는 것과 살충제, 살균제, 제초제와 같은 생물농약으로서 작물보호에 이용하는 것으로 대별될 수 있다. 즉 미생물은 식물과 밀접한 관계를 가지면서 식물비료로서 작물의 성장에 크게 도움을 주고 있는데 그 대표적 예가 공기 중의 질소를 식물이 이용 가능한 형태로 고정시키는 질소고정균, 인 등의 무기 영양분을 식물에 공급하는 VA mycorrhizae, 그리고 다양한 식물생육촉진 작용을 나타내는 PGPR (plant growth promoting rhizobacteria)등이라 하겠다.
- 현재까지 국내외적으로 “특수환경미생물”분야 연구는 고온성미생물 분야에 집중되어 왔고, 호염성미생물에 대한 연구와 개발은 세계적으로도 초기 단계이기 때문에 한국에서는 호염성 미생물자원에 선택집중하여 연구 할 필요가 있다 [Fig. 1. 참조: 고온성미생물 분야는 이미 특허가 우점하고 있어 성숙기 상태이고, 호염성과 관련된 분야는 아직까지 특허는 별로 없고 논문 발표가 다수임. 즉 호염성미생물 분야는 아직까지 도입기 상태로 판단됨].

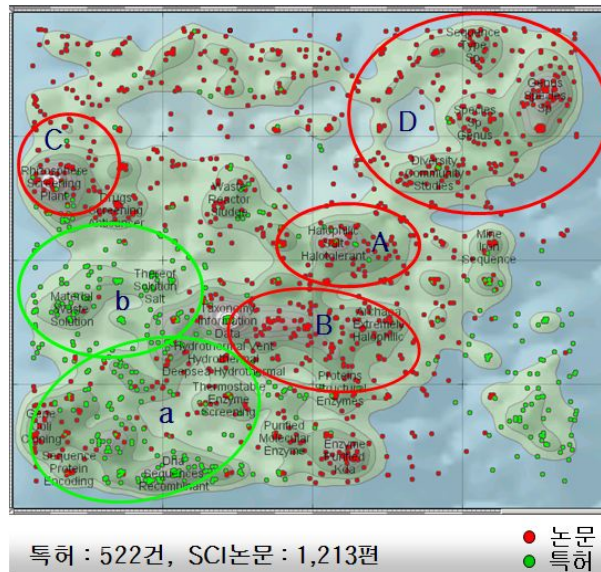


Fig. 1. 특수환경 미생물 관련 특허 및 논문 맵 분석.

A: 호염성 및 내염성, B: 고세균 및 초호염성, C: 근권 및 식물, D: 균분류 및 다양성
a: 호염성, b: 환경 및 폐수처리

- 제13회 농업인의 날 기념 녹색성장 심포지엄에서는 “농업부문 녹색성장 추진방안”으로서 2012년까지 화학비료를 40%, 농약을 30% 감축하는 목표를 제시하였고 녹비작물, 천적, 미생물을 이용하는 친환경 기술개발을 통해 화학비료, 화학농약을 대체하겠다고 발표하였다 (한국농촌경제연구원 2008년 11월 11일). 따라서, 막대한 비용이 들어가는 물리적인 방법을 사용하지 않고도 극한환경하의 식물스트레스를 극복할 수 있는 호염성 미생물을 이용한 식물생육촉진 연구개발기술은 경제적 측면에서도 중요하다 하겠다.
- 식물분야에서는 내염성 유전자 도입에 의한 내염성 식물 종을 개발하고 있으나, 식물자체적인 연구 방법은 현장 적용 및 적응상의 문제점 및 불안전성(LMO)이 있으므로 연구개발 및 이용성이 용이한 미생물을 이용하여 미생물·식물상호작용 메커니즘에 기반한 기술을 개발한 후에 식물에 적용한다면 식물생육촉진 원천기술확보 및 실용화가 가능할 것으로 기대된다. 이와같이 분자생물학적 특성에 기반한 미생물 이용 식물생육촉진 연구는 LMO 이용상의 제한점 및 문제점을 극복할 수 있는 대안으로서도 중요하다.
- 최근에는 “미생물프런티어사업”과 관련하여 특수환경 (호염성) 미생물을 탐색하여 80여종의 균주를 계통분류학적으로 분류 동정하여 신종으로서 국제기관에 등록하였다. 이로부터 유용성을 탐색하던 중 식물 호르몬이자 스트레스 원인 물질 에틸렌의 전구체인 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)를 탈아미노화하여 ammonia와 α -ketobutyrate로 분해함으로써 에틸렌 축적을 조절하는 ACC-deaminase 활성균주를 분리하였다. 실제 토마토 유묘를 사용한 4주간 pot 실험에서 210 mM NaCl (1.2% NaCl) 농도에서도 2배 이상의 biomass 증가로 식물생육

촉진 활성을 나타내는 것을 확인하여 특허출원 하였다["신규 엔테로박터속 균주 및 그를 이용한 식물 성장조절방법" 대한민국특허 출원번호 제10-0068781 출원일 2009년 7월 28일 / "신규 시트로박터속 균주 및 그를 이용한 식물 성장촉진방법" 대한민국특허 출원번호 제 10-0090446 출원일 2009년 9월 24일].

- 현재 선진 각국에서 특수환경에 대하여 신규 유전자에 의한 새로운 생리활성 물질 및 효소 발굴 경쟁이 치열한 가운데 효소, 항생물질, 생리활성물질 등 산업적으로 유용한 고부가 소재가 끊임없이 발견되고 있다. 따라서 고염분 토양과 같은 특수환경 유래 호염성미생물로부터 탐색분리하여 식물생육촉진 및 내염·내건성 특성의 용도개발 연구를 통해 의약, 식품, 농축산, 낙농업 분야에 친환경·녹색성장에 이용할 수 있는 원천기술확보가 가능하다.
- 본 연구팀에서 국내외의 다양한 균분리원 시료로부터 미생물을 분리·배양 보존하면서 생리활성물질을 탐색해 왔다. 특히 프런티어연구개발사업(2002년)을 통해 특수환경으로부터 호염성미생물을 다수 탐색하여 세계적인 신종탐색 분야 1위 도달에 크게 기여하였으며, 최근 몇 년간 80여 균주를 신종으로서 분류동정하여 관련 국제기관에 등록하였다. 그리고 분리미생물로부터 유용성을 탐색하던 중 근권 미생물로부터 식물스트레스 물질인 에틸렌의 축적을 조절하는 ACC-deaminase 활성을 가진 몇 균주를 분리하였으며, pot 상에서 토마토를 대상으로 실험결과 210 mM NaCl (1.2% NaCl)에서도 생육을 촉진시키는 활성을 확인하여 특허출원 하였다["신규 엔테로박터속 균주 및 그를 이용한 식물 성장조절방법" 대한민국특허 출원번호 제10-0068781 출원일 2009년 7월 28일 / "신규 시트로박터속 균주 및 그를 이용한 식물 성장촉진방법" 대한민국특허 출원번호 제10-0090446 출원일 2009년 9월 24일]

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 헤어리베치 유래 호염성 질소 고정 활성균 분리 및 탐색

1. 헤어리베치 근류 수집 및 근류균 분리

2010년 헤어리베치 재배지 전국 7개 지역 전남 (장흥·강진), 충남 (당진·예산), 전북 새만금, 경북 예천, 경기도 평택으로부터 헤어리베치 뿌리혹을 수집(Fig.1) 및 분리하여, 뿌리혹으로부터 총 107개 균주를 분리하였고, 이중 16S rRNA sequencing 결과 52개 *Rhizobium* sp.이 분리되었다(Table 1). 뿌리혹을 95% ethanol 1분, 2% NaClO 2분간 표면살균하여 메스를 이용 뿌리혹을 절개한 후 절개면을 YMA (yeast extract mannitol agar) 배지에 도말, 치상하여 30℃ 항온기에서 3~4일간 배양하였고 분리된 균들을 다시 도말하여 순수한 single colony를 얻어 이들을 액체 배양 후 20% glycerol stock 하여 -80℃에 보존하여 실험에 이용하였다.

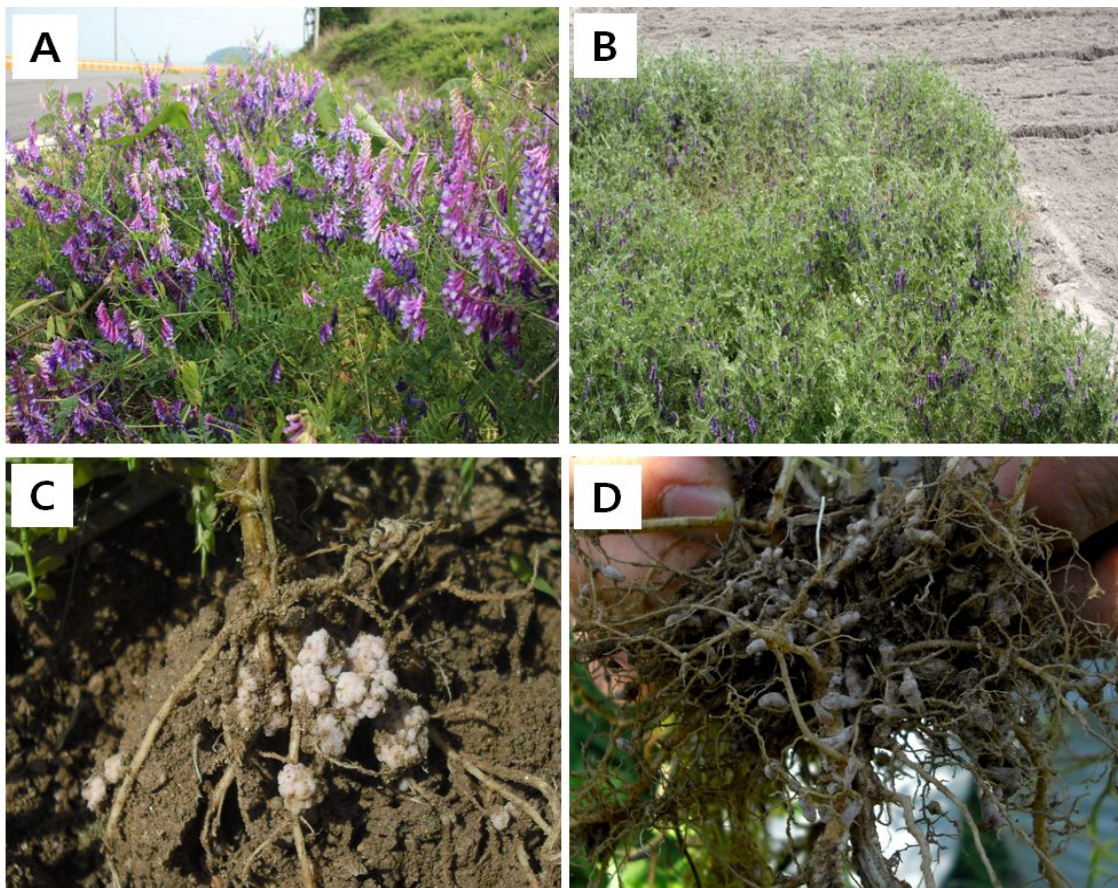


Fig.1. Typical symptom caused by root nodule bacteria on hairy vetch root.

A, B; Purple-flowered hairy vetch, C, D; symptom with numerous root nodules on hairy vetch root naturally infected (2010)

Table 1. Isolation of hairy vetch root nodule bacteria from various sites (2010)

Sample sites		Number of isolates	Number of <i>Rhizobium</i> sp.
Jeonnam	Jangheung	6	6
	Gangjin	5	3
Chungnam	Dangjin	2	1
	Yesan	39	20
Jeonbuk	saemankum	20	10
Gyeonbuk	Yecheon	28	8
Gyeonggi	Pyeongtaek	7	4
Total		107	52

Hairy vetch root nodules were collected from all over the country in 2010. Dormant root nodules were sterilized with 70% ethanol solution for 1 min, 2% NaClO solution for 2 min and rinsed three times with sterile water. Root nodules were cultured on yeast extract mannitol agar (YMA) plate for 4 days at 30°C.

추가적인 우수 균주 선별을 위하여 2011년 4월부터 5월까지 농촌진흥청 헤어리베치 농가실증시험포 및 지역적응 시험포(Fig. 2)를 대상으로 품종별로 헤어리베치 뿌리혹을 수집(Fig. 3), 근류균을 분리하였다. 헤어리베치 수집지는 전남 장흥, 충북 청원, 경남 밀양, 경북 (영덕·예천), 대구, 경기도 (평택·수원), 강원도 (평창·춘천)(Table 2.) 전국 10개 지역이었으며 총 200개 *Rhizobium* sp. 균주를 분리하였다. 근류균 분리 및 보존 방법은 뿌리혹을 절개한 후 절개면을 YMA (yeast extract mannitol agar) 배지에 도말, 치상하여 30°C 항온기에서 3~4일간 배양하였고 분리된 균들을 다시 도말하여 순수한 single colony를 얻어 이들을 액체 배양 후 20% glycerol stock 하여 -80°C에 보존하여 실험에 이용하였다.



경북농업기술원 내 지역적응시험포

경북 예천군 농가실증시험포

Fig. 2. Various sites of hairy vetch root nodule bacteria.



Fig. 3. Typical symptom caused by root nodule bacteria on hairy vetch root. (2011).
 A; Purple-flowered hairy vetch (Yeongdeok), B; Symptom with numerous root nodules on hairy vetch root naturally infected (Yecheon)

Table 2. Isolation of hairy vetch root nodule bacteria from various sites and a variety (2011)

수집 지역	품종수	품종명	비고
전남 장흥군 안양면 신촌리 177	1	청풍보라	농진청 농가실증 시험중
충북 청원군 오창읍 괴정리 383번지 충청북도 농업기술원 시험포장	5	청풍보라, 마메초, 베치4호, 베치5호, H1	농진청 지역적응 시험중
경남 밀양시 상동면 여수동 685	1	청풍보라	농진청 농가실증 시험중
경북 영덕군 병곡면 원황1리 767 국립식량과학원 영덕출장소 시험포장	5	청풍보라, 마메초, 베치4호, 베치5호, H1	농진청 지역적응 시험중
경북 예천군 유천면 고림리 25-14	1	청풍보라	농진청 농가실증 시험중
대구광역시 북구 동호동 189번지 경상북도 농업기술원 시험포장	5	청풍보라, 마메초, 베치4호, 베치5호, H1	농진청 지역적응 시험중
경기도 평택시 고덕면 여염리 산-109	1	청풍보라	농진청 농가실증 시험중
경기도 수원시 권선구 수인로 125 국립식량과학원 시험포장	24	청풍보라, 마메초, 베치4호, 베치5호, H1 외 육성·도입품종	농진청 연구 시험중
강원도 춘천시 우두동 402 강원도 농업기술원 시험포장	5	청풍보라, 마메초, 베치4호, 베치5호, H1	농진청 지역적응 시험중
강원도 춘천시 서면 월송 3리	1	청풍보라	농진청 농가실증 시험중
강원도 평창군 대관령면 황계 3리 54-36 국립식량과학원 고령지농업연구소	6	청풍보라, 베치2호, 베치3호, 베치4호, 베치5호, H1	농진청 지역적응 시험중
총 10개 지역			

2. 호염성 헤어리베치 근류균 선발

2010년 1차로 분리된 52개 헤어리베치 *Rhizobium* sp. 균주들을 0.5~5% NaCl 첨가 YMB(액체)와 YMA(고체) 배지에 7일간 배양하며 균생장을 관찰한 결과 0.5% 이상 NaCl 첨가 배지에서 자란 16개의 호염성 균주를 선발 하였다. 52개 균주 모두 *Rhizobium* sp. 선발배지인 YMA, YMB(0.01% NaCl 포함)에서는 잘 자랐으나 YMA+0.5% NaCl에서는 16균주, YMA+1% NaCl에서는 10균주, YMA+3% NaCl에서는 9균주만이 성장하였고 YMA+5% NaCl 배지에서 자란 균주는 없었다. YMA+0.5% NaCl(고체) 배지에 비해 YMB+0.5% NaCl(액체) 배지에서는 2균주가 추가된 18균주가 자랐는데 액상, 고상 모두에서 자란 호염성 균주를 선발하기 위해 두 균주는 배제하였으며, 앞으로 균 선발시 NaCl 첨가 고체 배지만을 이용해도 충분할 것으로 사료된다. 또한 2011년 2차로 분리한 200개 헤어리베치 *Rhizobium* sp. 균주들로부터 호염성 균주를 선발하기 위하여 0.5~5% NaCl 첨가 YMA배지에 7일간 배양하며 균생장을 관찰한 결과, 0.5% NaCl 첨가 배지에서는 178개의 호염성 균주가 1% NaCl 첨가 배지에서는 24개 균주가 성장하였다. 3%와 5% 배지에서 성장하는 균주는 없었다. 1% NaCl 첨가 배지에서 자란 균주들 중 지역, 품종, 생육등을 고려하여 총 17균주를 추가 호염성 헤어리베치 근류균으로 선발하였다(Table 3).

Table 3. Growth limit concentration of *Rhizobium* sp. isolated from hairy vetch root nodule isolates

Year	Isolation No.	Growth limit conc. of NaCl(%)	Sample sites
2010	RH1	0.5	Yesan
	RH3	0.5	Yesan
	RH6	3	Yesan
	RH10	1	Yesan
	RH35	1	Yesan
	RH76	3	Yecheon
	RH81	0.5	Yecheon
	RH82	0.5	Yecheon
	RH84	0.5	Yecheon
	RH93	0.5	Yecheon
	RH99	3	Dangjin
	RH101	3	Pyeongteak
	RH106	3	Yesan
	RH122	3	Jangheung
	RH128	3	Gangjin
RH129	1	Gangjin	
2011	RH11070	1	Jangheung
	RH11073	1	Jangheung
	RH11098	1	Suwon
	RH11120	1	Suwon
	RH11121	1	Suwon
	RH11162	1	Chuncheon
	RH11163	1	Chuncheon
	RH11166	1	Chuncheon
	RH11167	1	Chuncheon
	RH11170	1	Chuncheon
	RH11171	1	Chuncheon
	RH11174	1	Chuncheon
	RH11177	1	Chuncheon
	RH11178	1	Pyeongchang
	RH11180	1	Pyeongchang
RH11199	1	Pyeongchang	
RH11200	1	Pyeongchang	

제 2 절 근류형성능 및 질소고정능 우수 균주 선발

1. 근류형성능 우수 균주 선발

헤어리베치에 대한 뿌리혹 형성능을 확인하기 위하여 분리 선발한 33개 호염성 균주들을 헤어리베치 종자에 접종한 후 뿌리혹 형성 유무를 관찰하였다. 실험은 경실종자를 제거 후 표면 살균하여 실험에 사용하였다. 표면 살균은 95% 에탄올로 1분 30초, 2% sodium hypochlorite solution으로 3분간 처리 후 멸균된 증류수로 여러 번 세척하였다.

질석을 2/3 가량 채운 유리 시험관(지름 3 cm, 길이 15 cm)과 상토와 질석을 동량으로 섞어 채운 플라스틱 비닐 pot (가로 8 cm, 세로 8 cm)의 두 가지 시험구로 나누어 실험하였고, 상토와 질석을 121℃에서 30분간 멸균한 후 사용하였다. 종자에 처리할 균주는 고체 배지 상에서 3 - 4일간 배양 후 멸균 증류수로 회수하여 10^9 cfu/ml 농도로 균주에 코팅 후 파종하였다. 추가적으로 종자 코팅 농도와 같은 농도의 균체 현탁액을 pot 당 5 ml씩 관주 접종하였다. 각 처리구는 3반복하였고 20-22℃로 유지되는 유리 온실 내에서 자연광의 상태로 생육시켰다(Fig. 4). 6 - 8 주 후 형성된 뿌리혹의 수, 크기, 색깔과 모양을 비교 관찰하였다.



Fig. 3 Nodulation test of halophilic isolates by artificial inoculation.

A and B; hairy vetches grown for six weeks after inoculation, A; nodulation test in glass tube, B; nodulation test in plastic vinyl pot

질석 시험구 관찰 결과 1차 분리균 16개 중 헤어리베치 종자에 접종 시, 식물의 뿌리혹 발달에 영향을 주는 균주는 RH1, RH3, RH81, RH82, RH84, RH93으로 6개의 균주만이 뿌리혹을 형성하였다. 각 헤어리베치 당 뿌리혹의 수는 15개 내외였으며, 그 중 RH84를 접종한 헤어리베치의 뿌리혹 개수가 가장 많았다(Table 4). 각 뿌리혹의 모양은 원형 내지는 타원형으로 전반적으로 0.5 - 1 mm의 작고 그 단면이 흰색이었다(Fig. 4). 2차 분리균 17개 중 헤어리베치

뿌리혹 형성 균주는 17개로 모두 뿌리혹을 형성하였고, 개수는 10 - 40개 내외로 1차 분리균보다 뿌리혹 형성 능력이 우수한 것으로 관찰되었다. 특히 RH11167은 37개, RH11070과 RH11171은 각각 23개 22개로 높은 뿌리혹 형성능을 보였다(Tble 4). 각 뿌리혹의 모양은 1차 분리균과 마찬가지로 원형 내지는 타원형이었으며 그 크기가 0.5 - 1 mm의 작고 그 단면이 흰색이었다(Fig. 4).

Table 4. Chracterization of nodules formed in vermiculite

Isolate No.	Nodule number	Nodule shape
RH1	2	circle, oval
RH3	7	"
RH81	7	"
RH82	11	"
RH84	13	"
RH171	9	"
RH11070	23	"
RH11073	20	"
RH11098	11	"
RH11120	19	"
RH11121	18	"
RH11162	21	"
RH11163	19	"
RH11166	10	"
RH11167	37	"
RH11170	21	"
RH11171	22	"
RH11174	15	"
RH11177	18	"
RH11178	17	"
RH11180	15	"
RH11199	14	"
RH11200	13	"
Control	0	-

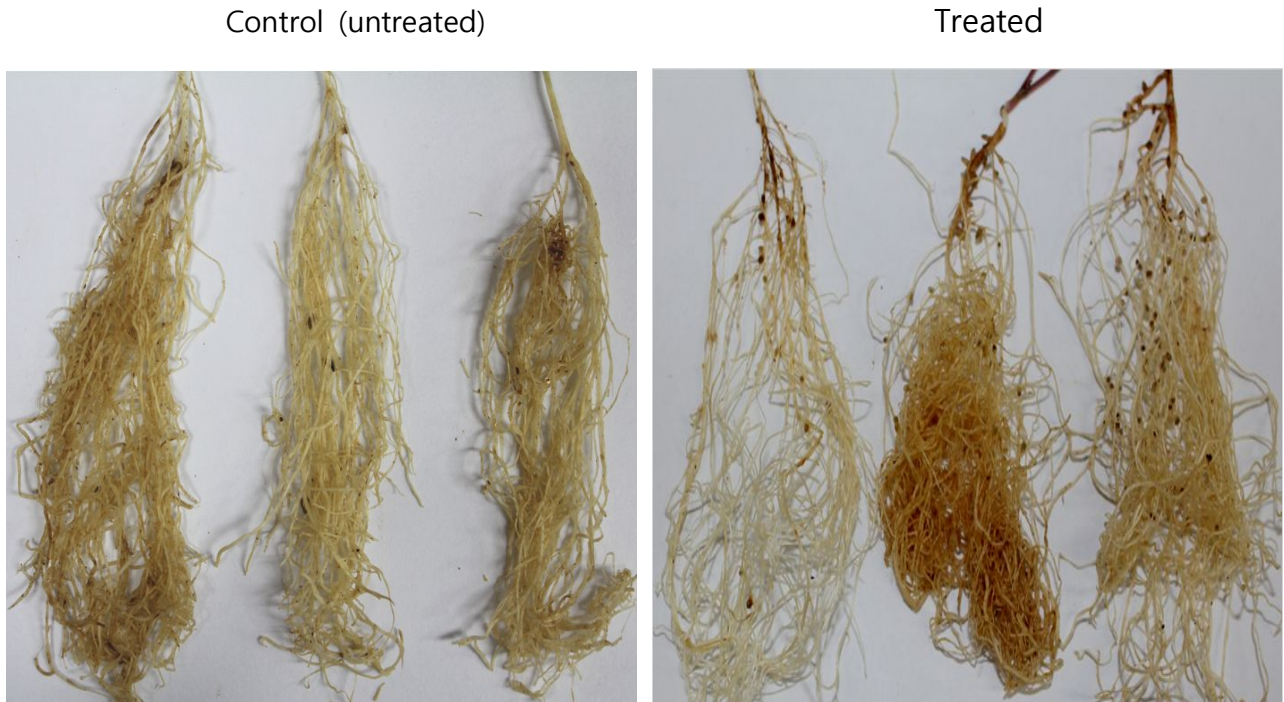


Fig. 4. Nodules of halophilic isolates formed by artificial inoculation in glass tube.

상토와 질석을 동량으로 섞어 채운 시험구 관찰 결과 1차 분리균은 질석구와 마찬가지로 16개 중 6개의 균주인 RH1, RH3, RH81, RH82, RH84, RH93이 뿌리혹을 형성하였다. 각 헤어리베치 당 뿌리혹의 수는 17 - 52개였으며, 그 중 RH93을 접종한 헤어리베치의 뿌리혹 개수가 가장 많았다. 뿌리혹의 크기는 2 - 6 mm였고 그 단면은 흰색, 분홍색, 붉은색으로 다양하였다 (Table 5). 각 뿌리혹의 모양은 원형, 타원형이거나 혹은 이들이 뭉쳐져 있는 모양이었다 (Fig. 5). 2차 분리균 17개 중 헤어리베치 뿌리혹 형성 균주는 17개로 질석 시험구와 마찬가지로 모두 뿌리혹을 형성하였고, 개수는 10 - 40개 내외로 1차 분리균 보다 뿌리혹 형성 능력이 우수하였다. RH11167은 37개, RH11070과 RH11171은 각각 23개 22개로 높은 뿌리혹 형성능을 보였다 (Table 5). 뿌리혹의 크기는 2 - 9 mm로 그 단면은 흰색, 분홍색, 붉은색으로 다양하였다 (Fig. 5). 각 뿌리혹의 모양은 1차 분리균과 마찬가지로 원형, 타원형 혹은 뭉쳐져 있는 모양이었다 (Fig. 5). 두 결과를 종합하여 RH84, RH82, RH93, RH11098, RH11167, RH11171의 다섯 균주를 선발하였다. 또한, 1, 2차에 걸쳐 분리된 균주 모두 질석 시험구 보다 상토와 질석을 동량으로 섞어 채운 시험구에서 더 많은 뿌리혹 개수와 큰 뿌리혹이 관찰되는 이유는 상토 유무에 따른 토양 내 유기물 함량에 따른 차이로 판단되며, 실제 간척지에 적용 시에는 유기물 함량이 비교적 적은 질석 시험구의 경우가 유사한 결과가 나올 것으로 추측된다. 또한, *Rhizobium*을 접종하지 않은 무접종구에서 뿌리혹이 형성 되지 않은 것으로 보아 *Rhizobium*의 추가적 접종은 헤어리베치의 뿌리혹 발달에 영향을 미칠 것이라 사료된다.

Table 5. Characteristics of nodules formed in vermiculte + peat moss

Isolate No.	nodule number	nodule color	nodule shape	nodule size (cm)
RH1	32	white, pink	oval	2.5-3
RH3	20	pink	oval	2
RH81	24	pink	oval, flower	4
RH82	19	white, pink, red	oval, flower	3-4
RH84	17	pink	oval	3
RH93	52	white	flower	5-6
RH11070	23	white, pink	flower	7-9
RH11073	20	white, pink	flower	7-9
RH11098	11	red	flower	6-8
RH11120	19	deep pink	oval, flower	4-6
RH11121	18	deep pink	oval, flower	4-6
RH11162	21	pink	oval	2
RH11163	19	pink	flower	7
RH11166	10	pink	flower	8-9
RH11167	37	red	flower	5
RH11170	21	pink	flower	4
RH11171	22	pink	oval, flower	4
RH11174	15	pink	flower	6
RH11177	18	pink	oval	2-3
RH11178	17	pink	oval, flower	3-4
RH11180	15	pink	oval, flower	3-4
RH11199	14	pink	oval, flower	3-4
RH11200	13	pink	oval, flower	3-4
control	0			

Control (untreated)

Treated



Fig. 5. Nodules of halophilic isolates formed by artificial inoculation in vermiculite + peat moss

2. 질소고정능 우수 균주 선발

뿌리혹을 형성하는 것으로 확인된 23개의 근류균(1차 분리 6균주, 2차 분리 17균주) 중 질소고정능이 우수한 균주를 선발하고자 하였다. 2절 1막의 근류형성능 우수 균주 선발과 동일한 방법으로 근류균을 접종하여, 7주 동안 헤어리베치를 생육시켰고 이때 뿌리혹이 형성된 뿌리를 sample로 이용하였다. 뿌리를 물로 가볍게 세척하고 수분을 제거한 다음 뿌리혹이 붙어 있는 상태로 뿌리를 50.5 ml 유리 용기에 넣고 이를 고무마개로 막은 다음, 유리 용기에서 주사기로 공기 5 ml를 뽑아내고, 뽑아낸 공기대신 acetylene gas 5 ml를 주입하였다. 이를 30°C 배양기에서 60분간 항온처리한 후 주사기로 유리 용기내의 혼합기체 100 μ l를 뽑아 환원된 ethylene 생성량을 GC 측정하였다. GC-FID는 shimazu GC-2010을, 분석용 column으로는 HP-AL/S capillary (length 50 m, diameter 0.53 mm, film 15 μ m, Aglient technologies, USA)를 이용하였다. carrier gas는 He으로, 유속 391.1ml/min, split ratio 20 : 1로 조절한 후 FID로 ethylene 생성량을 측정하였고, injector, detector, column 온도는 각각 200°C, 250°C, 110°C이었다. Acetylene peak는 1.76 min, ethylene peak는 1 min에 출현했고(Fig. 6) 균주마다 생성된 ethylene area 수치를 상대 비교하였다(Table 6). 생성된 ethylene의 양은 균주에 따라 최대 30배까지 차이가 났으며, 이 중 질소고정능이 우수한 균주는 RH84, RH3, RH11171의 순이었다. RH84와 RH11171은 앞의 실험인 근류형성능 우수 균주 테스트에서도 선발된 균주였다. 1, 2절의 실험 내용을 종합하여 호염성을 지니면서 뿌리혹 형성능과 질소고정능이 모두 우수한 헤어리베치 근류균 RH84, RH93, RH11098, RH11171을 우선 선발하였고, 균주의 분리 및 동정을 실시하였다.

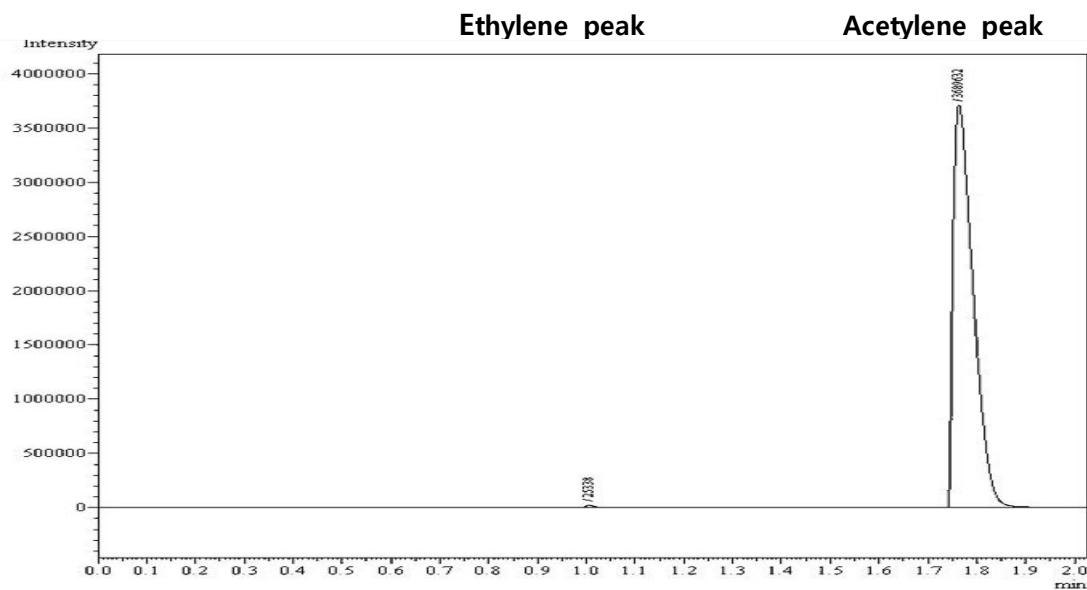


Fig.6. Ethylene peak of hairy vetch nodule produced by acetylene reduction.

Table 6. Nitrogen fixation activities measured from haplophilic hairy vetch isolates

Isolate No.	Nitrogen fixation activities ^a
RH1	2037
RH3	5616
RH81	3559
RH82	2744
RH84	7554
RH93	1022
RH11070	362
RH11073	1296
RH11098	2178
RH11120	581
RH11121	242
RH11162	776
RH11163	485
RH11166	873
RH11167	1509
RH11170	1661
RH11171	3422
RH11174	2268
RH11177	1355
RH11178	300
RH11180	2371
RH11199	417
RH11200	179
control	0

^a Ethylene area measurements were used as nitrogen fixation. At this point the acetylene area was 15,000.

제 3절 선발 균주의 분류 및 동정

1. 형태 및 생리학적 특성

콩과작물과 공생하는 근류균은 기주식물에 대한 친화성 또는 증식속도의 완급에 따라 *Rhizobium* 속으로 분류되기도 하는데, 배지상에서 증식이 빠르고 산을 생성하는 균을 *Rhizobium* 속, 증식이 느리고 알칼리를 생산하는 것을 *Bradyrhizobium* 속으로 분류하기도 한다. 우수 균주로 선발한 RH84, RH93, RH11098, RH11171 균주는 모두 YMA 배지 배양시 2 ~3일 이내에 colony가 형성되어 빠른 증식속도를 보였다. 투명하면서 백색 내지 유백색에 가까운 둥글고 볼록한 균총을 형성하였고, 많은 점액성 물질을 지니고 있었다(Table 7). 이러한 특징은 *Rhizobium* 속에 속하는 균주들과 동일하였다. 또한 다섯 균주 모두 산을 생성하여 bromothymol blue(최종농도 25 ppm) 용액을 첨가하여 조제한 YMBA(pH7.0)를 푸른색에서 노란색으로 변화시켜 산을 생성하는 *Rhizobium* 속의 특징을 보여주었다(Fig. 7). 따라서 2011년 추가 우수 균주로 선발한 두 균주 모두 *Rhizobium* 속으로 분류하였다.

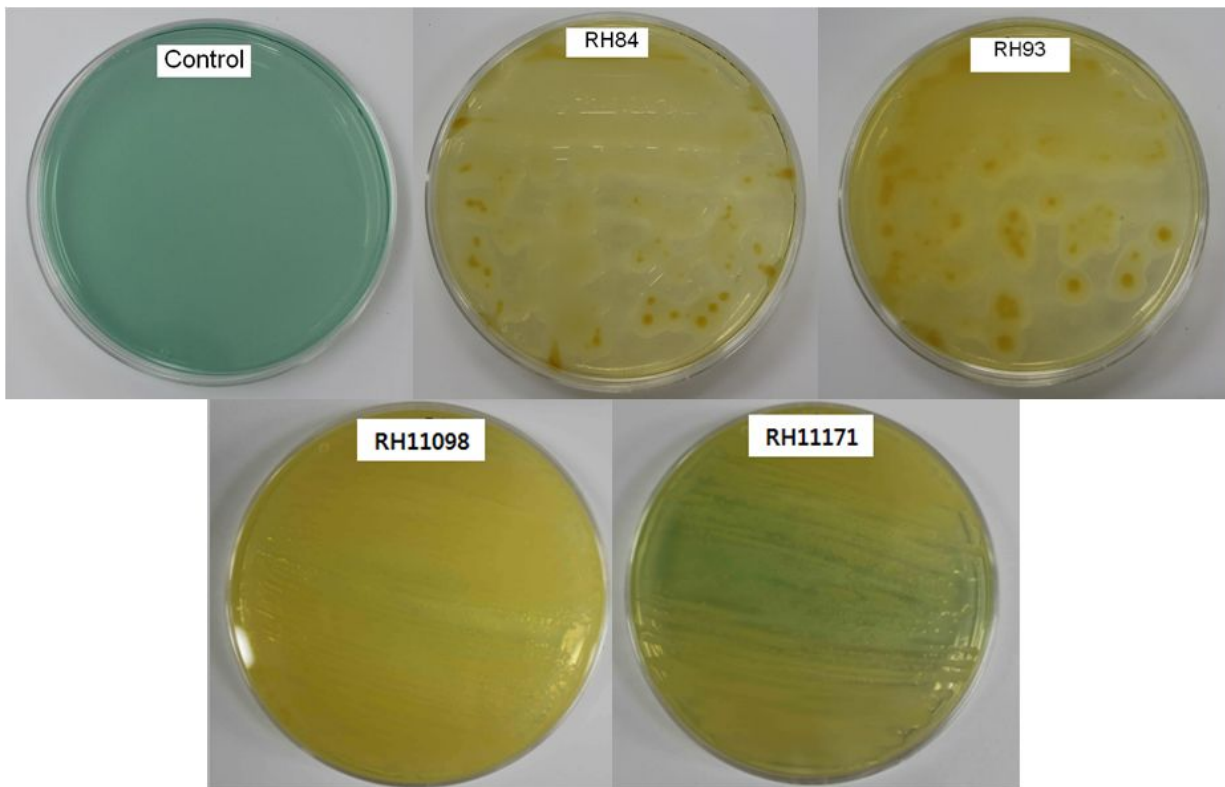


Fig. 7. Acid production by bromothymol blue test.

Table 7. Morphological and physiological characteristics of selected isolates

Isolates	Growth rate ^a	Colony color	Mucous	Bromothymol blue test
RH84	fast	White~milk white	○	Yellow
RH93	fast	White~milk white	○	Yellow
RH11098	fast	White~milk white	○	Yellow
RH11171	fast	White~milk white	○	Yellow

2. 분자계통분류학적 특성

2010년 우수 선발 균주 RH84, RH93 균주와 2011년 추가 우수 선발 균주 RH11098, RH11171 균주의 근연관계 및 종 동정은 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 수행 하였다. 선발균주들의 genomic DNA를 추출한 후 primer 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCAG-3')와 1492R (5'-GGTACTTGTACGACTT-3')을 사용하여 증폭하였다. 반응 조건은 초기 denaturation 94℃ 5분, 이후 denaturation 94℃ 1분, annealing 55℃ 1분, extension 72℃ 1분, 30cycle 증폭 하고 최종 extension 72℃ 10분으로 PCR하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit (Qiagen사)를 사용하여 정제하고 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems model 377)를 이용하여 염기서열분석을 수행하였다. 선발된 균주의 16S rRNA 염기서열은 NCBI BLAST를 사용하여 기존에 등록된 다양한 세균들에 상응하는 염기서열과 비교하여 높은 상동성을 나타내는 세균 그룹을 1차적으로 선별하고, 선별된 세균 그룹 내의 각각의 균주와 선발균주의 16S rRNA 염기서열간 상동성 값은 Similarity Matrix version 1. 1을 이용하여 계산하였다. 정확한 계통학적 분석을 위해, 선발균주의 염기서열은 선별된 기존에 알려진 분류군 균주들의 상응하는 유전자 염기서열과 CLUSTAL W software를 사용, alignment하였고 분자 계통학적 계통수 작성은 PHYLIP 프로그램 패키지를 사용하였다. 분자 진화거리는 DNADIST 프로그램 속의 Kimura 2 - parameter model 알고리즘을 이용하여 계산하였고, 최종적인 계통수는 NEIGHBOR 프로그램 속의 neighbor - joining method에 의하여 작성하였다. 선발균주들의 16S rRNA BLAST 결과, 네 균주 모두 *Rhizobium* 속에 속하였으며, RH84 균주는 *Rhizobium fabae*와 99.704%, RH93 균주는 *Rhizobium fabae*와 99.926%, RH11098 균주는 *Rhizobium fabae*와 99.819%, RH11171 균주는 *Rhizobium pisi*와 100% 유사도를 각각 나타내었다. 분자계통학적 계통수상에 있어서 세 선발균주(RH84, RH93, RH11098)의 위치는 *Rhizobium fabae* CCBAU 33202^T(DQ835306) 균주에 가장 근연한 것으로 나타났으며, 세 균주 모두 유사한 근연관계로 묶여 있었다. 한편 RH11171 균주는 *Rhizobium pisi* DSM 30132^T(AY509899)균주에 가장 근연한 것으로 나타났다 (Fig. 8).

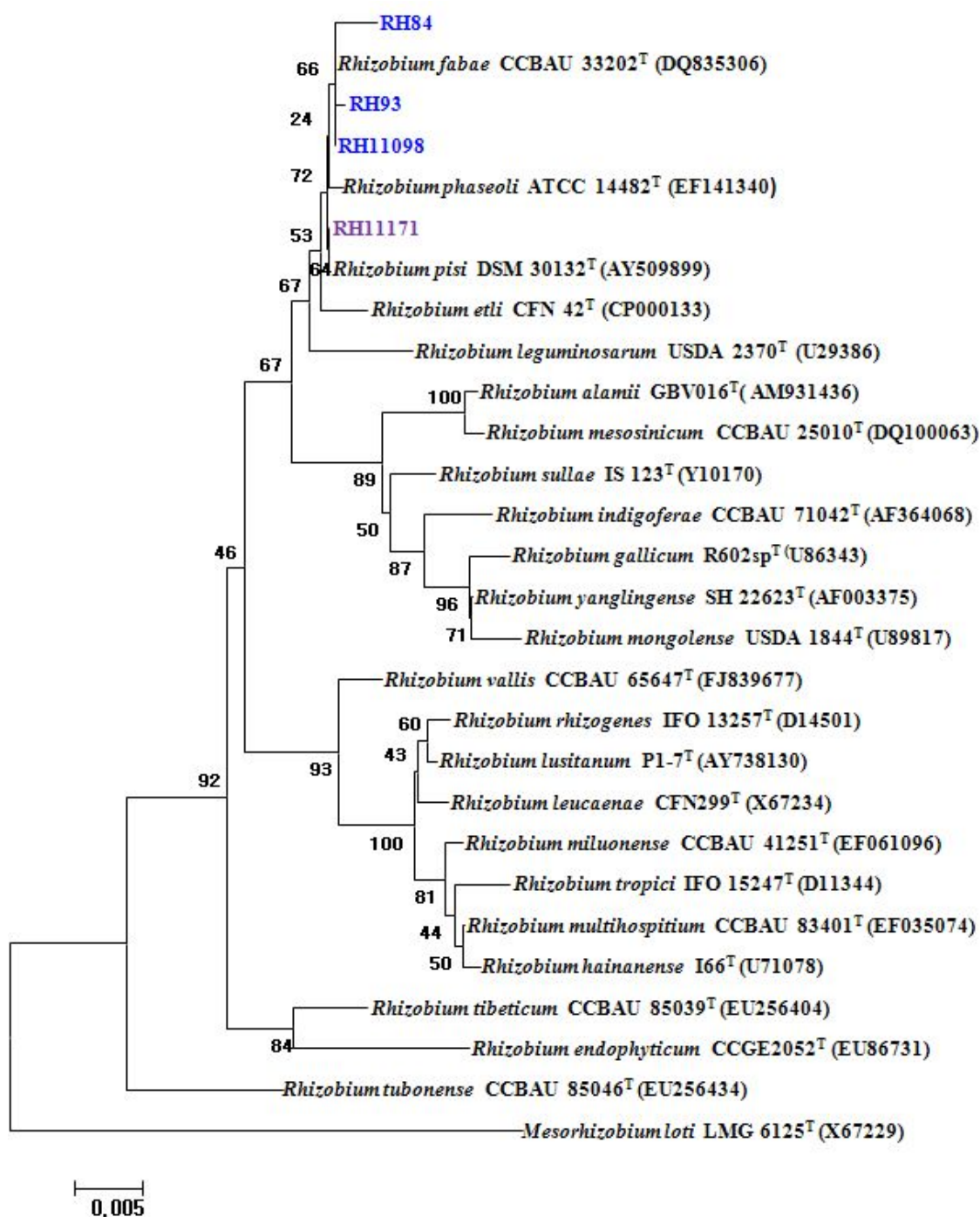


Fig. 8. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequence comparison, showing the relationship of strain RH84, RH93, RH11098 and RH11171 to *Rhizobium* species. *Mesorhizobium loti* LMG 6125^T (X67229) was used as an outgroup.

한편 2010년도 분리 균주였던 RH84와 RH93균주의 전자현미경(TEM) 촬영 결과에서 두 균주 모두 간균의 형태로 2 - 3개의 주모를 지니고 있어(Fig. 6) 전형적인 *Rhizobium* sp.의 형태를 보였다. 현재 KCTC에 균주기탁(RH84:KCTC12024BP, RH93:KCTC12025BP)하여 보존 중이며, 이들 균주들은 특히 출원하였다. 「“헤어리베치 근류 호염성 리조비움속 균주”-출원번호 10-2011-0106981호」

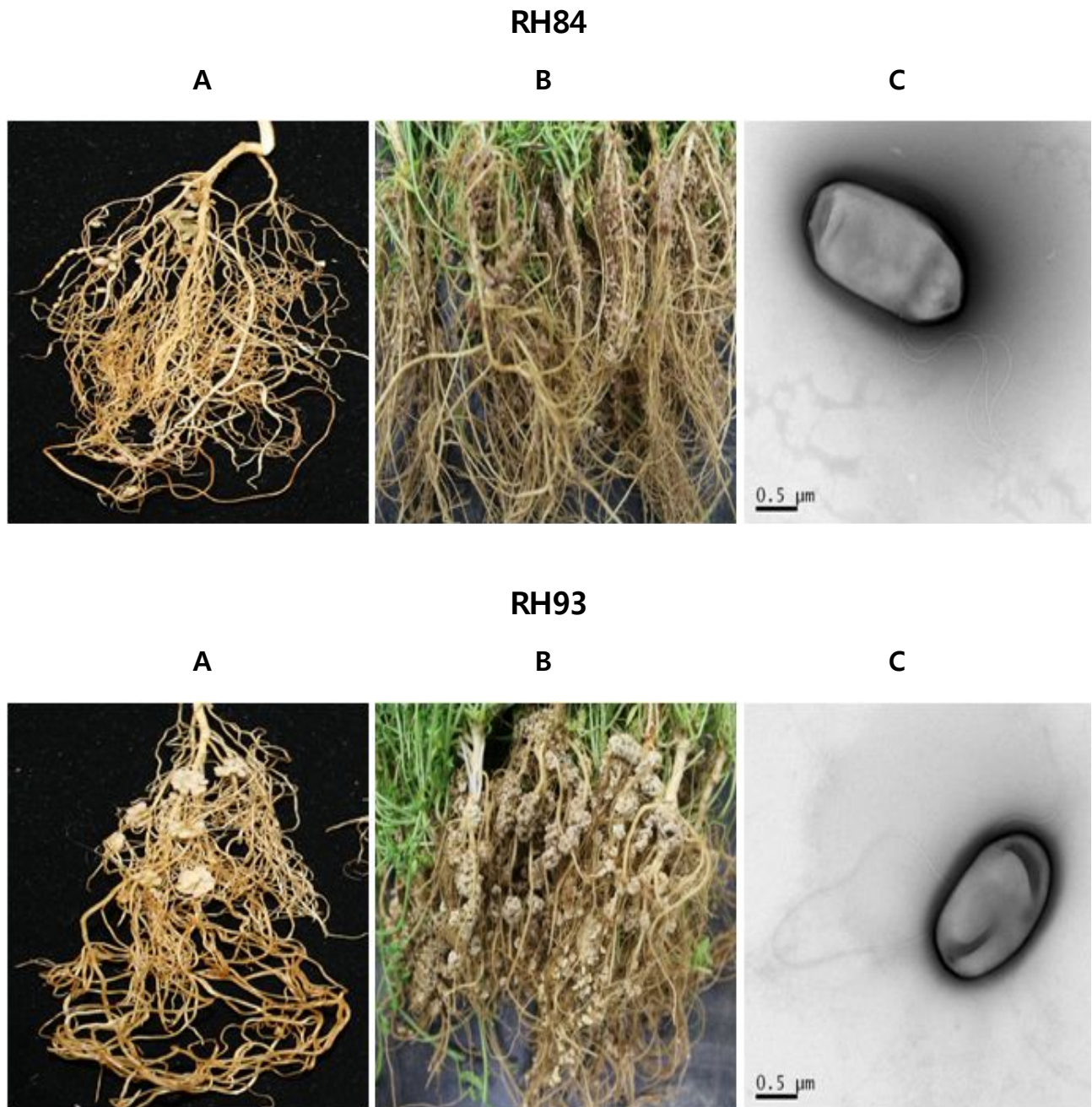


Fig. 9. Morphological characteristics of selected halophilic isolates in 2010.

A; root nodules formed from pot test(peat moss:vermiculite =1:1), B; root nodules formed from field test, C; TEM images

제 4절 선발균주 적용 시험

1. 소규모 포트 적용 시험

가. 간척지 토양에서의 뿌리혹 형성능 조사

선발한 호염성 우수 균주들이 간척지 토양에서도 뿌리혹을 잘 형성 할 수 있는지 검정하기 위하여, 헤어리베치 재배 가능 염농도로 알려진 0.1% 염농도 새만금 간척지 토양을 이용하여 포트 실험을 수행하였다. 종자소독한 헤어리베치에 선발균주인 RH84, RH93을 종자 코팅(1% CMC안에 10^9 cfu/ml 농도의 균주 포함)하여 파종하고 균주현탁액(10^9 cfu/ml) 5 ml씩 관주 처리 하였으며 이때 토양은 멸균 후 사용하였다. 모든 처리는 4반복씩 수행하였고, 포트당 3립의 종자를 파종하였으며 6주 후 뿌리혹 형성을 관찰하였다. 그결과 무처리는 뿌리혹을 형성하지 않은 반면, 일반 토양에서 검정했을 때와 똑같이 RH84 균주는 작은 원통형의 뿌리혹을 형성하였고 RH93 균주는 꽃모양의 크기가 큰 뿌리혹을 다수 형성하여(Fig. 10) 간척지 토양에서도 질소고정을 통한 헤어리베치 생육 촉진에 효과를 가져 올 균주로 기대하였다.

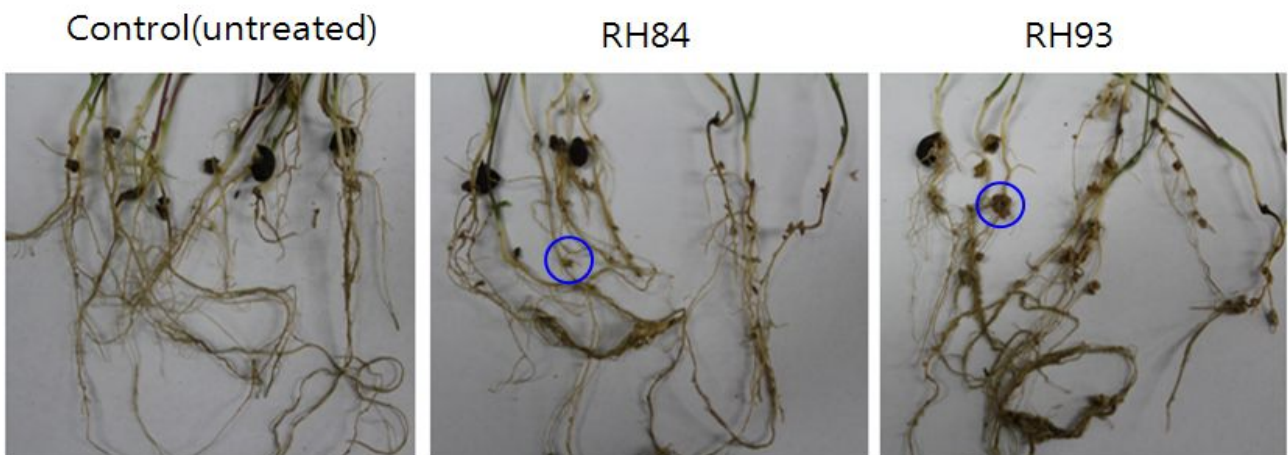


Fig. 10. Nodules of 2 isolates formed by artificial inoculation in reclaimed land soil.

나. 염 농도별 간척지 토양에서의 생육촉진 효과 검정

간척지를 밭으로 이용 시 지하수위 및 배수조건에 따라 토양 표면의 염류 분포가 불균일하여 재배작물의 생육에 차이가 많이 나며, 일반적인 작물재배 시 염 농도 0.3% 이상에서는 작물의 생육에 심한 저해가 일어나 재배가 불가능하다고 알려져 있다. 그중 녹비 효과를 기대한 헤어리베치는 염에 약하여 신간척지에서 저농도인 0.1%이하에서 재배하도록 권장되고 있다 (간척지 녹비작물 활용기술, 농촌진흥청, 2011년). 2010년 기 선발 우수 균주 RH84, RH93균주는 염 농도 0.5%까지 생육 가능한 균주로 신간척지의 염 농도가 높은 토양에서도 잘 적응하여 헤어리

베치의 생육 촉진에 기여 할 수 있을 것으로 기대되었다. 염 농도별 헤어리베치의 생육한계점과 선발한 균주에 의한 생육가능 염 농도 변화 및 생육촉진 효과를 알아보하고자 0.05 - 0.35% 까지 염 농도별로 간척지 흙을 조제하여 간척지 토양만 처리한 것, 간척지 토양 + 토양개량제 첨가한 처리, 간척지 토양 + 토양개량제 + 선발균주 RH84와 RH93 각각 접종한 처리를 하였다. 사용한 간척지 흙은 전북 부안 새만금 간척지에서 저염 중염 고염 농도별로 수거해 온 것으로 일정량씩 섞어가며 각 농도별 간척지 흙을 조제하였고, 첨가한 토양개량제는 간척지 토양에서 투수성 개량에 효과적이며 제염효과가 알려진 석고 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 「300kg/10ar(한국의 간척지 농업, 농진청)」와 통기성 증가를 위해 perlite를 석고와 동량으로 처리하였다. 균 접종은 종자 소독 한 헤어리베치에 선발균주인 RH84, RH93을 종자 코팅(1% CMC안에 10^9 cfu/ml 균주)하여 파종하고 균주현탁액(10^9 cfu/ml) 5 ml씩 관주 처리하였으며 이때 토양은 멸균 후 사용하였다. 모든 처리는 포트 당 5립 종자를 파종, 3반복씩 수행하였고, 14주 후 헤어리베치의 생체중, 지상부 길이, 뿌리무게를 조사하였다. 먼저 생육가능 염 농도를 살펴보면 무처리(간척지 토양만 처리)는 0.05 - 0.15% 에서만 생육했고 0.2% 이상에서는 생육 불가능했으나, 개량제 처리시 0.23% 까지 생육이 가능했으며, 선발균주를 처리시는 0.3% 까지 생육이 가능하여 균 처리시 생육가능 염 농도가 증가하였다(Fig. 11).



Fig. 11. The change of growth capability of hairy vetch by *Rhizobium* sp. under NaCl percentage range.

생육촉진 효과면에서 생체중의 경우, 무처리 대비 개량제 처리시 약 2배 가까이 수량이 증가하였으며 선발균주들 처리시 수량 증가 효과는 더 컸다. 특히 무처리의 한계 생육 염농도 0.15%에서 무처리 대비 개량제 처리시 1.7배, 선발균주 처리시는 4 - 5배까지 생체중이 증가하였으며, 또한 개량제 대비 선발균주 처리시 1.5~1.9배 생육촉진 효과를 보였다(Fig. 12). 한편 특이적인 경향으로 0.05~0.15%까지는 RH84 균주처리의 생육촉진 효과가 더 컸으나, 0.2% 이상 염농도가 높아질수록 RH93 균주처리의 생육촉진 효과가 우수하게 나타나 RH84 균주는 저염에서 현저한 생육촉진 효과를 가져 올 것으로 기대되며, 반면 RH93 균주는 고염 적응능이 더 뛰어나는 것으로 예측되어 두 균주의 선택적 처리가 효과적일 것으로 사료된다. 또한 지상부의 길이와 뿌리무게 역시 생체중과 같은 경향을 나타내었다. 따라서 호염성 우수 선발균주 RH84, RH93균주는 염농도가 높은 간척지토양에서 헤어리베치의 생육을 효과적으로 촉진시켜 간척지 녹비화 기술에 유용한 균주로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

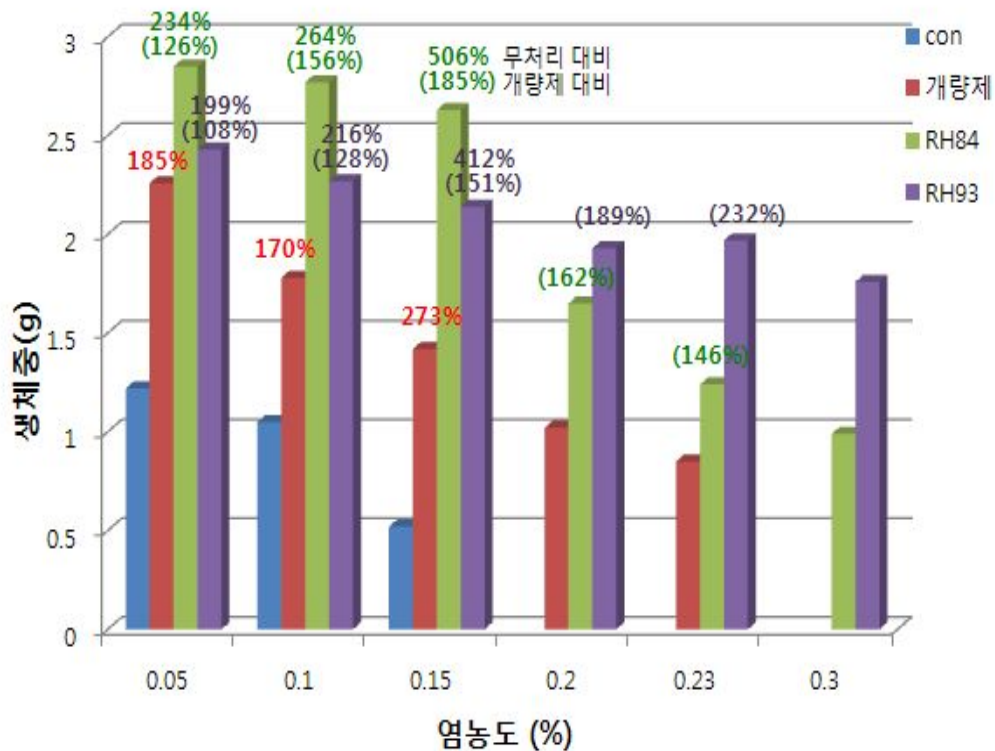


Fig. 12. Total fresh weight of hairy vetch under NaCl concentration.

2. 대규모 포트 적용 시험

앞의 소규모 토양 적용 시험에서 뿌리혹 형성이 우수했던 RH84 균주와 2차 균주 선발에서 추가적으로 선발된 RH171 균주의 대규모 pot 적용 시험을 위하여, 초화 pot (15.5 cm × 50 cm × 12 cm)에 간척지 토양을 사용하여 헤어리베치 생육 촉진을 검증하였다. 소규모 pot 실험과 다르게 필드 테스트를 염두하여 헤어리베치 재배 가능 염 농도로 알려진 0.1%의 새만금 간척지 토양을 멸균하지 않고 이용하였다. 종자 소독한 헤어리베치에 선발균주인 RH84와 RH171을 종자 코팅 (1% CMC안에 10^9 cfu/ml 농도의 균주 포함)하여 파종하였고 추가 관주 접종은 생략하였다. 각 pot 당 100립의 종자를 파종하였으며, 8주 후 뿌리혹 형성을 관찰하고 헤어리베치의 생체중(fresh weight)를 측정하여 비교하였다. 그 결과 무처리구는 뿌리혹을 형성하지 않거나 혹은 몇 개의 뿌리혹이 형성되었으며, RH84와 RH171 균주 처리구에서는 다량의 뿌리혹 형성을 확인하였다 (Fig. 13).

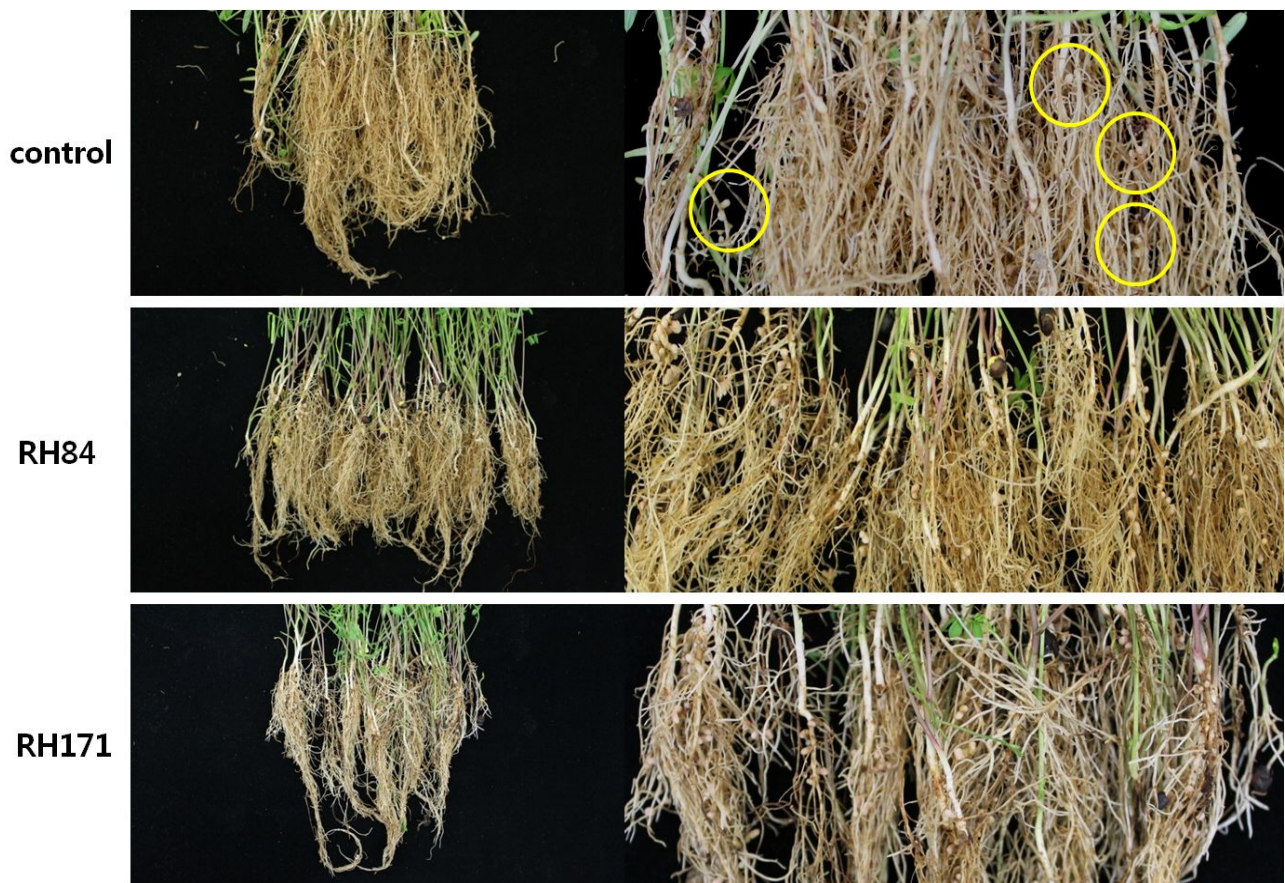


Fig. 13. Nodules of hairy vetch under the large scale pot.

각 헤어리베치의 뿌리, 줄기, 식물체 전체의 생체중을 비교한 결과 뿌리의 생체중은 RH84 > RH171 > control 순이었고, 줄기의 생체중은 RH84 > control > RH171 순이었다. 식물체 전체의 생체중은 RH84 > control > RH171 순으로 모든 결과를 종합하여 볼때 RH84 균주가 헤어리베치의 생장에 가장 우수한 효과를 가져 올 균주로 사료된다(Fig. 14). 또한 별균하지 않은 새만금 간척지 토양을 이용한 결과 control에서 약간의 뿌리혹 형성을 보였지만, 그 수가 처리구 보다 월등히 적은 것으로 보아 선발 균주의 추가적 처리는 새만금 간척지에서의 헤어리베치의 생육에 크게 영향을 줄 것으로 기대된다.

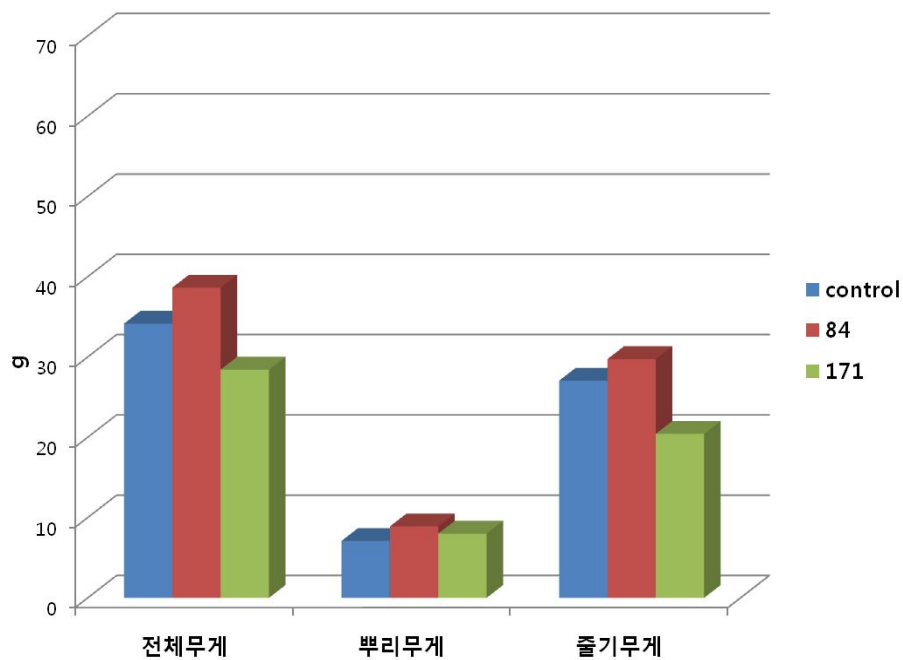



Fig. 14. Fresh weight of hairy vetch under the large scale pot.

3. 시용 방법에 따른 생육촉진 효과 검정

가. 화학비료 처리에 따른 생육촉진 효과

헤어리베치는 어느 토양 조건에서나 비교적 잘 적응하기 때문에 화학비료를 사용하지 않아도 잘 자라지만 간척지와 같이 척박한 토양에서는 사용하여야 한다(간척지 녹비작물 활용기술 참조). 특히, 농업기술실용화재단 종합분석검정센터에 간척지 토양의 이화학적 분석을 의뢰한 결과 Fig. 15 처럼 인산, 질소, 유기물 함량 등이 일반 토양보다 낮아 척박하다는 것을 알 수 있다.

Fig. 15. The result of analysis.

발급번호 : 12-SOIL-1-00186					분 석 성 적 서				
① 의 뢰 인	성 명	한국생명공학연구원		사업자등록번호	314-82-06063				
	주 소	305-806 대전 유성구 어은동 52 한국생명공학연구원 생명자원센터							
② 의 뢰 내 용	대상 물품명	헤어리베치 제배중 간척지토양(계화포장)							
	시 험 개 요	16항목:pH(산도)(1:5),EC(전기전도도)(1:5),유기물,유효인산,유효규산,석회소요량,총질소,암모니아태질소,질산태질소,양이온치환용량,치환성칼슘,치환성나트륨,치환성칼륨,치환성마그네슘,염분,토성							
	용 도	연구용							
③ 분석(시험) 성적									
성분명		분석결과(단위)			성분명		분석결과(단위)		
pH(1:5)		7.7							
EC(전기전도도)		0.43 dS/m							
유기물		2 g/kg							
유효인산		42 mg/kg							
유효규산		398 mg/kg							
석회소요량		88 kg/10a							
총질소		0.04 %							
암모니아태질소		6 mg/kg							
질산태질소		4 mg/kg							
양이온치환용량		7.5 cmol+/kg							
치환성칼슘		1.6 cmol+/kg							
치환성나트륨		1.10 cmol+/kg							
치환성칼륨		0.60 cmol+/kg							
치환성마그네슘		2.6 cmol+/kg							
염분		0.0085 %							
토성		사양토 (Sandy loam) 이하 여백							
④ 비 고		석회소요량은 발 작토깊이 10cm를 기준으로 계산							
「농업기술실용화재단 분석검정 의뢰 및 처리규정」 제4조의 규정에 의하여 2012년 05월 22일 자로 의뢰한 시료에 대한 분석(시험)성적입니다.									
이 성적은 신청인이 제출한 시료를 분석한 것으로 관련사항 이외의 선전 소송 등 증거자료로 사용하지 수 없습니다.					2012년 06월 07일 				
농업기술실용화재단 이사장									

이에 따라 간척지 토양에 부족한 인산, 칼리, 질소 성분을 화학비료를 사용하여 헤어리베치의 생육촉진 효과를 확인하고자하였다. 초화 pot (15.5 cm × 50 cm × 12 cm)에 간척지 토양을 4 kg 채운 후 시중에 판매하고 있는 용과린(KG케미칼), 몰타K (KG케미칼), 유안 (카프로)을 권장량 기준으로 환산하여 간척지 토양과 잘 섞었다. 종자 소독한 헤어리베치에 선발균주인 RH84와 RH171을 종자 코팅 (1% CMC안에 10⁹ cfu/ml 농도의 균주 포함)하여 파종하였다. Control은 균 무처리구로 1% CMC만으로 종자 코팅 하여 파종 뒤 8주간 생육 시킨 결과를 확인하였다. 유안을 사용한 pot에서는 발아가 전혀 되지 않았고, 용과린과 몰타K를 사용한 pot에서는 전반적으로 발아율이 낮으며 발아가 되었다하더라도 시간이 지나면 점점 시들어 죽는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 각각의 비료 권장량보다 1/10배 희석 된 pot에서도 동일하게 관찰되었다.

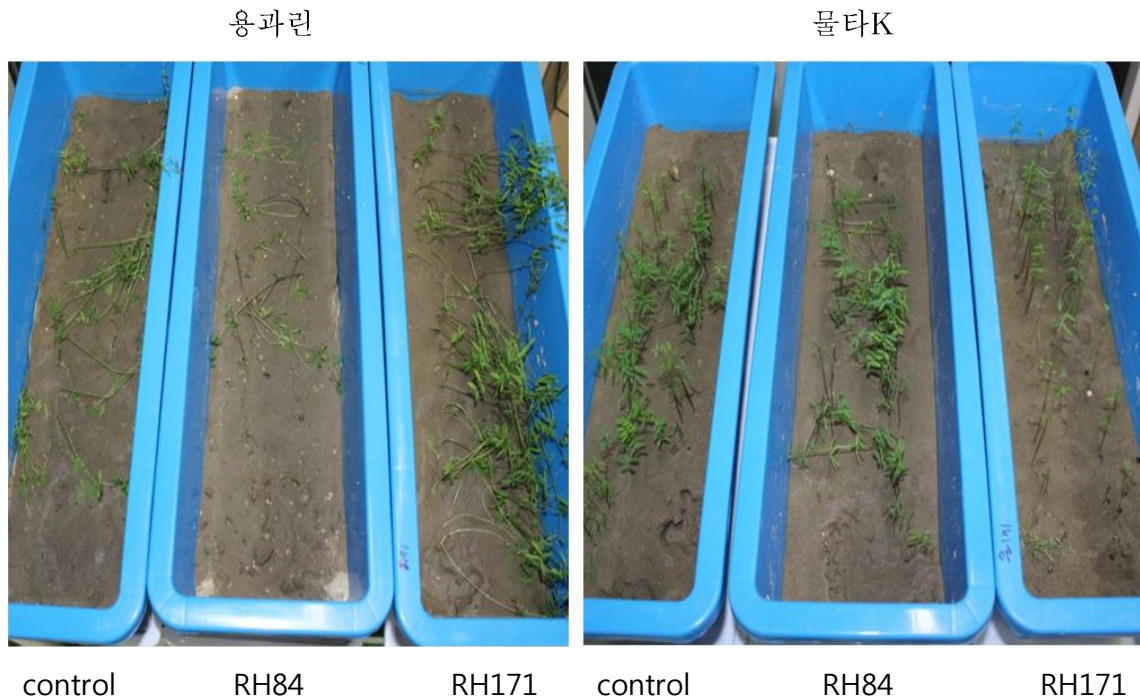


Fig. 16. Growth of hairy vetch by chemical fertilizer.

나. 토양개량제에 처리에 따른 생육촉진 효과

(1) 석고, 왕겨 처리에 따른 효과

간척지는 염 농도의 분포가 불균일하기 때문에 재배작물의 염해를 최소화하기 위해서는 배수 개선, 객토, 심경, 석회 시용 등의 토양개량이 필요하다. 특히 석고의 사용은 염해지 토양의 개량을 위해 전해질원으로 잘 알려져 있다. 토양에 처리한 석고는 침투된 빗물 중의 전해질 농도를 증가시키고, 전기적 2중층을 축소시키며, 대부분의 토양에 있는 Na과 Mg에 대해 선택성을 가진 치환성 복합체에 Ca를 공급한다 (백승화 외, Dontsova K. M and Norton, L. D., Sparks D. M., Lebron, I. *et al*, Shainberg, I. *et al*). 토양개량제의 처리에 따른 간척지 토양에서의 헤어리베치 생육촉진 효과를 확인하기 위해 석고와 왕겨를 이용하여 소형 pot에서 실험하였다. 석고 300 kg/10 ar (이문희 외)와 왕겨 1500 kg/10 ar (백승화 외)를 저염의 간척지 토양과 섞어 pot 에 채운 후 표면 살균한 헤어리베치 종자에 선발균주인 RH84와 RH171을 종자 코팅 (1% CMC안에 10⁹ cfu/ml 균주)하여 파종하였다. Pot 내 염 농도는 NaCl을 이용해 0, 0.2, 0.4%로 조절하였다. 모든 처리는 pot 당 25립 종자를 파종, 2반복씩 수행하였고, 2주 동안 헤어리베치의 발아 개수를 조사하였다. 1주차 결과 NaCl 0%인 pot에서만 80% 이상의 헤어리베치가 발아 되었고, NaCl 농도 0.2, 0.4%의 pot에서는 발아되지 않았다. 헤어리베치가 발아되어 생육한 정도는 무처리 > 왕겨 > 왕겨 + 석고 > 석고의 순이었고 (Fig. 17), 균 처리 유무에 따른 발아 개수는 크게 차이 나지 않았다. 2주차 부터는 0.2% NaCl pot에서도 발아되었고 발아 된 개수는 왕겨 > 무처리 > 석고의 순이었다 (Table 8). 균 처리 유무에 따른 발아 개수는 RH84 처리구 > RH171 처리구 > 무처리구로 선발 균주의 처리에 따른 발아의 차이는 토양에 염이 존재할 때 차이가 났다.

Table 8. Growth rate of hairy vetch by soil conditional

	0.2%			0.4%		
	control	Gypsum	Rice hull	Control	Gypsum	Rice hull
control	2	4	10	2	0	0
RH84	26	18	30	0	0	0
RH171	18	8	32	6	0	0

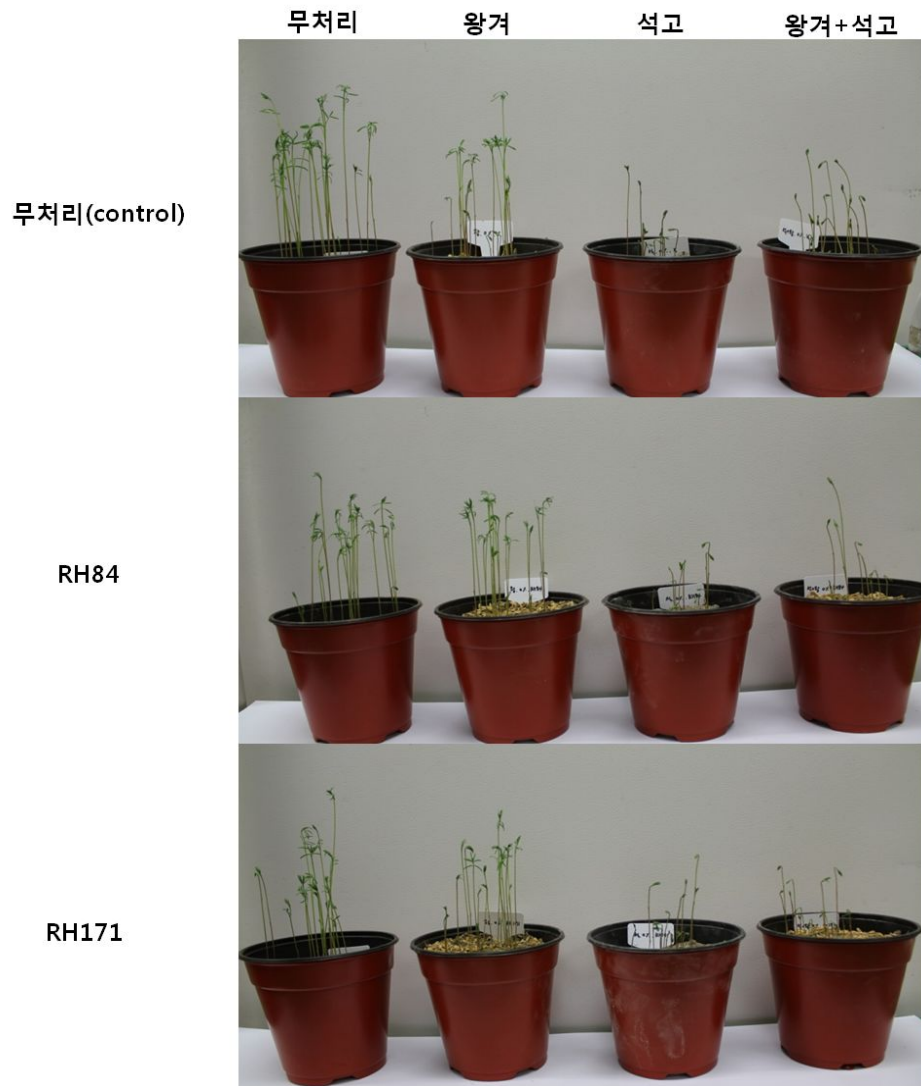


Fig. 17. Pot test of hairy vetch by soil conditional.

소형 pot에서 확인했던 토양개량제 처리에 따른 생육촉진 효과를 재확인하기 위하여 초화 pot (15.5 cm × 50 cm × 12 cm)에서 8주간 생육시킨 후 뿌리, 줄기, 전체의 생체중(fresh weight)을 측정하였다. 초화 pot에 간척지 토양을 4 kg 채운 후 석고 300 kg/10 ar와 왕겨 1500 kg/10 ar을 각각 섞었다. 간척지 토양은 필드에서의 상태를 유지하기 위해 멸균하지 않았다. 표면 살균한 헤어리베치 종자에 선발균주인 RH84와 RH171을 종자 코팅 (1% CMC안에 10^9 cfu/ml 농도의 균주 포함)하여 파종하였다. 균주 처리에 대한 control은 균 무처리구로 1% CMC만으로 종자 코팅 하였고, 토양개량제에 대한 control은 개량제를 첨가하지 않은 간척지 흙으로 하였다. 석고 처리구에서의 생체중 측정 결과(Fig. 18) 뿌리는 RH171 균주 처리 시 가장 생육이 좋았고, 줄기는 RH84 균주 처리 시 가장 생육이 좋았다. 전체 무게는 RH171 균주 처리구에서 가장 높았으며, RH84 처리구 역시 균주 무처리구인 control (Fig. 14 참조) 보다 약 30% 높은 결과가 나왔다.

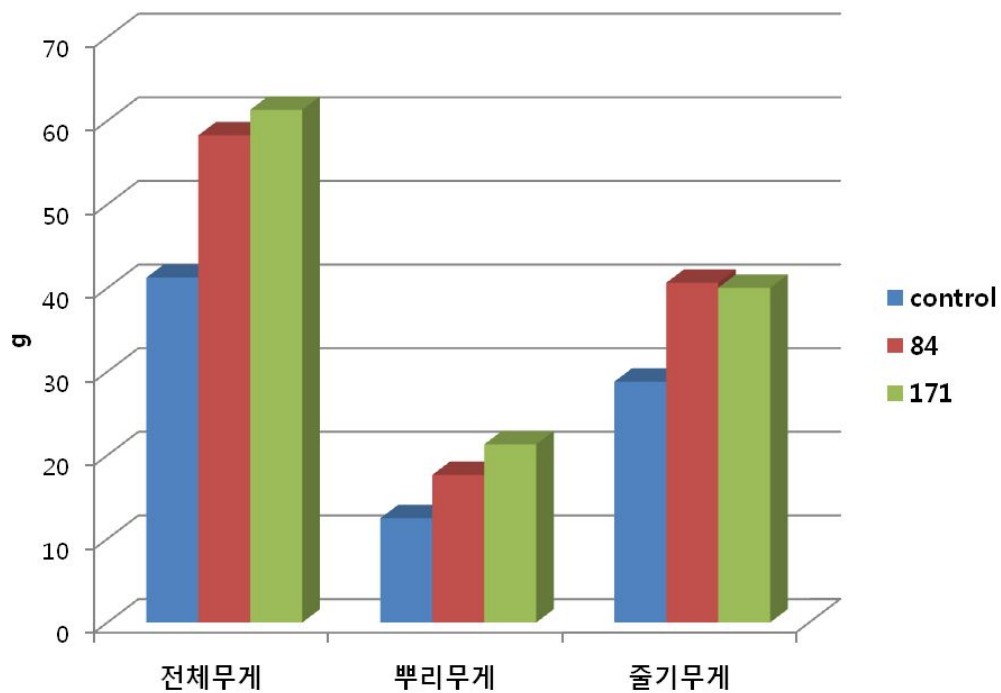


Fig. 18. The fresh weight of hairy vetch by gypsum.

왕겨 처리구에서의 생체중 측정 결과(Fig. 19) 뿌리는 RH84 균주 처리 시 가장 생육이 좋았고, 줄기는 RH171 균주 처리 시 가장 생육이 좋았다. 전체 무게는 RH171 균주 처리구에서 가장 높았으며, RH84 처리구 역시 균주 무처리구인 control 보다 높은 생체중량을 보였다. 그러나 전체적으로 석고 처리구보다 생육 촉진능이 떨어지는 것으로 확인되었다. 이는 소형 pot에서 확인했을 때와는 대조적인 결과로서 헤어리베치 생육 초기 발아 시에는 석고보다 왕겨의 처리가 적절한 것으로 판단되나, 시간이 지나면 왕겨 처리구에서는 잎이 빨리 시드는 경향이 관찰되었다. 또한 석고 처리구에서는 초기 발아는 늦으나 시간이 지날수록 헤어리베치의 성장 정도가 빠르고 줄기의 굵기가 굵어지는 것으로 보아 발아 후 생장에 영향을 미치는 것으로 판단된다 (Fig. 20, 21).

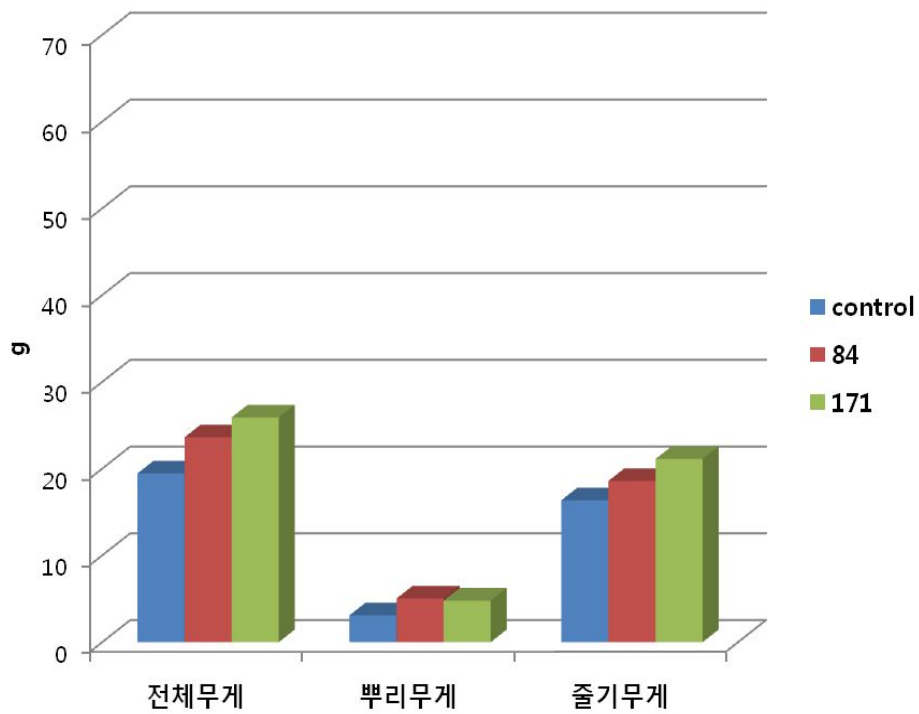


Fig. 19. The fresh weight of hairy vetch by rice hull.

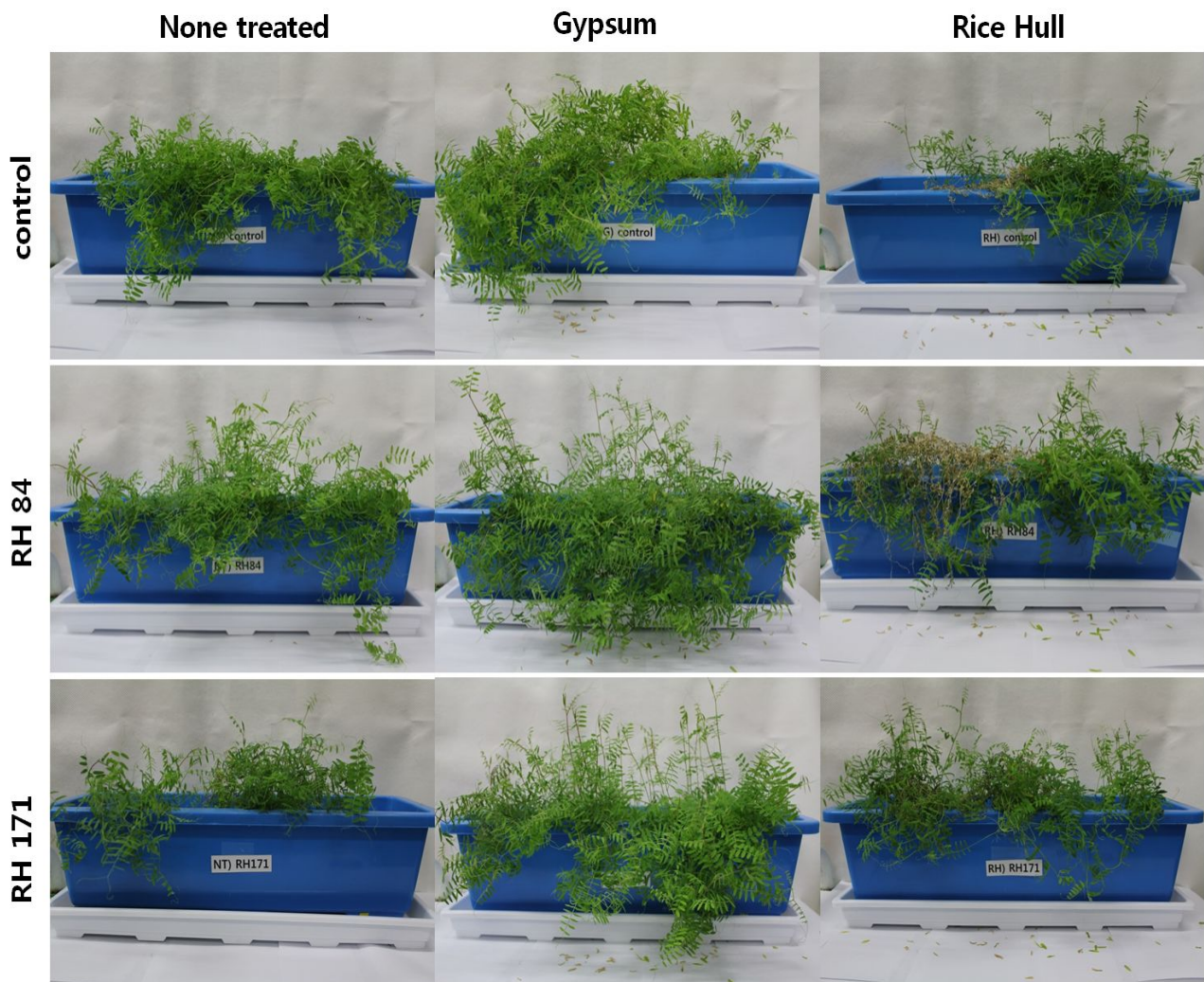


Fig. 20. Growth promoting of hairy vetch by soil conditional.

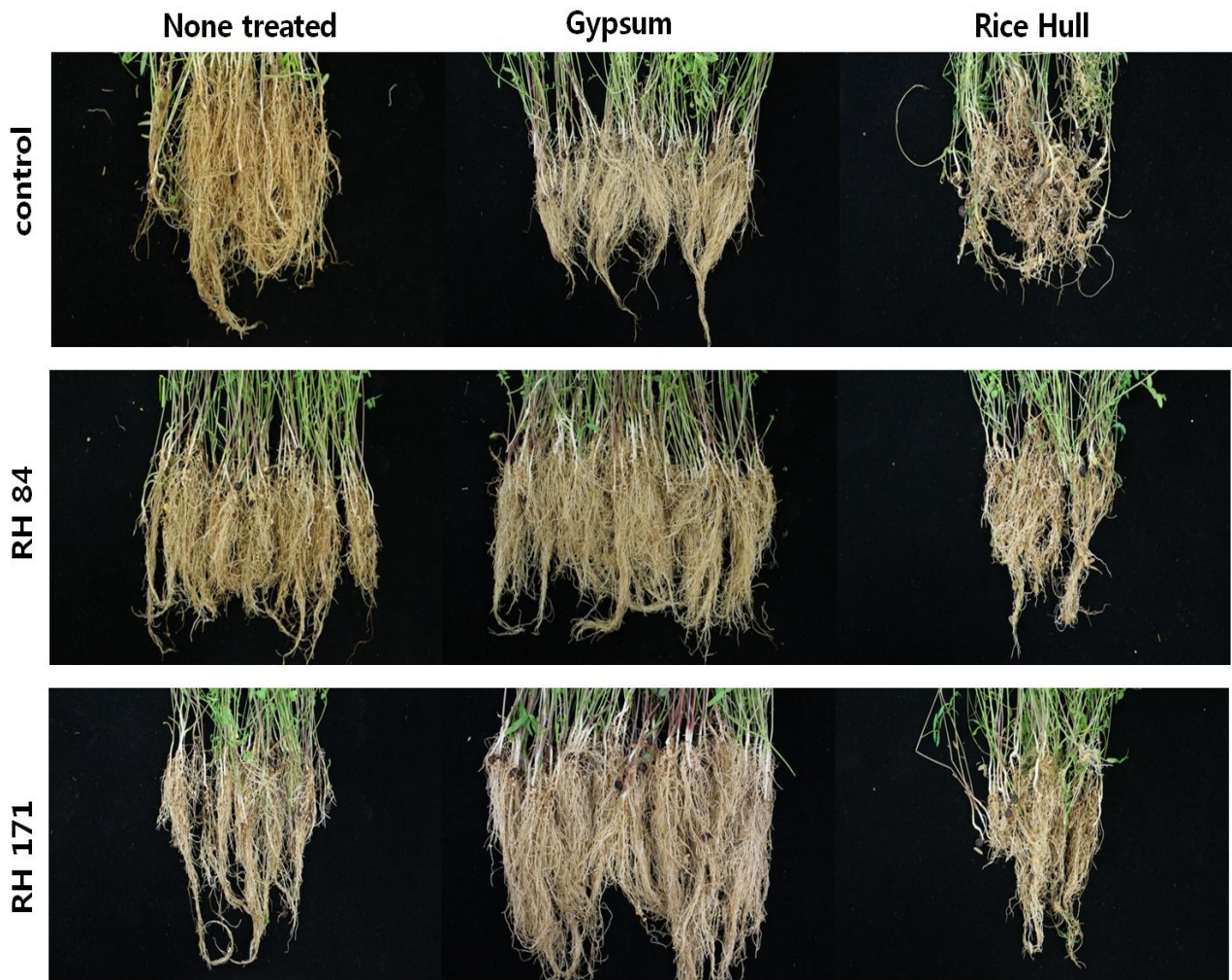


Fig. 21. Root growth promoting of hairy vetch by soil conditional.

(2) 상토 처리에 따른 효과

새만금을 비롯하여 최근 완공되거나 현재 개발 중에 있는 우리나라 간척지는 고상의 비율이 높고 공극률이 낮은 물리적 특성을 보인다. 일반적으로 간척지는 토양구조가 발달되지 않아 투수성과 통기성이 나쁘기 때문에 토양층이 굳어져 용적밀도가 높다. 간척지의 용적밀도는 $1.35 - 1.55 \text{ Mg/m}^3$ 의 범위로 일반농경지의 용적밀도인 $1.20 - 1.35 \text{ Mg/m}^3$ 보다 높은 값을 나타낸다 (강종국 외). 토양의 경도를 낮추고 공극을 증가시키기 위한 방법으로 유기물 함량을 높여 주는 방법이 있으나 자연적 유기물 보충은 단기간에 어렵기 때문에 본 실험에서는 상토를 이용해 유기물을 보충시켜 헤어리베치의 생육 정도를 확인하고자 하였다.

먼저 상토만으로 채운 pot에 NaCl을 농도별로 관주하여 헤어리베치의 발아 정도를 확인하였다. 플라스틱 비닐 pot에 150 g의 상토를 동일하게 채운 뒤 1% CMC안에 10^9 cfu/ml 농도의 RH84를 종자 코팅하여 각 pot 당 10개 씩 3반복으로 파종하였다. NaCl 농도는 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%로 관주하였다. 1주차 실험 결과 0% NaCl 관주 한 pot에서는 87%의 발아율을 보였고, 2주차에서는 90%의 발아율을 보였다. 헤어리베치의 생육 한계점이었던 NaCl 0.2%에서는 1주차 때 83%의 발아율을 보였고, 2주차에는 93%의 발아율을 보였다. 최종적으로 0.5%의 NaCl에서도 1주차 때 50% 였던 발아율이 2주차 때는 70%까지 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 헤어리베치의 생육이 간척지 토양의 물성 변화에 따라 영향이 크다는 것을 보여주는 것이라 사료된다.



Fig. 22. The hairy vetch germination by NaCl concentration.

Table 9. The hairy vetch germination rate by NaCl concentration

발아율 (%)	NaCl 농도 (%)					
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
1주차	87	77	83	83	73	50
2주차	90	77	93	83	87	70

또한, 상토 : 간척지 토양 (w : w)을 달리한 실험에서도 헤어리베치의 생육과 토양의 물성 변화간의 중요성을 확인 할 수 있었다. 상토와 간척지 토양의 비율 10 : 0, 9 : 1, 7 : 3, 5 : 5, 3 : 7, 1 : 9, 0 : 10으로 달리하여 pot를 조성하여 1% CMC안에 10^9 cfu/ml 농도의 RH84를 종자 코팅하여 각 pot 당 10개 씩 3반복으로 파종하였다. 6주 뒤 실험 결과 10 : 0, 9 : 1, 7 : 3, 5 : 5, 3 : 7의 pot에서는 헤어리베치가 정상적으로 성장하였고, 1 : 9 비율의 pot에서는 정상적으로 성장 한 것과 잎의 마름증상이 있는 것이 섞여 있었고, 0 : 10 비율의 pot에서는 전반적으로 잎의 마름증상이 보였다.

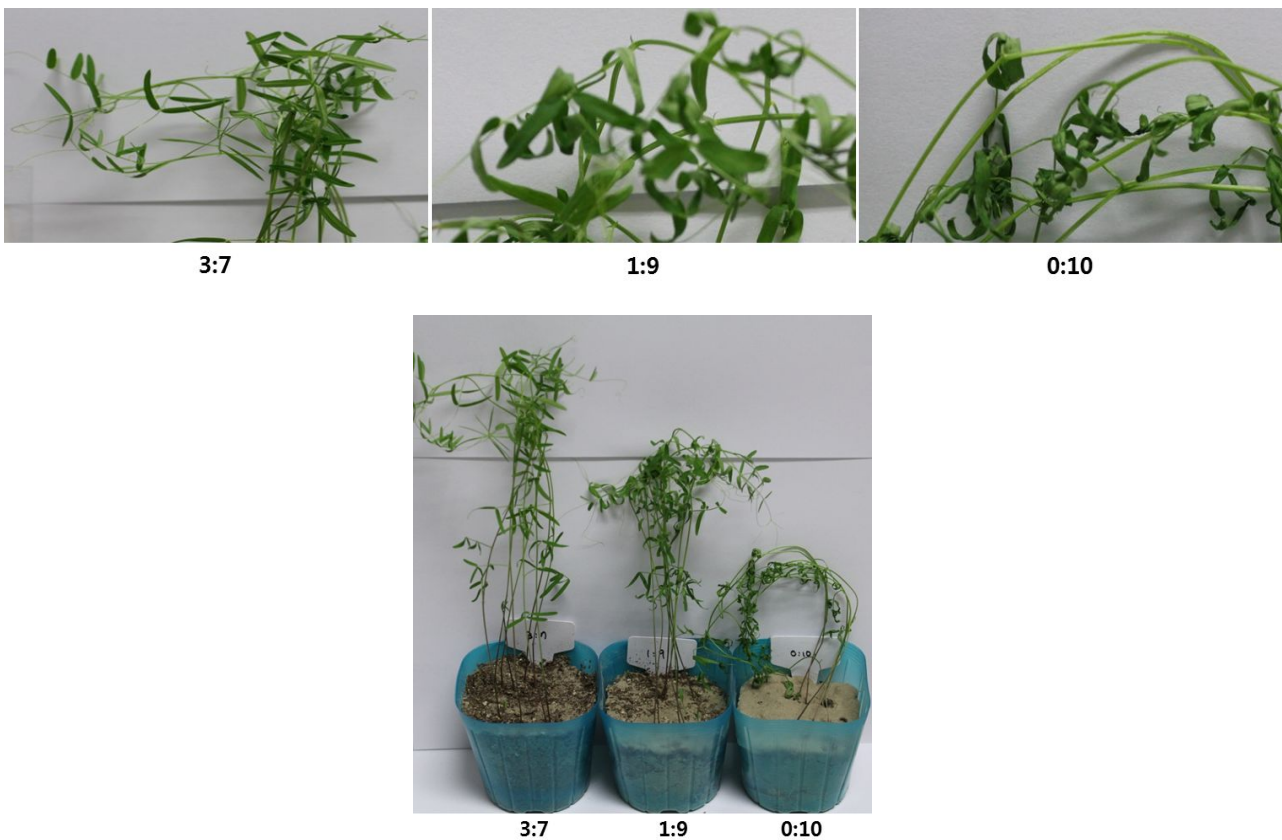


Fig. 23. The growth of hairy vetch by ratio of peat moss : reclaimed land soil (w : w)

간척지 토양 무게는 상토 무게의 약 3.5배이기 때문에 앞의 실험 결과를 바탕으로 상토 : 간척지 토양의 비율을 volume : volume 으로 최적화하였다. 상토와 간척지 토양 비율을 무게로 9 : 1, 7 : 3, 5 : 5, 3 : 7로 달리하여 pot를 조성하여 1% CMC안에 10⁹ cfu/ml 농도의 RH84를 종자 코팅하여 각 pot 당 10개 씩 3반복으로 파종하였다. 6주 뒤 실험 결과 9 : 1, 7 : 3의 pot에서는 헤어리베치가 정상적으로 성장하였고, 5 : 5, 3 : 7의 pot에서는 2주 뒤 발아가 되는 느린 성장을 보였다. 이는 NaCl 0.3%를 관주 한 pot에서도 같은 패턴으로 나타났다.

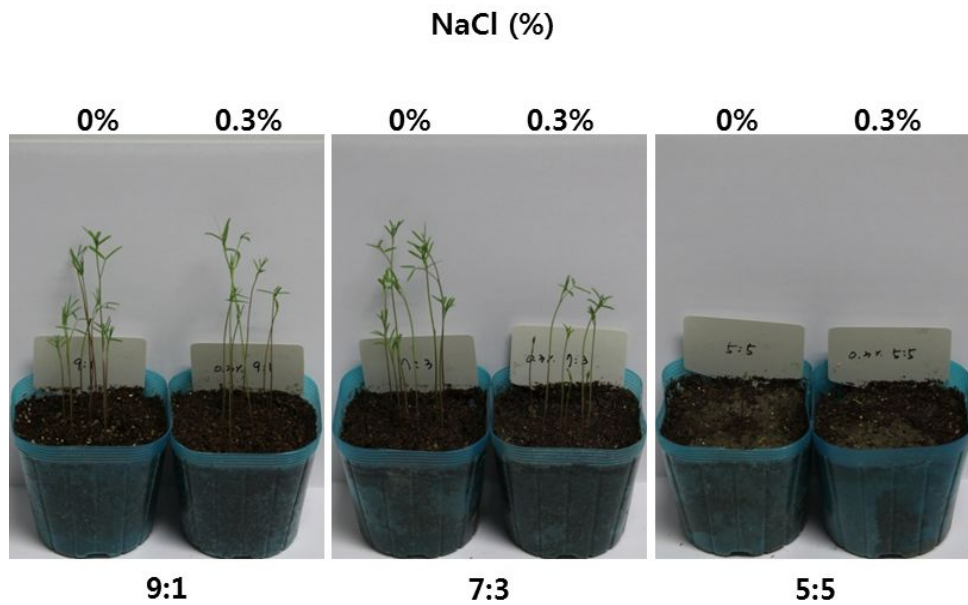


Fig. 24. The germination of hairy vetch by ratio of peat moss : reclaimed land soil (w : w)

Table 10. The germination rate of hairy vetch by ratio of peat moss : reclaimed land soil

NaCl conc. (%)	peat moss : reclaim soil (v : v)				
	9 : 1	7 : 3	5 : 5	3 : 7	1 : 9
0	86.7	93.3	6.7	0	0
0.3	86.7	86.7	3.3	0	0

지금까지의 헤어리베치 생육 테스트는 간척지 토양만을 이용하여 pot를 조성하고 선발 균주의 추가 접종에 의한 생육의 증가를 기대하였다. 그러나 유기물 함량이 낮고, 용적 밀도가 높은 간척지 토양의 특성 때문에 염의 농도가 높아질수록 헤어리베치의 생육에 한계를 가져왔다. 그래서 화학비료의 처리와 토양개량제의 처리에 의한 생육 증가를 기대하였으나 역시 염 농도의 한계는 극복하지 못하였다. 다음의 개선책으로 단기간에 유기물의 함량을 증대시키며 공극률을 증가시키기 위해 상토와 간척지 토양을 비율별로 섞어 pot를 조성한 결과 헤어리베치의 발아율도 높이면서 염에 대한 한계도 극복할 수 있는 결과를 얻었다.

제 5절 배양 최적화

1. pH 조절에 의한 생육 조사

Rhizobium sp.의 배양배지로 YM배지(K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, NaCl 0.1g, yeast extract 0.4g, mannitol 10g/1L, pH6.8)가 주로 이용되고 있다. 선발한 균주들을 대량 배양하기 위하여 YM 배지를 기본배지로 사용하면서, 간단한 배양 조건의 변화로 생장의 증가를 도모하고자 pH 조절에 따른 성장 변화를 살펴보았다. YM 배지의 pH를 pH2 - pH9 까지 조절하여 선발 균주 4종을 접종, 배양 4일째 성장 OD값을 측정하였다. YM 기본 배지의 산도 pH 6.8 보다 pH8로 조정시 균주에 따라 2배에서 3배까지 생장이 증가하였고, pH9가 되면 생장이 저하되었다 (Fig. 25). 따라서 간단히 YM 배지의 pH를 기존 6.8에서 8로 조정함으로써, 2배 이상의 생육증가를 가져올 수 있었다.

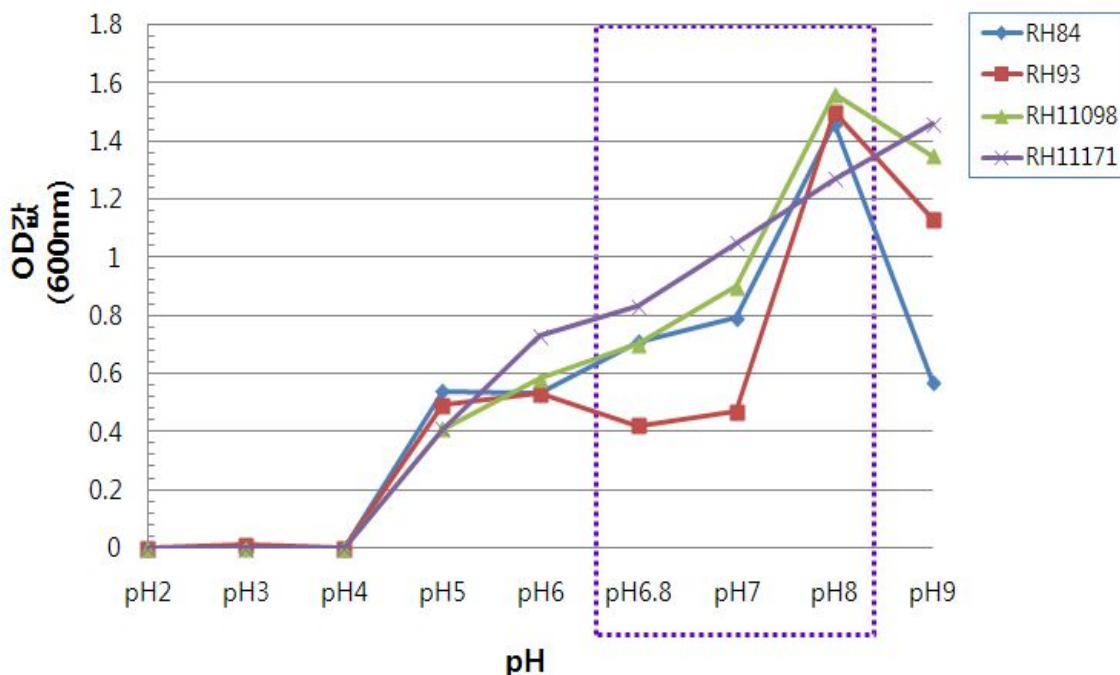


Fig. 25. Characterization of the growth pH each strains.

2. 탄소원에 따른 생육 조사

선발 균주 중 헤어리베치 생육 촉진효과가 우수했던 RH84와 RH171 균주의 배양 최적화를 위해 탄소원을 다르게하여 배양 후 2일째와 4일째의 균수를 측정하였다. YM broth (K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, NaCl 0.1g, yeast extract 0.4g, mannitol 10g/L, pH6.8)를 기본 배지로 하되 주요 탄소원인 mannitol 대신 sorbitol, galactose, manose, glycerol, inositol, glucose, lactose, dextrin, sucrose를 10 g/L로 배지 조성하였으며 28°C, 130 rpm에서 성장시킨 후 colony counting 하였다. 두 선발 균주 모두 기본 배지의 탄소원인 mannitol 배지에서는 4일째에 10^8 cfu/ml 까지 균수가 증가하였으며, galactose를 탄소원으로 이용할 때도 균수가 증가하였다. 또한 공통적으로 manose를 탄소원으로 이용할 때는 2일째 균수가 급격하게 증가하지만 4일까지는 그 수를 유지하지 못하고 급격히 감소하는 것으로 확인되었다(Table 11, 12).

Table 11. Growth changes by carbon source of RH84

탄소원 (가격 비율)	2일째 ($\times 10^6$ cfu/ml)	4일째 균수의 변화
Control (0)	4	유지
Mannitol (1)	5	증가
Sorbitol (0.5)	11	증가
Galactose (2.6)	8	증가
Mannose (46)	250	감소
Glycerol (0.4)	7.4	감소
Innositol (3.5)	42	유지
Glucose (0.3)	4.4	감소
Lactose (0.75)	9	유지
Dextrin (0.5)	12	유지
Sucrose (0.4)	100	감소

유지: $\times 10^6$ cfu/ml, 증가: $\times 10^6$ cfu/ml 이상, 감소: $\times 10^6$ cfu/ml 미만
 가격비율: mannitol을 1로 했을 때 각 탄소원의 가격 비율

Table 12. Growth changes by carbon source of RH171

탄소원 (가격 비율)	2일째 ($\times 10^6$ cfu/ml)	4일째 균수의 변화
Control (0)	5	유지
Mannitol (1)	6.4	증가
Sorbitol (0.5)	11	유지
Galactose (2.6)	10	증가
Mannose (46)	300	감소
Glycerol (0.4)	6	감소
Inositol (3.5)	5.4	유지
Glucose (0.3)	5.2	감소
Lactose (0.75)	18	유지
Dextrin (0.5)	28	유지
Sucrose (0.4)	83	감소

유지: $\times 10^6$ cfu/ml, 증가: $\times 10^6$ cfu/ml 이상, 감소: $\times 10^6$ cfu/ml 미만
 가격비율: mannitol을 1로 했을 때 각 탄소원의 가격 비율

3. 식품 유래의 배지 조성에 따른 생육 조사

앞의 탄소원에 따른 생육 조사 시 결과 균의 수를 10^8 cfu/ml로 증가시키기 위한 탄소원은 RH84의 경우 sorbitol 혹은 galactose이며, RH171은 galactose로 확인되었다. 그러나 galactose의 경우 mannitol의 2.6배가 되는 가격이며, 단기간에 균수를 증가시키는 mannose는 mannitol의 46배가 되는 가격으로 향후 대량 배양을 할 때 경제적 측면에서 적합하지 못하다고 사료되었다. 그러므로 본 실험에서는 경제적 측면 뿐만 아니라, 실제 농가에 보급 시 배양이 용이하게 하기 위해 상업적 탄소원 대신 식품으로 대체하여 선발 균주의 배양 가능 여부를 확인하고자 하였다. 실험에 이용한 식품은 건포도, 알로에, 양배추 등 10가지로 mannose의 함량이 높은 식품으로 알려져 있으며 모두 일반 마트에서 구매하였다. 10가지 식품에 대한 g 당 탄수화물, 단백질, 식이섬유의 양은 농촌진흥청 농식품종합정보시스템 국가표준식품성분표를 참조, Table 13에 정리하였다.

Table 13. Food ingredient fact

식품명	성분 (g)		
	탄수화물	단백질	식이섬유
건포도	0.74	0.03	0.036
알로에	-	-	-
양배추	0.05	0.006	0.022
무	0.04	0.008	0.012
가지	0.05	0.009	0.019
토마토	0.03	0.009	0.013
콩	0.01	0.052	-
팽이버섯	0.06	0.027	-
다시마	0.04	0.01	-
곤약	0.03	0.002	-

출처: 농촌진흥청 농식품종합정보시스템 국가표준식품성분표

앞의 탄소원에 따른 생육 조사 실험과 마찬가지로 YM broth를 기본 배지로 하였고, mannitol 대신 10가지 식품을 믹서기로 갈거나 막자 사발로 으깨어 10 g/L로 배지 조성하였으며 28°C, 130 rpm에서 성장시킨 후 4일째에 colony counting 하였다. 실험 결과 RH84와 RH171 모두 전반적으로 생육 정도가 높았으나 특히 콩을 넣어 준 배지에서 가장 우수한 성장을 보였다 (Fig. 26).

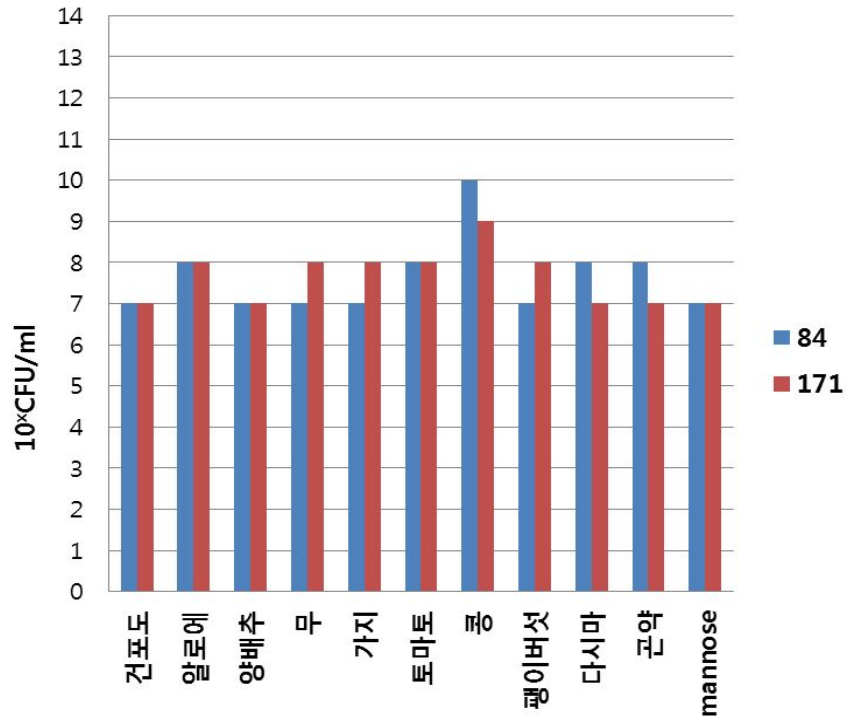


Fig. 26. The growth of food medium of RH84 and RH171.

콩의 농도에 따른 선밭 균주의 성장을 확인하기 위해 콩을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%가 되게 배지를 조성한 후 7일간 colony counting 하였다. 2일째부터 성장이 급격히 증가하여 3 - 4 일째에 가장 높았으며, 5일째 부터는 줄어드는 추세였다. 특히 2%의 콩을 넣어 준 배지에서는 6일째까지 높은 수준의 성장을 유지하였다(Fig. 27).

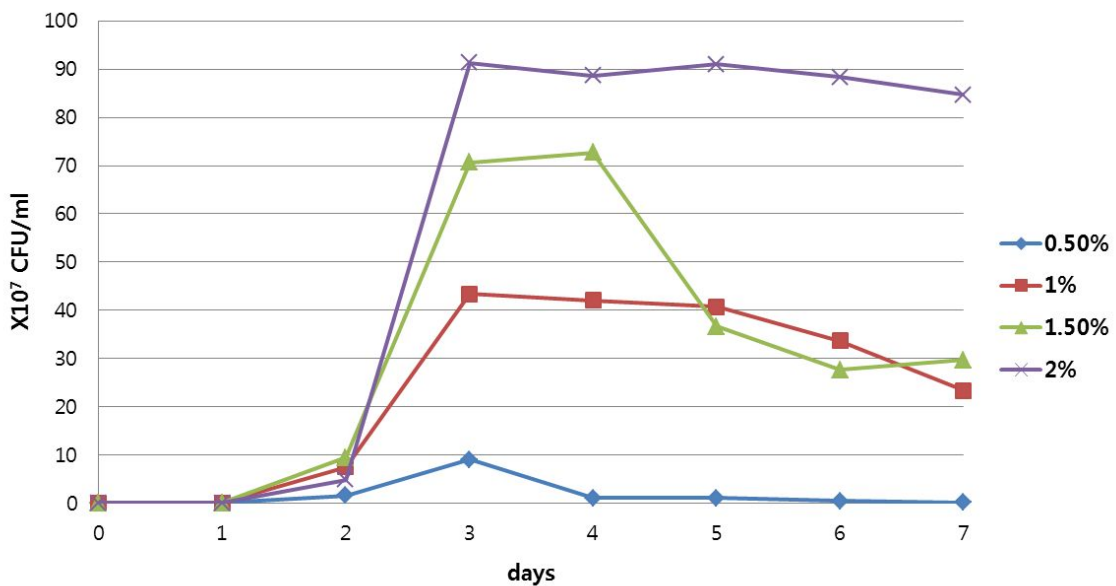


Fig. 27. Growth curve of RH84 by soy bean concentration.

4. 소규모 발효조 배양

선발 균주인 RH84를 앞에서 최적화 된 2% 콩을 이용하여 Table 14와 같은 배지 조성으로 5 L 배양을 하였다. 1 L flask에 YM broth를 사용하여 200 ml seed 배양을 하였으며 24시간 뒤 본배양 접종을 하였다. 5 L 발효조에 3 L working volume으로 seed 배양액 1% 접종, 28°C에서 150 rpm으로 7일간 배양하였다. 접종 2일째 점차 균수가 증가하여 3일에서 7일까지 10^8 cfu/ml의 수준을 유지하였다. *Rhizobium* sp. 의 배양 특성상 폴리머를 형성함에도 불구하고 배양 기간 동안 form의 형성에 의한 번거로움은 없었으며, 생콩을 배지로 이용하면서 선발 균수의 증가 및 유지의 의미는 산업적인 측면에서 중요한 의미를 갖는다.

Table 14. Medium composition of permentation

콩 (대두)	2%
Yeast extract	0.04%
NaCl	0.01%
K_2HPO_4	0.05%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02%

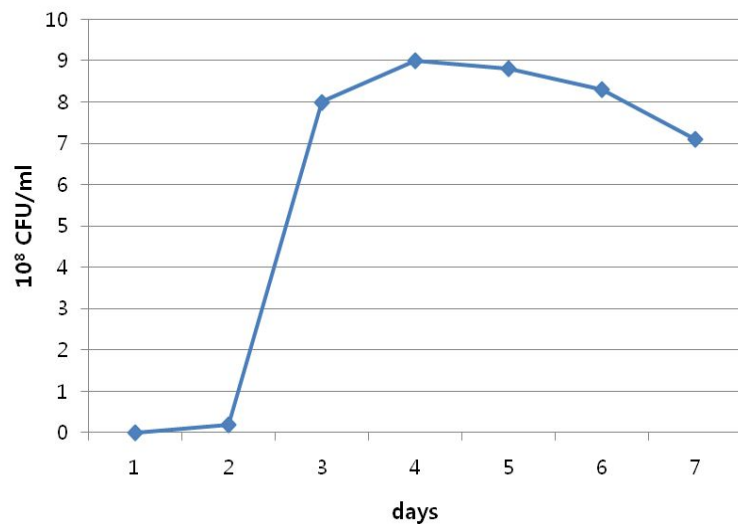


Fig. 28. 5 L permentaion of RH84

제 6절 제제화 및 종자 코팅 기술 개발

1. 헤어리베치 종자에 대한 제제 기술 개발

가. 전착제 선발 및 처리 농도의 설정

종자 pelleting은 접착물질을 종자 표면에 처리 후 피복물질을 종자 표면에 결합시키는 것으로 피복물질들은 수분이 투입되면 어느 정도 결합능력이 있지만, 운송 과정이나 농가에서 실제 파종 시 충격에 의한 파손의 우려가 많아 종자와 피복물질의 결합력을 강화시켜야 한다. 따라서 수분 외에 보조 접착물질이 필요하며, 접착물질은 일정 농도에서 종자발아를 감소시키지 않으면서 종자모양 형성에 수월해야 하고, 알려진 종자 전착제로는 methyl cellulose, carboxymethyl cellulose, gum, starch, polyvinyl alcohol, cyclo dextrin 등이 있다. 특히 종자 pelleting시 접착물질과 피복물질의 결합력에 관한 선행연구들에서 methyl cellulose, gum류의 효과가 우수했다는 보고 많았으며, *Rhizobium* sp.에서 1% CMC의 효과가 보고 되어있다. 따라서 carboxymethyl cellulose(CMC)와 arabic gum(AG) 두 종류의 전착제를 헤어리베치 종자코팅 전착제로 선정하였고, 이들의 처리 농도별 헤어리베치 발아율을 조사하여 최적 전착제 및 적정 처리 농도를 설정하고자 하였다. 경실종자를 제외한 건전한 헤어리베치 종자를 0.5 - 2.5% AG와 CMC 전착제에 30분간 침지한 후 음건하여 멸균수를 처리한 filter paper위에 종자를 치상, 28°C 항온기에서 4일간 발아율을 조사하였으며, 종자는 처리당 3반복씩 반복당 20립씩 사용하였다. AG는 1 - 2% 범위에서 CMC는 0.5 - 1% 범위에서 무처리 이상의 발아율을 보여주어 두 전착제 모두 헤어리베치에 적정 전착제로 사용 가능하였으며 이중 무처리 이상의 발아율을 보인 처리 중 가장 우수한 발아율을 보인 AG 1%(55% 발아율)와 CMC 1%(55% 발아율)를 각 전착제의 적정 처리 농도로 설정하였다(Table 15).

Table 15. Germination of seed by spreader concentration

발아율(%)										
Aarabic gum(%)					CMC(%)					무처리
0.5	1	1.5	2	2.5	0.5	1	1.5	2	2.5	
48.3	55.0	50.0	50.0	46.7	53.3	55.0	45.0	43.3	43.3	50.0

나. 피복제 선발

기 선발한 1% AG과 1% CMC 전착제를 처리한 헤어리베치 종자와 부착력이 좋은 피복제를 선발하기 위하여 잘 알려진 5개의 피복제 bentonite, calcium carbonate, kaoline, perlite, pyrophyllite를 선정하여 종자 부착력을 조사하였다. 종자무게의 2 ~ 4% 전착제 처리시 전착효과가 좋다는 보고가 있어, 헤어리베치 종자 5g과 4% volume 전착제를 각각 잘 혼합하고 종자무게와 동량의 피복제를 첨가하여 잘 섞고 도포 형태를 관찰하였다. 전착제를 처리하지 않은 무처리의 경우 kaoline과 pyrophyllite를 제외하고는 피복제가 도포되지 않았으며 두 피복제의 피복 효과도 적었다. 전착제별로는 같은 도포 경향을 보였으며(Table 16), perlite를 제외한 피복제들의 피복 효과는 좋았으며 이중 kaoline과 pyrophyllite 처리에서 가장 우수한 피복효과를 보여주었다(Fig. 29).

Table 16. Seed adhesion of spreader and cover

전착제	피복제				
	Bentonite	Calcium carbonate	Kaoline	Perlite	Pyrophyllite
1% arabic gum	+++	+++	++++	+	++++
1% CMC	+++	+++	++++	+	++++
멸균수	+++	+++	++++	+	++++
무처리	-	-	++	-	+++

++++; very good, +++; good, ++; middle, -; not, +;poor

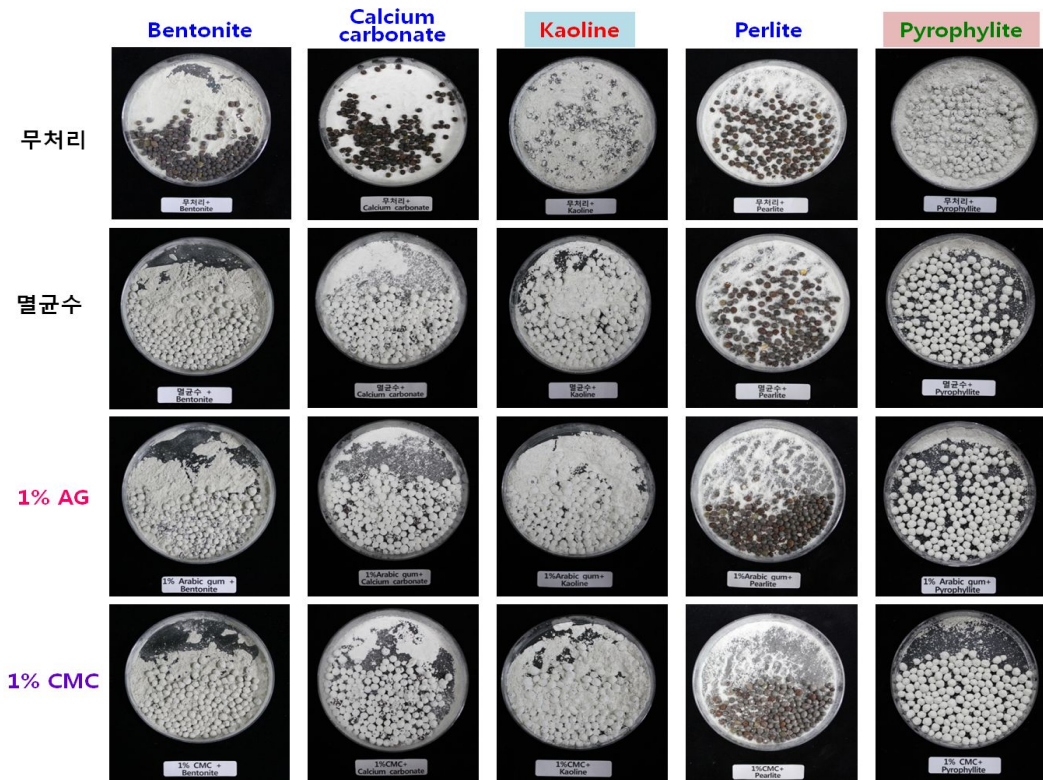


Fig. 29. Seed adhesion of spreader and cover.

경실종자를 배제한 건전한 헤어리베치 종자에 멸균수를 전착제로, 도포 효과가 우수했던 4종 피복제 bentonite, calcium carbonate, kaoline, pyrophyllite를 종자 무게와 동량으로 각각 피복하고 멸균수 첨가 filter paper위에 종자를 치상하여 28℃ 항온기에서 4일간 발아율을 조사하였다. 처리당 3반복씩, 반복당 20립씩 사용하였다. bentonite와 calcium carbonate의 발아율은 31.7%로 무처리 발아율 50%에 비해 현저한 발아율 저하를 가져왔으며, pyrophyllite는 46.7%로 약간 저하되었고, kaoline은 51.7%로 가장 우수한 종자발아율을 보여주었다(Table 17). 따라서 도포력과 발아력에서 우수했던 kaoline과 pyrophyllite를 헤어리베치 종자 코팅용 피복제로 선발하였다.

Table 17. Germination rate by spreader

Germination rate(%)				
Bentonite	Calcium carbonate	Kaoline	Pyrophyllite	무처리
31.7	31.7	51.7	46.7	50.0

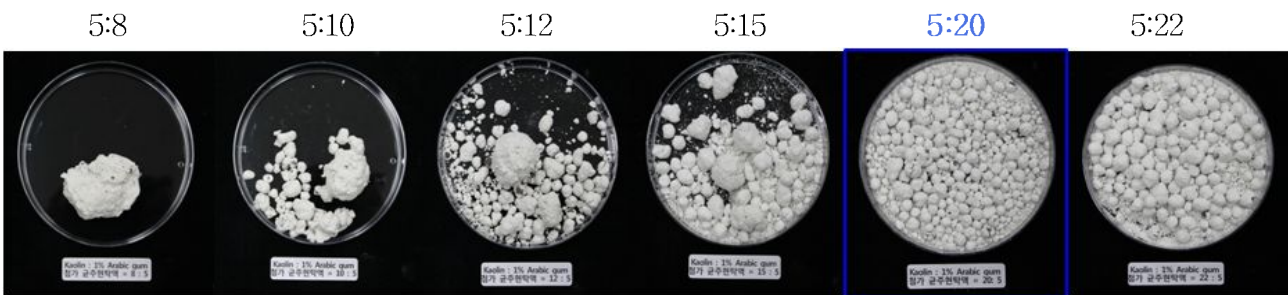
다. 전착제와 피복제 혼합 비율 설정

종자 코팅은 전착제와 피복제의 적정 혼합비율이 중요하다. 균을 포함한 전착제양이 많고 피복제 양이 적을시 피복제가 묻쳐 종자에 고루 도포되지 않으며, 반대로 필요 이상의 많은 피복제의 사용은 종자코팅 비용의 상승을 가져오게 된다. 따라서 선발 전착제 1% AG와 1% CMC를 종자에 처리한 후 선발 피복제 kaoline과 pyrophyllite를 피복시, 전착제별 피복제의 적정 혼합 처리 비율을 측정하고자 하였다. 최종농도 1% 전착제 포함 균주현탁액 5 ml(2% arabic gum or 2% CMC : 균 현탁액 2×10^8 cfu/ml = 1 : 1)과 헤어리베치 종자 5 g(약 125개)을 잘 섞은 후 kaoline 피복제는 8 - 22g 범위로, pyrophyllite는 12 - 22g 범위로 각각 혼합하여 피복 양상을 확인 하였다. 전체적으로 전착제에 따라 피복제의 흡수량이 달라졌으며, 1% AG 보다 1% CMC 전착제 처리시 피복제의 사용량이 줄어드는 경향을 보여주었다. 1% AG 처리는 kaoline 과 pyrophyllite 20 g 처리시 적절히 피복되는 반면 1% CMC 처리는 20 g 처리시 피복제가 과다하여 잔여분이 남게 되고 오히려 15 g 처리가 적정하였다(Fig. 30). 따라서 전착제와 피복제의 적정 혼합 처리 비율은 1% Arabic gum : kaoline or pyrophyllite = 1 : 4로 1% CMC : kaoline or pyrophyllite = 1 : 3으로 나타났다(Table 18).

Table 18. The ratio of spreader and cover

전착제 포함 균주현탁액(10 ⁸ cfu/ml) 5ml + 종자 5g	피복제 (g)									
	Kaoline						Pyrophyllite			
	8	10	12	15	20	22	12	15	20	22
1% AG	아주 무름	무름	무름	약간 무름	적당	과다	-	-	적당	과다
1% CMC	무름	약간 무름	적당	적당	과다	-	적당	적당	-	-

1% AG (1% AG 첨가 균주현탁액:Kaoline 혼합 비율)



1% CMC (1% CMC 첨가 균주현탁액:Kaoline 혼합 비율)

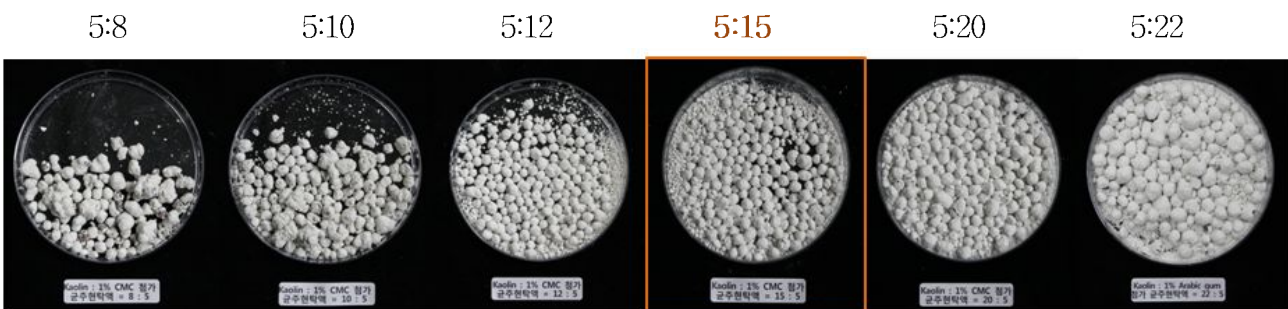


Fig. 30. The optimum blending ratio of kaoline by spreader

라. 종자코팅 접종제 기술개발

전착제별로 피복제 kaoline과 적정 혼합 비율에 따라 종자코팅제를 조제하여, 이들의 실제 균코팅 효과를 검정하고 최종 종자코팅 접종법을 개발하고자 하였다. 최종농도 1% 전착제 포함 균주현탁액 5 ml(2% AG or 2% CMC : RH84 균주현탁액 2×10^8 cfu/ml = 1 : 1)과 헤어리베치 종자 5 g을 잘 혼합한 후 1% AG 처리 종자는 kaoline 20 g을, 1% CMC 처리 종자는 15 g kaoline을 골고루 혼합하여 종자코팅제를 조제하였다. 또한 전착제포함 균주현탁액만 처리한, 피복제 무처리구도 함께 조사하였다. 조제한 종자코팅제들로부터 종자 20립씩을 무작위 선별하여 멸균수 100 ml을 혼합하고 40분간 진탕배양한 후 희석액을 streptomycin 10 ppm을 첨가한 YMA 배지(RH84 균주 선별 항생제)에 도말, 30°C 항온기에서 4일간 배양하여 종자당 균수를 측정하였다. 전착제 처리 후 Kaoline으로 피복한 처리구와 피복 처리하지 않은 무처리 비교시, 전착제 처리시 1% AG는 1.72배, 1% CMC는 1.7배 접종균 밀도가 높게 검출되었다. 또한 kaoline 피복 처리구내에서는 1% CMC 전착제 처리구가 1% AG 전착제보다 1.26배 높은 접종균수가 검출되어(Table 19), 피복제가 적게 사용되면서도 전착 효과가 더 우수한 1% CMC를 헤어리베치 전착제로 선별하였다. 종합하여, 1% CMC를 포함한 균주현탁액에 균주현탁액과 같은 부피의 종자를 침지한 후 피복제로 균주현탁액 3배 부피의 kaoline을 피복하는 방법을 헤어리베치 우수 근류균 종자코팅 접종법으로 개발하였다(Fig. 31).

Table 19. Inoculum density of spreader and cover

전착제 포함 균주현탁액(10^8 cfu/ml) 5 ml + 종자 5 g	접종 후 회수 균밀도(cfu/seed)	
	피복제 무처리	Kaoline
1% AG	2×10^5	3.4×10^5
1% CMC	2.5×10^5	4.3×10^5
멸균수	6×10^4	1.5×10^5

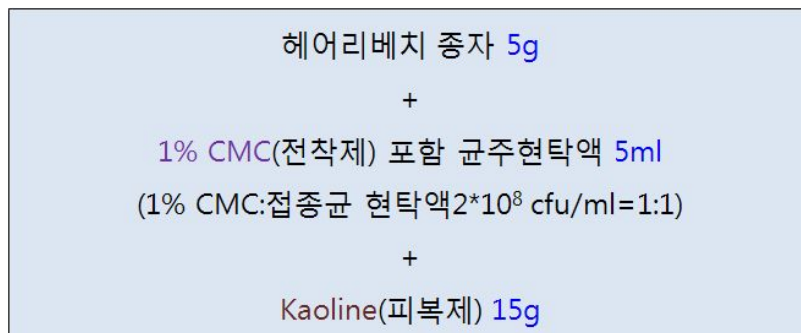


Fig. 31. Seed coating method of hairy vetch seed.

2. 선발균주 제제 기술 개발

가. 선발균주 제제의 피복제 선발 및 안정성

앞의 ‘1. 헤어리베치 종자 제제 기술 개발’에 대한 내용은 헤어리베치 종자의 제제화에 대한 기초를 제공하기 위해 수행되었다면, 지금부터의 내용은 본 연구에서 분리 한 RH84균주를 이용한 제제화에 대한 내용이다. 헤어리베치 종자는 1% CMC를 전착제로, kaolin을 피복제로 제제화하였을 때 종자발아를 감소시키지 않으면서 종자모양 형성에 수월하였으나, 실제적으로 RH84 균주와 제제(피복제)와의 친화성을 검토하기 위해 안정성 실험을 하였다.

RH84를 YMB 배지에 3일간 배양 후 배양 상등액은 제거하고 균체만 회수하였다. 1×10^7 cfu/ml 농도의 균 현탁액 8 ml을 20 g의 bentonite, kaolin, pyrophyllite, perlite와 섞은 후 상온에 보관하며 일주일간 RH84의 안정성을 평판 도말법으로 확인하였다. 그 결과 bentonite, kaolin, pyrophyllite와 RH84를 섞은 경우 균체의 안정성 정도가 눈에 띄게 감소하는 것을 확인하였고, perlite와 RH84를 섞은 경우에는 안정한 것으로 확인하였다.

또한 perlite를 제제로 하여 보관 온도별, 시간별 안정성을 확인하기 위하여 위와 같은 방법으로 1×10^7 cfu/ml 농도의 균 현탁액 8 ml을 20 g의 perlite와 섞은 후 4°C, 실온(22 - 23°C), 28°C에서 6개월간 보관하여 평판 도말법으로 RH84의 안정성을 보았다. 그 결과 perlite를 제제로 한 RH84는 6개월 간 여러 조건의 온도에서 안정한 것으로 확인되었다(Fig. 32).

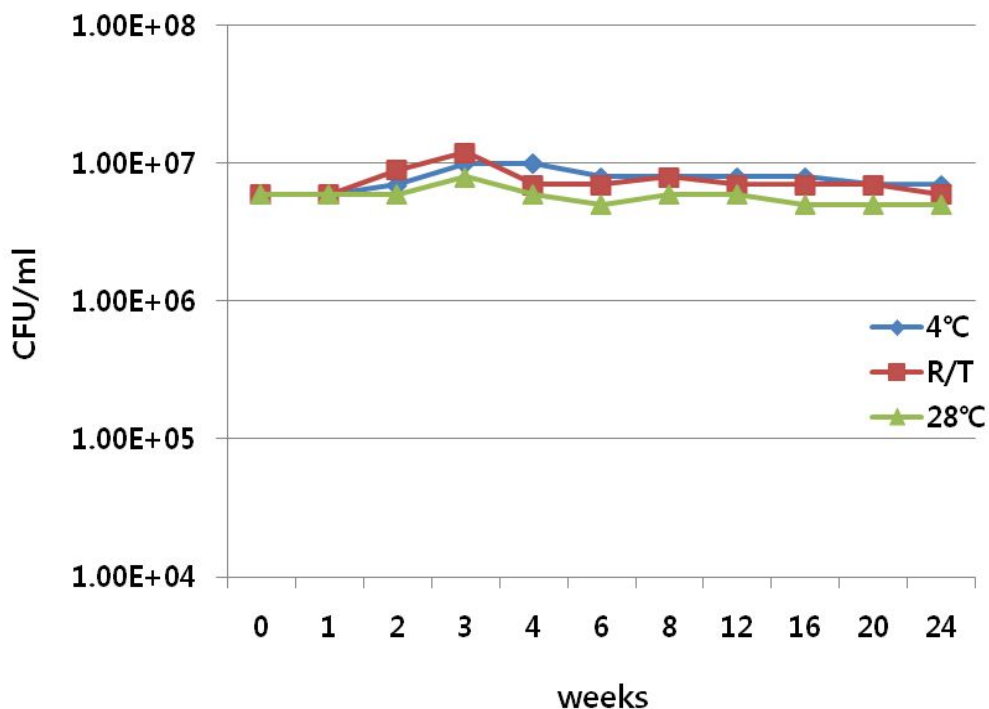


Fig. 32. Storage temperature and stability of the formulation

나. 선발균주 제제에 의한 생육 촉진능 검증

헤어리베치 종자를 파종 시 기온, 수분, 토양의 특성 등 여러 가지 요인이 발아력에 영향을 미치지만 특히 간척지에 파종 시 염분이나 토양의 물성 등에 의해 헤어리베치의 종자가 발아 전 썩거나 염해를 받아 발아력이 떨어지게 된다. 선발 균주로 만든 제제에 코팅 된 종자의 발아력을 확인하기 위해 간척지 토양에 제제가 코팅 된 헤어리베치 종자를 심어 발아력의 차이를 보고자 하였다. 전착제는 2% CMC를 사용하였고, 피복제는 선발 균주인 RH84의 균주 현탁액 10^8 cfu/ml을 perlite와 섞어 조제하였다. 표면 살균 된 헤어리베치 종자를 전착제로 1차 코팅 후, 피복제로 2차 코팅하였다. Control은 perlite에 균체를 섞지 않은 피복제로 코팅하였고, 간척지 토양으로 채운 pot에 코팅 된 종자를 10개씩 3반복으로 파종하였다. 3주 후 관찰 결과 control 구에서는 30%의 발아력을 보였고, 이와 대조적으로 RH84로 만든 제제로 코팅 된 처리 구에서 약 70% 이상의 발아력을 보였다(Fig. 33).

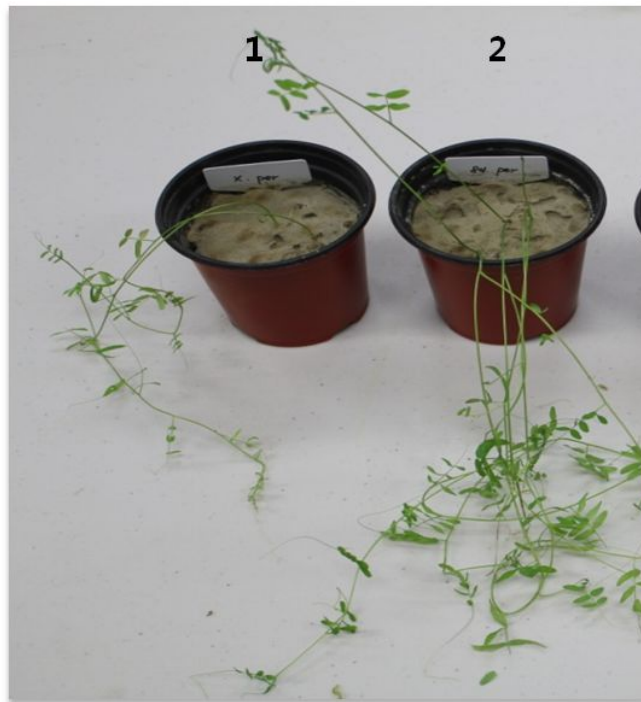


Fig. 33. Pot test of formulation.
1; control. perlite only, 2; treatment. perlite + RH84

제 7절 *Rhizobium* sp. RH84와 ACC deaminase 활성 균주의 복합 이용

식물체가 환경으로부터 스트레스를 받게 되면 공통적으로 식물체의 에틸렌 생합성이 증가하게 된다. 환경에 의한 스트레스는 가뭄, 홍수, 병원체의 침범 등이 있으며 염해도 식물체에게 스트레스의 요인이 된다(Glenn, E. P. *et al*, Niu, X. *et al*, Yeo, A. R.). 식물체내에서 에틸렌의 생합성은 methionine이 SAM synthase에 의해서 S-adenosymethionine (SAM)로 변환되고, 변환된 SAM이 ACC synthase에 의해 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate)로 변환되며 최종적으로 ACC oxidase에 의해 에틸렌을 생성한다. 이렇게 생성된 에틸렌은 적은 양일 경우 뿌리의 신장을 촉진시키지만 많은 양일 경우에는 반대로 뿌리의 신장을 억제시킨다. ACC deaminase는 스트레스로 인해 생성된 ACC를 가수분해 시켜 식물 성장에 긍정적인 영향을 미치게 한다. 이러한 이론을 바탕으로 본 연구에서는 *Rhizobium* 선발 균주와 복합으로 이용 가능한 ACC deaminase 균주를 선발하고 제제화하여 염 환경에 따른 복합 균주 처리의 효과를 검증하고자 하였다.

1. ACC deaminase 활성 균주의 선발

본 연구에서 사용한 ACC deaminase 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에 확보되어 있는 2003년부터 2008년 토양 500여 점과 대전지역의 밭, 논 등의 경작지 토양과 산림 토양 등 250여 점에서 스크리닝 한 균주이다. 또한 충북 청원군에서 서식하는 억새의 뿌리로부터 분리한 30여 점의 세균 중 ACC deaminase 활성이 있으며 식물의 생육을 촉진하는 균주도 포함하였다. 총 780여점의 세균 중 ACC deaminase 활성 값이 높은 균주를 임의로 5균주 선발하였고, Table 20과 같다.

Table 20. Identification of selected from ACC deaminase high activity strains

Strain No.	Origin	16S rRNA sequence	Similarity (%)
BN084004	soil	<i>Pseudomonas vancouverensis</i> 17555T	99
BN084045	soil	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	96
BN084089	soil	<i>Pseudomonas</i> sp. P7014	97
BN084502	soil	<i>Enterobacter hormaechei</i> EN-562T	99
BE506	<i>Miscanthus</i> root	<i>Bacillus thuringiensis</i> 104XG46	99

2. 제제화

선발 균주와 ACC deaminase 균주가 동시에 효율적으로 종자에 영향을 주기 위해서는 종자에 코팅하는 방법이 가장 우수할 것이라 판단되었다. 그래서 앞의 종자코팅 접종제 기술개발의 내용을 바탕으로 1차와 2차에 나누어 헤어리베치 종자를 코팅하였다. 먼저 1차로 2% CMC 전착제에 동량의 선발 균주(2×10^9 cfu/ml)를 섞어 최종 적으로 1% CMC 안에 선발 균주가 1×10^9 cfu/ml이 되도록 한 후 헤어리베치 종자에 코팅하였다. 2차로는 1일간 LB broth에 배양한 ACC deaminase 활성 균주의 균체를 원심 분리하여 상등액은 제거 후 균체만 모아 증류수에 현탁 후 perlite와 섞었다. 1차에서 전착제에 의해 끈적하게 코팅 된 헤어리베치 종자를 2차에서 제조 한 피복제에 다시 코팅하여 최종적으로 2번에 걸쳐 균주에 코팅 된 헤어리베치 종자 제제를 만들었다(Fig. 34). 이렇게 만들어진 종자 제제는 약 12 - 24시간 안에 정상적으로 발아 되는것을 확인하였다(Fig. 35).

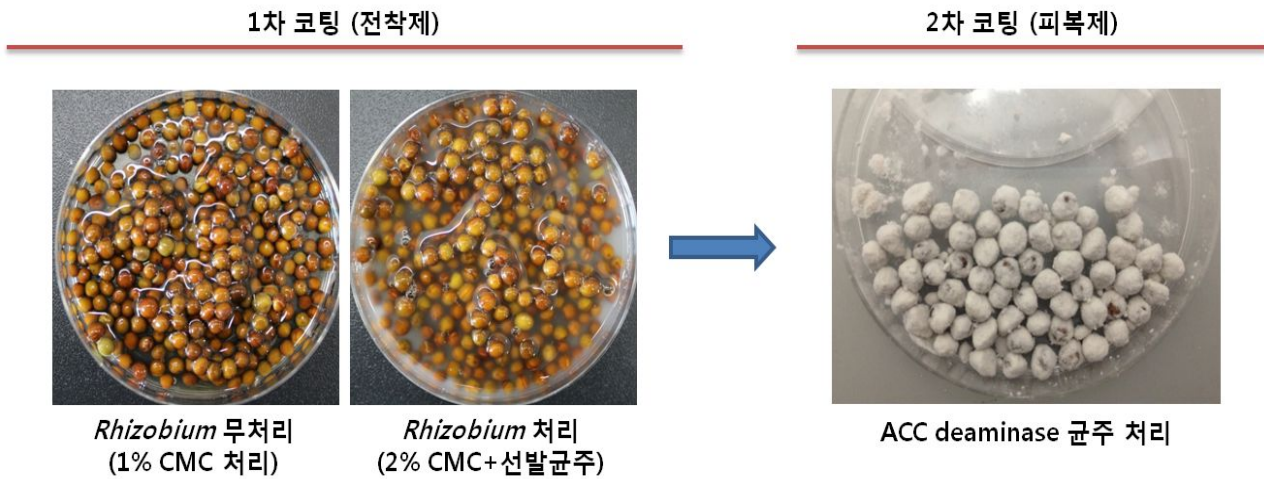


Fig. 34. Mix strains coating process



Fig. 35. Normal germination seed after seed coating

3. 염 환경에 따른 복합 균주 처리의 효과

복합 균주로 코팅 된 헤어리베치 종자의 생육 정도를 확인하기 위하여 pot test를 수행하였다. 플라스틱 비닐 pot 내에 상토 : 간척지 토양을 7 : 3 (v : v)으로 맞추어 채운 후 염 환경은 NaCl 0%, 0.5%로 맞추었다. 1차 전착제는 무처리(증류수)와 RH84로 코팅 된 처리구로 나누었 으며, 2차 피복제는 ACC deaminase BN084004 균주의 무처리구와 배양액 관주 처리구, perlite 에 섞어 제제로 만든 구로 나누어서 실험하였다. 각 실험은 pot 당 10립씩 파종, 3반복 하였고 1주차와 2주차에 각 pot 당 발아율을 계산하였다. 실험 결과 Table 21에서 처럼 pot 내의 염 농도가 0% 보다 0.5%일때 발아율이 낮으며, 헤어리베치의 생육도 낮았다. 1주차에는 NaCl 0.5% pot 에서의 발아율이 3 - 23%로 낮았으나, 2주차에는 발아율이 40 - 77%까지 증가하였 다. 또한 ACC deaminase 활성 균주는 배양액 관주처리 보다 perlite 제제로 만든 처리구에서 발아율이 높음을 알 수 있다. 마지막으로 ACC deaminase 활성 균주의 처리는 염 농도가 낮을 때보다 높을 때 효율적이라는 것을 확인하였고, 향후 염 농도가 불균형하거나 높은 간척지에서 헤어리베치의 발아율을 증대 시킬 것을 기대할 수 있다.

Table 21. Germination rate of mixed strains under salt concentrations

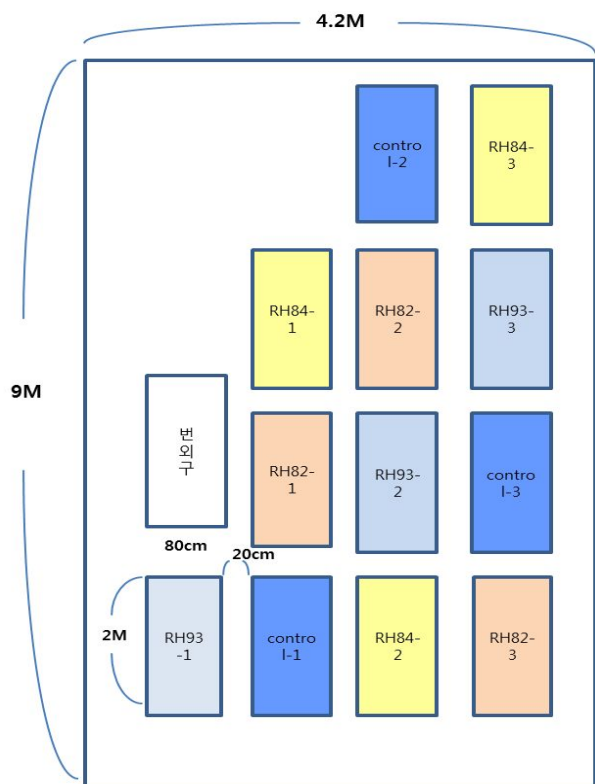
1차 코팅	2차 코팅	1주차 발아율 (%)		2주차 발아율 (%)	
		NaCl 농도 (%)		NaCl 농도 (%)	
		0	0.5	0	0.5
무처리	무처리	76.7	13.3	76.7	50
	배양액 처리	56.7	23.3	80	60
	perlite 제제	86.7	10	93.3	76.7
1% CMC + RH84	무처리	93.3	3.3	93.3	40
	배양액 처리	46.7	3.3	80	46.7
	perlite 제제	93.3	6.7	93.3	73.3

제 8절 토양 환경별 소포장 적용 시험

2011년과 2012년의 2년에 걸쳐 조성된 헤어리베치 포장 적용 시험은 월동하는 헤어리베치의 생육 특성에 맞추어 가을 (10월 말 - 11월 초)에 파종하였고, 그 다음해 늦봄 (5월 말 - 6월 초)에 거두어 생장 정도를 확인하였다. 3년의 과제기간 동안 포장 적용 기회는 두 번 밖에 없었기 때문에 과제의 최종 목적인 간척지에서의 적용 시험과 함께 이와는 반대의 환경인 일반 토양에서의 적용 시험을 동시에 시행하였다. 또한, 근류형성능과 질소고정능이 우수한 균주 선발을 2차에 걸쳐 했기 때문에 1차 포장 적용 시험에서는 1차에서 선발된 우수 균주를, 2차 포장 적용 시험에서는 1차 포장 적용에서 확인된 우수 균주와 2차로 선발된 균주를 포장에 적용하였다.

1. 일반토양에서의 소포장 효능평가

선발한 균주들의 토양환경별 효능을 알아보기 위하여 일반토양에서 2년에 걸쳐 1, 2차로 나누어 적용시험을 수행하였다. 1차 일반토양 시험포는 충북 괴산군 '흙살림' 포장을 이용하였는데 총 포장 면적은 4.2 M × 9 M, 처리구당 면적은 80 cm × 200 cm로 조성하였다(Fig. 36). 선발균주인 RH82, RH84, RH93 처리와 control, 총 4처리를 3반복 하였고, 처리구당 종자코팅한 종자를 30립씩 파종하고 균주현탁액(10^9 cfu/ml) 5 ml씩을 추가 접종하였다. 종자코팅은 종자소독 후 1% carboxymethylcellulose(CMC)가 첨가된 균주현탁액(10^9 cfu/ml)에 종자를 5분간 침지시켜 건조하고, perlite에 균주현탁액을 섞어 만든 균제제를 종자에 도포하였다. 2011년 10월 조성된 일반토양 포장은 2012년 6월에 harvesting 하였고 그 결과는 Fig. 37, 38과 같다. 각각의 선발균주를 처리한 구에서는 실험실 내에서 pot test를 할 때와 마찬가지로 각 균주마다의 뿌리혹 모양이 관찰되었으며, control에서는 뿌리혹이 거의 생기지 않거나 혹은 선발 균주와는 다른 모양의 뿌리혹이 관찰되었다. 이는 원래 포장에서 우점하는 균주에 의한 뿌리혹일 것이라 사료된다. 또한 헤어리베치의 생체중을 측정한 결과 포장에서 우점하는 균주에 의한 효과는 그리 크지 않은 것으로 확인되었으며, RH84를 접종한 처리구에서 control 대비 45 - 50% 헤어리베치의 무게가 증가하는 것을 확인하였다.



2012. 05. 03



2012. 06. 08. harvesting

Fig. 36. View of the fertile soil experiment field.

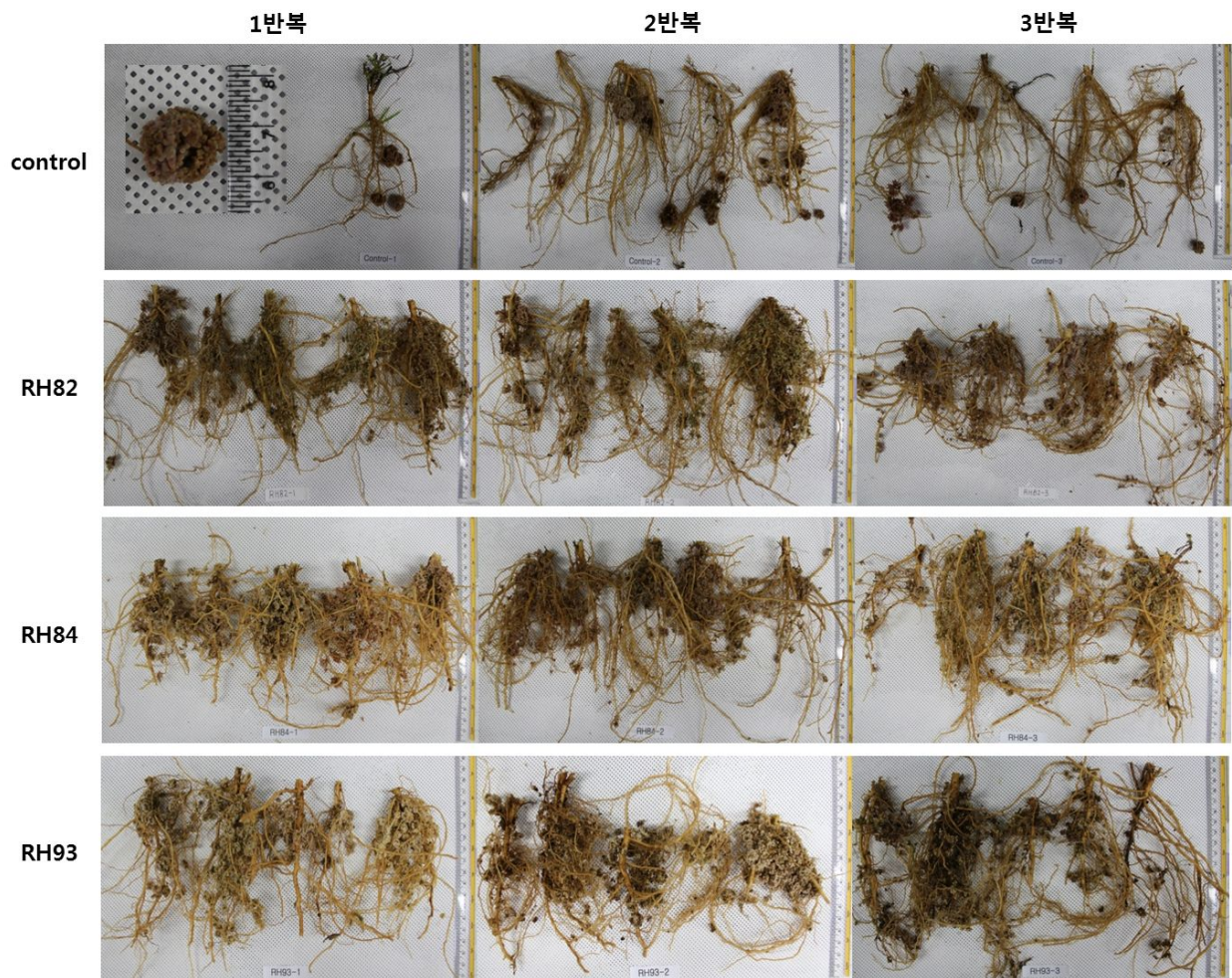


Fig. 37. The nodulation root of the fertile soil experiment field.

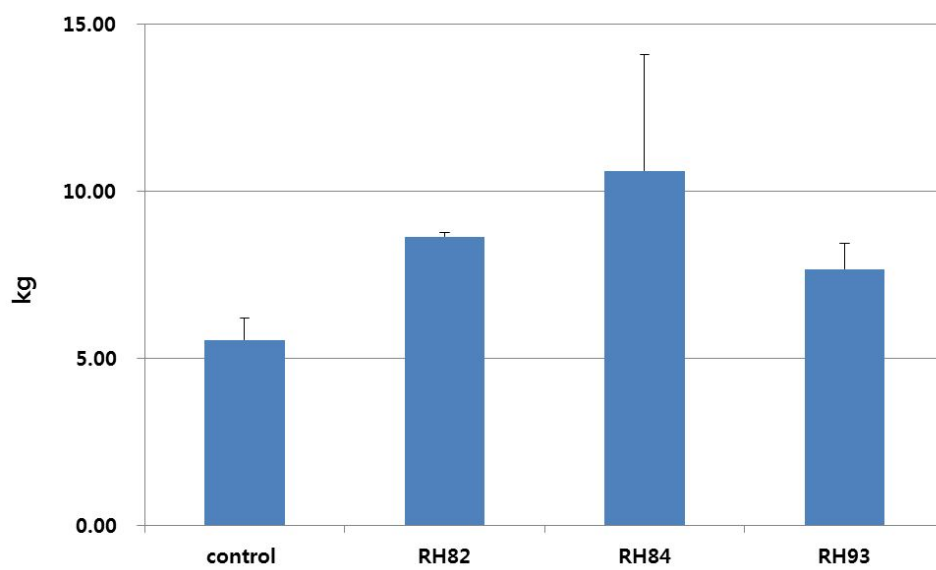


Fig. 38. The total weight of the fertile soil experiment field.

2차 일반토양 시험포는 1차와 마찬가지로 충북 괴산군 ‘흙살림’ 포장을 이용하였으며, 처리구 당 면적은 90 cm × 200 cm로 조성하였다 (Fig. 39). 1차 포장 시험에서 헤어리베치 생육 우수 선발 균주인 RH84 처리구와 RH171 균주 처리구, control로 총 3처리를 3반복 하였고, 처리구 당 종자 코팅한 종자를 45립씩 파종하였다. 종자코팅은 종자소독 후 1% CMC가 첨가된 균주현탁액(10^9 cfu/ml)에 종자를 5분간 침지시켜 건조하고, pearlite에 균주현탁액을 섞어 만든 균제제를 종자에 도포하였다. 2012년 10월 조성된 일반토양은 2013년 06월에 harvesting 하였고 그 결과는 Fig. 40과 같다. 2차의 소포장 시험 결과에서는 1차 포장 적용 시험과 다르게 control에서 가장 높은 활성이 나왔는데 이는 2013년 5월까지 지속되었던 추위와 서리에 의해 헤어리베치의 정상적인 생육이 불가능하여 나온 결과로 사료된다. 그러나 뿌리혹 내부에 붉은색을 띄게 하는 leghemoglobin이 뿌리혹의 산소공급과 nitrogenase의 활성을 도와 질소 고정성이 일어난다는 기존의 보고(Bergersen, F. J. and Turner, G. L., Dazzo, F. B. and Hrabak, E. M., Ott, T. *et al*)에서 처리 control의 뿌리혹 단면은 검은색으로 뿌리혹의 질소 고정력이 약할 것으로 짐작할 수 있고, RH84 처리구의 뿌리혹 단면에서는 그 색이 붉은색으로 질소 고정력이 우수할 것이라 짐작할 수 있다.

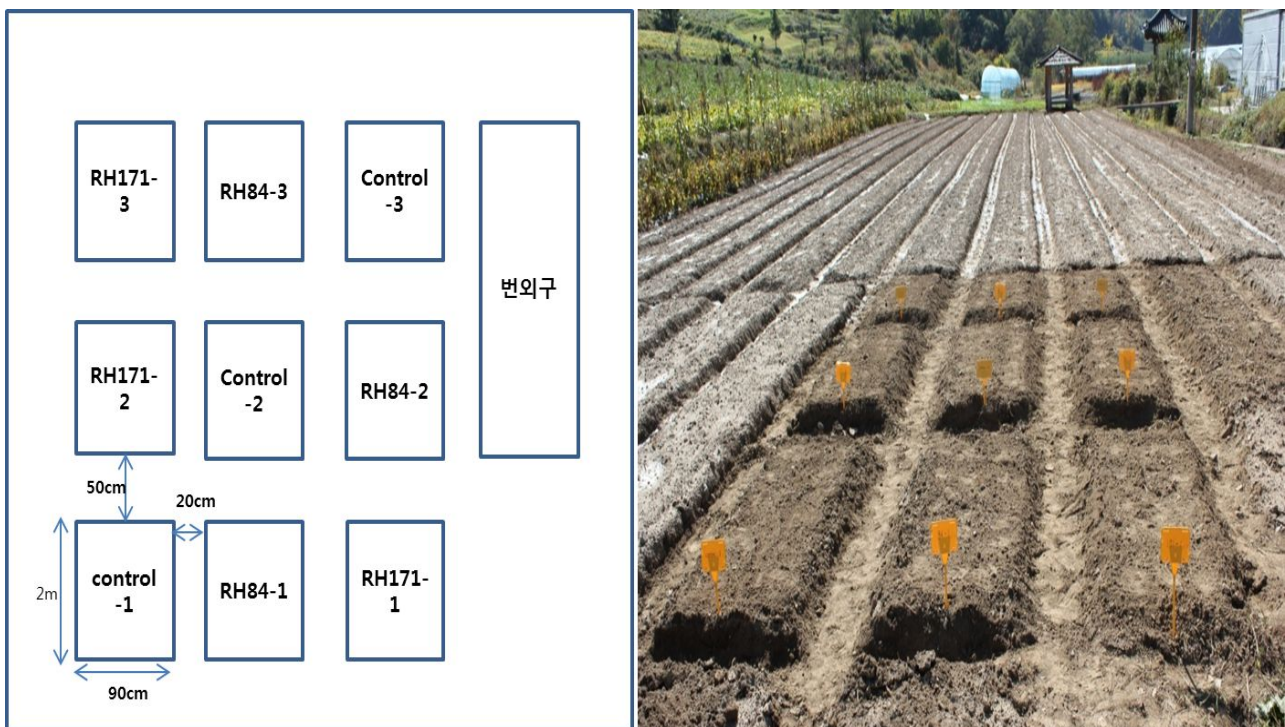


Fig. 39. View of the fertile soil experiment field.

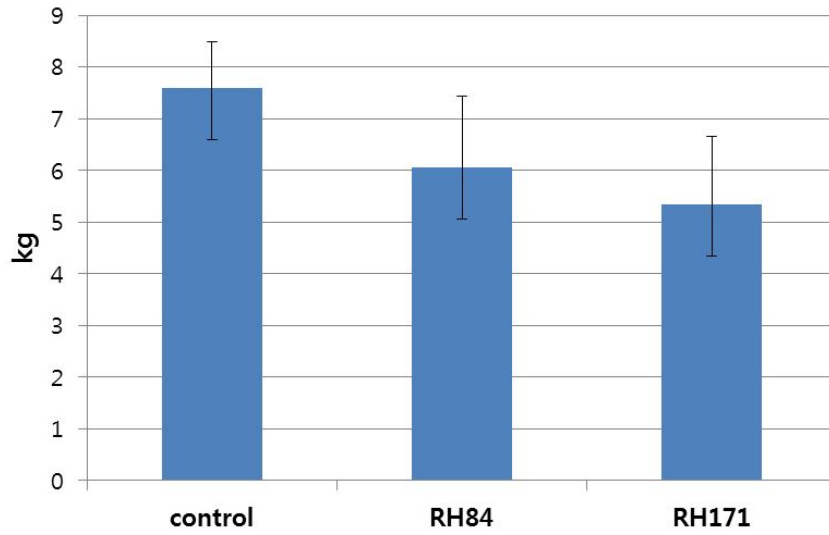


Fig. 40. The total weight of the fertile soil experiment field.

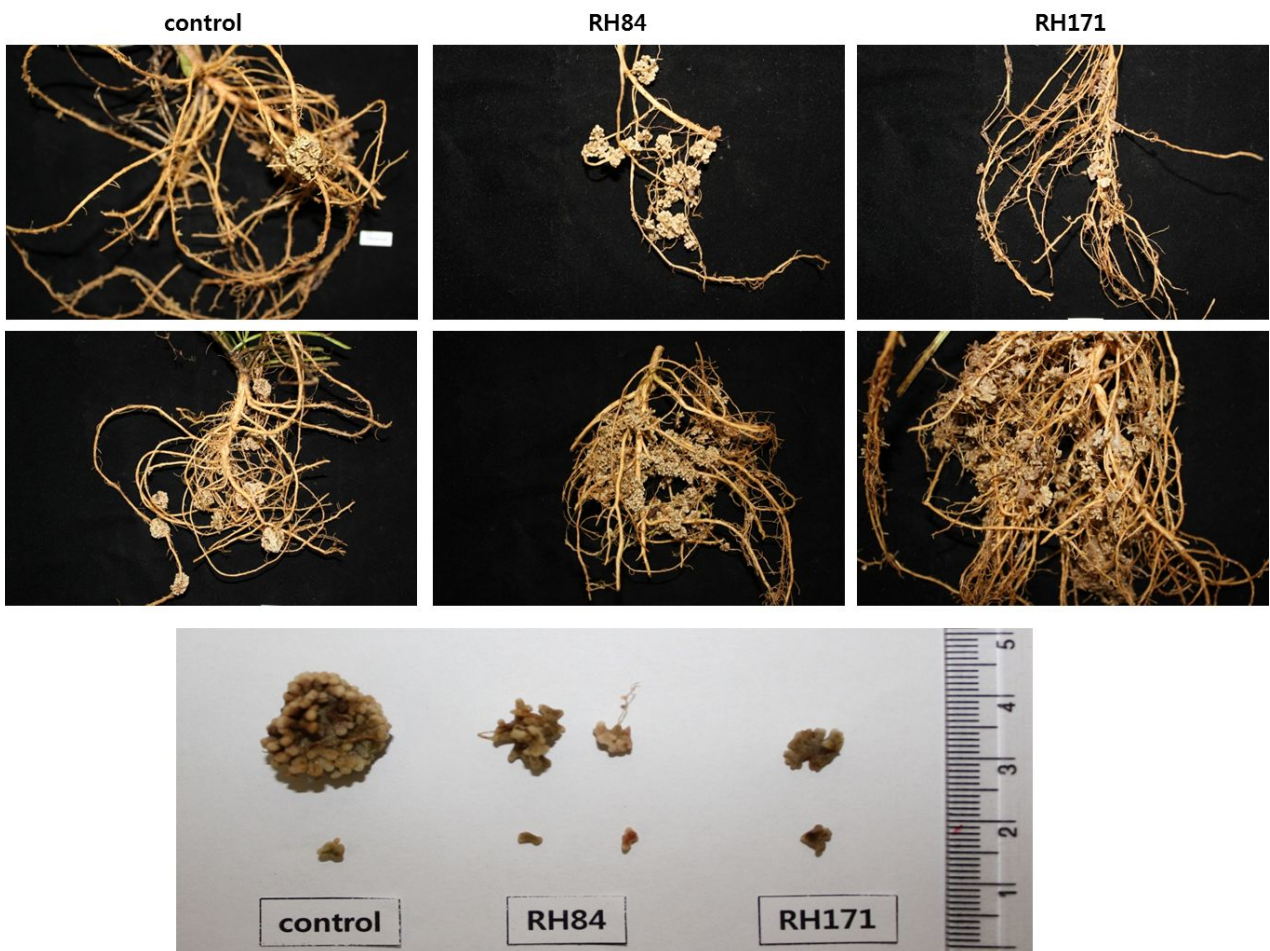


Fig. 41. The nodule shape and nodule color of the fertile soil experiment field.

2. 간척지에서의 소포장 효능평가

간척지 시험포장은 전북 부안군 새만금 계화도에 있는 국립식량과학원 벼맥류부 간척지 농업과 시험포장을 이용하였고 저염 포장과 중염 포장(Table 22, 23)으로 나누어 처리하였으며 총 포장면적은 각각 포장 9.8 M×6.7 M, 처리구당 면적은 300 cm×1300 cm로 조성하였다(Fig.42, Fig. 43). 선발균주인 RH82, RH84, RH93 처리와 종자소독 한 무처리 총 4처리 3반복 하였고, 1차 일반토양 포장 처리와 같은 방법으로 종자 코팅하여 처리구당 종자 코팅한 종자를 45립씩 파종하였다. 일반적인 헤어리베치 파종시기에 맞추어 2011년 10월에 조성되어 2012년 5월 harvesting 하였고 그 결과는 Fig. 44, 45와 같다. 중염의 시험포에서는 헤어리베치의 생육을 확인할 수 없었는데 그 이유는 Table 23 처럼 염의 농도가 0.43 - 0.6%로 헤어리베치가 생육하지 못할 정도로 높았기 때문인 것으로 사료된다. 중염에서의 효능평가 실험은 차후 복합 균주로 코팅 된 헤어리베치 종자를 이용하여 효능을 평가 할 예정이다. 1차 일반토양 소포장의 결과와 마찬가지로 각각의 선발 균주를 처리한 구에서는 실험실 내에서 pot test를 할 때와 마찬가지로 각 균주마다의 뿌리혹 모양이 관찰되었으며, 일반토양 포장 보다는 적은 수의 뿌리혹이 관찰되었다. Control에서는 선발 균주 처리구와는 모양이 다른 뿌리혹이 형성되었는데 이는 원래 포장에서 우점하는 균주에 의한 뿌리혹일 것이라 사료된다. 또한 헤어리베치의 생체중을 측정한 결과 포장에서 우점하는 균주에 의한 효과는 그리 크지 않은 것으로 확인되었으며, RH84를 접종한 처리구에서 control 대비 약 45% 헤어리베치의 무게가 증가하는 것을 확인하였다. 특히 본 연구에서 실제 헤어리베치가 파종된 간척지 포장에서의 염 농도를 12군데 무작위로 측정 시 0.09 - 0.2%로 염 분포가 불균일하였으나, 무처리구 대비 처리구의 높은 수량 증가는 처리된 선발 균주에 의해 헤어리베치의 염 환경 적응에 긍정적인 영향을 미친 것이라 사료된다.

Table 22. Salt concentration of reclaimed land (low salt region)

Treatment	EC	NaCl (%)	수분(%)	온도 (°C)
control-1	3.02	0.20	30.33	17.20
control-2	2.35	0.14	25.37	17.60
control-3	1.58	0.09	23.00	17.80
mean	2.31	0.14	26.23	17.53
RH82-1	3.17	0.20	24.20	17.60
RH82-2	1.62	0.09	25.93	17.17
RH82-3	1.68	0.10	29.97	16.90
mean	2.16	0.13	26.70	17.22
RH84-1	2.49	0.16	29.30	17.27
RH84-2	2.11	0.12	27.60	16.87
RH84-3	2.00	0.12	25.90	17.37
mean	2.20	0.13	27.60	17.17
RH93-1	2.98	0.20	22.90	16.57
RH93-2	2.06	0.16	23.60	16.63
RH93-3	2.05	0.16	22.73	17.00
mean	2.36	0.17	23.08	16.73

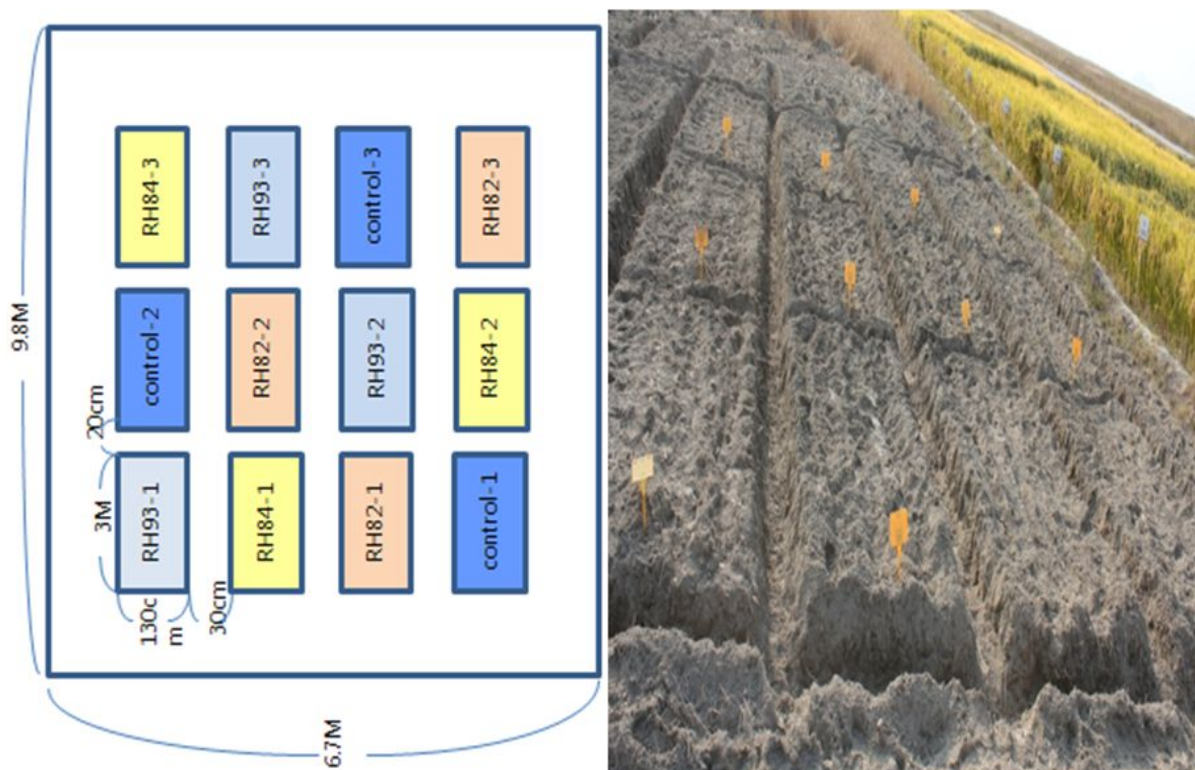


Fig. 42. View of the reclaimed land (low salt region) experiment field.

Table 23. Salt concentration of reclaimed land (middle salt region)

Treatment	EC	NaCl (%)	수분(%)	온도 (°C)
control-1	6.34	0.49	94.57	19.33
control-2	7.26	0.60	90.47	19.17
control-3	6.18	0.47	75.23	18.87
mean	6.59	0.52	86.76	19.12
RH82-1	6.13	0.47	98.23	19.27
RH82-2	6.02	0.46	90.30	19.17
RH82-3	6.24	0.48	89.50	19.50
mean	6.13	0.47	92.68	19.31
RH84-1	6.10	0.46	99.20	19.40
RH84-2	6.20	0.47	92.10	19.20
RH84-3	5.70	0.43	96.43	18.80
mean	6.00	0.45	95.91	19.13
RH93-1	6.29	0.48	97.03	19.20
RH93-2	6.01	0.46	90.63	19.28
RH93-3	7.13	0.59	92.27	19.60
mean	6.48	0.51	93.31	19.36

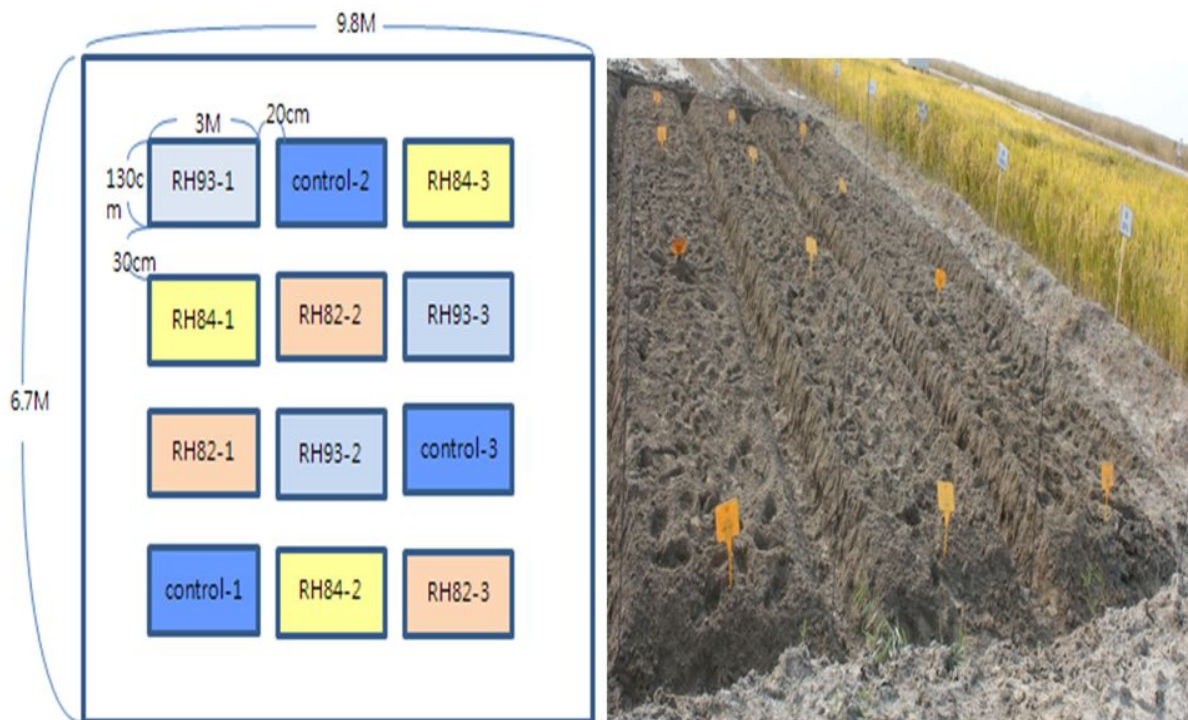


Fig. 43. View of the reclaimed land (middle salt region) experiment field.

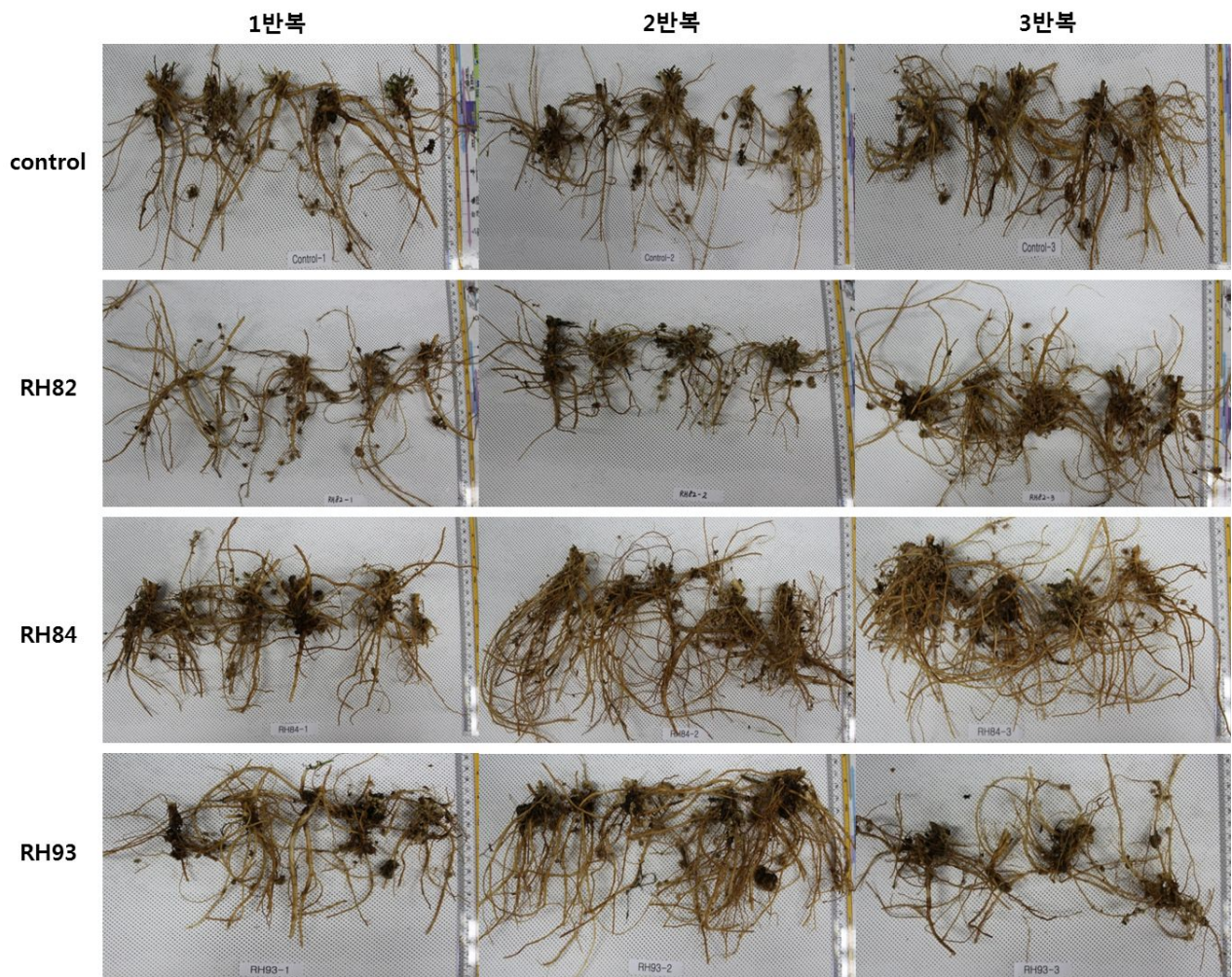


Fig. 44. The root nodulation of the reclaimed land experiment field.

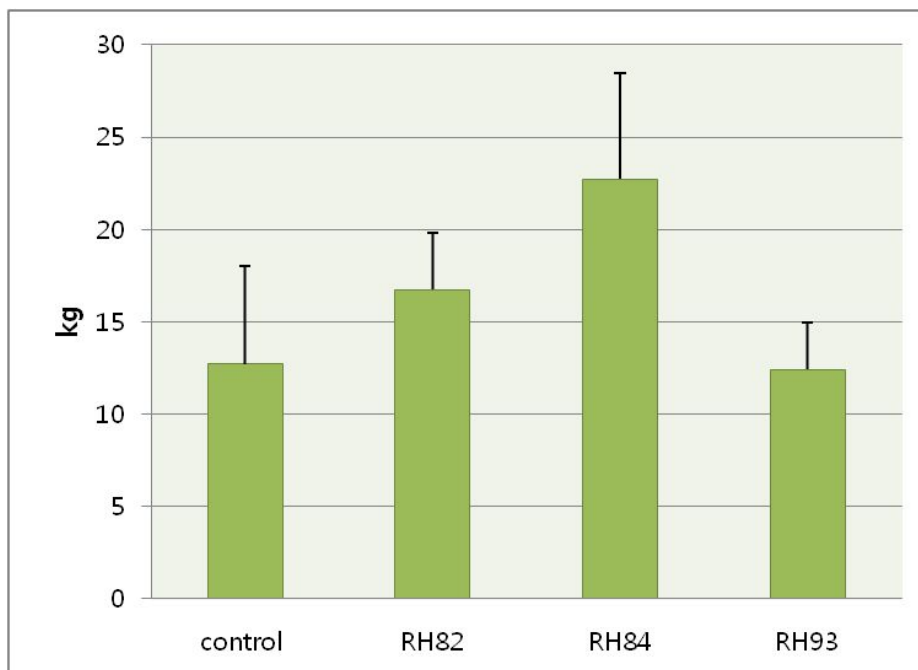


Fig. 45. The total weight of the reclaimed land experiment field.

2차 간척지 시험포는 1차와 마찬가지로 전북 부안군 새만금 계화도에 있는 국립식량과학원 벼맥류부 간척지 농업과 시험포장을 이용하였고, 처리구당 면적은 90 cm × 200 cm로 조성하였다 (Fig. 46). 1차 포장 시험에서 헤어리베치 생육 우수 선발 균주인 RH84 처리구와 RH171 처리구, control로 총 3처리구를 5반복 하였으며, 처리구당 종자 코팅한 종자를 30립씩 파종하였다. 종자코팅은 종자소독 후 1% CMC가 첨가된 균주현탁액(10^9 cfu/ml)에 종자를 5분간 침지시켜 건조하고, perlite에 균주현탁액을 섞어 만든 균제제를 종자에 도포하였다. 2012년 11월 조성된 간척지 시험포는 2013년 06월에 harvesting 하였으며 그 결과는 Fig. 47과 같다.

2차의 소포장 시험 결과에서는 1차 포장 적용 시험 보다는 control과 균주 처리구의 차이가 적게 나는 것으로 확인되었다. 일반토양에서의 결과와 마찬가지로 2013년 5월까지 지속되었던 추위와 서리에 의해 헤어리베치의 정상적인 생육이 불가능하여 나온 결과로 사료된다. 특히 난피법으로 조성한 포장에서 일부 구간만 유의적인 결과가 나왔는데 이는 여전히 간척지 토양의 염 분포가 불균일하기 때문일 것으로 생각되며, 그렇기 때문에 더욱 선발 균주의 처리 및 종자 코팅의 중요성이 필요하다는 것을 의미하는 결과이다. Fig. 48의 뿌리혹 단면을 관찰한 결과 접종 균주와 다른 모양의 뿌리혹, 즉 포장 실험 토양에 우점하는 세균에 의해 생긴 control의 뿌리혹 단면은 검은색으로 뿌리혹의 질소 고정력이 약할 것으로 짐작되며, RH84와 RH171 처리구의 뿌리혹 단면은 그 색이 붉은색으로 질소 고정력이 우수할 것이라 사료된다.

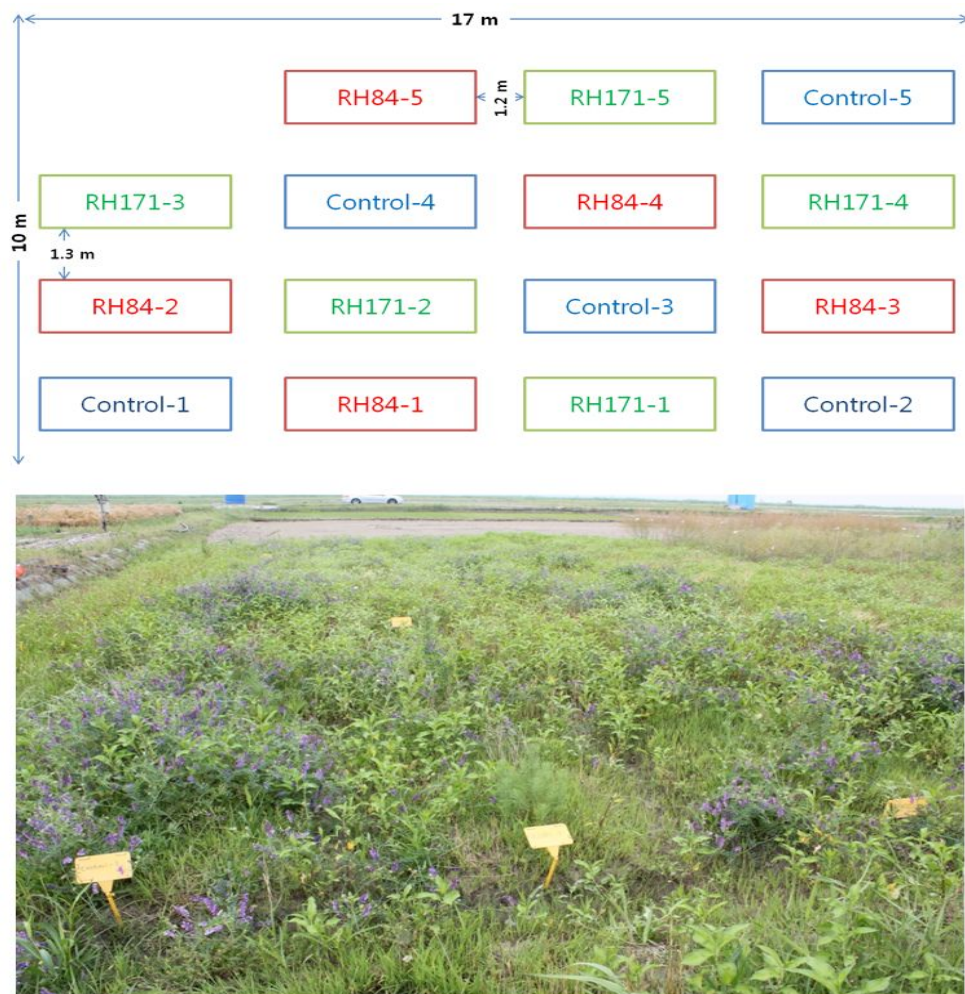


Fig. 46. View of the reclaimed land experiment field.



Control 1
0.6 kg

RH84-2
0.8 kg

RH171-3
0.7 kg



Control 3
0.2 kg

RH84-4
1.0 kg

RH171-5
1.0 kg

Fig. 47. Harvested hairy vetch of the reclaimed land experiment field.

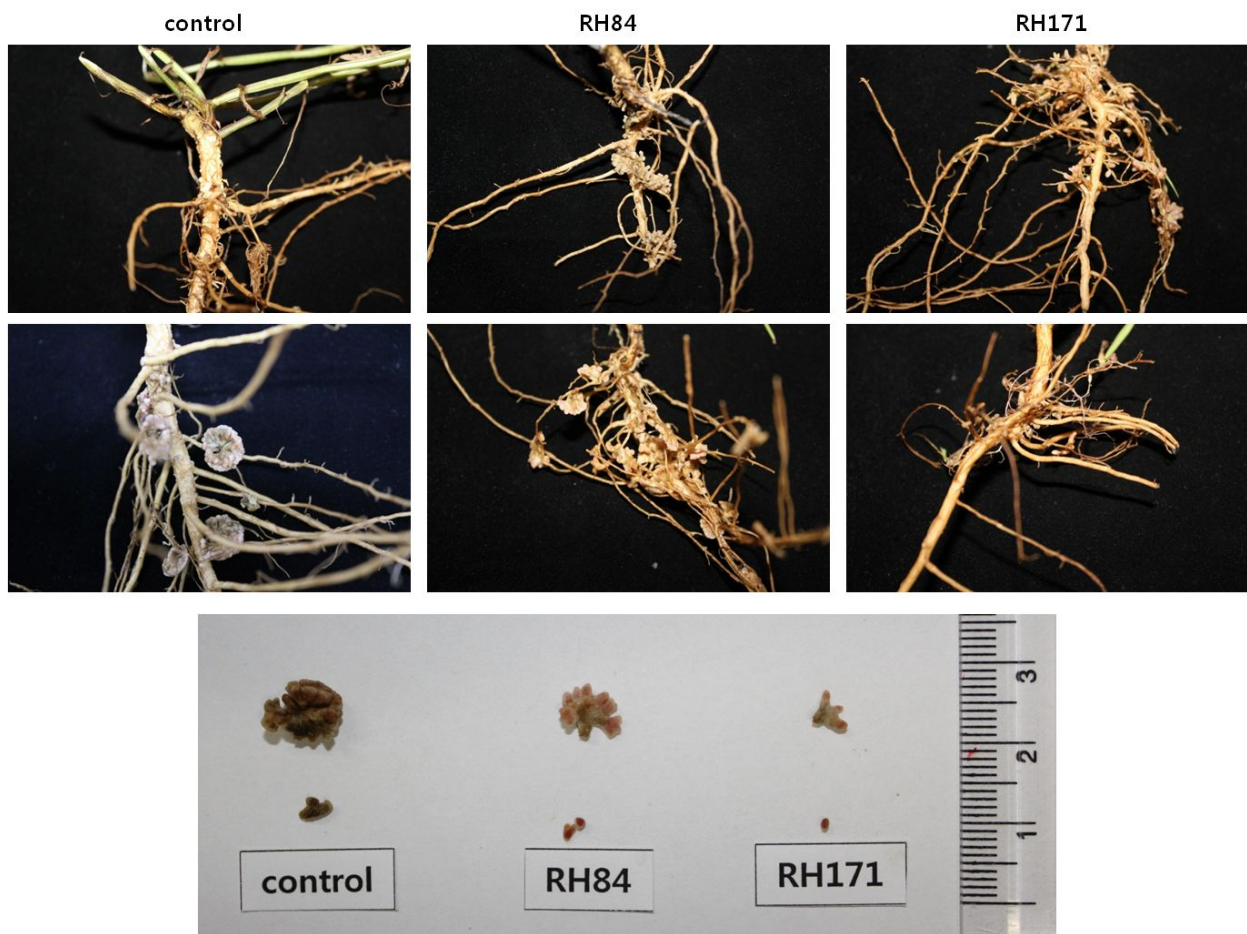


Fig. 48. The nodule shape and nodule color of the reclaimed land soil experiment field.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발의 최종목표

최근 농진청에서 선정 추천하고 있는 녹비작물인 헤어리베치에 대해서 근류형성능과 질소고정능이 우수할 뿐 아니라 호염성 특성을 갖는 미생물 균주를 선발하여 간척지와 시설재배지 등 고염환경지역에서 작물생육을 촉진시키는 데 요구되는 미생물 이용 녹비 실용화 기술을 개발하고자 하였다.

- 헤어리베치 뿌리혹 수집 및 근류균 분리
- 헤어리베치용 호염성 질소고정활성 균주의 분리 및 탐색
- 근류형성능 및 질소고정능 스크리닝 및 우수균주 선발
- 선발균주의 형태·생리·계통학적 분류 동정
- 선발균주에 대한 토양 및 근권 정착력 및 안정성 시험
- 선발균주의 간척지 토양 적용 시험
- 간척지 토양을 이용한 염농도별 균주처리 효과 검정
- 균주의 제제화 및 종자 코팅제 개발
- 토양환경별(일반토양, 간척지) 소포장에서의 효능 및 적용시험

제 2 절 연차별 연구개발 목표내용 및 달성도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도(%)
1차년도	2010	헤어리베치 유래 호염성 질소고정 활성균 분리 및 탐색 (1차)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 헤어리베치 재배지로부터 뿌리혹 수집 및 근류균 분리 ○ 호염성 균주 스크리닝 ○ 활성균주 동정 	100
		근류형성능 및 질소고정능 우수균주 선발	<ul style="list-style-type: none"> ○ pot nodulation test를 통한 뿌리혹 형성 근류균 확인 ○ 형성된 근류균의 질소 고정능 확인 ○ 형태·생리학적 특성 검정 	100

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도(%)
2 차 년 도	2011	헤어리베치 유래 호염성 질소고정 활성균 분리 및 탐색 (2차)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2차 우수균주 선발 (농진청 지역적응 시험 및 농가실증시험포) ○ 호염성 균주 스크리닝 ○ 활성균주 동정 ○ pot nodulation을 통한 뿌리혹 형성 균류균 확인 및 질소 고정능 확인 ○ 형태·생리학적 특성 검정 	100
		선발 균주의 특성 파악 및 종자 코팅제 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선발 균주의 배양 최적화 (pH) ○ 헤어리베치 종자 코팅을 위한 제제 선발 ○ 종자 코팅법 개발 	100
		소포장 적용시험 및 시험 포장 토양 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 일반토양 및 간척지 필드 테스트 ○ 시험 포장 토양 분석 	100
3 차 년 도	2012	간척지 토양 적용 시험	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pot 별 뿌리혹 형성 및 적용시험 ○ 시용 방법에 따른 간척지 토양 적용 ○ 일반토양 및 간척지 필드 테스트 	100
		배양 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 탄소원에 따른 생육 조사 ○ 식품 유래의 배지 조성에 따른 생육 조사 ○ 소규모 발효조 배양 	100
		코팅제 개발 및 복합균주 적용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선발 균주의 제제화 ○ 제제 안정성 및 생육 촉진능 검정 ○ ACC deaminase 활성 균주에 의한 생육 촉진능 검정 	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과 활용계획

제 1 절 연구 성과

가. 특허 성과

출원년도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록번호
2011	헤어리베치 근류 내염성 리조비움 속 균주	한국생명공학 연구원	대한민국	10-2011-010 6981	
2012	스트렙토마이 세스 에룸펜스 KRB-001 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 잡초 방제용 제초제 조성물	한국화학 연구원, 한국생명공학 연구원	대한민국	10-2012-014 1838	

-특허 출원번호 10-2011-0106981호: 헤어리베치 근류 내염성 리조비움 속 균주

원 國 際 特 許 法 律 事 務 所

우) 135-080 서울시 강남구 역삼동 642-16 성지하이츠 II 8층
전화 (02)3453-0507.0508 / 전송 (02)3453-8155.8156 / E-mail : ip@wonpat.com

문서번호 제 원11-10103호
시행일자 2011. 10. 19.
수 신 한국생명공학연구원
참 조 김 장 진 박사님/ 권 미 경 박사님
E-mail changjin@kribb.re.kr / mariacan@kribb.re.kr

제 목 출원 완료 보고의 건

명 칭 : 헤어리베치 근류 내염성 리조비움 속 균주
출 원 인 : 한국생명공학연구원
발 명 자 : 김장진, 권미경, 박동진, 이재찬, 장종욱
관리번호 : P2011-03L-KR

1. 귀원의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 귀원에서 출원 의뢰하신 상기 건에 대해 2011년 10월 19일자로 출원완료 하였기에 이에 보고 드리오니 업무에 참조하시기 바랍니다.
(담당 변리사 이원희, 변리사 김보민)

출원번호: 특허출원 제2011-0106981호, 출원일 : 2011년 10월 19일

대표 변리사 李 原



별 결 : 1. 안내문 1부
2. 출원번호통지서
3. 명세서 및 출원서지

【부처명】 농림수산식품부(농림부)

【연구관리전문기관】 농림수산식품기술기획평가원

【연구사업명】 농림기술개발사업

【연구과제명】 호염성 질소고정균을 이용한 헤어리베치 생육촉진 및 이를 통한 간척지 녹비화기술 개발

【기여율】 1/1

【주관기관】 한국생명공학연구원

【연구기간】 2011.07.01 ~ 2012.06.30

위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 이원희

(서명 또는 인)

【수수료】

【기본출원료】 0 면 38,000 원

【가산출원료】 31 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 0 항 0 원

【합계】 38,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면후 수수료】 19,000 원

【첨부서류】 1.공지예외적용대상(신규성상실의예외, 출원시의특례)규정을

적용받기 위한 증명서류_1통

2.미생물기탁증명서_1통

-특허 출원번호 10-2012-0141838호: 스트렙토마이세스 에룸펜스 KRB-001 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 잡초 방제용 제초제 조성물

관인생략

출원번호통지서



출원일자 2012.12.07
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2012-0141838 (접수번호 1-1-2012-1018070-82)
출원인명칭 한국화학연구원(3-1998-007765-1) 외 1명
대리인성명 이원희(9-1998-000385-9)
발명자성명 최정섭 이보영 고영관 김은애 배영애 분석식 김창진 박동진 주윤정
발명의명칭 스트렙토마이세스 에룸펜스 KRB-001 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 잡초 방제용 제초제 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허담당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

2012-12-07

【우편번호】 305-806

【주소】 대전광역시 유성구 과학로 125

【국적】 KR

【미생물 기탁】 명세서 기재

【핵산염기 서열목록 또는 아미노산 서열목록】

【서열개수】 1

【서열목록 전자파일】 첨부

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 KK-1204-B0

【부처명】 산업기술연구회

【연구관리전문기관】 산업기술연구회

【연구사업명】 기관고유사업

【연구과제명】 천연물 기반 그린바이오 작물보호소재 개발

【기여율】 1.8/3

【주관기관】 한국화학연구원

【연구기간】 2012.01.01 ~ 2012.12.31

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 110067-03-2-SB010

【부처명】 농림수산식품부

【연구관리전문기관】 농림수산식품기술 기획평가원

【연구사업명】 농림기술개발사업

【연구과제명】 호염성 질소고정균을 이용한 헤어리베치 생육촉진 및
이를 통한 간척지 녹비화 기술개발

【기여율】 0.6/3

【주관기관】 한국생명공학연구원

【연구기간】 2011.07.01 ~ 2012.06.30

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 KGM4111241

나. 논문 게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Screening of Rhizobium, Hairy Vetch Root Nodule Bacteria, with Promotion of Nodulation and Nitrogen Fixation	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Mi-Kyung Kwon, Dong-Jin Park, Chang-Keun Sung	Korean Journal of Microbiology	49(2)	국내	SCIE
2012	Hairy Vetch Growth-Promoting <i>Rhizobium</i> sp. RH84 and Application to Reclaimed Land	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Mi-Kyung Kwon, Dong-Jin Park, Chang-Keun Sung	The Korean Society for Applied Biological Chemistry	accepted	국내	SCIE

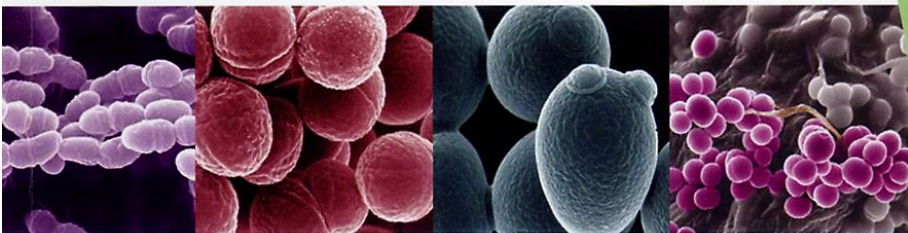
ISSN 0440-2413

Vol. 49, No. 2 June 2013

제49권 제2호 2013년 6월

Korean Journal of
Microbiology

미생물학회지 <http://www.msk.or.kr>



윤노타쓰야(제주대학교), "Pyrosequencing을 이용한 하절기 영산강 유역의 Phylum 계층의 세균 군집 조사", p. 150



사단 **한국미생물학회**

The Microbiological Society of Korea

<http://www.msk.or.kr>

뿌리혹 형성능과 질소 고정능이 우수한 헤어리베치 유래 *Rhizobium*의 분리 및 선발

장종옥^{1,3} · 권미경² · 박동진¹ · 성창근³ · 김창진^{1*}

¹한국생명공학연구원 미생물자원센터

²충청남도농업기술원 농업환경연구과

³충남대학교 식품공학과

Screening of *Rhizobium*, Hairy Vetch Root Nodule Bacteria, with Promotion of Nodulation and Nitrogen Fixation

Jong-Ok Jang^{1,3}, Mi-Kyung Kwon², Dong-Jin Park¹, Chang Keun Sung³,
and Chang-Jin Kim^{1*}

¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Republic of Korea

²Agricultural Environment Research Division, Chungcheongnam-do Agricultural

Research and Extension Services, Yesan 340-861, Republic of Korea

³Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

(Received March 26, 2013 / Accepted April 19, 2013)

This study was conducted to select rhizobia from hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) with nodulation and excellent nitrogen-fixing ability. Hairy vetch root was collected from 7 of cultivation region of all over the country, rhizobia were isolated from the root nodules. Isolates were re-inoculated into a hairy vetch separately and studied nodulation and nitrogen-fixing ability. As a result, total of 52 *Rhizobium* isolates were isolated from the hairy vetch root nodules, among these, 16 isolates were *Rhizobium* which show good growth at more than 0.5% NaCl concentration. These 16 isolates were re-inoculated separately, 8 weeks after, good root nodule formation was observed from *Rhizobium* sp. RH1, RH3, RH81, RH82, RH84, and RH93 strain treated samples. Six isolates were positive for nitrogen fixing ability, the highest acetylene reduction activity was shown by *Rhizobium* sp. RH84. Results suggest that the *Rhizobium* sp. RH84 could be used as the possibility of its application as a green manure crop of hairy vetches in nonuniform salt distribution reclaimed land.

Keywords: *Rhizobium* sp., hairy vetch, nitrogen fixation, root nodule

녹비작물로 알려진 콩과 식물인 베치(vetch)는 전 세계적으로 150여 품종이 재배 중이고(Bull and Mayfield, 1992) 코먼베치(*Vicia sativa* L.), 헤어리베치(*Vicia villosa* Roth), 퍼플베치(*Vicia benghalensis* L.) 그리고 울리포드베치(*Vicia villosa* spp., *dasycarpa* Ten. Eav.)가 대표적인 품종으로 알려져 있다. 그러나 나라마다 재배되고 있는 품종이 다르며(Shin and Ko, 2003), 일본과 터키 등지에서는 종자수량이 많은 개체를 선발 육성하여 이용하고 있다(Walton, 1991; Mayfield, 1999). 최근 한국에서도 농촌진흥청 국립식량과학원에서 자생종 헤어리베치로부터 육성된 품종인 청풍보라를 이용하여 수확시기에 따른 종자 수량 등에 관한 연구가 보고되었다(Ku *et al.*, 2012). 베치 중에서도 헤어리베치는 월동이 가능하여 겨울에서 봄 사이 휴경지에서 녹

비효과를 기대할 수 있다. 또한, sand vetch (Goar, 1934)라고 불릴 만큼 모래에서 진흙토양까지 그 생육 범위가 넓고, 산성과 알칼리 토양에서도 잘 적응한다고 알려져 있다(Walton, 1991). 헤어리베치의 녹비작물로서 큰 장점은 뿌리에 공생하는 뿌리혹박테리아에 의해 공기 중의 질소를 고정하며(Mueller and Thorup-Kristensen, 2001; Provorov and Tikhonovich, 2003), 수확기 이후 헤어리베치가 분해된 후에도 토양에 부족한 질소 공급이 가능하기 때문에 화학성 질소비료를 대체할 수 있다는 점이라 하겠다(Stewart, 1987).

최근 국토 확장 사업의 목적으로 여러 간척지가 조성되었으 며, 식량 자급도가 낮은 우리나라로서는 새만금 등의 대규모 간척지를 농업용지로 활용하려는 요구도가 높아지게 되었다. 한편 간척지는 염 농도의 분포가 불균일하기 때문에 재배작물의 염해를 최소화하기 위해서는 배수개선, 객토, 심경, 석회 시용 등의 토양개량이 필요하며 종합적인 제염 및 재 염화 방지기술이 필

*For correspondence. E-mail: changjin@kribb.re.kr; Tel.: +82-42-860-4332; Fax: +82-42-860-4625



KSABC

The Korean Society for Applied Biological Chemistry



July 23, 2013

Dear Dr. 창진 김:

It affords me pleasure to inform you that your manuscript "Rhizobium sp. RH84에 의한 간척지 환경에서의 헤어리베치 생육촉진" has been accepted for publication.

Please be advised that the Managing Editor will shortly provide further details for formatting and minor correction regarding your manuscript before publication.

I appreciate your submission of your valued work in JABC.

With kind regards

Hoi-Seon Lee
Editor-in-Chief

Copyright(C)2008 KSABC. All rights reserved.
mailto: agchem@ksabc.or.kr

다. 포스터 게재 성과

게재 연도	포스터명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Isolation and Identification of Halophilic Hairy Vetch Root Nodule Bacteria for Application on Newly Reclaimed Land	Mi-Kyung Kwon	Chang-Jin Kim	Jong-Ok Jang, Dong-Jin Park	한국 식물병리학회		국내	
2011	Screening of Halophilic Hairy Vetch Root Nodule Bacteria with Effective Biological Nitrogen Fixation Ability	Mi-Kyung Kwon	Chang-Jin Kim	Jong-Ok Jang, Zion Kang, Dong-Jin Park	한국 식물병리학회		국내	
2012	Development of Green Manure Technology Using Halophilic Hairy Vetch Root Nodule Bacteria on Newly Reclaimed Land	Mi-Kyung Kwon	Chang-Jin Kim	Jong-Ok Jang, Dong-Jin Park	녹색기술포럼		국내	
2012	Apply to New Reclaimed Land of Salt Stress Using Halophilic Rhizobium and Hairy Vetch	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Jae-Chan Lee, Chang-Keun Sung, Seon-Woong Hwang	한국 미생물학회연합		국내	
2013	Growth Promoting of Hairy vetch (<i>Viciavillosa</i> Roth) Using <i>Rhizobium</i> sp. RH84 under the Reclaimed Soil Condition	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Chang-Keun Sung, Seon-Woong Hwang	한국 미생물학회		국내	
2013	Increased Growth of Hairy vetch (<i>Vicia Villosa</i> Roth) by Seed Treatment with Rhizobacteria in Field Test	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Dong-Jin Park, Chang-Keun Sung, Seon-Woong Hwang	한국 미생물학회연합회		국내	

게재 연도	포스터명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Rhizobacteria and ACC Deaminase Producing Bacteria Confer Resistance in Hairy vetch (<i>Vicia Villosa</i> Roth) to Salt Stress	Jong-Ok Jang	Chang-Jin Kim	Dong-Jin Park, Chang-Keun Sung	한국 미생물 연합회		국내	

제 2 절 성과 활용계획

일차적으로 간척지에서 화학비료 없이 헤어리베치의 생육을 촉진하며, 이차적으로 생육이 끝난 헤어리베치를 간척지에 환원함으로써 척박한 토양에 유기물을 공급할 수 있다. 더 나아가 유기물의 함량이 높아진 간척지에서 새로운 식량 자원 생산이 가능하게 될 것이며, 친환경 및 지속가능한 농업을 통한 농업생태계 보호 및 환경 오염 방지의 실천이 가능할 것이다.

Dong Min Kim, Sang-Mi Yu, Jong-Chan Chae, Kui-Jae Lee, Byung-Taek Oh, Yong Hoon Lee*
Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Jeonbuk 570-752, Korea

Salinity stress is of great importance in reclaimed or greenhouse areas due to its impact in reducing crop growth and yield. Salinity also affect negatively on the survival of beneficial microorganisms in the plant rhizosphere. To increase salt tolerance and consequently promote plant growth by the treatment of rhizobacteria, we collected soil samples from coastal sand dunes and reclaimed paddy fields in Buan, Chonbuk province, and isolated salt tolerant bacteria. The isolated bacteria were primarily tested for the induction of salt tolerance and plant growth promotion in petridish with filter paper soaked in salt solution at 100 mM, and *Proteus* sp. strian JBLS202 was selected. The JBLS202 significantly increased germination rate and growth of chinese cabbage (*Brassica rapa*) in salt stress conditions. For the parctical use, optimal concentrations and treatment methods were also assayed. The bacterium produced auxin and solubilized phosphate. However, the precise mechanism for the induction of salt tolerance needs more investigation.

[A-03]

Isolation and identification of halophilic hairy vetch root nodule bacteria for application on newly reclaimed land

Mi-Kyung Kwon, Jong-Ok Jang, Dong-Jin Park, Chang-Jin Kim*
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon, 305-333, Korea

Newly reclaimed land has high salinity and low-organic-matter soil content as a result of crop productivity fall. Hairy vetch is strong in the cold and can thus be grown on idle agricultural land in winter as a green manure crop. This is made possible by nitrogen fixation by the hairy vetch root nodule bacteria, especially for crops grown without the use of chemical fertilizers. This study was conducted to select root nodule bacteria for hairy vetch with halophilic and excellent nitrogen-fixing ability, for application on newly reclaimed land containing high salinity. Hairy vetch root nodules were collected from all over the country, and a total of 52 *Rhizobium* sp. isolates were isolated from the hairy vetch root nodules. Among these, 16 isolates grown on a yeast extract mannitol broth (YMB) medium supplemented with 0.5-5% NaCl were selected. These isolates were inoculated on a surface-sterilized hairy vetch seed grown for six to eight weeks, and bacteria were re-isolated from the root nodules formed via inoculation. As a result, after

one-time inoculation, the same isolates were confirmed in six isolates, which showed 99% homology to *Rhizobium etli* or *Rhizobium* sp. via ITS region sequencing of 16S rDNA. The results of this study suggested that the six isolates can be effectively used for the cultivation of hairy vetches in newly reclaimed land.

[A-04]

Functional analysis of (CAP-like protein) gene, *xoclP* in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Ulambayar Temuujin¹, Jong-KunKim¹, Deok-hun Moon¹, Byoung-MooLee² and Hee-Wan Kang¹
¹The Graduate School of Biotechnology and Information Technology, Hankyong National University; ²National Academy of Agricultural Science, Suwon 441-707, Korea

The CAP-like protein gene (cAMP-regulatory protein) was PCR amplified from *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10859 genome, cloned into TA-cloning vector and mutated by transposon insertion. Tn inserted *clp* gene was maker exchanged with target genes of wild type strain, yielding *clpxo::Tn5*. Pathogenicity of the mutant strains was assayed on susceptible rice variety, Milyang 23. The protein band of 28kDa was absent in extracellular secretion fraction of *clpxo::Tn5*, suggesting secretion of XoclP is dependent on TypeII secretion system. Interestingly, the secreted proteins were dramatically reduced in *clpxo::Tn5* compared to wild type and other mutant strains. Furthermore, wild type strain KACC10859 and *hrpX* mutant (*hrpX::Tn5*) were cultured in *hrp* inducing XOM2 medium. Total RNA samples extracted from them were subjected to Reverse transcriptase (RT)-PCR. *clpxo* primer set did amplify RT-PCR band in RNA sample of wild type strain, but not in that of *hrpX::Tn5*, indicating transcriptional expression of *clpxo* is regulated by *hrpX*.

B. Bacteriology and Bacterial Diseases

[B-01]

Functional analysis of the *aroE* gene encoding shikimate dehydrogenase from *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*

Eun-Sung Song¹, Young-Jin Park², Tae-Hwan Noh³ and Byoung-Moo Lee¹


Program and Abstracts

The 2011 KSPF Fall Meeting
& International Symposium
**Plant Pathology
for Sustainable Agriculture**

20_(Thu)~22_(Sat) October, 2011
Deogyusan Resort

Organized by | The Korean Society of Plant Pathology

Supported by | Jeollabuk-do
The Korean Federation of Science and Technology Societies

 The Korean Society of Plant Pathology

solanacearum, resulting in high sensitivity to hydrogen peroxide in *rpoS*- mutant. Therefore, the rapid decline of viable cells of wild type in a nutrient limited condition is likely due to the bacterial sensitivity to increased organic acids but not to oxidative stress.

<B-07>

Gene Expression and Ultrastructure of *Ralstonia solanacearum* in Copper Induced Viable but Nonculturable State

Hyun Gi Kong¹, Hae Young Um², Hyoung Ju Lee¹, Hye Kyung Choi², Eunsook Chung²,
Jai-Heon Lee², and Seon-Woo Lee^{1,2*}

¹Department of Applied Biology, Dong-A University, Busan 604-714, Republic of Korea; ²Department of Medical Bioscience (BK21), Dong-A University, Busan 604-714, Republic of Korea

Morphological analysis of viable but nonculturable (VBNC) state of plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* was performed in liquid microcosm treated with 200 μ M of copper. Supplemented copper sulfate has completely suppressed bacterial colony formation on culture media. However, analysis of the bacterial cells in liquid microcosm using LIVE/DEAD *bac* Light bacteria viability staining indicated that over 10% of bacteria cells maintained viability until 60 days. Ultrastructure analysis of the VBNC state cells using transmission electron microscopy revealed that poly--hydroxybutyrate granules were highly disintegrated and cellular ribosome contents were remarkably decreased in VBNC cells, probably resulting in dramatic reduction of ribosomal RNA content in VBNC state. In fact, total RNA contents were significantly decreased over time in VBNC state compared to culturable state. Interestingly, the VBNC cells were highly aggregated each other and surrounded by some unknown extracellular material. Reverse transcription PCR analysis showed that *dps* gene expression was up-regulated at the transcriptional level in VBNC cells, while expression of *rpoS* and *phcA* were not different. Dps protein expression in VBNC state may reflect oxidative stress response during starvation. When we compared H₂O₂ production between culturable cells and VBNC cells, H₂O₂ production was significantly increased in VBNC cells of *R. solanacearum*. The alteration in *dps* expression and bacterial ultrastructure in VBNC state suggested that VBNC state is physiologically unique state compared to culturable bacterial state of *R. solanacearum*.

<B-08>

Screening of Halophilic Hairy Vetch Root Nodule Bacteria with Effective Biological Nitrogen Fixation Ability

Mi-Kyung Kwon, Jong-Ok Jang, Zion Kang, Dong-Jin Park and Chang-Jin Kim*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon, 305-333, Korea

Hairy vetch is a strong legume in the cold and has been used as green manure crops. It lives in a close relationship with rhizobacteria to establish themselves in the roots of the plant. These bacteria take nitrogen from the atmosphere and make it available to the plant in a usual form. Treatment of appropriate rhizobia strains on seed is essential for nodulation and enhanced biological nitrogen fixation of hairy vetch. Newly reclaimed land has high salinity and low-organic-matter soil content as a result of crop productivity fall. This study was conducted to select root nodule bacteria for hairy vetch with halophilic, excellent nodule formation ability and effective biological nitrogen-fixing ability. We suggested that selected isolates can be appropriate rhizobia used for the cultivation of hairy vetches on inappropriate environment containing high salinity.

<B-09>

Characterization of a paired two-component signal transduction system that affects virulence and cell division in *Burkholderia glumae*

Bongsoo Lee, Hongsup Kim, Eunhye Goo, Young-Su Seo, Jae Hyung An, Moon Sun Jang, and Ingyu Hwang

Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

Burkholderia glumae causes rice panicle blight and possesses a quorum sensing (QS) system, which is mediated by *N*-octanoyl-homoserine lactone (C8-HSL) and its cognate receptor TofR. TofR/C8-HSL controls toxoflavin production which is a key virulence factor. In addition to toxoflavin as a virulence factor, we identified one of the paired two-component signal transduction systems (TCS), RisS (histidine protein kinase) and RisA (response regulator). The *risS* or *risA* mutant failed to induce hypersensitive response in tobacco plants. Mutants of *risS* and *risA* exhibited reduced virulence in rice, suggesting that RisA and RisS are important for pathogenicity of *B. glumae*. When we analyzed toxoflavin production of the *risS* or *risA* mutant, both mutants produced toxoflavin. This indicated that reduced virulence of both mutants is not due to lack of toxoflavin production. We hypothesized that loss of virulence of the *risA* mutant might be due to defects in growth and swimming motility since the mutant lost swimming motility at 28°C. In fact, the *risA* mutant had defects in cell division to form long filaments. The long filament type cells did not show swimming motility thereby exhibiting reduced virulence. However, it appears that RisS and RisA have common but distinct roles. A mutation in *risA* conferred a growth and cell division defects whereas a mutation in *risS* did not. Moreover, the *risS* mutant was highly sensitive to H₂O₂ compared to the *risA* mutant and showed non-directional motility of individual cells. Therefore, it is very likely that RisS might interact with more than one transcriptional regulator as partners in TCS. Taken together, a paired TCS, RisA and RisS, has multi-functional roles in physiological life as well as pathogenicity of *B. glumae*.



2012
GREEN
TECHNOLOGY
FORUM

2012 녹색기술포럼

www.greentechforum.or.kr



2012년 4월 3일(화) ~ 5일(목)

서울교육문화회관

주최 | 녹색성장위원회의, 국가과학기술위원회, 방송통신위원회, 기획재정부, 교육과학기술부, 문화체육관광부, 농림수산식품부, TIK, 지식경제부, 보건복지부, 환경부, 국토해양부, 발전산업진흥원, 소방청, R&A, NIA, 선진분, 중소기업청, 기상청

주관 | NRF 한국연구재단, KRCRC (한국연구재단의 후원으로 운영되는 한국연구재단 산하의 연구지원기관)

협력기관 | 한국콘텐츠진흥원, 농림수산물식품기술기획평가원, 한국에너지기술연구원, 한국산업기술평가관리원, 한국보건산업진흥원, 한국환경산업기술원, 한국건설교통기술평가원, 한국해양과학기술진흥원, 한국전자통신연구원, 국방과학기술연구소, 국립산림과학원, 중소기업기술정보진흥원, 국립기상연구소, 기상지진기술개발사업단

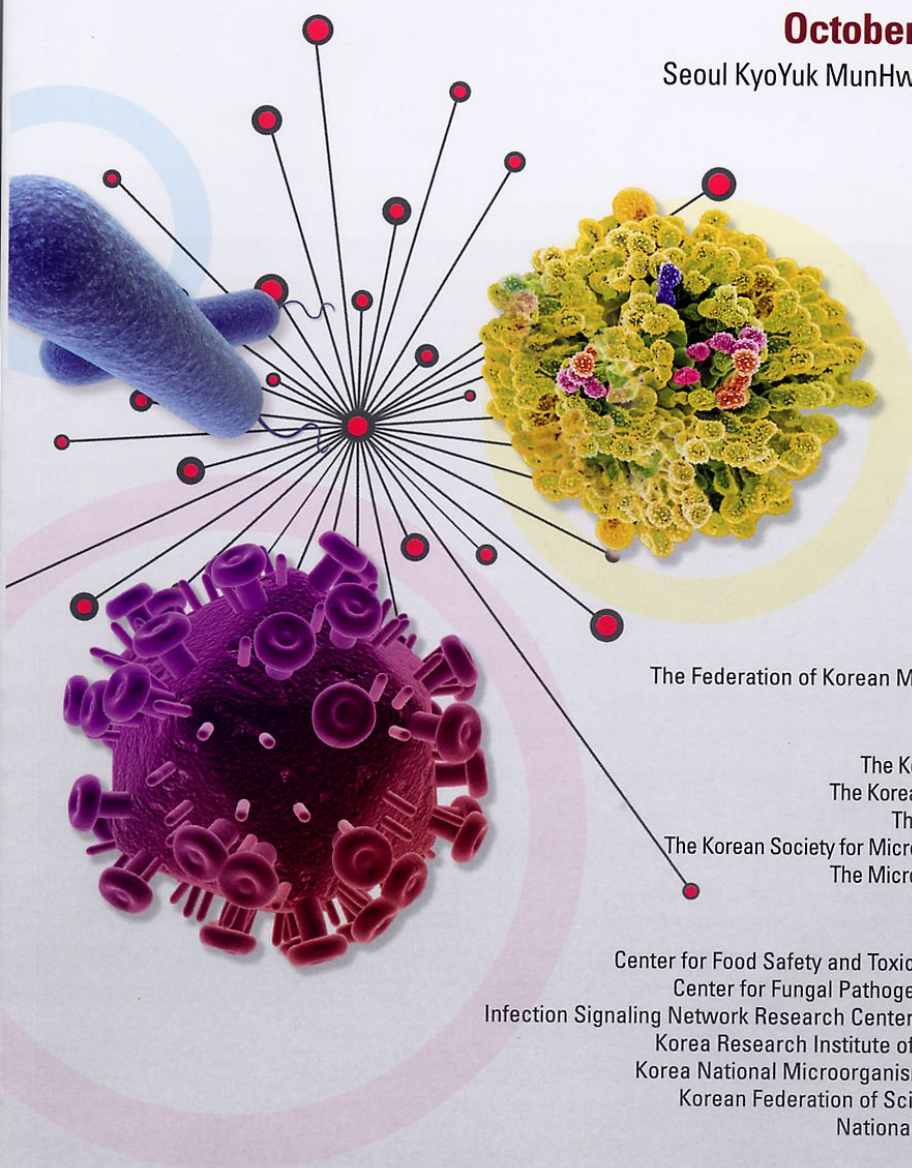
문의 | 발표 관련 TEL 042-860-3490 / krcrc@krcrc.re.kr, 등록 관련 TEL 042-860-3689 / jeanne@krcrc.re.kr, 주소 305-343 대전광역시 유성구 가정로 152 (장동가-2)

번호	세션	발표제목	발표자	소속기관
27	생태공간, 도시재생, 건물	새만금 노출간척지 염분차단공법	김도균	산림청 ✓
28		초고층빌딩 시공기술	김진호	포항산업과학연구원
29		나노 기술을 이용한 에너지 절약형 난연성 단열재 개발	김우년	고려대학교
30		알레르기 비염 마우스모델에서 집먼지 진드기를 이용한 경구면역요법의 효율성에 관한 연구	김수환	가톨릭대학교
31	친환경 식물성장 촉진기술	식물열 충격단백질의 작용기작의 규명 및 환경스트레스 내성작물의 개발을 위한 유전육종적 연구	안예진	상명대학교
32		벼 곰팡이병 발생 형질의 기능유전체학적 분석	이인원	서울대학교
33		벼의 환경 스트레스 저항성 유전자의 기능분석 및 분자유종	신정섭	고려대학교
34		Ethylene Antagonist 로서의 씨클로프로펜 유도체의 제품화	유상구	(주)룸바이오 테크놀로지
35		땅콩나물의 고품질 생산 체계확립과 기능성 제품 개발	강점순	부산대학교
36		종나방 내성 GM양배추의 수출용 계통 및 품종개발과 GM양배추의 환경 위해성평가 확립	한지학	(주)농우바이오
37		호염성 질소고정균을 이용한 헤어리베치 생육촉진 및 이를 통한 간척지 녹비화기술 개발	김창진	한국생명공학연구원
38		수직형 식물생산공장 자동화 시스템 개발	이공인	국립농업과학원
39		고성능/대용량 하이브리드 에너지 변환 시스템에 대한 연구	곽상신	중앙대학교
40		전력IT, 전기기기 효율향상	외부자계에 의한 자성나노유체의 매크로 및 마이크로 열-유체 제어기술 개발	이세희
41	전력IT 통합실증 기술개발 및 Test Bed 구축		황우현	한국전력공사
42	고속엘리베이터용 고효율기어리스 권상기개발		송준호	코리아엘텍
43	이차전지	나노 형상구조 제어를 통한 고출력 금속 산화물계 전극소재 개발	성영은	서울대학교
44		나노구조 전극을 채택한 고출력 이차전지에서의 SEI 형성제에 관한 연구	김재정	서울대학교
45		방사광 가속기 분석기술을 활용한 리튬이차전지용 고안전성/고용량 전극 소재 연구	정경윤	한국과학기술연구원
46		무가선 트램용 고용량 배터리 개발 및 전망	박정민	LG화학
47		금속 충전 리튬이차전지용 나노급 3차원구조 산화물계 양극재 개발	최수안	(주)엘앤에프신소재
48		850kW급 풍력발전기용 저전압수용운전(LVRT)을 위한 리튬이온 파워 모듈형 에너지저장장치개발	강정욱	아이셀시스템즈 코리아
49		고안전성 고용량 나시론 구조 리튬 양극 신물질 개발	강기석	서울대학교
50	태양전지	고효율 및 장수명을 위한 유기 태양 전지의 전하추출층 및 계면 조절 연구	이태우	포항공과대학교

2012년도
한국미생물학회연합 국제학술대회 **2012**

International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies

October 11 (Thu)~**12** (Fri), 2012
Seoul KyoYuk MunHwa HoeKwan, Seoul, Korea



Organized by

The Federation of Korean Microbiological Societies (FKMS)

Hosted by

The Korean Society of Mycology (KSMY)

The Korean Society for Microbiology (KSMi)

The Korean Society of Virology (KSV)

The Korean Society for Microbiology and Biotechnology (KMB)

The Microbiological Society of Korea (MSK)

Sponsored by

Center for Food Safety and Toxicology, Seoul National University

Center for Fungal Pathogenesis, Seoul National University

Infection Signaling Network Research Center, Chungnam National University

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

Korea National Microorganisms Research Resources Center

Korean Federation of Science and Technology Societies

National Research Foundation of Korea

B041

Polar and Alpine Microbial Collection (PAMC): A Culture Collection Dedicated to Polar and Alpine Microorganisms

Yung Mi Lee¹, GoHeung Kim¹, You-Jung Jung¹, Cheng-Dae Choe²,
Joung Han Yim¹, Hong Kum Lee¹, and Soon Gyu Hong^{1*}

¹Department of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute,
²BRN Science, Seoul National University

Microorganisms in polar areas may have important ecological roles in biogeochemical cycles and the food chain. Culture collections for polar and alpine microorganisms can provide research resources for ecological and physiological studies. The Polar and Alpine Microbial Collection (PAMC) is a specialized culture collection for maintenance and distribution of polar and alpine microorganisms. A database system was developed to share important data fields with DarwinCore2 and OBIS database schemas. Approximately 1,500 out of 5,500 strains maintained in PAMC have been identified and belonged primarily to the phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Proteobacteria*. Many of the microbial strains can grow at low temperature and produce proteases, lipases, and/or exopolysaccharides. PAMC provides search tools based on keywords such as taxonomy, geographical origin, habitat and physiological characteristics. Biological materials and information provided by PAMC will be important resources for ecological and physiological studies on polar and alpine microorganisms. [Supported by Korea Polar Research Institute (Grant PE06050, PE11030, and E411060)]

Keywords : polar and alpine microorganism, biodiversity, culture collection, physiological characteristics

B042

Production and Characterization of Xylanase from *Aspergillus niger* During Solid State Fermentation

Kathiravan Malthur Nadarajan¹, Sankaranarayanan Subramanian²,
Sun Il Seo¹, and Si Wouk Kim^{1*}

¹Department of Environmental Engineering, BK21 Team for Biohydrogen Production, Chosun University, ²Department of Chemical Engineering, A.C.College of Technology, Anna University, India

In this study, xylanase was produced from *Aspergillus niger* (MTCC 1344) during solid state fermentation (SSF) using wheat bran as a low cost substrate. In addition, the major factors influenced on xylanase extraction from SSF were optimized. From the experimental results, maximum xylanase activity (1460 U/g) was obtained from 14ml/g of extractant with 200 rpm for 2h. The xylanase was found to be active in a vast range of pH from 3.6 to 9. The optimum pH and temperature of xylanase were found to be 5 and 50 °C, respectively. The effect of metals ions and surfactants on xylanase activity was studied. The metal ions such as Ca²⁺ and Mn²⁺ stimulated its activity whereas, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ and Co²⁺ inhibited. On the other hand, the Hg²⁺ ions completely inhibited the activity of xylanase. Among the various surfactants, Tween 80 showed an increased trend. The extracted xylanase showed high specific activity to several xylans, of which birchwood xylan yielding the maximum activity. It was concluded that xylanase obtained in this study is very low-cost and also helpful in food and other industries.

Keywords : *Aspergillus niger*, xylanase, solid state fermentation, surfactants, metal ions

B043

Apply to New Reclaimed Land of Salt Stress Using Halophilic Rhizobium and Hairy Vetch

Jong-Ok Jang^{1,2}, Dong-Jin Park¹, Jae-Chan Lee¹, Chang-Keun Sung²,
Seon-Woong Hwang³, and Chang-Jin Kim^{1*}

¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, ²Department of Food Science and Technology Chungnam National University, ³Division of Reclaimed Land Agriculture Research, National Institute of Crop Science

Newly reclaimed land has high salinity and low-organic-matter soil content as a result a severe environment to crop and plant growth. Hairy vetch is strong in the cold and can thus be grown on idle agricultural land in winter as a green manure crop. Rhizobium is made possible that fix nitrogen after becoming established inside nodules of hairy vetches, especially for crops grown without the use of chemical fertilizers. This study was screening to root nodule rhizobium for hairy vetch with halophilic and excellent nitrogen fixing ability, for application on newly reclaimed land containing high salinity. And investigate NaCl resistance, nitrogen fixation activity and growth promoting effect of hairy vetch by halophilic rhizobium. As a result, showed effect of growth promote of hairy vetch at 0.3% or more of the salt concentration. We suggest that apply to new reclaimed land of high salinity and low-organic to rhizobium inoculated with hairy vetch.

[This research was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea]

Keywords : Hairy vetch, Rhizobium, Newly reclaimed land, Plant growth promotion, Halophilic

B044

Bacterial Community of Sediments from the Australian-Antarctic Ridge

Yung Mi Lee^{1,2}, Sung Hyun Park³, You-Jung Jung¹, Jongsik Chun², and
Soon Gyu Hong^{1*}

¹Division of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute, ²School of Biological Sciences, College of Natural Science, Seoul National University, ³Division of Polar Earth-System Sciences, Korea Polar Research Institute

Benthic bacterial communities in the ocean environment play significant roles in the biogeochemical cycle and remineralization of organic matters. In this study, the bacterial community of surface sediments from Australian-Antarctic Ridge (AAR) was revealed by 454 pyrosequencing method. Bacterial communities inhabiting the sediments of AAR were highly diverse, covering 39 different taxonomic groups at the phylum level. Among 39 phyla and candidate phyla, *Gammaproteobacteria*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, and *Gemmatimonadetes* were dominant comprising approximately 85–88% of bacterial community. 16S rDNA sequences of major OTUs with 1% or higher abundance showed high similarity (96.6% ~ 100%) with uncultured environmental sequences which were mostly recovered from sediments of various areas of Arctic Ocean, Southern Ocean, Atlantic Ocean, Indian Ocean, Pacific Ocean, etc, which implies that they represent taxonomically novel groups of bacteria and their function and physiology are mostly unknown and marine sediments were the most important source of the major OTUs.

Keywords : Benthic bacterial communities, Australian-Antarctic Ridge, Pyrosequencing

Microbiology and Beyond **2013**
INTERNATIONAL MEETING of
the MICROBIOLOGICAL
SOCIETY of KOREA

May 1 (Wed.) ~ **3** (Fri.), 2013
Chonbuk National University, Jeonju-si, Jeollabuk-do, Korea

PROCEEDINGS

Hosted by
The Microbiological Society of Korea

Sponsored by
Jeollabuk-do Province
CJ CheilJedang Corp.
CELL BIOTECH
CELLTRION
Chonbuk National University
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
Korean Federation of Science and Technology Societies

www.msk.or.kr

B009

Pyrosequencing-Based Analysis of Bacterial Community and Metabolites Profiles in Korean Traditional Seafood Fermentation: a Flatfish-Fermented Seafood

Jaejoon Jung¹, Se Hee Lee², Hyun Mi Jin², Che Ok Jeon², and Woojun Park^{1*}
¹Department of Environmental Science and Ecological Engineering, Korea University, ²Department of Life Science, Chung-Ang University

Bacterial community and metabolite profiles were analyzed in a flatfish jeotgal (gajami sikhae), a traditional Korean fermented seafood made featured by the addition of a white radish at the middle stage of fermentation. The copy number of 16S rRNA gene increase from 10^{12} to 10^{14} copies/100 ng DNA during fermentation as the pH decreased from 6.0 to 4.5. Barcoded pyrosequencing revealed lower bacterial diversity in white radish-added samples; the bacterial community mainly consisted of *Lactobacillus* and *Weissella*. In the absence of white radish, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, and *Serratia* comprised the minor group. ¹H-Nuclear magnetic resonance showed that fructose, glucose, maltose, and mannitol levels decreased when white radish was added. However, these compounds were observed at relatively higher levels in samples to which white radish was not added. Our data suggest that the addition of white radish is important in the establishment and succession of bacterial and metabolite profiles during fermentation.

[This work was supported by a grant from the Next-Generation BioGreen 21 Program (PJ00820803), Rural Development Administration, Republic of Korea]

B011

Growth Promoting of Hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) Using *Rhizobium* sp. RH84 under the Reclaimed Soil Condition

Jong-Ok Jang^{1,2}, Dong-Jin Park¹, Chang-Keun Sung²,
 Seon-Woong Hwang³, and Chang-Jin Kim^{1*}
¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, ²Department of Food Science and Technology Chungnam National University, ³Div. of Reclaimed Land Agriculture Research, NICS

The reclaimed land has a high salt and low organic matter content of soil as a result of crop productivity falls. Hairy vetch is strong in the cold can be grown from idle agricultural land in winter as a green manure crop and nitrogen fixation by root nodule bacteria, especially of crops grown without chemical fertilizer makes possible. This study was conducted to select root nodule bacteria for hairy vetch with halophilic, excellent nodulation effectiveness and nitrogen-fixing ability, for application on environment containing high salinity. Hairy vetch root nodules were collected from all over the country, and *Rhizobium* sp. RH84 was isolated from the hairy vetch root nodules. And then *Rhizobium* sp. RH84 was inoculated on surface sterilized hairy vetch seeds, we planted seeds in small and large scale pot containing reclaimed soil and reclaimed land scale. As a result, *Rhizobium* sp. RH84 was growth promoting of hairy vetch and more detailed results will be presented at the poster session.

[This research was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea]

B010

Novel Cytochrome P450 Involving in Biotransformation of 2-Hydroxyphenylacetate in *Comamonas testosteroni* Strain P19

Si Nae Lee¹, Kui-Jae Lee^{1,2}, and Jong-Chan Chae^{1,2*}
¹Division of Biotechnology, Chonbuk National University, ²Advanced Institute of Environment and Bioscience, Chonbuk National University

Comamonas testosteroni strain P19 was originally isolated as a biphenyl degrader and capable of degrading several aromatic compounds as a sole source of carbon and energy. Using plasposon mutagenesis, we isolated a mutant strain which lost the ability to degrade 2-hydroxyphenylacetate (2HPA). Whereas the mutant strain was not grown in the presence of 2HPA as a sole carbon source, it was grown in analogous compounds, 3-hydroxyphenylacetate (3HPA) and 4-hydroxyphenylacetate (4HPA). The strain had a mutation on a gene exhibiting highest identity with cytochrome P450 (CYP). The deduced protein is composed of domains for cytochrome P450, ferredoxin reductase, and ferredoxin indicating that it is multifunctional for hydroxylation and electron transfer. The transcription of CYP gene was induced 200 folds by 2HPA, but not by 3HPA or 4HPA. The transformation of 2HPA to homogentisate was observed in resting cell assay performed with recombinant *E. coli* harboring CYP gene. Consequently the novel CYP plays a key role in hydroxylation of 2HPA in strain P19.

[This work was supported by grant from KRF.]

B012

Newly Isolated *Enterobacter* sp. KE1 Facilitates the Growth and Improves the Salt Stress Tolerance in *Arabidopsis* and Tomato

Kangmin Kim, Eunji Kim, Yejin Jang, Gunwoong Lee, Kui-Jae Lee,
 and Jong-Chan Chae
 Division of Biotechnology, College of Environmental & Bioresource Sciences, Chonbuk National University

Microbiota in the niche of rhizosphere and endosphere zone can affect the plant growth and responses to environmental stressed conditions via mutualistic or commensalistic interactions with host plants. Specifically, some beneficial bacteria, collectively called as PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), increase the plant biomass and innate immunity potential. Here, we report that a bacterium newly isolated from sea china pink (*Dianthus japonicus thunb*) in reclaimed Gyeheung-do in Korea, *Enterobacter* sp. KE1, improved the vegetative growth as well as salt stress tolerance of *Arabidopsis* and tomato. *Enterobacter* sp. KE1 utilized the ACC as a sole carbon source and also exhibited the common properties of PGPRs like cellulose activity, phosphate solubilization, and siderophore production. In the presence of 200 mM NaCl, the isolate conferred the increased fresh weight, dry weight, and plant height of *Arabidopsis* and tomato. In the molecular level, the enhanced tolerance against salt stresses was correlated with the increased expression levels of salt stress responsive genes (i.e. *DREB2* and *RAB18*). GFP-tagged version of KE1 displayed the colonization inside of vascular tissues in plants. In conclusion, current data strongly suggest that newly isolated *Enterobacter* sp. KE1 is likely an endophyte and positively modulates the salt stress tolerance of plants via conserved stress responsive signaling pathways against salt stresses in plants.

[Supported by grants from NRF, MEST (No. 2011-0020202)]

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 지금까지 일반적 환경에서 서식하는 질소고정 미생물에 대한 연구는 많이 보고되었지만, 호염성 질소고정 미생물과 관련해서는 거의 연구된 바가 없다[직접 문헌 검색 확인한 결과 및 질소고정 미생물 분야 세계적 전문가인 Michael Sadowsky(Minnesota 대학) 교수로부터 확인].
- 식물분야에서는 내염성 유전자 도입에 의한 내염성 식물 종을 개발하고 있으나, 식물자체적인 연구 방법은 현장 적용 및 적응상의 문제점 및 불안전성(LMO)이 있다.
- 현재까지 국내외적으로 "특수환경미생물"분야 연구는 고온성미생물 분야에 집중되어 왔고, 호염성미생물에 대한 연구와 개발은 세계적으로도 초기 단계이다.
- 중국의 간척지에서 세스바니아의 재배와 이용 기술에 대한 보고가 있고, 녹비의 목적으로 벼 단작 지역의 자운영 재배와 이용 기술 또는 친환경 쌀 생산 기술에 대한 연구가 있다.
- PGPR(Plant Growth Promoting Rhizobacteria)에 대한 연구는 1980년대부터 최근까지도 연구 범위가 넓고 활발하게 진행되고 있다. 특히 최근에는 식물과 미생물간의 상호 작용에 의한 식물체의 생육 증가, NGS 분석을 통한 미생물의 군집 변화 등에 대한 연구가 활발하다.

제 7 장 참고문헌

1. 강종국 외 (2011) 간척지 녹비작물 활용기술. 농촌진흥청 국립식량과학원.
2. 백승화, 이상욱, 김대근, 허종욱, 김성조 (2008) 새만금 간척지에서 석고, 팽화왕겨 및 제올라이트 처리가 토양 중 양이온 함량에 미치는 영향. *Korea Journal of Environmental Agriculture*. 27, 4, 321-327.
3. 이분희 외 (2002) 한국의 간척지 농업. 농촌진흥청 호남농업시험장.
4. Alexander, M. (1991) Introduction to soil microbiology. Krieger Pub Co.
5. Bergersen, F. J. and Turner, G. L. (1976) The role of O₂-limitation in control of nitrogenase in continuous cultures of *Rhizobium* sp.. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 73, 524-531.
6. Dazzo, F. B. and Hrabak, E. M. (1981) Presence of trifoliin A, a rhizobium trifolii binding lectin, in clover root exudate. *J. Surranomol. Struct. Cell. Biochem.* 16, 133-138.
7. Dontsova, K. M. and Norton, L. D. (2002) Clay dispersion, infiltration and erosion as influenced by exchangeable Ca and Mg. *Soil. Sci.* 163, 184-193.
8. Egamberdieva D, Berg G, Lindstrom K, and Rasanen LA. (2012) Alleviation of salt stress of symbiotic *Galega officinalis* L. (goat's rue) by co-inoculation of *Rhizobium* with root-colonizing *Pseudomonas*. *Plant soil*.
9. Gharzouli, R., Carpena, M.-A., Couderc, F., Benguedouar, A., and Poinot, V. (2012) Relevance of Fucose-rich extracellular polysaccharides produced by *Rhizobium sullae* strains nodulating *Hedysarum coronarium* L. legume. *Appl. Environ. Microbiol.* 79.
10. Glenn, E. P., Brown, J. J., Blumwald, E. (1999) Salt tolerance and crop potetial of halophytes, *Crit. Rev. Plant Sci.* 18, 227-255
11. Gordon SA and Weber RP (1951) Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol.* 26, 192-195.
12. Hameeda BG, Rupela OP, Wani SP, and Reddy G (2008) Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composte and macro-fauna. *Microbiol. Res.* 163, 234-242.

13. Kim JG, Chung ES, Lim YC, Seo S, Kim MJ, and Kim JD (2004) Studies on the comparison of agronomic characteristics and productivity in induced vetch cultivar. *J. Korean Grassl. Sci.* 24, 177-182.
14. Kirchhof G, Reis VM, Baldani JJ, Eckert B, Dobereiner J, and Hartmann A (1997) Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plant. *Plant and Soil* 194, 45-55.
15. Laskowski M, Williams M, Nusbaum H, and Sussex I (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development.* 121, 3303-3310.
16. Lebron, I., Suarez, D. L. and Yishiba, T. (2002) Gynsum effect on the aggregate size and geometry of three sodic soils under reclamation. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66, 92-98
17. Long, S. R. (1996) Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* 8, 1885-1898.
18. Mayfield, A. (1999) *Namoi woolly pod vetch dynamic spring pasture*. Kondinin Group, Australia.
19. Mothapo NV, Grossman JM, Maul JE, Shi W, and Isleib T (2013) Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) genotypes. *APPL SOIL ECOL.* 64, 201-213.
20. Mueller T and Thorup-Kristensen K (2001) N-fixation of selected green manure plants in an organic crop rotation. *Biol Agric Hort* 18, 345-363.
21. Niu, X., Bressan, R. A., Hasehawa, P. M., Pardo, J. M. (1995) Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* 109, 735-742
22. Ott, T., Van Dongen, J. T. Gnther, C. Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., and Udvardi, M. K. (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation on legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* 15, 531-535
23. Provorov, N.A. and Tikhonovich, I.A. (2003) Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis. *Genet Resour Crop Evol.* 50, 89-99.
24. Reinhardt D, Mandel T, and Kuhlemeier C (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* 12, 507-518.

25. Ryoo, J. W. (2008) Growth characteristics and green manure productivities of hairy vetch and woolly pod vetch under different sowing seasons in the highland area. *Kor. J. Organic agric.* 16, 409–420.
26. Safronova VI, Piluzza G, Zinovkina NY, Kimeklis AK, Belimov AA, and Bullitta S (2012) Relationships between pasture legumes, rhizobacteria and nodule bacteria in heavy polluted mine waste of SW Sardinia. *Symbiosis* 58, 149–159.
27. Schwyn B and Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochem.* 160, 47–56.
28. Shainberg, I., Summer, M. E., Miller, W. P., Farina, M. P. W., Pavon, M. A. and Fey, M. V. (1989) Use of gypsum on soils: A review p. 2–111. In Stewart, B. A. (ed.) *Advances in soil science*. Springer–Verlag, New York.
29. Shobha G and Kumudini BS (2012) Antagonistic effect of the newly isolated PGPR *Bacillus* spp. on *Fusarium oxysporum*. *Int. Journal of Applied Science and Engineering Research.*, 463–474.
30. Stewart, B.A. (1987) *Advances in Soil Sciences*. In Smith, M.S.;Frye, W.W., and Varco, J.J. (eds.), *Legume winter cover crops* . Springer–Verlag, New York, USA, Vol. 7, pp. 95–139.
31. Sparks, D. L. (1995) *Environmental soil chemistry*. Academic Press, San Diego.
32. Tobert HA, Reeves DW, and Mulvaney RL (1996) Winter legume cover crop benefits to corn rotation vs. fixed–nitrogen effects. *Agron.J.* 88, 527–535.
33. Yang, C.H., Lee, J.H., Beak, N.H., Jeong, J.H., Cho, K.M., Lee, S.B., and Lee, G.B. (2012) Incorporation effect of green manure crops on improvement of soil environment on Saemangeum reclaimed land during Sorghum x Sudangrass hybrid cultivation. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 45, 744–748.
34. Yeo, A. R. (1998) Molecular biology of salt tolerance in the context of whole–plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49, 915–929.