

11-15430
00-00235
0-01

발간등록번호

11-1543000-002350-01

포스트게놈다부처유전체사업 R&D Report

미생물 유전체 기능분석 및 토성 작물 맞춤형 생물비료 개발 최종보고서

2018

농림축산식품부

미생물 유전체, 기능분석 및 토성
작물 맞춤형 생물비료 개발
최종보고서

2018. 11. 9

주관연구기관 / 충북대학교
협동연구기관 / (주)흙살림

농림축산식품부

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처 미생물유전체사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처 미생물유전체사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물 유전체, 기능분석 및 토성, 작물 맞춤형 생물비료 개발”(개발기간 : 2014. 8. 23 ~ 2018. 8. 22)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 8. 20.

주관연구기관명 : 충북대학교 (대표자) 윤 여 표 (인)
협동연구기관명 : (대표자) (인)
참여기관명 : (주) 흙살림 연구소 (대표자) 최 관 호 (인)

주관연구책임자 : 사 동 민
협동연구책임자 : 이 이
참여기관책임자 : 최 관 호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	914004-4	해 당 단 계 연 구 기 간		단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	포스트게놈다부처유전체사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	미생물 유전체, 기능분석 및 토성, 작물 맞춤형 생물비료 개발			
연구책임자	사 동 민	해당단계 참여연구원 수	총: 16명 내부: 16명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 220,000천원 민간: 73,500천원 계: 268,500천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 40명 내부: 40명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 830,000천원 민간: 275,500천원 계: 1,105,500천원
연구기관명 및 소속부서명	충북대학교 농업생명환경대학			참여기업명 (주) 흙살림	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일 반
-------------------------	-----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품중	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약 (연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

■ 생물비료의 현장 활용을 증대시키고 경제적 및 고효율적인 상토첨가용 생물비료를 개발

- 다양한 환경을 가지는 지역의 토양 및 식물로부터 분리한 미생물유전자 중 식물생장촉진 효능이 우수한 균주를 선정하여 총 20종의 유용 미생물 유전자원을 확보
- 우수한 미생물 유전자원을 2차 선발하여 유전자원의 접종에 따른 토마토 내 식물생장촉진 효능 및 식물체 내 균집능을 확인
- 생물비료의 시비효과를 증대시키기 위해 메타분석을 이용하여 토양 pH, 유기물, 작물의 생육주기 및 유형, 생물비료의 시비방법 및 재배조건 그리고 생물비료 별 (*Bacillus*, *Pseudomonas*) 접종효과를 분석하여 생물비료의 최적 시비효과 분석
- 경제적이고 친환경적인 생물비료의 개발을 위해 선발한 미생물 유전자원의 최적배지 및 에너지원을 선정하여 경제적인 대량배양 기술 확립
- Chitosan bead를 포함한 생물비료의 제형화를 통해 이용하여 생물비료의 보존기한 증대 및 국내 육묘장에서 다양한 작물 및 상토용 시비효과 증대
- 최종 생물비료를 선정하여 비료공적규격을 통해 고품질의 상토첨가용 생물비료를 개발, 제품화 (제품명 : 잘자라골드)하여 사업화
- 우수 미생물 유전자원의 명확한 식물생장촉진 효능 및 유전체를 분석하기 위해 5종의 미생물 유전자원을 선정하고, *de novo sequencing* 및 *assembly*를 통해 전략 미생물 유전자원의 파이프라인 구축 및 최적화
- 구축된 파이프라인을 통해 유용 미생물 유전자원의 식물생장촉진 활성 기능 관련 유전체 분석
- 유용 미생물 유전체 5종 분석 및 데이터 NABIC 등록

■ 연구성과

- 국내 특허를 출원 5건, 등록 5건, SCI 논문 6편, 비SCI 논문 7편, 학술발표 57건, 연구인력 20명 양성 전문일간지 홍보 2건

보고서

면수 : 146

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>생물비료 개발을 위한 유전자원 수집 및 효능 분석, 보유 미생물 유전자원을 이용한 생물비료 개발, 다양한 토성, 작물별 생물비료 효능 메타분석 및 경제적인 대량생산을 통한 생물비료를 제조하고 신종 유용미생물의 유전체 분석을 이루어 다양한 기능의 생물비료 개발을 위한 유전자원을 확보하려 한다. 또한 생물비료 현장 활용기술을 보급하고 산업화하여 경제적이고 고효율적인 상토첨가용 생물비료를 개발하고자 한다.</p>			
<p>연구개발성과</p>	<p>본 연구에서는 생물비료의 현장 활용을 증대시키고 경제적 및 고효율적인 상토첨가용 생물비료를 개발하기 위해 먼저 다양한 환경을 가지는 지역의 토양 및 식물로부터 분리한 미생물유전자 중 식물생장촉진 효능이 우수한 균주를 선정하여 총 20종의 유용 미생물 유전자원을 확보하였다. 이 중에서 가장 우수한 미생물 유전자원을 2차 선발하여 유전자원의 접종에 따른 토마토 내 식물생장촉진 효능 및 식물체 내 균집능을 확인하였다. 이러한 생물비료의 시비효과를 증대시키기 위해 메타분석을 이용하여 토양 pH, 유기물, 작물의 생육주기 및 유형, 생물비료의 시비방법 및 재배조건 그리고 생물비료 별 (<i>Bacillus</i>, <i>Pseudomonas</i>) 접종효과를 분석하여 생물비료의 최적 시비효과를 분석하였다. 보다 경제적이고 친환경적인 생물비료의 개발을 위해 선발한 미생물 유전자원의 최적배지 및 에너지원을 선정하여 경제적인 대량배양 기술을 확립하였고, Chitosan bead를 포함한 생물비료의 제형화를 통해 이용하여 생물비료의 보존기한 증대 및 국내 육묘장에서 다양한 작물 및 상토용 시비효과를 증대시켰다. 최종 생물비료를 선정하여 비료공적규격을 통해 고품질의 상토첨가용 생물비료를 개발, 제품화 (제품명 : 잘자라골드)하여 사업화를 완료하였다. 선정된 우수 미생물 유전자원의 명확한 식물생장촉진 효능 및 유전체를 분석하기 위해 5종의 미생물 유전자원을 선정하고, <i>de novo sequencing</i> 및 <i>assembly</i>를 통해 전략 미생물 유전자원의 파이프라인 구축 및 최적화를 수행하였다. 구축된 파이프라인을 통해 유용 미생물 유전자원의 식물생장촉진 활성 기능 관련 유전체 분석을 완료하였다. 또한 유용 미생물 유전체 분석 데이터를 NABIC에 등록하였다. 이와 같은 4년간의 연구 활동에 대한 우수한 결과를 인정받아 국내 특허를 출원 5건, 등록 5건, SCI 논문 6편, 비SCI 논문 7편, 학술발표 57건, 우수한 연구인력 20명을 양성하였으며, 전문일간지에 본 연구에 대한 홍보를 2건 완료하였다.</p>			
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>본 연구를 통해 식물생장촉진 효능이 우수한 상토첨가용 생물비료의 유전체를 명확하게 규명하여 경제적이고 친환경적인 생물비료의 개발이 가능할 것이다. 이러한 경제적이고 효율적인 생물비료 사용기술의 확립은 고효율 생물비료의 현장 적용을 보다 확대시킬 것이며, 건전 작물재배 기술 및 화학비료 절감 등의 작물 생산 기술을 개발하는 기반이 될 것이다. 또한 학문적으로는 메타분석을 이용하여 여러 가지 환경요인에 따른 토성 및 작물 재배조건에 따른 생물비료의 데이터베이스 구축이 가능할 것이며, 생물비료 사용매뉴얼 등의 작성을 통해 생물비료에 대한 농가의 불신을 회복이 가능할 것으로 사료된다.</p>			
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>미생물 유전체</p>	<p>생물비료</p>	<p>메타분석</p>	<p>대량생산</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Microbial genome</p>	<p>Biofertilizer</p>	<p>Meta analysis</p>	<p>Mass production</p>

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	8
2. 연구수행 내용 및 결과	13
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	120
4. 연구결과의 활용 계획 등	123
붙임. 참고 문헌	138

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

우리나라는 전반적으로 미생물 유전체에 대한 연구가 미흡한 실정으로 새로운 미생물 유전 자원의 확보와 미생물 유전체 염기서열 해석과 유전체간 유전정보 비교·분석 등의 유전체학적 연구방법이 필요하다. 또한 친환경농업 확산에 따른 미생물제제 개발 필요성이 증가하고 있으나 효능 및 작용 기작에 대한 정보가 미흡하고 정확한 효과가 입증되어 있지 않아 미생물 비료에 대한 농가의 불신을 초래하는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 생물비료 개발을 위한 유전자원 수집 및 효능 분석, 보유 미생물 유전자원을 이용한 생물비료 개발, 다양한 토성, 작물별 생물비료 효능 메타분석 및 선발 미생물 대량생산을 통한 생물비료를 제조하고 신종 유용미생물의 유전체 분석을 이루어 다양한 기능의 생물비료 개발을 위한 유전자원을 확보하려 한다. 또한 생물비료 현장 활용기술을 보급하고 산업화하여 경제적이고 고효율적인 생물비료를 개발하고자 한다.

1-2. 연구개발의 필요성

최근 생명공학연구의 중심은 유전체, 단백질체 분석과 생물정보 분석을 통한 생명현상의 해석이며, 이러한 자원과 정보를 바탕으로 새로운 신소재를 개발하기 위한 연구개발이 주목받고 있다. 유전체 (genome)는 유전자 (gene)와 염색체 (chromosome)를 합성한 단어이며, 유전체 연구는 생물체의 구성 및 생존에 필요한 모든 요소를 합성하는 암호화된 DNA를 발굴하고, 이들의 염기서열을 밝히고 분석하여 궁극적인 생명현상을 이해하거나 필요한 용도로 활용하기 위하여 조작 또는 가공하는 모든 것을 의미한다. 미생물은 지구 생태계의 근간을 이루고 있으며, 그들의 다양한 물질 대사 능력과 상호작용은 중요한 산업용 소재를 제공해 준다. 따라서 미생물 유전체 연구는 이런 미생물의 지구 생태계 내의 역할을 이해하고 응용한다는 측면에서 중요한 역할을 한다고 할 수 있다. 해외 미생물 유전체 연구기관과 투자 현황을 살펴보면 미국은 에너지성 (DOE), ONR, NIDCR, DARPA, NSF, NIAID, OBER, USDA, 국립보건원 (NIH)으로 가장 다양하며, 한 해의 국가 총 연구개발투자비의 21.5%에 해당하는 178억 달러를 NHGRI와 NCI 등 16개 기관을 지휘하고 있는 NIH에 투입한 바 있다. 유럽연합의 경우 European&Canadian Consortium에서 공동으로 지원하고, 독일의 Ministry of Lower Saxony, BYK Gulden, BMBF, FASF, 네덜란드 NWO, 벨기에 Region Wallonne, 스웨덴 SSF 등에서도 미생물 유전체 연구를 적극 지원하고 있다. 그 밖에 브라질에서는 FAPESP에서, 아시아는 일본 NITE과 중국 CNCBD, Chinese Ministry of Public Health 등에서 국가적으로 미생물 유전체 연구를 지원하고 있다. 우리나라는 2001년을 ‘생명공학의 해’로 선언한 이후 B-KOREA를 건설하기 위해 연간 50억 원을 지원하고 100명이 참여하는

국가유전체 센터를 통해 인간/동물·식물/미생물 유전체 및 생물정보학 연구에 관한 정보 및 인력을 통합·관리하겠다는 계획을 발표했다. 그러나 유전체 연구의 경우 집중적인 연구비 투자가 요구되기 때문에 전반적으로 미생물 유전체에 대한 연구가 미흡한 실정이며 분석하고 있는 미생물 균주도 이미 외국에서 분석이 완료된 균주이기 때문에 국내 생명공학 및 제약 산업에서 빠른 시일 내에 효과를 거둘 수 있는 경쟁력 있는 새로운 미생물 유전자원의 확보와 미생물 유전체에 대한 연구가 절실하다. 또한 미생물과 식물 간 상호작용의 기작을 연구하는 연구수단으로 미생물 유전체 염기서열 해석과 유전체간 유전정보 비교, 기능 유전체 분석 등의 유전체학적 연구방법이 필요하다. 국내에서는 친환경농업 확산에 따른 미생물제제 개발 필요성이 증가하고 있으나 효능 및 작용 기작에 대한 정보가 미흡하고 유통기간 및 정확한 효과가 입증되어 있지 않아 현재 유통 중인 미생물비료의 효과 재현 실패로 인하여 농가의 불신을 초래하는 실정이다. 실제 한국 바이오협회에서 실시한 2007~2010년도 바이오산업 통계에 따르면 전국의 농가 109호를 대상으로 설문 실시한 결과, 미생물제제의 이용에 있어 가장 큰 문제점으로 높은 가격 (31.2%), 사용 및 관리의 불편함 (26.6%), 품질 및 효능의 불확실성 (22.0%), 사용 및 관리 방법에 대한 정보부족 (17.4%) 순으로 나타났다. 이에 따라 국내환경에 적합한 생물비료 개발 및 활용 기술체계를 확립하고, 친환경농업의 경쟁력을 강화하기 위한 생물비료용 전략 미생물 유전체의 구조 및 작용기작을 명확하게 규명함으로써 고효율적인 생물비료 생산 기술 및 체계적 사용방법 개발이 요구된다.

1-3. 연구개발 범위

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
미생물 분리 및 선발	- 유용 미생물 유전자원의 분리 및 특성 분석	- 근권 토양으로부터 미생물 유전자원의 분리 - 분리 미생물 유전자원의 계통학적 및 생리·생화학적 특성 분석 - 근권 토양의 이화학적 특성분석
식물생장촉진 효능 확인	- 분리 미생물 유전자원의 식물생장촉진 효능 확인	- 분리 미생물 유전자원의 식물생장촉진 효능 확인
	- 분리 미생물의 성장패턴 분석	- 분리 균주의 저온 내성 및 온도에 따른 성장패턴 분석 - 지방산 분석 및 에너지원 형태 분석
식물생장촉진 미생물 선발	- 보유 미생물 중 식물생장촉진 미생물의 2차 선발	- 보유 미생물 중 식물생장촉진능이 우수한 미생물 2차 선발
우수 미생물 유전자원 확보	- 분리 및 기 보유 미생물 중 우수 미생물 유전자원 확보	- 분리 및 기 보유 미생물 유전자원 중 식물생장 촉진 효능이 우수한 미생물 유전자원 20종 확보

미생물 유전자원 접종 효과 확인	- 선발 미생물 유전자원의 식물생장촉진 효과 확인	- 선발 미생물 유전자원의 접종에 따른 토마토 종자발아 및 유묘 성장촉진 효과 확인 - 선발 미생물 유전자원의 토마토 저온내성 증진 효과 확인
미생물 유전자원의 균집능 확인	- 형질전환 미생물을 이용한 미생물 유전자원의 균집능 확인	- Triparental conjugation을 이용한 선발 식물 생장촉진 미생물 유전자원 형질전환 및 gfp 활성 측정
		- CLSM을 이용하여 gfp 형질전환 미생물의 토마토 뿌리 내 균집 확인
메타분석을 이용한 생물비료 시비효과 확인	- 다양한 생물비료 시비효과 최적 토양 pH 조건 확립	- 다양한 생물비료 및 작물별 시비효율 최적 토양 pH 조건 확립
	- 다양한 생물비료 시비효과 최적 토성 및 유기물 함량 조건 확립	- 다양한 생물비료별 시비효율 극대화 토양 유기물 함량 조사 - 다양한 생물비료별 시비효율 극대화 토성 조사
	- 작물 특성별 생물비료 시비 효과 최적 조건 확립	- 식물 생육주기 및 유형별 생물비료 시비 효율 비교 분석
	- 식물 배양조건에 따른 생물 비료 효과 최적화 조건 확립	- 미생물 유전자원 시비방법 및 재배조건에 따른 생물비료 시비 효율 비교 분석
미생물 대량배양	- 선발 미생물 유전자원의 대량 배양 기술 확립	- 대량배양에 적합한 미생물 유전자원의 에너지원 선발 - 대량배양에 적합한 미생물 유전자원의 배지 최적화
생물비료 기능향상 및 보존 기한 증대	- 생물비료 기능향상 및 보존 기한 증대 기술 개발	- Chitosan 과 alginate를 이용한 생물비료의 저장 수명 향상에 적합한 첨가제 선별
		- 선발 첨가제의 최적 처리농도 탐색
		- 토양 내 생물비료의 생존율 비교 분석
		- Chitosan과 alginate를 이용한 생물비료의 토양 내 분해능 분석
식물생육촉진 효과	- 생물비료의 제조형태 및 첨가제에 따른 식물생육촉진 효과 분석	- Chitosan과 alginate bead를 이용하여 생물 비료의 제조형태 및 첨가제에 따른 토마토 육묘 성장촉진 효과 분석

생물비료의 대량배양 최적화 및 제형화 개발	- 액상 생물비료 경제적인 제조방법 개발	- 대량 합성 배지에서 경제적 대량 배양을 위한 산업용 배지를 활용한 배양 최적화
	- 분상 및 입상 생물비료 제조법 및 보존기한 증대 방법 개발	- 경제적 대량 생산을 고려한 입상 원료의 선택 과 입상원료 + 액상비료를 선택 후 보존 기한 증대법 탐색
	- 액상, 분상 및 입상 생물비료 제조 및 보존기한 증대 시험	- 제오라이트, 황토, 규조토, 벤조나이트를 이용한 생물비료 제품화 방안 검토 - 생물비료의 보존기한 증대를 위해 분상 및 액상 보존기한 증대법 개발
선발 생물비료의 작물 생육촉진 효과	- 생물비료의 작물별 초기 생육촉진 효과 확인	- 선발 생물비료의 접종이 토마토, 호박, 오이의 생장에 미치는 효과 확인
	- 재배시험 및 비제시험	- 저면관수장치에 의한 토마토 정식 후 재배시험 - 작물생육 및 토양관리용 유기자재 공시 위한 5작물에 대한 비제시험
최종 생물비료 선발 및 등록	- 최종 선발 미생물 유전자원의 미생물제제 등록 및 제품화	- 비료공정규격 및 비료관리법에 의거 선발 생물비료 토양미생물제제 등록 및 제품화 완료
생물비료 개발을 위한 전략 미생물 유전체 해독 및 유용유전자 분석	- 전략 미생물 유전체 <i>de novo sequencng</i> 을 위한 미생물 선정	- 다양한 지역의 근권으로부터 분리된 미생물의 형태학적, 생리 생화학적인 특성 분석 - 질소 고정능, 인산 가용화능 등의 식물생장촉진 활성을 가진 미생물 분리
	- 전략 미생물 3종 <i>de novo sequencing</i>	- PacBio RS II 시스템을 사용해 선정된 3종의 균주 시퀀싱 - 20kb의 라이브러리를 구성하여 <i>de novo</i> <i>assembly</i> 를 수행해 genome을 완성.
	- 전략 미생물 유전체 <i>de novo assembly</i> 파이프라인 구축 및 최적화	- CLC workbench와 PacBio SMRT analysis 2.3.0 소프트웨어를 활용하여 유전자의 alignment나 blast 등의 기능을 이용해 파이프라인을 구축 및 최적화
	- 전략 미생물 2종 추가 <i>de novo sequencing</i>	- ATSB16 균주에 대해 PacBio RSII 시스템을 사용해 시퀀싱 - 20 kb의 라이브러리를 구성해 <i>de novo</i> <i>assembly</i> 를 수행
	- 전략미생물 유전체 annotation 시스템 구축 및 수행	- Assembly가 완료된 미생물에 대해 다른 종의 유전자 db를 참고로 하여 유전자를 동정 - 기존의 밝혀진 유전자의 sequence와 높은 상동성을 가지는 유전자에 대해 기능을 annotation.

<p>생물비료 개발을 위한 전략 미생물 유전체 해독 및 유용유전자 분석</p>	<p>- 전략미생물 유전체 annotation 정보 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자를 예측할 수 있는 SEED, COG, EzTaxon-e, Pfam db를 이용해 미생물의 염기서열 중에서 유전자 부분을 동정 - RAST server와 GLIMMER 3.02를 이용하여 유전자의 기능에 대해 annotation - rRNA와 tRNA는 각각 RNAMer 1.2와 tRNAscan-SE 1.23 프로그램을 이용해 유전체 annotation 정보 최적화
	<p>- 전략미생물 유전체 Gene Family 규명 및 비교 분석</p>	<p>- 서열 중심 분석법을 in silico 분석을 통해 특정 활성에 대한 유전자 집단을 예측하고, 유전자의 상관관계를 연구</p>
		<p>- 예측된 유전자 집단이 활성화 될 수 있는 조절 유전자를 확인하고, 전략미생물의 유용유전자 활성을 위한 최적의 조건 탐색</p>
	<p>- 전략미생물 유전체의 비교 유전체 분석 파이프라인 구축</p>	<p>- 유전체 서열을 기반으로 유전적 거리가 가까운 미생물을 대상으로 MUMmer, ANI 또는 Tetra nucleotide 분석을 이용해 서열의 상동성을 비교</p>
		<p>- Pan-genome 분석을 통해 유용미생물이 특이적으로 갖고 있거나, 가까운 미생물 속이 공통으로 갖고 있는 유전자를 분석</p>
		<p>- 같은 속의 미생물 유전체와 비교하여 서열의 상동성과 유전자의 진화 속도 확인</p>
	<p>- 구축된 파이프라인을 통한 유용미생물의 유전체 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - PacBio 시스템을 이용한 <i>Brevibacterium linens</i> RS16의 유전체 시퀀싱 - 136x, 4,421,157bp complete genome 완성
		<p>- RS16, RS16 유사미생물 3종 + 비유사미생물 1종 포함 5종 Pan-genome, MUMmer analysis를 통한 RS16의 유전체 특징 분석</p>
<p>- CDSs, COG, Genome Comparative analysis를 통한 질소 고정능, 인산 가용화능, ACC deaminase등의 식물생장촉진 활성 기능 관련 유전자 분석</p>		

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 단위과제별 세부수행결과

제 1 세부과제 : 식물생장촉진 미생물 유전자원 확보 및 특성 검정

○ 유용 미생물 유전자원의 분리 및 특성 분석

- 근권 토양 채취 및 이화학적 특성 분석

본 연구실에서는 임의의 3개 site를 선정하여 식물의 근권 토양을 채취하였다. 토양의 이화학적 특성 분석을 위해 시료를 풍건시킨 후 2 mm 체를 통과시킨 토양을 사용하였다. 토양의 pH와 전기전도도 (ECe)는 토양과 증류수를 1:5로 섞어 30분간 진탕시킨 현탁액을 각각 pH meter와 EC meter를 이용하여 측정하였다. 유기물은 diphenylamine을 지시약으로 사용하는 Tyurin 법을 사용하였으며, 총 질소함량은 Kjeldhal 증류 적정장치를 이용하여 적정에 사용된 산의 소모량을 측정하여 계산하였다. 유효인산은 Lancaster법에 준하여 분석하였으며, 치환성 양이온 (K, Ca, Mg, Na, Fe)은 ICP-OES를 이용하여 측정하였다. 채취한 토양의 이화학적 특성은 Table 1에 나타났다. pH는 7.0~7.3, EC value는 0.2~0.8 dS m⁻¹로 측정되었으며, 유기물 함량과 총 질소함량은 각각 0.8~1.5%, 0.05~0.08%로 나타났다. 치환성 양이온 K는 0.2 cmol⁺ kg⁻¹, Ca는 4.3~8.3 cmol⁺ kg⁻¹, Mg는 0.4~1.6 cmol⁺ kg⁻¹, Na는 0.2~0.3 cmol⁺ kg⁻¹, Fe는 7.7~7.9 cmol⁺ kg⁻¹로 나타났다.

Table 1. Chemical properties of soil samples

Sampling sites	pH	EC (dS m ⁻¹)	Organic matter (%)	T-N	P ₂ O ₅ (mg kg ⁻¹)	Exchange cations				
						K	Ca	Mg	Na	Fe
Site 1	7.0±0.02	0.8±0.04	1.1±0.03	0.05±0.0	844.4±78.6	0.2±0.02	7.2±0.24	0.8±0.03	0.3±0.02	7.9±0.07
Site 2	7.4±0.02	0.2±0.01	1.5±0.03	0.08±0.0	881.8±71.5	0.2±0.01	8.3±0.32	1.6±0.11	0.2±0.01	8.5±0.16
Site 3	7.3±0.01	0.2±0.01	0.8±0.07	0.05±0.0	540.2±38.2	0.2±0.01	4.3±0.08	0.4±0.02	0.2±0.01	7.7±0.09

Values represented are mean ± standard error of at least 3 replications.

- 근권 토양으로부터 미생물 유전자원의 분리

미생물 유전자원을 분리하기 위해 근권 토양 10 g을 준비된 100 mL minimal (MM)배지 (0.05% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, 0.1% glucose, 0.2% trace metal solution)에 첨가하고 5°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양한 다음 1 mL의 배양액을 채취하여 희석한 후 준비된 MM plate 배지에 접종하고 5°C에 배양하였다. 분리된 균주는 30% glycerol stock 상태로 -80°C에서 보관하였다.

- 분리 균주의 16S rRNA 염기서열 분석 및 생리·생화학적 특성 분석

16S rRNA 염기서열을 분석하기 위해 genomic DNA의 분리 및 16S rRNA 증폭은 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 이용하였다. 16S rRNA 뉴클레오티드 염기서열 분석은 fluorescent dye terminator를 이용하는 PCR-direct sequencing을 이용하였다 (ABI prism equipment and a Bigdye Terminator cycle sequencing ready reaction kit V.3.1). 염기서열 분석한 후, 균주는 EZTaxon sever (<http://eztaxon-e.ezbiolud.net>)를 이용하여 확인하였다 (Figure 1). 균주의 생리·생화학적 특성은 Gram positive, Gram negative, Catalase, Oxidase, Urease, Nitrate reductase 6가지 특성을 분석하였다. 분리된 미생물 유전자원은 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 균주를 분류하였다 (Table 2). 총 38종의 균주 중에서 20개의 균주가 *Pseudomonas* 속에 속하는 것으로 확인되었고, 7개의 균주가 *Flavobacterium* 속, 6개의 균주가 *Arthrobacter* 속, 3개의 균주가 *Massilia* 속, *Pedobacter*와 *Flavimonas* 속에 속하는 균주가 이에 속하는 것을 확인되었다. 분리된 균주의 생화학적 특성을 분석한 결과, Gram positive 균주는 4개, Gram negative 균주는 34개, Catalase 효소활성 균주는 35개, Oxidase 활성은 28개, Urease와 Nitrate reductase 활성 균주는 각각 1개, 15개의 균주가 확인되었다.

○ 분리 미생물 유전자원의 식물생장촉진 효능 확인

- 분리 균주의 식물생장촉진 특성 분석

분리한 미생물 유전자원의 식물생장촉진 특성을 분석하기 위해 38종 미생물 유전자원의 indole acetic acid (IAA) 생산능, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase 활성, salicylic acid 생산능, 인산가용화능, siderophore 생산능을 각각 측정하였다. IAA 생산능은 Bano and Mussarat (2003)의 방법에 따라 tryptophan 결핍 양을 이용하여 정량측정 하였으며, siderophore 생산능은 Alexander and Zuberer (1991)의 방법에 따라 CAS 고체배지를 이용하여 측정하였다. ACC deaminase 활성은 3 mM ACC를 첨가한 nitrogen free 배지에서 균주를 배양하고 ACC deaminase에 의한 α -ketobutylate의 생산된 양을 측정한다. Salicylic acid 생산능은 Mercado-Blanco (2001)의 방법에 따라 측정하였다. 분리한 균주의 IAA 생산능, ACC deaminase 활성, salicylic acid 생산능, 인산가용화능, siderophore 생산능 결과는 Table 3에 나타났다. 총 38종의 미생물 유전자원 중에서 23종의 균주가 IAA 생산능을 보였으며, ACC deaminase 활성은 7종, salicylic acid 생산능은 15종, 인산가용화능과 siderophore 생산능은 각각 17종과 14종의 균주가 활성을 보이는 것을 확인하였다.

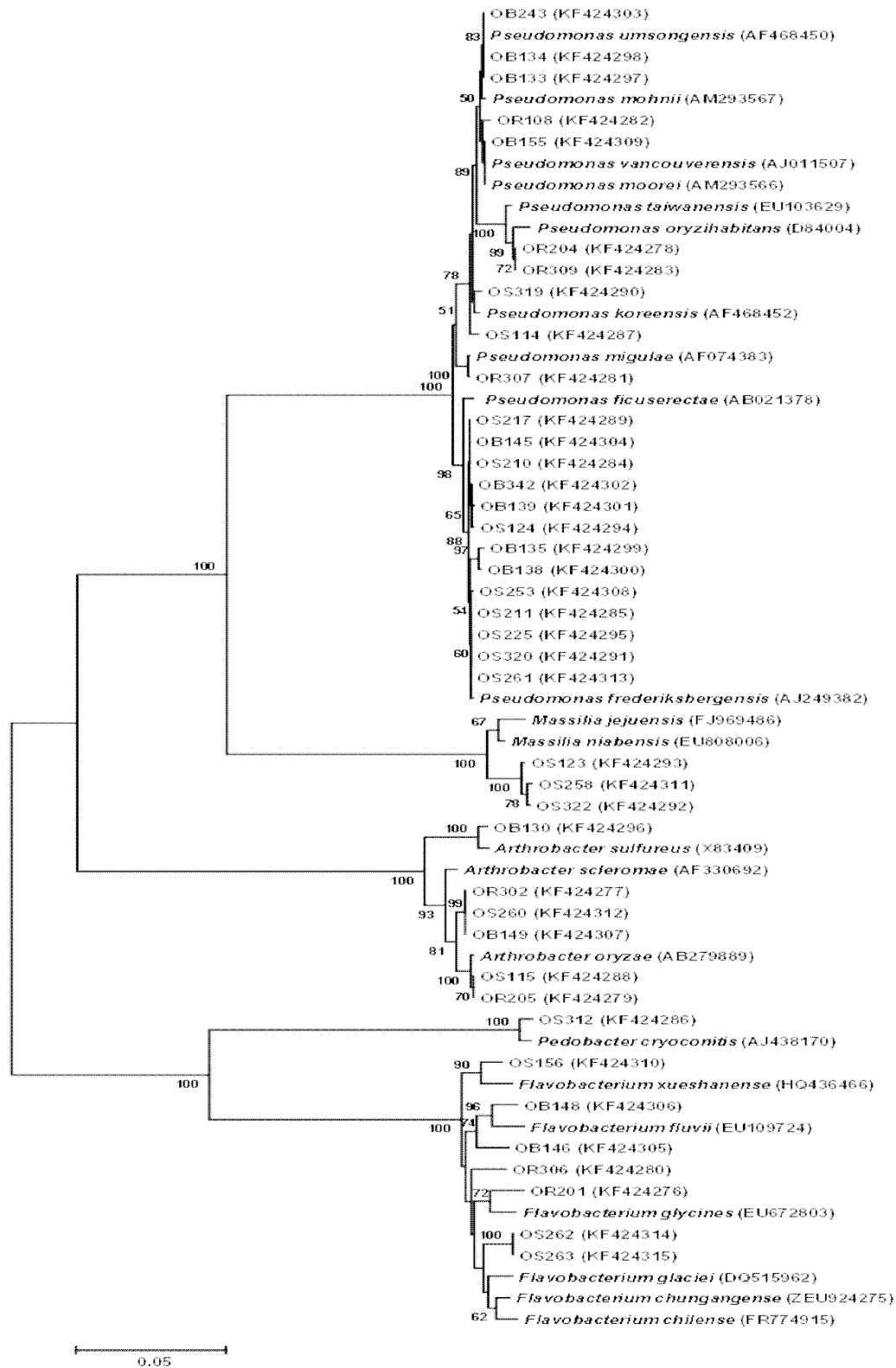


Figure 1. Phylogenetic diversity among the psychrotolerant bacterial isolates. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences. Bar- 0.06 nucleotide changes per position. Bootstrap values are shown at the branch points.

Table 2. Biochemical characteristics of the obtained bacterial isolates

Strains	Gram reaction	Catalase	Oxidase	Urease	Nitrate reductase
<i>Flavobacterium</i> sp. OR201	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Arthrobacter scleromae</i> OR302	Gm(+) rods	+ (ve)	- (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> OR204	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Arthrobacter oryzae</i> OR205	Gm(+) rods	+ (ve)	- (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Flavobacterium</i> sp. OR306	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas migulae</i> OR307	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas moorei</i> OR108	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> OR309	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS210	Gm(-) rods	+ (ve)	- (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS211	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pedobacter</i> sp. OS312	Gm(-) rods	+ (ve)	- (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas mohnii</i> OS114	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Arthrobacter oryzae</i> OS115	Gm(+) rods	+ (ve)	- (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> OS217	Gm(-) rods	+ (ve)	- (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas koreensis</i> OS319	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS320	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Massilia</i> sp. OS322	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Massilia</i> sp. OS123	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> OS124	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS225	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Arthrobacter sulfureus</i> OB130	Gm(+) rods	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)	+ (ve)
<i>Pseudomonas umsongensis</i> OB133	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Pseudomonas umsongensis</i> OB134	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> OB135	Gm(-) rods	+ (ve)	- (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB138	Gm(-) rods	- (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB139	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> OB342	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas umsongensis</i> OB243	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB145	Gm(-) rods	+ (ve)	- (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Flavobacterium</i> sp. OB146	Gm(-) rods	- (ve)	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Flavobacterium</i> sp. OB148	Gm(-) rods	- (ve)	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Arthrobacter scleromae</i> OB149	Gm(+) rods	+ (ve)	- (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS253	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	- (ve)
<i>Flavobacterium</i> sp. OS156	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Massilia</i> sp. OS258	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Arthrobacter scleromae</i> OS260	Gm(+) rods	+ (ve)	- (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Flavobacterium</i> sp. OS262	Gm(-) rods	+ (ve)	+ (ve)	- (ve)	+ (ve)
<i>Flavobacterium</i> sp. OS263	Gm(-) rods	+ (ve)	- (ve)	- (ve)	+ (ve)

+(ve): growth; -(ve): no growth.

Table 3. Plant growth promoting characteristics of the isolated bacteria strains

Strains	IAA production ¹		ACCD activity ²	Salicylic acid ³	P solubilization	Siderophore production
	with trp	without trp				
<i>Flavobacterium</i> sp. OR201	0.5 ± 0.04	0.2 ± 0.00	ND	1.1 ± 0.1	-	-
<i>Arthrobacter scleromae</i> OR302	1.1 ± 0.03	0.8 ± 0.09	ND	ND	-	-
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> OR204	1.6 ± 0.08	0.8 ± 0.01	ND	1.6 ± 0.5	+	+
<i>Arthrobacter oryzae</i> OR205	0.8 ± 0.03	0.4 ± 0.02	ND	ND	-	-
<i>Flavobacterium</i> sp. OR306	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Pseudomonas migulae</i> OR307	1.1 ± 0.08	0.3 ± 0.03	ND	ND	+	+
<i>Pseudomonas moorei</i> OR108	1.0 ± 0.06	0.3 ± 0.03	ND	4.1 ± 0.3	+	+
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> OR309	2.7 ± 0.19	1.5 ± 0.05	ND	ND	+	+
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS210	0.3 ± 0.02	0.2 ± 0.02	ND	ND	-	+
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS211	ND	ND	ND	0.5 ± 0.1	+	-
<i>Pedobacter</i> sp. OS312	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Pseudomonas mohnii</i> OS114	ND	ND	ND	ND	+	+
<i>Arthrobacter oryzae</i> OS115	6.2 ± 0.55	0.9 ± 0.15	ND	4.7 ± 0.5	-	-
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> OS217	0.7 ± 0.09	0.4 ± 0.05	ND	0.3 ± 0.1	-	+
<i>Pseudomonas koreensis</i> OS319	3.2 ± 0.26	1.9 ± 0.03	0.20 ± 0.08	0.7 ± 0.1	-	+
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS320	ND	ND	ND	0.3 ± 0.1	+	-
<i>Massilia</i> sp. OS322	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Massilia</i> sp. OS123	0.4 ± 0.07	0.3 ± 0.05	ND	ND	-	-
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> OS124	ND	ND	ND	ND	+	+
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS225	ND	ND	ND	0.3 ± 0.1	+	+
<i>Arthrobacter sulfureus</i> OB130	2.7 ± 0.17	1.9 ± 0.09	ND	ND	-	-
<i>Pseudomonas umsongensis</i> OB133	1.3 ± 0.02	0.6 ± 0.10	ND	ND	+	+
<i>Pseudomonas umsongensis</i> OB134	ND	ND	ND	1.0 ± 0.1	+	+
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> OB135	ND	ND	ND	1.4 ± 0.1	+	-
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB138	0.5 ± 0.01	0.4 ± 0.00	4.18 ± 1.20	ND	+	-
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB139	1.7 ± 0.01	1.1 ± 0.04	0.90 ± 0.39	ND	+	-
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> OB342	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Pseudomonas umsongensis</i> OB243	2.9 ± 0.02	1.0 ± 0.03	1.73 ± 0.09	0.5 ± 0.1	+	+
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB145	6.1 ± 0.10	4.0 ± 0.05	1.56 ± 0.17	0.8 ± 0.1	+	-
<i>Flavobacterium</i> sp. OB146	ND	ND	ND	7.3 ± 0.2	-	-
<i>Flavobacterium</i> sp. OB148	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Arthrobacter scleromae</i> OB149	6.1 ± 0.08	1.8 ± 0.11	4.67 ± 0.06	ND	-	-
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS253	5.5 ± 0.09	2.4 ± 0.04	ND	ND	+	+
<i>Flavobacterium</i> sp. OS156	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.03	ND	ND	-	-
<i>Massilia</i> sp. OS258	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>Arthrobacter scleromae</i> OS260	3.5 ± 0.04	1.6 ± 0.08	ND	2.1 ± 0.8	-	-
<i>Flavobacterium</i> sp. OS262	ND	ND	7.35 ± 0.44	ND	-	-
<i>Flavobacterium</i> sp. OS263	ND	ND	ND	ND	-	-

¹µg mL⁻¹; ²α-KB mg⁻¹ protein h⁻¹; ³mg L⁻¹; ND: not detected; (+): positive; (-): negative.

○ 미생물 유전자원의 저온 내성 및 성장패턴 분석

- 온도에 따른 분리 균주의 성장범위 측정

미생물 유전자원의 저온 내성 및 성장 온도범위를 측정하기 위해, 분리한 균주를 minimal (MM) 배지 broth에 접종한 후 5°C 에서 72시간 동안 성장시킨 후, 균주 배양액 20 μ L을 plate에 접종하여 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C 의 온도에서 각각 7일간 배양하면서 24시간 단위로 single colony 개수를 확인하였다. 또한 배양온도에 따른 선발 미생물의 상대적인 성장속도 측정을 위해, 균주를 접종한 후 5°C 와 25°C 에서 균주 각각의 colony 생성 일수를 측정하였다. 총 38종의 균주 중에서 32개 균주의 성장범위는 5~35°C 이고, 2개의 균주는 5~30°C 의 성장범위를 보였으며, 25°C 미만의 성장범위에서는 6개의 균주를 확인할 수 있었다. 균주를 접종한 후 5°C 와 25°C 에서 균주 각각의 colony 생성 일수를 측정한 결과, 5°C 에서 colony 생성까지 경과일수는 25°C 에서 자란 colony 보다 상대적으로 길었으나, 몇몇 종을 제외한 대부분의 균주들은 3일 이내에 colony가 생성되는 것을 확인하였다 (Figure 2).

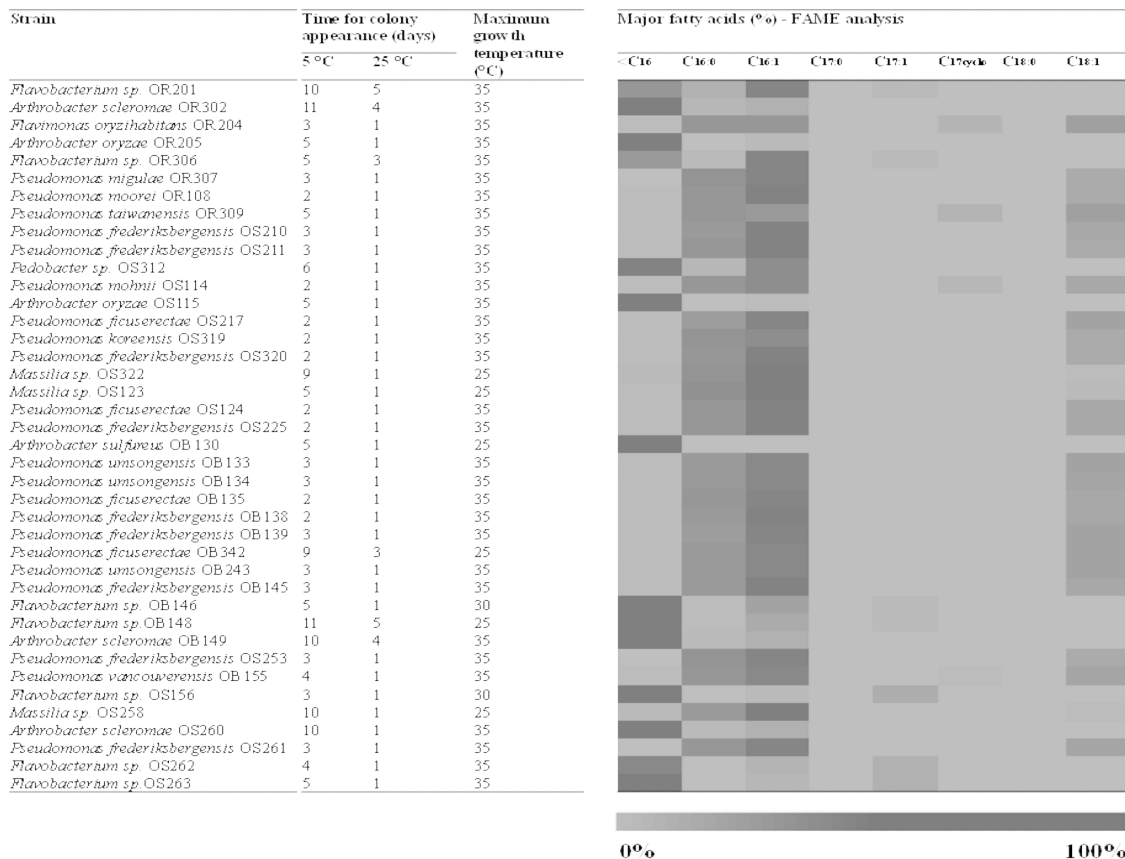


Figure 2. Psychrotrophic characteristics of the isolates as observed by days taken for colony appearance at 5°C and 25°C; maximum temperatures of growth and heat map indication distribution of fatty acids taken as markers for cold adaptation.

- 지방산 메틸 에스테르 분석 및 에너지 이용형태 분석

미생물 유전자원의 막 지방산 분석을 위해, 균주의 전체 세포 지방산을 methyl ester로 추출하고, gas chromatography (GC)를 이용하여 분석하였다. 지방산 분석 결과, 모든 균주에서 C_{16:1} 불포화 지방산이 존재하는 것을 확인하였으며, 포화 C_{16:0} 지방산의 비율은 모든 균주에서 불포화 지방산에 비해 낮은 비율을 보이는 것을 확인하였다 (Figure 2). 지방산 불포화 C_{18:1} 및 C_{17:1} 지방산으로부터 분지 지방산의 iso 및 anteiso의 존재 유무를 확인하였고, 분리 균주 중에서 몇몇의 균주는 고리형 C_{17:cyclo} 지방산을 가지는 것으로 확인되었다. 분리 균주의 에너지원 이용 형태를 분석한 결과, 대부분의 균주가 succinate를 가수분해하였으며, *Pedobacter* 속을 제외한 거의 모든 분리된 *Arthrobacter*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Massilia* 및 *Pseudomonas* 속은 malate를 이용하는 것으로 나타났다 (Figure 3). Urease를 가수분해하는 것으로 나타난 *Arthrobacter sulfureus* OB130를 제외한 균주에서는 Urease 생산은 확인되지 않았다.

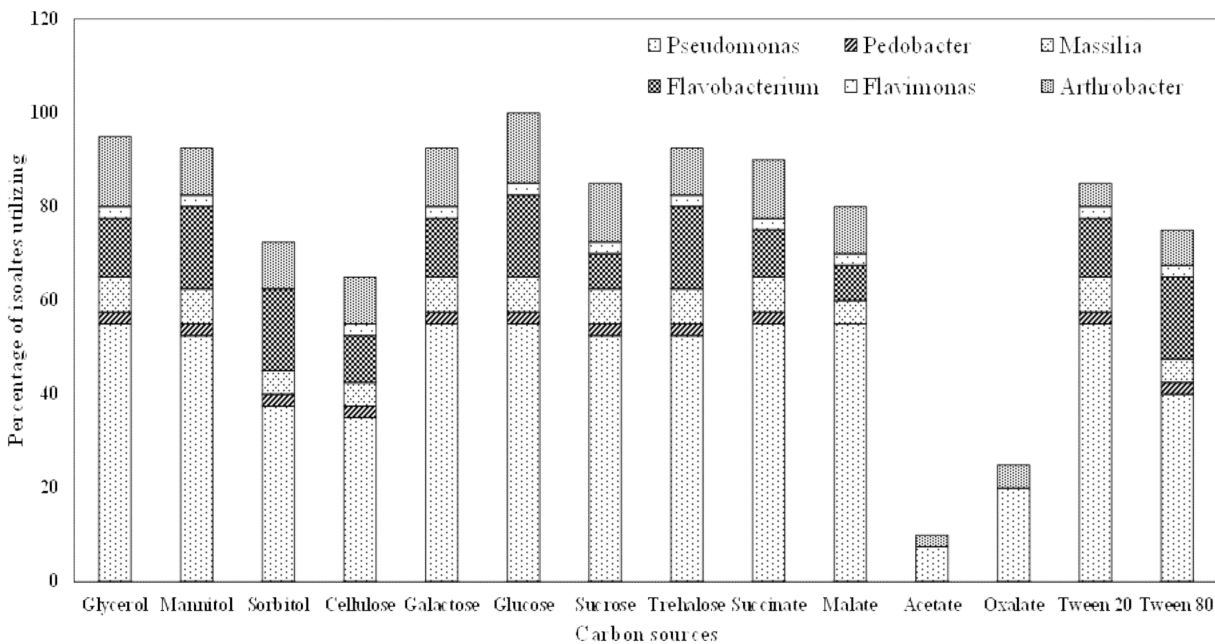


Figure 3. Carbon source utilization pattern of the psychrotrophic bacterial isolates at genus level

○ 미생물 유전자원의 접종에 따른 식물생장촉진 효과 확인

- 선발 미생물 유전자원의 접종이 토마토 종자 발아율에 미치는 효과 확인

분리한 38종의 미생물 유전자원의 접종에 따른 토마토 종자 발아율을 측정하기 위해 토마토 종자 (*Solanum lycopersicum* cv Mill)를 0.02% Tween20[®]을 함유한 2% Sodium hypochlorite를 이용

하여 5분 동안 표면을 살균하고, 70% ethanol로 다시 1분 동안 살균한 후 종자를 멸균수로 5회 이상 세척하였다. 분리한 38종의 미생물 유전자원의 단일 콜로니를 채취한 후 준비된 100 mL MM 배지에 첨가하고 5°C에서 48시간 동안 배양하였다. 균주 배양액을 원심분리하여 cell pellet을 얻은 후 0.03 M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 희석하여 ($OD_{600}=0.8$) 세포현탁액을 준비하였다. 멸균한 filter paper를 깔은 plate에 멸균수 20 mL을 분주한 후 균주를 접종한 토마토 종자를 10개씩 3반죽으로 파종하였다. 파종한 종자를 Growth chamber에 넣고 15°C에서 암조건으로 배양하였고, 24시간 단위로 발아한 종자의 개수를 측정하였다. 분리한 균주의 접종에 따른 종자의 발아율을 측정된 결과, 총 38종의 균주 중에서 9종의 균주 (*Arthrobacter scleromae* OR302, *Flavimonas oryzihabitans* OR204, *Pseudomonas migulae* OR307, *P. moorei* OR108, *P. frederiksbergensis* OS210, *P. ficuserectae* OS217, *P. koreensis* OS319, *Massilia* sp. OS123, *A. sulfureus* OB130)를 제외한 모든 균주 접종 처리구에서 균주를 접종하지 않은 대조구 (control)에 비해 유의성 있는 종자 발아율 증가를 확인할 수 있었다 (Figure 4).

- 선발 미생물 유전자원의 접종이 토마토 유묘의 생장에 미치는 효과 확인

분리한 38종의 미생물 유전자원의 접종이 토마토 유묘의 생장에 미치는 효과를 측정하기 위해, 균주를 접종한 종자를 멸균한 Growth pouches에 파종하고, growth chamber에서 25°C/25°C에서 10/14 시간씩 밤/낮 주기로 6일 동안 재배한 후 토마토 유묘의 초장과 뿌리길이를 측정하였다. 측정된 결과, 토마토 유묘의 초장 길이는 *P. umsongensis* OB134와 *P. frederiksbergensis* OS253 균주 처리구를 제외한 모든 처리구에서 균주를 접종하지 않은 대조구에 비해 유묘의 초장 길이가 증가하였으며, *P. frederiksbergensis* OS211과 *Flavobacterium* sp. OB146를 접종한 처리구는 대조구에 비해 유의성 있는 유묘 줄기길이 증가를 확인할 수 있었다 (Figure 5). 균주의 접종에 따른 토마토 유묘의 뿌리길이 변화를 측정된 결과, 모든 균주 접종 처리구에서 균주를 접종하지 않은 대조구에 비해 유묘의 뿌리길이가 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 6). *P. moorei* OR108, *Pseudomonas taiwanensis* OR309, *Pseudomonas frederiksbergensis* OS211, *Pseudomonas ficuserectae* OS217, *Pseudomonas frederiksbergensis* OB145, *Flavobacterium* sp. OB146, *Flavobacterium* sp. OB148, *Massilia* sp. OS258 균주의 경우 토마토 유묘에 접종하였을 때, 대조구에 비해 뿌리 길이가 유의성 있는 증가를 보였다.

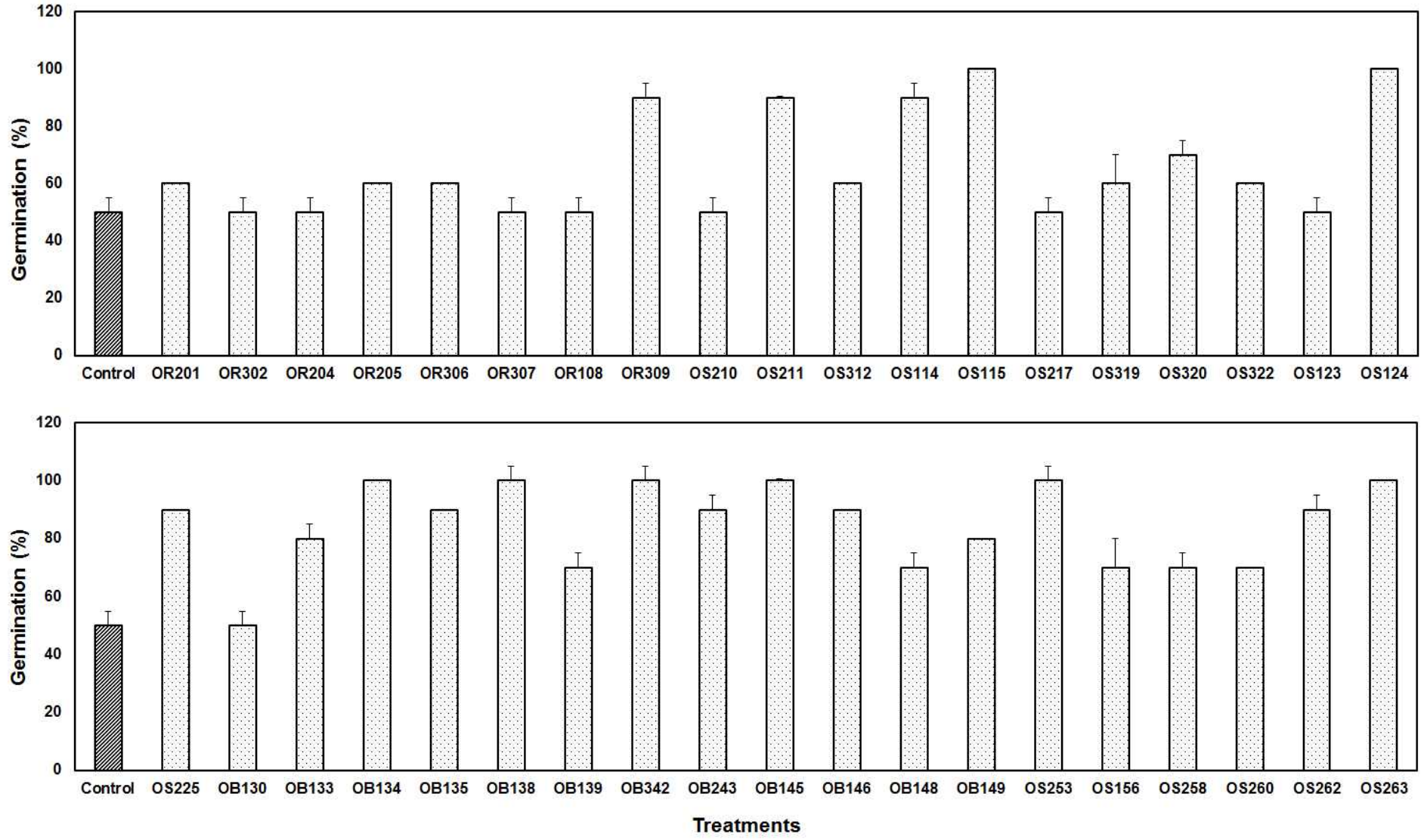


Figure 4. Germination percentage of tomato seeds on inoculation of isolates

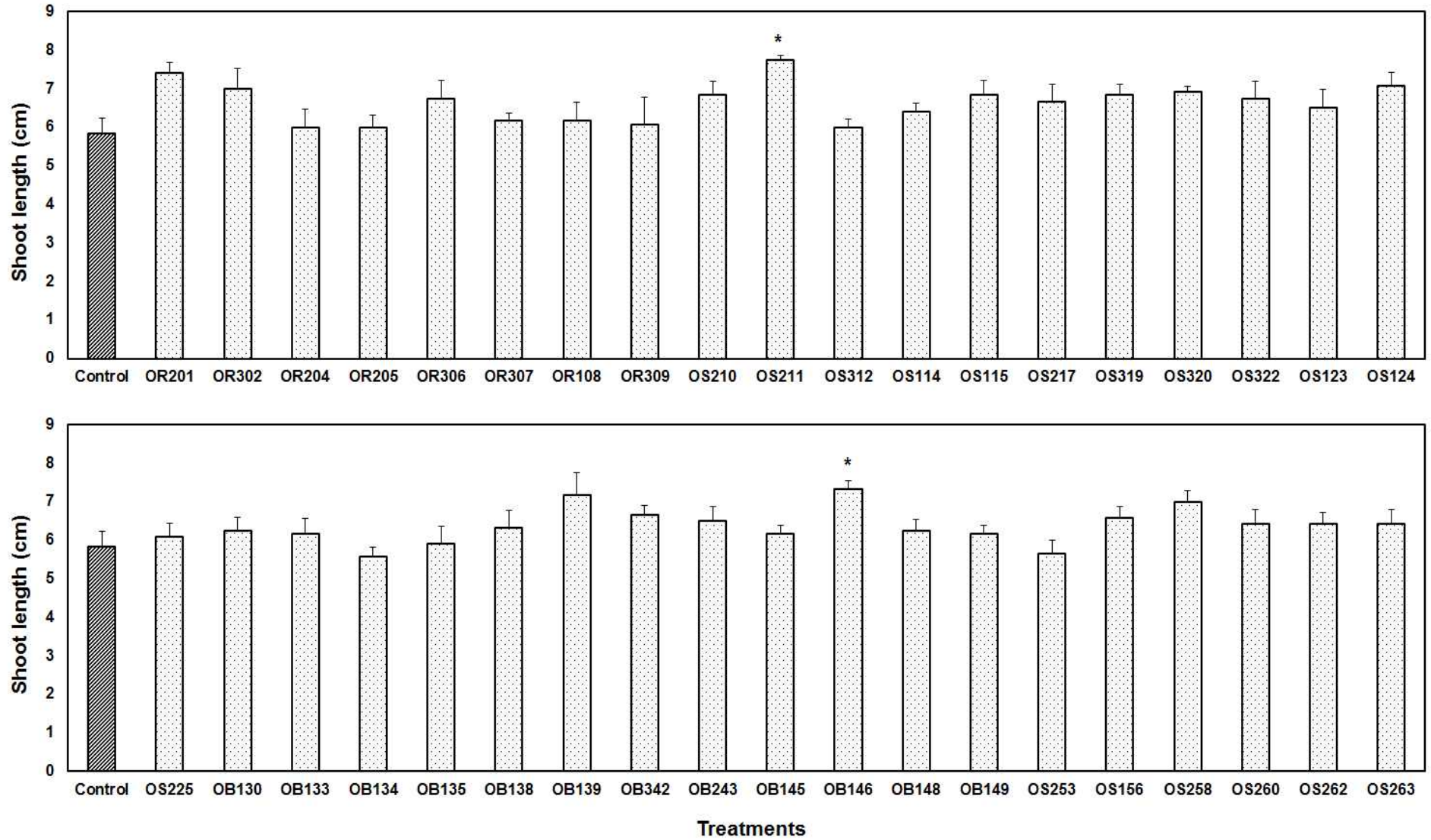


Figure 5. Shoot length of tomato seedling on inoculation of isolates

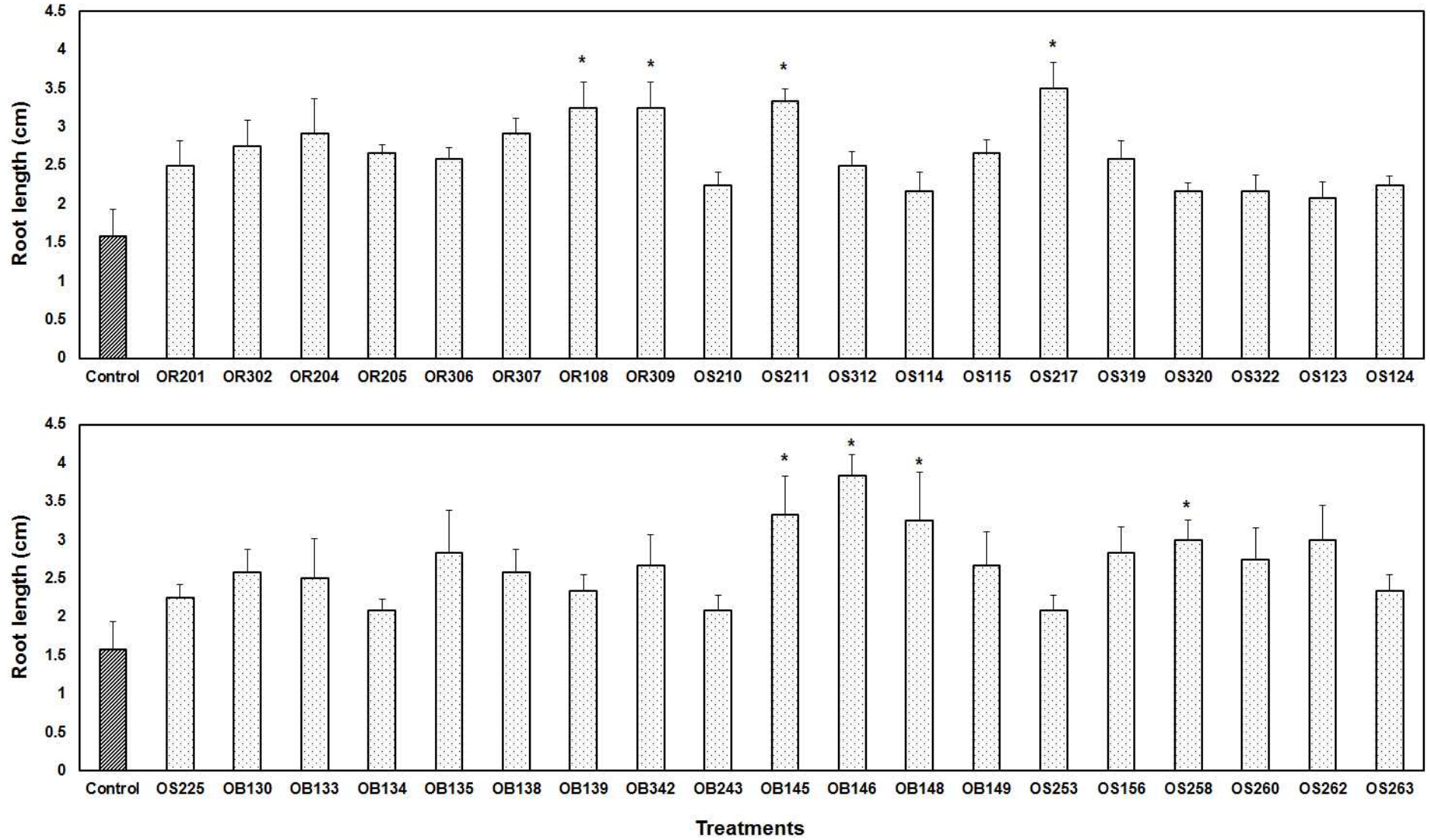


Figure 6. Root length of tomato seedling on inoculation of isolates

- 선발 미생물 유전자원의 토마토 저온 내성 증진 효과 분석

분리한 38종의 미생물 유전자원 중에서 토마토의 생장촉진이 우수한 균주 2종 (*P. frederiksbergensis* OS211, *Flavobacterium* sp. OB146)을 선발하여 저온 조건에서 토마토의 내성 증진 효과를 분석하였다. 균주를 접종한 종자를 유묘 포트에 파종하고 일주일 동안 배양하였다. 배양 후 자란 토마토 유묘를 상토가 담겨 있는 포트에 옮겨 심은 후 2주 동안 배양하고, 이후에는 15°C의 온도에서 일주일 동안 배양하였다. 막투과성 (membrane permeability)은 토마토 잎의 전해질 누출 (electrolyte leakage)과 말론디알데하이드 함량 (malondialdehyde content)을 통해 측정하였다. 또한 저온 조건에서 균주의 접종에 따른 토마토 잎의 프롤린 함량 (proline content), 항산화 효소 (antioxidant enzyme)인 superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GSH) 함량을 측정하였다 (Ding et al., 2011). 측정된 결과, 전해질 누출은 균주를 접종하지 않은 처리구에 비해 두 가지 균주를 접종한 처리구에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으나, 말론디알데하이드 함량은 균주를 접종하였을 때 감소하였지만 균주 접종 여부에 따른 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었다 (Figure 7A and 7B). SOD 함량은 OS211 균주를 접종한 처리구에서 균주를 접종하지 않은 처리구에 비해 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인하였고, APX와 GSH 함량은 OS211 균주를 접종한 처리구에서 함량이 증가하였으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다 (Figure 7C, 7D and 7E). 프롤린 함량의 경우, OS211과 OB146 균주를 접종한 처리구에서 균주를 접종하지 않은 처리구에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인하였으며, OB146 균주를 접종한 처리구에서 가장 높은 프롤린 함량을 확인하였다 (Figure 7F).

- 저온 스트레스 조건에서 미생물 유전자원의 접종이 토마토의 생육과 에틸렌 발생량에 미치는 효과

표면을 살균한 토마토 종자를 종자침지법을 이용하여 미생물 유전자원 (*Flavobacterium* sp. OR301, *P. frederiksbergensis* OS211)을 접종하였다. 접종한 종자는 growth chamber에서 낮/밤 25°C/25°C의 온도에서 광도 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 조건으로 4주 동안 배양하였다. 배양 후 토마토에 저온 스트레스 조건을 위해 성장상의 온도를 낮/밤 12°C/10°C로 설정하고 7일 동안 배양하였다. 일주일 이후 토마토를 수확하여 초장 길이를 측정하였다 (Theocharis et al., 2012). 저온 스트레스 조건에서 토마토 잎에서 발생하는 에틸렌의 발생량을 측정하기 위해, 토마토의 잎 1 g을 채취하여 120 mL GC bottle에 넣은 후 마개를 막고 4시간 동안 보관하였다. 이후 1 mL gas를 채취해서 gas chromatograph를 이용하여 잎에서 발생한 에틸렌의 양을 측정하였다 (Yim et al., 2012). 측정된 결과, 저온 스트레스 조건에서 미생물 유전자원의 접종은 균주를 접종하지 않은 대조구에 비해 토마토 초장의 길이가 증가하였으며, OS211의 접종 처리구는 유의적으로 토마토 초장의 길이를 증가시키는 것을 확인하였다 (Figure 8A). 미생물 유전자원의 접종에 따른 토마토 내 에틸렌 발생량을 측정한 결과, 미생물 유전자원의 접종은 저온 스트레스에 따른 스트레스 에틸렌의 발생량이 감소하였으며, OS211의 접종 처리구는 에틸렌 발생량이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 8B).

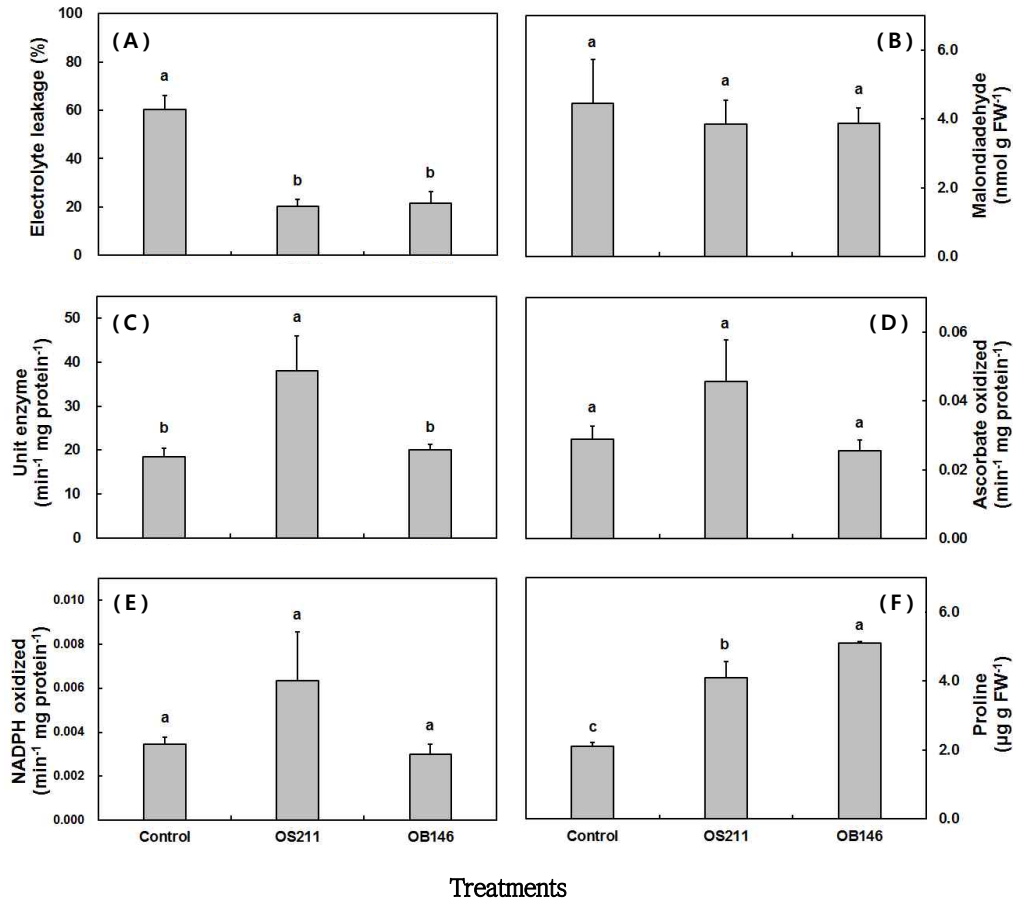


Figure 7. Effect of chilling on inoculated tomato plants. (A) electrolyte leakage in leaves after one week of chilling treatment, (B) malondialdehyde content, (C) superoxide dismutase (SOD), (D) ascorbate peroxidase (APX), (E) glutathione reductase (GSH), (F) proline content.

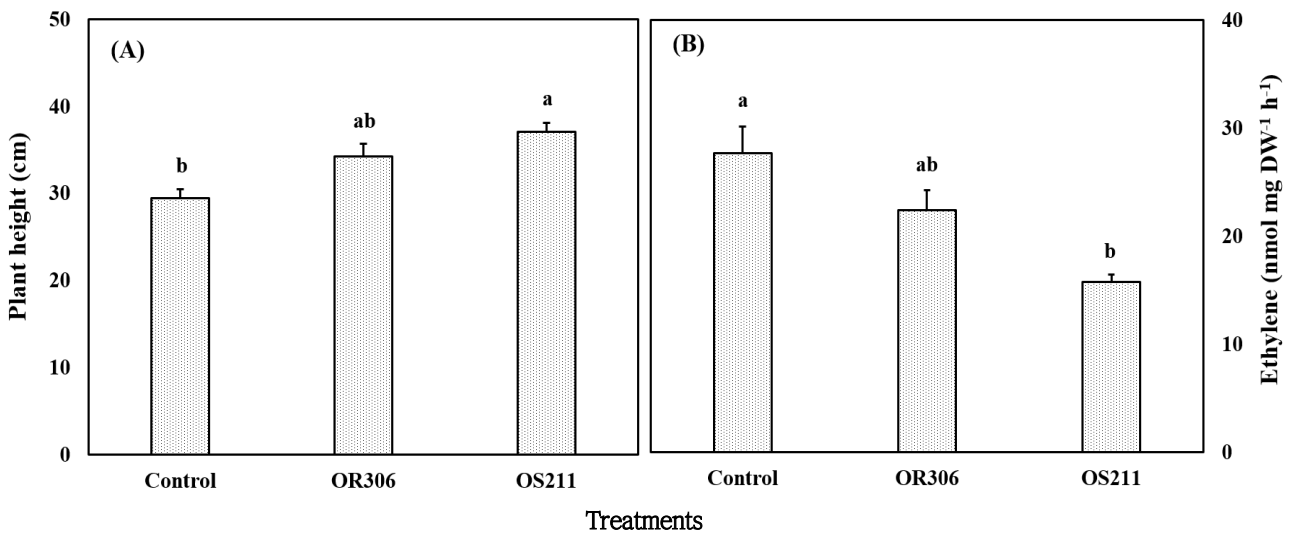


Figure 8. Plant growth (A) and ethylene emission (B) in tomato leaves. Data were one week of chilling treatment at 12/10°C. Alphabets on top of columns indicate statistical grouping based on DMRT ($P \leq 0.5$).

- 낮은 스트레스 조건에서 내한성 미생물의 접종이 토마토 내 ACC 축적과 ACO 활성에 미치는 효과

낮은 스트레스 조건에서 ACC deaminase 활성을 가지는 미생물 유전자원의 접종이 토마토 내 ACC 축적과 ACC oxidase (ACO) 활성에 미치는 효과를 확인하기 위해, 토마토 잎 1 g을 절개한 후 액체 질소를 이용하여 분쇄하였다 (Yim et al., 2012). 분쇄한 잎 조직으로부터 80% methanol을 함유하는 butylated hydroxytoluene as antioxidant (BHT, 2 mg L⁻¹)를 이용하여 ACC를 추출한 후 실온에서 45분 동안 배양하였다. 배양 후 원심분리를 통해 펠릿을 채취한 후 메탄올로 재현탁 한 다음 0.2 mL의 NaOCl 용액을 주입하고 8분 동안 진탕한 다음 생성된 gas를 GC를 이용하여 측정하였다. ACC oxidase 활성을 측정하기 위해, 액체질소를 이용해 분쇄한 토마토 잎 조직을 100 mM Tris-HCl (pH 7.2), 10% (w/v) glycerol, 30 mM sodium ascorbate을 함유하는 완충용액 2 mL g⁻¹를 이용하여 균질화 하였다. 균질화 용액을 원심분리하여 얻은 상등액을 1.5 mL과 50 μM FeSO₄, 1 mM ACC, and 5% (v/v) CO₂를 혼합한 후 30°C에서 15분 동안 배양한 후 ACO 활성을 측정하였다. 낮은 스트레스 조건에서 내한성 미생물의 접종에 따른 토마토 식물체 내 ACC 축적과 ACO 활성을 측정한 결과, 미생물을 접종하지 않은 대조구에 비해 균주를 접종한 처리구에서 ACC 축적과 ACO 활성이 유의적으로 감소하였으며, OS211 균주를 접종한 처리구에서 가장 낮은 활성을 보이는 것을 확인하였다 (Figure 9).

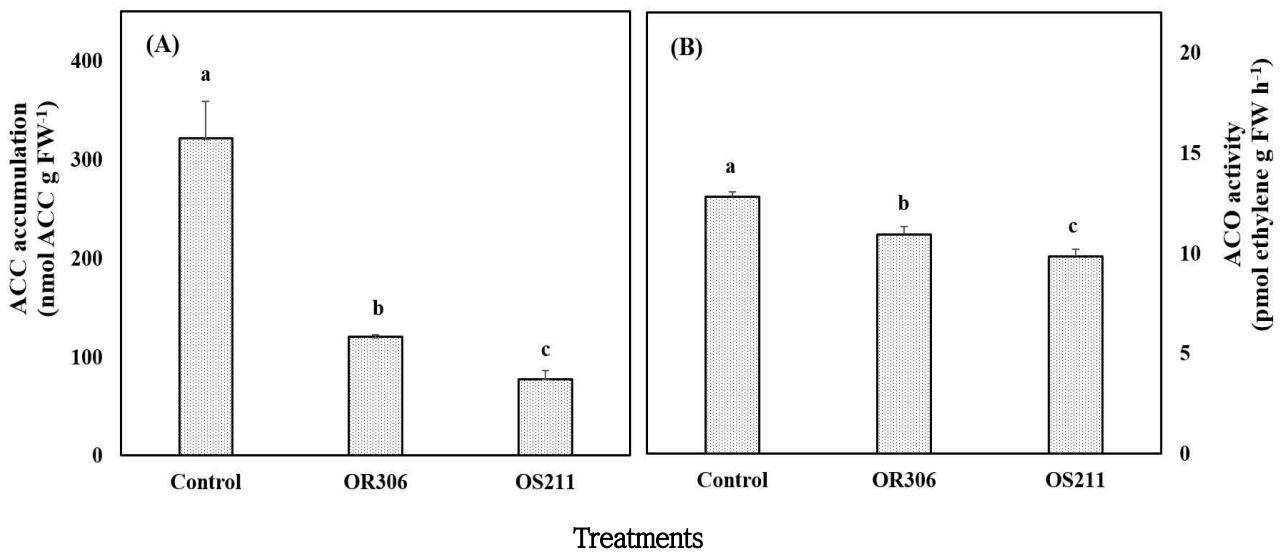


Figure 9. ACC accumulation (A) and ACC oxidase activity (B) in leaves observed after one week of cold treatment. Alphabets on top of columns indicate statistical grouping based on DMRT ($P \leq 0.5$).

○ Triparental conjugation을 이용한 선발 식물생장촉진 미생물 유전자원의 균집능 확인

선발한 미생물 유전자원을 *gfp* 형질전환하기 위해 Triparental mating 기법을 사용하였다. 총 7종의 미생물 유전자원 (*Pseudomonas frederiksbergensis* OB145, *P. umsongensis* OB243, *P. umsongensis* OB133, *P. moorei* OR108, *Pantoea* sp. CBMB55, *Burkholderia pyrocinia* CBPB-HOD, *Brevibacterium linens* RS16)을 선정하였으며, Recipient cell과 donor cell (pFAJ1820 을 가지는 *E. coli* S17-1) 그리고 helper strain (*E. coli* PRK2013)을 이용하여 형질전환 하였다. 형질전환 된 미생물 유전자원은 M9 배지에서 배양한 후, kanamycin을 함유한 LB 배지에서 다시 배양하였다. 형질전환 된 미생물 유전자원의 *gfp* 삽입 여부를 확인하기 위하여 개체별 PCR 검증하였다 (Kamala-Kannan et al., 2010). PCR은 [stage1: 94°C 3분, stage 2 (30 cycles) : step1-94°C 30초, step2-56°C 1분, step3-72°C 1분, stage3: 72°C 10분] 조건으로 증폭하였으며, primer는 YL065 (5'-GCGATGTTAATGGGCAAAAA-3')와 YL066(R) (5'-TCCATGCCATGTGTAATCCT-3')를 사용하였고, 증폭된 형질전환 미생물 유전자원의 DNA는 전기영동을 통해 밴드의 유무를 확인하였다. 전기영동을 통해 형질전환 된 미생물 유전자원의 DNA 밴드를 확인한 결과 7종의 미생물 유전자원 모두 형질전환 된 밴드를 확인할 수 있었다 (Figure 10).

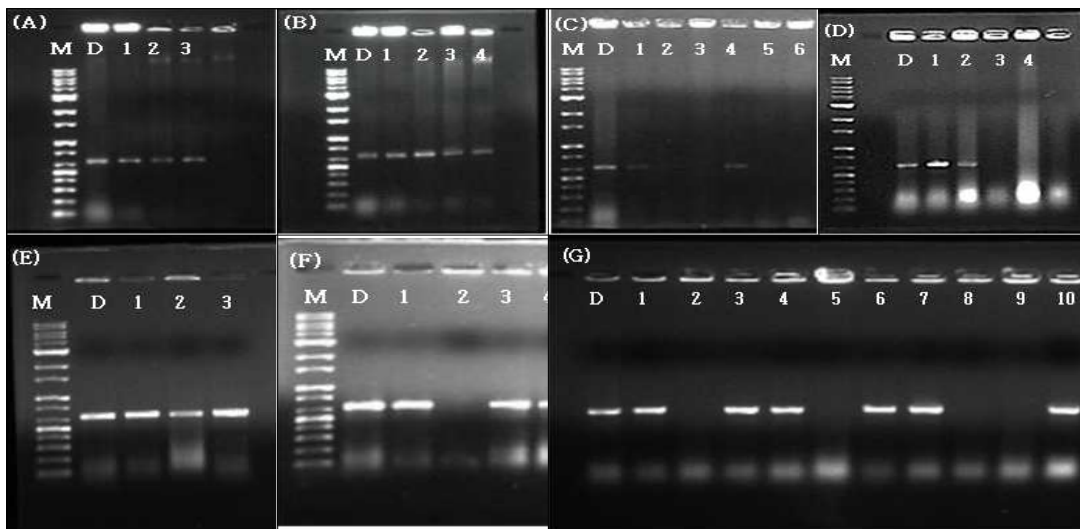


Figure 10. PCR analysis for selection (A) *P. frederiksbergensis* OB145, (B) *P. umsongensis* OB243, (C) *P. umsongensis* OB133, (D) *P. moorei* OR108, (E) *Pantoea* sp. CBMB55, (F) *Burkholderia pyrocinia* CBPB-HOD, (G) *Brevibacterium iodium* RS16, M: marker, D: donor cell, number: *gfp* derivatives.

○ Flow cytometry를 이용한 gfp 형질전환 미생물의 상대적 형광활성 측정

gfp 형질전환 된 미생물 유전자원의 상대적 형광활성을 측정하기 위해 flow cytometry 기기를 이용하였다. 50 mL LB broth에 형광성을 측정할 미생물을 접종한 후, 1 mL씩 채취하고 12,500 g 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 1.5X Phosphate buffer saline으로 cell pellet을 세척하고 0.22 μ m filter로 여과하였다. 여과액을 flow cytometry로 측정하였다. 측정과정에서는 빛을 차단한 상태에서 하는 것이 좋으며, tube 또한 알루미늄 호일을 이용하여 암조건으로 진행하였다. Flow cytometry를 이용해 Positive control (donor pFAJ1820, sample 1), negative control (sample 2), *Pseudomonas moorei* OR108-gfp (sample 3, 4), *Pseudomonas umsongensis* OB243-gfp (sample 5, 6), *Pseudomonas frederiksbergensis* OB145-gfp (sample 7, 8, 9) 균주의 상대형광측정을 한 결과 모든 균주가 negative control 보다 높은 형광성을 가지고 있었으며, 그 중에서 OB243 (sample 5)이 positive control보다 높은 형광활성을 가지고 있는 것을 확인하였다 (Figure 11).

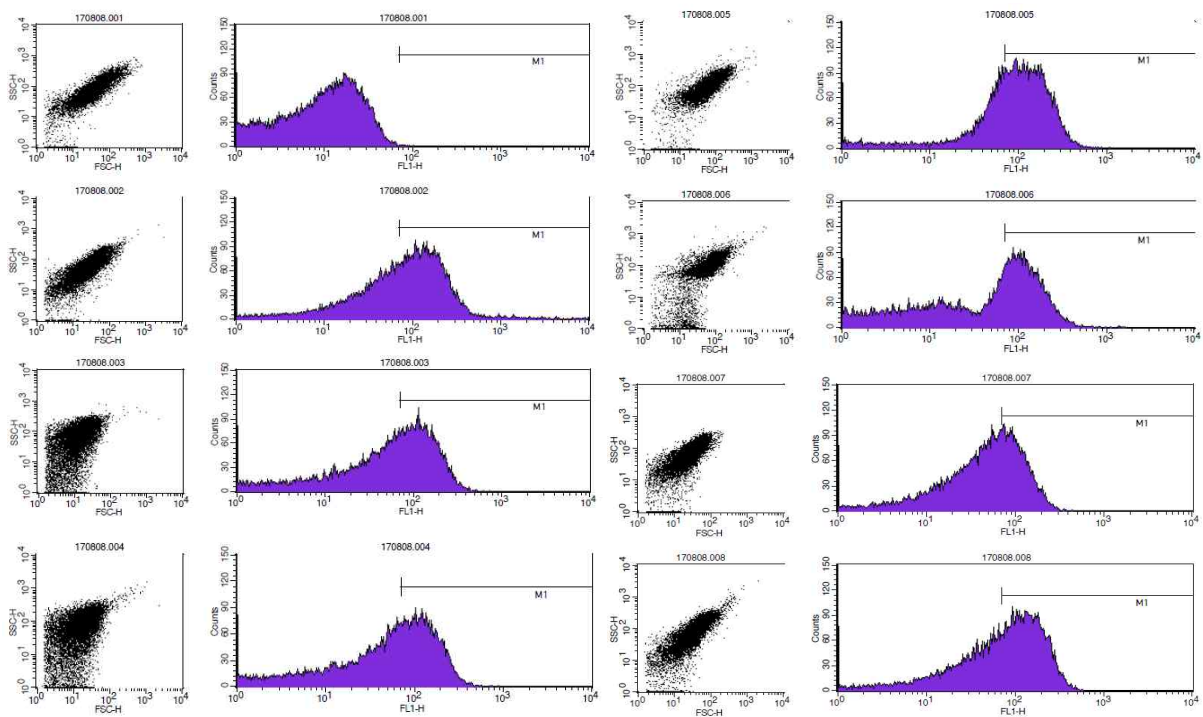


Figure 11. The relative fluorescence activity of the gfp-derivatives

○ Confocal laser scanning microscopy를 이용한 gfp 미생물의 군집능 확인

형질전환 미생물의 식물체 내 군집능을 확인하기 위해 토마토 종자의 표면을 70% ethanol에 종자를 싹 거즈를 1분간 담가놓은 후 증류수로 세척하였다. 세척한 종자를 2% NaClO에 30초간 멸균 후 증류수를 이용하여 5~10회 세척하였다. 세척한 후 형질전환 된 *P. frederiksbergensis* OB145, *P. umsongensis* OB133, *B. linenes* RS16, *P. umsongensis* OB243 균주를

LB broth에 배양한 후, 10000rpm으로 4℃ 10분간 원심분리 하였다. Cell pellet을 증류수나 10 mM MgSO₄을 가한 후 같은 조건으로 원심분리 하였다. 세척하는 과정을 2~3번 반복한 다음 페트리디쉬에 세척된 균주 현탁액 10 mL과 종자를 넣고 30℃에서 60 rpm으로 12시간 동안 shaking incubator에서 접종하였다. 균주를 접종한 후 토마토 종자를 filter paper가 깔린 pertri dish에 파종하고 배양하였다. 공초점 주사현미경 (CLSM)을 통해 형질전환 균주의 식물체 내 군집을 확인하기 위해, 유묘의 뿌리를 절단하여 채취한 후 Phosphate buffer saline으로 세척하였다. 세척한 후 immersion oil을 한 방울 떨어뜨려 cover glass를 덮었다. 실험과정은 빛을 차단한 암조건에서 진행되었다. CLSM은 pinhole은 156 μm, laser는 488 nm에서 측정되었다. 측정된 결과, 형질전환 된 OB145 균주가 토마토의 뿌리 조직 내에서 군집하고 있는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 12).

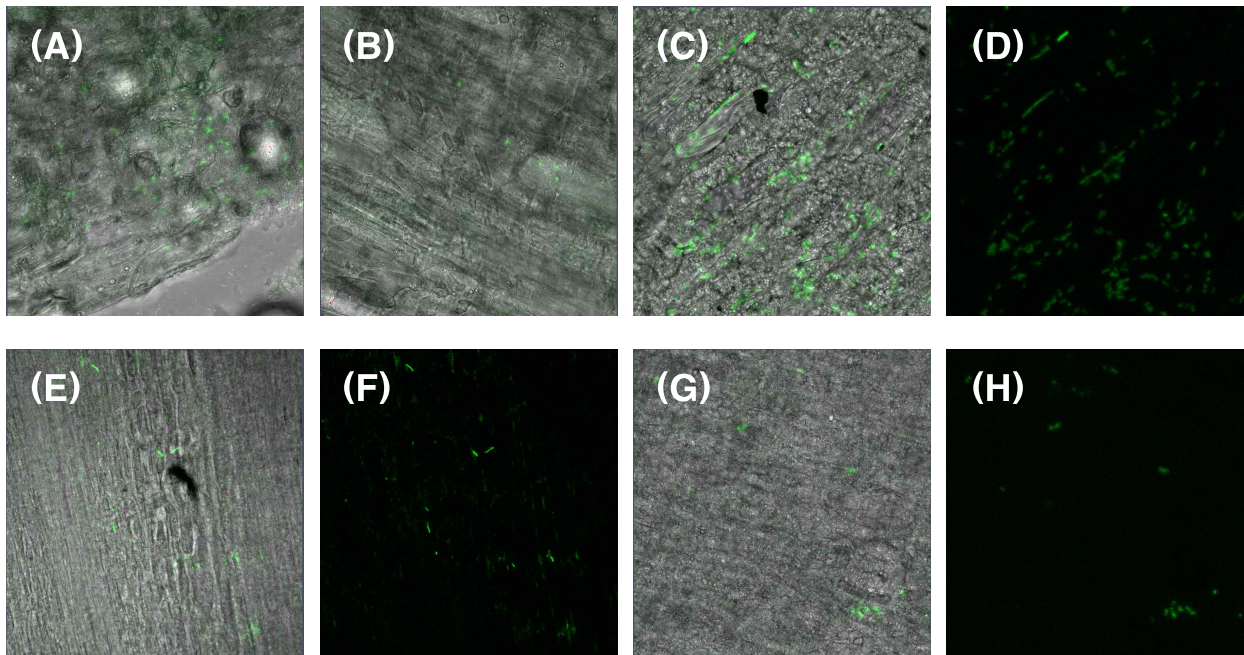


Figure 12. Confocal microscopy images illustrating the intercellular and intracellular colonization of tomato roots by strains OB145-gfp (A, B), OB133-gfp (C, D), RS16 (E, F) and OB243 (G, H).

○ 보유 미생물 유전자원을 이용한 생물비료 개발

- 우수 미생물 유전자원 기능 분석 및 2차 선발

본 연구실에서 보유하고 있는 충북지역에서 채취한 야생균류에서 분리한 뿌리혹 생성균 39종, 농업과학기술원에서 채취한 논토양에서 분리한 질소고정균 30종, 다양한 작물의 근권에서 분리한 황산화균 21종, 벼로부터 분리한 메탄올 자화세균 36종, 배추에서 분리한 인산가용화균

10종, 배추좀나방 (*Plutella xylostella*) 내장에서 분리한 식물생장촉진 미생물 20종, 배추의 뿌리와 근권에서 분리한 질소고정균 19종, 해안토양에서 분리한 식물생장촉진 호염성 미생물 36종, 중금속 오염토양에서 분리한 비소 내성균 21종 중에서 식물생장촉진 효능이 우수한 미생물을 2차 선발하였다. 우수한 미생물을 2차 선발한 결과, 충북지역에서 채취한 야생균류에서 분리한 뿌리혹 생성균은 IAA 생성능, ACC deaminase 활성, 인산가용화능 및 siderophore 생성능을 가지는 6종을 선발하였으며, 농업과학기술원에서 채취한 논토양에서 분리한 질소고정균은 질소 고정능이 우수한 균주 7종을 선발하였다 (Table 4 and Table 5).

Table 4. 충북지역에서 채취한 야생균류에서 분리한 뿌리혹 생성균 2차 선발 (6종)

Strains	NCBI Accession numbers	Closest relative in database	IAA production	ACC deaminase	Phosphate solubilization	Siderophore production	Nodulation test
LNW4	GQ181025	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	++	+	+	+	+
LNW5	GQ181026	<i>Rhizobium tropici</i>	+	+	+	+	+
LNW14	GQ181034	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	+	++	+	+	+
JNFb1	GQ181041	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	++	+	+	+	+
JNFb5	GQ181043	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	++	+	+	+	+
LN5	GQ181045	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	+	+++	+	+	+

Table 5. 농업과학기술원에서 채취한 논토양에서 분리한 질소고정균 2차 선발 (7종)

Strains	Soil sample	ARA activity ^a	16S rRNA sequencing	
			Close Relatives in GenBank database (Similarity %)	GenBank Accession No. (Seq. length, bp)
RFNB12	Control	325.743 ± 0.27	<i>Burkholderia phytofirmans</i> (99)	FJ266322 (1411)
RFNB13	Control	102.570 ± 0.34	<i>Burkholderia phytofirmans</i> (99)	FJ266323 (1410)
RFNB16	NPKC1500	511.201 ± 0.75	<i>Burkholderia phytofirmans</i> (99)	FJ266326 (1402)
RFNB17	NPKC2250	115.387 ± 0.64	<i>Serratia</i> sp. (99)	FJ266327 (1411)
RFNB20	NPKC3000	107.263 ± 0.52	<i>Herbaspirillum</i> sp. (99)	FJ266330 (1400)
RFNB30	NPKC2250	620.387 ± 0.40	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> (99)	FJ266340 (1415)
RFNB32	NPKC2250	195.550 ± 0.29	<i>Brevundimonas</i> sp. (99)	FJ266342 (1336)

^anmol C₂H₂ h⁻¹ mg⁻¹ protein Data presented are mean results and standard errors from three replicates

다양한 작물의 근권에서 분리한 황산화균은 황산화능과 IAA 생성능이 우수한 균주 2종을 선발하였으며, 배추에서 분리한 인산가용화균은 인산가용화능과 ACC deaminase 활성을 가지는 균주 1종을 2차 선발하였다 (Table 6 and Table 7). 또한 배추의 뿌리와 근권에서 분리한 질소 고정균은 질소고정능과 IAA 생성능이 우수한 9종을 선발하였다 (Table 8).

Table 6. 다양한 작물의 근권에서 분리한 황산화균 2차 선발 (2종)

Strains	Crops	Accession No. (Sequence length)	Close relative in GenBank database	Thiosulfate oxidation*	Soluble P ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	IAA production ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
ATSB28	<i>Capsicum annuum</i>	EF397586	<i>Pandoraea sputorum</i>	197 \pm 17	-	-
ATSB30	<i>Daucus carota</i>	EF397587	<i>Pandoraea</i> sp.	224 \pm 20	-	-

*Oxygen consumption (nmol O_2 consumed min^{-1} ($\text{mg of protein}^{-1}$))

Table 7. 배추에서 분리한 인산가용화균 2차 선발 (1종)

Strains	GenBank Accession No.	Nearest phylogenetic neighbor	P solubilization		ACC deaminase*	PREP activity (%)
			Solubilization index (%)	P ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
CPBE37	DQ840549	<i>Pseudomonas poae</i>	233.3 \pm 28.3	301.3 \pm 1.45	84.3 \pm 7.12	34.43

*ACC deaminase activity (values are mean \pm S.D. of three replications); $\mu\text{mol } \alpha$ -ketobutyrate $\text{mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Table 8. 배추의 뿌리와 근권에서 분리한 질소고정균 2차 선발 (9종)

Strains	Relationship to host	Genbank Accession number	Homologous microorganism (% identity)	ARA ($\text{pmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	IAA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	nifH gene
CBCEN2	Root interior	EF427845	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (99%)	561.14	21.57	+
CBCEN3	Root interior	EF427846	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (99%)	566.66	21.67	+
CBCEN9	Root interior	EF427850	<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)	310.59	10.34	+
CBCEN17	Root interior	EF427852	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (99%)	494.20	23.64	+
CBCEN26	Root interior	EF427856	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (100%)	434.48	21.98	+
CBCN5	Rhizospheric	EF427857	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (99%)	366.48	21.17	+
CBCN13	Rhizospheric	EF427859	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (100%)	447.36	22.07	+
CBCN23	Rhizospheric	EF427860	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (99%)	439.82	22.75	+
CBCN27	Rhizospheric	EF427862	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (99%)	415.03	19.78	+

해안토양에서 분리한 식물생장촉진 호염성 미생물은 ACC deaminase 활성, 질소고정능, IAA 생성능 등을 가지는 균주 13종을 선발하였다 (Table 9). 배추좀나방 (*Plutella xylostella*) 내장에서 분리한 식물생장촉진 미생물은 Chitinase 및 siderophore 생성능을 가지는 균주 10종을 선발하였다 (Table 10). 벼로부터 분리한 메탄을 자화세균은 황산화능, IAA 생성능, ACC deaminase 활성을 가지는 균주 11종을 선발하였으며, Table 11에 나타냈다.

Table 9. 해안토양에서 분리한 식물생장촉진 호염성 미생물 2차 선발 (13종)

Strains	NCBI Accession numbers	Closest genus/species (similarity %)	ACC deaminase activity*	Nitrogen fixation	IAA production	Thiosulphate oxidation
RS111	GU968460	<i>Zhihengliuella alba</i> (98.3)	1.38 ± 0.86	+	+	+
RS212	GU968464	<i>Brevibacterium epidermidis</i> (99.1)	2.25 ± 0.51	+	+	+
RS231	GU968467	<i>Oceanimonas smirnovii</i> (98.9)	1.40 ± 0.51	+	+	+
RS233	GU968468	<i>Bacillus stratosphericus</i> (100)	1.93 ± 0.54	+	+	+
RS236	GU968470	<i>Zhihengliuella alba</i> (98.3)	0.73 ± 0.06	+	+	+
RS343	GU968474	<i>Exiguobacterium acetylicum</i> (99.5)	0.99 ± 0.09	+	+	+
RS361	GU968485	<i>Brevibacterium epidermidis</i> (98.9)	1.27 ± 0.81	+	+	+
RS448	GU968479	<i>Brevibacterium epidermidis</i> (99.0)	4.90 ± 1.0	+	+	+
RS449	GU968480	<i>Brevibacterium epidermidis</i> (99.1)	0.69 ± 0.27	+	+	+
RS451	GU968481	<i>Brevibacterium iodinum</i> (98.6)	1.11 ± 0.12	+	+	+
RS652	GU968482	<i>Bacillus stratosphericus</i> (99.7)	2.01 ± 0.63	+	+	+
RS654	GU968484	<i>Bacillus stratosphericus</i> (99.9)	1.63 ± 0.21	+	+	+
RSA68	GU968489	<i>Arthrobacter nicotianae</i> (99.2)	0.70 ± 0.06	+	+	+

*ACC deaminase activity (values are mean ± S.D. of three replications); $\mu\text{mol } \alpha\text{-ketobutyrate mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$.Table 10. 배추즙나방 (*Plutella xylostella*) 내장에서 분리한 식물생장촉진 미생물 2차 선발 (10종)

Strains	NCBI Accession numbers	Close relatives	Synthesis of Chitinase		Synthesis of siderophore	
			Plate assay (zone dia. Mm)	Activity (mU ml ⁻¹)	Plate assay (orange zone dia mm)	Arnow' s assay ($\mu\text{g catechol ml}^{-1}$)
PRGB09	EF195343	<i>Serratia marcescens</i>	2.0 ± 0.146	4.32 ± 0.080	2.9 ± 0.219	13.3 ± 0.996
PRGB11	EF195344	<i>Serratia</i> sp.	2.0 ± 0.015	4.27 ± 0.109	2.3 ± 0.146	ND
PRGB15	EF195345	<i>Acinetobacter</i> sp.	2.0 ± 0.080	4.60 ± 0.182	2.5 ± 0.219	ND
PSGB07	EF195347	<i>Serratia</i> sp.	2.3 ± 0.226	4.17 ± 0.036	2.3 ± 0.219	ND
PSGB15	EF195348	<i>Serratia marcescens</i>	2.0 ± 0.102	4.20 ± 0.138	2.3 ± 0.073	ND
PSGB12	EF195350	<i>Serratia marcescens</i>	2.0 ± 0.029	5.03 ± 0.036	2.5 ± 0.219	13.6 ± 0.052
PSGB13	EF195352	<i>Serratia</i> sp.	2.4 ± 0.219	4.10 ± 0.306	2.3 ± 0.146	9.6 ± 0.577
PSGB03	EF195353	<i>Acinetobacter</i> sp.	2.2 ± 0.036	3.94 ± 0.211	2.5 ± 0.073	ND
FLGB16	EF195338	<i>Serratia marcescens</i>	2.0 ± 0.153	5.01 ± 0.029	1.8 ± 0.073	ND
FLGB17	EF195339	<i>Serratia marcescens</i>	2.1 ± 0.146	3.77 ± 0.182	2.4 ± 0.219	16.2 ± 1.311

Table 11. 벼로부터 분리한 메탄을 자화세균 2차 선발 (11종)

Strains	GeneBank Accession numbers	Nearest phylogenetic neighbour	S- oxidizing	IAA production	ACC deaminase
CBMB43	EF126748	<i>Methylobacterium extorquens</i>	+	+	+
CBMB46	EF126743	<i>Methylobacterium</i> sp.	+	+	+
CBMB104	EU194878	<i>Pandoraea sputorum</i>	+++	+	++
CBMB145	EU194883	<i>Methylophilus</i> sp.	+++	+	++
CBMB113	EU194886	<i>Methylophilus</i> sp.	+++	+	++
CBMB147	EU194892	<i>Methylophilus</i> sp.	+++	+	+
CBMB161	EU194893	<i>Methylophilus</i> sp.	+++	+	++
CBMB105	EU194879	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+	++
CBMB18	EF126753	<i>Pseudomonas poae</i>	+	+	+
CBMB23	EF165043	<i>Pantoea ananatis</i>	+	+	+++
CBMB55	EF165046	<i>Pantoea ananatis</i>	+	+	+

○ 우수 미생물 유전자원 확보

- 분리 및 기 보유 미생물 유전자원 중 식물생장촉진 효능이 우수한 유용 유전자원 20종 확보

본 연구실에서 분리 및 기 보유한 미생물 유전자원 중에서 식물생장촉진 효능이 우수한 유용 미생물 유전자원 20종을 선발하여 확보하였다. 확보한 유용 미생물 유전자원 및 특성은 Table 12에 나타냈으며, 충북 토양에서 분리한 균주 7종, 내생균근 포자 포면으로부터 분리한 균주 1종, 배추의 뿌리와 근권에서 분리한 균주 4종, 작물 근권에서 분리한 균주 1종, 배추좀나방 (*Plutella xylostella*) 내장에서 분리한 균주 2종, 벼로부터 분리한 균주 2종, 해안토양에서 분리한 균주 3종으로 총 20종을 확보하였다.

Table 12. 유용 미생물 유전자원 확보 (20종)

Strains	IAA production ¹	ACCD activity ²	Salicylic acid ³	P solubilization	Siderophore production
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB138	0.4 ± 0.00	4.18 ± 1.20	ND	+	-
<i>Arthrobacter scleromae</i> OB149	1.8 ± 0.11	4.67 ± 0.06	ND	-	-
<i>Flavobacterium</i> sp. OB146	ND	1.56 ± 0.17	0.8 ± 0.1	+	-
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS211	ND	ND	0.5 ± 0.1	+	-
<i>Pseudomonas umsongensis</i> OB243	1.0 ± 0.03	1.73 ± 0.09	0.5 ± 0.1	+	+
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB145	4.0 ± 0.05	1.56 ± 0.17	0.8 ± 0.1	+	-
<i>Flavobacterium</i> sp. OS262	ND	7.35 ± 0.44	ND	-	-
<i>Paenibacillus xylanexedens</i> S210B16	1.67 ± 0.04	4.48 ± 4.48	ND	+	-
<i>Pseudomonas poae</i> CPBE37	4.15 ± 3.91	84.3 ± 7.12	ND	+	ND
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CBCEN26	22.0 ± 2.31	75.5 ± 3.18	ND	ND	ND
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CBCN27	19.8 ± 1.04	43.7 ± 2.1	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas</i> sp. CBCEN9	10.3 ± 0.82	47.1 ± 4.7	ND	ND	ND
<i>Pandoraea</i> sp. ATSB30	ND	2.01 ± 0.2	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> sp. PSGB03	7.9 ± 0.2	60.4 ± 0.06	5.8 ± 0.5	+	+
<i>Serratia</i> sp. PRGB11	8.7 ± 0.1	ND	8.0 ± 0.4	+	-
<i>Pseudomonas poae</i> CBMB18	+	+	ND	ND	ND
<i>Pantoea ananatis</i> CBMB55	+	+	ND	ND	ND
<i>Brevibacterium linens</i> RS16	+	4.13 ± 1.05	+	ND	ND
<i>Bacillus stratosphericus</i> RS233	+	1.93 ± 0.54	+	ND	ND
<i>Bacillus stratosphericus</i> RS652	+	2.01 ± 0.63	+	ND	ND

¹µg mL⁻¹; ²α-KB mg⁻¹ protein h⁻¹; ³mg L⁻¹; ND: not detected; (+): positive; (-): negative.

○ 다양한 생물비료 시비효과 최적 토양 pH 조건 확립

- *Bacillus* 생물비료 시비효율 극대화 토양 pH 조건 확립

생물비료의 시비효율을 극대화할 수 있는 토양 pH 조건, 유기물 함량, 토성에 대한 메타분석을 실시하기 위한 데이터베이스를 구축하기 위해 인터넷 학술 검색창 (Science direct, Springer, Wiley & Balckwell, google scholar 등)에서 검색어 및 출판된 논문에 인용된 참고문헌을 검색하여 수집하였다. 핵심어는 pH의 경우, pH, 산성 및 알칼리 조건, 유기물 함량, 토성, 식물 생육주기, 식물유형, *Bacillus*, *Pseudomonas* 등 하나 또는 두 개 이상의 단어를 이용해 조합하여 검색하였으며, 유기물과 토성의 경우도 동일한 방법으로 검색하였다. 분석결과의 신뢰성과 타당성을 위해 선정된 주제와 관련하여 발표된 연구물뿐만 아니라 발표되지 않은 연구들까지 수집하였으며, 메타분석을 시행하기 위해 각 연구에서 미생물 접종 및 비접종 식물의 생장 (total biomass, shoot and root biomass) 및 토양 pH, 양분 흡수 (N, P, K)에 대한 평균, 표준편차 (또는 표준오차) 수치를 수집하였다. 표준오차가 제시된 경우, Meta-Win 계산기를 사용하여 $SE = SD (n^{-1/2})$ 방정식에 따라 전환하였고, 평균과 표준오차가 그래프에 표시된 경우, GAVO data center 내의 'Dexter' software를 사용해 이미지를 수치화시켜 값을 추정하였다. 효과 크기 (effect size) 산출은 자연 로그 (LRR)를 사용하여 계산하며 이는 Meta Win V2.1 프로그램을 통해 산출하였으며, 소규모 연구는 대규모 연구보다 영향을 더 많이 받기 때문에 데이터 결합 시 대규모 연구에 상대적으로 더 많은 가중치를 부여하였다 (Rosenberg et al., 2000). 신뢰구간 추정은 4999 반복 순열 절차를 이용해 모집단 분석의 신뢰도를 높여주며, 출판 편향을 고려하여 부트스트랩 (bootstrap) 신뢰구간을 추정하였다 (Adams et al., 1997). 또한 출판 편향 (publication bias)이 존재하는지의 여부를 확인하기 위해 Spearman 순위 상관계수를 이용해 평가하였다. 메타분석을 이용하여 *Bacillus* 생물비료 시비효율 극대화 토양 pH 조건을 확립하기 위해, 총 92여개의 논문을 통해 다양한 pH 조건에서 *Bacillus* 생물비료의 접종이 작물의 total biomass, shoot and root biomass, 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. 분석한 결과, total biomass는 pH < 6.5 에서 가장 높은 효과크기를 보였으며, 양분흡수의 경우, N, P, K 모두 pH > 7.4에서 가장 높은 효과크기를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 13). 다양한 토양 pH 조건에서 *Bacillus* 생물비료 (*Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 생장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, *B. megaterium*와 *B. subtilis* 생물비료는 pH 6.6~7.3 범위에서 가장 높은 효과크기를 보였으며, *B. polymyxa*는 pH > 7.4에서 높은 효과크기를 보이는 것을 확인하였다 (Figure 14). Mixed species 생물비료는 pH < 6.5에서 높은 효과크기를 보이는 것을 확인하였다.

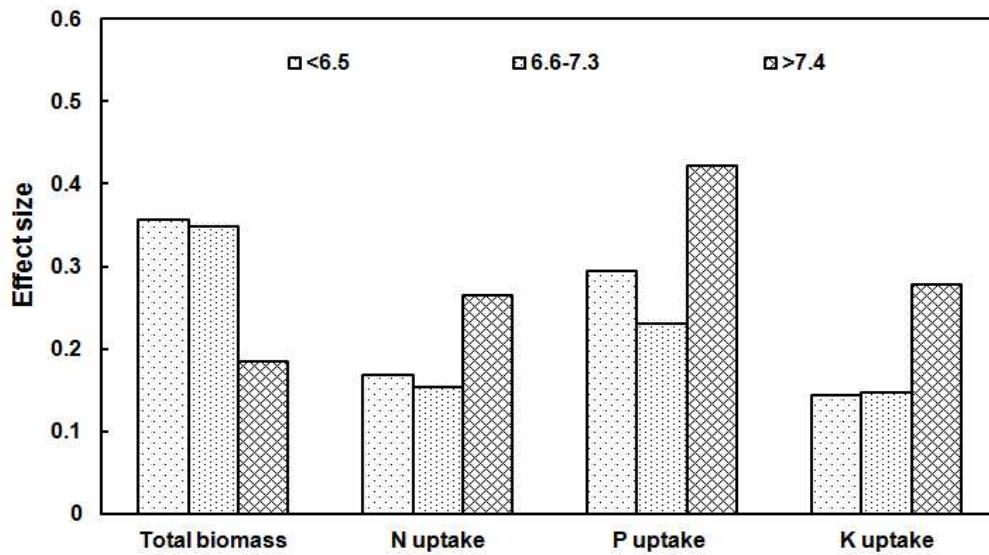


Figure 13. Mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of plant biomass and nutrient uptake response to *Bacillus* inoculation in related to soil pH. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant at $P < 0.05$ and non-significant at $P > 0$.

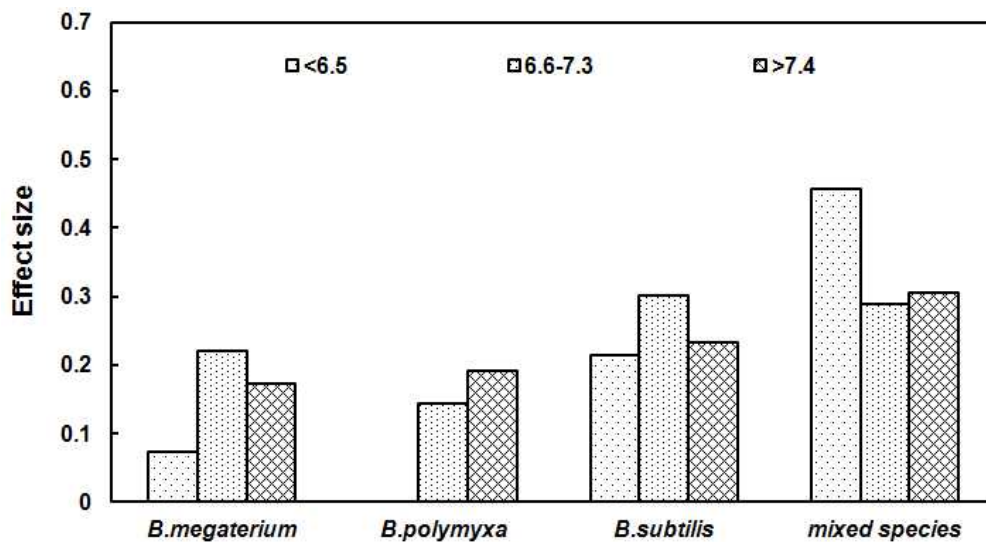


Figure 14. Mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to different species of *Bacillus* inoculation in related to soil pH. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant at $P < 0.05$ and non-significant at $P > 0$.

- *Pseudomonas* 생물비료 시비효율 극대화 토양 pH 조건 확립

Pseudomonas 생물비료의 시비효율을 극대화할 수 있는 토양 pH 조건 확립에 대한 메타분석을 실시하기 위한 데이터베이스 구축 및 효과크기 산출, 신뢰구간 추정, 범주형 분석은 *Bacillus* 생물비료의 분석방법과 동일하게 수행하였다. 메타분석을 이용하여 *Pseudomonas* 생물비료 시비효율 극대화 토양 pH 조건을 확립하기 위해, 총 105여개의 논문을 통해 다양한 pH 조건에서 *Pseudomonas* 생물비료의 접종이 작물의 total biomass, shoot and root biomass, 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. 분석한 결과, total biomass는 pH < 6.5 에서 가장 높은 효과크기를 보였고, 양분흡수의 경우, N uptake는 pH < 6.5에서 유의성 있는 효과크기를 보였으며, P와 K uptake는 각각 pH > 7.4와 pH < 6.5에서 높은 효과크기를 확인하였다 (Figure 15). 다양한 토양 pH 조건에서 *Pseudomonas* 생물비료 (*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 생장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, *P. putida*와 *P. fluorescens* 생물비료 모두 pH > 7.4 범위에서 가장 높은 효과크기를 보이는 것을 확인하였다 (Figure 16). Mixed species 생물비료 또한 pH > 7.4에서 높은 효과크기를 보이는 것을 확인하였다.

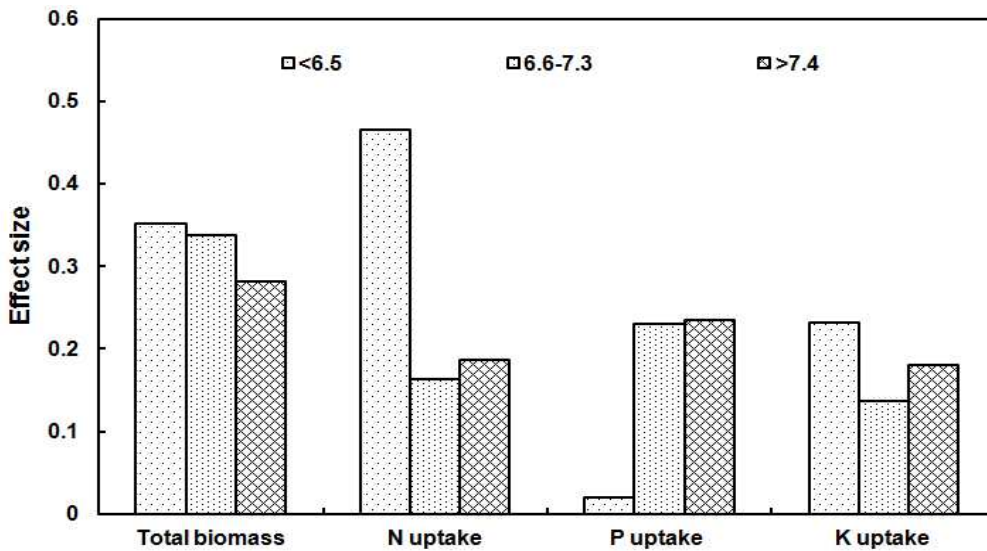


Figure 151. Mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of plant biomass and nutrient uptake response to *Pseudomonas* inoculation in relation to soil pH. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant at $P < 0.05$ and non-significant at $P > 0$.

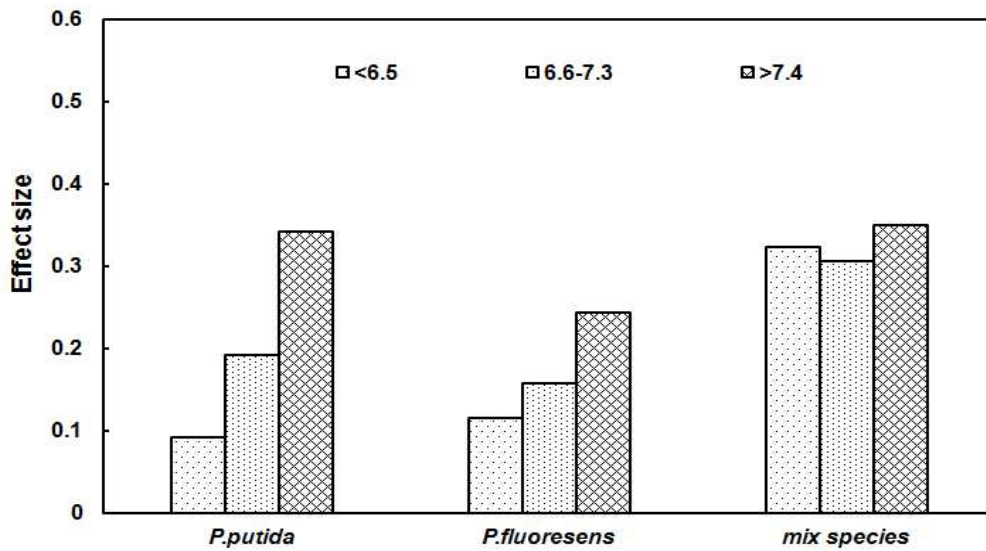


Figure 16. Mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to different species of *Pseudomonas* inoculation in relation to soil pH. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant at $P < 0.05$ and non-significant at $P > 0$.

○ 다양한 생물비료별 시비효율 극대화 토양 유기물 함량 조사

- *Bacillus* 생물비료 시비효율 극대화 토양 유기물 함량 조사

메타분석을 이용하여 *Bacillus* 생물비료 시비효율 극대화 토양 유기물 함량을 조사하기 위해, 총 92여개의 논문을 통해 다양한 유기물 함량 조건에서 *Bacillus* 생물비료의 접종이 작물의 total biomass (TB), shoot (SB) biomass, root biomass (RB), 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. 본 연구에 대한 독립변인은 생물비료와 토양 유기물 함량은 1.2이하와 1.2이상으로 이는 토양 특성을 고려해 미국 농무부 (USDA)에 기재된 사항에 따라 세분화하였다. 분석한 결과, TB, SB, RB, N과 P 양분흡수에서는 유기물 함량이 1.2이하인 처리구에서 유기물 함량이 1.2이상인 처리구에 비해 유의성 있는 효과크기를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 17). 다양한 토양 유기물함량 조건에서 *Bacillus* 생물비료 (*B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 생장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, *B. megaterium*와 *B. polymyxa* 생물비료는 유기물 함량에 따른 유의성 있는 효과를 확인할 수 없었고, *B. subtilis*, Mixed species, Other species 생물비료에서는 유기물 함량이 1.2이하 처리구에서 1.2이상인 처리구에 비해 유의성 있는 효과크기를 확인할 수 있었다 (Figure 18).

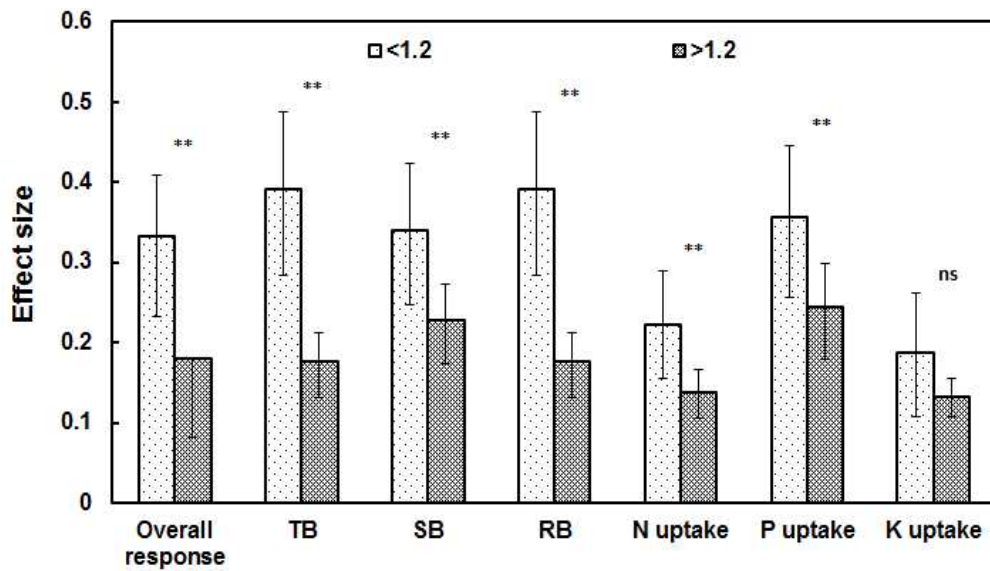


Figure 17. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response, plant biomass and nutrient uptake response to *Bacillus* inoculation in different range of soil OM. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (**) at $P < 0.05$ and non-significant (ns) at $P > 0$.

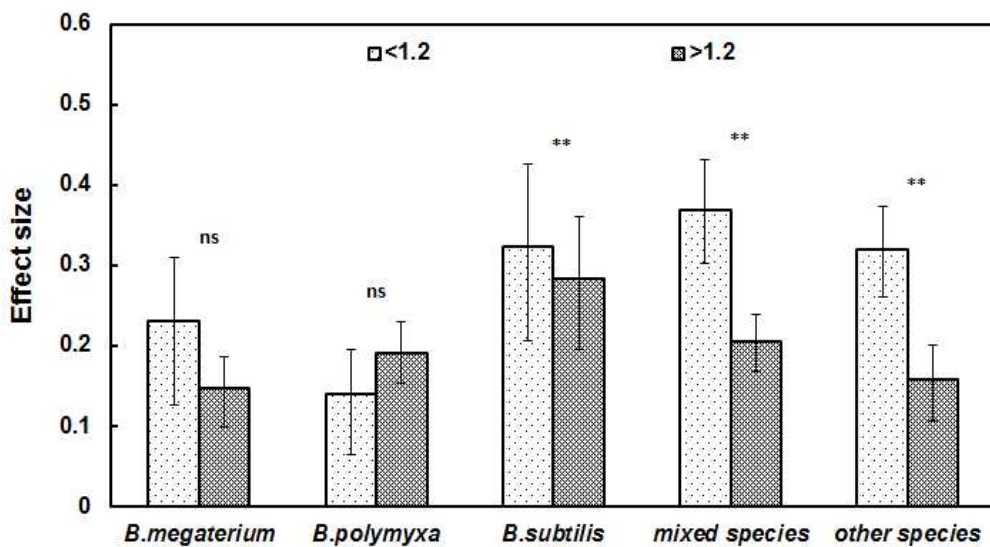


Figure 18. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Bacillus* inoculation in different range of soil OM. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (**) at $P < 0.05$ and non-significant (ns) at $P > 0$.

- *Pseudomonas* 생물비료 시비효율 극대화 토양 유기물 함량 조사

메타분석을 이용하여 *Pseudomonas* 생물비료 시비효율 극대화 토양 유기물 함량을 조사하기 위해, 총 77여개의 논문을 통해 다양한 유기물 함량에서 *Pseudomonas* 생물비료의 접종이 작물의 total biomass, shoot and root biomass, 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. 유기물 함량은 *Pseudomonas*의 경우, 1.3이하와 1.3이상으로 선정하여 분석하였다. 분석한 결과, 전체 식물생장, shoot and root biomass는 유기물 함량이 1.3이하인 처리구에서 유의성 있는 효과크기를 보였으나, N 흡수의 경우는 유기물 함량이 1.3이상인 처리구에서 유의성 있는 효과크기를 확인할 수 있었다 (Figure 19). 다양한 토양 유기물함량 조건에서 *Pseudomonas* 생물비료 (*P. putida*, *P. fluorescense*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 생장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, *P. putida*와 Mixed species 생물비료는 유기물 함량이 1.3이하인 처리구에서 유의성 있는 효과크기를 보였으며, 나머지 처리구에서는 유기물 함량에 따른 유의성 있는 효과크기를 확인할 수 없었다 (Figure 20).

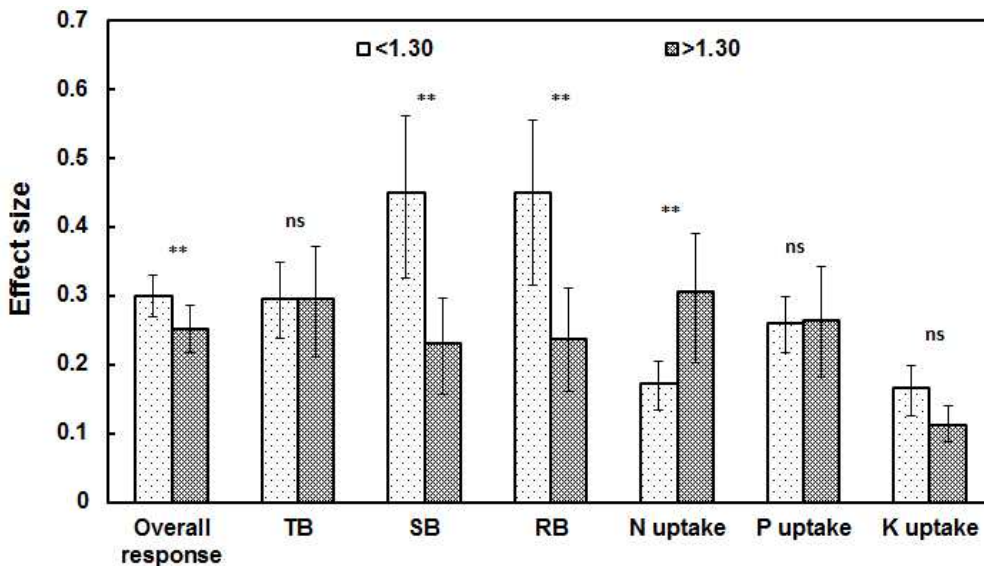


Figure 19. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Pseudomonas* inoculation in different range of soil OM. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (**) at $P < 0.05$ and non-significant (ns) at $P > 0$.

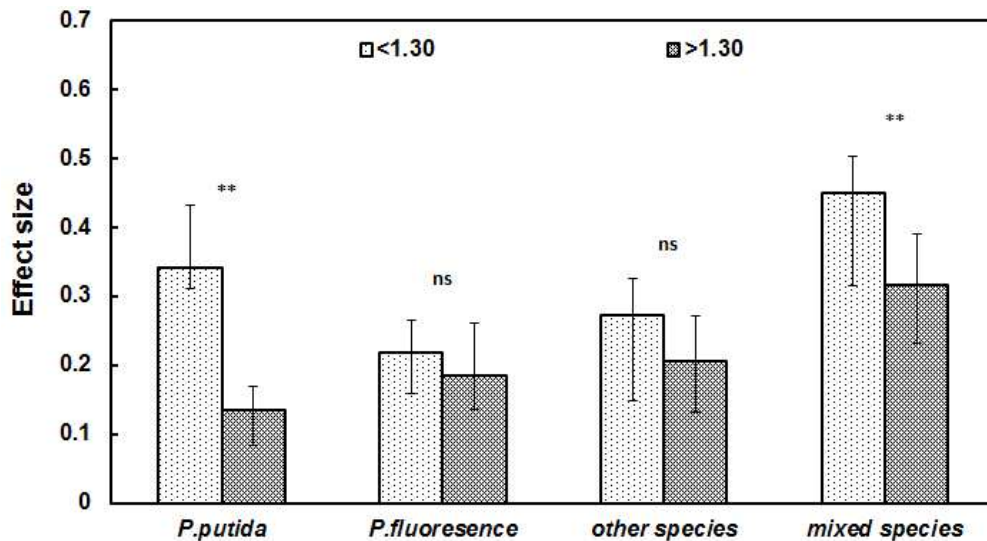


Figure 20. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Pseudomonas* inoculation in different range of soil OM. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (**) at $P < 0.05$ and non-significant (ns) at $P > 0$.

○ 다양한 생물비료별 시비효율 극대화 토성 조사

- *Bacillus* 생물비료 시비효율 극대화 토양 토성 조사

메타분석을 이용하여 *Bacillus* 생물비료 시비효율 극대화 토양 토성을 조사하기 위해, 총 92여개의 논문을 통해 토양 토성에 따른 *Bacillus* 생물비료의 접종이 작물의 total biomass, shoot and root biomass, 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. 본 연구에 대한 독립변인은 생물비료 (*Bacillus*)와 토양 토성은 sandy와 non-sandy로 선정하였고, 이는 토양 특성을 고려해 미국 농무부 (USDA)에 기재된 사항에 따라 세분화하였다. 분석결과, total biomass는 sandy 토양에서 유의성 있는 효과크기를 보였으며, N 흡수에서는 non-sandy 토양에서 유의성 있는 효과크기를 보이는 것을 확인하였다 (Figure 21). 토양 토성에 따른 *Bacillus* 생물비료 (*B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 생장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, Mixed species 생물비료 처리구는 non-sandy 토양에서 유의성 있는 효과크기를 보이는 것을 확인하였다 (Figure 22).

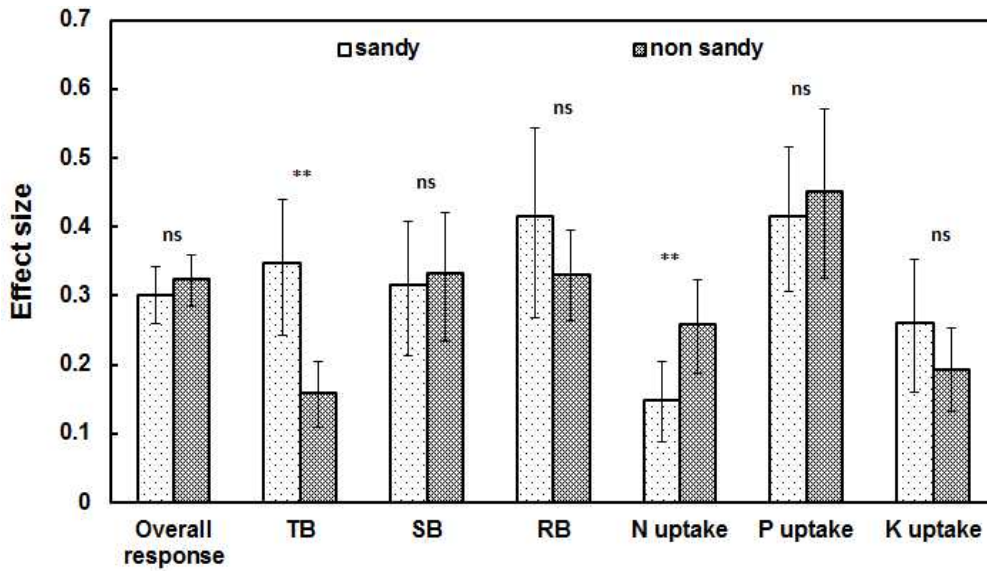


Figure 21. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response, plant biomass and nutrient uptake response to *Bacillus* inoculation in different range of soil types (sandy and non-sandy). Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (**) at $P < 0.05$ and non-significant (ns) at $P > 0$.

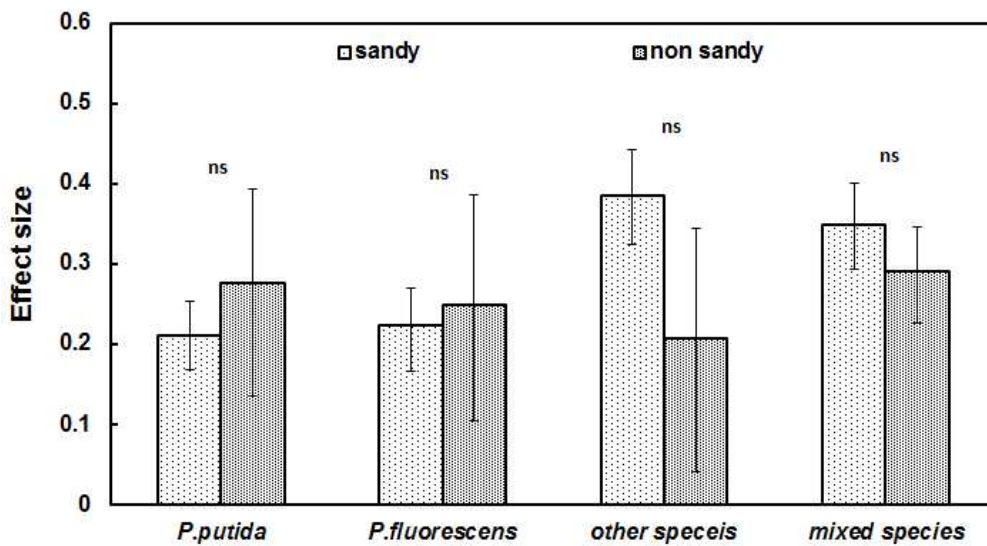


Figure 22. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Bacillus* inoculation in different range of soil types (sandy and non-sandy). Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (**) at $P < 0.05$ and non-significant (ns) at $P > 0$.

- *Pseudomonas* 생물비료 시비효율 극대화 토양 토성 조사

메타분석을 이용하여 *Pseudomonas* 생물비료 시비효율 극대화 토양 유기물 함량을 조사하기 위해, 총 105여개의 논문을 통해 다양한 유기물 함량에서 *Pseudomonas* 생물비료의 접종이 작물의 total biomass, shoot and root biomass, 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. 메타분석을 실시하기 위한 데이터베이스 구축 및 효과크기 산출, 신뢰구간 추정, 범주형 분석은 *Bacillus* 생물비료의 분석방법과 동일하게 수행하였다. 분석한 결과, Shoot biomass와 N 흡수에서는 non-sandy 토양에서 sandy 토양에 비해 높은 효과크기 (size effect)를 보였으나, 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었고, Total and root biomass, P 흡수의 경우는 sandy 토양에서 높은 효과크기를 보였으나, 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었다 (Figure 23). 토양 토성에 따른 *Pseudomonas* 생물비료 (*P. putida*, *P. fluorescense*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 생장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, *P. putida* 균주 *P. fluorescense* 균주 처리구에서는 non-sandy 토양에서 높은 효과크기를 보였고, 이외의 다른 *Pseudomonas* 균주 처리구와 다른 균주와의 혼합 처리구 (mixed species)는 sandy 토양에서 높은 효과크기를 확인하였으나, 모든 처리구에서 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었다 (Figure 24).

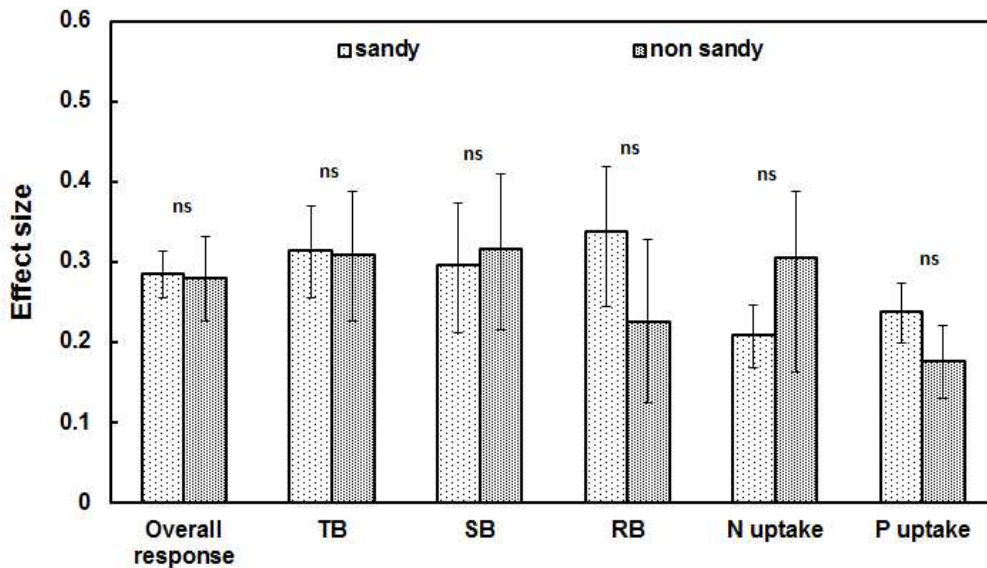


Figure 23. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response, plant biomass and nutrient uptake response to *Pseudomonas* inoculation in different range of soil types (sandy and non-sandy). Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (**) at $P < 0.05$ and non-significant (ns) at $P > 0$.

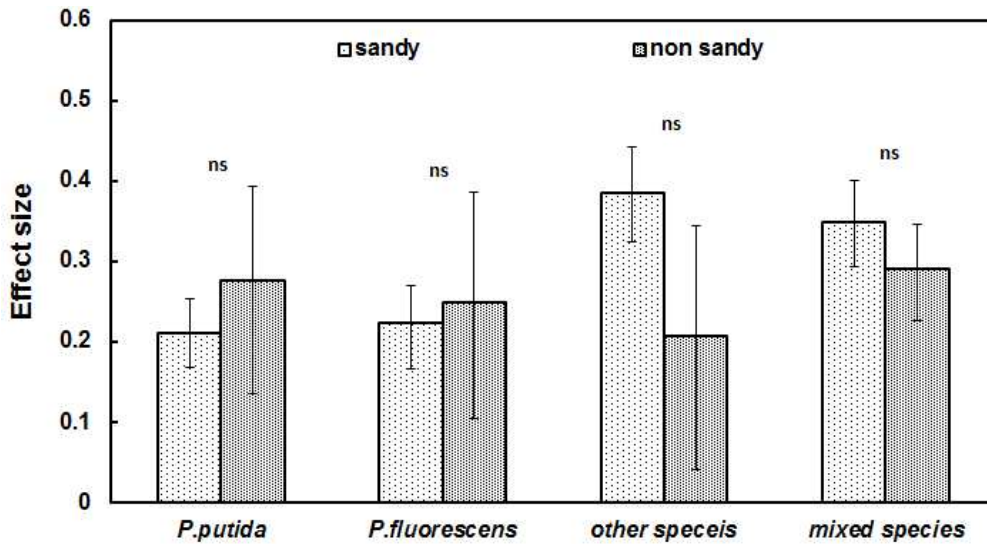


Figure 24. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Pseudomonas* inoculation in different range of soil types (sandy and non-sandy). Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (**) at $P < 0.05$ and non-significant (ns) at $P > 0$.

○ 작물 특성별 생분비료 효과 최적화 조건 메타분석

- 식물의 생육주기에 따른 *Bacillus* 생분비료 효능 비교 분석

메타분석을 이용하여 식물의 생육주기 (일년생, 다년생)에 따른 *Bacillus* 생분비료의 시비효율을 조사하기 위해, 공시식물은 일년생 식물인 병아리콩 (*Cicer arietinum*)과 옥수수 (*Zea mays*), 다년생 식물인 사탕무 (*Beta vulgaris*)와 밀 (*Triticum aestivum* L.)를 선정하여 수행하였다. 총 102여개의 논문을 통해 식물 생육주기에 따라 *Bacillus* 생분비료의 접종이 식물의 생장 (total biomass, shoot and root biomass)과 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. *Bacillus* 생분비료의 접종은 total biomass와 P 양분흡수의 경우, 병아리콩 (*C. arietinum*)에 접종했을 유의성 있는 효과 크기를 보였으며, root biomass는 밀 (*T. aestivum* L.)에 접종했을 때 유의적인 효과 크기를 보였으나, 일년생과 다년생간의 유의성 있는 효과 크기 차이는 확인할 수 없었다 (Figure 25). 식물 생육주기에 따른 *Bacillus* 생분비료 (*B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 생장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, Mixed species 생분비료 처리구는 옥수수 (*Z. mays*)에서 유의성 있는 효과 크기를 보이는 것을 확인하였고, other species는 밀 (*T. aestivum* L.)에 접종했을 때 유의적인 효과 크기를 보였다 (Figure 26).

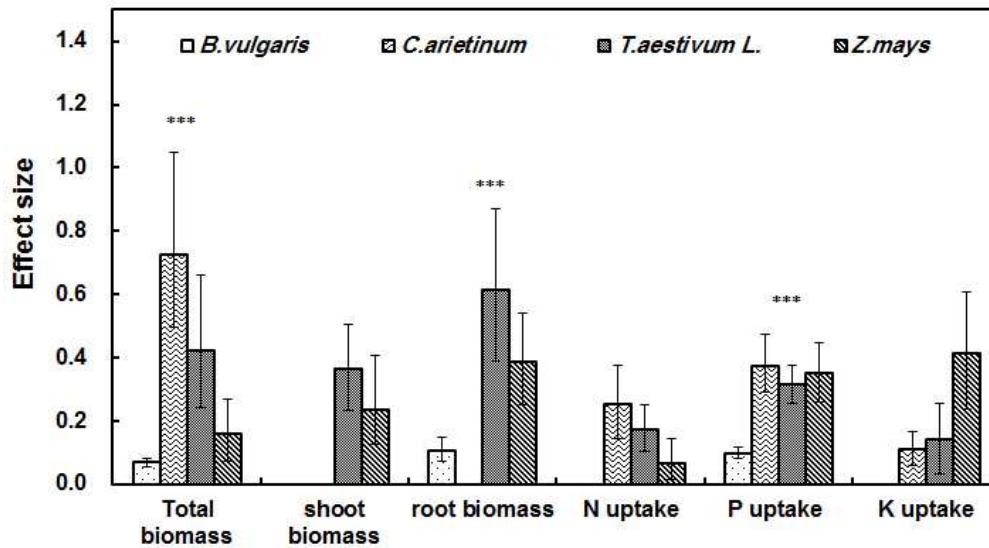


Figure 25. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Bacillus* inoculation in different plant life cycle. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

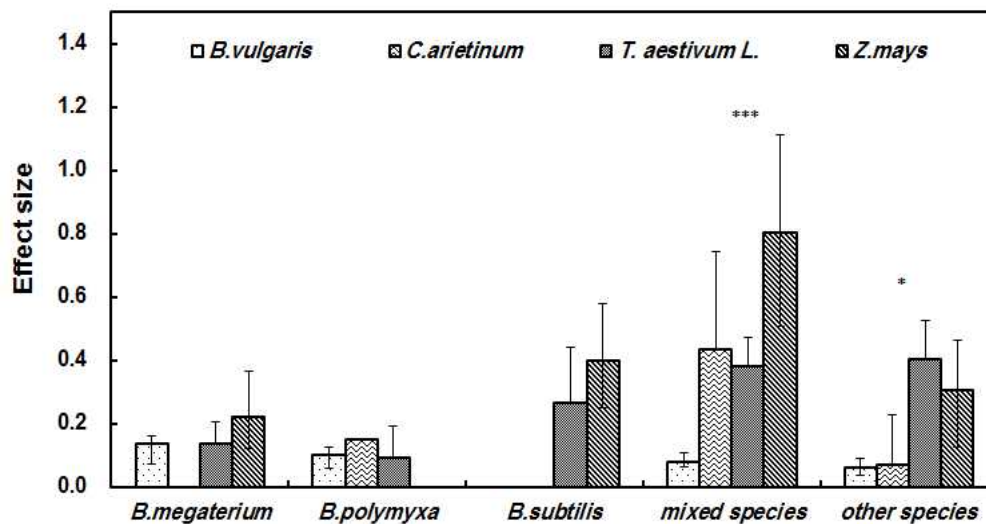


Figure 26. Mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to different species of *Bacillus* inoculation in related to plant life cycle. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

- 식물의 생육주기에 따른 *Pseudomonas* 생물비료 효능 비교 분석

메타분석을 이용하여 식물의 생육주기 (일년생, 다년생)에 따른 *Pseudomonas* 생물비료의 시비 효율을 조사하기 위해, 공시식물은 일년생 식물인 병아리콩 (*C. arietinum*)과 옥수수 (*Zea mays*), 다년생 식물인 완두콩 (*Pisum sativum*)와 밀 (*T. aestivum* L.)를 선정하여 수행하였다. 총 98여개의 논문을 통해 식물 생육주기에 따라 *Pseudomonas* 생물비료의 접종이 식물의 생장 (total biomass, shoot and root biomass)과 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. *Pseudomonas* 생물비료의 접종은 total biomass의 경우, 병아리콩 (*C. arietinum*)에 접종했을 유의성 있는 효과크기의 차이를 보였고 shoot biomass는 옥수수 (*Z. mays*)에 접종했을 때, root biomass와 P 양분흡수는 밀 (*T. aestivum* L.)에 접종했을 때 유의적인 효과크기를 보였으나, 일년생과 다년생 간의 유의성 있는 효과크기 차이는 확인할 수 없었다 (Figure 27). 식물 생육주기에 따라 *Pseudomonas* 생물비료 (*P. putida*, *P. fluorescens*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 생장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, 모든 처리구에서 유의성 있는 차이를 확인할 수 있었으나 생육주기에 따른 차이는 확인할 수 없었다 (Figure 28). *P. putida* 종의 경우 병아리콩 (*C. arietinum*)에 접종했을 때는 음의 효과크기를 보이는 것을 확인하였으며, *P. putida*와 *P. fluorescens* 종은 옥수수에 접종했을 때 가장 높은 효과크기를 보였다. Mix species는 완두콩 (*P. sativum*)에, other species는 밀 (*T. aestivum* L.)에 접종했을 때 유의적인 효과크기를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

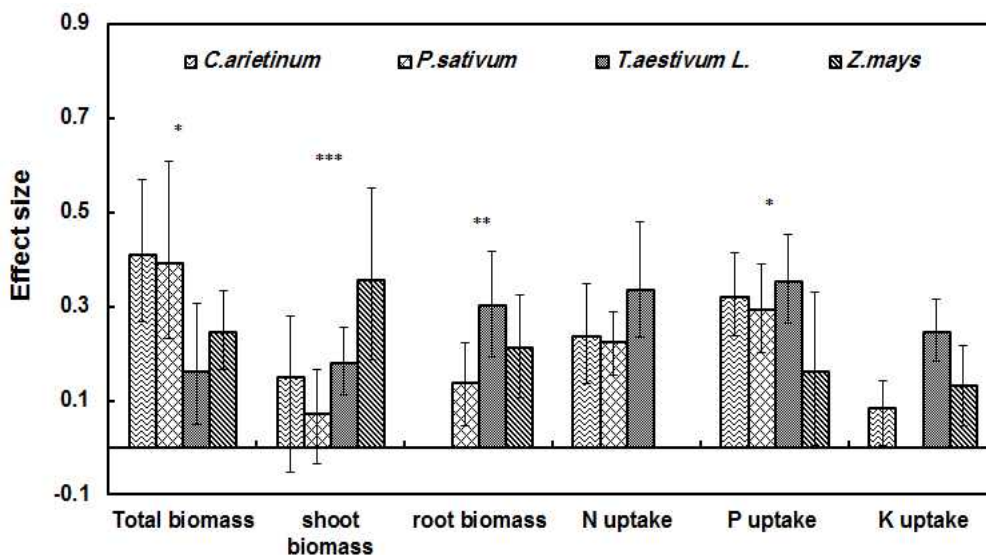


Figure 27. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Pseudomonas* inoculation in different plant life cycle. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

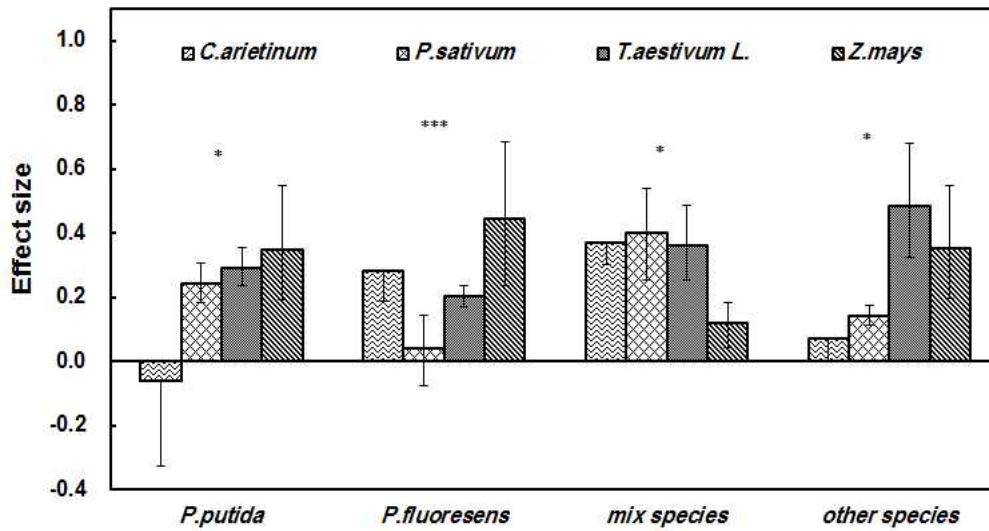


Figure 28. Mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to different species of *Pseudomonas* inoculation in related to plant life cycle. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

- 식물의 유형에 따른 *Bacillus* 생물비료 효능 비교 분석

메타분석을 이용하여 식물의 유형 (Grass, Herb, Woody)에 따른 *Bacillus* 생물비료의 시비효율을 조사하기 위해, 총 133여개의 논문을 통해 식물 유형에 따라 *Bacillus* 생물비료의 접종이 식물의 성장 (total biomass, shoot and root biomass)과 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. Grass (목초), Herb (초본), Woody (목재)의 유형에 따라 *Bacillus* 생물비료 접종 효과를 비교 분석한 결과, total biomass, shoot biomass 에서는 식물 유형에 따른 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었으나, root biomass와 양분흡수의 경우 woody에서 *Bacillus* 생물비료의 접종이 유의성 있는 효과크기를 보이는 것을 확인하였다 (Figure 29). 식물 유형에 따른 *Bacillus* 생물비료 (*B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 성장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, 세 가지 *Bacillus* 종에서는 식물 유형에 따른 유의성 있는 생물비료 접종효과를 확인할 수 없었으나, mixed species와 other species 생물비료 처리구에서 woody에 접종하였을 때 유의성 있는 효과크기의 차이를 보이는 것을 확인하였다 (Figure 30).

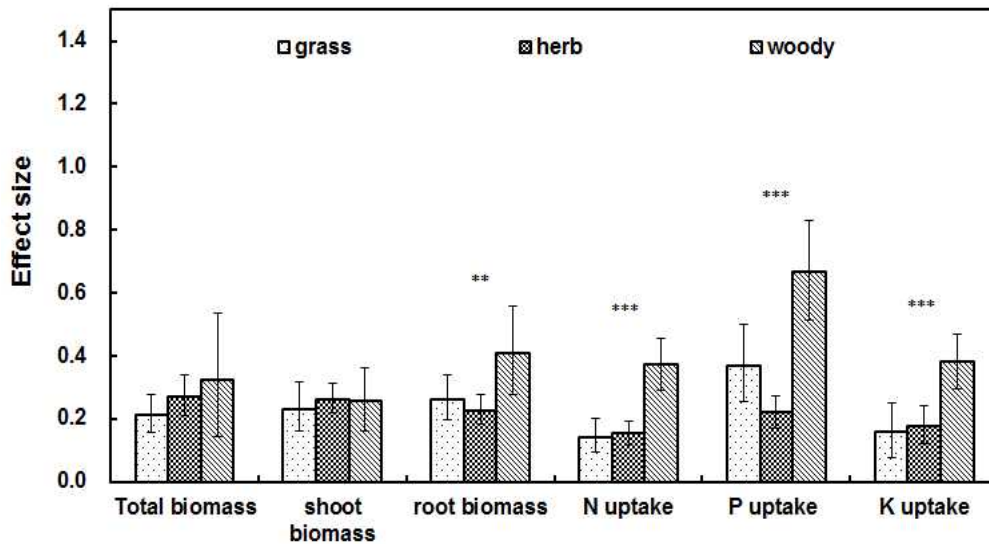


Figure 29. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Bacillus* inoculation in different plant types. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

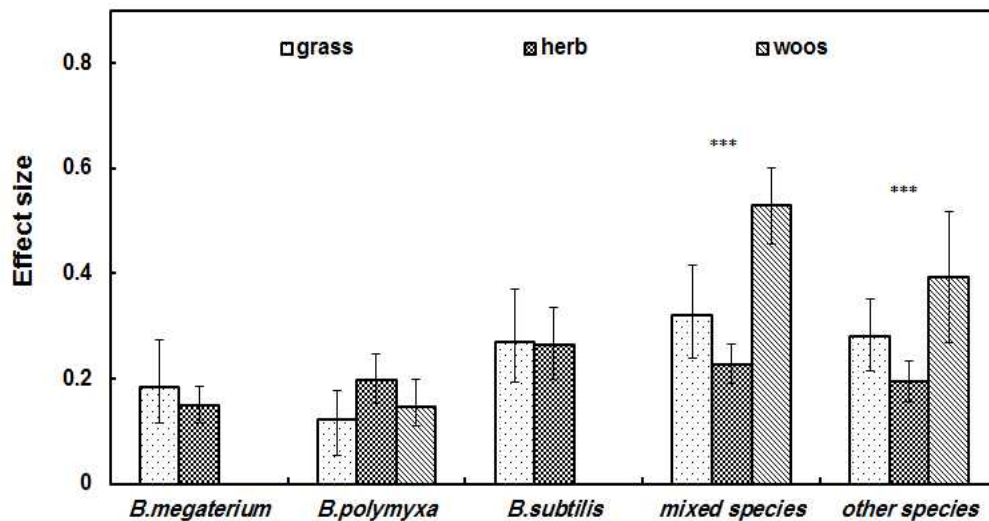


Figure 30. Mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to different species of *Bacillus* inoculation in relation to plant types. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

- 식물의 유형에 따른 *Pseudomonas* 생물비료 효능 비교 분석

메타분석을 이용하여 식물의 유형 (Grass, Herb, Woody)에 따른 *Pseudomonas* 생물비료의 시비 효율을 조사하기 위해, 총 129여개의 논문을 통해 식물유형에 따라 *Pseudomonas* 생물비료의 접종이 식물의 성장 (total biomass, shoot and root biomass)과 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. Grass (목초), herb (초본), woody (목재)의 유형에 따라 생물비료 접종 효과를 비교 분석한 결과, total biomass 에서는 grass에 생물비료를 접종했을 때 herb에 비해 유의성 있는 효과크기를 보였으며, root와 shoot biomass, K 양분흡수에서는 식물유형에 따른 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었으나, N 양분흡수는 woody에서 *Pseudomonas* 생물비료의 접종이 유의성 있는 효과크기를 보였고, P 양분흡수는 grass에 접종하였을 때 다른 식물유형에 비해 유의적으로 높은 효과크기를 확인하였다 (Figure 31). 식물유형에 따른 *Pseudomonas* 생물비료 (*P. putida*, *P. fluorescense*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 성장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, 모든 처리구에서 식물유형에 따른 유의성 있는 *Pseudomonas* 생물비료 접종효과를 확인할 수 없었다 (Figure 32).

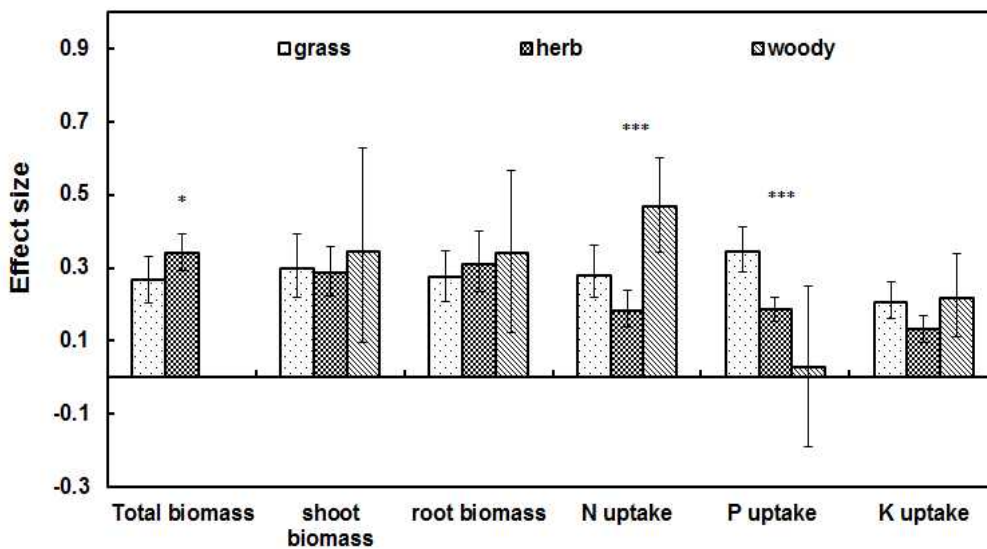


Figure 31. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Pseudomonas* inoculation in different plant types. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

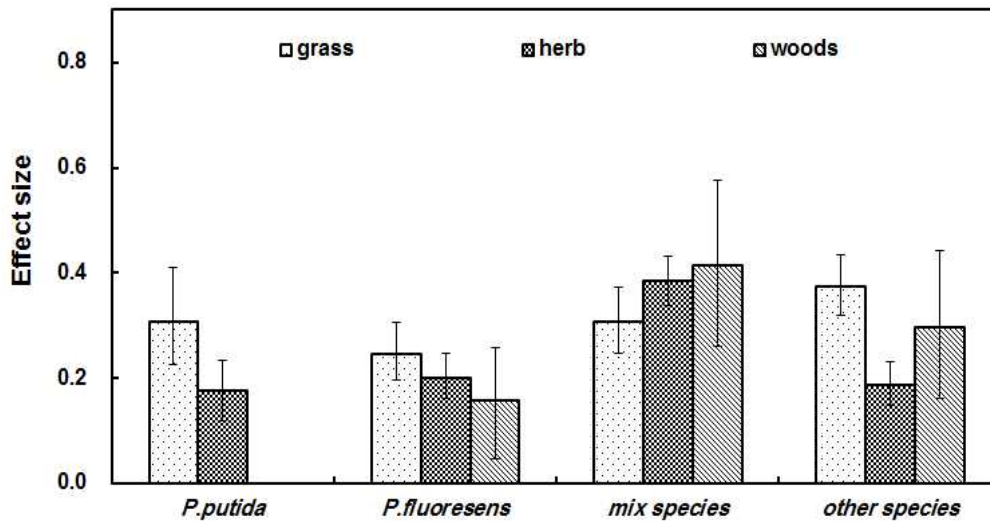


Figure 32. Mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to different species of *Pseudomonas* inoculation in relation to plant types. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

○ 시비방법 및 재배조건에 따른 생물비료 효과 최적화 조건 확립

- *Bacillus* 생물비료의 접종방법에 따른 효능 비교 분석

메타분석을 이용하여 총 105개의 논문을 통해 *Bacillus* 생물비료의 토양 및 종자 접종방법에 따른 식물의 Total biomass, shoot and root biomass, 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. 분석한 결과, total biomass, N, P, K 양분흡수는 토양에 균주를 접종한 처리구가 종자에 균주를 접종한 처리구에 비해 높은 효과크기를 보였으며, total biomass는 유의적인 효과크기의 차이를 보였다 (Figure 33). Shoot and root biomass는 종자에 균주를 접종한 처리구에서 높은 효과크기를 보였으나 유의적인 차이는 확인할 수 없었다. 미생물의 접종방법에 따른 *Bacillus* 생물비료 (*B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 생장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, *B. megaterium* 를 제외한 *Bacillus* 생물비료 접종 처리구에서는 근권에 접종하였을 때, 식물의 생장에 대한 높은 효과크기를 보였으나, *Bacillus* 생물비료의 종류와 접종방법에 따른 유의적인 효과크기는 확인할 수 없었다 (Figure 34).

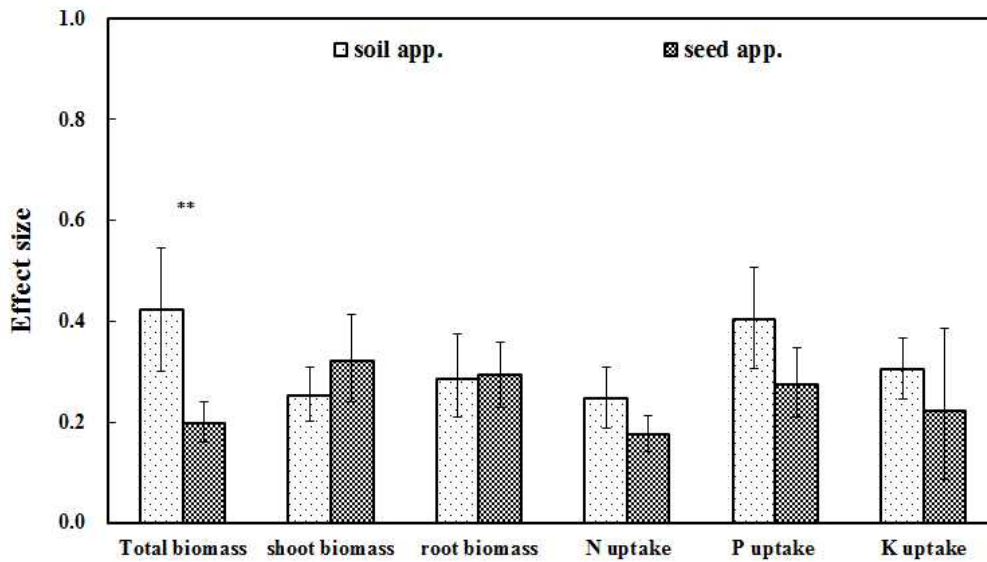


Figure 33. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Bacillus* inoculation in different application method. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

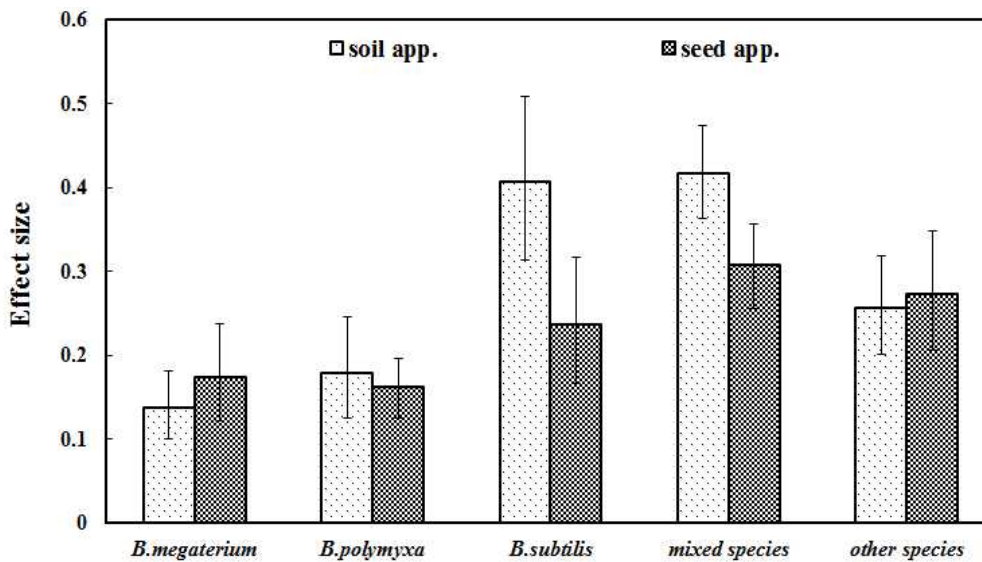


Figure 34. Mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to different species of *Bacillus* inoculation in related to different application method. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

- 접종방법에 따른 *Pseudomonas* 생물비료 효능 비교 분석

메타분석을 이용하여 접종방법 (토양, 종자)에 따른 *Pseudomonas* 생물비료의 시비효율을 조사하기 위해, 총 149여개의 논문을 통해 접종방법에 따라 *Pseudomonas* 생물비료의 접종이 식물의 성장 (total biomass, shoot and root biomass)과 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. 분석한 결과, P 양분흡수는 토양에 비해 종자에 접종한 처리구에서 높은 효과크기를 보였고, 이외 total, shoot, root biomass, N과 K 양분흡수는 토양에 접종한 처리구에서 높은 효과크기를 보이는 것을 확인하였다 (Figure 35). 접종방법에 따른 *Pseudomonas* 생물비료 (*P. putida*, *P. fluorescense*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 성장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, *P. putida*, *P. fluorescense*, Mixed species는 종자에 균주를 접종한 처리구에서 높은 효과크기를 보였으며, 이외 other species는 토양에 접종한 처리구에서 높은 효과크기를 보였다. *Pseudomonas* 생물비료와 접종방법에 따른 유의적인 효과크기의 차이는 확인할 수 없었다 (Figure 36).

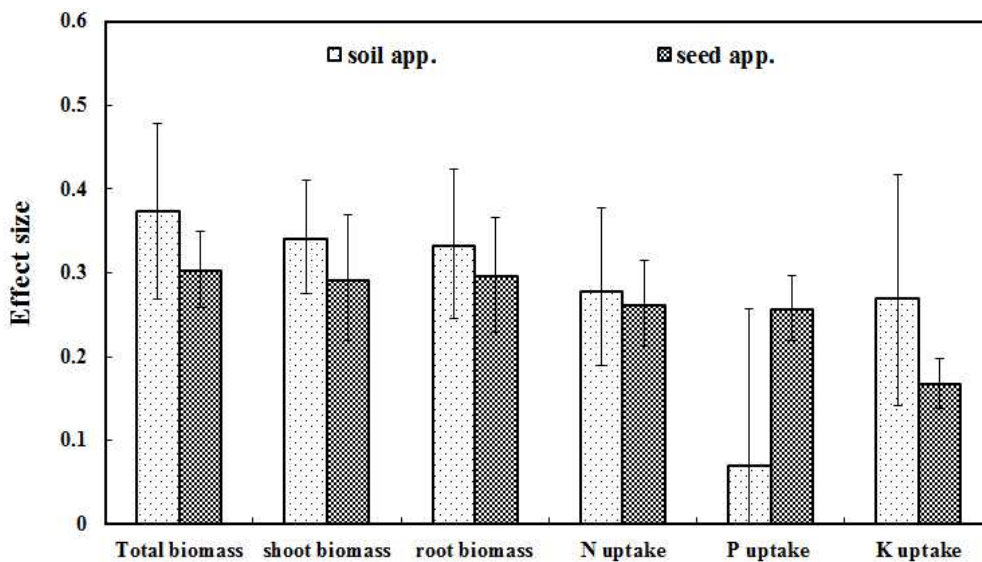


Figure 35. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Pseudomonas* inoculation in different application method. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

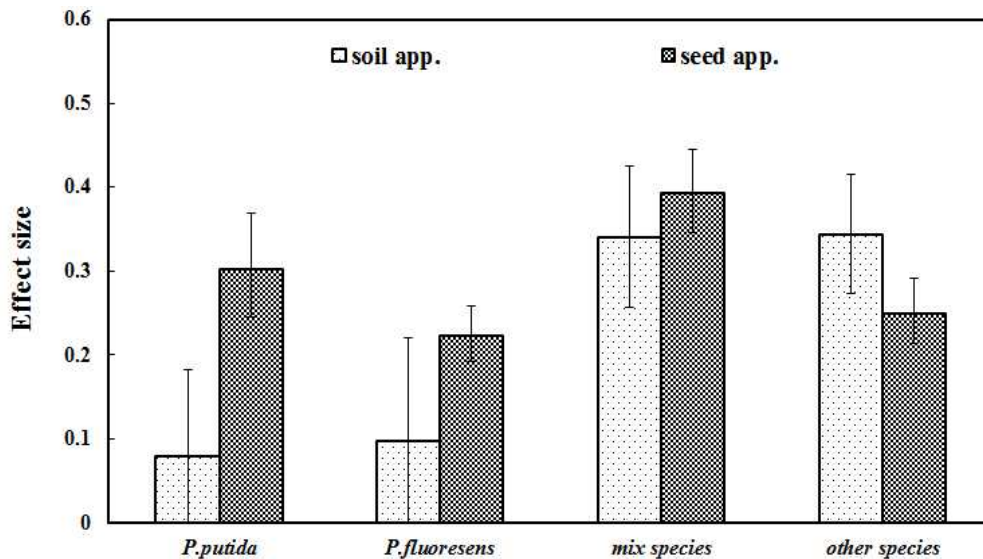


Figure 36. Mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to different species of *Pseudomonas* inoculation in relation to different application method. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

- 재배조건에 따른 *Bacillus* 생물비료의 효능 비교 분석

메타분석을 이용하여 총 134개의 논문을 통해 포트와 필드 재배조건에서 *Bacillus* 생물비료의 접종이 식물의 Total biomass, shoot and root biomass, 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. 분석한 결과, total and root biomass, N 양분흡수는 포트실험에서 *Bacillus* 생물비료 접종에 따른 높은 효과크기를 보였고, total biomass는 매우 유의적으로 높은 효과크기를 보였다 (Figure 37). shoot biomass, P and K 양분흡수는 포트실험에 비해 필드실험에 *Bacillus* 생물비료를 접종하였을 때 높은 효과크기를 보였고 K 양분흡수는 유의적으로 높은 효과크기를 보이는 것을 확인하였다. *Bacillus* 생물비료 (*B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, Mixed species, Other species)의 접종이 재배조건에 따라 식물의 생장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, *B. megaterium*와 *B. subtilis*는 포트실험에서, *B. polymyxa*와 mixed species는 필드실험 조건에서 높은 효과크기를 보였고, 이를 제외한 other species를 접종한 처리구에서는 포트실험에서 유의적으로 높은 효과크기를 보이는 것을 확인하였다 (Figure 38).

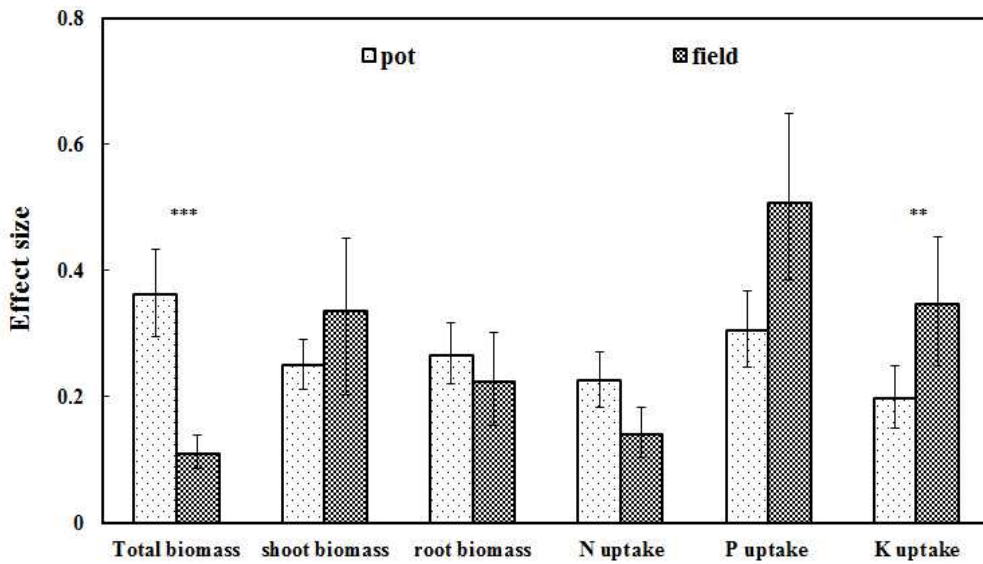


Figure 37. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Bacillus* inoculation in experimental location. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

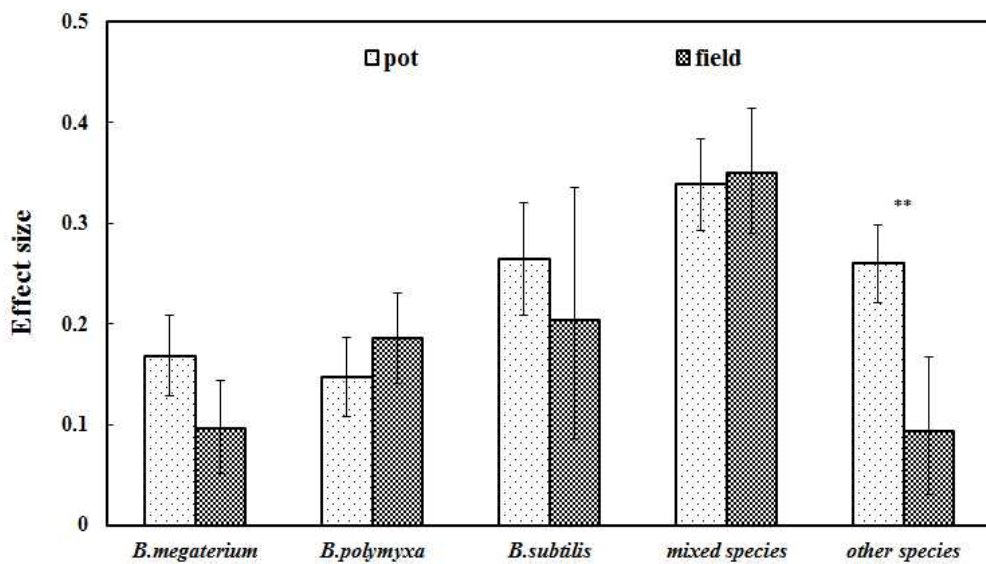


Figure 38. Mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to different species of *Bacillus* inoculation in related to experimental location. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

- 재배조건에 따른 *Pseudomonas* 생물비료 효능 비교 분석

메타분석을 이용하여 재배조건 (포트, 필드)에 따른 *Pseudomonas* 생물비료의 시비효율을 조사하기 위해, 총 150여개의 논문을 통해 재배조건에 따라 *Pseudomonas* 생물비료의 접종이 식물의 성장 (total biomass, shoot and root biomass)과 양분흡수 (N, P, K)에 미치는 효과를 분석하였다. 분석결과를 확인한 결과, 식물성장 (total, shoot, root)은 필드실험 조건에서 *Pseudomonas* 생물비료를 접종했을 때 높은 효과크기를 보였으며, total biomass는 유의적으로 높은 효과크기를 보였다 (Figure 39). 양분흡수 (N, P, K)는 필드실험에 비해 포트실험 조건에서 생물비료의 접종에 따른 높은 효과크기를 보였고, 이 중에서 N 양분흡수는 유의적으로 높은 효과크기를 보였다. 재배조건에 따른 *Pseudomonas* 생물비료 (*P. putida*, *P. fluorescense*, Mixed species, Other species)의 접종이 식물의 성장에 미치는 효과를 메타분석을 이용하여 분석한 결과, *P. putida*, *P. fluorescense*, other species는 필드실험 조건에서 접종했을 때 식물의 성장에 높은 효과크기를 보였고, Mixed species는 포트실험 조건에서 생물비료 접종에 따른 높은 효과크기를 보이는 것을 확인하였다 (Figure 40).

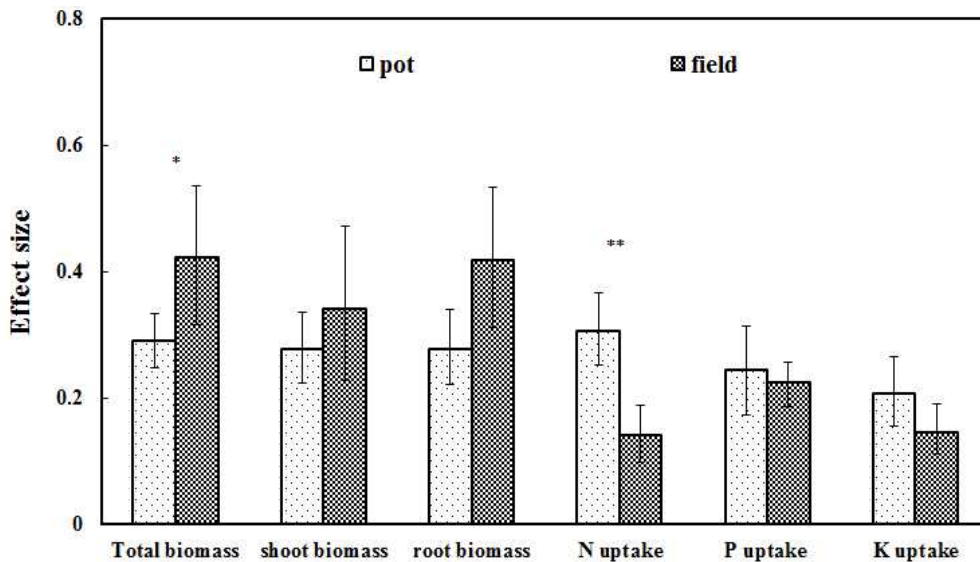


Figure 39. Overall mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to *Pseudomonas* inoculation in experimental location. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

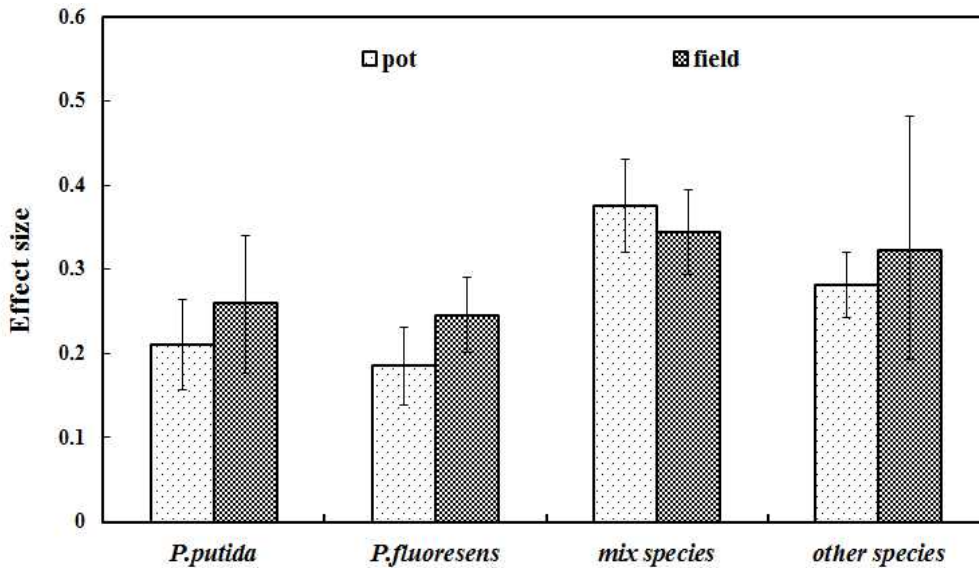


Figure 40. Mean effect size ($\pm 95\%$ BS CIs) of overall plant response to different species of *Pseudomonas* inoculation in related to experimental location. Where the CIs do not overlap zero, the effect size for a parameter is significant (***) at $P < 0.001$, (**) at $P < 0.01$ and (*) at $P < 0.05$.

제 1 협동과제 : 선발 미생물 대량생산을 통한 생물비료 제조 및 산업화

○ 선발 미생물 유전자원의 대량배양 기술 확립

- 대량배양에 적합한 미생물 유전자원의 에너지원 선발

대량배양에 적합한 미생물 유전자원의 에너지원을 선발하기 위해 배지의 다양한 탄소원과 질소원의 농도에서 균주의 생장을 측정하였다. 공시균주는 *Methylobacterium*속의 CBMB20과 CBMB27 균주를 이용하였고, 배지는 Yeast extract malt peptone (YEMP, yeast extract 3.0 g L⁻¹, malt extract 3.0 g L⁻¹, soy peptone 5.0 g L⁻¹, glucose 10.0 g L⁻¹)를 사용하였으며, 대조구 배지는 Ammonium mineral salt (AMS, sodium succinate 5.0 g L⁻¹, NH₄Cl 0.5 g L⁻¹, K₂HPO₄ 0.7 g L⁻¹, KH₂PO₄ 0.54 g L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g L⁻¹, CaCl₂ · 2H₂O 0.2 g L⁻¹, FeSO₄ · 7H₂O 0.004 g L⁻¹, ZnSO₄ · 7H₂O 100.0 µg L⁻¹, MnCl₂ · 4H₂O 30.0 µg L⁻¹, H₃BO₄ 300.0 µg L⁻¹, CoCl₂ · 6H₂O 200.0 µg L⁻¹, CuCl₂ · 2H₂O 10.0 µg L⁻¹, NiCl₂ · 7H₂O 20.0 µg L⁻¹, Na₂MoO₄ · 2H₂O 60.0 µg L⁻¹)를 사용하였다. 대량배양을 위한 탄소원 농도 선발은 YEMP 배지 조성에서 glucose를 25, 50, 75 g L⁻¹ 농도로 결정하였고, 질소원은 yeast extract를 2.5, 5.0, 10.0 g L⁻¹로 결정하였다. 평판배지에서 배양한

두 균주의 singly colony를 채취하여 각각의 액체배지 50 mL에 접종한 후, 30°C에서 150 rpm으로 96시간 동안 배양하였다. 균주의 생장은 균주를 접종한 후 4시간 간격으로 배양액을 채취하여 UV spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다양한 탄소원 조성에 따른 균주의 생장을 측정한 결과, CBMB20의 경우 AMS 배지보다 YMEP 배지에서 균주의 생장이 증가하였으며, 특히 glucose를 50.0 g 첨가한 YMEP 배지에서 균주의 생장이 매우 증가하는 것을 확인하였다. CBMB27의 경우에도 AMS 배지보다 YMEP 배지에서 균주의 생장이 증가하였으며, 다른 배지에 비해 glucose를 50 g 첨가한 YMEP 배지에서 균주의 생장이 가장 높은 것으로 확인되었다 (Figure 41).

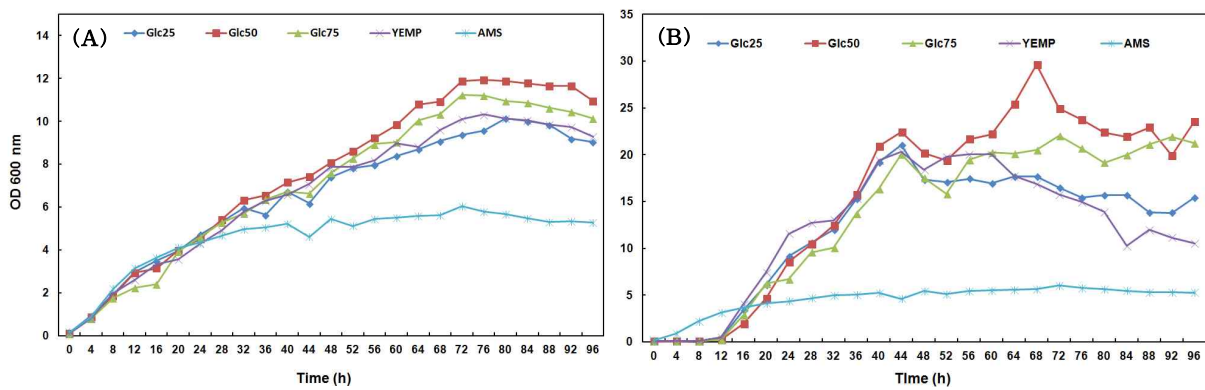


Figure 41. Growth of *Methylobacterium* spp. CBMB20 (A) and CBMB27 (B) in different concentration of carbon source (glucose 25, 50, 75 g L⁻¹) in YMEP medium.

다양한 질소원 조성에 따른 균주의 생장을 측정한 결과, CBMB20의 경우 yeast extract를 10.0 g 첨가한 YMEP 배지에서 균주의 생장이 가장 증가하는 것을 확인하였으며, CBMB27의 경우에는 다른 배지에 비해 YMEP 배지에서 균주의 생장이 가장 높은 것으로 확인되었다 (Figure 42).

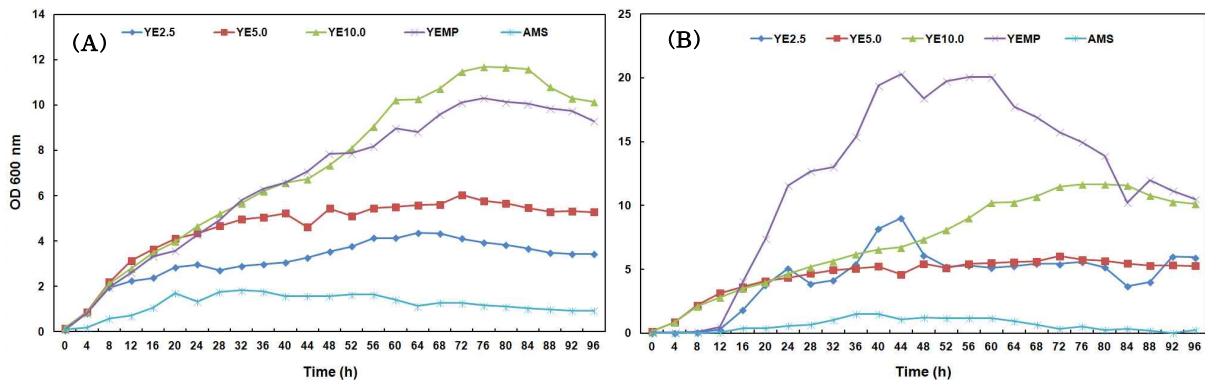


Figure 42. Growth of *Methylobacterium* spp. CBMB20 (A) and CBMB27 (B) in different concentration of nitrogen source (yeast extract 2.5, 5.0, 10.0 g L⁻¹) in YMEP medium.

- 대량배양에 적합한 미생물 유전자원의 배지 최적화

미생물 유전자원의 대량배양에 적합한 최적 배지를 탐색하기 위해 AMS 배지와 CHOI (sodium succinate 5.0 g L⁻¹, NH₄SO₄ 1.5 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1.3 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 1.35 g L⁻¹, Na₂HPO₄·12H₂O 4.02 g L⁻¹, CaCl₂·2H₂O 60.0 mg L⁻¹, FeSO₄·7H₂O 60.0 mg L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 7.8 mg L⁻¹, MnCl₂·4H₂O 14.7 mg L⁻¹, H₃BO₄ 1.8 mg L⁻¹, CoCl₂·6H₂O 2.4 mg L⁻¹, CuCl₂·2H₂O 2.4 mg L⁻¹, Na₂MoO₄·2H₂O 2.4 mg L⁻¹) 배지에 따른 *Methylobacterium* 속의 CBMB15, CBMB20, CBMB27, CBMB110 균주의 성장을 측정하였다. 균주의 접종원은 CHOI 평판배지에서 배양한 균주의 single colony를 채취하여 각각의 액체배지 50 mL가 담겨있는 플라스크에 접종하고 30°C 에서 180 rpm으로 96시간 동안 배양하였다. 균주의 생장은 균주를 접종한 후 8시간 간격으로 배양액을 채취하여 UV spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도 (OD value)를 측정하였으며, 1 mL의 배양액을 채취하여 희석한 다음 균주의 개체수 (colony forming unit, CFU)를 측정하였다. 서로 조성이 다른 AMS 배지와 CHOI 배지에 따른 4가지 균주의 성장을 측정한 결과, CBMB12와 CBMB15 균주의 경우 균주를 접종한지 16시간 이후부터 AMS 배지에 비해 CHOI 배지에서 균주의 생장이 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 43). CBMB20 균주는 배지에 따른 생장의 차이는 확인할 수 없었으며, CBMB27 균주는 균주를 접종한지 32시간 이후부터 AMS 배지에 비해 CHOI 배지에서 균주의 생장이 증가하는 것을 확인하였다.

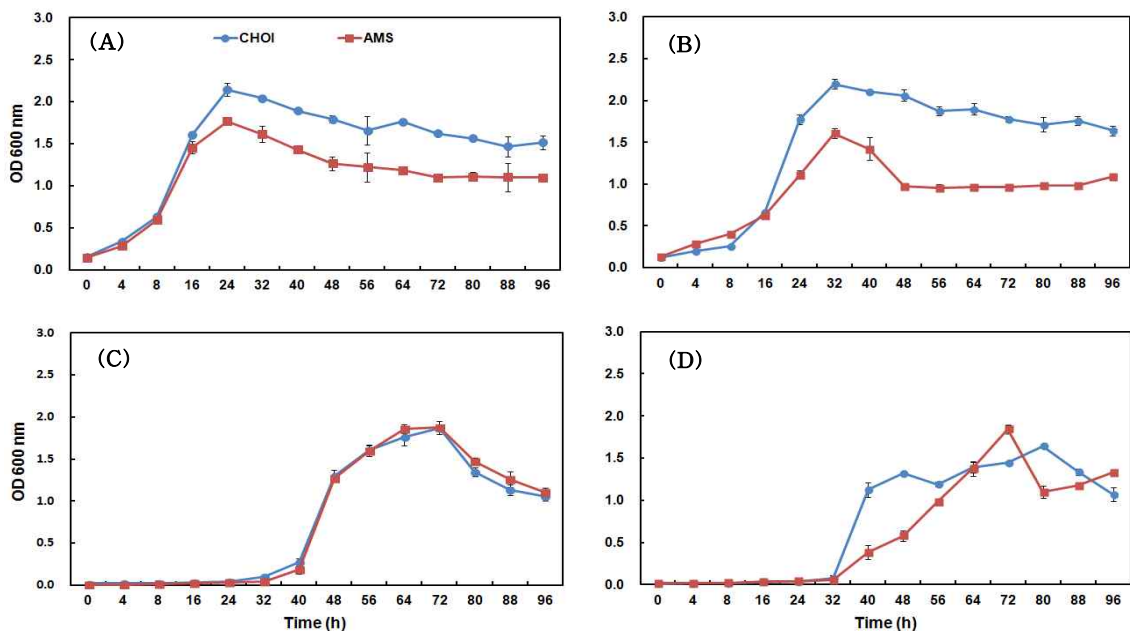


Figure 43. Growth of *Methylobacterium* spp. CBMB12 (A), CBMB15 (B), CBMB20 (C) and CBMB27 (D) in modified medium of CHOI and AMS medium (mean ± SE, n=3).

서로 조성이 다른 AMS 배지와 CHOI 배지에 따른 4가지 균주의 개체수를 측정된 결과, CBMB12 균주의 경우는 배지에 따른 개체수의 유의성 있는 차이는 확인할 수 없었으나, CBMB15 균주는 균주를 접종한지 8시간 이후부터 AMS 배지에 비해 CHOI 배지에서 균주의 개체수가 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인하였다 (Figure 44). CBMB20과 CBMB27 균주 또한 AMS 배지에 비해 CHOI 배지에서 균주의 개체수가 각각 균주를 접종한지 8시간 이후부터 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 AMS 배지보다 CHOI 배지가 *Methylobacterium* 속 균주를 대량 배양하는데 있어 적합한 배지라고 사료된다.

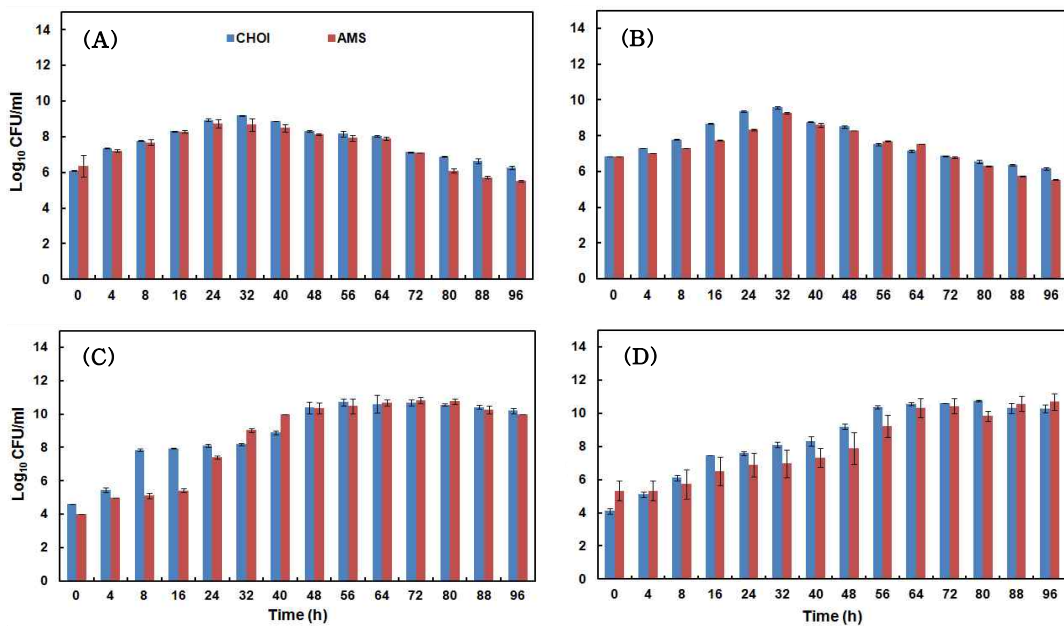


Figure 44. Population of *Methylobacterium* spp. CBMB12 (A), CBMB15 (B), CBMB20 (C) and CBMB27 (D) in modified medium of CHOI and AMS medium (mean \pm SE, n=3).

○ 생물비료 기능향상 및 보존기한 증대 기술 개발

- 생물비료 저장 수명 향상에 적합한 첨가제 선발

미생물 유전자원의 저장 수명 향상에 적합한 첨가제를 개발하기 위해 본 연구에서는 Chitosan 과 Alginate를 이용한 첨가제를 선발하였으며, 미생물 유전자원을 접종한 chitosan과 alginate bead 를 제조하여 다양한 저장기한 및 조건에 따른 미생물 유전자원의 개체수를 확인함으로써 생물 비료 기능향상 및 보존기한 증대 기술을 개발하고자 하였다.

- Chitosan을 이용한 미생물 유전자원의 저장 수명 향상에 적합한 첨가제 개발

Chitosan을 이용하여 미생물 유전자원 저장 수명 향상에 적합한 첨가제를 개발하기 위해, 다양한 chitosan 농도 및 pH에 따른 미생물 유전자원의 개체수를 측정하였다. 연구에 사용한 공시균주는 *Methylobacterium oryzae* CBMB20 균주를 사용하였으며, 공시배지는 CHOI 배지를 이용하였다. Sodium succinate를 탄소원으로 하는 CHOI 배지에 chitosan 용액을 각각 0.5, 0.7, 0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0, 3.0% 농도로 첨가하였다. 다양한 농도의 chitosan 용액을 첨가한 배지에 균주를 접종하고 30°C에서 180 rpm으로 72시간동안 배양한 후 균주의 개체수를 확인하였다. CHOI 배지에서 chitosan 용액 농도에 따른 균주의 개체수를 측정한 결과, 1.5% 농도에서는 개체수가 9.56 log₁₀ CFU mL⁻¹로 나타났으나, 2.0% 이상의 농도에서는 개체수가 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 45).

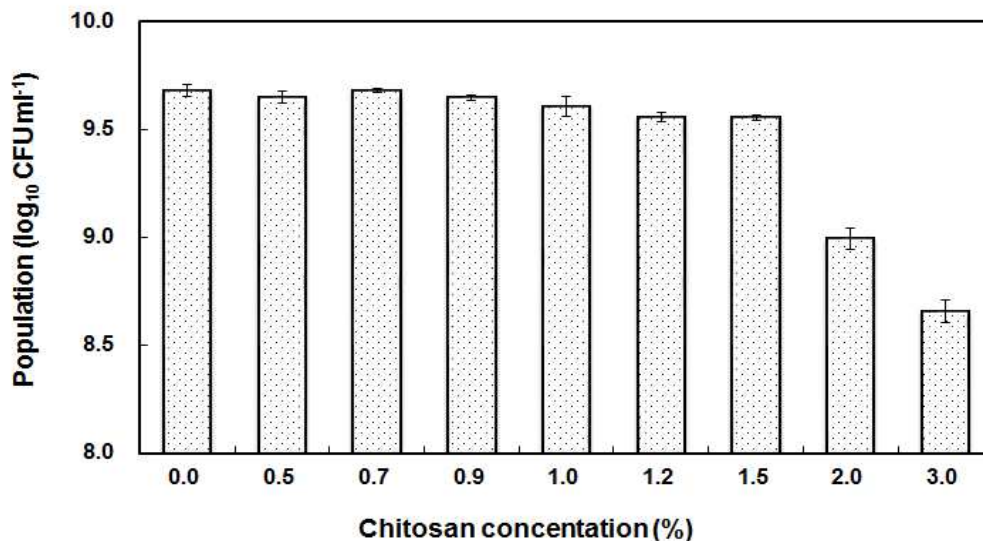


Figure 45. Different concentration of chitosan on the growth of *Methylobacterium* CBMB20 (Mean±SE, n=3). Bacteria grown in CHOI medium supplemented with different concentration of chitosan. Controls for choi medium were maintained without chitosan.

다양한 pH의 chitosan 용액을 첨가한 CHOI 배지에서 미생물 유전자원의 개체수를 측정하기 위해 1.5% 농도의 chitosan 용액의 pH를 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0로 맞춘 CHOI 배지에 균주를 접종하고 30°C에서 180 rpm으로 72시간 동안 배양한 후 균주의 개체수를 확인하였다. 균주의 개체수를 측정한 결과, pH 5.5~6.0에서 균주의 개체수가 높은 것을 확인하였으며, pH 5.5에서 가장 높은 개체수 (8.99 log₁₀ CFU mL⁻¹)를 확인하였다 (Figure 46).

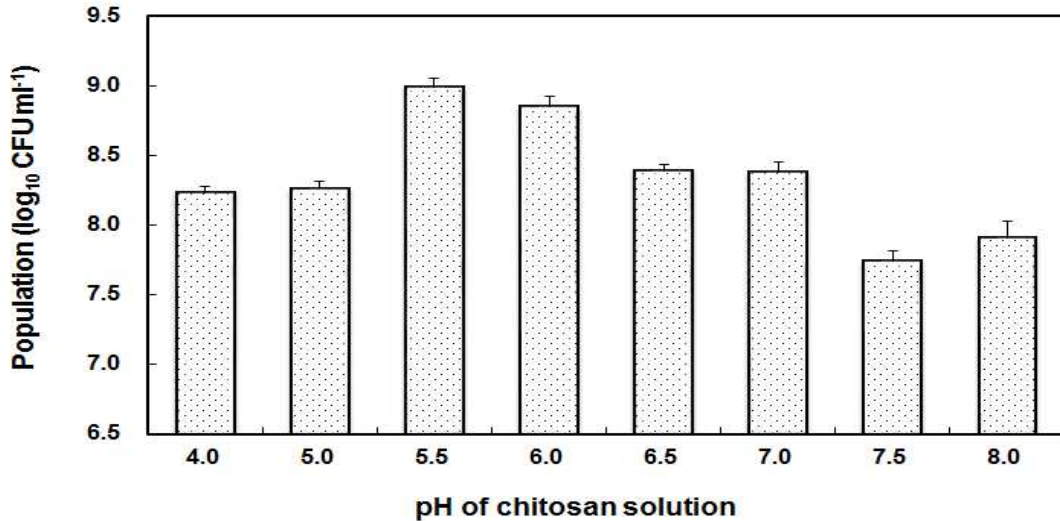


Figure 46. Growth of *Methylobacterium* CBMB20 in 1.5% chitosan solution maintained at different pH levels population in log CFU mL⁻¹ CBMB20 (Mean±SE, n=3). Bacteria grown in CHOI medium supplemented with 1.5% concentration of chitosan. Controls for CHOI medium were maintained without chitosan.

이와 같은 결과를 바탕으로, 균주의 개체수가 가장 높았던 pH 5.5와 1.5% 농도의 chitosan 용액을 첨가한 배지에서 균주의 생존율을 측정하기 위해, CBMB20 균주를 CHOI 배지에 접종하고 30°C에서 72시간 동안 배양하였다. 배양한 후, 균주 배양액을 10,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하고 30 mM MgSO₄ · 7H₂O으로 2번 세척하였다. 세척한 균주 현탁액을 1 mL 채취하고 1.5% chitosan 용액 (pH 5.5)과 1% (w/v) sodium tripolyphosphate (TPP) 용액 (pH 9.0)을 첨가한 CHOI 배지에 접종하였다 (Angelim et al., 2013). 균주를 접종한지 3, 6, 9, 24시간 이후에 균주 배양액을 5 µL 채취하여 AMS 배지에 접종한 후 28°C에서 72시간 동안 배양하여 균주 생존 여부를 확인하였다. 확인한 결과, pH 5.5와 1.5% 농도의 chitosan 용액을 첨가한 CHOI 배지에서 균주가 24시간 까지 생존하는 것을 확인하였다 (Figure 47). Chitosan을 이용하여 미생물 유전자원의 저장수명 향상을 위한 bead를 제조 여부를 확인하기 위해, 균주의 chitosan 분해에 관여하는 chitosanase 생산 여부를 확인하였다. 균주를 CHOI 배지에서 72시간 동안 배양한 후, 원심분리를 통해 얻은 균주 현탁액 5 µL를 0.2% chitosan 용액을 첨가한 chitosanase detection agar (CDA) 배지에 접종하고 28°C에서 72시간 동안 배양하여 균주의 chitosanase 생산여부를 확인하였다. 대조구는 균주를 접종하지 않은 멸균수를 배지에 접종하였다. 확인한 결과, 균주가 chitosanase 생산능을 가지고 있을 경우 균주가 성장하면서 배지 내 가용화존을 형성하게 되는데 CBMB20의 경우 CDA 배지에서 가용화존을 형성하지 않았으며, 이는 CBMB20 균주가 chitosanase 생성능을 가지지 않는 것으로 확인되었다 (Figure 48).

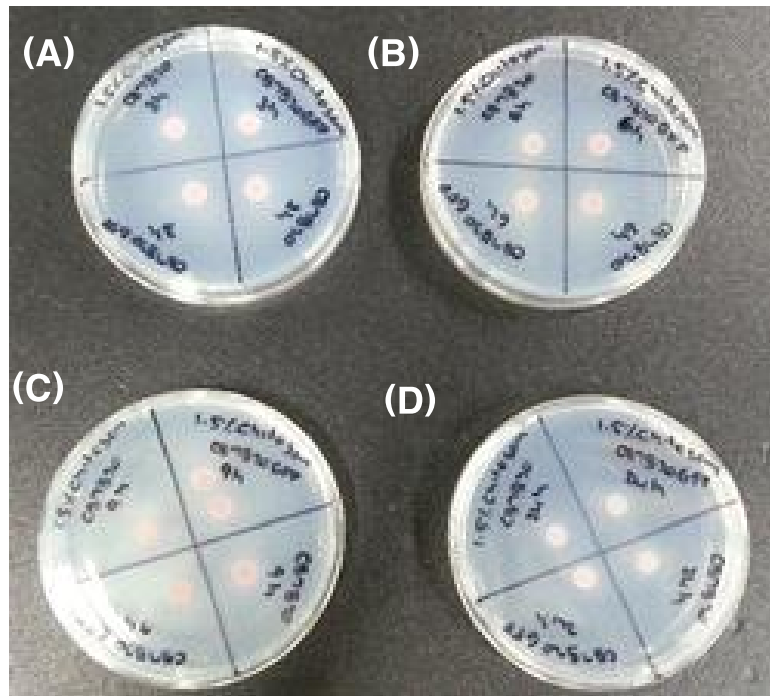


Figure 47. Influence of 1.5% chitosan solution (pH 5.5) and cross-linking solution % TPP (pH 9.0) on the growth of CBMB20. (A) 6 hour incubation time; (B) 6 hour; (C) 9 hour; (D) 24 hour.

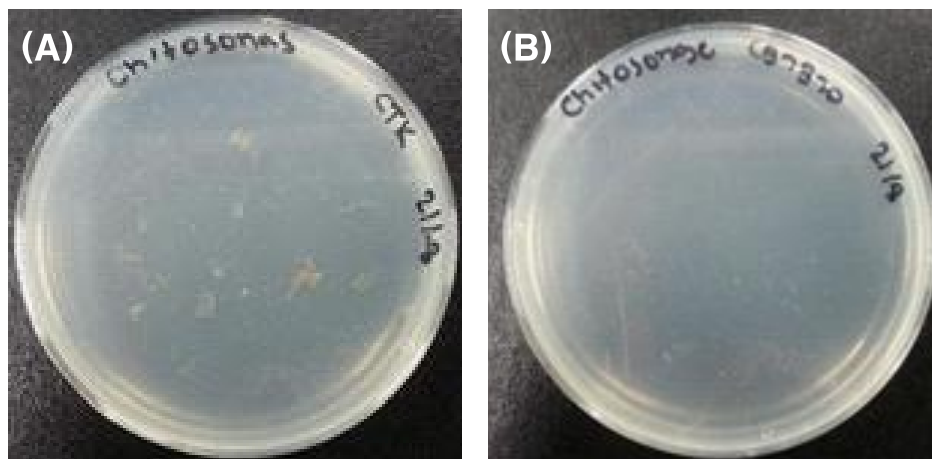


Figure 48. Chitosanase production of *M. oryzae* CBMB20 strain on CDA plates. (A) control plate and (B) inoculated CBMB20 plate.

- Chitosan 을 이용한 미생물 유전자원 Bead 제조

Chitosan 을 이용하여 미생물 유전자원의 저장수명 향상을 위한 bead 제조는 Angelim et al. (2013)의 방법을 이용하여 수행하였다. 원심분리 한 균주 cell (15.0×10^8 cell) 5 mL을 1.5% 농도의 chitosan 용액 20 mL에 첨가하고 30°C 에서 100 rpm으로 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 0.1% tween 80 용액을 chitosan 용액에 첨가하여 경화 용액의 표면장력을 낮춰 주었다. 이 혼합액을 피펫을 이용하여 1% tripolyphosphate (pH 9.0)에 떨어트려 직경 약 3 mm의 gel bead를 생성하였다. 생성된 bead는 TPP 용액에서 3시간 동안 경화시켰다. 굳은 bead를 0.5 M PBS / 0.15 M K_2HPO_4 으로 세척하여 잔여의 acetic acid와 TPP 용액을 제거하고 bead의 공극 형성을 유도한 다음 4°C 에서 0.1% peptone 용액에 보관하였다. 생성된 chitosan bead는 Figure 49에 나타났다.



Figure 49. Chitosan bead formation

- Alginate 을 이용한 미생물 유전자원 Bead 제조

Alginate 을 이용하여 미생물 유전자원의 저장수명 향상을 위한 bead 제조는 Bashan et al. (2002)의 방법을 이용하여 수행하였다. CHOI 배지에서 배양한 균주 현탁액 5 mL을 2% sodium alginate 에 첨가하여 1시간 동안 혼합하였고, 균주 혼합액을 40 rpm으로 교반 중인 0.1 M $CaCl_2$ 용액에 떨어트려 bead를 생성하였다. 생성된 bead는 멸균한 500 mL saline solution (0.85% NaCl) 으로 4번에 걸쳐 세척한 다음 4°C 에서 0.1% peptone 용액에 보관하였다. 생성된 alginate bead는 Figure 50에 나타났다.



Figure 50. Alginate bead formation

- Chitosan 과 Alginate를 이용하여 제조한 bead의 특성 비교

제조한 chitosan 과 alginate 를 이용하여 제조한 bead의 특성을 비교 분석하기 위해, calipers를 이용하여 생성된 입자의 10개 bead 입자의 크기를 측정하였고, 생존율 및 균주 유도 효율 (bacterial entrapment efficiency, BEE)은 chitosan 과 alginate bead를 분쇄한 후 0.1 M acetic acid (pH 4.0)와 0.1 M sodium citrate (pH 6.0)에 첨가하고, 100 rpm으로 60분 동안 교반하였다. 균주 현탁액을 0.1% peptone 용액으로 희석하고 nutrient agar (NA)배지에 접종한 후 30°C 에서 72시간 동안 배양하여 균주 개체수를 확인하였다. 균주 유도 효율 (BEE)는 다음 공식을 이용하여 계산하였다. $BEE (\%) = \log_{10} \text{cfu } 100 \text{ mg}^{-1} \text{ of preapare bead} \times 100 / \log \text{cfu mL}^{-1} \text{ initially loaded in the bead matrix}$. 공극율 (porosity) 측정은 chitosan 과 alginate bead를 10 mL 메스실린더에 가득 채우고 메스실린더를 여러분 두드려 감소하는 용액의 양을 측정하였다. 공극율 계산은 다음 공식을 이용하여 계산하였다. $\text{Porosity } (\%) = V_b - V/V_p \times 100$ (V_b : bulk volume of the beads = 10 mL; V_p : true / tape volume of the beads; $V = V_b - V_p$). Bead의 팽윤 (swelling)과 침식 (erosion)을 측정하기 위해 bead 1 g을 2 가지 pH 용액 (0.1 M HCl (pH 3.0), 0.1 M NaOH (pH 6.8))이 담겨있는 10 mL test tube에 첨가하고, 30°C 에서 100 rpm으로 1~3시간 (M_t) 동안 배양하였다. 배양 후 물기를 제거하고 60°C 에서 24시간 동안 건조시킨 후 건물중 (M_f)을 측정하였다. $\text{Swelling degree } (\%) = M_t - M_f / M_t \times 100$, $\text{erosion } (\%) = M_0 - M_f / M_0 \times 100$, M_0 = initial fresh bead, M_t = predetermined weight interval time (1 ~ 3 h), M_f =dry weight bead). Chitosan 과 alginate 를 이용하여 제조한 bead의 특성 비교는 Table 13에 나타났다. 입자의 크기는 chitosan bead에 비해 alginate bead가 더 큰 것으로 나타났고, 침식율 (erosion) 또한 유의적으로 높은 것을 확인하였다. Bead 내 개체수와 균주 유도 효율 (BEE, %)은 alginate bead에 비해 chitosan bead에서 높은

것으로 나타났다. 공극률 (porosity)와 팽윤 (swelling)은 2가지 유형의 bead에 높은 차이점을 확인할 수는 없었다.

Table 13. Physical properties and characteristic of chitosan and alginate beads.

Parameters	Chitosan	Alginate
Size of bead (mm)	1.45 ± 0.03	1.83 ± 0.02
Porosity (%)	99.2	98.3
Swelling (%)	98.15	99.15
Erosion (%)	93.88	97.32
Population (log CFU mL ⁻¹ 100 mg bead ⁻¹)	7.34 ± 0.02	6.95 ± 0.03
BEE (%)	79.9 ± 0.20	76.0 ± 0.31

- Chitosan 과 Alginate bead의 형태와 저장 온도에 따른 생존율 (shelf life) 비교

Chitosan 과 alginate bead의 형태와 저장 온도에 따른 균주의 생존율을 비교하기 위해 0.1 g bead를 동일한 양의 균주 배양액 0.1 mL에 첨가하고 5°C와 30°C에서 각각 3개월 동안 저장하고 0, 10, 30, 60, 90일간 간격으로 생존한 균주를 측정하기 위해 AMS 배지에 접종하고 30°C에서 72 시간 동안 배양한 후 개체수를 측정하였다. Wet bead 처리구는 chitosan 과 alginate bead 제조 후 수분을 함유하고 있는 bead를 이용하였으며, dry bead 처리구는 bead 제조 후 30°C에서 48시간 동안 bead를 건조시킨 후 이용하였다. Free-living cell 처리구는 균주 배양액을 4°C에서 10,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 0.85% saline solution을 세척하고 2% glycerol에 보관하여 이용하였다. Chitosan과 alginate를 이용한 미생물 유전자원 bead의 저장 유형과 온도에 따른 shelf life를 측정한 결과, 5°C에서 배양한지 30일에는 free-living cell의 개체수가 가장 높았으나, 60일이 후 부터는 chitosan과 alginate를 이용한 첨가제 처리구에서 free-living cell 처리구에 비해 높은 개체수를 확인하였다. 배양한지 90일 이후에서는 wet chitosan 처리구에서 가장 높은 개체수 (5.79 log₁₀ CFU g⁻¹ bead)를 보였다 (Figure 51A). 실온조건 (30°C)에서 shelf life를 측정한 결과, free-living cell의 경우 배양한지 60일까지는 가장 높은 개체수를 확인할 수 있었지만, 90일 이후에는 개체수를 확인할 수 없었다. Chitosan과 alginate bead를 이용한 처리구는 90일 이후에도 균주 개체수를 확인할 수 있었으며, 이 중에서 wet alginate 처리구에서 가장 높은 개체수 (4.68 log₁₀ CFU g⁻¹ bead)를 보였다 (Figure 51B).

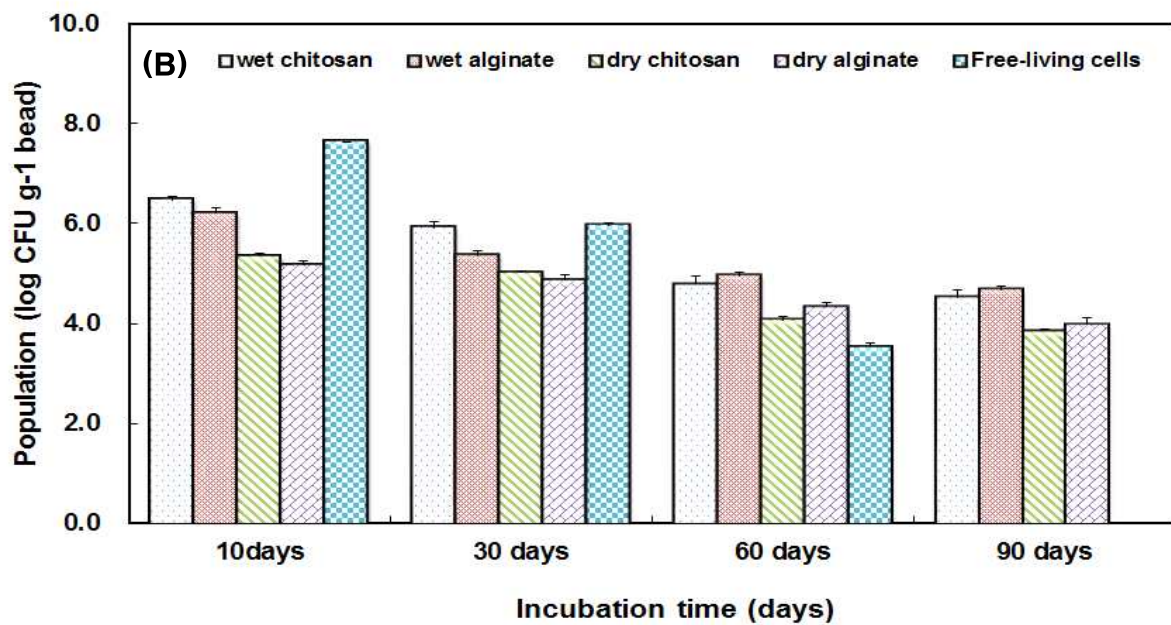
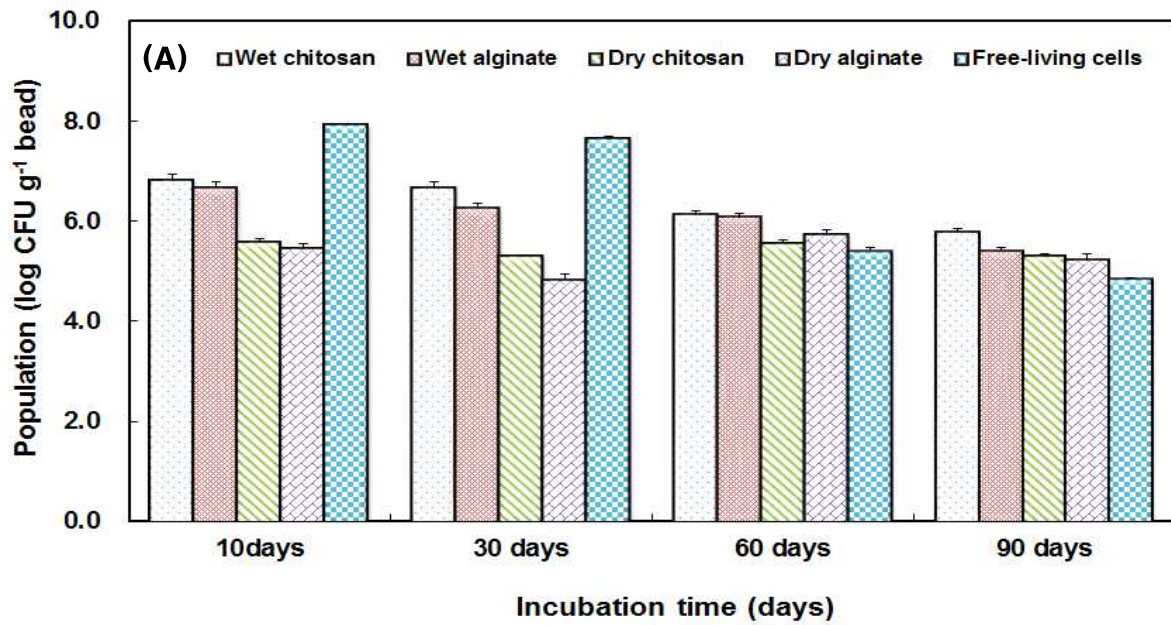


Figure 51. Population of *Methylobacterium* CBMB20 immobilized in chitosan and alginate which stored at 5°C (A) and room temperature 30°C (B) (Mean±SE, n=3). Initial load cell in bead and free cell $8.80 \pm 0.02 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$.

- 전자주사현미경을 이용한 미생물 유전자원의 bead 내 서식의 경시적 확인

전자주사현미경 (Scanning electron microscopy, SEM)을 이용한 chitosan과 alginate bead 내 미생물 유전자원의 서식의 경시적 확인은 Chen et al. (2012)의 방법을 이용하여 수행하였다. Chitosan과 alginate bead의 표면을 멸균수로 세척하고 bead를 고정시키기 위해 3% (w/v) glutaraldehyde 용액을 2시간 동안 처리하였다. 고정된 bead는 ethanol 농도가 증가 (30 ~ 100%로 10%씩 ethanol 농도를 증가)하면서 발생하는 탈수과정을 통하여 10분 동안 탈수하였다. 탈수 후 28°C에서 48시간 동안 건조시킨 후 Pelco 3 sputter coater를 사용하여 gold-palladium에서 60초간 코팅시킨 후, Hitachi S-3700C Scanning Electron Microscope with GEMINI column (Hitachi Co., Japan)을 사용하여 bead의 표면과 내부를 관찰하였다. 미생물 유전자원의 free-living cell 또한 동일한 방법으로 관찰하였다. 관찰한 결과 chitosan과 alginate bead의 표면과 내부에서 미생물 유전자원이 서식하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 52).

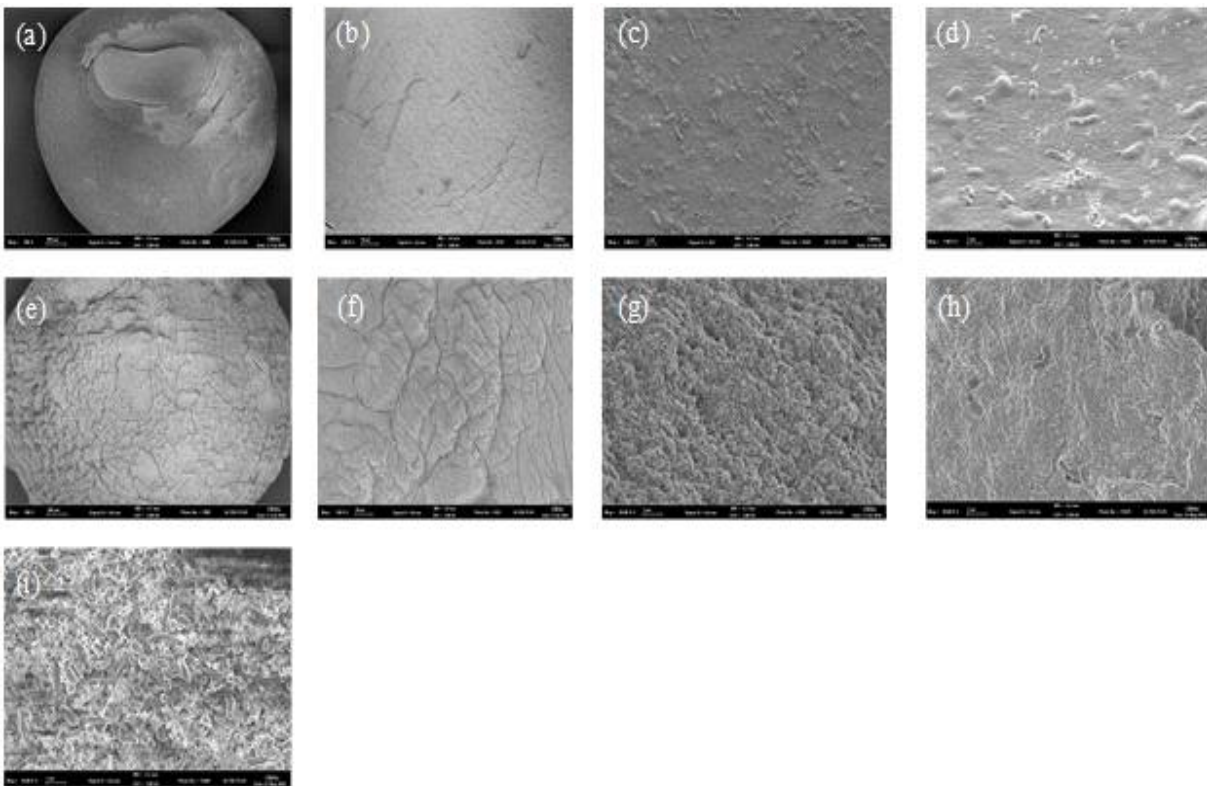


Figure 52. Scanning electron microscope of chitosan and alginate beads containing *M. oryzae* CBMB20. The surface view of alginate (a, x150; b, x1.0k), the inside view of alginate containing inoculants (c and d, x5.0k). The surface view of chitosan (e, x150; f, x1.0k), the inside view of chitosan containing inoculants (g and h, x5.0k) and free living cells (i, x10.0k), Voltage: 3.0 kv.

- 토양 내 chitosan과 alginate bead의 분해능 (degradability) 분석

토양 내 미생물 bead의 분해능 분석은 Bashan et al. (2002)의 방법을 이용하여 분석하였다. 총 8개의 처리구 (T1: wet chitosan + CBMB20, T2: wet chitosan, T3: dry chitosan + CBMB20, T4: dry chitosan, T5: wet alginate + CBMB20, T6: wet alginate, T7: dry alginate + CBMB20, T8: dry alginate)를 선정하였고, 5×5 cm 크기의 땅에 약 40여개의 bead를 넣고 토양을 넣은 포트에 접종한 후 온실에서 30일 동안 분해 정도를 분석하였다. 수분은 포트의 토양이 포화되지 않을 정도로 모든 처리구에 동일하게 공급하였다. Bead를 접종하고 3일 간격으로 토양 내의 bead를 채취하여 현미경을 이용하여 bead를 관찰하였으며, bead의 분해정도는 다음 수치를 적용하여 판단하였다. [0= microbeads not degraded; 1= little degradation with small holes and deformations in the bead structure and 2= completely degraded or microbeads were absent from the bag]. 처리구간의 bead 분해정도를 분석한 결과, chitosan과 alginate bead는 degradation index가 0~2로 다양하게 나타났으며, 분해정도에 따른 bead는 Figure 53에 나타냈다. Chitosan과 alginate bead는 균주를 접종하지 않은 bead에 비해 균주를 접종한 bead에서 degradation index 높은 것을 확인하였고, wet bead와 dry bead 모두 접종한지 14일 이후 유의적으로 degradation index가 증가하였으며, alginate bead가 30일 이후 완전히 분해되는데 비해 chitosan bead는 30일 이후에도 degradation index가 2.0 이하인 것을 확인할 수 있었다 (Figure 54).

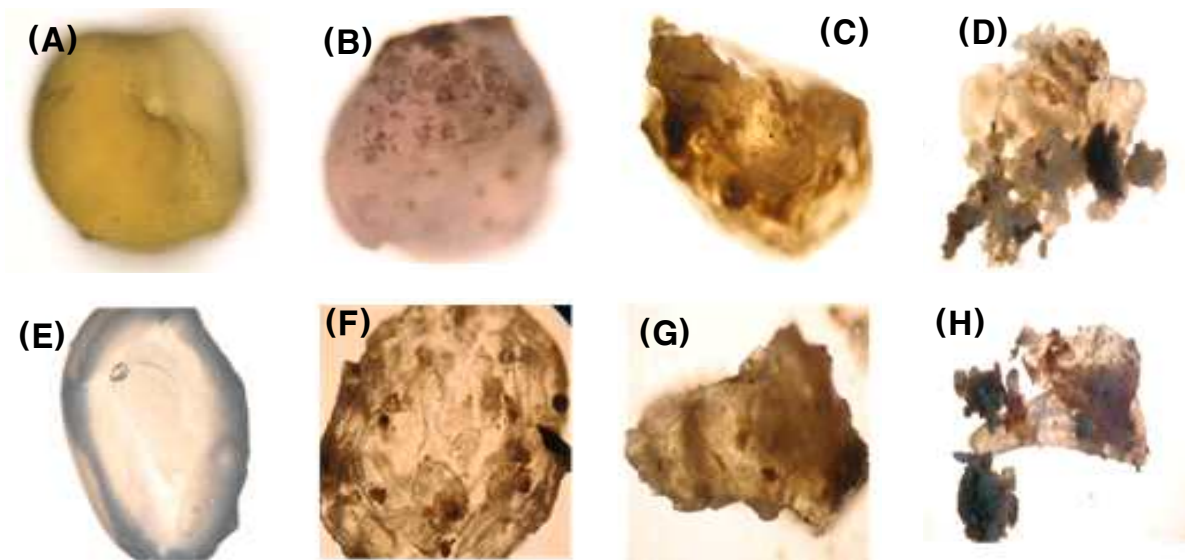


Figure 53. Degradability of (A-D) chitosan and (E-H) alginate beads in the soil after 0, 3, 7, and 14 days, respectively. Using bead degradation scale, A and E is 0; B - D, F - H is 1 and 2 artfully degraded (picture not shown).

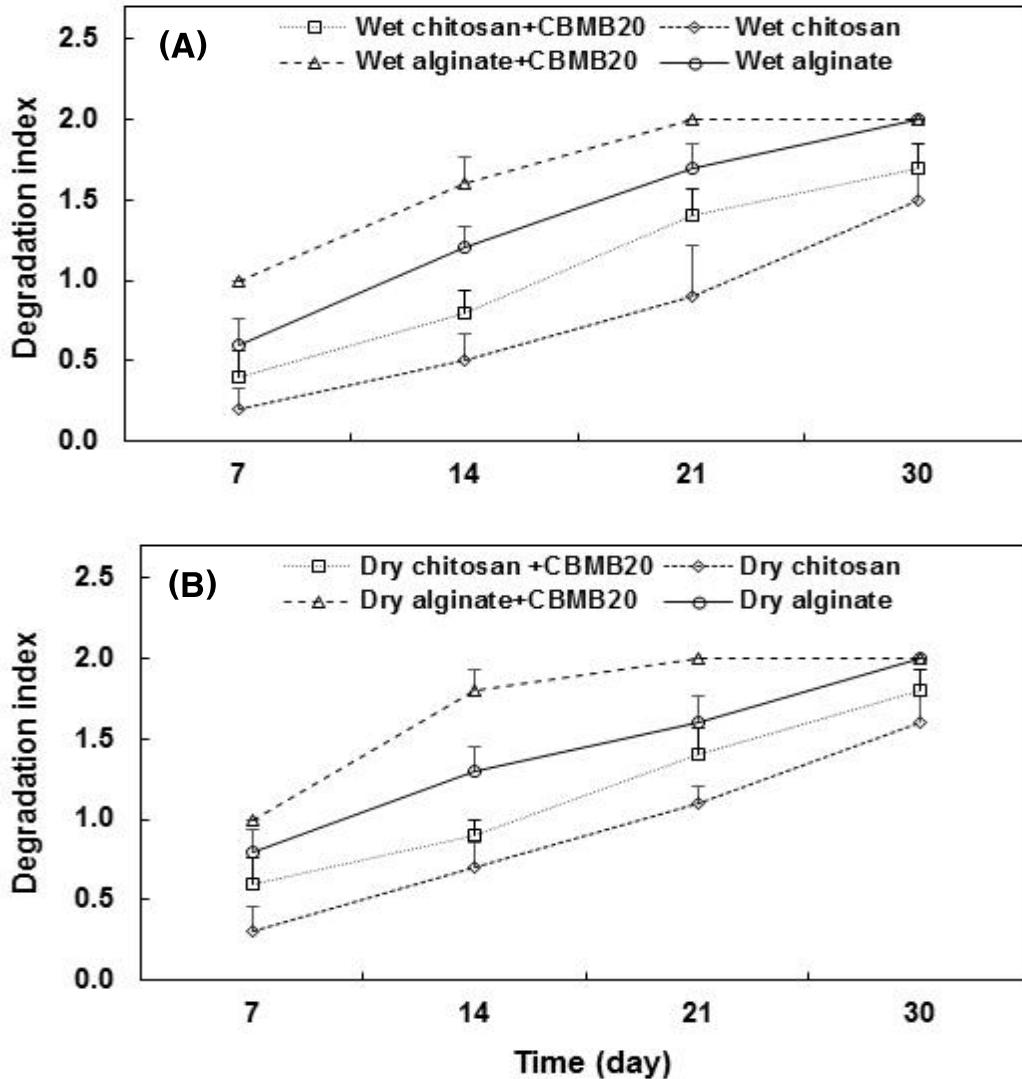


Figure 54. Degradability of wet (A) and dry beads (B) buried in the field soil under greenhouse condition after 7, 14, 21 and 30 days of inoculation. Data represents mean \pm S.E (standard error) of three replications.

- 생물비료의 종자권 (Spermosphere)에서의 생존을 비교 분석

Kanamycin에 저항성을 가지는 균주를 접종한 Chitosan과 Alginate bead의 종자권에서 생존을 분석하기 위해, 1 g의 토마토 종자에 동일한 양의 wet bead, dry bead, free cell을 접종하였다. 처리구는 총 5개의 처리구 (T1- Free cell of CBMB20, T2- wet chitosan+CBMB20, T3- dry chitosan+CBMB20, T4- wet alginate+CBMB20 and T5- dry alginate+CBMB20)를 선정하였으며, 각 처리구는 3반복으로 수행하였다. 접종한 종자는 유료 포트에서 파종하고 온실에서 실온조건으로 21일 동안 배양하였으며, 종자를 파종한지 0일부터 일주일 간격으로 1 g의 근권 토양을 채취

하였다 (Emmert et al., 1998). 채취한 토양은 10 mL의 phosphate buffer에서 150 rpm으로 30분 동안 진탕한 후 균주 상등액을 kanamycin을 함유한 NA배지에 접종하여 균주의 개체수를 확인하였다. 균주의 개체수를 통해 종자권에서의 생물비료의 생존율을 확인한 결과, 토마토 종자를 파종한지 7일까지는 처리구간의 유의성 있는 차이를 확인할 수 없었으나, 14일 이후부터 wet 또는 dry chitosan을 접종한 처리구의 균주 개체수가 free cell과 alginate bead를 접종한 처리구에 비해 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다 (Figure 55). 토마토 종자를 파종한 지 21일 이후에는 chitosan과 alginate bead를 접종한 처리구에서 free cell 처리구에 비해 균주의 개체수가 유의적으로 높았으며, chitosan bead 접종 처리구에 alginate bead 접종 처리구에 비해 균주의 개체수가 유의적으로 높았다. 그러나 chitosan 과 alginate bead에서 wet과 dry 처리구 간의 유의적인 차이는 확인할 수 없었다.

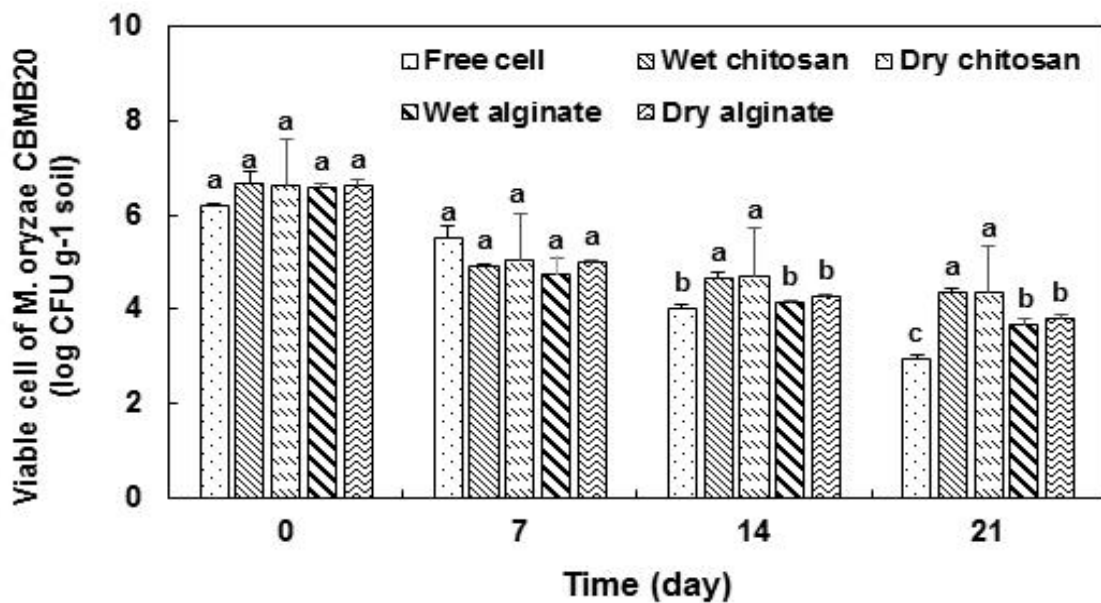


Figure 55. Effect of chitosan and alginate immobilization on spermosphere survivability of *M. oryzae* CBMB20 at 0, 7, 14 and 21 days under greenhouse condition. Data represents mean \pm S.E (standard error) of three replications; letters show differences between treatments according to DMRT test ($P \leq 0.05$).

○ 생물비료의 접종이 토마토의 생장에 미치는 효과

- Chitosan 과 Alginate bead 생물비료의 접종이 토마토의 생장에 미치는 효과

균주를 접종한 Chitosan과 Alginate bead의 접종이 토마토의 생장에 미치는 효과를 확인하기 위해, 공시토양은 충북대학교 농장에서 채취한 토양을 이용하였으며, 토양의 이화학적 특성은 Table 14에 나타냈다. 생물비료의 접종효과를 확인하기 위한 처리구는 총 10개의 처리구 (T1 - control, T2 - wet chitosan with CBMB20, T3 - wet chitosan, T4 - wet alginate with CBMB20, T5 - wet alginate, T6 - dry chitosan with CBMB20, T7 - dry chitosan, T8 - dry alginate with CBMB20, T9 - dry alginate, T10 - free cell of CBMB20)를 선정하였고, 처리구는 모두 3반복으로 수행하였다. 토마토 종자를 1% (w/w) carboxymethyl cellulose (CMC) solution 10 mL과 균주를 접종한 chitosan과 alginate bead와 함께 혼합하였다. 종자를 유묘 포트에 파종한 후 15일 이후에 공시토양에 담긴 포트에 옮겨 심었다. 종자를 파종한지 30일 이후에 처리구별 토마토의 초장 및 뿌리의 길이와 건물중을 측정하였다 (Lichtenthaler and Buschmann, 2001). 측정된 결과, 식물 생장의 경우는 wet chitosan with CBMB20 처리구가 가장 높은 초장 (59.5 cm)과 뿌리 길이 (31.5 cm)를 보였으며, 대조구와 다른 처리구에 비해 초장과 뿌리의 길이가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Table 16). 건물중의 경우 또한 대조구 및 다른 처리구에 비해 wet chitosan with CBMB20 처리구에서 초장 (8.7 g), 뿌리 (6.5 g), total 건물중 (15.2 g)이 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 Chitosan bead를 건조하지 않은 wet 상태로 CBMB20을 접종하여 토마토에 접종하였을 때 식물생장촉진 효과가 가장 좋은 것을 확인하였다.

Table 14. Soil chemical properties of experimental soil

pH	EC	OM	Total N	Ave. P2O5	CEC	Exch. cation			
						K	Ca	Mg	Na
1:5	ds m ⁻¹	g kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	-----	cmol kg ⁻¹ -----			
6.12	0.65	1.28	0.03	31.34	1.53	0.3	0.21	0.44	0.11

EC: electrical conductivity; OM: organic matter; CEC: cation exchange capacity

Table 15. Tomato plant growth parameters (shoot and root length, shoot dry weight, root dry weight, total dry weight) after 30 days of chitosan and alginate immobilized CBMB20 inoculation.

Treatments	Plant length (cm)		Dry weight (g)		
	Shoot	Root	Shoot	Root	Total
Control	43.2 ± 1.9 ^f	15.1 ± 1.6 ^f	6.6 ± 1.8 ^d	4.2 ± 0.1 ^c	10.8 ± 0.4 ^e
Wet chitosan + CBMB20	59.3 ± 0.2 ^a	31.5 ± 0.2 ^a	8.7 ± 0.1 ^a	6.5 ± 0.2 ^a	15.2 ± 0.2 ^a
Wet chitosan	53.2 ± 0.1 ^{cd}	24.7 ± 0.2 ^d	7.3 ± 0.0 ^c	5.3 ± 0.2 ^b	12.6 ± 0.1 ^{cd}
Wet alginate + CBMB20	55.6 ± 0.1 ^{bc}	28.9 ± 0.1 ^b	8.1 ± 0.1 ^b	6.3 ± 0.1 ^a	13.4 ± 0.3 ^b
Wet alginate	51.1 ± 0.6 ^{de}	23.4 ± 0.2 ^d	7.1 ± 0.2 ^c	4.9 ± 0.3 ^{bc}	12.0 ± 0.2 ^d
Dry chitosan + CBMB20	56.3 ± 0.1 ^b	29.4 ± 0.1 ^b	8.0 ± 0.1 ^b	5.3 ± 0.1 ^b	14.2 ± 0.3 ^b
Dry chitosan	51.5 ± 0.9 ^{de}	1.8 ± 0.2 ^e	6.5 ± 0.2 ^d	4.3 ± 0.3 ^c	10.8 ± 0.2 ^e
Dry alginate + CBMB20	53.1 ± 0.7 ^{cd}	26.9 ± 0.3 ^c	7.9 ± 0.2 ^b	4.7 ± 0.4 ^{bc}	12.6 ± 0.1 ^{cd}
Dry alginate	45.2 ± 0.9 ^f	19.2 ± 0.3 ^e	6.5 ± 0.2 ^d	4.0 ± 0.3 ^c	10.5 ± 0.5 ^e
Free cell	49.3 ± 0.6 ^e	23.3 ± 0.4 ^d	7.7 ± 0.1 ^{bc}	4.8 ± 0.4 ^{bc}	12.4 ± 0.2 ^d

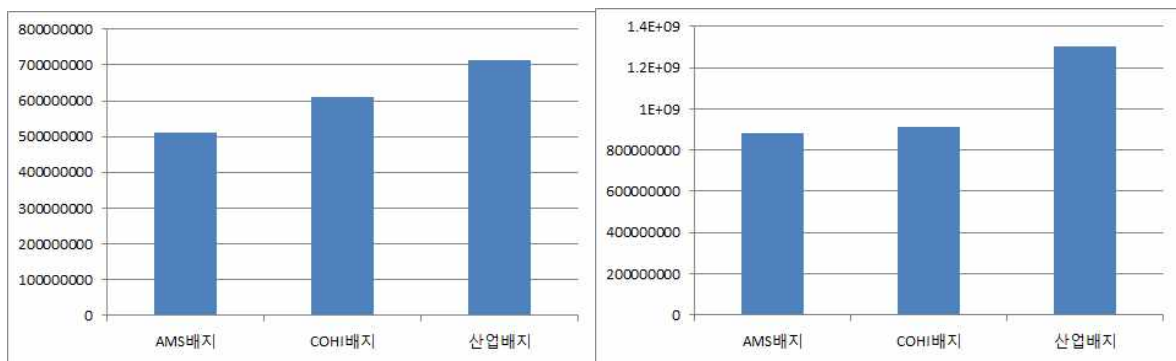
Each value represents mean ± S.E. (standard error) of the three replication; letters show differences between treatments according to LSD test (P≤0.05)

○ 생물비료의 경제적인 제조방법을 위한 대량 배양 최적화

- 액상 생물비료로써의 경제적인 제조방법 개발

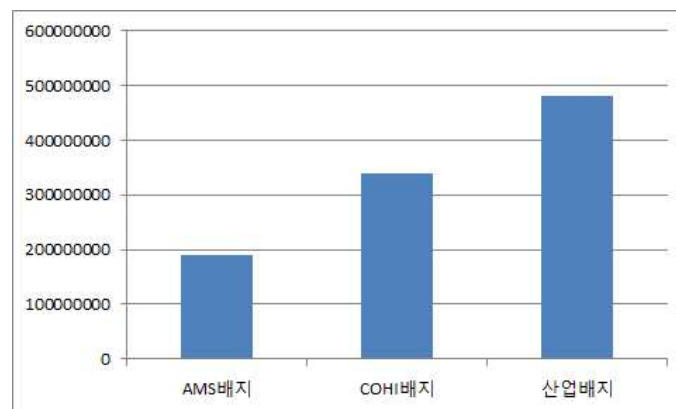
선택 미생물의 대량배양에 적합한 최적 산업용배지를 탐색하기 위해 기존에 사용하였던 AMS (Ammonium mineral salt: NH_4Cl 0.5 g L⁻¹, K_2HPO_4 0.7 g L⁻¹, KH_2PO_4 0.54 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 mg L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 µg L⁻¹, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 30 µg L⁻¹, H_3BO_2 300 µg L⁻¹, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 µg L⁻¹, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 µg L⁻¹, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 µg L⁻¹, Na_2MoO_4 60 µg L⁻¹) 배지와 CHOI (sodium succinate 5.0 g L⁻¹, NH_4SO_4 1.5 g L⁻¹, KH_2PO_4 1.3 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.35 g L⁻¹, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.02 g L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60.0 mg L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60.0 mg L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.8 mg L⁻¹, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 14.7 mg L⁻¹, H_3BO_4 1.8 mg L⁻¹, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.4 mg L⁻¹, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.4 mg L⁻¹, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.4 mg L⁻¹) 배지에서 확인된 물리적 배양조건을 이용하여 산업용 배지를 탐색하는 시험을 진행하였다. 우선 *M. oryzae* CBMB20 균주의 산업용배지의 최적화를 위해 탄소원으로 molasses를 사용하였고, 질소원으로 Corn steep liquor를 사용하였다. 배양은 균주의 single colony를 채취하여 멸균된 배지 100 mL이 담겨 있는 플라스크에 접종하고 30°C에서 180 rpm으로 96시간 동안 배양하였다. 균주의 생장은 배양액 1 mL을 채취하

여 희석한 다음 평판도말법으로 균주의 개체수를 측정하였다. 탄소원인 molasse의 함량은 0.3, 0.5, 0.7, 0.9%로 조절하여 배양한 결과 0.7%에서 균 밀도가 가장 높은 성장을 보였다. 질소원인 Corn steep liquor의 농도는 molasses 농도를 0.7%로 고정하고, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4%로 조절하여 배양한 결과 0.3%에서 균 밀도가 가장 높게 나타났다. 상기에서 나타난 결과와 같이 molasses 7%와 Corn steep liquor 0.3%의 배지로 배양을 한 결과 AMS배지나 COHI 배지에서 배양한 균의 성장보다 높게 나타났다 (Figure 43). 이는 경제성을 갖춘 배지로 배양을 한 결과 기존의 합성배지보다 나쁘지 않은 결과를 나타내어 향후 제품 대량생산 시에 경제성을 갖춘 제품화를 기대할 수 있다. *Methylobacterium phyllosphaerae* CBMB27 균주의 산업용배지의 최적화는 molasses 0.9%와 Corn steep liquor 0.3%에서 배양된 균 생장이 AMS배지나 COHI 배지에서 배양한 균의 성장보다 높은 결과를 보였다 (Figure 56). *Brevibacterium linens* RS16 균주도 산업용배지의 최적화를 위해 탄소원은 molasses를 질소원은 Corn steep liquor를 사용하였다. 최적의 조합은 molasses 2%와 Corn steep liquor 1%에서 가장 높은 균 밀도를 나타내었다.



Methylobacterium oryzae CBMB20

Methylobacterium phyllosphaerae CBMB27



Brevibacterium iodinum RS16

Figure 56. Effects of cell growth on media

- 경제적인 대량 생산된 생물비료의 생육 효과 조사

경제적인 산업용배지 최적화가 진행된 선발 균주 3개에 대하여 각각 100배와 500배 희석하여 작물에 7일 간격으로 3회 처리한 후 생육조사를 하였다. 사용한 작물은 배추를 사용하였고, 생육 조사는 지하부 무게와 길이, 지상부 초장, 엽수, 무게를 조사하였다. Control은 물을 처리하였고, positive control은 시중에서 판매되고 있는 생육용 미생물비료를 구입하여 사용하였다. 초장의 경우 100배 처리시에는 *M. phyllosphaerae* CBMB27 균주의 산업배지에서 positive control 보다 생육이 증가하는 것으로 나타났다. 500배 처리에서는 산업배지와 positive control이 비슷하게 생육이 되었지만 positive control 이 생장이 높은 것으로 나타났다 (Figure 57). 전체적으로 초장 길이에서는 산업배지가 positive control 에 비해 생육이 증가하는 것을 확인하였다. 엽수에서는 100배 처리구와 500배 처리구에서 *B. iodinum* RS16균이 다른 미생물군과 positive control 보다 많은 엽수를 나타내었다. 지상부 무게에서는 100배 처리와 500배 처리에서 *B. iodinum* RS16 균주가 가장 높게 나타났고, 그 다음으로 positive control, 산업배지 *M. phyllosphaerae* CBMB27 처리구, 산업배지 *M. oryzae* CBMB20 처리구 순으로 나타났다. 지하부의 무게와 길이는 산업배지 *M. phyllosphaerae* CBMB27과 *M. oryzae* CBMB20이 다른 미생물 균주나 positive control보다 좋은 생육을 보였다. 상기의 결과로 선발 3균주를 산업배지로 배양했을 경우 배추의 생육효과를 가지고 있는 것으로 사료되므로 앞으로 더 많은 시험을 통하여 경제적 산업배지를 이용한 미생물 대량배양이 생물비료로서의 효과를 확인하여야 할 것이다

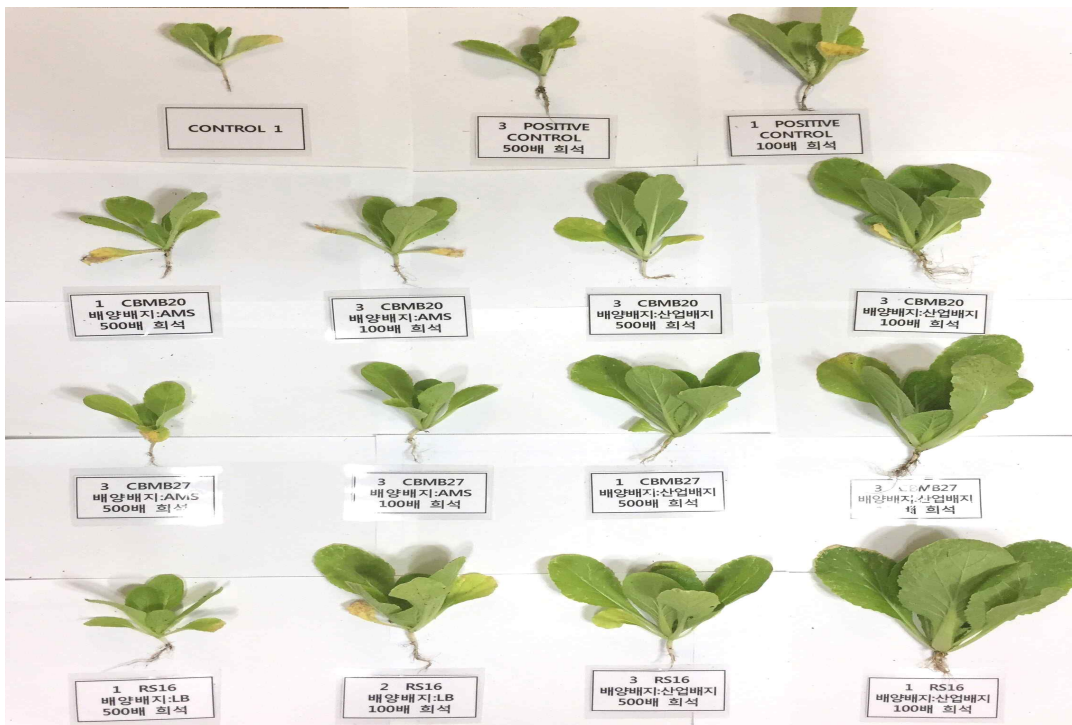


Figure 57. 선택미생물 3종 처리 후 배추에 대한 생육 효과.

- 액상 및 입상 생물비료의 경제적인 제조방법 개발 및 보존기한 증대를 위한 첨가제 선별

가장 경제적인 입상 생물 비료를 제조하기 위해 토양에서 분해가 잘되고, 손쉽게 제조가 되어야 하고, 친환경에 사용할 수 있어야 하는 원료들 중에서 우선 제오라이트 소성불과 소성하지 않은 불, 황토불 등을 이용해서 alginate 입상과 비교 검토 중에 있다 (Figure 58).

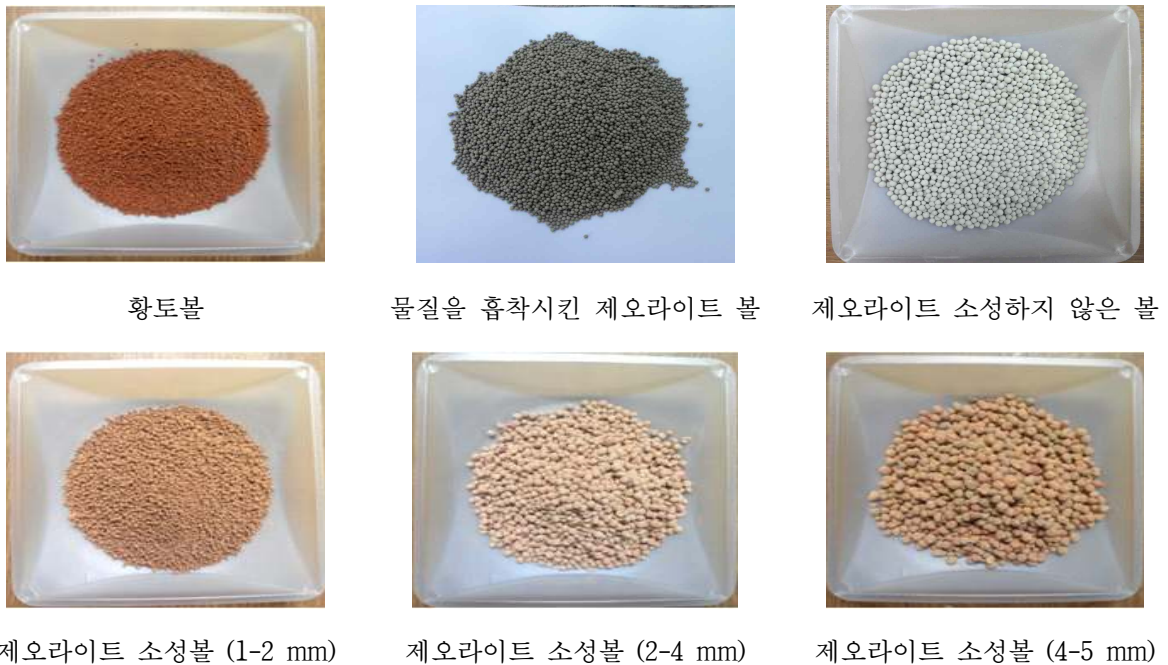


Figure 58. 다양한 부형제를 이용한 제형화

○ 상토첨가제 개발을 위한 상토에서 생물비료 접종량에 따른 시 토마토 초기 생육촉진 효과 확인

선발 미생물 대량생산을 통한 생물비료 제조 및 산업화 연구를 위해 분양받은 3종의 미생물 (*M. oaryzae* CBMB20, *M. phyllosphaerae* CBMB27, *B. linens* RS16)을 현장적용 방안을 탐색하는 일환으로서 토마토 무접목묘 (품종 : 베타티니) 유묘의 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 충북 청주시 소재 청원한 우리 육묘장에서 5월 14일 40공 육묘 트레이에 유묘용 상토를 충전하고, 종자를 파종하였으며, 1주일 후 발아를 확인 한 후 트레이당 20 mL 및 10 mL의 미생물 배양액을 물 480 mL에 희석하여 각 주당 12 mL씩 주입하였다. 각 처리별로 3 트레이씩 처리하였다. 기타 관리는 육묘장의 관리방식을 그대로 적용하였다. 6월 14일 생육조사를 실시하였으며, 그 결과 초장에 있어서는 RS16과 CBMB 27은 20 mL 처리구에서 증가하지 않고 10 mL 처리구에서 증가하였으나, CBMB20은 20 mL에서 증가하고 10 mL에서는 증가하지 않는 경향을 보였다 (Figure 59). 엽수에 있어서는 CBMB 27과 RS16의 경우 미생물 20 mL 처리구와 10 mL 처리구 모두 엽수가

증가 경향을 보였으나, CBMB20의 경우는 20 mL 처리구에서만 증가 경향을 보였다 (Figure 60).

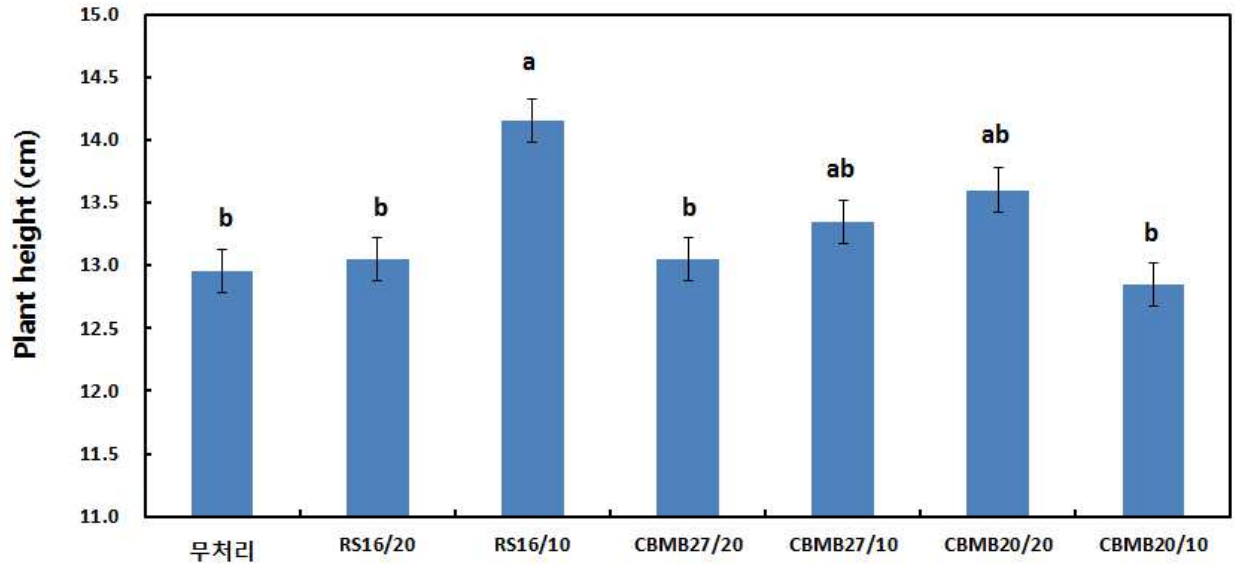


Figure 59. The height of tomato seedling. The number after slash is dose (mL) per a tray. Error bar is S.E,

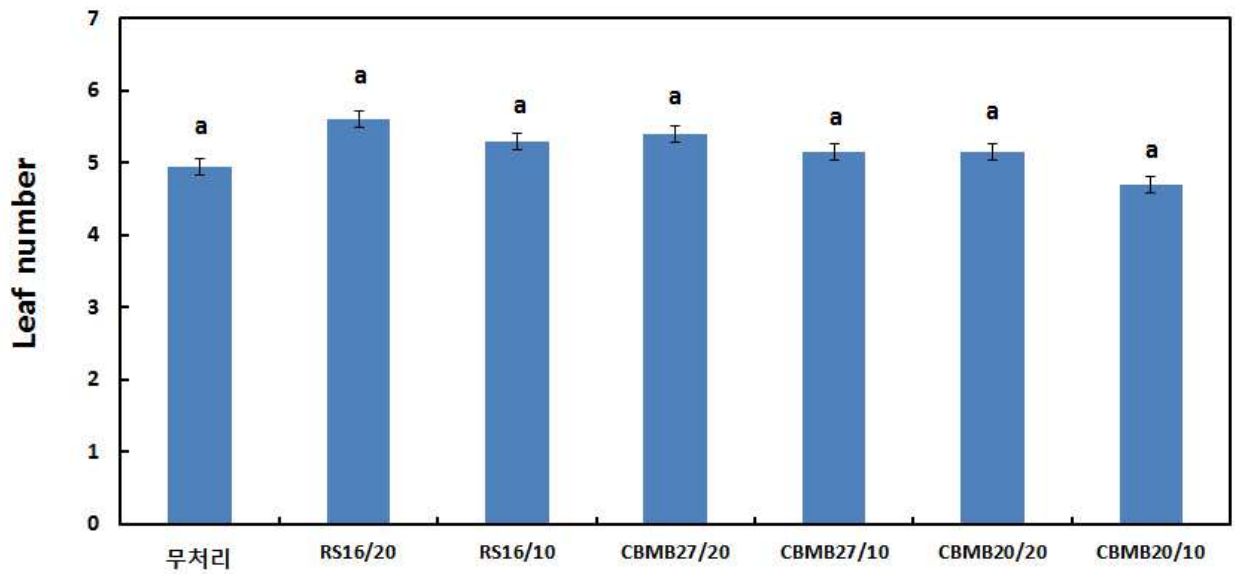


Figure 60. Leaf number of tomato seedling. The number after slash is dose (mL) per a tray. Error bar is S.E,

- 생물비료의 접종이 토마토, 호박, 오이의 생장에 미치는 효과 확인

6월 3일 청원 한우리 육묘장에서 토마토, 호박, 오이를 40구 tray에 각각 1 tray씩 파종하고 곧바로 미생물 배양액을 10배로 희석한 것을 파종구당 10 mL씩 주입하였다. 이후 관리는 한우리

육묘장의 육묘 관리에 따랐다. 이 후 7월 25일에 묘 전체에 대해 각각 초장, 근장을 측정하고 70°C의 건조기에서 3일간 건조 후 건물중을 측정했다. 먼저 토마토 대목 (품종 : 커넥션)의 생육을 조사한 결과, 토마토 대목의 지상부 및 지하부 생육에 있어 미생물의 처리 효과가 인정되는데, 지상부와 지하부를 모두 고려할 때 CBMB27 균주가 가장 유의적으로 높은 것으로 나타났다 (Figure 61). 이는 발아 후 처리한 성적과 다소 차이가 있는데, 이것이 처리 시기별 차이인지 대목과 접수의 품종별 특성에 기인하는 것인지는 좀 더 연구가 필요할 것으로 사료된다. 토마토묘의 건물중도 미생물 처리에서 증가하는 경향을 보였으며, 초장, 근장에서와 같이 CBMB27에서 유의적으로 높은 것을 확인하였다 (Figure 62).

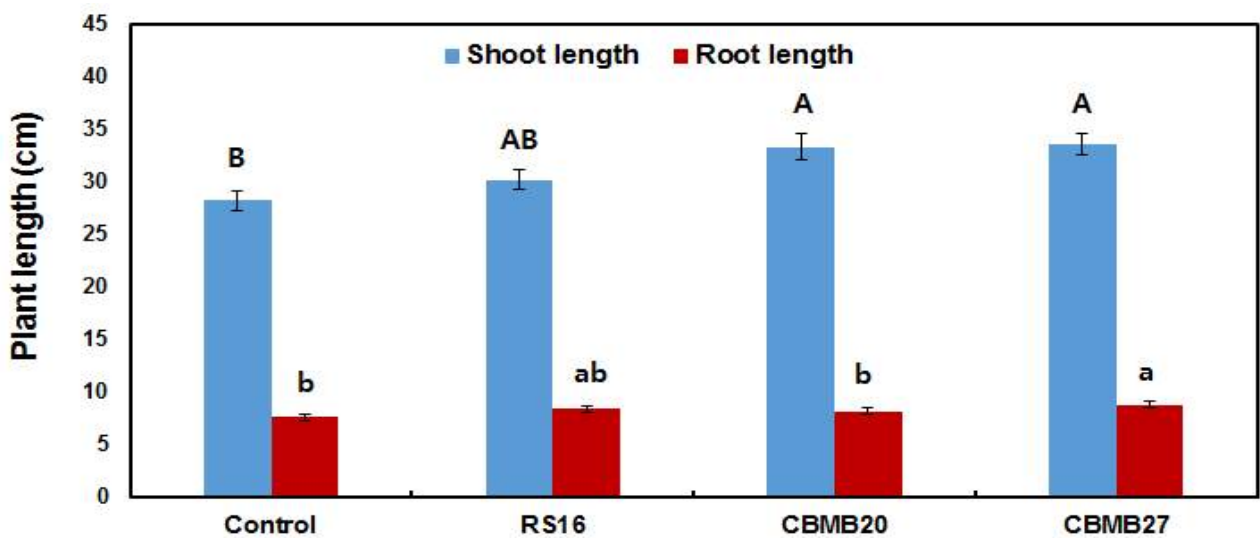


Figure 61. Effect of bacterial inoculation on tomato shoot and root length (cm).

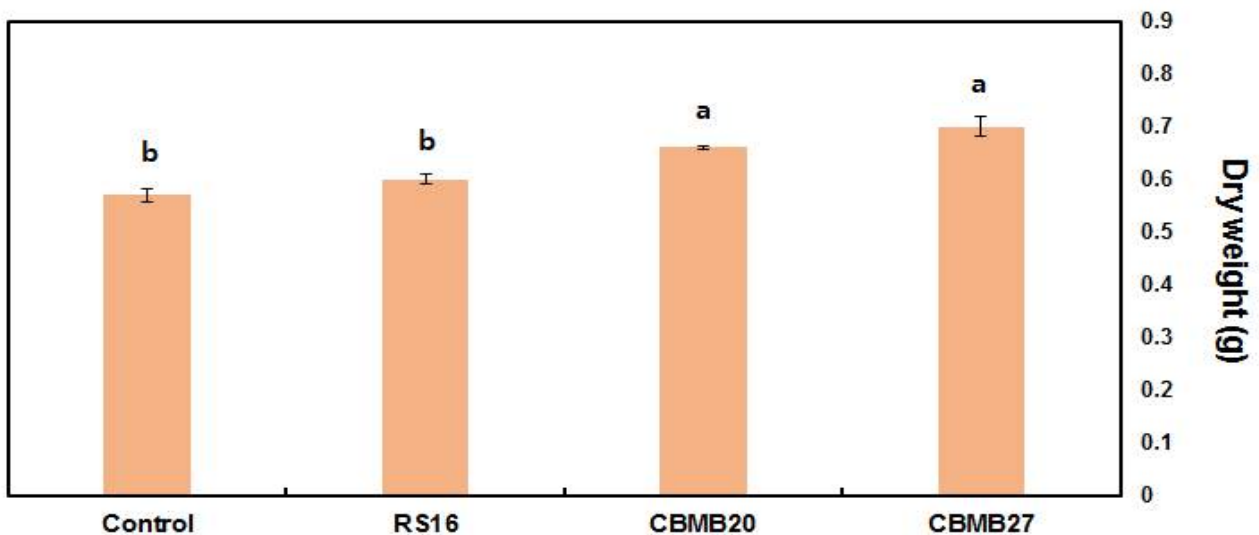


Figure 62. Effect of bacterial inoculation on tomato dry weight (g plant⁻¹).

미생물 유전자원의 접종이 호박 (품종 : 최고봉쭈키니) 육묘의 생장에 미치는 효과를 확인한 결과, 호박의 지상부는 미생물제 처리 시 증가하는 경향을 보였으나 지하부에서는 RS16에서만 증가를 보였으나 유의적인 차이는 확인할 수 없었다 (Figure 63). 토마토와는 달리 호박에서는 RS16이 생육촉진 효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 호박묘의 건물중에서는 모든 미생물 처리가 효과를 보였는데, 그 중에서 RS16의 효과가 유의적으로 컸다. 결과적으로 호박 육묘용으로는 RS16이 가장 적합할 것으로 사료된다 (Figure 64).

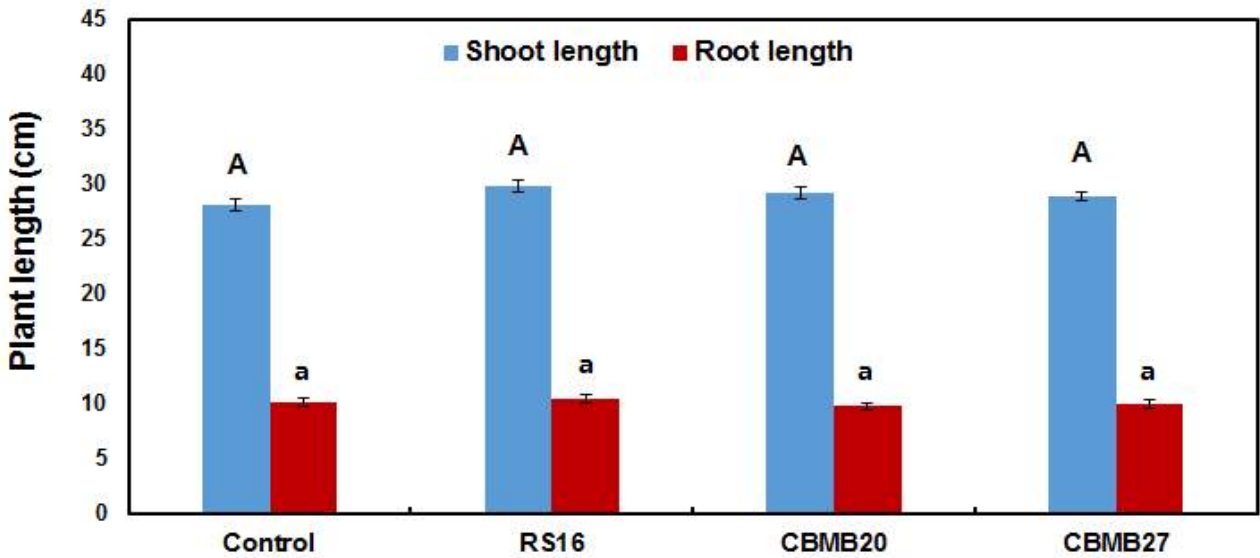


Figure 63. Effect of bacterial inoculation on pumpkin shoot and root length (cm).

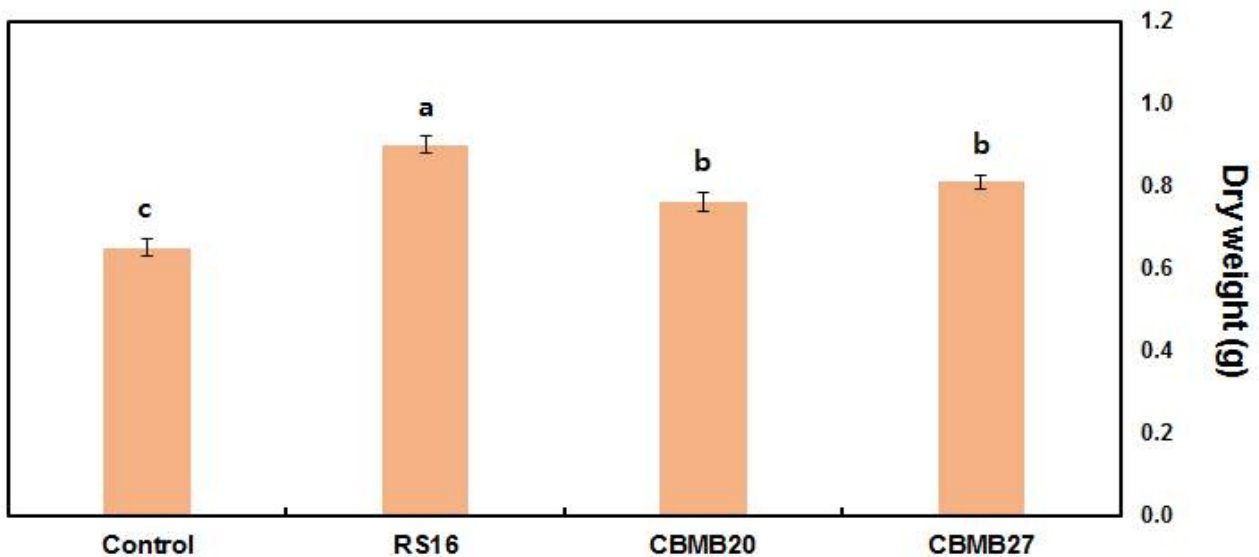


Figure 64. Effect of bacterial inoculation on pumpkin dry weight (g plant⁻¹).

미생물 유전자원의 접종이 오이 (품종 : 오대백다다기) 육묘의 생장에 미치는 효과를 확인한 결과, 오이의 생육효과는 초장에서는 CBMB20과 RS16에서 유의적으로 증가하는 것을 확인하였고, 지하부의 경우는 모든 처리구에서 대조구에 비해 유의적으로 높은 효과를 확인하였다 (Figure 65). 오이의 건물중에서는 처리구간의 유의적인 차이는 확인할 수 없었다 (Figure 66). 이와 같은 결과를 종합해 보면 단일 균주보다는 RS16과 CBMB20 혹은 CBMB27균주를 혼합하여 사용하는 것이 육묘에 있어 효과적일 것으로 사료된다. 다만 CBMB20과 27의 배양액 조성으로 볼 때 혼합균주의 산업화에 큰 무리가 없을 것으로 사료되나, RSS16균주의 배지조성은 큰 차이가 있어 혼합제품은 적합하지 않을 것으로 생각되어진다.

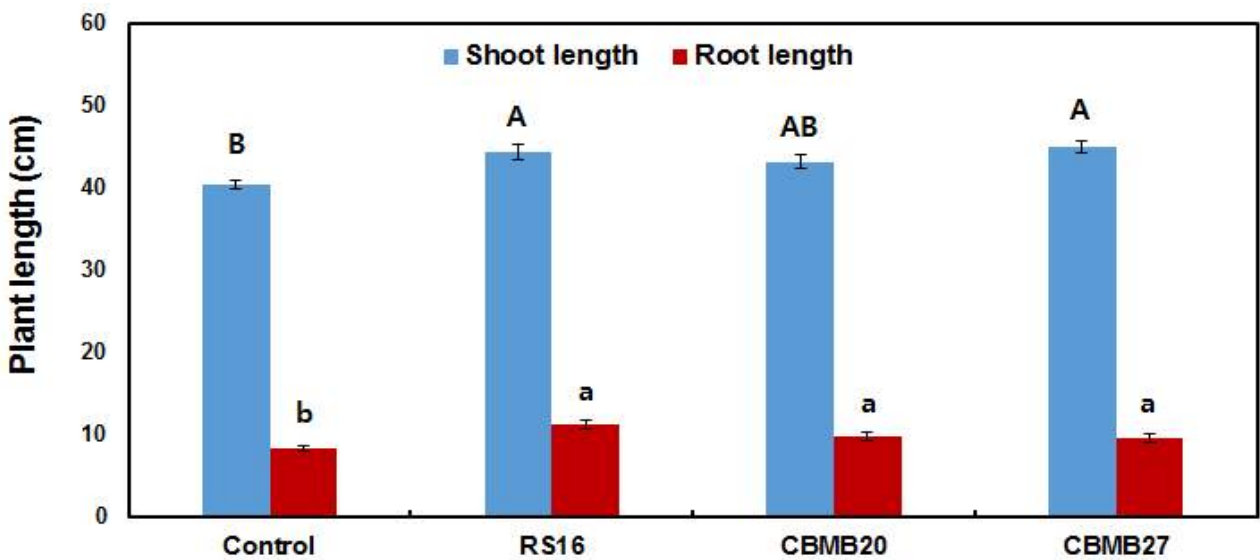


Figure 65. Effect of bacterial inoculation on cucumber shoot and root length (cm).

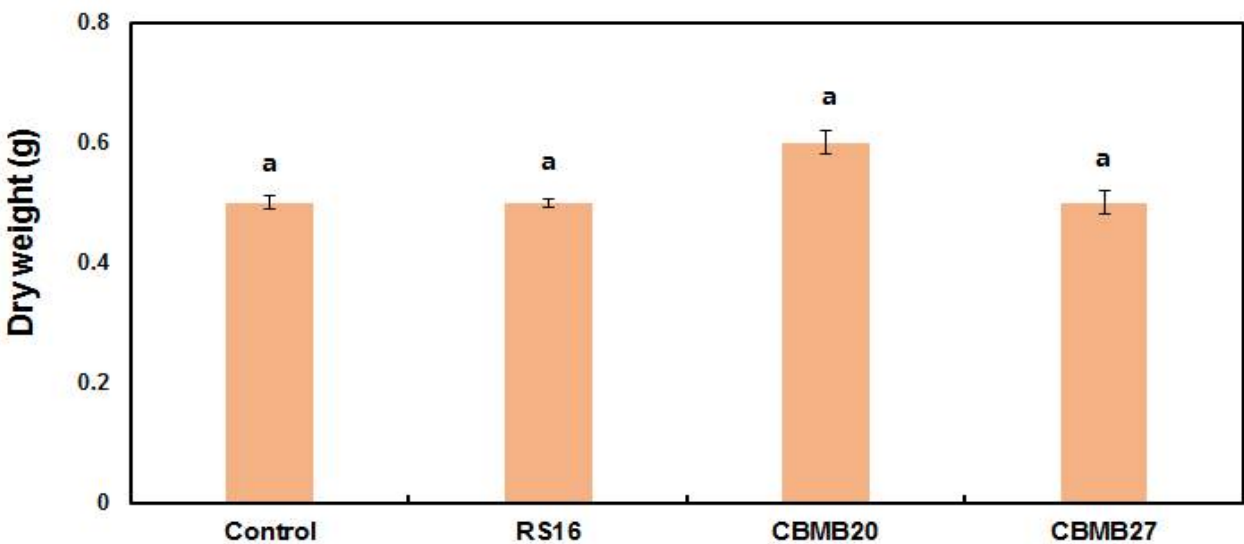


Figure 66. Effect of bacterial inoculation on cucumber dry weight (g plant⁻¹).

○ 액상, 분상 및 입상 생물비료 제조

제오라이트와 황토는 각각 분상, 소성 입상, 비소성 입상의 3형태, 규조토는 분상, 벤토나이트는 비소성 입상에 대해 각각 미생물을 접종하여 제품화하는 방안을 검토하였다. 액상제품의 보관 기간에 대해서도 검토하였다 (Figure 67). 황토볼과 제오라이트볼 중에서 소성의 경우는 미생물 배양액 10%를 첨가하였을 때 입자 붕괴는 없었으나 수분이 일부 흘러서 건조가 필요했다. 당해 미생물의 적정 온도가 25 ~ 30℃ 이므로 저온에서 건조할 경우 24시간 이상의 시간이 소요되는 것으로 추정된다. 비소성의 경우는 미생물 배양액 물이 흐르지는 않으나 일부 입자가 붕괴되어 그대로 보관 시 고결되어 덩어리가 생성될 우려가 있으므로 역시 건조가 필요하다. 분말의 경우는 혼합이 교반 과정에서 일부 입자가 형성되고 그대로 두면 덩어리가 형성될 가능성이 있으므로 역시 건조가 필요하다. 본 실험에서는 25℃ 내외의 실온에 5일간 방치한 후 중량을 측정하고 2개월 후 균수를 측정해 본 결과 Table 16과 같았다.

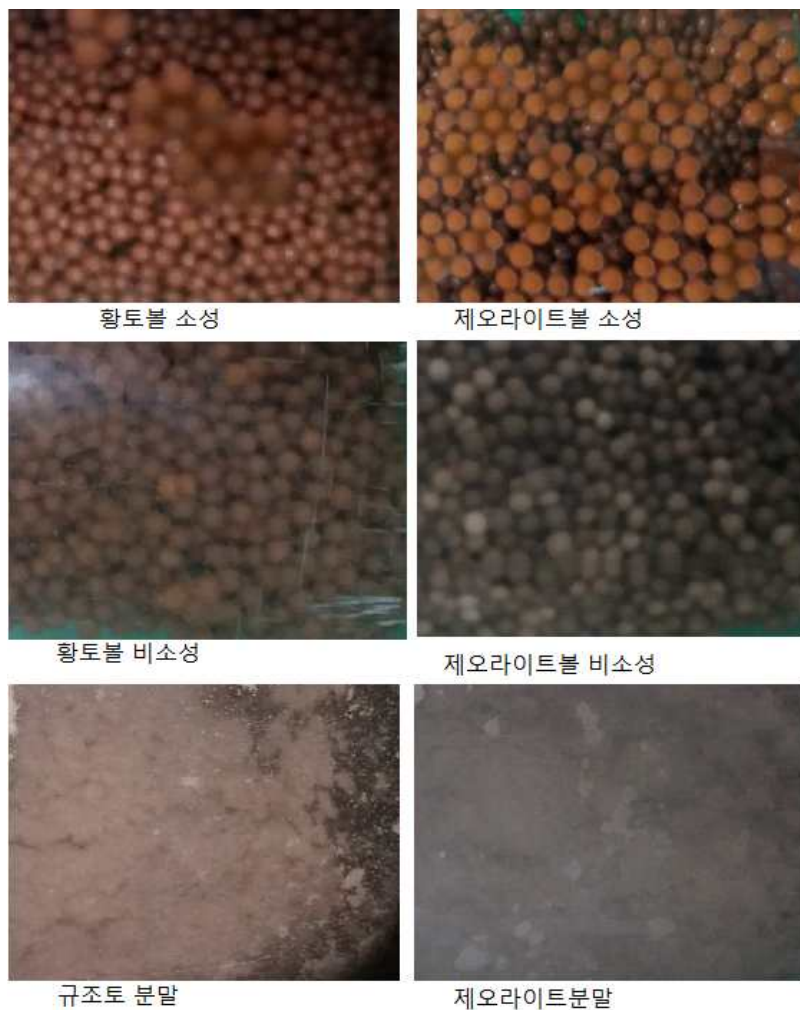


Figure 67. 제오라이트와 황토는 각각 분상, 소성 입상, 비소성 입상의 3형태, 규조토는 분상, 벤토나이트는 비소성 입상

Table 16. 입상 및 분상 시제품 제조 시험 결과

재료	균주	증발률	2개월 후 균수
황토볼 소성	CBMB27	42%	2.23E + 07
	CBMB20	70%	1.35E + 07
	RS16	23%	2.21E + 07
황토볼 비소성	CBMB27	16%	2.10E + 07
	CBMB20	60%	1.24E + 07
	RS16	24%	1.77E + 07
제오라이트볼 비소성	CBMB27	9%	8.57E + 07
	CBMB20	59%	4.02E + 07
	RS16	17%	2.66E + 07
제오라이트볼 소성	CBMB27	19%	3.03E + 06
	CBMB20	69%	2.47E + 06
	RS16	23%	4.78E + 07
규조토 분말	CBMB27	26%	<1.0E + 05
	CBMB20	68%	2.76E + 07
	RS16	17%	<1.0E + 05
제오라이트볼 분말	CBMB27	15%	7.15E + 07
	CBMB20	74%	1.07E + 07
	RS16	16%	6.04E + 07
벤토나이트볼 비소성	RS16	47%	3.22E + 07

그 결과 액상의 보관기간이 가장 오래 지속되는 것으로 나타났다. 고상제품화 하는 데 있어 광물질 혼합하기 전에 동결건조하여 제조하는 방안이 있으나 현재 당사가 보유한 설비가 아니고 이를 제품화하기 위해 추가설비를 할 만한 여건이 아니므로 이에 대한 검토는 이번에는 하지 않았다. Table 16에서 특이한 점은 CBMB20의 수분 증발률이 모든 재료에서 타 균주에 비해 2배 이상 높았으며, RS16의 경우 벤토나이트볼 비소성의 증발률이 타 재료의 2배 이상 높았다. CBMB27의 경우는 황토볼 소성의 경우가 특히 증발률이 높았다. 다만, 액상제품의 보급이 성과를 낸다면 수년 후 설비투자를 검토할 수는 있을 것으로 보인다. 고체배지의 수명이 현재처럼 액상을 흡착시키는 방식으로는 액상보다 오래가기는 어려울 것으로 사료된다.

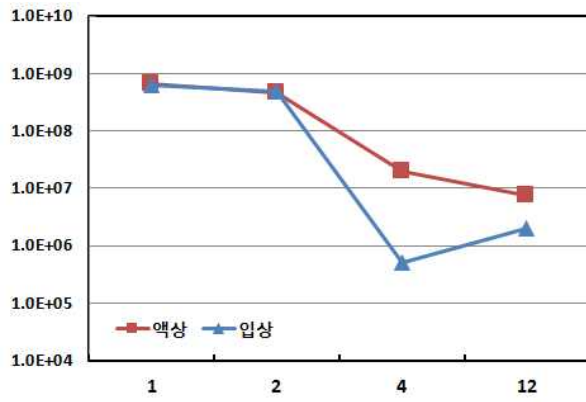
- 입상과 액상에서 균주의 경시별 균주 개체수 변화

상온과 38℃에서 배양액과 제오라이트 입상에 대한 경시별 균수를 조사한 결과는 Figure 68에 나타났다. 비료공정규격에 의거 미생물 제품의 균수는 10⁶ 이상이어야 하므로 이 수치 이하인 경우에는 분석할 의미가 없다. 고체배지보다 액체배지상태가 균수 유지기간이 길므로 액상제품화가 유리할 것으로 판단된다. 입상 (제오라이트볼)과 액상제품의 보관기간에 대해서도 검토한 결과 액상의 보관기간이 더 오래 지속되는 것으로 나타났다. 배양액과 제오라이트 입상에 대한 경시

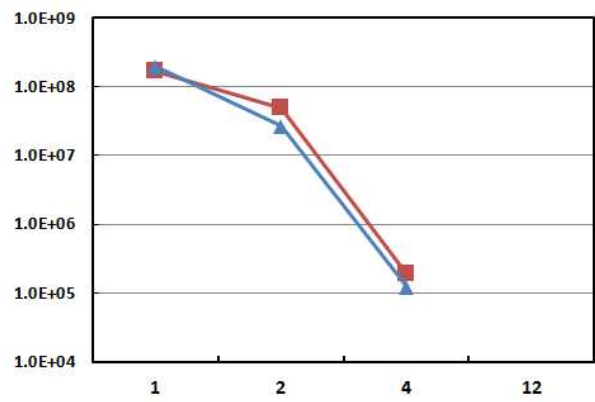
별 균수를 조사한 결과는 다음과 같다. 각 그래프에서 점과 선이 없는 것은 균수가 1.0E+05 미만인 경우다. 비료공정규격에서 토양미생물 제제의 최소 보증량은 1.0E+06이상이므로 1.0E+05 이상을 측정하였기 때문이다. 고상제품화 하는 데 있어 광물질에 혼합하기 전에 동결건조하여 제조하는 방안이 있으나 현재 당사가 보유한 설비가 아니고 이를 제품화하기 위해 추가설비를 할 만한 여건이 아니므로 이에 대한 검토는 이번에는 하지 않았다. 다만, 액상제품의 보급이 성과를 낸다면 수년 후 설비투자를 검토할 수는 있을 것으로 보인다. 고체배지의 수명이 현재처럼 액상을 흡착시키는 방식으로는 액상보다 오래가기는 어려울 것으로 사료된다. 입상과 고체 배지에 접종하는 방법도 현재 당사가 보유하고 있는 설비는 외부 오염을 차단할 수 없기 때문에 고체배지 제품화에 대해서는 설비투자가 선행되어야 된다는 조건도 있어서 액상제품을 산업화하는 것으로 정했다. 여러 차례 확대배양과 보관시험에서 CBMB20과 27은 쉽게 타 미생물로 오염되는 것을 확인하였는데 반해, RS16은 여간해서 오염되지 않는 것을 확인하였다. 아마도 RS16의 배지의 EC가 17 dS m⁻¹의 고염도이기 때문에 일반 미생물이 번식하기 어려운 상황이고 문헌에 보면 *B. linens*가 항세균 polypeptide를 생산한다고 하므로 항생물질 생성에 의한 오염방지 효과도 있는 것으로 사료된다. RS16이 절대 호기성균이라서 장기보존을 위해서는 산소공급이 필요하므로 공기가 통하는 병마개를 할 경우 미생물 오염 가능성이 가장 낮으므로 제품화하는데 3가지 균주 중 가장 유력하다. 또한 RS16은 비료공정규격이 설정되어 있어서 이번 연구기간에 제품등록 및 생산 판매가 가능하나 CBMB는 먼저 비료공정규격 설정하기 위해 1,100만원의 시험비용과 1년 이상의 기간이 소요되므로 이번 연구기간에 제품화가 불가능하다.

○ 입상 및 액상 생물비료의 보존기한 증대 시험

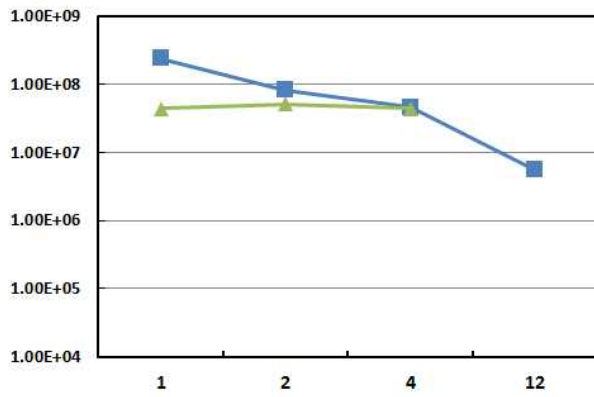
분상제품의 보존기간을 늘리는 유효한 방법은 동결건조를 하는 것으로 사료된다. 액상제품의 보존기간을 늘리는 것은 공기유통마개를 하고 미생물이 보전하는 동안 먹고 살 수 있는 먹이를 좀 더 넣어주는 것이 효율적인 방법이다. 이미 참여기업의 미생물제제는 공기유통 마개를 한 용기를 사용하고 있으며, RS16은 고염도에서 견디는 미생물이므로 먹이를 추가로 넣어주는 것은 별 문제가 되지 않는다는 것을 확인하였다. 배양액의 pH가 1이상 올라가는 것으로 보아 토양의 산도 개선효과가 있을 것으로 기대하고 미사질 양토에 접종하여 시험하였으나 토양에서 pH 변화는 나타나지 않았다 (Table 17). 시험용 배지에서는 균수와 ABS간에 상관관계가 있으므로 ABS 분석에 의해 균수 추정이 가능하나 산업배지에서는 상관관계가 잘 나타나지 않아서 ABS에 의한 품질관리는 곤란한 것으로 사료된다 (Table 18). 산업배지는 Figure 69처럼 시험용 배지에 비해 색깔이 검고 탁도가 높기 때문으로 사료된다.



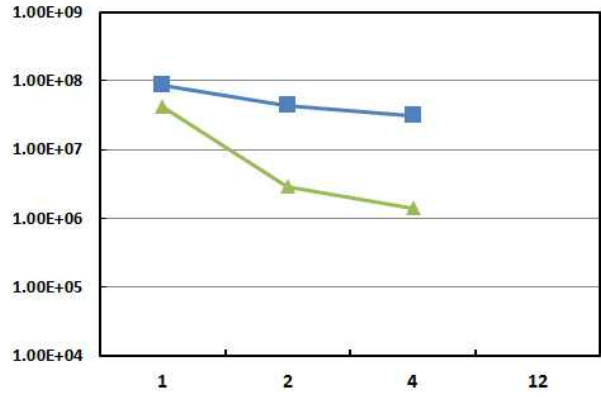
RS16 (room temperature)



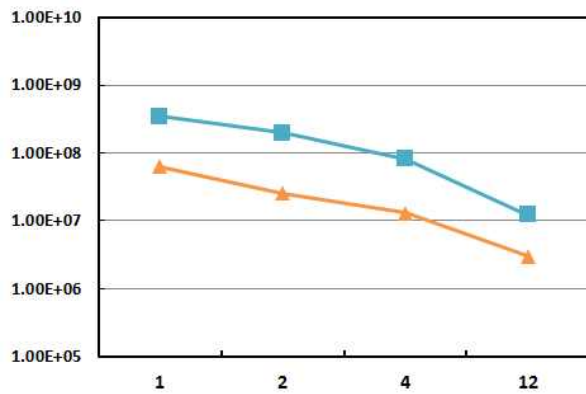
RS16 (38°C)



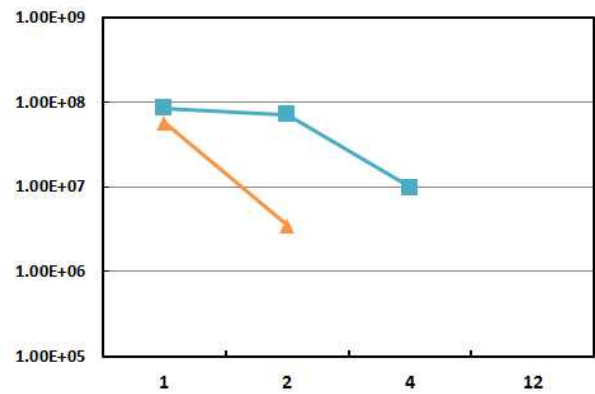
CBMB20 (room temperature)



CBMB20 (38°C)



CBMB27 (room temperature)



CBMB27 (38°C)

Figure 68. Population of RS16, CBMB20 and CBMB27 in different incubation temperature

Table 17. 산업배지에서 pH와 EC 조정 지침 마련을 위한 시험

	CBMB20	CBMB27	RS16
NaOH 첨가량	0.013%	0.015%	0.030%
배지 pH	6.84	7.13	6.82
배지 EC	1.42	1.75	17.22
배양액 pH	7.94	8.55	7.74
배양액 EC	1.61	2.04	17.05

Table 18. 산업배지에서 시간별 균주의 성장 및 ABS와의 관계

배양시간	RS16		CBMB20		CBMB27	
	밀도 (cfu ml ⁻¹)	ABS	밀도 (cfu ml ⁻¹)	ABS	밀도 (cfu ml ⁻¹)	ABS
Blank	0	0	0	0	0	0
4 hr	3.0X10 ⁵	0.003	1.65X10 ⁶	0	7.10X10 ⁶	0
8 hr	1.40X10 ⁷	0.008	3.65X10 ⁶	0	7.60X10 ⁶	0.003
23 hr	1.00X10 ⁸	0.027	2.45X10 ⁷	0.002	5.45X10 ⁷	0.003
27 hr	8.90X10 ⁸	0.044				
31 hr	5.30X10 ⁹	0.078	5.00X10 ⁷	0.002	2.30X10 ⁸	0.005
47 hr	9.05X10 ⁸	0.05	2.20X10 ⁸	0.003	1.40X10 ⁸	0.007
51 hr	1.10X10 ⁸	0.038	1.40X10 ⁸	0.001	3.70X10 ⁸	0.005
71 hr			6.65X10 ⁸	0.002	6.65X10 ⁸	0.011
75 hr			2.35X10 ⁸	0.002	2.35X10 ⁸	0.006
78 hr			1.70X10 ⁸	0.001	4.60X10 ⁸	0.016



Figure 69. RS16 실험용배지(좌)와 산업배지(우) 색과 탁도

pH가 5.5이하로 낮아진 경우 균수가 1.0E+05 미만으로 감소되는 것을 확인하였으므로 향후 pH를 측정하여 품질관리하는 방안을 연구할 계획이다. 또한, 시험용배지와 산업배지 원료에 대한 성분분석을 실시하고 13가지 필수원소에 대한 최적의 성분조성을 실시함으로써 보존기간을 연장하는 것이 가능하다고 사료되는데, 이번 연구에서 이러한 힌트를 얻게 된 시기가 얼마 되지 않아 그 효과를 검증하지는 못했고, 향후 제품의 품질 향상을 위해 지속적으로 검증해 나갈 계획이다.

Table 19. RS16 시험용배지 (LBhs)와 산업용배지 원료 (CSL, Molasses)의 성분량

Nutrients	수용성 (%)		
	LBhs	CSL	Molasses
N	6.98	2.74	0.65
P ₂ O ₅	1.48	3.4	0.1
K ₂ O	2.04	2.41	4.15
MgO	0.25	1.16	0.52
CaO	0.03	0.01	1.35
Fe	0.002	0.007	0.009
B ₂ O ₃	0.004	0.008	0.009
MnO	0.0004	0.003	0.006
ZnO	0.00474	0.019667	0.00474
Cu	0.000379	0.001157	0.000379
Mo	0.0001	0.0001	0.0002
SiO ₂	0.01	0.02	0.17

○ 저면관수장치에 의한 토마토 정식 후 생육증대 효과 확인

재배시험 특히 포트 시험에서는 포트 당 용토의 증진량을 일정하게 함으로써 배지의 균질성을 확보할 수는 있지만 각 포트 당 관주를 함에 있어서 일정한 물을 주입하더라도 토양에 형성된 공극의 형태에 따라 관수한 물의 용탈되거나 되지 않을 수 있으므로 포트 당 일정한 물 관리를 하는 것은 매우 어렵고, 이로 인해 pot당 균일한 관리가 사실상 불가능하다. 이에 비해 각 pot에 흡수용 심지를 부착하고 저면 급수하는 방식은 균일한 관리가 용이할 것으로 사료되어 시도해 보았다. 처리당 6주씩 3반복으로 처리하였고, 용토는 화분용 용토인 흙살림 작은텃밭 용토를 사용하였고, 포트의 용량은 350 mL, 용토 무게는 273 g이었다. 물에 비료성분을 첨가하지 않았다. 31 일간의 생육시험 결과 종합적인 측면에서 RS16만 무처리 대비 생육을 증진하는 경향을 보였다. 따라서 RS16은 육묘뿐 아니라 본 포장에서 적용이 가능할 것으로 사료되며, 일부농가에서 실시하고 있는 바닷물 시비 시 혼용하는 방안도 검토할 필요가 있다 (Figure 70 and Table 20).



Figure 70. 저면관수장치를 이용한 토마토 정식 후 생육조사

Table 20. 저면관수장치를 이용한 토마토 정식 후 생육조사

	07월 20일			06월 19일			생육증가		
	길이	마디수	화방수	길이	마디수	화방수	길이	마디수	화방수
Control	80.12	16.06	2.28	15.92	6.11	0	64.20	9.95	2.28
RS16	81.18	16.00	2.30	15.89	5.97	0	65.29	10.03	2.30
CBMB20	82.33	15.83	2.24	16.81	5.86	0	65.53	9.97	2.24
CBMB27	79.47	16.09	2.30	16.25	5.92	0	63.22	10.17	2.30

친환경농업육성 및 유기식품 관리법에 의거하여 작물생육 및 토양관리를 유기자재로 공시를 받기 위해서는 5작물에 대한 비헤시험을 실시해야하므로 시험을 실시하였다. 본 포장에서 효과확인 시험은 농가 시범포로 수행하였다 (Figure 71). 6월 초에 충주 임○락 (토마토, 정식직전/직후 묘판처리), 괴산 신○섭 (토마토, 정식직전 묘판처리), 음성 성○남 (고추, 정식 후 관주처리), 청주 나○복 (오이 엽면살포) 농가 포장에 본포장 시험용 균제를 제공하여 시험을 실시하였으나, 임○락 농가는 바이러스 감염 때문에, 신○섭 농가는 역병 발생으로, 나○복 농가는 농약 오용으로 뽑아버려서 생육조사 및 수량조사는 실시하지 못했다. 임○락 농가는 8월 초 새로 정식한 토마토 포장에 새로 RS16을 처리하여 10월 31일부터 수확이 시작되고 2109년 1월말까지 수확 예정할 예정이다.



Figure 71. 본포장에서 효과 확인 시험

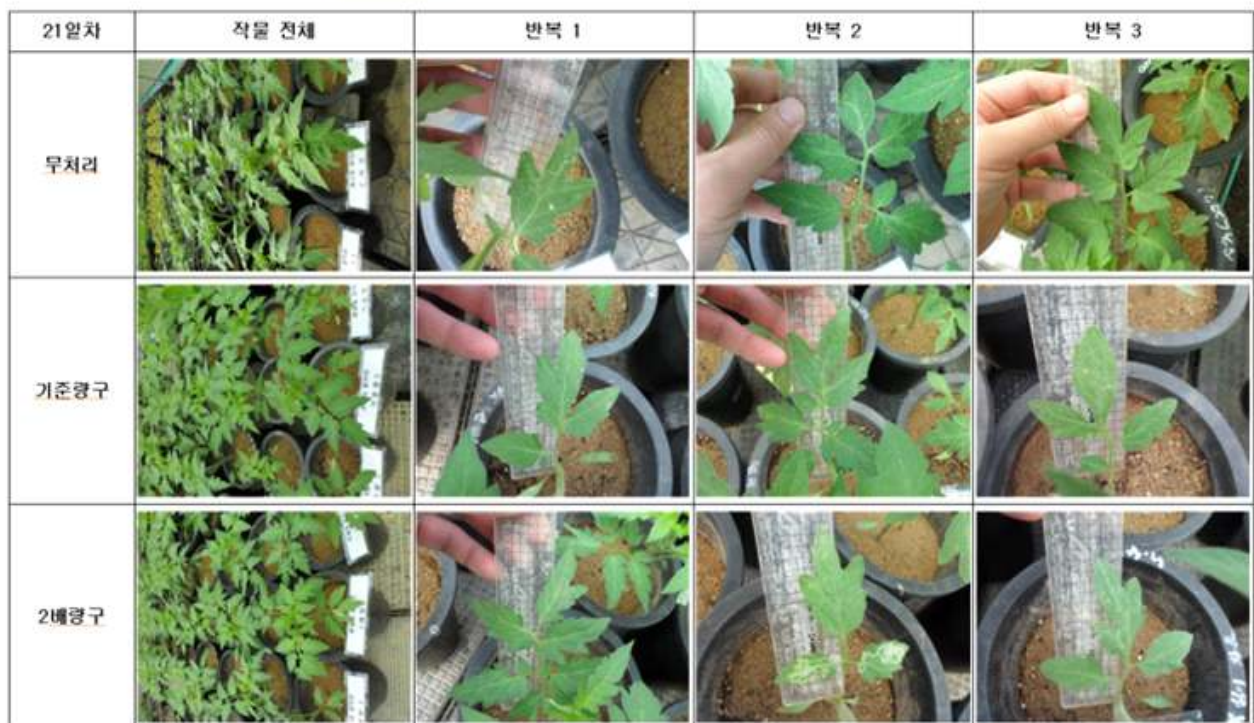
○ 비해시험

친환경농업육성 및 유기식품 관리법에 의거하여 작물생육 및 토양관리용 유기자재로 공시를 받기 위해서는 5작물에 대한 비해시험을 실시해야 하므로 RS16 (시제품 : 잘자라골드)과 CBMB20에 대한 비해시험을 실시하였다. 공시작물은 방울토마토 (탱크원), 배추 (얼갈이), 상추 (청치마), 오이 (조은백다다기), 고추 (슈퍼마니파)를 사용하였다. 정식일자는 2017년 10월 18일이었으며, 시험 기간 중 일부작물에서 온실가루이의 피해가 있었으나 시험 결과에 영향을 주는 정도는 아니었다. 비해시험 결과, RS16의 경우는 시험제제 잘자라골드를 이용하여 시험 작물에 대해 기준량 및 2배량 처리구 모두 비해 발생이 발생하지 않는 것을 확인하였다 (Table 21).













Table 21. RS16 (잘자라골드) 비해시험 결과

시험제제	시험작물 (품종)	비해정도 (0 ~ 5)		비 고
		기준량	2배량	
RS16 흙살림 잘자라골드	방울토마토 (탱크원)	0	0	-
	배추 (얼갈이)	0	0	-
	상추 (청치마)	0	0	-
	오이 (조은백다다기)	0	0	-
	고추 (슈퍼마니파)	0	0	-

비해 시험구 방울토마토에 대한 21일차 조사















비해 시험구 배추에 대한 21일차 조사

21일차	작물 전체	반복 1	반복 2	반복 3
무처리				
기준량구				
2배량구				













비해 시험구 상추에 대한 21일차 조사

21일차	작물 전체	반복 1	반복 2	반복 3
무처리				
기준량구				
2배량구				

비해 시험구 오이에 대한 21일차 조사

21일차	작물 전체	반목 1	반목 2	반목 3
무처리				
기준량구				
2배량구				

비해 시험구 고추에 대한 21일차 조사

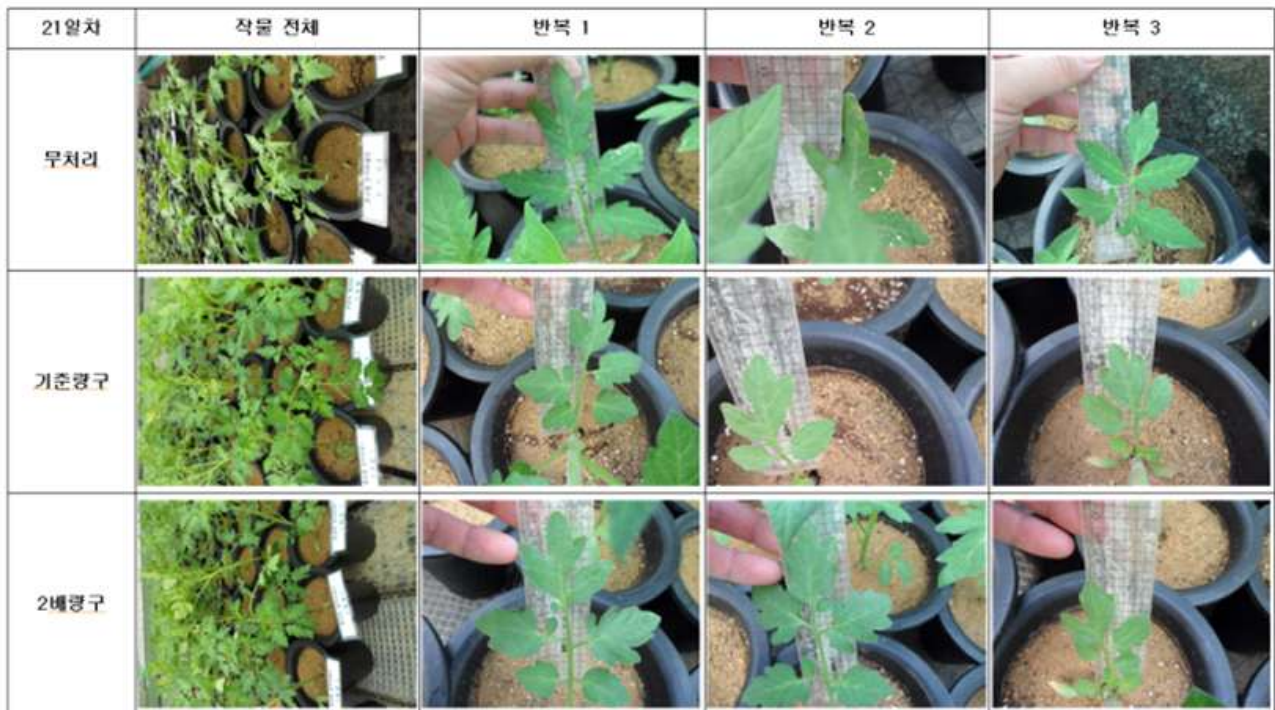
21일차	작물 전체	반목 1	반목 2	반목 3
무처리				
기준량구				
2배량구				

CBMB27의 경우는 시험제제 잘자라를 이용한 결과, RS16 (잘자라골드)와 동일하게 시험 작물에 대해 기준량 및 2배량 처리구 모두 비해 발생이 발생하지 않는 것을 확인하였다 (Table 22). 이와 같은 결과를 바탕으로 RS16과 CBMB27을 이용한 미생물 시험제제 모두 시험 작물에 대해 비해 증상을 유발하지 않았으므로 다양한 작물에 사용 가능한 것으로 사료된다.













Table 22. CBMB27 (잘자라) 비해시험 결과

시험제제	시험작물 (품종)	비해정도 (0 ~ 5)		비 고
		기준량	2배량	
CBMB27	방울토마토 (탱크원)	0	0	-
	배추 (얼갈이)	0	0	-
	흙살림	0	0	-
	잘자라	0	0	-
	고추 (슈퍼마니파)	0	0	-

비해 시험구 방울토마토에 대한 21일차 조사















비해 시험구 배추에 대한 21일차 조사

21일차	작물 전체	반목 1	반목 2	반목 3
무처리				
기준량구				
2배량구				













비해 시험구 상추에 대한 21일차 조사

21일차	작물 전체	반목 1	반목 2	반목 3
무처리				
기준량구				
2배량구				

비해 시험구 오이에 대한 21일차 조사

21일차	작물 전체	반복 1	반복 2	반복 3
무처리				
기준량구				
2배량구				

비해 시험구 고추에 대한 21일차 조사

21일차	작물 전체	반복 1	반복 2	반복 3
무처리				
기준량구				
2배량구				

○ 최종 선발 미생물 유전자원의 미생물제제 등록 및 제품화

작물생육용 미생물 제제를 등록하는 방안은 2가지가 있다. 하나는 비료관리법에 의해 비료로 등록하는 것이다. 이를 위해서는 우선 당해 균주가 비료공정규격에 등재되어 있어야 한다. 만약 등재되어 있다면 미생물동정 및 유해성분과 균주 수 분석 성적서를 첨부하여 비료생산업 등록신청서 또는 변경신고서를 관할 시군청에 제출하면 된다. 이에 소요되는 기간은 대략 1개월 내외다. 비료공정규격이 설정되어 있지 않은 경우는 지역 또는 시기를 달리한 작물 재배시험을 2회 실시한 결과를 첨부하여 비료경정규격설정 신청서를 농촌진흥청에 제출하여 심의를 받아야 한다. 재배시험에 소요되는 경비는 1,100만원 내외이며, 총 소요 기간은 1년 내외다. 또 다른 방법으로 친환경농업육성 및 유기식품관리법에 의거 토양개량 및 작물생육용 유기자재 목록공시를 받는 방법이다. 비료공정규격이 있을 경우에는 비해 시험만 실시하면 되며, 이에 소요되는 기간은 약 3개월, 총 비용은 500만원 내외다. 비료공정규격이 없는 경우에는 동법의 살균용 유기자재로 공시 받는 경우로서 이때는 독성시험을 해야 하므로 2,500여 만원의 비용과 3개월여가 소요된다. RS16 균주인 *B. linens*가 비료공정규격에 설정되어 있는 Table 23과 같이 시장성과 기술성이 모두 유리한 점을 이용하여 토양미생물제제로 등록하였다.

Table 23. 미생물제제 등록 및 제품화에 있어 고려사항

제품화 시 고려요인		RS16	CBMB20	CBMB27
시장성	차별화 가능성	고	중-저	중-저
	효과성	고	중	저
기술성	제품화 소요기간	1개월 이내	1년 이내	1년 이내
	제품화 비용	100만원 이내	1,200만원 내외	1,200만원 내외

이와 같은 결과를 바탕으로 2018년 8월 31일 재단법인 전주 농생명소재연구원으로부터 보증미생물 및 유해성분에 대한 검사 성적을 받았으며, 2018년 9월 4일 목원대학교 미생물생태자원연구센터에서 16S rRANA 유전자 전염기서열 해석에 대한 시험 성적을 인정받았다. 이후 충청북도 괴산군으로부터 [비료관리법] 제11조 제1항, 같은 법 시행령 제11조 4항 및 같은 법 시행규칙 제7조 제4항에 의거 같이 비료생산업을 등록을 증명하였다.

제 2 세부과제 : 생물비료 개발을 위한 전략 미생물 유전체 해독 및 유용유전자 분석

○ 5종 유용미생물 선정

식물 생육에 유용한 물질을 생산하는 5종의 균을 선발하기 위해, 균주가 생산하는 여러가지 물질 중에서 에틸렌 합성 조절에 관여하다고 알려져 있는 ACC deaminase 활성을 갖는 균을 중심으로 선정을 수행하였다. 본 연구에서는 1세부과제에서 기 분리한 미생물 중에서 이러한 활성을 가지는 균으로, CBMB205 (*Bacillus methylotrophicus*), CBMB27 (*Methylobacterium phyllosphaerae*), ATSB16 (*Pandoraea thiooxydans*), CBMB127 (*Methylophilus rhizosphaerae*), ATSB10 (*Dyella thiooxydans*)의 5종이 선발되었다. Methylophony 속에 속하는 CBMB205는 ACC deaminase 활성을 가질 뿐만 아니라, siderophore 합성, 황산화 활성을 가지는 것으로 나타났다. Methylobacteria 속에 속하는 CBMB27와 *Dyella* 속에 속하는 ATSB10도 ACC deaminase 활성을 나타내었다. ATSB10은 기존의 연구에서 카놀라의 뿌리 신장을 촉진하고, rock phosphate의 바이오산성화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. *Pandoraea* 속에 속하는 ATSB16은 참깨 뿌리의 근권 토양으로부터 분리된 공생균으로 질소 고정과 thiosulfate 산화 활성을 가지는 것으로 나타났다. Methylophylic bacteria에 속하는 CBMB127은 벼 뿌리의 근권 토양에서 발견된 균으로 ACC deaminase 활성을 가질 뿐만 아니라, 황산화 활성을 가지는 것으로 나타났다.

○ 3종 유용미생물의 시퀀싱

우선적으로 CBMB205 (*B. methylotrophicus*), CBMB27 (*M. phyllosphaerae*), ATSB16 (*P. thiooxydans*)의 유전체 시퀀싱을 수행하였다. ACC deaminase 활성을 보이는 균의 싱글 콜로니를 30°C에서 3~4일 배양하였다. 배양된 균은 Wizard® Genomic DNA Purification Kit를 이용하여 genomic DNA 추출을 수행하였으며, QC test를 통과한 gDNA는 시퀀싱을 위한 library 제작에 이용되었다. QC 수행결과는 Figure 72와 같다. 확인한 결과, 선정된 5종 모두에서 양질의 DNA가 추출되었다. 이것을 기반으로 16S rRNA 시퀀싱 분석을 수행한 결과, 모두 표적한 세균임을 알 수 있었다. CBMB27의 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과, 기존의 *M. phyllosphaerae* (Accession No. EF126746)과 1,343 bp 중에 3개의 염기가 다른 것으로 나타나, 99.85% 상동성을 보임을 알 수 있었다. CBMB205의 1,299 bp의 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과, *B. methylotrophicus* (Accession No. EU194897)의 16S rRNA 서열과 100% 동일하였다. ATSB16의 16S rRNA 1,369 bp의 상동성을 분석한 결과, *P. thiooxydans* (Accession No. EF397578)과 96.91%의 상동성을 나타내었다. ATSB10의 경우는 *D. thiooxydans* (Accession No. EF397574)의 16S rRNA 서열이 1,408 bp 중에 3개가 달라 99.79%의 상동성을 나타내었다. 이와 같은 결과로, 선정한 5종의 미생물중 4종의 유용

미생물을 확인 및 보유할 수 있었다. 16S rRNA 염기서열 분석결과에 따라 위 4종 가운데, 우선적으로 CBMB205, CBMB27, ATSB16의 3종의 유전체 염기서열을 수행하였다.

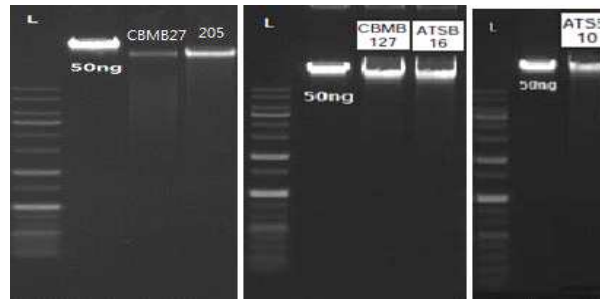


Figure 72. 선정된 5종의 genomic DNA 추출 후 전기영동

○ CBMB205의 어셈블리 완료

CBMB205의 유전체 해독을 위해 SMRTbell Template Prep Kit을 사용하여 길이 20 kb 이상의 library를 제작하고, PacBio platform을 이용하여 시퀀싱을 수행하였다. CBMB205의 유전체 어셈블리를 수행하기 위해 PacBio SMRT Analysis 2.3.0 프로그램을 이용하였다. Filtering과 trimming과정을 거쳐 77,620개의 reads가 assembly에 이용되었다. 전체 유전체를 시퀀싱 한 결과, CBMB205는 16S rRNA의 상동성 비교 결과와 동일하게 *B. methylotrophicus* 균으로 분류되었다. Contig 숫자는 1개였으며, 플라스미드는 존재하지 않는 것으로 나타났다. 총 259 coverage로 시퀀싱 된 것으로 분석되었다. 어셈블리 결과, genome size는 3,929,745 bp이었으며, GC ratio는 46.5 %였다. 이 결과를 가장 유사한 유전체를 갖고 있는 6개종과 비교한 결과, 유전체 크기 및 GC ratio 모두 비슷한 결과를 나타내었다 (Table 24). 또한 완성되어진 CBMB205 유전체 지도는 다음 Figure 73에 나타났다.

Table 24. CBMB205와 근연종간의 유전체 크기 및 GC ratio 비교

Strains	Ref Seq	Genome size	GC ratio
		(Mb)	(%)
<i>B. Methylotrophicus</i> (CBMB205)		3.93	46.5
<i>B. Amyloliquefaciens</i>	NC_014551.1	3.98	46.1
<i>B. Vallismortis</i>	NZ_AFSH00000000.1	3.87	43.8
<i>B. Subtilis</i>	NC_000964.3	4.22	43.5
<i>B. Atrophaeus</i>	NZ_CP007640.1	4.18	43.2
<i>B. Licheniformis</i>	NC_006270.3	4.22	46.2
<i>B. Mojavensis</i>	-	3.96	43.7

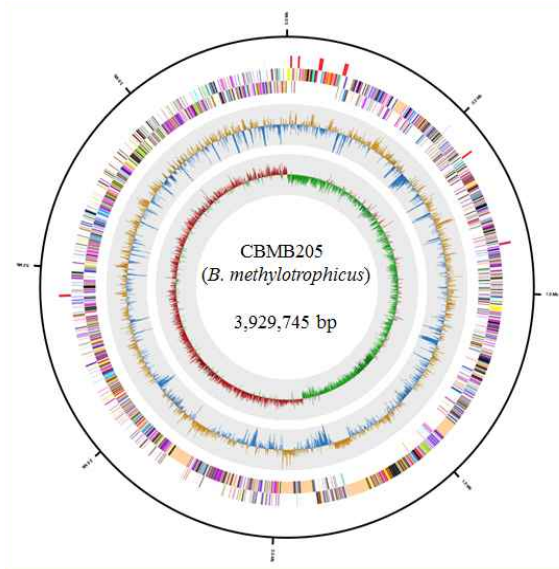


Figure 73. CBMB205의 유전자 지도

○ CBMB205 유전자 예측

유전자 개수를 추측한 결과, CBMB205균은 rRNA는 27개, tRNA는 86개, 4,016개의 ORF를 포함하여 총 4,129개의 유전자를 갖고 있는 것으로 추측되었다. 이 유전자의 개수는 CBMB205와 16S rRNA 서열분석에 의해 가장 근연종으로 분류되어진 *B. amyloliquefaciens*의 4,043개, *B. vallismortis*의 3,989개, *B. subtilis*의 4,421개, *B. atrophaeus* 4,100개, *B. licheniformis*의 4,304개, *B. mojavensis*의 4,131개와도 비슷하여 유전자 예측 결과가 잘 이루어졌다고 추측되었다. 총 4,129개의 유전자 중에서 ORF로 예측되어진 4,016개의 유전자들의 평균 길이는 872 bp였고, 이들을 Clusters of orthologous groups (COG) 분석 방법에 의해 다음 Table 25와 같이 18개 군으로 총 분류하였고, 총 2,846개의 유전자가 포함되었다. 또한, CBMB205 4,016개의 유전자 목록에서 중복되는 유전자를 제외한 고유의 유전자 개수는 1,805개인 것으로 나타났다. 이와 같은 결과를 원형 그래프로 표시하여, 분류에 따른 유전자 수를 비교하였다 (Figure 74). 분석한 결과, R군의 General function prediction only와 S군의 unknown 유전자가 전체의 약 23% 를 차지하여, *Bacillus* 균에는 아직 알려지지 않은 유전자가 대다수 존재하고 있음을 알 수 있었다. 기능이 알려진 것 중에서는 아미노산 수송과 대사에 관련된 유전자가 약 9.9% (282개)가 가장 많았으며, 전사과정과 관련된 유전자가 8.2% (234개)와 탄수화물 수송과 대사에 관련된 유전자가 235개 (8.2%)를 차지하였다. COG에 들어가지 않는 유전자 1,087개 중 780개가 hypothetical protein으로 분류되었으며, 그 외에도 51개의 membrane protein, 15개의 phage potal protein 등이 존재하는 것으로 나타났다.

Table 25. 예측되어진 유전자들의 Clusters of Orthologous Groups (COG) 분석 방법에 의한 분류

COG	Description	Number of Genes	(%)
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	137	4.81
K	Transcription	234	8.22
L	Replication, recombination and repair	114	4.01
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	36	1.26
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	98	3.44
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	176	6.18
N	Cell motility	58	2.04
P	Inorganic ion transport and metabolism	150	5.27
T	Signal transduction mechanisms	132	4.64
C	Energy production and conversion	166	5.83
G	Carbohydrate transport and metabolism	235	8.26
E	Amino acid transport and metabolism	282	9.91
F	Nucleotide transport and metabolism	79	2.78
H	Coenzyme transport and metabolism	117	4.11
I	Lipid transport and metabolism	121	4.25
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	62	2.18
R	General function prediction only	332	11.67
S	Function unknown	317	11.14
Total		2,846	100

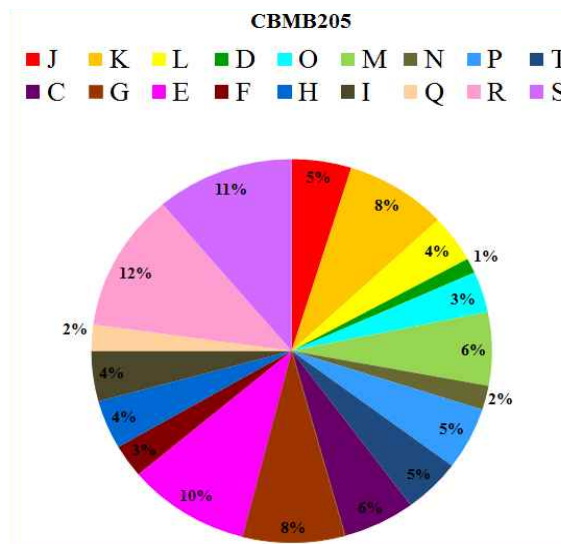


Figure 74. Clusters of Orthologous Groups (COG) 분석 방법에 의한 CBMB205 유전자 분류

○ 기존 보고되어진 균과 CBMB205 유전체 및 유전자 비교

기존의 보고되어진 균주 중에서 CBMB205와 유사도가 높다고 알려져 있는 균 4개를 선발하여

Mummer 분석을 수행하였으며, 결과는 Figure 75와 같다. 그림의 X축은 그래프의 하단에 있는 종의 genome size이고, Y축은 CBMB205의 genome size이다. 결과, (D)의 항균성을 가지는 것으로 보고되어진 *B. amyloliquefaciens*와 유전체가 가장 비슷한 것으로 나타났다. 이외에도, (A)의 산업적으로 유용하다고 보고되어진 *B. atrophaeus*와도 높은 유사성을 나타내었다. CBMB205의 유전자 목록 중에서 이 균에만 특이적으로 예측되어진 유전자를 우선적으로, *B. amyloliquefaciens*의 유전자 목록과 *B. atrophaeus* 유전자 목록을 작성하여 비교하여 보았다. 결과, 360개의 유전자가 *B. amyloliquefaciens*에는 존재하지 않고, CBMB205에만 존재한다고 추측되었다. 이외에도 식물의 생장에 유용할 것이라고 추측되는 유전자로 phosphofructokinase가 CBMB205에 한 개 (BCBMB205_14570) 존재하는 것으로 추측되었다. 식물의 스트레스 저항에 도움을 주는 물질로 알려진 glutathione peroxidase (BCBMB205_20730)가 한 개 있는 것으로 추측되었다. 이외에도 세 가지의 peroxidase (BCBMB205_27740, BCBMB205_36690, BCBMB205_38190)를 추가적으로 확인할 수 있었다. 식물의 생장에 중요한 호르몬인 옥신 합성의 중요한 성분인 트립토판을 생합성하는 관련 유전자로는 4개가 검출되었다 (BCBMB205_21540, BCBMB205_21550, BCBMB205_21580, BCBMB205_21560). 식물의 생육에 도움을 주는 *Bacillus*의 생합성 물질 중의 하나인 siderophore 합성 또는 수송에 관련되어 28개의 유전자가 있는 것으로 추측되었다. 또한, 식물의 생육에 중요한 질소 고정에 관련된 유전자 (nitrate metabolism)에 관련된 유전자로는 21개가 예측되었다 (Table 26).

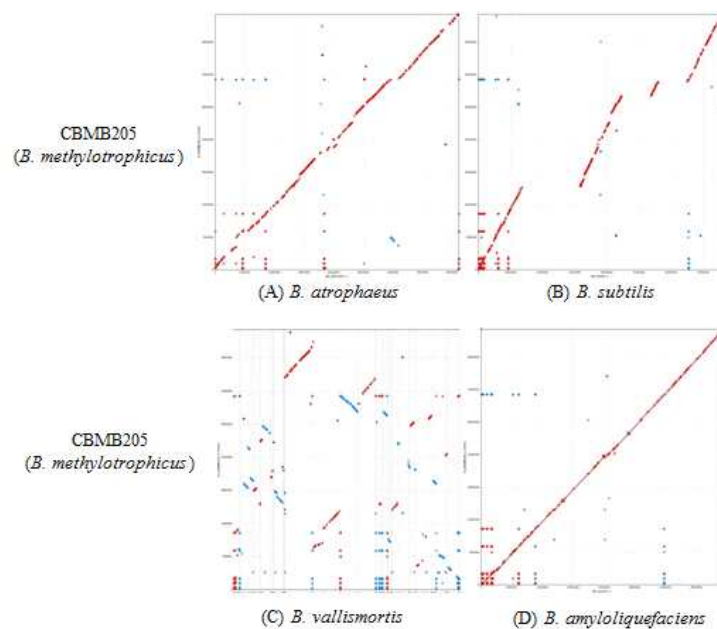


Figure 75. Mummer 분석을 이용한 CMBM205와 유사균과의 유전체 비교

Table 26. 질소 고정에 관련된 CBMB205의 유전자 목록

Gene name	Length (bp)	Product name	E value
BCBMB205_03170	2418	assimilatory nitrite reductase subunit	0
BCBMB205_12350	666	LuxR family transcriptional regulator	4.23E-117
BCBMB205_03200	1206	major facilitator transfer	0
BCBMB205_36340	1131	MFS transporter	4.49E-180
BCBMB205_36260	672	nitrate reductase	2.13E-99
BCBMB205_36270	558	nitrate reductase	6.64E-94
BCBMB205_36280	1464	nitrate reductase	0
BCBMB205_36290	3687	nitrate reductase	0
BCBMB205_03180	2133	nitrate reductase	0
BCBMB205_03190	2328	nitrate reductase	0
BCBMB205_03160	321	nitrite reductase NAD(P)H small subunit	2.18E-54
BCBMB205_05570	1218	sensor histidine kinase	0
BCBMB205_09270	1137	sensor histidine kinase	0
BCBMB205_29930	645	transcriptional regulator	2.86E-109
BCBMB205_10920	1251	cytochrome P450	0
BCBMB205_12120	1221	cytochrome P450	0
BCBMB205_18870	1197	cytochrome P450	0
BCBMB205_17550	1212	cytochrome P450 of bacillaene metabolism	0
BCBMB205_22800	1155	DfnK	0
BCBMB205_07450	1092	nitric oxide synthase oxygenase	0
BCBMB205_30550	237	nitrogen fixation protein yutI	8.68E-29

CBMB205에는 5개의 catalase가 존재하는 것으로 추측되었다 (BCBMB205_05930, BCBMB205_08750, BCBMB205_37820, BCBMB205_04540, BCBMB205_06940). CBMB205는 cold shock 관련 유전자인 *CspC*를 세 개 갖고 있는 것으로 나타났다 (BCBMB205_05070, BCBMB205_09040, BCBMB205_20770). CBMB205의 motility에 관여하는 chemotaxis protein은 18개인 것으로 추측되었다 (Table 27). 또한, 균의 표면 부착과 관련된 type IV pilli는 2가지 유전자가 있는 것으로 확인되었다 (BCBMB205_23910, BCBMB205_23920). 그러나 ACC deaminase 활성화에 중요한 역할을 한다고 추정되는 ACC 유전자는 CBMB205의 유전자 목록에서 발견할 수 없었다.

Table 27. CMBM205의 운동성 (motility) 관련 유전자

Gene name	Length (bp)	Product name	E value
BCBMB205_14150	1968	chemotaxis protein	0
BCBMB205_21630	933	chemotaxis protein	6.42E-177
BCBMB205_29410	2007	chemotaxis protein	0
BCBMB205_29420	1986	chemotaxis protein	0
BCBMB205_29430	1989	chemotaxis protein	0
BCBMB205_16770	2019	chemotaxis protein CheA	0
BCBMB205_16800	501	chemotaxis protein CheD	1.34E-85

○ CBMB27 및 ATSB10 어셈블리 완료

CBMB27 및 ATSB10의 유전체 해독을 위해 SMRTbell Template Prep Kit을 사용하여 길이 20 kb 이상의 library를 제작하고, PacBio platform을 이용하여 시퀀싱을 수행하였다. CBMB205의 유전체 어셈블리를 수행하기 위해 PacBio SMRT Analysis 2.3.0 프로그램을 이용하였다. 유전체 시퀀싱 후, 각 균주의 16S rRNA 상동성 비교한 결과 CBMB27과 ATSB10은 각각 *Methylobacterium phyllosphaerae*와 *Dyella thiooxydans* 균으로 분리되었다. 어셈블리 결과 CBMB27은 총 6,316,624bp 사이즈로 3개의 플라스미드 DNA를 포함해 총 4개의 컨티그가 생산되었고, ATSB10의 genome 사이즈는 4,227,172bp의 하나의 컨티그가 생산되었다. 유전체의 GC ratio는 69.81% (CBMB27 chromosome)과 67.98% (ATSB10)으로 나타났다. 완성된 각 유전체의 지도는 다음 Figure 76과 Figure 77에 나타냈고, 각 유전체의 genome size와 GC ratio는 Table 28에 나타냈다.

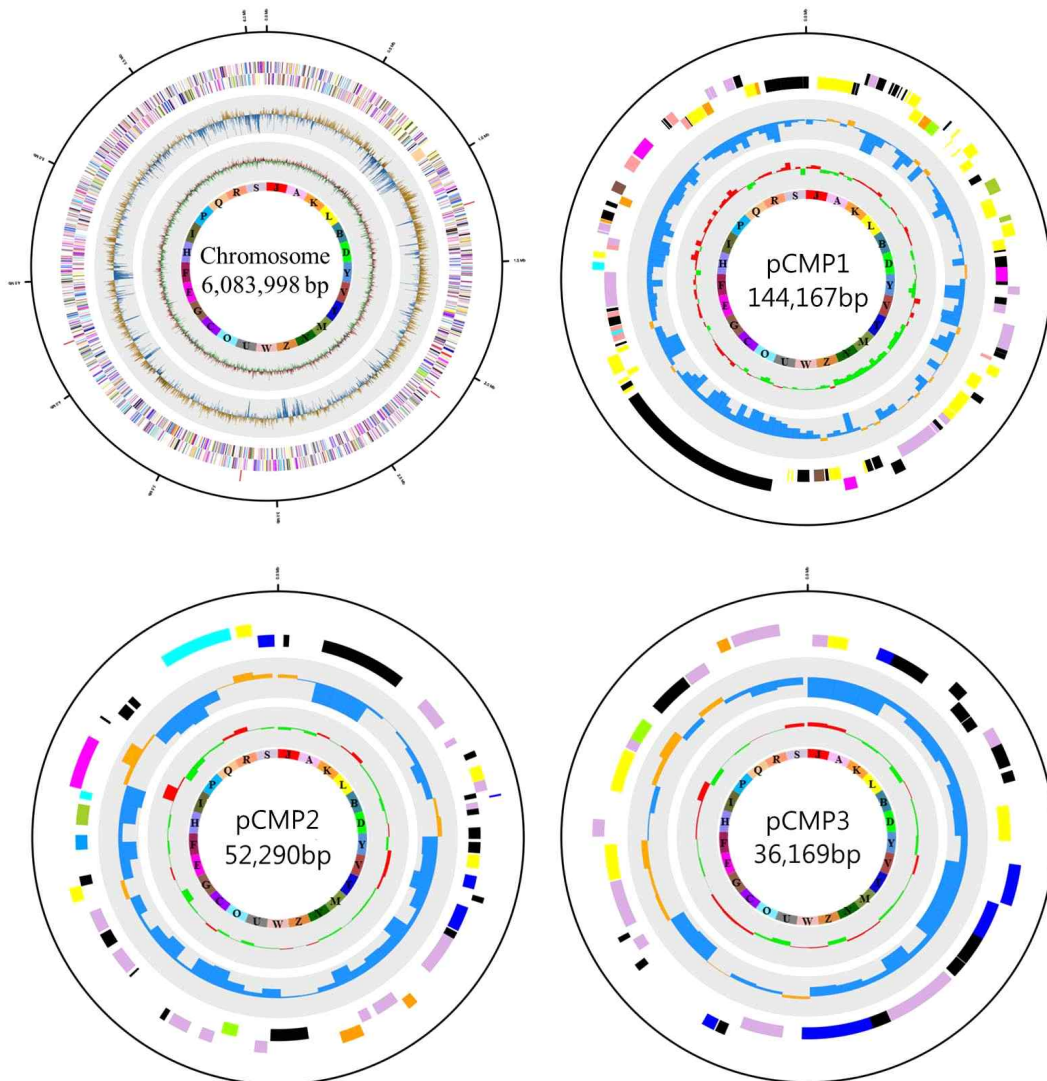


Figure 76. CBMB27 및 유전체 지도

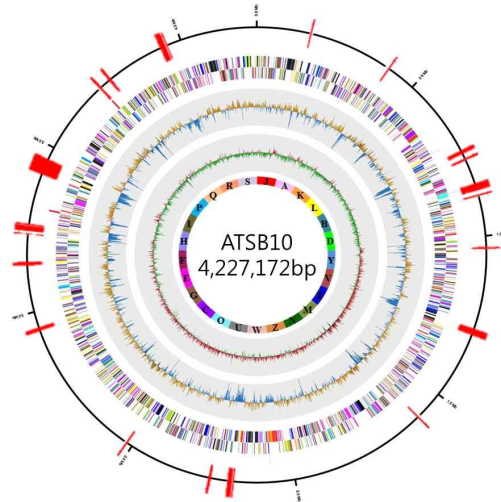


Figure 77. ATSB10의 유전체 지도

Table 28. CBMB27과 ATSB10의 contig summary

Strain		Genome size (bp)	G+C ratio (%)	rRNA	tRNA
	Chromosome	6,083,998	69.81	12	56
<i>M. phyllosphaerae</i>	pCMP1	144,167	63.13		
CBMB27	pCMP2	52,290	63.25		1
	pCMP3	36,169	63.2		
<i>D. thiooxydans</i> ATSB10		4,227,172	67.98	6	49

○ CBMB27 유전자 annotation

인터넷 상에 공개된 유전자 데이터베이스를 이용해 CBMB27의 유전자의 개수 및 기능을 추측한 결과, CBMB27균의 유전체에는 57개의 tRNA와 12개의 rRNA 유전자와 총 5,865개의 유전자를 암호화 하고 있는 것으로 확인되었다. 그 중 단백질로 번역되어 기능을 갖고 있는 유전자의 개수는 5,796개로 확인되며, 이들의 COG 분석 방법에 의해 다음 Table 29와 같이 4,697개의 유전자가 22개 군으로 분류되었다. 가장 많은 유전자가 분류된 S군은 단백질의 기능이 정확하게 밝혀지지 않은 유전자들이며, 총 1,121개의 유전자로 전체에서 23.87%를 차지해 CBMB27균의 유전자가 기능이 제대로 밝혀지지 않은 유전자를 대다수 포함하는 것을 알 수 있다. 또한 Q군에 속하는 2차 대사산물 합성과 관련된 유전자는 전체 중 1.43%를 차지하며, 대부분의 식물의 생장에 상호 작용 할 수 있을 것으로 예상되는 유전자들이 포함됨을 유추할 수 있다. 뿐만 아니라 균주 자체의 방어기작에 관련된 유전자가 전체의 1.55%로 V군에 속하는 것을 알 수 있다. COG category에

포함되지 않은 1,099개의 유전자들 또한 기능이 잘 알려지지 않은 hypothetical protein이 932개로 가장 많았으며, 그 외에도 수송과 대사에 관련된 유전자들이 다수 포함되는 것을 알 수 있었다. Annotation의 결과, 기능이 예측된 CBMB27의 유전체에는 methane metabolism에 관여하는 유전자 외에도 기존에 식물생장에 유용한 유전자라고 예상한 siderophore 생합성 유전자를 갖고 있으며, 이 외에도 multidrug에 저항하는 유전자 및 중금속에 저항성을 갖는 유전자를 확인 할 수 있었다. CBMB27의 유용유전자는 Table 30에서 확인 할 수 있다.

Table 29. CBMB27균의 Clusters of Orthologous Groups (COG) 분석 방법에 의한 유전자 분류

COG category	Description	Number of Genes	Ratio (%)
B	Chromatin structure and dynamics	4	0.09
C	Energy production and conversion	284	6.05
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	28	0.60
E	Amino acid transport and metabolism	374	7.96
F	Nucleotide transport and metabolism	68	1.45
G	Carbohydrate transport and metabolism	200	4.26
H	Coenzyme transport and metabolism	114	2.43
I	Lipid transport and metabolism	165	3.51
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	163	3.47
K	Transcription	265	5.64
L	Replication, recombination and repair	244	5.19
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	284	6.05
N	Cell motility	71	1.51
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	151	3.21
P	Inorganic ion transport and metabolism	272	5.79
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	67	1.43
R	General function prediction only	428	9.11
S	Function unknown	1,121	23.87
T	Signal transduction mechanisms	269	5.73
U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	51	1.09
V	Defense mechanisms	73	1.55
Z	Cytoskeleton	1	0.02
Total		4,697	100

Table 30. CBMB27의 유용 유전자

	Gene name	Length (bp)	Product name
	CBMB27_00085	1,805	dehydrogenase XoxF
	CBMB27_00100	794	Formyltransferase/hydrolase complex Fhc subunit C
	CBMB27_00101	947	Formyltransferase/hydrolase complex subunit D
	CBMB27_00102	1,646	Formyltransferase/hydrolase complex Fhc subunit A
	CBMB27_00103	1,070	Formyltransferase/hydrolase complex Fhc subunit B
	CBMB27_00105	893	NAD(P)-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase
	CBMB27_00107	974	Methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase
	CBMB27_00110	512	5,6,7,8-tetrahydromethanopterin hydro-lyase
	CBMB27_00124	2,297	Protein YdeP
	CBMB27_00405	1,757	Methanol dehydrogenase [cytochrome c] subunit 1
	CBMB27_00514	962	Malate dehydrogenase
	CBMB27_00579	1,289	Enolase
	CBMB27_00661	1,925	Acetyl-coenzyme A synthetase
	CBMB27_00683	2,435	Formate dehydrogenase-O major subunit
	CBMB27_00684	596	Formate dehydrogenase-O major subunit
	CBMB27_00701	923	Probable fructose-bisphosphate aldolase class 1
	CBMB27_01054	1,304	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 2
	CBMB27_01298	1,049	Malyl-CoA/beta-methylmaly-CoA/citramaly-CoA lyase
	CBMB27_01380	455	Isoquinoline 1-oxidoreductase subunit alpha
	CBMB27_01618	539	Bifunctional enzyme Fae/Hps
Methane metabolism	CBMB27_01729	596	Sedoheptulose 1,7-bisphosphatase
	CBMB27_02064	1,250	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 2
	CBMB27_02185	650	3-hexulose-6-phosphate synthase
	CBMB27_02330	1,628	3,4-dihydroxy-2-butanone kinase
	CBMB27_02359	983	Fructose-1,6-bisphosphatase class 2
	CBMB27_02726	2,354	Caffeine dehydrogenase subunit alpha
	CBMB27_02727	869	6-hydroxypseudoxyonicotine dehydrogenase complex subunit alpha
	CBMB27_02787	1,217	Acetate kinase
	CBMB27_02888	731	Methane monoxygenase component C
	CBMB27_03045	1,055	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1 1
	CBMB27_03108	1,169	Phosphoserine aminotransferase
	CBMB27_03145	971	L-malyl-CoA/beta-methylmalyl-CoA lyase
	CBMB27_03146	2,750	Phosphoenolpyruvate carboxylase
	CBMB27_03147	890	Malate--CoA ligase subunit alpha
	CBMB27_03148	1,178	Malate--CoA ligase subunit beta
	CBMB27_03150	863	Bifunctional protein MdtA
	CBMB27_03151	941	Glycerate dehydrogenase
	CBMB27_03152	1,208	Serine--glyoxylate aminotransferase
	CBMB27_03145	971	L-malyl-CoA/beta-methylmalyl-CoA lyase
	CBMB27_03146	2,750	Phosphoenolpyruvate carboxylase
	CBMB27_03147	890	Malate--CoA ligase subunit alpha
	CBMB27_03148	1,178	Malate--CoA ligase subunit beta

Methane metabolism	CBMB27_03150	863	Bifunctional protein MdtA
	CBMB27_03151	941	Glycerate dehydrogenase
	CBMB27_03152	1,208	Serine--glyoxylate aminotransferase
	CBMB27_03358	1,175	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase
	CBMB27_03437	1,304	Serine hydroxymethyltransferase
	CBMB27_03542	1,397	Phosphate acetyltransferase
	CBMB27_03721	290	Methanol dehydrogenase [cytochrome c] subunit 2
	CBMB27_03722	587	Cytochrome c-L
	CBMB27_03723	908	Protein MoxJ
	CBMB27_03724	1,883	Methanol dehydrogenase [cytochrome c] subunit 1
	CBMB27_03926	980	Glycerate dehydrogenase
	CBMB27_03977	548	Bifunctional enzyme Fae/Hps
	CBMB27_04035	893	Probable phosphoserine phosphatase
	CBMB27_04089	1,538	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
	CBMB27_04442	2,873	Formate dehydrogenase subunit alpha
	CBMB27_04588	2,318	Uncharacterized oxidoreductase MT2968
	CBMB27_04895	1,946	Acetyl-coenzyme A synthetase
	CBMB27_05098	638	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase 1
	CBMB27_05110	1,460	Glycerate 2-kinase
	CBMB27_05140	1,070	Fructose-bisphosphate aldolase 1
	CBMB27_05204	1,037	Methanesulfonate monooxygenase ferredoxin reductase subunit
	CBMB27_05258	833	S-formylglutathione hydrolase
	CBMB27_05259	1,136	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase 2
	CBMB27_05395	1,178	Uncharacterized zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein AdhB
CBMB27_05399	2,330	Uncharacterized oxidoreductase MT2968	
CBMB27_05472	2,975	Carbon monoxide dehydrogenase large chain	
CBMB27_05473	863	6-hydroxypseudooxynicotine dehydrogenase complex subunit alpha	
CBMB27_05633	497	Probable S-adenosyl-L-methionine-binding protein VirR	
CBMB27_02884	1,508	Methanol utilization control sensor protein MoxY	
Siderophore biosynthesis	CBMB27_05709	8,330	Enterobactin synthase component F
	CBMB27_05710	10,337	Enterobactin synthase component F
	CBMB27_00890	13,583	Linear gramicidin synthase subunit C
	CBMB27_00891	9,590	Linear gramicidin synthase subunit C
	CBMB27_00892	30,737	Linear gramicidin synthase subunit C
CBMB27_02821	761	Vibriobactin-specific 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	
Multidrug resistance	CBMB27_05737	1,166	Multidrug export protein EmrB
	CBMB27_00253	1,472	Tetracenomycin C resistance and export protein
	CBMB27_00540	860	Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA
	CBMB27_00843	1,379	Multidrug resistance protein MdtA
	CBMB27_00943	1,490	Probable multidrug resistance protein NorM
	CBMB27_01169	1,271	Multidrug resistance protein MdtN
	CBMB27_01249	1,259	Multidrug export protein EmrA
	CBMB27_01318	326	ethidium bromide resistance protein
	CBMB27_01610	1,070	Tellurium resistance protein TerC
	CBMB27_01611	1,547	Methylenomycin A resistance protein
	CBMB27_01667	1,751	Multidrug resistance protein pgp-1
	CBMB27_01689	1,217	Multidrug resistance protein MdtA
	CBMB27_01709	1,148	Multidrug efflux pump subunit AcrA
	CBMB27_02223	1,103	Multidrug resistance protein MdtE
	CBMB27_02295	3,164	Multidrug resistance protein MdtC
	CBMB27_02296	1,253	Multidrug resistance protein MdtA
	CBMB27_02929	1,610	Lincomycin resistance protein LmrB
	CBMB27_03006	1,427	Methylenomycin A resistance protein
CBMB27_03085	1,667	Multidrug resistance protein 3	

	CBMB27_03086	1,277	Multidrug export protein EmrA	
	CBMB27_03572	3,116	Multidrug resistance protein MdtB	
	CBMB27_03612	3,173	Multidrug resistance protein MexB	
	CBMB27_03613	1,178	Multidrug efflux pump subunit AcrA	
	CBMB27_03836	3,467	Multidrug resistance protein MdtB	
	CBMB27_03838	3,125	Multidrug resistance protein MdtC	
	CBMB27_03839	1,394	Multidrug resistance protein MdtA	
	CBMB27_04042	3,272	Multidrug resistance protein MdtC	
	CBMB27_04220	1,574	Multidrug resistance protein 3	
	CBMB27_04665	1,844	Multidrug resistance protein 1	
Multidrug resistance	CBMB27_04886	1,760	Multidrug resistance protein homolog 65	
	CBMB27_05211	3,290	Multidrug resistance protein MdtC	
	CBMB27_05545	1,130	Tetracycline resistance protein from transposon Tn4351/Tn4400	
	CBMB27_05554	1,484	Fusaric acid resistance protein FusA	
	CBMB27_05555	1,547	Multidrug resistance protein B homolog	
	CBMB27_05556	1,307	Multidrug export protein EmrA	
	CBMB27_01491	1,865	ATP-binding/permease protein CydC	
	CBMB27_01708	1,808	Cyclolysin secretion/processing ATP-binding protein CyaB	
	CBMB27_02777	800	Uncharacterized protein slr1819	
	CBMB27_02906	749	Iron import ATP-binding/permease protein IrtB	
	CBMB27_03014	1,769	ABC transporter ATP-binding protein exp8	
	CBMB27_04587	1,370	Uncharacterized protein slr1152	
	CBMB27_05642	1,865	ABC transporter ATP-binding protein exp8	
		CBMB27_00842	3,164	Nickel and cobalt resistance protein CnrA
		CBMB27_01610	1,070	Tellurium resistance protein TerC
	Heavymetal resistance	CBMB27_03169	3,149	Nickel and cobalt resistance protein CnrA
CBMB27_03301		320	Quaternary ammonium compound-resistance protein QacC	
CBMB27_03791		1,001	Zinc/cadmium resistance protein	
CBMB27_04575		1,484	Copper resistance protein A	

○ ATSB10 유전자 annotation

CBMB27균과 마찬가지로, 인터넷 상에 공개된 유전자 데이터베이스를 이용해 ATSB10의 유전자의 개수 및 기능을 추측한 결과, ATSB10균의 유전체에는 49개의 tRNA와 6개의 rRNA 유전자와 총 3,917개의 유전자를 암호화 하고 있는 것으로 확인되었다. 그 중 단백질로 번역되어 기능을 갖고 있는 유전자의 개수는 3,862개로 확인되며, 이들의 COG 분석 방법에 의해 다음 Table 31와 같이 3,160개의 유전자가 22개 군으로 분류되었다. CBMB27과 마찬가지로, 단백질의 기능이 정확하게 밝혀지지 않은 많은 유전자들이 S군에 분류되었으며, 총 675개의 유전자로 전체에서 21.36%

를 차지해 ATSB10균의 유전체 또한 기능이 제대로 밝혀지지 않은 유전자를 대다수 포함하는 것을 알 수 있다. ATSB10균의 유용 유전자로 예상되던 phosphate 산화 효소와 ACC deaminase 유전자는 주로 P군에 속하는 것을 알 수 있었다. COG 분석에 포함되지 않은 702개의 유전자 중 593개에 해당하는 유전자가 hypothetical protein으로 가장 많았고, 그 외의 유전자로는 세포막 수송이나 합성에 관여하는 유전자, chemotaxis에 관련된 유전자가 포함되는 것을 알 수 있었다.

Table 31. ATSB10균의 Clusters of Orthologous Groups (COG) 분석 방법에 의한 유전자 분류

COG category	Description	Number of Genes	Ratio (%)
A	RNA processing and modification	2	0.06
B	Chromatin structure and dynamics	1	0.03
C	Energy production and conversion	171	5.41
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	25	0.79
E	Amino acid transport and metabolism	209	6.61
F	Nucleotide transport and metabolism	59	1.87
G	Carbohydrate transport and metabolism	136	4.30
H	Coenzyme transport and metabolism	76	2.41
I	Lipid transport and metabolism	114	3.61
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	160	5.06
K	Transcription	189	5.98
L	Replication, recombination and repair	138	4.37
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	211	6.68
N	Cell motility	66	2.09
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	146	4.62
P	Inorganic ion transport and metabolism	133	4.21
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	34	1.08
R	General function prediction only	293	9.27
S	Function unknown	675	21.36
T	Signal transduction mechanisms	175	5.54
U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	64	2.03
V	Defense mechanisms	83	2.63
Total		3,160	100

CBMB27과 마찬가지로 annotation한 결과 ATSB10의 유전체에는 어떤 유전자가 분포하는지 알 수 있었다. 그 중 유용유전자라고 예상된 siderophore 생합성 유전자와 inorganic phosphate를 uptake하는데 관여하는 유전자를 확인 할 수 있었다. ATSB10의 유용유전자는 Table 32에서 확인 할 수 있다.

Table 32. ATSB10의 유용유전자

	Gene name	Length (bp)	Product name	
	ATSB1011550	3,227	carbamoyl phosphate synthase large subunit	
	ATSB1011560	1,127	carbamoyl phosphate synthase small subunit	
	ATSB106720	641	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate3-phosphatidyltransferase	
	ATSB109740	1,445	enoyl-CoA hydratase/phosphate acetyltransferase	
	ATSB100100	1,124	inorganic phosphate transporter	
Inorganic phosphate	ATSB1011750	761	inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase	
	ATSB102980	815	phosphate ABC transporter ATP-binding protein	
	ATSB103000	1,019	phosphate ABC transporter permease	
	ATSB103010	1,022	phosphate ABC transporter substrate-binding protein	
	ATSB1021370	992	phosphate starvation protein PhoH	
	ATSB102990	866	phosphate transporter permease subunit PtsA	
	ATSB106870	2,159	polyphosphate kinase	
	ATSB1012860	2,108	polyphosphate kinase	
		ATSB101420	773	Pfam: Siderophore-interacting FAD-binding domain; Pfam: Siderophore-interacting protein
	Siderophore biosynthesis	ATSB1011280	719	Iron acquisition and metabolism Siderophores Siderophore_Pyoverdine Pyoverdine efflux carrier and ATP binding protein
ATSB1013060		2,198	tonB-dependent receptor	
ATSB1013250		875	Iron acquisition and metabolism Siderophores Siderophore_Pyoverdine Pirin-related protein, coexpressed with pyoverdine biosynthesis regulon	
ATSB1017110		1,250	TIGRFAM: tonB_Cterm: TonB family C-terminal domain; Pfam: Gram-negative bacterial TonB protein C-terminal; Pfam: BlaR1 peptidase M56	

	ATSB1017560	2,351	catecholate siderophore receptor Fiu
	ATSB1019960	767	Iron acquisition and metabolism Siderophores Siderophore_Pyoverdine Hypothetical protein PvdX
	ATSB1021800	1,535	Membrane Transport Ton_and_Tol_transport_systems Ferric siderophore transport system, periplasmic binding protein TonB
	ATSB1022080	827	Pfam: Gram-negative bacterial TonB protein C-terminal; TIGRFAM: tonB_Cterm: TonB family C-terminal domain
	ATSB1024920	1,265	TIGRFAM: tonB_Cterm: TonB family C-terminal domain; Pfam: Gram-negative bacterial TonB protein C-terminal
	ATSB1028800	1,280	Iron acquisition and metabolism Siderophores Siderophore_Enterobactin Enterobactin exporter EntS
	ATSB1029350	833	Iron acquisition and metabolism Siderophores Siderophore_Pyoverdine Pirin-related protein, coexpressed with pyoverdine biosynthesis regulon
Siderophore biosynthesis	ATSB1029450	977	Pfam: Gram-negative bacterial TonB protein C-terminal; TIGRFAM: tonB_Cterm: TonB family C-terminal domain
	ATSB1029780	659	biopolymer transporter TonB
	ATSB1030520	3,545	Membrane Transport Ton_and_Tol_transport_systems Ferric siderophore transport system, periplasmic binding protein TonB
	ATSB1031780	1,016	Iron acquisition and metabolism Siderophores Siderophore_Pyoverdine Antisigma transmembrane sensor FpvR
	ATSB1034340	971	Iron acquisition and metabolism Siderophores Iron_siderophore_sensor_&_receptor_system Iron siderophore sensor protein
	ATSB1035730	668	Pfam: Gram-negative bacterial TonB protein C-terminal; TIGRFAM: tonB_Cterm: TonB family C-terminal domain
	ATSB1035860	1,877	Iron acquisition and metabolism Siderophores Siderophore_Pyoverdine Non-ribosomal peptide synthetase modules, pyoverdine??
	ATSB1036960	1,013	TIGRFAM: tonB_Cterm: TonB family C-terminal domain; PRINTS: Gram-negative bacterial tonB protein signature; Pfam: Gram-negative bacterial TonB protein C-terminal

○ *in silico* 분석을 통한 유용유전자 집단 예측

- IAA 생합성 유전자 집단

식물호르몬 중 옥신호르몬인 IAA는 식물이 굴지성과 굴광성을 띠게 하는 물질이며, 세포분열과 분화 및 신장을 조절하는 것뿐만 아니라 미생물과의 상호작용에도 관여하는 것으로 알려져 있다. PGPR에 의해 만들어지는 IAA도 식물의 IAA와 마찬가지로 뿌리를 신장시키며, 뿌리의 세포벽을 느슨하게 만들어 삼출액을 증가시킴으로써 PGPR이 뿌리 근처에서 군집화하기 좋은 환경을 조성한다. IAA의 생합성과정은 크게 tryptophan 의존 방법과 tryptophan-비의존 방법으로 나눌 수 있다. IAA의 주요 전구체인 tryptophan은 indole-3-acetamide pathway, indole-3-pyruvate pathway, tryptamine pathway, indole-3-acetonitrile pathway에 의해 IAA로 전환된다고 알려져 있다 (Figure 78).

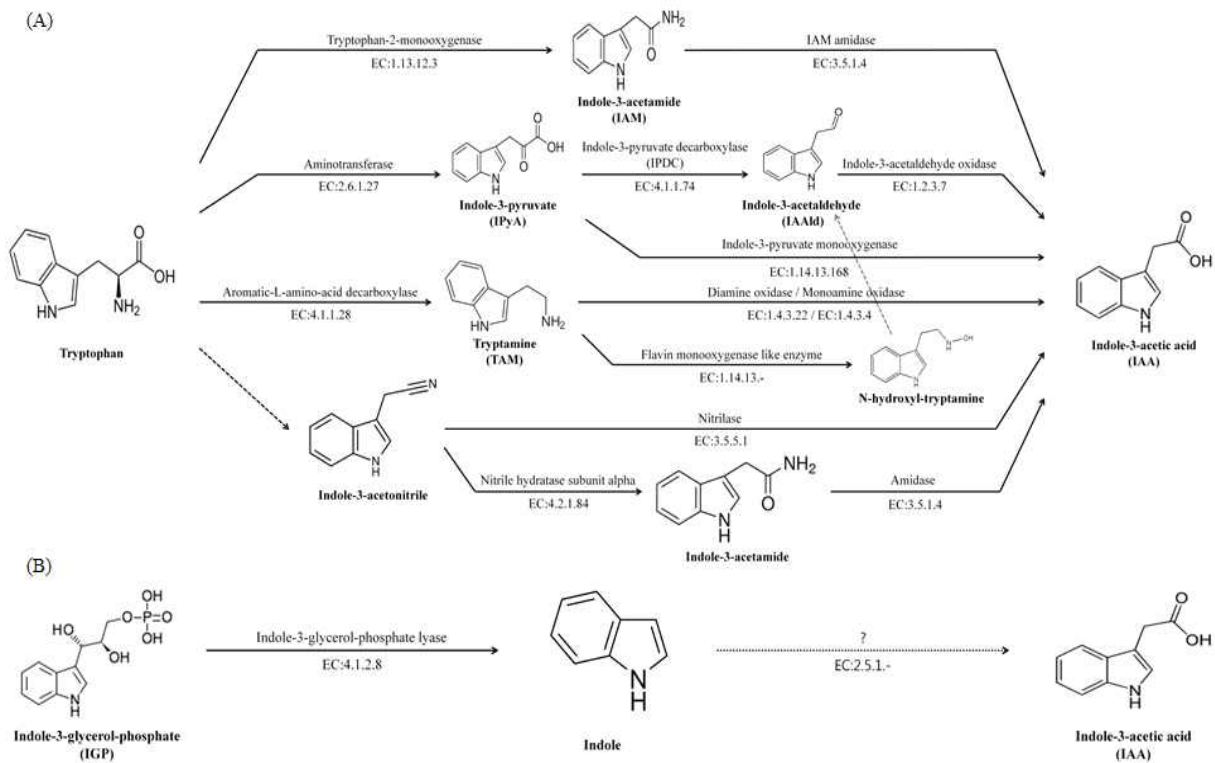


Figure 78. IAA 생합성 과정

CBMB27은 IAA 생합성 경로 5가지 중, tryptophan이 tyramine을 거쳐 IAA로 전환되는 경로와 관련된 유전자 집단을 갖고 있었으며, nitrilase (EC:3.5.5.1), nitrile hydratase subunit alpha (EC:4.2.1.84)와 amidase (EC:3.5.1.4)를 암호화 하는 유전자를 갖고 있는 것으로 확인되었다. ATSB10은 iaaM 유전자가 암호화 하는 효소의 작용으로 indole-3-acetamide(IAM)를 거쳐 iaaH 유전자가 암호화하는 IAA가 생합성 되는 경로의 유전자 집단을 갖고 있는 것으로 확인되었다. 그 외에도, Indole-3-acetaldehyde (IAAld)를 IAA로 전환시키는 aldehyde dehydrogenase (EC:1.2.1.3)를 암호화하고 있는 유전자가 ATSB10과 CBMB205에서도 각각 발견되었다.

- Cytokinin 생합성 유전자 집단

Cytokinin은 식물의 세포질분열과 세포분열을 촉진하고, 어린 싹 (shoot)과 뿌리의 길이생장을 촉진하는 물질로, 식물이 생물적 (biotic stress) 및 비생물적 스트레스 (abiotic stress)로 부터 확연하게 저항성을 갖게 하는 물질로 알려져 있다. 미생물 cytokinin의 역할은 뿌리에서 삼출액이 나오도록 자극하고, 삼출액을 이용해 균주 군집화를 활성화한다. 또한 미생물의 cytokinin이 식물이 생산하는 cytokinin과 같이 생장을 자극하는 활성을 보인다는 것을 확인하였다. Cytokinin은 trans-zeatin (tZ), N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) adenine (iP), cis-zeatin (cZ), dihydrozeatin (DZ)로 자연상태에서 주로 4가지 형태로 존재하며, 식물에서는 tZ와 iP가 주요 cytokinin으로 작용한다. Cytokinin은 크게 ATP/ADP/AMP와 adenosine phosphate-isopentenyltransferase (IPT) 효소의 작용을 통해 iP, tZ, DZ를 합성하는 경로와 tRNA를 이용해 cZ를 합성하는 경로 두 가지가 있는 것으로 알려져 있다. cZ를 제외한 3 종류의 Cytokinin의 생합성 과정에는 메발론산 (MVA) 생합성과정 또는 비메발론산 (MEP/DOXP) 생합성과정에서 나오는 산물인 isoprene과 ATP/ADP/AMP를 adenine 자원으로 사용한다 (Figure 79).

- Volatile Organic Compounds (VOCs)

VOCs는 volatile organic compounds의 약자로, 식물에 systemic resistance를 유도하고, 식물의 뿌리와 지상부의 생장을 유도하는 물질로 알려져 있다. 대표적으로 acetoin과 2,3-butanediol이 식물에 systemic resistance를 유도하는 물질로 알려져 있다 (Figure 80). CBMB205와 CBMB27, ATSB10번은 모두 acetoin을 합성할 수 있는 acetolactase decarboxylase를 암호화하는 유전자를 갖고 있었으며, CBMB205와 CBMB27은 2,3-butanediol을 합성하는 효소를 암호화하는 유전자를 갖고 있는 것으로 확인되었다. Thiosulfate oxidizing 연구 중 분리 및 동정된 ATSB10의 유전체에서는 추가적으로 sulfide를 합성하는 유전자 집단을 가지며, 이로 인해 식물의 생장을 촉진하는 것으로 보인다.

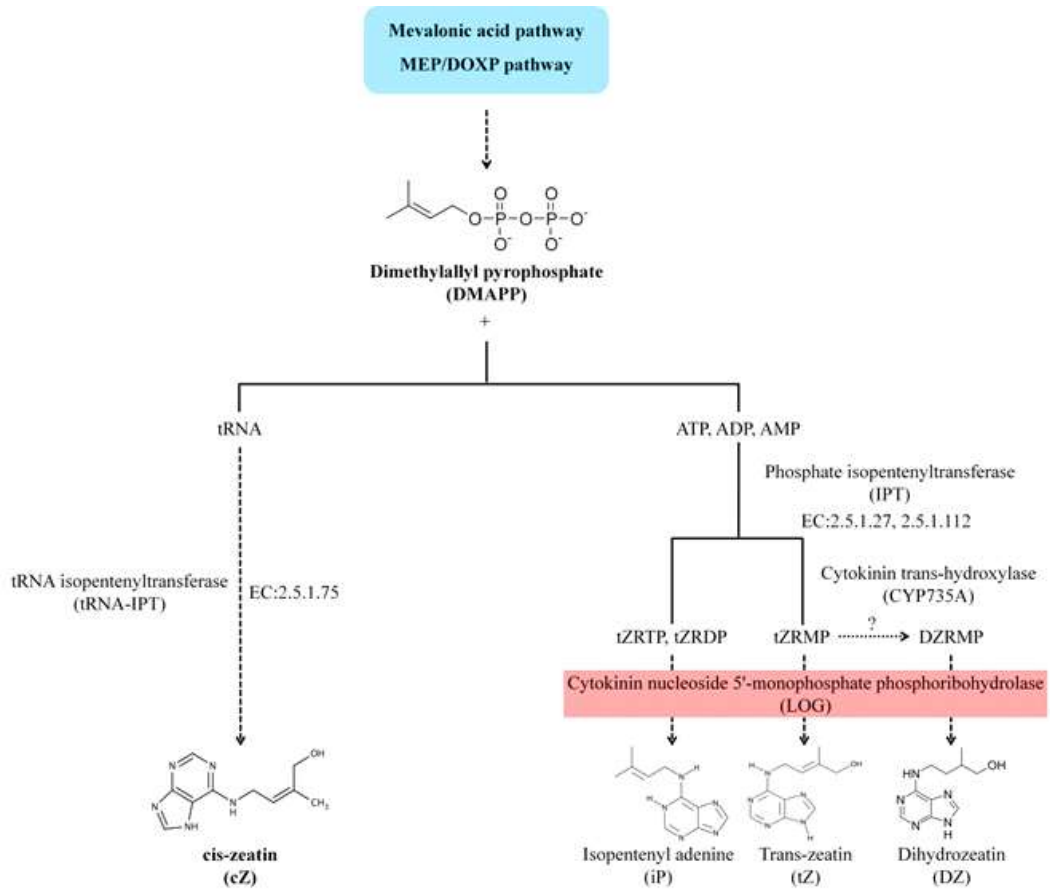


Figure 79. Cytokinin 생합성 과정

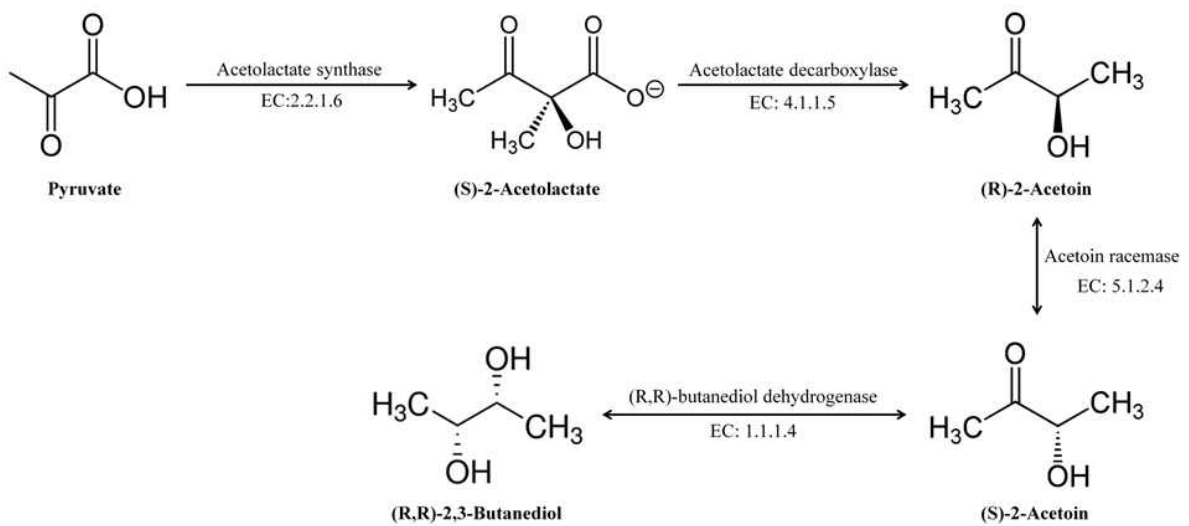


Figure 80. VOCs 생합성 과정

○ 전략미생물 유전체의 비교유전체 분석 파이프라인 구축

- 비교 유전체 분석 파이프라인

MUMmer 분석은 전체 유전체 서열의 align을 기반으로 전략미생물과 다른 미생물 유전체의 비교하는 방법으로, 특히 정렬된 정보가 그림으로 보인다는 점이 유용하다. 본 분석을 통해 두 유전체 사이에 삽입되거나 결실, 역위된 유전자의 위치와 크기를 알 수 있다. OrthoANI 분석은 두 유전체 염기서열 간의 유사도를 나타내는 말로, 유전체를 일정한 크기로 분할시킨 후, 상호 간의 서열 상동성에 따라 값을 계산한다. 같은 종의 미생물은 그 값이 95~96% 이상으로 나타나며, 이 값을 토대로 비교 유전체의 phylogenetic tree를 그려 확인한다. Tetra nucleotide 분석은 256 종류의 4개의 염기로 구성된 DNA 조각을 미생물 유전체에 적용하여, tetra nucleotide 집합체로 변환시키고, tetra nucleotide 빈도에 의해 비교 유전체 분석을 진행한다. 유전체의 서열이 비슷할수록 tetra nucleotide 의 패턴은 비슷한 양상을 보인다.

- 전략미생물 특이적 유전자 및 유용유전자

전략미생물의 특이적으로 가속화된 진화 유전자를 검출하기 위해서는 전략미생물의 유전체와 다른 미생물의 유전체를 이용해 비교유전체 분석을 수행한 후 비교 유전체에 사용된 모든 pan genome에서 core genome을 추출한다. pan genome에서 core genome을 제외한 유전자들은 accessory genome이라 정의된다. 그 중 genome specific gene은 비교 유전체를 수행한 미생물 중 특이적으로 한 종에서만 나타나는 유전자로 정의된다. 본 실험을 수행하기 위해서는 비교유전체 분석을 시행한 후 accessory 유전자를 추출하고, 그 중에서도 전략미생물이 특이적으로 갖고 있는 genome specific gene을 전략미생물이 진화를 거치면서 특이적으로 가속화된 진화유전자로 판단한다. 이를 기반으로 전략미생물의 핵심 유전자 및 프로세스를 연구한다.

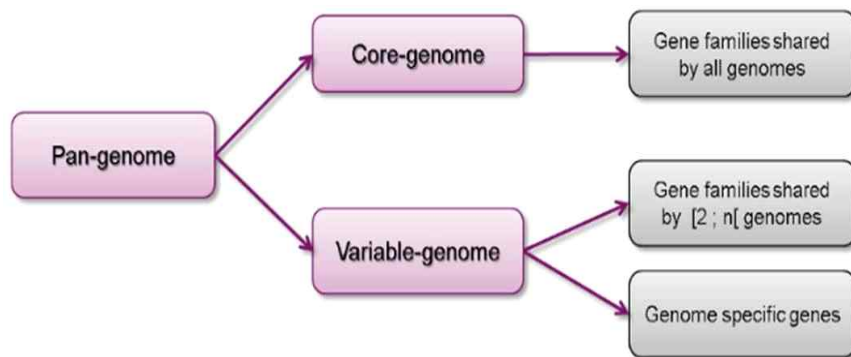


Figure 81. Genome specific gene과 pan genome, core genome 간의 모식도

○ 생물비료 개발을 위한 전략 미생물 유전체 해독 및 유용유전자 분석

전략미생물의 특이적인 유전자를 검출하기 위해 전략미생물의 유전체와 다른 미생물의 유전체를 이용해 비교유전체 분석을 수행한 후 비교 유전체에 사용된 모든 pan genome에서 core genome을 추출한다. pan genome에서 core genome을 제외한 유전자들은 accessory genome이라 정의된다. 그 중 genome specific gene은 비교 유전체를 수행한 미생물 중 특이적으로 한 종에서만 나타나는 유전자로 정의된다. 전략 미생물과 비교대상 종들의 유전체에 존재하는 Ortholog 유전자 세트를 찾아 전략미생물의 종이 공통적으로 어떤 유전자들을 갖고 있는지 알아본다. 위와 같은 연구를 수행한 후 진화과정을 거치면서 전략미생물이 비교대상의 종들과 비교해 어떤 유전자의 염기서열이 돌연변이를 일으켰는지, 그 결과로 유전자 발현에 어떤 영향을 미쳤으며, 돌연변이로 인해 활성을 갖게 된 식물 성장 촉진 유전자는 어떤 것이 있는지 예측한다.

- 유용미생물의 시퀀싱

ACC deaminase 활성을 보이는 *Brevibacterium linens* RS16 균주의 single colony를 30°C에서 3~4일 배양하였다. 배양된 균은 Wizard® Genomic DNA Purification Kit를 이용하여 genomic DNA 추출을 수행하였으며, QC test를 통과한 gDNA는 시퀀싱을 위한 library 제작에 이용되었다. 16S rRNA 시퀀싱 분석을 수행한 결과, 모두 표적한 세균임을 알 수 있었다.

- *B. linens* RS16의 어셈블리 완료

유전체 해독을 위해 SMRTbell Template Prep Kit을 사용하여 길이 20 kb 이상의 library를 제작하고, PacBio platform을 이용하여 시퀀싱을 수행하였다. 유전체 어셈블리를 수행하기 위해 H gap v.2 프로그램을 이용하였다. Filtering과 trimming과정을 거쳐 4,421,157 bp의 genome이 assembly되었다. 전체 유전체를 시퀀싱 한 결과, Contig 숫자는 1개였으며, 플라스미드는 존재하지 않는 것으로 나타났다. 총 136.22 x coverage로 시퀀싱 된 것으로 분석되었고 GC ratio는 64.3%였다. 유전체 지도는 다음 Figure 82에 나타났다.

- *B. linens* RS16의 유전자예측

유전자 개수를 추측한 결과, RS16균은 rRNA는 12개, tRNA는 47개 그리고 ORF 4028개로 총 4,087개의 유전자를 갖고 있는 것으로 분석되었다. 총 4,129개의 유전자 중에서 ORF로 예측되어진 4,016 개의 유전자들의 평균 길이는 988 bp였고, 이들을 Clusters of Orthologous Groups (COG) 분석 방법에 의해 다음 Figure 83와 같이 26개 군으로 총 분류하였고, 총 3,627개의 유전자가 포함되었다.

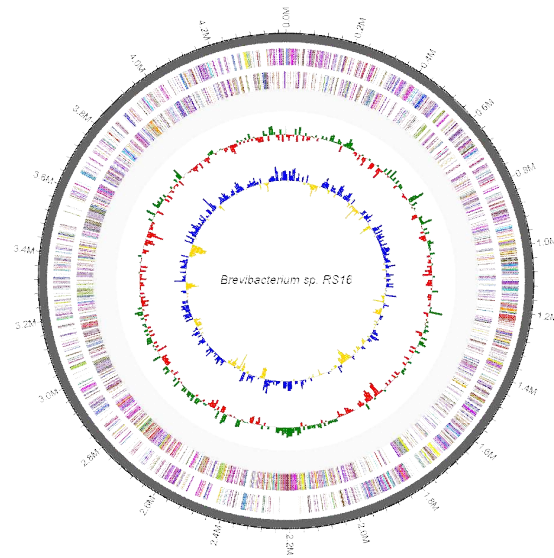


Figure 82. RS16의 유전자지도

COG functional categories

- D : Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
- M : Cell wall/membrane/envelope biogenesis
- N : Cell motility
- O : Post-translational modification, protein turnover, and chaperones
- T : Signal transduction mechanisms
- U : Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
- V : Defense mechanisms
- W : Extracellular structures
- Y : Nuclear structure
- Z : Cytoskeleton
- A : RNA processing and modification
- B : Chromatin structure and dynamics
- J : Translation, ribosomal structure and biogenesis
- K : Transcription
- L : Replication, recombination and repair
- C : Energy production and conversion
- E : Amino acid transport and metabolism
- F : Nucleotide transport and metabolism
- G : Carbohydrate transport and metabolism
- H : Coenzyme transport and metabolism
- I : Lipid transport and metabolism
- P : Inorganic ion transport and metabolism
- Q : Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism
- R : General function prediction only
- S : Function unknown
- X : Not matched to database

Figure 83. Clusters of Orthologous Groups (COG) 분석 방법에 의한 유전자 분류

- 기존 보고되어진 균주와 RS16의 유전체 및 유전자 비교

기 보고된 균주 중에서 RS16과 유사도가 높다고 알려져 있는 균 3종과 비교를 위해 전혀 다른 속에 속하는 균주 1종을 선발하여 Mummer 분석을 수행하였으며, 결과는 Figure 84와 같다. 그림의 X축은 그래프의 하단에 있는 종의 genome size이고, Y축은 CBMB205의 genome size이다. 결과 *B. siliguriense*, *B. sandarakinum*는 RS16과 역방향으로 유사도가 높게 나왔다. 다만 *B. epidermidis*는 같은 속임에도 크게 다르게 나와 비교적 유사도가 떨어졌다. *Corynebacterium uterequi*는 다른 속에 속하기 때문에 전혀 유사하지 않았다.

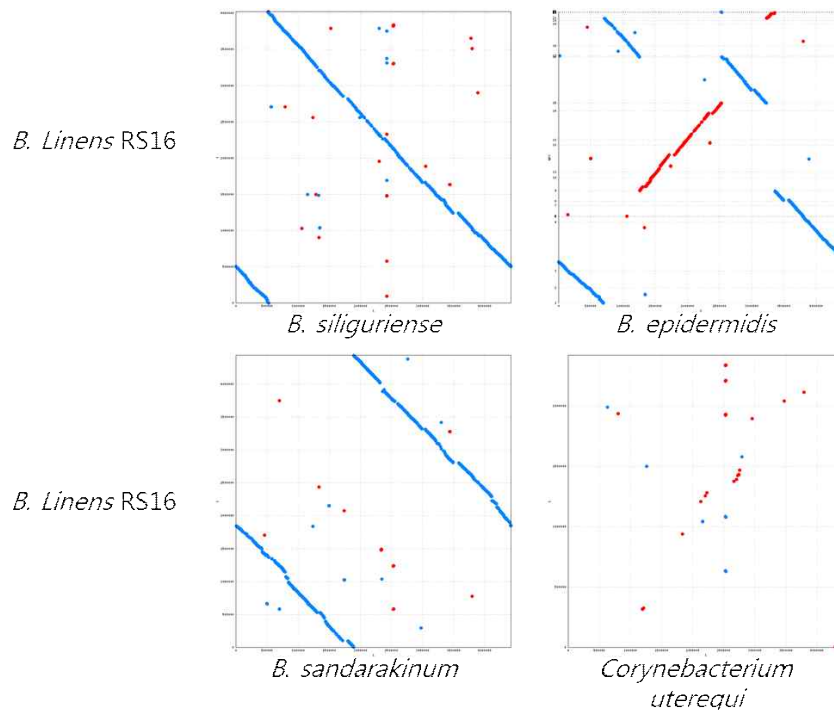


Figure 84. Mummer 분석을 이용한 RS16과 유사균과의 유전체 비교

- RS16 Pan-genome분석과 PGPR 유전자탐색

위의 분석에 사용된 4개종과 RS16을 Pan-genome분석을 수행하였다 (Figure 85). 그 모든 종에서 존재하는 유전자 (core-genome) 1,061개가 확인되었고, RS16에만 존재하는 유전자 (Variable-genome)는 652개로 확인되었다. 그 외에 식물의 성장을 방해하는 에틸렌의 생성을 억제하는 ACC deaminase 1개, 7 peroxidase, 활성산소를 만드는 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 catalase 2개, catalase의 수소를 떼어내는 Catalase peroxidase 1개 등 PGPR 활성을 갖는 다양한 유전자가 존재하였다.

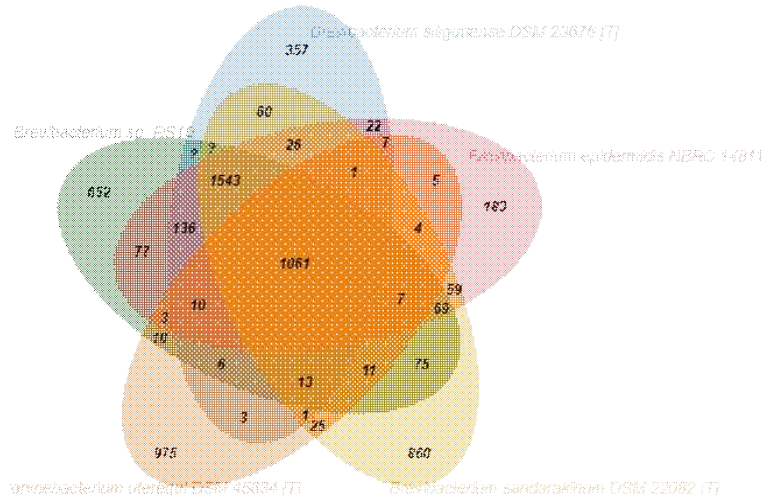


Figure 85. Pan-genome 분석을 이용한 RS16의 PGPR 유전자 탐색

- *P. thiooxydans* ATSB16^T의 어셈블리 완료

유전체 해독을 위해 SMRTbell Template Prep Kit을 사용하여 길이 20 kb 이상의 library를 제작하고, PacBio platform을 이용하여 시퀀싱을 수행하였다. 유전체 어셈블리를 수행하기 위해 PacBio SMRT Analysis 2.3.0 프로그램을 이용하였다. Filtering과 trimming과정을 거쳐 4,464,185 bp의 genome이 assembly되었다. 전체 유전체를 시퀀싱 한 결과, Contig 숫자는 1개였으며, 플라스미드는 존재하지 않는 것으로 나타났다. GC ratio는 63.19%였다. 유전체 지도는 다음 Figure 86에 나타났다.

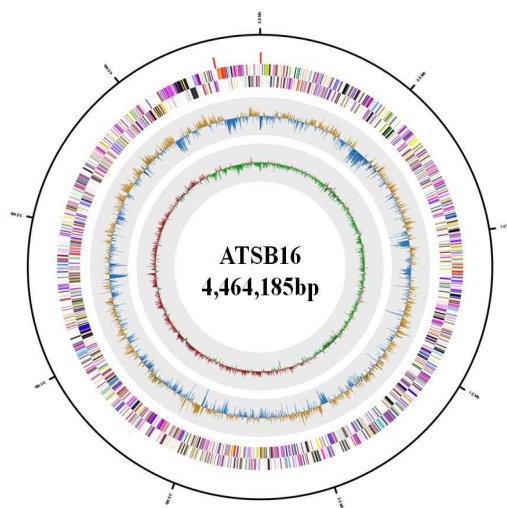


Figure 86. ATSB16의 유전자지도

- ATSB16의 유전자예측

유전자 개수를 추측한 결과, ATSB16균은 rRNA는 7개, tRNA는 49개 그리고 ORF 4117개로 총 4,173개의 유전자를 갖고 있는 것으로 분석되었다. 총 4,173개의 유전자 중에서 ORF로 예측되어진 4,117 개의 유전자들의 평균 길이는 973 bp였고, 이들을 Clusters of Orthologous Groups (COG) 분석 방법에 의해 다음 Figure 81과 같이 26개 군으로 총 분류하였고, 총 3,597개의 유전자가 포함되었다. Amino acid transport and metabolism 기능이 11% 그리고 metabolism and energy production and conversion 기능이 8%로 다수를 차지하고 있었다. 그 외의 분류는 Figure 87와 같았다.

Class	Categorization	ATSB16 (<i>P. thiooxydans</i>)
A	RNA processing and modification	3
B	Chromatin structure and dynamics	2
C	Energy production and conversion	291
D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	27
E	Amino acid transport and metabolism	407
F	Nucleotide transport and metabolism	84
G	Carbohydrate transport and metabolism	191
H	Coenzyme transport and metabolism	138
I	Lipid transport and metabolism	194
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	174
K	Transcription	333
L	Replication, recombination and repair	139
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	236
N	Cell motility	87
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	146
P	Inorganic ion transport and metabolism	176
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	59
R	General function prediction only	361
S	General function prediction only	306
T	Signal transduction mechanisms	139
U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	62
V	Defense mechanisms	42
Total		3597

Figure 87. ATSB16의 유전자 기능 분류

- 기존 보고되어진 균주와 ATSB16의 유전체 및 유전자 비교

유전체 비교를 위해 기 보고된 균주 중에서 ATSB16과 유사도가 높다고 알려져 있는 유사종 8종과 비교를 위해 같은 속에 속하는 다른 균주 1종을 Figure 88과 같이 선발하였으며 균주 genome의 통계적 분석은 Figure 89과 같다. Mummer 분석을 수행하였으며, 결과는 Figure 90과 같다. 그림의 X축은 그래프의 하측에 있는 종의 genome size이고, Y축은 ATSB16의 genome size 이다. 결과 DSM 25325는 동종의 균주이기에 높은 정방향의 유사도를 보였으나 그 외 7종은 방향성이 없는 낮은 유사도를 보였으며 DSM23572는 ATSB16과 assembly 되지 않아서 분석이 불가능했다. ATSB16가 종 내 독특한 서열 때문에 다른 종과 유사도가 낮은 genome을 같은 균주이며 종 내 유사도가 높은 균주라는 것을 추측할 수 있었다.

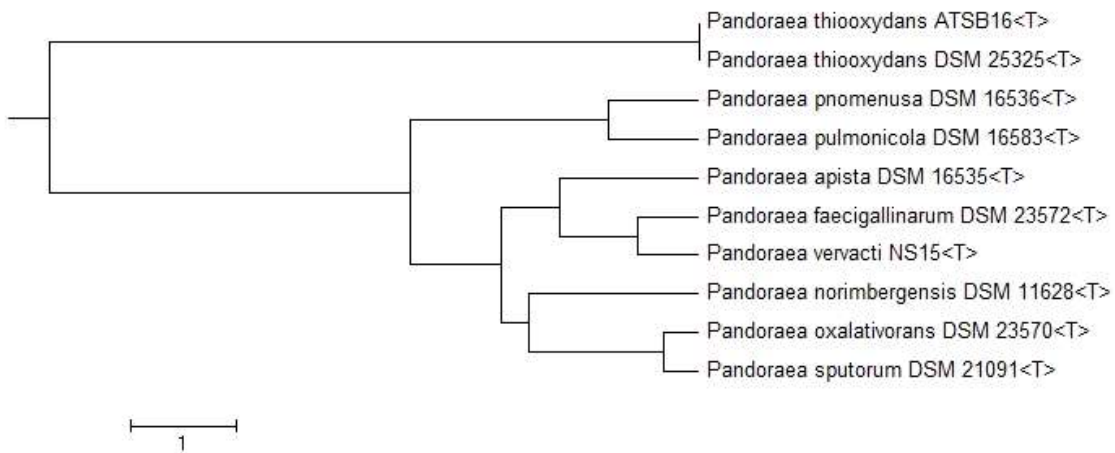


Figure 88. 선발된 ATSB16 유사 균주

	ATSB16	DSM16536	DSM21091	DSM 6583	NS15	DSM23570	DSM25325	DSM23572	DSM11628	DSM16535
Genome size (bp)	4,464,185	5,389,285	5,742,997	5,867,621	5,736,282	6,500,731	4,464,186	5,732,664	6,167,370	5,571,260
G+C content (%)	63.19	64.87	62.77	64.30	63.52	63.08	63.19	63.45	63.06	62.63
Number of CDSs	4,398	4,811	5,047	5,039	4,969	5,805	4,115	5,114	5,395	5,027
CDS summary										
Protein of assigned function	2,854	3,487	3,647	3,525	3,627	3,939	3,058	3,503	3,798	3,524
Protein of unassigned function	1,544	1,324	1,400	1,514	1,342	1,866	1,057	1,611	1,597	1,503
Not in COG	808	424	427	539	413	721	211	596	445	494
Percentage coding (%)	65	72	72	70	73	68	74	68	70	70
Average gene length (bp)	914	973	991	998	996	954	964	962	1,003	960
rRNA	6	12	12	12	12	12	6	12	12	12
tRNA	49	64	64	73	64	65	49	66	65	64

Figure 89. 선발된 유사 균주와 ATSB16의 genome 비교

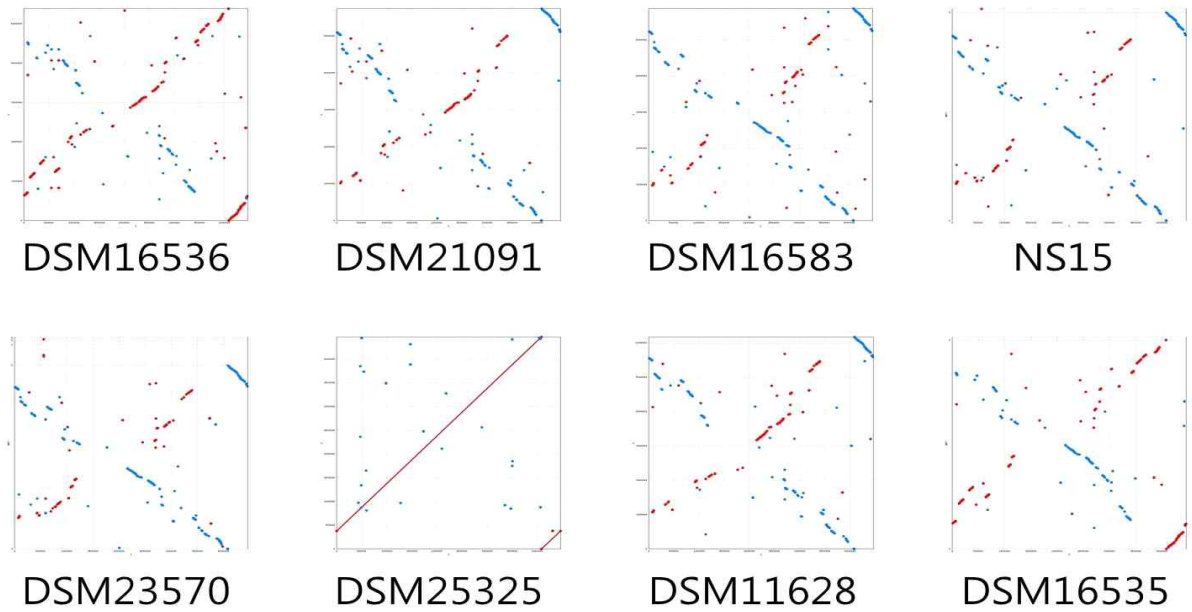


Figure 90. ATSB16와 기 보고된 균주의 Mummer 분석

- PGPR 유전자탐색

위의 분석에 사용된 9개 균주와 ATSB16에 Heat-map 분석을 수행하였다 (Figure 91). 이 분석에서도 DSM25325와 ATSB16은 특이적인 차이가 존재하지 않았으며 651개의 CDS가 다른 균주와 다른 이 두 균주에 특이적으로 존재했으나 196개 만이 기능이 확인되었다.

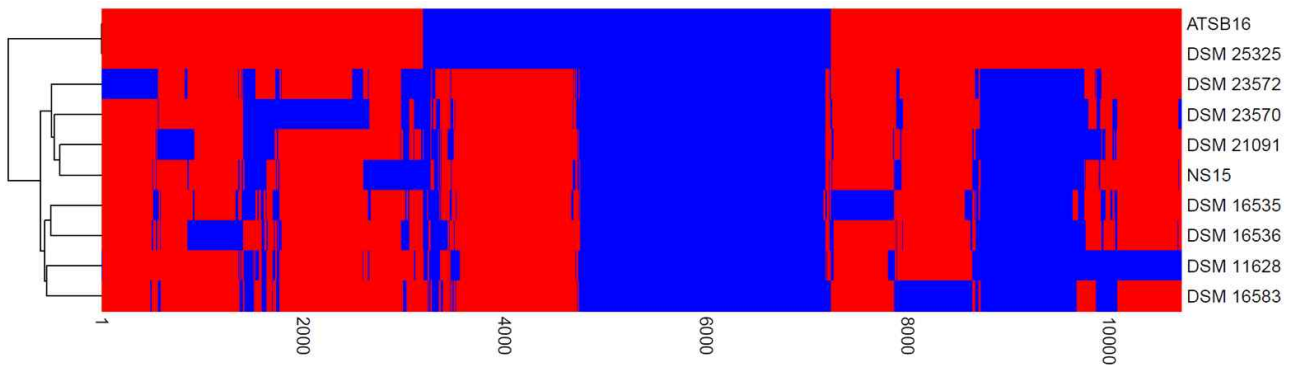


Figure 91. ATSB16와 기 보고된 균주의 Heat-map 분석

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	1 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	1 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 0.1 % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			20 위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		0		
	소요예산(백만원)		0		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
				0.5	1.0
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내		0.5	1.0
국외				0.01	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		1. 화학비료 및 유기질비료 함유 미생물제제 2. 기후변화 대응 미생물제제 3. 생육촉진제 함유 미생물제제			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)			0.5	1.0
	수 출				1.0

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

○ 사업성과

(단위 : 건수)

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 ·실용화	표준 유전체 해독	메타지 놈 분석	유전체 분석기 술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보완 성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		5	20	1				5			
1차 년도	목표										
	실적										
2차 년도	목표	3	6								
	실적	3	6								
3차 년도	목표		6					3			
	실적		6					3			
4차 년도	목표	2	8	1				2			
	실적	2	8	1				2			
소계	목표	5	20	1				5			
	실적	5	20	1				5			

○ 기타성과

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표										연구기간지표								
	지식재산권			기술 실시 (이전)		사 업 화					기술 인 증	학술성과		교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용 홍보		기 타 (매 뉴 얼 작 성	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												SCI	비 SCI						
최종목표		5	2		1		1					4	6	9		20		2	1
1차 년도	목표															4			
	실적	1										1		7		8			
2차 년도	목표	2											2	3		5		1	
	실적	2	2										4	16		3			
3차 년도	목표	2	2										2	3		5			
	실적	2											2	20		6		1	
4차 년도	목표	1			1		1						2	3		6		1	1
	실적		3				1						3	14		3		1	1
소계	목표	5	2		1		1					4	6	9		20		2	1
	실적	5	5		0		1					6	7	57		20		2	1

3-2. 목표 달성여부

○ 사업목표 달성

성과목표	성과결과	달성도 (%)
전략 미생물 해독 5건	CBMB205, CBMB27, ATSB10, ATSB16, RS16 전략 미생물 유전체 해독 5건 완료	100
유용 유전자원 확보 20건	분리 및 기 보울 미생물 유전자원 중 식물생장촉진 효능이 우수한 유용 미생물 유전자원 20종 확보	100
NABIC 등록 5건	전략 미생물 유전자원의 5종 (CBMB205, CBMB27, ATSB10, ATSB16, RS16) NABIC 등록 5건 완료	100
사업화 실용화 1건	상토용 미생물 비료 1건 사업화 및 실용화	100

○ 기타목표 달성

성과목표	성과결과	달성도 (%)
지식재산권 특허 출원 5건, 등록 2건	지식재산권 특허 출원 5건, 등록 5건 완료	143
사업화 (제품화) 1건	상토용 미생물 비료 (잘자라골드) 제품화 1건 완료	100
학술성과 SCI 4건, 비SCI 6건	- SCI 논문 6건, 비SCI 논문 7건 총 13건 게재 완료	130
학술성과 학술발표 9건	국제학회 14건, 국내학회 43건 참석하여 총 57건 참석	633
인력양성 20명	박사 6명, 석사 5명, 학사 9명 총 20명 인력양성 완료	100
홍보 전시 2건	충북일보와 전자신문에 연구사업 홍보 2건 완료	100
기 타 사용매뉴얼 작성 1건	최종 선발 생물비료의 사용매뉴얼 작성 1건 완료	100

○ 최종 연구성과 및 개발내용

- 사업성과

가. 전략미생물 해독

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1	<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205	de novo sequencing을 이용해 미생물의 genome의 염기서열을 해독하였으며, 각 미생물의 특성을 설명할 수 있는 유전자들에 대한 정보를 확인	2차 년도
2	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i> CBMB27		2차 년도
3	<i>Dyella thiooxydans</i> ATSB10		2차 년도
4	<i>Pandoraea thiooxydans</i> ATSB16		3차 년도
5	<i>Brevibacterium linens</i> RS16		4차 년도

나. 유용 유전자원 확보

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	Accession No.	분석내용	비 고
1	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB138	KF424300	IAA 생성능, ACCD 활성, 인산가용화능	2차 년도
2	<i>Arthrobacter scleromae</i> OB149	KF424307	IAA 생성능, ACCD 활성	2차 년도
3	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> S210B16	KM507159	IAA 생성능, ACCD 활성, 인산가용화능	2차 년도
4	<i>Pseudomonas poae</i> CPBE37	DQ840547	IAA 생성능, ACCD 활성, 인산가용화능	2차 년도
5	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CBCEN26	EF427856	IAA 생성능, ACCD 활성, 질소고정능	2차 년도
6	<i>Acinetobacter</i> sp. PSGB03	EF195353	IAA 생성능, ACCD 활성, 인산가용화능, Siderophore 생성능	2차 년도
7	<i>Flavobacterium</i> sp. OB146	KF424305	IAA 생성능, ACCD 활성, 인산가용화능	3차 년도
8	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS211	KF424285	IAA 생성능, ACCD 활성, 인산가용화능	3차 년도
9	<i>Pandoraea</i> sp. ATSB30	EF397587	ACCD 활성, 질소고정능	3차 년도
10	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CBCN27	EF427862	IAA 생성능, ACCD 활성, 인산가용화능	3차 년도
11	<i>Serratia</i> sp. PRGB11	EF195344	IAA 생성능, ACCD 활성, 인산가용화능	3차 년도
12	<i>Pantoea ananatis</i> CBMB55	EF165046	IAA 생성능, ACCD 활성, 인산가용화능	3차 년도
13	<i>Pseudomonas umsongensis</i> OB243	KF424303	IAA 생성능, ACCD 활성, 인산가용화능	4차 년도
14	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OB145	KF424304	IAA 생성능, ACCD 활성, 인산가용화능	4차 년도
15	<i>Flavobacterium</i> sp. OS262	KF424314	ACCD 활성, 질소고정능	4차 년도
16	<i>Pseudomonas</i> sp. CBCEN9	EF427850	IAA 생성능, ACCD 활성	4차 년도
17	<i>Pseudomonas</i> sp. CBMB18	EU439305	IAA 생성능, ACCD 활성	4차 년도
18	<i>Brevibacterium linens</i> RS16	GU968457	IAA 생성능, ACCD 활성, Salicylic acid	4차 년도
19	<i>Bacillus stratosphericus</i> RS233	GU968468	IAA 생성능, ACCD 활성, Salicylic acid	4차 년도
20	<i>Bacillus stratosphericus</i> RS652	GU968482	IAA 생성능, ACCD 활성, Salicylic acid	4차 년도

다. NABIC 등록

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용 (등록번호 / 일자)	비 고
1	<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205 유전체 서열	NG-0720-000001 / 2017. 01. 04	3차 년도
2	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i> CBMB27 유전체 서열	NG-0722-000001~4 / 2017. 01. 04	3차 년도
3	<i>Dyella thiooxydans</i> ATSB10 유전체 서열	NG-0723-000001 / 2017. 01. 04	3차 년도
4	<i>Brevibacterium linens</i> RS16 유전체 서열	NG-1012-000001 / 2018. 07. 11	4차 년도
5	<i>Pandoraea thiooxydans</i> ATSB16 유전체 서열	NG-1013-000001 / 2018. 07. 17	4차 년도

- 기타성과

가. 국내외 논문 게재

No	연차 구분	논문명	학술지명	주저 자명	호	국명	발행 기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	분야별 rank
1	1차 년도	<i>In vitro</i> antibacterial activity of nanoemulsion formulation on biofilm, AHL production, hydrolytic enzyme activity, and pathogenicity of <i>Pectobacterium carotovorum</i> sub sp. <i>carotovorum</i>	Physiological and Molecular Plant Pathology	Manoharan Melvin Joe	91 (1)	네덜란드	ELSEVIER	SCI	2015. 05.28	Plant Science 115/222
2	3차 년도	Beneficial Soil Bacterium <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> OS261 Augments Salt Tolerance and Promotes Red Pepper Plant Growth	Frontiers in Plant Science	Poulami Chatterjee and Sandipan Samaddar	1	스위스	Frontiers	SCI	2017. 05.04	Plant Science 24/222 (상위 10%)
3	3차 년도	Influence of salinity variations on exocellular polysaccharide production, biofilm formation and flocculation in halotolerant bacteria	Journal of Environmental Biology	Bohui Hong	1	인도	Triveni Enterprises	SCI	2017. 07.31	Environmental Science 224/241

4	4차 년도	The Gut Bacterial Diversity of Insecticide-Susceptible and -Resistant Nymphs of the Brown Planthopper <i>Nilaparvata lugens</i> Stål (Hemiptera: Delphacidae) and Elucidation of Their Putative Functional Role	Journal of Microbiology and Biotechnology	Malathi M. Vijayakumar	28 (6)	대한 민국	Korean Soc Microbiology & Biotechnology	SCI	2018. 04.14	Biotechnology and Applied Microbiology 97/160
5	4차 년도	Spore associated bacteria regulates maize root K+/Na+ ion homeostasis to promote salinity tolerance during arbuscular mycorrhizal symbiosis	BMC Plant Biology	Gopal Selvakumar	18	영국	CrossMark	SCI	2018. 06.05	Plant Science 19/222 (상위 10%)
6	4차 년도	Conservation and transmission of seed bacterial endophytes across generation following crossbreeding and repeated inbreeding of rice at different geographic locations	Microbiology open	Denver I. Walitang	1 (1)	미국	WIKEY	SCI	2018. 06.10	Microbiology 59/125
7	2차 년도	Isolation of phosphate solubilizing endophytic bacteria from <i>Phyllanthus amarus</i> Schum & Thonn: Evaluation of plant growth promotion and antioxidant activity under salt stress	Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants	Manoharan Melvin Joea	3	독일	ELSEVIER	비SCI	2016. 02.22	
8	2차 년도	An Overview of Different Techniques on the Microbial Community Structure, and Functional Diversity of Plant Growth Promoting Bacteria	Korean Journal of Soil Science and Fertilizer	Kiyoon Kim	49 (2)	대한 민국	토양 비료 학회지	비SCI	2016. 05.01	
9	2차 년도	Complete Genome Sequence of <i>Dyella thiooxydans</i> ATSB10, a Thiosulfate-oxidizing Bacterium Isolated from Sunflower Fields in Korea	Genome Announcement	Kyeong Hwangbo, Yurry Um	4(3)	미국	American society for microbiol ogy	비SCI	2016. 06.23	

10	2차 년도	Complete Genome Sequence of <i>Bacillus velezensis</i> CBMB205, a Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Rhizosphere of Rice in Korea	Genome Announcement	Kyeong Hwangbo, Yurry Um	4(3)	미국	American society for microbiology	비SCI	2016.07.14	
11	3차 년도	Benefits of Bio-inoculant Immobilization Process for the Development of Biofertilizers	Journal of Agricultural Science CBNU	Mak Chanratana	32(2)	대한민국	충북대학교 농업과학 기술연구소	비SCI	2016.12.30	
12	3차 년도	NGS 데이터를 기반으로 한 PGPR의 분자생물학적 접근	Journal of Agricultural Science CBNU	황보경	33(1)	대한민국	충북대학교 농업과학 기술연구소	비SCI	2017.06.30	
13	4차 년도	계놈의 비교분석을 통한 <i>Dyella thiooxydans</i> ATSB10 특이적 마커의 개발	Journal of Agricultural Science CBNU	황보경	34(1)	대한민국	충북대학교 농업과학 기술연구소	비SCI	2018.06.26	

나. 지식재산권 (특허 출원 및 등록)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	저온에서 식물의 생장을 촉진하는 슈도모나스 반코버런시스 OB155 균주 및 이의 용도	대한민국	충북대학교 산학협력단	2015.01.20	10-2015-0009019	충북대학교 산학협력단	2015.12.02	10-1575666	100
2	식물 생장을 촉진하는 내염성 패니바실러스 사이렌엑시던스 균주 및 이의 용도	대한민국	충북대학교 산학협력단	2016.02.03	10-2016-0013246	충북대학교 산학협력단	2016.05.11	10-1621732	100
3	바실러스 벨레젠시스 CBMB205의 판별 마커	대한민국	충북대학교 산학협력단	2016.05.13	10-2016-0058846	충북대학교 산학협력단	2017.11.24	10-1803642	100
4	다이엘라 티오옥시단스 ATSB10 검출용 프라이머 세트 및 이의 용도	대한민국	충북대학교 산학협력단	2017.03.21	10-2017-0035187	충북대학교 산학협력단	2017.11.24	10-1803678	100
5	메틸로박테리움 필로스피아래 CBMB27 검출용 프라이머세트 및 이의 용도	대한민국	충북대학교 산학협력단	2017.03.21	10-2017-0035137	충북대학교 산학협력단	2017.11.24	10-1803677	100

다. 국내 및 국제학술회의 발표

No	연차구분	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	1차년도	한국 식물병리학회	사동민	2015.04.23	충북대학교	대한민국
2	1차년도	춘계 한국토양비료학회	Mak Chanratana	2015.05.15	국립농업과학원	대한민국
3	1차년도	한국미생물생명공학회	황보경	2015.06.25	경주화백컨벤션센터	대한민국
4	1차년도	한국미생물생명공학회	황보경	2015.06.25	경주화백컨벤션센터	대한민국
5	1차년도	한국미생물생명공학회	황보경	2015.06.25	경주화백컨벤션센터	대한민국
6	1차년도	PAG Asia Meeting	이이	2015.07.14	Capthon Front Hotel	싱가포르
7	1차년도	PAG Asia Meeting	황보경	2015.07.14	Capthon Front Hotel	싱가포르
8	2차년도	2015 ESAFS	사동민	2015.09.18	Nanjing Conference Hotel	중국
9	2차년도	2015 ESAFS	Mak Chanratana	2015.09.18	Nanjing Conference Hotel	중국
10	2차년도	한국미생물학회연합	황보경	2015.11.06	KINTEX	대한민국
11	2차년도	한국미생물학회연합	황보경	2015.11.06	KINTEX	대한민국
12	2차년도	한국미생물학회연합	황보경	2015.11.06	KINTEX	대한민국
13	2차년도	한국미생물학회연합	황보경	2015.11.06	KINTEX	대한민국
14	2차년도	한국응용생명화학회	Mak Chanratana	2015.11.27	중원대학교	대한민국
15	2차년도	한국응용생명화학회	Manoharan Melvin Joe	2015.11.27	중원대학교	대한민국
16	2차년도	한국토양비료학회	Poulami Chatterjee	2015.12.04	서울 aT센터	대한민국
17	2차년도	한국토양비료학회	Mak Chanratana	2015.12.04	서울 aT센터	대한민국
18	2차년도	한국토양비료학회	Manoharan Melvin Joe	2015.12.04	서울 aT센터	대한민국
19	2차년도	한국토양비료학회	Poulami Chatterjee	2016.03.10	서울 농협중앙회	대한민국
20	2차년도	한국토양비료학회	Sandipan Samaddar	2016.03.10	서울 농협중앙회	대한민국
21	2차년도	한국토양비료학회	강연경	2016.03.10	서울 농협중앙회	대한민국
22	2차년도	한국토양비료학회	Mak Chanratana	2016.03.10	서울 농협중앙회	대한민국
23	2차년도	한국미생물학회연합	황보경	2016.06.22	대전 컨벤션센터	대한민국
24	3차년도	한국미생물학회연합	황보경	2016.11.03	대전 컨벤션센터	대한민국
25	3차년도	한국토양비료학회	강연경	2016.10.21	무주 덕유산리조트	대한민국
26	3차년도	한국토양비료학회	Mak Chanratana	2016.10.21	무주 덕유산리조트	대한민국
27	3차년도	한국응용생명화학회 충청지회	Mak Chanratana	2016.11.04	대천 한화리조트	대한민국
28	3차년도	한국응용생명화학회 충청지회	강연경	2016.11.04	대천 한화리조트	대한민국
29	3차년도	한국미생물학회	표채은	2016.12.22	정선 하이원리조트	대한민국
30	3차년도	한국토양비료학회	C. Aritra Roy	2017.05.19	목포대학교	대한민국
31	3차년도	한국토양비료학회	MD Abdul Halim	2017.05.19	목포대학교	대한민국
32	3차년도	한국토양비료학회	강연경	2017.05.19	목포대학교	대한민국
33	3차년도	한국토양비료학회	전선영	2017.05.19	목포대학교	대한민국
34	3차년도	한국미생물생명공학회	황보경	2017.06.28	부산 벅스코	대한민국
35	3차년도	한국미생물생명공학회	황보경	2017.06.28	부산 벅스코	대한민국
36	3차년도	한국환경농학회	C. Aritra Roy	2017.07.07	용평리조트 그린피아콘도	대한민국
37	3차년도	한국환경농학회	MD Abdul Halim	2017.07.07	용평리조트 그린피아콘도	대한민국
38	3차년도	한국환경농학회	강연경	2017.07.07	용평리조트 그린피아콘도	대한민국
39	3차년도	한국환경농학회	전선영	2017.07.07	용평리조트 그린피아콘도	대한민국
40	3차년도	2017 Asian PGPR	Mak Chanratana	2017.07.17	IPB convention hotel	인도네시아
41	3차년도	2017 Asian PGPR	Poulami Chatterjee	2017.07.17	IPB convention hotel	인도네시아
42	3차년도	2017 Asian PGPR	강연경	2017.07.17	IPB convention hotel	인도네시아
43	3차년도	2017 Asian PGPR	전선영	2017.07.17	IPB convention hotel	인도네시아
44	4차년도	한국응용생명화학회 충청지회	Aritra Roy Choudhury	2017.09.22	제천 청풍리조트	대한민국

테일러 리포트

2018 AIED 9월, 10월, 11월 NEXT STAGE
인공지능(AI) 차세대 컨택센터
최신 기술 및 구축 전략
컨택센터 2018

'AI 차세대 컨택센터 2018' 콘퍼런스 내달 24일 개최
· 마인즈랩, 하반기부터 동종 AI연진 컨택센터로 세계시장 넓...
· 문상봉 KTDS 전무 "고객경험"에 중점 둔 AI컨택센터로 업무...

충북대 식물영양 비료학 연구팀, '생물비료 활용 기술' 중국 진출 교두보 확보

김수미 기자 | 2018.08.16

[AD] [단독] 스마트폰 최대 13회 충전! 대용량 고품배터리

최근 먹거리 안전에 대한 관심 증가와 농업정책의 변화로 인해 친환경 농업이 주목받고 있다. 특히 친환경 농업의 핵심 기술이라 할 수 있는 미생물제제 개발 필요성이 증가하고 있다.

이에 충북대 식물영양 비료학 연구팀(책임교수 사동민)은 농자재 제조업체 **홍살림** 중앙미생물연구소와 함께 생물비료 활용 기술을 중국에 수출하기 위한 업무를 협력하기로 했다고 16일 밝혔다.

Z208

1000쪽 한정
지금 예약하세요
주문량이 없습니다

기획가격 39,800원

충북대학교 농업생명환경대학 식물영양 비료학 연구팀은 2004년 '고정화된 인산 가용화 미생물'을 포함하는 비료 조성물 특허 출원을 시작으로 현재까지 생물비료를 이용한 친환경적인 작물 재배 기술에 대한 특허 출원 14건, 등록 22건을 보유하고 있다.

이러한 연구 활동의 성과를 인정받아 2014년부터 4년간 농림축산식품기술포럼위원의 포스트게놈 다부처 유전체 사업에 친환경 농자재 제조업체 **홍살림**(소장 최관희)과 함께 참여했고 다양한 종류의 맞춤형 생물비료를 개발했다.

또한 충북대학교 이이 교수팀과 함께 5종의 신규 특허 등록을 완료했으며, 개발 완료된 기술과 생물비료는 **홍살림**에서 생산해 국내 시장에 유통할 계획이라고 밝혔다.

중국 진출을 함께 추진하는 중앙미생물연구소(대표 임우종)는 다양한 미생물 소재와 대사산물 생성기술을 보유하고 있다. 중앙미생물연구소 관계자에 따르면 "식품, 환경, 농업 등에 활용 가능한 차별화된 제품 등을 연구개발 및 생산해온 중앙미생물연구소가 이번 협약 체결로 산업의 융복합을 통한 새로운 시너지효과를 기대하고 있다"고 밝혔다.

특히 연구팀은 합작 회사인 **북경 항취둥둥 과학기술 유한회사**를 통해 충북대 연구팀과 **홍살림**의 기술을 접목시킨 생물비료 활용 기술을 중국에 선보일 예정이다. 해당 회사는 북경 연서경제개발구내에 위치해 있으며, 친환경적 미생물 자원 활용기술(환경, 농업, 식품), 100% 무기나노기술, 나노 재료 응용기술을 중앙미생물연구소와 **합작해 연구개발, 생산, 판매하는 기업이다.**

연구소를 관계자는 "이번 3자간 업무 협약을 통해 중국진출의 교두보를 마련하고 한국 바이오산업의 경쟁력을 높일 수 있을 것으로 전망된다"고 밝혔다.

김수미 기자 (sumi@etnews.com)

기자의 다른 기사 보기 >

ANALOG DEVICES

지금 바로 무료로 다운로드하세요 >

ANALOG DEVICES
AHEAD OF WHAT'S POSSIBLE™

- BIZPLUS**
- SBA, 'SPP2018, 국내 콘텐츠 해외진출 돈드...
 - SBA, 오는 22일 '우수 소공인 유통통령회' 개...
 - SBA, CJ ENM-KTH의 '인기 결혼 풍차' 매니...
 - GDPR VS WHOIS, 인터넷 질서 혼란일까
 - 말도 안되는 가격비 곱프 플랫폼이 598,000원
 - 치주염, 구취 막는데 이 방법이 최고

- allshowTV**
- 오라클 셋넷 대담구
2018. 09. 04(화) 14:00 - 15:00
 - Software 전략유자 안내 및
Software 기업들의 전략유자 제
2018. 08. 29(월) 14:00 - 15:00

이향선의 테크비전

상상 위에 그린 현실...산업 지도 바꾸다

애드버트리얼

현대자동차, AS 로마-해리티 BSC
태블릿 후원

- 많이 본 기사**
- 삼겹살, 기름 연기없이 먹는 방법?
 - 삼성진자, 추 떨어진 휴대용 공장 질수 검토
 - 삼성진자, 세계 최초 5G문송더블폰 '홍사표'
 - 유튜브 '넛 뜨거운' 배행...선정성 광고 여진
 - 국산 상용차, 판매 부진·수입차 할인 판매 '이...
 - 스마트폰 카메라 '스펙업'...드러글4000만 화...
 - 미행, 불에 타지않는 친해역 개발...내년 양산
 - '겔노드9 2년 후 반납하면 출고가 40% 올라...
 - 삼성디스플레이, A4공정 양산 준비...10월...

- 터치엔리뷰**
- 최강의 게임 플레이를 위해 탄생,
삼성진자 '오디세이Z'
 - 'LG G7 씬큐', '젊은 가진'의 질학
을 담다

인간과 AI와의 공존,
연락 센터
NEXT STAGE

인공지능 (AI)
차세대
컨택센터
최신 기술
및
구축 전략
컨퍼런스
2018

8월 24일(목)
코엑스
그랜드볼룸 103호

바. 기타 (사용매뉴얼 작성)

토양미생물제 잘자라골드 사용매뉴얼

☞ 잘자라골드는?

- 보증 성분 : 충북대학교 농업생명환경대학 연구실에서 분리한 *Brevibacterium linens* 10^6 cfu mL⁻¹ 이상 함유되어 있습니다.
- 치즈를 만드는 세균과 같은 종으로 인체에 매우 안전합니다.
- 액비와 혼용하여 사용할 수 있습니다.
- 광범위한 pH 5.5~9.5 조건에서 생존할 수 있으며, 건조 상태에서도 생존할 수 있습니다.
- 배양액의 pH를 올려주므로 산성 배지를 중화하는 데 도움을 줄 수 있습니다.

☞ 잘자라골드의 효과 및 장점

- 작물의 염류장해를 경감시킬 수 있습니다.
- 작물의 건조해와 고온장해를 경감시킬 수 있습니다.
- 작물의 생육 증진 효과가 있습니다. 벼, 옥수수, 토마토, 호박, 오이 줄기, 뿌리 신장 및 건물 중을 증가시킵니다.
- 작물 종자의 발아를 촉진시킵니다.
- 카제인, 젤라틴, 우유 단백질을 분해하여 아미노산으로 만들어 작물이 쉽게 흡수할 수 있도록 도와줍니다.
- 리스테리아 등 유해 세균에 대한 길항작용이 있습니다.

☞ 잘자라골드의 사용법

● 종자 파종 시

대립종자 : 잘자라골드 10배액에 종자를 2시간 담갔다 파종하거나 파종 직후 관주처리 합니다.

소립종자 : 잘자라골드 100배액에 종자를 2시간 담갔다 파종하거나 파종 직후 관주처리 합니다.

어린 모 : 정식 수일 전부터 정식 당일까지 10~100배 희석액을 모판에 골고루 살포 후 정식합니다.

● 엽면시비

박과 오이과 작물 : 500 ~ 1,000배로 희석하여, 5-7일 간격으로 살포합니다.

기타 작물 : 100 ~ 500배 희석하여 5-7일 간격으로 살포합니다.

● 토양관주

300평당 1-3리터를 7-10일 간격으로 토양에 관주합니다.

스프링클러를 사용할 경우에는 100 ~ 500배로 희석하여 살포합니다.

☞ 잘자라골드 사용 시 주의사항

※ 희석액은 당일 사용하세요.

※ 햇볕이 들지 않는 서늘한 곳에 보관하세요. 냉장보관하면 더욱 좋습니다.

※ 통기성 용기이므로 용기를 세워서 보관하세요.

☞ 잘자라골드의 구성 성분은?

● 잘자라골드의 이화학적 특성 : pH 7.0±0.2, EC 17.0, Urea, MKP, KCl, CaCl², Borax, MnSO₄

● 비료 성분을 함유하고 있는 미생물제제 생산이 가능하므로 토양과 비료의 상태에 따라 다른 미생물제제 공급이 가능합니다.

☞ 잘자라골드에 대해 문의사항이 있을 경우에는 아래의 주소로 문의바랍니다.

☎ (주)휴살림 연구소, 043 216 6426

☎ 충북대학교 농업생명환경대학 식물영양 비료학 연구팀, 043 261 3447

잘자라 골드

작물 스트레스 감감 도입 미생물 제제



잘자라골드는 농업수산식품부에서 4년간 시행한 미생물 유전자, 기능 분석 및 토성, 작물 맞춤형 생물비료 개발사업(4004-4)의 연구결과로 탄생한 미생물 제제로서 2011년부터 2016년까지 충북대학교 및 휴스살림 부설 연구소의 시험결과 다음과 같은 특성과 효기를 나타냈습니다.

- *Brevibacterium linens* RS16은 식물생장촉진 근권세균(DGPR)으로서 ACC deaminase 등 성장촉진 물질을 생산한다.
- 배, 옥수수, 수수, 수단그라스, 카놀라, 고추, 토마토, 호박, 오이의 재배시험 결과 생물촉진 및 열해경감 효과를 보였다.
- 치즈의 풍미를 내는 균과 같은 종으로 인축에 매우 안전하다.
- 20%의 소금물(EC 400)에서도 생존할 수 있으므로 염류도양에서도 활성이 유지된다. 일반 세균들은 염류도양에서는 활성이 급격히 낮아지는 경향이 있다.
- 광범위한 pH 5.5~9.5 조건과 건조상태에서도 생존할 수 있다.
- 염류집적도양에서도 일반 흡수를 촉진한다.

사용방법 및 효과

- 작물의 스트레스(염류장애 등) 감감: 100~500백배으로 희석하여 7~14일 간격으로 2~3회 관주 또는 엽면시비
- 피중, 정식 후 생육 및 뿌리 발달 촉진: 파종 및 정식 직후 100~500배로 희석하여 관주하고,
- 7~14일 간격 1~2회 관주 또는 엽면시비
- 말아 또는 활착 촉진: 30배로 희석하여 2~4시간 중차 침지 후 파종 또는 정식

사용상 • 보관상 주의사항

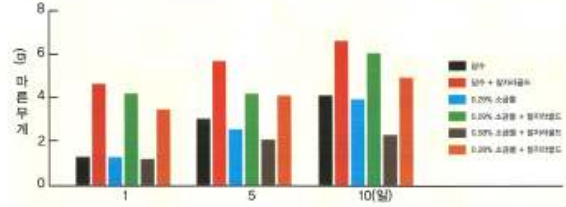
- 잘 흔들며 사용하십시오.
- 냉암소에 보관해 주시고 유효기간 내에 사용하십시오.
- 각종 비료, 영양제와 교반이 심근제 및 살충제와 혼합 가능합니다.
- 농약용 미생물 제제이므로 약제나 음식과 접촉하지 마십시오.
- 10세 이상 희석하여 사용하십시오.



휴스살림 충북 청주시 청원구 복이면 대동리덕말길 93-13
 무료상담 : 080-333-8179
 www.heuksalim.com

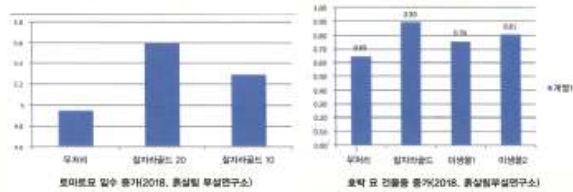
☎ 무료상담!

080-333-8179
 www.heuksalim.com



염분 스트레스 처리 후 기간에 따른 잘자라골드 처리별 벼 생육(2018, 충북대학교)

배지 없이 후 7일과 14일에 토양에 잘자라골드 살포 후 3주된 모를 생토에 심고, 비닐을 10cm 허치한 농도인 0.29% 소금물 및 5배 희석한 농도인 0.59% 소금물로 관수하고 나서 1일, 5일, 10일에 건물중(어른 식물체 무게)을 측정하고, 염수조건은 물론 소금물을 관수한 곳에서도 잘자라골드의 생육 촉진효과가 뚜렷하게 나타났다.



잘자라골드가 작물생육을 촉진하고 스트레스를 감감하는 기작

노화를 촉진하는 과산화수소 산화아스르브산염, 칼로다말라레이디명자 피리, 리보신아세안살렘명자 같은 항식 발생 억제 물질의 흡수와 과산화수소분해효소인 카탈라제 활성 촉진
 예나지 대사에 관여하는 미토콘드리아ATPase 생성 촉진

잘자라골드의 염류장애 감감효과



1. 염수(소금 0.7%) 2. 소금물(소금 0.88%) 3. 소금물(소금 0.88%) + 잘자라골드
 자료: Plant Physiology and Biochemistry 48(2010), p43
 *45도일의 소금염 3%

관리번호 제 18-150호

시험 성적서				
신청인	성명	김현수	소속기관	휴스살림
	주소	충청북도 괴산군 불명면 한봉로 1136		
	전화	043-216-6426	FAX	043-216-0936
공시품명	영종	잘자라골드		
	형태	액상 미생물제제		
대표 유해세균 동종	• 16S rRNA 유전자 전염기서열 분석			
	• 유전자 상동성 검색에 의한 동일군주 확인 • 희석평판법을 이용한 동일 군주의 계수			
용도	관경서 재출용			
시험책임자	권인호	서명일자	2018. 09. 03	
대표 유해세균의 동종 및 생균수 측정결과				
<i>Brevibacterium sediminis</i>		2.3 × 10 ⁶ CFU/ml		
2018년 9월 4일				
농촌진흥청장 비료·유기농업자재 시험연구기관				
목원대학교 미생물생태자원연구센터장				
* 본 시험 성적서의 내용은 신청인이 제공한 시료에 대한 시험 결과로서 해당 시료의 특성에 사용함에 따라 발생하는 모든 사항에 대해서, 당 연구소는 그 어떠한 법적책임을 지지 않습니다.				

【별지 제4호 서식】

발행번호 : 생면비 제 2018-002 호				
검사 성적서				
위탁자	상호	휴스살림	생년월일	60.01.14
	주소	충북 괴산군 불명면 한봉로 1136, 1층		
공시품명	비중 및 명칭	토양미생물제제(잘자라 골드), (잘자라)		
	수량	2		
오염원	변호			
	제조사 설명	희판호		
검사방법	생산연월일	비료의 품질검사방법 및 시료채취기준 제3조에 의거,		
	수량	위탁자는 오염원을 편성하지 않는 것을 원칙으로 합니다.		
검사 방법				
비료의 미생물학적 검사 및 유해성분 검사				
검사 성적				
구분	항목	기준함량 (cfu/ml)	성적 (cfu/ml)	비고
	포충미생물	<i>Brevibacterium linens</i>	1X10 ⁶ 이상	1.0X10 ⁶
<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i>		1X10 ⁶ 이상	1.9X10 ⁶	
유해성분	대장균 O157:H7 (<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	-	불검출	
	살모넬라 (<i>Salmonella</i> spp.)	-	불검출	
		"이 하 이 백"		
* 준거는 검출한계 이하임				
농촌진흥청 고시 「비료의 품질검사방법 및 시료채취기준」 제10조제1항에 따른 검사상입니다.				
2018. 08. 31.				
재단법인전주농생명소재연구원 이사장				
이 성적은 비료의 등록 신고 및 연시할 이외의 다른, 소용 등을 위한 증거자료로 사용하지 못합니다.				

3-3. 목표 미달성 시 원인 (사유) 및 차후대책 (후속연구의 필요성 등)

○ 미달성 사업 및 기타목표

성 과	성과내용	목 표
기타성과	기술이전	1 건

○ 미달성 사유

기술이전의 경우, 현재 (주)흙살림 연구소와 함께 주기적인 세미나를 통해 현재 본 과제에서 등록된 특허 중 산업화 및 실용화가 가능한 특허를 선정하여 기술이전을 실시하기 위해 노력 중에 있으나 본 연구과제의 경우, 과제를 수행하는 동안 불가피한 사정으로 인해 참여기업의 연구책임자가 변경되고 미생물비료 등록과정 등에서 여러 가지 부득이한 문제점이 발생하였습니다. 현재 참여기업 (흙살림)과 충분한 시간을 가지고 기술이전을 수행하기 위해 노력하고 있으며, 과제종료 후에도 최종평가 이전에 흙살림과 충북대학교 산학협력단간의 기술이전 계약을 성실히 수행하기 위해 노력하고 있습니다.

4. 연구결과의 활용 계획 등

(1) 활용방안

- 메타분석을 이용한 토성 및 작물 재배조건에 따른 생물비료 데이터베이스 구축
- 개발된 고효율 미생물제제의 활용가능성을 키우기 위해서 관련 영농인 (단체), 기업 및 지자체 등과 협력하여 현장시험 확대 실시
- 우수한 미생물 유전체 개발 기술의 특허 출원 및 산업화
- 다양한 토양재배조건에서 활용 가능한 경제적이고 친환경적인 사용기술의 확립으로 생물비료의 현장적용 확대
- 생물비료 사용 매뉴얼 및 리프шет 작성 보급 및 제품의 농가 보급

(2) 기대성과

○ 기술적 측면

- 미생물 유전체의 구조 및 작용기작 규명으로 인한 전략 미생물 유전체 선발 및 생물비료 개발
- 생물비료의 성능과 안전성을 검토하고 적정처리방법을 설정하여 농가의 신뢰회복
- 생물비료용 전략 미생물 유전체 해독 분석을 통해 최신 기술을 활용한 다양한 사이즈의 라이브 러리 제작

- 기술홍보 및 농민단체로 기술이전을 통한 전략 미생물 유전체 생물비료의 현장적용 확대 및 활용기술 보급
- 고효율 복합 미생물을 이용한 환경친화적 작물 생산 기술 확립
- 화학비료대체 생물농업소재 기술 확보

○ 경제·산업적 측면

- 고부가가치 친환경 농소재산업 발전
- 미생물제제 및 관련 기술의 해외 수출
- 화학비료 사용 저감으로 농업생태계 보호, 그린농업 발전
- 토양재배조건 맞춤형 생물비료 데이터베이스 구축 및 경제적 생물비료 생산기술 확립
- 부가가치가 크고 특허적 보완이 가능한 미생물 응용 작물 생산 개발 기술의 기업화 가능
- 생물비료의 품질 규격화와 효율증진으로 농가활용을 증대

(3) 연구개발 성과활용 및 사업화 전략

○ 개발 제품의 기존 제품과의 차별성 및 우수성

- 기존 제품은 단지 식물생육촉진 효과가 있는 미생물을 이용하여 제품화했으나, 본 연구팀에서 개발한 잘자라골드 제품은 생물비료용 전략 미생물 유전체를 선별하고 미생물 유전체 기능 및 구조분석을 통해 다양한 환경에서도 활용이 가능하고 신뢰도가 높은 고효율의 미생물제품을 개발
- 메타분석을 이용하여 다양한 작물 및 토양재배조건 맞춤형 생물비료 활용방법을 개발하고 적용하여 기존 제품의 효과, 특성, 검증 등 문제점을 해결할 수 있어 기존 제품과 차별화

○ 차별화된 생물비료 실용화

- 생물비료 제품 개발에 따른 생물비료의 대량배양 기술, 장기보존, 활성유지 기술에 대한 특허 출원 진행 중
- 생물비료의 효과 증진 및 활성 유지를 위한 첨가제를 개발하여 경쟁업체를 상대로 경쟁력 있는 신기술 확보
- 생물비료의 사용 매뉴얼을 작성 및 정기적인 세미나 개최 및 교육을 통해 농가에 개발 제품에 대한 홍보 및 활용증대 효과

○ 개발 생물비료 제품의 구체적인 사업화 전략

- 사업화하는 방안은 비료관리법에 의한 미생물비료로 등록하는 방안과 친환경농어업육성 및 유기식품등 관리.지원에 관한 법률에 의한 목록공시를 받는 방법이 있는데, 미생물비료로 등록하기 위해서는 비료공정규격이 설정되어 있어야 하는데, RS16만 비료공정규격이 설정되어 있어서 이번에 비료생산업등록을 받았음.
- RS16은 타 미생물과 달리 고염도에서 생육이 가능하므로 화학비료를 이용하여 비료성분이 다양하게 함유된 다양한 제제를 생산할 수 있는 가능성이 있으므로 향후 농가실증시험과 품질관리 가능성 시험을 거쳐 다양한 제품을 개발할 계획임.
- RS16의 일반배지 단가는 0 L당 8,380원인데 비해 산업배지 단가는 550원에 불과하므로 현재 출고단가가 10 L에 12,000원인 점을 감안할 때 가격경쟁력이 뛰어남 (표 1).
- 표 1. 시험용배지와 산업배지의 원재료 비교

원료명	시험배지					산업배지			
	시약			공업용원료		원료	투입량	원/g	금액
	투입량	원/g	금액	원/g	금액				
LB broth high salt	25	240	6,000			Molasse	20	0.24	4.7
Tryptone	10		0	75	750	CSL	5	0.48	2.4
Yeast extract	5		0	15	75	NaCl	10	1.25	12.5
NaCl	10		0	1.25	12.5	NaOH	3	1.8	5.4
						Silica Oil	3	10	30
합계			6,000		838				55

- 표 1에서와 같이 산업용 배지의 원재료비는 시험용배지에 비해 매우 저렴하다. 자라나골드의 출고단가가 10 L에 12,000원이므로, 시험용배지를 사용할 경우 가격이 저렴한 공업용 원료를 사용하더라도 배지 가격만 10L에 8,380원에 이르러 포장대와 제조경비를 더하면 이익을 내기 어려우나, 산업용 배지를 사용할 경우엔 10L에 배지가격이 550원에 불과하여 수익성이 높게 된다.

○ 제품 신뢰성 인증 확보 계획



- 다양한 인증기관에 고시된 재배시험 기준 및 방법으로 재배시험을 수행·결과 확인
- 친환경 생물비료 공시 및 품질인증 신청
- 지역 농가를 대상으로 생물비료 홍보 및 공급추진

○ 국내외 생물비료 시장 현황 분석을 통한 사업화 전략 체계화

- 본 연구과제 수행 기간 중 지속적으로 국내외 생물비료 시장 현황을 분석하여 유기농작물 수요 증가에 따른 생물비료의 개발 및 사업화 전략 체계화

○ 국내 생물비료 시장 현황

- 친환경 농산물에 대한 국민적 수요가 증대됨에 따라 생물비료 (미생물제제)와 같은 친환경 농자재의 중요성 또한 증가하고 있다. 이러한 추세로 친환경 농산물 시장규모는 계속 증가할 것이며, 2012년 한국농어촌경제연구원에서 조사한 ‘국내외 친환경 농산물 생산실태와 시장전망’에 따르면 유기농 농산물 시장은 2015년까지 17,536억 원으로, 무농약 농산물 시장은 51,709억 원으로 성장할 것으로 전망하고 있다. 국내 생물비료 시장은 약 253억 원 규모로 예상되며 친환경 농업의 확산에 따라 생물비료 생산량은 5.5%의 성장률로 2016년에는 297억 원 규모로 성장할 것으로 추정되고 있다 (표 2).

표 2. 국내 생물비료 시장 현황 및 전망

(단위 : 억원)

시장규모					성장률
2012	2013	2014	2015	2016	CAGR(%)*
240	253	267	281	297	5.5

*CAGR (compound annual growth rate, 연평균성장률) <2013년 중소기업청>

○ 국외 생물비료 시장 현황

- BCC Research에서 전 세계 미생물 제품 시장을 조사한 결과, 2012년 미생물 및 미생물제품 시장은 1,170억 달러 수준이었으며, 2013년에는 1,340억 달러로 12.6% 증가하였으며, 2018년에는 1,790억 달러로 5년간의 연평균 성장률 (CAGR)이 6%에 이를 전망으로 보인다. 이 중에서 세계 미생물비료 시장은 2011년 기준 12억 달러 수준이었으나, 연평균성장률이 4.5%인 것을 고려하면 2016년에는 약 15억 달러에 달할 것으로 전망된다 (표 3).

표 3. 세계 미생물비료 시장 규모

(단위 : 백만달러)

Segment	2010	2011	2016	CAGR (%)
Bacterial fertilizers	920	980	1,165	3.5
Fungal products	180	210	315	8.4
Total	1,100	1,190	1,480	4.5

- 세계 각국의 생물비료 현황을 살펴보면, 먼저 미국의 경우 친환경 비료를 사용하는 농업인들이 늘고 있으며, 대량생산 및 대규모 농장, 협동조합, 전진농업기술에 중점을 두어 생물비료 수요 증가 및 북미 시장 범위가 확장됨에 따라 2018년 생물비료 시장 수익은 약 2억 560만 달러로 전망되고 있다. 일본은 Recycling에 의한 유기질, 베토·토양개량제 비료시장이 활성화되어 있으며, 생물비료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고 토양미생물제제를 지력증진법에 의한 토양개량자재로서 품질표시를 규정하도록 하고 있으며, 현재 VA균근균 자재가 지정되어 있다. 중국의 경우 2012년 친환경비료의 매출액은 전체 비료 매출액의 7%인 595억 위안에 불과하였으나, 친환경비료에 대한 관심이 증가하고 있고 생물비료 산업에 대해 현재 중국 정부가 적극적으로 지원을 하고 있어 전략적 지원사업으로 인해 2015년 매출액은 900억 위안, 2020년에는 1,400억 위안으로 향후 5~10년 이내에 친환경비료의 비중이 15%를 차지할 것으로 전망된다. 말레이시아는 생물비료 및 유기질비료 시장은 미미한 수준이나 녹비와 야자 퇴비 등 유기질 비료를 생산하고 친환경 농업에 대한 관심이 증가함에 따라 근류균, 내생균근과 같은 미생물비료 연구가 진행되고 있다. 인도는 Azotobactor (곡류, 유류종자, 채소), Mycorrhizae (이식용 식물), 인산가용화균 및 근류균 (두과작물) 등 생물비료 연구가 활발히 진행 중에 있다. 베트남과 태국 또한 생물비료 개발에 관한 연구가 활발히 진행 중에 있는데 베트남은 생물비료에 대한 연구가 1982년부터 수행되고 있으며, 10개 이상의 연구기관 및 대학에서 두과작물용 근류균제 생산기술, 비두과 작물용 질소고정 접종제, 농업 및 임업 혼합용 생물비료 개발 등과 같은 연구가 진행 중에 있다.

붙임. 참고문헌

- Adams, D.C., Gurevitch, J., and Rosenberg, M.S. 1997. Resampling tests for Meta-analysis of ecological data. *Ecology*. 78: 1277-1283.
- Alexander, D.B., and Zuberer, D.A., 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils*. 12: 39-45.
- Angelim, A.L., Costa, S.P., Farias, C.S., Freitas, F.L., and Melo, M.V.M. 2013. An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in Chitosan beads. *J. Environ. Manage.* 127: 10-17.
- Bano, N. and Mussarat, J. 2003. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Curr. Microbiol.* 6: 324-328.
- Bashan, Y., Hernandez, J.P., Leyva, L.A., and Bacillio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth promoting bacteria. *Bio. Fertil. Soils*. 35: 359-368.
- Chen, X.H., Wang, X.T., Lou, W.Y., Li Y., Wu, H., Zong, M.H., Smith, T.J., and Chen, X.D. 2012. Immobilization of *Acetobacter* sp. CCTCC M208061 for efficient asymmetric reduction of ketones and biocatalyst recycling. *Microb. Cell Fact.* 11: 19.
- Ding, S., Huang, C.L., Sheng, H.M., Song, C.L., Li, Y.B., and An, L.Z., 2011. Effect of inoculation with the endophyte *Clavibacter* sp. strain Enf12 on chilling tolerance in *Chorispora bungeana*. *Physiol. Plantarum*. 141: 141-151.
- Emmert, E.A.B., Milner, J.L., Lee, J.C., Pulvermacher, K.L., Olivares, H.A., Clardy, J., and Handelsman, J. 1998. Effect of canavanine from alfalfa seeds on the population biology of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4683-4688.
- Kamala-Kannan, S., Lee, K.J., Park, S.M., Chae, J.C., Yun, B.S., Lee, Y.H., Park, Y.J., and Oh, B.T. 2010. Characterization of ACC deaminase gene in *Pseudomonas entomophila* strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil. *J. Basic Microbiol.* 50: 200-205.
- Lichtenthaler, H.K., and Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 1: 8.
- Mercado-Blanco, J., van der Drift, K.M., Olsson, P.E., Thomas-Oates, J.E., van Loon, L.C., and Bakker, P.A., 2001. Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic

acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. J. Bacteriol. 183(6): 1909–1920.

Rosenberg, N.J., Adams, D.C., and Gurevitch, J. 2000. Meta Win: Statistical software for Meta-analysis version 2.0. Sunderland, MA: Sinauer.

Theocharis, A., Clement, C., and Barka, E.A., 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. Planta. 235(6): 1091–1105.

Yim, W., Seshadri, S., Kim, K., Lee, G., and Sa, T., 2012. Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions. Plant Physiol. Biochem. 67: 95–104.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 미생물 유전체, 기능분석 및 토성, 작물 맞춤형 생물비료 개발				
	(영문) Biofertilizer development fitted to soil, crop properties and genomic, functional analysis and beneficial soil microbe				
주관연구기관	충북대학교		주 관 연 구	(소속) 식물자원환경화학부	
참 여 기 업	(주) 흙살림		책 임 자	(성명) 사 동 민	
총연구개발비 (1,105,500천원)	계	1,105,500	총 연 구 기 간	2014. 8. 23 ~ 2018. 8. 22 (4년)	
	정부출연 연구개발비	830,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	40
	기업부담금	275,500		내부인원	40
	연구기관부담금			외부인원	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>생물비료 개발을 위한 유전자원 수집 및 효능 분석, 보유 미생물 유전자원을 이용한 생물비료 개발, 다양한 토성, 작물별 생물비료 효능 메타분석 및 경제적인 대량생산을 통한 생물비료를 제조하고 신종 유용미생물의 유전체 분석을 이루어 다양한 기능의 생물비료 개발을 위한 유전자원을 확보하려 한다. 또한 생물비료 현장 활용기술을 보급하고 산업화하여 경제적이고 고효율적인 상토첨가용 생물비료를 개발하고자 한다. 본 연구를 수행하면서 전략미생물 유전체 해독 및 NABIC 등록 각 5건, 유용미생물 유전자원 20건 확보, 특허 출원 5건 및 등록 5건, 국내외 전문학술지 게재 (SCI 6건, 비SCI 7건, 국내외 학술활동 54건 및 전문 인력양성 20명을 비롯하여 연구과제 홍보 2건, 생물비료의 사용매뉴얼을 1건 작성하였다. 현재 이와 같은 연구결과 및 성과를 바탕으로 고품질의 상토첨가용 생물비료를 제품화 (제품명 : 잘자라골드) 및 사업화를 완료하였으며, 과제를 수행하면서 개발한 특허기술에 대한 기술이전을 참여기업과 함께 진행 중에 있다.</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>본 연구를 성실히 수행하여 국내외 다양한 토양 및 작물로부터 분리한 미생물 유전자원 중에서 식물생장촉진 효능이 우수한 미생물 유전자원을 분리하여 선정한 후 미생물 유전자원의 접종에 따른 토마토를 비롯한 여러 작물의 식물생육촉진 효과를 확인하였다. 생물비료의 시비효과를 증대시키기 위해 메타분석을 통해 생물비료, 토양 pH 및 유기물 함량, 식물의 유형, 생육주기, 재배장소, 미생물 유전자원의 시비방법에 따른 생물비료의 최적 시비효과를 규명하였고, 최적 배지 및 다양한 제형화를 통해 경제적으로 고효율적인 미생물 생물비료를 제형화 하였다. 선발한 미생물 유전자원의 보다 명확한 식물생장촉진 효과를 규명하기 위해 de novo sequencing을 통해 전략 미생물 유전체의 해독 및 파이프라인을 구축하였다.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>본 연구의 수행으로 토양재배조건 맞춤형 생물비료 활용기술 개발 및 전략 미생물 유전체 분석 기술의 특허 출원 및 산업화가 가능할 것이다. 또한 메타분석을 통해 다양한 토성 및 작물별 생물비료 최적처리 조건을 확립할 수 있으며, 전략 미생물 해독 연구를 통해 최신 기술을 활용한 다양한 라이브러리를 제작하고 고품질 염기서열 데이터를 이용하여 전략 미생물 5종의 유전체를 완성할 수 있을 것으로 사료된다.</p>					

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		914004-4	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	생명과학			과제구분	단위
사업명	포스트게놈다부처유전체사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	미생물 유전체, 기능분석 및 토성, 작물 맞춤형 생물비료 개발			과제유형	기초
연구기관	충북대학교			연구책임자	사동민
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.8.23.~2015.08.22	220,000	55,000	275,000
	2차년도	2015.8.23.~2016.08.22	220,000	73,500	293,500
	3차년도	2016.8.23.~2017.08.22	195,000	73,500	268,500
	4차년도	2017.8.23.~2018.08.22	195,000	73,500	268,500
	계	2014.8.23.~2018.08.22	830,000	275,500	1,105,500
참여기업	(주) 흙살림				
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018. 8. 14

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
충북대학교	교수	사동민

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	사동민
----	-----

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

기존의 개발되었던 생물비료의 문제점은 불확실한 효능 및 유통기한, 농가의 불신, 생물비료에 대한 이해부족 등 다양한 문제점을 가지고 있었다. 본 연구는 다양한 토양 및 식물로부터 분리한 우수한 생물비료의 식물생장촉진 효능을 규명할 뿐만 아니라 메타분석을 이용한 생물비료의 시비효과 및 다양한 제형화를 통해 생물비료의 보존기한 증대시키고, 유전체 분석을 통해 보다 명확한 생물비료의 효능을 규명할 수 있게 하였다. 이를 바탕으로 본 연구는 고효율의 식물생장촉진 생물비료를 보다 경제적이고 효율적으로 활용할 수 있는 기술을 확립했다고 사료된다. 또한 본 연구는 나아가 농가의 생물비료에 대한 불신을 해결하고 보다 현장 활용을 증대시키며, 특히 다양한 작물의 수요를 보다 효율적으로 재배할 수 있는 상토용 생물비료를 개발하였다고 사료된다.

2. 연구개발결과의 과급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구는 다양한 토양 및 식물로부터 분리한 미생물 유전자원 확보를 통해 유전체 분석을 이용하여 생물비료의 식물생장촉진 효능 및 유전자에 대한 정보를 보다 명확하게 규명하였으며, 메타분석을 통해 다양한 토양 및 환경조건에 대한 생물비료의 최적 시비조건을 확립하였고, 다양한 제형화를 통해 경제적이고 고효율적인 생물비료의 접종체계를 확립하였다. 또한 제형화에 따른 생물비료의 사용매뉴얼 작성 및 연구에 대한 홍보활동을 통해 농가에 대한 신뢰 회복 및 체계적이고 경제적인 생물비료의 현장 활용 기술을 확립하였다고 평가된다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구의 수행으로 토양재배조건 맞춤형 생물비료 활용기술 개발 및 전략 미생물 유전체 분석 기술의 특허 출원 및 산업화가 가능할 것이다. 또한 메타분석을 통해 다양한 토성 및 작물별 생물비료 최적처리 조건을 확립할 수 있으며, 전략 미생물 해독 연구를 통해 최신 기술을 활용한 다양한 라이브러리를 제작하고 고품질 염기서열 데이터를 이용하여 전략 미생물 5종의 유전체를 완성할 수 있을 것으로 사료된다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구는 1단계 2년, 2단계 2년에 걸쳐 총 4년 동안 진행되었으며, 연구원 활용 및 연구비 수행, 결과 진행에 있어서 성실하게 수행되었다고 평가된다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구과제를 4년 동안 성실히 수행하면서 연구수행 및 연구의 정량적 목표를 달성하였다. 전략 미생물 유전체 해독 5건, 유용 유전자원 20종 확보, 유전체 분석 NABIC 5건 등록, SCI급 6편, 비SCI급 7편 총 13편의 논문을 국내외 전문학술지에 게재하였고, 전문지식재산권 특허 출원 5건, 등록 5건을 달성하였다. 연구과제를 수행하면 국내외 학술대회에 참가하여 총 54편의 연구논문을 발표하였으며, 이 중에서 연구의 우수성을 인정받아 7편의 우수논문 발표상을 수상하였다. 연구를 수행하는 동안 박사, 석사, 학사 등 우수한 인재 20명을 양성하였고, 개발한 상토첨가용 생물비료의 제품을 등록 (제품명 : 잘자라골드) 하였으며, 현장 활용 증진을 위해 농민들이 쉽게 이용할 수 있는 사용매뉴얼을 작성하였다. 또한 연구를 수행하면서 달성한 특허기술의 참여기업 기술이전을 현재 진행 중에 있다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
미생물 유전자원 분리 및 선발	5	100	근권 토양으로부터 미생물 유전자원의 분리 및 우수 식물생장촉진 미생물 유전자원 선발
식물생장촉진 효능 확인	5	100	분리 미생물 유전자원의 식물생장촉진 효능 확인
우수 미생물 유전자원 확보	15	100	식물생장촉진 효능이 우수한 미생물 유전자원 20종 확보
미생물 유전자원의 접종 효과 확인	5	100	선발 미생물 유전자원의 토마토 저온 내성 및 생육촉진 효과 확인
미생물 유전자원의 균집능 확인	5	100	Gfp 형질전환을 통해 미생물 유전자원의 토마토 식물체 내 균집 확인
메타분석을 이용한 생물비료 시비효과 확인	10	100	메타분석을 이용하여 다양한 생물비료, 최적 토양 pH 및 유기물 함량, 식물 생육주기 및 유형, 생물비료의 시비방법 및 재배조건에 따른 최적 시비효과 확인
경제적 대량배양 및 제형화	5	100	선발한 미생물의 경제적이고 효율적인 대량배양 기술 확립 및 제형화를 통해 보존기한 증대
생물비료 제형화	5	100	액상, 분상 및 입상 생물비료 제조 및 보존기한 증대 시험
생물비료 제품화 및 사업화	20	100	고품질 상토첨가용 생물비료 (잘자라골드) 제품화 및 사업화
전략미생물 유전체 5종 선정 및 유전체 분석	15	100	선정한 5종의 전략 미생물 유전체 분석
전략 미생물 유전체 해독 및 유용유전자 분석	10	100	전략 미생물 유전체 de novo assembly 파이프라인 구축 및 최적화
		100	전략미생물 유전체 Gene family 규명 및 비교 분석
		100	구축된 파이프라인을 통한 유용미생물의 유전체 분석
합계	100		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구에서는 생물비료의 현장 활용을 증대시키고 경제적 및 고효율적인 상토첨가용 생물비료를 개발하기 위해 먼저 다양한 환경을 가지는 지역의 토양 및 식물로부터 분리한 미생물유전자 중 식물생장촉진 효능이 우수한 균주를 선정하여 총 20종의 유용 미생물 유전자원을 확보하였다. 이 중에서 가장 우수한 미생물 유전자원을 2차 선발하여 유전자원의 접종에 따른 토마토 내 식물생장촉진 효능 및 식물체 내 군집능을 확인하였다. 이러한 생물비료의 시비효과를 증대시키기 위해 메타분석을 이용하여 토양 pH, 유기물, 작물의 생육주기 및 유형, 생물비료의 시비방법 및 재배조건 그리고 생물비료 별 (*Bacillus*, *Pseudomonas*) 접종효과를 분석하여 생물비료의 최적 시비효과를 분석하였다. 보다 경제적이고 친환경적인 생물비료의 개발을 위해 선발한 미생물 유전자원의 최적 배지 및 에너지를 선정하여 경제적인 대량배양 기술을 확립하였고, Chitosan bead를 포함한 생물비료의 제형화를 통해 이용하여 생물비료의 보존기한 증대 및 국내 육묘장에서 다양한 작물 및 상토용 시비효과를 증대시켰다. 현재 최종 생물비료를 선정하여 비료공적규격을 통해 등재를 진행 중에 있다. 선정된 우수 미생물 유전자원의 명확한 식물생장촉진 효능 및 유전체를 분석하기 위해 5종의 미생물 유전자원을 선정하고, *de novo sequencing* 및 *assembly*를 통해 전략 미생물 유전자원의 파이프라인 구축 및 최적화를 수행하였다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

해당사항 없음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구를 통해 식물생장촉진 효능이 우수한 상토첨가용 생물비료의 유전체를 명확하게 규명하여 경제적 이고 친환경적인 생물비료의 개발이 가능할 것이다. 이러한 경제적이고 효율적인 생물비료 사용기술의 확립은 고효율 생물비료의 현장 적용을 보다 확대시킬 것이며, 건전 작물재배 기술 및 화학비료 절감 등의 작물 생산 기술을 개발하는 기반이 될 것이다. 또한 학문적으로는 메타분석을 이용하여 여러 가지 환경 요인에 따른 토성 및 작물 재배조건에 따른 생물비료의 데이터베이스 구축이 가능할 것이며, 사용매뉴얼 등의 작성을 통해 생물비료에 대한 농가의 불신을 회복이 가능할 것으로 사료된다.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 · 실용화	표준 유전체 해독	메타지놈 분석	유전체 분석기술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표	5	20	1				5			
연구기간 내 달성실적	5	20	1				5			
달성율(%)	100	100	100				100			

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인 증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (사용매뉴얼작성)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	건	
가중치	15	15		20		20							5		5		5	5	
최종목표	5	2		1		1					4	6		9		20		2	1
연구기간 내 달성실적	5	5		0		1					6	7		54		20		2	1
달성율(%)	100	250		0		100					150	116		600		100		100	100

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	우수 미생물 유전자원의 확보
②	미생물 유전자원의 접종 효과 확인
⑥	메타분석을 이용한 생물비료 시비 효과 확인
⑦	경제적 대량배양 및 제형화
⑧	생물비료 제형화
⑩	전략미생물 유전체 5종 선정 및 유전체 분석
⑪	전략 미생물 유전체 해독 및 유용유전자 분석

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 결 해	정책 자료	기타
①의 기술		V				V	V			
②의 기술					V	V				
⑥의 기술		V		V				V	V	
⑦의 기술		V				V	V			
⑧의 기술		V			V			V	V	
⑩의 기술		V				V				
⑪의 기술		V				V				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	국내 다양한 토양 및 식물로부터 분리한 유용 미생물 유전자원의 표준균주 등록 및 데이터베이스 구축
②의 기술	친환경적인 식물 재배 기술 확립의 특허 출원 및 등록
⑥의 기술	토성 및 작물 재배조건에 따른 생물비료 데이터베이스 구축
⑦의 기술	경제적인 대량배양 및 제형화 기술의 특허 출원 및 등록
⑧의 기술	생물비료 사용 매뉴얼 및 리프셋 작성 보급 및 제품의 농가 보급
⑩의 기술	미생물 유전체의 구조 및 작용기작 규명으로 인한 전략 미생물 유전체 선발 및 생물비료 개발
⑪의 기술	생물비료용 전략 미생물 유전체 해독 분석을 통해 최신 기술을 활용한 다양한 사이즈의 라이브러리 제작

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 · 실용화	표준 유전체 해독	메타지 놈 분석	유전체 분석기 술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보완 성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표	5	20	1				5			
연구기간 내 달성실적	5	20	1				5			
연구종료 후 성과창출 계획										

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권		기술실 시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기 타 (사 용 매 뉴 얼 작 성)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명					
가중치																			
최종목표	5	2	1		1						6	8	9	20	2	1			
연구기간내 달성실적	5	5			1						6	7	54	20	2	1			
연구종료 후 성과창출 계획												1							

