보안과제( ), 일반과제(○)

발 간 등 록 번 호
11-1541000-001215-01

유전체정보기반 맞춤형 미생물비료 및 활용기술 개발에 관한 연구

(세부과제1 “바이오매스/사료작물에 적합한 미생물비료제 개발에 관한 연구”, 세부과제2 “미생물비료제의 현장 적용기술 및 제제화 기술 개발에 관한 연구”)

한국생명공학연구원

농 림 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “유전체정보기반 맞춤형 미생물비료 및 활용기술 개발에 관한 연구” 과제(세부과제1 “바이오매스/사료작물에 적합한 미생물비료제 개발에 관한 연구”, 세부과제2 “미생물비료제의 현장 적용기술 및 제제화 기술 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2011년 12월 30일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원
주관연구책임자 : 박 승 환
세부연구책임자 : 김 창 진
연 구 원 : 최 수 근
연 구 원 : 박 동 진
연 구 원 : 정 해 영
연 구 원 : 김 영 태
연 구 원 : 박 수 영
연 구 원 : 이 재 찬
연 구 원 : 권 미 경
연 구 원 : 정 다 은
연 구 원 : 전 정 민
연 구 원 : 장 종 옥
연 구 원 : 강 혜 영
연 구 원 : 주 윤 정
연 구 원 : 김 기 용(국립축산과학원)
위탁연구기관명 : 충북대학교 산학협력단
위탁연구책임자 : 사 동 민

요 약 문

Ⅰ. 제 목 : 유전체정보기반 맞춤형 미생물비료 및 활용기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 연구개발 목적

- 유전체 기능정보를 활용한 식물생장촉진 미생물제 기술 고도화
- 비식량 바이오매스/사료작물 맞춤형 미생물비료제 개발
- 미생물비료의 현장 적용기술 개발 및 산업적 활용기반 구축
- 염류집적지에서의 기능성 미생물비료의 적용기술 개발 및 산업적 활용기반 구축

○ 필요성

- 친환경 농업소재에 대한 수요증가

  OECD국가 2013년까지 화학비료의 사용량을 40% 감축하는 목표를 세우고 있으며 친환경 농업 소재 개발에 대한 필요성에 대한 사회 전반적 인식이 크게 높아지고 있음.

- 바이오매스 확보기술 개발 필요성

  바이오에너지 및 석유대체 산업자원 확보 필요성이 시급함. 신재생에너지 의무혼합제도(RFS) 도입이 임박해 있고 이미 경유에 바이오디젤의 혼합사용(BD2.0)을 시행하고 있음.

- 조사료 확보기술 개발 필요성

  국내 조사료 자급율이 2008년 82%(503만톤)로 보고되었고, 2014년 90% 목표를 설정하는 등 자급율 제고가 절실히 요청되고 있음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

○ 바이오매스/사료작물에 적합한 미생물비료제 개발

- 기 확보균 (*P. polymyxa*균 및 *M. oryzae*균)의 균주특성 활용 및 근연균 추가 개발
- 미생물 대량배양 기술 개발; 배지 최적화, 포자형성율 제고, 포자 대량생산기술 개발
- 생장촉진/증수 기능 제고를 위한 기술개발; 보리, 밀, 감자를 대상으로 활용기술 개발

○ 맞춤형 미생물비료제 및 현장 적용기술 개발

- 대상 작물로부터 식물생장촉진 미생물의 분리
- 대상 작물 및 포장에 따른 미생물제 처리 방법 개발

- 바이오매스 및 사료 작물(억새 및 헤어리베치)을 대상으로 현장 적용시험
- 미생물제 효능평가 및 안정성 확보기술 개발
- 대규모 지역 시용에 적합한 적용기술 개발
- 제제화 기술 개발 (종자처리, 담체이용 투입, 엽면시비 등의 방법)

○ 복합미생물제의 조건불리지역 활용기술 개발
- 염분집적 토양에서의 미생물제 효과 검정 및 이용기술 개발
- 새만금 간척지 개화지구 시험포장지에서 염류농도별 토양 채취 및 분석
- 염류농도별 토양에서 작물의 발아율 측정
- 비료시비 수준과 식물생장촉진 미생물의 접종에 따른 작물 생장촉진 효과 확인

Ⅳ. 연구개발결과

가. 제1 세부과제

○ 미생물 비료제로 활용하기 위한 *Paenibacillus polymyxa* E681균의 포자 대량생산 기술을 확립하였다.

○ E681균의 관주처리, 침지처리, 코팅처리 등을 통해 일반 경작지 및 간척지 염분 토양에서 생육중인 밀 및 보리의 생장촉진 효과를 얻었다.

○ 인공 씨감자 및 일반 절단 감자에 대한 E681균의 처리로 생장촉진 및 증수효과와 저장성 향상을 나타냈다.

나. 제2 세부과제

○ 바이오매스 맞춤형 미생물비료제를 개발하기 위하여 억새 시료를 수집하였고, 물억새 (*Miscanthus sacchariflorus*) 뿌리로부터 식물생장촉진 미생물 313 균주를 분리하였다.

○ 분리한 미생물에 대하여 온도, pH, 염농도 등 조건불리지역에서의 작물재배에 적합한 특성을 지닌 31 균주를 선발하였다.

○ 선발균주에 대하여 Auxin 및 ACC deaminase 등의 식물생산촉진 활성물질을 생산하고, 억새, 수단그라스, 보리, 벼, 배추, 및 토마토에 대하여 종자 발아 촉진 효과를 나타내는 *Tumebacillus* sp. BE100501, *Bacillus* sp. BE100506, *Agrobacterium* sp. BE100516 및 *Lysinibacillus* sp. BE100533 4균주를 바이오매스 맞춤형 미생물비료제 개발 균주로 선발하였다.

○ 사료작물 맞춤형 미생물비료제를 개발을 위해 헤어리베치 시료를 수집하였고, 뿌리로부터

분리한 근권미생물 48 균주 중 뿌리혹형성 및 질소고정과 관련된 *Rhizobium* 속 21 균주를 분리하였다.

○ *Rhizobium* 속 21 균주에 대하여 뿌리혹형성능을 조사하여 RE110039 균주를 사료작물 맞춤형 미생물비료제 개발균주로 선발하였다.

○ 억새 생육촉진 선발 미생물에 대하여 *in vitro* 분석 및 pot 시험을 통한 식물생장촉진 효과와 그 재현성을 확인하여 특허를 출원하였다 [특허출원 “물억새 뿌리로부터 분리한 미생물을 이용한 식물생장촉진 방법” 출원번호: 제2011-0122257호, 출원일: 2011년 11월 22일].

○ 선발균주들에 대하여 50L 발효조 배양을 실시하였고 배양 후 동결건조균체를 제제화 및 포장적용 시험에 사용하였다.

○ 억새 및 헤어리베치 분리균을 이용하여 분말수화제 및 종자코팅제를 개발하여 포트 및 포장시험에 사용하였다.

○ 억새 및 헤어리베치의 대규모 지역 및 조건불리지역 시용한 적합한 적용기술 개발을 위한 포장시험이 진행 중에 있다.

다. 위탁과제

○ *M. oryzae* CBMB20와 *B. iodinum* RS16을 접종한 결과, 염분토양 조건에서 옥수수 (*Zea maize*)와 수수-수단그라스 교잡종 (*Sorghum bicolor* L.)의 생장과 건물중이 균주를 접종하지 않은 처리구에 비해 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인하였다.

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

○ *P. polymyxa* E681균의 포자를 대량으로, 1.1 x 10^9/ml 수준으로 생산할 수 있는 기술을 확립하였음.

○ E681균의 포자를 간편하고 비용이 적게드는 seed coating 방법으로 보리, 밀, 이탈리안 라이그라스 등 사료작물에 처리하여 생장을 촉진 할 수 있는 방법을 개발하였음.

○ E681균의 포자를 인공씨감자 및 절단감자에 처리하여 생장 촉진 및 증수효과를 내는 방법을 개발하였으며 또한 이렇게 도입한 E681균에 의해 수확한 감자의 저장성을 향상시킬 수 있는 방법을 개발하였음. E681균의 포자를 쉽게 분의처리 할 수 있는 분말제제를 개발하였음.

○ 물억새와 헤어리베치로부터 식물유용세균 2균을 확보하여 특허 2건 출원하였음.

(1) 물억새 뿌리로부터 분리한 미생물을 이용한 식물생장촉진 방법

출원번호: 제2011-0122257호, 출원일: 2011년 11월 22일

(2) 헤어리베치 근류 내염성 리조비움 속 균주

출원번호: 제2011-010981호, 출원일: 2011년 10월 19일

○ 특허출원한 균주에 대해서는 추후 식물생장촉진 미생물 제제로 활용하고 특히 바이오 에너지 작물인 억새에 처리하여 바이오매스생산량을 증진시키고 사료작물인 헤어리베치에 PGPR 균주를 처리하여 친환경 미생물 비료제로 활용하되 다양한 포장에서의 적용시험과 제형화 연구개발 및 처리기술 개발을 통한 산업화 추진이 가능함.

○ 고기능 식물생장촉진 미생물인 *M. oryzae* CBMB20와 *B. iodinum* RS16을 이용한 화학비료 수준 저감과 환경친화적 바이오매스 생산 기술을 개발하였음.

본 연구에서 얻은 위의 성과들은 바이오매스 또는 사료자원 확보를 위한 작물재배 현장에 적용하여 화학비료를 저감하고 수확량을 높일 수 있는 기술로서 향후 관련 업체 및 영농단체와 협력하여 대규모 현장시험을 통해 실용화 및 산업화 추진이 이루어 질 수 있도록 후속연구가 필요함.

SUMMARY

Development of microbial fertilizer based on functional genomic information and its application

In our previous study we isolated usuful bacteria beneficial to plants, so-called 'PGPR' such as *Paenibacillus polymyxa* E681 and *M. oryzae* CBMB20, and whole genome sequencing of the two strains was completed years ago. *P. polymyxa* E681, an endospore former isolated from the rhizosphere of winter barley in South Korea, suppresses plant diseases, produces antibiotics and a plant hormone, secretes a variety of hydrolytic enzymes, and has good root-colonizing ability. *M. oryzae* CBMB20 isolated from surface-disinfected stem of rice can produce IAA and ACC deaminase and can grow using metanol as a sole carbon source.

The objective of this study was to develop efficient microbial fertilizer based on the previously isolated bacterial strains and their genome information, and to develop application methods for applying the microbial fertilizers to efficiently grow forage or biomass crops such as barley, wheat, silver grass, hairyvetch, maize, and potato. We developed a medium and optimized fermentation process to produce large amount of *P. polymyxa* spores. To develop the application method E681 spores were applied to barley, wheat and Italian ryegrass by seed coating, seed soaking or drainage treatment of the spores. In all cases the colonizing efficiency of the E681 strain was shown to reach 10^{-4}-10^{-5}cfu/g root and seed coating showed a little higher colonizing capacity. It was shown that the growth of those forage crops could be improved by the treatment of E681 spores, and nutritional value was also improved. We concluded that seed coating method which is easy to do, require low cost and can give good growth promoting effect is the best one in this study. We also tried to apply the E681 spores to potato to examine if there is any beneficial effect on the growth, yield and other things. We found that the E681 spores improved the yeild of potato significantly, that is the number of potato tuber produced in pots was increased up to 20%, and the E681 strain was also shown to play a role as a biocontrol agent to protect the harvested potatoes from bacterial soft rot.

On the other hand, to develop microbial fertilizers for biomass target crop, *Miscanthus,* plant samples were collected and 313 isolates were separated from the roots of *Miscanthus*

sacchariflorus. 31 strains were selected from the isolates for cultivation at the disadvantageous location after test at various temparature, pH and salinity. *Tumebacillus* sp. BE100501, *Bacillus* sp. BE100506, *Agrobacterium* sp. BE100516 *and Lysinibacillus* sp. BE100533 were selected as strains for the development of microbial fertilizers for biomass target crop, *Miscanthus*. They produced auxin, ACC deaminase and showed the seed germination-promoting effects for other forage crops. To develop microbial fertilizers for target forage crop, Hairyvetch, plant samples were collected and 48 isolates were separated from the roots of Hairyvetch, 21 strains belonged to the genus *Rhizobium* were selected from the isolates for nodulation and nitrogen fixation. RE110039 strain was selected as a strain for the development of microbial fertilizers for target forage crop, Hairyvetch. A patent was submitted for the plant growth-promoting effect and its reproductivity after confirming by *in vitro* assay and pot test for the selected strains for *Miscanthus sacchariflorus* [Patent application "Plant growth promotion by using bacterial strains isolated from roots of *Miscanthus sacchariflorus*" Application no.: 2011-0122257, Application date: 22. Nov. 2011]. Large-scale fermentation (50L) was performed by the selected strains and freeze-dried cells were used for the formulation and field application. Formulation was developed for the powder solubilizer and seed coating agents by using selected microbes from *Miscanthus sacchariflorus* and Hairyvetch. Field test has been under the test for the appilicaion of microbial fertilizers to the large scale area and disadvantageous location.

In other part of this study to develop an application method of our bacterial strains, inoculation of *M. oryzae* CBMB20 and *B. iodinum* RS16 were significantly increased plant growth and dry biomass on maize (*Zea maize*) and sorghum-sudangrass hybrid (*Sorghum bicolor* L.) in Saemangeum reclaimed soil.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction ····· 12

Chapter 2 State of the art report ····· 18

Chapter 3 Results and Discussion ····· 20

Ⅰ. Development of effective microbial fertilizer for biomass and forage crops

1. Large scaled production of *Paenibacillus polymyxa* E681 spores ····· 20
2. Plant growth promoting effect on forage crops in fields ····· 23
   1) Grwoth promoting effect on wheat and barley in regular fields ····· 23
   2) Grwoth promoting effect in reclaimed fields ····· 44
3. Growth promoting and increasing yields on potatoes in fields ····· 48
   1) Experiments on artificial potato seeds ····· 48
   2) Experiments on regular potatoes ····· 62
   3) Experiments on enhancing storage of potatoes ····· 68
4. Investigation and development of
   Paenibacillus polymyxa E681 relative strains ····· 69

Ⅱ. Field application test for Biomass and forage crops

1. Isolation of plant growth-promoting rhizobacteria from *Miscanthus* ····· 73
   1) Collection of *Miscanthus* sample ····· 73
   2) Isolation of rhizobacteria from the root of Miscanthus ····· 75
   3) Identification of isolates by the analysis of 16S rRNA gene sequences ····· 77
   4) Analysis of growth characteristics of isolates ····· 79
   5) Analysis of plant growth-promoting effects of selected isolates ····· 81
   6) Identification and its characteristics of selected isolates ····· 85
2. Isolation of plant growth-promoting rhizobacteria from Hairyvetch ····· 87
   1) Collection of samples of forage crops ····· 87

2) Isolation of root nodule bacteria from Hairyvetch root ····· 88
3) Nodulation activity of isolates for the Hairyvetch ····· 88
3. Development of formulation techniques ····· 89
1) Mass culture for formulation and field test ····· 89
2) Formulation ····· 91
4. Development of treatment methods using microbial fertilizer in various fields ····· 92
1) Plant growth-promoting effects on *Miscanthus* ····· 92
2) Pot test for the plant growth-promoting effects on the rhizome of *Miscanthus* ····· 95
3) Effects on seed germination and plant growth-promotion for various crops ····· 99
5. Development of application techniques for field test at large scale ····· 101
1) Field test for *Miscanthus* ····· 101
2) Field test for Hairyvetch ····· 104

Ⅲ. Development of applying methods for the production of biomass crops in high saline fields.

1. Analysis of physical and chemical characters of soils from reclaimed fields ····· 105
2. Germination rate of biomass crops in reclaimed fields ····· 107
3. Plant growth-promoting effect in accordance with fertilization in reclaimed fields ····· 109

Chapter 4 Goal achievement ····· 119

Chapter 5 Futher applications ····· 120

Chapter 6 Information from foreign countries ····· 123

Chapter 7 References ····· 124

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 12

제 2 장 국내와 기술개발 현황 ····· 18

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 20

Ⅰ. 바이오매스/사료 작물에 적합한 미생물 비료제 개발

1. *Paenibacillus polymyxa* E681 균 포자 대량생산기술 개발 ····· 20
2. 사료작물에 대한 E681균의 생장촉진 및 증수효과 검정을 위한 포장시험 ····· 23
   가. 일반 경작지에서의 보리 및 밀에 대한 생장촉진효과 검정 ····· 23
   나. 간척지 염분토양에서의 효과검정 시험 ····· 44
3. 감자에 대한 E681균의 생장촉진 및 증수효과 검정을 위한 온실 및 포장시험 ····· 48
   가. E681균 및 대사산물의 인공씨감자에 대한 생장촉진 및 증수효과 검정 ····· 48
   나. E681균의 일반 절단 감자에 대한 생장촉진 및 증수효과 검정 ····· 62
   다. E681균 처리에 의한 감자 저장성 향상 시험 ····· 68
4. *Paenibacillus polymyxa* E681의 근연균 개발 및 특성 분석 ····· 69

Ⅱ. 미생물 비료제의 현장 적용기술 및 제제화 기술 개발

1. 바이오매스 및 사료 작물 대상 현장 적용시험 ····· 73
   가. 억새 시료의 채취 ····· 73
   나. 억새 뿌리로부터 미생물의 분리 ····· 75
   다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통한 분리균주의 동정 ····· 77
   라. 분리균주의 생육특성 분석 ····· 79
   마. 선발 균주의 식물생장 촉진효과 측정 및 최종선발 ····· 81
   바. 최종선발균주의 균주동정 및 특성 ····· 85
2. 사료작물 헤어리베치로부터 식물생육촉진 미생물 분리 ····· 87
   가. 사료작물 시료의 채취 ····· 87
   나. 헤어리베치 뿌리로부터 근류근 분리 ····· 88

다. 선발 균주의 헤어리베치 근류균 뿌리혹형성능 확인 ····· 88
3. 제제화 기술 개발 ····· 89
가. 제제화 및 포장실험을 위한 대량배양 ····· 89
나. 제제화 및 제형화 ····· 91
4. 미생물제 효능평가 및 안정성 확보기술 및 개발 대상작물과
포장에 따른 미생물제 처리 방법 개발 ····· 92
가. 억새 생장 촉진효과 ····· 92
나. 억새 rhizome 미생물처리 생육촉진효과 포트 시험 ····· 95
다. 다양한 작물에 대한 종자 발아 및 생장 촉진효과 ····· 99
5. 대규모 지역 시용에 적합한 적용기술 개발 ····· 101
가. 억새 현장적응 포장시험 ····· 101
나. 헤어리베치 근류형성능 및 생육촉진 우수 균주의 소포장 토양 적용 시험 ····· 104

Ⅲ. 염류 집적지에서 바이오매스 생산을 위한 기능성 미생물 비료의 적용기술 개발

1. 실험에 사용된 새만금 간척지 토양의 이화학성 분석 ····· 105
2. 실험에 사용된 간척지 토양에서의 발아율 측정 ····· 107
3. 간척지 토양에서 비료시비 수준에 따른
식물생장촉진 미생물의 식물생육 촉진효과 ····· 109

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 119

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ····· 120

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 123

제 7 장 참고문헌 ····· 124

제 1 장 연구개발과제의 개요

○ 연구목적

- 유전체 기능정보를 활용한 식물생장촉진 미생물제 기술 고도화
- 비식량 바이오매스/사료작물 맞춤형 미생물비료제 개발
- 미생물비료의 현장 적용기술 개발 및 산업적 활용기반 구축
- 염류집적지에서의 기능성 미생물비료의 적용기술 개발 및 산업적 활용기반 구축

○ 연구의 필요성

- **바이오에너지용 바이오매스 확보를 위한 국내외 동향**

ㅇ 현재 전 세계적으로 석유에너지를 대체할 바이오에너지 개발 열풍이 불고 있으며, 미국, 유럽연합(EU), 브라질, 중국 등은 세제 혜택이나 보조금 지급 등을 통해 바이오에너지 개발에 적극으로 나서고 있다. 미국은 2030년까지 수송용 원료의 30%를 바이오에너지로 대체할 계획이다.

ㅇ 녹색성장위원회에서 2010년 2월 대통령께 보고한 저탄소녹색성장 국가전략에서 10대 정책방향의 하나로 '녹색국토의 조성'이 포함되었고 여기에 '자원순환형 지역개발 및 녹색거점 확대'를 위한 **'신재생 바이오에너지 생산단지 조성(새만금 지역 등)'**이 포함되었다.

ㅇ 우리나라는 2008년도 기준 약 427천 TOE의 바이오에너지를 보급하고 있으며, 이는 석유에너지 보급량의 약 0.5% 수준이다(신·재생에너지백서 2008).

ㅇ 정부는 2011년 총 1차 에너지 소비량 (2.667억 TOE/년)의 5%인 13,335천 TOE/년을 신재생에너지로 공급키로 하였고 그 중에서 바이오에너지는 1,053천 TOE의 공급을 목표로 하고 있으며 바이오매스 작물의 재배면적은 앞으로 크게 확대될 전망이다(신·재생에너지백서 2008).

ㅇ 2006년 경유에 0.5%의 바이오디젤유를 혼합한 BD0.5를 상용화했고, 2009년엔 바이오디젤 혼합율을 1.5%로 올렸으며 경유에는 바이오디젤 혼합을 의무화할 예정이다. 2012년까지 경유에 바이오디젤유 3%를 혼합하는 BD3을 목표로 하고 있다.

ㅇ 그러나 현재 바이오디젤 원료의 국내 자급능력이 낮아 많은 원료를 수입에 의존하고 있어 국내에서의 원료 생산 확대를 위한 기술개발이 시급하다.

- **국내 유망 바이오매스 작물 및 관련 현황**

○ 여러 연구팀들의 연구 및 분석에 의해 국내 자연환경 등 여러 요인을 고려하여 가장 유망한 바이오매스 작물로 대두되고 있는 것은 바이오디젤 원료인 유채와 비식량 바이오매스 작물인 갈대, 억새 등 이다.

○ 바이오매스 작물로는 생육기간이 짧고 단위면적당 바이오매스(cellulose) 생산량이 많고 비료/에너지/노동력의 투입이 적어야하고, 식량작물을 생산해야할 농지와 경쟁관계가 아니어야 한다.

○ 이러한 조건하에 비경작지 및 간척지에서 생산 가능하며 바이오매스 생산량이 최대인 갈대(*Phragmites communis*)와 바이오매스 생산량이 높고 총 탄수화물의 함량이 높은 억새가 국내외 여러 전문가들에 의해 추천되어 이를 이용하기 위한 연구가 진행되고 있다. 바이오에너지용 억세인 *Miscanthus giganteus*의 경우는 성장기 후반에 크기가 4미터 정도이며, 약 40ton/ha의 수확량을 나타내고 있고, 에탄올 수율도 다른 셀룰로오스계 작물과 비교해볼 때 약 2배에서 4배 정도의 고효율을 보이고 있다(*J Plant Biotechnol.* 2009).

Table 1. Harvestable biomass and ethanol production in various sources of biomass

Biomass crop		Harvestable Biomass (tons/acre)	Ethanol Production (gallons/acre)
Corn	Grain	4.6	456
	Stover	3.0	300
	Total	7.6	756
Switchgrass		5.6	563
Miscanthus (억새)		14.1	1,410

(출처: *J Plant Biotechnol.* 36: 320-326 2009)

○ 바이오디젤 원료로서 상대적으로 많은 연구가 이루어진 유채의 경우 2009년 전북 부안군, 전남 보성군과 장흥군 그리고 제주특별자치도가 참여하여 1,500ha에서 유채를 시범 생산함으로써 연간 약 48억원(ha당 평균 320만원)의 농가소득을 달성할 수 있을 것으로 예측하였다. 또한 이 유채 시범재배 사업이 성공한다면 2012년까지 45,000ha까지 재배면적을 확대할 계획이다(농촌진흥청소식 252, 2009).

- **바이오매스 생산을 위한 미생물비료의 필요성**

○ 바이오매스 확보, 탄소배출권 확보 등을 위해 동일 작물의 대규모 재배 필요성이 증가되고 있으며 화학비료를 대체할 친환경 소재가 필요하다.

○ 식물체를 대량 확보하기 위해서는 필요 영양소를 공급해야 하는데 기능성 미생물

을 이용하여 화학비료 사용을 대체하거나 최소화 할 수 있다.

○ 2006년 수립한 정부의 친환경농업육성 5개년 계획에 맞춰 화학비료 사용량을 2010년까지 당초 기준량의 69% 수준으로 줄이는 정책 수립 및 원자재 가격 폭등으로 인한 화학비료의 가격 상승으로 화학비료의 사용량은 매년 줄어드는 추세이다.

○ 실제로 1990년 화학비료의 사용량은 482 kg/ha 에 달하였으나, 매년 감소하여 06'~07' 년도에는 299 kg/ha 수준으로 낮아졌으며, 계속 감소하는 추세이다(식량정책단 친환경농업팀 자료).

○ 이와 같은 화학비료·농약의 저감 정책에 따라 이를 대체할 친환경 미생물비료의 수요가 크게 증가하고 있으나, 제품개발 및 공급은 이에 부응하지 못하고 있다.

○ 특히 바이오매스 작물을 대상으로 한 미생물 비료 개발은 거의 이루어지지 않고 있다.

○ 2009년의 경우 유채의 시범생산을 위한 경작면적이 1,500 ha인데 일반적 방법에 의해 화학 비료 필요량을 산출하면 약 360 ton (N≒180 ton, P≒150 ton, K≒33 ton)이다. 시험재배 성공 시 재배면적을 30배까지 확대할 계획인바 비료도 이에 비례하여 증가될 것이고 금액으로 수십억원을 넘어설 것으로 추산된다. 화학비료 사용은 경제적 측면과 화학비료 생산에 따른 에너지 손실 측면에 있어 매우 불리하며, 환경오염 및 화학비료 사용에 따른 온난화가스 배출과 같은 문제를 야기하게 된다(농촌진흥청소식, 2009; 장영석, 2005; David et al., 2008).

○ 따라서 유채재배에 적합한 미생물 비료의 개발 시 비료비용 절감, 증수효과 및 농업환경보호 차원에서의 파급효과는 매우 클 것이다.

○ 갈대나 억새의 경우 강가 등 수변구역, 유휴지 및 간척지 등을 이용한 대규모 재배가 이루어져야 하는데 증수를 위해 화학비료를 사용하는 것은 비용문제나 환경문제 차원에서 바람직하지 않다. 따라서 미생물비료의 개발이 필요하고 세계적으로 개발 초기여서 경쟁력이 있다. 미생물비료에 의한 증수 효과는 필요 재배면적의 감소 및 생산비 절감과 직결되어있는 만큼 중요한 과제이다.

- **미생물비료의 유용성 및 개발가능성**

○ 본 연구팀이 연구해온 *Paenibacillus*균, *Methylobacterium*균 등 식물유용균의 경우 질소고정, 식물호르몬 생산, 인산가용화 효소 생산, 스트레스 저감기능 효소 생산 등 식물유용성이 크며 이를 활용할 가치가 크다.

○ *Paenibacillus*균의 경우 보리, 토마토, 오이, 옥수수 등 여러 작물의 생장을 촉진하는 효과가 탁월한 것으로 나타난다 (Ryu et al., 1997, 2005)

○ *Methylobacterium*이 생산하는 ACC deaminase 활성에 의해 유채의 에틸렌 발생 수준을 저하함으로써 유채의 바이오매스가 증가함을 확인하였다(Madhaiyan et al., 2005, 2007).

○ 사탕수수에 *Methylobacterium* 종자침윤, 근권접종, 엽면시비를 실시하여 바이오매스 증가와 함께 당분함유량의 증가를 확인하였다(Madhaiyan et al., 2005).

○ Desai 등(2007)은 *Bacillus* 종의 접종이 자트로파의 생장을 촉진한다는 결과 보고가 있었으며, *Acetobacter* 와 *Herbaspirillum*은 사탕수수, 수수, 옥수수와 *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella, Pseudomonas*는 벼와 옥수수와 같은 바이오연료 작물들에 군집하여 생장을 촉진하는 결과를 확인하였다(Balachandar et al., 2007; Boddey et al., 2000).

○ 이외 미생물제의 사용은 바이오연료 작물인 유채, 콩과식물, 사탕수수, 옥수수, 자트로파 등의 바이오매스를 증가시킨다는 결과들이 다수 보고되었다.

○ 본 연구팀이 확보하고 있는 *Paenibacillus*균, *Methylobacterium*균 및 근연균의 유전체 정보를 활용함으로써 조기에 바이오매스작물에 유용한 미생물비료를 개발 할 가능성이 크다.

- **유전체정보 이용 고효능 미생물제 개발 필요**

○ 기 축적된 유전체정보 등 생명자원의 농업적 활용도 제고가 필요하다.

○ 미생물제의 효능과 적용 효율을 한 차원 높이기 위해서는 유전체 정보를 이용한 맞춤기능 미생물 확보와 안정적 효과 재현 기술이 필요하다.

○ 일반적 연구절차 (균주 분리・수집, 유용기능 탐색, 활성 검정, 균주 특성 분석 및 배양기술 개발, 등)를 거쳐 목적하는 미생물제를 개발 하려면 최소 4-5년 소요된다.

○ 그러나 지난 수년간의 기초연구를 통해 균주에 대한 특성 및 식물에 대한 생장촉진기능 등 유용성을 확보하고, 나아가 유전체 해독 및 기능연구를 통해 식물에 유용한 유전자 규명 등 작용기작에 대한 많은 정보를 확보한 균주를 활용함으로써 개발 기간을 최소화 할 수 있다.

- **현장 맞춤형 미생물제 및 적용기술 개발**

○ 살아있는 미생물을 이용하므로 현장 환경과 대상작물에 잘 적응하는 맞춤형 제제라야 기대효과를 낼 수 있다.

○ *Paenibacillus*균, *Methylobacterium*균, *Bacillus*균 등 본 연구팀이 확보한 미생물들은 식물에 대한 유용성이 매우 큰 것으로 밝혀졌고 본 연구팀이 유전체 정보를 확보하여 경쟁력 있는 응용연구기반을 갖추었다.

○ *Paenibacillus*균의 경우 식물뿌리에서의 정착능이 우수하고 질소고정, 식물생장호르몬 생산, 인산가용화, 식물병원성 미생물 제어기능이 우수하여 작물을 잘 자라게 하고 보호하는 효과가 우수하다.

○ *Methylobacterium*은 식물의 줄기에서 분리한 균으로서 작물의 군집능, 질소고정능 및 다른 영양분 가용화능이 우수하며, 그로인해 다양한 작물에서의 직, 간접적 생장촉진 결과를 확인한 바 있다.

○ *Methylobacterium*의 식물 생장 조절물질 생산능을 측정한 결과 IAA와 cytokinies이 각각 2.33 g/t, 103.3 μg/t 으로 매우 높게 나타났으며, 실제 작물에 접종한 결과 작물의 생장촉진 물질(t-ZR, iPA, IAA) 생산의 유의성 있는 증가를 확인하였다.

○ *Methylobacterium*이 생산하는 대량의 ACC deaminase 활성으로 식물의 스트레스에 의한 에틸렌 발생 수준을 저감함으로서 건조지역, 염분집적지역, 중금속 토양과 같은 척박한 토양 환경에서도 식물의 생장을 촉진한다.

○ 미생물들의 특성을 고려하여 효과를 가장 잘 발휘할 수 있는 작물과 환경조건을 연계함으로써 맞춤형 미생물비료로 개발하여 활용도를 제고할 것이다.

○ 염류집적지인 새만금 간척지 토양에서의 미생물제 효과 검정 및 이용기술 개발이 필요하다.

○ 식물생장촉진 미생물을 이용한 화학비료 절감 효과와 바이오매스 생산기술 확립이 필요하다.

○ 연구의 범위

- 바이오매스/사료작물에 적합한 미생물비료제 개발

○ 기 확보균의 균주특성 활용 및 유전체정보기반 우수균주 추가 개발

- *P. polymyxa* E681균 및 근연균, *M. oryzae* CBMB20^{T}균 및 근연균 대상

○ 미생물 대량배양 기술 개발

- 배지 최적화, 포자형성율 제고, 파일롯 규모 배양을 통한 포자 대량생산기술 개발

○ 생장촉진/증수 기능 제고를 위한 기술개발

- 보리, 밀, 감자를 대상으로 생장촉진, 증수 등 작물 유용성 제고를 위한 활용기술 개발

- 맞춤형 미생물비료제 및 현장 적용기술 개발

○ 대상 작물로부터 식물생장촉진 미생물의 분리

○ 대상 작물 및 포장에 따른 미생물제 처리 방법 개발

○ 바이오매스 및 사료 작물을 대상으로 현장 적용시험

- 바이오매스용 대상 작물: 억새

- 사료용 대상 작물: 헤어리베치

○ 미생물제 효능평가 및 안정성 확보기술 개발

○ 대규모 지역 시용에 적합한 적용기술 개발

○ 제제화 기술 개발 (종자처리, 담체이용 투입, 엽면시비 등의 방법)

- 복합미생물제의 조건불리지역 활용기술 개발

○ 염분집적 토양에서의 미생물제 효과 검정 및 이용기술 개발

○ 새만금 간척지 개화지구 시험포장지에서 염류농도별 토양 채취 및 분석

○ 염류농도별 토양에서 작물의 발아율 측정

○ 비료시비 수준과 식물생장촉진 미생물의 접종에 따른 작물 생장촉진 효과 확인

제 2 장　국내외 기술개발 현황

○ 국외 친환경 미생물제 기술개발 현황

1980년대 초부터 BT미생물살충제를 필두로 농용미생물제 개발이 시작되어 여러 선진국에서 활발한 연구개발이 이루어지고 있다. 최근 단일 미생물제 품목으로 년 1억불 매출을 내는 제품 (세레나데, 미 Agra Quest)의 등장 등 성공적인 미생물 기반 제품이 개발되고 있으며 다양한 미생물이 이용되고 있다. 화학비료/화학농약의 감축계획에 따라 친환경 대체 농소재 개발이 활발히 추진되고 있다.

○ 국내 친환경 미생물제 기술개발 현황

국내에서도 1980년대 후반부터 생물농약 개발 연구가 시작되었고 최근 정부의 생물농약개발 및 사용 촉진 정책으로 더욱 활기를 띄고 있다. 현재 국내제조 미생물농약으로 살균제 16개와 살충제 13개 등 총 29개 품목이 등록되어 시판되고 있고 2008년 생산액 규모는 약 25억원으로 조사되었다. 미생물비료의 경우는 2009년 생산액 규모가 약 200억원으로 조사되었고 대부분 시설원예용으로 사용되고 있는 것으로 파악된다. 우리나라의 친환경 미생물제제 수요는 지난 5년간 약 600% 증가하여 2010년 현재 약 90,000 ton 에 달하는 것으로 조사되었다. 그러나 대규모로 재배되는 바이오매스작물을 대상으로 미생물비료를 개발하는 연구는 아직 초보적 단계로서 이에 대한 보고를 찾기 어려운 실정이다.

오늘날 급격한 인구증가로 인한 식량부족과 산업화, 도시화의 영향으로 인해 농경지가 다른 용도로 전용됨으로 따라 그 면적이 급속히 감소되고 있다. 간척지는 식량의 안정적 공급을 위한 농경지 면적을 확보하는데 있어 매우 중요한 자원으로 여겨지고 있다. 간척지를 농경지로 활용하기 위해서는 간척지 토양의 염분 제거 및 개량, 간척지에 적응하는 고부가가치 작물선발과 기존의 논 농업 중심의 식량작물 뿐만 아니라 사료작물, 에너지작물 등 다양한 밭작물을 도입, 활용하는 재배법의 개발이 필요하다. 새만금 간척지는 우리나라 서해안 중심부에 위치하고 있으며, 전체 토지이용 계획 중 농업용지로 사용할 토지의 면적이 전체의 30.3%로 가장 큰 비중을 차지하고 있다. 하지만 농업용지로 사용할 토지 중, 작물의 생육이 가능한 토지의 면적이 전체 면적의 17%로 토양환경이 매우 열악한 실정이다. 새만금 간척지 토양 중, 제염작업을 실시한 토양을 채취하여 분석한 결과, 토양의 염분함량을 절감시켰음에도 불구하고 일반 농경지 토양에 비해 토양 화학성과 물리성이 매우 열악하며, 유기물 함량 또한 매우 낮은 것으로 나타났다.

일부 간척지에 대한 연구는 낮은 염농도의 관개수를 이용해 염을 효율적으로 제거할 수 있어 토양 관리가 상대적으로 용이한 농경지 특히, 벼 재배를 위한 연구 위주로 이루어져 왔다. 그러나 이제는 농지중심에서 탈피하여 다목적 토지이용을 위한 연구가 진행되고 있다. Lee et al. (2000)은 대호간척 토양의 염농도별 밭작물의 염해에 대한 평가를 하였다. Bae et al. (2001)이 간척지의 생태적 환경복원을 위한 식물 선정에 관한 연구를 하였고, Lee et al. (2003)이 간척지에서 6가지 밭작물 생육에 대한 연구를 수행하였으며, Lee et al. (2007)이 간척지 토양개량을 위한 내염성 식물의 활용성을 평가하였다. 최근에는 경제성 있는 밭작물을 재배할 수 있는 토양 관리 방법에 대한 연구가 진행되고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

Ⅰ. 바이오매스/사료 작물에 적합한 미생물 비료제 개발

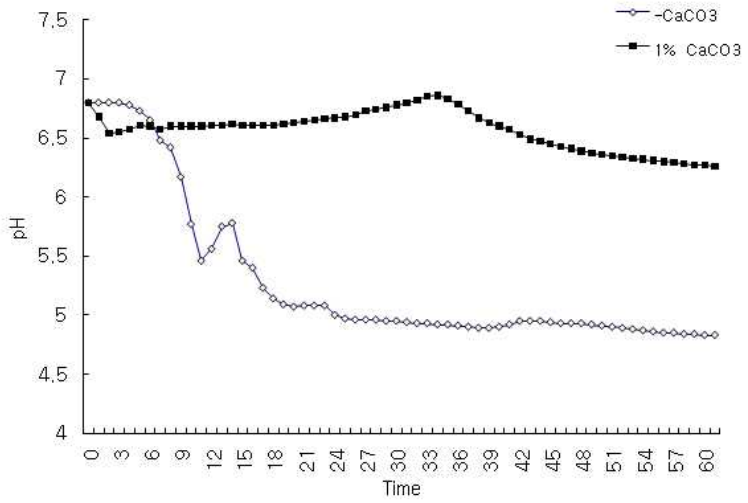
1. *Paenibacillus polymyxa* E681 균 포자 대량생산기술 개발

가. 배지조성 및 대량배양 조건 확립

Paenibacillus polymyxa E681의 배양은 tryptic soy broth(TSB)를 사용하여 30℃에서 20시간 전배양 후 사용하였다. 포자형성을 위한 배지로는 PMX배지 [Glucose (1%), Sodium glutamate (0.2%), Sodium citrate (0.5%), $(NH_4)_2SO_4$(0.2%), KH_2PO_4 (10mM), Yeast Extract (0.05%), $MgSO_4.7H_2O$ (0.2%), NaCl (0.1%), $CaCl_2$ (0.01%), Biotin (10㎍/L), Thiamine-HCl (0.1g/L), Pyridoxin-HCl (0.1g/L) and Tris-Cl (50mM, pH 7.5)], SYN 배지 [starch (0.5-4%), yeast extract (0.1%) and ammonium sulfate (0.5%), calcium carbonate (1%)], GYN 배지 [glucose (0.5-3%), yeast extract (0.1%) and ammonium sulfate (0.5%), calcium carbonate (1%)]등을 사용하여 포자 형성 조건을 탐색하였다. 포자형성을 위한 배양은 TSB에서 20시간 배양된 배양액 2%를 각 배지에 (1L 삼각 flask에 200ml씩) 접종하여 30℃ 200 rpm의 조건으로 배양하였다. 발효조에서의 포자 형성 탐색을 위한 배양은 5L ferment jar에 3L 배지를 사용하여 실시하였다. 포자 형성율 측정은 72시간 배양액을 80℃, 15분간 열처리하여 TSB 고체 배지에 평판 도말하여 2일 뒤 자라나온 콜로니의 개수를 열처리하지 않은 배양액으로부터 나온 콜로니 수의 비율로 계산하였다. Fig. 1과 같이 4%의 starch를 사용하여 SYN 배지로 포자 형성 조건을 탐색 하여 본 결과 탄산칼슘이 중요한 포자 형성의 인자임을 확인할 수 있었다. 탄산칼슘이 들어가지 않은 조건에서는 포자형성을 거의 하지 못한 반면 (~10^{-4}%)에 1%의 탄산칼슘이 들어간 배지에서는 80% 이상의 포자 형성율을 보였다. 이런 결과는 탄산칼슘의 pH 조절 효과인 것으로 사료되어 배양액의 pH를 시간별로 분석해보니 탄산칼슘이 들어가지 않은 배양액의 pH는 배양이 진행되는 동안 지속적으로 감소하는 반면 1% 탄산칼슘이 들어 간 배양액의 pH는 6.3 이상 유지됨을 확인 할 수 있었다 (Fig, 1A). E681균의 포자형성 배양에 pH의 영향을 확인하기 위해 pH를 보정해주는 버퍼를 사용하여 포자 형성율을 관찰하였다. 그 결과 Tris-HCl과 Phosphate 버퍼를 사용한 배양액에서 포자형성이 관찰되었고 다른 포자형성 배지로 사용한 PMX배지(Tric-Cl buffer 사용)에서도 포자형성율이 90% 이상 관찰되어지는 것으로 보아 E681균의 포자 형성 배양은 pH의 조절이 중요한 것으로 확인 되었다. 4% starch가 첨가된

SYN배지를 사용하여 포자형성 배양에 있어 배양액의 점성이 높아 배양액으로부터 원심분리 후 포자 회수가 어려워 점성을 최소화 하기 위해 SYN배지의 탄소원 과 질소원 조정을 탐색하였다. Fig. 2에서 보듯이 starch 1.5-2%의 사용으로 48시간 배양액의 포자형성과 점성의 최소화가 glucose나 다른 영양분 조합의 사용보다는 효과적이였다. 최종적으로 *P. polymyxa* E681의 포자형성 배지 조성은 starch 2%, yeast extract 0.1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.012%, 0.01mM $MnCl_2$, 0.001mM $FeSO_4$, 5mM KH_2PO_4 로 확정 하였다. 이와 같은 배지 조성을 사용하여 500L 발효조에 200L 배지를 사용하여 포자의 대량 생산을 실시하였다. 500 ml의 SYN 배지로 30도, 200rpm 조건으로 18시간 전배양하고 전배양액 5% 사용하여 7.5L를 배양하여 200L 발효 배양을 하였다. 이때 NaOH를 사용하여 발효 배양액의 pH를 6.3으로 유지시켰고 48시간 배양 후 1.1 x 10^9/ml의 포자가 형성된 배양액을 확보 하였다.

(A)



(B)

	SYN medium (4%starch, 0.1% yeast extract, 0.5% ammonium sulfate)				PMX medium
	0% $CaCO_3$	1% $CaCO_3$	Tris-Cl buffer (50mM, pH 6.8)	Phosphate buffer (25mM, pH 7.0)	
Total	$1.5X10^8$	$2.4X10^8$	$7.95X10^8$	$2.8X10^9$	$2.2X10^8$
Heat resistant	$1.3X10^4$	$1.94X10^8$	$2.6X10^8$	$1.23X10^9$	$2.18X10^8$
Sporulation %	~10^{-4} %	81%	33%	44%	99%

Fig. 1 pH control by calcium carbonate in the culture (A) and various buffer (pH control) for spore formation of *P. polymyxa* E681(B).

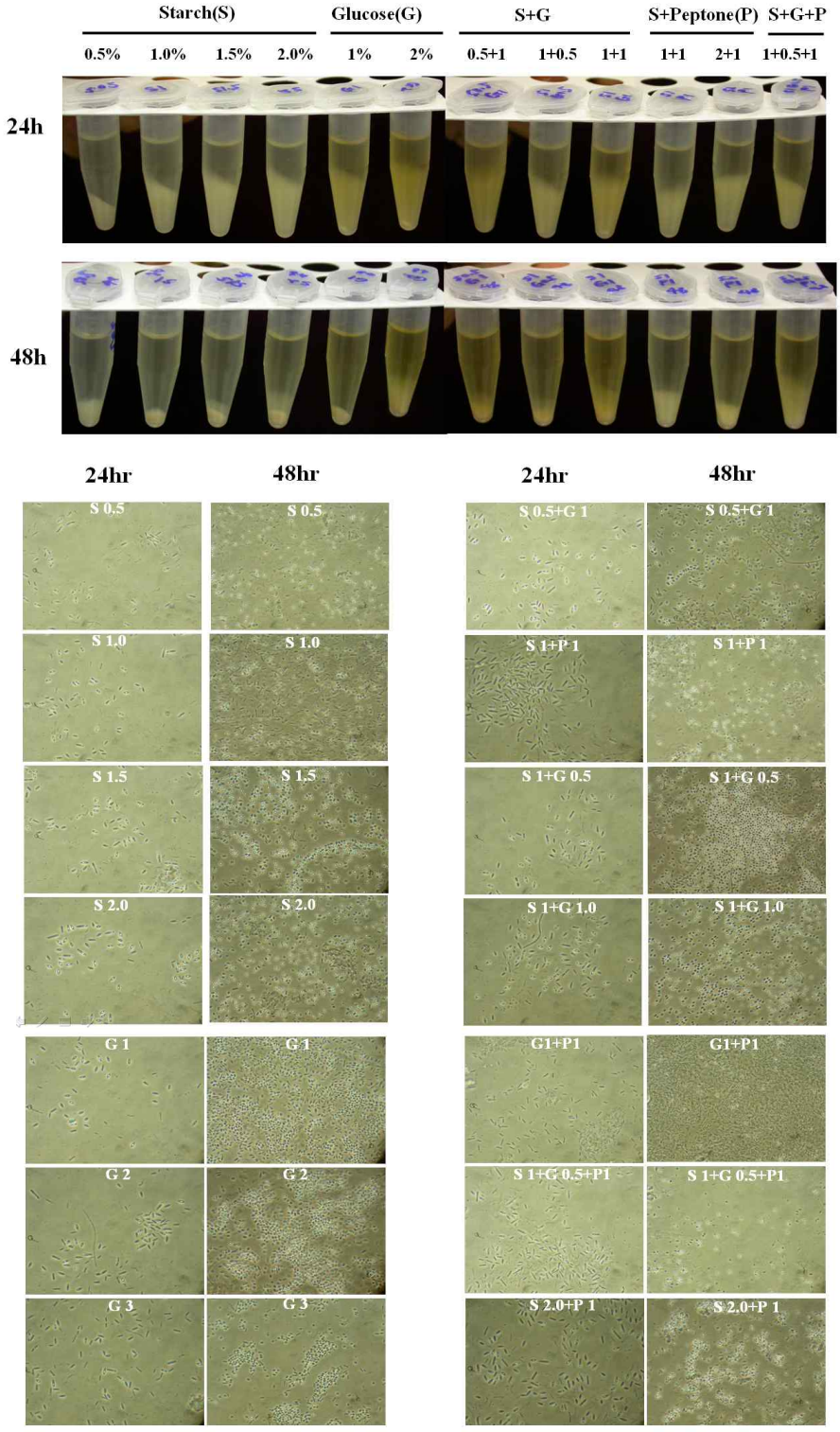


Fig. 2 Adjustment of carborn and nitrogen source for reduction of polymer production.

2. 사료작물에 대한 E681균의 생장촉진 및 증수효과 검정을 위한 포장시험

가. 일반 경작지에서의 보리 및 밀에 대한 생장촉진효과 검정

(1) 관주처리

충남 연기군 금남면 영대리 (밀과 보리 혼파) 및 장재리 (밀 단일 파종) 2개소에 *Paenibacillus polymyxa* 포자 (배양원액 농도 1.1 x 10^9/ml cfu/ml)를 고농도 (1/20 희석), 중간농도 (1/100 희석), 저농도 (1/500 희석)로 나누어 처리하였으며 대조구는 배양원액 희석에 이용 되었던 물을 사용하였다. 각 처리구는 2 × 3 m^2 의 크기로 하여 3반복으로 구성하였으며 각 처리구당 *P. polymyxa* E681 포자를 13.3L씩 관주하였다 (Fig 1, 2). 관주 처리한 후 3주 경과 뒤 밀 뿌리를 채취하여 *P. polymyxa*의 root colonization capacity를 조사하였다. 채집된 작물의 뿌리 절편에 1/10 Tryptic Soy broth (Difco)와 1.5 mm Glass Bead를 첨가하고 Bead beater로 10초간 강하게 진탕한 후 그 현탁액에 대해 희석평판 배양법을 이용하여 1/3 Tryptic Soy Agar (50μg/ml Rifampicin)에 48시간 배양후 나타난 *P. polymyxa* 콜로니를 개수하였다. 그 결과 1/500 희석액 관주시 밀 뿌리 1g 당 최대 4.0 log CFU/g의 밀도로 *P. polymyxa*가 정착하고 있음을 관찰하였다. 관주시 이보다 포자액의 농도가 높았던 1/20 희석액과 1/100 희석액의 경우 뿌리 정착 밀도는 좀 더 증가하여 각각 최대 5.3 및 5.1 log CFU/g로 나타났다 (Fig. 3). 따라서 본 시험 방법에 의해 관주 처리할 경우 10^4 ~ 10^5 CFU/g의 밀도로 *P. polymyxa*가 뿌리에 정착할 수 있었다. 한편 뿌리의 진균 밀도도 함께 조사한 결과 관주 처리구에서 *P. polymyxa*의 포자 농도가 높을수록 대조구 및 포자 농도가 낮은 처리구에 비해 진균의 밀도가 좀 더 낮은 결과를 보였다. 이는 관주한 *P. polymyxa*의 포자농도에 비례하여 뿌리에 정착하는 *P. polymyxa*의 밀도는 증가하는 반면 근권의 기타 진균류의 밀도는 상대적으로 감소함을 나타내어 *P. polymyxa*의 항균 효과 가능성도 기대할 수 있었다 (Fig. 4). 한편 최초 관주 처리 후 8주 경과 뒤 초장과 생체중 측정하였다. 그 결과 영대리와 장재리 시험 포장 모두 대조구에 비해 관주 처리구가 밀의 초장과 생체중에 증가를 나타내었다. 초장 평균값의 경우 영대리 포장은 대조구는 약 133 cm 이었지만 1/20 희석액 관주구에서 약 137 cm로 증가하였으며 장재리 포장도 대조구 138 cm로 보다 1/20 관주 처리구에서 142 cm로 초장의 증가를 나타내었다. 생체중의 경우도 영대리는 대조구 6.1 g에서 1/20 관주 처리구 6.6g으로, 장재리 역시 6.3g에서 6.9g으로 증가 하였다 (Fig. 5, 6). 보리의 경우에도 대조구는 그 초장이 46 cm 내외였으나 관주 처리의 *P. polymyxa* 포자 밀도가 높아 질수록 초장도 점자 증가하여 1/20 희석 관주 처리구의 경우 54 cm내외로 크게 증가하였다 (Fig. 7). 또한 보리의 생체중도 2.5 g

미만이었던 대조구에 비해 증가하여 1/100 희석 관주 처리구의 경우 약 3.0 g 내외로 증가하는 결과를 나타내었다 (Fig. 8).

종합하면 밀과 보리 재배지 포장에 *P. polymyxa* 포자 희석액을 관주 처리한 경우에 각 사료작물의 뿌리에 적절한 10^4 ~ 10^5 CFU/g의 농도로 잘 정착하며 식물 생장 촉진 효과로 확연한 초장 및 생체중의 증가를 관찰할 수 있었다.

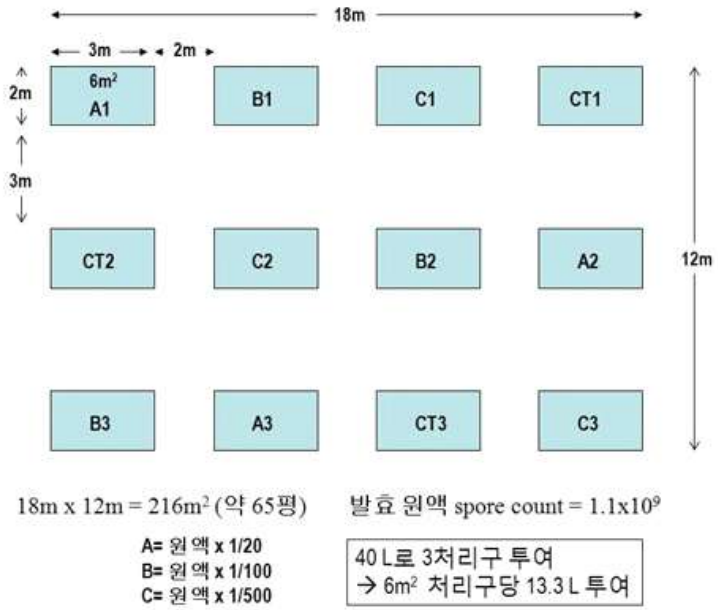


Fig. 1 충남 연기군 금남면 영대리 및 장재리 시험포장 설계

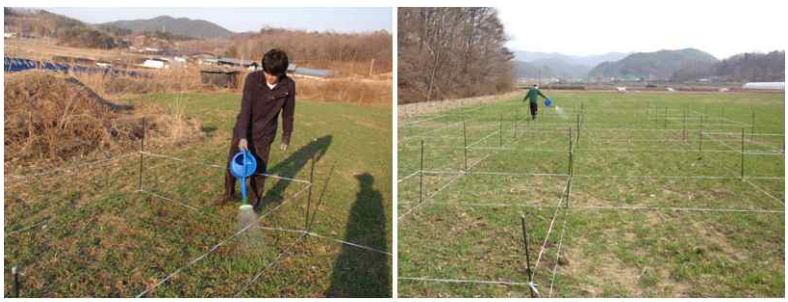


Fig 2. *P. polymyxa* 포자액 관주 처리

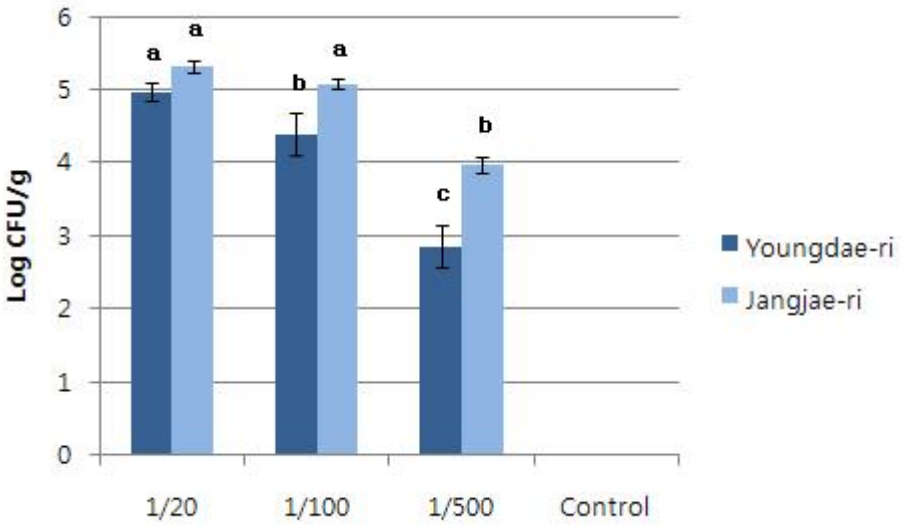


Fig. 3 관주 처리 후 3주 경과 뒤 밀에 대한 *Paenibacillus polymyxa*의 root colonization capacity.

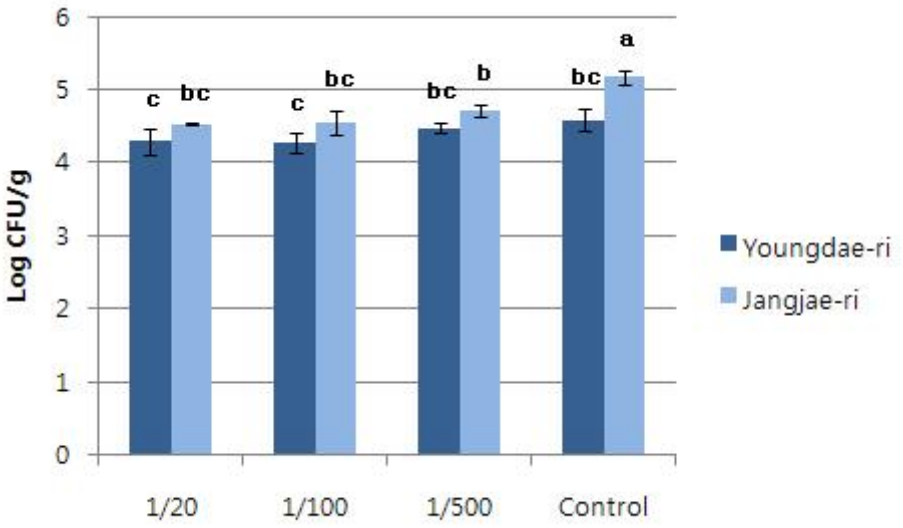


Fig. 4 관주 처리 후 3주 경과 뒤 밀 뿌리에 나타난 진균류의 Population density.

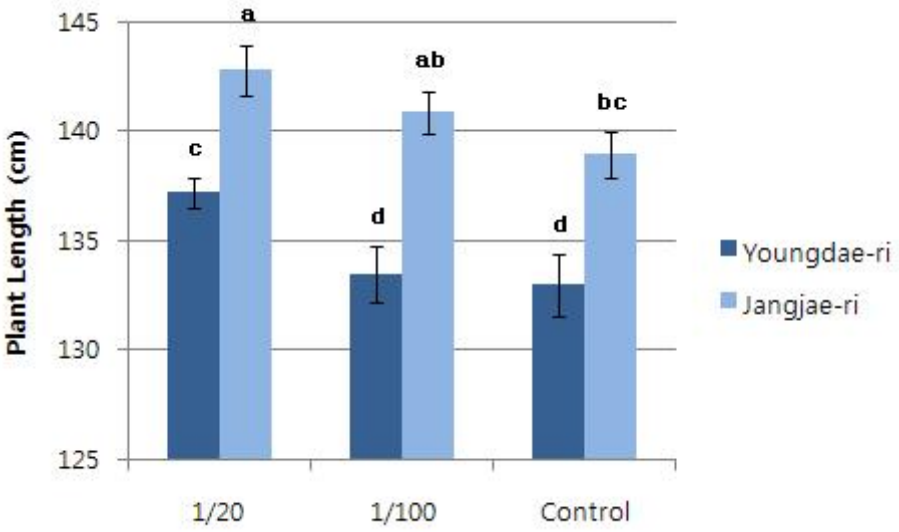


Fig. 5 밀의 초장에 대한 *Paenibacillus polymyxa*의 Plant growth promoting effect

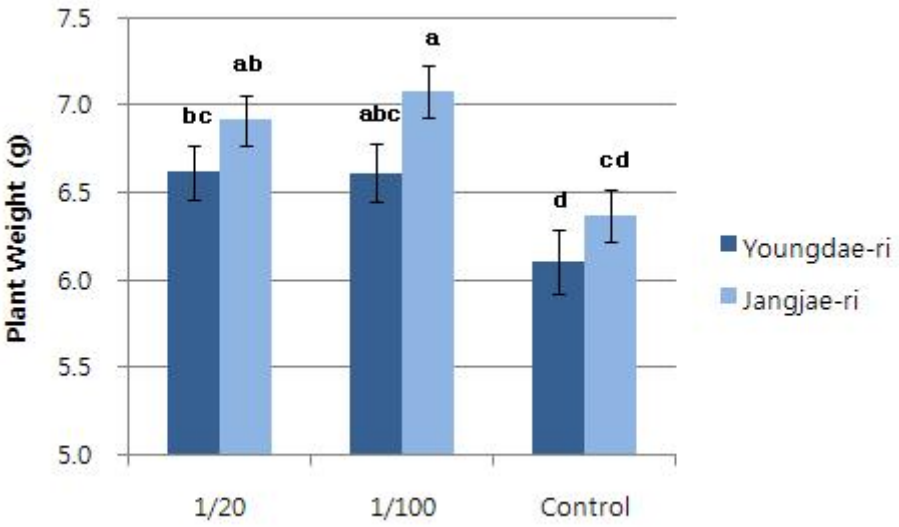


Fig. 6 밀의 생체중에 대한 *Paenibacillus polymyxa*의 Plant growth promoting effect

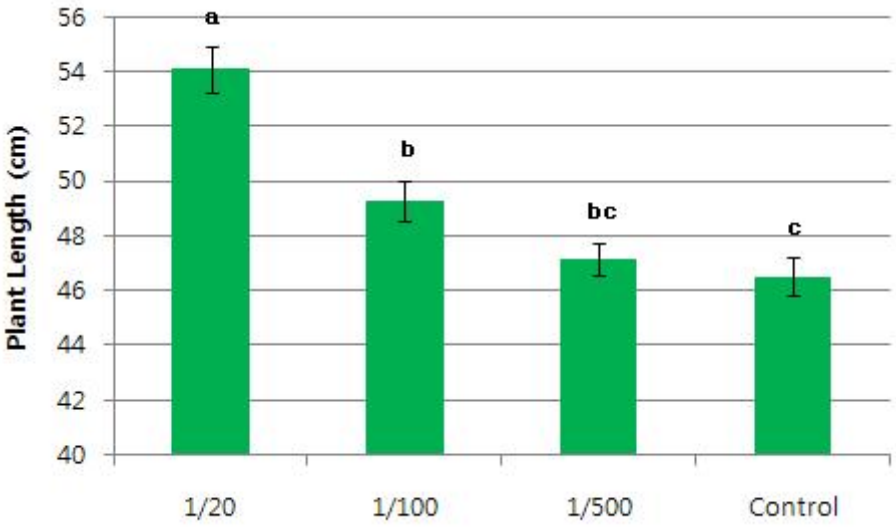


Fig. 7 보리의 초장에 대한 *Paenibacillus polymyxa*의 Plant growth promoting effect

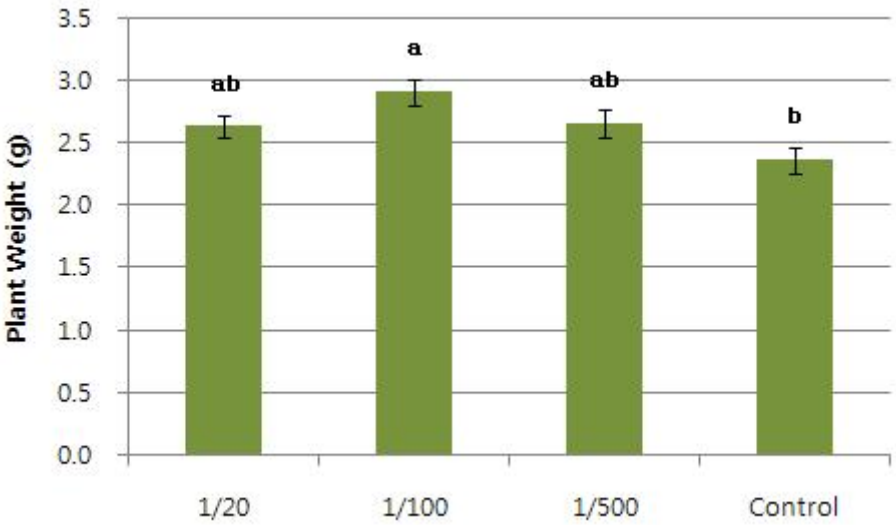


Fig. 8 보리의 생체중에 대한 *Paenibacillus polymyxa*의 Plant growth promoting effect

(2) 침지 처리

천안시 성환읍 축산과학원내 포장 및 충남 청양군에 Italian Ryeglass (IRG) 및 영양보리 종자에 대한 *P. polymyxa* 포자액의 침지 파종 실험을 다음과 같이 실시하였다. 위 포자 배양원액을 각각 0.2% CMC (Carboxymethyl cellulose sodium salt) 용액에 1/5, 1/10, 1/20, 1/50씩 희석한 후 한 처리당 Italian Ryeglass (IRG) 종자 24g을 250ml의 포자 희석액에 9시간 동안 실온에서 침지하였다. 또한 동일한 방법으로 보리 종자 90g을 포자 희석액 350ml에 침지하였다. 침지된 종자는 멸균모래에 혼합한 후 한 처리당 2 × 3 m^2 의 크기의 구획에 3반복씩 파종하였다 (Fig 9, Fig 10, Fig 11).

P. polymyxa 포자액에 침지 처리한 영양보리 및 Italian Ryeglass (IRG) 종자를 파종 6주후 그 뿌리를 채취하여 뿌리에 정착한 *P. polymyxa*의 밀도를 측정하였다. 그 결과 1/50 포자 희석액 침지종자 파종구로부터 보리는 평균 2.8 log CFU/g, IRG는 3.3 log CFU/g 의 밀도를 나타냈다. 한편 침지 포자 희석액의 농도가 높을수록 뿌리에 정착하는 *P. polymyxa*의 밀도도 점차 증가하여 천안시 성환읍 시험 포장의 경우 1/5 포자 희석액에 침지시 뿌리로 부터 보리는 4.2 log CFU/g, IRG는 4.1 log CFU/g의 정착 밀도를 나타냈다. 따라서 침지시 1/5 포자 희석액을 사용할 경우 최대 10^4 CFU/g의 밀도로 *P. polymyxa*가 보리 및 IRG의 뿌리에 정착이 가능하였다 (Fig. 12-A). 또한 충남 청양군 시험 포장도 1/10 ~ 1/5 포자 희석액에 침지후 파종시 10^4 CFU/g의 밀도로 *P. polymyxa*가 보리와 IRG의 뿌리에 잘 정착하였다 (Fig. 12-B).

한편 천안 성환 시험포장에 침지 파종 후 13주 경과한 뒤 각 처리구의 초장 및 처리구 전체 수확물의 생체중을 조사하고 각 처리구로부터 얻어진 수확물의 사료가치를 판별하기위해 ADF, NDF, CP 및 TDN (Total Digestible Nutrients)의 함량을 파악하였다. 그 결과 초장과 생체중에서 보리는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았으나 IGR의 경우 1/20 포자 희석액 침지 처리구에서 대조구보다 그 초장이 증가하였으며 이것은 관행적인 시비 처리구의 증가 정도와 유사할 정도였다. 또한 IRG의 생체중 역시 1/20 포자 희석액 침지 처리구가 가장 좋았으며 이는 시비 처리구 보다도 우수하였다 (Fig. 13).

이어서 Table 1과 같이 천안 성환 시험포장의 각 처리구에 대한 사료가치를 분석하고 그로부터 TDN (Total Digestible Nutrients) 조사하였다. 그 결과 보리의 경우 그 초장과 생체중에 있어서 대조구와 관행 시비구에 비해 큰 차이는 나타내지 않았으나 1/20 침지 처리구의 TDN 비율은 오히려 대조구 및 관행 시비구보다도 더 우수한 것으로 나타났다. IRG 역시 1/20 침지 처리구에서 TDN 비율의 우수성을 나타냈다 (Fig. 14).

한편 충남 청양군 시험 포장에 침지 처리하여 파종한 IRG의 경우에서도 15주 경과 후 1/20 침지 처리구에서 무처리 대조구 및 기타 처리구에 비해 그 초장과 건조중의 평균값이 가장 높

은 것으로 나타났다 (Fig. 15).

종합하면 *P. polymyxa* 포자 침지 처리후 파종시에도 관주 처리와 유사한 10^4 CFU/g의 밀도로 뿌리에 *P. polymyxa* 균주가 정착 가능하며 이는 관주 처리법보다 사용 포자 배양액의 양을 절감할 수 있는 효율적인 방법으로 사료된다. 또한 침지 처리했던 사료작물 중 IRG에서 초장과 생체중의 증가로 그 생장 촉진효과가 관찰되었으며 또한 보리 및 IRG에서 대조구 와 관행 시비구 보다도 뛰어난 TDN 비율을 보여 사료가치 증대에도 효과적일 것으로 기대된다.

Italian Ryeglass (IRG)

영양보리

Fig. 9 *P. polymyxa* 포자액에 Italian Ryeglass (IRG) 및 영양보리 종자 침지처리

11 m		9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	C
		5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	B
		2m												
	3m	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A

1) IRG-무처리, 2) IRG-농도4(1/50), 3) IRG-정상시비
4) IRG-농도1(1/5), 5) IRG-농도2(1/10), 6) IRG-농도3(1/20)

7) 영양보리-무처리, 8) 영양보리-농도4(1/50), 9) 영양보리-정상시비
10) 영양보리-농도1(1/5), 11) 영양보리-농도2(1/10), 12) 영양보리-농도3(1/20)

(3)과 (9) 외에는 무시비 조건

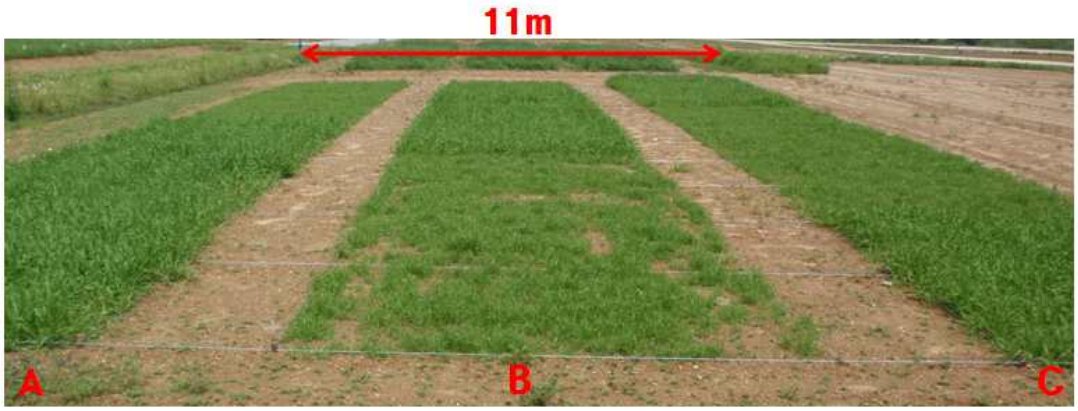
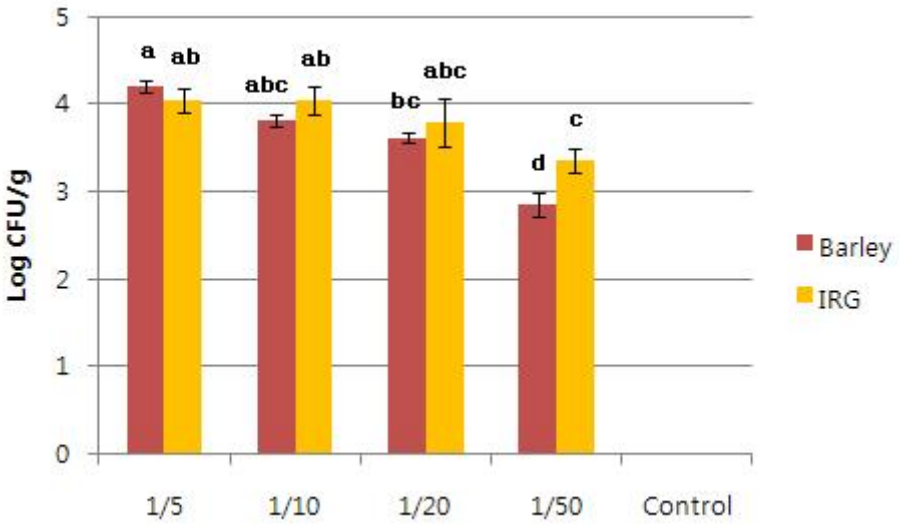


Fig. 10 천안시 성환읍 축산과학원내 시험 포장 설계 (파종일 2011년 4월 1일)

Fig. 11 충남 청양군 시험 포장 (파종일 2011년 4월 12일)

A



B

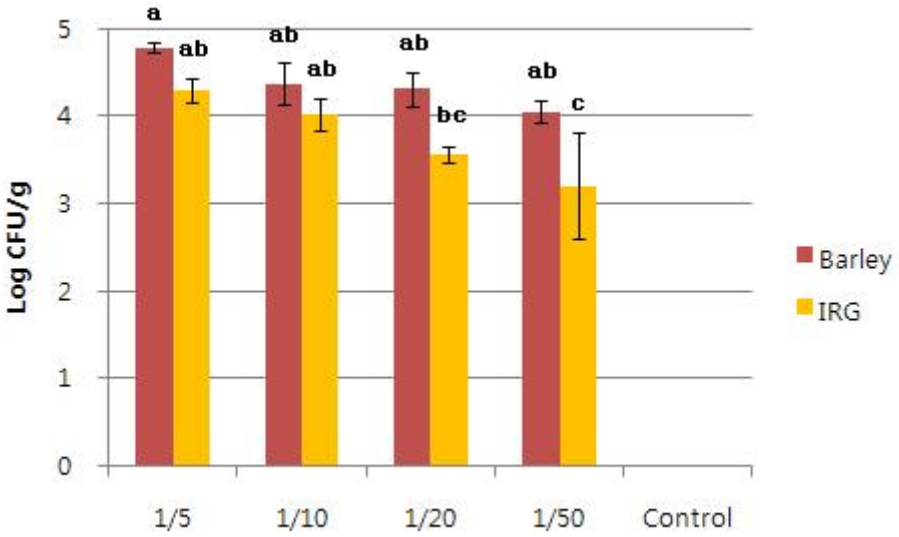
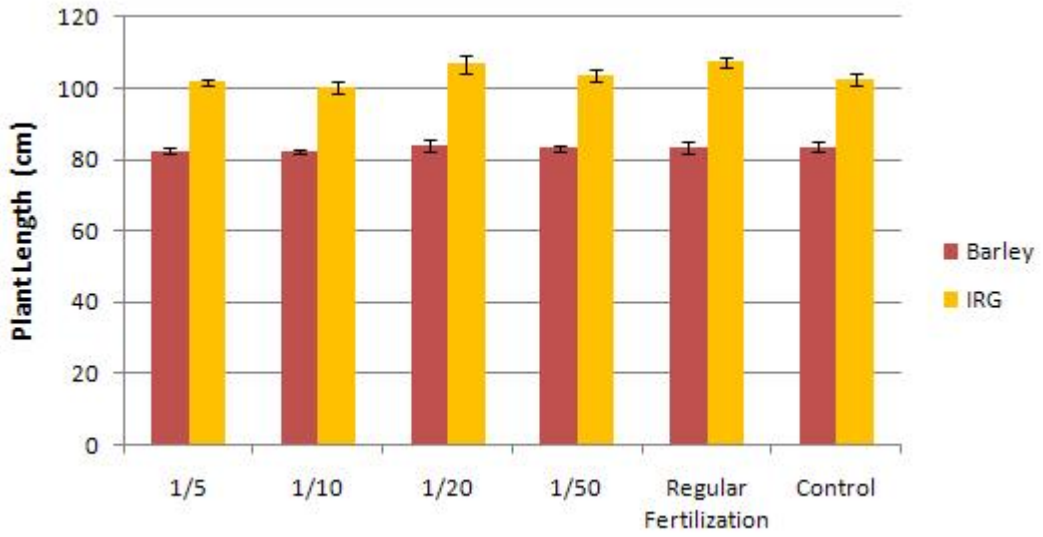


Fig. 12 침지 종자 파종 후 6주 경과 뒤 보리와 Italian ryegrass (IRG)에 대한 *Paenibacillus polymyxa*의 root colonization capacity. 천안시 성환읍 시험 포장 (A), 충남 청양군 시험 포장 (B)

A



B

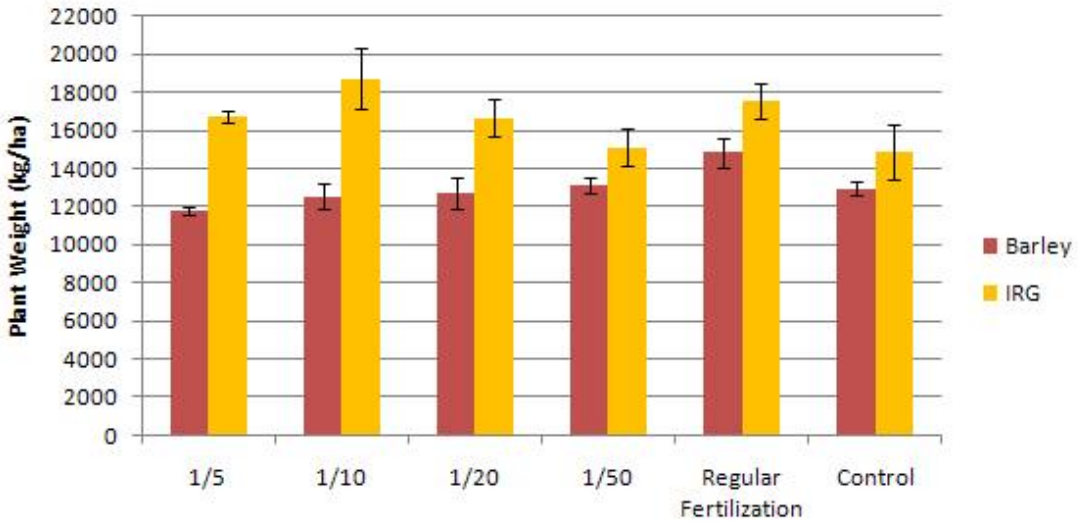


Fig. 13 천안시 성환읍 시험 포장에서 보리와 Italian ryegrass (IRG)의 초장 (A) 및 생체중 (B)에 대한 *Paenibacillus polymyxa* 처리구의 Plant growth promoting effect.

대상작물	처리구	분 석 항 목(%)			
		ADF	NDF	CP	소화율
IRG	1/5 희석	41.14	65.73	6.90	57.15
	1/10 희석	40.14	64.01	6.89	58.22
	1/20 희석	39.73	65.10	6.51	56.52
	1/50 희석	41.55	65.68	5.60	56.35
	정상시비	42.03	68.13	8.22	58.29
	무처리	40.70	64.71	5.46	63.20
영양보리	1/5 희석	29.71	48.68	6.12	60.18
	1/10 희석	30.09	48.24	6.30	60.78
	1/20 희석	26.96	46.15	6.97	63.78
	1/50 희석	31.16	51.81	6.60	67.66
	정상시비	27.75	46.38	7.84	69.60
	무처리	29.73	49.87	6.21	62.65

Table 1 성환 시험 포장의 각 처리구에 대한 사료가치 분석 결과

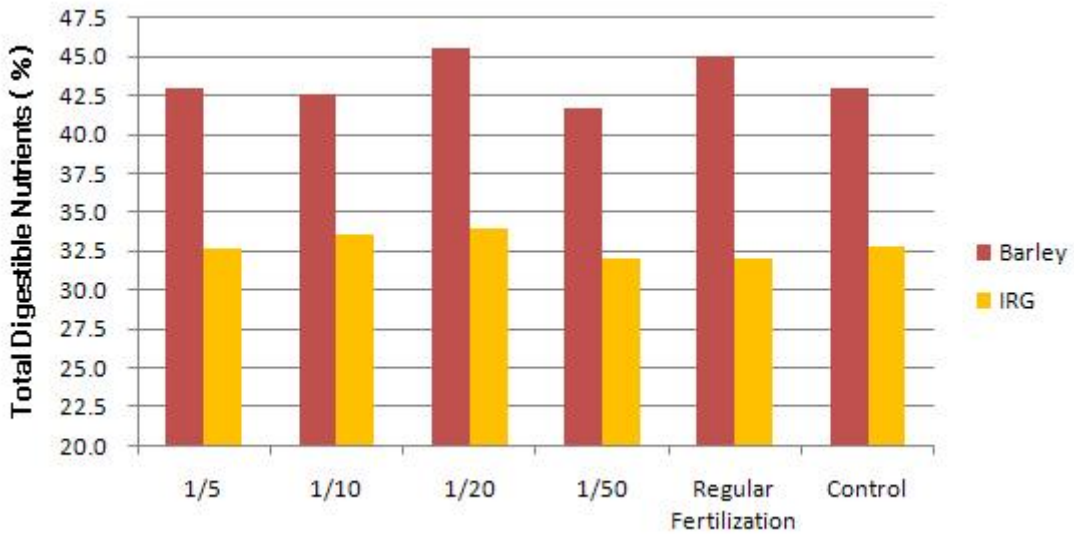


Fig. 14 성환 시험 포장 각 처리구의 TDN (Total Digestible Nutrients) 비교
TDN(%) = {[(87.46 + (0.2 x CP)] x 0.816} - 2.38) - (0.91 x ADF)

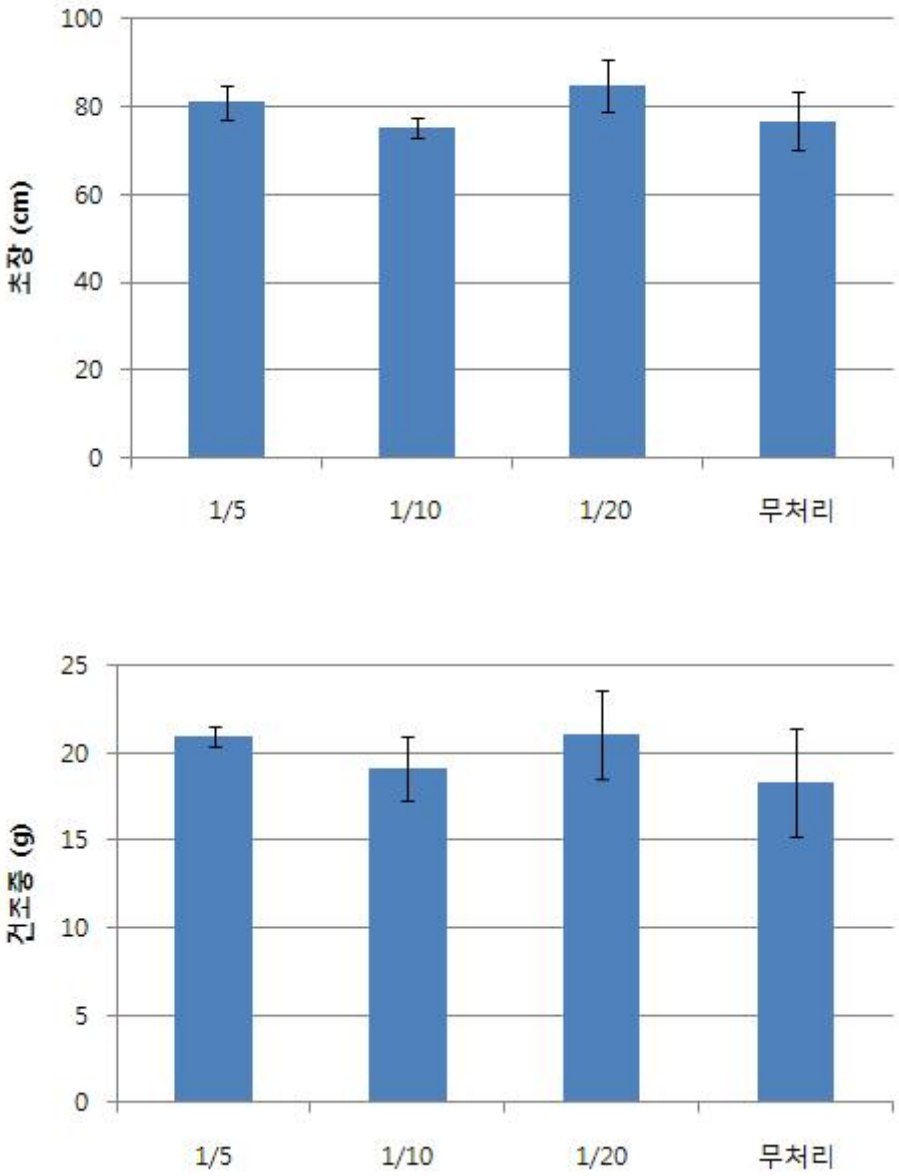


Fig. 15 충남 청양군 시험 포장의 IRG 침지처리구의 생장 촉진 효과

(3) 코팅 처리

코팅재료에 따라 종자에 대한 *P. polymyxa* 포자의 부착정도와 발아후 root colonization capacity 및 생장 촉진 효과를 조사하기 위해 코팅 물질로써 Clay, Activated (대정화학 2564-1405), Kaolin (대정화학 5041-1405), Talc (삼천퓨어케미칼 T0008) 그리고 접착제로써 물, CMC (Carboxymethyl cellulose sodium salt, 삼천 퓨어케미칼 C0292), Gum Arabic (Sigma G9752) 등 을 이용하였다. 코팅은 보리와 Sudangrass 종자를 대상으로 실시하였다. 코팅 방법은 우선 *P. polymyxa* 포자 배양 원액을 접착제 용액과 혼합하여 5배 희석한 후 이것과 코팅물질의 비율이 2:1가 되도록 현탁하여 종자와 잘 버무려 섞고 체로 걸로 물기를 제거한 후 음지에서 풍건하는 방식으로 실시하였다 (Fig. 16, 17). 코팅 처리한 종자의 표면에 부착한 포자의 수를 측정할 경우 코팅 종자에 Glass Bead와 함께 1/10 Tryptic Soy broth (Difco)를 가해 강하게 진탕해서 얻어진 현탁액을 80℃에서 20분간 처리하여 포자 발아를 유도한 후 1/3 Tryptic Soy Agar 배지(50μg/ml Rifampicin)에 희석평판 배양을 실시하였다.

P. polymyxa 포자의 보리 종자에 대한 부착정도를 조사한 결과 코팅물질 없이 침지만 한 경우보다 코팅물질을 같이 사용해 코팅하면 종자 1g당 10^8 CFU/g 이상의 *P. polymyxa* 포자가 부착 가능하였다. 이때 침지시 그 침지 시간을 더 길게 하거나 접착제의 농도를 높여도 코팅의 효과에는 미치지 못했다. 따라서 코팅처리가 침지처리보다 종자에 부착하는 *P. polymyxa* 포자 밀도를 최대화할 수 있는 좋은 방법으로 사료된다. 또한 코팅물질과 접착제의 종류에 따라 종자에 부착하는 *P. polymyxa* 포자 밀도에 큰 차이는 없었으나 그 중 Kaolin과 0.2% CMC용액을 사용했을 때 보다 우수한 것으로 나타났다 (Fig. 18).

한편 코팅된 보리와 Sudangrass를 직경 12cm 포트에 파종 후 2주 경과 뒤 그 뿌리로부터 *P. polymyxa* 정착 밀도를 조사하였다. 그 결과 보리는 최대 5.4 logCFU/g 나타냈으며 Sudangrass는 최대 4.8 logCFU/g로 나타났다. 반면 침지만 하였을 경우 보리는 최대 4.9 logCFU/g, Sudangrass는 4.0 logCFU/g로 나타나 종자 코팅시 *P. polymyxa*의 뿌리 정착 밀도도 종자 침지만 하였을 경우 보다 우수하였다 (Fig. 19).

P. polymyxa 포자와 더불어 Kaolin 코팅 또는 침지된 Sudangrass 종자를 포트에서 발아 시킨 후 2주 경과 뒤 초장과 생체중을 측정하여 침지 처리와 코팅 처리간의 생장 촉진 효과에 차이가 있는지 조사하였다. 그 결과 침지와 코팅 처리 모두 대조구에 비해 초장과 생체중의 증가를 보였으며 코팅 처리시 침지 처리에 비해 그 초장과 생체중의 증가가 더 우수한 것으라 나타났다. 따라서 침지처리에 비해 코팅처리가 작물 생장 촉진 효과를 더 증진할 것으로 사료된다 (Fig. 20)

한편 실제 포장에 대한 코팅 보리의 적용 실험을 위해 10월 중순과 말에 전북 부안군 계화면

및 충남 연기군 금남면 시험 포장에 *P. polymyxa* 포자를 지닌 Kaolin 코팅 처리 보리를 각각 약 5 kg씩 파종하였다 (Fig 21). 그 결과 야외 포장 조건에서도 1주 및 5주 경과 뒤 각각 4.6 그리고 4.3 logCFU/g의 밀도로 *P. polymyxa*가 뿌리에 잘 정착하고 있음을 관찰하였다 (Fig 22). 또한 5주 경과 뒤 초장을 측정한 결과 무처리 종자 파종구의 경우 평균 22 cm 내외 이었던 것에 반해 코팅 종자 파종구는 평균 26 cm로 증가하여 생장 촉진 효과를 기대할 수 있었다 (Fig. 23). 현재 코팅 보리를 파종한 두 시험 포장은 계속 생육 중에 있으며 봄 수확기에 이르면 생장 촉진 및 증수 효과를 좀 더 확연히 조사할 수 있을 것이다 (Fig. 24).

종합하면 10^8 cfu/g의 농도로 *P. polymyxa* 포자를 종자 코팅 하였을 때 관주 및 침지 방법에 비하여 root colonization capacity가 증대되었으며 식물 생장 촉진 효과도 보다 우수하였다. 한편 동일 면적의 파종지에 시용시 필요한 포자 배양액의 양이 관주처리 보다 적게 소요되고 저렴한 코팅물질을 사용하기 때문에 비용대비 효율이 가장 뛰어났다. 또한 코팅 방법이 복잡하지 않고 손쉬우며 코팅 직후 바로 파종하지 않고 일시적인 보관도 용이하여 관주나 침지 방법보다 실용적이었다.

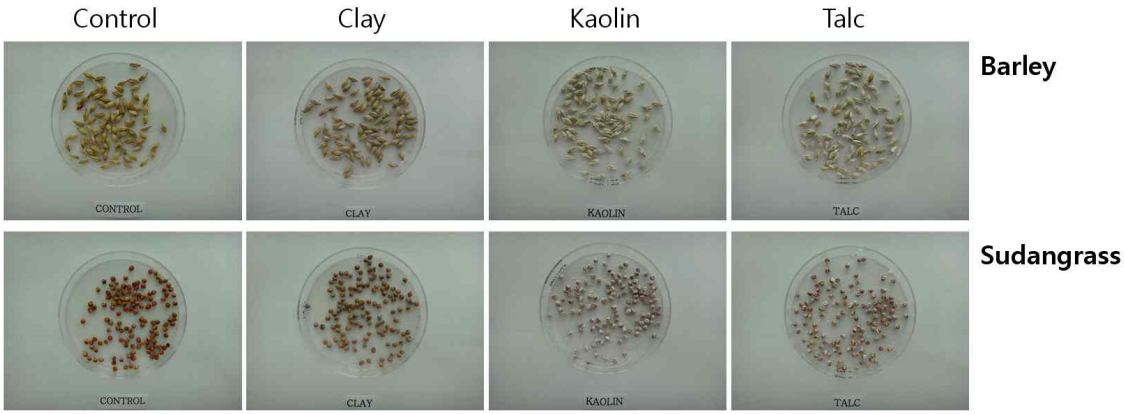


Fig. 16 다양한 종자 코팅 물질

Fig. 17 Kaolin과 *Paenibacillus polymyxa* spores를 이용한 보리 종자의 코팅

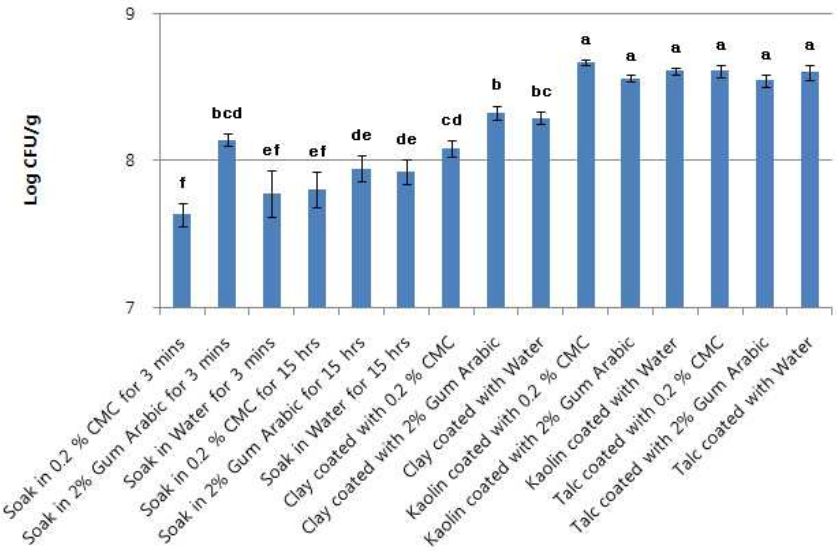


Fig. 18 종자 코팅 또는 침지 방법에 따른 *Paenibacillus polymyxa* 포자의 종자 표면 부착 밀도 비교.

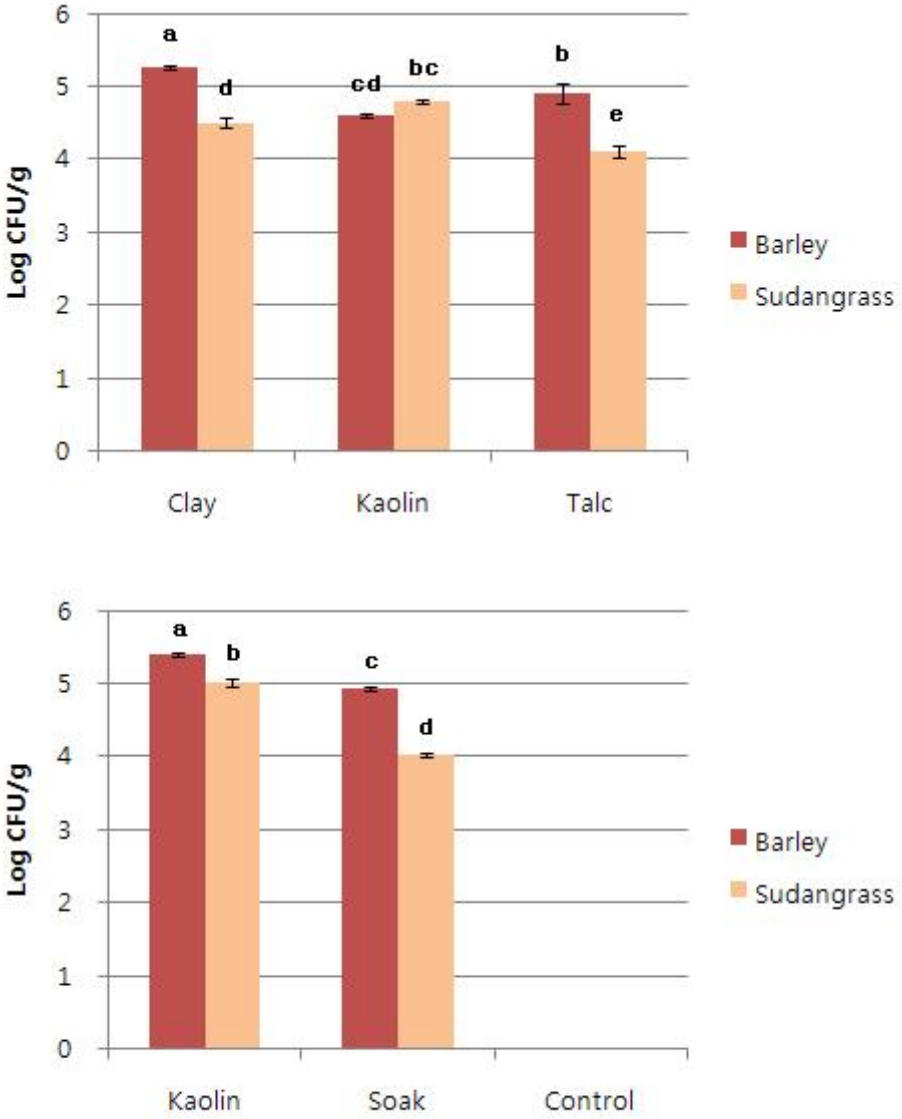
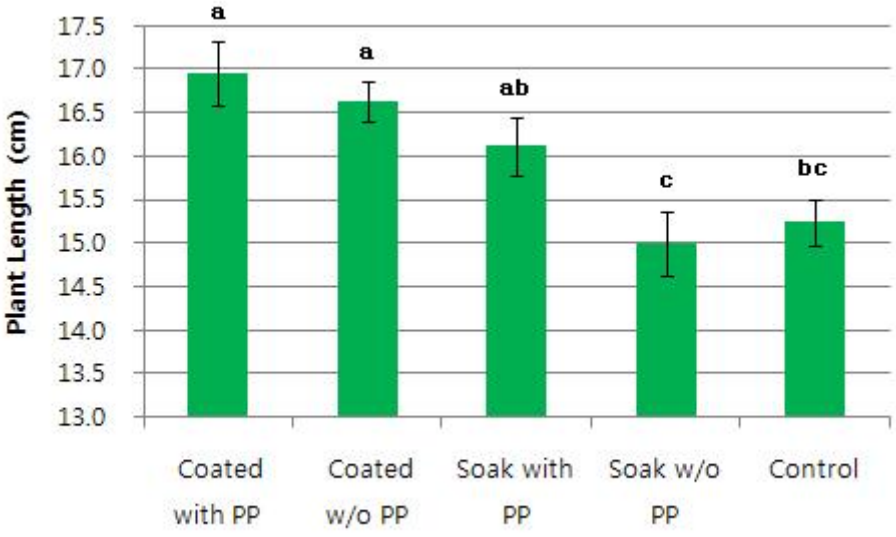


Fig. 19 종자 코팅 또는 침지에 따른 *Paenibacillus polymyxa* 포자의 root colonization capacity 비교

A



B

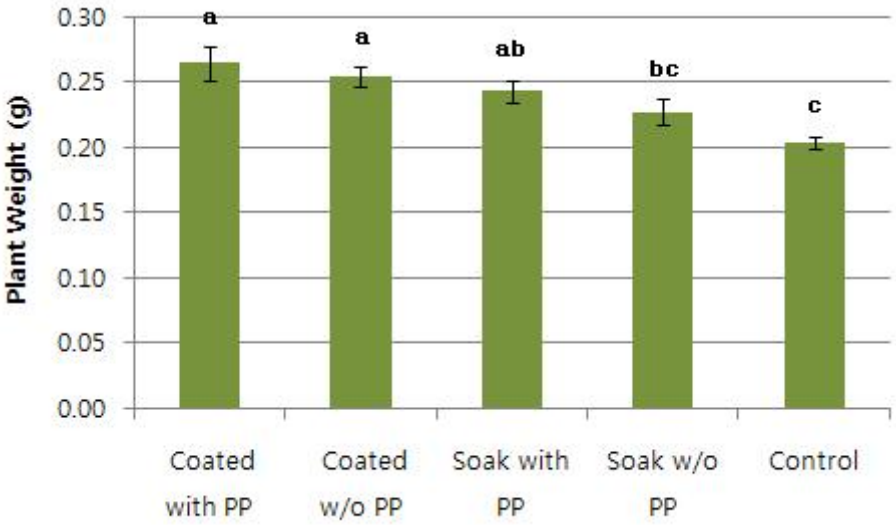


Fig. 20 Sudangrass 파종 2주 후 종자 코팅 또는 침지 방법에 따라 초장 (A) 및 생체중 (B)에 대한 *Paenibacillus polymyxa*의 Plant growth promoting effect 비교.

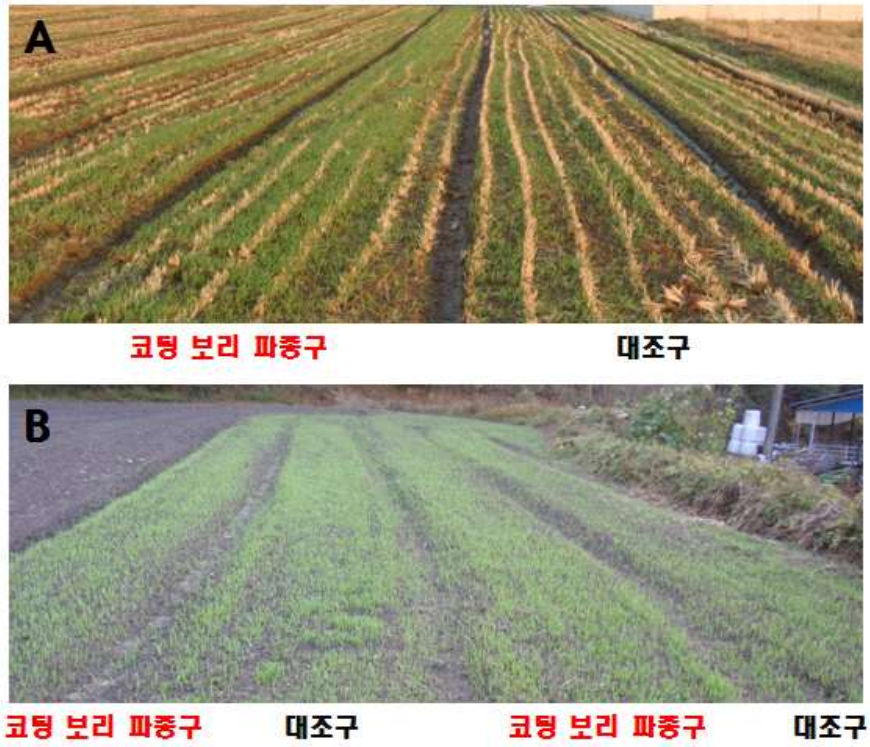


Fig. 21 전북 부안군 계화면 (A, 파종일 2011년 10월 28일) 및 충남 연기군 금남면 (B, 파종일 2011년 10월 11일) 시험 포장

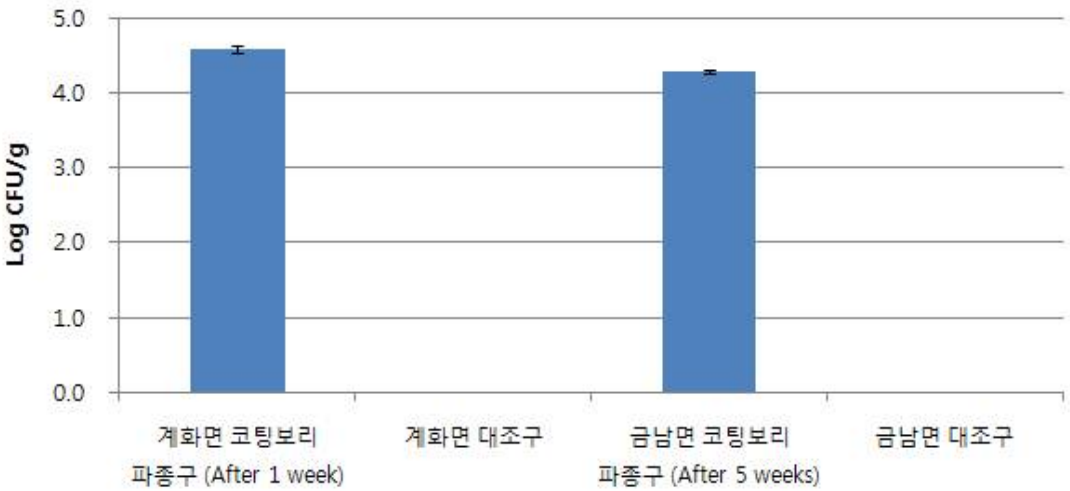


Fig. 22 전북 부안군 계화면 및 충남 연기군 금남면 포장에 코팅 보리 파종 후 *Paenibacillus polymyxa* 균주의 Root colonizing capacity 측정 결과

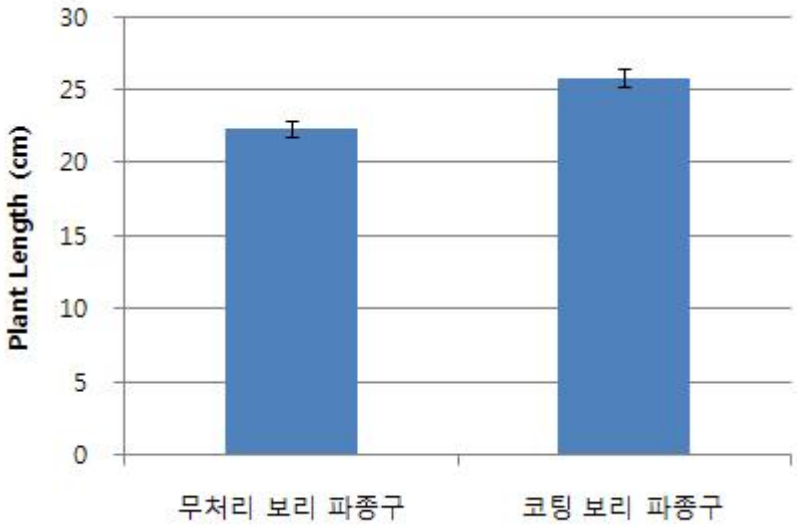


Fig. 23 충남 연기군 금남면 장재리 포장에 코팅 보리 파종 5주 후 초장 측정 결과

A

B

Fig. 24 전북 부안군 계화면 시험 포장에 코팅 보리 파종 7주 경과 후 (A), 충남 금남면 장재리 코팅 보리 파종 11주 경과 후 (B)

겨울을 나고 4월 초 금남면 장재리 파종한 보리 뿌리를 3지점에서 채집하여 패니바실러스균의 정착 밀도를 조사한 결과 3지점 평균 $3.9x10^4$ CFU/g root로 여전히 높게 나타났다(Fig. 26).

Fig. 25 충남 연기군 금남면 장재리 포장에 코팅 보리 파종 6개월 후(2012. 4. 9) 생장모습

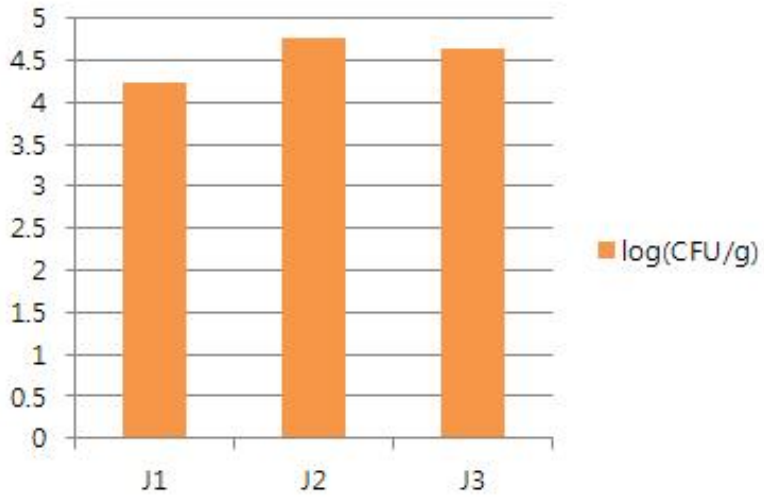


Fig. 26 충남 연기군 금남면 포장에 코팅 보리 파종 6개월 후(2012. 4. 9) *Paenibacillus polymyxa* 균주의 뿌리 정착력 측정 결과

파종 7개월 11일 후 (2012. 5. 22) 금남면 장재리 포장의 보리를 Fig. 27에 보이는 바와 같이 처리구별로 6지점에서 일정 면적을 수확하여 지상부 무게와 초장을 비교한 결과 처리구 보리가 무처리구에 비해 각각 4.76% 및 6.80% 증가된 것으로 나타났다.

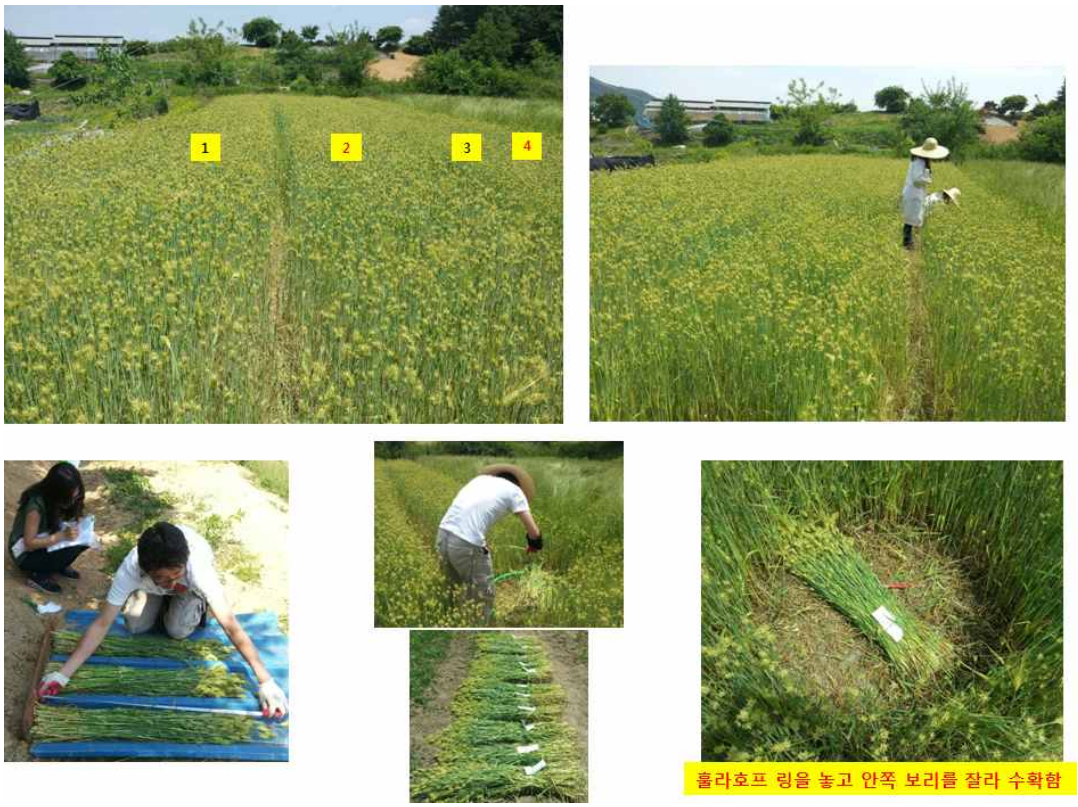


Fig. 27 충남 연기군 금남면 장재리 포장에 코팅 보리 파종 7개월 11일 후(2012. 5. 22) 수확하는 모습

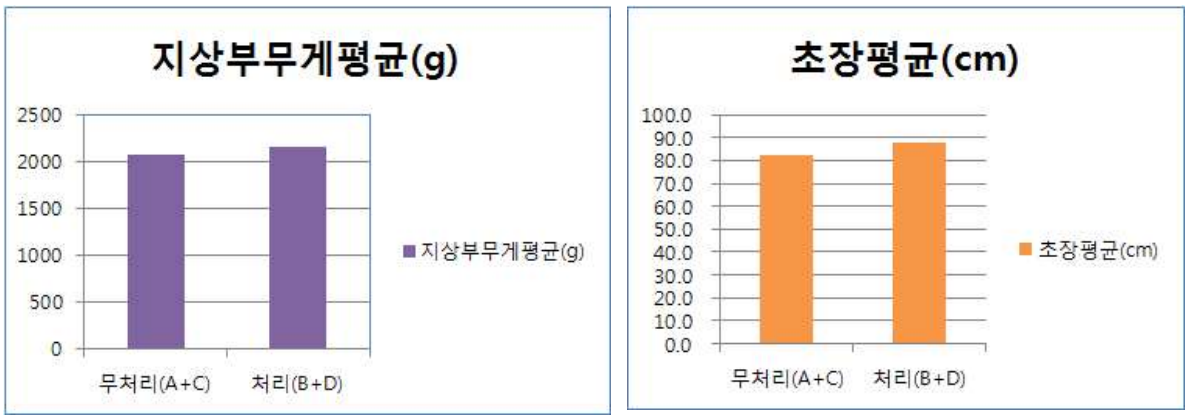


Fig. 28 충남 연기군 금남면 장재리 포장에 코팅 보리 파종 7개월 11일 후 지상부 무게 및 초장 측정 결과

나. 간척지 염분토양에서의 효과검정 시험

보리에 Kaolin과 *P. polymyxa* 포자로 코팅한 것을 전북 부안군 계화면 간척지 시험 포장에 한 처리구 당 6g의 종자로 6반복 파종 하였다. 계화면 간척지 시험포장은 저염 함유 토양으로서 작물이 생육하기에 척박한 특성을 지녀 시비 처리구 (요소 91g : 용성인비 360g : 염화가리 120 g)와 무시비 처리구로 나누어 실험하였다 (Fig. 29). 파종 3주후 보리 뿌리에 정착한 *P. polymyxa*의 밀도는 시비 처리구가 4.6 logCFU/g, 무시비 처리구가 4.7 logCFU/g로 큰 차이가 없었다 (Fig. 30). 또한 5주 이후에도 시비 처리구의 밀도는 4.7 logCFU/g로 유지되어 *P. polymyxa*가 보리 뿌리에 잘 정착함을 알 수 있었다.

한편 3주 경과 뒤 초장 측정 결과 무시비 처리구는 시비 처리구에 비해 생장이 매우 빈약하였으며 코팅 보리 처리구와 대조구 간에 큰 차이를 발견할 수 없었다. 그러나 시비 처리구에서 대조구는 초장이 평균 약 10 cm 내외였으나 코팅보리 파종구는 초장이 평균 약 11 cm 이상으로 대조구에 비해 생장 촉진 효과를 나타내고 있었다 (Fig. 31). 위 처리구들은 겨울을 지나 (Fig. 32) 수확기에 이르면 *P. polymyxa*에 의한 생장 촉진 효과를 좀 더 분명하게 조사할 수 있을 것이다.

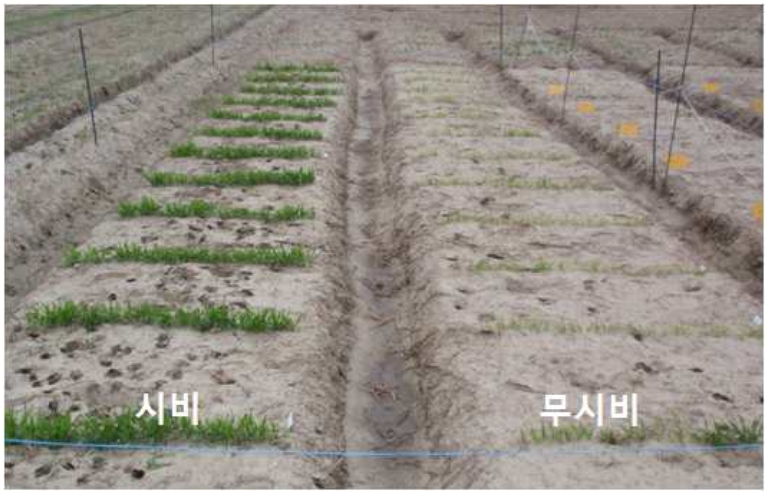


Fig. 29 전북 부안군 계화면 간척지 시험 포장 (파종일 2011년 10월 6일)

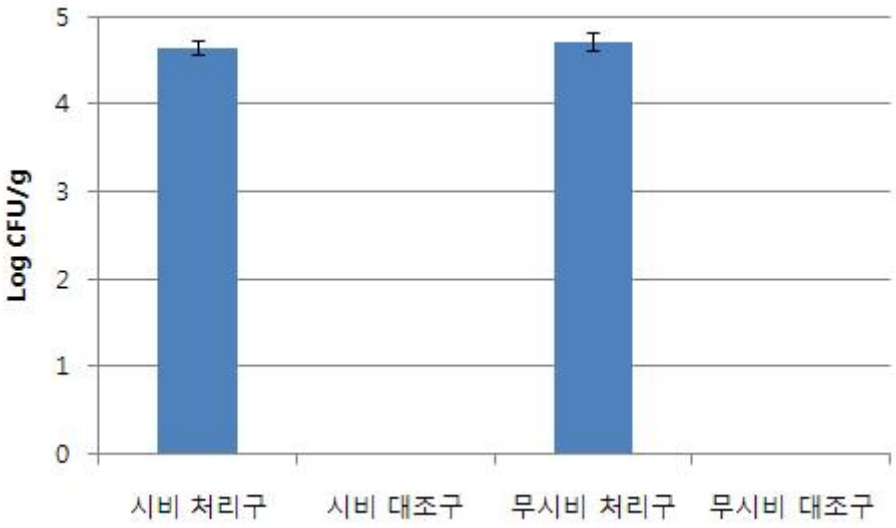


Fig. 30 전북 부안군 계화면 간척지 포장에 코팅 보리 파종 3주 후 *Paenibacillus polymyxa* 균주의 Root colonizing capacity 조사 결과

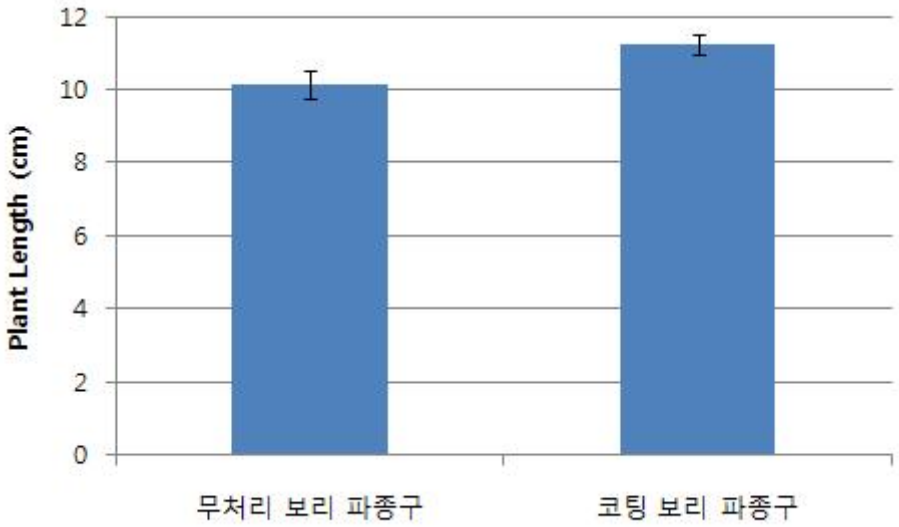


Fig. 31 전북 부안군 계화면 간척지 포장에 코팅 보리 파종 3주 후 초장 측정 결과

Fig. 32 전북 부안군 계화면 간척지 포장 코팅 보리 파종 10주 경과 후

겨울을 나고 4월 27일 부안군 계화면 간척지 포장에 파종한 보리 뿌리를 무시비구 및 시비구 각각 3지점에서 채집하여 패니바실러스균의 정착 밀도를 조사한 결과 각각 평균 $1.9x10^4$ 및 $8.6x10^4$ CFU/g root로 여전히 높게 나타났다(Fig. 34).

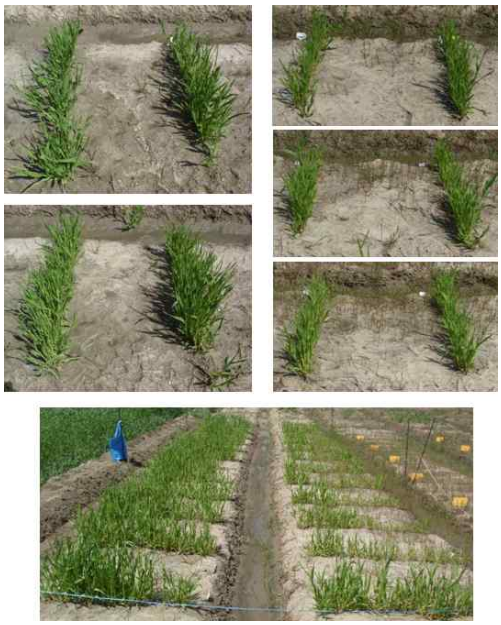


Fig. 33 전북 부안군 계화면 간척지 포장 코팅 보리 파종 6개월 20일 경과 후 보리 생장모습

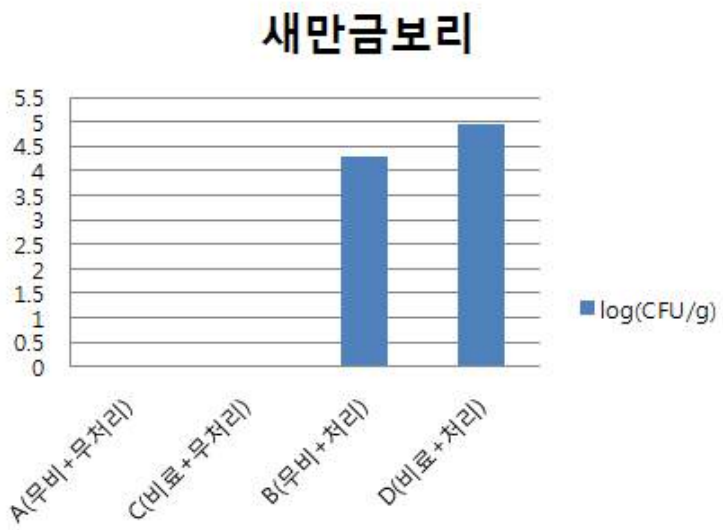


Fig. 34 전북 부안군 계화면 간척지 포장 코팅 보리 파종 6개월 20일 경과 후 패니바실러스균의 보리뿌리 정착력

3. 감자에 대한 E681균의 생장촉진 및 증수효과 검정을 위한 온실 및 포장시험

가. E681균 및 대사산물의 인공씨감자에 대한 생장촉진 및 증수효과 검정

인공씨감자를 이용하여 감자를 생산함에 있어서 초기 생장이 감자 생산성에 중요한 요인이 될 수 있다. 인공씨감자를 포트에 파종하여 종서를 생산하는 시스템을 구축할 경우에 대비하여 생산성을 향상시키는 방법을 모색하고자 본 연구팀이 확보하고 있는 식물유용세균 *Paenibacillus polymyxa* 균과 이 균에서 분리된 식물유용 휘발성 대사산물 4종(선행연구에서 확보)을 대상으로 효과를 검정하기 위한 시험을 수행하였다.

(1) 포트를 이용한 생장촉진효과 검정 (식물배양기 이용)

인공씨감자(추백품종)를 한국생명공학연구원 그린바이오연구센터 전재홍 박사 연구팀으로부터 제공받아 크기가 비슷하고 발아가 잘된 것을 선별하여 사용하였다.

재배용기로는 2색포트 (직경 12cm)를 이용하였고 일반적으로 인공씨감자 재배에 사용하고 있는 원예용 상토(High)를 사용하였다. 포트당 5개의 인공씨감자를 파종하였다. 처리균으로는 *P. polymyxa* E681(Rm^+) 균의 포자를 사용하였고 대사물질로는 본 연구팀의 선행연구를 통해 식물생장 촉진 기능이 있는 것으로 밝혀진 E681균 유래의 대사물질 3-Acetyl-propanol(AP), 3-methyl-1butanol(MB), isoamyl acetate(IA) 및 butyl acetate(BA) 4종을 사용하였다. E681균 포자는 발효원액(포자수: $1.1x10^9$/ml)을 1/20 희석하여 포트당 60ml 관주하였다. 이때 포자의 발아율을 높이고자 80°C 20분 열처리 한 것을 별도로 준비하여 시험하였다. 대사물질은 Aldrich Co.에서 구입한 원액을 생수를 이용하여 10^{-5} 농도로 희석하여 포트당 60ml 관주처리하였다. 각 처리당 3-5 반복으로 실험하였다. E681균 포자 및 대사물질의 처리는 인공씨감자 파종 10일 후 잎이 2-3본 나왔을 때 위에서 서술한 대로 1차 처리하였고 파종14일 후 2차 처리 파종 22일 후 3차 처리 하였다.

포트는 25°C 식물배양기에서 광조건과 암조건을 12:12로 하여 관리하였다. 파종 36일 후 지상부를 채취하여 생체중과 초장을 측정하여 비교하였고 E681균 을 처리한 경우 뿌리를 채취하여 균의 뿌리정착력을 분석하였다. 그 결과 대사물질 AP와 MB를 처리한 경우 지상부 무게가 대조구 대비 21.9% 및 32.7% 증가되었고 열처리한 E681 포자를 처리한 경우 9.1% 증가되었다. 기대와 달리 초장의 경우는 모든 처리구에서 대조구에 비해 짧게 나타났다. E681균의 뿌리정착력은 열처리와 무관하게 뿌리 1g 당 10^6 cfu 이상으로 높게 나타나 E681균이 감자 뿌리에 잘 정착하고 있음을 보여주었다.

인공씨감자를 선별하여 사용했지만 초기 생육 양상을 살펴볼 때 씨감자에 따라 다소의 quality 차이가 있어 자라는 속도가 조금씩 차이가 났는데 향 후 실험 시 개체 수를 늘리고 생육기간을 늘려 관찰하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 또한 E681균 포자와 대사물질을 복합처리하여 단기적으로는(유묘생장기) 대사물질 처리에 의한효과를 기대하고 장기적으로는(생육 중기 및 후기) E681균의 효과를 기대해볼 수 있을 것으로 생각된다.

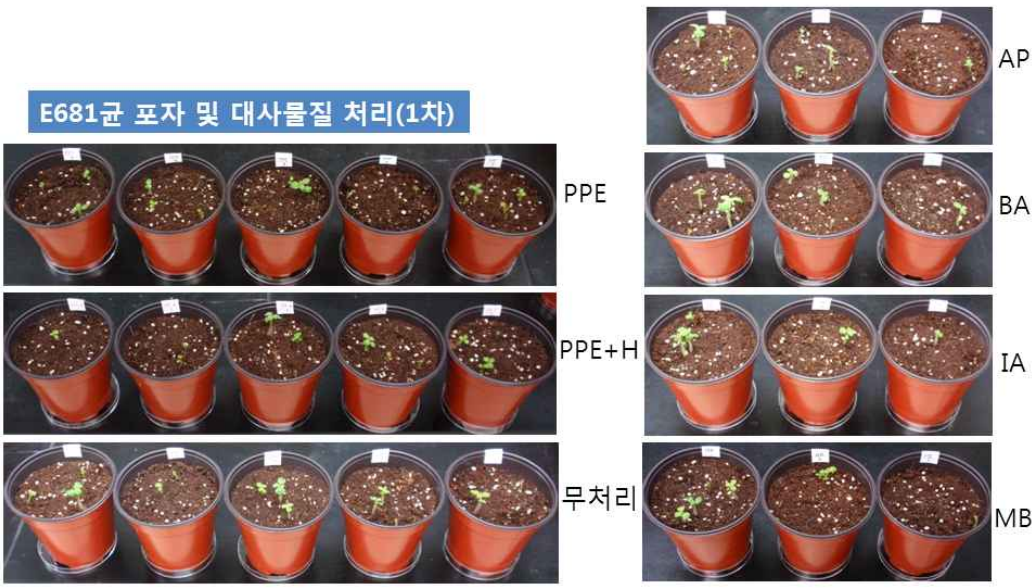


Fig. 1 인공씨감자 파종 10일 후 E681균 포자 및 대사물질 희석액 1차 관주처리

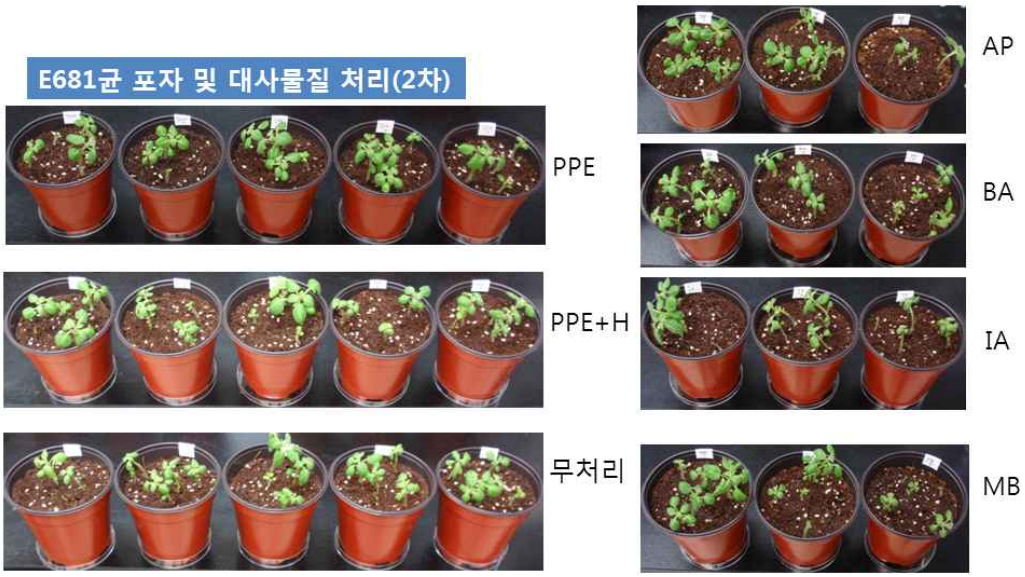


Fig. 2 인공씨감자 파종 14일 후 E681균 포자 및 대사물질 희석액 2차 관주처리

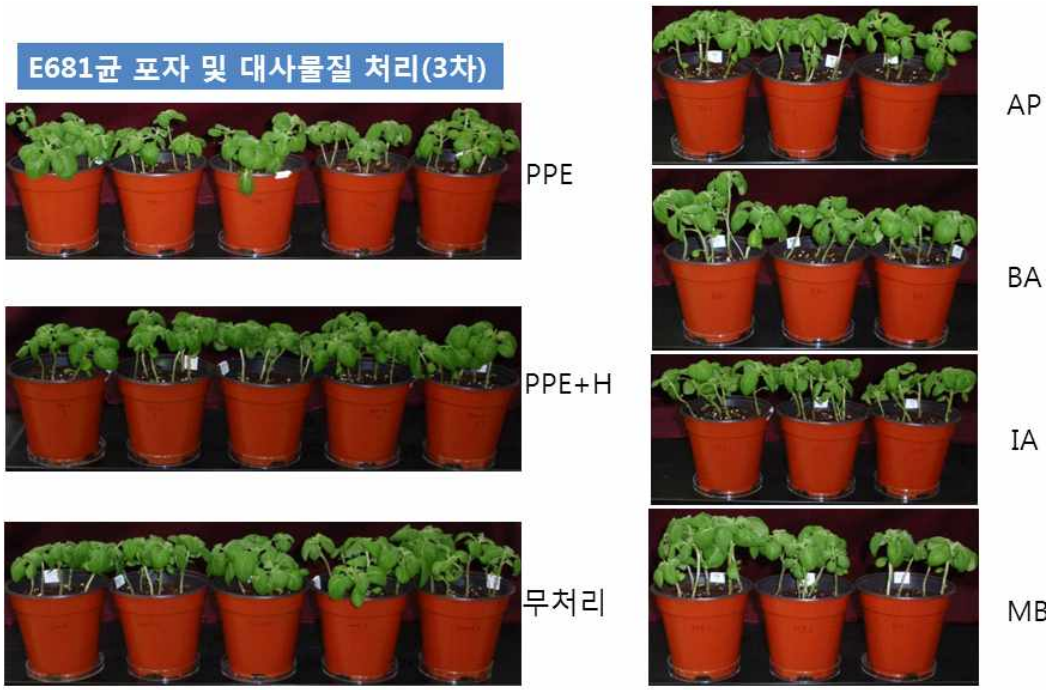


Fig. 3 인공씨감자 파종 22일 후 E681균 포자 및 대사물질 희석액 3차 관주처리

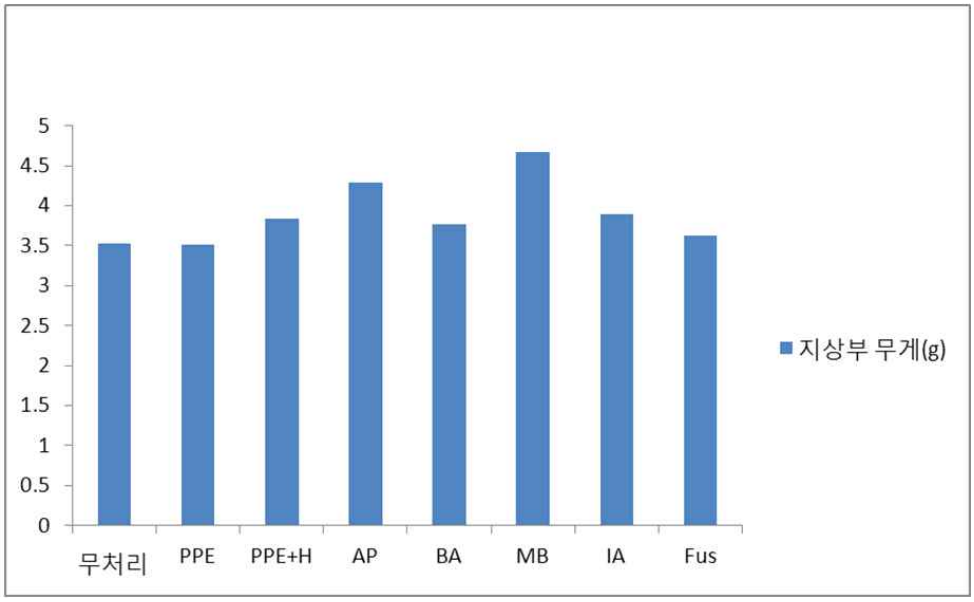


Fig. 4 감자 지상부 생체중에 대한 E681균 포자 및 대사물질 처리효과 분석

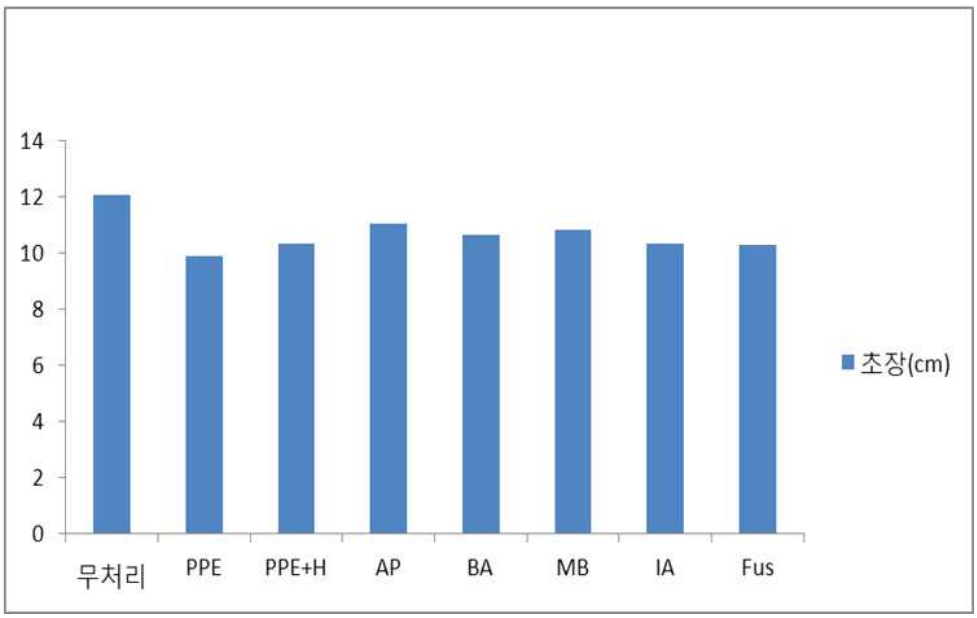


Fig. 5 감자 지상부 초장에 대한 E681균 포자 및 대사물질 처리효과 분석

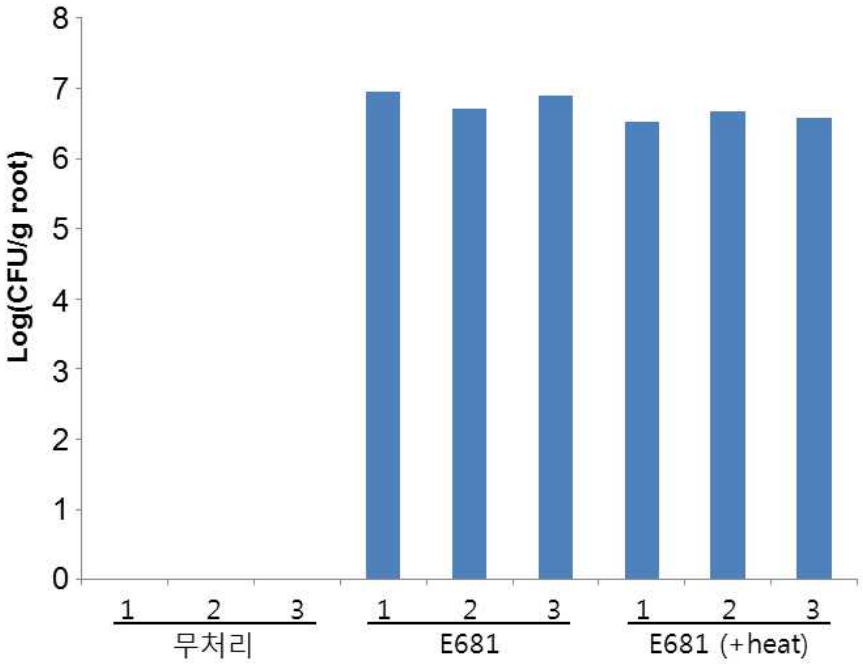


Fig. 6 관주 처리한 E681균 포자의 감자 뿌리에서의 정착력 분석

(2) 포트를 이용한 생장촉진 및 증수효과 검정 (온실 이용)

인공씨감자 품종, 포트 및 상토는 위에서 언급한 바와 동일하게 수행하였다. 본 실험에서는 감자의 생산에 대한 효과를 보기 위해 포트당 1개의 인공씨감자를 파종하여 59일간 재배하였다. 처리균은 위의 실험과 동일하고 대사물질로는 위 실험에서 좋은 효과를 보여준 3-Acetyl-propanol(AP)과 3-methyl-1butanol(MB) 2종을 사용하되 E681균 포자와 대사물질을 함께 처리하였다. 다만 E681균 포자는 관주처리 대신 인공씨감자에 코팅하여 처리하는 방법을 사용하였다. 즉 E681균 발효원액(포자수: $1.1x10^9$/ml)을 CMC를0.2% 함유한 생수로 1/5 희석하였고 이 포자 희석액 300ml 에 Kaolin 150g을 현탁한 후 여기에 인공씨감자를 침지하여 코팅을 하였다. 침지 후 즉시 건져내어 여분의 현탁액을 제거하고 음건하였다 (Fig. 7).

이렇게 E681균 포자를 코팅처리 한 씨감자를 포트당 1개씩 파종하여 8일 후 잎이 2-3개 전개될 때 대사물질 2종(AP 및 MB, 10^{-5} 희석액)을 포트당 10ml 씩 1차 관주처리하였고(Fig. 8) 파종 14일 후 20ml 씩 2차 관주처리하였으며 파종 23일 후 50ml 씩 3차 관주처리하였다(Fig. 9). 본 실험에서는 대조구(무처리)와 처리구1(E681포자+AP) 및 처리구2(E681포자+MB)를 두어 진행하였는데 반복수를 충분히 하여 인공씨감자 개체의 차이로 인한 실험오차를 줄이고자 하였다. 대조구의 경우 94 반복, 처리1의 경우 87 반복, 처리2의 경우 88 반복이 이루어졌다. 실험기간이 8월 23일부터 시작되어 온실의 온도가 상승되어 온도관리에 어려움이 컸다.

파종 42일 후 중간 결실 분석을 위해 대조구와 처리구 각 경우 9개 포트에 대해 지상부를 채취하여 생체중과 초장을 측정하여 비교하였고 생산된 감자의 숫자를 비교하였다. 그 결과 Fig. 10, 11에 나타난 바와 같이 지상부 길이는 약 4% 증가되었고 및 생체중에는 유의성 있는 차이가 없었다. 생산된 감자 개수는 무처리의 경우 1주당 평균 4.0개에서 처리1의 경우 4.33개 처리2의 경우 4.56개로 8-14% 증가하였다(Fig. 12).

파종 59일 후 최종 결실 분석을 위해 대조구 94포트, 처리구1 87포트, 처리구2 88포트에 대해 지상부를 채취하여 생체중과 초장을 측정하여 비교하였고 생산된 감자의 숫자를 비교하였다. 그 결과 Fig. 13에 나타난 바와 같이 지상부 길이와 생체중에는 유의성 있는 차이가 없었다. 생산된 감자 수는 무처리의 경우 1주당 평균 4.17개에서 처리1의 경우 5.01개 처리2의 경우 4.82개로 15.6-20.1% 증가하였다(Fig. 15, 16). 이는 씨감자 생산에 있어서 매우 획기적인 성과로 생각된다.

한편 E681균의 뿌리 및 감자표면에서의 정착력을 분석하였다. 각 처리구 당 3반복으로 분석한 결과 E681균의 뿌리 정착력은 1g 당 10^6 cfu 이상으로 높게 나타났고 감자 표면의 경우에도 1cm당 10^3-10^4 cfu의 정착력을 보여 E681균이 감자에 잘 정착하고 있음을 보여주었다(Fig. 17-18). 일부 무처리구에서 낮은 수준으로 E681균이 나타난 것은 포트를 관리하는 동안 물을 통해 이동한 것으로 판단된다.

Fig. 7 인공씨감자에 대한 E681균 포자 코팅처리

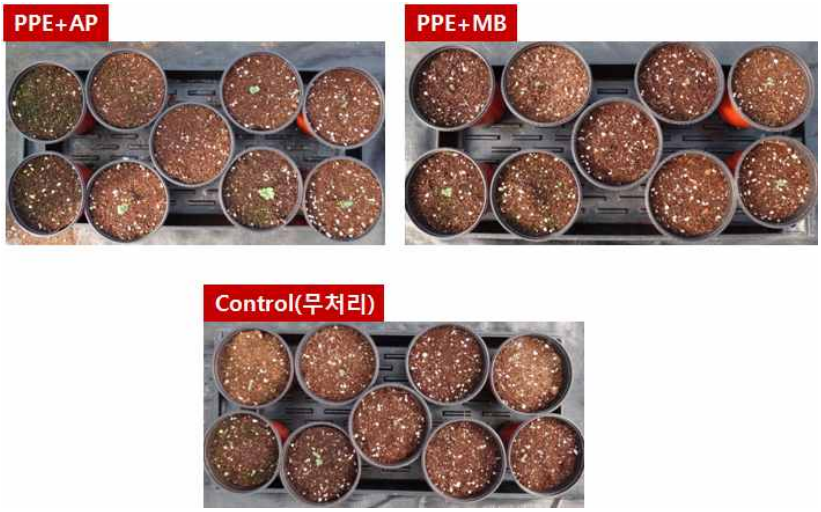


Fig. 8 인공씨감자 파종 8일 후 대사물질(AP 및 MB 희석액) 1차 관주처리

Fig. 9 인공씨감자 파종 23일 후 대사물질(AP 및 MB 희석액) 3차 관주처리

Fig. 10 인공씨감자 파종 42일 후 지상부 생장 및 감자 수확량 조사

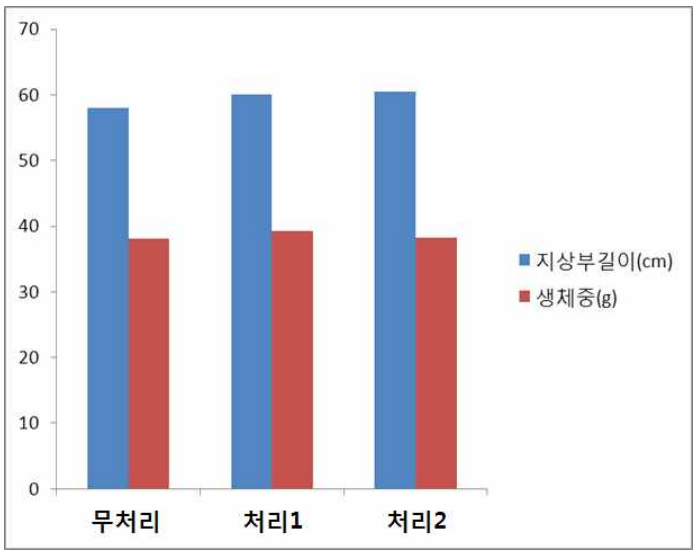


Fig. 11 인공씨감자 파종 42일 후 지상부 생장 및 생체중 조사

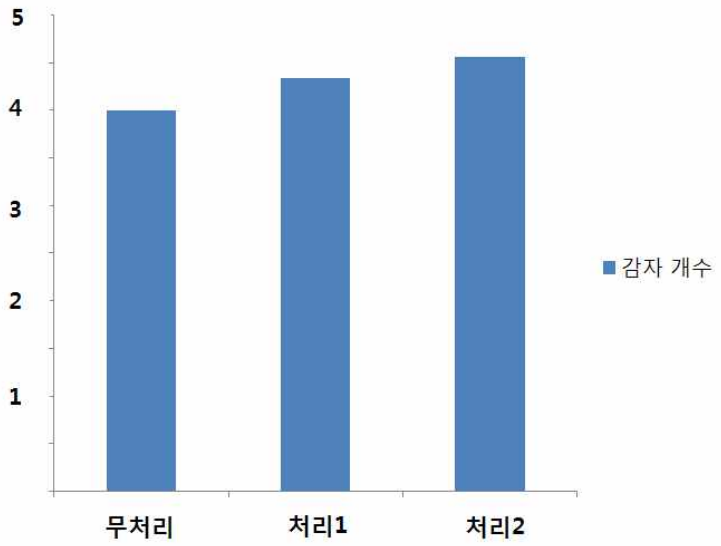


Fig. 12 인공씨감자 파종 42일 후 감자 수확량 조사

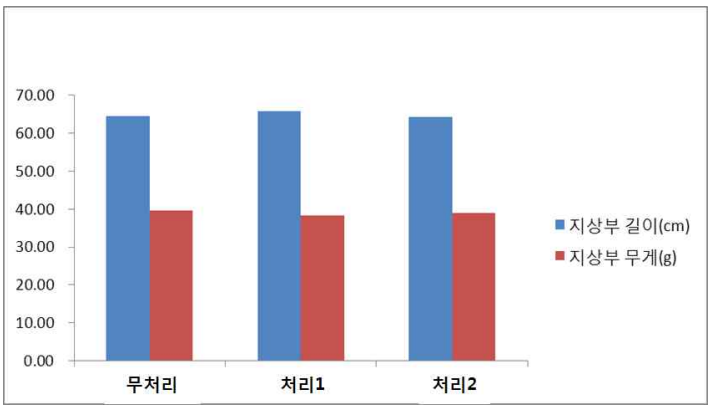


Fig. 13 인공씨감자 파종 59일 후 지상부 생장 및 생체중 조사

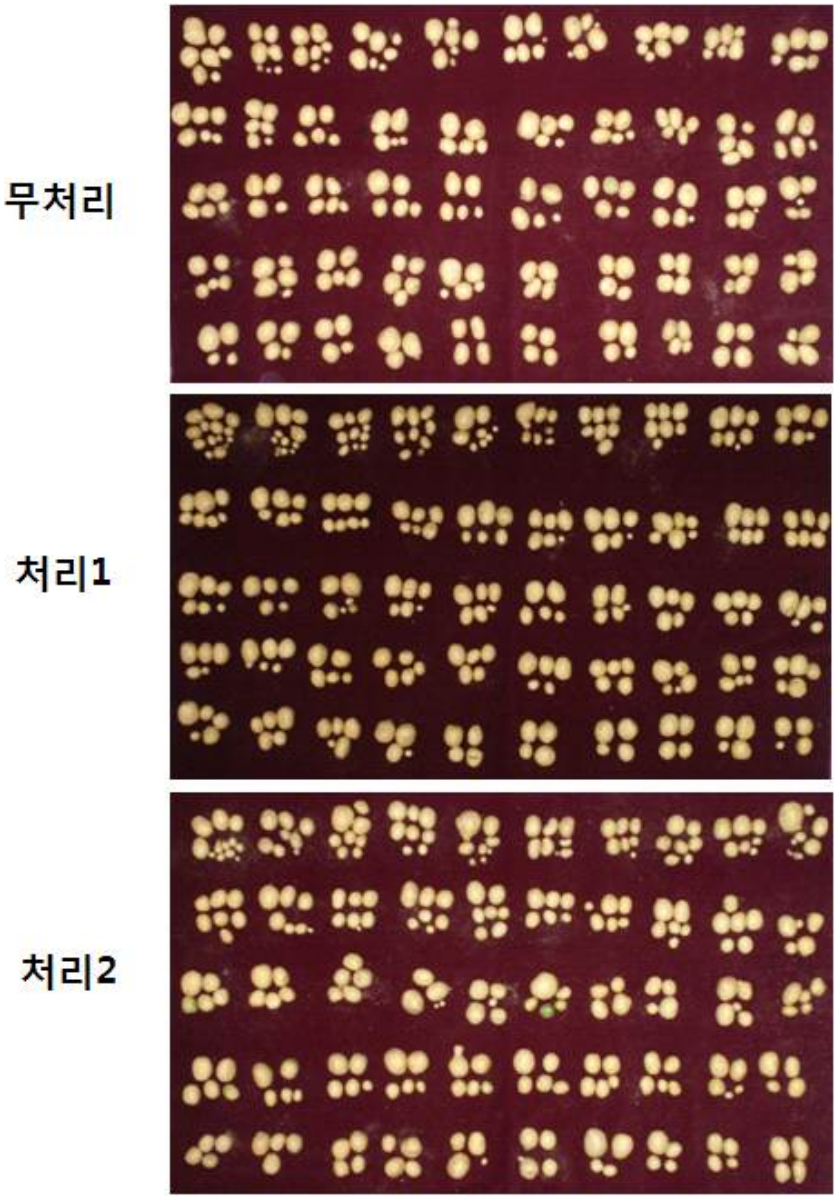


Fig. 14 각 처리구에서 수확량이 많은 순서로 나열한 50개 Pot의 감자 괴경

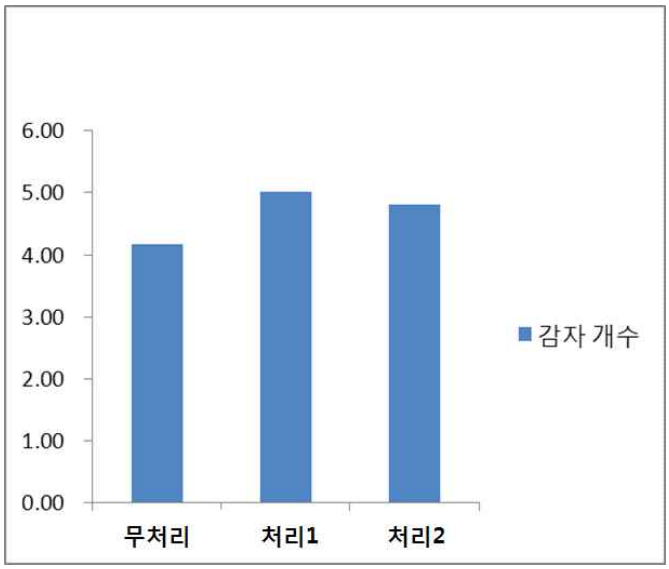


Fig. 15 인공씨감자 파종 59일 후 감자 수확량 조사

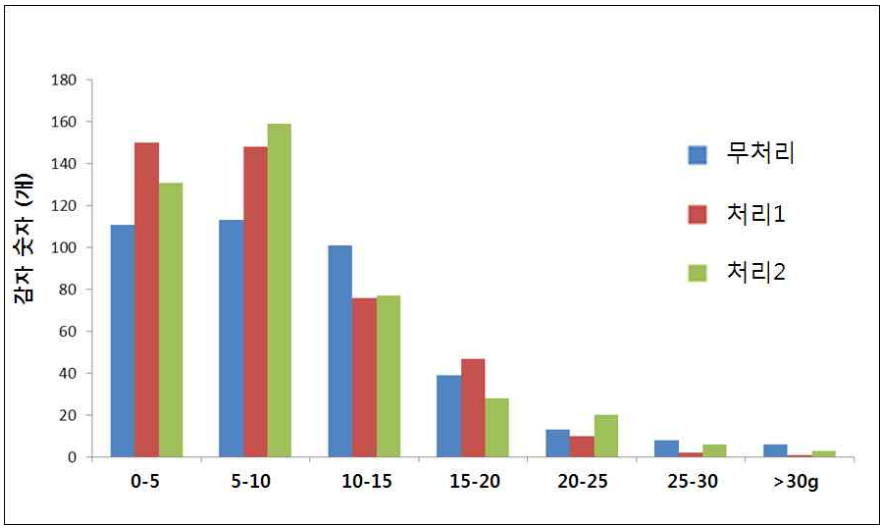


Fig. 16 수확한 감자의 개별 무게 분포

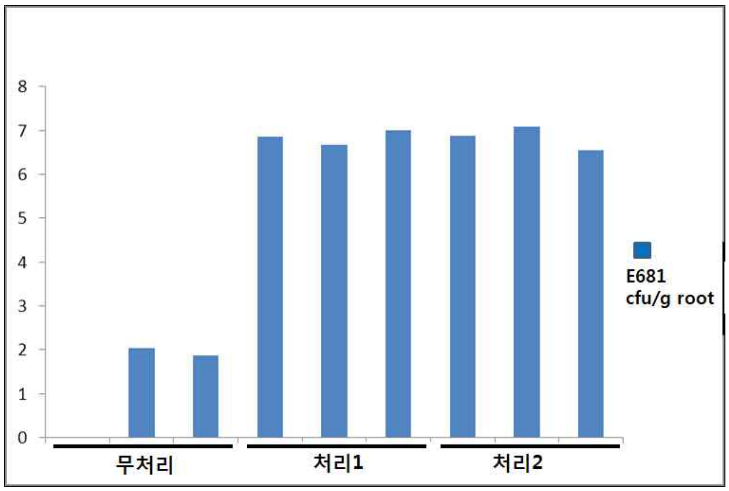


Fig. 17 코팅 처리한 E681균의 감자 뿌리에서의 정착력 분석

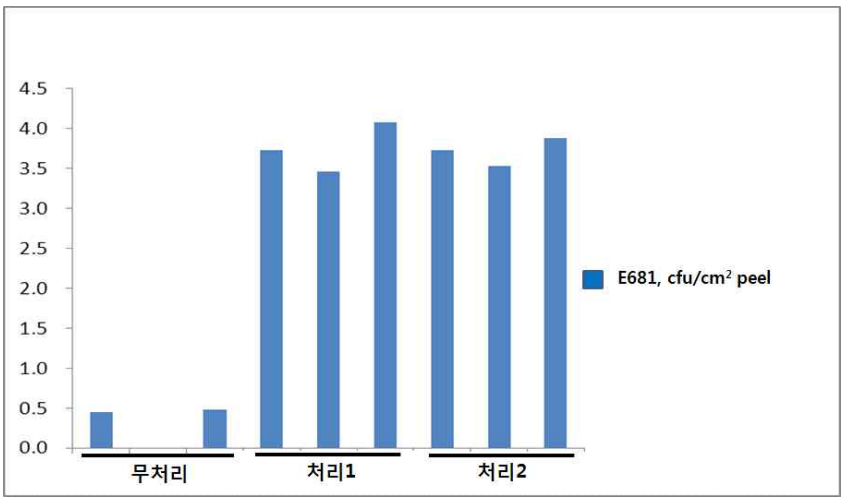


Fig. 18 코팅 처리한 E681균의 감자 표면에서의 정착력 분석

(2) 포장에서의 생장촉진효과 검정 (오창, 공주 2곳 포장 이용)

위에서의 E681균 및 대사물질의 감자 생장촉진 및 증수 효과에 대한 검정시험은 포트를 이용한 것이며 실제 포장에서의 처리효과를 보기 위해 다음의 실험을 수행하였다. 0.5-1.0g 정도의 작은 인공 씨감자를 바로 포장에 파종할 경우 초기 생육에 문제가 생길 수 있어 우선 32구 육모포트에 상토(high)를 이용하여 육묘를 한 후 포장에 정식하는 방법을 사용하였다. 이번에는 파종 6일 후 E681균 포자와 대사물질 2종을 모두 함께 혼합한 희석액, 즉 E681 포자(1/20)+AP+MB(10^{-5}희석액)을 묘 1주당 5ml 씩 관주처리하였고 파종 10일 후 1주당 10ml씩 2차 관주처리 하였으며 18일-22일 후 포장에 정식하기 직전에 육묘포트가 충분히 적셔질 정도로 3차 처리하였다.

오창포장의 경우 18일간 재배한 유묘를 비닐하우스와 노지 두 곳에 정식을 하였는데 처리구와 대조구(무처리구)를 각각 24주씩 정식하였다. 노지재배의 경우 날씨 관계상(기온저하) 정식 29일 후(파종 47일 후) 수확하여 지상부 및 수확량을 조사하였는데 Fig. 20에 나타난 바와 같이 초장 및 지상부 생체중은 각각 16.2% 및 36.4% 로 증가된 것으로 나타났으나 수확된 감자의 숫자는 대조구 4.26개 대비 처리구 3.65개로 적게 나타났다. 비닐하우스의 경우 정식 35일 후 수확하여 조사하였는데 Fig. 22에 나타난 바와 같이 지상부 생장이나 수확량에 있어서 무처리구가 더 우세하게 나타났다. 이와 같이 포장에서의 결과가 예상과 달리 나왔는데 이는 기온 저하로 충분한 생육기간을 주지 못하고 정식 재배기간 29-35일의 짧은 기간에 수확을 하였기 때문으로 판단된다.

Fig. 19 오창 노지 포장에서의 인공씨감자 재배, 수확직전 모습

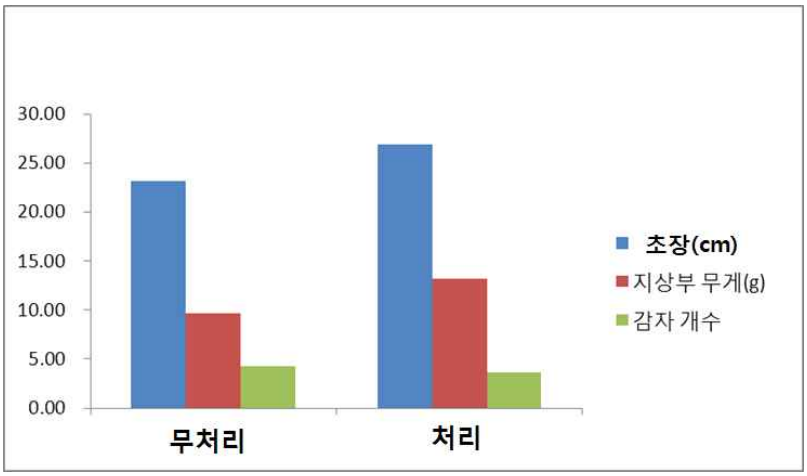


Fig. 20 오창 노지포장에서의 유묘정식 29일 후 지상부 생장 및 감자 수확량 조사

Fig. 21 오창 비닐하우스에서의 인공씨감자 재배, 수확 직전 모습

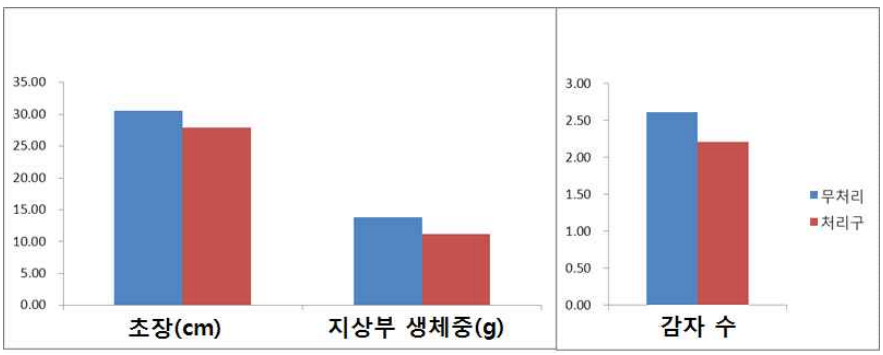


Fig. 22 오창 비닐하우스에서의 유묘정식 35일 후 지상부 생장 및 감자 수확량 조사

오창에서 사용한 인공씨감자 유묘와 같은 묘를 사영하여 공주 포장에서도 같은 방법으로 시험을 하였는데 정식 후 32일 후 수확하였으나 기온 저하로 생육이 전체적으로 부진하여 예상하였던 결과는 얻지 못하였다.

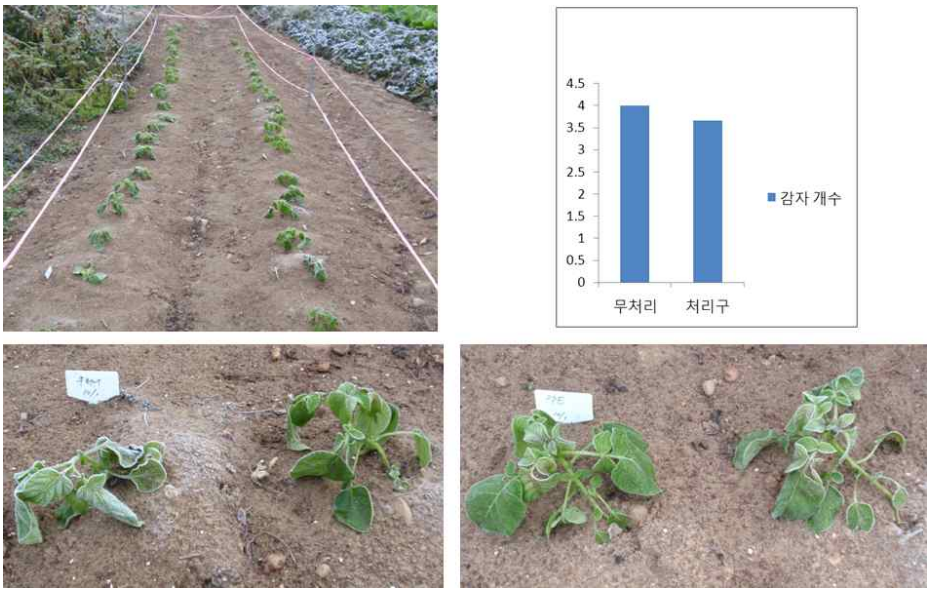


Fig. 23 공주 노지 포장에서의 인공씨감자 재배, 수확직전 모습 및 감자수확 결과

나. E681균의 일반 절단 감자에 대한 생장촉진 및 증수효과 검정

앞의 인공씨감자를 이용한 포트시험에서 E681균이 감자의 뿌리와 괴경 표면에 높은 수준으로 잘 정착이 되고 생장촉진 및 증수효과를 나타냄을 알게 된 후 현재 농민들이 주로 종서로서 사용하는 절단 감자에 대해 E681균의 유용성을 검정하고자 본 연구를 수행하였다. 실험의 주목적은 절단감자에 E681균 포자를 고농도로 처리 시 약해가 없는지를 조사하고 E681균에 의한 유용한 효과 즉 생장촉진, 증수 및 병에 대한 방제 효과를 분석하는 것이다.

(1) 겨울감자 시설 재배지 현장시험 (전북 부안군 계화면 소재)

1/20로 희석한 E681균 발효액 (포자수: 5.5 x 10^7cfu/ml)에 절단 감자를 약 10분간 침지하여 건져내어 약 1시간 음건한 후 비닐하우스에 2줄로 파종하였다 (2011년 10월 15일 파종). 농민의 파종시기에 맞추어 급히 시료를 준비하느라 포자 희석액에 침지를 하게 되었으나 침지보다는 분의처리가 바람직하다고 생각되어 이에 대한 예비실험을 연구소 내 온실에서 수행중이다. 비닐 하우스에 파종한 처리 감자는 현재 Fig. 25에 나타난 바와 같이 이상 없이 잘 자라고

있으며 하우스 전체적으로도 병 발생 등 이상이 없는 상태이다.

Fig. 24 E681균 포자의 절단 감자에 대한 침지처리 및 파종 (2011.10.15)

Fig. 25 E681균 포자를 처리한 감자의 생육 모습 (우측 2줄이 처리구, 2011.11.25)

(2) E681균 포자 분의처리 방법 개발을 위한 실험

절단감자에 미생물을 간편하고 효율적으로 처리 할 수 있는 방법 중 하나가 분의처리인 것으로 판단되어 이에 대한 방법을 개발하고자 하였다. 농민들이 편리하게 처리 할 수 있도록 적절한 농도의 포자를 함유하는 분말 제제를 제조하기 위해 부재료로서 구하기 쉽고 저렴한 Kaolin과 clay를 선정하였다. 카오린 또는 클레이 500g에 E681균 발효원액 125 ml을 철저히 혼합하여 포자농도 $2x10^8$cfu/g 의 원제를 제조하였고 이를 1/3, 1/10, 1/20으로 희석한 희석제를 준비하여 실험에 사용하였다(Fig. 26). 감자(수미품종)는 계화면 농민이 보유한 것을 얻어와 사용하였다. 비슷한 크기가 되도록 절편을 준비하여 각각의 농도로 준비한 분말제제로 분의처리 후 대형 4각 포트에 2립씩 3반복으로 파종하였다(2011년 11월 1일 파종).

Fig. 26 카오린과 클레이를 이용하여 제조한 E681균 포자 분말제제

Fig. 27 E681균 포자 분말제제에 의한 절단감자 분의처리

발아하여 초기 생육하는 과정을 관찰한 바로는 E681균 포자의 분의처리에 의해 특별한 이상 징후는 없으며 정상적인 성장이 이루어지고 있음을 볼 수 있었다.

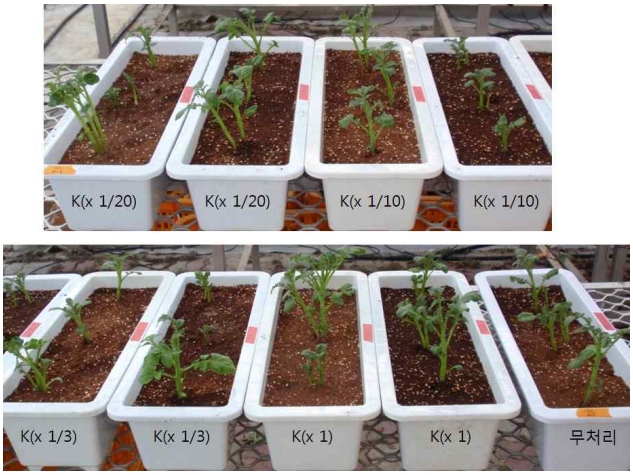


Fig. 28 E681균 포자를 분의처리한 감자의 생육 모습 (파종 13일 후)

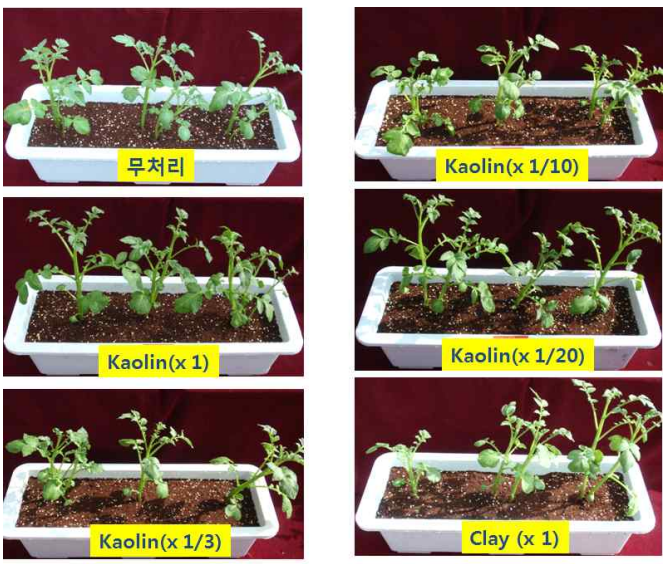


Fig. 29 E681균 포자를 분의처리한 감자의 생육 모습 (파종 17일 후)

(3) 겨울감자 시설 재배지 현장시험 (2) (전북 부안군 계화면 소재)

위 (1)에서의 절단 씨감자 침지처리 방법을 보완하고자 (2)에서 기술한 방법으로 패니바실러스 포자 분의처리제 ($4x10^8$cfu/g)를 준비하여 Fig. 30과 같이 절단 씨감자에 분의처리 하여 비닐하우스에 7줄로 파종하였다 (2012년 2월 25일 파종). 파종 99일 후 수확하여 대조구와 처리구의 수확량을 비교한 결과 처리구 감자(식물체) 10주당 생산된 감자 수가 평균 103.6 개로 무처리 대조구에 비해 13.8% 증가되었고 처리구의 감자 중량은 10주당 평균 7,414 g 으로 무처리 대조구에 비해 24.6% 증가된 것으로 나타났다.

Fig. 30. 씨감자 절단 및 분의처리 모습

Fig. 31. 씨감자 파종 및 지상부 생장 모습

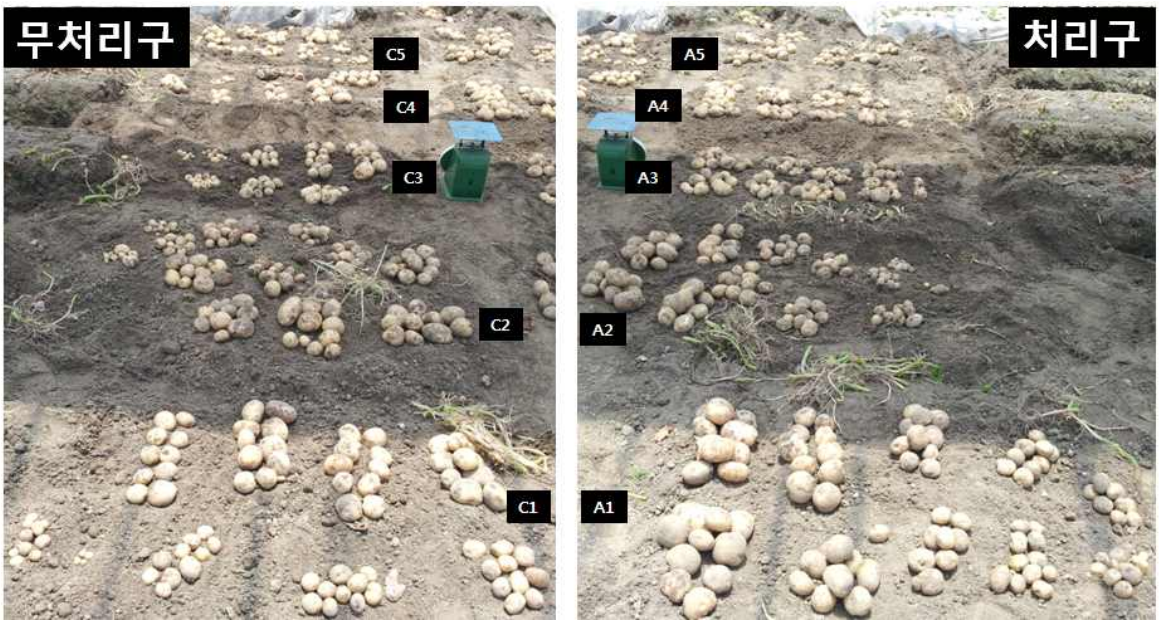


Fig. 32. 패니바실러스 포자 처리 및 무처리 씨감자를 파종하여 수확 한 감자 모습

다. E681균 처리에 의한 감자 저장성 향상 시험

앞의 실험에서 살펴본 바 처리한 E681균이 괴경의 표면에 10^4cfu/cm^2 수준의 밀도로 정착하고 있음을 감안할 때 이로 인하여 수확 후 감자의 저장성을 향상시키는 효과가 있을 것으로 예상이 되었다. 이에 따라 저장 중에 흔히 발생하는 병 중 하나인 무름병에 대해 시험을 수행하였다. 앞의 포트실험에서 수확한 감자 (무처리구 및 처리구 1&2) 각각 7개 씩을 임의로 선정하여 표면에 멸균한 칼로 작은 상처를 내었다. 여기에 무름병균인 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 15시간 배양액을 1/10 희석하여 5ul씩 drop 접종 후 멸균한 paper towel 조각을 덮어 접종균이 잘 유지되도록 하였다. 30°C 로 4-5일 배양 후 관찰한 결과 Fig. 33에 나타난 바와 같이 무처리구, 즉 E681균이 표면에 정착되지 않은 감자의 경우 대부분 무름병이 발생되었으나 처리구의 경우엔 병이 거의 발생되지 않았다. 이 결과로부터 E681균을 처리하여 생산한 감자는 괴경 표면에 정착된 처리균에 의해 수확 후 저장성을 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

Fig. 33 E681균 정착 감자의 무름병 저감효과 검정

4. *Paenibacillus polymyxa* E681의 근연균 개발 및 특성분석

가. 보리 등 작물 뿌리로 부터 *P. polymyxa* 근연균 탐색

국내 다양한 지역에서 재배중인 보리의 뿌리와 중국 사막 토양으로부터 미생물 균주를 분리하고 이들 중 염분 토양에서 잘 견딜 수 있는 내염성 균주를 선발하고자 하였다. 우선 분리균들의 gDNA에 대해 BoxA1R primer (5'-ACG TGG TTT GAA GAG ATT TTC G-3')를 이용해 BOX-PCR을 수행하고 (Fig. 1) 그 결과를 토대로 서로 다른 종들로 보이는 분리균들을 모아 동정하고 7.5%의 NaCl을 함유한 1/10 TSA 배지상에 도말하여 내염성 균주를 선발하였다. 그 결과 내염성 균주 109주와 *Paenibacillus*속 균주 43주를 확보하였다 (Table 1).

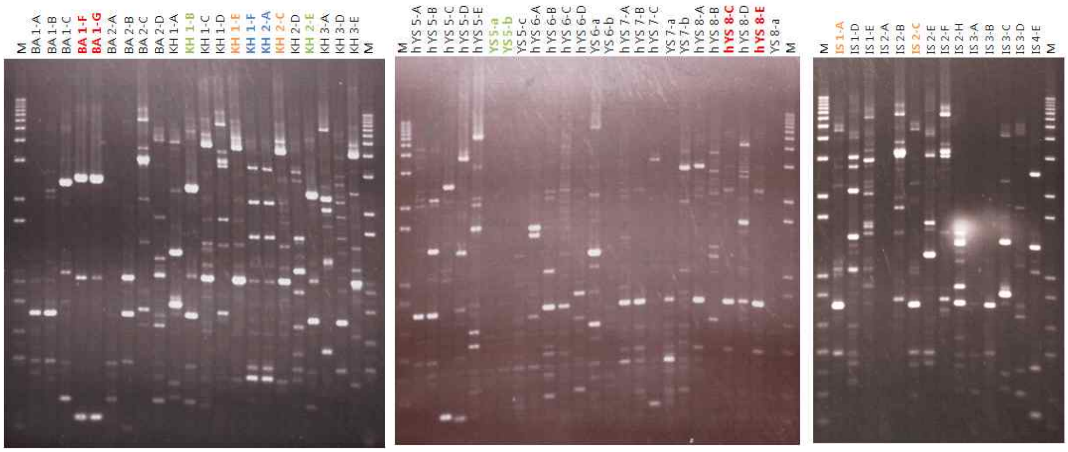


Fig. 1 보리 뿌리 분리균들에 대한 BOX-PCR 결과

시료 종류		내염성 균주	*Paenibacillus* 속 균주
보리 뿌리	정읍, 만경	6주	-
	예산, 횡성, 익산, 부안, 계화	37주	11
고구마 뿌리		-	17주
중국 사막 토양	1차	6주	2주
	2차	42주	13주
	3차	18주	-

Table 1 다양한 시료로부터 얻어진 내염성 및 *Paenibacillus*속 균주

나. 분리균의 유전자 특성 분석

(1) *Nif*H 유전자 탐색

*Nif*H 유전자를 선택적으로 증폭하기 위한 Primer Set을 Table 2와 같이 구성하고 앞서 선발된 내염성 균주와 *Paenibacillus*속 균주의 gDNA를 대상으로 PCR을 실시하였다. 그 결과 다른 선발균에서는 발견되지 않았으나 강원도 횡성의 보리 뿌리에서 분리된 HS1-D 균주에서 예상한 증폭산물을 얻어 이 균주가 *Nif*H 유전자를 지니고 있을 것으로 예상되었다 (Fig. 2).

Primer Set	Sequence		Amplicon size (bp)
I	Forward	5'-GGCTGCGATCCVAAGGCCGAYTCVACC CG-3'	326
	Reverse 1	5'-TGVGCCTTGTTYTCGCGGATSGGCATGGC-3'	
II	Forward	5'-GGCTGCGATCCVAAGGCCGAYTCVACC CG-3'	304
	Reverse 2	5'-GGCATKGCGAAACCSCCGCAYACAACGTC-3'	

Table 2 *Nif*H 유전자 증폭을 위한 PCR Primer Set

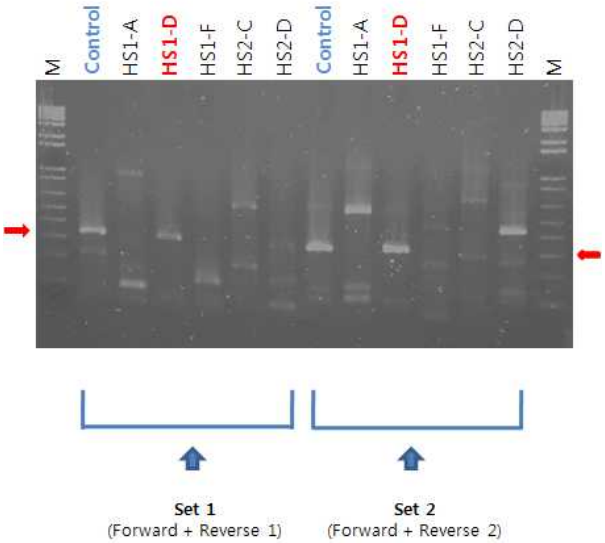


Fig. 2 PCR에 의한 *Nif*H 유전자의 검출, 빨간색 화살표의 bp에 해당하는 각 Primer Set의 Amplicon이 *Nif*H 유전자로부터 증폭된 것임.

(2) *aii*A 유전자 탐색

*aii*A 유전자를 선택적으로 증폭하기 위한 Primer Set을 Table 3과 같이 구성하고 앞서 선발된 내염성 균주와 *Paenibacillus*속 균주의 gDNA를 대상으로 PCR을 실시하였다. 그 결과 *Paenibacillus* 균주 중에서는 F18균주가, *Bacillus* 균주 중에서는 SSR10-2, CH3-12, CH4-4, CH5-8, CH13-12 등의 균주가 *aii*A 유전자를 가지고 있는 것으로 추정되었다 (Fig 3).

Primer Set	Sequence		Amplicon size (bp)
I	PPaiiA Forward	5'-TAACAAATTGTACTGGTTACCGATCG-3'	703
	PPaiiA Reverse	5'-ATGACCGAAGAACAACAGATTCGACT-3'	
II	BaiiA Forward 1	5'-GACAGTAAAGAAGCTTTATTTCATC-3'	720
	BaiiA Reverse 1	5'-TTTTCCTGCTCTATATCATGACCAA-3'	
III	BaiiA Forward 2	5'-AGGTATGCCAGAAAGTGCAGTTAAT-3'	464
	BaiiA Reverse 2	5'-CGAACGGCACTTCATCTTCAAAATT-3'	

Table 3 *aii*A 유전자 증폭을 위한 PCR Primer Set

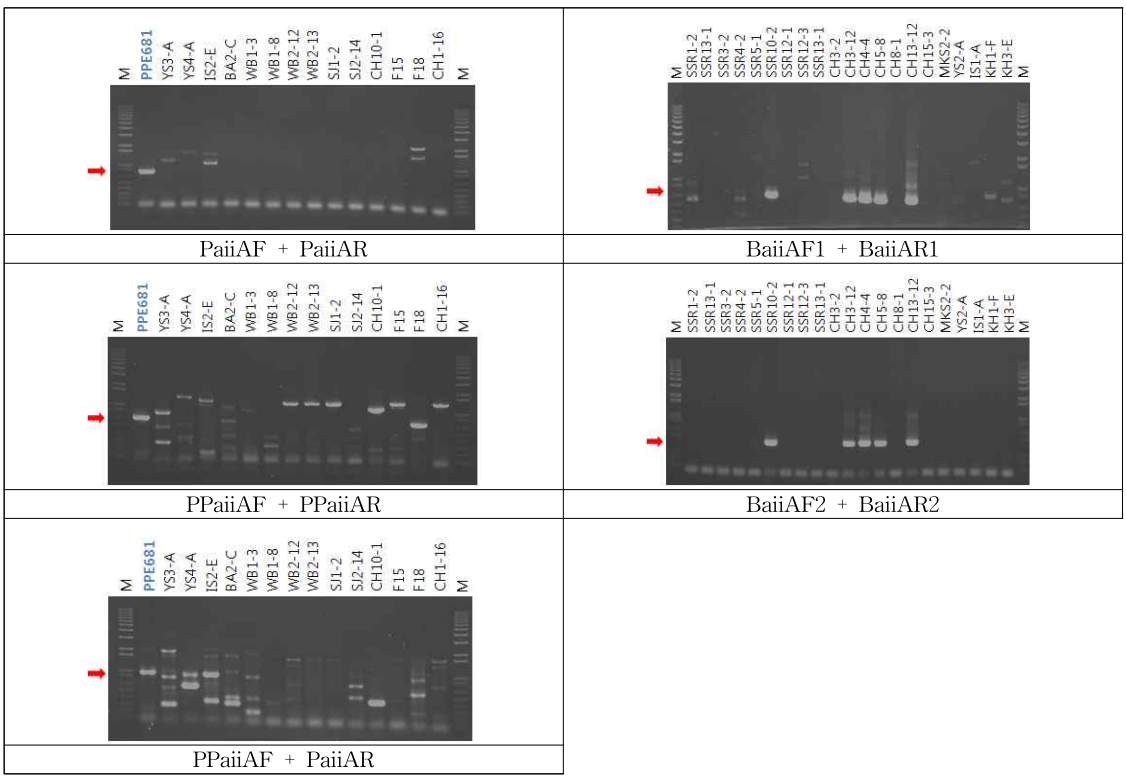


Fig. 3 PCR에 의한 *aii*A 유전자의 검출, 빨간색 화살표의 bp에 해당하는 각 Primer Set의 Amplicon이 *aii*A 유전자로부터 증폭된 것임.

다. 작물에 대한 유용성 비교 검정

앞서 선발된 내염성 균주들을 대상으로 이들이 염분 함유 토양에서 식물의 생장 촉진 효과도 나타내는지 실험하였다. 원예용 상토와 간척지에서 수집한 염토를 혼합하여 염농도 0.25%, EC 값 3.73 (수화도 76.3, 24.3℃) 으로 조정한 것을 염분 함유 토양으로 하여 실험에 사용하였다. 선발된 균주들을 1/3 TSA 배지에 도말하여 성장시킨 배지에 멸균수를 가해 포자를 회수하고 이 각 회수 현탁액에 보리 또는 Sudangrass 종자를 침지 처리 한 후 염분 함유 토양을 넣은 포트에 20립씩 한 균주 처리당 3반복으로 파종하였다. 그 결과 고염분 함유 토양의 물리적 특성 변화에 따른 영향으로 종자 발아율이 불량하고 발아 후 성장 또한 매우 부진하여 대조구와 내염성 균주 처리구 간에 뚜렷한 생장의 차이를 발견하기는 어려웠다 (Fig 4). 따라서 추후 이 같은 문제점을 보완한 실험이 필요하다.

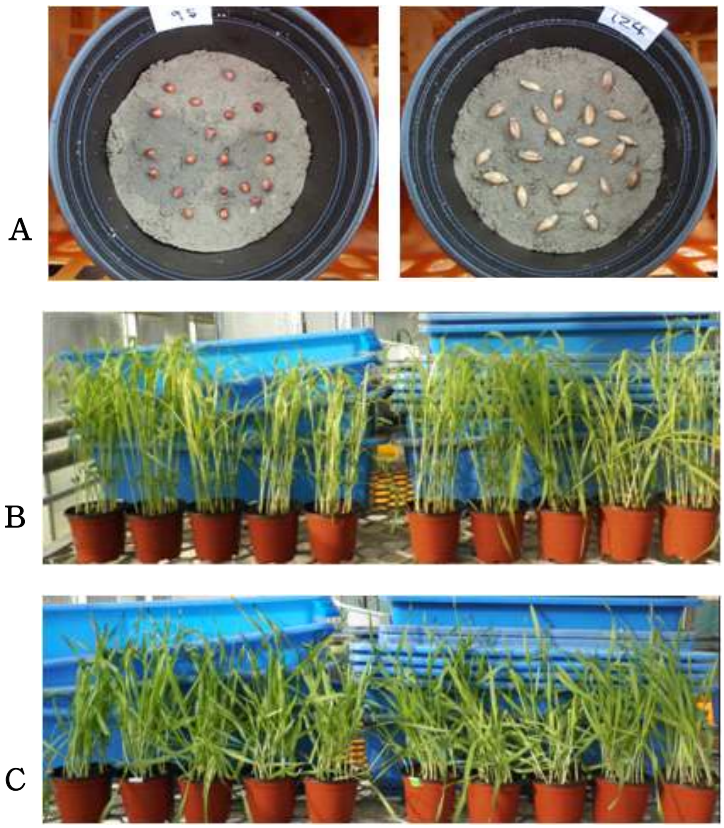


Fig. 4 염토 혼합 토양에서의 식물 생장 촉진 효과 검정 시험. A) Sudangrass (왼쪽), 보리 (오른쪽), B) Sudangrass, C) 보리

Ⅱ. 미생물 비료제의 현장 적용기술 및 제제화 기술 개발

1. 바이오매스 및 사료 작물 대상 현장 적용시험

바이오매스 대상작물인 억새의 생육을 촉진시키기 위하여 대상 작물의 뿌리로부터 근권미생물을 분리하고 종자 발아촉진 및 식물 생장 촉진 효과가 탁월한 균주를 선발하여 억새와 사료작물 등의 다양한 작물에 적용시켜 맞춤형 식물 생장 촉진 미생물 제제로 유용하게 사용될 수 있도록 기초 및 현장적용 시험을 수행하였다.

가. 억새 시료의 채취

비식량 바이오매스 맞춤형 미생물비료제 개발을 위해 대상작물인 억새에 대하여 식물생육촉진 활성이 있는 근권미생물을 분리, 선발하여 현장에 적용하고자 하였다.

억새는 다년생 C_4 광합성 식물로서 영년생 작물이며 연간 biomass 생산량이 많고 비료 요구도가 낮으며 자연 상태에서 병해충 발생도 거의 없어 바이오 연료용 원료작물로 각광받고 있다. 억새 속에는 참억새(*Miscanthus sinensis*), 물억새(*Miscanthus sacchariflorus*) 등 17개 종이 있으며 주로 알려진 세 종류로 참억새는 2배체로서 염색체 수가 38개이며, 물억새는 주로 4배체로 염색체 수는 76개이고 biomass 수량이 많아 주목받고 있는 3배체인 *Miscanthus X giganteus*는 참억새와 물억새의 자연 교잡형으로 염색체 수가 57개이다. 억세 시료는 내륙에 서식하는 참억새와 강가 및 호수주변에 서식하는 물억새로 나눠 억새 군락지로부터 지역 및 시기별로 채취하였고, 그 외에 원예재배단지에서 재배하고 있는 다양한 억새 종을 채취하여 식물생육촉진 미생물 분리를 위한 시료로 사용하였다. 시료 채취에 대한 특징은 다음 표 1과 같고 재배용 억새의 종류는 표 2 와 같다.

전라남도 순천만 일대의 갯벌은 갈대와 함께 억새가 공존하며 자생하면서 군락을 형성하고 있으며 억새 채종과 rhizome을 2회에 채취하였다. 수집한 억새 시료 중 충북 청원군 대청호 부근에서 수집한 억새는 물억새로 동정되었고 나머지 지역은 모두 참억새로 동정되었다. 따라서 본 연구에서는 대청호 주변에서 수집한 물억새 rhizome을 억새번식 및 근권세균 분리시료로 사용하였다.

표 1. 억새 시료 채취지역의 시료특징

	억새 시료 채취지역	종류	시 료 특 징
1	전라남도 순천군 순천만 일대지역	참억새	해안가 내염성 억새 서식지역
2	충청남도 서천군 신성리 일대지역	참억새	방조제에 의해 담수화가 진행되고 있는 해안가 억새 서식 지역
3	충청남도 연기군 금남면 일대지역	참억새	내륙의 참억새 서식지역
4	충북 청원군 대청호 주변	물억새	담수지역의 물억새 서식지
5	충남 공주시 식물원	참억새	재배용 억새

그림 1. 억새 시료 채취 지역

표 2. 억새 시료의 종류 (충남 논산소재 화훼식물원)

시료명	억새종	시료명	억새종	시료명	억새종
명1	*Miscanthus sinensis*	백14	*Miscanthus sinensis*	Dixie4	*Miscanthus sinensis*
명2	*Miscanthus sinensis*	하늘1	*Miscanthus sinensis*	Yaku dwart 1	*Miscanthus sinensis*
명3	*Miscanthus sinensis*	하늘빛	*Miscanthus sinensis*	Yaku dwart 2	*Miscanthus sinensis*
명4	*Miscanthus sinensis*	하늘0	*Miscanthus sinensis*	Zebra 1	*Miscanthus sinensis*
명5	*Miscanthus sinensis*	하늘1	*Miscanthus sinensis*	Zebra 2	*Miscanthus sinensis*
명6	*Miscanthus sinensis*	하늘2	*Miscanthus sinensis*	Light 1	*Miscanthus sinensis*
명7	*Miscanthus sinensis*	하늘3	*Miscanthus sinensis*	Light 2	*Miscanthus sinensis*
백1	*Miscanthus sinensis*	하늘4	*Miscanthus sinensis*	Hin 1	*Miscanthus sinensis*
백7	*Miscanthus sinensis*	Strict1	*Miscanthus sinensis*	Kitten 2	*Miscanthus sinensis*
백8	*Miscanthus sinensis*	Strict2	*Miscanthus sinensis*	Kitten 3	*Miscanthus sinensis*
백9	*Miscanthus sinensis*	Zebri1	*Miscanthus sinensis*	Punk	*Miscanthus sinensis*
백10	*Miscanthus sinensis*	Zebri2	*Miscanthus sinensis*	Chen	*Miscanthus sinensis*
백11	*Miscanthus sinensis*	Dixie1	*Miscanthus sinensis*	Yago	*Miscanthus sinensis*
백12	*Miscanthus sinensis*	Dixie2	*Miscanthus sinensis*	Ya dwart	*Miscanthus sinensis*
백13	*Miscanthus sinensis*	Dixie3	*Miscanthus sinensis*		

나. 억새 뿌리로부터 미생물의 분리

수집한 억새 뿌리내에 서식하는 근권세균을 분리하기 위하여 다음과 같이 수행하였다. 뿌리 표면에 있는 흙을 수돗물(tap water)을 이용하여 제거한 다음 상온에서 하루 동안 건조시켰다.

건조된 억새 뿌리를 1 cm 크기로 자른 후, 식물표면에 존재하는 착생미생물(epiphyte)을 제거하기 위하여 4% NaClO에 5분, 2.5% $Na_2S_2O_3$에 10분간 침지시킨 다음 멸균수로 4회 세척하였다. 그런 다음, 75% 에탄올(Ethanol)에 3분간 침지시킨 후, 멸균증류수로 4회 세척하고 10% $NaHCO_3$에 10분간 침지시킨 후 무균대에서 건조시켰다. 위와 같이 표면살균한 억새 뿌리를 homogenizer를 이용하여 5,000 rpm으로 3분간 갈아서 분리용 시료로 사용하여 분리용 배지인 TYA 및 R2A 배지에 도말하여 28℃ 에서 7일간 배양한 후, 형성된 순수한 단일콜로니(single colony) 313 균주를 분리하였다.

그림 2. 억새뿌리로부터 내생미생물 분리

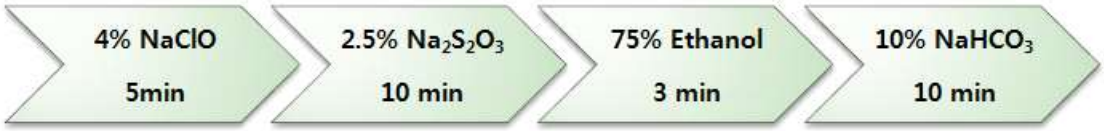


그림 3. 식물 내생미생물 분리를 위한 표면살균

표 3. 억새 근권세균 분리 배지 및 조성

분리배지	배지조성 (/L)	
R2A	Yeast extract	0.5 g
	Proteose peptone No.3	0.5 g
	Casamino acids	0.5 g
	Dextrose	0.5 g
	Soluble starch	0.5 g
	Sodium pyruvate	0.3 g
	Dipotassium phosphate	0.3 g
	Magnesium sulfate	0.05 g
	Agar	15 g
TYA	Tryptone	5 g
	Yeast extract	3 g
	$CaCl_2$	0.7 g
	Agar	15 g

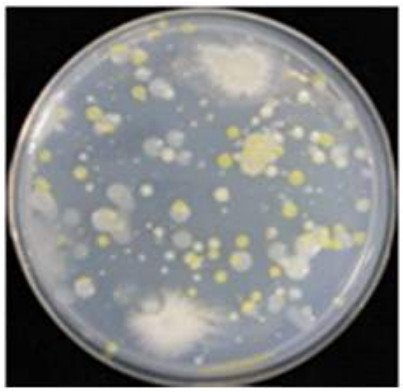


그림 4. 억새 근권세균 집락

다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통한 분리균주의 동정

억새 뿌리로부터 분리한 근권세균의 동정을 위하여 대상 균주에 대한 DB가 구축되어 안정된 분류동정 key로 인정받고 있는 16S rRNA 부분 유전자 염기서열을 분석하였다. 게놈(genomic) DNA 추출, PCR 및 염기서열 분석 방법으로 수행하였으며, 분리된 균의 동정결과는 분리균의 부분염기서열을 NCBI에서 블라스트(Blast) 검색을 통해 표준 균주와의 유사도를 고려하여 가장 유사도가 높은 표준 균주명으로 동정결과를 반영하였다. 먼저, 분리균주의 게놈 DNA는 평판 배지에 자란 미량의 콜로니를 5%(w/v) Chelex-100 100 ㎕가 든 E-tube에 넣고 100℃에서 5 내지 10분간 끓인 다음 상온에서 식혀 원심분리 한 후, 그 상등액을 Colony-PCR에 이용하였다. 16S rRNA는 두 개의 알려진 universal primer를 사용하여 증폭하였다 [정방향 프라이머: 27F(*E. coli* 16S rRNA positions 8-27; 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′); 및 역방향 프라이머: 1492R (*E.coli* 16S rRNA position 1492-1510; 5′-GGTTACTTGTTACGACTT-3′)].

PCR 반응물의 조성은 10× reaction buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 50 mM dNTPs, 0.5 ㎕의 5U Taq polymerase(Bioneer Co. Ltd.), 20 pmol 프라이머이며, 약 20~80 ng의 정제된 DNA를 주형으로 첨가하였고 PCR을 위한 각 반응의 온도 조건은 다음과 같다; DNA denaturation을 위해 94℃에서 40 초, annealing을 위해 55℃에서 40초, DNA strand elongation을 위해 72℃에서 1분 과정을 28회 반복하는 조건을 사용하였다. 반응이 끝난 PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 확인하였으며 PCR purification kit(NucleoGen사)를 사용하여 정제한 후 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정은 자동염기서열장치(ABI 3730XL; Applied Biosystems)를 사용하여 결정하였으며, 결정된 염기서열은 미국 NCBI의 BLAST (http://www.ncbi.nim.nih.gov/BLAST/) 검색방법을 사용하여 기존에 등록된 다양한 균주들의 상응하는 염기서열과 비교하여 유사도를 결정하였다. 그 결과, *Bacillus*가 18종으로 절반 이상으로 분리되었으며 그 밖의 균종으로는 *Brevibacterium, Renibacterium, Microbacteriums, Tumebacillus, Pseudomonas, Lysinibacillus, Agrobacterium, Janthinobacterium* 등이 분리되었다. 분리 균주 중 *Bacillus thuringiensis Tumebacillus permanentifrigoris, Pseudomonas koreensis, Lysinibacillus sphaericus, Agrobacterium vitis, Janthinobacterium lividum* 등과 유사한 분리균들은 식물생장촉진과 발아촉진 관련 미생물로 선발하였다. 그 중 BE100501 균주는 *Tumebacillus permanentifrigoris*와 99% 유사성을 나타내었고, BE100506은 *Bacillus thuringiensis*와 99%, BE100516은 *Agrobacterium vitis*와 99% 및 BE100533은 *Lysinibacillus fusiformis*와 99% 유사성을 나타내었다 (표 4).

표 4. 분리균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 BLAST 결과

No.	분리균주	Strain name	Length(bp)	Similarity
1	BE100484	*Bacillus subtilis* xfchu2	983/986	99%
2	BE100485	*Bacillus psychrosaccharolyticus*	977/981	99%
3	BE100487	*Brevibacteriumfrigoritolerans* AN-1	983/990	99%
4	BE100489	*Renibacterium salmoninarum*	966/977	99%
5	BE100490	*Bacillus simplex* MX6	967/971	99%
6	BE100497	*Microbacteriumhominis* M23051	958/966	99%
7	BE100498	*Bacillus foraminis* DRG5	968/980	99%
8	BE100499	*Burkholderiacepacia* KCTC 11096BP	983/986	99%
9	BE100500	*Bacillus acidiceler* EI-19	980/983	99%
10	BE100501	*Tumebacillus permanentifrigoris* Eur1 9.5	1072/1180	90%
11	BE100502	*Bacillus cereus* MG209	985/987	99%
12	BE100503	*Bacillus megaterium* TOBCMDU-1	978/978	100%
13	BE100506	*Bacillus thuringiensis* 104XG46	979/992	99%
14	BE100507	*Bacillus shandongensis* SD	977/984	99%
15	BE100509	*Bacillus niacini*strain G11	973/974	99%
16	BE100513	*Bacillus luciferensis* LMG	976/980	99%
17	BE100514	*Bacterium 072827*	967/978	99%
18	BE100516	*Agrobacterium vitis* K309	970/979	99%
19	BE100518	*Paenibacillus glebae* LMG 23880^{T}	972/983	99%
20	BE100522	*Pasteurellapneum otropica* ZFJ-3	991/995	99%
21	BE100525	*Pseudomonas koreensis* HG-K5	966/977	99%
22	BE100526	*Bacillus koreensis* BR030	946/946	100%
23	BE100531	*Bacillus drentensis* G18	974/983	99%
24	BE100533	*Lysinibacillus fusiformis* CCM1B	977/977	100%
25	BE100534	*Bacillus bataviensis* IDA 1115	973/976	99%
26	BE100537	*Lysinibacillus boronitolerans* 116YG15	979/985	99%
27	BE100538	*Bacillaceae bacterium* CL3.139	958/982	99%
28	BE100542	*Bacillus muralis* REG126	972/978	99%
29	BE100545	*Bacillus pumilus* B07061	987/987	100%
30	BE100546	*Lysinibacillus sphaericus* 13632	992/994	99%
31	BE100547	*Janthinobacterium lividum* BR01	988/991	99%

라. 분리균주의 생육특성 분석

조건 불리지역에서의 바이오매스 작물의 대량재배에 적합한 생육환경특성에 따른 내생미생물의 선발을 위해 분리균에 대하여 저온, 산성, pH 및 내염특성에 대한 특성을 파악하였다 (그림 5). 온도는 10, 15, 28℃범위에서 측정하였고, pH 5.0 과 6.0 및 NaCl 농도는 0.5, 1.0, 2.0 및 3.0% 범위에서 측정하여 생육특성이 우수한 31 균주를 선발하였다 (표 5). 그 결과, BE100501 균주는 10℃에서 자라지 않았고 15℃에서 약하게 자랐으며, 분리균주 BE100506, BE100516 및 BE100533 균주는 10℃에서 모두 잘 자랐다 (표 5). 분리균주들이 pH 조건에서는 대부분 약하게 자랐다. 분리균주의 NaCl 농도에 따른 배양 결과 대부분의 균주가 0.5%에서 잘 자랐고, BE100501 균주는 1%에서 약하게 자랐으나 2% 이상에서는 자라지 않았으며, BE100506, BE100516, BE100533 균주는 2%와 3%에서 모두 잘 자랐다. 따라서 저온, 산성 pH, 내염 특성을 보인 BE100501, BE100506, BE100516 및 BE100533 균주를 선발하였다. (표 5).

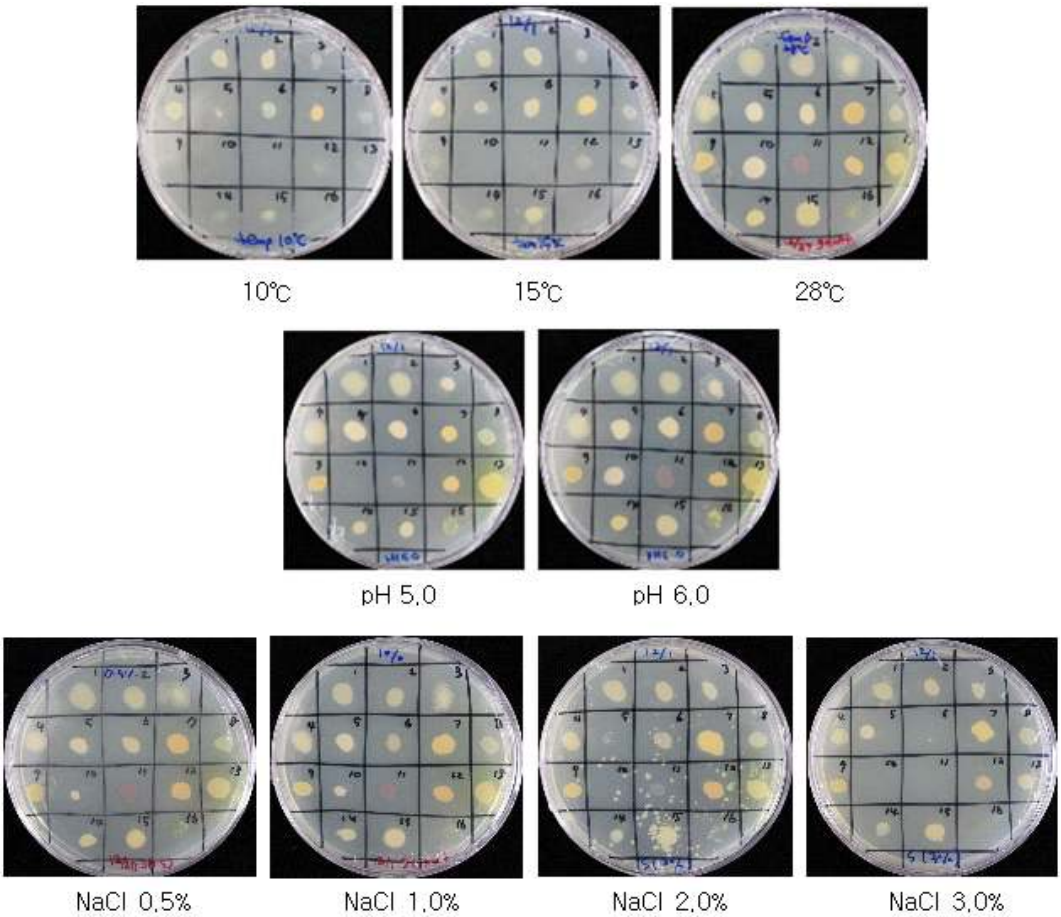


그림 5. 분리균의 온도, pH, NaCl 농도에 따른 생육특성

표 5. 생육특성에 따라 선발한 억새 근권세균

No.	Isolates	Control	Temperature			pH		Salinity			
			10℃	15℃	28℃	pH 5.0	pH 6.0	NaCl 0.5%	NaCl 1.0%	NaCl 2.0%	NaCl 3.0%
1	BE100484	+++	−	+	+++	+	+	++	+	−	−
2	BE100485	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
3	BE100487	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
4	BE100489	+++	−	+	+++	+	+	++	+	−	−
5	BE100490	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
6	BE100497	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
7	BE100498	+++	−	+	+++	+	+	++	+	−	−
8	BE100499	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
9	BE100500	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
10	BE100501	+++	−	+	+++	+	++	+++	+	−	−
11	BE100502	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
12	BE100503	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
13	BE100506	+++	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
14	BE100507	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
15	BE100509	+++	+	+	+++	+	+	++	+	−	−
16	BE100513	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
17	BE100514	+++	−	+	+++	+	+	++	+	−	−
18	BE100516	+++	++	++	+++	++	++	+++	+++	++	++
19	BE100518	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
20	BE100522	+++	−	+	+++	+	+	++	+	−	−
21	BE100525	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
22	BE100526	+++	+	+	+++	−	+	++	+	−	−
23	BE100531	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
24	BE100533	+++	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
25	BE100534	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
26	BE100537	+++	−	+	+++	−	+	++	+	−	−
27	BE100538	+++	+	+	+++	+	+	++	+	−	−
28	BE100542	+++	−	+	+++	−	+	++	+	−	−
29	BE100545	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−
30	BE100546	+++	+	+	+++	−	+	++	+	−	−
31	BE100547	+++	−	−	+++	+	+	++	+	−	−

마. 선발 균주의 식물생장 촉진효과 측정 및 최종선발

Auxin은 식물이 씨에서 발아하여 생장하는데 필요하며 특히 줄기 신장에 관여하는 식물호르몬이며, ACC-deaminase는 식물 스트레스를 물질인 에틸렌의 전구체인 ACC를 가수분해하는 효소로서 식물 생장을 촉진시키는 역할을 한다. 따라서 선발균주의 식물 생장 촉진효과를 확인하기 위하여 auxin 생성능과 ACC-deaminase 활성을 측정하였으며 활성이 우수한 BE100501, BE100506, BE100516, BE100533 등 4균주를 최종적으로 선발하였다 (표 8).

(1) 옥신(Auxin) 생성능

옥신 호르몬 생산은 King's medium B(KB) 배지에 옥신 전구체인 L-트립토판(L-tryptophan)을 0.1% 첨가하고 선발균을 접종하여 28℃에서 24시간 배양하였다. 배양액을 4℃에서 6,000 rpm으로 15분간 원심분리하고 분리된 상등액과 salkoski 용액 (35% $HClO_4$, 50 mL, 0.5M $FeCl_3$ 1 mL)을 1:2로 30분간 암실에서 반응시킨 후 옥신 생성능을 확인하였다. 그 결과, 선발균주 BE100501, BE100506, BE100516, BE100533 균주를 포함한 8균주에서 auxin 생성이 우수하게 나타났다 (표 8).

표 6. Auxin 생성능 확인 배지조성

Medium	Composition (/L)	
King's medium B	Difco proteose peptone no.3	20 g
	K_2HPO_4	1.5 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5 g
	Glycerol	10.0 ml
	*L-tryptophan	0.1 %
	*pH 7.2 at 25℃	

Control (−) (+) (+++)

(−) negative, (+) positive

그림 6. 선발균주에 대한 auxin 생성능

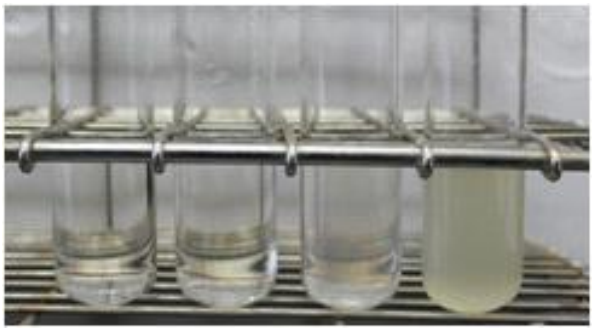
(2) ACC-deaminase 활성

ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) deaminase 생산능은 질소원으로서 3 mM ACC만 첨가된 DF salt minimal 배지에 선발균주를 접종하여 28℃에서 2일간 배양한 후, ACC

를 분해하는 ACC deaminase 생산 여부를 확인하였다. 그 결과, 선발균주 4균주를 포함한 10균주에서 ACC deaminase 생산능이 우수하게 나타났다 (표 8).

표 7. ACC-deamonase 생성능 확인 배지조성

Medium	Composition (/L)	
DF salts (minimal medium)	K_2HPO_4	4.0 g
	Na_2HPO_4	6.0 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
	Glucose	2.0 g
	Gluconic acid	2.0 g
	$(NH_4)_2SO_4$ (N-source)	2.0 g
	Trace elements	
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0 mg
	H_3BO_3	10 μg
	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	11.19 μg
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	124.6 μg
	$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	78.22 μg
	MoO_3 (pH 7.2)	10 μg



Control (−) (+) (+++)

(−) negative, (+) positive

그림 7. 선발균주에 대한 ACC-deaminase 생성능

(3) 가수분해 효소 활성

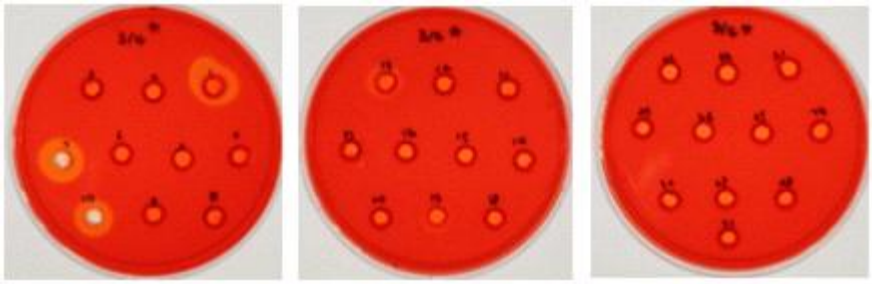
효소활성은 선발균을 LB 액체 배지에 접종하고 28℃에서 24시간 배양한 다음 배양액을 6,000 rpm에서 15분간 원심분리한 상등액을 시료로 사용하였다.

Cellulase 활성은 BMM [(0.2% $(NH_4)_2SO_4$, 0.11% Na_2HPO_4, 0.07% KH_2PO_4, 0.0001% $MgSO_4$, 0.0001% $MnSO_4$] 배지에 0.4% CMC(Carboxymethyl cellulose)가 포함된 고체 배지에 시료를 분주하여 투명환 형성으로 cellulase 활성을 확인하였다.

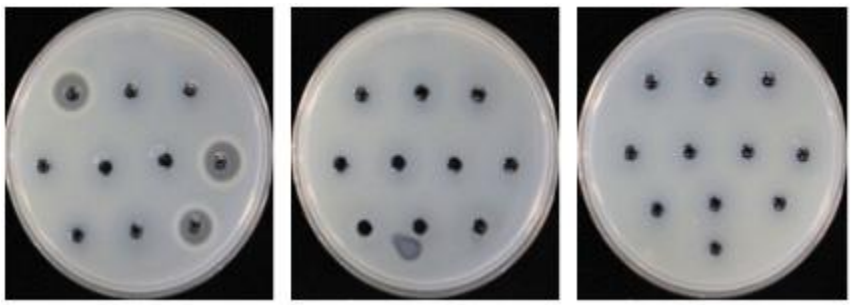
Pectinase는 pectate lyase medium (1% polygalacturonic acid, 1% yeast extract, 0.38 μM $CaCl_2$, 100 mM Tris HCl (pH 8.5), 0.8% agarose, 0.8% sodium azide에 선발균주의 배양 상등액을 분주하여 투명환 형성으로 pectinase 활성을 확인하였다.

Protease는 protease medium 3% gelatin 또는 skim milk, 0.4% nutrient broth, 0.8% agarose, 0.2% sodium azide에 배양 상등액을 분주하여 투명환 형성으로 protease 활성을 확인하였다.

그 결과, 선발균주 BE100501 균주에서 cellulase, pectinase 및 protease을 보인 반면 나머지 선발균주에서는 활성이 없거나 BE100506 균주에서와 같이 활성이 약하게 나타났다 (그림8, 표 8).



Cellulase



Pectinase

Protease

그림 8. 선발균주에 대한 cellulase, pectinase 및 protease 활성

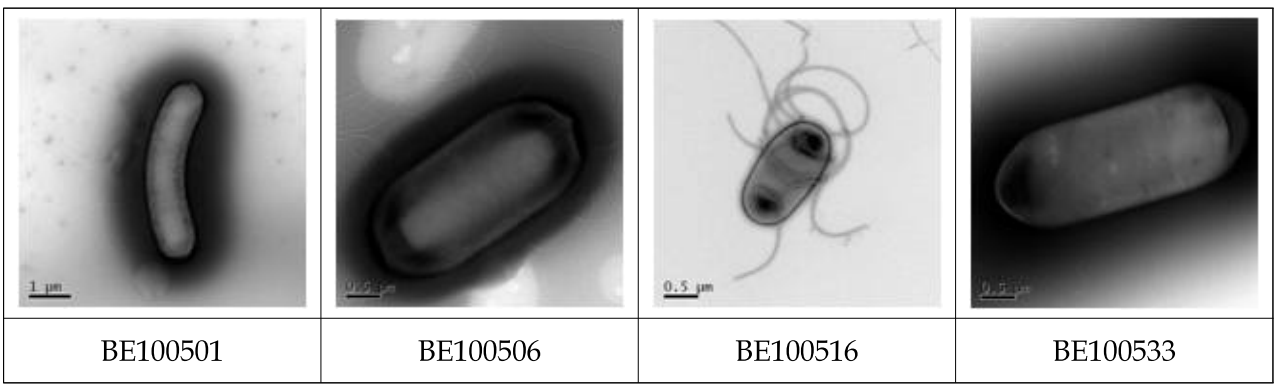
표 8. 식물생육촉진 특성에 따른 최종선발균주

No.	Isolates	Original	Auxin	ACC deaminase	Hydrolytic enzymes		
					Cellulase	Pectinase	Protease
1	BE100484	tissue	-	+	+++	+++	+++
2	BE100485	suspension	-	+++	-	-	-
3	BE100487	suspension	+	-	-	-	-
4	BE100489	suspension	+	+	-	-	-
5	BE100490	tissue	+	+	-	-	-
6	BE100497	suspension	-	+++	-	-	-
7	BE100498	suspension	-	-	+++	+++	+++
8	BE100499	suspension	+	+++	-	-	-
9	BE100500	suspension	-	-	-	-	-
10	BE100501	suspension	+	+++	++	+++	+++
11	BE100502	tissue	+	+	-	-	-
12	BE100503	tissue	+	+++	-	-	+
13	BE100506	tissue	+++	+++	+	-	-
14	BE100507	suspension	-	-	-	-	+
15	BE100509	suspension	+	+++	-	-	-
16	BE100513	suspension	-	+++	-	-	-
17	BE100514	suspension	-	-	-	-	-
18	BE100516	suspension	+++	+++	-	-	+
19	BE100518	tissue	+	-	+	-	-
20	BE100522	suspension	-	-	-	-	-
21	BE100525	suspension	-	-	-	-	-
22	BE100526	suspension	+++	-	-	-	+
23	BE100531	suspension	-	-	-	-	-
24	BE100533	suspension	+++	+	-	-	-
25	BE100534	suspension	+++	-	-	-	-
26	BE100537	tissue	+++	-	-	-	-
27	BE100538	tissue	+	+++	-	-	-
28	BE100542	suspension	+	-	-	-	-
29	BE100545	suspension	-	+	-	-	++
30	BE100546	tissue	+++	-	-	-	-
31	BE100547	tissue	+++	+++	-	-	-

바. 최종선발균주의 균주동정 및 특성

선발균주의 형태적 특성을 확인하기 위하여 투과전자현미경으로 분석한 결과 선발균주 모두 rod type으로 2개 이상의 flagella를 가진 운동성이 있는 균주로 확인 되었다 (그림 9). 선발균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과 BE100501 균주는 *Tumebacillus permanentifrigoris*와 99% 유사도를 나타냈고, BE100506은 *Bacillus thuringiensis*와 99%, BE100516은 *Agrobacterium vitis* 99%, BE100533은 *Lysinibacillus fusiformis* 99% 유사도를 나타냈다 (표 9). 선발균주의 생리적 특성을 조사하기 위하여 배양온도 10℃, 15℃, 28℃에서 3일간 배양하면서 24시간별로 배양특성을 측정한 결과 BE100501 균주는 10℃에서 자라지 않았고 15℃에서 약하게 자라며, 28℃에서는 잘 자랐으며, 선발균주 BE100506, BE100516, BE100533 균주는 10℃에서 모두 자랐다 (표 10). 선발균주를 pH 5.0, pH 6.0 조건에서 배양한 결과 BE100501 균주는 pH 5.0에서 미약하게 자랐으나, pH 6.0에서는 잘 자랐다. 그 밖의 선발균주는 pH 5.0과 pH 6.0에서 모두 잘 자랐다(표 10). 선발균주의 내염성을 확인하기 위하여 NaCl 농도를 각각 0.5%, 1%, 2% 및 3%로 하여 배양한 결과 BE100501 균주는 1% NaCl 농도에서 약하게 자랐고 2% 이상에서는 자라지 않았으며, BE100506, BE100516, BE100533 균주는 NaCl 2%와 NaCl 3%에서 모두 잘 자랐다 (표 10).

한편, 식물생장촉진능력을 가진 균주선발을 위하여 auxin 생성능과, ACC deaminase활성 및 cellulase, pectinase, protease 가수분해 활성능이 우수하고 내염성과 생리적 특성 등 다양한 생리적 특성을 지닌 4균주를 선발하였고 (그림 10, 표 11) 억새의 생장을 촉진하는 효과를 확인하여 이들 4균주에 대하여 특허를 출원하였다 [특허출원 “물억새 뿌리로부터 분리한 미생물을 이용한 식물생장촉진 방법” 출원번호: 제2011-0122257호, 출원일: 2011년 11월 22일]



BE100501	BE100506	BE100516	BE100533

그림 9. 선발균주의 전자현미경 사진 (TEM)

표 9. 최종선발균주의16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과

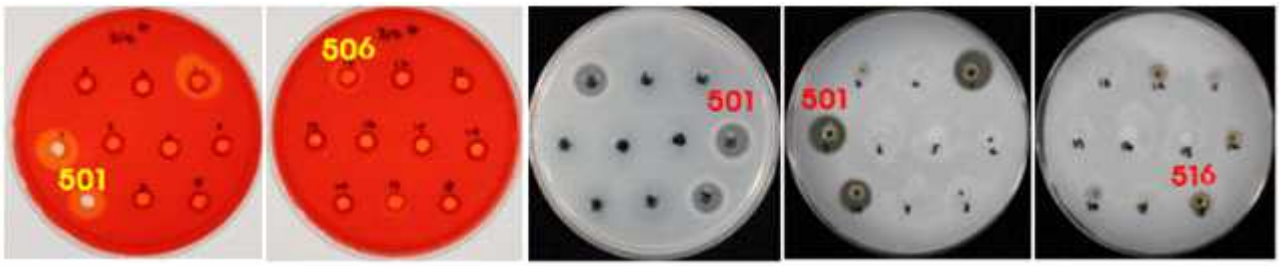
균주번호	균주명	길이(bp)	유사도
BE100501	*Tumebacillus permanentifrigoris* Eur1 9.5	1072/1180	99%
BE100506	*Bacillus thuringiensis* 104XG46	1450/1452	99%
BE100516	*Agrobacterium vitis* K309	1420/1438	99%
BE100533	*Lysinibacillus fusiformis* CCM1B	1491/1498	99%

표 10. 최종선발균주의 생육특성

Isolates	Control	Temperature			pH		Salinity			
		10℃	15℃	28℃	pH 5.0	pH 6.0	NaCl 0.5%	NaCl 1.0%	NaCl 2.0%	NaCl 3.0%
BE100501	+++	-	+	+++	+	++	+++	+	-	-
BE100506	+++	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
BE100516	+++	++	++	+++	++	++	+++	+++	++	++
BE100533	+++	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++

표 11. 최종선발균주의 식물생육촉진 특성

Isolates	Original	Auxin	ACC deaminase	Hydrolytic enzymes		
				Cellulase	Pectinase	Protease
BE100501	suspension	+	+++	++	+++	+++
BE100506	tissue	+++	+++	+	-	-
BE100516	suspension	+++	+++	-	-	+
BE100533	suspension	+++	+	-	-	-



Cellulase Pectinase Portease

그림 10. 최종선발균주의 식물생육촉진 특성

2. 사료작물 헤어리베치로부터 식물생육촉진 미생물 분리

헤어리베치는 두과작물로 겨울철 유휴농지를 활용한 청정유기질 비료로 활용되고 있는 작물로서 화학질소비료 없이 재배가 가능하고 유기물을 토양에 공급시키고 토양의 물리성 및 미생물상을 개선시켜준다. 따라서 헤어리베치 뿌리혹으로부터 rhizobium균을 분리하고 내염 및 저온, 질소고정능력 및 뿌리혹형성능이 우수한 균주를 선발하여 녹비작물의 재배에 이용하고자 하였다.

가. 사료작물 시료의 수집

사료작물로부터 식물생육촉진 근권미생물을 분리하기 위하여 헤어리베치, 청보리 및 살갈퀴 등의 사료작물을 수집하였다. 수집지는 전남(장흥·강진), 충남(당진·예산), 전북 새만금, 경북 예천, 경기도 평택 지역과 농촌진흥청 헤어리베치 농가실증시험포 및 지역적응 시험포 전체를 대상으로 수집하였다 (그림 11). 수집한 시료의 뿌리혹으로부터 근류균을 분리하여 뿌리혹 형성능 및 생육촉진 효과가 우수한 균주를 선발하였다.

그림 11. 사료작물 시료수집

나. 헤어리베치 뿌리로부터 근류균 분리

근류균을 분리하기 위하여 뿌리혹을 95% ethanol 1분, 2% NaClO 2분간 표면살균하여 메스를 이용 뿌리혹을 절개한 후 절개면을 YMA(yeast extract mannitol agar) 배지에 도말하여 30℃에서 3~4일간 배양하였다. 분리된 균들을 다시 도말하여 순수한 single colony를 얻었고 이들을 액체 배양 후 20% glycerol stock 하여 -80℃에 보존하여 실험에 이용하였다. 분리결과 헤어리베치 뿌리혹으로부터 총 48개가 균주가 분리되었고, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 이중 21개가 *Rhizobium* 속이었다.

다. 선발 균주의 헤어리베치 근류균 뿌리혹 형성능 확인

분리한 21개 근권세균들이 실제 헤어리베치 뿌리혹 형성균인지 확인하기위하여 각 균주들을 헤어리베치 종자에 접종한 후 nodulation 여부를 확인하였다. Nodulation test는 밑부분이 완전히 막힌 직경 3cm 굵은 유리 시험관 pot와 직경 12cm 플라스틱 pot 두 가지로 나누어 수행하였으며 유리시험관은 vermiculite를 비닐 pot는 peat moss : vermiculite를 1:1로 혼합한 멸균흙을 사용하였다(그림 12). 소독한 헤어리베치 종자에 10^9cfu/ml 농도로 균주코팅 후 파종하고 같은 농도의 균주현탁액을 5ml씩 추가 접종하여 6주 후 뿌리혹형성 유무를 관찰한 결과 (그림 13) 21균주 중 RE110039 및 RE110102 2균주에서만 뿌리혹이 형성되었다.

유리시험관 pot　　플라스틱 pot

그림 12. 헤어리베치 근류균 뿌리혹 형성 확인실험

Control RE110039 Control RE110102

그림 13. 헤어리베치 근류균에 의한 뿌리혹 형성

3. 제제화 기술 개발

가. 제제화 및 포장실험을 위한 대량배양

(1) 억새 근권세균의 대량배양 (50L scale)

억새 근권세균 4균주에 대하여 제제화 및 포장실험을 위한 대량배양을 50L 발효조로 실시하였다. 사용배지는 LB배지를 사용하였고, BE100501 균주의 경우는 액체배지에서 잘 자라지 않은 특성이 있는 균주로서 억새 뿌리 추출물을 R2A 배지에 첨가하여 배양하였다 (표 12).
종배양은 1L 플라스크에 본배양 배지와 동일한 배지를 사용하여 300ml 용량으로 1~2일간 배양하여 본배양 접종에 사용하였다. 본배양은 50L 발효조에 30L working volume으로 종배양액 1% (v/v)를 접종하여 28℃에서 120 rpm., 1 vvm 조건으로 1~2일 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 원심분리 한 다음 동결건조하여 제제 제조를 위한 시료로 사용하였다.

표 12. 억새 근권세균 대량배양 조건

선발균주	균 종	배지	배양시간	비고
BE100501	*Tumebacillus permanentifrigoris*	R2A	48시간	억새뿌리 추출물 0.5%
BE100506	*Bacillus thuringiensis*	LB	24시간	
BE100516	*Agrobacterium vitis*	LB	24시간	
BE100533	*Lysinibacillus fusiformis*	LB	24시간	

그림 14. 50L 발효조

그림 15. Freezer dryer

(2) 헤어리베치 근권세균의 대량배양

헤어리베치 근류균 RE110039 균주에 대하여 제제화 및 포장실험을 위한 대량배양을 50L 발효조로 실시하였다. 선발균주는 *Rhizobium* 속으로 배지는 YM배지를 사용하였고(표 13), 종배양은 1L 플라스크에 본배양 배지와 동일한 배지를 사용하여 300ml 용량으로 3~4일간 배양하여 본배양 접종에 사용하였다. 본배양은 50L 발효조에 30L working volume으로 종배양액 1% (v/v)를 접종하여 28℃에서 120 rpm., 1 vvm 조건으로 3~4일 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 원심분리 한 다음 동결건조하여 제제 제조를 위한 시료로 사용하였다.

표 13. 헤어리베치 근류균 배양배지

Medium	Composition (/L)	
YM broth	K_2HPO_4	0.5 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
	Yeast extract	0.4 g
	Mannitol	10.0 g
	NaCl	0.1 g
	pH 6.8	

나. 제제화 및 제형화

(1) 억새 근권세균

최종선발균주를 이용하여 수화제를 제조하였다. 분말수화제는 선발균주 동결건조 분말을 원제로 하여 증량제로 pyrophylite와 perlite를 첨가하여 조성하였고 계면활성제로 WP700을 조합한 다음 물에 희석하여 제조하였다 (그림 16, 표 14).

표 14. 억새용 분말수화제 원료 조성

성 분		용 량
원제	선발균주 동결건조분말 (10^9 CFU/g)	1 g
증량제	Pyrophylite	69 g
	Perlite	20 g
계면활성제	WP 700	10 g
총 량		100 g

분말수화제

그림 16. 억새용 분말수화제

분말수화제

헤어리베치 종자 종자코팅제 처리

그림 17. 헤어리베치용 분말수화제 및 종자코팅제

(2) 헤어리베치 근권세균

최종선발균주를 이용하여 수화제 및 종자코팅제를 제조하였다. 분말수화제는 RE110039 균주의 동결건조 분말을 원제로 하여 증량제로 pyrophylite와 perlite를 첨가하여 조성하였고 계면활성제로 WP700을 조합한 다음 물에 희석하여 제조하였다 (그림 17, 표 17).

종자코팅제는 RE110039 균주의 동결건조 분말을 원제로 하여 증량제로 perlite, 점착제로 arabic gum를 첨가하여 조성하였고 계면활성제로 WP700을 조합한 다음 2배 양의 증류수에 희석하여 사용하였다 (그림 17, 표 18).

표 17. 헤어리베치용 분말수화제 원료 조성

성 분		용 량
원제	RE110039 동결건조분말 (10^9 CFU/g)	1 g
증량제	Pyrophylite	69 g
	Perlite	20 g
계면활성제	WP 700	10 g
총 량		100 g

표 18. 헤어리베치용 종자코팅제 원료 조성

성 분		용 량
원제	RE110039 동결건조분말 (10^9 CFU/g)	1 g
증량제	Perlite	88 g
점착제	Arabic gum	1 g
계면활성제	WP 700	10 g
총 량		100 g

4. 미생물제 효능평가, 안정성 확보기술 및 개발대상 작물과 포장에 따른 미생물제 처리 방법 개발

가. 억새 생장 촉진효과

(1) 억새 지하경(rhizome)에 대한 식물 생장 촉진효과

선발균주의 억새 생장촉진 효과를 확인하기 위하여, 지하경에 선발균주를 처리하여 생장 촉진 효과를 관찰하였다. 억새 뿌리로부터 잘 형성된 지하경(rhizome)을 엄선하고 지하경을 3마

디 간격으로 전지용 가위로 잘라서 억새 발아 유목으로 이용하였으며, 엄선된 지하경은 직경 10 cm 실험용 포트에 멸균된 상토를 채워서 pot에 이식한 후 30℃ growth chamber에서 3일간 억새 발근의 활착을 유도하여 억새 생육촉진에 이용하였다. 접종 시료는 선발균체로부터 배양균체의 배지 성분을 멸균수로 3~4회 세척한 균주 현탁액을 10^8 CFU/ml 농도로 각 지하경 주위에 10 ml씩 분주하였고 대조구로 멸균수를 동일 양으로 각각 3개체씩 3회 반복으로 처리한 후, 접종 30일 후에 선발 균주에 대한 억새 생육촉진 효과를 확인하였다.

그 결과, 지하경 뿌리에 접종한 네 균주는 대조구인 무처리구 100%보다 억새 줄기 길이가 118~120% 정도 식물 생장이 촉진되었고, 뿌리생성도 무처리구 보다 생장촉진 효과를 나타내는 것을 확인하였다 (그림 18).

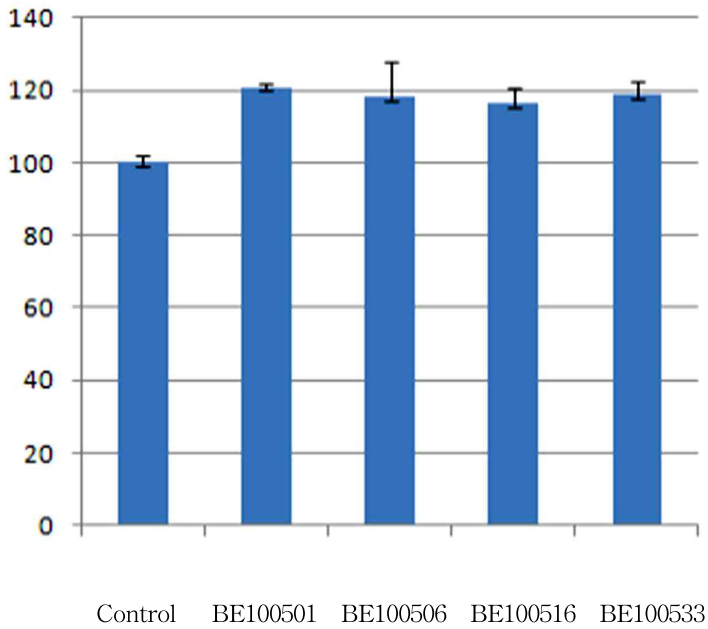


그림 18. 선발균주의 억새 지하경 처리에 의한 억세 생육촉진 효과

(2) 억새 종자에 대한 식물 생장 촉진효과

선발균주의 억새 종자처리에 대한 생장촉진 효과를 확인하기 위하여, 억새 종자에 선발균주를 처리하여 생장 촉진 효과를 관찰하였다. 억새 종자를 2% NaClO 용액에 10분간 침지하여 표면살균하고 멸균수로 4차례 세척한 종자를 실험에 이용하였으며 멸균한 여과지를 petridish에 깔고 멸균수를 5 ml씩 분주한 후 준비한 억새 종자를 여과지에 올려 30℃에서 7일간 발아시켰다. 발아된 종자 유묘를 포트에 이식하고 선발균주의 현탁액(10^8 CFU/ml)을 억새 뿌리 주위에 10 ml씩 분주하였으며 대조구로 멸균수를 동일량으로 처리하였다. 각 처리구는 1개체에

8회 반복 실험하였으며 처리 30일 후 억새의 생장을 확인하였다.

그 결과, 억새 종자 발아를 이용한 식물 생장촉진 효과는 무처리구 보다 선발균주를 처리하였을 경우 줄기가 최대 200% 이상 생장이 촉진되는 것을 확인하였다 (그림 19, 20).

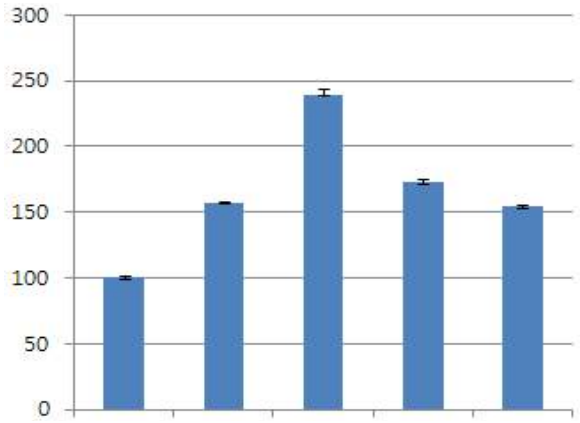
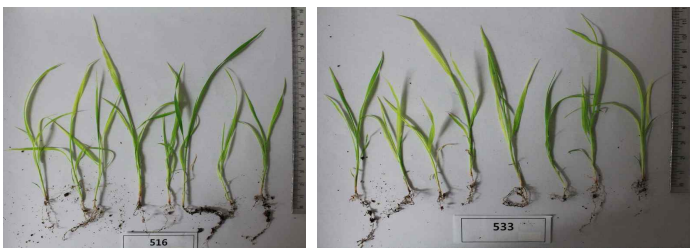


그림 19. 선발균주의 억새 종자 처리에 의한 억세 생육촉진 효과

Control BE100501 BE100506



BE100516 BE100533

그림 20. 선발균주의 억새 종자 처리에 의한 억세 생육촉진 효과

나. 억새 rhizome 미생물처리 생육촉진효과 포트 시험

(1) 1차 포트시험

선발균주에 대한 억새 생장촉진 효과를 확인하기 위하여, 억새 뿌리로부터 잘 형성된 지하경(rhizome)을 엄선하고 지하경을 전지용 가위로 잘라서 억새 발아 유묵으로 이용하였다. 엄선된 지하경은 직경 10 cm 실험용 포트에 멸균된 상토를 채워서 Pot에 이식후 30℃ growth chamber에서 3일간 억새 발근의 활착을 유도하여 억새 생육촉진에 이용하였다. 접종 시료는 본 발명의 균주 배양균체의 배지 성분을 멸균수로 3~4회 세척한 균주 현탁액을 10^8 CFU/ml 농도로 각 지하경 주위에 10 ml씩 분주하였고 대조군으로 멸균수를 동일 양으로 각각 3개체씩 3회 반으로 처리한 후, 접종 30일 후 선발 균주에 대한 억새의 생육촉진 효과를 확인하였다 (그림 21). 그 결과, 그림 22에 나타낸 바와 같이, 지하경 뿌리에 접종한 균주는 대조구인 무처리구 보다 BE100516, BE100518, BE100533, 및 BE100534 처리구에서 지상부 생장에서 150~200% 이상의 생장촉진효과를 나타냈고, 뿌리생성도 무처리구 보다 생장이 촉진되는 효과를 나타냈다.

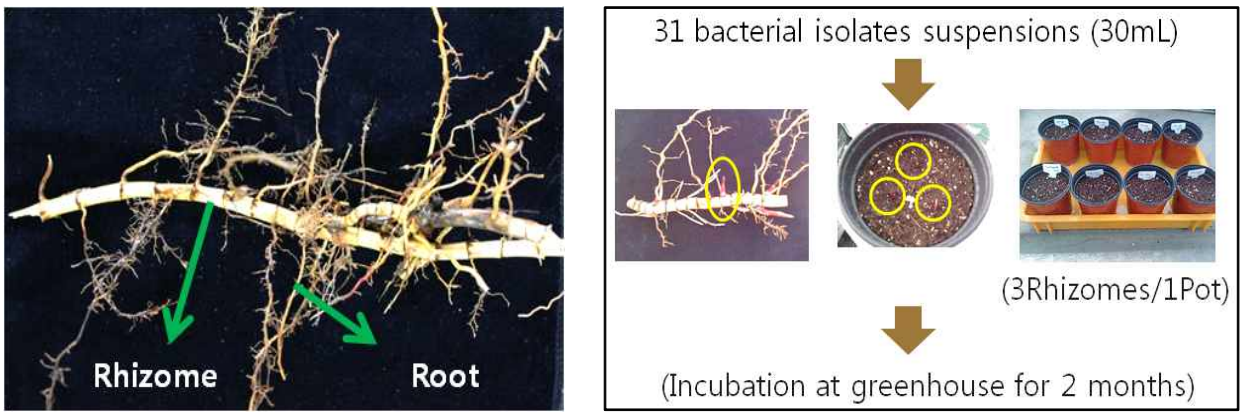


그림 21. 억새 뿌리로부터 rhizome 분리 방법 및 미생물처리 생육촉진 효과 포트실험

Con. BE100516

Con. BE100518

Con. BE100533

Con. BE100534

그림 22. 억새 rhizome 미생물처리에 의한 생육촉진 효과

(2) 2차 포트시험

1차 test와 동일한 방법으로 선발균주 및 추가균주에 대한 생육촉진 효과를 시험한 결과, 그림 23에 보인 바와 같이, 미생물 접종 30일 경과 후, 지하경 뿌리에 접종한 처리구는 대조구인 무처리구 보다 BE100501, BE100506, BE100516, BE100518, BE100533, BE100534 및 BE100547 처리구에서 지상부의 생육이 130~180% 이상 촉진되는 효과를 나타냈고, 뿌리생성도 무처리구 보다 생장이 촉진되는 효과를 나타냈다.

Con. BE100501 Con. BE100506 Con. BE100516 Con. BE100518

Con. BE100533 Con. BE100534 Con. BE100547

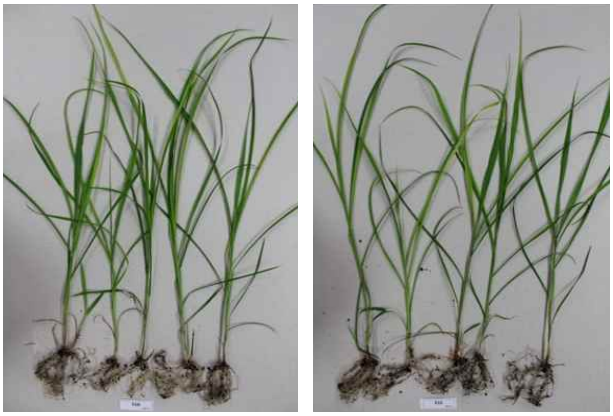
그림 23. 억새 rhizome 미생물처리에 의한 생육촉진 효과

(3) 3차 포트시험

2차 test와 동일한 방법으로 선발균주 및 추가균주에 대한 생육촉진 효과를 시험한 결과, 그림 24에 보인 바와 같이, 미생물 접종 60일 경과 후, 대조군인 무처리구 보다 BE100501, BE100506, BE100516, 및 BE100533 처리구에서 지상부 생육이 120~150% 이상 촉진되는 효과가 나타났고, 뿌리생성도 무처리구 보다 생장이 촉진된 효과를 보였다.

이상의 1차, 2차 및 3차 pot 시험결과, 초기에 생장효과가 우수하고 시간이 경과되면서 생장촉진효과가 감소되는 경향을 보였다. 미생물처리 후 30일 까지는 생장촉진효과가 유의적으로 있었으나 60일 후 시험결과는 30일까지의 결과보다 효과가 떨어지게 나타났다. 따라서, 추후 연구에서는 미생물처리 30일 이전에 처리 횟수와 제제 개발 및 처리기술 등의 약효지속성과 약효증진에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Control BE100501 BE100506



BE100516 BE100533

그림 24. 억새 rhizome 미생물처리에 의한 생육촉진 효과

다. 다양한 작물에 대한 종자 발아 및 생장 촉진효과

선발균주의 종자 발아 및 생장 촉진효과를 확인하기 위하여, 바이오에너지작물인 억새 외에 녹비작물인 수단그라스, 대표적 식량 작물인 보리와 벼, 쌍떡잎식물인 배추와 토마토 종자를 대상으로 실험을 수행하였다.

수단그라스, 벼, 보리, 배추 및 토마토 종자를 2% NaClO 용액에 10분간 침지하여 종자표면을 살균한 후 멸균수로 4회 세척하여 발아용 종자로 이용하였다. 종자 발아는 petridish 내에 멸균된 여과지를 깔고 28℃에서 발아를 유도하였다. 균주처리는 여과지에 균주 현탁액을 각각 10^8 CFU/ml의 농도로 3 ml씩 분주하였다. 대조구로는 멸균수를 각각 3 ml씩 처리하였으며 각 처리구는 20개체씩 3회 반복 실험하였다.

각 작물의 발아 및 생장촉진효과는 처리 후 7일 동안 관찰하였다. 수단그라스는 그림 25에 나타낸 바와 같이 BE100501, BE100506 및 BE100516 균주가 종자발아 및 식물 생장 촉진효과를 나타냈으며, 특히 BE100506 처리구에서는 무처리구 보다 200% 이상 발아 촉진 효과를 보였다. 보리의 경우, 그림 26과 같이 BE100501 및 BE100516 균주가 종자발아 및 식물 생장 촉진효과를 나타냈고, 벼는 그림 27과 같이 BE100501 균주가 효과를 나타냈다. 배추의 경우는 그림 28에 나타난 바와 같이 BE100501 및 BE100533 균주가 효과를 나타냈으며, 특히 균주 처리구는 무처리구와 비교하여 줄기 직경이 현저히 두껍게 발아하였다. 또한, 토마토의 경우는 그림 29와과 같이 BE100516 균주가 종자발아 및 식물 생장 촉진효과를 나타냈다.

선발균주에 대한 이상의 종자발아 및 발아촉진 시험결과, 억새에서는 발아 촉진효과가 선발균주 4균주 모두에서 나타났고, BE100501은 억새, 수단그라스, 보리 벼, 배추의 발아를 촉진하였다. BE100506 균주는 억새, 수단그라스를, BE100516은 억새, 보리, 토마토를 BE100533은 억새와 배추의 발아를 촉진하였다.

이상과 같이 식물생장촉진능력과 auxin 생성능, ACC deaminase 활성 및 cellulase, pectinase, protease 가수분해 활성능이 우수하고 내염성과 생리적 특성 등 다양한 생리적 특성을 지닌 4균주를 선발하고 (표 19) 억새의 생장을 촉진하는 효과를 확인하여 특허를 출원하였다 [특허출원 “물억새 뿌리로부터 분리한 미생물을 이용한 식물생장촉진 방법” 출원번호: 제 2011-0122257호, 출원일: 2011년 11월 22일]

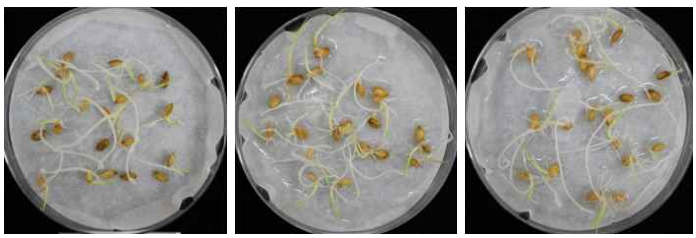
표 19. 선발균주의 다양한 작물에 대한 종자발아촉진 효과

선발균주	균 종	억새	수단그라스	밀	보리	벼	배추	오이	토마토
BE100501	*Tumebacillus permanentifrigoris*	++	++	−	++	+++	++	−	−
BE100506	*Bacillus thuringiensis*	+++	+++	−	−	−	−	−	−
BE100516	*Agrobacterium vitis*	+++	−	−	++	−	−	−	+++
BE100533	*Lysinibacillus fusiformis*	+++	−	−	−	−	++	−	−

(+): 양성, (−): 음성

Control BE100501 BE100506 BE100533

그림 25. 선발균주의 수단그라스 종자 처리에 의한 발아촉진 효과



Control BE100501 BE100516

그림 26. 선발균주의 보리 종자 처리에 의한 발아촉진 효과

Control BE100501

그림 27. 선발균주의 벼 종자 처리에 의한 발아촉진 효과

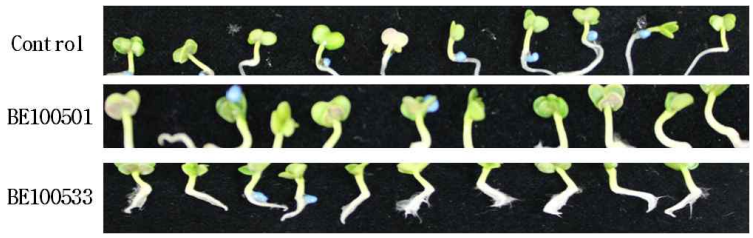
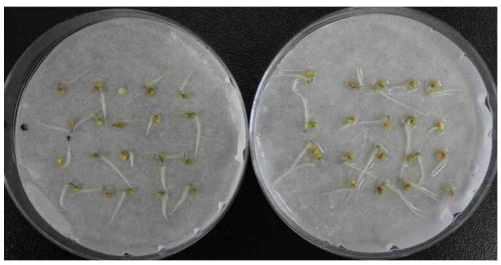


그림 28. 선발균주의 배추 종자 처리에 의한 발아촉진 효과



Control BE100516

그림 29. 선발균주의 토마토 종자 처리에 의한 발아촉진 효과

5. 대규모 지역 시용에 적합한 적용기술 개발

가. 억새 현장적응 포장시험

(1) 한국생명공학연구원 포장실험

선발균주에 대한 소포장에서의 억새 생장촉진 효과를 확인하기 위하여, 억새 뿌리로부터 잘 형성된 지하경(rhizome)을 엄선하고 지하경을 3마디 간격으로 전지용 가위로 잘라서 억새 발아 유목으로 이용하였다. 엄선된 지하경은 직경 10 cm 실험용 포트에 멸균된 상토를 채워서 pot에 이식한 다음 30℃ growth chamber에서 15일간 억새 유묘를 배양하고 균일하게 자란 억새 유묘를 선별 포장시험묘목으로 이용하였다. 포장은 한국생명공학연구원 포장에 가로 2 m 세로 4m 포장에 난괴법으로 3개체씩 4반복으로 포장을 조성하였다 (그림 30). 접종 시료는 선발균주 BE100501, BE100506, BE1005 및 BE100533의 배양균체의 배지 성분을 멸균수로 3~4회 세척한 균주 현탁액을 10^8 CFU/ml 농도로, 대조구는 각 지하경 주위에 증류수를 10 ml씩 관주하여 처리하였다. 억새생장촉진 효과 검증은 현재 진행 중에 있다.

그림 30. 억새 rhizome 미생물처리에 의한 포장시험

(2) 새만금 포장시험 (1차)

선발균주에 대한 현장적응 및 염집적 토양에서의 억새 생장촉진 효과를 확인하기 위하여, 새만금간척지의 저염, 중염 및 고염 지역의 포장에서 시험하였다. 억새 파종은 억새 뿌리로부터 잘 형성된 지하경(rhizome)을 엄선하고 지하경을 3마디 간격으로 전지용 가위로 잘라서 억새 발아 유목으로 이용하였다. 엄선된 지하경은 직경 10 cm 실험용 포트에 멸균된 상토를 채워서 pot에 이식한 후에 30℃ growth chamber에서 15일간 억새 유묘를 배양하고 균일하게 자란 억새 유묘를 선별 포장시험묘목으로 이용하였다. 포장은 전라북도 부안군 계화면 소재 계화 새만금간척지 포장의 저염(NaCl 0.15%), 중염(NaCl 0.3%), 고염(NaCl 0.4%)포장에 처리구당 가로 2m 세로 1.8m 면적에 난괴법으로 3개체씩 4반복으로 포장을 조성하였다 (그림 31). 접종 시료는 선발균주 BE100501, BE100506, BE1005 및 BE100533의 배양균체의 배지 성분을 멸균수로 3~4회 세척한 균주 현탁액을 10^8 CFU/ml 농도로, 대조구는 각 지하경 주위에 증류수를 10 ml씩 관주하였으며, 관주처리 30일 후 선발 균주에 대한 억새의 생육촉진 효과를 확인하였다. 그 결과, 새만금 간척지 중염 및 고염에서는 염장해로 인하여 억새가 고사하였고, 저염에서는 일부 발아는 되었으나 집중호우와 장마로 포장이 침수되어 결과를 얻을 수 없었다.

저 염　　중 염　　고 염

저 염　　중 염　　고 염

그림 31. 억새 rhizome 미생물처리에 의한 염집적 포장시험

(3) 새만금 포장시험 (2차)

2011년 10월 26일, 2차 새만금 포장시험을 실시하였다. 1차 새만금 포장시험에서 중염 및 고염에서 염장해로 인하여 억새가 발아 되지 않아서 억새종자 발아 후 3개월 동안 배양한 억새 유묘를 포장에 이식하여 시험용 억새시료로 사용하였다. 포장은 전라북도 부안군 계화면 소재 새만금간척지의 저염(NaCl 0.01%), 중염(NaCl 0.03%) 토양의 가로 1.8 m 세로 0.8 m 면적 포장에서 시험하였으며, 난괴법으로 3개체씩 4반복으로 이식하여 실시하였다. 접종 시료는 선발균주 BE100501, BE100506, BE1005 및 BE100533의 배양균체 배지 성분을 멸균수로 3~4회 세척한 균주 현탁액을 10^8 CFU/ml 농도로, 대조구는 각 지하경 주위에 증류수를 10 ml 씩 관주하여 처리하였다 (그림 32).

억새는 월동기에 지상부는 고사하고 지하 뿌리에 양분을 축척해서 억새뿌리로 월동 후 봄에 뿌리로부터 발아해서 여름에 자라게 된다. 새만금 시험포장은 가을에 실시하였으며 현재는 억새가 월동에 들어간 상태이므로 추후 억새생장촉진효과 등을 조사할 계획이다.

그림 32. 억새 rhizome 미생물처리에 의한 염집적 포장시험

나. 헤어리베치 근류형성능 및 생육촉진 우수 균주의 소포장 토양 적용 시험

사료작물인 헤어리베치의 생육을 촉진하는 근류균을 선발하기 위하여 각지에서 수집한 뿌리혹으로부터 총 48 균주를 분리하였으며 이중 16S rDNA sequencing 결과 21개 *Rhizobium* sp.이 분리되었다. 분리한 21개 *Rhizobium* 속 분리균으로부터 뿌리혹 형성능 및 생육촉진 효과가 우수한 RE110039 균주를 선발하였으며 선발 균주의 토양에서 적용시험을 수행하였다. 시험포는 충북 괴산군 '흙살림' 포장을 이용하였으며 총 포장면적은 3.4×10.2 m, 처리구당 면적은 80×180 cm로 조성하였다 (그림 33). 선발균주인 RE110039 균주처리와 종자소독 한 무처리, 총 2처리를 4반복 하였고, 처리구당 종자코팅한 종자를 40립씩 파종하고 균주현탁액(10^9cfu/ml) 5ml 씩을 추가 접종하였다. 종자코팅은 종자소독 후 1% carboxymethylcellulose (CMC)가 첨가된 균주현탁액(10^9cfu/ml)에 종자를 5분간 침지시켜 건조하고, pearlite에 균주현탁액을 섞어 만든 균제제를 종자에 도포하였다. 헤어리베치의 파종적기에 맞추어 2011년 10월 초 조성된 포장은 현재 7cm 정도 헤어리베치가 자란 상태로 추후 뿌리혹 형성 및 헤어리베치 생육촉진 효과 등에 대해 조사할 계획이다.

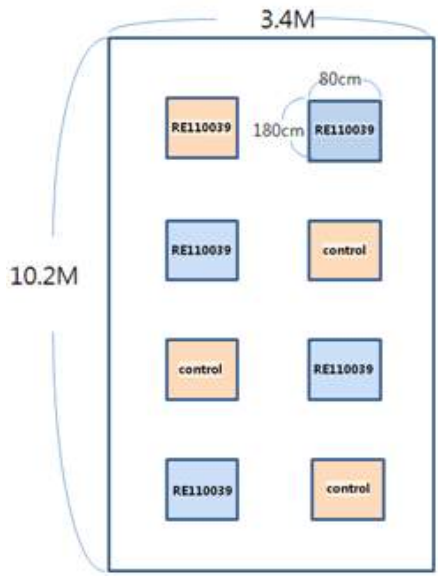


그림 33. 헤어리베치 소포장 실증 실험

Ⅲ. 염류 집적지에서 바이오매스 생산을 위한 기능성 미생물 비료의 적용기술 개발

1. 실험에 사용된 새만금 간척지 토양의 이화학성 분석

가. 간척지 토양의 채취와 이화학적 특성 분석 방법

실험에 사용한 토양은 새만금 간척지 계화지구 계화시험포장지의 토양을 사용하였다. 토양의 채취는 포트실험을 위해 염류농도별로 3개의 구역을 선정하였으며, 각각의 구역별로 다시 10군데의 토양을 채취하였다 (Fig. 1). 토양의 이화학성 분석을 위해 채취된 시료는 그늘에서 풍건시킨 후 2mm 체를 통과시킨 것을 사용하였다. 토양의 pH는 토양과 물을 1:5로 섞어 현탁액으로 만든 다음 30분 진탕 후 pH meter를 사용하여 측정하였다. EC는 포화침출법을 이용해 측정하였으며, 유기물은 Walkely-Black법에 준하여 측정하였다. 토양 내 NH_4^+-N은 켈달분해를 통해 Kjeldahl Autoanalyzer 1030을 이용하여 측정하였고, NO_3^--N은 Ion Selective Analyzer를 이용하여 측정하였다. 유효인산 함량은 Lancaster법에 준하여 UV/Vis spectrophotometer를 이용해 측정하였다. 치환성 양이온 (K, Ca, Mg, Na)은 100 mL 삼각 플라스크에 풍건토 5 g을 칭량하여 넣은 후 1 M NH_4OAc 침출액 50 mL로 30분 동안 진탕하였다. No. 2 여과지로 여과한 후 ICP-OES로 측정하였다.

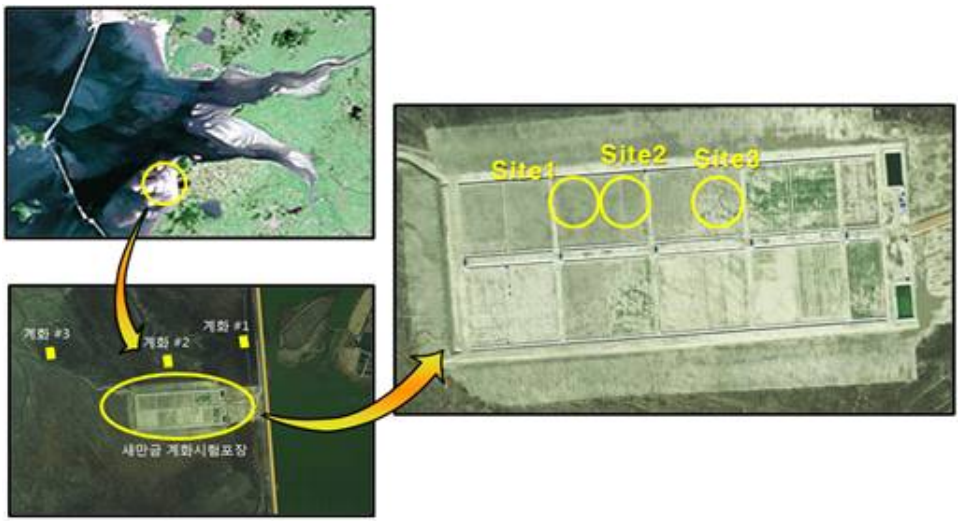


Fig. 1 Soil sampling from Gyehwa area in Saemangeum reclaimed land.

나. 간척지 토양의 채취와 이화학적 특성 분석 결과

실험에 사용된 간척지 토양의 이화학적 특성 분석 결과는 표 1에 나타냈다. pH는 6.2~7.4로 약산성에서 중성을 나타내었다. 전기전도도 (EC)는 Site 1과 Site 2가 각각 13.4와 16.0으로 매우 높았으며, Site 3는 0.51로 비교적 낮은 염분농도를 보였다. 유기물은 0.13 ~ 0.27%, 토양 내 NO_3^--N은 9.98 ~ 46.83 mg kg^{-1}, NH_4^+-N은 2.52 ~ 4.12 mg kg^{-1}, 유효인산은 21.9 ~ 81.4 mg kg^{-1} 로 토양 염분농도가 낮을수록 함량이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 치환성 양이온 또한 K (0.33 ~ 0.88 mmol L^{-1}), Ca (0.06 ~ 1.01 mmol L^{-1}), Mg (0.02 ~ 1.87 mmol L^{-1}), Na (0.33 ~ 6.43 mmol L^{-1})로 토양염분농도가 높은 Site 1, Site 2에 비해 염분농도가 낮은 Site 3에서 낮은 농도를 보이는 것을 확인하였다.

Table 1 Chemical properties of experimental soil sampled from Saemangeum reclaimed land.

Samples	pH	EC	OM	NO_3-N	NH_4^+-N	Ave. P_2O_5	Exch. Cations			
							K	Ca	Mg	Na
	(1:5)	(dS m^{-1})	(%)	------ mg kg^{-1} ------			---------- mmol L^{-1} ----------			
Site 1	6.7	13.4	0.23	46.83	4.12	81.4	0.83	1.01	1.87	6.43
Site 2	6.2	16.0	0.27	19.20	2.52	30.3	0.88	0.62	1.20	1.30
Site 3	7.4	0.51	0.13	9.98	2.74	21.9	0.03	0.06	0.02	0.33

Values in each column are the means of three replications.

2. 실험에 사용된 간척지 토양에서의 발아율 측정

가. 공시작물 선택

실험에 사용한 공시작물은 옥수수 (*Zea maize*)와 수수-수단그라스 교잡종을 (*Sorghum bicolor* L.)을 사용하였다. 두 작물은 현재 새만금 간척지 계화지구 시험포장지에서 실험중인 작물 중에서 내염성과 내병성이 강한 두 작물을 선별하여 선정하였다.

나. 새만금 간척지 토양에서의 작물 발아율 측정 방법

채취한 세 토양에서의 옥수수와 수수-수단그라스 교잡종의 발아율을 측정하기 위해 각각의 토양을 25구 유묘포트에 나눠담았다. 옥수수 종자를 70% 에탄올에서 1 분, 6% NaOCl에서 5 분간 담가 표면살균한 후 증류수로 7 ~ 10번 세척하였고, 수수-수단그라스 교잡종 종자의 경우 70% 에탄올에서 2 분, 1% NaOCl에서 3 분간 담가 표면살균한 후 증류수로 7 ~ 10번 세척하였다. 표면살균 옥수수, 수수-수단그라스 종자를 세 가지 토양이 담긴 유묘포트에 각각 파종하였다. 파종한 종자의 발아율을 7일간 측정하였다.

다. 새만금 간척지 토양에서의 작물 발아율 측정 결과

새만금 간척지에서 채취한 토양에서의 옥수수와 수수-수단그라스 교잡종 종자의 발아율을 측정한 결과, 옥수수의 경우 염분농도가 높은 Site 1과 Site 2에서는 종자가 발아하지 못하였으나, Site 3에서는 옥수수 종자가 84%까지 발아하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2A). 수수-수단그라스 교잡종의 경우, 옥수수와 마찬가지로 Site 1과 Site 2에서는 종자가 발아하는 것을 확인할 수 없었으나, Site 3에서는 90%까지 발아하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2B).

라. 포트실험에서 사용할 공시토양 선택

채취한 세 토양에서 옥수수와 수수-수단그라스 교잡종의 종자 발아율을 측정한 결과, 염분농도가 높은 Site 1과 Site 2에서는 종자가 발아하지 못하는 것을 확인하였으며, 염분농도가 낮은 Site 3에서는 옥수수와 수수-수단그라스의 종자가 각각 84%와 94%까지 발아하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 포트실험에서 사용할 공시토양으로 Site 3에서 채취한 토양을 선정하였다.

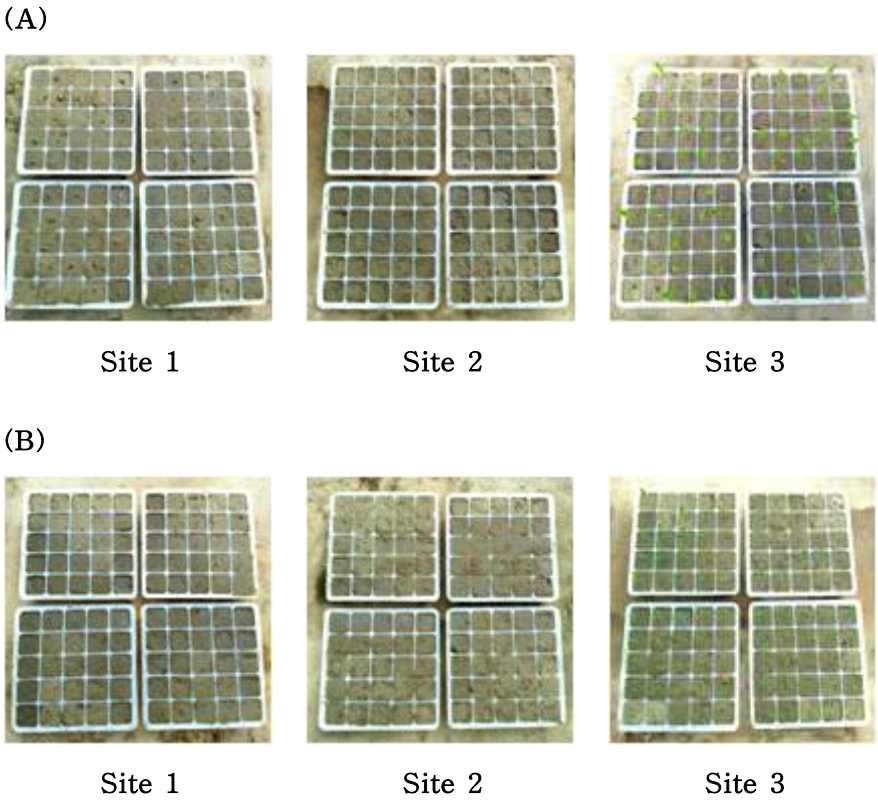


Fig. 2 Germination of maize (A) and sorghum-sudangrass hybrid (B) seeds on three different saline soils of Saemangeum reclaimed land.

3. 간척지 토양에서 비료시비 수준에 따른 식물생장촉진 미생물의 식물생육 촉진효과

가. 공시균주와 균주의 배양조건

실험한 사용한 균주는 *Brevibacterium iodinum* RS16과 *Methylobacterium oryzae* CBMB20을 사용하였다.

- *Brevibacterium iodinum* RS16는 인천 서해안 간척지 토양에서 분리한 호염성 균주로서, 노란색의 콜로니를 형성하며, 호기성, 그람양성의 성질을 가지며 질소고정능을 가지고 있다 (Siddikee et al. 2011). *B. iodinum* RS16는 5% (~0.85 M)의 NaCl을 첨가한 tryptic soy agar (TSA)배지에서 배양한 single colony를 채취하여 25 mL tryptic soy broth (TSB) 배지에 접종한 후, shaking incubator에서 30℃, 150 rpm으로 24 시간동안 배양하였다. 72 시간동안 배양한 *B. iodinum* RS16 배양액 (1×10^8 cfu mL^{-1})을 다시 100 mL의 TSB 배지에 재접종하여 shaking incubator에서 30℃, 150 rpm으로 24 시간동안 배양하였다.

- *Methylobacterium oryzae* CBMB20는 벼의 줄기조직으로부터 분리한 PPFM (pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria)으로 대표적인 식물생장촉진 미생물 중 하나이다 (Madhaiyan et al. 2007). *M. oryzae* CBMB20는 0.5% sodium succinate를 첨가한 ammonium mineral salt (AMS) 배지에서 배양한 single colony를 채취하여 25 mL AMS broth 배지에 접종한 후, shaking incubator에서 30℃, 150 rpm으로 72 시간동안 배양하였다. 72 시간동안 배양한 *M. oryzae* CBMB20 배양액 (1×10^8 cfu mL^{-1})을 다시 100 mL의 AMS broth 배지에 재접종하여 shaking incubator에서 30℃, 150 rpm으로 72 시간동안 배양하였다.

나. Pot experiment

(1) 실험처리구 선정 및 포트준비

이번 실험은 작물별로 70%와 100% 비료시비 수준에서 균주의 접종여부에 따라 총 4 개의 처리구 (T1 - 대조구, T2 - *B. iodinum* RS16 접종, T3 - *M. oryzae* CBMB20 접종, T4 - *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20 동시접종)로 30일 동안 수행하였다. 작물별로 플라스틱 포트 (옥수수 - bottom diameter : 8 cm, height : 19.5 cm, width : 8 cm; 수수-수단그라스 - width : 15.5 cm, length : 11 cm, height : 8.5 cm)에 새만금 간척지 토양 (Site 3)을 2 kg씩 담아 준비하였다. 포트실험은 충북대학교 농업생명환경대학

첨단원예센터의 온실에서 수행하였다.

(2) 비료시비 수준 선정

이번 실험에서는 70%와 100%의 2 가지 비료시비 수준을 선정하여 실험하였다. 화학비료는 요소 (질소함량 46%), 용과린 (인산함량 20%), 염화가리 (칼륨함량 60%)를 사용하였으며, 작물별 표준시비량을 고려하여 옥수수 (N : P : K = 17.4 : 3.0 : 6.9, kg 10 a^{-1})와 수수-수단그라스 교잡종 (N : P : K = 20.0 : 15.0 : 15.0, kg 10 a^{-1})의 포트에 각각 시비하였다. 퇴비 (계분 60%, 수피 20%, 톱밥 20% 함유) 또한 옥수수와 수수-수단그라스 교잡종의 표준시비량을 고려하여 토양 1 kg당 20.0 g 씩 시비하였다.

다. Bacterial inoculation

(1) 종자접종

각각의 배지에 배양한 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20 배양액을 4℃, 10000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 균주펠릿을 얻었다. 0.03 M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 용액으로 2회 세척하고, 이 용액으로 현탁액을 만들었다. 표면살균한 옥수수와 수수-수단그라스 교잡종 종자를 *B. iodinum* RS16, *M. oryzae* CBMB20, *B. iodinum* RS16 + *M. oryzae* CBMB20 균주 현탁액에서 4 시간동안 접종하였다. 무처리구는 종자에 균주를 접종하지 않았다. 접종한 옥수수, 수수-수단그라스 종자를 준비한 플라스틱 포트에 처리구별로 각각 파종하였다.

(2) 근권접종

각각의 배지에 배양한 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20 배양액을 5 L Fermenter을 이용하여 대량배양하였다. 균주 배양액을 4℃, 10000 rpm으로 10 분간 원심분리한 후, 상등액은 버리고 0.1 M phosphate buffer solution (PBS)을 첨가하여 균주 현탁액을 만들었다. 단일접종은 처리구별로 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20 배양액을 20 mL씩 근권접종하였고, 동시접종은 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20 배양액을 각각 10 mL씩 근권접종하였다. 접종은 종자를 파종한 후, 일주일 간격으로 접종하였다.

라. 비료시비 수준과 균주의 접종이 옥수수와 수수-수단그라스 교잡종의 생장에 미치는 효과 확인 방법

비료시비 수준에 따른 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20의 접종이 옥수수와

수수-수단그라스의 생장에 미치는 효과를 확인하기 위해 종자를 파종한지 10일 이후부터 5일 간격으로 30일까지 옥수수와 수수-수단그라스의 줄기 길이를 처리구별로 측정·비교하였다.

마. 비료시비 수준과 균주의 접종이 옥수수와 수수-수단그라스 교잡종의 생물량에 미치는 효과 확인 방법

비료시비 수준에 따른 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20의 접종이 옥수수와 수수-수단그라스의 생물량에 미치는 효과를 확인하기 위해 종자를 파종한지 30일 이후 작물을 수확하였다. 수확한 작물을 지상부와 지하부로 분리하고 70℃ 오븐에서 충분히 건조시킨 후, 각각 무게를 측정·비교하였다.

바. 옥수수

(1) 비료시비 수준과 균주의 접종이 옥수수의 생장에 미치는 효과 확인

비료시비 수준에 따른 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20의 접종이 옥수수의 생장에 미치는 효과를 확인한 결과, 2 가지 비료시비 수준 (70%와 100%)에서 균주 접종시 무처리구에 비해 옥수수의 생장이 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 70% 비료시비 수준에서 종자를 파종한지 15, 25, 30일에 균주 접종시 옥수수의 생장이 무처리구에 비해 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). 특히 종자를 파종한지 30일 이후에서는 *M. oryzae* CBMB20 단일접종 처리구와 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20을 동시접종한 처리구에서 옥수수의 생장이 무처리구에 비해 각각 16.8%와 22.4% 씩 증가하였다. 100% 비료시비 수준에서는, 종자를 파종한지 20, 25, 30일에 균주 접종시 옥수수의 생장이 무처리구에 비해 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 특히 종자를 파종한지 30일 이후에서는 *B. iodinum* RS16, *M. oryzae* CBMB20 단일접종 처리구와 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20을 동시접종한 처리구에서 옥수수의 생장이 무처리구에 비해 각각 28.3%, 41.2%, 33.9% 씩 증가하였다.

비료시비 수준에 따른 옥수수의 생장을 확인한 결과, 균주를 접종하지 않은 무처리구에서는 비료시비 수준에 따른 유의성 있는 차이를 확인할 수 없었다 (Table 2). 70% 비료수준에서 균주 접종를 접종한 처리구와 100% 비료수준에서 균주를 접종하지 않은 처리구를 비교한 결과, 70% 비료수준에서 균주 접종시 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

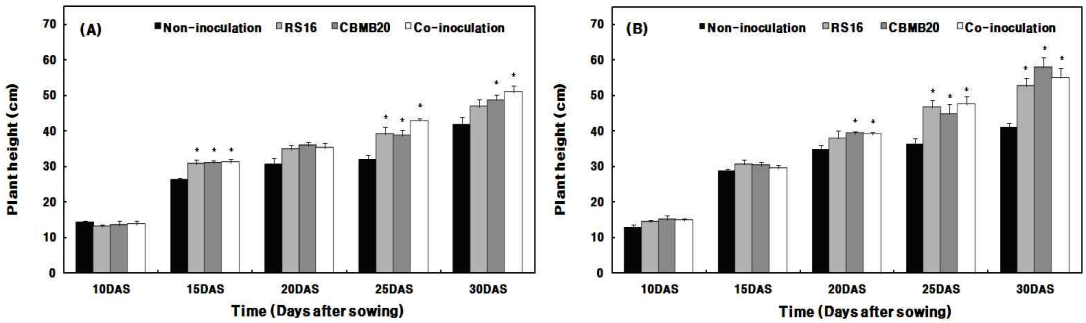


Fig. 3 Effect of *B. iodinum* RS16 and *M. oryzae* CBMB20 inoculation and co-inoculation on plant height of maize with 70% (A) and 100% (B) levels of fertilizer amendment. Each value represents the mean ± S.E (n = 4). Asterisk shows significant difference in values from the control, per group by LSD test ($P \leq 0.05$). $^{*}P \leq 0.05$, $^{**}P \leq 0.001$.

Table 2 Comparition of maize plant height in all treatment of 70% fertilizer level with non-inoculated treatment of 100% fertilizer.

Treatments	Plant height				
	10 DAS	15 DAS	20 DAS	25 DAS	30 DAS
	---------- (cm) ----------				
70% Non-inoculation	14.1±0.4a	26.3±0.5a	30.5±1.8a	31.8±1.4a	41.6±2.2a
100% Non-inoculation	12.6±0.9a	28.6±0.7a	34.6±1.4a	36.3±1.5a	41.0±1.3a
70% + *B. iodinum* RS16	13.0±0.6a	30.6±1.2a	34.8±1.1a	39.0±2.0a	46.8±2.1a
100% Non-inoculation	12.6±0.9a	28.6±0.7a	34.6±1.4a	36.3±1.5a	41.0±1.3b
70% + *M. oryzae* CBMB20	13.4±1.2a	30.9±0.8a	35.8±1.0a	38.6±1.7a	48.6±1.6a
100% Non-inoculation	12.6±0.9a	28.6±0.7a	34.6±1.4a	36.3±1.5a	41.0±1.3b
70% + Co-inoculation	13.6±1.0a	31.0±1.1a	35.1±1.5a	42.8±0.8a	50.9±1.8a
100% Non-inoculation	12.6±0.9a	28.6±0.7b	34.6±1.4a	36.3±1.5b	41.0±1.3b

Each value represents the average of four replicates per treatment ± S.E. In the same column, significant difference according to LSD at $P \leq 0.05$ levels are indicated by different letter.

(2) 비료시비 수준과 균주의 접종이 옥수수의 생물량에 미치는 효과 확인

비료시비 수준에 따른 *B. iodinum* RS16과 *M. oryzae* CBMB20의 접종이 옥수수의 생물량에 미치는 효과를 확인한 결과, 2 가지 비료시비 수준 (70%와 100%)에서 균주 접종시 무처리구에 비해 옥수수의 지하부, 지상부, 전체 건물중이 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 70% 비료시비 수준에서 지하부의 건물중을 측정한 결과, *M. oryzae* CBMB20을 접종한 처리구에서 가장 높은 건물중을 보였다. 지상부와 전체 건물중은 *B. iodinum* RS16 단일접종 처리구와 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20을 동시접종한 처리구에서 가장 높은 건물중을 보였다 (Fig. 4A). 100% 비료시비 수준의 경우, 지하부 건물중은 균주 접종시 무처리구에 비해 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 지상부와 전체 건물중의 경우 *M. oryzae* CBMB20 단일접종과 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20을 동시접종 처리구에서 다른 처리구에 비해 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4B).

료시비 수준에 따른 옥수수의 생물량을 확인한 결과, 균주를 접종하지 않은 무처리구에서는 비료시비 수준에 따른 유의성 있는 차이를 확인할 수 없었다 (Table 3). 70% 비료수준에서 균주 접종를 접종한 처리구와 100% 비료수준에서 균주를 접종하지 않은 처리구를 비교한 결과, 70% 비료수준에서 균주 접종시 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

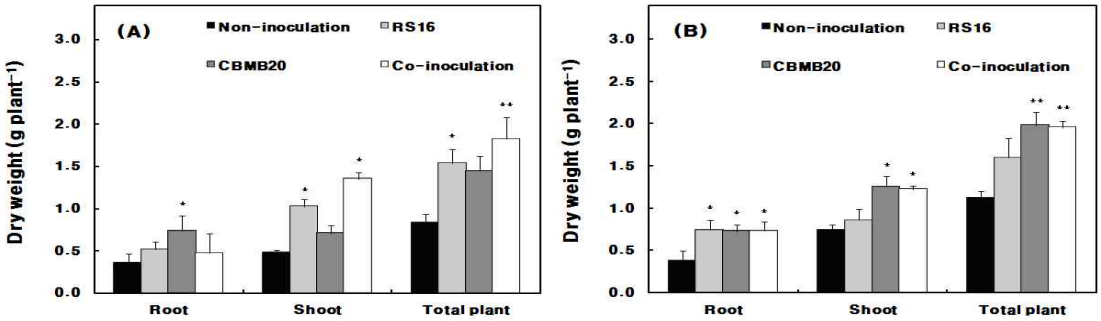


Fig. 4 Effect of *B. iodinum* RS16 and *M. oryzae* CBMB20 inoculation and co-inoculation on dry biomass of maize with 70% (A) and 100% (B) levels of fertilizer amendment. Each value represents the mean ± S.E (n = 4). Asterisk shows significant difference in values from the control, per group by LSD test ($P \leq 0.05$). $^{*}P \leq 0.05$, $^{**}P \leq 0.001$.

Table 3 Comparition of maize dry biomass in all treatment of 70% fertilizer level with non-inoculated treatment of 100% fertilizer.

Treatments	Dry weight (g)		Total dry weight
	Shoot	Root	
70% Non-inoculation	0.48 ± 0.11a	0.36 ± 0.03a	0.83 ± 0.10a
100% Non-inoculation	0.74 ± 0.12a	0.38 ± 0.06a	1.12 ± 0.09a
70% + *B. iodinum* RS16	1.02 ± 0.09a	0.52 ± 0.08a	1.54 ± 0.17a
100% Non-inoculation	0.74 ± 0.12a	0.38 ± 0.06a	1.12 ± 0.09a
70% + *M. oryzae* CBMB20	0.71 ± 0.18a	0.74 ± 0.06a	1.44 ± 0.18a
100% Non-inoculation	0.74 ± 0.12a	0.38 ± 0.06b	1.12 ± 0.09a
70% + Co-inoculation	1.35 ± 0.12a	0.47 ± 0.08a	1.82 ± 0.12a
100% Non-inoculation	0.74 ± 0.12b	0.38 ± 0.06a	1.12 ± 0.09b

Each value represents the average of four replicates per treatment ± S.E. In the same column, significant difference according to LSD at $P \leq 0.05$ levels are indicated by different letter.

사. 수수-수단그라스 교잡종

(1) 비료시비 수준과 균주의 접종이 수수-수단그라스 교잡종의 생장에 미치는 효과 확인

비료시비 수준에 따른 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20의 접종이 수수-수단그라스 교잡종의 생장에 미치는 효과를 확인한 결과, 2 가지 비료시비 수준 (70%와 100%)에서 균주 접종시 무처리구에 비해 수수-수단그라스 교잡종의 생장이 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 70% 비료시비 수준에서 종자를 파종한지 20, 25, 30일에 균주 접종시 수수-수단그라스 교잡종의 생장이 무처리구에 비해 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). 특히 종자를 파종한지 30일 이후에서는 *B. iodinum* RS16, *M. oryzae* CBMB20 단일접종 처리구와 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20을 동시접종한 처리구에서 수수-수단그라스 교잡종의 생장이 무처리구에 비해 각각 19.6%, 21.4%, 15.9% 씩 증가하였다. 100% 비료시비 수준에서는, 종자를 파종한지 15, 20, 25, 30일에 *M. oryzae* CBMB20 단일접종과 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20을 동시접종시 수수-수단그라스 교잡종의 생장이 무처리구에 비해 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5B). 특히 종자를 파종한지 30일 이후에서는 *M. oryzae* CBMB20 단일접종 처리구와 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20을 동시접종한 처리구에서 수수-수단그라스 교잡종의 생장이 무처리구에 비해 각각 31.1%와 43.8% 씩 증가하였다.

비료시비 수준에 따른 수수-수단그라스 교잡종의 생장을 확인한 결과, 균주를 접종하지 않은 무처리구에서는 비료시비 수준에 따른 유의성 있는 차이를 확인할 수 없었다 (Table 4). 70% 비료수준에서 균주 접종를 접종한 처리구와 100% 비료수준에서 균주를 접종하지 않은 처리구를 비교한 결과, 70% 비료수준에서 균주 접종시 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

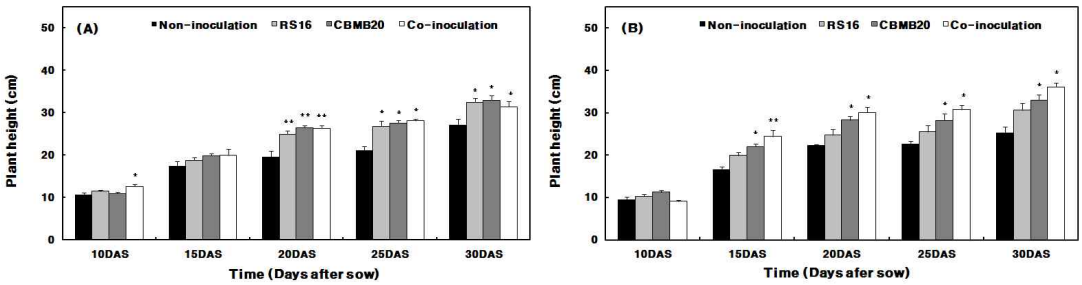


Fig. 5 Effect of *B. iodinum* RS16 and *M. oryzae* CBMB20 inoculation and co-inoculation on plant height of sorghum-sudangrass hybrid with 70% (A) and 100% (B) levels of fertilizer amendment. Each value represents the mean ± S.E (n = 4). Asterisk shows significant difference in values from the control, per group by LSD test ($P \leq 0.05$). $^{*}P \leq 0.05$, $^{**}P \leq 0.001$.

Table 4 Comparition of sorghum-sudangrass hybrid plant height in all treatment of 70% fertilizer level with non-inoculated treatment of 100% fertilizer.

Treatments	Plant height				
	10 DAS	15 DAS	20 DAS	25 DAS	30 DAS
	---------- (cm) ----------				
70% Non-inoculation	10.6±0.5a	17.4±1.0a	19.5±1.4a	21.1±1.0a	27.1±1.4a
100% Non-inoculation	9.5±0.7a	16.6±0.6a	22.3±0.2a	22.6±0.7a	25.1±1.5a
70% + *B. iodinum* RS16	11.5±0.2a	18.8±0.6a	24.9±0.8a	26.8±1.3a	32.4±1.0a
100% Non-inoculation	9.5±0.7b	16.6±0.6b	22.3±0.2b	22.6±0.7a	25.1±1.5b
70% + *M. oryzae* CBMB20	10.9±0.4a	19.8±0.5a	26.5±0.5a	27.6±0.6a	32.9±1.1a
100% Non-inoculation	9.5±0.7a	16.6±0.6b	22.3±0.2b	22.6±0.7b	25.1±1.5b
70% + Co-inoculation	12.6±0.6a	19.9±1.5a	26.3±0.6a	28.1±0.4a	31.4±1.2a
100% Non-inoculation	9.5±0.7b	16.6±0.6a	22.3±0.2b	22.6±0.7b	25.1±1.5b

Each value represents the average of four replicates per treatment ± S.E. In the same column, significant difference according to LSD at $P \leq 0.05$ levels are indicated by different letter.

(2) 비료시비 수준과 균주의 접종이 수수-수단그라스 교잡종의 생물량에 미치는 효과 확인

비료시비 수준에 따른 *B. iodinum* RS16과 *M. oryzae* CBMB20의 접종이 수수-수단그라스 교잡종의 생물량에 미치는 효과를 확인한 결과, 2 가지 비료시비 수준 (70%와 100%)에서 균주 접종시 무처리구에 비해 수수-수단그라스 교잡종의 지하부, 지상부, 전체 건물중이 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 70% 비료시비 수준에서 지하부의 건물중을 측정한 결과, *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20을 동시접종한 처리구에서 가장 높은 건물중을 보였다. 지상부와 전체 건물중은 *B. iodinum* RS16, *M. oryzae* CBMB20 단일접종 처리구와 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20을 동시접종한 처리구에서 가장 높은 건물중을 보였다 (Fig. 6A). 100% 비료시비 수준의 경우, 지하부 건물중은 *M. oryzae* CBMB20 단일접종시 무처리구에 비해 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6B). 지상부는 *M. oryzae* CBMB20 단일접종과 *B. iodinum* RS16와 *M. oryzae* CBMB20을 동시접종 처리구에서 다른 처리구에 비해 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 전체 건물중의 경우 모든 처리구에서 무처리구에 비해 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인하였다.

비료시비 수준에 따른 수수-수단그라스 교잡종의 생물량을 확인한 결과, 균주를 접종하지 않은 무처리구에서는 비료시비 수준에 따른 유의성 있는 차이를 확인할 수 없었다 (Table 5). 70% 비료수준에서 균주 접종를 접종한 처리구와 100% 비료수준에서 균주를 접종하지 않은 처리구를 비교한 결과, 70% 비료수준에서 균주 접종시 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

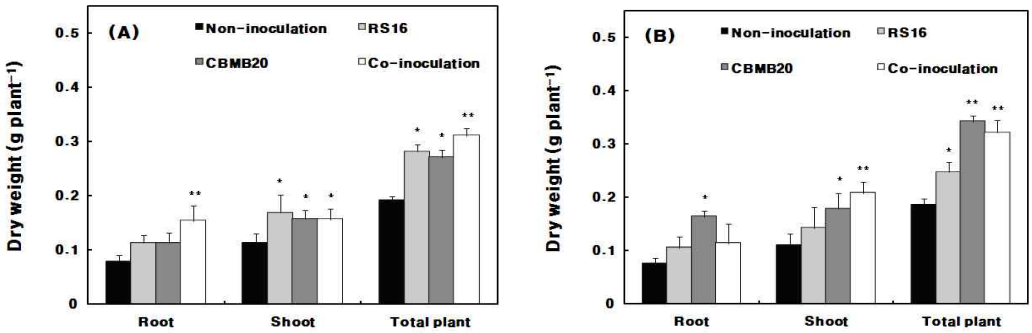


Fig. 6 Effect of *B. iodinum* RS16 and *M. oryzae* CBMB20 inoculation and co-inoculation on dry biomass of sorghum-sudangrass hybrid with 70% (A) and 100% (B) levels of fertilizer amendment. Each value represents the mean ± S.E (n = 4). Asterisk shows significant difference in values from the control, per group by LSD test ($P \leq 0.05$). $^{*}P \leq 0.05$, $^{**}P \leq 0.001$.

Table 5 Comparition of sorghum-sudangrass hybrid dry biomass in all treatment of 70% fertilizer level with non-inoculated treatment of 100% fertilizer.

Treatments	Dry weight (g)		Total dry weight
	Shoot	Root	
70% Non-inoculation	0.11±0.01a	0.08±0.01a	0.19±0.01a
100% Non-inoculation	0.11±0.01a	0.08±0.01a	0.19±0.01a
70% + *B. iodinum* RS16	0.17±0.02a	0.11±0.01a	0.28±0.01a
100% Non-inoculation	0.11±0.01b	0.08±0.01b	0.19±0.01b
70% + *M. oryzae* CBMB20	0.16±0.01a	0.11±0.01a	0.27±0.01a
100% Non-inoculation	0.11±0.01b	0.08±0.01b	0.19±0.01b
70% + Co-inoculation	0.16±0.01a	0.15±0.01a	0.31±0.01a
100% Non-inoculation	0.11±0.01b	0.08±0.01b	0.19±0.01b

Each value represents the average of four replicates per treatment ± S.E. In the same column, significant difference according to LSD at $P \leq 0.05$ levels are indicated by different letter.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

과제/구분	연구목표	평가 착안점	연구목표 달성도 및 관련분야 기여도
제1세부(주관)	바이오매스/사료작물에 적합한 미생물 비료제 개발	E681균 포자 대량생산기술 확보	포자형성율 80% 이상, 포자밀도 5 x 10^8/ml 이상의 대량배양조건을 확립함
		사료작물에 대한 생장촉진 및 증수 기능 제고 기술개발	E681균의 포자를 보리, 밀 등 사료작물 종자에 코팅처리하여 비료사용을 저감하고 생장을 촉진할 수 있는 방법 개발
		감자에 대한 생장촉진 및 증수 기능 제고 기술개발	인공 씨감자 및 절단 감자에 대한 E681균의 처리로 생장촉진, 증수 및 저장성 향상 기술 개발
		*P. polymyxa*균 근연균 확보 및 유전정보 분석	우수기능 근연균 10주 이상 확보하여 맞춤형 미생물제 기반 강화
제2세부	미생물비료제의 현장 적용기술 및 제제화 기술개발	바이오매스 대상작물 적합 유용 미생물 확보	억새와 헤어리베치로부터 다수균주 확보 및 2균 최종 선발하여 특허 확보
		미생물제 효능검정	50L 발효조 이용 배양기술 개발, 포트시험을 통한 생장촉진효과 검정
		미생물제 처리방법 및 대규모 지역 시용에 적합한 적용기술 개발	분말수화제 및 종자코팅제를 개발하여 포트 및 포장시험 수행
위탁	염류집적지에서 바이오매스 생산을 위한 기능성 미생물비료의 적용기술 개발 및 산업적 활용기반 구축	염류집적지인 새만금 간척지 토양에서의 미생물제 효과 검정 및 이용기술 개발	새만금 간척지 토양에서 미생물 접종에 따른 옥수수와 수수-수단그라스 교잡종의 생장촉진효과 확인
		식물생장촉진 미생물을 이용한 화학비료 절감 효과와 바이오매스 생산기술 확립	식물생장촉진 미생물의 접종에 따른 화학비료 절감효과 확인

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

* 실용화・산업화 계획(기술실시 등)

* 교육・지도・홍보 등 기술확산 계획 등

* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

○ 특허출원

“물억새 뿌리로부터 분리한 미생물을 이용한 식물생장촉진 방법”, 출원번호: 제2011-0122257호, 출원일: 2011년 11월 22일

“헤어리베치 근류 내염성 리조비움 속 균주”, 출원번호: 제2011-010981호, 출원일: 2011년 10월 19일

○ 포스터발표

“Application methods for efficient root colonization by *Paenibacillus polymyxa*.” 한국식물병리학회. 2011. 10. 20-22, 덕유산 리조트

“Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on *Miscanthus sacchariforus*.” 한국식물병리학회. 2011. 10. 20-22, 덕유산 리조트

“Isolation and Identification of Halophilic Hairy Vetch Root Nodule Bacteria for Application on Newly Reclaimed Land” 한국식물병리학회. 2011. 4. 경북대

“Screening of Halophilic Hairy Vetch Root Nodule Bacteria with Effective Biological Nitrogen Fixation Ability” 2011. 10. 20-22, 덕유산 리조트

○ *P. polymyxa* E681균의 포자를 대량으로, 5 x 10^8/ml 수준으로 생산할 수 있는 기술을 확립하였음.

○ E681균의 포자를 간편하고 비용이 적게드는 seed coating 방법으로 보리, 밀, 이탈리안 라이그라스 등 사료작물에 처리하여 생장을 촉진 할 수 있는 방법을 개발하였음. 본 연구와 관련하여 현재 겨울보리를 재배하는 영농가와 협력하여 현장연구를 진행중임.

○ E681균의 포자를 인공씨감자 및 절단감자에 처리하여 생장 촉진 및 증수효과를 내는 방법

을 개발하였으며 또한 이렇게 도입한 E681균에 의해 수확한 감자의 저장성을 향상시킬 수 있는 방법을 개발하였음. E681균의 포자를 쉽게 분의처리 할 수 있는 분말제제를 개발하였음. 본 연구와 관련하여 현재 겨울감자를 재배하는 영농가와 협력하여 현장연구를 진행중임. 본 연구중 추가 확보한 *P. polymyxa* 근연균 중 우수 기능을 나타내는 1종과 E681균을 이용하여 감자의 저장성을 향상시키는 기술에 대해 특허를 출원할 계획임.

○ 물억새와 헤어리베치로부터 분리하여 특허출원한 균주에 대해서는 추후 식물생장촉진 미생물 제제로 활용하고 특히 바이오 에너지 작물인 억새에 처리하여 바이오매스생산량을 증진시키고 사료작물인 헤어리베치에 PGPR 균주를 처리하여 친환경 미생물 비료제로 활용하되 다양한 포장에서의 적용시험과 제형화 연구개발 및 처리기술 개발을 통한 산업화 추진이 가능함.

○ 고기능 식물생장촉진 미생물을 이용한 환경친화적 바이오매스 생산 기술 확립

- 식물생장촉진 미생물인 *M. oryzae* CBMB20와 *B. iodinum* RS16의 단일 또는 동시접종을 통해 옥수수와 수수-수단그라스 교잡종의 생장과 생물량이 균주를 접종하지 않은 처리구에 비해 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인

○ 미생물 제제를 이용하여 고비용의 화학비료 절감 효과

- 70%와 100%의 화학비료 시비 수준에서 균주 접종여부에 따른 옥수수와 수수-수단그라스 교잡종의 생장과 생물량을 비교한 결과, 70% 비료시비 수준에서 균주 접종시 100%의 비료시비를 시비한 처리구에 비해 옥수수와 수수-수단그라스의 생장과 생물량이 유의성 있는 증가를 보이는 것을 확인.

* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

○ 다양한 포장실험과 제형화 연구개발 및 처리기술 개발을 통한 산업화

○ 추후 식물생장촉진 미생물 제제로 활용하고 특히 바이오 에너지 작물인 억새에 처리하여 바이오매스생산량을 증진시키고 사료작물인 헤어리베치에 PGPR 균주를 처리하여 친환경

미생물 비료제로 활용

○ 기능성 미생물제제의 바이오매스 작물 생장 촉진 확인

- 새만금 간척지에서 제형화된 미생물제제의 바이오매스 작물 포장실험을 통한 생육 촉진 효능 검정

○ 효율제고를 위한 이용기술 개발

- 다양한 토양환경 (토양 염분 농도, 토양 화학성, 토양 물리성 등)에 따른 미생물제제의 최적 처리 방법 (근권, 엽면시비 등) 및 이용기술 개발

본 연구에서 얻은 위의 성과들은 바이오매스 또는 사료자원 확보를 위한 작물재배 현장에 적용하여 화학비료를 저감하고 수확량을 높일 수 있는 기술로서 향후 관련 업체 및 영농단체와 협력하여 대규모 현장시험을 통해 실용화 및 산업화 추진이 이루어 질 수 있도록 후속연구가 필요함. 본 연구를 통해 얻은 결과를 바탕으로 현재 2건의 특허가 출원되었고 향후 2건의 특허를 추가 출원할 예정이며 2건 이상의 논문을 발표가 가능함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

특기할 사항 없음

제 7 장 참고문헌

Choi, J. H., H. J. Park, B. J. Park, K. H. Park and C. S. Kim (2007). Selection of coating materials to leafy perilla seed for reducing endosulfan residue in greenhouse soil. 2007. The Korean Journal of Pesticide Science, 11, 276-280

Lee. K.B., M.G. Xu, J.D. Kim, K.Y. Jung. (2006). Soil characteristic and utilization on reclaimed land in Jangsu province coastal region of China Soc. of Int. Agri. 18:245-252.

Lee. K.B., J.G. Kang, J.Li, D.B. Lee, C.W. Park and J.D. Kim. (2007). Evaluation of salt-tolerance plant for improve saline soil of reclaimed land. Korean J. Soil Sci. Fert. 40:173-180.

Lee. S.H., B.D. Hong, Y. An. and H.M. Ro. (2003). Relation between growth condition of six upland-crops and soil salinity in reclaimed land. Korean J. Soil Sci. Fert. 36:66-71.

Lee. S.H., S.H. Yoo, S.I. Seol, Y. An. Y.S. Jung, and S.M. Lee. (2000). Assessment of salt damage for upland-crops in Dae-Ho reclaimed soil. Korean J. Environ. Agri. 19:358-363.

Madhaiyan, M., B.Y. Kim, S. Poonguzhali, S.W. Kwon, M.H. Song, J.H. Ryu, S.J. Go, B.S. Koo, and T.M. Sa. (2007). *Methylobacterium oryzae* spp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylothropic, 1-aminocyclo-propan-1-carboxylate deaminase- producing bacterium isolated from rice. Int. J. Syst, Evol. Microbiol, 57, 326-331.

Ryu, C. M., J. Kim, O. Choi, S. Y. Park, S. H. Park, C. S. Park. (2005) Nature of a root-associated Paenibacillus polymyxa from field grown winter barley in Korea. J. Microbiol. Biotechnol, 15, 984-991

Ryu, C. M., J. Kim, O. Choi, S. H. Kim, C. S. Park. (2006) Improvement of biological control capacity of Paenibacillus polymyxa E681 by seed pelleting on sesame. Biological Control, 39, 282-289

Siddikee, Md.A., R. Bernard, B.R. Glick, P.S. Chauhan, W.J. Yim, and T.M. Sa. (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclo- propane-1-carboxylic acid deaminase activity. Plant Physiology and Biochemistry, 49, 427-434.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.