



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

(45) 공고일자 2014년05월29일  
 (11) 등록번호 10-1400897  
 (24) 등록일자 2014년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 1/20* (2006.01) *A01N 63/02* (2006.01)  
*C12R 1/41* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-0106981  
 (22) 출원일자 2011년10월19일  
 심사청구일자 2012년10월11일  
 (65) 공개번호 10-2013-0042861  
 (43) 공개일자 2013년04월29일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 JP2008228572 A  
 US5484464 A  
 KR1019960001108 A  
 WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND  
 BIOTECHNOLOGY, Vol.10, pp.637-639(1994.)

(73) 특허권자  
 한국생명공학연구원  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
 (72) 발명자  
 김창진  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
 권미경  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
 (74) 대리인  
 이원희

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **헤어리베치 근류 내염성 리조비움 속 균주**

**(57) 요약**

본 발명은 헤어리베치(Hairy vetch, *Vicia villosa* Roth) 근류 균주에 관한 것으로, 고염조건에서 내성이 있는 헤어리베치 근류 리조비움 속(*Rhizobium* sp.) 균주를 선발하였으며, 이를 헤어리베치에 접종하였을 때 근류 형성능 및 질소 고정능이 우수한 것을 확인하였으므로, 고염 환경에서 녹비작물로 헤어리베치를 이용하고자 할 때, 본 발명의 헤어리베치 근류 리조비움 속 균주를 근류균 접종제의 유효성분으로 이용할 수 있다.

**대표도** - 도3

control(untreated) RHH84 isolates RHH93 isolates



(72) 발명자

**박동진**

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

**이재찬**

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

**장종욱**

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545002475

부처명 농림수산식품부(농림부)

연구사업명 농림기술개발사업

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

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2011.07.01 ~ 2012.06.30

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

수탁번호 KCTC12024BP 또는 KCTC12025BP로 기탁된 헤어리베치(*Vicia villosa Roth*)의 근류에서 분리한, 근류형성능 및 질소 고정능을 가지며, 호염성인 헤어리베치 근류 리조비움 속(*Rhizobium sp.*) 균주.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 리조비움 속 균주는 NaCl 0.1~1 (w/v)% 조건에 대해 고염 내성이 있는 것을 특징으로 하는 리조비움 속 균주.

### 청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 리조비움 속 균주는 NaCl 0.3~1 (w/v)% 조건에 대해 고염 내성이 있는 것을 특징으로 하는 리조비움 속 균주.

### 청구항 5

제 1항의 리조비움 속 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 헤어리베치 생장 촉진용 근류균 접종제.

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 리조비움 속 균주는 NaCl 0.1~1 (w/v)% 조건에 대해 고염내성이 있는 것을 특징으로 하는 헤어리베치 생장 촉진용 근류균 접종제.

### 청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 리조비움 속 균주는 NaCl 0.3~1 (w/v)% 조건에 대해 고염내성이 있는 것을 특징으로 하는 헤어리베치 생장 촉진용 근류균 접종제.

### 청구항 9

삭제

### 청구항 10

제 1항의 균주, 이의 배양액 또는 제 5항의 근류균 접종제를 토양, 식물 또는 식물의 종자에 처리하는 단계를 포함하는 헤어리베치 생장 촉진 방법.

**청구항 11**

제 10항에 있어서, 상기 근류균 접종제는 액체 상태로 식물에 관주, 작물의 종자에 침지 또는 분무하거나 종자에 코팅하여 이용할 수 있는 것을 특징으로 하는 헤어리베치 생장 촉진 방법.

**청구항 12**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 헤어리베치(*Vicia villosa Roth*)의 근류에서 분리한 호염성 근주로서, 헤어리베치에 접종하였을 때, 근류 형성능 및 질소 고정능을 가지는 헤어리베치 근류 리조비움 속(*Rhizobium sp.*) 근주에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 질소고정은 공기 중에 다량으로 존재하는 안정된 불활성 질소 분자를 반응성이 높은 다른 질소 화합물(암모니아, 질산염, 이산화질소 등)으로 변환하는 과정을 말한다. 질소고정세균은 질소를 고정시키는 세균이며, 질소고정세균에서 대표적으로 콩뿌리에 있는 근류균이 있다. 질소고정세균은 생물학적 질소 고정 과정을 거치는데, 생물학적인 질소 고정 과정은 질소 동화라고 하기도 한다. 대기 중의 질소나 무기 질소 화합물을 생물체의 작용으로 유기 질소 화합물로 바꾸는 것을 의미한다.

[0003] 두과 작물은 근류균인 리조비움 속 근주와 공생관계를 통하여 공기 중의 질소를 고정 이용하여 생육할 뿐만 아니라, 두과 작물이 고정한 질소를 다른 작물이 이용할 수 있어 질소 시용량을 절감할 수 있으므로 초지농업에서 녹비로서 중요하다. 안정적인 두과작물 재배를 위해서 질소 고정력이 우수한 근류균 접종은 필수적이다. 질소고정세균 중 대표적인 세균으로서 뿌리혹박테리아가 있다. 뿌리혹박테리아는 리조비움 속(*Rhizobium sp.*)의 그램 음성 토양 세균이며, 근류균이라고도 한다. 두과 작물과 공생(혹은 기생)하며 공기 중의 질소를 고정한다. 토양 속의 근류균 밀도의 변화는 콩의 재배년수와 관계가 있는데 수년간 콩을 재배하지 않거나 전혀 작물을 재배하지 않았던 신개간지 등에는 인공접종으로 근류균을 보충하지 않으면 충분한 근류형성과 질소고정을 기대할 수 없다.

[0004] 최근에는 국내에서는 부족한 토양을 보충하기 위하여, 본래 바다 또는 하천이었으나 육지로 변경시킨 간척지를 개척하고 있다. 방조제관리법(防潮堤管理法)에서는 농수산업의 재해방지와 생산력증가를 목적으로 국가나 지방자치단체가 이를 보존 관리하도록 하고 있다. 그러나, 간척지같은 경우에는 흙으로 메워져 있으나, 토양의 염농도가 높아 일반 식물을 재배할 수 없기에 그 효용성이 많이 떨어지고 있는 실정이다. 이에 각 지방자치단체 뿐만 아니라, 국가적인 차원에서 간척지의 식물 효용성을 증대시킬 필요가 대두되고 있고 투자가 이루어지고 있는 실정이다.

[0005] 간척지와 같은 토양의 비옥도를 개선하기 위해 질소를 고정할 수 있는 녹비 작물을 재배하는 것이 필요하며, 내염성이 있는 미생물을 활용하여, 식물의 생장을 도울 수 있는 방법을 강구 중에 있다. 고염환경인 간척지 토양의 경우 토양 비옥도를 개선하기 위하여 상기 두과작물과 같은 녹비가 필요하나, 현재까지 녹비로서 헤어리베치를 이용하고, 헤어리베치에 접종하여 간척지와 같은 고염환경에서 질소 고정율을 높일 수 있는 근류균 접종제에 대해서는 개발된 바 없다.

[0006] 이에 본 발명자들은 헤어리베치(Hairy vetch, *Vicia villosa Roth*) 근류 리조비움 속(*Rhizobium sp.*) 박테리아 중 고염 환경에서 질소고정능이 우수한 근주를 탐색하였고, 헤어리베치에서 분리된 리조비움 속 근주가 고염 환경에서 생장이 우수하며, 헤어리베치에 접종하였을 때 근류 형성능 및 질소 고정능이 우수한 것을 확인하였으므로, 고염 환경에서 녹비작물로 헤어리베치를 이용하고자 할 때, 본 발명의 헤어리베치 근류 리조비움 속 근주를 근류균 접종제의 유효성분으로 이용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0007] 본 발명의 목적은 헤어리베치(*Vicia villosa Roth*)의 근류에서 분리한 호염성 근주로서 근류 형성능 및 질소 고정능을 가지는 헤어리베치 근류 리조비움 속(*Rhizobium sp.*) 근주를 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 헤어리베치 근류 리조비움 속 근주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식물 성장 촉진용 근류균 접종제를 제공하는 것이다.
- [0009] 아울러, 본 발명의 다른 목적은 상기 리조비움 속 근주, 이의 배양액 또는 상기 근류균 접종제를 토양, 식물 또는 식물의 종자에 처리하는 단계를 포함하는 식물 성장 촉진 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 헤어리베치(*Vicia villosa Roth*)의 근류에서 분리한 호염성 근주로서 근류 형성능 및 질소 고정능을 가지는 헤어리베치 근류 리조비움 속(*Rhizobium sp.*) 근주를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 헤어리베치 근류 리조비움 속 근주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식물 성장 촉진용 근류균 접종제를 제공한다.
- [0012] 아울러, 본 발명은 상기 리조비움 속 근주, 이의 배양액 또는 상기 근류균 접종제를 토양, 식물 또는 식물의 종자에 처리하는 단계를 포함하는 식물 성장 촉진 방법을 제공한다.

**발명의 효과**

- [0013] 본 발명의 헤어리베치(Hairy vetch, *Vicia villosa Roth*) 근류 리조비움 속(*Rhizobium sp.*) 근주를 헤어리베치에 접종하였을 때 근류 형성능 및 질소 고정능이 우수한 것을 확인하였으므로, 고염 환경에서 녹비작물로 헤어리베치를 이용하고자 할 때, 본 발명의 헤어리베치 근류 리조비움 속 근주를 근류균 접종제의 유효성분으로 이용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0014] 도 1은 인공 접종에 의한 내염성 분리균의 유리 튜브(glass tube)와 플라스틱 비닐 포트(plastic vinyl pot)에서 각각 근류 형성 시험을 나타낸 도이다.
- 도 2는 유리 튜브에 인공 접종에 의해 형성된 내염성 분리균의 근류를 나타낸 도이다:  
control(untreated) : 처리하지 않은 대조군;  
RHH84 isolates : RHH84 분리균;  
RHH93 isolates : RHH93 분리균.
- 도 3은 플라스틱 비닐 포트에서 인공접종에 의해 형성된 내염성 분리균의 근류를 나타낸 도이다.
- 도 4는 선발 균주의 브로모티몰 블루(bromothymol blue) 시험 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 선발 균주의 투과전자현미경 사진 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6는 선발 균주의 염기서열 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6a는 선발균주, 리조비움 에틀리(*Rhizobium etli*, *R. etli*) 및 리조비움 레구미노사룸 비부이 비시아에(*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*)의 염기서열을, 선발균주의 16S rDNA 염기서열 중 1번째 뉴클레오티드에서 746번째 뉴클레오티드까지 비교한 결과를 나타낸 도이다.

도 6b는 상기 선발균주, *R. etli* 및 *R. leguminosarum* bv. *viciae*의 염기서열을, 선발균주의 16S rDNA 염기서열 중 747번째 뉴클레오티드에서 1445번째 뉴클레오티드까지 비교한 결과를 나타낸 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0016] 본 발명은 헤어리베치(*Vicia villosa* Roth)의 근류에서 분리한 호염성 균주로서 근류 형성능 및 질소 고정능을 가지는 헤어리베치 근류 리조비움 속(*Rhizobium* sp.) 균주를 제공한다.
- [0017] 상기 리조비움 속 균주는 수탁번호 KCTC12024BP 또는 KCTC12025BP로 기탁된 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0018] 상기 리조비움 속 균주는 NaCl 0.1~1 (w/v)% 조건에 대해 고염 내성이 있는 것일 수 있고, 구체적으로 상기 리조비움 속 균주는 NaCl 0.3~1 (w/v)% 조건에 대해 고염 내성이 있는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0019] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 헤어리베치 호염 질소 고정 활성균 분리 및 탐색하기 위해, 전국 7개 지역의 헤어리베치 재배지로부터 헤어리베치 근류(뿌리혹)를 수집하여 16S rDNA 서열분석(sequencing) 결과 52개 리조비움 속(*Rhizobium* sp.) 균주를 분리하였다.
- [0020] 호염성 헤어리베치 근류균을 선발하기 위해, 분리된 52개 헤어리베치 리조비움 속 균주들을 0.5~5 (w/v)% 염화나트륨(NaCl)를 첨가한 이스트 만니톨 브로스(yeast mannitol broth, YMB)(액체)와 YMA(고체)배지에 7일간 배양하며 균생장을 관찰한 결과 0.5% 이상 NaCl 첨가 배지에서 생장이 우수한 16개의 호염성 균주를 선발하였다. 상기와 같이 분리한 16개 호염성 균주들이 실제 헤어리베치 근류형성균인지 확인하기 위하여 각 균주들을 헤어리베치 종자에 접종하고 6주 후 근류 형성 유무를 관찰하였다. 그 결과, 15개의 균주 중 RH1, RH3, RH81, RH82, RHH84, RHH93 6개의 균주에서만 근류가 형성된 것을 확인하였다. 호염성 균주 접종 후 형성된 근류로부터 재분리한 균주들이 초기 접종 균주와 동일한지 확인하기 위하여 16개 호염성 균주별 항생제 마커(marker)를 선발하였으며(표 2 참조), 그 결과, 근류가 형성된 6개 균주로부터 균을 재분리하여 16S rDNA 및 선발한 항생제 마커(marker)를 이용하여 초기 접종한 균주와 동일한 균주임을 확인하였다.
- [0021] 상기 실시예의 16개 호염성 헤어리베치 리조비움 속들 중 근류 형성 시험에서 근류를 형성하여 헤어리베치 근류균으로 확인된 5개 균주들 중 근류 형성수가 많고, 근류 크기가 큰 근류형성능 우수 균주를 선발하고자 하였다. 그 결과, 양분이 거의 없었던 유리 튜브 처리의 경우 근류 형성 수는 15개 내외로 많지 않았으며 RHH84, RH82, RHH93 균주 순으로 근류 수가 많았고 크기들은 1~2 cm 범위로 유사하였다(도 2 참조). 반면 다소 양분이 있는 흙을 사용한 플라스틱 비닐 포트 처리에서는 균주별로 15~52개까지 많은 근류가 형성되었으며 크기도 2~6 cm 까지 다양하였다(도 3 참조). 무처리한 대조군에서는 근류가 전혀 형성되지 않았다. 양분에 차이가 있는 두 처리를 이용함으로써 근류 형성이 우수한 RHH84와 근류의 크기가 큰 RHH93 균주를 선발하였다.
- [0022] 상기 실시예의 15개 호염성 헤어리베치 리조비움 속 균주들 중 근류 형성 시험에서 근류를 형성하여 헤어리베치 근류균으로 확인된 6개 균주에서 아세틸렌(acetylene) 환원에 의한 질소고정능 우수 균주를 선발하고자 하였다. 환원된 에틸렌(ethylene) 생성량을 비교한 결과, 균주 간에 에틸렌 생성량이 4배까지 차이가 났으며 균주들 중 질소고정능이 가장 우수한 RHH84 균주를 선발하였는데, 이 균주는 상기와 같이 근류 형성능 우수 균주로 기선발한 균주였다(표 5 참조). 종합하여, 호염성을 지니면서 근류형성능과 질소고정능이 우수한 헤어리베치 근류균으로써 RHH84 및 RHH93 균주를 최종 선발하였다.
- [0023] 선발 균주의 형태 및 생리학적 특성을 확인하였다. 상기 실시예를 통해 우수 균주로 선발한 RHH84 및 RHH93는 모두 YMA 배지 배양시 2 ~ 3일 이내에 콜로니가 형성되어 빠른 증식속도를 지니고 있었고, 투명하면서 백색 내지 유백색에 가까운 둥글고 볼록한 균층을 형성하였으며, 많은 점액성 물질을 지니고 있었다(표 7 참조). 이러한 특징은 리조비움 속에 속하는 균주들과 동일하였다. 또한 YMA 배지에 브롬티몰 블루(bromthymol blue) 용액을 넣어 만든 YMBA(pH7.0) 배지에 두 균주를 증식시킨 결과, 산을 생성하여 푸른색 배지를 노란색으로 변화시켜 리조비움 속의 특징을 보여주었다(도 4 참조).
- [0024] 선발한 균주들의 균 동정은 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 수행되었다. RHH84 및 RHH93 균주의 게놈(genomic) DNA를 추출한 후 프라이머(primer) 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCAG-3')와 1492R (5'-GGTACTTGTTACGACTT-3')을 사용하여 PCR 하였고, 증폭이 확인된 PCR 산물을 정제한 후 T-blunt PCR cloning kit를 이용하여 클로닝

(cloning)한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다. 16S rDNA BLAST 결과 RHH84와 RHH93 균주 모두 리조비움 에틀리 (*Rhizobium etli* strain, *R. etli*) WzP15 균주와 99% 유사도를 나타내었으며 두 균주 간에는 5개 염기서열에 차이가 존재하였다. 또한 기존에 헤어리베치에 근류균으로 알려져 있는 리조비움 레구미노사룸 비비아에(*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*)와 *R. etli*로 동정된 선발균주 간에는 9개 염기서열에 차이가 존재하여 기존에 헤어리베치에 보고된 균주와는 확연한 차이를 나타내었다(도 6 참조).

- [0025] 따라서, 헤어리베치에서 분리된 리조비움 속 균주가 고염환경에서 생장이 우수하며, 헤어리베치에 접종하였을 때 근류 형성능 및 질소 고정능이 우수한 것을 확인하였으므로, 고염 환경에서 녹비작물로 헤어리베치를 이용하고자 할 때, 본 발명의 헤어리베치 근류 리조비움 속 균주를 유효성분으로 함유하는 근류균 접종제를 이용할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 헤어리베치 근류 리조비움 속 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식물 성장 촉진용 근류균 접종제를 제공한다.
- [0027] 상기 리조비움 속 균주는 수탁번호 KCTC12024BP 또는 KCTC12025BP로 기탁된 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0028] 상기 리조비움 속 균주는 NaCl 0.1~1 (w/v)% 조건에 대해 고염내성이 있는 것일 수 있고, 구체적으로 상기 리조비움 속 균주는 NaCl 0.5 (w/v)% 조건에 대해 고염내성이 있는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0029] 상기 식물은 헤어리베치인 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0030] 따라서, 헤어리베치에서 분리된 리조비움 속 균주가 고염환경에서 생장이 우수하며, 헤어리베치에 접종하였을 때 근류 형성능 및 질소 고정능이 우수한 것을 확인하였으므로, 고염 환경에서 녹비작물로 헤어리베치를 이용하고자 할 때, 본 발명의 헤어리베치 근류 리조비움 속 균주를 유효성분으로 하는 근류균 접종제를 이용할 수 있다.
- [0031] 상기 근류균 접종제는 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명에 의한 근류균 접종제는 통상적인 방법으로 식물성장 촉진용으로 제형화할 수 있으며 건조분말 형태 또는 액상비료 형태로 제조할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 의한 근류균 접종제는 액상 비료 형태로 제조될 수 있으며, 이에 증량제를 첨가하여 가루분말의 형태로 이용하거나 이를 제형화하여 과립화시킬 수도 있으나, 그 제형에 특별히 한정되지는 않는다. 구체적으로, 화학비료를 대체하기 위한 식물성장 촉진 생물비료로 제형화 할 수 있고, 즉 화학비료 공급이 제한된 친환경 유기농업에서 이를 극복하기 위한 생물비료로 제형화가 가능하다.
- [0032] 상기 근류균 접종제는 당업자에게 알려진 방법대로 제조되는 것일 수 있으며, 그 적용방법은 통상 일반적으로 행하고 있는 방법, 즉 살포(예를 들면 분무, 미스팅, 아토마이징, 분말 살포, 과립 살포, 수면시용, 상시용 등), 토양시용(예를 들면 혼입, 관주 등), 표면사용(예를 들면 도포, 도말법, 피복 등), 침지, 독이, 혼연 시용 등에 의해 행할 수 있다. 그 사용량은, 그 체형, 피해상황, 적용방법, 적용장소 등에 따라 적절히 결정할 수 있다.
- [0033] 아울러, 본 발명은 상기 리조비움 속 균주, 이의 배양액 또는 상기 근류균 접종제를 토양, 식물 또는 식물의 종자에 처리하는 단계를 포함하는 식물 성장 촉진 방법을 제공한다.
- [0034] 상기 근류균 접종제는 액체 상태로 식물에 관주, 작물의 종자에 침지 또는 분무하거나 종자에 코팅하여 이용할 수 있는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0035] 상기 식물은 헤어리베치인 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0036] 상기 침지하는 방법의 경우, 상기 균주, 이의 배양액 또는 상기 근류균 접종제를 식물체 주변의 토양에 붓거나 또는 종자를 배양액 및 제제에 담가둘 수 있고, 분무할 경우에는 당업계에 널리 공지된 기술로 식물체에 흐르도록 살포할 수 있으나 이에 한정하지 않는다.
- [0037] 따라서, 헤어리베치에서 분리된 리조비움 속 균주가 고염환경에서 생장이 우수하며, 헤어리베치에 접종하였을 때 근류 형성능 및 질소 고정능이 우수한 것을 확인하였으므로, 고염 환경에서 녹비작물로 헤어리베치를 이용하고자 할 때, 본 발명의 헤어리베치 근류 리조비움 속 균주를 근류균 접종제의 유효성분으로 이용할 수 있으며,

상기 근류균 접종제를 헤어리베치 생장 촉진에 이용할 수 있다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0039] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0040] <실시예 1> 헤어리베치 호염 질소 고정 활성균 분리 및 탐색

[0041] <1-1> 헤어리베치 근류 수집 및 근류균 분리

[0042] 2010년에 전국 7개 지역 전남(장흥,강진), 충남(당진, 예산), 전북 새만금, 경북 예천 및 경기도 평택의 헤어리베치 재배지로부터 헤어리베치 근류(뿌리혹)를 수집하였다. 수집된 근류를 95% 에탄올(ethanol) 1분, 2% 차아염소산 나트륨(NaClO)에 2분간 표면살균하여 메스를 이용 근류를 절개한 후 절개면을 이스트 만니톨 아가(yeast extract mannitol agar, YMA)배지에 도말하고, 치상하여 30℃ 항온기에서 3~4일간 배양하였고 분리된 균들을 다시 도말하여 순수한 단일 균집(single colony)을 얻었다. 이들 분리균을 16S rDNA 염기서열 분석하여 리조비움 속으로 확인된 52개 균주들을 액체 배양 후 20% 글리세롤(glycerol) 처리하여 -80℃에 보존하며 실험에 이용하였다.

[0043] <1-2> 호염성 헤어리베치 근류균 선발

[0044] 분리된 52개 헤어리베치 리조비움 속 균주들을 0.5~5 (w/v)% 염화나트륨(NaCl) 첨가 이스트 만니톨 브로스(yeast mannitol broth, YMB)(액체)와 YMA(고체)배지에 7일간 배양하며 균생장을 관찰한 결과 0.5 (w/v)% 이상 NaCl 첨가 배지에서 자란 15개의 호염성 균주를 선발하였다.

[0045] 그 결과, 52개 균주 모두 리조비움 속 선발배지인 YMA 또는 YMB(0.01 (w/v)% NaCl 포함)에서는 잘 생육하였으나 YMA+0.5 (w/v)% NaCl에서는 16개 균주, YMA+1 (w/v)% NaCl에서는 10개 균주, YMA+3 (w/v)% NaCl에서는 9개 균주만이 생육하였고 YMA+5 (w/v)% NaCl 배지에서 생육한 균주는 없었다(표 1). YMA+0.5 (w/v)% NaCl(고체) 배지에 비해 YMB+0.5 (w/v)% NaCl(액체) 배지에서는 2개 균주가 추가된 18개 균주가 생육하였으나, 액상 및 고상 모두에서 생육한 호염성 균주를 선발하기 위해 두 균주는 배제하였다.

표 1

리조비움 속 분리균	NaCl 저항성			
	YMA	YMA + 0.5 (w/v)% NaCl	YMA + 1 (w/v)% NaCl	YMA + 3 (w/v)% NaCl
RH1, RH3, RH81, RH82 RHH84, RHH93	+++	+++	-	-
RH10, RH35, RH129	+++	+++	+++	-
RH6, RH76, RH99, RH101, RH106, RH122, RH128	+++	+++	+++	+++

[0047] ++++ : 우수한 생장, - : 생장 없음

[0048] <1-3> 호염성 헤어리베치 근류균의 근류 형성능 확인

[0049] 상기와 같이 분리한 16개 호염성 균주들이 실제 헤어리베치 근류형성균인지 확인하기 위하여 각 균주들을 헤어리베치 종자에 접종하고 6주 후 근류 형성 유무를 관찰하였다. 근류 형성 시험은 밑부분이 완전히 막힌 직경 3 cm 굵은 유리 시험관 포트(pot)와 직경 11 cm 플라스틱 비닐 포트 두 가지로 나누어 수행하였으며 유리시험관은 버미큘라이트(vermiculite)를 비닐 포트는 피트모스(peat moss):버미큘라이트를 1:1로 혼합한 멸균 흙을 사용하였다(도 1). 소독한 헤어리베치 종자에 10<sup>9</sup>cfu/ml 농도로 균주를 코팅 후 파종하고 같은 농도의 균주현탁액을 5 ml씩 추가 접종하여 6주 후 형성된 근류의 유무를 관찰하였다.



[0050] 그 결과, 16개의 균주 중 RH1, RH3, RH81, RH82, RHH84, RHH93 6개의 균주에서만 근류가 형성된 것을 확인하였다.

[0051] 코흐의 법칙을 충족하기 위해 호염성 균주들 접종 후 형성된 근류로부터 재분리한 균주들이 초기 접종 균주와 동일한지 확인하기 위하여 16개 호염성 균주별 항생제 마커(maker)를 선발하였다(표 2). 항생제는 리조비움 속 분류에 주로 쓰이는 스트렙토마이신(Streptomycin), 스펙티노마이신(spectinomycin) 외에 암피실린(Ampicillin), 네오마이신(Neomycin), 반코마이신(vancomycin)을 10, 25, 50 또는 100 ppm 농도로 사용하였다.

[0052] 그 결과, 근류가 형성된 6개 균주로부터 균을 재분리하여 16S rDNA 및 선발한 항생제 마커(maker)를 이용하여 초기 접종한 균과 동일한 균임을 확인하였다.

표 2

[0053]

분리균	항생제 (ppm)																			
	암피실린				네오마이신				스펙티노마이신				스트렙토마이신				반코마이신			
	10	25	50	100	10	25	50	100	10	25	50	100	10	25	50	100	10	25	50	100
RH1									+				+++							
RH3									+				+++							
RH6	+++	+++	+		+++				+++	+++	+++	+++	+++	+			+++	+		
RH10	+++																			
RH35	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++				+++	+++	+++	+++				
RH76	+++				+++				+++	+++	+		+++	+++	++		+++	++	+	+
RH81													+++	+						
RH82													+++	+++						
RHH84													+++	+++						
RHH93													+++	+						
RH99	+++	++	+													+++	+++			
RH101	+++	+			++				+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	
RH106	+++	++	+													+++	++			
RH122	+++	+++	++		+++				+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+	+	+
RH128	+++	++	+	+	+++				+							++				
RH129	+++																			

[0054] +++ : 우수한 성장, ++ : 중간 성장, + : 약한 성장, - : 성장 없음

[0055] <실시예 2> 근류 형성능 및 질소고정능 우수 호염성 헤어리베치 균주 선발

[0056] <2-1> 근류형성능 우수 균주 선발

[0057] 상기 실시예1의 16개 호염성 헤어리베치 리조비움 속들 중 근류 형성 시험에서 근류를 형성하여 헤어리베치 근류균로 확인된 6개 균주들 중 근류 형성수가 많고, 근류 크기가 큰 근류형성능 우수 균주를 선발하고자 하였다. 멸균 버미큘라이트가 담긴 유리 튜브와 멸균흙(피트모스:버미큘라이트=1:1)이 담긴 플라스틱 비닐 포트에, 종자를 소독한 후 10<sup>9</sup>cfu/ml 농도로 코팅한 헤어리베치 종자를 포트당 3립씩 파종하고 그 위에 같은 농도의 균주현탁액 5 ml을 관주 접종하여 멸균수로 8주 동안 생육시킨 후 근류 형성 수 및 크기를 관찰하였다. 모든 처리는 3 반복으로 수행되었다.

[0058] 그 결과, 버미큘라이트만 넣어주어 양분이 거의 없었던 유리 튜브 처리의 경우 근류 형성 수는 15개 내외였으며 RHH84, RH82, RHH93 균주 순으로 근류 수가 많았고 크기들은 1~2 cm 범위로 유사하였다(도 2). 근류 색은 균주에 따라 흰색, 분홍색, 옅은 붉은색을 띠었으며 모양은 모두 원형 내지는 타원형이었다(표 3).

표 3

[0059]

분리균	형성된 근류 수	근류 색	근류 모양	근류 크기(cm)
RH1	2	흰색	원형, 타원형	1~1.5
RH3	7	분홍색	원형, 타원형	0.5~2

RH81	7	분홍색	원형, 타원형	0.5~2.2
RH82	11	분홍색, 옅은 붉은색	원형, 타원형	1~2.2
RHH84	13	분홍색, 옅은 붉은색	원형, 타원형	1.8~2
RHH93	9	흰색	원형, 타원형	0.7~2
대조군	0	-	-	-

[0060] 반면 다소 양분이 있는 흙을 사용한 플라스틱 비닐 포트 처리에서는 균주별로 15~52개까지 많은 근류가 형성되었으며 크기도 2~6 cm 까지 다양하였다(도 3). 근류 색은 균주별로 흰색, 분홍색, 붉은색을 띠었고 모양은 타원형과 꽃모양등을 나타내었다(표 4). 무처리한 대조군에서는 근류가 전혀 형성되지 않았다. 두 결과를 종합하여 질소질 양분이 결핍된 유리 튜브 처리에서는 근류 형성이 우수한 RHH84를 선발하였고 다소 양분이 있는 비닐 포트 처리에서는 꽃이 핀 형태처럼 큰 근류를 형성한 RHH93 균주를 선발하였다. 양분에 차이가 있는 두 처리를 이용함으로써 근류 형성이 많이 된 균주와 근류의 크기가 큰 두 균주를 효율적으로 동시에 선발할 수 있다.

표 4

[0061]

분리군	형성된 근류 수	근류 색	근류 모양	근류 크기(cm)
RH1	32	흰색, 분홍색	타원형	2.5~3
RH3	20	분홍색	타원형	2
RH81	24	분홍색	타원형, 꽃모양	4
RH82	19	흰색, 분홍색, 붉은색	타원형, 꽃모양	3~4
RHH84	17	분홍색	타원형	3
RHH93	52	흰색	꽃모양	5~6
대조군	0	-	-	-

[0062] <2-2> 질소고정능 우수 균주 선발

[0063] 상기 실시예의 16개 호염성 헤어리베치 리조비움 속 균주들 중 근류 형성 시험에서 근류를 형성하여 헤어리베치 근류균으로 확인된 6개 균주 중에서 아세틸렌(acetylene) 환원에 의한 질소고정능 우수 균주를 선발하고자 하였다. 실시예 <2-1> 근류형성능 시험에서 사용한 플라스틱 비닐 포트 근류균 처리와 동일한 방법으로 접종하여 7주 동안 헤어리베치를 생육시켰고 이때 형성된 근류 뿌리를 시료로 이용하였다. 뿌리를 물로 가볍게 세척하고 수분을 제거한 다음 근류가 붙어 있는 상태로 50.5 ml 유리 용기에 넣고 이를 고무마개로 막은 다음, 유리 용기에서 주사기로 공기 5 ml을 뽑아내고, 뽑아낸 공기대신 5 ml 아세틸렌 가스를 주입하였다. 이를 30℃ 배양기에서 60분간 항온처리한 후 주사기로 유리 용기내의 혼합기체 100 μl 뽑아 환원된 에틸렌(ethylene) 생성량을 기체크로마토그래피(gas chromatography, GC)로 측정하였다. 기체크로마토그래피-불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector, GC-FID)는 shimazu GC-2010을, 분석용 컬럼(column)으로는 HP-AL/S capillary(length 50m, diameter 0.53mm, film 15, Aglient technologies)를 이용하였다. 운반기체(carrier gas)는 헬륨(He)으로, 유속 391.1 ml/분, 분할 비율(split ratio) 20:1로 조절한 후 불꽃 이온화 검출기로 에틸렌 생성량을 측정하였고, 주입기(injector), 검출기, 컬럼 온도는 각각 200℃, 250℃, 110℃이었다.

[0064] 그 결과, 아세틸렌 피크(peak)는 1.76 분, 에틸렌 피크는 1 분에 출현하였고, 아세틸렌의 높이 수치 3,500,000을 기준으로 아세틸렌을 환원하여 생성된 에틸렌 높이 수치를 상대 비교하였다(표 5). 균주 간에 에틸렌 생성량이 4배까지 차이가 났으며 균주들 중 질소고정능이 가장 우수한 RHH84 균주를 선발하였는데 이 균주는 앞서 실시예 <2-1>에서 근류 형성능 우수 균주로 기선발한 균주였다. 종합하여, 호염성을 지니면서 근류형성능과 질소고정능이 우수한 헤어리베치 근류균으로써 RHH84 및 RHH93 균주를 최종 선발하였다.

표 5

[0065]

분리군 번호	질소 고정 활성 <sup>a</sup>
RH1	6,786
RH3	18,536
RH81	11,854
RH82	6,351
RHH84	25,158

RHH93	7,020
대조군	0

[0066] a : 환원된 에틸렌 높이 수치를 측정하여 질소 고정 활성으로 사용하였다.

[0067] <실시에 3> 호염성 헤어리베치 선발 균주의 분류 및 동정

[0068] <3-1> 선발 균주의 형태 및 생리학적 특성

[0069] 콩과작물과 공생하는 근류균은 기주식물에 대한 친화성에 따라 리조비움 속으로 분류되기도 하며, 증식속도에 따라 YMA 배지에서 증식이 빠르고 산을 생성하는 균을 리조비움 속이라 하고, 증식이 느리고 알칼리를 생산하는 것을 브래디리조비움 속(*Bradyrhizobium* sp.)으로 분류하기도 한다.

[0070] 상기 <실시에 2>를 통해 우수 균주로 선발한 RHH84 및 RHH93는 모두 YMA 배지 배양시 2 ~ 3일 이내에 콜로니가 형성되어 빠른 증식속도를 지니고 있었고, 투명하면서 백색 내지 유백색에 가까운 둥글고 볼록한 균층을 형성하였으며, 많은 점액성 물질을 지니고 있었다(표 6). 이러한 특징은 리조비움 속에 속하는 균주들과 동일하였다. 또한 YMA 배지에 브로모티몰 블루(bromthymol blue)(최종농도 25 ppm/L) 용액을 넣어 만든 YMBA(pH7.0) 배지에 두 균주를 증식시킨 결과, 산을 생성하여 푸른색 배지를 노란색으로 변화시켜 리조비움 속의 특징을 보여주었고(도 4), 전자현미경 촬영결과 긴 원통형의 간균형태를 나타내었다(도 5). 따라서 우수 균주로 선발한 두 균주 모두 리조비움 속으로 분류하였다.

표 6

분리균	성장 속도 <sup>a</sup>	콜로니 색	점액	브로모티몰 블루 시험
RHH84	빠름	흰색~유백색	o	노란색
RHH93	빠름	흰색~유백색	o	노란색

[0072]

[0073] <3-2> 선발 균주의 분자계통분류학적 특성

[0074] 선발한 균주들의 균 동정은 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 수행되었다. RHH84 및 RHH93 균주의 게놈(genomic) DNA를 추출한 후 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCAG-3')와 1492R (5'-GGTACTTGTTACGACTT-3') 프라이머(primer)를 이용, Maxim PCR premix(intron)를 사용하여 PCR하였다. 반응 조건은 초기 변성 94℃ 2분, 이후 변성 95℃ 20초, 어닐링(annealing) 58℃ 40초, 연장 72℃ 1분, 30 사이클(cycle)로 증폭하고 최종 연장 72℃ 10분으로 PCR하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit(Qiagen)을 사용 정제하고 T-blunt PCR cloning kit (solgent)를 이용하여 16S rDNA 영역을 클로닝한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다. 16S rDNA BLAST 결과 RHH84와 RHH93 균주 모두 *R. etli* WzP15 균주와 99% 유사도를 나타내었으며 두 균주 간에는 5개 염기서열에 차이가 존재하였다. 또한 기존에 헤어리베치에 근류균으로 알려져있는 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 와 *R. etli*로 동정된 선발균주 간에는 9개 염기서열에 차이가 존재하여 기존에 헤어리베치에 보고된 균주와는 확연한 차이를 나타내었다(도 6).

수탁번호

[0075]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12024BP

수탁일자 : 20110928

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

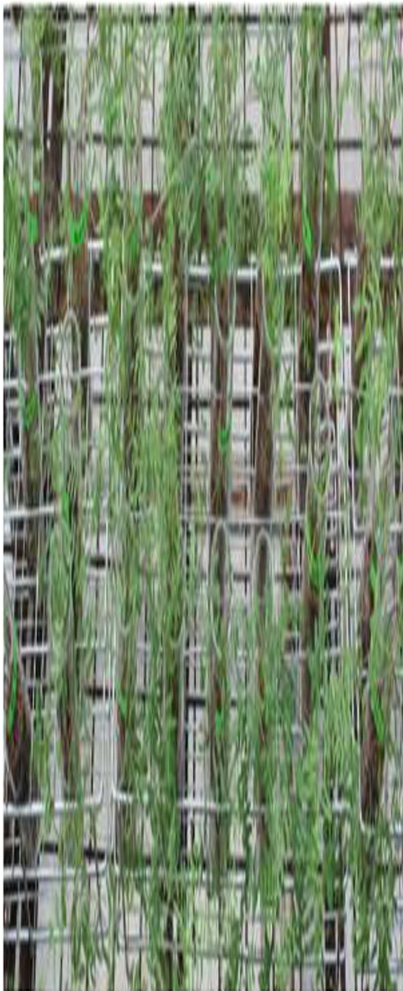
수탁번호 : KCTC12025BP

수탁일자 : 20110928

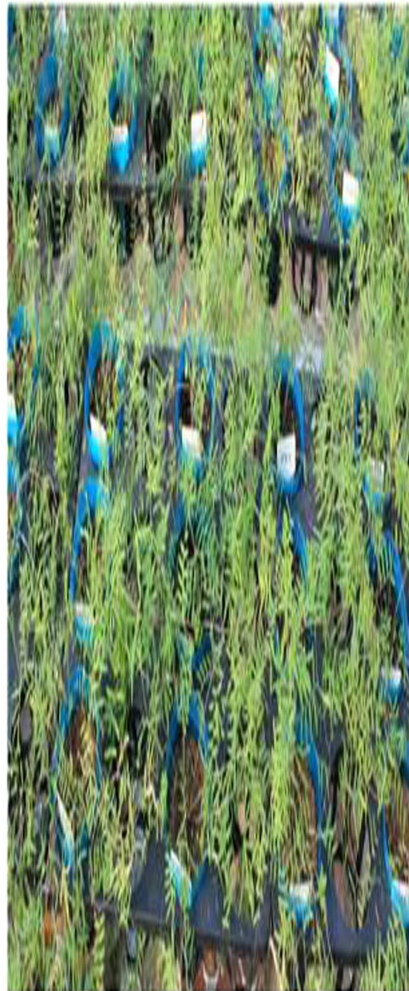
**도면**

**도면1**

유리 튜브처리 (비미컬라이드)



플라스틱 비닐 포트처리 (파트로스:비미컬라이드=1:1)



도면2

control(untreated) RHH84 isolates RHH93 isolates



도면3

control(untreated)

RHH84 isolates

RHH93 isolates



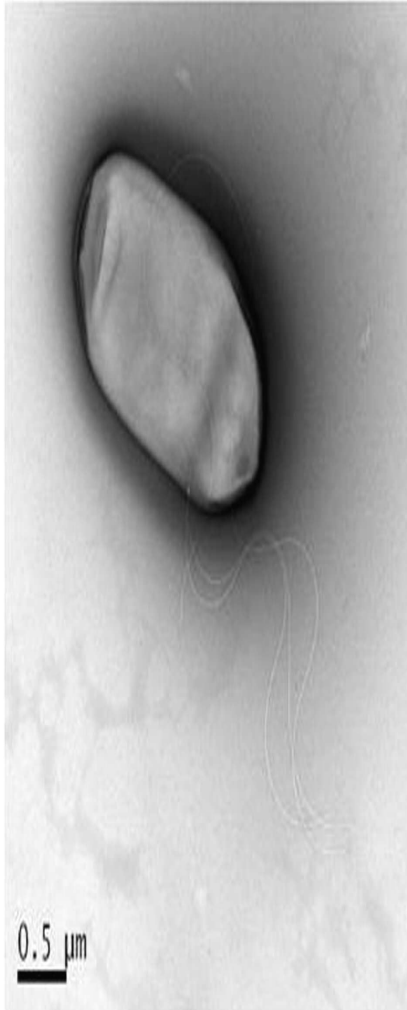
도면4

control(untreated) RHH84 isolates RHH93 isolates

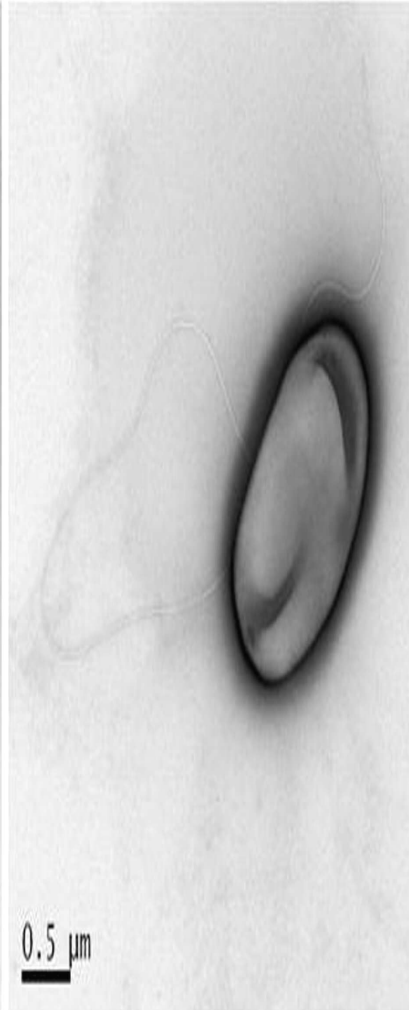


도면5

RHH84

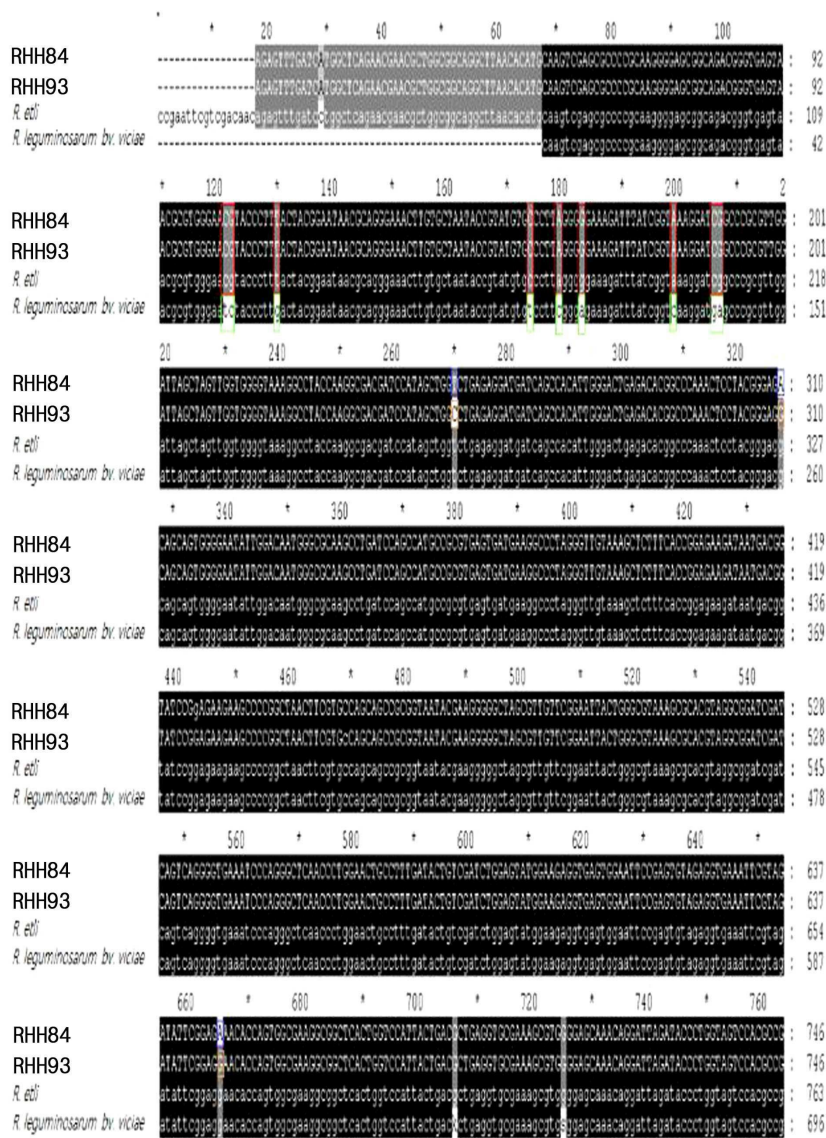


RHH93





도면6a



도면6b

