(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0012685
(43) 공개일자 2019년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 63/02 (2017.01) *C05F 11/08* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 63/02 (2013.01)
C05F 11/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0096057
(22) 출원일자 2017년07월28일
심사청구일자 2017년07월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이호정
서울특별시 서대문구 가재울미래로 2, 122동 2301호(남가좌동, DMC파크뷰자이)
정남현
서울특별시 성북구 보국문로 116, 315동 501호(정릉동, 정릉힐스테이트3차)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

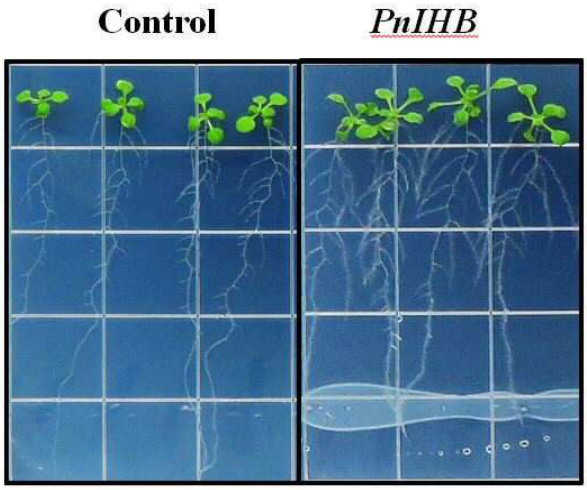
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **슈도모나스 나이트로리듀센스 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 식물성장 촉진용 미생물 제제**

(57) 요 약

본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 식물성장 미생물 제제, 식물 성장 촉진용 조성물, 비료첨가용 조성물 및 상기 균주 또는 이의 배양물을 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물 성장을 촉진하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주는 세포 분열 및 질산염 섭취(intake)를 증진시킴으로써 식물의 성장을 촉진하는 우수한 효과를 가지고 있다. 이에 따라, 본 발명의 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주 또는 이의 배양물은 비료의 이용이 제한된 친환경 유기농업에서 화학비료를 대체하여 작물의 수량 증대 또는 품질 향상에 기여할 수 있는바, 식물 성장 촉진용 미생물 제제, 식물 성장 촉진용 조성물, 비료첨가용 조성물 등 농업 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도4a



(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
(72) 발명자
이원제
서울특별시 마포구 마포대로7길 22, 302동 404호(공덕동, 래미안 공덕3차)
트린 카오 손
서울특별시 종로구 북촌로 123(삼청동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 116118031HD030
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 수출전략기술개발사업
연구과제명 원예작물 활착 우수 PGPR균 식물생장 활성 검정
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.11.29 ~ 2019.11.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 식물 성장 촉진용 미생물 제제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주의 16rRNA 염기서열은 서열번호 1로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 하는, 식물 성장 촉진용 미생물 제제.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미생물 제제는 질산염 섭취(intake) 증진을 통해 식물 성장을 촉진하는 것을 특징으로 하는, 식물 성장 촉진용 미생물 제제.

청구항 4

슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 식물 성장 촉진용 조성물.

청구항 5

슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 식물의 질산염 섭취(intake) 증진용 조성물.

청구항 6

슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 비료첨가용 조성물.

청구항 7

슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 식물의 성장을 촉진하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 식물성장 미생물 제제, 식물 성장 촉진용 조성물, 비료첨가용 조성물 및 상기 균주 또는 이의 배양물을 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물 성장을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 화학비료나 농약 남용은 소비자뿐만 아니라 재배자의 건강을 해치며, 토양의 황폐화를 가져온다. 토양 황폐화는 토양산성화, 식물병원균에 의한 병해를 유발하기 때문에 화학비료나 농약에 더욱 의존하는 악순환을 반복하게 된다. 구체적으로, 농업에서 비료는 작물의 수량을 결정짓는 중요한 농자재이나, 지나치게 많이 사용할 경우, 하천수의 부영양화, 지하수의 수질오염, 토양양분의 불균형, 및 작물의 생육불량 등의 원인으로 작용하여 작물의 수량감소는 물론 작물의 품질하락을 야기할 수 있다.

[0003] 따라서 농업생산성을 높이기 위해 과다하게 사용되고 있는 비료나 농약 때문에 자연환경과 사람의 건강이 크게 위협받고 있는 현시점에서 생산성을 유지하여 농가의 소득을 증대시키고 소비자들이 건강하게 살 권리도 충족시킬 수 있는 유일한 대안은 환경친화적인 농법의 개발에 있다고 할 수 있다.

[0004] 그러나 산업의 발달 및 다양화로 인해 농경지 면적이 감소되고 있기 때문에 작물의 생산성을 높이기 위한 비료의 사용은 불가피한 것이며, 따라서 기존의 화학비료보다 미생물을 이용한 친환경적인 기능성 농자재의 개발을 위한 관심이 높아지고 있다.

[0005] 이러한 관심으로 인해 화학비료의 사용량은 1990년대 초를 정점으로 하여 지속적으로 감소하는 추세에 있으며, 1997년 이후에는 저농도의 화학비료 개발 및 공급 등과 같은 시비량 감축유도 및 퇴비, 유기질 비료의 사용 확대로 화학비료의 사용량이 더욱 감소하고 있다. 화학비료의 사용량은 1990년대 초반 1,104천 톤, 1995년에 954천 톤, 2000년에 801천 톤으로 감소하였고, 2005년에는 이보다 더욱 감소하였으며, 이에 반해 퇴비 및 유기질 비료의 사용량은 점차 증가하고 있는 추세이다. 그러나 아직도 국내의 화학비료 사용량은 OECD 국가 중 높은 수준이다.

[0006] 또한, 친환경 농업기술 중의 하나로 최근에는 토양미생물을 이용한 작물의 재배방법이 사용되고 있는데, 현재 토양미생물을 이용한 농작물의 재배는 콩과식물에서 광범위하게 이루어지고 있다. 이러한 농작물의 재배에 주로 사용되는 미생물로는 라이조비움(Rhizobium; 뿌리혹박테리아)이 있는데, 이 균주에 의해 콩과식물이 감염되면 뿌리혹(root nodule)을 형성하며 기체 상의 질소를 수소와 결합된 상태의 암모니아태 질소(NH_3)로 전환시키는 질소고정(nitrogen fixation)이 이루어지게 된다. 특히, 질소고정은 농업적으로 대단히 중요한 의미를 갖고 있는데 이는 시비를 하지 않은 토양에서 질소 결핍은 당연한 결과이나 이와 같은 토양 조건하에서 뿌리혹을 가진 콩과식물은 질소결핍의 문제점을 스스로 해결하여 질소가 결핍되어 식물이 성장할 수 없는 토양 조건하에서도 생육이 가능하기 때문이다.

[0007] 이에 따라, 본 발명자들은 효과적으로 식물 성장을 촉진할 수 있는 방법에 대하여 연구하던 중, 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주 또는 이의 배양물이 우수한 식물 성장 촉진 효과를 가짐을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 공개특허공보 제10-2011-0116734호

(특허문헌 0002) KR 공개특허공보 제10-2011-0102787호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 식물 성장 촉진용 미생물 제제를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 식물 성장 촉진용, 식물의 질산염 섭취(intake) 증진용 또는 비료첨가용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 식물의 성장을 촉진하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 식물 성장 촉진용 미생물 제제를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분

으로 포함하는, 식물 성장 촉진용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스(Pseudomonas nitroreducens) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 식물의 질산염 섭취(intake) 증진용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 비료첨가용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 식물의 성장을 촉진하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주는 세포 분열 및 질산염 섭취(intake)를 증진시킴으로써 식물의 성장을 촉진하는 우수한 효과를 가지고 있다. 이에 따라, 본 발명의 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주 또는 이의 배양물은 비료의 이용이 제한된 친환경 유기농업에서 화학비료를 대체하여 작물의 수량 증대 또는 품질 향상에 기여할 수 있는바, 식물 성장 촉진용 미생물 제제, 식물 성장 촉진용 조성물, 비료첨가용 조성물 등 농업 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 GUS 어쎄이를 통해 DR5:GUS (a) 또는 CycB1pro:GUS (b) 형질전환 애기장대에서 GUS 발현을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주와의 공동 배양에 따른 *NRT2* 유전자의 발현량 변화를 q-PCR 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주와의 공동 배양에 따른 질산염 함량 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주가 애기장대의 성장에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다(도 4a: 외관 관찰, 도 4b: 엽록소 수치, 도 4c: 뿌리 길이, 곁뿌리 수 및 생중량).

도 5는 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주가 상추의 성장에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다(도 5a: 외관 관찰, 도 5b: 생중량).

도 6은 저 질소 조건 하, GUS 어쎄이를 통해 DR5:GUS (a) 또는 CycB1pro:GUS (b) 형질전환 애기장대에서 GUS 발현을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 저 질소 조건에서 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주가 애기장대의 성장에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다(도 7a: 외관 관찰, 도 7b: 뿌리 길이, 곁뿌리 수 및 생중량).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 자세하게 설명한다.

[0020] 일례로, 본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 식물 성장 촉진용 미생물 제제를 제공한다.

[0021] 또 다른 예로, 본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 식물 성장 촉진용 조성물을 제공한다.

[0022] 또 다른 예로, 본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스(Pseudomonas nitroreducens) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 식물의 질산염 섭취(intake) 증진용 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명에 있어서, '슈도모나스 나이트로리듀센스'는 혐기성 그람 음성세균에 속하는 토양 세균으로, 사슬형 지방산으로부터 PHB(polyhydroxybutyrate) 단일 중합체를 합성할 수 있다는 특징이 있다. 다만, 아직까지 식물 성장 촉진 용도를 가짐이 전혀 공지되어 있지 않고, 더욱이 상기 균주가 질산염 섭취(intake) 증진을 통한 식물 성장 촉진 용도를 가짐이 공지되어 있지 않다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에서는 16rRNA 서열 검색에 의한 분자 유전학적인 방법에 의하여 분석 및 동정을 통해, 토

양 샘플로부터 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 16rRNA 유전자를 가진 슈도모나스 나이트로리듀센스를 분리하고 이를 실험에 이용하였으며, 상기 분리 균주는 슈도모나스 나이트로리듀센스 IHB B 13561 균주로 확인되었으나, 이는 슈도모나스 나이트로리듀센스의 일례일 뿐, 이에 의해 본 발명이 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주는 토양으로부터 직접 분리하여 수득할 수 있으며, 시판되는 것을 제한없이 사용할 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, '배양물'은 특정 미생물 자체뿐만 아니라, 상기 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 것으로, 상기 배양배지는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄 등을 포함하는 배지를 사용할 수 있다.

[0026] 보다 구체적으로 상기 배양액이란 액체배지에 균주를 접종하여 배양한 것을 의미하고, 상기 배양액은 균주를 포함한 것, 또는 균주를 접종하여 배양한 후 원심분리 등으로 균주만을 제거한 배양여액일 수 있다. 아울러, 상기 배양액은 배양물의 농축물, 건조물, 분획물 등을 포함하는 개념으로, 그 제형이 한정되지 아니하며, 일 예로 액체 또는 고체일 수 있다. 이때, 상기 배양액의 농축액이란 상기 배양액을 농축한 것을 의미하고, 상기 배양액의 건조물이란 상기 배양액의 물기를 없앤 것을 의미한다. 건조방법은 통풍건조, 자연건조, 분무건조 및 동결건조가 가능하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에 있어서, '식물 성장 촉진'은 식물의 질산염 섭취(intake)를 통한 세포 분열 촉진, 식물체의 길이 생장, 부피 생장 등을 촉진시키는 것을 모두 포함하며, 이의 결과로 식물체의 생체중량 또는 특정 화합물의 함량으로 표시되는 바이오매스(Biomass)를 증가시키는 것을 모두 포함한다. 특히, 본 발명의 균주는 적은 양의 질산염이 토양에 포함되어 있다고 하더라도, 질산염 섭취의 증진으로 우수한 식물 성장 촉진 효과를 가지는 데, 이 점이 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, '식물'은 세균, 균류, 동물을 제외한 생물로, 세포벽과 엽록소를 가지고 광합성을 하는 생물을 지칭하는 개념이다. 이에, 본 발명의 미생물 제제 또는 조성물을 사용할 수 있는 작물은 질산염을 이용하여 성장하는 식물이라면 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 식물에는 아라비돕시스속 식물 또는 락투카속 식물이 포함되며, 본 발명의 일 실시예에서는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 또는 상추(*Lactuca Sativa*; Lettuce)를 이용하였으나, 이에 식물의 범위가 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명에 있어서, '미생물 제제'는 생물학적 제제의 일종으로, 토양 등에 사용하는 경우, 함유된 유용 미생물의 활성에 의해 용도에 기재된 효과를 가지며 최종적으로 식물재배에 도움이 되는 효과를 나타내는 제제를 의미한다. 이에, 본 발명의 미생물 제제는 질산염(nitrate)의 식물로의 섭취를 통해 식물 성장을 촉진하는 미생물 제제에 관한 것으로, 본 발명의 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 미생물 제제는 추후 액상 비료 형태로 제조될 수 있다. 즉, 본 발명의 미생물 제제는 화학비료 공급이 제한된 친환경 유기농업에서 이를 극복하기 위한 생물비료로 제형화가 가능하다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 미생물 제제의 형태는 당업계에 공지된 다양한 형태로 제조할 수 있는데, 예컨대 건조분말 형태 또는 액상비료 형태로 제조할 경우에는 상기 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주를 건조분말 g 당 또는 액상 1 ㎖ 당 10^7 CFU/ml 이상으로 함유하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 10^7 내지 10^{11} CFU/ml의 범위로 함유할 수 있고, 보다 바람직하게는 10^9 CFU/ml로 함유할 수 있다. 또한, 사균 상태가 아닌 생균 상태로 대상 작물에 적용할 경우 더욱 좋다.

[0031] 또 다른 예로, 본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 비료첨가용 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명에 있어서, '비료'란 거름이라고도 불리며, 초목의 생육을 촉진시키는 영양물질을 의미한다. 본 발명의 조성물을 포함하는 비료는 파종 전 토양과 혼화하여 간편하게 사용할 수 있으며, 농약 등의 살포시 함께 시비할 수 있다. 특히, 상기 비료첨가용 조성물은 천연물로부터 유래된 성분을 포함하는 친환경적인 조성물로서, 사람이나 가축 및 토양에 무해하므로 화학비료보다 안전하게 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 이를 포함하는 비료를 제공할 수 있으며, 본 발명의 비료는 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주 또는 이의 배양물을 비료 첨가제 형태로 따로 제조하여 비료에 혼합시키거나, 비료 제조 시 직접 첨가시켜 제조할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 조성물 내 슈도모나스 나이트로리듀센스는 액상 또는 건조상태일 수 있으며, 바람직하게는 건조된 분말형태이다. 건조방법은 통풍건조, 자연건조, 분무건조 및 동결건조가 가능하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 균주 또는 이의 배양액은 비료 중량 당 10^5 CFU/ml 이상으로 함유하는 것이 바람직

하나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 비료는 본 발명의 균주 또는 배양액 외에 비료의 보존성을 높일 수 있는 통상의 첨가제들을 추가로 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 모든 비료 및 농약 화학에서 일반적으로 적용되는 방법에 따라 제조할 수 있으며, 바람직하게 본 발명의 조성물은 통상적인 방법으로 식물성장 촉진용 제제, 즉 통상적인 비료와 함께 사용할 수 있도록 제형화 할 수 있으며, 상기 조성물을 식물 또는 식물을 재배하는 토양에 대하여 적용하는 범위는 식물의 종류, 나이, 기후 조건 등에 따라 변할 수 있다.

[0037] 또 다른 예로, 본 발명은 슈도모나스 나이트로리듀센스(*Pseudomonas nitroreducens*) 균주 또는 이의 배양물을 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 식물의 성장을 촉진하는 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 질산염의 섭취를 통해 식물 성장을 촉진하는 것을 특징으로 한다. 이에 상기 식물의 성장을 촉진하는 방법은 본 발명의 균주 또는 이의 배양물을 사용하여 토양 중에 존재하는 질산염을 용이하게 가용화시키는 방법일 수 있다.

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 구체적으로 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주, 이를 배양한 배양물 또는 상기 본 발명의 미생물 제제 등을 직접적으로 식물 또는 토양, 바람직하게는 토양에 침지하거나 살포 또는 관주, 즉, 분무하여 수행할 수 있다.

[0040] 일례로, 상기 침지하는 방법으로 본 발명의 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주 또는 이의 배양물을 식물체 주변의 토양에 붓거나 또는 종자를 배양액 및 제제에 담가두는 방법이 있다. 또한, 상기 관주하는 방법으로 본 발명의 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주 또는 이의 배양물을 당해 분야에 널리 공지된 기술로 식물체에 줄줄 흐르도록 살포하는 방법이 있다.

[0042] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0044] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 및 실험예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만, 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 및 실험예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0046] **실시예 1. 슈도모나스 나이트로리듀센스(Pseudomonas nitroreducens) 균주의 분리**

[0047] 일반 상추 재배 농가의 흙 표본(오더스(odus)사)을 10 ml의 탈이온수가 포함된 15 ml의 코니칼 튜브(conical tube)에 첨가하였다. 이후 도말 평판법을 통하여 본 발명의 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주를 분리하였다. 구체적으로 상기 흙 표본을 첨가한 코니칼 튜브를 5분 동안 교반해주고(vortexing), 그 결과로 생성된 100 μl의 현탁액을 10^{-1} 농도로 희석하기 위하여 900 μl의 LB 브로스(luria-bertani broth)를 포함하는 마이크로튜브에 첨가하였다. 이후, 상기 희석을 반복 수행하여 상기 현탁액을 10^{-2}, 10^{-3} 및 10^{-4} 농도로 희석하였고, 10^{-4} 농도의 현탁액을 TSA(tryptic soy agar)에서 스트리킹하였다. 이를 37 ℃에서 24시간 동안 배양하여 본 발명의 슈도모나스 나이트로리듀센스의 단일 콜로니를 분리하였다.

[0048] 이후 상기 균주를 동정하기 위하여, 16S rRNA의 서열 비교분석을 수행하였다. 상기 과정을 통해 분리한 균주는 서열번호 1의 16S rRNA 서열을 가지고 있으며, 분석 결과 공지 균주인 슈도모나스 나이트로리듀센스 IHB B 13561의 16S rRNA 서열(GenBank KJ767371.1)과 99% 이상의 상동성을 가지고 있으며, 공지 균주와 동일한 균학적 특성을 가지고 있음을 확인하였다.

[0049] 이후 실험에 이용하기 위하여, 상기 분리 균주의 스탁을 80% 글리세롤 용액에 넣은 후 80 ℃에서 보관하였다.

[0051] **실험예 1. 본 발명 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주의 식물 성장 촉진 효과 확인**

[0052] **1-1. GUS 어쎄이를 통한 식물 성장 촉진 효과 확인**

[0053] 외부 옥신 (DR5:GUS) 또는 세포 분열 촉진 신호 (CycB1pro:GUS)에 반응하는 DR5:Gus 또는 CycB1pro:GUS를 포함하는 4일 된 형질 전환 애기장대와 함께 상기 실시예 1의 균주(이하, 'PnIHB' 라고 함)를 공동 배양하였다. 공동 배양 1일 전에, PnIHB를 37 ℃의 진탕기에서 18 시간 동안 배양하였다. 공동 배양 4일 후, 애기장대를 수집하고 2 시간 동안 37 ℃ 배양기에서 GUS 용액으로 염색하였다. 그런 다음 각 샘플에 70 % EtOH를 처리하고 70 ℃에서 모든 엽록소가 제거될 때까지 배양하였다. 대조군으로는 균주 없이 LB 배지에서 배양한 애기장대를 이용하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0054] 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주(PnIHB)와 공동 배양한 형질 전환 애기장대에서 GUS 활성이 대조군에 비해 현저하게 증가함을 확인하였다. 특히, DR5보다 CycB1pro의 활성이 현저하게 높았는데, 이는 본 발명에 따른 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주(PnIHB)의 기능이 옥신 생산보다 세포 분열 증가와 더 밀접하게 관련되어 있음을 의미한다.

[0056] **1-2. q-PCR 분석을 통한 *NRT2(nitrate specific transport2)* 유전자의 발현량 증가 확인**

[0057] 질산염 섭취(intake)와 관련이 있다고 공지된 *NRT2* 유전자 발현 변화를 q-PCR로 분석하였다. 구체적으로, 애기장대를 상기 실시예 1의 균주(PnIHB)와 8일간 공동 배양한 후, 애기장대로부터 전체 RNA를 분리하고, 상기 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 그리고 나서 상기 cDNA에 대하여 이 기술분야에서 일반적으로 사용되는 방식으로 q-PCR을 수행하였다. 대조군으로는 균주 없이 LB 배지에서 배양한 애기장대를 이용하였다. q-PCR에 이용된 프라이머 세트의 서열을 표 1에 나타내었으며, 실험 결과를 도 2에 나타내었다.

표 1

[0058]

Gene	Primer sequences
NRT1.1 *(At1g12110)*	F: AACAAACACCCCCAAAAACTGCA R: CCTTGGAAGTCCCAAGCATC
NRT1.2 *(At1g69850)*	F: AGGTCTCAAGATGGGAAGGC R: GGCGAGCATGCCACCGTGA
NRT2.1 *(At1g08090)*	F: AAAGACAAATTCGGAAAGATTCTG R: AAGTACTCGGCGATAACATTATCA
NRT2.2 *(At1g08100)*	F: CCAAAGACAAATTCGGAAAGATTC R: AAGTACTCGGCGATAACATTGTCT
NRT2.5 *(At1g12940)*	F: CTTGTTCGGTCAGGATCTTCCT R: GTTATCCATCCCCTATAGTTTTTG
NRT2.6 *(At3g45060)*	F: TGTTCTTGAGGCCATCACAAG R: CTTCGTGTAGTCCTAAGCTCT

[0059] 도 2에 나타낸 바와 같이 본 발명에 따른 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주(PnIHB)와 공동 배양한 애기장대에서 HATS(high-affinity nitrate uptake system)로 작용하는 6종류의 *NRT2* 유전자 발현이 현저하게 증가함을 확인하였다.

[0061] **1-3. 질산염 함량 확인**

[0062] 상기 실험예 1-2의 애기장대에서 질산염 함량을 확인하기 위하여, 종래 공지된 살리신산 법(Cataldo et al., 1975; Na Xu et al., 2016; Vendrell and Zupancic, 1990)을 이용하여 정량하였다. 구체적으로, 분쇄된 애기장대 샘플 50 mg을 증류수 1 mL에 넣고 100℃에서 20분간 끓여 주었다. 상기 샘플을 10분 동안 15,871g에서 원심분리하고, 0.1 mL의 상층액을 새로운 12 mL 튜브로 옮겼다. 이어서, 0.4 mL의 살리실산-황산(살리실산 5 g을 100 mL의 황산에 넣음)을 첨가하여 화학 반응을 시작하였다. 실온에서 20분간 반응시킨 후, 8% NaOH 용액 9.5 mL를 첨가하였다. 실온에서 5분 반응 후, 다중 검출 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 OD410에서의 흡광도를 측정하였다. 질산염 함량은 다음의 식을 활용하여 계산하였다.

[0063] * 질산염 함량 = C x V / W (C: OD410에서 회귀 방정식으로 계산한 질산염 농도, V: 추출된 시료의 부피, W: 시료 중량).

[0064] 상등액 0.1 mL 대신에 증류수 0.1 mL를 사용하였으며, 표준 곡선은 농도가 0.5 내지 2 mg/L 범위의 농도에서 KNO_3를 사용하여 만들었고, 회귀 방정식은 r2 ≥ 0.99 인 표준 곡선으로부터 계산되었다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0065] 도 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주(PnIHB)와 공동 배양한 애기장대가 대조군에 비해 다소 낮은 질산염 함량을 보였다. 이는 본 발명에 따른 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주(PnIHB)에 의해 질산염의 섭취가 증가하지만, 이로 인해 세포 분열이 촉진되고, 더 많은 질소와 ATP를 필요로 하는바, 식물체 내의 질산염 함량이 감소된다는 것을 의미한다.

[0067] **1-4. 애기장대의 성장 촉진 효과 확인**

[0068] 애기장대 (Arabidopsis thaliana (Col-0 ecotype)) 종자를 차아 염소산 나트륨으로 5분간 멸균한 다음, 멸균수로 5회 세척하였다, 3일간 4℃에 보관한 후, 상기 애기장대 종자를 2% 수크로스가 함유된 MS 한천에서 배양하였다. 균일한 크기의 발아된 애기장대(Col-0 모종)를 상기 실시예 1의 균주(PnIHB)가 포함된 플레이트 (2 % 수크로스 및 실시예 1의 균주 현탁액(15×10^8 CFU mL^{-1})을 포함하는 MS 한천)에 옮긴 후, 8일 간 배양하였다. 8일간의 외관 변화를 도 4a에 나타내었으며, 8일 후 엽록소 수치 변화를 도 4b에, 뿌리 길이, 곁뿌리 수 및 생중량 변화를 도 4c에 나타내었다.

[0069] 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주(PnIHB)와 공동 배양된 애기장대는 대조군과 비교하여 엽록소 함량에는 유의한 차이가 없으나, 싹 및 뿌리의 성장이 촉진되었음을 확인하였다. 특히, 도 4c에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주(PnIHB)가 포함된 배지에서 배양된 애기장대는 대조군에 비해 곁뿌리 수가 약 15% 이상 증가하였으며, 생중량 역시 두 배 이상 증가하였다.

[0071] **1-5. 상추 성장 촉진 효과 확인**

[0072] 상추(L. sativa)는 종자 상점에서 시판되고 있는 적색 상추 종자를 이용하였다. 상추 종자를 차아 염소산 나트륨으로 5분간 멸균한 다음, 멸균수로 5회 세척한 후, 3일간 냉장 보관하였다. 상기 소독된 상추 종자를 멸균된 컨테이너 내에서 멸균된 토양에 파종하였다. 이때 토양의 멸균은 토양에 존재하는 다른 미생물의 제거를 위해 이루어졌다. 4일 후, 균일한 크기의 상추 모종을 90 ml의 증류수가 첨가된 멸균된 토양 컨테이너에 옮겼다. 접종을 위해, LB에 1 ml의 상기 실시예 1의 균주(PnIHB) 배양액을 서로 다른 농도(10^1, 10^3, 10^5CFU mL^{-1})로 식물체의 뿌리에 직접 처리하였다. 식물 뿌리에 박테리아가 포함되지 않은 LB 1 ml을 처리한 토양 컨테이너를 대조군으로 이용하였다. 상기 실시예 1의 균주(PnIHB)가 처리된 상추를 23℃(16-h light/8-h dark) 및 60% 상대 습도에서 10일간 공동배양하였다. 10일간의 외관 변화를 도 5a에 나타내었으며, 10일 후의 생중량 변화를 도 5b에 나타내었다.

[0073] 도 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주(PnIHB)가 포함된 배지에서 배양된 상추는 대조군과 비교하여 잎의 성장이 현저하게 증가하였음을 확인하였다.

[0074] 이상의 실험 결과를 통하여, 본 발명에 따른 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주는 세포 분열 및 질산염 섭취를 증가시킴으로써 식물체의 성장을 촉진하는 우수한 효과를 가지고 있음을 확인하였다.

[0076] **실험예 2. 저질소 배지 하 본 발명 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주의 식물 성장 촉진 효과 확인**

[0077] 본 발명의 균주가 질소가 부족한 환경에서도 식물 성장 촉진 효과를 가지는지 여부를 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0079] **2-1. GUS 어쎄이를 통한 식물 성장 촉진 효과 확인**

[0080] 낮은 질소 조건에서 실험을 수행하기 위하여, 단독 질소원으로서 1 mM KNO_3를 첨가한 Hoagland N-free 배지를 이용하였다. 외부 옥신 (DR5:GUS) 또는 세포 분열 촉진 신호 (CycB1pro:GUS)에 반응하는 DR5:Gus 또는 CycB1pro:GUS를 포함하는 4일 된 형질 전환 애기장대를 상기 실시예 1의 균주와 함께 저 질소 조건 하에서 공동 배양하였다. 구체적인 실험 방법은 실험예 1-1과 동일하다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0081] 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주(PnIHB)와 공동 배양한 형질 전환 애기장대는 저 질소 조건 하에서도 대조군에 비해 현저하게 높은 GUS 활성을 보임을 확인하였다.

[0083] **2-2. 애기장대의 성장 촉진 효과 확인**

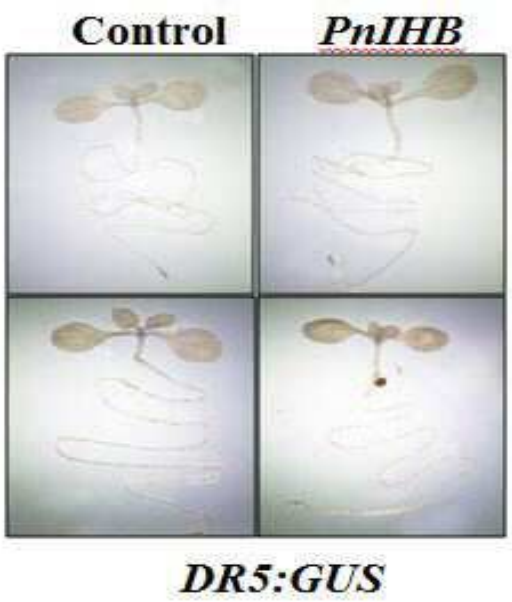
[0084] 2% 수크로스를 함유한 MS 한천에서 발아된 애기장대(Col-0 모종)를 상기 실시예 1의 균주(15×10^8 CFU mL-1)가 포함된 플레이트 (1 mM KNO_3 및 2 % 수크로스를 첨가한 Hoagland N-free 한천)에 옮긴 후, 8일간 배양하였다. 8일간의 외관 변화를 도 7a에, 8일 후 뿌리 길이, 곁뿌리 수 및 생중량 변화를 도 7b에 나타내었다.

[0085] 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주(PnIHB)가 포함된 배지에서 배양된 애기장대는 저 질소 조건 하에서도 대조군과 비교하여 증가된 곁뿌리 수 및 생중량을 보임을 확인하였다.

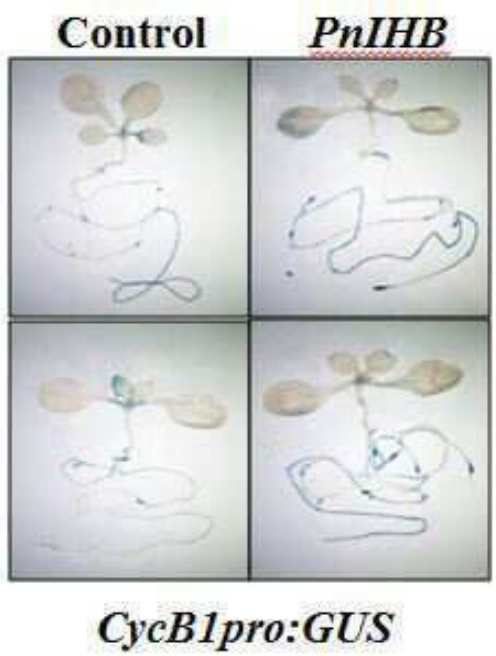
[0087] 종합적으로, 본 발명의 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주는 세포 분열 및 질산염 섭취(intake)를 증진시킴으로써 식물의 성장을 촉진하는 우수한 효과를 가지고 있다. 이에 따라, 본 발명의 슈도모나스 나이트로리듀센스 균주 또는 이의 배양물은 비료의 이용이 제한된 친환경 유기농업에서 화학비료를 대체하여 작물의 수량 증대 또는 품질 향상에 기여할 수 있는바, 식물 성장 촉진용 미생물 제제, 식물 성장 촉진용 조성물, 비료첨가용 조성물 등 농업 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면

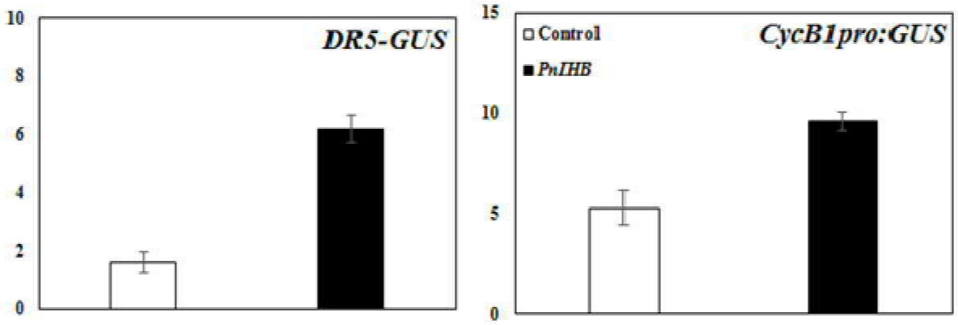
도면1a



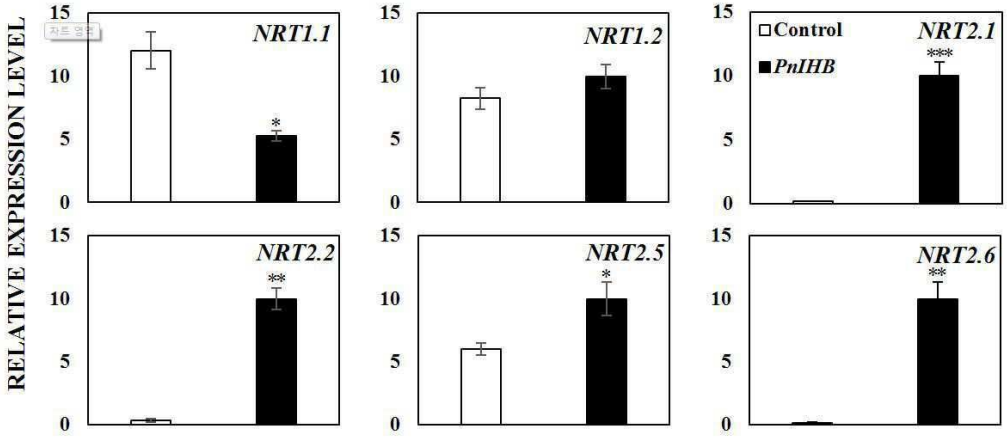
도면1b



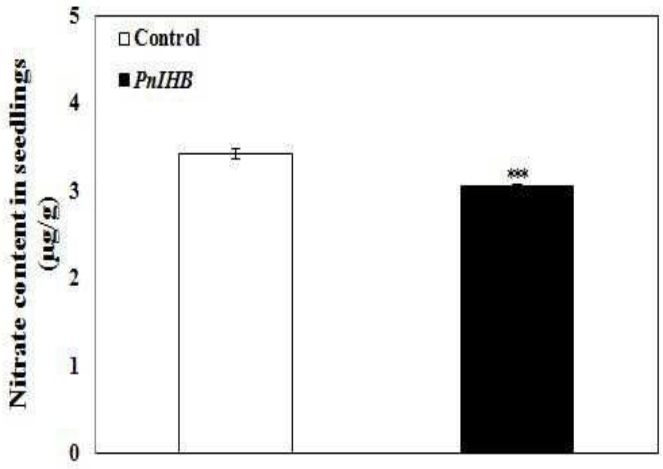
도면1c



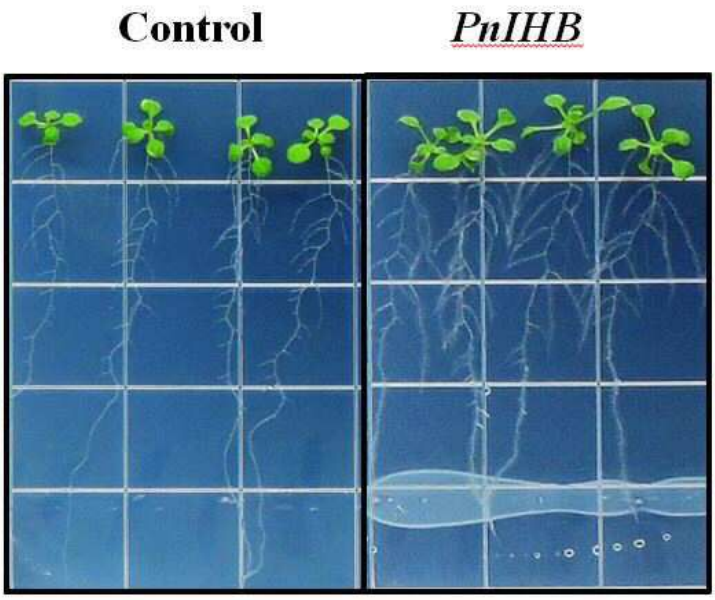
도면2



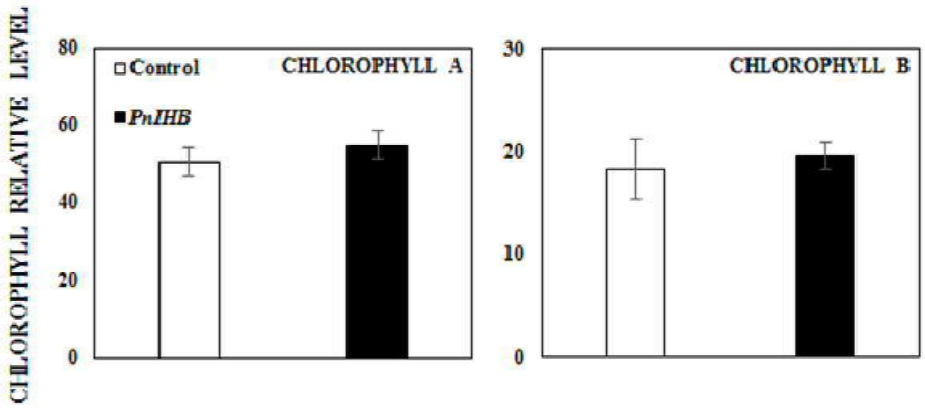
도면3


Control
PnIHB
Nitrate content in seedlings (μg/g)
0
1
2
3
4
5
***

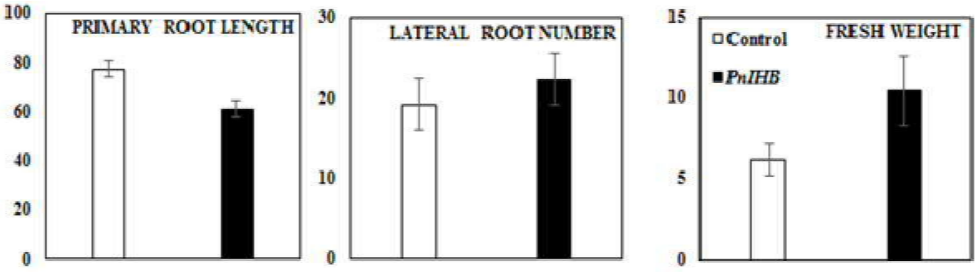
도면4a


Control
PnIHB

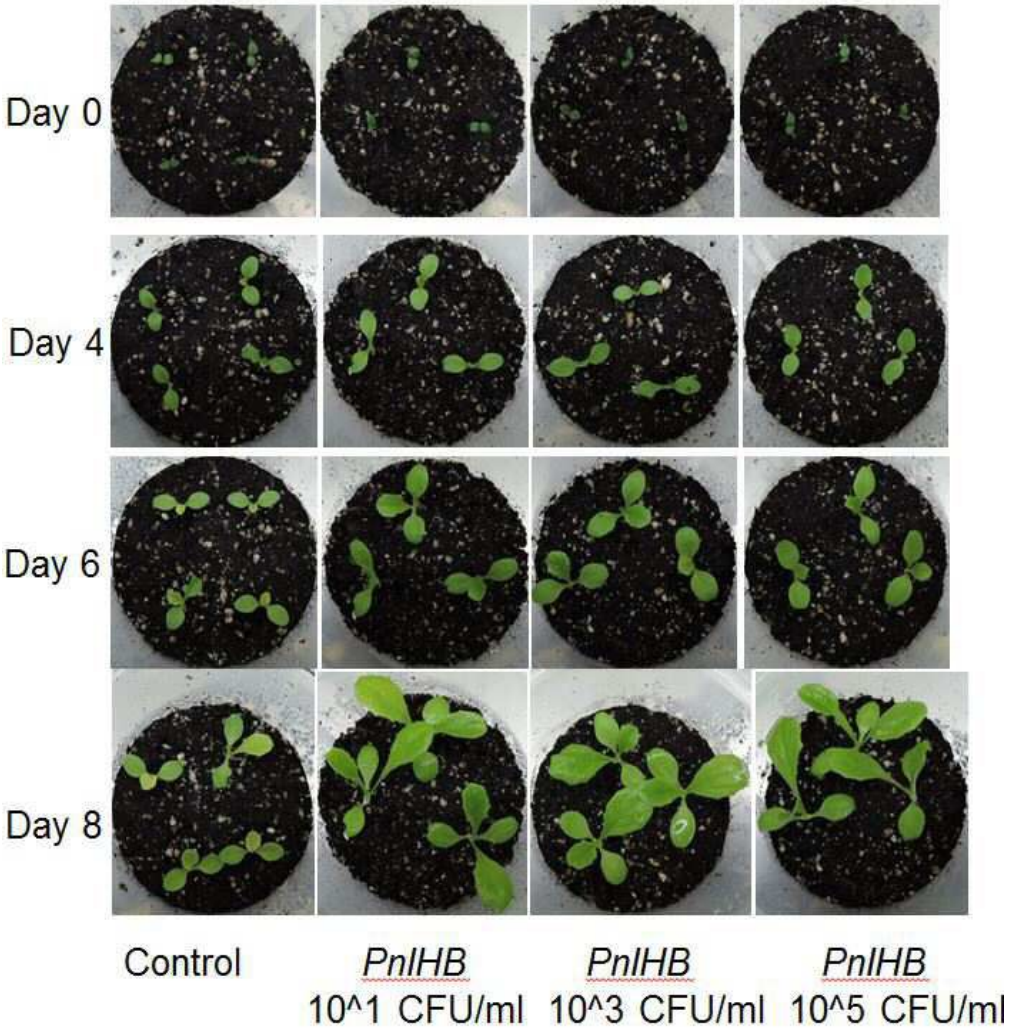
도면4b


CHLOROPHYLL RELATIVE LEVEL
80
60
40
20
0
Control
PnIHB
CHLOROPHYLL A
30
20
10
0
CHLOROPHYLL B

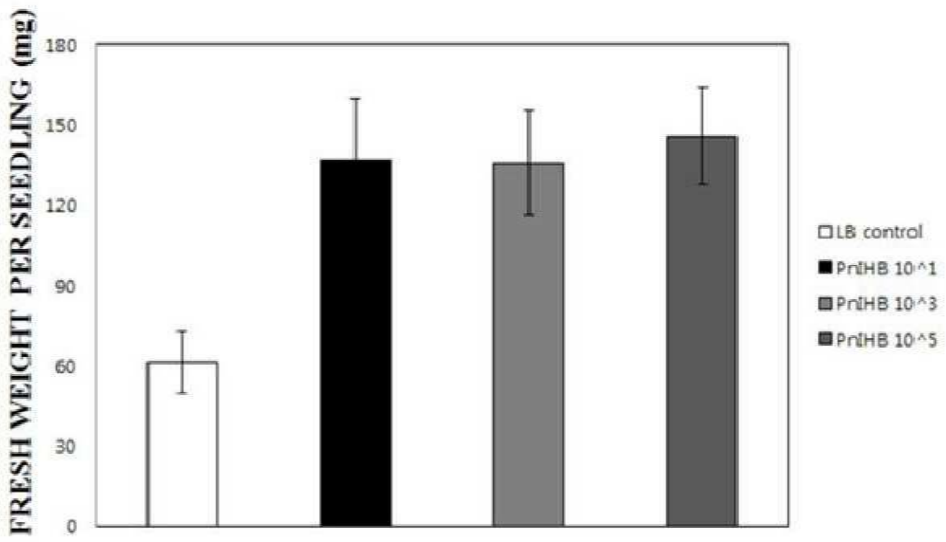
도면4c


100
80
60
40
20
0
PRIMARY ROOT LENGTH
30
20
10
0
LATERAL ROOT NUMBER
15
10
5
0
Control
PnIHB
FRESH WEIGHT

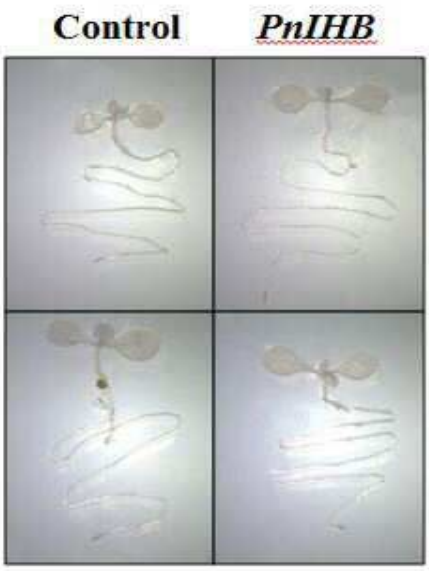
도면5a


Day 0
Day 4
Day 6
Day 8
Control
PnlHB 10^1 CFU/ml
PnlHB 10^3 CFU/ml
PnlHB 10^5 CFU/ml

도면5b

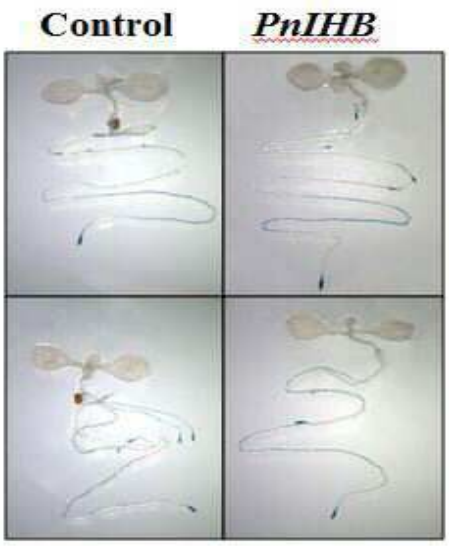

FRESH WEIGHT PER SEEDLING (mg)
180
150
120
90
60
30
0
LB control
PnlHB 10^1
PnlHB 10^3
PnlHB 10^5

도면6a



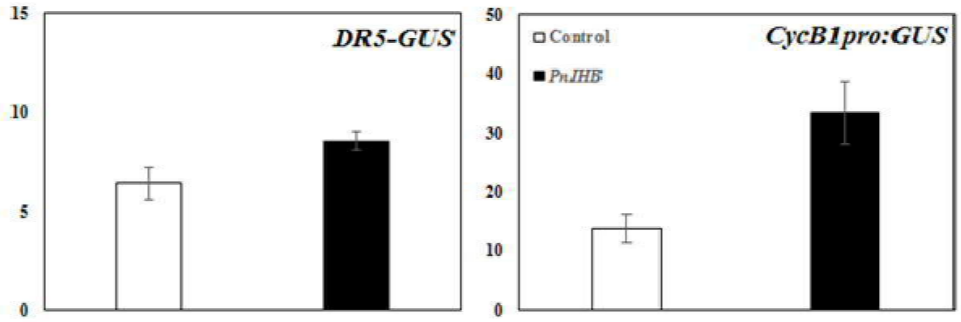
DR5:GUS

도면6b

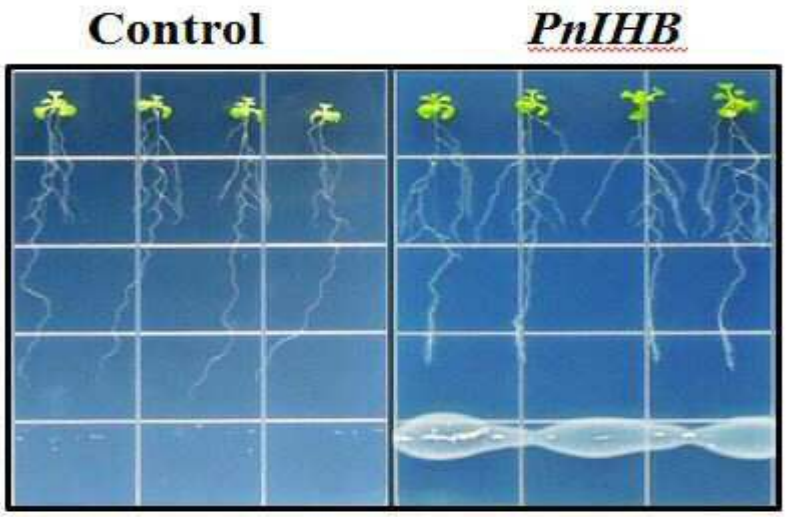


CycB1pro:GUS

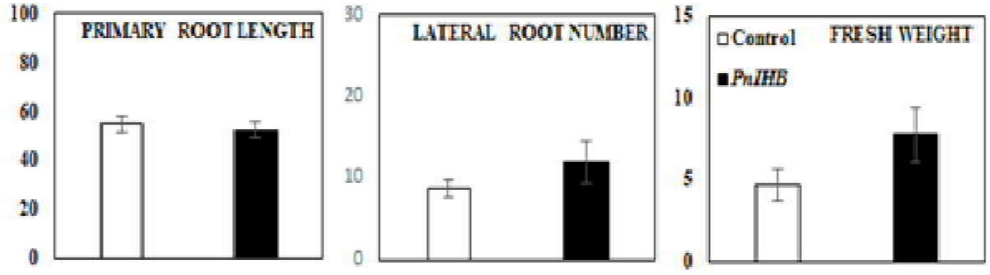
도면6c



도면7a



도면7b



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Microbial agents for promoting plant growth comprising Pseudomonas nitroreducens or culture thereof as active ingredient

<130> 1-89

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 941

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16S ribosomal RNA partial sequence

<400> 1

atcgggatta ctgggcgtaa gcgcgcgtag gtggtttggt aagatggatg tgaaatcccc 60

gggctcaacc tgggaactgc atccataact gcctgactag agtacggtag agggtggtgg 120

aatttcctgt gtagcggtga aatgcgtaga tataggaagg aacaccagtg gcgaaggcga 180

ccacctggac tgatactgac actgaggtgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 240

ccctggtagt ccacgccgta aacgatgtcg actagccgtt gggatccttg agatcttagt 300

ggcgcagcta acgcgataag tcgaccgcct ggggagtacg gccgcaaggt taaaactcaa 360

atgaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga 420

agaaccttac ctggccttga catgtccgga accttgcaga gatgcgaggg tgccttcggg 480

aatcggaaca caggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 540

tcccgtaacg agcgcaaccc ttgtccttag ttaccagcac gttatggtgg gcactctaag 600

gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaagtcatc atggcccttа 660

cggccagggc tacacacgtg ctacaatggt cggtacagag ggttgccaag ccgcgaggtg 720

gagctaatcc cataaaaccg atcgtagtcc ggatcgcagt ctgcaactcg actgcgtgaa 780

gtcggaatcg ctagtaatcg tgaatcagaa tgtcacggtg aatacgttcc cgggccttgt 840

acacaccgcc cgtcacacca tggggagtgg gttgctccag aagtagctag tctaaccgca 900

aggggacgg ttaccacgga gtgattcatg actggggtga a 941