



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0160964
(43) 공개일자 2022년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/20 (2020.01)
B09C 1/10 (2006.01) C02F 3/34 (2017.01)
C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A01N 63/20 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0069272
(22) 출원일자 2021년05월28일
심사청구일자 2021년05월28일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
조경숙
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 이화여자대학교
이수연
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 이화여자대학교
이윤영
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 이화여자대학교
(74) 대리인
김순웅

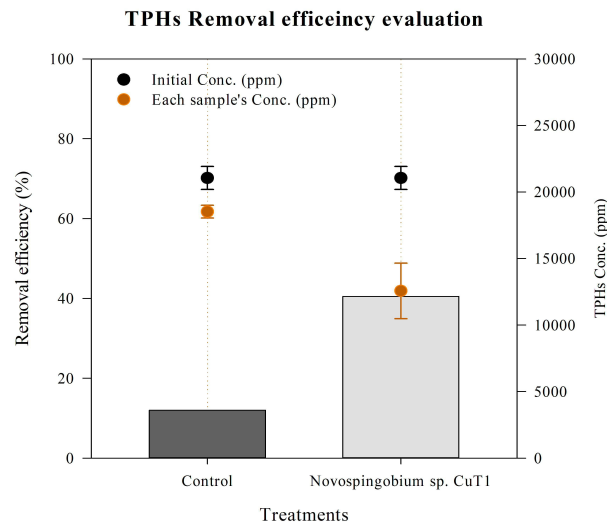
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 신규한 노보스핑고비움 속 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명을 통해 분리된 상기 신규한 노보스핑고비움 속 CuT1 균주는 중금속 내성을 보유한 균주로, 우수한 유류 분해능을 보유하고 있고 식물의 성장 또는 발아를 촉진할 수 있음과 동시에 상기 균주와 식물을 동시 이용하는 경우 우수한 오염 정화 능력을 보임을 확인한 바, 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주는 유류 및/또는 중금속에 의한 오염 정화, 또는 유류 및/또는 중금속에 의하여 오염된 땅에서 성장하는 식물의 성장 또는 발아 촉진을 위하여 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B09C 1/10 (2013.01)

C02F 3/34 (2013.01)

C12R 2001/01 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711132147

과제번호 2019R1A2C2006701

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 오염토양 정화효율 향상과 non-CO2 온실가스 배출 저감을 위한 오믹스 기반

rhizoremediation

기 여 율 1/1

과제수행기관명 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2019.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP).

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 균주는 유류 분해능을 가지는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 균주는 중금속에 대한 내성을 가지는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 균주는 식물의 생장 또는 발아 촉진능을 가지는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 유효성분으로 포함하는, 유류 오염 정화용 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 유류는 탄소수 10개 이상의 고분자 석유계 탄화수소를 포함하는 것을 특징으로 하는, 유류 오염 정화용 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 유류는 디젤, 윤활유, 항공유, 휘발유, 등유, 경유, 중유 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 석유계 유류인 것을 특징으로 하는, 유류 오염 정화용 조성물.

청구항 8

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 유류 오염원에 처리하는 단계를 포함하는, 유류 오염 정화 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 유류 오염원은 중금속을 포함하는 것을 특징으로 하는, 유류 오염 정화 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 유류 오염 정화 방법은 식물을 식재하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 정화 방법.

청구항 11

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 유효성분으로 포함하는, 중금속 오염 정화용 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 중금속은 구리(Copper, Cu), 카드뮴(Cadmium, Cd), 납(Lead, Pb) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 중금속 오염 정화용 조성물.

청구항 13

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 중금속에 의한 오염원에 처리하는 단계를 포함하는, 중금속 오염 정화 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 중금속 오염 정화 방법은 식물을 식재하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 중금속 오염 정화 방법.

청구항 15

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 식물 생장 또는 발아 촉진용 조성물.

청구항 16

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 식물에 처리하는 단계;를 포함하는 식물 생장 또는 발아 촉진 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 식물은 유류, 중금속 및 이들의 혼합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 의해 오염된 환경에서 성장하는 것을 특징으로 하는, 식물 성장 또는 발아 촉진 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유류 분해능, 중금속 내성 및 식물 성장 또는 발아 촉진능을 가진 신규한 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 원유 또는 정제유 유래 석유계 탄화수소(Petroleum hydrocarbons, PHs)는 인간과 생태계를 위협하는 대표적인 환경오염 물질로, 특히 토양과 지하수로 유입되는 경우 생태적 기능을 심각하게 저하시키는 것으로 알려져 있다. 석유 및 LNG 등의 액체를 저장하는 지하탱크의 누출, 유조선의 해난사고 등으로 인한 기름 유출, 수송 과정 및 산업 공정에서의 배출 등으로 인해 PHs 오염이 발생한다.

[0004] 독성 및 복잡한 화학 조성을 가지는 PHs에 의해 오염된 토양의 정화 기술은 크게 물리 및 화학적 처리 또는 생물학적 처리로 구분할 수 있다. 물리 및 화학적 처리방법은 오염을 신속하게 처리할 수 있고, 추가적인 오염물질의 확산을 막을 수 있다는 장점이 있다. 그러나 물리 및 화학적 처리는 처리 과정에서 환경이 파괴될 수 있고, 막대한 에너지 및 비용이 소모되는 단점이 있어, 국민 수용성(public acceptance)이 낮은 제한점이 있다.

[0005] 생물학적 처리기술은 이러한 물리 및 화학적 정화기술의 한계를 극복할 수 있는 기술로서, 친환경적이고 경제적이며 자연경관의 심미성 증대 등과 같은 부가가치가 창출된다는 장점을 지닌다. 더불어 생물의 자연적인 대사활동에 의존하는 방법이기 때문에 투입되는 노동 및 에너지의 양이 적으며, 일반적으로 PHs를 CO₂나 H₂O로 전환시키는 완전 무기화작용(mineralization)이 촉진되기 때문에 2차 오염물질의 발생 문제가 없다.

[0006] 상기 생물학적 처리기술은 오염물질의 분해를 담당하는 미생물의 외부공급 여부에 따라 생물 자극법(영양분 및 전자수용체 공급, (Biostimulation))과 생물증대법(미생물 공급, (Bioaugmentation))으로 분류할 수 있다. 생물 자극법은 영양 염류와 산소를 공급하여 오염 토양 내에 존재하는 토착미생물을 활성화시켜 오염물질 분해를 유도하는 것으로서, 생물증대법에 비하여 처리시간이 길며 이에 소요되는 비용도 대체적으로 높은 편이다. 반면 생물증대법은 유류 분해능을 가진 미생물을 직접 오염현장에 주입함으로써 처리시간을 단축시킬 수 있다.

[0007] 한편, 농작물의 수확량을 높이기 위하여 오랜 기간동안 지속적으로 사용해온 비료, 살충제 및 제초제 등에는 중금속이 다량 함유되어 있다. 상기 중금속은 생분해되지 않기 때문에 토양에 잔류되어 왔으며 이로 인한 환경 오염 문제가 점점 큰 문제로 여겨지고 있다. 또한, 산업화 및 도시화로 인해 중금속이 함유된 폐수 및 폐기물로 인해 중금속 오염은 점점 심화되고 있다.

[0008] 최근 상기와 같은 중금속 오염 정화 또는 중금속 독성으로 인한 식물의 저해된 성장 촉진 효율을 향상시키기 위해 식물성장촉진 근권세균(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)을 활용하는 연구들이 활발하게 진행되고 있다.

[0009] PGPR을 활용함에 있어서, 식물을 이용한 중금속 오염 토양 정화 효율을 향상시키기 위해 중금속에 대한 내성을 가지면서 식물 성장을 촉진할 수 있는 세균을 활용하는 것이 매우 중요하다. 또한, 최근 들어서는 중금속과 유류로 오염된 복합오염 토양의 정화에 대한 요구가 높아지고 있어, 유류 분해능을 가지면서 중금속에 대한 내성을 가진 신규 PGPR 미생물 자원의 확보가 더욱 더 중요해지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 신규한 노보스핑고비움 속 균주를 분리하고, 이의 유류 분해능, 중금속 내성 및 식물 생장 또는 발아 촉진능을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 따라서 본 발명의 목적은 신규한 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) 균주를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 유류 오염 정화용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 유류 오염 정화 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은 중금속 오염 정화용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 중금속 오염 정화 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 식물 생장 또는 발아 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 식물 생장 또는 발아 촉진 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 제공한다.
- [0021] 또한 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 유효성분으로 포함하는, 유류 오염 정화용 조성물을 제공한다.
- [0022] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 유류 오염원에 처리하는 단계를 포함하는, 유류 오염 정화 방법을 제공한다.
- [0023] 또한 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 유효성분으로 포함하는, 중금속 오염 정화용 조성물을 제공한다.
- [0024] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 중금속에 의한 오염원에 처리하는 단계를 포함하는, 중금속 오염 정화 방법을 제공한다.
- [0025] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 식물 생장 또는 발아 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 식물에 처리하는 단계;를 포함하는 식물 생장 또는 발아 촉진 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명은 신규한 노보스핑고비움 속 CuT1 균주 및 이의 활성화에 대한 것으로, 본 발명에 따른 신규한 노보스핑고비움 속 CuT1 균주는 중금속 내성을 보유한 균주로 우수한 유류 분해능을 보유하며, 식물의 성장 또는 발아를 촉진할 수 있음과 동시에 상기 균주와 식물을 동시 이용하는 경우 우수한 오염 정화 능력을 보임을 확인한 바, 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주는 유류 및/또는 중금속에 의한 오염 정화, 또는 유류 및/또는 중금속에 의하여 오염된 땅에서 성장하는 식물의 성장 또는 발아 촉진을 위하여 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 디젤 분해능을 확인한 결과이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 구리에 의해 오염된 토양에서 식재하는 식물의 발아에

대한 촉진 효과를 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 납에 의해 오염된 토양에서 식재하는 식물의 발아에 대한 촉진 효과를 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속 CuT1 균주와 동일 속의 다른 균주의 디젤 분해능을 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0032] 본 발명은 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 제공한다.
- [0033] 상기 노보스핑고비움 속 CuT1 균주(KCTC14573BP)는 본 발명자들에 의해 새로이 동정된 미생물로서, 우수한 유류 분해능을 가지고 있어, 생물학적인 방법으로 효과적으로 유류 오염 정화 방법에 유용하게 활용될 있는 미생물이다.
- [0034] 본 발명자들은 중금속 및 유류로 복합 오염된 토양에서 식재하는 톨페스큐의 뿌리에 붙어있는 근권토양으로부터 중금속 내성을 보유한 균주를 분리하고 상기 균체의 DNA를 추출해 동정한 결과, 노보스핑고비움 속의 신규 균주임을 확인하였으며, 이를 CuT1 균주라 명명하였다. 본 발명의 발명자들은 상기 노보스핑고비움 속 CuT1 균주를 2021년 05월 18일자로 생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하여 기탁번호 KCTC14573BP를 부여받았다.
- [0035] 본 발명의 실시시에 따르면, 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속 CuT1 균주(KCTC14573BP)는 구리, 카드뮴, 납에 대한 내성을 보유하고 있음을 확인하였다. 보다 구체적으로 0.5, 1, 5 또는 10mM 농도의 구리 또는 납에 대하여 영향없이 성장하였으나, 카드뮴은 1mM 농도 이상일 경우 저해를 받음을 확인하였다. 따라서 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주(KCTC14573BP)는 0.1 내지 15 mM 농도의 구리 또는 납, 0.1 내지 1mM의 카드뮴에 대하여 내성을 보유하는 것일 수 있다. 보다 바람직하게는 0.1 내지 10mM 농도의 구리 또는 납, 0.1 내지 1 mM 농도의 카드뮴에 대하여 내성을 보유하는 것일 수 있다.
- [0036] 더불어 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속 CuT1 균주(KCTC14573BP)는 30,000 ppm의 고농도의 디젤에 대하여 분해할 수 있음을 보여주었다.
- [0037] 따라서 본 발명의 균주는 중금속에 대한 내성을 가지고 있으며, 유류 분해능을 가지고 있는 것을 특징으로 한다.
- [0038] 또한 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속 CuT1 균주(KCTC14573BP)는 식물 성장 촉진 활성을 나타내는 지표인 인돌아세트산(indole acetic acid, IAA), 사이드로포어(Siderophore) 생산능 및 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate) 탈아미노효소(deaminase) 활성능을 보유하고 있다.
- [0039] 또한 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주를 처리한 경우, 식물 생장 및 식물 발아가 촉진됨을 확인할 수 있는 바, 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주(KCTC14573BP)는 식물 생장 또는 발아 촉진능을 가지고 있는 것을 특징으로 한다.
- [0040] 따라서 본 발명은 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 유효성분으로 포함하는, 유류 오염 정화용 조성물을 제공한다.
- [0041] 상기 조성물은 미생물 제제일 수 있다. 본 발명의 미생물 제제는 유효성분으로 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP) 또는 그 배양액을 함유하는 것을 특징으로 하며, 상기 균주 또는 그 배양액을 함유하기만 하면 다양한 형태로, 다양한 부형제를 첨가하여 제조될 수 있다. 즉, 미생물 제제의 제조를 위해 필요하다면 담체 등을 사용할 수 있고, 미생물의 초기 생육을 담보할 수 있는 영양원 등이 같이 첨가될 수 있다. 상기 담체는 균체 흡착, 활성유지, 환경에서의 안정화를 위해 첨가하며, 다공성, 흡착성 및 내구성이 우수한 소재를 사용할 수 있고, 영양물질은 미생물의 활성화를 위해 첨가하는 것으로 질소, 인 또는 황의 무기염류와 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미네랄을 사용할 수 있다. 보조제는 토양 또는 수질의 pH 교정, 수분유지, 염류장해 완화 등의 목적으로 첨가하여 사용할 수 있다. 또한, 제형의 제조에 있어서 필요할 경우, 전분을 비롯한 다양한 형태의 바인더를 사용하여 펠렛 형태로 제조할 수도 있다. 미생물 제제의 제조에 관한 일반적인 사항은 당업계의 통상의 지식을 이용할 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다.
- [0042] 상기 유류는 탄소수 10개 이상의 고분자 석유계 탄화수소를 포함하는 것일 수 있으며, 디젤, 항공유, 휘발유, 등유, 경유 및 중유로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 석유계 유류일 수 있다. 더불어 상기 유류는

바람직하게는 탄소수 11 내지 16의 고분자 석유계 탄화수소를 포함하는 유류일 수 있고, 보다 바람직하게는 디젤(diesel)일 수 있다.

[0043] 또한 본 발명은 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 유류 오염원에 처리하는 단계를 포함하는, 유류 오염 정화 방법을 제공한다.

[0044] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 유류로 오염된 환경에 적절하게 처리하여 오염을 정화시킬 수 있는데, 사용량은 오염 정도 및 대상 환경에 따라 적절하게 가감할 수 있다. 상기 유류 오염원은 토양, 강, 바다 및 지하수로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어 상기 유류 오염원이 토양일 경우, 총 석유탄화수소농도로 5,000 내지 30,000 mg/kg 평균 오염도를 가진 유류 오염 토양에 대하여, 오염 토양 1kg 당 CuT1 균주 농도가 약 10^8 내지 10^{10} CFU가 되도록 처리하여 사용하는 것이 바람직하다.

[0045] 투여 방법은 특별한 제한은 없으나, 넓은 면적의 오염원에 적용될 경우 소방차, 헬리콥터 등을 이용하여 골고루 살포할 수 있고, 좁은 면적의 오염원에는 분무기 등을 이용하여 골고루 살포할 수 있다. 오염원이 토양일 경우, 살포 후에는 정기적으로 경작기를 이용하여 토양층을 뒤집어주는 경작법 등을 추가로 수행하여 정화처리할 수 있다.

[0046] 더불어 상기 유류 오염원은 중금속을 추가로 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 중금속은 구리(Copper, Cu), 카드뮴(Cadmium, Cd), 납(Lead, Pb) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 또한 상기 유류 오염 정화 방법은 식물을 식재하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 식물은 유류 오염에 내성이 있으며 유류 분해 활성이 있는 식물인 것이 바람직하며, 옥수수, 소리쟁이, 닭의장풀, 해바라기 등일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 또한, 노보스핑고비움 속 CuT1 균주(KCTC14573BP)의 투여시점은 유류로 오염된 환경에 따라 적절하게 조절될 수 있는데, 유류 오염 토양에 식물의 종자 파종과 동시에, 또는 파종 후 일정기간 재배하여 생장시킨 후 노보스핑고비움 속 CuT1 균주(KCTC14573BP)를 살포할 수 있다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기의 방법으로 식물(옥수수)과 노보스핑고비움 속 CuT1 균주(KCTC14573BP)를 함께 활용하여 유류 및 중금속 복합 오염 토양을 정화 처리한 경우, 디젤 제거 효율은 83%, 중금속 제거 효율은 51%로, 식물만을 이용한 경우(디젤 제거 효율 54%, 중금속 제거 효율 28%)보다 유류 및 중금속 제거율이 향상됨을 확인하였다.

[0050] 따라서 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주를 식물과 함께 유류 또는 유류 및 중금속 복합 오염 토양에 적용함으로써 식물만을 이용하는 경우에 비하여 유류로 오염된 토양의 정화 효율이 극대화되는 작용효과를 나타낸다.

[0051] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 유효성분으로 포함하는, 중금속 오염 정화용 조성물을 제공한다.

[0052] 상기 중금속은 구리(Copper, Cu), 카드뮴(Cadmium, Cd), 납(Lead, Pb) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 상기 조성물은 미생물 제제일 수 있다. 본 발명의 미생물 제제는 유효성분으로 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP) 또는 그 배양액을 함유하는 것을 특징으로 하며, 상기 균주 또는 그 배양액을 함유하기만 하면 다양한 형태로, 다양한 부형제를 첨가하여 제조될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 부형제는 상기에 기재한 바와 같다.

[0054] 더불어 본 발명은 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)를 중금속에 의한 오염원에 처리하는 단계를 포함하는, 중금속 오염 정화 방법을 제공한다.

[0055] 상기 중금속 오염 정화 방법은 식물을 식재하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 식물 및 투여 시점은 상기에 기재한 바와 같다.

[0056] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는,

식물 성장 또는 발아 촉진용 조성물을 제공한다.

[0057] 본 발명의 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP)는 식물생장촉진 근권세균(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)에 속한다. 상기 PGPR에 의한 식물생장촉진 기작은 다음과 같다. (1) 대기 중의 질소를 식물이 흡수 가능한 질소화합물의 형태로 고정화하여 식물 성장에 필요한 다량영양소(macro nutrient) 중 하나인 질소를 제공함, (2) 불용성 인산염 화합물을 가용화하여 식물 성장에 필요한 인산염을 공급함, (3) PGPR에 의해 생산된 유기산은 식물의 성장을 촉진시키는 영양분으로 이용되고, 이러한 유기산은 중금속과 복합화합물을 형성할 수 있는데, 특히 금속옥살레이트(metal-oxalate) 결정물로 형성되면 독성도가 저하됨, (4) PGPR 중 식물 스트레스 호르몬인 에틸렌(ethylene)의 전구물질인 ACC를 암모니아와 2-옥소부타노에이트(2-oxobutanoate)로 분해하는 ACC 탈아미노효소를 생산할 수 있는 PGRP은 식물 뿌리 성장을 촉진하고, 식물에 의한 영양분 흡수를 증가시킬 수 있음, (5) PGPR 중 식물 성장을 촉진하는 식물호르몬(phytohormone)인 IAA를 생산하는 PGPR은 식물에 대한 중금속의 독성 영향을 감소시킬 수 있고, 뿌리 성장을 촉진하여 영양분과 중금속 흡수를 향상시키며, 식물의 항산화 효소 활성을 촉진시킬 수 있음, (6) PGPR 중 철과 매우 높은 친화력을 가진 저분자 킬레이터(chelator)인 사이드로포어 생산능을 가진 PGPR은 식물에 철을 제공하여 식물 성장을 촉진할 수 있음, (7) PGPR 중 세포 외부에 다당류와 계면활성제를 생산하는 PGPR은 중금속에 대한 식물의 내성을 증가시키고 중금속 제거효율을 향상시킬 수 있음.

[0058] 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속 CuT1 균주(KCTC14573BP)는 상기 IAA, 사이드로포어 생산능 및 ACC 탈아미노효소 활성능을 보유하고 있으므로 식물 배양시 식물의 근원토양에 상기 노보스핑고비움 속 CuT1 균주(KCTC14573BP)를 접종한다면 식물의 성장 또는 발아를 촉진할 수 있다.

[0059] 본 발명의 일 실시예에서 노보스핑고비움 속 CuT1 균주(KCTC14573BP)를 접종함으로써 옥수수과 같은 식물의 생장이 1.2배 정도 향상됨을 확인하였다.

[0060] 더불어 본 발명은 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주(KCTC14573BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 식물에 처리하는 단계;를 포함하는 식물 성장 또는 발아 촉진 방법을 제공한다.

[0061] 본 발명에 있어서, "배양액"은 상기 균주를 적합한 배지에서 배양한 배양액 자체, 상기 배양액을 여과 또는 원심분리하여 균주를 제거한 여액(여과액, 원심분리한 상등액, 상기 여액을 농축한 농축액, 배양액을 초음파 처리하거나 상기 배양액에 라이소자임(Lysozyme)을 처리하여 수득한 세포 파쇄액, 상기 균주를 배양한 다음 수득한 산물 등이 제한 없이 포함된다. 상기 배양액의 조성은 통상의 세라티아 속 균주 배양에 필요한 성분뿐 아니라, 세라티아 속 균주의 성장에 상승적으로 작용하는 성분을 추가적으로 포함할 수 있으며, 이에 따른 조성은 당업계의 통상의 기술을 가진 자에 의하여 용이하게 선택될 수 있다.

[0062] 본 발명에 있어서, "무세포 상등액(Cell Free Supernatant)"은 균주를 배양한 후 이를 원심분리하고 필터를 이용하여 여과한 세포를 제거한 순수 액체를 지칭한다. 상기 무세포 상등액은 균주를 배양한 후 이를 원심분리하고 필터를 이용하여 여과한 액체를 지칭한다.

[0063] 상기 식물은 유류 오염에 내성이 있으며 유류 분해 활성이 있는 식물인 것이 바람직하며, 옥수수, 소리쟁이, 닭의장풀, 해바라기 등일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 상기 식물은 유류, 중금속 및 이들의 혼합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 의해 오염된 환경에서 성장하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0066] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0068] 실시예 1. CuT1 균주 분리

[0069] 중금속에 대한 내성을 보유 동시에 석유계 탄화수소 화합물을 분해할 수 있는 능력을 가진 미생물을 분리하고자, 중금속(구리, 카드뮴, 납) 그리고 유류(디젤)로 복합 오염된 토양에서 식재하는 톨페스큐(*tall fescue*)를 채취하였다. 톨페스큐를 흔들어서 뿌리에 느슨하게 붙어있는 토양을 제거한 후 뿌리에 단단하게 붙어

있는 근권토양을 털어내어 채취한 후 2 mm 체에 거른 뒤 4℃에서 냉장 보관하였다.

[0070] 상기 수득한 톨페스큐의 근권토양으로부터 중금속 내성 균주를 분리하기 위해 다음과 같이 수행하였다. 근권토양 1 g이 들어있는 시험관에 9 mL의 멸균수를 주입하고 1,200 rpm에서 1분동안 현탁시킨 후 15분 간 정치시켰다. 상기 근권토양 현탁액으로부터 상등액을 수득하고, 이를 10 내지 4까지 연속 희석한 후 접종액으로 사용하여 구리, 카드뮴, 납(0.01, 0.1, 0.5, 1 mM)을 각각 첨가한 1/10 희석한 배지(10% LB 배지)에 도말하였다. 1/10 희석 LB 배지는 트립톤(Tryptone) 1 g/L, 효모 추출물(Yeast extract) 0.5 g/L, NaCl 1 g/L에 한천(agar) 15 g/L를 첨가한 후 120 ℃, 15분간 멸균하여 제조하였다. 더불어 각 중금속의 저장(stock) 용액은 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 시약을 이용하여 제조하였다. 상기 멸균 배지를 60 ℃ 전후로 냉각한 후, 상기 각 중금속의 저장 용액을 설정 중금속 농도가 되도록 첨가하였다. 3 종류의 중금속 함유 배지에 접종액을 200 μL 씩 분주하고 도말한 후 30 ℃에서 48 내지 72시간 동안 배양하였다.

[0071] 그 결과, 구리가 포함된 배지로부터 해당 중금속에 내성을 가지는 콜로니가 확인되었다. 순수 균주로의 분리를 위해 동일한 농도의 중금속이 함유된 1/10 희석 LB 배지에 상기 콜로니를 접종한 후 동일한 조건에서 배양하여 노란색의 콜로니를 형성하는 균주(CuT1)의 순수 배양체를 확보하였다.

[0073] 실시예 2. 노보스핑고비움 속(*Novosphingobium* sp.) CuT1 균주 동정

[0074] 상기 실시예 1의 선별한 근권세균 CuT1을 동정하고자 다음과 같이 16S rRNA 서열분석을 수행하였다. CuT1 콜로니를 1.5 mL 튜브에 넣고 3차 증류수를 30 μL 주입하여 충분히 현탁시킨 다음 11,000 rpm으로 5초간 원심 분리하였다. 균체를 용해시키기 위해 95 ℃로 15분간 열처리한 후, 11,000 rpm으로 5초간 원심 분리하였다. 상기 용해 과정을 3번씩 반복하여 추출된 게놈 DNA(genomic DNA)를 주형(template)으로 하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다. 이를 위하여 340f에 대한 프라이머(5'-TCCTACGGGAGGCAGCAG-3')와 805r에 대한 프라이머(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')를 사용하였다. 튜브에 상기 DNA 주형 2 μL , 340f에 대한 프라이머(10 μM)와 805r에 대한 프라이머(10 μM) 각각 1 μL , dNTPs (2.5 mM) 4 μL , PCR 버퍼(MgCl_2 포함) 5 μL , Taq 중합효소(Taq-polymerase) 0.25 μL 를 넣고 최종부피 50 μL 에 맞춰 증류수를 넣었다. PCR은 94 ℃에서 3분간 초기 변성(initial denaturation), 94 ℃에서 30초간 변성(denaturation), 55 ℃에서 30초간 어닐링(annealing), 72 ℃에서 30초간 신장(extension) 과정을 30 사이클(Cycle) 반복한 후, 72 ℃에서 5분간 최종 신장(Final extension)하는 조건으로 수행하였다.

[0075] PCR 생성물의 염기서열 분석은 마크로젠(Macrogen (서울, 한국))에 의뢰하여 수행하였다. 분석된 염기서열을 BioEdit v7.2.6.0(Bioedit Sequence Alignment Editor)프로그램을 이용해 정렬하였다. 그 결과 CuT1 균주는 하기 서열번호 1의 16S rDNA 염기서열을 가지는 것을 확인하였다.

[0076] TGTGGGAATATTGGACAATGGGGAAACCTGATCCAGCAATGCCGCTGAGTGATGAAGCCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTTTTACCAGGGATGATAATGACAGTACCTGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGAGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGTTACTCAAGTCAGAGGTGAAGCCCGGGCTCAACCCGGAACAGCCTTTGAACTAGGTGACTGGAATCTTGGAGAGGCGAGTGGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCACTGGCGAAGGCGACTCGCTGGACAAGTAT-GACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTTAGAT(서열번호 1)

[0077] 이 후 NCBI의 Blast 프로그램을 통해 상기 염기서열을 이용하여 CuT1 균주를 동정한 결과, 노보스핑고비움 속에 속하는 것으로 판단되었다.

[0078] 본 발명자들은 상기 균주를 “*Novosphingobium* sp. CuT1”으로 명명하였으며, 생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 2021년 05월 18일자로 기탁하여, 기탁번호 KCTC14573BP를 부여받았다.

[0080] 실시예 3. 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 중금속 내성 확인

[0081] 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 고농도 중금속에 대한 내성을 고농도 중금속이 함유된 1/10 희석 LB 배지에서 CuT1 균주의 성장 여부로 평가하였다. Cu, Cd, Pb (0.5, 1, 5, 10 mM)를 각각 첨가한 1/10 희석 LB배지에 노보스핑고비움 속 CuT1 균주를 접종한 후 30 ℃에서 48 내지 72시간 동안 배양한 뒤 성장 여부를 확인하였다.

표 1

중금속	농도(mM)	성장 여부
Cu	10	+
	5	+
	1	+
	0.5	+
Cd	10	-
	5	-
	1	+
	0.5	+
Pb	10	+
	5	+
	1	+
	0.5	+

[0083]

[0084]

그 결과 상기 표 1과 같이, 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주는 10 mM의 구리 또는 납을 첨가한 1/10 희석 LB 배지에서 성장이 가능함을 확인할 수 있었다. 그러나 카드뮴의 경우, 최대 1 mM의 농도에서는 성장할 수 있었으나, 그 이상의 농도에서는 저해를 받아 성장이 이루어지지 않았다.

[0086]

실시예 4. 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 유류 분해능 확인

[0087]

본 발명에 따른 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 유류 분해능을 평가하기 위하여, 시험관에 무기염 배지를 5 mL 씩 주입한 후 균주를 접종하였다. 무기염 배지는 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17.09 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0.5 g/L, CaCl_2 0.01 g/L, NH_4Cl 1 g/L의 조성으로 준비하였다. 그 후 멸균한 0.15 mL(3%, v/v)의 디젤을 주입한 후 30 °C에서 2주 동안 120 rpm으로 진탕배양하였다. 더불어 균주를 접종하지 않은 무기염 배지에 동일한 양의 디젤을 첨가한 후 동일 조건에서 배양하여 대조군으로 설정하였다. 그 후 배양액 5 mL에 추출용매인 헥산(hexane) 5 mL를 넣은 후 30 °C, 120 rpm의 조건에서 30분간 교반하여 추출하였다. 그 후 시험관을 실온에서 30분간 정치한 후 상등액(hexane 용매층)을 채취하여 용매 속에 녹아있는 잔류 유류의 농도를 불꽃 이온화 검출기와 HP-5 모세관 컬럼(capillary column (30 m×0.320mm×0.25 μm), Agilent Technologies))이 장착된 가스 크로마토그래피(gas chromatography, (GC 6980N system, Agilent Technologies, CA, USA))를 이용하여 분석하였다. 가스 크로마토그래피의 주입기와 감지기 작동 온도는 각각 300 °C와 320 °C로 설정하였다. 또한 가스 크로마토그래피의 오븐 온도는 3분 동안 60 °C로 유지하였고, 4 °C·min⁻¹ 속도로 260 °C까지 상승시킨 다음 84 °C·min⁻¹ 속도로 310 °C로 상승시킨 후 5분 간 유지하였다. 총 석유계 탄화수소(Total Petroleum Hydrocarbons, TPH) 제거 효율은 초기농도와 2주 후 농도를 비교하여 백분율로 환산 후 그 정도를 상대적으로 평가하였다.

[0088]

그 결과 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주는 30,000 ppm의 고농도 유류 조건에서도 큰 저해없이 유류를 분해함을 확인하였다.

[0090]

실시예 5. 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 식물 성장 촉진능 확인

[0091]

본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 식물 성장 촉진능을 확인하기 위하여, 식물 성장 촉진 활성을 나타내는 지표인 인돌아세트산(indole acetic acid, IAA) 생산, 사이드로포어(Siderophore) 생산, ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate) 탈아미노효소(deaminase) 활성능을 확인하였다.

[0092]

먼저 1/10 희석 LB 배지를 시험관에 5 mL씩 분주하였다. 이에 노보스핑고비움 속 CuT1 균주를 접종하고 30°C에서 100 내지 120rpm으로 48시간 동안 진탕배양하였다.

- [0093] IAA 생산능을 평가하기 위해, 2 mL의 상기 배양액이 들어있는 시험관에 인산 완충액(phosphate buffer(pH7.5)) 6 mL, L-트립토판(L-tryptophane (0.06%, w/v)) 4 mL를 주입한 후 압조건의 37 °C에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 인산 완충액은 $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 22.81 g/L, 글루코오스(Glucose) 10 g/L의 조성으로 준비하였다. 배양 종료 후 배양액을 4,000 rpm에서 5분 간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 상기 상등액 3 mL와 살코프스키 '용액(Salkowski)' s reagent (HClO_4 (35%, v/v) 98mL, 0.2 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mL을 혼합한 용액)) 2 mL를 혼합하였다. 이를 압조건의 25 °C에서 30분 동안 정치시킨 후 분홍색 내지 자주색으로 발색되는 정도를 흡광도(535 nm)측정을 통해 비교 평가하였다.
- [0094] 더불어 사이드로포어 생산능을 평가하기 위해, 배양액 5 mL에 1 M HCl 용액을 50 μL 씩 첨가하여 pH 2 내지 pH 3 사이로 조정하였다. 더불어 배양액 및 첨가한 1 M HCl 용액과 동일한 양의 에틸 아세테이트(ethyl acetate($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Ethyl alcohol), 99.9%)를 첨가하고 천천히 흔들어서 유기상과 수용액상이 분리되도록 정치시켰다. 상층의 유기상 2 mL를 회수하여 새로운 시험관에 분주한 후, 해썬웨이 용액(Hathway reagent (1 mL의 0.1 M 페리시안화칼륨(potassium ferricyanide), 1 mL의 0.1 M HCl(0.1 M FeCl_3 포함), 98 mL의 증류수를 혼합한 용액))을 2 mL 첨가하고 30 °C에서 30분 동안 정치하였다. 하층의 수용액상이 청록색으로 발색되는 정도를 흡광도(700 nm)측정을 통해 비교 평가하였다.
- [0095] ACC 탈아미노효소 활성능은 다음과 같이 평가하였다. 균주를 TSB(Tryptic soy broth, (Difco))배지에 접종하고 30 °C에서 120 rpm으로 24시간 배양하였다. TSB 배지는 카제인의 췌장 소화물(pancreatic digest of casein) 17.0 g/L, 콩의 파파인 소화물(papaic digest of soybean) 3.0 g/L, 덱스트로오스(dextrose) 2.5 g/L, 염화나트륨(sodium chloride) 5.0 g/L, 인산이포타슘(dipotassium phosphate) 2.5 g/L의 조성으로 준비하였다. 배양 완료 후 질소원으로서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 대신에 3 mM ACC를 함유한 DF(Dworkin-Foster) 배지에 다시 접종하고 30 °C, 200 rpm으로 48시간 동안 배양하였다. DF 배지는 Na_2HPO_4 5.8 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH_4Cl 1 g/L, CaCl_2 0.25 mM, MgSO_4 1 mM, 글루코오스 0.15%, 비오틴(biotin) 0.3 mg/L의 조성으로 준비하였다. ACC(98%, Sigma-Aldrich, Israel)는 0.5 M 저장 용액으로 제조한 후 배지에 첨가하였으며 제균 처리(Minisart®Syringe filter, 0.2 μm)하였다. 질소원이 없는 DF 배지에 균주를 접종하고 10일 동안 배양한 후 흡광도(600 nm) 값을 비교하여 ACC 탈아미노효소의 활성을 평가하였다.

표 2

식물성장촉진능력 평가	흡광도 측정	활성 정도
IAA	$\text{OD}_{535\text{nm}}=0.243$	+++
Siderophore	$\text{OD}_{700\text{nm}}=0.088$	++
ACC deaminase	$\text{OD}_{600\text{nm}}=0.005$	+

- [0096]
- [0097] 그 결과 상기 표 2와 같이, 본 발명에 따른 노보스핑고비움 속 CuT1 균주는 우수한 IAA 생산능을 보여주었으며, 우수한 사이드로포어 생산능 및 ACC 탈아미노효소 활성능을 보여주었다.
- [0099] 실시예 6. 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 식물 발아 촉진능 확인
- [0100] 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 식물 발아 촉진능을 확인하기 위하여, 구리와 납으로 오염된 마사토에 옥수수 종자를 심어주었다. 이를 위해 토양을 저온 멸균법(100°C, 1시간)으로 3일 연속으로 멸균하고 구리 300 ppm, 납 500 ppm으로 오염시킨 후 모판에 동일한 양으로 채워주었다. 옥수수 종자의 경우 표면살균(10% 표백제(Bleach), 1시간)한 후 멸균한 증류수로 여러 번 헹구내어 주었다. 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주는 1/10 희석 LB 배지에 접종하고 120rpm으로 24시간 진탕배양하였고, 이의 현탁액($\text{OD}_{600\text{nm}}=0.6$)에 옥수수 종자를 2시간 동안 침중시켜 주었다. 침중 종료 후 종자를 상기에서 준비한 증금속 오염 토양이 담겨있는 모판에 심고 13 내지 16일 동안 발아 현황을 관찰하였다.
- [0101] 그 결과 도 2 및 도 3과 같이, 구리 300 ppm 또는 납 500 ppm으로 오염된 토양의 경우 모두 본 발명의 노보스핑

고비움 CuT1 균주가 접종된 실험군의 종자 발아개수가 접종되지 않은 대조군 대비 훨씬 많음을 확인하였다.

[0103] 실시예 6. 노보스핑고비움 속 CuT1 균주 및 식물에 의한 오염 정화 효과 확인

[0104] 더불어 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주와 식물을 동시 이용하여 오염 정화 효과를 확인하였다. 먼저 디젤-중금속 복합 오염 토양(디젤 농도: 10,000 mg/kg-soil, 중금속(구리, 납) 500 mg/kg-soil) 10 kg이 들어있는 화분에 옥수수를 식재하고, 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주 배양액 100 ml를 접종하였다. 50일 동안 재배한 후, 토양의 잔류 디젤 및 중금속 농도, 옥수수 건조 중량을 측정하였다. 더불어 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주를 접종하지 않고 옥수수만을 식재한 대조군도 동시에 수행하였다.

[0105] 토양의 잔류 디젤 농도 분석을 위해 토양 시료에 헥산을 1:1 비율(부피비)로 넣고, 30초간 혼합한 후 28 °C에서 180 rpm으로 30분간 교반하여 디젤을 추출하였다. 디젤이 추출된 헥산층을 채취하여 디젤 농도를 가스크로마토그래피(FID 검출기)를 이용해 측정하였다. 토양의 잔류 중금속 농도 분석을 위해 토양을 산처리한 후, 원자흡수분광광도기(atomic absorption spectrophotometer, AAS)를 이용하여 분석하였다.

[0106] 또한 옥수수 건조 중량 측정을 위해, 식물체를 물로 세척하여 뿌리에 붙어있는 토양 입자를 완전히 제거하고 70 °C에서 24시간 건조한 후 건조 중량을 측정하였다.

[0107] 상기와 같이 확인한 결과를 하기 표 3에 나타내었다. 이때 식물생장율은 대조군의 옥수수의 건조생체량 대비 실험군 옥수수의 건조생체량 비율로 나타내었다.

표 3

항목	대조군(옥수수)	실험군 (옥수수+CuT1 접종군)
디젤 분해(정화) 효율(%)	54	83
중금속 제거 효율(%)	28	51
식물생장율*	1	1.2

[0110] 그 결과 상기 표 2와 같이, 옥수수만을 식재한 대조군 토양에서는 54%의 디젤 분해효율 및 28%의 중금속 제거효율을 확인하였다. 반면 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주를 접종한 토양에서는 88%의 디젤 분해효율 및 51%의 중금속 제거효율을 확인하였다. 또한, 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주 접종에 의해 옥수수 생장이 1.2배 향상됨을 확인하였다. 따라서 상기 결과로부터 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주를 이용하면 유류 및 중금속 복합 오염 토양의 정화 효율이 증가하고, 식물 생장이 향상될 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0112] 실시예 7. 노보스핑고비움 속 CuT1 균주와 다른 노보스핑고비움 속 균주의 효과 비교

[0113] 7-1. 중금속 내성 비교

[0114] 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 중금속 내성 능력에 대한 우수성을 평가하기 위하여, 동일한 속 균주인 노보스핑고비움 속 CdT5 균주의 중금속에 대한 내성을 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 확인하였다.

[0115] 이에 앞서 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 상기 노보스핑고비움 속 CdT5 균주의 16S rDNA 염기서열을 확인한 결과, 노보스핑고비움 속 CdT5 균주는 하기의 염기서열을 보유한 것을 확인하였다.

[0116] AGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCTGAGTGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAGCTCTTTTACCAGGGATGATAA
TGACAGTACCTGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGGAGGGAGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACG
TAGGCGGTTACTCAAGTCAGAGGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCGGAAGTGCCTTTGAACTAGGTGACTGGAATCTTGAGAGGCGAGTGAATTCGAG
TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGACTCGCTGGACAAGTATTGACGCTGAGGTGCGAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGA

표 4

중금속 내성 평가	<i>Novosphingobium</i> sp. CuT1		<i>Novosphingobium</i> sp. CdT5	
	농도 (mM)	성장여부	농도 (mM)	성장여부
Cu	10	+	10	-
	5	+	5	-
	1	+	1	+
	0.5	+	0.5	+
Cd	10	-	10	-
	5	-	5	-
	1	+	1	-
	0.5	+	0.5	-
Pb	10	+	10	-
	5	+	5	-
	1	+	1	+
	0.5	+	0.5	+

두 균주의 중금속 내성 평가 결과 상기 표 4와 같이, 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주는 Cu, Cd, Pb의 모든 종류의 중금속에서 더 우수한 내성을 보였으며, 동일 속 균주인 노보스핑고비움 속 CdT5 균주는 중금속에 대하여 내성을 보유하지 않음을 확인하였다.

7-2. 식물 성장 촉진능 비교

본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 식물 성장 촉진능에 대한 우수성을 평가하기 위하여, 동일한 속 균주인 노보스핑고비움 속 CdT5 균주의 식물 성장 촉진능을 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 확인하였다.

표 5

식물 성장 촉진능력 평가	<i>Novosphingobium</i> sp. CuT1		<i>Novosphingobium</i> sp. CdT5	
	흡광도 측정	활성정도	흡광도 측정	활성 정도
IAA	OD _{535nm} =0.243	+++	OD _{535nm} =0.217	+++
Siderophore	OD _{700nm} =0.088	++	OD _{700nm} =0.054	++
ACC deaminase	OD _{600nm} =0.005	+	OD _{600nm} =0.000	-

그 결과 상기 표 5와 같이, 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주는 동일 속 균주인 노보스핑고비움 속 CdT5 균주 대비 우수한 식물 성장 촉진능을 가짐을 확인하였다.

7-3. 유류 분해능 비교

본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 유류 분해능에 대한 우수성을 평가하기 위하여, 동일한 속 균주인 노보스핑고비움 속 CdT5 균주의 유류 분해능을 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 확인하였다.

그 결과 도 4와 같이, 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주에 의한 유류 제거효율은 40.5%이었으며 비교 대상 균주인 노보스핑고비움 속 CdT5 균주에 의한 유류 제거효율은 7.2%이었다. 따라서 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주의 유류 제거능은 동일 속 균주보다 5배 이상 우수함을 확인할 수 있었다.

[0130] 종합적으로 본 발명의 실시예를 통해 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주는 우수한 유류 분해능을 보유하고 있고, 중금속 내성을 보유하고 있으며, 식물의 성장 또는 발아를 촉진할 수 있음과 동시에 상기 균주와 식물을 동시 이용하는 경우 우수한 오염 정화 능력을 보임을 확인한 바, 본 발명의 노보스핑고비움 속 CuT1 균주는 유류 및/또는 중금속에 의한 오염 정화, 또는 유류 및/또는 중금속에 의하여 오염된 땅에서 성장하는 식물의 성장 또는 발아 촉진을 위하여 유용하게 활용할 수 있다.

수탁번호

[0132]

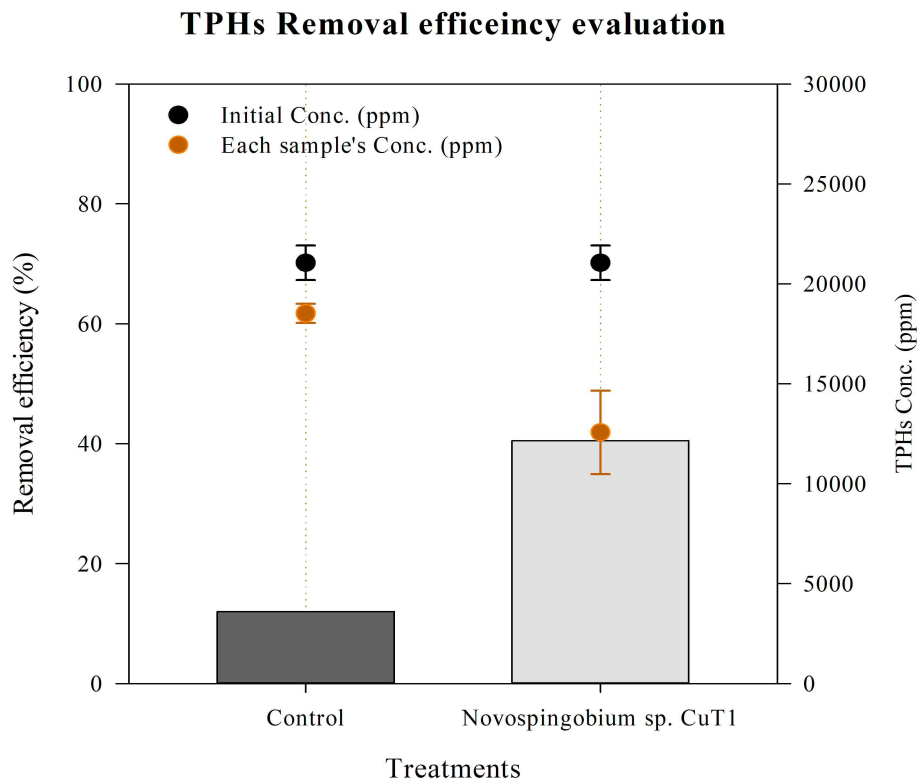
기탁기관명 : 생명공학연구원 생물자원센터

수탁번호 : KCTC14573BP

수탁일자 : 20210518

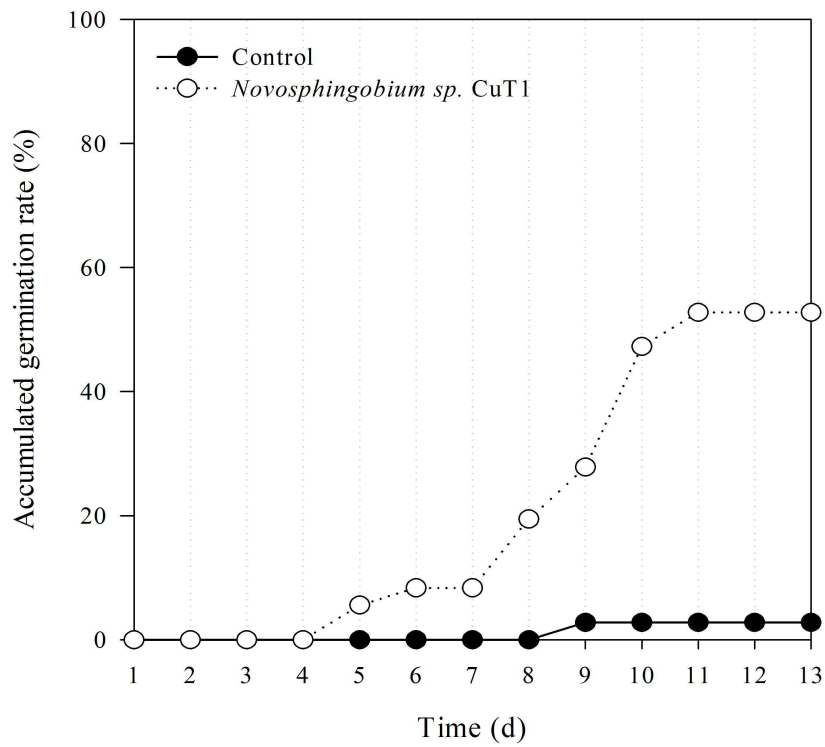
도면

도면1



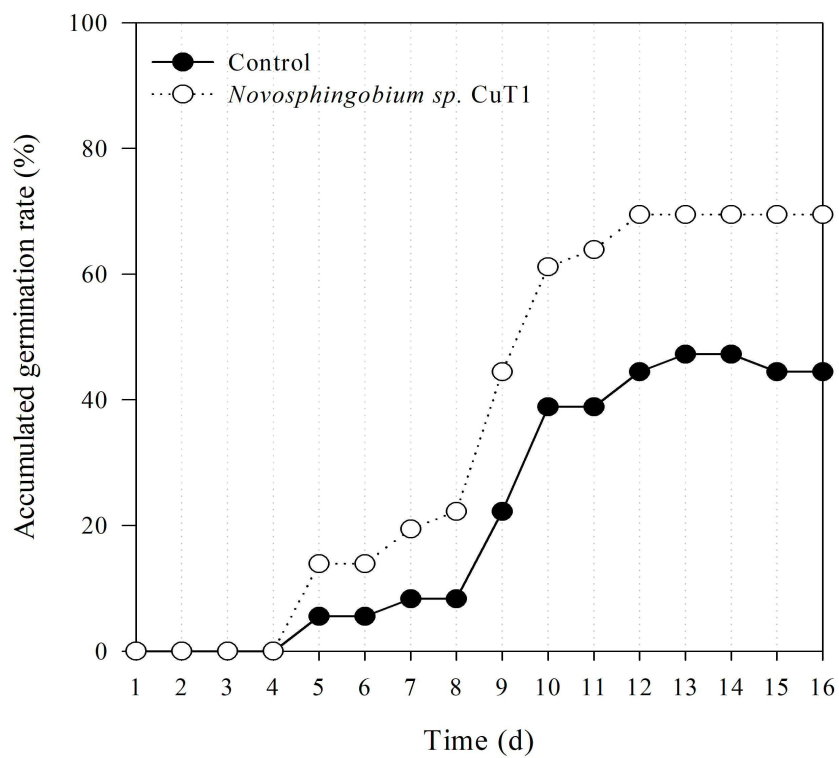
도면2

Maize's Germination in Cu contaminated soil



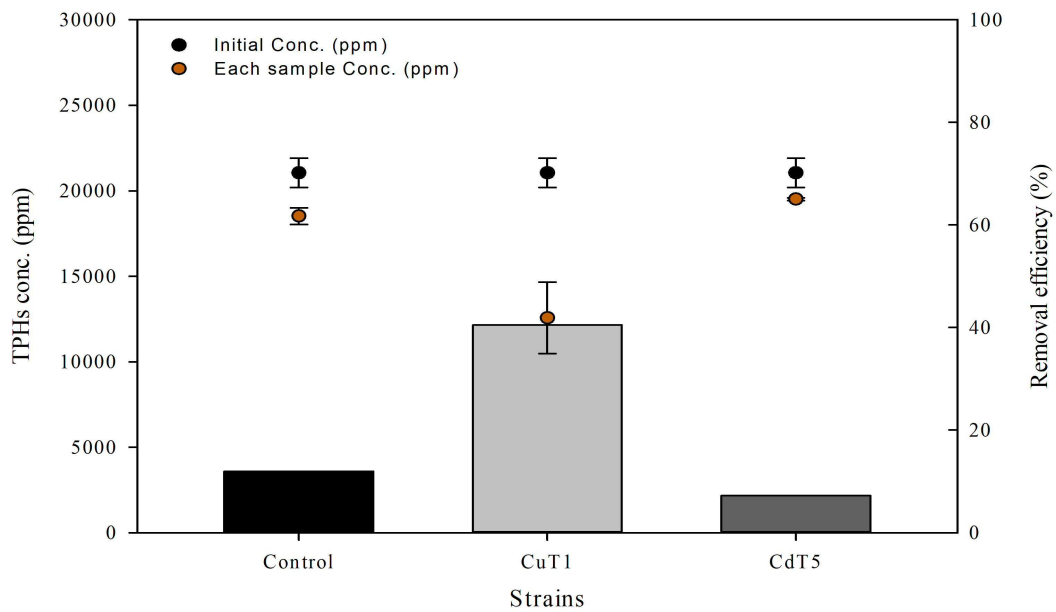
도면3

Maize's Germination in Pb contaminated soil



도면4

TPHs Removal efficiency evaluation



서열 목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Novel *Novosphingobium* sp. strain, and uses thereof

<130> 1-104P

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> *Novosphingobium* sp. CuT1 16S rDNA

<400> 1

tgtggggaat attggacaat gggggaaacc ctgatccagc aatgccgcgt gagtgatgaa 60

ggccttcggg tcgtaaagct cttttaccag ggatgataat gacagtacct ggagaataag 120

ctccggctaa ctccgtgcc aagccgcgg taatacggag ggagctagcg ttgttcggaa 180

ttactgggcg taaagcgcac gtaggcggtt actcaagtca gaggigaaag cccggggctc 240

aaccccgaa cagcctttga aactaggtga ctggaatctt ggagaggcga gtggaattcc 300

gagtgtagag gtgaaattcg tagatattcg gaagaacacc agtggcgaag gcgactcgct 360

ggacaagtat gacgctgagg tgcgaaagcg tggggagcaa aacaggattt agat 414