

***Bacillus subtilis* S37-2 균주의 항진균활성 및 식물생육촉진 효과**

권장식* · 원항연 · 서장선 · 김완규 · 장갑열 · 노형준

농촌진흥청 농업과학기술원

Plant Growth Promoting Effect and Antifungal Activity of *Bacillus subtilis* S37-2

**Jang-Sik Kwon,* Hang-Yeon Weon, Jang-Sun Suh, Wan-Gyu Kim,
Kab-Yeul Jang, and Hyung-Jun Noh**

National Institute of Agricultural Science and Technology Suin-ro 150, Seodun-dong Kweonseon-gu, Suwon-si 441-707, Korea

With a broad objective for the development of microbial based fertilizers, a total of 373 strains were isolated from rhizoplane and rhizosphere of pepper, tomato, lettuce, pasture, and grass. The efficacy of the isolates to augment overall plant growth was evaluated. After screening for their plant growth promotion and antagonistic properties in vitro efficient strains were further selected. The most efficient strains was characterized by 16S rRNA gene sequences and biochemical techniques and was designated as *Bacillus subtilis* S37-2. The strains facilitated plant growth and inhibited the plant pathogenic fungi such as *Fusarium oxysporum* (KACC 40037), *Rhizoctonia solani* (KACC 40140), and *Sclerotinia sclerotiorum* (KACC 40457). Pot based bioassay using lettuce as test plant was conducted by inoculating suspension (10^5 to 10^8 cells mL^{-1}) of *B. subtilis* S37-2 to the rhizosphere of lettuce cultivated in soil pots. Compared with non-inoculated pots, marked increase in leaf (42.3%) and root mass (48.7%) was observed in the inoculation group where the 50ml of cell mixture (8.7×10^8 cells mL^{-1}) was applied to the rhizosphere of lettuce either once or twice. Antagonistic effects of *B. subtilis* S37-2 strain on *S. sclerotiorum* (KACC 40457) were tested. All the tested lettuce plants perished after 9 days in treatment containing only *S. sclerotiorum*, but only 17% of lettuce was perished in the inoculation plot. *B. subtilis* grew well in the TSB culture medium. The isolates grew better in yeast extracts than peptone and tryptone as nitrogen source. The growth rate was 2~4 times greater at 37°C as compared with 30°C incubation temperature. *B. subtilis* S37-2 produced $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of IAA (indole 3-acetic acid) in the TSB medium containing L-tryptophan (20 mg mL^{-1}) in 24 hours.

Key words : Antifungal Activity, PGPR, Biofertilizer, Phytohormone

서 언

시설재배지는 경제작물의 연중재배로 비료성분이 과다 집적된 경우가 많으며, 그에 따른 토양용액의 염류농도 상승은 작물생육의 불량을 초래하게 된다. 또한 연작에 의한 병해충 다발생은 농약사용의 증가로 이어지기 쉽다. 즉, 농업자재의 과다투입은 또 다른 토양환경 오염을 유발시키고 그에 따른 경제적인 손실도 뒤따른다. 이와같은 문제점을 해소하기 위해 토양양분의 집적이 많은 토양이나 연작재배지에서는 비료 및 농약의 사용을 줄이고 비료와 농약을 어느 정도

대체할 수 있는 수단으로, 미생물비료에 대한 관심과 그 필요성이 한층 더 고조되고 있다. 특히 미생물비료는 염류집적 등의 토양환경오염 문제를 일으키지 않으며, 농업환경의 부담을 최소화하면서 생태계 안전성 유지와 작물생산성을 지속적으로 향상시키는 이점이 있다. 이러한 장점 때문에 많은 연구자들은 미생물비료 개발에 많은 관심을 가지고 있다.

식물생장촉진 미생물로서 콩과에 공생하는 근류균을 비롯하여 VA 균근균이 잘 알려져 있으며, 그 외에도 슈도모나스 속(Dey et al., 2004; Klopper et al., 1980), 아조토박터 속(Abbass and Okon, 1993), 바실러스 속(Provanza et al., 2002; Park et al., 2001), 아조스피릴럼(Fallik and Okon, 1995) 등이 식물의 성장을 돕는 것으로 알려져 있다. 그러나 다양한 미생물의 존재에

접수 : 2007. 9. 21 수리 : 2007. 10. 20
*연락처 : Phone: +82312900371,
E-mail: jskwon@rda.go.kr

비하면 아직도 일부 미생물만이 이용되고 있는 실정이다.

미생물에 의한 식물생육촉진 효과 및 식물병원균의 억제에 있어서 처리한 균주가 식물근권에서 얼마나 오랫동안 유효밀도를 유지하느냐 따라 효과는 다르게 나타날 것이다. 그리고 효과를 나타내는 기능이 우수하다 하더라도 종에 따라 내염성이 약한 균주도 있어 염류농도가 높은 토양에서는 활성이 저하되기도 한다(權 등, 1998). 이러한 점을 감안할 때 유용 기능균의 활용극대화를 위해서는 다양한 토양환경 조건에서도 생육이 가능하며 활성이 뛰어난 미생물이 유리하다. 즉, 화학비료 또는 유기물을 과다 사용한 토양으로 내염성이 요구되는 염류집적 토양, 내열성이 요구되는 하우스재배 토양, 연작장해가 빈번히 발생하는 불량한 토양환경에도 생존능력이 뛰어난 미생물이 요구된다. 따라서 본 연구는 다양한 토양환경에서도 생존능력이 우수한 적합한 균주를 선발하여 생물비료로 개발하여 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

분리 미생물의 기능탐색 및 유용 근권균의 선발
작물생육에 유용한 미생물을 선발하여 미생물비료로 이용하고자 오이, 상추, 토마토, 고추, 목초, 잔디, 콩의 뿌리 및 근권토양에서 세균을 순수 분리한 후 각각의 균주를 식물에 접종하여 식물생육촉진 효과 및 식물병원성 진균에 대한 억제기능을 평가하였다.

분리세균 각각의 균주를 시험작물인 오이와 상추에 접종하여 종자발아, 뿌리발근, 생육상태 등의 식물생장촉진 효과의 발현을 관찰하였다. 실내시험은 MS agar 배지 및 멸균토양 조건에서 실시하였다. 원통형 polystyrene container (68×110 mm)에 MS agar배지를 분주하여 균현다음 시험작물의 종자를 파종하였다. 종자살균은 파종하기전 식물세포공학실험법(日本生物工學會, 1993)에 준하였으며, 균주접종은 발아종자를 각각의 시험균주 현탁액에 침지하는 방법으로 하였다. 첨가된 MS기본배지의 조성은 Murashige & Skoog의 방법을 사용하였으며, pH는 6.5로 조절하였다. 시험균주가 처리된 오이, 상추의 발아종자를 무균적으로 파종하여 25일간 생육시킨 다음 작물생육도를 조사하여 유용근권균을 선발하였다.

또한 선별한 유용 세균중에서 식물병원성 진균에 대한 길항능은 식물병원성 진균인 *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* 과 대치 배양하여 조사하였다. 식물병원성 진균은 한국농용미생물보존센터(KACC)에서 분양 받은 균주를 사용하였다. 접종방법은 V8배지 및 PDA (potato dextrose agr)배지상에서 paper disk를 양쪽에 올려놓

고 미리 준비한 *F. oxysporum* (KACC 40037), *R. solani* (KACC 40140), *S. sclerotiorum* (KACC 40457)의 균사현탁액을 50 μ 씩 균주별로 구분하여 점적한 후, 선별한 분리세균은 균체현탁액을 만들어 면봉에 흡수시켜 식물병원성 진균을 접종한 양쪽의 페이퍼 디스크 사이 중앙에 획선으로 그어 집중하였다. 집중한 dish는 28°C에서 2주간 배양하면서 식물병원성 진균의 저지원을 측정하였다.

선발 미생물의 동정 선별한 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열분석, 형태학 및 생화학적 특성을 통하여 동정하였다. 즉 DNA extraction kit (Toyobo, Japan)로 분리균주의 DNA를 추출한 후 universal primer인 fD1 (5'-AGAGTTTGTGATCCTGGCTCAG-3')과 rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')를 이용하여 16S rRNA gene을 PCR을 통해 증폭하였다. 이렇게 얻어진 PCR 산물은 DNA sequencing kit (BigDye terminator Cycle Sequencing Ready Reactions v3.1; Applied Biosystem)를 사용하여 반응시킨 후, 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems)로 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 NCBI server의 BLAST 프로그램을 통해 속 (genus)까지 동정하였다. 균주간 유연관계를 분석하기 위하여 16S rRNA gene 염기서열은 CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994)을 이용하여 표준균주의 염기서열과 정렬하였다. 데이터셋의 진화계통수 작성은 MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004)프로그램을 이용하였다. branch의 안정성 (bootstrap value)은 1,000회의 resampling을 통하여 조사하였다. 생리생화학 특성 중 catalase, oxidase, 혐기생육, 가수분해능 등은 Claus and Berkeley (1986)와 Smibert and Krieg (1994)의 방법에 따라 수행하였다. 그 외의 탄소원 자화능 및 생리생화학 시험은 API 20NE와 API 20E system (bioMérieux)을 이용하여 제조사의 표준방법을 따라 수행하였다. 형태학적 특징으로서 세포 및 내세포자 형태 등은 MnSO₄ 5 mg이 첨가된 TSA 배지에서 2일 배양 후 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. 분석된 형태학 및 생화학적 특성은 Reva 등 (2001)의 호기성 포자형성세균의 분류검색표에 의하여 종까지 동정하였다.

***Bacillus subtilis* S37-2 균주의 작물처리 효과** 실내 및 온실검정에서 작물생육촉진이 양호하고 식물병원성 진균에 대한 억제력이 가장 강한 *B. subtilis* S37-2 균주를 최종 선발하여 작물생육촉진 효과를 시험하였다. 시험작물은 상추로 하였으며, 포트시험으로 토양 재배 하였다. 토양은 농업과학기술원 시험포장의 석

천미사질양토를 사용하였다. 선발한 *B. subtilis* S37-2 균주의 현탁액을 상추유묘의 근권에 처리하여 작물생육을 조사하였다. 처리한 균주현탁액은 TSB 배양액에서 3~4일 배양한것을 원심분리하여 상등액은 버리고 물에 희석한 균체현탁액(8.7×10^8 cell ml⁻¹)을 $10^5 \sim 10^8$ cell ml⁻¹ 수준으로 단계별로 희석하여 각각 주당 50 ml씩 1~2회 상추의 근권에 처리하였다. 대조구는 균체가 없는 물만 처리하였다.

B. subtilis S37-2 균주의 식물병원성진균의 억제 효과
 토양중에서 *B. subtilis* S37-2 균주에 의한 *F. oxysporum* (KACC 40037)의 생장억제 효과를 보기 위해 *B. subtilis* S37-2 균주와 *Fusarium* 균을 인위적으로 토양에 처리한 후 경시적으로 균수를 조사하였다. 미리 배양하여 조제된 *F. oxysporum* 포자현탁액 (10^7 spore ml⁻¹)을 토양중에 1.0×10^6 (spore 토양g⁻¹)농도로 접종하였다. 토양에 처리한 균의 생육증가를 위하여 TSB (tryptic soy broth) 및 PDB (potato dextrose broth)배지의 10배 희석액을 1:1로 혼합하여 토양 최대용수량의 45% 정도로 첨가하였다. 그리고 균핵병균의 발병억제효과를 보기 위하여 육묘상추에 균핵병균을 인위적으로 처리한 다음 선발균주를 처리하여 이 병주율을 조사하였다. 균주접종은 먼저 균핵병균인 *S. sclerotiorum*(KACC 40457) 균사현탁액을 시험구 모두 동일하게 경엽에 분무 접종 처리한 후, 선발균주인 *B. subtilis* S37-2 균주를 분무 접종 하였다. 처리한 상추 생육기는 본엽이 1~2엽 유묘 및 4~5엽 정식묘를 대상으로 하였다. 접종한 균핵병균은 PDB에 3일간 액체 배양후 원심분리하였다. 얻어진 균사체에 멸균 생리식염수를 넣고 호모게나이저로 균질화한 후 1×10^6 cell ml⁻¹ 농도로 희석현탁액을 만들어 사용하였다. *B. subtilis* S37-2 균주는 TSA (tryptic soy agar)배지에서 생성된 균체를 수거하여 멸균수에 현탁하고, 현탁액을 TSB배지 10배 희석액에 1×10^8 cell ml⁻¹의 밀도로 조제하여, 상추유묘 (본엽1~2엽)에 3일 간격 2회 분무 처리하였고, 정식묘 (본엽4~5엽)는 5일 간격 3회 분무 접종하여 조사하였다. 유묘는 접종후 3일, 6일, 9일 후에, 정식묘는 7일, 14일, 21일, 28일후에 균핵병의 이 병주율을 조사하였다.

B. subtilis S37-2 균주의 배양적 특성 및 식물생육촉진물질 생산성
B. subtilis S37-2 균체증식 최적배지 선발을 위하여 TSB배지 (tryptone 17 g, soytone 3.0 g, glucose 2.5 g, NaCl 5 g, K₂HPO₄ 2.5 g DW 1L), LB 배지 (tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, DW 1L), NB배지(beef extract 3 g, peptone 5 g, NaCl 5 g, yeast extract 2 g, DW 1L)를 이용하여 균체증식량을 비교하였다. 그리고 균체의 대량생산을 위한 질소원 효과를 보기 위하여 TSB배지에 peptone, tryptone, yeast extract를 따로따로 1%씩 첨가하여 30°C 와 37°C에서 72 hr 배양후 균체생성량을 건물중으로 측정하였다.

또한 *B. subtilis* S37-2 균주의 배양조건에서 오옥신 및 지베렐린 등 식물생육촉진물질의 생산성을 시험하였다. 전구물질인 L-tryptophan (20 mg L^{-1})과 mevalonate를 첨가하여 각각 오옥신 및 지베렐린의 생성량을 분석하였다. 분석시료는 전구물질을 첨가한 TSB배지에 시험균주를 접종하여 24시간 배양후 배양액을 원심분리하여 제거하고 상등액을 0.45 µm 필터로 여과한 용액을 사용하였다. 식물생육촉진물질 분석은 Waters사의 HPLC PAD를 사용하여 reverse phase로, symmetry C₁₈, 5 µm, 4.6×250 mm column을 사용하여 분석하였다. 검출기는 UV, 280 nm에서, 이동상은 A액 (물에 용해한 1% acetic acid/1 mM tetrabutylammonium phosphate, pH 2.8)과 B액 (acetonitrile)을 13:87 비율로 산성화시켜 사용하였다. 용출속도는 1 ml min⁻¹이었다.

결과 및 고찰

분리미생물의 기능탐색 및 유용근권균의 선발
 2004~2006년까지 식물근권 등에서 세균 373균주, 기타 15균주의 모두 388균주를 분리하였다. 분리균주는 종자발아, 뿌리발근, 생육상태 등 식물생장촉진기능을 평가하였다. 그리고 식물생장촉진기능을 가진 균주를 대상으로 식물병원성 진균에 대한 억제 효과도 동시에 평가하였다. 그 결과 작물생육에 유용한 10균주 중에서 작물생육이 양호하고 식물병원성 진균 억제효과가 탁월한 *B. subtilis* S37-2 균주를 최종 선발하였다 (Table 1).

다음은 작물생육이 양호한 *B. subtilis* S37-2 균주의 식물병원성 진균에 대한 억제능을 V8 및 PDA 배지

Table 1. Selection of plant growth-promoting Rhizobacteria.

| Strains | Seed germination | Rooting promotion | Growth phase | Phosphate-solubilization ability | Antagonistic activity on phythogenic fungi |
|--------------------------|------------------|-------------------|--------------|----------------------------------|--|
| <i>B. subtilis</i> S37-2 | ++ | ++ | ++ | - | +++ |

++; good, +++; very good, -; none

Table 2. Antagonistic effects of *B. subtilis* S37-2 on phytopathogenic fungi.

| Strains | Medium | Antagonistic inhibition on phythogenic fungi(Ø: mm) | | |
|--------------------|--------|---|------------------|------------------------|
| | | <i>F. oxysporum</i> | <i>R. solani</i> | <i>S. sclerotiorum</i> |
| <i>B. subtilis</i> | V8 | 8.3±0.6 | 11.0±1.0 | 23.0±0.0 |
| S37-2 | PDA | 10.2±0.8 | 9.0±0.7 | 18.0±0.7 |

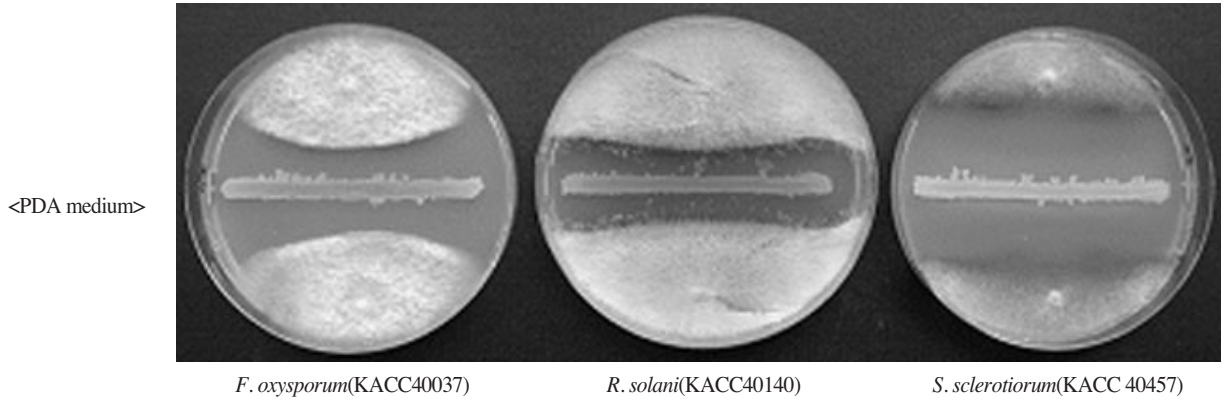


Fig. 1. Antagonistic effects of *B. subtilis* S37-2 strain on phytopathogenic fungi.

상에서 관찰한 결과이다. *B. subtilis* S37-2 균주가 *F. oxysporum* (KACC 40037), *R. solani* (KACC 40140), *S. sclerotiorum* (KACC 40457)의 성장에 대한 억제능을 표시한 저지원의 크기는 Table 2, Fig. 1과 같다.

위에서와 같이 *B. subtilis* S37-2 균주는 *F. oxysporum* (KACC 40037), *R. solani* (KACC 40140), *S. sclerotiorum* (KACC 40457) 등에 대해서 강력하게 억제하는 것이 확인되었다.

선발한 유용기능균의 분류동정 S37-2 균주의 16S rRNA gene sequence는 NCBI BLAST 결과, 가장 가까운 유사도를 가진 표준균주는 *B. subtilis* (NCDO 1769^T)였으며 99%의 유사도를 나타내었다. 계통분류학적 분석결과는 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 *B. mojavensis*, *B. amyloliquefaciens*와 유연관계가 높았다. 최종적으로 형태학 및 생리생화학적 특성을 Reva 등(2001)의 분류검색표에 따라 검토한 결과, S37-2 균

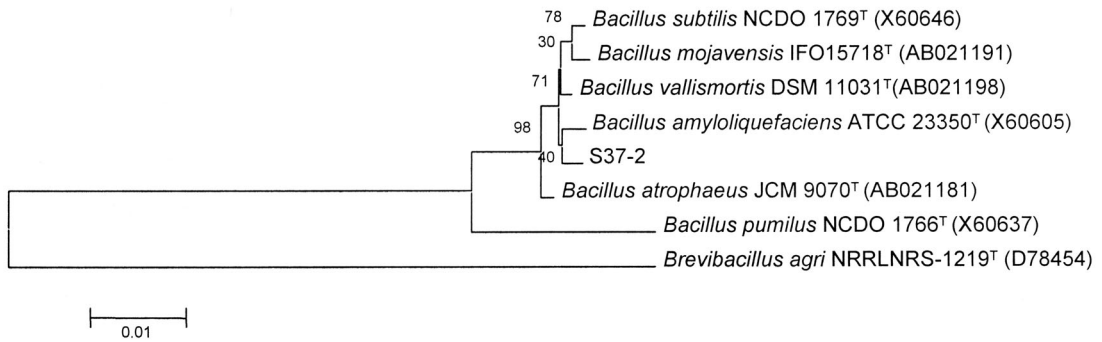


Fig. 2. Phylogenetic tree of S37-2 based on 16S rRNA sequence similarity. Branching values determined using 1000 bootstraps. Bar, 1 substitution per 100 nucleotides.

Table 3. Phenotypic characteristics of strain *B. subtilis* S37-2.

| Characteristic | Results |
|--|---------|
| Nitrate reduction, activity of catalase, arginine dihydrolase, ornithine decarboxylase, hydrolysis of starch, casein, gelatin, esculin, urea and CM-cellulose, acetoin production, assimilation of glucose, arabinose, mannose, mannitol, maltose, N-acetyl-glucosamine, gluconate, malate and citrate | + |
| Citrate utilization, activity of oxidase, β-galactosidase, lysine decarboxylase and tryptophane deaminase, H ₂ S production, indol production, anaerobic growth, assimilation of caprate, adipate and phenyl-acetate | - |

주는 *B. subtilis*로 동정되었으며 *B. subtilis* S37-2로 명명하였다. *B. subtilis* S37-2 균주는 TSA배지에서 묽고 끈적하게 자라며 세포의 크기는 2.1~5.2×1.1 μm로 간상형이며 포자를 형성하였다. 생화학적 특성은 Table 3과 같이 통성혐기성이며, catalase 시험은 양성, oxidase 시험에서는 음성반응을 보였다. 또한 starch, casein, gelatin, esculin, urea, CM-cellulose를 가수분해할 수 있었다. 탄소원 이용성은 caprate, adipate, phenyl-acetate를 제외한 glucose, arabinose, mannose, mannitol, maltose, N-acetyl- glucosamine, gluconate, malate, citrate 등의 당을 이용하였다. 그리고 염농도 저항성에 대해서는 10% NaCl을 첨가한 배지에서도 생육하는 특성이 있었다.

***B. subtilis* S37-2 균주의 작물처리 효과** 바실러스 서브틸리스 S37-2 균주의 균체현탁액을 농도별로 상추의 근권에 관주 처리후 생육촉진효과를 본 결과 Table 4와 같이 접종균수가 증가할수록 상추생육량은 증가하였으며, 10⁸ cell ml⁻¹처리구에서 가장 많은 증가량을 보였다. 토양조건에서 8.7×10⁸ cell ml⁻¹처리시

대조구에 비해 상추의 엽생체중이 48.7%, 뿌리건물중이 42.3% 씩 각각 생육량을 증가시키는 효과를 나타내었다.

***B. subtilis* S37-2 균주의 식물병원성 진균의 억제 효과** 상추유묘의 균핵병균(*S. sclerotiorum*)의 억제 효과는 Table 5에서 보는바와 같이 접종후 9일에 균핵병균만 접종한 대조구는 100% 이병율을 보여 고사한 반면에 균핵병균+B. subtilis S37-2 균주의 현탁액을 처리한 구에서는 16.7%의 이병율을 보여 뚜렷한 억제효과를 보였으며, 상추 정식묘에서는 대조구가 38.9%, *B. subtilis* S37-2 균주를 처리한 구에서는 5.6%의 이병주율을 보여 대조구에 비해 상당한 억제효과를 보였다(Table 6).

토양조건에서 *B. subtilis* S37-2 균주에 의한 *F. oxysporum* (KACC 40037)의 억제효과는 Table 7에 나타내었다. *B. subtilis* S37-2 균주를 처리한 구와 처리하지 않은 대조구를 비교한 결과 처리후 9일에 S37-2 균주를 처리한 구가 158(×10⁴ cfu g⁻¹), 처리하지 않은 대조구가 367(×10⁴ cfu g⁻¹)으로 처리한 구에 비해

Table 4. Effects of concentraion of *B. subtilis* S37-2 cell supernatnant on growth of lettuce.

| Inoculum density (cell ml ⁻¹) | Shoot fresh wt.(g) | Rate of increase(%) | Root dry wt.(g) | Rate of increase(%) |
|---|--------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| 0 | 7.8±0.4 | - | 0.300±0.015 | - |
| 10 ⁵ | 8.1±1.0 | 3.8 | 0.319±0.099 | 6.3 |
| 10 ⁶ | 8.5±0.6 | 8.9 | 0.367±0.072 | 22.3 |
| 10 ⁷ | 9.0±0.7 | 15.4 | 0.377±0.062 | 25.7 |
| 10 ⁸ | 11.6±0.7 | 48.7 | 0.427±0.089 | 42.3 |

Table 5. Antagonistic effects of *B. subtilis* S37-2 on growth of lettuce contaminated with *S. sclerotiorum*(normal leaf 1~2).

| Strain | Rate of diseased plant(%) | | |
|---------------------------|---------------------------|------|--------|
| | 3 | 6 | 9 days |
| Control | 0.0 | 75.0 | 100 |
| <i>B. subtilis</i> S 37-2 | 0.0 | 8.3 | 16.7 |

Table 6. Antagonistic effects of *B. subtilis* S37-2 on growth of lettuce contaminated with *S. sclerotiorum*(normal leaf 4~5).

| Strain | Rate of diseased plant(%) | | | |
|---------------------------|---------------------------|------|------|---------|
| | 7 | 14 | 21 | 28 days |
| Control | 2.8 | 22.2 | 30.5 | 38.9 |
| <i>B. subtilis</i> S 37-2 | 2.8 | 2.8 | 2.8 | 5.6 |

Table 7. Antagonistic effects of *B. subtilis* S37-2 on *F. oxysporum* in soil.

| Strain | Numbers of <i>F. oxysporum</i> (×10 ⁴ cfu g ⁻¹) | | | |
|---------------------------|--|--------|--------|--------|
| | 0 | 3 | 6 | 9 days |
| Control | 104±12 | 292±15 | 324±12 | 367±16 |
| <i>B. subtilis</i> S 37-2 | 102±6 | 127±16 | 145±7 | 158±17 |

Fusarium 균이 2배 이상 증가한 균수를 나타내었으며, 시일이 경과할수록 현저히 증가하는 추세를 보였다. 위와 같이 토양중에서도 *B. subtilis* S37-2 균주에 의해 *Fusarium* 균이 현저히 억제되는 효과를 보였다.

B. subtilis S37-2 균주의 배양적 특성 및 식물생육촉진물질 생산성 바실러스 서브틸리스 S37-2 균주의 균체증식 최적배지 선발을 위하여 배지종류별로 균체증식량을 비교한 결과 Table 8에서 보는바와 같이 TSB배지가 양호하였으며, 배양 온도별로는 30°C에 비해 37°C가 4배 이상 균체 생성량이 많았다. 그리고 균체의 대량생산을 위한 질소원 효과는 Table 9에서 보는바와 같이 peptone, tryptone을 첨가한 구보다 yeast extract를 첨가한 구가 균체 생성량이 양호하였다.

B. subtilis S37-2 균주의 식물생육촉진물질인 phytohormone을 분석한 결과 IAA는 0.1 µg ml⁻¹의 생성량을 검출할 수 있었으나 GA는 검출되지 않아 GA에 의한 생육촉진효과 (Probanza et al., 2002; Frankenberger and Arshad, 1995)는 기대할 수 없었다.

미생물에 의해 생성되는 식물생육촉진 물질은 phytohormones(Frankenberger and Arshad, 1995) 외에도 siderophore, 4,5-dihydroxy-6-phenylhexanoic acid, 그리고 휘발성유기물질(Farag et al., 2006) 등 다양하게 보고되고 있으나, 이와관련한 유기물질에

의해 유도되는 생육촉진물질은 추후 더 검토가 필요할 것으로 판단되었다.

적 요

작물생육에 유용한 미생물을 선발하여 생물비료로 이용하고자 고추, 토마토, 상추, 오이, 목초, 잔디, 콩의 근권토양 및 뿌리표면에서 세균을 373균주 분리하였다. 각각의 균주를 작물에 접종후 작물생육에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 중 작물생육을 촉진시키는 균주를 대상으로 작물생육량과 식물병원성 진균 억제능을 평가한 후 우수한 1균주를 선발하였다. 그리고 선발한 균주의 배양적 특성 및 식물호르몬 생산성을 분석하였다. 선발된 균주는 16S rRNA 염기서열분석, 생화학적특성 등의 분석으로 속·종명을 동정하였다. 식물생육촉진 및 식물병원성 진균을 효과적으로 억제하는 *Bacillus subtilis* S37-2 균주를 선발하였다. 시험에 사용된 식물병원성 진균은 *Fusarium oxysporum* (KACC 40037), *Rhizoctonia solani* (KACC 40140), *Sclerotinia sclerotiorum* (KACC 40457)의 3 균주였으며, 이들 균주에 대하여 모두 효과적이었다. 토양이 충전된 포트에 상추를 재배하여 *B. subtilis* S37-2 균주의 희석현탁액을 10⁵~10⁸ cell ml⁻¹범위의 접종 농도별로 근권에 처리후 상추의 생육량을 조사하였다. 접종균수가 많을수록 상추 생육량은 증가하였다. 8.7×10⁸ cell ml⁻¹를 주당 50 ml씩 1~2회 접종시 대조구에 비해 상추의 엽 생체중이 48.7%, 뿌리의 건물중이 42.3% 씩 각각 생육량이 증가하는 효과를 나타내었다. 상추 유묘에 식물병원성 진균인 *S. sclerotiorum* (KACC 40457)처리후 *B. subtilis* S37-2 균주를 접종한 구와 접종하지 않은 대조구를 비교한 결과 접종후 9일에 접종구는 16.7%, 대조구는 100% 이병되어 고사되었다. 배지 종류별로 *B. subtilis* S37-2 균주의 균체증식량을 비교한 결과 TSB배지가 양호하였으며, 질소원을 첨가할 경우 peptone, tryptone보다 yeast extract를 첨가한 구가 균체생성량이 양호하였다. 그리고 배양 온도별로는 30°C에 비해 37°C가 약 2~4배이상 균체생성량이 많았다. L-tryptophan을 20 mg L⁻¹ 첨가

Table 9. Effects of nitrogen sources on *B. subtilis* S37-2 strain.

| Medium | Culture temperature (°C) | Yield of S37-2 strain (d.w mg 100 ml ⁻¹) |
|----------------------|--------------------------|--|
| TSB | 30 | 58.0±4.7 |
| | 37 | 268.0±4.7 |
| TSB+Peptone 1% | 30 | 43.8±8.3 |
| | 37 | 191.3±17.0 |
| TSB+Tryptone 1% | 30 | 71.0±11.9 |
| | 37 | 273.4±41.6 |
| TSB+Yeast extract 1% | 30 | 153.9±16.1 |
| | 37 | 347.9±38.7 |

Table 8. Selection of optimal medium for *B. subtilis* S37-2 strain.

| Medium | Culture temperature (°C) | Yield of S37-2 strain (d.w mg 100 ml ⁻¹) | Composition of medium |
|--------|--------------------------|--|--|
| TSB | 30 | 58.0±4.7 | Tryptone 17 g, Soytone 3.0 g, |
| | 37 | 268.0±4.7 | Glucose 2.5 g, NaCl 5 g, K ₂ HPO ₄ 2.5 g DW 1L |
| LB | 30 | 20.1±4.3 | Tryptone 10 g, Yeast extract 5 g, |
| | 37 | 120.2±15.3 | NaCl 10 g DW 1L |
| NB | 30 | 28.3±2.2 | Beef extract 3 g, Peptone 5 g, |
| | 37 | 112.0±18.9 | NaCl 5 g, Yeast extract 2 g, DW 1L |

한 TSB 배지에 *B. subtilis* S37-2 균주를 접종하여 24 시간 배양후 IAA(indole 3-acetic acid) 생성량은 $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ 이 검출되었다.

인 용 문 헌

- Abbass, Z. and Y. Okon. 1993. Plant growth promotion by azotobacter paspali in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*, 1993, 25(8):1075-1083).
- Claus, D. & R. C. W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1105-1140. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Dey, R., K. K. Pal, D. M. Bhatt and S.M. Chauhan. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut(*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 159 : 371-394.
- Fallik, E., and Y. Okon. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(1):123-126.
- Farag, M.A., C.M. Ryu, L.W. Sumner, P.W. Pare. 2006. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*, 67:2262-2268.
- Frankenberger, W. T., Jr. and M. Arshad. 1995. *Phytohormones in soils. Microbial production and function, USA.*
- Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze, and M. N. Schroth. 1980. Enhancement of plant growth by siderophore produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*. 286 : 885-886.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5:150-163.
- Park, K. S., I. P. Ahn, and C. H. Kim. 2001. Systemic resistance and expression of the pathogenesis-related genes mediated by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* EXTN-1 against anthracnose disease in cucumber. *Mycobiology*. 29 : 48-53.
- Probanza, A., J. A. Lucas Garcia, M. Ruiz Palomino, B. Ramos, and F. J. Gutierrez Manero. 2002. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology*. 20(2):75-84.
- Reva, O. N., I. B. Sorokulova, and V. V. Smimov. 2001. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. *Int J Syst Evol Microbiol*. 51:1361-1371
- Smibert, R. M. & N. R. Krieg. 1994. Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 607-654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *NucleicAcids Res*. 22:4673-4680.
- 日本生物工學會編, 1993. *生物工學實驗書*. 6.細胞工學實驗. p379-386.
- 權章軾, 徐壯善, 元恒淵. 1998. 鹽類의 스트레스가 主要土壤微生物의 變動 및 根圈定着性에 미치는 影響. *한국토양비료학회지*. 31(3):291-300.