

Characterization of Potential Plant Growth-promoting Rhizobacteria as Biological Agents with Antifungal Activity, Plant Growth-promoting Activity, and Mineral Solubilizing Activity

Song Min Lee¹, Ji-Youn Kim¹, Hee Sook Kim¹, Ka-Yoon Oh¹, Kwang Hui Lee¹, Sang-Hyeon Lee² and Jeong Su Jang^{1*}

¹Food Research Center, Angel Co., Ltd., Busan 46988, Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 46958, Korea

Received May 11, 2021 / Revised June 29, 2021 / Accepted July 2, 2021

The purpose of this study was to confirm the antifungal activity, plant growth-promoting activity, and mineral solubilizing activity of 18 types of bacteria isolated purely from rhizosphere soil. The potential of isolates of the genus *Bacillus* and *Pseudomonas* as biocontrol agents was confirmed through the antifungal activity of these isolates. This activity has been determined to be due to various hydrolytic enzymes on the cell wall of plant pathogenic fungi and the production of siderophores in isolates. In addition, most of the isolates have been found to have aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase production activity, indole-3-acetic acid production activity, and nitrogen fixation activity. These characteristics are believed to have a positive effect on root development, growth, and the productivity of crops via a reduction in the concentration of ethylene under conditions of environmental stress, to which plants are commonly exposed. In addition, on testing for the solubilizing activity of the isolates for phosphoric acid, silicon, calcium carbonate, and zinc, some isolates were found to have mineral solubilizing activities. Inoculation of these isolates during plant growth is expected to assist plant growth by converting nutrients necessary for growth into usable forms that can be absorbed by plants. The 18 isolated strains can be used as biocontrol agents due to their antifungal activity, plant growth-promoting activity, and mineral solubilizing activity.

Key words : Antifungal activity, biocontrol agent, mineral solubilizing activity, plant growth promoting activity, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)

서론

식물은 생존기간(발아에서 사멸까지) 동안 주변 환경으로부터 끊임없는 스트레스를 받게 된다. 식물이 주변 환경으로부터 받는 스트레스는 병충해에 의한 생물학적 스트레스와 환경에 의한 비생물학적 스트레스로 구분된다[39]. 이러한 생물학적, 비생물학적 환경 스트레스는 농업에서 작물 생산성을 제한하며, 식량 확보를 위협한다[45]. 이러한 환경 스트레스로 인해 한정된 작물의 생산성을 개선하기 위해 환경 스트레스 조건에서 식물 생장이 가능하도록 하는 노력이 계속되고 있다.

다양한 박테리아 속은 토양의 중요한 구성요소로, 토양 생태계의 다양한 생물 활동에 참여하여 영양소 전환을 활발히 하고 작물생산이 지속 가능하도록 한다. 이들 박테리아 속은

토양에서 영양소를 동원하고, 수많은 식물 성장 조절제를 생산하며, 식물 병원균을 제어하거나 억제함으로써 식물 보호, 토양구조 개선, 식물 성장 자극 등과 같은 역할을 한다[1]. 이러한 특성을 갖는 박테리아를 식물 성장촉진 근권 박테리아 (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)라고 한다. PGPR은 다양한 직·간접 메커니즘에 의해 식물 생장에 영향을 미칠 수 있는데, 대기 중의 질소 고정, 인산 가용화, indole-3-acetic acid (IAA)와 gibberellic acid와 같은 호르몬 분비, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase 생성을 통한 에틸렌 조절에 도움을 줌으로써 성장촉진 화합물을 식물체에 제공하거나 환경으로부터 영양분을 활용할 수 있도록 함으로써 식물 성장촉진에 직접적으로 영향을 미친다. 또한 PGPR은 유도 전신 저항성, 항생제, 영양분 경쟁 및 대사산물(시안화수소, siderophore)을 생성함으로써 식물 병원체에 대한 저항성을 증가시킴으로써 식물 생장에 간접적으로 도움을 주는 것으로 알려져 있다[13, 35].

본 연구에서는 근권 토양으로부터 식물 병원성균에 대한 항진균 활성, ACC deaminase 생성능, IAA 생성능, 질소고정능, siderophore 생성능, 인산, 탄산칼슘, 규소, 아연과 같은 미네랄을 가용화시키는 능력과 세포의 효소 활성을 갖고 있는 미생물을 분리하여 생리학적 특성을 분석함으로써 환경으로

*Corresponding author

Tel : +82-51-852-3636, Fax : +82-51-852-4477

E-mail : jeongsu25@naver.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

부터 유용한 영양분을 활용하고, 식물 병원체로 인한 영향을 감소시켜 식물 생장에 도움을 줄 수 있는 미생물을 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

미생물 분리

본 연구에서는 유용 미생물을 분리하기 위하여 부산 삼락공원의 갈대밭, 다대포 해변, 경남 창원 인근의 텃밭 등에서 토양과 뿌리를 수집하였다. 수집된 각각의 토양 또는 뿌리 1 g을 증류수 9 ml와 혼합하고 이를 연속으로 희석하여 bennet agar (BA, 1% glucose, 0.2% peptone, 0.1% beef extract, 0.1% yeast extract, 1.5% agar), tryptic soy agar (TSA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), Luria-Bertani (LB) agar (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar), humic-vitamin (HV) agar (0.1% humic acid, 0.05% KCl, 0.05% Na₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, 0.002% CaCO₃, 0.002% FeSO₄, 0.1% V_B stock solution, 1.5% agar) 배지에 평판도말하여 10, 30, 50℃에서 배양하였다. 이후 colony의 형태학적 특성에 따라 미생물을 순수 분리하였다.

분리균주의 동정

분리된 미생물을 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자 분석을 ㈜솔젠트(Solgent Co., Ltd., Daejeon, Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 염기서열 분석에는 universal primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였다.

분리균주의 항진균 활성

항진균 활성 측정을 위한 식물 병원성 진균으로는 고추 검은 곰팡이병균 *Alternaria alternata* KACC 40019, 잭빛 곰팡이병균 *Botrytis cinerea* KACC 40573, 고추 탄저병균 *Colletotrichum acutatum* KACC 40042, 토마토 잎마름병균 *Corynespora cassiicola* KACC 44719, 시들음병균 *Fusarium oxysporum* f.sp. lactucae KACC 42795, 마른 썩음병균 *Fusarium solani* KACC 41092, 시들음병균 *Fusarium tricinctum* KACC 42097, 고추 역병균 *Phytophthora capsici* KACC 40180, 뿌리 썩음병균 *Rhizoctonia solani* AG-2-1 KACC 40124, 균핵병균 *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 41065 등 총 10종을 사용하였다. 식물 병원성 진균에 대한 분리균주의 항진균 활성은 Kim 등[17]의 방법에 따라 well diffusion법을 이용하여 측정하였으며, potato dextrose agar (PDA) 배지에 분리균주와 식물 병원성 진균을 25℃에서 대치 배양하였다. 항진균 활성은 식물 병원성 진균과 분리균주 간의 거리를 측정하여 억제율(%)로 환산하여 표시하였다[21].

$$\text{억제율(\%)} = ((R-r)/R) \times 100$$

R: 식물병원성 곰팡이와 분리균주 사이의 거리(mm)

r: 식물병원성 곰팡이의 성장 반경(mm)

ACC deaminase 생성

ACC deaminase 생성능은 Barnawal 등[4]의 방법에 따라 측정하였다. 분리균주를 tryptic soy broth (TSB, BD Biosciences)에 접종하여 30℃에서 130 rpm으로 2일 동안 배양한 후 원심분리(3,000 rpm, 4℃, 15분)하였다. 원심분리 후 균체를 회수하여 DF salt 배지(0.4% KH₂PO₄, 0.6% Na₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.0001% FeSO₄, 0.000001% H₃BO₃, 0.000001% MnSO₄·H₂O, 0.000007% ZnSO₄, 0.000005% CuSO₄, 0.000001% MoO₃, 0.2% glucose, 0.2% C₆H₁₂O₇, 0.2% C₆H₈O₇, pH 7.3)로 2회 세척하였다. 세척한 균체는 질소원으로 3 mM ACC가 첨가된 DF salt 배지에 접종하여 30℃에서 130 rpm으로 5일 동안 배양하여 분광광도계(Spectrophotometer, Multiskan GO, Thermo Scientific, Vantaa, Finland)로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로 질소원이 첨가되지 않은 배지를 이용하여 ACC의 이용에 따른 균체의 증가를 통해 ACC deaminase 생성능을 확인하였다.

IAA 생성

IAA 생성능은 Leveau와 Lindow [25]의 방법에 따라 수행하였다. 분리균주를 0.1% tryptophan이 첨가된 King's B 배지(2% proteose peptone, 0.25% K₂HPO₄, 0.6% MgSO₄, 1.5% glycerol)에 접종하여 30℃에서 130 rpm으로 2일 동안 배양하였다. 원심분리(10,000 rpm, 4℃, 15분) 후 상등액을 회수하여 Salkowski's reagent (35% HClO₄ 50 ml, 0.5 M FeCl₃ 1 ml)와 1:2(v/v)의 비율로 상온에서 30분간 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 indole-3-acetic acid (IAA, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 검량선을 작성한 후 시료의 농도를 환산하였다.

질소 고정

질소 고정능은 Um 등[42]의 방법에 따라 수행하였다. 분리균주를 30℃에서 130 rpm의 조건으로 1일 동안 전배양한 후 전배양액을 nitrogen free bromothymol blue (NFB, 0.5% (HO₂CCH₂CH(OH)CO₂H, 0.05% K₂HPO₄, 0.001% MgSO₄·7H₂O, 0.002% NaCl, 0.005% FeSO₄·7H₂O, 0.0002% Na₂MoO₄, 0.001% MnSO₄·7H₂O, 0.001% CaCl₂, 0.4% KOH, 0.2% bromothymol blue (in 0.5% alcohol), 0.175% agar, pH 6.8) 배지에 loop을 이용하여 접종하였다. 이 후 30℃에서 130 rpm으로 4일 동안 배양하면서 배지의 색상변화를 관찰하였다.

Siderophore 생성

Siderophore 생성능은 chrome azurol S (CAS) blue agar

plate assay법[27]을 응용하여 수행하였다. CAS 60 mg을 증류수 50 ml에 녹이고, hexadecyltrimethylammonium bromide 73 mg을 증류수 40 ml에 녹여서 LB agar와 혼합한 후 pH를 6.8로 조정하여 고압멸균하였다. 멸균한 배지를 식힌 후 10 mM HCl 10 ml에 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.7 mg을 녹여 제조한 용액과 혼합하여 고체 배지를 제조하였다. 제조된 CAS blue agar 배지에 well diffusion법을 이용하여 분리균주의 상등액을 접종하여 orange halo zone 형성 유무를 조사하였다.

인산가용화능

인산가용화능 측정은 Pande 등[31]의 방법에 따라 0.5% calcium phosphate ($10\text{CaO} \cdot 3\text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$)가 첨가된 Pikovskaya (PVK) agar 배지를 이용하였다. 분리균주를 TSB 배지에 접종한 후 30°C에서 130 rpm으로 2일 동안 전배양하였다. 배양액을 원심분리(3,000 rpm, 4°C, 15분)하여 회수한 상등액을 PVK agar 배지에 well diffusion법으로 접종한 뒤 30°C에서 4일 동안 배양하면서 clear zone 형성 유무를 조사하였다.

탄산칼슘 가용화능

탄산칼슘 가용화능은 Tamilselvi 등[41]의 방법에 따라 Deveze-Bruni agar (D-glucose 5 g, yeast extract 1 g, peptone 1 g, K_2HPO_4 0.4 g, MgSO_4 0.01 g, NaCl 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05 g, CaCO_3 5 g, agar 15 g/1 l) 배지를 이용하여 측정하였다. 분리균주의 배양상등액을 well diffusion법으로 접종한 뒤 30°C에서 4일 동안 배양하면서 clear zone 형성 유무를 조사하였다.

규소 가용화능

규소 가용화능은 Kang 등[16]의 방법에 따라 silicate agar (D-glucose 10 g, magnesium trisilicate 2.5 g, agar 15 g/1 l) 배지를 이용하여 측정하였다. Well diffusion법에 따라 고체 배지에 well을 형성한 후 분리균주의 배양 상등액을 접종하여 30°C에서 4일 동안 배양하면서 clear zone 형성 유무를 조사하였다.

아연 가용화능

아연 가용화능은 Ramesh 등[33]의 방법에 따라 ZnO, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, ZnCO_3 에 대하여 분리균주의 가용화능을 측정하였다. Tris-minimal salt agar (D-glucose 10 g, Tris-HCl 6.06 g, NaCl 4.68 g, KCl 1.49 g, NH_4Cl 1.07 g, Na_2SO_4 0.43 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, agar 15 g/1 l) 배지를 제조한 후 ZnO 1.24 g, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ 2.00 g, ZnCO_3 1.73 g을 각각 첨가하여 고체배지를 제조하였다. 제조된 고체배지에 well diffusion법을 이용하여 분리균주의 배양상등액을 접종하여 30°C에서 4일 동안 배양하면서 clear zone 형성 유무를 조사하였다.

세포 외 효소 활성

세포 외 효소 활성을 측정하기 위하여 분리균주를 30°C에서

130 rpm으로 2일 동안 배양한 후 배양상등액을 회수하여 amylase, cellulase, xylanase, protease 활성을 측정하였다. Amylase 활성은 Miller의 방법[28]을 응용하여 측정하였다. 배양 상등액과 50 mM sodium phosphate buffer에 녹인 1% starch solution을 1:1(v/v)로 상온에서 3분 동안 반응시켰다. 이후 color reagent인 dinitrosalicylic acid (DNS) 용액을 첨가하여 100°C에서 15분 동안 가열하였다. 가열반응이 끝난 반응액은 얼음에 냉각시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Amylase 활성은 표준물질로 maltose (Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 검량선을 작성한 후 maltose mg/100 g로 표시하였다. Cellulase와 xylanase 활성은 Shin과 Cho의 방법[37]에 따라 측정하였다. Cellulase와 xylanase 활성 측정을 위한 기질은 각각 carboxymethyl cellulose (CMC, Junsei Chemical Co., Ltd.)와 beechwood xylan (Megazyme, Bray, Ireland)을 사용하여 1% 농도의 기질용액을 제조하여 측정하였다. 배양상등액을 각각의 기질용액과 1:1(v/v)로 혼합하여 50°C에서 10분 동안 반응시켰다. 이후 DNS 용액을 첨가하여 100°C에서 10분간 가열한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cellulase와 xylanase 활성은 표준물질로 glucose (Junsei Chemical Co., Ltd.)와 xylose (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)를 사용하여 검량선 작성 후 각각 glucose mg/100 g와 xylose mg/100 g로 표시하였다. Protease 활성은 Oh 등[30]의 방법을 응용하여 측정하였다. 배양상등액을 50 mM sodium phosphate buffer에 녹인 0.65% casein (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)과 1:5(v/v)의 비율로 혼합하여 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 반응 후 0.44 M trichloroacetic acid를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시키면서 단백질을 응고시켰다. 반응액을 0.45 μm syringe filter를 이용하여 여과하여 1 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Co.)와 10% sodium carbonate (Junsei Chemical Co., Ltd.)를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 흡광도 660 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로 tyrosine (Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 동일하게 분석하여 검량선을 작성한 후 tyrosine mg/100 g로 표시하였다.

분리균주의 생리학적 특성 분석

분리균주의 생리학적 특성을 분석을 위하여 API ZYM kit (bioMérieux, France)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 분석하였다. 효소활성은 표준색상표와 비교하여 활성 정도를 +++: strong positive (> 40 nanomoles), ++: positive (20~40 nanomoles), +: weakly positive (< 20 nanomoles), -: negative로 나타냈다.

통계분석

모든 분석은 3회 이상 수행하여 평균±표준편차(Mean ± SD)로 표현하였다. 평균값의 유의한 차이는 SPSS (version 20.0

for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 일원 배치 분산분석(one-way ANOVA)의 Duncan's multiple range test로 분석하였다. 유의성 검증은 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 분석하였다.

결과 및 고찰

미생물 분리

유용 미생물 분리는 부산의 삼락공원 갈대밭, 다대포 해변, 경남 창원 인근 텃밭 등에서 토양과 뿌리로부터 colony의 형태학적 특성을 근거로 18종을 순수분리하였다. 이후 연구에서 분리균주들의 식물 성장촉진 활성, 미네랄 가용화능, 항진균 활성 및 세포 외 효소 활성을 측정하였다.

미생물 동정

유용 미생물 18종의 16S rRNA 염기서열 분석 결과(Table 1), *Bacillus aerius* 3종, *Bacillus circulans* 1종, *Bacillus idriensis* 1종, *Bacillus megaterium* 2종, *Bacillus safensis* 1종, *Bacillus tequilensis* 1종, *Exigobacterium undae* 1종, *Fictibacillus solisalsi* 1종, *Kocuria palustris* 1종, *Pseudomonas psychrotolerans* 1종, *Rhodococcus qingshengii* 2종, *Paenibacillus polysaccharolyticus* 1종, *Paenibacillus taichungensis* 1종, *Paenibacillus xylanilyticus* 1종으로 판명되었다. 본 연구에서 분리한 *Kocuria palustris*, *Rhodococcus qingshengii*, *Paenibacillus polysaccharolyticus*, *Paenibacillus taichungensis*, *Paenibacillus xylanilyticus*는 병원성이 아직 보고되지 않았거나 비병원성으로 보고되었다[19, 44]. *Bacillus* 속과 *Pseudomonas* 속 등은 다양한 활성을 가지는 PGPR로서 대부분 비병원성을 나타내나 *Bacillus* 속 중에서 *B.*

*circulans*는 일부 연구에서 면역력이 떨어진 환자에게서 감염을 일으키는 기회감염균으로 보고되었다[34]. 이 후 연구에서는 동정된 균주의 항진균 활성, ACC deaminase 생성능, IAA 생성능, 질소 고정능, siderophore 생성능, 미네랄 가용화능 등의 측정을 통해 식물 성장촉진 미생물로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

분리균주의 항진균 활성

항진균 활성 측정 결과(Table 2), *B. tequilensis* DDP23과 *B. megaterium* DDP364는 본 연구에 사용된 진균 10종 모두에 대하여 항진균 활성을 가지고 있는 것을 확인하였으며, 그중에서도 *B. tequilensis* DDP23이 *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Corynespora cassiicola*에 대하여 60% 이상의 높은 항진균 활성을 나타냈다. *B. safensis* DDP417의 경우, 진균 10종 가운데 8종에 대하여 항진균 활성을 나타냈으며, 특히, *Phytophthora capsici*에 77.77%로 높은 항진균 활성을 보였다. *Rhodococcus qingshengii* DDP120, *P. psychrotolerans* DDP438, *B. idriensis* SN42, *B. circulans* SN47, *B. aerius* SN172의 경우, 각각 6종, 6종, 4종, 2종, 6종의 진균에 대하여 10.61~69.86%의 항진균 활성을 갖는 것으로 나타났다. Kim 등[18]의 연구에서는 *Bacillus* 속이 *Fusarium* sp., *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* 등의 식물 병원성 진균에 대하여 항진균 활성을 나타낸다고 보고하였으며, 본 연구에서도 *Bacillus* 속 분리균주들이 항진균 활성을 갖는 것을 확인하였다. Kwon 등[23]은 고추 탄저병에 대한 *Bacillus* 속의 항진균 활성을 관찰하였으며, 그 결과 화학농약 처리구의 방제가보다 *Bacillus* 속 배양액 처리구의 방제가 높게 나타남으로써 고추 탄저병균에 대하여 미생물제제로서의 가능성을 확인하였다고 보고하였다. 본 연

Table 1. Identification of strains isolated from rhizosphere soil by 16s rRNA sequencing

Strains	Species	Identity (%)	Accession
ANG17	<i>Exigobacterium undae</i> strain DSM 14481 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.93%	NR_043477.1
DDP23	<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.86%	NR_104919.1
DDP119	<i>Rhodococcus qingshengii</i> strain djl-6-2 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%	NR_115708.1
DDP120	<i>Rhodococcus qingshengii</i> strain djl-6-2 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.93%	NR_115708.1
DDP136	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 = ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.93%	NR_112636.1
DDP138	<i>Paenibacillus taichungensis</i> strain BCRC 17757 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.72%	NR_044428.1
DDP336	<i>Paenibacillus polysaccharolyticus</i> strain BL9 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.02%	NR_108250.1
DDP342	<i>Kocuria palustris</i> strain TAGA27 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.93%	NR_026451.1
DDP354	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14 16S ribosomal RNA, partial sequence	98.59%	NR_029109.1
DDP364	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 = ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%	NR_112636.1
DDP417	<i>Bacillus safensis</i> FO-36b 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%	NR_041794.1
DDP438	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> strain C36 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.50%	NR_042191.1
DDP472	<i>Fictibacillus solisalsi</i> strain YC1 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.58%	NR_044387.1
SN42	<i>Bacillus idriensis</i> strain SMC 4352-2 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.93%	NR_043268.1
SN47	<i>Bacillus circulans</i> strain NBRC 13626 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%	NR_112632.1
SN172	<i>Bacillus aerius</i> strain 24K 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%	NR_118439.1
SN236	<i>Bacillus aerius</i> strain 24K 16S ribosomal RNA, partial sequence	99.93%	NR_118439.1
SN246	<i>Bacillus aerius</i> strain 24K 16S ribosomal RNA, partial sequence	100%	NR_118439.1

Table 2. Antifungal activities against phytopathogenic fungi of isolated strains from rhizosphere soil

Strains	Antifungal activities (%)										
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Corynespora cassicola</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium tricinatum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
ANG17	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DDP23	65.15±0.13 ²⁾	60.21±3.03 ^c	51.59±1.37 ^e	64.09±0.79 ^e	31.80±3.22 ^{ab}	41.25±5.42 ^b	28.32±1.82 ^a	57.30±3.98 ^d	47.61±2.51 ^c	42.77±2.73 ^b	
DDP119	-	-	32.58±3.03 ^c	-	-	-	-	-	-	-	
DDP120	-	-	63.99±3.63 ^f	69.86±6.07 ^e	41.82±3.15 ^c	66.99±5.80 ^c	49.28±3.52 ^c	-	-	17.41±2.13 ^a	
DDP136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DDP138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DDP336	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DDP342	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DDP354	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DDP364	50.00±4.55 ^c	41.26±1.46 ^a	57.58±6.94 ^{ef}	50.72±3.52 ^d	34.19±3.72 ^{ab}	39.44±2.94 ^b	39.39±2.63 ^b	44.36±3.93 ^c	45.53±2.51 ^b	17.48±4.36 ^a	
DDP417	60.43±5.67 ^d	55.40±2.30 ^b	18.89±1.92 ^b	14.81±1.56 ^a	58.59±4.50 ^d	-	-	77.77±0.50 ^e	27.46±3.24 ^a	53.37±1.90 ^c	
DDP438	19.67±1.36 ^b	-	12.78±3.73 ^{ab}	33.77±3.23 ^c	36.03±5.31 ^{bc}	24.53±4.75 ^a	-	27.25±5.17 ^b	-	-	
DDP472	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SN42	11.19±2.49 ^a	-	10.61±2.63 ^a	31.50±5.03 ^c	-	-	-	16.11±2.57 ^a	-	-	
SN47	12.71±5.51 ^a	-	-	-	-	30.45±5.69 ^a	-	-	-	-	
SN172	12.86±5.37 ^a	-	41.10±5.44 ^d	24.61±1.71 ^b	26.98±2.75 ^a	26.23±2.38 ^a	-	24.44±4.19 ^b	-	-	
SN236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SN246	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

¹⁾ -; negative. ²⁾Data are mean±SD of at least three replicates. Different letter(a-e) within a column are significantly different ($p < 0.05$), as calculated by Duncan's multiple range test.

구 결과 *B. tequilensis* DDP23과 *B. megaterium* DDP364의 경우, 식물 병원성 진균 10종 모두에 대하여 항진균 활성을 나타내어 여러 식물 병원성 진균으로 인한 병해의 예방에 도움이 될 것으로 판단된다.

ACC deaminase 생성

ACC deaminase 생성은 질소원으로 ACC를 첨가한 배지에서 분리균주의 생육 여부를 통해 확인하였다. ACC deaminase 생성능을 측정된 결과(Table 3), *Exiguobacterium undae* ANG17, *Paenibacillus taichungensis* DDP138, *Paenibacillus polysaccharolyticus* DDP336, *Paenibacillus xylanilyticus* DDP354, *Fictibacillus solisalsi* DDP472를 제외한 13종의 분리균주가 생육하였으며, 이로써 이들 분리균주 13종이 ACC deaminase를 생성하는 것으로 나타났다. 특히 *P. psychrotolerans* DDP438은 0.4이상의 흡광도를 보여 가장 우수한 ACC deaminase 활성을 보였다. 토양환경에 오염물질, 염분, 수분부족 등과 같은 스트레스 요인이 존재하면 식물의 뿌리에 식물성 호르몬인 에틸렌과 전구체인 ACC가 축적된다. 에틸렌은 식물의 초기 성장 단계에서 중요하며, 종자 발아 및 묘목 성장 중에 에틸렌 생성이 증가한다. 그러나 에틸렌이 일정 수준 이상으로 생성되면 스트레스 에틸렌(stress ethylene)이 되어 뿌리 신장을 억제한다[38]. ACC deaminase는 에틸렌의 전구체인 ACC를 암모니아와 α-ketobutyrate로 분해하는 효소이며, 이는 미생물의 성장

을 위해 추가로 대사될 수 있다. ACC deaminase를 생산하는 PGPR은 식물 생장을 억제하는 스트레스 에틸렌 수준을 저하시켜 생물적 및 비생물적 스트레스 하에서 식물의 생장을 돕는다[9]. Seo와 Song의 연구[35]에서는 ACC deaminase와 식물호르몬 생성능을 가진 균주가 토마토의 종자발아 시 뿌리신장에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 ACC deaminase와 식물호르몬 생성능을 가진 균주가 발아된 토마토 유묘의 뿌리 길이를 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났으며, 이는 ACC deaminase 작용에 의해 나타난 에틸렌 억제능과 식물생장 촉진능에 의한 것이라고 보고하였다. 또한 Mayak 등[26]은 가뭄 스트레스(drought stress) 조건에서 PGPR이 토마토와 고추 식물에 미치는 영향을 연구하였는데, ACC deaminase를 가진 PGPR이 에틸렌 농도를 감소시켜 가뭄과 같은 조건에 의한 스트레스 에틸렌 생성을 억제하여 식물이 성장하는데 도움을 준다고 보고하였다. 본 연구에서 분리한 대부분의 분리균주가 ACC deaminase 생성능을 갖고 있는 것으로 나타났으며, 이들 분리균주가 에틸렌의 분해를 통해 스트레스 에틸렌 농도를 감소시킴으로써 식물 생장에 도움을 주는 미생물제제로서의 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다.

IAA 생성

IAA 생성능 측정결과(Table 3), 모든 분리균주가 IAA를 생성하는 것으로 나타났다. 특히, *B. safensis* DDP417이 57.26 µg/

Table 3. Activities of ACC deaminase production, IAA production, nitrogen fixation and siderophore production of isolated strains from rhizosphere soil

Strains	ACC deaminase production ¹⁾	IAA production (µg/ml) ²⁾	Nitrogen fixation	Siderophore production ³⁾
ANG17	-	3.49±0.07 ^a	+	-
DDP23	+	8.01±0.03 ^c	+	++
DDP119	+	27.50±0.37 ^k	+	++
DDP120	+	21.52±0.12 ^j	+	+
DDP136	+	11.78±0.09 ^d	+	-
DDP138	-	17.79±0.26 ^h	+	-
DDP336	-	15.67±0.02 ^g	+	-
DDP342	+	34.98±0.84 ^m	+	++
DDP354	-	16.51±1.35 ^g	+	-
DDP364	+	19.40±0.60 ⁱ	+	+
DDP417	+	57.26±0.53 ⁿ	+	+
DDP438	++	32.42±1.23 ^l	+	++
DDP472	-	16.52±0.59 ^g	+	-
SN42	+	5.64±0.19 ^b	+	+++
SN47	+	21.51±0.52 ^j	+	+++
SN172	+	12.93±0.96 ^e	+	++
SN236	+	14.50±0.30 ^f	+	-
SN246	+	13.50±0.05 ^e	+	+

¹⁾++: strong positive (absorbance at 600 nm≥0.2), +: positive (absorbance at 600 nm<0.2), -: negative.
²⁾Data are mean ± SD of at least three replicates. Different letter(a-n) within a column are significantly different (p<0.05), as calculated by Duncan’s multiple range test.
³⁾+++ : strong positive (>20 mm), ++: positive (10~20 mm), +: weakly positive (<10 mm), -: negative.

ml로 가장 높은 IAA 생성능을 보였으며, 그 다음으로 *Kocuria palustris* DDP342, *P. psychrotolerans* DDP438이 각각 34.98 µg/ml, 32.42 µg/ml의 IAA 생성능을 나타냈다. 식물 성장 조절제 중에서 IAA는 식물에서 발견되는 가장 일반적인 천연 옥신 (auxin)으로서, 불리한 환경 조건에서 식물의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다[11]. 근권미생물의 80%는 IAA를 합성할 수 있으며, 근권미생물이 생성한 IAA는 뿌리 표면적과 길이를 증가 시켜 식물이 토양 영양소에 더 많이 접근 할 수 있도록 한다. 또한, 근권미생물이 생성한 IAA는 식물 세포벽을 느슨하게 하고 결과적으로 뿌리 삼출작용(exudation)을 촉진하고 증가 시켜 근권미생물의 성장을 지원하는 추가 영양소를 제공한다[1]. Kim 등[20]은 다래(hardy kiwi) 삽목 시 생장조절물질을 처리하여 뿌리 생존율과 발근율을 비교 관찰하였으며, 생장조절물질 중 IAA가 가장 높은 뿌리 생존율과 발근효과를 나타냈다고 보고하였다. 또한 Hwang 등[12]은 딸기의 삽목 번식 시 옥신의 종류 및 처리 농도에 따른 발근율과 생존율을 조사하였으며, IAA 처리가 다른 옥신 처리구 보다 주근 수가 많았으며, 뿌리 길이가 유의적으로 긴 것으로 나타났다고 보고하였다. 그러나 IAA 농도가 150 mg/l일 때는 모든 항목에서 감소하는 경향을 보였으며, 옥신이 최적농도 이상일 때 뿌리에서의 에틸렌 발생량을 증가시켜 뿌리 생육 억제제를 심화시킨다고 알려져 있다[6]. 따라서 본 연구에서 분리한 IAA 생성능을 가진 분리균주를 적절하게 사용하게 되면 식물의 뿌리를 발달시켜 식물이 토양의 영양소를 흡수하는 것을 도와 식물의 성장을 촉진할 수 있을 것으로 판단된다.

질소 고정

질소 고정능 측정결과(Table 3), 분리균주 18종 모두 질소 고정능을 갖고 있는 것으로 나타났다. 질소는 식물의 생장과 생산성에 가장 중요한 영양소이지만, 대기 중에 78%의 N₂가 존재함에도 성장하는 식물에 이용할 수 없다. 이러한 대기 중의 N₂는 nitrogenase로 알려진 복합 효소 시스템을 이용하여 질소 고정 미생물에 의해 질소를 암모니아로 바꾸는 생물학적 질소고정(biological N₂ fixation)을 통하여 식물이 이용가능한 형태로 전환된다[1, 3]. Jha 등[13]에 따르면 질소 고정능을 가진 *Bacillus* 속이 곡물의 수확량을 증가시킬 수 있다고 보고하였으며, Cakmakci 등[5]은 질소고정 균주인 *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus*는 미생물 제제(formulation)로써 큰 잠재력을 갖고 있으며, 밀, 사탕무, 시금치의 수율과 품질을 향상하기 위한 생물비료로 사용될 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 생물학적 질소 고정능으로 알려진 *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* 이외에도 *Exiguobacterium undae*, *Rhodococcus qingshengii*, *Kocuria palustris*, *Fictibacillus solisalsi*도 질소 고정능을 갖고 있는 것을 확인하였으며, 이들 분리균주도 대기 중의 질소를 식물이 이용할 수 있도록 하는 질소고정을 통하여 식물생장에 도움을 줄 것으로 판단된다.

Siderophore 생성

Siderophore는 환경에 존재하는 많은 불용성 화합물로부터 ferric iron을 킬레이트할 수 있는 저분자량의 화합물로, 철 함량이 낮은 스트레스 조건 하에서 많은 미생물에 의해 합성된다[40]. 식물 병원성 진균에 의해 생산된 siderophore보다 특정 근권미생물에 의해 생산된 siderophore는 철과의 친화성이 높아 철 이온 복합체 형성 후 세균세포 내로 들어가 식물 병원성 진균의 포자형성과 발아관 신장을 억제하여 증식을 막는다. 또한, 식물에 철을 공급하여 식물체 내의 철 농도를 증가시킨다[14]. Siderophore 생성능 측정결과(Table 3), 분리균주 18종 가운데 11종이 siderophore 생성능을 갖는 것으로 나타났다. Siderophore 생성능을 갖는 11종의 균주 중 *B. idriensis* SN42와 *B. circulans* SN47이 20 mm 이상의 orange halo zone을 나타내며 높은 siderophore 생성능을 보였다. 그 다음으로 *B. tequilensis* DDP23, *Rhodococcus qingshengii* DDP119, *Kocuria palustris* DDP342, *P. psychrotolerans* DDP438, *B. aerius* SN172가 10~20 mm의 orange halo zone을 보이며 siderophore 생성능을 가지는 것으로 나타났다. Shaikh와 Sayyed [36]에 따르면, siderophore를 생성하는 근권미생물은 여러 작물의 식물 뿌리에 빠르게 집락을 형성함으로써 항진균 대사 산물을 분비한다고 보고하였다. 또한 siderophore를 생성하는 PGPR과 관련하여 쌀의 병원균 억제 효과[7]와 병아리 콩에서의 뿌리 부패병 감소 효과[2] 등에 관한 연구 결과가 보고되었다. 본 연구에서도 분리균주 중 11종이 siderophore 생성능을 갖는 것으로 확인되었으며, 이들 분리균주가 siderophore를 생성함으로써 식물 병원성 진균의 포자형성과 발아관 신장을 억제하여 항진균 활성에 영향을 주었을 것으로 판단된다.

인산 가용화능

인산 가용화능 측정결과(Table 4), *Exiguobacterium undae*, ANG17, *Paenibacillus taichungensis* DDP138, *Fictibacillus solisalsi* DDP472를 제외한 15종의 분리균주가 인산 가용화능을 갖는 것으로 나타났다. 인은 식물의 최적 성장을 위해 필요한 필수적인 영양소 중 하나로, 에너지 전달, 신호 전달, 호흡, 거대분자 생합성, 광합성을 포함한 거의 모든 주요 대사과정에 중요한 역할을 한다. 그러나, 95~99%의 인은 식물이 흡수하기 어려운 불용성, 고정화, 침전된 형태로 존재하며, 식물은 오직 H₂PO₄⁻와 HPO₄²⁻ 형태의 인을 흡수하는데[10], 불용성 인을 식물이 흡수하기 위해서는 인의 가용화가 선행되어야 한다. 불용성의 인은 인산 가용화 미생물이 생성한 유기산과 무기산에 의하여 가용화되며, 인산 가용화 미생물은 주로 저분자량의 유기산(gluconic acid와 keto gluconic acids)을 생성함으로써 토양에 존재하는 인을 용해한다. 또한 인산 가용화 미생물은 양성자의 생물학적 생산, 중탄산염의 배출, 가스 교환을 통해 근권 pH도 감소시킨다[24]. 인산을 가용화시키는 미생물로는 *Bacillus* 속, *Pseudomonas* 속, *Arthrobacter* 속 등이

Table 4. Activities of mineral solubilization of isolated strains from rhizosphere soil

Strains	Mineral solubilization ¹⁾					
	Phosphate	CaCO ₃	Mg ₂ Si ₃ O ₈	ZnO	ZnCO ₃	Zn ₃ (PO ₄) ₂ ·4H ₂ O
ANG17	-	+	-	-	-	-
DDP23	+	-	-	-	-	-
DDP119	+	-	-	-	-	-
DDP120	+	-	-	-	-	-
DDP136	+	++	-	-	-	++
DDP138	-	+	-	-	-	-
DDP336	++	+	-	-	-	-
DDP342	+	-	-	-	-	-
DDP354	+	++	-	-	-	++
DDP364	++	-	-	-	-	++
DDP417	+	-	-	-	-	-
DDP438	++	-	+++	-	-	-
DDP472	-	+	-	-	-	-
SN42	++	-	-	-	-	-
SN47	+	-	-	-	-	-
SN172	+	++	-	-	-	++
SN236	+	++	+	-	-	-
SN246	+	-	-	-	-	+++

¹⁾+++ : strong positive (>15 mm), ++ : positive (10~15 mm), + : weakly positive (<10 mm), - : negative.

대표적으로 보고되었으며[24], 본 연구에서도 *Bacillus* 속, *Pseudomonas* 속을 포함한 여러 종류의 분리균주가 인산 가용화능을 나타냈다. 이는 식물의 성장을 위해 토양 내의 불용성 인을 가용화함으로써 식물이 흡수할 수 있는 상태로 만드는데 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

탄산칼슘 가용화능

탄산칼슘 가용화능 측정결과(Table 4), *Exiguobacterium undae* ANG17, *B. megaterium* DDP136, *Paenibacillus taichungensis* DDP138, *Paenibacillus polysaccharolyticus* DDP336, *Paenibacillus xylanilyticus* DDP354, *Fictibacillus solisalsi* DDP472, *B. aerius* SN172, *B. aerius* SN236이 활성을 갖는 것으로 나타났다. 식물의 생장과 발육을 위해서는 여러 가지의 필수 원소를 필요로 하며, 이들은 이온 형태로 식물체의 뿌리로부터 흡수되어 이용된다. 칼슘은 주로 토양 내의 칼슘이온이 도관부를 통해 흡수되어 식물 기관조직으로 이동하여 이용되며, 토양에 칼슘이 부족할 경우에 석회로 보충할 수 있다[32]. 칼슘은 식물의 영양에 있어 필수적이며, 세포의 분화 및 신장 성장 조절 역할 등 식물의 여러 발달과정에서 칼슘이온이 중요한 조절 역할을 하는 것으로 몇몇 연구에서 보고되었다[16]. 일부 연구에서 미생물에 의하여 석회(calcite)가 용해되는 것을 확인하였는데, 이러한 석회 용해 현상의 메커니즘으로 유기산, 무기산, 킬레이트 물질 등에 의한 산성화(acidification) 메커니즘이 제시되었다[41]. 본 연구에서 분리한 탄산칼슘 가용화능을 갖는 분리균주는 유기산 생성을 통해 탄산칼슘을 가용화하였을 것으로 생각되며, 이러한 탄산칼슘 가용화를 통하여 식물의 생장에

필수적인 영양소를 공급할 수 있을 것으로 판단된다.

규소 가용화능

규소 가용화능 측정결과(Table 4), *P. psychrotolerans* DDP438과 *B. aerius* SN236에서 규소 가용화능을 확인할 수 있었다. 특히, *P. psychrotolerans*의 경우 15 mm 이상의 투명환을 가지며 높은 규소 가용화능을 나타냈다. 규소는 많은 식물의 성장, 발달과 수확량을 향상시키고 세포벽, 특히 잎 표피세포의 외막을 강화하여 여러 병리 시스템에서 많은 곰팡이 질병 발생을 감소시켜 병원성 진균의 침투에 대한 저항성을 증가시킨다고 보고되었다[29]. 규소 또한 암석의 풍화 작용, 식물 뿌리와 미생물의 생물학적 활동에 의해 가용화 되지 않는 한 불용성 형태로 존재하며, 규소 가용화능을 가진 미생물은 불용성 형태의 규산염을 가용화시켜 토양 비옥도를 높이고 식물 방어 메커니즘을 강화하는 역할을 수행한다[29, 43]. *P. psychrotolerans* DDP438의 경우 규소 가용화능이 가장 우수한 것으로 나타났다. 항진균 활성과 더불어 병원성 진균의 침투에 대한 저항성을 증가시키는데 기여를 할 수 있을 것으로 판단된다.

아연 가용화능

아연은 살아있는 유기체의 적절한 성장과 발달을 위해 소량으로 필요한 미량원소 중 하나이며, 특히, 식물에서 탄수화물과 auxin의 대사에 관여한다. 식물의 아연 결핍은 생장에 영향을 주고, 빛과 곰팡이 감염에 대한 감수성을 초래할 뿐만 아니라 곡물 수확량, 뿌리 발달 등에 영향을 준다. 식물은 아연을 Zn²⁺의 형태로 흡수할 수 있지만, 토양에서 아연은 극히 일부

만이 용해성 형태로 존재한다. 이러한 이유로 토양에서는 아연의 사용이 어려워 아연 결핍 현상이 발생하게 된다. 미생물의 다양한 아연 가용화 메커니즘 중 하나는 산성화이다. 아연 가용화 미생물은 토양에서 유기산을 생성하여 아연 양이온을 분리하고 인근 토양의 pH를 감소시킨다. 또한, 음이온은 아연을 킬레이트화하여 아연의 용해도를 높일 수 있다[15]. 아연 가용화능을 갖는 미생물을 분리하기 위하여 ZnO, ZnCO₃, Zn₃(PO₄)₂·4H₂O에 대하여 가용화능을 측정 한 결과, 모든 분리 균주는 ZnO와 ZnCO₃에 대하여 가용화능이 없는 것으로 나타났다(Table 4). Zn₃(PO₄)₂·4H₂O에 대한 가용화능 측정 결과, *B. megaterium* DDP136, *Paenibacillus xylanilyticus* DDP354, *B. megaterium* DDP364, *B. aerius* SN172, *B. aerius* SN246과 같이 5종의 분리균주에서 Zn₃(PO₄)₂·4H₂O에 대한 아연가용화능을 확인하였다. 5종의 분리균주는 10 mm 이상의 투명환을 보였으며, 특히, *B. aerius* SN246이 15 mm 이상의 투명환을 보이며 Zn₃(PO₄)₂·4H₂O에 대하여 높은 아연가용화능을 나타냈다. Kutman 등[22]은 아연을 가용화시키는 PGPR을 접종하면 뿌리의 무게, 길이, 면적, 부피, 새싹의 무게, 원추꽃차례(panicle) 출현율에 긍정적인 영향을 미친다고 보고하였으며, 본 연구에서 분리한 아연가용화능을 갖고 있는 분리균주를 식물에 접종하였을 때 뿌리와 새싹 등의 발달에 긍정적인 영향을 줌으로써 식물 생장에 기여 할 수 것으로 판단된다.

세포 외 효소 활성

근권 토양 내의 다양한 가수분해 작용은 토양이 특정 생화

학 반응을 수행 할 가능성을 나타내며, 이러한 가수분해효소의 작용은 토양 비옥도와 식물 생산성을 유지하는데 중요하다. 근권미생물은 protein, cellulose 등과 같은 다양한 고분자 화합물을 가수분해시키는 효소를 생성하여 세포 외로 분비함으로써 식물 병원성 진균을 직접적으로 억제할 수 있다[8]. 분리균주 18종의 세포 외 효소 활성 측정결과를 Table 5에 나타냈다. 18종의 분리균주 중 *B. idriensis* SN42의 amylase, cellulase, protease, 그리고 xylanase 활성이 각각 214.97 mg/100 g, 33.80 mg/100 g, 282.28 mg/100 g, 180.72 mg/100 g로 전반적으로 높은 활성을 갖는 것으로 나타났다. 그 다음으로 *B. tequilensis* DDP23의 amylase, cellulase, protease, xylanase 활성이 각각 94.69 mg/100 g, 47.70 mg/100 g, 153.47 mg/100 g, 137.71 mg/100 g로 높은 효소 활성을 보였다. 본 연구결과 대부분의 분리균주가 세포 외 효소활성을 갖는 것으로 나타났으며, 이들 분리균주의 가수분해효소 작용을 통해 식물 생산성 유지 및 식물 병원성 진균의 생장을 억제하는데 기여할 것으로 판단된다.

효소적 특성 분석(API ZYM kit)

API ZYM kit를 이용하여 분리균주의 효소적 특성을 측정하여 Table 6에 나타냈다. Phosphatases는 그람양성균 세포벽의 구성성분 형성을 저해하며, esterase와 lipase는 그람음성 및 그람양성 포자의 중요 구성성분 중 하나인 지질과 관련되어 있다. 그리고, galactosidase, glucosidase, glucuronidase는 carbohydrate의 형성을 저해한다고 보고되었다[21]. 본 연구

Table 5. Extracellular enzyme activities of strains isolated from rhizosphere soil

Strains	Extracellular enzyme activities (mg/100 g) ¹⁾			
	Amylase	Cellulase	Protease	Xylanase
ANG17	- ²⁾	21.88±3.94 ^{hi}	31.25±1.11 ^{ab}	40.66±8.56 ^a
DDP23	94.69±2.85 ⁱ	47.70±3.65 ^k	153.47±1.09 ⁱ	137.71±8.51 ^b
DDP119	49.59±1.91 ⁱ	18.33±2.63 ^{fg}	74.72±11.39 ^{efgh}	151.27±1.11 ^b
DDP120	-	24.86±5.41 ⁱ	88.12±.27 ^{gh}	25.34±4.99 ^a
DDP136	18.69±1.57 ^{ab}	10.27±1.58 ^{abcd}	70.64±13.76 ^{defg}	20.25±1.90 ^a
DDP138	27.34±2.35 ^{defg}	13.25±0.84 ^{bcde}	79.86±6.24 ^{fg}	23.26±4.08 ^a
DDP336	31.78±8.73 ^{fg}	18.46±1.56 ^{fg}	55.67±5.17 ^{cd}	16.54±2.38 ^a
DDP342	21.73±7.89 ^{bcde}	14.74±1.64 ^{defg}	65.69±2.09 ^{cdef}	8.01±2.48 ^a
DDP354	23.45±6.86 ^{cde}	9.29±0.87 ^{ab}	57.45±4.00 ^{cd}	9.70±0.53 ^a
DDP364	32.54±3.22 ^{gh}	7.27±0.21 ^a	59.15±2.73 ^{cd}	20.39±3.64 ^a
DDP417	25.48±2.26 ^{cdefg}	25.20±3.40 ⁱ	47.43±1.16 ^{bc}	26.41±3.17 ^a
DDP438	36.10±5.95 ^h	16.04±0.64 ^{efg}	60.47±4.54 ^{cde}	15.64±5.47 ^a
DDP472	28.04±3.99 ^{defg}	19.34±0.89 ^{gh}	27.03±0.63 ^a	23.86±2.20 ^a
SN42	214.97±4.44 ^k	33.80±3.12 ^j	282.28±29.92 ⁱ	180.72±17.76 ^b
SN47	20.33±2.31 ^{abc}	14.13±1.30 ^{cdef}	84.02±11.34 ^{gh}	15.72±2.84 ^a
SN172	24.33±1.30 ^{cdef}	9.67±0.95 ^{abc}	97.11±11.98 ^h	27.43±2.50 ^a
SN236	14.66±3.04 ^a	21.34±2.99 ^{hi}	65.39±7.76 ^{cdef}	23.63±.72 ^a
SN246	28.77±0.99 ^{efg}	17.64±2.04 ^{efgh}	58.46±6.37 ^{cd}	15.59±3.23 ^a

¹⁾Data are mean ± SD of at least three replicates. Different letter (a-k) within a column are significantly different (p<0.05), as calculated by Duncan's multiple range test.

²⁾-.: negative.

Table 6. Biochemical characterization of strains isolated from rhizosphere soil by API ZYM kit¹⁾

	ANG17	DDP23	DDP119	DDP120	DDP136	DDP138	DDP336	DDP342	DDP354	DDP364	DDP417	DDP438	DDP472	SN42	SN47	SN172	SN236	SN246
1 Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 Alkaline phosphatase	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
3 Esterase (C4)	+	+	+	+	++	++	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+
4 Esterase (C8)	+	+	++	++	+	+	++	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
5 Lipase (C14)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 Leucine arylamidase	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
7 Valine arylamidase	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
8 Crystine arylamidase	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 Trypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 α -Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11 Acid phosphatase	+	-	++	++	+	+	+	+++	+	++	-	+	-	+++	-	+	+	-
12 Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13 α -Galactosidase	+	+	-	-	++	++	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14 β -Glucuronidase	+	-	-	-	+	+++	++	-	++	+	-	+	+	-	+	+	+	-
15 β -Glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16 α -Glucosidase	++	+	++	++	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
17 β -Glucosidase	+	+	+++	+++	-	+	+++	-	+	-	+++	+	++	-	-	++	+++	+
18 N-Acetyl- β -glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19 α -Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
20 α -Fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾ +++: strong positive (>40 nanomoles), ++: positive (20~40 nanomoles), +: weakly positive (<20 nanomoles), -: negative.

에서 분리한 대부분의 분리균주는 이들 효소적 특성을 모두 갖는 것으로 나타났으며, *Rhodococcus qingshengii*로 동정된 DDP119와 DDP120이 가장 많은 11종의 효소에 대하여 양성 반응을 나타냈다. 다양한 가수분해효소의 작용은 병원성균의 외벽 가수분해를 통해 생물학적 방제에 유용하게 사용된다고 알려져 있다[8]. 그러나 *Rhodococcus qingshengii* DDP119와 *Rhodococcus qingshengii* DDP120의 경우 분리균주 중에서 가장 많은 11종의 효소에 대한 양성반응을 보였지만, 식물병원성 진균 10종 중에서 각각 1종과 6종에 대하여 항진균 활성을 갖고 있는 것으로 나타났다. 또한 9종의 효소에 대하여 양성반응이 나타난 *Exiguobacterium undae* ANG17과 *Paenibacillus polysaccharolyticus* DDP336의 경우, 식물 병원성 진균 10종에 대하여 항진균 활성이 없는 것으로 나타났다. 이처럼 우수한 효소적 특성이 항진균 활성으로는 발현되지 않는 것으로 나타났는데, 상기의 결과는, 분리균주들을 이용한 토양 비옥도 및 식물 생산성 유지, 식물 병원성 진균에 대한 항진균 활성을 갖는 우수한 biocontrol agent로 개발하기 위해서는, 다양한 가수분해효소를 생산하고 항진균 활성이 우수한 분리균주들의 혼합 배양이 필요함을 제시한다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Ahemad, M. and Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* **26**, 1-20.
- Akhtar, M. S. and Siddiqui, Z. A. 2009. Use of plant growth promoting rhizobacteria for the biocontrol of root-rot disease complex of chickpea. *Aust. Plant Pathol.* **38**, 44-50.
- Baber, M., Fatima, M., Abbas, R., Qaisrani, M. M., Naz, S., Hanif, M. K. and Naqqash, T. 2018. Weed rhizosphere: a source of novel plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Int. J. Biosci.* **13**, 224-234.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C. and Kalra, A. 2014. ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *J. Plant Physiol.* **171**, 884-894.
- Cakmakci, U. G., Donmez, M. F. and Erdogan, U. 2007. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. *Turk. J. Agric. For.* **31**, 189-199.
- Chadwick, A. V. and Burg, S. P. 1967. An explanation of the inhibition of root growth caused by indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* **42**, 415-420.
- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S. and Lumyong, S. 2009. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1919-1928.
- Egamberdieva, D., Renella, G., Wirth, S. and Islam, R. 2010. Enzyme activities in the rhizosphere of plants. *In: Soil Enzymology*. Springer, pp. 149-166.
- Glick, B. R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* **21**, 383-393.
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S. and Patra, J. K. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol. Res.* **206**, 131-140.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K. and Singh, V. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J. Microb. Biochem. Technol.* **7**, 96-102.
- Hwang, H. S., Jeong, H. W., Lee, H. R., Jo, H. G. and Hwang, S. J. 2021. Rooting and survival rate as affected by various types and concentrations of auxin on 'Maehyang' strawberry in cutting propagation. *J. Bio-Env. Con.* **30**, 56-64.
- Jha, C. K. and Saraf, M. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *E3 J. Agric. Res. Develop.* **5**, 108-119.
- Jung, T. K., Kim, J. H. and Song, H. G. 2012. Antifungal activity and plant growth promotion by rhizobacteria inhibiting growth of plant pathogenic fungi. *Kor. J. Microbiol.* **48**, 16-21.
- Kamran, S., Shahid, I., Baig, D. N., Rizwan, M., Malik, K. A. and Mehnaz, S. 2017. Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat. *Front. Microbiol.* **8**, 2593.
- Kang, S. M., Wagas, M., Shahzad, R., You, Y. H., Asaf, S., Khan, M. A., Lee, K. E., Joo, G. J., Kim, S. J. and Lee, I. J. 2017. Isolation and characterization of a novel silicate-solubilizing bacterial strain *Burkholderia eburnean* CS4-2 that promotes growth of japonica rice (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin). *Soil Sci. Plant Nutr.* **63**, 233-241.
- Kim, H. S., Kim, J. Y., Lee, S. M., Park, H. J., Lee, S. H., Jang, J. S. and Lee, M. H. 2019. Isolation and characterization of indole-3-acetic acid- and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing bacteria related to environmental stress. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **47**, 390-400.
- Kim, H. S., Park, J. Y., Choi, S. W., Choi, K. H., Lee, G. P., Ban, S. J., Lee, C. H. and Kim, C. S. 2003. Isolation and characterization of *Bacillus* strains for biological control. *J. Microbiol.* **41**, 196-201.
- Kim, J. E., Lee, E. B., Yang, Y. J., Kim, W. H., Oh, J. M., Lim, D. Y., Park, Y. D., Choi, M. S., Lee, C. Y., An, Y. S., Song, H. J., Yoon, Y. J. and Kim, H. J. 2019. Isolation, counting and identification of microorganisms from elevator button, ATM, and smartphone surface. *J. Kor. Soc. Environ. Eng.* **41**, 419-430.
- Kim, J. H., Park, Y. K., Kim, C. W., Kim, S. H. and Lee, D. H. 2016. Effect of growth regulators on cutting of new cultivar hardy kiwi as honey plant. *J. Apiculture* **31**, 79-84.

21. Kim, J. Y., Kim H. S., Lee, S. M., Park, H. J., Lee, S. H., Jang, J. S. and Lee, M. H. 2020. Plant growth promoting and disease controlling activities of *Pseudomonas geniculata* ANG3, *Exiguobacterium acetylicum* ANG40 and *Burkholderia stabilis* ANG51 isolated from soil. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **48**, 38-47.
22. Kutman, U. B., Yildiz, B., Ozturk, L. and Cakmak, I. 2010. Biofortification of durum wheat with zinc through soil and foliar applications of nitrogen. *Cereal Chem.* **87**, 1-9.
23. Kwon, J. J., Lee, J. B., Kim, B. S., Lee, E. H., Kang, K. M., Shim, J. S., Joo, W. H., Jeon, C. P. and Kwon, G. S. 2014. Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in red pepper by *Bacillus* sp. CS-52. *Kor. J. Microbiol.* **50**, 201-209.
24. Lee, K. K., Mok, I. K., Yoon, M. H., Kim, H. J. and Chung, D. Y. 2012. Mechanisms of phosphate solubilization by PSB (phosphate-solubilizing bacteria) in soil. *Kor. J. Soil Sci. Fert.* **45**, 169-176.
25. Leveau, J. H. J. and Lindow, S. E. 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2365-2371.
26. Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B. R. 2004. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci.* **166**, 525-530.
27. Milagres, A. M. F., Machuca, A. and Napoleão. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *J. Microbiol. Methods* **37**, 1-6.
28. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
29. Naureen, Z., Aqeel, M., Hassan, M. N., Gilani, S. A., Bouqelalah, N., Mabood, F., Hussain, J. and Hafeez, F. Y. 2015. Isolation and screening of silicate bacteria from various habitats for biological control of phytopathogenic fungi. *Am. J. Plant Sci.* **6**, 2850-2859.
30. Oh, D. G., Jang, Y. K., Woo, J. E., Kim, J. S. and Lee, C. H. 2016. Metabolomics reveals the effect of garlic on antioxidant- and protease-activities during Cheonggukjang (fermented soybean paste) fermentation. *Food Res. Int.* **82**, 86-94.
31. Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M. and Kaushik, S. 2017. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **15**, 379-391.
32. Park, J. R., Kim, E. G., Lee, S. H., Chung, I. K. and Kim, K. M. 2019. Comparison of the migration and absorption of calcium and magnesium in apple leaves sprayed with plant nutrients prepared by wet nano-grinding technology. *J. Life Sci.* **29**, 769-773.
33. Ramesh, A., Sharma, S. K., Sharma, M. P., Yadav, N. and Joshi, O. P. 2014. Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhattai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in vertisols of central India. *Appl. Soil Ecol.* **73**, 87-96.
34. Russo, A., Tarantino, U., d'Ettoire, G., Rocca, C. D., Ceccarelli, G., Gasbarra, E., Venditti, M. and Iundusi, R. 2021. First report of spondylodiscitis caused by *Bacillus circulans* in an immunocompetent patient: clinical case and review of the literature. *IDCases* **23**, e01058.
35. Seo, M. S. and Song, H. G. 2013. Growth promotion of tomato plant under drought conditions by treatment of rhizobacteria producing ACC deaminase and phytohormones. *Kor. J. Microbiol.* **49**, 46-50.
36. Shaikh, S. S. and Sayyed, R. Z. 2015. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their formulation in biocontrol of plant diseases. *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer. pp. 337-351.
37. Shin, P. Y. and Cho, S. J. 2011. Cellulase and xylanase activity of compost-promoting bacteria *Bacillus* sp. SJ21. *Kor. J. Soil Sci. Fert.* **44**, 836-840.
38. Singh, R. P., Shelke, G. M., Kumar, A. and Jha, P. N. 2015. Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to "stress ethylene" produced in plants. *Front. Microbiol.* **6**, 937.
39. Song, E. Y. and Lee, J. H. 2012. Plant responses to environmental stresses. *KSBMB NEWS* **32**, 27-34.
40. Srinivasan, T. 2017. Studies on antifungal activity of siderophores produced by *Rhizobium* spp. isolated from groundnut (*Arachis hypogaea*). *J. Agri. Sci. Food Res.* **8**, 1-2.
41. Tamilselvi, S. M., Thiagarajan, C. and Uthandi, S. 2016. Calcite dissolution by *Brevibacterium* sp. SOTI06: a futuristic approach for reclamation of calcareous sodic soils. *Front. Plant Sci.* **7**, 1828.
42. Um, Y. R., Kim, B. R., Jeong, J. J., Chung, C. M. and Lee, Y. 2014. Identification of endophytic bacteria in *Panax ginseng* seeds and their potential for plant growth promotion. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **22**, 306-312.
43. Vasanthi, N., Saleena, L. M. and Raj, S. A. 2012. Silicon in day today life. *World Appl. Sci. J.* **17**, 1425-1440.
44. Yi, K. J., Cho, S. S. and Kim, S. K. 2017. Characteristics of digestive enzyme activity, antibiotic resistance, and pathogenicity of bacteria inhabited in animal feed resources. *Kor. J. Vet. Serv.* **40**, 119-131.
45. Zhu, J. K. 2016. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* **167**, 313-324.

초록 : 항진균 활성, 식물 생장촉진 활성, 미네랄 가용화능을 가진 생물학적 제제로서 잠재적 식물 생장 촉진 근권세균의 특성조사

이송민¹ · 김지윤¹ · 김희숙¹ · 오가윤¹ · 이광희¹ · 이상현² · 장정수^{1*}

(¹(주)엔젤 식품연구소, ²신라대학교 바이오산업학부 제약공학전공)

본 연구에서는 근권토양으로부터 18종의 세균을 순수분리하고, 이들의 식물 병원성 진균 생육억제 활성, 식물 생장촉진 활성 및 미네랄 가용화능을 평가하였다. *Bacillus* 속과 *Pseudomonas* 속 분리균주의 항진균 활성을 통해 생물학적 방제제로서의 가능성을 확인할 수 있었으며, 이는 식물 병원성 진균의 세포벽에 작용하는 여러 가수분해효소 활성과 siderophore 생성능 등에 기인된 것으로 판단된다. 또한 대부분의 분리균주가 aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase 생성능, indole-3-acetic acid 생성능 및 질소 고정능을 갖고 있는 것으로 나타났으며, 이러한 특성은 식물이 흔히 노출될 수 있는 환경 스트레스 조건 하에서 스트레스 에틸렌의 농도를 감소시킴으로써 뿌리 발달 및 성장, 그리고 작물의 생산성에 긍정적인 영향을 줄 것으로 판단된다. 그리고 분리균주의 인산, 규소, 탄산칼슘, 아연 가용화능 등을 확인한 결과, 일부 분리균주들의 미네랄 가용화능을 확인하였으며, 이들 분리균주를 식물 성장 시에 접종한다면 식물 생장에 필요한 영양분을 식물이 흡수할 수 있는 이용가능한 형태로 변환시켜 식물의 생장에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 항진균 활성, 식물생장촉진 활성 및 미네랄 가용화능의 결과를 통해 분리균주 18종의 biocontrol agent로서의 이용가능성을 제시하고자 한다.