

근권에서 분리한 *Bacillus* sp.의 적용에 의한 토마토의 생장 촉진

이강형 · 송홍규*

강원대학교 자연과학대학 생명과학부, 강원대학교 생명과학연구소

식물호르몬(phytohormone)을 생성하며 불용성 인산 가용화능이 있는 세균을 근권에서 분리하여 각각의 생성능을 조사하고 토마토 씨앗에 적용하여 생장촉진 가능성을 조사함으로써 분리 균주의 생물학적 비료로서의 가능성을 제시하고자 하였다. 분리 균주인 *Bacillus* sp. PS2와 RFO41은 첨가된 두 종류의 500 mg/L 불용성 인산을 약 80% 이상 가용화시켰으며, 펩톤이 풍부한 성장배지에서 여러 가지 식물호르몬을 생성하였다. 이를 토대로 토마토 씨앗의 생장촉진 실험을 수행한 결과, PS2와 RFO41이 적용된 실험균의 발아한 토마토 묘종의 뿌리와 줄기의 길이 생장은 대조군에 비하여 각각 26.8과 34.8% 및 45.5와 36.5%가 증가하였다. 이 결과는 분리 균주인 *Bacillus* sp. PS2와 RFO41의 인산 가용화능과 식물호르몬의 생성능이 토마토 씨앗의 발아와 생장에 직접적인 영향을 주는 요인으로 작용한 결과라고 판단할 수 있으며, 생물학적 비료로서의 가치를 뒷받침하는 것이라고 할 수 있다.

Key words □ *Bacillus* sp., growth promotion, phytohormones, tomato

근권에서 분리한 일부 토양미생물은 식물 생장이나 생산성을 증가시킬 수 있으며, 이러한 미생물은 일반적으로 PGPB (plant growth promoting bacteria) 또는 중국의 일부 학자들에 의하여 yield increasing bacteria (YIB)라고 한다(8). 식물 생장과 생산성 증가를 위한 식물과 PGPB의 연관성은 아직 충분히 연구되지 않은 실정이나, 현재까지 밝혀진 설명 가능한 이론은 PGPB가 여러 식물생장촉진 호르몬을 생산할 수 있으며, 불용성 인산과 다른 영양염류들을 식물이 이용할 수 있도록 한다는 것이다(16).

식물의 생육 촉진에 영향을 미치는 식물호르몬으로는 indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA), gibberellin 그리고 zeatin 등 다양한 물질이 존재한다. PGPB는 이러한 식물호르몬을 직접 생성할 수 있으며, 그 기능은 식물세포의 거대화화 분열, 그리고 세포 분화 및 빛과 중력에 대한 반응을 보이고, 식물체 내로 유입되어 auxin pool에서 auxin의 합성을 촉진하는 역할을 수행한다고 알려져 있다(14, 21). 인(P)은 식물이 성장하는데 중요한 역할을 차지하고 있지만, 토양에서 식물이 필요로 하는 충분한 양으로 존재하지 못하기 때문에 대표적인 식물생장 제한요인으로 알려져 있다. 인이 토양 내에서 충분한 양으로 존재하지 못하는 이유는 공급된 인이 토양 내 양이온인 철, 알루미늄, 칼슘 등과 결합하여 식물체가 쉽게 이용할 수 없는 불용성 형태로 전환되어 축적되기 때문이다(20). 이렇게 토양 내 인산을 식물이 이용하지 못하고 축적되는 문제를 해결하기 위해 불용성 인산 가용화능이 있는 미생물을 토양에 접종하여 불용성 인산을 가용화시킬 수 있다면 식물의 생장에 긍정적인 효과를 나타내며, 또한 이를 응용하여 미생물 비료로 이용한다면 경제적, 환경적으로

큰 도움이 될 것이다(26).

이러한 특징의 PGPB를 통해 나타나는 다양한 생리활성 작용을 이용한 친환경적 농업에 대한 관심이 증가하고 있으며 이에 대한 다양한 연구들이 시도되고 있다(17). 그러나 현재 이용되고 있는 미생물제제는 미생물의 활성이 일정하지 못한 효과 등의 문제점들이 나타나고 있다. 따라서 이러한 문제들을 극복할 수 있는 방법 중 하나로 질소 고정능과 같은 직접적인 영향과 아미노산, 당과 같은 물질을 생산하여 간접적인 식물생장 촉진 기작을 나타내는 다양한 PGPB를 함께 처리함으로써 식물의 생장을 촉진시키는 방법들이 보고되었다. 또한 토양에 존재하지만 식물에게 유용하게 쓰이지 못하고 있는 불용성 인산을 가용화하여 유리인산의 형태로 분해할 수 있는 특징을 지닌 토양 미생물들의 능력은 이미 많이 연구되어 있다(9, 10, 11).

본 연구는 식물생장촉진 근권세균의 적용범위 확대를 위해 대표적 농작물 중의 하나인 토마토의 생장에 미치는 유용미생물의 영향을 조사하고 식물생장 촉진능력을 검증함으로써 미생물비료의 개발과 실용화를 위한 기초자료를 확립하고자 하였다. 인산가용화능이 우수한 균주를 근권으로부터 분리하여 토양에 존재하는 다양한 불용성 인산에 대한 가용화능과 함께 식물호르몬의 생성능을 조사하여 실제 토마토 씨앗의 생장촉진에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

인산가용화 세균의 분리

토양에서 불용성 인산을 가용화하여 식물이 이용가능하게 할 수 있는 균주를 분리하였다. 균주 선별방법은 토양 1 g을 멸균된 0.9% NaCl 용액 100 ml에 넣고 30분간 교반하여 토양세균

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-33-250-8545, Fax: 82-33-251-3990
E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr

을 토양으로부터 분리하였다. 이 시료를 일정한 비율로 희석하여, NA-calcium phosphate [Nutrient Broth (NB, Oxoid) 8 g, agar 15 g per 1 liter dH₂O, calcium phosphate 5 g] 평판배지에 100 µl 씩 도말하고 30°C에서 4일 동안 배양한 후 균주 주위에 투명대를 형성하는 균체를 불용성 인산의 가용화능이 있는 균주로 결정하고(1), 그 중에서 상대적으로 투명대가 큰 균주를 선별하여 2종의 단일 균주를 확보하였다.

불용성 인산의 가용화능 측정

분리균주 PS2와 RFO41을 대상으로 불용성 인산의 가용화능을 조사하였다. 분리 균주를 NB 배지에 접종한 뒤 24시간 동안 선 배양한 뒤, 배양액의 혼탁도(OD₆₀₀)가 1이 되도록 보정하여, 0.5% 불용성 인산(tricalcium phosphate 또는 aluminum phosphate)이 포함된 NB 배지 40 ml에 단일균주 선배양액 0.4 ml을 접종하여 200 rpm으로 30°C에서 6일간 배양하였다. 배양 중 24시간 간격으로 배양액으로부터 유리된 인산을 다음의 방법으로 측정하였다. 분리 균주가 접종된 NB-P 배지의 배양액 1 ml을 원심분리(10,000×g, 4°C, 10 min)하여 얻은 상등액 1 ml에 vanadomolybdophosphoric acid 반응용액(solution A: ammonium molybdate 25 g, dH₂O 300 ml, solution B: ammonium metavanadate 1.25 g, dH₂O 300 ml; solution A, B를 섞은 다음 최종 부피가 1,000 ml이 되도록 증류수를 첨가) 1 ml을 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 뒤, 470 nm에서 흡광도를 측정하였고, potassium phosphate monobasic을 사용하여 얻은 phosphate 표준곡선을 이용하여 정량하였다(2, 5, 13).

Phosphatase 활성의 측정

분리균주를 40 ml NB 배지에 24시간동안 배양한 배양액을 NB-CaP 배지에 10%씩 접종한 뒤, 24시간 간격으로 phosphatase 활성을 측정하였다. 배양 상등액 1 ml을 25 mM의 p-nitrophenyl phosphate (pNP) 1 ml과 modified universal buffer (pH 5.5, 6.0, 6.5, 10.5) 4 ml를 각각 혼합하여 37°C에서 1시간동안 반응시킨 뒤, 0.5 M CaCl₂ 1 ml과 0.5 M NaOH 1 ml을 첨가한 반응액을 0.45 µm 공극의 여과막으로 여과한 다음, 410 nm에서의 흡광도를 측정하였다(7, 22).

분리균주의 동정

불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 토양 미생물 중 평판배지에서의 불용성 인산 가용화능이 우수한 균주인 PS2와 RFO41의 분류학적 위치를 확인하기 위해 형태학적 특징을 관찰하였고, 16S rDNA를 증폭하여 염기서열 분석을 실시하였다. 순수 분리된 각 균주를 (주)마크로젠에 의뢰하여 분석하였으며, PCR primer는 universal primer 27F; 5'-AGAGTTTGATCMTGCTC AG-3'와 1492R; 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'을 사용하였고, sequencing 결과는 Mega 3.1의 BLAST program의 Jukes-Cantor 모델을 적용한 Neighbour-joining 방법에 따라 작성하였다.

식물호르몬의 생성능 조사

식물호르몬의 생성능 조사를 위해 사용한 배지는 brain heart broth [BHB; peptone 27.5 g, D(+) glucose 2.0 g, NaCl 5.0 g, Na₂HPO₄ 2.5 g per 1 liter dH₂O]으로, BHB 배지 100 ml에, NB 배지에서 선배양한 분리균주의 배양액(OD₆₀₀이 1이 되도록 보정) 0.4 ml을 접종하여 130 rpm으로 30°C에서 3일간 진탕배양한 뒤, 식물호르몬을 측정하였다. 분석한 식물호르몬은 IAA, IBA, gibberelin, zeatin 그리고 zeatin-ribose이며, HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석방법은 다음과 같다. 3일간 진탕배양한 시료 100 ml을 원심분리(5,000×g, 4°C, 30 min) 한 후, 상등액을 회수하였다. IAA, IBA 그리고 gibberellin의 분석을 위해 회수한 상등액의 pH를 2.5로, zeatin과 zeatin-ribose를 분석하기 위한 상등액의 pH를 7.0으로 보정한 뒤, 15 ml의 ethylacetate를 첨가하고 extraction shaker (Recipro shaker RS-1, JEIO TECH, Korea)에서 300 rpm으로 10분간 진탕하여 3번씩 추출하여 ethylacetate층을 회수하였다. 회수된 45 ml의 ethylacetate를 증발시키고 5 ml의 methanol에 녹인 뒤 0.45 µm 공극의 여과막으로 여과하여 분석시료로 사용하였다. 분석은 HPLC (Waters, Breeze Model, USA)로 Luna 5µ C18 250×4.6 mm column (Phenomenex, USA)을 이용하였다. Flow rate는 1 ml/min로 IAA와 IBA는 35% methanol in 1% acetic acid, gibberellin은 30% methanol (0.1 M H₃PO₄를 이용하여 pH를 3.0으로 보정), zeatin과 zeatin-ribose는 70% methanol을 이동상으로 하였으며, 각각 280, 208 그리고 265 nm의 파장에서 분석하였다(12, 21).

토마토 씨앗의 성장촉진 실험

식물호르몬의 생성능을 보이며 불용성 인산의 가용화능이 우수한 균주인 PS2와 RFO41을 대상으로 토마토 씨앗의 성장촉진 실험을 무균조건에서 수행하였다. 먼저 증류수에 충분히 적신 씨의 일정량을 비이커에 넣고 멸균한 다음, 1% sodium hypochloric acid를 포함한 증류수에 10분간 소독한 토마토 씨앗(‘제우스’, 동부농화(주))을 9개씩 비이커에 분주하였다. 분리균주는 BHB 배지에서 72시간 동안 배양한 뒤, 원심분리(5000×g, 4°C, 50 min)하여 0.1 M MgSO₄ buffer로 두 번 씻은 다음 현미경과 hemocytometer를 이용하여 계수하여 배양액의 분리균주 개체수가 1×10⁸ cells/ml이 되도록 보정하였다.

1차 실험은 PS2와 RFO41에 의한 토마토 씨앗의 성장촉진의 가능성을 알아보기 위하여 증류수 실험군, 멸균된 PS2, RFO41 접종 실험군, 그리고 살아있는 PS2, RFO41 접종 실험군으로 진행하였으며, 2차 실험은 분리균주를 대상으로 토양에서의 성장촉진 실험을 진행하였다. 토양을 채취하여 121°C, 20분 동안 멸균하고 각각의 plastic pot에 50 g씩 넣은 뒤, 불용성 인산의 농도가 0.5%가 되도록 첨가한 조건에서 15일간 실험을 수행하였다. 토마토 씨앗의 성장촉진 실험은 triplicate로 진행되었으며, replicate 당 토마토 씨앗의 개수는 9개로 정하였고, 24시간 중 15시간의 광조건(3,000 lux)에서 9일(무균조건 실험)과 15일(토양 실험)간 배양하면서 발아한 묘종의 길이생장 그리고 건조중량을 측정하였으며, 각각의 조건에서 측정된 수치는 Student's *t*-test를

이용하여 분석하였다(15).

결 과

분리균주의 동정

불용성 인산 가용화능과 phytohormone 생성능이 나타나는 PS2와 RFO41의 형태학적 분석을 알아보기 위하여 NB 배지에서 배양한 균체를 대상으로 그람 염색법을 수행, 광학현미경으로 관찰한 결과, 그람 양성이며, 간균의 형태를 갖고 있었다. 분류학적 위치를 알아보기 위하여 16S rDNA를 증폭, 전체 염기서열을 분석한 결과, PS2 (GenBank accession no. EF213021)와 RFO41 (GenBank accession no. EF213022)이 모두 *Bacillus subtilis* (GenBank accession no. AY364963)와 각각 99.63과 99.75%의 서열 유사성을 나타냈다.

분리균주의 인산 가용화능 및 phosphatase 활성

불용성 인산을 기질로 사용하여 인산 가용화능을 측정된 결과, tricalcium phosphate를 기질로 했을 때 RFO41 균주가 접종 후 72시간에서 492.5 mg/L의 인산 가용화능을 나타내었고(Fig. 1A), 기질이 aluminum phosphate였을 때, RFO41 균주가 48시간에서

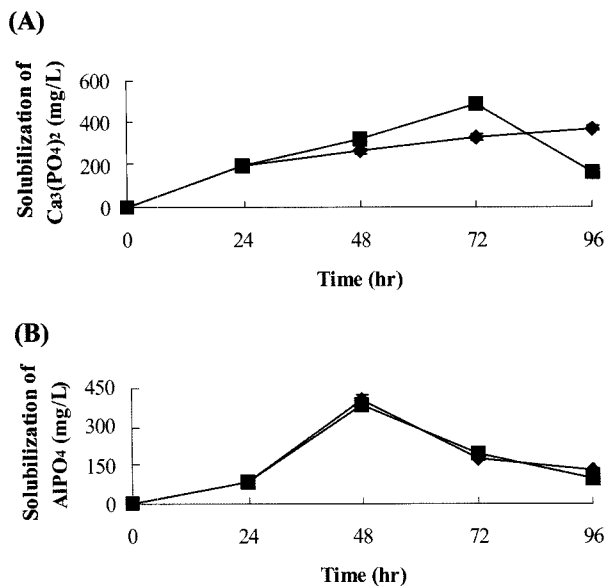


Fig. 1. Solubilization of insoluble tricalcium phosphate (A) and aluminum phosphate (B) by *Bacillus* sp. PS2 (◆) and RFO41 (■).

최대 395.8 mg/L, PS2 균주는 381.3 mg/L의 인산 가용화능을 나타내었다(Fig. 1B).

Bacillus sp. PS2와 RFO41의 phosphatase 활성을 초기 pH의 변화에 따라 측정하였다. 두 균주 모두 phosphatase 활성 측정에 사용된 buffer의 pH가 6.5일 때 PS2는 2.18, RFO41은 2.70 μmol pNP/ml/hr로 다른 pH 조건에 비하여 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 2).

식물성장 촉진물질의 생성능

불용성 인산가용화능이 우수한 두 균주를 대상으로 식물호르몬의 생성능을 조사하였는데, PS2와 RFO41 두 균주 모두 IAA, IBA, gibberellin, zeatin 그리고 zeatin-ribose를 생성하였으며, RFO41의 식물호르몬 생성능이 PS2보다 더 우수하였다(Table 1).

토마토 씨앗의 성장촉진 실험

불용성 인산 가용화능과 식물호르몬 생성능에 대한 활성을 나타낸 *Bacillus* sp. PS2와 RFO41을 대상으로 토마토 씨앗의 발아 및 성장촉진 가능성의 연구를 위한 토마토 씨앗의 성장촉진 실험

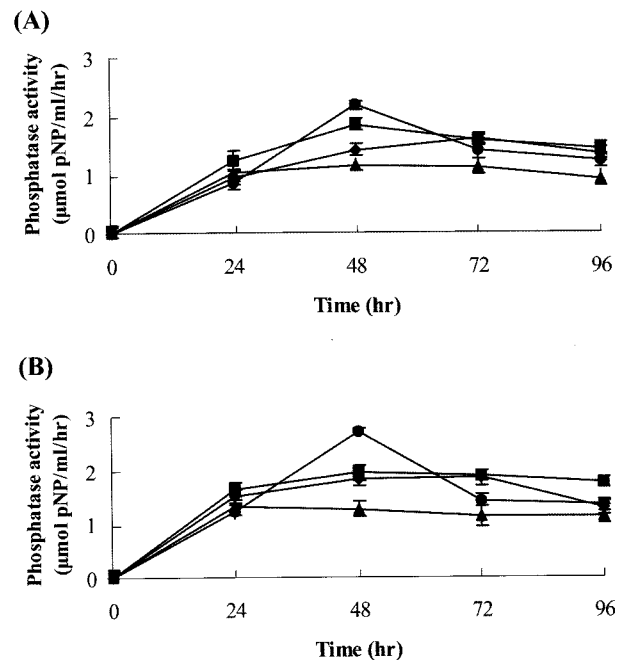


Fig. 2. Phosphatase activity in liquid culture of *Bacillus* sp. PS2 (A) and RFO41 (B) (symbol: ◆, pH 5.5; ■, 6.0; ●, 6.5; ▲, 10.5).

Table 1. Production of phytohormones by *Bacillus* sp. PS2 (■) and RFO41 (◆) in the supernatant of bacterial cultures after 4 days of incubation

Strain	Production of phytohormone (μg/mg protein) ^a				
	IAA	IBA	Gibberellin	Zeatin	Zeatin-ribose
PS2	213.8±11.2	172.3±10.9	1.2±0.1	11.0±0.2	6.9±0.1
RFO41	199.3±9.3	542.3±13.5	3.0±0.2	19.6±0.1	21.1±0.2

^aThe values represent the Mean±Standard Deviation for triplicate samples.

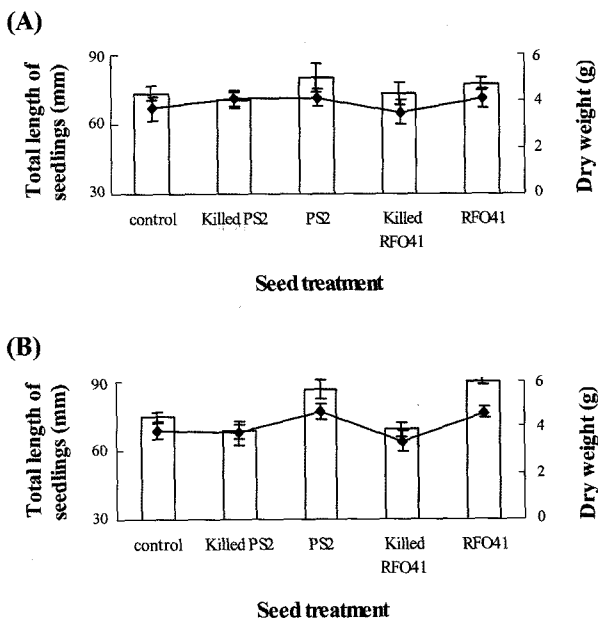


Fig. 3. Lengths and dry weight of germinated tomato seedlings treated with *Bacillus* sp. PS2 and RFO41 together without phosphate (A) or with phosphate (B) in axenic conditions (open bar, total length of tomato seedling; ◆, dry weight). Data were analyzed by Student's t-test (n=3).

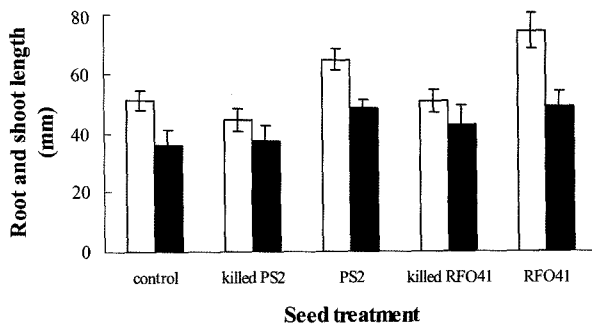


Fig. 4. Root and shoot lengths of germinated tomato seedlings treated with *Bacillus* sp. PS2 and RFO41 together with phosphate in pot soil (open bar, root; closed bar, shoot). Data were analyzed by Student's t-test (n=3)

험을 무균 조건에서 진행하였다(Fig. 3). PS2가 접종된 실험군은 증류수 첨가 대조군에 비해 총 길이와 건조중량이 각각 9.1과 12.6% 증가하였다(Fig. 3A). 그리고 tricalcium phosphate와 PS2가 함께 적용된 실험군의 총 길이와 건조중량의 증가는 tricalcium phosphate 첨가 대조군과 비교하여 각각 16.2와 20.9%로 나타났으며, tricalcium phosphate와 RFO41이 같이 접종된 실험군은 tricalcium phosphate 첨가 대조군보다 21.1과 19.8%의 총 길이 및 건조중량이 유의한 수준($P < 0.003$)으로 증가되었다(Fig. 3B).

각 균주를 불용성 인산이 처리된 토양에 접종하여 성장실험을

수행한 결과, 뿌리와 줄기의 길이는 대조군에 비해 PS2를 적용한 실험군이 26.8과 34.8%, 그리고 RFO41 처리 실험군이 45.5와 36.5% 만큼 각각 유의하게 증가하는 결과($P < 0.012$)가 나타났다(Fig. 4).

고 찰

식물생장촉진능이 있는 토양세균을 분리하기 위해 불용성 인산의 가용화능이 우수한 균주를 선별하여 16S rDNA의 전체 염기서열 분석결과 두 균주 모두 *Bacillus subtilis*와 높은 서열 유사성을 나타냈는데, 보다 정확한 동정을 위해서는 DNA-DNA hybridization 실험이 필요하다. *Bacillus* sp. PS2와 RFO41을 tricalcium phosphate와 aluminum phosphate가 포함된 NB 배지에서 배양하면서 유리된 인산의 생성량을 조사했을 때 PS2와 RFO41 균주는 첨가된 불용성 인산(500 mg/L)으로부터 80% 이상(400 mg/L)의 인산을 가용화시켰다. 이 결과는 Murphy 등(18)이 *Bacillus* sp.를 대상으로 실행한 인산 가용화능이 17.3~22.5 mg/L인 것과 비교하였을 때, PS2와 RFO41의 인산 가용화능이 매우 우수하다는 것을 알 수 있다. 또한 불용성 인산을 가용화하는 phosphatase 활성을 측정된 결과, 두 균주 모두 측정에 사용된 원충액의 pH가 6.5일 때 다른 pH 조건에 비하여 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 2). 두 균주는 pH 10.5에서도 상당히 높은 수준의 phosphatase 활성을 나타내었는데 *Xanthomonas maltophilia* R85의 alkaline pH 범위에서의 0.72~2.15 $\mu\text{mol pNP/ml/h}$ (7) 보다 약 두 배 이상 높은 것이다. 이는 *Bacillus* PS2와 RFO41이 산성과 염기성 토양에서 모두 활성을 유지할 수 있으며, 또한 실제 작물재배 시 산성토양의 중화를 위해 사용되는 석회를 첨가할 경우에도 식물 성장에 긍정적인 효과가 있음을 예상할 수 있다. 토양 내 많은 개체군을 차지하고 있는 PGPB 중에 인산 가용화능이 우수한 균주가 존재할 것이라 추측되지만 미세환경의 산성화에 의한 기작을 이용한 인산 가용화가 대부분이며 그 경우 pH 완충능이 높은 토양에서의 효과는 크게 기대하기 어려운 것이다. 그러나 본 실험 균주 가운데 인산 가용화능이 높고 넓은 pH 범위에서 phosphatase 활성이 우수한 RFO41 균주가 실제 토양에 적용된다면 불용성 인산의 가용화에 의한 식물생장 촉진이 유도될 것이라고 판단된다.

불용성 인산 가용화능이 우수한 *Bacillus* strain PS2와 RFO41을 대상으로 식물호르몬 생성능을 조사하였다. 두 균주 모두 여러 식물호르몬을 생성하였으며, RFO41 균주가 PS2에 비해 많은 양의 식물호르몬을 생성하였다. 이 결과는 Cohen 등(6)의 연구에서 보고된 내용, 즉 tryptophan 의존적 IAA 생합성 기작은 tryptophan의 첨가가 BIPs (bacterial IAA producers)에 의한 IAA의 생성으로 식물이 더 잘 자랄 수 있도록 한다는 내용과 부분적으로 일치하지만, tryptophan 의존적 IAA 생합성 기작 이외의 펩톤이 풍부한 성장배지에서도 식물호르몬이 생성될 수 있음을 조사한 Karadeniz 등(12)의 연구와 동일한 결과를 나타냈다. 이들의 식물호르몬 생성능은 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 IAA를 생성한 *Klebsiella pneumoniae* 및 0.36과 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 의 gibberellin와 zeatin을 생성한

Proteus mirabilis (12)와 비교했을 때, IAA를 제외한 giberrellin, zeatin의 생성능은 낮게 측정되었으나, 식물호르몬의 생성능을 알아보기 위해 실험에 사용한 균주의 생리학적 특성이 모두 다르기 때문에 동일한 배양 조건이라 하더라도 균주의 배양 일시 및 추출 방법 등에 따라 측정되는 식물호르몬의 생성능도 다를 것이라고 추측할 수 있다. 또한 배양 상등액뿐만이 아닌 균체 내의 식물호르몬의 잔존량도 측정하여 유리 또는 결합된 식물호르몬의 생성능을 모두 조사해야 할 필요가 있다.

불용성 인산 가용화능과 식물호르몬의 생성능을 나타낸 *Bacillus* strain PS2와 RFO41을 대상으로 토마토 씨앗의 생장촉진을 위한 발아실험을 진행하였다. 무균조건 실험에서 *Bacillus* strain PS2와 RFO41 균주의 적용에 의한 발아 토마토 묘종의 총 길이 및 무게의 변화는 phosphate를 처리하지 않았을 경우 큰 차이가 없었지만, tricalcium phosphate를 처리한 조건에서의 분리 균주 적용에 의한 발아 토마토 묘종의 변화는 RFO41 균주를 접종시킨 조건에서 증류수 실험군보다 21.1과 19.8%의 총 길이 및 무게의 증가를 보였다(Fig. 3). 증류수를 처리한 실험군에서 killed PS2의 경우에도 건조중량의 증가가 PS2와 RFO41의 결과와 유사하게 나타났는데, 이는 killed PS2에 존재하는 영양물질이 토마토 씨앗의 생체량을 증가시킨 것으로 추정된다. 한편 멸균된 토양에서 tricalcium phosphate를 첨가한 조건의 발아실험을 진행한 결과, 발아 토마토 묘종의 뿌리와 줄기의 길이는 대조군과 비교하여 PS2를 적용한 실험군이 26.8과 34.8%, 그리고 RFO41 처리 실험군이 45.5와 36.5% 만큼 증가하였으며, RFO41이 PS2보다 토마토 묘종의 생장촉진능이 더 높았다(Fig. 4). 이 결과는 *Acidithiobacillus* sp.가 rock phosphate가 적용된 토양 내에서 콩의 건조중량을 대조군에 비하여 8.68% 증가시켰다는 보고(24)에 비하여 RFO41 균주가 더 높은 생장촉진 효과를 나타낸다는 것을 나타낸다.

생장촉진 결과(Fig. 3, 4)를 비교하면 토마토 묘종의 생장촉진에 있어서 불용성 인산의 첨가와 인산 가용화능을 가지고 있는 균주의 동시 적용은 뿌리와 줄기의 길이 생장에 긍정적인 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 또한 토양에서 수행한 실험결과는 무균조건에서 실시한 실험 결과와 비교할 때 발아 토마토 묘종의 뿌리 및 줄기의 길이 증가율이 더 높았다. PGPB가 생성하는 식물호르몬의 적용에 따른 식물의 반응은 뿌리 주변에서 생성되는 IAA, IBA의 양과 농도변화에 따른 식물 조직의 민감성에 있다. 예를 들어 뿌리는 IAA의 농도에 가장 민감한 기관인데, IAA의 양이 증가할수록 뿌리의 초기 길이생장이 증가하며, 뿌리에 대하여 지속적인 이득을 나타낸다는 결과가 보고된 바 있다(14). 이는 균주의 처리방법별 식물생장 촉진효과는 균주의 종류와 농도에 따라 각각 다르게 나타나는 것으로 보이며, 이러한 식물생장촉진 근권 미생물이 갖추어야 할 조건으로는 작물의 씨앗에 입식할 수 있어야 하고, 운동성, 뿌리분비물에 대한 화학반응 등이 뛰어나야 되는 것으로 보고한 바 있는 연구(3, 25)와 같은 결과로 나타났다. 즉 식물에 대한 입식능력과 식물로부터 생성되는 뿌리 분비물에 대한 미생물의 생장반응은 기주식물로 이용된 토마토와의 상호작용 및 다른 근권 미생물과의 작용에서

필수적인 요인이라는 보고(23)와 같이 분리균주인 PS2와 RFO41은 식물-미생물, 미생물-미생물의 관계에서 긍정적인 효과를 나타낸다고 판단할 수 있다.

토마토 씨앗의 발아 생장촉진 실험 결과 실험실 조건에 적용된 *Bacillus* sp. PS2와 RFO41은 토마토 씨앗의 발아와 생장촉진에 우수한 효과가 있음이 증명되었다. 이 연구는 광합성 미생물 배양액의 종자침지를 통한 토마토의 생장촉진 효과를 확인한 기존의 보고(4)와 유사한 결과로 분리균주인 PS2와 RFO41에 의한 불용성 인산 가용화능과 식물호르몬의 생성능, 그 밖의 다양한 생리활성 물질의 작용에 기인한 것으로 사료된다. 또한 두 균주는 실제 토양에 적용하였을 때 식물 생장에 크게 도움이 될 것으로 생각되며, 미생물비료로 활용될 수 있는 가능성이 존재한다고 판단할 수 있다. 그러나 무균조건 실험과 소규모 토양 내에서 실시한 발아실험은 실제 농경지 환경과 매우 다르며, 또한 토양에 존재하는 미생물 등 다양한 환경요인으로 인하여 분리균주의 토마토 씨앗에 대한 입식능력을 증가시킬 수 있는 연구와 함께 근권세균이 생성하는 식물호르몬이 토양 내 작물의 뿌리에서 어떠한 영향을 미치는지, 분리균주의 적용이 작물의 성분 변화에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 대규모 현장연구가 진행되어야 할 것이다. 그리고 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)와 같은 분자생물학적인 방법(19)을 이용하여 토양에 적용한 각각의 분리균주가 토양 내에서 얼마나 많은 개체군을 유지하며, 각각의 생리활성을 지속적으로 나타내고 있는가에 대한 연구가 필요하다.

감사의 말

이 연구는 농촌진흥청의 2007년 현장협력기술개발과제로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 강선철, 최명철. 1998. 인산가용화 사상균 *Penicillium* sp. PS-113 균주의 분리 및 배양 특성. 한국생물공학회지 13, 497-501.
2. 전중수, 안태석, 송홍규. 2003. 식물생장을 촉진하는 토양세균들의 indoleacetic acid 생성능과 인산 가용화능. 기초과학연구 14, 183-192.
3. Arora, D.K., A.B. Filonow, and J.L. Lockwood. 1983. Bacterial chemotaxis to fungal propagules in vitro and soil. *Can. J. Microbiol.* 29, 1104-1109.
4. Cho, J.Y., K.C. Nah, and S.J. Chung. 1998. Effects of seed immersion and bacterialization into peat moss compost with culture solution of photosynthetic bacteria on the early growth of tomato plug seedlings. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 39, 24-29.
5. Cleaceri, L.S., A.E. Greenberg, and A.D. Eaton. 1998. Standard methods for examination of water and wastewater. 20th (ed). APHA-AWWA-WEF. Washington, D.C., USA.
6. Cohen, J.D., J.P. Slovin, and A.M. Hendrickson. 2003. Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *TREND Plant Sci.* 8, 197-199.
7. De Fritas, J.R., M.R. Banerjee, and J.J. Germida. 1997. Phosphate-

- solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Bio. Fertil. Soils* 24, 358-364.
8. Dey, R., K.K. Pal, D.M. Bhatt, and S.M. Chauhan. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis phygaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 159, 371-394.
 9. Freitas, J.R., M.R. Banerjee, and J.J. Germida. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils* 24, 358-364.
 10. Gray, E.J. and D.L. Smith. 2005. Intracellular and extracellular PGPR commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37, 395-412.
 11. Hilda, R. and F. Reynaldo. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17, 319-339.
 12. Karadeniz, A., S.F. Topcuoglu, and S. Inan. 2006. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World. J. Microbiol. Biotech.* 22, 1061-1064.
 13. Leach, A.M., D.L. Burden, and G.M. Hieftje. 1999. Radioluminescence detector for the flow injection determination of phosphorus as vanadomolybdophosphoric acid. *Anal. Chim. Acta* 402, 267-274.
 14. Leveau, J.H.J. and S.E. Lindow. 2005. Utilization of plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2365-2371.
 15. Lifshitz, R., K.W. Kilepper, M. Kozlowski, C. Simonson, J. Carlson, E.M. Tipping, and I. Zaleska. 1987. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic condition. *Can. J. Microbiol.* 33, 390-395.
 16. Macros, A., S. Gagne, and H. Antoun. 1995. Effect of compost on rhizosphere microflora of tomato and on the incidence of plant growth-promotion rhizobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 194-199.
 17. Mayak, S., T. Tarosh, and B.R. Glick. 2004. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci.* 166, 525-530.
 18. Murphy, J. and J.P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31-36.
 19. Muzyer, G., C.W. Ellen, and G.U. Andre. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
 20. Narsian, V. and H.H. Patel. 2000. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 32, 559-565.
 21. Patten, C.L. and B.R. Glick. 2002. Role of *pseudomonas putida* indolacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3795-3801.
 22. Pompei, R., G. Cornaglia, A. Ingiani, and G. Satta. 1990. Use of a novel phosphatase test for simplified identification of species of the tribe *Proteeae*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1214-1218.
 23. Scher, F.M., J.W. Kloepper, and C.A. Singleton. 1985. Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates *in vitro* and in soil. *Can. J. Microbiol.* 31, 570-574.
 24. Seymour, P.W.K. and N. Doetsch. 1973. Chemotaxis responses by motile bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 78, 287-296.
 25. Stamford, N.P., P.R. Santo, C.E.S. Snatos, A.D.S. Freitas, S.H.L. Dias, and M.A. Lira, Jr. 2007. Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* for yam bean grown on a Brazilian tableland acidic soil. *Biores. Technol.* 98, 1311-1318.
 26. Whitelaw, M.A., T.J. Harden, and K.R. Helyar. 1999. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem.* 31, 655-665.

(Received November 30, 2007/Accepted December 17, 2007)

ABSTRACT : Growth Promotion of Tomato Seedlings by Application of *Bacillus* sp. Isolated from Rhizosphere

Kang-Hyeong Lee and Hong-Gyu Song* (Division of Life Sciences, and Research Institute of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

Two bacterial strains isolated from soil (*Bacillus subtilis* strains: PS2 and RFO41) were evaluated to determine their promoting effect on the growth of tomato seedling under axenic and pot conditions. The production of phytohormone, such as indole-3-acetic acid, indole-3-butyric acid, gibberellin and zeatin by these two strains was investigated as possible mechanisms for plant growth stimulation. Both PS2 and RFO41 were shown to produce various phytohormones, and the production of phytohormones was stimulated by the addition of peptone-rich brain heart broth medium. In addition, these bacteria exhibited high levels of phosphatase activity, which ranged from 2.18 to 2.7 μM p-nitrophenol/ml/hr. PS2 and RFO41 were applied to the pot test for growth of tomato seed with phosphate. Root and shoot lengths of germinated tomato after 15 days were 45.5% and 36.5% longer than that of control in RFO41 treated samples, respectively. *Bacillus* sp. PS2 and RFO41 may have a potential for biofertilizer in the agriculture.