

Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria *Pantoea* Species as a Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Chang Yeon Yun and Yong Hwa Cheong*

Department of Bio-Environmental Science, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

Received July 21, 2016 / Revised August 16, 2016 / Accepted August 18, 2016

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) have gained worldwide importance and acceptance due to their agricultural benefits. These microorganisms are potential tools for sustainable agriculture, with effects on plant growth, biofertilization, induced systemic resistance, and biocontrol of plant pathogens. In this study, four different *Pantoea* species were isolated from field soil, and their plant growth-promoting characteristics were studied. Based on 16S rDNA gene sequencing analyses, they were grouped into *Pantoea ananatis*, *Pantoea citrea*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea vagans* and named as Pa1, Pc1, Pd1, Pv1, respectively. All of these strains have their ability for solubilization of insoluble phosphate depending on pH decrease at the range around pH 5 at 1 days after inoculation and production of plant hormone indole acetic acid (IAA) with 85.3±16.3 µg/ml of Pa1, 183.9±16.8 µg/ml of Pc1, 28.8±17.3 µg/ml of Pd1 and 114.1±16.5 µg/ml of Pv1, respectively. Pa1, Pc1 and Pd1 also have high activity for production of gibberellin (GA₃) hormone with 331.1±19.2 µg/ml of Pa1, 288.5±16.8 µg/ml of Pc1, 309.2±18.2 µg/ml of Pd1, but Pv1 does not. Furthermore, all these species have significantly promoted the growth of the lettuce seedling plants at the range around 32~37% for fresh weight and 10~15% for shoot length enhancement, so that these microbe could be used as a potential bio-fertilizer agents.

Key words : Biofertilizer agent, IAA and GA₃ production, *pantoea* species, phosphate solubilizing bacteria (PSB), plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)

서 론

일반적으로 토양에서 식물생장은 많은 비생물학적 및 생물학적 요인들에 의해 영향을 받는다. 식물의 뿌리 주변 영역인 근권의 환경조건이 식물생장에 중요한 역할을 하며, 특히 토양미생물 활동의 영향을 받는 것으로 알려져 있다[2].

식물생장촉진미생물(plant growth-promoting rhizobacteria: PGPR)은 많은 종류의 식물 근권에 존재하면서 식물에 유익한 생장촉진효과를 나타낸다. 식물에 영향을 미치는 직·간접적 메커니즘으로는 인돌 아세트산(IAA) 혹은 지베렐린(GA) 식물생장 호르몬 생성, 질소고정(nitrogen fixation), 무기 인산염 등의 영양소 가용화 및 식물병원성 균주에 대한 저항성 증진 등으로 알려지고 있다. 지금까지 많은 미생물들이 식물생장촉진미생물로 알려지고 있으며 특히 *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus* 및 *Serratia* 등의 다양한 미생물들이 식물생장을 촉진시키는 것으로 잘 알려져 있다[1, 7, 9, 13, 19-20, 27, 34].

*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3298, Fax : +82-61-751-8011

E-mail : yhcheong@suncheon.ac.kr

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.

특히 인산(phosphorus: P)은 많은 종류의 식물 필수영양소들 중에서 질소(nitrogen: N) 다음으로 중요한 식물의 핵심 영양요소이면서 식물의 광합성 작용, 에너지 전달, 신호 전달, 고분자 물질의 생합성, 호흡 및 콩과 식물에서의 질소 고정 작용 등을 포함하여 거의 모든 주요 대사 과정에서 중요한 역할을 담당하고 있다[16, 26]. 비록 인산은 토양에서 무기 또는 유기형태로 풍부하게 존재하고 있지만 대부분 흡수할 수 없는 불용성 형태로 존재하기 때문에 식물생장의 주요 제한인자로 작용하고 있다[23]. 이런 불용성 형태의 인산 화합물을 가용성형태로 전환시키는데 중요한 역할을 하는 것 중 하나가 인산 가용화 미생물(phosphate solubilizing bacteria: PSM)로 알려져 있다[15, 24-25]. 지금까지 많은 인산 가용화 미생물들이 보고되고 있으며 이들 중 특히 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pantoea* 속등이 주요 미생물로 알려지고 있다[12, 25, 30]. 많은 인산 가용화 미생물들은 인산 가용화 활성뿐만 아니라, 인돌 아세트산 호르몬 생성 능력을 가지면서 식물생장을 촉진시키는 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[19, 25, 30]. 따라서 현재 식물생장 촉진효과를 보이는 많은 미생물들의 중요성이 대두되고 있으며, 특히 농업적으로 유익한 미생물들 작물에 대한 생물비료 재료로 중요하게 사용할 수 있으므로, 인산 분해 미생물을 포함한 다양한 식물생장 촉진 미생물들의 분리 및 특성을 규명하는 연구들이 널리 수행되고 있다[1, 34].

Pantoea 속 미생물들은 토양, 물 등 자연환경에 널리 분포하

며 현재까지 일부 종들이 무기 인산 분해 능력, 식물 성장 촉진 및 식물 병 저항성 증진 등의 유익한 기능을 보이는 것으로 알려지고 있다[4-6, 8, 31, 35].

따라서, 본 연구는 농업적으로 유익한 다양한 식물 성장 촉진 미생물을 분리하고자, 토양으로부터 서로 다른 네 종류의 *Pantoea* 종들을 분리 하여 그들의 식물 성장 촉진 특성을 규명하였다. 분리된 모든 미생물들은 높은 무기 인산 가용화, 인돌 아세트산 및 지베렐린 생성 활성을 나타내었고, 어린 상추 (lettuce)의 성장을 촉진시키는 활성을 보였다.

재료 및 방법

인산 분해 활성 균주 분리 및 16S rDNA 동정

인산 분해 활성을 가진 미생물을 분리하고자 순천시 서면 지분리 소재 순천대학교 부속농장의 유기농 재배지 토양으로부터 시료를 채취하여 0.5% 인산칼슘[Ca₃(PO₄)₂]를 포함하는 Pikovskaya agar배지에 도말하여 인산 분해 활성을 보이는 균주를 분리하였다[22]. 분리된 미생물로부터 genomic DNA를 분리하여 16S rDNA 영역을 27F primer (5'-AGAGTTTGA TCCCTGGCTCAG-3') 과 1492R primer (5'-GGTTACCTTGT TAGGACTT-3')을 이용하여 연쇄 증폭 반응(polymerase chain reaction: PCR)을 이용하여 확보하였다. 확보된 16S rDNA 연쇄 증폭 반응 산물을 Solgent 회사(Daejeon, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하여 염기서열을 확보한 다음, BLAST analysis와 NCBI database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 이용하여 유사염기서열을 분석하였다. Phylogenetic tree는 CLUSTAL X 프로그램을 이용하여 neighbor-joining 방법과 MEGA4 프로그램을 활용하여 분석하였다[17, 28, 33].

인산분해 활성 및 pH 측정

미생물들의 인산 분해 활성을 정량적으로 측정하고자 0.5% Ca₃(PO₄)₂가 함유되어있는 Pikovskaya 용액배지에 균을 접종한 다음, 30°C 배양기에서 1일, 2일, 3일 및 5일간 배양한 후 원심 분리한 다음 미생물 배양 상등액을 확보하여 molybdenum-blue 방법[21]을 이용하여 인산 분해 활성을 조사하였고, 또한 pH 변화를 pH 미터기를 이용하여 정량적으로 분석하였다.

인돌 아세트산 및 지베렐린 생성 활성 측정

인돌 아세트산 생성 활성은 Leveau 와 Lindow 방법[18]에 따라 측정하였다. 분리된 균주를 0.2% tryptophan을 함유하고 있는 King's medium에 24시간 배양한 다음, 배양액 상등액과 Salkowski's reagent를 1:2(v/v)의 비율로 혼합 한 다음, Gordon 과 Weber 방법[10]을 바탕으로 분홍색으로 발색되는 정도를 흡광 광도계 (UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu)를 이용하여 530 nm에서 흡광도로 측정하였다.

지베렐린 생성 활성 측정은 배양액 상등액 1 ml과 에탄올 1 ml 그리고 3.75 M 염화수소(HCl) 8 ml를 첨가하여 10 ml 되게 한 후 10초간 혼합하여 실온에서 5분 정도 둔 다음 흡광 광도계로 254nm 흡광도를 측정하여 정량적으로 분석하였다 [11]. 모든 실험은 3회 반복 수행 하였으며 정량적인 분석을 위하여 인돌 아세트산(IAA)과 지베렐린(GA₃) 표준용액을 이용하여 표준곡선을 활용하여 정량적인 분석을 수행하였다.

식물 성장 촉진 활성 측정

분리된 미생물의 식물 생육 촉진 능력을 측정하기 위하여, 상추 생육 비교 실험을 수행하였다. 분리된 미생물을 LB배지에 30°C, 200 rpm 조건의 배양기에서 overnight 배양 한 후, 6일간 생육시킨 상추가 존재하는 pot 당 균주 수를 10⁸ pfu/ml 농도에 맞춰 각각 100 ml를 접종 한 다음, 2주 후에 생체량 및 상추부 성장길이를 측정하여 비교하였다. 모든 실험은 3반복 이상 수행하여 평균값을 측정하였다.

통계분석

모든 실험 data는 SAS package [29]를 이용한 ANOVA (analysis of variance)에 적용하여 분석하였다. 다양한 처리 방법들 사이의 차이는 5% ($p \leq 0.05$) 확률 유의 수준에 해당하는 LSD (least significant differences test)를 사용하여 비교 하였다[32]. 모든 처리는 3회 반복 하였다.

결과 및 고찰

인산 분해 미생물 *Pantoea* species 분리 및 16S rDNA 분자생물학적 동정

인산분해 능력을 가진 미생물을 분리하고자 순천시 서면 지분리 소재 순천대학교 부속농장의 유기농 재배지 토양으로부터 채취한 시료를 0.5% Ca₃(PO₄)₂가 함유되어있는 Pikovskaya agar 배지에 도말하여 3일 배양 후 투명한(clear zone)을 보이는 약 50여종의 미생물을 확보하였다. 이들 분리된 미생물들을 16S rDNA 염기서열 분석방법으로 확인한 결과, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Pantoea*속 미생물들로 확인되었다. 이들 중 서로 다른 네 종류의 *Pantoea* species를 각각 Pa1, Pc1, Pd1, Pv1으로 명명한 다음 무기 인산염 분해 활성 등 식물성장 촉진 능력을 규명하고자 하였다. 16S rDNA 염기서열을 이용하여 BLAST search 와 phylogenetic tree 분석방법에 의하여 미생물을 분석한 결과, Pa1는 *Pantoea ananatis* LMG2665와 99% 유사성, Pc1는 *Pantoea citrea* LMG22049와 99% 유사성, Pd1는 *Pantoea dispersa* LMG2603와 99% 유사성, Pv1는 *Pantoea vagans* LMG241999와 95% 유사성을 각각 보였다(Fig. 1).

*Pantoea*속 미생물들은 다양한 자연환경에 존재하고 있으며 현재까지 20여종 이상이 확인되고 있다[35]. 이들 중 *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea eucalypti*, *Pantoea crpri-*

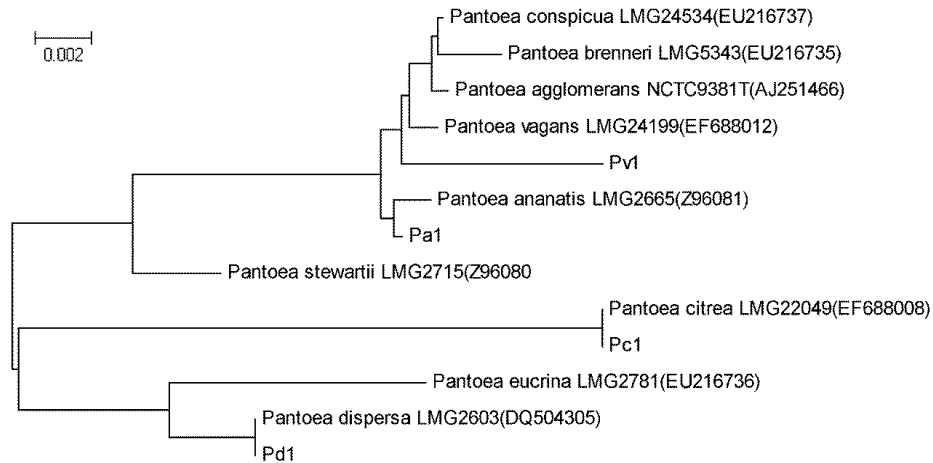


Fig. 1. Phylogenetic tree between isolated Pa1, Pc1, Pd1 and Pv1 and other related *Pantoea* species based on 16S rRNA gene sequences. The GenBank accession number is given for each organism and the scale bar indicates 0.002 substitutions per nucleotide position.

pedii 등 일부 종들은 높은 인산분해활성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있고 아울러 식물생장촉진 및 식물 병 저항성 증진 등의 유익한 기능을 보이는 것으로 연구 되고 있다[4-6, 8, 31]. 따라서 본 연구에서 분리된 서로 다른 네 종류의 *Pantoea* 미생물들의 식물 생장 촉진 활성에 대한 특성을 비교 분석하고자 하였다.

인산 분해 활성 비교 측정

분리 확보된 네 종류의 *Pantoea* species (Pa1, Pc1, Pd1, Pv1)의 무기인산분해능력을 확인하고자 각각 미생물을 LB 용액배지에서 overnight 배양한 후 10^8 pfu/ml 농도의 균주를 각각 50 μ l와 500 μ l를 $Ca_3(PO_4)_2$ 가 함유되어있는 Pikovskaya agar와 liquid 용액(10 ml)에 접종한 후 투명한 생성 활성과 흡광도를 통한 정량적인 분석을 수행하였다(Fig. 2). 고체배지에서 모든 균주들은 매우 높은 무기 인산 분해 능력을 보이는 활성을 보였다(Fig. 2A). 무기 인산 분해능력을 정량적으로 분석한 결과(Fig. 2B)에 의하면, 분리된 네 종류의 *Pantoea* 미생물은 모두 접종 후 1일차에 가장 높은 활성(113.2 \pm 6.8 mg/l for Pa1, 107.1 \pm 5.9 mg/l for Pc1, 90.4 \pm 6.2 mg/l for Pd1, 122.5 \pm 7.5 mg/l for Pv1)을 보인 후 점차적으로 감소하는 경향을 보였다. 같은 조건에서의 pH변화를 0일, 1일, 2일, 3일, 5일 배양된 상등액을 측정된 결과(Fig. 2C)에 의하면, Pa1의 경우는 각각 6.2, 5.1, 5.9, 6.3, 6.6, Pc1의 경우는 각각 6.1, 5.0, 5.9, 6.1, 6.3, Pd1의 경우는 각각 6.2, 5.2, 5.6, 6.0, 6.6, Pv1의 경우는 각각 6.1, 4.9, 5.9, 6.1, 6.5값을 보였다. 따라서 미생물의 인산분해 활성은 pH가 가장 낮은 1일차에 가장 높은 활성을 보이다가 pH가 점차 증가함에 따라 분해활성이 낮아지는 결과를 보이는 것으로 인산분해활성은 pH 감소와 상당한 연관성이 있는 것으로 나타났다.

일반적으로 미생물에 의한 무기 인산 분해 활성은 미생물이

생성하는 글루코닉산(gluconic acid) 등의 유기산에 의해 중요하게 영향을 받는 것으로 알려져 있으며 많은 인산분해 미생물의 경우 인산분해 활성은 pH감소와 상관성을 보여주었다[4, 30-31]. 최근에는 발표된 인산 분해 미생물인 *Pantoea cypripedii* PS1의 경우에도 인산 분해 활성이 초기 2일차에 가장 높은 활성을 보이다가 점차적으로 감소하는 경향을 보였고 pH변화도 본 연구결과와 유사하게 인산 분해 활성이 높은 2일차에 가장 낮은 수치를 보이다가 점차적으로 증가하는 결과를 보였다[31]. 따라서 본 연구에서 분리된 네 종류의 미생물들 역시 다양한 유기산 생성으로 pH를 감소시키면서 무기인산 분해활성을 보이는 것으로 생각된다.

식물호르몬 인돌 아세트산 및 지베렐린 생성 활성

지금까지 보고된 많은 인산 분해 미생물의 경우 다양한 기작으로 식물생장을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 특히 식물의 대표적인 생장 호르몬인 인돌 아세트산과 지베렐린 생성으로 식물생장을 촉진하는 기작이 대표적으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 분리된 인산 분해 미생물의 인돌 아세트산과 지베렐린 생성 활성을 측정된 결과 대부분의 미생물의 경우 매우 높은 인돌 아세트산과 지베렐린 생성 활성을 보였다(Fig. 3). 지베렐린 생성의 경우, Pa1, Pc1, Pd1의 경우 각각 331.1 \pm 19.2 μ g/ml, 288.5 \pm 16.8 μ g/ml, 309.2 \pm 18.2 μ g/ml 농도의 매우 높은 활성을 보인 반면 Pv1의 경우 10.2 \pm 11.5 μ g/ml의 아주 낮은 활성을 보였다(Fig. 3A). 인돌 아세트산 호르몬 생성 활성은 네 종류의 미생물인 Pa1, Pc1, Pd1, Pv1 모두 높은 활성을 보였고, 생성농도의 경우 각각 85.3 \pm 16.3 μ g/ml, 183.9 \pm 16.8 μ g/ml, 28.8 \pm 17.3 μ g/ml, 114.1 \pm 16.5 μ g/ml 수치를 보였다(Fig. 3B).

옥신(auxin)은 대표적인 식물 생장 호르몬으로서 세포의 생장과 분화, 결눈 생장, 뿌리신장, 꽃과 열매의 발달 등의 기능

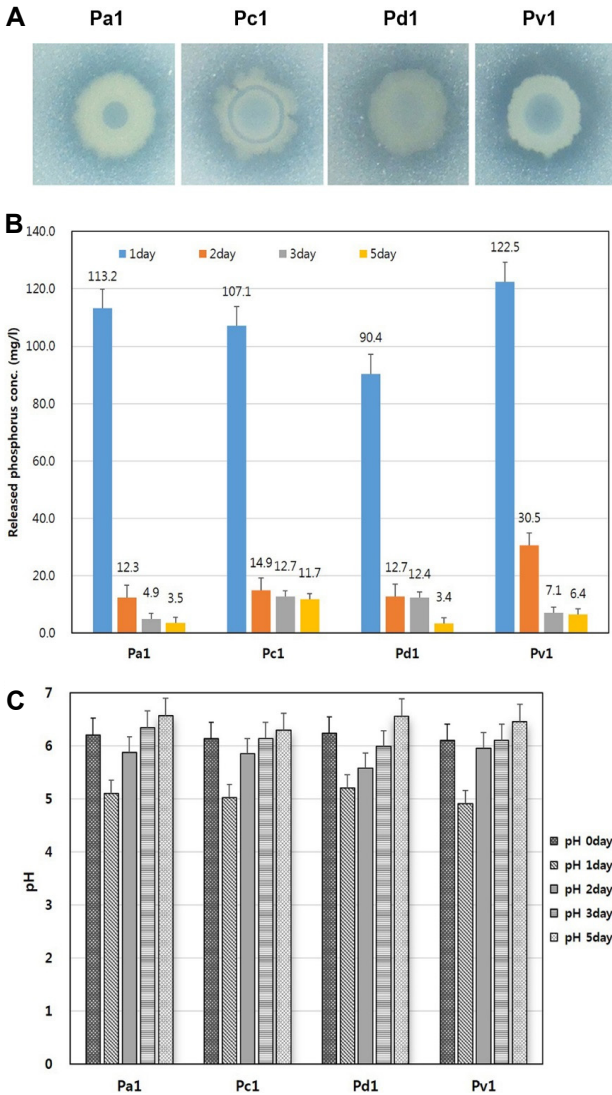


Fig. 2. Plate assay (A) and liquid assay (B) for phosphate solubilizing activity and pH change (C) of four *Pantoea* species (Pa1, Pc1, Pd1 and Pv1). The numbers above the bars mean the average number each condition, respectively, from 3 replicate experiments. Error bars mean the SD by LSD at $p \leq 0.05$, respectively.

을 수행하는데, 일부 세균들이 식물 근권에서 옥신을 생성 후 분비하고 이를 식물이 흡수하여 생장에 이용할 수 있다. 인돌 아세트산은 대표적인 옥신 계통의 호르몬으로 줄기 절편의 길이 생장을 촉진하고 줄기와 뿌리의 발달, 꽃과 과실의 발생, 그리고 굴성 운동 등을 유도한다. 다른 대표적인 식물호르몬인 지베렐린(GA₃)은 diterpenoid 복합체로서 식물의 생장과 종자의 발아, 줄기의 신장, 잎의 성장, 개화유도 및 휴면 타파 그리고 과육의 성숙을 조절한다고 알려져 있다. 특히 대부분의 인산분해미생물과 식물생장촉진미생물은 일반적으로 인돌 아세트산과 지베렐린 호르몬 생성하며 궁극적으로 식물생장을 촉진하는 기능을 가지는 것으로 알려져 있다[1, 3, 14,

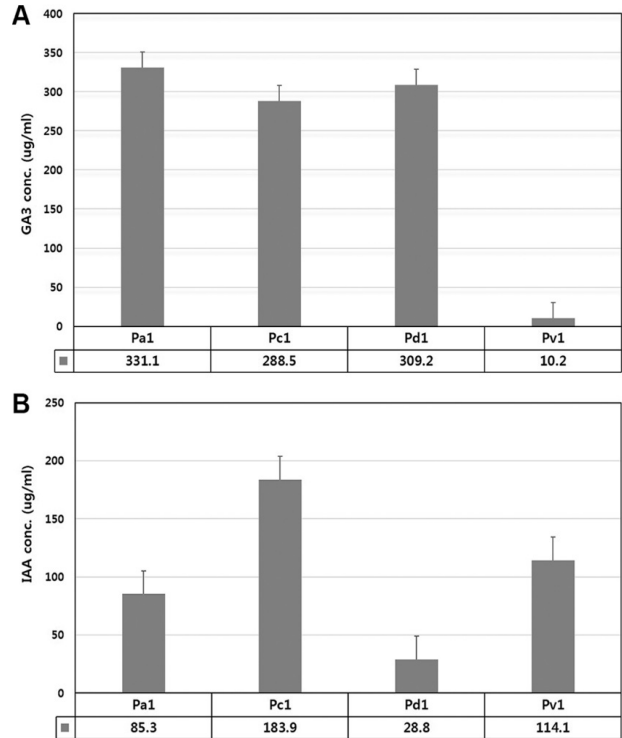


Fig. 3. Production of plant hormone GA3 (A) and IAA (B) from four *Pantoea* species (Pa1, Pc1, Pd1 and Pv1). The numbers below the bars mean the average number each condition, respectively, from 3 replicate experiments. Error bars mean the SD by LSD at $p \leq 0.05$, respectively.

18-19, 31]. 따라서 본 연구에서 분리된 네 종류의 인산분해 미생물인 *Pantoea* species의 경우에도 인산 분해 능력뿐만 아니라 인돌 아세트산과 지베렐린 같은 식물생장호르몬을 생성함으로써 잠재적으로 식물생장촉진 활성을 가지는 것으로 생각된다.

식물 생장 촉진 활성

분리된 네 종류의 *Pantoea* 균주들이 인산분해활성, 식물호르몬 인돌 아세트산과 지베렐린 생성능력을 가지고 있으므로, 다른 식물 생장 촉진 미생물들처럼 식물생장촉진 활성을 검증하고자 어린 상추 식물을 대상으로 균주 접종 후 식물의 생장 특성을 조사하였다(Fig. 4). 처리된 네 종류의 미생물 모두 식물의 생장을 촉진시키는 활성으로 보였으며 생체량(fresh weight)의 분석결과에 의하면 대조구의 경우 0.19 ± 0.06 g/plant를 보인 반면, 처리구의 경우 $0.25 \sim 0.26 \pm 0.08$ g/plant를 보였으며 대조구에 비해 상대적으로 32~37%의 증진효과를 보였다. 상층부 길이생장(shoot length)의 경우에도 대조구에 비해 10~15% 증가를 보였다.

많은 식물 생장 촉진 미생물은 인돌 아세트산 혹은 지베렐린 등의 식물생장 호르몬 생성 및 무기 인산염등 영양소의 가용화 작용으로 식물생장을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

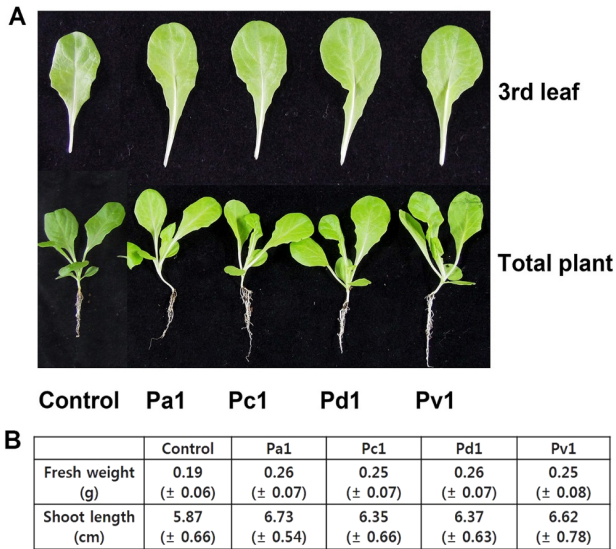


Fig. 4. Effects of isolated *Pantoea* spp (Pa1, Pc1, Pd1 and Pv1) inoculation on growth of lettuce seedlings. Photographs (A) were taken at 2 weeks after inoculated. The numbers (B) mean the average number on fresh weight (g/plant) and shoot length (cm/plant) from 10 independent plants each condition, respectively. Mean values (mean +/- SD) sharing the same letter do not differ significantly by LSD at $p \leq 0.05$. All data was analyzed from 3 replicate experiments.

많은 미생물들 중에서 *Pantoea*속에 속하는 *Pantoea agglomerans*, *Pantoea eucalypti*, *Pantoea cypripedii*, *Pantoea ananatis* 등의 미생물들의 경우에도 다른 식물 성장 촉진 미생물처럼 인산 가용화 활성뿐 아니라, 인돌 아세트산 또는 지베렐린 호르몬 생성 능력을 가지고 있으며 아울러 식물생장을 촉진 시키는 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다[4-6, 8, 31].

전 세계적으로 지속 가능한 친환경 농업의 관심증대로 인하여 생물비료와 생물농약의 중요성이 대두되고 있으며 많은 연구자들에 의해 다양한 유용미생물들이 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서 분리된 네 종류의 *Pantoea ananatis* (Pa1), *Pantoea citrea* (Pc1), *Pantoea dispersa* (Pd1), *Pantoea vagans* (Pv1) 미생물들 역시 친환경 농업에 적용될 수 있는 인산 분해 활성, 식물 성장 호르몬 생성 활성 등 다양한 생물비료특성 및 식물 성장 촉진 특성을 보이므로 이들 미생물을 미생물비료 재료로 경작지에 적용한다면 농가의 수익증대에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 순천대학교 학술기반조성비로 연구되었습니다.

References

- Bhattacharyya, P. N. and Jha, D. K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1327-1350.
- Bloemberg, G. V. and Lugtenberg, B. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 343-350.
- Bottini, R., Cassan, F. and Piccoli, P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 497-503.
- Castagno, L. N., Estrella, M. J., Sannazzaro, A. I., Grassano, A. E. and Ruiz, O. A. 2011. Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *J. Appl. Microbiol.* **110**, 1151-1165.
- Dastager, S. G., Deepa, C. K., Puneet, S. C., Nautiyal, C. S. and Pandey, A. 2009. Isolation and characterization of plant growth-promoting strain *Pantoea* NII-186. From Western Ghat forest soil, India. *Let. Appl. Microbiol.* **49**, 20-25.
- da Silva, J. F., Barbosa, R. R., de Souza, A. N., da Motta, O. V., Teixeira, G. N., Carvalho, V. S., de Souza, A. L. and de Souza Filho, G. A. 2015. Isolation of *Pantoea ananatis* from sugarcane and characterization of its potential for plant growth promotion. *Genet. Mol. Res.* **14**, 15301-15311.
- Dey, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M. and Chauhan, S. M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* **159**, 371-394.
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M. and Milanowski, J. 2016. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Ann. Agric. Environ. Med.* **23**, 206-222.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **4**, 1109-1114.
- Gordon, S. A. and Weber, R. P. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol.* **2**, 192-195.
- Holbrook, A., Edge, W. and Bailey, F. 1961. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. *Adv. Chem. Ser.* **28**, 159-167.
- Illmer, P. A. and Schinner, F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem.* **24**, 389-395.
- Jeon, J. S., Lee, S. S., Kim, H. Y., Ahn, T. S. and Song, H. G. 2003. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *J. Microbiol.* **41**, 271-276.
- Jha, Y. and Subramanian, R. B. 2014. Characterization of root-associated bacteria from paddy and its growth promotion efficacy. *3 Biotech.* **4**, 325-330.
- Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S. and Rasheed, M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J. Agric. Biol. Sci.* **1**, 48-58.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M. and Wani,

- P. A. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective. *Arch. Agron. Soil Sci.* **56**, 73-98.
17. Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. and Nei, M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244-1245.
18. 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.
19. Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 541-556.
20. Marques, A. P. G. C., Pires, C., Moreira, H., Rangel, A. O. S. S. and Castro, P. M. L. 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 1229-1235.
21. Murphy, J. and Riley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.* **27**, 265-270.
22. Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* **17**, 362-370.
23. Rengel, Z. and Marschner, P. 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytol.* **168**, 305-312.
24. Richardson, A. E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**, 897-906.
25. Rodriguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* **17**, 319-339.
26. Saber, K., Nahla, L. D. and Chedly, A. 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agron. Sustain. Dev.* **25**, 389-393.
27. Sahin, F., Cakmakci, R. and Kanta, F. 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil.* **265**, 123-129.
28. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
29. SAS 1999. SAS/STAT User's Guide Version 8. SAS. Cary. NC.
30. Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. and Gobi, T. A. 2013. Phosphate solubilizing microbe: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* **2**, 587.
31. Singh, O., Gupta, M., Mittal, V., Kiran, S., Nayyar, H., Gulati, A. and Tewari, R. 2014. Novel phosphate solubilizing bacteria '*Pantoea cypripedii* PS1' along with *Enterobacter aerogenes* PS16 and *Rhizobium ciceri* enhance the growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Growth Regul.* **73**, 79-89.
32. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1980. Principles and Procedures of Statistics 2nd Edn. New York, NY: McGraw Hill Book Co. Inc.
33. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The clustal x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.
34. Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **255**, 571-586.
35. Walterson, A. M. and Stavrinides, J. 2015. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol.* **39**, 968-984.

초록 : 식물 성장 촉진 활성을 가진 인산분해 미생물 *Pantoea* 종의 분리 및 특성 규명

윤창연 · 정용화*

(순천대학교 생명산업과학대학 생물환경학과)

식물성장촉진미생물(PGPR)은 농업생산성에 전세계적으로 매우 중요한 기작과 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 이들 미생물들은 식물생장조절, 생물비료, 식물의 병 저항 및 방제 등 다양한 기작으로 식물생장을 촉진하면서 유용하게 이용되고 있다. 본 논문에서는 토양으로부터 네 종류의 서로 다른 *Pantoea* 종을 분리하여 식물생장 특성을 규명하고자 하였다. 16S rDNA 유전자의 분석에 의하면, 이들은 각각 *Pantoea ananatis*, *Pantoea citrea*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea vagans*으로 확인되었고 각각 Pa1, Pc1, Pd1, Pv1으로 명명하였다. 분리된 모든 종들은 pH 5정도의 수치를 보이는 접종 1일차에 매우 높은 인산 분해 활성을 보였으며 배지의 pH 감소와 높은 상관성을 보였다. 또한 네 종류의 모든 Pa1, Pc1, Pd1, Pv1종은 각각 85.3±16.3 µg/ml, 183.9±16.8 µg/ml, 28.8±17.3 µg/ml, 114.1±16.5 µg/ml 농도의 매우 높은 인돌 아세트산 생성활성을 보였다. 지베렐린 생성의 경우 Pa1, Pc1와 Pd1는 각각 331.1±19.2 µg/ml, 288.5±16.8 µg/ml, 309.2±18.2 µg/ml 농도로 높은 활성을 보였지만, Pv1는 10.2±11.5 µg/ml 농도의 비교적 낮은 생성활성을 보였다. 또한 모든 분리 종들은 어린 상추식물의 경우 생체량의 32~37%, 상층부 길이의 10~15% 성장을 촉진하는 활성을 보이므로 이들 분리된 미생물을 잠재적으로 식물성장촉진을 위한 미생물비료제제로 사용할 수 있다고 생각된다.