

토양에서 분리한 *Pseudomonas geniculata* ANG3, *Exiguobacterium acetylicum* ANG40 및 *Burkholderia stabilis* ANG51의 식물 성장촉진 활성 및 식물병 방제활성

김지윤¹, 김희숙¹, 이승민¹, 박혜정¹, 이상현², 장정수^{1*}, 이문현¹

¹(주)엔젤 식품연구소

²신라대학교 바이오산업학부 제약공학전공

Received: June 4, 2019 / Revised: June 19, 2019 / Accepted: June 20, 2019

Plant Growth Promoting and Disease Controlling Activities of *Pseudomonas geniculata* ANG3, *Exiguobacterium acetylicum* ANG40 and *Burkholderia stabilis* ANG51 Isolated from Soil

Ji-Youn Kim¹, Hee Sook Kim¹, Song Min Lee¹, Hye-Jung Park¹, Sang-Hyeon Lee², Jeong Su Jang^{1*}, and Mun Hyon Lee¹

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

²Major in Pharmaceutical Engineering, Division of Bioindustry, Silla University, Busan 46958, Republic of Korea

This study was conducted to investigate both plant growth-promoting and plant disease-controlling activities of bacterial strains isolated from soil. All the isolated strains were able to grow at various temperatures. All the strains, except ANG40, showed antagonistic effects against various phytopathogenic fungi. This antagonism can be ascribed to the production of siderophores and antibiotic substances. In addition, all the strains showed abilities such as nitrogen fixation, phosphate solubilization, and siderophore production. These results suggest that nitrogen, phosphorus, and iron can be converted into forms that can be easily absorbed by the plants for their growth. Analysis of the growth-promoting properties revealed that ANG51 produced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase and indole-3-acetic acid (IAA) both of which are related to ethylene production. In contrast, the other strains were found to have only IAA-producing ability. Therefore, this study suggests that *Pseudomonas geniculata* ANG3, *Exiguobacterium acetylicum* ANG40, and *Burkholderia stabilis* ANG51, which were selected through analysis of comparative advantages for both plant growth promotion and disease-controlling activity, may be used as biological agents.

Keywords: Abiotic stress, biological control, plant growth promoting rhizobacteria, Siderophore production

서론

현재 농업에 사용되는 화학비료와 무기질비료의 사용을 줄여 토양과 환경을 보호하면서 작물 재배를 활성화할 미생물 제제를 찾는 것은 중요한 의미가 있다. 근권에 존재하는 유용 미생물은 환경 오염의 주요인으로 뽑히는 화학비료의 대체제로서 주목을 받아왔으며, 식물 성장촉진 미생물로 *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*,

Arthrobacter, *Acinetobacter* 속 등이 연구되어왔다[1]. 식물 뿌리는 토양 근권에 존재하는 유용 미생물의 성장을 촉진하는 저분자 탄소원을 방출하고, 토양 근권에서 존재하는 유용 미생물은 질소 고정, 미네랄 고정 및 가용화를 통해 영양분을 제공하거나 성장호르몬인 indole-3-acetic acid (IAA) 및 siderophore 생성, 항생물질, 세포외 효소 등을 통해 식물 성장을 촉진하며 식물 병원성 곰팡이의 성장을 억제해 식물 생장에 도움을 준다[2]. 또한 유용 미생물이 생성하는 다양한 물질에 의한 식물의 유도 저항성 연구가 진행되면서 식물이 유용미생물에 의해 전신저항성이 유도되는 것이 밝혀졌으며, 이를 유도전신저항성(induced systemic resistance, ISR)으로 명명하였다[3]. 이는 식물의 생장에 대한 약해 없이 면역반

*Corresponding author

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

E-mail: jeongsu25@naver.com

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

응을 유도하기 때문에 농업에 지속 가능한 농법으로 새롭게 조명되고 있으며, 근권미생물에 의해 생성되는 phenazine, 휘발성물질, N-acyl-homoserine lactone, 세균의 salicylic acid와 siderophore 등의 외부 분비물질도 식물 면역 증진의 결정인자로 알려져 있다[3].

기온의 변화가 극심하게 나타남에 따라서 식물은 스트레스에 노출되어 성장과 발달이 저해된다. 특히 저온에서는 세포막의 구조와 조성의 변화 및 대사과정 등의 변화를 통해서 노화가 가속화되며, 고온에서는 농작물의 생산량이 많이 감소한다[4]. 따라서, 저온에 적합한 균주 및 고온에 적합한 균주에 관한 연구가 진행되어오고 있으며, 저온에 저항성을 갖는 균주로서 시베리아에서 *Exiguobacterium* 속이 발견되었다[5]. 식물은 스트레스 환경에 지속적으로 노출되면 스트레스 호르몬인 에틸렌의 합성을 촉진하여 식물의 노화나 과성숙을 유도하여 식물을 시들게 하는데, 일부 근권 미생물이 분비하는 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase는 이러한 환경 스트레스와 연관되어 있다. ACC deaminase는 스트레스 에틸렌의 전구체인 ACC를 ammonia와 α -ketobutyrate로 분해하여 식물체 내의 에틸렌의 수준을 낮춰 식물의 성장에 도움을 준다[6].

본 연구에서는 부산, 창원, 제주도 일대에서 채취한 토양과 뿌리로부터 식물 병원성에 대한 항진균 활성, 세포외 효소 활성 및 siderophore 생성능 등을 통해 분리 균주가 식물 병원성 곰팡이에 방제활성을 가지는지 확인하고자 하였다. 또한, 질소고정능, 인산 가용화능, IAA 생성능 등을 통해 식물 성장 촉진 활성뿐만 아니라 식물 병원성 곰팡이에 대해서 우수한 방제 효과를 갖는 새로운 미생물을 분리, 동정하고자 하였다.

재료 및 방법

미생물 분리

다양한 환경으로부터 우수한 균주를 탐색하기 위하여 부산, 창원, 제주도 일대의 토양을 채취하여 미생물을 분리하였다. 채취한 토양 시료 1 g을 멸균된 생리 식염수에 현탁 후 Bennet agar (BA, 1% glucose, 0.2% peptone, 0.1% beef extract, 0.1% yeast extract), glucose minimal salts agar (GMSA, 0.2% glucose, 1% yeast extract, 0.2% KH_2PO_4 , 0.3% K_2HPO_4 , 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0002% MnSO_4), potato dextrose agar (PDA, Difco™), tryptic soy agar (TSA, Difco™) plate에 도말하여 균을 분리하였다. 또한 뿌리 주변으로부터 근권 미생물을 채취하기 위해서 계면활성제인 Tween 80과 표백제인 perchloric acid (1%)를 처리하여 표면 미생물을 제거 후 BA, GMSA, PDA, TSA에 30°C에서 2일간 배양하여 순수분리하였다[7]. 그 후 분리균주를 이용하여 식물 병원성 곰팡이 길항능 조사, 세포외 효소 활성,

식물 성장촉진 활성 등을 조사하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통한 분리균의 동정

분리된 6종의 균주를 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 분리균주의 동정을 위하여 균체를 TSB에 접종하여 30°C에서 2일간 배양 후 회수하였다. 회수한 균체의 DNA는 Wizard® Genomic DNA purification kit를 이용하여 추출하였다. 16S rRNA 유전자 구간을 증폭시키기 위해서 universal primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')과 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하여 PCR로 30 cycles (94.0°C - 5분, 55.0°C - 30초, 72.0°C - 1분)을 실행하였다(TP600, Takara Bio Inc., Japan). 증폭된 PCR 산물은 PCR/Gel combo kit (Cat. No. 3412, NucleoGen, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 1% agarose gel을 이용하여 확인하였다. 염기서열 분석은 Solgent Co. Ltd. (Korea)에 의뢰하였으며, 염기서열은 NCBI의 BLAST에서 분석하였다.

분리균주의 온도에 따른 성장조건 분석

분리된 균주들의 온도에 따른 성장 조건을 확인하기 위해, 30 ml의 TSB 배지에 균주 0.5%를 접종하여 0-50°C에서 5일간 배양하여 24시간 간격으로 분광광도계(Spectrophotometer, Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 600 nm에서 optical density (OD)를 측정하였다.

분리균주의 항진균 활성 조사

분리한 균주들의 항진균 활성을 조사하기 위하여 잣곰팡이를 유발하는 *Botrytis cinerea* KACC 40574, 탄저병을 유발하는 *Colletotrichum acutatum* KACC 40801, 잎 마름병을 유발하는 *Corynespora cassiicola* KACC 44719, 시들병을 유발하는 *Fusarium* sp. KACC 40241, 고추역병을 유발하는 *Phytophthora capsici* KACC 40180, 뿌리 썩음병을 유발하는 *Rhizoctonia solani* AG-2-1 KACC 40124, 균핵병을 유발하는 *Sclerotinia sclerotiorum* KACC 40457와 같은 식물 병원성 곰팡이를 사용하였다.

식물 병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성은 PDA를 이용한 well diffusion 법을 이용하였으며, PDA 배지에 분리균주를 접종하여 검정 균주와 25°C에서 대치 배양하였다. 식물 병원성 곰팡이와 유용 미생물 간의 거리(25 mm)를 측정하여 억제율(inhibition rate)로 환산하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{(R-r)}{R} \times 100$$

R: 식물병원성 곰팡이와 분리균주 사이의 거리(25 mm)

r: 식물병원성 곰팡이의 성장 반경(mm)

Siderophore 생성능 조사

식물병원균의 길항 기작 중의 하나인 siderophore 생성능 여부를 확인하기 위해 siderophore 생성 균주 감별 배지인 chrome azurole S (CAS) blue agar plate assay 방법을 이용하였다[8]. CAS 평판 배지에 접종하여 30°C에서 4일간 배양한 후 orange halo zone 형성 유무를 관찰하였다.

분리균주의 세포의 효소활성

세포의 효소활성을 측정하기 위해서 각 starch, carboxymethyl cellulose (CMC), skim milk, xylan이 들어있는 nutrient broth에 균주를 접종하여 30°C에서 2일간 배양하였다. Amylase 활성은 Miller [9]의 방법을 일부 변형하여 시험을 진행하였으며, 배양 상등액과 1% starch 용액(50 mM sodium phosphate buffer)을 1:1로 혼합하여 반응시켰다. 반응시킨 후 color reagent 용액과 혼합하여 100°C에서 열처리 후 얼음에 냉각시킨 다음 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. Cellulase와 xylanase 활성은 Shin과 Cho [10]의 방법을 이용하여 측정하였다. 원심분리한 상등액을 각 1% CMC 용액(50 mM sodium phosphate buffer)과 1% xylan 용액(50 mM sodium phosphate buffer)을 혼합하여 50°C에서 10분간 반응시켰다. 그 다음 dinitrosalicylic acid 시약을 첨가하여 100°C에서 10분간 열처리 후 냉각시켰다. OD는 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. Protease 활성은 Oh 등[11]의 방법을 일부 변형하여 시험을 진행하였으며, 원심 분리한 상등액은 0.65% casein 용액(50 mM sodium phosphate buffer)을 혼합한 뒤 37°C에서 10분간 반응시켰다. 그 후 0.44 M trichloroacetic acid를 첨가하여 37°C에서 30분간 단백질을 응고시켰다. 응고된 단백질을 0.45 µm filter를 이용하여 여과한 후 여과액과 3배 희석한 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. OD는 660 nm에서 측정하였다.

질소 고정화능 조사

질소 고정세균 분리용 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) 배지를 이용하여 수행하였다. 분리용 NFB 배지는 무기염과 탄소원만 들어 있고 질소원이 결핍된 배지로서 대기 중의 질소를 고정할 능력이 있는 균주만이 생장 가능한 선택배지이다[12]. 시험관에 NFB 배지를 넣고 전배양된 균주를 접종하여 30°C에서 4일간 배양하면서 배지 색이 푸른빛으로 색깔이 변할 때 양성으로 판단하였다.

인산 가용화능 조사

분리균들의 불용성 인산염 분해능을 조사하기 위해 0.5% calcium phosphate (10CaO·3P₂O₅·H₂O)가 첨가된 Pikovskaya (PVK) agar 배지를 이용하였다[13]. 고체배지 중앙에 cork borer를 이용하여 잘라낸 뒤 순수 분리된 전배양 균주를 접종 후 30°C에서 4일간 배양하면서 균체 주위의 clear zone 형성 유무를 조사하여 불용성 인산 가용화능을 측정하였다.

저항성 물질 ACC deaminase 생성능 조사

ACC deaminase 활성은 Barnawal 등[14]와 Blaha 등[15]의 방법을 응용하여 측정하였다. 시험관에 TSB를 넣고 선별된 균주를 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 뒤 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 DF salt 배지(0.4% KH₂PO₄, 0.6% Na₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.0001% FeSO₄, 0.000001% H₃BO₃, 0.00001% MnSO₄·H₂O, 0.000007% ZnSO₄, 0.000005% CuSO₄, 0.000001% MoO₃, 0.2% glucose, 0.2% C₆H₁₂O₇, 0.2% C₆H₈O₇, pH 7.3)로 두 차례 세척하고 질소원으로 3 mM ACC가 첨가된 DF salt 배지에 접종하여 30°C에서 2일간 배양 후 600 nm에서 OD를 측정하여 ACC deaminase 생성을 확인하였다.

Indole-3-acetic acid (IAA) 생성능 조사

식물성 호르몬인 IAA 생성능을 평가하기 위해 전배양액을 0.1%의 tryptophane이 첨가된 King's B (2% proteose peptone, 0.25% K₂HPO₄, 0.6% MgSO₄, 1.5% glycerol) 배지에 분리된 균을 접종하여 30°C에서 2일간 배양하였다. 원심분리 후 상층액을 분리하여, Salkowski's reagent (35% HClO₄ 50 ml, 0.5 M FeCl₃ 1 ml)와 1:2 (v/v)의 비율로 혼합한 다음, 분홍색이 발색되는 동안 상온에서 30분간 정치하였다. 발색되는 정도를 분광광도계를 이용하여 530 nm에서 측정하였다. 표준물질로 indole-3-acetic acid를 이용하여, 위와 같은 동일한 방법으로 검량선을 작성하여 시료의 농도를 환산하였다[16].

생화학적 특성 조사

균주가 분비하는 효소의 특성 분석은 API ZYM kit (Biomérieux, Marcy-L Etoile, France)를 이용하여 분석하였으며, suspension medium에 분리균주를 풀어 McFarland standard (Biomérieux)의 5 McFarland로 탁도를 맞춰 검체를 준비하였다. 그 다음 각 큐플에 검체를 접종하여 37°C에서 4시간 배양 후 ZYM A와 ZYM B 시약을 한 방울씩 떨어뜨렸다. 5분 후 판독표에 따라 결과를 확인하였다.

통계분석

모든 분석은 3회 이상 수행하였으며, 평균 ± 표준편차

(Mean \pm SD)로 표현하였다. 평균값의 유의한 차이는 SPSS (version 20.0 for Windows, SPSS Inc., USA)를 이용한 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)의 Duncan's multiple comparisons를 사용하였다. 유의성 검증은 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 분석하였다.

결과 및 고찰

미생물의 분리 및 동정

일반적으로 중성과 약산성 토양 조건에서 토착미생물의 생장이 유리하므로 중성과 약산성 토양을 중심으로 미생물을 분리하고자 하였다[17]. 식물 성장촉진 및 식물병 방제활성을 가진 유용 미생물을 선별하기 위해서 부산, 창원, 제주도의 야산, 텃밭, 과수원 등 중성과 약산성 토양을 중심으로 7곳에서 토양 및 뿌리를 채취하였다. Colony의 형태 및 색을 기준으로 서로 다른 특징을 갖는 균주를 분리하였으며, 최종 선별된 균주들의 식물 성장촉진 및 식물병 방제활성을 확인하고자 하였다. 선별된 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 BLAST에서 분석하였으며, 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 98.6% 상동성을 가진 ANG3와 ANG9를 제외한 균주는 99% 이상의 상동성을 보였으며, *Pseudomonas koreensis* ANG2, *Pseudomonas geniculata* ANG3, *Pantoea agglomerans* ANG8, *Kluyvera intermedia* ANG9, *Exiguobacterium acetylicum* ANG40, *Burkholderia stabilis* ANG51로 명명하였다. 또한 균주 온도에 따른 성장 조건을 분석하기 위해서 0–50°C에서 5일간 배양하여 600 nm에서 OD를 측정하였다. 그 결과, ANG2는 0–50°C에서 성장하는 것을 확인하였으며 6종의 균주 중에서 가장 다양한 온도에서 성장하였다. ANG3, ANG8, ANG9의 경우에는 5–50°C에서 성장하는 것을 확인하였으며, ANG40의 경우에는 10–50°C, ANG51의 경우에는 10–30°C로 가장 좁은 범위에서 성장하는 것을 확인하였다(Fig. 1). 전반적으로 20°C에서 가장 생육이 좋은 것을 확인할 수 있었으며, 모든 실험은 1×10^6 CFU/ml로 접종하여 시험을 진행하였다.

Table 1. Identification of isolated strains by 16S rRNA sequencing.

Isolate	Species	Accession No.	Similarity (%)
ANG2	<i>Pseudomonas koreensis</i>	NR_025228	99.6
ANG3	<i>Pseudomonas geniculata</i>	NR_024708	98.6
ANG8	<i>Pantoea agglomerans</i>	NR_111998	99.6
ANG9	<i>Kluyvera intermedia</i>	NR_028802	98.6
ANG40	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	NR_043479	99.6
ANG51	<i>Burkholderia stabilis</i>	NR_114522	99.8

분리균주의 항진균 활성 검증

분리균주의 항진균 활성을 알아보기 위해서 식물 병원성 곰팡이 7종을 이용하여 시험을 진행하였다. 성장 저해 활성은 PDA 배지에 대치 배양을 통해 식물 병원성 곰팡이와 유용 미생물 간의 거리(25 mm)를 측정하여 억제율(inhibition rate)로 환산하였다. 그 결과를 Table 2에 나타내었다. ANG51에서 7종의 식물 병원성 곰팡이에 대해 모두 항진균 활성을 나타냈으며, 그 중에서도 *B. cinerea*, *C. cassiicola*, *P. capsici*, *S. sclerotiorum*에 대해서 억제율이 70% 이상 나타났다. ANG2에서도 *C. acutatum*에 대해서 76%로 높은 항진균 활성을 보였고, *R. solani*, *Fusarium* sp.에 대해서도 비교적 높은 활성을 나타냈다. ANG3의 경우에는 활성이 높지는 않았지만 7종 가운데 6종의 식물 병원성 곰팡이에 대해 항진균 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. ANG8과 ANG9의 경우에는 *C. acutatum*, *C. cassiicola*, *Fusarium* sp.에 대해서 비교적 높은 항진균 활성을 나타냈다. 하지만 ANG40의 경우에는 항진균 활성을 확인할 수 없었다. 식물 병원성 곰팡이에 대한 Quan 등[18]의 연구에 의하면 *B. cepacia*가 다양한 식물 병원성 곰팡이에 대해 길항능을 가지며, 그 중에서도 *R. solani*, *Fusarium* sp., *B. cinerea*에 길항능을 갖는 것을 확인하였으며, 이는 본 실험 결과와도 일치하였다.

Siderophore 생성능

Siderophore는 철 이온 특이 결합 물질로서 식물 생장에 필수적인 철과 친화력이 높은 분자로 식물 성장촉진 및 식물 병원성 곰팡이를 방제하는 기능을 가진 것으로 알려져 있다. Siderophore 생성은 주로 철 결핍 조건하에서 주로 생성되며, 탄소원, 질소원, pH, 온도와 같은 다른 요인들도 siderophore 생성에 있어 필수적이다[19]. 본 연구에서는 식물 성장촉진 및 식물 병원성 곰팡이 방제역할을 하는 siderophore 생성능을 확인하고자 하였다. 연구 결과, 선별된 모든 균주에서 siderophore 생성능이 확인되었다(Fig. 2). 이는 식물이 철의 흡수를 도와 식물 성장촉진을 유도할 것으로 판단되며, 식물 병원성 곰팡이와의 Fe^{3+} 흡수 경쟁에서 우위를 선점함으로써 식물 병원성 미생물에 대한 길항능을 나타낼 것으로 기대된다[20].

분리균주의 세포외 효소 활성

선별된 균주가 갖는 효소적 특성을 확인하기 위해서 amylase, cellulase, protease, xylanase 활성을 측정하였다. 그 결과 6종의 균주 중 ANG40에서만 amylase, cellulase, xylanase 활성을 확인할 수 있었으며, protease 활성은 확인할 수 없었다(Table 3). 일반적으로 세포외 효소는 식물 병원성 곰팡이의 세포벽을 분해하여 곰팡이의 성장에 영향을 줌으로써 항진균 활성에 영향을 준다고 알려져 있으나[21],

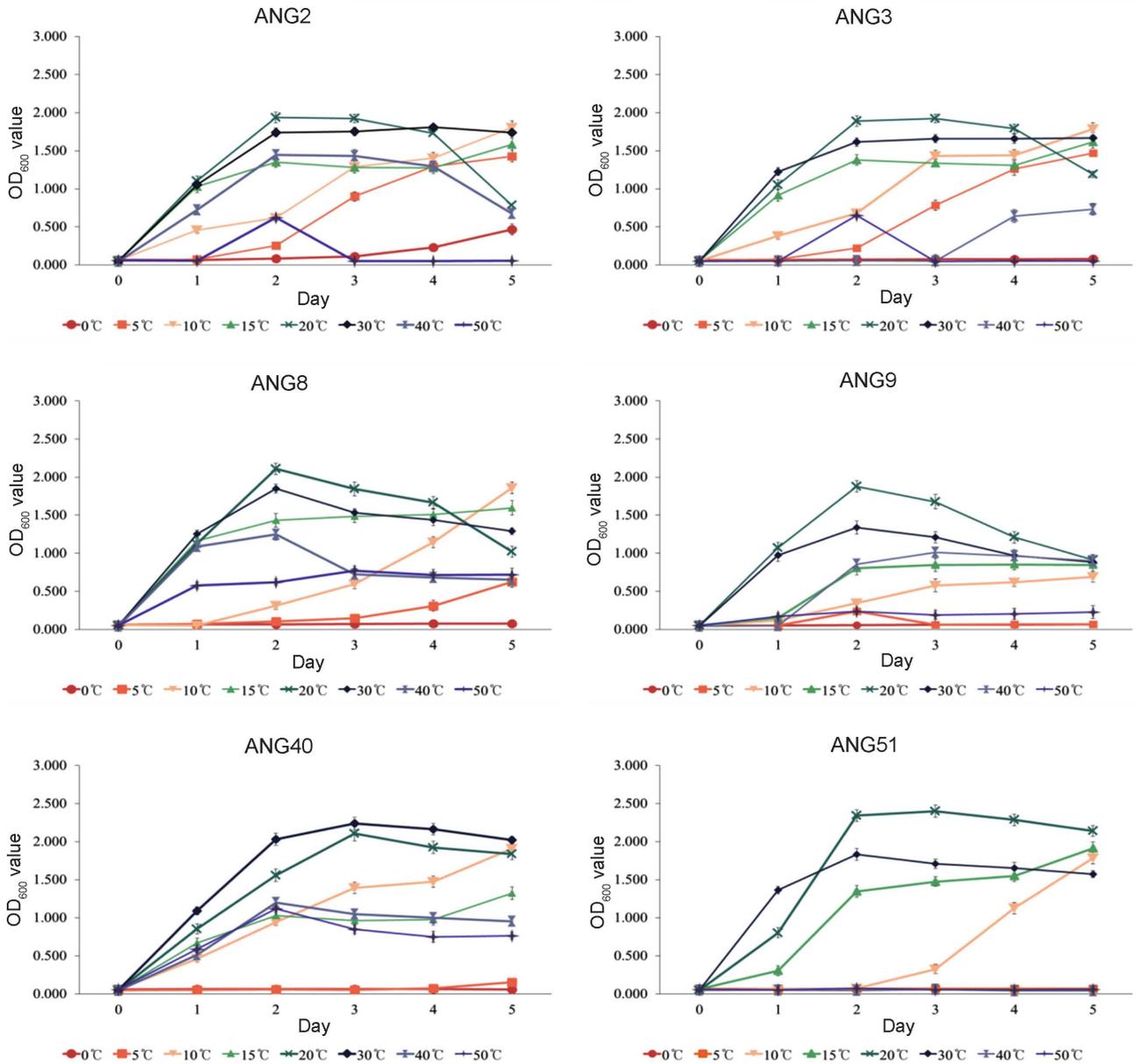


Fig. 1. Growth curves of isolated strains at various temperature. Data are mean ± SD of at least three replicates.

본 연구에서는 용균 효소를 가진 ANG40에서는 항진균 활성을 확인할 수 없었다. 이는 amylase, cellulase, xylanase가 식물 병원성 곰팡이에 대한 활성은 나타내지 못했지만, 식물체가 이용할 수 없는 고분자의 물질을 저분자의 물질로 변화시켜 이용할 수 있도록 하여 성장하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있으므로 분리균주가 식물 성장촉진에 도움을 줄 것으로 판단된다. 다음으로는 곰팡이에 대한 방제활성 이외에도 성장 촉진활성을 갖는 균주를 선별하기 위해서 질소 고정화능, 인산 가용화능 등 식물 성장촉진 활성을 확인하고

자 하였다.

질소 고정화능, 인산 가용화능

질소는 단백질을 구성하는 성분 중 하나로 식물에 질소가 부족하게 되면 잎의 엽록체 수가 감소하여 생장이 제대로 일어나지 못해 결과적으로 수확량의 감소를 초래한다. 이러한 질소는 대기 중의 약 78%로 공기 중에 존재하고 있음에도 불구하고 대부분 N₂의 형태인 안정적인 구조로 존재하기 때문에 일반적으로 생물체가 이용할 수 없는 실정이며, 그로

Table 2. Antifungal ability of isolated strains against phytopathogenic fungi.¹⁾

Strain	Inhibition rate (%)					
	ANG2	ANG3	ANG8	ANG9	ANG40	ANG51
<i>B. cinerea</i>	45.5 ± 9.1 ^a	20.1 ± 7.7 ^b	40.9 ± 6.4 ^{ab}	-	-	82.1 ± 4.1 ^d
<i>C. acutatum</i>	76.1 ± 9.1 ^c	34.4 ± 7.5 ^c	50.0 ± 10.1 ^{abc}	50.0 ± 6.4 ^b	-	62.3 ± 16.5 ^{bc}
<i>C. cassicola</i>	43.7 ± 1.5 ^a	36.6 ± 8.8 ^c	58.2 ± 13.3 ^c	63.3 ± 4.7 ^c	-	76.2 ± 1.9 ^{cd}
<i>Fusarium</i> sp.	50.0 ± 9.1 ^{ab}	38.3 ± 8.7 ^c	54.5 ± 1.1 ^{bc}	44.6 ± 7.7 ^b	-	45.5 ± 4.6 ^a
<i>P. capsici</i>	48.6 ± 4.5 ^{ab}	6.1 ± 2.9 ^a	-	14.0 ± 0.5 ^a	-	70.9 ± 4.6 ^{cd}
<i>R. solani</i>	56.8 ± 3.2 ^b	21.0 ± 4.0 ^b	36.4 ± 6.4 ^a	-	-	55.3 ± 11.2 ^{ab}
<i>S. sclerotiorum</i>	-	-	-	-	-	73.1 ± 0.7 ^{cd}

¹⁾ - : no activity. Data are mean ± SD of at least three replicates and significantly different at $p < 0.05$; different letters indicate significant differences among samples.

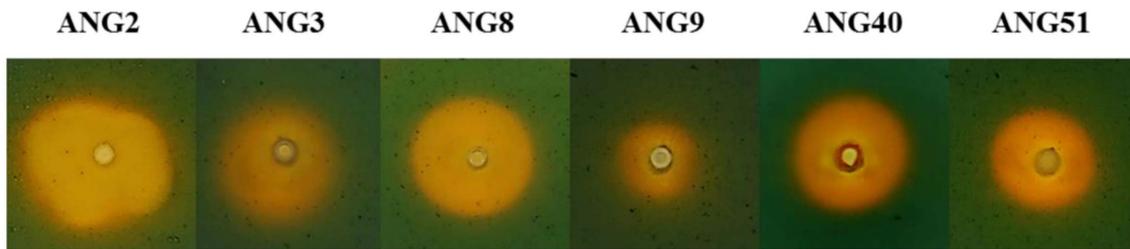


Fig. 2. Confirmation of orange halo zone on CAS medium by production of siderophore from the strains. The strains were cultured on CAS agar medium at 30 °C for 4 days.

인해 무분별한 질소비료의 사용이 증가되어 지하수 등의 수질 오염이 초래되고 있다. 따라서, N₂ 형태의 질소를 생물체가 이용할 수 있는 질산염 형태로 질소원을 제공해주는 질소 고정능을 갖는 미생물을 분리하고자 하였다[22, 23]. 질소 고정 박테리아는 대기 중의 질소와 고정된 암모니아를 주변 환경으로 고정하는 특성을 가진다. 이 경우에는 질소 고정능을 가진 균주에 의해 암모니아가 배지 내에 축적되고, 그로 인해 배지 내의 암모늄 농도가 증가함에 따라 pH 변화가 일어나므로 선택배지의 색깔이 녹색에서 푸른색으로 변하는 결과를 가져온다[24]. 따라서, 배양 중에 NFB 선택배지의 색깔이 푸른색으로 변화되었을 때 양성으로 판정하였다. 이는

결과적으로 6종의 균주 모두 질소 고정능이 확인되었으며 (Table 4), 이는 무분별한 질소비료의 사용을 대처할 수 있는 대체제로써 환경오염을 줄여 줄 것으로 기대한다.

또한 인은 식물의 성장 및 발달에 필요한 다량 영양소로 가장 중요한 요소 중 하나이다. 그러나 화학비료로 이용되는 가용성 무기 인산 대부분은 빠르게 고정되기 때문에 식물이 이용하는데 있어 어려움을 겪는다[25]. 이에 반해 근권 미생물은 토양 속에 존재하는 인을 가용화 및 미네랄화하여 유기물과 무기물로부터 효과적으로 인을 방출하며, 주로 HPO₄²⁻ 또는 H₂PO₄⁻ 형태로 식물이 이용할 수 있도록 도와준다[1]. 따라서, 인산 가용화능을 가진 유용 미생물을 선별

Table 3. Production of extracellular enzymes by isolated strains.¹⁾

Activity	Strains					
	ANG2	ANG3	ANG8	ANG9	ANG40	ANG51
Amylase ²⁾	-	-	-	-	239.9 ± 25.0	-
Cellulase ³⁾	-	-	-	-	73.9 ± 0.2	-
Protease ⁴⁾	-	-	-	-	-	-
Xylanase ⁵⁾	-	-	-	-	223.8 ± 14.3	-

¹⁾ - : no activity. Data are mean ± SD of at least three replicates.

²⁾⁻⁵⁾ One unit of activity was defined as the quantity of enzyme that liberates the equivalent of 1 µg of product per min under the assay condition. In each assay, the product is maltose, glucose, tyrosine and D-xylose, respectively.

Table 4. Activity of nitrogen fixation, phosphate solubilization, ACC deaminase from isolated strains.

Strains	Nitrogen fixation ¹⁾	Phosphate solubilization ²⁾	ACC deaminase ³⁾
ANG2	+	+	-
ANG3	+	++	-
ANG8	+	+	-
ANG9	+	++	-
ANG40	+	++	-
ANG51	+	++	+

¹⁾⁻³⁾+: activity, ++: strong activity, -: no activity.

하고자 PVK 고체배지를 이용하여 clear zone의 형성유무를 확인하였으며, 그 결과 6종의 분리균주 모두에서 인산 가용화능을 확인할 수 있었다(Table 4). Park 등[26]의 연구에 의하면, 인산가용화능을 가진 *B. stabilis*를 상추모종에 접종하였을 때 무처리구인 대조구에 비해서 잎과 뿌리의 길이가 각 1.1%와 4.8%의 생육증진효과를 나타내었다. 따라서, 6종의 분리균주가 이용할 수 없는 형태의 인을 가용화하여 이용 가능한 영양분으로 만들어줌으로써 식물 생장에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

저항성 물질 ACC deaminase 생성능 조사

에틸렌은 식물 성장과 발달의 모든 단계에서 필수적인 생장호르몬으로써 거의 모든 식물에서 생성되지만, 고농도의 에틸렌은 뿌리의 신장을 저해함으로써 식물의 성장을 억제한다. 이에 에틸렌 농도 수준을 조절할 수 있는 ACC deaminase를 생성하는 PGPR이 연구되어왔으며, PGPR에 의해 생성되는 ACC deaminase는 에틸렌 전구체인 ACC를 ammonia와 α -ketobutyrate로 분해하여 식물체 내 에틸렌의

농도 수준을 낮춰 다양한 범위의 스트레스를 완화시켜 준다 [14]. 또한 식물이 염분에 대한 내성을 갖게 되어 가뭄에 따른 스트레스를 감소시켜 식물의 성장과 발달을 촉진한다[27]. 따라서, 다양한 스트레스로부터 식물의 성장과 발달에 영향을 미치는 ACC deaminase의 활성을 측정하고자 하였다. ACC deaminase 활성은 먼저 질소원으로 ACC만을 첨가한 배지에서 생육여부로 활성을 측정하였으며, 그 결과 6종의 균주 가운데 ANG51에서만 성장을 확인할 수 있었다(Table 4). 이는 Onofre-Lemus 등[28]의 연구에 의하면, 대부분의 *Burkholderia* sp.가 ACC deaminase 활성을 나타냈다는 보고와도 일치하였다. 결과적으로 ANG 51 균주가 에틸렌 농도 수준을 조절하여 식물 생장에 도움을 줄 것으로 판단된다.

Indole-3-acetic acid (IAA) 생성능 조사

식물 성장촉진 미생물에 의해 생성되는 식물 생장호르몬인 IAA는 ACC deaminase와 마찬가지로 에틸렌 농도 수준을 조절함으로써 다양한 스트레스와도 관련되어 있다. IAA는 줄기의 신장에 관여하는 호르몬으로써 식물의 뿌리 및 씨앗 표면에 존재하는 PGPR에 의해서 합성되고 분리된다. 생성된 IAA의 일부는 식물에 의해 흡수되어 식물의 생장에 도움을 주며, 일부는 ACC 합성효소를 자극하여 ACC 합성에 도움을 준다. 이 ACC는 에틸렌의 전구체로써 에틸렌 생합성을 촉진하여 식물의 성장과 발달에 도움을 준다[29]. 따라서, 본 연구에서는 식물 생장에 도움을 주는 IAA 생성능을 확인하고자 하였으며, 그 결과를 Fig. 3A에 나타내었다. ANG2, ANG3, ANG8, ANG9, ANG40, ANG51은 각 29.2, 27.5, 46.9, 195.4, 13.0, 5.5 μ g/ml의 활성을 나타냈다. 따라서, 분리균주의 IAA 생성능은 식물의 성장과 발달에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 하지만, 고농도의 IAA 생성은 오히려 에틸렌의 농도 수준을 높여 뿌리 성장을 억제할 수

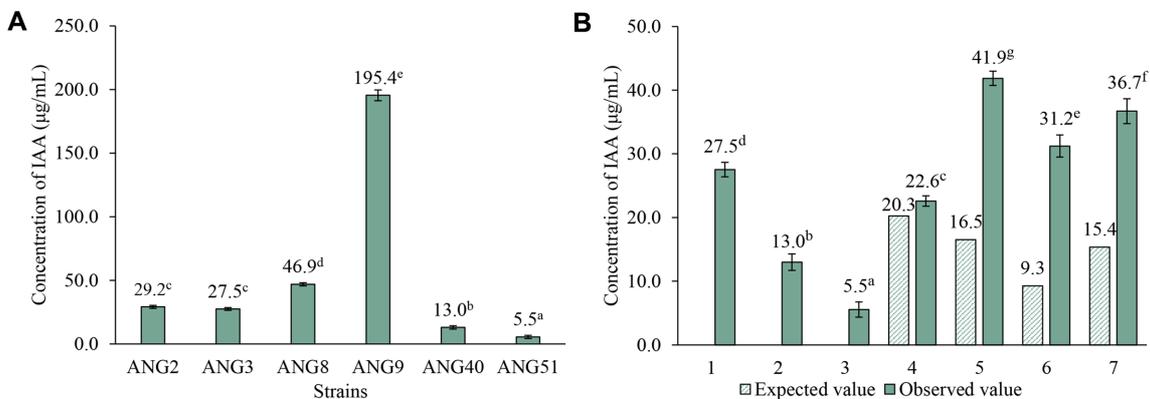


Fig. 3. (A) IAA production activity of isolated strains and (B) synergy effect of IAA production through co-culture of isolated strains. (1) ANG3, (2) ANG40, (3) ANG51, (4) ANG3 + ANG40, (5) ANG3 + ANG51, (6) ANG40 + ANG51, (7) ANG3 + ANG40 + ANG51. Data are mean \pm SD of at least three replicates and significantly different at $p < 0.05$; different letters indicate significant differences among samples.

있으므로 IAA 농도 수준을 고려해야 할 것으로 판단된다. 따라서, 가장 높은 항진균 활성과 ACC deaminase를 생성하는 ANG51과 6종의 균주 중 유일하게 세포의 효소를 가진 ANG40, 그리고 식물 성장촉진 활성과 배양온도를 고려하여 ANG3을 최종적으로 선별하였다. 최종 선별된 균주를 1:1 비율로 혼합 배양하여 IAA 생성능에 대한 시너지 효과를 확인하고자 하였으며, 그 결과를 Fig. 3B에 나타내었다. 결과적으로 3가지 균주를 혼합 배양한 결과 전반적으로 시너지 효과를 확인할 수 있었으며, ANG3과 ANG40 혼합 배양 조건에서는 시너지 효과를 확인할 수 없었다. ANG3과 ANG51을 혼합 배양했을 때는 약 2.5배, ANG40과 ANG51을 혼합 배양했을 때는 약 3.4배의 시너지 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한 3종의 균주 모두 혼합 배양했을 때는 약 2.4배의 시너지 효과가 있음을 확인하였다. Selvakumar 등[30]의 연구에 의하면, 밀 재배 시 IAA 생성능, 인산가용화능, siderophore 생성능을 가진 *E. acetylicum* 1P 균주를 10^6 CFU/ml 접종 시 접종하지 않은 대조군과 비교 시 뿌리와 길이생장이 각 16.54%, 8.16% 증가하는 결과를 보여주었다. 또한, Gopalakrishnan 등[31]의 연구에 의하면, IAA 생성능, siderophore 등의 활성을 가진 *P. geniculata*를 chickpea에 접종 시 접종하지 않은 대조군과 비교 시 뿌리무게(root weight)가 최대 9%, 길이(length)가 최대 20% 증가하는 결과를 보여주었다. 따라서 분리균주가 식물생장 호르몬인 IAA를 생성함으로써 식물 생장에 도움을 줄 것으로 기대된다.

생화학적 특성 조사

분리균주가 갖는 효소적 특성을 확인하기 위해서 API ZYM kit를 이용하여 측정하였으며, ANG3, ANG40, ANG51의 효소적 특성을 확인한 결과는 Table 5에 나타내었다. 공통적으로 alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase (C8), leucine arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase의 효소에 대해서 양성반응을 보였다. 또한, ANG3의 경우에는 α -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase에 대해서도 활성을 나타내었다. ANG40의 경우에는 lipase (C14), acid phosphatase, n-acetyl- β -glucosaminidase에 활성을 나타내었다. 마지막으로 ANG51의 경우에는 trypsin, acid phosphatase 활성이, 그리고 약하게 α -glucosidase, β -glucosidase의 활성도 나타내었다. Phosphatases의 효소적 특성을 갖는 경우 그람 양성균의 세포벽의 일부 구성 성분인 teichoic acid의 형성을 저해한다. 또한 esterase와 lipase의 경우에는 그람 음성 뿐만 아니라 그람 양성 포자에 중요 구성 성분인 지질과 관련이 있으며, leucine arylamidase는 단백질 동화 과정에서 간섭을 일으키기 때문에 단백질 합성에도 영향을 받는다. 그 외 효소인 galactosidase, glucosidase, glucuronidase 등은 carbohydrate의 형성을 저해시키는 것

Table 5. Confirmation of biochemical characterization of isolated strains by API ZYM kit.¹⁾

Characateristics	ANG3	ANG40	ANG51
Alkaline phosphatase	+	++	+
Esterase (C4)	++	+	+
Esterase (C8)	++	++	++
Lipase (C14)	-	+++	-
Leucine arylamidase	+++	+++	W
Trypsin	-	-	+
Acid phosphatase	-	+++	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+++	+
α -galactosidase	+	-	-
β -glucuronidase	W	-	-
α -glucosidase	+++	-	W
β -glucosidase	+++	-	W
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	++	-

¹⁾ - : negative, W: weakly positive, +: positive, ++: moderate positive, +++: strong positive.

으로 알려져 있다[32]. Romas RL 등[33]과 Ong 등[34]의 연구와 비교해보면, *P. geniculata* LMG 2195와 *B. stabilis*가 본 연구의 균주들과 공통적으로 leucine arylamidase의 활성을 갖고 있음을 확인하였다. 따라서, 3종의 균주 모두 식물 병원성 곰팡이에 대한 진균 외벽 가수분해 효소를 지닌 균주로 식물 병원성 곰팡이의 성장을 저해하여 방제 효과에 도움을 줄 것으로 기대된다.

요 약

본 연구는 토양으로부터 분리한 균주를 대상으로 식물병 방제활성 및 식물 성장촉진 활성을 확인하고자 하였다. 식물 병원성 곰팡이에 대한 길항능을 통해 방제기능을 확인할 수 있었으며, 이는 siderophore 및 항생물질 생성 등에 기인되는 것으로 판단된다. 또한 ANG40의 경우에는 amylase, cellulase, xylanase와 같은 세포의 효소활성을 갖고 있음을 확인하였다. 이 외에도 질소 고정능, 인산 가용화능, siderophore 생성능 등 다양한 실험을 통해 식물 생장에 필수적인 질소, 인, 철 등을 식물이 흡수 가능한 형태로 변화시켜 식물 생장에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 또한 6종의 분리균주는 모두 에틸렌 생성과 연관된 IAA를 생성하였으며, 그 중에서도 ANG51의 경우에는 ACC deaminase 활성도 갖고 있음을 확인하였다. 따라서, 최종 선별된 *Pseudomonas geniculata* ANG3, *Exiguobacterium acetylicum* ANG40, *Burkholderia stabilis* ANG51을 이용하여 식물 성장촉진 활성과 식물 병원성 곰팡이에 항진균 활성을 갖는 새로운 생

물학적 제제로써 이용 가능성을 제시하였다.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Rodríguez H, Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* **17**: 319-339.
- Mohamed I, Eid KE, Abbas MHH, Salem AA. 2019. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizae to improve the growth and nutrient utilization of common bean in a soil infected with white rot fungi. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **171**: 539-548.
- Lee SM, Chung JH, Ryu CM. 2015. Augmenting plant immune responses and biological control by microbial determinants. *Res. Plant Dis.* **21**: 161-179.
- Mahajan S, Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* **444**: 139-158.
- Rodrigues DF, Goris J, Vishnivetskaya T, Gilichinsky D, Thomas MF, Tiedje JM. 2006. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. *Extremophiles* **10**: 285-294.
- Forni C, Duca D, Glick BR. 2017. Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant Soil* **410**: 335-356.
- Jung BK, Lim JH, An CH, Kim YH, Kim SD. 2012. Selection and identification of phytohormones and antifungal substances simultaneously producing plant growth promotion rhizobacteria from microbial agent treated red-pepper field. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 190-196.
- Ali SS, Vidhale NN. 2013. Bacterial siderophore and their application: A review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **2**: 303-312.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Shin PY, Cho SJ. 2011. Cellulase and xylanase activity of compost-promoting bacteria *Bacillus* sp. SJ21. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **44**: 836-840.
- Oh DG, Jang YK, Woo JE, Kim JS, Lee CH. 2016. Metabolomics reveals the effect of garlic on antioxidant- and protease-activities during Cheonggukjang (fermented soybean paste) fermentation. *Food Res. Int.* **82**: 86-94.
- Um YR, Kim BR, Jeong JJ, Chung CM, Lee Y. 2014. Identification of endophytic bacteria in *Panax ginseng* seeds and their potential for plant growth promotion. *Korean J. Med. Crop Sci.* **22**: 306-312.
- Pande A, Pandey P, Mehra S, Singh M, 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.
- Barnawal D, Bharti N, Maji D, Chanotiya C, 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.
- Blahe D, Prigent-Combaret C, Mirza MS, Moëgne-Loccoz Y. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**: 455-470.
- Leveau JHJ, Lindow SE. 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2365-2371.
- Cao P, Shen SS, Wen CY, Song S, Park CS. 2009. The effect of the colonization of *Serratia plymuthica* A21-3 in rhizosphere soil and root of pepper in different soil environment. *Res. Plant Dis.* **15**: 101-105.
- Quan CS, Zheng W, Liu Y, Fan SD. 2006. Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 1276-1284.
- Yu S, Teng C, Bai X, Liang J, Song T, Dong L, et al. 2017. Optimization of siderophore production by *Bacillus* sp. PZ-1 and its potential enhancement of phytoextraction of Pb from soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 1500-1512.
- Jung HK, Kim JR, Woo SM, Kim SD. 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 94-100.
- Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* **18**: 355-383.
- Hong SW, Shin KC, Lee EY. 2010. Characterization of nitrogen fixing bacteria *Mycobacterium homini* sp. AKC-10 isolated from the wetland. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 302-307.
- Biswas JC, Ladha JK, Dazzo FB. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **64**: 1644-1650.
- Latt ZK, Yu San S, Kyaw EP, Lynn TM, Nwe MT, Mon WW, et al. 2018. Using cellulolytic nitrogen fixing bacterium, *Azomonas agilis* for effective degradation of agricultural residues. *Open Microbiol. J.* **12**: 154-162.
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* **34**: 33-41.
- Park HS, Yeom YH, Yoon MH. 2018. Comparison on phosphate solubilization ability of *Pantoea rodasil* and *Burkholderia stabilis* isolated from button mushroom media. *J. Mushrooms* **16**: 31-38.
- Ahemad M, Kibret M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* **26**: 1-20.
- Onofre-Lemus J, Hernández-Lucas I, Girard L, Caballero-Mellado J. 2009. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 6581-6590.

29. Glick BR, Penrose DM, Jiping L. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**: 63-68.
30. Selvakumar G, Kundu S, Joshi P, Nazim S, Gupta AD, Gupta HS. 2010. Growth promotion of wheat seedlings by *Exiguobacterium acetylicum* 1P (MTCC 8707) a cold tolerant bacterial strain from the Uttarakhand Himalayas. *Indian J. Microbiol.* **50**: 50-56.
31. Gopalakrishnan S, Srinivas V, Prakash B, Sathya A, Vijayabharathi R. 2015. Plant growth-promoting traits of *Pseudomonas geniculata* isolated from chickpea nodules. *3 Biotech.* **5**: 653-661.
32. Adelantado C, Shiva C, Arosemena L, Costa-Batlioni L, Calvo MA. 2007. Enzymatic mechanisms related to antimicrobial activity of *Rutaceae* extracts. *J. Biol. Sci.* **7**: 71-73.
33. Ramos PL, Van Trappen S, Thompson F, Rocha RCS, Barbosa HR, De Vos P, et al. 2010. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugarcane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 926-931.
34. Ong KS, Aw YK, Lee LH, Yule CM, Cheow YL, Lee SM. 2016. *Burkholderia paludis* sp. nov., an antibiotic-siderophore producing novel *Burkholderia cepacia* complex species, isolated from Malaysian tropical peat swamp soil. *Front. Microbiol.* **7**: 2046.