

과제구분	기본연구	수행시기		전반기	
연구과제 및 세부과제		연구분야	수행기간	연구실	책임자
유용미생물 개발 및 이용연구		작물보호	'10~'12	농업기술원 환경농업연구과	이현주
작물 생육촉진 미생물 개발 및 효과 구명		작물보호	'10~'12	농업기술원 환경농업연구과	이현주
색인용어	미생물, 작물생육촉진, 지베렐린, GM-B6				

ABSTRACT

To isolate a bacterium that produce plant growth promoting hormone, a total 150 bacteria were obtained from the soil in Gyeonggido, Korea. Among these, one isolate GM-B6 showed a good growth promoting results in a lettuce seedling. The strain was identified as *Bacillus* sp. by 16sRNA sequence, the results of morphological and biochemical characteristics. We named this isolate as *Bacillus* sp. GM-B6. Gibberellic acid 4(GA₄) 102.1ng/ml was produced by GM-B6 culturing in a fermenter with TSB media 25°C, pH 5-7, 72hr. Cultured GM-B6 was mixed with nursery bed soil, lettuce leaves growth promoting activity 8~15% compare to non treatment. In the field test, flow water treatment with GM-B6 was 8~10% growth promoting effect in lettuce, cucumber and 12~23% in cherrytomato, respectively. In this study, selected isolate could be a potentially effective PGPR agent in cultivated crops.

Key words : Plant growth pormoting hormone, *Bacillus* GM-B6, GA₄

1. 연구목표

친환경농업에 대한 관심이 증가하면서 미생물을 이용한 식물병해 방제뿐만 아니라 작물에 양분을 공급하는 미생물제제, 미생물비료에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 토양미생물 중에는 식물 신장 촉진기능이 있는 옥신, 지베렐린과 세포분열을 촉진하는 사이토키닌, 성숙, 낙엽을 촉진하는 에틸렌 등을 생산하는 기능성 미생물도 많이 알려져 있다.

이러한 식물생장촉진 물질들 중 지베렐린은 식물절간의 신장, 분열조직의 성장유도, 종자발아, 개화 등을 유도하며 생리적 과정을 조절하며, 현재까지 110여 종류 이

상이 알려져 있다. 최근에는 *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* 등에서 지베렐린이 생산된다고 하였고(Ates et al, 2006), 지베렐린4(GA₄)는 세포의 신장비대와 줄기 성장에 활성을 보인다고 하였다(Eriksson et al, 2006). 한편, 미생물제를 농업에 이용함으로써 작물재배시 농약과 비료 과다 사용으로 인한 토양오염 등의 문제점을 해결하고, 식물의 생육을 촉진시켜 작물 생산성 증가와 함께 안전한 농산물을 생산함으로 토양환경의 보존과 농산물에 대한 안전성을 확보할 수 있다.

본 연구는 토양에서 분리한 미생물을 이용하여 작물생장 촉진용 호르몬 지베렐린 생산을 위한 최적 조건을 확립하고 포장에 처리 시 적용방법과 그 효과를 확인하기 위하여 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 미생물 분리 및 선발

생육촉진 기능을 가진 미생물을 선발하기 위하여 경기도농업기술원의 시설하우스 내 토양 10g을 살균수 90ml과 혼합하여 진탕한 후, 1ml을 채취하여 9ml 멸균수에 차례대로 희석하고 100 μ l씩 취하여 NA(Nutrient Agar)배지에 평판희석법으로 25 $^{\circ}$ C에서 3일 이상 배양하였다. 생성된 각각의 독립콜로니를 취하여 균주번호를 붙여주고 상추종자를 각각의 미생물 배양액에 2시간 침지 후 파종하여 2주후 발아율을 조사하였으며 4주후 잎과 뿌리를 조사하여 생육촉진 효과가 있는 균주를 분리하고 선발하였다.

나. 선발균주의 동정

작물의 생육촉진 효과를 보이는 균주를 동정하기 위해 주사전자 현미경(HITACHI S-3000)으로 형태적 특징을 관찰하였고, 세균검정 기 Vitek 2 compact의 BCL카드를 이용하여 생화학적 특성을 조사하였으며, 16s rRNA 염기서열 분석을 통해 NCBI blast 검색으로 유전적 동정을 하였다.

다. 선발균주의 최적 배양 및 배지조건

선발된 미생물에 대한 적정 배양조건 확인을 위해 TSB배지를 이용하여 온도범위 10~40 $^{\circ}$ C 범위에서 5 $^{\circ}$ C 간격으로 180rpm 24시간 배양 후 분광광도계 파장 600nm에서 흡광도를 측정하였고, pH는 pH3~9범위에서 pH 1간격으로 조절하여 배양후 흡광도를 측정하였다. 미생물 생육에 적합한 탄소원을 선발하기 위해 최소배지(K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, 글루코스 0.5%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.01%)에 글루코스를 빼고 sucrose, arabinose, fructose, glucose, lactose, mannitol, starch,

sorbitol을 각 1% 농도로 첨가하여 25°C, 180rpm으로 24시간 배양 후 미생물의 생육 정도를 확인하였고, 질소원은 최소배지에서 (NH₄)₂SO₄ 0.1% 대신 yeast extract, beef extract, malt extract, peptone, tryptone, ammonium sulfate, ammonium phosphate의 질소원을 각 0.5%씩 첨가하여 배양정도를 조사하였다. 무기염류는 최소 배지에서 무기염류인 K₂HPO₄ 0.7%, KH₂PO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.01% 대신 NH₄Cl, NaCl, K₂HPO₄, CaCl₂, LiCl, KCl, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄, FeCl₂, BaCl₂의 무기염류를 각 5mM씩 첨가하여 미생물의 배양을 확인하였다.

라. 생장촉진 호르몬 생성 조사

작물에 대한 생육촉진 활성 물질을 확인하기 위하여 생장촉진 호르몬들에 대한 생성여부를 확인하였다. 그 중 지베렐린4에 대한 생성을 분석하기 위해서 배지 종류별로 NB(Nutrient Broth), YMB(Yeast Maltose Broth), TSB(Tryptic Soy Broth)배지에서 180rpm으로 72시간 진탕배양 한 배양액 100ml를 5,000xg, 4°C, 30분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 pH 2.5로 보정하였다. 보정한 회수액에 15ml 에틸아세테이트를 첨가하여 300rpm으로 10분간 3회 진탕 추출하여 에틸아세테이트 층을 회수하여 농축시켰고, 농축한 추출액을 5ml 메탄올로 녹인 후 0.45µm 여과막에 여과하여 주입하였다. 분석장비는 Acquity UPLC-Tandem Quadrupole Mass Spectrometer(TQ-MS) 및 Acquity UPLC를 이용하여 Acquity UPLC C₁₈ 1.17µm, 2.1×50mm Column으로 flow rate 0.4ml/min으로 분석하였다.

마. 미생물 처리시 작물생육 촉진 효과

채소육묘 및 재배시 선발 미생물 처리에 대한 효과를 확인하기 위해 상토와 10⁷cfu/ml 농도로 맞춘 미생물 배양액을 6 : 1의 비율로 혼합처리한 후 파종하였으며, TSB 배지에서 180rpm으로 72시간 배양한 GM-B6 미생물을 1×10⁷cfu/ml 농도로 조절한 후 상추와 오이에 대해 시설재배 하우스에서 10ml/주씩 4월부터 매주 한번씩 4회 관수 처리하였으며, 상추는 7회, 오이는 5회 수확하여 수량을 비교하였고, 방울토마토에 대한 생육촉진 효과는 수원시 당수동에 위치한 농가에서 정식 후 관수처리시 GM-B6 미생물을 200배 희석하여 5회 관수 처리하여 효과를 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 미생물 분리 및 선발

분리선발한 미생물을 육묘상 상추에 처리한 결과 무처리 대비 발아율과 엽중, 근장 모두 효과가 좋은 B6균주를 최종 선발하였다(표 1).

표 1. 육묘상 미생물 처리 효과

균주No.	발아율(%)	엽중(g)	근장(mm)	
			적측면	칭치마
1	63.3	0.46	29.6	43.0
2	80.0	0.67	40.1	47.4
3	33.3	0.88	50.8	56.7
4	6.7	0.35	43.4	50.6
5	6.7	0.35	44.6	53.2
49	46.7	0.54	52.2	54.7
B5	40.0	0.66	44.3	53.7
B6	60.0	0.68	54.5	59.5
B7	50.0	0.67	51.3	52.8
B9	66.7	0.61	46.6	55.1
무처리	23.3	0.37	48.5	48.3

↓ 품종 : 적측면, 처리방법 : 미생물배양액에 2시간 침지 후 파종
 ↓ 파종시기 : 6월 7일, 발아율조사 : 6월 14일, 엽중조사 : 6월 28일

나. 선발균주의 동정

작물에 생육촉진 효과를 보이는 미생물을 전자현미경으로 그 형태적 특성을 관찰한 결과 단간균으로 확인되었고, 16s rRNA 염기서열 분석으로 NCBI blast 검색으로 유전적 동정 결과 *Bacillus subtilis*와 100%의 상동성을 보였으며, 생화학적 특성조사 결과 *Bacillus* sp.의 결과를 보였다(표 2). 이에 분리된 균주를 *Bacillus* sp. GM-B6로 명명하고, 이 균을 한국미생물보존센터에 기탁번호 KCCM11324P로 기탁하여 특허출원하였다(그림 1).

표 2. 기질종류별 생화학적 특성

No.	기질종류	반응결과	No.	기질종류	반응결과
1	β-자일로시다제	+	31	D-만니톨	+
3	라이신	-	32	D-만노즈	+
4	아스파테이트	(-)	34	D-엘레디토즈	-
5	루이신	+	36	N-아세틸-D-글루코사민	-
7	페닐알라닌	+	37	팔라티노즈	+
8	L-프롤린	-	39	L-람노즈	-
9	β-갈락토시다제	-	41	β-글루코시다제	+
13	티로신	+	46	α-글루코시다제	-
14	β-N-아세틸-글루코사민다제	-	47	D-타가토즈	+
15	알라페프로아릴아미다제	+	48	D-트리할로즈	+
19	D-갈락토스	-	53	D-글루코스	+
21	클라이코진	+	54	D-리보즈	-
22	미오-이노시톨	(+)	56	푸트레신	-
24	메틸-A-D-글루코피라노사이드	+	58	NaCl6.5%	+
25	엘만	-	59	카나마이신	-
30	클라이신	-	63	플로마이신	-

* + : 양성 결과, - : 음성 결과

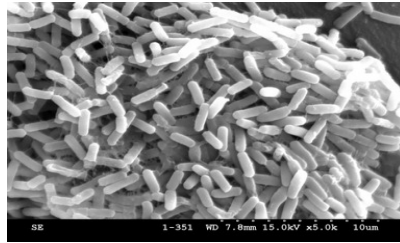


그림 1. *Bacillus* sp. GM-B6 전자현미경 사진

다. 선발균주의 최적 배양 및 배지조건

생육촉진 미생물 *Bacillus* GM-B6에 대한 배양적 특성을 조사한 결과 25℃, pH 5~7, 48시간 이상 배양조건에서 600nm 파장의 OD값이 1.0 이상이 적합한 것으로 나타났다(그림 2). 적정 배지선발을 위해 배지종류별 25℃에서 배양한 결과, MIB(Micro Inoculum Broth, Difco)배지와 TSB(Tryptic Soy Broth, Difco)배지에서 180rpm으로 48시간 배양하였을 경우 OD값이 가장 높았다(표 3).

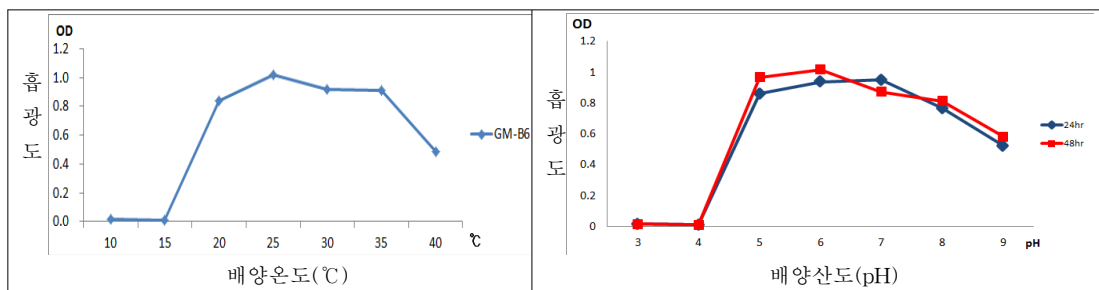


그림 2. *Bacillus* sp. GM-B6의 온도 및 산도 조건에 따른 OD값 변화

표 3. 배지 종류와 배양 시간별 *Bacillus* sp. GM-B6의 배양 특성

배양시간 \ 배지종류	TSB	MIB	MRSB	PDB	YMB	NB	LB
24시간	1.25*	1.26	0.01	0.01	1.01	0.18	1.00
48시간	1.17	1.54	0.01	0.01	0.89	0.58	1.31

* 배양정도: 600nm OD값 측정

Bacillus GM-B6 배양에 적합한 탄소원은 표 4와 같이 sucrose와 starch를 이용했을 때 배양이 잘 되었으며, 질소원은 효모추출물을 이용한 배양에서(표 5), 무기염류는 NH₄Cl, KCl이용시 배양이 잘 되었다(표 6).

표 4. 탄소원별 *Bacillus* GM-B6의 배양 특성

배양시간 \ 탄소원	maltose	fructose	glucose	lactose	sucrose	mannitol	starch	sorbitol
24	0.01*	0.01	0.01	0.01	0.07	0.07	0.06	0.06
48	0.04	0	0.10	0.10	0.11	0.09	0.23	0.07
72	0.05	0.04	0.07	0.08	0.12	0.08	0.21	0.07

* 25°C, 600nm OD값 측정

표 5. 질소원별 *Bacillus* GM-B6의 배양특성

배양시간 \ 질소원	Yeast extract	beef extract	malt extract	bacto peptone	bacto tryptone	ammonium sulfate	ammonium chloride
24	1.15*	0.07	0.14	0.11	0.95	0.07	0.36
48	1.38	0.14	0.14	0.15	0.80	0.09	0.53
72	1.24	0.13	0.13	0.14	0.72	0.09	0.42

표 6. 무기염류별 *Bacillus* GM-B6의 배양특성

배양시간 \ 무기염류	NH ₄ Cl	NaCl	K ₂ HPO ₄	CaCl ₂	LiCl	KCl	MgSO ₄ ·7H ₂ O	FeSO ₄	FeCl ₂	BaCl ₂
24	0.89*	0.86	0.74	0.61	0.91	0.90	0.85	0.19	0.18	0.50
48	1.17	1.14	1.27	0.79	1.06	1.16	1.08	0.25	0.19	0.75

라. 생장촉진 호르몬 생성 조사

작물생육촉진 활성 물질을 LC MS/MS를 이용하여, 그림 3과 같이 지베렐린4의 생성을 확인할 수 있었고, 배지종류별 지베렐린의 생성량을 조사한 결과 TSB배지에서 배양하였을 경우 가장 많이 생성되었으며, 배양시간별 지베렐린4의 생성량을 비교했을 때 72시간 이상 배양하였을 경우 102.1ng/ml로 가장 많이 검출되었다(표 7,8).

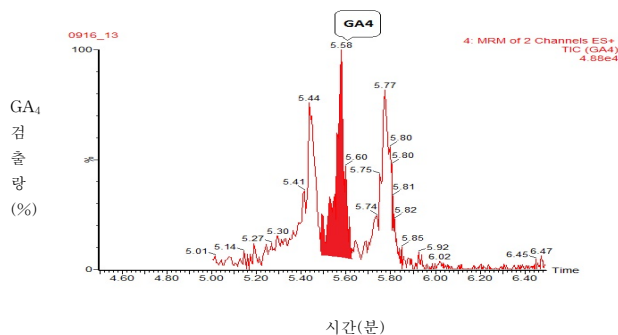


그림 3. 지베렐린4 생성 스펙트럼

표 7. 배지종류별 성장촉진 호르몬 생성

호르몬 종류	배지종류별 호르몬 생성량(ng/ml)		
	NB	YMB	TSB
GA ₄	42.4	73.6	102.1
IBA	-	-	-
BA(6-Benzylaminopurine)	-	-	-
Kinetin	-	-	-

* - : non-detected

표 8. 배양시간별 지베렐린 생성량

배지 종류	배양시간별 생성 지베렐린(ng/ml)		
	24시간	48시간	72시간
TSB	30.8	75.3	102.1
YMB	35.1	50.4	73.6

마. 미생물 처리시 작물생육 촉진 효과

채소육묘 및 재배시 본 발명 미생물 처리에 대한 효과를 확인하기 위해 상토와 10⁷cfu/ml 농도로 맞춘 미생물 배양액을 6 : 1의 비율로 혼합한 후 파종하였을 경우 출아율은 작물별로 표 9과 같이 무처리보다 2~28% 높았으며 육묘상에서의 생육은 무처리 대비 작물별로 엽장 5.6~18%, 엽폭 3.3~8.3%, 엽수 4.5~7.8%로 생육이 촉진되었다(표 10).

표 9. 육묘상에서 GM-B6의 작물별 출아율

처리내용	작물별 출아율(%)				
	상추	배추	쭈갓	오이	토마토
GM-B6	100	100	83	87	95
무처리	87	97	55	78	93

표 10. 육묘상에서 GM-B6의 작물별 생육촉진 효과

작물	처리내용	엽장(mm)	엽폭(mm)	엽수(개)	육묘일수(일)
상추	GM-B6	98.9	66.8	5.5	19.8
	무처리	83.8	61.7	5.1	21.3
배추	GM-B6	91.0	42.6	4.2	14.3
	무처리	83.1	39.3	3.9	15.3
오이	GM-B6	71.0	92.6	2.3	-
	무처리	67.2	89.6	2.2	-

시설재배 하우스에서 상추와 오이, 방울토마토에 대한 생육촉진 효과를 확인한 결과, 상추 수량이 약 10% 증가하였으며 오이는 수량은 증가하였으나 유의성이 없었

다(표 11), 방울토마토는 엽장 12%, 엽폭 14%, 주경 21% 증가하는 작물생육 촉진효과를 보였으며, 과실에 대해서는 무처리 대비 과실길이 5.5%, 과실폭 8.7%, 과실무게가 22.9% 증가하는 효과를 보였다(표 12).

표 11. 포장에서 GM-B6의 상추, 오이 생육촉진 효과

작 물	처 리 내 용	수 량	
		(g/주)	(kg/10a)
상 추	GM-B6	341.3	3,379 ^{a,j}
	무처리	314.6	3,115 ^b
오 이	GM-B6	676.0	6,556 ^a
	무처리	611.8	5,058 ^a

* GM-B6처리(월/일) : 4회(4/25, 5/3, 10, 17)

* 상추품종; 선풍, 정식(월/일) ; 4/12, 수확 ; 7회(4/30, 5/9, 14, 22, 29, 6/5, 11)

* 오이품종; 백다다기, 정식(월/일) ; 4/9, 수확:5회(5/22, 31, 6/4, 7, 11)

↓: t-Test

표 12. 포장에서 GM-B6의 방울토마토 생육촉진 효과

작 물	처리내용	엽장 (mm)	엽폭 (mm)	주경 (cm)	과장 (mm)	과폭 (mm)	과중 (g)
토마토	GM-B6	13.1 ^{a,j}	7.4 ^a	10.2 ^a	37.9 ^a	26.2 ^a	16.6 ^a
	무처리	11.7 ^b	6.5 ^b	8.4 ^b	35.9 ^b	24.1 ^b	13.5 ^b

* 정식(월/일) : 5/6, GM-B6 관수처리(월/일) : 5회(5/9, 18, 30, 6/13, 27)

* 조사시기(월/일) : 7/5, 시험장소 : 수원시 당수동

↓: t-Test

4. 적 요

채소 친환경재배 기술 확립을 위한 작물의 생육촉진 미생물을 개발하기 위하여 시설하우스 토양에서 미생물을 분리, 선발하고 균 특성과 지베렐린을 생성하여 작물생육 촉진효과를 조사한 결과는 다음과 같다.

가. 작물의 생육촉진 효과가 있는 미생물 균주를 육묘상 처리를 통해 선발하였다.

나. 선발된 균주는 생화학반응과 16s rRNA분석을 통해 동정한 결과 *Bacillus* sp.로 동정되었고, *Bacillus* sp. GM-B6로 명명하였다.

다. *Bacillus* sp. GM-B6의 배양조건은 온도 25℃, pH 5-7, MIB, TSB배지 48시간 이상 배양하는 것이 OD값이 1.0이상 높게 나타났다. 최적 영양원으로 탄소원은 sucrose, 질소원은 yeast extract, 무기염류는 NH₄Cl, KCl에서 배양이 우수하였다.

라. *Bacillus* sp. GM-B6 균주는 TSB배지, 72시간 이상 배양시 성장촉진 호르몬 GA₄ 102.1ng/ml 생성이 확인되었다.

마. *Bacillus* sp. GM-B6를 상토혼합처리하여 작물육묘시 생육은 무처리 대비 상추잎이 8~15% 생육이 좋았고, 포장에 관수처리시 상추와 오이는 8~10% 증수하였으며, 농가에서 관수처리한 방울토마토 생육은 엽장 12%, 엽폭 14%, 과장 6%, 과중 23% 증가하여 생육이 양호하였다.

5. 인용문헌

- 이강형, 송홍규. 2007. 근권에서 분리한 *Bacillus* sp.의 적용에 의한 토마토의 생장 촉진. *Kor. J. Microbiol.*, 43(4):279-284
- 정희경, 김진락, 우상민, 김상달. 2006. Auxin과 Siderophore 생산성 다기능 생물방제 균 *Bacillus subtilis* AH18. *Kor. J. Microbil. Biotechnol.* 34(2):94-100.
- 정희경, 김진락, 우상민, 김상달. 2007. Auxin, Siderophore 및 Cellulase 생산성 다기능 식물생장촉진 미생물 *Bacillus licheniformis* K11의 선발 및 식물생장촉진 효과. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 50(1):23-28.
- Arkhipova T.N., Veselov S.U., Melentiev A.I., Martynenko E.V. and Kudoyarova G.R. 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil* 272:201-209.
- Ates, S., Ozenir, S. and Gokdere, M. 2006. Effect of silicone oil on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* and *Aspergillus niger*. *Appl, Biochem. Microbiol.* 42:500-501.
- Eriksson S., Bohlenius H., Morits T., and Nilsson O. 2006. GA4 Is the Active Gibberellin in the Regulation of LEAFY Transcription and Arabidopsis Floral Initiation. *The Plant Cell* 18:2172-2181.

6. 연구결과 활용제목

- 지베렐린을 생산하는 미생물 및 이를 이용한 미생물제제(특허출원 제2012-0149488호)

7. 연구원 편성

세부과제	구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도
						'10~'12
작물 생육촉진 미생물 개발 및 효과 구명	책임자	농업기술원 환경농업연구과	농업연구사	이현주	세부과제총괄	○
	공동연구자	"	농업연구관	홍순성	과제수행자문	○
		"	"	원선이	자료조사	○
		"	"	김순재	시험자문	○
		"	"	김희동	시험자문	○