

최 중
연구보고서

유용미생물 (질소고정균, 인산가용화균,
PGR 생성균)복합체를 이용한 친환경 생물비료 개발
Biofertilizer development using beneficial microbial
(N₂-fixer, P-solubilizer, PGPR) consortium

주관연구기관 : 충북대학교

협동연구기관 : 대구대학교

농 립 부

최 중
연구보고서

유용미생물 (질소고정균, 인산가용화균,
PGR 생성균)복합체를 이용한 친환경 생물비료 개발
Biofertilizer development using beneficial microbial
(N₂-fixer, P-solubilizer, PGPR) consortium

주관연구기관 : 충북대학교

협동연구기관 : 대구대학교

농 립 부

유용미생물 (질소고정균, 인산가용화균,
PGR 생성균) 복합체를 이용한 친환경 생물비료 개발

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유용미생물(질소고정균, 인산가용화균, PGR 생성균) 복합체를 이용한 친환경 생물비료 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월

주관연구기관명 : 충북대학교
총괄연구책임자 : 사 동 민
연 구 원 : M. Madhaiyan
R. Anandham
S. Poonguzahli
P. Indiragandhi
류 정 현
임 우 종
김 경 아
홍 인 수
협동연구기관명 : 대구대학교
협동연구책임자 : 정 종 배

요 약 문

I. 제 목

유용미생물(질소고정균, 인산가용화균, PGR 생성균) 복합체를 이용한 친환경 생물비료 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

토양은 지구 생태계의 대다수 생명체들이 살아가는 바탕으로서, 토양에서 서식하는 미생물 중 많은 종류의 미생물이 식물의 생육촉진, 물질 순환 및 환경 정화 등 수 없이 많은 중요한 역할을 수행하고 있다. 농업은 이러한 토양 생산력에 기반을 두기 때문에 생산성 지속을 위해서는 환경보전형 농업을 통한 토양의 건전성 확보가 시급한 상황이다. 농업 생산성 지속성을 위협하는 주요한 요인은 화학비료와 농약의 과다한 사용량과 장기 지속적인 사용에 따라 유발되는 토양악화에 있다. 화학비료의 연속적인 사용은 토양을 산성화시킬 뿐만 아니라 토양내의 염류 집적에 의해 토양 물리성을 악화시킴으로서 잠재적 농업 생산성을 감소시킨다. 이러한 이유로 화학비료의 사용을 줄이는 저투입 농업(LISA)과 꾸준한 유기질 비료의 사용으로 지력을 유지 또는 증진시키는 것이 관건이라 할 수 있으며, 환경보전형 농업이 지향되어야 할 필요성이 절실한 시점이다.

친환경농업에 있어서 필요 불가결한 요인은 화학물질에 의한 부담을 최소화하고 오염된 환경을 회복할 수 있는 자원을 공급하여 토양의 구조와 비옥도를 지속적으로 유지하거나 개선해나가는 것이라 할 수 있다. 이러한 목적을 성취하기 위한 하나의 방법으로 미생물 제제(microbial material)가 사용되어 오고 있는데 이유는 농업환경 안의 모든 작물 특히 토양의 양분순화에 있어서 미생물의 역할이 핵심적이기 때문이다. 화학질소비료의 사용량을 감소시킬 수 있는 대안으로 다양한 비효관련 미생물(질소고정균, 인산가용화균, PGR 생성균 등)을 이용하여 미생

물 비료를 개발하는데 본 연구의 목적이 있다. 이를 위하여 다양한 이화학적 성질을 토양에서 분리된 질소고정능 및 인산가용화능이 우수한 균주 및 PGR 생성균을 이용하여 다양한 종류 및 크기의 담체에 고정화시켜 제재화를 시도하여 몇 가지 작물을 대상으로 단독 및 복합 처리하여 생육을 검토하여 화학비료를 일정 부분 대체할 수 있는 환경친화적인 미생물 비료의 개발이 요구된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 내용은 미생물 비료의 개발을 위하여 우수한 능력을 보유한 인산가용화균, 질소고정균 및 PGR 생성균을 2차 선발 또는 신규 분리하여 생리학적 및 분자생물학적 기법으로 측정하였다. 또한 미생물 단독 배양시 질소고정능 및 인산가용화능은 물론 접종 미생물이 뿌리에 감염되는 정도 및 감염된 상태에서 질소고정능 및 인산가용화능을 비교되고 각각의 미생물을 접종하여 작물의 초기생육에 미치는 영향을 비교하였다. 2차 선발된 우수균주를 대상으로 경제적 방법의 제형화 방법 개발을 위하여 고기능 인산가용화균을 대상으로 황토, 쌀겨 및 인광석을 이용하여 고정화시켜 제형화된 제품의 성능을 비교하였다. 또한 미생물 비료의 처리효능을 화학비료 처리와 비교하기 위하여 인산가용화균 및 인광석 처리와 인산화학비료 처리구와 비교하였으며 질소고정균, 인산가용화균 및 PGR 생성균의 단독 및 복합 처리시 작물체에서의 효과를 실험하였다. 본 연구의 범위는 다음과 같다.

균주의 인산가용화 활성을 측정하기 위해 선발된 질소고정균을 사용하여 배양한 후 상정액을 이용하여 ammonium-molybdate 청색 발색법으로 유리인산의 농도를 측정 및 정량하여 질소고정균 중 인산가용화능이 있는 균주를 최종 선발하였다. 인산가용화균의 질소고정능을 측정하기 위해 N-free 액체배지에 접종하여 배양한 후 배지에서 10% 공기를 뽑아내고, 10%의 아세틸렌 가스를 주입한 후, 다시 4시간동안 배양한 후 에틸렌 가스를 가스크로마토그래피로 정량하고, 배지내 균생체량은 단백질 분석법을 이용하여 계산하였다. 질소고정균 및 인산가용화균의 식물생장조절물질(PGR) 생산량을 알아보기 위해 100 mL 선택배지에

L-Tryptophan(100 mg L⁻¹)을 첨가하고, 균주를 접종한 후, 진탕배양하여 원심분리하고, 상정액을 1N-HCl로 pH 2.8까지 산성화시킨 후, 상정액과 동량의 ethyl-acetate로 2~3번 추출하여, 감압건조하고 잔사는 70% ethyl alcohol 재현탁하여, 액체크로마토그래피로 측정 및 정량하였다.

미생물 접종 후 근권의 활착률을 알아보기 위하여 일정한 크기의 종자를 골라 멸균한 후 발아시켰다. 오염되지 않은 종자를 골라 4 g의 멸균된 vermiculite가 포함된 50 mL McCartney병에 2 개체씩 파종하고, 배양액을 field capacity(3.4 mL g⁻¹ dry vermiculite)로 조정된 후 접종하였다. 작물 성장 3~4일 후 일정량의 균을 각각의 병에 접종하고 light chamber에서 배양하였다. 각 병에 2~4일에 한번씩 소실된 양만큼의 배양액을 공급하였다. 작물 뿌리에 *Azospirillum* 균주의 군집 형성능을 확인하기 위해 국내 토양으로부터 분리 동정되어진 5종의 *A. brasilense* 와 1종의 *A. lipoferum* 균주를 pLA-lacZ gene을 포함하는 *E. coli* S17.1와 접합 시켰다. *Azospirillum* 균주가 식물 뿌리에 효과적으로 군집형성능을 나타낸 것을 X-gal 염색을 통하여 확인하였다. 또한 작물재배 실험에서 일반적으로 호르몬 제조제인 2,4-D를 소량 처리하고 처리하지 않은 균주와의 작물 뿌리에 군집을 이루는 균체수를 비교하였다. 감염된 작물의 질소고정능 측정은 다음과 같이 시행하였다. 오염되지 않은 종자를 골라 4 g의 멸균된 vermiculite가 포함된 50 mL McCartney병에 2 개체씩 파종하였다. 배양액을 field capacity(3.4 mL g⁻¹ dry vermiculite)만큼 파종 시 접종하였다. 작물 성장 3~4일후 일정량의 균을 각각의 병에 접종 한 후 light chamber에서 배양하였다. 균 접종 2주 후 가스크로마토그래피를 이용하여 환원된 에틸렌의 양을 측정하였다.

간접 인산가용화 효율을 측정하기 위해 Pikovskaya 배지를 이용하여 plate assay로 테스트 하였다. 30℃에서 8일간 배양한 균주의 용해 범위와 colony 직경을 측정하였다. 정량 평가는 Pikovskaya의 액체 배지를 이용하여 실시하였다. 삼각플라스크에 배지 100 ml를 넣고 세균 균주(10⁷cfu ml⁻¹) 1ml를 3반복으로 접종하였다. 배양 후 원심분리하여 상정액에 있는 가용성 인산을 molybdenum blue method 로 분석하였다. 동시에, 배지의 pH를 측정하고, 균 밀도는 10배씩 순차로 희석된 배양액들을 가지고 nutrient agar 배지에서 pour plate technique을 사용하

여 측정하였다. 황토+5% 인광석, 황토+10% 인광석, 황토:쌀겨(1:1)+5% 인광석, 황토양:쌀겨 (1:1) + 10% 인광석 등 4가지 조합으로 펠렛을 25℃ 및 4℃에 저장하여 0일, 3일, 15일, 30일, 60일, 90일 만에 생존 균수를 측정하였고, 다음으로 황토와 쌀겨를 1:1로 함유한 펠렛에서 탄소원으로 glucose 또는 glycerol을 0.1% 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 25℃ 및 4℃에 저장하였을 때 *Burkholderia* sp.의 생존수를 평가하였다. 마지막으로 황토와 쌀겨가 1:1이고 인광석이 10% 함유된 펠렛에서 탄소원으로 0.1% glucose, 1% glucose, 0.1% glycerol, 1% glycerol 및 무 탄소 등 속효성 탄소 수준별로 *Burkholderia* sp.의 생존력과 인산 가용화능을 측정하였다. 영양 배양액 1리터에 세균(10^7 cfu ml⁻¹) 10ml를 넣고 120rpm으로 진탕 시키면서 30℃에서 배양 후에 지수 성장 후기 세포를 원심분리기로 수확하여 0.85 % 염화나트륨 60ml로 2회 씻은 후 0.85% 염화나트륨 200ml에 넣어 세포 현탁액을 만들었다. 입상 미생물 제제 조제는 황토, 쌀겨 및 인광석을 혼합하여 멸균한 뒤 증류수 및 glucose/glycerol 탄소원 첨가액 200ml를 세포현탁액 200ml과 혼합하여 담체 1kg과 잘섞어 잘 섞어 펠렛을 만들었다. 균주를 투여하지 않고 조제된 펠렛을 Control로 공시하였다. 직경이 3mm인 펠렛을 약 1.5cm 길이로 잘라 2일간 풍건하였다. 펠렛을 3반복으로 나눠 90일간 각각 25℃ 및 4℃에 저장하였다. 펠렛의 세균수 계측은 펠렛 5g을 취해 멸균 증류수 95 ml에 무균상태로 넣고 120 rpm으로 작동하는 로터리 진탕기에서 30분간 진탕한 후에 Nutrient agar에서 Spread plate technique을 사용하여 계측하였다. 펠렛의 화학적 분석을 위해 펠렛 5g을 200ml 용량의 추출병에 넣었다. 추출액 즉, 증류수 혹은 0.5M NaHCO₃ (NaOH를 사용하여 pH 8.5로 조정) 50ml를 추출병에 넣었고 20℃에서 30분동안 40rpm으로 진탕하였다. 추출 후 현탁액을 whatman No.42 여지로 여과하였다. 수용성 및 중탄산소다 가용성 인을 molybdenum blue method로 측정하였다. 증류수와 혼합(고체:물=1:5)한 후 간간히 저어 주면서 15분간 정치 후 펠렛의 pH를 측정하였다.

복합 미생물[질소고정균(Rhizobium) 및 인산가용화균(Bacillus)의 동시배양]의 작물체 접종효과를 규명하기 위하여 식물체(콩, blackgram)에 인산가용화균 및 질소고정균을 동시배양하여 접종[M(N+P)]한 것과 인산가용화균 및 질소고정균을 별도로 배양하여 각각 접종[S(N+P)]한 후 식물체의 발아율, 생육 및 수확 후 토양

효소의 활성을 비교하였다. 토양효소활성 측정방법은 acid phosphatase와 urease는 Tabatabai and Bremner의 방법을 이용하였으며 nitrogenase 활성은 acetylene환원법으로 측정하였다. 다양한 미생물 복합체를 개발하기 위하여 세균과 함께 선발된 곰팡이를 대상으로 인산가용화세균에 대해 비교적 가용화능이 약한 철 및 알루미늄에 결합된 인산에 대하여 가용화능이 우수한 것으로 판명된 *P. oxalicum*을 이용하여 옥수수 재배시 철, 칼슘 및 알루미늄에 결합된 인산의 가용화능을 평가하여 인산 화학 비료(용성인비)시용과 효과를 비교 하였다. 질소고정균, 인산가용화균 및 식물생장조절물질생산균의 복합 접종효과를 규명하기 위해서 CW903(질소고정균), CBMB20(식물생장조절물질생산균) 및 CBPB-HOD(인산가용화균)을 단독, 2중 복합 및 3중복합 접종하여 토마토, 고추 및 병의 생육을 검토하였다. 또한 작물수확 후 질소, 인산, 가리, 칼륨 및 마그네슘의 흡수량을 분석하여 유의성 검정을 행하였다. *Methylobacterium oryzae* 균주 CBMB20은 0.5% methanol이 포함된 AMS 배지에서 배양하였고, *Burkholderia* CBPB-HOD는 TSB 배지에서 배양하였다. 질소 고정균인 *Azospirillum brasilense* CW903은 리터당 1g의 NH_4Cl 을 첨가한 Nfb 배지에 배양하였다. 그런 후에 종자처리를 위해 종자를 멸균, 세척한 후에 균주를 접종하기 위해 액체 배지에서 배양한 박테리아를 원심분리 한 후 30mM MgSO_4 로 25°C에서 다시 현탁하였다. 균주는 $1.0(10^8 \text{ cfu/ml})$ 의 OD_{600} 에서 조정되어 종자에 접종시켰다. 토양 접종은 파종 20일째에 배양액 1ml을 pot의 근권부 토양에 두 번씩 접종하였고, 엽면 시비는 20, 30 일째 두 번에 걸쳐 접종원(10^8 cfu/ml)을 잎이 충분히 젖을 때 까지 뿌려주었다. 그 후 작물을 뿌리째 이식 45일 후 수확하여, 분석하였다.

Nitrogenase의 활성은 다음과 같이 측정하였다. 토양 샘플 1g을 40ml 반고체의 N-free 배지가 들어있는 120ml McCartney bottle에 첨가했다. 30°C에서 48시간 bottle을 배양한 후 bottle에서 10%의 공기를 제거하고 10% acetylene을 첨가한 후 이 bottle을 30°C, 24시간 이상 배양했다. 토마토 뿌리에 부착된 토양 입자들을 제거하고, 병에 넣어 봉한 후 실온에서 한 시간 동안 배양한 후 GC를 이용하여 생성된 ethylene을 측정했다.

식물체 분석은 고추, 토마토, 벼 식물체를 수확, 세척, 건조 후, 마쇄 후 시행하

였다. 과중 후 8주에 식물에서 채취한 뿌리의 질소고정력을 측정하였다. 건강한 식물 뿌리는 vial에 보관하고, 공기 5ml를 주사기를 이용해 acetylene으로 대체한 후 실내온도에서 삼십 분 동안 정치시킨 후에 에틸렌의 생성량을 GC를 이용하여 측정하였다. 식물 뿌리와 줄기에서 양분의 흡수는 hot plate에 과염소산, 황산, 분석법을 이용하여 측정했다. 분해 후 샘플을 filter paper로 두 번 여과시킨 후 100ml 플라스크에 샘플 10ml을 넣고 ICP-OES를 이용하여 측정하였다. PerkinElmer Life와 Analytical Sciences의 품질 관리 기준 21 표준 용액을 사용했다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

근권 토양에서 분리한 미생물의 IAA 생산능력, 질소고정능력 및 인산가용화능력을 측정하였다. 1차 선별된 400여개의 미생물 중 IAA를 생산하고, 질소고정능력을 동시에 보유하는 미생물은 47개였으며 IAA 생산능력은 1.44-28.08ug/ml로 매우 다양하였다 또한 아세틸렌환원력을 측정하여 질소고정능력을 측정한 결과는 1.72-14.28 nmole/mg-protein/h 로 나타났다. 이러한 IAA 생산 및 질소고정능을 대상으로 15개의 미생물을 대상 지방산 분석비교 방법(MIDI)을 이용하여 동정하였다. 이러한 방법으로 동정한 결과 *Pseudomonas* 및 *Burkholderia*가 많은 것으로 나타났다. 또한 이 15종의 균을 대상으로 인산가용화능을 측정한 결과 이 중 10개의 균이 인산가용화능을 나타내었다.

본 실험실에서 기 분리한 식물생장조절물질 생산능 및 질소 고정능을 보유하고 있는 균(CBMB 20)을 이용하여 벼에 감염시킨 후 식물유묘의 식물생장조절물질(t-ZR, iPA 및 IAA) 및 감염된 유묘뿌리의 질소 고정능을 측정하였다. CBMB20을 접종한 식물체의 식물생장조절물질의 함유량이 대조구에 비하여 20% (IAA)에서 450% 정도 증가함을 알 수 있었으며 국내 균주보관소에서 보관중인 다른 우량주보다 접종 효과가 우수함을 알 수 있었다. 또한 감염된 뿌리의 질소 고정능도 CBMB20을 접종한 경우 대조구나 기타 균을 접종한 것보다 우수함을 알 수 있었다.

CBMB20을 종자에 처리하여 발아율을 측정 하였다. CBMB20을 종자에 처리

하였을 때 무처리구에 비하여 20%이상의 발아율이 증가됨을 알 수 있었으며 이는 CBMB20의 종자처리가 식물생장 조절물질의 생성을 촉진한 결과로 생각된다. CBMB20접종에 의하여 벼 유묘에서 Seedling vigor index 또한 30%이상 증가되는 결과를 나타내었다.

충북지역 근권토양에서 분리한 질소고정균(*Azospirillum*)의 생리화학적 성질을 알아보기 위해 실험을 수행하였다. 질소고정균의 2개 기준균인 *A.lipoferum* 687과 *A.brasilense* Sp.7과 함께 비교한 결과 모든 균들은 그람 음성자 산화효소로 반응했고, 표면 아래 상피 특징을 NFB배지에서 형성했다. 16개 중 12개 균은 *A.brasilense* Sp.7의 특징을 보여줬고, CW1503은 *A.lipoferum* 687의 특징을 보여줬다. 반면 3개종, 즉 CW 302, CW 709, CW902는 *A.lipoferum* 687과 *A.brasilense* Sp.7의 특징을 어느 것도 보여주지 않았다. 비록 이 균이 자신의 성장에 글루코오스와 비오틴을 사용할 수 있더라도, 그들은 BMS agar에서 모식적인 노란 콜로니를 생산했다. 또한 *Enterobacter* spp. *Enterobacter*균으로 밝혀진 것도 API 20E 분석결과 모두 그람 음성자, 산화효소 음성자, 자동성을 지닌 편모로 나왔고, 질소고정을 할 수 있었다.

모든 분리균주는 단독 생육상태에서 acetylene환원 방법을 이용하여 측정된 결과 질소고정력을 나타냈다. 토양에 접종 사용 시 효과를 보기 위해서는 작물의 뿌리에 감염되어 질소를 고정시키는 능력이 우수한 균주가 필요하기 때문에 분리균주를 대상으로 뿌리 감염률을 조사하고 감염된 식물체 근권의 질소고정력을 측정하였다. 본 실험실에서 분리한 질소고정균(CW1401, 1503, 301, 307, 716 및 903)을 접종한 밀 유묘의 뿌리를 채취하여 근권에 존재하는 접종균주를 계수한 결과, CW1401에 접종된 뿌리에서 가장 높은 수의 접종균주가 생존함을 알 수 있었다. 접종균주의 뿌리 활착률 향상에 도움이 되는 것으로 알려진 2, 4-D의 처리는 질소고정균의 뿌리활착에도 도움이 되는 것으로 나타났으나 실제로 응용하기 위하여서는 사용 방법에 관한 많은 연구가 필요할 것이다.

Plate assay에 의한 간접적인 인산 가용화 능력 측정 결과, *Burkholderia* sp. CBPB-HIM strain의 가용화 효율은 120.54%로 나타났으며, 액체 배지에서 인산 가용화 능력, pH 및 미생물의 밀도의 변화를 측정하였다. *Burkholderia* sp.

CBPB-HIM에 의해 용해된 가용성 인(P)은 48시간 만에 최고치인 363.78 mg L^{-1} 를 기록하였다. 48시간 후 가용성 인 함량이 감소하였으며, 96시간과 120시간에는 가용성 인이 존재하지 않았다. 이것은 아마도 측정하는 동안 유효인산의 소모에 기인하는 것으로 추정된다. 배지의 초기 pH는 7.2였는데, 가용화가 진행됨에 따라 배지의 pH가 크게 저하되어 48시간대에 최저인 5.11을 기록하였다. 그 후 배지 pH가 증가하여 96시간에는 6.11을 나타냈다. 세균의 밀도는 48시간의 배양에서 최고치인 약 10^8 cfu ml^{-1} 에 달하였으며, 그 후에 감소하였으나 120시간까지 일정한 수준을 유지하였다.

고품질의 접종제를 위한 가장 중요한 요인은 세포의 생존력이다. 생존하는 세포 수를 측정함으로써 접종제의 품질을 측정하는 것은 접종제의 역가에 대한 정밀한 지표로 간주 된다. 슬러리 접종제보다 펠렛 상태의 접종제가 근류 세균의 생존에 좋은 조건을 제공하였다는 보고가 있다. 본 실험에서는 황토, 쌀겨, 인광석으로 이뤄진 펠렛에서 *Burkholderia* sp.의 생존에 대해 실험하였다. 펠렛 제조 당일에는 황토:쌀겨(1:1)+인광석 펠렛의 생존 세포수가 황토+인광석보다 유의하게 많았다. 30일 및 60일의 저장에서는 처리간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 90일간 4°C에 저장한 경우에는 황토:쌀겨(1:1)+10% 인광석 함유 펠렛의 군수가 타 처리에 비해 유의하게 많았다. 점토:쌀겨(1:1) 펠렛에 glucose 0.1% 첨가한 경우 글리세린 0.1% 첨가한 경우 및 아무것도 첨가하지 않은 경우보다 세포수가 많았다. 그러나 펠렛 제조 당일에는 탄소원을 첨가하지 않은 펠렛과 통계적으로 유의차는 없었다.

토양에 세균과 양분을 함께 투입함으로써 접종제의 생육이 증진되었다는 연구 결과가 있으며, 본 연구에서도 담체에 양분과 세균을 함께 첨가하여 펠렛을 만든 후 결과를 비교하였다. glycerol이 첨가된 펠렛에 비해 glucose가 첨가된 펠렛의 세포 수가 유의성 있게 높게 유지되었다. 1% glucose가 첨가된 점토:쌀겨(1:1)+10% 인광석을 담체로 한 펠렛을 25°C에 저장한 경우 15일과 30일에는 타 처리보다 유의성 있게 세포수가 많았고, 0.1% glucose를 첨가한 펠렛이 다음을 차지하였다. 한편, 점토:쌀겨(1:1)+10% 인광석을 담체로 한 펠렛을 4°C에 저장한 경우에는 90일까지 전 기간에 걸쳐 1% glucose를 첨가한 처리가 타 처리보다 균

주의 생존량이 많았다. 다음은 0.1% glucose 첨가 처리가 차지하였다.

펠렛에서의 가용화된 인산의 함량을 측정하였다. 모든 처리에서 수용성 인 함량은 5일에 최대가 되었는데, 0.1% glucose 펠렛을 5일간 배양한 경우 가장 높았으나(206.86gP g⁻¹ dry pellet), 1% glucose 첨가와 별 차이가 없었다. 이 결과는 액체 배지에서 인산 가용화는 glucose 농도에 비례하여 증가한다는 보고와 일치하지는 않았다. 펠렛의 중조 가용성 인은 15.97 ~21.04mg kg⁻¹ dry pellet이었으며, 이는 수용성 인보다 약간 높았다. 중조 가용성 인 함량은 5일에 1% glycerol 첨가 펠렛에서 가장 높았는데(245.17mg kg⁻¹ dry pellet), 1% glucose 첨가 펠렛과 비슷하였다.

복합 미생물[질소고정균(Rhizobium) 및 인산가용화균(Bacillus)의 동시배양]의 작물체 접종효과를 규명하기 위하여 식물체에 인산가용화균 및 질소고정균을 동시배양하여 접종[M(N+P)]한 것과 인산가용화균 및 질소고정균을 별도로 배양하여 각각 접종[S(N+P)]한 후 식물체의 발아율, 생육 등을 비교하였다. 질소고정균(N)과 인산가용화균(P)의 종자처리는 무처리에 비하여 발아율 및 발아세에 유의성 있는 증가를 보였으며 각각의 단독처리에 비하여 복합처리시 그 증가율이 더욱 컸다. 또한 처리 방법 [M(N+P)와 S(N+P)]간에는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 처리 방법 [M(N+P)와 S(N+P)]에 따른 식물체의 생육을 조사한 결과 식물체의 건물량, 지상부 및 지하부 길이 모두 접종구에서 유의성 있는 증가를 나타내었다. 복합처리 방법 간에는 생육 초기(이식후 30일)에는 동시배양군처리가 건물량 증가에 더 큰 영향을 나타내었으며 중반기 이후에는(이식후 60일) 건물량, 지상부 및 지하부 길이가 단독배양하여 복합처리 한 것에 비하여 우수하였다. 처리 방법[M(N+P)와 S(N+P)]에 따른 식물체의 생육을 조사한 결과 M(N+P)처리가 S(N+P)처리에 비하여 주당 nodule수가 높았으나 nodule당 무게는 낮았다. 수확량은 무처리에 비하여 M(N+P)처리 및 S(N+P)처리에서 유의성 있게 증가하였으나 처리 방법 간에는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 수확 후 토양의 nitrogenase, urease 및 phosphatase의 활성은 무처리구에 비하여 M(N+P)처리 및 S(N+P)처리에서 유의성 있게 증가하였으나 처리 방법 간에는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

인산 가용화균 단독처리 또는 인광석 단독 처리시 식물의 인산 흡수량을 알아 보았다. 무처리에 비하여 인산흡수량이 크게 늘어났으며 인광석 및 인산가용화균 을 같이 처리할 경우 더욱 늘어났다. 이는 인산가용화균의 접종이 토양에서 흡착 되어 불용화된 인산의 가용화를 촉진 시켜 근권의 유효 인산량을 증기시키며 동 시에 함께 처리 한 인광석의 가용화속도도 증가 시키는 것을 나타낸다. 그러나 화학인산비료(용성인비)를 권장시비량에 따라 시비할 경우 인산 가용화균의 효과 는 나타나지 않았다. 또한 인산 가용화균 및 인광석의 처리에 따른 질소흡수도 인산의 흡수에 미치는 영향과 비슷하게 나타났다.

*Methylobacterium oryzae*와 N fixing *Azospirillum brasilense* 와 P-solubilizing bacterium *Burkholderia* sp. strain CBPB-HOD 의 접종을 통해 토마토와 고추, 벼의 세 가지 다른 작물의 성장과 양분 흡수 효과를 평가하였다.

토마토에 대한 3종 균주의 단독 및 복합처리 효과는 무처리구와 비교했을때 CW903, CBPB-HOD, CBMB20 의 접종은 뿌리와 근권 에서 줄기 길이, 가지 둘 레, nitrogenase 활성들의 증가를 나타내었다. 때때로 이들 균주 사이의 두 가지 박테리아 균주의 접종은 뚜렷한 다른 효과를 나타내는 결과를 나타내었다. CBMB20을 접종 시켰을 때 CBPB-HOD 또는 CW903으로 복합처리된 토마토 뿌 리에서 nitrogenase 활성은 특이적인 증가를 보여주었다. 그러나 무처리구와 비교 했을 때 세 가지 균주를 한 번에 접종시킨 경우에는 뿌리길이가 짧고 nitrogenase 활성도 현저히 낮았다. 질소고정균인 CW903의 단독접종은 다른 두 종류의 균주 단독처리와 비교 했을 때 질소 흡수가 더 높음을 보여주었다. 무 처 리구와 비교 했을 때 인산 가용화 균주인 CBPB-HOD로 처리한 것이 다른 종류 의 균주를 처리한 것보다 인산 흡수량이 증가함을 알 수 있었다. CW903과 CBPB-HOD의 접종이 토마토에서 질소의 농도가 가장 높았으며, 세 가지 균주를 혼합 접종시킨 경우에는 인산의 농도가 가장 높은 것으로 나타났다. 고추에서 CBMB20의 접종은 다른 두 균주의 접종과 비교했을 때 줄기와 뿌리가 가장 컸 음을 보였고, CBMB20과 CW903, CBPB-HOD와 CW903의 혼합 접종은 뿌리에 서 가장 높은 nitrogenase 활성을 나타내었다. 마찬가지로 CBMB20과 CW903, CBPB-HOD와 CW903의 혼합 접종은 단일접종에 비하여 N, P, K, Mg의 농도에

서 유의성있는 증가를 나타내었다. 벼에서 CBMB20와 CW903 또는 CBPB-HOD의 혼합접종은 지상부의 길이가 가장 크게 나타났으며 CW903와의 혼합접종이 뿌리의 생육이 우수하였다. ARA 활성은 근권에서는 CBPB-HOD 처리 시, 뿌리에서는 CBMB20 처리 시 최대치를 나타냈다. 종합적으로 보면, 박테리아 균주의 단일접종이나 혼합접종 영향은 작물마다 다양하게 나타나며, 양분 흡수도 양분의 종류에 따라 다르게 나타났다. 그렇지만 *M. oryzae* CBM20의 접종은 단일접종을 하거나 다른 균주와 혼합접종을 하는 경우 모두 작물생장이 증가하였다.

본 연구를 수행한 결과로 국제 학술지(5편), 국내학술지(1편)의 논문이 발간되었고, 국제학술회의(2편), 국내 학술회의 발표(31편)의 논문을 발표하였고 1편의 특허를 출원하였다. 이러한 출원된 특허 및 논문, 학술 발표한 기술을 재정리하여 산업화하는 기회가 주어진다면 친환경농업재재로 이용이 가능 할 것이다.

SUMMARY

Plant growth in agricultural soils is influenced by a myriad of abiotic and biotic factors. While growers routinely use physical and chemical approaches to manage the soil environment to improve crop yields, the application of microbial products for this purpose is less common. The rhizosphere, the narrow zone of soil surrounding the root that is under the immediate influence of the root system, is relatively rich in nutrients, due to the loss of as much as 40% of plant photosynthates from the roots. Consequently, the rhizosphere supports large and active microbial populations that not only benefit from the nutrients secreted by the plant root but also beneficially influence the plant in a direct or indirect way, resulting in a stimulation of its growth. The importance of rhizosphere microbial populations for maintenance of root health, nutrient uptake, and tolerance of environmental stress is now recognized. Beneficial free-living soil bacteria are generally referred to as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and are found in association with the roots of many different plants. The bacteria that provide some benefit to plants are of two general types: those that form a symbiotic relationship, which involves formation of specialized structures of nodules on host plant roots, and those that are free-living in the soil; the latter are often found near, on or even within plant tissues.

The so called PGPR classified according to their beneficial effects, can be a significant component of management practices to achieve the attainable yield. Although numerous free-living soil bacteria are considered to be PGPR, not all bacterial strains of a particular genus and species have identical metabolic capabilities and interactions with plants. The large scale applications of PGPRs to crops as inoculants would be attractive leading to potential environmental benefits; reducing the use of agricultural chemicals. The prospect of manipulating crop rhizosphere microbial populations by inoculation of beneficial bacteria to increase plant growth has shown considerable promise in laboratory and greenhouse studies, but responses have been variable in the field. Recent progress in our understanding of the biological interactions that occur in the

rhizosphere and of the practical requirements for inoculant formulation and delivery should increase the technology's reliability in the field and facilitate its commercial development.

This article gives an overview of the potential roles and different mechanisms of by which PGPR have been found to promote plant growth. Here we extend the potential for the PGPR to contribute as biofertilizers for field crops. We also advance the thesis that PGPR may promote crop yield increases by modifying soil-plant processes so that N and other nutrients are more completely retained in the plant-soil system.

- Nitrogen-fixing bacteria were isolated from the rhizosphere of different crops of Korea. A total of 16 isolates were selected and characterized. Thirteen of the isolates produced characteristics similar to those of the reference strains of *Azospirillum*, and the remaining 3 isolates were found to be *Enterobacter* spp. The isolates could be categorized into 3 groups based on their ARDRA patterns, and the first 2 groups comprised *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. The acetylene reduction activity (ARA) of these isolates was determined for free cultures and in association with wheat roots. There was no correlation between pure culture and plant-associated nitrogenase activity of the different strains. The isolates that showed higher nitrogenase activities in association with wheat roots in each group were selected and sequenced. Isolates of *Azospirillum brasilense* CW301, *Azospirillum brasilense* CW903, and *Azospirillum lipoferum* CW1503 were selected to study colonization in association with wheat roots. We observed higher expression of β -galactosidase activity in *A. brasilense* strains than in *A. lipoferum* strains, which could be attributed to their higher population in association with wheat roots. All strains tested colonized and exhibited the strongest β -galactosidase activity at the sites of lateral roots emergence.

- Mass culturing of two beneficial organisms used as biofertilizers for crops would reduce the risks in production and minimize the capital involved and this

demands appropriate media that supports both organism and also selection of organisms that are not antagonistic to each other. A study was initiated to culture a nitrogen fixer (Rhizobium) and phosphate solubilizer (Bacillus megaterium) in a single medium and to study their growth patterns and shelf life in carrier. The growth of Rhizobium and Bacillus megaterium was assessed in different media and a slight modification in the traditional yeast extract mannitol media promoted the growth of both the organisms. The growth of the individual organisms in the modified medium was assessed by estimating the population at regular intervals and compared to their original medium. Maximum population of Rhizobium and phosphobacteria was at 60 hr when the phosphobacteria inoculation of later was after 48 hr of Rhizobium inoculation. The shelf life of the individual organisms inoculated in a sterilized carrier. The population of both organisms in carrier based mixed inoculant remained at 10⁸ cells till 90 days.

- Inoculation of the carrier-based mixed bioinoculants of N-fixer (*Azospirillum lipoferum* strain Az204/Rhizobium strain BMBS P47) and phosphate -solubilizing bacterium (*Bacillus megaterium* var *phosphaticum* strain Pb1) promoted growth and yield of pearl millet and blackgram under potculture conditions. The mixed inoculant of Az204 and Pb1 enhanced germination, seedling vigor, plant height, and seed weight, and resulted in 6% increase in grain yield of pearl millet. Likewise, the mixed inoculant of BMBS P47 and Pb1 increased growth, nodulation, and yield in blackgram. The rhizosphere soil enzyme activities, including nitrogenase, urease, and phosphatase, in both pearl millet and blackgram were significantly increased by the inoculation of the mixed inoculant, compared to that of the individual inoculants. The results clearly indicate the beneficial effect of co-culturing the N-fixer and P-solubilizer in inoculants production.

- *Penicillium oxalicum* strain CBPS-3F-Tsa, an efficient phosphate solubilizing fungus, was evaluated for production of organic acid in vitro and effect of inoculation on the growth promotion of Maize under greenhouse conditions. The

fungus solubilized 129.1, 118.8 and 54.1 mg P/l of tri-calcium phosphate [Ca₃(PO₄)₂], aluminium phosphate (AlPO₄) and ferric phosphate (FePO₄), respectively, after 72 h of incubation. Malic acid, gluconic acid and oxalic acid were detected in the flasks supplemented with various phosphate sources together with large amount of malic acid [240, 146, 145 mM AlPO₄, FePO₄, and Ca₃(PO₄)₂ respectively] followed by the other two. The effects of inoculation of *P. oxalicum* CBPS-3F-Tsa on maize plants were studied under pot culture conditions. *P. oxalicum* CBPS-3F-Tsa was inoculated to maize plants alone or together with inorganic phosphates in the form of fused phosphates (FP) and rock phosphates (RP). Inoculation of *P. oxalicum* CBPS-3F-Tsa increased the plant growth, and N and P accumulation in plants, compared to control plants, and also had positive effects when applied with RP. The results of this study show that the fungus *P. oxalicum* strain CBPS-3F-Tsa could solubilize different insoluble phosphates by producing organic acids, particularly malic acid, and also improved the efficiency of RP applied to maize plants.

• Five phosphate solubilizing bacteria (PSB) used in this study were screened based on their ability to solubilize tricalcium phosphate (TCP) in Pikovskaya's medium. Among tested bacterial strains *Burkholderia* sp. strain CBPB-HIM showed the highest solubilization (363 µg of soluble P ml⁻¹) activity at 48 h of incubation. Further, this strain has been selected to assess its shelf life in nutrient amended and unamended clay, rice bran and rock phosphate (RP) pellet based granular formulation. The results showed that the maximum viability of bacterium was observed in clay and rice bran (1:1) + 10% RP pellets than clay-RP pellets, irrespective of tested storage temperatures. Further, clay and rice bran (1:1) + 10% RP pellets amended with 1% glucose supported the higher number of cells compared to glycerol amended and nutrient unamended pellets. In this carrier solubilization of Morocco rock phosphate (MRP) by *Burkholderia* sp. strain CBPB-HIM was also investigated. The maximum of water and bicarbonate extractable P (206 and 245 µg P g⁻¹ of pellet respectively) was recorded in clay and rice bran (1:1) + 10% RP pellets amended with 1% glucose and glycerol

respectively on day 5 of incubation. Therefore, this study proved the possibility of developing granular inoculant technology combining clay, rice bran and RP as substrates with phosphate solubilizing Burkholderia.

• The composition of the bacterial community associated with plant roots is influenced by a variety of plant, environmental factors and also management practices. Our study aimed at detecting the root associated bacterial communities of Chinese cabbage under different fertilization regimes using cultivation dependent methods. The cultivable population was studied using plate count assay, fatty acid methyl ester (FAME) analysis and carbon substrate utilization using BIOLOG™ plates. Taxonomical identification of the isolates by FAME resulted in about 83% identification and they represented 9 and 14 different known bacterial genera from the rhizosphere and root interior respectively from Proteobacteria (α , β , and γ), Firmicutes (actinobacteria and the Bacillus groups) and Bacteroidetes. Pseudomonas and Bacillus were associated with the plants grown under all the fertilized conditions and actinobacteria could be observed only in rhizosphere of plants grown on unfertilized plots. FAME and BIOLOG profiles of the rhizosphere and endophytic isolates could separate them with reference to fertilization. Principal component analysis (PCA) on the BIOLOG substrate utilization revealed that the isolates were metabolically dissimilar. The diversity, as revealed by the diversity indices was greater among the isolates obtained from unfertilized samples than that of fertilized ones. The isolates analyzed for different traits related to plant growth promotion revealed differences between rhizosphere and endophytic isolates and also with reference to the treatments. The highest percentage of phosphate solubilizing bacteria (PSB) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) utilizers was recorded in chemical fertilizer treated samples, followed by the organic fertilizer treated. The results from this study indicate that fertilizers have an effect on the root associated bacterial communities of Chinese cabbage and also on their physiological characteristics related to plant growth promotion.

CONTENTS

Abstract	2
Summary	13
Contents (English)	18
Contents	19
I. State of art and Research Goal	20
II. Research Scopes and Contents	24
III. Reserch Results and Discussion	26
IV. Contribution to related research area	85
V. Application plan	93
VI. New Research Information	94
VII. References	104

목 차

요 약 문	2
Summary	13
Contents (영문)	18
목 차	19
제 1 장 연구개발과제의 개요	20
제 2 장 국내의 기술 개발 현황	24
제 3 장 연구개발내용 및 결과	26
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	85
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	93
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	94
제 7 장 참고문헌	104

제 1 장 연구개발과제의 개요

요즘 우리 사회의 농업은 농업 생산품 수확의 증가와 그로 인한 소득의 증대를 중요시하던 예전과는 달리, 최근에 들어 생산품의 질을 높이고, 환경을 생각하는 친환경 농업으로 발전이 되고 있다. 지금까지는 생산품의 양적 증대만을 생각하였고, 그렇게 하기 위해 화학비료와 농약 등을 토양이나 작물에 과다 사용 하였다. 따라서 그것으로 인한 토양의 염류집적과 연작장해, 유기물 함량 저하 등의 토양오염 문제와 수질의 오염문제, 생태계 파괴와 병해충의 농약 저항성 증가 등의 여러 문제점이 생겨나기 시작하였고, 이런 오염을 줄이기 위해 환경 보존형 농업을 구현하려고 수많은 연구가 진행 중이다.

토양은 지구 생태계의 대다수 생명체들이 살아가는 바탕으로써, 토양에서 서식하는 미생물 중 많은 종류의 미생물이 식물의 생육촉진, 물질 순환 및 환경 정화 등 수 없이 많은 중요한 역할을 수행하고 있다. 농업은 이러한 토양 생산력에 기반을 두기 때문에 생산성 지속을 위해서는 환경보전형 농업을 통한 토양의 건전성 확보가 시급한 상황이다. 농업 생산성 지속성을 위협하는 주요한 요인은 앞서 언급한 화학비료와 농약의 과다한 사용량과 장기 지속적인 사용에 따라 유발되는 토양악화에 있다. 화학비료의 연속적인 사용은 토양을 산성화시킬 뿐만이 아니라 토양 내의 염류 집적에 의해 토양 물리성을 악화시킴으로서 잠재적 농업 생산성을 감소시킨다. 이러한 이유로 화학비료의 사용을 줄이는 저투입 농업(LISA)과 꾸준한 유기질 비료의 사용으로 지력을 유지 또는 증진시키는 것이 관건이라 할 수 있으며, 따라서 지향되어야 할 필요성이 절실한 시점이다.

20세기 후반부터 21세기로 접어든 오늘날은 환경 농업을 지향하는 추세로 가는 과도기적인 시기이기에 화학비료의 사용량은 '90년대 초를 정점으로 감소하는 추세를 보이고 있으며, 이에 따라 정부는 '97년도 이후 생산업체가 저농도 화학비료를 개발, 공급하여 시비량 감축을 유도하고 있지만 국내 농가들의 관행적인 시비로 인하여 단위 면적 당 화학비료의 사용량은 그리 크게 감소하지는 않고 있는 사정이다. 하지만, 친환경 농업의 중요성이 부각되면서부터 퇴비나 유기질 비료 등의 사용량은 상당한 증가 추세를 나타내고 있다. 농약의 경우는 채소 및 과수 등의 고소득 작물

의 재배면적 증가로 인한 원예용 농약의 사용량이 증가되어지고, 제초제 사용량의 증가로 이 역시 단위 면적 당 농약 사용량은 화학비료와 마찬가지로 줄어들지 않고 있는 실정이다. OECD 회원국의 농약 사용량과 비교 해 볼 때 우리나라는 높은 수준의 농약 사용량을 보이고 있으며, '91년을 정점으로 사용량에 있어 감소 추세를 보이고 있긴 하나 매년 태풍이나 집중 호우와 같은 기상조건의 변화로 인하여 병해충 발생양상이 상이하여 큰 폭의 감소 추세를 보이지 않고 있다. 이런 이유로 인하여 농업 여건의 변화에 대응하고 미래 세대의 건강과 자연생태계의 복원까지 생각하는 환경 친화적인 유기농업(Organic farming)의 필요성이 부각되어지며, 이를 해결하는 선결 연구 과제들의 중요성이 절실한 문제로 인식되어지고 있다.

친환경 농업을 구현하기 위해서는 지금까지의 비료와 농약 등의 화학물질을 줄이고, 이 화학물질을 대체할 만한 여러 가지의 친환경적인 재료를 개발해야만 한다. 또한, 오염되고 오래된 나쁜 환경을 회복할 수 있는 시간과 자원을 공급하여 토양의 비옥도, 토양의 구조 등에 있어 지속적으로 유지하거나 개선해 나가야만 한다. 이러한 목적을 성취하기 위한 하나의 방법으로 미생물제제 (microbial materials)의 사용을 언급할 수 있다. 왜냐하면 농업 환경안의 모든 작용, 그중에서도 특히 토양의 양분순환에 있어서 미생물의 역할은 핵심적이기 때문이다. 생물비료는 환경보전을 위한 농업적 부담을 낮추어 주는 토양 건전성 유지 및 조절자, 양분 공급자로서의 역할을 한다, 토양 건전성은 작물 생산성과 인류 및 동물의 건강을 지켜주는 역할과 밀접히 관련되어 있다. 따라서 토양건전성을 유지할 목적으로 사용하는 물질을 친환경자재라고 말할 수 있다. 따라서 친환경자재로서 미생물제제가 이용되어지고 있다. 그러나 이것에 대한 올바른 이해의 부족으로 여러 가지 문제점이 나타나고 있다. 그것은 과학적인 근거보다는 관습 혹은 통념적인 생각에 의한 것으로, 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 보다 정확한 정보를 얻고 해석하는 힘을 소비자는 물론 공급자도 가지고 있어야 한다.

앞서 언급한 것과 같이 농업과 축산업에서는 생산력을 높이기 위해 화학비료, 농약 및 동물성 수입 사료 등의 무분별한 사용으로 인한 문제점이 부각되어지기 시작하면서부터 농업에 있어서는 유기농법에 대한 중요성이 부각되고 있다. 유기농업은 환경과 조화로운 생산성에 악영향을 주는 화학비료와 농약의 사용을 가급적으로 자

제하여, 농업 생산에 의한 환경파괴를 경감시켜 농업 생태계 보전과 농업으로 인한 환경오염의 피해를 가급적으로 줄이려는 방법이며, 토양에 존재하는 각종 유기물 및 농업 부산물을 효율적으로 사용하여 작물을 안전하게 재배하는 방법이라고 볼 수 있다. 따라서 유기농업은 화학비료에 의존도가 높은 농업으로부터 환경파괴를 경감하고 극복하는 장점으로 세계적으로 관심이 모아지고 있는 환경문제를 농업분야에서 해결 할 수 있는 대안적인 대처 방안이라 할 수 있다.

비록 생물비료가 국가, 지역 및 기후 등의 환경 요인에 따라 효과의 차이가 있을 지라도 환경문제와 직면하고 있는 21세기의 우리는 환경을 보전한다는 입장에서 생물비료의 중요성을 간과해서는 안 될 것이다. 또한 생물비료의 가치는 화학물질의 무거운 짐에서 벗어나게 하는 것이므로, 생태계를 구성하고 있는 먹이사슬 안에 보이지 않는 끈으로 연결되어있는 구성원으로서 생물비료의 개념을 생물적 방제 및 생물복원의 측면까지 확장할 필요가 있다. 그러기 위해서는 이러한 특성을 종합적으로 발휘할 수 있게 하는 생물 공학적 접근 및 기술을 활용하여 현재의 문제점을 해결할 수 있는 고부가가치 생물비료를 개발하는 연구를 어느 때보다 적극적으로 추진하여야 할 시기라 생각된다. 그러므로 화학질소비료의 사용량을 감소시킬 수 있는 대안으로 다양한 비효관련 미생물(질소고정균, 인산가용화균, PGR 생성균 등)을 이용하여 미생물 비료를 개발하는데 본 연구의 목적이 있다. 이를 위하여 다양한 이화학적 성질을 토양에서 분리된 질소 고정능 및 인산가용화능이 우수한 균주 및 PGR 생성균을 이용하여 다양한 종류 및 크기의 담체에 고정화 시켜 제재화를 시도하여 몇 가지 작물을 대상으로 단독 및 복합처리하여 생육을 검토하여 화학비료를 일정부분 대체할 수 있는 환경친화적인 미생물 비료의 개발이 요구된다. 본 연구의 내용은 미생물 비료의 개발을 위하여 우수한 능력을 보유한 인산가용화균, 질소고정균 및 PGR 생성균을 2차선발 또는 신규 분리하여 생리학적 및 분자생물학적 기법으로 측정하였다. 또한 미생물 단독 배양시 질소고정능 및 인산가용화능은 물론 접종 미생물이 뿌리에 감염되는 정도 및 감염된 상태에서 질소고정능 및 인산가용화능을 비교되고 각각의 미생물을 접종하여 작물의 초기생육에 미치는 영향을 비교하였다. 2차 선발된 우수균주를 대상으로 경제적 방법의 제형화 방법 개발을 위하여 고기능 인산가용화균을 대상으로 황토, 쌀겨 및 인광석을 이용하여 고정화시켜 제형화된 제품의

성능을 비교하였다. 또한 미생물 비료의 처리효능을 화학비료 처리와 비교하기 위하여 인산가용화균 및 인광석 처리와 인산화학비료 처리구와 비교하였으며 질소고정균, 인산가용화균 및 PGR 생성균의 단독 및 복합처리시 효과를 작물체를 대상으로 실험하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

일반적으로 토양에 인산가용화균이 존재하지만, 일반적으로 그것의 비율은 근권토양에 존재하는 다른 미생물과 경쟁하기에 충분하지 못하다. 현재까지 여러 가지 종류의 인산가용화 fungi와 bacteria의 접종이 식물 성장 및 생산량증가에 대한 연구가 보고 되었다(Taha et al., 1969; Azcon et al., 1976; Khan and Bhatnagar, 1977; Banik and Dey, 1981; Jisha and Algawadi, 1996; Gadagi et al., 2003). 식물 근권토양에 존재하는 미생물의 상당한 수는 식물의 성장과 발달에 유익한 영향을 미칠 수 있다. 이러한 미생물의 분리와 이용은 농업생산성의 향상 및 친환경농업 구현을 위하여 국내, 외적으로 활발히 진행되고 있다.(Rodriguez and Fraga, 1999). 즉 생물 비료로써 인산 가용화 미생물을 이용한다.(Goldstein, 1993). 생물비료의 효율향상, 유효기간연장, 운송의 용이함 및 경제성을 고려하여 다양한 형태의 담체 (peat, lignite, soil-sand mixtures, vermiculite, perlite, agar, k-carragenan, alginate, gelatin, PAG(polyacrylamide))를 이용하는 연구가 진행되고 있으나 국내에서는 미미한 실정이다.

미생물을 이용한 비효 증진 방법을 개발하려는 시도는 부단히 이루어져 왔다. 1950년대 러시아와 동유럽에서 불용성 인산을 가용화 시킬 수 있는 미생물(phosphobacteria)을 분리하여 토양에 처리한 결과 작물의 인산 흡수를 증대시킬 수 있었으며, 평균 10%의 수량 증가를 보았다. 또한 미생물을 이용한 생물비료의 개발은 미국, 일본, 인도, 중국 등지에서 질소고정균인 근균과 리조비움 이 주로 연구되어 세계 약 30개 업체에서 생산하고 있으며, 미국 미주리대학에서는 근균과 인산가용화균의 혼용에 대하여 연구가 이루어지고 있다. 미생물을 이용한 인산비효 증진연구는 세계적으로 다양한 균이 분리되어 연구되고 있으며 특히 인도에서는 “Biophos”라는 이름으로 상용화되어 농가에서 사용하고 있다.

국내에서도 인산축적의 문제점 대두와 환경 친화적 시비기술의 필요성이 요구됨에 따라 인산가용화균 연구가 시작단계에 있다. 일부업체에서 외국에서 수입한 미생물을 그대로 증식하여 유통하고 있으나 미생물이 제제화 되지 않았기 때문에 생존력이 매우 저하되어 실효를 거두지 못하고 있으며 작물 시비효과도 검증 되지 않고 있다.

본 실험실에서도 균주 분리를 시작하여 현재 5종의 균주(*Bacillus polymixa*, *pseudomonas strata*, BRPS-116, 207, 419)를 보관하고 있다. 그러나 국내대부분의 연구가 토양특성을 무시하고 Ca-P 가용화균에 연구가 치우쳐 국내 토양에 많은 Al-P 및 Fe-P 가용화균에 대한 연구는 전문한 실정이다. 또한 대량배양기술, 다양한 토양을 대상으로 한 재배실험이 미흡하여 실용화에는 미치지 못하고 있다.

Gel carriers를 cell entrapment에 의해 고정화한 방법은 Rhizobium에 적용되어 field에서 효능이 인정되었다(Van Elsas and Heijen, 1990). 또한 최근에는 식물생장에 도움이 되는 미생물 복합체용 담체의 연구가 광범위하게 진행되고 있다(Bashan, 1998; Deelereck et al., 1996; Vassilev et al., 2001). 일반적인 고정화 과정은 미생물 배양 후 matrix 형태로 고정화하여, 작은 부피에 높은 미생물의 농도를 안전하게 유지하게 만들어내는 것이다.(Fedirici, 1993). 미생물의 고정화 기술의 이점은 각각의 담체에 따라 다를 수 있고 또한 장단점이 있으므로 각각의 특성비교 연구가 진행 중이다.

농업에 사용되는 미생물의 고정화는 보관, 운송뿐만 아니라 시비 후 토양 내에서 환경적인 스트레스로부터 미생물들을 보호하는 것과 서서히 토양으로 미생물을 방출하는 것과 같은 많은 이점을 갖고 있으므로 고정화 기술의 선택과 재료의 뒷받침은 고정화의 단점을 최소화하기 위해 필수적이다. 세포를 고정화시키기 위한 가장 알맞은 방법 중 하나는 calcium alginate를 이용하는 방법이다. 이 기술은 간단하고, 쉽기 때문에 여러 미생물들을 대상으로 국내외에서 많은 연구가 보고 되었고 생물분자들과 미생물들의 고정화 모형으로써 적절하다. 최근에는 이 기술이 즉, 인산가용화 미생물 등 농업유용미생물 연구분야에서 사용범위가 확장되어지는 경향이다.

제 3 장 연구개발내용 및 결과

제 1 절 연구개발 수행 내용

인산가용화균의 분리는 충북 보은 지역 배추재배지 근권 토양을 채취하여 사용하였다. 근권토양을 연속적으로 희석하여 인광석이 포함된 Reyes's basal medium plate에 배양하였다. bacterial colony들은 배지 위에 넓은 투명대를 형성하여 이를 근거로 선별되었고 투명대를 형성하는 하나의 colony를 순수 배양 하여 다음의 인산가용화 실험에 사용하였다.

균주의 인산가용화 활성 측정 및 선별 방법은, 선발된 질소고정균을 modified Pikovskaya(BCG 첨가)고체배지 중앙에 균체를 100 μ L 떨어뜨려 접종 후, 48시간동안 배양하여, 접종 균체 주위의 투명대를 측정 및 비교하였다. 큰 투명대가 확인된 균주의 유리인산 농도 측정 및 정량은 다음과 같이 실시하였다. 100 mL의 Pikovskaya 배지에 난용성인산[AlPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4]을 1% 농도로 각각 첨가한 후, 배지에 균주를 4.0 mL씩 각각 접종하여, 진탕배양($30^\circ\text{C}/150\text{rpm}/48\text{h}$)하고, 진탕배양된 배지는 원심분리($8,000\times\text{g}/28^\circ\text{C}/10\text{분}$)하여 cell은 침강시키고, 상등액을 ammonium-molybdate 청색 발색법으로 유리인산의 농도 측정 및 정량하여 질소고정균 중 인산가용화능이 있는 균주를 최종 선발하였다.

균의 질소고정능 측정은 인산가용화균을 N-free 액체배지에 접종하여 대수신장기까지 배양한 후 sealing하였다. Sealing되어진 배지에서 10% 공기를 뽑아낸 후, 10%의 아세틸렌가스를 주입한 후, 다시 4시간동안 배양하였다. 배양된 배지에서 30분~4시간동안 환원되어 나오는 에틸렌 가스를 가스크로마토그래피로 정량한 후, 배지내 균체생체량은 단백질 분석법을 이용하여 계산하였다.

질소고정균 및 인산가용화균의 식물생장조절물질(PGR) 생산 유무 및 정량은 100 mL 선택배지에 L-Tryptophan(100 mg L^{-1})을 첨가하고, 균주 1.0 mL를 접종한 후, 진탕배양($30^\circ\text{C}/120\text{rpm}/7\text{day}$)하였다. 배양된 배지는 원심분리($10,000\times\text{g}/15\text{분}$)하여 cell은 침강시키고, 상정액을 1N-HCl로 pH 2.8까지 산성화시킨 후, 상정액과 동량의

ethyl-acetate로 2~3번 추출하여, 감압건조하고 잔사는 70% ethyl alcohol 재현탁하여, 액체크로마토그래피로 측정 및 정량하였다. 미생물 접종 후 근권의 활착률 분석을 위하여 일정한 크기의 종자를 골라 70% ethyl alcohol로 1분간 표면살균 하였다. 20분간 1%(w/v) NaOCl(sodium hypochloride)로 세척한 후, 증류수를 이용하여 수차례 수세하여 30℃ 항온기에서 발아시켰다. 오염되지 않은 종자를 골라 4 g의 멸균된 vermiculite가 포함된 50 mL McCartney병에 2 개체씩 파종(깊이; 약 0.5 cm)하고, 배양액을 field capacity(3.4 mL g⁻¹ dry vermiculite)로 조정한 후 접종하였다. 작물 성장 3~4일 후 일정량의 균을 각각의 병에 접종하고 14h(27℃)/10h(22℃)의 light-dark 순환을 가진 light chamber에서 배양하였다. 각 병에 2~4일에 한번씩 소실된 양만큼의 배양액을 공급하였다 (그림 1, 2).

뿌리에 감염된 균수의 측정은 Miles and Misra에 의한 counting method로 측정하였다. 작물뿌리를 병으로부터 조심스럽게 제거한 다음 적정농도로 희석하여 congo red 고체배지에 접종한 후 30℃ 항온기에서 3일간 배양 후 콜로니(colony) 수를 계수하여 측정하였다. 또한, 현미경을 이용한 감염된 균의 관찰은 β -galactosidase 발현을 이용하였다. β -galactosidase는 미생물에서의 유도효소의 발현체계를 연구하는 모델로 이용되어지고 있다. β -galactosidase 발현을 위한 형질전환에는 *E.coli* S17.1 (containing *nifH* and *pLA* plasmids)을 숙주세포로 사용하였다. 뿌리 조각의 착색은 X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase)을 이용하여 변형된 *Bovine et al.* 방법을 이용하였다. 뿌리 착색 후 현미경을 이용해 균에 뿌리의 감염 형태를 관찰하였다.

감염된 작물의 질소고정능 측정은 다음과 같이 시행하였다. 오염되지 않은 종자를 골라 4 g의 멸균된 vermiculite가 포함된 50 mL McCartney병에 2 개체씩 파종(깊이; 약 0.5 cm)하였다. 배양액을 field capacity(3.4 mL g⁻¹ dry vermiculite)만큼 파종 시 접종하였다. 작물 성장 3~4일후 일정량의 균을 각각의 병에 접종 한 후 14h(27℃)/10h(22℃)의 light-dark 순환을 가진 light chamber에서 배양하였다. 균 접종 2 주 후 가스크로마토그래피를 이용하여 환원된 에틸렌의 양을 측정하였다. 또한, 수정 재배에 의한 질소고정능 측정은 종자의 표면살균 후 오염되지 않은 종자를 골라 멸균된 크기 20×150mm의 시험관(15 mL nitrogen-free hydroponic solution용액 안에

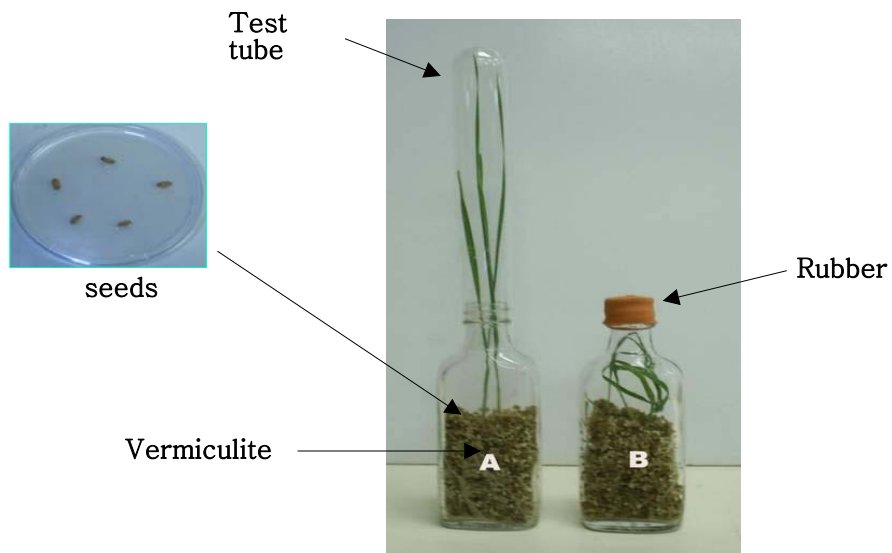


Fig 1. Model system of plant bottle inoculated with seedlings. (A), Growth stage; (B), Sealed for acetylene reduction assay.

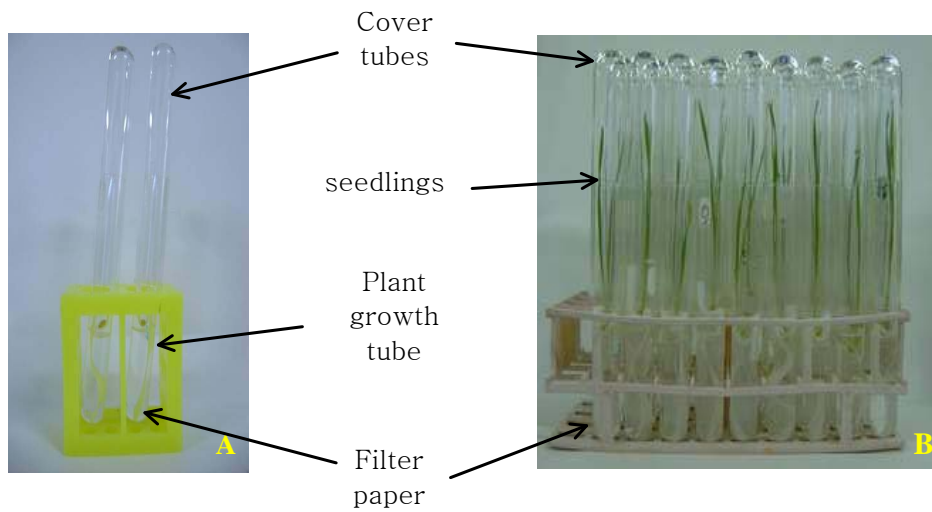


Fig 2. Model system of the test-tube hydroponic system. (A), seedlings; (B), Growth stage. Ten days after inoculation all the plants were assayed for β -galactosidase activity and stained with X-Gal for observation of colonization patterns.

접힌 filter paper가 포함)에 1개체씩 파종한 후, 작물은 14h(27°C) / 10h(22°C)의 light-dark 순환을 가진 light chamber에서 배양하였으며 생장 1주일 후 각각의 시험관에 일정량의 균을 접종하였다. 균 접종 2주 후 가스크로마토그래피를 이용해서 아세틸렌 환원력을 측정하였다.

인산가용화능 및 생육상태를 기준으로 2차 선발한 인산가용화능 8종을 대상으로 종자에 접종한 후 인광석이 포함된 배지의 petri dish상에서 발아 시 근권의 인산가용화능을 비교하였다 (그림 3).

미생물 비료의 장기간 보관 및 수송을 위하여 미생물 제제의 제형화 기술이 요구되므로 위에서 선발한 다양한 담체를 이용하여 제제화후 균의 활성 및 인산가용화능을 분석하였다. Agar, agarose, sepiolite 및 황토를 담체로 사용한 결과 agar, agarose는 균을 제제화 하기에는 용이하였으나 제제화후 물성이 비료로 사용하기에는 적합하지 않았으며 sepiolite는 국내에서 생산되지 않고 경제적인 면을 고려하면 적합하지 않아 sepiolite와 비슷한 특성을 가진 충북 보은군에서 생산되는 황토를 이용하여 제제화를 시도하였다. 실험에 사용한 균은 2차 선발하여 동정하고 NCBI에 보고한 균주 중 *Butkholderia* sp. CBPB-HIM(NCBI accession number AY640615)이었으며 이는 밀양의 영남 농업 시험장에서 벼(남평)의 근권에서 분리한 것이었다.

간접 인산가용화 효율을 측정하기 위해 2% 한천이 첨가된 Pikovskaya 배지 를 이용하여 plate assay로 테스트 하였다. 살균한 백금이를 이용하여 플레이트당 한 가지 균주를 접종했으며, 3반복으로 처리하였다. 30°C에서 8일간 배양한 후 용해 범위와 colony 직경을 측정하였다. 3반복 실험하여 그 결과를 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{가용화 효율(E\%)} = \frac{\text{용해 직경(S)}}{\text{colony 직경(G)}} \times 100 \text{ (Nguyen et al., 1992).}$$

또한, Pikovskaya의 액체 배지를 이용하여 가용화의 정량 평가를 실시하였다. 삼각플라스크(250 ml)에 배지 100 ml를 넣고 세균 균주(10^7 cfu ml⁻¹) 1ml를 3반복으로 접종하였다. Control에는 접종하지 않은 멸균 배지를 사용하였다. 접종 후 120 rpm으로 30°C에서 120시간 배양하였다. 접종, 배양 후 각각 24, 48, 72, 96 및 120시간에 시료를 채취하여 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 균주를 분리하고, 상등액에

있는 가용성 인산을 molybdenum blue method 로 분석하였다. 동시에, 배지의 pH를 측정하고, 균 밀도는 10배씩 순차로 희석된 배양액들을 가지고 nutrient agar 배지에서 pour plate technique을 사용하여 측정하였다.

황토+5% 인광석, 황토+10% 인광석, 황토:쌀겨(1:1)+5% 인광석, 황토양:쌀겨 (1:1) + 10% 인광석 등 4가지 조합으로 펠렛을 25℃ 및 4℃에 저장하여 0일, 3일, 15일, 30일, 60일, 90일 만에 생존 균수를 측정하였고, 다음으로 황토와 쌀겨를 1:1로 함유한 펠렛에서 탄소원으로 glucose 또는 glycerol을 0.1% 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 25℃ 및 4℃에 저장하였을 때 *Burkholderia* sp.의 생존 수를 평가하여 균의 생존에 미치는 인광석의 영향을 평가하기 위한 것과 탄소원의 효과 차이를 보기 위한 것이었으며, 마지막으로 황토와 쌀겨가 1:1이고 인광석이 10% 함유된 펠렛에서 탄소원으로 0.1% glucose, 1% glucose, 0.1% glycerol, 1% glycerol 및 무탄소 등 속효성 탄소 수준별로 *Burkholderia* sp.의 생존력과 인산 가용화에 미치는 영향을 보기 위한 것이었다. 본 실험에 사용된 황토 및 쌀겨의 물리화학적 성질은 표 1과 같다.

영양 배양액 1리터에 세균(10^7 cfu ml⁻¹) 10ml를 넣고 120rpm으로 진탕 시키면서 30℃에서 배양하였다. 배양 후에 지수 성장 후기 세포를 원심분리기(10000 g, 10 m, 4℃)로 수확하여 0.85 % 염화나트륨 60ml로 2회 씻은 후 0.85% 염화나트륨 200ml에 넣어 세포 현탁액을 만들었다.

입상 미생물 제제 조제는 다음과 같이 행하였다. 황토는 풍건한 후 분쇄하여 1mm체를 통과시켰으며, 인광석은 0.5mm 이하로 분쇄하였다. 세 가지 다른 재료 즉, 황토, 쌀겨 및 인광석을 처리에서 언급한 바대로 혼합하였다. 담체(혼합재료) 1kg을 P.P. bag에 넣고 존재할지도 모르는 토착 미생물과 포자를 제거하기 위해 121℃에서 3시간씩 2일 간격으로 2회 멸균하였다. 멸균 증류수 200ml를 염수에 넣어 만든 세포 현탁액 200ml에 첨가하였다. 이렇게 희석된 세포 현탁액을 담체 1kg과 잘 섞어 펠렛기로 펠렛을 만들었다. 이와 유사하게, 요구되는 양의 glucose/glycerol을 멸균 증류수 200ml에 용해시켜 탄소원 첨가액을 조제하였다. 이 멸균 탄소원 첨가액을 세포 현탁액 200ml에 첨가하여 앞에서 언급한 바대로 펠렛을 만들었다. 균주를 투여하지 않고 조제된 펠렛을 Control로 공시하였다. 직경이 3mm인 펠렛을 약 1.5cm 길이로 잘라 2일간 풍건하였다. 펠렛을 3반복으로 나눠 90일간 각각 25℃ 및 4℃에 저장하

였다.(그림 4)

펠렛의 세균 수 계측은 펠렛 5 g을 취해 멸균 증류수 95 ml에 무균상태로 넣고 120 rpm으로 작동하는 로터리 진탕기에서 30분간 진탕한 후에 Nutrient agar에서 Spread plate technique을 사용하여 계측하였다. Plate를 30°C에서 72시간 동안 배양하였다. Colony를 25-250개 함유하는 plate의 colony 수를 세어 건조 펠렛 g당 colony 형성 단위(cfu g⁻¹)으로 표시하였다.

펠렛의 화학적 분석을 위해 펠렛 5g을 200ml 용량의 추출병에 넣었다. 추출액 즉, 증류수 혹은 0.5M NaHCO₃ (NaOH를 사용하여 pH 8.5로 조정) 50ml를 추출병에 넣었다. 다음에 20°C에서 30분동안 40rpm으로 진탕하였다. 추출 후 현탁액을 whatman No.42 여지로 여과하였다. 수용성 및 중탄산소다 가용성 인을 molybdenum blue method로 측정하였다. 증류수와 혼합(고체:물=1:5)한 후 간간히 저어 주면서 15분간 정치 후 펠렛의 pH를 측정하였다.

미생물 비료의 개발은 단독미생물을 이용하는 것보다 미생물 복합체를 이용하는 것이 효과적이며 경제적으로 유리하다. 이러한 복합적 효능을 갖는 미생물 비료의 개발에 있어 복합 균주의 동시배양(co-culture)기술개발은 필수적이며 또한 복합균주의 효능 검정도 요구된다. 그러므로 상기에서 확립한 복합 미생물[질소고정균(Rhizobium) 및 인산가용화균(Bacillus)의 동시배양]의 작물체 접종효과를 규명하기 위하여 식물체(콩, blackgram)에 인산가용화균 및 질소고정균을 동시배양하여 접종 [M(N+P)]한 것과 인산가용화균 및 질소고정균을 별도로 배양하여 각각 접종 [S(N+P)]한 후 식물체의 발아율, 생육 및 수확 후 토양 효소의 활성을 비교하였다.

토양효소의 활성과 미생물 밀도를 측정하기 위해 채취한 토양시료는 풍건전에 냉동보관하였다. 토양효소활성 측정방법은 acid phosphatase (Orthophosphoric monoester phosphohydrolase EC 3.1.3.2; pH 6.5; 37°C)와 urease (Urea amidohydrolase EC 3.5.1.5; NH₄-N release method; pH 9; 37°C)는 Tabatabai and Bremner의 방법을 이용하였으며 nitrogenase 활성은 acetylene환원법으로 측정하였다.

또한 다양한 미생물 복합체를 개발하기 위하여 세균과 함께 선발된 곰팡이를 대상으로 철, 칼슘 및 알루미늄에 결합된 인산의 가용화능을 평가하여 인산가용화세균에

의한 가용화능이 약한 철 및 알루미늄에 결합된 인산에 대하여 가용화능이 우수한 것으로 판명된 *P. oxalicum*을 유효인산농도가 낮은 토양을 사용하여 옥수수 재배에 사용하여 인산 화학 비료(용성인비)사용과 효과를 비교 하였다.

질소고정균, 인산가용화균 및 식물생장조절물질생산균의 복합 접종효과를 규명하기 위해서 CW903(질소고정균), CBMB20(식물생장조절물질생산균) 및CBPB-HOD(인산가용화균)을 단독, 2중 복합 및 3중복합접종하여 토마토, 고추 및 병의 생육을 검토하였다. 또한 작물수확 후 질소, 인산, 가리, 칼륨 및 마그네슘의 흡수량을 농촌진흥청 분석법에 의하여 분석한 후 통계 처리하여 유의성 검정을 행하였다.

Methylobacterium oryzae 균주 CBMB20을 0.5% methanol이 포함된 ammonium mineral salts(AMS) 배지에서 배양하였고, *Burkholderia* sp. CBPB-HOD는 TSB 배지에서 배양하였다. 질소고정균인 *Azospirillum brasilense* CW903은 리터당 1g의 NH_4Cl 을 첨가한 Nfb 배지에 배양하였다.

Plastic pots에 대략 250g의 건조된 Wonjo-Mix 상토를 채운 후 처리된 종자를 파종하였다. 혼합된 상토는 65-75%의 cocoa peat, 15-20% zeolite, 10-15% perlite 그리고 다량 영양소(mg l^{-1}) $\text{NH}_4\text{-N}$ 150-200, $\text{NO}_3\text{-N}$ 100-150, 이용 가능한 P_2O_5 200-300을 함유하고 pH는 5.7-7.0, $40\pm 5\%$ 의 수분 함량을 갖고 있었다. Pots는 rack에 보관했고(하나의 rack에 20개씩), 무작위로 추출한 구조에서 네 가지 처리구를 포함한 pots를 준비하였다. 종자에 균주를 접종하기 위해, 박테리아를 액체 배지에서 배양했으며 지수성장기에서 원심분리, 씻어내고, 지수성장기 후기에 30mM MgSO_4 로 25°C에서 다시 현탁하였다. 균주는 $1.0(10^8 \text{ cfu/ml})$ 의 OD_{600} 에서 조정 되었고 종자를 멸균시킨 후에 종자에 균주를 접종시켰다. 종자의 멸균은 70%의 ethanol에서 1분, 2% NaOCL에서 30초 동안 멸균한 다음, 5-10 차례 무균의 증류수로 씻어냈다. 토양 접종을 위해, 20일째에 배양액 1ml을 pot의 근권부 토양에 두 번씩 접종하였다. 엽면 시비를 위해, 접종원(10^8 cfu/ml)을 잎이 충분히 젖을 때 까지 뿌려주었다. 20, 30 일째에 두 번 엽면 시비하였다. 작물을 뿌리째 이식 45일 후 수확하여, 분석하였다.

Nitrogenase의 활성은 Hardy *et al.* 에 따라 설명된 근권토로부터 측정하였다. 토양 샘플 1g을 40ml 반고체의 N-free 배지가 들어있는 120ml McCartney bottle에 첨가했다. 30°C에서 48시간 bottle을 배양한 후 cilican cork를 고무막으로 대체했다.

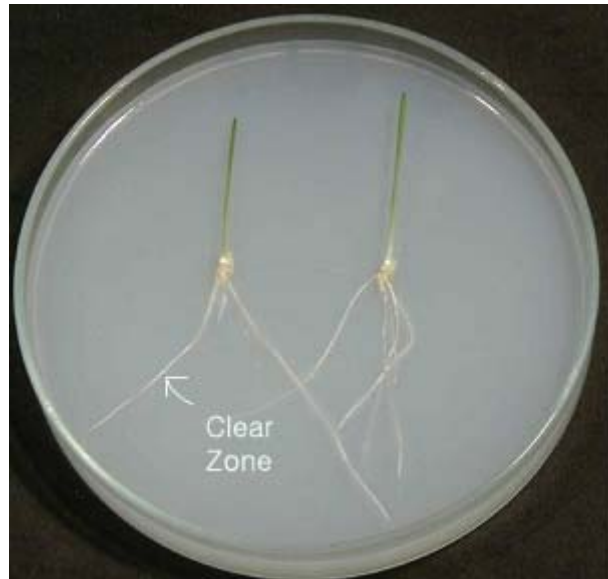


Fig 3. P-solubilization by root inoculated with P-solubilizer.

Table 1. The physio - chemical properties of the clay and rice bran

S.No.	Parameters	Clay	Rice bran
1	pH	6.52	6.65
2	EC (dS m ⁻¹)	2.06	0.87
3	WHC (%)	92	168.0
4	Soil type	Silty clay	-
5	Sand (%)	2.23	-
6	Silt (%)	46.57	-
7	Clay (%)	51.20	-
8	Total carbon (%)	1.63	14.37
9	Total nitrogen (%)	0.03	2.20
10	Total phosphorus	2.84	9487.17
11	Pb	5.35	ND
12	K	89.72	18066.38
13	Ca	261.43	342.16
14	Mg	143.19	9285.40
15	Mn	37.09	94.27
16	Zn	ND	45.21
17	Cu	ND	3.97
18	Na	24.13	ND

Parameters 10-18 are in mg kg⁻¹ ND-not detected; Cd, Ni and Cr not detected in both clay and rice bran.



Fig 4. Immobilization of P-solubilizer with clay and rice bran

bottle에서 10%의 공기를 제거하고 10% acetylene을 첨가한 후 이 bottle을 30℃, 24 시간 이상 배양했다. 토마토 뿌리에 부착된 토양 입자들은 제거하고 병은 알루미늄 뚜껑과 고무 막을 이용해 단단히 닫고, high vacuum grease로 봉한 후 실온에서 한 시간 동안 배양했다. Propak-Q column과 flame ionization detector이 장착된 Gas Chromatograph에서 생성된 ethylene을 측정했다. 샘플의 acetylene 환원 활동은 건조 중량을 기초로 한 토양의 $g^{-1} h^{-1}$ 동안 배출된 ethylene의 nmol로 표현했다.

식물체 분석은 고추, 토마토, 벼 식물체를 수확, 세척, 건조 후, 마쇄 후 시행하였다. 뿌리째 뽑은 식물은 뿌리에 부착된 토양이 떨어져 나가도록 부드럽게 씻어주었다. 파종 후 8주에 뿌리의 질소고정력을 측정하였다. 식물에서 채취한 건강한 식물 뿌리는 suba seal (밀봉 부재)이 부착된 vial에 보관하였고, 공기 5ml를 주사기를 이용해 acetylene으로 대체한 후 실내온도에서 삼십 분 동안 정치시킨 후에 에틸렌의 생성량을 PORAPAK-Q column 과 FID detector로 미리 조정해놓은 GC 에 1ml의 혼합 기체를 주입시켜서 측정한다.

식물 뿌리와 줄기에서 양분의 흡수는 hot plate에 과염소산, 황산, 분석법을 이용하여 측정했다. 분해 후 샘플을 filter paper로 두 번 여과시킨 후 100ml 플라스크에 샘플 10ml을 넣고 ICP-OES를 이용하여 측정하였다. PerkinElmer Life와 Analytical Sciences의 품질 관리 기준 21 표준 용액을 사용했다. 첫 번째 표준 용액으로부터 준비된 3차 증류수를 사용하였다.

옥수수의 뿌리와 줄기에서 질소의 농도는 산분해 후 1030 켈달 자동 분석기로 측정하였다. 뿌리와 줄기에서 인산의 농도는 Jackson(1973)의 방법에 따라 측정되었다. 마쇄한 식물체 0.5g, 1ml의 농축된 황산을 증해 시킨 것과 50% 과염소산 5ml을 마이크로 켈달 플라스크에 넣고 와트만 No.6 거름종이를 이용하여 여과시켰다. 5ml 여과액과 5ml ammonium metavanadate 시약을 혼합한 후, shaking후에 15분 동안 정치한 후 흡광도 470nm에서 측정하였다. 표준용액은 인산이수소칼륨으로 준비했다.

제 2 절 연구개발 수행 결과

근권 토양에서 분리한 미생물의 IAA 생산능력, 질소고정능력 및 인산가용화능력을 간단하게 요약하여 표 2에 나타내었다. 1차 선발된 400여개의 미생물 중 IAA를 생산하고, 질소고정능력을 동시에 보유하는 미생물은 47개였으며 IAA 생산능력은 1.44-28.08ug/ml로 매우 다양하였다 또한 아세틸렌환원력을 측정하여 질소고정능력을 측정한 결과는 1.72-14.28 nmole/mg-protein/h 로 나타났다. 이러한 IAA 생산 및 질소고정능을 대상으로 15개의 미생물을 대상 지방산 분석비교 방법(MIDI)을 이용하여 동정한 결과는 표 3에 나타내었다. 이러한 방법으로 동정한 결과 *Pseudomonas* 및 *Burkholderia*가 많은 것으로 나타났다. 또한 이 15종의 균을 대상으로 인산가용화능을 측정한 결과 이 중 10개의 균만이 인산가용화능을 나타내었다.

본 실험실에서 기 분리한 식물생장조절물질 생산능 및 질소 고정능을 보유하고 있는 균(CBMB 20)을 이용하여 벼에 감염시킨 후 식물유묘의 식물생장조절물질(t-ZR, iPA 및 IAA) 및 감염된 유묘뿌리의 질소 고정능을 측정한 결과는 표 4에 나타내었다. CBMB20을 접종한 식물체의 식물생장조절물질의 함유량이 대조구에 비하여 20% (IAA)에서 450% 정도 증가함을 알 수 있었으며 국내 균주보관소에서 보관중인 다른 우량주보다 접종 효과가 우수함을 알 수 있었다. 또한 감염된 뿌리의 질소고정능도 CBMB20을 접종한 경우 대조구나 기타 균을 접종한 것보다 우수함을 알 수 있었다.

CBMB20을 종자에 처리하여 발아율을 측정한 결과는 표 5에 나타내었다. CBMB20을 종자에 처리 하였을 때 무처리구에 비하여 20%이상의 발아율이 증가됨을 알 수 있었으며 이는 CBMB20의 종자처리가 식물생장 조절물질의 생성을 촉진한 결과로 생각된다. 균주접종이 벼유묘의 vigor index 에 미치는 영향은 그림 5와 같다. Seedling vigor index도 CBMB 20접종에 의하여 30%이상 증가 되는 결과를 나타내었다.

충북지역 근권토양에서 분리한 질소고정균(*Azospirillum*)의 생리화학적 성질은 표 6과 같다. 질소고정균의 2개 기준균인 *A.lipoferum* 687과 *A.brasilense* Sp.7과 합

Table 2. IAA production, ARA and P-solubilizing activity of rhizobacteria isolated from Chinese cabbages

Samples	Colony morphology, Gram reaction	IAA(Try) ug/ml	ARA(nmol/mg protein/h)	P soln.	Halo zone dia (mm)*
CBCR 1	Gram negative, circular, pink	13.27	4.84	-	-
CBCR 2	Gram negative, circular, pink	19.58	1.75	-	-
CBCR 3	Gram negative, circular, pink	13.46	14.28	-	-
CBCR 4	Gram negative, circular, yellow	14.92	3.61	-	-
CBCR 5	Gram negative, rods, yellow	11.42	4.13	-	-
CBCR 6	Gram negative, circular, yellow	28.08	8.28	-	-
CBCR 7	Gram negative, circular, yellow	16.62	2.32	-	-
CBCR 8	Gram negative, rods, fluorescent	9.23	1.55	+	3
CBCR 9	Gram positive, circular, yellow	11.77	6.04	-	-
CBCR 10	Gram negative, rod, white	7.00	1.75	-	-
CBCR 11	Gram negative, circular, white	12.69	1.92	-	-
CBCR 12	Gram negative, circular, pink	13.58	2.07	-	-
CBCR 13	Gram negative, circular, yellow	15.54	2.71	-	-
CBCR 14	Gram negative, rod, white	16.31	9.07	-	-
CBCR 15	Gram negative, circular, fluorescent	9.88	4.54	+	3
CBCR 16	Gram negative, circular, fluorescent	2.53	1.95	+	2.6
CBCR 17	Gram negative, circular, white	1.44	3.25	+	2
CBCR 18	Gram positive, circular, pink	2.62	2.59	-	-
CBCR 19	Gram negative, rod, white	6.20	5.66	-	-
CBCRI 20	Gram negative, rod, yellow	1.63	8.50	-	-
CBCRI 21	Gram negative, circular, yellow	0.74	3.12	-	-
CBCRI 22	Gram negative, rod, fluorescent	0.63	2.77	+	2.6
CBCRI 23	Gram negative, rod, white	0.87	5.24	-	-
CBCRI 24	Gram negative, rod, pink	1.63	2.60	-	-
CBCRI 25	Gram negative, rod, white	6.56	3.80	-	-
CBCRI 26	Gram negative, circular, pink	10.35	2.65	-	-
CBCRI 27	Gram positive, circular, yellow	14	1.83	-	-
CBCRI 28	Gram negative, rod, white	12	2.13	+	6
CBCRI 29	Gram positive, circular, white	17.8	6.62	-	-
CBCRI 30	Gram negative, rod, yellow	7.2	1.72	-	-

(Table continue)

Samples	Colony morphology, Gram reaction	IAA(Try) ug/ml	ARA(nmol/mg protein/h)	P soln.	Halo zone dia (mm)*
CBCRI 31	Gram negative, rod , white	10.2	3.11	+	2.3
CBCRI 32	Gram negative, rod, pink	10.55	1.90	-	-
CBCRI 33	Gram negative, circular, white	14.8	2.41	+	4.33
CBCRI 34	Gram negative, circular, white	21.85	2.43	-	-
CBCRI 35	Gram positive, circular, white	27	4.24	-	-
CBCRI 36	Gram positive, circular, yellow	7.75	16.75	-	-
CBCRI 37	Gram positive, circular, white	8.8	2.89	-	-
CBCRI 38	Gram positive, rods, orange	10.4	2.05	-	-
CBCRI 39	Gram negative, rods, orange	14.55	2.80	+	4
CBCRI 40	Gram negative, rods, yellow	9.1	2.41	-	-
CBCRI 41	Gram negative, rods, yellow	13	2.22	-	-
CBCRI 42	Gram negative, circular, white	24.05	2.52	-	-
CBCRI 43	Gram negative, rods, yellow	21.7	1.96	+	4
CBCRI 44	Gram negative,rods, white	20.7	2.46	+	2
CBCRI 45	Gram positive, rods, white	29.75	6.02	-	-
CBCRI 46	Gram negative, rods, white	14.45	3.11	+	3
CBCRI 47	Gram negative, circular, yellow	9.45	0.24	+	2

* halo zone diameter = (colony + zone) diameter colony diameter

Table 3. Selective plant growth promoting rhizobacteria from the rhizosphere of Chinese cabbage

Isolate	Gram reaction	IAA(Trn) g/ml	ARAnmol/mg protein/h	P soln. (mm)*	FAME identification
CBCR 4	Gram negative	14.92	3.61	-	<i>Sphingobacterium sprtivorum</i>
CBCR 6	Gram negative	28.08	8.28	-	<i>Flavobacterium capsulata</i>
CBCR 8	Gram negative	9.23	1.55	3	<i>Ewingella americana</i>
CBCR 14	Gram negative	16.31	9.07	-	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
CBCR 15	Gram negative	9.88	4.54	3	<i>Burkholderia gladioli</i>
CBCRI 22	Gram negative	0.63	2.77	2.6	<i>Burkholderia cepacia</i>
CBCRI 28	Gram negative	12	2.13	6.0	<i>Pseudomonas putida</i>
CBCRI 29	Gram positive	17.8	6.62	-	No match
CBCRI 33	Gram negative	14.8	2.41	4.33	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CBCRI 39	Gram negative	14.55	2.80	4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CBCRI 43	Gram negative	21.7	1.96	4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CBCRI 44	Gram negative	20.7	2.46	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CBCRI 45	Gram positive	29.75	6.02	-	<i>Brevibacillus choshinensis</i>
CBCRI 46	Gram negative	14.45	3.11	3	<i>Enterobacter cloacae</i>
CBCRI 47	Gram negative	9.45	0.24	2	<i>Sphingobacterium sprtivorum</i>

* halo zone diameter = (colony + zone) diameter - colony diameter

Table 4. Plant hormone concentration and ARA activity of N₂-fixing bacteria treated rice seedlings. Each value represents mean ± SE of three replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at P = 0.05 levels are indicated by different letters.

Treatment	Plant hormones			ARA activity(nmol of C ₂ H ₄ /g dry root /h)
	t-ZR (pmol/g FW)	iPA (pmol/g FW)	IAA (nmol/g FW)	
Control	69.4 ± 3.72 ^b	19.1 ± 2.73 ^b	8.8 ± 0.21	11.60 ± 0.95
KACC10744	631.1 ± 13.74 ^a	31.7 ± 3.33 ^{ab}	10.2 ± 0.40	22.06 ± 5.11
<i>M.extorquens</i> <i>miaA</i> -	69.8 ± 4.38 ^b	34.7 ± 3.23 ^a	10.1 ± 0.91	—
CBMB20	636.3 ± 12.50 ^a	41.8 ± 5.05 ^a	11.2 ± 1.36	94.90 ± 4.01
LSD (P = 0.05)	36.53	15.63	NS	—

Table 5. Effect of seed imbibition of rhizo bacteria on seed germination and rate of germination (RG) of rice. Values are the mean \pm SE of three replications of 200 seeds each. Values in parentheses are arc sine transformed values. In the same column, significant differences according to LSD at P = 0.05 levels are indicated by different letters.

Treatments	Germination (%)	Rate of germination (R _G)
Control	75.86 (60.84) ^b	20.51 \pm 0.58 ^b
Fresh AMS medium	76.18 (60.63) ^b	20.51 \pm 0.59 ^b
<i>M.fujisawaense</i> KACC 10744	95.00 (77.06) ^a	22.24 \pm 0.17 ^a
<i>M.extorquens miaA</i> ⁻	91.00 (72.61) ^a	22.17 \pm 0.28 ^a
CBMB20	96.33 (79.14) ^a	22.69 \pm 0.12 ^a
LSD (P = 0.05)	5.67	1.59

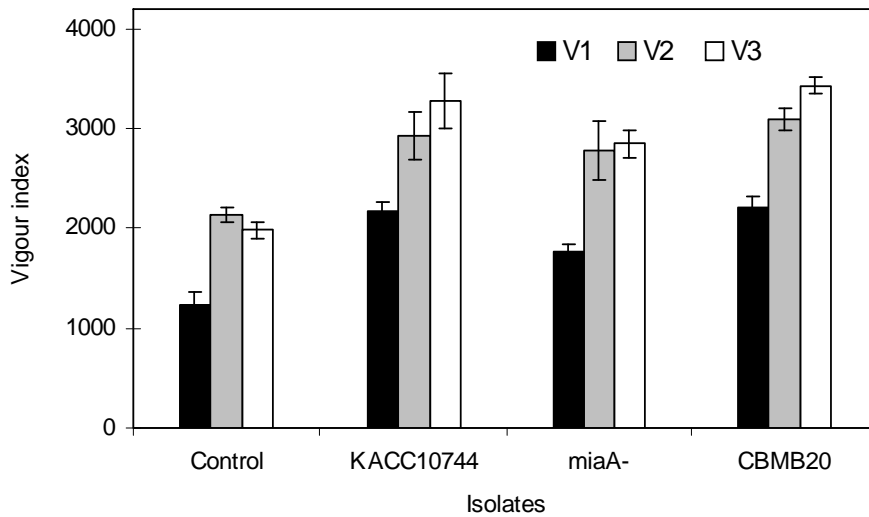


Fig 5. Effect of CBMB20 bacterial inoculation on seedling vigour index at different vegetative stages of rice seedlings. Error bars are \pm SE.

게 비교한 결과 모든 균들은 그람 음성자 산화효소로 반응했고, 표면 아래 상피 특
 징을 NFB배지에서 형성했다. 16개 중 12개 균은 *A.brasilense* Sp.7의 특징을 보여줬
 고, CW1503은 *A.lipoferum* 687의 특징을 보여줬다. 반면 3개중, 즉 CW 302, CW
 709, CW902는 *A.lipoferum* 687과 *A.brasilense* Sp.7의 특징을 어느것도 보여주지 않
 았다. 비록 이 균이 자신의 성장에 글루코오스와 비오틴을 사용할 수 있더라도, 그들
 은 BMS agar에서 모식적인 노란 콜로니를 생산했다. 또한 *Enterobacter* spp.
 *Enterobacter*균으로 밝혀진 것도 API 20E 분석결과 모두 그람 음성자, 산화효소 음
 성자, 자동성을 지닌 편모로 나왔고, 질소고정을 할 수 있었다. 모든 분리균주는 단
 독 생육상태에서 acetylene환원 방법을 이용하여 측정된 결과 질소고정력을 나타냈
 다. 토양에 접종 사용시 효과를 보기 위하여는 작물의 뿌리에 감염되어 질소를 고정
 시키는 능력이 우수한 균주가 필요하기 때문에 분리균주 중 CW301, CW903,
 CW1503을 대상으로 뿌리 감염률을 조사하고 감염된 식물체 근권의 질소고정력을
 측정하였다.

본 실험실에서 분리한 질소고정균 (표 6) 중 (CW1401, 1503, 301, 307, 716 및
 903)을 접종한 밀 유묘의 뿌리를 채취하여 근권에 존재하는 접종균주를 계수한 결과
 는 그림 6과 같다. CW1401에 접종된 뿌리에서 가장 높은 수의 접종균주가 생존함
 을 알 수 있었다. 접종균주의 뿌리 활착률 향상에 도움이 되는 것으로 알려진 2,
 4-D의 처리는 질소고정균의 뿌리활착에도 도움이 되는 것으로 나타났으나 실제로
 응용하기 위하여서는 사용 방법에 관한 많은 연구가 필요할 것이다.

본 실험실에서 1차 선발한 질소고정균의 질소고정력과 각각의 균주에 의하여 감염
 된 유묘 뿌리의 질소고정력은 그림 7에 나타내었다. 균주 자체의 질소 고정력은
 CW 705가 가장 높게 나타났으며 뿌리에 감염된 후 유묘 뿌리의 질소고정력은
 CW301, 903에서 가장 높게 나타났다. 이러한 질소고정력의 차이는 접종균주와 식
 물체간의 특이성에 기인하는 것으로 판단되며, 본 실험의 목표인 미생물 비료 개발
 을 위하여는 미생물 자체의 질소 고정능력도 중요하지만 식물 뿌리에 감염된 후
 질소고정력이 우수한 미생물의 선별 및 이용이 더욱 중요하리라 생각된다.

Table 6. Biochemical characteristics of the N₂-fixing isolates from rhizosphere of different crops

Strains	Host plant	Gram reaction	Oxidase reaction	Potato infusion (BMS) agar ^a	Carbon sources utilization		Biotin requirement	Groups
					Sucrose	Malic acid		
<i>A. brasilense</i> Sp7*	-	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. brasilense</i> CW5	Tobacco	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. brasilense</i> CW202	Rice	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. brasilense</i> CW301	Wheat	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. brasilense</i> CW307	Wheat	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. brasilense</i> CW406	Soybean	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. brasilense</i> CW705	Rice	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. brasilense</i> CW716	Onion	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. brasilense</i> CW805	Onion	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. brasilense</i> CW903	Taro	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. brasilense</i> CW1401	Soybean	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. brasilense</i> CW1402	Rice	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. brasilense</i> CW1502	Apple	-	+	Pink	-	+	-	I
<i>A. lipoferum</i> 687*	-	-	+	Pink	-	+	+	II
<i>A. lipoferum</i> CW1503	Sudan grass	-	+	Pink	-	+	+	II
<i>Enterobacter</i> sp. CW302	Wheat	-	+	Yellow	-	+	+	III
<i>Enterobacter</i> sp. CW309	Wheat	-	+	Yellow	-	+	+	III
<i>Enterobacter</i> sp. CW902	Rice	-	+	Yellow	-	+	+	III

*Reference strains obtained from the collection of Peter B. New (Australia)^a Typical colored colonies on Potato infusion (BMS) agar were observed after incubation at 30°C for 7 d (Krieg and Döbereiner, 1984). The groupings are based on the similarities to the reference strains *A. brasilense* Sp7 and *A. lipoferum* 687. Group III differed from the reference strains and hence grouped separately.

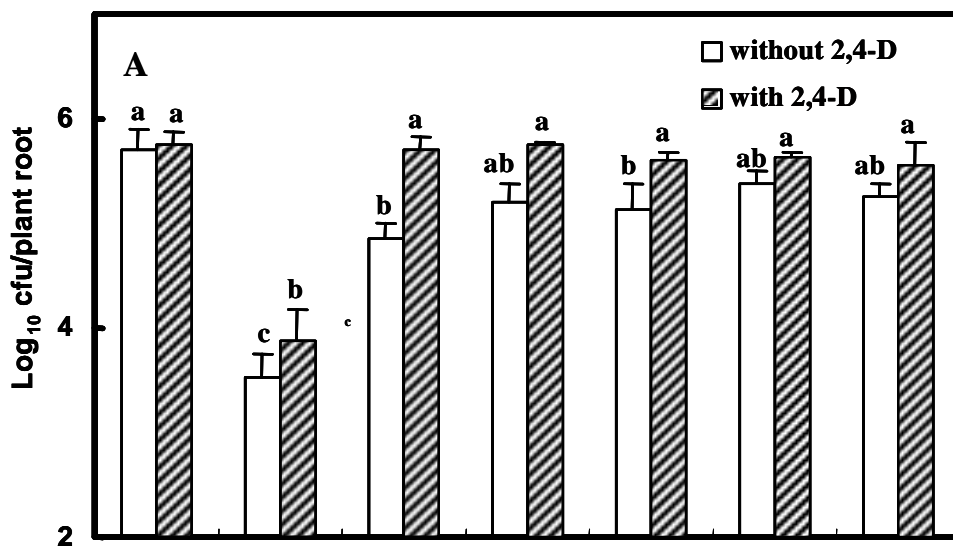


Fig. 6. Colonization of wheat roots in the presence and absence of 2,4-D, as measured by plate count of roots ten days after inoculation with *Azospirillum* strains containing pLA-*lacZ*. Columns denoted by a different lower case letter differ significantly by ANOVA at $P \leq 0.05$. Error bars are standard deviation.

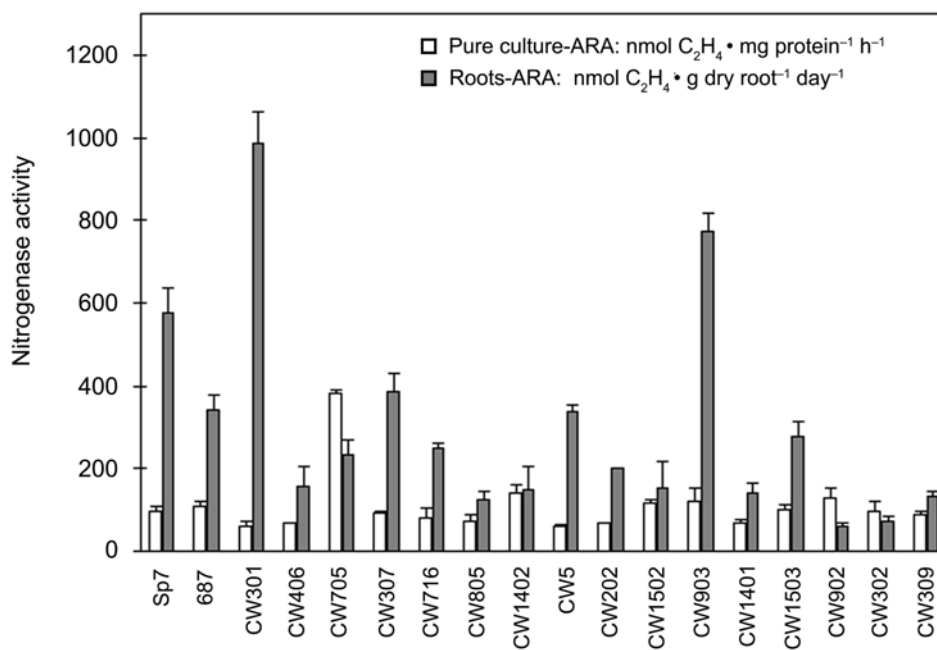


Fig 7. Nitrogenase activity by isolates in pure culture in Nfb medium and in association with roots of wheat seedlings. Reference strains; *Azospirillum brasilense*Sp7 and *Azospirillum lipoferum* 687. Error bars are standard deviation.

단독 및 작물체 감염 후 질소고정력이 우수한 3종의 균주를 분자생물학적 방법으로 동정한 결과(표 7, 그림 8) 이 세균들은 각각 *A.brasilense*, *A.lipoferum*, *Enterobacter* sp.에서 98%~99% 상동함을 가진다는 것을 찾을 수 있고, NCBI에 있는 GenBank 가입 번호인 AY518780, AY518777, AY518779, AY518778로 지정됐다. 뿌리 활착률은 유전자 변형체를 제조하여(표 8) β -galactosidase를 측정하고(그림 9, 10) 현미경 사진을(그림 11) 통하여 활착정도를 비교하였다.

사용한 균주 모두가 액체 배지 상의 free-cell상태에서는 우수한 인산 가용화능을 보였으나 종자에 접종하여 발아시 근권에 투명대를 형성을 비교하는 방법으로 감염된 식물체에 의한 인산가용화능은 차이를 나타내어 *Burkholderia*종이 일반적으로 타종의 인산가용화 균보다 뿌리의 활착률이 우수한 것으로 나타났으며 특히 *Burkholderia* sp. CBPB-HIM이 종자 처리 후 뿌리에 의한 인산 가용화를 촉진 시키는 것으로 판단되었다 (표 9)

인산가용화균 제제화를 위한 펠렛 실험의 액체 배지에서 미생물의 밀도, pH 및 인산 가용화 능력의 변화는 그림 12와 같다. *Burkholderia* sp. CBPB-HIM에 의해 용해된 가용성 인(P)은 48시간 만에 최고치인 363.78 mg L⁻¹를 기록하였다.

48시간 후 가용성 인 함량이 감소하였으며, 96시간과 120시간에는 가용성 인이 존재하지 않았다. 이것은 아마도 측정하는 동안 유효인산의 소모에 기인하는 것으로 추정된다.

배지의 초기 pH는 7.2였는데, 가용화가 진행됨에 따라 배지의 pH가 크게 저하되어 48시간대에 최저인 5.11을 기록하였다. 그 후 배지 pH가 증가하여 96시간에는 6.11을 나타냈다. 불용성 인산의 가용화는 pH 저하와 산의 생성에 의존하는 것으로 알려져 있다. *Burkholderia cepaci*가 생성하는 글루콘산과 2케토글루콘산에 의한 산성화와 착염화 과정이 액체 배지에서 불용성 인산을 용해한다는 보고도 있다.

세균의 밀도는 48시간의 배양에서 최고치인 약 10⁸ cfu ml⁻¹에 달하였으며, 그 후에 감소하였으나 120시간까지 일정한 수준을 유지하였다. 즉, 배양 48시

간에 세균의 밀도가 극대화됨에 따라 미생물의 생성하는 산이 극대화 되고, 가용성 인 함량이 최고가 된 것으로 보아 미생물이 생성하는 산에 의해 인이 가용화 된 것으로 보인다.

고품질의 집종제를 위한 가장 중요한 요인은 세포의 생존력이다. 생존하는 세포 수를 측정함으로써 집종제의 품질을 측정하는 것은 집종제의 역가에 대한 정밀한 지표로 간주 된다. 슬러리 집종제보다 펠렛 상태의 집종제가 근류세균의 생존에 좋은 조건을 제공하였다는 보고가 있다. 본 실험에서는 황토, 쌀겨, 인광석으로 이뤄진 펠렛에서 *Burkholderia* sp.의 생존에 대해 실험하였다.

펠렛 제조 당일에는 황토:쌀겨(1:1)+인광석 펠렛의 생존 세포수가 황토+인광석보다 유의하게 많았다.(표 10) 30일 및 60일의 저장에서는 처리간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 90일간 4℃에 저장한 경우에는 황토:쌀겨(1:1)+10% 인광석 함유 펠렛의 균수가 타 처리에 비해 유의하게 많았다.

생존하는 *Burkholderia* sp. 세포 수는 대체적으로 저장 온도와 기간에 상관없이 점토+인광석보다 점토+쌀겨+인광석 펠렛에서 더 많이 유지되었다. 저장기간 중 60일을 제외하고 4℃에 보관된 펠렛에서 보다 많은 세포들이 생존하였다. 담체로 토탄과 슬러지를 사용한 근류균에서도 비슷한 경향이 관찰되었다.

이는 Sparrow and Ham(1983)이 보고한 바와 같이 균주의 반응이 담체와 저장온도에 따라 다르기 때문일 것이다.

점토:쌀겨(1:1) 펠렛에 glucose 0.1% 첨가한 경우 글리세린 0.1% 첨가한 경우 및 아무것도 첨가하지 않은 경우보다 세포수가 많았다(그림 13). 그러나 펠렛 제조 당일에는 탄소원을 첨가하지 않은 펠렛과 통계적으로 유의차는 없었다.

15일 동안 25℃에 저장한 경우 glucose 0.1% 첨가한 점토:쌀겨(1:1) 펠렛의 생존 세포 수가 가장 많았다. 또한, 배양 중기까지 이런 추세가 지속되었다. 탈지분유가 첨가된 겔 상태의 미생물 집종제는 안정성이 증진되고, 보호제로서 작용하며, 영양도 제공한다는 보고가 있는데, 탈지분유는 탄소와 질소를

공급하는 기능이 있다.

일반적으로 황토:쌀겨(1:1) 펠렛의 세포 수가 황토:쌀겨(1:1)+ 10% 인광석 펠렛보다 많았다. 인광석을 첨가함으로써 펠렛의 물성이 변한 것에 기인하는 이는 공극이 많은 구조는 세포가 빨리 마르게 되어 세균의 생존 기간이 극단적으로 줄어들 수 있다는 사실도 인광석 첨가가 부정적으로 효과를 나타는 이유로 판단된다.

토양에 세균과 양분을 함께 투입함으로써 접종제의 생육이 증진되었다는 연구결과가 있으며, 본 연구에서도 담체에 양분과 세균을 함께 첨가하여 펠렛을 만든 후 결과를 비교하면 glycerol이 첨가된 펠렛에 비해 glucose가 첨가된 펠렛의 세포 수가 유의성 있게 높게 유지되었다 (그림 13A). Duquenne et al.(1999)는 glycerol이 담체 외부로 확산되어 균이 생육하기 위해 이용할 수 있는 양이 감소할 수 있다고 하였다.

그림 14를 보면, 1% glucose가 첨가된 점토:쌀겨(1:1)+ 10% 인광석을 담체로 한 펠렛을 25℃에 저장한 경우 15일과 30일에는 타 처리보다 유의성 있게 세포수가 많았고, 0.1% glucose를 첨가한 펠렛이 다음을 차지하였다. 제조 후 5일까지는 탄소원의 첨가 효과가 나타나지 않았다. 제조 후 또한 60일 이후에는 처리 간에 유의성 있는 차이가 없었다.

한편, 점토:쌀겨(1:1)+ 10% 인광석을 담체로 한 펠렛을 4℃에 저장한 경우에는 90일까지 전 기간에 걸쳐 1% glucose를 첨가한 처리가 타 처리보다 균주의 생존량이 많았다. 다음은 0.1% glucose 첨가 처리가 차지하였다. 글리세린을 첨가한 경우에는 무 첨가보다도 생존 세포 수가 적게 되는 경향을 보였다.

1% glucose가 첨가된 황토:쌀겨(1:1)+ 인광석 펠렛에서 0.1% glucose 첨가보다 유의성 있게 많은 수의 생존 세포가 검출된 것은 미생물의 먹이로서의 탄소원의 공급효과 외에 다량의 점질 물질 첨가로 펠렛의 공극이 채워져 세균이 심하게 건조해지지 않았기 때문인 것 같다. 반면에 glycerol의 효과가 낮은 이유는 첨가된 glycerol이 밖으로 확산되어 공극을 막아주지 못하여 건조가 심하고, 탄소원을 세균이 먹이로 이용하기가 glucose보다 어렵기 때문이라 판

Table 7. Percentage homology 16S rDNA sequences

Isolates	Organism sequence	with most similar	Similarity (%)	Accession number*
CW301	<i>Azospirillum brasilense</i>		99%	AY518780
CW903	<i>Azospirillum brasilense</i>		99%	AY518777
CW1503	<i>Azospirillum lipoferum</i>		98%	AY518779
CW309	<i>Enterobacter</i> sp.		99%	AY518778

*Accession number obtained from the GeneBank National Center for Biotechnology Information (NCBI).

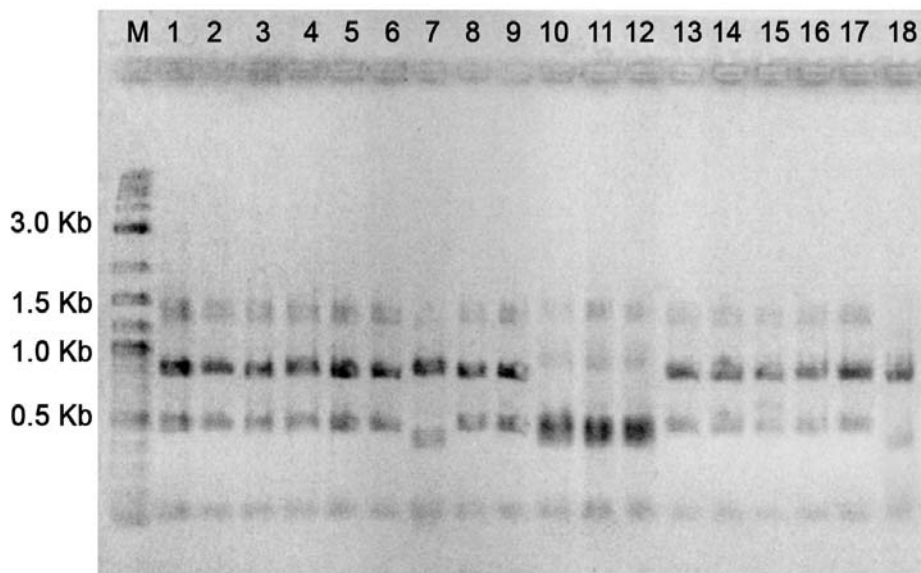


Fig 8. The ARDRA patterns of amplified 16S rDNA of sixteen strains digested with restriction enzyme *Rsa*I. Lanes contained: M, molecular weight marker; Lane 1, *A. brasilense*Sp7; Lane 2, CW805; Lane 3, CW705; Lane 4, CW307; Lane 5, CW1402; Lane 6, CW202; Lane 7, CW1503; Lane 8, CW716; Lane 9, CW301; Lane 10, CW309; Lane 11, CW302; Lane 12, CW902; Lane 13, CW1401; Lane 14, CW1502; Lane 15, CW406; Lane 16, CW903; Lane 17, CW5 and Lane 18, *A. lipoferum* 687.

Table 8. Bacterial strains and plasmids used

Strain or plasmid	Reference/source
<i>Azospirillum</i> strains	
<i>A. brasilense</i> Sp7	Tarrand et al. (1978)
<i>A. brasilense</i> CW301	This work
<i>A. brasilense</i> CW903	This work
<i>A. lipoferum</i> 687	Peter B. New, University of Sydney, Australia
<i>A. lipoferum</i> CW1503	This work
Plasmids	
<i>pLA-lacZ</i> *	Arsene et al. (1994)

* *lacZ-Kan* cartridge cloned into pLA2917 vector^b, Tc^r, Km^r, Lac⁺ pLA2917 is a low-copy-number, broad-host-range cloning-vector derivative of RK2 that is stable in *Azospirillum* strains

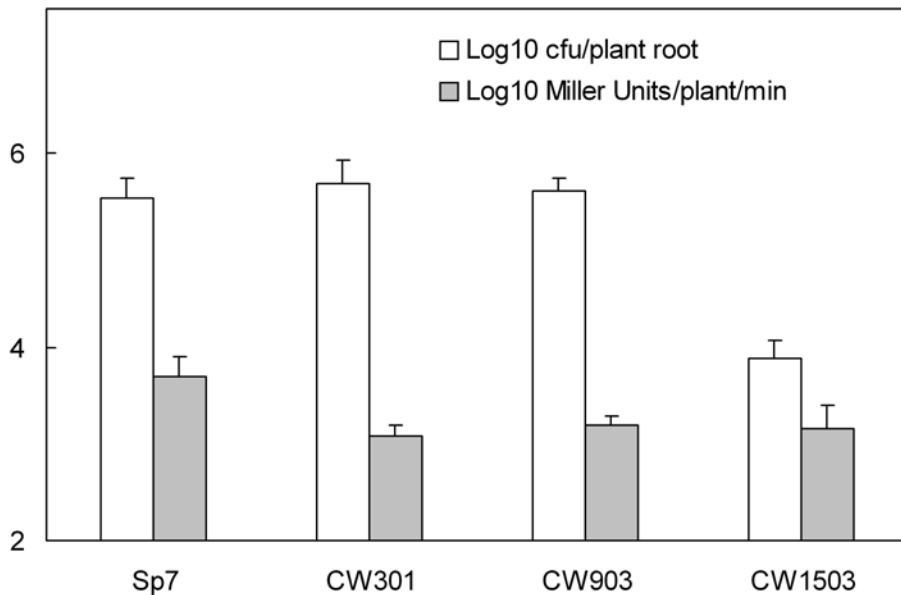


Fig 9. β -galactosidase activity of wheat inoculated with *Azospirillum* transconjugants. The β -galactosidase activity was determined at 10 days post inoculation. The data are averages of three independent experiments and error bars represent standard deviation. Sp7- *A. brasilense* reference strain; CW301, CW903 - *A. brasilense* strains; CW1503- *A. lipoferum* strain.

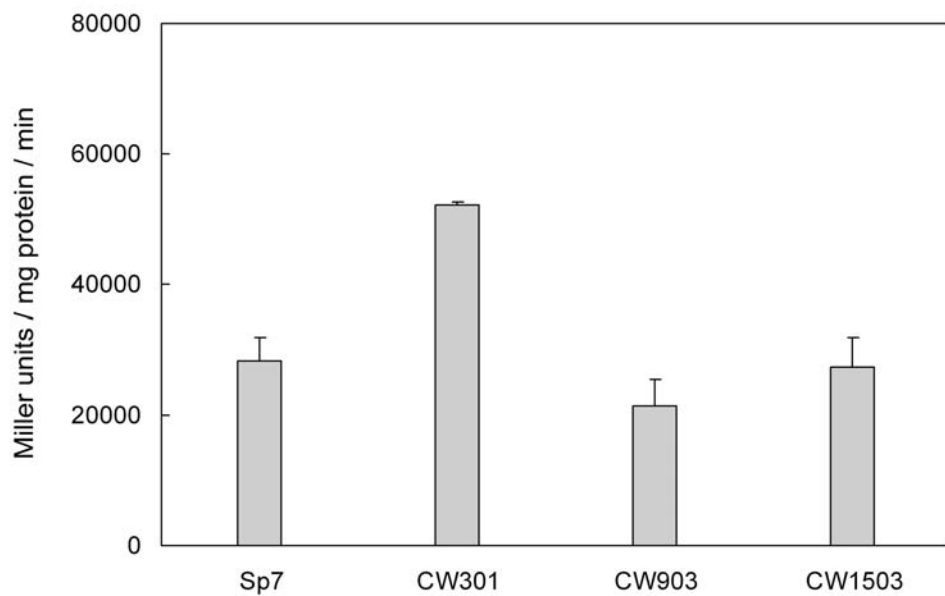


Fig 10. β -galactosidase activity of the Azospirillum transconjugants in pure cultures. Sp7- *A. brasilense* reference strain; CW301, CW903 - *A. brasilense* strains; CW1503- *A. lipoferum* strain. Error bars represents standard deviation.



Fig 11. *In situ* detection of β -galactosidase activity on root segments. All samples were stained after 10 days. X-gal staining was performed on five or six 1 cm root segments excised from the same plant starting from the tip. A) Root inoculated with *A. brasilense* CW903 (X60); B) Root inoculated with *A. brasilense* CW301 (X100); C) Root inoculated with *A. brasilense* Sp7 (X40).

Table 9. comparison of RP solubilization by root inoculated with P-solubilizer

Isolates	P-solubilization
<i>P. agglomerans</i> HK 14-1 (AY335552)	+
<i>E. aerogenes</i> HK 20-1 (AY335554)	+
<i>Klebsiella</i> sp. HK 34-2 (AY335553)	+
<i>Burkholderia</i> sp. CBPB-CDJ (AY640614)	+++
<i>Burkholderia</i> sp. CBPB-CDJ (AY640615)	+++
<i>Burkholderia</i> sp. CBPB-HOD (AY640614)	+++
<i>Burkholderia</i> sp. CBPB-HIM (AY640615)	+++++
<i>Burkholderia</i> sp. CBPB-MNP (AY640618)	+++

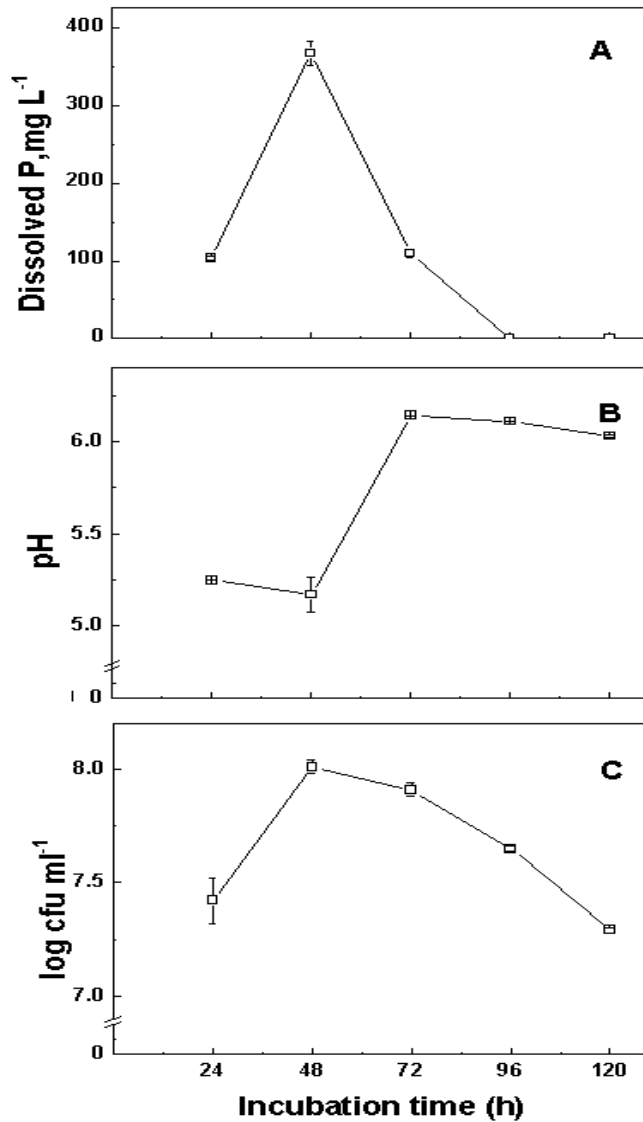


Fig 12. Phosphate solubilization by *Burkholderia* sp.(CBPB-HIM) grown in Pikovskaya's broth amended with insoluble $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. The effect of *Burkholderia* inoculation on A) soluble P, B) pH of the media over different periods. C) The population of the bacteria at different periods.

Table 10. Shelf life of Burkholderia sp. (CBPB-HIM) in loess, rice bran and rock phosphate pellets stored at 25 and 4°C

Treatment	Temp °C	log ₁₀ cfu g ⁻¹ of dry pellet					
		Days of storage					
		0	3	15	30	60	90
Clay + 5% RP	25	7.55 ^b	7.30 ^b	7.03 ^a	6.00 ^a	2.67 ^a	2.00 ^{bc}
	4	-	-	6.66 ^d	6.10 ^a	2.98 ^a	2.26 ^{bc}
Clay + 10% RP	25	7.54 ^b	7.36 ^{ba}	6.84 ^{bc}	6.30 ^a	3.23 ^a	2.33 ^{bc}
	4	-	-	6.48 ^e	6.16 ^a	3.08 ^a	2.36 ^{abc}
Clay:Rice bran(1:1) + 5% RP	25	7.74 ^a	7.52 ^a	6.98 ^{ba}	6.10 ^a	3.52 ^a	2.28 ^a
	4	-	-	6.75 ^{cd}	6.10 ^a	3.23 ^a	2.85 ^{ab}
Clay:Rice bran(1:1) + 10% RP	25	7.74 ^a	7.52 ^a	7.12 ^a	6.16 ^a	3.87 ^a	1.92 ^c
	4	-	-	6.90 ^{bc}	6.32	3.60 ^a	3.20 ^a
LSD(P≤0.05)		0.12	0.16	0.18	0.35	1.22	0.86

- Values in each column are mean of three replications per treatment
- Initial amounts of Burkholderia sp. added to carrier were 9.30 log₁₀ cfu ml⁻¹
- At 4th day, pellets were separated into two lots and stored at 25 and 4°C respectively

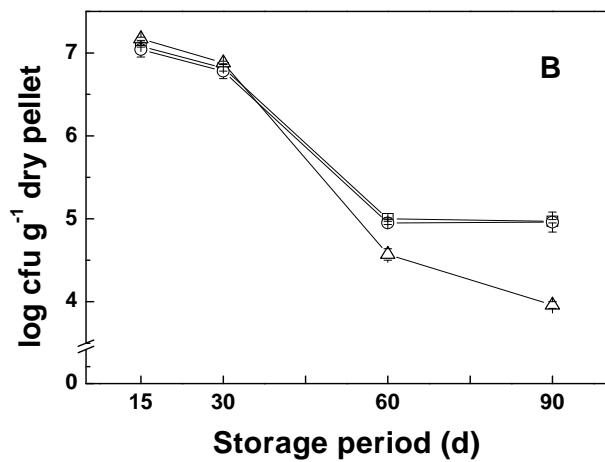
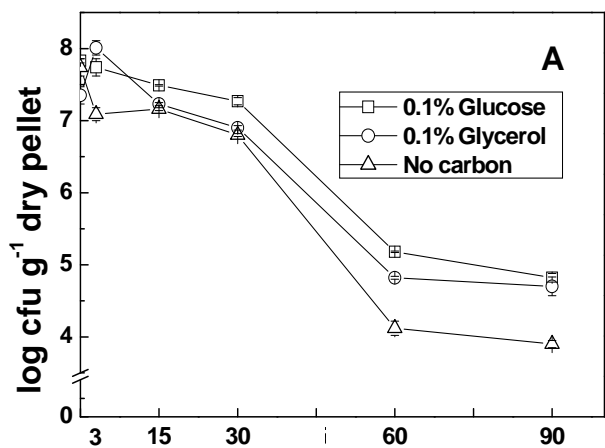


Fig 13. The survivability of Burkholderia sp.(CBPB - HIM) in pellets amended with different nutrients stored at different temperature.

A) 25°C B) 4°C

단된다. 저장 기간이 길어짐에 따라 유의성 있는 균 밀도 감소를 나타냈다(표 10, 그림 14-15). 저장기간이 길어짐에 따른 밀도 저하는 양분과 수분의 고갈 및 세포의 자기 분해에 기인한다는 보고가 있다. 25℃에 저장된 Control(미생물, 탄소원 무첨가) 펠렛의 수용성 인(P)은 6.45 ~ 16.79mg kg⁻¹dry pellet 을 나타냈다.

Burkholderia sp.로 배양한 경우 인광석의 수용성 인이 유의성 있게 증가되었다. 탄소원과 *Burkholderia* sp.가 첨가된 펠렛의 경우 농도에 관계없이 glucose가 첨가된 펠렛의 인광석의 가용성 인이 글리세린의 경우보다 유의성 있게 증가되었다(그림 16). 모든 처리에서 수용성 인 함량은 5일에 최대가 되었는데, 0.1% glucose 펠렛을 5일간 배양한 경우 가장 높았으나(206.86gP g⁻¹ dry pellet), 1% glucose 첨가와 별 차이가 없었다. 이 결과는 액체 배지에서 인산 가용화는 glucose 농도에 비례하여 증가한다는 보고와 일치하지는 않았다.

그 후부터 배양한지 30일이 될 때까지 수용성 인이 감소하다가 약간 증가하였다. 이것은 특히 양분이 첨가된 경우에 미생물에 의한 수용성 인의 고정화에 의한 것으로 추정된다. 배지에 존재하는 Fe, Ca, Mn, Mg, K 등 금속들도 용해된 인과 반응하여 가용성 인을 불용성으로 전환할 수 있다.

펠렛의 중조 가용성 인은 15.97 ~ 21.04mg kg⁻¹ dry pellet이었으며, 이는 수용성 인보다 약간 높았다. 중조 가용성 인 함량은 5일에 1% glycerol 첨가 펠렛에서 가장 높았는데(245.17mg kg⁻¹ dry pellet), 1% glucose 첨가 펠렛과 비슷하였다 (그림 17). 중조 추출 기법은 원래 식물에 유효한 토양 인의 측정을 위해 개발되었으며, 일반적으로 토양 유효 인의 지표로 이용된다. Son et al., (2006)은 탄소원으로서 glycerol을 사용한 불용성 인의 가용화를 시연하였다. 15일에 중조 추출 인이 감소한 것은 중조에 용해되지 않거나 용해성이 다른 매트릭스에 들어 있는 인 화합물의 존재로 설명할 수 있다. 이것은 수용성 인 (그림 16)보다 중조 추출 인 함량이 더 높은 것 (그림 17)을 설명할 수 있는 이유가 될 수 있다. 또한, Brookes et al.(1982)은 중조가 토양 미생물의 인을 측정하는 데 사용되는 다용도의 추출제라고 보고하였다.

펠렛 중 인광석의 가용화가 5일 만에 최대를 기록한 것은 시비와 관련하여 유용할 수 있다. 즉, 관행적으로 시비는 작물 식재 일주일 전에 하는 것으로 되어 있으므로, 시비 시 본 인산가용화 균을 인광석과 함께 시비하면 작물 식재 시 작물이 이용할 수 있는 인산을 공급해 줄 수 있을 것이다.

그런데, 인광석의 가용화가 5일만에 최고를 기록했지만, 저장한지 15일이 될 때까지 대조구에 비해 처리구 pH의 유의성 있는 감소는 보이지 않았다 (그림 18). 이는 완충제인 토양이 pH 하락을 방해했을 수 있기 때문이라 생각된다.

30일에는 1% glucose 첨가 펠렛에서 pH가 4.83으로 가장 크게 감소하였다 (그림 18). 30일에 pH 저하가 크게 나타난 것은 이때에 이르러 토양 완충력 이상으로 산이 생성된 것을 알 수 있는데, 이것은 세균에 의한 글루콘산의 생성 혹은 인광석의 산 성분, 특히 불소에 의한 것일 수 있다.

이상의 결과를 종합하면 인산 가용화능이 우수한 *Burkholderia* sp. strain CBPB-HIM의 입상화에 경제적인 담체인 황토와 쌀겨를 이용하는 것은 가능할 것으로 판단되며 추가적인 탄소원의 공급으로 균의 활성 및 인산가용화능의 향상과 유통기간의 장기화도 가능하리라 생각된다.

그러나, 실용화를 위해서는 쌀겨에 들어 있는 탄소와 N, P를 미생물이 이용할 수 있게 하는 방안, 재료의 간편하고 경제적인 대량 멸균방법, 입상 미생물 제제의 농업적 효과 확인 및 유통을 고려한 하절기의 고온 조건과 동절기의 저온 조건에서 균의 생존력 등에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

질소고정균(N)과 인산가용화균(P)의 종자처리는 무처리에 비하여 발아율 및 발아세에 유의성 있는 증가를 보였으며 각각의 단독처리에 비하여 복합처리시 그 증가율이 더욱 컸다. 또한 처리 방법 [M(N+P)와 S(N+P)]간에는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(표 11).

복합처리방법[M(N+P)]과 단독처리방법[S(N+P)]에 따른 식물체의 생육을 조사한 결과는 그림 19에 나타내었다. 식물체의 건물량, 지상부 및 지하부 길이 모두 접착구에서 유의성 있는 증가를 나타내었다. 처리방법 간에는 생육 초기(이식후 30일)에는 동시배양균처리가 건물량 증가에 더 큰 영향을 나타내

었으며 중반기 이후에는(이식후 60일) 건물량, 지상부 및 지하부 길이가 단독 배양하여 복합처리 한 것에 비하여 우수 하였다.

복합처리방법[M(N+P)]과 단독처리방법[S(N+P)]에 따른 식물체의 생육을 조사한 결과는 표 12에 나타내었다. M(N+P)처리가 S(N+P)처리에 비하여 주당 nodule수가 높았으나 nodule당 무게는 낮았다. 수확량은 무처리에 비하여 M(N+P)처리 및 S(N+P)처리에서 유의성 있게 증가하였으나 처리 방법 간에는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 수확 후 토양의 nitrogenase, urease 및 phosphatase의 활성은 무처리구에 비하여 M(N+P)처리 및 S(N+P)처리에서 유의성 있게 증가하였으나 처리 방법 간에는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(그림 20). 무처리에 비하여 인산가용화균의 단독처리는 식물의 건물중과 높이를 유의성 있게 증가시켰다. 인광석 단독처리도 무처리에 비하여 식물의 건물중과 높이를 유의성 있게 증가시켰으며 인광석 처리의 효과는 인산 가용화균 처리에 의하여 더욱 증가 되었다(그림 21). 그러나 권장 시비량의 인산을 용성인비로 시비 하였을 경우에는 인산가용화균의 접종 효과가 나타나지 않았다.

식물의 인산 흡수량은 인산 가용화균 단독처리 또는 인광석 단독 처리에 의해서도 무처리에 비하여 크게 늘어났으며 인광석 및 인산가용화균을 같이 처리할 경우 더욱 늘어났다(그림 22). 이는 인산가용화균의 접종이 토양에서 흡착되어 불용화된 인산의 가용화를 촉진 시켜 근권의 유효 인산량을 증가시키며 동시에 함께 처리 한 인광석의 가용화 속도도 증가시키는 것을 나타낸다.

그러나 화학인산비료(용성인비)를 권장시비량에 따라 시비할 경우 인산 가용화균의 효과는 나타나지 않았다. 이는 인산가용화균의 접종은 토양중 유효인산의 양이 충분할 경우 식물의 생육 및 인산의 흡수에 큰 영향을 나타내지 않음을 보여 주는 것으로 판단된다. 또한 인산 가용화균 및 인광석의 처리에 따른 질소흡수(그림 23)도 인산의 흡수에 미치는 영향과 비슷하게 나타났다.

*Methylobacterium oryzae*와 N fixing *Azospirillum brasilense* 와 P-solubilizing bacterium *Burkholderia* sp. strain CBPB-HOD 의 접종을 통해 세 가지 다른 작물의 생장과 양분흡수효과를 평가하였다. 즉, 토마토와 고

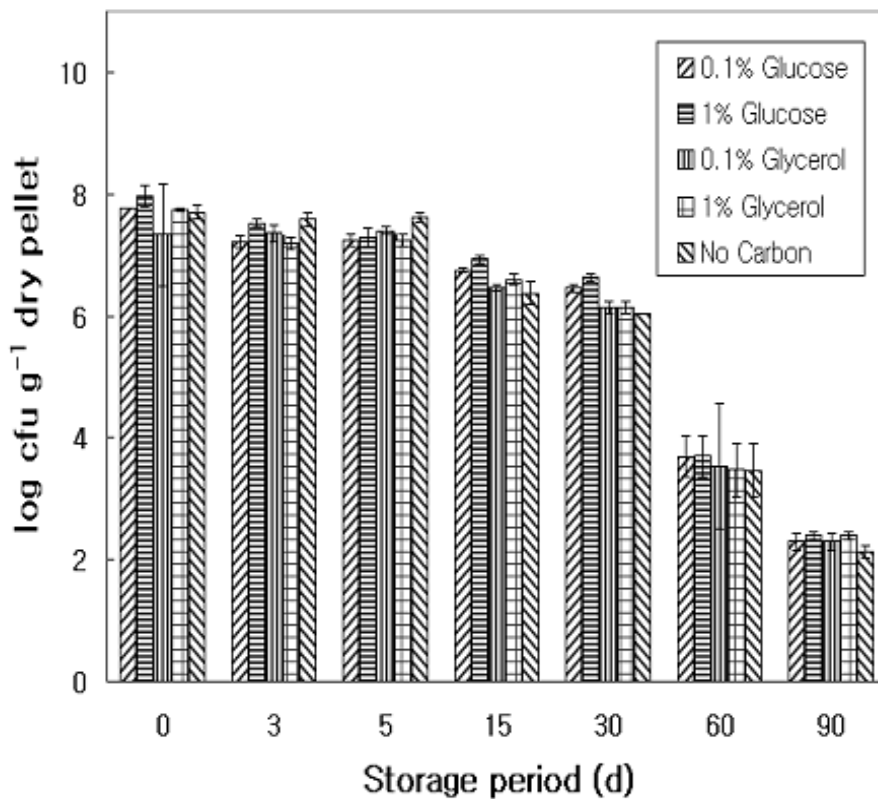


Fig 14. The survivability of *Burkholderia* sp. (CBPB-HIM) in carbon amended loess:rice bran (1:1) + 10% rock phosphate pellets stored at 25°C.

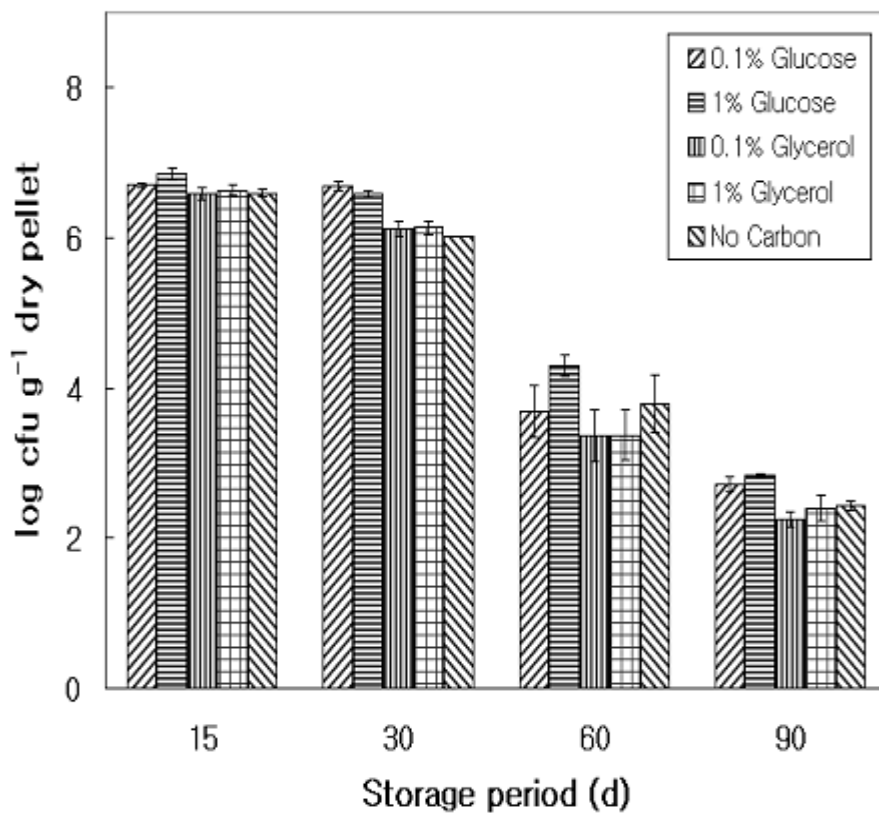


Fig 15. The survivability of *Burkholderia* sp. (CBPB-HIM) in carbon amended loess:rice bran (1:1) + 10% rock phosphate pellets stored at 4°C.

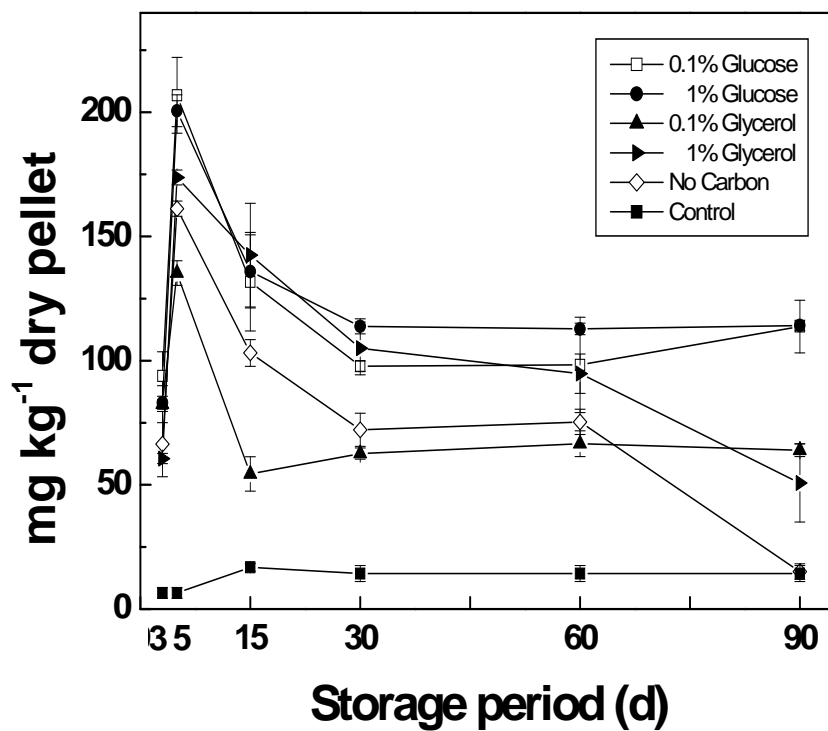


Fig 16. The changes in water-extractable P of loess: rice bran(1:1)+ 10% rock phosphate pellets respectively amended with carbon, inoculated with *Burkholderia* sp. (CBPB-HIM) and stored at 25°C.

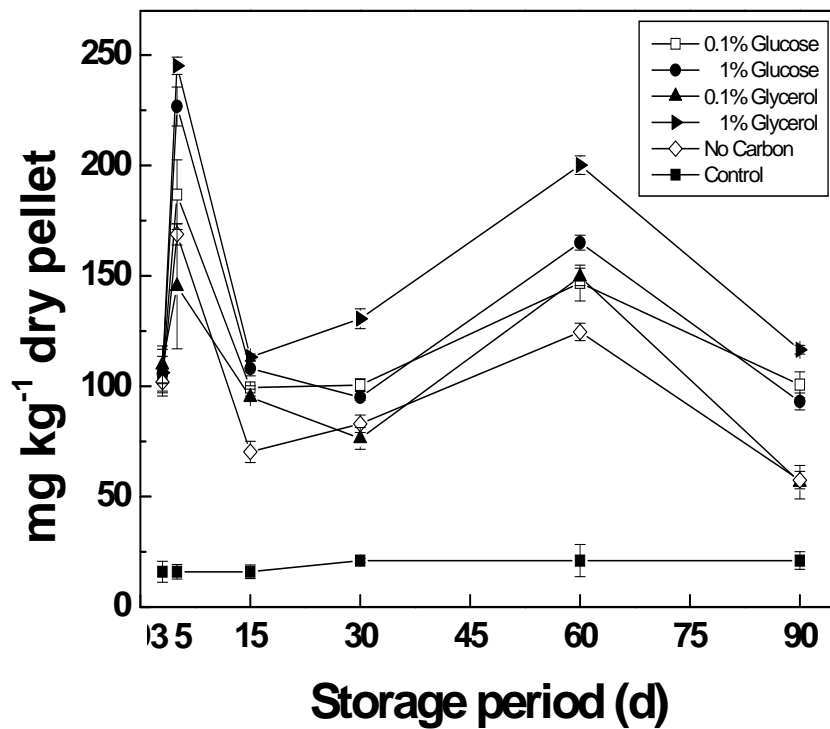


Fig 17. The changes in bicarbonate-extractable P of loess: rice bran (1:1)+ 10% rock phosphate pellets amended with carbon, inoculated with *Burkholderia* sp. (CBPB-HIM) and stored at 25°C.

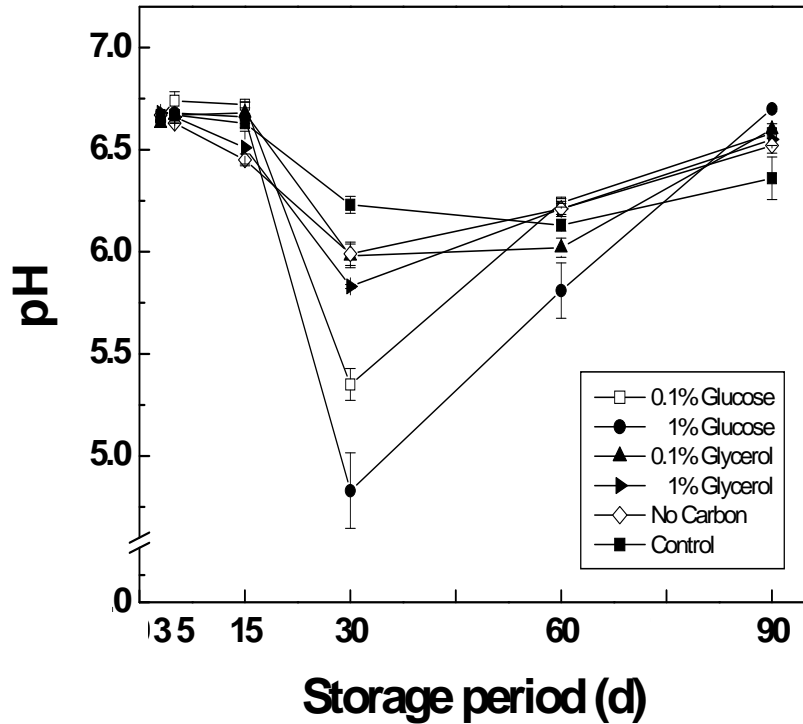


Fig 18. The changes in pH of loess: rice bran (1:1)+ 10% rock phosphate pellets amended with carbon, inoculated with *Burkholderia* sp. (CBPB-HIM) and stored at 25°C.

Table 11. Efficacy of individual and mixed bacterial inoculants on seed germination and seedling vigour.

Treatments	Germination per cent	Vigour index*	% increase over control
Control	92.0	2036.4±17.2	
N - fixer	95.2	2107.8±27.2	3.5
P - solubilizer	95.2	2127.4±107.2	4.5
S (P+N)	97.3	2541.5±161.0	24.8
M (P+N)	98.1	2580.9±85.3	26.7
LSD (P ≤ 0.05)	4.04	246.28	

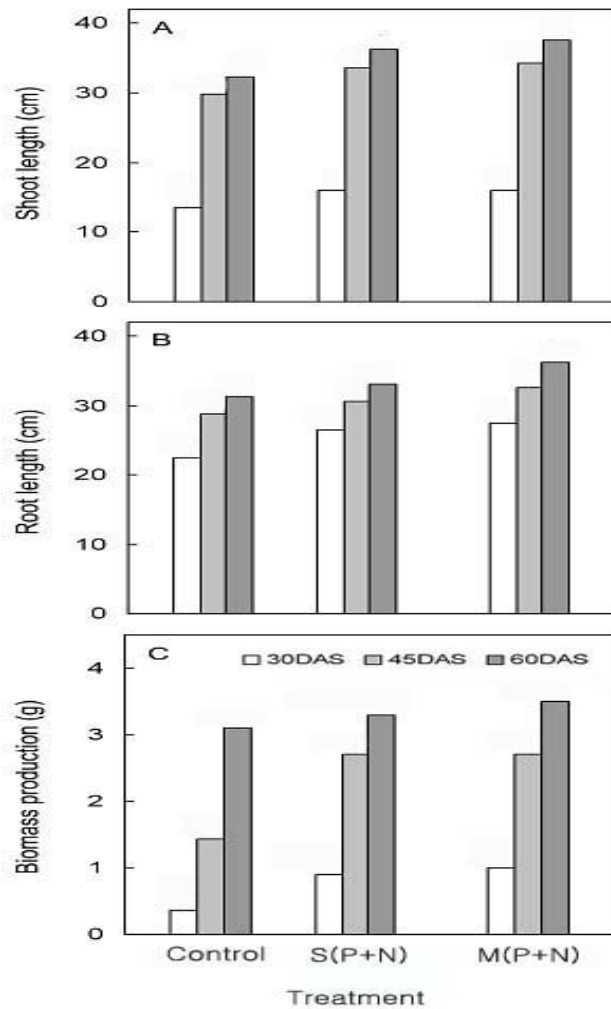


Fig 19. Effect of individual and mixed inoculants of N-fixer and P-solubilizer on the growth of shoot (A), root length (B) and biomass production (C) of blackgram. Each value represents mean of three replicates. The LSD values are 2.18, 1.81 and 1.07 (A); 2.18, 1.04, and 1.97 (B) and 0.06, 0.38, and 0.23 (C) for 30, 45, and 60 DAS respectively.

Table 12. Effect of mixed bioinoculant on yield parameters.

Treatments	Nodule number (per plant)	Nodule dry weight (mg)		No. of pods (per plant)	No. of seed (per pod)	100 seed weight (g)
		Per plant	Per nodule			
Control	7.7±0.32	12.1±1.46	1.58±0.11	26.0±1.18	10.0±0.94	3.60±0.28
S (P+N)	13.7±1.26	15.8±1.78	1.15±0.03	30.0±1.37	12.5±0.24	4.00±0.19
M (P+N)	17.7±1.26	15.9±1.35	0.90±0.03	32.0±2.69	13.0±1.60	4.20±0.28
LSD (P ≤ 0.05)	1.62	1.44	0.18	2.73	2.00	0.22

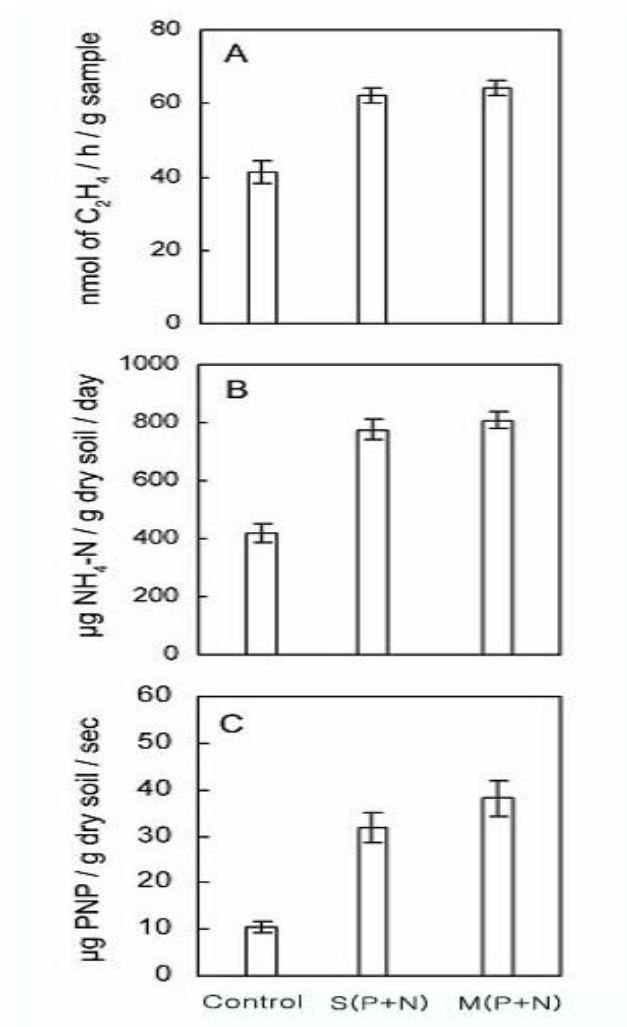


Fig 20. Effect of individual and mixed inoculants on nitrogenase (A), urease (B) and phosphatase activity (C) in rhizosphere soils. Each value represents mean of three replicates. Error bar indicate \pm SE

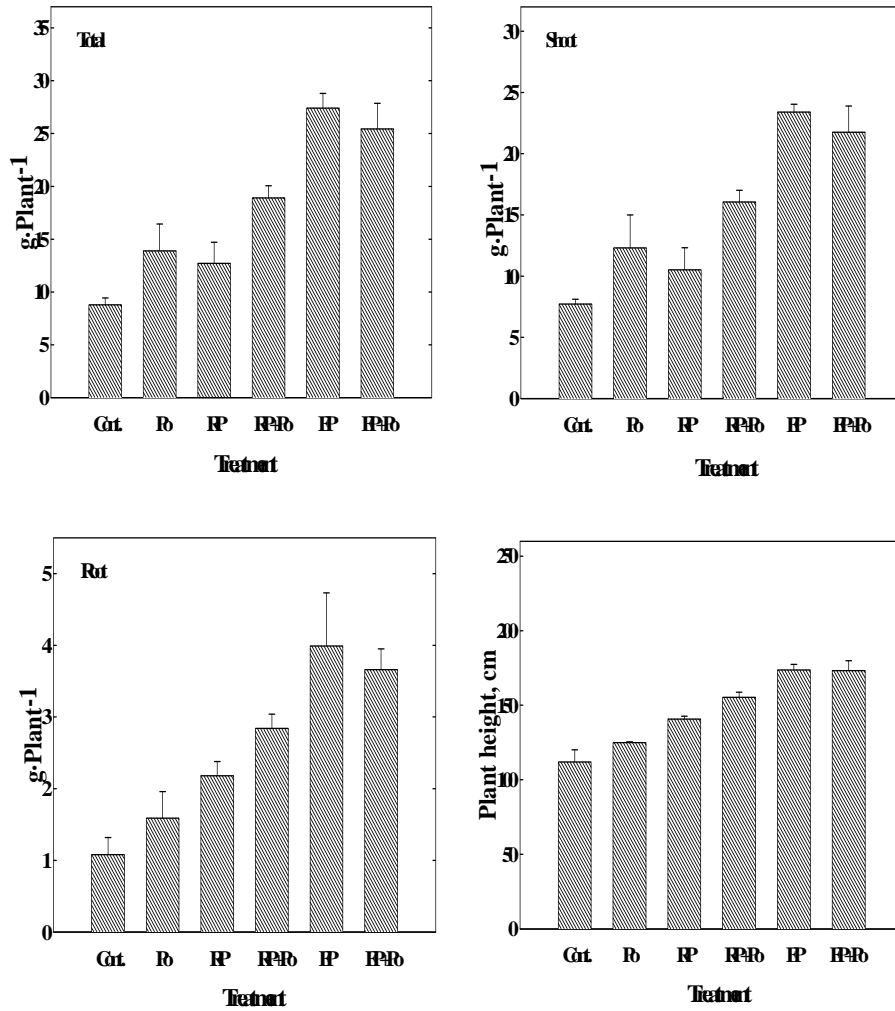


Fig 21. Effect of *P. oxalicum* CBPS-3F-Tsa on dry matter and plant height of maize at 60 DAS. Each data point represents a mean of three replicates. Error bars indicate \pm S.E.

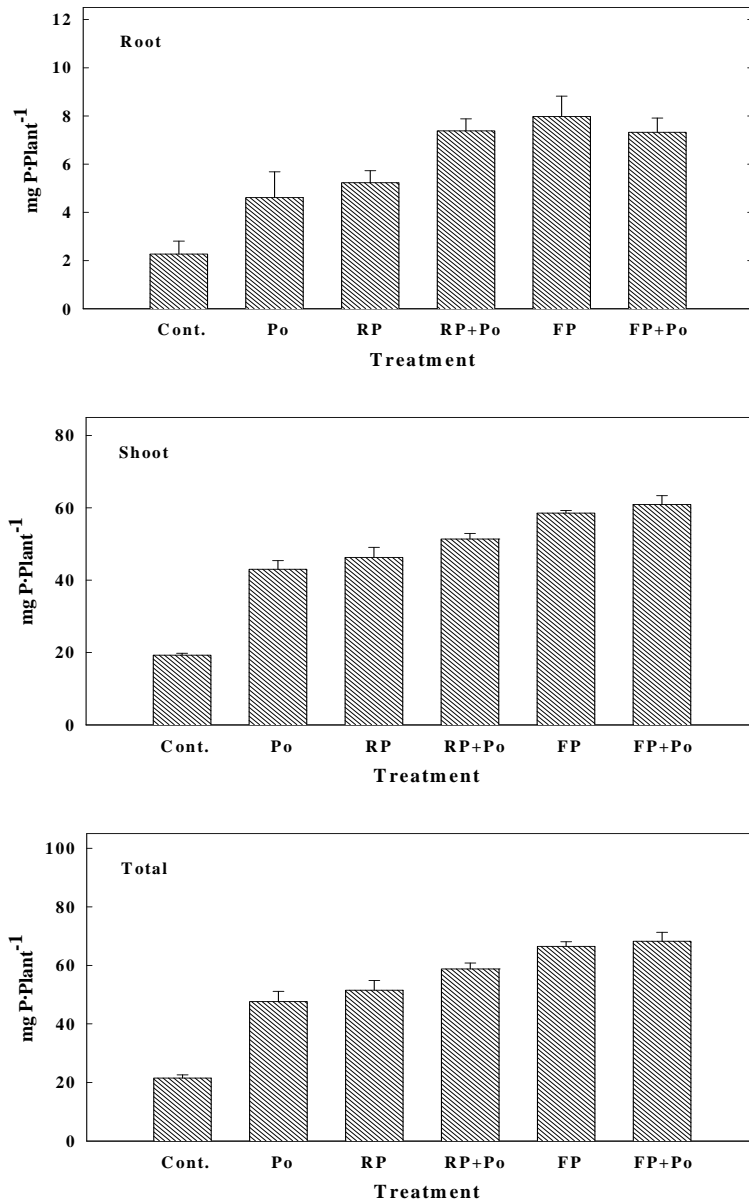


Fig 22. Effect of *P. oxalicum* CBPS-3F-Tsa on total phosphorus content in maize at 60 DAS. Each data point represents a mean of three replicates. Error bars indicate \pm S.E.

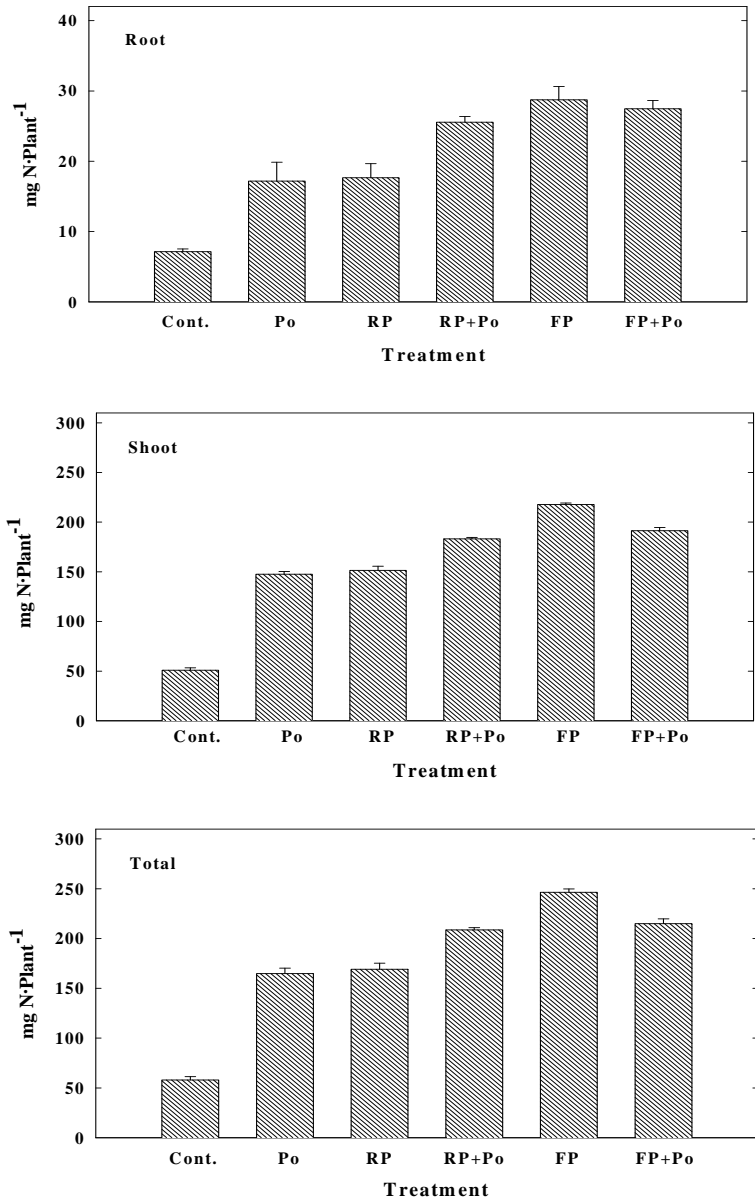


Fig 23. Effect of *P. oxalicum* CBPS-3F-Tsa on total nitrogen content in maize at 60 DAS. Each data point represents a mean of three replicates. Error bars indicate \pm S.E.

추, 벼의 3작물을 대상으로 복합한 후 효과를 연구하기 위해서 온실 조건에서 작물을 생육하였다. 토마토에 대한 3종 균주의 단독 및 복합처리 효과는 표 13, 14에 나타내었다. 무처리구와 비교 했을 때 CW903, CBPB-HOD, CBMB20의 접종은 뿌리와 근권 에서 줄기 길이, 가지 둘레, nitrogenase 활성들의 증가를 나타내었다. 때때로 이들 균주 사이의 두 가지 박테리아 균주의 접종은 뚜렷한 다른 효과를 나타내는 결과를 나타내었다. CBMB20을 접종시켰을 때 CBPB-HOD 또는 CW903으로 복합처리된 토마토 뿌리에서 nitrogenase 활성은 특이적인 증가를 보여주었다.(표 13) 그러나 무처리구와 비교했을 때 세 가지 균주를 한 번에 접종시킨 경우에는 뿌리길이가 짧고 nitrogenase 활성도 현저히 낮았다.(표 13) 질소고정균인 CW903의 단독접종은 다른 두 종류의 균주 단독처리와 비교 했을 때 질소 흡수가 더 높음을 보여주었다.(표 14) 무 처리구와 비교 했을 때 인산 가용화 균주인 CBPB-HOD로 처리한 것이 다른 종류의 균주를 처리한 것보다 인산 흡수량이 증가함을 알 수 있었다. CW903과 CBPB-HOD의 접종이 토마토에서 질소의 농도가 가장 높았으며, 세 가지 균주를 혼합 접종시킨 경우에는 인산의 농도가 가장 높은 것으로 나타났다. 이와 유사하게 세 종류 균주의 복합접종은 토마토에서 Mg 와 Ca의 농도를 유의성 있게 증가시켰다. 이 결과를 통해 각각의 균주나 두 종류 균주의 접종에는 변수가 있음을 보여주었다.(표 14)

균주의 접종효과는 작물의 종류에 따라 각기 다르게 나타났다. 고추에서 CBMB20의 접종은 다른 두 균주의 접종과 비교했을 때 줄기와 뿌리가 가장 컸음을 보였고, CBMB20과 CW903, CBPB-HOD와 CW903의 혼합 접종은 뿌리에서 가장 높은 nitrogenase 활성을 나타내었다(표 15). 마찬가지로 CBMB20과 CW903, CBPB-HOD와 CW903의 혼합 접종은 N, P, K, Mg의 농도도 단일접종에 비하여 유의성 있는 증가를 나타내었다(표 16).

벼에서 CBMB20와 CW903 또는 CBPB-HOD의 혼합접종은 지상부의 길이가 가장 크게 나타났으며 CW903와의 혼합접종이 뿌리의 생육이 우수하였다. ARA 활성은 근권 에서는 CBPB-HOD 처리 시, 뿌리에서는 CBMB20 처리 시 최대치를 나타냈다.(표 17) 마찬가지로 고추에서 CBMB20와 CBPB-HOD

의 혼합접종이 질소농도는 무처리구 및 다른 처리구들과 비교하여 유의성 있게 높게 나타났다. 오직 세 가지 균주를 모두 접종시킨 혼합 접종원 만이 무처리와 비교했을 때 인산 농도가 특이적으로 증가하였고, 다른 처리구는 무처리구와 큰 차이가 나지 않았다. 하지만 미생물 처리는 K, Ca, Mg 양분의 농도를 무처리구와 비교하여 유의성 있게 증가시켰다.(표 18) 혼합 접종원들 중에서 CW903과 CBPB-HOD의 접종이 최대 Ca, K농도를 나타냈고, Mg의 농도는 세 가지 균주를 모두 혼합접종 한 것이 가장 높았다.(표 18) 종합적으로 보면, 박테리아 균주의 단일접종이나 혼합접종 영향은 작물마다 다양하게 나타나며, 양분 흡수도 양분의 종류에 따라 다르게 나타났다. 그렇지만 *M. oryzae* CBM20의 접종은 단일접종을 하거나 다른 균주와 혼합접종을 하는 경우 모두 작물생장이 증가하였다. 하지만 식물에 생물 접종원으로 사용되기 전에 토양의 종류나, 토양의 수분과 같은 여러 가지 요인을 고려하여야 할 것으로 판단된다.

Table 13. Effects of co-inoculation of *Methylobacterium oryzae* with *Azospirillum brasilense* and/or *Burkholderia* in tomato on shoot length, root length, stem girth and nitrogenase activity at 45 DAS

Treatment	Mean Shoot length (cm)	Mean Root length (cm)	Mean Stem girth (mm)	ARA*	
				Root	Soil
T ₁ -Uninoculated control	64.6 c	24.8 a	9.35 bc	205.8 d	7.23 c
T ₂ -CW903 alone	73.0 a	25.1 a	9.86 ba	569.3 a	8.09 c
T ₃ -CBPB-HOD alone	71.8 ba	26.2 a	10.01 ba	311.0 c	8.52 cb
T ₄ -CBMB20 alone	70.0 b	26.2 a	10.38 a	301.5 c	8.09 c
T ₅ -CW903+CBPB-HOD	72.7 a	26.7 a	9.76 bac	460.6 b	12.84 a
T ₆ -CW903+CBMB20	71.6 ba	28.5 a	10.07 ba	644.6 a	11.92 a
T ₇ -CBPB-HOD+CBMB20	70.0 b	28.0 a	9.85 ba	624.6 a	7.21 c
T ₈ -CW903+CBPB-HOD+CBMB20	55.5 d	24.3 a	9.00 c	173.6 d	10.03 b
LSD (P=0.05)	2.58	8.04	0.83	86.9	1.74

*The nitrogenase activity measured through acetylene reduction assay (ARA) is expressed in pmol ethylene (g dry root)⁻¹ h⁻¹ (root sample) and nmol ethylene (g rhizosphere soil)⁻¹ h⁻¹ (rhizosphere soil sample). Each value represents mean of four replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at P= 0.05 levels are indicated by different letters.

Table 14. Accumulation of nutrients in tissue of tomato plants when inoculated with different bacteria either alone or co-inoculated at 45 DAS

Treatments	Nutrient elements (mg/g sample)				
	N (%)	P	K	Ca	Mg
T ₁ -Uninoculated control	2.11 ed	0.56 c	43.92 c	8.40 cd	4.33 c
T ₂ -CW903 alone	2.29 ba	0.61 cb	49.47 b	9.23 cb	4.97 b
T ₃ -CBPB-HOD alone	2.04 ef	0.65 b	54.09 a	9.82 b	4.98 b
T ₄ -CBMB20 alone	1.95 f	0.62 cb	50.58 b	8.86 cbd	4.42 c
T ₅ -CW903+CBPB-HOD	2.32 a	0.64 b	50.20 b	8.35 cd	3.96 d
T ₆ -CW903+CBMB20	2.18 bdc	0.64 b	48.06 b	8.47 cd	3.93 d
T ₇ -CBPB-HOD+CBMB20	2.24 bac	0.65 b	44.51 c	8.16 d	4.01 d
T ₈ -CW903+CBPB-HOD+CBMB20	2.13 edc	0.73 a	48.44 b	12.3 a	5.45 a
LSD (P=0.05)	0.12	0.07	2.64	1.05	0.31

Each value represents mean of four replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at P= 0.05 levels are indicated by different letters.

Table 15. Effect of co-inoculation of *Methylobacterium* with *Azospirillum*, and *Burkholderia* in red pepper on shoot length, root length and nitrogenase activity at 45 DAS.

Treatments	Mean shoot length	Mean root length	ARA activity	
			Root*	Rhizosphere soil**
Uninoculated control	9.06 d	16.81 bc	410.1 c	7.27 cb
CW903 alone	9.96 cb	18.13 ba	671.3 a	9.90 a
CBPB-HOD alone	9.44 cd	16.88 bc	512.7 b	9.88 a
CBMB20 alone	12.28 a	19.64 a	445.1 c	8.22 b
CW903+CBPB-HOD	10.30 b	17.17 bc	610.3 a	9.33 a
CW903+CBMB20	11.75 a	17.82 b	539.9 b	6.95 c
CBPB-HOD+CBMB20	10.31 b	17.63 b	646.2 a	9.98 a
CW903+CBPB-HOD+CBMB20	10.32 b	15.81 c	624.0 a	7.73 cb
LSD (P=0.05)	0.69	1.61	63.44	1.03

Each value represents mean of four replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at P= 0.05 levels are indicated by different letters. *pmol ethylene /g dry root/h **nmol ethylene/g soil/ h

Table 16. Accumulation of nutrients in tissue of red pepper plants when inoculated with different bacteria either alone or co-inoculated at 45 DAS

Treatments	Nutrient elements (mg/g sample)				
	N (%)	P	K	Ca	Mg
T ₁ -Uninoculated control	4.95 ba	0.58 cb	60.19 c	13.09 b	8.34 a
T ₂ -CW903 alone	4.82 ba	0.53c	61.99 bc	14.19 a	7.91 ba
T ₃ -CBPB-HOD alone	5.01 ba	0.56 cb	63.58 bc	12.06 dc	8.23 ba
T ₄ -CBMB20 alone	4.70 b	0.55 c	69.45 a	11.62 d	7.69 b
T ₅ -CW903+CBPB-HOD	4.98 ba	0.55 c	72.12 a	11.65 d	8.39 a
T ₆ -CW903+CBMB20	4.94 ba	0.61 b	67.05 ba	11.78 dc	8.02 ba
T ₇ -CBPB-HOD+CBMB20	5.11 a	0.55 c	70.95 a	11.75 dc	7.91 ba
T ₈ -CW903+CBPB-HOD+CBMB20	5.00 ba	0.67 a	66.98 ba	12.25 c	8.45 a
LSD (P=0.05)	0.33	0.05	5.56	0.57	0.58

Each value represents mean of four replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at P= 0.05 levels are indicated by different letters.

Table 17. Effect of co-inoculation of *Methylobacterium* with *Azospirillum*, and *Burkholderia* in rice on shoot length, root length and nitrogenase activity at 45 DAS.

Treatments	Mean shoot length	Mean root length	ARA activity	
			Root*	Rhizosphere soil**
Uninoculated control	23.56 bc	12.38 c	186.2 e	8.48 e
CW903 alone	23.85 bc	15.94 a	188.5 e	11.48 bc
CBPB-HOD alone	24.00 bc	14.85 ba	242.8 d	13.85 a
CBMB20 alone	24.62 ba	15.92 a	514.4 a	8.88 ed
CW903 + CBPB-HOD	23.35 c	13.67 bc	257.5 d	10.40 ecd
CW903 + CBMB20	25.52 a	16.18 a	316.2 c	10.56 bcd
CBPB-HOD + CBMB20	25.56 a	14.98 ba	208.8 e	9.45 ecd
CW903+CBPB-HOD+CBMB20	21.78 d	13.47 bc	344.4 b	12.47 ba
LSD (P=0.05)	1.18	1.77	24.27	2.07

Each value represents mean of four replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at P= 0.05 levels are indicated by different letters. *pmol ethylene /g dry root/h **nmol ethylene/g soil/ h

Table 18. Accumulation of nutrients in tissue of rice plants when inoculated with different bacteria either alone or co-inoculated at 45 DAS

Treatments	Nutrient elements (mg/g sample)				
	N (%)	P	K	Ca	Mg
T ₁ -Uninoculated control	3.02 ba	0.62 b	34.04 c	3.00 c	3.47 cb
T ₂ -CW903 alone	2.88 b	0.63 b	34.77 bac	3.01 c	3.59 b
T ₃ -CBPB-HOD alone	2.84 b	0.64 b	32.60 dc	3.31 cb	3.48 cb
T ₄ -CBMB20 alone	2.94 b	0.63 b	34.07 bc	3.37 cb	3.56 b
T ₅ -CW903+CBPB-HOD	3.06 ba	0.71 b	36.50 a	6.31 a	3.42 cb
T ₆ -CW903+CBMB20	3.12 ba	0.65 b	34.09 bc	3.04 c	3.37 c
T ₇ -CBPB-HOD+CBMB20	3.28 a	0.66 b	31.05 d	3.12 c	3.30 c
T ₈ -CW903+CBPB-HOD+CBMB20	2.87 b	1.16 a	36.39 ba	3.72 b	4.25 a
LSD (P=0.05)	0.29	0.10	2.33	0.46	0.19

Each value represents mean of four replicates per treatment. In the same column, significant differences according to LSD at P= 0.05 levels are indicated by different letters.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구를 수행한 결과로 국제 학술지(5편), 국내학술지(1편)의 논문이 발간되었고, 국제학술회의(2편), 국내 학술회의 발표(31편)의 논문을 발표하였고 1편의 특허를 출원하였다. 이러한 출원 된 특허 및 논문, 학술 발표한 기술을 재정리하여 산업화하는 기회가 주어진다면 친환경농업재재로 이용이 가능할 것이다.

<국제학술지 발표>

Poonguzhali, S., M. Madhaiyan, and T.M Sa.(2006) Cultivation-dependent characterization of rhizobacterial communities from field grown Chinese cabbage *Brassica campestris* ssp *pekinensis* and screening of potential plant growth promoting bacteria. Plant and Soil 286: 167-180

W.S. Shin, J.H. Ryu, S.J. Choi, C.W. Kim, R.S. Gadagi, M. Madhaiyan, S. Seshadri, J.B. Chung, and T.M. Sa.(2005) Solubilization of hardly soluble phosphates and growth promotion of maize (*Zea mays* L.) by *Penicillium oxalicum* isolated from rhizosphere. J. Microbiol. Biotechnol.15(6) 1273-1279

C.W. Kim, M.L. Kecskeys, R.J. Deaker, K. Gilchrist, P.B. New, I.R. Kennedy, S.W. Kim, T.M. Sa. (2005) Wheat root colonization and nitrogenase activity by *Azospirillum* isolates from crop plants in Korea. Can. J. Microbiol. 51: 948-956

S. Poonguzhali, M. Madhaiyan, M. Thangaraju, S.S. Yun and T.M. Sa.(2005) Effect of co-cultures, containing N-fixer and P-solubilizer, on the growth and yield of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br.) and blackgram (*Vigna mungo* L.). J. Biotechnol. Microbiol. 15:903-908

R.Anandham, K.H Choi, P.Indiragandhi, W.J Yim, S.J Park, K.A Kim, M.Madhaiyan, T.M Sa.(2007). Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *burkholderia* sp. in nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation. World J. Microbiol Biotechnol.(in press)

<국내 학술지 발표>

S. Poonguzhali,, M. Thangataju, Jung Hyun Ryu, ,Madhaiyan, M, .Keun Yook Chung and T.M. Sa. (2005) Effect of common medium on the growth of nitrogen fixer *Rhizobium* and phosphate solubilizer *Bacillus megaterium*. Korean J. Soil Sci. Fert. 38(1):8-14

<특허 출원>

과립형 접종제 및 이를 포함하는 비료 조성물

(특허번호 : 제10-2007-0053024호)

<국제 학술회의 발표>

W.S Shin, J.H Ryu, Y.J Kim, J.C Yang, M.Madhaiyan, and T.M Sa.(2006) Phosphate Solubilization and Growth Promotion of Maize(*Zea mays* L.) by the Rhizosphere Soil Fungus *Penicillium oxalicum*.18th World Congress of Soil Science. July 9-15, 2006. Philadelphia, Pennsylvania, USA

S.Poonguzhali, M.Madhaiyan, K.A Kim, D.S Suh, B.K Park, J.J Kim, and T.M Sa.(2006) characterization of Bacterial Communities Isolated from Rhizosphere Soil of Field Grown Chinese Cabbage (*Brassica campestris* ssp *pekinensis*) by Cultivation Dependent Methods and Screening of Potential Plant Growth Promotion.18th World Congress of Soil Science. July 9-15, 2006. Philadelphia, Pennsylvania, USA

<국내학술회의 발표>

S. Poonguzhali, M. Madhaiyan, Tongmin Sa.(2007) Colonization of plants and persistence of *Burkholderia vietnamiensis* in natural rhizosphere conditions. Korean society of Soil Science and Fertilizer, May 10-11 HanKyoung University, 181-182

Woojong Yim, M. Madhaiyan, S. Poonguzhali, Chungwoo Kim, Tongmin Sa.(2007) Isolation and identification of plant-growth promoting diazotrophic bacteria from chinese cabbage. Korean society of Soil Science and Fertilizer, May 10-11 HanKyoung University, p183-184

V.S. Saravanan, R. Anandham, M. Madhaiyan, In Soo Hong, Gillseung Lee, Tongmin Sa.(2007) Effect of Zn uptake by maize due to *Burkholderia* spp. inoculation. Korean society of Soil Science and Fertilizer, May 10-11 HanKyoung University, p187

R. Anandham, P.Indira Gandhi, M. Madhaiyan, V.S. Saravanan, Woojong Yim, Insoo Hong, Tongmin Sa.(2007) Ubiquitous presence of sulfur oxidizing bacteria in the rhizosphere of crop plants of Korea and determination of their sulfur oxidizing pathway. Korean society of Soil Science and Fertilizer, May 10-11 HanKyoung University, p188-189

P.Indira Gandhi, R. Anandham, M. Madhaiyan, Tongmin Sa.(2007) Plant growth promoting traits of bacterial strains isolated from guts of phytophagous insect Diamondback moth *Plutella xylostella* (Yponomeutidae : Lepidoptera). Korean society of Soil Science and Fertilizer, May 10-11 HanKyoung University, p190-191

P.Indira Gandhi, Kyounga Kim, R. Anandham, M. Madhaiyan, S. Poonguzhali, Tongmin Sa.(2007) Broad - spectrum antagonistic activity of

Pseudomonas sp. PRGB06 isolated from phytophagous insect gut and its phenotypic and physiological properties. Korean society of Soil Science and Fertilizer, May 10-11 HanKyoung University, p194-195

Yun-jeong Lee, Jae-Hong Yoo, Sang-Beom Lee, Ji-Hyun Park, Seung-Hwan Kim, Tong-Min Sa (2007) The contribution of *Azospirillum brasilense* to the yield of chinese cabbage under organic farming system. Korean society of Soil Science and Fertilizer, May 10-11 HanKyoung University, p196

S. Poonguzhali, M. Madhaiyan, T.M Sa(2006) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of Chinese cabbage and their plant growth promoting characteristics. Korean society of Soil Science and Fertilizer, November 19-20, Suanbo, p144-145

P. Indiragandhi, R. Anandham, K.A Kim, W.J Yim, M. Madhaiyan, T.M Sa.(2006) *Methylobacterium* induced ACC deaminase mediated defense responses in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) against the bacterial speck caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Korean society of Soil Science and Fertilizer, November 19-20, Suanbo, p146-147

V.S. Saravanan, M. Madhaiyan, M. Thangaraju, T.M. Sa.(2006) Comparative study on solubilization of Zn and other insoluble compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and certain PGPR's. Korean society of Soil Science and Fertilizer, November 19-20, Suanbo, p148-149

R.Anandham, K.H Choi, W.J Yim, S.J Park, T.M Sa.(2006) Shelf life of Burkholderia sp. in clay, rice bran and rock phosphate based soil implant. Korean society of Soil Science and Fertilizer, May 18~19, Sunchon National University, p176-177

R.Anandham, K.H Choi, W.J Yim, S.J Park and T.M Sa.(2006) Survivability and rock phosphate solubilization of *Burkholderia* sp. in nutrient amended clay, rice bran and rockphosphated pellets. 국제환경농학회, April 18, International Technical Cooperation Center, RDA Suwon, Korea. p148-149

M. Madhaiyan, H.S. Lee, S. Poonguzhali., T.M. Sa.(2005) Characterization of Methylo trophic Bacterial Communities Associated with Field-grown Rice (*Oryza sativa*L.) Cultivars. International symposium on Application of the Emerging Soil Researches to the Conservation of Agricultural Ecosystems. September 29-30, Seoul, Republic of Korea, p148-149

J.H. Ryu., M. Madhaiyan., T.M. Sa.(2005) Plant Growth Promoting Bacterial Inoculation Improved Growth and Yield of Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) International symposium on Application of the Emerging Soil Researches to the Conservation of Agricultural Ecosystems. September 29-30, Seoul, Republic of Korea, p152-153

P. Indira Gandhi, K. Gunasekaran, S. Poonguzhali, M. Madhaiyan, R. Anandham, T.M. Sa.(2005) Phytochemical Insecticide as Potential Seed Dresser to Protect Okra (*Abelmoschus esculentus* Moench L.) from Homopteran Sucking Pests (Aphid- *Aphis gossypii* Glov.-Aphididae and Leafhopper *Amrasca biguttuala biguttula* Ishida Cicadellidae) International symposium on Application of the Emerging Soil Researches to the Conservation of Agricultural Ecosystems. September 29-30, Seoul, Republic of Korea, p154-155

S. Poonguzhali, M. Madhaiyan, K.H. Kim., J.H. Ryu, T.M. Sa.(2005). Characterization of Culturable Bacterial Communities Associated with the Roots of Field Grown Chinese Cabbage. International symposium on Application of the Emerging Soil Researches to the Conservation of

Agricultural Ecosystems. September 29-30, Seoul, Republic of Korea, p156-157

R. Anandham, R. Sridhar, P. Nalayini, M. Madhaiyan, S. Poonguzhali, P. Indira Gandhi, K.H. Choi, T.M. Sa (2005). Effects of Combined Inoculation of *Thiobacillus* and *Rhizobium* on Growth and Yield of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) International symposium on Application of the Emerging Soil Researches to the Conservation of Agricultural Ecosystems. September 29-30, Seoul, Republic of Korea, p158-159

J.B. Chung, S.K. Park, K.H. Kim, D.Y. Chung. T.M. Sa.(2005) Effect of long term applications of organic and chemical fertilizers on the soil phosphorus status in paddy cropping systems. In 2004 symposium conducted by "The Korea Society of Agriculture and Environment" Cheonan, Republic of Korea, p252-253

M.S. Park, M. Madhaiyan, J.H. Ryu, K.A. Kim, R. Anandham, T.M. Sa.(2005) Identification of potential plant growth promoting diazotrophs from rhizosphere of agricultural crops of Korea. In 2004 symposium conducted by "The Korea Society of Agriculture and Environment" Cheonan, Republic of Korea, p262-263

P. Indira Gandhi, K. Gunasekaran and T.M. Sa(2005) Comparative efficacy of biopesticides and insecticides as seed treatment against sucking and borer pests in Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). In 67th Spring meeting of Korean Society of Soil Science and Fertilizer, Kangwon, Republic of Korea. p202-203.

J.H. Ryu, M. Madhaiyan, H.Y. Chung, P. Indira Gandhi and T.M. Sa(2005) Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) inoculation with

inorganic fertilizer on the growth and yield of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). In 67th Spring meeting of Korean Society of Soil Science and Fertilizer, Kangwon, Republic of Korea. p210-211.

S. Poonguzhali, M. Madhaiyan, E. H. Kim, K. H. Kim, M. Thangaraju and T.M. Sa.(2005) Growth of a nitrogen fixer *Azospirillum lipoferum* and a phosphate solubilizer (*Bacillus megaterium*) in a common media. In 67th Spring meeting of Korean Society of Soil Science and Fertilizer, Kangwon, Republic of Korea. p208-209.

R. Anandham, R. Sridar, C. W. Kim, P. Nalayini, M. Madhaiyan and T.M. Sa.(2005) Effects of co-inoculation of *Thiobacillus* with *Rhizobium* on nodulation, growth and yield of groundnut (*Arachis hypogea* L.). In 67th Spring meeting of Korean Society of Soil Science and Fertilizer, Kangwon, Republic of Korea. p204-205.

J.B. Chung and D.Y. Chung and T.M. Sa.(2005) Long term applications of organic and chemical fertilizers affect the soil phosphorus status in paddy cropping systems. 7th ESAFS International Conference, Quezon City, Philippines, June 1-5, p103-104.

M.S. Park, M. Madhaiyan, J.H. Ryu, and T.M. Sa.(2005) Isolation and identification of free living N_2 -fixing bacteria from rhizosphere of agricultural crops. 7th ESAFS International Conference, Quezon City, Philippines, June 1-5, p151-152.

S. Poonguzhalil, M. Thangaraju, M. Madhaiyan, S.S. Yoon and T.M. Sa.(2004) Rhizobacteria-based Bio-formulation to Enhanced Growth and Yield of Black gram (*Vigna mungo* L.). Proceedings of the Korean society

of Soil Science and Fertilizer, 2004. 10. 15-16

E.H. Kim, S.A. Park, T.M. Sa.(2004) Assessment of Phosphate Solubilization Activity by *Enterobacter aerogenes* Immobilized in Attapulgit , Alginate, Agar and -Carrageenan. Proceedings of the Korean society of Soil Science and Fertilizer, 2004. 10. 15-16

S.A. Park, E.H. Kim, J.H Ryu, S.S. Yun, S. Seshadri, and T.M. Sa.(2004) Assessment of Survival and Activity of Two Phosphate Solubilizing Bacteria *Pantoea agglomerans* and *Klebsiella* sp. in Wet Alginate Inoculant Carrier. Proceedings of the Korean society of Soil Science and Fertilizer, Spring 2004, p229-230

E.H. Kim, H.K. Chung, M.S. Park, J.C. Yang, J.H. Ryu, S. Seshadri and T.M. Sa.(2004) Nitrogen Sources Modulate Phosphate Solubilization by Alginate Immobilized Fungal Strain *Penicillium Oxalicum*-CBPS-3F-Tsa. Proceedings of the Korean society of Soil Science and Fertilizer, Spring 2004, p231-232

E.H. Kim, H.K. Chung, S.A. Park, J.C. Yang, S. Seshadri and T.M. S.(2004) "Influence of Carbon Sources on the Growth and Phosphate Solubilization by Alginate Immobilized Fungal Strain, *Penicillium Oxalicum*-CBPS-3F-Tsa" , Proceedings of the Korean society of Soil Science and Fertilizer, Spring 2004. p97-98

C.W. Kim, S.J. Choi, J.C. Yang, Peter New, Ivan R. Kennedy and T.M. Sa, "Wheat Root Colonization and Nitrogen Fixation of *Azospirillum* Isolates from Crop Plants in Korea", Proceedings of the Korean society of Soil Science and Fertilizer, Spring 2004. 95-96p

제 5장 연구 개발 결과의 활용계획

인구 증가와 산업의 발달에 따른 지표수 이용률의 증가로 이러한 부영양화 현상은 매우 심각한 사회문제를 낳고 있으며 최근의 근해 적조현상 등은 부영양화 지표수의 유입이 그 한 원인으로 생각되고 있다. 인산질 생물비료는 토양 속에 이미 다량으로 존재하는 불용성 인산염을 미생물을 이용하여 분해함으로써 작물이 필요로 하는 영양분을 공급하기 때문에 환경오염의 문제가 전혀 없으며 오히려 염이 집적된 토양환경을 개선하는 효과를 기대할 수 있다. 화학비료의 장기간 과다 사용은 토양의 산성화, 생산력 감퇴, 작물수량의 감소 및 품질 저하를 초래해 왔다. 반면에 생물비료의 사용은 미생물이 토양에 자리잡음으로써 토양 입단화를 촉진할 수 있고, 미생물이 부가적으로 생산하는 유기산, 식물 영양물질 또는 성장촉진제 등이 식물의 성장과 수확량 증대 및 품질향상 등에 도움을 준다. 특히 화학비료 사용으로 인한 야채와 과일의 고유한 맛을 잃어버리는 현상을 막고 아울러 농산물의 각종 지표도 환경기준에 맞게 제고시킬 수 있다.

농업환경문제의 중요성이 점차 증가하는 현실에 비추어 환경 친화적 비료개발 및 시비기술개발은 매우 중요한 기술이 될 것이다. 또한 기름 값 폭등, 수입원자재 가격의 인상으로 비료가격이 계속 증가될 것으로 판단된다. 이러한 현실에 비추어 토착미생물을 이용한 비효율 증진 및 토양 잔존 양분 이용 기술은 점차 수요가 급증할 것이다. 인광석을 가공하지 않고 효율적으로 인산비료로 이용할 수 있는 기술은 경제적으로 우수할 뿐 아니라 용출속도의 완효화도 기대할 수 있고 환경 친화적 매우 유용할 것이다. 이러한 환경 보존적 차원, 경제적으로 유리한 조건, 변화하는 정책에 부응하는 시비법 연구 등의 중요성에 비추어 미생물 비료의 개발은 향후 중요성이 급증할 것이다. 그러므로 본 연구를 기초로 하여 향후 지속적인 연구 및 농민에 대한 기술지도 등이 요망된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

과제를 수행하면서 국내외에 논문 발표 및 학회발표를 통하여 많은 전문가와 인산가용화균, 질소고정균, PGR 생성균의 복합체를 이용한 실용화에 대하여 많은 논의를 거쳐 본 실험을 수행하였으며, 유용미생물에 대한 많은 문헌을 접하게 되었다. 참고문헌에 제시한 많은 정보들이 본 연구의 향후발전에 큰 도움이 될 것이다.

<인산가용화균 관련 문헌>

Anandham R, Sridar R, Nalayini P, Poonguzhali S, Madhaiyan M, Sa TM (2006) Potential for plant growth promotion in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cv. ALR-2 by co-inoculation of sulfur-oxidizing bacteria and *Rhizobium*. Microbiol Res doi:10.1016/h.micres.2006.02.0050 (in press)

Chung H, Park M, Madhaiyan M, Seshadri S, Song J, Cho H, Sa TM (2005) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere of crop plants of Korea. Soil Biol Biochem 37:1970-1974

Deaker R, Roughley RJ, Kennedy IR (2004) Legume seed inoculation technology—a review. Soil Biol Biochem 36:1275-1288

Grant C, Bittman S, Montreal M, Plenchette C, Morel C (2005) Soil and fertilizer: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. Can J Plant Sci 85:3-14

Johri BN, Sharma A, Viridi JS (2003) Biotechnology in India: Rhizobacterial diversity in India its influence on soil and plant health. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 84:49-89

Lin TF, Huang HI, Shen FT, Young CC (2006) The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. *Bioresour Technol* 97:957-960

Nautiyal CS, Bhadauria S, Kumar P, Lal H, Mondal R, Verma D (2000). Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from saline soils. *FEMS Microbiol Lett* 182:291-296

Rebah FB, Tyagi RD, Prévost D (2002)Waste water sludge as a substrate for growth and carrier for rhizobia: the effect of storage conditions on survival of *Sinorhizobium meliloti*. *Bioresour Technol* 83:145-151

Son HJ, Park GT, Cha MS, Heo MS (2006) Solubilization of insoluble phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R42- isolated from soybean rhizosphere. *Bioresour Technol* 97:204-210

Stephens JHG, Rask HM (2000) Inoculant production and formulation. *Field Crop Res* 65:249-258

Vassilev N, Vassileva M, Fenice M, Federici F (2001) Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. *Bioresour Technol* 79:263-271

Viveganandan G, Jauhri KS (2002) Efficacy of rock phosphate based soil implant formulation of phosphobacteria in soybean (*Glycine max* Merrill). *Indian J Biotechnol* 1:180-187

<Azospirillum 관련 문헌>

Bashan, Y. (1998) *Azospirillum* plant growth-promoting strains are non-pathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. Can. J. Microbiol. 44: 168-174

Bashan, Y. (1999) Interactions of *Azospirillum* spp. in soil. Biol. Fertil. Soils. 29: 246-256

Bashan, Y., and Holguin, G. (1997) *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Can. J. Microbiol. 43: 103-121

Ben Dekhil, S., Cahill, M., Stackrandt, E., and Sly, L. I. (1997) Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobile* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 20: 72-77

Burdman, S., Kigel, J., Okon, Y., (1997) Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soil Biol. Biochem. 29: 923-929

Cassán, F. D., Lucangeli, C. D., Bottini, R., and Piccoli, P. N. (2001) *Azospirillum* spp. metabolize[17,17-²H₂]gibberellin A₂₀ to [17,17-²H₂]gibberellin A1 in vivo in *dy* rice mutant seedlings. Plant Cell Physiol. 42: 763-767

Creus, C. M., Sueldo, R. J., and Barassi, C. A. (2004) Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. Can. J. Bot. 82: 273-281

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., and Okon, Y. (2003) Plant Growth-Promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Crit. Rev. Plant Sci. 22: 107-149

Didonet, A. D., and Magalhães, A. C. (1997) Growth and nitrite production by *Azospirillum* strains subjected to different levels of dissolved oxygen in the medium. Soil. Biol. Biochem. 29: 1743-1746

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Thys, A., Vande Broek, A., and Vanderleyden, J. (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. Plant Soil. 212: 155-164

Eckert, B., Weber, O. B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., and Hartmann, A. (2001) *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass Miscanthus. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 17-26

Fadel-Picheth, C. M. T., Souza, E. M., Rigo, L. U., Funayama, S., Yates, M. G., and Pedorosa, F. O. (1999) Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. FEMS Microbiol. Letters. 179: 281-288

Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M. A., and Kecskés, M. L. (2004)

Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil. Biol. Biochem.* 36: 1229-1244

Lambrecht, M., Okon, Y., Vande Broek, A., and Vanderleyden, J. (2000) Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* 8: 298-300

Mehnaz, S., Mirza, M. S., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., Bano, A., and Malik, K. A. (2001) Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.* 47: 110-117

Pereg-Gerk, L. (2004) Expression of *flcA*, a gene regulating differentiation and plant interaction in *Azospirillum*. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1245-1252

Pereg-Gerk, L., Gilchrist, K., and Kennedy, I. R. (2000) Mutants with enhanced nitrogenase activity in hydroponic *Azospirillum brasilense*-wheat associations. *Appl. and Environ. Microbiol.* 66: 2175-2184

Reed, M. L. E., and Glick, B. R. (2004) Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Ant. van Leeuwenhoek.* 86: 1-25

Revillas, J. J., Rodelas, B., Pozo, C., Martinez-Toledo, M. V., and Gonzalez, L. J. (2000) Production of B-group vitamins by two *Azotobacter* strains with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. *J. Appl. Microbiol.* 89: 486-493

Steenhoudt, O., and Vanderleyden, J. (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacteria closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol. Rev. 24: 487-506

Steenhoudt, O., and Keijer, V., Okon, Y., and Vanderleyden, J. (2001) Identification and characterization of a periplasmic nitrate reductase in *Azospirillum brasilense* Sp245. Arch. Microbiol. 175: 344-352

Whipps, J. M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 52: 487-511

Vessey, J. K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil. 255: 571-586

Vande Broek, A., Lambrecht, M., and Vanderleyden, J. (1998) Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. Microbiol. 144: 2599-2606

Vande Broek, A., Lambrecht, M., Eggermont, K., and Vanderleyden, J. (1999) Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 181: 1338-1342

Yu, D., and Kennedy, I. R. (1995) Nitrogenase activity (C_2H_4 reduction) of *Azorhizobium* in 2,4-D induced root structures of wheat. Soil Biol. Biochem. 27: 459-462

Yanni, Y. G., Rizk, R. Y., abd El-Fattah, F. K., Squartini, A., Corich, V., Giacomini, A., de Bruijn, F., Rademaker, J., Maya-Flores, J. m., Ostrom, P.,

Vega-Hernandez, M., Hollingsworth, R. I., Martinez-Molina, E., Mateos, P., Velazquez, E., Wopereis, J., Triplett, E., Umali-Garcia, M., Anarna, J. A., Rolfe, B. G., Ladha, J. K., Hill, J., Mujoo, R., Ng, P. K., and Dazzo, F. B. (2001) The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 845-870

Zehnder, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E. J., and Kloepper, J. W. (2001) Application of rhizobacteria for induced resistance. *Eur. J. Plant. Path.* 107: 39-50

Zhang, Y., Burris, R. H., Ludden, P. W., Roberts, G. P. (1997) Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS. Microbiol. Letters.* 152: 195-204

<Methylobacterium 관련 문헌>

Belimov AA, Safronova VI, Sergeyeva, TA, Egorova TN, Matveyeva VA, Tsyganov VE, Borisov AY, Tikhonovich IA, Kluge C, Preisfeld A, Dietz KJ, Stepanok VV (2001) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can J Microbiol* 47: 642-652

Bleecker AB, Kende H (2000) Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 1-18

Butler HK, Dadson R, Holland MA (2000) Evidence that *trans*-zeatin riboside produced by a microbial symbiont is physiologically meaningful to its host plant.

Ghosh S, Penterman JN, Little RD, Chavez R, Glick BR (2003) Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiol Biochem* 41: 277-281

Glick BR (2004) Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Adv Appl Microbiol* 56: 291-312

Khalafalla MM, Hattori K (2000) Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation on faba bean shoots regenerated on medium containing thidiazuron. *Plant Growth Regul* 32: 59-63

Koenig RL, Morris RO, Polacco JC (2002) *tRNA* is the source of low-level *trans*-Zeatin production in *Methylobacterium* spp. *J Bacteriol* 184: 1832-1842

Li J, Ovakim DH, Charles TC, Glick BR (2000) An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. *Curr Microbiol* 41: 101-105

Ma W, Sebastianova SB, Sebastian J, Burd GI, Guinel FC, Glick BR (2003) Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. *Anton Leeuw Int J G* 83: 285-291

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Lee HS, Hari K, Sundaram SP, Sa TM (2005a) Pink-pigmented facultative methylophilic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). *Biol Fertil Soils* 41: 350-358

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sundaram SP, Sa TM (2005b) A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Environ Exp Bot* (published online 15 September 2005)

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Senthilkumar M, Seshadri S, Chung HY, Yang JC, Sundaram SP, Sa TM (2004) Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Bot Bull Acad Sin* 45: 315-324

Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol Plant* 118: 10-15

Penrose DM, Glick BR (2001) Levels of ACC and related compounds in exudate and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase containing plant growth-promoting bacteria. *Can J Microbiol* 47: 368-372

Petruzzelli L, Coraggio I, Leubner-Metzger G (2000) Ethylene promotes ethylene biosynthesis during pea seed germination by positive feedback regulation of 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid oxidase. *Planta* 211: 144-149

SAS Institute Inc. (2001) SAS user's guide, Version 8.2, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.

Schaller GE, Kieber JJ (2002) Ethylene. *The Arabidopsis book*, American

Society of Plant Biologists, USA

Stearns JC, Shah S, Greenberg BM, Dixon DG, Glick BR (2005) Tolerance of transgenic canola expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel. *Plant Physiol Biochem* (Article in Press)

Swarup R, Parry G, Graham N, Allen T, Bennett M (2002) Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Mol Biol* 49: 411-426

Trotsenko YA, Ivanova EG, Doronina NV (2001) Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. *Microbiology* 70: 725-736

Wachter R, Fischer K, Gabler R, Kuhnemann, F, Urban W, Bogemann GM, Voeselek LACJ, Blom CWPM, Ullrich CI (1999) Ethylene production and ACC accumulation *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumours and their impact on tumour and host stem structure and function. *Plant Cell Environ* 22: 1263-1273

제 7 장 참고문헌

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME (1992) Ethylene in Plant Biology. San Diego: Academic Press.
- Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R and Lalande R (1998) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). Plant Soil 204: 57-67.
- Acea MJ, Alexander M (1988) Growth and survival of bacteria introduced into carbon-amended soil. Soil Biol Biochem 20:703-709
- Acea MJ, Moore CR, Alexander M (1988) Survival and growth of bacteria introduced into soil. Soil Biol Biochem 20:509-515
- APHA, American Public Health Association (1992) Standard methods for examination of water and waste water, 18thed. American Public Health Association, Washington, DC
- Arsène, F., Katupitiya, S., Kennedy, I. R., and Elmerich, C. (1994) Use of *lacZ* fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. Molecular Plant-Microbe Interactions. 7: 748-757
- Arshad, M., and Frankenberger, WT (1993) Microbial production of plant growth regulators. In Soil microbial ecology. Applications in agricultural and environmental management. Edited by F.B. Metting, Jr. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 307-343.
- Atzorn R, Crozier A, Wheeler C, Sandberg G (1988) Production of gibberellins and indole 3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. Planta 175:532-538
- Baldani, V. L. D., and Döbereiner, J. (1980) Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil Biol. Biochem. 12: 433-439

- Baldani, V. L. D., Alvarez, M. A. B., Baldani, J. I., and Döbereiner, J. (1986) Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in the roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil*. 90: 35-46
- Baldani VLD, Baldani JI and Döbereiner J (2001) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fertil. Soils* 30: 485-491.
- Bally, R., Thomas-Bauzon, D., Heulin, T., and Ballandreau, J. (1983) Determination of the most frequent N₂-fixing bacteria in a rice rhizosphere. *Can. J. Microbiol.* 29: 881-887
- Barak, R., Nur, I., and Okon, Y. (1983) Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 399-403
- Barton, L. L., Johnson, G. V., and Orbock, M. S. (1986) The effect of *Azospirillum brasilense* on iron absorption and translocation by sorghum. *J. Plant. Nutr.* 9: 557-565
- Barazani O, Friedman J (1999) Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *J. Chem. Ecol.* 25: 2397-2406.
- Bar-Ness E, Chen Y, Hadar Y, Marschner H, Romheld V (1991) Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants. *Plant Soil* 130: 231-241.
- Bashan, Y (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16: 729-770.
- Bashan, Y., Harrison, S. K., and Whitmoyer, R. E. (1990) Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 769-775
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE (2004) *Azospirillum*-plant

- relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Can J Microbiol* 50: 521–577.
- Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R, Bottini R (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* 24:7–11
- Bayliss C, Bent E, Culham, DE, MacLellan, S, Clarke AJ, Brown GL, Wood JM (1997) Bacterial genetic loci implicated in the *Pseudomonas putida* GR12-2R3canola mutualism: identification of an exudate-inducible sugar transporter. *Can J Microbiol* 43: 809–818
- Beijerinck, MW (1925) Uber ein *Spirillum* welches freien Stickstoff binden kann? *Zentbl. Bakt. Parasitkde. II*, 63: 353–359.
- Belimov AA, Safronova VI, Sergeyeva TA, Egorova TN, Matveyeva VA, Tsyganov VE, Borisov AY, Tikhonovich IA, Kluge C, Preisfeld A, Dietz KJ and Stepanok VV (2001) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase. *Can. J. Microbiol.* 47: 642–652.
- Blomberg GV, Lugtenberg BJJ (2001) Molecular basis plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 343–350.
- Boddey, R. M., de Oliveira, O. C., Urquiaga, S., Reis, V. M., de Olivares, F. L., Baldani, V. L. D., and Döbereiner, J. (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil*. 174: 195–209
- Boddey, R. M. (1987) Methods for quantification of nitrogen fixation associated with Gramineae. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 6: 209–266
- Bottini R, Fulchieri M, Pearce D, Pharis RP (1989) Identification of

- Gibberellins A₁, A₃, and isoA₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*.
Plant Physiol 90:45-47
- Bottini R, Luna V (1993) Bud dormancy in deciduous fruit trees. Curr Top
Plant Physiol 1:147-159
- Bowen GD, and Rovira AD (1999) The rhizosphere and its management to
improve plant growth. Adv. Agron. 66:1-102.
- Brown, M. E. (1975) Rhizosphere microorganisms—opportunists, bandits or
benefactors. In Soil microbiology a critical review, pp. 21-38. Edited by
N. walker, Butterworths: London and Boston
- Budzikiewicz, H (1993) Secondary metabolites from fluorescent
Pseudomonas. FEMS Microbiology Reviews. 104: 209-228.
- Burd GI, Dixon DG and Glick BR (1998) A plant growth promoting
bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. Appl. Environ.
Microbiol. 64: 3663-3668.
- Cassán F, Bottini R, Schneider G, Piccoli P (2001a) *Azospirillum brasilense*
and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA₂₀ and metabolize
the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants.
Plant Physiol 125:2053-2058
- Cassán F, Lucangeli C, Bottini R, Piccoli P (2001b) *Azospirillum* spp.
Metabolize [17,17-²H₂]Gibberellin A₂₀ to [17,17-²H₂] Gibberellin A₁ in
vivo in *dy* rice mutant seedlings. Plant Cell Physiol 42:763-767
- Cassán FD, Piccoli P, Bottini R (2003) Promoción del crecimiento vegetal
por *Azospirillum* sp. a través de la producción de giberelinas. Un
modelo alternativo para incrementar la producción agrícola. In: Albanesi
A, Kunst C, Anriquez A, Luna S, Ledesma R (eds) Microbiología
Agrícola. Un aporte de la investigación en Argentina para la sociedad.
Universidad Nacional de Santiago del Estero, Santiago, pp 116
- Cattelan AJ, Hartel PG and Fuhrmann JJ (1999) Screening for plant

- growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Sci. Soc. Am. J. 63: 1670-1680.
- Cavalcante, V. A., and Döbereiner, J. (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant Soil. 108: 23-31
- Cervantes-Martinez J, Lopez-Diaz S and Rodriguez-Garay B (2004) Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence. Plant Science 166: 889-892.
- Chabot R, Beauchamp CJ, Kloepper JW and Antoun H (1998) Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Soil Biol. Biochem. 30: 1615-1618.
- Chen, T. W., Xie, Y. X., Chen, W. H., Yu, D. G., and Xu, J. (1988) Studies on the new system of nitrogen fixation for non-legumes. Nature Journal (Chinese). 11: 163-167
- Chet I, Inbar J (1994) Biological control of fungal pathogens. Appl Biochem Biotechnol 48: 37-43
- Chung HK, Ryu JH, Lee HY, Park MS, Madhaiyan M, Seshadri S, Sa TM (2004) Effects of immobilized cells of *Pantoea agglomerans* on growth promotion of rice (*Oryza sativa* L.) in the presence of rock phosphates. Korean J. Soil Sci. Fert. 37: 41-45.
- Chung HY, Park MS, Madhaiyan M, Seshadri S, Song JY, Cho HS, Sa TM (2005) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil Biol. Biochem. 37: 1970-1974.
- Cook RJ (2002) Advances in plant health management in the twentieth century. Ann. Rev. Phytopathol. 38:95-116.
- Cornelius ML, Grace JK, Yates III JR (1996) Acceptability of different

- sugars and oils to three tropical ant species (Hymen., Formicidae). *J Pest Sci* 69:41-43
- Coyne, M. (1999) *Soil Microbiology: An exploratory approach*. Delmar Publisher. Albany, New York
- Creus CM, Sueldo RJ, Barassi CA (1996) *Azospirillum* inoculation in pregerminating wheat seeds. *Can. J. Microbiol.* 42: 83-86.
- Croes, C., Bastelaere, V., DeClercq, E., Eysers, M., Vanderleyden, J., and Michiels, K. (1991) Identification and mapping of *loci* involved in motility, adsorption to wheat roots, colony morphology, and growth in minimal medium on the *Azospirillum brasilense* Sp7 90-Mda plasmid. *Plasmid.* 26: 83-93
- Crozier A, Kamiya Y, Bishop G, Yokota T (2000) Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiology, Rockville, pp 850-929
- Cunningham JE and Kuyack C (1992) Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1451-1458.
- Dahm, H., Rozycki, H., Strzelczyk, E., and Li, C. Y. (1993) Production of B-group vitamins by *Azospirillum* spp. growth in media of different pH at different temperatures. *Zentralbl. Mikrobiol.* 148: 195-203
- Davies PJ (1995) The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: Davies PJ (ed) *Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology*. Kluwer, Dordrecht, p1-12
- Day, J. M., and Döbereiner, J. (1976) Physiological aspects of N₂-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil Biol. Biochem.* 8: 45-50
- De Coninck, K., Horemans, S., Randojage, S., and Vlassak, K. (1988) Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. in temperate regions.

Plant Soil. 110: 213-218

- De Freitas JR, Banerjee MR and Germida JJ (1997) Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). Biol. Fertil. Soils 24: 358-364.
- De Freitas, J. R., and Germida, J. J. (1990) A root tissue culture system to study winter wheat-rhizobacteria interactions. Appl. Microbio. Biotechno. 33: 589-595
- Del Gallo, M. M., and Fendrik, I. (1994) The rhizosphere and *Azospirillum*. In *Azospirillum / Plant Associations*. Ed. Y. Okon. CRC Press Inc., Boca Raton. pp. 57-75.
- De Salamone IEG, Dobereiner J, Urquiaga S, Boddey RM (1996) Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. Biol. Fertil. Soils 23: 249-256.
- De Salamone IEG, Hynes RK and Nelson LM (2001) Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. Can. J. Microbiol. 47: 404-411.
- Devliegher W, Arif MAS, Verstraete W (1995) Survival and plant growth promotion of detergent-adopter *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. Appl Environ Microbiol 61:3865-3871
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences 22: 107-149.
- Döbereiner, J., and Pedrosa, F. O. (1987) Nitrogen-Fixing bacteria in Nonleguminous crop plants. Science Tech Publishers, Madison, Wisconsin
- Döbereiner, J., and Day, J. M. (1976) First international symposium on nitrogen fixation. In : Proceedings of International symposium on

- nitrogen fixation Ed. Newton, W.E. and Nyman, C.J., Washington State University Press, Pullman, W.A. pp. 518-538
- Döbereiner J, Day JM (1976) First international symposium on nitrogen fixation. In : Proceedings of International symposium on nitrogen fixation Ed. Newton, W.E. and Nyman, C.J., Washington State University Press, Pullman, W.A. pp. 518-538.
- Döbereiner, J. (1991) The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In The prokaryotes, 2nd ed., vol. 3, pp. 2236-2253. Edited by A. Balows, H.G., Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer, Springer-Verlag: New York
- Dobereiner J, Day JM, Dart PJ (1972) Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum* *Azotobacter paspali* association. J Gen Microbiol 71: 103-116.
- Dowling DN, O'Gara F (1994) Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. Trends Biotechnol 12: 133-141
- Dowling DN, Sexton R, Fenton A, Delany I, Fedi S, McHugh B, Callanan M, Moenne-Loccoz Y, O'Gara F (1996) Iron regulation in plant-associated *Pseudomonas fluorescens* M114: implications for biological control. In: Nakazawa T, Furukawa K, Haas D, Silver S (eds) Molecular Biology of *Pseudomonads*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, p502-511
- Duquenne P, Chenu C, Richard G, Catroux G (1999) Effect of carbon source and its location on competition between inoculated and established bacterial strains in sterile soil microcosm. FEMS Microbiol Ecol 29:331-339
- Dworkin M, Foster J (1958) Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. J Bacteriol 75: 592-601
- Egener T, Hurek T and Reinhold-Hurek B (1999) Endophytic expression of

- nif genes of *Azoarcus* sp. strain BH72 in rice roots. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 813-819.
- Elmerich, C., De Zamaroczy, M., Arsène, F., Pereg, L., Paquelin, A., and Kaminski, A. (1997) Regulation of nif gene expression and nitrogen metabolism in *Azospirillum*. *Soil. Biol. Biochem.* 29: 847-852
- Fages, J., and Lux, B. (1991) Identification of bacteria isolated from roots of sunflower (*Helianthus annuus*) cultivated in a French soil. *Can. J. Microbiol.* 37: 971-974
- Fages, J. (1994) The rhizosphere and *Azospirillum*. In *Azospirillum / Plant Associations*. Ed. Y. Okon. CRC Press Inc., Boca Raton. pp. 87-110
- Fåhræus, G. (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria, studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Micro.* 16: 374-381
- Falk, E. C., Johnson, J. L., Baldani, V. L. D., Döbereiner, J., and Krieg, N. R. (1986) Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 80-95
- Fani, R., Bazzicalupo, M., Ricci, F., Schipani, C., and Polsinelli, M. (1988) A plasmid vector for the selection and study of transcription promoters in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbio. Letters.* 50: 217-276
- Fluhr R, Mattoo AK (1996) Ethylene: biosynthesis and perception. *Crit Rev Plant Sci* 15: 479-523
- Fouilleux G, Revellin C, Catroux G (1994) Short term recovery of *Bradyrhizobium japonicum* during an inoculant process using mineral microgranules. *Can J Microbiol* 40:322-325
- Fouilleux, G Revellin C, Hartmen A, Catroux G (1996) Increase of *Bradyrhizobium japonicum* numbers in soils and enhanced nodulation of soybean using granular inoculants amended with nutrient. *FEMS Microbiol Ecol* 20:173-183

- Franche, C., and Elmerich, C. (1981) Physiological properties and plasmid content of several strains of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Annales Microbiol.* 132: 3-18
- Freyermuth SK, Long RLG, Mathur S (1996) Metabolic aspects of plant interaction with commensal methylophs. In: Lidstrom ME, Tabita FR. (eds.) *Microbial growth on C1 compounds*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p 277-284
- Frommel MI, Nowak J, Lazarovits G (1991) Growth enhancement and development modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol* 96: 928-936
- Fulchieri M, Lucangeli C, Bottini R (1993) Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedling roots. *Plant Cell Physiol* 34:1305-1309
- Gaind S, Gaur AC (1990) Shelf life of phosphate solubilizing inoculants as influenced by type of carrier, high temperature and low moisture. *Can J Microbiol* 36:846-849
- Galimand, M., Perroud, B., Delorme, F., Paquelin, A., Vieille, C., Bozouklian, H., and Elmerich, C. (1989) Identification of DNA regions homologous to nitrogen fixation genes *nifE*, *nifUS* and *fixABC* in *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1047-1059
- Ghani A, Rajan SSS, Lee A (1994) Enhancement of phosphate rock solubility through biological processes. *Soil Biol Biochem* 26:127-136
- Gillis, M., and Reinhold-Hurek, B. (1994) Taxonomy of *Azospirillum*. In *Azospirillum / Plant Associations*. Ed. Y. Okon. CRC Press Inc., Boca Raton. pp. 1-14
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41: 109-117

- Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM (1999) Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London
- Glick BR, Penrose DM, Li J (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol* 190: 63-68
- Gogstad, G. O., and Krutnes, M. (1982) Measurement of protein in cell suspensions using the coomassie brilliant blue dye-binding assay. *Anal. Biochem.* 126: 355-359
- Gonzalez-Lopez, J., Salmeron, V., Moreno, J., and Ramos-Cormenzana, A. (1983) Amino acids and vitamins produced by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in chemically defined media and dialysed soil media. *Soil Biol. Biochem.* 15: 711-713
- Green PN (1992) The genus *Methylobacterium*. *In:* Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds), *The prokaryotes*, 2nd edition, vol. III. Springer-Verlag, New York, pp. 2342-2349
- Grichko VP and Glick BR (2001) Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 11-17.
- Grifoni, A., Bazzicalupo, M., Di Serio, C., Fancelli, S., and Fani, R. (1995) Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiol. Lett.* 127: 85-91
- Gunarto, G., Adachi, K., and Senboku, T. (1999) Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. from a subtropical island, and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. *Biol. Fertil. Soils.* 28: 129-135
- Gutierrez-Manero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo

- FR and Talon M (2001) The plant-growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 111: 206-211.
- Han, S. O., and New, P. B. (1998) Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. *Microb. Ecol.* 36: 193-201
- Harari, A., Kigel, J., and Okon, Y. (1988) Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaseum* roots. *Plant Soil.* 110: 275-282
- Hartmann, A., and Burris, R. H. (1987) Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* 169: 944-948
- Hartmann, A., and Zimmer, W. (1994) Physiology of *Azospirillum*. In *Azospirillum / Plant Associations*. Ed. Y. Okon. CRC Press Inc., Boca Raton. pp. 15-39
- Hartmann, A., Fu, H. A., and Burris, R. H. (1986) Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp.. *J. Bacteriol.* 165: 864-870
- Hatmann, A. (1988) Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azaospirillum* spp. *Plant Soil.* 110: 225-238
- Hebbar, P., Berge, O., Heulin, T., and Singh, S. P. (1991) Bacterial antagonists of sunflower (*Helianthus annuus* L.) fungal pathogens. *Plant Soil.* 133: 131-140
- Hegde SV, BrahmaPrakash GP (1992) A dry granular inoculant of *Rhizobium* for soil application. *Plant Soil* 144:309-311
- Hill, S. (1988) How is nitrogenase regulated by oxygen? *MS Microbiol.* 54: 111-130
- Hiltbold AE, Thurlow DL, Skipper HD (1980) Evaluation of commercial soybean inoculants by various techniques. *Agron J* 72:675-681

- Holguin, G., Patten, C. L., and Glick, B. R. (1999) Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. *Biol. Fertil. Soils*. 29: 10-23
- Holguin G and Glick BR (2001) Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microbial Ecol.* 41: 281-288.
- Holland MA (1997) *Methylobacterium* and plants. *Rec Res Dev Plant Physiol* 1: 207-213
- Holland MA, Polacco JC (1994) PPFMs and other contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 197-209.
- Holland MA, Polacco JC (1992) Urease-null and hydrogenase-null phenotypes of a phylloplane bacterium reveal altered nickel metabolism in two soybean mutants. *Plant Physiol* 98: 942-948
- Honma M, Shimomura T (1978) Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric Biol Chem* 42: 1825-1831
- Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B and Piche Y (2002) *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 233-242.
- Hyodo H (1991) Stress/wound ethylene. In: Matoo AK, Suttle JC (eds) *The plant hormone ethylene*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 65-80
- Illmer P, Schinner F. (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem* 24:389-395.
- Islam N, Bora LC (1998) Biological management of bacterial leaf blight of rice (*Oryza sativa*) with plant growth promoting rhizobacteria. *Indian Journal of Agricultural Science* 68: 798-800.
- Jackson MB (1991) Ethylene in root growth and development. In: Matoo AK, Suttle JC (eds) *The Plant Hormone Ethylene*. CRC Press, Boca Raton, FL, p 159-181

- James EK, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquio QL, Reddy PM, Iannetta PPM, Olivares FL, Ladha JK (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67 Mol. Plant Microbe. Interact. 15: 894-906.
- James EK, Olivares FL, Baldani JI and Dobereiner J (1997) *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. J. Exp. Bot. 48: 785-797.
- Janzen, R., Rood, S., Dormar, J., and McGill. W. (1992) *Azospirillum brasilense* produces gibberellins in pure culture and chemically medium and in co-culture on straw. Soil Biol. Biochem. 24: 1061-1064
- Janzen R, Rood S, Dormar J, McGill W (1992) *Azospirillum brasilense* produces gibberellins in pure culture and chemically- medium and in co-culture on straw. Soil Biol Biochem 24:1061-1064
- Jauhri KS, Philip K (1984) Press mud, a potential carrier for *Rhizobium* and *Azotobacter*. Zentralbl Mikrobiol 139:97-107
- Katupitiya, S., Millet, J., Vesk, M., Viccars, L., Zeman, A., Lidong, Z., Elmerich, C., and Kennedy, I. R. (1995) A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1987-1995
- Katupitiya, S., New, P. B., Elmerich, C., and Kennedy, I. R. (1995) Improved nitrogen fixation in 2,4-D treated wheat roots associated with *Azospirillum lipoferum* : studies of colonization using reporter genes. Soil Biol. Biochem. 27: 447-452
- Kaushik R, Saxena AK, Tilak KVBR (2000) Selection of Tn5::lacZ mutants isogenic to wild type *Azospirillum brasilense* strains capable of growing at sub-optimal temperature. World J. Microbiol. Biotechnol. 16: 567-570.
- Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant

- Mol. Biol. 33: 172-296.
- Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecskes ML (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol. Biochem.* 36: 1229-1244
- Kennedy, I. R., Pereg-Gerk, L. L., Wood, C., Deaker, R, Gilchrist, K., and Katupitiya, S. (1997) Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. *Plant Soil.* 194: 65-79
- Khammas, K. M., Ageron, E., Grimont, P. A. D., and Kaiser, P. (1989) *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.* 140: 679-693
- Killham, K. (1994) *Soil ecology.* Cambridge University Press.
- Kim CW, Kecskés ML, Deaker RJ, Gilchrist K, New PB, Kennedy IR, Kim SH and Sa TM (2005) Wheat root colonization and nitrogenase activity by *Azospirillum* isolates from crop plants in Korea. *Can J Microbiol* (accepted).
- Kim KY, Jordan D and McDonald GA (1998) Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesiculararbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils* 26: 79-87.
- Kleiner D (1984) Bakterien und Ammonium. *Forum Mikrobiol.* 7: 13-19.
- Kloepper, J. W., and Shier, F. M., and Miller, T. D. (1980) Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology.* 70: 1078-1082
- Kloepper JW, Lifshitz R, Schroth MN (1988) *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas Sci: Anim Plant Sci XX:* 60-64
- Koch, B., and Evans, H. J. (1966) Reduction of acetylene to ethylene by soybean nodules. *Plant Physiol.* 41: 1748-1750
- Krieg, N. R., and Döbereiner, J. (1984) Genus *Azospirillum*. In *Bergey's*

- Manual of Systematic Bacteriology. Edited by N. R. Krieg and J. G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore, Md. pp. 94-104
- Kucey RMN, Janzen HH, Leggett ME (1989) Microbially mediated increases in plant available phosphorous. *Adv Agron* 42:199-228
- Kucey RMN (1988) Plant growth-altering effects of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus* C-11-25 on two wheat cultivars. *J Appl Bacteriol* 64:187-196
- Kuenen, J. G., and Robertson, L. A. (1988) Ecology of nitrification and denitrification. In: *The Nitrogen and Sulphur Cycles*. J. A. Cole, and S. J. Ferguson, Eds. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 161-218
- Kumar V and Narula N (1999) Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol. Fertil. Soils* 28: 301-305.
- Lalande, R., Bissonnette, N., Coutlee, D., and Antoun, H. (1989) Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant Soil*. 115: 7-11
- Lee HS, Madhaiyan M, Kim CW, Choi SJ, and Sa TM (2005) Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by phytohormone producing of N₂-fixing methylo-trophic isolates. *Geoderma* (communicated).
- Lehman A, Black R, Ecker JR (1996) *HOOKLESS1*, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the Arabidopsis hypocotyl. *Cell* 85: 183-194
- Leon LA, Fenster WE, Hammond LL (1986) Agronomic potential of seven phosphaterocks from Brazil, Coloumbia, Peru, and Venezuela. *Soil sci Soc Am J* 50:798-802
- Lindberg, T., and Granhall, U. (1984) Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of temperate cereals and

- forage grasses. Appl. Environ. Microbiol. 48: 683-689
- Liang, Y. Y., Kaminski, P. A., and Elmerich, C. (1991) Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. Mol. Microbiol. 5: 2735-2744
- Li J, Ovakim DH, Charles TC and Glick BR (2000) An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. Curr. Microbiology 41: 101-105.
- Loper JE, Nowak-Thompson B, Whistler CA, Hagen MJ, Corbell NA, Henkels MD, Stockwell VO (1997) Biological control mediated by antifungal metabolite production and resource competition: an overview. In: Ogoshi A, Kobayashi K, Homma Y, Kodama F, Kondo N, Akino S (eds) Plant growth-promoting rhizobacteria: present status and future prospects. OECD, Paris, p73-79
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with folin-phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275
- Lucangeli C, Bottini R (1997) Effects of *Azospirillum* spp. On endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. Symbiosis 23:63-72
- Lynch JM, Whipps JM (1991) Substrate flow in the rhizosphere. Pages 15-24 in: The rhizosphere and plant growth. D. L. Keister and B. Cregan, eds. Beltsville Sympos. in Agric. Res. 14. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu JH, Sa TM (2005) Regulation of ethylene levels in Canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. Plant Physiology (communicated)
- Madhaiyan M, Park MS, Lee HS, Kim CW, Lee KH, Seshadri S, Sa TM

- (2004) Phenotypic characterization of methylophilic N₂-fixing bacteria isolated from rice (*Oryza sativa* L.). Korean J. Soil Sci. Fert. 37: 46-53.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Lee HS, Hari K, Sundaram SP, Sa TM (2005) Pink-pigmented facultative methylophilic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). Biol. Fertil. Soils 41: 350-358.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Senthilkumar M, Seshadri S, Chung HY, Yang JC, Sundaram SP, Sa TM (2004) Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. Bot. Bull. Acad. Sin. 45: 315-324.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sundaram SP, Sa TM (2005) A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylophilic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Environ. Exp. Bot. (Article in Press)
- Magalhães, F. M. M., Baldani, J. I., Souto, S. M., Kuykendall, J. R., and Döbereiner, J. (1984) A new acid tolerant *Azospirillum* species. Anais Academia Brasileria Ciencias. 55: 417-430
- Ma JH, Yao JL, Cohen D, Morris B (1998) Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation from apple shoot cultures. Plant Cell Rep 17: 211-214
- Malik KA, Bilal R, Mehnaz S, Rasul G, Mirza MS and Ali S (1997) Association of nitrogen-fixing, plant promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. Plant Soil 194: 37-44.
- Malerba M, Crosti P, Armocida D, Bianchetti R (1995) Activation of ethylene production in *Acer pseudoplatanus* L. cultured cells by fusicoccin. J Plant Physiol 145: 93-100
- Marschner H, Romheld V (1994) Strategies of plants for acquisition of iron.

- Plant Soil 165: 261-274.
- Mattoo AK, Suttle JC (1991) The plant hormone ethylene. Boca Raton, FL: CRC Press. 337 p
- Mayak S, Tirosh T and Glick BR (1999) Effect of wild-type and mutant plant growth-promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. J. Plant Growth Regul. 18: 49-53.
- Mehnaz S, Mirza MS, Haurat J, Bally R, Normand P, Bano A, Malik KA (2001) Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. Can. J. Microbiol. 47: 110-117.
- Michiels, K., Croes, C., and Vanderleyden, J. (1991) Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 137: 2241-2246
- Michiels, K., Vanderleyden, J., and Van Gool, A. (1989) *Azospirillum*-plant root associations: a review. Biol. Fertil. Soils. 8: 356-368
- Milcamps, A., and Vanderleyden, J. (1991) In vitro construction of *lacZ* gene fusions with the *nifHDK*-operon of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbio. Letters. 77: 79-84
- Miles, A. A., and Misra, S. S. (1938) The estimation of the bactericidal power of blood. J. Hygiene, Cambridge. 38: 732-749
- Miller, J. H. (1972) Assay of β -galactosidase. In Experiments of Molecular Genetics, pp. 352-355. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Mirza MS, Ahmad W, Latif F, Haurat J, Bally R, Normand P and Malik KA (2001) Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. Plant Soil 237: 47-54.
- Morris, R.O. (1995) Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes. In Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and

- Molecular Biology (Davies, P.J., ed.), p318-339, Kluwer Academic Publishers
- Mrkovacki N and Milic V (2001) Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. *Ann. Microbiol.* 51: 145-158.
- Munsanje EM (1999) Potential of a cytokinin-secreting *Methylobacterium* as biofertilizer in soybean production. Ph.D. dissertation. University of Maryland Eastern Shore, Princess Anne, MD.
- Murty, M. G., and Ladha, J. K. (1988) Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant Soil.* 108: 281-285
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 273:31-36
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170:265-270
- Nautiyal CS, Bhaduria S, Kumar P, Lal H, Mondal R and Verma D (2000) Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol. Lett.* 182: 291-296.
- Neilands JB, Leong SA (1986) Siderophores in relation to plant growth and disease. *Ann Rev Plant Physiol* 37: 187-208
- Nieto KF, Frankenberger WT (1989) Biosynthesis of cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Soil Biol. Biochem.* 21: 967-972.
- Nie, Y. F. (1983) Studies on induced nodulation by 2,4-D on non-legumes. *Nature Journal (Chinese).* 5: 326-336
- Nguyen C, Yan W, Le Tacon F, Lapeyrie F (1992) Genetic variability phosphate solubilizing activity of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria*

- bicolor* (Maire) P.D. Orton. Plant Soil 143:193-199
- Oh, K. H., Seong, C. S., Lee, S. W., Kwon, O, S., and Park, Y. S. (1999) Isolation of psychrotrophic *Azospirillum* sp. and characterization of its extracellular protease. FEMS Microbiol. Lett. 174: 173-178
- O'Sullivan DJ, O'Gara F (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol Rev 56: 662-676
- Okon Y, Labandera-Gonzalez CA (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years world-wide field inoculation. Soil Biology and Biochemistry 26: 1591-1601.
- Pandey A, Sharma E and Palni LMS (1998) Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. Soil Biol. Biochem. 30: 379-384.
- Park MS, Gadagi R, Singvilay O, Kim CW, Chung HY, Ahn K, Sa TM (2001) Performance of MPS bacterial inoculation in two consecutive growth of maize plants. Korean J Environ. Agri. 20: 335-339.
- Park MS, Kim CW, Yang JC, Lee HS, Shin WS, Kim SH, Sa TM (2005) Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. Microbiol. Res. 160: 127-133
- Patrick JW (1987) Are the hormones involved in assimilate transport? *In* Hormone action in plant development: a critical appraisal. Edited by G.V. Hoad, J.R. Lenton, M.B. Jackson, and R.K. Atkin. Butterworths Co. Ltd., Long Ashton, U.K. p175-188.
- Patten C, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can J Microbiol 42: 207-220
- Penrose DM, Moffatt BA, Glick BR (2001) Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of

- ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. *Can J Microbiol* 47: 77-80
- Piccoli P, Bottini R (1994a) Metabolism of 17,17-[2H₂]gibberellin A20 to 17,17-[2H₂]gibberellin A1 by *Azospirillum lipoferum* cultures. *Agri Scientia* XI:13-15
- Piccoli P, Lucangeli D, Schneider G, Bottini R (1997) Hydrolysis of [17,17-²H₂]Gibberellin A20-Glucoside and [17,17-²H₂]Gibberellin A20-glucosyl ester by *Azospirillum lipoferum* cultured in a nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium. *Plant Growth Regul* 23:179-182
- Piccoli P, Masciarelli O, Bottini R (1996) Metabolism of 17,17 [2H₂]-Gibberellins A4, A9, and A20 by *Azospirillum lipoferum* in chemically-defined culture medium. *Symbiosis* 21:167-178
- Piccoli P, Masciarelli O, Bottini R (1999) Gibberellin Production by *Azospirillum lipoferum* cultured in chemically-defined medium as affected by oxygen availability and water status. *Symbiosis* 27:135-146
- Rao VR, Ramakrishnan B, Adhya TK, Kanungo PK, Nayak DN (1998) Current status and future prospects of associative nitrogen fixation in rice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 621-633.
- Reinoso H, Dauría C, Luna V, Pharis R, Bottini R (2002) Dormancy in peach (*Prunus persica*L.) flower buds VI. Effects of gibberellins and an acylcyclohexanedione (Cimectacarb) on bud morphogenesis in field experiments with orchard trees and on cuttings. *Can J Bot* 80:656-663
- Richardson AE (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 897-906.
- Rodriguez H, Reynaldo F (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17: 319-339.

- Roos W, Luckner M (1984) Relationships between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. J Gen Microbiol 130: 1007–1014.
- Rubery PH (1987) Manipulation of hormone transport in physiological and development studies. *In* Hormone action in plant development: a critical appraisal. Edited by G.V. Hoad, J.R. Lenton, M.B. Jackson, and R.K. Atkin. Butterworths Co. Ltd., Long Ashton, U.K. pp. 161–174.
- Saleh SS, Glick BR (2001) Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. Can. J. Microbiol. 47: 698–705.
- Salisbury FB Ross CW 1992 Plant Physiology, Wadsworth Pub. Co., Belmont, USA. p.682
- Salisbury FB (1994) The role of plant hormones. *In* Plant Environment Interactions. Ed. R EWilkinson. pp. 3981. Marcel Dekker, New York, USA.
- Sapatnekar HG, Rasal PH, Patil PL (2001) Effects of N-fixers along with inorganic fertilizers on paddy yield. Journal of Maharashtra Agricultural Universities 26: 118119.
- Seville M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *Nif*-mutant strains. Mol. Plant Microbe. Interact. 14: 358–366.
- Shah S, Li J, Moffatt BA, Glick BR (1998) Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth promoting rhizobacteria. Can J Microbiol 44: 833–843
- Singh S, Kapoor KK (1999) Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil.

- Biol. Fertil. Soils 28: 139-144.
- Stein T, Hayen-Schneeg N, Fendrik I (1997) Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. Soil Biol. Biochem. 29: 969-971.
- Stevenson FJ, Cole MA (1999) Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients, 2nd Edition. Wiley, New York, USA. p.427
- Tanimoto E (1987) Gibberellin-dependent root elongation in *Lactuca sativa*: recovery from growth retardant-suppressed elongation with thickening by low concentration of GA3. Plant Cell Physiol 28:963-973
- Timmusk S, Nicander B, Granhall U, Tillberg E (1999) Cytokinin production by *Paenobacillus polymyxa*. Soil Biol. Biochem. 31: 1847-1852.
- Vazquez P, Holguin G, Puente ME, Lopez-Cortez A and Bashan Y (2000) Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biol. Fertil. Soils 30: 460-468.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers Plant Soil 255: 571-586
- Wang C, Knill E, Glick BR, Defago G (2000) Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. Can J Microbiol 46: 898-907
- Wang Y, Brown HN, Crowley DE, Szaniszlo PJ (1993) Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. Plant Cell Environ. 16: 579-585

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

유
용
미
생
물
복
합
체
를
이
용
한
친
환
경
생
물
비
료
개
발
농
림
부