

옥수수 초기 성장을 촉진하는 근류세균의 특성

이상은 · 이외수 · 박승환¹ · 김사열*

경북대학교 미생물학과, ¹한국생명공학연구원 유전체연구센터

Characterization of a Rhizobacterium Promoting Early Growth in Maize. Lee, Sang-Eun, Hwe-Su Yi, Seung-Hwan Park¹, and Sa-Youl Ghim*. Department of Microbiology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, ¹Genome Research Center, KRIBB, Daejeon 305-600, Korea – A soil bacterium was isolated from maize roots cultivated in Korea (KNUC153). The isolate was partially classified on basis of 16S rDNA sequence analysis as *Stenotrophomonas maltophilia*. By the acetylene reduction assay (ARA), the strain KNUC153 contained nitrogen-fixing abilities. The amount of auxin produced by the strain KNUC153 was 77.6 µg/ml. The strain KNUC153 produced 4 times higher amount of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid deaminase than that of the other known strain *Azospirillum* sp. KNUC82. Inoculation treatment with the strain KNUC153 for maize seeds showed positive effect on early growth of the plants.

Key words: Nitrogen-fixing bacteria, auxin, ACC deaminase

식물이 성장하는 데에 있어서 근권 미생물과의 협력관계가 점차 알려져 왔다. 근권 미생물은 식물에게 질소나 무기염류와 같은 여러 가지 영양원을 공급하는데, 그러한 근권 미생물은 질소고정 능력을 가진 근류세균을 포함하고 있다. 이들 질소고정균 중 일부는 질소고정 능력 이외에도 식물 성장 호르몬인 옥신(auxin, indoleacetic acid)[10, 22], 사이토키닌(cytokinin)[3, 14] 등을 생산하는 것으로 밝혀졌다. 식물 성장 호르몬을 생산하는 균주로는 *Azospirillum* spp.이 잘 알려져 있다. *Azospirillum*에 의해 분비된 옥신은 작물 뿌리를 자극하여 작물 성장을 향상시켰다고 한다[22].

또한 일부 질소고정균은 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid(ACC) deaminase[7, 17]를 생산한다는 것도 알려져 있다. ACC deaminase는 에틸렌(ethylene)의 전구체인 ACC를 분해하는 효소이다. 에틸렌은 식물 성장 호르몬으로서 과도한 분비시 오히려 식물 성장을 억제하는 역할을 하여 식물에게 스트레스[6, 11]를 주기도 하는데 근권 미생물이 ACC deaminase를 분비할 수 있다면 이 효소를 이용하여 작물 내 에틸렌 양을 조절할 수 있다.

한편, 현장평가 실험을 통해 근류세균의 작물 생산 증대력이 검증된 바 있다[12]. 그 예로 *Azospirillum brasilense*는 사탕수수, 밀, 보리 등의 생산성을 26%나 증가시켜 주었고[3], *Burkholderia vietnamiensis* TVV75는 벼의 줄기의 무게를 33%, 뿌리의 무게를 55% 각각 증가시켜 주었다고 보고되었다[20]. 일반적으로 근류세균들은 작물에 대하여 영양공급뿐 아니라 다른 여러 가지 이로운 기능을 수행하여 최

근에는 농작물에 대한 생산증대 혹은 기능성 부여를 위해 산업적으로 이용되기도 한다[13].

본 연구에서는 한국산 옥수수의 뿌리에서 질소 고정균을 분리하여 부분적으로 동정하고, 작물에 대한 성장 촉진 능력과 관련된 여러 가지 실험을 수행하였기에 보고하고자 한다.

근류세균의 분리 및 분류

대구와 경북지역 농장에서 채취한 옥수수의 뿌리를 멸균 증류수로 세척한 후, 뿌리와 뿌리를 씻은 물을 질소원이 부족한 semi-solid 배지[2, 18]에 각각 접종하였다. 또 옥수수 뿌리의 조직 내부에서 살아가는 내생 질소고정균을 분리하기 위하여 이들 뿌리를 1.2% NaClO에 15분간 담궈서 표면 살균을 실행한 후, 뿌리를 멸균 증류수로 3회 세척하였다. 세척한 뿌리를 막자사발에서 간 후 그 상층액을 동일한 배지에 접종하였다. 질소고정균을 순수분리하기 위하여 30°C에서 48시간 이상 배양하여 형성된 균의 띠를 마이크로 피펫을 이용하여 1.5% 한천이 첨가된 질소원 부족 배지에 옮긴 후 도말하여 30°C에서 48시간 배양하여 분리된 집락을 얻었다.

분리된 세균의 16S rDNA의 염기서열을 분석하기 위해서 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하였다. 16S rDNA gene primer인 GF1(5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3')과 GR1(5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG-3')를 사용하였으며, 분리균주로부터 추출한 genomic DNA를 주형으로 사용하였다. PCR 반응액은 PCR premix(Bioneer, Korea), template DNA(30 ng), 10 pmol 농도의 primers로 구성하여 denaturaion(94°C, 30초), annealing(60°C, 30초), elongation(72°C, 45초) 단계로 53회 반복한 후 incubation(72°C, 15분)하여 16S rDNA 부분의 단편을 증폭하였다[2]. 증폭된

*Corresponding author

Tel: 82-53-950-5374, Fax: 82-53-955-5522

E-mail: ghimsa@mail.knu.ac.kr

genomic DNA 단편들은 전기영동을 실시하여 DNA PrepMate™(Bioneer, Korea)를 이용하여 겔에서 회수하여 염기서열을 결정하였다. 정제된 시료로부터 염기서열을 결정한 결과 분리균의 16S rDNA는 *Stenotrophomonas maltophilia*의 그것과 가장 유사도가 높았다(99%). 그래서 분리균을 *S. maltophilia* KNUC153으로 명명하였다. 일반적으로 근류 세균에 속하는 *S. maltophilia*는 주로 밀과 옥수수로부터 분리되었으며 작물생산에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. *S. maltophilia*의 생물학적 방제와 관계된 특징으로는 protease와 chitinase의 생산이 잘 알려져 있다[4].

분리균의 여러 가지 특성은 *S. maltophilia*의 특징과 대체로 일치하였고(data not shown), 주사전자현미경을 사용하여 분리 선발 균주의 형태를 Fig. 1에 나타내었다.

분리균의 질소고정 능력

KNUC153 균주가 질소원이 부족한 배지에서 분리된 것으로 보아 질소고정 능력이 있을 것으로 추정되어 acetylene reduction assay(ARA)를 실시하였다[5, 21]. 그 결과 분리세균은 nitrogenase의 활성을 나타내었다(Table 1). KNUC153 균주가 보여준 4.66 nmol of C₂H₄/h·mg of protein이라는 수치는 낮은 편인데, 같은 옥수수에서 분리한 *Azospirillum* sp. KNUC82 균주의 nitrogenase 활성치와 비교하자면 약 6 배 정도 낮은 것이었다[2]. Gyaneshwar 등[8]의 *Klebsiella planticola*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* 등을 대상으로 한 ARA 실험에서 분리균주들의 활성이 대체로 65에서 150까지 나타났던 것과 비교해 보더라도, KNUC153 균주의 활성치가 매우 낮은 것임을 알 수 있었다.

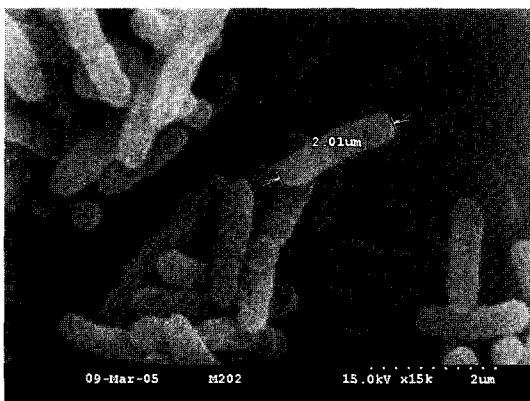


Fig. 1. Scanning electron micrography of the strain KNUC153.

Table 1. Nitrogenase activity of strains.

Strain ^a	ARA (nmol of C ₂ H ₄ ·h ⁻¹ ·mg of protein ⁻¹)
<i>S. maltophilia</i> KNUC153	4.66
<i>Azospirillum</i> sp. KNUC82	25.64

^a*Azospirillum* sp. KNUC82 strain was isolated from maize roots [2].

분리균의 식물 성장 호르몬 생산 능력

식물 성장에 관여하는 근류세균을 PGPR(plant growth promoting rhizobacterium)이라고 하는데, 이들 균주들 중 일부는 옥신과 같은 식물 성장 호르몬을 분비하는 것으로 알려져 있다. 분리 균주에 대한 옥신 생산 능력을 실험하고자 King B 배지(Proteose peptone No. 3 2%, K₂HPO₄ 0.115%, MgSO₄·7H₂O 0.15%, glycerol 1.5%)를 사용하였다. 여기에 옥신의 전구체인 L-tryptophan을 0.1% 첨가하여 균을 배양한 후 배양액을 4°C에서 10,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액을 Salkowski 용액과 1:2로 30분간 암실에서 반응시킨 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다[16, 19]. 옥신 활성 실험은 같은 지역에서 분리한 질소고정균 *Azospirillum* sp. KNUC82와 비교하여 분석하였다.

Table 2에서 표시한 바와 같이 KNUC153 균주가 옥신을 생성함을 확인할 수 있었다. 반면에 *Azospirillum* sp. KNUC82는 옥신 생산 능력이 없는 것으로 나타났다. KNUC153 균주는 auxin에 대한 흡광도 값이 535 nm상에서 매우 높게 나왔다. 물론 단순히 옥신 생성량이 높다고 하여 무조건 식물생장에 긍정적인 도움을 주는 것은 아니다. 오히려 고농도에서 식물에 대하여 생장을 억제함으로써 negative inhibition에 관여할 수도 있는 것으로 알려져 있기 때문이다.

ACC deaminase의 활성을 측정하고자 KNUC153 균주를 TSB 배지에 접종하여 Penrose & Glick[15]의 실험방법을 사용하였다. 에틸렌의 전구체인 ACC는 ACC deaminase에 의해서 α-ketobutyrate와 암모니아로 분해되므로 분리균주의 ACC deaminase 생성능을 측정하고자 α-ketobutyrate의 양을 흡광도로 측정하여 농도를 알아보았다[15].

분리 균주의 ACC deaminase 활성 측정에 필요한 단백질 정량은 Coomassie Protein Assay Reagent Kit(Pierce, USA)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, bovine serum albumin(Sigma, USA)을 표준 단백질로 사용하였다. 분리균의 총단백질량을 측정하기 위하여, ACC deaminase 활성 측정 실험 중에서 톨루엔과 섞인 세포액 100 μl를 따로 분리하여 사용하였다.

Table 3에서와 같이 KNUC153 균주는 ACC deaminase 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. KNUC153 균주의 ACC deaminase 활성치는 대조구로 사용되어진 *Azospirillum* sp. KNUC82의 그것과 비교하여 4배 이상 높게 나왔다. 또한 이미 연구되어진 *Pseudomonas putida* GR12-2의 ACC

Table 2. Indole acetic acid (IAA) production.

Strain	Auxin secreted (μg/ml) ^a
<i>S. maltophilia</i> KNUC153	77.6
<i>Azospirillum</i> sp. KNUC82	0

^aIAA was estimated 24 hrs after the bacterial growth in King B medium supplemented with 0.1% tryptophan.

Table 3. ACC deaminase activity.

Strain	ACC deaminase activity ($\mu\text{mol of } \alpha\text{-ketobutyrate} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$)
<i>S. maltophilia</i> KNUC153	57.14
<i>Azospirillum</i> sp. KNUC82	12.12

deaminase의 활성치($12 \mu\text{mol of } \alpha\text{-ketobutyrate/h} \cdot \text{mg of protein}$)에 비하여도 4배 이상 높게 나왔다[9]. 이것은 KNUC153 균주가 작물과 협력하여 작물 내의 에틸렌 농도를 조절함으로써 작물의 생장에 긍정적인 영향을 줄 수 있음을 암시하는 것이다.

분리균주가 옥수수 초기 생장에 미치는 영향

S. maltophilia KNUC153 균주가 옥수수의 초기 생장에 어떠한 영향을 주는가를 알아보기 위하여 해당 균주를 옥수수 종자에 접종 처리하여 옥수수를 재배하는 실험을 하였다. 균주들을 LB 액체 배지[1]에 접종하였다. 옥수수 종자를 키우기 위해서 인공토양을 사용하였고, 사용 전 인공토양을 121°C , 40분 멸균한 후 미리 멸균시킨 pot에 채웠다.

옥수수 종자를 완전히 멸균한 후 멸균 증류수로 수차례 씻고 말렸다. 완전히 말린 옥수수 종자를 KNUC153 균주 배양액에 1시간 정도 담근 후, pot에 40개씩 심었다. Pot을 plant growth chamber에 보관하여 옥수수를 키웠다(14 h of light at 25°C and 10 h of darkness at 20°C , humidity: 55%). 이 실험의 대조구로서 LB 배지에 1시간 정도 담근 옥수수 종자를 사용하였다. 옥수수 종자는 매일 같은 시간에 동일한 양의 물을 주었으며, 첫 날은 옥수수 종자에 정착시킨 균주의 생장을 돕기 위해서 LB 배지와 물을 1.4 정도로 혼합하여 옥수수에 주었고, 둘째 날부터 1차 증류수를 주어서 7일 동안 키웠다. 7일 후 성장한 옥수수의 줄기 및 뿌리 길이를 측정하였고 각각의 옥수수 무게를 측정하였다. 7일 후 Table 4에서와 같이 균주를 접종하지 않은 대조구와 비교하여 KNUC153 균주를 접종한 옥수수 줄기의 길이(stem length), 뿌리의 길이(root length)와 전체무게(total weight) 모두가 증가된 수치를 보였다.

그러나 KNUC153 균주가 절대적으로 옥수수 뿌리, 줄기와 무게를 증가시켜주는 것은 아니었다. 동일한 실험조건에

Table 4. Effects of bacterization with selected nitrogen-fixing bacteria on maize early growth.

Strain ^a	Stem length (cm)	Root length (cm)	Total weight (g) ^b
Control	3.42 ± 0.66	10.61 ± 1.20	0.16 ± 0.02
<i>S. maltophilia</i> KNUC153	3.79 ± 1.22	11.15 ± 1.48	0.17 ± 0.04

^aControl: without any bacterial inoculation treatment for maize seeds.

^bMeasured length and weight of maize grown for 7 days after germination.

서 뿌리 길이와 전체무게의 증가는 있었으나 줄기의 길이에서는 control 옥수수보다 성장이 감소한 경우도 볼 수 있었다(data not shown). KNUC153 균주가 작물의 생장에 대하여 지속적으로 관여하는지를 알기 위해서는 좀 더 오랜 기간의 field test를 통하여 작물의 성장률을 측정해 보아야 할 것으로 여겨진다.

이처럼 KNUC153 균주를 접종한 옥수수가 그렇지 않은 것에 비하여 초기 생장에서 성장 촉진의 효과를 보인 것은, 아마도 해당균주가 보여준 질소고정 능력이나 옥신, ACC deaminase 생산 능력과 연관성을 가진 것이 아닌가 추정되었다. 기존의 PGPR과 관련된 대부분의 연구들은 질소고정 능력이나 식물생장호르몬 생산 능력과 같은 어느 한 가지 측면만을 자료로 제시하였으나, 본 연구에서는 근류세균의 식물생장 능력의 여러 가지 가능한 요인을 조사하여 위와 같은 결과를 제시하였기에 상당한 의미가 있다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어 미생물유전체활용 기술 개발사업(과제번호: M102KK010001-02K1101-00631)의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bertani, G. 1951. Studies of lysogenesis. 1. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**: 290-300.
- Choi, E.-H., S.-E. Lee, K. S. Yoon, D.-K. Kwon, J.-K. Shon, S.-H. Park, M.-S. Han, and S.-Y. Ghim. 2003. Isolation of nitrogen-fixing bacteria from gramineous crops and measurement of nitrogenase activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 18-24.
- Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, J. Vanderleyden, P. Dutto, C. Labandera-Gonzalez, Caballero-Mellado, J. F. Aguirre, Y. Kapulnik, S. Brener, S. Burdman, D. Kadouri, S. Sarig, and Y. Okon. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**: 871-879.
- Dunne, C., J. J. Crowley, Y. Monne-Loccoz, D. N. Dowling, F. J. de Bruijn, and F. O'Gara. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology* **143**: 3921-3931.
- Elbeltagy, A. E., K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5285-5293.
- Esashi, Y. 1991. Ethylene and seed germination. pp. 133-157. In A. K. Matoo and J. C. Suttle. (eds), *The Plant Hormone Ethylene*. CRC Press, Boca Raton, FL.

7. Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 109-117.
8. Gyaneshwar, P., E. K. James, N. Mathan, P. M. Reddy, B. Reinhold-Hurek, and K. K. Ladha. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **183**: 2634-2645.
9. Hong, X., J. J. Pasternak, and B. R. Glick. 1996. Isolation and Characterization of Mutants of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 That Overproduce Indoleacetic acid. *Curr. Microbiol.* **32**: 67-71
10. Jackson, M. B. 1991. Ethylene in root growth and development. pp. 159-181. In A. K. Matoo and J. C. Suttle. (eds). *The Plant Hormone Ethylene*. CRC Press, Boca Raton, FL.
11. Jacobson, C. B., J. J. Pasternak, and B. R. Glick. 1994. Partial purification and characterization of ACC deaminase from the growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. *Can. J. Microbiol.* **40**: 1019-1025.
12. Kokalis-Burelle, N., C. S. Vavrina, E. N. Roskopf, and R. A. Shelby. 2002. Field evaluation of plant growth-promoting Rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant Soil.* **238**: 257-266.
13. Lucy, M., E. Reed, and B. R. Glick. 2004. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**: 1-25.
14. Noel, T. C., C. Sheng, C. K. Yost, R. P. Pharis, and M. F. Hynes. 1996. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. *Can. J. Microbiol.* **42**: 279-283.
15. Penrose, D. M., and B. R. Glick. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant* **118**: 10-15.
16. Salkowski, E. 1885. Ueber das verhalten der skatolcarbon-saure im organismus. *Z. Physiol. Chem.* **9**: 23-33.
17. Shah, S., J. Li, B. A. Moffat, and B. R. Glick. 1997. ACC deaminase genes from plant growth promoting bacteria. pp. 320-324. In A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Honma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino. (eds), *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Present Status and Future Prospects*, OECD, Paris.
18. Song, S.-D., S. J. Kim, and Y. S. Chu. 1990. Properties and activities of nitrogenase system of *Azospirillum amazonense* Kp1. *Kor. J. Microbiol.* **28**: 151-157.
19. Tang, Y. W., and J. Bonner. 1947. The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. *Arch. Biochem.* **13**: 11-25.
20. Tran, V. V., O. Berge, K. S. Ngo, J. Balandreau, and T. Heulin. 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil* **218**: 273-284.
21. Verma, S. C., J. K. Ladha, and A. K. Tripathi. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* **91**: 127-141.
22. Zimmer, W., M. Wesche, and L. Timmermans. 1998. Identification and isolation of indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. *Curr. Microbiol.* **36**: 327-331.

(Received Feb. 22, 2005/Accepted Mar. 14, 2005)