

중금속 내성 및 식물 성장 향상 근권세균 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1의 분리 및 특성

구소연 · 조경숙*
이화여자대학교 환경학과

Characterization of a Heavy Metal-Resistant and Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Methylobacterium* sp. SY-NiR1. Koo, So-Yeon and Kyung-Suk Cho*. Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University – The role of soil microorganisms, specifically rhizobacteria, in the development of rhizoremediation techniques is important to speed up the process and to increase the rate of mobilization or absorption of heavy metals to the plant. In this study, *Methylobacterium* sp. SY-NiR1 was isolated from the rhizosphere soils of plants in oil and heavy metal-contaminated soil. Based on its pink pigmented colony, rod-shape cells, and belonging in α -Proteobacteria, *Methylobacterium* sp. SY-NiR1 is considered a pink-pigmented facultative methylotroph. SY-NiR1 had the ability to produce indole acetic acid which is one of phytohormones. This bacterium showed resistance against multiple heavy metals such as Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, Zn, and the order of its resistance based on EC₅₀ was Zn > Ni > Cu > Pb > Cd > Cr. Therefore, *Methylobacterium* sp. SY-NiR1 can stimulate seed germination and plant growth in soil contaminated with heavy metals.

Key words: Phytoremediation, heavy metal, *Methylobacterium*, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)

서 론

다양한 산업현장에서 배출된 중금속은 토양 입자 등에 흡착되어 독성이 적은 물질로 분해되거나 안정화되지 않고 장기간 체류하여 생태계 내에 고농도로 축적된다[37]. 중금속은 토양 미생물의 여러 가지 효소 활성, 세포막의 기능 장애 및 핵산의 손상 야기 등의 독성을 가지고 있다[12, 13]. 토양 미생물의 군집 수준에서 보았을 때, 중금속은 전반적인 대사 활성을 떨어뜨리고, 군집의 다양성 및 군집 내 개체수 또한 감소시킨다[15, 20, 38, 39].

중금속 제거 방법 중 하나인 식물상 복원법(phytoremediation)은 토양 속에 축적되어 있는 중금속이 식물의 뿌리에 의하여 흡수 혹은 흡착되는 기작을 이용하여 토양으로부터 중금속을 제거하거나 토양 내 중금속 이동을 최소화시키는 방법이다[26]. 식물상 복원법에 있어서 식물체에 의한 중금속 흡수율을 향상시키기 위하여 식물의 뿌리와 식물의 성장을 향상시키는 근권세균(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)과의 상리공생적인 상호관계를 이용한 rhizoremediation에 대한 관심이 증가하고 있다.

식물의 근권부에서는 뿌리로부터 배출되는 삼출물 중의 acetic acid, oxalic acid, fumaric acid, citric acid, tartaric

acid 등과 같은 유기산 성분에 의하여 토양 입자에 흡착되어 있던 중금속이 가용화 상태로 전환되어 중금속의 생물학적 이용도가 증가될 뿐만 아니라 생물학적 독성도 또한 증가한다[25, 33, 41]. 따라서 phytoremediation에 있어서 중금속 독성에 내성을 가지고 있으며 식물의 성장을 향상시킬 수 있는 능력을 가지는 근권세균을 활용하는 것이 중요하다.

본 연구에서는 장기간 유류와 중금속으로 오염된 유류저장 탱크 주변부에 서식하고 있던 식물체의 근권토양을 접종원으로 하고, 농화배양법을 이용하여 중금속에 내성을 갖는 균주를 분리하여, 분리균의 중금속에 대한 내성 특징과 식물 성장 향상 특징을 조사하였다.

재료 및 방법

토양

울산에 위치한 정유공장의 유류 저장 탱크 주변의 장기간 유류 및 중금속으로 오염된 토양에서 들피(*Echinochloa crus-galli*, K1), 산쟁이사초(*Carex leiorhyncha*, K2), 닭의장풀(*Commelina communis*, H1) 그리고 흰여뀌(*Persicaria lapathifolia*, H2)의 근권토양을 식물체와 함께 채취하여 실험실로 옮겼으며, 근권미생물의 활성을 위하여 4°C에서 보관하였다.

중금속 내성 근권세균의 분리

각 식물의 근권토양 2 g을 18 ml의 멸균수에 넣고 160

*Corresponding author

Tel: 82-2-3277-2393, Fax: 82-2-3277-3275

E-mail: kscho@ewha.ac.kr

rpm에서 20분 동안 잘 섞은 후 30분간 정치시켰다. 각 근권 토양의 상등액을 각각 같은 양으로 혼합한 근권토양 현탁액을 접종액으로 사용하였다. Cr^{6+} (0.1 mM), Cd^{2+} (0.1 mM), Ni^{2+} (0.8 mM)을 각각 첨가한 1/10으로 희석한 LB 배지(Difco, USA)에 근권토양 현탁액을 10%(v/v) 접종하고, 30°C에서 180 rpm으로 배양하였다. 미생물 생장이 확인되면 각 중금속의 농도를 높은 1/10 LB 배지로 옮겨 배양하는 방법을 이용하여 점차적으로 중금속 농도를 높였다. 중금속은 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 시약을 이용하여 각 중금속의 stock 용액을 제조하여 배지에 첨가하였다. 중금속의 농도를 높은 배지에서 더 이상 배양이 관찰되지 않을 경우에는 직전 농도의 배양액을 같은 농도의 중금속이 포함된 1/10 LB-agar plate에 100 μL 씩 접종하여 30°C에서 배양하여 얻은 균주를 해당 중금속에 내성을 가진 균주로 분리하였다.

중금속 내성 근권세균의 indole acetic acid 생산능 비교

농화배양을 통하여 분리한 중금속 내성 근권세균 4종의 식물성 호르몬인 indole acetic acid(IAA) 생산능을 다음과 같은 방법으로 비교하였다. 균주를 각각 0.5 g L⁻¹의 tryptophane을 첨가한 DF 배지 5 ml에 접종하여(10%, v/v) 30°C에서 180 rpm으로 5일간 배양하였다. DF 배지의 조성은 다음과 같다: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g; KH_2PO_4 , 4 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 15 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 mg; B(as H_3BO_3), 10 μg ; Mn(as $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 11 μg ; Zn(as $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 125 μg ; Cu(as $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 78 μg ; Mo(as $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 17 μg ; distilled water, 1 L[10]. 각 근권세균의 배양액과 Salkowski's reagent(진한 황산 150 mL, 증류수 250 mL, 0.5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7.5 mL을 혼합한 용액)를 1:2의 비율로 섞은 후, 분홍색으로 발색되는 동안 상온에서 20분간 정치하였다. 발색되는 정도는 흡광광도계를 이용하여 530 nm에서 흡광도로 측정하였다. 3-indoleacetic acid($\text{C}_8\text{H}_6\text{N}-\text{CH}_2\text{COOH}$, SHOWA chemical Co., Japan) 시약을 이용하여 검량선을 작성하여 농도로 환산하였다. 각 균주의 IAA 생산능을 비교 평가하여 가장 우수한 SY-NiR1를 선택하였다.

SY-NiR1 균주 동정

16S rDNA의 부분 염기서열을 다음과 같이 분석하여 SY-NiR1를 동정하였다. SY-NiR1의 콜로니를 30 μL 의 0.5 N NaOH에 현탁시킨 후 95°C에서 30분간 가열하여 균체를 lysis 시켰고, 이에 따라 추출된 genomic DNA를 template로 하여 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. Universal primer인 27f(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AC-3')과 1492r(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT-3')를 사용하였다. DNA template 1 μL , primer 27f과 1492r를 각각 20 pmol, BSA를 0.5 mg mL⁻¹, dNTP를 0.2 mM, 10xbuffer 2.5 μL 를 넣고 dH₂O로 total volume을 25 μL 로

하였다. PCR 조건은 93°C에서 2분 동안 pre-denaturation한 후, denaturation 92°C 1분, annealing 55°C 1분, extension 68°C 45초 과정을 35 cycle 반복한 후, 72°C에서 2분 동안 최종 extension한 후 4°C holding 하였다. 증폭된 DNA의 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) algorithm을 이용하여 GenBank database와 비교하였다.

SY-NiR1에 의한 IAA 및 유기산 생산능

0.5 g L⁻¹의 tryptophane을 첨가한 DF 배지를 100 ml 삼각 플라스크에 50 mL 넣은 후, SY-NiR1 균주의 배양액을 10%(v/v)가 되도록 접종하였다. 균주의 전배양은 동일 배지에 SY-NiR1의 콜로니를 접종하여 30°C에서 180 rpm으로 배양하는 방법으로 하였다. 30°C에서 진탕 배양하면서(180 rpm) 하루에 한번씩 배양액을 2 mL씩 채취하였다. 상기에 기술한 방법을 이용하여 채취한 배양액에 Salkowski's reagent를 첨가하여 발색 시킨 후 IAA 농도를 측정하였다. 또한, 균주 생장을 모니터링하기 위해 배양액의 OD(흡광도)를 600 nm에서 측정하였다. 흡광도 값과 세균건조중량간의 환산식을 이용하여 흡광도 값을 세균건조중량으로 계산하였다[24].

30 g L⁻¹의 glucose를 첨가한 무기염 배지에서 2일간 전배양한 SY-NiR1 배양액을 동일 배지에 접종하여(1%, v/v) 30°C에서 160 rpm으로 교반 배양하였다. 무기염 배지의 조성은 다음과 같다: KH_2PO_4 , 1.5 g L⁻¹; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 9.0 g L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.0 g L⁻¹; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g L⁻¹; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g L⁻¹. 배양하는 동안 2일에 한번씩, 배양액을 5 mL씩 채취하여 흡광도(600 nm)와, pH 그리고 유기산의 농도를 측정하였다. 유기산 농도는 ion-chromatograph(Dionex, DX-500 with ED40 Electro-chemical Detector, IonPac AS11(4×250 mm) column, ASRS-Ultra II Anion self regenerating suppressor)를 이용하여 분석하였다.

SY-NiR1의 중금속 내성 평가

1/10 LB 배지를 이용하여 SY-NiR1 균주의 생장에 미치는 중금속의 영향을 다음과 같이 조사하였다. Cd 0.2~0.8 mM, Cr 0.01~0.2 mM, Cu 0.2~1.0 mM, Ni 1~9 mM, Pb 0.5~3.5 mM, 그리고 Zn 1~5 mM의 범위로 각 중금속을 첨가한 1/10 LB 배지에 SY-NiR1를 접종하여(1%, v/v), 30°C에서 3일 동안 배양하였다. 배양하는 동안 흡광광도계를 이용하여 시간별 흡광도(600 nm)를 측정하였다. 각 배지 조건에서 중금속이 균주 생장에 미치는 영향을 평가하기 위해 지수성장기에서의 비성장속도(specific growth rate)를 계산하였다. 또한 SY-NiR1 생장에 미치는 중금속 저해를 정량적으로 평가하기 위하여, 배양 60시간을 기준으로 SY-NiR1의 생장을 50% 저해하는 각 중금속 농도(EC₅₀)를 내삽법(interpolation regression analysis)을 이용하여 구하였다.

결 과

중금속 내성 근권세균의 분리 및 IAA 생산능 비교

Cd, Cr 및 Ni을 첨가한 배지에서 농화배양법에 의해 해당 중금속에 내성을 가지는 균주를 4종 분리하였다: Cd에 내성을 가지는 분홍색과 흰색의 colony를 형성하는 2 균주(SY-CdR1, SY-CdR2), Cr에 내성을 가지는 흰색 콜로니 형성 균주(SY-CrR1) 그리고 Ni에 내성을 가지는 분홍색 콜로니 형성 균주(SY-NiR1).

중금속에 내성이 있고 동시에 식물 성장 향상 능력을 지닌 근권세균을 스크리닝하기 위해 이들 균주를 대상으로 식물성 호르몬인 IAA 생산능을 평가하였다. 평가된 균주 모두 IAA를 생산하는 능력을 가지고 있었으나, 특히 Ni에 내성을 가진 균주인 SY-NiR1이 5일의 배양기간 동안 가장 많은 IAA를 생산하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 그 다음으로는 SY-NiR1 균주와 같은 분홍색의 콜로니를 형성하는 SY-CdR1로 SY-NiR1 균주가 생산한 IAA의 약 1/4 수준의 IAA를 생산하였으며, SY-CdR1과 SY-CrR1균주는 상대적으로 매우 낮은 IAA 생산능을 보였다.

SY-NiR1 균주 동정 및 특성

중금속에 대해 내성을 지니고 식물 성장 향상 능력 중의 하나인 IAA 생산능이 상대적으로 가장 우수한 SY-NiR1 균주의 16S rDNA 부분 염기서열을 분석한 결과, α -Proteobacteria의 *Methylobacterium fujisawaense*(Accession no. AB175634)와 유사도가 100%(754/754)인 것으로 나타났다. 또한 분홍색의 콜로니를 형성하는 SY-NiR1를 주사전자현미경으로 관찰한 결과 막대(rod) 모양이었다. SY-NiR1 균주의 부분 염기서열을 Genbank에 등록하였다(accession no. EF364431).

배양 시간에 따른 SY-NiR1의 IAA 생산 특성을 조사한 결과를 Fig. 2에 도시하였다. SY-NiR1 균주의 의하여 최종

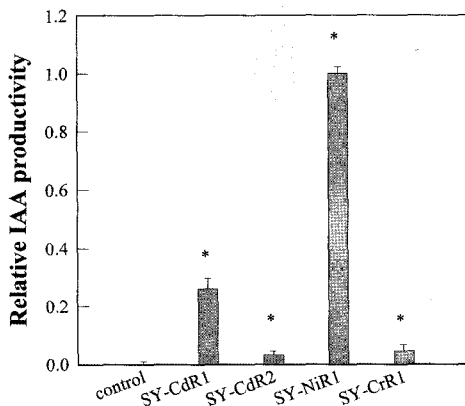


Fig. 1. Relative IAA productivity of heavy metal resistant isolates. Star(*) means the difference from control ($p < 0.05$), that is, the sample with star has the IAA production ability.

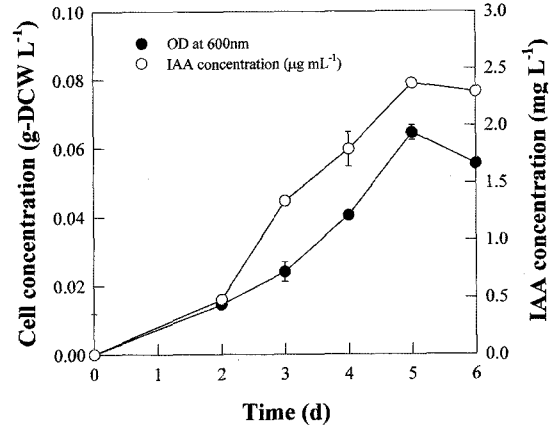


Fig. 2. Time courses of IAA and the cell concentrations of SY-NiR1 in the modified DF medium containing L-tryptophan.

적으로 생산된 IAA의 농도는 약 2.3 mg L^{-1} 이었으며, 균주의 성장에 비례하여 배지 내 IAA 농도도 증가하였으며, 균주의 생장이 정체기에 들어서면서 IAA 농도 또한 더 이상 증가하지 않았다.

30 g L^{-1} 의 glucose를 첨가한 무기염배지에서 SY-NiR1를 배양한 결과, 균주가 성장함에 따라 배양액의 pH는 약 7.0에서 6.0으로 감소하였다(Fig. 3(a)). 또한, 배양 시간별로 채취한 배양액 중의 유기산의 농도를 측정된 결과, 배양 초기 glucose가 가수분해되어 oxalic acid와 maleic acid의 초기 농도가 각각 2113 mg L^{-1} , 1253 mg L^{-1} 이었으나, 시간이 경과함에 따라 이들 유기산을 SY-NiR1 균주가 탄소원으로 사용하여 그 농도가 감소되었다. 이렇게 유기산의 농도가 증가하였다가 감소하는 현상이 반복되는 것으로 관찰되었다(Fig. 3(b)). 전체적으로 보았을 때 이들 유기산 성분의 농도는 점차적으로 증가하였다. 따라서 사용되는 유기산에 비하여 생산되는 유기산의 농도가 더 크다는 것을 의미하며, 이로 인하여 배양액의 pH가 감소된 것으로 보인다. 그 외 나머지 유기산 중에서는 succinic acid가 생산되었는데, 배양 13일째 농도가 119 mg L^{-1} 이었다.

SY-NiR1 균주의 중금속 내성능

SY-NiR1 균주를 대상으로 6 종류의 중금속(Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn)에 대한 내성능을 각각의 중금속 농도 변화에 따라 조사하였다. Cd와 Zn의 농도에 따른 SY-NiR1의 성장 곡선을 Fig. 4에 나타내었다. 중금속을 넣지 않은 대조군에 비하여 중금속이 첨가된 배지에서 균주의 생장은 저해를 받는 것으로 나타났다. 중금속의 농도가 증가함에 따라 저해 정도가 커졌는데, 정체가 길어져 지수생장기에 도달하는 시간이 증가하였다. 또한 SY-NiR1 균주는 Cd 0.6 mM , Cr 0.15 mM , Cu 1.0 mM , Ni 4 mM , Pb 1.0 mM , Zn 5 mM 의 농도 범위까지 생장이 가능하였다(결과 미 제시). 대조군에서의 비성장속도는 0.05 h^{-1} 로 나타났으나, 중금속 농

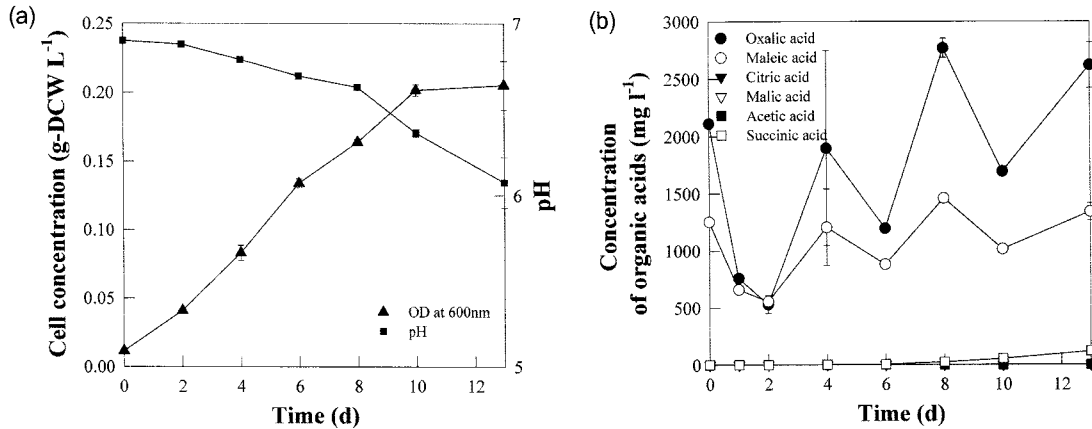


Fig. 3. Time courses of pH, the cell concentrations of *Methylobacterium* sp. SY-NiR1, and the concentration of organic acids.

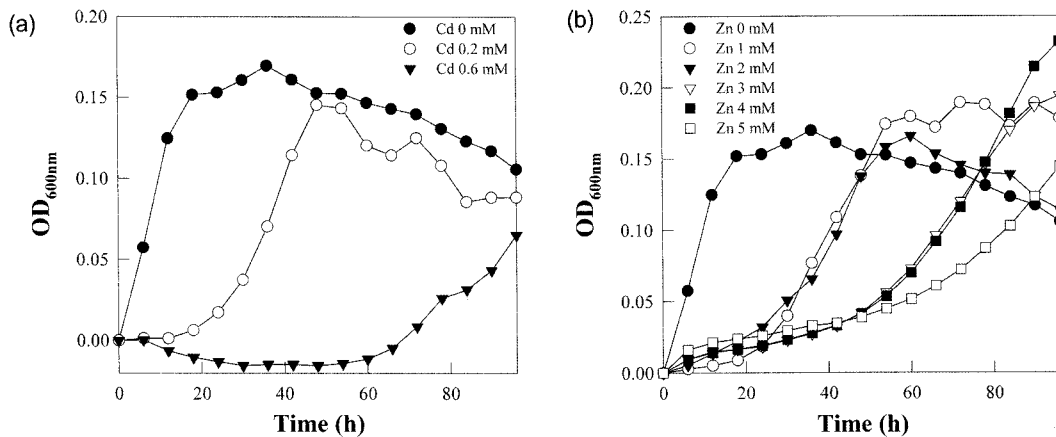


Fig. 4. Growth curve of *Methylobacterium* sp. SY-NiR1 in the liquid medium amended with heavy metal. (a) Cd; (b) Zn.

도가 증가할수록 감소하였다. 각각 중금속에 따른 SY-NiR1 균주의 비성장속도는 Cd 0.6 mM에서 0.02 h⁻¹, Cr 0.15 mM에서 0.01 h⁻¹, Cu 1.0 mM에서 0.005 h⁻¹, Ni 4 mM에서 0.025 h⁻¹, Pb 1.0 mM에서 0.012 h⁻¹, Zn 5 mM에서 0.015 h⁻¹ 수준으로 나타났다. 배양 60시간을 기준으로 SY-NiR1의 생장을 50% 저해하는 각 중금속 농도인 EC₅₀ 값을 Table 1에 나타내었다. Cd와 Cr에 대한 SY-NiR1의 EC₅₀은 각각 0.34, 0.14 mM로 낮았으며, Ni와 Zn에 대한 EC₅₀은 각각 1.52, 2.99 mM로 높게 나타났다(Table 1). EC₅₀을 기준으로 보았을 때, 각 중금속에 대한 SY-NiR1 균

주의 내성 크기는 Zn > Ni > Cu > Pb > Cd > Cr 순으로 나타났다.

고찰

본 연구에서 장기간 중금속으로 오염된 토양에서 자생하고 있던 4 종류 식물의 근권토양으로부터 토착의 중금속 내성 균주를 농화배양법에 의해 얻고 그 중에서 식물 성장 향상 능력 중의 하나인 IAA 생산능이 가장 우수한 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1 균주를 순수 분리하였다. *Methylobacterium* 속에 속하는 세균은 절대 호기성이며 Gram-negative, 그리고 막대 모양의 세균으로 serine pathway를 통해 메탄올(methanol)과 다른 환원된 화합물들을 이용하는 조건적 메틸 영양체(facultative methylotroph)로 알려져 있다[14]. α -Proteobacteria로 분류되는 *Methylobacterium* 은 대부분 분홍색 혹은 붉은 색의 색소를 형성하는데 이는 카로테노이드(carotenoids)를 합성하기 때문이다[16]. 이들 분홍색 색소를 내는 조건적 메틸 영양체(pink-pigmented facultative methylotrophs, PPFMs)는 자연계에 널리 분포하

Table 1. EC₅₀ at 60 hours of exposure to heavy metals.

Heavy metal	EC ₅₀ (mM)
Cd	0.34
Cr	0.14
Cu	0.89
Ni	1.52
Pb	0.78
Zn	2.99

고 있으며, 특히 식물과 관련하여 밀접한 관계를 형성하고 있는 것으로 밝혀졌다[2, 5, 17, 29, 30]. *Methylobacteria*는 식물의 기공(stomata)에서 배출되는 메탄올을 이용하기 위하여 [32], 식물 표면에 서식하거나[5, 6, 17], 식물 세포 내부나 조직 내에 endophytes로서 서식한다고 보고되었다[2, 18, 30]. 또한, 콩과 식물의 뿌리에 nodule을 형성하고, 식물에 질소를 고정하는 등 뿌리혹세균(rhizobia)과 비슷한 역할을 수행한다는 연구결과도 있다[23, 43]. 또한, PPFMs는 식물의 근권에서 높은 분포율을 보이는데[18], 이는 식물과 *Methylobacterium* 사이의 상리공생적 상호관계에 의한 것으로 식물이 *Methylobacterium*에 탄소원 및 에너지원으로 메탄올을 제공하면, *Methylobacterium*은 식물에 식물성호르몬이나 비타민 등을 제공하여 씨앗의 발아와 생장에 도움을 준다[4, 16, 31, 36]. 일부 *Methylobacterium*은 IAA[9, 22, 42]나 cytokinins[21]을 생산하는 것으로 발표되었으며, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC) deaminase 활성을 가지고 있어 식물의 스트레스를 감소시켜 주거나[21, 34], 철 공급체인 siderophores를 합성하기도 한다[3, 18].

많은 토양 미생물, 그 중에서도 근권세균은 옥신(auxins)의 일종인 IAA를 생산하는 능력을 가지고 있다[11, 28]. Doronina 등은 IAA를 생산하는 능력을 가지는 메탄올자화균(methylotrophic bacteria)들은 적게는 $1.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ 에서 많게는 $95.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ 의 IAA를 생산한다고 보고하였다[9]. Ryu 등의 연구에서는 2 종류의 *Methylobacterium* spp가 7일 동안 각각 $2.33 \mu\text{g mL}^{-1}$, $4.03 \mu\text{g mL}^{-1}$ 의 IAA를 생산하였다[42]. 본 연구에서 분리균주인 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1도 기존 연구 결과와 유사하게 5일 배양 기간 동안 총 $2.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ 의 IAA를 생산하였다(Fig. 2). 이러한 IAA는 저농도로 작용할 때에는 주근의 성장을 촉진시키며, 고농도로 작용할 때에는 식물의 성숙과 노화를 조절하는 식물생장호르몬의 일종인 에틸렌의 합성을 유도하여 주근의 성장을 제한하고 잔뿌리의 성장을 유도한다[7]. 일부 연구에 의해 IAA 혹은 cytokinins과 같은 식물생장호르몬 생산능이 있는 *Methylobacterium* spp.을 접종하여 식물의 생장이 촉진됨이 관찰되었다[31, 32, 35]. 따라서 본 연구에서 분리한 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1과 같은 근권세균을 식물과 함께 접종원하면, IAA의 생합성 및 분비로 인하여 식물 생장이 촉진될 것으로 기대된다.

Methylobacterium sp. SY-NiR1는 glucose을 기질로 성장하면서 oxalic acid와 maleic acid 같은 유기산을 탄소원으로 이용할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). *Methylobacterium*과 같은 PPFMs는 식물로부터 메탄올을 탄소원으로 공급받기도 하고, 식물이 배출해 내는 소량의 탄수화물(carbohydrates), 혹은 유기산을 탄소원으로 이용할 수 있다[1]. 한편, *Methylobacterium* sp. SY-NiR1에 의한 유기산 생산량이 소비량보다 크기 때문에 배양 시간이 경과할수록 배지 중에 유기산의 농도가 점점 증가하였다(Fig. 3). 중금속이나 인

과 같은, 토양 입자나 유기물질 등에 강력하게 흡착되어 있어 생물학적 이용도가 낮은 물질들은 식물의 뿌리 혹은 많은 토양 미생물이 배출해내는 acetic acid, oxalic acid, fumaric acid, citric acid, tartaric acid와 같은 저분자의 유기산 성분들에 의하여 가용화된다[33, 41]. 따라서 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1이 생산하는 유기산에 의하여 토양의 pH가 감소되고 토양 입자 등에 흡착되어 있던 중금속이 가용화 상태로 용출되어, 중금속의 식물체 내부로의 축적을 향상시킬 수 있을 것이다. 또한, 식물 생장의 제한요소인 인의 생물학적 이용도를 높여 식물의 영양학적 관점에서 보았을 때에도 유리한 효과를 줄 것이라 사료된다.

중금속 과축적 식물의 근권부에서는 상대적으로 많은 양의 중금속이 가용화 상태로 전환되어 중금속의 생물학적 이용도가 증가되며[25, 33, 41], 이러한 중금속 과축적 식물의 특이적 근권 환경으로 인하여 중금속에 내성을 가진 근권세균에 의한 군집구조가 선택적으로 형성된다[19]. Idrish 등의 연구에 의하면 Ni 과축적 식물인 *Thlaspi goesingense*의 근권에 다양한 미생물 군집이 형성되어 있었으며, 다양한 Ni 내성 균주들이 *Methylobacterium* 속에 속하는 것(*M. mesophillicum*, *M. extorquens* 그리고 *M. goesingense*)으로 나타났다[18]. *M. mesophillicum*, *M. goesingense*로 분류된 균주들을 대상으로 Ni, Cd, Co, Zn, Cr에 대한 내성 실험을 수행한 결과, Ni, Zn, Co, Cd 순으로 내성이 높았고, Cr에 대한 내성은 가지고 있지 않았다. 또한, *M. extorquens*로 분류된 균주들의 경우, Ni, Zn, Cr에는 내성을 가지고 있었으나, Cd과 Co에 대한 내성은 없었다[19]. Zn-Pb 광산 및 제련소 주변의 Zn 과축적 식물 *T. caerulescens*으로부터 Zn, Cd, Co, Ni에 대한 높은 내성을 가진 *Methylobacterium*들을 분리한 연구결과도 있다[30]. 본 연구에서 분리한 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1 균주 역시, 다양한 중금속(Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn)에 대하여 내성을 가지고 있었다. SY-NiR1의 성장을 50% 저해하는 중금속 농도인 EC_{50} 를 기준으로 보면 SY-NiR1 균주는 Zn에 대해 내성이 가장 크고, 그 다음이 Ni, Cu, Pb, Cd, Cr 순이었다(Table 1).

토양 내 중금속의 생물학적 이용도가 증가하면 토양 미생물의 세포 내로 유입되어 미생물에 미치는 중금속 독성의 정도는 증가한다[40]. Gram-negative 세균의 세포벽 구조성분인 lipopolysaccharides은 중금속의 세포벽으로의 흡착(biosorption)을 유도하여, 중금속의 세포 내부로의 유입을 막아 그 독성이 세포 내 대사과정에 직접적으로 영향을 주지 않게 하며 이러한 기작을 통하여 중금속에 대한 내성도가 증가될 수 있다[27, 44]. Roane의 연구에서는 중금속으로 오염된 토양으로부터 남에 내성을 가지는 두가지 균주를 분리하였는데, 두 균주의 내성 기작이 서로 달랐다. *Pseudomonas marginalis*는 exopolymer를 이용하여 남을 세포 밖에 고정(extracellular exclusion)시키는 기작을 이용하였고, 이러한 exopolymer은 중금속의 존재에 상관없이 생성되었다. 반면,

*Bacillus megaterium*은 세포 내에 납을 분리 및 축적하는 기작(intracellular mechanism)을 이용하였으며, 이 기작은 중금속 유무에 따라 의존적이었다[40]. Díaz-Raniña와 Bääth는 토양의 미생물 군집의 중금속에 대한 내성이 증가되는 주요 기작을 다음과 같이 설명하였다: 중금속에 대하여 민감한 종들은 그 독성에 의하여 사멸하고, 자연스럽게 중금속에 내성을 가지면서 생존에 경쟁력이 있는 종만이 살아남게 되며, 유전적 변이나 생리적 변화를 거치면서 중금속 독성에 적응한 미생물 군집이 우점한다[8]. 본 연구에서 분리한 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1 균주는 앞서 언급하였듯이 Gram-negative의 PPFMs로[14], 세포벽의 lipopolysaccharides에 중금속이 흡착되는 기작에 의하여 중금속에 대한 내성도가 증가되었을 것이라 사료되며, 장기간 중금속 오염 토양에서 서식하면서 자연적인 유전적 변이가 유도되었을 가능성도 있다.

결론적으로 본 연구에서 분리한 중금속에 내성을 가지는 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1은 식물로부터 메탄올이나 유기산과 같은 탄소원 및 서식처를 제공받으며, 식물생장호르몬인 IAA를 합성하여 식물의 성장을 향상시키는 능력을 가지고 있었다. 따라서 중금속으로 오염된 토양을 정화하고자 할 때, 적당한 중금속 과축적 식물과 함께 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1 균주를 적용한다면, 식물이 중금속 독성에 의한 스트레스에 대항하는데 도움을 줄 수 있어 식물이 보다 많은 중금속을 흡수, 축적하여 정화 효율이 증가 될 수 있을 것으로 기대된다. 또한, *Methylobacterium* sp. SY-NiR1 균주는 다양한 종류의 중금속에 대한 내성을 가지고 있으므로 고농도의 중금속으로 오염된 토양에도 활용 가능하리라 사료된다.

요 약

중금속으로 오염된 토양을 정화하기 위한 rhizoremediation 기법에서 식물이 중금속을 흡수하고 이동시키는 효율을 증가시키기 위하여 토양 미생물 특히, 근권세균의 역할이 중요하다. 이를 위하여 본 연구에서는 정유공장 주변의 유류 및 중금속으로 장기간 오염된 토양에서 서식하는 4가지 식물의 근권토양으로부터 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1 균주를 분리하였다. 분리한 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1은 분홍색 콜로니 형성, 막대모양 및 α -proteobacteria에 속하는 특성으로 보아 pink-pigmented facultative methylotroph인 것으로 사료된다. 이 균주는 식물성호르몬인 indole acetic acid (IAA) 생산능을 가지고 있으며, 카드뮴, 크롬, 구리, 납, 니켈 그리고 아연 등과 같은 다양한 중금속에 대하여 내성을 가지고 있었으며, EC₅₀을 기준으로 한 SY-NiR1의 중금속에 대한 내성은 Zn > Ni > Cu > Pb > Cd > Cr 순이다. 따라서 본 연구에서 분리한 *Methylobacterium* sp. SY-NiR1균주는 중금속으로 오염된 토양에서 식물의 발아, 성장 및 발달을 도

와 식물의 중금속 흡수를 증가시켜 rhizoremediation 효율을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초 연구지원사업(R01-2005-000-10268-0)과 차세대 바이오 환경기술 연구센터(AEBRC, R11-2003-006)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Abdoulaye, S., A. C. J. Timmers, C. Knief, and J. A. Vorholt. 2005. Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7245-7252.
2. Araújo, W. L., J. Marcon, W. Jr. Maccheroni, J. D. van Elsas, J. W. L. van Vuurde, and J. L. Azevedo. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4906-4919.
3. Bar-Ness, E., Y. Hadar, Y. Chen, A. Shanzer, and J. Libman. 1992. Iron uptake by plants from microbial siderophores. *Plant Physiol.* **99**: 1329-1335.
4. Basile, D. V., M. R. Basile, Q. -Y. Li, and W. A. Corpe. 1985. Vitamin B₁₂-stimulate growth and development of *Jungmannia leiantha* Grolle and *Gymnocolea inflata* (Huds.) Dum.(Hepaticae). *Bryologist* **88**: 77-81.
5. Corpe, W. A. 1985. A method for detecting methylotrophic bacteria on solid surfaces. *J. Microbiol. Ecol.* **62**: 243-250.
6. Corpe, W. A. and S. Rheem. 1989. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* **62**: 243-250.
7. Davies, P. J. 1995. The plant hormone concept: Concentration, sensitivity, and transport, pp. 13-18. In: P. J. Davies(ed.), *Plant hormones: Physiology, biochemistry, and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
8. Díaz-Raniña, M. and E. Bääth. 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2970-2977.
9. Doronina, N. V., E. G. Ivanova, and Yu. A. Trotsenko. 2002. New evidence for the ability of methylotrophic bacteria and methanotrophs to synthesize auxins. *Microbiology* **71**: 116-118.
10. Dworkin, M. and J. W. Foster. 1958. Experiments with some microorganism which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.* **75**: 592-603.
11. Fett, W. F., S. F. Osman, and M. F. Duun. 1987. Auxin production by plant-pathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1839-1845.

12. Foster, T. J. 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Rev.* **47**: 361-409.
13. Gadd, G. M. 1992. Microbial control of pollution, pp. 59-88. Cambridge Press, Cambridge.
14. Green, P. N. 1992. The genus *Methylobacterium*, pp. 2342-2349. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer(eds), *The prokaryotes*, second ed, Springer, Berlin, Germany.
15. Heggo, A. and J. S. Angel. 1990. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybean. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 865-869.
16. Hiraishi, A., K. Furuchi, A. Matsumoto, K. A. Koike, M. Fukuyama, and K. Tabuchi. 1995. Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2099-2107.
17. Holland, M. A. and J. C. Polacco. 1994. PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant. *Plant Physiol.* **45**: 197-209.
18. Idris, R., R. Trifonova, M. Puschenreiter, W. W. Wenzel, and A. Sessitsch. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2667-2677.
19. Idris, R., M. Kuffner, L. Bodrossy, M. Puschenreiter, S. Monchy, W. W. Wenzel, and A. Sessitsch. 2006. Characterization of Ni-tolerant methylobacteria associated with the hyperaccumulating plant *Thlaspi goesingense* and description of *Methylobacterium goesingense* sp. nov., *Syst. Appl. Microbiol.* **29**: 634-644.
20. Ietswaart, J. H., W. A. J. Griffioen, and W. H. O. Ernst. 1992. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1225-1228.
21. Ivanova, E. G., N. V. Doronina, A. O. Shepeliakovskaia, A. G. Laman, F. A. Brovko, and Y. A. Trotsenko. 2000. Facultative and obligate aerobic methylobacteria synthesize cytokinins. *Microbiology* **67**: 646-651.
22. Ivanova, E. G., N. V. Doronina, A. O. Shepeliakovskaia, A. G. Laman, F. A. Brovko, and Y. A. Trotsenko. 2001. Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiology* **70**: 392-397.
23. Jaftha, J. B., B. W. Strijdom, and P. L. Steyn. 2002. Characterization of pigmented methylotrophic bacteria which nodulate *Lotononis bainesii*. *Appl. Microbiol.* **25**: 440-449.
24. Kim, T. J., E. Y. Lee, Y. J. Kim, K. S. Cho, and H. W. Ryu. 2003. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 411-417.
25. Krishnamurti, G. S. R., G. Cieslinski, P. M. Huang, and K. C. J. Van Rees. 1997. Kinetics of cadmium release from soils as influenced by organic acids: Implication in cadmium availability. *J. Environ. Qual.* **26**: 271-277.
26. Kumino, T., K. Seaki, K. Nagaoka, H. Oyaizu, and S. Matsumoto. 2001. Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *Eur. J. Soil Biol.* **37**: 95-102.
27. Langley, S. and T. J. Beveridge. 1999. Effect of O-side-chain-lipopolysaccharide chemistry on metal binding. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 489-498.
28. Libbert, E., S. Wichner, U. Schiewer, H. Risch, and W. Kaiser. 1966. The influence of epiphytic bacteria on auxin metabolism. *Planta* **68**: 327-334.
29. Lidstrom, M. E. and L. Christoserdova. 2002. Plants in the pink: cytokinin production by *Methylobacterium*. *J. Bacteriol.* **184**: 1818.
30. Lodewyckx, C., M. Mergeay, J. Vangronsfeld, H. Clijsters, and D. Van der Lelie. 2002. Isolation, characterization, and identification of bacteria associated with the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *Calaminaria*. *Int. J. Phytoreme.* **4**: 101-105.
31. Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, M. Senthilkumar, S. Seshadri, H. Y. Chung, and J. C. Yang. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **45**: 315-324.
32. Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, J. Ryu, and T. Sa. 2006. Regulation of ethylene levels in canola (*Barassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta* **224**: 268-278.
33. Mench, M. and E. Martin. 1991. Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabbaccum* L., and *Nicotiana rustica* L. *Plant Soil* **137**: 187-196.
34. Nemecek-Marshall, M., R. C. MacDonald, J. J. Franzen, C. L. Wojciechowski, and R. Fall. 1995. Methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development. *Plant Physiol.* **108**: 1359-1368.
35. Omer, Z. S., R. Tombolini, A. Broberg, and B. Gerhardson. 2004. Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. *Plant Growth Regul.* **43**: 93-96.
36. Omer, Z. S., R. Tombolini, and B. Gerhardson. 2004. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**: 319-326.
37. Rajkumar, M., R. Nagendran, K. J. Lee, W. H. Lee, and S. Z. Kim. 2005. Influence of plant growth promoting bacteria and Cr⁶⁺ on the growth of Indian mustard. *Chemosphere* **62**: 741-748.
38. Reber, H. H. 1992. Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. *Biol. Fertil. Soils* **13**: 181-186.
39. Roane, T. M. and S. T. Kellogg, 1996. Characterization of bacterial communities in metal-contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* **42**: 593-603.
40. Roane, T. M. 1999. Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal-contaminated soils. *Microb. Ecol* **37**: 218-224.
41. Robert, M. and J. Berthelin. 1994. Role of biological and biochemical factor in soil mineral weathering. In: P.M. Huang, M. Schnitzer(eds.), *Interaction of soil minerals with*

- natural organic and microbes. Soil Sci. Soc. Amer, Madison, WI.
42. Ryu, J., M. Madhaiyan, S. Poonguzhali, W. Yim, P. Indiragandhi, K. Kim, R. Anadham, J. Yun, and T. Sa. 2006. Plant growth substances produced by *Methylobacterium* spp. and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and red pepper (*Capsicum annum* L.) growth. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 1622-1628.
43. Sy, A., E. Giraud, P. Jourand, N. Garcia, A. Willems, P. de Lajudie, Y. Prin, M. Neyra, M. Gillis, C. Boivin-Masson, and B. Dreyfus. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* **183**: 214-220.
44. Valls, M. and V. de Lorenzo. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 327-338.

(Received Feb. 28, 2006/Accepted Mar. 15, 2007)