

Brassica rapa subsp. *pekinensis* 근권 서식 미생물의 기질이용 활성 조사

정 세 라 · 김 승 범^{1,*}

충남대학교 보건바이오산업대학원 보건바이오산업학과

¹충남대학교 생명과학부 생명과학과

Analysis of Community Level Physiological Profiles in the Rhizosphere of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis*

Sera Jung and Seung Bum Kim^{1,*}

Graduate School of Public Health and Biotechnology

¹Department of Biological Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract – The community size of culturable heterotrophic bacteria and community level physiological profiles (CLPP) in the rhizosphere of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* (Chinese cabbage) were analyzed in two different sites. The average community size of culturable heterotrophic bacteria ranged between 2.65×10^6 CFU g⁻¹ soil (Suwon) and 3.75×10^6 CFU g⁻¹ soil (Yesan), whereas those of bulk soils ranged between 2.45×10^6 CFU g⁻¹ soil (Suwon) and 2.97×10^6 CFU g⁻¹ soil (Yesan). The average functional richness of Suwon rhizosphere was 90.8, whereas that of Yesan rhizosphere was 154.1. High level of correlation was found between the community size and functional richness. The most actively utilized substrates in both rhizospheres were adonitol, L-asparagine, D-gluconic acid, L-glutamic acid and D-galacturonic acid. Clear differences were seen in the utilization patterns between the two sites. Differences were also observed for the patterns of bulk soils between the two sites, although D-raffinose and D-mannose were found as the commonly utilized substrates.

Key words : *Brassica rapa* subsp. *pekinensis*, rhizosphere, viable count, community level physiological profile

서 론

십자화과 (*Brassica* family)에는 유채 (oilseed rape), 겨자 (mustard), 케일 (kale), 브로콜리 (broccoli), 콜리플라워 (cauliflower), 배추 (Chinese cabbage, 학명 *Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) 등 주요 농작물이 포함되어 있다. 이중

배추는 한국에서 가장 중요한 작물의 하나이다.

식물의 생장에 미생물이 미치는 영향은 매우 지대하며, 식물 내부 및 외부에서 식물과 상호작용을 하는 미생물은 다양한 기질을 통하여 식물의 생장에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Shin *et al.* 2007). 특히 근권서식 세균 (rhizobacteria)은 auxin, cytokinin, gibberellin 등 식물 성장호르몬의 분비, 항생물질이나 siderophore, 또는 균류의 세포벽 분해 효소 분비 등을 통한 식물 병원성 미생물에 대한 길항작용, 질소 고정, 식물 ethylene의 감

* Corresponding author: Seung Bum Kim, Tel. 042-821-6412, Fax. 042-822-7367, E-mail. sbk01@cnu.ac.kr

소 등의 작용을 통하여 식물의 성장을 촉진할 수 있다 (Glick 1995; Jeon *et al.* 2003; Shin *et al.* 2007).

하지만 이러한 중요성과는 달리 지금까지 배추와 연관된 미생물상에 대한 연구는 사실상 전무하며, *Brassica* 속 식물과 연관된 미생물상에 대한 연구 역시 많지 않다. Liao *et al.* (2007)은 미생물 총량 (microbial biomass) 및 인지질 지방산 (phospholipid fatty acids) 분석을 이용하여 백경채 (*Brassica chinensis*) 근권에서 남 성분이 근권 미생물상에 미치는 영향을 조사한 바 있다. 유채 (*Brassica napus*) 관련 미생물에 대한 연구는 여러 사례가 있으며, 이중 Kaiser *et al.* (2001)은 16S rDNA 클론 분석 및 배양의존적 분석을 통하여 근권 미생물 군집구성을 비교적 자세히 조사하였다. 다른 연구로는 유전자변형 유채 및 통상재배종 유채의 근권 미생물상을 군집 생리활성 (community level physiological profiles, CLPP), 군집 지방산에스터 (fatty acid methyl ester) 분석, T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 분석 등을 통하여 상호비교 한 사례도 있다 (Dunfield and Germida 2003). 한편 유채를 포함한 식물 근권 미생물의 주요 군집 및 군집구성의 변화 양상을 denaturing gradient gel electrophoresis 기법을 이용하여 조사하기도 하였다 (Smalla *et al.* 2001).

본 조사에서는 격리포장에서 재배중인 배추에서 근권의 종속영양세균 밀도 및 군집수준의 생리활성 (community level physiological profile)을 측정하고, 이로부터 기질 이용 경향을 파악하며, 나아가 종속영양세균 밀도와 생리활성 간의 연관성에 대하여 알아봄으로써 배추 근권 미생물 군집에 대한 이해를 높이고자 하였다.

재료 및 방법

1. 근권시료 채취

농촌진흥청의 수원 포장 (경기도 수원시 권선구 수원으로 150) 및 충청남도 농업기술원의 포장 (충남 예산군 신암면 중경리 365)에서 각각 재배된 삼진 배추 시료를 2006년 6월에 채취하였다. 배추는 70여 일간 재배되어 수확 직전의 개체를 채집하였다. 덩어리 흙을 제외하고, 뿌리에 바로 부착되어 있는 토양을 수집하여 근권시료를 확보하였고, 시료는 4°C를 유지하여 실험실로 운반, 분석하였다. 근권시료는 각각 2개의 시료를 채취하였다.

2. 종속영양세균 밀도 측정

배양에 의한 종속영양세균의 밀도는 Park *et al.* (2005)

의 방법을 이용하였다. 연속 희석된 시료를 영양한천배지 (nutrient agar)에 접종하였고, 배지는 28°C에서 2일간 배양한 후 단일콜로니들을 계수하였다. 계수는 2개의 연속 희석배수에서 각 희석 배수당 2개의 배지로부터 실시하여 평균을 구하였다.

3. 군집수준 생리활성 (community level physiological profile, CLPP) 측정

군집수준 생리활성 (CLPP)은 종속영양세균 계수에 이용하였던 희석시료를 다시 이용하였다. Biolog GN2 microplate (Biolog, USA)에 희석시료를 접종하여 암소에서 28°C에서 7일간 배양하였고, 각 well의 590 nm에서의 흡광도를 Microlog 4.2 microplate reader (Biolog, USA)를 이용하여 측정하였다. 평균 발색도 (average well color development, AWCD)는 Garland and Mills (1991)의 방법에 의하였다.

$$AWCD = [\sum(C - R)] / n$$

(*C*, 각 well의 흡광도; *R*, control well의 흡광도; *n*, 기질 수 [=95]).

이로부터 계산된 AWCD를 이용하여 Biolog microplate의 측정치를 나누어 표준화하였다. 기능풍부도 (functional richness)를 측정하기 위하여 각 well의 양성반응을 590 nm에서 0.25 이상으로 정의하였고, 각 시료의 기능풍부도는 해당 데이터 중 양성반응의 흡광도의 합으로 나타내었다. 근권시료로부터는 2개, 토양시료로부터는 1개의 plate를 이용하여 측정치를 얻었다.

결 과

1. 종속영양세균 군집 밀도

근권에서 측정된 종속영양세균 군집 밀도는 수원이 1.96 ~ 3.34 × 10⁶ CFU g⁻¹ soil (평균 2.65 × 10⁶), 예산이 3.40 ~ 4.10 × 10⁶ CFU g⁻¹ soil (평균 3.75 × 10⁶)로 예산의 측정치가 다소 높게 나타났다 (Table 1). 토양의 경우 수원이 2.45 × 10⁶ CFU g⁻¹ soil, 예산이 2.97 × 10⁶ CFU g⁻¹ soil로 각각 나타났다.

예산의 평균 종속영양세균 군집 밀도가 수원보다는 전반적으로 다소 높게 나타났다. 근권의 평균치는 3.20 × 10⁶ CFU g⁻¹ soil (표준편차 0.9 × 10⁶)였으며, 토양의 평균치인 2.71 × 10⁶ CFU g⁻¹ soil보다 다소 높게 나타났으나, 그 차이는 오차 범위 내에 있었다.

Table 1. Viable counts, number of positive tests and functional richness data from the CLPP analysis of *B. rapa* subsp. *pekinensis* rhizosphere

	Viable counts (CFU g ⁻¹ soil)		Positive tests ^a		Functional richness	
	Suwon	Yesan	Suwon	Yesan	Suwon	Yesan
Rhizosphere 1	1.96 × 10 ⁶	4.10 × 10 ⁶	56	87	61.4	170.1
Rhizosphere 2	3.34 × 10 ⁶	3.40 × 10 ⁶	84	82	120.2	138.1
Bulk soil	2.45 × 10 ⁶	2.97 × 10 ⁶	70	6	94.2	3.7

^aPositive tests are the number of tests with absorbance at 590 nm=0.25 or higher from the Biolog GN2 data, and functional richness is the sum of absorbances for all positive tests.

Table 2. The most actively utilized substrates

Collective	Suwon		Yesan	
	Rhizosphere ^a	Bulk soil	Rhizosphere ^a	Bulk soil
Adonitol (10.89) ^b	L-Asparagine (5.68)	D-Glucosaminic acid (3.22)	D-Trehalose (6.64)	D-Mannose (1.24)
L-Asparagine (10.62)	Adonitol (5.59)	D-Raffinose (3.02)	D-Raffinose (6.06)	D-Galactonic acid lactone (0.89)
D-Gluconic acid (10.03)	D-Gluconic acid (5.27)	D-Mannose (2.89)	D-Maltose (5.97)	D-Raffinose (0.54)
L-Glutamic acid (9.95)	D-Galacturonic acid (4.57)	D-Galacturonic acid (2.87)	D-Mannitol (5.97)	Malonic acid (0.41)
D-Galacturonic acid (9.52)	L-Glutamic acid (4.33)	Tween 40 (2.66)	α-D-Glucose (5.89)	Xylitol (0.34)

^aRhizosphere data are the averages of two estimates.

^bNumbers in parentheses indicate absorbance at 590 nm.

2. 균집의 기질 분해능

Biolog GN2 plate의 95개 기질에 대한 분해능 측정 결과 두 근권에서 공통적으로 가장 활발하게 분해된 5개의 기질은 adonitol, L-asparagine, D-gluconic acid, L-glutamine 및 D-galacturonic acid의 순으로 나타났다 (Table 2). 반면 두 근권에서 공통적으로 가장 약하게 분해된 5개의 기질은 α-cyclodextrin, 2,3-butanediol, L-leucine, α-keto butyric acid 및 acetic acid의 순으로 나타났다.

수원의 근권에서 가장 활발하게 분해된 5개의 기질은 L-asparagine, adonitol, D-gluconic acid, D-galacturonic acid 및 L-glutamic acid의 순으로 나타났으며, 예산 근권에서는 D-trehalose, D-raffinose, maltose, D-mannitol 및 α-D-glucose의 순으로 나타나 많은 차이를 보였다. 수원의 근권에서 가장 약하게 분해된 5개의 기질은 L-arabinose, α-cyclodextrin, formic acid, 2,3-butanediol 및 α-keto butyric acid의 순으로 나타났으며, 반면 예산 근권에서는 acetic acid, L-leucine, α-cyclodextrin, 2,3-butanediol 및 α-ketobutyric acid의 순으로 나타났다.

수원의 토양에서 가장 활발하게 분해된 5개의 기질은 D-glucosaminic acid, D-raffinose, D-mannose, D-galacturonic acid 및 Tween 40의 순으로 나타났으며, 예산 토양에서는 D-mannose, D-galactonic acid lactone, D-raffinose, malonic acid 및 xylitol의 순으로 나타났다. 수원의 토양에서 가장 약하게 분해된 5개의 기질은 D,L-carni-

thine, 2,3-butanediol, phenylethylamine, D-serine 및 itaconic acid의 순이었고, 예산 토양에서는 *i*-erythritol, D-melibiose, D-arabitol, succinic acid monomethyl ester, α-D-glucose-1-phosphate의 순으로 나타나 많은 차이를 보여주었다.

3. 균집의 기능 풍부도(functional richness)

수원의 2개 근권시료에서 590 nm에서의 흡광도가 0.25 이상의 양성반응을 보인 well의 수는 56 및 84개였고, 예산의 2개 근권시료에서는 87개 및 82개였다 (Table 1). 토양의 경우 수원은 70, 예산은 6개의 양성반응이 각각 검출되었다.

양성반응의 합에 기반한 기능 풍부도(functional richness)는 수원의 근권시료에서 각각 61.4 및 120.2, 예산의 근권시료에서 각각 170.1 및 138.1로 측정되었다. 토양에서는 수원의 경우 94.2, 예산의 경우 3.7로 나타났다.

고 찰

십자화속 (*Brassica* genus) 식물의 근권 미생물상에 대한 자료는 많지 않다. 비배양학적 방법(16S rDNA 클론 분석)을 이용한 방법으로 유채 (*Brassica napus* cv. Westar)의 근권 미생물상을 분석한 결과 *Alphaproteo-*

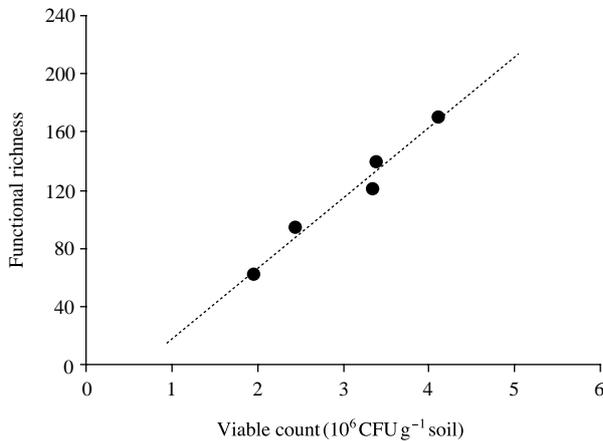


Fig. 1. Viable counts versus functional richness. The correlation coefficient was 0.986.

bacteria 및 Bacteroidetes가 주된 분류군으로 나타났으며, 이중 Bradyrhizobium sp.가 가장 많은 비중을 차지하였다 (Kaiser et al. 2001). 동일한 연구에서 배양에 의한 분석 결과는 Agrobacterium tumefaciens, Comamonas sp., Stenotrophomonas maltophilia 등 Proteobacteria에 속한 분류군들이 주로 나타남을 확인하였다. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 기법으로 Brassica napus L.의 근권을 분석한 결과에서는 Nocardia, Streptomyces 등의 방선균류가 주된 구성원으로 나타난 바 있다 (Smalla et al. 2001). 상기의 분류군들은 대부분 다양한 국내 식물의 근권에서의 존재가 널리 확인된 종류들로서 식물 생장에 영향을 미칠 수 있는 종류들을 포함하고 있다 (Park et al. 2005; Lee et al. 2006; Shin et al. 2007). 배추에서의 근권 미생물상에 대하여는 아직 구체적으로 조사된 바가 없어 향후 이의 연구가 필요하다.

본 조사에서 예산의 근권이 수원 근권에 비하여 전반적으로 다소 높은 종속영양세균 밀도를 보였으나, 배양법에 의한 생균수 측정의 오차를 생각하면 두 지역 간의 차이는 사실상 크다고 말할 수는 없을 것이다. 또한 근권의 군집 밀도가 비근권 토양에 비하여 약간 높게 나타났으나, 그 차이는 오차 범위 내에 들었으며, 따라서 근권과 토양 간의 차이 역시 분명하게 나타나지는 않았다. 지역 간 차이는 Biolog 데이터를 이용한 군집수준의 생리적 활성도 (CLPP)에서 보다 확연하게 나타나고 있다 (Table 1). 예산의 근권시료가 평균 154.1로 수원의 90.8보다 뚜렷이 높은 기능 풍부도 (functional richness)를 보였다. 한편 수원 토양시료는 94.2로 동 지역 근권과 차이를 보이지 않았다. 예산 토양 시료의 경우 양성 반응 및 기능 풍부도가 매우 낮게 측정되었는데, 그 원인은 확실하지 않으나 시료 내에 생리적 활성을 저해하

는 요인이 있었던 것으로 추정된다.

본 조사로부터 종속영양 군집 밀도와 기능 풍부도 사이에는 분명한 상관관계가 존재함을 확인하였다 (Fig. 1). 군집 밀도와 기능 풍부도 간의 상관계수는 0.986으로 측정되었다. 군집 크기와 생리적 활성도의 비례 관계는 군집 크기의 측정이 근권 미생물 군집의 이해에 있어 중요한 요소임을 보여주는 결과이다.

근권에서의 미생물 군집 밀도는 토양에서의 측정치와 큰 차이를 보이지 않았으나, 기능 풍부도는 상대적으로 뚜렷한 차이를 보여 근권 미생물 군집이 생리적으로 높은 활성을 가짐을 알 수 있었다.

적 요

Brassica rapa subsp. pekinensis (배추) 근권에 서식하는 종속영양세균의 군집 밀도 및 군집수준 생리활성을 2곳의 지역에서 각각 측정하였다. 근권의 종속영양세균군집 평균 밀도는 수원이 2.65×10^6 CFU g^{-1} soil, 예산이 3.75×10^6 CFU g^{-1} soil로 나타났고, 토양은 수원이 2.45×10^6 CFU g^{-1} soil, 예산이 2.97×10^6 CFU g^{-1} soil로 각각 나타났다. 평균 기능풍부도 (functional richness)는 수원이 90.8, 예산이 154.1로 각각 나타났다. 군집 밀도와 기능 풍부도 사이에는 밀접한 상관관계가 보였다. 양쪽 근권에서 가장 활발하게 분해된 기질은 adonitol, L-asparagine, D-gluconic acid, L-glutamic acid와 D-galacturonic acid 등이었으나, 수원과 예산 근권에서의 기질 분해 양상은 뚜렷한 차이를 보였다. 한편 두 곳의 토양 역시 어느 정도 차이를 보였으나, D-raffinose 및 D-mannose는 공통적으로 잘 분해되는 기질로 나타났다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청의 바이오그린 21 사업 (과제번호 20050901-034-001-06-00)의 지원에 의하여 이루어졌습니다.

참 고 문 헌

- Dunfield KE and JJ Germida. 2003. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). Appl. Environ. Microbiol. 69:7310-8.
- Garland JL and AL Mills. 1991. Classification and charac-

- terization of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2351-2359.
- Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- Jeon JS, SS Lee, HY Kim, TS Ahn and HG Song. 2003. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *J. Microbiol.* 41:271-276.
- Kaiser O, A Pühler and W Selbitschka. 2001. Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizoplane of oilseed rape (*Brassica napus* cv. Westar) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. *Microb. Ecol.* 42:136-149.
- Lee MS, JO Do, MS Park, S Jung, KH Lee, KS Bae, SJ Park and SB Kim. 2006. Dominance of *Lysobacter* sp. in the rhizosphere of two coastal sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *Antonie Leeuwenhoek* 90:19-27.
- Liao M, CL Chen, LS Zeng and CY Huang. 2007. Influence of lead acetate on soil microbial biomass and community structure in two different soils with the growth of Chinese cabbage (*Brassica chinensis*). *Chemosphere* 66:1197-205.
- Park MS, SR Jung, KH Lee, MS Lee, JO Do, SB Kim and KS Bae. 2005. Isolation and characterization of bacterial associated with two sand dune plants species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *J. Microbiol.* 43:219-227.
- Shin DS, MS Park, SR Jung, MS Lee, KH Lee, KS Bae and SB Kim. 2007. Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of coastal sand dune plants. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17:1361-1368.
- Smalla K, G Wieland, A Buchner, A Zock, J Parzy, S Kaiser, N Roskot, H Heuer and G Berg. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4742-51.

Manuscript Received: January 19, 2008

Revision Accepted: February 12, 2008

Responsible Editor: Sun Il Kwon