



Isolation of salt-tolerant bacteria from rhizosphere and rhizoplane of halophyte plant *Suaeda japonica* in Gochang·Buan tidal flat

Min-Gyu Ki¹ · Hyeri Lee¹ · Ahyeon Cho¹ · Tatsuya Unno² · Ji-Hoon Lee¹

고창·부안 갯벌에 자생하는 염생식물 칠면초 근권 및 근면으로부터 내염성 세균 분리와 그 특성화

기민규¹ · 이혜리¹ · 조아현¹ · 윤노타쯔야² · 이지훈¹

Received: 29 December 2016 / Accepted: 9 April 2017 / Published Online: 30 June 2017
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

Abstract Nine strains of high concentrations of salt-tolerant bacteria were isolated from the rhizosphere and rhizoplane of the halophyte plant *Suaeda japonica* grown in Gochang · Buan tidal flat. The isolated bacteria were classified as genera *Vibrio* (strains JRS-1, -2, -3, -4, and -5, and JRL-1 and -4) and *Bacillus* (strains JRL-2 and -3) based on the 16S rRNA gene sequence similarity. The optical growth condition for salt concentration was examined on the selected, representative strains. Strain JRS-1 with the closest relative of *Vibrio neocaledonicus* showed the highest growth rate at the total salt concentration of 6% among the incubation conditions of 3-8% salt concentrations. Strain JRL-2 with the closest relative of *Bacillus thuringiensis* showed the tendency that growth rate increased with increasing salt concentrations and the maximum growth rate at 7% of the total salt concentration. The isolated bacteria showed salt-resistances to higher salt concentrations than their habitat soils with 3%. In addition, we identified evidences of potentially plant interaction-relevant

enzymatic activities, from utilization of some substrates rich in plants, such as triglyceride, ρ -nitrophenyl- α ,D-glucoside, and ρ -nitrophenyl- β ,D-glucoside.

Keywords Halophyte · Rhizobacteria · Rhizoplane · Salt tolerance · *Suaeda japonica*

서론

염생식물은 일반적으로 염, 건조, 고온, 바람 등과 같은 환경스트레스에 좋은 면역성을 가진다고 알려져 있다(Mumms과 Tester 2008; Rodriguez 등, 2008; Yang 등, 2009). 이러한 환경스트레스 일부에 대한 저항 기작에 근권 및 근면, 내생 미생물들의 역할이 크고, 공생(symbiosis)을 통해 식물생장촉진물질의 생산, 질소고정, 항병원성 물질의 생산, 환경스트레스 저항성, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase 생산 등으로 생육에 직·간접적으로 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Reinhold 등, 1987; Lim 등, 1995; Glick 2003; Reva 등, 2004; Waller 등, 2005; You 등, 2012).

You 등(2011)은 서해안에 자생하는 갯메꽃의 뿌리로부터 8종의 내생진균을 분리하고 식물생장촉진검정을 하였고, You 등(2012)은 부안 갯벌에 자생하고 있는 염생식물의 뿌리로부터 다양한 내생 진균들을 분리 및 동정하였다. Park 등(2016)은 곰소 염전에 자생하는 통통마디의 뿌리로부터 24균주의 내생진균류를 분리하였다. 여러 환경적인 스트레스에 면역성을 갖는 내염식물 및 그 미생물과의 상호작용(공생)의 연구적, 산업적 가치에 대한 세계적인 관심이 증대되고 있으나, 세계적인 염습지를 보유

Ji-Hoon Lee (✉)
E-mail: jhlee2@jbnu.ac.kr

¹Department of Bioenvironmental Chemistry, Chonbuk National University, Jeonju, Republic of Korea

²Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하고, 다양한 자생 염생식물이 있음에도 불구하고 이에 대한 국내 연구는 미비한 실정이다. 또한 국내에는 간척지가 많은데, 농업 부지로의 활용을 위해서는 내염성이 강한 작물의 재배 및 개발이 필수적이다. 이를 위해 국내에 간척지 및 갯벌에 자생하는 염생식물과 공생 관계를 형성하고 있는 근권 및 근면, 내생 세균을 분리해, 향후 작물의 내염성 향상 기술개발에 활용하고자 하였다. 이에 이 연구에서는 세계 5대 갯벌 중 하나인 고창·부안 갯벌에 자생하는 칠면초(*Suaeda japonica*) 뿌리로부터 근권 및 근면 세균을 순수 분리하여 계통학적 분석을 통해 동정하였고, 분리된 내염성 세균의 염 농도에 대한 최적 성장 조건을 확인하였다. 이를 통해 국내 염생식물과 공생하는 세균자원을 확보하고, 향후 연구들을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

칠면초 채취 및 근권·근면·내생 세균 분리

전북 부안군 줄포면에 위치한 고창·부안 갯벌의 칠면초 군락을 형성하는 지점에서 칠면초를 뿌리 기준으로 반경 10 cm의 토양과 함께 채취하였다(Fig. 1). 채취된 칠면초 뿌리로부터 근권·근면·내생 세균을 분리하기 위해 다음과 같은 일련의 과정을 거쳤다(Gomes 등, 2001; Forchetti 등, 2007).

근권세균을 분리하기 위해 멸균된 핀셋을 이용하여 뿌리에 붙어있는 토양을 제거하고 멸균증류수로 씻어 내었다. 씻어낸 증류수에서 100 μ L를 취하여 30 g/L tryptic soy broth (TSB; BD, Sparks, MD, USA)에 20 g/L의 NaCl을 첨가한 한천배지에 평판도말한 뒤 28 °C에 배양하였다. 근면세균을 분리하기 위해 씻겨진 뿌리를 두 장의 멸균된 0.45 μ m cellulose acetate 여과지를 이용하여 뿌리 표면을 닦아 냈다. 닦아낸 여과지를 20 g/L NaCl이 첨가된 30 g/L TSB 한천배지에 부착해 28 °C에 배양하였다. 내생 세균의 분리를 위해, 여과지로 닦아낸 뿌리를 70%의 에탄올에 넣어 5분간 교반함으로써 뿌리 표면에 붙어 있는 세균을 배제하고자 하였다. 뿌리 표면 세균의 제거를 확인하기 위해 에탄올로 세척된 뿌리를 4차례 멸균증류수로 씻어 냈고, 사용된 증류수로부터 100 μ L를 취하여 TSB + 20 g/L NaCl 한천배지에 평판도말한 뒤 28 °C에 배양하였다. 뿌리 내

부에 존재하는 내생 세균을 추출하기 위해 멸균된 핀셋을 이용하여 뿌리를 작은 조각으로 찢은 뒤 2 mL의 증류수에 넣고 5분간 교반하였다. 교반된 증류수로부터 100 μ L를 취하여 TSB + NaCl 한천배지에 평판도말한 뒤 28 °C에 배양하였다. 각 단계로부터 접종되어 배양된 세균들은 다시 동일한 TSB + NaCl 한천배지에 여러 차례 계대배양 되었고, 순수 분리되었다.

분리균주 계통분석

분리된 세균의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 각 분리균에서 전체 유전자(genomic DNA)를 추출하였고, PCR 반응에는 세균에 대한 universal primer인 27F와 1391R을 사용하였다. 유전자의 증폭 반응을 위해 *Taq* PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 10 μ M의 forward, reverse primer를 각각 1 μ L씩 넣었고, 분리된 균주로부터 획득한 genomic DNA를 1 μ L, 멸균증류수 47 μ L를 넣어 총 50 μ L의 반응액을 제조하였다. PCR 증폭 조건은 94 °C에서 2분의 pre-denaturation 후, 94 °C에서 30초의 denaturation, 50 °C에서 30초의 annealing, 72 °C에서 1분30초의 extension 순환을 30회 반복하였고, final extension으로 72 °C에서 5분의 반응 조건을 구성하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자 반응물들은 정제 후 염기서열 분석(sequencing)을 수행하여 각각의 균주에 대해 약 1,500 염기의 서열을 얻었다.

분리된 모든 균주들에 대한 기존 유전자들과의 유사성을 확인하기 위해 GenBank의 BLAST 검색을 통해 균주를 비교 및 검토하였다. 각 균주 별 약 1,500 염기의 16S rRNA 유전자를 ARB 프로그램(Ludwig 등, 2004)을 이용하여 SILVA sequence database (Quast 등, 2013)에 정렬하였다. 정렬된 염기서열을 SILVA database의 계통수(phylogenetic tree)에 삽입하여, Jukes-Cantor distance 모형과 neighbor-joining 방법(Bootstrap method, 반복: 1000)을 이용하여 분리된 균주들의 계통수를 작성하였다.

분리 균주의 최적 성장 조건 분석

분리된 균주들의 염 농도에 따른 최적 성장 조건을 확인하기 위해, 부분 동정 결과에 따라 서로 다른 두 종의 균주들 중 대표성을 보이는 두 균주(JRS-1, JRL-2)를 선택하였고, 각각 TSB (30 g/L) + NaCl (20 g/L)의 액체배지 10 mL에 접종하여 28 °C, 150 rpm으로 약 16시간 진탕 배양하여 접종원으로 사용하였다. 배양된 세포액을 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액은



Fig. 1 Sampling location, Gochang-Buan mud flat, for the halophyte *Suaeda japonica* and the rhizosphere soils

제거하고, phosphate-buffered saline을 적당량 첨가하여 미생물 세포(펠릿)를 희석하였다. 각 현탁액에 대해 분광광도계를 이용하여 흡광도를 600 nm로 측정 한 뒤, 흡광도 값이 1이 되도록 희석하여 두 균주 현탁액을 표준화하였다.

염 농도 별 배지는 50 mL의 TSB 액체 배지(30 g/L)에 0, 10, 20, 30, 40, 50 g/L의 NaCl을 첨가, 각각 총 염분 3, 4, 5, 6, 7, 8%로 멸균 제조하였다. 각 배지에 표준화된 두 균주의 현탁액을 각각 500 µL씩 접종하여 28 °C, 150 rpm으로 진탕 배양하였고, 시간에 따라 각 배지의 흡광도를 측정하였다.

색소생산성 기질을 이용한 생화학적 특성 분석

생화학적 특성을 평가하기 위해, 계통분석 결과에 따라 JRS-1, JRS-4, JRL-1, JRL-2, JRL-3의 5 균주를 선택하였다. 각 균주의 생화학적 특성 분석은 RapID™ Systems (Thermo scientific, Pittsburgh, PA, USA)의 G(+) ANA II와 NF Plus 키트를 이용하여 분석하였고, 제공된 방법을 따라 수행하였다.

결과 및 고찰

칠면초의 근권·근면·내생 세균의 분리

고창·부안 갯벌에 자생하는 칠면초의 근권·근면·내생 세균을 일련의 과정을 통해 9개의 균주를 분리하였다. 4차례의 계대배양을 통해 colony의 형태 및 색깔 등의 차이를 육안으로 확인 가능한 수준에서 분리하였다. 그러나 위에서 언급한 뿌리 내부로부터 세균을 분리하는 과정 중에서 근권, 근면세균은 배제하고 내생세균만을 분리하기 위해 70% 에탄올 처리를 하였음에도 불구하고 대조군으로서 에탄올 처리 후 씻어낸 증류수로부터 세균이 배양되었고, 부분 동정한 결과 근권 세균군과 유사한 형태 및 색깔로 나타났다. 이러한 결과는 에탄올 처리 이전의 과정들 속에서 뿌리 표면의 토양이 완벽히 제거되지 않았기 때문으로 보인다. 게다가 근면세균을 분리하기 위해 여과지로 닦아내어 배양한 세균 또한 근권 세균군과 유사하게 나타났는데, 이 역시 덜 제거된 뿌리 표면의 토양으로부터 근권세균

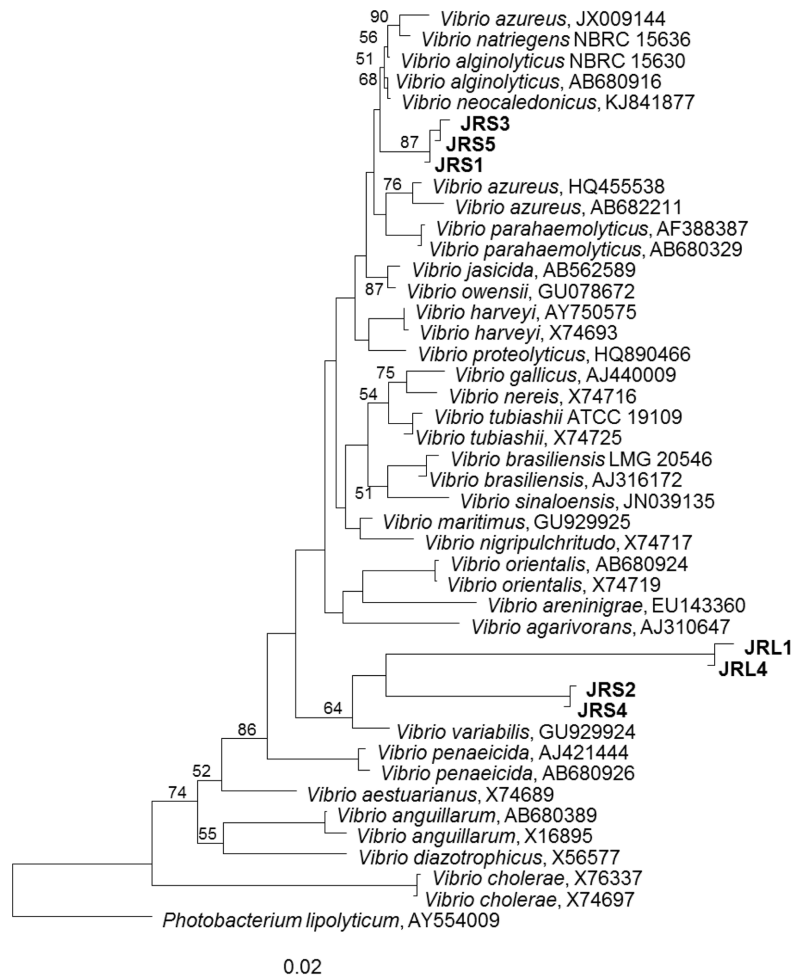


Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree of the rhizosphere isolates, strains JRS-1, -2, -3, -4, and -5, and the rhizoplane isolates, strains JRL-1 and -4. Bootstrap numbers based on 1,000 replicated datasets

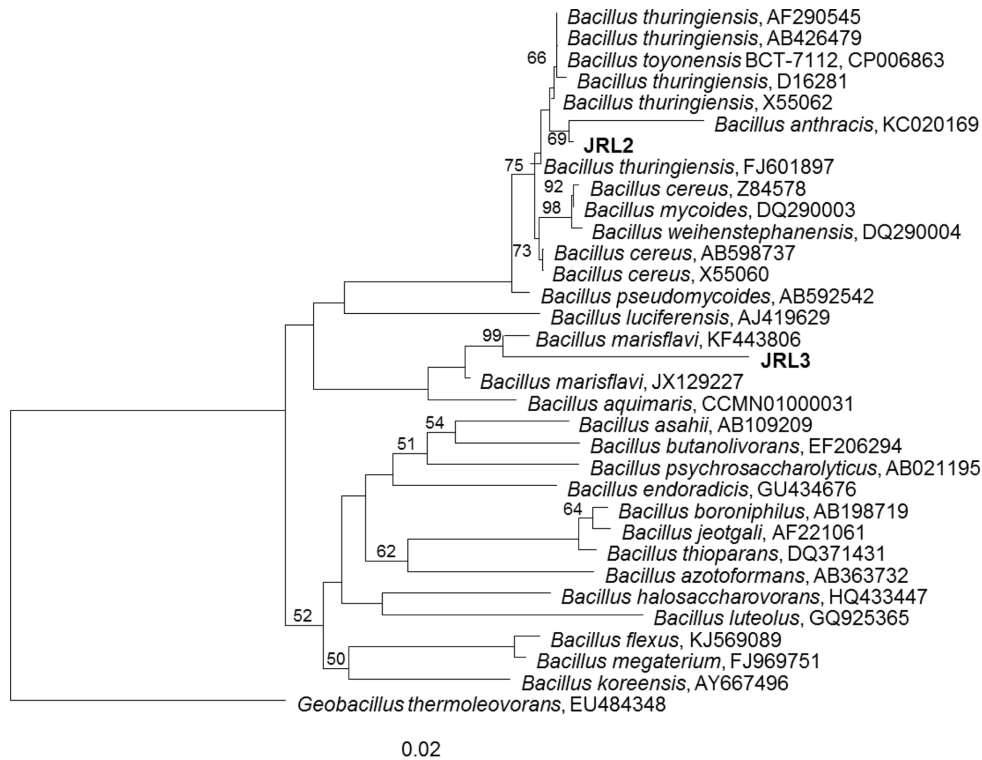


Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of the rhizoplane isolates, strains JRL-2 and -3. The tree was constructed by neighbor-joining method. Bootstrap numbers based on 1,000 replicated datasets

이 분리된 것으로 판단된다. 그러나 에탄올 처리 후 작은 조각으로 찢겨진 뿌리를 세척한 증류수로부터 배양된 세균군에서는 에탄올 처리 대조군과는 다른 형태와 색깔을 보였다. 따라서 에탄올 처리 이전 과정에서 얻어진 균주들은 근권세균으로 추정하였고, 에탄올 처리 이후 과정에서 얻어진 균주들은 근면 또는 내생세균으로 추정하였다.

계통학적 분석

분리된 9개 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열에 대해 BLAST 검색, 비교한 결과, 분리된 균주는 2개의 속(genus)으로 분류되었다. 근권 세균으로 추정된 JRS-1, -2, -3, -4, -5 균주와 근면 혹은 내생 세균으로 추정된 JRL-1, -4 균주는 *Vibrio* 속으로 확인되었고, 근면 혹은 내생 세균으로 추정된 JRL-2와 JRL-3 균주는 *Bacillus* 속으로 확인되었다.

SILVA database에 정렬한 16S rRNA 유전자 염기서열의 neighbor-joining 계통수(phylogenetic tree)는, *Vibrio* 속에 속하는 균주 JRS-1, JRS-2, JRS-3, JRS-4, JRS-5, JRL-1, JRL-4에 대해 하나의 계통수를 작성하였고(Fig. 2), *Bacillus* 속에 속하는 균주 JRL-2, -3에 대해서 하나의 계통수를 작성하였다(Fig. 3). 각 계통수에서 JRS-1, JRS-3, JRS-5 균주는 *Vibrio neocaledonicus*와 가장 가까운 이웃을 이루고 있는 것을 확인할 수 있었고, JRS-2, JRS-4, JRL-1, JRL-4 균주는 *Vibrio variabilis*와 가장 가까운 이웃을 이루고 있는 것을 확인하였다(Fig. 2). 균주 JRL-2는 *Bacillus anthracis*와, JRL-3은 *Bacillus marisflavi*와 가장 가까운 이웃을 이루고 있는 것을 확인하였다(Fig. 3). 9 균주의

16S rRNA 유전자 염기서열은 GenBank accession number KY750302-KY750310로 등록되었다.

앞서 각 단계적으로 분리된 균주를 근권 세균군(JRS 군), 근면 또는 내생세균군(JRL 군)으로 추정하였다. Gond 등(2015)에 따르면 *Bacillus*는 토양과 식물 내부에서 모두 분리 될 수 있다고 보고하였고, 따라서 계통분석을 통해 확인된 *Bacillus* 속인 JRL-2와 JRL-3에 대해서는 근면세균인지 내생세균인지에 대한 명확한 구분은 어렵다. 그러나 JRL-2와 JRL-3이 *Bacillus* 속이라는 점과 JRL-1, JRL-4가 JRS 균주들과 같은 *Vibrio* 속(genus)이나 다른 종을 나타냄에 따라, JRL 균주들은 근면 혹은 내생 세균, JRS 균주들은 근권 세균으로 분리 되었다고 할 수 있다.

생화학 특성 분석

분리된 9개의 균주 중 계통학적으로 차이를 보이는 5균주(JRS-1, -4; JRL-1, -2, -3)를 선발하여 색소생산성 기질을 이용한 생화학적 특성 분석을 수행하였다(Table 1). 이 실험에 이용한 것은 미생물 동정을 위한 목적으로 이용 기질을 선택해 놓은 것으로서, 기질 이용 형태가 자료화되어 있지 않은 새로운 균주는 확인할 수 없을 뿐만 아니라, 기질들이 균주의 일반적인 특성화와 완벽하게 부합하지는 않는다. 그렇지만 일부분의 기질 이용 특성을 보여줄 수 있는 방법으로서 활용하였다. *Vibrio* 속에 속하는 JRS-1, JRS-4, JRL-1을 보면, JRS-1의 경우 p-nitrophenyl-phosphoester, glucose, N-benzoyl-arginine-β-naphthylamide, p-nitrophenyl-β-D-glucoside, p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide,

Table 1 Biochemical characterization of selected bacterial strains isolated from the rhizosphere and rhizoplane of *Suaeda japonica*

Substrate (Test code)	JRS-1	JRS-4	JRL-1	JRL-2	JRL-3
Arginine (ADH)	-	-	-		
Aliphatic thiol (TRD)	-	-	-		
Triglyceride (EST)	-	-	+		
ρ-Nitrophenyl-phosphoester (PHS)	+	+	+		
Glucose (GLU)	+	-	-		
γ-Glutamyl-β-naphthylamide (GGT)	-	-	+		
Tryptophane-β-naphthylamide (TRY)	-	-	-		
N-Benzoyl-arginine-β-naphthylamide (BANA)	+	+	-		
Urea (URE)	-	-	-	-	-
ρ-Nitrophenyl-β,D-galactoside (ONPG)	-	-	+	-	-
ρ-Nitrophenyl-α,D-glucoside (αGLU)	-	-	-	+	+
ρ-Nitrophenyl-β,D-glucoside (βGLU)	+	-	+	-	+
ρ-Nitrophenyl-N-acetyl-β,D-glucosaminide (NAG)	+	+	-	+	-
Proline-β-naphthylamide (PRO)	+	+	+	-	-
Pyrrolidine-β-naphthylamide (PYR)	+	-		+	+
ρ-Nitrophenyl-β,D-disaccharide (BLTS)				-	-
ρ-Nitrophenyl-α,L-arabinoside (αARA)				-	-
ρ-Nitrophenyl-α,D-galactoside (αGAL)				-	+
ρ-Nitrophenyl-α,L-fucoside (αFUC)				-	-
ρ-Nitrophenylphosphate (PO ₄)				+	+
Leucyl-glycine-β-naphthylamide (LGY)				+	+
Glycine-β-naphthylamide (GLY)				-	+
Phenylalanine-β-naphthylamide (PAL)				+	+
Arginine-β-naphthylamide (ARG)				+	+
Serine-β-naphthylamide (SER)				+	+

proline-β-naphthylamide, proline-β-naphthylamide, pyrrolidine-β-naphthylamide에 대해 양의 반응을 보였다. 균주 JRS-4는 ρ-nitrophenyl-phosphoester, N-benzoyl-arginine-β-naphthylamide, ρ-nitrophenyl-N-acetyl-β,D-glucosaminide, proline-β-naphthylamide에 대해 양의 반응을 보였다. JRL-1은 triglyceride, ρ-nitrophenyl-phosphoester, γ-glutamyl-β-naphthylamide, ρ-nitrophenyl-β,D-galactoside, ρ-nitrophenyl-β,D-glucoside, proline-β-naphthylamide에 대해 양의 반응을 보였다. *Vibrio* 속에 속하는 3 균주 모두 단백질 분해 효소 활성을 나타내는 proline-β-naphthylamide 기질에 대해서는 분해(+) 반응을 보였다. 그러나 JRS 균주과는 달리 JRL-1의 경우 식물 조직 내에 존재하는 중성지방 기질인 triglyceride 분해능을 가짐을 확인하였고, 이는 JRL-1은 식물 근면에 서식하는 *Vibrio* 균주의 일원으로서, 근권으로부터 분리된 JRS (*Vibrio*) 균주과는 서식지가 달라 그 특성에 차이가 나는 것으로 여겨진다. 또한 JRL-1에서만 ρ-nitrophenyl-β,D-galactoside를 분해하는 β-galactosidase의 활성을 갖음을 확인하였다. 특히 하계 JRS-1과 JRL-1 균주는 ρ-nitrophenyl-β,D-glucoside에 대한 양의 반응으로 식물에 많은 glucoside 물질에 대한 이용능을 보여 줘, 식물 근권 및 근면에 특징적인 세균의 특성일 것으로 여겨진다. 균주 JRS-1, JRS-4에서는 식물과 세균 등의 세포벽 물질인 ρ-nitrophenyl-N-acetyl-β,D-glucosaminide을 분해하는 glucosaminidase 효소의 활성을 보여주고 있다.

Bacillus 속인 JRL-2, JRL-3 균주에 대한 생화학적 기질이용 시험 결과(Table 1), JRL-2의 경우 ρ-nitrophenyl-α,D-glucoside, ρ-nitrophenyl-N-acetyl-β,D-glucosaminide, pyrrolidine-β-naphthylamide,

ρ-nitrophenylphosphate, leucyl-glycine-β-naphthylamide, phenylalanine-β-naphthylamide, arginine-β-naphthylamide, serine-β-naphthylamide에 대해 양의 반응을 보였다. 균주 JRL-3은 ρ-nitrophenyl-α,D-glucoside, ρ-nitrophenyl-β,D-glucoside, pyrrolidine-β-naphthylamide, ρ-nitrophenyl-α,D-galactoside, ρ-nitrophenylphosphate, leucyl-glycine-β-naphthylamide, glycine-β-naphthylamide, phenylalanine-β-naphthylamide, arginine-β-naphthylamide, serine-β-naphthylamide에 대해 양의 반응을 보였다. 두 균주 모두 위의 근권 세균 3 균주에서는 확인되지 않은(음의 반응), 식물에 많은 ρ-nitrophenyl-α,D-glucoside을 분해하는 활성을 보여, 근면 또는 내생 세균이 식물로부터 제공될 수 있는 물질을 활용할 수 있는 것을 보여 준다. 또한 두 균주 모두 식물 조직에 있는 폴리인산을 가수분해하는 효소인 phosphatase의 활성을 ρ-nitrophenylphosphate 분해를 통해 보였다. 두 균주는 pyrrolidine-β-naphthylamide, ρ-leucyl-glycine-β-naphthylamide, phenylalanine-β-naphthylamide 등의 기질 이용능을 보여, 단백질 분해 및 단백질로부터 여러 아미노산을 떼어내는 효소로 인해 식물 조직을 더 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 판단되고, 이는 근면 또는 내생 세균의 특성일 것으로 추측된다.

분리된 균주의 염 농도에 따른 최적 생장조건 분석

분리된 균주들의 염 농도에 따른 최적 생장조건을 평가하기 위해 30 g/L의 TSB에 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50 g/L의 NaCl을 첨가하여 총 염 농도를 3-8%로 제조한 뒤 대표성을 띄는 두 균주(JRS-1, JRL-2)를 각 배지에 접종하여 진탕 배양하였고, 시

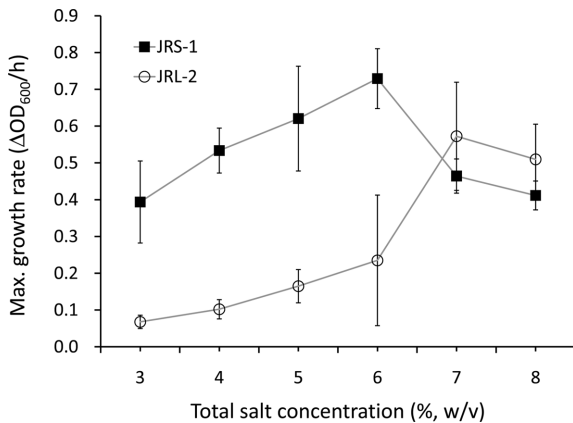


Fig. 4 Maximum growth rates of the strains JRS-1 and JRL-2 in a series of total salt concentrations of 3-8% (w/v)

간에 따라 각 배지의 흡광도를 600 nm로 측정하였다. 측정된 시간 별 흡광도 값으로부터 시간 구간 별 성장률을 구하고 (OD₆₀₀/h), 각 염 농도 별 최대 성장률을 구하였다.

균주 JRS-1(*Vibrio neocaledonicus*)은 총 염 농도가 증가할수록 최대 성장률이 증가하다, 6% 염농도에서 최대치를 보인 뒤 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 균주 JRL-2 (*Bacillus thuringiensis*) 역시 낮은 염 농도에서는 농도가 증가할수록 생장이 증가하는 경향을 보였으나, JRS-1와는 달리 7%에서 최대 성장률을 보이고 8%에서는 감소하는 경향을 보였다. 두 균주를 비교해보면, 6% 이하의 염 농도에서는 JRS-1이 JRL-2보다 내염성이 좋은 것으로 판단된다. 이는 *Vibrio* 세균이 주로 해양환경에서 서식하는 것으로 알려져 있고, *Bacillus* 세균이 일반적으로 토양환경에서 서식하는 것을 고려하면, 두 균주의 내염성 정도의 예측과 부합하는 결과이다.

각 균주의 최대성장률에 대해 측정 시간구간 별로 보면, JRS-1은 3, 4, 5, 6%의 농도에서는 0-4시간 구간에서 최대성장률을 보였고, 7, 8%의 농도에서는 4-8시간 구간에서 최대성장률을 보였다. JRL-2는 3, 4, 5%의 농도에서는 0-4시간 구간에서 최대성장률을 보였고, 6, 7, 8%의 농도에서는 4-8시간 구간에서 최대성장률을 보였다. 두 균주 모두 특정 염 농도 이상일 때 최대성장률이 지연되는 현상이 나타났다. 이러한 염 농도의 증가에 따른 세균들의 최대성장률의 지연현상은 염류장해(salt stress)에 따른 것으로(Mayak 등, 2004), 특정 염 농도 이상에서는 접종 직후 세균들의 염에 대한 적응 시간이 필요하다는 것을 의미한다.

Lee 등(2012)에 따르면 고창·부안 갯벌 토양의 염농도는 평균 약 30‰ 즉, 약 3% (w/v)의 염 농도를 보인다고 보고되었다. 최적 성장 조건 분석 결과와 비교하면, 분리된 균주들은 기존에 서식하던 토양의 염 농도 보다 더 높은 염 농도에도 견딜 수 있는 내염성을 갖고 있음을 알 수 있다. 따라서 어떠한 환경변화로 인해 갯벌 내 염농도가 증가하여도 8-9% 염 농도 이하에서는 두 균주 모두 적응할 것으로 기대되며, 또한 이러한 세균의 염 적응능력이 환경변화에 따른 염생식물의 염 적응에도 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대된다.

초 록

고창·부안 갯벌에 자생하는 칠면초의 근권 및 근면으로부터 내염성을 지니는 9 균주를 분리하였다. 16S rRNA 유전자를 이용한 계통분석으로 분리된 균주는 *Vibrio* 속과 *Bacillus* 속으로 분류되었다. 분리된 균주 중 *Vibrio*와 *Bacillus*로 나누어 각각 대표성을 나타낼 수 있는 균주를 선택하여 염 농도에 따른 최적 성장조건을 평가한 결과, 균주 JRS-1 (*Vibrio neocaledonicus*)은 총 염분 4-6%에서 높은 성장률을 보였다. 균주 JRL-2 (*Bacillus thuringiensis*)는 염분 농도 증가에 따라 생장이 증가하였으며, 7%에서 최대 성장률을 보이고 8%에서는 감소하는 경향을 보였다. 분리된 균주들은 기존에 서식하던 토양의 염 농도인 3% (w/v) 보다 더 높은 염분에도 견딜 수 있는 내염성을 보였다. 또한 분리균주에 대한 생화학적 기질 이용 형태에 분석을 통해 triglyceride, ρ -nitrophenyl- α ,D-glucoside, ρ -nitrophenyl- β ,D-glucoside 이용 등 식물과의 특이적인 상호작용을 나타내는 것으로 간주할 수 있는 반응들을 확인하였다.

Keywords 근권세균 · 근면세균 · 내염성 · 염생식물 · 칠면초

감사의 글 이 연구는 농촌진흥청 농업공동연구-농업첨단핵심기술개발 사업 (과제번호: PJ012263; 과제명: 식물-미생물 상호작용을 이용한 간척지 작물 내염성 향상기술 개발)의 지원으로 수행되었습니다.

References

- Forchetti G, Masciarelli O, Alemano S, Alvarez D, Abdala G (2007) Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 1145–1152
- Glick BR (2003) Phytomediation: synergistic use of plants and bacteria to clean the environment. *Biotechnol Adv* 21: 383–393
- Gomes NCM, Heuer H, Schönfeld J, Costa R, Mendonca-Hagler L, Smalla K (2001) Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil* 232(1): 167–180
- Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White JF Jr. (2015) Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiol Res* 172: 79–87
- Lee YW, Park MO, Yoon JH, Hur SB (2012) Temporal and spatial variation of microalgal biomass and community structure in seawater and surface sediment of the Gomso bay as determined by chemotaxonomic analysis. *J Korean Soc Oceanogr* 17(2): 87–94
- Lim SU, Lee TG, Sa DM (1995) Isolation and physiological characteristics of auxin-producing soil bacteria. *Korean J Soil Sci Fert* 28: 75–82
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Förster W, Brettske I, Gerber S, Gingart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, König A, Liss T, Lüßmann R, May M, Nongoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer K (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32(4): 1363–1371
- Mayak S, Tirosh T, Glick BR (2004) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol Biochem* 42: 565–572
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651–681

- Park JM, Park JH, Kim JG, You YH (2016) Securing and analysis of fungal endophytic diversity from roots of *Salicornia europaea* L. J Life Sci 50(3): 89–98
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res 41: 590–596
- Reinhold B, Hurek T, Fendrik I, Pot B, Gillis M, Kersters K, Thielmans S, De Ley J (1987) *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., an nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca*). Int J Syst Bacteriol 37: 43–51
- Reva ON, Dixelius C, Meijer J, Priest FG (2004) Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Ecol 48: 249–259
- Rodriguez R, Henson JJ, Van VE, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim Y, Redman R S (2008) Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. ISME J 2: 404–416
- Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, Wettstein D (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proc Natl Acad Sci USA 102: 13386–13391
- Yang J, Kloepper JW, Ryu C (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends Plant Sci 14(1): 1–4
- You YH, Yoon H, Seo Y, Kim M, Shin JH, Lee IJ, Choo YS, Kim JG (2012) Analysis of genomic diversity of endophytic fungal strains isolated from the roots of *Suaeda japonica* and *S. maritima* for the restoration of ecosystems in Buan salt marsh. Korean J Microbiol Biotechnol 40(4): 287–295
- You YH, Yoon H, Woo JR, Seo Y, Shin JH, Choo YS, Lee IJ, Kim JG (2011) Plant growth promotion activity of endophytic fungi isolated from the roots of *Calystegia soldanella*. Korean J Microbiol Biotechnol 39(4): 324–329