

Auxin과 ACC Deaminase를 생산하는 사구식물 복원용 근권세균의 선발

임종희 · 김종국¹ · 김상달*

영남대학교 응용미생물학과, ¹경북대학교 미생물학과

Selection of the Auxin and ACC Deaminase Producing Plant Growth Promoting Rhizobacteria from the Coastal Sand Dune Plants. Lim, Jong-Hui, Jong-Guk Kim, and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea, ¹Department of Microbiology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea – In order to develop the multi-functional rhizobacteria that can exert positive effect on the growth of plants growing in the coastal sand dune located along East Coast of Korea, rhizospheric bacteria of 11 different plants from this area were isolated 1,330 rhizobacteria. Among these, 23 strains were able to produce auxin and had spectrum of antagonism toward various phytopathogenic microbes. To know the mechanism of this antifungal activity, these 23 strains were subjected to further analyses; 19 strains of these produced siderophore as determined by color reaction on CAS-blue plate, 4 strains produced antifungal cellulase as judged by color change on CMC-Congo red plate, 17 strains were able to utilize insoluble phosphate salts, also determined by clear zone formation on PVK medium. Identification of the strain was assigned to all 23 strains by 16s rDNA sequence analysed, and all were identified to be in the genus of *Bacillus* and *Pseudomonas*. One strain of these, denoted *Pseudomonas fluorescens* IB4-14, showed ACC deaminase activity which is known to be involved in the resistance of environmental stress such as salt and drought. Also, *P. fluorescens* IB4-14 showed the germination stimulation and roots growth promoting activity on the *in vivo* assay of *Lysimachia mauritiana* Lam. (spoonleaf yellow loosestrife).

Key words: sand dune plant, auxin, ACC deaminase, PGPR

서 론

해안사구는 해양과 육상 생태계의 경계지역으로 해안의 보호와 사구 고유식물의 서식지로 매우 중요한 역할을 하고 있으며, 해안 식수원의 저장지 및 뛰어난 경관으로 인간과 자연에게는 보전되어야 할 중요한 지역이다. 하지만, 사구지역의 난개발과 오염 등으로 현재는 원형을 찾아보기 힘들 정도로 훼손되었으며, 우리나라 뿐만 아니라 전세계적으로도 그 심각성이 인식되어 해안사구의 복원과 보존에 심혈을 기울이고 있는 실정이다[12, 14]. 사구생태계의 복원 및 보존에는 시설물 설치로 침식방지 및 퇴적 환경 조성, 지면의 식피 등 인위적인 방법 등이 사용될 수 있지만, 훼손된 사구식생의 생태학적 복원이 가장 자연적이면서 경제적인 것이다. 사구식생의 대부분을 차지하는 사구식물은 건조와 고염 등의 척박한 환경과 각종 스트레스에 적응하여 살아야만 하는 것들로 그들의 생장을 위해서 근권에서 공생, 공존하고 있는 근권미생물들과의 상호작용이 반드시 필요하다. 따라서 이들 근권미생물들의 활용과 복원은 사라져가는 사구식

생의 증식과 확대에 이용하는 것이 당연한 것이다[10, 15, 18].

식물생장촉진근권세균(Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR)은 식물의 근권군서(rhizosphere community)를 구성하며, 다양한 기능으로 공생관계들을 가진다. 식물생장촉진물질의 생산[13, 16], 인산 가용화[20], 질소 고정화[16] 등 직접적인 성장촉진 영향과 항생물질[13], siderophore[11], 식물병원균 세포벽 분해성 cellulase[9], chitinase[13] 등의 항병원성 물질의 생산에 의한 사구식물병의 방제, 고염이나 건조 등의 환경스트레스 저항성 ACC delaminase 생산[6] 등이나 다른 근권미생물들과의 상호작용 등 간접적인 영향으로 사구식물의 생장에 큰 영향을 끼칠 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 경북 동해안 사구지역의 사구식물 근권에서 식물생장촉진근권세균을 분리, 선발하고, 이들 선발된 사구식물 생장촉진 근권세균의 특성을 조사하였다. 이렇게 분리, 선발된 사구식물생장촉진 근권세균은 우리나라 동해안 사구식물의 근권군서에서 사구식물과 공생하는 식물생장촉진 근권세균의 다양성 및 생태의 건전성을 알 수 있는 주요한 지표가 될 수 있고, 또한 이들 사구식물생장촉진 근권세균을 이용한 사구식물의 보존, 증식으로 사라져 가는 사구의 복원 및 확대에 의한 해안사구의 생태보존에 적용할 수 있는 기초연구가 될 수 있을 것이다.

*Corresponding author

Tel: 82-53-810-2395, Fax: 82-53-810-4663

E-mail: sdkim@yumail.ac.kr

재료 및 방법

사구식물 성장촉진물질 생산성 사구 근권미생물의 분리

사구식물 성장촉진물질 생산하는 사구 근권미생물 선발을 위해 경북 동해안의 고래불 해수욕장 사구지역에 서식하고 있는 11종의 사구식물(참꽃무릇, 갯잔디, 갯완두, 통보리사초, 갯방풍, 갯쇠보리, 순비기나무, 갯방풍, 갯메꽃, 갯쭈바귀, 갯쇠보리)의 근권모래를 시료로 사용하였다. 채취한 근권모래시료는 경작지토양 등의 다른 일반토양과는 달리 영양분의 공급이 매우 저조한 상태이고 염도가 높은 특성이 있는 점을 감안하여 평판희석법으로 3% NaCl이 첨가된 0.1배, 0.5배, 1배 LB (Luria-Bertani) agar 배지에서 28°C, 3일 배양하였다. 또, 옥신생산성 균주의 선발을 위하여 3% NaCl이 첨가된 LB broth 배지 5 mL에 분리된 근권미생물을 접종하고 28°C에서 24시간 배양하였다. 옥신생산 근권세균을 분리하기 위하여 각 균주의 배양 후 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 배양상등액을 Salkowski 시약(5% perchloric acid 100 mL, 0.05 M ferric chloride 2 mL)에 1 : 2 (v/v)로 섞어 암실에서 30분간 반응 시킨 후 분홍색으로 발색되는 옥신생산성 균주를 선발하였다[9]. 또, Salkowski 시약을 반응시킨 배양상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준물질로는 시판되는 식물성장촉진호르몬인 IAA (indole 3-acetic acid)를 사용하여 정량하였다.

사구식물 근권미생물의 식물병원균에 대한 길항능 및 길항기작 조사

다기능 사구식물 복원 미생물을 선발하기 위하여 옥신생산성 균주를 대상으로 식물병원성 진균에 대한 길항능을 조사하였다. 주요 식물병원성 진균인 *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Corynespora cassiicola*, *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* AG-1(IA), *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* AG-1(IB)를 PDA 배지에 6 mm 크기의 균체 disc로 접종하여 28°C, 2일 배양하고, 3 cm 떨어진 곳에 분리균주를 멸균된 이쭈시계로 tooth-picking하여 28°C에서 5일 배양하면서 발육저지대 형성 유무로 항진균능을 측정하였다. 식물병원성 진균의 길항기작중의 하나인 항진균성 siderophore 생산성을 조사하기 위하여 siderophore 생산균주의 분리배지인 CAS(chrome azurol S) blue agar 배지[11]에 식물병원성 진균에 대한 길항능을 나타내는 균주를 접종하여 28°C에 배양시키면서 orange halo zone의 생성 유무를 관찰하여 siderophore 생산균주를 선발하였다[19]. 진균세포벽 분해성 cellulase의 생산능 확인은 0.1% CMC를 첨가한 LB agar에 식물병원성 진균에 대한 길항능을 나타내는 균주를 tooth-picking하여 28°C에서 48 hr 배양 후 Congo red plate방법[1]으로 확인하였다.

사구식물 성장촉진물질 생산성 근권미생물의 인산가용화능 조사

분리된 균주들에서 다기능성의 하나인 또 하나의 성장촉진기능을 알아보기 위하여 사구지역의 모래토양에서 사구식물체가 이용하기 어려운 난용성 인을 분해할 수 있는 인산가용화능이 있는지 여부를 알아보려고 하였다. 난용성 인산염의 분해능을 조사하기 위해 LB-calcium phosphate agar배지(멸균된 LB agar 배지를 55°C로 식히고 여기에 따로 멸균한 CaCl₂와 K₂HPO₄를 0.5% 첨가하여 분주)에 옥신생산능과 식물병원성 진균 방제능을 동시에 가지는 다기능 균주로 분리된 사구 근권세균들을 도말하여 28°C, 5일간 배양하면서 균체주위에 인산용해의 clear zone을 형성하는 균주를 선발하였다[16].

옥신생산성 다기능 사구 근권미생물의 분류학적 동정

선발된 auxin 및 siderophore 동시생산 균주들의 동정은 형태 및 생화학적 특성을 시험한 후 Solgent Co., Ltd에 의뢰하여 선발균주의 16s rDNA를 PCR 증폭한 후 증폭된 sequence를 NCBI에 등록된 염기서열과 비교하여 상동성을 조사하였다. 상기 실험결과를 바탕으로 Bergey's manual을 참고하여 동정하였다[7].

환경스트레스 저항성 물질 ACC deaminase 생산성 조사

전조, 염 등 환경스트레스의 저항성 기작의 주요지표인 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) deaminase 생산능 조사는 먼저 3% NaCl이 첨가된 LB broth에서 28°C, 24시간 배양하고 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 1/5M phosphate buffer(pH 7.0)로 두 차례 깨끗하게 씻고 질소원으로 3 mM ACC만을 첨가한 DF salt minimal 배지[6]에 접종하여 28°C에서 2일간 배양하였다. 대조구로는 질소원으로 아무것도 첨가하지 않은 배지와 질소원으로 (NH₄)₂SO₄를 첨가한 배지와 비교하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 질소원으로 ACC를 이용하는지 여부를 알아보았다.

염농도에 따른 사구 근권미생물의 생장능 및 옥신생산능 조사

선발된 다기능 사구 PGPR균주의 실제 사구토양내 적용성과 적응능을 알아보기 위하여 다양한 염농도(NaCl, 0-6%)에서의 균체 생장능과 이에 따른 옥신생산능을 조사하였다. 5 mL LB broth배지에 NaCl의 농도를 달리하여 28°C에서 3일 동안 배양하여 생균수와 Salkowski test를 통한 옥신생산능을 조사하였다.

사구식물에 대한 성장촉진능 in vivo 검증

실제 동해안 사구식물인 갯까치수영(*Lysimachia mauritiana* Lam., spoonleaf yellow loosestrife)을 통하여 선발된 균주에 대한 성장촉진능을 식물실험으로 검증해 보았다. 동

해안 고래불 해수욕장의 사구에서 채집한 갯까치수영은 종자소독액(0.01배 락스, 70% EtOH)으로 소독한 후 4°C에서 3일간 저온처리를 실시하였다. 처리구는 물 처리 대조구와 균주 처리구로 나누고, 저온처리한 종자를 20립씩 각각 10 mL 멸균증수와 10 mL 균체가 포함된 멸균증류수에 2시간 침지시켰다. 선발균주 처리는 대수증식기까지 배양한 후 10⁸ CFU/mL으로 하여 10 mL의 멸균증류수에 희석시켜 사용하였다. 이렇게 침지된 종자는 멸균된 Whatman paper NO.1을 덮은 petri-dish에 조심스럽게 치상하고 30°C, 암실에서 보관하였다. 종자에 수분을 충분히 공급하기 위하여 2일에 한 번씩 멸균증류수 5 mL를 각 처리구마다 처리해 주면서 7일동안 관찰하였다. 본 실험은 3회 반복 실험을 실시하였다.

결과 및 고찰

사구식물 성장촉진물질 생산성 근권미생물의 선발

동해안의 포항사구지역에 서식하고 있는 11종의 사구식물의 근권에서 1,330균주의 근권세균(Table 1)을 분리할 수 있었다. 상대적으로 참골무꽃, 갯잔디, 통보리사초, 갯방풍의 근권에서 많은 근권세균들을 분리 할 수 있었다. 또, 일반인들의 출입이 거의 없는 해안 군부대내와 그 밖의 사구지역으로 구분하여 시료를 분리하였고, 군부대내의 사구지역에서 더 많은 근권미생물을 분리할 수 있을 것이라고 생각하였으나 사구식물의 종에 따라 분리된 미생물 수에서 차이가 있었고 지역은 크게 영향을 받지 않았다. 분리된 1,330균주의 근권세균을 대상으로 옥신생산능을 조사하였다. 그 결과 23균주의 근권세균에서 옥신생산능을 확인할 수 있었다(Table 2). 옥신생산균주로 확인된 분리 균주들은 모두 표준물질인 IAA와 비교하여 볼 때 높은 농도의 옥신을 생산할 수 있는 사구 근권세균이었다. 또, 이들 사구 근권세균들의 옥신생산능은 사구생태계 복원에 있어서 사구식물의 성장촉진작용에

이용할 만한 가치가 매우 높다고 생각된다.

사구식물 성장촉진물질 생산성 근권미생물의 식물병원성 곰팡이에 대한 길항능 조사

분리된 1,330균주의 사구 근권세균을 11종의 주요 식물병원성 진균에 대한 길항능을 PDA배지에서 대치배양방법을 통해 조사하였다. 그 결과 근권세균 101균주가 역병균인 *Phytophthora capsici*, 47균주가 시들음병균인 *Fusarium oxysporum*, 41균주가 잎마름병 *Corynespora cassiicola*, 42균주가 탄저병 *Colletotrichum acutatum*, 72균주가 잣빛곰팡이병 *Botrytis cinerea*, 78균주가 잎집무늬마름병 *Rhizoctonia solani* AG-1(IA), 34균주가 모잘록병 *Pythium ultimum*, 60균주가 줄기썩음병 *Rhizoctonia solani* AG-1(IB)에 대한 길항능을 나타내었고 이들 근권세균 중 23균주는 옥신생산능을 가짐과 동시에 식물병원성 진균에 대한 넓은 스펙트럼의

Table 2. Auxin producing PGPR from the coastal sand dune rhizosphere.

Strains	Amount of produced auxin (mg/mL) ^a	Strains	Amount of produced auxin (mg/mL)
IB1-1	1.90	IB5-9	2.99
IB1-5	3.16	IB5-10	2.95
IB2-9	2.37	IB5-14	3.02
IB3-8	2.05	IB6-5	4.11
IB4-7	1.97	IB6-7	4.26
IB4-13	1.99	SD7-1	2.61
IB4-14	1.93	SD7-7	2.40
IB4-15	1.96	SD7-16	3.08
IB5-5	3.56	SD11-6	1.82
IB5-7	2.96	SD11-9	2.22
IB5-8	3.30	SD11-10	2.23

^aAuxin production had been estimated absorbance at 535 nm with IAA standard calibration curve.

Table 1. Isolates of bacteria from sand dune rhizosphere.

Plant species		Number of isolated bacteria	
IB (Inside Barracks)	<i>Scutellaria strigillosa</i> Hemsl.	참골무꽃	216
	<i>Zoysia sinica</i> Hance	갯잔디	110
	<i>Lathyrus japonicus</i> Willd.	갯완두	68
	<i>Carex kobomugi</i> Ohwi	통보리사초	169
	<i>Glehnia littoralis</i> F.Schmidt ex Miq.	갯방풍	121
	<i>Ischaemum antheperoides</i> (Steud.) Miq.	갯쇠보리	96
SD (Sand Dune)	<i>Vitex rotundifolia</i> L.f.	순비기나무	56
	<i>Glehnia littoralis</i> F.Schmidt ex Miq.	갯방풍	186
	<i>Vitex rotundifolia</i> L.f.	갯메꽃	19
	<i>Vitex rotundifolia</i> L.f.	갯썩바귀	27
	<i>Ischaemum antheperoides</i> (Steud.) Miq.	갯쇠보리	110
	<i>Carex kobomugi</i> Ohwi	통보리사초	152
Total			1,330

Table 3. Antifungal spectrum of PGPR from the coastal sand dune rhizosphere of Pohang, Korea.

Isolated strains	<i>Phytophthora capsisi</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Corynespora.c assiicola</i>	<i>Colletotrich m.acutatum</i>	<i>Bacillus cinerea</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> (IA)	<i>Pythium ultimum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> (IB)
	역병	시드름병	앞마름병	탄저병	갯빛 곰팡이병	잎집무늬 마름병	모잘록병	줄기썩음병 잘록병
IB1-1	+	++	+++	+++		w	+	w
IB1-5	++	+	++	++	++			
IB2-9		+	+	+	+++	w		+++
IB3-8		+		+		++++	+	
IB4-7	++	w		+				+
IB4-13	++			+				+
IB4-14	++		w					w
IB4-15	++			+		+++	+	+
IB5-5	+		+++	++++	++++	++++		+++
IB5-7	++	+++	+++	++++	++++	++++		+++
IB5-8	++	+++	+++	++++	++++	++++		+
IB5-9	+++	+++	+++	++++	++++	++++		+++
IB5-10	+++	+++	+++	+++	++++	++++		
IB5-14	+	++	+++	+++	++++	++++	+	++
IB6-5	+	++	+++	+++	++++	++++		
IB6-7	+		+++	++++	++++	++++	+	
SD7-1	++	+++	+++	+++	+	+++		
SD7-7		+++	++	+++				+
SD7-16	+		++	+++				
SD11-6	w		w		++			
SD11-9			w			+	+	+
SD11-10	++		+	++				

+++ : >3mm, ++ : >2mm, <3mm, + : >1mm, <2mm, w : <1mm, - : negative

길항능을 나타내었다(Table 3). 이러한 결과는 선발된 균주들이 옥신생산능과 식물병 방제능을 동시에 가지는 다기능의 사구식물 PGPR이라는 것을 보여주는 결과로 식물병 방제능이 직접적으로 사구식물의 생장에 관련되어 촉진작용을 일으키지는 않지만, 부가적으로 식물병에 대한 방제능도 가지게 함으로써 실제 사구토양에 이용하였을 때 사라져가는 사구식물의 복원에 적용하기 용이한 다양한 기능을 가진 사구 근권미생물을 선발하였음을 알 수 있다[17].

사구식물 근권미생물의 식물병원성 곰팡이에 대한 길항기작 조사

옥신생산성 균주의 식물병원균 억제력 검증을 위해 억제기작 중의 또 하나의 기작인 siderophore(철이온 결합물질) 생산성을 조사한 결과 분리된 사구식물 근권세균 중 19종이 siderophore 생산균주였다(Table 4). Siderophore는 철 이온(Fe3+)을 선택적으로 흡수하여 병원균의 철이온 흡수를 방해함으로써 병원균을 사멸시키는 기작으로 사구식물의 병원균 감염에 대한 방제기작이 될 수 있을 것이다. 진균세포벽 분해성 cellulase의 생산능 확인결과, 분리된 근권세균 4종에서 cellulase 생산능을 확인 할 수 있었다(Table 4). 식물병원성 진균의 세포벽이 cellulase로 구성되어 있을 경우 진균세포벽

분해성 cellulase 생산능이 있는 선발된 균주가 길항능을 가지므로 사구식물도 병원균으로부터 보호될 것이라 생각된다.

사구식물 생장촉진물질 생산성 근권미생물의 인산가용화능 조사

사구지역의 모래토양에서 사구식물체가 이용하기 어려운 난용성 인을 분해할 수 있는 인산가용화능이 있는지 여부를 알아보고자 하였다. 옥신생산성 근권세균 중 17종이 난용성의 인산염을 분해할 수 있었으며(Table 4), 이 같은 결과는 토양 중에서 식물이 이용할 수 없는 불용성 인산염을 인산가용화능을 가진 균주를 이용하여 사구식물이 쉽게 유리인 산으로 이용할 수 있음을 보여주는 것이다[20]. 따라서 선발된 사구 근권미생물은 옥신생산능, 식물병방제능과 동시에 인산가용화능을 가진 3중 기능의 다기능 사구식물생장촉진성 PGPR균주임을 증명하는 것이다. 특히 인이 부족한 사구지역의 모래토양 특성상 인산가용화능을 가진 PGPR균주를 이용함으로써 사구식물의 복원을 더욱 좋게 할 수 있을 것이라 생각된다.

옥신생산성 다기능 사구 근권미생물의 동정

선발된 auxin 및 siderophore 생산 균주의 동정은 형태 및

Table 4. Siderophore, antifungal cellulase production, and phosphate-soluble activity of the isolated strains.

Strains	Production of		Phosphate-soluble activity ³
	Siderophore ¹⁾	Antifungal cellulase ²⁾	
IB1-1		++	+
IB1-5	+		+
IB2-9			
IB3-8			
IB4-7	+		
IB4-13	+		
IB4-14	+	+	+
IB4-15	+		
IB5-5	+		
IB5-7	+		+
IB5-8	+		+
IB5-9	+		+
IB5-10	+		+
IB5-14	+		+
IB6-5	+		+
IB6-7	+		+
SD7-1		+	+
SD7-7	+	++	
SD7-16	+	++	
SD11-6	+		
SD11-9			
SD11-10			+

¹⁾Siderophore production detected by color change of CAS-blue agar agar.

²⁾Cellulase production detected by color change on CMC-Congored plate.

³⁾Phosphate-solubilization activity determined by clear zone formation on PVK medium.

생화학적 특성을 시험한 후 16s rDNA의 분석을 통하여 Bergey's manual을 참고하여 동정하였다. 그 결과 Table 5에서 보는 것처럼 대부분 99.6%이상의 상동성으로 *Bacillus* sp.과 *Pseudomonas* sp.의 세균으로 동정되었고, 이들 사구 PGPR들은 일반적으로 사구식물 근권에 많이 우점하고 있는 것들로 신규한 균주들은 분리할 수 없었다.

사구식물 환경스트레스 저항성 물질 ACC deaminase 생산성 조사

사구지역의 모래토양은 건조, 높은 염농도 등의 환경스트레스에 항상 노출되어있다. 이러한 환경에서 자라는 사구식물과 그들의 근권에 서식하는 근권미생물은 병원균의 노출이나 토양오염 등의 경작지토양에서 받는 스트레스와 건조나 염 등의 환경스트레스에 더 많은 영향을 받고 있다. 일반적으로 식물들은 이와 같이 환경스트레스에 노출되면 식물 호르몬인 에틸렌을 과도하게 합성하여 식물의 성장을 억제하여 식물복원을 감소시킨다[6]. 본 실험에서는 환경스트레

Table 5. Identification of PGPR from the coastal sand dune rhizosphere of Pohang, Korea by 16S rDNA sequencing.

Strains	Identification	Similarity (%)
IB1-1	<i>Bacillus subtilis</i>	99.7
IB1-5	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	100
IB2-9	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	100
IB3-8	<i>Pseudomonas putida</i>	99.7
IB4-7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100
IB4-13	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100
IB4-14	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.8
IB4-15	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.7
IB5-5	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	100
IB5-7	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.9
IB5-8	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	100
IB5-9	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	99.9
IB5-10	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	100
IB5-14	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	99.8
IB6-5	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	99.8
IB6-7	<i>Bacillus vallismortis</i>	99.9
SD7-1	<i>Bacillus subtilis</i>	99.6
SD7-7	<i>Bacillus subtilis</i>	99.7
SD7-16	<i>Bacillus subtilis</i>	99.8
SD11-6	<i>Bacillus cereus</i>	99.9
SD11-9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.7
SD11-10	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.8

스에 작용하는 스트레스 반응의 지표인 에틸렌의 전구체 ACC(1-Amino cyclopropane-1-carboxylic acid)를 분해하는 ACC deaminase를 생산하는지 여부를 조사하였다. ACC 분해효소인 ACC deaminase를 생산하는 근권미생물은 식물뿌리내의 에틸렌의 전구체인 ACC농도를 감소시켜 결과적으로 에틸렌의 합성을 줄이고 따라서 식물의 성장을 촉진시키는 작용을 한다[6]. ACC deaminase 생산성 검토 실험은 선발된 다기능 사구 PGPR균주들이 질소원으로 ACC만을 첨가한 배지에서의 생육여부를 보고 판단하였다. 그 결과 23종의 분리된 세균 중 20종의 세균이 ACC만을 질소원으로 한 배지에서 생장이 가능했다. 하지만, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 질소원으로 한 배지에서의 생육에 비하여 현저하게 생장이 낮아 단지 ACC를 질소원으로 이용할 수 있다는 것만을 보여주었고, 선발 균주 IB4-14은 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 ACC를 분해하는 ACC deaminase의 생산능이 매우 좋아 ACC만을 질소원으로 한 배지에서도 생장능이 좋았다. 이러한 결과는 본 연구에서 선발된 사구 PGPR균주는 건조 및 고염 조건의 사구지역에서도 잘 자랄 수 있을 뿐만 아니라 사구식물에 노출되어있는 환경스트레스도 완화 할 수 있음을 보여주는 것이다. 또, 본 연구에서 선발된 다기능 사구 PGPR 균주가 가지고 있는 옥신생산능, 식물진균병 길항능, 인산가용화능, ACC deaminase 생산능 등은 PGPR균주를 이용한 사구식물상의 생태복원이 매우 용이할 뿐만 아니라 복원처리에도 매우 적합하다는 것을 보여준다.

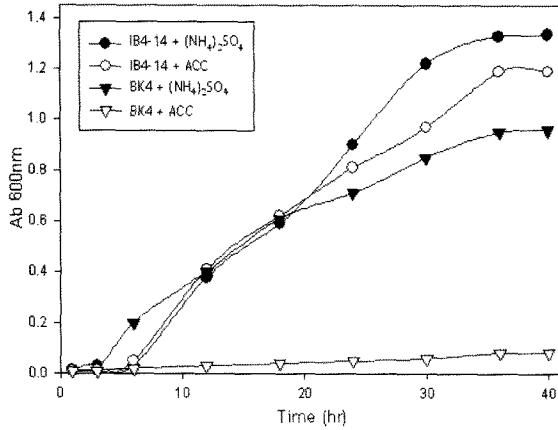


Fig. 1. Production of the ACC deaminase from the selected strain IB4-14 (growth on ACC as sole nitrogen source). The antagonistic strain BK4 was negative control (no ACC deaminase activity) and ACC and (NH₄)₂SO₄ were nitrogen source.

다양한 염농도에 따른 사구 근권미생물의 성장능 및 옥신 생산능 조사

선발된 다기능 사구 PGPR균주의 실제 사구토양내 염 적응능 알아본 결과 선발된 23종의 균주 모두 0-4% NaCl 농

도까지는 균체의 생육과 옥신 생산능이 95%이상 일정하게 유지되었으며, 5% NaCl 농도에서는 균체생장이 60%로 옥신 생산능은 50%로 감소하였다. 하지만, 6% NaCl 농도가 지는 균체의 생장이 50% 이상을 유지하였고 옥신생산능도 30% 이상을 유지하였다(Table 5). 이 같은 결과는 우리나라 연근해의 바닷물의 농도가 3-4%를 유지하고 있으므로 본 연구에서 선발된 사구식물 근권미생물을 사구현장 생태적 복원에 적용하기에 매우 적합하다는 것을 보여주는 것이다.

사구식물에 대한 생장촉진능 in vivo 검증

선발된 옥신생산성 사구 PGPR균주인 *P. fluorescens* IB4-14의 식물생장촉진효과를 사구식물인 갯까치수영의 종자 발아촉진실험을 통하여 검증하고자 하였다. 발아촉진실험을 실시한 후 4일째부터 발아가 시작되는 것을 관찰할 수 있었고, 6일째부터는 균체 처리구에서 차이를 볼 수 있었다. Fig. 2에서 보이는 것처럼 발아개수는 물 처리 대조구가 13개 (65%), 선발된 옥신생산균주인 *P. fluorescens* IB4-14 처리구가 14개 (70%)로 근소하게 많았지만, 발아된 뿌리길이에서는 물 처리 대조구에 비하여 확연한 생장촉진효과를 확인할 수 있었다. 이와같은 결과는 옥신생산성 다기능 근권균주인 *P. fluorescens* IB4-14가 실제 포트실험을 통하여 갯까치수영

Table 6. Effect of cell growth and auxin production on the various concentration of NaCl.

Strains	Concentration of NaCl (%)					
	0		4.0		6.0	
	cell growth	production of auxin ^a	cell growth	production of auxin	cell growth	production of auxin
IB1-1	3.8×10 ⁸	100 (%)	3.7×10 ⁸	96 (%)	6.6×10 ⁴	30 (%)
IB1-5	1.5×10 ⁷	100	1.5×10 ⁷	95	1.4×10 ⁴	30
IB2-9	4.5×10 ⁸	100	4.3×10 ⁸	95	5.7×10 ⁴	31
IB3-8	8.9×10 ⁸	100	8.7×10 ⁸	98	4.0×10 ⁴	41
IB4-7	2.5×10 ⁹	100	2.0×10 ⁹	95	9.1×10 ⁴	32
IB4-13	6.4×10 ⁷	100	6.0×10 ⁷	96	7.5×10 ⁴	31
IB4-14	2.8×10 ⁸	100	2.1×10 ⁸	96	1.9×10 ⁴	35
IB4-15	2.0×10 ⁸	100	1.9×10 ⁸	96	3.6×10 ⁴	30
IB5-5	8.1×10 ⁹	100	8.0×10 ⁹	99	1.7×10 ⁵	59
IB5-7	1.8×10 ⁸	100	1.5×10 ⁸	98	1.3×10 ⁴	60
IB5-8	3.4×10 ⁹	100	3.3×10 ⁹	98	3.8×10 ⁵	65
IB5-9	2.7×10 ⁹	100	2.6×10 ⁹	98	9.7×10 ⁴	64
IB5-10	2.2×10 ⁹	100	2.0×10 ⁹	98	8.1×10 ⁵	65
IB5-14	4.2×10 ⁸	100	4.2×10 ⁸	99	5.1×10 ⁴	51
IB6-5	9.1×10 ⁸	100	9.1×10 ⁸	95	8.9×10 ⁴	31
IB6-7	2.3×10 ⁹	100	2.3×10 ⁹	95	6.0×10 ⁵	30
SD7-1	6.1×10 ⁸	100	6.0×10 ⁸	95	6.6×10 ⁴	45
SD7-7	2.5×10 ⁸	100	2.2×10 ⁸	95	5.5×10 ⁴	45
SD7-16	2.5×10 ⁸	100	2.5×10 ⁸	96	2.6×10 ⁴	45
SD11-6	8.0×10 ⁷	100	8.0×10 ⁷	92	5.1×10 ³	31
SD11-9	1.5×10 ⁷	100	1.0×10 ⁷	96	1.5×10 ³	30
SD11-10	3.2×10 ⁶	100	3.0×10 ⁶	98	1.2×10 ³	31

^a The numbers were presented auxin production as percentage (%) relative to auxin production of 0% NaCl.

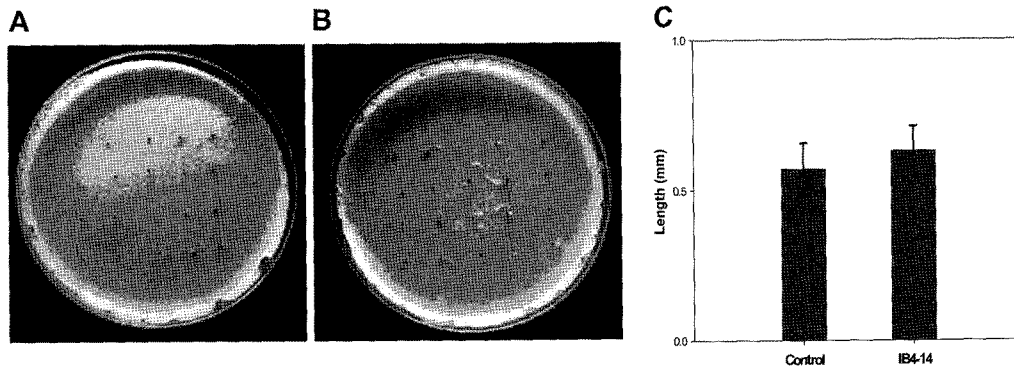


Fig. 2. The plant growth promotion by *P. fluorescens* IB4-14 on the seed germination and root elongation of *Lysimachia mauritiana* Lam (spoonleaf yellow loosestrife). A and B are seed germination test, C is root elongation test. A, only water treated; B, *P. fluorescens* IB4-14 treated.

을 비롯한 다양한 사구식물에서 생장촉진효과만 검증된다면 충분히 실제 해안사구에 적용하여 해불 만한 가치가 있다고 생각된다.

요 약

경북 포항지역의 해안사구지역에서 서식하는 11종의 해안 사구 식물의 근권으로부터 1,330균주의 근권세균들을 분리 하였다. 이들 분리된 근권세균들 중에서 9종의 주요 식물병원성 진균인 *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Corynespora cassiicola*, *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* AG-1(IA), *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* AG-1(IB)에 대하여 넓은 항진균성 스펙트럼을 가지고 동시에 생장촉진호르몬 옥신을 생산하는 23 균주의 근권세균을 선발하였다. 1차 선발된 23균주의 옥신 생산성 사구식물근권세균들에서 19균주가 항진균성 siderophore를, 4균주가 항진균성 cellulase를 생산할 수 있었으며, 17균주는 불용성 인산염을 분해할 수 있었다. 또, 23균주의 선발된 사구식물생장 촉진 근권세균들은 16S rDNA 염기서열 조사와 Bergey's manual에 의하여 99%이상의 상동성을 가지는 7균주의 *Bacillus* sp.균주들과 15균주 *Pseudomonas* sp.균주들로 동정할 수 있었다. 한편, 이들 중 다기능 사구식물생장촉진 근권세균인 *Pseudomonas fluorescens* IB4-14는 고염, 건조와 같은 환경스트레스에 저항성을 가질 수 있게 하는 ACC deaminase를 생산하므로써 식물생장촉진은 물론이고, 환경스트레스 저항성 기작을 가지는 다기능 균주이었다. 또한, 선발된 옥신생산성 다기능 균주인 *P. fluorescens* IB4-14는 사구식물인 갯까치수영의 종자발아능과 뿌리생장 촉진능에서 우수한 생육촉진능을 발휘함을 확인하였으므로 사구식물 복원에 사용할 미생물제제의 구성균주로 선발되었다고 생각한다.

감사의 글

본 연구는 환경부 ‘차세대 핵심환경기술개발사업’으로 지원받은 과제이므로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bhat, K. M. and R. Maheshwari. 1987. Sporotrichum thermophile growth, cellulose degradation and cellulase activity. *Appl. Env. Microbio.* **53**: 2175-2182.
- Chio, D. W. and I. G. Kim. 1996. Respection of pectic enzyme among the hydrolysis enzymes of plant cell wall. *Korean J. Food & Nutrition.* **9**: 92-101.
- Chun, J. O., Y. S. Hwang and J. C. Lee. 1995. Effect of cell wall hydrolase and Ca^{++} hydrolysis of isolated apple cell wall. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **13**: 206-207.
- Devender K. J. and G. David. 1984. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.* **31**: 206-210.
- Elad, Y. and R. Baker. 1985. Influence of trace amounts of cautions and siderophore producing *Pseudomonads* on chlamydospore germination of *Fusarium oxysprum*. *Phytopathol.* **75**: 1047-1052.
- Glick B. R. 2003. Phytomediation: synergistic use of plants and bacteria to clean the environment. *Biotechnol. Adv.* **21**: 383-393.
- Holt, J. G. N. R. Krieg, P. H. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th., Williams and Wilkins, U.S.A. 1004-1139.
- Katiyar, V. and G. Reeta. 2004. Improved plant growth from seed bacterization using siderophore overproducing cold resistant mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 653-657.
- Kim, D. H., H. K. Jung, and S. D. Kim. 2004. Selection and identification of Auxin- producing Plant growth promoting rhizobacteria having phytopathogen antagonistic activity. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**: 17-21.

10. Kowalchuk, G. A., F. A. de Souza, and J. A. van Veen. 2002. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Mol. Ecol.* **11**: 571-581.
11. Lee, J. M., H. S. Lim, T. H. Chang, and S. D. Kim. 1999. Isolation of siderophore-producing *Pseudomonas fluorescens* GL7 and its biocontrol activity against root-rot disease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **27**: 427-432.
12. Lee, M. S., J. O. Do, M. S. Park, S. Jung, K. H. Lee, K. S. Bae, S. J. Park, and S. B. Kim. 2006. Dominance of *Lysobacter* sp. in the rhizosphere of two coastal sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *Antonie Leeuwenhoek* **90**: 19-70.
13. Lim, S. U., T. G. Lee, and D. M. Sa. 1995. Isolation and physiological characteristics of auxin-producing soil bacteria. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **28**: 75-82.
14. Opelt, K. and G. Berg. 2004. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of Baltic sea coast. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6569-6579.
15. Park, M. S., S. R. Jung, K. H. Lee, M. S. Lee, J. O. Do, S. B. Kim, and K. S. Bae. 2006. *Chryseobacterium soldanellicola* sp. nov. and *Chryseobacterium taeanese* sp. nov., isolated from roots of sand-dune plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 433-438.
16. Reva, O. N., C. Dixelius, J. Meijer, and F. G. Priest. 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 249-259.
17. Seong, K. Y. 1995. Factors influencing siderophore production by plant growth promoting rhizopseudomonas strains. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **28**: 287-294.
18. Shin, D. S. et. al. 2007. Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of coastal sand dune plants. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 1361-1368.
19. Shivanna, M. B., M. S. Meera, and M. Hyakumachi. 1994. Sterile fungi from zoysia grass rhizosphere as plant growth promoters in spring wheat. *Can. J. Microbiol.* **40**: 637-644.
20. Vyas, Pratibha, P. Rahi, A. Chuhan, and A. Gulati. 2007. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of *Eupenicillium parvum* from tea soil. *Microbiological Research.* **167**: 931-938.
21. Waring, W. S. and C. H. Werkman. 1942. Growth of bacteria in an iron-free medium. *Arch. Biochem.* **1**: 303-310.
22. Weinberg, E. D. 1974. Iron and susceptibility to infectious disease. *Science.* **184**: 952-956.

(Received Sep. 9, 2008/Accepted Nov. 13, 2008)