

## 습지에서 분리한 질소고정 세균인 *Mycobacterium hominis* sp. AKC-10의 특성

홍선화 · 신기철 · 이은영\*  
수원대학교 환경에너지공학과

**Characterization of a Nitrogen Fixing Bacteria *Mycobacterium hominis* sp. AKC-10 Isolated from the Wetland.** Hong, Sunhwa, Ki Chul Shin, and Eun Young Lee\*. *Department of Environmental Engineerin and Environmental Microbiology, Suwon University, Gyeonggi 445-743, Korea* – Nitrogen is an element need to grow plants growth. Plants take up nitrogen in the form of nitrate or ammonium. Most of plants absorb nitrogen source as fertilizers. But from 50 to 70% of fertilizers applied were washed away. This study was conducted to isolate free-living nitrogen fixing bacteria from reed and to examine its beneficial traits for developing sustainable biofertilizers. Enriched consortium obtained from a reed in Ansan was developed for the fixing of nitrogen. Nitrogen fixing bacteria isolated from an enriched culture in Congo Red Medium was analyzed by 16s rDNA sequencing. AKC-10 was isolated and shown to have excellent nitrogen fixing ability. The optimum conditions of nitrogen fixing ability were 25°C ( $237.50 \pm 39.65$  nmole · mg-protein<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> and pH 7 ( $168.335 \pm 12.84$  nmole/hr mg-protein). It was identified as *Microbacterium hominis* [(AKC-10 (similarity : 99%)]. This strain was had to IAA (indole-3-acetic acid) productivity and ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) deaminase activity. Therefore, *Microbacterium hominis* AKC-10 stimulated plant development in the soil, enhancing the efficiency of remediation.

**Key words:** *Mycobacterium hominis* sp., nitrogen, nitrogen fixing bacteria, plant growth-promoting rhizobacteria

질소(Nitrogen; N)는 모든 생물이 살아가는데 꼭 필요한 원소로, 단백질, 핵산(nucleic acids) 그리고 다른 종류의 많은 유생분자(biomolecules)의 구성 요소이다[29]. 환경에서 질소는 대기 중의 기체형의 질소(dinitrogen; N<sub>2</sub>)로 가장 많이 존재하지만, 매우 안정된 구조를 이루고 있어서 살아있는 생물체가 스스로 이용할 수 없다[31]. 따라서, 대부분의 생물은 질소를 단백질, 암모니아 또는 질산염과 같은 형태로 ‘고정(fixation)’하여 이용한다[31]. 이러한 역할을 하는 미생물을 ‘질소고정세균’이라 부르며, 질소고정세균은 대기 중에 존재하는 질소를 생물체가 이용할 수 있는 암모늄염 등으로 변화시켜 생지화학적 질소순환에 있어 질소원을 제공하는 역할을 한다[27, 29, 34, 36]. 질소고정세균은 자연계에서 콩과식물의 뿌리혹에 기생하며 현재까지 알려져 있는 질소고정세균으로는 완두(*Pisum sativum*) 속에 기생하는 *Rhizobium leguminosarum*, 까치콩(*Dolichos lablab*) 속에 기생하는 *Rhizobium phaseali*, 전동싸리(*Melilotus suaveolens*) 속에 기생하는 *Rhizobium meliloti*, 개미자리(*Sagina japonica*) 속에 기생하는 *Rhizobium trifolii*, 콩 속에 기생하는 *Rhizobium japonicum* 그 밖에 *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* 그리고 *Azorhizobium*이 이에 속하는 것으로 알려져 있다[18, 25].

자연계에는 질소고정능을 가진 세균 이외에도 다양한 방법으로 식물의 성장을 촉진하는 미생물이 존재하는데, 이를 식물 성장 촉진 근권세균(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)이라 부른다[1, 2, 10, 16, 32]. PGPR은 Kloepper과 Schroth에 의해 처음으로 정의 되었으며[16], 이들은 식물 뿌리에 흡착하거나, 뿌리에 균락을 형성하고 뿌리삼출물을 이용하여 성장하게 된다. 근권세균은 항생물질을 생산하여 식물 병원균으로부터 식물을 보호하거나, 식물의 성장을 조절하는 효소를 생산하거나, 여러 대사를 통하여 토양 내의 인과 같은 미네랄을 가용화 시켜 식물이 흡수하기 쉽게 도와주는 등의 역할을 한다[13, 16, 19, 20]. 지금까지 알려져 있는 PGPR은 *Amaranthus* sp., *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. 그리고 *Setaria faberi* 등이 있다. 이들 균주는 후추(*Piper nigrum*)와 토마토(*Lycopersicon esculentum*), 상추(*Lactuca sativa*), 사과(*Malus domestica*), 라즈베리(*Rubus idaeus*) 그리고, 스위트체리(*Prunus avium lam*) 등의 식물 성장을 향상 시키는 것으로 알려져 있다[3, 4, 23, 30].

질소고정능을 가진 세균을 포함한 식물의 성장을 촉진하는 세균은 유류를 포함한 유기오염물과 중금속과 같은 무기오염물로 오염된 토양을 정화하는데 있어 식물을 이용한 식

\*Corresponding author

Tel: 82-31-220-2614, Fax: 82-31-220-2533

E-mail: ley@suwon.ac.kr

물상 복원에 함께 이용하여 오염된 토양의 정화 효율을 증대시킨다[13, 16]. 이에 본 연구에서는 오염된 토양의 정화에 이용하고자 질소고정능력과 식물의 성장을 촉진할 수 있는 능력을 가진 세균을 분리하여 특성을 조사하였다.

**균주 분리, 동정 및 질소고정능 평가**

균주를 분리하기 위한 시료채취는 식물 주변, 근권토양 그리고 식물이 서식하고 있는 호수물을 위주로 채취하였으며 시료채취 장소는 Table 1에 나타내었다. 채취한 모든 시료는 변질을 방지하기 위해 아이스박스에 넣어 4°C를 유지하여 운반하였다. 균주 분리를 위하여 사용한 Burk's medium (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 10 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.41 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.52 g/L; LNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05 g/L; CaCl<sub>2</sub>, 0.2 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/L; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.005 g/L; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.0025 g/L; Agar, 15 g/L), Congo medium(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 g/L; NaCl, 0.1 g/L; yeast extract, 0.5 g/L; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.015 g/L; DL-malic acid, 5 g/L; KOH, 4.8 g/L; Agar, 20 g/L) 그리고 NFB medium(Malic acid, 5.0 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 g/L; NaCl, 0.1 g/L; CaCl<sub>2</sub>, 0.02 g/L; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.002 g/L; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.001 g/L; KOH, 4.5 g/L; biotin, 0.0001 g/L; Fe-EDTA(1.64% (w/v)), 4.0 mL/L; Agar, 15 g/L; yeast extract(고체배지에서만 첨가하여줌), 0.02 g/L)을 이용하였다. 모든 생물의 생장에 필요한 주요 영양소로는 탄소원과 질소원이 가장 중요하다. 위의 질소고정세균 분리용 배지는 무기염과 탄소원만 들어 있고 질소원이 결핍된 배지로서 대기중의 질소를 고정할 능력이 있는 균주만이 성장할 수 있는 선택배지이다.

12곳에서 채취한 시료는 각각 250 mL 삼각플라스크에 멸균수 90 mL과 시료 10 g을 넣은 후 혼합하여 진탕배양기에 15분간 배양하였으며, 진탕배양기는 30°C, 180 rpm으로 운전하였다. 15분간 진탕 배양된 시료 중 혼탁액 5 mL을 분

취하여 250 mL 삼각플라스크에 넣은 후 50 mL의 액체 배지(Burk's, Congo Red 그리고 NFB)에 넣은 후 일주일간 농화배양 하였다. 농화배양은 모두 4번의 새 배지로의 계대배양을 진행하였으며, 이중 순수 분리를 하기에 앞서 각각의 배양액의 질소고정능력을 평가하였다. 질소고정능력을 가지고 있는 배양액을 고체배지(Burk's Agar, Congo Red Agar, NFA)에 도말하였다. 균주는 아세틸렌 활성도를 1 nmole mg protein<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> 이상 나타냈던 샘플에 대해서 고체배지에 도말을 하였다. 배지의 종류에 따라서, Burk's Agar 배지에 도말한 균주의 경우 7일 동안 배양하고, Congo Agar 배지 그리고 NFB agar 배지에 도말한 균주는 3일 동안 배양하였다. 배양된 균주는 색과 모양에 따라 분리되어 새 배지에 도말 하였고, 각 colony의 질소고정 능력을 평가하였다.

균주의 질소고정 능력을 평가하기 위해 acetylene(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)을 ethylene(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)으로 환원 시키는 아세틸렌 환원법[15]을 사용하였다. 시료 및 미생물을 120 mL vial에 20 mL 배지(Congo Red Medium)를 넣고, 3일간 30°C, 180 rpm으로 배양하였다. 배양된 질소 고정 활성 측정 vial에서 10%의 공기(10 mL)를 뽑아 낸 후, 다시 10%의 아세틸렌 가스(10 mL)를 주입하였다. 아세틸렌 가스를 주입한 vial은 30°C로 유지하며, 180 rpm에서 24시간 배양한 후, 환원되어 나오는 에틸렌 가스를 gas chromatography(Hewlett Packard model HP 5890, USA)로 분석하였다. 분석에 사용한 column은 Porapak-N(Mesh : 2 m(L), 3 mm internal diameter)이고, 분석조건은 oven 온도는 65°C로 carrier gas(N<sub>2</sub>)는 22 mL/min이고, injector 온도는 100°C, detector는 150°C로 하였다. 질소 고정능력을 측정 후, 질소 고정 미생물의 생체량을 측정하기 위해 Bradford 등(1976)의 단백질 정량법을 사용하여 측정하였다. 측정된 시료의 1 mL를 분취하여 1.5 mL microtube에 주입한 후, 12,000 rpm으로 3분간 원심분리를 실시하였다. 상등액은 버리고, 침전물에 1 mL의 멸균수를 주입한 후, 3 분간 혼합하였다. 그 다음 10 mL의 vial에 옮

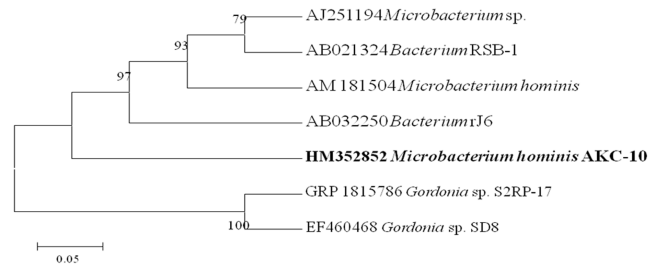
**Table 1. Sampling site and nitrogenase activities of isolates.**

No	Location	Source	Activity (nmole/hr mg-protein)
1	Bukok-ri, Paju-si Gyeonggi-do	Rhizosphere soil of soybean white ( <i>Glycine max</i> )	1.33
2	Wetland park, Ansan-si Gyeonggi-do	Lake water around reed ( <i>Phragmites communi</i> )	137.56
3	Kunsa-ri, Seosheon-gun, Chungcheongnam-do	Soil around paddy field	1.78
4	Hyeon-ri, Gapyeong-gun Gyeonggi-do	Lichen ( <i>Rhacomitrium canescens</i> ) and around soil	0.00
5	Sindun-myeon, Icheon-si, Gyeonggi-do	Rhizosphere soil of rice ( <i>Oryza Sativa</i> L.)	24.56
6	Wau-ri, Hwasung-si, Gyeonggi-do	Rhizosphere soil of rice ( <i>Oryza Sativa</i> L.)	0.00
7	Hyangnam-ri, Hwasung-si, Gyeonggi-do	Rhizosphere soil of rice ( <i>Oryza Sativa</i> L.)	0.00
8	Jeongok-ri, Yonchon-gun, Gyeonggi-do	Rhizosphere soil of rice ( <i>Oryza Sativa</i> L.)	0.00
9	Hyangnam-ri, Hwasung-si, Gyeonggi-do	Rhizosphere soil of rice ( <i>Oryza Sativa</i> L.)	0.00
10	Bibong wetland, Hwasung-si, Gyeonggi-do	Reed ( <i>Phragmites communi</i> ), Lake water around lotus ( <i>Nelumbo nucifera</i> )	0.00
11	Jungnam-myeon, Hwasung-si, Gyeonggi-do	Rhizosphere soil of rice ( <i>Oryza Sativa</i> L.)	0.00
12	Hoengseong-si, Gangwon-do	Livestock liquefied fertilizer	0.00

진 후, 4 N의 NaOH 1 mL를 주입한 후, 30분간(80°C)의 온도에서 중탕하였다. 그 후 dye reagent concentrate(Bio-Rad protein assay, Bio rad laboratories, INC. USA): D.W.를 1:4(v/v)으로 혼합한 후, 혼합액을 여과지(Whatman, USA)로 이용하여 여과하였다. 중탕이 완료된 샘플(미생물과 4 N의 NaOH 혼합액)은 40 µL를 분취하여 큐벳에 주입하였다. 그후, 발색시약을 2 mL 주입하여, 5분 이상 발색시켰다. 발색 시작 후, 1시간 가량 안정화되며, 발색되면 UV/VIS spectrophotometer(Model DR5000, Hach, USA), 595 nm에서 단백질을 정량하였다. 단백질 정량시 사용한 표준물질은 bovine serum albumin(BSA; Bio-Rad, USA)을 사용하였다.

배지의 pH만 5, 6, 7, 8 그리고 9로 달리하여 균주의 질소 고정 활성을 평가하였다. pH의 조절은 Citric acid buffer, Phosphate buffer, Glycine buffer, NaOH buffer를 이용하여 조절하였고, 100 mL의 vial에 각각의 pH 용액 20 mL를 주입한 후, AKC-10 배양액을 2 mL를 주입하여 30°C에서 3일간 배양한 후, gas chromatography를 통해 질소고정 능력을 측정하였다.

12곳에서 채취한 시료의 질소고정능력을 확인한 결과를 Table 1에 나타내었다. 그 결과, 경기도 안산 습지공원에서 채취한 갈대(*Phragmites communi*)주변의 호수 시료의 질소 고정 활성능력은 137.56 nmole/hr-mg protein으로 가장 우수하였고, 경기도 이천시 신둔면의 벼뿌리 토양은 24.56 nmole/hr-mg protein으로 나타났다. 총 12개의 지역에서 선별된 12종의 균주가 분리되었으며, 이 중 ARA활성이 있는 것은 4균주로 나타났다. 앞서 설명한대로 ARA활성은 분리 균주를 3일간 전배양하고 acetylene가스를 넣고 24시간의 활성을 조사하는 것이므로 실험조건에서 활성을 보인 균주로는 4종류가 확정되었다. 다른 균주의 경우 배양시간이나 acetylene 치환시간을 길게 연장할 경우 활성을 보일 수 있으나, 일반적인 ARA활성도 검사 시간을 기준으로 실험한 결과이다. 활성을 보인 4균주 중 두 지역의 시료를 대상으로 질소고정 능력이 우수한 순수 균주를 분리한 하였다. 분리한 균주 중 질소고정능력이 가장 우수한 균주는 16S rDNA 부분 염기서열을 분석하였다[21]. 분석된 균주는 the National Center for Biotechnology Information(NCBI) website의 basic Local Alignment Search Tool(BLAST) algorithm을 통해 GenBank database와 비교하여 동정하였다. 또한, 계통수(Phylogenetic Tree)를 그리기 위하여 Bioedit 프로그램으로 염기서열들을 편집한 다음, Clustal X 프로그램으로 염기서열을 정렬하였다. 계통수는 MEGA4 프로그램을 사용하여 구축하였다. 가장 우수한 질소고정능을 가진 균주는 경기도 안산 습지공원에서 채취한 갈대(*Phragmites communi*)주변의 호수물에서 *Mycobacterium hominis* sp. AKC-10(accession number : HM352852)이 분리되었다. 분리한 균주는 DNA 염기서열을 분석한 후 개통학적 특성을



**Fig. 1. Phylogenetic tree illustrating the relationship of the *Mycobacterium hominis* sp. AKC-10.**

알아보기 위해 phylogenetic tree를 작성하여 나타내었다(Fig. 1). 분석된 AKC-10의 DNA 염기서열은 총 1385 bp였고, NCBI Blast search한 결과 AKC-10은 밀뿌리의 성장을 촉진하는 *Mycobacterium hominis* sp. MAS133와는 1370/1371(99%)로 가장 유사하였으며, Phenanthrene을 분해하는 78균주와 1383/1385(98%)의 유사성을 가지고 있는것으로 나타났다.

일반적으로 질소고정세균은 벼뿌리 식물과 콩과식물의 뿌리에 많이 존재하고 있으며[17], 지금까지 알려져 있는 질소고정세균은 주로 *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Deraxia* 그리고 *Rhizobium* sp. 등이 보고 되고 있다[18, 25, 35]. 본 연구에서 분리된 *Mycobacterium hominis* sp. AKC-10은 지금까지 보고된 질소고정세균과는 다른 계통군으로 *Actinobacteria*와 유사한 계통 속에 속하는 것을 알 수 있었다.

분리 균주의 질소 고정능 특성은 다음과 같은 방법으로 조사하였다. 균주 성장에 배양온도가 미치는 영향을 조사하기 위해 15, 20, 25 그리고 30°C로 설정하여 실험을 수행하였다. 120 mL의 vial에 Congo Red Medium 20 mL과 AKC-10의 배양액을 2 mL 주입하여, 각각 다른 온도의 배양기에서 170 rpm, 3일간 배양한 후, 10%의 acetylene으로 기상부의 10%에 해당하는 10 mL의 공기를 치환하였다. 치환된 vial은 기존 배양되었던 각각의 온도에서 24시간 배양된 후, gas chromatography를 통해 질소고정 능력을 측정하였다.

*Mycobacterium hominis* sp. AKC-10의 생리적 특성을 알아보기 위해 배지의 pH와 배양온도를 달리하여 실험을 수행 하였다(Fig. 2.). pH의 변화에 따른 영향을 살펴보기 위해 초기 pH가 5, 6, 7, 8 그리고 9에서 AKC-10균주의 질소고정능력을 조사하였다(Fig. 2(a)). 배지의 pH가 5와 9일 때는 균주의 질소고정능력이 없었으며, 중성배지인 pH 7에서는 질소고정능력이  $237.50 \pm 39.65$  nmole/hr mg-protein으로 가장 우수하였다.

온도는 질소고정 세균이 대기 중의 질소를 고정하는데 중요한 인자 중 하나이다. 온도를 15, 20, 25 그리고 30°C로 달리하여 AKC-10균주의 질소고정능력을 조사하였다(Fig. 2(b)). 이때 30°C이상에서 균주 배양을 하지 않은 이유는 질소고정 세균은 토양에서 성장하는 균주이기 때문에 배제하

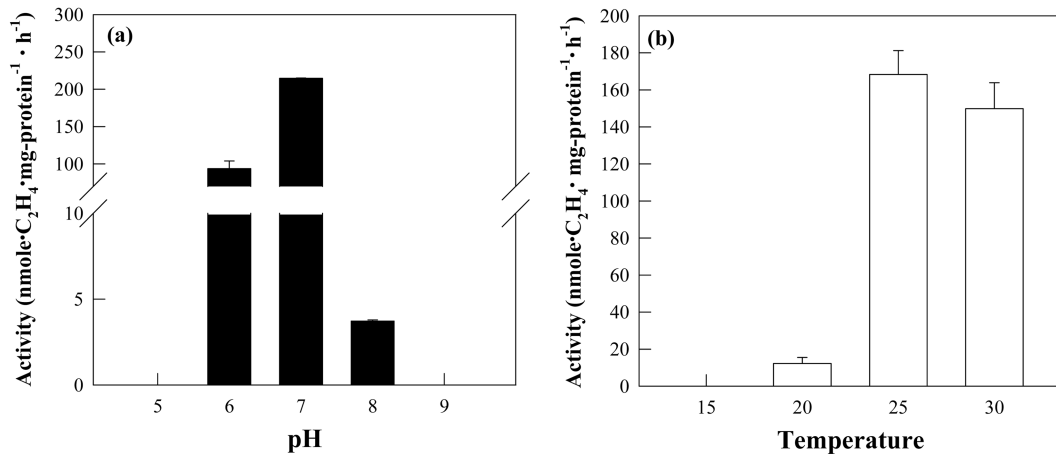


Fig. 2. Effects pH (a) and temperature (b) on the acetylene reduction activity test of *Mycobacterium hominis* sp. AKC-10. ■, pH; □, temperature.

였다. AKC-10균주는 25°C에서 질소고정능력이  $168.335 \pm 12.84$  nmole/hr mg-protein로 가장 우수하였고, 온도가 15°C에서는 0 nmole/hr mg-protein으로 낮은 배양온도에서는 질소고정능력이 없었다. 일반적으로 알려진 질소고정세균은 최적의 pH와 최적 온도가 각각 6.9-7.3 및 28-30°C로 알려져 있다[9]. 그런데 분리 균주 AKC-10은 발육 최적 pH가 7로 일반 질소고정균과 같은 경향을 보였지만, 생장을 위한 최적의 온도는 25°C로 다른 질소고정 균주와 다른 경향을 보였다. 이러한 이유는 AKC-10 균주를 분리한 인공습지의 7월 평균 온도가 22~24°C였기 때문이라고 시료된다.

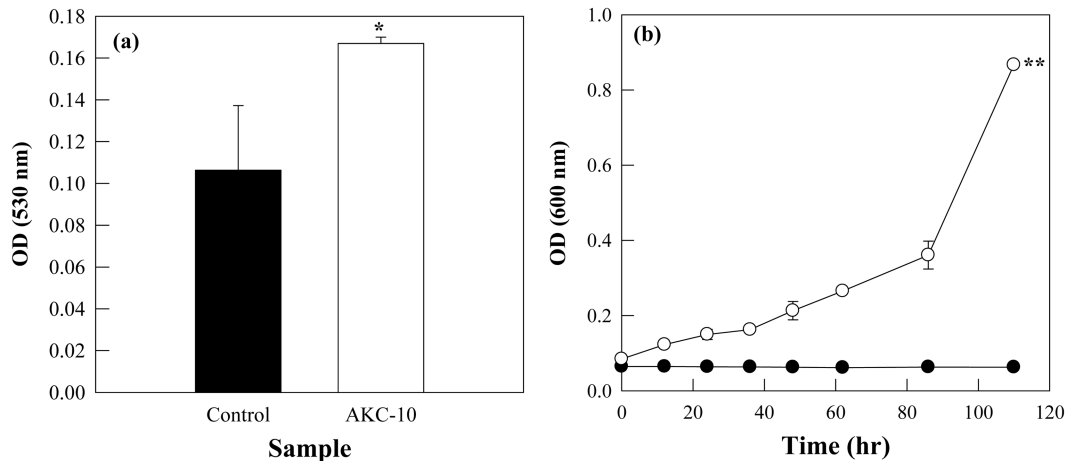
### 분리 균주의 식물성장 촉진 능력 평가

분리한 균주 중 질소고정능력이 가장 우수한 균주를 대상으로 식물성 호르몬인 IAA(indole-3-acetic acid) 생산능을 다음과 같은 방법으로 평가하였고, 모든 실험은 3회 반복하였다. 균주를 각각 0.5 mg/mL의 tryptophane을 첨가한 DF 배지[8] 5 mL에 접종하여 30°C에서 180 rpm으로 5일간 배양하였다. DF 배지의 조성은 다음과 같다: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 15 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.0 mg; B(as H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), 10 µg; Mn(as MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), 11 µg; Zn(as ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), 125 µg; Cu (as CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), 78 µg; Mo(as Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O), 17 µg; 증류수, 1 L). 균주를 배양 후, 배양액과 Salkowski's reagent (진한 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 mL; 증류수, 250 mL; 0.5 M FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 7.5 mL)를 1 : 2(v/v)의 비율로 섞은 후, 분홍색으로 발색되는 동안 상온에서 20분간 정치하였다. 발색되는 정도는 흡광도계(DR5000 UV-Visible Spectrophotometer, HACH, USA)를 이용하여 530 nm에서 흡광도로 측정하였다. 이렇게 측정된 흡광도 값은 SPSS(12.0K)를 이용하여 균주를 접종하지 않은 대조군과 two sample t-test를 수행하였다 ( $p < 0.05$ ).

ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) deaminase 활성은 다음과 같은 방법으로 평가하였다(실험에 사용된 배지는(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 대신 3 mM의 ACC를 넣은 DF medium이다). 분리한 각각의 colony들을 배지에 접종하여 30°C에서 180 rpm으로 48시간 동안 배양하였다. 배양기간 동안 흡광도계를 이용하여 4시간마다 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. SPSS(12.0K)를 이용하여 균주를 접종하지 않은 대조군과 two sample t-test 유의차 분석을 수행하여 균주의 ACC 이용 능력을 평가하였다[7].

Siderophores 합성능은 chrom azurol S(CAS) blue agar plate assay 방법을 이용하였다[28]. 1 L의 CAS agar를 만드는 방법은 다음과 같다: (1) dark-blue dye solution as a siderophores indicator(60.5 mg CAS를 50 mL 증류수에 녹인 다음 iron(III) solution 10 mL(1 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10 mM HCl)과 40 mL 증류수에 72.9 mg HDTMA 을 녹인 solution을 함께 첨가한 후, 멸균한다)와 (2) medium solution(750 mL 증류수에 100 mL 10× MM9 salts(60 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.9 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 g/L NaCl; 10 g/L NH<sub>4</sub>Cl), 15 g agar, 30.24 g PIPES 그리고 12.0 g의 50%(w/w) NaOH를 넣고 멸균하여 50°C로 식힌 후, 30 mL casamino acids(10%, w/v), 10 mL glucose(20%, w/v), 1 mL thiamine·HCl(0.2%, w/v), 그리고 3 mL L-tryptophane(1%, w/v)를 첨가한다)를 잘 섞은 후, petri dish에 30 mL씩 균혀 blue agar plate를 만들었다. 각각의 미생물을 CAS agar plate에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양하였으며, colony 주변에 orange halo가 형성되는 경우를 siderophores 합성 양상으로 평가하였다.

AKC-10 균주의 식물성장 능력을 조사하여 Fig. 3에 도시하였다. 그 결과, AKC-10 균주는 표준곡선으로 정량한 결과 19 mg/L의 IAA 생산능과 ACC deaminase활성을 가지고 있고, siderophores 합성능은 없었다. 식물성 호르몬은 옥신(auxin), 지베렐린(gibberellin), 시토키닌(cytokinin) 그리고



**Fig. 3.** IAA productivity (a) and ACC deaminase activity (b) of *Mycobacterium hominis* sp. AKC-10 cultured in DF medium supplemented with tryptophane and ACC, respectively. ●, control (w/o inoculation); ○, AKC-10. Star(\*) means the difference from control (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

기타 호르몬으로 분리가 된다. 이들의 기능은 서로 비슷하게 작용하며, 특히 식물 성장 호르몬인 옥신의 한 종류인 IAA는 식물 뿌리의 성장을 촉진 하며 높은 농도로 존재할 때는 뿌리의 형성을 방해한다[11, 24, 26]. IAA의 생산은 식물 뿌리의 성장과 직접적인 관계가 있으며[14], 일반적으로 PGPR은 host 식물에 있는 IAA와 같은 식물 호르몬은 식물 내부에 있는 pool의 제공에 의해 식물 성장에 영향을 미친다고 보고 되어있다[37]. 또한, ethylene은 식물성 호르몬의 일종으로 식물의 성장을 미치는 중요한 요소 중의 하나이며, 토양이 중금속에 노출될 경우 ethylene의 농도가 증가하게 된다[22]. Ethylene은 일정한 농도로 존재할 때는 식물의 뿌리 성장에 긍정적 영향을 미치지만 과다하게 분비 될 때는 식물의 뿌리 성장으로 저해하고 식물의 줄기 성장도 방해하게 된다[12, 20, 22, 24]. 이러한 ethylene의 농도를 조절해주는 것은 ethylene의 전구체인 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC)를 제거하는 것이다. IAA 생산능의 경우, 다른 균주에 비해 낮은 생산량을 나타냈지만, ACC deaminase활성의 경우 균주 배양 시간 110 시간을 기준으로 흡광도 값을 보았을 때  $0.87 \pm 0.00$ 으로 상당히 높은 ACC deaminase활성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다( $p < 0.01$ ). 그러므로 이러한 식물성장 촉진 능력을 가지고 있는 AKC-10 균주가 환경에 존재한다면 식물의 성장을 돕고, 그로 인해 식물상 복원의 효율을 증대시킬 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2009년 차세대 환경기술개발사업(2010-05002-0076-2)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Adenipekun, C. O. and O. S. Isikhuemhen. 2008. Bioremediation of engine oil polluted soil by the tropical white rot fungus, *Lentinus squarrosulus* Mont. (Singer). *Pak. J. Biol. Sci.* **11**: 1634-1637.
- Adeniyi, A. A. and O. J. Owoade. 2009. Total petroleum hydrocarbons and trace heavy metals in roadside soils along the Lagos-Badagry expressway, Nigeria. *Environ. Monit. Assess.* Published online, 24 July.
- Ahn, T. S., J. O. Ka, G. H. Lee, and H. G. Song. 2007. Revegetation of a lakeside barren area by the application of plant growth-promoting rhizobacteria. *J. Microbiol.* **45**: 171-174.
- Aslantas, R., C. Ramazan, and F. Sahin. 2007. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. *Sci. Horticulture-amsterdam.* **111**: 371-377.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-54.
- Burd, G. I., D. G. Dixon, and B. R. Glick. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can. J. Microbiol.* **46**: 237-245.
- Dell'Amico, E., L. Cavalca, and V. Andreoni. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**: 153-162.
- Dworkin, M. and J. W. Foster. 1958. Experiments with some microorganism which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.* **75**: 592-603.
- Eckert, B., O. B. Weber, G. Kirchhof, A. Halbritter, M. Stoffels, and A. Hartmann. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C(4)-grass *Miscanthus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 17-

- 26.
10. Fijalkowska, S., K. Lisowska, and J. Dlugonski. 1998. Bacterial elimination of polycyclic hydrocarbons and heavy metals. *J. Basic Microbiol.* **38**: 361-369.
  11. Frankenberger, W. T. Jr. and W. Brunner. 1983. Method of detection of auxin-indole-3-acetic acid in soil by high performance liquid chromatography. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**: 237-241.
  12. Glick, B. R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* **21**: 383-393.
  13. Glick, B. R., D. M. Karaturovic, and P. C. Newell. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *pseudomonads*. *Can. J. Microbiol.* **41**: 533-536.
  14. Glick, B. R., D. M. Penrose, and J. Li. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**: 63-68.
  15. Hardy, R. F., R. D. Holsten, E. K. Jackson, and R. C. Burns. 1968. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* **43**: 1185-1207.
  16. Johnson, D. L., D. R. Anderson, and S. P. McGrath. 2005. Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 2334-2336.
  17. Kahindi, J. H. P. 1997. Oxygen, hydrogen and nitrogen fixation in *Azotobacter*. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 863-869.
  18. Kalloniati, C., D. Tsikou, V. Lampiri, M. N. Fotelli, H. Rennenberg, I. Chatzipavlidis, C. Fasseas, P. Katinakis, and E. Flemetakis. 2009. Characterization of a *Mesorhizobium loti* -type carbonic anhydrase and its role in symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **191**: 2593-2660.
  19. Kennedy, I. R., L. L. Pereg-Gerk, C. Wood, R. Deaker, K. Gilchrist, and S. Katupitiya. 1997. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crop: Facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. *Plant soil* **194**: 65-79.
  20. Koo, S. Y. and K. S. Cho. 2006. Interaction between plants and rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal-contaminated soil. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 83-93.
  21. Koo, S. Y. and K. S. Cho. 2009. Isolation and characterization of a plant growth promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 1431-1438.
  22. Lebeau, T., A. Braud, and K. Jézéquel. 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environ. Pollut.* **153**: 497-522.
  23. Li, J. and R. J. Kremer. 2006. Growth response of weed and crop seedlings to deleterious rhizobacteria. *Biol. Control* **39**: 58-65.
  24. Ma, Y., M. Rajkumar, and H. Freitas. 2009. Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria. *J. Hazard. Mater.* **166**: 1154-1161.
  25. Oldroyd, G. E., M. J. Harrison, and M. Udvardi. 2005. Peace talks and trade deals. Keys to long-term harmony in legume-microbe symbioses. *Plant Physiol.* **137**: 1205-1210.
  26. Pattern, C. L. and B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* **42**: 207-220.
  27. Prell, J. and P. Poole. 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* **14**: 161-168.
  28. Schwyn, B. and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 47-56.
  29. Seefeldt, L. C., M. H. Brian, and R. D. Dennis. 2009. Mechanism of mo-dependent nitrogenase. *Annu. Res. Biochem.* **78**: 701-722.
  30. Siddiqui, Z. A. and K. Futai. 2009. Biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato using antagonistic fungi, plant-growth-promoting rhizobacteria and cattle manure. *Pest. Manag. Sci.* **65**: 943-948.
  31. Smil, V. 2001. Enriching the Earth: In Fritz Haber, Carl Bosch, and the Transformation of World Food Production. *J. Econo. His.* **61**: 874-875.
  32. Smreczak, B., B. Maliszewska-Kordybach, and S. Martyniuk. 1999. Effect of PAHs and heavy metals on activity of soil microflora. In: *Bioavailability of organic xenobiotics in the environment NATO ASI Series* **64**: 377-380.
  33. Sokhn, J., F. A. A. M. De Leij, T. D. Hart, and J. M. Lynch. 2001. Effect of copper on the degradation of phenanthrene by soil micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 164-168.
  34. Udvardi, M. K., and D. A. Day. 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 493-523.
  35. Whang, K. S. 2001. Taxonomic characteristics of nitrogen-fixing oilgotrophic bacteria from forest soil. *K. J. Microbiol.* **2**: 114-119.
  36. White, J., J. Prell, E. K. James, and P. Poole. 2007. Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* **144**: 604-614.
  37. Xie, H., 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. Microb.* **32**: 67-71.

(Received May 26, 2010/Accepted August 24, 2010)