

## Alginate에 고정화된 *Arthrobacter woluwensis* ED 처리 시 토마토의 생장촉진과 균주의 토양 내 잔류

권승탁 · 송홍규\*

강원대학교 생명과학과

## Growth Promotion of Tomato by Application of Immobilized *Arthrobacter woluwensis* ED in Alginate Beads

Seung-Tak Kwon and Hong-Gyu Song\*

Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

(Received February 14, 2014 / Accepted March 26, 2014)

In order to increase the persistence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in rhizosphere soil, the growth of tomato was examined after the application of *Arthrobacter woluwensis* ED immobilized in alginate bead, which was known as PGPR. When tomato seedlings were treated with *A. woluwensis* ED of  $1 \times 10^6$  cells g soil<sup>-1</sup> and incubated for 30 days in a plant growth chamber, the shoot length, root length, fresh weight and dry weight of the grown tomato plants treated with the suspended inoculants significantly increased by 36.2, 59, 51.1, and 37.5%, respectively compared to those of the uninoculated control. The treatment of the immobilized bacteria increased those by 42, 67.4, 62.5, and 60.4%, respectively compared to those of the uninoculated control. Therefore, the enhancement of tomato growth by the treatment of the immobilized bacteria was higher than those by the suspended inoculants. The effects of the inoculation on indigenous bacterial community and the fate of the inoculated bacteria were monitored by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. The DNA band intensity of *A. woluwensis* ED in the tomato rhizosphere treated with the suspended inoculants continuously decreased after the inoculation, but the band intensity in the tomato rhizosphere soils treated with the immobilized inoculants showed the maximum at 1 week after inoculation and the decreasing rate was less than that of the suspended inoculants, which indicated the longer maintenance of the immobilized bacteria at rhizosphere soils. Therefore, encapsulation of PGPR in alginate beads may be more effective than liquid inoculant for the plant growth promotion and survival of PGPR at plant rhizosphere.

**Keywords:** *Arthrobacter woluwensis*, alginate, immobilization, plant growth promotion

식물 근권에서 식물과 상호작용하여 여러 가지 식물호르몬과 영양물질을 제공할 수 있는 식물생장촉진 근권세균(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)의 미생물 비료로의 사용이 농업 및 임업 등의 분야에서 주목받고 있으며, 식물에 적용 시 식물 생장촉진에 효과적인 것으로 보고되어 있다(Segura *et al.*, 2009). 현재 우리나라의 농촌 지역 시, 군의 농업기술원과 농업 기술센터에서는 일부 미생물 비료를 배양하여 무상으로 공급하고 있다. 미생물 비료로 식물에 투여한 PGPR의 효능 및 생존 기간은 온도, 세균 종의 특성, 토양 특성 그리고 뿌리 분비물 등의 영향을 받는다(Dutta and Podile, 2010). 이러한 PGPR의 적용 방식은 세균 배양액을 물에 현탁하여 대상 식물이나 토양에 살포

하는 방법이 주로 사용되어 왔다. 하지만 이러한 투여방법은 자유 세포 상태의 PGPR이 물과 함께 이동되어 유실될 뿐만 아니라 온도, 자외선, 염 등 환경요인에 민감하여 식물 근권에서 집락화하기 어려운 단점이 있다(Wu *et al.*, 2012). 접종한 PGPR이 식물 근권에서의 집락화와 생존기간을 늘릴 수 있다면, 더욱 효과적인 식물생장 촉진능을 나타낼 수 있을 것이다. 따라서 미생물의 생존 기간을 늘리고 지속적인 공급을 위하여 미생물을 물에 현탁하여 살포하는 방법보다 효과적인 방법이 필요하며, 이에 미생물 고정화법을 활용할 수 있다.

미생물 고정화법은 영양분의 공급, 토양의 건조 방지 그리고 고정화한 미생물을 오랫동안 천천히 공급할 수 있는 방향으로 개선되어 왔다(Bashan, 1998; Kim *et al.*, 2012). PGPR을 고정화하여 적용하는 방법은 밀과 토마토를 대상으로 실험한 결과 식물생장을 효과적으로 촉진했으며(Bashan, 1998), 식물 근권에

\*For correspondence. E-mail: hgsong@kangwon.ac.kr; Tel.: +82-33-250-8545; Fax: +82-33-259-5665

PGPR이 집락화 하는데 도움을 주는 것으로 밝혀졌다(Heijnen and Van Veen, 1991). 미생물 고정화에 사용되는 담체로는 sodium alginate, polyacrylamide, xanthan gum 등 다양한데 그 중 무독성이며, 생분해성이고, 조작이 간단한 sodium alginate가 널리 사용되고 있다(Bashan, 1998). Alginate는 D-mannuronic acid와 L-gluronic acid가  $\beta$ -(1,4) 결합한 사슬형의 중합체이다. Sodium alginate는 사슬에  $\text{Na}^+$ 가 붙어 있는데  $\text{Ca}^{2+}$ 와 서로 치환된다.  $\text{Ca}^{2+}$ 는 2가 금속이온이기 때문에 2개의 alginate 사슬과 결합하여 다공성의  $\text{Ca}^{2+}$ -alginate 중합체가 형성된다(Haug, 1959). PGPR을 alginate bead에 고정하여 접종하는 것은 근권에서의 PGPR의 생존을 유지하고, 지속적으로 공급할 수 있는 것으로 보고되어 있다(Bashan, 1986).

이제까지 고정화 PGPR 균주에 의한 식물생장촉진 연구는 많았지만 균주의 근권 잔류에 대해서는 조사하지 않거나(Rekha et al., 2007; Schoebitz et al., 2014) 고정화 담체에서 방출되는 생균수만을 측정한 경우가 대부분이었으며(Bashan et al., 2002; Minaxi, 2011) 분자생물학적으로 조사한 사례는 거의 없었다. 본 연구에서는 PGPR로 보고된 *Arthrobacter woluensis* ED (Kim and Song, 2014)를 alginate bead에 고정하여 토마토에 처리하는 방법과 현탁액 적용 방법의 생장촉진능을 비교하면서, 접종 균주의 식물 근권 잔류와 토양 고유 세균군집에 미치는 영향을 분자생물학적 방법을 통해 조사하여 미생물비료로서의 적용 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 고정화

250 ml 플라스크에 1/10 희석 YEG 액체배지(yeast extract 0.1%, glucose 1%, pH 6.8) 100 ml를 넣고, *A. woluensis* ED (KCTC 12011BP)를 접종한 뒤 진탕배양(30°C, 150 rpm, 48시간)하였다. 배양액을 원심분리(4°C, 3400 × g, 20분)하여 상등액을 제거하고, hemocytometer로 개체수를 측정하여 토양에  $1 \times 10^6$  cells/g씩 접종할 수 있게 준비하였다. 균주 고정화는 Bashan (1986)의 alginate bead 제작방법을 변형하여 사용하였다. Sodium alginate (Junsei Chemical Co., Japan) 20 g을 증류수 1 L에 넣고 고압멸균(121°C, 15 psi, 15분)하고  $\text{CaCl}_2$  30 g을 증류수 2 L에 녹여 고압멸균하고 4°C로 냉각시킨다. 준비된 균주를 증류수로 2회 세척하고(4°C, 3400 × g, 20분) 2% sodium alginate 용액과 혼합한다. 22G needle과 연결된 라텍스 튜빙을 Easy-load<sup>®</sup> 1 pump heads가 연결된 연동펌프(7553-70, Cole Parmer Instrument Co., USA)에 장치한 후, 균주-alginate 혼합액을 미리 냉각시킨 1.5%  $\text{CaCl}_2$  용액에 분사하고, 상온에서 2시간 동안 자석교반기로 천천히 교반하여 굳힌다. 제작된 alginate bead는 증류수로 2회 세척하고 수분을 제거한 후, 냉장보관(4°C)하였다.

### 식물생장을 위한 pot test

균주 현탁액 접종과 고정화 균주 접종의 효과를 비교하고, 균주 비함유 control alginate bead가 식물생장에 어떤 영향을 미치

는지를 확인하기 위하여 소규모 pot test를 진행하였다. 실험에 사용된 토양은 PGPR의 생장촉진 효과를 보다 쉽게 알 수 있게 화천군 파로호 호안의 척박한 나대지에서 채취하였다. 채취한 토양은 4 mm 체로 걸러낸 후 250 g을 지름 7 cm, 높이 10 cm인 플라스틱 pot에 담아 준비하였다. 탈지면을 3 mm 두께로 넣고 고압멸균한 Petri dish에 70% ethanol로 5분간 표면살균한 토마토(*Solanum lycopersicum* cv. Yegwang) 종자를 넣고 멸균증류수 5 ml를 첨가한 후 3일간 plant growth chamber에서 광조건(30°C, 97.5  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ , 14시간)과 암조건(24°C, 10시간) 하에서 발아시켜 사용하였다. Pot 당 발아된 토마토 유묘를 3개씩 총 24개의 pot에 이식하였으며, pot 6개씩을 각각 무처리 대조군, 균주 현탁액 접종군, 고정화 균주 접종군과 균주 비함유 control alginate bead 실험군으로 나눠 준비하였다. 접종 실험군의 접종량은  $1 \times 10^6$  cells/g로 모두 같은 양을 접종하였다. Control alginate bead 실험군은 고정화 균주 제작에 들어간 sodium alginate와 동량으로 제작 및 살포하였다. 준비된 pot는 plant growth chamber에서 동일한 광조건과 암조건 하에서 30일간 배양하면서 주기적으로 멸균 증류수를 공급하였다. 1주 간격으로 토마토 근권 토양을 멸균된 용기에 채취하여 근권에서 *A. woluensis* ED의 잔류를 확인하기 위해 토양의 세균군집을 분석하였다. 배양30일이 지난 후에 모든 실험군에서 자라난 식물 전체를 손상되지 않게 회수하여 shoot 길이, 뿌리길이, 습윤중량과 건조중량을 측정하였다. 건조중량은 70°C 항온건조기에서 48시간 건조시킨 후 측정하였다. 결과의 유의성을 확인하기 위해 SYSTAT (ver. 10, SPSS Inc.) 프로그램을 이용하여 Analysis of Variance (ANOVA)를 시행하였다.

### 세균군집 DNA 추출 및 증폭

Pot test 중에 채취한 근권 토양에서 Powersoil<sup>®</sup> DNA isolation kit (MO BIO Laboratories, Inc., USA)의 매뉴얼에 따라 g-DNA를 추출하였고, YEG 배지에서 *A. woluensis* ED를 배양한 균주 배양액에서 G-spin<sup>TM</sup> genomic DNA extraction for bacteria (Intron Biotechnology, Korea)의 매뉴얼에 따라 g-DNA를 추출하였다. 채취한 근권 토양에서 추출한 g-DNA는 양이 적기 때문에 DNA를 증폭하기 위해 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 16S rRNA 유전자 지역을 증폭시키기 위해 1차 PCR에는 forward primer 27F (5'-AGAGTTTGA TCMTGGCTCAG-3')와 reverse primer 515R (5'-ACCGCGG CTGCTGGCAC-3')를 사용하였고, 2차 PCR에는 forward primer F352TA (5'-GCCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCA CGGGGGGACTCCTACGGGAGGC-3')와 1차 PCR과 같은 reverse primer 515R을 사용하였다. 식물 근권 토양에서 추출한 g-DNA를 template로 사용하였으며, 1차 PCR은 DNA template 2  $\mu\text{L}$ , 27F 1  $\mu\text{L}$ , 515R 1  $\mu\text{L}$ , 10X taq polymerase buffer 2  $\mu\text{L}$ , 2.5 mM dNTP 2.5  $\mu\text{L}$ , Ex-taq polymerase (TaKaRa Shuzo Co., Japan) 0.125  $\mu\text{L}$ 를 섞고 3차 증류수를 추가하여 최종부피를 25  $\mu\text{L}$ 로 보정하였다. 2차 PCR은 1차 PCR 산물을 100배 희석하여 그 중 1  $\mu\text{L}$ 를 DNA template로 사용하였고, 나머지 단계는 1차 PCR과 동일하게 섞은 후 3차 증류수로 최종부피를 25  $\mu\text{L}$ 로 보

정하였다. 1차 PCR 조건은 initial denaturation (94℃, 5분) 단계와 denaturation (94℃, 30초), annealing (58℃, 30초) 및 extension (72℃, 40초) 단계로 이루어진 과정을 25 cycle 반복한 후에 final extension (72℃, 3분) 단계를 거쳐 수행하였다. 이어서 2차 PCR은 1차 PCR 조건을 일부 변형하여 cycle 단계의 extension 과정을 30초로 수정하여, 이 단계를 40 cycle 반복한 후에 final extension (72℃, 5분) 단계를 거쳐 수행하였다. DNA의 증폭을 확인하기 위해 PCR 산물과 6X DNA loading dye를 5:1로 섞어 1% agarose gel에 넣어 PTC DNA Engine system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)에서 100 V로 약 20-30분간 전기영동하여 DNA 증폭을 확인하였고, 이 산물을 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)에 사용하였다.

#### DGGE 분석

DGGE에 이용할 gel의 농도구배 형성에 사용되는 denaturing solution은 40% Acrylamide/Bis (37.5:1) 17.5 ml과 50X TAE buffer 1 ml을 섞은 후 formamide와 urea를 넣고, 3차 증류수를 추가하여 최종부피가 50 ml이 되도록 만든다. 43% denaturing solution은 formamide 8.6 ml과 urea 9.03 g을 넣어 만들고, 63% denaturing solution은 각각 12.6 ml과 13.23 g을 넣어 만들었다. 각각의 denaturing solution 15 ml에 APS solution (ammonium persulfate 2 g, 3차 증류수 10 ml) 150  $\mu$ l과 N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (Sigma Chemical Co., USA) 10  $\mu$ l씩을 혼합하여 gradient maker를 통해 농도구배를 형성하여 polyacrylamide gel을 제작하였다. 이후 gel의 각 홈을 3차 증류수로 2회 세척한 후, 0.5X TAE buffer를 사용하여 1회 세척한 뒤, PCR로 증폭한 토양 g-DNA 15  $\mu$ l를 2X loading dye 15  $\mu$ l와 1:1로 섞어(균주 PCR 산물의 경우는 2.5  $\mu$ l과 2X loading dye 2.5  $\mu$ l을 섞어 총 5  $\mu$ l로 만들어 염색한다.) 총 30  $\mu$ l로 염색한 시료를 각 홈에 주입하고, DGGE 장치인 DCode™ universal mutation detection system (Bio-Rad Laboratories, USA)에 넣었다. 장치 내 0.5X TAE buffer의 온도는 64℃로 유지하고, 처음 30분은 20 V로 pre-run한 뒤에 약 24시간 동안 60V로 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide (0.5 mg/L) 10  $\mu$ l와 0.5X TAE buffer

30 ml의 혼합액에 넣고 최종부피 100 ml이 되도록 3차 증류수를 추가한 뒤에 20분간 교반하여 염색하였다. 염색 이후에 3차 증류수를 이용하여 2회 세척한 뒤에 gel을 100 ml의 3차 증류수에 넣고 20분간 교반하여 탈색하였다. 탈색한 이후에 UV transilluminator (SL-20 High Performance DNA Image Visualizer™, Seoulin Scientific Co., Korea)에 gel을 넣고 Gel Logic 100 imaging system과 molecular imaging software version 4.0 (Eastman Kodak Co., USA)을 이용하여 나타난 band의 패턴과 intensity를 분석하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 고정화 균주의 식물생장 촉진효과

*Arthrobacter woluwensis* ED (GenBank accession no.: HM536961)는 3 mM L-tryptophan이 첨가된 Nutrient broth에서 식물호르몬 옥신(auxin) 종류인 indole-3-acetic acid와 indole-3-butyric acid를 생성하여 24시간부터 7일 이후까지 배지 내에서 각각 약 2000과 1000-1500  $\mu$ g/mg protein의 높은 농도를 유지하였다(Kim and Song, 2014). 또한 식물호르몬 지베렐린(gibberellin)과 제아틴(zeatin)도 각각 271.7과 33.7 mg/L를 생성하는 등 식물호르몬의 생성능이 우수하고 불용성인산인  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 도 배양 하루 만에 222.7 mg/L의 인산 가용화능을 나타내어 미생물 비료로서의 사용이 가능한 것으로 보고되었다(Kim and Song, 2014). 이 균주를 alginate bead에 고정화한 균주를 제작하여 토마토의 생장에 미치는 영향을 비교하였다. *A. woluwensis* ED의 현탁액 접종과 고정화 균주 접종 그리고 균을 고정하지 않은 alginate bead의 토마토 생장에 미치는 영향을 조사한 결과 30일 재배한 토마토의 shoot 길이, 뿌리길이, 습윤중량과 건조중량이 비접종 대조군에 대해 균주 현탁액 접종군은 각각 36.2, 59.0, 51.1과 37.5%씩 유의성 있게 증가하였으며 고정화 균주 접종군은 각각 42.0, 67.4, 62.5와 60.4%씩 유의성 있게 증가하였다(Figs. 1 and 2). 따라서 고정화 균주 접종군은 균주 현탁액 접종군에 비하여 각각 6, 8, 11 그리고 23%씩 토마토의 생장을 촉진하였다. 이런 생장촉진 결과는 alginate 고정화

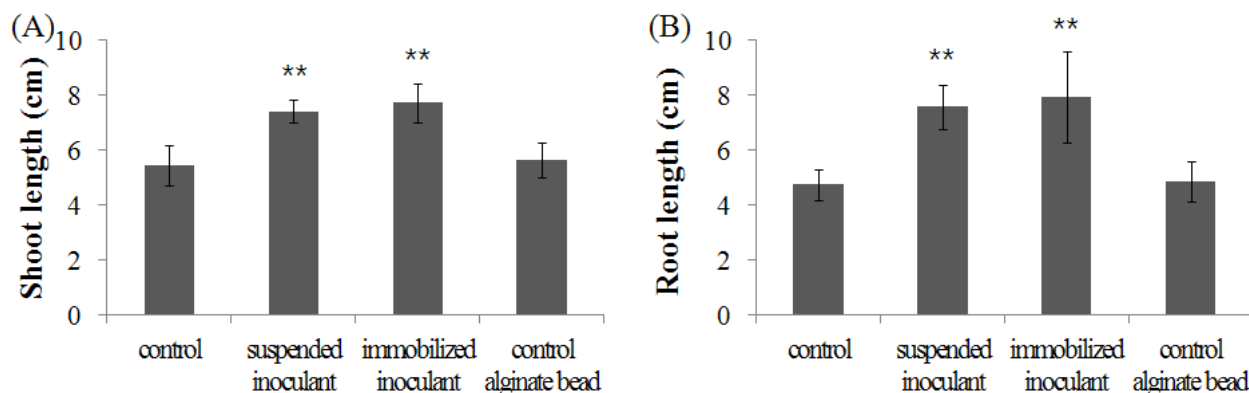


Fig. 1. Shoot length (A) and root length (B) of 30-day grown tomato seedlings treated with *A. woluwensis* ED in a pot test (\*\*  $P < 0.005$ ).

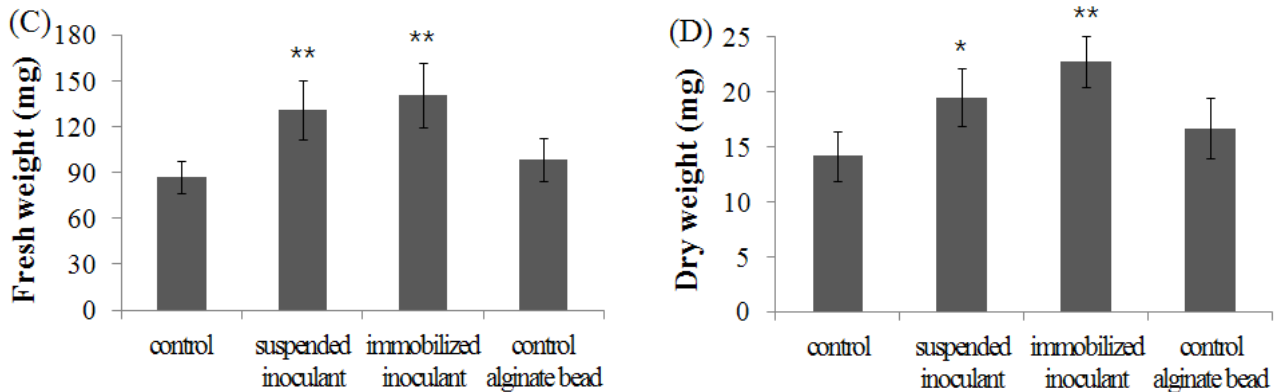


Fig. 2. Fresh weight (C) and dry weight (D) of 30-day grown tomato seedlings treated with *A. woluwensis* ED in a pot test. (\*\*  $P < 0.005$ , \*  $P < 0.05$ ).

*Azospirillum brasilense*가 18일 배양 후 토마토 유묘를 비접종 대조군에 비해 shoot 길이 생장을 약 30% 증가시킨 결과와 비교하여 상당히 높다(Bashan *et al.*, 2002). 비록 대상 식물 종과 환경조건이 다르지만 alginate에 고정된 *Pseudomonas fluorescens* BAM-4와 *Burkholderia cepacia* BAM-12가 밀의 shoot 길이 생장을 비접종 대조군보다 30-40% 정도 증가시킨 결과보다 우수하였으며(Minaxi, 2011), 상추(*Lectuca sativa*)를 대상으로 humic acid를 첨가한 alginate에 *Pseudomonas putida* CC-FR2-4를 고정화하여 접종했을 때 현탁액 접종보다 shoot와 뿌리 길이가 5-10% 정도로 생장이 증가한 결과와 유사하였다(Rekha *et al.*, 2007). 현탁액 접종에 비해 고정화 균주 접종의 식물생장 촉진효과가 높은 것은 고정화 균주가 한꺼번에 방출되지 않고 지속적으로 식물 근권에 공급되며 안정적으로 식물생장 촉진활성을 나타내기 때문인 것으로 추정된다(Vassilev *et al.*, 2001; Rekha *et al.*, 2007). 한편 균주 비함유 control alginate bead 실험군은 비접종 대조군에 비해 토마토의 shoot 길이, 뿌리길이, 습윤중량과 건조중량이 각각 3.9, 2.6, 13.7과 17.7% 증가하였으나 유의성은

나타나지 않았다. 균주 비함유 alginate bead 처리 시 유의성 없는 생장촉진은 토마토 유묘에서도 보고된 바 있다(Bashan *et al.*, 2002).

#### 고정화 균주의 토마토 근권 내 잔류성

식물생장촉진 근권세균을 환경에 투여하면, 다양한 부적절한 물리화학적 환경요인의 영향과 더불어 환경에 먼저 우점하고 있는 미생물들의 부정적인 영향으로 식물 근권에서 생장 및 생존하지 못하여 식물생장 촉진능이 나타나지 못할 수도 있다(Bashan, 1998). 따라서 alginate에 고정하여 투여한 *A. woluwensis* ED 균주가 토마토의 근권에 존재하면서 식물생장을 촉진하였는지 확인하였다. 세균군집 분석방법으로는 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), temperature gradient gel electrophoresis (TGGE)와 terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 등의 방법들 중 많이 이용되고 있는 DGGE 분석방법을 사용하였다(Muyzer *et al.*, 1993). 소규모 pot test 중에 3주까지 채취한 토마토 근권 토양 시료로부터 추출한 g-DNA를 이용

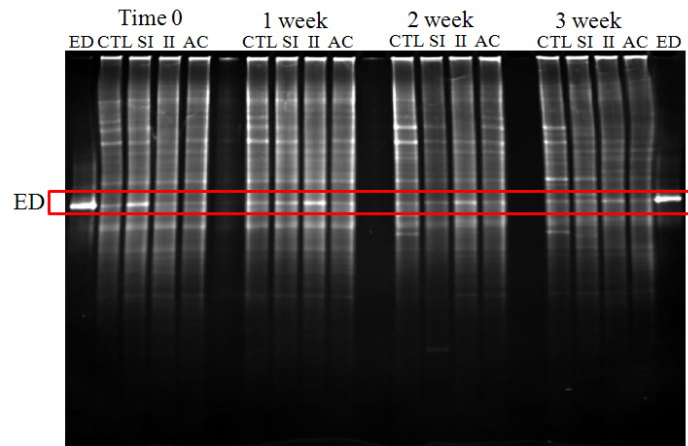


Fig. 3. Monitoring of the bacterial community of tomato rhizosphere soil by DGGE analysis in a pot test (ED, marker of *A. woluwensis* ED; CTL, uninoculated control; SI, suspended inoculant; II, immobilized inoculant; CA, control alginate bead).

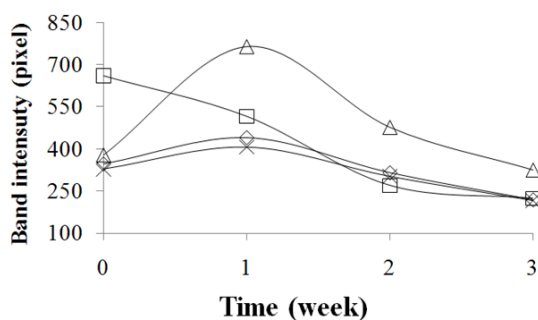


Fig. 4. Changes of the band intensity of *A. woluwensis* ED in the tomato rhizosphere soils of a pot test (□, suspended inoculant; △, immobilized inoculant; ◇, uninoculated control; ×, control alginate bead).

하여 DGGE를 실시한 결과 접종 후 *A. woluwensis* ED 균주가 근권 토양 세균군집 내에 존재하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 각 시료에서 ED 균주의 band intensity를 비교한 결과 접종 직후에는 균주 현탁액 접종균이 가장 높은 band intensity를 나타내었다가 급감하여 2주 이후에는 비접종 대조군과 유사한 band intensity를 나타내었는데(Fig. 4), 이는 현탁액 내의 균주들이 접종 직후에는 근권에 많이 존재하지만 이후 점차 생존능을 잃으며 또한 수분 공급 시 쉽게 근권 아래로 이동하여 용출되기 때문인 것으로 추정된다. 반면, 고정화 균주 접종군의 ED 균주의 band intensity는 접종 후 1주간 급증하고 이후 높은 band intensity를 3주까지 유지하였다(Fig. 4). DNA band intensity가 세균군집 내 개체수와 비례한다고 보고되어 있어(Watanabe *et al.*, 2004) band intensity가 높으면 세균군집 내에 *A. woluwensis* ED 균주가 많이 잔류한다고 볼 수 있다. 본 연구에서 *A. woluwensis* ED 균주의 토마토 근권 토양 내 잔류성은 wet alginate microbead에 고정화한 *A. brasilense* Cd로부터 방출된 생균수가 10일 후 1/3 수준으로 감소한 것과 비교할 때 훨씬 높은 것을 알 수 있다(Bashan *et al.*, 2002). 한편 비접종 근권토양에서도 *A. woluwensis* ED 균주 band와 같은 DGGE gel 상의 위치에 비록 intensity는 낮지만 DNA band가 나타났는데 이는 *A. woluwensis* ED와 유사한 종내 균주 및 여러 가지 *Arthrobacter* 종들이 토양에 비교적 흔하게 분포하기 때문인 것으로 추정된다(Goodfellow *et al.*, 2012).

토양에 도입된 alginate bead는 alginase (alginate lyase EC 4.2.2.3)를 분비하는 미생물에 의해 분해될 수 있는데, alginase를 생성하는 미생물은 매우 다양하고 토양에도 많이 존재한다(Hashimoto *et al.*, 2000). 따라서 고정화에 사용된 alginate bead는 토양에서 서서히 분해되면서 고정화된 세균을 방출시키고 환경에 악영향을 미치지 않을 것이며(Bashan *et al.*, 2002), 또한 DGGE 분석 결과 alginate bead에서 방출된 *A. woluwensis* ED는 토양 고유 세균군집에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 추정된다(Fig. 3). 한편 *A. woluwensis* ED는 alginase를 분비하지 못해 고정된 균주가 alginate bead를 분해하지 않는다(Goodfellow *et al.*, 2012).

본 연구에서는 식물생장 촉진능을 가진 *A. woluwensis* ED 균

주가 현탁액 접종 시 토마토의 생장을 증가시킬 수 있는데 이를 alginate에 고정하여 투여하면 현탁액 접종 때보다 토마토 근권 토양에 더 오래 잔류하면서 토마토 생장촉진에 더욱 효과적인 것을 확인하였다. 본 연구를 실제 환경에 효과적으로 적용하기 위해서는 고정화 균주의 장기간 보관 시 균주의 식물생장 촉진능의 유지를 확인해야 할 것이다. 미생물을 고정화한 alginate bead를 건조시켜 냉장(4–10°C) 보관하는 방법이 alginate bead의 균주를 용출하는 기능을 보존하면서 오랫동안 보관할 수 있다고 보고되었는데(Bashan and Gonzalez, 1999), 실제로 근권 토양에서 균주의 활성을 조사할 필요가 있다.

## 적 요

전 세계적으로 친환경 농업을 위해 식물생장촉진 근권세균을 이용한 미생물 비료에 대한 관심이 증가하고 있는데 투여하는 세균을 식물 근권에 보다 장기간 잔류시키기 위해 식물생장 촉진능이 있는 균주를 alginate bead에 고정화하여 식물생장을 조사하였다. 발아된 토마토 유묘에 *Arthrobacter woluwensis* ED를  $1 \times 10^6$  cells/g로 처리하고 30일 재배 후 자라난 토마토의 shoot와 뿌리 길이 및 습윤과 건조중량을 측정하고 비접종 대조군과 비교하여 균주 현탁액 접종군은 각각 36.2, 59.0, 51.1과 37.5%씩 유의성 있게 증가하였으며 고정화 균주 접종군은 각각 42.0, 67.4, 62.5와 60.4%씩 유의성 있게 증가하였다. 고정화 균주 접종군은 균주 현탁액 접종군에 비하여 각각 6, 8, 11과 23% 증가하였다. 접종 균주가 식물 근권에서 유지되는 양상을 관찰하기 위해 denaturing gradient gel electrophores를 이용하여 토양세균 군집을 분석하였는데 균주 현탁액 접종군에서 ED 균주의 DNA band intensity는 접종일로부터 1주일까지 가장 높게 나타났으나 그 이후로 감소하여 접종 2주 후 비접종 대조군과 비슷한 band intensity를 나타내었다. 반면, 고정화 균주 접종군의 ED 균주 band intensity는 접종일로부터 초기에는 비접종 대조군과 비슷하였으나 이후 급격하게 증가하여 계속 높게 유지되어 3주까지 band intensity가 현탁액 접종군 보다 높았다. 따라서 alginate에 *A. woluwensis* ED를 고정하여 적용하는 방법이 현탁액 적용보다 식물 근권에 균주의 공급을 효과적으로 유지하면서 식물생장을 더욱 촉진하는 것으로 나타났다.

## 감사의 말

이 논문은 “2013년도 강원대학교 학술연구조성비로 연구하였음(과제번호-120131240)”.

## 참고문헌

- Bashan, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1089–1098.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* **16**, 729–770.
- Bashan, Y. and Gonzalez, L.E. 1999. Long-term survival of the

- plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 262–266.
- Bashan, Y., Hernandez, J.P., Leyva, L.A., and Bacilio, M.** 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol. Fertil. Soils* **35**, 359–368.
- Dutta, S. and Podile, A.R.** 2010. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Crit. Rev. Microbiol.* **36**, 232–244.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H., Trujillo, M., Suzuki, K., Ludwig, W., and Whitman, W.** 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 5, pp. 578–585, Springer, New York, N.Y., USA.
- Hashimoto, W., Miyake, O., Momma, K., Kawai, S., and Murata, K.** 2000. Molecular identification of oligoalginate lyase of *Sphingomonas* sp. strain A1 as one of the enzymes required for complete depolymerization of alginate. *J. Bacteriol.* **182**, 4572–4577.
- Haug, A.** 1959. Fractionation of alginic acid. *Acta Chem. Scand.* **13**, 601–603.
- Heijnen, C.E. and Van Veen, J.A.** 1991. A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. *FEMS Microbiol. Lett.* **85**, 73–80.
- Kim, I.Y., Pusey, P.L., Zhao, Y., Korban, S.S., Choi, H., and Kim, K.K.** 2012. Controlled release of *Pantoea agglomerans* E325 for biocontrol of fire blight disease of apple. *J. Control. Release* **161**, 109–115.
- Kim, K.M. and Song, H.G.** 2014. Revegetation of barren lakeside land through growth enhancement of *Xanthium italicum* by rhizobacteria. *Paddy Water Environ.* In press.
- Minaxi, J.S.** 2011. Efficacy of rhizobacterial strains encapsulated in nontoxic biodegradable gel matrices to promote growth and yield of wheat plants. *Appl. Soil Ecol.* **48**, 301–308.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–700.
- Rekha, P.D., Lai, W.A., Arun, A.B., and Young, C.C.** 2007. Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresour. Technol.* **98**, 447–451.
- Schoebitz, M., Mengual, C., and Roldán, A.** 2014. Combined effects of clay immobilized *Azospirillum brasilense* and *Pantoea dispersa* and organic olive residue on plant performance and soil properties in the revegetation of a semiarid area. *Sci. Total Environ.* **466–467**, 67–73.
- Segura, A., De Wit, P., and Preston, G.M.** 2009. Life of microbes that interact with plants. *Microb. Biotechnol.* **2**, 412–415.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Fenica, M., and Federici, F.** 2001. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. *Bioresour. Technol.* **79**, 263–271.
- Watanabe, T., Asakawa, S., Nakamura, A., Nagaoka, K., and Kimura, M.** 2004. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiol. Lett.* **232**, 153–163.
- Wu, Z., Guo, L., Qin, S., and Li, C.** 2012. Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 317–327.