

Research Article



CrossMark

Open Access

## 염내성 세균에 의한 보리의 염 스트레스 내성 촉진

이 슬<sup>1</sup>, Anamika Khanal<sup>1</sup>, Kathyleen Nogrado<sup>1</sup>, 송형근<sup>1</sup>, 조유성<sup>1</sup>, 이지훈<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>전북대학교 농화학부, <sup>2</sup>전북대학교 농업생명과학대학 생물환경화학부

**Enhancement of Salt Stress Tolerance of *Hordeum vulgare*, L by Salt-Tolerant Bacteria**  
Seul Lee<sup>1</sup>, Anamika Khanal<sup>1</sup>, Kathyleen Nogrado<sup>1</sup>, Hyung-Geun Song<sup>1</sup>, Yu-Sung Cho<sup>1</sup> and Ji-Hoon Lee<sup>1,2\*</sup> (<sup>1</sup>Department of Agricultural Chemistry, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea, <sup>2</sup>Department of Bioenvironmental Chemistry, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea)

Received: 13 December 2021/ Revised: 22 December 2021/ Accepted: 23 December 2021

Copyright © 2021 The Korean Society of Environmental Agriculture

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.

ORCID

Ji-Hoon Lee

<https://orcid.org/0000-0001-8916-149X>

### Abstract

**BACKGROUND:** Salinity is one of the major limiting factors in agriculture that affect the growth and productivity of crops. It is economically difficult to artificially purify the soil affected by salt. Therefore, the use of plant growth-promoting bacteria (PGPB) in an effort to reduce stress caused by salt is emerging as a cost-effective and environment-friendly method. In this study, the purpose was to isolate the salt-tolerant bacteria from the rhizosphere soil and identify their ability to promote plant growth under salt stress condition.

**METHODS AND RESULTS:** The isolates KST-1, KST-2, AST-3, and AST-4 that showed plant growth-promoting activity for barley in salt conditions were close to *Bacillus cereus* (KST-1, KST-2, and AST-4) and *Bacillus thuringiensis* (AST-3) and showed high salt tolerance up to 7% of additional NaCl to the media. When inoculated to barley, the strains had only minor effect on the length of the barley. However, the concentrations of chlorophyll in the barley leaves were found to be higher from the bacteria-inoculated pots than those from the uninoculated control. In particular, the chlorophyll concentration in *Bacillus cereus* AST-4 experiment was 5.45 times higher than that of the

uninoculated control under the same experimental condition.

**CONCLUSION(S):** The isolated salt-tolerant bacteria were found to influence on chlorophyll concentration of the barley. As represented by the strain AST-4, microbes may suggest a cost-effective and environmentally benign method to alleviate salt stress of crops cultivated in salt-accumulated soils such as reclaimed lands.

**Key words:** *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, Plant growth-promoting bacteria, Salt stress, Salt-tolerant bacteria

### 서론

염분은 현대 농업에서 작물의 생육과 생산성에 큰 영향을 미치는 중요한 제한요소 중 하나이다[1]. 일반적으로 염분 토양은 전기전도도가 4 dS/m 이상인 토양을 말하는데, 이러한 염분 토양은 특히 건조-반건조 지역의 농업에 큰 문제를 불러 일으킨다. 이러한 지역에서는 강우에 의한 용탈이 심하게 일어나지 않기 때문에 토양에 염이 서서히 축적되며, 농업에서 필수적으로 사용되는 관개수의 염류가 토양에 집적되어 토양의 염화를 심화시키며, 이는 작물의 생산에 직접적인 영향을 미친다[2].

토양 염분이 식물에 스트레스를 일으키는 경로는 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 토양 중 염분의 농도가 높아져 식물의 뿌리가 토양에서 물을 흡수하기 어렵게 만들거나, 식물 내에

\*Corresponding author: Ji-Hoon Lee

Phone: +82-63-270-2546; Fax: +82-63-270-2550;

E-mail: [jhlee2@jbnu.ac.kr](mailto:jhlee2@jbnu.ac.kr)

고농도의 염이 축적되어 식물 독성을 일으키는 것이다[3]. 고농도의 염은 작물의 단백질합성을 저해하고 생산량을 감소시킬 뿐만 아니라 심한 경우 작물을 고사시킨다. 가장 널리 경작되고 있는 쌀(*Oryza sativa* L.)을 예로 들면, 1.9 dS/m 이상의 염분 농도는 쌀의 생산량을 감소시킬 수 있으며, 3.0 dS/m가 넘어가면 벼 수확량에 큰 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다[4].

농업에서 토양의 염류화 문제를 해결하는 가장 일반적인 방법은 훼손된 환경을 인간이 인공적으로 복구하는 것이다. 염류가 없는 물로 근권아래로 염을 용탈시키거나, 염류의 집적을 최소화할 수 있는 관개 기술을 개발하거나, 개량제를 첨가하여 토양의 양이온 교환 복합체에 흡착된 나트륨을 치환시키는 방법 등이다. 근본적으로 토양을 작물이 자라기 적합한 환경으로 교정하는 것으로, 이러한 시도는 막대한 시간과 노력, 자원과 재정이 필요하다. 염류화 문제를 해결하기 위한 또 다른 방안으로는 식물 성장 촉진 미생물(plant growth-promoting bacteria, PGPB)을 이용하는 방법이 있다. PGPB는 식물의 조직 내 혹은 식물 주위에 자리하면서 직접적인 메커니즘이나 식물 병원성 미생물의 성장을 억제시키는 등의 간접적인 메커니즘을 통해 식물의 성장을 촉진시키며[5].

식물이 환경적인 스트레스에 노출되면 식물의 에틸렌 농도가 증가하는 양상을 보인다. 에틸렌은 식물 호르몬의 일종으로 과실을 성숙시키는 일을 하지만, 종자의 발아 후 지속적으로 높은 수준의 에틸렌을 노출시켜 주면 뿌리의 신장을 억제하는 등 식물의 성장을 방해한다[6]. 이러한 환경 스트레스와 에틸렌 간의 관계를 스트레스 에틸렌 중후군이라고 한다[7]. 많은 연구에서 식물이 스트레스를 받는 환경에서 에틸렌의 전구물질인 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC)를 분해하는 ACC deaminase 효소를 생산하는 미생물을 발견하고 식물의 환경 스트레스를 완화시킬 것으로 기대하였다[8,9]. 콩과 식물의 에틸렌 수준을 낮추어 식물의 바이오메스가 25-45% 정도 증가한 연구 또한 보고된 바 있다[10,11].

식물의 성장과 환경 스트레스 완충에 있어 식물 호르몬도 중요한 역할을 한다. ACC deaminase 유전자를 가지지 않은 PGPB 중에서 indole acetic acid (IAA)를 생산할 수 있어 직접적으로 식물의 성장을 자극하여 환경 스트레스를 극복할 수 있게 도와준다[12-14]. IAA는 식물 호르몬인 옥신이다. 옥신은 식물의 성장을 조절하는 호르몬으로 특히 줄기의 신장에 크게 관여한다. 일반적으로 PGPB에 의해 생산된 IAA는 식물과 미생물의 상호작용에서 가장 널리 연구되어 왔다[2].

염 스트레스를 포함한 다양한 환경 스트레스에서 식물의 성장을 촉진할 수 있는 미생물들이 IAA와 ACC deaminase를 동시에 생산할 수 있음이 보고되었다[14-16]. 이 두 물질은 근권 토양에서 서로 상호작용하며 여러 환경 스트레스에서 식물을 보호하는 것으로 알려져 있다. IAA의 축적은 ACC 합성 효소 유전자의 전사를 도와 ACC 농도를 증가시켜 결과적으로 에틸렌의 생산을 유도하고 에틸렌의 축적은

IAA 생산을 억제시킨다[17]. 따라서 ACC deaminase 유전자를 가지는 미생물이 존재할 경우 에틸렌의 생산을 제한하며 IAA의 합성 저해를 감소시켜 식물의 성장을 극대로 촉진시킬 수 있다. 본 연구에서는 근권 토양에서 내염성 균주를 분리하고 균주의 특성을 조사하였으며, 분리한 균주의 식물 성장촉진 능력을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 보리 종자의 선별

염분 스트레스 환경에서 흰쌀보리, 영양보리, 수안밀, 금강밀의 성장을 확인하기 위하여 100 g의 상토가 들어있는 포트에 40 g/l 농도의 NaCl 100 ml씩 처리하여 최종 토양의 염 농도가 4%가 되도록 하고 포트 당 4개의 종자를 100개씩 파종하였다. 뿌리가 발아하는 48시간 동안 랩을 씌워 습도를 유지하고 암조건으로 실온에서 종자를 발아시켰다. 24시간 후 4개 종자 모두 뿌리가 발아한 것을 관찰하고 다시 명 조건 16시간 암 조건 8시간 실온에서 일주일 동안 재배하였다. 일주일 후 4개 작물의 성장 정도를 육안으로 판별하였으며, 후속 실험을 위해 최종적으로 영양보리를 선택하였다.

### 내염성 미생물의 분리 및 동정

균주 분리를 위한 접종원으로서 전북대학교 캠퍼스농장 비닐하우스 내 재배 작물의 근권 토양을 채취하여 사용하였고, 농화 및 분리를 위해 Tryptic Soy Broth (TSB, BD, Franklin Lakes, NJ, USA), R2A (BD, USA) 두 종류의 배지를 사용하였다. 농화배양을 위해 3%의 NaCl을 첨가한 TSB와 R2A 액체배지 100 ml에 근권 토양 1 g을 넣고 150 rpm, 28°C에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 계대배양을 위해 48시간 후 동일한 액체배지 100 ml에 배양액을 1 ml씩 접종하고 다시 150 rpm, 28°C에서 48시간 배양하였다. 총 5차례 반복 옮긴 후, 3% NaCl을 첨가한 TSB 고체배지와 R2A 고체배지에 각각 50 µl 배양액을 도말하였다. 28°C에서 48시간 동안 배양한 후, 형태학적으로 다른 19개의 단일 군락을 선별하였으며 후속실험을 위하여 20% glycerol stock에 풀어 -80°C에 보관하였다.

분리 균주의 계통학적 분석을 위하여 16S rRNA 유전자 분석 방법을 이용하여 동정하였다. 분리한 균주의 DNA는 G-spin genomic DNA Extraction Kit (iNtRON biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 추출하였으며, 추출한 genomic DNA로 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 16S rRNA 유전자에 대한 PCR은 Tag PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, South Korea)와 primer 쌍 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용해서 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 pre-denaturation 5분, 95°C에서 denaturation 30초, 55°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 30초 과정을 30 cycle 반복한 후, 72°C에서 10분 동안 최종 extension이었고, 이후

정제하여 Genotech (Daejeon, Korea)에서 염기서열을 분석하였다. 염기서열 어셈블리는 BioEdit(v. 7.2.5)을 이용하여 수행되었고, 염기서열 정렬과 수동 교정, Neighbor-Joining 계통수(phylogenetic tree)는 SILVA 데이터 베이스 Ref NR 99 release 132[18]을 사용하여 ARB 6.0.6[19]에서 작성되었다.

### 고염분 조건 식물생장촉진 균주 선별

영양보리 종자는 50% 락스(4% NaOCl)에 20분간 침지시키고 멸균증류수로 세척하여 소독하였다. 분리 균주는 3% NaCl을 첨가한 R2A 배지에 28°C에서 48시간동안 배양한 후, 5000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 세포 pellet을 phosphate-buffered saline (PBS) 10 ml에 현탁시켜 다시 5000 rpm에 10분 동안 원심분리 하여 상층액은 버려 세척하고, PBS 5 ml에 현탁시켰다. 이렇게 만든 접종액은 UV-Vis 분광광도계(Optizen POP, Mecasys, Korea)로 600nm에서 흡광도(OD)를 1로 맞추어 사용하였다. 식물의 생장을 촉진할 수 있는 균주를 선별하기 위하여 포트 당 20 g의 상토에 최종 40 g NaCl/kg의 농도로 NaCl을 처리한 후, 소독한 종자를 각 포트 당 50개씩 파종하고 균주 접종액은 5 ml씩 접종하였다. 48시간 동안은 암조건으로 22°C에서 종자를 발아시켰으며, 24시간 후 명 조건 16시간, 암 조건 8시간 조건으로 22°C에서 일주일 동안 재배하였다. 균주를 접종하지 않은 종자를 대조구(control)로 하였다. 일주일 후 육안으로 비교하여 대조구보다 길이와 발아율이 더 좋은 보리에 접종한 균주를 선택하였다.

### 염 농도에 따른 분리 균주의 생장 확인

염 스트레스 환경에서 염 농도에 따른 균주의 생장 차이를 알아보기 위하여 NaCl을 각각 0, 1, 4, 7% 첨가한 R2A 배지 100 ml을 제조하여 pH를 7.0으로 조정하였다. 각각의 배지에 KST-1, KST-2, AST-3, AST-4로 명명한 균주의 접종액을 준비하여 100 µl씩 접종하고, 36시간 동안 30°C에서 180 rpm으로 배양하였다. 미생물의 생장은 배양액의 흡광도를 UV-Vis 분광광도계로 600 nm에서 측정하였다.

### 인돌 화합물 생산 확인

분리한 균주가 인돌 화합물을 생성하는지 알아보기 위하여 Salkowski 방법을 이용하였다[20]. 영양보리 종자는 어두운 곳에서 24시간 동안 4°C의 증류수에 침지한 후 NaCl을 첨가하지 않은 상태에서 3일 동안 종자를 발아시켰다. 3%의 NaCl을 첨가한 R2A 액체배지에 각각 10 µM의 L-tryptophan을 첨가한 배지를 준비하였다. 분리 균주는 각각 L-tryptophan을 첨가한 R2A 배지 10 ml에 접종하고 발아한 영양보리 종자와 함께 30°C에서 48시간 동안 배양하였으며, 대조구는 균주를 접종하지 않았다. 48시간 후 배양액은 5000 rpm에 10분 동안 원심분리하여 상층액만 취하였으며, 이 상층액은 0.45 µm 주사기 필터로 여과하였다. 여과 시료를 반응액(iron(III) chloride 4.5 g/10.8 M 황산 1 l)과 섞

어 30분간 빛을 차단하여 실온에 배양한 후, UV-Vis 분광광도계로 530nm에서 흡광도를 측정하였으며, indole-3-acetic acid sodium salt의 표준검량곡선에 대입하여 농도를 계산하였다. 실험은 3번 반복하여 진행하였다.

### 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase 유전자 확인

분리한 균주가 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase 유전자를 가지고 있는지 확인하기 위해서 ACC deaminase 유전자를 분석하였다. 분리 균주의 genomic DNA를 Tag PCR PreMix와 primer 쌍 *acdF*, *acdR* [9]을 이용하여, 94°C에서 5분 동안 pre-denaturation, 94°C에서 denaturation 60초, 58°C에서 annealing 60초, 72°C에서 extension 60초 과정을 30 cycle 반복 조건으로 PCR 반응을 하였다. 전기영동을 통해 ACC deaminase 유전자의 유무를 확인하였다.

### 미생물에 의한 보리의 생장 촉진

영양보리 종자는 어두운 곳에서 24시간 동안 4°C의 증류수에 침지한 후 NaCl을 첨가하지 않은 상태에서 3일 동안 종자를 발아시켰다. 접종액은 3% NaCl을 첨가한 R2A 배지에 분리균주를 28°C에서 48시간 배양한 후, 5000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 pellet을 PBS 10 ml에 현탁시키는 세척을 2회 수행한 세포를 PBS 5 ml에 현탁시켰다. 이렇게 만든 접종액은 UV-Vis 분광광도계로 600 nm에서 흡광도를 1로 맞추었다. 분리한 균주의 식물 생장 촉진 능력을 확인하기 위하여 포트 당 20 g의 상토에 발아한 종자를 5개씩 옮겨 심은 후, 최종 40 g NaCl/kg의 농도로 NaCl을 처리하고, 총 15일 동안 명조건 16시간, 암조건 8시간의 조건으로 22°C에서 재배하였다. 접종액은 종자가 발아한 3일과 10일에 각각 5 ml 접종하였다.

재배 15일 후 영양보리의 줄기 길이와 잎의 엽록소(chlorophyll) 농도를 측정하였다[21]. 잎의 엽록소를 추출하기 위하여, 재배한 영양보리 잎 100 mg을 6 ml의 90% 에탄올에 넣어 80°C에서 5분간 끓이고, 실온에서 10분간 식히고 20분 동안 교반하였다. 그 후 3000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻은 샘플은 UV-Vis 분광광도계로 663 nm과 645 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식(1, 2, 3)으로 농도를 계산하였다.

$$\text{Chlorophyll a} = 12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645} \quad (1)$$

$$\text{Chlorophyll b} = 22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663} \quad (2)$$

$$\text{Total Chlorophyll (a+b)} = 20.29 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663} \quad (3)$$

## 결 과

### 내염성 미생물의 분리 및 동정

근린 토양에서 분리한 19개의 내염성 균주 중 선별시험을 통해 식물의 생장을 촉진할 것으로 기대되는 균주 KST-1,



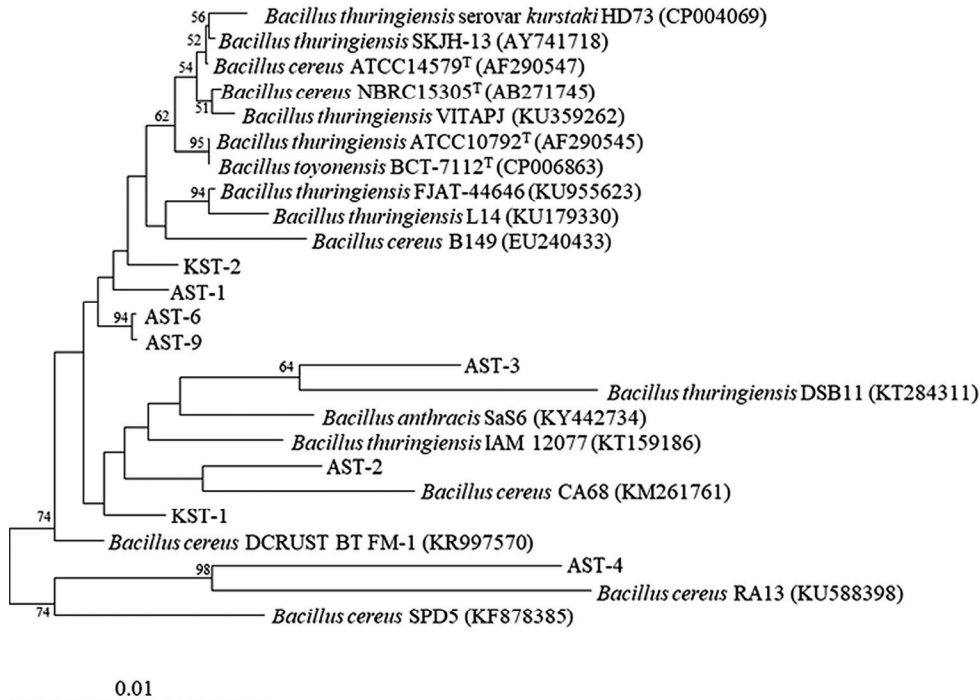


Fig. 1. Phylogenetic tree of the salt-tolerant bacterial isolates constructed by the Neighbor-joining method based on partial nucleotide sequences of 16S rRNA genes.

KST-2, AST-1, AST-2, AST-3, AST-4, AST-6, AST-9 총 8개 균주의 16S rRNA 유전자(nearly full length)를 분석하였다. 그 결과 KST-1은 *Bacillus cereus* Neha와 99% 일치율을 보였으며, KST-2은 *B. cereus* R2와 100% 일치율을 보였다. AST-1은 *B. cereus* CZW-5와 100%, AST-2는 *Bacillus paramycooides* MF-41와 99%, AST-3은 *Bacillus thuringiensis* F20와 99%, AST-4은 *B. cereus* WJ-22와 100%, AST-6과 AST-9는 *Bacillus* sp. S129와 99%의 일치율을 각각 보였다. 16S rRNA 유전자 염기서열에 의한 분리된 균주의 계통도는 Fig. 1에 제시되어 있다. 이후 실험에는 KST-1, KST-2, AST-3, AST-4의 네 균주를 선택하여 사용하였으며, 이는 각각 *B. cereus* KST-1, *B. cereus* KST-2, *B. thuringiensis* AST-3, *B. cereus* AST-4로 명명하였다. AST-4 염서열은 accession number MZ683258로 GenBank에 등록되었다.

#### 분리균주의 특성화

선별한 4 균주의 염 내성 실험을 진행하였다. R2A 배지에 NaCl을 0%, 1%, 4%, 7% 각각 추가하여 4 균주를 36시간 배양하였다. 4 균주 모두 NaCl 1%를 첨가했을 때가 NaCl을 첨가하지 않았을 때보다 높거나 비슷한 생장률을 보여주었으며, NaCl 추가 4%까지는 균주의 생장에 큰 영향을 끼치지 않았고, 7%의 NaCl 농도에서는 4 균주의 생장이 다소 더디었으나, 배양 20시간 이후 모든 균주에서 생장을 보여 4 균주 모두 7%의 고농도 염분에서도 성장할 수 있음을 확인하였다. 특히 *B. cereus* AST-4의 경우 배양 8시간 이후부터 7%

농도의 NaCl에서 성장하여 다른 균주보다 빠른 생장을 보였다(Fig. 2).

분리 균주의 indole acetic acid (IAA) 생산 능력을 확인하기 위해 *B. thuringiensis* KCTC1508 균주와 니켈 내성 균주인 *Cupriavidus metallidurans* Ni-2 (GenBank의 16S rRNA 유전자 염기서열 번호: MG9481949) [22]를 각각 IAA 생산의 양성대조구(positive control)와 음성대조구(negative control)로 사용하여 결과와 비교하였다. 균주를 접종하지 않은 대조구(uninoculated control)도 실험에 포함하였다. 또한 각 배양에 영양보리를 추가하거나 추가하지 않은 배양을 준비하여 IAA 생산을 상호 비교하였다. 영양보리와 함께 배양하지 않았을 때 미접종 대조구(control)의 IAA 농도는 2.4  $\mu$ M로서, 모든 균주가 대조구(control)보다 낮은 IAA 생산능을 보였다(Fig. 3). 영양보리와 함께 배양하였을 때 control의 IAA 농도는 7.0  $\mu$ M이었고, 영양보리를 첨가한 배양에서 *B. thuringiensis* KCTC1508와 *C. metallidurans* Ni-2, KST-1 균주는 대조구보다 낮은 IAA 생산능을 보였으나, KST-2 균주는 7.9  $\mu$ M, AST-3 균주는 8.5  $\mu$ M, AST-4 균주는 7.7  $\mu$ M로서 대조구보다 높은 농도의 IAA 생산능을 보였다(Fig. 3).

#### 미생물에 의한 식물 성장 촉진 확인

미생물에 의한 영양보리의 성장 촉진을 확인하기 위하여 포트 실험을 진행하였다(Fig. 4). NaCl을 처리하지 않고 균주를 접종하지 않은 영양보리의 평균 길이는 17.10 $\pm$ 1.21 cm였고, NaCl을 처리하고 균주를 접종하지 않은 대조구(control)

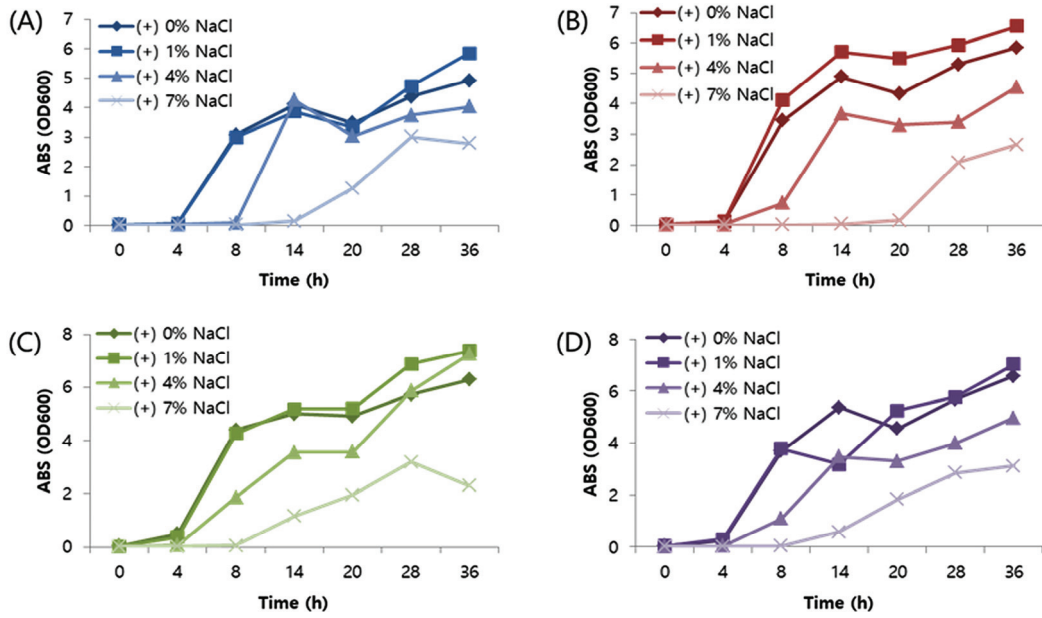


Fig. 2. Growth curves of the bacterial isolates of (A) KST-1, (B) KST-2, (C) AST-3, (D) AST-4 according to the salt concentrations (additional 0, 1, 4, and 7% NaCl).

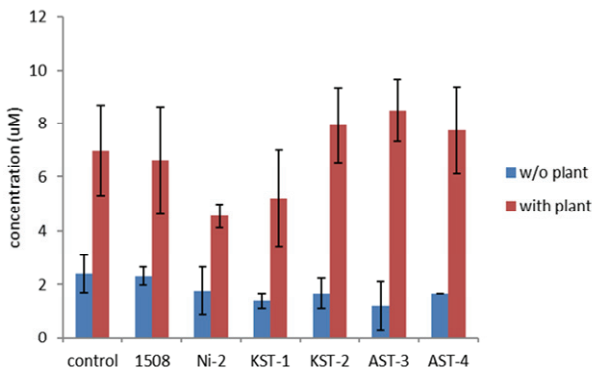


Fig. 3. Concentrations of IAA produced in the bacterial cultures incubated in L-tryptophan-added media with or without (w/o) barley.

는 평균 길이가 4.36±1.40 cm로 염분 토양에서 영양보리 줄기 길이가 현저히 줄어든 것을 확인하였다. 그러나 *B. cereus* KST-1을 접종한 모종의 길이가 4.73±0.90 cm, *B. cereus* KST-2을 접종한 모종의 길이가 4.54±1.09 cm, *B. thuringiensis* AST-3을 접종한 모종의 길이가 4.29±1.26 cm, *B. cereus* AST-4을 접종한 모종의 길이가 4.55±1.46 cm, 4 균주를 혼합하여 접종한 모종의 길이가 4.53±1.51 cm로, 대조구와 유의미한 차이를 보이지 않았다(Fig. 5). 따라서 4 균주는 모두 영양보리의 길이 생장에 유의미한 영향을 미치지 않은 것으로 확인되었다.

한편 4 균주는 영양보리 잎의 엽록소(chlorophyll) 함량을 증가시켰다(Fig. 6). 토양에 NaCl을 처리하지 않은 영양보리의 총 엽록소 농도는 17.2 mg/g, NaCl 처리한 토양에서 자란 대조구의 총 엽록소 농도는 1.5 mg/g으로 측정되었

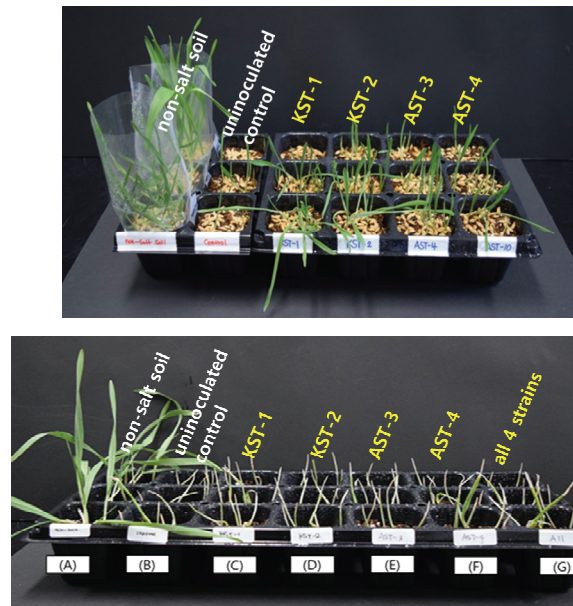


Fig. 4. Repeated pot experiment for barley growth in high salt condition (4%) with addition of the salt-tolerant bacterial isolates.

다. 4 균주를 모두 접종한 영양보리의 잎의 총 엽록소 농도가 8.6 mg/g, *B. cereus* AST-4을 접종한 영양보리의 잎의 총 엽록소 농도가 8.2 mg/g으로 NaCl을 처리하지 않은 토양의 총 엽록소 농도 다음으로 높았다. 그리고 *B. thuringiensis* AST-3, *B. cereus* KST-2, *B. cereus* KST-1 실험구 순으로 총 엽록소 농도가 4.6 mg/g, 3.3 mg/g, 2.7 mg/g으로 높았다(Fig. 6). 엽록소a(chlorophyll a)와 엽록소b(chlorophyll b)의 농도도 총 엽록소 농도와 비슷한 경향을 보였다.

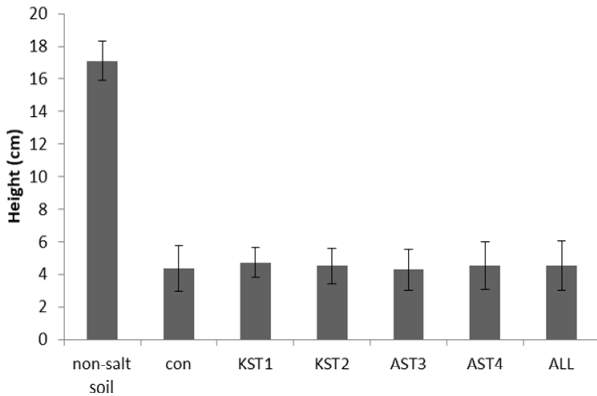


Fig. 5. Average lengths of the barley grown in high salt soils with or without addition of the salt-tolerant bacterial strains. Error bars represent standard deviation values of triplicate measurements.

NaCl을 처리하지 않은 영양보리의 엽록소a의 농도는 9.7 mg/g, 대조구(control)는 1.2 mg/g, 4균주를 모두 접종한 영양보리는 6.7 mg/g, *B. cereus* AST-4 실험구는 6.6 mg/g, *B. thuringiensis* AST-3 실험구는 3.8 mg/g, *B. cereus* KST-2 실험구는 2.7 mg/g, *B. cereus* KST-1 실험구는 2.3 mg/g의 농도를 보였다. 엽록소b의 농도는 NaCl을 처리하지 않은 영양보리에서 7.4 mg/g, 대조구는 0.3 mg/g, 4 균주를 모두 접종한 영양보리는 1.8 mg/g, *B. cereus* AST-4 실험구는 1.5 mg/g, *B. thuringiensis* AST-3 실험구는 0.9 mg/g, *B. cereus* KST-2 실험구는 0.6 mg/g, *B. cereus* KST-1 실험구는 0.4 mg/g의 농도를 보였다(Fig. 6).

## 고찰

토양에는 많은 수의 토양 미생물이 서식하고 있으며, 이 중 실험실에서 배양이 가능한 것은 1%에 불과하다[23]. 또한 여러 환경 스트레스, 온도, 습도, 토양에 자라는 식물상 등의 변화에 따라 군집이 크게 변하기도 한다. 이러한 토양 미생물은 토양에 고르게 분포하지 않으며 식물의 뿌리 주변에 밀집되어 식물 혹은 미생물 간에 상호작용을 하며 서로 영향을 미친다[5]. 본 연구에서는 토양에 서식하는 미생물 중 식물의 성장을 촉진할 수 있는 미생물을 분리 및 특성화 하고자 하였다. 분리된 균주 중 3%의 염분토양에 영양보리와 같이 접종한 결과, 균주를 접종하지 않은 모목보다 크게 자란 실험구의 균주는 모두 *Bacillus* 속에 속했다. 일부 *Bacillus*는 인간에 대해 병원성을 가지지만, 많은 *Bacillus* 균주가 식물 성장을 촉진하는 것이 보고되어 왔다. Arkhipova et al. [24]에 의하면 *Bacillus subtilis*를 상추에 접종했을 때, 2주 후 뿌리와 쪽에서 균주를 접종하지 않은 종자보다 많은 양의 cytokinin이 함유되어 있는 것을 확인하였으며, indole-3-acetic acid (IAA) 및 abscisic acid (ABA)와 같은 식물 호르몬도 같이 관찰되었다. *Bacillus amyloliquefaciens* 균주 FZB24, FZB42, FZB45와 *B. subtilis* FZB37 균주도 세포 배양액에서 높은

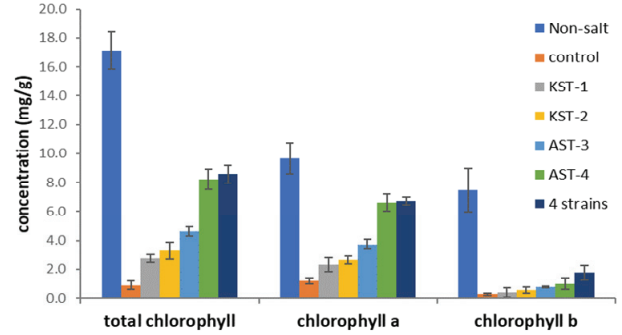


Fig. 6. Average concentrations of chlorophyll in barley leaves grown under high salt condition with or without addition of the salt-tolerant bacterial strains. Error bars represent standard deviation values from triplicate measurements.

농도의 옥신이 검출된 바 있다[25]. *Bacillus megaterium* UNCV1 균주의 경우 Fe(III)를 Fe(II)로 환원시켜 식물이 이용할 수 있게 하는 능력이 있음이 보고되었다[26]. 실험에 사용된 KST-1, KST-2, AST-4 균주는 모두 *B. cereus*로서, 레몬 나무의 뿌리털 발달과 식물의 뿌리 길이의 증가를 촉진시켰음이 보고되었다[27]. 또한 *Bacillus aerius* MHIRS1은 다른 보고된 균주보다는 IAA 생산능은 떨어지지만 ACC deaminase 활성과 siderophores 합성능을 동시에 가져 식물의 줄기와 뿌리의 성장을 향상시킬 것으로 기대되었다[28]. AST-3 균주는 *B. thuringiensis*로서 많은 농작물에 대한 바이오살충제 등으로 아주 잘 알려져 있고, 또 다양한 IAA 생산능과 ACC deaminase 활성을 가짐이 보고되었다[29].

분리 균주 KST-1, KST-2, AST-3, AST-4은 모두 7%의 고농도 염 환경에서도 생존할 수 있었으며, 1%의 염 환경에서 최고 생장률을 보였다. 고농도의 염은 일반적으로 단백질을 파괴할 뿐만 아니라, 단백질의 합성을 저해하여 식물의 생장은 물론 식물 성장 촉진 미생물의 생장도 더디게 만드는 것으로 알려져 있다. 따라서 고농도의 염 스트레스 환경에서 작물을 재배하는 것은 작물 자체의 생육뿐만 아니라 작물의 성장을 촉진시킬 수 있는 미생물의 도움을 받지 못하여 매우 어렵다. 하지만 본 연구에서 분리한 KST-1, KST-2, AST-3, AST-4은 고농도의 염에서도 생존하여 염환경에서 식물의 생장에 영향을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

반면 KST-1, KST-2, AST-3, AST-4 균주 모두 ACC deaminase 유전자가 검출되지 않아(자료 제시되지 않음), ACC deaminase 활성도 보이지 않을 것으로 사료된다. IAA 생산 또한 L-tryptophan이 첨가된 배지에 분리 균주만 배양했을 때는 IAA 생산능을 보이지 않았으나, 영양보리의 모목과 같이 48시간 배양했을 때 *B. thuringiensis* AST-3 균주가 최고 8.5  $\mu\text{M}$  농도로 생산하였고, KST-2, AST-4 균주는 대조구보다 높은 IAA 수치를 보였다. 이 연구에서 분리한 KST-1, KST-2, AST-3, AST-4 균주는 이전 보고된 IAA 생산능을 가지는 균주들 보다 IAA 생산능이 적은 것으로 비교되었다. 실험 및 배양 조건의 차이가 반영되었을 수도 있지만, 이러한 원인으



로 분리 균주에 의한 영양보리의 가시적인 생장의 효과가 크지 않은 것으로 추정할 수 있을 것이다.

영양보리의 생장 실험 결과, 4균주 모두 영양보리의 길이 생장에 긍정적인 영향을 미치지 못한 것이 확인되었지만, 4균주 모두 대조구보다 높은 엽록소 농도가 측정되었으며, 특히 AST-4 균주의 총 엽록소 농도는 대조구보다 5.4배 높았다. 염분 토양에서 작물은 여러가지 생육에 방해받을 하는데, 엽록소 함량의 감소 혹은 광합성 효율의 감소도 그 중 하나이다. 이 연구에서도 토양 내 염은 엽록소 함량을 크게 감소시켰으며, 균주의 처리는 영양보리의 엽록소 함량을 늘리는데 효율적이었다.

결론적으로, 본 연구에서 분리한 *B. cereus* KST-1, *B. cereus* KST-2, *B. thuringiensis* AST-3, *B. cereus* AST-4 균주는 7%의 고농도의 염 환경에서도 생장할 수 있었고, 작물과 함께 배양했을 때 상대적으로 높지 않은 농도의 IAA를 생성하여 영양보리의 길이 생장에는 큰 영향을 미치지 못하였으나, 염 스트레스 환경에서 영양보리의 엽록소 함량을 크게 증가시켜 염분 토양에서 작물의 생육을 도울 수 있을 것으로 기대된다. 분리한 세균 균주들이 영양보리 생장 촉진 효과에 기여한 기작은 더 연구되어야 할 것이다.

### Note

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgement

This work was supported by the Rural Development Administration (Project No. PJ012263), Republic of Korea and in part by the National Research Foundation of Korea (grant NRF-2016R1D1A3B01012231).

### References

- Allakhverdiev SI, Sakamoto A, Nishiyama Y, Inaba M, Murata N (2000) Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiology*, 123, 1047-1056. <https://doi.org/10.1104/pp.123.3.1047>.
- Ilangumaran G, Smith DL (2017) Plant growth promoting rhizobacteria in amelioration of salinity stress: A systems biology perspective. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01768>.
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>.
- Grattan SR, Zeng L, Shannon MC, Roberts SR (2002) Rice is more sensitive to salinity than previously thought. *California Agriculture*, 56, 189-195.
- Glick BR (2012) Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>.
- Qin H, He L, Huang R (2019) The coordination of ethylene and other hormones in primary root development. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00874>.
- Morgan PW, Drew MC (1997) Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum*, 100, 620-630. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03068.x>.
- Mayak S, Tirosh T, Glick BR (2004) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 565-572. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009>.
- Saravanakumar D, Samiyappan R (2007) ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogaea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1283-1292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03179.x>.
- Ma W, Guinel FC, Glick BR (2003) *Rhizobium leguminosarum* Biovar viciae 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4396-4402. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4396-4402.2003>.
- Ma W, Charles TC, Glick BR (2004) Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5891-5897. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5891-5897.2004>.
- Bianco C, Defez R (2010) Improvement of phosphate solubilization and *Medicago* plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 4626-4632. <https://doi.org/10.1128/AEM.02756-09>.
- Bianco C, Defez R (2009) *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. *Journal of Experimental Botany*, 60, 3097-3107. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp140>.
- Egamberdieva D, Kucharova Z (2009) Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Biology and Fertility of Soils*, 45, 563-571. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0366-y>.
- Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing

- soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 329-339. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9162-4>.
16. Zarei T, Moradi A, Kazemeini SA, Akhgar A, Rahi AA (2020) The role of ACC deaminase producing bacteria in improving sweet corn (*Zea mays* L. var *saccharata*) productivity under limited availability of irrigation water. *Scientific Reports*, 10, 20361. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77305-6>.
  17. Sharma A, Johri BN, Sharma AK, Glick BR (2003) Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 887-894. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00119-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00119-6).
  18. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
  19. Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, 32, 1363-1371. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh293>.
  20. Rahman A, Sitepu IR, Tang S-Y, Hashidoko Y (2010) Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly acidic tropical peat soil. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 2202-2208. <https://doi.org/10.1271/bbb.100360>.
  21. Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144, 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).
  22. Lee S, Khanal A, Cho AH, Lee H, Kang M-S, Unno T, Hur H-G, Lee J-H (2019) *Cupriavidus* sp. strain Ni-2 resistant to high concentration of nickel and its genes responsible for the tolerance by genome comparison. *Archives of Microbiology*, 201, 1323-1331. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01700-5>.
  23. Schoenborn L, Yates PS, Grinton BE, Hugenholtz P, Janssen PH (2004) Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4363-4366. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4363-4366.2004>.
  24. Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko EV, Kudoyarova GR (2005) Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272, 201-209. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x>.
  25. Idris EE, Iglesias DJ, Talon M, Borriss R (2007) Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 619-626. <https://doi.org/10.1094/mpmi-20-6-0619>.
  26. Valencia-Cantero E, Hernández-Calderón E, Velázquez-Becerra C, López-Meza JE, Alfaro-Cuevas R, López-Bucio J (2007) Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant and Soil*, 291, 263-273. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9191-y>.
  27. Gutiérrez-Luna FM, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Valencia-Cantero E, de la Cruz HR, Macías-Rodríguez L (2010) Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis*, 51, 75-83. <https://doi.org/10.1007/s13199-010-0066-2>.
  28. Lee E-S, Song H-G (2010) Plant growth promotion by purple nonsulfur *Rhodospseudomonas faecalis* strains. *Korean Journal of Microbiology*, 46, 157-161.
  29. Raddadi N, Cherif A, Boudabous A, Daffonchio D (2008) Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. *Annals of Microbiology*, 58, 47-52. <https://doi.org/10.1007/BF03179444>.