

벼과식물로부터 질소고정균의 분리와 Nitrogenase 활성 측정

최은화 · 이상은 · 윤기순¹ · 권덕기¹ · 손재근² · 박승환³ · 한명숙 · 김사열*
경북대학교 미생물학과, ¹생물교육과, ²농학과, ³한국생명공학연구원 유전체연구센터

Isolation of Nitrogen-Fixing Bacteria from Gramineous Crops and Measurement of Nitrogenase Activity. Choi, Eun-Hwa, Sang Eun Lee, Ki Soon Yoon¹, Duck-kee Kwon¹, Jae-Keun Sohn², Seung-Hwan Park³, Myung-Sook Han, and Sa-Youl Ghim*. Department of Microbiology, ¹Department of Biology Education, and ²Department of Agronomy, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, ³Genome Research Center, KRIBB, Taejeon 305-600, Korea - For researching nitrogen-fixing bacteria associated with gramineous crops, we collected growing roots of rices, wheats, oats, barleys, ryes, and maizes at 19 sites of southern Korean peninsula. Endophytes and free living bacteria were isolated from those crop roots. Sixty-three isolates were classified on the basis of different morphology, size, color, host of colony, and the 16S rDNAs sequence. The analyses of PCR amplification for *nifH* gene and nitrogenase activity assay, revealed that all isolates contained nitrogen-fixing abilities. In addition, most of them have cellulase activity which is one of the common features of endophytic bacteria from plant.

Key words: Nitrogen-fixing bacteria, 16S rDNA sequence, nitrogenase, cellulase

질소는 식물에게 필수적인 영양원이다. 산업적으로 생산되는 질소비료는 석유를 그 원료로 하여 만들어지므로 비용이 비싸고, 제한된 자원을 고갈시킨다[2, 11, 17]. 그리고 대부분의 질소 비료는 Haber-Bosch 과정을 통하여 만들어지는데, 이 과정에서 발생하는 이산화탄소는 온실효과를 일으키는 것으로 알려져 있다[17]. 질소비료의 이러한 문제점을 극복할 수 있는 대안으로 질소고정세균에 의한 생물학적 질소고정이 오랫동안 연구되어왔다. 질소고정이란 대기중의 N₂를 암모니아로 전환하는 과정으로 콩과식물에서 주로 공생세균과 연관지어 연구되었다.

최근에는 벼과식물과 관련된 다양한 종류의 질소고정균이 발견되고 있으며, 근권미생물에 의한 식물성장촉진이나 질소고정이 농업 생산량을 결정짓는 중요한 요소임이 밝혀졌다[13]. 질소고정균인 *Burkholderia* strain 2.2N에서는 박테리아, 효모, 곰팡이에 대한 항미생물 활성이 있다는 사실과, *B. cepacia* AC1100에서는 제초제인 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid를 분해하여 토마토 씨앗의 발아를 도와준다는 것이 보고되었다[4, 8]. 그리고 *Azospirillum brasilense* Sp7은 식물성장 호르몬인 indole-3-acetic acid (IAA)를 생산한다는 것이 보고됨으로써[12, 20], 질소고정균이 nitrogenase 활성 외에 식물의 성장과 관련된 다양한 기능을 가진다는 것이 밝혀졌다. 본 연구에서는 한반도 남부 지방 환경에 적응해 있는 벼과식물과 협조 관계를 가진 질소고정균을 다수 분리하여 동정하고, nitrogenase 활성 및

cellulase의 생산능을 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

배지 및 배지 조성

Nitrogen-fixing bacteria를 분리하기 위하여 질소원이 부족한 배지[malic acid 5 g, KH₂PO₄ 0.6 g, K₂HPO₄ 0.6 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, NaCl 0.1 g, CaCl₂ 0.02 g, FeCl₃ 0.01 g, NaMoO₄ · 2H₂O 0.002 g, H₃BO₃ 0.0028 g, Cu(NO₃) · 3H₂O 0.00004 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.00024 g, morpholinoethane sulfonic acid 50 mM per liter(pH 6.8)][16]를 사용하였으며, semi-solid 배지는 동일한 조성으로 agar를 0.2% 첨가하여 만들었다. 분리균주를 보관하기 위하여 LB 배지[3]를 사용하였다.

Nitrogen-fixing bacteria의 분리

Nitrogen-fixing bacteria를 분리하기 위해 대구, 경북, 경남, 전북, 전남지역의 19곳에서 벼과식물에 속하는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 귀리 등을 채집하여 멸균한 증류수로 뿌리를 세척한 후, 뿌리와 뿌리를 씻은 물을 각각 질소원이 부족한 semi-solid 배지에 접종하였다. 그리고 뿌리 속에 살고 있는 내생균을 분리하기 위하여 증류수로 수회 씻은 뿌리를 1% NaClO 용액에 15분 동안 담궈 표면을 살균한 후 다시 멸균한 증류수로 뿌리를 세척하고, 뿌리를 막자사발에서 간 후 그 상등액을 동일한 배지에 접종하였다. 이들을 순수분리하기 위하여 30°C에서 48시간 이상 배양하여 자란 균을 마이크로 피펫을 이용하여 1.5% agar가 첨가된 질소원이 부족한 배지에 옮긴 후 도말하여 30°C에서 48시간 배양하였다. 분리된 균은 glycerol(15%)이 첨가된 LB 배지에 현탁하

*Corresponding author

Tel. 82-53-950-5374, Fax. 82-53-955-5522

E-mail: ghimsa@knu.ac.kr

여 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

16S rDNA 증폭을 위한 primer 제작 및 PCR

질소원이 부족한 배지에서 분리된 균주는 genomic DNA를 추출하여 각각의 16S rRNA 유전자를 PCR을 통하여 증폭하였다. 16S rRNA 유전자 증폭을 위하여 사용한 primer는 GenBank database에 등록된 질소고정균의 16S rDNA 염기서열을 모아 보존영역의 염기서열을 비교하여 제작하였다. GF1(5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3')과 GR1(5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG-3')을 primer로 사용하였으며, genomic DNA 30 ng을 template으로 하여 PCR premix(Bioneer, KOREA)에 섞어 denaturation(94°C, 30초), annealing(60°C, 30초), elongation(72°C, 45초) 단계를 35회 반복한 후 incubation(72°C, 15분)하였다. PCR에 의하여 증폭된 단편은 PCR Purification Kit(Qiagen, Germany)으로 정제한 후 바로 염기서열을 결정하거나, 증폭된 단편을 전기영동한 다음 DNA PrepMate™(Bioneer, KOREA)를 이용하여 gel에서 회수하고 pGEM-T Easy Vector systems(Promega, USA)에 클로닝하여 *Escherichia coli* XL1-Blue에 형질전환 하였다. AccuPrep Plasmid Extraction Kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 분리된 재조합 plasmid에 삽입되어 있는 DNA 단편의 염기서열을 결정하였다.

nifH 유전자의 증폭

분리균주에서 *nifH* 유전자의 확인은 19F(5'-GCIWYTYAYG-GIAARGGIGG-3')와 407R(5'-AAICCRCCRAIACIACRTC-3')을 primer로 사용하여 genomic DNA 100 ng을 template으로 하여 PCR premix에 첨가하고 denaturation(94°C, 30초), annealing(50°C, 1분), elongation(72°C 30초) 단계를 40회 반복한 후 incubation(72°C, 15분)하였다[18]. PCR에 의하여 증폭된 DNA 단편은 전기영동으로써 분리한 후, gel에서 회수하여 염기서열을 결정하거나, pGEM-T Easy Vector systems에 클로닝하여 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환 한 후, plasmid를 분리하여 염기서열을 결정하였다.

Nitrogenase의 활성 측정

Nitrogenase의 활성은 아세틸렌 가스가 nitrogenase에 의하여 에틸렌 가스로 환원되는 양을 환산하는 방법으로 측정하였다[5, 19]. 먼저 시험관 속에 질소원이 부족한 semi-solid agar 배지를 만들어 균을 접종한 후, 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배지가 차지하는 양을 제외한 시험관 부피의 10%에 해당하는 부피의 공기를 주사기로 빼낸 후 동일한 양의 아세틸렌 가스를 주입하여, 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 시험관 내의 공기를 주사기를 이용하여 섞은 후, 1 ml의 공기를 빼내서 Gas Chromatograph(Shimadzu GC-8A, Japan)를 사용하여 nitrogenase의 활성을 측정하였다.

Cellulase 활성 조사

Cellulase 활성을 조사하기 위하여 0.2% carboxymethyl cellulose와 0.5% tryptone을 첨가한 질소원이 부족한 배지에 균을 접종하여 30°C에서 48시간 배양한다. 균이 자라면 congo red(1 mg/ml)를 부어 30분간 염색한 후 1 M NaCl로 여러 번 씻어내어 형성된 halo를 통하여 cellulase 활성을 확인하였다[14, 19].

단백질의 분리 및 정량

Nitrogenase 활성 측정에 사용한 분리균의 총단백질량을 측정하기 위하여, 마이크로 피펫으로 semi-solid agar 배지 속에 형성된 microaerophilic 밴드를 회수하여 4°C에서 20분간 10,000 g에서 원심분리하여 얻어진 agar가 포함되어 있는 cell을 potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 2번 씻었다. 원심분리를 통하여 모은 pellet에 동일한 부피의 20% trichloroacetic acid를 첨가하여 90°C에서 20분간 처리하여 agar를 녹이고 실온에서 20분간 10,000 g에서 원심분리하여 상등액만 단백질 시료로 사용하였다[1]. 단백질 정량은 Coomassie Protein Assay Reagent Kit(Pierce, USA)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, bovine serum albumin(Sigma, USA)을 표준 단백질로 사용하였다.

Phylogenetic tree 작성

GenBank database에서 *nifH* 유전자를 가지거나, nitrogenase 활성을 지니는 균들의 16S rDNA 염기서열을 모았다. 이것을 분리균주의 16S rDNA 염기서열과 함께 neighbor-joining 방법[15]으로 MEGA program[10]을 사용하여 phylogenetic

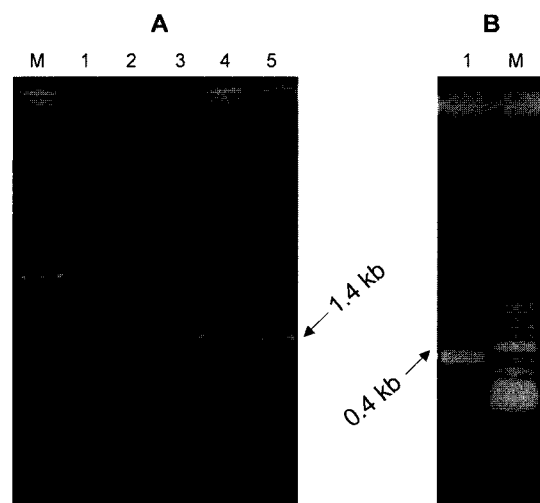


Fig. 1. PCR amplification with chromosomal DNAs of nitrogen-fixing bacteria. Panel A, amplified 1.4 kb DNA fragments by 16S rRNA gene primer: lane M, DNA size marker; lane 1, Wk1; lane 2, Wk5; lane 3, Wk6; lane 4, M2; lane 5, R4. Panel B, amplified 0.4 kb DNA fragments by *nifH* gene primer: lane M, DNA size marker; lane 1, R211.

tree를 작성하였다.

결과 및 고찰

벼과식물 근권에 존재하는 질소고정균의 분리와 동정

질소원이 부족한 배지에서 자란 균들은 colony의 형태, 색깔, 크기, 그람 염색, 분리한 host의 종류에 따라 63종으로 확인되었다(data not shown). 이들로부터 genomic DNA를 추출하여 16S rRNA 유전자 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 1.4 kb 정도의 증폭된 DNA 단편을 각각 확인할 수 있었다(Fig. 1). Fig. 1의 panel A에서 증폭된 DNA 단편의 크기가 조금씩 다른 것은, 이 후의 16S rDNA 염기서열 결정을 통하여 제작한 primer 사이에서 증폭되는 16S rDNA 염기의 크기가 균주마다 서로 다르기 때문이라는 것을 알 수 있었다. 이 각각의 DNA 단편을 대상으로 하여 16S rDNA 부분 염기서열을 결정된 결과 28개의 서로 다른 속으로 동정되었다. Table 1에 그 결과를 표시하였다. R4, R2', R211,

R212, R215, R302, M2, B2, Wk2, Wk3, Wk5, Wk6, Wk2', Wm4 등은 부분 염기서열을 결정하였을 때, 상동성이 낮아 reverse primer를 사용하여 다시 염기서열을 결정하였다. 그 중 94%로 가장 낮은 상동성을 나타내었던 Wm4는 *Chryseobacterium delfluvium*과 97%의 상동성을 나타내었다. 일차적으로 동정된 균들 중에 속명이 다른 28주를 선발하고, 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 분리균주와 알려진 질소고정균과의 유연관계를 phylogenetic tree로 나타내었다(Fig. 2).

Phylogenetic tree 분석을 통한 분리균주의 유연관계

Fig. 2에서와 같이 분리균주와 기존의 질소고정균은 크게 α , β , γ , δ -proteobacteria와 cyanobacteria, 그람 양성균, archaea의 7개의 그룹으로 다양하게 분류되었다. 그 중에서 Wm4와 B2를 제외한 모든 분리균주는 α , β , γ -proteobacteria와 그람 양성균으로 그룹 지어지는 것을 확인할 수 있었다. 벼에서 분리한 균주에서 *NifH*의 아미노산 서열로 phylo-

Table 1. Identification of strains isolated from gramineous crops by 16S rDNA sequence analysis.

Strain ^a	Homologous microorganism (% identity)	Strain ^a	Homologous microorganism (% identity)
R1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (98%)	M101	<i>Rhizobium</i> sp. (99%)
R2	<i>Pseudomonas putida</i> (99%)	M102	<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)
R3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (98%)	M103	<i>Novosphingobium subarcticum</i> (98%)
R4	<i>Sphingomonas</i> sp. (98%)	B1	<i>Rhizobium tropici</i> (99%)
R1'	<i>Azorhizobium caulinodans</i> (99%)	B2	<i>Pedobacter</i> sp. (97%)
R2'	<i>Mycobacterium</i> sp. (98%)	B3	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> (99%)
R201	<i>Xylophilus ampelinus</i> (96%)	B101	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (99%)
R202	<i>Pseudomonas</i> sp. (98%)	B102	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (98%)
R203	<i>Sphingomonas</i> sp. (99%)	Wk1	<i>Rhizobium</i> sp. (99%)
R204	<i>Sphingomonas pituitosa</i> (98%)	Wk2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (99%)
R205	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (98%)	Wk3	<i>Sphingomonas</i> sp. (97%)
R207	<i>Bacillus</i> sp. (98%)	Wk4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99%)
R208	<i>Afipia genosp</i> (99%)	Wk5	<i>Xanthomonas cynarae</i> (98%)
R209	<i>Agrobacterium</i> sp. (97%)	Wk6	<i>Xanthomonas cynarae</i> (99%)
R210	<i>Enterobacter agglomerans</i> (98%)	Wk2	<i>Sphingomonas</i> sp. (97%)
R211	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (98%)	Wk3	<i>Methanotrophic bacterium</i> (99%)
R212	<i>Terrabacter tumescens</i> (99%)	Wm1	<i>Rhizobium</i> sp. (98%)
R213	<i>Mycobacterium</i> sp. (98%)	Wm2	<i>Stenotrophomonas minatitlanensis</i> (98%)
R214	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (98%)	Wm3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (98%)
R215	<i>Pantoea</i> sp. (97%)	Wm4	<i>Chryseobacterium delfluvium</i> (97%)
R216	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (99%)	Wm1'	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> (98%)
R301	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (99%)	Wm2'	<i>Arthrobacter histidinolovorans</i> (99%)
R302	<i>Aureobacterium resistens</i> (97%)	Ry1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (99%)
R303	<i>Rhizobium</i> sp. (99%)	Ry2	<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)
R304	<i>Delftia acidovorans</i> (99%)	Ry3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99%)
R305	<i>Microbacterium</i> sp. (99%)	Ry4	<i>Pseudomonas</i> sp. (98%)
R306	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (99%)	Ry5	<i>Pseudomonas graminis</i> (98%)
R307	<i>Azospirillum</i> sp. (99%)	Ry1	<i>Sphingomonas asaccharolytica</i> (98%)
M1	<i>Pseudomonas</i> sp. (98%)	Ry101	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99%)
M2	<i>Azospirillum</i> sp. (99%)	Ry102	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99%)
M3	<i>Arthrobacter</i> sp. (98%)	Oa101	<i>Plantibacter flavus</i> (99%)
		Oa102	<i>Variovorax paradoxus</i> (99%)

^aR, rice; M, maize; B, barley; W, wheat; Ry, rye; Oa, oat.

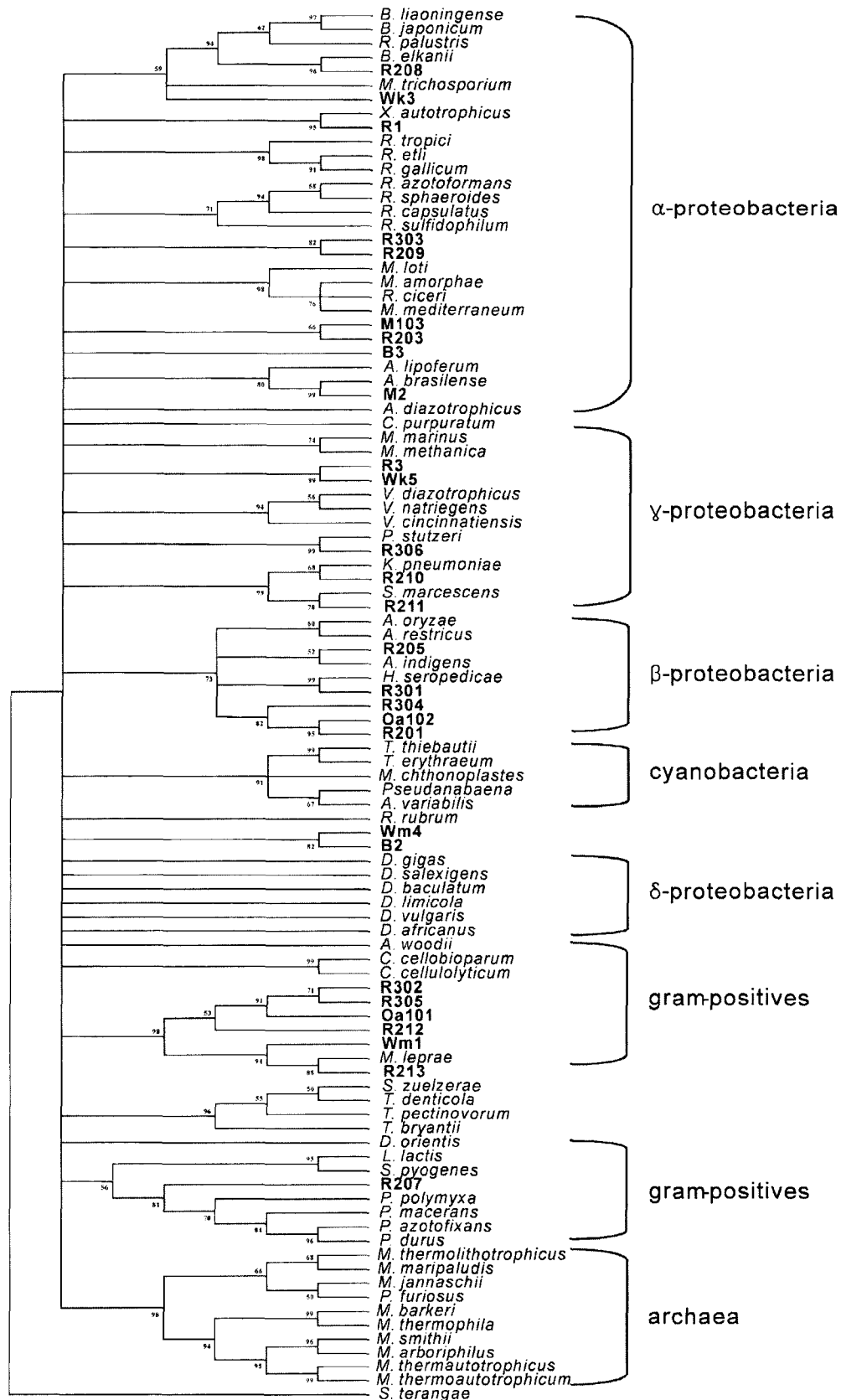


Fig. 2. Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence. The diagram shows the phylogenetic relationships between isolates and known nitrogen-fixing bacteria. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method[15].

Table 2. Comparison of *nifH* gene sequences from isolates with other known data.

Strain	Accession number in GenBank	Amino acid homology (%)
R201	AF545639	<i>Burkholderia</i> sp. <i>NifH</i> protein (96%) <i>Klebsiella pneumoniae</i> nitrogenase iron protein (98%)
R210	AF545637	
R211	AF545638	<i>Serratia marcescens</i> dinitrogenase reductase (94%)

genetic tree를 나타낸 기존의 연구[7]와 비교하여 보면, 많은 분리균주들이 그람 양성균으로 그룹 지어지는 동일한 결과를 얻을 수 있다. 그러나 본 연구에서는 기존의 연구와는 다르게 분리균주들이 α -proteobacteria에 더 많이 속한다는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 기존의 연구에서는 벼에서만 균을 분리[7]하였으나, 본 연구에서는 그 외 벼과식물도 대상으로 하였기 때문에 다양한 균들이 분리되어 이러한 결과가 나타났음을 알 수 있었다. 실제로 밀, 옥수수, 보리 등에서 분리한 균주인 Wk3', M103, B3, M2가 α -proteobacteria 속하는 것을 확인할 수 있었다. Phylogenetic tree를 통하여 분리균주들이 모두 기존의 알려진 질소고정균과 높은 유연관계를 지님을 확인할 수 있었다. 이것을 근거로 분리균주가 질소고정 능력을 가짐을 추정할 수 있었으며, 이를 증명하기 위하여 이후의 실험을 수행하였다.

분리된 균에서 *nifH*의 확인

알려진 *nifH* gene primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 14주에서 약 400 bp 크기의 DNA 단편이 증폭되었다. 그 염기서열을 결정된 결과 R201, R210, R211 등의 DNA 단편이 기존의 알려진 dinitrogenase reductase와 94% 이상의 아미노산 상동성을 지니는 것으로 확인되었다(Table 2). 세 종류의 염기서열은 GenBank에서 각각 AF545639, AF545637, AF545638의 등록번호를 얻었다. 질소원이 부족한 배지에서 분리한 균주이므로 분리균주 모두 질소고정 능력이 있을 것이라 추측하고 *nifH* 유전자를 증폭하였으나, 3주를 제외한 대부분의 분리균주에서 *nifH* 유전자를 확인하지 못하였다. 아마도 이것은 분리한 균주의 *nifH* 유전자가 다양성을 지니 사용한 primer에 의해 증폭되지 않은 것으로 추정하고, nitrogenase의 활성을 직접 측정해 보았다.

Nitrogenase 효소 활성

Acetylene reduction assay(ARA)를 통하여 nitrogenase의 활성을 측정해 본 결과, 분리된 28주 모두 활성을 나타내었다(Fig. 3). R3와 R203은 균을 접종하고 48시간 배양이 아닌 24시간 배양 후, 아세틸렌 가스를 주입하여 실행한 실험에서만 활성을 나타내었다. 기존의 관련 연구 중에서 *Enterobacter cloacae*는 4일 동안 배양하여 135±30 정도의 ARA(nmol of $C_2H_4/h \cdot mg$ of protein) 측정값[9]을 나타내

었다. ARA 측정을 위하여 3일 동안 배양한 속명이 동일한 분리균주 R210과 비교하여 볼 때, *E. cloacae*의 nitrogenase 활성이 4배 이상 높았다. 이 두 사실을 통하여 cell의 성장 속도가 nitrogenase의 활성과 연관성이 있다는 것을 알 수 있었다.

Table 3에서 표시한 바와 같이, 벼과식물과 관련된 다양한 종류의 질소고정균이 서로 다른 nitrogenase 활성으로 한반도 남부지방 환경에 적응하고 있음을 확인할 수 있었다. 분리균주는 0.18부터 29.15까지의 다양한 ARA 측정값을 나타내었다. 기존의 연구되어진 균들의 ARA 측정값이 최하 65부터 150[9]까지 나타나는 것과 비교하여 볼 때, 분리균주들의 활성이 1/5에서 1/2 정도 낮음을 알 수 있다. 이것은 실험 방법의 차이에 의한 것이라 추정한다.

CM-cellulose 분해능을 통한 cellulase 생산능 확인

벼에서 분리한 내생균은 pectinase와 cellulase를 생산하고 운동성이 있다[6]는 보고가 있어 분리한 균주에서 cellulase 생산능을 실험하였다. Table 3에서와 같이 대부분의 분리균주가 cellulase 활성을 나타내는 것으로 보아 내생균일 가능성이 있으며, R302, R305, M103에서 가장 큰 halo가 생기는 것으로 보아 이들은 cellulase의 활성이 높으며 농업적 이용의 가치가 있으리라 예상된다.

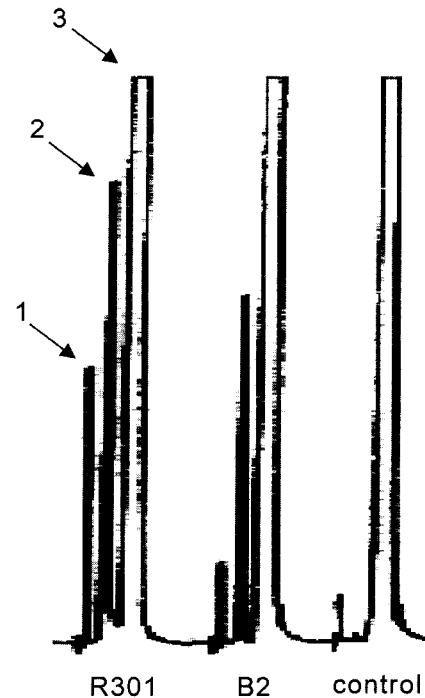


Fig. 3. Concentration measurement of ethylene produced from acetylene. Ethylene concentration was measured using gas chromatograph. Peak 1, air; peak 2, ethylene gas; peak 3, acetylene gas: R301, isolated from rice; B2, isolated from barley. In control, acetylene gas was injected into the test tube that wasn't inoculated with strains.

Table 3. Nitrogenase activity of strains by ARA and cellulase activity.

Strain	ARA (nmol of C ₂ H ₄ h ⁻¹ mg of protein ⁻¹)	Cellulase activity ^c
R3 ^a	4.66	+
R1	19.53	-
R201	1.93	+
R203 ^b	4.41	+
R205	0.18	-
R207	6.49	+
R208	5.47	-
R209	0.53	+
R210	29.15	+
R211	13.06	+
R212	3.05	-
R213	0.76	+
R301	22.56	+
R302	0.60	+++
R303	1.2	+
R304	1.88	+
R305	0.18	+++
R306	0.7	+
M2	25.64	+
M103	0.43	+++
B2	17.06	+
B3	12.40	-
Wk5	0.47	+
Wk3'	4.02	-
Wm1'	8.17	+
Wm4'	1.05	+
Oa101	0.37	-
Oa102	5.11	+

^{a,b}No nitrogenase activity from precultured samples for 48 h before acetylene injection. But positive nitrogenase activity by ARA from precultured samples for 24 h.

^cCellulase activity: +++, high; +, positive; -, negative.

요 약

벼과식물과 관련된 질소고정균을 분리하기 위하여 한반도 남부지방의 19지역에서 쌀, 밀, 귀리, 보리, 호밀, 옥수수 등을 채집하여 이들의 뿌리로부터 free living bacteria와 endophyte를 분류하였다. Colony의 형태, 크기, 색깔 등과 16S rDNA 염기서열을 근거로 63종으로 분류하였다. *nifH* 유전자 염기서열 결정과 nitrogenase 활성 측정을 통하여 분리균주 모두 질소고정 능력이 있음을 확인하였다. 그리고 식물에서 분리한 내생균의 특징 중 하나인 cellulase 활성이 대부분의 분리 균주에서 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구 되었음(KRF-2001-002-D00270).

REFERENCES

- Bazylnski, D. A., A. J. Dean, D. Schuler, E. J. P. Phillips, and D. R. Lovley. 2000. N₂-dependent growth and nitrogenase activity in the metal-metabolizing bacteria, *Geobacter* and *Magnetospirillum* species. *Environ. Microbiol.* **2**: 266-237.
- Bøtkman, O. C. 1997. Fertilizers and biological nitrogen fixation as sources of plant nutrients: perspectives for future agriculture. *Plant Soil* **194**:11-14.
- Bertani, G. 1951. Studies of lysogenisis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**: 290-300.
- Cain, C. C., A. T. Henry, R. H. Waldo, L. J. Casida, JR., and J. O. Falkinham. 2000. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4139-4141.
- Elbeltagy, A. E., K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5285-5293.
- Elbeltagy, A., K. Nishioka, H. Suzuki, T. Sato, Y. Sato, H. Morisaki, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2000. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* **46**: 617-629.
- Engelhard, M., T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek. 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ. Microbiol.* **2**: 131-141.
- Gangadhara, K. P. and A. A. M. kunhi. 2000. Protection of tomato seed germination from the inhibitory effect of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by inoculation of soil with *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 4314-4319.
- Gyaneshwar, P., E. K. James, N. Mathan, P. M. Reddy, B. Reinhold-Hurek, and J. K. Ladha. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **183**: 2634-2645.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 1994. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* **10**: 189-191.
- Ladha, J. K., F. J. de Bruijn, and K. A. Malik. 1997. Introduction: Assessing opportunities for nitrogen fixation in rice a frontier project. *Plant Soil* **194**: 1-10.
- Lambrech, M., Y. Okon, A. V. Broek, and J. Vanderleyden. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* **8**: 298-300.
- Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek. 1997. *Azoarcus* spp. and their interactions with grass roots. *Plant Soil* **194**: 57-64.
- Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, M. Claeysens, and M. V. Montagu. 1993. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and

- characterization of cellulotic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph. *J. Bacteriol.* **175**: 7056-7065.
15. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
16. Seung-Dal, S., S. J. Kim, and Y. S. Chu. 1990. Properties and activities of nitrogenase system of *Azospirillum amazonense* Kp1. *Kor. J. Microbiol.* **28**: 151-157.
17. Stoltzfus, J. R., R. So, P. P. Malarvithi, J. K. Ladha, and F. J. de Bruijn. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil* **194**: 25-36.
18. Ueda, T., Y. Suga, N. Yahiro, and T. Matsuguhi. 1995. Remarkable N₂-fixing bacteria diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J. Bacteriol.* **177**: 1414-1417.
19. Verma, S. C., J. K. Ladha, and A. K. Tripathi. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* **91**: 127-141.
20. Zimmer, W., M. Wesche, and L. Timmermans. 1998. Identification and isolation of indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. *Curr. Microbiol.* **36**: 327-331.

(Received Sep. 16, 2002/Accepted Dec. 20, 2002)