

## 광합성세균 *Rhodopseudomonas palustis* 분리 및 IAA와 Carotenoid 생성에 관한 연구\*

김유경\*\*\* · 조영윤\*\* · 강호준\*\* · 김정선\*\* · 양성년\*\* · 좌창숙\*\*

### Isolation of Photosynthetic Bacterium, *Rhodopseudomonas palustris* JK-1 and Researches on IAA and Carotenoid Production

Kim, Yu-Kyoung · Cho, Young-Yun · Kang, Ho-Jun ·  
Kim, Jung-Sun · Yang, Sung-Nyun · Jwa, Chang-sook

The JK-1 isolate which was the best producer of indole-3-acetic acid and carotenoid among the 388 strains isolated from 28 wetlands in Jeju, was identified to be *Rhodopseudomonas palustris* belongs to a typical group of non sulfur purple bacteria based on 16S rRNA sequencing. This study investigated the effect of different cultural conditions of pH, temperature, agitation, light and aeration on growth, IAA and carotenoid production of photosynthetic bacterium JK-1 for optimization of IAA and carotenoid production. It was found that growth, IAA, carotenoid, and bacteriochlorophyll production with light (3,000~3,500 Lux) and agitation (100 rpm) showed better results than those with dark/static or dark/agitation (100 rpm) in anaerobic conditions. The optimal pH, temperature and agitation speed for cell growth were 7, 30°C, 150 rpm, for IAA production were 9, 30°C, 150rpm and for carotenoid production were 6, 25°C, 50 rpm, cultured for 72 h under anaerobic light, respectively. The growth and IAA production were high in aerobic culture compared with anaerobic culture, whereas carotenoid and bacteriochlorophyll content were decreased extremely in aerobic condition (0.5~1 vvm). Subsequently, the optimal culture conditions for JK-1 were selected with pH 7, 30°C and 100 rpm under anaerobic light and the effect on plant growth was tested by pot assay. Inoculation of JK-1 with 3% (v/v) level caused increase in shoot and root dry weigh that varied from 20%~58% to 40%~28% in young radish in comparison to uninoculated treatment at 50 days of growth. The study suggests

\* 본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01082508)의 지원에 의해 이루어진 것임.

\*\* 제주특별자치도농업기술원 친환경연구과

\*\*\* Corresponding author, 제주특별자치도농업기술원 친환경연구과(kyk555@korea.kr)

that the JK-1 isolate may serve as efficient biofertilizer inoculants to promote plant growth.

Key words : *carotenoid*, *indole-3-acetic acid*, *photosynthetic bacteria*,  
*Rhodopseudomonas palustris*

## I. 서 론

Indole-3-acetic acid (IAA)는 천연에서 가장 널리 분포하고 있는 옥신 화합물이며 식물 생장을 조절하고 세포의 신장을 촉진하는 식물 호르몬의 일종이다(Lambrecht et al., 2000). 많은 Plant growth-promoting bacteria는 IAA 또는 관련 옥신 화합물을 생산하는데(Taghavi et al., 2009), 옥신은 미생물과 식물과의 signaling molecule로서(Spaepen et al., 2007) 식물 뿌리를 자극하여 세포분열과 발근이 촉진되며 줄기와 뿌리의 신장을 유도하여 기주 식물에 의한 토양 양분의 흡수를 증가시키는 것으로 알려져 있다(Dobbelaere et al., 1999; Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). IAA를 생산하는 미생물 중에서 홍색 비유황 광합성세균(purple non-sulfur phototrophic bacteria)은 자연계에 널리 분포하고 있고 옥상의 토양이나 물이 있는 환경에서 모두 발견되며(Larimer et al., 2004), *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroids*, *Rhodopseudomonas faecalis*, 그리고 *Rhodopseudomonas palustris* 등이 IAA를 합성하는 것으로 보고되었다(Song, 2010; Bong, 2017; Sakpirom, 2017).

Carotenoid는 식물과 미생물의 light-harvesting complex에 위치해 있는 천연색소이며 photo-protection과 light-absorbing 기능을 제공한다(Saejung and Apaiwong, 2015). 최근의 연구에서 carotenoid는 vitamin A의 전구체로서 항산화, anti-tumor와 anti-cancer 효과 그리고 자외선으로부터 피부를 보호하는데 이용될 수 있는 것으로 보고되고 있으며(Murtaugh et al., 2004), 양식업에서는 carotenoid가 연어(salmon)와 관상어(ornamental fish) 등의 면역력을 높이고 채색을 개선하는 효과가 있는 것으로 밝혀져 사료첨가제로 많이 이용되고 있다(Kim and Lee, 2000). 최근에 광합성세균은 혐기적 조건에서 carotenoid를 경제적으로 생산할 수 있어 관심이 증대되고 있으며(Pierre, 1997), *R. faecalis*, *R. palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, 그리고 *R. sphaeroids* 등에 의한 carotenoid 합성과 이용에 관한 연구들이 보고되고 있다(Kuo, 2012).

특히 광합성세균 중에서 *Rhodopseudomonas palustris* 균주는 영양요구성이 다른 미생물군보다 단순하고 혐기명, 혐기암, 호기명 및 호기암의 어떤 환경에서도 생장이 가능하며, IAA 및 carotenoid를 합성할 뿐만 아니라 질소고정, 식물생장 조절물질인 5-aminolevulinic acid (ALA) 합성, 토양미생물 활성 증진, 온실가스(CH<sub>4</sub>) 경감과 중금속(Cd, Zn) 제거와 같은 다양한 기능이 밝혀지면서 biofertilizer로서 농업적으로 유용하다고 보고되고 있다(Xu et al., 2015). 또한 최근의 연구들에서 *R. palustris* 등 광합성세균을 벼(*Oryza sativa*) (Nunkaew, et

al., 2014), 청경채(*B. chinensis* L.) (Lee et al., 2016), 고추(*Capsicum annuum*) (Yoon et al., 2012), 토마토(*Lycopersicon esculentum*) (Lee and Song, 2010), 스테비아(*Stevia rebaudiana* Bertoni) (Wu et al., 2013), 칼슘나무(*Prunus humilis* Bunge) (Yin et al., 2012) 등에 처리하였을 때 작물생육촉진 효과가 있는 것으로 보고되었다.

우리는 제주도 한라산 습지대에서 IAA 및 carotenoid 합성이 우수한 *R. palustris* 균주를 새롭게 선발하였다. 이전 연구에서 *R. palustris* 균주는 다양한 대사경로(photoautotrophic, photoheterotrophic, chemoheterotrophic, chemoautotrophic)를 통해서 환경에 적응하고 있어 외부조건에 따라 세균의 형태학적 변화와 함께 대사 작용에도 변화가 있는 것으로 보고되고 있다(Pechter et al., 2016). Apine 등(2011)도 미생물에 의한 IAA 등의 생합성은 pH, 온도 등 여러 가지 요인들의 영향을 받을 수 있다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 호기 또는 혐기, 명 또는 암조건 등을 포함한 여러 가지 배양조건들이 선발한 *R. palustris*의 생장과 IAA 및 광합성색소 합성에 미치는 영향을 구명하고 최적 배양조건을 선발하였으며 작물 생육촉진 효과를 검증하여 미생물 비료로서의 가능성을 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 광합성세균 분리 및 선발

광합성세균 분리 및 선발을 위해 제주도 한라산 중산간 지대의 습지 28개소에서 시료를 수집하였다. 채취한 시료는 멸균수를 사용하여  $1 \times 10^2 \sim 10^3$  정도로 희석한 후 선택배지(modified Rhodospirillaceae Medium)에 도말하고 30°C, 3,000 Lux의 광 조명하에서 2주 정도 혐기배양하면서 출현하는 적색, 분홍색 또는 노란색 콜로니를 선발하였다. 이를 통해 388종의 단일균주를 분리하고 이 균주들 중에서 IAA 및 carotenoid 합성이 우수한 JK-1 균주를 최종 선발하였다. 선발 균주는 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하고 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 gene bank database 정보와 비교 분석하여 상동성을 확인하였으며 Bergey's manual에 준하여 동정하였다(Holt et al., 1994; Li et al., 2008).

### 2. 배양방법

광합성세균의 분리 및 배양을 위한 배지는 modified Rhodospirillaceae Medium (KCTC, RM)을 사용하였다. 배지조성은 각각 Yeast extract 1.0 g, Ethanol 0.5 mL, Disodium succinate 1.0 g, Fe (III) citrate solution (0.1% in H<sub>2</sub>O) 5.0 mL, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4 g, NaCl 0.4 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.4 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05 g, 그리고 Trace element solution (MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.03,

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.3 g/L) 1.0 mL L<sup>-1</sup>를 함유하며 pH는 6.8로 조절하고 Agar는 1.5% 첨가하여 사용하였다(Lee et al., 2002). JK-1 균주의 전배양액은 단일 콜로니를 취하여 평판배지에 접종하고 혐기배양기(Whitley A35)에서 30°C, 명조건으로 72 h 배양한 후 500 mL RM broth 배지에 접종하였다. 이후 30°C, 100 rpm 및 3,000~3,500 Lux 조건에서 72 h 배양하였으며, 희석평판법으로 10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup> CFU mL<sup>-1</sup> 밀도를 보이는 배양액을 시험에 이용하였다.

그리고 최적배양조건을 선별하기 위하여 여러 가지 조건에 따른 균주의 배양특성을 조사하였다. 명배양은 28W 형광등을 5열로 켜고(3,000~3,500 Lux) 배양하였고 암배양은 알루미늄 호일로 용기를 완전히 감싸서 광을 차단하고 배양하였는데(Song, 1993), 명/암조건에 따른 배양특성은 pH 6.8, 30°C 조건에서 배양회전속도를 0과 100 rpm으로 구분하여 배양하면서 조사하였다. 배지의 초기 pH는 3~10 조건에서 시험을 수행하였는데 300 mL Erlenmyer flask를 사용하여 RM broth 100 mL에 전배양액 3% (v/v) 접종하고, 28°C 그리고 명조건에서 배양하였다. 온도, 배양회전속도, 공기투입량 및 명/암 조건에 따른 배양특성 조사는 랩발효기(LiFlus GM4)를 사용하여 3L 액체 배지에 전배양액 3% (v/v) 접종하고 시험을 수행하였다. 배양온도는 15, 25, 30 및 35°C 조건에서 시험을 수행하였는데 pH 6.8, 50 rpm 및 명조건에서 배양하였으며 24 h 간격으로 시료를 채취하여 배양특성을 조사하였다. 배양회전속도는 0, 50, 100 및 150 rpm, 그리고 공기투입량은 0, 0.5 및 1 vvm 조건으로 구분하여 시험을 수행하였는데 pH 6.8, 30°C 및 명조건에서 배양하였으며 24 h 간격으로 시료를 채취하여 배양특성을 조사하였다.

### 3. 분석방법

건조균체량(dry cell weight, DCW)은 배양액 10 mL를 취하여 5,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 펠렛에 멸균증류수를 첨가하여 같은 과정을 2회 반복하여 세척하였으며, 수확한 펠렛은 미리 측량한 Aluminium foil boat에 옮기고 나서 105°C 건조기(Vision Sci.)에서 12 h 건조 후 무게를 측정하였다(Kim and Lee, 2000). Indole-3-acetic acid는 IAA의 전구물질인 L-tryptophan을 3 mM 농도로 첨가하여 배양하면서 24시간 간격으로 배양액을 채취하여 분석하였다. 시료는 10,000 g으로 15분 동안 원심분리 후 상등액 1 mL에 Salkowski 용액(35% HClO<sub>4</sub> 500 mL, 0.5M FeCl<sub>3</sub> 10 mL) 2 mL를 혼합하여 상온에서 25분 반응시킨 후 530 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 표준 IAA (Sigma Chemical Co., USA)를 사용하여 얻은 표준곡선을 이용하여 정량하였다(Glickmann and Dessaux, 1995). Carotenoid 및 bacteriochlorophyll 색소의 추출은 배양액을 취하고 원심분리(10,000 g, 15분) 하여 균체를 수확한 후, acetone-methanol (7:2, v/v) 혼합용매를 넣고 homogenizer (Tissue·Teator<sup>TM</sup>, Biospec products, INC)로 1분 동안 균질화 후 암조건에서 20분 방치하고 나서 원심분리(10,000 g, 15분)시켜

색소를 추출하였다. 추출과정에서는 가능한 한 흡광도의 변화를 방지하기 위해서 광을 차단하였고 BChl과 carotenoid 함량을 계산하기 위해서 각각 772 nm 및 485 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며 흡광계수는 BChl은  $65.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로, carotenoid는  $149 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 계산하였다(Jensen and Jensen, 1971).

#### 4. 생육촉진 검정

선발한 JK-1 균주의 미생물비료로서 가능성을 알아보기 위하여 열무(*Raphanus sativus* L.)에 대한 생육촉진효과 검증을 소규모 포트에서 수행하였다. JK-1 균주는 RM broth에 3% (v/v) 접종 후 30°C, 100 rpm, 및 3,000 Lux의 조건에서 L-typtophan을 3mM 농도로 첨가 후 IAA 생성을 유도하여 72 h 배양하였다. 배양액은 밀도( $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup>) 검사 후 상토에 각각 0.5%, 1%, 2% 및 3% (v/v) 수준으로 접종하였으며, 이때 대조군으로 무처리(수돗물) 및 멸균배지액을 배양액과 같은 수준으로 동일하게 상토에 처리하였다. 이후 동일한 크기의 소규모 포트(600 cc)에 각각의 상토를 일정하게 담고 열무 종자를 1개씩 파종하여 온실에서 재배하였다. 식물체는 파종 50일 후 수확하여 엽록소함량, 생체중 및 건물중 등을 조사하였으며 엽록소함량은 엽록소측정기(SPAD-502)를 이용하여 측정하였다.

#### 5. 통계분석

시험분석은 각 처리구당 3반복으로 수행하였고, 자료는 SAS 프로그램(SAS version 8/2, NC, USA, 2001)을 이용하여 분석하였으며, 평균간 유의차 검정은 Duncan's multiple range test로 95% 수준에서 분석하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 광합성세균 선발

제주도 한라산 중산간 지대 습지에서 광합성세균을 분리하고 IAA 및 carotenoid 합성이 우수한 JK-1 균주를 최종 선발하였다. 선발한 광합성세균의 동정을 위하여 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하고 MRGA 6.0 프로그램(Tamura et al., 2011)의 neighbour-joining method에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 phylogenetic tree를 확인한 결과 선발한 균주는 *Rhodospseudomonas palustris* S22와 99%의 상동성을 나타내었다(Fig. 1). 선발한 균주의 형태적 특징은 그람음성 간균으로 운동성을 나타내었고 혐기적 조건뿐만 아니라 호기적 조건에서

도 성장 가능한 통성혐기성 균주였으며, 질소고정능이 있고 cellulase 및 pectinase 활성은 없었다(data not shown). 그리고 여러 가지 생리학적 특성을 조사한 결과 *Rhodopseudomonas* 속 균주와 가장 가까운 특징을 나타내었으며(Lee 1971), 본 연구에서는 *Rhodopseudomonas palustris* JK-1으로 명명하였다.

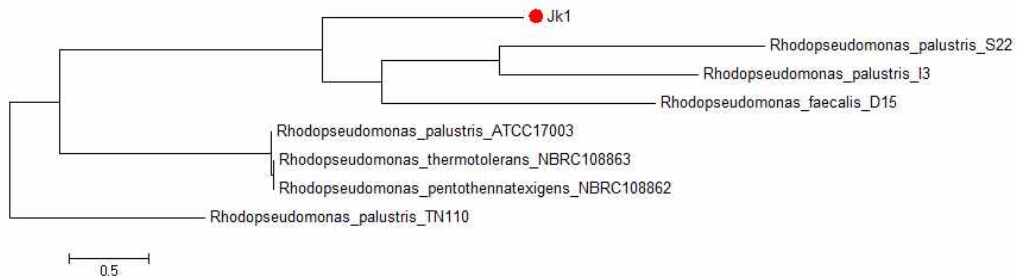


Fig. 1. Phylogenetic relationship between the identified *Rhodopseudomonas* strain and representative *Rhodospirillaceae* based on 16S rRNA gene sequences developed with the ClustalW program in MEGA 6.0 and constructed using the neighbour-joining method.

## 2. 명/암 조건에 따른 배양특성

선발한 광합성세균 *R. palustris* JK-1 균주의 최적배양조건을 선발하기 위하여 명조건(3,000~3,500 Lux) 및 암조건(0 Lux)에 따른 JK-1 균주의 배양특성을 혐기적 조건에서 회전 속도를 달리하여 조사하였다(Fig. 2). 건조균체량은 96 h 배양 후 명조건(Light/0 rpm) 대비 암조건(Dark/0 rpm)에서 18% 정도의 생육을 보였으며, 100 rpm 회전으로 0 rpm 대비 명조건에서 2배, 암조건에서 4배 정도 증가하였다. IAA 생산량도 건조균체량과 유사하게 명조건(Light/0 rpm) 대비 암조건(Dark/0 rpm)에서 34% 정도의 생산능을 보였으며, 100 rpm 회전으로 0 rpm 대비 명조건에서 4배, 암조건에서 6배 정도 증가하였다. Carotenoid 함량은 명조건(Light/0 rpm) 대비 암조건(Dark/0 rpm)에서 89% 감소하였고, 100 rpm 회전으로 0 rpm 대비 명조건에서 12% 감소하였으나 유의성은 없었으며, 반면에 암조건에서는 4배 정도 증가하였다. 그리고 BChl 함량은 명조건(Light/0 rpm) 대비 암조건(Dark/0 rpm)에서 91% 감소하였고, 100 rpm 회전으로 0 rpm 대비 명조건에서 1.4배, 암조건에서 4배 정도 증가하였다. 이전의 연구에서 *R. palustris* 균주는 명/혐기조건에서 세포질내막계가 발달하면서 BChl과 carotenoid와 같은 광합성색소를 형성하는 반면 암조건에서는 BChl 합성이 억제되고 세포내막 구조가 발달하지 못하는 것으로 밝혀졌으며(Alberto et al., 1987), Xing 등(2008)은 암조건에서 배양 시 carotenoid 함량이 낮고 배양액은 white 또는 whitish-pink 색상을 보인다고

하였다. 본 시험에서도 이와 유사하게 JK-1 균주는 암조건에서 광합성색소 합성이 크게 억제되었으며 균성장 뿐만 아니라 IAA 생산량 또한 암조건보다 명조건에서 높았다.

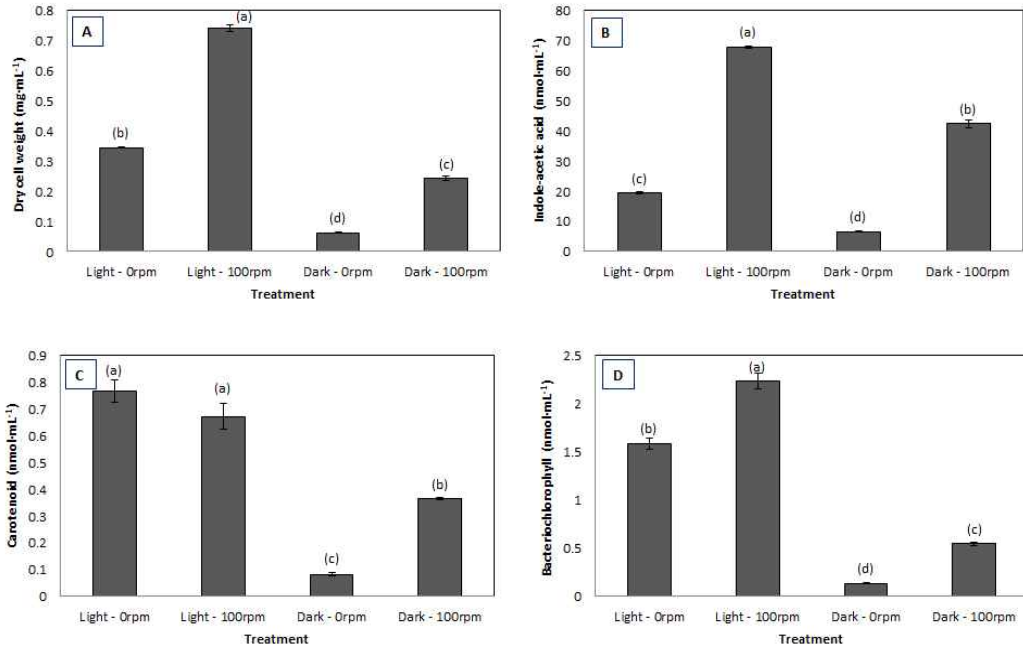


Fig. 2. Effect of light and dark condition on cell growth (A), IAA (B), carotenoid (C) and Bacteriochlorophyll (D) production by *Rhodospseudomonas palustris* JK-1 under anaerobe. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ , Bars represent  $\pm$ SD ( $n = 3$ ).

### 3. pH, 온도 및 배양회전속도에 따른 배양특성

Fig. 3은 명/협기조건에서 배지의 초기 pH 조건에 따른 여러 가지 배양특성을 나타낸 것이다. 건조균체량(DCW)은 pH 7에서  $0.72 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 가장 높았고 pH 6에서 다소 낮았으나 pH 5부터 8 범위에서의 생육은 큰 차이가 없었다. pH 9에서는 pH 7 대비 39%의 생육 감소를 보였으며 pH 3, 4, 및 10 조건에서는 생육이 크게 억제되었다. 이처럼 JK-1 균주는 pH 5~9 범위에서 생육이 가능한 것으로 나타났는데, 이는 Kim과 Lee (1976)가 한국산 *R. palustris* 균주의 pH 생육범위가 5.9~9.1이라고 한 보고와 다소 차이는 있으나, Liu 등(2014)이 논토양에서 분리한 *R. palustris* 균주의 생육 pH 범위는 5~9이며, 최적 pH는 7이라고 한 보고와는 일치하였다. IAA 생산량은 pH 9 조건에서  $136 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 가장 높았으나 pH 8과는 유의적인 차이가 없었으며 pH 9 대비 7에서 82% ( $112 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 6에서 63%, 그리

고 5에서 56%의 생성능을 보여 pH가 낮을수록 IAA 합성도 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 유사하게 Mohite (2013)는 IAA를 합성하는 5종의 근권미생물 중에서 3종은 pH 8, 1종은 pH 9에서 IAA 생산량이 가장 많았으며 pH 6 이하의 산성조건에서는 감소하였다고 보고하였다. 그리고 Sakpirom 등(2017)은 pH 7에서  $20.7 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 의 IAA를 생산하는 *R. plaustris* 균주를 논 토양에서 선발하였다고 보고하였는데, 이처럼 IAA 생성능은 배양조건 뿐만 아니라 서식처 환경에 따라서도 차이가 있을 것으로 보인다. 그리고 carotenoid 함량은 pH 6에서  $2.54 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 가장 높았고 IAA 생산량과는 반대로 pH 5를 제외하면 pH가 높을수록 감소하는 경향을 보였으며 BChl 함량도 carotenoid와 유사하였다. Li 등(2008)은 *R. palustris*의 carotenoid 함량은 pH 7까지 증가하고 이후 감소한다고 하였으며, Naghavi 등 (2014)은 *Rodotorula mucilaginosa* 균주의 경우 pH 5에서 가장 높고 이후 pH가 높을수록 감소하는 경향을 보인다고 하였다. 이처럼 균주에 따라 최적 pH 조건은 다소 차이가 있으나 pH에 따른 carotenoid 합성 반응은 유사한 경향을 보이는 것으로 판단된다.

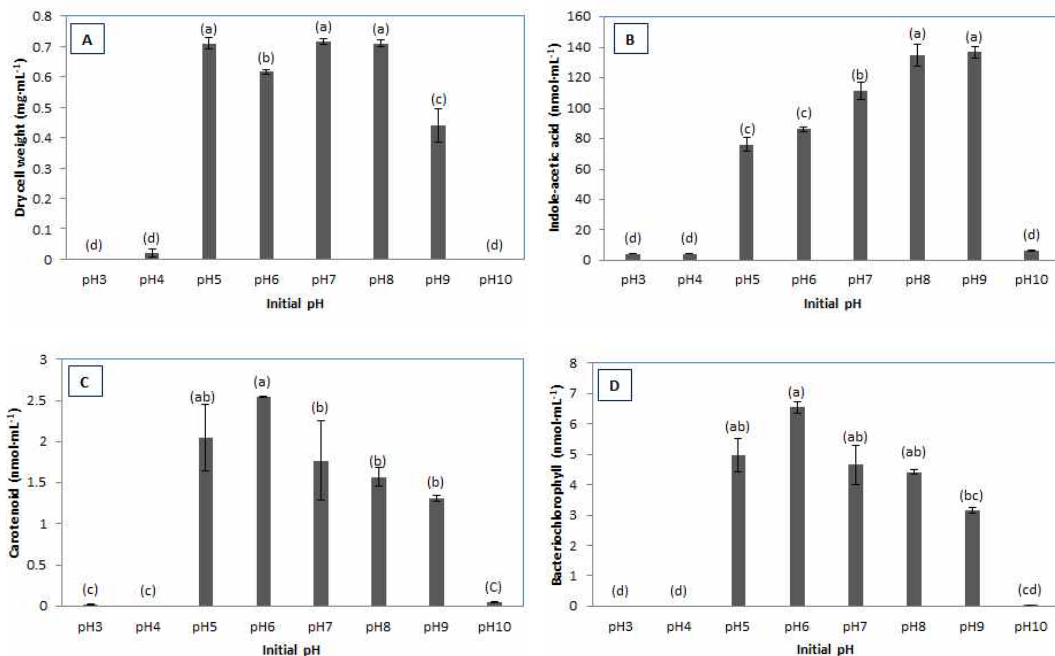


Fig. 3. Effect of initial pH on cell growth (A), IAA (B), carotenoid (C) and Bacteriochlorophyll (D) production by *Rhodospseudomonas palustris* JK-1 under anaerobic light. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ , Bars represent  $\pm$ SD ( $n=3$ ).

배양온도에 따른 JK-1 균주의 배양특성을 15°C, 25°C, 30°C 및 35°C 조건에서 조사하였다



(Fig. 4). 건조균체량은 72 h 경과 후 30°C 에서 가장 높았으나 25°C 조건과는 유의적인 차이가 없었으며 35°C 및 15°C 에서는 30°C 대비 각각 77% 및 33% 정도의 생육을 보였다. IAA 생산량은 온도가 높을수록 증가하는 경향을 보였으나 72 h 경과 후는 30°C 조건에서 가장 높았고 30°C 대비 35°C 91%, 25°C 90% 및 15°C 에서 11%의 생성능을 나타내었다. Carotenoid 함량은 72 h 경과 후 25°C 조건에서 2.88 nmol·mL<sup>-1</sup>로 가장 높았는데 15°C 를 제외하면 IAA 합성과는 반대로 온도가 높을수록 감소하는 경향을 나타냈으며 BChl 함량도 carotenoid 합성과 유사하였다. 이와 유사하게 Ramada 등(2012)은 토양에서 분리한 *R. palustis* 균주의 생육온도 범위는 15~35°C 이고 최적 온도는 30°C 라고 하였고, Mohite (2013)는 근권 미생물의 IAA 생산 최적 온도는 30°C 라고 보고하였으며, Li 등(2008)은 *R. palustris*의 carotenoid 합성은 28°C 에서 최대값을 보이며 이후 온도가 높을수록 감소한다고 하였다.

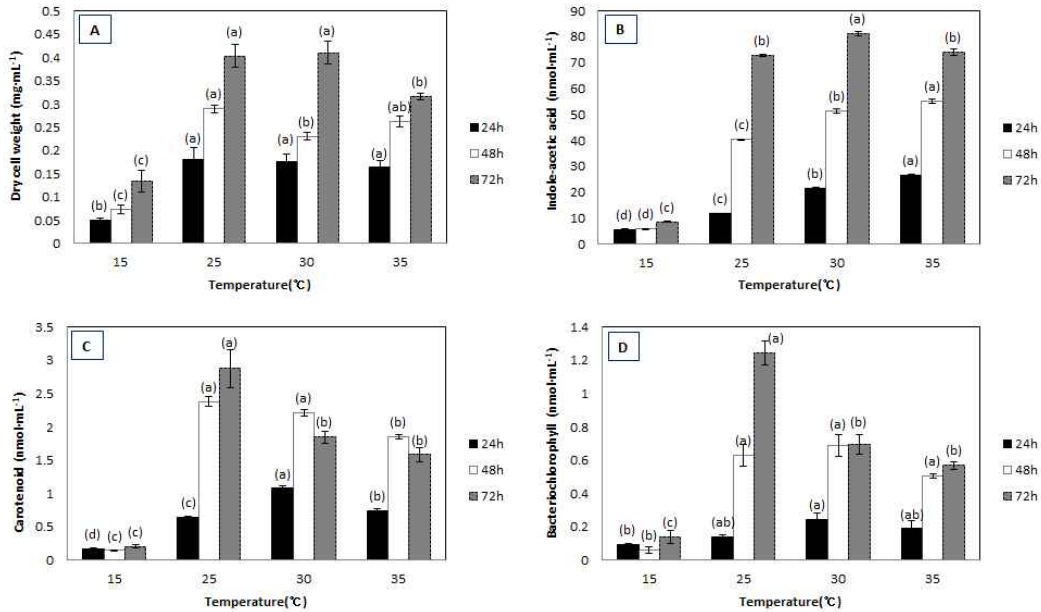


Fig. 4. Effect of culture temperature on cell growth (A), IAA (B), carotenoid (C) and Bacteriochlorophyll (D) production by *Rhodospseudomonas palustris* JK-1 under anaerobic light. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ , Bars represent  $\pm$ SD (n=3).

그리고 최적 배양회전속도를 결정하기 위하여 0, 50, 100 및 150 rpm 등 4가지 조건에서 배양특성을 조사하였다(Fig. 5). 건조균체량은 배양회전속도가 높을수록 증가하는 경향을 보였는데 72 h 경과 후 0 rpm 대비 50, 100 및 150 rpm 조건에서 각각 3.4, 3.8 및 5.2배 생육이 증가하였다. IAA 생산량 또한 균체량 변화와 유사한 경향을 보였으며 72 h 경과 후

0 rpm 대비 50, 100 및 150 rpm 조건에서 각각 3.2, 3.8 및 6.2배 증가하였다. Carotenoid 함량은 48 h 경과 시까지 배양회전속도가 높을수록 증가하는 경향을 보였으나 72 h 경과 후는 0 rpm 대비 50, 100 및 150 rpm에서 각각 1.4, 1.2 및 1.3배 증가로 오히려 배양회전속도가 높은 조건에서 감소하는 경향을 보였다. BChl 함량도 72 h 경과 후 50 rpm 조건에서 가장 높았으며 carotenoid 합성과 유사한 경향을 보였다. Kim과 Lee(2000)도 300 rpm까지는 배양회전속도가 높을수록 *R. palustris* 균주의 생육도 증가한다고 하였는데 이는 혼합 효과와 더불어 빛 전달 효과가 증가하는데 기인하는 것이며, 300 rpm 이후 생육이 감소하는 것은 shear stress에 의한 것으로 보인다고 하였다.

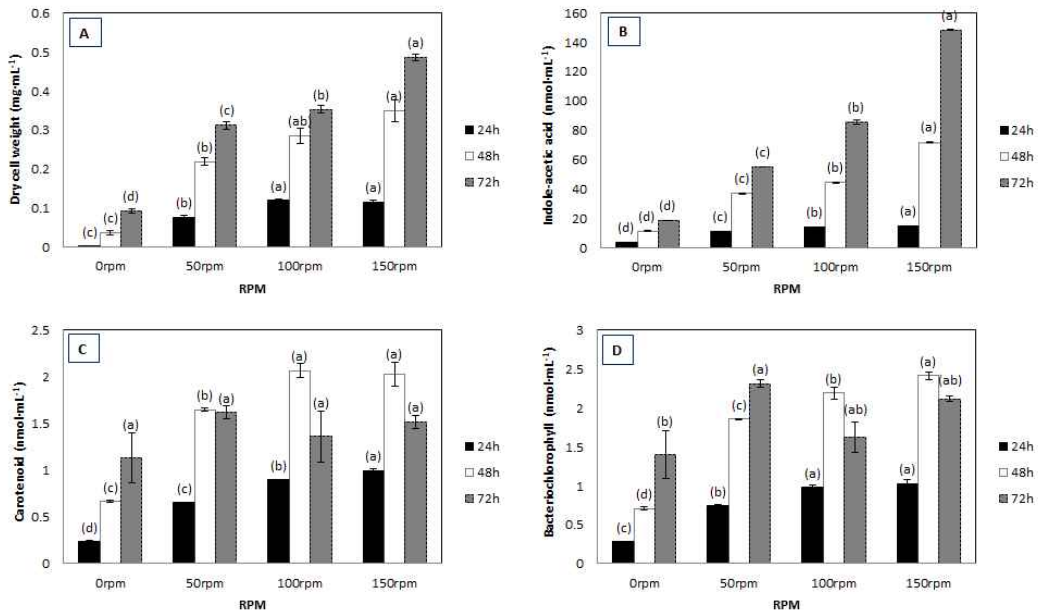


Fig. 5. Effect of agitation speed on cell growth (A), IAA (B), carotenoid (C) and Bacteriochlorophyll (D) production by *Rhodospseudomonas palustris* JK-1 under anaerobic light. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ , Bars represent  $\pm$ SD ( $n = 3$ ).

#### 4. 통기 조건에 따른 배양특성

통기량을 달리하여 JK-1 균주의 배양특성을 명조건(3,000~3,500 Lux)에서 조사하였다 (Fig. 6). JK-1 균주의 생육과 IAA 생산량은 호기조건(0.5~1 vvm)에서 우세하였는데 IAA 생산량은 72 h 경과 후 혐기조건 대비 0.5 및 1 vvm 조건에서 각각 3배 및 2배 정도 증가하였다. 반면에 carotenoid 및 BChl 함량은 72 h 경과 후 혐기조건(0 vvm) 대비 0.5 및 1 vvm 조

건에서 각각 5% 및 0%, 7% 및 0%로 합성이 크게 억제되었다. 이전의 연구에서 *R. palustris* 등 홍색비유황세균에 속하는 대부분의 종들은 명조건에서 혐기적으로 뿐만 아니라 호기적으로도 생장이 가능하고 암조건에서는 호기적으로 자란다고 하였으며, 산소분압이 높으면 색소형성이 전면적으로 억제되는데 이 억제는 광의 세기 등 조건과는 관계가 없다고 하였다(Lee, 1971). 본 연구에서도 JK-1 균주는 명/호기조건에서 균생장 뿐만 아니라 IAA 합성이 양호하였으나 광합성색소 합성은 크게 억제되는 것으로 나타났다.

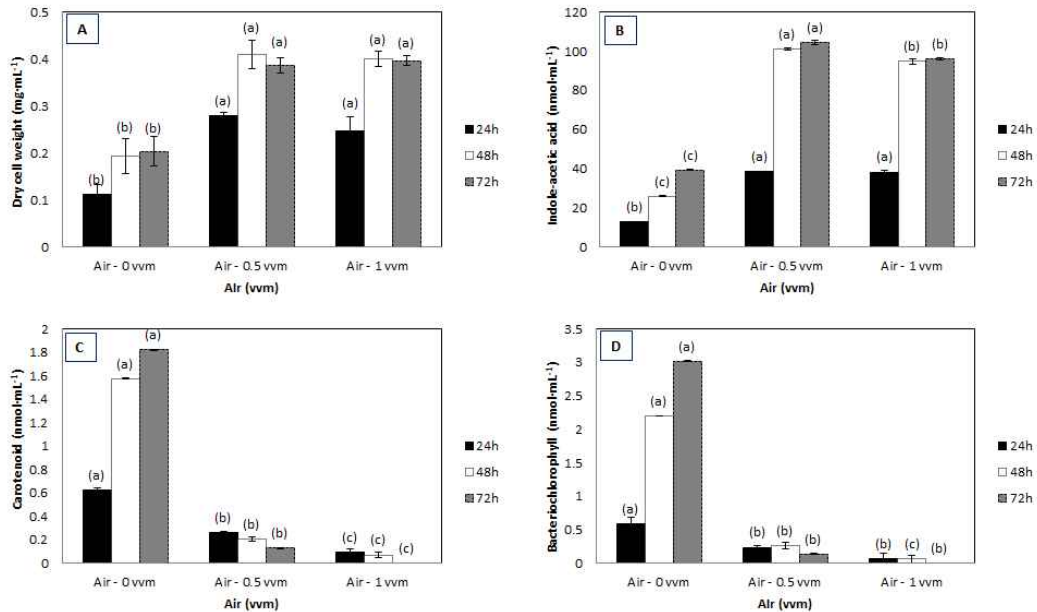


Fig. 6. Effect of aeration on cell growth (A), IAA (B), carotenoid (C) and Bacteriochlorophyll (D) production by *Rhodospseudomonas palustris* JK-1 under light. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ , Bars represent  $\pm$ SD ( $n = 3$ ).

이상의 결과를 종합해서 보면 JK-1 균주의 생육 및 IAA 생산을 위해서는 명/호기조건 (0.5 vvm)에서 pH 8, 온도 30°C, 회전속도 150 rpm으로 배양하는 것이 효율적이거나 carotenoid 및 BChl 함량을 동시에 고려하면 명/혐기조건에서 pH 7, 온도 30°C 및 회전속도 100 rpm 조건에서 배양하는 것이 적합한 것으로 보인다. 그리고 이 조건에서 JK-1 균주를 배양하고 작물 생육촉진 효과를 검증하였다. Liu 등(2014)은 *R. palustris* 균주의 작물 생육촉진 기작은 IAA 합성뿐만 아니라 질소고정 등과 같은 다른 기작과도 연관이 있으며, Spaepen 등(2007)도 IAA 합성 균주의 생육촉진 기작은 IAA 합성과 더불어 다른 생합성 기작을 포함한 여러 요인들과의 상호작용이 필요하다고 보고하였다.

## 5. 열무 생육촉진효과

열무에 대한 JK-1 균주 처리효과 시험 결과는 Table 1과 같다. 지상부 건물중은 균주 처리 농도가 높을수록 증가하는 경향을 보이는 반면 배지 처리구 간에는 차이가 없거나 감소하는 경향을 보였는데, JK-1 균주 3% (v/v) 처리 시 가장 높았으며 무처리(수돗물) 및 배지 3% (v/v) 처리구 대비 각각 20% 및 58% 증가하였다. 지하부 건물중 또한 균주 3% (v/v) 처리 시 무처리(수돗물) 및 배지 3% (v/v) 처리구 대비 40% 및 28% 증가하였으며 유의성 있는 차이를 보였다. 그리고 엽록소 함량은 균주 처리 농도가 높을수록 증가하는 경향을 보였는데 균주 3% (v/v) 처리구에서 가장 높았고 유의성 있는 차이를 보였으며 무처리 및 배지 3% (v/v) 처리구 대비 각각 15% 및 26% 증가하였다.

Table 1. Growth of young radish according to the inoculation levels of *Rhodopseudomonas palustris* JK-1

Treatment <sup>x)</sup>	Fresh weight (g · plant <sup>-1</sup> ) <sup>y)</sup>		Dry weight (g · plant <sup>-1</sup> )		Chlorophyll content (SPAD)
	Shoot	Root	Shoot	Root	
CON	14.83 <sup>bz)</sup>	3.82 <sup>bc</sup>	2.12 <sup>ab</sup>	0.38 <sup>b</sup>	22.10 <sup>abc</sup>
MD (0.5%)	13.46 <sup>b</sup>	3.43 <sup>c</sup>	1.85 <sup>bc</sup>	0.35 <sup>b</sup>	19.10 <sup>cd</sup>
MD (1%)	13.32 <sup>b</sup>	4.01 <sup>bc</sup>	1.86 <sup>bc</sup>	0.42 <sup>b</sup>	17.17 <sup>d</sup>
MD (2%)	14.98 <sup>b</sup>	4.10 <sup>bc</sup>	1.85 <sup>bc</sup>	0.41 <sup>b</sup>	21.63 <sup>abcd</sup>
MD (3%)	13.82 <sup>b</sup>	4.15 <sup>bc</sup>	1.64 <sup>c</sup>	0.42 <sup>b</sup>	20.13 <sup>bcd</sup>
RP (0.5%)	21.41 <sup>a</sup>	4.52 <sup>bc</sup>	1.87 <sup>bc</sup>	0.41 <sup>b</sup>	20.60 <sup>bcd</sup>
RP (1%)	19.37 <sup>a</sup>	3.99 <sup>bc</sup>	1.81 <sup>bc</sup>	0.38 <sup>b</sup>	21.57 <sup>abcd</sup>
RP (2%)	20.92 <sup>a</sup>	4.56 <sup>bc</sup>	2.29 <sup>ab</sup>	0.43 <sup>b</sup>	24.20 <sup>ab</sup>
RP (3%)	21.77 <sup>a</sup>	5.69 <sup>a</sup>	2.55 <sup>a</sup>	0.54 <sup>a</sup>	25.40 <sup>a</sup>

<sup>x)</sup> CON : uninoculated control, MD : Sterilized liquid medium, RP : *R. palustris* JK-1

<sup>y)</sup> Fresh and dry mass were measured 50 days after inoculation of bacteria

<sup>z)</sup> Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

이와 유사하게 최근에 *Rhodopseudomonas* 속 광합성세균의 작물 생육촉진 효과에 대한 연구사례가 보고되고 있는데 Koh 등(2007)은 IAA를 생산하는 *Rhodopseudomonas* spp. KL9 균주를 토마토 육묘에 처리한 결과 발아율, 초장 및 건물중이 무처리 대비 각각 30.2%, 71.1% 및 270.8% 증가하였다고 하였고, Liu 등(2014)도 논 토양에서 분리한 IAA를 생산하는 *R. palustris* 균주를 청경채에 50% 절감시비 조건에서 처리한 결과 100% 시비구와 수량

성에서 차이가 없었다고 하였다. 또한, Lee 등(2016)은 *R. palustris* PS3 균주를 청경채에 처리 시 생체중 및 건물중이 무처리 대비 각각 10~27% 및 22~40% 증가하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 JK-1 균주의 미생물비료로서의 가능성을 제시하였으며 앞으로 작물별 효과 검증 및 활용방법에 대한 연구가 지속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

#### IV. 적 요

본 연구에서는 제주도 한라산 중산간 습지대 28개소에서 IAA 및 carotenoid 생성능이 우수한 광합성 세균 1종을 최종 선발하였으며, 16S rRNA 염기서열 분석과 생리학적 특성을 조사한 결과 *Rhodospseudomonas palustris* JK-1 균주로 동정하였다. JK-1 균주의 최적배양조건을 선발하기 위하여 pH, 온도, 빛 및 통기 등을 포함한 여러 가지 요인들이 균주의 생장과 IAA 및 carotenoid 등 광합성색소 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 시험결과 JK-1 균주는 명/혐기조건에서 균생장, IAA 및 광합성색소 생성이 양호하였으며 암/혐기조건에서 균생장, IAA 및 광합성색소 형성이 모두 크게 억제되었다. 명/혐기조건에서 균생장, IAA 및 carotenoid 등 광합성색소의 생산을 위한 최적 pH, 온도 및 배양회전속도는 각각 7, 30°C, 150 rpm, 9, 30°C 및 150 rpm, 그리고 6, 25°C 및 50 rpm이었다. 그리고 명/호기조건(0.5~1 vvm)에서는 명/혐기조건(0 vvm)보다 균생장 및 IAA 합성이 양호하였으나 광합성색소 형성은 크게 억제되었다. 따라서 최적배양조건은 명/혐기조건에서 pH 7, 온도 30°C 및 회전속도 100 rpm을 선발하였으며, IAA 합성을 유도한 배양액을 생육촉진 효과검증에 이용하였다. 시험결과 *R. palustris* JK-1 균주를 열무에 3% (v/v) 처리 시 지상부 및 지하부 건물중이 무처리 및 배지처리구 대비 각각 20~58% 및 40~28% 증가하였다.

[Submitted, September. 8, 2017 ; Revised, October. 30, 2017 ; Accepted, November. 1, 2017]

#### References

1. Alberto, A. V., E. A. Wider, and A. M. C. Batlle. 1987. Porphyrin biosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris*-XII.  $\delta$ -aminolevulinat synthetase switch-off/on regulation. Int. J. Biochem. 19(4): 379-383.
2. Apine, O. A. and J. P. Jadhav. 2011. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. J. Appl. Microbiol. 110(5): 1235-1244.

3. Bong, K. M. K. M. Kim, M. K. Seo, J. H. Han, I. C. Park, C. W. Lee, and P. I. Kim. 2017. Optimization of medium for the carotenoid production by *Rhodobacter sphaeroides* PS-24 using response surface methodology. Korean J. Org. Agric. 25(1): 135-148.
4. Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, B. A. Vande, and J. Vanderleyden. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. Plant Soil. 212: 155-164.
5. Glickmann, E. and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indole compounds produced by phytopathogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61: 793-796.
6. Holt, G. J., N. R. Krieg, P. H. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed., Williams and Wilkins Co. Baltimore: 787.
7. Jensen, S. L. and A. Jensen. 1971. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. Methods Enzymol. 23: 586-602.
8. Kim, J. K. and B. K. Lee. 2000. Mass production of *Rhodopseudomonas palustris* as diet for aquaculture. Aqua. Eng. 23: 281-293.
9. Kim, K. S. and H. S. Lee. 1976. Studies on *Rhodopseudomonas palustris* in Korea. Kor. J. Microbiol. 14(4): 167-175.
10. Koh, R. H. and H. G. Song. 2007. Effects of application of *Rhodopseudomonas* sp. on seed germination and growth of tomato under axenic conditions. J. Microbiol. Biotechnol. 17(11); 1805-1810.
11. Kuo, F. S., Y. H. Chien, and C. J. Chen. 2012. Effects of light sources on growth and carotenoid content of photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas palustris*. Bioresource Tech. 113: 315-318.
12. Lambrecht, M., Y. Okon, A. V. Broek, and J. Vanerleyden. 2000. Indole-3-acetic acid : a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. Trends Microbiol. 8(7): 298-300.
13. Larimer, F. W., P. Chain, L. Hauser, J. Lamerdin, S. Malfatti, L. Do, M. L. Land, D. A. Pelletier, J. T. Beatty, A. S. Lang, F. R. Tabita, J. L. Gibson, T. E. Hanson, C. Bobst, J. L. Torres, C. Peres, F. H. Harrison, J. Gibson, and C. S. Harwood. 2004. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. Nature biotechnology. 22(1): 55-61.
14. Lee, E. S. and H. G. Song. 2010. Plant growth promotiom by purple nonsulfur *Rhodopseudomonas faecalis* strains. Kor. J Microbiol. 46(2): 157-161.
15. Lee, K. W. 1971. General characters and applications of photosynthetic bacteria. Kor. J. Microbiol. 9: 130-138.

16. Lee, S. K., H. S. Lur, K. J. Lo, K. C. Cheng, C. C. Chuang, S. J. Tang, Z. W. Yang, and C. T. Liu. 2016. Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodopseudomonas palustris* strain PS3. *Applied Microbiol & Biotech.* 100(18): 7977-7987.
17. Lee, S. S., H. J. Joo, S. C. Lee, M. Jang, T. K. Lee, H. J. Shim, and E. B. Shin. 2002. Development of advanced wastewater treatment system using photosynthetic purple non-sulfur bacteria. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30(2): 189-197.
18. Li, F. Z., X. Y. Zhou, X. X. Zeng, and J. Deng. 2008. Identification of a strain of *Rhodopseudomonas palustris* and researches on its carotenoid production. *J. Food Sci. & Biotech.* 27(4): 116-121.
19. Liu, C. T., W. T. Wong, C. H. Tseng, S. H. Hsu, H. S. Lur, C. W. Mo, C. N. Huang, S. C. Hsu, and S. C. Hsu. 2014. Promoting effects of a single *Rhodopseudomonas palustris* inoculant on plant growth by *Brassica rapa chinensis* under low fertilizer input. *Microbes Environ.* 29(3): 303-313.
20. Mohite, B. 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 13(5): 1-11.
21. Murtaugh, M. A., K. N. Ma, J. Benson, K. Curtin, B. Can, and M. L. Slattery. 2004. Antioxidants, carotenoids, and risk of rectal cancer. *Am. J. Epidemiol.* 159: 32-41.
22. Naghavi, F. S., P. Hanachi, and A. Saboora. 2014. Effect of temperature, pH and salinity on carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa*. *Research in Biotech.* 5(4): 01-04.
23. Nunkaew, T., D. Kantachote, H. Kanzaki, T. Nitoda, and R. J. Richie. 2014. Effect of 5-aminolevulinic acid (ALA)-containing supernatants from selected *Rhodopseudomonas palustris* strains on rice growth under NaCl stress, with mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes. *Electronic J. Biotech.* 17: 19-26.
24. Pechter, K. B., L. Gallagher, H. Pyles, C. S. Manoil, and C. S. Harwood. 2016. Essential genome of the metabolically versatile alphaproteobacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *J. of Bacteriology.* 198(5): 867-876.
25. Pierre, A. 1997. Food carotenoids and cancer prevention : An overview of current research. *Trends in Food Sci. Tech.* 8: 406.
26. Ramana, V. V., S. K. Chakravarthy, P. S. Raj, B. V. Kumar, E. Shobha, E. V. V. Ramaprasad, C. Sasikala, and Ch. V. Ramada. 2012. Description of *Rhodopseudomonas parapalustris* sp. nov., *Rhodopseudomonas harwoodiae* sp. nov. and *Rhodopseudomonas pseudopalustris* sp. nov., and emended description of *Rhodopseudomonas palustris*. *Int. J.*

- Systematic and Evo. Microbiology. 62: 1790-1798.
27. Saejung, C. and P. Apaiwong. 2015. Enhancement of carotenoid production in the new carotenoid-producing photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas faecalis* PA2. Biotech. & Biopro. Eng. 20: 701-707.
  28. Sakpirom, J., D. Kantachote, T. Nunkaew, and E. Khan. 2017. Characterizations of purple non-sulfur bacteria isolated from paddy fields, and identification of strains with potential for plant growth-promotion, greenhouse gas mitigation and heavy metal bioremediation. Research in Microbiology. 168: 266-275.
  29. Song, H. G. and E. S. Lee. 2010. Plant growth promotion by purple nonsulfur *Rhodopseudomonas faecalis* strains. Kor. J. Microbiology. 46(2): 157-161.
  30. Song, S. H. 1993. Effects of carbon sources on the growth, formation of bacteriochlorophyll and carotenoid in a photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. Graduate school of education, Jeju National University, Jeju, Korea.
  31. Spaepen, S., J. Vanderleyden, and R. Remans. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol. Rev. 31: 425-448.
  32. Staley, J. T. 1989. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wikinsm Co., New York.
  33. Steenhoudt, O. and J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum* a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol. Rev. 24: 487-506.
  34. Taghavi, S., C. Garafola, S. Monchy, L. Newman, and A. Hoffman. 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. Appl. Environ. Microbiol. 75: 748-757.
  35. Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. 28: 2731-2739.
  36. Wu, J., Y. Wang, and X. Lin. 2013. Purple phototrophic bacterium enhances stevioside yield by *Stevia rebaudiana* Bertoni via foliar spray and rhizosphere irrigation. PLOS ONE 8(6): 1-5.
  37. Xing, D., Y. Zuo, S. Cheng, J. M. Regan, and B. E. Logan. 2008. Electricity generation by *Rhodopseomonas palustris*. Environ. Sci. Tech. 42: 4146-4151.
  38. Xu, J., Y. Feng, Y. Wang, X. Luo, J. Tang, and X. Lin. 2015. The foliar spray of *Rhodopseudomonas palustris* grown under *Stevia* residue extract promotes plant growth via changing soil microbial community. J. Soils Sediments (doi: 10.1007/s11368-015-1269-1).



39. Yin, Z. P. Z. W. Shang, C. Wei, J. Ren, and X. S. Song. 2012. Foliar sprays of photosynthetic bacteria improve the growth and anti-oxidative capability on chinese dwarf cherry seedlings. *J. Plant Nutr.* 35(6): 840-853.
40. Yoon, S. T., Y. O. Kim, I. S. Kim, and M. C. Lee. 2012. Effect of effective microorganism applications on growth, yield and fruit nutrient contents in Hot pepper. *Kor. J. Organic Agriculture.* 20(3): 313-326.