Journal of the Korean Applied Science and Technology
Vol. 39, No. 6. December, 2022. 831~838
ISSN 1225-9098 (Print)
ISSN 2288-1069 (Online)
http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2022.39.6.831

Indole-3-acetic acid (IAA) 생성 *Arthrobacter* sp.의 분리 및 식물 생육촉진 효과

김다솜[1,*] · 신호용[1] · 한송이[1,†]

[1]목원대학교 미생물생명공학과

(2022년 12월 1일 접수: 2022년 12월 14일 수정: 2022년 12월 16일 채택)

Isolation of Indole-3-acetic acid (IAA) producing *Arthrobacter* sp. and plant growth promotion effect

Da Som Kim · Ho-Young Shin · Song-Ih Han†

Department of Microbial Biotechnology, Mokwon University, Daejeon 35349, Korea
(Received December 1, 2022; Revised December 14, 2022; Accepted December 16, 2022)

요 약 : 농업 재배지 토양으로부터 auxin 생성세균 KSD16, KSD33 그리고 KSD36를 분리하였다. 분리 균주 KSD16, KSD33 그리고 KSD36 는 16S rRNA 유전자 계통분석을 통해 *Arthrobacter* 속으로 분류되었다. 이들 균주는 R2A배지에 0.1% L-tryptophan를 첨가한 배지에서 28℃, 48 시간 배양한 결과, auxin의 일종인 indole-3-acetic acid (IAA)를 204.4 mg L^{-1} 생성하는 것으로 확인되었다. IAA 생성세균의 녹두종자 발아에 미치는 영향을 확인한 결과, *Arthrobacter* 속 균주 KSD16, KSD33 그리고 KSD36 는 대조군에 비해 뿌리길이와 발근수가 증가하였다. *Arthrobacter* 속 균주의 녹두 성장촉진 효과를 확인한 결과, 녹두의 발아율이 대조군보다 73.4 % 증가하는 특징을 나타내었다.

주제어 : auxin, Arthrobacter sp., indole-3-acetic acid, 식물생육촉진, 종자발아

Abstract : An auxin-producing bacteria, KSD16, KSD33, and KSD36 were isolated from agricultural soil. The strain KSD16, KSD33, and KSD36 was classified as a strain of *Arthrobacter* sp. based on phylogenetic analysis of 16S rRNA gene. The isolated KDS16, KDS33, and KSD36 was confirmed to produce indole-3-acetic acid (IAA), which is one of the auxin hormones. When the concentration of IAA was assessed the maximum concentration of IAA, 206.62 mg L^{-1}, was detected from the culture broth incubated in R2A medium containing 0.1% L-tryptophan for 48 h at 28 ℃. To study the effect of IAA producing bacteria on germination rate, seeds of Mung bean were prepared for each treatment. KSD16, KSD33, and KSD36 showed significant increase in root length and number of adventitious

†Corresponding author
(E-mail: h1882@mokwon.ac.kr)

roots than the controls. To investigate the growth-promoting effects on the crops, *Arthrobacter* species were placed in water cultures and seed pots of mung beans. In consequence, the seed germination of mung beans was 73.4% higher than the control.

Keywords : auxin, Arthrobacter sp., indole-3-acetic acid, plant growth promotion, seed germination

1. 서 론

농업 생산에 화학 비료를 광범위하게 사용하면 작물 수확량을 늘리고 식량 안보를 보장할 수 있다. 그러나 장기적이고 과다한 사용은 작물의 품질에 영향을 미칠 뿐만 아니라 토양 불균형 등 환경을 파괴한다[1]. 이에, 세계 각국은 친환경유기농업에 대한 정책을 마련하고 있다. 현재 작물 생육용자재로 사용 가능한 물질 중 식물생장촉진능을 갖는 미생물 및 미생물 추출물에 많은 관심을 갖고 있다.

식물생장촉진세균이 식물에 미치는 직·간접적 메커니즘으로 식물생장호르몬, 질소고정, 무기인 산염 가용화 및 식물병원성 균주에 대한 항균활성능 등으로 알려져있다[2]. 식물생장호르몬은 gibberellin, auxin, cytokinin, abscisic acid 등이 있으며[3], 대표적 식물호르몬인 indole-3-acetic acid (IAA)는 L-tryptophan을 전구체로 사용하여 합성되며 식물의 생리 및 발달과 생장을 조절하는 기능을 하는 유기화합물이다[4]. 식물생장호르몬을 비롯한 생리활성 물질을 분비하는 세균으로 *Bacillus* 속, *Streptomyces* 속, *Arthrobacter* 속 등이 보고되어 있으며, 이들 식물생장촉진세균은 토양 내 유익균의 생장을 촉진시켜 토양을 입단화하고 비옥도를 증가시켜 토양개량과 산성화 방지에 특히 효과적이기에 친환경농자재로서 활용성이 기대된다 [2,5-10].

본 연구에서는 재배지 토양에서 분리한 IAA 생성 우수균주를 이용하여 기내에서 녹두 종자의 발아 및 유식물체의 뿌리 발달효과를 조사하여 친환경유기농업자재로서의 활용 가능성을 검토하였다.

2. 실 험

2.1. 균주 분리

식물호르몬인 auxin 생산균주의 분리를 위하여 콩 그리고 녹두 재배지 토양(36.4430827, 127.27.312)을 채취하였다. 채취한 토양 10 g을 멸균수 90 mL에 희석하고 Sonication를 이용하여 1분 30 초 30 W 한 후 단계적 희석 평판법을 이용하여 희석액을 R2A 고체 배지에 도말하여 28 ℃에서 배양하였다. 도말한 고체배지에서 단일 colony를 분리하여 1차 선발을 하였다.

2.2. 식물 성장 촉진 활성 균주의 선발

2.2.1. Indole-3-acetic acid 생산

선발한 1차 균주의 auxin 생산율을 확인하기 위해 auxin의 생산성의 주요 기능 중 하나인 Indole-3-acetic acid를 조사하였다. 분리균의 배양액을 R2A broth 배지(pH 7.0)에 접종후 28 ℃에서 24 시간 이상 전배양, 본배양으로 진탕 배양한 배양액을 4 ℃, 8000 rpm, 10 분간 원심분리하여 배양 상등액을 회수하였다. 배양 상등액과 Salkowski 시약을 1:2 (v/v)의 비율로 섞은 후 암조건에 30 분간 반응시킨 후 이 반응액을 분광광도계를 이용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하여 0.8 이상으로 측정이 되면 양성인 것으로 판단하였다. 표준물질 IAA를 사용하여 표준곡선을 작성하고 균주의 생육에 따른 auxin의 생성량을 표준곡선에 의거하여 함량을 측정하였다 [11].

2.2.2. Siderophore 생산

선발한 1차 균주의 철이온 특이 결합물질(siderophore)의 생성을 평가하기 위하여 chrome azurol sulfate (CAS) 배지에 접종하고 30 ℃에서 3~7일 동안 배양하고, colony 주변의 투명한 환이 생기면 siderophore 생산에 양성인 것으로 판단하였다[12].

2.2.3. N_2 fixation

분리균주의 질소 고정 효능을 확인하기 위해 Nitrogen-free 배지에서 질소 고정 효능에 대해 조사하였다. Nitrogen-free 배지에 접종하고 28 ℃에서 7일~10일 동안 성장시켰다. Nitrogen-

free 배지에 colony가 형성되면 질소 고정 효능이 양성인 것으로 판단하였다[13].

2.3. 16S rRNA 유전자 분석 및 계통학적 특성

순수 배양된 균주의 16S rRNA 유전자 분석 및 계통학적 특성을 분석하기 위해 단일 콜로니를 주형으로 사용하여 직접 PCR 증폭을 수행하였다. *E. coli* 16S rRNA 유전자 부분의 conserved sequence를 기초로 한 27F (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′) primer와 1492R (5′-ATTACCGCGGCTGCTGG-3′) primer를 이용하였다. PCR 조건은 2× Master Mix (Bioneer, Korea), PCR buffer, 0.2 μM primer, template는 10~50 ng으로 하였다. 16S rRNA 유전자 PCR조건에 따라 95 ℃에서 2 분, 94 ℃에서 30 초, 54 ℃에서 40 초, 72 ℃에서 1 분 30 cycle 조건으로 반복하고 72 ℃ 5 분 처리하여 PCR 증폭을 하였다. PCR 증폭산물은 0.8 %의 agarose gel, 0.5×TAE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 100 V, 25 mA로 30 분간 전기영동하고 PCR purification kit (Qiagen Inc.)를 이용하여 정제한 후 염기서열 분석을 수행하였다. 결정된 16S rRNA 유전자 염기서열은 EzBioCloud (http://www.ezbiocloud.net/eztaxon)을 이용하여 상동성을 검색하고[14], homology를 비교하였다. 각 염기서열은 Clustal W program으로 multiple sequence aligment한 후, MEGA 6.0 [15]을 사용하여 분자 계통수를 작성하였다.

2.4. IAA 생산능 확인

IAA생성을 TLC분석을 통해 확인하기 위하여 0.1 % L-tryptophan을 함유한 R2A액체배지에서 28 ℃에서 24 시간 배양한 후, 배양 상등액을 1M HCl을 이용하여 pH 2.8까지 산성화 시킨 후, 2배의 ethyl acetate로 분획 추출하고 수용액층은 버리고 회수한 ether층을 감압증류장치로 얻어진 잔사를 methanol 2mL에 녹여 TLC를 수행하였으며 이때 전개용매는 1-propanol: NH_4OH: H_2O (6: 3: 1) 혼합액을 사용하며, 발색시약은 증류수 100 mL, 농 염산 150 mL, p-dimethylamino benzaldehyde 0.7 g을 용해한 Ehrlich 시약을 사용하였다[16].

2.5 식물생장실험

2.5.1. 녹두 종자 발아

녹두종자는 70 % ethyl alcohol로 30 초간 침지하고 증류수로 3회 수세하여 표면 소독하였다. 2 % sodium hypochlorite로 15 분 간 침지하고 멸균수로 3회 수세한 후 멸균된 여과지가 든 90 mm petri dish 안에서 풍건하였다. 소독된 종자는 암조건에 28 ℃ 7일간 배양하였다[17]. 배양은 28 ℃, 습도 60 %가 유지되는 항온항습실에서 생육하고 발아율과 초기생육인 뿌리발달을 확인하였다.

2.5.2. 녹두발근생검법에 따른 생장효과

선발된 균주의 식물생육촉진능력을 검증하기위해 녹두발근검정법을 이용하여 뿌리 발근촉진효과를 조사하였다. 녹두종자를 0.3 % sodium hypochloride 용액에 3분 동안 표면 살균한 다음 멸균수로 여러 번 세척 하고, 멸균된 여과지를 건조하고 종자를 암조건에 28 ℃ 3일간 배양한 후 식물 배양 배지인 MS배지에 처리별로 녹두를 심은 후 동일한 환경조건에서 연속 조명으로 7일간 발근시킨 후 발근수를 계수하였고, 뿌리 길이를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 식물 성장 촉진 활성을 갖는 *Arthrobacter* sp. 속 균주 분리

농업 재배지 토양시료를 도말평판법에 의거하여 평판배지에 형성된 콜로니 50균주를 순수분리하고 IAA, siderophores, N2 고정능을 확인하여 총 11 균주의 식물생육촉진세균을 선발하였다 (Table 1). 식물생육촉진세균 11균주를 대상으로 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과, *Arthrobacter* (3 균주), *Streptomyces* (1 균주), *Bacillus* (1 균주), *Neobacillus* (1 균주), *Pseudomonas* (2 균주), *Rhodococcus* (1 균주), *Flavitalea* (1 균주) 그리고 *Massilia* (1 균주)로 확인되었다(Table 1).

Table 1. Isolation of IAA, sideropore production, N_2 fixing bacteria from paddy soils. 16S rRNA gene sequences analysis of plant growth promoting bacteria

Strain	N_2 fixation	Sideropore	IAA	Closet sequence	Similarity (%)
KSD36	−	+	+	*Arthrobacter ginsendisoli*	100%
KSD33	+	+	+	*Arthrobacter globiformis*	100%
KSD16	+	+	+	*Arthrobacter oryzae*	99.46%
KSD2	−	+	−	*Streptomyces sanglieri*	99.84%
KSD43	−	+	+	*Bacillus wiedmannii*	100%
KSD12	+	+	+	*Neobacillus cucumis*	100%
KSD26	+	+	+	*Pseudomonas knackmussi*	100%
KSD23	+	−	+	*Pseudomonas knackmussi*	100%
KSD13	−	+	+	*Rhodococcus jostii*	99.83%
KSD14	+	+	−	*Flavitalea antarctica*	97.33%
KSD55	+	+	−	*Massilia agri*	99.28%

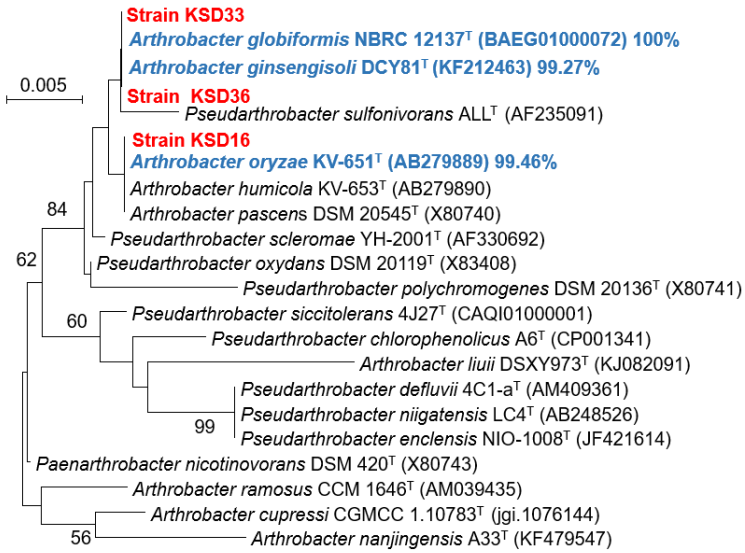


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain KSD16, KSD33 and KSD36 located in the type strains of the genus *Arthrobacter*. Bootstrap values (> 50 %) based on 1,000 replicates are shown at branch nodes. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

3.2. 16S rRNA 유전자를 활용한 *Arthrobacter* 속 분리균의 동정

식물생육촉진 세균 KSD16, KSD33와 KSD36 균주의 16S rRNA 유전자 염기 서열을 결정하고 계통수를 작성한 결과, KSD16, KSD33그리고 KSD36 균주는 *Arthrobacter* 속에 속하였으며, *Arthrobacter oryzae* KV-651^{T}와 99.46 %, *Arthrobacter globiformis* NBRC12137^{T}와 100 %와 *Arothrobacter ginsendisoli* DCY81^{T}와 100 %의 상동성을 나타내어 *Arthrobacter* sp.로 동정되었다.(Fig. 1.)

3.6. *Arthrobacter* 속 IAA 생산능 비교

선별된 *Arthrobacter* 속에 속하는 KSD16, KSD33 그리고 KSD36균주를 0.1 % L-tryptophan이 함유된 R2A broth (pH 7.0) 배지에 배양하면서 auxin 생성을 검토하였다. 분리균을 접종 한 후 28 ℃에서 배양 시 균의 생육은 약 24시간에 대수기에 도달하였다. 생육초기에는 9.5 mg L^{-1} 이하의 낮은 수준을 유지하였으나, 생육의 최대인 배양 24 시간에는 IAA가 50 mg L^{-1}이상으로 급격히 증가하였다. *Arthrobacter* KSD36균주는 IAA생성능이 204.4 mg L^{-1}으로 높은 IAA생성능을 보였다(Fig. 2).

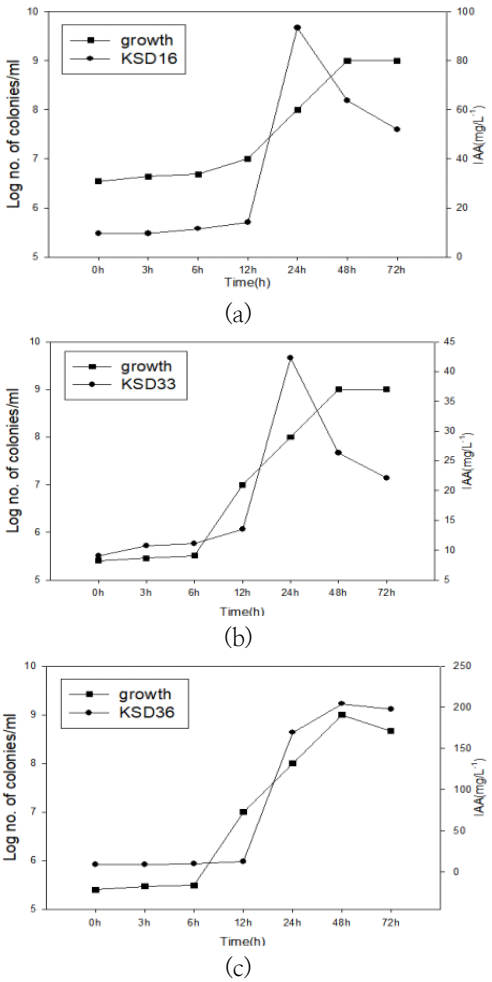


Fig. 2. The profile of IAA production of *Arthrobacter* sp. strain KSD16 (a) KSD33 (b) and KSD36 (c) incubation time in 200 ㎖ flask culture.

3.3. IAA 생산의 TLC 분석

분리된 KSD16, KSD33와 KSD36 균주의 IAA 생성을 확인하기 위해 TLC를 이용하였다. IAA를 표준물질로 비교하였다. 그 결과 KSD16, KSD33와 KSD36에서 추출된 물질은 TLC상에서 IAA와 동일한 위치로 IAA계 auxin 물질임을 확인 할 수 있었다. (Fig. 3)

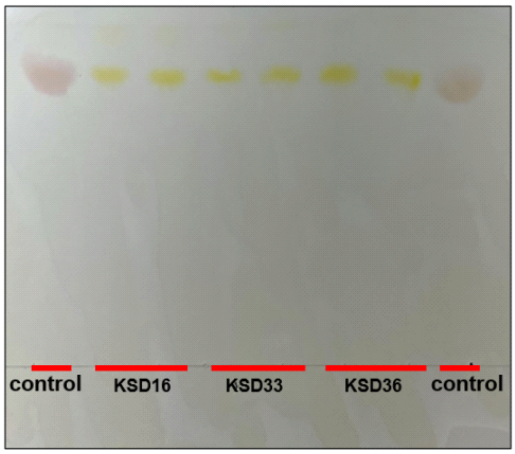


Fig. 3. TLC analysis of IAA produced from the selected strains. Concentration of IAA standard : 100 mg L^{-1}.

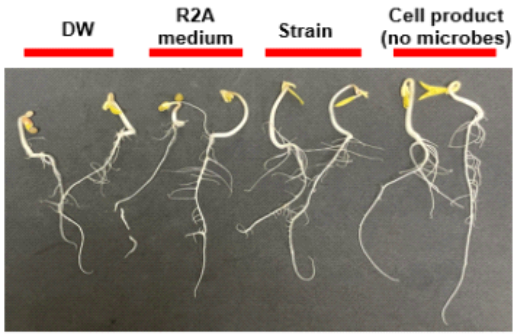
3.4. *Arthrobacter* 속 균주의 녹두 종자 발아

선별된 *Arthrobacter* 속에 속하는 KSD16, KSD33 그리고 KSD36균주의 녹두 종자의 발아율은 대조구의 경우, 모두 100 %의 발아율을 나타내었다. 초기 뿌리 생장의 경우, KSD16균주의 뿌리길이는 10 cm로 대조구(5.38 cm)에 비해 약 1.8배, KSD33균주는 9.3 cm로 대조군에 비해 약 1.7배 높게 나타났으며, KSD36균주는 9.6 cm로 약 1.78배까지 나타나는 것으로 확인하였다(Fig. 4).

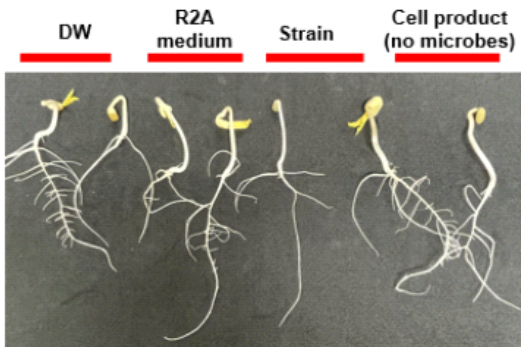
3.5. 선별된 *Arthrobacter*에 의해 촉진되는 녹두발근력 확인실험

대조군과 비교하여 *Arthrobacter* sp. KSD16, KSD33 그리고 KSD36은 각각의 발근 길이를 평균값의 백분율로 비교한 결과 52.4 %, 109.5 %, 42.9 % 증가한 것으로 나타났다. *Arthrobacter* sp.의 대사산물에 대한 발근수는 KSD16, KSD33 그리고 KSD36 각각 63.2 %, 115.8 %, 57.9 % 증가한 것으로 나타났다 (Fig. 5). 이상의 결과로

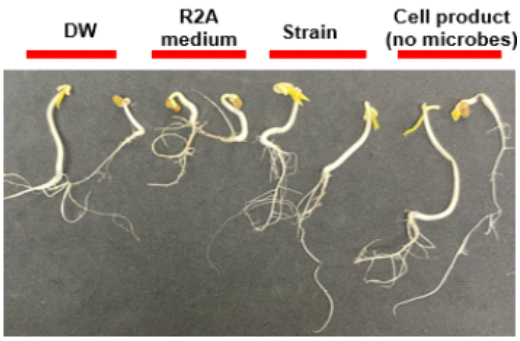
IAA 생성 *Arthrobacter* 속 균주는 기내에서 발아한 녹두 유식물체의 뿌리발달에 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 5).



(a)



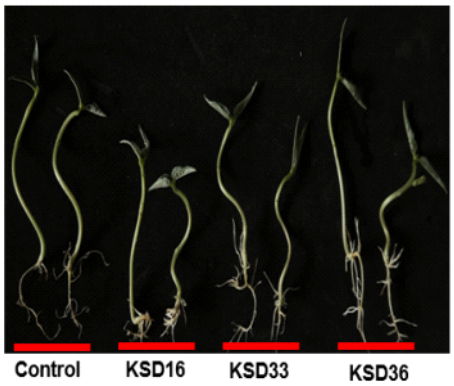
(b)



(c)

Fig. 4. Seed germination effect of mung bean infected with *Arthrobacter* sp. strain KSD16 (a) KSD33 (b) and KSD36 (c).

(a)



(b)

Fig. 5. Growth effect of mung bean infected with cell cultures (a) and cell product(no microbes) (b) of *Arthrobacter* sp. strain KSD16, KSD33 and KSD36 in water culture

4. 결 론

이상의 결과로 식물생장촉진 세균으로 선정된 *Arthrobacter* 속에 속하는 KSD16, KSD33 그리고 KSD36 균주는 배양 24 시간에 204.4 mg L^{-1}으로 높은 IAA생성능을 보였으며, 질소고정 그리고 siderophore의 식물생육촉진 활성을 나타내었다. 이들 균주는 녹두 발아 및 뿌리 생장에 효과를 보이는 것으로 확인되었으며, 배양 7일 이내 초기 녹두 뿌리 생장을 73.4 % 증가시키는

것으로 확인되었다. 본 연구에서 확보된 *Arthrobacter* 균주는 식물 성장을 촉진하는 효율적인 생물비료용 미생물로 추후 IAA 대량생산을 위한 최적 조건 연구, 대량배양 및 다양한 작물에 대한 효과 시험을 통해 작물생육촉진용 친환경유기농업자재로의 활용 가능성이 높은 것으로 사료된다.

References

1. D.B. Brana, P.T. Lacava, A. Ferrari, N. S. Teixeira-silva, "M.L. Bonatelli, *et al.* Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability", *Microbiol Res.* Vol.206, pp.33-42, (2018).
2. Y. Jiang, Y. Song, C. Jiang, X. Li, T. Liu, J. Wang, C. Chen, J. Gao. "Identification and Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* JI39, a Novel Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Strain From *Panax ginseng*", *Frontiers in Plant Science,* 13: 873621, (2022).
3. M. Lambrecht, Y. Okon, A. Broek, J. Vanderleyden. "Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions", Trends in *microbiology*. Vol.8, No.7, pp.298-300, (2000).
4. M. R. Sunayanal, Ch. Sasikala, and Ch. V. Ramanal. "Rhodestrin: a novel indole terpenoid phytohormone from Rhodobacter sphaeroides", *Biotechnology Letters*. Vol.27, pp.1897-1990, (2005).
5. B. Mahadevan, and D. L. Crawford. "Properities of the chitinase of the antifungal biocontrol agent Streptomyces lydicus WYEC108", *Enzyme and Microbial Technology*. Vol.20, pp.489-493, (1997).
6. M. Sunayanal, C. Sasikala, and C. Ramanal. "Rhodestrin: a novel indole terpenoid phytohormone from Rhodobacter sphaeroides", *Biotechnology Letters*. Vol.27, pp.1897-1990, (2005).
7. de Vasconcellos, R. L. F. and E. J. B. N. Cardoso. "Rhizoʊspheric Streptomycetes as potential biocontrol agents of Fusarium and Armillaria pine rot and as PGPR for Pinus taeda", *Biocontrol*. Vol.54, pp.807, (2009).
8. J. Y. Yoo, H. H. Lee, C. H. Han, and M. H. Yoon. "Characterization of auxin production plant growth promotion by a bacterium isolated from button mushroom compost", *Journal of Mushroom.* Vol.15, No.1, pp.8-13, (2017).
9. S. J. Moon and M. H. Yoon. "Plant growth promotion effect of *Arthrobacter enclensis* Yangsong-1 isolated from a button mushroom bed", *Journal of Mushroom.* Vol.17, No.1, pp.12-18, (2019).
10. N. Napawit P. Watanalai, S. Wisuwat, I. Bungonsiri. "Plant growth-promoting properties of *Streptomyces* spp. isolates and their impact on mung bean plantlets' rhizosphere microbiome", *Frontiers in microbiology*. Vol.13, pp.247-252, (2022).
11. J. C. Lee and K. S. Whang. "Optimization of Indole-3-acetic Acid (IAA) Production by Bacillus megaterium BM5", *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer,* Vol.49, No.5. pp.461-468, (2016).
12. B. Schwyn, and J. B. Neiland. "Universal chemiacl assay for the detection and determination of siderophores", *Anal Biochem*. Vol.160, No.1, pp.47-56, (1987).
13. E. A. Rodriguez Caeres. "Improved medium for isolation of Azospirillum spp", *Appl Environ Microbiol.* Vol.44, No.4, pp.990-991. (1982).
14. O. S. Kim, Y. J. Cho, K. Lee, S. H. Yoon, M. Kim, et al. "Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species", *Microbiology.* Vol.62, pp.716-721, (2012).
15. K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis

version 6.0", *Molecular Biology and Evolution.* Vol.30, No.12, pp.2725-2729, (2013).
16. H. S. Lim, J.M. Lee, S. D. Kim. "A plant growth promoting Pseudomonas fluorescens GL20: Mechanism for disease suppression, outer membrane receptor for ferric siderophore, and genetic improvement for incresed biocontrol efficacy", *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol.12, No.2, pp.249-257, (2002).
17. K. S. Choi, S. K. Song, D. E. Koo, H. N. Lee, H. I. Sung, J. J. Kim. "Characteristics of Seed and Germination of *Rhododendron mucronulatum* by Collection Dates and Germination Temperatures", *Journal of Korean Society of Forest Science*. Vol.107, No.3, pp.237-244, (2018).