

중금속 오염배지에서 식물성장증진 근권미생물에 의한 식용 피 발아율과 유식물 성장 증진

이아름 · 배범한*

경원대학교 토목환경공학과

Improved Germination and Seedling Growth of *Echinochloa crus-galli* var. *frumentacea* in Heavy Metal Contaminated Medium by Inoculation of a multiple-Plant Growth Promoting Rhizobacterium (m-PGPR).

Ahreum Lee · Bumhan Bae*

Department of Civil & Environmental Engineering, Kyoungwon University

ABSTRACT

Positive effect of multiple-PGPR (Plan Growth Promoting Rhizobacteria), isolated from heavy metal contaminated soil, on the germination of Barnyard grass (*Echinochloa crus-galli* var. *frumentacea*) was quantitatively estimated in 5 heavy metal (Cd, As, Ni, Cu, and Pb) contaminated liquid medium. The EC₅₀ value for respective heavy metal was estimated by TSK (Trimmed Speraman-Karber) model based on germination rate. The results showed overall increase in EC₅₀ with PGPR inoculation. The EC₅₀ value increased 1.4% from 96.0 mg/L (control) to 97.4 mg/L (PGPR-treated) in As contaminated medium. In Ni contaminated medium, the EC₅₀ value increased 31.9% from 148.0 mg/L (control) to 195.2 mg/L (PGPR-treated), while the EC₅₀ showed 4.8% increase from 63.4 mg/L (control) to 66.5 mg/L (PGPR-treated) in Cu medium. Overall seedling growth was stronger in the PGPR treated seeds than that in the control, but positive effect on seedling growth was not conspicuous. At effective concentration of 100 mg/L, the average seedling length of the PGPR treatment in As, Cd, Cu, and Ni medium, respectively, was 1.13, 0.14, 0.40, and 0.06 cm longer than that in the control. However, the increase of seedling growth was statistically insignificant ($p < 0.05$). These results suggest that inoculation of the isolated-PGPR exerts positive effects on seed germination by reducing heavy metal toxicity and can be an effective tool for application of phytoremediation on heavy metal contaminated soils.

Key words : EC₅₀, *Echinochloa crus-galli* var. *frumentacea*, Heavy metal, Germination, PGPR

서 론

토양은 물, 대기와 더불어 생물의 생활에 필수적인 3대 매질로, 타 매질과는 달리 이동성이 없고, 토양입자 혹은 공극 사이에 생물, 유기물 및 오염물질을 고정하는 특성이 있다. 각종 오염물질이 토양으로 배출되면 토양에 흡착되거나 고정되며, 이동성이 거의 없으므로 수질, 대기에 비해 오염속도가 느리고 시각적으로 차단되어 오염을 인지하기 어렵다. 그 중에서 중금속은 잘 분해되지 않고 순환계를 따라 이동하거나 확산되면서 생태계에 지속적으로

악영향을 준다. 이에 토양 중금속오염은 생태계뿐만 아니라 인간 건강에 매우 큰 위해 요소가 된다. 그러므로 토양 중금속 오염은 전 지구적으로 주요한 환경오염문제 중 하나로 규정되고 있으며 (Adriano, 2001), 국내에서도 토양 중금속 오염 범위와 농도로 인하여 사회적 문제가 발생하고 있다. 최근 보고에 의하면 토양오염우려기준으로 폐기물처리매립소각지역 404개소, 금속광산주변지역 147개소, 금속제련소주변지역 19개소 및 과거 군부대주둔 지역 등에서 다양한 중금속 오염이 추정된다(환경부, 2010). 중금속 오염이 심각한 휴·폐광산지역 조사에서는

*Corresponding author : bhbae@kyungwon.ac.kr

원고접수일 : 2011. 5. 26 심사일 : 2011. 9. 5 게재승인일 : 2011. 9. 5
질의 및 토의 : 2011. 12. 31 까지

전체 조사지역 중 60%인 94 개 광산에서 토양오염 우려 기준을, 55%인 87 개 광산에서 대책기준을 초과하였다(박용하 등, 2005). 이에 중금속 오염 토양을 정화할 수 있는 경제적이고 실용적 공법이 필요하여 다양한 분야에서 많은 연구가 진행되고 있다.

중금속 오염토양 정화공법은 물리적처리법으로 토양세정법, 물리화학적 처리방법에는 화학적 산화/환원법, 생물학적 처리방법으로는 식물상정화공법, 및 열처리 방법인 열탈착법이 많이 적용된다(환경부, 2007). 그 중에서 식물상정화공법은 흙의 자연적 특성을 보존하고, 태양열 에너지를 이용하여 부차적인 에너지를 사용하지 않아 경제적인 장점이 있다. 반면에 정화식물이 과축적종이 아니면 중금속 흡수량이 적고 속도가 느리며, 식물체내 안정화(Sequestration) 기작과 거동을 모르고, 중금속 독성으로 식물성장이 저해될 수 있다(Cunningham et al., 1995). 특히 독성이 강한 Cu 또는 Cd 오염토양에서는 중금속 독성에 의해 발아율이 크게 감소하고 초기성장에서 큰 저해를 받기 때문에 이를 보완할 수 있는 방안이 필요하다(Kamnev, 2003).

Kloepper and Schroth(1978)은 식물뿌리(근권)에 사는 미생물 중에서 식물성장을 돕는 유익한 미생물을 총칭하여 식물성장증진근권미생물(PGPR, Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms)이라고 하였다(홍선화 등, 2007). PGPR이 하는 역할에 따라 식물병원균을 생물학적으로 제거하는 미생물과 영양물질순환 및 식물성장을 자극하는 미생물의 2개 그룹으로 구분한다(Barea et al., 2005). 전자는 미생물간 적대적 관계를 이용하여 병원균 뿌리감염 빈도감소와 병원균 부생(saprophytic)성장을 제어하고, 숙주 식물의 induced systemic resistance(ISR)을 자극하고 항생물질이나 siderophore 합성으로 병원성 미생물의 해로운 효과를 감소하거나 방지할 수 있다(Khan, 2005). Saravankumar et al.(2007)은 차나무에 PGPR을 접종한 결과, 과산화효소, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia lyase, chitinase, β -1,3-glucanase, 석탄산 같은 방어 효소가 유도되어 blister병이 감소하고 차 수득율이 증가하였다. 영양물질순환과 성장촉진에 관여하는 PGPR은 직접적으로는 질소고정, 무기인산 가용화, siderophore 생산에 의한 Fe 흡수증진에 영향을 주며, 식물 뿌리의 막 전위의 감소, Auxin 형태의 식물호르몬 생산과 노화호르몬 ethylene의 전구물질인 ACC(amino-cyclopropane carboxylic acid)를 ACC deaminase로 제거하여 식물성장을 증진한다(Ahmad et al., 2008; Zhuang et al., 2007).

중금속 오염토양에 대한 식물상정화공법에 PGPR을 적

용할 경우, 식물에 의한 중금속 흡수도 증가한다. Ma et al.(2009)는 Ni 오염토양에서 Indian mustard를 재배하면서 사문암(serpentine) 토양에서 분리한 5종의 PGPR을 접종한 결과, 유식물의 길이 Ni함량이 대조군에 비해 73% 증가하였다. Rajkumar and Freitas(2008)은 Ni 오염토양에서 PGPR을 접종한 Indian mustard의 Ni 흡수 및 생체량 증가가 IAA 생산, siderophore 및 P 용해에 기인한다고 하였다. 다른 중금속에도 유사한 결과가 보고되었다. Wang et al.(2007)은 꽃향유(*Elsholtzia splendens*)에 PGPR을 접종하여 중금속 오염토양에서 재배한 결과, Cu, Zn 및 Pb의 식물추출과 유식물 생체량이 동시에 증가하였다.

이상과 같이 많은 연구들이 PGPR의 기능과 증진사례를 제시하고 있으나, PGPR에 의한 식물성장증진효과에 대한 유효성은 여전히 정량적으로 명확하지 않은 경우가 많다. 이에 본 연구에서는 PGPR이 식물에 미치는 효과를 정량적으로 제시하기 위한 첫 단계로 중금속 오염토양에서 분리한 multiple-PGPR을 식물(피) 종자에 접종한 다음, 중금속 오염배지에서의 발아율(germination rate)과 초기성장(initial growth)에 미치는 영향을 정량적 값인 EC₅₀(50% Effective Concentration)으로 산정하고, 대조군과 비교하였다. 그 결과 m-PGPR을 접종할 경우, 일부 중금속에서 EC₅₀값이 대조군에 비해 유의적으로 증가하여 PGPR에 의해서 식물종자가 중금속 독성에 대한 내성을 강화시킨다는 것을 확인하였다.

재료 및 방법

2.1. 식물성장증진근권미생물 분리 및 배양

장항제련소 인근 논토양에서 식물체근권토양을 채취한 다음, King's B medium에서 PGPR 특성 미생물을 분리하였다. 이어 1차로 분리된 미생물의 중금속 내성을 확인하기 위해 Cd, Cu, Pb, Ni 및 As로 오염된 액체배지에 접종한 후, 10일 동안 배양하여 성장하는 미생물을 2차로 분리하였다. 이 때 오염 중금속 농도는 토양오염대책기준 농도의 1.2배로 하였다. 2차로 분리된 미생물들은 인용해 미생물이 성장할 수 있는 NBRIP 고체배지에 옮겨 인 용해능 및 유기산 생성에 의한 pH 감소를 측정하여 3차 분리하였다. 분리한 10여종의 미생물을 대상으로 L-tryptophan을 전구물질로 하여 Indole-3-acetic acid(IAA) 생산능을 확인하였다. 또한 이 미생물을 대상으로 O-CAS(Overlay chrome azurol S) 실험을 실시하였다. O-CAS 실험은 우선 MM9-Casamino acids 고체배지에 분리한 미생물을 접종한 후 overlay할 medium을 제조하여

MM9-Casamino acids 고체배지 위에 약 10 mL을 부어 주어 미생물 군체 주변의 orange색의 halo의 유무 및 크기로 siderophore의 생산량을 추정하는 방법이다(Schwyn and Neilands, 1987). 마지막으로 ACC deaminase의 정성실험을 실시하였다. ACC 정성실험은 PAF 고체배지에서 미생물을 5일간 배양하고, PAF에서 배양된 미생물을 minimal medium with DF salts 고체배지에 접종하여 7일간 배양된 미생물을 ACC deaminase를 생산하는 종으로 판별하였다. 미생물의 배양 및 유지는 모두 25°C에서 실시하였다. 이상과 같은 방법으로 한 종의 미생물(GH3)을 분리하였고, 한국미생물보존센터에서 세포지방산 분석법(MIDI)에 의해 *Bacillus megaterium*으로 동정되었다.

피 발아실험에서 사용된 PGPR인 GH3 미생물은 NBRIP 배지에 접종 후 150 rpm shaker table에서 7일간 배양하였다. 미생물을 분리하기 위해 멸균한 50 mL polycarbonate vial에 각각의 미생물 배양액 50 mL을 넣은 다음 10 분간 2,000 rpm으로 원심분리한 후, 상정액을 버리고 고형물만 남긴 다음 50 mL 미생물 배양액을 다시 넣는 과정을 수회 반복하였다. 수확한 미생물은 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 3회 세척하여 잔류 배양액을 모두 제거하고 순수한 미생물 현탁액을 준비하였다. 이 때 PGPR 접종액의 OD₆₀₀을 2.0으로 조정하였다.

2.1.1. 식물종 선정 및 PGPR 식종

실험 대상 식물로는 피 종자를 선정하였다. 실험에 사용할 피 종자는 하루 전에 미리 세척하고 멸균한 DIW에 24시간 담아두었다. 실험 전 70% 에탄올에 1분, 10% 하이포염소산(Hypochloric sodium)에서 15분간 표면소독 후, HOCl 냄새가 사라질 때까지 무균수로 충분히 세척하였다. 세척한 피 종자는 PGPR 접종액에 30분간 담가 PGPR이 표면에 부착되도록 하였다. Petri dish에 Whatman 여과지

를 두고, 각각의 중금속 농도로 오염된 Hoagland solution을 멸균 피펫으로 5 mL 주입한 다음, PGPR을 접종한 PGPR균 배지균과 아무것도 접종시키지 않은 대조균(Control) 배지를 만들었다. 대조균 배지와 PGPR균 배지에 피 10개를 균일한 간격으로 넣고 20°C에서 7일간 암배양하고, 실험이 종료되면 발아한 종자와 유식물의 길이를 측정하였다. 이와 같은 모든 실험은 3배수로 실시하였다.

2.2. 중금속 유효농도 산정

선정한 식물의 발아 및 초기 성장에 영향을 주는 중금속으로는 장항 현장에서 우려기준이상을 초과하는 5종의 중금속(Cd, As, Ni, Cu 및 Pb)으로 선정하였다. 각 중금속의 농도 구간은 Cd는 5 ~ 200 mg/L, As는 5 ~ 200 mg/L, Ni와 Cu는 5, 20, 100, 200, 500 mg/L, Pb는 10, 60, 300, 600, 1500 mg/L로 결정하였다. 그러나 Hoagland solution(pH 4.5)에 첨가한 일부 중금속이 complexation 반응을 일으켜 침전물을 형성하는 것이 관찰되었다. 이 경우 첨가한 중금속 유효농도(effective concentration)가 감소하기 때문에 visual MINTEQ을 사용하여 중금속 이온농도를 재계산하였다. 예를 들어 visual MINTEQ 프로그램 사용하였을 때 Cu 500 mg/L일 때, 33.9%가 착화합물로 침전하고, 66.1%인 330.37 mg/L만 Cu⁺² 상태로 존재하였다. 이와 같이 중금속 유효농도를 계산한 결과를 Table 1에 요약하였다. 특히 Pb와 Cu를 첨가할 경우 침전물이 형성되었는데 visual MINTEQ로 계산하였을 때에도 침전물 생성으로 유효농도가 감소하는 것과 일치하였다. 이와 동시에 인산이온의 농도변화가 가장 현저하였는데, 초기 인산이온 농도 2.0×10^{-3} M이 Cu 500 mg/L에서는 2.2×10^{-4} M로 89%가 감소하였고, Pb 1,500 mg/L에서는 1.4×10^{-7} M로 99% 감소하였다. 이상의 사실로 보아, Cu와 Pb의 농도 감소는 인산염 화합물

Table 1. Added and effective heavy metal concentrations in the Hoagland solution calculated by visual MINTEQ

Heavy metal			Concentration (mg/L)			
Cd	Added	5.0	10.0	40.0	50.0	80.0
	Effective	5.0	10.0	39.9	49.9	79.9
As	Added	5.0	10.0	80.0	100.0	200.0
	Effective	5.0	10.0	80.0	100.0	200.0
Ni	Added	5.0	20.0	100.0	200.0	500.0
	Effective	5.0	20.0	100.0	200.0	500.0
Cu	Added	5.0	20.0	100.0	200.0	500.0
	Effective	5.0	20.0	70.2	104.0	330.4
Pb	Added	10.0	60.0	300.0	600.0	1500.0
	Effective	3.2	4.1	12.0	17.9	610.5

Table 2. Comparison of *Echinochloa crus-galli* var. *frumentacea* seed germination percentage for control and PGPR treatment after 7 days dark incubation in Hoagland solution contaminated with respective heavy metal (As, Cd, Cu, Ni and Pb)

Heavy metal	Concentration (mg/L)	Germination (%)			
		Control		PGPR	
		Average	Stdev	Average	Stdev
Cd	0.0	83.3	0.6	86.7	0.6
	5.0	80.0	1.1	86.7	0.5
	9.9	76.7	1.5	83.3	1.4
	39.9	65.0	2.1	68.3	2.3
	49.9	38.3	1.5	41.7	1.5
	79.9	35.0	1.0	36.7	0.6
As	0.0	83.3	0.6	86.7	0.6
	10.0	71.7	1.8	81.7	1.2
	20.0	60.0	1.0	73.3	1.5
	80.0	63.3	3.8	83.3	2.1
	100.0	70.0	1.7	83.3	1.2
	200.0	63.3	0.6	40.0	1.0
Ni	0.0	83.3	0.6	86.7	0.6
	5.0	66.7	1.2	71.1	1.5
	20.0	64.4	2.0	63.3	2.4
	100.0	56.7	1.9	74.4	2.1
	200.0	34.4	2.1	43.3	1.6
	500.0	5.6	1.1	7.8	1.1
Cu	0.0	83.3	0.6	86.7	0.6
	5.0	57.8	2.2	62.2	1.6
	20.0	73.3	2.1	71.1	1.5
	70.2	44.4	2.5	47.8	2.0
	104.0	15.6	1.1	21.1	1.5
	330.4	0.0	0.0	3.3	0.7
Pb	0.0	83.3	0.6	86.7	0.6
	3.2	86.7	1.2	83.3	1.5
	4.1	83.3	0.6	73.3	0.6
	12.0	80.0	1.7	80.0	1.0
	17.9	73.3	1.2	66.7	1.2
	610.5	40.0	1.7	40.0	1.7

형성에 의한 침전으로 판단된다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 발아율 비교

중금속 처리를 하지 않은 경우에는 PGPR로 처리유무에 따른 발아율은 각각 83.3%와 86.7%로 큰 차이가 없었다. 그러나 중금속 처리 시 발아율은 전반적으로 중금속 농도가 증가함에 따라 발아율은 감소하는 경향을 보였지만, PGPR 처리구에서 발아율이 높은 경향을 보였다. (Table 2) Cd의 경우 PGPR로 처리할 경우 대조군에 비

해 유효농도 5.0, 9.9 mg/L에서 6.6%, 유효농도 39.9, 49.9 mg/L에서 3.3%, 유효농도 79.9 mg/L에서 1.7%의 발아율이 증가하였다. 농도가 높아질수록 그 영향은 감소하였으나, 저농도에서는 유의적인 발아율 증가가 관측되었다.

As는 Cd와 유사한 형태로 식물에 독성을 주며, 안정화 기작도 유사하다(Verbruggen et al., 2009). 그에 따라 피는 As에 대한 내성을 보였고, 유효농도 10.0, 20.0, 80.0, 100.0 mg/L일 때 PGPR 처리군 발아율이 대조군에 비해 평균 14.2% 증가하였다. 그러나 200.0 mg/L일 때 23.3% 감소하였는데, PGPR 접종에 의한 발아율 증가 혹은 감소

가 특정 농도까지만 유효함을 의미하는 것으로 판단된다. Ni의 경우 PGPR접종 시 20.0 mg/L일 때 1.1%의 미미한 감소율을 보였지만 통계적으로 유의하지 않았으며, 100.0 mg/L일 때 17.7%의 발아증가율을 보였다. 나머지 농도에서는 2.2~8.9%의 증가율을 보였다. 실험 결과 PGPR 접종은 Ni 유효농도 100.0 mg/L일 때 발아율 증진 효과가 가장 우수했다.

Cu는 피에 가장 높은 독성을 주는 중금속 중 하나였다. Xu et al.(2006)은 pot 실험으로 Cu 오염토양에서 벼의 성장을 비교하였다. 그 결과 Cu는 벼와 식물의 뿌리 성장에 큰 독성을 나타내었고, Cu 농도가 100.0 mg/kg일 때 10%, 300.0~500.0 mg/kg일 때 50%, 1000 mg/kg일 때 90%의 수확량이 감소하였다. 본 연구에서도 Cu는 다른 중금속에 비해 유효농도 5.0 mg/L일 때 대조군과 PGPR 처리군 발아율은 각각 57.8, 62.2%로 매우 낮았다. 또한 20.0 mg/L일 때 PGPR 처리군이 대조군에 비해 2.2% 발아율 감소를 보였고, 나머지 유효농도에서도 3.3~5.5%의 낮은 증가율을 보였다. 독성이 강한 Cu로 오염된 배지에서는 PGPR에 의한 발아 증진 영향이 미미하였다.

Pb는 식물 독성이 Cu에 비해 약 1/20배에 불과한 것으로 보고되고 있다(Wang et al., 2007). 본 연구에서도 Pb 배지에서의 발아율을 Cu와 비교하면, Pb 유효농도 610.5 mg/L에서의 발아율은 두 처리구 모두 40%로 Cu 유효농도 70.2 mg/L일 때 대조군 및 PGPR 처리구 발아율 44.4 및 47.8%와 유사하였다. 이와 같이 높은 발아율을 나타내는 이유는 Pb가 급성독성보다는 만성독성을 나타내기 때문이라 판단된다. 따라서 다른 중금속과 달리 거의 모든 농도범위에 PGPR 처리로 발아율이 증가하지 않았다.

3.2. EC₅₀ 산정

상기의 중금속 유효 농도와 중금속 오염배지에서의 발아율(%) 시험결과를 바탕으로 미국 EPA가 개발한 Trimmed SPEARMAN-KARBER(TSK) model을 사용하여 EC₅₀(Effective Concentration)을 산정하고 중금속 및 처리구별로 비교·분석하였다(US EPA, 1993). (Fig. 1)

Cd는 TSK model을 이용한 EC₅₀이 계산되지 않았다. 그 이유는 다른 벼과 식물과 마찬가지로 피가 Cd에 내성을 가지고 있어 실험에 사용한 농도범위에서는 충분한 독성이 발현되지 않았기 때문으로 판단된다(Prasad, 1995). As 오염된 배지에서 자란 피에 대한 대조군의 EC₅₀은 96.0 mg/L이었고, PGPR을 접종한 처리군의 EC₅₀값은 97.4 mg/L로 약 1.4% 증가하였고, 95% 신뢰구간은 87.8~

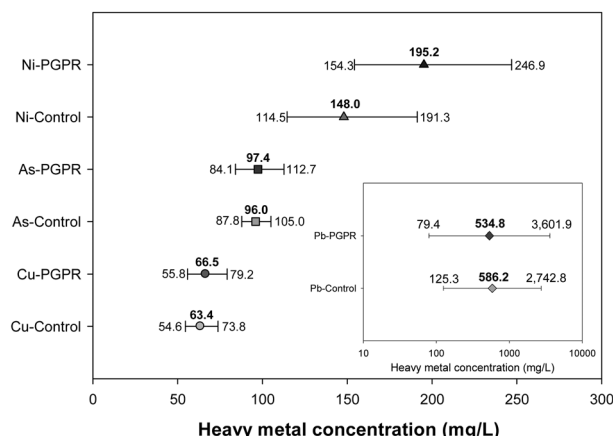


Fig. 1. Comparison of EC₅₀ values calculated by TSK model based on effective heavy metal concentrations and germination rates. EC₅₀ values are in the middle in bold character with 95% lower and upper confidence limits on both ends.

105.0 mg/L에서 84.1~112.7 mg/L로 변화하였다. Cd와 달리 As는 EC₅₀은 계산되었지만 PGPR 접종효과는 1.4% 증가에 불과하였다. As는 Cd와 유사한 독성 기작을 가지므로(Verbruggen et al., 2009), 피가 As에도 강한 내성이 있어 PGPR 접종효과가 경미하다고 판단된다.

Ni로 오염된 배지에서 대조군에 대한 EC₅₀은 148.0 mg/L이었고, PGPR 처리군 EC₅₀은 195.2 mg/L로 약 31.9% 증가하였다. 이와 함께 95% 신뢰구간은 114.5~191.3 mg/L에서 154.3~246.9 mg/L로 크게 증가하였다. 따라서 Ni의 경우 다른 4종 중금속에 비하여 PGPR 접종으로 피 발아증진이 매우 효과적일 수 있음을 보인다.

독성이 강한 Cu 오염된 배지에서 대조군 EC₅₀은 63.4 mg/L이었고, 처리군 EC₅₀은 66.5 mg/L로 약 4.8% 증가하였다. 95% 신뢰구간은 54.6~73.8 mg/L에서 55.8~79.2 mg/L로 소폭 변화하였으나, Cu의 강한 독성을 고려하면 PGPR처리가 발아율에 큰 영향을 주었음을 알 수 있다. 불용성인 Pb 오염된 배지에 대한 대조군 EC₅₀ 586.2 mg/L이 처리군 EC₅₀ 534.8 mg/L보다 오히려 8.8% 높은 것으로 나타났다. 그러나 95% 신뢰 상한값은 2,742.8 mg/L에서 3,601.9 mg/L로 31.3% 증가하였다. 이와 같은 결과는 Pb 불용성때문에 발생한 것이며, 신뢰 상한값 증가는 PGPR 접종에 의한 독성 감소로 볼 수도 있다고 판단된다.

Chino and Baba(1981)의 연구에서 벼(*Oryza sativa*)는 Cd > Cu > Ni > As > Pb 순으로 유식물의 길이 수확량에 대한 독성이 증가하였다. 그러나 본 연구에서 TSK model로 산정한 EC₅₀ 값을 비교하면 Cu > As > Ni > Pb



Fig. 2. Photographs of seedling growth of *Echinochloa crus-galli* var. *frumentacea* in the blank and control after seven days of dark incubation at 20°C. The seeds in the blank were without any heavy metal or PGPR, while the seeds in the control received PGPR treatment.

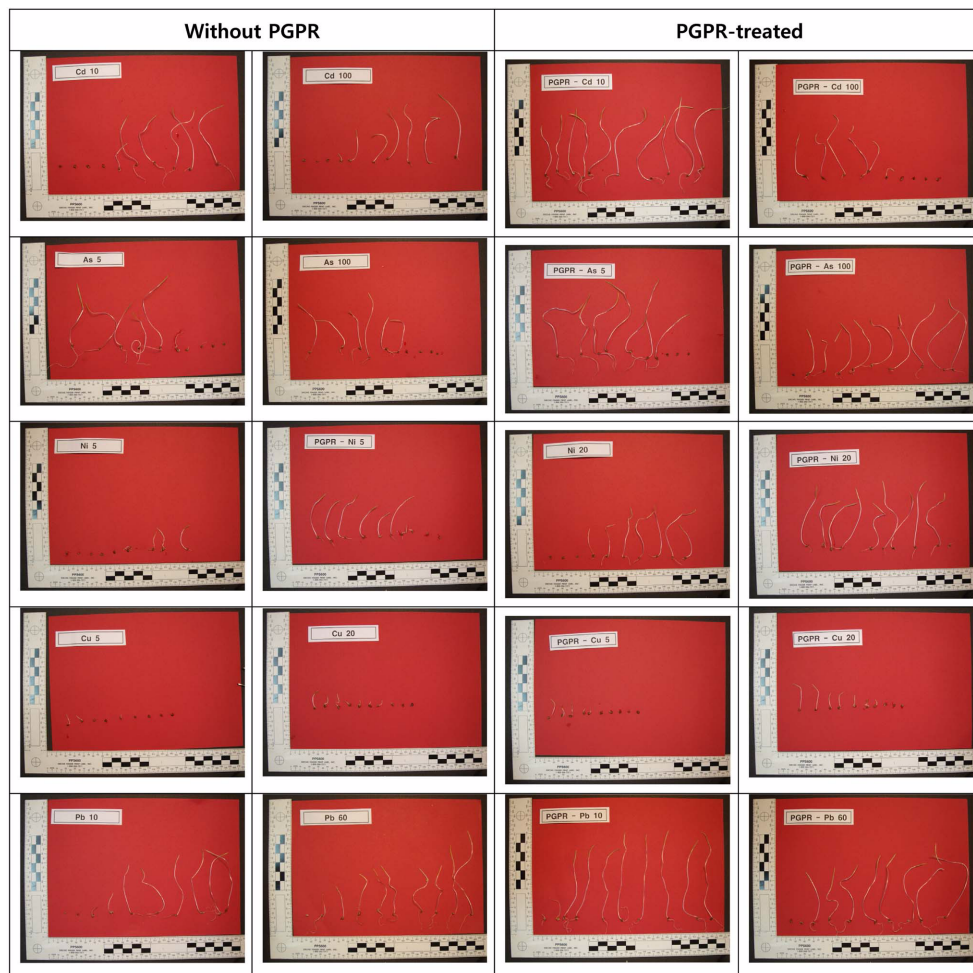


Fig. 3. Comparison of germination and seedling growth of *Echinochloa crus-galli* var. *frumentacea*, with and without PGPR treatment in Hoagland solution containing respective heavy metal after seven days of dark incubation at 20°C.

순으로 피 종자의 발아에 대한 독성이 증가하였다. 피도
벼과에 속하므로 전반적으로 Cu가 높고 Pb는 낮은 경향

은 유사하지만, Ni와 As의 독성 순서는 다르게 나타났다.

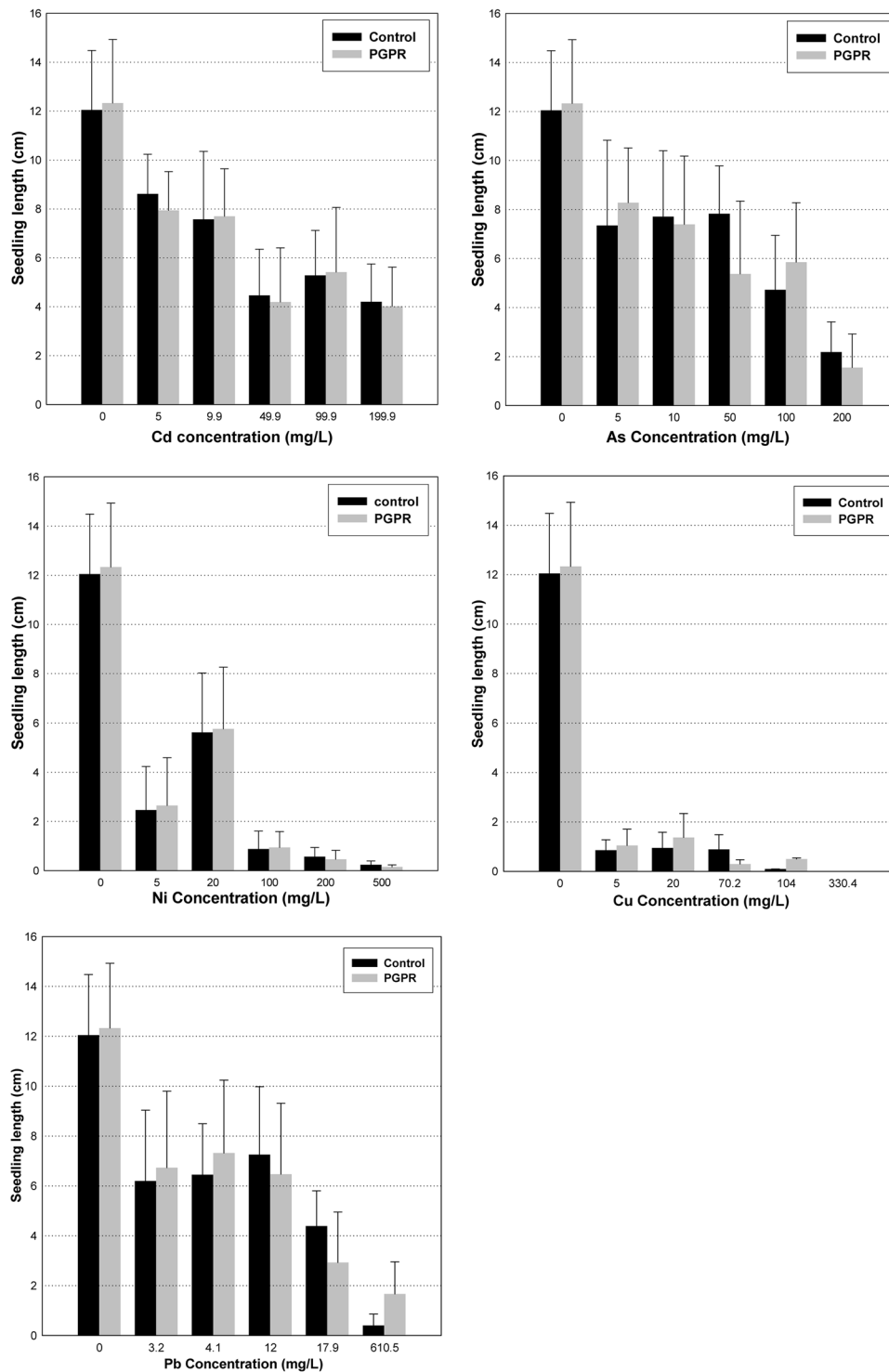


Fig. 4. The effects of PGPR inoculation on seedling length of *Echinochloa crus-galli* var. *frumentacea* after seven days of dark incubation in petri dish at 20°C.

3.3. 초기길이성장

20°C에서 7일간 암배양한 대조군 피 종자의 유식물 길이성장을 중금속 및 PGPR 처리여부에 따라 분류하면

Fig. 2와 같다. 배지에 중금속이 없는 경우, 10개의 종자는 1~2개를 제외하고 대부분 발아하여, PGPR 처리구에서 유식물의 평균길이(± 표준편차)는 각각 12.33 ± 2.60

cm로 무처리구 12.05 ± 2.43 cm보다 0.28 cm 길었다. 그러나 PGPR 처리구 초기길이성장이 통계적으로 유의하지는 않았다.

중금속으로 처리할 경우, 처리 농도가 높을수록 식물 길이성장 감소가 확인하였고(Fig. 3), 중금속 농도별로 도식하여 PGPR 처리군과 비교하면 Fig. 4와 같다. 상기한 바와 같이 피는 Cd, As, Pb에 대하여 내성이 있어 저농도(10.0~12.0 mg/L)에서는 대조군과 PGPR 처리군의 유식물 길이는 약 7 cm로 큰 변동이 없었다(Fig. 4). 그러나 중금속 농도가 증가하면서, 식물 길이성장에 큰 변화가 있었다. Cd로 오염된 배지에는 유효농도 10.0, 100.0 mg/L 일 때 PGPR 처리군의 피 유식물이 각 0.13 cm 더 길게 성장했고, 나머지 유효농도에서는 대조군의 피 유식물이 처리군보다 길게 성장하였다. As로 오염된 배지에서는 유효농도 5.0, 10.0 mg/L일 때 처리군의 피 유식물이 각 0.92, 1.12 cm 길이성장 증가를 보였지만, 나머지 유효농도에서는 대조군의 피 유식물이 더 길게 측정되었다. 특히 유효농도 50.0 mg/L의 대조군이 처리군보다 2.46 cm 더 길게 측정되었다.

Ni 오염배지에서는 유효농도 5.0, 20.0, 100.0 mg/L일 때, PGPR 처리군에서 각각 0.18, 0.14, 0.06 cm 유식물의 길이 성장 증가를 보였지만, 고농도인 200.0, 500.0 mg/L일 때는 오히려 처리군이 대조군에 비해 0.10, 0.09 cm 감소함을 보여 고농도로 오염된 Ni 배지에 피의 길이 성장에 대한 PGPR이 식물 성장에 영향이 경미하다고 판단된다. Cu 오염 배지에서는 유효농도 70.2 mg/L를 제외하고 모든 농도에서 처리군의 유식물 성장이 대조군에 비해 높아, PGPR이 피의 유식물의 길이 성장에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 그러나 다른 중금속에 비하여 독성이 강한 Cu는 유효농도 330.4 mg/L에서는 식종한 10개 종자가 모두 발아하지 않아 피에 대한 처리군과 대조군의 유식물 성장을 비교할 수 없어 PGPR이 피의 유식물 성장에 영향을 미치는지 확인 할 수 없었다(Fig. 4). Pb로 오염된 배지에서 특정 고농도인 610.5 mg/L일 때 PGPR접종으로 처리군이 대조군에 비해 1.27 cm 더 성장함을 확인하였다. 그리고 3.2, 4.1 mg/L일 때도 각 0.53, 0.87 cm의 처리군의 길이 성장이 증가하였고, 12.0, 17.9 mg/L일 때는 처리군이 대조군에 비해 각 0.78, 1.46 cm 작았다.

이상에서와 같이 PGPR 처리가 중금속 배지에서 피종자의 길이 성장에 미치는 영향은 육안으로는 확인한 차이가 있었으나 통계적으로는 유의하지 않았다. 그 원인은 곡선인 유식물의 길이 측정에 어려움이 있었고, 성장이 아

주 낮은 유식물도 측정에 포함하였기 때문에 오차범위가 크게 증가하였으며, 암배양을 하여 유식물 성장이 종자 내 에너지에 의존하였기 때문에 PGPR 영향이 최소화 되었기 때문이다. 그러나 명배양을 할 경우에는 유식물 성장과 뿌리 발달이 크게 증가하는 것이 관측되었다(data not shown).

두 번째로 유효농도 200 mg/L에서 유식물의 길이를 비교하면, Cd 처리구는 4.20 ± 1.55 cm, As 처리구는 2.18 ± 1.23 cm, Ni 처리구는 0.57 ± 0.38 cm로 중금속 독성은 $Ni > As > Cd$ 순이었다. Cu 유효농도 104 mg/L에서 유식물의 길이는 0.10 cm에 불과하므로 Cu 독성이 Ni보다 크며, Pb는 독성이 가장 낮아 전반적으로 잘 성장하였기에, 길이 성장에 미치는 중금속 독성은 $Cu > Ni > As > Cd > Pb$ 의 순으로 평가할 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 중금속 오염토양에서 multiple-PGPR(m-PGPR)을 분리하여 동정한 *Bacillus megaterium* GH3을 인위적으로 식물(피) 종자에 접종함으로써, PGPR이 중금속 오염배지에서 피 종자 발아율과 초기길이 성장에 주는 증진 효과를 대조군과 비교하고, EC_{50} 을 산정하여 중금속 독성에 대한 PGPR의 영향을 정량적으로 평가하고자 하였다.

피는 Cd, As에 대한 내성이 있어 다른 중금속과 달리 발아율과 유식물 성장이 높았다. Cd 오염배지에서는 피의 Cd 내성으로 대조군과 PGPR 처리군의 EC_{50} 값은 도출되지 않았으며, As 오염배지에서는 EC_{50} 값이 1.4% 증가하는데 그쳤다. Ni 오염배지에서는 PGPR 접종으로 EC_{50} 값이 31.9% 증가하여 PGPR에 의해 식물종자가 Ni 독성에 대한 내성을 강화하는 것으로 나타났다. 그러나 독성이 강한 Cu 오염배지에서는 PGPR 접종으로 발아율 혹은 EC_{50} 증가효과가 전혀 나타나지 않았고, Cu보다 상대적으로 독성이 낮은 Pb에서는 PGPR의 접종효과가 경미함을 보였다.

PGPR 접종이 발아한 피 유식물 성장에 전반적으로 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났으나, 통계적으로는 유의적이지 않았다. 그 원인은 유식물의 근권이 발달하지 못해서, PGPR의 성장 증진 효과가 제대로 발현되지 않은 것에 기인하는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 한국환경산업기술원 토양·지하수오염방지 기

술 개발 사업(GAIA project)의 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 박용하, 서경원, 2005, 휴폐금속광산지역의 토양오염관리방안, 한국환경정책평가연구원, WO-03.
- 홍선화, 조정숙, 2007, 오염 토양의 식물상 복원효율에 미치는 식물, 근권세균 및 물리·화학적 인자의 영향, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **35**(4), 261-271.
- 환경부, 2007, 오염토양 정화방법 가이드라인.
- 환경부, 2010, 토양측정망 및 토양오염 실태조사결과.
- Adriano, D.C., 2001, Trace Elements in Terrestrial Environments, 2nd ed., Springer, USA.
- Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M.S., 2008, Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities, *Microbiological Research*, **163**(2), 179-181.
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R., and Azcon-Aguilar, C., 2005, Microbial co-operation in the rhizosphere, *J. of Experimental Botany*, **56**(417), 1761-1778.
- Chino, M. and Baba A., 1981, The effects of some environmental factors on the partitioning of zinc and cadmium between roots and tops of rice plants, *J. Plant Nutr.* **3**, 203-214.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., and Huang, J.W., 1995, Phytoremediation of contaminated soils, *Trends in Biotechnology*, **13**, 393-397.
- Kamnev, A.A., 2003, Phytoremediation of heavy metals: An Overview, In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., (Eds.), Recent Advances in Marine Biotechnology, Vol. 8.; Bioremediation, Science Publishers Inc., Enfield (NH) USA, 269-317.
- Khan, A.G., 2005, Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **18**, 355-364.
- Ma, Y., Rajkumar, M., and Freitas, H., 2009, Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel-resistant-plant-growth promoting bacteria, *J. of Hazardous Materials*, **166**(2-3), 1154-1161.
- Prasad, M.N.V., 1995, Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants, *Environmental and Experimental Botany*, **35**(4), 525-545.
- Rajkumar, M. and Freitas, H., 2008, Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard, *Bioresource Technology*, **99**, 3491-3498.
- Saravanakumar, D., Vijayakumar, C., Kumar, N., and Samiyappan, R., 2007, PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease, *Crop Protection*, **26**, 556-565.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1987, Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores, *Analytical Biochemistry*, **160**, 47-56.
- US EPA, 1993, Trimmed Spearman-Kärber (TSK) Program User Manual, Ver. 1.5, Ecological Monitoring Research Division, Cincinnati, OH, USA.
- Verbruggen, B., Hermans, C. and Schat, H., 2009, Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 364-372.
- Wang, F.Y., Lin, X.G., and Yin, R., 2007, Role of microbial inoculation and chitosan in phytoextraction of Cu, Zn, Pb and Cd by *Elsholtzia splendens*-a field case, *Environmental Pollution*, **147**, 248-255.
- Xu, J., Yang, L., Wang, Z., Dong, G., Huang, J., and Wang, Y., 2006, Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil, *Chemosphere*, **62**, 602-607.
- Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., and Bai, Z., 2007, New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation, *Environment International*, **33**, 460-413.