

*Rhizobium japonicum*의 생장 및 poly-β-hydroxybutyric acid (PHB)의 축적에 미치는 환경요인의 영향

李 基 渥 · 崔 榮 吉

(漢陽大學校 自然大學 生物學科)

The effect of environmental factors affecting to the growth of *Rhizobium japonicum*

—The microbial growth and accumulation of poly-β-hydroxybutyric acid (PHB)—

LEE, Ki Sung and Yong-Keel CHOI

(Department of Biology, Hanyang University)

ABSTRACT

Rhizobium japonicum was isolated from the nodule of soybean root grown at the reclaimed tidal land in Kang-wha island. The effect of pH and salt concentration to the viability of the isolated strain were examined in relationship between microbial growth and accumulation of PHB.

Optimal pH value for the good viability of the isolated strain was 7.0 and also, at 5.0 and 6.0, viability was favorable to large extent, but 9.0 was unfavorable. Examined the effect of salt concentration treated two times as of the salinity in the reclaimed tidal land, viability of the isolated strain showed about 30 to 40%. And also in treatment with NaCl(40g/l) whatever the pH value adopted, viability was mostly less than 10%. The amount of accumulated PHB was relatively high at low pH value (5~6) and at high salt concentration, respectively.

緒 論

간척지 토양의 토성을 생물학적 방법에 의하여, 개량하므로써 경토화하는 기초연구는 홍과 최등(1968~1970)에 의해 우리나라 강화도 일대 간척지를 대상으로 이루어진 바 있다. 즉 간척토양의 제염효과를 위해서는 토양의 texture를 양호하게 함이 최우선인데 이는 토양미생물에 의해서 기대되는 작용중의 하나이다.

공중에 무한히 존재하는 질소가스를 유용한 형태의 화합물로 고정시켜, 작물에게 질소 화합

물을 공급하는 질소고정 미생물군의 한 종류인 *Rhizobium*의 분포에 대해서는 우리나라 전역에 걸쳐 조사 연구(최등, 1978)된바 있다.

그러나, 간척지토양과 같은 특수한 환경은 염분도가 높기 때문에, 특이한 염생식물의에는 다른 식물의 생장이 저해되는 요인이 되고 있다. 그러므로 간척지는 무기영양염류가 다량 포함되어 있는 까닭에, 이러한 간척지환경 조건에서 잘 자라고, 토질의 개선 및 식물생장에 이로운 유용미생물 군주의 선정이 시급한 과제라고 하겠다.

그리하여, 본 실험에서는 간척지에서 생육된

대豆에 직접 nodule을 형성하고, 공생하므로써, 고정할 질소성분을 식물에 공급하는 까닭에, 실제적 응용이 가장 손쉬운 균주로 알려진 *Rhizobium japonicum*을 분리하여, 간척지 토양조건과 유사한 조건하에서 분리된 균의 생장 및 생존도를 살피는 한편, 이 균주의 viability에 미치는 salt tolerancy 및 pH의 영향을 조사하였으며, 이러한 조사로 간척지 토양의 개선에 적용가능한 균주인가를 기초적으로 검정하였다. 또한, 이 균주의 세포내 물질대사의 생리적인 특성을 환경조건과 비교검토하기 위해, 환경조건에 매우 민감하게 합성 분해되며, 이 균주가 갖는 독특한 세포내 함유물인 poly-β-hydroxybutyric acid(PHB)의 함량을 측정하여, 에너지(탄소원 등)의 저장물질이며 생리적인 물질대사에 중요한 역할을 하는 PHB의 축적량과 환경조건과의 상호관계를 해석코자 했다.

材料 및 方法

1. *Rhizobium japonicum*의 분리동정

강화도 간척지에서 생육된 대두의 뿌리를 채집하여, 뿌리로부터 nodule을 분리하고, 분리된 nodule을 0.01% HgCl₂용액에서 10분, 70% Et-OH에서 15분 처리한 후, 멸균 증류수로 수회 세척한 다음에 무균적으로, nodule을 자른 후, *Rhizobium*의 선택배지인 Ashby's 배지에 streaking하였다.

이후, 28°C에서 5일간 배양한 후 형성된 white, circular, punctiform colony를 순수분리하였으며, Bergey's Manual 및 Vincent(1968)의 방법에 따라 세균을 동정하였다.

2. 배지의 조성

Ashby's media		Modified Ashby's media	
Mannitol	15g	Mannitol	15g
K ₂ HPO ₄	0.2g	*K ₂ HPO ₄	0.42g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g	*MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.95g
NaCl	0.2g	NaCl	0.2g
CaSO ₄	0.1g	CaSO ₄	0.1g
CaCO ₃	5.0g	CaCO ₃	5.0g

(Adjusted to the reclaimed tidal land condition)

Agar	20g	*NaNO ₃	0.2g
D.H ₂ O	1l	Agar	20g
		D.H ₂ O	1l

정상적인 Ashby's 배지에 NaCl 양을, 배지에 포함된 수준인 0.2g/l, 1.2g/l(간척지의 평균 염분도, 홍과최등(1969)), 2.4g, 12g, 40g/l의 5가지 농도로 조정하는 한편, 각각의 다른 염분 농도에 따른 pH의 영향을 살피기 위해, 각각의 염분농도에 따라 pH를 5, 6, 7, 8, 9, 5구간으로 조정하였다(간척지표층의 pH, 5.6~7.24).

또한 홍과최등(1969)의 기초연구에서 조사된 간척지의 염류의 조성을 토대로, PO₄⁻³, Mg⁺⁺, NO₃⁻, 등을 간척지 수준으로 조정한 modified Ashby's 배지를 만든 후, 역시 NaCl농도 및 pH구간을 상기와 같은 방법으로 각각 5구간씩 조정하였다.

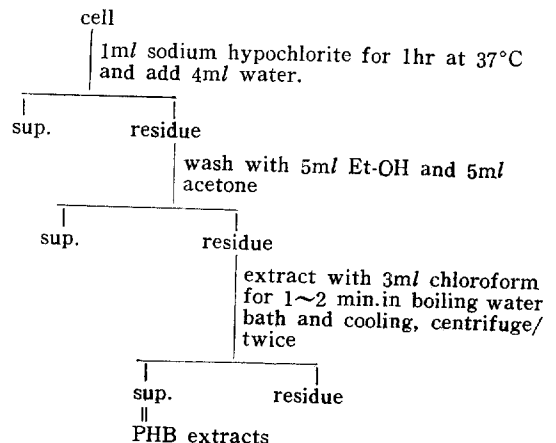
3. 생존도 측정

상기와 같이 조정된 배지에, 분리균주를 전배양한 후, hemacytometer로 세포 수를 측정한다음, 일정량씩 접종하여, 정상적인 Ashby's 배지에 나타나는 균체수를 기준으로, 5일간 28°C에서 배양한 후, 각 시험구의 상대적인 viability를 조사하였다. 이러한 실험을 5번 반복 시행하여, viability를 산출했다.

4. PHB 추출 및 정량

PHB 추출 및 정량은 Slepecky and Law(1960) 방법에 의거하였는데 그 처리순서는 다음과 같다.

*Procedure for PHB extraction.



5일간 배양하여 정제기에 이른 세포를 적량 harvesting하여, 37°C에서 1시간동안 sodium hypochlorite(12% 용액)에 처리한 후, 증류수를 가하고 원심분리한다. 침전된 lipid granule을 absolute Et-OH로 처리한 후 원심분리(10,000 rpm/10min, model, Sorval)하고, 다시 acetone으로 처리하여 원심분리한다. 이후 boiling water bath에서 1~2분간 chloroform으로 2회 반복 추출하여, 상등액(PHB extracts) 적량을 취하여, boiling water bath에서 10분간 conc. H₂SO₄로 가수분해시켜, crotomic acid로 전환시킨 후, 식힌 다음, 235nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

結果 및 考察

1. 분리균주의 생존도에 미치는 NaCl농도와 pH의 영향

분리균주의 NaCl농도와 pH에 따른 생존도는 Fig. 1,2에 나타내었다.

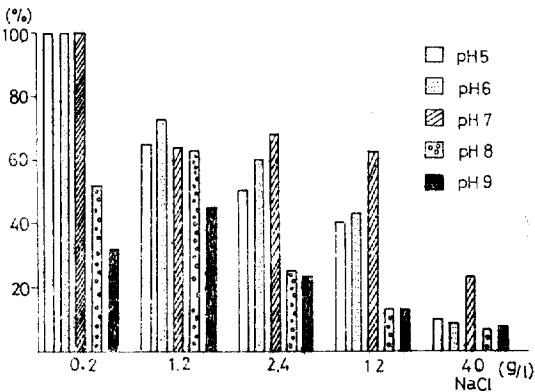


Fig. 1. Viability on the effect of various NaCl concentrations and various pH in optimal Ashby's media.

Fig. 1.에서는 정상적인 Ashby's 배지에 NaCl 농도와 pH를 달리하였을 때, 성장한 균들의 viability를 나타냈다.

NaCl 0.2g/l 처리구에서는 pH 5, 6, 7에서 모두 100% 생존되었으나, pH 8, 9,에서는 상당히 떨어져 50% 정도의 viability를 나타냈으며, NaCl 1.2g/l 처리구에서도 pH 5, 6, 7, 8에서 거의 유사했으나, pH6일 때 가장 높은 viability를 보였으며, NaCl 2.4g, 12g, 40g/l 처리구로 갈수록,

즉 염분도가 높을수록 거의 일정하게 viability가 감소됨을 보여주었다. 그러나 같은 염분농도를 지닌 조건에서는, pH7인 경우에 가장 높은 viability를 나타냈으며, pH5와 6의 경우에도 상당히 높은 viability를 보였다.

NaCl 40g/l 처리구에서 pH7인 경우 viability가 23%인데 반해, 12g/l 처리구의 pH8과 9의 시험구에서 viability가 9%, 9% 정도로 나타난 것을 비교해 볼 때, 최적 pH일때는 비교적 높은 염분내성도를 나타낼 수 있다.

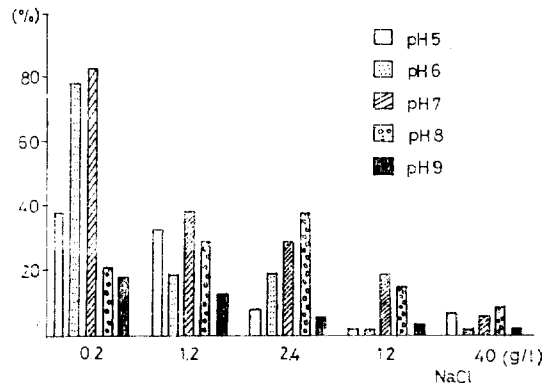


Fig. 2. Viability on the effect of various NaCl concentrations and various pH in modified Ashby's media.

Fig. 2에서는 Mg⁺⁺, PO₄⁻³, NO₃⁻를 자연 간척지 수준으로 맞춘 modified Ashby's 배지에, 각기 다른 염분농도와 pH가 분리균의 viability에 미치는 영향을 나타내었는데, Fig. 1의 경우와 유사하게, NaCl 농도를 높일수록 viability가 낮아지고, pH7에서 가장 viability가 높음을 보여준다. 그러나, NaCl 농도를 같은 수준으로 처리한 시험구끼리 비교해 볼 때, 간척지 환경과 비슷하게 조정된 Fig. 2에 나타난 시험구가, Fig. 1에 나타난 시험구에 비해 viability가 떨어짐을 볼 수 있는데, 이는 간척지 수준으로 염류를 조정된 배지가 ionic strength가 너무 높아진 한편, ion의 불균형, 질소원의 첨가등의 원인에 기인한 것으로 생각된다.

분리된 *Rhizobium japonicum*의 성장에 대한 NaCl 농도와 pH의 영향을 살펴 볼 때, 최적 pH는 pH7인 것으로 나타났으나, pH5와 6, 8에서도 상당히 viability가 높은 것으로 보아, *Rhizobium* 屬의 적응가능한 pH범위가 pH5~8.5로 넓은 pH

범위에서 적응할 수 있다(Bergey's manual 8th. ed.)는 것과 일치함을 볼 수 있었으며, 자연 간척지 환경의 salinity 수준의 2배농도에서도, 30~40%의 viability를 나타낸 것은 이균의 간척지에 대한 실제적 응용이 가능함을 시사해 준다.

2. NaCl 농도와 pH에 따른 PHB 축적량

염분농도와 pH의 영향에 의한 PHB 축적량은 Fig. 3, Table 1에 나타내었다.

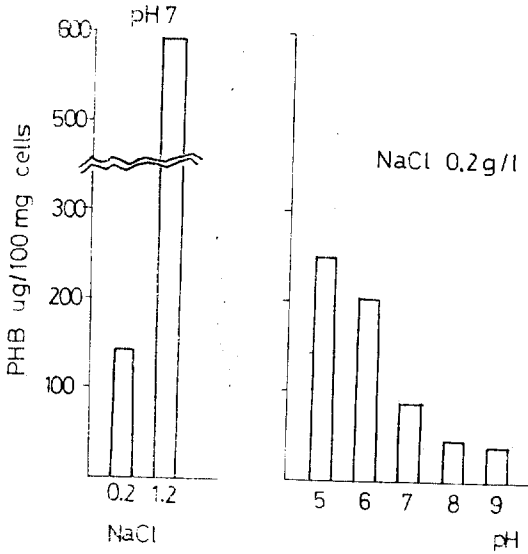


Fig. 3. Relationships between the accumulated PHB and NaCl concentration in accordance with pH gradients.

Table 1. Relationships between the accumulated PHB and NaCl concentration in accordance with pH gradients.

Media NaCl pH	(PHB $\mu\text{g}/100\text{mg cell}$)			
	Ashby's medium	Modified Ashby's medium		
	0.2 (g/l)	0.2 (g/l)	1.2 (g/l)	
5	250.86			
6	214.89			
7	81.37	139.37	596.06	
8	41.90			
9	26.02			

시험구로는 viability가 가장 좋은 NaCl 0.2g/l 처리구의 pH5, 6, 7, 8, 9로 조정된 5개 시험구와, 간척지조건으로 조정된 시험구중 viability가 좋은 시험구 즉 pH 7로 조정된 후 NaCl 0.2g/l, 1.2g/l로 처리한 2개 시험구에서 PHB 축적량을

조사하였다.

PHB는 많은 세균류와 남조류에서 나타나며, 환경조건, 영양조건(질소원, 탄소원, 황, 인산)에 따라 축적이 증감된다. 즉, 영양원으로 질소 황, 인산 등이 다 소모되면 성장이 멈추어지며, 이때 PHB 합성이 일어나는 데, 건조중량의 40%에 이르기도 하며(Williamson et al. 1958, Wilkinson 1963), 배지내의 pH 및 temperature도 PHB의 세포내 축적량에 많은 영향을 미친다고 하였다(Dawes et al. 1962).

PHB는 stationary phase 때 대부분 최고의 축적량을 나타내나, PHB의 분해에 관여하는 PHB depolymerase는 log phase 후반에 합성되어 stationary phase 때 release된다(Stinson, et al, 1974). stationary phase때는 영양결핍 등 성장이 멈추는 시기로, 이때, 세포내 물질대사를 유지하는 데 PHB를 이용한다.

이와같이 PHB는 대체로 환경조건이 나쁠때 많이 축적되는데, 본 실험의 경우에서도 Fig. 3 및 Table 1.에서 나타냈듯이, 간척지조건으로 조정된 배지조건하에서 역시 PHB 축적량이 높음을 볼 수 있다. 즉, 같은 pH7 조건하일지라도, 간척지조건의 배지중 NaCl 0.2g/l 처리구의 PHB 축적량이 약 140 $\mu\text{g}/100\text{mg cell}$ 인데 비해, 정상적인 배지의 경우 81 μg 이므로, 염분도가 높은 간척지 환경에서 PHB 축적량이 높음을 볼 수 있으며, NaCl 1.2g/l 처리구에서는 596 μg 의 축적량을 보여 가장 높은 수준을 보였다. 이는 PHB depolymerase가 constitutive, extracellular enzyme인 까닭에(Stinson, et al. 1974), 높은 염분도에 의해 release되는 것이 저해되므로 PHB degradation이 안되어 높은 축적량을 보인 것으로 사료된다.

또한, pH에 따른 PHB 축적량을 살펴보면, pH가 낮을수록 많은 축적량을 보였으며, pH가 높을수록 적은 PHB 축적량을 보였다. 이러한 결과도 역시 PHB depolymerase의 secretion에는 pH가 절대적인 영향을 미친다는 Stinson, et. al (1974)의 보고와 일치하는데 Pseudomonas lem-aignei를 재료로 한 그의 연구에서는, pH6.0일 때 생장은 좋으나, PHB depolymerase의 secretion은 저조한 반면, pH7.5일 때는 그 반대현상이 있음을 지적했다. 즉 영양결핍 등 성장조건

이 좋지 않을 때, 축적된 PHB를 이용하기 위해 PHB depolymerase가 release된다고 했는데, 본 실험의 경우에도, pH 5, 6과 7이 *Rhizobium japonicum*의 좋은 성장조건이지만, PHB depolymerase의 secretion이 낮은 pH로 인해 저해되는 까닭에, 세포질 내지 세포막에 함유된 PHB의 degradation이, pH 5, 6, 7의 경우 pH 8, 9의 시험

구에 비해 덜 되어 PHB의 축적량이 높은 것으로 생각된다.

pH 8과 9 시험구의 경우, 극소량의 PHB 축적량을 나타내었는데, pH 8과 9의 조건이, *R. japonicum*의 성장을 저해하는 요인이 되지만, PHB depolymerase의 secretion이 높아지므로, PHB의 축적량이 감소된 것으로 사료된다.

摘 要

간척지에서 생육된 大豆에 nodule을 형성하며 공생하는 한편, 질소고정능력이 있으며, 실제적 응용이 가장 쉬운 균주로 알려진 *Rhizobium japonicum*을 분리하여, 이 균주의 성장에 미치는 salt tolerancy, 및 pH의 영향을 살피며, 이 균주가 갖는 독특한 세포내 함유물인 poly-β-hydroxybutyric acid의 함량을 측정하여, 에너지의 저장물질이며, 생리적으로 중요한 역할을 하는 PHB의 축적량과 환경조건과의 상호관계를 해석하고자 했다.

그 결과, 이 균주의 성장에 대한 최적 pH는 7.0으로 나타났으나, 비교적 넓은 pH범위 즉 5~6에서도 성장량이 좋은 것으로 나타났다. 또한 염분내성도를 살핀 결과, 염분농도를 높일수록 성장에 심한 억제효과를 보였으나, PHB합성량의 경우 pH가 낮을수록 또한 염분도가 높을수록 높은 합성량을 보였다.

引用文獻

1. Brown, A.D. 1964. Aspect of bacterial response to the ionic environment. *Bacteriol. Rev.* **28**, 3 : 296~329.
2. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. The Williams and Wilkins Co./Baltimore
3. Choi, Y.K. 1978. Distribution of *Rhizobium* and development of useful strain *Faculty papers of Hanyang Univ.* **12** : 237~249.
4. Dunlop, W.F. and A.W. Robards. 1973. Ultrastructural study of poly-β-hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **114**, 3 : 1271~1280.
5. Griebel, R.J. and J.M. Merrick. 1971. Metabolism of poly-β-hydroxybutyrate: Effect of mild alkaline extraction on native poly-β-hydroxybutyrate granules. *J. Bacteriol.* **108**, 2 : 782~789.
6. Hong, S.W., Y.C. Hah, and Y.K. Choi. 1969. Biological improvement of reclaimed tidal land soil. (I)-Desalination effects of saline soil by the growth of certain halophytes. *Kor. J. Bot.* **12** : 1~4.
7. _____ K.W. Lee. 1968. Biological improvement of reclaimed tidal land soil(II)-Changes of soil microbial population in reclaimed tidal land. *Kor. J. Microbiol.* **6**, 4 : 131~140.
8. _____ Y.K. Choi. 1969. Biological improvement of reclaimed tidal land soil(III)-Changes of saline soil by addition of organic acids-. *Kor. J. Bot.* **12**, 4 : 9~18.
9. _____ K.W. Lee. 1970. Biological improvement of reclaimed tidal land soil(IV)-Effects of organic matters on saline soil respiration. *Kor. J. Microbiol.* **8** : 13~20.
10. _____ Y.K. Choi. 1970. Ecological studies of the certain halophytes on the high saline soil. *Kor. J. Bot.* **13**, 1 : 25~32.
11. Jensen, T.E. and L.M. Sicko. 1971. Fine structure of poly-β-hydroxybutyric acid granules in a blue green alga, *Chlorogloea fritschii*. *J. Bacteriol.* **106**,

- 2 : 683~686.
12. Larsen, H. 1973. The halobacteria's confusion to biology. *Antonie van Leeuwenhoek* **39** : 383~396.
 13. Lee C, J.R. and R.S. Berk (1971). Membranous inclusions of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **105** : 250~256.
 14. Norris, J.R. and D.W. Ribbons. 1971. Methods in microbiology. Academic Press London and New York. 5B.; 189~207, 358~383.
 15. Stinson, M.W. and J.M. Merrick. 1974. Extracellular enzyme secretion by *Pseudomonas lemoignei*. *J. Bacteriol.* **119** : 152~161.
 16. Vincent, J.M. 1968. The identification and classification of *Rhizobium*. Identification Methods for Microbiologists **18** : 65.