

## 벼뿌리 부근에 서식하는 질소고정미생물에 관한 연구

정건섭 · 민태익\* · 변유량 · 유주현

연세대학교 식품공학과  
\*한국과학기술원 미생물연구실  
(1985년 8월 1일 수리)

## Studies on Nitrogen-Fixing Microorganisms in Rice Rhizosphere

Kun Sub Chung, Tae Ick Mheen, Yu Ryang Pyun, Ju Hyun Yu

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea  
\*Microbiology Laboratory, KAIST, Seoul, Korea  
(Received August 1, 1985)

Nitrogen-fixing bacteria were isolated from the rice rhizosphere of various paddy fields in our country. The screening of 238 isolates for nitrogen-fixing ability resulted in the isolation of *Enterobacter agglomerans* NFB264 and three *Klebsiella pneumoniae* NFB3, NFB278, NFB320. Plasmids of various molecular weight from 1.7 to more than 84 Mal. were detected by agarose gel electrophoresis in three out of four isolates. But, these plasmids had not any nitrogen-fixing genes. Hybridization experiments using *Klebsiella pneumoniae* M5a1 nitrogen-fixing genes, *nifQ-K* and *nifDH*, as probes revealed the presence of homologous sequences in the chromosomal DNA of all isolates. However the restriction patterns of *nif* genes of the isolates by various restriction endonucleases were different to those of *Klebsiella pneumoniae* M5a1.

세계적으로 유류자원의 고갈 및 가격상등의 이유에서 생물학적 질소고정에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다. 한편 미생물에 의한 생물학적 질소고정은 콩과식물의 뿌리와 공생관계를 갖고 있는 *Rhizobium* 群과 공생관계를 갖고 있지 않는 free-living 상태의 질소고정群으로 대별되는데, 근년에 들어서는 비콩과식물과 free-living 상태의 질소고정 미생물과의 association에 대한 연구가 많이 보고되고 있다. 이들 미생물은 사탕수수, 옥수수, 보리, 밀, 벼등 식물체의 rhizosphere에 서식하며 질소고정을 하는 것으로 알려져 있으며<sup>1-5)</sup>, 특히 벼과식물의 rhizosphere에는 *Klebsiella*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Alkaligenes*, *Azotobacter* sp. 등의 질소고정미생물이 서식한다고 알려져 있다. 벼과식물에 관련된 질소고정미생물에 대한 연구는 일본의 國立遺伝学研究所에서 질소고정유전자

및 벼품종에 따른 질소고정확성에 대한 연구를 하고 있으며<sup>6-7)</sup>, 필리핀의 IRRI에서는 논토양속 질소고정미생물의 생태변화와 벼생육 관계에 대한 연구를 해오고 있다<sup>8-10)</sup>.

쌀을 주식량 자원으로 이용하고 있는 우리나라의 입장에서도 벼과식물에 관련된 질소고정 미생물에 대한 연구는 매우 중요한 일로 사려되어 국내 논의 흙으로부터 질소고정 활성이 높은 미생물을 분리하여, 이들에 대한 몇 가지 특성을 조사하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

### 실험재료 및 방법

#### 질소고정미생물의 분리

벼뿌리 사이의 흙을 생리식염수에 현탁하여 nitrogen-free agar media<sup>11)</sup> (sucrose 6g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13.9g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7g, NaCl 2.0g, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 8mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 3mg, thiamine 1mg, Agar purified (Difco) 13g, d-water 1,000 ml)에 도달하여 질소기체하에서 5일간 배양하여 single colony를 분리하여 nutrient agar slant에 이식 보관하였다.

#### 질소고정활성측정

질소고정활성은 acetylene reduction 방법<sup>(12)</sup>으로 행하였으며 이때 환원된 ethylene기체는 gas chromatography (FID, Porapak Q column)을 사용하여 정량하였다.

#### 미생물의 동정

분리한 미생물의 동정은 API 20E (API International S. A)를 사용하여 생화학적 검사를 행하여 이 결과를 API 20E Analytical Profile Index를 이용하여 행하였다.

#### Plasmid 분리 및 전기영동

선별한 질소고정활성미생물의 plasmid 및 *E. coli* plasmid의 분리는 Uozumi 등의 방법<sup>(13)</sup>에 따라 CsCl-EtBr equilibrium density gradient ultracentrifuge를 행하여 분리하였고 전기영동은 vertical slab를 사용하여 0.8% agarose gel (BRL)로 행하였다.

#### Hybridization

분리미생물의 DNA를 agarose gel 전기영동후에 Southern의 방법<sup>(14)</sup>에 따라 nitrocellulose filter sheet (S & S B85)에 blotting시켜 80°C에서 진공건조시켜

**Table 1. Acetylene reduction activities of the nitrogen-fixing isolates.**

strain	activity ( $\mu$ mole C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /day/vial)
NFB 2	1.96
NFB 3	2.94
NFB 5	2.44
NFB 8	1.29
NFB 10	1.59
NFB 264	3.83
NFB 278	2.51
NFB 320	2.72
<i>K. pneumoniae</i> M5a1	2.02

One ml culture was aseptically added to 10ml of its N-free semisolid medium in 25ml vial and incubated for 2 days at 30°C. Cotton plugs were changed to serum stopper then under 3% C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, 97% Ar. The vials were again incubated for 3 days at 30°C, after which C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> formed was measured.

사용하였다. Probe DNA는 plasmid pCM 1<sup>(15)</sup>으로부터 *nif* Q-K 단편과 plasmid pSA 30<sup>(15)</sup>으로부터 *nif* DH 단편을 절단해내서 nick translation 방법<sup>(16)</sup>으로 <sup>32</sup>P를 표지하여 준비하였다. 이 때 nick translation은 Amersham社의 Nick Translation Kit (PB 5025)로 행하였다.

Hybridization은 20ml의 50% formamide-5×SSC-0.1% SDS용액 (pH 7.25)에 100°C에서 5min간 열처리한 probe DNA용액을 섞고, blotting된 nitrocellulose filter sheet를 담그어 40°C에서 18~24hr 반응시킨 후 이 sheet를 50% formamide-5×SSC-0.1% SDS 세척용액으로 씻어주고 진공건조하여 autoradiography를 행하였다. Autoradiography는 고감도

**Table 2. Typical API 20E test results for the isolates.**

test	NFB -3	NFB -264	NFB -278	NFB -320
$\beta$ -galactosidase	+	+	+	+
arginine dihydrolase	-	-	-	-
lysine decarboxylase	(+)	-	(+)	(+)
ornithine decarboxylase	-	-	-	-
citrate	+	+	+	+
production of H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
urease	-	-	-	-
tryptophane deaminase	-	-	-	-
indole	-	+	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+
gelatin liquefaction	-	-	-	-
glucose	+	+	+	+
mannose	+	+	+	+
inositol	+	-	+	+
sorbitol	+	-	+	+
rhamnose	+	+	+	+
saccharose	+	+	+	+
melibiose	+	-	+	+
amygdaline	+	+	+	+
arabinose	+	+	+	+
cytochrome oxidase	-	-	-	-
production of nitrite	-	+	-	-
production of nitrogen	+	-	+	+
motility	-	+	-	-
MacConkey	+	+	+	+
oxidation & fermentation				
of glucose	+	+	+	+
catalase	+	+	+	+

+; positive, (+); weakly positive, -; negative

의 X-ray film (Kodak X-Omat film) 위에 건조시킨 sheet를 덮어 놓고 -45°C에서 수일간 행하였다<sup>17)</sup>.

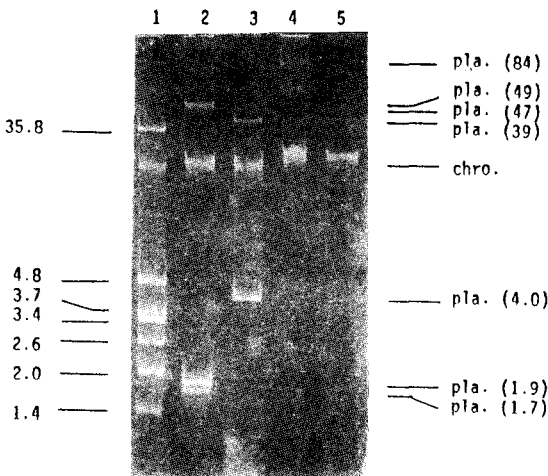
**결과 및 고찰**

**질소고정미생물의 분리 및 활성 측정**

논의 흙으로부터 총 238株를 분리하여 acetylene reduction 활성을 나타내는 51株를 1차선별 하였으며, 이 중 NFB3, NFB264, NFB278, NFB320의 4株를 2차선별하여 이후 실험을 행하였다. 이들의 활성은 Table 1에 나타낸 바와 같이 대표적인 질소고정미생물로 알려진 *K. pneumoniae* M5a1보다 높게 나타났으며, 특히 NFB264가 가장 높은 활성을 보여주었다.

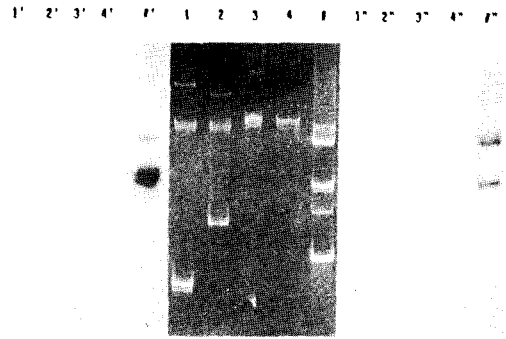
**선별한 미생물의 동정**

API 20E system의 생화학적 검사결과를 Table 2에서 보는 바와 같다. NFB3, NFB278 및 NFB320은 모두 같은 생화학적 반응결과를 보여주어서 7 digit profile 이 5 205 773으로 Analytical Profile Index에서 *Klebsiella pneumoniae*로 확인되었으며, NFB264는 1 245 133으로 앞의 3株와는 lysine decarboxylase, indole production, 당이용성에서는 inositol, sorbitol 및 melibiose에서 서로 다른 차이를 보여 *Enterobacter agglomerans*로 동정되었다. 또한 이들의 차이로 *K. pneumoniae*는 motility가 없는



**Fig. 1. Agarose gel electrophoresis pattern of plasmids of the isolates.**

lane 1 ; *E. coli* V517, lane 2 ; NFB3  
lane 3 ; NFB264, lane 4 ; NFB278,  
lane 5 ; NFB320, pla.; plasmid, chro.;  
chromosome, m. w. ; Mdal.



**Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the isolate plasmids and Southern hybridization with *nif* probes.**

lane 1 ; NFB 3, lane 2 ; NFB264, lane 3 ; NFB278, lane 4 ; NFB320, lane # ; plasmid pCM 1 (15.7Mdal.), pSA30 (6.9Mdal.), pKO11 (2.6Mdal.), lane 1', 2', 3', 4', #' are hybridization pattern for *nif* Q-K probe. lane 1", 2", 3", 4", #" are hybridization pattern for *nif* DH probe.

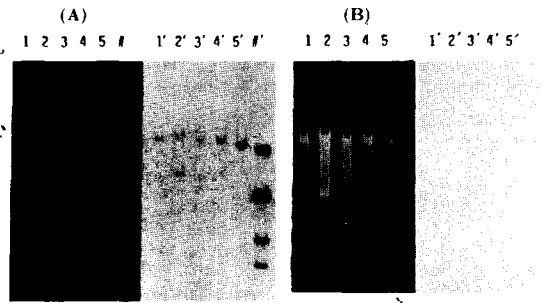
반면 *E. agglomerans*는 motility를 가지고 있었으며, MacConkey agar에 배양하였을 때 colony 주변의 색에도 차이가 있었다.

**선별한 질소고정활성미생물의 plasmid**

선별한 미생물의 DNA를 추출하여 agarose gel 전기영동을 행하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. NFB320만을 제외한 3株에서는 plasmid들의 band를 확인할 수 있었으며, 이들 plasmid의 분자량은 *E. coli* V517이 함유하고 있는 ccc-molecular marker DNA를 이용하여 측정하였다. Plasmid를 함유하고 있는 선별미생물의 large plasmid들은 분자량이 39 ~ 84 Mdal. 으로서 전체 질소고정유전자를 함유하기에 충분하므로, 이들 plasmid를 hybridization 방법으로 질소고정유전자함유 여부를 조사하여 보았으나, Fig. 2의 결과와 같이 positive band가 나타나지 않은 것으로 보아 plasmid상에는 질소고정 유전자가 존재하지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 이들 질소고정활성미생물의 질소고정 유전자는 chromosomal DNA상에 위치해 있음을 알 수 있다. 한편, small plasmid들은 1.7~4.0Mdal. 으로 비교적 작으므로 질소고정 미생물에서의 cloning vector로 개발이용할 수 있을 것으로 사려된다.

**질소고정 유전자의 homology비교**

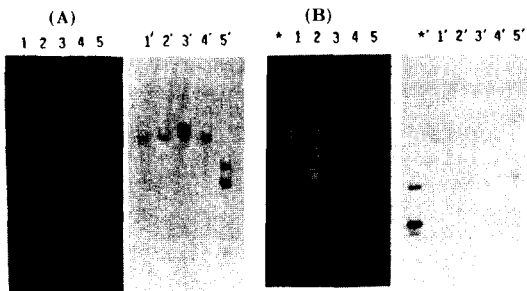
선별한 미생물의 질소고정 유전자와 대표적인 free-living 질소고정 미생물인 *K. pneumoniae* M5a1의



**Fig. 3. Southern hybridization of *Hind* III digested total DNA of the isolates with *nif* probes.**

(A); *nif* Q-K, (B); *nif* DH  
 lane 1; digest of NFB 3, lane 2; digest of NFB264, lane 3; digest of NFB278, lane 4; digest of NFB320, lane 5; digest of *K. pneumoniae* M5a1, lane #; pCM 1-*Hind* III, pCM 1-*EcoR* I & *Hind* III fragments lane 1', 2', 3', 4', 5', #' are hybridization patterns.

질소고정 유전자와의 homology를 비교하기 위하여 이들 미생물의 total DNA를 *Hind* III (Fig. 3), *EcoR* I (Fig. 4), *Bam* H I, *Pst* I, *Sal* I 및 *Xho* I 으로 절단하여 <sup>32</sup>P로 표지한 *nif* Q- K와 *nif* DH 단편을 probe DNA로 사용하여 hybridization시켰다. Autoradiography상의 hybridization band를 marker DNA 단편과 비교하여 분자량을 구해 종합한 결과를 Table 3에 나타냈다. 선별한 미생물 4株는 모두



**Fig. 4. Southern hybridization of *EcoR* I digested total DNA of the isolates with *nif* probes.**

(A); *nif* Q-K, (B); *nif* DH  
 lane 1; digest of NFB 3, lane 2; digest of NFB264, lane 3; digest of NFB278, lane 4; digest of NFB320, lane 5; digest of *K. pneumoniae* M5a1 \*; pSA 30-*Hind* III, pSA 30-*EcoR* I, pSA 30-*Hind* III & *EcoR* I fragments as control  
 lane 1', 2', 3', 4', 5', \*' are hybridization patterns.

**Table 3. Restriction analysis of *nif* genes of the isolates by Southern hybridization. (molecular weight; Mdal.)**

restriction enzyme	strain	<i>nif</i> Q-K	<i>nif</i> DH
<i>Bam</i> H I	NFB3	14.0, 4.7, 3.5	6.4, 4.7, 1.0
	NFB264	14.0	14.0
	NFB278	14.0, 4.7, 3.5	14.0, 4.7, 1.0
	NFB320	4.7, 3.5	4.7, 1.0
	M5a1	4.7, 3.5, 1.9, 1.5, 1.2	14.0, 4.7
<i>EcoR</i> I	NFB3	13.5, 11.5	13.0
	NFB264	14.0, 3.4	3.5, 2.5
	NFB278	13.5, 11.5	13.0, 7.4, 3.5
	NFB320	13.5, 11.5	13.0
	M5a1	5.7, 4.5, 3.9, 1.3	4.5
<i>Hind</i> III	NFB3	11.5	8.6, 2.2, 2.0
	NFB264	11.5, 5.5	13.0
	NFB278	11.5, 5.5	13.0, 8.6
	NFB320	11.5	13.0, 8.6
	M5a1	11.5	13.0
<i>Pst</i> I	NFB3	1.0, 0.9, 0.7	2.1
	NFB264	12.5, 10.3, 3.2	8.6
	NFB278	1.9, 1.2, 0.9, 0.7	2.1
	NFB320	not digested	not digested
	M5a1	2.8, 2.2, 1.7, 0.8, 0.6	2.1
<i>Sal</i> I	NFB3	2.5, 1.8, 1.5	2.0
	NFB264	5.8, 3.6, 2.7, 2.5	2.9
	NFB278	2.5, 1.8, 1.7, 1.5	2.0
	NFB320	2.5, 1.8, 1.7, 1.5	2.9
	M5a1	2.6, 2.4, 1.8, 1.6, 1.5, 12.4, 1.5, 1.0	
<i>Xho</i> I	NFB3	14.5, 5.4, 2.7, 2.5	2.6
	NFB264	14.5, 8.4	15.0
	NFB278	14.5, 5.4, 2.5	2.6
	NFB320	14.5, 5.4, 2.5	2.6
	M5a1	14.5	14.0

*nif* Q-K 및 *nif* DH 단편과 hybridization 되었으므로 질소고정 유전자를 가지고 있음이 확인되었고, 또한 probe DNA가 *K. pneumoniae* M5a1에서 유래한 질소고정 유전자 단편이므로 *K. pneumoniae* M5a1과 homology를 가지고 있음을 알 수 있다. 이 결과는 Ruvkun 등<sup>(18)</sup>의 질소고정 유전자는 서로 다른 종 사이에도 homology를 갖는다는 보고와 잘 일치하였다.

또한 *K. pneumoniae* M5a1과 hybridization 된 band pattern을 비교해 보면, 선별한 미생물의 질소고정 유전자는 제한효소 절단부위가 *K. pneumoniae* M5a1과 차이가 있음을 알 수 있고, 선별한 미생물중

에서도 NFB264는 다른 것들에 비해 많은 차이를 보이고 있다. 이런 결과는 선별한 질소고정 미생물이 *K. pneumoniae* M5a1과는 다른 변종일 가능성을 시사해 준다.

## 요 약

국내 논 의 흙으로부터 벼과식물에 관련된 질소고정 미생물을 238株 분리하여 비교적 활성이 높은 4株의 질소고정활성 미생물을 선별하여 이중 3株는 *K. pneumoniae*, 1株는 *E. agglomerans*로 동정하였다. NFB3, NFB264, NFB278의 3株는 1.7~8.4Mdal,의 plasmid들을 가지고 있었으나 이들 plasmid에 질소고정유전자 단편을 함유하고 있지는 않았다. 선별미생물의 chromosomal DNA상에 존재하는 질소고정 유전자는 *K. pneumoniae* M5a1의 질소고정유전자와 homology를 나타냈으며, 이들의 질소고정유전자는 *K. pneumoniae* M5a1의 질소고정유전자와 제한효소 절단부위가 상이하였다.

## Reference

- Pederson, W.L., K. Chakrabarty, R.V. Klucas and A.K. Vidaver: *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 129 (1978)
- Raju, P.N., H.J. Evans and R.J. Seidler: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3474 (1972)
- Neal, J.L., Jr and R.I. Larson: *Soil Biol. Biochem.*, **8**, 151 (1976)
- Lethbridge, G., M.S. Davidson and G.P. Sparling: *Soil Biol. Biochem.*, **14**, 27 (1982)
- Dommergues, Y., J. Balandreau, G. Rinaudo and P. Weinhard: *Soil Biol. Biochem.*, **5**, 83 (1973)
- Hirota, Y., T. Fujii, Y. Sano and S. Iyama: *Nature (London)*, **276**, 416 (1978)
- Sano, Y., T. Fujii, S. Iyama, Y. Hirota and K. Komagata: *Crop Science*, **21**, 758 (1981)
- Watanabe, I. and W. L. Barraquio: *Nature (London)*, **277**, 565 (1979)
- Watanabe, I., W.L. Barraquio, M.R.De Guzman and D.A. Cabrera: *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 813 (1979)
- Kulasooriya, S.A., P.A. Roger, W.L. Barraquio and I. Watanabe: *Soil Sci. Plant Nutr.*, **27**, 19 (1981)
- MacNeil, T., W.J. Brill and M.M. Howe: *J. Bacteriol.*, **134**, 821 (1978)
- Hardy, R.W.F., R.D. Holsten, E.K. Jackson and R.C. Burns: *Plant Physiol.*, **43**, 1185 (1968)
- Uozumi, T., K.L. Narayana, T. Beppu and K. Arima: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2205 (1980)
- Southern, E.M.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503 (1975)
- Cannon, F.C., G.E. Riedel and F.M. Ausubel: *Mol. Gen. Genet.*, **174**, 59 (1979)
- Rigby, P.W.J., M. Dieckmann, C. Rhodes and P. Berg: *J. Mol. Biol.*, **113**, 237 (1977)
- Chung K.S., T. Uozumi and T. Beppu: *Annual Reports of ICME*, **5**, 173 (1982)
- Ruvkun, G.B. and F.M. Ausubel: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 191 (1980)