

大豆 根瘤菌의 分離 및 特性

尹 漢 大 · 趙 武 濟 · 李 啓 瑚*

慶尙大學校 農科大學 農化學科, *서울大學校 農科大學
(1987년 3월 12일 수리)

Isolation and Characterization of Rhizobia from Soybean Cultivated in Korea

Han-Dae Yun, Moo-Je Cho and Ke-Ho Lee*

Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University,
* College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

Soybean rhizobia were isolated from 101 soybean (*Glycine max.*) cultivar which had been grown for the breeding experiment in Korea. Seven strains of the fast-growing soybean rhizobia and nine strains of the slow-growing soybean rhizobia were selected on the basis of their growth rate in AMA medium and their high ability of nodulation. The slow-growing soybean rhizobia were identified as *Bradyrhizobium japonicum* in the acetylene-reducing activity, microbial characteristics, and biochemical characteristics whereas the fast-growing soybean rhizobia were very similar to *Rhizobium fredii*.

서 론

Rhizobium 속의 균주는 제한된 두과작물에서 근류를 형성하여 숙주식물에 따라 대두 근류군 *Rhizobium japonicum* 으로 분류되어 왔으나¹⁾, 최근에는 생리적 특징에 따라 *Rhizobium* 과 *Bradyrhizobium* 의 두 속으로 분류되고 있다^{2,3)}. Keyser⁴⁾ 등이 동일한 숙주식물인 아시아 계통의 대두에서 분리한 근류군에서 전형적인 대두 근류군인 slow-growing soybean rhizobia 에 비해 성장 속도가 빠른 fast-growing soybean rhizobia 를 분리하여 보고하였⁵⁾, 이 균들의 yeast extract mannitol(YEM) 배지상에서 생육속도와 산 생성능^{4,5,6)}, 근류형성능^{4,6,7,8)}, plasmid 특성^{9,10)}, 질소고정 유전자¹¹⁻¹⁶⁾, 항생물질내성⁶⁾, 생리적 특성^{4,5,6)}, DNA hybridization 실험¹⁷⁾ 등이 보고되었으며, 이러한 일련의 실험 결과 이 균주들은 배양학적 및 생화학적 성질에 있어서는 fast-growing

rhizobia group 의 특성을 가지고 있었고 근류형성력에 있어서는 slow-growing rhizobia group 과 유사한 성질을 가지고 있었다. 따라서 이 균주들은 적절한 명명을 하지 못하고 fast-growing soybean rhizobia 혹은 전형적인 *Rhizobium japonicum* 과 구별하여 fast-growing *Rhizobium japonicum* 으로 사용되어 왔다^{5,6,7)}. 이와 관련하여 최근 근류군을 분류하는데 기주식물에 대한 친화성보다도 생리적 차이에 대한 중요성이 강조되어 Jordan^{2,3)} 등은 slow-growing rhizobia 를 *Bradyrhizobium* 속으로 재분류하여 종래의 *Rhizobium japonicum* 을 *Bradyrhizobium japonicum* 으로 명명하였고, 새로 분리된 fast-growing soybean rhizobia 균주들은 생리적으로 전형적인 fast-growing rhizobia 와 유사하기 때문에 *Rhizobium* 속으로 분류되어 오다가 최근 Elkan¹⁸⁾ 등은 새로운 분류 체계에 의해 이들 균주가 *Rhizobium japonicum* 으로 명명되어야하나 *Bradyrhizobium japonicum* 과의 혼란을 없애기 위하여 *Rhizobium*

연구의 개척자인 E.B. Fred(1887~1981)을 추모하는 뜻에서 *Rhizobium fredii* 로 명명하였다.

본 연구자들도 한국에서 시험 재배되고 있는 대두 근류에서 fast-growing soybean rhizobia와 slow-growing soybean rhizobia를 분리하였으며 앞으로 이들 간의 유전적, 생화학적 유연관계를 밝히는 데 유용할 것으로 생각되어 일련의 비교실험을 하였으며 본보에서는 이들의 질소고정력, 미생물학적인 특징 및 생화학적 특징을 조사하고 동정한 바를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 사용배지 및 식물

대두 근류균의 분리 및 보관용 배지는 yeast extract mannitol (AMA) 배지를 사용하였으며¹⁹⁾, 근류균의 분리원으로 경상대학교 실험 농장에 매년 재배되고 있는 101종의 대두 품종을 사용하였으며, 분리 선정된 균의 질소고정력 측정을 위해서는 장려 품종인 광교(*Glycine max.* var. *Guanggyo*)를 사용하였다.

2. 근류균 분리

개화 최성기의 대두 뿌리로 부터 근류를 분리하여 살균 증류수로 세척하고 이것을 70% 에탄올에 침적한 다음, 0.1% HgCl₂ 용액에 5분간 표면을 소독하고 다시 살균 증류수로 충분히 세척한 후 근류내에 존재하는 bacteroid를 분리하였다.

3. 질소고정력 측정

대두종자를 20% chlorox 용액에 10분간 침적 살균한 다음 살균 증류수로 세척하고 0.01N HCl 용액에 10분간 침적한 다음 다시 살균 증류수로 7~8회 정도 세척 후 침적된 살균 여과지가 깔린 petri dish 상에 대두종자를 배열한 후 25°C로 조정된 암실에서 2일간 발아시켰다. 발아된 대두 종자는 무질소 수경재배액²⁰⁾을 살균 vermiculite가 채워진 25ml vial(Fig. 1)에 20ml 정도 가한 다음 순수 분리한 근류균을 식물당 10⁸ cell 이상되게 접종하고 난 후 Fig. 1A와 같이 살균 비닐봉지를 씌운 다음 growth chamber (60 R.H., 28°C, light intensity 1.7×10⁴ lux)에 넣은 다음 14일간 재배하였다. 재배 후 정상적으로 성장한 것만 골라서 식물의 상층부를 절단하고 serum stopper를 Fig. 1B와 같이 밀폐시킨 다음 공기 0.4 ml를 뺀 후

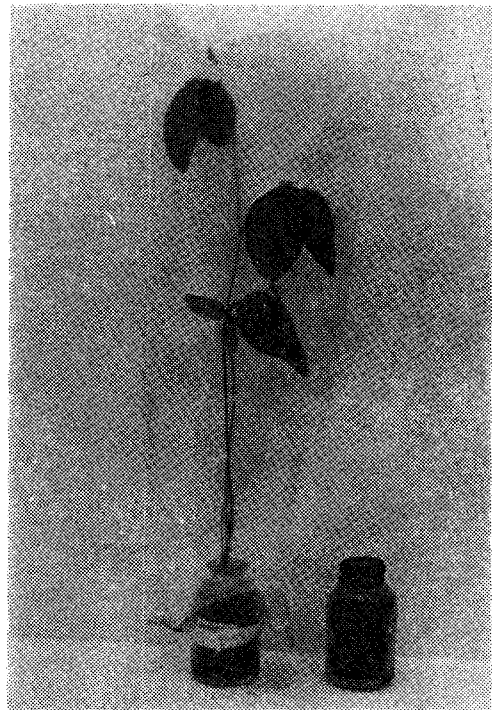


Fig. 1. Soybean plant growing in vial after 14 days incubation(A). Soybean stem being cut and sealed with serum stopper for acetylene reduction assay(B).

0.4 ml의 acetylene을 상압하에서 vial에 주사하여 25°C에서 2시간 반응시킨 후에 주사기로 0.5 ml를 gas chromatograph에 주입하여 질소고정력을 측정하였으며 specific activity는 시간당 생성되는 nmole ethylene으로 나타내었다.

4. 세균의 등정

대부분의 배양은 AMA 배지상에서 2~7일 정도 배양하여 관찰하였다. 분리된 균의 형태 및 크기 측정은 crystal violet로 염색하여 현미경으로 관찰하였으며, 그림 염색은 Hucker 방법으로 관찰하였다. Motility는 반고체 상태의 배지에서 생육시킨 균을 현미경하에서 관찰하였으며, 배양학적 특징은 상법²¹⁾에 따라 일반적인 성질을 비교하였다.

5. 세균의 평균 세대기간 측정

균의 평균 세대기간을 측정하기 위하여 AMA 액체배지를 사용하여 대수 증식기에 도달한 균을 원심분리하여 AMA 액체배지로 한번 세척하였다. 이

Table 1. Growth type on AMA and nodule fresh weight by the isolated strains

Stock No.	Growth type (day)	Nodule fresh weight* (mg)	Stock No.	Growth type (day)	Nodule fresh weight*	Stock No.	Growth type (day)	Nodule fresh weight*
1	4	2.4	35	4	3.7	69	4	2.3
2	4	2.5	36	4	3.3	70	4	2.2
3	5	3.5	37	5	2.3	71	4	3.1
4	4	2.3	38	4	3.5	72	5	3.7
5	1	—	39	4	3.4	73	4	2.9
6	5	2.0	40	4	2.3	74	4	2.3
7	1	+	41	4	4.5	75	4	2.2
8	4	2.5	42	1.5	—	76	4	3.9
9	3	2.3	43	5	5.4	77	4	2.4
10	4	4.0	44	4	2.3	78	4	3.5
11	4	2.0	45	4	3.0	79	4	2.4
12	5	4.1	46	1.5	2.2	80	4	2.2
13	4	4.2	47	4	2.3	81	3	2.3
14	4	7.5	48	4	3.1	82	4	2.2
15	4	3.6	49	4	4.0	83	4	2.3
16	4	2.2	50	4	2.3	84	5	4.4
17	5	3.5	51	4	3.5	85	4	4.5
18	3	2.3	52	5	6.5	86	1	+
19	4	2.3	53	4	5.4	87	4	2.2
20	4	2.2	54	4	2.2	88	4	3.0
21	5	9.6	55	4	2.3	89	4	10.7
22	4	3.7	56	1.5	—	90	4	3.1
23	4	3.8	57	4	4.3	91	4	2.9
24	4	3.7	58	4	3.9	92	4	4.4
25	5	3.6	59	4	2.3	93	4	3.2
26	4	12.0	60	5	1.9	94	4	3.0
27	4	4.1	61	4	1.8	95	5	2.3
28	4	3.3	62	3	2.2	96	4	2.4
29	4	2.2	63	4	2.3	97	1	—
30	4	2.2	64	4	3.5	98	4	2.5
31	5	2.3	65	4	4.0	99	4	2.6
32	4	4.2	66	4	3.5	100	4	4.3
33	4	2.3	67	4	3.0	101	4	2.7
34	4	3.0	68	4	2.9			

* Nodules from 25 plants of each strain were picked from the roots and pooled onto moistened filter paper. Values are average total nodule fresh weight (mg)/plant.

세척된 세포현탁액 1ml 용량을 위하여 300 ml AMA가 함유된 삼각플라스크에 넣고 진탕 배양하였다. 이 때 생육정도를 경시적으로 흡광도 600nm에서의 탁도로서 비교하였다.

6. 생리적 특징

각 당의 자화성은 RMM 배지²²⁾에서 mannitol을 맨 기본배지 50ml에 시험하고자 하는 각각의 당을

Table 2. Acetylene reduction activities of the fast- and slow-growing soybean rhizobia isolates

Strains	Specific activity*
Slow-growing	
ROKS 14	256 + 97
ROKS 21	322 ± 101
ROKS 26	387 ± 115
ROKS 41	174 ± 76
ROKS 43	217 ± 82
ROKS 52	242 ± 77
ROKS 53	221 ± 68
ROKS 85	153 ± 57
ROKS 89	342 ± 103
Fast-growing	
ROKF 5	—
ROKF 7	49 ± 21
ROKF 42	—
ROKF 46	—
ROKF 56	—
ROKF 86	42 ± 19
ROKF 97	—

* nmoles ethylene formed per hour/plant

mannitol의 농도와 같이 첨가하여 시험하였다. 이때 무당배지를 대조구로 하여 생육정도를 관찰하였으며, 이 때 접종균은 AMA plate 상에 생육된 균을 모아 다시 살균 증류수에 현탁하여 동일한 세포수로 조정하여 접종하였다. 분리균의 항생물질 내성실험을 위해 각 항생물질의 stock solution을 10 mg/ml 되게 조제하여 membrane filter를 통과시켜 사용하였다. Minimal inhibitory concentration (MIC)는 접종균을 당자화성에서와 같이 조정하여 사용하였다.

산 및 알카리 생성시험은 Keyser¹⁾ 등의 방법에 준하였으며, 일반적인 생리 실험은 Manual for general bacteriology²⁾에 준하였다.

결과 및 고찰

1. 분리균의 생육속도와 근류형성력

101종의 대두근류로부터 근류균을 순수분리하는 과정에서 Table 1과 같이 AMA 배지상에서 colony 생육이 전형적인 대두 근류균보다 훨씬 빠른 fast-

growing type 들이 발견되었다. 이들 fast grower 들은 근류 형성실험을 통하여 slow grower 들이 복합적으로 오염되어 실험의 오류를 야기시킬 가능성을 감안하여 면밀한 종자 살균과 반복적인 실험을 통하여 확인하였다.

AMA 고체배지 상에서의 생육속도에 따라 fast-growing soybean rhizobia 7 균주를 선발하였고, 생육속도가 느리고 근류형성력이 우수한 slow-growing soybean rhizobia 9 균주를 선발하였으며 이들 두 group 은 분류학적 중요성과 유전학적 연관성을 비교하는 데 좋은 자료가 될 것으로 생각되어 이후의 비교실험 균주로서 사용하였다 (Table 2).

한편 Keyser¹⁾ 등이 분리한 균주들은 세대기간이 6시간 미만이었으며 대두 품종 및 균주에 따라 특성이 상이함을 보고하였는데 본 실험에서 분리한 fast grower 들도 균주간의 근류형성력에 있어 차이를 발견하였다.

2. 질소고정력 측정

생육속도와 근류형성력에 의해 선정된 fast grower 7 균주와 slow grower 9 균주를 acetylene 환원법에 의하여 질소고정력을 측정한 결과는 Table 2과 같다. Slow-growing soybean rhizobia 9 균주의 specific activity는 시간당 153~387 nmole 범위의 ethylene 생성력을 보였으며, fast-growing soybean rhizobia 7 균주중에서 ROKF 7과 ROKF 86은 specific activity가 각각 시간당 49 nmole과 42 nmole의 환원력을 보였으며 다른 균주들은 아주 미약한 activity를 보였다. 한편 Stower⁶⁾ 등이 Keyser¹⁾가 분리한 균을 사용하여 균주와 대두 품종간의 acetylene 환원력을 측정한 결과 품종에 따라 상이하다는 보고를 하였으며 Hattori⁷⁾ 등은 동일한 균주를 사용하며 *Bradyrhizobium japonicum* 61A76과 품종 간의 질소고정력을 측정한 결과 그 중 한 균주는 acetylene 환원력이 거의 차이 없음을 밝혔는데 본 실험에서 분리한 균주들과 대두 품종 간의 질소고정력을 더욱 조사해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

3. 형태적 특징

Table 3에 나타난 바 같이 두 group 모두 간균이었으며, 크기는 1.8-2.6×0.7-1.2 μm 이었고 모든 균주는 양끝이 원형을 이루고 있었고 대부분 한개의 세포단위로 관찰되었으나 가끔 쌍을 이루

Table 3. Morphological characteristics of the fast- and slow-growing soybean rhizobia isolates

Strains	Form	Size (μm) (W×L)	Gram staining	Motility
Slow-growing				
ROKS 14	Rod	(1.1~1.4)×(2.1~2.6)	—	Motile
ROKS 21	"	(0.5~0.7)×(0.9~1.1)	—	"
ROKS 26	"	(0.8~1.2)×(1.2~1.5)	—	"
ROKS 41	"	(0.9~1.3)×(1.3~1.6)	—	"
ROKS 43	"	(0.8~1.0)×(1.1~1.3)	—	"
ROKS 52	"	(1.2~1.4)×(2.4~2.8)	—	"
ROKS 53	"	(0.8~1.2)×(1.2~1.6)	—	"
ROKS 85	"	(0.7~0.9)×(1.2~1.4)	—	"
ROKS 89	"	(0.7~0.9)×(1.2~1.4)	—	"
Fast-growing				
ROKF 5	Rod	(1.0~1.1)×(1.4~1.6)	—	Motile
ROKF 7	"	(0.8~1.1)×(1.3~1.6)	—	"
ROKF 42	"	(0.8~0.9)×(1.6~1.8)	—	"
ROKF 46	"	(0.9~1.1)×(1.2~1.4)	—	"
ROKF 56	"	(0.8~1.0)×(1.9~2.1)	—	"
ROKF 86	"	(0.9~1.1)×(1.3~1.5)	—	"
ROKF 97	"	(1.0~1.2)×(2.0~2.3)	—	"

Table 4. Cultural characteristics of the fast- and slow-growing soybean rhizobia isolates

Strains	Colony				
	Color	Form	Elevation	Margin	Slime/Mucoid
Slow-growing					
ROKS 14	Clear white	Circular	Convex	Entire	S
ROKS 21	White	"	"	"	M
ROKS 26	"	"	"	"	S
ROKS 41	"	"	"	"	M
ROKS 43	"	"	"	"	M
ROKS 52	Clear white	"	"	"	S
ROKS 53	"	"	Flat	"	S
ROKS 85	White	"	Convex	"	S
ROKS 89	"	"	Flat	"	S
Fast-growing					
ROKF 5	Light orange	Circular	Flat	Entire	S
ROKF 7	Clear white	"	"	"	S
ROKF 42	"	"	"	"	S
ROKF 46	White	"	"	"	S
ROKF 56	"	"	"	"	S
ROKF 86	Light orange	"	"	"	S
ROKF 97	Slight gray	"	Convex	"	S

Table 5. Mean generation times of the fast- and slow-growing soybean rhizobia isolates

Strains	Mean generation times* (hr.)
Slow-growing	
ROKS 14	8.5
ROKS 21	9.6
ROKS 26	6.9
ROKS 41	7.3
ROKS 43	10.7
ROKS 52	11.5
ROKS 53	12.3
ROKS 85	7.3
ROKS 89	12.1
Fast-growing	
ROKF 5	3.5
ROKF 7	3.3
ROKF 42	4.7
ROKF 46	4.5
ROKF 56	4.1
ROKF 86	3.8
ROKF 97	2.9

* Mean of three replicates

고 있는 것도 관찰되었다. Fast grower의 균주들은 AMA 배지상에서 대수증식기 말기에서나 정상기에서는 pleomorphism 현상도 관찰되었으며 모든 균에서 endospores는 관찰되지 않았다. 모든 균주에서 motility는 매우 느렸으며, slow grower는 fast grower보다 motility가 컸다.

4. 배양학적 특징

균의 배양학적 특징은 Table 4에서 같이 AMA 고체배지 상에서 대부분의 균주들은 white 혹은 clear white를 나타내었으나 일부는 light orange 혹은 slight gray 색을 나타내는 colony를 형성하였다. 두 group 모두가 colony의 형태에서는 circular 형태, elevation상태에서는 fast group은 대개 flat type이었으나 slow grower에서는 convex type을 이루었다. Colony margin은 두 group 모두 entire한 형태를 나타내었다. AMA 고체배지 상에서 fast group은 대개 그 colony 직경이 1~4 mm 정도가 되었으나 slow group에서는 0.5~2 mm로써 비교적 작았고, 배양 일수가 길어지면서

모든 균주는 slime 혹은 mucoid 상태로 되었으며 10일 이상에서는 colony와 colony가 겹쳐져서 서로 구별할 수 없는 정도로 되었는데 이러한 성질들은 근류균의 colony특징과 잘 부합되었다.

5. 평균 세대기간

각 균주의 평균 세대기간은 대수증식기 중의 생육정도를 비탁법으로 측정하였는데 이것은 회석법에 의한 생균수와 비례적인 관계가 있었고, 그 결과는 Table 5에서와 같이 fast group은 2~4시간, slow group은 6~12시간의 평균 세대기간을 나타내었다. 이러한 결과는 Keyser⁴⁾ 등이 중국에서 아세아 계통의 대두에서 분리한 fast growing-soybean rhizobia에서의 세대기간이 2~4시간으로 보고한 것과 일치하고 있다. 일반적으로 전형적인 fast-group인 *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. trifolii*는 세대기간이 2~4시간, slow group인 *B. japonicum*은 6시간 이상의 평균 세대기간이 소요된다는 것을 고려할 때 본 실험에서 분리된 fast-growing soybean rhizobia는 동일한 host specificity를 가진 *B. japonicum*보다는 전형적인 fast group rhizobia에 더 유사한 균으로 나타났다.

6. 당자화성 특성

20 종류의 당자화성을 조사한 결과는 Table 6에서와 같이 분리한 fast group의 균들은 slow group보다도 더 많은 종류의 당 이용성을 보여주었다. 모든 균주들은 glycerol을 위시하여 sorbitol 등의 단당류들을 이용하였다. 한편 Graham 등²⁵⁾과 Fred 등²⁶⁾은 전형적인 fast grower들은 slow grower보다 다양한 당 이용성이 있다는 사실을 보고하였으며, Sadowsky 등⁵⁾ 및 Stowers 등⁶⁾은 당의 이용율에 있어서 fast grower들은 glucose, sucrose, arabinose, xylose, fructose가 비교적 이용율이 높고 slow grower에서는 arabinose, xylose, galactose 등의 이용율이 높았다고 보고하였다.

Glenn 등²⁷⁾은 slow grower에서는 2당류를 이용할 수 있는 대사계가 결핍되어 있기 때문이라는 것을 밝혀냈다. 이러한 사실에 비추어서 본 실험에서 분리된 fast-growing soybean rhizobia는 slow-growing soybean rhizobia가 이용할 수 없는 2당류 혹은 3당류를 자화할 수 있는 결과가 나타난 현상은 slow grower균들의 세포내 효소계와 근본적인 차이가 있다는 것을 보여주고 있으며,

Table 6. Utilization of carbon sources by the fast- and slow-growing soybean rhizobia isolates*

Carbohydrates	Slow-growing ROKS									Fast-growing ROKF						
	14	21	26	41	43	52	53	85	89	5	7	42	46	56	86	97
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Three replicates

당 이용성이 광범위하다는 특성은 그 만큼 생육속도에도 좋은 영향을 미칠 것으로 생각된다.

7. 항생물질 내성 특성

항생물질 6종류의 감수성 실험은 *E. coli*를 이용한 표준 Muntler-Hinton 배지²⁸⁾와 AMA 배지에서 균의 증식율을 탁도로써 비교한 결과 표준배지에 비하여 약간의 차이가 있었으나 MIC 값을 결정하는 데는 지장이 없었다. 각 분리균들의 항생물질에 대한 감수성을 나타낸 결과는 Table 7에서 보는 바와 같이 모든 균주는 gentamycin, kanamycin, neomycin, streptomycin의 비교적 낮은 농도에서도 감수성이 예민하였지만 carbenicillin에 대해서는 높은 농도에서도 저항성을 나타내었다. Group으로 볼 때는 fast-growing soybean rhizobia는 slow-growing soybean rhizobia보다 항생물질에 대해 더 예민하게 반응하였다.

8. 생리적 특성

Table 8은 fast group과 slow group의 생리적인 특성을 비교한 결과로서 근류균에서 산과 알칼리 생성능은 분류학적으로 중요한 기준이 되고 있는데 fast group은 yeast extract mannitol 배지에서 산을 생성하고, slow group은 알칼리를 생성하였고, fast group은 gelatinase 양성인데 slow group은 음성, NaCl 2%에서 fast group은 생육하였으나 slow group은 못자라는 등 현저한 상이성을 나타내었다.

이러한 결과는 Keyser⁴⁾ 등이 분리한 균주들의 결과와 유사한 결과임을 알 수 있었고, 이는 전형적인 fast group에 속하고 있음을 더욱 뒷받침해주고 있다. 한편 분리균 모두 catalase, urease, oxidase 양성반응을 나타내었으며, H₂S를 생성하지 못하고 탄소원으로 citric acid를 이용하지 못하였다. 또한 Graham²⁵⁾ 등의 보고에 의하면 대부분의 *B. japonicum* 균주들이 이와 유사한 성질을

Table 7. Growth response of the fast- and slow-growing soybean rhizobia isolates to antibiotics

Strains	MIC value (μg antibiotic/ml)					
	Carbencillin	Gentamycin	Kanamycin	Neomycin	Streptomycin	Tetracycline
Slow-growing						
ROKS 14	100	6.2	12.5	5.0	12.5	12.5
ROKS 21	100	6.2	3.1	12.5	6.2	6.2
ROKS 26	100	12.5	12.5	25.0	12.5	6.2
ROKS 41	50	6.2	3.1	12.5	6.2	12.5
ROKS 43	100	6.2	12.5	50.0	25.0	12.5
ROKS 52	100	3.1	6.2	12.5	6.2	12.5
ROKS 53	50	3.1	6.2	6.2	3.1	6.2
ROKS 85	50	3.1	6.2	6.2	6.2	6.2
ROKS 89	100	3.1	3.1	12.5	3.1	3.1
Fast-growing						
ROKF 5	25	3.1	6.2	6.2	6.2	6.2
ROKF 7	50	12.5	12.5	25.0	6.2	12.5
ROKF 42	25	3.1	3.1	6.2	3.1	3.1
ROKF 46	50	6.2	3.1	6.2	6.2	6.2
ROKF 56	25	6.2	6.2	12.5	6.2	6.2
ROKF 86	50	6.2	6.2	12.5	6.2	3.1
ROKF 97	25	3.1	3.1	6.2	3.1	3.1

Note: The MIC value was defined as the minimum concentration of the antibiotics that completely prevented rhizobial growth.

Table 8. Physiological characteristics of the fast- and slow-growing soybean rhizobia isolates

Characteristics	Slow-growing ROKS									Fast-growing ROKF						
	14	21	26	41	43	52	53	85	89	5	7	42	46	56	86	97
Production																
Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Alkali	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-ketolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Reduction																
Nitrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilization																
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tolerance																
2% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

가진 것으로 보고하였고, H₂S 불형성이나, citric acid 비이용성은 *R. meliloti*의 몇 균주에서만 제한되어 있는 것으로 보고하였다. 내염성과 내산성에 대한 전형적인 fast group 과 slow group 사이의 연구결과가 많이 보고되었는데^{5,6,25)}, 대부분의 전형적인 fast group 은 slow group 보다도 산에는 예민하고 알카리에서는 생육이 가능함을 보여주었으며 Graham²⁵⁾ 등의 rhizobia의 내염성 보고에 의하면 fast group 중에 *R. meliloti*가 비교적 내염성이 강한 것으로 보고하였다.

따라서 지금까지 실험결과 분리된 fast-growing soybean rhizobia와 slow-growing soybean rhizobia는 균의 생육속도, 질소고정력, 미생물학적 특징 및 생화학적 특징을 조사하여 근류균의 새로운 분류법^{2,3)}에 의거한 결과 slow-growing soybean rhizobia는 *Bradyrhizobium japonicum*으로 동정되었으며, fast-growing soybean rhizobia는 Elkan¹²⁾ 등이 명명한 *Rhizobium fredii*와 일치되었으므로 *R. fredii*로 동정하였다.

적 요

한국에서 시험재배되고 있는 대두(*Glycine max.*) 101 품종의 근류로 부터 근류균을 분리하여 AMA 교체배지 상에서의 생육속도 및 근류형성력에 따라 fast-growing soybean rhizobia 7 균주와 slow-growing soybean rhizobia 9 균주를 선발하였다. 선정균의 질소고정력, 미생물학적 특징 및 생화학적 특징을 조사한 결과 slow-growing soybean rhizobia는 *Bradyrhizobium japonicum*과 일치하였으며, fast-growing soybean rhizobia는 *Rhizobium fredii*와 유사하였다.

References

1. Jordan, D.C., and Allen, O.N.: In 'Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed, Williams and Wilkins, Baltimore (1977).
2. Jordan, D.C.: Int. J. Syst. Bacteriol., 32 : 136 (1982).
3. Jordan, D.C.: In 'Bergey's manual of systematic bacteriology, 9th ed., vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore (1984).
4. Keyser, H.H., Bohlool, B.B., Hu, T.S. and Weber, D.F. Science, 215 : 1631 (1982).

5. Sadowsky, M.J., Keyser, H.H. and Bohlool, B.B.: Int. J. Syst. Bacteriol., 33 : 716(1983).
6. Stowers, M.D., and Eaglesham, A.R.J.: Plant Soil, 77 : 3 (1984).
7. Hattori, J., and Johnson, D.A.: Appl. & Environ. Microbiol., 48 : 234 (1984).
8. Israel, D.W., Mathis, J.N. Barbour, W.M. and Elkan, G.H.: Appl. & Environ. Microbiol., 51 : 898 (1986).
9. Heron, D.S., and Pueppke, S.G.: J. Bacteriol., 160 : 1061 (1984).
10. Plazinski, J., Cen, Y.H. and Rolfe, B.G.: Appl. & Environ. Microbiol., 48 : 1001 (1985).
11. Sadowsky, M.J., and Bohlool, B.B.: Appl. & Environ. Microbiol., 49 : 906 (1983).
12. Prakash, R.K., and Atherly, A.G.: J. Bacteriol., 160 : 785 (1984).
13. Mathis, J.N., Barbour, W.M. and Elkan, G.H.: Appl. & Environ. Microbiol., 49 : 1385 (1985).
14. Masterson, R.V., Parakash, R.K. and Atherly A.G. J. Bacteriol. 163 : 21 (1985).
15. Barbour, W.M., Mathis, J.N. and Elkan, G.H.: Appl. & Environ. Microbiol., 50 : 41 (1985).
16. Engwall, K.S., and Atherly, A.G.: Plant Mol. Biol., 6 : 41 (1986).
17. Scholla, M.H., Moorefield, J.H. and Elkan, G.H.: Int. J. Syst. Bacteriol., 34 : 283 (1984)
18. Scholla, M.H., and Elkan, G.H.: Int. J. Syst. Bacteriol., 34 : 484 (1984)
19. Vincent, J.M.: In 'A manual for practical study of the rootnodule bacteria, International Biological Programme, Blackwell Scientific Publ., Oxford, England(1970).
20. Wacek, T.J. and Brill, W.J.: Crop Sci., 6 : 519 (1976).
21. Norris, J.R., and Ribbons, D.W.: In 'Method in Microbiology', Academic Press, Vol. 1~12, New York (1969).
22. Hooykaas, P.J.J., Klapwijk, P.M., Nuti, M.P., Schilperoort, R.A., and Rorsch, A: J. Gen. Genet., 162~307 (1978).
23. Meyer, M.C., and Pueppke, S.G.: Can. J.

- Microbiol., 26 : 606 (1980).
24. Smibert, E.M., and N.R. Krig.: In 'Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiol, Washington, D.C. (1981).
25. Graham, P.H.: J. Microbiol. Serol., 30 : 60 (1971).
26. Fred, E.B., Baldwin, I.L., and McCoy, E.: In root nodule bacteria and leguminous plants. Univ. of Wisconsin Press, Madison, U.S.A. (1932).
27. Glenn, A.R., and Dilworth, M.J.: Arch. Microbiol., 129 : 233 (1981).
28. Petersdorf, R.G., and Sherris, J.G.: Am. J. Med., 39 : 766 (1965).