

우리나라 벼 근권으로부터 분리한 *Azospirillum* 균주의 미생물학적 특성

김원곤 · 서현창¹ · 김종평 · 김창진 · 이계호² · 유익동*

한국과학기술연구원 유전공학연구소 ¹신구전문대학 식품영양학과

²서울대학교 농업생명과학대학 식품공학과

경기도, 충청남도 일원의 벼 근권에서 400~900 nmol C₂H₄/hr/vial의 아세틸렌 환원 활성을 갖는 질소고정균인 *Azospirillum* 15균주를 분리하였다. 이 분리균주들은 1.0×3.0 μm 크기를 갖는 vibrioid 형태였으며 액체배양시 monopolar single 편모를 가졌다. 이 분리균주들은 생리적, 형태적 특성에 따라 두 그룹으로 분류되었는데, 그룹 I 균주들은 탄소원으로 glucose를 잘 이용하였고 biotin 요구성인 반면, 그룹 II 균주들은 glucose를 전혀 이용하지 못하였고 biotin 비요구성이었다. 또한 semisolid 무질소 배지에서 48시간 배양할 때 그룹 I 균주들은 원래의 vibrioid 형태에서 좀 더 길어지면서 S자 모양으로 변하는 pleomorphic 특성을 보인 반면, 그룹 II 균주들은 원래의 모양과 운동성을 유지하였다. 이상의 결과로부터 그룹 I 균주들은 *Azospirillum lipoferum*으로, 그룹 II 균주들은 *Azospirillum brasilense*으로 동정하였다.

KEY WORDS □ nitrogen fixer, *Azospirillum*, nitrogenase activity.

벼, 옥수수, 밀 등의 근권(rhizosphere)에서 일어난 생물학적 질소고정은 미생물과 식물 상호관계에 따라서 *Azotobacter*, *Clostridium*, *Bacillus*, blue-green algae, 광합성 세균 등의 free-living 미생물에 의한 단생 질소고정(non-symbiotic nitrogen fixation)과 *Azospirillum*, *Klebsiella* 등에 의한 협동 질소고정(associative nitrogen fixation)으로 나뉘어진다(1, 6). 이들 질소고정 미생물 중에서 특히 *Azospirillum*은 총 세균수의 1~10%를 차지하며, 크기도 1.0×3.0 μm 정도로서 다른 질소고정 미생물(0.5×1.5 μm)보다 상대적으로 크므로 bacterial biomass 측면에서 볼 때 논 토양의 비옥도 활성화에 큰 비중을 차지한다. 또한 작물의 뿌리표면이나 내부에 생존하며 대기 중으로부터 질소원을 직접 공급할 뿐만 아니라, 뿌리를 발달시켜 물과 무기염류의 흡수를 촉진하는 등 작물의 생산성 향상에도 직접 간접으로 큰 영향을 미치고 있다(8, 11). 그러나 분리된 *Azospirillum* 균주는 숙주작물의 종류나 지역에 따라서 질소고정 활성 또는 분포 등이 매우 상이하다고 보고되었다(2, 5, 9, 10, 13, 14). 한편, *Azospirillum*은 1925년 Beijerinck에 의해 무질소 액체배지의 혼합배양에서 최초로 관찰되어 *Spirillum lipoferum*이라 명명되었다. 그 후 Döbereiner는 벼나 옥수수의 근권에 서식하는 *Spirillum lipoferum*을 semisolid 무질소 배지를 이용하여 enrichment 배양으로 쉽게 분리하였고(3, 4), Tarrand와 Kreig 등도 세계 각지에서 분리한 *Spirillum lipoferum*과 유사한 균주들을 *Azospirillum lipoferum*(*S. lipoferum*)과 *Azospirillum brasilense*로

분류하였으며(12), 그 후 *Azospirillum amazonense*와 *Azospirillum halopraeferans*가 더 보고되어(4) 현재 모두 4종이 알려져 있다.

본 연구에서는 경기도 및 충청남도 일원의 벼 근권에서 서식하는 질소고정미생물 중 *Azospirillum*을 선택적으로 분리하였고 그 중에서, 질소고정 활성이 우수한 균주를 선발, 동정하였다.

재료 및 방법

배 지

벼 근권 토양에서 *Azospirillum*을 분리하기 위하여 사용한 배지는 무질소 배지[nitrogen-free malate 배지, L-malic acid 5.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 0.1 g, CaCl₂, 0.02 g, trace element solution(Na₂MnO₄·2H₂O 0.2 g, MnSO₄·H₂O 0.235 g, H₃BO₃ 0.28 g, CuSO₄·5H₂O 0.008 g, ZnSO₄·7H₂O 0.024 g, 증류수 1 l) 2.0 ml, bromothymol blue (0.5% aqueous solution in 0.2 N KOH) 2.0 ml, Fe EDTA (1.64% solution) 4.0 ml, vitamin solution (biotin 0.01 g, pyridoxin 0.02 g, 증류수 1 l) 1.0 ml, KOH 4.0 g, pH 6.8, 증류수 1 l, semisolid 배지는, 3 g agar/l)를 이용하였다. *Azospirillum*의 순수분리에는 BMS 배지 [potatoes 200 g, L-malic acid 2.5 g, KOH 2.0 g, raw cane sugar 2.5 g, vitamin solution (biotin 0.01 g, pyridoxin 0.02 g, 증류수 1 l) 2 drops, agar 15 g, pH 7.0, 증류수 1 l)를 이용하였으며, 균의 액체배양에는 succinate-malate

배지(MPSS 배지, peptone 5.0 g, succinic acid 1.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002 g, pH 7.0, 증류수 1 l)를 이용하였다 (7). 토양시료 채취

벼의 생육이 제일 왕성한 7월 중순에 경기도 평택, 수원지역과 충청남도 아산지역의 농약 무처리 논을 포함한 논에서 벼뿌리를 포함한 벼 근권의 토양을 채취하여 실험에 사용하였다.

Azospirillum의 분리 및 우수균주 선발

*Azospirillum*의 분리는 Döbereiner가 고안한 선택 배지 semisolid 무질소 배지를 이용하여 실시하였다 (3). 10 ml의 semisolid 무질소 배지가 들어있는 25 ml serum vial에 토양시료 0.1 g을 넣고 면전을 한 다음 30°C에서 배양하였다. 2~3일 배양후 *Azospirillum*의 배양특성으로 알려진 흰색의 얇지만 매우 진한 pellicle이 형성되면 면전을 butyl 고무마개로 바꾸고 기상층을 10% 아세틸렌으로 치환한 후 20시간 반응시킨 다음, 아세틸렌 환원활성을 측정하여 적어도 30~100 nmol $\text{C}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{vial}$ 의 질소고정 활성을 나타내는 배양액을 다시 새로운 semisolid 무질소 배지에 계대배양 하였다.

24시간 배양후 형성된 pellicle을 1/당 20 mg의 yeast extract가 함유된 무질소 평판배지에 streaking하여 35°C에서 1주일 정도 배양후 형성된 흰색의 단일 colony를 질소고정 활성을 확인한 후 BMS 배지에서 다시 순수 분리하였다. 순수 분리한 균주중에서 400~900 nmol $\text{C}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{vial}$ 의 높은 질소고정 활성을 나타내는 균주를 우수균주로 선발하였다.

분리균주의 동정

분리균주는 Bergey's manual of systematic bacteriology (7)에 따라 배양적, 형태적, 생리적 특성을 조사하였다. 전자현미경 관찰은 MPSS 액체배지에서 자란 균주를 수확하여 2% phosphotungstic acid로 음영 염색한 다음 Philips CM20형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

질소고정 활성의 측정

질소고정 활성의 측정은 Döbereiner 등의 방법 (3)을 사용하였다. 25 ml serum vial에 10 ml semisolid 무질소 배지를 넣고 접종한 후 butyl 고무마개로 마개를 한 다음 10% 아세틸렌을 주입하였다. 30°C에서 20시간 배양후 생성된 에틸렌량을 gas chromatography (Porapak R150 column, column temp. 37°C, 20 ml N_2 gas/min, hydrogen flame ionization detector)를 이용하여 측정하였다. 질소고정 활성 단위는 각 vial에서 시간당 생성되는 에틸렌의 몰수 (nmol $\text{C}_2\text{H}_4/\text{hr}/\text{vial}$)로 표기하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 배양학적 특성

Döbereiner가 고안한 semisolid 무질소 배지는 0.3% agar를 포함하고 있어 *Azospirillum* 균주가 질소

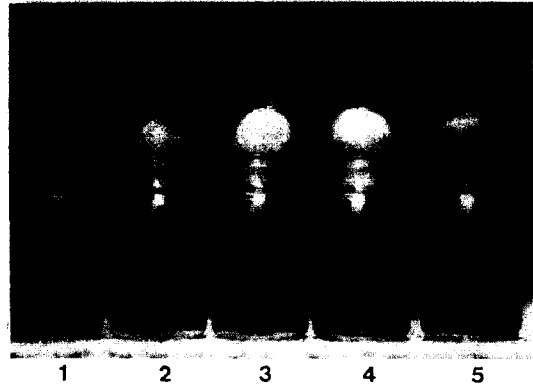


Fig. 1. Characteristic growth sequence of *Azospirillum* isolate in semisolid nitrogen-free malate media. 1) 3~4 hr after inoculation, 2) 1 day, 3) 2 day, 4) 3 day, 5) 4 day.

고정을 할 수 있는 조건인 미호기적 (0.0050~0.0075 atm pO_2) 상태가 배지표면으로부터 2~5 mm 아래 부분에 형성되기 때문에 *Azospirillum* 균주를 선택적으로 용이하게 분리해 낼 수 있었다. 이와 함께 BMS 평판배지를 이용하여 순수분리한 균주는 semisolid 무질소 배지에서 Fig. 1과 같은 *Azospirillum*의 특징적인 생육 패턴을 보였다 (4). 즉 접종 3~4시간이 경과하면 기포가 형성되며 배양 1일 후에는 풍선모양으로 부풀게 되고 3일 후에는 흰색의 진한 pellicle이 표면으로부터 2~5 mm 하부에 형성되면 서, pH의 변화로 pellicle 주변의 배지색이 녹색에서 청색으로 변화하였다. 이와 같이 semisolid 무질소 배지에서 독특한 pellicle을 형성하는 것은 다른 미호기적 질소고정 세균인 *Aquaspirillum*, *Xanthobacter*, *Rhodospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* 등과는 명확히 구별할 수 있는 *Azospirillum*과 *Herbaspirillum*의 특징으로 알려져 있다 (4). BMS 평판배지에서 배양할 때 colony는 배양 2일 후에는 convex, smooth, shiny, creamy 하다가 5일후부터는 pink, wrinkled한 형태로 변화하였다.

분리균주의 형태학적 특성

분리된 *Azospirillum* 균주들은 형태에 따라 두 그룹으로 분류되었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 MPSS 액체배지에서 24시간 배양후에는 그룹 I과 II균주들 모두 $1 \times 3 \mu\text{m}$ 크기를 나타냈으며 운동성이 있고 short, plump 모양이면서 약간 구부러지거나 직선 모양이었으나, semisolid 무질소 배지에서 48시간 배양하여 배지가 알칼리 조건으로 됨에 따라 그룹 II 균주들은 세포 모양의 변화가 없었으나, 그룹 I균주들은 직경이 $1.5 \mu\text{m}$ 로 넓어지고 $5 \mu\text{m}$ 이상 길어지며 S자 모양으로 변하는 pleomorphic 특징을 나타냈다. 이러한 pleomorphism은 *A. lipoferum*의 전형적인 특징으로서 malate의 산화로 생긴 배지의 알칼리 조

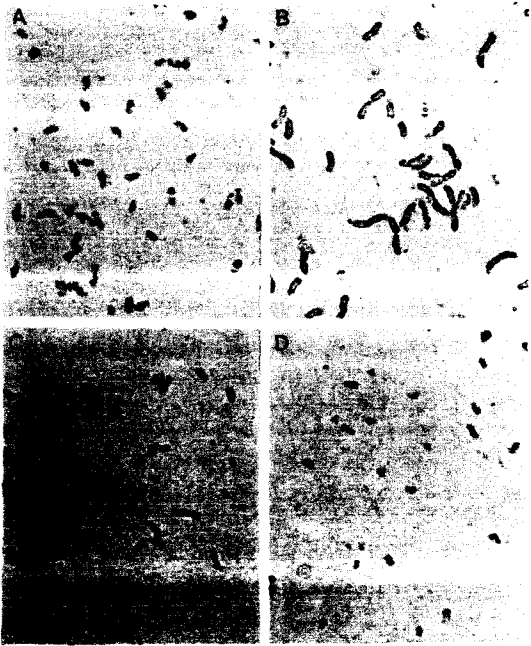


Fig. 2. Appearance of group I and group II strains of *Azospirillum* isolates. A and C, group I and group II strains, respectively, cultured in MPSS broth at 37°C for 24 hr. B and D, group I and group II strains, respectively, cultured in semisolid nitrogen-free malate medium at 37°C for 48 hr. Bar is equivalent to 10 μm.

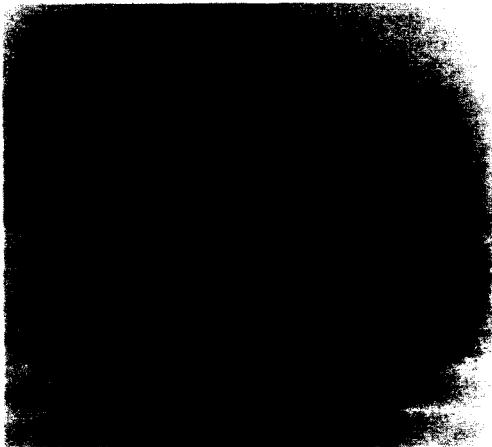


Fig. 3. Transmission electron micrograph of *Azospirillum* isolates cultured on MPSS broth at 30°C for 24 hr. The monopolar single flagellum can be seen (12000×). Bar is equivalent to 1 μm.

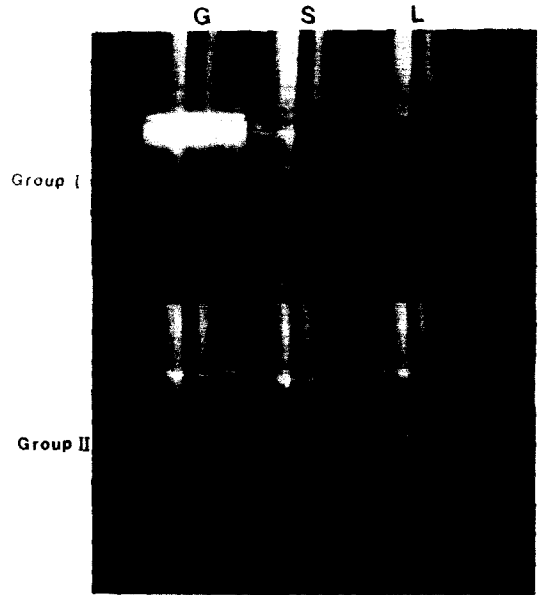


Fig. 4. Difference of growth of group I and group II strain of *Azospirillum* isolates in semisolid nitrogen-free media containing glucose (G), sucrose (S), or lactose (L) as a sole carbon source.

건과 관련된 것으로 알려져 있다(7). 또한 액체배지에서 배양한 후 편모의 형태를 조사한 결과 Fig. 3과 같이 monopolar single 편모이었다. 이것은 다른 유사한 질소고정균들인 peritrichous 편모를 가지는 *Azotobacter*나 bipolar 편모를 갖는 *Herbaspirillum*, *Rhodospirillum*과 구별되는 *Azospirillum*의 독특한 특징이다(7, 12).

분리균주의 생리학적 특징

당 이용성에서 그룹 I과 II 균주들 모두 malate와 succinate는 잘 이용하였으나, sucrose와 lactose는 이용하지 못했다. 특히 glucose의 경우 그룹 I 균주들은 배양초기에는 배지 깊숙히 pellicle을 형성하다가 3~4일 지남에 따라 배지표면으로 pellicle이 이동하면서 두꺼운 층의 생육을 보였으나 그룹 II 균주들은 pellicle을 전혀 형성하지 못하거나 매우 약하게 형성되다가 결국 퍼져버렸다(Fig. 4). 이러한 당 이용성 특성은 *Derxia gummosa*, *Aquaspirillum*, *Comamonas*, *Pseudomonas*와 구별할 수 있는 *Azospirillum*의 특성이다(7, 12). 한편 그룹 I 균주들은 biotin 요구성 이었으나, 그룹 II 균주들은 생육하는데 biotin이 필요하지 않았다.

분리균주의 질소고정 활성

분리된 *Azospirillum* 균주들은 100 nmol C₂H₄/hr/vial 이상의 질소고정 활성을 보였으며, 이중에서 400~900 nmol C₂H₄/hr/vial의 높은 질소고정 활성을 보인 균주는 Table 1에서 보는 바와 같이 15 균

Table 1. Comparative nitrogenase activity of *Azospirillum* isolates.

Isolate No.	Location	ARA ^a
19-1D-2	Asan-gun, Chungcheongnam-do	830
10D-2	Pyongtaek-gun, Kyonggi-do	725
19D-2	Asan-gun, Chungcheongnam-do	714
19D-5	Asan-gun, Chungcheongnam-do	713
11D-2	Asan-gun, Chungcheongnam-do	711
19-1D-5	Asan-gun, Chungcheongnam-do	637
21-1U-2	Asan-gun, Chungcheongnam-do	602
6D-2	Suwon-si, Kyonggi-do	598
19D-5	Asan-gun, Chungcheongnam-do	562
3D-1	Suwon-si, Kyonggi-do	598
18-1D-5	Asan-gun, Chungcheongnam-do	543
20-2D-2	Asan-gun, Chungcheongnam-do	562
4-1D-2	Suwon-si, Kyonggi-do	462
19D-3	Asan-gun, Chungcheongnam-do	421
19-1D-3	Asan-gun, Chungcheongnam-do	420

^aAcetylene reduction activity measured as nmol C₂H₄ per hour per vial.

Table 2. Characterization of *Azospirillum* isolates.

	Isolates of group I	Isolates of group II
cell width (μm)	1.0-1.5	1.0-1.2
colony type on potato media	pink, raised curled	pink, raised curled
biotin requirement	+	-
use of glucose	+	-
use of sucrose, lactose	-	-
use of malate, succinate	+	+
pleomorphic cells in alkaline media	+	-

주이었다. 한편 논 토양시료에 따라서 분리균주의 수와 분리균주의 질소고정 활성에 큰 차이가 있었다. 특히 채취한 총 21지역의 시료중에서 3년간 농약 무처리 논에서 채취한 시료에서는 질소고정 활성이 가장 높은 19-1D-2균주를 비롯해서 19D-2, 19D-5, 19-1D-5, 19D-1, 19D-3, 19-1D-3 균주 등 총 7균주들이 분리되었다 (Table 1).

분리균주의 동정

분리균주들은 semisolid 무질소 배지에서 *Azospirillum*의 독특한 생육패턴인 흰색의 진한 pellicle을 형성하였고, BMS 평판배지에서 pink, wrinkled한 형태의 colony를 보였고, 탄소원으로 malate와 succinate를 잘 이용하였다. 또한 이 분리균주들은 vibrioid 형태로 액체배양시 monopolar single 편모를 가지고 강력한 질소고정 활성을 나타내었다. 이상의 결과로부터 본 균주를 *Azospirillum*으로 동정하였다 (7). 또한 이 *Azospirillum* 균주들은 생리적, 형태적 특성에 따라 Table 2와 같이 두 그룹으로 분

Table 3. Systematic position of the isolates.

Group of strain isolated	Isolate designation	Species
Group I	19-1D-2; 10D-2; 19-1D-5 6D-2; 3D-1; 19-1D-3	<i>Azospirillum lipoferum</i>
Group II	19D-2; 19D-5; 11D-2 21-1U-2; 19D; 18-1D-5 20-2U-2; 4-1D-2; 19D-3	<i>Azospirillum brasilense</i>

류되었다. 즉 그룹 I 균주들은 탄소원으로 glucose을 잘 이용하는 반면 그룹 II균주들은 전혀 이용하지 못하였고, 그룹 I 균주들은 biotin 요구성이었으나 그룹 II균주들은 biotin 비요구성이었다. 또한 semisolid 무질소 배지에서 48시간 배양하여 배지의 pH가 알칼리조건으로 됨에 따라 그룹 I 균주들은 운동성이 없어지고 vibrioid 형태에서 좀 더 길어지면서 S 모양으로 변한 반면, 그룹 II 균주들은 원래의 모양과 운동성을 그대로 유지하는 등의 뚜렷한 차이점을 나타냈다. 이상의 결과로부터 Bergey's manual에 근거하여 그룹 I 균주들은 *Azospirillum lipoferum*으로 그리고 그룹 II 균주들은 *Azospirillum brasilense*으로 각각 동정하였다 (Table 3). 본 연구에서 우수균주로 분리되어 *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*로 각각 동정된 균주들은 벼와 *Azospirillum*간의 상호작용 연구나 질소고정 유전자 연구 재료로 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Bally, R., D. Thomas-Bauzon, T. Heulin, J. Balandreau, C. Richard, and J. Deley, 1983. Determination of the most frequent N₂-fixing bacteria in a rice rhizosphere. *Can. J. Microbiol.* 29, 881-887.
- Cho, M.J., K.Y. Kang, S.M. Kang, and H.D. Yun, 1987. Characterization of *Azospirillum* spp. isolated from Korean paddy roots. *Kor. J. Microbiol.* 25, 129-136.
- Döbereiner, J., I.E. Marriel, and M. Nery, 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22, 1464-1473.
- Krieg, N.R. and J. Döbereiner, 1987. Taxonomic differentiation of *Azospirillum* from other genera, p. 4-14. In J. Döbereiner and F. O. Pedrosa(ed.), Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Science Tech, Inc., Madison.
- Elmerich, C., 1984. Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants. *Bio/Technology* 2, 967-978.
- Hirota, Y., T. Fujii, Y. Sano, and S. Iyama, 1978. Nitrogen fixation in the rhizosphere of rice. *Nature* 276, 416-417.
- Krieg, N.R. and J. Döbereiner, 1984. Genus

- Azospirillum* Tarrand, Krieg and Döbereiner 1979, 79^{AL}, p. 94-103. In Krieg, N.R. and J.G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. I The Williams and Wilkins Co., Baltimore, London.
8. Y. Okon, 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for argiculture. *Trends Biotechnol.* 3, 223-228.
 9. Okon, Y., 1985. The physiology of *Azospirillum* in relation to its utilization as inoculum for promoting growth of plants, p.165-174. In P.W. Ludden, and J.E. Burris (ed.), Nitrogen fixation and CO₂ metabolism. Elsevier, New York.
 10. Patriquin, D.F., J. Döbereiner, and D.K. Jain, 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29, 900-915.
 11. Smith, R.L., S.C. Schank, J.R. Milan, and A.A. Baltensperger, 1984. Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the N₂-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1331-1336.
 12. Tarrand, J.J. and N.R. Krieg, 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group. *Can. J. Microbiol.* 24, 967-980.
 13. Umali-Garcia, M., D.H. Hubell, M.H. Gaskins, and F.B. Dasso, 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 219-226.
 14. Yoav, B., Hanna, L., and I.V. Orit, 1987. The fate of field-inoculated *Azospirillum brasilense* Cd in wheat rhizosphere during the growing season. *Can. J. Microbiol.* 33, 1074-1079.

(Received February 22, 1994)

(Accepted March 4, 1994)

ABSTRACT: Isolation and Microbiological Characterization of *Azospirillum* from the Rhizosphere of *Oryza sativa* L. in Korea

Kim, Won-Gon, Hyun-Chang Seo¹, Jong-Pyung Kim, Chang-Jin Kim, Ke-Ho Lee², and Ick-Dong Yoo* (Genetic Engineering Research Institute, KIST, Daejeon 305-600, ¹Department of Food and Nutrition, Shingu Junior College, Sungnam 462-743, Kyonggi-do, and ²Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Suwon 441-744, Kyonggi-do, Korea)

Fifteen strains of the nitrogen fixer *Azospirillum* were isolated from the rhizosphere of rice collected from Kyonggi-do and Chungcheongnam-do in Korea. They had strong acetylene-reducing activity of 400 to 900 nmol C₂H₄ per hour per vial and had a similar morphology in succinate-malate medium: vibrioid cells having a diameter of 1.0 μm and a monopolar single flagellum in liquid media. According to their physiological and morphological characteristics, they were divided into two distinct groups, group I and group II. Group I strains were, unlike group II, distinguished by their ability to use glucose as a sole carbon source in nitrogen-free medium, requirement for biotin, and formation of wider, longer, and S-shaped cells in semisolid nitrogen-free malate medium. On the basis of their characteristics, strains belonging to group I were identified as *Azospirillum lipoferum*, while those belonging to group II were identified as *Azospirillum brasilense*.