

韓國產 *Rhodopseudomonas* sp. 의 分離 및 同定

吳 德 鐵·李 賢 順

(成均館大學校 理工大學 生物學科)

Isolation and Identification of *Rhodopseudomonas* sp. in Korea.

OH, Duck Chul, and Hyun Soon LEE

(Dept. of Biology, Sung Kyun Kwan Univ.)

ABSTRACT

This work was designed to study the species belonging to Family Rhodospirillaceae in Korea.

The species of *Rhodopseudomonas palustris* and *R. gelatinosa* were isolated and identified. The utilization of various substrates such as malate, succinate, citrate, pyruvate, propionate and acetate were tested with isolated KS 007 and KS 016.

Though there were some differences according to nitrogen source in media it was thought that the intermediates of TCA cycle were comparatively good substrates. Also it was confirmed that isolated strains have the ability of nitrogen fixation.

緒 論

Photosynthetic nonsulfur purple bacteria는 처음 Molish(1907)에 의해서 *Athiorhodaceae*라고 불리웠고 지금까지 여러 사람들에 의해 3屬 13種이發表되어 있다. (Hama, 1933; Kluyver & van Niel, 1936; van Niel, 1944; Duchon & Douglas, 1949; Drews & Giesbrecht, 1966; Pfennig, 1969; Hansen & Veldkamp, 1973). Athiorhodaceae라는用語는 Pfennig와 Trüper(1971)의 주장에 따라 지금은 *Rhodospirillaceae*라고 대체되어 사용되고 있다.

이科에屬하는細菌들은光合成作用을한다는事實以外에도 Kamen과 Gest(1949)에 의해서大氣中の질소를고정할수있다는 사실이 밝혀지고, 질소 고정제의 제문제에서도 다른細菌이나 남조류와 함께 실험재료로 사용되었다(Schick, 1971; Bulen

et al., 1965; Wilson *et al.*, 1947; Munson *et al.*, 1969).

本實驗은 一次的으로 韓國產 *Rhodospirillaceae*의 未記錄種을 分離, 同定하였고, 질소고정 능력을 확인하였기에 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料 및 培養

1972年 10월부터 1973年 6월까지 서울 창경원 연못(깊이 1~1.5m)의 물과 밑바닥을採取하여, 섞어 흔들어 혼탁된 흙탕물을材料로 하였다. 培養은 van Niel(1944)과 Pfennig(1969)의 方法을 改良하였다. 즉 NH_4Cl 1g, K_2HPO_4 0.5g, MgCl_2 0.2g, NaCl 1g, NaHCO_3 2g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1g, 증류수 1000ml을 基本 無機培地로 定하고, 여기에 yeast extract 1g, peptone 1g을 첨가하고, ethyl alcohol, acetate, malate, prop-

ionate 등의 基質을 各各 0.3% 되게 넣었고 pH를 7.0으로 조절하여 集積培養法의 培養液으로 하였다. 이 培地를 滅菌한 硝子시린더(직경 3cm, 높이 30cm)에 가득 채우고, 위의 材料를 5cc가량 接種한 다음 비닐로 硝子入口를 密閉한 後 白熱燈(60~100watt)을 一列로 배열하여 켜놓은 옆에(조도 2,000Lux) 安置하여 培養하였는데 이때의 溫度는 29°~34°C로 하였다. 以上の 方法으로 3~4日 경과하면 完全히 培養液이 赤紫色으로 變하여 肉眼으로도 豊富히 증식되었음을 알 수 있었고 光學顯微鏡으로 쉽게 確認할 수 있었다.

2. 純粹分離

1에서 使用한 培地에 2%寒天을 첨가하여 試驗管에 넣고 滅菌한 후 寒天이 굳어지기 前에 集積培養法에서 白金針으로 잘 저어 接種한 後 寒天이 完全히 굳고나면 그 위에 液體과라핀 對 固體과라핀을 1:1(v/v)로 녹여 混合한 것을 약 1cm 높이로 부어서 굳혀서 酸素의 통과를 차단하였다. 이들 試驗管을 1의 方法과 같은 條件으로 培養하여 約 3~5日이 經過하면 赤紫色 혹은 黑褐色의 集落이 볼록렌즈 모양으로 培地 全部位에 흩어져 發生하였었다. 이것을 계속 1週 日間 培養한 後 分離해서 準備된 1의 培地에 하나씩 넣어 다시 液體培養한 後 純粹分離를 正確히 하기 爲하여 再次 寒天培地에 移植하여 分離한 것을 液體培養하였다.

3. 同 定

2에서의 方法으로 20個의 純粹分離한 strain을 얻고 各 韓國產 strain을 (Korean Strain) KS001부터 KS020까지 번호를 붙였다. 同定은 主로 Bergey's Manual(1957)과 Pfennig 와 Trüper의 Manual(1969)을 參考했었다. 形態는 먼저 光學顯微鏡으로 觀察한 後 確實한 形態의 관찰이 必要할 時는 電子顯微鏡(Hitachi HS6)을 使用하였다. 炭素源으로서 여러가지 基質의 試驗은 1에

서의 基本 無機培地에다 trace element (Drews, 1968)와 비타민(thiamine, nicotinic acid, biotin, *p*-aminobenzoic acid 各 0.0001%)을 첨가한 후 20cc 시험관으로 試驗했다. 生細胞의 吸光帶의 測定은 液體培地를 4,000rpm으로 1시간 遠心分離한 後 중류수를 첨가하여 再次 遠心分離한 후 生細胞를 수거하여, 光散亂을 막기 爲하여 適當量을 60% w/v 설탕溶液(Pfennig, 1969)에 浮遊시켜서 Beckmann DU spectrophotometer로 測定하였다.

斜面寒天培地에서의 生長能 試驗은 1의 基本 無機培地에 malate, succinate 등의 炭素源을 넣고, 비타민, trace element를 넣고 2% 寒天培地를 만들어 實驗했다.

水溶性色素의 生成與否는 液體培地를 4,000rpm으로 1시간 遠心分離하여 상등액을 관찰하였다.

4. 純粹分離菌株에 對한 培養

上記한 同定方法에 依하여 同定된 KS016 *R. palustris*와 KS007 두 種을 使用하여 질소源으로 NH_4Cl 을 넣었을 때와 N_2 gas를 넣었을 때를 區分하여, 細胞의 生長에 좋은 影響을 주는 基質을 알아보기 爲하여 試驗했다. 질소源으로 NH_4Cl 을 넣었을 때 基本 無機培地는 1과 同一하고 여기에 비타민, trace element를 넣고 pyruvate, malate, succinate, acetate, propionate 등의 基質을 각각 0.3%로 넣고 pH 7.0으로 조절하여 500ml들이 배양병에 넣어 멸균한 後 細胞를 同量씩 移植하고 恒溫水槽에 30°C로 유지하여 照度 2,000Lux로 조명하여 배양한 후 같은 날에 培養液을 同量씩 遠心分離하여 수거된 細胞量을 比較했다. 질소源으로 N_2 gas를 넣었을 때는 NH_4Cl 을 除外한 다른 培地組成은 위의 것과 同一하고, N_2 gas의 注入方法은 Schick(1971)의 方法에 따랐으며 다른 培養條件은 위와 같고, 같은 方法으로 比較하였다.

Table 1. The size and morphology of each strain

Strain	Size & Morphology	Size (μ)	Morphology
KS 001	Width	0.4-0.6	short rod
	Length	1-10	
KS 002	Width	0.6-1	ovoid, rod
	Length	1.5-10	
KS 003		"	"
KS 004		"	"
KS 005		"	"
KS 006		"	"
KS 007		"	"
KS 008		"	"
KS 009		"	"
KS 010		"	"
KS 011	Width	0.4-0.6	rod
	Length	1-10	
KS 012	Width	0.6-1	ovoid, rod
	Length	1.5-10	
KS 013		"	"
KS 014	Width	1.8-2.5	rod
	Length	1.8-3	ovoid, spherical
KS 015	Width	0.6-1.5	ovoid, short rod
	Length	1.5-10	
KS 016	Width	0.6-1	ovoid, rod
	Length	1.5-10	
KS 017		"	"
KS 018	Width	0.5-0.7	"
	Length	2-3	
KS 019	Width	1.8-2.5	Ovoid, spherical
	Length	1.8-3	short rod
KS 029	Width	0.6-1	Ovoid, rod
	Length	1.5-10	

The great variations were detected in size and morphology within a same strain and same medium.

結果 및 考察

各菌株의 形態 및 크기는 Table 1과 같다. 그中에서 KS001과 KS010은 폭이 0.4~1 μ , 길이 1~10 μ 의 짧은 桿形 또는 卵球形이며 약간 굴곡된 것도 있고, KS016은 폭이 0.6~1 μ , 길이 1.5~10 μ 의 桿形 또는 卵球形이고 屈曲된 桿形도 많이 存在하였다. 그러나 같은 培地內에서도 相當히 甚한 差異가 있었으며 共通的으로 오래된 培養에서 길이가

길어지는 경향이 있었고 鞭毛가 달려있어 運動性이 있었다(plate 1). KS001과 KS010은 二分法에 依해서, KS016은 出芽에 依해서 增殖하였다.

生理的 및 生化學的 特性은, 혐기성 배양하의 集落이나 液體培養은 KS016에 있어서는 처음에는 淡赤色이고 후에 赤紫色으로 되며 오래된 배양에 있어서는 赤褐色으로 되고, KS001과 KS010에 있어서는 처음에는 엷은 분홍색으로부터 후에는 暗赤色으로 된다.

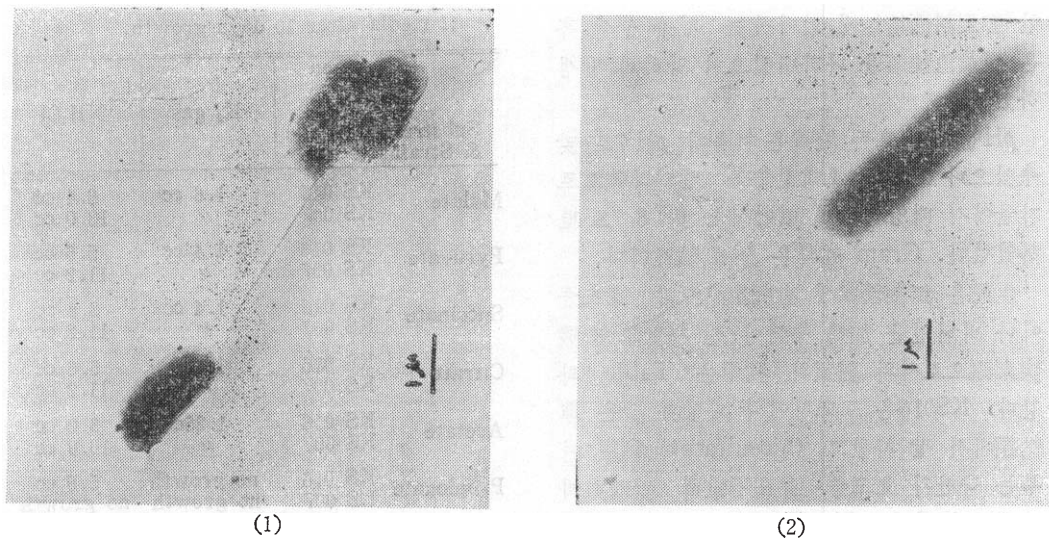


Plate 1. Electron micrographs of strain (1) KS016 and (2) KS007, magnification X8,000.

Table 2. Utilization of electron donors and organic compounds by each strains grown under the light of 2,000 Lux. and the temperature of $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$

Strain(KS)	001	002	003	004	005	006	007	008	009	010	011	012	013	014	015	016	017	018	019	020
Substrate																				
Gelatin	+	⊕	-	⊕	⊕	⊕	-	⊕	⊕	+	⊕	-	⊕	⊕	⊕	-		⊕	⊕	⊕
Tartarate	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Glutamate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Propionate	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Acetate	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Lactate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Succinate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Formate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Malate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ethanol	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Glycerol		+					+	+		+	+					+	+			
Alanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Leucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asparagin	-	+	-	-		-	+	+	+			+	+	+	+	+	-	-		-
Thiosulfate																+				

All kinds of substrates were added to a concentration of 0.3%(w/v). Almost all acids were added as sodium salts. ++=good growth, +=slow growth, -=no growth, ⊕=having more or less ability.

약간의 空氣存在下에 있어서 暗所에서 培養한 寒天斜面培地에 있어서는 전부 무색 혹은 淡黃色集落을 나타내었으며 약하게 발생하였었다.

pH변화는 모든 培養은 처음에 pH 7로 맞추었으나 時間이 오래될수록 알칼리쪽으로 기울어져 배양 8일에 있어서는 pH 8.7로 변하였었다. Gram 염색은 全部 陰性이다.

生長은 無機營養에 有機炭素源과 호모즙이나 비타민을 가해 주어야 잘 자랐고 有機炭素源으로서의 基質의 利用은 Table 2와 같다. KS016은 포도당이나 과당과 같은 單糖類에서 잘 자랐고, thiosulfate의 利用 여부는 약간의 호모즙 存在下에서 미약하게 자랐으나 역시 thiosulfate의 利用은 뚜렷하게 나타났었다. KS001과 KS010은 gelatin 배양에서 자랐었고 점성이 강하며 sorbitol, mannitol에서 잘 자랐었고 이 菌株들은 galatin을 液化했었다.

生細胞의 光合成色素의 吸光度는 KS016에 있어서 Figure 1과 같다. 이것은 bacteriochlorophyll a의 吸光度를 나타내는 것으로 380m μ , 595m μ , 810m μ 그리고 875m μ

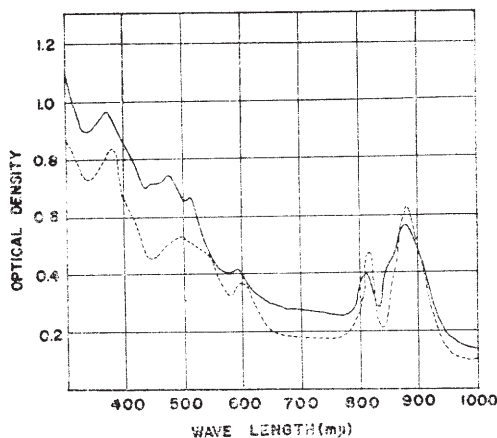


Fig. 1. *In vivo* absorption spectra of KS016 (···) and KS007(—), cells suspended in 60% sucrose solution.

Table 3. The packed volume of cells in each 1/ media after 10 days growth.

Nitrogen source		N ₂ gas	NH ₄ Cl
Substrates & Strains			
Malate	KS 016	1.6 cc	6.4 cc
	KS 007	"	13.0 cc
Pyruvate	KS 016	1.4 cc	5.6 cc
	KS 007	"	11.2 cc
Succinate	KS 016	1.4 cc	5.6 cc
	KS 007	"	11.2 cc
Citrate	KS 016	1.4 cc	5.6 cc
	KS 007	"	11.2 cc
Acetate	KS 016	1.25cc	5.0 cc
	KS 007	"	10.0 cc
Propionate	KS 016	no growth	5.6 cc
	KS 007	no growth	no growth

* In all cases initial inoculated cell volumes were 0.1cc per 1000ml medium.

의 波長에서 頂點을 나타내었고 455m μ , 480m μ 과 510m μ 은 carotinoid의 頂點을 나타냈었다.

구연산회로의 中間產物과 푸로피온산을 기질로 하였을때의 細胞의 增殖과 窒素가스 固定能의 比較를 보면 Table 3과 같다. KS 007이 無機窒素源 NH₄Cl에서 KS016보다 구연산회로 中間產物에서 2배로 잘 자랐으나 푸로피온산에서는 자라지 않았고 窒素固定能은 窒素가스存在下에서 미약하게 모든 구연산회로 中間產物에서 자랐으나 푸로피온산에서는 자라지 않았다.

以上の 結果로 考察해보면 KS016은 出芽에 依해서 增殖하고 (Pfennig, 1969; Bergey's Manual 8th. 1974) 약간의 호모즙存在下에 thiosulfate를 利用할 수 있고 제라틴 액화를 하지 않으며 유기탄소기질과 光線下에 혐기성배양으로 赤紫色으로 잘 자라며 (Table 2), 暗所에서 약간의 空氣存在下에서는 無色 또는 淡黃色으로 미약하게 자란다는 것은 Bergeny's Manual과 van Niel(1944)의 *Rhodospseudomonas palustris*에 對한 것과 一致하였다. 또한 光合成色素의 吸光度는 Fig. 1과 같이 bacteriochlorophyll a의 吸光度를 나타내었으며, 差異가 나는 것은 有機炭素源利用에 있어서 KS016은 單糖類

를 잘 이용한다는 것과 또한 糖알콜인 sorbitol을 利用한다는 것이 Bergey's Manual과 van Niel(1944)의 것과 差異가 나나, 지역적인 관계 또는 각균주의 개체차이로 생각됨으로 KS016을 *Rhodopseudomonas palustris*의 韓國菌株로 同定하고자 한다. 또한 KS016은 窒素가스固定能이 미약하나마 存在하고, NH_4Cl 을 包含한 培地에서 자란 細胞는 NH_4Cl 代身에 窒素가스를 넣어주었을 때 約 3日間の 適應期間이 必要했었고 一端 適應이된 後 새로운 培地로 옮겨서 窒素가스를 공급하면 처음부터 잘 자랐었다. 그러나 窒素源으로 N_2 가스를 공급했을 경우는 NH_4Cl 을 供給했을때보다 증식이 1/4정도로 떨어졌고, KS016의 경우 NH_4Cl 을 넣어주었을 때는 푸로피온산培地에서 잘 자랐으나 窒素가스를 공급했을 때는 자라지 않았다. 이것은 *Rhodospirillum rubrum*에 의한 窒素가스固定能은 基質에 따라서 差異가 있다는 Schick (1971)의 實驗의 結果와 거의 一致하며 이

경우에도 구연산회로의 中間產物이 窒素固定에 對해서 다른 有機炭素源보다 比較의 좋은 基質로 利用된다고 생각된다. 또한 KS016의 水溶性色素의 形成은 보이지 않으나 푸로피온산 培地에서만 형성되었다.

KS001과 KS010은 KS016과는 달리 不動性인 것을 많이 관찰했었고 제라틴에서 자라며 또한 제라틴을 액화하고 점성이 강하다는 것으로 Bergey's Manual의 *Rhodopseudomonas gelatinosa*와 一致하고 生長소가 必要하다는 것이나 혐기성으로 光線下에서 자라고 암소에서 약간의 空氣存在下에 거의 無色으로 자란다는 점, mannitol, sorbitol을 잘 이용한다는 것 (Table 2) 푸로피온산을 잘 이용하고 역시 구연산회로의 中間產物인 malate, succinate를 잘 利用한다는 것이 Bergey's Manual과 一致되나, KS001과 KS010은 formate를 利用하지 않는다는 것이 차이를 나타내나 이것을 一次的으로 *Rhodopseudomonas gelatinosa*로 同定하고자 한다.

摘 要

本實驗은 창경원 연못에 살고 있는 光合成 細菌 中 一次的으로 두가지 균주를 分離同定하였는데 KS016은 出芽에 依해서 증식하고 thiosulfate를 利用한다는 점으로 *Rhodopseudomonas palustris*로 同定하고, KS001과 KS010은 不動性의 菌이 많이 存在하고 점성이 強하고 gelatin에서 잘 자라고 또한 gelatin을 液化한다는 것으로 *Rhodopseudomonas gelatinosa*로 同定한다. 또한 KS016과 KS007에 대한 炭素基質에 따른 窒素固定能을 관찰하여 구연산회로의 中間產物を 基質로 하였을때 窒素固定能을 보였으나 NH_4Cl 질소원에 依한 生長과 비교했을 때는 1/4정도 밖에는 안되고 푸로피온산에서는 질소고정능을 나타내지 않았다.

引 用 文 獻

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. 1974.
2. Bulen, W.A., R.C. Burns, J.R. Le Comte, 1965. Nitrogen fixation: Hydrosulfite as electron donor with cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 53, 532-539.
3. Drews, G. and P. Giesbrecht, 1966. *Rhodopseudomonas viridis* nov. spec., ein neu isoliertes, obligat. phototrophes Bakterium. *Arch. Mikrobiol.* 53, 255-263.
4. Drews, G., 1968. *Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler*. Springer Verlag. Berlin.
5. Duchow, E., and H.C. Douglas, 1949. *Rhodomicrobium vannielii*. A new photoheterotrophic bacteria. *J. Bacteriol.* 58, 409-416.

6. Fogg, G.E., 1965. Nitrogen fixation by photosynthetic organism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **7**, 51-70.
7. Hama, T., 1933. Studien über eine neues *Rhodospirillum* aus Yumoto bei Nikko. *J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B., Div 2, Bot.* **1**, 135-155.
8. Hansen, T.A., and H. van Gernerden, 1972. Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Arch. Mikrobiol.* **86**, 49-56.
9. Hansen, T.A., and H. Veldkamp, 1973. *Rhodospseudomonas sulfidophila*, nov. spec., a new species of the purple nonsulfur bacteria. *Arch. Mikrobiol.* **92**, 45-58.
10. Kamen, M.D., and H. Gest, 1949. Evidence for a nitrogenase system in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Science* **109**, 560.
11. Kluyver, A.J., and C.B. van Niel, 1936. Prospects for a natural system of classification of bacteria. *Zbl. Bakt. Abt. 2*, **94**, 369-403 cited from Pfennig, N., Truper, H.G. 1969. Phototrophic Bacteria. GSF-Bericht M32.
12. Molish, H., 1907. Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen. G. Fisher, Jena, cited from Pfennig, N., Truper, H.G. Prototrophic bacteria. GSF-Bericht M32.
13. Munson, T.G., and R.H. Burris, 1969. Nitrogen fixation by *Rhodospirillum rubrum* grown in nitrogen-limited continuous culture. *J. Bact.* **97**, 1093-1098.
14. Pfennig, N., 1969. *Rhodospseudomonas acidophila*, sp. n., a new species of the budding purple nonsulfur bacteria. *J. Bacteriol.* **99**, 2, 597-602.
15. *Ibid.* 1969. *Rhodospirillum tenue* sp. n., a new species of the purple nonsulfur bacteria. *J. Bacteriol.* **99**, 2, 619-620.
16. *Ibid.* 1971. Personal communication cited from Schmidt, K. Carotenoids-composition and biosynthesis of the carotenoids of some strains *Rhodospseudomonas acidophila*, *Rhodospirillum tenue*, and *Rhodocyclus purpureus*.
17. Pfennig, N., and H.G. Truper, 1969. Phototrophic bacteria. GSF-Bericht M32.
18. *Ibid.* 1971. Higher taxa of the phototrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**, 1, 17-18.
19. Schick, H.J., 1971. Substrate and light dependent fixation of molecular nitrogen in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Mikrobiol.* **75**, 89-101.
20. *Ibid.* 1971. Interrelationship of nitrogen fixation, hydrogen evolution and photo-reduction in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Mikro biol.* **75**, 102-109.
21. van Niel, C.B., 1944. Culture, general physiology, morphology and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriol. Rev.* **8**, 1-118.
22. Wilson, P.W., and R.H. Burris, 1947. The mechanism of biological nitrogen fixation. *Bact. Rev.* **11**, 41-73.