KOR. JOUR. MICROBIOL. Vol. 22, No. 2, 73~76, 1984

한국산 *Rhizobium* 속의 분리 및 동정

하남주 · 안태근* · 이영록*
(삼육대학 약학과, *고려대학교 생물학과)

Isolation and Identification of the Genus *Rhizobium*

Ha, Nam-Ju, Tae-Kun An* and Yung-Nok Lee*
(Dept. of Pharmacy, Sahmyook Univ., *Dept. of Biology, Korea Univ.)

ABSTRACT

From the root nodules of legumes distributed in South Korea, 74 strains of *Rhizobium* were isolated. The strains isolated were identified based on Bergey's Manual and Vincent's identification key. Following 5 species of *Rhizobium* were confirmed. *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. trifolii*, and *R. japonicum*

서 론

공생적 질소고정균인 *Rhizobium*은 특정한 종의 콩과식물과 공생하는 숙주특이성이 있다(Denarie and Truchet, 1976; Schwinghamer, 1977; Jones and Russell, 1972; Holl, 1975; Holl and La Rue, 1976). Jordan and Allen (1974)은 *Rhizobium*을 숙주특이성에 근거하여 *R. leguminosarum*. *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum*, *R. lupini* 등 6종으로 분류하였는데 이러한 *Rhizobium*의 숙주 특이성은 분류의 기준이 되고 있다.

*Rhizobium*은 콩과식물과 공생을 하여 연간 최소한 90×10^6 metric ton의 질소를 고정하는 것으로 추정되며(Hardy and Holsten, 1972), 이 량은 매년 생물에 의해 고정되는 질소량의 약 절반을 차지한다. *Rhizobium*의 이런 성질은 콩과식물의 수확량을 증진시키기 위해 농업적으로 많이 연구되었고, 최근에는 *Rhizobium*의 *nif*-gene과 nitrogenase에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.

본 연구에서는 *Rhizobium*의 질소고정에 관한 연구의 일환으로 우선 우리나라에서 재배되고 있는 콩과식물의 뿌리혹으로 부터 *Rhizobium*을 분리하여 몇몇 종을 동정하였기에 그 결과를 보고 한다.

재료 및 방법

1. 재 료

1982년 5월 부터 1982년 8월 사이에 우리나라 중부이남에서 재배하는 콩과식물을 채취하여 그 뿌리혹으로 부터 분리한 *Rhizobium*을 실험재료로 사용하였다. 채취한 콩과식물은 대한식물도감(Lee, 1980)에 의해 그 종을 동정하였다.

2. Rhizobium의 분리

*Rhizobium*의 분리는 Behringer (1973)의 방법으로 하였다. 즉 채집한 콩과식물의 뿌리혹을 눌러 균의 현탁액을 만들었다. 이 현탁액을 YMA (Yeast extract Mannitol agar) 배지에 세균 분리 조작에 준하여 평판배양하여 전형적인 *Rhizobium*의 콜로니를 순수 분리하였다. 분리한 균주들은 사면배지에 옮겨 28°C에서 5~7일간 배양한 후 5°C에서 보존하였다.

3. Rhizobium의 동정

상기 방법으로 순수분리한 균주들은 Jordan and Allen (1974)의 분류 기준과 Vincent (1970,

1981)의 방법에 의하여 속과 종을 동정하였다.

*Rhizobium*의 형태적 특징으로는 YMA배지에서의 콜로니의 크기, 모양, 상면상태, 색깔, 점액성, 그람염색, 균의 모양, 편모의 형태 등을 조사하였고, 편모의 형태는 Mayfield and Inniss (1977)의 방법으로 관찰하였다.

*Rhizobium*의 생리적 특징으로는 브로모티몰블루시험(Vincent, 1979), *Agrobacterium*과의 구분을 위한 나일블루환원시험(Skinner, 1977), 그리고 3-케토락토오스의 생성시험(Bernaerts and De Ley, 1963) 등을 하였고, pH9.5, pH45, 2% NaCl, 39°C에서의 성장여부 등을 조사하였다. 또한 *Rhizobium*의 종을 동정하기 위하여 숙주식물에 *Rhizobium*을 접종하고 뿌리혹의 형성을 확인하였다. 종이 확실한 숙주식물의 우량종자를 선택하여 발아율을 조사한 다음 Gross and Vidaver (1978)의 방법으로 종자를 소독하였다. 소독한 종자는 121°C에서 40분간 가압멸균한 Vermiculite에 심고 화분상면은 멸균한 폴리에틸렌필림으로 밀폐하여 외부로 부터의 잡균의 오염을 막으면서 빛이 잘드는 18~20°C의 Growth cabinet에서 재배하였다. 건조를 막기 위해 질소성분을 제거한 Modified Knop Solution (K_2HPO_4, 0.25g; KCl, 0.21g; $CaCO_3$, 1.0g; $MgSO_4$, 0.25g; $FeCl_3$, trace; D.W., 1*l*)을 무균적으로 관수하면서 배양한 후 뿌리혹의 형성능을 조사하였다.

결과 및 고찰

전국 일원에 걸쳐 수집한 콩과식물의 뿌리혹으로 부터 74균주의 *Rhizobium*을 분리하였다. 분리한 균주들의 숙주식물을 Table 1.에 표시하였다.

Table 1. Host legumes of the isolates.

Host legumes		Strain number of isolates
Scientific name	Common name	
Pisum sativum	완 두	5, 21, 22, 24, 27, 39, 40, 41, 56, 70,
Phaseolus vulgaris	강낭콩	15, 16, 17, 19, 34, 35, 36, 50, 54, 62, 64, 72, 74,
Medicago sativa	알파파	29, 32, 43, 44, 57, 63,
Trifolium repense	흰 토끼풀	46, 47, 48, 49, 55, 59, 66, 67,
Trifolium prapense	붉은 토끼풀	26, 30, 52, 60, 73,
Phaseolus aureus	녹 두	25, 28, 31, 33, 37, 38, 42, 45, 51, 53, 58, 61, 65, 68,
Arachis hypogaea	땅 콩	20, 23,
Glycine max	대 두	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 69, 71,

분리한 *Rhizobium*균주들은 나일블루환원 시험과 3-케토락토오스의 형성 유무 조사에 의해 일차적으로 *Agrobacterium*과 구분하였다. Skinner (1977)는 모든 *Agrobacterium*은 나일블루를 부분적으로 또는 색깔이 없는 상태로 까지 환원시키는 데 반하여 *Rhizobium*은 *R. meliloti*만이 균주에 따라 나일블루를 환원시키는 능력이 있을 뿐 그 밖의 다른 종들은 나일블루를 환원시키지 못한다고 보고하였다. 또한 *Rhizobium*은 생장속도에 따라 fast growing group과 slow growing group으로 크게 구분되는 데, 분리한 균주들을 YMA 배지상에 있어서의 콜로니의 크기 및 편모의 모양과 수효 등에 근거하에 두 종군으로 나눈 실험성적을 Table 2.에 나타내고 이들의 숙주식물에 대한 접종시험, 결과를 Table 3.에

Table 2. Characteristics of two species groups of *Rhizobium*.

species group	colony size in YMA	flagella		strain number of the isolates
		No.	form	
slow growing group	0.5~1.0	1~2	polar	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 19, 26, 30, 43, 54, 71,
fast growing group	2.5~5.0	2~6	peritrichous	16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74

Table 3. Nodulation specificity of the isolates.

host legume / strain No. of isolates	*Glycine max*	*Pisum sativum*	*Phaseolus vulgaris*	*Trifolium repense*	*Medicago sativa*
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,	+	−	−	−	−
21, 22, 24, 27, 39, 40, 41, 56, 70	−	+	−	−	−
16, 17, 34, 35, 36, 50, 62, 64, 72, 73, 74,	−	−	+	−	−
46, 47, 48, 49, 55, 59, 66, 67,	−	−	−	+	−
29, 32, 44, 57, 63	−	−	−	−	+

Table 4. Species identification of the isolates.

species	Strain number
R. japonicum	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,
R. leguminosarum	21, 22, 24, 27, 39, 40, 41, 59, 70,
R. phaseoli	16, 17, 34, 35, 36, 50, 62, 64, 72, 73, 74,
R. trifolii	46, 47, 48, 49, 55, 59, 66, 67,
R. meliloti	29, 32, 44, 57, 63,
unidentified slow growing group	15, 19, 26, 30, 43, 54, 71,
unidentified fast growing group	18, 20, 23, 25, 28, 31, 33, 37, 38, 42, 45, 51, 53, 58, 60, 61, 65, 68, 69,

나타내었다. Brockwell *et al.*, (1975)에 의하면 *Glycine max*에서 *R. japonicum*은 뿌리혹을 형성하지만 *R. lupini*는 잘 형성치 못하며 미확정된 slow growing Rhizobium은 *Glycine max*에서 보다도 *Uinga sinenis*에서 뿌리혹 형성이 양호하다고 하였으나 본 연구에서는 *R. lupini*는 확인할 수 없었다.

Table 2. 및 3.의 실험성적에 근거하여 *R. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* 및 *R. trifolii* 등 5종을 동정할 수 있었다(Table 4).

종의 기재

R. leguminosarum; YMA배지에서 성장속도가 빠르며 백색, 점성의 콜로니로서 퍼지면서 성장한다. BTB배지에서 양성반응을 나타내며 pH4.5에서도 성장이 가능하고 완두나 잠두에서 분리된다.

R. phaseoli; *R. leguminosarum*이나 *R. trifolii* 보다 작은 간균으로 YMA배지에서 성장속도가 빠르며 백색, 점성의 콜로니로서 퍼지면서 성장한다. BTB배지에서 양성 반응을 나타내며 pH 4.5에서도 성장이 가능하며 강낭콩에서 분리된다.

R. trifolii; YMA배지에서 성장속도가 빠르며 백색, 점성의 콜로니로서 퍼지면서 성장한다. BTB배지에서 양성반응을 나타내며 pH4.5에서도 성장이 가능하며 clover에서 분리된다.

R. meliloti; YMA배지에서의 성장이 fast growing group 중에서도 가장 빠르다. pH4.5에서는 극미한 성장을 하나 pH9.5에서 성장이 활발하다. BTB배지에서 양성반응을 나타내고 2% NaCl첨가 배지에서도 약간 성장하며 39°C에서도 성장이 가능하다. 나일블루를 환원하는 균주도 있으며 sweet clover나 alfalfa에서 분리된다.

R. japonicum; YMA배지에서의 성장 속도가 느리며 작은 콜로니를 형성한다. 비교적 긴 간균이며 BTB배지에서 음성반응을 나타내고 pH 4.5에서도 성장이 가능하며 대두에서 분리된다.

적 요

국내에 분포하는 콩과식물을 채취하여 그 뿌리혹으로 부터 74균주의 Rhizobium을 분리하였다. 분리한 균주는

Bergey's Manual (1974) 및 Vincent (1979, 1981)의 검색표에 따라 동정하였는 데 다음 5종을 확인할 수 있었다 : *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. trifolii*, *R. japonicum*

REFERENCES

Behringer, M., 1973. Techniques and Materials in Biology. McGraw-Hill Company. 409.

Bernaert, M. J., and J. Dey Ley, 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature* **197**. (26,) 406-407.

Brockwell, J., Diatloff, A., Grassia, A. and A.C. Robinson, 1975. Use of wild soybean (*Glycine ussuriensis* Regel and Meack) as a test plant in dilution nodulation frequency tests for counting *Rhizobium japonicum*. *Soil Biol. and Bichem.* **7**, 135.

Denarie, J., Truchet, G., and B. Bergeron, 1976. Effects of some mutations on symbiotic properties of *Rhizobium*. 47-61. In: Nutman, P.S. (ed.), Symbitic nitrogen fixation in plants. International Biological Programe. 7. London: London: Cambridge University Press.

Cross, D.C. and A.K. Vidaver, 1978. Bacteriocin like substances produced by *Rhizobium japonicum* and other slow growing rhizobia. *Appl. and Environ. Microbiol.* **36**, 936-943.

Hardy, R.W.F., and R.D. Holsten, 1972. The Aquatic Environment: Microbial transformations and water quality management implications. Environmental Protection Agency. Washington. D.C.

Holl, F.B., 1975. Host plant control of the inheritance of dinitrogen fixation in the *Pisum-Rhizobium* symbiosis. *Euphytica.* **24**, 767-770.

Holl, F.B. and T.A. LaRue, 1976. Genetics of legume plant hosts. In Proceedings of The First International Symposium on Nitrogen Fixation eds. Newton, W.E., and Nyman, C.J. 391-399. Pullman, Washington.

Jones, D.C. and P. E. Russell, 1972. The application of immunofluorescence techniques to host plant nodule bacteria selectivity experiments using *Trifolium repens*. *Soil Biol. and Biochem.* **4**, 277-281.

Jordan, D.C. and O.L. Allen, 1974. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th. ed. Williams Wilkins, 261-264.

Lee, T.B., 1980. Illustrated Flora of Korea. Hyangmoonsa, Seoul. 463-495.

Mayfield, C.I., and W.E. Inniss, 1977. A rapid, simple method for staining bacterial flagella. *Can. J. Microbiol.* **23**, 1311-1313.

Schwinghamer, E.A., 1977. Genetic aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: The microsymbiont, 577-622. In: Hardy, R.W.F., Silver, W.S. (eds.), Biology. A treatise on dinitrogen fixation, Sect. 3. New York: Wiley Interscience.

Skinner, F.A., 1977. An Evaluatoin of the Nile blue test for differentiating *Rhizobia* from *Agrobacteria*. *Jour. of Appl. Bacteriol.* **43**, 91-98.

Vincent, J.M., 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Vincent, J.M., P.S. Nutman, and F.A. Skinner, 1979. The identification and Classification of *Rhizobium*. Identification Methods for Microbiologists. 2nd. ed. 49-69.

Vincent, J.M., 1981. The genus *Rhizobium*. In: The Prokaryotes. Starr et al., Vol. 1: 818-841.