

몇가지 공생질소고정세균들의 분리와 계통발생관계분석

문윤국, 김동률, 문혜경, 김철성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《우리는 남이 한걸음 걸을 때 열걸음, 백걸음으로 달려 과학기술발전에서 하루빨리 세 계선진수준에 올라서야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 485페이지)

질소고정세균 특히 공생질소고정세균에 대한 연구를 심화시키는것은 식물들의 질소영양을 강화하고 그 생육을 촉진시키는데서 매우 중요한 문제로 나선다. 오늘 많은 나라들에서 공생질소고정세균에 대한 연구와 그 성과를 농업부문과 산림부문 등에 응용하기 위한 사업이 활발히 진행되고있으며 우리 나라에서도 적지 않은 연구[1, 2]성과들이 이룩되였다.

우리는 콩과작물들을 비롯한 여러 작물들과 몇가지 토양시료들로부터 공생질소고정세균들을 분리하고 16S rRNA염기배열분석방법으로 동정하여 그것들의 계통발생관계를 분석하기 위한 일련의 연구를 하였다.

재료와 방법

콩과작물들로부터 공생질소고정세균의 분리는 꽃피는 초시기에 비옥한 토양에서 자라는 작물의 뿌리혹과 토양을 분리원으로 하여 YMA배지와 R2A배지에서 진행[1, 3]하였는데 그 배지조성은 다음과 같다.

YMA배지: 효모엑스 1g, 만니트 10g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, NaCl 0.1g, 1% 콩고적용액 2.5mL, 우무 20g, 증류수 1L, pH 6.8~7.0.

R2A배지: 효모엑스 0.5g, 프로테오즈펩톤 0.5g, 카자미노산 0.5g, 텍스트로즈 0.5g, 가용성농마 0.5g, 피루빈산소다 0.3g, K_2SO_4 0.3g, $MgSO_4$ 0.05g, 우무 15.0g, 증류수 1L, pH 7.2.

그람염색, 현미경관찰을 통하여 그 순수성을 확인한 다음 핵산을 추출하고 PCR를 진행하였다. PCR를 위한 Taq폴리메라제(Mg^{2+} , dNTP, PCR완충액이 함께 들어있음)와 상하류프라이머들은 《TaKaRa》의것을 리용하였다.

상류프라이머(27F) 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

하류프라이머(1540R) 5'-AGA AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

PCR는 예비변성 94°C 10min→94°C 1min, 53°C 1min, 72°C 1min, 반응회전수 33회→최종늘이기 72°C 10min으로 진행하였다.

리용한 프로그램들은 ChromasPro, MEGA 4.0, Clustal-X, Primer premier, Vector NTI 등이다.

장치로는 PCR장치(《Eppendorf》), 전기영동기(《Mupid-2plus》), 광학현미경(《Olympus BX51》), 탁상원심분리기(《Eppendorf》), 랭동원심분리기(《5417R Eppendorf》), 자동회전식현탁기(《HY-1》) 등을 리용하였다.

결과 및 논의

먼저 꽃피는 초시기에 비옥한 토양에서 자라는 콩(*Glycine max* Merr.)의 뿌리혹으로부터 뿌리혹균들을 분리하고 질소고정활성과 뿌리감염률을 분석하여 1종을 선발하였다. 분리균주 <콩-32>의 질소고정활성은 $21.86\text{C}_2\text{H}_4\text{nmol}/(\text{대}\cdot\text{h})$, 뿌리감염률은 58.9%이다.

이 균주의 형태배양학적특성, 생리생화학적특성은 표 1-3과 같다.

표 1. 분리균주 <콩-32>의 형태학적특성

균주	세포의 모양	운동성	세포길이/ μm	그람물들임성	아포형성능
대조균	짧은 막대모양	+	2.0~3.0	-	-
<콩-32>	"	+	1.5~3.0	-	-

대조균 *Bradyrhizobium japonicum* CB1809(TAL379)

표 2. 분리균주 <콩-32>의 배양학적특성

균주	모양과 색깔	겉면과 자름면	직경/mm	변두리	구조	끈기	투명성
대조균	둥근형, 흰색	매끈, 볼록	2~3	매끈함	균일함	보통	불투명
<콩-32>	"	"	1~3	"	"	"	"

대조균 *Bradyrhizobium japonicum* CB1809(TAL379)

표 3. 분리균주 <콩-32>의 생리생화학적특성

조사지표	대조균 <콩-32>		조사지표	대조균 <콩-32>	
2% NaCl에서 생장	-	-	고기즙-펩톤배지에서 생장	-	-
39~40°C에서 생장	-	-	메틸렌청에 의한 염색	+	+
YMA배지에서 빠른 증식	-	-	3	-	-
YMA배지에서 알칼리생성	+	+	4	-	-
H ₂ S생성	-	-	5	-	+
뿌리혹형성능	+	+	생장pH	6	+
CRYMA배지에서 CR흡수능	-	-	8	+	+
포도당-펩톤배지에서 생장	+	+	9	+	+

대조균 *Bradyrhizobium japonicum* CB1809(TAL379)

분리균주의 순수성을 확인한 다음 핵산추출과 PCR, 전기영동을 거쳐 16S rRNA염기배열분석[2]을 진행하였다.

콩뿌리혹균 <콩-32>의 16S rRNA염기배열분석결과는 그림 1과 같다.

다음 같은 방법으로 헤아리벤티(*Vicia villosa*)의 뿌리혹으로부터 뿌리혹균 1종을, 전청(*Sesbania cannabina*)의 줄기혹으로부터 줄기혹균 1종을 분리하였다.

또한 팔숙(*Phaseolus*)의 강남콩 *Phaseolus coccineus*, 말굴레풀숙(*Vicia*)의 보라콩 *Vicia faba*, 층층부채꽃속(*Lupinus*)의 흰층층부채꽃(루핀) *Lupinus albus*, 꽃자리풀속(*Medicago*)의 자주꽃자리풀 *Medicago sativa*, 단너삼속(*Astragalus*)의 자운영 *Astragalus sinicus*, 아카시아나무속(*Robinia*)의 아카시아나무 *Robinia pseudoacacia*의 뿌리로 부터 뿌리혹들을 채취하고 직경이 5mm이상, 질량이 0.1g이상인 뿌리혹들을 선발하여 공생질소고정세균들을 분리하였다.

한편 강냉이뿌리권토양시료로부터 *Rhizobium radiobacter*, 북극토양시료로부터 *Rhizobium herbae*, 아카시아뿌리권토양시료로부터 *Mesorhizobium amorphae*, 콩뿌리권토양시료로부터 *Sinorhizobium fredii*와 *Mesorhizobium loti*를 각각 1종씩 분리하였다.

TGATCCTGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGCGTAGCA
ATACGTCAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTACCTTTTGGTTCGGAACAACACAG
GGAACTTGTGCTAATACCGGATAAGCCCTTACGGGGAAAGATTTATCGCCGAAAGATCGGCC
GCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAG
AGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGGACAATGGGGGCAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTT
GTAAAGCTCTTTTGTGCGGGAAGATAATGACGGTACCGCAAGAATAAGCCCCGGCTAACTTCGT
GCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGC
GTAGGCGGGTCTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCTTTGATACT
GAGGATCTTGAGTTCGGGAGAGGTGAGTGGAAGTGCAGGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT
CGCAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCCCGATACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGCCGTTAG
TGGGTTTACTCACTAGTGGCGCAGCTAACGCTTTAAGCATTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAA
GATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAC
GCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCAGGACCGGTCGAGAGATGTGACCTTCT
CTTCGGAGCCTGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCGTCCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAG
ACTGCCGCTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGATGCTAAGGGGCGACCCTTCGCAAATCT
CAAAAAGCCGTCTCAGTTTCGATTGGGCTCTGCAACTCGAGCCCATGAAGTTGGAATCGCTAGT
AATCGTGGATCAGCACGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACC
ATGGGAGTTGGTTTTACCTGAAGACGGTGCGCTAACCCGCAAGGGAGG

그림 1. 콩뿌리혹균 〈콩-32〉의 16S rRNA염기배열분석결과

분리균주들은 YMA배지에서 자라는 속도와 알카리생성능에서 일부 차이가 있을뿐 그
형태배양학적, 생리생화학적특성이 거의 일치하였다.

분리한 균주들의 16S rRNA염기배열자료를 얻은 다음 인터넷상에서 세계 모든 세균들
의 16S rRNA염기배열자료들과 비교(사이트주소 EzTaxon server 2.1(<http://147.47.212.35:8080/>),
NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>))하여 종검색을 하였다.(표 4)

표 4. 분리한 공생질소고정세균들의 종검색결과

No.	분리원	균주	비교되는 종의 이름	상동률/%
1	전청줄기혹	〈전-361〉	<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571(T)	99.724
2	콩뿌리혹	〈콩-32〉	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110(T)	99.928
3	락화생뿌리혹	〈락-45〉	<i>Bradyrhizobium lablabi</i> LMG 25572(T)	99.715
4	락화생뿌리혹	〈락-12〉	<i>Bradyrhizobium</i> sp. DASA 35082(T)	99.776
5	헤아리벤티뿌리혹	〈헤-37〉	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370(T)	99.776
6	강남콩뿌리혹	〈강-5〉	<i>Rhizobium phaseoli</i> ATCC 14482(T)	99.932
7	보라콩뿌리혹	〈보-6〉	<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202(T)	99.872
8	루핀뿌리혹	〈루-3〉	<i>Rhizobium lupini</i> DSM 30140(T)	99.879
9	강냉이뿌리권토양	〈M14〉	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	99.335
10	북극토양	〈721〉	<i>Rhizobium herbae</i> CCBAU 83011(T)	99.697
11	자주꽃자리뿌리혹	〈자-2〉	<i>Sinorhizobium meliloti</i> IAM 12611(T)	100.000
12	자운영뿌리혹	〈자운-1〉	<i>Mesorhizobium huakuii</i> ATCC 51122(T)	100.000
13	아카시아뿌리혹	〈아-2〉	<i>Mesorhizobium robiniae</i> ACCC 14543(T)	99.968
14	아카시아뿌리권토양	〈아-10〉	<i>Mesorhizobium amorphae</i> ACCC19665(T)	100.000
15	콩뿌리권토양	〈콩-21〉	<i>Sinorhizobium fredii</i> ATCC 35423(T)	99.983
16	콩뿌리권토양	〈콩-27〉	<i>Mesorhizobium loti</i> ATCC 33669(T)	99.879

이 16개의 공생질소고정세균들의 16S rRNA염기배열 자료를 리용하여 계통발생관계를 분석하였다.(그림 2)

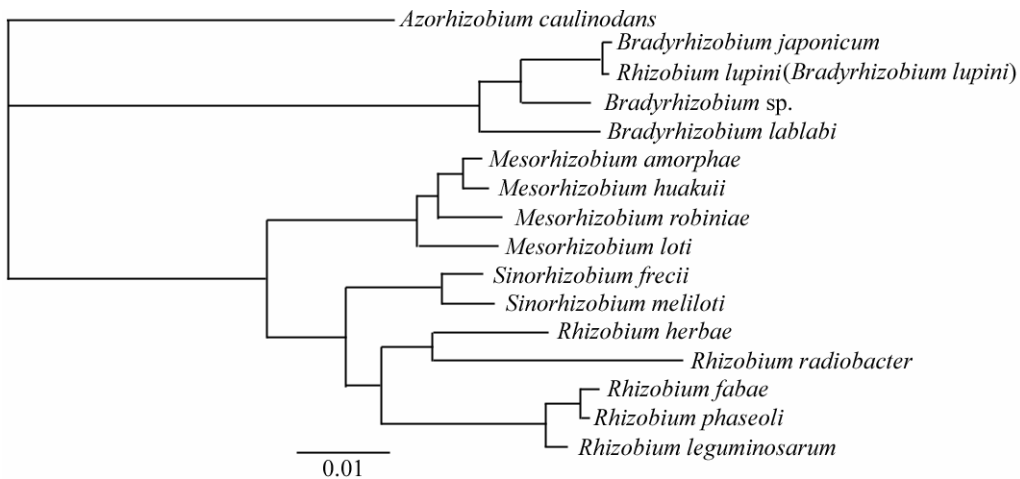


그림 2. 공생질소고정세균들의 계통발생관계

그림 2에서 보는바와 같이 *Sinorhizobium*과 *Rhizobium*속은 연이 매우 가까우며 이 2개 속은 *Mesorhizobium*과 비교적 연이 가깝다. 그리고 이 3개 속으로 된 집단과 *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*속은 서로 연이 멀다는것을 알수 있다. 한편 우리가 분리한 루핀뿌리혹균 *Rhizobium lupini*는 *Bradyrhizobium*속에 포함되어 *Bradyrhizobium japonicum*과 연이 매우 가까운것으로 나타났다. 이 공생질소고정세균들의 16S rRNA염기배열을 비교분석한 *Rhizobium lupini*의 16S rRNA염기배열은 *Bradyrhizobium*속의것들과 매우 유사하였다. 이것은 루핀뿌리혹균 *Rhizobium lupini*가 분류학적으로 *Bradyrhizobium*속에 속한다는것을 보여준다.

최근의 연구자료들을 보면 《버지계통세균학편람》 제2판[3, 4]에서도 *Rhizobium lupini*와 *Bradyrhizobium lupini*를 동종이명으로 분류하고있다.

《버지계통세균학편람》 제2판의 제2권[4](The Proteobacteria), Part C(The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria)에서는 제1강, 제6목(Class I. Alphaproteobacteria, Order VI. Rhizobiales)안에 10개의 과 즉 I. Rhizobiaceae, II. Bartonellaceae, III. Brucellaceae, IV. Phyllobacteriaceae, V. Methylocystaceae, VI. Beijerinckiaceae, VII. Bradyrhizobiaceae, VIII. Hyphomicrobiaceae, IX. Methylobacteriaceae, X. Rhodobiaceae를 두었는데 공생질소고정세균들은 이 목에 속한다.

《버지계통세균학편람》 제1판에서는 Rhizobiaceae과안에 모든 공생질소고정세균들이 속해있었지만 제2판에서는 이렇게 다시 정리하여 분류하고있다.

《버지계통세균학편람》 제2판에서 *Sinorhizobium*속과 *Rhizobium*속은 Rhizobiaceae과에, *Mesorhizobium*속은 Phyllobacteriaceae과에, *Azorhizobium*속은 Hyphomicrobiaceae과에, *Bradyrhizobium*속은 Bradyrhizobiaceae과에 속한다. 이것은 분리한 공생질소고정세균들의 16S rRNA염기배열자료에 기초하여 우리가 분석한 계통발생관계가 정확하다는것을 보여준다.

이와 같이 우리는 콩과작물에서 몇가지 공생질소고정세균들을 분리하고 그 특성들을 조사하였으며 16S rRNA염기배열분석법으로 분류학적위치를 밝히고 계통발생관계를 분석하였다.

우리가 분리한 이 균주들은 콩과목비를 장려하여 유기질비료를 많이 생산하고 풀먹는 집짐승의 먹이문제를 해결하는데서 의의를 가진다고 본다.

맺 는 말

1) 콩과작물로부터 공생 질소고정세균 16종을 분리하고 16S rRNA 염기배열 분석법으로 그 분류학적 위치를 밝혔다.

2) 분리한 공생 질소고정세균 16종의 계통발생관계 분석을 진행하고 루핀 뿌리혹균 *Rhizobium lupini*가 *Bradyrhizobium*속의 *Bradyrhizobium japonicum*과 연이 매우 가깝다는 것을 밝혔다.

참 고 문 헌

- [1] 주수한 등; 생물학적 질소고정과 질소고정균의 리용, 김일성종합대학출판사, 81~140, 주체 98(2009).
- [2] 김동률 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 2, 59, 주체 103(2014).
- [3] Michael Goodfellow et al.; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 5, Springer, 142~586, 2012.
- [4] D. J. Brenner et al.; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2, Springer, 324~574, 2005.

주체 105(2016)년 10월 5일 원고접수

Isolation of Several Symbiotic Nitrogen Fixation Bacteria and Genealogical Analysis

Mun Yun Guk, Kim Tong Ryul, Mun Hye Gyong and Kim Chol Song

We isolated and identified 16 species of symbiotic nitrogen fixation bacteria and analyzed genealogical relationship.

Key words: symbiotic nitrogen fixation bacteria, 16S rRNA, genealogical relationship