

# 數種 *Rhizobium* 의 편모에 대한 電子顯微鏡的 觀察

安慶濬·李雄植

서울대학교 師範大學 生物教育科

## Electron Microscopical Observation on the Flagella of Several Species of the Genus *Rhizobium*

Kyung-Joon Ahn and Woong-Jik Lee

Department of Biological Education, College of Education, Seoul National University  
Seoul, Korea

### Abstract

Five strains of the Genus *Rhizobium* were isolated from the nodules of five leguminous plants respectively.

They were identified according to Bergey's Manual together with the results of Vincent.

The flagella of each strains were observed by electron microscope using negative staining with PTA and metal shadowing with chromium. Five host plants and identified *Rhizobium* strains were as follows.

- Pisum sativum* .....*R. leguminosarum*
- Phaseolus vulgaris* .....*R. phaseoli*
- Trifolium repens* .....*R. trifolii*
- Glycine max* .....*R. japonicum*
- Lupinus grandiflorus*.....*R. lupini*

Electron micrographs showed that *R. leguminosarum* and *R. phaseoli* had 4 peritrichous flagella, where as *R. trifolii* had 5 peritrichous flagella.

On the other hand, *R. japonicum* and *R. lupini* had 1 subpolar flagellum.

### 序 論

*Rhizobium* 屬은 1886년 Hellriegel 과 Wilfahrt 에 의해 콩과 식물의 뿌리에 형성된 根瘤내에서 共生하면서 분자 상태의 질소를 NH<sub>3</sub> 상태로 고정시킨다는 사실이 밝혀졌고, 1901년 Beijerinck 에 의해 根瘤菌이 分離되고 命名된 후 현재에 이르고 있다(崔, 1975).

그간 많은 학자들에 의해 根瘤菌의 보다 정확한 동정실험이 이루어져 왔으며, 현재로서는 실제 응용 단계에 들어가서 *Rhizobium* 을 인공으로 대량 배양하여 土壤에 살포하는 등으로 營農에 혁신을 꾀함과 동

시에 질소비료 제조에 사용되는 막대한 에너지를 다른 분야에 사용하여 인류의 복지를 꾀하고자 하고 있다.

우리나라에서도 崔(1975) 에 의해서 土壤에서 根瘤菌이 分離, 同定되어 현재까지 알려진 6種 중에서 *R. meliloti* 를 제외한 5種이 記載되었으며, 이 중에서 優秀菌株를 選定하여 콩과 작물의 증산을 도모하고자 하였다.

박테리아의 편모 관찰은 光學顯微鏡 수준에서 특수한 染色法을 사용하여 관찰하거나(Shunk, 1921 및 Leifson, 1951). 螢光顯微鏡을 사용하여 관찰하는 방법(Bohlool 와 Schmidt, 1976), 그리고 暗視野 顯微鏡을 사용하여 觀察하는 法(Pijper, 1955) 등이 있

나, 電子顯微鏡을 사용하게 되면 위의 어떤 방법보다 해상능이 높아 더욱 고배율로 관찰할 수 있는利點이 있다.

*Rhizobium* 屬의 편모에 대한 電子顯微鏡의 研究는 1947년 Conn 과 Elord 로부터 시작하여 현재까지 몇몇 학자들에 의해 극히 산만하게 試圖되었으며, 좀더 體系的인 研究가 필요한 과제이다(Deley 와 Ras-sel, 1965).

1974년 Bergey's Manual 에 收錄된 *Rhizobium* 屬에 속하는 種은 6種으로 나와 있으나, 그 각 種의 分類 同定에는 아직도 完全한 방법이 提示되어 있지 못한 실정이고, 비슷한 몇 種끼리 모아서 같은 種으로 同定하려는 意圖까지 보이고 있는 실정이다(Moffett 와 Colwell, 1968).

이러한 점을 감안하여 *Rhizobium* 의 편모를 광학현미경 수준에서 벗어나서 전자현미경으로 관찰하는 연구를 시도하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 菌株의 分離

경기도 수원시 원예시험장에서 완두(*Pisum sativum*)와 강남콩(*Phaseolus vulgaris*)을, 경기도 양주군에서 콩(*Glycine max*), 그리고 서울시 관악구 서울대 온실에서 루피너스(*Lupinus grandiflorus*)와 토끼풀(*Trifolium repens*)을 채집하여 각각의 뿌리에서 근류를 채취하였다.

흐르는 수도물로 根瘤의 周邊을 잘 닦은 뒤, 70% ethanol에서 각 1분씩 2회, 0.2% HgCl<sub>2</sub>에서 각 1분씩 2회 根瘤周邊을 滅菌한 후, 滅菌 蒸溜수로 3회 세척하고, 화염 살균된 칼로 根瘤를 잘라서 그 斷面을 YMA(Yeast Extract Mannitol Agar; Mannitol 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, NaCl 0.1 g, CaCl<sub>2</sub> 4.0 g, yeast extract 0.4 g, D.W. 1 l)의 평판 배지에 接種하여, 28°C에서 배양하였다.

이렇게 배양된 colony에서 한 loop를 취하여, 滅菌 蒸溜수로 稀釋하여, 여기서 다시 한 loop를 취하여 YMA 平板培地에 도말하였다.

White, smooth, glistening의 특징을 가지는 colony를 YMA 斜面培地에 옮겨서 同定실험에 임하는 한편, 各 菌株의 편모에 대한 電子顯微鏡 觀察을 하였다.

### 2. 菌株의 同定

YMA 斜面培地에 옮긴 菌株들을 Bergey's Manual

(1974)과 Vincent(1968)씨 등의 同定方法에 따라 同定하였다.

同定실험으로서는,

#### (1) Gram stain

YMA 培地에서 48시간 배양하여, Hucker의 變法을 사용하여 Gram 陰性인가의 與否를 觀察하였다.

#### (2) Litmus milk test

우유를 2,000~3,000 rpm에서 15分間 遠心分離하여 脂肪을 제거한 후, 리트머스를 0.5% 내외로 첨가하여, 滅菌한 다음 菌株을 接種시켜서 28°C에서 2週동안 배양하면서, 그 醱酵產物이 acid인가, alkaline인가를 보았고, 단백질을 分解하여 pepton 化 시킴으로써 배양액의 상층부에 투명한 serum을 형성하는가 與否를 관찰하였다.

#### (3) Glucose pepton medium에서의 生長速度

Glucose 10 g, peptone 20 g, NaCl 5 g, agar 15 g, D.W. 1 l로 된 培地에서 24시간 내에 生長을 보이는가를 보았다.

#### (4) Yeast extract medium에서의 生長速度

Yeast extract 성분이 포함된 배지에서의 生長速度를 보았다.

#### (5) Nodulation test

*Rhizobium* 各 種은 콩과 식물의 종류에 따라 根瘤 形成에 限界를 나타낸다. 본 실험에서는 콩(*Glycine max*)과 완두(*Pisum sativum*)를 指標植物로 選定하여, 이의 種子를 70% ethanol로 각 1분씩 2회, 0.2% HgCl<sub>2</sub>에서 각 1분씩 2회 주변을 滅菌한 후 滅菌蒸溜수에서 3회 세척하여 이를 滅菌한 모래에 넣고, 滅菌 蒸溜수를 供給하다가, 떡잎이 나온 후부터는 질소 성분을 除去한 Modified Knop씨 배양액을 同量씩 공급하였다. Modified Knop씨 액의 組成은 다음과 같다.

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0.25 g, KCl : 0.12 g, CaCO<sub>3</sub> : 1.0 g

MgSO<sub>4</sub> : 0.25 g, FeCl<sub>3</sub> : trace, D.W. 1 l

種子를 播種한 후 2일 후에 순수 분리된 5菌株을 pH 7.0의 Phosphate buffer 6 cc에 각각 한 loop씩 떠서 稀釋한 다음, 종자의 播種 部位(花盆 한개 당 3個體)에 각각 2 cc씩 接種하여 根瘤 形成 유무를 관찰하였다.

## 3. 電子顯微鏡 試料 製作

### (1) Media

순수 분리된 5菌株을 각각 YMA 斜面培地와 YEM 組成의 液體培地의 두가지 media에 接種시킨지 12~24시간된 colony를 사용하였다.

(2) 試料支持膜

Amyl acetate 에 녹인 2% collodion 膜을 mesh 에 발은 다음, carbon coating 하여 試料를 받아서 觀察하였다.

(3) 試料 製作 方法

① Negative staining

2% PTA(Phosphotungstic acid)를 NaOH 로 pH 6.8~7.0으로 맞춘 후, 이를 slide glass 위에 한 방울 떨어뜨리고, 여기에 colony 의 상층부를 백금으로 가볍게 떠서 풀었다.

이를 mesh 에 받아서 공기 중에서 말린 후, 電子顯微鏡 JEM-50 B 로 50 KV 에서 觀察하였다.

이 때 PTA 에 염색하는 시간은 數 초~30초로 제한하였다.

② Metal shadowing

滅菌한 蒸溜水를 slide glass 위에 한 방울 떨어뜨리고 colony 의 上層部를 백금으로 떠서 풀었다.

이를 mesh 에 받아서 공기 중에서 말린 후, 이어서 眞空蒸着器(vacuum evaporator)에 넣어서 角度를 20°까지 調整하여 chromium 으로 shadowing 시켰다.

이를 電子顯微鏡으로 觀察하였다.

(4) 寫眞 撮影 및 現像

위와 같이 만든 試料를 35 mm film camera 에서 ×1,000, ×1,500, ×2,000로 觀察하여 Positype film 으로 撮影하였고, sheet film camera 에서 ×3,000, ×4,500, ×6,000로 觀察하여 Fuji Electron Microscopic Film FG(5.9 cm×4.1 cm)로 撮影하였다. Film 의 現像은 KODAK Dektol 로 하였다.

結 果

(1) 菌株의 同定

根瘤에서 菌株를 分離해 낸 콩과식물 5種은 현재

까지 報告된 6種 가운데, alfalfa 나 sweet clover 와 共生을 하고 있는 *R. meliloti*를 除外한 5種이 host specificity 를 갖는 식물이었으며, 그 各 菌株의 同定 實驗을 한 결과 Table 1과 같다.

편모의 數는 電子顯微鏡 試料 製作 過程 혹은 菌의 成長 段階에 따라 變化하는 것 등을 고려하여, 가장 보편적이고, 한 菌에 붙어 있는 最多 편모 數를 선택하였다.

Glucose peptone medium 에서는 5菌株 모두 24시간 내에 生長을 보이지 않았는데, 이 培地에서는 *R. meliloti* 만이 生長을 보인다고 報告되어 있다(Vincient, 1968). YEM 에서의 生長 속도를 보면 rapid growth 는 3~5일 내에 2~3 mm 의 colony 를 형성한 것이며 slow growth 는 1 mm 내외의 生長을 보이는 것이다.

Nodulation test 의 결과는 接種시킨 콩과식물 3개체 중, 3週 내에 모두 根瘤를 형성하면 +, 한 개체라도 형성하면 ±, 모두 형성하지 않으면 -로 表示하였다. 완두에 接種한 T-3는 3개체 중 1개체에 根瘤를 형성하였다.

(2) 電子顯微鏡에 의한 편모 觀察

*R. leguminosarum* 의 경우 Fig. 1, 2, 3에서 보는 바와 같이 4개의 편모를 peritrichous 상태로 가지고 있었으며, 그 길이는 5~6 μ 이었다.

Fig. 3은 negative stain 한 것인데 菌體의 內部構造와 細胞壁構造도 잘 볼 수 있었다. 반면에 편모는 PTA 에서의 染色時間이 지연된 탓으로 몇 군데에서는 녹아버린 것을 볼 수 있었다.

Fig. 4, 5는 *R. phaseoli* 로서 peritrichous 상태인 4개의 편모를 갖고 있었는데, Fig. 4의 경우는 비교적 정상대로 4개의 편모가 붙어 있었으며, 그 길이를 測定한 결과 5~6 μ 이었다.

Fig. 5에서는 편모가 3개 보이며, 그 폭을 측정한다

Table 1. Characters of isolated strains of Rhizobium

No. of Strains	Host Plants	Gram Stain	No. of flagella	Litmus milk test		Glucose Peptone Medium	YEM*	Nodulation test		Names of Species
				Alkali	Serum			Glycine max	Pisum sativum	
Le 15-1	<i>Pisum sativum</i>	-	4	+	+	-	R	-	+	<i>R. leguminosarum</i>
P1-2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	4	+	+	-	R	-	-	<i>R. phaseoli</i>
T-3	<i>Trifidium repens</i>	-	5	+	+	-	R	-	±	<i>R. trifolii</i>
G-3	<i>Glycine max</i>	-	1	+	-	-	S	+	-	<i>R. japonicum</i>
Lu-3	<i>Lupinus grandiflorus</i>	-	1	+	-	-	S	+	-	<i>R. lupini</i>

\* R: Rapid growth on yeast extract medium  
S: Slow growth on yeast extract medium

결과 15~18 $\mu$ 이었다.

Fig. 6, 7, 8은 *R. trifolii* 로 同定된 것으로 편모의 수는 5개로 觀察되었고 그 길이는 4~5 $\mu$ 이었다.

Fig. 6은  $\times 2,000$ 로 撮影한 것이며, 보다 낮은 倍率로 觀察할 경우 편모가 마치 가지를 친듯 보였으나, 사진에서 보면 基部쪽에서는 붙어 있으나 끝에 가서는 떨어진 모습을 뚜렷이 볼 수 있었다.

Fig. 9는 *R. japonicum* 으로, 觀察은 negative stain 에 의하였으며, subpolar 상태인 한개의 편모가 보였고, 길이는 8~9 $\mu$ 이었다.

이 菌은 液體培地에서 배양한 것으로 菌體의 모양은 다른 경우와는 대조적으로 橢圓形을 이루고 있었다.

Fig. 10, 11은 *R. lupini* 의 菌으로 모두 subpolar 상태인 한개의 편모를 볼 수 있었다. 길이를 測定한 결과 3~4였다.

### 考 察

電子顯微鏡 試料 製作에 있어서 培地는 YEM 組成의 液體培地와 斜面培地의 두가지를 썼는데, 액체배지에서는 사면배지에서와는 달리, 菌體의 形態가 變하였으며(Fig. 9), 試料를 만들어 觀察해 본 結果 편모가 거의 喪失된 상태로 보였는데, 그 原因으로는 試料 製作 過程에서 볼 때, 液體培地에서 배양된 菌이 固體培地의 경우보다, 外部 環境 즉, PTA와 같은 染色液에 급격히 接하게 됨으로써, 편모와 같은 弱한 構造物이 損傷을 입으리라는 점을 생각할 수 있었다. 그래서 이런 경우에는 일단 菌을 증류수에 풀어서 이를 mesh 에 떠서 말린 후 PTA 액을 mesh 위 에 묻혀서 염색을 시키는 방법을 취하였다.

배양시간이 지연되면 편모는 거의 상실된 상태를 보여 주었다. 이는 *Rhizobium* 의 생활사에 따르는 편모의 양상을 보면 잘 알 수 있다.

結果에서도 언급하였지만, negative stain 에 의해 菌의 内部 構造까지 觀察할 수 있다는 사실을 좀 더 研究하면 分類에 까지도 응용할 수 있으리라고 믿어진다.

한편, PTA 에 의한 negative stain 은 染色時間이 遲延되면 편모를 녹여버리며(Gray, 1973), PTA 액

이 菌체 주변에 모여서 검게 만들므로 정확한 편모의 觀察을 방해하였다.

支持膜의 狀態도 또한 중요하다. Fig. 11에서 볼 수 있는 와바 같이 菌體를 支持膜에 받아서 말리는 도중, 支持膜이 얇으면 菌 주변에 주름이 잡혀서 편모로 誤認되기 쉽기 때문이다.

### REFERENCES

Bergey's Manual for Determinative Bacteriology. 1974; Williams and Wilkins Co. Baltimore.

Bisset, K.A. 1952; Complete and reduced life cycle in *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol., 7 : 233-242.

Bohlool, B.B., and E.L. Schmidt., 1976; Immunofluorescent Polar Tips of *Rhizobium japonicum*: Possible Site of Attachment or Lectin Binding. J. of Bact., 125: 1188-1194.

Choi, Y.K. 1975; Distribution of *Rhizobium* and development of useful strain. Ann. Report of Min. of Sci. & Tech. R-75-68.

Conn, H.J. and R.P. Elrod., 1947; Concerning flagellation and motility. J. Bact., 54 : 681-687.

DeLey, J. and A. Rassel., 1965; DNA base composition, flagellation and taxonomy of the Genus *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol., 41 : 85-91.

Gray. 1973; Negative stain. Encyclopedia of Microscopy and Microtechnique: 350-353.

Leifson, E. 1951; Staining shape and arrangement of bacterial flagella. J. Bact., 62 : 377-389.

Moffett, M.L. and R.R. Colwell., 1968; Adansonian analysis of the *Rhizobia*. J. Gen. Microbiol., 51: 245-266.

Shunk, I.V., 1921; Notes on the flagellation of the nodule bacteria of leguminosae. J. Bact., 6 : 239-247.

Vincent, J. M., J. Kleczkowska, P.S. Nutman and F.A. Skinner. 1968; The Identification and Classification of *Rhizobium*. Identification Methods for Microbiologist: 51-65.



Fig. 1. *R. leguminosarum*. Metal shadowing.  
Fig. 2. *R. leguminosarum*. Metal shadowing.  
Fig. 3. *R. leguminosarum*. Negative staining.  
Fig. 4. *R. phaseoli*. Metal shadowing.

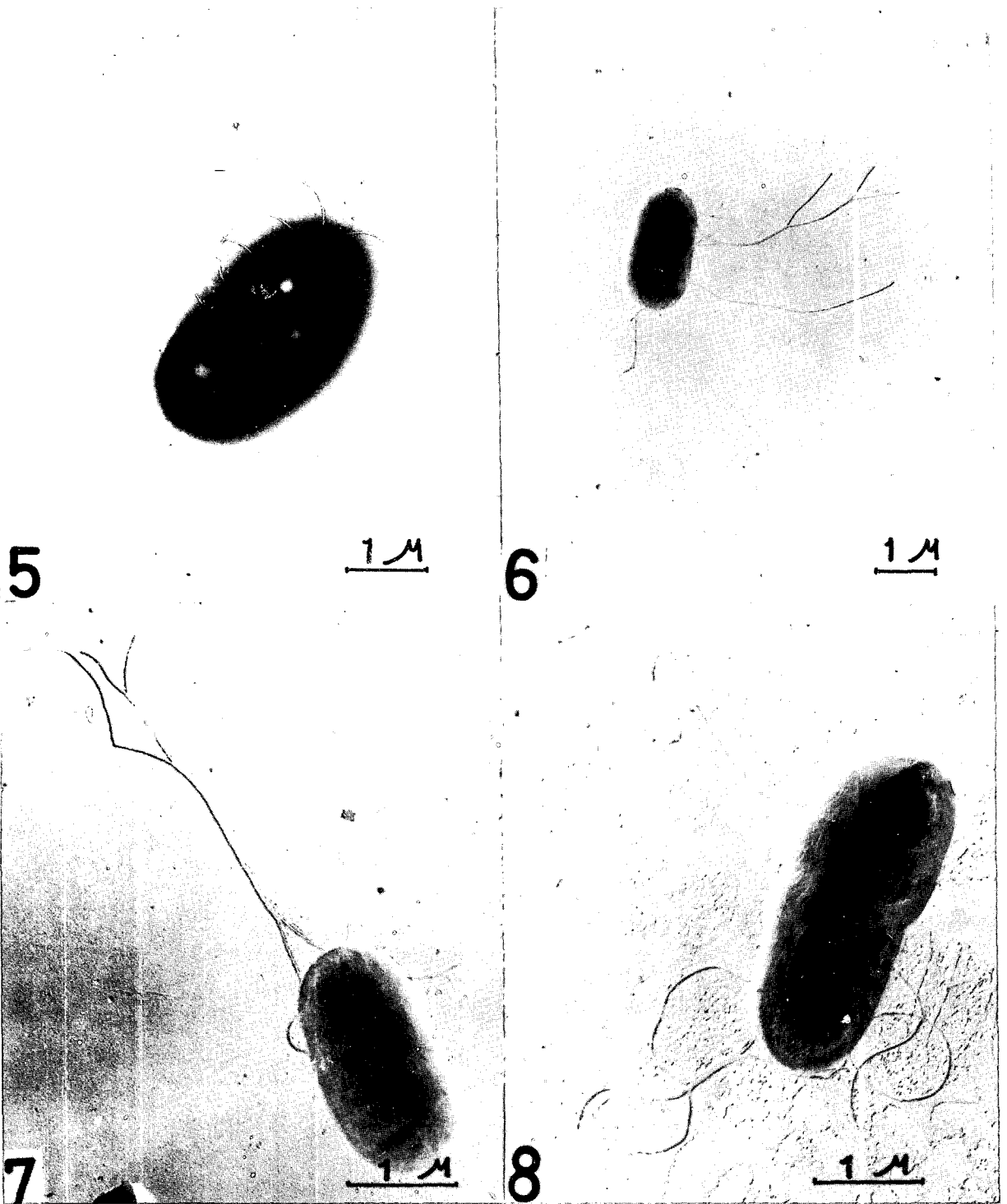


Fig. 5. *R. phaseoli*. Negative staining.

Fig. 6. *R. trifolii*. Metal shadowing. Photographed with 35mm film camera.

Fig. 7. *R. trifolii*. Metal shadowing.

Fig. 8. *R. trifolii*. Metal shadowing.

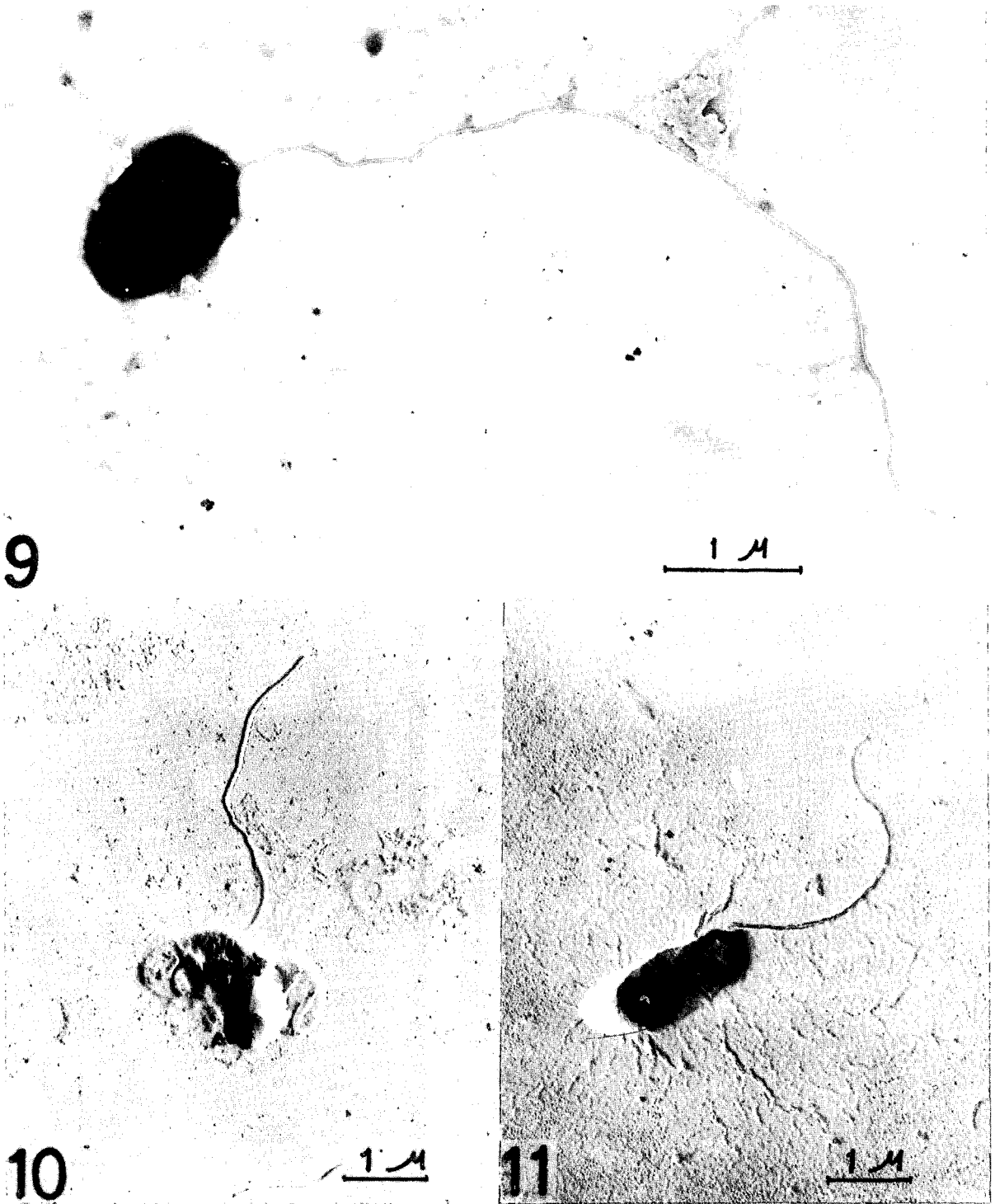


Fig. 9. *R. japonicum*. Negative staining. Submerged culture.

Fig. 10. *R. lupini*. Metal shadowing.

Fig. 11. *R. lupini*. Metal shadowing.