

## 韓國產 Rhodospirillaceae에 관한 研究

### (1) 濟州道에서 分離된 몇種의 non-sulfur purple bacteria에 관한 研究

金 京 植

## Studies on Rhodospirillaceae in Korea.

### (1) Studies on the some strains of non-sulfur purple bacteria in Jeju Do.

Kim, Kyung Sik

#### Summary

20 strains of non-sulfur purple bacteria was isolated from fresh water in Jeju Do and studied their characteristics to identify them. The strains of group 1 (strain number 1-7) are identified as *Rhodospseudomonas palustris*, the strains of group 2 (strain number 8-10) as *R. capsulata* which is reported for the first time in Korea and the strains of group 3 (strain number 11-16) as *R. gelatinosa*. The strains of group 4 (strain number 17-20) seemed to be a new species of non-sulfur purple bacteria but its exact classification warrant further studies.

#### I. 序 論

Non-sulfur purple bacteria는 Pfennig와 Trüper의主張에 따라 Rhodospirillaceae로 分類되며 여기에는 *Rhodospirillum*, *Rhodospseudomonas*, *Rhodomicrobium*의 3個의 屬이 있다. 現在 Bergey's Manual (8th ed.)에는 모두 12種이 記載되어 있으나 계속 新種 및 變異種들이 發表되고 있어 (Hansen et al. 1973, Pfennig 1974, Toshio et al. 1976) 앞으로도 새로운 種들이 發見될 可能性이 매우 큰 細菌群이라 하겠다. 또한 이들을 材料로 하여 細菌性 光合成作用과 (James et al. 1967, Slater et al. 1973, Oelze et al. 1976) 一般生理現象 研究 (Pasehinger 1974) 및 廢水淨化에 利用可能性 (小林 등 1970) 등의 研究가 많이 이루어지고 있다.

韓國產 non-sulfur purple bacteria에 관한 研究는 *Rps. palustris*와 *Rps. gelatinosa*가 分離同定되었고 (吳·李 1975) 韓國產 *Rps. palustris*의 特性이 Bergey's Manual과 比較 調査된 바가 있다 (金·李 1976).

筆者는 韓國產 Rhodospirillaceae에 對한 分類學的 調査의 一環으로 濟州道 數個處의 淡水를 採取하여 20

個의 새로운 菌株를 分離한 後 그 特性들을 調査하고 同定하였다.

#### II. 材料 및 方法

##### 1. 材 料

濟州道 表善面一帶 및 西歸邑 西好里 附近의 소먹이는 물과, 天地淵瀑布 연못 등에서 淡水와 흙을 採取하여 이로부터 새로운 菌株를 分離하였다.

##### 2. 培地 및 培養條件

基本無機培地는  $KH_2PO_4$ ; 0.5g,  $K_2HPO_4$ ; 0.5g,  $NH_4Cl$ ; 0.8g,  $MgCl_2$ ; 0.4g,  $NaCl$ ; 0.4g,  $CaCl_2$ ; 0.1g에 蒸溜水를 添加 1,000ml로 하여 使用하였으며 growth factor로 yeast extract 0.1g을 添加하였다. 모든 菌株는 이 基本無機培地에 0.2%의 organic substrate를 炭素源(또는 水素供與體)으로 넣어 培養하였다. 複合培地는 蒸溜水에 0.2%의 casamino acid와 0.3%의 yeast extract를 넣어 製調, 使用하였다. 集積培養, 純粹分離, 保存培養等 모든 一般의인 培養에는 基本無機培地에 0.2%의 malate를 炭素源으로 넣은 培地와 複合培地를 並用하였다. 모든 固體培地에

는 1.5%의 agar를 添加하였으며 모든 培地의 pH는 7.0으로 調節하였다.

培養容器는 회전마개병(50ml)과 고무마개를 한 試驗管(30ml)을 使用하였다.

純粹分離는 agar shake culture를 3回 反復하여 實施하였으며 炭素源檢査는 malate 代身 表 2의 基質들 을 넣어 行하였다.

培養은 白熱電球를 켜 놓아 2,000lux의 照度 및 30℃의 溫度를 維持시킨 incubator에서 培養하였으며 暗處好氣性培養은 위의 incubator에서 白熱電球를 除去한 後 培養하였다.

### II. 結果 및 考察

#### 1. 菌株의 分離

各 地域에서 採取하여 온 材料를 잘 흔들어 3ml씩 試驗管에 넣은 後, 液體複合培地 또는 malate를 炭素源으로 넣은 無機培地를 가득 채워 마개를 막고 이를 培養하면 2~3日 後에는 色은 赤紫色, 黃褐色. 濁한 粉紅色 등으로 變하여 肉眼으로도 豊富히 增殖이 되었 음을 알 수 있었다.

이를 檢鏡하였더니 여러 種類의 non-sulfr purple bacteria가 나타났다. 이를 3回 subculture하여 雜菌들을 除去한 後, 種에 따른 選擇의 培地를 爲하여 다시 한번 subculture를 實施하였다. 卽 *Rhodospirillum*屬의 種들을 集積培養하기 爲하여는 0.05% Pelargonate를 炭素源으로 넣은 培地에 옮겨 심어 培養하였으며, *Rhodopseudomonas*屬의 種들을 集積培養하기 爲하여는 acetate(0.2%) malate(0.2%), benzoate(0.05%)를 炭素源으로 넣은 培地들에 옮겨 심어 培養하였다 (van Niel, 1971). 이들중 *Rhodospirillum*屬의 種들은 원래 個體數가 적어 培養이 거의 안되었으나 *Rhodopseudomonas*屬의 種들의 集積培養은 2~3日 經過後, 豊富한 增殖이 이루어졌다. 이를 1.5%의 agar를 添加한 固體複合培地에 agar shake culture를 하면 赤紫色 및 黃褐色의 둥근 圓盤形態의 colony를 얻을 수 있었다. 이 colony를 떼어 내어 다시 2回 agar shake culture를 하면 純粹하게 分離된 colony를 얻을 수 있었다. 이를 각기 떼어 내어 液體複合培地에 接種하여 菌株를 얻었다.

Table 1. Characteristic features of new isolated strains.

strain No.	liquid culture colour	cell shape and size			Gram stain	morphological characteristic	agar slant culture
		shape	width	length			
1	brownish red	rod	0.5μ	1.5μ	-	dumbbell shape. star like cluster.	+
2	pink	◇	◇	◇	-	◇	+
3	◇	◇	◇	◇	-	◇	+
4	purple red	◇	◇	◇	-	◇	+
5	brownish red	◇	◇	◇	-	◇	+
6	◇	◇	◇	◇	-	◇	+
7	◇	◇	◇	◇	-	◇	+
8	yellowish brown	ovoid	0.7	2.5	-	zigzag chain	-
9	◇	◇	◇	◇	-	◇	-
10	◇	◇	◇	◇	-	◇	-
11	pink	rod	0.4	1.5	-	cell aggregation	-
12	◇	◇	◇	◇	-	◇	-
13	◇	◇	◇	◇	-	◇	-
14	red	◇	◇	◇	-	◇	+
15	pink	◇	◇	◇	-	◇	+
16	◇	◇	◇	◇	-	◇	+
17	◇	ovoid	1.5	3.0	-	large size	-
18	◇	◇	◇	◇	-	◇	-
19	◇	◇	◇	◇	-	◇	-
20	◇	◇	◇	◇	-	◇	-

Table 2. Utilization<sup>2)</sup> of single organic substrates and electron donors by new isolated strains.

strain No. substrates	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Formate	+	++	+	+	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetate	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+
Propionate	++	+++	++	+	+++	+	+++	++	++	++	++	+	++	+	++	+	+	+	+	+
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	++	-	+	-	-	-	-
Malate	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Succinate	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	++	++	+	+	++	++
Tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Benzoate	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	++	++	+	+	++	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Glycerol	++	++	++	+	++	++	++	-	-	-	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Casamino acid	++	++	+	++	++	++	+++	++	++	+++	+++	++	+	++	++	++	++	++	+++	++
Yeast extract	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+	+++	++	+	++	++	++	++	+
Thiosulfate	+	+	++	+	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin liquifaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	+++	++	+++	+++	-	-	-	-

2) Growth response : +++; good growth, ++; moderate growth, +; poor growth, -; no growth.

2. 菌株別 特性 및 同定

새로이 分離된 20個의 菌株은 모두 Gram陰性 反應을 나타내었고 또한 桿菌形態를 나타내었으므로 *Rhodospseudomonas*屬임을 알 수 있었다. 이들중 같은 特性을 나타내어 同一한 種으로 同定이 된 것은 함께 묶어 모두 4個의 group으로 나누었다.

1) 第一群 菌株(1번~7번 菌株)

모두 뚜렷한 桿菌形態를 나타내었고 pH 7이하의 培地에서도 *Rps. capsulata*나 *Rps. spheroides*처럼 球形으로 變하지 않았으며(van Niel, 1944), 活潑한 運動性을 가진 것으로 보아 鞭毛가 있음을 알 수 있었다.

크기는 폭이 0.5 $\mu$ m~0.8 $\mu$ m, 길이가 1.5 $\mu$ m~3 $\mu$ m이며 菌株間의 差異는 거의 없었다. 한편, 아령 形態의 細胞들이 많이 나타나는 것으로, 出芽에 依한 增殖을 하는 것을 알 수 있었다(Bergey's Manual 8th ed).

또한 星狀의 cluster가 많이 나타나며 오래된 培養液에서는 5~8 $\mu$ m 以上の 長이를 가지고 分枝를 한 細胞들도 많이 나타났다(表 1). 일단 cluster를 形成하면 運動性이 없어지는 것으로 미루어 鞭毛가 붙은 쪽으로 서로 結合됨을 알 수 있었다. (Bergey's Manual 8th ed.).

液体培養液의 色은 赤紫色, 粉紅色, 갈은 褐色등으로 菌株마다 差異를 나타내었으며(表 1), 炭素源으로 使用되는 基質檢査에서는 他菌株와는 달리 formate, benzoate, thiosulfate를 炭素源으로 넣은 培地에서 生長을 나타내었는데(表 2) 이는 *Rps. palustris*의 特徵인 것이다(Bergey's Manual 8th ed). 以上の 特性들로서 이 群은 *Rps. palustris*로 同定할 수 있으며 지금까지 이루어진 研究들(吳·李 1975, 金·李 1976)로 보아서 國內에 가장 많이 存在하는 non-sulfur purple bacteria 임을 알 수 있었다.

2) 第二群 菌株(8번~10번 菌株)

大部分 桿菌形態를 나타내나 球形, 卵形의 것들도

자주 나타났으며 특히 pH7 이하의培地에서는球形의 것들이 더 많이存在하였다(表 1). 이들은 앞의群들보다運動성이弱하나新鮮한培養液에서는活潑한運動성이 나타나는 것으로 보아 이들도鞭毛를 가지고 있음을 알 수 있었다. 크기는 폭이  $0.5\mu\text{m}\sim 1.2\mu\text{m}$ , 길이가  $2\mu\text{m}\sim 2.5\mu\text{m}$ 인 것들이 가장 많았으며菌株間の差異點은發見할 수 없었다. 특히 4~5個의細胞가 서로 연결되어 지그재그形態로 사슬을 이루는 것들이 많이 나타났는데 이는 *Rps. capsulata*의獨特한形態의特性이다.

液体培養液의色은 주로黃褐色이 많았으며菌株間の差異點은別로 없었다(表 1).炭素源으로 사용되는基質에對한檢査에서는 다른菌株들과는 달리 Carbohydrate類 즉 fructose와 glucose를 잘利用하였으며 ethanol과 glycerol을炭素源으로 한培地에서는 거의生長이 이루어지지 않은 것으로 보아 alcohol類는利用하지 못하는 것을 알 수 있었다(表 2). 이러한生理的特性 또한 *Rps. capsulata*의特徵적인 것이다(Bergey's Manual 8th ed.).

以上の特性들로 보아서 이들은 *Rps. capsulata*로同定할 수 있겠으며 이는 아직國內에서는分離된 바가 없는種이다.

### 3) 第四群 菌株(11번~16번 菌株)

모두桿菌形態를 나타내었으며 pH7이하의培地에서도球形으로變하지 않았다.培養初期에는運動성을 볼 수 있으나 1日정도經過하면細胞들이 크게 뭉쳐서運動성은 완전히 없어졌다. 이러한培養液은 다른菌株들과는 달리粘性을 나타내었다. 이와같은粘性의原因은細胞들이 서로不規則하게 뭉쳐서運動성을 잃었기 때문인 것으로 알려져 있으며 이는 또한 *Rps. gelatinosa*의特徵이다(Bergey's Manual 8th ed.)

液体培養液의色은粉紅 및褐色으로菌株間に약간의差異를 보였다(表 1).炭素源으로 사용되는基質檢査에서는他菌株와는 달리 citrate와 manitol을利用할 수 있는菌株들이 있었으며 특히 이들은 모두 gel-

atin을液化시키는能力이 있었다.以上の特性으로 이들이 *Rps. gelatinosa*임을 알 수 있었다.

### 4) 第四群 菌株(17번~20번 菌株)

이들은卵形에 가까운桿形을 나타내었으며大部分 2개씩 짝지어 있어雙球菌에 가까운形態를 나타내었다. 특히 이들은 다른菌株들보다 크기가 훨씬 컸었다. non-sulfur purple bacteria보다 크기가 크고生理的特性이 다른細菌群보다 가장 가까운細菌群인 sulfur purple bacteria와 그 크기가 비슷하나形態의으로는 sulfur granule이 없었으며生理的으로는 sulfide와 thiosulfate를利用하지 못하고 sulfur가 포함되지 않은複合培地에서 잘 자라는 것으로 보아 sulfur purple bacteria는 아닌 것 같으며 non-sulfur purple bacteria中細胞의 크기가 가장 큰 *Rps. acidophila*와도 크기가 비슷하나 *Rps. acidophila*가 가장 잘 자라는 succinate를炭素源으로 하고 pH가 5.8인培地에서(Pfennig 1969)生長이 매우 늦은 것으로 보아 *Rps. acidophila*와도差異를 보였다.

以上の特性들로 보아新種일 가능성이 매우 크나보다廣範圍하고細密한形態的,生理的特性研究이 이루어지기前에는決定지을 수 없는 것으로 생각된다.

## IV. 摘 要

濟州道內 몇 곳의淡水를採取하여 non-sulfur purple bacteria 20 菌株를分離하고 이들의特性들을調査하여同定하였다. 그決果를要約하면 다음과 같다.

(1) 第一群菌株는 *Rhodopseudomonas palustris*로同定되었다.

(2) 第二群 菌株들은 *R. capsulata*로同定되었으며 이는韓國에서 처음으로分離되었다.

(3) 第三群 菌株들은 *R. gelatinosa*로同定되었다.

(4) 第四群 菌株들은 새로운 non-sulfur purple bacteria로 추측되나 확실한同定은 할 수 없었다.

## 引 用 文 獻

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. 1974.

Hansen, T. A. and H. Veldkamp. 1973. *Rhodopseudomonas sulfidophila*, nov. spec., a new species of the purple nonsulfur bacteria. Arch. Mikrobiol. 92: 45~58.

James, P., Rolls, and E. S. Lindstrom, 1967. Effect of thiosulfate on the phototrophic growth of *Rps. palustris*. J. Bacteriol. 94, 860~866.

金京植·李賢順, 1976. 韓國産 *Rhodopseudomonas palustris*에 관한 研究 Kor. Jour. Micro-

- biol. 14 : 167~175.
- 小林達治・小林正泰・中西弘・高橋英一, 1970. 光合成細菌による廢液の處理とその資源化(1). 日本土壤學雜誌, 41, 129~131.
- van Niel, C. B. 1944. Culture, General physiology, Morphology and Classification of the non-sulfur purple and brown rown bacteria. Bacteriol. rev. 8, 1~118.
- van Niel, C. B. 1971. Technique for the enrichment, isolation and maintenance of the photosynthetic bacteria. Methods in Enzymology Part A. 23, 3~28.
- Oelze, J. and W. Pahlks, 1976. The early formation of the photosynthetic apparatus in *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Microbiol. 108 : 281~285.
- 吳德鐵・李賢順, 1975. 韓國産 *Rhodopseudomonas* sp. 의 分離 및 同定 Kor. Jour. Microbiol 13, 24~30.
- Paschinger, H. 1974. A changed nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum* after substitution of tungsten for molybdenum. Arch. Microbiol. 101 : 379~389.
- Pfennig, N. 1969. *Rhodopseudomonas acidophila*, sp. n, a new species of the budding purple nonsulfur bacteria. J. Bacteriol. 99 : 592~602.
- Pfennig, N. 1974. *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. n, a new species of the Rhodospirillaceae. Arch. Microbiol. 100 : 197~206.
- Satoh, T., Y. Hoshimo and H. Kitamura. 1976. *Rhodopseudomonas spheroides* forma sp. denitrificans, a denitrifying strain as a subspecies of *Rps. spheroides*. Arch. Microbiol. 108 : 263~269.
- Slater, S. H. and I. Moris. 1973. Photosynthetic carbon dioxide assimilation by *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Microbiol. 88 : 213~223.