
碩士學位論文

광합성세균 *Rhodospirillum rubrum*의
무기질소원의 이용에 관한 연구

濟州大學校大學院

生物學科



姜 奉 助

1997年 12月

광합성세균 *Rhodospirillum rubrum*의
무기질소원의 이용에 관한 연구

指導教授 吳德鐵

姜奉助

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

1997年 12月

姜奉助의 理學 碩士學位 論文을 認准함



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校大學院

1997年 12月

Study on the Utilization of Inorganic Nitrogen
Sources in a Photosynthetic Bacterium,
Rhodospirillum rubrum

Bong-Jo Kang

(Supervised by Professor Duck-Chul Oh)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE



DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1997. 12.

목 차

ABSTRACT-----	1
I. 서 론 -----	2
II. 재료 및 방법 -----	4
1. 균주 및 배지-----	4
2. 접종 및 배양 -----	4
3. 성장량 측정 -----	5
4. 각 항목별 분석 방법-----	5
III. 결과 및 고찰 -----	7
1. 각기 다른질소원이 <i>R. rubrum</i> 의 성장에 미치는영향-----	7
2. <i>R. rubrum</i> 의 질소원별 이용-----	11
3. <i>R. rubrum</i> 의 성장에 따른 배지의 pH 변화-----	18
IV. 적 요 -----	22
참고문헌 -----	23

List of Table

Table 1. Changes of nitrogen compound concentration in the NaNO ₃ medium by <i>Rhodospirillum rubrum</i> .-----	13
--	----

List of Figures

Fig. 1. Growth of <i>Rhodospirillum rubrum</i> in the medium of different nitrogen sources under anaerobic and aerobic condition.-----	10
Fig. 2. Utilization of NH ₄ by <i>Rhodospillum rubrum</i> in the NH ₄ Cl medium under anaerobic and aerobic condition.-----	15
Fig. 3. Utilization of NO ₃ and production of NO ₂ by <i>Rhodospillum rubrum</i> in the NaNO ₃ medium under anaerobic and aerobic condition.---	16
Fig. 4. Utilization of NO ₂ by <i>Rhodospillum rubrum</i> in the NaNO ₂ medium under anaerobic and aerobic condition.-----	17
Fig. 5. pH changes of NH ₄ Cl medium by <i>Rhodospillum rubrum</i> under anaerobic and aerobic condition.-----	19
Fig. 6. pH changes of NaNO ₃ medium by <i>Rhodospillum rubrum</i> under anaerobic and aerobic condition.-----	20
Fig. 7. pH changes of NaNO ₂ medium by <i>Rhodospillum rubrum</i> under anaerobic and aerobic condition.-----	21

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the utilization of inorganic nitrogen sources in a photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. It was measured that the cell growth, use of nitrogen sources, consumption of total nitrogen, and change of pH of media according to cell growth. The cell growth was most abundant with NH_4Cl among three nitrogen sources regardless of aerobic or anaerobic condition. With usable nitrogen source, the cell growth were always greater under anaerobic condition than aerobic condition. *R. rubrum* used NH_4Cl and NaNO_3 , but not NaNO_2 as nitrogen source under anaerobic condition. But under aerobic condition, *R. rubrum* used all nitrogen sources. The consumption of total nitrogen by *R. rubrum* was highest in the NH_4Cl medium among three kinds of media regardless of culture conditions. The pH was increased according to cell growth. The production of nitrite from nitrate in the NaNO_3 medium was much greater under anaerobic condition than aerobic condition.

I. 서론

세균은 단백질을 합성하기 위해서 탄소 골격외에 질소와 유황 성분을 필요로 하며 RNA와 DNA합성에도 질소를 필요로 한다(김, 1995). 세균은 질소원으로서 질소가스나 질산염같은 간단한 무기화합물에서 부터 histidine, arginine 등의 아미노산이나 cytidine같은 nucleoside 등의 넓은 범위의 질소화합물을 이용할 수 있다(Merrick, 1995).

우리가 알고있는 질소대사에 관한 연구는 대부분 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* 등의 장내세균에 대한 연구에서 밝혀졌으며 (Tyler, 1978; Magasanik, 1982; Merrick *et al.*, 1982), 광합성 세균의 질소대사에 관한 연구는 질소고정에 대해 많이 이루어지고 있다(Moon, 1996; Sasikala *et al.*, 1994; Schultz *et al.*, 1985). Flores 등(1983)은 절대 광합성 세균인 *Synechococcus*는 질소원으로서 질산염과 아질산염 그리고 암모니아의 이용이 가능하다고 보고 하였으며, *Chromatium*과 *Rhodospseudomonas* 종들은 질산염이나 아질산염같은 질소화합물을 이용하지 못하는 것으로 보고되었다(Kondrat'eva, 1963). Moon 등(1996)에 의해 분리된 *Chromatium* sp는 NH_4^+ 의 첨가에 따라 N_2 고정이 억제 되었으며 첨가된 NH_4^+ 은 세균에 의해 빠르게 동화 되었으며 성장수율에 있어서도 NH_4^+ 가 첨가된 배지에서가 NH_4^+ 가 없는 배지에서보다 높게 나타났다고 보고하였다. Nagatani 등(1971)은 광합성세균을 포함한 세균은 NH_4^+ 를 Tempest 등(1970)에 의해 발견된 경로를 통해 glutamate로 합성 한다고 보고하였다. Taniguchi와 Kamen(1963)의 보고에 의하면 *Rhodospirillum rubrum*은 NO_3^- 를 동화적 환원에 의해 광합성으로 성장이 가능하다고 보고 하였다. 또한 nitrate에서의 성장은 NH_4^+ 가 공급된 배지에서의 성장과 비교하여 성장 속도가 느리다고 보고 되었다. *R. rubrum*인 경우에는 Lindstrom 등(1951)에 의해 질소 고정이 입증 되었으며, 광합성 세균의 질소 고

정은 혐기성이며 빛이 존재하는 경우에만 이루어진다고 밝혀졌다(Lindstrom *et al.*, 1951; Kamen *et al.*, 1949). 또한 *R. rubrum*의 질소고정을 위한 배양중에 NH_4Cl 을 첨가했을 때는 질소고정이 억제된다고 보고되었다(Lindstrom *et al.*, 1951; Kamen *et al.*, 1949).

비유황 광합성 세균의 일종인 *R. rubrum*은 빛이있는 조건하에서는 혐기적 광합성으로, 빛이 없는 조건하에서는 호기적 호흡으로 성장할 수 있고 (Elsden and Ormerod, 1956; Oelze and Pahlke, 1976; Thore *et al.*, 1969), 빛이 없고 혐기적인 상태에서도 탄소원에 따라 발효에 의해 성장할 수 있어서(Kohlmler and Gest, 1951; Schultz *et al.*, 1985; Schultz and Weaver, 1982; Thore *et al.*, 1969; Uffen and Wolfe, 1970) 생리학적으로 매우 흥미있는 생물로 취급되어 왔다.

본 연구는 *R. rubrum*이 빛이 있는 혐기적 조건과 빛이 없는 호기적 조건에서의 NH_4Cl , NaNO_3 , NaNO_2 등의 무기질소원을 첨가했을 때 각각의 질소원에서의 세균의 성장정도와 각 질소원의 이용정도를 알아 보고자 실시하였다.



II. 재료 및 방법

1. 균주 및 배지

실험에 사용된 균주는 *Rhodospirillum rubrum* S1(ATCC 11170)이고, 배지는 malate를 탄소원으로 한 Bose 등(1961)의 배지에서 질소원을 뺀 것을 기본 배지로 하였으며, 그 조성은 1,000mL의 증류수에 KH_2PO_4 , 600mg; K_2HPO_4 , 900 mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 75mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11.8mg; EDTA, 20mg; biotin, 15 μg ; DL-malic acid, 3g; trace element solution, 1mL(H_3BO_3 , 280mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 210mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 75mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24mg; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4mg; D.W, 100mL)이었다.

각기 다른 무기 질소원의 이용특성을 알아보기 위해 기본배지에 질소원으로 NH_4Cl (NH_4Cl 배지), NaNO_3 (NaNO_3 배지), NaNO_2 (NaNO_2 배지)를 각각 18.6mM이 되게 첨가한 후 50psi의 압력으로 헬륨가스를 1시간동안 주입하여 배지내 질소 가스를 제거하였다. pH는 1N NaOH 를 사용하여 pH7.0으로 조정 한 후 멸균하여 본 실험을 실시하였다.

2. 접종 및 배양

1). 혐기적 조건

NH_4Cl 을 질소원으로 한 배지에서 빛이 있는 혐기적 조건에서 자란 대수기의 *R. rubrum*을 5000rpm에서 15분간 원심 분리 시킨 후 pellet에 질소원을 뺀 배지를 넣어 다시 두 번 원심 분리하여 정상 배지의 질소원을 씻어낸 후 각각의 다른 질소원이 첨가된 배지에 최초의 흡광도가 0.05가 되도록 하여 접종 하였

다. 빛이 있는 조건에서의 혐기적인 배양은 투명한 20mL cap tube에 배지를 가득 채운 후 마개를 막아 혐기적으로 한후 백열등으로 4000lux로 조도를 조절하여 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 정치 배양 하였다.

2). 호기적 조건

NH_4Cl 을 질소원으로 한 빛이 없는 호기적 조건에서 자란 *R. rubrum*을 혐기적 조건과 동일하게 처리한 후 100mL의 삼각 플라스크에 각각의 배지 20mL을 넣어 silicon 마개로 막은 후 알루미늄 foil로 싸서 (Horio and kamen, 1962; Uffen and Wolfe, 1970) shaking incubator에서 150rpm, $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 조건에서 배양 하였다.

3. 성장량 측정

각기 다른 질소원에서 혐기적 및 호기적으로 배양된 세포는 24시간대별로 수확하여 spectrophotometer(HEWLETT PACKARD, 8452A DIODE ARRAY spectrophotometer)를 이용하여 파장 680 nm에서의 흡광도로서 성장량을 측정하였다(Cohen-Bazire and Kunisawa, 1960; Solaiman and Uffen, 1982).

4. 각 항목별 분석방법

각기 다른 질소원이 첨가된 *R. rubrum* 배양액을 24시간 간격으로 취한 후 5000 rpm에서 20 분간 원심분리(Heraus, Megafuge 1.0)하여 상정액을 $0.2\mu\text{m}$ membrane filter를 이용하여 여과한 후 배지의 pH, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ 및 총 질소의 농도를 측정하였다. $\text{NO}_3\text{-N}$ 과 $\text{NO}_2\text{-N}$ 은 Ion Chromatograph(Dionex, DX-5000)를 이용하여 Standard Methods (Clesceri *et*

al., 1989)에 따라 분석하였다. $\text{NH}_4\text{-N}$ 은 인도페놀법으로 630nm에서 spectrophotometer(HEWLET PACKARD, 8452A DIODE ARRAY spectrophotometer)를 이용하여 측정 하였으며, 총 질소의 농도는 220nm에서 자외선 흡광광도법으로 각각 분석 하였다(환경부, 1995). 이때 Ion Chromatograph의 분석 조건으로는 Ionpac AS4A column을 사용하였으며, 1.8 mM Na_2CO_3 + 1.7 mM NaHCO_3 /2L의 eluent를 20mL/Min의 유속으로 흐르게 하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 각기 다른 질소원이 *R. rubrum*의 성장에 미치는 영향

Fig.1(A, B)는 각기 다른 질소원인 NH_4Cl , NaNO_3 , NaNO_2 를 첨가하여 혐기적이며 빛이있는 조건과 호기적이며 빛이 없는 조건에서의 성장정도를 나타낸 곡선으로 호기적 및 혐기적 조건에서 모두 질소원의 종류에 따라 성장에 차이를 보이고 있다.

Fig. 1(A)에서 보는 바와 같이 혐기적이고 빛이 있는 조건에서 NH_4Cl 과 NaNO_3 배지에서는 성장이 이루어 졌으며, NaNO_2 배지의 경우는 배양기간 동안 거의 성장이 이루어지지 않았다. 혐기적 조건에서 NH_4Cl 배지에서는 유도기가 거의 없이 접종 1일째 부터 성장이 이루어져 접종 6일째에 최고성장율을 나타냈으며, NaNO_3 배지에서는 1일 정도의 유도기를 거쳐 NH_4Cl 배지의 경우와 비슷한 시기인 접종 6일째에 최고의 성장을 나타내어 정지기에 이르렀다. 혐기적인 조건에서 NH_4Cl 과 NaNO_3 배지에서 정지기에 이르는 시기는 비슷하였으나 성장율은 NH_4Cl 배지에서가 NaNO_3 배지의 경우보다 약 3배 정도 높게 나타났다. 이는 Tamiguchi와 Kamen(1963)이 *R. rubrum*은 질산염이 공급되어진 배지에서 광합성으로 성장할 때 NH_4^+ 가 공급되어진 배지에서의 성장과 비교해서 성장율이 낮다고 보고한것과도 일치하는 결과이다. 또한 Igeno등(1995)은 광합성세균 *Rhodobacter capsulatus* EIF1이 각기다른 농도의 NaCl이 첨가된 malate 배지에서 질소원으로 질산염과 암모니아가 주어진 조건에서 혐기적 광합성으로 성장할 때 암모니아가 주어진 배지에서는 모든 조건에서 성장이 이루어졌으나 질산염이 주어진 조건에서는 저농도의 NaCl이 첨가된 경우는 성장이 이루어졌으나 고농도의 NaCl이 첨가된 경우는 암모니아가 주어진 배지에 비해 성장이 저조하였다는 보고와도 유사한 결과이다. Sasikala 등(1994)은 다른 광합

성세균인 *Rhodopseudomonas palustris* OU11균주의 경우 NH_4Cl 과 N_2 를 질소원으로 하여 여러종의 탄소원에서 광합성에 의한 성장 정도를 비교했을 때 탄소원으로 benzonate를 사용했을 때는 N_2 가 첨가된 배지에서가 NH_4Cl 이 첨가된 배지의 경우보다 성장이 좀더 잘 이루어졌으나, 다른 이용가능한 탄소원의 경우에는 NH_4Cl 이 N_2 보다 높은 성장을 보였다. 그러나 이(1986)는 광합성세균 *Rhodopseudomonas sphaeroides* D-230을 최소배지 30mM succinate와 7mM의 질소화합물을 첨가하여 배양하였을 때 alanine, histidine등은 좋은 질소원으로 사용되었으나 NaNO_3 , NH_4Cl 은 성장이 저조하였다고 보고하였다. 또한 강 등(1993)은 *R. rubrum* P17이 혼합 유기산 배지에서 성장할 때 NH_4Cl 이 무첨가시에 비해 첨가된 경우가 약 8배 정도의 높은 균체 생산성을 나타내었다고 보고하였다.

호기적인 조건에서는 Fig. 1(B)에서 보는 바와 같이 NH_4Cl , NaNO_3 , NaNO_2 의 모든 배지에서 성장이 이루어졌다. NH_4Cl 배지에서는 유도기가 거의 없이 접종 1일째부터 빠른 성장이 이루어져 접종 3일째에 정지기에 도달하였으며 NaNO_3 와 NaNO_2 배지에서는 약 1일정도의 유도기를 거친후 빠르게 성장하여 NH_4Cl 과 비슷한 시기인 접종 3일째에 정지기에 도달하였다. 호기적 조건에서의 성장율을 볼 때 NaNO_3 와 NaNO_2 배지에서의 흡광도가 각각 약 0.5와 0.6에서 정지기에 도달한것에 비해 NH_4Cl 배지에서는 정지기때 약 1.2정도를 나타내어 NaNO_3 나 NaNO_2 배지의 경우보다 약 2배 이상의 높은 성장을 보였다.

종합적으로 보면 malate를 탄소원으로 한 배지에 NH_4Cl , NaNO_3 , NaNO_2 를 각각 질소원으로 하여 혐기적 조건 및 호기적 조건에서 배양할 경우 NH_4Cl 이 첨가된 혐기적인 조건에서가 가장높은 성장을 보였으며 NH_4Cl 배지에서 호기적인 경우는 NaNO_3 배지의 혐기적인 경우와 비슷한 성장율을 나타냈으며, NH_4Cl 배지의 혐기적인 조건에서의 성장과 비교해서 약 1/3수준을 보였다. NaNO_3 가 첨가된 호기적인 조건에서의 성장과 NaNO_2 가 첨가된 호기적인조건에서의 성장은 저조하였다.

성장이 이루어진 모든조건에서 같은 질소원이 첨가된 배지에서 혐기적인 조건과 호기적인 조건에서의 성장을 비교하여 볼 때 호기적인 조건에서가 좀더 빠른 성장이 이루어져 빠른 시간에 정지기에 이르렀으나 정지기때의 흡광도는 혐기적인 경우가 NH_4Cl 이 첨가된 경우는 약 3배, NaNO_3 가 첨가된경우는 약 2 배정도 높게나타나 혐기적인 광합성에 의한 성장이 호기적인 호흡에 비해 성장율이 높음을 알 수있다.

*R. rubrum*은 암모니아와 질산염을 질소원으로 이용 한다고 알려져있으나 (Pfennig and Trüper, 1989) 아질산염의 이용에 관한 보고는 보이지 않고 있다. 본 실험결과 NaNO_2 도 호기적 조건에서 성장은 저조하나 질소원으로서 이용이 가능함을 알 수 있으며, 혐기적 조건에서는 거의 이용되지 않은 것으로 밝혀졌다. 앞으로 질소 대사에 관여하는 효소나 유전자에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 판단된다.



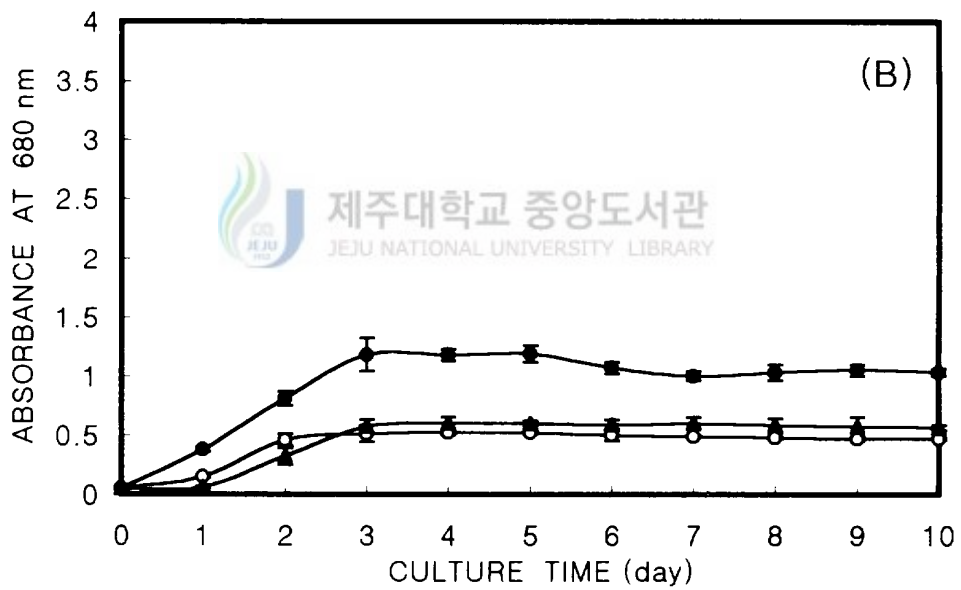
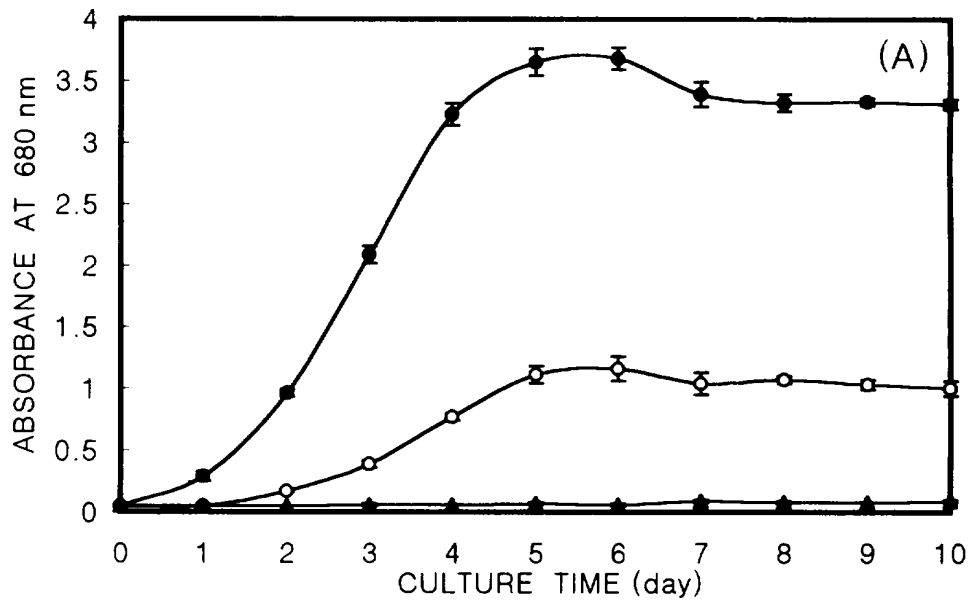


Fig. 1. Growth of *Rhodospirillum rubrum* in the medium of different nitrogen sources under anaerobic(A) and aerobic(B) condition (mean \pm standard error; n=3). NH₄Cl(●), NaNO₃(○) and NaNO₂(▲).

2. *R. rubrum*의 질소원별 이용

Fig. 2는 질소원으로 NH_4Cl 이 첨가된 배지에서 호기적 및 혐기적인 조건에서 NH_4 의 이용 정도를 배양시간에 따른 배지내 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 잔여 농도로 나타낸 것이다. 혐기적 및 호기적인 조건에서 모두 배양 1일째 부터 급격한 농도 감소가 이루어져 배양 초기 부터 질소원의 소비가 일어남을 알 수 있다. 호기적 조건에서는 정지기 도달 시간인 3일째까지 지속적인 배지내 NH_4 의 농도 감소를 나타내다가 이후에 비슷한 농도를 유지했다. 혐기적인 조건에서는 배양 6일째까지 계속 감소하다가 정지기때 이르러서 비슷한 농도를 유지했다. 두 조건 모두에서 배양 시간의 경과에 따라 NH_4Cl 의 농도가 계속감소하다가 정지기때 이르러 비슷한 농도를 유지하였다.

배지내 NH_4Cl 의 소비율은 정지기때를 기준으로 혐기적인 조건에서는 약 70%정도의 소비율을 보였으며 호기적인 경우에는 약 50%정도의 소비율을 보여 호기적인 경우가 혐기적인 경우에 비해 배양 초기에 많은 질소원의 소비가 이루어졌으나 최종 소비율에 있어서는 혐기적인 조건에서가 더 많은 소비가 이루어짐을 알 수 있다. 김 등(1994)은 다른 광합성 세균인 *Rhodospseudomonas palustris* KK14를 이용한 돈분 폐수 처리에 있어서 유입수의 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 농도가 1.6g/L이던 것이 5.5일 처리 후 0.28g/L로 나타나 고농도의 암모니아 함유 폐수 처리에 광합성 세균의 이용가능 성을 보고 하였다. 이 등(1989)은 광합성세균 *Rhodospseudomonas sphaeroides*는 균이 성장함에 따라 배지속에 남아있는 암모니아량은 거의 측정되지 않았다고 보고하였으며 배지에 암모니아가 없을 때 glutamate synthetase(GS)이 활성이 가장 높다고 보고하였다.

Fig. 3은 혐기적 및 호기적 조건에서 NaNO_3 배지에서 배양시간에 따른 배지내 NO_3 의 농도 변화와 NO_2 의 생성을 나타낸 그래프이다. 호기적 조건에서는 빠른 시간에 배지내 $\text{NO}_3\text{-N}$ 의 농도가 감소하기 시작하여 배양초기에 266.14mg/L이던 것이 배양 2일 이후에는 약 160mg/L로 유지되었다. 그러나 혐

기적인 배양조건에서는 배양 2일째 부터 배지내 감소가 이루어져 배양 6일째이 후에는 측정되지 않았다.

그리고 그래프에서 보면 배양시간의 경과함에 따라 NaNO_3 의 감소에 비례하여 배양초기에 측정되지 않았던 NO_2 의 배지내 농도가 증가함을 알 수 있다. 호기적인 경우는 배양 2일째 까지 NO_2 가 증가하다가 이후에 $\text{NO}_2\text{-N}$ 의 배지내 농도를 약 50 mg/L정도를 유지했으며, 혐기적인 경우는 배지내 NO_3 가 검출되지 않는 6일째 까지 증가하다가 이후에 $\text{NO}_2\text{-N}$ 의 농도가 180 mg/L정도로 유지되었다.

Fig. 3에서 보이는 NO_3 의 감소에 따른 배지내 NO_2 의 증가는 *R. rubrum*에 의해 NO_3 가 NO_2 로 환원 되어진 결과라고 사료된다. 혐기적인 조건에서 성장에 따른 질소원의 감소는 Tamaguchi와 Kamen(1963)이 *R. rubrum*이 NO_3 를 질소원으로 한 경우 광합성에 의해 성장할수 있다고 보고와 일치하는 결과이다. *Rhodobacter* 속의 세균들중 *R. capsulatus*, *R. sphaeroides*등은 질산염의 동화가 가능하며 *R. sulfidophilus*, *R. adrioticus*, *R. veldkampii*의 경우는 질산염 동화가 이루어지지 않는다고 알려져있다(Pfenning and Trüper, 1989). Flores(1983)는 절대 광합성세균인 *Synechococcus*는 질산염을 질산염환원에 의해 세포내에서 아질산염을 거쳐 암모니아로 환원 되어진다고 보고하였다. 그리고 McEwan 등(1984)은 *Rhodobacter capsulatus*는 광합성에 의해 성장할 때 2가지형태의 nitrate reductase를 가진다고 보고하였다. 또한 Richardson 등(1990)은 *Rhodobacter capsulatus*는 비발효성 탄소원에서는 NO_3 를 환원시킬수 없다고 보고하였다. Heda와 Madigan(1986)에 의해 보고된 *Chloroflexus aurantiacus*가 NaNO_3 를 질소원으로 한 조건에서 성장이 이루어지지않고 NH_4^+ 의 조건에서만 성장이 이루어진 다고 보고한 것에 비해 *R. rubrum*이 질소이용면에서 유리함을 알 수 있다.

NaNO_3 배지에서 NO_3 의 감소와 NO_2 의 생성에 따른 배지내 질소화합물의 농도를 Table 1에 나타내었다. 혐기적 조건과 호기적 조건에서의 정지기(각각 6

일과 3일, Fig.1)의 배지내 총 질소농도는 각각 199.83mg/L와 221.37mg/L로 혐기적 조건에서가 좀더 높은 질소의 소비가 일어남을 알 수 있다.

Table 1. Changes of nitrogen compound concentration in the NaNO₃ medium by *Rhodospirillum rubrum*.¹⁾ (Unit; mg/L)

Culture Time (day)	Anaerobic Culture			Aerobic Culture		
	NO ₃ -N	NO ₂ -N	T-N ²⁾	NO ₃ -N	NO ₂ -N	T-N ²⁾
0	266.14	0.00	268.07	266.14	0.00	268.07
1	261.69	2.85	265.02	253.53	3.16	257.25
2	239.41	19.49	258.49	165.31	46.75	218.69
3	152.41	66.66	233.32	163.90	48.77	221.37
4	60.79	132.66	196.15	161.68	49.98	216.56
5	13.22	177.40	200.18	163.94	48.82	220.11
6	0.00	184.15	199.83	166.70	44.70	215.72
7	0.00	181.46	186.91	161.75	45.74	219.65
8	0.00	182.37	184.91	162.90	48.92	218.81
9	0.00	186.44	188.86	158.54	51.07	215.09
10	0.00	184.49	186.85	155.35	50.99	209.71

¹⁾ Data are mean values of 3 replicates. ²⁾ Total nitrogen.

NaNO₂ 배지에서 혐기적 및 호기적 조건에서 배양 할 때 시간에 따른 배지내 NO₂의 농도 변화는 Fig. 4와 같았다. 혐기적인 조건에서는 Fig.1(A)에서 보이는 바와 같이 성장이 거의 이루어지지 않음에 따라 NO₂의 배지내 농도가 거의 일정하게 유지되어 질소원으로 주어진 NO₂의 소비가 이루어지지 않음을 알 수 있다. 그리고 호기적인 경우에는 성장이 이루어지기 시작한 배양 2일째 부터 배지내 NO₂의 농도가 감소하기 시작 하였으며 정지기 때인 3일이후에는

감소 정도가 미약하였다. 이는 malate를 탄소원으로한 배지에서 혐기적 광합성으로 성장할 때 질소원으로 NO_2 는 이용하지 못하는 것으로 사료된다. 혐기적 조건에서 거의 이용 되지 않는 NO_2 가 호기적 조건에서 질소원으로 이용되는 것은 NO_2 의 세포내 흡수나 NO_2 의 이용에 관련된 효소 등의 활성과 관련이 있는 것으로 생각되며 이에 대한 연구가 좀 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

각각의 배지에서의 총 질소의 소비율을 Fig. 2, 3, 4와 Table 1에서 보면 혐기적 조건에서는 NH_4Cl 배지의 질소농도가 가장 낮게 측정되어 가장 높은 질소 소비율을 나타냈으며 다음으로 NaNO_3 배지로 나타났고 NaNO_2 배지에서는 질소의 소비가 거의 일어나지 않았다. 그리고 NH_4Cl 배지의 질소 소비율은 약 70% 정도로 NaNO_3 배지의 약 30%에 비해 2배 이상 높게 나타났다. 강 등 (1993)은 *Rhodospirillum rubrum* P17균주를 이용한 두부공업 폐수의 처리에 있어서 총질소의 농도가 원폐수 198.5mg/L이던 것이 혐기적 광합성 조건에서 2일의 처리후 131.7mg/L로 나타났다고 보고하였다.

호기적 조건에서의 각 배지내 질소 소비율을 보면(Fig. 2, 3, 4와 Table 1) NH_4Cl 배지에서가 약 50% 정도이고 NaNO_3 배지와 NaNO_2 배지에서가 약 19%와 23% 정도로 호기적 조건에서 역시 NH_4Cl 배지에서가 다른 두 배지 보다 약 2배 정도 높은 소비율을 나타냈다.

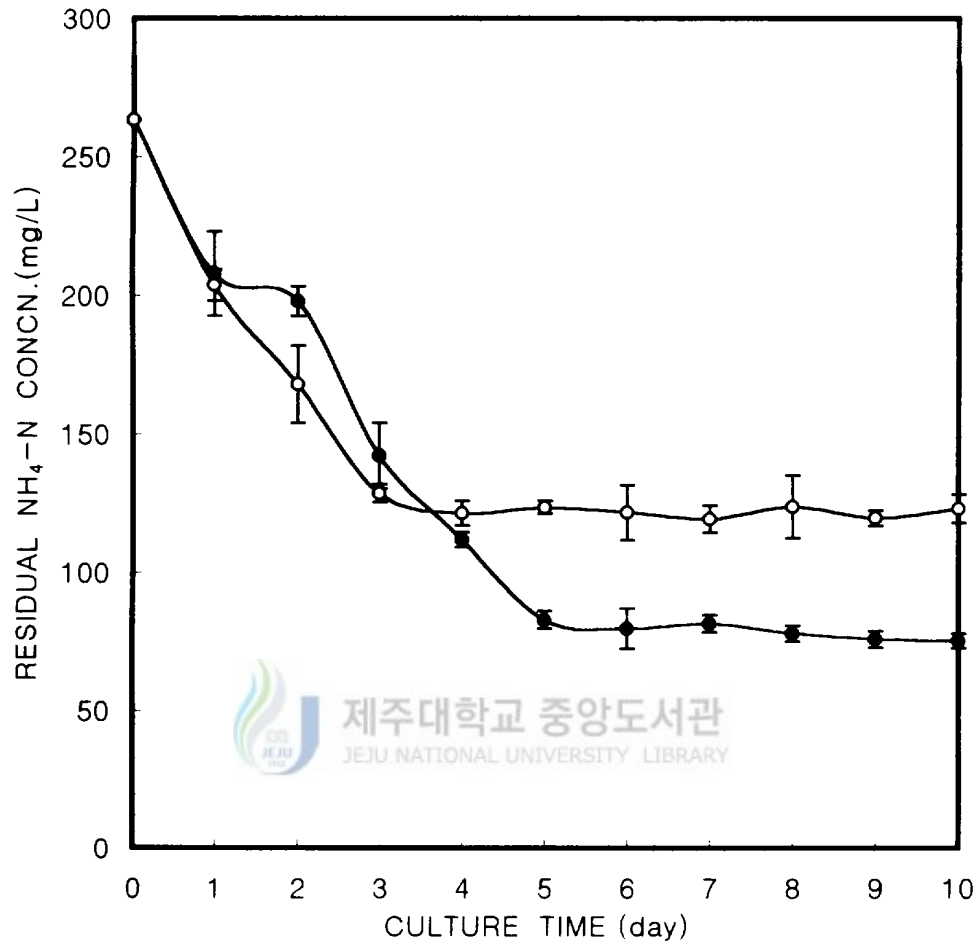


Fig. 2. Utilization of NH₄ by *Rhodospillum rubrum* in the NH₄Cl medium under anaerobic(●) and aerobic(○) condition (mean ± standard error; n=3).

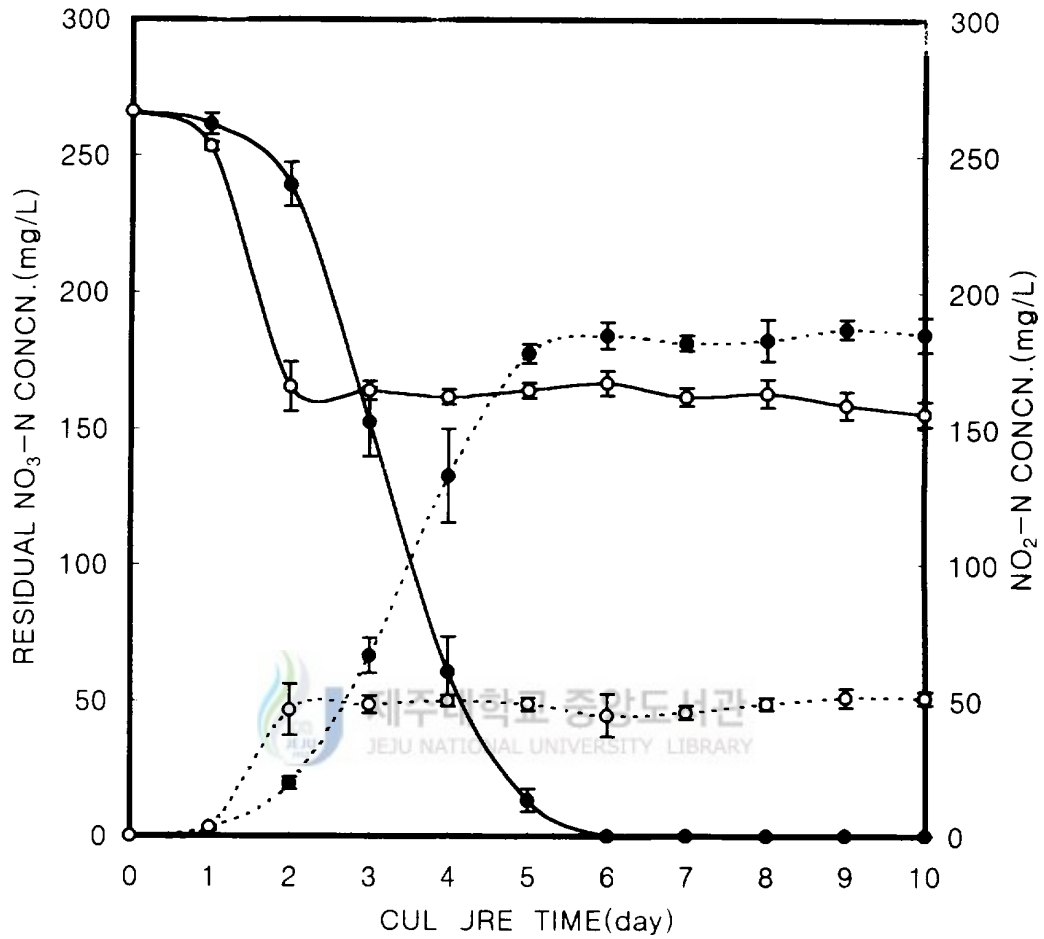


Fig. 3. Utilization of NO₃(—) and production of NO₂(---) by *Rhodospillum rubrum* in the NaNO₃ medium under anaerobic(●) and aerobic(○) condition(mean ± standard error; n=3).

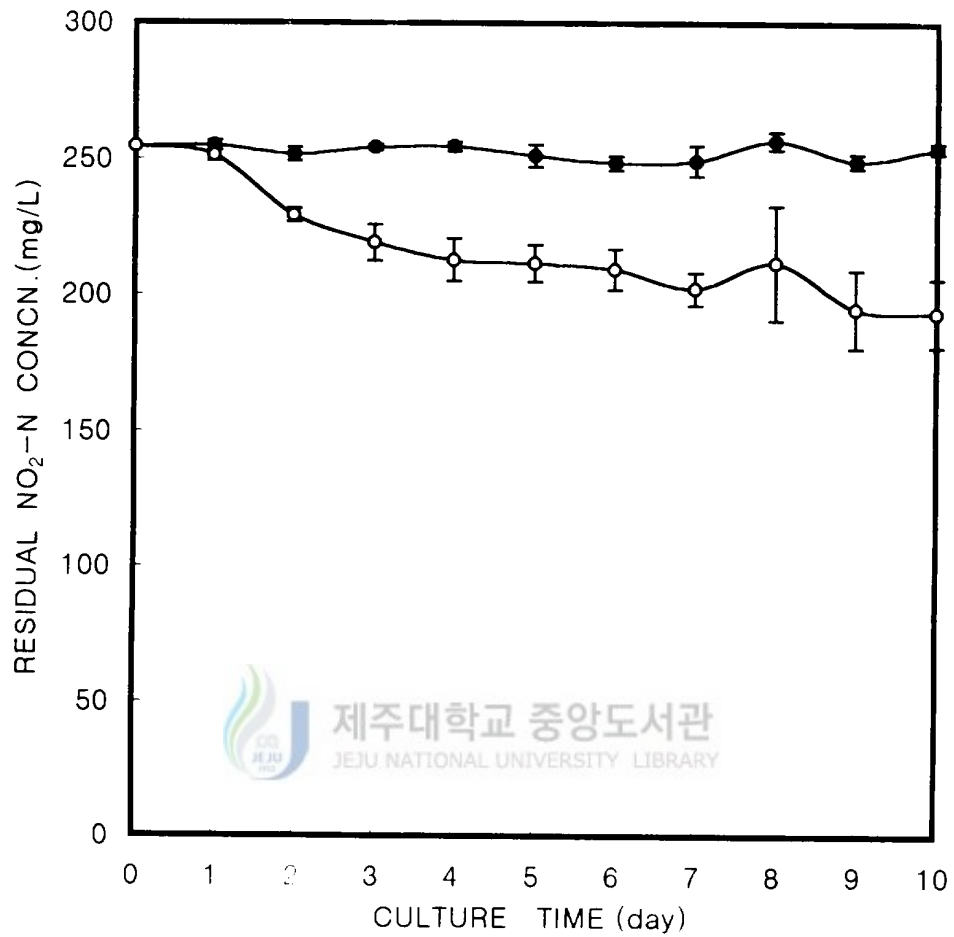


Fig. 4. Utilization of NO₂ by *Rhodospillum rubrum* in the NaNO₂ medium under anaerobic(●) and aerobic(○) condition (mean ± standard error; n=3).

3. *R. rubrum*의 성장에 따른 배지의 pH 변화

Fig. 5, 6, 7은 각 배지에서 혐기적 및 호기적 조건에서 성장할 때 배양 기간에 따른 배지내 pH의 변화를 나타낸 그래프이다. Fig. 5는 NH_4Cl 배지에서의 pH 변화로 호기적인 경우에는 배양 1일째 부터 급격한 pH의 증가를 가져와 정지기때는 약 pH 8.9정도로 혐기적인 경우의 pH 8.5정도에 비해 약간 높은 증가를 가져왔다.

Fig. 6은 NaNO_3 를 질소원으로 한 혐기적 및 호기적인 조건에서 *R. rubrum*의 성장에 따른 배지내 pH의 변화를 나타낸 곡선으로 혐기적인 경우에는 정지기인 배양 6일정도까지 점차적으로 증가하다가 pH 7.6정도에서 비슷한 수준을 유지하였다. 그리고 호기적인 조건에서는 pH 9.0까지 증가 하였다.

Fig. 7은 NaNO_2 배지에서 pH 변화를 나타낸 것으로 혐기적인 조건에서는 초기의 pH가 거의 일정하게 유지 되었으며 호기적인 경우에는 약 8.9정도 까지 증가 하였다.

모든 조건에서 볼 때 호기적인 경우가 혐기적인 경우에 비해 배지내 pH가 높게 나타났으며, 호기적 조건에서 최종 pH는 약 9.0정도로 모든 배지에서 비슷함을 알 수있다. 혐기적 조건에서는 NH_4Cl 배지에서가 가장 높은 pH를 나타냈다.

이와 같은 세균의 성장에 따른 배지내 pH의 증가는 이 등(1989)이 *Rhodopseudomonas sphaeroides*가 광합성으로 성장할 때 pH가 증가하여 정지기 때의 pH가 약 9.0에서 9.5에 수렴한다고 보고한것과도 유사한 결과이다. 또한 pH의 변화에 대한 연구는 다른 탄소원을 이용한 연구와 대사 산물의 분석 등을 통해 좀 더 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

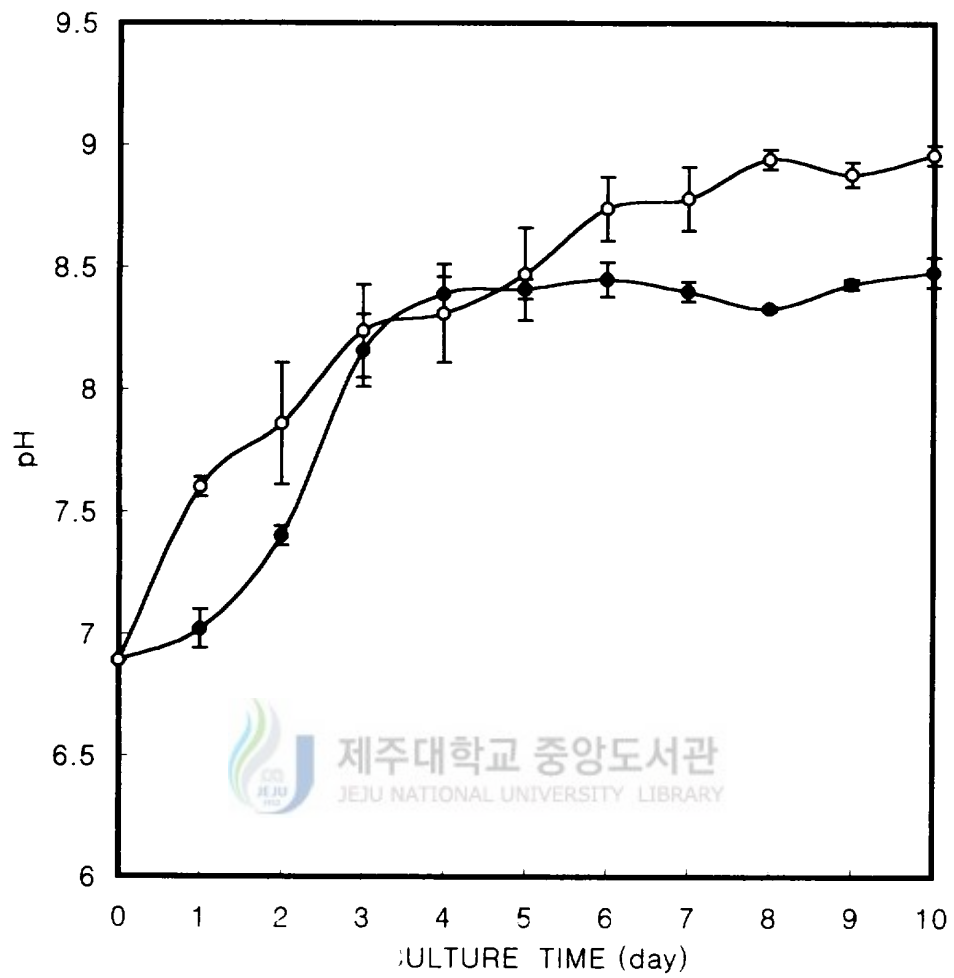


Fig. 5. pH changes of NH_4Cl medium by *Rhodospillum rubrum* under anaerobic(●) and aerobic(○) condition (mean \pm standard error; n=3).

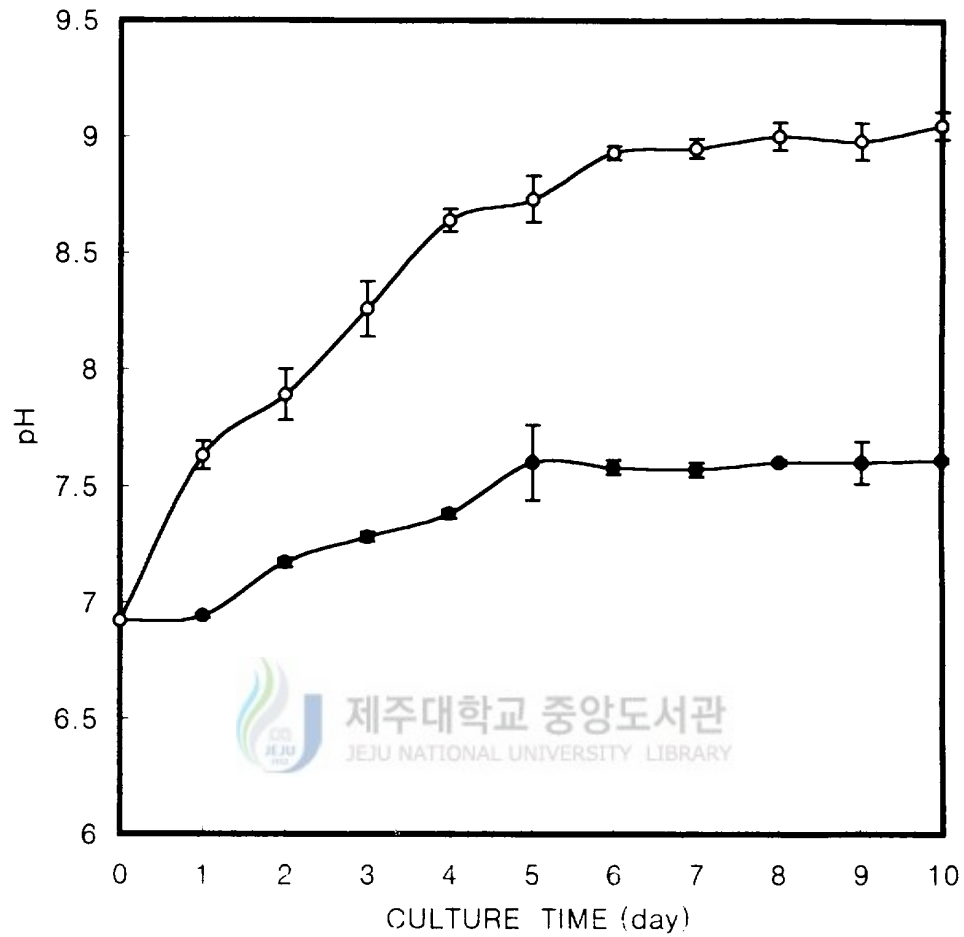


Fig. 6. pH changes of NaNO_3 medium by *Rhodospirillum rubrum* under anaerobic(●) and aerobic(○) condition (mean \pm standard error; n=3).

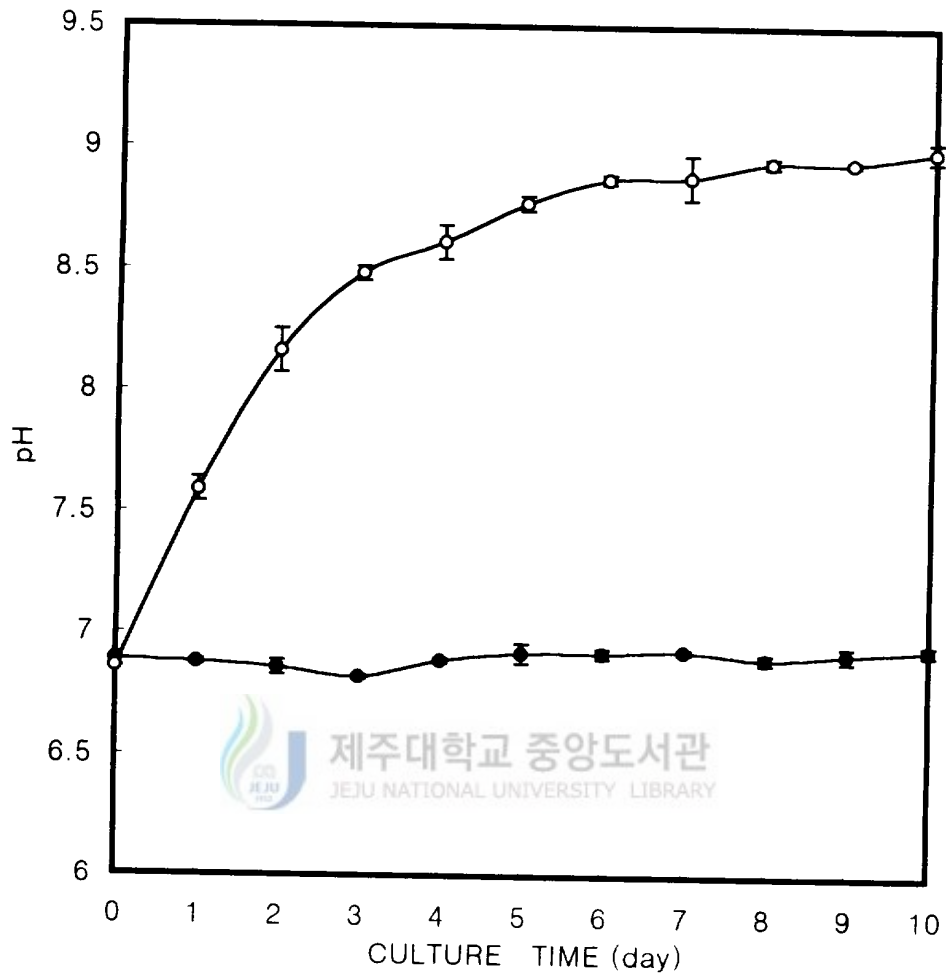


Fig. 7. pH changes of NaNO_2 medium by *Rhodospillum rubrum* under anaerobic(●) and aerobic(○) condition (mean \pm standard error; n=3).

IV. 적 요

호기적 조건과 혐기적 조건에서 *Rhodospirillum rubrum*의 각기 다른 무기 질소원 NH_4Cl , NaNO_3 , NaNO_2 의 이용정도를 알아 보기 위하여 각 질소원에서의 성장정도, 질소원의 이용 정도, 총 질소의 소비정도, 성장에 따른 pH변화 등을 관찰 하였다. 혐기적 조건에서 배양한 경우 NH_4Cl 및 NaNO_3 를 첨가한 경우에는 성장이 이루어졌으나 NaNO_2 를 질소원으로 한 경우에는 성장이 이루어지지 않았다. 호기적 조건의 경우는 세가지 무기질소원 NH_4Cl , NaNO_3 , NaNO_2 가 첨가된 모든 배지에서 성장이 이루어졌다. 혐기적 조건과 호기적 조건 모두에서 NH_4Cl 을 질소원으로 한 경우가 가장 높은 성장을 보였다. 성장이 이루어진 모든 조건에서 pH가 증가하였다. 혐기적 조건에서 총질소의 소비정도는 NH_4Cl 배지가 NaNO_3 배지 보다 높게 나타났으며, NaNO_2 배지의 경우는 성장이 이루어지지 않아 초기 농도가 그대로 유지되었다. 호기적 조건에서의 총질소의 소비정도는 NH_4Cl 배지가 가장 높게 나타났으며 NaNO_2 배지가 NaNO_3 배지보다 약간 높은 소비율을 나타내었다. 혐기적 및 호기적 조건에서 모두 성장이 이루어진 배지의 경우에는 혐기적인 경우가 호기적인 경우보다 높은 성장량을 보였다. NaNO_3 배지의 경우에는 배지내 NO_3 가 감소하면서 NO_2 가 생성되었다. *R. rubrum*은 모든 조건에서 세가지 질소원중 암모니아를 가장 좋은 질소원으로 이용 하였으며, NO_3 는 배지내에서 NO_2 로 환원되어지고, NO_2 는 혐기적 조건에서는 미확인된 이유로 질소원으로서 이용이 불가능 한 것으로 나타났다

참고문헌

- Bose, S. K., H. Gest, and J. G. Omerod. 1961. Light-activated hydrogenase activity in the photosynthetic bacterium : A permeability phenomenon. J. Biol. Chem. 236(3) : 13~14.
- Clesceri, L. S., A. E. Greenberg, and R. R. Trussell. 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA-AWWA-WPCF. 17th edition : 4-2~4-6.
- Cohen-Bazire, G., and R. Kunisawa. 1960. Some observation on the synthesis function of the photosynthetic apparatus in *Rhodospirillum rubrum*. P.N.A.S. 46 : 1543~1557.
- Coleman, G. S. 1959. The effect of D,L-glutamic acid on the growth of *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. Biophys. Acta. 31 : 55~65.
- Elsden, S. R., and J. G. Ormerod. 1956. The effect of monofluoroacetate on the metabolism of *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. 75 : 691~701.
- Flores, E., M. G. Guerrero, and M. Losada. 1983. Photosynthetic nature of nitrate uptake and reduction in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Biochim. Biophys. Acta. 722 : 408~416.
- Heda, G. D., and M. T. Madigan. 1986. Nitritization of acid and lack of diazotrophy in the thermophilic anoxygenic phototroph *Chloroflexus*

- aurantiacus*. J. Gen. Microbiol. 132 : 2469~2473.
- Horio, T., and A. G. Kamen. 1962. Observation on the respiratory system of *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. 1(6) : 1141~1157.
- Igeno, M. I., C. Gonzalez del Moral, F. Castillo, and F. J. Caballero. 1995. Halotolerance of the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1 is dependent on the nitrogen source. Appl. Environ. Microbiol. 61(8) : 2970 ~ 2975.
- Kamen, M. D., and H. Gest. 1949. Evidence for a nitrogenase system in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. Science. 109 : 560.
- Kohlmiller, E. F. Jr., and H. Gest. 1951. A comparative study of the light and dark fermentations of organic acids by *Rhodospillum rubrum*. J. Bacteriol. 61 : 269-282.
- Kondrat'eva, E. N. 1963. Photosynthetic Bacteria (translated from the Russian). Israel Program for Scientific Translation. Jerusalem. pp. 243.
- Lee, H. J. 1986. Role of glutamine synthetase as regulator of nitrogenase in *Rhodopseudomonas sphaeroides* D-230. Kor. J. Microbiol. 24(2) : 113 ~ 118.
- Lindstrom, E. S., S. M. Lewis, and M. J. Pinsky. 1951. Nitrogen fixation and hydrogenase in various bacterial species. J. Bacteriol. 61 : 481~487.

- Lindstrom, E. S., S. R. Burris, and P. W. Wilson. 1949. Nitrogen fixation by photosynthetic bacteria. *J. Bacteriol.* 58 : 313~316.
- Magasanik, B. 1982. Genetic control in nitrogen assimilation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 16 : 135~168.
- McEwan, A. G., J. B. Jackson, and S. J. Ferguson. 1984. Rationalization of properties of nitrate reductase in the *Rhodospseudomonas capsulatus*. *Arch. Microbiol.* 137 : 344~349.
- Merrick, M., S. Hill, H. Hennecke, M. Hahn, R. Dixon, and C. Kennedy. 1982. Repressor properties of the *nifL* gene product of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* 185 : 75~81.
- Merrick, M. J., R. A. Edwards. 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* 59. pp. 604~616.
- Moon, S. W., and M. Matsuyama. 1996. N₂ fixation and growth of *Chromatium* sp. with and without NH₄'₄ addition. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* 76. : 107~110.
- Nagatani, H., M. Shimizu, and R. C. Valentine. 1971. The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria. *Arch. Microbiol.* 79 : 164 ~175.

- Oelze, J., and W. Pahlke. 1976. The early formation of the photosynthetic apparatus in *Rhodospillum rubrum*. Arch. Microbiol. 108 : 281~285.
- Pfenning, N., and H. G. Trüper. 1989. Anoxygenic phototropic bacteria. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins. 3 : 1635~1682.
- Richardson, D. J., A. G. McEwan, M. D. Page, J. B. Jackson, and S. J. Ferguson. 1990. The identification of cytochrome involved in the transfer of electrons to the periplasmic NO₃⁻ reductase of *Rhodobacter capsulatus* and resolution of a soluble NO₃⁻ reductase-cytochrome-C552 redox complex. Eur. J. Biochem. 194 : 263~270.
- Sasikala, Ch., Ch. V. Ramana, and P. Raghuvver Rao. 1994. Nitrogen fixation by *Rhodopseudomonas palustris* OU 11 with aromatic compounds as carbon source/electron donors. FEMS Microbiol. Letters 122 : 75~78.
- Schultz, J. E., and P. F. Weaver. 1982. Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. J. Bacteriol. 149(1) : 181~191.
- Schultz, J. E., J. W. Gotto., P. F. Weaver, and D. C. Yoch. 1985. Regulation of nitrogen fixation in the *Rhodospillum rubrum* grown under dark, fermentative conditions. J. Bacteriol. 162(3) : 1322~1324.

- Solaiman, D., R. L. Uffen. 1982. Pyruvate-dependent diauxic growth of *Rhodospillum rubrum* in the light. J. Bacteriol. 152(3):1175~1187.
- Tamiguchi, S., and Kamen, M. D.. 1963. On the nitrate metabolism of facultative photoheterotrophs, in Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria (edited by the Japanes Society of Plant Physiologists). The University of Tokyo Press. Tokyo. pp. 465~484.
- Tempest, D. W., J. L. Meers, and C. M. Brown. 1970. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. J. Biochem. 117 : 405~407.
- Thore, A., D. L. Keister, and A. S. Pietro. 1969. Studies on the respiratory system of aerobically(dark) and anaerobically(light) growth *Rhodospillum rubrum*. Arch. Microbiol. 67 : 378-396.
- Tyler, B. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Annu. Rev. Biochem. 47 : 1127~1162.
- Uffen, R. L., and R. S. Wolfe. 1970. Anaerobic growth of purple nonsulfur bacteria under dark conditions. J. Bacteriol. 104 : 462~472.
- Uffen, R. L. 1973. Growth properties of *Rhodospillum rubrum* mutants and fermentative of pyruvate in anaerobic, dark conditions. J. Bacteriol. 116 : 874~884.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 지속적인 지도와 조언으로 이끌어 주신 오덕철 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 심사과정에서 미흡한 부분들을 일일이 다듬어주신 김원택 교수님과 고석찬 교수님 그리고 학부때 부터 지금까지 배움을 주신 오문유 교수님, 허인옥 교수님, 이용필 교수님, 김문홍 교수님, 이화자 교수님, 김세재 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

그리고 어려움을 함께 느끼며 서로 도와주고 위로해 주었던 이동천 선배를 비롯한 미생물학 연구실 식구들에게 고마움을 전합니다.

아울러 바쁜 업무중에도 학위과정을 마칠 수 있도록 배려해 주신 고용구 원장님과 자료분석과 편집에 도움을 주신 문봉춘 연구사님, 현익현 연구사님, 김태현 연구사님을 비롯한 보건환경 연구원 모든분들께 감사드립니다.

끝으로 곁에서 언제나 사랑과 믿음으로 보살펴 주신 부모님, 그리고 아무런 불평없이 참고 내조해 준 사랑하는 아내와 건강하게 자라주는 딸 현영에게 조그만 보답이 되었으면 합니다.