

## *Rhodopseudomonas sphaeroides*의 질소 동화작용에 미치는 simazine의 영향

이혜주, 이진애\*, 박인호, 선우양일

동아대학교 자연대 생물학과, 인제대학교 자연대 환경학과\*

### Effect of simazine on nitrogen assimilation of *Rhodopseudomonas sphaeroides*

LeeHye Joo, Zin Ae Lee\*, In Ho Park, and Yangil Sunwoo

Dept. Biol., coll. Nat. Sci., Dong-A Univ., Pusan and

\*Dept. Environ. Sci., coll. Nat. Sci., Inze Univ. Pusan

**ABSTRACT:** The effects of simazine [2-chloro-4, 6-bis(methylamino)-s-triazine] on *in vivo* nitrogenase, glutamine synthetase, glutamate synthase, and glutamate dehydrogenase which are important in nitrogen assimilation of *Rhodopseudomonas sphaeroides* were investigated.

Simazine inhibited the synthesis of nitrogenase and glutamine synthetase. The activity of glutamine synthetase in crude extracts of *Rhodopseudomonas sphaeroides* is less inhibited by simazine than that of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase.

These results suggest the possibility that simazine inhibits photosynthetic activity and so inhibits the synthesis of nitrogenase and glutamine synthetase in *Rhodopseudomonas sphaeroides*.

**KEY WORDS** □ *In vivo* nitrogenase, glutamine synthetase, glutamate synthase, glutamate dehydrogenase, simazine, *Rhodopseudomonas sphaeroides*

농작물의 생산성 향상은 인구 증가로 인한 식량 문제 해결을 위한 중요한 당면 과제이다. 농작물의 생산성을 높이기 위해서는 내병성을 갖는 새로운 품종을 개발하거나, 농작물 재배과정에 문제가 되고 있는 여러가지 병충해나 환경 스트레스를 제거함으로써 생산성을 향상시킬 수 있다. 후자의 경우 시간과 노력 및 경비가 비교적 적게 들므로 일반적으로 여러가지 biocides를 농작물에 사용함으로써 생산성을 향상시킨다. biocides중 대부분의 제초제는 식물의 세포분열과 생장을 저해할 뿐만 아니라(Sasena and King, 1988), 식물체내의 광합성기구에 관여하는 화합물의 생합성 과정 및 광합성기능을 저해하는 것으로 알려져 있으며, 광합성과정중에서도 특히 전자 전달계를 강하게 억제하는 것으로 보고 되고 있다(Arntzen *et al.*, 1983; Oettmeir and Masson, 1980; Trebst *et al.*, 1983; Kwon *et al.*, 1988). 뿐만아니라 제초제의 처리에 의해 광음향 신호에도 변화가 생긴다는 보고도 있

다(Chunn *et al.*, 1988). 그러나 질소고정능을 가진 생물에 대한 제초제의 영향은 남조류와 뿌리혹박테리아를 재료로 일부 진행되고 있는 실정이다(Kaszubiak, 1966; Hawxby, 1977; Singh *et al.*, 1978, 1979; Pandey *et al.*, 1984).

광합성 세균은 대기중의 질소를 고정할 수 있을 뿐만아니라 태양에너지를 이용하여 광합성을 할 수 있다. 광합성과 질소고정의 결과 무공해 수소 가스를 생성할 수 있고(Lee, 1986a, b, 1988), 생태계의 오염물질인 폐기물을 분해할 수 있을 뿐만 아니라(Siefert, 1978) 질소고정능이 있어 천연 비료로서의 역할(Kobayashi, 1971)을 할 수 있다. 따라서 본 연구는 광합성 세균인 *Rhodopseudomonas sphaeroides* 를 재료로하여, triazine계 제초제인 simazine [2-chloro-4,6-bis(methylamino)-s-triazine]이 질소 고정능 및 암모니아 동화 과정에 어떠한 영향을 주는지를 조사하고자 한다.

본 연구는 1988년도 문교부 기초과학 육성연구비의 지원에 의한 것임.

**재료 및 방법**

**실험 재료 및 배양 조건**

본 실험실에서 분리한(Lee, 1986a)광합성세균인 *Rhodospseudomonas sphaeroides*를 사용하였으며, 배지는 Ormerod의 배지(Ormerod, 1961)에 2%(w/v) yeast extract를 growth factor로 첨가한 것을 최소 배지로하여 전자공여체로 succinate를 30mM 첨가하고 질소원으로는 L-glutamate를 7mM 첨가하여 사용하였으며, *Rp. sphaeroides*의 배양은 12ml이나 30ml serum vial에 미리 준비한 균 1%(660nm에서의 흡광도 0.9-1.0)를 접종하고 고무마개로 막은 다음 이 용액을 12M NaOH에 5% pyrogallol과 silica gel을 통하여 산소와 물이 제거된 100% 아르곤 가스로 bubbling 시킨 후 8,000-9,000룩스의 백열등아래에서 30℃를 유지하며 24시간 배양하였다. 균의 성장은 660nm에서의 흡광도변화와 건중량으로써 측정하였다.

**in vivo 질소고정효소의 활성 측정**

질소 고정효소의 활성측정은 Clark형의 O<sub>2</sub>전극(Yellow Springs Inst., Ohio)을 수소검침으로 사용하여 amperometric 방법(Sweet et al., 1980)을 변형한 방법(Lee, 1988)으로 수소생성량을 측정하였다. 이때 측정온도는 30℃를 유지하였으며, 조도는 4,000룩스를 유지하였다.

**조효소의 준비**

위의 조건에 따라 배양한 세포의 현탁액을 20,000×g에서 원심 분리(Beckman Model J2-21)시켜 수확한 후 10mM 인산완충 용액(pH6.8)으로 세척한 다음 300μA에서 30초 간격의 pulse 로 3분 동안 sonication(Nissie US300)하여 20,000×g에서 원심 분리한 후 상층액을 조효소로 사용 하였다.

**Glutamine Synthetase 활성 측정**

Glutamine Synthetase(GS)의 활성은 Shapiro와 Stadtman(1970)의 방법을 변형하여 측정하였다(Lee, 1986b).

**Glutamate Synthase 활성 측정**

Glutamate Synthase(GOGAT)의 활성(Streicher et al, 1974)은 340nm에서 NADPH의 산화물으로써 측정하였다.

**Glutamate Dehydrogenase 활성 측정**

Glutamate dehydrogenase(GDH) 활성(Streicher et al, 1974)은 NADH의 산화물으로써 측정하였다.

**단백질 정량**

Lowry등(1951)의 방법에 따라 750nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였으며, 표준단백질은 우혈청단백질(BSA)을 사용하였다.

**암모니아 정량**

암모니아 정량은 균을 4℃에서 20,000×g로 30분 동안 원심분리시키고, 그 상층액을 phenate방법으로 반응시킨 후, 630nm에서의 흡광도로 암모니아량을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

Fig. 1은 *Rhodospseudomonas sphaeroides*를 ormerod 배지에서 배양하였을 때의 성장 곡선 및 배지 속의 pH 및 암모니아의 변화량을 나타낸 것이다. *Rp. sphaeroides*는 약 6시간의 잠복기를 거친후 대수기에 들어 갔으며, 약 24시간 후에 정체기에 들어감

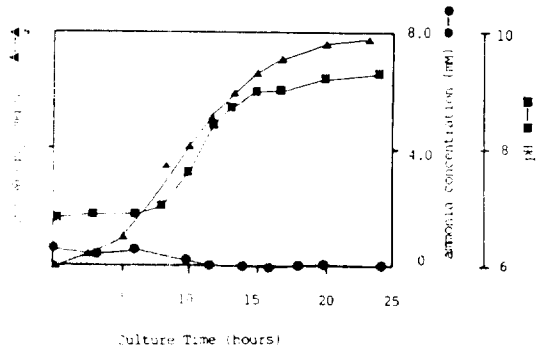


Fig. 1. Change of ammonia and pH in complete medium during the growth of *Rp. sphaeroides*.

을 알 수 있었다. pH의 변화는 균이 성장함에 따라 증가하였으며, 정체기때의 pH는 약 9에서 9.5에 수렴함을 알 수 있었다. 균이 성장함에 따라 배지 속에 남아있는 암모니아의 양은 거의 측정되지 않았다. 광합성 세균은 배지속의 암모니아의 양에 따라 암모니아가 Glutamine synthetase/glutamate synthase (GS/GOGAT)경로나 glutamate dehydrogenase (GDH)경로를 통해 암모니아 동화가 일어난다. (Tyler, 1978; Bogdahn et al., 1983). 따라서 배지에 어느 정도의 암모니아가 존재할때 암모니아의 동화가 GS/GOGAT경로에서 GDH경로로 전환되는지를 알기 위하여 질소원으로 각각 다른 농도의 염화암모니움을 첨가한 배지에서 24시간 성장시킨 *Rp. sphaeroides*의 GS, GOGAT, GDH의 활성을 조사 하였다(Fig. 2). 그 결과 GS의 활성은 암모니아가 전혀 없을 때가 가장 높았고 암모니아의 농도가 증가함에 따라 활성은 감소하였으며,

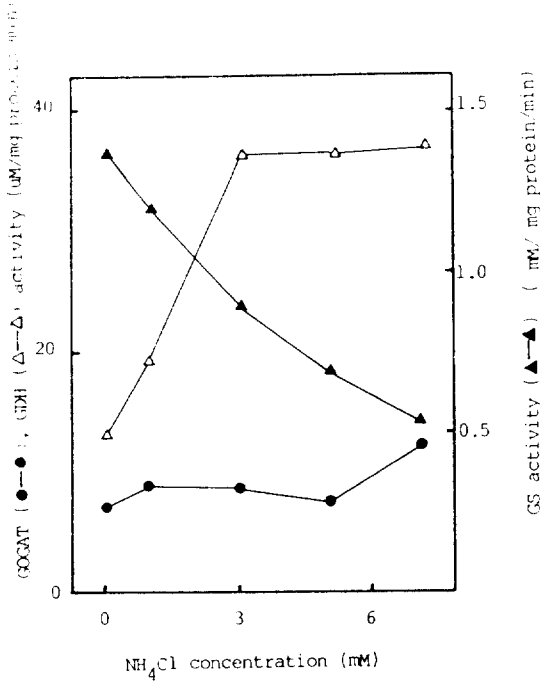


Fig. 2. Glutamine synthetase, glutamate synthase, and Glutamate dehydrogenase activity of *Rp. sphaeroides* grown in various  $NH_4Cl$  concentration.

GDH의 활성은 암모니아가 전혀 없을때 가장 낮았고 암모니아의 농도가 증가함에 따라 활성은 증가 하였다. 그러나 GOGAT의 활성 변화는 거의 없었다. 그러므로 *Rp.sphaeroides*의 암모니아 동화는 암모니아의 농도가 1.8mM이하에서는 GS/GOG 경로로 주로 일어나며 암모니아의 농도가 1.8mM 이상에서는 GDH경로로 암모니아 동화가 주로 일어남을 알 수 있었다. GDH와 GOGAT의 활성은 생물의 종류에 따라 보조인자로 NADH또는 NADPH 중 어느 하나를 사용하는 것으로 알려져 있다(Brown and Herbert, 1977a,b). 따라서 *Rp. sphaeroides*의 경우 어떠한것을 보조인자로 사용하는지를 알아본 결과 Tab. 1에 나타나 있는 것과 같이 GDH의 경우 NADH를 GOGAT의 경우 NADPH를 보조인자로 사용함을 알 수 있었다. Fig. 3은 질소원으로 glutamate가 첨가되어 있는 Omerode배지에 제초제인 simazine을 첨가한 후 *Rp. sphaeroides*을 배양하였을 경우 성장 저해 및 pH변화, GS의 활성 저해 정도를 나타낸 것이다. Fig. 3a에 나타나 있는 바와 같이  $5 \times 10^{-5}$  M의 simazine 농도에 의해 약 35%정도의 성장 저해를 받았으며,  $2 \times 10^{-4}$ M의

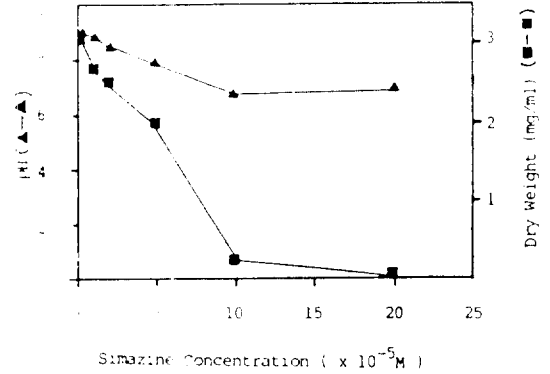


Fig. 3. Effect of simazine on the growth of *Rp. sphaeroides* and pH changes after 24 hour culture in medium containing various concentration of simazine.

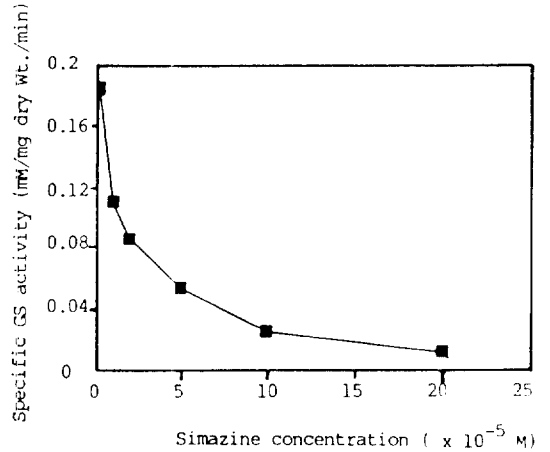


Fig. 4. Specific glutamine synthetase activity after 24 hour culture of *Rp. sphaeroides* in medium containing various concentration of simazine.

simazine농도에 의해 약98%의 성장 저해를 받았다. 따라서 *Rp. sphaeroides*의 경우 *Anabaena inaequalis* (Kwon et al., 1988)보다 훨씬 높은 농도의 simazine에 의해 저해 효과가 있었다. 이것은 아마 *Rp. sphaeroides*와 *Anabaena inaequalis*의 세포막의 구조적인 차이 때문으로 사료된다. 배양액속의 pH의 변화는 성장이 진행됨에 따라 점점 증가하였다 (Fig. 3b). simazine이 첨가된 배지에서 자란 *Rp. sphaeroides*의 GS의 활성도 역시 simazine에 의해 저해를 받았다(Fig. 4). 이것은 simazine에 의해 *Rp. sphaeroides*의 성장이 저해될 뿐만 아니라 GS의 합성도 저해됨을 의미한다 하겠다. Fig. 5는 simazine이 첨가된 ormerod 배지에서 배양한 *Rp.sphaeroides*의 *in vivo*상태의 질소고정 효소의 활성을

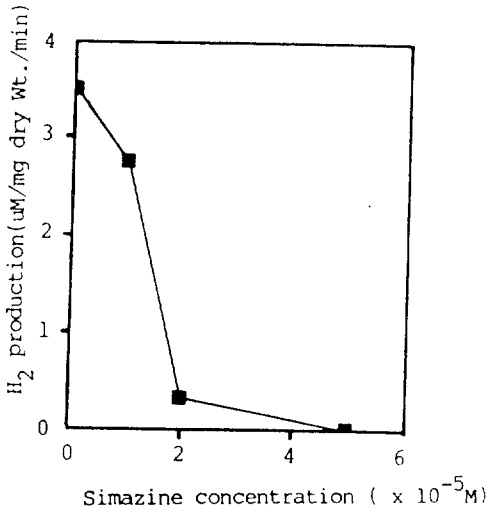


Fig. 5. Inhibition of hydrogen production by simazine.

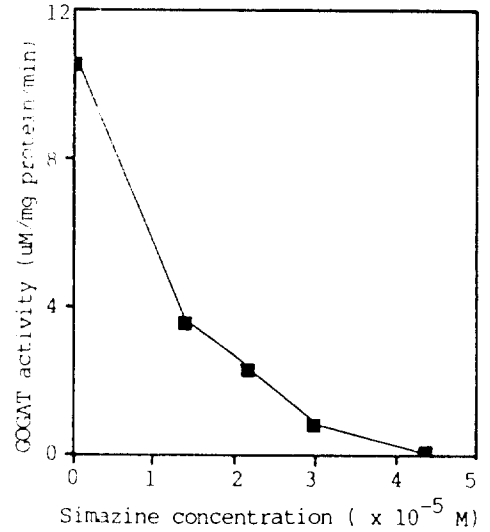


Fig. 7. Effect of simazine on glutamate synthase activity in crude extract of *Rp. sphaeroides*.

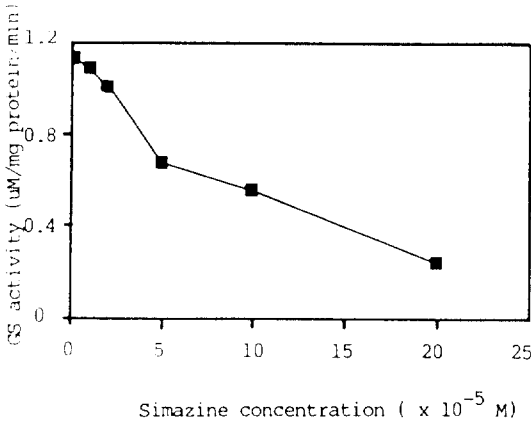


Fig. 6. Effect of simazine on glutamine synthetase activity in crude extract of *Rp. sphaeroides*.

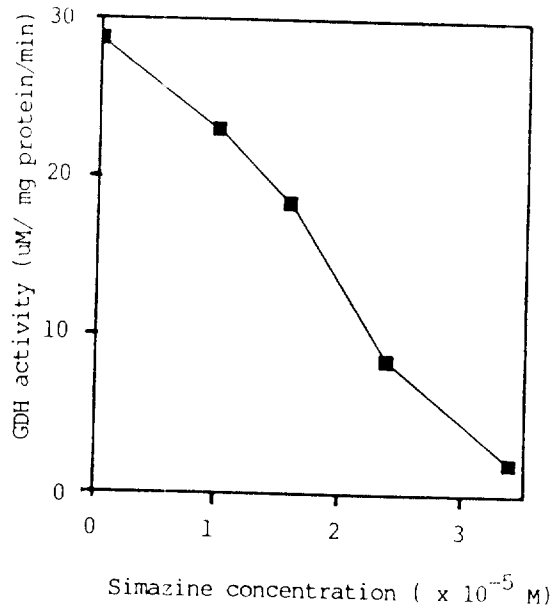


Fig. 8. Effect of simazine on glutamate dehydrogenase activity in crude extract of *Rp. sphaeroides*.

수소 생성량으로 조사한 것이다. 질소 고정 효소의 활성은  $1 \times 10^{-5}$  M의 simazine에 의해 20% 정도 저해를 받았으며  $2 \times 10^{-5}$  M의 simazine에 의해 90% 이상 저해를 받았다. 이는 simazine이 *Rp. sphaeroides*의 전자전달계 및 광인산화과정에 강한 저해를 함으로써 이와 직접 연관되어 있는 질소고정 효소의 활성이 GS의 활성 보다 훨씬 강하게 저해를 받기 때문으로 사료된다. simazine에 의한 GS의 합성 저해가 합성만 저해하는지 활성도 저해하는지를 알아보기 위하여, 정상배지에서 배양한 *Rp. sphaeroides*를 마쇄하여 조효소를 만든 후 GS의 활

성을 측정할 때 저해제로 simazine을 처리하였다. 그 결과  $1 \times 10^{-5}$  M의 simazine에 의해 GS의 활성이 약 5% 정도 저해를 받았으며  $2 \times 10^{-4}$  M의 simazine에 의해 80% 정도 저해를 받았다. 그러나 Fig. 4에 나타난 것과 같이 GS의 합성 저해는  $1 \times 10^{-5}$  M의 simazine에 의해 40%,  $2 \times 10^{-4}$  M의 simazine

테 의해 95% 저해 되었으므로 이는 GS의 활성 자체보다도 *Rp. sphaeroides*의 성장 및 GS의 합성에 simazine의 더 큰 영향을 주기 때문으로 사료된다. *Rp. sphaeroides*의 질소 동화 과정에 관여하는 효소인 GOGAT와 GDH의 활성에 미치는 simazine의 영향을 알아본 결과 Fig. 7, 8에서 보느냐와 같

이 GOGAT의 경우  $3 \times 10^{-5}$  M의 simazine에 의해 활성이 약 90%이상 저해되었으며, GDH는  $3.4 \times 10^{-5}$  M의 simazine에 의해 90%정도 저해를 받았다. 따라서 simazine이 GS보다 GOGAT 및 GDH의 활성에 더 큰 영향을 주는 것으로 사료된다.

## 적 요

광합성 세균인 *Rhodospseudomonas sphaeroides*의 질소고정 효소 합성 및 암모니아 동화 경로에 중요한 glutamine synthetase (GS), glutamate synthase(GOGAT) 및 glutamate dehydrogenase(GDH) 활성에 미치는 Triazine계 제초제인 simazine의 영향을 조사하였다. 배양중에 simazine을 처리할 경우 성장 및 *in vivo* 질소고정효소의 합성 및 GS의 합성이 크게 저해되었다. 그리고 정상 배지에서 배양한 *Rp. sphaeroides*의 GOGAT 및 GDH의 활성이 GS의 활성보다 simazine에 의해 더 큰 저해를 받았다. 이상의 결과는 simazine이 *Rp. sphaeroides*의 광합성 과정을 억제하여, 질소고정효소의 합성을 저해하며 이로 인해 GS의 합성이 저해될 가능성이 있음을 시사한다고 하겠다.

## 참고문헌

- Arntzen, C.J., K.E. Steinback, W. Vermass and I. Ohad. 1983. Molecular characterization of the target sites for herbicides which affect photosynthetic electron transport. Pestic. Chem. vol.3. (edt. Miyamoto, J. and P. C. Kearney) Pergamon Press, New York.
- Bogdahn, M., J. R. Andreesen, and D. Kleiner. 1983. Pathways and regulation of  $N_2$ , ammonium and glutamate assimilation by *Clostridium formicoaceticum*. Arch. Microbiol. 134, 167-169.
- Brown, C. M. and R. A. Herbert. 1977a. Ammonia assimilation in purple and green sulphur bacteria. FEMS Microbiol. Lett., 1, 39-46.
- Brown C. M. and R. A. Herbrt. 1977b. Ammonia assimilation in members of the *Rhodospirillaceae*. FEMS Microbiol. Lett., 1, 43-46.
- Chun, Hyun Sik, Hye Joo Lee, Yanil Sunwoo, In Ho Park and Chin Bum Lee. 1988. Effect of simetryne on chloroplast-mediated electron transport and photoacoustic signal. Kor. J. Bot., 31(3), 205-215 .
- Hawxby, K., B. Tubeca, J. Ownby and E. Basler. 1977. Effects of various classes of herbicides on four species of algae. Pesticide Biochem. Physiol. 7, 203-209.
- Kaszubiak, H. 1966. The effect of herbicides on *Rhizobium*. I. Susceptibility of *Rhizobium* to herbicides. Acta Microbiologia Pol. 15, 357-364.
- Kobayashi, M., and M. Z. Haque. 1971. Contribution to nitrogen fixation and soil fertility by photosynthetic bacteria. Plant Soil Spec., 443-456.
- Kwon, Hyuk Dong, Hye Joo Lee, Yangil Sunwoo, Chin Bum Le and In Ho Park. 1988. Inhibitory effect of simazine on photosynthetic electron transport activity in *Anabaena inaequalis*. Kor. J. Bot., 31(3), 217-226.
- Lee, H. J. 1986a. Characterization of hydrogen evolving strain of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Kor. J. Microbiol. 24, 62-66
- Lee, H. J. 1986b. Role of glutamine synthetase as a regulator of nitrogenase in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Kor. J. Microbiol. 24(2), 113-118.
- Lee, H. J. 1988. Effect of methionine sulfoximine in nitrogenase activity by ammonia and glutamine in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Kor. J. Microbiol. 26 (3), 215-222.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randal. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Oettmeier, W., K. Masson, 1980. Synthesis and thylakoid membrane binding of the radioactively labeled herbicide dinoseb. Pestic. Chem. and Physiol. 14, 86-97.
- Ormerod, J. G., K. S. Ormerod, and H. Gest. 1961. Light dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria: Relationship with nitrogen metabolism. Arch. Biochem. Biophys. 94, 449-463.
- Pandey, A. K., V. Strivastava and D. N. Tiwari. 1984. Toxicity of the herbicide stam f-34(propamil) on *Nostoc calcicola*, Zeit. Allege. Mickrobiol. 24(6), 369-376.
- Saxena, P. K. and J. King. 1988. Herbicide resistance in *Datura innoxia*: Cross-resistance of sulfonylurea-resistant cell lines to imidazolinones. Plant Physiol. 86, 863-867.
- Shapiro, B. M. and E. R. Stadtman. 1970. Glutamine synthetase(*Escherichia coli*). In Methods in enzymology. 17(A). Colowich S. P., Kaplan N. O. 8th eds. Academic Press, New York. London, pp901-922.
- Siefert, E., Irgens, R. L. and N. Pfennig. 1978. Phototrophic purple and green bacteria in sewage treatment plant. Appl. Environ. Microbiol. 35, 38.
- Singh, H. N. and A. Vaishampayan. 1978. Biological effects of rice-field herbicide Machete on various strains of the nitrogen-fixing blue-green algae *Nostoc mucorum*. Environ. Exp. Bot. 18, 87-94.
- Singh, H. N and A. Vaishampayan. 1979. Toxic and mutagenic action of the herbicide alachlor(Lasso)on

- various strains of the nitrogen-fixing blue-green algae *Nostoc Mucorum* and characterization of the herbicide-induced mutants resistant to methylamine and l-methionine-DL-sulfoximine. *Environ. Exp. Bot.* **19**, 5-12.
22. **Streicher, S. L., K. T. Shanmugam, F. Ausubel, C. Moramdi, and R. B. Olberg.** 1974. Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*: Evidence for a role of glutamine synthetase as a regulator of nitrogenase synthesis. *J. Bacteriol.* **120**, 815-821.
23. **Sweet, W. J., J. P. Houchins, P. R. Rowen and D. J. Arp.** 1980. Polarographic measurement of H<sub>2</sub> in aqueous solutions. *Ann. Biochem.*, **107**, 337-340.
24. **Trebst, A., W. Draber and W. T. Donner,** 1983. Mode of action and MO calculation of two classes of herbicides interacting with the reducing side of photosystem II. *Pestic. Chem.* (ed. Miyamoto, J. and P. C. Kearney) **3**, 85-90. Pergamon press. New York.
25. **Tyler, B.** 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 1127-62.

(Received Jul. 28, 1989)