

## *Anabaena variabilis* ATCC 29413의 생장과 질소고정활성의 조절요인

송승달 · 한동훈

경북대학교 자연과학대학 생물학과

광자가영양이며 질소고정능을 갖는 사상체의 남조 *Anabaena variabilis* ATCC 29413을 Allen & Arnon(1/8)의 무질소 최소배지에서 배양하여, 이형세포를 유도하고 생장과 질소고정활성의 변화와 각종 조절요인의 영향을 분석하였다. 질소결핍의 배지에서 생장과 질소고정활성의 증가율은 비례하였고, 생장에 따라 배지내 질산( $\text{NO}_3^-$ -N)의 축적을 보였으며, 배양 6일 후에도 생장은 지속되었으나, 질소고정은 최대활성을 보인 후 급격한 감소를 보여 질산의 저해농도와 일치하였다. 중요 환경요인의 영향은 혐기적 조건, 10,000 lux, pH 8 및 30°C에서 최적의 생장과 활성을 보였고, 질소화합물은 0.1 mM 이상의 저농도에서 현저히 활성을 저해하였으며, 탄산은 5 mM에서 활성을 촉진하였으나 보다 높은 농도에서 저해를 보였다. 내염성은 NaCl 20 mM 이하이었고, 중금속이온은  $\text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 의 순으로 0.3~10 ppm의 범위에서 활성을 저해하였다. 탄수화물은 0.5~1.0%에서 생장과 활성을 촉진하였고, 설탕>과당>포도당의 순이었다.

KEY WORDS □ Factors, Nitrogenase Activity, Growth, *Anabaena variabilis*

남조류는 단세포 또는 사상체의 다세포로 구성되는 다양한 종류를 포함하며, 광계구조를 갖는 영양세포에서 태양에너지를 이용하여 광합성기능을 영위하고, 질소결핍의 환경에서 이형세포(heterocyst)를 분화시켜 *nif* gene을 활성화 하여 질소고정 효소계를 생성하며, 단독 또는 공생적으로 질소고정능을 통하여 지구상의 각종 생태계의 초기천이과정의 촉진과 생물생산성의 향상에 중요한 역할을 하고 있다(18). 남조류의 질소고정에 대해서는 논에서 벼재배의 생산성촉진을 위한 이용과 토양의 비옥화 및 이형세포의 분화와 질소고정효소형성에 대한 분자생물학적 및 유전학적 기구에 대해 큰 관심이 모아지고 있다(10, 19).

사상체 남조류의 질소고정활성을 갖는 이형세포에서는 영양세포와는 달리 광합성활성의  $\text{CO}_2$  고정효소생성이 억제되는 반면, 질소고정효소의 생성이 촉진되며, 질소고정활성은 압조건이나 호기적 조건에 의해 저해되고(8, 16), 광합성 저해제인 dichlorophenyl dimethyl urea(DCMU)에 의해서도 억제된다(13). Ernst 등(7)은 탄수화물의 공급에 의해 질소고정활성의 회복을 밝혔으며, Goldberg 등(9)은 고농도의 산소조건에서 제한된 전자의 부족에 의해 충분한 환원력을 제공하지 못함을 발견하였다. 그리고 각종 염류 및 중금속 이온에 의한 활성의 저해작용에 대해서 많은 논의가 이루어지고 있다(12).

사상체의 남조인 *Anabaena variabilis* ATCC 29413은 광합성 및 질소고정의 유전자구성의 연구에 사용되고 있으나, 질소고정활성의 조절요인에 대해서는

밝혀진바 없으므로 본 연구에서는 각종 배양조건을 통하여 생장의 변화와 질소결핍배지에서 이형세포의 분화 및 질소고정활성의 변화를 분석하고, 배양조건인 조도, 온도, pH, 산소, 탄산, 무기염류, 질소화합물, 당류 및 중금속 등의 조절요인의 농도에 따른 변화를 비교 분석하였다.

### 재료 및 방법

#### *Anabaena variabilis* ATCC 29413의 생장

남조류는 *Anabaena variabilis* ATCC 29413을 사용하였고, BG11~1.5% agar plate에 전배양한 균주를 Allen & Arnon(1/8)(1)의 질소첨가배지와 무질소배지를 각각 50 ml씩 넣은 삼각플라스크(100 ml)에 접종하여 30°C와 10,000 lux에서 진탕(120 rpm) 배양하고 생장은 Hitach U-2000의 UV-Vis spectrophotometer에 의해  $A_{664}$ 의 흡광도에서 측정하였다(4). 영양세포의 증식배양은 질소첨가배지를 넣은 배양기(2000 ml)에 기포발생기로  $\text{CO}_2(2 \cdot \text{l} \cdot \text{min}^{-1})$ 를 공급하면서 회분배양을 하였다. 염류소-a 함량은 dimethyl sulfoxide(DMSO)법에 의해 추출하여 Trichromate 법에 의해 spectrophotometer를 이용하여  $A_{630}$ ,  $A_{647}$  및  $A_{664}$ 의 흡광도에서 측정하였다(11). 암모니아( $\text{NH}_4^+$ -N)의 함량은 Nesslerization법에 의해  $A_{430}$ 의 흡광도에서 측정하였으며(15), 질산( $\text{NO}_3^-$ -N)의 함량은 UV-spectrophotometry법에 의해  $A_{220}$ 과  $A_{275}$ 의 흡광도의 차이로서 측정하였다(6).  
환경요인별 질소고정활성의 측정

회분배양한 영양세포를 원심분리(10,000 rpm, 10 min, 20°C) 하여 무질소배지에 접종한 다음 같은 조건에서 진탕배양하면서 생장의 시간 경과에 따른 이형세포의 분화를 현미경으로 관찰하고, 아세틸렌 환원법으로 질소고정활성의 변화를 측정하였다. 4~5 일 배양하여 아세틸렌 환원활성이 100 nM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·ml<sup>-1</sup>·hr<sup>-1</sup> 이상되는 균액을 10 ml/vial에 2 ml씩 옮겨 넣은 후 각종 환경요인별로 처리하여 30분간 전배양하고, 아세틸렌(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)을 vial 용적의 10%로 주입하여 진탕 배양(120 rpm)하면서 시간별로 가스 시료를 0.5 ml씩 주사기로 채취하여 Porapak R Column(182×0.32 cm)의 Shimadzu GC 8 APF 가스 크로마토그래프(FID)에서 환원된 에틸렌(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)량을 정량하였다. 질소고정효소에 의한 아세틸렌 환원활성은 질소고정활성에 비해 3대 1의 물비로 환산하였다(22).

생장과 활성에 대한 조절요인으로서 산도를 pH 5, 6, 7, 8 및 9의 buffer용액으로 처리하였고, 산소농도는 균액을 넣은 vial을 밀봉하고 manifold 장치에서 진공상태로 만든 후 아르곤 가스로 치환하여 혐기적으로 처리한 후 산소량을 0, 1, 4, 10, 20 Kpa로 처리하여 측정하였다. 조도는 압조건과 형광등에 의해 1,000, 5,000, 7,000, 10,000 및 12,000 lux로 처리하고, 온도는 15, 20, 25, 30, 35, 40 및 45°C로 처리하였다. 탄산원으로서 KHCO<sub>3</sub>의 농도를 0, 5, 20, 40, 50 및 100 mM로 처리하였고, 인산(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)은 0, 0.1, 0.5, 1.0, 10 및 50 ppm로 처리하였다. 질소화합물은 NH<sub>4</sub>Cl과 KNO<sub>3</sub>를 각각 0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 및 5.0 mM로 처리하여 생장과 활성을 분석하였다. 내염성은 NaCl 0, 1, 10, 20, 50 및 100 mM에서 처리하여 측정하였고, 각종 중금속 이온은 Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup> 등의 저장액에 의해 각각 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10 및 30 ppm으로 처리하여 생장과 활성을 측정하였다. 탄수화물의 영향은 과당, 포도당 및 설 탕을 각각 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5.0%로 처리하고, 압조건에서 30분간 전배양한 후 생장과 환원 활성의 변화를 비교 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### A. variabilis ATCC 29413의 생장과 질소고정활성

A. variabilis ATCC 29413은 질소결핍의 최소배지에서 24시간 이후 이형세포를 분화유도하였고, 질소고정기능에 의해 질소첨가배지의 생장과 유사한 생장을 계속하였다(Table 1). 세포의 염록소-a 함량(Y) 및 건물량(Z)의 변화는 각각 A<sub>660</sub>의 흡광도(X)와 높은 상관관계를 보였으며, Y=4.269X-0.207(mg Chl a·ml<sup>-1</sup>, r=0.97), Z=0.45X-0.021(mg dm<sup>-1</sup>, r=0.92), 건물량 1g에 대한 염록소-a의 양은 11.4 mg였다. 질소결핍배지에서 균체의 성장변화와 질소고정활성의 변화는 비례하여 현저하게 증가하였다. 세포의 생장은 지속되었으나, 비활성(SPA)은 6일째에 최대치 600 nM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·mg<sup>-1</sup>·hr<sup>-1</sup>에 이른 후 급격히 감소하였으며, 또한 배지내에 질산(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)의 축적(4.5 ppm 이상)은 활성의 저해농도 보다 높았다. 질소결핍배지에서 고정된 질소로부터 어떤 대사과정에 의해 이와 같은 질산의 축적이 일어나는가에 대해서는 현재 구명되지 않고 있다. 배지내의 암모니아(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)의 축적은 156시간 배양 후에 약 0.32 ppm의 낮은 농도였다. 질소고정활성은 질산 0.3 mM(4 ppm)이상에서 급격한 저해를 보였고, 암모니아의 저해농도는 0.1 mM(1.4 ppm) 이상이었다(Table 2).

### 질소고정활성에 대한 조절요인

조도 : 광반응과 각종 환원물질의 생성에 필요한 광에너지는 질소고정활성을 촉진하였고, 압조건에서는 최저의 활성을 보였다. 이는 Millineux 등(14)이 밝힌 명·암순환에 있어서 남조활성의 변화와 일치하였으며, Ernst 등(8)은 이형세포에 대한 에너지 공급이 압조건에서 최소가 된다고 하였다.

최적의 조도는 10,000 lux로서 4.0 μM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·ml<sup>-1</sup>·12 hr<sup>-1</sup>의 최대활성을 보였으며, 12,000 lux 이상에서는 시간이 경과함에 따라 저해를 보였고, 1,000 lux의 낮은 조도에서는 58%의 저해를 보였다. 균체의 생장은 압조건에서 48%의 감소를 보였다(Table 2).

**Table 1.** Time trends of the cell growth (A<sub>660</sub>, mgdwt·ml<sup>-1</sup>), acetylene reduction activity (ARA), specific activity (SPA) and accumulation of nitrogen compounds in the N-free AA/8 culture of A. variabilis ATCC 29413

Items	Cultivation hours															
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	
Growth (A <sub>660</sub> )	0.10	—	0.10	—	0.22	—	0.35	—	0.49	0.62	0.71	0.84	0.89	0.96	1.02	
(mgdwt·ml <sup>-1</sup> )	0.043	—	0.043	—	0.078	—	0.13	—	0.20	0.26	0.30	0.36	0.38	0.41	0.44	
ARA (nM·ml <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	—	—	—	—	32	—	56	—	98	130	180	216	214	48	35	
SPA (nM·mg <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	—	—	—	—	410	—	430	—	475	498	585	600	562	115	78	
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)	0.07	—	0.10	—	0.42	—	1.14	—	1.72	2.20	2.50	3.80	4.50	5.60	6.40	
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (ppm)	0.09	—	0.11	—	0.15	—	0.17	—	0.20	0.23	0.25	0.28	0.30	0.31	0.32	

**Table 2.** Effects of light, temperature, pH, oxygen,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $\text{KNO}_3$  gradients on the relative cell growth (%) and acetylene reduction activity (ARA) of *A. variabilis* ATCC 29413

Items	Light intensity (lux)						
	0	1,000	5,000	7,000	10,000	12,000	
Cell growth (%)	52	95	97	98	100	99	
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ hr}^{-1}$ )	0.4	1.6	2.7	3.2	4.0	3.5	
Items	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )						
	15	20	25	30	35	40	45
Cell growth (%)	94	97	98	99	100	96	86
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ hr}^{-1}$ )	1.2	1.9	2.7	4.2	4.7	4.5	2.9
Items	pH						
	5	6	7	8	9		
Cell growth (%)	90	95	98	100	80		
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ hr}^{-1}$ )	2.1	2.7	3.2	3.5	2.3		
Items	Oxygen (KPa)						
	0	1	4	10	20		
Cell growth (%)	100	100	100	98	96		
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ hr}^{-1}$ )	4.0	4.1	3.8	3.5	3.3		
Items	$\text{KHCO}_3$ (mM)						
	0	5	20	40	50	100	
Cell growth (%)	100	122	98	92	66	54	
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ hr}^{-1}$ )	3.5	3.8	2.6	2.2	1.7	0.9	
Items	$\text{NaCl}$ (mM)						
	0	1	10	20	50	100	
Cell growth (%)	100	100	97	93	86	71	
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ hr}^{-1}$ )	3.8	3.6	3.2	2.2	1.5	0.6	
Items	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (ppm)						
	0	0.1	0.5	1.0	10	50	
Cell growth (%)	100	104	100	99	97	70	
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ hr}^{-1}$ )	3.6	3.8	3.1	2.6	2.1	1.6	
Items	Concentrations (mM)						
	0	0.05	0.1	0.3	0.5	1.0	5.0
$\text{NH}_4\text{Cl}$							
Cell growth (%)	100	106	109	112	110	105	98
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ hr}^{-1}$ )	3.6	3.4	2.3	1.8	1.1	0.3	—
$\text{KNO}_3$							
Cell growth (%)	100	100	106	113	115	112	110
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ hr}^{-1}$ )	3.6	3.6	3.4	2.5	1.8	1.2	0.5

온도 : 40°C와 35°C의 고온처리에서 초기에 최대 질소고정 활성을 보였으나, 장시간 처리에 따라 활성의 감소를 보였다. 생장의 최적조건인 30°C에서는 지속적으로 높은 활성을 유지하였으나, 실온이하의 저온에서 활성의 감소는 급격한 반면 온도 상승시에

비교적 안정된 활성을 유지하여 내열성을 보였다 (Table 2).

pH : 최대의 질소고정활성은 pH 8에서 있었고, 남조류의 최적 생장조건이 약알칼리성인 것과 일치하였다. pH 6과 5에서는 생장에 대한 억제보다 민감한

활성의 저해를 보였다(Table 2). 이와 같은 결과는 Apte 등(3)이 수중의 남조류에 대해 pH의 영향을 조사한 바와 일치하고, 강산성에서 생육이 저해되며, Na<sup>+</sup> 유입이 제한되어 활성의 감소를 초래되는 것으로 생각된다.

**산소** : 산소농도 0~20 Kpa의 범위에 있어서 최대 질소고정활성은 혐기적 조건 과 미호기적 조건이었고, 호기상대에서는 활성이 감소하여 20 Kpa O<sub>2</sub>에서는 17%의 저해를 보였다(Table 2). Nitrogenase의 활성은 절대혐기적 조건을 요구하지만 남조는 이형세포 내에 효과적인 산소방어기구를 갖고 있어 산소의 저해작용은 다른 호기적 및 혐기적세균에 비하여 크지 않았다(24). 또한 Ca<sup>2+</sup>에 의한 산소의 막투과성을 조절하는 기작을 가지고 있어 활성에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다(21, 22).

**탄산** : CO<sub>2</sub> 공급원으로서 광합성을 촉진시키는 효과가 있는 KHCO<sub>3</sub>는 5 mM 농도에서 생장은 약 22%의 증가를 보였으나, 질소고정활성은 약 8%의 증가를 보였다. 그러나 20 mM 이상의 고농도에서는 생장과 활성의 감소를 보였으며, 100 mM에서는 6시간 이상 경과시에 생장은 46% 감소하였고, 활성은 거의 정지되었다. 이 결과는 Scherer 등(20)이 *A. variabilis*에 대해서 측정된 것과 같은 경향이었고, 고농도의 CO<sub>2</sub>를 흡수할 때 세포막에서 ATPase에 의한 proton의 유출을 초래하여 활성의 저해가 나타나는 것으로 생각된다. 한편 배지에서 pH 10.7의 상

승은 활성 억제 의 원인으로 생각된다(Table 2).

**NaCl** : 염농도에 따른 질소고정활성은 NaCl 10, 20, 50 및 100 mM의 농도에서 각각 93, 65, 43 및 19%로 감소하였고, 50%의 활성저해농도는 35 mM이었다. 생장은 100 mM 농도에서 29%의 감소를 보여 활성에 비해 내염성이 강한 것으로 나타났다(Table 2). 이와 같은 결과는 Apte와 Thomas(2) 그리고 Apte 등(3)이 *Anabaena torulosa*와 *Plectonema boryanum*에 대해 조사한 것과 일치하고, 염농도에 대한 활성의 내염성은 질소원이나 pH 등의 환경요인에 의해 Na<sup>+</sup> 유입이 감소할 때 증가되는 것으로 알려지고 있다.

**인산** : 인산(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)은 0.1 ppm 이하의 농도에서 활성의 증가를 보였고, 0.5, 1, 10 및 50 ppm의 농도에서는 89, 74, 62 및 54%로 활성의 저해를 보였다. 생장은 50 ppm에서 30%의 감소를 보였고, 시간 경과에 따라 저해율이 높았다(Table 2).

**질소화합물** : 암모니움(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 및 1 mM에 대한 질소고정 활성은 각각 95, 62, 51, 33 및 8%로 급격한 저해를 보였으나, 생장은 질소원 공급에 의해 증가하였다(Table 2). 50% 활성의 저해농도는 0.3 mM있으며, 시간이 경과함에 따라 급격한 활성의 감소를 보여 1 mM 이상의 농도에서 3시간 뒤의 활성은 10% 이하로 감소되었다. Apte 등(3)은 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 이 세포막에서 Na<sup>+</sup> 유입을 억제하여 탈분극을 일으키는 것을 밝혔으며, 이와 같은 저해는 다른 난생 또는 공생의 질소고정생물에서도 많이 알려지고 있는

**Table 3.** Effects of heavy metal ions on the cell growth (%) and acetylene reduction activity (ARA) of *A. variabilis* ATCC 29413

Items	Concentration (ppm)				
	0	0.1	0.3	0.5	1.0
<b>Cd<sup>2+</sup></b>					
Cell growth (%)	100	102	101	100	98
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ h}^{-1}$ )	3.5	3.6	2.7	1.2	0.3
<b>Co<sup>2+</sup></b>					
Cell growth (%)	100	104	103	100	96
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ h}^{-1}$ )	3.5	4.0	3.3	3.1	0.7
<b>Hg<sup>2+</sup></b>					
Cell growth (%)	100	104	100	94	64
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ h}^{-1}$ )	3.5	3.2	2.7	1.2	0.1
	Concentration (ppm)				
	0	3	5	10	30
<b>Pb<sup>2+</sup></b>					
Cell growth (%)	100	102	100	96	93
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ h}^{-1}$ )	3.5	2.9	2.3	1.5	0.8
	Concentration (ppm)				
	0	0.3	0.5	1.0	3.0
<b>Zn<sup>2+</sup></b>					
Cell growth (%)	100	104	98	96	94
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 12 \text{ h}^{-1}$ )	3.5	2.8	2.3	1.1	0.2

**Table 4.** Effects of carbone sources on the cell growth (%) and acetylene reduction activity (ARA) of *A. variabilis* ATCC 29413

Item	Concentration (%)						
	0	0.05	0.1	0.5	1.0	2.5	5.0
<b>Fructose</b>							
Cell growth (%)	100	109	111	118	116	112	93
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{m}^{-1} \cdot 12 \text{ h}^{-1}$ )	3.5	3.9	4.4	5.0	4.5	4.0	0.7
<b>Glucose</b>							
Cell growth (%)	100	109	114	112	110	108	104
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{m}^{-1} \cdot 12 \text{ h}^{-1}$ )	3.5	3.8	3.6	3.4	3.0	2.9	0.2
<b>Sucrose</b>							
Cell growth (%)	100	136	129	127	125	121	109
ARA ( $\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \cdot \text{m}^{-1} \cdot 12 \text{ h}^{-1}$ )	3.5	5.2	4.6	4.3	4.0	3.1	2.5

것이다(22). 질산태( $\text{NO}_3^-$ )는 0.1, 0.3, 0.5 및 1 mM의 농도에서 질소고정활성을 각각 80, 56, 53 및 48%로 저해하였다. 그러나 세포의 생장은 질소원 공급에 의해 촉진되었다(Table 2).

**중금속 이온** : 각종 유독성의 2가 양이온인 중금속  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  및  $\text{Zn}^{2+}$  등의 농도별 처리에 따른 생장의 변화와 질소고정활성의 저해는 Table 3에서 보는 바와 같다.  $\text{Cd}^{2+}$  은 0.3 ppm과 0.5 ppm 처리시에 각각 21%와 53%의 질소고정 활성저해를 보였으며, 50%의 활성저해농도는 0.47 ppm이었다. 생장은 1.0 ppm까지 큰 저해가 없었다.  $\text{Co}^{2+}$  는 0.5 ppm과 1.0 ppm에서 49%와 80%의 활성저해를 보였으나, 시간이 경과함에 따라 활성의 회복을 보였고, 생장은 1.0 ppm 이하에서는 영향이 없었다.  $\text{Hg}^{2+}$  은 0.3 ppm과 0.5 ppm에서 각각 22%와 65%의 활성저해를 보였으며, 50% 저해농도는 0.41 ppm이었고, 생장은 1 ppm에서 36% 감소하였다.  $\text{Pb}^{2+}$  에 대해서는 비교적 감수성이 낮았으나, 3, 5 및 10 ppm에서 각각 20, 30 및 65%의 활성저해를 보였으며, 30 ppm에서는 9시간 배양 후에 완전 저해를 보였고, 생장은 7%의 감소를 보였다.  $\text{Zn}^{2+}$  은 0.3, 0.5 및 1.0 ppm의 농도에서 21, 32 및 68%의 활성저해를 보였고, 3 ppm 이상에서는 활성이 완전히 소실되었다. 생장은  $\text{Zn}^{2+}$  3 ppm에서도 90% 이상 유지되었다. 이러한 결과는 Song(23)이 *Scenedesmus* sp.의 생장에 미치는  $\text{Zn}^{2+}$  의 영향분석과 일치하였다. 그외의 중금속 이온( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ )에 대해서도 모두 1 ppm 이상의 농도에서 활성의 저해를 보였다(자료는 제시하지 않았음).

**탄수화물** : 암조건에서 광합성 작용이 없을 때 탄소원을 첨가하면 질소고정활성을 유지시킬 수 있다(17). 과당은 0.05~2.5%의 농도범위에서 질소고정활성 및 생장의 증가를 보였으나, 고농도(5%)에서는 활성저해가 일어났으며, 삼투압에 의한 영향이 있을 것으로 생각된다. 포도당은 0.5~1.0%의 범위에서 활성의 증가를 보였고, 2.5% 이상의 고농도에서는 저해를 보였으나 생장은 증가를 보였다. 설탕은 0.1, 0.5

및 1.0%의 저농도에서 대조구에 비해 각각 155, 128 및 116%의 활성 증가를 보였고, 2.5%의 고농도에서도 비교적 높은 활성을 유지하였으며, 생장은 각 농도별로 36, 29, 27, 21 및 9%의 증가를 보였다(Table 4). 그러나 암조건에서 당류를 첨가한 후 혐기적 조건으로 배양하거나, 빛을 조사할 때 활성에 미치는 영향이 검토되어야 할 것이다.

## 사 사

본 연구는 한국과학기술진흥재단의 연구비 지원(1990)에 의해 수행되었음.

## 참 고 문 헌

1. Allen, M.B. and D.I. Arnon, 1955. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiol.* **30**, 366-372.
2. Apte, S.K. and J. Thomas, 1984. Effect of sodium on nitrogen fixation in *Anabaena torulosa* and *Plectonema boryanum*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1161-1168.
3. Apte, S.K., B.R. Reddy and J. Thomas, 1987. Relationship between sodium influx and salt tolerance of nitrogen-fixing cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1934-1939.
4. Bonilla, I. and P. Mateo, 1990. Effect of boron deficiency on photosynthesis and reductant sources and their relationship with nitrogenase activity in *Anabaena* PCC 7119. *Plant Physiol.* **93**, 560-565.
5. Bothe, H., 1982. Nitrogen fixation. In N.G. Carr and B.A. Whitton (ed.). *The Biology of cyanobacteria*. Blackwell, Oxford. pp. 87-104.
6. Cawse, P.A., 1967. The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst.* **92**, 311-315.
7. Ernst, A., H. Kirschenlohr, J. Diez and P. Böger, 1984. Glycogen content and nitrogenase activity

- in *Anabaena variabilis*. *Arch. Microbiol.* **140**, 120-125.
8. Ernst, A., S. Reich and P. Boger, 1990. Modification of dinitrogenase reductase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* due to C-starvation and ammonia. *J. Bacteriol.* **172**, 748-755.
  9. Goldberg, I., Y. Nadler and A. Hochman, 1987. Mechanism of nitrogenase switch off by oxygen. *J. Bacteriol.* **169**, 874-879.
  10. Golden, J.W., 1988. Genome rearrangements during *Anabaena* sp. heterocyst differentiation. *Can. J. Bot.* **66**, 2098-2102.
  11. Jeffrey, S.W. and G.F. Humphrey, 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b and c in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **167**, 191-201.
  12. Kostyaev, V.Y., 1980. Effect of heavy metal ions on cyanobacteria (*Anabaena spiroides*). *Mikrobiologiya.* **49**, 821-824.
  13. Lex, M. and W.D.P. Stewart, 1973. Algal nitrogenase, reductant pools and photosystem-I activity. *Biochem. Biophys. Acta.* **292**, 436-443.
  14. Millineaux, P.M., J.R. Gallon and A.E. Chaplin, 1981. Acetylene reduction (nitrogen fixation) by cyanobacteria grown under alternating light-dark cycles. *Fems. Microbiol. Lett.* **10**, 245-248.
  15. Nicholos, M.S. and M.E. Foote, 1931. Distillation of free ammonia from buffered solution. *Lnd. Eng. Chem. Anal. Ed.* **3**, 1-311.
  16. Ohmori, M., 1984. Effects of preillumination on dark nitrogen fixation and respiration by *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.* **25**, 125-130.
  17. Pearce, J. and N.G. Carr, 1969. The corporation and metabolism of glucose by *Anabaena variabilis*. *J. Gen. Microbiol.* **54**, 451-462.
  18. Peterson, R.B. and R.H. Burris, 1976. Conversion of acetylene reduction rates to nitrogen fixation rates in natural populations of blue-green algae. *Anal. Biochem.* **73**, 404-410.
  19. Rippka, R. and R.Y. Stainer, 1978. The effects of anaerobiosis on nitrogenase synthesis and heterocyst development by *Nostocacean* cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **105**, 83-84.
  20. Scherer, S., H. Riege and P. Boger, 1988. Light-induced proton release by the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Plant Physiol.* **86**, 769-772.
  21. Smith, R.J., 1988. Calcium-mediated regulation in the cyanobacteria. In L.J. Rogers and J.R. Gallon(ed.). *Biochemistry of the algae and cyanobacteria*. Clarendon Press, Oxford. pp. 185-199.
  22. Smith, R.L., C.V. Baalen and F.R. Tabita, 1990. Control of nitrogenase recovery from oxygen inactivation by ammonia in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain CA(ATCC 33047). *J. Bacteriol.* **172**, 2788-2790.
  23. Song, S.D., 1977. Ecological characteristics of some algal populations along environmental gradients of Zn. *Kor. J. Botany.* **20**, 119-126.
  24. Stewart, W.D.P. and H.W. Pearson, 1970. Effects of aerobic and anaerobic conditions on growth and metabolism of blue-green algae. *Proc. R. Soc. London. B.* **175**, 293-311.

(Received August 17, 1992)

(Accepted September 2, 1992)

**ABSTRACT: Factors Regulating the Nitrogen Fixation Activity and Growth of *Anabaena variabilis* ATCC 29413**

Song, Seung-Dal and Dong-Hoon Han (Department of Biology, Kyungpook National University, Taegu)

*Anabaena variabilis* ATCC 29413, a photoautotrophic and nitrogen fixing cyanobacteria, was investigated on the environmental factors regulating the growth and nitrogen fixation activity. A good growth of cyanobacterial cells was observed due to nitrogen fixation by the heterocyst differentiation in nitrogen free Allen and Arnon (1/8) medium. The nitrogenase activity was appeared to be in proportion to the cell growth for 6 days then drastically decreased in the later growth period when the nitrate was accumulated to high level in the culture to cause the inhibition. The optimal conditions for the cell growth and nitrogenase activity of *A. variabilis* were anaerobic, 10,000 lux, 30°C and pH 8 with the nitrogen free minimal medium. The activity was significantly inhibited by the low concentrations of ammonium and nitrate, but was stimulated by the low level of phosphate and carbonate sources. The treatments of several toxic heavy metals showed strong inhibition of the cell growth and nitrogenase activity by 0.3~10 ppm in the order of  $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Co^{+} > Zn^{2+} > Pb^{2+}$ , and the concentrations for 50% inhibition of the maximum activity were 0.41, 0.47, 0.51, 0.66 and 8.1 ppm, respectively. The addition of carbohydrates (0.5~1.0%) in the dark condition stimulated the growth and activity in the order of sucrose > fructose > glucose.