

## *Caulobacter* 細胞의 分化形態와 鹽素를 包含하는 水質汚染과의 相關關係

金致卿 · 朴文櫛 · 廉 錕\*

### Correlations between Water Quality and Morphology of *Caulobacter* Isolated from Gradually Polluted Waters

Kim C.K., M.K. Park, and K. Yum\*

#### Abstract

On the basis of the facts found in the previous report that chlorine destroyed cell membrane and stalk of *Caulobacter crescentus* and that the damaged cells abnormally differentiated to elongate their stalks when the chlorinated cells were reincubated in fresh medium, it was suggested that there might be some ecological correlations between the level of water pollution and morphology and physiology of *Caulobacter* cells. In order to determine such correlations in this study, 18 isolates of caulobacters were isolated from three sites of Musimcheon River which were gradually polluted by domestic sewages and 6 species were identified. Four cell types of bacteroid, vibroid, subvibroid, and fusiformis were isolated from the least polluted water at the rate of 43%, whereas only two cell types of bacteroid and vibroid were isolated from the more polluted waters at the rates of 7 and 10%, respectively. There was no significant difference in each species of *Caulobacter* isolated from the gradually polluted river waters, except that abnormally long filamentous cells were occasionally observed in *C. crescentus* isolated from the most polluted water. Each species showed various responses to chlorine. The resistances of *C. crescentus* isolates to chlorine were proportionally correlated with the level of water pollution. When they were compared to *C. crescentus* CB 13 which had been adapted to laboratory environment, the *C. crescentus* isolated from the most polluted water was more resistant to chlorine.

#### 서 론

細胞分裂이 非對稱的으로 일어나는 caulobacter 는 *Caulobacter* 와 *Asticcacaulis* 의 2 개의 屬으로 分類되

며 Bergey's manual of determinative bacteriology 에 의하면 *Caulobacter* 는 현재 10개 種으로 구성 되어 있다. *Caulobacter* 細胞는 形態上의 차이에 따라 vibroid, subvibroid, fusiformis, bacteroid 등 4 가지

忠北大 自然大 生物學科 · \*國立保健院 眞菌科

Department of Biology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University.

\*Department of Mycology, Korea National Institute of Health

本 研究는 1982年度 韓國科學財團의 研究費로 遂行되었음.

type 으로 區分된다. 이와 같은 細胞 分化上의 特異性 때문에 *Caulobacter* 의 細胞器官의 分化에 미치는 物理的 또는 化學的 외부 環境要素의 影響에 관한 研究들이 比較的 많이 수행되어 왔다.

Schmidt 와 Stanier 는 磷酸이 결핍된 培地에서 *C. crescentus* 의 stalk 의 成長이 촉진된다고 報告하였으며, Poindexter 는 炭素源이 부족하여 細胞의 生長이 억제되는 自然環境이나 人工培養液에서는 stalk 가 異常的으로 길어질 뿐 아니라 때로는 細胞의 兩極에서 stalk 가 形成된다고 보고하였다. 그밖에 *Caulobacter* 의 細胞分裂이 억제되어 體長이 긴 絲狀의 細胞가 形

成되는 경우는 mitomycin C penicillin G, cis-platinum (II) diaminodichloride 등의 化學物質을 使用한 실험에서 報告되었다.

Kim 등은 上下水의 殺菌處理에 널리 使用되고 있는 鹽素가 水中 微産物의 生理作用 및 形態的인 特性에 影響을 준다는 報告에 근거를 두고 下水 및 上水로 부터 *Caulobacter* 를 分離하여 그 細胞의 形態와 分化에 미치는 鹽素 및 鹽素化合物의 影響을 研究하였다. 그들은 *Caulobacter* 에 鹽素를 처리 했을때 細胞膜과 stalk 에 손상이 일어나며 細胞 內客物質이 流出된다는 것을 確認했으며 또 鹽素處理를 한 *Caulobacter* 細胞

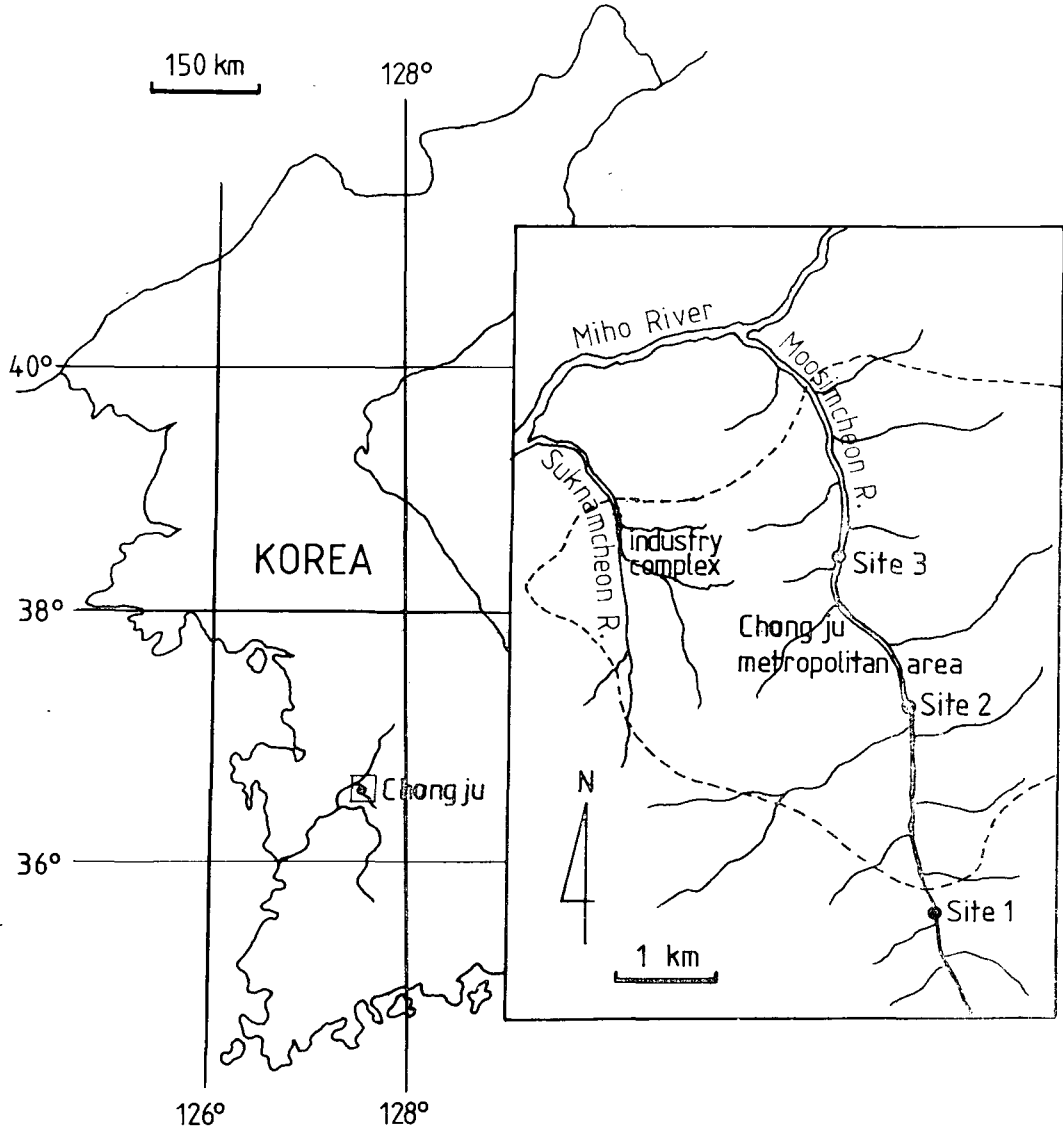


Fig. 1. Location of study sites

를 fresh medium에서 再培養했을때에는 stalk가長大化되는 등 異常分化가 일어난다고 報告하였다. 이와 같은 結果는 自然水에 存在하는 *Caulobacter*의 形態가 鹽素를 包含하는 水質의 汚染物質과 生態學的인 聯關性이 있음을 示唆해 준다. 따라서 本 研究에서는 汚染程度가 다른 河川水로 부터 *Caulobacter*를 分離하여 이들의 分布와 形態의인 差異 그리고 鹽素에 대한 反應등 水質汚染과의 相關關係를 추구하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 試驗細菌의 分離場所 및 河川水의 汚染度 調査

淸州市內를 貫流하는 無心川에서 Fig. 1과 같은 3地點을 선정하여 *caulobacter*의 分布와 形態上의 차이점을 比較하였다. 각 지점의 河川水의 오염도는 Standard Methods에 의하여 分析하였다.

#### 2. *caulobacter*의 分離 및 培養

*caulobacter*는 Poindexter의 方法에 의하여 각 지점의 河川 表面水 100ml를 滅菌된 flask에 채취하여 peptone을 최종 농도가 0.01%가 되도록 첨가한 후 25°C에서 定置培養하면서 分離하였다. 약 5일 동안 培養하여 *caulobacter*의 相對的 빈도를 증가시킨 다음 表層水를 分離用 寒天培地(0.05% peptone; 1.5% 寒天)에 도달하여 30°C에서 배양하였다. 培地 위에 發生한 colony는 하나하나씩 滅菌된 needle을 사용하여 Peptone Yeast Extract(PYE) 한천배지에 接種하여 30°C에서 2일간 배양하였다. 각 colony의 細菌은 Gray's flagella staining의 方法으로 染色한 후 光學 현미경으로 形態上의 特徵을 觀察하여 *caulobacter*를 分離하였다. 分離된 *caulobacter*는 PYE 寒天 또는 溶液培地를 사용하여 30°C에서 增殖시켰다.

#### 3. *caulobacter*의 同定

分離된 *caulobacter* 菌株들은 Bergey's manual of determinative bacteriology에 의하여 形態學的 특성 및 growth factor의 要求性を 기준으로 同定하였다. 形態의 特性은 光學 및 電子顯微鏡을 利用하였으며 growth factor 要求性은 Hutner mineral base에 磷酸鹽, 포도당, 그리고  $NH_4Cl$ 을 각각 20mM, 11mM, 93mM을 첨가하여 Table 1과 같은 組成으로 vitamin  $B_1$ 과  $B_{12}$ , 그리고 biotin에 대하여 檢査하였다.

#### 4. 光學 및 電子顯微鏡 觀察

光學 현미경 관찰은 試料를 slide glass에 도달한 후 Gray's flagella staining 方法으로 染色하여 1,500倍로 관찰했다. 電子현미경 試料는 formvar와 炭素로 皮膜한 300mesh의 銅製 grid에 細菌 培養液을 點滴한

Table 1. Composition of Hutner mineral base

Ingredient	Amount
Nitritotriacetic acid	10.0g
$MgSO_4$	14.45g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3.335g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.00925g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.099g
Stock salts solution*	50.0ml
Distilled water	150.0ml

\*Stock salts solution is consisted of the following:

EDTA	2.5g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10.95g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.0g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	1.54g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.392g
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.248g
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	0.177g
Distilled water	1.0l

후 1%의 phosphotungstic acid로 negative staining을 하여 Jeol 電子현미경(model JEM-50B)로 觀察하였다.

#### 5. *caulobacter*의 鹽素處理

鹽素處理를 위한 鹽素溶液은 sodium hypochlorite (Hayashi Pure Chemical Co.)을 멸균된 2次 증류수를 사용하여 實驗 직전에 필요한 농도로 희석하여 使用하였으며 鹽素의 濃度는 Standard Methods의 iodometric method에 의하여 測定하였다.

試驗 菌株는 100ml의 PYE 용액배지에서 對數增殖 末期까지 배양한 후 遠心分離하여 침전된 細胞들을 멸균된 2次 증류수에 현탁시켜  $10^8$  cell/ml의 농도로 조절한 후 사용하였다. 鹽素溶液 27ml에 3ml의 細胞용액을 混合하여 室溫에서 反應을 시작한 후 5분, 15분, 30분, 그리고 45분 후에 4ml의 試料를 채취하여 0.05% sodium thiosulfate 0.2ml와 混合하여 殘存 鹽素의 作用을 중단시켰다.

### 결 과

#### 1. 河川水의 汚染度

試驗細胞들을 分離한 無心川의 각 地點에서 河川水를 分析한 結果는 Table 2와 같다. 下流로 내려가면서 無核 ion들 BOB, 微産物의 汚染 등 전체 水質汚染은 漸進的으로 增加하였다.

**Table 2.** Pollutional characteristics of the water samples

Parameters	Sampling sites		
	1	2	3
Color(degree)	1	1	2
Turbidity(degree)	2	2	3
pH	7.27	7.76	7.68
NO <sub>3</sub> -N(mg/l)	0.2	0.2	1.0
Cl ion(mg/l)	12.2	23.4	33.3
Fe ion(mg/l)	0.05	0.05	0.10
Ca and Mg ions(mg/l)	66.0	72.0	92.0
BOD(mg/l)	21.6	78.4	131.5
Standard plate count (CFU/ml)	1.2×10 <sup>4</sup>	7.6×10 <sup>4</sup>	1.4×10 <sup>6</sup>
Coliform count (CFU/ml)	9.1×10 <sup>3</sup>	3.6×10 <sup>4</sup>	3.8×10 <sup>5</sup>

**2. caulobacter 의分離**

低濃度の炭素源을 使用하는 溶液培地에서 表層水에 모이는 caulobacter 細胞의 빈도를 光學현미경으로 每日 조사한 결과 25°C에서 약 5일간 培養했을 때에 가

장 높았다. 培地의 表層水에 모이는 caulobacter 는 Fig. 2에서와 같이 粘着性이 있는 stalk 의 末端을 利用하여 固體物에 부착되어 있었다.

**3. caulobacter 의 同定**

分離된 caulobacter 는 모두 18 株였으며 이들을 同定한 結果는 Table 3과 같다. 全體 分離菌株 중 *Caulobacter crescentus*(Fig. 3)가 4 株, *C. bacteroides* (Fig. 4)가 8 株, *C. vibroides*(Fig. 5)가 3 株 그리고 *C. leidyii*, *C. henrichii* (Fig. 5), *C. subvibroides* (Fig. 6)가 각 각 1 株씩 이었다.

**4. caulobacter 의 分布 및 形態와 水質 汚染度와의 相關關係**

汚染 程度가 가장 낮은 1번 地點에서는 分離된 全體 細菌 중 caulobacter 가 43%(13/30) 이었으나 汚染度가 높은 2번과 3번 地點에서는 그 分離빈도가 각 각 7%(2/30)와 10%(3/30)로서 1번 地點에 比하여 훨씬 낮았다.

分離된 *Caulobacter* 의 細胞 形態上的 特徵은 Table 3에서와 같이 1번 地點에서는 vibroid, subvibroid, bacteroid, 그리고 fusiformis 형이 모두 發見되었으나 2번과 3번 地點에서는 vibroid와 bacteroid 형 만이

**Table 3.** Characteristics of *Caulobacter* isolates for identification

Isolate No.	Sampling site	Morphological type	Pigmentation	Growth factor requirement	Species
1	1	vibroid	none	none	<i>C. crescentus</i>
2	1	vibroid	none	none	<i>C. crescentus</i>
3	1	vibroid	none	vitamin B2	<i>C. vibroides</i>
4	1	vibroid	none	vitamin B2	<i>C. vibroides</i>
5	1	fusiformis	none	none	<i>C. leidyii</i>
6	1	vibroid	yellow	vitamin B12	<i>C. henrichii</i>
7	1	bacteroid	orange	unidentified	<i>C. bacteroides</i>
8	1	bacteroid	orange	unidentified	<i>C. bacteroides</i>
9	1	bacteroid	orange	unidentified	<i>C. bacteroides</i>
10	1	bacteroid	orange	unidentified	<i>C. bacteroides</i>
11	1	bacteroid	orange	unidentified	<i>C. bacteroides</i>
12	1	bacteroid	orange	unidentified	<i>C. bacteroides</i>
13	1	subvibroid	none	unidentified	<i>C. subvibroides</i>
14	2	vibroid	none	vitamin B2	<i>C. vibroides</i>
15	2	vibroid	none	none	<i>C. crescentus</i>
16	2	bacteroid	none	unidentified	<i>C. bacteroides</i>
17	3	bacteroid	none	unidentified	<i>C. bacteroides</i>
18	3	vibroid	none	none	<i>C. crescentus</i>

발견되었다. Excentrical caulobacter 는 어느 地點에서 도發見되지 않았다. 1번 地點에서 分離된 caulobacter 는 bacteroid 형이 40%(6/13), vibroid 형이 38%(5/13), subvibroid 형이 8%(1/13) fusiformis 형이 8%(1/13)인 形態的 分布 比率을 나타냈다.

汚染程度가 相異한 水質環境에서 分離한 같은 種의 caulobacter 는 菌株사이에 形態 및 分化上의 뚜렷한 差異는 발견되지 않았다. 다만 汚染이 심한 3번 地點에서 分離된 *C. crescentus*(isolate 18)는 정상적인 vibroid 형의 細胞 뿐 아니라 Fig. 7에서와 같은 體長이 非正常的으로 긴 細胞들이 subculture에서 많이 관찰되었다.

**5. caulobacter의 鹽素 抵抗性和 水質 汚染度와의 相關關係**

各 地點에서 分離한 *C. crescentus*에 대한 鹽素의 殺菌效果는 Fig. 8과 같다. 2.0mg/l의 鹽素로 pH7.0에서 15분간 處理했을 때 isolate 1은 4.3 log, isolate 15는 3.2 log, isolate 18은 1.0 log의 細菌이 殺菌감 소되어 汚染程度가 높은 地點에서 分離된 caulobacter 일수록 鹽素에 대한 抵抗力이 크게 나타났다. Isolate 1과 isolate 15의 경우 15분간 처리했을 때 對照細菌으로 使用한 *C. crescentus* CB 13에 비하여 殺菌效果가 컸으나 30분간 처리했을 때에는 작아졌고 이 경향은 45분간 처리했을 때 더욱 뚜렷해 졌다. 이는 汚染度가 가장 높은 3번 地點에서 分離된 *C. crescentus*만이 實驗室 環境에 適應된 *C. crescentus* CB 13보다 鹽素에 대한 抵抗力이 크다는 것을 意味한다.

*C. vibroides*에 대한 鹽素의 殺菌效果는 Fig. 9와 같이 細菌의 分離地點에 따르는 差異는 거의 없었으며

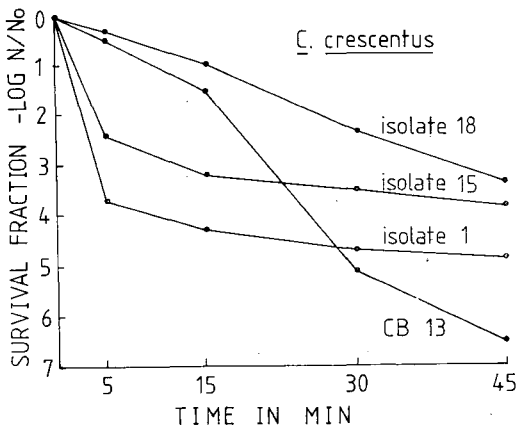


Fig. 8. Disinfection effects of chlorine on *Caulobacter crescentus*.

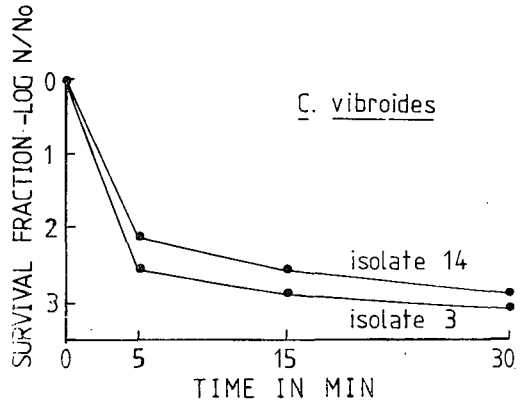


Fig. 9. Disinfection effects of chlorine on *C. vibroides*

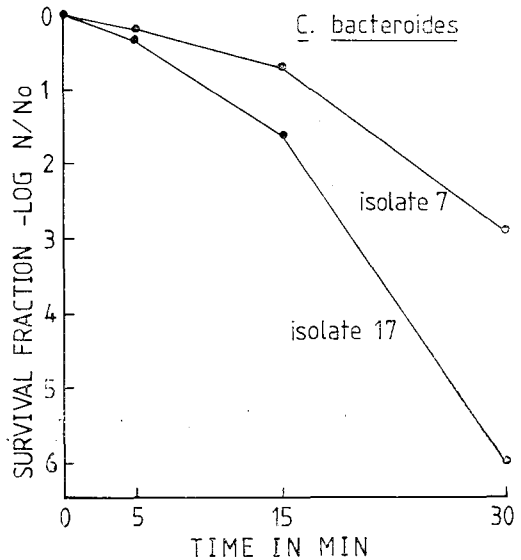


Fig. 10. Disinfection effects of chlorine on *C. bacteroides*

*C. bacteroides*의 경우는 Fig. 10에서와 같이 1번 地點에서 分離된 isolate 7이 3번 地點에서 分離된 isolate 17보다 鹽素에 대한 抵抗力이 오히려 컸다. 그러므로 河川水의 汚染程度와 그곳에서 分離한 caulobacter의 鹽素 抵抗力 사이의 相關關係는 *C. crescentus*에서만 正比例하는 結果를 나타냈고 그 밖의 種에서는 一定한 相關性을 발견할 수 없었다.

**고 찰**

無心川의 水質汚染은 本 實驗의 位置에 따라 無機

ion, BOD, 微生物의 汚染등 主로 家庭下水의 特徴을 나타냈으며 下流로 가면서 汚染程度는 漸進的으로 증가하여 각 실험위치에서의 汚染度의 差異는 本 研究의 目的에 合當하였다.

Oligotrophic bacteria 의 代表的인 caulobacter 의 分離는 첫 단계에서 培地의 有機物 濃도를 0.01% 以下로 낮추는 것이 가장 効率的인 選別 分離方法이다. 그러므로 다른 細菌의 過成長(overgrowth)를 防止할 수 있도록 分離用 寒天培地의 peptone 濃도를 0.05% 以下로 制限함으로써 caulobacter 를 分離할 수 있었다.

caulobacter 의 同定과정에서 *C. crescentus*; *C. vibroides*, *C. leidyii* 그리고 *C. henrichii* 는 形態的인 特徵과 growth factor 의 要求性에 따라 同定하였으나 *C. bacteroides* 와 *C. subvibroides* 는 Poindexter 의 方法에 따라 主로 形態的인 特徵으로 同定하였다.

Caulobacter 의 分離빈도가 汚染度가 낮은 地點에서 높은 地點보다 훨씬 높았던 결과는 合當하다. Belyaev 는 caulobacter 의 분리빈도는 水中의 heterotrophic 細菌의 수와 有機物質의 濃도에 反比例한다고 報告하였다. 本 研究에서 BOD 가 21.6mg/l 이고 standard plate count 가  $1.2 \times 10^4$  CFU/ml 인 1번 地點에서의 caulobacter 分離빈도와 BOD 가 각각 78.4mg/l 와 131.5mg/l 이고 또 standard plate count 가 각각  $7.6 \times 10^4$  CFU/ml 와  $1.4 \times 10^6$  CFU/ml 인 2번과 3번 地點에서의 分離빈도에 비하여 훨씬 높았던 것은 Belyaev 의 결과와 同一하다고 해석된다.

汚染度가 比較的 낮은 1번 地點에서 分離된 caulobacter 의 形態의 分布比率(bacteroid, 40%; vibroid, 38%; subvibroid, 8%; fusiformis, 8%)는 Poindexter (12)가 보고한 bacterid 형이 46%, vibroid 형이 30%, subvibroid 형이 12%, fusiformis 형이 8%인 分布比率과 매우 유사하다. 2번과 3번 地點에서는 vibroid 형과 bacteroid 형 만이 分離되어 汚染度가 높아짐에 따라 種의 多樣性이 줄어드는 경향을 나타냈다.

汚染度가 다른 河川水에서 分離同定된 같은 種의 caulobacter 는 菌株사이의 形態的 差異가 별로 나타나지 않았으나 汚染度가 높은 3번 地點에서 分離된 *C. crescentus* 의 subculture 에서는 vibroid 형 세포 뿐 아니라 體長이 非正常的으로 長大화된 細胞들이 관찰되는 것은 汚染度와의 어떤 연관성을 시사해 준다. 이 現象은 mitomycin C, penicillin G, cis-platinum(II) diamminodichloride 등의 特質과 같이 細胞 구성물질의 合成은 저해하지 않으면서 세포의 分裂만을 저해하는 機作에 의한 결과인지 또는 汚染源物質의 다른 機作에

의한 결과인지는 確實하지 않다.

### 결론

汚染程度가 相異한 無心川의 3地點의 水質로 부터 caulobacter 를 分離한 빈도는 오염도가 낮은 1번 地點에서는 43%였으나 오염도가 높은 2번과 3번지점에서 7~10%였다.

제 1번 地點에서 分離한 caulobacter 는 bacteroid 형이 40%, vibroid 형이 38%, subvibroid 형이 8% 그리고 fusiformis 형이 8%였다.

汚染度가 다른 河川水에서 分離된 같은 種의 caulobacter 는 菌株사이의 形態的 差異가 없었으나 汚染度가 높은 1번 地點에서 分離한 *C. crescentus* 의 세포는 正常的인 vibroid 형 뿐 아니라 非正常的으로 體長이 긴 細胞들도 발견되었다.

河川水의 汚染程度와 그곳에서 分離한 caulobacter 의 鹽素抵抗力 사이의 相關關係는 *C. crescentus* 에서만 正比例하는 결과가 나타났고 그 밖의 種에서는 一定한 相關性이 없었다.

### 참고문헌

American Public Health Association. 1976. Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Belyaev, S.S. 1967. Distribution of the caulobacter group of bacteria in the Volga-Don reservoirs. Mikrobiologiya 36 : 157~162.

Belyaev, S.S. 1968. Caulobacter in soils and some reservoirs of the USSR. Vestn. Mosk. Univ. 6 : 98~105.

Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Copuzzo, J.M., S.A. Lawrence, and J.A. Davidson. 1976. Combined toxicity of free Chlorine, Chloramine, and temperature to stage I larvae of the American lobster *Homerus americanus*. Water Res. 10 : 1093~1099.

Doetsch, R.N. 1981. Oeterminative methods of light microscopy. P. 21-23. In p. Gerhardt(ed), Manual of methods for general bacteriology. Amer. Soc. for Microbial. Washington, D.C.

Harrs, E.G., and J.M. Schmidt. 1974. Stalk formati-

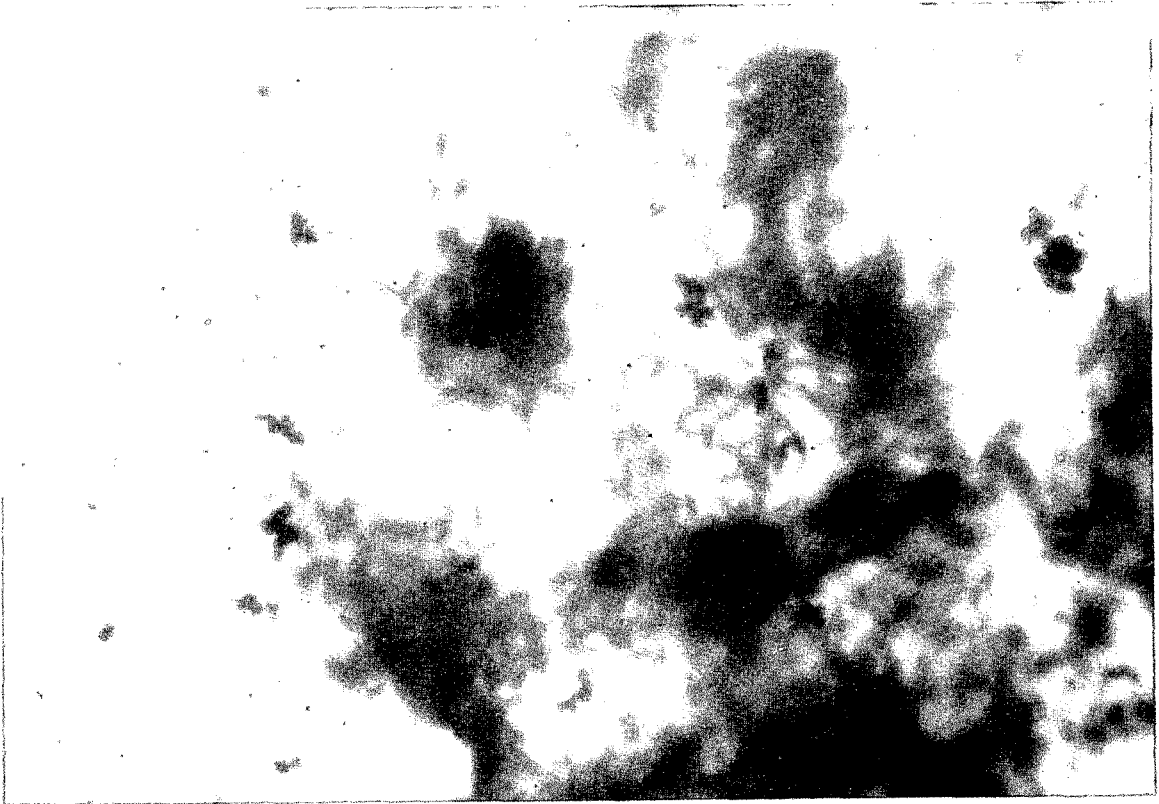
- on and its inhibition in *Caulobacter crescentus*, J. Bacteriol. 120 : 1409~1416.
- Kim, C. K., M.K. Park, and K. Yum. 1982. Effects of Chlorine and Chlorine Compounds on morphology and function of *Caulobacter Cells*. Kor. Jour. Electron Microscopy. 12 : 23~32.
- Moore, R. L., and R. Brubaker. 1976. Effect of cisplatinum (II) diamminodichloride on cell division of *Hyphomicrobium* and *Caulobacter*. J. Bacteriol. 125 : 317~323.
- Muchmore, D., and D. Epel. 1973. The effects of chlorination of wastewater on fertilization in some marine invertebrates. Mar. Biol. 19 : 93~95.
- Poindexter, J.S. 1964. Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. Bacteriol. Rev. 28 : 231~295.
- Poindexter, J.S. 1981. The Caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. Microbiol. Rev. 45 : 123~179.
- Shih, K.L., and J. Lederberg. 1976. Chloramine mutagenesis in *Bacillus subtilis*. Science. 192 : 1141~1143.
- Schmidt, J.M., and R.Y. Stanier. 1966. The development of cellular stalks in bacteria. J. Cell Biol. 28 : 423~436.
- Smibert, R.M., and N.R. Krieg, 1981. General Characterization, p.434-435. In P. Gerhardt(ed.) Manual of methods for general bacteriology. Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D. C.
- Terrana, B., and A. Newton. 1976. Requirement of a cell division step for stalk formation in *Caulobacter crescentus*. J. Bacteriol. 128 : 456~462.

#### Figure Legends

- Fig. 2.** Light micrograph of caulobacters observed on the surface of water sample after 5 d cultivation. Several curved and stalked caulobacters are seen to be attached to solid materials. Magnification is 3,000X.
- Fig. 3.** Electron micrograph of *Caulobacter crescentus*(isolate #15) isolated from the site 1. The cell type is vibroid. Tapered body and long curved axis are seen. Magnification is 12,000X.
- Fig. 4.** Electron micrograph of *Caulobacter bacterioides*(isolate #11) isolated from the site 1. The cell type is bacterioid with pole rounded and long axis not curved. Magnification is 12,000X.
- Fig. 5.** Electron micrograph of *Caulobacter henricii* (isolate #6) isolated from the site 1. The cell type is vibroid. Tapered body and curved axis are seen. Magnification is 12,000X.
- Fig. 6.** Electron micrograph of *Caulobacter subvibrioides*(isolate #13) isolated from the site 1. The cell type is subvibrioid. The body is tapered and long axis is not strongly curved. Magnification is 12,000X.
- Fig. 7.** Electron micrograph of *Caulobacter crescentus* (isolate #18) isolated from the site 3. These kinds of abnormally long filamentous are occasionally observed besides the normal shape of *C. crescentus*. Magnification is 12,000X.



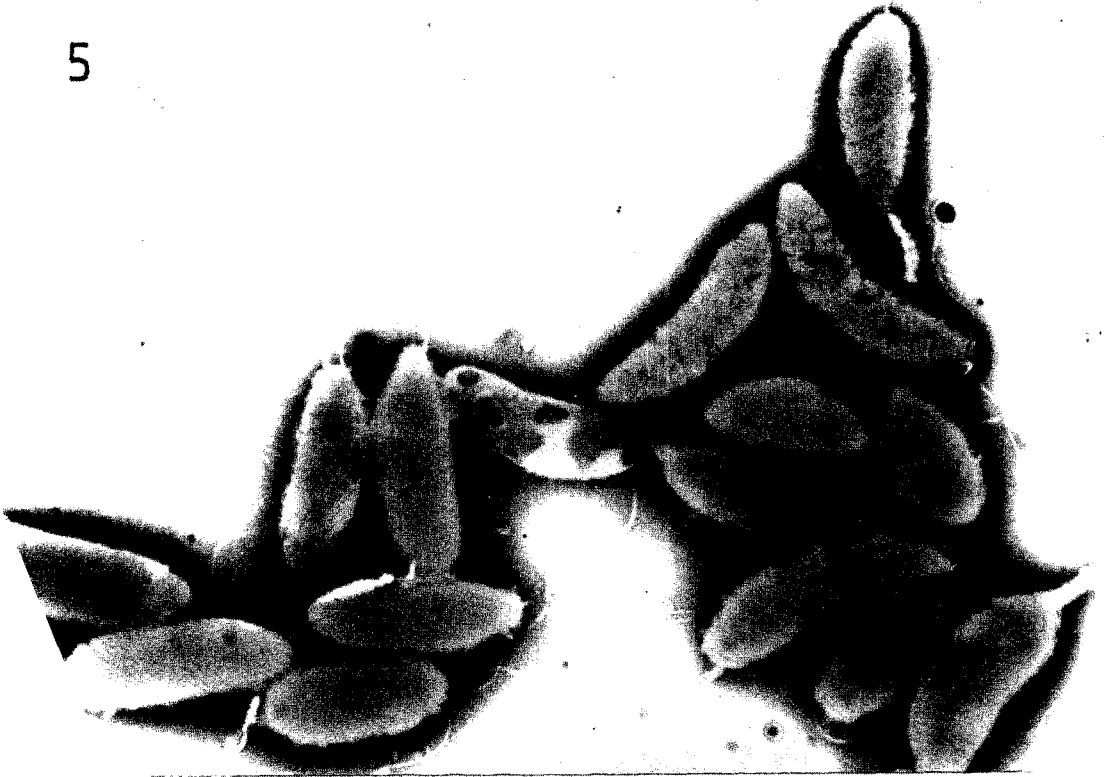




4



5



6



7

