

담수식물 뿌리로부터 세균의 분리

김 영 희^{*}

동의대학교 미생물학과, 동의대학교 기초과학연구소

Isolation of Bacteria from Freshwater Plant Roots

Young-Hee Kim^{*}

Department of Microbiology and Research Institute of Basic Sciences, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract

The isolation and identification of bacteria from freshwater plant root system were performed. Twenty four different strains were identified by microbiological identification system. Gram negative bacteria were isolated three times more than Gram positive ones. The ratio of rod and coccus was 11:1. The similarity above 0.5 was 37.5% from the tested samples in identification. Among these isolated bacteria, three dominant strains *Pseudomonas cepacia* JH10, *Xanthomonas maltophilia* JH12, *Aeromonas salmonicida* JH13 were selected to investigate biochemical properties and optimal growth conditions. These strains reached maximum growth after 24-36 hr of incubation in peptone broth, and their optimal temperature was 28°C and that of pH was between 7 and 8.

Key words – Freshwater root system, Similarity, *Pseudomonas cepacia* JH10, *Xanthomonas maltophilia* JH12, *Aeromonas salmonicida* JH13

서 론

오늘날의 급진적인 산업화는 우리에게 수많은 공해물질을 생산하게 하였고 수질을 비롯하여 쓰레기, 대기 등은 서로 상호 복합적으로 작용하여 생명체에 위협을 주는 물질을 내포하는 대상이 되었다. 그 중에서도 수질의 악화는 생태계에 가장 큰 위협이 되고 있다. 이러한 수질오염을 해결하기 위한 다각적인 노력이 시도중이며 지금까지의 물리화학적 방법에서 벗어나 생물을 이용하고자 하는 시도가 진행중이다. 그 중에서도 수중식물을 이용한 수질개선이 관심을 갖게되고 정확력이 인정되어 실용화하고 있는 실정이다[6,7,11]. 오늘날 이용되는 생물관리는 수생 관

속 식물을 이용하는 것으로 이들의 기전은 식물 자체는 물론 식물에 부착된 미생물과의 상관관계의 역할로 본다[3,4].

습지에는 식물, 동물, 플랑크톤, 조류 및 미생물들이 군집을 이루고 있으며, 이들 중 미생물은 대형 수생식물의 뿌리에 부착하여 영양을 공급받고 이들의 유기물 분해에 의하여 얻어진 유기물을 식물이 영양원으로 공급받아 공생관계를 유지하고 있다. 대형 수생식물의 근계(根系)는 미생물의 매질이 되어 수중의 입자성 물질과 전기적으로 반대의 입자를 띄어 입자성 물질을 흡착시킴으로써 미생물에게 영양원을 제공하고, 통기조직을 통해 산소를 근계로 전달시켜 미생물의 유기물 분해활동을 촉진시키며, 미생물의 유기물분해를 통해 생성된 영양염류는 식물의 영양원이 될

^{*} Corresponding author

뿐만 아니라 식물이 합성한 유기물과 대사물질은 다시 미생물의 영양원이 된다. 따라서 대형 수생 식물에 의한 수질 개선은 식물과 미생물의 상호공생 및 상승작용을 통해 이루어진다고 볼 수 있다[5,8,9]. 동시에 지금까지의 일부 밝혀진 결과에서도 수중 식물과 미생물은 공생하고 있으며 미생물이 제거된 식물은 정화능이 떨어진다고 하였다[2,5,7].

일반적으로 오수처리에 이용되는 미생물의 종류는 약 1000-2000종에 이르러는 것으로 보고 있으나 각각의 미생물에 대한 특성이나 자료는 충분하지 못하다. 지금까지 수생식물과 이들 식물에 부착한 미생물의 공동작용에 의하여 오염물의 정화가 이루어진다는 일부 보고가 있었으나[2,7,9] 구체적으로 어떤 미생물이 관여하는지에 대하여서는 언급된 바가 없으며 군집의 특성이 주변 환경에 따라 매우 다양하여 그 특성을 정의하기 매우 어렵다.

따라서 본 연구에서는 계절적인 영향으로 식물의 생육이 제한적인 점을 감안하여, 토착화된 담수수중생태계의 미생물에 접근하여 이들이 실제로 수질정화에 관여하는지를 검토하기 위한 방법의 한 과정으로, 경남지역의 담수 수계환경을 중심으로 세균의 분리를 시도하여 얻은 결과의 일부를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료 채취

1997년 및 1998년도 4월에서 10월 사이에 밀양, 울산 및 그 외 경남지역의 자연 늪에서 채취한 식물의 뿌리를 세균 분리원으로 사용하였다.

세균의 분리

세균 분리를 위하여 채취한 식물의 뿌리를 멸균수로 약 20분 vortexing한 후 0.5% NaCl이 첨가된 nutrient 액체배지에 넣고 37°C에서 24-76시간 배양한 후 고체 nutrient 배지에 도말하였다. 이 과정으로 얻어진 순수집락을 선별하여 다시 nutrient 액체 및 고체배양 과정을 거친 후 gram 염색 및 3% KOH 염색을 한 후 동정을 시행하였다.

세균의 동정

분리균의 동정은 미생물 자동, 수동 동정 시스템 분석기기(E-10136, Biolog Microstation, Biolog사 제품)를 사용하

였다.

1) 배지 선택

본 기기를 위한 자동 분석을 위하여서는 미생물의 생육에 알맞은 배지를 선택하여 증식시키는 과정이 선행되어야 하는데 대부분의 Gram 양성 및 음성의 균주에는 BUGM(Biolog Universal Growth Medium)+5% sheep blood 배지를 사용하였고 Gram 음성의 경우에는 TSA (Tryptic Soy Agar) 배지나 blood agar 배지를 사용하였고 특히 까다로운 Gram 음성의 경우에는 chocolate agar 배지를 사용하였다. Bacillus sp.인 경우에는 BUGM+1% glucose가 함유된 배지를 사용하였다. 모든 배양은 35°C에서 하였다.

2) 균의 현탁

동정을 위한 균주는 미리 따뜻하게 만든 20 ml의 멸균 saline(0.85% NaCl) 용액에 순수 집락만을 접종하여 특정한 밀도 범위안에(3×10^8 cells/ml) 오도록 현탁하여야 하므로 이때 신선한 세포의 590 nm에서의 투과율 수준이 Gram 음성의 경우엔 53-59%로 조절하였고, Gram 양성의 경우에는 35-42% 이내에 들도록 조절하였다.

3) 검색

세포현탁액을 분석용 microplate에 각 well 당 150 μ l 씩 분주하고 28-35°C에서 4-24시간 배양한 후 microplate reader에 넣어 자동검색 하였다. 이 과정에서 사용되는 microplate는 사용 전에 28-35°C로 예열하여 사용하였다.

4) Similarity

동정은 3의 과정에서 4시간 배양한 경우에는 similarity 값이 0.75 이상일 때와 24 시간 배양의 경우에는 similarity 값이 0.5 이상일 때를 의의 있는 값으로 간주하였다.

선별 균의 생화학적 성질 및 생육조건

분리 균의 생화학적 성질은 자동 분석 자료를 비교하였다. 생육조건을 검토하기 위하여 균주를 선별하여 생화학적 특성을 검토하였다. 1% peptone 액체배지를 사용하여 배양시간을 12 시간별로 84 시간까지의 생육곡선을 조사하였고, 최적 pH는 pH를 5에서 10으로 조절하여 검토하였다. 최적 온도는 20°C, 24°C, 28°C, 32°C, 36°C로 달리하여 생장에 미치는 정도를 조사하였다. 전 과정의 생육정도는 분광광도계를 사용하여 660 nm에서의 흡광도 값으로

측정하였으며 전 과정의 배양은 진탕배양으로 하였다.

결 과

균 분리

분리된 세균의 동정 결과는 Table 1에 나타내었다. 분리균의 similarity 값이 0.5 이상인 것과 0.75 이상인 것은 전체 동정 대상의 37.7%이었으며 속 종이 규명된 것은 22 균주였고 속종이 동정되지 않은 균주도 총 시료대상의 62.5%이었다. 대부분이 Gram 음성이었고 모양은 단순한 구균과 간균이었다. 간균의 분포도가 22 균주로서 2 균주인 구균보다 많았다. 동정 대상종에는 같은 속, 종으로 동정된 것도 나타났다. 동정된 균주중에는 동일종으로는 *Xanthomonas maltophilia*가 가장 우점종으로 나타났으며 그 외에

Pseudomonas cepacia, *Aeromonas salmonicida*의 분리빈도가 높았으며 그 외에 *Acinebacter* 2종, *Callulomonas turbata*, *Citrobacter freundii*, *Corynebacterium jeikium*, *Weeksella virosa*, *Bacillus* spp, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter*속 4종, *Serratia*속 2종, *Acinetobacter*속 2종, 그리고 *Sphingo multivorum* 등이 분리되었다.

선별균의 생화학적 특성

선별된 세 균주의 생화학적 성상은 Table 2에 나타내었다. *Pseudomonas cepacia* JH10은 gelatin, glucose, sorbitol, amygdalin 그리고 oxidase에 양성반응을 나타내었으며 *Aeromonas salmonicida* JH13는 gelatin, amygdalin, 그리고 oxidase에 양성반응을 나타내었다. 한편 *Xanthomonas maltophilia* JH12은 *O*-nitrophenyl- β -D-galactopyronoside, indole, sucrose 및 arabinose에 양성반응을 나타내었다.

Table 1. Identification of the bacteria from freshwater plant roots

Sample No	Gram strain	Shape	Strains
1	-	Rod	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BV ALC
2	-	Rod	<i>Acinetobacter genospicis</i> 15
3	-	Rod	<i>Aeromonas salmonicida</i>
4	+	Rod	<i>Bacillus</i> spp
5	+	Rod	<i>Callulomonas turbato</i>
6	+	Rod	CDC group B-1/B-3
7	-	Rod	<i>Citrobacter freundii</i>
8	+	Rod	<i>Corynebacterium jeikium</i> A
9	-	Rod	<i>Enterobacter annigenus</i>
10	-	Coccus	<i>Enterobacter cloaceae</i>
11	-	Rod	<i>Enterobacter cloaceae</i> A
12	-	Rod	<i>Enterobacter intermedicus</i>
13	-	Rod	<i>Kingella denitrificans</i>
14	-	Rod	<i>Kingella kingae</i>
15	-	Rod	<i>Klebsiella oxytoca</i>
16	-	Coccus	<i>Pseudomonas cepacia</i>
17	-	Rod	<i>Salmonella subspecies</i> 1G
18	-	Rod	<i>Serratia ficaria</i>
19	-	Rod	<i>Serratia liquefaciens</i>
20	-	Rod	<i>Sphingo multivorum</i>
21	+	Rod	<i>Staphylococcus felis</i>
22	+	Rod	<i>Staphylococcus lentus</i> B
23	-	Rod	<i>Weeksella virosa</i>
24	-	Rod	<i>Xanthomonas maltophilia</i>

Identification by BIOLOG Microstation System

생육특성

분리된 균주를 대상으로 생육특성을 검토한 결과 최대 생육에 이르는 시간은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 접종후 36-48 시간대이었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 생육온도 범위는 20℃에서 28℃ 사이로 나타났으나 그 중에서도 25℃에서 생육이 가장 활발하였으며 최적 pH는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH 7-8이었다.

고 찰

미생물은 환경오염물질을 영양분으로 사용 가능하게 하는 효소를 보유하고 오염물질과의 직접적인 접촉이 가능할 정도로 크기가 작다는 점이 환경오염물질 분해작업에 이상적인 조건을 가진 생물체다[10]. 따라서 이 미생물의 종류를 파악하고 특히 토착미생물의 이용가능성을 탐구하는 작업이 매우 중요하다. 더구나 담수식물에 부착하는 미생물이 식물과의 공동작용으로 유기물을 분해하여 무기물화할 수 있다는 견해와 이미 담수생태계 식물의 자체정화능과 함께 이들 식물에 부착한 미생물의 정화능에 대한 작용이 미생물의 대사와 연관이 있음이 보고되어 있으므로 [7,9] 식물의 생육이 계절적인 제한을 받는 점을 감안할 때 이들 미생물의 이용이 기대되고 동시에 이용성을 높일 필요가 있다고 본다. 물리화학적인 전처리가 오염물을 한

Table 2. Biochemical properties of selected strains

Properties	<i>Pseudomonas cepacia</i> JH10	<i>Aeromonas salmonicida</i> JH13	<i>Xanthomonas maltophilia</i> JH12
<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyronoside	-	-	+
Arginine dihydrolase	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Sodium citrate	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-
Indole	-	-	+
Voges proskauer	-	-	-
Gelatin	+	+	+
Glucose	+	-	-
Inositol	-	-	-
Mannitol	-	-	-
Sorbitol	+	-	-
Rhamnose	-	-	-
Sucrose	-	-	+
Melibiose	-	-	-
Amygdalin	+	+	-
Arabinose	-	-	+
Oxidase	+	+	-

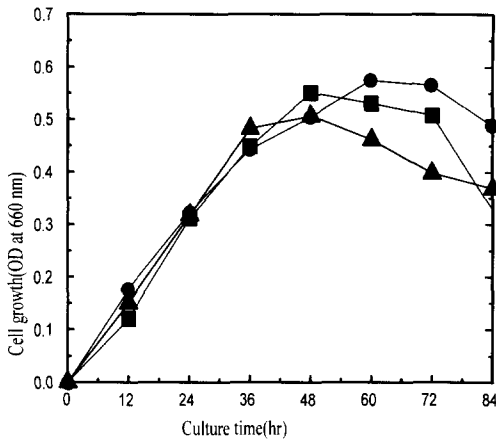


Fig. 1. Time course of the cell growth in peptone broth at 28°C for 4 days.

■ : *Pseudomonas cepacia* JH10
 ▲ : *Aeromonas salmonicida* JH13
 ● : *Xanthomonas maltophilia* JH12

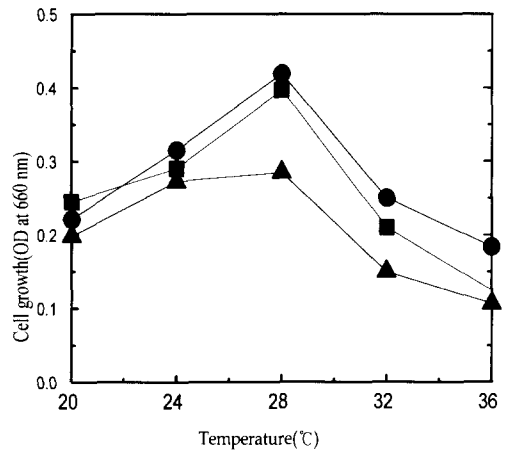


Fig. 2. Effect of temperature on the cell growth. Cultivation was carried out in peptone broth for 24 hr.

■ : *Pseudomonas cepacia* JH10
 ▲ : *Aeromonas salmonicida* JH13
 ● : *Xanthomonas maltophilia* JH12

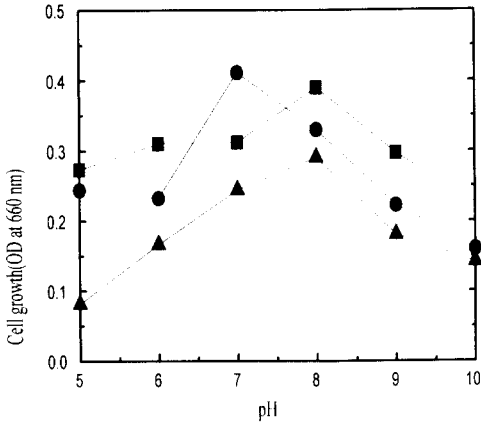


Fig. 3. Effect of pH on the cell growth. Cultivation was carried out in peptone broth for 24hr.

- : *Pseudomonas cepacia* JH10
- ▲: *Aeromonas salmonicida* JH13
- : *Xanthomonas maltophilia* JH12

phase에서 다른 phase로 바뀔 뿐이므로 대사능이 활발한 미생물이 오염물질의 제거에 이용되어야 한다[5,12]. 그러나 미생물은 종류도 많고 자연계에 존재하는 세균의 대다수가 살아는 있으나 배양이 되지 않는 군집이 전체의 95%를 차지하는 만큼 이들의 기능 파악에는 어려움이 있다[9,10].

본 과정에서는 세균 분리를 위하여 농경지나 민가와 떨어진 곳으로 시료채취 장소를 무작위적으로 선택하였으나 분리 균주의 동정시에 같은 종이 나타나 우점종의 경우 한 종류가 전체 분리중 25%를 차지하였고 동시에 15% 이상을 차지하는 균주도 있었다. 본 세균의 분리시기가 4월에서 10월 사이에 이루어 졌으므로 사계절을 통한 분리가 필요할 것으로 보인다. 세균의 분리 시에 지역적인 한계를 피할수는 없을 것 같았으며 강수량이나 건조기에 따른 차이가 있을 것으로 사료되어 지속적인 분리의 필요성이 요구되었다.

본 연구 과정에서는 담수식물의 뿌리로부터 세균 배양을 위해 nutrient 배지만을 사용하였는데 본 배지를 통하여 분리된 세균들이 현장에 존재하는 군집을 대변한다고 보기 힘들었는데 상대적으로 부(富)영양 상태인 배지가 세균의 분리에 이용되었으므로 자연계에서 대부분을 차지하고 있는 빈(貧)영양 세균을 분리할 가능성이 매우 낮다

[10]. 따라서 이들을 선별 할 수 있는 배지의 다양화가 요구되고 자연 생태계에서는 살아는 있으나 생장이 되지 않는(viable but not culturable) 세균이 많이 있으므로 이들의 선별을 위한 배지의 개발이 필요한 것으로 판단되어지고 다양한 영양원에 따른 선별 방법이 검토되어져야 할 것으로 보인다.

분리 및 동정의 결과 담수 식물에서 뿌리에서 분리한 세균들이 22종으로 분류되었으며 동정이 되지 않은 균주도 총 시료중 62.5%에 이르렀다. 분리 세균 중 *Xanthomonas*는 분리 비중이 매우 높았는데 조[1]등이 이미 *Xanthomonas maltophilia*의 암모니아 산화에 관하여 보고하였는바 이들 세균의 정화능이 기대되어 지는 바이다. 대부분의 분리 세균이 담수 생태계에 분포하는 군집으로 보이나 본 분리의 결과로 보아 육상의 오염균이 혼재되어 있을 가능성을 배제 할 수는 없었는데 분리를 계속하면 그 차이점을 비교 할 수 있을 것으로 사료되었다.

본 과정에서 분리된 균주중 가장 분리 빈도가 높은 균주를 선별하여 생육조건을 검토한 결과 최대 생육이 28℃에서 36시간에서 48시간대로 나타났는데 이는 대체로 일반 세균이 18-24시간 내에 최대 증식에 이르는 것과는 대조적이다. 동시에 접종 후 72시간대까지 생육이 지속되는 것으로 보아 온도 변화가 심한 자연환경에 대한 적응력 때문일 것으로 추정되어 졌다. 최적 pH도 7에서 8로 나타나 중성 pH를 선호하는 경향을 보였다.

아직 보고 사례는 매우 드무나 담수식물뿌리 부착미생물의 역할이 매우 커서 생리적 특성이나 유전적인 특성을 계속 밝혀 이들의 오염물질 제거 이용가능성에 대하여 검토하여야 할 것으로 판단되어지며 이들 분리균을 대상으로 정화능에 대한 실험이 진행중이므로 이어 그 결과를 보고하고자 한다.

요 약

1997년, 1998년 4월에서 10월 사이에 경남 지역의 담수 서식 식물의 뿌리를 대상으로 부착 미생물의 특성을 밝혀 보기 위하여 세균 분리를 시도하였다. 미생물 자동 분석기기를 이용하여 전체 시료를 대상으로 동정한 결과는 37.5%만이 similarity가 0.5 이상이었다. 22종의 속, 종을 가진 세균을 동정하였고 동정이 되지 않은 균주도 62.5%로 나타

났다. 본 분리에서는 Gram 음성균의 분포가 양성균 보다 3배 많았으며 간균:구균의 비율은 11:1이었다. 분리군중 분리 빈도가 높은 *Pseudomonas cepacia* JH10, *Aeromonas salmonicida* JH13, *Xanthomonas multivorum* JH12을 선별하여 이들을 대상으로 peptone 액체배지 내에서의 생육 최적 조건을 조사한 결과 생육이 최대에 이르는 시기는 접종 후 배양 36-48 시간대이었으며 최적 온도는 28℃이었고 최적 pH 범위는 7-8로 나타났다. 더욱 다양한 지역을 대상으로 시료를 채취하고 사계절 분리 및 지속적인 분리를 계속하면 다양한 세균 군집의 분리가 가능 할 것으로 보였다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 동의대학교 학술연구조성비에 의해 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Choi, M. K., H. Y. Han, Y. H. Jung and K. H. Min. 1994. A comparison of nitrite production by ammonium oxidizing bacteria *Xanthomonas maltophilia* SU6 and *Achromobacter* sp, 12A. *Kor. J. Microbiol.*, **32**(6), 517-524.
2. Dunigan, E. P., 1974. Some preliminary observations

- on the nitrogen-utilizing microorganisms on the roots of water hyacinth. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **37**, 22-24.
3. Godfrey, P. C., 1994. Biological control of water lettuce in various impoundments of Zimbabwe. *J. Aquat. Plant Manage.*, **32**, 27-29.
4. Reddy, K. R. and D. E. Busk. 1985. Nutrient removal potential of selected aquatic macrophytes. *J. Environmental. Quality*, **14**(4), 459-462.
5. Uba, B. N., 1995. Microbiological characteristics of wastewater from a nitrogen and phosphate-based fertilizer factory. *Bioresource Technology*, **51**, 143-152.
6. 김복영, 이상규, 권장식, 소규호, 윤근호. 1991. 부레옥잠에 의한 생활오수와 정화효과. *한국환경농학회지* **11**, 133-139.
7. 심우섭, 한인섭. 1998. 울산지역에서 자생하는 갈대, 부들, 갈풀을 이용한 reed-bed의 생활 하수 정화능력 연구. *한국환경과학회지* **7**(2), 117-121.
8. 안태석. 1988. 인이 담수 생태계에 미치는 영향. *미생물과 산업* **14**(3), 27-30.
9. 유익동. 1988. 질소순환에서 미생물의 역할. *미생물과 산업* **14**(3), 23-26.
10. 이동훈, 김상종. 1997. 수계 생태계에서의 세균 군집 구조의 분자생물학적 분석. *한국미생물학회지* **33**(1), 55-65.
11. 이영옥. 1993. 수생관속식물이 수질에 미치는 영향. *한국육수학회지* **12**, 37-51.
12. 조재창, 김상종. 1996. 오염토양의 Bioremediation. *미생물과 산업* **22**(1), 70-80.