

지하수에서 분리한 은(銀) 축적균주에 대한 축적조건 및 특성

배진희¹ · 민병래³ · 한명수^{1,2} · 최영길^{1,2*}

¹한양대학교 생명과학과, ²물환경생태복원연구실, ³상명대학교 생물학과

본 연구에서는 중금속, 특히 은(銀)을 축적하는 세균을 지하수로부터 분리, 동정하고, 분리 균주의 특성 및 중금속 축적조건을 규명하여 최대축적이 일어날 수 있는 조건을 검토하였다. 서울시 지하수 10개 정점으로부터 분리된 은(銀) 축적 세균 중 가장 축적능이 뛰어난 두 균주를 선별하였으며 이들은 *Pseudomonas fluorescens*와 *Bacillus cereus*로 동정되었다. 본 분리 균주는 은(銀)의 농도가 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm으로 높아질수록 성장 저해를 심하게 받았다. pH가 낮아질수록 세포의 성장이 저하되기는 하였지만 세포 당 은(銀) 축적율은 오히려 증가하였으며 24시간 이내에 최대축적이 이루어졌다. 이때 은(銀) 축적량은 *Pseudomonas fluorescens*의 경우 약 1.9 mg/g·cell이었으며 *Bacillus cereus*는 약 1.65 mg/g·cell이었다. 은(銀) 처리시, *Bacillus cereus*에서 126 KDa, 89 KDa, 25 KDa 등 3개의 단백질이 특이적으로 증가하였으며, *Pseudomonas fluorescens*에서는 101 KDa, 68 KDa, 27 KDa 크기의 단백질이 감소하였으나 34 KDa 크기의 새로운 단백질이 유도됨을 확인하였다.

Key words □ accumulation, inducible proteins, silver

산업화가 급속도로 진행되고 인구가 증가되면서 환경에 대한 문제가 경제적으로나 생태학적으로 급속히 제기되고 있다. 특히 중금속의 오염은 직·간접적으로 인체에 해를 끼칠 뿐 만 아니라 수질의 자정작용을 감소시키는 등 생태계에 큰 영향을 미치므로 이들 중금속 등 독성오염물질의 효과적인 처리를 위한 연구가 요구된다. 일부 중금속은 생물체에 필요하지 않을 뿐만 아니라 저 농도에서 매우 큰 독성을 나타낸다. 생태계로 방출되는 중금속을 원핵생물 또는 진핵생물의 작용에 의해 생물학적 제거가 일어난다는 많은 보고가 있으며(1,2,3,6,9) 이 같은 생물학적 제거의 증거들은 중금속 내성 세균의 세포와 다당류, 곰팡이나 효모의 peptidoglycan, 그리고 조류의 세포벽 등에서의 중금속 축적으로 제시되고 있다(12). 중금속 축적능력을 가지는 박테리아들은 중금속의 재생과 농축, 제거 등의 개발에 이용될 수 있다(13). 은(銀)은 전기·열의 양도체이고 가공성·기계적 성질이 좋아 금속재료로서의 용도가 넓고 병원에서 다양한 치료에 응용되어지기도 하며 사진제판에 사용되는 감광제로 사용되기도 하지만 매우 toxic하기 때문에 박테리아 세포의 물리, 화학적인 변화의 원인이 되기도 한다. 박테리아 중 일부는 은 화합물에 저항성을 나타낸다는 보고가 있으며(4,11). 본 연구에서는 서울지역의 지하수로부터 은(銀) 축적균주를 분리 동정하고 그 축적능력을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

은(銀) 축적 균주의 분리 및 동정

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-2290-0952, Fax: 02-2293-9230
E-mail: ykchoi@hanyang.ac.kr

LB agar 배지에 희석한 지하수를 100 μ l씩 도말하여 30°C에서 24 hr 배양하였다. 콜로니의 지름을 4 mm까지 키운 다음 6 mM AgNO₃를 포함한 LB agar 10 ml을 55°C까지 식힌 후 overlay 하였다. AgNO₃은 빛에 노출시 석출되어 균이 흡수할 수 없는 상태가 되므로 암조건에서 배양하였으며, 은을 축적하여 black colony를 형성한 균주를 선별하여 BIOLOG system을 이용하여 동정하였다.

은(銀) 축적균주의 개량

은(銀) 축적 능력이 우수한 균주를 개량하기 위해 돌연변이 유발원의 하나인 MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)를 처리하여 얻어진 세포들을 최소배지로 옮겨 접종한 뒤 30°C에서 48 hr 배양한 후 colony가 LB 배지에서는 나타나지만 최소배지에서는 나타나지 않는 세포들을 선택하여 5회 이상 동일한 방법으로 계대 배양 후 변이의 안정성을 확인하였다. LB agar 배지에 24시간 배양한 후 6 mM AgNO₃를 overlay 처리하여 높은 농도의 은 처리 균에서 성장능이 뛰어난 균주를 선별하였다.

은(銀) 처리 농도에 따른 성장변화

은이 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 균주 별로 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm 처리된 배지에서 성장 속도를 측정하였다. LB 배지에서 전 배양한 분리세균을 pH 7.0 의 LB배지 200 ml 당 5×10^9 cells/ml이 되도록 접종하여 150 rpm, 30°C에서 진탕 배양하면서 3시간 간격으로 660 nm에서 흡광도를 측정하여 성장율을 확인하였다.

Dithizone 법을 이용한 세포 내 은(銀)축적량 측정

배양 균주를 원심 분리(3000×g, 20 min)한 후 0.01 M Tris-

HCl (pH 6.0) buffer로 7~8회 수세하여 균주 표면에 묻어있는 배양액과 중금속을 제거하였다. 0.01 M Tris-HCl (pH 6.0) 100 ml에 균주를 현탁하고 5 ml의 HNO_3 를 처리한 후 서서히 가열하여 액량이 약 15 ml이 될 때까지 증발 농축하고 방냉하였다. 전처리한 시료 100 ml에 conc H_2SO_4 11 ml을 넣고 Dithizone solution A 5 ml을 2회 처리하여 분리된 침전물에 NH_4CNS 를 넣어 상등액을 분리하고, 여기에 conc H_2SO_4 를 첨가한 후 시료를 증발시켰다. 0.6 ml의 1 N HNO_3 를 첨가하고 녹인 후 1 ml의 urea와 hydroxylamine sulfate solution를 처리하여 끓는점 가까이에서 5 min 동안 침전시키고 소량의 D.W.를 가하여 상온에서 방냉한 후 1 ml의 dithizone sol. B를 첨가하여 분석시료로 사용하였다.

분석 시료는 spectrophotometer (Hewlett Packard, HP 845× UV-Visible System, U.S.A.)를 이용하여 620 nm에서 측정하였다.

은(銀) 축적능에 미치는 농도 및 pH의 영향

은(銀)이 농도별(5, 10, 20 ppm)로 첨가된 LB 액체 배지(pH 7.0)와 은(銀)을 20 ppm 농도로 첨가한 후 pH를 달리한 LB 액체배지(pH 2, 3, 5, 7, 9, 11)에 전 배양된 균주를 5.0×10^9 cells/ml 농도로 접종한 후, 30°C에서 배양하면서 3시간 간격으로 세포 내 중금속 축적량을 측정하였다.

SDS-PAGE를 이용한 유도단백질 양상 변화

각 농도구간의 세포를 원심분리하여 수확한 후(10,000×g, 10 min, 4°C) 총 단백질은 0.01 M Tris-HCl (pH 6.0) buffer를 가하여 sonication하여 얻은 세포 상등액을 시료로 사용하였다. 전기영동은 Laemmli의 방법(10)을 따라 실시하였으며, 5% stacking gel에서 20 mA로 12% separating gel에서 32 mA로 전개 후 Coomassie brilliant blue (R-250)를 사용하여 염색하였다.

결과 및 고찰

은(銀) 축적 균주의 분리 및 동정

은(銀)을 overlay 한 LB plate에서 black colony (Fig. 1)를 형성한 균주(14)를 분리하였다. 5~30 ppm까지 은 처리한 배지에서 높은 내성을 가지는 균주를 Dithizone법을 이용하여 축적량을 비교함으로써 은(銀)내성과 축적능이 우수한 균주를 선별하였으며, BIOLOG를 사용하여 동정한 결과 *Pseudomonas fluorescens*와 *Bacillus cereus*로 확인되었다.

성장률에 미치는 은 농도의 영향

은(銀) 처리농도(5 ppm~30 ppm)에 따른 야생형의 성장률은 높은 농도에서 긴 유도기를 보이며, 30 ppm에서는 거의 생장을 못하는 것으로 나타났다. *P. fluorescens*의 경우 은을 10 ppm 처리한 배지에서는 8 시간, 20 ppm에서는 32 시간, *B. cereus*의 경우 10 ppm에서는 10 시간, 20 ppm에서는 26 시간 정도의 적응기가 정상적인 성장을 위해 필요하다는 것이 관찰되었으며 (Fig. 2, 3), 성장배지에 은 처리 농도가 증가됨에 비례하여 긴

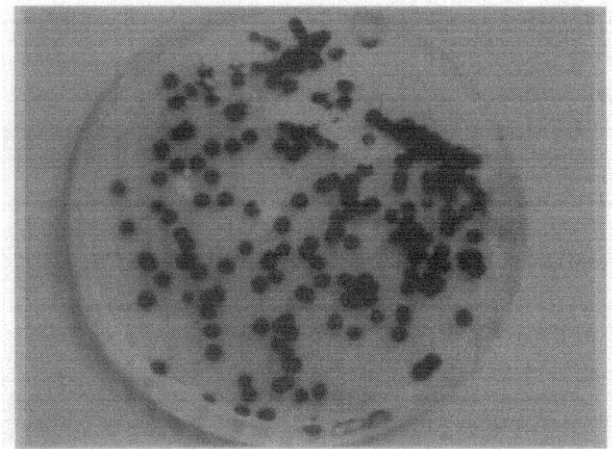


Fig. 1. Black colony formation at overlay AgNO_3 (6 mM) agar on LB agar plates.

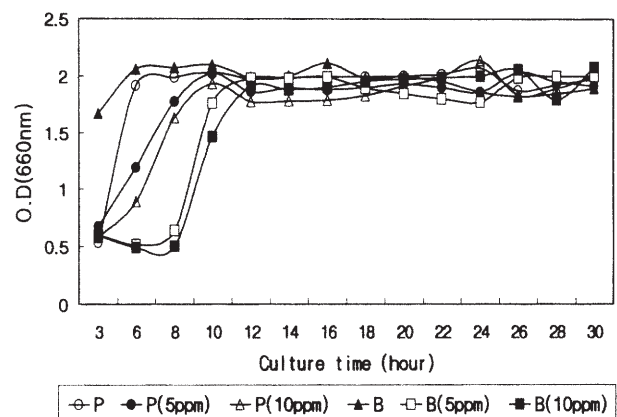


Fig. 2. The changes of growth rate by silver in *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus cereus* which were cultured at 30°C in LB media (pH 7.0) containing 5 and 10 ppm of silver.

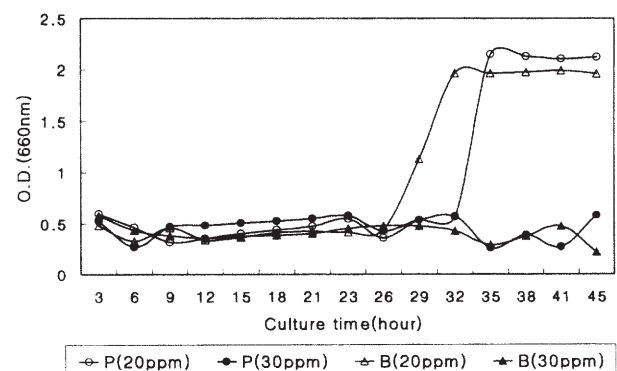


Fig. 3. The changes of growth rate by silver in *Pseudomonas fluorescens* (○ 20 ppm, ● 30 ppm) and *Bacillus cereus* (△ 20 ppm, ▲ 30 ppm) which were cultured at 30°C in LB media (pH 7.0) containing 20 and 30 ppm of silver.

유도기를 통해 적응된 세포는 최고 20 ppm의 농도에서 생장을 관찰할 수 있었다. 20 ppm 이상의 농도에서는 거의 생장이 불가능할 뿐만 아니라 축적능 또한 거의 없는 것으로 관찰되

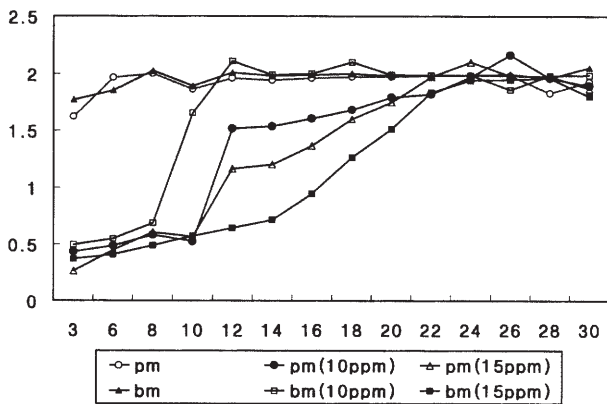


Fig. 4. The changes of growth rate by silver in *Pseudomonas fluorescens* mutant strain and *Bacillus cereus* mutant strain and B-M which were cultured at 30°C in LB media (pH 7.0) containing 10 and 15 ppm of silver.

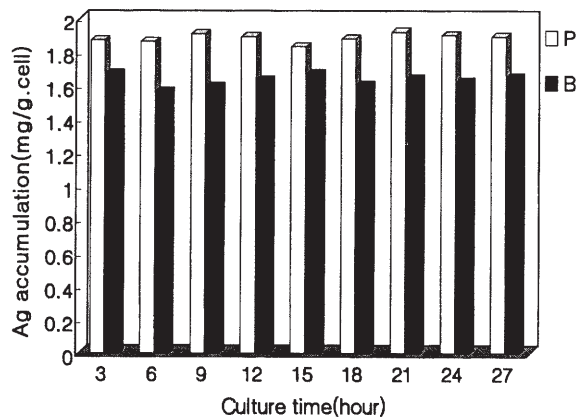


Fig. 5. Amount of accumulation of silver by *Pseudo monasfluorescens* (P) and *Bacillus cereus* (B).

었다.

P. fluorescens 돌연변이주와 *B. cereus* 돌연변이주는 10 ppm의 농도에서는 야생형과의 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나, 농도가 높아짐에 따라 성장저항력이 뛰어난 것으로 나타났다(Fig. 4). 그러나 은(銀) 농도가 20 ppm, 30 ppm으로 높아질수록 성장 저해를 심하게 받았다.

배양시간에 따른 은(銀) 축적량 변화

분리균주의 은(銀) 축적은 배양 24시간 이내에 최대축적이 이루어지는 것을 확인하였다. 은 축적량은 *P. fluorescens*의 경우 약 1.9 mg/g cell이었으며 *B. cereus*는 약 1.65 mg/g cell이었다

pH 구배에 따른 은(銀) 축적량 변화

*P. fluorescens*는 pH 2, 3일 때, 2.0 mg/g cell 이상의 축적량이 나타났으며, *B. cereus*에서도 pH3 에서 1.7 mg/g cell의 결과를 나타내어 pH가 낮아질수록 은 축적량이 증가하는 경향을 나타내었으나, pH가 낮아질수록 오히려 생육은 불량하였기 때문에 cell

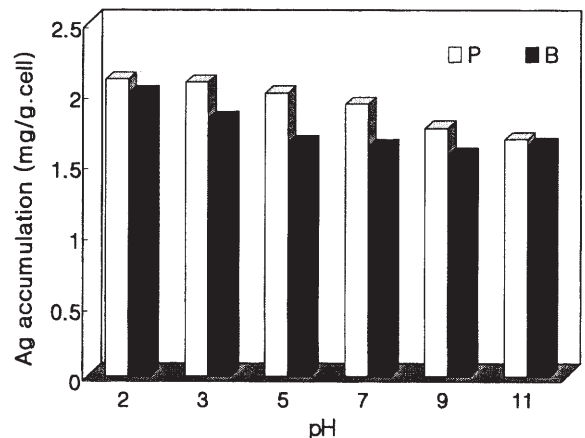


Fig. 6. pH-dependent accumulation of silver in *Pseudomonas fluorescens* (P) and *Bacillus cereus* (B) which were cultured at 30°C in the LB media containing 20 ppm of silver.

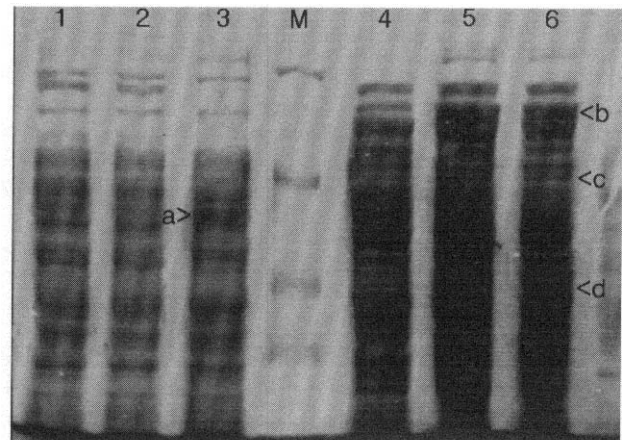


Fig. 7. SDS-PAGE gels of proteins that isolated from *P. fluorescens* (P) and *B. cereus* (B). 1; Ag-free P, 2; Ag 10 ppm P, 3; Ag 20 ppm P, M ; Maker protein, 4; Ag-free B, 5; Ag 10 ppm B, 6; Ag 20 ppm B. a> : 34 KDa, b> : 126 KDa, c> : 89 KDa, d> : 25 KDa

당 축적량이 많아도 적절한 pH로 볼 수는 없었다.

은(銀) 처리농도에 따른 단백질 양상의 변화

은(銀) 처리농도에 따른 단백질 양상의 변화를 분석한 결과, *P. fluorescens*는 101 KDa, 68 KDa, 27 KDa 크기의 단백질이 감소하는 경향을 나타내었으며, 34 KDa의 크기의 새로운 단백질이 유도되었다. *P. putida*를 대상으로 한 실험에서 고농도의 카드뮴을 처리하면 안정기에 중금속 결합단백질(metallothionein)이 형성된다는 보고(5,8)와 연관해볼 때, 이 34 KDa 단백질 역시 은의 농도 증가에 따른 metallothionein의 일종인 것으로 추측된다. *B. cereus*에서는 새로운 유도단백질은 관찰할 수 없었으나, 은 농도가 높아질수록 126 KDa, 89 KDa, 25 KDa 크기의 단백질 농도가 증가하였다. 이러한 결과는 은 축적능을 가진 두 균주의 무독화 과정이 서로 다른 기작에 의해 일어남을 시사하는 것으로(7)

은의 detoxification mechanism을 규명하는 추후 연구에 좋은 모델 균주가 될 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한양대학교 2001년도 교내연구비에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. Akira, M., C. Wada, and Y. Hayashi. 1981. Cadmium-binding peptide induced in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biochem.* 90, 1561-1564.
2. Aiking, H., K. Kok, H. van Heerikhuizen, and J. van't Riet. 1982. Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 938-944.
3. Beveridge, T.J. and R.G.E. Murray. 1980. Site of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 141, 876-887.
4. Clement, J.C. and P.S. Jarrett. 1994. Antibacterial silver. *Metal Based Drugs*, 1, #5-6. 467.
5. Ecker, D.J., T.R. Butt, E.J. Sternberg, M.P. Neeper, C. Debouck, J.A. Gorman, and S.T. Crooke. 1986 Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *J. Biol. Chem.* 261, 16895-16900.
6. Gadd, G.M. 1990. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia* 46, 834-840.
7. Hamer, D.H. 1989. Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 913-951.
8. Higham, D.P. and P.J. Sadler. 1984. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science*, 225, 1043-1046.
9. Kim, Y.B. and S.R. Lee. 1976. Isolation of cadmium-tolerant bacteria and accumulation of cadmium into the bacteria cell. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 4, 111-115.
10. Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227, 680-685.
11. Richard L.D. and S.F. Etris. 1997. The development and functions of silver in water purification and disease control. *Elsevier Science*, 36, 107-114.
12. Standberg, G.W., S.E. Shumate, and J.R. Parrott. 1981. Microbial cells as biosorbents for heavy metals : accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 237-245.
13. Shumate S.E. and G.W. Strandberg. 1985. In: Robinsion C.W., Howell J.A. (eds) Comprehensive biotechnology, vol. 4. Pergamon Press, Oxford, pp 235-247.
14. Pümpel, T., B. Pernfuß, B. Pigher, L. Diels, and Schinner. 1995. A rapid screening method for the isolation of metal-accumulating microorganisms. *J. Indust. Microbiol.* 14, 213-217.

(Received November 12, 2001/Accepted December 14, 2001)

ABSTRACT: Characterization and Condition of Silver Accumulation Bacteria in Groundwater

Jin Hee Bae¹, Byung-Re Min³, Myung-Soo Han^{1,2}, Yong-Keel Choi^{1,2*} (¹Department of Life Science, ²Hanyang University National Research Laboratory for Water Environmental & Restoration, Hanyang University, 17 Haengdang-dong, Seoul 133-791, ³Department of Biology, Sangmyong University, Seoul 110-743, Korea)

The strain which accumulate the silver in cell were isolated and characterized. And condition of accumulation of heavy metal was examined closely to investigate optimal condition of accumulation. *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus cereus* were Isolated from groundwater as the strain of silver accumulating bacteria. These strains did not grow in the medium at silver over the concentration 20 ppm. The largest accumulations of silver in the culture of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus cereus* occurred within 24 hours. The amount of silver accumulation in *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus cereus* were 1.9 mg/g cell and 1.65 mg/g cell, repetively. In protein patterns of cell after the treatment of silver, three reducible proteins (126 KDa, 89 KDa, 25 KDa) in *Bacillus cereus* and one new protein (34 KDa) in *Pseudomonas fluorescens* were detected by SDS-PAGE