

*Citrobacter amalonaticus*와 *Citrobacter farmari*에 의한 perchlorate 환원

Nirmala Bardiya, 이일순, 배재호

인하대학교 환경공학과, (e-mail : jhb@inha.ac.kr)

<요약문>

The present study reports the novel physiological function of dissimilatory perchlorate reduction by two strains JB101 and JB109 isolated from a sewage treatment facility in Incheon, South Korea. The physiological data of the isolates showed good correspondence with the members of the family Enterobacteriaceae. The partial 16S rRNA and 16S rDNA sequence of strains JB101 and JB109 showed similarity of 99.8% to *Citrobacter amalonaticus* and 98% to *Citrobacter farmari*, respectively. The study infers toward possibility of *Citrobacter* spp. to form an important group of dissimilatory perchlorate reducers within the γ subclass of Proteobacteria because the majority of the known members belong to two monophyletic groups, namely *Dechloromonas* and *Dechlorosoma* in β subclass of Proteobacteria.

Key words: Perchlorate, Electron-acceptor, 16S rDNA, Enterobacteriaceae, *Citrobacter*

1. 서론

로켓 연료와 탄약제조에 있어 산화제로 이용되는 perchlorate는 인간의 갑상선에 의한 요오드의 이용을 억제하여 호르몬의 생산을 방해하며, 6 mg perchlorate/kg body weight-day의 농도에서 인간의 골수에 치명적인 장애를 유발할 수 있다. 미국 캘리포니아의 Department of Health Services은 perchlorate의 잠정적 규제치를 300ug/L에서 4 ug/L로 개정하였다. 용수로부터 perchlorate를 제거하여 위하여 인공 교환이 사용되어 왔으며 최근에는 이화적 perchlorate 환원균의 빠른 진화도 인하여 perchlorate의 생물학적 복원에 훨씬 더 많은 관심이 모아지고 있다.

Walker와 Giblin에 의해 발견된 *Citrobacter* genus는 방향성 분으로 *risk group*으로 분류될 수 있지만, 건강한 사람과 동물의 소화기관에 흔하게 서식할 뿐만 아니라 침의 발효 배양액에 널리 분포하기 때문에, 아직 환경에서 *Citrobacter* spp.의 역할은 확실히 밝혀지지 않았다.3) 본 연구에서는 두 strains, 즉 *C. amalonaticus* JB101과 *C. farmari* JB109를 분리하였으며, 이화적 perchlorate 환원균의 중요한 group의 하나로 Proteobacteria의 γ subclass에 속한 *Citrobacter*의 분류적 특성을 연구하였다. 또한, 두 strains의 대사와 부분적인 유전적 특성에 대한 연구를 수행하였다.

2. 본 론

2.1. 물질 및 방법

Inoculum and Medium 본 연구에서는 인천광역시 S 하수종말처리장의 1차 침전조로부터 채취된 액상 시료와 슬러지를 식중원으로 이용하였으며, 모든 실험은 standard anaerobic techniques에 의해 수행되었다.

Isolation Strains의 분리가 N₂:CO₂:H₂(85:10:5)의 가스 조성을 갖는 anaerobic glove box에서 3-4회 반복된 연속적인 희석과 alternate plate-tube method에 의해 수행되었다.

Morphological and metabolic characterization Cell morphology의 확인을 위해 96 시간동안 배양되고 희석된 isolates에 대해 SEM(scanning electron microscope, Hitachi S-4200) 촬영을 수행하였으며, 자동화된 BIOLOG MicroStation system(Biolog Inc., Hayward, California)과 carbon-source utilization MicroPlate technique를 이용하여 "metabolic fingerprints"를 확인하였다.

Amplification and partial 16S rDNA sequence determination 본 연구에서 분리된 미생물들의 16S rDNA sequence의 유사성을 확인하고 분류하기 위한 실험이 수행되었으며, sequence similarities를 확인하기 위한 DNA database를 찾기 위해, BLAST programs(5)가 이용되었다.

Perchlorate reduction Perchlorate 환원에 대한 희분식 실험을 위해, 20 mL의 medium에 2.5%(by volume)의 식중원이 이용되었으며, 30-34°C의 온도에서 교반(100-125 rpm) 배양되었다. Sodium acetate와 sodium perchloate는 각각 전자공여체와 수용체로써 약 1:1의 무게비로 이용되었다.

Chlorite dismutation Chlorite dismutase(CD) 활성의 존재, 위치, 그리고 온도에 대한 저항성 등을 평가하기 위하여, 원심분리(10,000 rpm; 10분)에 의해 준비된 cell pellet으로 여러 온도(0-80°C; 5 min)에서 효소 활성에 대한 온도의 영향을 평가하였다. 효소의 활성은 산소발생 유무에 의해 결정하였다.

2.2. Analytical methods

Perchlorate, acetate, 그리고 nitrate 분석을 위한 시료들은 10 분간 원심분리(7,000 rpm)에 의해 준비되었다. 분석항목 및 방법은 다음과 같다.

Table 1. Analytical methods

Items	Analytical methods	Remark
perchlorate	Ion chromatograph (DX500, Dionex)	IonPac AS11/AG11 columns
acetate	Ion chromatograph (DX500, Dionex)	IonPac AS11/AG11 columns
nitrate	Ion chromatograph (DX500, Dionex)	IonPac AS14/AG14 columns
cell density	Agilent 8453 UV-Visible spectrophotometer	

2.3. 실험결과

Morphological characterization *C. amalonaticus* strain JB101(0.6-0.8×1.0-2.5 μm)과 *C. farmeri* strain JB109(0.3×1.72 μm)는 모두 운동성이 컸고 Fig. 1에서와 같이 Gram-negative 간균이었다.



Fig. 1. Scanning Electron Micrographs (SEM) of the isolates.

Amplification and partial 16S rDNA sequence determination and Metabolic characterization Blast program을 이용한 16S rDNA nucleotide sequences 결과는 strain JB101은 *C. amalonaticus*와 99.8%, JB109의 경우 *C. amalonaticus*와 *C. farmeri* 모두에 98%의 유사성을 가지며, 두 strains가 *Proteobacteria* γ subclass의 Enterobacteriaceae과에 속한다는 것을 확인시켜 주었다. 한편, 탄소원 이용에 기초한 실험방법이 *Citrobacter* spp.의 형질적 그리고 생화학적 특성을 확인하는데 신뢰도가 높다고 보고되었기 때문에,⁶⁾ BIOLOG 배지를 이용한 Gram-negative 반응에 대한 실험 후에, 두 strains의 대사 능력에 대해 평가하였다. 실험결과 strain JB101은 Type strain *Citrobacte. amalonaticus*와 99.8%의 유사성을 가지며, strain JB109는 *C. amalonaticus*와 *C. farmeri*에 각각 2%와 98%의 유사성을 보여 *C. farmeri*로 분류될 수 있음을 알 수 있었다.

Perchlorate reduction Strains JB101과 JB109에 의한 성장과 perchlorate 환원에 대한 실험결과 strain JB101의 성장속도는 JB109의 경우보다 빨랐으며, 제거된 perchlorate양과 비례하여 cell density가 증가하였다.

C. amalonaticus strain JB101이 여러 조건에서 perchlorate 환원에 관한 회분식 실험결과, pH 6.0-8.5에서 strain JB101은 10-11 mM perchlorate를 65시간 이내에 완전하게 제거하였으나, pH 5.5와 pH 9.0에서는 각각 55%와 65% 이하의 perchlorate만이 제거되었다. 또한, 28-37°C의 온도에서 성장이 가장 활발하였으며, sodium azide(15 mM)에 의해 성장과 perchlorate 환원이 완전히 억제되었다. 한편, 장시간동안 perchlorate의 환원에 적응되었던 strain JB101과 JB109 모두는 대안의 전자공여체인 nitrate를 제거할 수 없었으나, 24시간 이내에 nitrate 환원능력을 회복하여 perchlorate보다 먼저 nitrate를 제거할 수 있는 것으로 나타났다.

Chlorite dismutation 48 시간 배양된 균주의 상등수에서 CD 활성이 없었기 때문에 strain JB101의 chlorite dismutation(CD)에 관여하는 효소가 cell-bound에 존재하며, 0-50°C의 온도에서 chlorite 첨가 후 10초 이내에 chlorite를 dismutation하는 능력이 있는 것으로 밝혀졌지만, 60°C 이상에서는 효소의 완전한 비가역적 불활성화가 발생하였고, 다시 25°C를 장시간 유지시켜 주어도 활성을 회복하지 못했다.

3. 결론

- 1) 새롭게 분리된 strains JB101과 JB109에 대한 16S rDNA sequence 분석결과 두 strains는 *Citrobacter amalonaticus*와 *Citrobacter farmeri* genus와 각각 99.8%와 98%의 유사성을 보였다.
- 2) *C. amalonaticus* JB101과 *C. farmeri* JB109은 perchlorate를 환원시키는 능력이 있으며, *Proteobacteria* γ subclass의 주요한 perchlorate 환원균 그룹을 형성할 수 있다.
- 3) *C. amalonaticus* JB101의 chlorite dismutation 효소는 넓은 범위의 온도(0°C-50°C)에서 활성을 유지할 수 있다.
- 4) *C. amalonaticus* JB101은 perchlorate와 nitrate를 전자수용체로 동시에 이용할 수 있으며, 실험결과 perchlorate보다는 nitrate제거가 선행되는 것으로 밝혀졌다.

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2002-000519-0)지원으로 수행되었음.

4. 참고문헌

- 1) Chaudhuri, S.K., OConnor, S.M., Gustavson, R.L., Achenbach, L.A., and Coates, J.D., Environmental

- factors that control microbial perchlorate reduction, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68** (9), 4425-4430, 2002.
- 2) Werkman, C.H. and Gillen, G.F., Bacteria producing trimethylene glycol, *J. Bacteriol.*, **23**, 167-182, 1932.
 - 3) Katzenellenbogen, E., Zatonky, G.V., Kocharova, N.A., Bogulska, M., Kowal, A.K., Shashkov, A. S., Gamian, A., and Knirel, Y.A., Structure of a new 2-deoxy-2-[(R)-3-hydroxybutyramido]-D-glucose-containing O-specific polysaccharides from the lipopolysaccharide of *Citrobacter gillanii* PCM 1542, *Carbohydr. Res.*, **337**, 1541-1546, 2002.
 - 4) Altschul, S. F., Thomas, L.M., Alejandro, A. S., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, **25**(17), 3389-3402, 1997.
 - 5) Brenner, D.J., OHara, C.M., Grimont, P.A.D., Janda, J.M., Falsen, E., Eldova, E., Ageron, E., Schindler, J., Abbott, S.L., and Steigerwalt, A.G., Biochemical identification of *Citrobacter* species defined by DNA hybridization and description of *Citrobacter gillanii* sp. nov. (Formerly *Citrobacter* Genomospecies 10) and *Citrobacter murlinae* sp. nov. (Formerly *Citrobacter* Genomospecies 11), *J. Clin. Microbiol.*, **37**(8), 2619-2624, 1999.