

土壤중에서의 *Bdellovibrio* sp.의 분리시도

高春明 · 李逢起 · 滕永建

(延世大學校 醫科大學 微學生物學敎室)

Isolation of Ectoparasitic *Bdellovibrio* sp. from Several Soils
KOH, Choon-Myun, Bong-Kee LEE, and Young-Kun DEUNG

(Dept. of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University.)

Asbtract

Bdellovibrio sp. is an ectoparasitic bacteria which is predatory and parasitic upon other bacteria.

This study was carried out the isolation of *Bdellovibrio* sp. from several soil samples and observation of this organisms by means of electron microscope.

The results are as follows: The primary isolated *Bdellovibrio* sp. from soil is an obligate intracellular rod form parasite and possess a monoflagella.

Escherichia coli is one of the suitable host cell for growth of *Bdellovibrio* sp.

緒 論

Bdellovibrio 균주에 대한 연구는 1963년 Stolp 및 Starr에 의하여 최초로 그람 음성 세균에 대하여 체외기생성(ectoparasitic)을 나타내며, 동시에 용균현상을 나타내는 미생물(세균)이 존재한다는 보고가 있는 이래 여러 학자들(Shilo 및 Bruff, 1965; Starr 및 Baigent, 1966; Burnham 등, 1968; Seidler 및 Starr, 1969)에 의하여 여러 방면으로 연구가 진행되었으며 현재도 진행되고 있는 형편이다.

Bdellovibrio sp.는 토양, 담수, 하수, 해수 주위의 토양 등에서 많이 발견되며, 형태학적으로는 그람 음성 간균으로서 크기는 장경이 1~3 μ m, 단경이 0.3 μ m정도이며 한 개의 편모를 소유하고 있어 활발한 운동성이 있으며 숙주 세포의 세포벽과 세포막사이에 침입하여 증식하고(Seidler 및 Starr, 1968), 이들의 숙주세포는 주로 phytopathogen인 그람 음성 간균인 것으로 알려져 있다.

또한, *Bdellovibrio* sp는 과거에는 편성 기생성 세균으로 알려져 있었으나(Starr 및 Baigent, 1966; Stolp 및 Starr, 1963; Varon 및 Shilo, 1968, 1969; Diedrich 등 1970) 근래에 와서는 두가지 형태 있다고 주장하고, 이중 숙주세포의 기생성인형(host-dependent type)과 숙주세포의 비기생성인형(host-independent type)이 존재하여 이들 중 비기생성인형은 비병원성인 균이며, 이는 숙주세포 기생성형의 菌株를 특수 cell-free 배지에 계속 계대 배양하므로써 출현이 가능하다고 발표하였다(Seidler 및 Starr, 1969; Diedrich 등, 1970; Reiver 및 Shilo, 1969).

이에 저자들은 토양에서 이들 *Bdellovibrio* 균을 분리 동정하고 이들의 특성을 관찰할 목적으로 본 실험에 착수하였던 바, 수종 토양으로부터 이들 균주를 관찰할 수 있었기에 여기 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 試料 : 실험에 사용된 시료로서는 연세대학교 주변의 下水의 토양을 사용하였다.

2) 실험에 사용된 宿主細胞 : 실험에 사용된 숙주세포인 균주에 대하여는 본 교실에서 계대 보관중인 그람 음성간균 중 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aerobacter aerogenes*, *Salmonella typhi* 및 *Shigella flexneri*의 각각 1 주씩을 이용하였다.

3) 실험에 사용된 培地 : 실험에 사용된 배지로서는 diluted nutrient broth (DNB 배지)*, non-nutrient TM 배지** 및 Tris, yeast-extract 및 peptone 배지***이었다.

實驗結果

1. 培養成績

시료의 배양성적을 보면 숙주세포들 간에 배양 정도의 차이를 나타내는 감이있어 *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, 및 *Shigella flexneri* 중 각각의 plaque forming unit는 *Escherichia coli*, 2×10^3 ; *Pseudomonas aeruginosa*, 4×10^2 ; *Aerobacter aerogenes*, 2×10 ; 그리고 *Salmonella typhi* 및 *Shigella flexneri*. 수 개 정도로서 *Escherichia coli*가 가장 높은 plaque forming unit를 나타내었다.

2. 實驗方法

1) 숙주세포의 배양 : 각종 숙주세포는 보통 배양방법에 따라 brain heart infusion broth 배지에 정지 배양한 후 세균의 수가 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ cell/ml 정도가 되게 균체를 조정하였다.

2) 試料의 接種方法 : 접종방법으로서는 먼저 채취한 각종 시료를 일정량의 증류수

에 처리, 진탕시킨 뒤 낮은 속도로 원심침전을 실시하여 상층액을 얻는다. 얻어진 상층액은 다시 pore의 크기가 $0.45 \mu\text{m}$ 인 membrane filter를 통하여 여과한 뒤 $12,000 \times g$ 로서 10분간 다시 원침을 실시하여 상층액은 버리고 침전물만을 취하여 이를 숙주세포에 접종하였다.

3) 培養方法 : 20ml의 각종 배지에 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ cell/ml의 숙주 세포를 접종하고, 동시에 시료로부터 얻은 침전물의 일정량을 접종하여 37°C 배양기에서 진탕 배양한 후 이를 다시 고체배지에 접종 plaque 형성 여부를 관찰하였다.

4) 전자현미경적 관찰방법 : 전자현미경적 방법으로는 첫째 shadowing 방법과 둘째 초박절편 작성방법을 이용하였다. 즉 shadowing 방법으로는 탄소분말로 처리된 grid상에 시료를 도포한 후 진공 증착기를 이용하여 탄소 분말을 재도포하여 형태를 관찰하였으며, 아울러 고정후 탈수술(ethyl-alcohol 및 propylene oxide) 실시하고 초박절편을 작성 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 두 표본 모두 Hitachi 제품 전자 현미경으로 관찰하였다.

2. 전자현미경적 관찰성적

전자현미경을 통한 관찰성적을 보면 shadowing 방법에 의한 형태학적 구조를 보면 단일 편모를 가지고 있는 간균이었으며 (Photo. 1), 초박절편을 작성하여 절단표본을 통한 관찰성적에서는 숙주세포의 세포벽의 변화로 인한 전형적인 간균의 형태를 갖추고 있지 못하며, 세포의 세포벽이 불규칙한 형태를 나타내고 있었으며, *Bdellovibrio*는 숙주세포에 부착되어 숙주세포내로 침입하기 시작하는 간균 내지 구형의 양상을 나타내고 있었다(Photo. 2, 3).

* Diluted nutrient broth (mg/liter) : Nutrient broth, 800; casamino acid, 500; yeast extract, 100; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 200; FeSO_4 , 10; MnSO_4 , 10; pH 7.2

** Non-nutrient TM medium (mg/liter): 0.002 M tris -(hydroxymethyl)-aminomethane; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 200; FeSO_4 , 10; MnSO_4 , 10; pH 7.8

*** Tris, yeast extract peptone (TYP) medium; yeast-extract, 3.0 gm; Peptone, 0.6 gm; 0.5 M Tris buffer sol., 100ml; pH 7.5

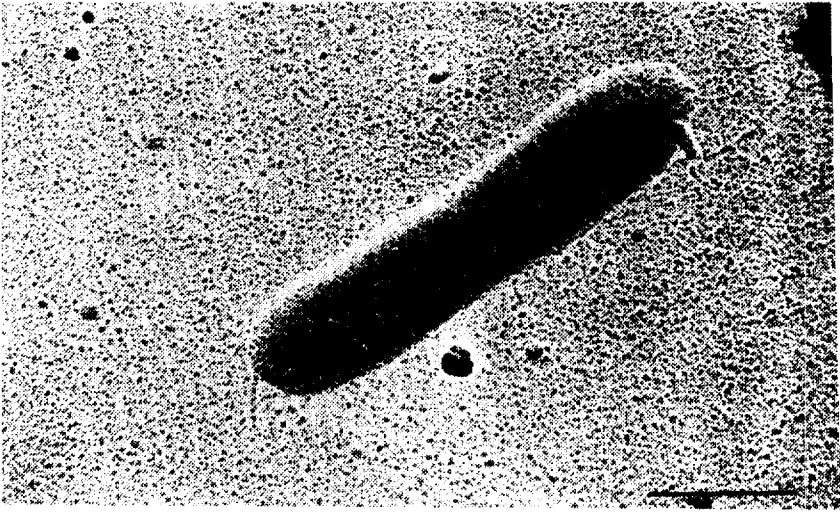


Photo. 1. An electron micrograph of the monoflagellated *Bdellovibrio* sp. attached to the host cell



Photo. 2 and 3. *Bdellovibrio* sp. invaded in the host cell.

考 察

1963년 Stolp 및 Starr에 의하여 체외기생 세균(ectoparasitic bacteria)의 존재를 보고한 이래 많은 학자들에 의하여 이들 세균에 대한 연구가 진행되었으며, 이는 형태학적으로 그람음성 간균 내지 나선형을 나타내고 있으며 숙주세포에 기생부위, 및 증식부위도 세포벽과 세포막 사이에서 증식하고, 이 증식 결과 숙주세포의 용균현상을 초래한다고 주장하였다(Burnham 등, 1968; Sei-

ler 및 Starr, 1969; Shilo 및 Bruff, 1965). 또한, 이와같은 세균은 특히 토양, 담수, 하수등에 많이 존재한다고 주장하고, 이들 기생세균의 숙주세균은 그람음성 간균중 phytopathogenic organism이 대부분이라고 발표하였다(Seidler 및 Starr, 1968).

한편, 이들 *Bdellovibrio* sp.의 생활사역시 과거에는 편성 기생성세균이라고 알려져 있었으나 근래에 와서는 기생성 세균(host-dependent organism)과 자유생활을 하는 숙주 비기생성 세균(host-independent orga-

anism)의 두가지 형태가 있는 것으로 알려져 있다.

본 연구자들도 시료의 채취는 하수에 있는 토양을 대상으로 하였으며, 이 시료로부터 균주를 분리할 수 있었고, 숙주세포 역시 *Escherichia coli*가 타 실험 균주보다 실험 결과가 우수하게 나타난 점은 타 연구자들의 주장과 일치하는 점이었다(Seidler 및 Starr, 1968; Abram 등, 1974).

또한, 형태학적 구조를 보면, 단일 편모를 가지고 있는 간균의 형태를 나타내고 있으며(Photo. 1), 숙주 세포에 부착되는 경우 숙주세포의 세포벽에 변화를 초래하는 현상

(Photo. 2, 3) 등도 역시 타 연구자들의 연구 결과와 같은 점들이라고 사료된다.

이상, 본 실험을 종합하여 볼 때 토양중 특히, 하수, 담수 등의 토양 중에는 많은 *Bdellovibrio*균주가 존재하고 있을 것으로 믿어지며, 이는 좀 더 많은 장소에서 시료를 채취하여 체계적인 방법에 의한 연구를 통하여 우리나라에 분포되어 있는 *Bdellovibrio* sp.의 등정과 아울러 숙주비기생성세균(host-independent organism)에 대한 출현 등에 대한 연구는 앞으로 계속되어야 될 것으로 생각된다.

摘 要

토양 중에서 *Bdellovibrio* sp.를 분리할 목적으로 일련의 실험을 실시하였던 바, 하수 토양에서 *Bdellovibrio* sp.의 균주를 분리할 수 있었으며, 이는 단일 편모를 소유한 간균의 형태이었고 숙주 세포로서는 *Escherichia coli*가 좋은 숙주세포종의 하나이었다.

引 用 文 獻

1. Abram, D., Castroemelo, J., and Chou, D., 1974. Penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into host cells. *J. Bacteriol.*, **118** : 663.
2. Burnham, J.C., Hashimoto, T. and Conti, S.F., 1968. Electron microscopic observations on the penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into gram negative bacterial hosts. *J. Bacteriol.*, **96** : 1366.
3. Diedrich, D.L., Denny, C.F., Hashimoto, T. and Conti, S.F., 1970. Facultatively parasitic strain of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Bacteriol.*, **101** : 989
4. Reiner, A.M. and Shilo, M., 1969. Host-independent growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* in microbial extracts. *J. Gen. Microbiol.*, **59** : 401.
5. Seidler, R.J. and Starr, M.P., 1969. Factors affecting the intracellular parasitic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* developing within *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **97** : 912.
6. _____, 1969. Isolation and characterization of host-independent *Bdellovibrios*. *J. Bacteriol.*, **100** : 769.
7. Shilo, M. and Bruff, B., 1965. Lysis of gram-negative bacteria by host-independent ectoparasitic *Bdellovibrio bacteriovorus* isolates. *J. Gen. Microbiol.*, **40** : 317.
8. Star, M.P. and Baigent, N.L., 1966. Parasitic interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* with other bacteria. *J. Bacteriol.*, **91** : 2006.
9. Stolp, H. and Starr, M.P., 1963. *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et. sp. n., A predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism, Antonie van Leeuwenhoek, *J. Microbiol. Serol.*, **29** : 217.
10. Varon, M., and Shilo, M., 1968. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria (I). *J. Bacteriol.*, **95** : 744.
11. _____, 1969. Attachment of *Bdellovibrio bacteriovorus* to cell wall mutants of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **97** : 977.