

수정된 Gram 염색법에 의한 혼합세균 개체군의 분별 측정

장진경·임종락·*정계효·한홍의
 인하대학교 이과대학 생물학과 *서울기독병원

Differentiation of mixed bacterial populations by modified Gram stain

Jang, J.G., C.R. Lim, *G.H. Jung and H.E. Han
 Dept. of Biology, College of Science, Inha University
 *Seoul Christian Hospital

ABSTRACT: Attempts were made to enumerate the number of Gram positive and negative bacteria in the development of natural fermentation rapidly and simultaneously. A general Gram stain was applied to this study. The number of cells by Gram stain was proportional to the cell turbidity by spectrophotometer within a range of 0.7 absorbance at 610nm. The cells washed out during procedures were not exceeded about 8 percentage. The standard error of separate counts in the mixture of *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* was $5.1 \pm 2.3\%$. The possible range of counting was $5.5 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ cells/ml. Therefore, it is believed that a general Gram stain could be applied to the separate counting of mixture of Gram positive and negative bacterial populations too. In practice, growth kinetics of hemp retting and Kimchi fermentation were presented.

KEY WORDS □ Gram stain, cell turbidity, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, hemp, Kimchi.

세균수를 측정하는 일반적인 방법으로는 평판배양법에 의한 총세균수와 생균수, 전조중량, 세포구성물질의 정량, 그리고 분광광도계에 의한 혼탁도를 측정하는 방법들이 알려져 있으나(Atlas *et al.*, 1981; Ingraham *et al.*, 1983), 이 방법들은 기지의 단일 미생물의 측정 내지는 혼합된 미생물의 전체적인 측정에 한정되어 있다. 단일 미생물에 의한 발효과정이 아닌 자연발효 또는 부패과정에는 Gram 양성 및 음성균이 혼합되어 있으므로 이들 개체군을 분리 측정하고자 할 때는 상기 열거된 방법들로서는 적합하지 못하다고 볼 수 있다.

세균의 분류는 에너지 생산방법에 따라서 분류되었으나(Bergey's manual of determinative Bacteriology, 1974), 최근 Bergey's manual of Systematic Bacteriology(Gibbons *et al.*, 1978; Krieg *et al.*, 1984)에 의하면 원핵생물

계(Kingdom prokaryotae)를 Gram 염색법에 의하여 4가지군(Division)으로 분류할 만큼 Gram 염색법은 중요시되고 있다. 따라서 자연발효 및 부패과정중에 Gram 양성 및 음성균의 동역학적 변화를 동시에 그리고 신속하게 분리측정하는 것은 이들 개체군의 역할을 파악하는데 좋은 변수(Parameter)가 될 수 있다고 볼 수 있다.

Matsunaga *et al.*, (1985)은 Gram 음성균과 양성균들을 CoA에 의한 최대 전류의 비를 이용하여 그 개체수를 측정할 수 있다고 보고하였으나 실제적인 자연발효 및 부패과정에서도 이용이 가능한지에 대해서는 언급하지 않았다.

Gram 음성 및 양성균의 분별측정은 아닐지라도 김치 발효과정에서 미생물들의 동적변화를 파악하기 위하여 각각의 군에 적합한 선택배지를 이용하여 각각의 세균수를 측정하였다. 김치 발효과정에 관여하는 주된 세균은 *Lactobacillus plantarum*,

Lactobacillus brevis, *Sterptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides* 등이 분리 보고되었는데, 이들 세균은 모두 Gram 양성균들임을 감안할 때 (Kim *et al.*, 1966; Mheen *et al.*, 1984), 이들 각각의 분리 측정보다는 Gram 염색법에 의하여 전체적인 동적변화를 신속하게 파악하는 방법이 필요하다고 생각할 수 있다. 이상과 같이 Gram 음성 및 양성균의 분별측정은 최근에 시도되고 있는 연구로써 자연시식처에서 그들의 동적변화의 역할 뿐만 아니라 세균분류의 기초적인 방법으로써도 중요한 의의를 포함하고 있다.

본 연구에서는 Hans C.H. Gram(1884)이 고안하여 현재 널리 사용되고 있고 비교적 취급하기가 용이하고 신속한 Gram 염색법을 응용하여 직접 현미경하에서 Gram 양성과 음성균의 수를 각각 분리 측정할 수 있는 방법의 유의성을 검토하였으며, 또한 식물체 발효과정중에 증식하는 세균개체군의 동역학적 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에 사용된 균주는 *Escherichia coli* ATCC 19853과 *Micrococcus luteus*이며 *E. coli* 는 LB 사면배지(증류수 1L당 tryptone, 10g Yeast extract, 5g; NaCl, 15g)에서 계대배양하여 사용하였으며, *M. luteus* 는 Nutrient agar 사면배지(증류수 1L당 Beef extract, 3g; Peptone, 5g; Agar, 15g)에서 계대배양하여 사용하였다.

Gram 염색과 단순염색(Simple stain)에 의한 균수 측정

정량적으로 세균수를 측정하기 위하여, Slide glass 상에 2cm 지름의 원을 유성펜으로 그린 후, 그 원내에 5 μ l의 세포 현탁액을 도말하여 대기중에서 건조하여 고정하였다. 그 다음 Gram 염색과 단순염색을 일반적인 방법에 의하여 실시하였다 (Gerhardt *et al.*, 1981). 세균수 측정은 현미경하에서 1500 \times 배율로 조정할 후, Gram 염색을 끝낸 Slide glass 상에 Immersion oil을 떨어뜨려 임의적으로 5회 계수하여, 그 평균값으로 단위 microscopic field(120 μ m ϕ)의 면적에 대한 세

균수로 계산하였다. 단위면적당 측정된 세균수를 단위 ml용량으로 환산하면 다음과 같다.

$$\text{세균수} / \text{ml} = 5.5 \times 10^6 \times \text{측정 세균수}$$

혼탁도 측정

세균 현탁액의 혼탁도는 분광광도계로 610 nm에서 측정하였다.

식물체 발효

김치 발효에 사용된 배추 (*Brassica pekinensis*) 는 1cm 정도의 크기로 하였으며, 배추 무게에 대하여 마늘 0.5%, 파 1%, 고추가루 1.5%, 염도는 1%되게 조절하여 혼합한 후, 10 $^{\circ}$ C에서 발효시키면서 Gram 음성 및 양성균의 증식을 측정하였다. 배추는 통상적인 방법에 의하여 소금에 절여서 사용하였다. 대마 (*Cannabis sativus*) 침지 (retting)는 안동지역에서 재배한 건조된 대마를 사용하였다. 건조된 대마를 30 cm씩 잘라서 100g을 5L 증류수에 넣은 후, 28 $^{\circ}$ C에서 통기시키면서 Gram 음성 및 양성세균의 증식을 측정하였다.

상기 두 발효과정은 접종하지 않고 자연적인 접종에 의한 것이며, 살균도 하지 않은 것이 특징이다.

결과 및 고찰

Gram 염색법에 의한 세균수 측정조건

Gram 염색법에 의한 세균수 측정의 정확성을 알기 위하여 동일 시료의 혼탁도를 측정하여 비교 검토하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 Gram 염

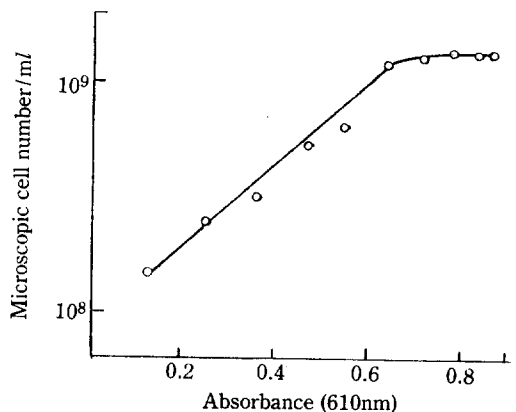


Fig. 1. Relationship between microscopic cell number and absorbance of *Escherichia coli* ATCC 19853.

Table 1. Percentage of remaining cells of *E. coli* ATCC 19853 after Gram stain and simple stain.

Turbidity(610nm)	Simple stain	Gram stain	% (Gram stain/ simple stain)
0.13	$1.8 \pm 0.4 \times 10^8$	$1.6 \pm 0.2 \times 10^8$	88.9
0.25	$4.0 \pm 0.6 \times 10^8$	$3.5 \pm 0.6 \times 10^8$	87.5
0.36	$5.1 \pm 0.3 \times 10^8$	$4.9 \pm 0.9 \times 10^8$	96.1
0.47	$7.3 \pm 0.3 \times 10^8$	$6.9 \pm 1.5 \times 10^8$	94.5
0.54	$8.2 \pm 1.4 \times 10^8$	$6.2 \pm 1.1 \times 10^8$	75.6
0.64	$1.0 \pm 0.2 \times 10^9$	$9.5 \pm 0.8 \times 10^8$	95.0
0.71	$1.1 \pm 0.2 \times 10^9$	$1.1 \pm 0.02 \times 10^9$	100.0
0.78	$1.4 \pm 0.3 \times 10^9$	$1.2 \pm 0.1 \times 10^9$	85.7
0.83	$1.2 \pm 0.2 \times 10^9$	$1.2 \pm 0.2 \times 10^9$	100.0
0.86	$1.3 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.3 \pm 0.1 \times 10^9$	100.0

Average value 92.3 ± 7.5

색법에 의한 세균수와 혼탁도와 관계는 $A_{610} = 0.7$ 이하에서는 직선적인 비례관계가 성립되었으나 그 이상의 값에서는 비례하지 않음을 알 수 있다. $A_{610} = 0.7$ 값은 $1.1 \pm 0.2 \times 10^9$ 세균/ ml에 해당됨으로 세균수가 이 이상의 값을 가질 때 Gram 염색법은 적용할 수 없음을 의미하였다. 따라서 세균수가 ml 당 약 10^9 이상일 때는 시료를 희석한 다음 세균수를 $5.5 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ 세균/ ml 내가 되도록 측정함으로써 정확한 값을 얻을 수 있었다.

그리고 Gram 염색과정중 세척에 의하여 실제적으로 제거되는 세균수를 파악하기 위하여 1회 세척하는 단순 염색법과 4회 세척하는 Gram 염색법을 비교하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 단순 염색법에 의한 세균수에 대한 Gram 염색법에 의한 세균수와 백분율로 표시한 평균값은 $92.3 \pm 7.5\%$ 이었다. 이것은 세척을 4회 반복할지라도 대부분의 세포는 제거되지 않고 Slide glass 표면에 부착되어 있으므로 세균수 측정에는 지장이 없음을 의미하고 있다. 또한 단순 염색법이나 Gram 염색법에 의하여 측정된 세균수는 혼탁도와도 비례관계가 성립되었다. 그러므로 혼탁도에 의한 세균수 측정대신에 Gram 염색법을 이용할 수 있었다.

Gram 음성 및 양성균의 분리측정

Gram 음성균과 양성균이 혼합되어 있을 때 Gram 염색법에 의한 분별 측정이 가능한지를 알기 위하여 Gram 음성균인 *Escherichia coli*

ATCC 19853과 Gram 양성균인 *Micrococcus luteus*의 현탁액을 흡광도로 측정하여 Table 2에서 보는 바와 같이 각각 다른 비로써 혼합한 후 본 실험에서 고안된 Gram 염색법으로 각각의 세균수를 측정된 비율과 흡광도 비율과의 관계를 비교하였다. 그 결과 흡광도에 의한 Gram 음성과 양성균의 비율과 Gram 염색법에 의한 세균수의 그 비율은 $5.1 \pm 2.3\%$ 의 오차를 나타내었다. 따라서 Gram 음성 및 양성균이 혼합되어 있는 자연 발효과정중에서도 본 실험에서 고안된 염색법을 사용할 수 있음을 알았다. 실제적으로 배추 (*Brassica pekinensis*)와 대마 (*Cannabis sativus*)와 같은 식물체를 사용하는 발효과정중에서 Gram 음성 및 양성 개체군의 동역학적 변화 관계를 관찰하였다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 대마침지 (Hemp retting)에서는 시간이 경과함에 따라서 Gram 음성균은 약 5×10^8 세균/ ml까지 증가한 후 거의 일정수를 유지하는 반면에 Gram 양성 개체군은 10^7 세균/ ml까지 증가한 후 그 수가 점차 감소하여

Table 2. Microscopic cell counts of mixed suspensions of *Escherichia coli* ATCC 19853 and *Micrococcus luteus* by Gram stain.

Authentic ratio of Gram +/-	4/6	2/8	8/2
Experimental ratio of Gram +/-	4.8/5.2	1.7/8.3	7.6/2.4
Error (%)	± 8.2	± 2.7	± 4.4

* Standard error (%) is 5.1 ± 2.3 .

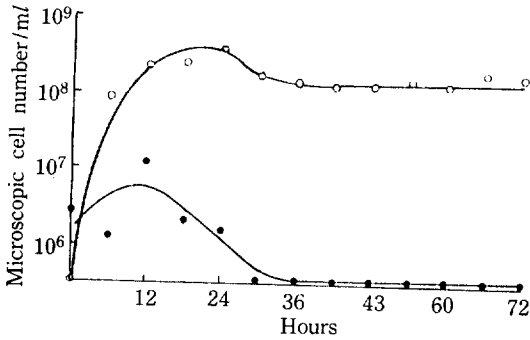


Fig. 2. Growth kinetics of Gram positive(—●—) and negative(—○—) bacterial populations by Gram stain during the development of Hemp (*Cannabis sativus*) retting.

나중에는 거의 관찰되지 않았다. 즉, 대마침지에서는 Gram 음성균이 우점종임을 알 수 있었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 김치 발효에서는 대마침지에서와는 달리 Gram 양성 개체군이 점차 증가하여 15일 후에 약 7×10^8 세균/ ml까지 증가한 후 일정수를 유지하였고 Gram 음성균의 수적 증가는 초기와는 별로 차이가 없었으나 20일 이후부터는 급격히 감소되어 나중에는 거의 관찰되지 않았다. 즉, 김치 발효에서는 Gram 양성 개체군이 우점종으로 역활함을 알 수 있었다. 김치 발효에서 Gram 양성균이 우점종으로 되는 결과는 Kim *et al.*, (1966)과 Mheen *et al.*, (1984)에 의한 김치 발효중의 세균의 동적변화와 잘 일치되었다.

두 종류의 식물체를 이용한 발효중에서 우점종이 대마침지에서 Gram 음성균이고, 김치 발효에서는 Gram 양성균으로 나타난 반대현상은 정확하게 해석하기 어려운 문제이나, 생태학적인 면에서 앞으로 연구되어야 할 분야라고 말할 수 있겠다.

미생물 생태학 분야에서 세균수 측정 방법중의 하나는 직접적인 계수법으로써 편광현미경이나 형광현미경을 사용하여 세균수를 측정하는데, 그 장

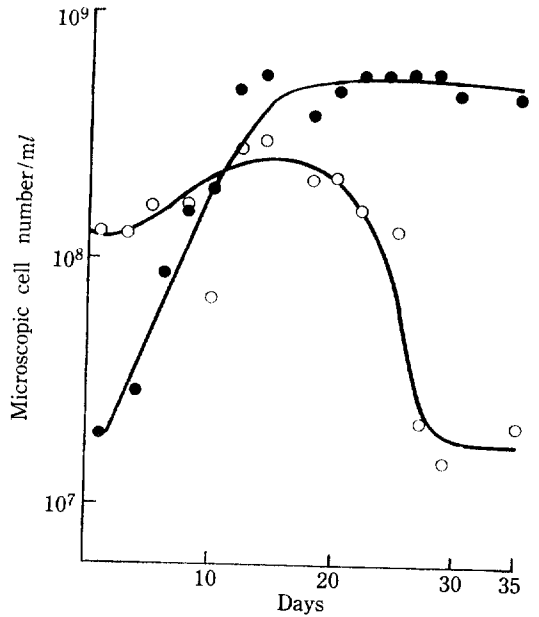


Fig. 3. Growth kinetics of Gram positive(—●—) and negative(—○—) bacterial populations by Gram stain during the development of Cabbage (*Brassica pekinensis*) fermentation.

점으로는 세균과 함께 이물질이 혼합되어 있어도 서로 구별이 가능하므로 세균수 측정이 보다 정확성을 기할 수 있다는 점이다(Atlas *et al.*, 1981). Gram 염색법에 의하여 광학현미경하에서의 균수 측정도 이와같은 장점을 가지고 있으며, Slide glass를 사용하므로 특수 장치나 기구없이도 이용할 수 있고, 시료의 준비과정도 필요없는 등의 장점을 가지고 있음을 알 수 있었다. 그리고 특히 Gram 염색법은 약 20분 이내에 총 균수측정은 물론 Gram 음성균과 양성균을 분별 측정할 수 있는 이점이 있었다.

이 방법은 본 연구실에서 약 2년간 사용하여 왔으며, 그동안 사용상의 문제점은 발견되지 않았다.

적 요

자연 발효과정중에 Gram 양성 및 음성세균의 수를 신속하고 동시에 측정할 수 있는 방법을 검토하였다. 본 연구에서는 일반적으로 사용되고 있는 Gram 염색법을 응용하였다. 그 결과로써 Gram 염색법에 의한 세균수는 분광광도계에 의한 혼탁도와 $A_{610} = 0.7$ 의 범위내에서 비례관계가 성립하였다. 염색조작중 세척에 의한 균의 제거는 약 8%를 초과하지 않았다. 그리고 *Escherichia coli*와 *Micrococcus luteus*의 혼합액에서 이들의 분리 측정에 대한 표준오차는 $5.1 \pm 2.3\%$ 이었다. 계수가능범위는 $5.5 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$ 세로/ ml이었다. 그러므로 일반적인 Gram 염색법은 Gram 양성 및 음성 개체군이 혼합된 배양액에서 이들을 분별 측정하는데도 적용될 수 있다고 본다. 실제적으로, 대마침지와 김치 발효과정에서 균 생장의 동역학적 관계를 검토하였다.

REFERENCES

1. Atlas, R.M., and R. Bartha, 1981. Microbial Ecology; Fundamentals and Applications. Addison-Wesley Publishing Company, pp. 91-111.
2. Buchanan, R.E., and N.E. Gibbons, 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th. The Williams & Wilkins Company, pp. 18-19.
3. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips, 1981. Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology. pp. 23-27, 182-198.
4. Gibbons, N.E. and R.G.E. Murray, 1978. Proposals Concerning the higher taxa of Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28(1) 1-6.
5. Ingraham, J.L., O. Maaloe, and F.C. Neidhardt, 1983. Growth of the Bacterial cell. Sinauer Associates, Inc. pp. 230-234.
6. Kim, H.S. and J.K. Kim. 1966. Studies on the Dynamic changes of Bacteria during the "Kimchi" Fermentation. *J. Nuclear Sci.* 6. 112-118.
7. Krieg, N.R., and J.G. Holt, 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1, Williams & Wilkins, pp. 35-36.
8. Matsunaga, T., and T. Nakajima, 1985. Electrochemical Classification of Gram-negative and Gram-positive Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 50(2) 238-242.
9. Mheen, T.I. and T.W. Kwon. 1984. Effect of Temperature and Salt Concentration on Kimchi Fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 16(4) 443-450.

(Received April 28, 1987)