

한국산 무당거미(*Nephila clavata*)에서 분리한 장내 세균의 동정

문은영¹ · 오현우¹ · 맹필재² · 배경숙^{1*}

¹한국생명공학연구원 유전자원센터, ²충남대학교 미생물학과

거미는 육식동물로 구강의 소화라는 독특한 방법을 통하여 곤충을 비롯한 작은 동물을 먹이자원으로 이용한다. 거미의 독샘에 함유되어 있는 단백질 분해 효소 뿐만 아니라 소화관에 존재하는 미생물도 거미의 소화에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다. 본 연구에서는 한국산 무당거미(*Nephila clavata*)의 소화관내 미생물 군집의 분포와 단백질 및 지질 분해능을 확인하고, 거미의 장내 미생물을 분리·동정하고자 하였다. 한국산 무당거미의 소화관에 존재하는 총 개체수는 거미 10개체를 통합하여 처리하였을 때와 개체별로 처리하였을 때 모두 거미 한 마리당 10^3 - 10^5 CFUs 로 매우 유사하였다. 계수된 미생물 중에서 90% 이상이 단백질 또는 지질 분해능을 나타내었다. 그리고 계수된 미생물 중에서 균종별로 1균주씩 순수 분리하였고, 분리된 미생물 중 63.3%가 각각 단백질 또는 지질 분해능을 나타내었고, 이중 50%의 균주는 단백질과 지질 분해능을 동시에 함유하는 것으로 나타났다. 형태적, 생리·생화학적 방법을 통하여 동정한 결과, 11종류의 그람음성균(*Acinetobacter calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *Alcaligenes faecalis*, *Cedecea davisae*, *C. neteri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Suttonella indologenes*)과 11종류의 그람양성균(*Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. pasteurii*, *B. thuringiensis*, *Cellulomonas flavigena*, *Corynebacterium martruchotii*, *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus hominis*, *S. sciuri*)으로 분류되었다.

Key words □ enteric bacteria, lipase, *Nephila clavata*, protease

거미는 생태적으로나 분류학적으로 곤충과 가장 유연관계가 높은 절지동물로 서식범위가 대단히 넓으며, 식충성인 동시에 포식물이 대단히 높고 포식해충의 범위가 넓어 실제로 농림지 등에서 생물학적 방제의 한 방법인 천적으로 이용되고 있다. 최근에는 국내에서도 농약 대신 거미를 이용하여 벼 수확량이 늘어났다는 연구결과와 벼별구 방제를 위하여 황산적 거미를 이용한 연구가 보고되고 있다(6).

이와 같이 생물학적 방제의 매개체로서 크게 각광을 받고있는 거미는 육식동물로 구강의 소화라는 방법을 통하여 곤충을 비롯한 작은 동물을 먹이자원으로 이용한다. 즉, 포획한 먹이에 독액과 소화액을 주입하여 외부에서 소화효소에 의해 어느 정도 소화된 먹이를 반 액체 상태로 흡입한다. 이러한 먹이 자원은 단백질과 지질이 매우 풍부한 반면 일부 필수영양분이 부족할 수 있기 때문에 단백질이나 지질을 분해하는 효소를 분비하거나 거미에게 부족한 필수영양분을 제공하는 역할을 하는 장내 미생물 군집이 존재하리라 추정된다(2).

거미의 소화에 관여하고 있는 단백질이나 지질 분해효소는 산업적으로도 많이 이용되고 있는데 근래에는 국내·외를 막론하고 환경 규제 강화 추세에 따라 화학적 촉매로부터 동·식물이나 미생물을 이용하는 생물 촉매로의 전환이 활발하게 진행되고 있다(1). 특히 단백질 가수분해효소는 식품공업, 세제공업, 의약품업, 피혁가공공업 및 환경공업 등에 다용도로 응용되고 있는데,

그 시장 규모가 효소 전체 시장의 60%를 차지하고 있다. 이와 같은 산업적 중요성으로 인하여 이 효소에 대한 연구가 현재 활발히 진행되고 있다(13).

곤충과 공생하는 미생물은 나타나는 위치에 따라 크게 두 가지 형태로 나누어 볼 수 있는데, 미생물이 곤충의 서식지나 표피에 나타나는 외부 미생물과 곤충의 몸 안에 나타나는 내부 미생물이 있다. 외부 미생물의 대부분은 일시적이고 그들의 수에 있어서도 매우 다양하며, 어떤 경우에는 편리공생이나 상리공생의 형태로도 나타나는데, 먹이 또는 수분이나 적당한 환경을 유지하기 위한 목적으로 곤충이 배양하는 곰팡이(딱정벌레에서의 *Ascomycotina*, 개미에서의 *Attamyces*, 흰개미에서의 *Termitomyces*)가 그 대표적인 예라 할 수 있다(12).

내부 미생물은 곤충 소화관의 내강, 대강, 관, 그리고 세포내에서 발견되며, pH, 효소, 먹이 등의 환경에 따라 미생물의 종류나 수가 다르다. 곤충 내부에는 그람음성의 막대형 세균이 대부분이고, 곰팡이(saprophytic fungi, yeast, yeast-like organism)나 곤충을 매개로 이용하는 식물 병원성 바이러스도 일부 나타난다. 내부 미생물 중 곤충과 공생관계를 나타내는 미생물들은 현재까지 주로 섭식과 관련하여 장내 미생물 군집을 형성하는 장내 공생 미생물들과 생식기와 소화관의 세포질 내에서 발견되는 세포내 공생미생물들이 알려져 있다. 소화관의 체강내의 미생물군집 중 가장 흔한 것은 세균류 또는 균과 비슷한 모양을 보여주는 종류로 바퀴벌레, 흰개미목, 노린재목(매미목), 이목, 털이목, 딱정벌레목, 벌목 및 파리목 등에서 볼 수 있다. 이외에도 목재를 먹는 흰개미류와 바퀴 등에서는 편모충 등의 원생동물, 진딧물과 딱정

*To whom correspondence should be addressed.
Tel : 042-860-4610, Fax : 042-860-4677
E-mail : ksbae@mail.kribb.re.kr

벌레목에서는 효모류, 노린재목에서는 방선균 등이 있지만 대부분의 경우 이들의 분류학적 위치는 분명치 않다.

본 연구에서는 최근 생물학적 방제의 매개체로서 각광을 받고 있는 거미중 대형의 곤충도 포식할 수 있어 비교적 소화관이 잘 발달했을 것으로 생각되는 갈거미과 무당갈거미속 중 유일하게 국내에 서식하는 한국산 무당거미(*Nephila clavata*)의 소화관내 미생물의 분포 양상과 단백질 및 지질 분해능을 조사하였고, 배양 가능한 장내 미생물을 분리하고 동정하였다.

재료 및 실험방법

실험곤충

실험곤충은 1997년 9월부터 10월까지와 1998년 8월부터 10월까지 대전 및 충청남도 일원의 야외에서 채집한 무당거미(*Nephila clavata*)를 한국생명공학연구원 곤충자원실의 곤충사육실(온도, $25 \pm 1^\circ\text{C}$; 상대습도, 60%; 광주기 16L:8D)에서 사육하면서 실험에 이용하였다.

소화관내 미생물 군집의 분포 측정

야외에서 채집하여 온 한국산 무당거미 자성 성체를 60일간 굶긴 후 70% 에탄올로 거미의 표면을 살균하여 사용하였다. 한국산 무당거미 10마리의 개체로부터 미리 살균하여 준비된 면도날과 핀셋으로 거미의 큐티클성 외피를 조심스럽게 벗긴 후 소화관(digestive tract, DT)을 분리하였다. 분리 추출된 소화관을 멸균된 생리식염수 $0.5 \sim 2 \text{ ml}$ 에 첨가하여 homogenization 후 연속 희석법으로 희석하여 plate count agar(PCA, Difco) 배지에 도말하고 30°C 에서 3일간 배양하면서 매일 관찰하여 균종별로 관찰하였다. 균종별 계수는 육안으로 서로 다르게 보이는 미생물 군집을 임의로 구분하여 수행하였으며 2차에 걸쳐 반복 실험하였다.

단백질 및 지질 분해능의 확인

한국산 무당거미 자성 성체로부터 소화관(중장, 가지창자, 후장)을 분리하고 homogenization하여 전체 군집을 계수하고 그 결과에 근거하여 한 plate당 30~300 CFU가 형성되도록 nutrient agar(NA, beef extract, 3 g; peptone, 5 g, Difco, USA) 배지에 도말하여 30°C 에서 3~4일 동안 계속적으로 colony 형성을 관찰하였다. 이렇게 형성된 colony 중 강한 단백질 분해능력을 보이는 균주를 선별하기 위하여 3% skim milk를 함유하는 brain heart infusion(BHI, calf brains, 200 g; beef heart, 250 g; proteose peptone, 10 g; dextrose, 2 g; NaCl, 5 g; Na_2PO_4 , 2.5 g/l, Difco, USA) 배지에 이들을 picking하고 30°C 에서 15~18시간 배양하여 단백질 분해 효소의 분비 능력을 확인하였다. 지질 분해능은 NA(Difco) 배지에 1% tributyrin 및 3~5% tween 80(v/v)을 함유하는 배지를 이용하여 확인하였다.

미생물의 형태 관찰

미생물을 순수 분리하기 위한 colony의 형태 관찰은 색깔, 크기, 모양, elevation과 margin 등을 구분하는 방법으로 수행하였

다(3,7,11). 광학현미경은 Nikon의 microphot-FXA 위상차 현미경을 사용하였다. 세균의 편모와 형태를 관찰하기 위하여, 1% PTA를 사용하여 세균을 음염색하고, Philips의 CM20 투과 전자현미경으로 관찰하였다. 주사 전자현미경으로 관찰하기 위하여 미생물을 2% glutaraldehyde(v/v)와 0.1 M sodium cacodylate pH 7.4 완충용액에서 2시간 동안 고정하였고, 에탄올의 농도를 증가시키면서 탈수시킨 후, 임계점 건조기를 이용하여 건조하고 금으로 증착하였다.

미생물의 생리·생화학적 특성의 조사

미생물의 모든 생리·생화학적 실험은 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 수행하였다. Oxidase 활성은 filter paper위에서 tetramethyl- ρ -phenylenediamine의 산화능력으로 조사하였다(11). Catalase 활성은 3% 과산화수소용액을 사용하여 기포 생성여부로 관찰하였다(11). Indole 생성은 1% trypton 용액을 사용하여 검사하였다(11). Citrate 이용 능력은 Simmon's citrate agar (MgSO_4 , 0.2 g; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1 g; K_2HPO_4 , 1 g; NaCl, 5 g; $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g; brom thymol blue, 0.08 g; Agar, 15 g/l, Difco) 배지를 사용하였고, urease는 Christensen urea agar (peptone, 1 g; glucose, 1 g; NaCl, 5 g; KH_2PO_4 , 2 g; phenol red, 0.012 g; Agar, 20 g/l) 배지를 사용하였으며, H_2S 생성은 kligler's iron agar 배지를 이용하여 검증하였다(3). Nitrate 환원과 탈질산화는 Durham's tube를 사용하여 질소 가스의 생성여부로 조사하였다(11). 아미노산(Sigma, St. Louis, Missouri USA)의 decarboxylation은 Moeller base를 사용하여 조사하였으며, 이에 사용된 모든 시험관에 멸균된 mineral oil을 떨어뜨렸다(3). 탄소원으로부터의 산생성은 Leifson의 방법에 의해 결정하였다(8). 추가적인 생화학 실험은 API 20E, API 20NE(BioMerieux St. Louis, Missouri USA), Biolog GN, 그리고 Biolog GP(BIOLOG, MicroLogTM System, Release 4.0)의 상용되는 kit를 이용하여 수행하였다.

미생물의 세포지방산 조사

세포지방산의 성분을 조사하기 위하여 분리된 미생물을 trypticase soy agar에서 28°C 로 24시간 동안 배양하였다. Fatty acid methyl esters는 Guckert 등(4)의 방법에 의해 준비하였고, 5% phenyl methyl silicone으로 채워진 silica capillary column (0.2 mm by 25 m; Hewlett-Packard)과 flame ionization detector가 갖춰진 Hewlett-Packard의 5890A gas chromatograph를 이용하여 분리하였다. Carrier gas는 고순도의 수소를 사용하였으며, 온도는 170°C 에서 270°C 로 분당 5°C 씩 상승하도록 프로그래밍하였다. Fatty acid methyl esters의 분석과 정량은 MIS library generation software (Microbial ID)를 사용하여 수행하였으며, 결과는 MIDI Aerobe Library (version 3.8)와 비교하였다.

결과 및 고찰

소화관내 미생물 군집의 분포

한국산 무당거미의 소화관내 미생물 군집의 분포는 호기적으로 배양된 미생물 군락을 색깔, 형태 등 육안으로 구분이 가능한

방법으로 우선적으로 구분하여 각각의 군종을 따로 계수하였다. 통합한 10개체의 소화관에서 계수된 총 개체 수는 $10^3 \sim 10^5$ CFUs/spider로 계수되었으며, 미생물 군종별로는 수십 CFU에서 10^4 CFU까지 다양하게 분포하였다(Table 1A).

개체별 소화관내 미생물 군집을 조사하기 위하여 임의로 선발된 한국산 무당거미 자성 성체로부터 개체별로 소화관을 적출하여 미생물 군집을 계수하였다. 호기적으로 배양된 미생물 군락을 육안으로 구분하여 계수한 결과 개체별로는 $10^3 \sim 10^6$ CFUs/spider로 10개체를 통합하여 처리하였을 때와 유사하였으나 미생물 군종은 개체별로 차이가 심하여 다양한 군종이 나타나는 개체와 일부 군종만이 나타나는 개체로 크게 구분되었다(Table 1B).

소화관내 미생물의 효소 활성 조사

한국산 무당거미 총 10 개체의 소화관에서 계수된 미생물 군집 중 일부를 선택하여 단백질 또는 지질 분해능을 확인하였다. 선택된 미생물 colony 40개 중에서 38(95%)개가 단백질 분해능을 나타내었고, 37(92.5%)개가 지질 분해능을 나타내었다. 그리고 개체별 미생물 군집 조사에서 나타난 수종의 미생물 군락을 색깔, 형태 등 육안으로 구분이 가능한 방법으로 구분하고, 군종별로 1 균주씩 순수 분리하여 단백질 및 지질 분해능력을 조사

하였다. 그 결과 순수 분리된 미생물 30균주 중 단백질 또는 지질 분해능을 갖는 균주가 각각 19균주(63.3%)로 나타났다. 그리고 분리된 30균주 중 15균주(50%)는 단백질과 지질 분해능을 동시에 함유하는 것으로 나타났다.

Table 1. Population of microorganisms from *Nephila clavata*

A. Colony-forming units and total microbial population obtained from digestive tracts of 10 spiders

(unit: CFU ^b)							
	A	B	C	D	E	F	Total
DT ^a	1.5×10^3	2.5×10^3	2.0×10^4	1.3×10^2	-	-	2.4×10^4

B. Data obtained from digestive tracts of individual spiders

(unit: CFU)							
	A	B	C	D	E	Total	
DT	1	4.5×10^3	8.0×10^3	1.2×10^5	1.4×10^3	1.0×10^4	1.4×10^5
	2	5.5×10^2	1.1×10^4	1.1×10^6	-	1.5×10^2	1.1×10^6
	3	-	1.0×10^2	1.1×10^3	1.0×10^2	-	1.1×10^3

^aDigestive tract.

^bColony forming unit.

A~F : different colonies from digestive tract of spider.

1~3 : digestive tracts of individual spider.

Table 2. Characteristics of isolated Gram-negative bacteria

The isolates	S1	S2	S3	S4	B11	B12	B21	C18	C21	T11	T23
Colony color	cream to pale yellow	pale yellow	yellowish	fluorescent	pale yellow	yellowish	pale yellow	cream	cream	pale yellow	cream
Colony shape	convex	flat	flat smooth	flat, slimy	flat	smooth	flat	convex	convex	mucoid	convex
Cell shape	straight rod	straight rod	rod	rod	short rod	coccobacilli	rod	rod	rod	coccobacilli	rod
Motility	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Oxidase	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
β -galactosidase	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
β -glucosidase	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Lysine decarboxylase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ornithine decarboxylase	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Tryptophane desaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Casein hydrolysis	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Tween80 hydrolysis	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Citrate utilization	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Acetoin production (VP)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Nitrate reduction	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+

Table 3. Carbon utilization of isolated Gram-negative bacteria

The isolates	S1	S2	S3	S4	B11	B12	B21	C18	C21	T11	T23
Utilization of :											
Glucose	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Sucrose	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
Melibiose	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Arabinose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Mannose	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
Maltose	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
Lactose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Trehalose	+	-	+	-	-	-	-	+	+		+
Cellobiose	-	-	+	-	-	-	-	+	+		+
Mannitol	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Sorbitol	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Glycerol	+	-	-	+	-	-	+	-	-		+
Acetate	+	+	+				-	-	-		+
Gluconate	+	-	-	+	-	-					
Caprate			-	+	+	+					
Adipate			-	-	-	-					
Malate			+	+	+	+				-	
Phenyl acetate			-	-	+	+				+	
N-acetyl glucosamine	+	+	+	+	-	-					
Salicin	+	-					-	+	+		+

Table 4. The cellular fatty acid composition of isolated Gram-negative bacteria

The isolates	S1	S2	S3	S4	B11	B12	B21	C18	C21	T11	T23
12 : 0					7.6	5.3					
12 : 0 2OH				6.4						5.6	
12 : 0 3OH				5.3	6.2	6.9				9.6	
14 : 0	5.2	5.8					11.1	5.1	4.9		8.0
15 : 0 iso		34.4	31.0								
15 : 0 anteiso		15.3	14.2								
14 : 0 3OH/ 16 : 1 iso I	6.2						11.4	10.4	8.0		8.1
16 : 1 ω 7c/ 15 : 0 iso 2OH	15.9	11.9	11.8	26.8	19.6	15.5	27.9	24.6	15.5	20.2	14.2
16 : 0	31.6	5.0	7.3	29.0	16.9	20.0	31.2	29.4	30.7	19.7	25.7
17 : 0 cyclo	17.5			11.4					11.1		8.2
18 : 1 ω 7c											
18 : 1 ω 9c					41.8	38.7					
18 : 1 ω 7c/ ω 9t/ ω 12t	12.4			14.5			12.7	16.5	18.1	31.0	24.1
Identification*	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Suttonella indologenes</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Cedecea davisae</i>	<i>Cedecea neteri</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Table 5. Characteristics of isolated Gram-positive bacteria

	S4-10	S5-5	B2-3	C1-7	S5-4	B2-4	T2-4	S6-5	C1-5	C1-4	S4-9
Colony color	cream (pink tint)	wax-color	cream	cream (yel.tint)	cream	white	pale yellow	grey-white	white	lemon yellow	yellow
Colony shape	dull, undulate margin	circular glossy	dull	small flat	smooth, entire	smooth	irregular	glistening, circular	dull, umbonate	edge fimbriate	smooth, convex
Cell shape	rod	straight rod	rod $\geq 1 \mu m$ width	slender rod	ovoid		whip handle rod+ filament	spherical $\geq 5 \mu m$	spherical, in tetrads	irregular rod	spherical, in tetrad cube
Endospores	+(E,N,C,PC)	+(R,S,T)	+(E,N,C,PC)	+(E,N,ST,T)	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Catalase	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Oxidase	-				+	+		+	-	-	+
Anaerobic growth	+	+	+	+	+	+		+(w)	-		-
Arginine dihydrolase	-	-	-		+	+		-	-		-
Ornithine decarboxylase								-	-		
β -glucosidase	+		+	-	+	+	+	+	-	+	-
β -galactosidase	-		-	+	-	?		-	-		-
Urease	-	+	+(w)	-			-	-	+	-	-
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-					
Indole production	-	-	-	-							
Acetoin production (VP)	+	-	-	+				-	-		-
Nitrate reduction	+	+	+	-			+	+	+	+	-
Hydrolysis of :											
Gelatin	+	+	+	-			-			+	+
Casein	+	+	+	+	+		+		+	-	+
Tween80	-	-	-	-							-
Hippurate					+	+	+				
Starch	+	-	+	+			-			+	-
Growth at pH 5.4	+	-	+	+	+						
Growth on 6.5% NaCl	+	+	+	-	+	+		+	+		+
Citrate utilization	+	-	+	-							-

E: ellipsoidal, R:round or spherical, N: sporangium not swollen, S:sporangium swollen, C:central, PC:paracentral, ST:subterminal, T:terminal, W:weak

소화관내 미생물의 동정

미생물 군집의 조사에서 계수된 군종별로 3~5 균락을 임의로 선택하여 단일 균락으로 순수 분리하였다. 순수 분리된 총 60여 균주의 미생물을 배지 상에서의 균락의 형태와 광학 현미경 관찰 및 그람 염색으로 그람음성균과 그람양성균으로 구분하였다. 일차 구분된 미생물을 세포 지방산 분석으로 분류하여 동일 종

을 제외하고 총 22종의 미생물을 선택하였다. 이들은 11종의 그람음성균과 11종의 그람양성균으로 구분되었으며 동정을 위하여 생리·생화학적 특성 조사 및 세포지방산을 분석하였다.

11종의 그람음성균은 생리·생화학적 특성조사(Table 2, 3)와 지방산 구성 분석(Table 4), 그리고 전자 현미경의 관찰을 통하여 분류 실험을 수행한 결과, *Acinetobacter calcoaceticus*, A.

Table 6. Acid production of the Gram-positive bacteria isolated

The isolates	S4-10	S5-5	B2-3	C1-7	S5-4	B2-4	T2-4	S6-5	C1-5	C1-4	S4-9
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Maltose	+	-	+	+	+		+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Fructose	-	-	+		+		+	+	+		
Raffinose	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
Trehalose	-	-	-		+	+	-	+	-	+	
Ribose	+	-	+		+	+		+	-	+	
Melibiose	-	-	+		-	-		-			
Sucrose	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
Lactose	-	-	-	-	+	+	-	+(w)	-	-	-
Cellobiose	-	-	+		+			+	-	+	-
Mannitol	-	-	-	-	+	-		+	-		-
Glycerol					+	-					-
Salicin	+	-	-	+	+		+	+	-		
	(dextrin)	(pyruvate)			+	-					
	(glycogen)				(sorbitol)	(sorbitol)					

Table 7. The cellular fatty acid composition of isolated Gram-positive bacteria

The isolates	S4-10	S5-5	B2-3	C1-7	S5-4	B2-4	T2-4	S6-5	C1-5	C1-4	S4-9
13:0 iso	11.2	11.2	10.9								
14:0 iso		6.0	5.2								7.0
14:0					6.6	6.1	7.4				
15:0 iso	33.3	31.0	32.3	14.5				45.0	6.1	10.2	7.6
15:0 anteiso		5.0	5.0	42.8				28.2	36.8	46.7	73.2
16:0 iso	6.1		5.9							18.7	5.0
15:0 iso 2OH/16: ω 7c	9.4	11.1	9.9		14.7	13.3	17.9				
16:0	5.0			6.4	22.2	24.7	21.1				
iso 17: ω 5c	6.2	6.1	5.5								
17:0 iso	12.7	6.2	9.5					7.2			
17:0 anteiso				35.7					11.5	13.4	
18:1 ω 7c/ ω 9t/ ω 12t					35.7	42.7	39.2				
18:0									9.3		
19:0 iso									5.0		
19:0 anteiso									6.0		
19:0 cyclo ω 8c					18.6	10.5	10.6				
20:0									15.3		
Identification*	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus pasteurii</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Cellulomonas flavigena</i>	<i>Micrococcus luteus</i>

*The identification results are from table 5, 6, 7.

haemolyticus, *Alcaligenes faecalis*, *Cedecea davisae*, *C. neteri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Suttonella*

indologenes 등으로 동정되었다(Table 4). 그리고 11종의 그람양성균 역시 생리생화학적 특성조사(Table 5, 6)와 지방산 구성 분석(Table 7) 그리고 전자 현미경 관찰을 통한 실험 결과,

Bacillus cereus, *B. coagulans*, *B. pasteurii*, *B. thuringiensis*, *Cellulomonas flavigena*, *Corynebacterium martruchotii*, *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus hominis*, *S. sciuri*로 동정되었다(Table 7).

이들 중 곤충 혹은 절지동물과 연관되었음이 보고된 세균은 그람음성균이 11종 중 6종, 그람양성균이 11종 중 6종이었다. 분리된 미생물 중에서 *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *P. vulgaris*, *S. marcescens* 등 6종의 세균은 곤충의 gut microflora에서 존재한다고 보고되었으며(10), *K. pneumoniae*와 *P. fluorescens*의 경우를 제외하고는 body surfaces로부터 분리되었거나(*Staphylococcus species*), 혹은 entomopathogen(*B. cereus*, *B. thuringiensis*)으로 보고되었다(5,9). 한국산 무당거미의 소화관에서 발견되는 4종의 *Bacillus species* 중 *B. coagulans*와 *B. pasteurii*는 아직 곤충과의 연관성이 알려지지 않았다. 한국산 무당거미의 소화관으로부터 분리된 세균 중, 곤충이나 절지동물과 연관되었음이 알려져 있지 않은 10종의 세균 중 4종이 *Enterobacteriaceae*에 해당하였으며 나머지 6종 중 4종은 일반적인 자연환경에서 쉽게 관찰되는 종류에 해당하였다.

한국산 무당거미의 소화기관에서 발견되는 미생물들이 무당거미의 소화와 관련되는 microflora를 형성하는지 혹은 기회주의적 감염에 의한 결과인지 여부는 명확하지 않다. 하지만 총 22종 중 16종의 미생물들이 곤충에 존재함이 보고되었거나 장내 미생물에 속하는 것으로 나타나는 점을 고려할 때 본 연구 결과가 유의성이 있다고 사료된다.

참고문헌

- 오태평. 1998. 미생물 효소의 개발. p117-133. 민태익. 산업과 미생물. 한림원
- Baumann, P., L. Baumann, C.Y. Lai and D. Rouhbakhsh. 1995. Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: Intracellular symbionts of aphids. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 55-94.
- Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. p47-72. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
- Guckert, J.B., D.B. Ringelberg, D.C. White, R.S. Hanson and B.J. Bratina. 1991. Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of ethylotrophs within the proteobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2631-2641.
- Khyami-Horani H., A. Katbeh-Bader and Z.H. Mohsen. 1999. Isolation of endospore-forming bacilli toxic to *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae) in Jordan. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 57-60.
- Kim, S.T. 1998. Studies on the ecological characteristics of the spider community at paddy field and utilization of the *Pirata subpiaticus* (Araneae: Lycosidae) for control of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). Ph.D. thesis. p90. Kon-kuk University.
- Krieg, N.R. 1984. Identification of Bacteria. p24-26. In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), Manual of systematic bacteriology, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A.
- Leifson, E. 1963. Determination of carbohydrate metabolism of marine bacteria. *J. Bacteriol.* 85, 1183-1184.
- Peyronnet O., V. Vachon, R. Brousseau, D. Baines, J.L. Schwartz and R. Laprade. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1679-1684.
- Schafer A., R. Konrad, T. Kuhnigk, P. Kampfer, H. Hertel, and H. Konig. 1996. Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 471-478.
- Smibert, R.M. and N.R. Krieg. 1994. Phenotypic characterization. p. 607-654. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood and N.R. Krieg (ed.), Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Tanada, Y. and H. K. Kaya. 1993. Insect pathology. p12-51. Academic press, Inc., San Diego, California.
- Ward, O.P. 1985. Proteolytic Enzymes. pp789-818. In M. Y. Murray(ed), Comprehensive Biotechnology: The principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. vol.3. Pergamon press Inc., Maxwell House, Fairview Park, Elmsford, New York, U.S.A.

(Received August 30, 2000/Accepted March 12, 2001)

ABSTRACT: Identification of Enteric Bacteria from *Nephila clavata*

Eun Young Moon¹, Hyun Woo Oh¹, Pil Jae Maeng², and Kyung Sook Bae^{1*}(¹KCTC, GRC, KRIBB, #52 Oun-dong, Yusong-ku, Taejon 305-333, ²Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea)

Spiders are carnivores that prey upon insects and other small arthropods through digestion of food outside the body. Although spider poison may contain proteolytic enzymes, these are thought to play an insignificant role in actual digestion. The source of active proteolytic enzymes can be either the digestive tract cells of spider, or natural microbial flora in the digestive tract of spider. In this study, digestive tracts from the spider, *Nephila clavata*, were screened for bacteria that have protease or lipase activity. A total of 10³–10⁵ CFU was recovered from a spider and more than 90% of them showed protease and lipase activity respectively. Of the microbial isolates, 63.3% showed protease or lipase activity, and 50% of these showed both protease and lipase activity. Some of the isolates were characterized using a battery of chemical, phenotypic and genotypic methods. Eleven Gram negative bacteria (*Acinetobacter calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *Alcaligenes faecalis*, *Cedecea davisae*, *C. neteri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Suttonella indologenes*) and 11 Gram positive bacteria (*Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. pasteurii*, *B. thuringiensis*, *Cellulomonas flavigena*, *Corynebacterium martruchotii*, *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus hominis*, *S. sciuri*) were identified.