

DMSO와 Glycerol 처리에 따른 점액세균의 글리세롤포자 형성능 조사

장은혜 · 김도희 · 김진우 · 조경연*

호서대학교 생명공학과

Glycerol-Spore Formation of Myxobacteria in the Presence of DMSO and Glycerol. Jang, Eunhae, Dohee Kim, Jinwoo Kim, and Kyungyun Cho*. Department of Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea - Glycerol-spore formation of wild myxobacteria isolated in Korea has been tested. One third of the wild myxobacterial isolates belonged to the genus *Myxococcus* and *Coralloccoccus* produced a large number of glycerol-spores in the presence of glycerol or dimethyl sulfoxide. However, two third of the other wild myxobacterial isolates belonged to the genus *Myxococcus* and *Coralloccoccus* produced a negligible number of spores under the same condition. In addition, the myxobacterial isolates belonged to the other genus, such as *Stigmatella*, *Archangium*, and *Cystobacter*, failed to produce a noticeable number of glycerol-spores.

Key words: Myxobacteria, glycerol-spore

점액세균(myxobacteria)은 δ -proteobacteria에 속하는 토양 미생물로 항생물질을 포함한 다양한 활성의 생리활성물질을 생산 분비하며, 영양분이 부족한 환경에서는 수십만 마리의 세포들이 모여 다세포 자실체를 형성하는 것으로 잘 알려져 있다[3, 10, 11]. 점액세균의 대표적 모델 종인 *Myxococcus xanthus*는 두 가지 방식에 의해 포자를 생성할 수 있는 것으로 알려져 있는데, 첫 번째 방식은 영양분이 부족한 상황에서 자실체를 형성한 후 자실체 안에 포자를 형성하는 방식으로 기아유발 포자형성(starvation-induced sporulation)이라 불린다[15, 17]. 다른 방식은 glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, β -lactam계 항생제와 같은 물질이 존재하는 경우 자실체 형성이 없어도 개별 세포들이 단시간 안에 포자를 형성하는 방식으로 글리세롤유도 포자형성(glycerol-induced sporulation)이라 불리며 생성된 포자를 글리세롤포자(glycerol-spore)라 부른다[1, 2, 4, 6].

미생물을 취급함에 있어서 균주의 보관은 매우 중요한데, 점액세균의 경우에는 glycerol 용액에 넣어 -80°C 에 보관하는 경우 대부분 사멸하며, 냉동건조를 하는 경우에서도 다른 미생물들과 달리 생존율이 그다지 높지 않다[12]. 따라서 점액세균의 장기보존은 영양분이 부족한 배지에서 자실체 형성을 유도한 후 자실체 내에서 생성된 포자를 건조 보관하는 방법을 사용한다. 하지만 자실체 유도는 10일 이상의 오랜 기간이 소요되며, 보존되는 포자들도 덩어리 상태로 딱딱하게 굳어있어 접종을 위해 빈번히 사용되는 균주의 보존 방법으로는 적합지 않은 방법이다.

한편, 글리세롤 유도에 의한 포자형성은 자실체 내 포자

형성과 비교해서 훨씬 짧은 시간인 3~4시간 안에 포자형성이 이루어지며, 생성되는 포자들도 액상에서 분산되어 존재한다[1, 13]. 또, 이렇게 형성된 포자는 -80°C 에 보관하는 경우 수년 동안 생존하며, 냉동과 해동이 반복되는 경우에도 생존율이 크게 변하지 않는다. 따라서 글리세롤 유도에 의한 포자형성은 빈번히 접종에 사용되는 균주의 보존에 매우 간편하며 효율적인 방법이 될 수 있다. 하지만 다른 글리세롤 유도 포자형성에 대한 대부분의 연구는 자실체 연구의 모델균주로 사용되는 극소수의 *M. xanthus* 균주를 대상으로 이루어져 온 까닭에 다른 점액세균들도 *M. xanthus*와 마찬가지로 글리세롤포자를 형성하는 것으로 알려져 있기는 하지만 *M. xanthus*와 *Stigmatella aurantiaca* 이외에는 특정 점액세균 종류가 글리세롤포자를 형성했다는 직접적인 실험 결과가 실린 보고를 찾아볼 수 없다[1, 8, 9]. 따라서 본 연구에서는 *M. xanthus* 이외의 야생 점액세균들을 대상으로 글리세롤포자 형성 여부를 조사하여 봄으로써 글리세롤 유도 포자형성에 의한 야생 점액세균 보관 가능성을 탐색해 보았다.

대부분의 야생점액세균들은 액체배지 내에서 세포의 집단으로 존재하기 때문에 배양액의 탁도 측정에 의해 성장단계를 측정하기 어렵다. 따라서 본 연구에서는 우선 분산해서 자라는 균주인 *M. xanthus* DZF1[5]을 사용하여 글리세롤 유도 포자형성의 최적조건을 조사하였다. 이를 위해 *M. xanthus* DZF1을 1% casitone, 0.5% yeast extract, 10 mM morpholinepropanesulphonic acid (MOPS, pH 7.6), 8 mM MgSO_4 를 함유하고 있는 CYE 배지[14]에서 배양하였으며, 배양액의 탁도(OD_{600})가 1이 되었을 때 각각의 배양플라스크에 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 M의 glycerol 또는 DMSO를 첨가하였다. 그리고 18시간 더 배양한 후, 배양액 1 ml을 취하여 50°C 에서 30분간 열처리하고, sonication함으로써 영양

*Corresponding author

Tel: 82-41-540-5627, Fax 82-41-548-6231

E-mail: kycho@hoseo.ac.kr

세포를 사멸시켰다. 글리세롤포자는 이러한 조건에서 열과 sonication에 의해 사멸하지 않는다[16]. 이렇게 하여 얻어진 포자액을 희석하여 CYE 평판배지에 도말하고, 32°C에서 6일간 배양한 후 생겨난 집락의 수를 측정함으로써 각각의 glycerol과 DMSO 농도에서 유도 생성된 포자수를 측정하였다. 그 결과, Fig. 1에서 보였듯이 glycerol과 DMSO 모두 0.5 M에서 포자 유도가 가장 높은 것으로 나타났으며, 이 때 생성된 포자들의 형태는 Fig. 2에 보인 바와 같았다. 그리고 ethylene glycol을 첨가한 경우에도 포자형성이 유도되었으나 glycerol과 DMSO에 비해서는 훨씬 낮은 수의 포자가 생성되어 일반적으로 알려진 결과[1, 4]와 유사하였다.

야생 점액세균의 글리세롤유도 포자형성을 확인하기 위해서는 먼저 본 연구실이 국내 토양으로부터 순수 분리하여 보고한 4개의 서로 다른 균주[7], *Corallocooccus* sp. KYC1009, *Stigmatella* sp. KYC1032, *Archangium* sp. KYC1050, *Myxococcus* sp. KYC1051을 사용하여 이들이 글리세롤포자를 형성하는지 조사해 보았다. 우선, 각각의 균주를 0.5% casitone, 0.1% yeast extract, 0.1% CaCl₂·2H₂O로 구성된

CYC 배지에서 배양한 후, 0.5 M glycerol 또는 DMSO를 넣어주고 18시간을 더 배양하였으며, 배양액 1 ml을 취하여 위에서와 마찬가지로 50°C에서 30분간 열처리하고, sonication함으로써 영양세포를 사멸시켰다. 그리고 이렇게 하여 얻어진 포자액을 희석하여 CYC 평판배지에 도말하고, 32°C에서 6일간 배양한 후 생겨난 집락의 수를 측정함으로써 glycerol과 DMSO에 의해 유도 생성된 포자의 수를 측정하였다. 그 결과, *Corallocooccus* sp. KYC1009와 *Myxococcus* sp. KYC1051은 1 ml 당 1.0×10⁶개 이상의 포자를 형성한 것으로 나타났으나, *Stigmatella* sp. KYC1032와 *Archangium* sp. KYC1050은 포자를 전혀 생성하지 않거나 생성해도 50개 미만의 포자를 생성하는 것으로 나타났다. 위 상차현미경을 사용하여 포자를 관찰하였을 때도 KYC1009와 KYC1051의 배양액에서는 구형 또는 타원형으로 높은 굴절률을 보이는 많은 포자들이 관찰되었으나 KYC1032와 KYC1050의 배양액에서는 이러한 포자들이 관찰되지 않았다.

이러한 결과들은 *Corallocooccus*와 *Myxococcus*에 속하는 균주들은 주어진 조건에서 글리세롤포자를 효율적으로 형성하지만 *Stigmatella*와 *Archangium*에 속하는 균주들은 글리세롤포자를 잘 형성하지 못할 가능성을 보여주는 것으로, 본 연구에서는 이를 좀 더 확인하기 위하여 *Corallocooccus*에 속하는 3균주, *Myxococcus*에 속하는 15균주, *Stigmatella*로 추정되는 8균주, 그리고 *Cystobacter*로 추정되는 4균주, *Archangium*으로 추정되는 3균주, 그리고 *Melittangium*에 속

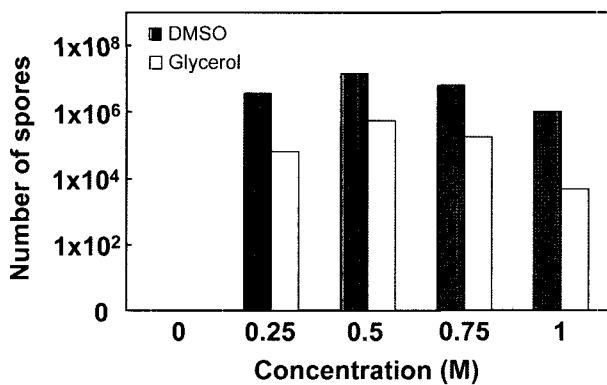


Fig. 1. Induction of glycerol-spore formation by glycerol and dimethyl sulfoxide. 0, 0.25, 0.5, 0.75, and 1 M of glycerol or dimethyl sulfoxide were added to culture broth of *M. xanthus* DZF1 and incubated at 32°C for 18 hrs. Number of spores indicates the number of heat and sonication resistant viable spores in 1 ml of culture broth.

Table 1. Formation of glycerol-spores by wild myxobacterial isolates.

Genus	Number of strains	Glycerol-spore formation	
		+	-
<i>Myxococcus</i>	15	5	10
<i>Corallocooccus</i>	3	1	2
<i>Archangium</i>	3	0	3
<i>Cystobacter</i>	4	0	4
<i>Melittangium</i>	1	0	1
<i>Stigmatella</i>	8	0	8

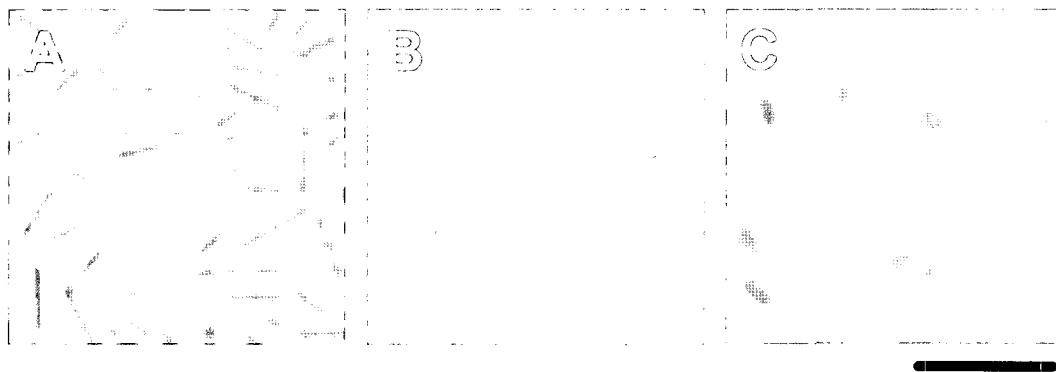


Fig. 2. Morphology of vegetative cells and spores of *M. xanthus* DZF1. (A) Vegetative cells, (B) Fruiting body spores, and (C) Glycerol-spores of *M. xanthus* DZF1. Bar, 10 μm.

하는 한 균주에 대해 0.5 M DMSO가 존재하는 배지에서의 포자형성을 추가적으로 조사하여 보았다. 먼저, 각각의 균주를 CYC 배지에서 배양한 후, 0.5 M DMSO를 넣어주고 18 시간을 더 배양하였으며, 배양액을 위상차현미경으로 관찰함으로써 글리세롤포자의 형성 여부를 판단하였다. 그 결과, Table 1에서 보였듯이, *Corallococcus*의 경우에는 3균주 중 한 균주만 글리세롤포자를 형성하였으며, *Myxococcus*에 속하는 균주들의 경우에는 15균주 중 5균주만 글리세롤포자를 형성하여 전체적으로 1/3에 해당하는 균주들만 글리세롤포자를 잘 형성한 반면, 나머지 2/3의 균주들은 글리세롤포자를 거의 형성하지 않는 것으로 나타났다. 그리고 *Stigmatella*, *Cystobacter*, *Archangium*, *Melittangium*으로 추정되는 균주들은 모두 글리세롤포자를 형성하지 못했다. 이에 더해, 0.5 M DMSO 존재 하에서 글리세롤포자를 전혀 생성하지 못하는 *Stigmatella* 속 균주에 대해 0.25, 0.75, 1 M DMSO가 존재하는 배지에서 글리세롤포자 형성을 조사하여 보았으나 어떤 농도에서도 글리세롤포자는 생성되지 않았다. 그러므로 야생균주들이 글리세롤 포자를 형성하지 못하는 이유가 유도체질의 다른 농도를 요구하기 때문은 아닌 것으로 보여진다.

본 연구에서는 여러 야생 점액세균들을 대상으로 glycerol과 DMSO에 의한 글리세롤포자 형성을 조사해보았는데, 대부분의 점액세균들이 글리세롤포자를 형성할 것이라고 알려진[8] 것과는 달리 대부분의 야생 점액세균들은 글리세롤포자를 잘 형성하지 못하였으며, *Corallococcus*와 *Myxococcus* 속에 속하는 균주들 중 일부만이 효율적으로 글리세롤포자를 생성하는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과는 글리세롤포자형성 방법이 모든 야생점액세균의 일반적인 보관 방법으로는 적당치 않음을 보여준다. 하지만 *Corallococcus*와 *Myxococcus* 속에 속하는 일부 균주들과 같이 특정 점액세균 균주가 효율적으로 글리세롤포자를 형성하는 것으로 확인된다면 글리세롤포자 상태로의 보관은 균주보존방법으로 여전히 매우 간편한 방법이 될 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 호서대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Dworkin, M. and W. Sadler. 1966. Induction of cellular morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. I. General description. *J. Bacteriol.* **91**: 1516-1519.
2. Dworkin, M. and S. M. Gibson. 1964. A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of microcysts in

- Myxococcus xanthus*. *Science* **146**: 243-244.
3. Kim, Y., W. Bae, and S. Baek. 2003. Bioactive substances from myxobacteria. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 1-12.
4. Komano, T., S. Inouye, and M. Inouye. 1980. Patterns of protein production in *Myxococcus xanthus* during spore formation induced by glycerol, dimethyl sulfoxide, and phenethyl alcohol. *J. Bacteriol.* **144**: 1076-1082.
5. Morrison, C. E. and D. R. Zusman. 1979. *Myxococcus xanthus* mutants with temperature-sensitive, stage-specific defects: evidence for independent pathways in development. *J. Bacteriol.* **140**: 1036-1042.
6. O'Connor, K. A. and D. R. Zusman. 1997. Starvation-independent sporulation in *Myxococcus xanthus* involves the pathway for β -lactamase induction and provides a mechanism for competitive cell survival. *Mol. Microbiol.* **24**: 839-850.
7. Park, S., B. Lee, J. Kim, C. Lee, E. Chang, and K. Cho. 2004. Isolation and characterization of bacteriolytic wild myxobacteria. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 218-223.
8. Reichenbach, H. and M. Dworkin. 1970. Induction of myxospore formation in *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacteriales) by monovalent cations. *J. Bacteriol.* **101**: 325-326.
9. Reichenbach, H., H. Voelz, and M. Dworkin. 1969. Structural changes in *Stigmatella aurantiaca* during myxospore induction. *J. Bacteriol.* **97**: 905-911.
10. Reichenbach, H. 1999. The ecology of the myxobacteria. *Environ. Microbiol.* **1**: 15-21.
11. Reichenbach, H. 2001. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 149-156.
12. Reichenbach, H. and M. Dworkin. 1992. The myxobacteria. pp. 3416-3487. In Balows, A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*, 2nd ed., vol. IV, Springer Verlag, New York.
13. Sadler, W. and M. Dworkin. 1966. Induction of cellular morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. II. Macromolecular synthesis and mechanism of inducer action. *J. Bacteriol.* **91**: 1520-1525.
14. Shi, W., T. Kohler, and D. R. Zusman. 1994. Motility and chemotaxis in *Myxococcus xanthus*. *Methods Mol. Gen.* **3**: 258-269.
15. Shimkets, L. J. 1990. Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev.* **54**: 473-501.
16. Sudo, S. Z. and M. Dworkin. 1969. Resistance of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **98**: 883-887.
17. White, D. 1993. Myxospore and fruiting body morphogenesis. pp. 307-332. In Dworkin, M. and D. Kaiser (eds.), *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington, D.C.

(Received Nov. 15, 2006/Accepted Dec. 5, 2006)