

스트레스 하의 자연세균의 활성 및 생존의 발광표현형을 이용한 탐지

박경제¹ · 윤혜영¹ · 천세진¹ · 이호자² · 이동훈³ · 장덕진⁴ · 이규호^{1*}

¹한국외국어대학교 환경학과 및 환경과학연구소, ²경희대학교 미생물학과

³충북대학교 생명과학부, ⁴명지대학교 화학공학과

자연미생물, KP964에 *luxAB* 유전자를 주입하여 발광기능을 부여함으로써 그들의 발광정도가 스트레스에 대한 적응, 생존 및 활성도를 나타내는 색인이 될 수 있는가, 그리고 특히 non-culturable but viable(NCBV) 상태로 존재하는 미생물의 활성에 대한 정보를 제공할 수 있는가를 알아보았다. 영양결핍조건 하에서 그들의 총 세균수, 배양가능세균(colony-forming-unit; CFU) 수, viable cell 수, 그리고 발광정도(relative light unit; RLU)의 변화를 조사하였다. 형광현미경으로 확인된 총 수는 변화가 없었으며, 첨가된 yeast-extract에 의해 성장하는 viable cell 수는 완만하게 감소하였으나 CFU 수는 급격히 줄어들어 37일째 이후에는 탐지한계 이하로 감소하였다. RLU의 경우, 처음 7일의 영양결핍동안 0.016%까지 감소하였으며, 그 이후에는 탐지한계수준 이하로 검출되었다. 아울러 스트레스를 받는 4시간 동안 CFU수와 RLU의 관계를 알아보기 위하여 발광 KP964 균주에게 독성유해물질, acid shock, osmotic shocks를 접촉시킨 후 시간별로 CFU와 RLU를 측정한 결과, KP964 CFU 당 RLU는 9.1-26%까지 감소하였다. 이는 스트레스의 종류에 따라 접촉시간이 길수록 CFU 당 나오는 빛의 양이 줄어들음을 보인 것이다. 이러한 결과는 영양결핍조건 시 RLU의 감소율이 CFU의 감소율보다 더 크며 영양결핍 이외의 다른 스트레스 조건 하에서도 RLU의 감소율과 CFU의 감소율의 연관성을 찾을 수 없음을 보이므로, 발하는 빛의 정량만으로는 NCBV 상태는 물론 배양가능한 세균의 양이나 활성을 나타내지 못하는 듯 하였다. 그러나 스트레스를 받은 KP964의 활성 정도와 잠재발광능력의 관계는 좋은 연관성을 보여주었다. 즉, *p*-xylene, hypo-osmotic stress, 또는 영양결핍에 노출된 세균으로부터 각 스트레스를 제거하였을 시 나타나는 발광증가 유형을 조사하였는데, 증가가 시작하기까지의 lag period는 각각 32, 26, 22분으로 나타났다. 즉 미생물에 강력한 스트레스로 작용한 경우일수록 lag time이 길고, 또한 발광의 증가율이 느리며 도달하는 최대 RLU값도 낮음이 관찰되었다. 따라서 스트레스 하의 세균으로부터 직접적인 RLU의 측정보다는 이들이 스트레스 조건으로부터 재성장 또는 소생되는 과정에서의 잠재발광능력의 분석이 자연세균의 적응, 활성 및 생존의 정도를 나타내주었다.

KEY WORDS □ starvation, stresses, survival, potential bioluminescence

자연계의 미생물들은 각 niche 내에서 주위 환경과의 관계 하에서 살아가면서 그들의 생태계를 유지, 진화하고 있다. 따라서 자연계의 미생물은 좋은 환경 하에서의 빠른 성장기간과 불리한 환경에 노출되었을 시의 비성장기간이 주기적으로 산재하게되는 전형적인 생활사(life cycle)를 갖는다. 즉, 자연환경 내의 이러한 세균들은 적당한 환경조건을 발견하여 재성장하고 번식할 수 있을 때까지 생명력(viability)을 유지하여야 그들의 생태적 고리(ecological cycle)를 유지할 수 있는 것이다. 자연환경에서 종종 보여지는 스트레스로 인해 빠른 성장 또는 생존이 불가능한 이유는 여러 환경요인의 변화때문이라 여겨지는데, 그 중에서 영양분의 농도, 온도, 염분도, 삼투압, 산성도 등의 변화가 주된 요인이라 보고되어있다(5, 30). 생태계에 존재하는 자연적 환경적 제조건 외에도, 현대 산업사회의 인위적인 부산물 중 특히 자연계로 배출된 유해물질 또한 미생물에 대한 스트레스의 종류로서 이해되고 있다.

변화된 환경조건에 대한 세균의 적응능력은 여러가지 유전형과 표현형의 발현 및 억제에 의해 나타날 수 있다. 예를 들면, 항속적 또는 유도된 효소의 합성에 의해서, 성장을

제한하는 조건에의 적응 또는 다른 대사과정으로의 전환으로 생명유지가 가능하다. 더욱이 세포의 구조와 기능을 유지하기 위해서 효소나 세포내 구조물의 합성율을 조정할 수 있는 능력도 존재한다. 가장 극적인 적응을 보여주는 미생물로는 *Bacillus*, *Streptomyces*, *Myxobacteria* 등이 있는데 이들은 불리한 환경 하에서 복잡한 발달과정을 거쳐 형태적인 변화를 수반한다(13). 그러나 대부분의 미생물은 이러한 형태적인 변화가 없는 비분화성 적응과정(non-differentiating adaptation)을 보인다. 대장균(*Escherichia coli*)의 경우, 영양결핍이나 열 충격이라는 억제조건 하에서 특이한 sigma factor에 의해 필요한 또는 새로운 단백질군들이 즉시 합성되어 그들의 내성을 증진시켜 생존을 돕는다고 알려져 있다(21).

최근 이들 세균에 대한 생리연구로부터 자연계에 존재하는 균은, 스트레스 하에서 생존하기 위한 전략의 일환으로, 기존의 미생물 배양법으로는 탐지할 수 없는 nonculturable한 상태로의 전이가 일어난다고 보고되어 있다(30). 그러나 이러한 생리적인 변화에도 불구하고, nonculturable한 세균은 생명력을 유지하여 그 고유의 활동성(예를 들면, 병원성 세균인 경우 잠재적인 감염성)을 유지할 수 있다(2, 24). 이러한 경우를 일컬어 non-culturable but viable(NCBV)한 상태의 세균이라 하며, 해양 및 육지생태계에서 많이 발견되

*To whom correspondence should be addressed

있으며 특히 최근에는 임상 실험실에서도 종종 보여져왔다. 예를들면, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* 등의 많은 세균이 NCBV로 존재할 수 있음이 연구되었다. 해양 생태계에는 장소와 세균종에 따라서 한가지 종의 세균이 99% 이상 NCBV 상태로 존재하는 경우도 보고되어 있다(17). 따라서 기존에 보고된 이들 세균에 대한 생태학적인 데이터(배양을 기초로 한 방법으로부터 연구된 자료)에 대한 제고가 필요하며, 이는 종종 실제로 발생하는 미생물 활성도의 측정치와의 비연관성으로도 설명될 수도 있다. NCBV 상태의 세균은 기존의 방법으로 탐지되지 않으므로, 그들의 양과 분포를 연구하는데 많은 어려움이 있다(26, 35). 또한 특별한 물질을 에너지원으로 사용하는 미생물 또는 특수한 목적을 위하여 개발되고 변형된 미생물을 자연계에 인위적으로 접종시켰을 시, 이들이 환경 스트레스에 대해 적응하고 생존하는 양식에 대한 연구는 중요한 관심사이기도하다. 다시 말하면, 자연계에 존재하는 화학 및 물리적인 요인들의 변화에 대한 이해와 이에 따른 중요 세균들의 양 및 활동성에 대한 파악이 필요하나, 놀랍게도 이들의 자연계 내에서의 정확한 분포와 생존에 대한 지식은 많이 축적되어있지 못한 실정이다(14).

최근 세균 내에 보고유전자를 주입한 후 이 유전자산물의 활성도로부터 성장하고 있는 세균의 활성정도를 비교 연구한 논문들의 보고가 있었다(3, 4, 20, 22). 본 연구에서는 자연적 또는 인위적인 스트레스 하에서 자연미생물의 생존을 알아보는 데 있어서 기존의 탐지방법(배양을 필수로 하는 탐지 방법)으로 그들의 정확한 양을 알 수 있는지의 여부를 조사하였다. 이들이 스트레스에 대한 적응·생존 방식으로서 NCBV 상태에 들어간다면, 그들의 생존 및 양을 탐지할 수 있는 방법으로서 발광기능을 자연미생물에게 분자생물학적인 방법으로 부여하여 생성된 균을 사용하여 여러가지 성장 억제조건 하에서 그들이 발하는 빛의 양을 정량하였다. 이 결과 잠재적 발광능력(potential bioluminescence)을 정량하는 방법은 여러종류의 스트레스를 받은 NCBV 미생물의 생태적인 고리 및 그들의 생활사를 이해하며, 성장억제조건 하에서의 세균의 생리적 적응양식을 연구하는데 있어서 기술적인 용이함을 제공하였다.

재료 및 방법

자연미생물의 채취

자연계에 존재하는 미생물을 채취하기 위해서 경안천(경기도, 용인시)에서 담수시료를 멸균된 병에 채수하여, 부유물질이 가라앉은 후 M9 solution(42.2 mM Na_2HPO_4 ; 22.0 mM KH_2PO_4 ; 8.6 mM NaCl; 18.7 mM NH_4Cl ; 0.1 mM CaCl_2 ; 1 mM MgSO_4)에 적당히 희석하여 LB(trypton 1%; yeast extract 0.5%; NaCl 1%; agar 1.5%) plate와 R2A(Bacto yeast extract 0.05%; Bacto proteose peptone No. 3 0.05%; Bacto casamino acids 0.05%; Bacto dextrose 0.05%; soluble starch 0.05%; sodium pyruvate 0.03%; potassium phosphate, dibasic 0.03%; magnesium sulfate 0.005%; Bacto agar 1.5%)

plate 상에 도말하여 30°C에서 배양하여 성장한 colony 중에서 유전자조작이 용이한 Gram-음성균, KP964를 선택하였다.

발광표현형으로의 형질전환

lux 유전자의 공여체(donor strain)로서 *E. coli* S17-1 λ pir strain에 pUT*luxAB*(11, 25, 33)를 electroporator(Bio-Rad)를 사용하여 형질전환시켰다. *lux* 유전자의 수령체(recipient cell)로 사용될 KP964의 접합(conjugation) 후 선택을 위하여, rifampin에 내성을 갖는 돌연변이주를 그들의 정치기배양액으로부터 획득한 후, 이 중에서 야생형의 성장유형과 차이가 없는 균, KP964R를 최종적으로 선택하였다.

공여체와 수령체 각 세균을 LB-ampicillin과 LB-rifampin에서 키운 배양액을 0.85% NaCl 용액에 혼합한 후, 멸균된 0.22 μm 여과지(Millipore)에 통과시켰다. 이 여과지를 LB plate 상에서 8시간 동안 30°C에서 배양한 후, 여과지를 10 mM MgSO_4 용액에 넣어 혼합한 다음, 100 μl 를 LB-rifampin-tetracycline plate에 도말하였다. 안정적인 발광표현형을 나타내는 exconjugant, KP964R-C 내의 *lux* 유전자가 염색체에 삽입되었는지 또는 plasmid 상태로 존재하는지를 알아보기 위해서 LB-ampicillin과 LB-tetracycline에서 성장 여부로 확인하였다. 선택된 exconjugant는 두가지 배지에서 모두 잘 자라며, 이들로부터 plasmid DNA 정제 결과 pUT*luxAB* plasmid는 항생제가 없는 non-selective pressure에서도 유지됨을 보였다(data not shown).

영양결핍 조건 하에서의 세균 수 및 발광의 측정

KP964R-C 세균을 LB 액체배지에 30°C에서 16-18시간 동안 배양한 현탁액을 fresh LB에 다시 접종시킨 후 세포농도가 OD_{600nm} 0.5에 도달한 대수성장기 배양액으로부터 KP964R-C를 수확하여 M9 용액에 약 10^6 cells/ml의 농도가 되도록 채부유시켰다. 총 60일의 30°C 영양결핍 기간 동안 aliquot를 취하여 아래의 4가지 방법으로 세균의 수와 발광의 정도를 정량하였다.

1. 총 세균수; Nitrocellulose(0.45 μm) 여과지 위에 Irgaran-Black으로 염색된 polycarbonate 여과지(0.2 μm , Nuclepore)를 놓은 뒤, 2 ml의 시료와 50 μl 의 0.1% acridine orange (Sigma) 용액을 섞은 후, 10분 간 염색한 뒤 여과하였다. 세균이 부착된 표면의 여과지에 immersion oil(type FF, fluorescence-free, Cargille Lab.)을 처리한 뒤 형광현미경(Olympus, Axioshop)을 사용하여 염색된 세포 수를 세었다. 정량은 10개 이상의 다른 상으로부터 나온 수를 평균낸 뒤 cells/ml로 나타내었다.
2. 살아있는(viable) 세균수; 시료에 nalidixic acid(0.002%)와 yeast extract(0.025%)를 첨가한 후 8-16시간 후, 균의 분열이 일어나지 않고 첨가한 영양분(yeast extract)에 의해 elongation이 된 세포를(15) acridine orange로 염색하여 형광현미경으로 관찰하여 viable cell을 세었다.
3. 배양가능한 세균수; 적당한 한천배지(LB 또는 해당되는 항생제를 함유한 LB 한천배지) 상에 도말하여 1-2 일 간 30°C에서 배양한 후 눈으로 관찰할 수 있는 크기의 colony 수를 세었다.
4. Relative light unit; 각 시료로부터 100 μl 씩 취하고, 이에 aldehyde를 섞은 후 5초간 혼합시켜서 luminometer(Turner Co.)로 측정하여 그 결과를 RLU 단

위로 표시하였다. Luciferase의 기질로 사용된 aldehyde는 n-decyl aldehyde(Sigma)였으며 최대발광을 위한 최적농도는 0.05%이었다(27).

스트레스 조건 하에서의 세균의 CFU 및 발광의 측정

자연생태계에서 미생물이 접할 수 있는 환경 스트레스로서, 영양분의 결핍(M9-minimal 배지), 독성물질의 존재(benzene, toluene, *p*-xylene, phenol), acid shock(pH4), hyper-osmotic pressure(인공해수), hypo-osmotic pressure(증류수) 등을 처리한 후 0.8, 1, 2, 4시간마다 각 시료로부터 CFU와 RLU를 측정하였다.

KP964R-C의 18시간 배양의 일부를 LB에 재접종시킨 후 OD_{600nm}가 약 0.5 정도 되었을 시(즉, 지수성장기의 배양), 10,000 rpm으로 원심분리시켜 cell pellet만 남기고 상등액 LB는 버리고 M9 용액이나 실험 목적에 맞는 용액에 미생물의 농도가 10⁶ cells/ml 정도 되도록 재부유시켰다. 열충격에 의한 cross-protection(21)을 방지하기 위하여, 세균을 옮기거나 원심분리할 때, 온도를 20-25°C 사이로 유지하였다. Toluene, benzene, *p*-xylene, 그리고 phenol은 0.1%의 최종농도로 첨가하였으며, pH4는 M9 용액에 HCl을 사용하여 적정하였다. 삼투압 충격을 위하여 인공해수(0.4 M NaCl; 0.1 M MgSO₄; 0.02 M KCl; 0.02 M CaCl₂; pH 8.0; 31) 또는 증류수를 사용하여 M9-세균 현탁액과 1:1의 비율로 혼합하였다. 30°C에서 정치 배양하면서 해당하는 시간에 시료를 채취하였다.

스트레스 받은 세균의 잠재적 발광능력(potential bioluminescence)의 측정

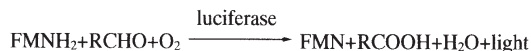
세균이 스트레스를 받아서 줄어들었던 빛이 이를 제거함으로써 다시 증가할 때까지 걸리는 시간, 즉 lag period를 조사하였다. CFU와 RLU의 상관관계가 서로 다른 세가지의 억제조건(*p*-xylene, 증류수, 그리고 최소배지 하에서의 영양 결핍; 37)을 대표적인 스트레스로 선택하였다. LB 액체배지에 18시간 배양시킨 KP964R-C 배양액 100 µl를 10 ml의 LB가 들어있는 삼각플라스크에 접종한 후 5시간째에 약 10⁷ cells/ml 농도의 cell로 희석한 후, 영양결핍(M9 용액), hypo-osmosis 스트레스(증류수), 그리고 독성물질(0.1% *p*-xylene)을 각각 1시간 동안 노출시켰다. 다음 주어진 각 스트레스를 세균으로부터 제거하기 위하여 원심분리시킨 후 상등액을 버리고 cell pellet은 LB 액체배지에 재부유하였다. 그 후 시간에 따른 빛의 변화를 측정하면서 발광이 증가하기까지의 lag period, 발광의 증가율, 그리고 최대 발광수준을 분석하였다.

결과 및 고찰

luxAB 유전자가 형질전환된 KP964R-C가 나타내는 발광의 특징

미생물이 발광기능을 갖기 위해서는 적어도 5개의 유전자군(*lux operon*)의 발현을 필요로 한다(9). Luciferase(*luxAB* 유전자 산물)는 산소가 존재할 때 long-chain aldehyde를 기질로 이용하여 지방산으로 그리고 FMNH₂를 FMN으로 산화시키며 이 과정에서 생긴 전기적으로 여기된 flavin으로부터

터 490 nm의 파장의 푸른색 빛을 발생시킨다.



이 반응의 산물인 지방산과 FMN은 acid reductase complex (*luxCDE* 유전자 산물)와 NADH+H⁺에 의해 aldehyde와 FMNH₂로 환원되어 luciferase의 기질로 재활용될 수 있다(23). 이러한 *lux operon*은 해양 발광 미생물의 염색체 DNA로부터 cloning되어 대장균 등의 일반 미생물에 *lux operon*을 주입하면 발광기능을 보이며, aldehyde를 외부에서 첨가해 줄 경우 *luxAB*만 발현되어도 세균은 발광표현형을 나타낼 수 있다(9, 10).

luxAB 유전자를 갖는 *E. coli*와 수형체로서 자연세균(KP964)과의 접합 결과로 항속적으로 발현되는 발광표현형을 갖는 exconjugant, KP964R-C를 획득하였다. KP964R-C의 세포농도에 따른 발광유형을 알아보기 위하여, LB 액체배지에서 지수적 성장을 하는 동안 세포농도(OD)와 relative light units(RLU) 사이의 관계를 알아보았다. Fig. 1이 보여주는 바와 같이, 세균 수와 발광은 통계적으로 유의한 관계(RLU = (2.3 × 10⁴) × (OD) - 33.9, r² = 0.98)를 보여주었는 바, 지수적 성장기간의 KP964R-C 세포로부터 발하는 세포 당 발광량은 일정하였다. 이는 *Vibrio harveyi*로부터 유래된 promoter-

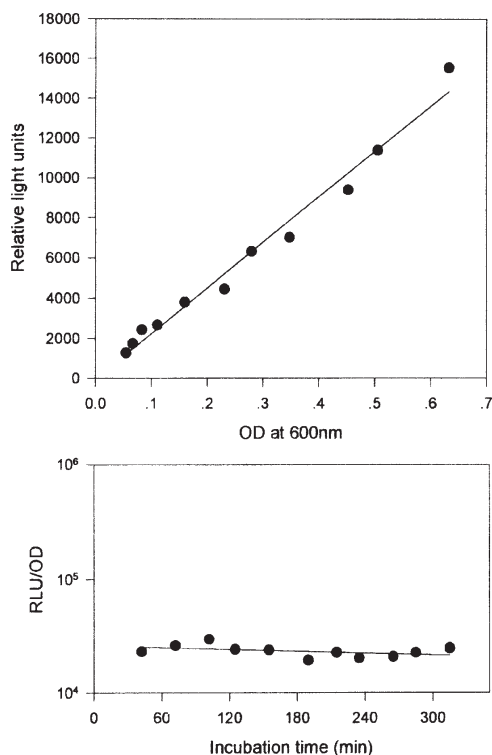


Fig. 1. Light emission vs. cell density of *luxAB*-transformed bacterial strain, KP964R-C, during an exponential growth phase in LB medium at 30°C.

less *luxAB*의 발현이 plasmid 상의 다른 유전자의 발현으로부터 기인하는 것으로 추측되며(11), 평형성장기 동안 이의 발현은 다른 조건에 의하여 영향을 받지 않음을 보여주었다(data not shown). 따라서 적어도 좋은 조건 하에서 성장하는 세균의 수는 그들이 발산하는 빛의 양으로 나타낼 수 있다. 다른 종류의 자연세균의 경우도 비슷한 유형의 상관관계를 보여주었다(37).

최소배지 내에서의 KP964R-C의 세균수와 발광

KP964R-C를 이용하여, 이들이 미생물의 성장에 필요한 탄소 및 에너지원이 전혀 없는 최소배지(minimal medium; M9 용액)에서의 적응과 생존을 총 세균, viable cell, 배양가능한 세균, 그리고 RLU(relative light unit)의 변화를 통하여 조사하였다.

30°C 영양결핍 조건 하에서 acridine orange direct counting 방법을 이용하여 측정된 총 세균 수는 60일 간의 실험 기간 동안 변화없이 초기 접종농도인 약 10^6 cells/ml를 유지하였다(Fig. 2). 이 세균의 culturability의 감소율은 처음 23일 간은 $-0.21/\text{day}(r^2=0.96)$ 이며, 그 이후에는 약 4배 이상 빠른 $-0.96/\text{day}(r^2=0.99)$ 의 감소율을 보여주어 37일 이후에는 <10 CFU/ml로서 plating counting의 탐지한계 이하를 기록하였다(Fig. 2). Direct viable count 방법에 의해 확인된 생명력을 유지하는 세균 수는 영양결핍 60일 후, 1.43×10^4 cells/ml로서 이 양은 총 세균 수의 0.092%이며 배양가능한 세균 수 보다는 1430배 이상 많은 수치이다. Luminometry로 측정한 발광의 경우, 같은 기간의 CFU/ml의 감소율보다 빠른 $-1.08/\text{day}(r^2=0.90)$ 로서 7일 이후의 RLU는 사용한 luminometer의 탐지한계(0.553 relative light unit/ml) 이하까지 내려가 7일 이상 영양결핍 상태에 있는 배양가능한 세균(즉, CFU)은 물론 NCBV cell(즉, viable cell 수에서 CFU 수를 뺀 값)도 거의 빛을 발하지 않음을 보여주었다. 즉 빛의 감소가 배양가능한 세균의 감소나 viable cell의 감소보다 더 빨리 일어나

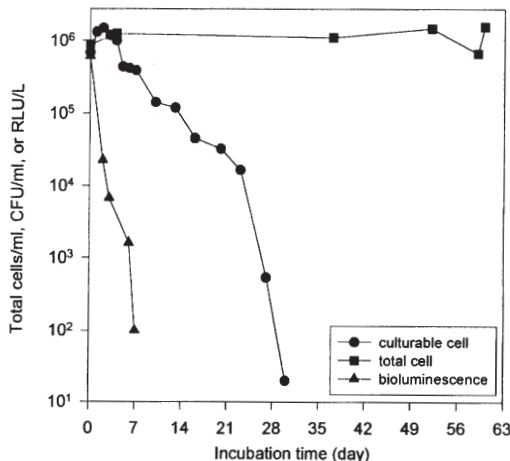


Fig. 2. Change in the numbers of the total cell and the culturable cells, and the production of bioluminescence of the strain KP964R-C under the starvation condition for 60 days at 30°C.

므로, 빛의 양을 정량하는 것만으로는 NCBV-상태나 영양결핍 상태(또는 스트레스 조건)에 있는 배양가능한 세균의 양을 파악하는데 어려움이 있다는 것을 암시한다 하겠다.

위에서 서술한 동일한 실험을 4°C에서 수행한 결과, CFU 및 RLU의 감소가 현저히 늦어지며, RLU의 변화는 CFU의 변화와 비교적 좋은 상관관계를 보여주었다(data not shown). KP964R-C의 서식처였던 경안천으로부터 채취한 자연 강물에 KP964R-C를 직접 배양하여 조사된 이 균의 CFU 및 RLU의 감소율은 순수배양 상태로 M9 용액에서 실험한 것보다 빠른 감소율을 보였으나, M9-배양의 결과와 같이 4°C에서의 감소율이 30°C의 것보다 느린 경향성을 나타내었다(data not shown). 따라서 이 균이 30°C는 물론 4°C하의 자연 강물에서도 빠른 CFU 및 RLU 감소율을 보이므로, CFU를 감소시키는 주 요인이 세균포식자 및 경쟁자의 존재보다는 강물에 존재하는 어떠한 스트레스와의 접촉일 가능성이 크다고 하겠다.

여러종류의 스트레스 하에서 KP964R-C의 CFU와 RLU의 관계

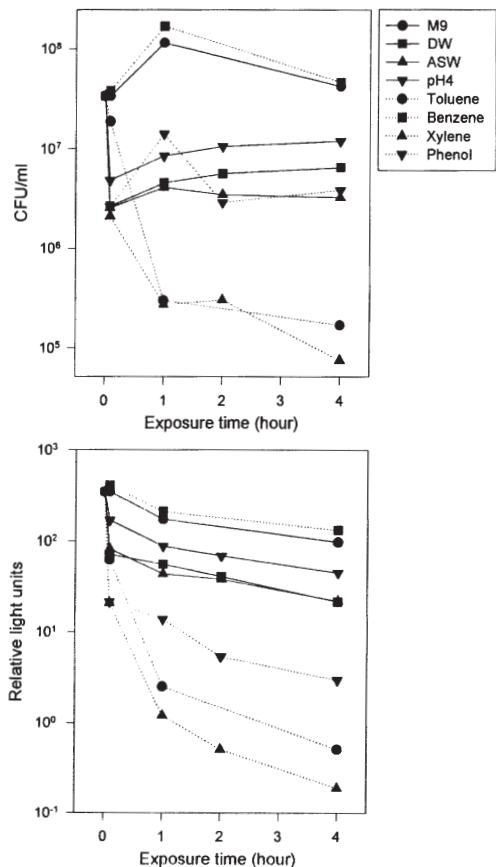


Fig. 3. Colony-forming-units (A) and relative light unit (B) of the strain KP964R-C under the various stressed conditions.

독성물질, 삼투압 충격, 산성 pH 등을 접촉시키면서 시간에 따른 KP964R-C의 배양가능한 세균 수와 발광(RLU)의 변화를 알아보았다(Fig. 3). RLU는 각 스트레스에 노출되어 있는 시간이 지남에 따라 점진적인 감소 경향을 보이나, CFU는 toluene과 p-xylene의 경우를 제외하고는 그 수가 감소하지 않으며, 특히 benzene에 노출되었을 시 증가하는 경우도 보였다. 따라서 0.5분-4시간 동안 각 스트레스와 접촉하는 동안 RLU/CFU의 비율을 비교하였는데, 배양가능한 세균 당 발하는 발광의 정도가 대체적으로 감소함을 보여주지만 각 스트레스의 종류 및 접촉시간과의 좋은 연관성을 보여주지 못하였다. KP964이외의 다른 자연세균의 경우에도 비슷한 결과를 보였다(data not shown; 37). 배양가능한 세균 농도의 감소가 발광의 감소와 같은 비율로 일어난다는 보고가 있으나(7, 8, 16), 우리가 사용한 균주의 경우에는 RLU의 정량만으로는 억제조건 하의 세균(따라서 많은 부분이 NCBV 상태인 population)의 수를 탐지하기에는 불충분함을 제시하였다.

보다 명확한 CFU와 RLU사이의 연관성을 조사하기 위하여 각 스트레스가 KP964R-C의 CFU 및 RLU의 감소에 끼치는 영향을 비교하기 위하여, 각 스트레스가 접촉초기의 CFU나 RLU 값의 10%를 감소시키는데 필요한 시간(D-value; Table 1)을 알아보았다. Table 1에서 보여주는 바와 같이 phenol [CFU의 D값은 56 hr, RLU의 D값은 6.7 hr]과 hyper-osmotic shock [CFU의 D값은 320 hr, RLU의 D값은 10.7 hr]의 경우, CFU나 RLU의 10%를 감소시키는데 필요한 시간이 매우 다를 수 있다는 것을 보여준다. 따라서 toluene [CFU의 D값은 2.4 hr, RLU의 D값은 2.1 hr]과 p-xylene [CFU의 D값은 3.1 hr, RLU의 D값은 2.1 hr]의 경우를 제외하고는 CFU와 RLU 사이의 연관성을 찾을 수 없었다.

Pre-stress를 받은 KP964R-C의 잠재적 발광능력의 특징

세균이 여러 제한조건 하에서 발하는 빛이 NCBV 세포나 배양가능한 세균의 정량을 위한 색인으로는 이용하기 어렵다는 결론 아래, 스트레스를 받았던 세균에게 재성장 조건(예를들면, 주어진 스트레스를 제거한 후 LB 배지 또는 yeast extract의 첨가)을 조성해준 후, 발광의 양상, 즉 빛의 증가가 있기까지 필요한 시간(lag period), 발광증가율, 그리

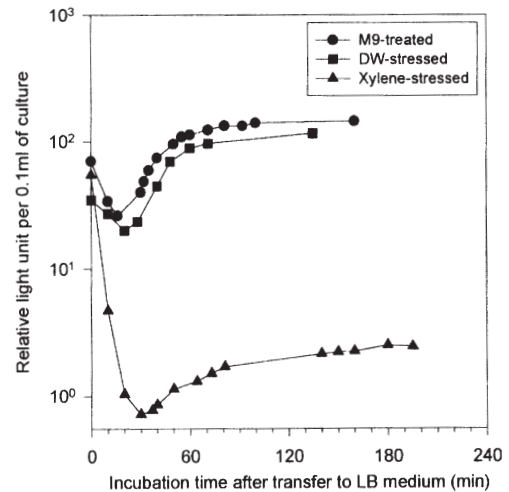


Fig. 4. The pattern of bioluminescence from the strain KP964R-C which had been pre-stressed by starvation (M9 solution), *p*-xylene, and hypo-osmotic shock (distilled water; DW) for one hour.

고 최대발광정도를 조사하였다. 대표적인 스트레스로서, CFU와 RLU의 관계가 서로다른(37) 영양결핍(M9 용액), 삼투압충격(중류수), 그리고 독성물질과의 접촉(0.1% *p*-xylene)을 1시간 동안 가한 후 재성장 조건에서 KP964R-C는 각 pre-stress에 대하여 26, 32, 36 min의 lag time을 보였다(Fig. 4). Lag time의 차이 외에도, 세균에 가하는 pre-stress의 정도가 셀수록(즉, M9, 중류수, *p*-xylene의 순서; 27) 발광의 증가율이 느리게 나타났는데, 각 pre-stress에 대하여 3.6, 2.5, 1.0 hr⁻¹의 증가율을 보였다. 아울러 도달할 수 있는 최대 RLU의 값의 경우에도 각 pre-stress에 대하여 144, 96, 2.5 RLU를 나타내어 pre-stress의 정도가 셀수록 낮음이 관찰되었다.

전통적으로 NCBV 미생물의 탐지에는 direct viable count (15) 이외에, *p*-iodonitrotetrazolium salt를 사용한 호흡량의 정도(38), 특이한 monoclonal antibody의 사용(35), intracellular ATP level의 측정(2), flow cytometry(12), nucleotide uptake(19), amino acid uptake(28), fluorescent probe의 이용(29), radioisotopic labelling 후 autoradiography(32) 등 많은 방법들이 응용되었다. 하지만 혼합배양 상태인 자연시료의 경우에는 특별한 종만을 탐지하기에는 위에서 언급한 어떠한 방법도 선택성과 민감도에 만족을 줄 수 없는 실정이다. 또한 방법 자체의 복잡성과 조사시간이 오래 걸린다는 단점이 제기되고 있다.

따라서 NCBV 세균의 효율적인 탐지를 위하여, 연구하고자 하는 균에 특별한 marker(예를 들면, *lacZ* [6], drug-resistance를 coding하는 유전자 [1], *xyIE* [34], green fluorescent protein을 coding하는 유전자 [18], *lux* [22])를 분자생물학적인 방법을 사용하여 인위적으로 첨가시켜, 그 기능의 정도를 측정하는 방법의 이용이 대안으로 제시되고 있다. 그 예로서 성장하는 세균의 세포농도의 증감과 발광의 증감의 연관성을 보여준 보고가 있었다(7, 8, 16). 본 논문에서는 자연

Table 1. Time (hour) required to decrease the number of CFU or the amount of RLU by 10% (D-values) under the various stress conditions

Stress		CFU	RLU
starvation :	M9	58.7	15.0
hypoosmosis :	DW	nd ^a	16.1
hyperosmosis :	ASW	320	10.7
acid shock :	pH4	nd	11.2
toxic chemicals :	toluene	2.4	2.2
	benzene	18.1	14.1
	p-xylene	3.1	2.1
	phenol	56	6.7

^and : can not be determined the D-value due to increase of the numbers of CFU during stress-exposure.

미생물에 *lux* 유전자를 넣어 여러 가지 실험을 통하여 기존의 탐지방법의 단점을 극복할 수 있는가를 알아본 결과 직접적인 빛의 정량만으로는 스트레스 하의 미생물의 생리적 또는 생태적인 상태를 알아내기 어렵고 NCBV 상태를 나타내는데도 사용할 수 없다는 결론에 이르렀다. 그러나 스트레스 하의 미생물이 갖을 수 있는 잠재적인 발광능력의 조사를 통하여 세균개체군의 활성도를 비교하는데 이용될 수 있으리라고 본다. 또한 잠재발광능은 세균이 스트레스 조건, 특히 유해물질의 존재 하에서 보이는 성장유형의 변화, 예를들면 비성장률(specific growth rate)의 감소와 lag period의 증가(36)와도 연관성이 있으리라 짐작된다. 따라서 성장억제조건 하의 잠재적 발광능력의 구체적인 이해를 위하여 세균성장과 세포의 일반대사작용을 나타낼 수 있는 세포 내 생화학적인 요인과의 상관관계에 대한 연구가 현재 진행 중이다.

본 연구 결과로부터 다음의 세가지 사실을 알 수 있었다. 자연 미생물에 분자유전학적으로 발광기능을 부여하고 영양결핍 상태에서 온도에 따른 총 세균, viable cell, 배양가능한 세균(CFU), relative light unit(RLU)의 변화를 관찰한 결과, 60일 간의 배양기간 동안 population의 많은 부분의 세균이 NCBV 상태로 들어가는 것을 관찰할 수 있었고, 빛의 감소가 CFU의 감소보다 빨리 일어나 빛의 양을 정량하는 것만으로는 NCBV 상태나 배양가능한 세균의 양을 파악하는데 어려움이 있었다. 스트레스를 받은 세균 중 배양가능한 세균과 RLU와의 관계를 알아보기 위한 실험에서는 스트레스를 받은 시간이 길수록 배양가능한 세균 당 나오는 빛의 양이 줄어들음을 보였다. 그러나 CFU와 RLU의 D-value를 비교해 본 결과 서로간의 상관성을 찾을 수 없었으며 RLU가 배양가능한 세균 수에 의존한다는 결론을 얻기 어려웠다. 빛의 측정을 직접적으로 이용하는 대신 스트레스를 받은 세균의 잠재적 발광능력을 조사한 결과, 세균에 강한 스트레스로 작용한 경우일수록 발광 증가를 위한 lag period는 길고, 발광의 증가율이 느리며, 도달하는 최대 RLU의 값도 낮음이 관찰되었다. 따라서 스트레스 하의 세균으로부터 직접적인 RLU의 측정보다는 이들이 스트레스로부터 벗어나 재성장 또는 소생(resuscitation)되는 과정에서 RLU의 분석(즉, potential bioluminescence)이 자연세균의 적응, 활성 및 생존을 나타내주는 색인으로 사용할 수 있음을 보여주었다.

감사의 말

본 연구는 교육부 기초과학연구소 학술연구지원비(BSRI-96-4438) 및 G-7 환경공학기술개발사업(9-2-4)에 의해 수행되었다.

참고문헌

- Bale, M., J.C. Fry, and M.J. Day. 1987. Plasmid transfer between strains of *Pseudomonas aeruginosa* on membrane filters attached to river stones. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 3099-3107.
- Beumer, R.R., J. de Vries, and F.M. Rombouts. 1992. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *Internatl. J. Food Microbiol.* **15**, 153-163.
- Blouin K., S.G. Walker, J. Smith, and R.F.B. Turner. 1996. Characterization of in vivo reporter systems for gene expression and biosensor applications based on *luxAB* luciferase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2013-2021.
- Brennerova M.V. and D.E. Crowley. 1994. Direct detection of rhizosphere-colonizing *Pseudomonas* sp. using an *Escherichia coli* rRNA promoter in a Tn7-*lux* system. *FEMS Microbiol. Ecol.* **14**, 319-330.
- Colwell, R.R., P.R. Brayton, D.J. Grimes, D.B. Roszak, S.A. Huq, and L.M. Palmer. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology.* **3**, 817-820.
- Drahoš, D.J., B.C. Hamming, S. McPherson. 1986. Tracking recombinant organisms in the environment: β -galactosidase as a selective non-antibiotic marker for fluorescent pseudomonads. *Bio/Technol.* **4**, 439-443.
- Duffy G., A. Ellison, W. Anderson, M.B. Cole, and G.S. A.B. Stewart. 1995. Use of bioluminescence to model the thermal inactivation of *Salmonella typhimurium* in the presence of competitive microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3463-3465.
- Duncan S., L.A. Glover, K. Killham, and J.I. Prosser. 1994. Luminescence-based detection of activity of starved and viable but nonculturable bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1308-1316.
- Engbrecht, J., K.H. Neelson, and M. Silverman. 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell.* **32**, 773-781.
- Ferguson, Y., L.A. Glover, D.M. McGillivray, and J.I. Prosser. 1995. Survival and activity of *lux*-marked *Aeromonas salmonicida* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3494-3498.
- Herrero, M.V., V. de Lorenzo, and K. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 6557-6567.
- Kaprelyants, A.S. and D.B. Kell. 1991. Rapid assessment of bacterial viability and vitality using rhodamine 123 and flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 410-422.
- Kjelleberg, S. 1993. Starvation in bacteria. Plenum Press, New York.
- Kjelleberg, S., M. Hermansson, P. Marden, and G.W. Jones. 1987. The transient phase between growth and non-growth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 25-49.
- Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**, 415-420.
- Lampinen J., M. Virta, and M. Karp. 1995. Use of controlled luciferase expression to monitor chemicals affecting protein synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2981-2989.
- Lee, K.-H., and E.G. Ruby. 1995. Symbiotic role of the viable but nonculturable state of *Vibrio fischeri* in Hawaiian coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 278-283.
- Leff, L.G. and A.A. Leff. 1996. Use of green fluorescent

- protein to monitor survival of genetically engineered bacteria in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3486-3488.
19. **Marden, P., M. Hermansson, and S. Kjelleberg.** 1988. Incorporation of tritiated thymidine by marine bacterial isolates when undergoing a starvation survival response. *Arch. Microbiol.* **149**, 427-432.
 20. **Marschner, P. and D. E. Crowley.** 1996. Physiological activity of a bioluminescent *Pseudomonas fluorescens* (strain 2-79) in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). *Soil. Biol. Biochem.* **28**, 869-876.
 21. **Matin, A., E.A. Auger, P.H. Blum, and J.E. Schultz.** 1989. Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 293-316.
 22. **Matrubutham, U., J.E. Thonnard, and G.S. Saylor.** 1997. Bioluminescence induction response and survival of the bioreporter bacterium *Pseudomonas fluorescens* HK44 in nutrient-deprived conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 604-609.
 23. **Meighen, E.A.** 1988. Enzymes and genes from the lux operons of bioluminescent bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**, 151-176.
 24. **Murphy, S.K. and J.D. Oliver.** 1992. Effects of temperature abuse on survival of *Vibrio vulnificus* in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2771-2775.
 25. **Nealson, K.H. and J.W. Hastings.** 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* **43**, 496-518.
 26. **Oliver, J.D., F. Hite, D. McDougald, N.L. Andon, and L. M. Simpson.** 1995. Entry into and resuscitation from the viable but non-culturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2624-2630.
 27. **Park, K.-J., S.-J. Chun, and K.-H. Lee.** 1997. Development of toxicity test system using a luminously transformed freshwater bacterium. 52nd Korean As. Biol. Sci., Univ. Chunbuk.
 28. **Rahman, I., M. Shahamat, P.A. Kirchman, E. Russek-Cohen, and R.R. Colwell.** 1994. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type 1. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3575-3578.
 29. **Rodriguez, G.G., D. Phipps, K. Ishiguro, and H.F. Ridgway.** 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1801-1808.
 30. **Roszak, D.B. and R.R. Colwell.** 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**, 365-379.
 31. **Ruby, E.R. and K.H. Nealson.** 1977. Pyruvate production and excretion by the luminous marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 164-169.
 32. **Shahamat, M., U. Mai, C. Paszko-Kolva, and M. Kessel.** 1993. Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1231-1235.
 33. **Stewart, G.S.A.B., M.J. Loessner, and S. Scherer.** 1996. The bacterial lux gene bioluminescent biosensor revisited. *ASM news.* **62**, 297-301.
 34. **Winstanley, C., J.A.W. Morgan, R.W. Pickup, J.G. Jones, and J.R. Saunders.** 1989. Differential regulation of Lambda pL and pR promoters by a cI repressor in a broad-host-range thermoregulated plasmid marker system. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 770-777.
 35. **Xu, H.-S., N.C. Roberts, L.B. Adams, P.A. West, R.J. Siebeling, A. Huq, M.I. Huq, R. Rahman, and R.R. Colwell.** 1984. An indirect fluorescent antibody staining procedure for detection of *Vibrio cholerae* serovar O1 cells in aquatic environmental samples. *J. Microbiol. Methods.* **2**, 221-231.
 36. **Yang, J. and D. Jahng.** Toxicity evaluation of hazardous contaminants by measuring lag periods and specific growth rates of a test microorganism. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* in press.
 37. **Yoon, H.-Y., K.-J. Park, H.-S. Lee, and K.-H. Lee.** 1997. Detection of activity and survival of the natural bacteria under the stressed condition by using bioluminescent phenotype. 52nd Korean As. Biol. Sci., Univ. Chunbuk.
 38. **Zimmermann, R., R. Iturriaga, and J. Becker-Birck.** 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 926-935.

(Received August 7, 1998/accepted September 15, 1998)

ABSTRACT: Activity and Survival of the Natural Bacteria under the Stressed Conditions Detected by Bioluminescent Phenotype

Kyoung-Je Park¹, Hye-Young Yoon¹, Se-Jin Chun¹, Ho-Sa Lee², Dong-Hun Lee³, Deokjin Jahng⁴, and Kyu-Ho Lee^{1*} (¹Department of Environmental Science, Hankuk University of Foreign Studies, ²Department of Biology, Kyunghee University, ³Division of Life Science, Chungbuk National University, ⁴Department of Chemical Engineering, Myongji University)

To investigate whether the introduced genetic marker is useful to detect the survivalship and activity of the natural bacteria under the stressed conditions, one Gram-negative isolate, KP964 was transformed to the luminous phenotype by transferring *luxAB* gene. Under the starvation-stress this luminous bacterial culturability (determined by colony-forming-units [CFU] on agar plate) decreased rapidly below the detection limit by 37 days, while its total cell number (determined by AODC) remained almost the same as its initial inocular size. At that time period, the viable cell number was estimated to be 1400 times higher than its CFU number. The bioluminescence (determined by relative light units [RLU]) produced under the same condition was also monitored and found to decrease more rapidly than the culturability by 5-fold. Under the other stresses, *e.g.*, osmotic shocks, acid shock, and exposure to toxic chemicals, this bacterial strain did not show the reliable correlation between CFU and RLU. These results might not suggest the direct estimation of bioluminescence from the stressed bacteria be an index of both the survivalship and its activity. However, when the stressed bacterial cells were incubated under the favorable condition by relieving from the existing stress, the potential bioluminescence (the lag periods before the increase of bioluminescence, the increase rates of bioluminescence, and the maximal levels of bioluminescence) was shown to be highly dependent upon the strengths of the stresses exposed to the bacterial cells. Therefore, analysis of the potential bioluminescence from the stressed bacteria revealed good relationships with survival as well as activity.