

논산 관촉사 석조문화재에 분포하는 남세균의 분리 및 동정에 관한 연구

오 인 혜
배재대학교 생물약학과

Isolation and Identification of Cyanobacteria of the Cultural Heritages in the Gwanschoksa, Nonsan City in Korea

Oh, In-Hye
Dept. of Biology & Medicinal Science, Pai-Chai University

ABSTRACT

The importance of microbial activity in the alteration and deterioration of stone and concrete walls has been frequently neglected. Organisms present on stone monuments can include photolithoautotrophs, such as algae, cyanobacteria, mosses, and higher plants. Because of their ability to survive repeated drying and rehydration cycles and high UV levels, the cyanobacteria are particularly important on exposed surfaces. The cyanobacteria distributed on the surface of the stone cultural heritages in Gwanschoksa, Nonsan city were investigated. *Chlorococcus* sp. *Aanabaena* sp. *Gloeocapsa* sp. *Lyngbya* sp. *Stigomena* sp. *Synechocystis* sp were identified. *Haplaosiphon fontinalis* and *Stigonema turfatum*, which were not recorded in Korea, were also identified. Cells often have thick pigmented sheath in dry, sun-exposed environment and shorter filament, which can be different than that in aquatic systems. Special attention should be paid to production of an adequate DNA database in order to accelerate the rate at which information on the species present in biofilms become available.

Keywords: cyanobacteria, Gwanschoksa, biofilms, dark pigment, DNA database

Corresponding Author : In-Hye Oh, Dept, of Biology & Medicinal Science, Pai-Chai University, Daejeon 302-735, Korea. Tel. : +82-42-520-5384, E-mail: inhyeoh@pcu.ac.kr

I. 서론

석조 및 코크리트 벽을 부식시키고, 변형시키는데 있어 미생물의 활동이 중요하다는 사실이 그동안 인식되지 못했다. 그러나 미생물과 습도가 있는 곳은 어디든 활발한 생물필름(biofilm)이 발견되는데, 복잡한 생물필름 생태계는 건물의 외벽에 발달될 수 있다. 석조 건물 표면의 미생물상은 환경조건과 건물재료의 물리화학적 성질에 따라 여러 가지 방식으로 다양한 생태계로 나타난다.

석조기암물 표면에는 조류(algae), 남세균(cyanobacteria) 같은 광요구성 자가 독립영양생물과 이끼, 고등식물이 있다. 질산과, 아질산, 황산을 분비하는 화학적 독립영양생물도 있어 부분적으로 pH를 변화시킨다. 여러 가지 다양한 속과 종의 미생물이 컨소시엄을 형성한다고 한다(Anagnostidis, *et al.* 1983; Ortega-Calvo *et al.* 1995). 처음에는 손상된 무기물에 관련하여 화학암석영양미생물이 19세기 석조건물 훼손에 주요 역할을 한다고 알려졌으나, 최근 연구에 의하면 화학유기영양 세균과 곰팡이가 광독립영생물과 더불어 중요하다고 한다. 심지어 광영양생물의 필름이 없어도 종속영양세균과 곰팡이는 기질페인트의 유기화합물을 이용하여 페인트 표면에서 자랄 수 있으며 페인트와 그 표면을 부식시키는 산을 생성한다. 남세균(cyanobacteria)은 건조와 재수화(rehydration)의 순환이 반복되고(Whitton, 1992), 자외선 수준이 높은 곳(Chazal and Smith, 1994)에서의 생존력이 강하기 때문에 특히 노출된 표면에서 중요하다.

석조건축물에서 미생물의 정착은 광영양생물로 부터 시작되는데, 이것은 석재 건축물 표면에서 뚜렷한 생물필름을 형성한다. 이끼와 고등식물 뿐 아니라 이러한 조류(algae), 남세균 및 지의류의 성장과 대사활동은 광선과 습도 같은 요인에 의해 조절된다. 광합성 미생물은 석재건축물 표면에서 자라며 석재를 몇 mm 침투해들어갈 수도 있다. 광합성 생물체가 축적되면 다음에 종속영양 미생물을 위한 좋은 유기적 영양기반이 되며 생물은 부식활동을 하게 되는 것이다. 독립영양생물은 탄수화물과 성장물질들을 분비하여 암석위에 복잡한 미생물 군집(생물필름)형성을 촉진시킬 수 있고 결국에는 건축물을 훼손하게 된다.

충남 논산시 관촉동 반야산에 있는 관촉사 경내에는 석불, 석등, 석탑 등 다양한 문화재가 한자리에 모여 있다. 관촉사 경내의 유수 문화재들 중 보물 제218호인 석불, 보물 제 232호인 석등, 그리고 석탑은 고려초기의 대표적 석조물이다. 자연암반 위의 석불과

미륵전 앞 풍화토 위에 조성된 석등 및 석탑은 화강암질 암석으로서 오랜 세월 동안 빗물, 대기, 생물들에 노출되어 물리적, 화학적, 생물학적 풍화를 받았다. 그동안 석조문화재의 생물학적 훼손과 관련하여 민경희 등(2001), 한성희 등(1990), 정용재 등(2003), 윤운경(2003, 2005, 2006), 윤석봉(2007)에 의하여 연구되었다. 그러나 석조건축물의 보존 대책 수립을 위한 체계적인 연구는 부족한 실정이다.

본 연구에서는 논산 관촉사 경내의 문화재인 보물 제218호인 석불, 보물 제 232호인 석등, 그리고 석탑에 대한 종합적인 보존대책을 수립하는데 기초자료를 제공하기위하여 석조문화재에 분포하는 남세균의 종류를 동정하여 파악하였다.

II. 실험 및 방법

(1) 시료채취

관촉사는 충남 논산시 관촉동 254 번지에 위치하며, 968년(광종 19) 창건되었다. 관촉사 석불, 석등, 석탑에서 이끼류 및 남세균이 분포하는 것으로 추정되는 13 지점에서 생물시료를 채취하였다. 석조 건축물에서 생물 분포형태를 사진을 찍고, 생물시료를 접착 테이프법 (Gaylarde and Gaylarde, 1998)으로 취하고, 석재에 밀착된 시료는 멸균된 압설자를 이용하여 채취하여 멸균 페트리 디시에 넣어 밀봉하고 4 °C 아이스박스에 넣어 실험실로 운반하였다.

(2) 실험방법

실험실로 운반된 시료 중 일부는 광학 현미경(Leica DM 1000)으로 10~400의 배율로 관찰하여 동정하였다. 시료 중 일부는 BG11 액체 및 고체배지 (Rippka *et al.* 1979)에 무균 접종하여, 액체배지에 접종한 것은 조도 30~40 $\mu\text{mol/s/cm}^2$, 28°C, 150 rpm의 shaking incubator에서 그리고 고체배지에 접종한 것은 동일한 조도 및 온도 조건에서 정치하여 7주간 배양한 후 광학현미경으로 관찰하여 석조문화재에서 직접 채취한 남세균 형태와 비교, 분석하여 동정하였다.

III. 결과 및 논의

석조문화재에서 채취한 생물시료를 현미경으로 관찰해보면 (Fig.1) 우리가 흔히 수계 생태계에서 관찰되는 생물 형태와는 차이가 있었다. 남세균의 세포벽은 다소 두껍고, 색소는 다소 진하거나 갈색으로 착색되어 있었으며, 여러 종류의 생물들이 컨소시엄을 형성하고 있었다. 생물의 모양이 이렇게 차이가 있는 것은 석조문화재 표면에서 오랜 기간 극심한 건조, 강한 광선 및 여름의 고온 및 겨울철의 극한 저온 등의 극한 환경에서 노출되면서 생존하기 위한 적응전략일 것으로 추측된다. 이런 극한 환경에 견디기 위하여 남세균은 외부막을 두껍게 한다거나, 보호색소를 형성하기도 하며(Chazal and Smith, 1994; Garcia-Pichel *et al.* 1992; Crispim and Galyarde, 2004). *Chlorella*는 휴면포자를 형성하기도 하는것으로 보고되고 있다(Klochkova and Kim, 2005). Fig. 1에서 관찰되는 바와 같이 색소가 보통 수계에서 자라는 남세균보다 짙었으며, 필라멘트형 남세균은 길이가 다소 짧은 것을 알수 있다. 따라서 시료를 단순히 광학 현미경 관찰만으로는 남세균을 정확히 동정하기는 다소 어렵다.

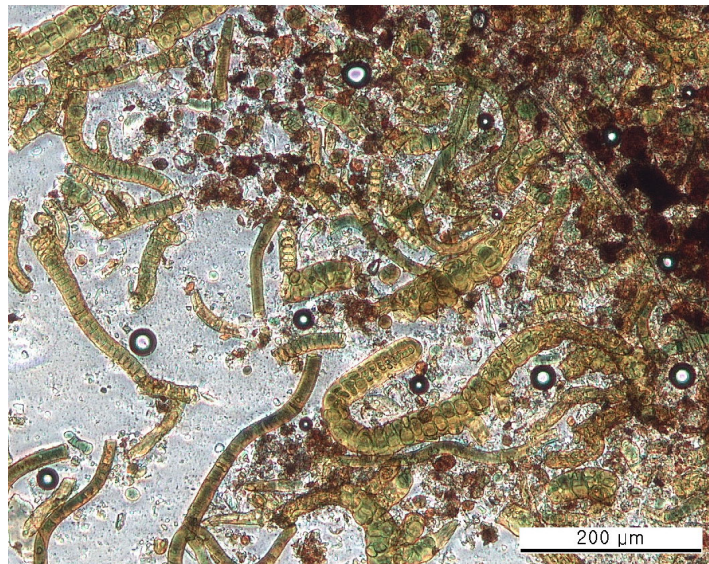


Fig 1. Consortium of cyanobacteria distributed in the stone heritage in Gwanschoksa

그래서 석조 문화재의 생물 필름에서 자라는 남세균을 동정할 때 통상 직접 시료를 현미경으로 관찰하는 방법과 실험실에서 특정한 성장 배지에서 일정 기간동안 배양시킨 후 현미경으로 관찰하는 방법이 이용되고 있다. 그러나 이 경우 균류, 세균 및 원생생물같은 포식자의 존재로 소수 개체만이 체크된다(Crispim and Galylarde, 2004). Ortega-Calve *et al.* (1991)과 Hernandez-Marine *et al.* (2003)이 지적한 바와 같이 실제 석조문화재에서는 구형 남세균이 더 흔하게 관찰되는 경향이 있는데, 전통적 배양방법으로는 필라멘트형 남세균이 더 잘 배양된다. 본 연구에서도 유사하게 고체배지에서 배양한 경우 필라멘트형 남세균이 더 잘 자라 번번히 관찰되었다. 액체 배지에서 관찰된 남세균은 형태도 수계에서 자라는 형태와 유사한 모양이 관찰되었다(Fig. 2 & Table 1). 액체 배지에서는 *Chlorococcus* sp., *Aanabaena* sp., *Gloeocapsa* sp., *Lyngbya* sp., *Stigomena* sp.와 *Synechocystis* sp.이 관찰되었으며, 한국산 미기록종이라고 보고된 (임 과 이, 2008)인 *Haplaosiphon fontinalis*와 *Stigonema turfaceum*의 2종도 관찰되었다.

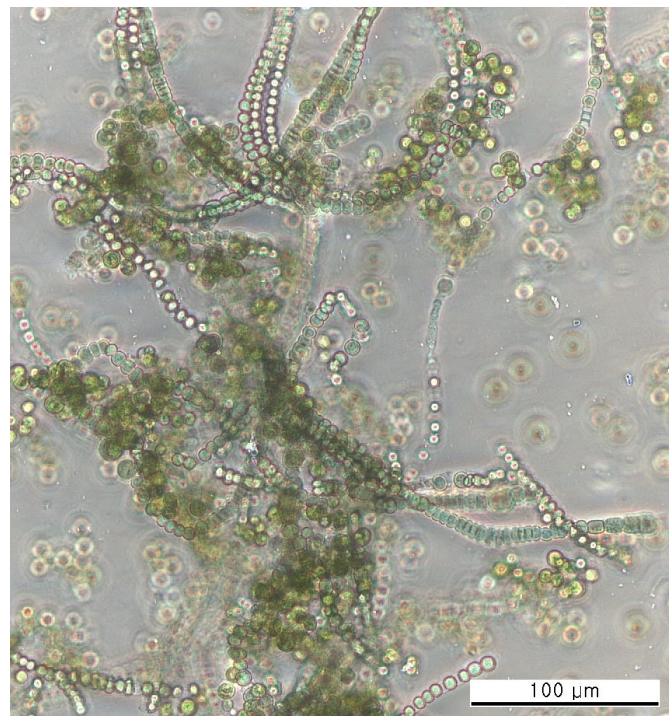


Fig 2. Several kinds of cyanobacteria cultural in BG-11 liquid media for seven weeks.

Klochkova and Kim (2005) 는 중원 미륵사지 석조문화재에서는 *Chlorella sp.*가 가장 흔하고, 구조인 *Phormidium sp.* 및 *Klebsormidium klebsii* Mattox et Blackwell이 흔하다고 보고하였으며, 임과 이(2008)는 여주 고달사지, 여주 하리 삼층석탑, 신륵사 석종과 석등의 석조 문화재에서는 녹조류인 *Protococcus viridis*와 남세균인 *Synechocystis aquatilis*가 각각 많이 출현하였음을 보고하였다. 또한 임 과 이(2008)는 한국산 미기록종인 *Haplaosiphon frutinalis*와 *Stigonema turfatum*의 2종이 출현함을 보고하였다. 이중 *Haplaosiphon frutinalis*는 곰팡이 성장을 억제하는 대사물질을 배출하는 것임이 보고되었는데(Burja et al., 2001). 석조문화재에서는 이러한 물질이 곰팡이류의 성장에 어떠한 영향을 미치는 지는 더 연구되어야 할 부분이다. 또한 석조 문화재에서 가장 흔하게 나타나는 생물 종이 문화재에 따라 다른 것인지 아니면 생물조사방법에 따른 것인지도 더 연구되어야 할 부분이다.

Table 1. The cyanobacterial list occurred at stone monuments in Ganschoksa, Nonsan

Species of cyanobacteria
<i>Chlorococcus sp.</i>
<i>Aanabaena sp.</i>
<i>Gloeocapsa sp.</i>
<i>Lyngbya sp.</i>
<i>Stigomena sp.</i>
<i>Synechocystis sp.</i>
<i>Haplaosiphon frutinalis</i>
<i>Stigonema turfatum</i>

석조문화재에 출현하는 남세균은 극한 환경에서의 변형된 형태 또는 휴면형이므로 정상적 환경에서의 모양과는 다르다. 그러나 석조 문화재에 분포하는 모든 남세균이 모두 배양가능하지는 않으므로 최근에는 16S rRNA를 이용한 남세균의 분자생물학적인 동정법이 종종 이용된다(Giovannoni et al., 1988; Turner 1997; Gaylarde et al., 2004). 그러나, 남조류의 여러 종에 대한 유전 database 정보가 충분하지 않아서 16S rRNA 자료만으로는 종수준의 동정에는 충분하지 않으며, 때로는 형태적 종 분류와 일치하는 않는 단점이 있다(Wisotzkey et al. 1992; Crispim and Gaylarde, 2004). 또한 현재의 남세균의 유전정보로는 수계의 남세균의 동정에는 적용 가능하기도 하나, 육상의 건축물에 분포하는 남세균의 동정에 적용하기에는 다소 무리가 있다. Crispim and Gaylarde (2004)는 현재 문화재를 훼손

시키는데 있어서 남세균의 역할을 연구하고 있는 연구 집단의 연구가 앞으로 건축물 표면에 서식하는 남세균을 동정하는데, 곧 큰 도움이 될 것으로 기대하고 있다.

그와 더불어 남세균이 극심한 건조, 강한 광선, 극한 온도에서의 남세균의 형태적 또는 생리적 생존기작을 연구하여 이러한 결과를 문화재에 분포하는 남세균을 동정하는데 이용 하는 것도 필요하다고 사료된다.

IV. 결 론

석조 및 코크리트 벽을 부식시키고, 변형시키는데 있어 미생물의 활동이 중요하다. 석조기념물 표면에는 조류(algae), 남세균(cyanobacteria) 같은 광요구성 자가 독립영양생물과 이끼, 고등식물이 분포하는데, 남세균의 건조와 재수화의 순환이 반복되고, 자외선 수준이 높은 곳에서 생존력이 강하기 때문에 특히 노출된 표면에서 중요하다.

논산 관촉사의 석조문화재 표면에 분포하는 남세균을 조사하기 위하여 생물시료를 채취하였다. 석조문화재 표면에 분포하는 남세균은 세포막이 두텁고 색소가 진하여 흔히 수계에서 관찰되는 남세균과는 차이가 있었으나, 액체배지에서 배양하여 분포하는 남세균을 동정하였다. *Chlorococcus* sp., *Aanabaena* sp., *Gloeocapsa* sp., *Lyngbya* sp., *Stigomena* sp.,와 *Synechocystis* sp.이 관찰되었으며, 한국산 미기록종이라고 보고된 *Haplaosiphon fontinalis*와 *Stigonema turfaceum*의 2종도 관찰되었다. 더 정확한 동정을 위하여 분자생물학적인 접근이 필요하다.

V. 참고문헌

- 민경희, 윤윤경, 김미란, 유정영, 안지영, 김영주, 이은경. 2001. 석조문화재의 생물훼손 규명과 그 보존방안, 석조문화재 보존관리연구 보고서 190-240. 문화재청/ 한국문화재보존과학회
- 윤석봉. 2007. 논산 관촉사 석조문화재의 풍화훼손도 진단. 공주대학교 대학원 박사학위 논문.
- 윤윤경. 2003. 미생물에 의한 경주석탑의 훼손(1). 경주문화연구, vol 6
- 윤윤경. 2005. 우리나라 석탑과 부도에 분포하는 미생물에 관한 연구. 한국문화재보존과학회 제22회 학술대회발표논문집, 226-230

- 윤윤경. 2006관촉사 석조미륵보살입상에 나타난 생물분포에 관한 연구, 한국문화재보존과학회 제23회 학술대회발표논문집, 78-83
- 정용재, 서민석, 이규식, 한성희(2003), 석조문화재의 생물학적 손상과 보존방안. 보존과학연구 24집 5-28
- 한성희, 안희균(1990), 석조문화재의 생물학적 손상요인과 보존대책. 문화재 제 23호
- Anagnostidis, K., Economou-Amilli, A., Roussomoustakaki, M. 1983. Epilithic and chasmolithic microflora (Cyanophyta, bacillariophyta) from marble of the Parthenon (Akropolis-athens, Greece). *Nova Hedwigia* 38: 227-275.
- Burja,, A. M., Banaigs, B., Abou-Mansour E., Burgess J. G. Wright P. C. 2001. Marine cyanobacteria-prolific source of natural products. *Tetrahedron* 57: 9347-9377.
- Chazal, N. M. and Smith, G. D. 1994. Characterization of a brown Nostoc species form Java that is resistant to high light intensity and UV. *Microbiology* 140: 183-189.
- Crispim, C. A. and Gaylarde, C. C. 2004. Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: A review. *Microbial Ecol* 49: 1~9.
- Garcia-Pichel. F. F., Sherry, N. D., Castenholz, R. W. 1992. Evidence for ultraviolet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. *Photochem Photobiol* 56: 17-23.
- Gaylarde, P. M. and Gaylarde, C. C. 1998. A rapid method for the detection of algae and cyanobacteria on the external surfaces of buildings. In: Gaylarde, C. C. Barbosa, T. C. Barbilan, H. N. (eds): Proceedings of the Third Latin American Biodegradation and Biodeterioration Symposium. The Phycological Society, UK. Paper No. 37.
- Gaylarde, C. C., Gaylarde, P. M., Copp, J., and Neilan, B. 2004. Polyphasic detection of cyanobacteria in terrestrial biofilms. *Biofouling* 20: 71~79.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J., and Pace, N. R. 1988. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* 170: 3584-3592.
- Klochkova, T. A. and G. H. Kim. 2005. Ornamented resting spores of green alga, *Chlorella* sp., collected from the stone standing buddh statue at Jungwon Miruksazi in Korea. *Algae* 20: 295-298.
- Ortega-Calve, J. J., Hernandez-Marine, H., and Saiz-Jimenez, C. 1991. Biodeterioration of building stones by cyanobacteria. *International Biodeterioration* 28: 165-186.

- Ortega-Calvo, J. J., Arino, X., Hermander-Marine, M., and Saiz-Jimenez, C, 1995. Factors affecting the weathering and colorization of monuments by phototrophic microorganism. *Sci. Total Environ* 167: 329-341.
- Rippka R., Deruelles J., Watebury J. B., Herdman M., and Stanier, R. Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen Microbiol.* 111: 1-61.
- Turner, S. 1997. Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. *Plant Syst. Evol* Suppl. 11: 13-52.
- Whitton, B. A, 1992. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In: Mann, N. H, and Carr, N. G. (eds)Photosynthetic Prokaryotes, Plenum Press, New York, pp. 1-51.
- Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., Fox, G. E., Deinhard, G., and Pralla, K. 1992. Comparative sequence analyses on the 16S ribosomal RNA (rRNA) of *Bacillus acidocaldarisu*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation or a genus, *Alicyclobacillus gen nov.* *Int J. Syst Bacteriol* 42: 263-269.