

## Filter Plate Micro Trap as a Device for *in situ* Cultivation for Environmental Microorganisms

Dawoon Jung and Tae-Seok Ahn\*

Department of Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Received January 18, 2012 / Revised May 11, 2012 / Accepted June 4, 2012

Filter plate microbial trap (FPMT) was invented as an *in situ* cultivation device for the isolation of bacteria from natural environments. FPMT consists of a medium and membrane filters (0.45  $\mu\text{m}$  pore size) and microorganisms and compounds can be moved freely into the medium. This device was applied to two soil samples of Greenland. The microbial diversity of both soil samples by FPMT was higher than that by the conventional Petri dish-based method. Moreover, novel bacterial species were isolated by FPMT. The new FPMT is effective for *in situ* cultivation of natural samples and could be applicable to the isolation of uncultivable microorganism.

**Key words** : Cultivation device, *in situ* cultivation, microbial diversity, uncultivable bacteria

### 서 론

미생물의 생리학적 특성을 파악하여 생태학적 지위와 기능을 이해하고, 더 나아가서 이들의 특성을 활용하고 산업적으로 이용하기 위해서는 환경으로부터 미생물을 분리, 배양하는 것이 필수적이다. 그러나 자연계에 존재하는 대부분의 미생물은 통상적인 실험실 배양방법으로 배양이 되지 않는다[2,15]. 이러한 사실은 배양되는 CFU (Colony Forming Unit)와 직접 계수했을 때의 미생물 수에 큰 차이가 있음을 파악함으로써 밝혀졌으며[4,9], 근래에는 분자생물학이 크게 발전함에 따라 대부분의 자연계에 존재하는 미생물이 현재의 기술로 배양되지 않는 난배양성 미생물인 것이 밝혀졌다[10,24,25].

이러한 난배양성 미생물의 배양을 위한 방법으로 배양성을 증진시킬 수 있는 첨가물질의 추가[7,8], 저농도 영양물질이 포함된 빈영양 배지의 사용[1,16,17] 및 미생물의 배양 시간을 늘리는 등[12,23]의 다양한 방법들이 시도되었지만 환경에 존재하는 대부분의 미생물들의 상당수가 여전히 현존하는 배양 방법으로는 배양되지 않는 것으로 알려져 있다[6].

요즘 새롭게 개발되고 있는 방법 중 하나인 *in situ* 배양기술은 미생물이 성장하는데 필수요소인 현장의 여러 화합물질을 자유롭게 교환할 수 있게 함으로써 난배양성 미생물의 배양을 유도하는 방법으로, 대표적인 방법으로는 diffusion Chamber [5,6,18], hollow-Fiber membrane chamber 등[3]이 있으며 그 결과 난배양성 미생물을 배양하는데 효과를 나타내었다. 하지만 아직까지 개발된 *in situ* 배양방법의 종류가 적고, 다른 방법과 비교해 제작과 배양과정이 복잡한 단점이 있어서 지속적인 *in situ* 배양방법의 개발과 향상이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 난배양성 미생물의 배양과 보다 다양한 미생물의 분리를 위하여 새로운 trap 형식의 filter plate micro trap (FPMT) 장치를 이용한 *in situ* 배양방법을 개발하였다. FPMT는 토양이나 저질토 같은 시료 위에 설치하여 미생물의 유입을 트랩(trap)과 같이 유도하는 장치로 하단에 설치된 0.45  $\mu\text{m}$  필터로 인해 적절한 수의 미생물이 유입되는 동시에 그들이 자라는데 필요한 현장의 화합물질들이 교환될 수 있게 설계하였다. 그리고 새로운 방식의 *in situ* 배양기술인 FPMT를 Greenland의 2가지 토양에 적용하여 미생물을 배양하였으며 통상적인 Petri dish 배양방법과 배양결과를 비교하여 그 효율성을 확인하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료채취

Greenland의 Thule 인근 두 지점(76° 32' 52. 83"N, 68° 34' 02. 02"W), (76° 33' 21. 92"N, 68° 39' 06. 41"W)에서 2010년 8월에 시료를 채취하였다. 첫 번째 지점의 토양시료는 표토에 식물 등이 거의 존재하지 않는 지역에서 채취하였으며 입자크기가 작은 sand의 형태였으며(Sand 지점으로 명명), 두 번째 지점의 토양에는 식생이 잘 발달하였고 토양입자가 silt 형태로 수분을 많이 포함하고 있었다(Silt 지점으로 명명).

#### 배지의 조성

통상적인 Petri dish 배양방법과 FPMT에 사용된 배지는 100분의 1로 희석된 Nutrient Broth 이었다. Agar를 Petri dish 방법에는 1.5%, FPMT 방법에는 0.7% 첨가하였다.

Filter plate microbial trap (FPMT)의 제작

FPMT는 토양시료 위에 설치되어 장치의 하부를 통해 미생

#### \*Corresponding author

Tel : +82-33-250-8574, Fax : +82-33-251-3991

E-mail : ahnts@kangwon.ac.kr

물이 유입되도록 유도하는 구조를 가지고 있다. 96 well UNIFILTER filtration microplate (Whatman No 7700-1806, Germany)를 본체로 사용하였다(Fig. 1A). UNIFILTER filtration microplate는 가로 12.4 cm 세로 8.1 cm 높이 3 cm의 polystyrene 소재이며, 96개(8×12)의 독립된 원통형 공간을 가지고 있으며 각 공간에 최대 약 800 µl 액체를 넣을 수 있다. 이 독립된 공간을 미생물을 배양하는 chamber로 사용하였다. 각각의 chamber는 윗부분은 개방되어 있고 바닥에는 0.45 µm pore size의 친수성(hydrophilic) Polyvinylidene fluoride (PVDF) 필터가 장착되어 있다. 필터 밑으로 각 chamber 당 지름 1 mm 크기 한 개의 구멍이 있는 밀판이 부착되어 있어 토양시료가 필터에 과도하게 접촉되지 않도록 되어있다(Fig. 1B). FPMT의 제작을 위하여 UNIFILTER filtration microplate를 클린벤치 안에서 자외선에 24시간 노출시킨 후 멸균된 배지(100분의 1로 희석한 Nutrient Broth, 0.7% agar)를 각 chamber 당 500 µl씩 넣어주었다. Negative control은 밀판구멍을 방수접착제(3M, USE)를 이용하여 막은 것을 사용하였다. FPMT의 상부에는 공기의 통과가 가능한 cover를 덮어 주어 상부로부터 오염을 막아주었다.

**균주의 배양 및 분리**

토양시료를 가로 40 cm, 세로 30 cm, 높이 30 cm 크기의 밀폐용기 안에 10 cm 깊이로 채운 후 그 위에 제작한 FPMT를 3주일 동안 설치하였다. 밀폐용기를 저온 배양기에 넣어 현상 온도로 유지하였고 하루에 한번씩 멸균된 3차 증류수를 공급하여 토양시료의 습도를 유지하였다. 3주 후 FPMT를 꺼내 cover를 제거한 후 멸균된 loop를 이용하여 각 chamber의 배

지를 상부로부터 약 5 mm 깊이에서 채취하였다. 채취한 배지를 3 ml 멸균 증류수에 넣은 후 30분 동안 vortex하고, 100 RCF (×g) 속도에서 1분간 원심 분리하여 agar 조각을 침전시켰다. 상등액을 채취하여 연속적으로 희석한 후 agar plate에 평판 도말하여 재 배양하였다. 배양 후 형태와 크기가 다른 colony를 지점당 30개 선별하여 순수 분리하였다. FPMT와 결과 비교를 위하여 보통의 Petri dish 배양을 진행하였다. 채취한 토양시료 1 g을 멸균 증류수 10 ml에 넣은 후 30분 동안 vortex하였다. 상등액을 채취하여 10배씩 연속적으로 희석한 후 10<sup>2</sup>~10<sup>5</sup>로 희석한 것을 nutrient agar 배지에 0.1 ml 평판 도말하여 3주일간 배양하였다. 배양 후 형태와 크기가 다른 colony를 지점당 30개 선별하여 순수 분리하였다.

**분리된 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석**

분리한 균주를 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. 균주의 colony를 colony direct PCR을 위한 template로 사용하였으며, 만약 colony direct PCR이 실패했을 경우 QIAGEN tissue kit (QIAGEN, Valencia, USA)를 이용하여 DNA를 추출한 후 다시 PCR과정을 진행하였다. 16S rRNA 유전자를 Universal primer (27F; 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 1492R; 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 이용하여 증폭하였으며 그 과정에서 Hot Start Taq system (QIAGEN, Valencia, USA)을 이용하였다. 증폭 생성물은 MACROGEN (Maryland, MD, USA)에 sequencing 분석을 의뢰하여 염기서열 분석을 하였으며 BLAST를 이용하여 (www.ncbi.nlm.nih.gov) databases에 수록된 염기서열들과의 유사도를 비교 분석하여 유전적 거리가 가장 가까운 균주

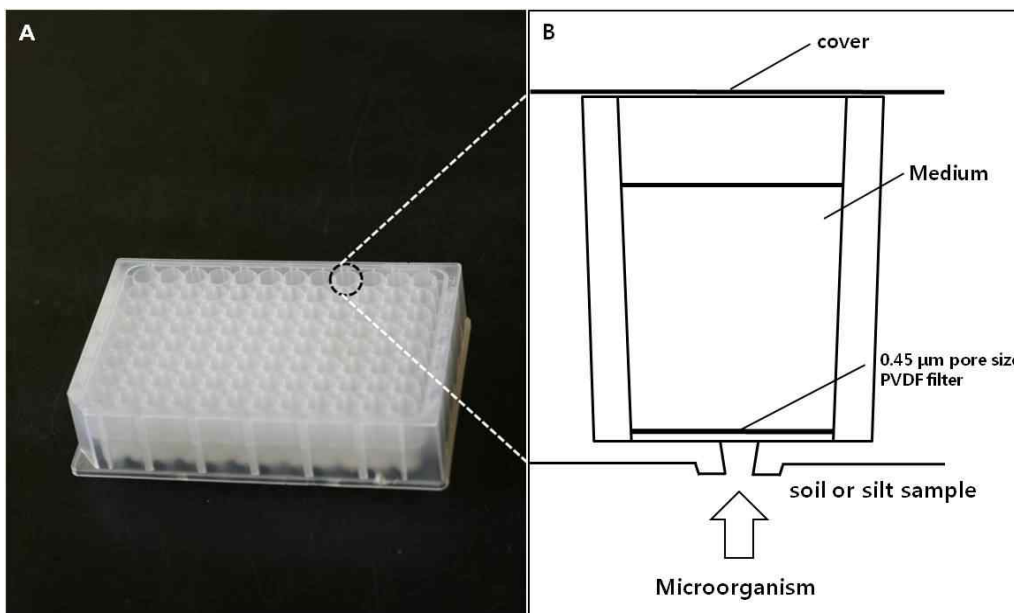


Fig. 1. Photograph of the UNIFILTER filtration microplate (A) and schematic diagram of one well of FPMT (B).

(closest species)를 찾았다.

분리한 균주의 다양성 분석

각각의 배양방법에 따른 분리한 균주들의 다양성을 비교하기 위하여 환경 Shannon weaver diversity index, Shannon weaver evenness index, Simpson diversity index를 구하였다 [20,22].

결 과

각 배양방법으로 분리한 세균의 16S rRNA 동정

두 종류의 토양시료로부터 각각 60개씩(통상적인 Petri dish 배양방법 30개, FPMT 30개) 균주를 분리하여 동정하였다. FPMT를 이용한 *in situ* 배양기술의 효율성을 확인하기 위하여 시료 한 지점당 통상적인 Petri dish 배양방법으로 30 균주, FPMT 배양 방법으로 30 균주를 분리 동정하여 각각의 결과를 비교하였다. Petri dish 배양방법으로 sand지점에서 *Arthrobacter oryzae*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Pseudomonas migulae*, *Pseudomonas lini*, *Pseudomonas mandelii* 5가지 종의 균주를, silt 지점에서 *Arthrobacter nitroguajacolicus*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Flavobacterium saccharophilum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Pseudomonas mandelii* 6 가지 종의 균주를 분리한 반면에(Table 1), FPMT 배양 방법으로 sand지점에서 *Janthinobacterium agaricidamnorum*, *Massilia niabensis*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Pseudomonas mandelii*, *Rugamonas rubra*, *Pedobacter caeni* 7가지 종의 균주를, silt 지점에서 *Duganella zooglooides*, *Janthinobacterium agaricidamnorum*, *Massilia niabensis*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Flavobacterium saccharophilum*, *Pseudomonas antarctica*, *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas meridian*, *Rugamonas rubra*, *Pedobacter caeni* 11가지 종의 균주를 분리하였다(Table 2).

각 배양방법으로 분리한 균주의 다양성

분리한 미생물의 다양성을 보았을 때 두 방법간에 큰 차이가 있음을 확인하였다. Sand 지점에서 통상적인 Petri dish 방법으로부터 3개의 phyla에 속한 5개 종을 분리 하였으며 FPMT 방법으로 4개의 phyla에 속한 7개 종을 분리할 수 있었다. Silt 지점에서는 Petri dish 방법으로 3 phyla에 속한 6개의 종을, FPMT 방법으로 4개 phyla에 속한 11개의 종을 분리할 수 있었다. 이러한 결과는 FPMT를 이용한 *in situ* 배양 방법이 통상적인 Petri dish 배양방법과 비교했을 때 훨씬 다양한 미생물을 분리 할 수 있다는 것을 나타낸다. 객관적으로 두 가지 방법간의 다양성 비교를 하기 위하여 환경 다양성 지표로 많이 사용되는 Shannon weaver diversity index, Shannon weaver evenness index 및 Simpson diversity index를 구하였다(Table 3). Sand 지역에서 통상적인 Petri dish 방법에 의해 분리된 세균의 Shannon weaver diversity index는 4.19이고 FPMT 방법에 의해 분리된 세균의 diversity index는 5.96으로 후자에 의한 방법이 약 1.4배 높게 나타났다. Silt 지역에서 Petri dish 방법과 FPMT 방법에 의해 분리된 세균의 Shannon weaver diversity index는 각각 3.74, 9.56으로 FPMT 방법으로 분리한 세균의 다양성 지표값이 2.6배 높게 나타났다. Shannon weaver diversity index 와 마찬가지로 Simpson diversity index도 Sand 지점에서 FPMT 방법의 값이 Petri dish 방법의 값보다 1.1 배 높게 나타나고, silt 지점에서 FPMT 방법의 값이 Petri dish 방법의 값 보다 1.3 배 높게 나타났다. 따라서 FPMT 방법으로 분리한 세균의 다양성 지표값이 통상적인 Petri dish 방법보다 높게 나오는 것을 확인 할 수 있는데 이러한 결과는 FPMT 방법을 이용하여 미생물을 분리할 경우 더욱 다양한 미생물을 분리할 수 있다는 것을 나타낸다.

난배양성 미생물의 배양

두 지점에서 각각의 배양방법에 의해 분리된 균주의 염기서열 분석결과로(www.ncbi.nlm.nih.gov) databases에 수록된 염기서열들과의 유사도를 구하고, 그 분포를 Fig. 2에 나타내었다. 두 지점 모두에서 통상적인 Petri dish 방법으로 분리한

Table 1. Phylogenetic affiliations of isolates with Petri dish on the basis of 16S rRNA gene sequences

Site	Taxonomic group	Closest species	% Similarity	No. of isolates
Sand	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter oryzae</i>	98-99	4
	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	98	5
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	99	2
		<i>Pseudomonas lini</i>	98-99	13
		<i>Pseudomonas mandelii</i>	100	6
Silt	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	98-100	2
	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	98-99	13
		<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	99	2
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	1
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	100	1
		<i>Pseudomonas mandelii</i>	99-100	11

Table 2. Phylogenetic affiliations of isolates with FPMT on the basis of 16S rRNA gene sequences

Site	Taxonomic group	Closest species	% Similarity	No. of isolates
Sand	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	97	2
		<i>Massilia niabensis</i>	96-98	5 (4)
	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	98	5
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	99-100	3
		<i>Pseudomonas mandelii</i>	98-100	10
		<i>Rugamonas rubra</i>	97	2 (2)
	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Pedobacter caeni</i>	99	3
Silt	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Duganella zoogloeooides</i>	97	2 (2)
		<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	96	1 (1)
		<i>Massilia niabensis</i>	96-97	5 (5)
	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	99	3
		<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	99	1
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas antarctica</i>	100	3
		<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	100	2
		<i>Pseudomonas mandelii</i>	98-100	3
		<i>Pseudomonas meridian</i>	98-100	5
		<i>Rugamonas rubra</i>	96-98	4 (3)
	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Pedobacter caeni</i>	99	1

The number in parentheses shows the number of similarity 97 and below.

Table 3. Diversity of isolates

Sample type and method	N <sup>a</sup>	n <sup>b</sup>	n/N	H <sup>c</sup>	1-D <sup>d</sup>	E <sup>e</sup>
Sand						
Petri dish	30	5	0. 17	4. 19	0. 75	2. 60
FPMT	30	7	0. 23	5. 96	0. 83	3. 06
Silt						
Petri dish	30	6	0. 20	3. 74	0. 69	2. 09
FPMT	30	11	0. 37	9. 56	0. 91	3. 99

<sup>a</sup> Total number of isolates.

<sup>b</sup> Number of OTUs.

<sup>c</sup> Shannon-Weaver diversity index, calculated as follows:  $H = -\sum(p_i) (\ln p_i)$ , where  $p_i$  is the proportion of each phylogenetic group to  $n$ .

<sup>d</sup> Simpson diversity index, calculated as follows:  $D = -\sum \frac{[n(n|1)]}{[N(N|1)]}$

<sup>e</sup> Evenness, calculated as follows from the Shannon-Weaver index:  $E = H/\ln n$ .

균주는 97% 이하의 유사도를 나타내는 종이 전혀 없는 것으로 나타났다. 반면에 FPMT 장치로 배양한 균주 중에서는 Sand 지역에서 8 균주(27%)가, silt 지역에서 11 균주(37%)가 97% 이하의 유사도를 갖는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 FPMT를 이용한 *in situ* 배양기술이 통상적인 Petri dish 방법과 비교했을 때 난배양성 미생물을 훨씬 높은 비율로 분리할 수 있다는 것을 나타낸다.

### 고 찰

각 배양방법으로 분리한 세균의 16S rRNA 동정

토양시료에 새로운 *in situ* 배양 기술인 FPMT를 적용한 결과, sand 지역에서 통상적인 Petri dish 방법으로 분리하지 못

한 *Janthinobacterium agaricidamnosum*, *Massilia niabensis*, *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Rugamonas rubra*, *Pedobacter caeni* 총 5종을 추가적으로 분리 할 수 있었고, silt 지역에서 Petri dish 방법으로 분리되지 않은 *Duganella zoogloeooides*, *Janthinobacterium agaricidamnosum*, *Massilia niabensis*, *Pseudomonas antarctica*, *Pseudomonas meridian*, *Rugamonas rubra*, *Pedobacter caeni* 총 7종을 추가적으로 분리 할 수 있었다 (Table 2). 이러한 결과는 두 가지 배양 방법으로부터 명확히 다른 종류의 세균을 분리 할 수 있음을 나타내며, FPMT를 이용한 *in situ* 배양 방법을 이용할 경우 Petri dish 방법과 비교하였을 때, 분리할 수 있는 미생물의 종류를 풍부하게 할 수 있다는 것을 나타낸다. 반면에 Petri dish 방법에서 배양되었지만 FPMT 방법에서 배양되지 않은 종도 비교적 적지만 존재하였

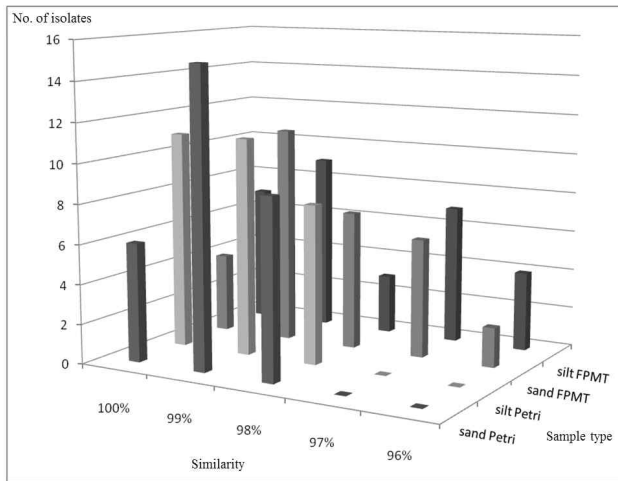


Fig. 2. Similarity of bacteria from sand and silt samples grown in Petri dish and FPMT.

다(Sand 지역: *Arthrobacter oryzae*, *Pseudomonas migulae*, *Pseudomonas lini*; Silt 지역: *Arthrobacter nitroguajacolicus*, *Pseudomonas fluorescens*). 이 종들은 모두 *Arthrobacter*와 *Pseudomonas* 속에 속하는 것으로 보통 이 속에 속한 종들은 상대적으로 성장(growth) 속도가 빠른 r-strategist에 해당하며 따라서 영양분의 공급이 충분한 실험실 배양환경에서 잘 배양되는 것으로 알려져 왔다[26]. 실험실 배양환경인 Petri dish 방법에서 분리된 위의 종들이 *in situ* 배양 기술인 FPMT에서 배양되지 않은 이유는 Petri dish 방법에서는 자라지 않은 균주들이 FPMT에서 자라면서 그 균주들과의 경쟁에 뒤져 배양되지 않은 것으로 사료된다. 따라서 다양한 환경에서 미생물을 분리할 때 상황에 따라 두 가지 방법을 동시에 사용하는 것도 효율적일 수 있을 것이라 판단된다.

통상적인 Petri dish 배양과 FPMT 배양 결과간에 큰 차이점 중 하나로 *Betaproteobacteria*에 속한 것이 전자의 방법에서 sand, silt 지점 모두에서 분리되지 않은 반면에 후자의 방법에서 Sand지점 7균주(23%), silt지점 8균주(27%)가 분리된 것을 확인할 수 있다. 일반적으로 *Betaproteobacteria*는 빈영양상태 (low-substrate concentration) [12,14], 휴면상태의 미생물을 깨우기 위해 신호물질을 첨가하는 경우(addition of signaling compounds) [7,8,13], 현장배양방법(*in situ* incubation) [6] 등의 배양환경에서 분리되는 것으로 알려져 왔다. 위에서 언급한 특수한 배양 방법들은 흔히 K-strategy라고 불리는 성장이 느린 빈영양을 선호하는 종(slower-growing oligotrophic species)에 맞는 환경을 제공하는데[5], 실제로 미생물이 존재하는 자연 환경은 충분한 영양분이 공급되는 실험실 환경이 아닌 빈영양 환경이므로 이러한 결과가 나왔다. 따라서 FPMT를 이용한 배양방법이 미생물들에게 그들이 존재하던 현장의 환경을 충분히 제공하고 있음을 확인하였고, 그 결과 실험실 환경, 즉 통상적인 Petri dish 배양에서는 분리할 수 없는 난배양성

미생물을 얻을 수 있다.

#### 각 배양방법으로 분리한 균주의 다양성

다양한 미생물을 효율적으로 분리하는 것은 특수한 배양방법을 사용하는 또 다른 이유이다. 특히 시료채취에 어려움이 있는 극한환경이나 오지 같은 곳에서 주어진 기회 안에 미생물 자원을 최대한 효율적으로 분리할 수 있다면 경제적, 시간 효율적으로 큰 효과를 얻을 수 있을 것이다. 시료를 채취한 Greenland의 Thule 지역은 연중 평균기온이  $-23\sim-4^{\circ}\text{C}$ 로 매우 극한환경을 가지고 있으며 따라서 그곳에서 서식하는 미생물은 새로운 종이거나 새로운 특징을 갖는 등 연구가치가 높을 것으로 판단된다. 하지만 이러한 극한환경을 갖는 곳은 접근이 어렵고 기회가 많지 않으므로 다양한 미생물을 분리할 수 있는 배양방법이 더욱 효과적일 것으로 판단된다.

이번 실험에서 FPMT를 이용해 분리한 세균의 다양성 지표는 통상적인 Petri dish 방법과 비교하여 1.1~2.6배 높게 나타났다. 이 결과는 FPMT를 이용한 배양 방법이 일반적인 방법과 비교하여 더 다양한 미생물을 분리할 수 있다는 것을 나타내는데 이것은 FPMT 배양방법이 일반적인 배양 방법과 차별되는 여러 특징을 갖고 있기 때문인 것으로 판단된다. 일반적으로 agar plate 배양방법에서 성장이 비교적 빠른 세균들은 배지의 표면에 biofilm을 생성하면서 넓은 범위로 자라고 그러한 현상이 비교적 성장이 느린 균들의 성장을 억제하는 것으로 알려져 왔다[5]. 하지만 FPMT 배양에서 미생물은 하단부로 유입되어 agar배지를 통과하여 올라가듯이 자라기 때문에 어느 한 종이 biofilm을 생성하여 성장이 약한 종들의 성장을 억제하는 타감 작용(allelopathy)이 나타나지 않았다고 볼 수 있다. 또한 여러 개로 독립된 FPMT의 chamber는 이러한 효과를 극대화 시킨 것으로 판단된다. 그밖에 *in situ* 배양에 의해 실험실 환경에서 자라지 않는 미생물이 FPMT에서 자랄 수 있었던 것도 미생물 다양성을 향상 시키는데 기여를 했으므로 사료된다.

#### 난배양성 미생물의 배양

환경에 존재하는 대부분의 미생물은 실험실에서 배양되지 않는 것으로 알려져 있다[2,15]. 실험실의 환경이 그들이 존재하는 환경과 다르기 때문에 대부분의 미생물들이 실험실에서 배양할 때 동면하는 생물처럼 휴면상태에 있기 때문이다[13]. 이러한 미생물은 분자생물학적인 기술이 발전함에 따라 더욱 명확하게 확인할 수 있게 되었으며[10,24,25], 난배양성 미생물로 분류되어 그것을 분리, 배양하기 위한 여러 가지 노력이 진행되고 있다[1,8,12,16,17,23]. 이번 실험에 사용한 FPMT를 이용한 *in situ* 배양기술은 그러한 노력 중 하나로 아래의 여러 가지 이유로 난배양성 미생물을 성공적으로 배양할 수 있었던 것으로 판단된다. 첫째 *in situ* 배양을 함으로서 미생물이 자라는데 영향을 주는 여러 물질들을 공급할 수 있었다. 다양

한 환경에 따라 미생물 성장에 큰 영향을 주는 유기, 무기 화학 물질이 존재하는데[18], FPMT는 이러한 화학물질이 하부의 0.45  $\mu\text{m}$  filter를 통해 유입될 수 있도록 하였고 따라서 난배양성 미생물이 자라는데 큰 역할을 하였을 것이다. 둘째로 FPMT 배양장치 하부의 좁은 입구와 0.45  $\mu\text{m}$  filter가 과도한 미생물의 유입을 막아 난배양성 미생물이 자라는데 방해가 되는 성장이 빠른 미생물의 다량 유입을 억제 할 수 있었던 것도 이유가 될 수 있었을 것이다. 성장이 빠른 r-strategy 미생물을 격리하여 난배양성 미생물을 분리, 배양하는 single cell (high throughput) 배양기술은 이미 그 효율성이 입증되었고 널리 사용되고 있는 방법이다[11,21]. 이번 실험에서 사용한 FPMT는 비록 single cell 배양기술처럼 엄격하게 미생물 개체를 분리하지는 않지만 1 mm의 좁은 토양시료가 접촉되는 부분과 0.45  $\mu\text{m}$  filter의 미생물이 통과하는 입구는 미생물의 유입을 최소화 시켰을 것이라 판단된다. 마지막으로 FPMT에서 발생하는 확산(diffusion)효과는 난배양성 미생물의 배양을 도왔을 것이다. FPMT 장치 하단의 0.45  $\mu\text{m}$  filter는 화학물질의 유입뿐만 아니라 배지의 영양분을 방출 시키는 작용을 하고 있다. 시간에 따라 감소되는 영양분의 농도는 빈 영양을 선호하는 K-strategy 미생물의 성장에 유리하게 적용되었을 것이고 난배양성 미생물이 K-strategy에 속하는 경우가 많다는 사실로 보았을 때[3], 이것은 난배양성 미생물을 분리할 수 있었던 원인이 되었을 것으로 사료된다.

#### 다른 *in situ* 배양 기술과 비교

본 실험에서 FPMT를 이용한 배양 기술은 난배양성 세균을 효율적으로 분리 하였을 뿐 아니라, 다른 *in situ* 배양기술과 비교하여 여러 장점을 나타내었다. 첫째, 이전 *in situ* 배양기술과 비교하여 그 절차를 간편하게 하였다. 이미 그 효율성을 입증한 대표적인 *in situ* 배양기술인 diffusion chamber, hollow-fiber membrane chamber 등의 경우 배양 초기단계에 환경에서 시료를 채취한 후 그 안의 세균 개체 수를 현미경으로 파악한 후 적절하게 희석하여 재 배양하는 과정을 가지고 있다. 하지만 FPMT의 경우 시료가 접촉되는 1 mm의 좁은 부분과 0.45  $\mu\text{m}$ 의 filter를 통해 현장에서 적절한 수의 미생물을 자동적으로 유입시키는 구조이므로 그러한 절차를 생략할 수 있어 배양방법이 비교적 간편화 되었다. 또한 소형화하여 한 장치에 다수의 chamber를 병렬로 배치함으로써 diffusion chamber와 같이 한 장소에 여러 개의 장치를 제작, 설치할 필요가 없다. 소형화 된 다수의 chamber를 보유한 *in situ* 배양 기술로는 hollow-fiber membrane chamber가 있으나 전체적인 장비의 크기가 매우 크고 특수한 필터를 사용하는 등 제작과 설치가 까다로워 FPMT를 이용한 배양방법이 훨씬 간편화된 것으로 판단된다. 둘째, FPMT의 독립된 chamber로 인해 다양한 배지를 적용할 수도 있다. 이번 연구에서는 한가지 종류의 배지만 사용하였지만 앞으로 여러 종류의 다양한 배지

를 FPMT에 적용할 수 있다. 예를 들어 현장환경에 따라 pH나 염분도 등을 다양하게 적용할 수도 있고, 목적이 되는 미생물을 배지를 다르게 하여 다양하게 배양할 수도 있다. 특히 난배양성 미생물 배양 방법에 사용되는 빈영양 배지와 gellan gum과 같은 gelling agent를 다르게 첨가한 배지[19] 및 현장시료 추출배지[1] 등을 다양하게, 동시에 FPMT에 접촉시킨다면 난분해성 미생물 분리를 위한 큰 시너지 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

#### 감사의 글

이 연구는 한국연구재단의 한독 IRDG사업(TERRECO)과 환경부의 환경산업전문인력양성사업의 지원으로 수행되었습니다.

#### References

1. Aagot, N., Nybroe, O., Nielsen, P. and Johnsen, K. 2001. An altered pseudomonas diversity is recovered from soil by using nutrient-poorpseudomonas-selective soil extract media. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5233-5239.
2. Amann, R. L., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
3. Aoi, Y., Kinoshita, T., Hata, T., Ohta, H., Obokata, H. and Tsuneda, S. 2009. Hollow-fiber membrane chamber as a device for *in situ* environmental cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3826-3833.
4. Barer, M. R., Harwood, C. R. and Poole, R. K. 1999. Bacterial viability and culturability, pp. 93-137, *Adv. Microb. Physiol.*, Academic Press.
5. Bollmann, A., Lewis, K. and Epstein, S. S. 2007. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6386-6390.
6. Bollmann, A., Palumbo, A. V., Lewis, K. and Epstein, S. S. 2010. Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7413-7419.
7. Bruns, A., Cypionka, H. and Overmann, J. 2002. Cyclic amp and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central baltic sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3978-3987.
8. Bruns, A., Nubel, U., Cypionka, H. and Overmann, J. 2003. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1980-1989.
9. Bussmann, I., Philipp, B. and Schink, B. 2001. Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. *J. Microbiol. Methods* **47**, 41-50.
10. Christen, R. 2008. Global sequencing: A review of current

- molecular data and new methods available to assess microbial diversity. *Microbes Environ.* **23**, 253-268.
11. Cannon, S. A. and Giovannoni, S. J. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3878-3885.
  12. Davis, K. E., Joseph, S. J. and Janssen, P. H. 2005. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 826-834.
  13. Epstein, S. S. 2009. Microbial awakenings. *Nature* **457**, 1083-1083.
  14. Ferrari, B. C., Binnerup, S. J. and Gillings, M. 2005. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8714-8720.
  15. Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 669-685.
  16. Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M. and Sait, M. 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions acidobacteria, actinobacteria, proteobacteria, and verrucomicrobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2391-2396.
  17. Joseph, S. J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C. A. and Janssen, P. H. 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7210-7215.
  18. Kaerberlein, T., Lewis, K. and Epstein, S. S. 2002. Isolating "Uncultivable" Microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**, 1127-1129.
  19. Lin, C. C. and Casida, L. E. 1984. Gelrite as a gelling agent in media for the growth of thermophilic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 427-429.
  20. Smith, B. and Wilson, J. B. 1996. A consumer's guide to evenness indices. *Oikos* **76**, 70-82.
  21. Song, J., Oh, H.-M. and Cho, J.-C. 2009. Improved culturability of sar11 strains in dilution-to-extinction culturing from the east sea, west pacific ocean. *FEMS Microbiol. Lett.* **295**, 141-147.
  22. Spellerberg, I. F. and Fedor, P. J. 2003. A tribute to claude shannon (1916-2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the 'shannon - wiener' index. *Global Ecol. Biogeogr.* **12**, 177-179.
  23. Stevenson, B. S., Eichorst, S. A., Wertz, J. T., Schmidt, T. M. and Breznak, J. A. 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4748-4755.
  24. Streit, W. R. and Schmitz, R. A. 2004. Metagenomics-the key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 492-498.
  25. Wagner, M., Nielsen, P. H., Loy, A., Nielsen, J. L. and Daims, H. 2006. Linking microbial community structure with function: Fluorescence *in situ* hybridization-microautoradiography and isotope arrays. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 83-91.
  26. Watve, M., Shejval, V., Sonawane, C., Rahalkar, M., Matapurkar, A., Shouche, Y., Patole, M., Phadnis, N., Champhenkar, A., Damle, K., et al. 2000. The 'k' selected oligophilic bacteria: A key to uncultured diversity? *Curr. Sci.* **78**, 1535-1542.

## 초록 : 환경시료에 존재하는 미생물 배양을 위한 filter plate micro trap의 개발

정다운 · 안태석\*

(강원대학교 환경학과)

난배양성 미생물의 배양과 보다 다양한 미생물의 분리를 위하여 Filter plate microbial trap (FPMT)을 개발하였고, 이 장치를 사용하여 Greenland의 토양에서 세균을 분리하였다. FPMT는 배지와 하단부의 membrane filter (0.45 µm pore size)로 구성되어 있다. 시료에 포함된 세균과 화학물질이 FPMT 내로 이동하고, 세균이 증식하는 원리이다. 그 결과, FPMT를 이용한 새로운 *in situ* 배양방법을 통해 통상적인 Petri dish 배양방법보다 더 많은 종과 기존의 방법으로는 배양할 수 없는 세균을 분리하였다. 이 장치는 앞으로 다양한 환경에서 난배양성 미생물을 분리하는데 유용함을 확인하였다.