

몇가지 저온성유기질분해균들의 분리와 동정

변설경, 김철성, 김동률, 문혜경

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《수력을 위주로 하면서 화력에 의한 전력생산을 합리적으로 배합하고 원자력발전의 비중을 높이며 다양한 자연에너지원전을 적극 리용하여 국가적인 에너지수요를 자체로 충족시켜야 합니다.》(《조선로동당 제7차대회에서 한 중앙위원회사업총화보고》 단행본 47페이지)

최근 메탄가스생산에서 가장 중요하게 제기되는 문제는 대기온도가 낮은 겨울철에 메탄생성량을 늘일수 있는 과학기술적문제들을 해결하는것[3, 4]이다.

우리는 유기질분해능력이 높은 저온성균주들을 분리, 동정하여 메탄발효를 개선하기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

우리 나라의 겨울철, 이른 봄철의 토양시료와 북극가까이에 위치한 노르웨이 앞바다의 섬(Svalbard Archipelago, Norway(N 78°))토양시료를 저온성토양세균분리원으로 리용하였다.

세균분리온도는 8℃로 하였고 리용한 배지는 R2A배지(효모엑스 0.5g, 프로테오즈펩톤 0.5g, 카자미노산 0.5g, 텍스트로즈 0.5g, 가용성농마 0.5g, 피루빈산소다 0.3g, K₂SO₄ 0.3g, MgSO₄ 0.05g, 우무 15.0g, 증류수 1L, pH 7.2)와 TSA배지(펩톤 17.0g, 콩펩톤 3.0g, 포도당 2.5g, NaCl 5.0g, K₂HPO₄ 2.5g, 우무 16g, 증류수 1L, pH 7.3)이다.[2]

선택평판배지에서의 분해피를 조사하는 방법[3]으로 분리균주들중에서 농마분해능, 단백질분해능, 유기태린분해능이 높은 균주들을 선발하였다.

선발균주의 동정에 16S rRNA염기배열분석법에 의한 세균동정기술[1]을 리용하였다.

실험기구로는 PCR장치(《Eppendorf》), 전기영동장치(《Mupid-2plus》), 영동겔화상입력장치(《ZF-90》), 광학현미경(《Olympus BX51》) 등을 리용하였다.

PCR를 위한 전문시약으로서 Premix(Taq폴리메라제, Mg²⁺, dNTP, PCR완충액이 함께 들어있음)를 리용하였으며 프라이머들은 다음과 같다.

상류프라이머(27F): GAGTTTGATCCTGGCTCAG

하류프라이머(1492R): TACGGTTACCTTGTACGACTT

PCR는 예비변성 94℃ 10min→변성 94℃ 1min, 아닐링 53℃ 1min, 늘이기 72℃ 1min, 33회전→최종늘이기 72℃ 10min으로 하였다.

분석에 리용한 프로그램들은 ChromasPro.exe, MEGA4.0.exe, Clustal-X.exe, Primer premier, Vector NTI 등이다.

결과 및 논의

우리 나라의 겨울철, 이른 봄철의 토양시료와 북극가까이에 위치한 노르웨이 앞바다의 섬토양시료에서 분리한 각이한 유형의 균주들가운데서 배양온도 8℃에서 비교적 잘 자라는 균주들을 골라 해당한 검사배지들에서 분해피직경/균무지직경 값을 조사하는 방법으로 농마분해능, 단백질분해능, 유기태린분해능을 조사하였다.(표 1-3)

표 1. 분리균주들의 농마분해능

균주번호	분리원	균무지직경 (A)/mm	분해피직경 (B)/mm	B/A
08	갈색발토양*, 겨울철(1월)시료	1.5	1.7	1.13
14	갈색발토양*, 이른 봄철(3월)시료	1.7	1.9	1.12
60	북극토양시료	2.0	3.0	1.50
93	북극토양시료	4.5	6.5	1.44

* 평양시 사동구역 장천남새전문협동농장 토양, 배양온도 8℃, 농마-우무평판배지에서 9d동안 배양

표 2. 분리균주들의 카제인분해능

균주번호	분리원	균무지직경 (A)/mm	분해피직경 (B)/mm	B/A
60	북극토양시료	11.0	18.0	1.64
76	"	3.0	4.0	1.33
93	"	3.5	6.0	1.71
105	"	5.0	10.0	2.00

배양온도 8℃, 카제인-우무평판배지에서 9d동안 배양
능과 단백질분해능검토배지에서 다같이
비교적 잘 자랐다.

표 3으로부터 유기태린분해활성이
높은 균주들은 No. 53, 106, 105, 76번
균주라는것을 알수 있다.

이와 같은 실험결과들에 기초하여
농마, 단백질, 유기태린분해능이 높은
균주들로서 No. 53, 60, 93, 105, 106을
선발하였다.

선발된 균주들의 형태배양학적특성
은 표 4와 같다.

표 1에서 보는바와 같이 농마분해

활성이 높은 균주들은 No. 60, 93번으
로서 분해피직경 대 균무지직경의 비가
1.50, 1.44였다.

표 2의 결과로부터 단백질분해활성
이 높은 균주들은 No. 105, 93, 60이었
으며 No. 60, 93번 균주들은 농마분해

표 3. 분리균주들의 유기태린분해능

균주 번호	분리원	균무지직경 (A)/mm	분해피직경 (B)/mm	B/A
41	북극토양시료	6.0	7.0	1.17
51	"	6.0	7.0	1.17
53	"	4.5	8.0	1.78
64	"	6.0	7.5	1.25
73	"	7.5	10.0	1.33
76	"	8.0	11.0	1.38
105	"	5.0	7.0	1.40
106	"	7.0	11.0	1.57

배양온도 8℃, 유기태린분해능검토평판배지에서 9d
동안 배양

표 4. 선발균주들의 형태배양학적특성

균주번호	형태학적특징	배양학적특징
53	작은막대모양, Gr ⁻ 동근형, 연한 미색, 매끈하고 불록함, 광택약함, 점성약함, ϕ 1~2mm	
60	" 동근형, 흰색, 매끈하고 불록함, 광택약함, 점성약함, ϕ 1~2mm	
93	" 동근형, 연한 미색, 매끈하고 불록함, 광택약함, 점성약함, ϕ 1~3mm	
105	" 동근형, 연한 미색, 매끈하고 불록함, 광택약함, 점성약함, ϕ 2~3mm	
106	" 동근형, 연한 미색, 매끈하고 불록함, 광택약함, 점성약함, ϕ 2~3mm	

배양조건: R2A 평판배지, 8℃, 7d

16S rRNA염기배열분석법에 의한 세균동정기술[2, 3]을 리용하여 선발균주들을 동정하였다.

먼저 균주들의 16S rRNA염기배열증폭을 위해 핵산을 추출하였다. 1.5mL들이 에펜도프관에 무균수 1mL를 넣고 균을 한백금이 떠넣은 다음 현탁기에서 잘 현탁하여 12 000r/min에서 2min간 원심분리하였다. 상층액을 찌워버리고 무균수를 1mL 넣은 다음 우와 같이 현탁, 원심분리하였다. 다시 상층액을 찌워버리고 무균수 100 μ L를 넣은 다음 현탁기에서 잘 현탁하고 100 $^{\circ}$ C 끓는 수욕에서 20min동안 끓였다. 에펜도프관을 끓는 수욕에서 꺼내어 찬물속에서 팽각시킨 후 12 000r/min에서 2min간 원심분리하였다. 상층액을 3 μ L씩 취하여 16S rRNA유전자염기배열증폭을 위한 PCR의 시료로 리용하였다. 150 μ L들이 PCR관에 Premix 25 μ L, 증류수 20 μ L, 상류프라이머 1 μ L, 하류프라이머 1 μ L 그리고 우에서 준비한 시료 3 μ L를 넣는 방법으로 반응액을 각각 준비한 다음 PCR장치에 넣어 반응을 시켰다.

영동결화상입력장치에서 16S rRNA염기배열증폭띠를 확인하고 전문기관에 의뢰하여 염기배열을 분석하였다.

16S rRNA염기배열자료들을 인터넷상에서 세계 모든 세균들의 16S rRNA염기배열자료들(EzTaxon server 2.1(<http://147.47.212.35:8080/>) 혹은 Ezbiocloud([http://www. Ezbiocloud.net/](http://www.Ezbiocloud.net/)), NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>))과 비교하여 종검색을 진행한 결과는 표 5와 같다.

표 5. 16S rRNA염기배열분석법에 의한 선발균주들의 종검색

균주번호	비교되는 종 이름 및 등록번호	상동률/%
53	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> JAJ28(T)	99.928
60	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> ACC 27013(T)	99.776
93	<i>Chryseobacterium gregarium</i> P461/12(T)	99.715
105	<i>Pseudomonas mandelii</i> CIP 105273(T)	99.697
106	<i>Pseudomonas baetica</i> a390(T)	99.859

표 5에서 보는바와 같이 16S rRNA염기배열분석법으로 분석한 선발균주 No. 53, 60, 93, 105, 106의 분류학적위치는 각각 *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*, *Chryseobacterium gregarium*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas baetica*로 밝혀졌다.

맺 는 말

농마분해능, 단백질분해능, 유기태린분해능이 높은 5개의 저온성균주들을 분리하고 형태배양학적특성들을 밝혔다.

16S rRNA염기배열분석자료에 의하면 이 균주들은 *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*, *Chryseobacterium gregarium*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas baetica*였다.

참 고 문 헌

- [1] 김동률 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 2, 59, 주체103(2014).
- [2] N. R. Krieg et al.; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 4, Springer, 1~56, 2010.
- [3] J. P. Harley; Laboratory Exercises in Microbiology, Springer, 37~186, 2005.
- [4] 焦迎春 等; 环境科学与技术, 36, 6L, 26, 2013.

주체105(2016)년 11월 5일 원고접수

Isolation and Identification of Organic Substance Decomposing Some Strains in Low Temperature

Pyon Sol Gyong, Kim Chol Song, Kim Tong Ryul and Mun Hye Gyong

Isolation and identification of microorganisms with high resolution on organic substances in low temperature are very important to continue the methane fermentation in winter.

In this study, we isolated 5 strains with high resolutions on starch, protein, organic phosphorus in low temperature and defined their morphological cultural characteristics. And then we determined their scientific names were *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*, *Chryseobacterium gregarium*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas baetica* by 16S rRNA sequencing.

Key words: methane fermentation, low temperature fermentation