

김치 및 김에서 分離한 好氣性 細菌의 同定에 關하여

Identification of the Aerobic Bacteria Isolated from Kimchi and Laver

金 浩 植 · 鄭 允 秀

서울大學校農科大學 農化學研究室
國防部科學研究所 微生物學研究室

Dept of Agricultural Chemistry, Seoul National University,
Bacteriological Laboratory

(1962年 8月 25日 受理)

黃等⁽¹⁾은 沈菜類의 細菌學的研究에서 分離한 D-28, D-28a의 兩菌株는 *Pseudomonas sp* 일것이라고 報告한바 있었다. 太等⁽²⁾은 김에서 分離한 88-3菌株가 Vitamin B₁₂ 生産性이 強力함을 發表하였으며 이와 同時에 黃等⁽³⁾은 이 88-3菌株는 김치에서 分離한 好氣性細菌인 D-1, D-4, D-7, 및 D-22와 同一菌으로서 亦是 *Pseudomonas sp*, 에 屬할것이라고 提唱하였었다. 但 Vitamin B₁₂ 生産性에 있어서는 김치에서 分離한 菌株들이 88-3보다는 매우 劣等하여 不過4/1에 지나지않음도 아울러 發表하였었다. 그後 이들 菌株들을 얼마동안 保存하여 두었다가 確實한 分類學的位置를 定하려고 再檢討한 實驗結果는 前에 發表한것과 相異되는點이 있으므로 이를 是正할겸 아래와같이 報告하는 바이다.

實 驗

1. 使用菌株

本實驗에 使用한 菌株는 김치에서 分離한 橙黃色色素生成의 D-28, D-28a와 김치에서 分離한 Vitamin B₁₂ 生産性의 88-3이였으며 同定하는 標準菌株로는 California大學 (Darvis)에서 分讓받은 *Bacillus megaterium* 425, 同 425-1, 同 425-2 (以下 各各 425, 425-1, 425-2라 略稱함)과 美國農務省農產物利用研究所 (Peoria, Illinois)에서 分讓받은 Vitamin B₁₂ 生産性의 *B. megaterium*

NRRL-B 938 (以下 NRRL-B 938이라 略稱함) 등이였었다.

2. 使用培地

使用한 培地의 組成은 다음과같다.

Medium I : Beef Extract 0.3%, Peptone 0.5%
Agar 1.5%

Medium II : Yeast Extract 0.3% Tryptone 0.5%
%, Glucose 0.1% Agar 1.5%

Medium III : Peptone 0.5%, K₂HPO₄ 0.5%
Glucose 0.5%

3. 培養試驗

a) 이들 세 菌株의 發育適溫은 Medium I에서 28-35°C 사이였으며 最適pH는 Medium II에 있어서 6.5-7.0 사이였었다.

b) Medium II에서 88-3은 接種後 20時間까지는 白色의 菌體를 維持하였으나 20時間이 지나면 漸次色素生成을 始作하여 菌體의 빛같이 김색과같은 엷은 紫色으로 되었다.

c) D-28, D-28a의 兩菌株는 같은 Medium II에서 接種後 5時間까지는 Streak culture한 것보다 Stab culture한것이 빠르게 Stab line에 生育하였으며 12時間이 지나면 橙色素를 生成하기 始作하며 20時間이 經過하면 Slant面은 全部 橙黃色으로 變化하였다. D-28은 同一條件에서 D-28a보다 色素生成이 더 迅速하며 또한 色相도 더 짙었었다.

4. 培養特性試驗

a) 菌體의 크기와 孢子形成能 및 Gram染色에 對한 觀察結果는 Table 2와 같다. 이表에서 特히 注目할點은 이들 菌株가 다-Gram陽性이며 Möller法으로 染色한 結果가 孢子形成菌인것으로 前發表¹⁾와는 다르다. 그리하여 이들 菌株를 標準菌인 *Bacillus megaterium* group과 比較하여 보았더니

D-28 및 D-28a는 425-2와 크키 및 菌體의 配列狀態가 類似하였으며 88-3은 NRRL-B 938과 크키, 配列狀態 및 形狀이 좀 Spherical한 點等에서 비슷하였다.

b) 이들 菌株의 Medium II에서의 培養特徵은 Table 1과 같으며 모두 다-*B. megaterium* group과 비슷한 特徵을 보였다.

Table 1 Culturing Characteristics of strains, 88-3, D-28, D-28a.

Strain No.	Agar Colony				Growing on			Liquid Culture					
	Form	Surface	Elevation	Edge	Agar Color	Agar slant	Agar stab	Pigment	motility	Clo- Film	Sedi- udy	Optimum temperature	
88-3	Regular	Smooth	Unbo-nate	Entire	dark brown	Echi-nulate	+	dark brown	-	-	+	+	28~38°C
D-28	"	"	"	"	White Yellow	Echin-ulate moist	#	Yellow pigment	+	-	+	+	"
D-28a	"	"	"	"	" "	"	#	"	+	-	+	+	"
<i>Bacillus megaterium</i> 425-2	"	"	"	"	White		+	no pigment	+	-	+	+	
<i>Bacillus megaterium</i> NRRL-B938	"	"	"	"	"		+	"	-	-	+	+	

Table 2 Morphological Characteristics of Strains, 88-3, D-28, D-28a.

Strain	Gram stain	Spore-forming capacity	Size of Bacteria
88-3	+	+	0.6~0.9×1.5~1.7 (μ)
D-28	+	+	0.8 × 1.0~1.8 (")
D-28a	+	+	0.8 × 1.0~1.8 (")

Table 3 Physiological Characteristic Comparison of following strains, 88-3, D-28, D-28a, and *Bacillus megaterium* etc.

Strain Number	Growing on		Test of					Production of					T.G. Y. media			
	Starch	litmus milk	Gela-tin	litm-us G-lucose Broth	Potato	soy Bean	sodi-um citr-ate	V.P	M.R	NO ₂	Cata-ind-lase	ole		H ₂ S	urea	
88-3	+	+	Pept-onise	Craf-ter form	Red	Growth dark brown	Growth dark brown	#	+	+	-	#	-	-	+	#
D-28	#	+	" slowly	"	"	Growth Golden Yellow	Growth Yellow pigment	+	+	#	+	#	-	-	#	#

D-28a	+	+	"	"	"	"	"	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Bacillus megaterium 425-2	+	+	"	"	Growth	Growth	+					-	+	-	-	+
Bacillus megaterium NRRL-B 938	+	+	Pept-onise	"	"	"	+					-	+	-	-	+

c) 生理學的特徵은 Table 3과같이 3菌株뿐만 아니라 標準菌인 *B. megaterium* group도 거친 같은 傾向을 보였다. 단지 다른點은 88-3 및 *B. meg-*

aterium group은 亞硝酸을 還元하지 않는데 反하여 D-28과 D-28a는 이를 還元하는것이다.

Table 4. Comparatiive Test of acid Producibility from Carbohydrates by 88-3, D-28, D-28a, and *Bacillus megaterium*

kinds of sugars	Stran																	
	X	A	F	G	M	Sa	Rh	Gl	T	Rf	Mal	La	O	I	St	Mi	in	sal
88-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-28	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
D-28a	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Bacillus megaterium 425	+	+	+	+→-	+	+	-	+	+	+→-	+	-	+	-	+	-	-	+
Bacillus megaterium 425-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Bacillus megaterium 425-2	+	+	+	+→-	+	+	-	+	+	+→-	+	-	+	-	+	-	-	-
Bacillus megaterium NRRL-B 938	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Note:

X: xylose, A: Arabinose. Rh: Rhamnose. Gl: Glucose. F: Fructose G: Galactose. M: Mannose. Sa: Saccharose. Mal: Maltose. La: Lactose T: Trehalose. Rf: Raffinose. D: Dextrin. I: Inulin. St: Starch. Mi: mannit. in: Inosit. Sal: Salicin.

d) 糖類에서의 生酸性醱酵試驗은 Table 4와 같았다. 이表에서 88-3은 그 醱酵現象이 NRRL-B 938과 類似하였다. 좀다른點은 88-3은 Maltose와 Dextrin培養基에서 48時間 以內 30°C의 條件에서 皮膜을 形成하였으나 NRRL-B 938은 形成하지 않는것이다. D-28과 D-28a는 425-2와 그 醱酵狀態가 類似하였으나 다른點은 D-28등은 Inulin Positive인 對하여 425-2는 Negative인 것이다.

e) 培養基(Medium)의 pH와 食鹽濃度가 이들菌株의 生育狀態 및 色素生成에 如何한影響을 주는가를 實驗하여보았더니 Table 5와 같은 結果를 얻었

다. 먼저 pH와의 關係는 Table 5-1에서 보는바와같이 이들菌株는 다 pH 6.4-6.8에서 生長이 迅速하였으며 色素生成도 良好하였다. 다음 pH와 食鹽濃度와의 關係를 보았더니 Table 5-2 및 5-3와같이 88-3은 pH 6.8의 無鹽狀態에서 比較的 生長力이 旺盛하였으며 D-28, D-28a는 pH 5.0의 食鹽 4%濃度에서 生長이 迅速한 便이었다. 色素生成과 食鹽濃度와의 關係를 보면 88-3은 pH 7.0-2% 食鹽濃度에서 色素生成이 至適條件이었으며 D-28 D-28a는 pH 6.8의 無鹽條件에서 色素生成이 最適으로 各各 다른現象을 보였다.

Table 5. Comparatiive Growth Condition of Strains, 88-3, D-28, D-28a, and *Bacillus megaterium*

Table 5-1. Growth condition of pH Differences.

Strain	pH	unadjusted pH	5.0		7.0		9.0		
			Pigment	+	Pigment	+	Pigment	+	
88-3		≡	≡	+	≡	≡	+	+	+
D-28		≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+
D-28a		≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+
<i>Bacillus megaterium</i> 425-2		≡	-	≡	-	≡	-	≡	-
<i>Bacillus megaterium</i> NRRL-B938		≡	-	+	-	≡	-	+	-

Table 5-2. Growth Condition of pH and Salt Concentration.

pH	Unadjusted	pH				
		5.0	7.0	8.0	9.0	
Strain	% of Salt	no Salt	4%	6%	8%	10%
88-3	≡	≡	≡	≡	-	
D-28	≡	≡	+	-	-	
D-28a	≡	≡	+	-	-	
<i>Bacillus megaterium</i> 425-2	≡	≡	≡	+	-	
<i>Bacillus megaterium</i> NRRL-B 938	≡	≡	≡	≡	-	

Table 5-3 Optimum Salt Concentration of Pigment Production.

pH	7.0					
	Concentration of pigment, production	no salt	2%	6%	8%	10%
Strain						
88-3	+	≡≡≡	-	-	-	
D-28	+	+	-	-	-	
D-28a	+	+	-	-	-	
<i>Bacillus megaterium</i> 425-2	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus megaterium</i> NRRL-B 938	-	-	-	-	-	

f) 固體培養基 (pH 7.0 無鹽狀態)에서의 生育 狀態를 보았더니 Table 6과 같은 結果를 얻었다. 88-3, D-28 및 D-28a는 接種後 30°C에서 定 温한바 다- 12時間以內的 生長速度를 같았으나

Original Strain인 *B. megaterium* group은 接種 後 4時間까지는 同一條件에서 前記菌株보다 좀더 러지는 生長速度를 보였다.

Table 6. Comparative Growth test of Strains, 88-3, D-28, D-28a, and *Bacillus megaterium* group on Solid media.

Strain	Time of the Culture						
	4	8	12	16	20	24	96
88-3	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡≡
D-28	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡≡
D-28a	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡≡

Bacillus megaterium 425	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
Bacillus megaterium 425-1	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
Bacillus megaterium 425-2	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
Bacillus megaterium 398	+	++	+++	+++	+++	+++	+++

그러나 20時間經過後에는 이들 모-든 菌株들은 거이같은 完全發育을 보였다. 그보다도 Original Strain과 88-3, D-28 및 D-28a와의 顯著한 差異는 前者가 以上諸條件下에서 色素를 生成하지 않는 點이다. 特히 注目할것은 88-3과 NRRL-B 938은 色素生成을 除外한 모-든 培養特徵이 같은 點이다.

考 察

Strain 88-3, D-28 및 D-28a에 對한 同定結果는 黃等⁽³⁾이 既爲發表한바 있었다. 그러나 其後 著者等은 이를 菌株에 對한 特徵을 追試하였더니 먼저 Catalase陽性임이 觀察되어 黃等の 結果와 反對됨을 보았으므로 黃等の 同定結果에 疑問이 나게되어 다시 細菌同定에 第一重要한 特徵인 Gram 染色과 Möller의 孢子染色을 再試하였다. 그 結果는 一陽性으로 나오게되었다. (黃色의 同定結果는 一陰性). 이로써 이들菌株에 對한 黃等の 同定은 全然잘못임이 밝혀지게되었다. 黃等の 實驗結果에 왜 이러한 誤差가 생겼으나 한點에 對하여는 確言할수는 없으나 Catalase試驗에 使用한 過酸化水素의 試藥이 調製한지 오래된것을 使用한 탓으로 陰性으로 나온것 같으며 Gram染色이 陰性으로 나온것은 黃等の 實驗結果의 잘못이라기보다 Bergey⁽⁴⁾의 冊에도 記載된바와같이 *Pseudomonas sp.*나 *Bacillus sp.*는 培養條件에 따라 Gram陽性으로 되며 또한 陰性으로도 되는것이므로 그다지 考察의 對象이 되지않으나 孢子形成能試驗에 있어서는 黃等の 實驗結果가 다분히 잘못된것으로 指摘하지 않을수없다.

그 結果로서 이들菌株가 色素生成能임과 아울러 *Pseudomonas sp.*로 速斷을 하였던것이다.

그러나 孢子形成能도 培養條件에 따라 變化되는 것이 다음 文獻에서 볼수 있으므로 黃等の 이 實驗結果가 全的으로 잘못이라하기도 斷定하기 困難한것 같다. 即 N. Grelet⁽⁵⁾는 合成培地에 Glucose

를 爲始하여 硝酸鹽 硫酸鹽 磷酸鹽 및 鐵或은 亞鉛等이 缺乏되어야 *B. megaterium*은 孢子形成을 잘 한다 하였으며 R. Tinelli⁽⁶⁾도 Glucose 或은 硝酸鹽 缺乏培養基에서 *B. megaterium*의 孢子形成이 誘導됨을 報告하였다. 氏는 또한 Sporulation이 이러하면 菌體의 Lipides가 消失이되며 Ca dipicolinate가 合成이되며 Polysaccharide는 減少되나 Polysaccharide分子中에 Uronic Acid가 나타나게됨을 觀察하였다.

다음 이菌을 2,3-Butanediol을 唯一한 炭素源으로한 無機培養基에서 生育시키면 Nonsporulating Strain으로 變하였음을 實驗하였다. 氏⁽⁷⁾는 또한 Non-Sporulating Strain을 孢子形成培養地에다 移植하더라도 孢자를 形成하지 못하며 Autolysis가 이려난다고 報告하였다. S. K. Majumder等⁽⁸⁾은 *B. Cereus*, *B. Subtilis* 및 *B. megaterium*의 Sporulation이 Beef Extract, Peptone 및 xylose培養液에서 잘 이려나며 만약 xylose를 다른 糖類로 代置하면 孢子形成이 아주 貧弱하여졌음을 發表하였다. V. Vinter⁽⁹⁾는 培養液에다 $10^{-4}M$ 濃度の Cystine 或은 Cystein을 加하면 *B. megaterium*의 孢子形成은 阻止당하며 여기에다 Ca^{++} 이 $6 \times 10^{-4}M$ 濃度로 加하면 그 阻止는 더 促進이 된다고 報告하였다. 이들의 阻止現象은 培養新舊에 關係되며 오래된 培養일수록 더 影響을 받는다. 朝井等⁽¹⁰⁾은 日本된장中에 存在하는 *B. Subtilis*를 爲始한 모-든 有孢子細菌들은 된장中에 棲息하였을 때에는 孢子形成能이 喪失되어 이들菌을 pH 5-6의 無鹽培地로 移植하면 孢子形成能이 回復됨을 觀察하고 食鹽은 孢子形成을 阻害하는 것이라 發表하였다. 따라 이들菌은 된장中에서도 大部分 榮養細胞로만 存在한다.

以上諸文獻에서 보는바와같이 細菌의 孢子形成은 培養條件에 따라 至大한 影響을 받는다. 特히 *B. megaterium*에서는 Non-sporulating Strain까지 있는것으로 미루어볼때 黃等の 實驗結果가 잘못되었다고 一方的으로 否定하기도 速斷인것 같다.

黃 등이 胞子形成試驗에 供한 Sample 이 Non-sporulation Strain 이었는지 알수없는 것이며 또한 Autolysis 現象도 看破하지 못하였으므로 이 以上 論議할 수는 없다.

그러나 著者들의 追試結果는 이들 菌株들이 *Pseudomonas sp.*에 屬하는 것이 아니고 *B. megaterium*에 屬하는 것임을 밝혔다. 이 提唱은 또한 Voges-Proskauer 反應 및 Methyl red 試驗을 除外한 其他의 一은 生理學的 試驗에서는 88-3은 NRRL-B 938과 D-28과 D-28a는 425-2와 各各 一致되었으며 特히 Citrate를 炭素源으로 利用하는 點은 다 *B. megaterium* group과 同一하였다. 糖類 醱酵試驗에서 88-3은 Maltose 및 Dextrin에서 皮膜을 形成하는 것 外에는 NRRL-B 938과 一致되었으며 D-28도 Inulin에서 酸을 生成함에 對하여 425-2는 Alkali를 生成하는 點이 다른 點이며 또한 D-28a도 Rhamnose 醱酵性에 差異가 있을 뿐 425-1과 一致되었다.

다음 特記할 點은 김에서 分離한 88-3은 Vitamin B₁₂ 生産菌으로서 太等⁽²⁾의 報告와 같이 靜置培養에서는 676mγ/ml, 液浸培養에서는 1000mγ/ml (未發表)의 Vitamin B₁₂ 生産能力을 가져서 亦是 Vitamin B₁₂ 生産菌인 NRRL-B 938과 培養特徵에 있어서 거진 一致된다는 것이다.

88-3의 Vitamin B₁₂ 生産성에 對한 試驗은 其後 繼續中인바 興味있는 것은 88-3을 김의 Water Extract (10%)를 添加한 培地에서는 Vitamin B₁₂ 가져진 倍가 더 生産되는 點이다 (未發表). 한편 D-28, 및 D-28a와 425-1, 425-2 등은 88-3 및 NRRL-B 938과 上記培養上의 特徵에서 다른 點이 아니라 또한 Vitamin B₁₂ 生産성이 缺如된 點에서도 差異를 보여주고 있다. 이로써 88-3은 NRRL-B 938과 D-28 및 D-28a는 425-1 및 425-2와 各各 同一菌으로 斷定하여도 좋을 것 같다.

總 括

동김치에서 分離한 D-28 및 D-28a와 김에서 分離한 88-3은 追試한 結果

1. 이들 菌株는 다 *Gram* 陽性 Catalase 陽性 및 胞子形成能을 갖었음을 밝혔다.

2. Voges-Proskauer 反應 및 Methyl red 試驗에서 88-3, D-28, 및 D-28a는 *B. megaterium* group과 一致되지 않았으나 其他培養上의 特徵은 一致되었다.

3. 糖類 醱酵試驗에 있어서 若干의 差는 있으나 이들 菌株는 *B. megaterium* group과 거진 一致되

었다.

4. 以上의 實驗結果 및 Vitamin B₁₂ 生産성에 있어서 88-3은 NRRL-B 938과 D-28 및 D-28a는 425-1 및 425-2와 各各 同一菌임을 證明하였다.

SUMMARY

The results of re-examination for the isolates D-28, D-28a from Kimchi and 88-3 from laver are summarized as follows:

- 1). All these isolates were proved to be Gram positive, catalase positive and spore-forming.
- 2). While these strains were not consistent with *Bacillus megaterium* group with respect to Voges-Proskauer reaction and methyl red test, their cultural characteristics were well consistent with this group.
- 3). These isolates showed the similar sugar-fermentability as *B. megaterium* group with a slight difference.
- 4). It is proved that, according to the forgoing results and vitamin B₁₂ producibility, the isolate 88-3 is identical with *B. megaterium* NRRL-B 938 and D-28, D-28a, with *B. megaterium* 425-1 and 425-2, respectively.

文 獻

- 1) 黃圭贊, 鄭允秀, 金浩植: 科研彙報 5, 51-5, 1960
- 2) 太斗浩, 李啓瑚: 科研彙報 5, 61-4, 1960
- 3) 黃圭贊, 金浩植, 李啓瑚: 科研彙報 5, 65-7, 1960
- 4) R.S. Breed, E.G.D. Murray and N.R. Smith: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th Ed, 1957
- 5) N.Grelet: *Ann. Inst Pasteur* 81, 430-40 1951; C.A. 46, 9654a, 1952
- 6) R. Tinelli: *Compt. Rend.* 238, 1662-24, 1954; C.A. 49, 1866h, 1955
- 7) ———: *Ann Inst. Pasteur* 88, 642-9, 1955; C.A. 49, 12590 c, 1955
- 8) S.K. Majumder and M.C. Padma: *Can. J. Microbiol.* 3, 639-42, 1957
- 9) V. Vinter: *J. Appl. Bacteriol.* 20, 325-32, 1957; C.A. 52, 930h, 1958
- 10) 那須野精一, 薄田亘, 朝井勇宣: 日農工 39, 13-24, 1961