

천일염으로부터 고호염균의 분리 및 동정

박형숙 · 정명주*
경성대학교 생물학과

Isolation and Identification of an Extremely Halophilic Bacterium from Solar Salts. Hyung-Sook Park and Myeong-Ju Jeong*. Department of Biology, Kyungsoong University, Pusan 605-025, Korea - An Extremely halophilic bacterium was isolated from solar salts. The isolated strain was Gram-negative, facultatively anaerobic, and motile bacterium. The colony was circular, smooth, and red-orange color. The strain showed pleomorphism depending on magnesium ion concentrations. The range of temperature and pH for growth of the isolate were 35~45°C and 7.0~9.0. NaCl concentration for growth of it was 4.3~5.0 M. The isolate was catalase and oxidase positive, and sensitive to bacitracin. It showed starch hydrolyzing and acid forming characteristics. DNA G+C content was 62.7 mol%. The morphological, physiological and biochemical characteristics of the isolate resembled those of the *Haloarcula vallismortis*, therefore it was identified as *Haloarcula* sp. EH-1.

호염성균은 소금호수나 염전과 같은 천연환경(1)이나 염장어류와 피혁과 같은 인위적으로 염도를 높인 환경(2,3)과 같이 고염수(>15%, w/v, NaCl)에서 우점미생물 집단을 형성하는 화학합성 유기영양균이다(4). 성장을 위해 요구되는 호염도에 따라 내염성(0~0.3 M), 중호염성(0.2~2.0 M), 고호염성(3.0~5.0 M)으로 분류하고 있지만(5), Kushner은 이것을 비호염균(non-halophile: 0.2 M 이하), 저호염균(slight halophile: 0.2~0.5 M), 중호염균(moderate halophile: 0.5~2.5 M), 경계역고호염균(borderline extreme halophile: 1.5~4.0 M), 고호염균(extreme halophile: 2.5~5.2 M 포화농도) 및 내염균(halotolerant: 0~2.5 M)과 같이 6가지로 더 세분화하였다(6). *Halobacteria* 과는 *Halobacterium* (Hb) 과 *Halococcus* (HC)의 두 속이 제안된 후 다시 *Natronobacterium* (Nb), *Natronococcus* (Nc), *Haloarcula* (Ha) 및 *Haloferax* (Hf) 4속의 추가제안으로 현재 6속으로 구성되어 있다(4,7,8). 최근 생화학적 및 분자생물학적 분류기법에 약간의 변화가 일어나고 있다(9). 우리나라에는 소금호수, 암염광산 등 특수환경은 없지만 일상생활에서 천일염을 비롯하여 젓갈 등 염도가 높은 식품이 상용되고 있으며, 최근 고호염성균은 극지미생물의 연구 뿐만 아니라, 염류폐수처리, 중금속회수, polymer 및 고호염성 효소를 이용한 젓갈숙성등 산업적 이용면의 연구가 활발해지고 있다(10-14). 그러나 우리나라에서는 고호염균의 기초연구뿐 아니라 산업적 응용에 관한 연구도 매우 드물다.

본 연구는 이런 목적에 이용할 유용한 균주를 개발하고자 시판되고 있는 천일염으로부터 고호염성균을

분리하여 균주의 특성을 조사하고 동정하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

분리재료는 시판되고 있는 천일염을 사용하였으며, 분리를 위한 배지는 Sehgal and Gibbons 복합배지 (SGC)(10) 즉, 0.75% casamino acid(Difco), 1.0% yeast extract(Difco), 25% sodium chloride, 0.3% sodium citrate, 0.2% potassium chloride, 2.0% magnesium sulphate(heptahydrate), 0.0023% ferric sulphate를 용해하여 pH 7.4로 조정후 121°C에서 5분간 멸균하여 사용하였으며, 고체배지는 SGC액체배지에 1.5% agar를 첨가하였다. SGC 액체배지가 50 ml 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 분리시료인 천일염을 최종농도가 2% (v/v)가 되도록 첨가하여 37°C에서 12~14일간 진탕배양(108 rpm/min) 하였다. 호염균의 증식에 따라 red-orange색을 띠면 그 배양액을 취하여 SGC 고체평판 배지에 도말하여 배지의 건조를 방지하기 위하여 플라스틱 용기에 넣어 37°C에서 5~6일간 배양한 후 red-orange색을 나타내는 콜로니를 실험균주로 선별하였다(15-17). 분리된 균주는 수분증발을 방지하기 위하여 뚜껑달린 시험관(screw cap bottle)의 SGC 사면배지에 이식하여 4°C에서 보관하고, 4~5개월마다 계대배양하였다.

균주의 동정

형태학적 특성 분리균의 형태, 크기 및 운동성에 관한 실험은 Manual of methods for general bacteriology(18)에 따라 실시하였다. 그람염색은 2% acetic acid로 고정후 실행하였으며(19), 운동성은 hanging

*Corresponding author.

Key words: Extremely halophilic bacterium, *Haloarcula* sp., Archaeobacteria.

drop법으로, 크기 및 형태는 광학현미경, 투과전자현미경(JEOL 100S, Japan) 및 주사전자현미경(Carl Zeiss DSM 940, German)으로 관찰하였다. 투과전자현미경은 2% phosphotungstate negative 염색을 하여 관찰하였다.

배양학적 특성

분리균의 배양학적 특성은 SGC 평판배지와 사면배지에 접종하여 38°C에서 배양하면서 콜로니의 형태, 색깔 및 opacity 등을 관찰하였다. 균체의 생육을 위한 최적조건을 검토하기 위하여 10 ml의 SGC 액체배지를 넣은 100 ml의 삼각플라스크에 최종농도가 2% 되게 전배양액을 접종한 후, 진탕배양하면서 온도별·pH별·배양시간별 및 NaCl 농도에 따른 생육도를 측정하였다. 생육도의 측정은 Spectrophotometer(Spectronic 20) 및 Bio-Photorecorder(TN-1120, Japan)을 이용하여 660 nm에서 측정하였다.

생화학적 특성

분리균의 생화학적 특징은 Microbiology a laboratory manual(20)에 따라 실시하였으며, 탄소원 이용성, respiratory type, amylase activities 실험을 위해서 SGC 배지와 Tomlinson and Hochstein의 basal buffered medium(21) 즉, 0.1% yeast extract(Difco), 0.2% potassium chloride, 2.0% magnesium sulphate(heptahydrate), 0.02% calcium chloride, 25% sodium chloride을 용해하여 pH 7.3으로 조정된 후 함께 사용하였다. Respiratory type test를 위해 0.05% cysteine을 첨가하였으며, amylase, caseinase 및 gelatinase activities를 위해 0.2% soluble starch, 1.0% casein 및 1.0% gelatin을 각각 첨가하여 사용하였다. 탄소원 이용성은 pH 7.3에서 최종농도 1.0%가 되도록 당을 첨가하여 배양한 후, gas

및 acid 생성을 관찰하였다. 그리고 항생제 감수성 검사를 위해 polymyxin(300 U/disc), bacitracin(10 U/disc), ampicillin(10 µg/disc), erythromycin(15 µg/disc), streptomycin(10 µg/disc)을 사용하였다. DNA의 G+C 함량은 Tamaoka와 Komagata의 방법(22)에 따라 HPLC로 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 선발

SGC 한천배지에 분홍색을 나타내는 콜로니중 지름이 약 2 mm 이상인 것을 분리하여 NaCl이 25% 이상에서 생육이 가장 좋은 것을 고호염성 균주로 선발하여, 이 분리균을 EH-1으로 명명하고 이후 실험에 사용하였다.

균주의 동정

형태학적 특성 분리균주 EH-1의 전자현미경 사진은 Fig. 1과 같으며, 형태학적 특성을 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다. 본 균주는 크기가 0.5×2.4~5.0 µm의 그람음성 간균으로서 편모에 의한 운동성을 나타내며, 균체 중앙부의 수축에 의하여 균체의 분리가 이루어지며, 성장과 더불어 SGC 배지상에 나타나는 red-orange 색소를 나타내었다(23,24).

배양학적 특성 분리균주의 배양학적 성질을 조사한 결과는 Table 2에 나타내었다. 분리균주 EH-1은 최소 0.005 M의 마그네슘 이온 농도에서 생육하였으며(Fig. 2), 0.08 M 이상의 농도에서 간상을 포함한 다형태성(pleomorphism)을 나타내면서(25), 0.03 M 이하의 농도에서는 구형으로 형태적 변화가 일어난다(Fig. 3). 이것은 Mg²⁺가 lipids 막의 phosphatidyl glycerophosphate의 diether analogue와 강한 친화력을 가지므로 구조적 안정성 유지에 관계하기 때문인 것으로 추정된

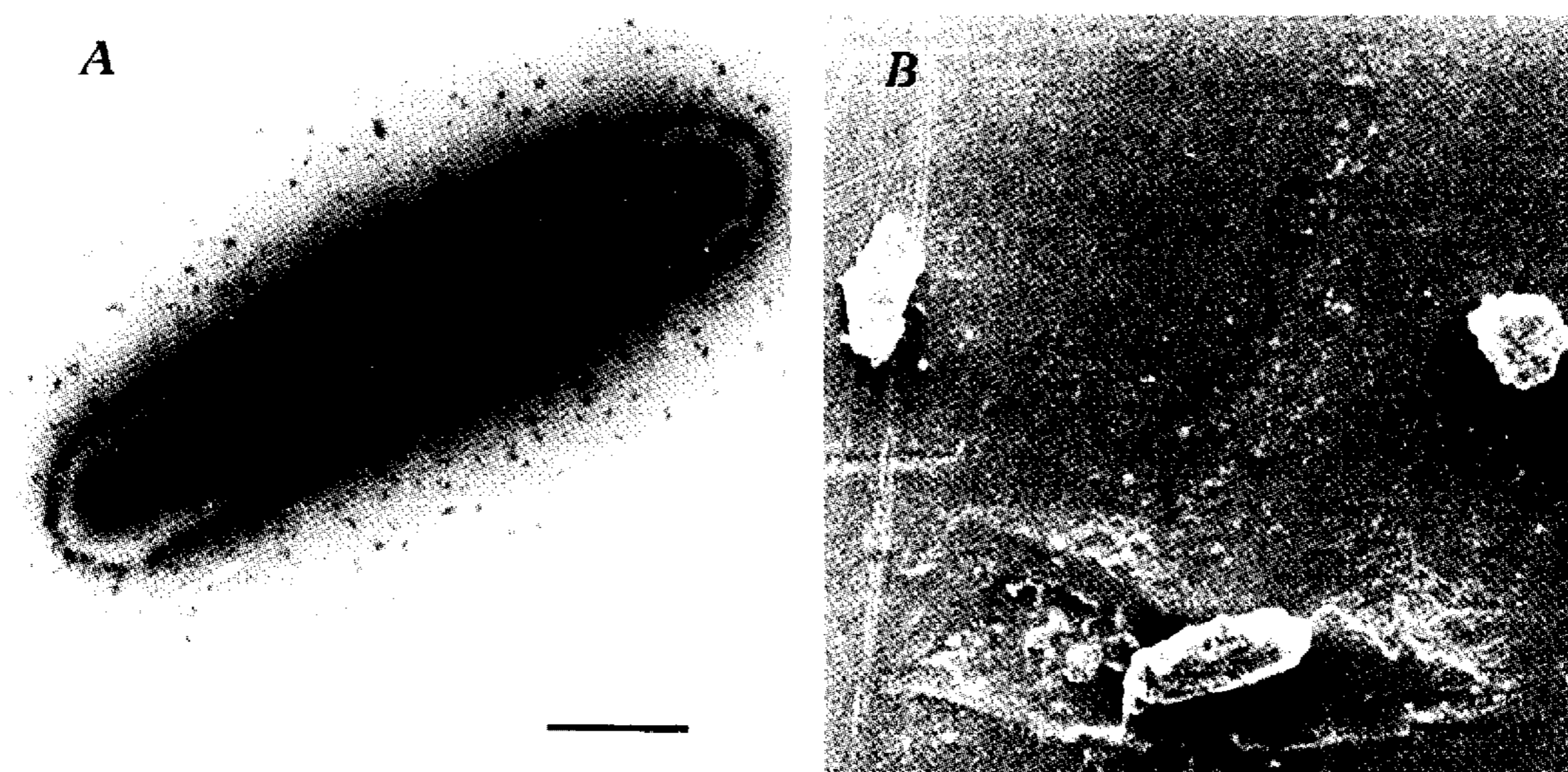


Fig. 1. A: Transmission electron micrograph (Bar: 50 nm), B: Scanning electron micrograph (Bar: 2 µm) of the strain EH-1.

Table 1. Morphological characteristics of the strain EH-1.

Characteristics	Isolated strain (EH-1)	<i>Hb. salinarium</i> (IAM12045)	<i>Hb. saccharovorum</i> (IAM13168)	<i>Ha. vallismortis</i> (IAM13180)
Shape	rod	rod	rod	rod
Cell size	0.5×2.4~5.0 μm	0.5~1.0×1.0~6.0 μm	0.6~1.2×2.5 μm	0.6~1.0×3.0~5.0 μm
Motility	+	+	+	+
Gram stain	-	-	-	-
Spore	-	-	-	-
Flagella	+	+	+	+
Type of cell division	constriction	constriction	constriction	constriction

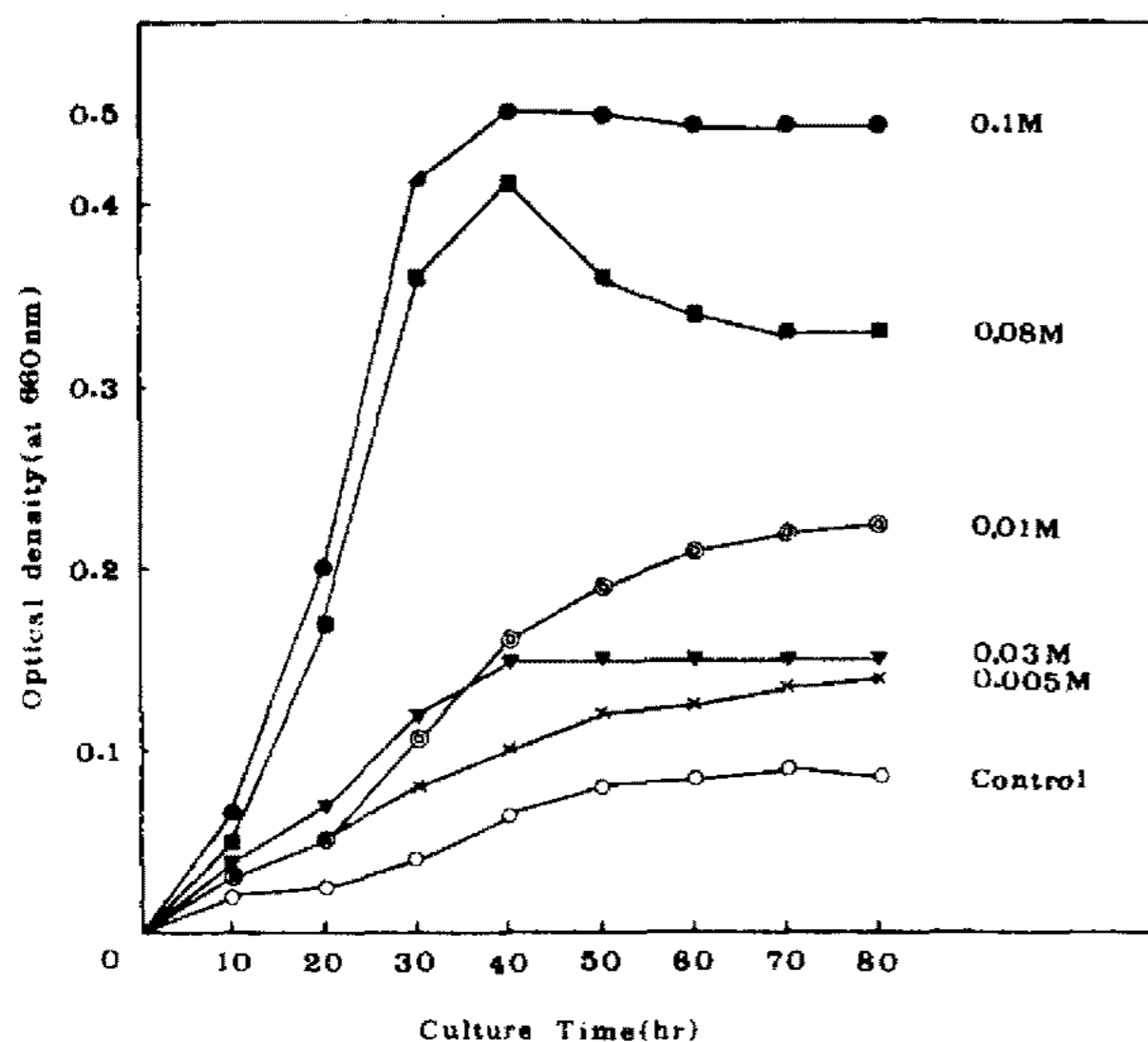
+ : positive, - : negative.

Table 2. Cultural characteristics of the strain EH-1.

Characteristics	Isolated strain (EH-1)	<i>Hb. salinarium</i> (IAM12045)	<i>Hb. saccharovorum</i> (IAM13168)	<i>Ha. vallismortis</i> (IAM13180)
Colony Shape	circular	circular	circular	circular
Surface	smooth	smooth	smooth	smooth
Color	red	red	red	red
Opacity	transparent	transparent	transparent	transparent
Major pigment produced	red-orange	red-orange	red-orange	red-orange
Flagella	+	+	+	+
Facultatively anaerobic	+	-	-	+
Alkalophilic ^a	-	-	-	-
Cells disk shaped	-	-	-	-
Moderate salt requirement ^b	-	-	-	-
Optimum temperature, °C	40	50	50	40

^aOptimum pH is 8.5~9.5.^bOptimum NaCl concentration is less than 3.0 M (~17%, w/v).

+ : positive, - : negative.

**Fig. 2. Effect of magnesium ion concentration on growth of the strain EH-1.**

다(26,27). NaCl 농도에 따른 생육은 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 4.3~5.0 M에서 최대 생육을 나타내었으며,

2.6 M에서는 거의 생육이 되지 않는 것으로 나타나 고호염균의 염요구 특이성과 일치하였다(4,18). NaCl 농도가 10%(w/v) 이하일 때는 용균현상이 일어난다고 보고한 Tomlinson 등(28)의 보고와 일치하였다. SGC 평판상의 콜로니는 지름이 약 2 mm이었고, 둥글고 불룩한 red-orange색이었다. 분리균 EH-1은 35~45°C의 비교적 높은 온도영역에서 좋은 생육을 보였으며, 최적온도는 40°C이었고(Fig. 5), 세대시간은 3.5시간으로 나타났었다(Fig. 6). 이는 최적배양 온도가 50°C인 *Hb. salinarium*과 *Hb. saccharovorum*에 비하여 낮고(4,15), *Ha. vallismortis*의 최적배양 온도와 일치하였다(17). 또한 최적배양 pH는 8.0으로 나타났으며, pH 7.0~9.0 사이에서 양호한 생육을 나타내었으나, pH 5.0에서는 전혀 생육을 나타내지 않으며 pH 9.0에서는 생육이 매우 느리게 나타났었다(Fig. 7). 이는 고호염성 호알칼리성(pH 9.0~11.0) 및 매우 낮은 Mg²⁺ 농도(0.001 M)에서 양호한 생육을 나타내는 *Natronobacterium* 및 *Natronococcus*와는 구별되는 특성이었다(7).

생화학적 특성 분리균주의 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 3에 나타내었다. 본 균주는 *Ha. vallismor-*

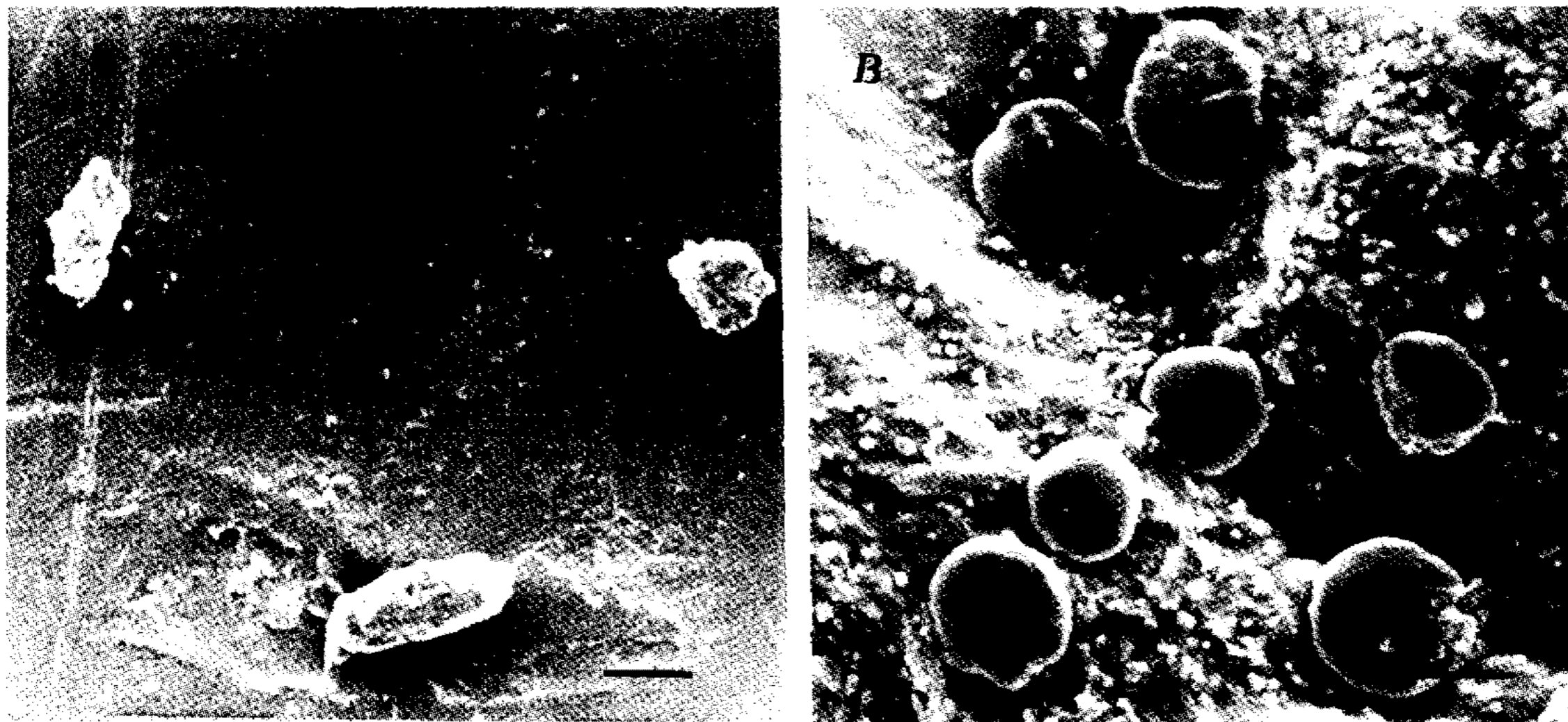


Fig. 3. Effect of magnesium ion concentration on the morphology of the strain EH-1. A: 0.08 M magnesium concentration (Bar: 2 μ m), B: 0.03 M magnesium concentration (Bar: 5 μ m).

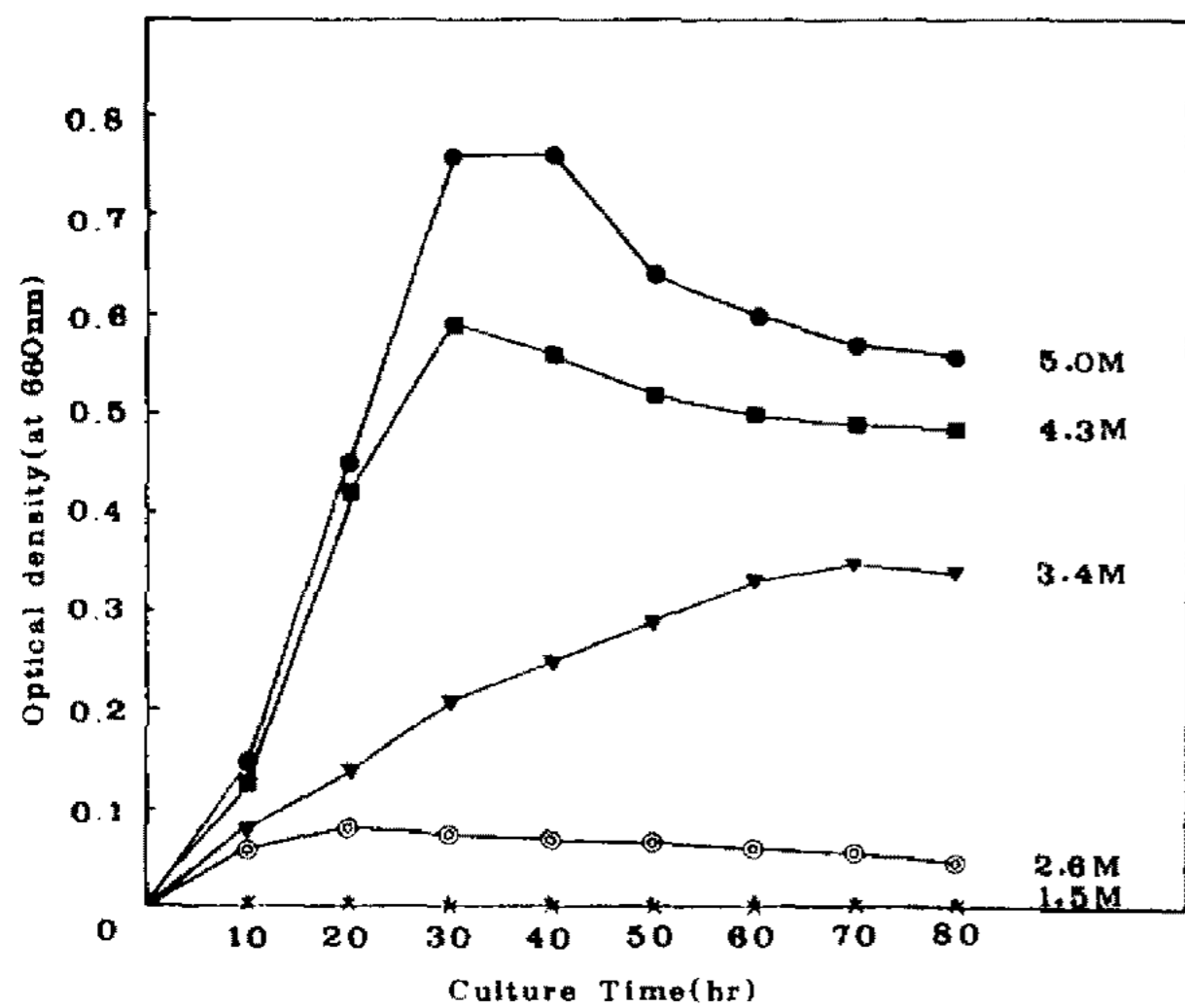


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on growth of the strain EH-1.

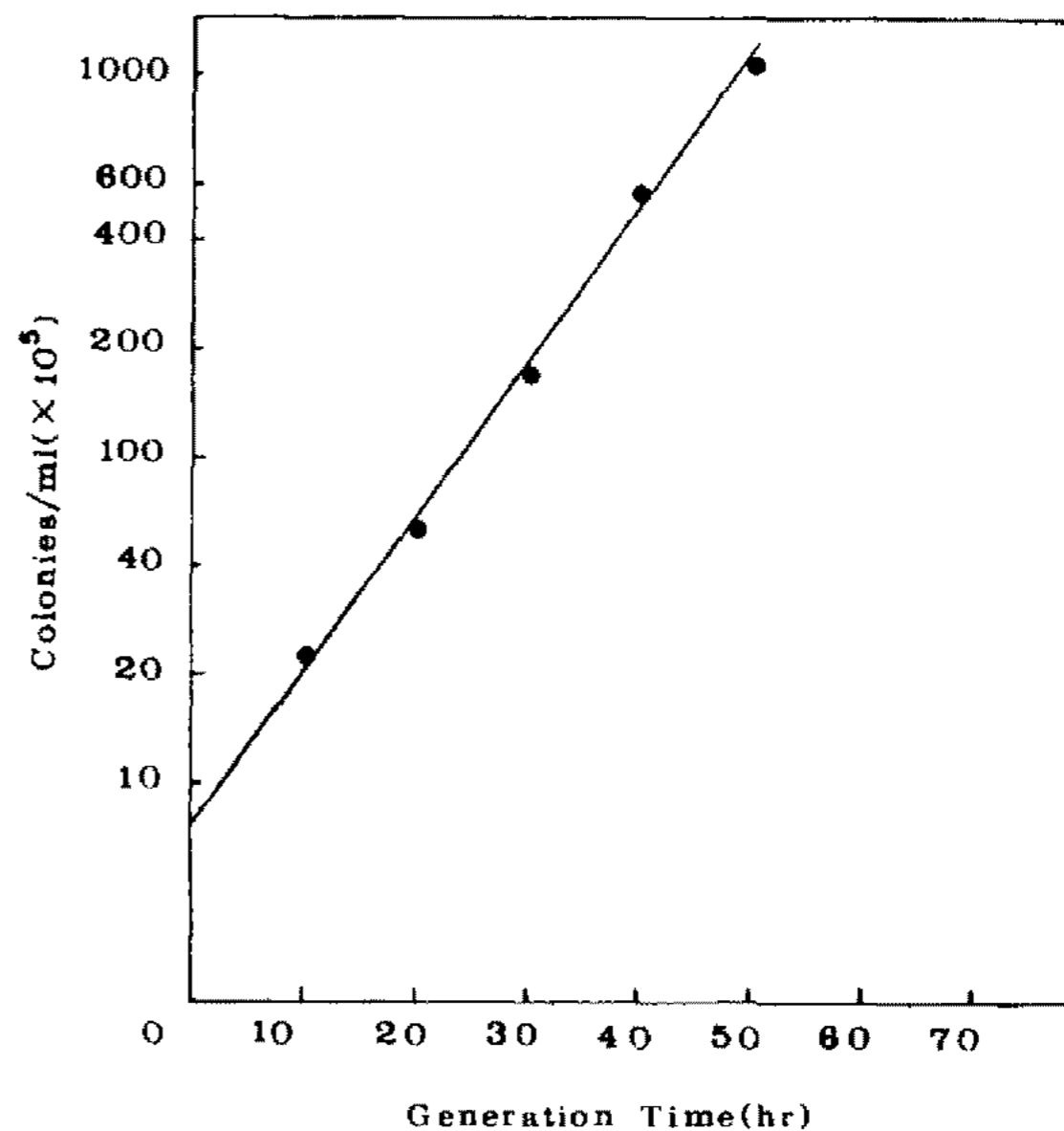


Fig. 6. Generation time of the strain EH-1 at 40°C.

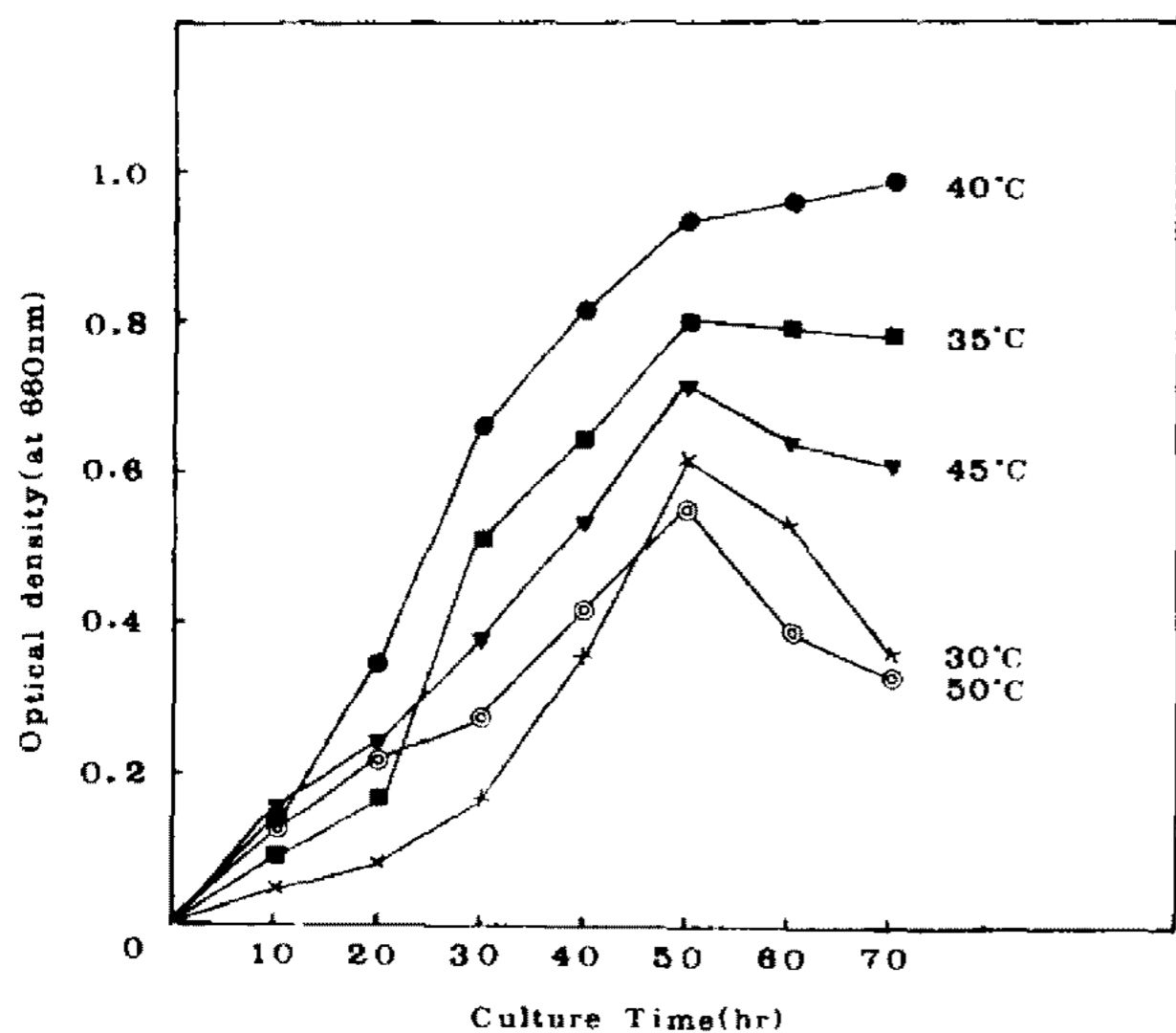


Fig. 5. Growth rates of the strain EH-1 at different temperatures.

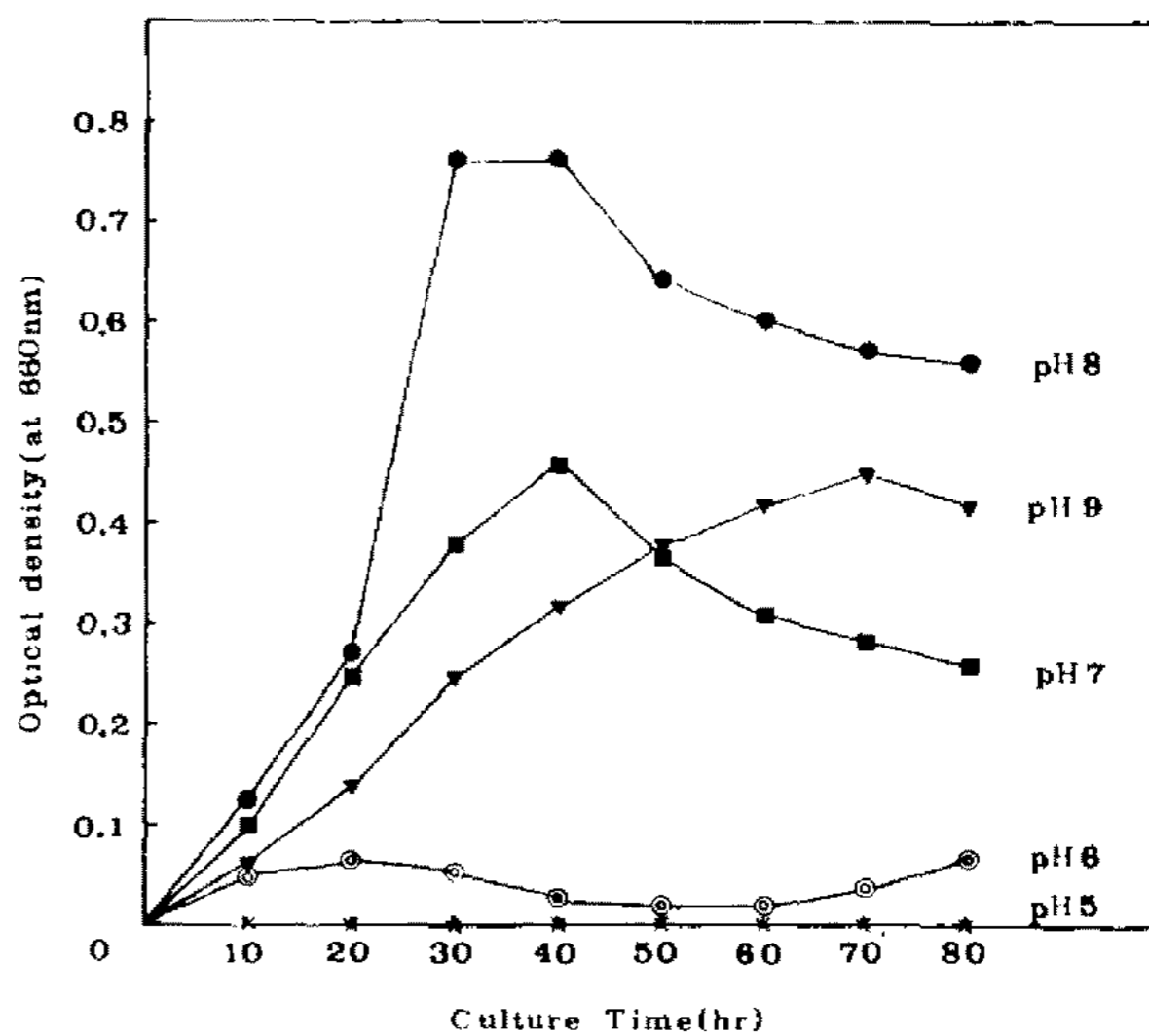


Fig. 7. Growth rates of the strain EH-1 at different pH.

Table 3. Biochemical and physiological characteristics of the strain EH-1.

Characteristics	Isolated strain (EH-1)	<i>Hb. salinarium</i> (IAM12045)	<i>Hb. saccharovorum</i> (IAM13168)	<i>Ha. vallismortis</i> (IAM13180)
Catalase test	+	+	+	+
Oxidase test	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	-	+	-	-
Starch hydrolysis	+	-	-	+
Casein hydrolysis	-	NT	NT	-
NO ₃ to NO ₂	+	-	+	+
Gas from NO ₃	+	-	-	+
H ₂ S production	+	+	+	+
Indole production	+	+	-	+
Polymyxin, sensitive to	-	-	-	-
Bacitracin, sensitive to	+	+	-	+
Ampicillin, sensitive to	-	-	-	-
Erythromycin, sensitive to	-	+	+	-
Streptomycin, sensitive to	-	-	-	-
G+C mol%	62.7	67.1~71.2 (major) 57~60 (minor)	71.2*	64.7*

*data from Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3.

+ : positive, - : negative, NT : not test.

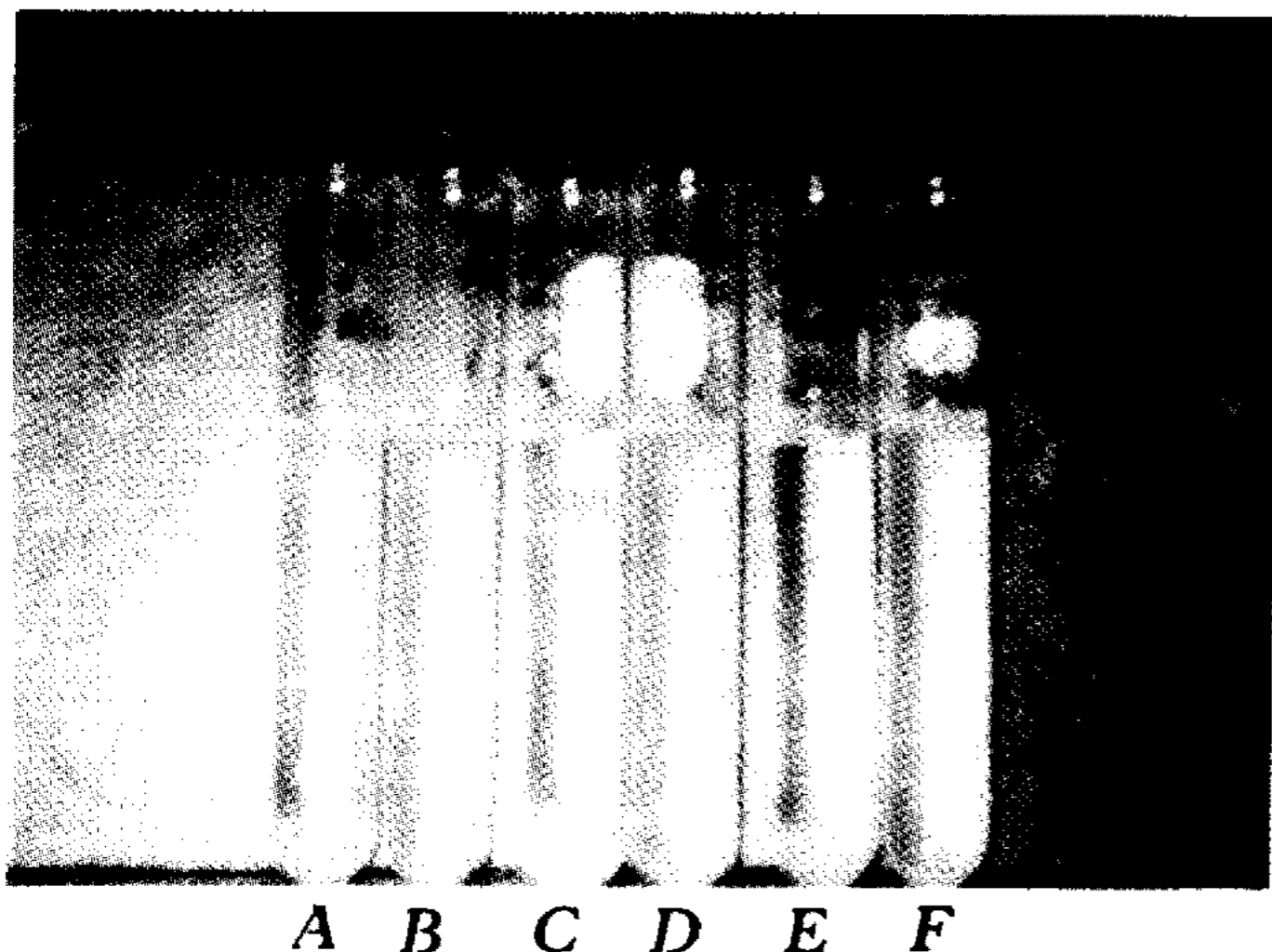


Fig. 8. Respiratory types of the strain EH-1 (A, B), *Ha. vallismortis* (C, D), *Hb. saccharovorum* (E, F); cysteine was added in A, C, E.

*tis*와 같이 0.05% cysteine이 들어있는 배지에서도 생육이 양호한 그람음성의 통성혐기성균(Fig. 8)으로서, 절대호기성인 *Hb. salinarium* 및 *Hb. saccharovorum*과는 구별되었다. Catalase, oxidase test에서 양성반응을 나타내며, starch를 가수분해하였다(Fig. 9). Bacitracin 감수성에는 양성반응을 나타내었으나, polymyxin 등에서는 음성반응을 나타내었다. 또한 탄소원으로는 glucose, galactose, mannose, fructose, maltose, lactose, sucrose, glycerol을 이용하였다(Table 4). Glucose를 포함하여 탄수화물을 전혀 이용하지 않는 *Hb. salina-*

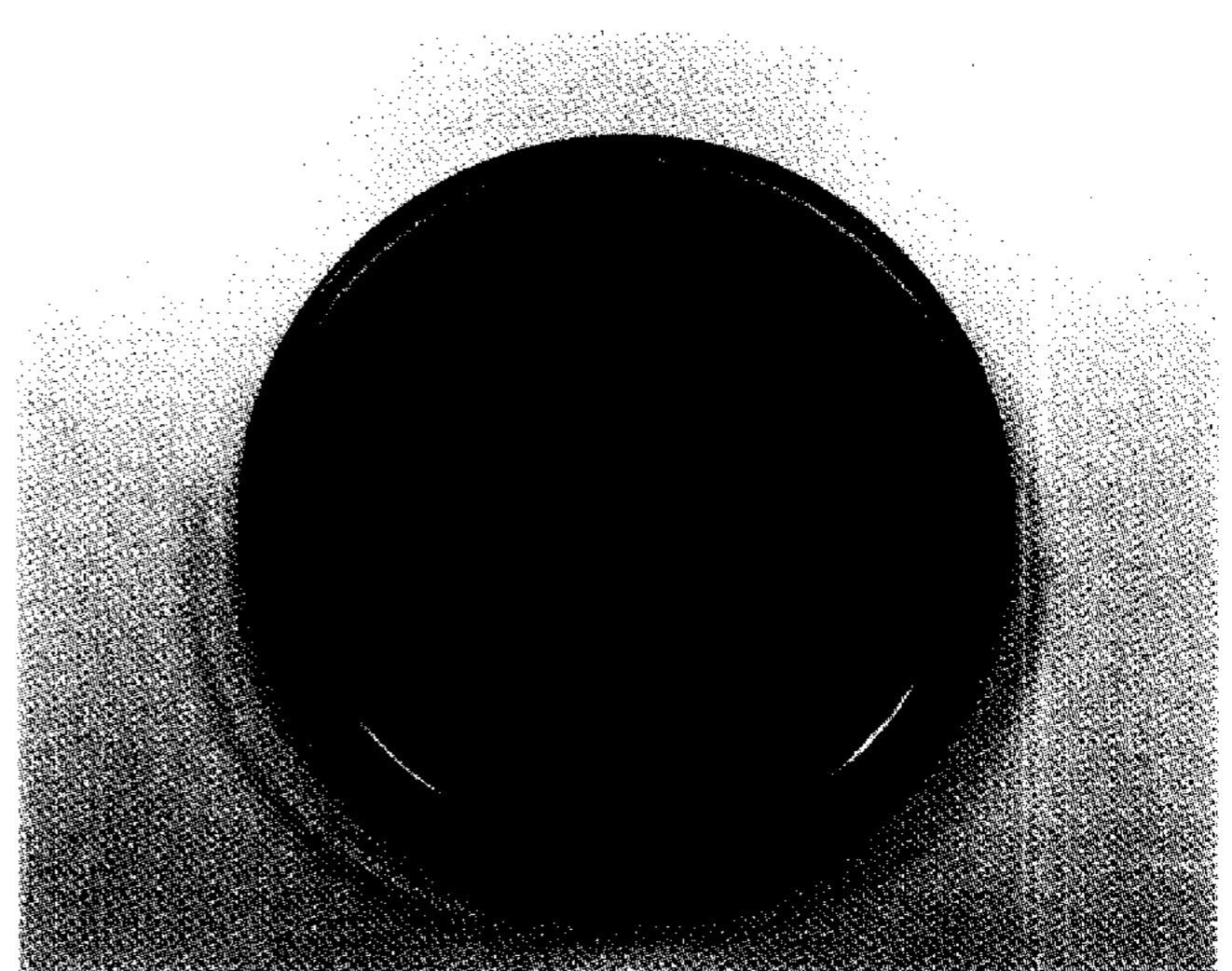


Fig. 9. Petri plate showing amylase activity by the strain EH-1.

*rium*과는 구별되었다(29). 분리균주는 glucose를 첨가한 배지에서 *Hb. saccharovorum* 및 *Ha. vallismortis*와 같이 산의 생성이 관찰되었다. DNA의 G+C 함량은 62.7 mol%로서 이 값은 GC함량의 상대적 표준오차의 범위가 같은 속의 경우 10% 이내, 같은 종의 경우 3% 이내의 범위에 분포한다(30)는 것을 고려한다면 *Ha. vallismortis*에 보다 근접하였다.

이상의 실험결과를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 따라 비교 검토해 본 결과, 본 분리균주는 *Haloarcu*속의 *Ha. vallismortis*와 거의 일치하였으므로 본 균주를 *Haloarcu* sp. EH-1으로 명명하였다.

Table 4. Utilization of sugars by the strain EH-1.

Sugars	Isolated strain (EH-1)	<i>Hb. salinarium</i> (IAM12045)	<i>Hb. saccharovororum</i> (IAM13168)	<i>Ha. vallismortis</i> (IAM13180)
Glucose	+	-	+	+
Galactose	+	-	+	+
Mannose	+	-	+	-
Fructose	+	-	+	+
Maltose	+	-	+	+
Lactose	+	-	+	-
Sucrose	+	-	+	+
Glycerol	+	-	+	+
Acid production from glucose	+	-	+	+

+ : positive, - : negative.

요 약

시판 천일염으로부터 고호염성균을 분리하여 동정하였다. 분리균주는 그람음성, 통성혐기성으로 운동성을 나타내었다. 배양적 특성은 콜로니의 형태가 둥글고 불록하였고, 지름은 약 2 mm 정도이며, red-orange색을 나타내었다. Mg^{2+} ion의 농도에 따라서 간상 또는 구형으로 다형태성을 나타내었고, 생육온도 범위는 35~45°C, 생육 pH 범위는 7.0~9.0이었다. 생육은 40°C에서 NaCl의 농도가 4.3~5.0 M에서 최대를 나타내었다. 생리적 특성으로 catalase, oxidase 양성이며, 전분을 분해하였고, bacitracin 감수성을 나타내었다. 다양한 당 이용성을 나타내며, DNA의 G+C 함량은 62.7 mol%이었다. 이상의 결과로부터 분리균주는 *Haloarcula* 속으로 동정되어 *Haloarcula* sp. EH-1으로 명명하였다.

감사의 말

본 연구는 1994학년도 경성대학교 학술연구조성비에 의하여 수행하였습니다. 이에 감사를 드립니다. 또한 균주동정에 도움을 주신 KIST 신기선 선생님에게도 감사드립니다.

참고문헌

- Post, F.J. 1977. The microbial ecology of the Great salt lake. *Microbial Ecol.* 3: 143-165.
- Aderson, H. 1954. The reddening of salted hides and fish. *Appl. Microbiol.* 2: 64-69.
- Lochhead, A.G. 1934. Bacteriological studies on the red discoloration of salted hides. *Can. J. Res.* 10: 275-286.
- Grant, W.D. and H. Larsen. 1989. Extremely halophilic archaeobacteria. Order Halobacteriales ord. nov., Pp. 2216-2233. In N. Pfennig(ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 3. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Gilmour, D. 1990. Halotolerant and halophilic microorganism. Pp. 147-177. In C. Edwards (ed.), *Microbiology of Extreme Environments*. McGraw-Hill, New York.
- Kushner, D.J. 1985. The halobacteriaceae. Pp. 171-214. In *The Bacteria*. Vol. 8. Academic Press, New York.
- Tindall, B.N.J., H.N.M. Ross, and W.D. Grant. 1984. *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 5: 41-57.
- Torreblanca, M., B. Rodriguez-Valera, G. Juez, A. Ventosa, M. Kamekura, and M. Kates. 1986. Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *System. Appl. Microbiol.* 8: 89-99.
- Kamekura, M. and M.L. Dyal-Smith. 1995. Taxonomy of the family halobacteriaceae and the description of two new genera *Halorubrobacterium* and *Natrialba*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41: 333-350.
- Sehgal, S.N. and N.E. Gibbons. 1960. Effect of some metal ions growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* 6: 165-169.
- Gochner, M.B. and D.J. Kushner. 1969. Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 15: 1157-1165.
- Norberg, P. and B.V. Hofsten. 1969. Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 55: 251-256.
- Fernandez-castillo, R., F. Rodriguez-valera, J. Gonzalez-ramos and F. Ruiz-berraquero. 1986. Accumulation of Poly(β -Hydroxybutyrate) by Halobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 214-216.
- Tindall, B.J. 1992. The family Halobacteriaceae. Pp. 768-808. In *The Prokaryotes* (Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. eds.). Springer-Verlag.
- Tomlinson, G.A. and L.I. Hochstein. 1976. *Halobacterium saccharovororum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can. J. Microbiol.* 18: 587-591.
- Gibbons, N.E. 1969. Isolations, growth and requirements

- of halophilic bacteria. Pp. 169-183. In Norris and Gibbons (Editors), *Methods in microbiology*. Vol. 3B. Academic Press, London.
17. Gonzalez, C., C. Gutierrez and C. Ramirez. 1978. *Halobacterium vallismortis* sp. nov., An amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can. J. Microbiol.* **24**: 710-715.
 18. Smibert, R.M. and N.R. Krieg. 1981. General characterization. Pp. 409-443. In *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 19. Dussault, H. P. 1955. An improved technique for staining halophilic bacteria. *J. Bacteriol.* **70**: 484-485.
 20. Cappuccino, J.G. and N. Sherman. 1987. Biochemical activities of microorganisms. Pp. 125-183. In *Microbiology, a laboratory manual*. 2nd ed. The Benjamin/Cummings Publishing Co.
 21. Tomlinson, G.A. and L.I. Hochstein. 1972b. Studies on acid production during carbohydrate metabolism by extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **18**: 1973-1976.
 22. Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Letters.* **25**: 125-128.
 23. 이홍금. 1995. 호염성 및 내염성 미생물. *미생물과 산업.* **21**: 287-292.
 24. Norton, C.F., T.J. McGenity and W.D. Grant. 1993. Archaeal halophiles (halobacteria) from two British salt mines. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1077-1081.
 25. Javor, B., C. Requadt and W. Stoeckenius. 1982. Box-shaped halophilic bacteria. *J. Bacteriol.* **151**: 1532-1542.
 26. Dundas, I.E.D. 1977. Physiology of *Halobacteriaceae*. *Advances in microbial physiology.* **15**: 85-120.
 27. Brown, H.J. and N.E. Gibbons. 1955. The effect of magnesium, potassium and iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **1**: 486-494.
 28. Tomlinson, G.A. and L.I. Hochstein. 1972a. Isolation of carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **18**: 698-701.
 29. Larsen, H. 1967. Biochemical aspects of extreme halophilism. Pp. 97-132. In *Advances in microbial physiology*. Vol. 1. Academic Press, Inc., New York.
 30. Shin, Y.K., J.S. Lee., H.J. Kim., W.H. Joo., J.D. Lee and Y.H. Park. 1996. Microbial DNA base composition (G+C mol%) and its taxonomic implications. *Korean J. Life Science.* **6**: 72-77.

(Received 9 September 1996)