

유독 이온성 액체의 장기 노출에 대한 *Shewanella oneidensis* MR-1의 반응: MR-1과 순응된 균주 SH-1의 비교 연구

한상현¹, 강창호¹, 광대영¹, 하성호², 구윤모¹, 소재성^{1*}

Response of *Shewanella oneidensis* MR-1 to Longterm Exposure with Toxic Ionic Liquid: Comparative Studies on MR-1 and SH-1, an Acclimated Strain

Sang Hyun Han¹, Chang-Ho Kang¹, Dae Yung Kwak¹, Sung Ho Ha², Yoon-Mo Koo¹, and Jae-Seong So^{1*}

접수: 2012년 12월 23일 / 게재승인: 2013년 4월 9일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, we investigated the effects of long-term exposure to ionic liquid (IL) on *Shewanella oneidensis* MR-1 (MR-1). MR1 was acclimated through repeated exposure to IL. The acclimated strain was named as *S. oneidensis* SH-1 (SH-1) and compared with MR-1 in various aspects including morphology, cell surface hydrophobicity (CSH), motility, and fatty acid. Compared to the MR-1, SH-1 showed elongated cell shape on scanning electron microscopy. Upon exposure to IL, hydrophobicity of SH-1 (28.2%) was higher than that of MR-1 (3.3%). In contrast, motility of SH-1 (7 mm) was lower than that also of MR-1 (22 mm), and branched chain fatty acid of SH-1 was lower than that of MR-1, 27.6% and 41.1%, respectively.

Keywords: *Shewanella oneidensis* MR-1, Ionic Liquid, Acclimation, Comparative Study

1. 서론

이온성 액체는 상온에서 이온들의 결합으로 구성된 액체 상태로 존재하는 물질을 말한다. 이 물질은 1,3dialkylimidazolium, Nalkylpyridinium, quaternary ammonium, quaternary phosphonium, imidazolium 등의 양이온과, NO³⁻, BF⁴⁻, PF⁶⁻, AlCl⁴⁻, Al₂Cl⁷⁻ 등의 음이온으로 이루어져 있으며, 이온으로 구성되어 있기 때문에 이온전도도가 높다 [1]. 또한 안전성 (safety) 및 안정성 (stability)과 높은 회수율 (high recovery) 등의 특성으로 청정용매 (Green Solvents)로 사용되고 있다 [2,3]. 그러나 최근 이온성 액체에 대한 생태학적 독성연구가 시작되면서 이온성 액체의 환경 유해성이 새롭게 대두되었지만 [4-6] 대부분의 연구는 이온성 액체가 미생물을 비롯한 생물체에 미치는 독성에 대해서만 진행되고 있다. 그러나 화학적으로 안정한 구조를 지니는 난분해성 이온성 액체의 사용이 증가하면서, 환경유입과 축적으로 인한 생태계에 미치는 영향이 중요시되고 있으나 관련 연구는 미비한 실정이다. 환경유입에 따른 생태계 내 축적을 보일 수 있는 이온성 액체로는 imidazolium 계열의 이온성 액체가 있으며, 기존 유기 용매를 대체하기 위해 널리 연구된 이온성 액체로 광분해와 생분해에 대해 저항성이 강하다고 알려져 있다. United States National Toxicology Program [7]에 의하면 전반적인 imidazolium 계열의 이온성 액체가 구강, 피부, 호흡기, 눈에 접촉되면 염증을 일으킬 수 있을 만큼 높은 독성을 가지고 있다고 알려져 있다.

¹인하대학교 생물공학과

¹Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel: +82-32-860-7516, Fax: +82-32-872-4046

e-mail: sjaeseon@inha.ac.kr

²한남대학교 나노생명화학공학과

²Department of Chemical Engineering and NanoBioTechnology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

Shewanella oneidensis MR-1 (MR-1)은 그람 음성 미생물로 대표적인 환경미생물 중 하나이다 [8]. MR-1은 다양한 대사 과정을 통해서 용해된 구리나 금 등을 금속 형태로 추출하는 미생물학적 채광이나 중금속의 환원 및 오염성 유기 물질의 분해뿐만 아니라 방사성 물질 격리를 위한 응용 및 관련연구의 모델 생물체로 주목받고 있다 [9-11]. 또한 2002년 Institute for Genomic Research에 의해 유전자 서열 분석이 완료되어 분자생물학적 연구에 이상적인 모델 생물체로 알려져 있다 [12].

이에 본 연구에서는 이온성 액체의 환경유입으로 인한 생태계에 미치는 영향에 대한 관련 연구가 미비한 바, 이를 위한 기초 연구로서 주요 환경 모델 생물체로 알려져 있는 MR-1과 imidazolium 계열의 이온성 액체 [Omim][BF₄]에 순응된 *Shewanella oneidensis* SH-1 (SH-1)이 [Omim][BF₄]에 노출되었을 때 세포학적, 생화학적인 변화를 비교 분석하여 이온성 액체의 장기 노출이 미생물에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 이온성 액체

본 실험에 사용된 이온성 액체는 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [Emim][BF₄], 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [Bmim][BF₄], 1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [Hmim][BF₄], 1-octyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [Omim][BF₄]이며 모두 Tcis (Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 균주 및 배양 조건

본 연구에 사용된 미생물은 *S. oneidensis* MR-1 (MR-1)으로 캘리포니아주 대학의 Ken Nealson 교수로부터 분양받아 사용하였다 [12]. 배양 배지인 Luria-Bertani (LB) media는 Difco 사 (Detroit, MI, USA) 제품을 사용하였고, 배양조건은 30°C, 200 rpm, 24시간이며, 균주 보존을 위해 균배양액을 glycerol의 농도 25% (v/v)가 되도록 조성하여 -70°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

2.3. 순응 균주 선별

MR-1을 이온성 액체에 장시간 순응시키기 위해 이온성 액체에 대한 최소저해 농도를 측정하여 이보다 낮은 농도인 10 mM의 [Bmim][BF₄], 2 mM의 [Hmim][BF₄], 0.5 mM의 [Omim][BF₄]가 각각 포함된 LB 액체배지에 30°C, 200 rpm, 24시간 배양한 후 같은 농도의 이온성 액체가 포함된 LB 액체배지에 1% 접종하여 계대 배양하였다. 계대배양 과정에서 배지에 첨가하는 이온성 액체의 농도를 점차적으로 증가시키면서 최대 농도까지 순응시켰다 (Table 1). 순응된 균주는 이온성 액체가 없는 LB 액체배지에 30일간 계대배양한 후, 최대 순응 농도의 이온성 액체가 포함된 LB 액체배지에 접종하여

Table 1. Concentration range and MIC (Minimal Inhibition Concentration) for acclimation

Ionic liquids	Concentration range	MIC (Minimal Inhibition Concentration)
[Bmim][BF ₄]	10~60 mM	35 mM
[Hmim][BF ₄]	2~10 mM	3 mM
[Omim][BF ₄]	0.5~5 mM	1.5 mM

생장함을 확인함으로써 이온성 액체에 순응되었는지 확인하였으며 이 중 [Omim][BF₄]에 대해 순응된 균주를 *S. oneidensis* SH-1 (SH-1)이라 명명하였다.

2.4. 주사전자현미경 촬영

MR-1과 SH-1의 세포학적인 차이를 확인하기 위해 주사전자현미경을 통해 세포 길이 변화를 관찰하였다. 전처리를 위해 LB 액체배지와 5 mM의 [Omim][BF₄]가 포함된 LB 액체배지에 MR-1과 SH-1을 각각 24시간 배양하여 1% glutaraldehyde (Junsei, Japan) 용액에 4°C, 24시간 동안 고정화 과정을 거친 후, 에탄올에 탈수시켜 시료를 준비하였다. Field Emission SEM (Hitach S-4300, Japan)을 이용하여 미생물을 관찰하였다 (6.00 K, 5.0 µm scale).

2.5. 세포 표면 소수성 분석

세포 표면 소수성 분석은 hexadecane (SIGMA, St. Louis, MO, USA)을 이용한 방법으로 [13,14] 이를 위해 LB 액체배지와 5 mM의 [Omim][BF₄]가 포함된 LB 액체배지에 MR-1과 SH-1을 각각 30°C, 200 rpm, 24시간 동안 배양하여 시료를 준비하였다. 배양액을 원심분리 (6000 rpm, 5 min)하여 상등액을 제거한 후 phosphate buffer로 2회 세척하여 OD₆₀₀ = 0.7로 설정하였다. 두 개의 30 mL 유리관에 MR-1과 SH-1의 현탁액을 각각 2.5 mL를 넣고 hexadecane을 2.5 mL 첨가하여 진탕하였다. 진탕액을 정치하여 hexadecane과 미생물 혼합액이 완전히 분리될 때까지 기다렸으며 그 후 수용액을 취하여 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 세포 표면 소수성을 위해 $[1 - (OD_f/OD_i)] \times 100$ (%)로 나타냈다 (f: final optical density, i: initial optical density).

2.6. 세포 운동성의 분석

이온성 액체의 순응에 따른 운동성의 변화를 확인하기 위해 LB 액체배지와 5 mM의 [Omim][BF₄]가 포함된 LB 액체배지에 MR-1과 SH-1을 각각 30°C, 200 rpm, 24시간 동안 배양하여 원심분리 (6000 rpm, 5 min)를 통해 상등액을 제거한 후, phosphate buffer로 2회 세척하여 OD₆₀₀ = 0.7로 설정하였다. 이 현탁액 5 µL를 LB 0.3% 한천 배지에 접종하여 24시간 후 콜로니의 직경을 측정하였으며, 대조균으로 동일한 양의 현탁액을 LB 한천 배지에 접종하여 24시간 후 콜로니의 직경을 측정 후 비교하였다.

2.7. 지방산 분석

이온성 액체의 순응에 따른 지방산 조성의 변화를 확인하기

위해, LB 액체배지와 5 mM의 [Omim][BF₄]가 포함된 LB 액체배지에 MR-1과 SH-1을 각각 30°C, 200 rpm, 24시간 동안 배양한 미생물의 지방산을 분석하였다. 지방산 분석은 Miller [15]의 방법으로 측정하였다. 분석기기로는 Gas chromatography (Agilent 6890, Agilent, CA, USA)를 사용하였으며, separation column은 A30 m×0.320 mm×0.25 µm Crosslinked Methyl siloxane column (HP1)을 이용하였다.

3. 결과

3.1. 순용 균주 선별

이온성 액체의 장기 노출이 미생물에 미치는 영향을 알기 위해 MR-1을 Table 1과 같이 이온성 액체의 순차적인 농도 증가를 통해 순용시켰다. 순용 중 [Omim][BF₄]의 최대 순용 농도가 5 mM을 보여 최대 순용 농도가 각각 60 mM과 10 mM인 [Bmim][BF₄]와 [Hmim][BF₄]에 비해 높은 독성을 보임을 알 수 있었다. 이는 이온성 액체의 alkyl carbon chain의 길이가 길수록 더 강한 독성을 보인다는 Cho et al. [6]의 연구결과와 같이 실제로 [Omim][BF₄]의 alkyl carbon chain의 길이가 [Omim][BF₄]와 [Bmim][BF₄]보다 더 길기 때문에 가장 강한 독성을 보임을 알 수 있었다. 순용 기간은 총 6개월이며 순용 미생물을 이온성 액체가 없는 LB 액체 배지에 30일 동안 계대 배양한 후 각 최대 순용 농도의 이온성 액체가 들어 있는 LB 액체 배지에서의 성장을 통해 순용 능력 유지를 확인하였다. 이 중 가장 강한 독성을 보이는 [Omim][BF₄]에 대해 순용된 미생물인 SH-1과 MR-1을 세포학적, 생화학적으로 비교, 분석하였다.

3.2. 주사전자현미경을 이용한 세포학적 비교

이온성 액체에 노출되었을 때 세포학적인 변화를 확인하기 위해 LB 액체배지와 5 mM의 [Omim][BF₄]가 포함된 LB 액체배지에 각각 MR-1과 SH-1을 24시간 배양 후 주사전자현미경으로 관찰하였다. Fig. 1에서 SH-1이 평균 3 µm로 평균 1 µm인 MR-1에 비해 3배 정도 길이가 길어졌음을 확인할 수 있었다. Zhang et al. [16]의 연구에서 이온성 액체 [EtPy][BF₄]를 *Pseudomonas fluorescens*에 노출시켰을 때 세포 길이가 길어진 결과와 유사하며, Aertsen et al. [17]의 연구결과에 의하면 다양한 stress가 미생물의 세포벽 합성에 관련된 유전

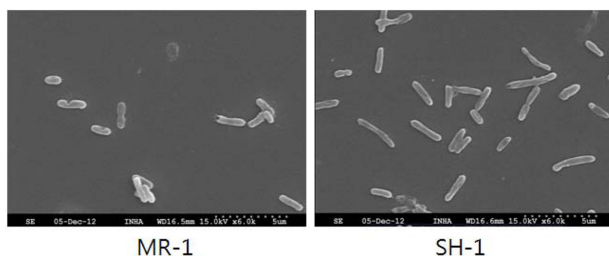


Fig. 1. Images of *S. oneidensis* MR-1 and acclimated *S. oneidensis* SH-1.

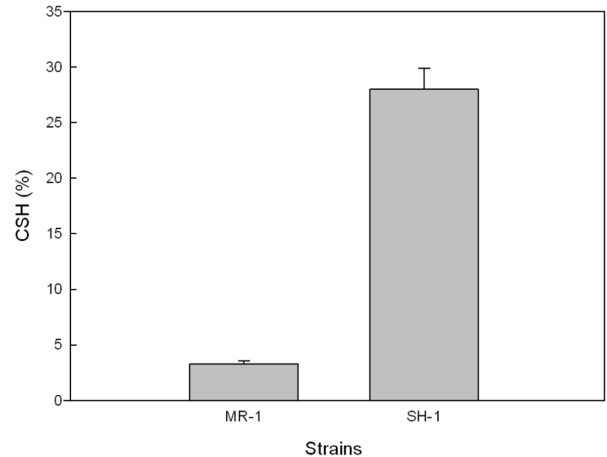


Fig. 2. Cell Surface Hydrophobicity of *S. oneidensis* MR-1 and acclimated *S. oneidensis* SH-1.

자의 변화와 세포 분열이나 대사 과정의 저해를 유발시켜 세포 길이가 길어진다고 보고되어져 있어 [Omim][BF₄]의 장기 노출이 MR-1에 stress로서 작용되어 세포 길이를 증가시키며 유전 및 대사적인 저해를 일으킬 수 있음을 유추할 수 있었다.

3.3. 세포 표면 소수성 분석

미생물을 이온성 액체에 노출시켜 세포 표면 소수성 변화를 분석하였다. Fig. 2에서 MR-1의 소수성은 3.3%를 보였으나 SH-1은 28.2%로 현저히 증가하였다. Saini et al. [18]의 연구에서 염인 ammonium sulfate를 MR-1에 처리하여 소수성을 증가시켰으며, 이는 수용액에서 염에 의해 증가된 이온 강도가 정전기적 상호작용을 억제시키고 소수성 상호 작용을 증가시켜 미생물의 소수성을 증가시킨다고 하였다 [18, 19]. 본 실험에 사용된 [Omim][BF₄]도 이온 결합으로 이루어진 염이기 때문에 수용액에서 위와 같은 작용으로 [Omim][BF₄]의 장기 노출이 의해 MR-1의 세포 표면이 소수성화된 것으로

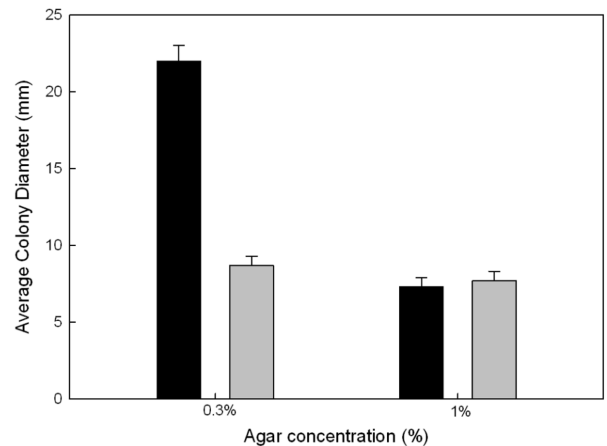


Fig. 3. Motility test of *S. oneidensis* MR-1 and acclimated *S. oneidensis* SH-1. Mean diameter (mm; ± standard deviation) of MR-1 (black) and SH-1 (gray) grown.

Table 2. Fatty acid composition of *Shewanella oneidensis* MR-1 and *Shewanella oneidensis* SH-1

Strain	Mean % (by weight) fatty acid ± SD				BCFA/SCFA ratio	UFA/SFA ratio
	BCFA ^a	SCFA ^b	SFA ^c	UFA ^d		
MR-1	41.1±1.5	38.1±2.1	17.8±1.7	61.5±0.3	1.1±0.1	0.3±0.1
SH-1	27.6±2.5	53.4±1.8	19.3±0.4	61.7±0.5	0.5±0.0	0.3±0.0

a: Branched Chain Fatty Acid, b: Straight Chain Fatty Acid, c: Saturated Fatty Acid, d: Unsaturated Chain Fatty Acid

사료된다.

3.4. 세포 운동성 분석

이온성 액체의 장기 노출이 미생물의 운동성에 미치는 영향을 조사하였다. LB 한천 배지에서 SH-1과 MR-1의 운동성이 각각 7 mm와 8 mm로 큰 차이가 없었으나, LB 0.3% 한천 배지에서 SH-1의 운동성이 7 mm로 운동성 22 mm인 MR-1에 비해 대폭 감소한 것을 알 수 있다 (Fig. 3). Liu et al. [20]의 연구에서 NaCl를 MR-1에 처리하여 MR-1의 운동성이 감소된 것을 보였으며 이는 NaCl이 MR-1의 편모에 저해를 주어 운동성을 감소시키는 것이라고 설명하였다. 따라서 MR-1은 이온성 액체에 장기 노출되었을 때 편모에 저해를 받아 운동성이 감소되는 것으로 유추할 수 있다.

3.5. 지방산 분석

이온성 액체의 장기 노출이 미생물을 구성하는 지방산에 미치는 영향을 알아보기 위해 MR-1과 SH-1의 지방산을 비교, 분석하였다. MR-1과 SH-1의 Saturated Fatty Acid (SFA)와 Unsaturated Fatty Acid (UFA)의 조성은 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 MR-1의 Branched Chain Fatty Acid (BCFA)와 Straight Chain Fatty Acid (SCFA)는 각각 41.1%와 38.1%를 보인 반면, SH-1인 경우 BCFA와 SCFA는 각각 27.6%, 53.4%를 보였다. MR-1의 BCFA와 SCFA 간의 비율을 보면 1:1로 거의 유사함을 보이나, SH-1이 MR-1에 비해 BCFA가 13.5% 감소하였고, SCFA는 15.3% 만큼 증가하여 BCFA과 SCFA 간의 비율이 0.5로 BCFA/SCFA비가 절반 가까이 감소한 것을 볼 수 있다 (Table 2). BCFA의 함량은 미생물 세포막의 유동성을 증가시킨다고 보고된 바 있는데 [21] 본 연구에서도 MR-1이 장기간 이온성 액체에 노출되었을 시 BCFA의 감소를 통해 세포막 유동성이 감소된 것으로 예상할 수 있다.

4. 결론

본 연구에서 이온성 액체 [Omim][BF₄]의 장기 노출이 환경 미생물인 *Shewanella oneidensis* MR-1 (MR-1)에 미치는 영향을 조사하였다. MR-1을 다양한 이온성 액체에 순응시켰으며 이 중 독성이 강한 [Omim][BF₄]에 대해 순응된 미생물을 선택하여 *Shewanella oneidensis* SH-1 (SH-1)이라 명명하고, SH-1에 [Omim][BF₄]를 노출시켜 MR-1과 세포학적, 생화학적으로 비교 분석하였다. 주사전자현미경을 이용한 세포학적 비교에서는 SH-1의 길이가 MR-1에 비해 3배 길어졌으며 세포 표면 소수성 비교 분석 결과, SH-1은 MR-1보다

24.9% 만큼 증가한 소수성을 나타내었다. 세포의 운동성에서 SH-1의 운동성이 68.2%만큼 감소함을 알 수 있었다. 또한 지방산 분석을 통해서 SH-1의 BCFA가 27.6%로 41.1%인 MR-1에 비해 낮은 함량을 보이는 것을 알 수 있었다. 위 결과들을 토대로 모델 생물체인 MR-1이 [Omim][BF₄]의 장기 노출에 의해 세포학적, 생화학적으로 변화가 생김을 알 수 있었다. 이러한 연구 결과는 이온성 액체의 장기 노출로 인해 생길 수 있는 세포 수준의 변화와 생태학적 조사를 위한 기초 연구로 쓰일 수 있으며, 추후 MR-1에 대한 이온성 액체의 장기 노출이 유전자와 대사활성에 어떤 영향을 주는지에 대한 연구도 필요할 것이다.

감사

본 연구는 인하대학교 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Plechkova, N. V. and K. R. Seddon (2008) Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem. Soc. Rev.* 37: 123-150.
2. Matsumoto, M., K. Mochiduki, and K. Kondo (2004) Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid producing bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 98: 344-347.
3. Lee, S. M., W. J. Chang, A. R. Choi, and Y. M. Koo (2005) Influence of ionic liquids on the growth of *Escherichia coli*. *Korean J. Chem. Eng.* 22: 687-690.
4. Azimova, M. A., S. A. Morton, and P. D. Frymier (2009) Comparison of three bacterial toxicity assays for imidazolium derived ionic liquids. *J. Environ. Eng.* 135: 1388-1392.
5. Bernot, R. J., M. A. Brueseke, M. A. E. White, and G. A. Lamberti (2005) Acute and chronic toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 87-92.
6. Cho, C. W., T. P. T. Pham, Y. C. Jeon, K. Vijayaraghavan, W. S. Choe, and Y. S. Yun (2007) Toxicity of imidazolium salt with anion bromide to a phytoplankton *Selenastrum capricornutum*: Effect of alkylchain length. *Chemosphere.* 69: 1003-1007.
7. National Toxicology Program (NTP) and National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (2004) "Review of Toxicological Literature for Ionic Liquids", prepared by Integrated Laboratory Systems Inc., Research Triangle Park, NC, USA.
8. Fredrickson, J. K., M. F. Romine, A. S. Beliaev, J. M. Auchtung, M. E. Driscoll, T. S. Gardner, K. H. Nealson, A. L. Osterman, G. Pinchuk, J. L. Reed, D. A. Rodionov, J. L. M. Rodrigues, D. A. Saffarini, M. H. Serres, A. M. Spormann, I. B. Zhulin, and J. M.

- Tiedje (2008) Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 592-603.
9. Brown, S. D., M. Martin, S. Deshpande, S. Seal, K. Huang, E. Alm, Y. Yang, L. Wu, T. Yan, X. Liu, A. Arkin, K. Chourey, J. Zhou, and D. K. Thompson (2006) Cellular Response of *Shewanella oneidensis* to Strontium Stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 890-900.
 10. Boukhalfa, H., G. A. Icopini, S. D. Reilly, and M. P. Neu (2007) Plutonium (IV) Reduction by the Metal Reducing Bacteria *Geobacter metallireducens* GS-15 and *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5897-5903.
 11. Hau H. H. and J. A. Gralnick (2007) Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 237-258.
 12. Heidelberg, J. F., I. T. Paulsen, K. E. Nelson, E. J. Gaidos, W. C. Nelson, T. D. Read, J. A. Eisen, R. Seshadri, N. Ward, B. Methe, R. A. Clayton, T. Meyer, A. Tsapin, J. Scott, M. Beanan, L. Brinkac, S. Daugherty, R. T. DeBoy, R. J. Dodson, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. F. Kolonay, R. Madupu, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, A. M. Wolf, J. Vamathevan, J. Weidman, M. Impraim, K. Lee, K. Berry, C. Lee, J. Mueller, H. Khouri, J. Gill, T. R. Utterback, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, H. O. Smith, J. C. Venter, K. H. Nealson, and C. M. Fraser (2002) Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat. Biotech.* 20: 1118-1123.
 13. Zhang, Y. and R. M. Miller (1994) Effect of a *Pseudomonas* Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2101-2106.
 14. Al-Tahhan, R. A., T. R. Sandrin, A. A. Bodour, and R. M. Maier (2000) Rhamnolipid Induced removal of Lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3262-3268.
 15. Miller, L. T. (1982) Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy. *J. Clin. Microbiol.* 16: 584-586.
 16. Zhang, C., S. V. Malhotra, and A. J. Francis (2011) Toxicity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids and the cometabolic degradation of Nethylpyridinium Tetrafluoroborate. *Chemosphere.* 82: 1690-1695.
 17. Aertsen, A., R. Van Houdt, K. Vanoirbeek, and C. W. Michiels (2004) An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186: 6133-6141.
 18. Lindahl, M., M. Faris, T. Wadstrom, and S. Hjerten (1981) A new test based on 'salting out' to measure relative hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 677: 471-476.
 19. Rosenberg, M. (2006) Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiol. Lett.* 262: 129-134.
 20. Liu, Y., W. Gao, Y. Wang, L. Wu, X. Liu, T. Yan, E. Alm, A. Arkin, D. K. Thompson, M. W. Fields, and J. Zhou (2005) Transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 in response to elevated salt conditions. *J. Bacteriol.* 187: 2501-2507.
 21. Kaneda, T. (1991) Iso- and Anteiso-Fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Function, and Taxonomic Significance. *Microbiol. Rev.* 55: 288-302.