

Moderate 호염성 세균의 Plasmid 유전자 분리

홍 용 기
부산수산대학 자원생물학과
(1985년 9월 15일 수리)

Isolation of Plasmids from the Moderately Halophilic Bacteria

Yong-Ki HONG

Department of Marine Biology, National Fisheries University of Pusan,
Nam-gu, Pusan 608, Korea
(Received September 15, 1985)

Moderately halophilic bacteria were collected from solar salt with Larsen medium containing 10% NaCl. A total of 56 strains were isolated and tested for the presence of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. Twelve isolates (21%) carried at least one kind of plasmid. Six different isolates among them were selected to study the molecular weight of plasmids and the morphological and physiological characters. *Vibrio* sp. 14, *Alcaligenes* sp. 63, *Pseudomonas* sp. 11, *Flavobacterium* sp. 38, *Bacillus* sp. 16, and *Alcaligenes* sp. 52 carried at least one plasmid of about 7.2 kbp, 6.4 kbp, 6.85 kbp, 8.5 kbp, 8.75 kbp, and 6.8 kbp respectively.

서 론

호염성 세균들중에는 해수의 염농도보다 더 높은 염도, 염전같은 환경이나, 염장식품등에 널리 존재하는 moderate 호염성 세균과 extreme 호염성 세균으로 대별할 수 있는데 이들은 그 생육조건에서 염의 농도를 3~15% 정도와 15%이상을 각각 요구하는 것으로 구별할수가 있다.¹⁾

그중 extreme 호염성 세균의 형태나^{2~6)} 생리적 성질에^{1,4,7,8)} 대해서는 이미 많이 알려져 있으며, 최근에 이들 유전자의 특성^{9~12)} 및 plasmid 유전자의 성질^{13,14)} 등에 관하여 많이 연구되어지고 있다. moderate 호염성 세균에 대해서는 그 생리적 성질이 Gibbons¹⁾, Katznelson¹⁵⁾, Flannery¹⁶⁾, MacLeod¹⁷⁾ 등에 의하여 이미 조사되었으며 Ventosa¹⁸⁾ 등에 의하여 이들중 gram 음성 간균의 분류가 이루어졌다. 그러나 이들의 유전자 특성이나 plasmid 유전자의 분포등에 관하여는 해양 *Vibrio* 균¹⁹⁾ 외에는 거의 알려져 있지 않다. 그래서 본 연구에서는 천일염으로부터의 mode-

rate 호염성균을 분리하여 고농도 염의 환경에 적응하는 수단으로서의 plasmid 유전자의 관련성과 염장식품의 숙성미생물에 대한 유전자 조작의 vector로서의 개발을 위하여 우선 이들중 plasmid 유전자를 가진 6종을 선별하고 이들을 각각 동정하였다.

재료 및 방법

호염성 세균의 분리

moderate 호염성 세균은 천일염으로부터 10%의 NaCl을 함유하는 Larsen 배지⁸⁾(2% MgSO₄, 0.5% KCl, 0.02% CaCl₂, 0.4% yeast extract, 0.5% tryptone)을 사용하여 30°C에서 7일간 배양하여 균분리하였다.

배양조건

분리된 균주들은 모두 6% NaCl을 함유하는 Larsen 배지⁸⁾를 완전배지로서 사용하여 30°C에서 1일

간 진탕배양하였으며, 필요에 따라 최소배지로서는 6% NaCl 을 함유하는 해양세균 분리용배지²²⁾ (0.1 % glycerol, 0.1% K-acetate, 19 mM NH₄Cl, 0.33 mM K₂HPO₄, 100 mM MgSO₄, 20 mM KCl, 20 mM CaCl₂, 0.1 mM FeSO₄, 50 mM Tris·Cl, pH 7.5)를 사용하여 2일간 진탕배양하였다. 이때 각 배지성분들은 별도로 살균한후 합하여 사용하였으며 균체성장은 540 nm 에서의 흡광도로서 측정하였다.

Plasmid 분리

plasmid 유전자를 함유하는 균을 선별하기 위하여 우선 간단한 boiling 추출법²⁰⁾을 사용하였다. 그리고 이들 plasmid 들을 확인하기 위하여 20 ml 배양액으로부터 Alkaline-Lysis 법²⁰⁾과 큰 분자량의 plasmid 유전자를 추출하는 D. Portnoy & F. White 방법²¹⁾을 사용하여 마지막에 RNase A 로 RNA 를 제거하고 ethanol 로 침전회수하여 30 μl TE 용액(0.05 M Tris·Cl, 0.01 M EDTA, pH 8.0)에 녹였다.

Agarose Gel 전기영동

위의 plasmid 용액(5 μl)을 동일량의 염색용액(30 % glycerol, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol)과 혼합하여 0.6%의 agarose gel 위에서 전기영동하였다. 이때 완충용액은 TBE 용액(89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2.5 mM Na₂EDTA, pH 8.4)을 사용하여 gel 1 cm 당 5V의 전압으로 3시간동안 전기영동하였다. 그리고 이 plasmid 들은 ethidium bromide 용액(2.5 μg/ml) 내에서 발색시켜 자외선하에서 확인하였다.

Plasmid 분자량

plasmid 의 분자량은 4종의 이미 분자량이 알려진 pUC 9(2.7 Kbp), pBR 322(4.36 Kbp), YEP 13(10.7 Kbp), pGU 66(18.1 Kbp)과 함께 전기영동하여 이동 거리에 대한 지수적 분자량의 반비례에 따라 비교 결정하였다.

형태적 및 생리적 특성

gram 염색은 KOH 법²³⁾에 따라 행하였으며 Hucker 법²⁴⁾으로 확인하였다. 균체생육에 필요한 NaCl 의 요구도는 16% 농도까지만 완전배지로서는 Larsen 배지¹⁸⁾를, 최소배지로서는 해양세균 분리배지²²⁾를 각각 사용하여 540 nm 에서의 흡광도 증가로서 측정하였다. 성장온도, 성장 pH, VP test, 질산환원, 항

생물질 감수성조사는 완전배지를 사용하였으며, 그의 혐기배양, gas 생성, catalase, H₂S 생성, casein·gelatin·전분·urea 분해성, 각종 탄수화물(1%)로부터의 산생성등은 최소배지를 사용하여 일반 세균 동정방법²⁴⁾에 따라 행하였으며 이 결과 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(8판)²⁶⁾ 및 Ventosa 분류¹⁹⁾에 따라 동정하였다.

결과 및 고찰

Plasmid 함유균의 분리

천일염으로부터 10% NaCl 을 함유하는 Larsen 배지¹⁸⁾에서 생육하는 56균주중에서 plasmid 를 함유하는 세균을 boiling 법²⁰⁾으로 추출하여 agarose minigel 을 사용한 전기영동으로 확인한바 12개균 즉 21%의 moderate 호염성균이 plasmid 를 가진것으로 나타났다. 이중 서로 다른 형태적 생리적 특성을 지닌 6균주를 선택하여 plasmid 확인 및 동정실험을 하였다.

Plasmid 확인

plasmid 를 확인하기 위하여 20 ml 의 완전배지에서 1일동안 배양한 세포를 원심분리하여 작은 크기의 plasmid 를 추출하는 Alkaline-Lysis 법²⁰⁾으로 추출하였다.

여기에 RNase A (20 μg)를 실온에서 20분간 처리한후 polyethylene glycol 8000 으로 Plasmid 들을 농축한 다음 phenol 추출, chloroform 추출하여 단백질을 제거하고 ethanol 로 침전회수하여 30 μl 의 TE 용액에 녹였다. 이 plasmid 들을 agarose 전기영동한 결과 Fig.1과 같다. 14번, 38번, 16번 균주의 경우는 염색체들의 일부가 함께 추출되어서 상층에 두꺼운 band 가 보인다. 그러나 모든 균주의 경우 분자량의 크기가 pBR 322 와 YEP 13 사이에 1개 이상의 plasmid band 를 가지고 있다. 다음 150 Kbp 이상의 큰 분자량의 plasmid 존재를 확인하기 위하여 D. Portnoy & F. White 방법²¹⁾에 따라 pH12.4의 4% SDS 용액에서 세포를 분해시킨 다음 1M NaCl 로 염색체를 제거시키고 isopropanol 로 plasmid 를 침전 회수하여 RNase 를 처리한 다음 Alkaline-Lysis 법과 같이 TE 에 용해시켰다. 이를 agarose 전기영동한 결과 Fig.2에서와 같이 38번 균주의 경우는 염색체의 일부만 보이는 것 같으며 그의 균주에서는 plasmid band 가 선명하게 보인다. 이는 고분자 plasmid

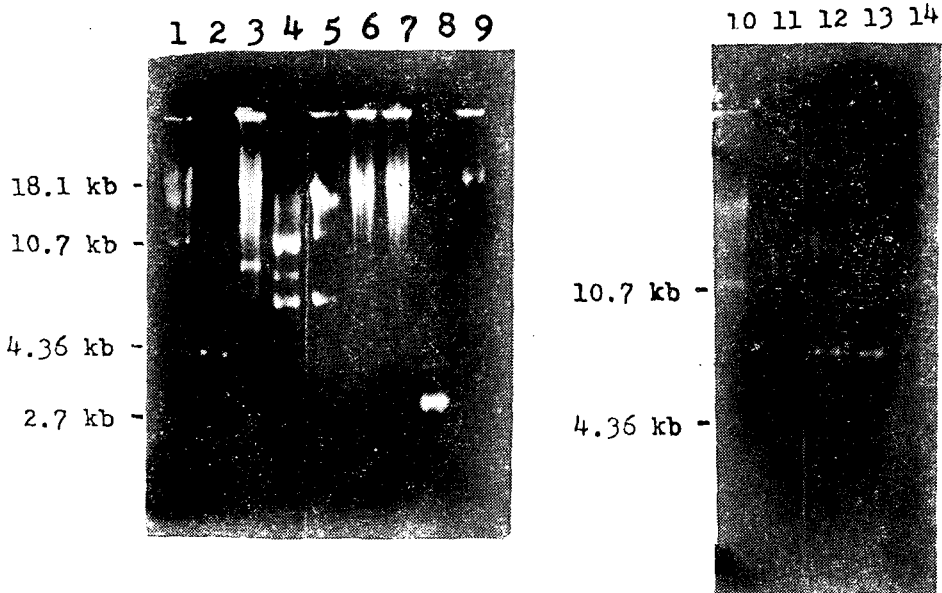


Fig. 1. Agarose Gel Electrophoresis of Plasmids Extracted by Alkaline-Lysis Method. Lane 1 & 10, molecular marker YEP13. Lane 2 & 11, molecular marker pBR322. Lane 3, plasmid of strain 14. Lane 4 & 12, plasmid of strain 63. Lane 5 & 14, plasmid of strain 11. Lane 6, plasmid of strain 38. Lane 7, plasmid of strain 16. Lane 8, molecular marker pUC 9. Lane 9, molecular marker pGU 66. Lane 13, plasmid of strain 52.

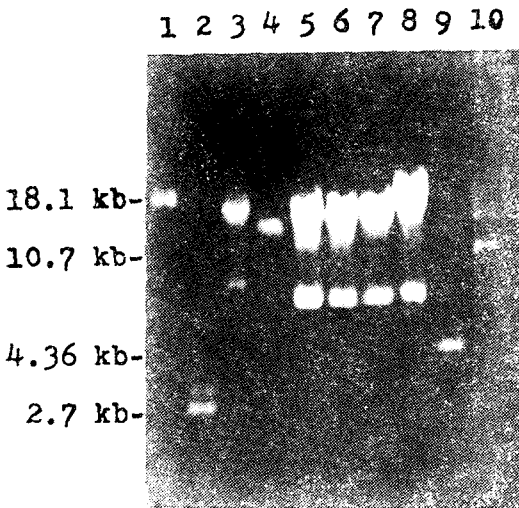


Fig. 2. Agarose Gel Electrophoresis of Plasmids Extracted by the Large Plasmid Isolation Method of D. Portnoy & F. White. Migration distances of the molecular markers pGU 66, pUC 9, pBR 322, and YEP 13 are shown in lane 1, 2, 9, and 10 respectively. Lanes 3 to 8 are plasmids of strains 16, 38, 11, 52, 63, and 14, respectively.

를 추출하는 방법이므로 앞의 방법보다 더 많은 위층의 염색체 band 들이 보이며 큰 plasmid 들은 존재하지 않는 것으로 보인다.

Plasmid 들의 분자량

이들의 분자량을 측정하기 위하여 4개의 이미 분자량을 알고있는 plasmid 들과의 agarose 전기영동 (Fig.1)상에서 이동거리를 비교하였다. 14번, 63번, 11번, 52번 균주들은 3개의 plasmid band 를 가지는데 Fig.2에서는 단일의 band 만 있으므로 closed circular plasmid 외에 추출과정에서 open circular 혹은 linear 상태로 구조가 변하여 일부 나타난것으로 여겨진다. 그래서 가장 아래쪽의 closed circular 모양으로 여겨지는 plasmid 들로만 Fig.3에서 보는바와 같이 표준 plasmid 들과 비교하였다. 그 결과 14번균주는 7.2 kbp, 63번균주는 6.4 kbp, 11번균주는 6.35 kbp, 52번균주는 6.8 kbp의 Plasmid 를 가진것으로 나타났다. 38번균주는 약한 2개의 band 중 많이 이동한 band 가 8.5 kbp 크기를 가지며 Fig.2의 약 12 kbp 크기의 단일 band 는 염색체 일부인것 같이 보이나 아직 확인되지는 않았다. 16번균주는 38번과 비슷한 크기의 희미한 band 가 8.75 kbp 의 크

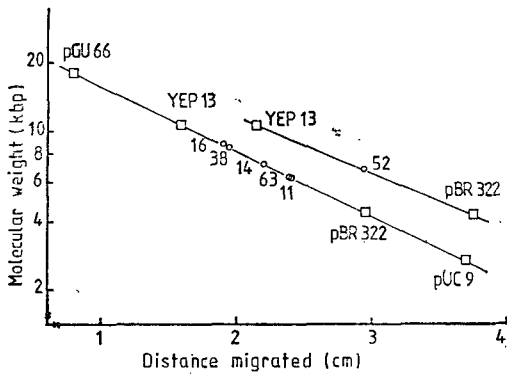


Fig. 3. Molecular Size of The Plasmids. Results are derived from the migration distances of plasmids runned on agarose gel electrophoresis of Fig. 1.

기로서 Fig. 2에서도 분명히 확인할 수 있었다. 이런 작은 크기의 plasmid 들의 분포는 해양 *Vibrio* 균의

대부분 plasmid 들이 15 kbp 미만이라는 사실¹⁹⁾과 일치하며 깨끗한 환경에서 서식하는 세균의 plasmid 는 작은크기를 주로 가지며 많이 오염된 환경의 세균들로부터는 큰 plasmid 들이 주로 분포되어있다는 사실²⁰⁾과도 잘 일치한다.

형태적 및 생리적 특성

위와같이 plasmid 를 함유하는 moderate 호염성 세균을 동정하기 위하여 각 균의 형태적 특성을 조사한 바 Table 1과 같다.

그리고 Table 2와 Table 3에서는 각 균의 생리적 특성 및 탄수화물들로 부터의 산생성능력을 조사하였다.

그 결과 14번균주의 경우 gram 음성 간균으로, 운동성이있고, VP test 양성, 질산환원, 포도당으로부터 산을 생성할 수 있으나 gas 생성은 없고, urease 음성이므로 Bergey's manual 8판²⁶⁾에 의하여 *Vibrio*

Table 1. Morphological characters of six moderately halophilic bacteria

	14	63	11	38	16	52
Form	rod	rod	coccal rod	rod	rod	rod
Width, μm	0.8—1.0	0.7	1.3	0.8—1.0	0.4—0.8	0.6—0.8
Length, μm	2.2—3.8	1.9—2.3	2.0—2.3	1.8—3.2	1.8—3.2	1.5—1.9
Motility	+	+	+	+	—	+
Pigment	none	creamy	creamy	orange	none	creamy
Gram stain	—	—	—	—	+	—

Table 2. Physiological characters of six moderately halophilic bacteria

	14	63	11	38	16	52
NaCl requirement (%)						
on CM	2—10	1—16	2—14	2—16	1—11	1—16
on MM	1—10	1—12	1—12	2—10	1—10	0—14
Opt. concentration	3—6	5—7	4—8	4—7	3—7	3—9
Growth temperature	30—42	30—42	25—42	30—37	25—42	20—42
Growth pH	5—9	6—10	6—9	6—9	6—9	6—10
Anaerobic growth	±	—	—	—	—	—
Gas production	—	—	—	—	—	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
VP test	+	—	—	—	+	—
NO ₃ reduction	+	+	+	+	+	+
H ₂ S production	+	—	—	+	—	—
Caseinolysis	—	—	—	+	+	—
Gelatinolysis	—	—	—	+	—	—
Amylase	—	—	—	+	+	—
Urease	—	—	—	—	—	—
Streptomycin ^R	—	—	—	—	—	—
Penicillin ^R	+	+	+	+	+	+
Erythromycin ^R	—	+	—	—	—	+
Rifampicin ^R	—	—	—	—	—	—

Table 3. Acid production from carbohydrates (1%) in minimal medium

	14	63	11	38	16	52
Arabinose	-	-	-	-	-	-
Galactose	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	+	+	-
Mannose	+	-	-	+	-	-
Sucrose	+	-	-	+	+	-
Glucose(fermentative)	+	-	-	+	-	-

속으로 간주될 수 있으나 본 균은 30°C와 37°C에 비하여 증식도는 낮지만 42°C에서도 생육할 수 있는 차이점을 가지고 1~10%의 NaCl 농도에서도 생육할 수 있으며 casein과 gelatin, 전분을 분해하지 못하고 NaCl 없이는 생육하지 못하므로 *V. costicola*로 추정된다. 63번균주의 경우는 gram 음성 간균으로 운동성이 있고 catalase 양성, urease 음성이며, pH 5에서는 생육하지 못하고 pH 10에서는 약간 생육할 수 있고, H₂S 생성배지에서는 약한 황색을 가지나 일반배지에서는 cream 색을 가진다. 그리고 16% NaCl에서도 잘 생육하므로 더 높은 염농도에서도 증식가능한 것으로 보인다. 42°C에서도 잘 생육하고 절대 호기성 균으로, 발효력이 없고, NH₄ 이온을 함유한 최소배지에서도 잘 생육하며, 단백질분해력이 없으므로 Beygey's manual²⁶⁾과 Ventosa 분류¹⁸⁾에 따라 *Alcaligenes* 속으로 간주된다. 그리고 비발효적 해양 Eubacteria 중에서 amylase와 gelatin 분해력, 색소등이 없는 균으로는 *Alteromonas* 속과 *Pseudomonas* 속을 들 수 있는데 11번 균주의 경우는 Gram 음성, single coccal rod 형태로, 운동성이 있고, 절대 호기성균으로, 초산염을 이용할 수 있고, catalase 양성이며, 30°C와 37°C에서 최적생육을 나타내나 42°C에서도 그 절반 정도의 생육을 보인다. 그리고 fructose 등 많은 탄수화물들을 이용할 수 있으므로 Bergey's manual²⁶⁾에 따라 *Pseudomonas* 속으로 추정된다. 그중에서도 성장인자를 요구하지 않는 group으로 분류될 수 있다. 38번균주의 경우는 gram 음성 간균으로 운동성이 있고, 비수용성 황색 색소를 가지며, 포도당으로부터 산을 생성하나 gas 형성능력은 없다. 그리고 30°C 이하에서 생육을 잘하나 37°C에서는 겨우 생육할 수 있다. 따라서 Bergey's manual²⁶⁾에 의하여 *Flavobacterium* 속으로 간주되며 그중에서도 생육에 반드시 NaCl을 요구하며

casein 및 gelatin을 분해할 수 있고 glucose·sucrose·maltose로부터 산을 생성하므로 *F. indoltheticum*으로 추정되나 질산환원능력을 갖고있는 점이 상이하다. 16번균주는 gram 양성 간균으로 절대 호기적이며, catalase 양성, 질산환원, VP test 양성 및 casein 분해력을 가지며, glucose·sucrose·xylose·mannitol 등으로부터 산생성능력을 지닌다. 그래서 Bergey's manual²⁶⁾에 따라 *Bacillus* 속으로 추정된다. 그러나 대부분의 *Bacillus* 들은 운동성을 가지지만 일부 7% NaCl에서도 생육할 수 있는 종들은 운동성이 없으므로 이와 일치한다.

52번균주는 전반적으로 63번 균주와 형태적 생리적 특성이 같아서 *Alcaligenes* 속으로 추정하나 1% 포도당을 함유한 혐기조건의 배지에서 산생성은 없지만 gas 형성을 볼 수 있는 점이 상이하다.

요 약

천일염으로 부터의 10% NaCl 농도에서 생육할 수 있는 moderate 호염성 세균들을 대상으로하여 간단한 boiling 법으로 plasmid 유전자를 함유하는 6종을 선별하여 Alkaline-Lysis 법과 고분자 plasmid 추출법인 D. Portnoy & F. White 방법에 따라 plasmid를 추출하여 agarose gel 전기영동으로 확인하였고 각 균을 동정하였다. 그중 *Vibrio* sp. 14는 최소 7.2 kbp, *Alcaligenes* sp. 63은 6.4 kbp, *Pseudomonas* sp. 11은 6.35 kbp, *Flavobacterium* sp. 38은 8.5 kbp, *Bacillus* sp. 16은 8.75 kbp, *Alcaligenes* sp. 52는 6.8 kbp 크기의 plasmid를 가지고 있는 것으로 나타났다.

文 獻

- Gibbons, N. E. 1969. Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria. Methods in Microbiology. Vol. 3B. 169—183. Academic press, N. Y.
- Cho, K. Y., C. H. Doy, E. H. Mercer. 1967. Ultrastructure of the obligate halophilic bacterium *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. 94. 196—201.
- Bazire, G. C., R. Kunisawa, N. Pfennig. 1969. Comparative study of the structure of vacuole. J. Bacteriol. 100, 1049—1061.
- Walsby, A. E. 1972. Structure and function of

- gas vacuoles. *Bacteriol. Rev.* 36, 1—32.
5. Krantz, M. J., C. Ballou. 1973. Analysis of *Halobacterium halobium* gas vacuoles. *J. Bacteriol.* 114, 1058—1067.
 6. Javor, B., C. Requadt, W. Stoeckenius. 1982. Box shaped halophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 151, 1532—1542.
 7. Flannery, W. L. 1956. Current status of knowledge of halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 20, 49—66.
 8. Larsen, H. 1981. The family *Halobacteriaceae*. *The Prokaryotes*. Vol. I. 985—993. Springer-Verlag. N. Y.
 9. Fox, G. E. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science*. 209, 457—463.
 10. Woese, C. R. 1981. Archaeobacteria. *Scient. Am.* 244, 94—106.
 11. Pfeifer, F., G. Weidinger, W. Goebel. 1981. Genetic variability in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 145, 375—381.
 12. Sapienza, C., W. F. Doolittle. 1982. Unusual physical organization of the *Halobacterium* genome. *Nature* 295, 384—389.
 13. Simon, R. D. 1978. *Halobacterium* strain 5 contains a plasmid which is correlated with the presence of gas vacuoles. *Nature* 273, 314—317.
 14. Weidinger, G. G. Klotz, W. Goebel. 1979. A large plasmid from *Halobacterium halobium* carrying genetic information for gas vacuole formation. *Plasmid* 2, 377—386.
 15. Katznelson, H., A. G. Lochhead. 1952. Growth factor requirements of halophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 64, 97—103.
 16. Flannery, W. L., R. N. Doetsch, P. A. Hansen. 1952. Salt desideratum of *Vibrio costicola*, an obligate halophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 64, 713—717.
 17. MacLeod, R. A., E. Onofrey, M. E. Norris. 1954. Nutrition and metabolism of marine bacteria. *J. Bacteriol.* 68, 680—686.
 18. Ventosa, A., E. Quesada, F. R. Valera, F. R. Berraquero, A. R. Cormenzana. 1982. Numerical taxonomy of moderately halophilic gram negative rods. *J. Gen. Microbiol.* 128, 1959—1968.
 19. Hada, H. S., R. K. Sizemore. 1981. Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. isolated from an oil field in the northwestern gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 199—207.
 20. Maniatis, T., E. F. Fritsch, J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning*. CSH Laboratory. 365.
 21. Crosa, J. H., S. Falkow. 1981. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology pp269.
 22. Baumann, P., L. Baumann. 1981. The marine Gram negative eubacteria. *The Prokaryotes*. vol. II. 1302—1331. Springer-Verlag. N. Y.
 23. Buck, J. D. 1982. Nonstaining method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 992—993.
 24. Smibert, R. M., N. R. Krieg. 1981. General characterization. *Manual of Methods for General Bacteriology* 409—443. American Society for Microbiology. Washington, D. C.
 25. Kobori, H., C. W. Sullivan, H. Shizuya. 1984. Bacterial plasmids in antarctic natural microbial assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 515—51.