

## 한국 염전에서 부터 분리한 고도 호염성 세균의 동정 및 특성

배우 · 이정임

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과

### Identification and Characteristics of Extreme Halophilic Bacteria Isolated from a Saltern in Korea

Moo Bae and Jeong Im Lee

Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

**ABSTRACT:** Extremely halophilic bacteria isolated from salterns at Mado, Kyunggido, Korea, were identified and investigated on their salt requirements. The results have shown that six strains were identified to be belonged to the genus *Halobacterium* and three strains identified as the genus *Halococcus*. Among them, the optimal NaCl concentration for growth of *Halobacterium* sp. EH10 was at 4.2 M and no growth occurs below 2.0 M NaCl. The strain, EH10, is nonmotile and showed acid production from glucose, fructose and maltose while *H. salinarum* is motile and does not produce acid from any carbohydrates. On the other hand, the strain EH10 does not utilize readily glucose while a number of sugars are readily utilized for growth with acid production by *H. saccharovorum*. Thus, the isolate, EH10, was classified into the genus *Halobacterium* and could be a novel species of the genus by its main morphological and physiological features including G+C content. The optimal temperature for growth of the isolate, EH10, was 50°C. But this strain did not grow when NaCl was replaced with KCl.

**KEY WORDS** □ *Halobacterium*, *Halococcus*, Extreme halophilic bacterium

대부분의 미생물은 생리적 염농도 이상의 높은 염 농도에서 증식이 억제되지만 특정세균은 높은 NaCl 농도에 잘 적응되어 있다(Gibbons, 1969).

이들 호염성균(Halophiles)은 더욱 세분하여 3-15% 염농도에서 증식하는 중도 호염성균과 15% 이상의 염을 필요로 하는 고도 호염성균으로 구분할 수 있다(Brown, 1964).

고도 호염성 세균으로 잘 알려진 *Halobacterium* 속균은 10% NaCl 농도 이하에서는 용균(lysis) 되어 증식할 수 없으며 최적 증식을 위해 20-30% NaCl을 요구한다(Larsen, 1972).

따라서 효소와 ribosome 같은 세포의 기능적, 구조적 소 단위체들도 높은 염 농도에 잘 적응되어 있으며, 효과적으로 작용한다(Lanyi, 1972).

고도 호염성 세균은 일반적인 세균과는 다른 특성을 갖고 있으나 이들 호염성 세균의 세포내 생리대사가 세포외의 염 농도에 의해 어느정도 영향을 받는지,

그리고 그들의 생리적, 효소적 특성에 염이 어떠한 영향을 주며 어떻게 작용하는지는 아직도 의문시 되고 있다. 따라서 본 실험에서는 고도 호염성 세균을 염 전으로 부터 분리하여 동정하고 국내 염전의 고도 호염성 균주의 생리적 특성과 최적증식 조건을 조사 하였다.

### 재료 및 방법

#### 고도 호염성 세균의 분리

경기도 마도의 염전에서 채취한 토양을 1g 씩 12% NaCl을 포함한 식염수에 현탁하여 15%와 25% NaCl이 포함된 Sehgal & Gibbons 배지 (SGM) (Sehgal, 1960)에 접종하고 30°C와 45°C에서 약 2주간 배양하여 생성된 콜로니를 순수분리 하였다.

#### 분리균주의 배양과 세포증식의 측정

20 ml SGM을 포함한 100 ml Erlenmyer flask에

**Table 1.** Isolation of halophilic bacteria at different conditions.

Isolation temp. (°C)	NaCl conc. (%)	
	15	25
30	5 strains	none
45	none	9 strains

Media, Sehgal and Gibbons media (SGM). Sample source; Saltern at Mado, Kyunggido.

균을 접종하고 45°C에서 진탕 배양하였다(150 strokes/min).

세포의 증식은 turbidimeter (Hf instruments Model DRT 100D, Fort Myers, Florida, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다. 이때 탁도의 unit는 Nephelometric turbidity unit (NTU)이며 그 범위는 0에서 1400으로 이것은 고도 호염성 세균 ml 당 0에서 1.4 mg 건조중량에 해당된다.

**세포 형태의 관찰**

세포의 형태는 임계점 건조방법(Bae, 1986)을 이용 표본제작을 하여 주사 전자 현미경(JEOL, JSM-35 CF)을 사용하여 검경하였다.

**분리 균주의 동정**

분리 균주의 배양학적, 생리적 특징은 Cappucino와 Sherman (1983)의 실험서, Bergy's manual of systematic bacteriology (Helge, 1984)와 Bergy's manual of determinative bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1974) 참고하여 동정 하였다.

DNA의 G.C 함량은 UV/Vis spectrometer (Gilford 2600)을 이용하여 Marmur *et al.* (1962)의 방법에 의해 결정하였다. GC content (mol% GC) = (Tm-69.3)/0.41(Tm: midpoint of melting temperature).

**결과 및 고찰**

**고도 호염성 세균의 분리 선별**

경기도 마도의 염전으로부터 채취한 토양에서 14 종류의 콜로니를 분리하였으며 분리 균주의 증식을 SGM 배지에 NaCl의 농도를 0, 10, 20, 25, 30%로 변화시키면서 조사하였다. 그 결과 30°C, 15% NaCl 농도에서 분리한 5균주는 중도 호염성 세균으로서 10-20% NaCl에서 빠른 증식을 나타내고 이들은 45°C에서는 증식하지 않았다.

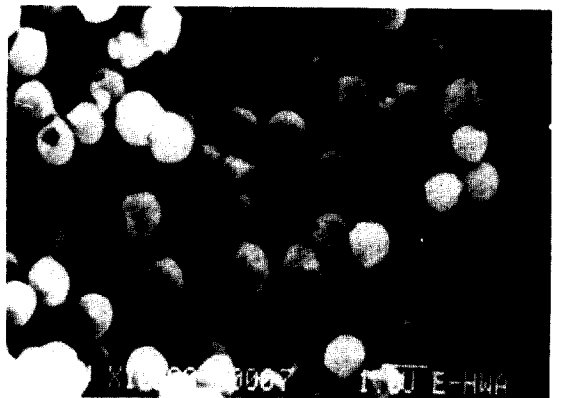
45°C, 25% NaCl 농도에서 분리한 9균주는 20-30% NaCl에서 빠른 증식을 나타내는 고도 호염성 세균으로서 30°C에서는 증식하지 못하였다(Table 1).

**분리된 고도 호염성 세균의 생리 특성과 동정**

분리한 고도 호염성 세균인 9균주를 잠정적으로 균주 EH8, EH10, EH11, EH12, EH13, EH17, EH18,



**Fig. 1.** Scanning electron micrograph of *Halobacterium* sp. EH10.



**Fig. 2.** Scanning electron micrograph of *Halococcus* sp. EH11.

EH19, EH23라 부호를 부여하여 생리적 성질을 조사한 결과 모두 gram 음성이고, 포자는 형성하지 않으며, 운동성이 없었다. 또한 이 균주들은 SGM 배지에 10% NaCl을 첨가했을때 모두 생육저해를 보였으며 20-30% NaCl을 첨가했을때 잘 자랐다. 콜로니의 색은 빨강에서 주홍색을 나타냈고, catalase와 oxidase는 양성이며 urease는 음성이었다. 전분과 casein 가수분해능은 없었으나 Tween의 분해능은 25% NaCl을 포함한 Tween 배지에서 대체로 높게 나타났다.

9균주의 고도호염성 세균중 균주 EH8, EH10, EH17, EH18, EH19, EH23은 형태가 간상 또는 불규칙형(Fig. 1)이며 콜로니의 색이 빨강-오렌지이고, NaCl의 요구성으로 보아 *Halobacterium* 속임을 알 수 있었고 균주 EH8과 EH10은 당으로 부터 산을 생성하고, nitrate로 부터 gas를 생성할 수 있는 점과 생리학적 성질 (Table 2)로 보아 *Halobacterium* 속에 속하

**Table 2.** Morphological, cultural and phyiological characteristics of extremely halophilic bacteria EH8, EH10

	EH8	EH10	* <i>Halobacterium salinarium</i>	* <i>H. saccharovororum</i>
<i>Morphological characteristics</i>				
Shape	Rod	irregular	rod	rod
motility	-	-	+	+
gram staining	-	-	-	-
spore formaiton	-	-	-	-
<i>Cultural characteristics</i>				
nutrient borth	-	-		
NaCl 10%	-	-		
NaCl 20%	-	-		
<i>SGM</i>				
NaCl 0%	-	-	-	-
NaCl 10%	+	-	-	-
NaCl 20%	+	+	+	+
NaCl 25%	+	+	+	+
NaCl 30%	+	+	+	+
colony color	vermillion	geranium red	red-orange	+
<i>Physiological characteristics</i>				
catalase	+	+	+	+
oxidase	+	+	+	+
iondol test	+	+	+	-
gelatin ligqueaction	+	+	+	-
starch hydrolysis	-	-	-	-
casein hydrolysis	-	-	-	-
nitrate reduction	+	+	-	-
urease	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-	+	-
acid procution				
fructose	+	+	-	+
galactose	-	-	-	+
glucose	+	+	-	+
lactose	-	-	-	+
maltose	+	+	-	+
mannose	-	-	-	+
sucrose	+	+	-	+
xylose	+	+	-	+
G+C content	65.4	65.9	66-68	not known

\*This data quoted from Bergey's manual of systematic bacteriology (Helge, 1984).

나 아직 미기재 종으로 추정된다.

Bergey's manual (Holt, 1977)에 의하면 *H. saccharovororum*과 *H. vallismortis* DNA의 GC 함량은 아직 미지인 것으로 되어 있으나 본 연구에서는 균주 EH8은 65.4로 나왔고 균주 EH10은 65.9로 나왔으므로 *H. salinarium* (GC 함량 66-68 mol%) *H. valcanni* (63.4 mol%) *H. pharaonis* (64 mol%) 등 기재된 종과는 일치하지 않는다.

*H. vallismortis*는 pleomorphic 한것이 특징이라 균주 EH10와 세포형태가 유사하나 통성 혐기성인것

이 특징이라 본균과는 상이하다.

또한 균주 EH11, EH12, EH13은 형태가 구형 (Fig. 2)이며 빨강-오렌지의 콜로니색, NaCl 요구성과 배양학적 및 생리학적 성질로 보아 *Halococcus* sp.로 확인하였는데 Bergey's manual (Holt, 1977)에서도 *Halococcus*는 하나의 종만 인정하고 있다(Table 3).

고도 호염성 세균의 최적 증식에 대한 NaCl 요구와 무기염의 영향.

SGM 배지에 NaCl의 농도를 0%에서 30% 까지 각기 달리하며 *Halobacterium* EH10 균주를 배양하여

**Table 3.** Morphological, cultural and physiological characteristics of extremely halophilic bacteria EH11, EH12, EH13.

	EH11	EH12	EH13	* <i>Halococcus morrhuae</i>
<i>Morphological characteristics</i>				
Shape	cocci	cocci	cocci	cocci
motility	-	-	-	-
gram staining	-	-	-	-
spore formation	-	-	-	-
<i>Cultural characteristics</i>				
nutrient broth				
NaCl 10%	-	-	-	-
NaCl 20%	-	-	-	-
SGM				
NaCl 0%	-	-	-	-
NaCl 10%	±	±	±	±
NaCl 20%	+	+	+	+
NaCl 25%	+	+	+	+
NaCl 30%	±	±	±	±
colony color	light vermillion	pinkish vermillion	pinkish vermillion	red-orange
<i>Physiological characteristics</i>				
catalase	+	+	+	+
oxidase	+	+	+	+
indol test	+	+	+	+
gelatin liquefaction	+	+	+	+
starch hydrolysis	-	-	-	+
casein hydrolysis	-	-	-	-
nitrate reduction	+	+	+	+
urease	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	+
acid production				
fructose	+	+	+	-
galactose	-	-	-	-
glucose	+	+	+	-
lactose	-	-	-	-
maltose	+	-	+	-
mannose	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	-
xylose	+	+	+	+
G+C content (mol%)	66.8	67.6	66-1	61-67

\*This data quoted from Bergey's manual of systematic bacteriology (Vol. 1)

그 증식곡선을 조사한 결과 20-30% NaCl 농도에서는 거의 비슷한 정도의 빠른 증식을 나타냈으나 10% NaCl에서는 생육저해를 나타냈다. EH10 균주의 최적 증식 NaCl 농도는 25%로 나타났다(Fig. 3).

SGM 배지에서 NaCl을 KCl로 대체하여 KCl의 농도를 1, 1.5, 2.5, 3.5 M로 달리하면서 증식 양상을 조사한 결과 EH10 균주는 실험한 모든 KCl 농도에서 증식하지 않았으며 (Fig. 3) 본 연구실에서 첫갈로

부터 분리조사한 중도 호염성 세균이 1.5 M NaCl 1.5 M NaCl 대신 1.5 M KCl로 대체하여도 증식할 수 있는 염요구성과 매우 대조적인 성질을 나타냈다. 균주 EH8 에도 결과는 같았다.

이와 같은 결과는 *Halobacterium* sp.가 세포의 증식과 유지를 위해 10% NaCl (W/V)보다 높은 NaCl을 요구하고 대부분의 균주는 20-26% NaCl에서 가장 빠른 증식을 나타냈다. 10% NaCl 농도 미만일 때는

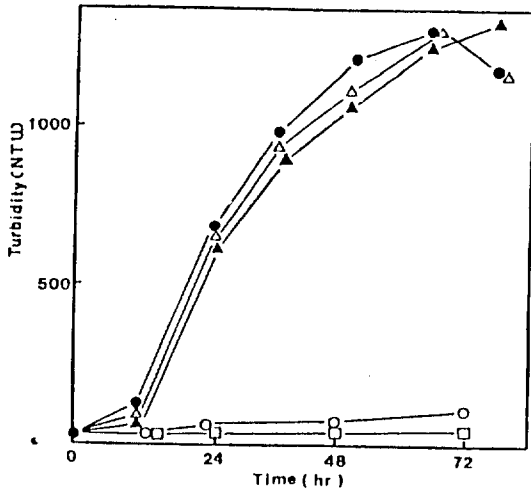


Fig. 3. Growth curves of *Halobacterium* sp. EH10 at different concentration of salt.   
 ▲—▲: 5.1 M(30%) NaCl, ●—●: 4.2 M(25%),   
 △—△: 2/3.4 M(20%). ○—○: 1.7 M(10%), □   
 —□: 1. 1.5, 2.5, 3.5 M KCl.

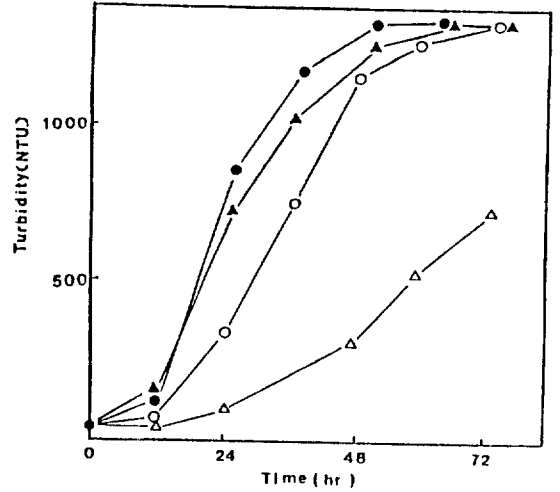


Fig. 5. Optimum growth temperature of *Halobacterium* sp. EH10.   
 △—△: 30°C, ○—○: 40°C, ▲—▲: 45°C, ●—   
 ●: 50°C.

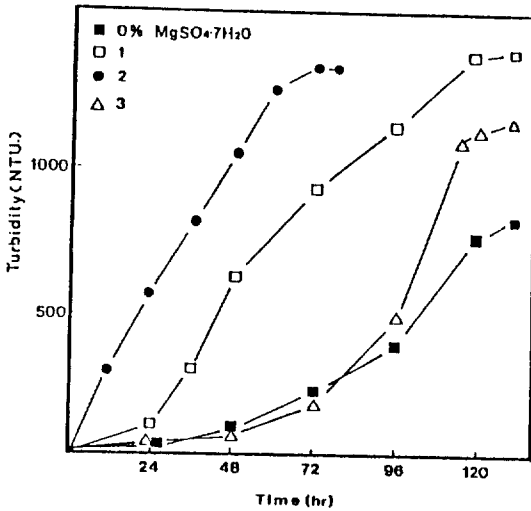


Fig. 4. Effect of  $MgSO_4$  concentration on the growth of *Halobacterium* sp. EH10.

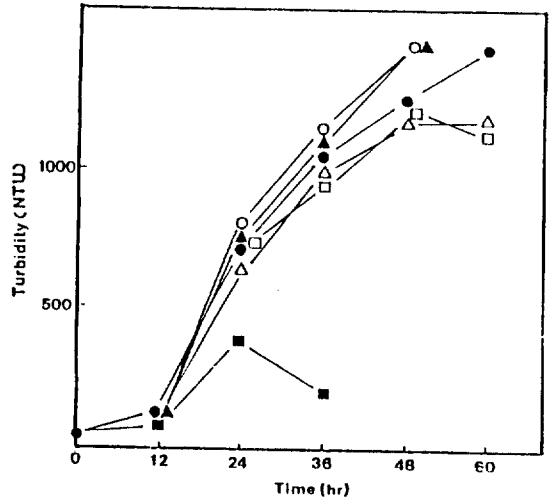


Fig. 6. Effect of carbon sources on the growth of *Halobacterium* sp. EH10.

●—●: none, △—△: galactose ▲—▲: fructose □—□: lactose ○—○: sucrose ■—■: glucose.

세포가 용해 (lysis)될 뿐 아니라 NaCl이 그들의 증식에 특이적으로 요구되며 다른 염이나 화학물질에 의해 완전히 대체될 수 없다는 보고와 (Helge, 1984) 일치하고 있다.

SGM 배지에  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 양을 0, 1, 2, 3%로 각기 달리하여 증식곡선을 조사한 결과 *Halobacterium* EH10 균주는 1내지 2%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 에서는 빠른 증식을 나타내었으나 전혀 첨가하지 않거나 혹은 3%에서는 생육 저해를 나타냈으며 (Fig. 4) 최적

증식  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도는 2%로 나타났다.

**분리균 Halobacterium EH10의 배양학적 특성**

SGM 배지에 2% NaCl을 포함시켜 30, 40, 45, 50 °C로 온도를 달리하며 배양하면서 증식곡선을 조사한 결과 EH10 균주는 40, 45, 50°C에서는 비교적 빠른 증식을 나타내었으나 30°C에서는 느리게 증식하였고

**Table 4.** Final pH of *Halobacterium* sp. EH10 cultures grown in modified SGM containing various carbohydrates

Compound add (1%)	pH
None	7.6
Glucose	4.7
Sucrose	6.3
Fructose	5.2
Lactose	8.0
Maltose	6.4
Galactose	7.0
Xylose	5.2
Mannose	7.7
Sorbitol	8.0
Manitol	7.4
Glycerol	5.0

*Halobacterium*의 일반적 증식 온도와 비슷하게 45-50°C에서 잘 증식하였다(Fig. 5).

고도 호염성 세균은 보통 아미노산에서 에너지를 얻으며 탄소원으로 당을 첨가하여도 증식이 촉진되지 않는다(Holt, 1977). 따라서 탄소원으로 각종 당을 사용하였을 때 증식 촉진 여부와 72시간 배양후의

최종 pH를 측정하여 당의 이용능력을 알아보았다. 그 결과 EH10 균주는 fructose와 sucrose에 의해 증식이 약간 촉진되었으며 포도당을 첨가하였을 때는 24시간까지 증식이 되었으나 시간이 경과하면서 증식이 억제되었다(Fig. 6).

이와 같은 현상은 포도당이 첨가된 배지내에서 세포가 증식할 때 다량의 피르부산과 아세트산이 배지내로 유출됨에 따라 배지내의 pH가 즉각적으로 감소되면서 세포가 용해되어 증식할 수 없기 때문이라고 추정된다(Tomilinson, 1972).

반면 fructose가 첨가된 배지에서는 유도기(lag phase)가 지나면서 당을 소량 이용하면서 배지내의 pH가 서서히 산성화됨에 따라 증식은 어느정도 촉진된다고 추측된다(Tomilinson, 1972, 1976). 또한, 배지내의 glycerol과 fructose를 각각 첨가하였을 때 glucose의 경우에 이어 pH가 각각 5.0 및 5.2로 감소하였으며, lactose와 mannose의 경우는 pH가 8.0으로 증가하였(Table 4). 이런 현상은 첨가된 당은 이용되지 않는 반면 배지중의 아미노산의 deamination 또는 decarboxylation의 결과 배지의 pH가 알칼리화 되기 때문에 증식이 억제된다고 생각된다(Holt, 1977).

## 적 요

국내염전으로부터 14주의 호염성 세균을 분리하여 10, 20, 25, 30% NaCl 농도에 따른 증식으로부터 염요구성을 조사하고 동정에 필요한 생리실험과 최적 증식 조건을 조사하였다. 14균주중 5주는 중도 호염성 세균이고 9주는 고도 호염성 세균으로 *Halobacterium* sp. 6주와 *Halococcus* sp. 3주가 분리되었다. *Halobacterium* EH8 및 EH10은 4.2 M NaCl 농도에서는 잘 증식 하였으나 2.0 M NaCl 이하 염농도에서는 증식하지 않았고 비운동성이며 포도당, 과당으로부터 산을 생성하였다. 그러나 포도당의 자화능력은 극히 저조하며 G+C 함량도 상이하여 기존 기재된 종과는 생리학적 성질이 일치하지 않아 *Halobacterium* 속의 새로운 종으로 추정된다. 그중 EH10 균주의 최적증식 NaCl 농도는 25% (4.2 M)였고, 최적 증식 온도는 50°C로 나타났으며 NaCl을 KCl로 대체하였을 경우 증식하지 않았다.

## 사 사

본 논문은 한국과학재단 차관연구비 (1987-1998)의 지원에 의해 수행 되었다.

## 참고문헌

1. 배무, 이은주, 1986. *Cellulomonas flavigena* 의 원형질체 형성과 주사전자 현미경 연구. 한국산업미생물학회지, 14, 175-179.
2. Bae Moo and Kyung-Sook Song, 1987. *Kor. J. Microbiol. Bioeng.*, 15, 301.
3. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons, 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 24-75.
4. Brown, A.D., 1964. Aspects of bacterial response to the ionic environment *Bacteriol. Rev.*, 28, 296-329.
5. Cappuccino, J.G. and N. Sherman, 1983. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Addison-wesley Publishing Company.
6. Gibbons, N.E., 1969. Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria. *Meth. in Microbiol.*, Vol. 3B, 169-183.
7. Helge, L., 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, I, 261-266.
8. Holt, J.G., 1977. *The Shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The William Wikins Co., Baltimore, 8th ed.
9. Larsen, H., 1972. *The Prokaryotes*, 985-993.
10. Lanyi, J.K., 1972. Studies of the electron transport chain of extremely halophilic bacteria-VII.

- Solubilization properties of menadione reductase, *J. Biol. Chem.*, **247**, 3001-3007.
11. Marmur, J. and P. Dody, 1962. Determination of the base composition of DNA from its thermal denaturation temperature, *J. Mol. Biol.*, **5**, 109-118.
  12. Sehgal, S.N. and C.V.E. Gibbons, 1960. Effect of some metal ions on the growth *Halobacterium cutirubrum*, *Can. J. Microbiol.*, **6**, 165-169.
  13. Tomlinson, G.A. and L.I. Hochstein, 1972. Isolation of carbohydrate metabolizing, extremely halophilic bacteria, *Can. J. Microbiol.*, **18**, 698-701.
  14. Tomlinson, G.A. and L.I. Hochstein, 1972. Studies on acid production during carbohydrate metabolism by extremely halophilic bacteria, *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1973-1976.
  15. Tomlinson, G.A. and L.I. Hochstein, 1976. *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate metabolizing, extremely halophilic bacterium, *Can. J. Microbiol.*, **22**, 587-591.

(Received July 12, 1990)

(Accepted February 24, 1991)