

한국 근해에서 분리한 그람양성 세균의 화학 분류학적 및 표현형적 특성

전정훈¹ · 박진숙*

¹국립보건원 장내세균과, 한남대학교 미생물학과

제주도의 여섯 지역과 인천 작약도 근해의 해수로부터 내염성 그람양성 세균 25균주를 분리하여 화학 분류학적 특징과 표현형적 특성을 조사하였다. 분리된 균주들은 화학 분류학적 특징에 의거하여 4개의 group으로 구분되었다. Group 1은 40.1~49.9 mol%의 G+C 함량과 MK-7의 menaquinone type, peptidoglycan의 주요 아미노산으로 meso-A₃pm을 함유하며 *Bacillus pumilus*와 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*로 동정되었으며, group 2는 63.9~66.4 mol%의 G+C 함량과 MK-8을 함유하는 *Arthrobacter*속 세균이었으며, group 3은 31.0~37.6 mol%의 G+C 함량과 MK-7을 함유하며 *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus intermedius*로, group 4는 72.0 mol%의 G+C 함량과 MK-8을 주요 quinone으로 함유하는 *Micrococcus luteus*로 동정되었다. 분리된 세균들 중 *Bacillus*속 세균들은 68%로 우세한 분포를 나타내었다.

Key words □ *Arthrobacter*, *Bacillus*, chemosystematic character, coastal seawater, halotolerant bacteria, *Micrococcus*, *Staphylococcus*

최근, 해양이나 염전에 존재하는 내염성 세균과 생육시 Na⁺이온을 필수적으로 요구하는 호염성 세균들의 특이한 생리적 특성을 인간 생활에 응용하기 위해 다각적인 연구가 수행되고 있다. 호염세균이 생성하는 polymer는 천연 접착제, 약제의 도포제로 사용 가능성이 시사되고 있으며(8,30), 항균제 생성능(14) 및 세포의 효소생성능(12)이 탁월한 호염세균들이 밝혀져 있다.

세균은 최적성장 NaCl농도에 따라 고호염세균(25%), 중호염세균(10%), 내염세균(0%에서도 자랄 수 있으며 최고 15%이상의 농도에서도 견딜 수 있는 세균)으로 구분할 수 있으며(10), 해양세균은 주로 내염성 및 중호염세균으로 구성되어 있다. 호염세균에 관한 연구는 주로 고호염세균의 생리기작을 중심으로 활발히 연구가 이루어지고 있으나(17), 오히려 넓은 농도 범위의 염농도에 적응 가능한 내염성 세균 및 중호염성 세균에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이러한 세균은 해수의 우점종이면서도 해양보다는, 주로 염전과 같은 토양으로부터 분리 보고되어 왔으며(28), 해수로부터 분리한 예(4,5)는 비교적 적다. 또한 해수로부터 분리되는 세균은 주로 그람음성 세균인 것으로 알려져 있다. Brisou 등(6)과 Marquez 등(18)은 염전에서 내염성 세균을 다수 분리 보고하였으며, Quesada 등(20)은 고염토양에서 분리한 균주 중 34%의 균주가 그람양성의 내염세균임을 보고하였으며, 사해(Dead sea)에서도 내염성의 그람양성 포자형성균이 분리 보고되어 있다(21). 국내에서는 배무 등(2), 박형숙 등(1)에 의해 발표된 고호염 세균에 관한 연구 보고가 있을 뿐 해양세균(3)에 관한 분

류학적 연구는 적다.

현재까지 국·내외적으로 보고된 그람양성 내염성 및 중호염 세균들은 *Planococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*(20), *Bacillus*, *Halobacillus*, *Marinococcus*, *Salinococcus*, *Nesterenkonia*, *Tetragenococcus*가 있으며(27), 최근 신속 *Haloterrigena*(29)가 추가되었다.

본 실험은 제주도와 인천 지역 연안 해수에서 총 190균주의 해양세균을 분리하여 그중 그람양성 세균 25균주를 선별하여 DNA의 G+C 함량, isoprenoid quinone계, peptidoglycan의 주요 아미노산의 분석과 아울러 형태적 및 생리·생화학적 특징을 고찰하였다.

재료 및 방법

실험 균주 및 배양

실험균주는 제주도의 보목(BM), 삼양(SY), 성산(SS), 정방(JB), 중문(JM), 표선(PS) 6지역과 인천 작약도(JY) 근해로부터 분리한 25균주(Table 1)와 참고균주 10균주(Table 2)를 사용하였다. 분리된 세균들은 Ventosa 등(26) 기조배지를 변형하여 사용하였다. 즉, NaCl, 40.5 g; MgSO₄ · 7H₂O, 4.8 g; MgCl₂ · 6H₂O, 3.5 g; KCl, 1.0 g; CaCl₂ · 2H₂O, 0.18 g; NaHCO₃, 0.03 g; NaBr, 0.013 g을 주요 염성분으로 사용하였고, Bacto-Peptone(Difco), 2.5 g; Yeast extract (Difco), 5.0 g; Glucose(Sigma), 1.0 g; 증류수 1,000 ml, pH 7.2, 배양온도는 30°C로 하였다. 세균을 분리하기 위하여 염성분이 각각 5%, 10%, 15%, 20%, 25%가 첨가된 배지를 사용하였고, 참고 균주의 배양은 NB배지(Nutrient broth medium)와 0.5%, 5%의 NaCl을 첨가한 NB배지를 사용하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel : 042-629-7498, Fax : 042-629-7498
E-mail : jspark@mail.hannam.ac.kr

에서 전개하여 분석하였다. 표준 물질로는 diaminopimelic acid mixture(Sigma, USA)를 사용하였다.

형태 및 배양 상의 특징

세균 세포의 형태, 그람염색, 운동성, 포자 형성능, 편모는 기조 배지를 사용하여 30°C에서 24~48시간 배양한 후 관찰하였다.

각 균주의 성장 가능한 염농도를 조사하기 위해 기조 배지의 NaCl농도를 각각 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 및 25%(w/v)로 조정한 다음 30°C에서 3일간 배양하였고, pH 변화에 따른 생장 여부를 조사하기 위해 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 및 11로 기조 배지를 각각 조정하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 또 생장 온도를 조사하기 위해 항온 수조의 온도를 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 및 60°C로 조절한 다음, 액체 배지 상에 각각의 균주를 접종하여 생장 여부를 판별하였다. 또한 혐기적 생장 여부는 기조 배지에 균을 접종하여 anaerobic system(Difco, USA)을 사용하여 관찰하였다.

생리, 생화학적 특징

생리, 생화학적 특징은 Gerhardt *et al.*(10)의 방법을 변형하여 사용하였다. Catalase와 oxidase등의 호흡 효소의 존재 유무, nitrate reduction, methyl-red test, vogas-proskauer test, citrate의 이용능, indole, H₂S가스 형성 유무를 시험하였고, gelatin, starch, casein, tween 80, esculin, urea, phosphate의 가수분해능 존재 유무, glucose, sucrose, lactose등의 산화.발효능 시험, 탄소원과 질소원의 자화능 및 산 생성 유무, 혈액배지를 이용한 용혈성 유무, 0.001% lysozyme하에서의 성장 여부를 실험하였다.

결과 및 고찰

DNA의 G+C함량과 isoprenoid quinone계의 분자종 및 peptidoglycan의 A₂pm isomer 분석 결과, 분리된 25균주는 4개의 group으로 구분되었다(Table 1).

모든 분리 균주는 Kushner(16)의 기준에 따라, NaCl 0%에서 생육할 수 있으며, 동시에 7.5% NaCl농도 범위까지 생육하는 내염성(halotolerant) 혹은 15%이상의 NaCl농도에서도 자라는 극도 내염성(extreme halotolerant)세균이었다. 분리 균주 모두는 pH 7.0-8.0, 30°C에서 최적 생장을 보이는 그람양성, 호기성 세균으로 catalase, coagulase 양성반응을 나타내었으며, 0.001% lysozyme하에서 생장하였다. Citrate이용, indole 생성, H₂S 발생, DNase 시험에서 모두 음성 반응을 나타내었으며, 그외 다른 생리, 생화학적 특징은 Table 2에 나타내었다.

Group 1은 17균주로 구성되며 모든 균주가 40.7~49.9 mol% 사이의 G+C함량과 MK-7을 주요 quinone계로, 주요 세포벽 아미노산으로 meso-A₂pm을 함유하며, 내생 포자를 형성하는 간균으로 대부분 운동성을 나타내었다. Group 1의 7균주(SS1, JB4, JB9, BM16, PS18, JY7, JY21)는 40.7~48.3 mol%의 G+C함량을 나타내며, oxidase 양성 반응과 탄소원으로서 mannitol, raffinose, cellobiose등을 이용하며, JY7의 제외한 모든 세균이 β

-hemolysis을 일으킨다. 또한 질산염을 환원하지 않으며, gelatin을 액화시키는 등의 특성을 나타내어 *Bacillus pumilus*로 동정하였다. *Bacillus pumilus*로 동정된 7균주는 *Bacillus polymyxa*와 *Bacillus circulans*와 생리, 생화학적 특성이 거의 유사하였으나, 생장 가능한 온도 범위에서 차이를 보였다. 분리된 균주를 포함한 *Bacillus pumilus*의 경우 10~50°C에서 생장을 보였으나 *Bacillus polymyxa*와 *Bacillus circulans*는 40°C까지만 생장을 보여(23) 차이를 나타냈다. Group 1의 4균주(JB3, BM21, JY17, JY23)는 45.4~46.7 mol% G+C 함량을 나타내고 nitrate를 nitrite로 환원시키며, 탄소원으로서 starch를 이용하며, xylose, sorbitol, adonitol, acetone, inositol을 이용하여 산을 생성하며, 특히 20~55°C의 범위에서 성장하여 다른 *Bacillus* 종과 구별되어 이를 *Bacillus licheniformis*로 동정하였다. Group 1의 4균주(JB7, SS12, SS17, JM24)는 40.1~49.9 mol% G+C함량을 나타내며, 0.1% glucose가 포함된 기조배지상에서 약 7~10일 정도 배양시 집락 주위에 갈색 혹은 검은 색의 색소를 나타내는 특징을 보여 *Bacillus megaterium*임이 확인되었다. 이들 4균주는 *Bacillus subtilis* var. *niger*와 *Bacillus atrophaeus*(19)가 0.1%의 glucose가 포함된 배지 상에서 7~10일간 배양시 갈색 내지 검은 색의 색소를 내는 특징과 서로 유사하나 생장 가능한 온도 범위(5~55°C) 및 0.001% lysozyme하에서의 생장 등의 특징에서 차이를 보였다. JY15는 47.0 mol%의 G+C함량과 vogas-proskauer 양성 반응을 보이며, gelatin, casein, tween 80, esculin분해하며, 20~45°C 범위에서 성장하고, 0~10%의 염농도에서 성장하는 특징을 가지므로, *Bacillus subtilis*로 동정하였으며, 47.4 mol%의 G+C함량을 나타내는 JY8은 esculin분해시험, catalase, methyl-red시험에서 음성 반응을 보여 *Bacillus* sp.로 하였다.

Group 2는 3균주로 구성되며, 포자를 형성하지 않고, 다형태성을 보이는 간균으로서 노란 색의 집락을 형성하며, 63.9~66.4 mol%의 G+C함량과 MK-8을 함유하여 *Arthrobacter*속으로 동정되었다. Phosphate가수분해에서 양성 반응을 보였을 뿐 대부분의 기질 자화능 시험에서는 음성 반응을 보였다.

Group 3은 4균주로 구성되며 31.0~37.6 mol%의 G+C 함량과 주요 quinone으로 MK-7을 가지며, 포자를 형성치 않고 백색의 집락을 형성하며, 주로 쌍구균, 사련구균, 포도상구균으로 배열하는 특징이 있어 이를 *Staphylococcus*의 속으로 동정하였다. BM20은 37.6 mol%의 G+C함량을 나타내며, methyl-red와 voges-proskauer, gelatin액화 반응에 양성 반응을 보이며, 탄소원으로서 mannitol과 raffinose를 이용하고 질소원으로는 asparagine과 serine을 이용하며, β-hemolysis를 일으키는 등 *Staphylococcus haemolyticus*와 일치하는 성상을 보였다. PS26은 32.6 mol%의 G+C함량을 나타내며, methyl-red시험과 urea가수분해 반응에 양성 반응을 보이고, 0~25%의 염농도와 20~45°C의 온도 범위에서 좋은 성장을 보이며, gelatin 액화 반응외에는 *Staphylococcus saprophyticus*와 일치하는 성상을 나타내었다. SS4와 SY10은 31.0~31.3 mol%의 G+C함량과 0~25%의 염농도와 10~40°C의 온도에서 좋은 성장을 보이며, nitrate reduction과 β-hemolysis를 일으켜, *Staphylococcus intermedius*로 동정되었다(14).

Group 4는 1균주로 구성되며, 짙은 노란색의 콜로니를 가지며, 사린균의 형태를 가진다. 또한 72.0 mol%의 G+C함량과 MK-8을 주요 quinone으로 가지며, oxidase와 tween 80가수분해 반응에 양성 반응을, esculin과 arginine의 가수분해 반응에 음성 반응을 나타내어 *Micrococcus luteus*로 동정하였다. 이 균주는 *Micrococcus varians*와 표현형적 특징은 유사하나 glucose로부터 산을 생성치 않고, nitrate를 nitrite로 환원과 simmon's citrate agar상에서 생장하지 않는(15) 특징상의 차이를 나타내었다.

실험 균주들의 grouping은 화학 분류학적 특징에 의거하였으며, 이는 속 level의 구별에 좋은 상응성을 나타내었다. Group 1은 *Bacillus*속, group 2는 *Arthrobacter*속, group 3은 *Staphylococcus*속, group 4는 *Micrococcus*속으로 각각 동정되었으며, 분리된 그람양성 세균 중 *Bacillus*속은 전체 68%를 차지하여 가장 우세한 분포를 나타내었다. *Staphylococcus*속 세균은 16%를 차지하여 해수 환경에서 분리된 전체 그람양성 세균들 중 *Staphylococcus*속 세균들이 17~19%의 분포를 나타낸다는 Gunn et. al(11)의 보고와 유사한 수치였다. 또한 염전으로부터 분리된 154 균주의 내염성 세균중 우점종은 그람 양성의 *Staphylococcus*와 *Micrococcus*이며, *Bacillus*는 소수라는 보고(18)와는 상이한 결과를 나타내었으나 이는 분리원의 차이로 생각된다. 분리된 균주들의 계통학적 유연관계를 밝히기 위해 수치 분류학의 적용과 유전자 수준에서의 연구가 더욱 필요하리라 생각된다.

감사의글

본 연구는 1999년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 박형숙, 정명주. 1996. 천일염으로부터 고호염균의 분리 및 동정. 산업미생물학회지. 24, 671-677
2. 배무, 이정임. 1991. 한국 염전으로부터 분리한 고도 호염성 세균의 동정 및 특성. 한국미생물학회지. 29, 56-62
3. 정희동, 강창근, 박희열. 1986. Isolation and physiological properties of marine bacteria in the eutrophic coastal waters. 1. Environmental factors and marine bacterial flora in the eutrophic coastal waters. 한국수산학회지. 19, 586-592.
4. Baumann, L., P. Baumann, M. Mandel, and R. D. Allen. 1972. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J. Bacteriol.* 110, 402-429.
5. Bowman J. P. 1998. Psedoalteromonas prydzensis sp. nov., a psychrotrophic halotolerant bacterium from Antarctic sea ice, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1037-1041.
6. Brisou, J., D. Courtois, and F. Fenis. 1974. Microbiological study of a hypersaline lake in French Somaliland. *Appl. Microbiol.* 27, 819-822.
7. Calvo, C., M. R. Ferrer, F. Martinez-Chewca, V. Bejar, and E. Quesada. 1995. Some ecological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Volcaniella eurthalina* F2-7. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 55, 45-54
8. Collins, M. D., and D. Jones. 1981. A note on the separation of natural mixtures of bacterial ubiquinones using reverse-phase partition thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography. *J. Appl. Bacteriol.* 51, 129-134
9. Garabito, M. J., M. C. Marquez, and A. Ventosa. 1998. Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline environments. *Can. J. Microbiol.* 44, 95-102
10. Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, W. A. Wood, N. R. Krieg, E. W. Nester, and G. B. Philips(eds.). 1981. *Manual of methods for general Bacteriology*. ASM
11. Gunn, B. A. & Colwell, R. R. 1983 Numerical taxonomy of staphylococci isolated from the marine environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33, 751-759.
12. Honrichsen, L. L., M. C. Montel, and R. Talon. 1994. Proteolytic and lipolytic activities of *Micrococcus roseus*, *Halomonas elongata* and *Vibrio* sp. isolated from Danish bacon curing brines. *Int. J. Food Microbiol.* 22, 115-126
13. James, S. G., C. Holmstrom, and S. Kjelleberg. 1996. Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. *Appl. Env. Microbiol.* 62, 2783-2788
14. Kloos, W. E., and K. H. Schleifer. 1986. Genus *Staphylococcus*, in Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. II, Sneath, P. H., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G., Eds., Williams and Wilkins, Baltimore. 1013.
15. Kocur, M. 1986. Genus *Micrococcus*, in Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. II, Sneath, P. H., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G., Eds., Williams and Wilkins, Baltimore. 1004.
16. Kushner D. J. 1985. The halobacteriaceae, In The bacteria, vol. 8 Edited by C.R. Woese and R.S. Wolfe. Academic press, Orlando, Fla. pp. 171-214.
17. Kushner D. J. 1989. Halophilic bacteria: Life in and out of salt, P. 60-64, In T. Hattori, Y. Ishida, Y. Maruyama, R. Y. Morita, and A. Uchida(ed), Recent advances in microbial ecology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan
18. Marquez, M. C., A. Ventosa, and F. Ruiz-Berraquero. 1987. A Taxonomic Study of Heterotrophic halophilic and non-halophilic bacteria from a solar saltern. *J. Gen. Microbiol.* 133, 45-56
19. Nakamura, L. K. 1989. Taxonomic Relationship of Black-Pigmented *Bacillus subtilis* strains and proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 295-300.
20. Quesada, E., A. Ventosa, F. Rodriguez-Valera, and A. Ramos-Cormenzana. 1982. Types and properties of some bacteria isolation from hypersaline soil. *J. Appl. Microbiol.* 53, 155-161.
21. Ramos-cormenzana, A. 1989. Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganism. In Microbiology of Extreme Environments and Its potential for Biotechnology, ed., M.S. Da Costa, J. C. Durate, and R. A. D. Williams, Elsevier Applied Science press, London and New York, pp.289-309.
22. Saito, H., and V. Miura. 1963. Preparation of transforming DNA by phenol treatment. *Biophys. Acta.* 72, 619-629.
23. Sneath, P. H. A. 1986. Genus *Bacillus*, in Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. II, Sneath, P. H., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G., Eds., Williams and Wilkins, Baltimore. 1105.
24. Stanek, J. L., and G. D. Roberts. 1974. Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by Thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 28 (2), 226-231.
25. Tamaoka, J., and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reserved-phased high-performance liquid chromatography. *FEMS Micro. Lett.* 25, 125-128.
26. Ventosa, A., M. C. Marquez, F. Ruiz-Berraquero, and M. Kocur. 1990. *Salinicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., a New Moderately

- Halophilic Gram-Positive Coccus. *System. Appl. Microbiol.* 13, 29-33.
27. Ventosa, A., J. J. Nieto, and A. Oren. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 504-544
 28. Ventosa A., M. C. Mequez, M. J. Garabito and D.R. Arahal. 1998. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles.* 2, 297-304
 29. Ventosa, A. M., C. Gutierrez, M. Kamekura, and M. L. Dyal-Smith. 1999. Proposal to transfer *Halococcus turkmenicus*, *Halo-*
bacterium trapanicum JCM 9743 and strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 131-136.
 30. Weiner, R. M., R. R. Cowell, R. N. Jarman, D. C. Stein, Ch. C. Somervill, and D. B. Bonar. 1985. Applications of biotechnology to the production recovery and use of marine polysaccharides. *Biotechnol.* 3, 899-902.

(Received August 23, 2000/Accepted September, 14, 2000)

ABSTRACT: Chemosystematic and Phenotypic Characterization of Gram-positive Bacteria from Coastal Seawater, Korea

Chung-Hoon Chun¹ and Jin-Sook Park^{*}(¹Department of Bacteriology, National Institute of Health, Seoul 122-020, Korea, ^{*}Department of Microbiology, Han Nam University, Deajon 300-791, Korea)

Twenty-five halotolerant gram-positive bacteria were isolated from the coastal seawater of Cheju Island and Incheon Jakyakdo. Chemosystematic and phenotypic characteristics were used to investigate the taxonomic position of these bacteria. According to their chemosystematic characteristics, the twenty-five isolates were divided into 4 groups. Group 1 bacteria possessed 40.1 to 49.9 mol% in DNA G+C content, menaquinone-7 as a major quinone, and meso-A₂pm as a diamino acid of peptidoglycan. Group 1 taxa were identified as *Bacillus pumilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*. Group 2 bacteria possessed 63.9 to 66.4 mol% and MK-8. They were all in the genus *Arthrobacter*. Group 3 bacteria possessed 31.0 to 37.6 mol% and MK-7. They were identified as *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, and *Staphylococcus intermedius*. Group 4 bacterium possessed 72.0mol% and MK-8 and was identified as *Micrococcus luteus*. *Bacillus* species accounted for 68% of the total isolates.