



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

초록갈파래로부터 분리한 세균의
군집 분석 및 신종 미생물의 동정

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

金志炫

2019 年 2 月

초록갈파래로부터 분리한 세균의
군집 분석 및 신종 미생물의 동정

指導教授 許文洙

金志炫

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2018 年 12 月

金志炫의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 정준범 _____

委 員 _____ 여인규 _____

委 員 _____ 허문수 _____



濟州大學校 大學院

2018 年 12 月

Bacterial community analysis and identification of a
novel bacterium isolated from *Umbraulva japonica*

Ji-Hyun Kim

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Master of Science

Department of Marine life science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2019

목 차

목 차	i
List of Tables	iv
List of Figures	vi
Abstract	vii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
2.1. 시료채집	4
2.2. 미생물의 분리, 배양 및 보관	4
2.3. 염기서열 분석	7
2.3.1. Genomic DNA 추출 및 유전자 증폭	7
2.3.2. 염기서열 및 계통학적 분석	8
2.4. 신종 미생물 UJT9 ^T 의 동정	9
2.4.1. 계통분류학적 분석	9
2.4.1.1. Genomic DNA 및 계통학적 분석	9
2.4.1.2. 표준균주	10
2.4.1.3. DNA-DNA hybridization	11
2.4.2. 형태학적 특성	12
2.4.2.1. 주사전자현미경(SEM, Scanning Electron Microscopy)	12
2.4.2.2. 그람염색 및 운동성	12
2.4.3. 생리학적 특성	13
2.4.4. 생화학적 특성	15
2.4.4.1. Catalase • Oxidase test	15

2.4.4.2. 가수분해(Hydrolysis) test	15
2.4.4.3. API 20 NE 및 ZYM	16
2.4.5. 화학 분류학적 특성	17
2.4.5.1. 지방산(Fatty acid)	17
2.4.5.2. 퀴논(Quinones)	18
2.4.5.3. 극성지방(Polar lipids)	19
2.4.5.4. DNA G+C content	20
2.4.6. 항생제 시험(Antibiotic test)	21
2.5. 항균 활성 탐색	22
III. 결 과	24
3.1. 염기서열 및 계통학적 분석	24
3.2. 세균 군집 분석	31
3.3. 신종 미생물 UJT9 ^T 의 동정	34
3.3.1. 계통분류학적 분석	34
3.3.2. 형태학적 특성	36
3.3.3. 생리학적 특성	37
3.3.4. 생화학적 특성	38
3.3.5. 화학 분류학적 특성	40
3.3.6. 항생제 시험(Antibiotic test)	44
3.4. 항균 활성 탐색	46
IV. 고 찰	47
V. 요 약	52

VI. 참고 문헌	54
VII. 감사의 글	64

List of tables

Table 1. Composition of Marine agar (MA)	5
Table 2. Composition of R2A agar	6
Table 3. Composition of Zobell's marine agar	14
Table 4. List of antibiotics used of antibiotic test	21
Table 5. List of the strains used of antibacterial test	22
Table 6. Composition of medium for antibacterial test	23
Table 7. The phylogenetic relatives of bacteria in MA	28
Table 8. The phylogenetic relatives of bacteria in 1/10 MA	29
Table 9. The phylogenetic relatives of bacteria in R2A	30
Table 10. Bacterial diversity associated with <i>Umbraulva japonica</i>	32
Table 11. Differential biomedical characteristics of strain UJT9 ^T and related type strains	39
Table 12. Fatty acid analysis of strain UJT9 ^T and related type strains	41
Table 13. Antibiotic susceptibility of strain UJT9 ^T and related type strains	45

Table 14. Antibacterial activity of UJT7, UJT20, UJR17 against pathogenic
bacteria 46

List of figures

- Fig. 1. Phylogenetic tree analysis of 16S rRNA gene sequences of bacteria isolated from *Umbraulva japonica* and some other related taxa. 27
- Fig. 2. Pie-diagram showing structure and the diversity of bacterial community of *Umbraulva japonica*. 33
- Fig. 3. Pie-diagram of various bacterial Phylum isolated from *Umbraulva japonica*. 33
- Fig. 4. A neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequence showing the phylogenetic position UJT9^T among the related strains of the genus *Nonlabens* and representatives of some other related taxa. 35
- Fig 5. (A) Colony morphology and (B) Scanning electron microscope (SEM) of strain UJT9^T. 36
- Fig 6. Two dimensional thin layer chromatogram of the polar lipids of strain UJT9^T. 43

Abstract

This study sought to carry out bacterial community analysis and examine the identification of a novel bacterium isolated from the surface of *Umbraulva japonica*, which is a marine algae collected in Jeju Island.

A total of 79 strains were isolated from *U. japonica* and cultivated using Marine agar, 1/10 Marine agar, R2A. The 16S rRNA gene sequence of the isolated bacteria were analyzed using NCBI and EzbioCloud. Based on the result, the major groups were classified into 4 phyla as *Proteobacteria* (*α-proteobacteria*, *β-proteobacteria*, *γ-proteobacteria*) (74.7%), *Bacteroidetes* (20.3%), *Actinobacteria* (2.5%) and *Firmicute* (2.5%) along with 7 classes, 13 order, 17 families and 31 genera. The phylogenetic analysis showed 3 strains were showed similarity of <97% with the previously identified strains, and could be reported as a new genus or species. Therefore, it is considered that additional experiments should be conducted together with the standard strain.

The novel strain, UJT9^T, was identified as an orange colony, gram-negative, rod-shaped, non-motility and aerobic bacterium. Strain UJT9^T grew at a temperature range of 15-35°C (optimum, 20-25°C), a pH range 5.5-8.0 (optimum, pH 6.0-7.0) and in the presence 1.0-3.0% (w/v) NaCl (optimum, 1.0-2.0%). The 16S rRNA gene sequence-based phylogenetic analysis showed that strain UJT9^T belong to the *Nonlabens* and was most closely related to *Nonlabens arenilitoris* M-M3^T, *Nonlabens ulvanivorans* PLR^T with a sequence similarity of 97.7%, 97.6%, respectively. Strain UJT9^T contained menaquinones type 6 (MK-6) as the major quinones and Fatty acids (>5%) were iso-C_{15:0} (20.1%), iso-C_{16:0} 3-OH (14.1%), iso-C_{16:0} (10.2%), iso-17:0 3-OH (7.8%), anteiso-C_{15:0} (6.3%), iso-C_{16:1} H (5.6%). The major polar lipids were phosphatidylethanolamine (PE), two unidentified lipids and two unidentified amino lipids. The DNA G+C content of strain UJT9^T was determined to be 38.50 mol%. The DNA-DNA hybridization values for strain between *N. arenilitoris* M-M3^T and *N. ul-*

vanivorans PLR^T were $67.42 \pm 1.41\%$, $48.21 \pm 4.53\%$, respectively. On the basis of the data presented, strain UJT9^T is considered to represent a novel species of the genus *Nonlabens*. The type strain is *Nonlabens* sp. UJT9^T (=KACC 19635^T = JCM 32766^T).

The antibacterial activity of 79 strains including the novel bacterium was evaluated. Strain UJT7, UJT20 and UJR17 showed antibacterial activity against *Vibrio vulnificus*, while UJR17 showed antibacterial activity against *Streptococcus parauberis*. UJT7 and UJT20, UJR17 have been identified as *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. and it can be safely presumed that it is beneficial to carry out additional experiments for various applications.

I. 서론

해양은 지구 면적의 70%를 차지하며 지구에 존재하는 전체 생물의 80%가 서식할 수 있는 서식처를 제공한다(Andersen and Sorensen, 1986; Hamann and Scheuer, 1993). 해양은 담수와 다르게 염분을 비롯한 칼슘, 마그네슘, 철 등의 여러 무기질을 포함하고 있다. 그뿐만 아니라 해양은 넓은 범위의 온도와 수압, 영양 범위를 가지며 유광층과 무광층 영역이 모두 존재하고 있다. 이와 같은 해양 환경에 서식하고 있는 해양생물은 육상생물과는 다른 다양한 구조적, 계통학적, 생리학적, 생화학적인 특성이 있어 열대우림에 서식하는 생물보다 생물학적 다양성이 더 높을 것 이라 추정되고 있다(McConnell *et al.*, 1994; Haygood *et al.*, 1999; Kelecom, 2002; Haefner, 2003).

미생물은 지구 생물량의 약 60%를 차지하며 생태계에 존재하는 미생물의 종(species)은 약 $10^5 \sim 10^6$ 정도 존재할 것이라 추정되고 있다. 미생물의 군집구조는 생태계에서 차지하는 종 구성과 상대적인 비율에서 비롯한다. 미생물의 군집구조와 다양성에 관한 연구는 생태계 대부분을 차지하는 미생물의 생물학적 유연관계를 파악하게 하며, 생 지화 학적 순환과 같은 미생물의 기능을 이해할 수 있는 기반을 제공한다(Allsopp *et al.*, 1995). 미생물의 군집구조와 다양성을 조사하는 방법으로 비배양법과 배양법을 이용한다. 비배양법은 환경으로부터 추출한 유전자를 이용하여 미생물의 군집구조와 다양성을 배양법보다 더 빠르고 편리하게 분석할 수 있어 널리 이용되고 있다. 대표적인 비배양법으로는 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), 차세대 염기서열 분석법(Next Generation Sequencing) 중 하나인 pyrosequencing 방법이 있으며, 이외에도 Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) 등이 있다. 이러한 방법들은 배양법으로는 발견되기 어려운 난 배양성과 비배양성의 미생물에 대한 연구가 가능하다는 장점이 있다. 하지만 미생물의 형태적 특징과 미생물이 가지는 생리·화학적 특징을 파악하기에는 어려움이 있으며, 이에 배양을 기초로 한 군집분석 연구 또한 중요하다 할 수 있다. 배양법은 난 배양성과 비배양성의

미생물을 연구하기 힘들다는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 여러 가지 방법이 고안되었다. 담수 혹은 해수를 배지로 사용하여 서식환경과 같은 조건을 만들어주는 방법, 배지를 희석하여 사용하는 방법, 배양 기간을 연장하거나 생장에 필요한 화합물을 추가하는 방법 등 난 배양성의 미생물을 배양하기 위한 노력이 이루어지고 있다(Koach, 1997; Connon and Giovannoni, 2002; Zengler *et al.*, 2002).

토양을 원천으로 한 연구 대상의 감소와 해양 탐색 기술의 발전에 힘입어 해양생물에 관한 연구가 비약적으로 증가하였다(McCarthy and Pomponi, 2004; Newman and Cragg, 2004). 해양 생물 유래의 신물질 중 많은 수의 유용 생리활성 물질이 미생물에 의한 것이라는 결과가 알려지면서 해양 유래 미생물에 관한 연구가 증대되었다. 이러한 해양 미생물이 생산하는 생리활성 물질은 화장품, 식품, 제약 등 다양한 산업분야에서 이용되고 있으며, 현재까지도 새로운 물질을 탐색하기 위한 연구가 지속되고 있다. 다양한 생물이 공존하는 해양환경 속 미생물은 해수, 해조류, 해면 등을 기질로 삼아 부생 및 공생, 기생하며 서식하고 있다. 해양 미생물은 해양 생태계 내에서 분해자의 역할로 미생물 순환 고리(microbial loop)를 통한 탄소, 질소, 황의 산화 환원 작용 등 물질 및 생태계 순환에 있어 중요한 역할을 한다. 또한, 자신이 부착하여 서식하는 생물을 외부환경으로부터 보호하며 영양소의 공급, 면역 반응, 성장, 발달과 번식에 긍정적인 효과를 준다. 또 앞서 언급한 바와 같이 해양이라는 독특한 환경에 노출되어 있어 육상 미생물과는 다른 대사산물을 생산해낸다(Reinheimer, 1985; Weisse, 1992).

해조류가 정상적인 기능을 하기 위해서 미생물의 역할이 중요하다고 알려져 있다. 다른 생물들의 공생관계와 같이 해조류와 미생물은 상호작용하며 필수 영양소를 제공하며 성장에 긍정적인 영향을 미친다. 비배양법을 통해 갈조류, 녹조류, 홍조류 표면의 미생물을 분석한 결과, 군집구조는 매우 다양하게 존재하며 주변의 해수와는 다른 형태로 형성되어 있음이 보고되었다(Burke *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2013; Stratil *et al.*, 2013). 더불어 해조류에서 분리된 미생물이 새로운 화합물의 원천이 될 수 있음이 여러 연구에서 증명되었다. 이러한 관점에서 해조류 표면의 미생물에 관한 연구가 필수적이라 할 수 있다(Duan *et al.*, 1993; Marshall *et al.*, 2006; Capbell *et al.*, 2015).

자연 생태계에 많은 종의 미생물이 존재하지만 전체의 0.1-1.0%만이 순수 분리를 통한 배양이 가능하다. 미생물은 유전자의 탐색과 새로운 물질을 발견하기 위한 가장 풍부한 자원 중 하나이다. 이에 새로운 미생물을 발견하고 배양하여 분석하는 것은 미생물 자원 확보에 기여하므로, 발견되지 않은 미생물을 찾기 위한 연구가 활발하게 이루어져야 한다.

본 논문에서 사용한 초록 갈파래(*Umbraulva japonica*)는 갈파래과(*Ulvaceae*)에 속하는 녹조류이다. 한국을 비롯한 일본, 중국 등 북태평양 서안 등지에 분포하며 조하대 수심 10-20 m에서 서식한다. 초록갈파래는 식용 해조류로 분리되지만 실질적인 활용은 이루어지지 않고 있다. 최근 초록갈파래가 일본의 해양지역에서 엄청난 생산량을 보였지만, 활용이 어려워 악취와 경관 훼손 등의 문제를 일으켰다. 이를 해결하기 위해 초록갈파래를 이용하여 불소 또는 중금속 이온 제거를 위한 활용 연구가 이루어졌으며 녹조류 유래 카로티노이드, 탈모 방지 예방 및 발모 촉진에 관한 연구가 진행되었다. 하지만 아직까지도 초록갈파래에 대한 연구가 부족한 실정이다(Ghimire *et al.*, 2007; Paudyal *et al.*, 2013).

본 연구에서는 제주도 바다에서 채집한 초록갈파래(*Umbraulva japonica*)로부터 세균을 분리하여 16S rRNA 염기서열분석을 통해 균집 구조를 파악하고, 기존에 보고되지 않은 미생물을 탐색하여 계통학적, 형태학적, 생리학적, 생화학적, 화학분류학적 분석을 진행하여 표준균주와 비교 및 동정하고자 한다. 또, 신종 미생물을 비롯한 본 연구에서 분리된 세균을 이용하여 인체 유해세균과 어류 질병세균에 대한 활성 효과를 평가하였다.

II. 재료 및 방법

2. 1. 시료채집

본 연구에서의 초록갈파래는 2017년 4월 제주도 비양도 앞바다에서 채집하였으며, 멸균된 지퍼백에 담아 4℃에 보관한 후 운반하여 미생물을 분리하는 데 사용하였다.

2. 2. 미생물의 분리, 배양 및 보관

채집한 초록갈파래는 멸균된 인공해수로 세척하고 잘게 자른 후, 멸균된 0.85% 생리식염수에 넣어 균질화시켰다. 균질화된 시료는 연속 단계 희석법으로 10^{-1} ~ 10^{-5} 배로 희석하였고 희석액을 Marine agar (MA, Difco., USA)와 1/10 Marine agar, R2A agar (Difco., USA)에 도말한 후 25℃에서 배양하였다. 배양 7일 후 형태학적 특징에 따라 colony를 선별한 후 각각의 배지에 2-3회 계대 배양하여 순수 분리하였다. 순수 분리된 균주는 20% (v/v) glycerol에 현탁한 후 -80℃에서 보관하여 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition of Marine agar (MA)

Ingredient	Amounts
Peptone	5.0 g
Yeast extract	1.0 g
Ferric citrate	0.1 g
Sodium chloride	19.45 g
Magnesium chloride	8.8 g
Sodium sulfate	3.24 g
Calcium chloride	1.8 g
Potassium chloride	0.55 g
Sodium bicarbonate	0.16 g
Potassium bromide	0.08 g
Strontium chloride	0.034 g
Boric acid	22.0 g
Sodium silicate	4.0 g
Sodium fluoride	2.4 g
Ammonium nitrate	1.6 g
Disodium phosphate	8.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1L
pH	7.6 ± 0.2

Table 2. Composition of R2A agar

Ingredient	Amounts
Yeast extract	0.5 g
Proteose peptone	0.5 g
Casamino acid	0.5 g
Dextrose	0.5 g
Soluble starch	0.5 g
Sodium pyruvate	0.5 g
Dipotassium phosphate	0.3 g
Magnesium sulfate	0.05 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L
pH	7.2 ± 0.2

2. 3. 염기서열 분석

2. 3. 1. Genomic DNA 추출 및 유전자 증폭

분리한 균주의 genomic DNA를 추출하기 위하여 다음과 같이 진행하였다 (Wilson, 2001). TE buffer를 이용하여 균체를 풀어준 후 100 mg/ml lysozyme을 10 μ l를 넣어 반응하였다. 10% SDS (sodium dodecyl sulphate) 30 μ l, 10 mg/ml proteinase 6 μ l를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 후, 5M NaCl 80 μ l, CTAB/NaCl solution 80 μ l를 분주, inverting하였고 65 $^{\circ}$ C water bath에서 10분간 반응하였다. 25:24:1 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (v/v/v)을 750 μ l 분주 후 원심분리하였다. 상층액을 새 tube에 옮겨준 후 24:1 chloroform/isoamyl alcohol (v/v)을 동량으로 첨가하고 원심분리하였다. 상층액을 새 tube에 옮겨준 후 0.6배의 isopropanol을 넣어 원심분리 한 후 상층액을 모두 버린 뒤 70% Ethanol을 분주하였고 다시 원심분리하였다. 상층액을 모두 버리고 1시간 동안 건조하였다. 새 tube에 TE buffer 99 μ l와 10 mg/ml RNase를 섞어준 후 건조한 DNA tube에 30 μ l 분주하였다.

추출한 genomic DNA는 4 $^{\circ}$ C에 보관하였고 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 27 Forward primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1522 Reverse primer (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')를 사용하였다(Weisburg *et al.*, 1991).

AccuPowerTM PCR Premix (Bioneer., USA)에 추출한 DNA 1 μ l, 각 primer 10 pmol/primer 1 μ l, 멸균증류수 22 μ l을 첨가하여 최종 부피 25 μ l로 맞추어 PCR을 수행하였다. PCR조건은 95 $^{\circ}$ C에서 초기 변성 단계(Initial denaturation) 5분 반응을 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C 변성단계(Denaturation) 1분, 55 $^{\circ}$ C 결합단계(Annealing) 1분, 72 $^{\circ}$ C 합성단계(Extension) 1분 반응을 30 cycle 진행하였고 72 $^{\circ}$ C에서 최종 합성단계(Final extension) 10분 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose에 전기영동(Sub-cell[®] Agarose Gel Electrophoresis System, Bio-rad., USA)을 통해 밴드를 확인하였다.

2. 3. 2. 염기서열 및 계통학적 분석

증폭이 확인된 16S rRNA 유전자는 솔젠트(Dajeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 분석한 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 및 EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017; <http://www.ezbiocloud.net/>)에서 유사한 염기서열을 비교하였고 가장 근 연속이나 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 본 연구에서 결정된 염기서열과 NCBI 및 EzBioCloud에서 확인된 표준 미생물 염기서열은 ClustalX program을 통해 multiple alignment로 정렬하였고 (Jeanmougin *et al.*, 1998), Mega 6.0 software를 이용하여 neighbor-joining, jukes-Cantor model, pairwise-deletion 방법을 통해 계통수를 작성하였다(Tamura *et al.*, 2013). 계통수의 신뢰성 조사는 1,000회 replication을 적용한 bootstrap 분석으로 진행하였다(Felsenstein, 1985).

2. 4. 신종 미생물 UJT9^T의 동정

2. 4. 1. 계통분류학적 분석

2. 4. 1. 1. Genomic DNA 및 계통학적 분석

계통분류학적 분석을 위해 genomic DNA를 추출하였고(Wilson, 2001), 27 Forward primer와 1522 Reverse primer를 사용하여 PCR을 수행하였다(Weisburg *et al.*, 1991). TOPO Cloning kit (Invitrogen., USA)를 사용하여 PCR product의 cloning을 진행하였고, AccuPowerTM Nano-Plus Plasmid Mini Extraction kit (Bioneer., USA)를 사용하여 Plasmid DNA를 추출한 후 솔벤트에 의뢰하여 분석하였다. 분석한 염기서열은 NCBI 및 EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017: <http://www.ezbiocloud.net/>)에서 기존 세균들과의 염기서열 유사성을 비교하였고 97% 이하의 유사성을 보이면 신종으로 추정하여 가장 근 연속이나 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 분리균주와 염기서열 유사성이 높은 균주들의 염기서열은 ClustalX program (Jeanmougin *et al.*, 1988)을 통해 multiple alignment로 정렬하였고, Mega 6.0 software (Tamura *et al.*, 2013)를 이용하여 neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987), maximum-likelihood (Felsenstein, 1981), maximum-parsimony (Fitch, 1971) 알고리즘을 사용하여 계통수를 작성하였다. 최종 계통수는 neighbor-joining 계통도식을 기준으로 maximum-likelihood 계통도식과 maximum-parsimony 계통도식을 비교하여 일치하는 부분을 검은색 점으로 표시하였다. 계통수의 신뢰성 조사는 1,000회 replication을 적용한 bootstrap 분석으로 진행하였다(Felsenstein, 1985).

2. 4. 1. 2 표준균주

분리균주와 기존 균주들과의 염기서열 비교 및 계통학적 분석을 통해 표준균주를 선정하였다. 표준균주로 선정된 *Nonlabens arenilitoris* KCTC 32109^T와 *Nonlabens ulvanivorans* DSM 22727^T는 한국생물자원센터(Korea Collection for Type Culture, KCTC)와 DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)에서 각각 분양받아 분리균주 UJT9^T와 함께 비교 실험하였다.

2. 4. 1. 3. DNA-DNA hybridization

분리균주 UJT9^T를 MA에 배양한 후 genomic DNA를 회수하였다(Wilson, 2001). DNA의 농도가 0.1 mg/ml이 되도록 TE buffer와 섞어준 후 100°C에서 10분간 끓인 후 얼음에 꽂아주었다. DNA 200 µl에 PBS buffer 1.8 ml 첨가한 후 96 Black Immunoplate well에 100 µl 씩 분주하고 호일로 감싼 뒤 37°C에서 2시간 반응하였다. Plate well에 있는 용액을 제거한 후, 1X PBS buffer 200 µl를 가하여 세척한 뒤 45°C에서 overnight하였다. DNA를 고정된 plate well에 pre-hybridization (Sigma[®], USA) 용액을 200 µl씩 분주한 후 1시간 반응하였다. Probe-DNA를 제조하기 위하여 DNA 10 µl (1 mg/ml)에 10 µl photobiotin (1 mg/ml)을 가하여 혼합하였고 100°C에서 5분 동안 끓인 후 얼음에 꽂아주었다. 0.1M Tris-HCl (pH 9.0) 200 µl와 1-butanol 100 µl를 넣어 혼합한 후 원심분리 (13000 rpm, 30초, 4°C)하여 상층액을 제거한 뒤 다시 1-butanol 100 µl 첨가하고 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 남아있는 하층액을 100°C에서 15분 반응한 뒤 급냉하여 probe-DNA를 제조하였다. Plate well에 있는 pre-hybridization 용액을 제거한 뒤 probe-DNA와 hybridization solution을 혼합하여 각 well에 100 µl 씩 분주한 후 40°C에서 두 시간 반응하였다. 반응 종료 후 plate well의 용액을 제거한 뒤 2X SSC로 2회 세척하였고 Solution 1 (Bovine serum albumin 0.05 g, Triton X-100 10 µl, 1X buffer 10 ml)을 200 µl씩 분주한 후 10분간 반응하였다. Solution 1을 제거한 후 Solution 2 (Bovine serum albumin 0.05 g, Triton X-100 10 µl, 1X buffer 10 ml, Streptavidin-β-galactosidase 10 µl)를 100 µl씩 각 well에 첨가하였고 37°C에서 30분 반응한 후 solution을 제거하였다. 그다음, 0.1% Triton X-100이 포함된 1X PBS buffer로 2회 세척하였고 4-MUF-Gal solution (1M MgCl₂ 10 µl, 4-Methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside 1 mg, 1X PBS buffer 10 ml, N,N-dimethylformamide 100 µl)을 100 µl씩 각 well에 첨가한 후 0분부터 15분마다 형광광도를 측정하였다(Ezaki *et al.*, 1989)

2. 4. 2. 형태학적 특성

2. 4. 2. 1. 주사전자현미경(SEM, Scanning Electron Microscopy)

분리균주 UJT9^T의 형태학적 특성 확인을 위해 아래와 같이 수행하였다. 0.5 × 0.5 cm PTFE 0.2 μm membrane filter에 배양한 분리균주를 2.5 % glutaraldehyde 용액에 담근 후 2시간 동안 고정하였으며 1X PBS buffer로 2회 세척하였다. 세척 후 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% Ethanol로 각각 30분씩 탈수한 후, Isoamyl acetate 0.5 ml : 100% Ethanol 1.5 ml 용액에 1시간, Isoamyl acetate 1 ml : 100% Ethanol 1 ml 용액에 1시간, Isoamyl acetate 1.5 ml : 100% Ethanol 0.5 ml 용액에서 1시간 처리하였다. 그 후 Isoamyl acetate 2 ml 용액에 1시간 방치하였고 CO₂ gas로 건조한 뒤 금박 처리하여 전자현미경(Jeol., Japan)을 이용하여 관찰하였다.

2. 5. 2. 2. 그람염색 및 운동성 시험

그람염색은 Gram-staining kit (BBL, Difco., USA)를 사용하여 수행하였다. 분리균주를 슬라이드 글라스에 열 고정 시킨 후, Crystal violet 1분, Iodine 1분, 95% Alcohol 20초 그리고 Safranin을 1분간 처리하여 염색 후 현미경으로 결과를 관찰하였다. 운동성을 평가하기 위해 Marine broth에 0.5% agar를 추가하여 배지를 제조한 후 접종하였고, 25℃에서 3일간 배양하여 관찰하였다(Bowman, 2000).

2. 4. 3. 생리학적 특성

분리균주 UJT9^T의 성장 가능 온도 범위를 확인하기 위해 MA에 도말한 후 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40 및 45℃에서 배양하여 성장상태를 관찰하였다.

성장 가능 pH 범위를 확인하기 위해 Zobell's marine agar (Table 5)를 제조하였고 1M NaOH와 HCl을 이용하여 배지의 pH를 5.0-11.0 (간격 pH 0.5)으로 조정한 후 분리균주를 도말하여 성장 상태를 관찰하였다.

분리균주 UJT9^T의 성장 가능 NaCl 농도 범위를 확인하기 위해 NaCl이 제외된 Zobell's marine agar에 NaCl의 농도가 0-9.0% (간격 1.0%) (w/v)가 되도록 NaCl을 첨가한 후 분리균주를 도말하여 성장 상태를 관찰하였다.

혐기성 조건에서 분리균주의 성장 가능성을 확인하기 위해 MA에 균을 도말한 후 anaerobic jar에 혐기성 가스 발생 팩(Oxoid., UK)과 도말한 균을 함께 넣어 25℃에서 배양하여 성장을 확인하였다.

Table 3. Composition of Zobell's marine agar

Ingredient	Amounts
Bacto Peptone	5.0 g
Yeast extract	1.0 g
Ferric citrate	0.1 g
Magnesium Sulfate	5.94 g
Magnesium chloride	4.53 g
Potassium Chloride	0.64 g
Calcium chloride	1.3 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1L
pH	7.6 ± 0.2

2. 4. 4. 생화학적 특성

2. 4. 4. 1. Catalase · Oxidase test

Catalase test를 위해 분리균주 UJT9^T를 MA에 배양한 후 분리균주 집락에 Catalase reagent (BioMérieux., France)를 떨어트린 후 기포 생성 유무를 확인하여 기포가 발생하면 양성으로 판단하였다. Oxidase test는 MA에 분리균주의 집락을 도말하여 배양한 후 Oxidase reagent (BioMérieux., France)를 떨어트려 보라색을 띠면 양성으로 판단하였다.

2. 4. 4. 2. 가수분해(Hydrolysis) test

분리균주 UJT9^T의 가수분해능을 확인하기 위해 MA에 Casein 5% (w/v), Starch 2% (w/v), Cellulose 0.5% (w/v), Tween 20, 40, 60, 80 1%의 농도가 되도록 하였고, DNase agar는 MB broth에 1%의 농도로 첨가하여 배지를 제조하였다. 제조된 배지에 분리균주를 도말하여 배양한 후 가수분해능을 판독하였다. Casein은 배양 후 생성된 투명환을 확인하여 양성으로 판독하였고 Starch는 요오드 용액(Iodine)을 떨어트려 투명환이 형성되면 양성으로, Cellulose는 1% Congo red로 반응한 후 1M NaCl로 세척 후 투명환이 형성되면 양성으로 판독하였다. Tween 20, 40, 60, 80은 분리균주 집락 주위의 혼탁 환을 확인하였고, DNase는 1N HCl을 첨가하여 투명환이 생성되면 양성으로 판독하였다(Smibert and Krieg, 1994).

2. 4. 4. 3. API 20 NE 및 ZYM

분리균주 UJT9^T의 기질이용 및 효소 활성 등을 확인하기 위해 API 20 NE kit (BioMérieux, France)와 API ZYM kit (BioMérieux., France)를 이용하였다.

냉장 상태의 kit와 시약들은 사용하기 전에 미리 실온에 꺼내두고 트레이에 멸균 증류수를 채워 넣어 스트립이 건조해지지 않도록 하였다. API 20 NE 실험을 위해 분리균주의 집락을 NaCl 0.85% (w/v) medium 2 ml에 탁도가 McFarland 0.5가 되도록 제조하였다. 혼탁액을 NO₃에서 PNPG까지 큐플과 튜브에 가득 채우고, GLU, ADH, URE는 혐기적인 조건을 위해 광유(mineral oil)를 큐플에 채워주었다. AUX medium에 균 혼탁액을 200 µl 분주하여 잘 섞어준 후 GLU에서 PAC까지 접종하였고 스트립 뚜껑을 덮어 25℃에서 3일 동안 배양하였다. 스트립의 결과는 API 20 NE kit의 지침에 따라 판독하였다.

ZYM 실험 또한 API 20 NE와 동일하게 스트립을 준비하였고 Suspension medium 2 ml에 분리균주의 집락을 풀어 McFarland 5~6이 되도록 하였다. 피펫을 이용하여 혼탁액 65 µl를 각각의 큐플에 분주한 후 25℃에서 3일 동안 배양하였다. 반응 결과는 제조사의 지침에 따라 시약을 넣어준 후 결과 테이블에 따라 판독하였다.

2. 4. 5. 화학 분류학적 특성

2. 4. 5. 1. 지방산(Fatty acids)

지방산 분석을 위해 분리균주 UJT9^T와 표준균주들을 MA에서 25℃, 3일간 배양하였다. 배양된 균주의 집락 약 40 mg을 시험관에 넣은 후 Reagent 1 (Sodium hydroxide 45g, Methanol 150 ml, D.W 150 ml) 1 ml을 첨가하여 30초 vortexing 실시하였고 100℃ water bath에서 5분간 반응하였다. 다시 5~10초 vortexing 후 100℃ water bath에서 25분간 반응하였다. 37℃에서 1분간 반응시킨 후 Reagent 2 (6N HCl 325 ml, Methanol 275 ml) 3 ml을 넣고 5~10초 vortexing 후 80℃ water bath에서 10분 반응시킨 뒤 1분간 식혀주었다. Reagent 3 (Hexane 200 ml, Methyl tert-butyl ether 200 ml) 2 ml 첨가한 후 10분간 교반하여 섞어주었다. 교반 후 하층액을 제거하였고 Reagent 4 (NaOH 10.8 g, D.W 900 ml)를 3 ml 첨가 후 교반 해주었다. 분리한 용매의 상층액을 GC vial에 보관한 후, Microbial Identification System (MIDI., USA)사의 sherlock microbial identification system version 4.5 (MIS) 프로그램과 TSBA6 database를 사용하여 분석하였다(Sasser., 1990).

2. 4. 5. 2. 퀴논(Quinones)

분리균주 UJT9^T의 퀴논(Quinones)을 추출하기 위하여 Marine broth에 접종하여 3일 동안 25℃에서 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 회수한 후 동결 건조하였다. 동결 건조된 균체 50 mg에 0.3% NaCl: Methanol (10: 100, v/v) 2 ml과 Hexan 2 ml을 혼합하여 15분간 교반하였다. 그 후 원심분리(3000 rpm, 10분, 4℃)하여 상층액을 분리하였고 남아있는 하층액에 Hexan 1 ml을 가하여 위의 과정과 같이 교반한 뒤 원심분리하였다. 다시 상층액을 분리하여 퀴논을 분석하는데 사용하였다. 분석을 위해 Isopropyl ether: MeoH (1: 4, v/v) 혼합용액을 가한 뒤, Spherisorb 5µm ODS2 column (250 × 4.6 mm; Waters)으로 여과하였고 reversed-phase HPLC를 이용하여 퀴논을 분석하였다 (Minnikin *et al.*, 1984; Tamoka, 1986).

2. 4. 5. 3. 극성지방(Polar lipids)

세포막의 극성지방(Polar lipids)은 two-dimension TLC method를 이용하였다. 먼저, 배양한 분리균주 UJT9^T의 균체를 회수한 후 동결 건조하였다. 건조된 균체 50 mg을 유리 시험관에 옮긴 후 0.3% NaCl (w/v)과 Methanol을 10: 100으로 혼합한 용매 2 ml와 Hexane 2 ml을 첨가하여 15분 동안 교반하였고, 원심분리(3000 rpm, 10분, 4℃)하여 상층액을 제거하였다. 남아있는 하층액에 Hexane 1 ml을 넣고 15분 동안 교반기를 이용해 잘 섞어준 후 다시 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 하층액을 5분 동안 100℃ water bath에서 가열하고 37℃에서 식혀준 후, chloroform: methanol: 0.3% NaCl (w/v) (90: 100: 30, v/v/v) 혼합용매를 2.3 ml 첨가한 후 1시간 교반하였다. 그 후 원심분리(3000 rpm, 10분, 4℃)하여 상층액을 획득하였다. 남아있는 하층액에 chloroform: methanol: 0.3% NaCl (w/v) (50: 100: 40, v/v/v) 혼합용매를 0.75 ml 첨가하여 5분 교반하였고 원심분리(3000 rpm, 10분, 4℃) 후 상층액을 전 단계에서 획득한 상층액과 혼합하였다. 상층액만을 모아둔 유리 시험관에 chloroform 1.3 ml과 0.3% NaCl (w/v) 1.3 ml을 첨가하여 vortexing해주고 원심분리(3000 rpm, 10분, 4℃) 후 상층액을 제거하여 하층액을 회수하였다. 하층액을 37℃에서 overnight하여 최종 극성지방을 획득하였다. 최종 극성지방에 chloroform: methanol (2: 1, v/v) 혼합용매를 50 µl 분주하여 녹인 후 TLC plate (silica gel 60 plate 10 × 10 cm, Merck)의 왼쪽 아래 모서리 1cm × 1cm 교차점에 5 µl 점적하였다. solvent 1 (chloroform: methanol: water = 65: 25: 4, v/v/v) 용매에 35분간 전개한 후 1시간 동안 건조하였고 solvent 2 (chloroform: methanol: acetic acid: water = 80: 15: 12: 4, v/v/v/v)에 25분 전개 뒤 1시간 건조하였다. 건조한 각 TLC plate에 ninhydrin reagent (amino lipid), 5% phosphomolybdic acid (total lipid), α-naphthol-sulphuric acid (glycolipid), molybdenum blue reagent (phospholipid) 발색시약을 사용하여 극성 지방을 검출하였다(Minnikin *et al.*, 1984).

2. 4. 5. 4. DNA G+C content

분리균주 UJT9^T의 DNA G+C 함량을 확인하기 위해 MA에서 25℃, 3일 동안 배양한 후, 한국미생물보존센터(KCCM)에 분석을 의뢰하였다.

2. 4. 6. 항생제 시험(Antibiotic test)

항생제에 대한 분리균주 UJT9^T의 감수성과 저항성을 실험하기 위해 disc diffusion method를 이용하여 수행하였다(Table 6). 배양한 분리균주와 표준균주를 멸균된 면봉을 사용하여 MA에 전체 도말하였고 항생제 disc (BD BBL, USA)를 올려놓은 후 배양하였다. 배양 후 disc 주변에 형성된 생육 저해환(clear zone)을 관찰하여 분리균주의 감수성과 저항성을 확인하였다.

Table 4. List of antibiotics used of antibiotic test

Antibiotic	Concentration
Ampicillin	10 µg
Cephalothin	30 µg
Chloramphenicol	30 µg
Erythromycin	15 µg
Gentamicin	10 µg
Kanamycin	30 µg
Lincomycin	2 µg
Nalidixic acid	30 µg
Neomycin	30 µg
Novobiocin	30 µg
Oxytetracycline	30 µg
Penicillin	10 IU
Polymyxin B	300 IU
Spiramycin	100 µg
Streptomycin	10 µg
Tetracycline	30 µg

2. 5. 항균 활성 탐색

초록갈파래(*U. japonica*)로부터 분리한 균주를 이용하여 인체 유해세균과 어류 질병세균에 대한 항균실험을 진행하였다. 항균 실험은 paper disc method (Valgas *et al.*, 2007)를 이용하였으며 실험에 사용된 병원균은 한국생물자원센터(Korea Collection for type Culture, KCTC)와 한국미생물보존센터(Korea Culture Center of Microorganisms, KCCM)로부터 분양받았다(Table 3).

분양받은 병원균은 각각의 최적 배지에서 배양한 후 생리식염수로 희석하여 McFarland No. 0.5 농도로 제조하였다. 멸균된 면봉을 사용하여 희석한 병원균을 Muller Hinton Agar (MHA, Difco., USA)에 전체 도말하였다. 순수 분리한 균주의 배양액은 원심분리하여 상층액과 균체를 획득한 뒤 직경 8 mm paper disc에 100 µl씩 분주하여 25°C에서 건조하였다. 건조된 paper disc를 병원균이 도말된 MHA 배지에 올려놓고 적정온도에서 48시간 배양한 후 paper disc 주변에 형성된 생육 저해환을 측정하였다.

Table 5. List of the strains used of antibacterial test

	Strain	Strain NO.	Growth conditions
Fish pathogenic bacteria	<i>Edwardsiella tarda</i>	KCTC 12267	1.5% BHIA, 25°C
	<i>Vibrio harveyi</i>	KCTC 12724	MA, 24°C
	<i>Streptococcus iniae</i>	KCTC 3657	1.5% BHIA, 25°C
	<i>Streptococcus parauberis</i>	KCTC 3651	1.5% BHIA, 25°C
Human clinical bacteria	<i>Escherichia coli</i>	KCTC 1682	TSA, 37°C
	<i>Streptococcus mutans</i>	KCCM 40105	BHIA, 37°C
	<i>Listeria monocytogenes</i>	KCCM 40307	1.5% BHIA, 37°C
	<i>Vibrio vulnificus</i>	KCCM 41665	1% TSA, 30°C

Table 6. Composition of medium for antibacterial test

Mueller Hinton Agar (MHA)	
Ingredient	Amounts
Beef Extract powder	2.0 g
Acid Digest of Casein	17.5 g
Starch	1.5 g
Agar	17.0 g
Distilled water	1 L
pH	7.3 ± 0.2

Brain Heart Infusion Agar (BHIA)	
Ingredient	Amounts
Calf Brains, Infusion from 200 g	7.7 g
Beef Heart, Infusion from 250 g	9.8 g
Proteose Peptone	10.0 g
Dextrose	2.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Disodium Phosphate	2.5 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L
pH	7.4 ± 0.2

Tryptic Soy Agar (TSA)	
Ingredient	Amounts
Pancreatic Digest of Casein	15.0 g
Papaic Digest of Soybean	5.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L
pH	7.3 ± 0.1

Ⅲ. 결과

3. 1. 염기서열 및 계통학적 분석

초록갈파래(*U. japonica*)에서 79개의 균주가 분리되었고 NCBI 및 EzBioCloud에서 유사한 염기서열을 비교하여 계통수를 작성하였고(Fig.1), 분석 결과, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*의 4개의 주요 문(Phylum)이 관찰되었다.

Actinobacteria 문(Phylum), *Actinobacteria* 강(Class), *Actinomycetales* 목(Order)은 *Microbacteriaceae*, *Micrococcineae*의 2개의 과(Family)가 분리되었고 *Microbacteriaceae* 과에 속하는 UJR7 균주는 *Microbacterium saperdae* IFO 15038^T와 98.6%, *Micrococcineae* 과에 속하는 UJT2는 *Citricoccus zhacaiensis* FS24^T와 98.3%의 염기서열 유사도를 나타냈다.

Bacteroidetes 문은 *Flavobacteria*와 *Cytophaga*의 2개의 강이 분리되었고, *Flavobacteria* 강의 *Flavobacteriales* 목, *Flavobacteriaceae* 과에는 7개의 속(Genus)이 분리되었다. *Flavobacteriaceae* 과에 속하는 UJM12, UJM15, UJM17은 *Aquimarina latercula* DSM 2041^T와 98.5~99.7%의 유사도를, UJM16은 *Aquamarine amphilecti* 92V^T와 98.6% 유사도를 보였다. UJT14는 *Cellulophaga baltica* NN015840^T와 99.1%, UJR10은 *Chryseobacterium indoltheticum* DSM 16778^T와 98.7%, UJM39는 *Croceitalea litorea* CBA3205^T와 98.7%, UJT9는 *Nonlabens arenilitoris* M-M3^T 97.7%의 유사도를 보였다. 또, UJM20은 *Dokdonia donghaensis* JSAQ01000001^T와 98.9%, UJM32와 UJM34는 *Dokdonia genika* AB198086^T와 99%이상의 유사도를 나타내었고, UJR11은 *Flavobacterium chilense* LMG 26360^T와 98.7%, UJR1, UJR2, UJR16은 *Flavobacterium arsenitoxidans* S2-3H^T와 98.2%의 염기서열 유사도를 보였다. *Bacteroidetes* 문의 *Cytophaga* 강, *Cytophagales* 목, *Cyclobacteriaceae* 과에는 UJT10이 *Algoriphagus namhaensis* DPG-3^T와 99.2%의 유사도를 나타내었다.

Firmicutes 문은 *Bacilli* 강, *Bacillales* 목, *Bacillaceae* 과, *Bacillus* 속이 분리되었고 UJT7이 *Bacillus aryabhatai* B8W22^T와 99.1%, UJR15는 *Bacillus luciferensis*

LMG 18422^T와 98.5%의 염기서열 유사도가 관찰되었다.

Proteobacteria 문은 3개의 강이 분리되었다. 먼저, *α-proteobacteria* 강에는 *Caulobacterales*, *Rhodobacterales*, *Sphingomonadales*의 3개의 목과 *Caulobacteraceae*, *Rhodobacteraceae*, *Erythrobacteraceae*, *Sphingomonadaceae*의 4개의 과로 분리되었다. *Caulobacterales* 목, *Caulobacteraceae* 과에 속하는 UJT12와 UJR12는 *Brevundimonas* 속으로 *Brevundimonas vesicularis* NBRC 12165^T와 각각 99.4%, 99.1%의 유사도를 보였다. *Rhodobacterales* 목, *Rhodobacteraceae* 과는 4개의 속으로 나뉘며 *Sulfitobacter* 속에 있는 UJM18은 *Sulfitobacter pontiacus* DSM 10014^T와 99.3%, UJT6, UJT15, UJT16은 *Sulfitobacter dubius* DSM 16472^T와 98.8~99.9%의 유사도를 나타내었고, *Rugeria* 속에 속하는 UJM25, UJM26, UJM36은 *Ruegeria atlantica* CECT 4292^T와 98.2~99.0%의 유사도를 보였다. 또, *Loktanella* 속의 UJT8은 *Loktanella salsilacus* DSM16199^T와 98.97%, *Paracoccus* 속의 UJR9는 *Paracoccus marcusii* DSM 11574^T와 99.0%의 염기서열 유사도를 확인하였다. *Sphingomonadales* 목의 *Erythrobacteraceae* 과는 두개의 속이 분리되었으며 UJM23, UJM29, UJM31, UJM35, UJM38, UJM 40, UJM41이 모두 *Altererythrobacter ishigakiensis* ATCC BAA-2084^T와 98.3~98.5%의 유사도를 나타내었고, UJM28이 *Erythrobacter longus* DSM 6997^T와 97.4%, UJM37이 *Erythrobacter seohaensis* SW-135^T와 98.5%의 염기서열 유사도를 보였다. *Sphingomonadales* 목의 *Sphingomonadaceae* 과는 4개의 속으로 분리되었으며 이에 속하는 UJT13은 *Novosphingobium lindaniclasticum* LE124^T와 98.7%의 염기서열 유사도를, UJM27은 *Sphingorhabdus litotis* FR1093^T와 98.8%, UJT3, UJR5, UJR27은 *Sphingobium limneticum* 301^T과 99.5~99.7%의 유사도가 관찰되었다.

Proteobacteria 문의 *β-proteobacteria* 강은 2개의 목으로 구분되며 *Burkholderiales* 목, *Comamonadaceae* 과, *Comamonas* 속으로 UJR4가 분리되었으며 *Comamonas jiangduensis* YW1^T와 97.5%의 염기서열 유사성을 보였고, *Neisseriales* 목, *Neisseriaceae* 과, *Neisseria* 속에 속하는 UJR21이 *Neisseria subflava* U37^T와 100% 염기서열 유사성을 나타내었다.

Proteobacteria 문의 *γ-proteobacteria* 강은 *Altermonadales*, *Enterobacteriales*, *Pseudomonadales*, *Vibrionales* 4개의 목으로 구분되며 *Altermonadales* 목은 *Pseudoaltermonadaceae*, *Shewanellaceae* 2개의 과로, *Enterobacteriales* 목은

Enterobacteriaceae 과, *Pseudomonadales* 목은 *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae* 2개의 과, *Vibrionales* 목은 *Vibrionaceae* 과로 분리되었다. *Pseudoaltermonadaceae* 과의 *Pseudoaltermonas* 속에 속하는 UJM1은 *Pseudoalteromonas atlantica* IAM 12927^T와 99.7%, UJM6과 UJM22는 *Pseudoalteromonas marina* Mano4^T와 99.7%의 염기서열 유사성을 나타내었고, *Shewanellaceae* 과, *Shewanella* 속에 속하는 UJT18과 UJT19는 *Shewanella inventionis* KX27^T와 98% 이상의 유사성을 보였다. *Enterobacteriaceae* 과의 *Pantoea*에 속하는 UJR30은 *Pantoea vagans* LMG 24199^T와 99.3%의 염기서열 유사도를 나타내었다. *Moraxellaceae* 과의 *Acinetobacter* 속의 UJR22는 *Acinetobacter lwoffii* NCTC 5866^T와 98.8%, *Enhydrobacter* 속의 UJR28, UJR29, UJR31, UJR32는 *Enhydrobacter aerosaccus* LMG 21877^T와 98.8~99.0%의 염기서열 유사도를 나타내었고, *Psychrobacter* 속의 UJR14, UJR19는 *Psychrobacter proteolyticus* 116^T, UJR18과 UJR26은 *Psychrobacter nivimaris* 88/2-7^T, UJR20은 *Psychrobacter alimentarius* JG-100^T와 99% 이상의 염기서열 유사도를 보였다. *Pseudomonadaceae* 과, *Pseudomonas* 속의 UJT5는 *Pseudomonas rhodesiae* CIP 104664^T, UJT17은 *Pseudomonas simiae* OLi^T, UJT20과 UJR25는 *Pseudomonas koreensis* Ps9-14^T, UJR3, UJR6, UJR8, UJR13, UJR17, UJR24는 *Pseudomonas putida* NBRC 14164^T, UJR23은 *Pseudomonas marginalis* ATCC 10844^T와 99% 이상의 염기서열 유사도를 나타내었다(Table 7, 8, 9).

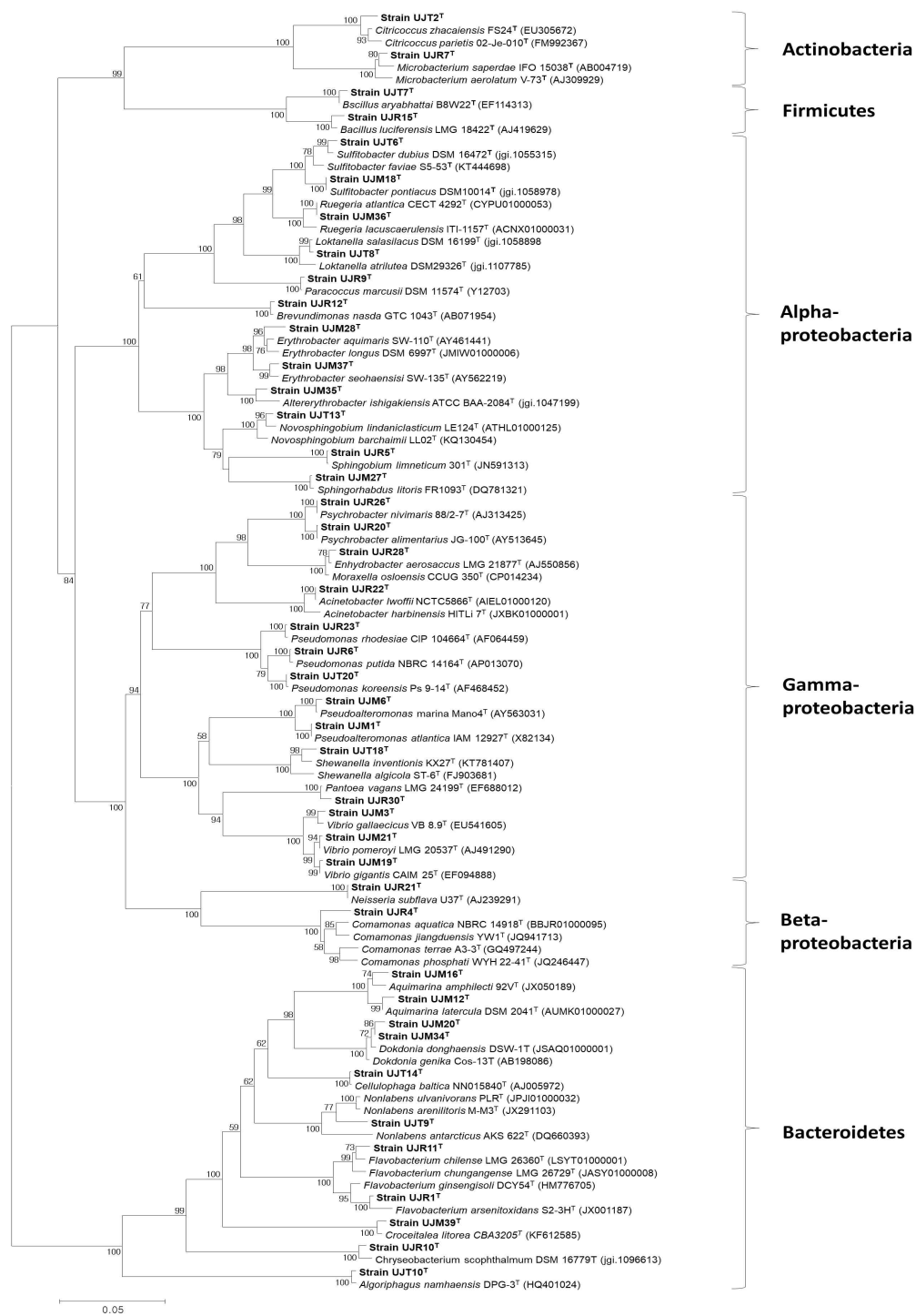


Fig. 1. Phylogenetic tree analysis of 16S rRNA gene sequences of bacteria isolated from *Umbraulva japonica* and some other related taxa. Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis (>50%) from 1,000 replication. Bar 0.05 nucleotide substitution per nucleotide position.

Table 7. The phylogenetic relatives of bacteria in MA

Name	Closest relative species	Similarity (%)
UJM1	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	99.7
UJM3	<i>Vibrio gallaecicus</i>	99.2
UJM4	<i>Vibrio gigantis</i>	99.7
UJM5	<i>Vibrio pomeroyi</i>	100
UJM6	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	99.7
UJM12	<i>Aquimarina latercula</i>	98.9
UJM15	<i>Aquimarina latercula</i>	99.3
UJM16	<i>Aquimarina amphilecti</i>	98.6
UJM17	<i>Aquimarina latercula</i>	99.7
UJM18	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>	99.3
UJM19	<i>Vibrio gigantis</i>	99.6
UJM20	<i>Dokdonia donghaensis</i>	98.9
UJM21	<i>Vibrio pomeroyi</i>	98.3
UJM22	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	99.7
UJM23	<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i>	98.5
UJM25	<i>Ruegeria atlantica</i>	99.0
UJM26	<i>Ruegeria atlantica</i>	99.0
UJM27	<i>Sphingorhabdus litoris</i>	98.8
UJM28	<i>Erythrobacter longus</i>	97.4
UJM29	<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i>	98.5
UJM31	<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i>	98.5
UJM32	<i>Dokdonia genika</i>	99.5
UJM34	<i>Dokdonia genika</i>	99.0
UJM35	<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i>	98.4
UJM36	<i>Ruegeria atlantica</i>	98.2
UJM37	<i>Erythrobacter seohaensis</i>	98.5
UJM38	<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i>	98.5
UJM39	<i>Croceitalea litorea</i>	98.7
UJM40	<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i>	98.5
UJM41	<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i>	98.5

Table 8. The phylogenetic relatives of bacteria in 1/10 MA

Name	Closet relative species	Similarity (%)
UJT2	<i>Citricoccus zhacaiensis</i>	98.3
UJT3	<i>Sphingobium limneticum</i>	99.7
UJT5	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	99.9
UJT6	<i>Sulfitobacter dubius</i>	98.8
UJT7	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99.1
UJT8	<i>Loktanella salsilacus</i>	99.0
UJT9	<i>Nonlabens arenilitoris</i>	97.0
UJT10	<i>Algoriphagus namhaensis</i>	99.2
UJT12	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	99.4
UJT13	<i>Novosphingobium lindaniclasticum</i>	98.7
UJT14	<i>Cellulophaga baltica</i>	99.1
UJT15	<i>Sulfitobacter dubius</i>	99.0
UJT16	<i>Sulfitobacter dubius</i>	99.9
UJT17	<i>Pseudomonas simiae</i>	99.5
UJT18	<i>Shewanella inventionis</i>	98.1
UJT19	<i>Shewanella inventionis</i>	98.0
UJT20	<i>Pseudomonas koreensis</i>	99.5

Table 9. The phylogenetic relatives of bacteria in R2A

Name	Closet relative species	Similarity (%)
UJR1	<i>Flavobacterium arsenitoxidans</i>	98.2
UJR2	<i>Flavobacterium arsenitoxidans</i>	98.2
UJR3	<i>Pseudomonas putida</i>	99.6
UJR4	<i>Comamonas jiangduensis</i>	97.5
UJR5	<i>Sphingobium limneticum</i>	99.5
UJR6	<i>Pseudomonas putida</i>	99.2
UJR7	<i>Microbacterium saperdae</i>	98.6
UJR8	<i>Pseudomonas putida</i>	99.4
UJR9	<i>Paracoccus marcusii</i>	99.0
UJR10	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	98.7
UJR11	<i>Flavobacterium chilense</i>	98.7
UJR12	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	99.0
UJR13	<i>Pseudomonas putida</i>	99.9
UJR14	<i>Psychrobacter proteolyticus</i>	99.8
UJR15	<i>Bacillus luciferensis</i>	98.5
UJR16	<i>Flavobacterium arsenitoxidans</i>	98.2
UJR17	<i>Pseudomonas putida</i>	99.4
UJR18	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	99.7
UJR19	<i>Psychrobacter proteolyticus</i>	99.7
UJR20	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	99.9
UJR21	<i>Neisseria subflava</i>	100
UJR22	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	98.8
UJR23	<i>Pseudomonas marginalis</i>	99.4
UJR24	<i>Pseudomonas putida</i>	99.9
UJR25	<i>Pseudomonas koreensis</i>	99.6
UJR26	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	99.3
UJR27	<i>Sphingobium limneticum</i>	99.6
UJR28	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	98.8
UJR29	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	98.9
UJR30	<i>Pantoea vagans</i>	99.3
UJR31	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	99.0
UJR32	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	99.0

3. 2. 세균 군집 분석

초록갈파래로부터 분리된 세균의 군집 구조는 4개의 문, 7개의 강, 12개의 목, 17개의 과, 31개의 속으로 구성되어 있으며, 그 중 *Proteobacteria* 문의 *α-proteobacteria* 강은 3개의 목, 4개의 과, 10개 속으로, *γ-proteobacteria* 강에서는 4개의 목 6개의 과, 8개의 속으로 다양한 분류군이 관찰되었다(Table 10). 속은 *Pseudomonas* 13.9%, *Altererythrobacter* 8.9%, *Psychrobacter*와 *Vibrio* 각각 6.3%, *Aquimarine*, *Flavobacterium*, *Sulfitobacter*, *Enhydrobacter* 각각 5.1%, *Dokdonia*, *Rugeria*, *Sphingobium*, *Pseudoaltermonas* 각각 3.8%, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Erythrobacter*, *Shewanella* 각각 2.5%, *Microbacterium*, *Citricoccus*, *Cellulophage*, *Chryseobacterium*, *Croceitales*, *Nonlabense*, *Algoriphagus*, *Loktanella*, *Paracoccus*, *Novosphingobium*, *Comamonas*, *Neisseria*, *Pantoea*, *Acinetobacter* 각각 1.3%로 확인되었다(Fig. 2).

Actinobacteria 문이 1개의 강, 1개의 목, 2개의 과, 2개의 속으로 2.5%, *Bacteroidetes* 문이 2개의 강, 2개의 목, 2개의 과, 8개의 속으로 20.3%, *Firmicutes* 문이 1개의 강, 1개의 목, 1개의 과, 1개의 속으로 구성되어 2.5%로 나타났다. *Proteobacteria* 문은 3개의 강, 9개의 목, 12개의 과, 20개의 속으로 74.7%를 차지하였으며 그 중 *α-proteobacteria* 강이 31.7%, *γ-proteobacteria* 강이 40.5%로 가장 높은 비율을 나타내었다(Fig. 3).

Table 10. Bacterial diversity associated with *Umbraulva japonica*

Phylum	Class	Order	Family	Genus	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>	
			<i>Micrococcineae</i>	<i>Citricoccus</i>	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Aquimarina</i>	
				<i>Cellulophage</i>	
				<i>Chryseobacterium</i>	
				<i>Croceitalea</i>	
				<i>Dokdonia</i>	
				<i>Flavobacterium</i>	
				<i>Nonlabens</i>	
	<i>Cytophagis</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Cyclobacteriaceae</i>	<i>Algoriphagus</i>	
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	
			<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Loktanella</i>	
					<i>Paracoccus</i>
					<i>Ruegeria</i>
					<i>Sulfitobacter</i>
			<i>Sphingomonadales</i>	<i>Erythrobacteraceae</i>	<i>Altererythrobacter</i>
					<i>Erythrobacter</i>
			<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Novosphingobium</i>	
				<i>Sphingobium</i>	
				<i>Sphingorhabdus</i>	
		<i>β-proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Comamonas</i>
	<i>Neisseriales</i>		<i>Neisseriaceae</i>	<i>Neisseria</i>	
		<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Altermonadales</i>	<i>Pseudoaltermonadaceae</i>	<i>Pseudoaltermonas</i>
				<i>Shewanellaceae</i>	<i>Shewanella</i>
	<i>Enterobacteriales</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea</i>	
	<i>Pseudomonadales</i>		<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	
				<i>Enhydrobacter</i>	
				<i>Psychrobacter</i>	
			<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	
		<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>	

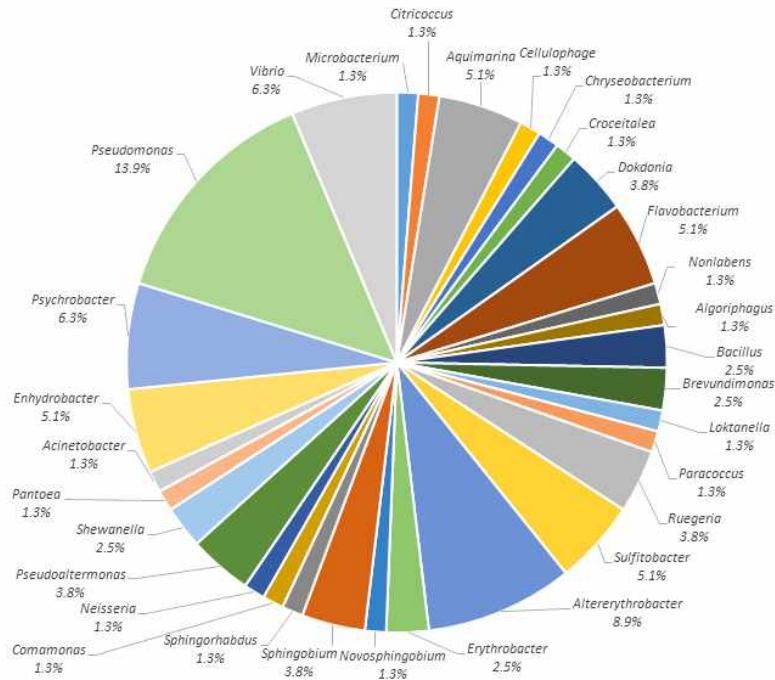


Fig. 2. Pie-diagram showing the community structure and the diversity of bacterial community of *Umbraulva japonica*.

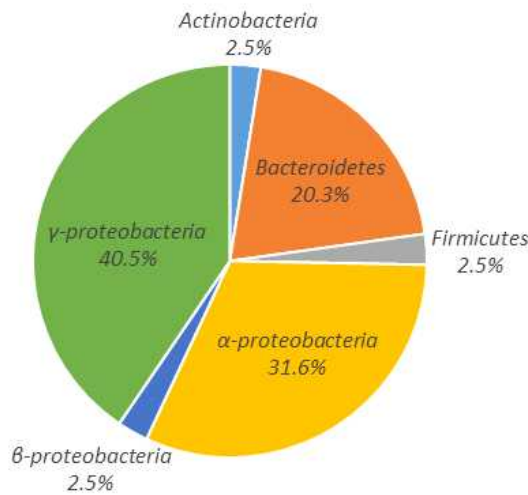


Fig. 3. Pie-diagram of various bacterial Phylum isolated from *Umbraulva japonica*.

3. 3. 신종 미생물 UJT9^T의 동정

3. 3. 1. 계통분류학적 분석

분리균주 UJT9^T의 genomic DNA를 분석한 결과, 1,520 bp의 염기서열을 결정하였다. NCBI에 유전자 등록하여 accession number (MH061317)를 획득하였으며 미생물 보존 기관 KACC (Korean Agricultural Culture Collection)와 JCM (Japan Collection of Microorganisms)에 기탁하여 각각 KACC 19635, JCM 32766로 균주 번호를 부여받았다. 분리균주 UJT9^T의 유전자 염기서열을 EzBioCloud와 NCBI에서 기존 세균의 유전자 염기서열을 비교하여 분석하여 계통수를 작성하였으며 *Nonlabens arenilitoris* KCTC 32109^T와 97.7%, *Nonlabens ulvanivorans* DSM 22727^T와 97.6%의 유사성을 확인하여 신종으로 보고될 가능성이 있다고 판단하였다 (Fig. 4). 표준균주와의 DNA-DNA hybridization을 실행한 결과 *N. arenilitoris* KCTC 32109^T과 약 $67.4 \pm 1.4\%$, *N. ulvanivorans* DSM 22727^T와 약 $48.2 \pm 4.5\%$ 의 상동성을 나타내었다.

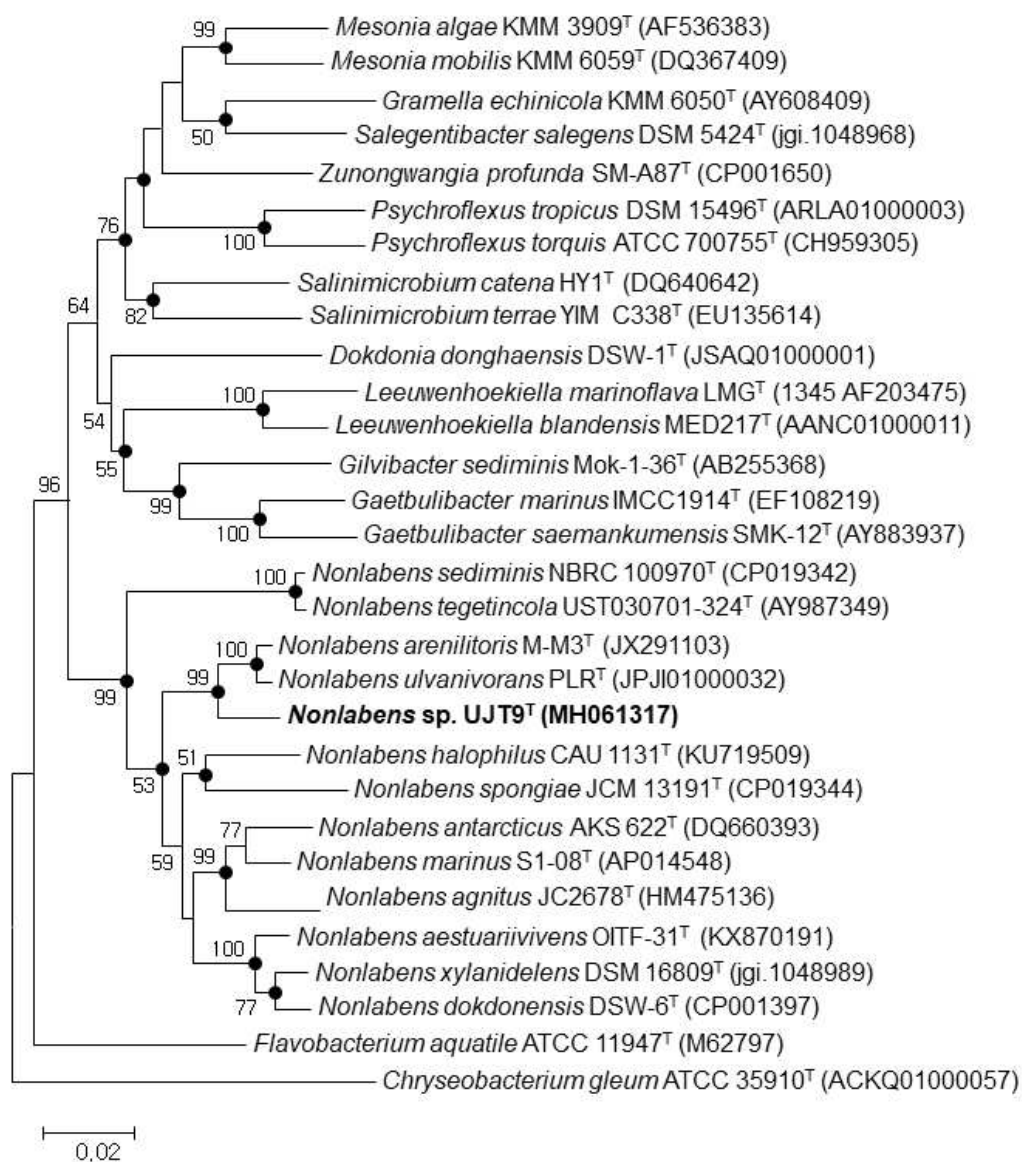


Fig. 4. A neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequence showing the phylogenetic position UJT9^T among the related strains of the genus *Nonlabens* and representatives of some other related taxa. Bootstrap values (>50%) are based on 1,000 replication. The dots indicate that corresponding nodes were also recovered in the maximum-likelihood and maximum-parsimony trees. Bar 0.02 nucleotide substitutions per nucleotide position.

3. 3. 2. 형태학적 특성

분리균주 UJT9^T를 MA에서 25℃, 3일간 배양하여 오렌지색의 둥근 콜로니를 확인하였으며 주사현미경을 통해 관찰한 결과, 간균으로 직경 0.3~0.4 × 길이 0.9~1.4 μm의 크기를 확인하였다(Fig 5). 그람염색 결과 음성으로 나타났으며 운동성은 없는 것으로 확인되었다.

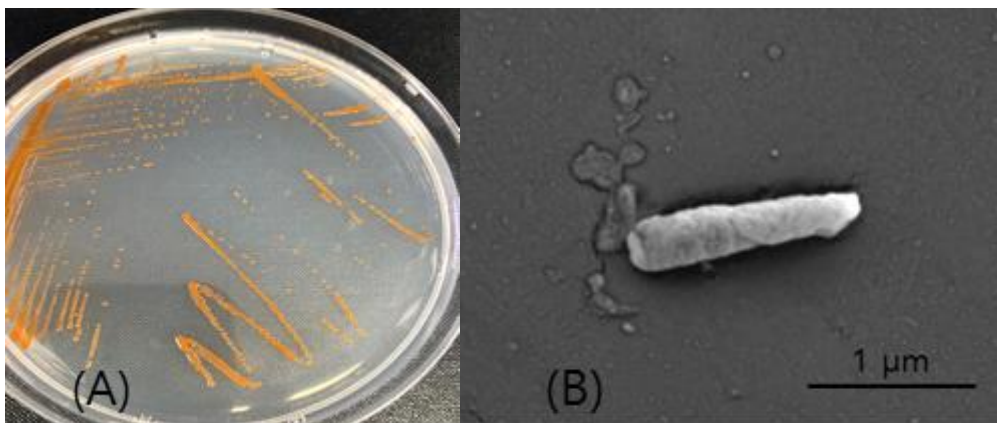


Fig. 5. (A) Colony morphology and (B) Scanning electron microscope (SEM) of strain UJT9^T.

3. 3. 3. 생리학적 특성

분리균주 UJT9^T는 15~35℃ 사이에서 생장이 가능하였고 최적 생장 온도는 20~25℃로 확인되었다. 생장 가능한 pH 범위는 5.5에서 8.0사이로 관찰되었으며, pH 6.0~7.0에서 가장 높은 생장을 보였다. NaCl 농도 1.0~3.0% (w/v)에서 생장을 보였으며 생장을 위한 최적의 NaCl 농도는 1.0~2.0%로 나타났다(Table 12). 혐기성 테스트 결과, 혐기 조건의 환경에서는 생장하지 못하며 호기성 미생물로 확인되었다.

3. 3. 4. 생화학적 특성

분리균주 UJT9^T의 Catalase와 Oxidase test 결과는 모두 양성으로 관찰되었다. 가수분해 (Hydrolysis) 실험 결과, UJT9^T균주는 Starch, Tween 40, Tween 60에서 양성을 나타내 분해능을 확인하였으나 Cellulose, DNase, Casein, Tween 20, Tween 80에서는 분해능이 관찰되지 않았다.

기질 이용과 효소 활성 확인을 위한 API 20 NE, ZYM 실험결과는 다음과 같다. 기질 이용에 있어 Asculin, Gelatin degradation에서 양성반응이 관찰되었으며 나머지 Nitrate reduction, Indole production, Glucose fermentation, Arginine dihydrolase, Urease, β -galactosidase, *D*-glucose, *D*-arabinose, *D*-mannose, *D*-mannitol, *N*-acetyl-*D*-glucosamine, *D*-maltose, Potassium gluconate, Capric acid, Adipic acid, Malic acid, Trisodium citrate, Phenylacetic acid에서는 모두 음성반응을 확인하였다.

효소 활성에서는 Alkaline phosphatase, Esterase (C4), Esterase lipase (C8), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, Trypsin, α -chymotrypsin, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase에 대하여 양성반응을, Lipase (C14), α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -mannosidase, α -fucosidase에 대하여 음성반응을 나타내었다(Table 12).

Table 11. Differential biomedical characteristics of strain UJT9^T and related type strains: 1, UJT9^T; 2, *N. arenilitoris* KCTC 32109^T; 3, *N. ulvanivorans* DSM 22727^T

Characteristic	1	2	3
Size(μm)	0.2-0.4×0.6-1.4	0.2-0.4×0.6-6.0 ^a	0.8-1.0×1.5-5.5 ^b
Temperature range(°C)	15-35	15-35	5-37
pH range	5.5-8.0	5.5-8.0	5.5-8.0
NaCl range (%)	1.0-3.0	1.0-3.0	1.0-3.0
Hydrolysis of			
DNA	-	+	+
Casein	-	+	-
Tween 40	+	-	+
Acid production from			
Nitrate reduction	-	+	-
Gelatin	+	+	-
Enzyme activity			
Esterase (C4)	-	+	+
N-acetyl-β-glucosaminidase	+	+	-
DNA G+C (mol%)	38.5	38.2 ^a	35.3 ^b

Data from ^aPark *et al.* (2013); ^bBarbeyron *et al.* (2011).

3. 3. 5. 화학분류학적 특성

분리균주 UJT9^T의 DNA G+C 함량은 38.5 mol%로 확인되었으며, UJT9^T의 주요 지방산으로 iso-C_{15:0} (20.1%), iso-C_{16:0} 3-OH (14.1%), iso-C_{16:0} (10.2%), iso-C_{17:0} 3-OH (7.8%), anteiso-C_{15:0} (6.3%), iso-C_{16:1} H (5.6%)로 확인되었다(Table 13).

UJT9^T의 극성지방을 분석한 결과, UJT9^T의 주요 극성지방으로 phosphatidylethanolamine (PE)과 두 개의 unidentified amino lipid (AL), 두 개의 unidentified lipids (L)로 구성되어 있음을 관찰하였으며(Fig. 6), 주요 퀴논은 menaquinones type (MK-6)으로 확인되었다.

Table 12. Fatty acid analysis of strain UJT9^T and related type strains: 1, UJT9^T; 2, *N. arenilitoris* KCTC 32109^T; 3, *N. ulvanivorans* DSM 22727^T. Values indicate percentage of total fatty acids. tr, trace amount (less than 0.5% of total); -, not detected. All data were obtained in this study

Fatty acid	1	2	3
Straight-chain			
C _{14:0}	tr	-	-
C _{16:0}	tr	0.7	0.8
Branched			
Iso-C _{10:0}	tr	0.6	0.8
Iso-C _{13:0}	tr	tr	0.6
Iso-C _{14:0}	2.2	1.8	1.8
Iso-C _{14:1E}	-	tr	tr
Iso-C _{15:0}	20.1	26.7	29.8
anteiso-C _{15:0}	6.3	7.2	6.1
Iso-C _{16:0}	10.2	9.6	4.2
Iso-C _{16:1 H}	5.6	1.8	1.4
Iso-C _{17:0}	-	tr	
Iso-C _{17:1 ω9c}	3.0	5.1	5.3
anteiso-C _{17:0}	-	tr	-
anteiso-C _{17:1 ω9c}	-	1.3	-
Unsaturated			
C _{15:1 ω6c}	3.0	1.0	1.8
C _{16:0 N alcohol}	0.7	-	-
C _{17:1 ω6c}	4.1	2.6	2.4
C _{17:1 ω8c}	0.8	0.6	0.5
C _{18:1 ω5c}	1.0	1.4	2.7
Hydroxylated			
C _{15:0 2-OH}	1.2	1.4	1.2
C _{15:0 3-OH}	1.8	-	1.4
C _{16:0 3-OH}	0.6	tr	tr

Table 12. Continue.

Fatty acid	1	2	3
C _{17:0} 2-OH	1.9	1.5	1.0
C _{17:0} 3-OH	0.5	0.7	0.7
Iso-C _{14:0} 3-OH	0.6	0.5	tr
Iso-C _{15:0} 3-OH	4.0	4.5	6.4
Iso-C _{16:0} 3-OH	14.1	4.8	4.9
Iso-C _{17:0} 3-OH	7.8	14.3	14.9
Summed Feature			
3	7.8	8.0	7.4

*Summed feature 3 comprises C_{16:1} *ω*7*c* and/or Iso C_{15:0} 2-OH

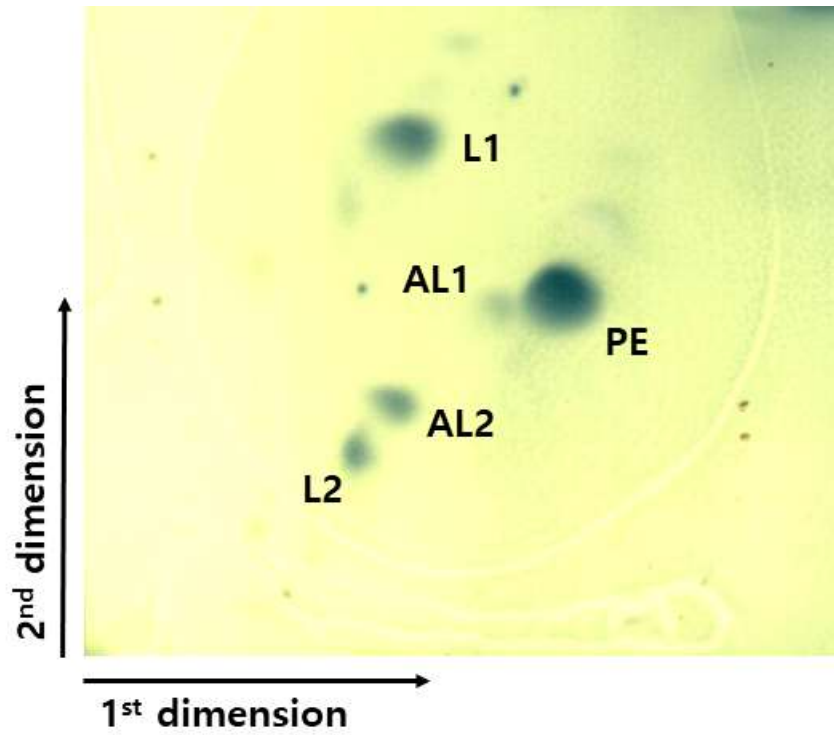


Fig. 6. Two dimensional thin layer chromatogram of the polar lipids of strain UJT9^T. PE, phosphatidylethanolamine; AL 1-2, unidentified amino lipids; L 1-2, unidentified lipids.

3. 3. 6. 항생제 시험 (Antibiotic test)

항생제 시험 결과, UJT9^T와 표준균주 모두 공통적으로 cephalothin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), lincomycin (2 µg), novobiocin (30 µg), spiramycin (100 µg), tetracycline (30 µg)에 대하여 10 mm 이상의 생육 저해환을 형성하여 감수성이 있는 것으로 관찰되었으며, gentamycin (10 µg), kanamycin (30 µg), neomycin (30 µg), polymyxin B (300 IU), streptomycin (10 µg)에 대해서는 저항성이 있는 것으로 관찰하였다. Ampicillin (10 µg), penicillin (10 IU)에 대하여 UJT9^T만이 감수성을 보였고 nalidixic acid (30 µg)과 oxytetracycline (30 µg)에는 표준균주들이 감수성을 나타내었다(Table13).

Table 13. Antibiotic susceptibility of strain UJT9^T and related type strains: 1, UJT9^T; 2, *N. arenilitoris* KCTC 32109^T; 3, *N. ulvanivorans* DSM 22727^T

Antibiotic	1	2	3
Ampicillin	+	-	-
Cephalothin	+	+	+
Chloramphenicol	+	+	+
Erythromycin	+	+	+
Gentamicin	-	-	-
Kanamycin	-	-	-
Lincomycin	+	+	+
Nalidixic acid	-	+	+
Neomycin	-	-	-
Novobiocin	+	+	+
Oxytetracycline	-	+	+
Penicillin	+	-	-
Polymyxin B	-	-	-
Spiramycin	+	+	+
Streptomycin	-	-	-
Tetracycline	+	+	+

3. 4. 항균 활성 탐색

인체유해세균과 어류질병세균에 대해 세균의 항균활성을 탐색한 결과 3개의 균주가 항균 활성 효과를 나타냈으며 나머지 76개의 균주에서는 항균 활성 효과가 관찰되지 않았다. 항균활성을 나타내는 3개의 균주의 항균 활성을 측정한 결과는 다음과 같다(Table 11). *Vibrio vulnificus*에 대해 UJT7, UJT20, UJR17의 균체 현탁액에서 항균 활성이 관찰되었다. UJT7은 20 mm, UJT20은 13 mm, UJR17은 18 mm의 생육 저해환을 나타내어 UJT7의 항균 활성 효과가 가장 높은 것을 확인하였다. *Streptococcus parauberis*에 대하여 UJT7과 UJT20이 항균 활성 효과가 나타나지 않은 반면 UJR17에서 18 mm의 생육 저해환이 관찰되어 UJR17이 *V. vulnificus*와 *S. parauberis*에 대하여 항균 활성 효과가 있음을 관찰하였다.

Table 14. Antibacterial activity of UJT7, UJT20, UJR 17 against pathogenic bacteria

Isolated strain	Diameter of inhibition zone (mm)	
	<i>V. vulnificus</i>	<i>S. parauberis</i>
UJT7	20	-
UJT20	13	-
UJR17	18	18

IV. 고찰

초록갈파래(*U. japonica*)로부터 79개의 세균을 분리하여 분석한 결과, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* 4개의 문을 관찰하였으며 7개의 강, 12개의 목, 17개의 과, 31개의 속을 확인하였다. *Actinobacteria* 문이 1개의 강, 1개의 목, 2개의 과, 2개의 속으로 2.5%, *Bacteroidetes* 문이 2개의 강, 2개의 목, 2개의 과, 8개의 속으로 20.3%, *Firmicutes* 문이 1개의 강, 1개의 목, 1개의 과, 1개의 속으로 구성되어 2.5%로 나타났다. *Proteobacteria* 문은 3개의 강, 9개의 목, 12개의 과, 20개의 속으로 74.7%를 차지하였으며 그 중 *α-proteobacteria* 강이 31.7%, *γ-proteobacteria* 강이 40.5%로 가장 높은 비율을 나타내었는데, 이러한 결과들은 대부분의 해양생태계에서 *Proteobacteria* (*α-proteobacteria*, *γ-proteobacteria*) 문과 *Bacteroidetes* 문이 우점으로 존재한다는 기존 실험 결과들과 일치한다(Alfreider *et al.*, 1996; Eilers *et al.*, 2000). 하지만 수심 200m 이내의 해역에서는 *α-proteobacteria* 강이 *γ-proteobacteria* 강보다 더 높은 비율로 분포한다는 다른 연구 결과(Zinger *et al.*, 2011)와는 달리, 수심 10-20m에서 서식하는 초록갈파래에서 분리한 세균의 군집에서는 *γ-proteobacteria* 강이 *α-proteobacteria* 강보다 더 높은 비율로 분포하였다. 이러한 결과는 세균의 군집 구조는 주위 환경을 비롯한 실험 방법, 배양 조건 등에 따라 달라질 수 있다는 것을 시사하며, 여러 연구에 따라 해조류 표면에서 분리되는 세균의 군집구조가 숙주의 종을 비롯하여 온도나 계절, 지리적 위치 등 주위의 환경에 따라 달라질 수 있음이 보고되어 있다(Miranda *et al.*, 2013; Stratil *et al.*, 2013; Tujula *et al.*, 2010). 비배양법이 환경으로부터 유전자를 추출하여 난 배양성과 비배양성 미생물의 분석이 가능해 미생물의 군집 구조와 다양성을 보다 정확하고 쉽게 규명할 수 있지만, 본 연구와 같이 배양법을 통한 연구는 미생물의 완전한 군집 구조와 다양성을 파악하는 데 한계가 있다. 따라서 해양 생태계 내 미생물을 온전히 파악하기 위해서는 배양법을 비롯한 비배양법을 이용하여 다양한 해양 환경에서의 세균의 군집구조와 다양성의 비교·분석 연구가 필요로 하다고 사료된다.

16S rRNA 유전자 염기서열을 비교한 결과, 79개의 세균은 기존에 발견된 세균

들과 97.4-100%의 염기서열 유사도를 나타내었다. 그 중 *Bacteroidetes* 문에 속하는 UJT9^T 균주와, *Proteobacteria* 문에 속하는 UJM28과 UJR4는 표준균주와의 유사도가 97% 이하로, 낮은 염기서열 상동성을 관찰하였다. 이처럼 초록갈파래에서 분리된 79균주 중 3균주가 신속 또는 신종으로 보고될 가능성이 있으며 향후 표준균주와 함께 추가적인 신종 실험을 수행해야 할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 신속 또는 신종으로 보고 될 가능성이 있는 세 균주 중 하나인 UJT9^T 균주의 동정 실험을 수행하였다. 계통분류학적 분석을 통해 계통수를 작성한 결과, UJT9^T 균주는 *Nonlabens* 속으로 분류되었다. *Nonlabens*는 *Bacteroidetes* 문, *Flavobacteria* 강, *Flavobacteriales* 목, *Flavobacteriaceae* 과에 속하는 세균의 속으로 Lau 등에 의해 *Nonlabens tegetincola* 1종이 처음으로 보고되었다(Lau *et al.*, 2005). 2012년 Yi와 Chun이 *Persicivirga*, *Stenothermobacter*, *Sandarakinotalea*의 세 개의 속을 *Nonlabens* 속으로 포함해 재분류하였고, 현재 12종의 세균이 *Nonlabens* 속으로 등록되어있다(<http://www.bacterio.net/nonlabens.html>). *Nonlabens* 속의 세균은 공통적으로 그람음성, 호기성, 간균, 오렌지색의 집락, 비운동성을 나타내며 주요 퀴논으로 menaquinones type (MK-6), G+C 함유량은 33.6~41.0 mol% 으로 알려져 있다. *Nonlabens* 속의 세균은 해수, 해변, 해조류 등 다양한 해양환경으로부터 분리되었다(Yoon *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2006; O'Sullivan *et al.*, 2006; Barbeyron *et al.*, 2011; Yi and Chun., 2012; Park *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2017; Oh *et al.*, 2017).

분리균주 UJT9^T는 *Nonlabens arenilitoris* KCTC 32109^T와 97.7%, *Nonlabens ulvanivorans* DSM 22727^T와 97.6%의 유사성이 확인되었다. UJT9^T는 보고된 *Nonlabens* 속의 세균들과 같이 오렌지색의 집락을 형성하였으며 간균, 그람음성, 운동성이 없는 것으로 관찰되었다. UJT9^T의 성장 온도 범위는 15~35°C (최적 15~25°C)로 확인되었다. 표준균주 *N. ulvanivorans* DSM 22727^T이 5°C, 10°C와 37°C에서도 생장할 수 있다는 것과 비교하였을 때, 분리균주 UJT9^T의 성장 가능 온도는 비교적 범위가 좁은 것을 알 수 있다. 하지만 UJT9^T의 성장 가능한 pH와 NaCl의 농도 범위는 표준균주와 같은 양상으로 pH 5.5~8.0 (최적 pH 7.0), NaCl 1.0~3.0% (최적 NaCl 1.0~2.0%)로 확인되었다. UJT9^T의 Catalase와 Oxidase test 결과 모두 양성으로 표준균주와 동일한 양상을 나타내었다. 가수분해 실험 결과로 Starch, Tween 40, Tween 60을 분해능을 확인하여 양성반응을, Cellulose, DNase, Casein,

Tween 20과 Tween 80에서는 음성반응을 나타내었다. 표준균주와 비교하면, *N. arenilitoris* KCTC 32109^T와 달리 Tween 40에서 양성, Casein에서 음성반응을 보였고 나머지 실험 결과는 동일하였다. 기질 이용에 있어 Asculin, Gelatin degradation에서 양성반응이 관찰되었으며 나머지 Nitrate reduction, Indole production, Glucose fermentation, Arginine dihydrolase, Urease, β -galactosidase, *D*-glucose, *D*-arabinose, *D*-mannose, *D*-mannitol, *N*-acetyl-*D*-glucosamine, *D*-maltose, Potassium gluconate, Capric acid, Adipic acid, Malic acid, Trisodium citrate, Phenylacetic acid에서는 모두 음성반응을 확인하였다. 대부분 표준균주와 동일한 결과를 나타내었고 Nitrate reduction에서 표준균주와 다르게 음성반응을, Gelatin degradation에서 양성반응을 관찰하였다. 효소 활성에서는 Alkaline phosphatase, Esterase (C4), Esterase lipase (C8), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, Trypsin, α -chymotrypsin, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase에 대하여 양성반응을 나타내었고, Lipase (C14), α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -mannosidase, α -fucosidase에 대하여 음성반응을 나타내었다. 표준균주와 달리 Esterase (C4)에서 음성, *N*-acetyl- β -glucosaminidase에서 양성반응을 확인하였다. 분리균주 UJT9^T의 DNA G+C 함량은 38.5 mol%로 확인되었는데 이는 *Nonlabens* 속의 세균에서 확인된 DNA G+C 함량범위인 33.6~41.0 mol%에 속한다. 주요 지방산으로 iso-C_{15:0} (20.1%), iso-C_{16:0} 3-OH (14.1%), iso-C_{16:0} (10.2%), iso-C_{17:0} 3-OH (7.8%), anteiso-C_{15:0} (6.3%), iso-C_{16:1} H (5.6%)로 확인하였다. 표준균주와 비교하였을 때, 주요 지방산으로 iso-C_{15:0}, anteiso-C_{15:0}, iso-C_{17:0} 3-OH가 공통적으로 구성되어 있으며 표준균주들과는 다르게 iso-C_{16:0} 3-OH와 iso-C_{16:1} H가 주요 지방산으로 이루어져 있음을 확인하였다. 주요 퀴논으로 표준균주와 동일한 menaquinones type (MK-6)을 확인하였으며, 주요 극성지방 또한 표준균주에서 관찰된 phosphatidylethanolamine (PE)와 두 개의 unidentified aminolipid (AL), 두 개의 unidentified lipids (L)로 구성되어 있음을 관찰하였다. 표준균주와의 DNA-DNA hybridization을 실행한 결과 *N. arenilitoris* KCTC 32109^T과 약 67.4 ± 1.4%, *N. ulvanivorans* DSM 22727^T과 약 48.2 ± 4.5%의 상동성을 나타내었다. DNA-DNA hybridization 실험 결과, 상동성이 70% 미만이면 신종으로 간주하며(Wayne, 1988), 이에 본 실험에서 분리된

UJT9^T는 *Nonlabens* 속의 신종으로 확인되었다.

본 연구에서 분리된 UJT9^T의 계통학적, 형태학적, 생리학적, 생화학적, 화학분류학적 특성들은 *Nonlabens*속의 세균에서 발견되는 기존의 보고된 결과와 일치하며, 이러한 결과들을 토대로 UJT9^T는 *Nonlabens* 속의 신종 세균임을 확인하였다. 이에 NCBI에 유전자 등록을 하여 accession number (MH061317)를 획득하였으며 KACC (=KACC 19635^T)와 JCM (=JCM 32766^T)에 기탁하여 균주번호를 부여받았다.

본 연구에서는 신종 세균인 UJT9^T를 비롯한 79개의 균주를 이용하여 인체 유해세균과 어류 질병세균에 대하여 항균 활성 효과를 평가하였다. 79 균주 중 3 균주가 항균활성 효과를 나타내었는데, UJT7, UJT20, UJR17의 균체 현탁액에서 *V. vulnificus*에 대한 항균 활성 효과를 나타내었으며 UJR17은 *S. parauberis*에도 항균 효과를 나타내었다. 염기서열 분석 결과, UJT7은 *Bacillus* sp.에 속하는 세균으로 확인되었다. *Bacillus* sp.의 세균은 병원균과 곰팡이에 대해 광범위한 억제 화합물을 생산하는 것으로 알려져 있다(Baruzzi *et al.*, 2011; Yilmaz *et al.*, 2006). 특히 *B. subtilis*는 그람 양성균의 성장을 저해하는데 효과적이며, 인체 유해세균 뿐만 아니라 어류와 식물에 질병을 일으키는 세균에 대해서도 항균 활성 효과가 있는 것으로 보고되었다(Amin *et al.*, 2012; Berić *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016). *B. subtilis*를 비롯한 *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. laterosporus*, *B. circulans*는 어류와 대한의 성장과 면역에 긍정적인 영향을 미치는 프로바이오틱스로도 활용이 되었다(Ariğ *et al.*, 2013; Zuenko *et al.*, 2017).

UJT20과 UJR17은 *Pseudomonas* sp.에 속하며 *Pseudomonas* sp. 또한, 질병을 일으키는 다양한 세균에 대하여 항균 활성을 가지는 것으로 보고되어 있다(Vachee *et al.*, 1997). 해조류에서 분리된 *Pseudomonas* sp.는 DAPG (2,4-Diacetylphloroglucinol)를 생산하며, 이 물질은 사람에게 염증, 폐렴, 식중독 등을 일으키는 *Staphylococcus aureus*에 대하여 항균 활성을 나타낸다. 토양에서의 *Pseudomonas* sp.는 폐놀을 분해하고 식물 성장에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Degrassi *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2005).

항균 펩타이드는 생명체의 방어 작용 중 하나로, 자연계에 존재하는 대부분의 생명체들이 외부로부터 스스로를 보호하기 위해 생산한다. 그 중 미생물이 생산하는 항균 펩타이드를 통칭하여 bacteriocin이라 하며 단백질 합성 저해, 핵산 분해, 세포막 투과 등과 같은 메커니즘을 통해 다른 미생물의 성장을 억제하거나

사멸시킨다(Gillor *et al.*, 2008). 이러한 bacteriocin은 기존 항생제에 내성이 있는 균주에 대해 강력한 항균 활성을 가지며, 남용에 의한 내성균 발생이 적은 것으로 알려져 있다. 또한 대량생산이 가능하다는 장점이 있어 bacteriocin을 이용하여 생물학적 보존제, 천연 항생제, 항바이러스, 의료용 소재 등으로의 적용이 가능하다. 하지만 일반적으로 발견되는 항균 펩타이드는 기존 항생제와 비교하였을 때 상대적으로 낮은 활성을 가질 가능성이 크다고 알려져 있다(Cha *et al.*, 2012; Cleveland *et al.*, 2001). 따라서 본 연구에서 분리한 *Bacillus* sp.와 *Pseudomonas* sp.를 기존 항생제와의 활성 비교 연구를 수행하여 활용 가능성을 파악하고 추가적인 실험을 진행한 뒤 다양하게 이용될 수 있을 것이라 사료된다.

IV. 요약

이 논문은 제주도에서 채집한 초록갈파래(*Umbraulva japonica*)의 표면에서 배양 가능한 세균을 분리한 후 염기서열 분석을 통해 세균의 군집을 파악하였고, 신종 미생물을 분리하여 동정하였다. 또, 본 연구에서 분리된 세균을 이용하여 인체 유해세균과 어류 질병세균에 대한 항균 활성 효과를 평가하였다.

Marine agar, 1/10 Marine agar, R2A 배지를 사용하여 초록갈파래로부터 총 79 균주를 분리하여 배양하였다. 분리한 세균의 16S rRNA 유전자 염기서열을 NCBI와 EzBioCloud에서 분석하여 비교하였다. 그 결과, 주요 계통군은 *Proteobacteria* (α -*proteobacteria*, β -*proteobacteria*, γ -*proteobacteria*) (74.7%), *Bacteroidetes* (20.3%), *Actinobacteria* (2.5%), *Firmicute* (2.5%)로 4개의 문으로 분류되었고, 7개의 강, 13개의 목, 17개의 과, 31개의 속이 관찰되었다. 계통학적 분석 결과, 79 균주 중 3 균주가 표준균주와 97% 이하의 유사성을 나타내어 새로운 속이나 종으로 보고될 가능성이 확인되었으며, 향후 표준균주와 함께 추가적인 신종 실험이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

분리균주 중 UJT9^T 균주를 신종 후보 균주로 추정, 분류 및 동정실험을 진행하였다. UJT9^T균주는 오렌지색의 집락을 형성하며 그람음성, 간균으로 운동성이 없는 호기성 세균이다. UJT9^T균주는 15-35℃ (최적조건 20-25℃), pH 5.5-8.0 (최적조건 pH 6.0-7.0), NaCl 1.0-3.0% (최적조건 1.0-2.0%)에서 생장이 가능하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 계통수를 작성한 결과, UJT9^T균주는 *Flavobacteriaceae* 과의 *Nonlabens* 속으로 확인하였으며 표준균주 *Nonlabens arenilitoris* KCTC 32109^T과 97.7%, *Nonlabens ulvanivorans* DSM 22727^T과 97.6%의 유전자 염기서열 유사도를 나타내었다. 주요 지방산으로 iso-C_{15:0}, anteiso-C_{15:0}, iso-C_{17:0} 3-OH가 관찰되었다. UJT9^T균주의 주요 퀴논은 MK-6이며, 주요 극성지방은 phosphatidylethanolamine과 두 개의 unidentified lipids, 두 개의 unidentified amino lipids로 구성되었다. DNA G+C 함량은 38.5 mol%이며 DNA-DNA hybridization 실험결과, *N. arenilitoris* KCTC 32109^T와 67.4 ± 1.4%, *N. ulvanivorans* DSM 22727^T와 48.2 ± 4.5%의 상동성을 나타내었다. 이러한 실험결과에 따라

UJT9^T 균주는 *Nonlabens* 속의 신종으로 판단되어 KACC와 JCM (=KACC 19635^T=JCM 32766^T)에 기탁하였다.

신종 균주를 비롯한 본 연구에서 분리된 79 균주를 이용하여 인체 및 어류 질병 세균에 대한 항균 활성을 탐색한 결과, 79 균주 중 3 균주가 항균 활성이 있음을 관찰하였다. *V. vulnificus*에 대하여 UJT7, UJT20, UJR17 균주가 항균 활성을 나타내었고, UJR17은 *S. parauberis*에 대해서도 항균 활성이 있음을 관찰하였다. 향후 이를 활용하기 위한 추가적인 실험을 수행한 후 유익하게 이용될 수 있을 것이라 사료된다.

V. 참고 문헌

Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glöckner, F. O., Wille, A. and Psenner, R. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of high mountain lake by in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2138-2144.

Allsopp, D., Colwell R. R. and Hawkworth D. L. 1995. Microbial diversity and ecosystem function. *CAB international*, Wallingford, UK.

Amin A, Khan MA, Ehsanullah M, Haroon U, Azam S. M. F. A. H. 2012. Production of peptide antibiotics by *Bacillus* SP. GU 057 indigenously isolated from saline soil. *Braz. J. Microbiol.* **43**: 1340-1346.

Andersen, P., Sorensen, H. M. 1986. Population dynamics and trophic coupling pelagic microorganisms in eutrophic coastal waters. *Marine Ecology prog.* **33**: 99-109.

Ariğ, N., Suzer, C., Gökvardar, A., Başaran, F., Çoban, D., Yıldırım, S., Kamaci, H. O., Firat, K., Saka, S. 2013. Effects of probiotic (*Bacillus* sp.) supplementation during larval development of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* **13**: 407-414.

Barbeyron, T., Lerat, Y., Sassi, J. F., Panse, S. L., Helbert, W., Collén, P. N. 2011. *Persicivirga ulvanivorans* sp. Nov., a marine member of the family *Flavobacteriaceae* that degrades *ulvan* from green algae. *Int J Syst Evol Microbiol.* **61**, 1899-1905.

Baruzzi, F., Quintieri, L., Morea, M., Caputo, L. 2011. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food, pp. 1102-1111. In Vilas AM

(ed.), Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances, Formatex: Badajoz, Spain.

Berić, T., Kojić, M., Stanković, S., Topisirović, L. J., Degrassi, G., Myers, M., Venturi, V., and Fira, D. 2012. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **50**: 25-31.

Bowman, J. P. 2000. Description of *Cellulophaga algicola* sp. nov., isolated from the surface of Antarctic algae, and reclassification of *Cytophaga uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Cellulophaga uliginosa* comb. nov. *Int J Syst Microbiol.* **50**, 1861-1868.

Burke, C., Thomas, T., Lewis, M., Steinberg, P., & Kjelleberg, S. 2011. Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *The ISME Journal.* **5**, 590-600.

Campbell, A. H., Marzinelli, E. M., Gelber, J., Steinberg, P. D. 2015. Spatial variability of microbial assemblages associated with a dominant habitat-forming seaweed. *Front. Microbiol.* **6**, 230. doi:10.3389.

Cha, Y. K., Kim, Y. S., Choi, Y. S. 2012. Antimicrobial peptide as natural antibiotic materials. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **27**: 9-15.

Chen, Y., Li, J., Xiao, P., Zhu, W., Mo, Z. 2016. The ability of marine *Bacillus* spp. isolated from fish gastrointestinal tract and culture pond sediment to inhibit growth of aquatic pathogenic bacteria. *Iran J. Fish. Sci.* **15**: 701-714.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Cjikindas, M. L. 2001. Bacteriocin: safe,

natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**: 1-20.

Connon, S. A. & Giovannoni, S. J. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3878-3885.

Degrassi, G., Aguilar, C., Bosco, M., Zahariev, S., Pongor, S., Venturi, V. 2002. Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. *Curr. Microbiol.* **45**: 250-254.

Duan, D., Xu, L., Fei, X., Xu, H. 1993. Short Communication: Marine organisms attached to seaweed surface in Jiaozhou Bay, China. *World J. Microb. Biot.* **11**, 351-352.

Eilers, H., Pernthaler, J., Glockner, F. O., and Aman, R. 2000. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 3044-3051.

Ezaki, T., Hashimoto, Y., and Yabuuchi, E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **39(3)**, 224-229.

Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequence: A maximum Likelihood approach. *J Mol Evol.* **17**, 368-376.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenetics: an approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**, 783-791.

Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree *topology*. *Syst. Biol.* **20**, 406-416.

Ghimire, K. N., Katsutoshi, I., Keisuke, O., Hayashida, T. 2007. Adsorptive separation of metallic pollutants onto waste seaweeds, *Porphyra Yezoensis* and *Ulva Japonica*. *Separ. Sci. Technol.* **42**, 2003-2018.

Gillor, O., Etzion, A., and Riley, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 591-606.

Haefner, B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*. **8**, 536-544

Hamann, M., Scheuer, P. J., Kahalide, F. 1993. A Bioactive Depsipeptide from the Sacoglossan Mollusk *Elisa refescens* and the Green Alga *Bryopsis* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 5825-5826.

Haygood, M., Schmidt, E. W., Davidson, S. K. and Faulkner, D. J. 1999. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1(1)**, 33-43.

Isnansetyo, A., Cui, L., Hiramatsu, K., Kameo, Y. 2003. Antibacterial activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. isolated from a marine alga, against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**, 545-547.

Jeanmougin, F., Thomas, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1998.

Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochem Sci.* **23**, 403-405.

Jeju National University Industry-Academic Cooperation Foundation, JeJu Technopark.
Composition comprising the extract of *Ulva japonica* for prevention of hair loss or promoting hair growth. Korea patent 10-2016-0073042.

Kelecom, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganism. *An. Acad. Bras. Cienc.* **74(1)**, 151-170.

Khan, S. T., Nakagawa, Y., Harayama, S. 2006. *Sandarakinotalea sediminis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**, 959-963.

Koch, A. L. 1997. Microbial physiology and ecology of slow growth. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61**, 305-318.

Kumar A, Kumar S, Kumar S. 2005. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem. Eng. J.* **22**: 151-159.

Kwon, Y. M., Yang, S. H., Kwon, K. K., Kim, S. J. 2014. *Nonlabens antarcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from glacier ice, and emended descriptions of *Nonlabens marinus* Park *et al.* 2012 and *Nonlabens agnitus* Yi and Chun 2012. *Int J Syst Evol Microbiol.* **64**, 400-405.

Lau, S. C. K., Tsoi, M. M. Y., Li, X., Plakhotnikova, I., Dobretsov, S., Wong, P. K., Pawlik, J. R., Qian, P. Y. 2005. *Nonlabens tegetincola* gen. nov., sp. nov., a

novel member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from a microbial mat in a subtropical estuary. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**, 2279-2283.

Lau, S. C. K., Tsoi, M. M. Y., Li, X., Plakhotnikova, I., Dobretsov, S., Wong, P. K., Pawlik, J. R., Qian, P. Y. 2006. *Strenothermobacter spongiae* gen. nov., sp. Nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from a marine sponge in the Bahamas, and emended description of *Nonlabens tegetincola*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**, 181-185.

Marshall, K., Joint, I., Callow ME, Callow J. A. 2006. Effects of marine bacterial isolates on the growth and morphology of axenic plantlets of the green alga *Ulva linza*. *Microbial Ecology.* **52**, 30-310

McCarthy, P. J., Pomponi, S. A. 2004. A search for new Pharmaceutical drugs from marine organisms. *Marine. Biomed. Res.* 1-2.

Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. and Parlett, J. H. 1984. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods.* **2**, 233-41.

Miranda, L. N., Hutchison, K., Grossman, A. R., & Brawley, S. H. 2013. Diversity and abundance of the bacterial community of the red macroalga *Porphyra umbilicalis*: did bacterial farmers produce macroalgae?. *PLoS One*, 8, e58269.

Newman, D. J., Cragg, G. M. 2004. Marine Natural Products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials. *J. Nat. Prod.* **67**, 1216-1238.

O'Sullivan, L. A., Rinna, J., Humphreys, G., Weightman, A. J., Fry, J. C. 2006.

Culturable phylogenetic diversity of the phylum '*Bacteroidetes*' from river epilithon and coastal water and description of novel members of family *Flavobacteriaceae*: *Epilithonimonas tenax* gene. nov., sp. Nov. and *Persicivirga xylanidelens* gen. nov., sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**, 169-180.

Oh, M., Kim, J. H., Bora, N., Kim, W. 2017. *Nonlabens halophilus* sp. nov., isolated from reclaimed land. *Int J Syst Evol Microbiol.* **67**, 169-180.

Park, S., Kang, C. H., Yoon, J. H. 2013. *Nonlabens arenilitoris* sp. nov., a number of the *Flavobacteriaceae* isolated from a tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol.* **67**, 1535-1539.

Park, S., Yoshizawa, S., Chiura, H. X., Muranatsu, Y., Nakagawa, Y., Kongure, K., Yokota, A. 2012 *Nonlabense martinus* sp. nov., a novel member of the *Flavobacteriaceae* isolated from the Pacific. *Antonie van Leeuwenhoek.* **102**, 669-676.

Paudyal, H., Pangen, B., Inoue, K., Kawakita, H., Ohto, K., Ghimire, K. N. 2013. Preparation of novel alginate based anion exchanger from *Ulva japonica* and its application for the removal of trace concentrations of fluoride from water. *Bioresour. Technol.* **148**, 221-227.

Reinheimer, G. 1985. *Aquatic Microbiology*. 3rd ed.

Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4**, 406-425.

Sasser, M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technocal Note 101, Newark, DE: MIDI Inc.

Smibert, R. M. & Krieg, N. R. 1994. Phenotypic characterization. *In Methods for general and Molecular Bacteriology*. pp.607-654. Edited by P. Gerhardt. Washington, D. C., USA: American Society for Microbiology.

Stratil, S. B., Neulinger, S. C., Knecht, H., Friedrichs, A. K., & Wahl, M. 2013. Temperature-driven shifts in the epibiotic bacterial community composition of the brown macroalga *Fucus vesiculosus*. *Microbiologyopen*. **2**, 338-349.

Tamaoka, J. 1986. Analysis of bacterial menaquinone mixture by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* **123**, 251-256

Tamura, K., Stecher, G., Perterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetic analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729.

Tujula, N. A., Crocetti, G. R., Burke, C., Thomas, T., Holmström, C., & Kjelleberg, S. 2010. Variability and abundance of the epiphytic bacterial community associated with a green marine *Ulvacean* alga. *The ISME Journal*. **4**, 301-311.

Vachee A, Mossel DA, Leclerc H. 1997. Antimicrobial activity among *Pseudomonas* and related strains of mineral water origin. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 652-658.

Valgas, C., Souza, S. M., Smania, E. F. A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbiol.* **38**, 1678-4405.

Wayne, L. G. 1988. International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches

to Bacterial Systematics.

Weisse, T. 1992. The microbial food web and its sensitivity to eutrophication and contaminant enrichment; a cross-system overview. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* **76**, 327-337.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* **173**, 697-703.

Wilson, K. 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria: miniprep of bacterial genomic DNA. In *Current protocols in Molecular Biology*, pp. 2.4.1-2.4.2. Edited by F.M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. new York: Wiley.

Yi, H., Chun, J. 2012. Unidentified of the genera *Nonlabens*, *Persicivirga*, *Sandarakinotalea* and *Stenothermobacter* into a single emended genus, *Nonlabens*, and description *agnitus* sp. Nov. *Syst Appl Microbiol.* **35**, 150-155.

Yilmaz, M., Soran, H., Beyatli, Y. 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiol. Res.* **161**: 127-131.

Yoon, J. H., Kang, S. J., Lee, C. H., Oh, T. K. 2006. *Dongheana dokdonensis* gen. nov., sp. Nov., isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**, 187-191.

Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., and Chun, J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequence and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 1613-1617.

Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E. J, Short, J. M & Keller, M. 2002. Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**, 15681-15686.

Zinger, L., Amaral-Zettler, L. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devin, M. C., Huse, S. M, Welch, D. B. 2011. Global patterns of bacteria beta-diversity in seafloor and ecosystems. *PLoS One* **6**: e24570.

Zuenko, V. A., Laktionov, K. S., Pravdin, I. V., Kravstsova, L. Z., Ushakova, N. A. 2017. Effect of *Bacillus subtilis* in feed probiotic on the digestion of fish cultured in cages. *Iran J. Ichthyol.* **57**: 152-157.

VI 감사의 글

저의 학부 시절부터 석사 졸업까지의 진학에 있어 많은 가르침과 도움을 주신 허문수 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 올립니다. 또 논문심사를 위해 애써 주시고 조언해주신 정준범 교수님과 여인규 교수님께 감사드립니다. 그리고 학부생부터 지금까지 많은 가르침을 주셨던 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 전유진 교수님, 이경준 교수님, 이제희 교수님, 김기영 교수님, 이승헌 교수님, 정석근 교수님, 박상울 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다.

제가 대학원 생활에 적응하고 무사히 졸업할 수 있도록 항상 옆에서 격려해주신 동휘오빠, 소현언니, 경미언니, 지영언니, 해리, 영수, 원선에게도 감사의 말을 전합니다.