


博士學位論文

제주도 하계 조간대
해양미생물의 다양성

The logo of Jeju National University is a large, faint watermark in the background. It features a stylized 'J' shape with a flame-like design in blue, green, and grey. The text 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952' is written in a circular path around the 'J'. In the center of the 'J', there is a smaller logo with the word 'JEJU' and a book icon above it.

濟州大學校 大學院

海洋生物工學科

文榮健

2009年 2月

제주도 하계 조간대 해양미생물의 다양성

指導教授 許 文 洙

文 榮 健

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2009年 2月

文榮健의 理學博士 學位論文을 認准함

審査委員長 이 순 동 (印)

委 員 송 춘 복 (印)

委 員 최 광 식 (印)

委 員 이 제 희 (印)

委 員 허 문 수 (印)

濟州大學校 大學院

2009年 2月

Diversity of Marine Microorganisms
Isolated from Intertidal Zone in the
Summer Season of Jeju Island

Young-Gun Moon

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for
the degree of DOCTOR OF PHILOSOPHY

Department of Marine Biotechnology

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2009. 02

목차

ABSTRACT	IV
LIST OF FIGURES	VI
LIST OF TABLES	XI
PART I. 제주도 조간대 해양미생물의 계통학적 분석	
ABSTRACT	2
1. 서론	3
2. 재료 및 방법	13
2.1. 연구지 개황	13
2.2. 생물 시료 채집 방법	16
2.3. 환경요인 분석	16
2.4. 중속영양세균 분석	16
2.5. 미생물 분리	17
2.6. 미생물 분리 방법	20
2.6.1. 해양 미생물의 분리	20
2.6.2. 해양 생물체로부터 미생물 분리	20
2.6.3. 해양 퇴적토 시료로부터 미생물 분리	20
2.7. 분리된 미생물의 형태 및 생리적 특성조사	21
2.7.1. Gram staining, Oxidase and Catalase test	21
2.7.2. 성장 온도 및 pH 실험	21
2.7.3. 염분 실험	21
2.7.4. 운동성 시험	22
2.7.5. Tween 40 및 80 가수분해 실험	22
2.7.6. API kit을 이용한 생화학적 특성 조사	22
2.7.7. 색소 추출	23
2.8. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석	24
2.8.1. Genomic DNA 분리	24
2.8.2. 16S rRNA 유전자 증폭	24
2.8.3. 16S rRNA 유전자 염기서열 결정	24
2.9. 계통 분석	25
3. 결과 및 고찰	26
3.1. 채집 시료	26
3.2. 환경요인 분석	31
3.2.1. 수온, pH 그리고 염분	31
3.2.2. 용존산소와 화학적 산소요구량	31

3.2.3. 영양염류	31
3.2.4. 종속영양세균	32
3.3. 분리균주의 특성	34
3.3.1 색소생성 미생물	34
3.3.1.1. 분리 균주의 색소 특성	45
3.3.1.2. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 및 계통분석	49
3.3.2. 생리적 특성균	73
3.3.2.1 단백질 분해효소 생성 미생물의 특성	73
3.3.2.2. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 및 계통분석	77
3.3.2.3. 지질 분해효소 생성 미생물의 특성	84
3.3.2.4. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 및 계통분석	88
3.4. 신종 후보 미생물	94
4. 요약	96

PART II. 신규 미생물 *Loktanalla pyoseonensis* sp. nov.의 다상적 분류

ABSTRACT	100
1. 서론	101
1.1. 새로운 미생물의 중요성	101
1.2. 미생물의 진화	103
1.3. 미생물 분류	108
1.4. 분자생물학적 접근의 필요성	114
1.5. Phylum <i>Proteobacteria</i>	115
1.6. <i>Proteobacteria</i> ; <i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Rhodobacterales</i> ; <i>Rhodobacteraceae</i> ; <i>Loktanella</i>	119
2. 재료 및 방법	122
2.1. 미생물 분리 및 보존	122
2.2. 표현형적 특성 분석	123
2.2.1. 표준균주 및 참조균주	123
2.2.2. 형태적 특성 분석	123
2.2.2.1. Gram staining	123

2.2.2.2. 운동성 실험	123
2.2.2.3. Scanning Electron Microscopy (SEM)	124
2.2.3. 생리·생화학적 특성 분석	125
2.2.3.1. Oxidase and Catalase test	125
2.2.3.2. 성장 온도 및 pH 실험	125
2.2.3.3. 염분 실험	126
2.2.3.4. Agar, DNA 그리고 Starch 분해 실험	126
2.2.3.5. Casein 가수분해 실험	126
2.2.3.6. Cellulose 가수분해 그리고 Flexirubin pigment 생산 실험 ..	126
2.2.3.7.. Chitin, Tween 20, 40 그리고 80 가수분해 실험.....	126
2.1.1.10. API kit을 이용한 생리, 생화학적 특성 조사	127
2.3. 지방산 분석	127
2.4. G+C 함량 (mol/%) 분석.....	130
2.5. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석	130
2.6. 계통 분석	131
3. 결과 및 고찰	133
3.1. 표현형적 특성 분석	133
3.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)	135
3.3. 지방산 분석	137
3.4. G+C contents (mol%)	140
3.5. 16S rRNA 유전자 염기서열 및 계통 분석	141
4. 요약	147
종합요약	149
참고문헌	153
감사의 글	168

Abstract

In this study, we investigated bacterial diversity of intertidal zone in summer season of Jeju Island, They were characterized by determining morphological and physio-biochemical properties, and subjected to comparative analysis of partial 16S rRNA gene sequences. The phylogenic relationship of the domain Bacteria was investigated by performing a comparative sequence analysis of PCR-amplified 16S ribosomal RNA in organism of intertidal zone. Microorganisms isolated from marine organisms and investigated analysis of 16S rRNA sequence. The 16S rRNA genes were amplified by using oligonucleotide primers (27F and 1492R). Phylogenetic diversity and taxonomic position of pigment-producing, protease-producing and lipase-producing bacterial isolates were discussed.

A total of 850 marine bacteria were isolated from various substrates. Among them, 136 strains produced several kinds of pigments, 35 strains produced protease, and 9 strains were lipase-producer. They showed growth in the various range of temperture, pH and NaCl. By comparative study of partial 16S rRNA gene sequences, 136 isolates were divided into 6 major groups: *Proteobacteria/Gammaproteobacteria* (64 %), *Bacteroidetes/Flavobacteria* (13 %), *Firmicutes/Bacilli* (10.8 %), *Proteobacteria/Alphaproteobacteria* (8 %), *Bacteroidetes/Sphingobacteria* (2.1 %) and *Bacteroidetes/Actinobacteria* (2.1 %). 35 protease-producing strains were divided into 3 major groups: *Proteobacteria/Gammaproteobacteria* (91.4 %), *Proteobacteria/Alphaproteobacteria* (2.8 %) and *Firmicutes/Bacilli* (5.8 %).

Among these, *Gammaproteobacteria* group was the largest and distributed in the genera *Pseudoalteromonas* (10 strains), *Vibrio* (21 strains)(and *Ferrania* 1 strain). All of the lipase-producers (9 isolates) were contained in several genera of the *Gammaproteobacteria*: *Shewanella* (1 strain), *Vibrio* (2 strains),

Alteromonas (4 strains), *Pseudoalteromonas* (1 strain) and *Agarivorans* (1 strain).

On the other hand, it was strongly suggested that 8 isolates were candidates of new species based on low 16S rRNA gene sequence similarity. They were distributed in the families *Alteromonadaceae* (JJM10 and JJM57), *Pseudoalteromonadaceae* (JJM39 and JJM137) and *Shewanellaceae* (JJM25 and JJM33) of the order *Alteromonadales* (the class *Gammaproteobacteria*). Strain JJM84 belonged to the family *Flavobacteriaceae* of the order *Flavobacteriales*, the class *Flavobacteria*. On the other hand, strains JJM85 represented a novel species of the genus *Loktanella* in the family *Rhodobacteraceae* (the class *Alphaproteobacteria*) on this basis of the phenotypic features and phylogenetic evidence, for the name *Loktanella pyoseonensis* sp. nov. is proposed.



LIST OF FIGURES

PART I

Fig. 1-1. Ecology of intertidal zone

Fig. 1-2. Forms of intertidal zone

Fig. 1-3. The current chart of Jeju island.

Fig. 1-4. Map for collection of organisms in Jeju Island.

Fig. 2. Absorption spectra of various pigments showing the differences in absorption maxima.

Fig. 3. Absorption spectra of methanolic extracts of isolates having carotenoids.

Fig. 4. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of pigment-producing bacteria isolated from Site A(1, 2, 3, 4).

Fig. 5. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of pigment-producing bacteria isolated from Site B-5.

Fig. 6. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of pigment-producing bacteria isolated from Site B-6.

Fig. 7. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of pigment-producing bacteria isolated from Site B-7.

Fig. 8. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of pigment-producing bacteria isolated from Site C(8, 9, 10).

Fig. 9. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of pigment-producing bacteria isolated from Site D(11, 12).

Fig. 10. Phylogenetic composition of pigment-producing bacterial group in intertidal zone of Jeju.

Fig. 11. Phylogenetic composition of *Gammaproteobacteria* group among pigment-producers.

Fig. 12. Phylogenetic composition of *Flavobacteria* group among pigment-producers.

Fig. 13. Phylogenetic composition of *Bacilli* group among pigment-producers.

Fig. 14. Phylogenetic composition of *Alpha-proteobacteria* group among pigment-producers.

Fig. 15. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic position of *Pseudoalteromonas*-like protease-producers, based on 16S rRNA gene sequences.

Fig. 16. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic position of *Vibrio*-like protease-producers, based on 16S rRNA gene sequences.

Fig. 17. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic position of *Bacillus*-, *Phesobacter*-, and *Ferrania*-like protease-producers, based on 16S rRNA gene sequences.

Fig. 18. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the position of isolated lipolytic enzyme-producers within the radiation including representatives of the class *Gammaproteobacteria*.



PART II

Fig. 1. The phylogenetic tree of cellular organisms

Fig. 2. The phylogenetic tree of Domain Eubacteria

Fig. 3. The phylogenetic tree of Domain Archaea

Fig. 4. The phylogenetic tree of Domain Eukarya

Fig. 5. G-C (or guanine-cytosine content) contents.

Fig. 6. DNA-DNA hybridization.

Fig. 7. Proposed taxonomic groupings based upon DNA homology data.

Fig. 8. Taxonomic resolution of some of the currently used technique.

Fig. 9. The phylogenetic tree of the phylum *Proteobacteria* and related taxa.

Fig. 10. Map for an organisms collection in Segwipo-si, Jeju Island.

Fig. 11. Sample preparations for the analysis of cellular fatty acid.

Fig. 12. Scanning electron micrography of cells of strain JJM85^T.

Fig. 13. Fatty Acid Methyl Ether (FAME) profile of strain JJM85^T

Fig. 14. HPLC chromatogram of 4 type of nucleosides from genomic DNA of

strain JJM85^T

Fig. 15. NCBI blast search of the 16S rRNA gene sequence of JJM85^T.

Fig. 16. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain JJM85^T within the radiation of the genus *Loktanella* and related taxa.



LIST OF TABLES

PART I

Table 1-1. Composition of marine agar.

Table 1-2. Composition of ZS medium (Zobell 2216e + Skim milk)

Table 1-3. Composition of ZT medium (Zobell 2216e + Tributlynin)

Table 2. List of organisms and inorganic substrates used for bacterial isolation (Site A)

Table 3. List of organisms and inorganic substrates used for bacterial isolation (Site B)

Table 4. List of organisms and inorganic substrates used for bacterial isolation (Site C)

Table 5. List of organisms and inorganic substrates used for bacterial isolation (Site D)

Table 6. Environmental factors and bacterial count according to sampling sites

Table 7. Bacteria strains isolated from samples collected in Site A

Table 8. Bacteria strains isolated from samples collected in Site B

Table 9. Bacteria strains isolated from samples collected in Site C

Table 10. Bacteria strains isolated from samples collected in Site D

Table 11. Physiological characteristics of pigment-producing isolates.

Table 12. Absorption spectrum of methanolic extracts of the isolates.

Table 13. 16S rRNA gene sequence similarity values between pigment-producing isolates (Site A) and their closest relatives

Table 14. 16S rRNA gene sequence similarity values between pigment-producing isolates (Site B) and their closest relatives

Table 15. 16S rRNA gene sequence similarity values between pigment-producing isolates (Site C) and their closest relatives

Table 16. 16S rRNA gene sequence similarity values between pigment-producing isolates (Site D) and their closest relatives

Table 17. Physiological characteristics of protease-producing isolates.

Table 18. Levels of 16S rRNA gene sequence similarity between protease-producers and their closest neighbors.

Table 19. Physiological characteristics of lipase-producing isolates.

Table 20. 16S rRNA gene sequence identities between lipolytic enzyme-producers and their closest relatives.

Table 21. Candidates for novel species on the basis of 16S rRNA sequences.

PART II

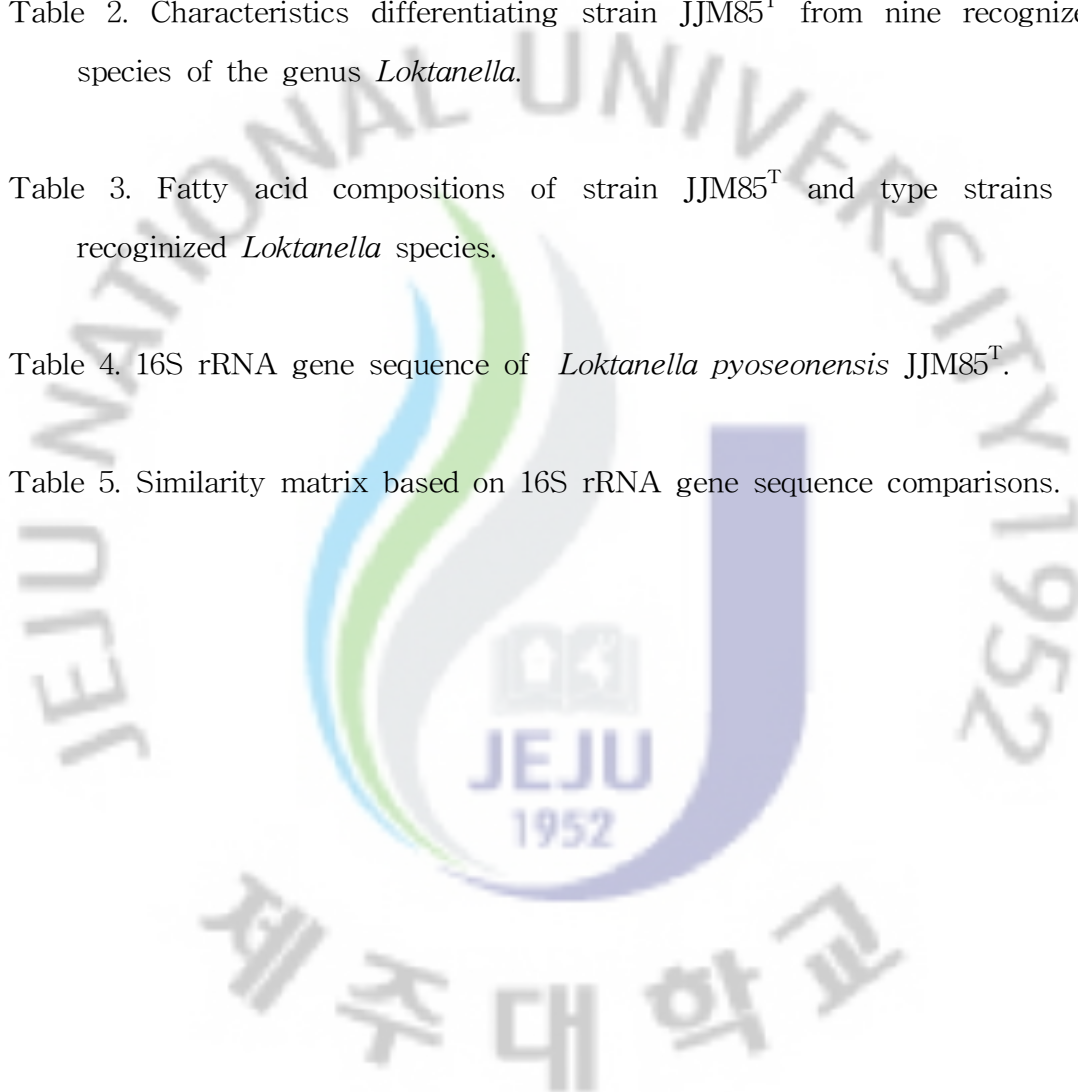
Table 1. Culturability determined as a percentage of culturable bacteria in composition with total cell counts.

Table 2. Characteristics differentiating strain JJM85^T from nine recognized species of the genus *Loktanella*.

Table 3. Fatty acid compositions of strain JJM85^T and type strains of recognized *Loktanella* species.

Table 4. 16S rRNA gene sequence of *Loktanella pyoseonensis* JJM85^T.

Table 5. Similarity matrix based on 16S rRNA gene sequence comparisons.



PART I

제주도 하계 조간대 해양미생물의 계통학적 분석

Phylogenetic Analysis of Marine Microorganisms
from Intertidal Zone in Summer Season of
Jeju Island



ABSTRACT

A total of 850 strains of marine microorganisms were isolated from intertidal zone of Jeju Island. They were characterized by determining morphological, physiological and biochemical properties, and subjected to comparative analysis of partial 16S rRNA gene sequences. The 16S rRNA genes were amplified by using oligonucleotide primers (27F and 1492R). Phylogenetic diversity and taxonomic position of pigment-producing, protease-producing and lipase-producing bacterial isolates were discussed. They showed growth in the various range of temperature, pH and NaCl. By comparative study of partial 16S rRNA gene sequences, 136 isolates were divided into 6 major groups: *Proteobacteria/Gammaproteobacteria* (64%), *Bacteroidetes/Flavobacteria* (13%), *Firmicutes/Bacilli* (10.8%), *Proteobacteria/Alphaproteobacteria* (8%), *Bacteroidetes/Sphingobacteria* (2.1%) and *Bacteroidetes/Actinobacteria* (2.1%). Protease-producers including 35 isolates were divided into 3 major groups: *Proteobacteria/Gammaproteobacteria* (91.4%), *Proteobacteria/Alphaproteobacteria* (2.8 %) and *Firmicutes/Bacilli* (5.8%). Among these, *Gammaproteobacteria* group was the largest and contained strains distributed in the genera *Pseudoalteromonas* (10 strains), *Vibrio* (21 strains) and *Ferrania* (1 strain). All of the lipase-producers (9 isolates) were contained in several genera of the *Gammaproteobacteria*: *Shewanella* (1 strain), *Vibrio* (2 strains), *Alteromonas* (4 strains), *Pseudoalteromonas* (1 strain) and *Agarivorans* (1 strain). On the other hand, it was strongly suggested that 8 isolates were candidates of new species based on low 16S rRNA gene sequence similarity. They were distributed in the families *Alteromonadaceae* (JJM10 and JJM57), *Pseudoalteromonadaceae* (JJM39 and JJM137) and *Shewanellaceae* (JJM25 and JJM33) of the order *Alteromonadales* (the class *Gammaproteobacteria*). Strain JJM84 belonged to the family *Flavobacteriaceae* of the order *Flavobacteriales*, the class *Flavobacteria*.

1. 서론

삼면이 바다와 접해 있는 우리나라의 해안가는 암반 조간대(Rocky Intertidal Zone)에서부터 모래 해변(Beach) 및 갯벌(Tidal flat)에 이르기까지 다양한 형태의 해변들로 구성되어 있다. 그러나 아무리 넓은 모래 해변이나 갯벌일지라도 그 끝은 항상 암반 조간대로 끝나고 있다. 모래 해변이나 갯벌의 사이사이로 크고 작은 암초들이 솟아나 있고 그 곳에는 상당수의 조간대 생물들이 살아가고 있다. 특히 바다와 접해있는 삼면 중에서 동해안은 극히 일부 모래 해변을 제외하고는 거의 전체 해변이 완전한 암반 조간대로 구성되어 있으며, 남해안 역시 동해안에 비해서 상대적으로 길이는 짧을지라도 많은 암반 조간대들이 발달해 있다. 제주도 같은 경우는 사면이 바다에 노출되어 있고, 제주도의 해변은 전체적으로 암반 조간대가 골고루 발달되어 있다. 일반인들이 가장 많이 찾게 되는 해안가는 주로 암반 조간대로 짧은 거리임에도 불구하고 복잡 다양한 미세환경(microenvironment) 들이 존재하며, 간조 시 조수 웅덩이(tidepool)들이 형성되기 쉬운 곳이다.

조간대가 가지고 있는 생물들의 생태적인 환경 조건을 보았을 때에는 경제적인 가치가 큰 어패류를 포함하여 많은 종류의 해양생물이 이곳에서 번식을 하고 유년기를 보내거나 서식한다. 또한 각종 철새들도 이곳을 주요서식 공간으로 이용한다. 더불어서 조간대 환경에서 발달한 염생 습지나 갯벌은 육상 환경에서 유입되는 오염물질들을 정화하는 역할을 하기도 한다. 뿐만 아니라 경제적인 측면에 있어서도 간척농지, 상업·공업용지, 관광지등으로도 유용한 조건을 가지고 있기 때문에 모든 면에서 매력적인 곳이다(Goldberg, 1994). 1980년대 중반 이후 전 세계적으로 친환경적인 개발의 패러다임이 본격화되면서, 조간대 환경에 대한 관심이 급증하였고, 조간대 환경을 중심으로 한 해양환경의 개발과 이용에 대해서도 많은 연구가 수행 되었으며, 이와 함께 세계 여러 나라에서 조간대 환경에 현명한 이용을 위한 방안 들이 제시되었다(Ramsar Convention Bureau, 1993).

람사르 협약(Ramsar Convention)으로 불리우는 조간대 환경에 대한 이용 지침은 현재에도 지속적으로 보안·제시되고 있는데, 여기에는 지리학, 생물학, 해양학, 생태학, 지질학과 같은 여러 학문 분야가 다양하게 참여하고 있고, 다양한 연

구 결과들을 제시하는 다문학적 접근방법이 활용되고 있다(IUCN, 1993). 우리나라는 미국의 남동부 해안, 유럽의 북해 연안과 함께 세계 3대 조간대 환경을 보유하고 있는 국가로서 1995년 OECD 가입 이후 람사르협약에도 활발하게 참여하고 있다.

조간대(intertidal zone)는 또한, 연안대(littoral zone)라고도 하는데, 조수간만의 차이에 의해서 보통 하루에 두 번씩, 물속에 잠기었다가 공기 중에 노출되는 것을 반복하는 해변 부분을 말한다. 그러므로 생물에 있어서는 혹독한 환경에 놓이게 된다. 육상 생물로서는 물에 잠기는 시간이 길어지고 빛이 차단되고, 해양 생물로서는 공기와 접하는 시간이 길어져 건조가 진행됨에 따라 양 생물 모두 항상 스트레스를 받게 된다. 이들 조간대의 수직적 높이나 넓이는 지역에 따라 또는 지형에 따라 다소 차이가 있다. 이러한 조간대 지역은 분포하는 생물의 종류나 물리, 화학적 환경 특성들에 의해서 통상 세 개의 세부 지역으로 나누어지는데 해변을 수직적으로 구분하는 방법에는 학자에 따라 다양한 방법들이 제안되고 있지만 통상 비말대(Splash zone), 상부 조간대(High intertidal), 중부 조간대(Middle intertidal), 하부 조간대(Low intertidal)로 구분하며 각각의 환경 조건이 달라 서식하는 생물상이 다양하다(Son and Hong, 2003) (Fig. 1-1, 1-2).

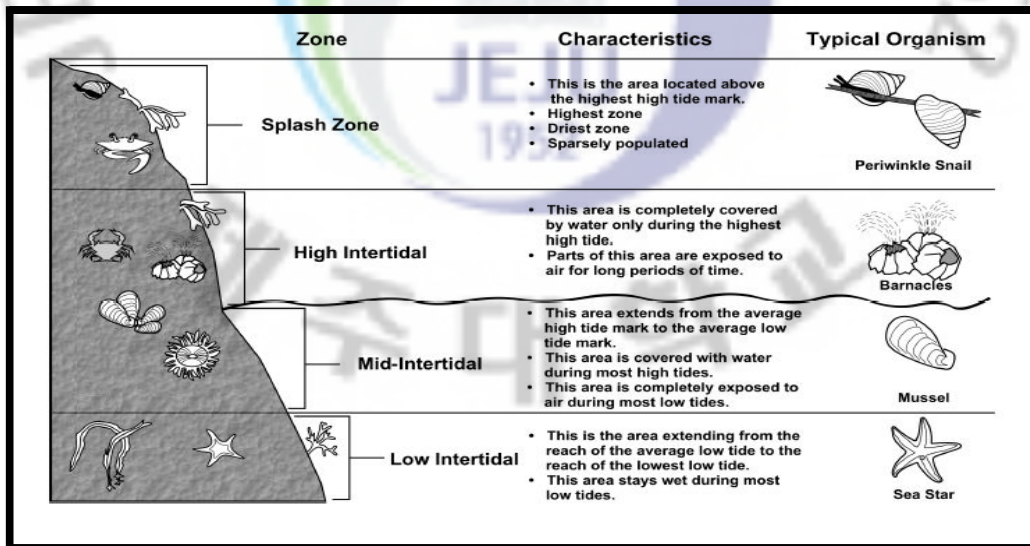


Fig. 1-1. Ecology of intertidal zone

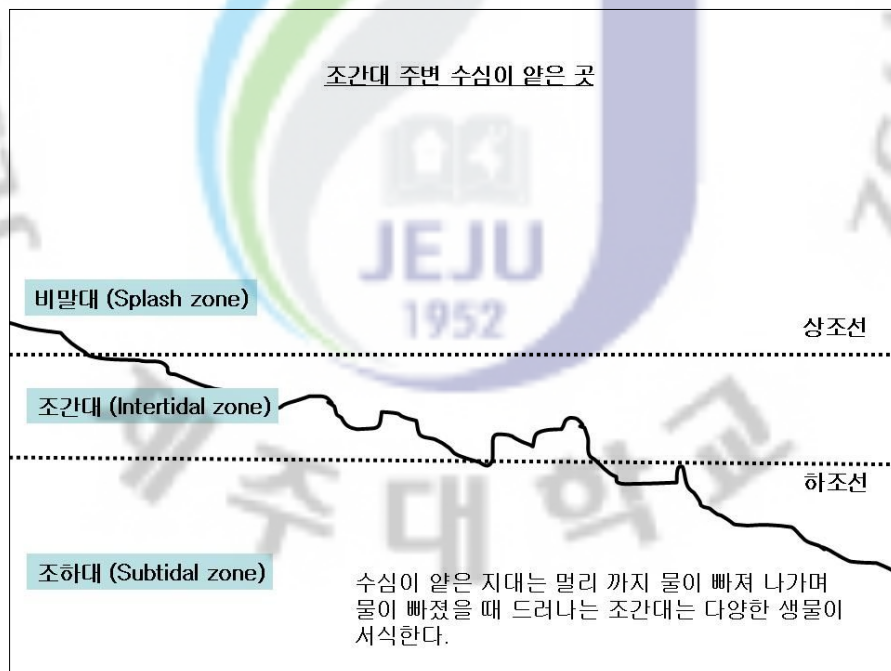


Fig. 1-2. Forms of intertidal zone

비말대(Splash zone)는 바닷물이 파도에 부딪쳐서 튀어나오는 물이 미치는 습기에 의해서 생육하는 식물의 서식대로 특별한 지의류(lichens) 등이 서식하여 이곳의 바위는 언제나 검게 덮여져 있는 고조선 수면의 윗부분인 상부지대를 말한다.

상부 조간대(High intertidal)는 조간대 지역 중에서도 물리, 화학적 환경 조건이 가장 열악한 지역이다. 바다로부터 가장 높은 즉, 가장 육지 쪽 지역으로 만조 시 강한 파도에 의해서 포말이 겨우 닿는 최상부 지역이기 때문에 뜨거운 태양 열과 건조에도 잘 견딜 수 있는 좁쌀무늬총알고둥(*Nodilittorina radiata*), 조무래기따개비(*Chthamalus challengeri*), 갈고둥(*Nerita japonica*) 등이 주로 분포한다. 또한, 수분 공급이 거의 없기 때문에 해조류는 거의 분포하지 않는다. 중부 조간대(Middle intertidal)는 만조 시에는 물에 잠기지만 간조 시에는 공기 중에 노출되는 전형적인 조간대 지역이라 말할 수 있다. 또한 공기 중에 노출이 된다 할지라도 항상 어느 정도의 수분은 공급이 된다. 만조와 간조 시 자연 조건 모두에 대해서 어느정도 견딜 수 있는 생물들이 서식한다. 주로 바위게(*Pachygrapsus crassipes Randall*), 대수리(*Thais clavigera*), 고둥류, 굴류 등이 서식하며, 일부 해조류도 분포하고 있다. 하부 조간대(Low intertidal)는 가장 바다와 가까운 부분이며 간조 시를 제외하고는 항상 물에 잠겨있는 부분이며 물속에서 다양한 포식자들로부터 자신을 보호 할 수 있으며, 강한 파도에도 바위 표면에서 떨어져 나가지 않는 강한 부착력을 가지고 있는 담치류나 많은 종류의 해조들이 서식한다.

또한 조간대에는 간조 시 소규모 웅덩이가 형성되는데 이를 조수 웅덩이(tidepool)이라 하고 그 크기와 깊이 그리고 생성 위치에 따라 서식생물의 생태적 특성이 독특하기 때문에 mesocosm 등의 생태모델 연구 장소로 활용되기도 한다(Lee *et al.*, 2001, Metaxas and Scheibling, 1994, Barlow *et al.*, 1998). 즉, 만조 시에 조간대에 유입된 유기물은 조간대에 서식하는 미생물 등에 의해 분해되어 무기물로 바뀌고 이 무기물은 플랑크톤 등의 광합성 작용으로 다시 유기물로 변화시켜 다양한 생물의 호흡과 성장을 돕는다. 간조 때에는 만조 시 먹이를 찾거나 산란을 위해 조간대에 들어왔던 어류나 새우, 꽃게 등이 물을 따라 나가기 때문에 조간대에는 어린 고기나 갑각류가 안전하게 피신하여 생육할 수 있다.

다시 말하자면, 조간대 환경(Intertidal environment)은 육지와 바다의 접이치대에 위치하여 밀물과 썰물의 관계 속에서 침수와 노출이 반복되며, 해식애와 파식대 같은 침식지형과 갯벌, 염생습지, beach와 같은 퇴적지형이 다양하게 나타나는 지역이다(Viles and Spencer, 1994). 또한 조간대는 해양환경에 있어 조하대와 육상환경이 접해있어 생태적으로 천이지역으로 분류된다. 조간대의 물리, 화학적 환경요인 중, 생물의분포가 가장 큰 영향을 미치는 요인은 조석에 따른 환경의 변화이다(Kronberg, 1988). 조간대에 서식하는 생물들은 조석에 따라 공기 중으로 노출되거나 물속에 잠기게 된다. 즉, 분포하고 있는 생물들의 조간대 서식지 위치에 따라 노출 또는 해수에 잠기는 시간이 각기 다르게 된다. 그러므로 많은 조간대 생물들은 조하대(Subtidal zone) 생물들과 달리 급변하는 수온, 염분 및 노출시간에 따른 건조 환경에 적응하며 살게 된다(Tait, 1972, Valiela, 1984, Brown and McLachlan, 1990). 그 중에서도 암반 조간대 생태계는 해양 환경 중에서도 다양한 생물 구성원을 이루고 있다. 평면구조로 인한 단순한 공간 경쟁이 외에도 해조류 서식이나 다른 부착 생물에 의한 기질 환경이 다양하게 공존함으로써 3차원적인 공간 분포를 이룬다(Lewis, 1964, Weinberg, 1978). 이와 같이 조간대에는 다른 지역에서 찾아 볼 수 없는 독특한 생육조건이 형성되면서, 다양한 생물종이 서식환경에 적응하면서 살고 있어 생태계의 보고라고 볼 수 있다.

Swinbanks(1982)는 조간대는 계절에 따라 생물들의 가입과 이입이 왕성하여 군집변화가 왕성해 지는데 조간대의 구조와 재질에 따른 환경 영향도 매우 중요하게 작용한다고 하였다. 암반 조간대의 환경 특성은 한마디로 미세환경의 복잡성과 '파도'라는 물리적 환경 조건에 있다. 물론, 모래 해변이나 갯벌에도 바닥의 수직적 깊이에 따라 물리·화학적으로 다양한 미세환경이 존재한다. 그러나 암반 조간대처럼 수평적으로 단 1 ~ 5 cm 의 거리 사이에 35 °C라는 뜨겁고 건조한 환경(여름철 직사광선을 받는 부분)과 20 °C라는 서늘하고 습한 환경(바위 면이 직각으로 깎여 그늘진 곳)이 함께 존재하기는 어렵다. 또한 하부 조간대 같은 경우는 파도에 의해 항상 수분을 공급 받지만, 수직으로 약 50 cm 정도 떨어진 위 부분은 태양열에 노출되어 바위 표면에 온도가 높아 말라붙은 소금기가 남아있게 되고, 바위 표면에 부착하여 서식하는 각종 해조류들은 건조 시 마른 채 바위 면에 쓰러져 있게 된다. 하지만 마른 해조류 밑에는 습한 상태를 유지하기 때문

에 수많은 생물들이 만조 시 때까지 이곳에서 머물러 있게 된다. 이처럼, 암반으로 이루어진 조간대에는 상상할 수 없을 정도로 다양한 미세환경들이 아주 짧은 거리를 사이에 두고 다양한 형태로 존재하고 있다(Son and Hong, 2003).

제주도 해안은 306.3 km에 이르는데 대부분 용암류가 바다에 접하면서 형성된 전형적인 화산해안이다. 제주도의 지질분포를 보면 화산암이 전체 면적의 95% 이상을 차지하며, 서귀포 일대를 제외하면 해안에는 주로 현무암이 분포하고 있다(Lee *et al.*, 2001). 비록 해안선이 단순하지만 해안에 다양한 형태의 기질이 존재하고 있으며, 대마난류 영향을 크게 받지만 다른 여러 수괴의 영향도 동시에 받고 있어 생물다양성이 높을 수 있는 여건을 갖추고 있다. 또한 열대와 아열대 생물인자를 온대해역으로 수송하는 쿠로시오의 지류인 대마난류의 영향권에 위치함에 따라 한반도의 해안과는 다른 종 조성을 가지고 있다. 이런 점에서 우리나라 해안 생태계에서 제주도 해안생태계가 가지는 중요성이 입증되고 있으며 온대와 아열대 및 열대 생물이 공존하는 곳으로서 특이한 생물 지리적 특성을 가지고 있다. 또한, 제주도 해안가는 암반 조간대가 대부분을 차지하고 있기 때문에 조수웅덩이가 주기적으로 생성될 수 있는 조건을 갖추고 있으며, 크기 또한 다양하여 주변의 해양환경과 육상 환경 조건에 따라 독특한 생태적 특성을 보이고 있다(Lee *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 2002, Choa and Lee, 2000).

이러한 제주도의 해안 생태계의 중요성과 특이성 때문에 상대적으로 많은 연구진들이 제주도 해양생물 조사를 시도하였다. 특히 저서동물에 대한 조사가 많았으며, 조사를 통해서 해양생태계의 보전의 필요성이 제기됨에 따라 보호지역 지정에 위한 조사들도 수행되었다. 제주도에서 수행된 저서생물에 대한 연구들은 해조류와 저서동물로 생물군별로 크게 분류되고, 연구 분야에 따라 목록과 생물상 (이 등, 1990; 이와 고, 1991; 한국해양연구소, 1995 등), 분류(김과 장, 1984; 노와 서, 1984; 이와 안, 1984; 오 등, 1990 등), 생태 (이와 이, 1976), 분포와 생물지리(부, 1988; 이와 부, 1993 등), 보전 연구 (문화부, 1992; 서귀포시, 2000 등) 등으로 구분되며, 보전연구는 보통 전체 생물군에 대한 종합적인 연구였다. 이밖에도 저서 규조류에 대한 조사도 있었지만 (이 등, 1991), 이 조사에서는 대형 저서생물만으로 제한하였다. 하지만 위에 언급한 연구들은 조간대 및 조수 웅덩이에 분포하는 미세조류 군집, 저서 대형무척추동물의 종 다양성 및 생물 생태

학적 연구가 대부분이다

미생물은 지구 생물량의 약 60%를 차지하며 지구상의 어떤 환경에서도 존재한다. 다른 생물은 살 수 없는 혹한의 남극 얼음 속에도, 뜨거운 온천수나 심해저의 열수구에서도, 엄청나게 높은 압력이 미치는 심해저에서도, 빛이 전혀 없는 바다 속에도 미생물은 살고 있다. 연안의 경우에도 해수, 해저퇴적층, 갯벌, 부유물질의 표면, 해양생물 표피나 내부기관등에 다양한 형태와 생리적 특성을 지닌 해양미생물들이 존재하고 있다.

일반적으로 연안의 해양 생물의 분포는 주위 환경과 밀접한 관계를 맺고 있다. 특히 조간대 지역은 조석간만의 차, 일기의 변화, 지역적 특성, 염분농도, pH 등의 물리 화학적 요인과 해조류, 먹이, 포식동물의 분포 등의 생물학적 요인이 다양한 미생물에 생존을 가능케 한다. 또한 조간대의 형태와 구조, 각 생물의 갖고 있는 생리적 저항성으로 인하여 조간대의 생물군집은 매우 다양하고 독특한 양상을 나타내고 있다(Dayton, 1971., Connell, 1975). 해양 생태계는 생물과 환경의 상호관계에 의하여 이루어지는 복잡한 구조물로서 환경의 다양성을 폭넓게 보유한다. 특히 제주도 주변해역에서는 서로 다른 특성을 갖는 대마난류, 황해 냉수, 남해안 연안수 및 중국대륙의 연안수 등이 계절적으로 복잡하게 영향을 미치고 있고, 제주 연안에는 강우기에 주변에서 유입되는 육수와 연중 계속되는 용천수로 인하여 해양학적으로 특수한 환경을 이루고 있다.

생태계의 다양성은 생물군집의 양상과 상호 작용하는 시스템의 차이로 구분되며, 일반적으로는 특정 서식지의 특성으로 대변된다. 또한 물질과 에너지의 순환, 시스템의 재생력 등 생태계의 평형유지기능을 하나의 통합된 개념으로서 정의한다. 따라서 생태계 다양성은 정적 상태이기보다는 시·공간적인 동적 상태로 이해해야 할 것이다. 특히 연안이나 하구 같은 생태계에 서식하는 미생물들은 물질순환에 아주 중요한 역할은 맡고 있으며 환경의 지속적인 보전에 기여하고 있다. 위에 언급하였듯이 이러한 제주도의 지역적 환경 특성 때문에 생물 분포에 직접적인 영향을 주는 요인들이 지역에 따라 상이하기 때문에 조간대를 중심으로 한 생물분포에 관련되는 연구가 많은 학자들에 의하여 이루어지고 있다.

앞서도 언급하였듯이 미생물은 해수, 해저퇴적층, 갯벌, 부유물질의 표면, 해양생물 표피나 내부기관에는 다양한 형태와 생리적 특성을 지닌 해양미생물들이 존

재하고 있다. 한 예를 들자면 미국의 Finical 그룹은 열대의 산호로부터 분리한 *Streptomyces* sp.로부터 8각형 lactone을 가진 octalactins을 분리하였다(Tapiolas *et al.*, 1991). Octalactine A는 강력한 항암 효과를 나타내었다. 그리고 Deep-sea sediment core로부터 분리한 gram positive strain C237로부터 macrolide계 물질인 macrolactins를 분리하였다. 이는 기존 천연물에서 발견된 바가 없는 24-membered lactone을 가지는 macrolactins는 항미생물, 항암 효과와 함께 HSA- I, -II, HIV 등에 대하여 강력한 항바이러스 효과를 나타내었다(Gustafson *et al.*, 1989). 또한 해파리의 표면에서 분리한 streptomycete로부터 강력한 소염효과를 나타내는 독특한 이중 고리 depsipeptides인 salinamides가 발견되어 새로운 소염제로서 개발하고 있는 등 많은 연구가 이루어지고 있다. 이렇듯 해양 미생물에서 발견되는 천연물들은 의약품 이외에도 농약, 건강보조제, 기능성 화장품, 기타 화학적 혹은 생물학적 신소재의 개발에도 직·간접적으로 널리 이용되고 있다.

또한 해양이나 염전에 존재하는 내염성 세균과 호염성 세균들의 특이한 생리적 특성을 인간 생활에 응용하기 위해 다각적인 연구가 수행되어 왔다(Collins and Jones., 1981, Weiner *et al.*, 1985, Kloos *et al.*, 1986, Honrichsen *et al.*, 1994). 또한 미생물의 생성하는 천연 색소를 이용하면 배양에 의한 대량생산이 가능하고 안정된 품질의 제품을 상시 생산할 수 있어 미생물을 이용한 색소생산에 대한 관심이 높고 안정성에 대한 연구도 많이 이루어지고 있다(Ryu and Kim., 2000, Choi and Jeong., 1999, Madigan *et al.*, 2003).

또한 최근에 들어서 국내에서 신종 미생물에 대한 국제 논문이 급속히 증가하고 있다. 국제적으로 미생물 분류 학회지로 가장 권위 있는 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology에 국내 연구팀에서 활발하게 발표하였다. 특히, 유기물이 많고 다양한 미세 환경을 지니고 있는 갯벌에서 가장 많은 신종의 미생물이 발견되었다. 해수에서 분리된 신종으로는 *Halomonas marisflavae*, *Sporosarcina aquimarina*, *Bacillus hwajinpoensis*, *Alteromonas marina*, *Marinobacter litoralis*, *Erythrobacter flavus*가 있으며 신속으로는 적조 생물을 죽이는 *Kordia algicida*(Sohn *et al.*, 2004)가 있다. 연안 퇴적물에서는 세포외다당류를 생산하는 신속으로 *Hahella chejuensis*(Lee *et al.*, 2001)가 보고되

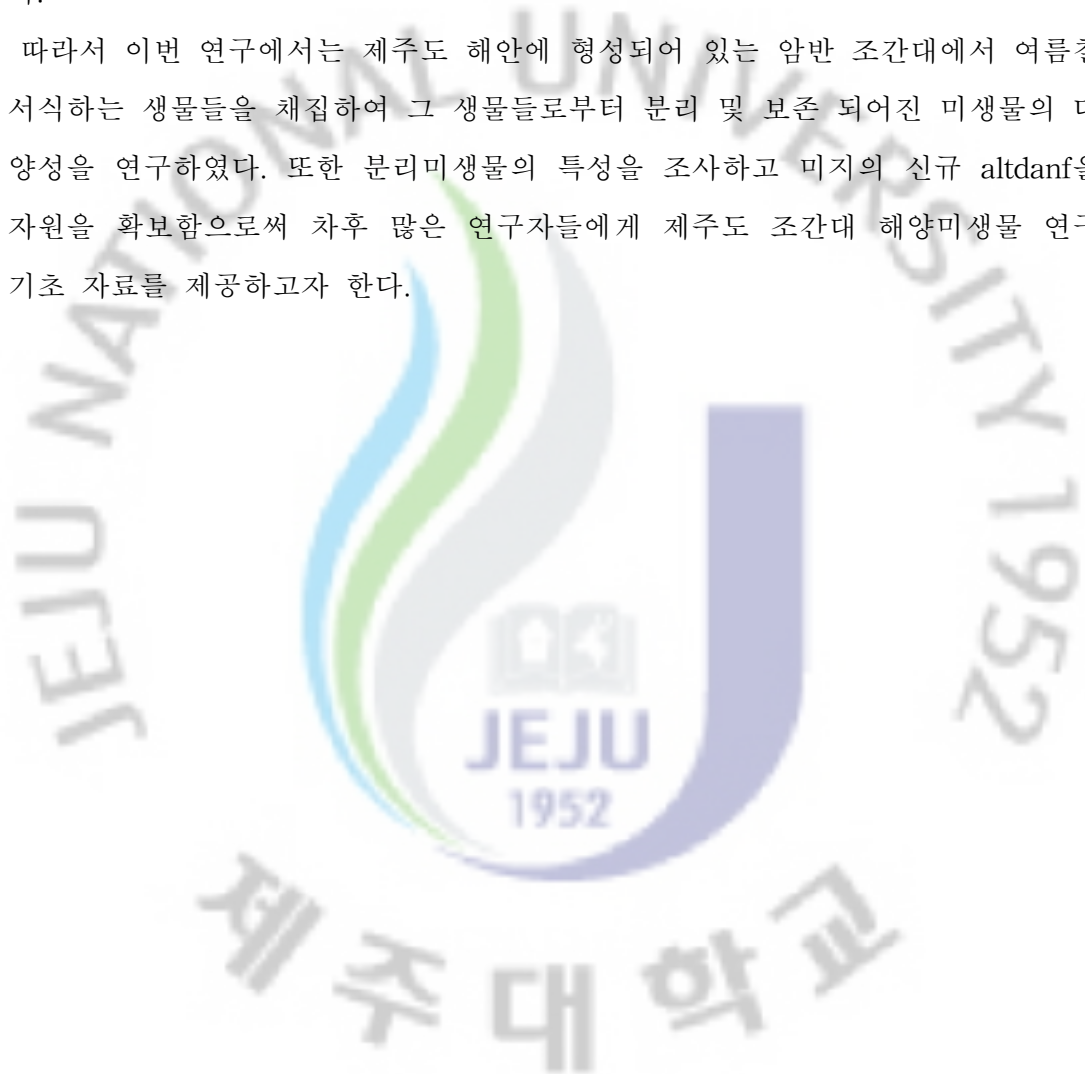
었다. 갯벌에서는 신속으로 *Aestuariibacter salexigens*, *Hongiella mannitolivorans*, *Zooshikella ganhwensis*가 분리 보고되었고 신종으로는 *Bacillus marisflavi*, *B. aquimaris*, *Shewanella gaetbuli*, *Alteromonas litorea* 등 다양한 미생물의 분리 보고되었다.

또한 제주대학교 연구팀에서도 최근 3년간 제주도 해변의 저질토에서 *Kineococcus marinus*, *Brevibacterium samyangense*, *Blastococcus jejuensis*, *Tamlana crocina*, *Lewinella agarilytica*, *Marmoricola aequoreus*, *Devosia subaequoris*, *Tessaracoccus flavescens*, 해변 모래에서 *Nocardia harenae*, *Nocardioides marinisabuli*, *Nocardioides furvisabuli*, 해수에서 *Aeromicrobium ponti*, *Nocardioides hwasunensis*, *Brevibacterium marinum* 그리고 해조류에서 *Phycococcus jejuensis*, *Labedella gwakjiensis*, *Agrococcus jejuensis*, *Phycicola gilvus* 등의 새로운 신속과 신종의 미생물을 분리 보고하였다(IJSEM, 2006, 2007, 2008). 이렇듯 제주도 해양 환경은 다른 지역과 비교하여 해양 생태계 보존이 잘 되어 다양한 생물종이 서식할 뿐만 아니라 아직 밝혀내지 못한 수많은 미생물들이 존재하고 있다는 것을 시사하고 있다.

앞으로는 미생물의 산업적 이용 가능성 때문에 더 많은 미생물 그 중에서도 현재까지 그 특성이 알려지지 않은 미생물에 대한 연구가 점차 활발해질 것이다. 그러므로 생물자원의 확보가 결국은 생명공학 산업에서 있어서 원천기술의 확보로 연결이 될 것이다. 그러하기 때문에 제주도뿐만 아니라 우리나라에서만 서식하는 고유 미생물 자원을 확보하고 유용한 미생물자원의 생리, 생화학적 특성과 분자생물학적 정보를 확보하는 것이 대한민국 생명공학 산업을 다른 나라보다 앞서 나아갈 수 있을 것이라 본다. 그러나 아직까지 전체 해양 미생물 중 극히 일부분만이 연구된 실정이며 다양성이나 유전체 연구에서도 크게 주목받지 못하고 있다. 따라서 앞으로 해양미생물을 이용하기 위해서는 이들의 생물다양성을 확보하고 유전자원을 분리하며 이용 가능한 방법을 찾는 기술의 개발이 절대적으로 필요하다. 특히 조간대, 연근해, 퇴적물, 해양생물체, 염전 등 극한환경에 서식하는 해양미생물의 다양성 연구가 활성화되어야 할 것이다. 미생물 자원은 고부가가치 의약품 단백질 생산, 생리활성 물질, 효소 등의 균주로서 산업적 가치가 매우 높고 현재 우리나라의 경우 바이오산업의 60% 이상을 미생물 관련 산업이

차지하고 있다. 그러나 현재 알려진 미생물은 지구상에 존재하는 전체 미생물 종의 불과 1% 미만에 불과하고 특히 미생물 중 생명공학 분야에서 가장 많이 이용되는 박테리아의 경우 자연계에 수백만 종이 존재할 것으로 추정되지만, 현재까지 발견된 종은 8천여 종에 불과하다. 따라서 생명공학 분야 국가 경쟁력 제고에 있어 이러한 미지의 미생물 자원의 적극적인 확보와 활용이 보다 강조되고 있다.

따라서 이번 연구에서는 제주도 해안에 형성되어 있는 암반 조간대에서 여름철 서식하는 생물들을 채집하여 그 생물들로부터 분리 및 보존 되어진 미생물의 다양성을 연구하였다. 또한 분리미생물의 특성을 조사하고 미지의 신규 altdanf을 자원을 확보함으로써 차후 많은 연구자들에게 제주도 조간대 해양미생물 연구 기초 자료를 제공하고자 한다.



2. 재료 및 방법

2.1. 연구지역 개황

제주도는 제3기말 플라이오세에 화산활동이 시작된 이후 제4기에 완성된 대륙붕 위의 화산섬이다. 동경 126° 09' ~ 127° 00', 북위 33° 10' ~ 34° 05'의 범위에 위치한 섬의 면적은 1,845.36 km²이며 해안선의 길이는 306.3 km이다. 섬의 모양은 타원형이며, 장축의 방향은 동북동 ~ 서남서이다. 제주도의 지형은 한라산을 중심으로 동서사면은 3° ~ 5°의 매우 완만한 경사이며, 남북사면은 5° 정도로 약간 급한 경사를 이루고 있다. 제주도의 지질은 퇴적암층 (sedimentary rock)과 현무암 (Basalt), 조면질안산암 (trachyandesite-hawaiite), 조면암 (trachyte) 등의 화산암류와 기생화산에서 분출한 화산쇄설암 (phroclastic rocks) 등으로 구성되어 있으며, 일부 지방의 점사질 토양을 제외하면 대부분이 흑갈색의 화산회토 (volcanic ash soil)로 덮여 있다.

제주도는 연중 온난하고 기온의 연교차도 적은 해양성 기후를 나타내는 바 제주지역은 연평균 기온이 14.7°C, 1월 평균기온 4.8°C, 8월 평균기온 25.8°C인 데 비하여 서귀포시 지역은 연평균 기온이 15.6°C, 1월 평균기온 6.0°C, 8월 평균기온 27.6°C이다. 제주도는 한반도로부터 멀리 떨어진 고도로서 해양환경이 한반도 해안과는 많은 차이가 있다. 이러한 차이는 제주해역에 존재하는 독특한 특성을 가진 다양한 수괴에 기인한 것이다(고, 1998). 제주도의 바다는 각각 독특한 특성을 지닌 해류들이 섞이는 곳이라는 점에서 우리나라의 주변 해역과 많은 차이를 보인다. 지하에서 솟아나는 담수, 황해 저층에 있는 차가운 바닷물, 중국 양쯔강으로부터 유입되는 엄청난 양의 담수가 섞인 바닷물, 따뜻한 해류인 쓰시마 난류가 함께 섞인다. 쓰시마 난류는 연중 수온이 섭씨 15°C 이상으로 열대해역에서 발원하여 북상하는 쿠로시오로부터 일본 규슈 남쪽에서 분리되어 주로 제주도 남쪽 바다로 흘러오다가 대한해협으로 간다. 이런 다양한 해류들이 섞이는 곳이기 때문에 온대와 열대 그리고 아열대 생물들이 생태계를 이루고 있는 것이다(Fig. 1-4).

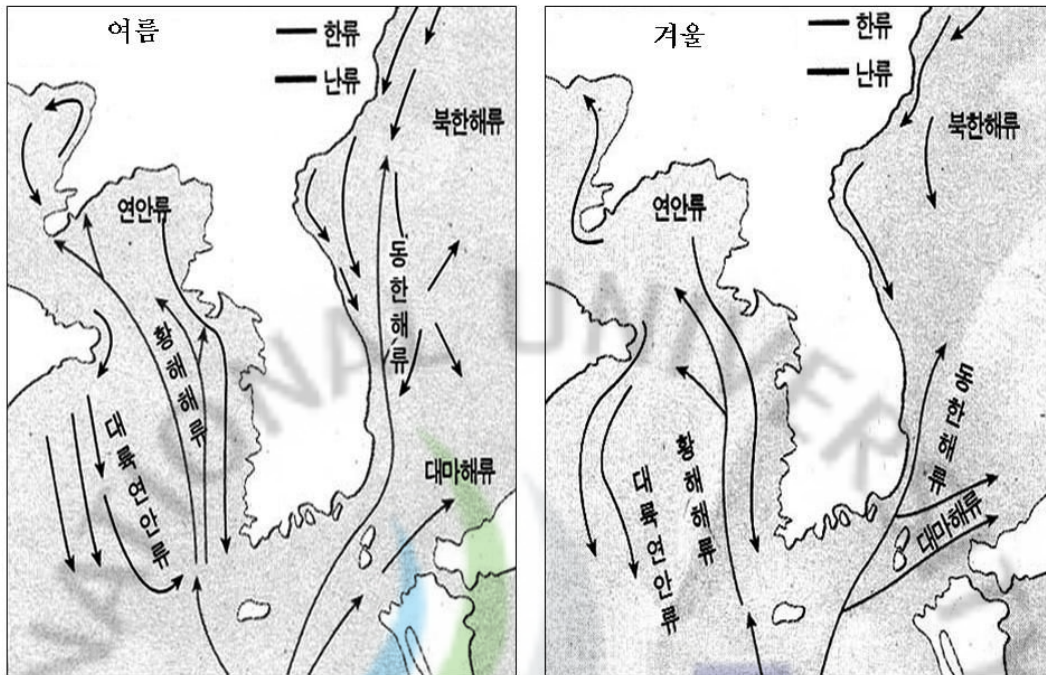


Fig. 1-3. The current chart of Jeju island.

생물들마다 살아가는 방식이 다르기 때문에 그들 각자에게 적합한 서식지가 다양하게 있어야 한다. 제주 바다에는 실로 다양한 종류의 서식지가 있다. 서식지를 모래해안, 바위해안, 자갈해안 그리고 절벽해안으로 구분할 수 있는데, 모래해안도 파도의 영향을 직접 받는 해안, 작지만 하천 입구에 있으면서 모래갯벌 형태를 띤 해안, 모래와 바위가 혼재되어 있는 해안, 하천 입구에 펄이 있는 해안, 모래가 아닌 석회조류로 이루어진 해안 등이 있다. 자갈해안과 바위해안은 모래해안보다 훨씬 더 다양하다. 작은 자갈로 된 해안, 둥글고 큰 바위로 된 해안, 큰 암반으로 된 해안, 여러 형태의 바위가 함께 흩어져 있는 해안 등 다양하다. 수직암벽으로 이루어진 해안은 제주도 남쪽 해안에서 많이 발견된다. 또한 경사가 완만한 바위지역이 있고 수중동굴도 있다. 이와 같은 다양한 서식지의 수심에 따라 서로 다른 다양한 생물들이 또한 살아가고 있다.

본 연구를 수행하기 위해 시료를 채집한 지역은 제주도 해안가를 중심으로 제

주시 지역과 서귀포시 지역으로 나누어 제주시 지역은 동부(신촌①, 함덕②, 김녕③, 월정④)와 서부지역(애월⑤, 귀덕⑥, 한림⑦)으로 서귀포시 지역 또한 서부지역(성산⑧, 표선⑨, 위미⑩)과 동부(하모⑪, 하예⑫) 지역으로 구분하여 각 지역마다 형성된 암반 조간대에서 시료를 채집 하였다(Fig. 1-5).

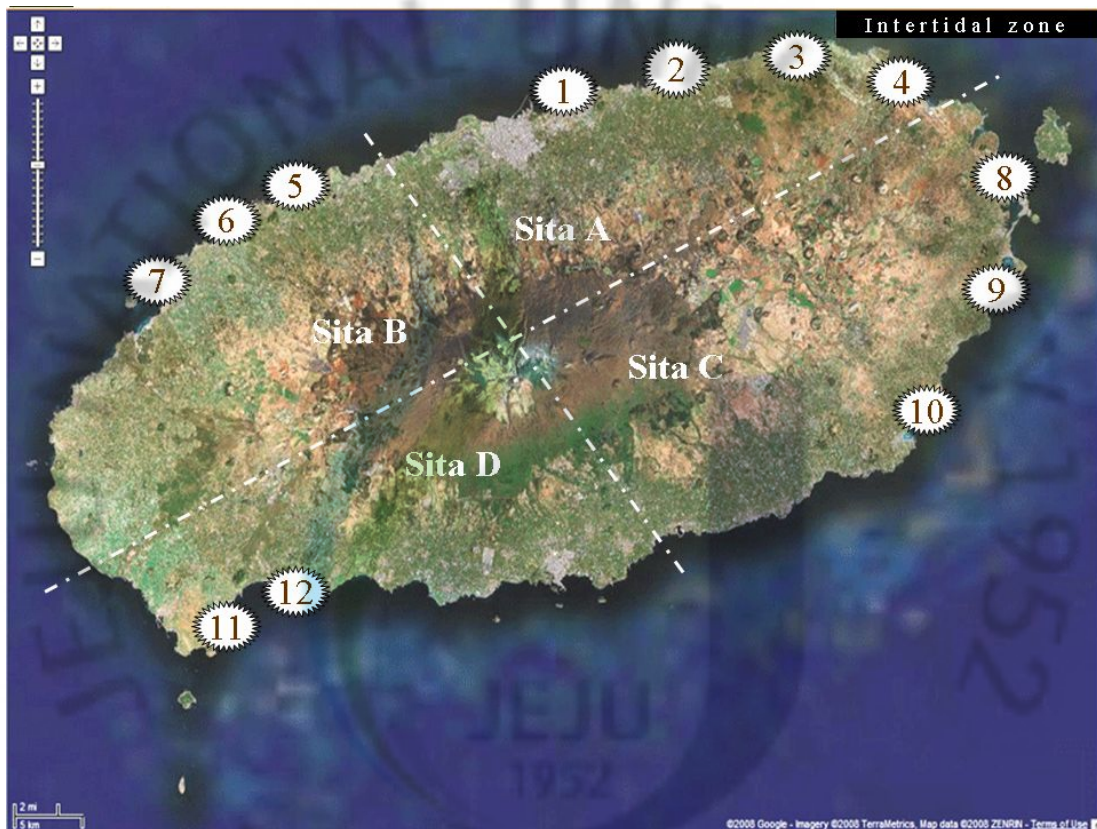


Fig. 1-4. Map for collection of organisms in Jeju Island. Dotted circles indicate the sampling sites.

1; Sin-chon, 2; Ham-duck, 3; Kim-nyeong, 4; Weol-jung, 5; Ae-wol, 6; Gwi-dok, 7; Han-lim, 8; Sung-san, 9; Pyo-seon, 10; Wi-mi, 11; Ha-mo, 12; Ha-ye

2.2. 생물 시료 채집 방법

조간대에서 생물을 채집하기 위해 2007년 6월 - 7월까지 조석표를 이용하여 간조시간대에 조간대를 상, 중, 하부 구역으로 따로 구분하지 않고 분포 되어 있는 생물에 대하여 육안으로 관찰하였으며 우점적으로 서식하고 있다고 판단되는 생물을 채집하였다. 채집된 시료들은 현장에서 사진을 찍어 실험실에서 동정을 하였다(유, 1976; 권 등, 1993; 최, 1992). 채집된 생물 시료는 멸균된 polypropylene bottle에 담아 4 °C를 유지하여 실험실로 운반하여 미생물을 분리하는데 사용하였다.

2.3. 환경요인 분석

수온, 염분 및 pH는 YSI 600QS를 이용하여 현장에서 측정하였으며, 용존산소(DO)는 현장에서 DO meter를 사용하여 측정하는 방법과 산소병에 고정하여 실험실로 옮긴 후 Winkler-Azide 방법을 병행하여 측정하였다(APHA, AWWA, WPCF, 1993). 화학적 산소요구량(COD)은 Carberg(Carberg, 1972)방법에 따라 분석하였다. 그리고 총질소(T-N)는 암모니아성 질소(NH₃-N), 질산성 질소(NO₃-N), 아질산성 질소(NO₂-N)의 합으로 나타냈고, 측정방법은 Strickland와 Parson(Strickland & Parsons, 1972) 및 환경오염공정시험방법(환경부, 1995)에 따라 분석하였다. 또한 인산염 인(PO₄-P)과 부유물질(SS) 측정도 위 방법에 의해 분석하였다.

2.4. 종속영양세균 분석

조간대 주변 해수에 분포되어 있는 종속영양세균을 조사하기 위해 각 조사 지역에서 만조시 해수를 채수하여 도말 평판법(spread plate method)으로 간접적으로 계수하였다. 채수한 해수를 무균적으로 4°C를 유지하여 실험실로 옮긴 후 10 단계 희석법을 이용하여 0.85% 멸균생리식염수에 희석한 후 MA에 도말하여 2

5℃에서 2일간 배양한 후 자란 colony를 계수하였다. 배지상에 출현한 집락수 (colony forming unit; cfu)를 평판계수법에 따라 계수하였다.

2.5. 미생물 분리

조간대에서 서식하는 해양 생물에 공생 또는 부착하여 생존하는 미생물 중 색소생성 미생물은 Marine agar(Difco)(Table 1-1)를 사용하여 분리하였다. 또한 조간대에 분포하는 생리적 특성균으로 알칼리성 단백질분해효소 생성 미생물을 분리하기 위해 ZS medium (Table 1-2)과 지질분해효소 생성 미생물을 분리하기 위해 ZT medium (Table 1-3)를 사용하였다. 단백질분해효소 생산하는 미생물은 skim milk 첨가배지(ZS)에서 투명환을 나타내는 균주를 분리하였고, 지질분해효소 생산하는 미생물은 Tributyrin (TBN, Sigma)을 첨가한 배지를 분해하는 미생물의 단일 colony를 기본배지에 도말하여 순수분리 하였다.

Table 1-1. Composition of marine agar

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
Agar	15.9 g
Strontium chloride	34.0 mg
Boric acid	22.0 mg
Sodium silicate	4.0 mg
Sodium fluoride	2.4 mg
Ammonium nitrate	1.6 mg
Disodium phosphate	8.0 mg
pH	7.0

Table 1-2. Composition of ZS medium (Zobell 2216e + Skim milk)

Peptone (Difco)	5 g
Yeast extract (Difco)	1 g
FePO₄ (Sigma)	0.01 g
Agar sea water	750 ml
D.W	250 ml
pH	9.0

+

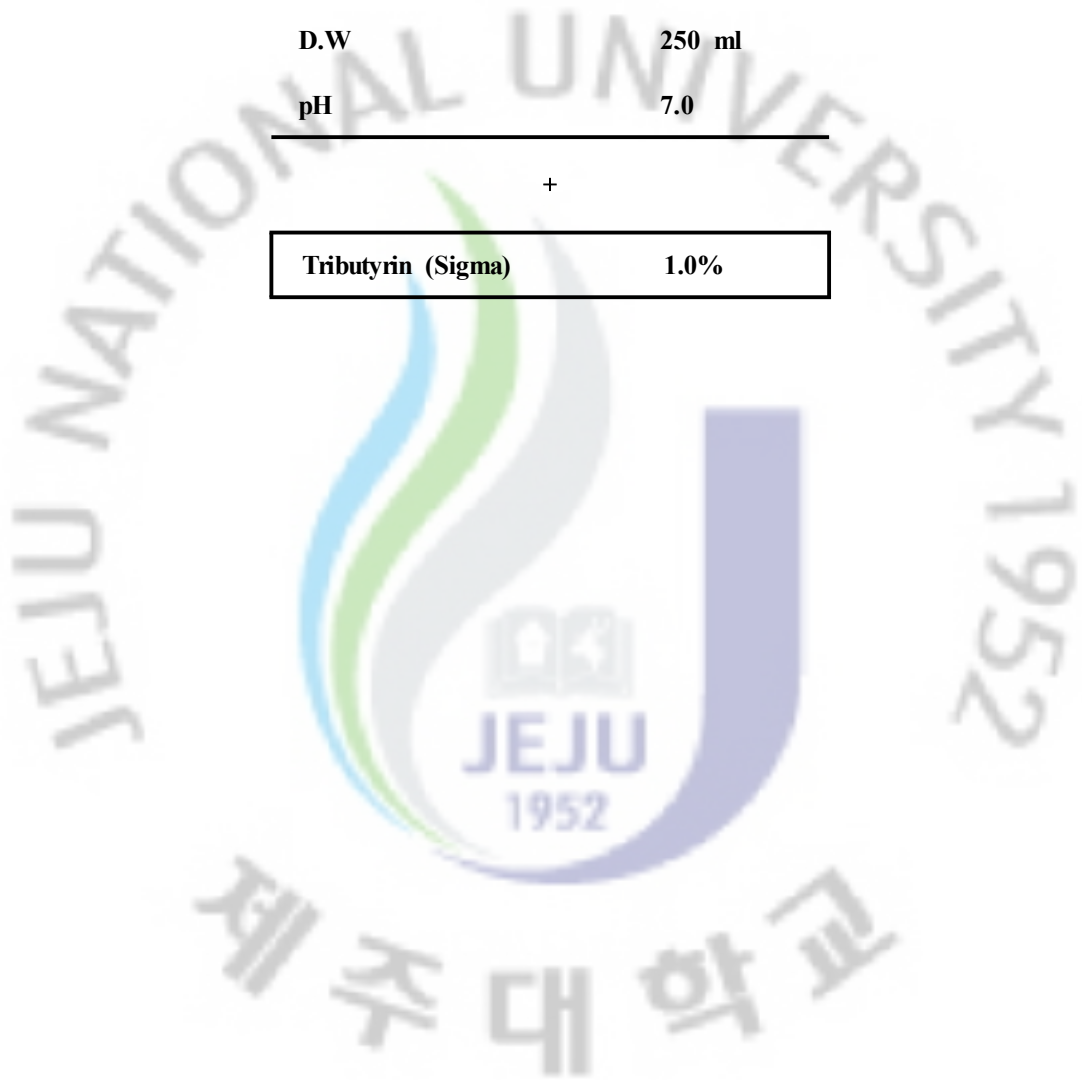
Skim milk (Difco)	1.0%
--------------------------	-------------

Table 1-3. Composition of ZT medium (Zobell 2216e + Tributyrin)

Peptone (Difco)	5 g
Yeast extract (Difco)	1 g
FePO4 (Sigma)	0.01 g
Agar sea water	750 ml
D.W	250 ml
pH	7.0

+

Tributyrin (Sigma)	1.0%
---------------------------	-------------



2.6. 미생물 분리 방법

제주도 연안 조간대에서 종류별로 해양 미생물의 공생, 기생, 부생 숙주생물 및 모래 등 채집된 시료는 멸균된 polypropylene bottle에 담아 4℃를 유지하여 실험실로 운반하여 미생물을 분리하는데 사용하였다.

2.6.1. 해양 미생물의 분리

조간대 및 조수 웅덩이에서 채집된 시료들을 멸균된 polypropylene bottle을 이용하여 채집한 후 marine agar (Difco)위에 채집시료를 전 처리하여 접종 하였다. 채집된 시료 1 g을 50 ml conical tube에 멸균해수 5 ml를 넣어 5분간 분산시켜 분산액을 만든 다음 분산액을 1분간 정치시켜 시료층과 수층으로 분리하였다. 1 분간 정치시켜 분리된 수층액에서 0.1 ml를 Marine agar와 Marine broth (MB, Difco)에 접종한 후 도말하여 25℃에서 1-3일간 배양하여 colony를 순수 분리하였다.

2.6.2. 해양 생물체로부터 미생물 분리

조간대 및 조수 웅덩이에서 채집된 생물체를 homogenizer를 사용하여 분쇄한 후 분쇄액 100 μ l를 Zobell 2216 agar(Difco)를 기본배지로 한 후 탄소원으로 skim milk(Difco)를 1% 첨가한 ZS medium과 Tributlyrin (Sigma)을 1% 첨가한 ZT medium에 올려놓은 후 25℃에서 1-3일간 배양하며 colony를 순수 분리하였다.

2.6.3. 해양 퇴적토 시료로부터 미생물 분리

조간대 및 조수 웅덩이에서 해양 퇴적토 또는 모래는 box core 또는 grab를 이용하여 채취한 모래 및 퇴적토의 표면 1-2 cm 부분을 whirl-pack에 200 g 정도 채취하였다. 시료 1 g을 50 ml conical tube에 옮긴 후 여과 멸균한 해수 5 ml 넣어 5 분간 분산 시킨 후 1분간 정치시켰다. 수층 100 μ l를 MA 배지와 탄소원

으로 skim milk(Difco)를 1% 첨가한 ZS medium, 또 다른 탄소원으로 tributyrin (Sigma)을 1% 첨가한 ZT medium에 도말하여 25℃에서 1-3일간 배양하며 colony 관찰, 순수 분리하였다.

분리 균주들은 순수 분리 배지에 50% glycerol을 첨가하여 -80℃에서 보관하고 분리한 균주에 임의 명을 붙여 database화 하였다.

2.7. 분리 미생물의 형태 및 생리·생화학적 특성조사

2.7.1. Gram staining, Oxidase and Catalase test

Gram staining은 Buck(1982)의 방법으로 염색약을 사용하지 않고 3% KOH 시약을 이용하여 측정하였다. 대조균주로는 그람양성인 *Bacillus subtilis* IAM 12188^T와 그람음성인 *E. coli* KCTC 1116을 이용하였다. Oxidase 활성은 Bactident-Oxidase test strips(Merck)을 이용하여 측정하였다. 대조균주로는 양성인 *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750^T를 음성인 *E. coli* KCTC 1116을 이용하였다. Catalase 활성은 3% H₂O₂를 이용하여 측정하였는데 3% H₂O₂를 1-2 방울 적하하였을 때 기포가 발생하는 것을 양성으로 판단하였다. 대조균주로는 *E. coli* KCTC 1116을 이용하였다.

2.7.2. 성장 온도 및 pH 실험

실험균주의 성장 온도(4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40℃) 및 pH(3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12)영향은 marine agar(BD)와 marine broth(BD)을 이용하여 조사하였다.

2.7.3. 염분 실험

실험균주 성장에 미치는 염분 농도 및 절대 해양성 미생물인지를 알아보기 위해 NaCl이 1 - 14% (1% 농도 간격)을 첨가된 nutrient agar(BD)(beef extract

3.0 g, peptone 5.0 g, agar 15.0 g)에서 균주 성장을 조사하였다.

2.7.4. 운동성 시험

분리된 미생물의 운동성 관찰은 반고체 배지법(semisolid medium)과 현적표본법(hanging drop) 2가지를 사용하여 2가지 방법에서 모두 양성으로 나타나면 운동성이 있는 것으로 판단하였다. 반고체 배지법은 agar를 0.3 ~ 0.5% 첨가한 반고체 배지(semisolid medium)를 사용하며, 배지가 혼탁 되었을 때 운동성이 있고, 천자부분만 균이 자라면 운동성이 없는 것으로 균 감별 하였다. 그리고 현적표본법은 cover glass 네 모퉁이에 baseline을 조금씩 바른 후 cover glass 중앙부에 12시간 배양한 균부유액을 1 방울을 떨어뜨려 오목 파여진 slide glass(hole slide glass) 중앙의 홈 부분에 균액이 있는 중앙에 오게 덮고서 즉시 뒤로 젖혀 100배 ~ 400배로 관찰하여 운동성을 판단하였다.

2.7.5. Tween 40 및 80 가수분해 실험

Tween 40과 80의 가수분해 실험은 지질분해효소인 lipase에 의한 지질분해능(lipolytic activity)을 관찰하는 것이다. Tween 40, 80이 함유된 한천배지(heart infusion agar)에 균을 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 colony 주위에 혼탁 환(opaque halo)이 나타나는데 이것을 Tween 40, 80이 가수분해 된 것으로 판단하였다. 양성 대조균주로 *Serratia marcescens* (KCCM 21204)와 음성 대조균주로 *Escherichia coli* (KCCM 40880)을 사용하였다.

2.7.6. API kit을 이용한 생화학적 특성 조사

분리 균주의 생화학적 및 탄소원 동화시험은 API 20NE (bioMerieux)을 이용하여 생화학적 특성을 조사하였다.

2.7.7. 색소 추출

분리된 미생물을 marine broth에 접종하고 25℃에서 24시간 배양한 후 집균하여 메탄올과 아세톤(7:2) 1 ml 첨가하여 원심분리 한 후 어두운 곳에서 상등액을 새로운 tube에 옮겨 UV/VIS Spectrophotometer(survey scan)로 350 ~ 900 nm의 범위에서 흡광도를 측정하여 carotenoid 또는 bacteiochlorophyll의 유무를 확인하였다.



2.8. 16S rRNA 염기서열 분석

2.8.1. Genomic DNA 분리

미생물의 16S rRNA 분석은 각각 1.5 % NaCl이 첨가된 MB(Difco, USA) 배지 5 ml에 접종하여 Shacking incubator를 이용하여 25℃에서 200 rpm으로 24시간 배양한 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮겨서 16000 xg에서 1분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 모아진 bacteria pellet을 수집하여 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)을 사용하여 genomic DNA를 분리 한 후, Unicam UV/VIS Spectrophotometer (Helios β. Unicam Ltd, United Kingdom)를 사용하여 파장 260 nm에서 DNA농도를 측정하였다.

2.8.2. 16S rRNA 유전자 증폭

PCR 반응은 bacterial genomic DNA 100 ng, 1 μM에 universal primer pairs (27F forward primer; 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R reverse primer; 5' -GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 10 mM dNTPs, 10X PCR buffer, 5 Unit Taq polymerase (TAKARA, Japan) 혼합액에 멸균된 증류수를 첨가하여 최종부피를 50 μl로 맞추고, PTC-150 Minicycler (MJ Research)를 사용하여 증폭하였다. 증폭 과정은 94℃ predenaturation 2분, 94℃ denaturation 45초, 55℃ annealing 45초, 72℃ extension 1분의 반응을 30회 동안 수행하였고, 마지막 72℃에서 5분간 extension을 실시하였으며 증폭된 PCR product는 1% agarose(Agarose LE, Promega Co.) gel을 0.5 μg/ml ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

2.8.3. 16S rRNA 염기서열 결정

증폭이 확인된 PCR product는 (주)솔젠타사(Dajeon, Korea)에 의뢰하여 ABI prism™ Bigdye™ terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1

(Fluorescent dye terminators method)와 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer를 사용하여 PCR product의 염기서열 분석을 수행하였다.

2.9. 계통 분석

염기서열간의 유사도를 확인하기 위해 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Genbank와 EMBL Nucleotide Sequence Database에서 유사한 염기서열을 비교하여 가장 근연속이나 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 또한 Ribosomal Database Project II (RDP II)내에 저장되어 있는 bacteria 16S rRNA 유전자 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. 본 연구에서 결정된 분리균주의 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program (ver 3.2; <http://plaza.snu.ac.kr/~iphydit/phydit>)에 포함된 Clustal W multiple alignment로 정렬하였다. 염기서열 분석은 CLUSTAL X software (Thompson et al., 1997)을 이용하여 Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) 방법에 의해 분석하였다. 염기서열 분석 시 Bootstrap은 1000회의 replication을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였다. 염기서열간 진화거리는 Jukes & Cantor (Jukes and Cantor, 1969) 모델을 이용하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 채집 시료

미생물 분리를 위한 시료는 Site A ~ Site D 총 12지역에서 채집하였다. 미생물 분리를 위해 채집된 시료들은 Table 2-5와 같다.

Site A에서는 모래와 자포동물문의 말미잘류 1종, 연체동물문의 고둥류 5종, 절지동물문의 갑각류 2종, 녹조식물 2종, 홍조식물 5종 및 갈조식물 1종을 채집하였다. Site B에서는 모래와 연체동물문의 고둥류 5종, 군부류 1종, 해면동물문의 해면류 2종, 극피동물문의 해삼류 1종, 불가사리류 1종, 녹조식물 1종 및 갈조식물 1종을 채집하였다. Site C에서는 모래와 연체동물문의 고둥류 4종, 절지동물문의 갑각류 1종, 홍조식물 2종 및 갈조식물 1종을 채집하였다. Site D에서는 모래와 저질토, 연체동물문의 고둥류 5종, 해면동물 4종, 연체동물문의 군부류 1종 및 갈조식물 1종을 채집하였다.

Table 2. List of an organisms and inorganic substrates used for bacterial isolation (Site A)

Isolation site	Species name	Korean name
A-1	Sea sand	해사
	<i>Omphalius pfeifferi carpenteri</i>	팽이고둥
	<i>Ulva pertusa</i>	구멍갈파래
	<i>Pachygrapsus crassipes</i>	바위게
	<i>Laurencia okamurae</i>	쌍발이서실
	<i>Galaxaura falcata Kjellman</i>	여린가위손말
A-2	<i>Actinia equina</i>	홍색꽃해변말미잘
	Sea sand	해사
	<i>Cellana toreuma</i>	에기삿갓조개
	<i>Capitulum mitella</i>	거북손
A-3	<i>Monodonta labio confusa</i>	개울타리고둥
	<i>Hizikia fusiformis</i>	톳
	<i>Cryptopleura membranacea</i>	만입맥
	<i>Chondracanthus tenellus</i>	돌가사리
	<i>Codium arabicum</i>	떡청각
A-4	<i>Monodonta neritoides</i>	각시고둥
	Sea sand	해사
	<i>Myelophycus simplex</i>	마디잘록이
	<i>Capitulum mitella</i>	거북손
	<i>Nerita(Heminerita) Japonica</i>	갈고둥

Table 3. List of an organisms and inorganic substrates used for bacterial isolation (Site B)

Isolation site	Species name	Korean name
B-5	Sea sand	해사
	<i>Balanus albicostatus</i>	고랑따개비
	<i>Sargassum horneri</i>	괘쟁이모자반
	<i>Ischnochiton comptus</i>	연두군부
	<i>Cucumaria chronhjelmi</i>	오각광삼
	<i>Hypselodoris festiva</i>	파랑갯민숭달팽이
B-6	Sea sand	해사
	<i>Lithophyllum okamurae</i>	흑돌잎
	<i>Codium arabicum</i>	떡칭각
	<i>Halichondria japonica</i>	주황바위해면
	<i>Petrosia ushitsuensis</i>	바위해면
	<i>Chromodoris orientalis</i>	흰갯민숭달팽이
	<i>Haloa japonica</i> Pilsbry	포도민챙이
	<i>Ophiarachnella gorgonia</i>	뱀거미불가사리
B-7	Sea sand	해사
	<i>Colpomenia sinuosa</i>	불레기말
	<i>Chlorostoma turbinata</i>	구멍밤고둥

Table 4. List of an organisms and inorganic substrates used for bacterial isolation (Site C)

Isolation site	Species name	Korean name
C-8	<i>Lomentaria catenata</i>	마디잘록이
	Sea sand	해사
	<i>Capitulum mitella</i>	거북손
	<i>Heminerita Japonica</i>	갈고둥
C-9	<i>Nassarius livescens</i>	좁쌀무늬고둥
	<i>Batillus cornutus</i>	눈알고둥
	Sea sand	해사
	<i>Galaxaura falcata Kjellman</i>	여린가위손말
C-10	<i>Chlorostoma turbinata</i>	구멍밤고둥
	Sea sand	해사
	<i>Acanthoceras zachariasii</i>	패
	<i>Lithophyllum okamurae</i>	흑돌잎
	<i>Aplysia kurodai</i>	군소

Table 5. List of an organisms and inorganic substrates used for bacterial isolation (Site D)

Isolation site	Species name	Korean name
D-11	<i>Sargassum thunbergii</i>	지층이
	<i>Aplysia juliana</i>	말군소
	Sea sediment	저질토
	Sea sand	해사
	<i>Anthopleura midori</i>	폴색꽃해변말미잘
	<i>Chlorostoma turbinata</i>	구멍밤고둥
	<i>Halichondria japonica</i>	주황바위해면
	<i>Haliclona permollis</i>	보라해면
	<i>Nerita(Heminerita) Japonica</i>	갈고둥
	<i>Hypselodoris festiva</i>	파랑갯민숭달팽이
D-12	Sea sand	해사
	<i>Haliclona permollis</i>	보라해면
	<i>Ischnochiton comptus</i>	연두군부
	<i>Halichondria panicea</i>	회색바위해면
	<i>Chlorostoma turbinata</i>	구멍밤고둥

3.2. 환경요인분석

조사기간에 측정된 환경 요인은 Table 6과 같다.

3.2.1. 수온, pH 및 염분

미생물을 분리하기 위해 생물 시료를 채집한 지역의 수온, pH 및 염분을 측정한 결과 수온은 25.8 ~ 28.6°C로 각 지역별로 아주 큰 차이를 보이고 있지는 않았다. pH는 8.15 ~ 8.56 범위로 전반적으로 약알카리성을 나타내었다. 염분 농도는 일반적으로 담수의 유입정도와 강우량, 증발량 등의 영향을 받는다. 평균적인 해수의 염분 농도는 32.5~34.3 ‰ 정도인데 조사지역은 31.4 ~ 32.88 ‰ 사이로 큰 변화를 나타내지는 않았다.

3.2.2. 용존산소와 화학적 산소요구량

용존산소(DO) 농도를 조사지역 별로 살펴보면 최저 농도는 Site B-6에서 5.88 mg/mL를 나타냈으며 최고는 Site C-8에서 7.9 mg/mL를 나타냈다. 화학적 산소요구량(COD)은 BOD와 더불어 주로 유기물질의 농도를 간접적으로 나타내는 지표이다. 일반적으로 KMnO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 와 같은 산화제를 이용하여 수중의 피산화물을 이용하여 산소량을 나타내는 것으로 해수 같이 무기물질을 함유하고 있을 경우 COD를 측정한다. 화학적 산소요구량(COD)은 Site B-7, C-9, C-11에서 0.48 mg/mL로 가장 낮은 농도를 나타냈으며, Site B-5에서 가장 높은 0.91 mg/mL의 농도를 나타냈다.

3.2.3. 영양염류

수중의 용존 물질이나 현탁입자 (세균이나 플랑크톤을 포함하는 미립자로 이루어진 유기물질)들을 부유물질 (Suspended Solids; SS)이라 하는데 이들은 어폐류의 호흡을 방해하고, 물의 투명도를 저하시켜 광합성을 방해함으로써 수중의

광합성생물의 기초 생산력을 저하시키는 원인으로 작용한다. 조사지역의 SS는 최저 0.83 mg/mL에서 최고 3.9 mg/mL 농도를 나타내고 있다. 해역 수질 환경 기준 I 등급 즉 수산생물 서식, 양식 및 산란에 적합한 수질 기준으로 부유물질은 10 mg/L로 규정되어 있는데, 본 연구에서 조사된 12개 조사지역 표층의 SS 평균값이 I 등급 기준으로 조사되었다.

해수에서 총 질소는 암모니아성 질소($\text{NH}_3\text{-N}$), 질산성 질소($\text{NO}_3\text{-N}$), 아질산성 질소($\text{NO}_2\text{-N}$)의 합으로 나타내는데, 주로 암모니아성 질소와 질산성 질소가 대부분을 차지한다. 조사결과 총 질소값은 0.624 ~ 0.954 mg/mL 농도로 나타났다. 해수의 인산염 인 농도는 해양에 존재하는 생물체의 생산력을 제한하는 인자로 작용하는데 저 농도의 경우 플랑크톤 수의 증가를 억제함으로써 바다의 생산력을 제한하는 것으로 알려져 있다. 조사지역의 인산염 인 농도는 0.007 ~ 0.074 mg/mL 농도로 나타났다.

3.2.4. 종속영양세균

수서환경내의 종속영양세균은 해당 수역내의 유기물 양과 아주 밀접한 상관관계를 가지고 있다. 과량의 유기물이 유입되면 일시적으로 종속영양세균의 밀도가 급증하게 되어 순간적인 조류의 번식과 더불어 용존산소의 양이 줄어들어 심각한 혐기적 상태를 일으킬 수가 있다(Brock, 1997). 이렇듯 환경적인 면이나 생물학적인 면에서 미치는 영향이 크므로 이들의 밀도를 조사, 분석하면 수질환경을 관정할 때 지표로 쓰일 뿐만 아니라 수환경의 변화를 예측, 판단하는 자료로 활용할 수가 있다.

종속영양세균의 개체수에 의한 수서환경의 영양화 정도를 비교함에 있어서 개체수가 10^2 cfu/ml 이하이면 빈영양역, $10^3 \sim 10^4$ cfu/ml이면 부영양역, $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml 이면 과영양역 그리고 10^5 cfu/ml 이상이면 폐수역으로 구분한다(하 등, 1978). 본 연구에서 조사한 12 지역은 $2.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ CFU/ml 로 나타나 과영양역에 속하는 것으로 나타났다.

Table 6. Environmental factors and bacterial count according to sampling sites.

Factor	Tem (°C)	Salinity (%)	pH	DO (mg/L)	COD (mg/L)	SS (mg/L)	TIN (mg/L)	T-P (mg/L)	Bacterial count (CFU/ ml)
Site A-1	27.6	31.4	8.25	6.83	0.87	3.9	0.954	0.065	4.0×10^5
Site A-2	28.6	32.4	8.15	6.83	0.88	3.5	0.932	0.074	3.6×10^5
Site A-3	27.68	31.81	8.56	5.88	0.84	2.6	0.707	0.007	5.0×10^5
Site A-4	28.38	32.65	8.36	6.08	0.81	2.83	0.624	0.065	3.0×10^5
Site B-5	28.6	32.4	8.35	6.87	0.91	3.2	0.954	0.065	5.0×10^5
Site B-6	27.68	31.85	8.26	5.8	0.84	2.6	0.827	0.057	5.0×10^5
Site B-7	26.23	32.88	8.34	6.78	0.48	1.03	0.743	0.018	2.0×10^5
Site C-8	23.82	32.72	8.23	7.9	0.56	0.89	0.629	0.021	3.0×10^5
Site C-9	26.9	32.57	8.21	7.29	0.48	1.01	0.693	0.01	2.5×10^5
Site C-10	27.38	32.65	8.22	7.04	0.62	2.11	0.72	0.012	5.0×10^5
Site D-11	26.23	32.88	8.24	6.78	0.48	0.98	0.68	0.01	4.0×10^6
Site D-12	25.83	32.67	8.25	6.74	0.75	0.83	0.683	0.018	3.0×10^5

3.3. 분리균주의 특성

조간대에서 채집된 시료로부터 색소생성 미생물, 알칼리성 단백질분해효소 생성 미생물과 지질분해효소 생성 미생물을 각각 분리하였다.

3.3.1 색소생성 미생물

조간대 4개 지점 12개 지역에서 분리된 미생물은 총 850균주가 분리되었다. 그 중 색소생성 미생물은 136 균주로 전체 분리균주의 16%를 차지하였다. 분리균주들의 colony 색상은 yellow, red, orange, pink 혹은 violet 등으로 다양했으며 19균주는 그람양성균인 반면 그람음성균은 117균주로 대체적으로 그람음성균이 많이 분포하고 있었다. 운동성 실험에서는 총 136균주 중에 118균주에서 운동성이 관찰되었다. 분리균주들의 성장 온도는 4℃ ~ 40℃까지 범위에서 성장이 가능하였다. 염 농도 실험에서는 최저 0 %에서 최대 14.0 %의 염 농도에서도 성장이 가능한 내염성 미생물(JJM123과 JJM124)과 초기 생육 배지 염분 농도가 6% 이상이 되어야만 성장이 가능한 절대호염성 미생물(JJM36, JJM41, JJM93과 JJM133)도 존재하였다. 이 결과로 조간대의 미생물은 다양한 온도와 높은 염 농도에서도 성장이 가능하다는 것을 확인할 수가 있었다(Table 7-10). 또한 각 분리균주의 기본적인 생리, 생화학적 특성을 조사한 결과 일부 균주(JJM131, JJM82, JJM74, JJM54과 JJM114)를 제외하고는 모두 catalase 양성 반응을 나타내고 있었다(Table 11).

Table 7. Bacteria strains isolated in site A.

No.	Isolation site	Strain No.	Colony color	Gram stain	Motility	Growth at	
						NaCl(%)	Temp.(°C)
1		JJM24	Yellow	-	+	1.0 - 9.0	10 - 37
2		JJM25	Pink	-	+	1.0 - 6.0	10 - 30
3		JJM56	Orange	-	-	1.0 - 6.0	10 - 40
4	Site A-1	JJM57	Orange	-	+	0.5 - 10	4 - 40
5		JJM77	Orange	-	+	1.0 - 7.0	4 - 37
6		JJM78	Bright Orange	+	-	2.0 - 14	10 - 40
7		JJM133	Orange	-	+	6.0 - 9.0	10 - 37
8		JJM26	Pink	-	+	1.0 - 5.0	10 - 40
9		JJM27	Pink	-	+	0.5 - 7.0	4 - 37
10		JJM28	Beige	-	-	1.0 - 6.0	4 - 30
11	Site A-2	JJM79	Orange	-	+	1.0 - 6.0	4 - 30
12		JJM80	Yellow	-	+	4.0 - 11.0	10 - 37
13		JJM117	Orange	-	+	1.0 - 7.0	4 - 37
14		JJM118	Yellow	-	+	4.0 - 11.0	10 - 37
15		JJM29	Bright Orange	-	+	0.5 - 6.0	4 - 30
16	Site A-3	JJM30	Orange	-	+	1.0 - 7.0	4 - 37
17		JJM58	Orange	-	+	1.0 - 10	10 - 37

Table 8. Bacteria strain isolated in site B.

No.	Isolation site	Strain No.	Colony color	Gram stain	Motility	Growth at	
						NaCl(%)	Temp.(°C)
1		JJM3	Yellow	-	+	1.0 - 6.0	10 - 35
2		JJM6	Pink	-	-	1.0 - 9.0	10 - 37
3		JJM7	Yellow	-	+	1.0 - 7.0	15 - 40
4		JJM8	Yellow	-	+	1.0 - 7.0	4 - 37
5		JJM9	Pink	-	-	1.0 - 5.0	10 - 30
6		JJM10	Yellow	-	+	1.0 - 9.0	10 - 37
7		JJM11	Orange	-	-	1.0 - 6.0	10 - 45
8		JJM12	Yellow	+	-	1.0 - 7.0	10 - 40
9		JJM36	Orange	-	+	6.0 - 9.0	10 - 37
10		JJM37	Orange	-	+	0 - 6.0	10 - 30
11	Site B-5	JJM38	Incarnadine	-	+	1.0 - 7.0	4 - 37
12		JJM39	Violet	-	+	1.0 - 9.0	10 - 30
13		JJM64	Orange	-	+	1.0 - 10	10 - 37
14		JJM65	Orange	-	+	0.5 - 10	10 - 37
15		JJM66	Yellow	-	+	0.5 - 10	10 - 37
16		JJM92	Creamy	-	-	1.0 - 6.0	4 - 30
17		JJM93	Orange	-	+	6.0 - 9.0	10 - 37
18		JJM94	Violet	-	+	1.0 - 4.0	4 - 30
19		JJM95	Creamy	-	+	4.0 - 11.0	10 - 37
20		JJM126	Yellow	-	+	0.5 - 10	10 - 37
21		JJM127	Orange	-	+	1.0 - 9.0	10 - 37
22		JJM14	Creamy	-	+	1.0 - 7.0	15 - 37
23		JJM15	Violet	-	+	0 - 10	10 - 37
24		JJM16	Bright yellow	-	+	1.0 - 7.0	10 - 40
25		JJM40	Yellow	-	+	1.0 - 6.0	4 - 37
26		JJM41	Brown	-	+	6.0 - 9.0	10 - 37
27	Site B-6	JJM42	Brown	-	+	2.0 - 7.0	10 - 37
28		JJM43	Orange	-	+	1.0 - 6.0	4 - 37
29		JJM67	Brown	-	+	1.0 - 6.0	4 - 30
30		JJM96	Pink	+	+	1.0 - 14	10 - 40
31		JJM97	Orange	-	+	1.0 - 6.0	4 - 30
32		JJM98	Yellow	-	+	1.0 - 9.0	10 - 37

Table 8. Continue.

No.	Isolation site	Strain No.	Colony color	Gram stain	Motility	Growth at	
						NaCl(%)	Temp.(°C)
33		JJM99	Yellow	-	+	1.0 - 7.0	10 - 37
34		JJM100	Orange	-	+	1.0 - 7.0	4 - 37
35		JJM128	Yellow	-	-	2.0 - 5.0	4 - 30
37	Site B-6	JJM129	Creamy	-	+	1.0 - 9.0	10 - 37
38		JJM136	Orange	-	+	1.0 - 9.0	10 - 37
39		JJM137	Yellow	-	+	1.0 - 8.0	10 - 40
40		JJM138	Yellow	-	+	0.5 - 10	10 - 37
41		JJM17	Yellow	-	+	0.5 - 10	10 - 37
42		JJM18	Brown	-	+	1.0 - 9.0	4 - 37
43		JJM44	Orange	-	+	1.0 - 9.0	10 - 37
44		JJM45	Bright yellow	-	+	1.0 - 6.0	4 - 37
45		JJM102	Orange	+	+	0 - 12	4 - 40
46	Site B-7	JJM103	Yellow	-	+	0 - 7.0	4 - 40
47		JJM104	Brown	-	+	1.0 - 7.0	10 - 37
48		JJM130	Incarnadine	-	+	1.0 - 10	4 - 40
49		JJM131	Yellow	-	+	1.0 - 10	10 - 37
50		JJM132	Orange	-	+	1.0 - 7.0	4 - 37
51		JJM139	Green	-	+	1.0 - 10	4 - 40

Table 9. Bacteria strain isolated in site C.

No.	Isolation site	Strain No.	Colony color	Gram stain	Motility	Growth at	
						NaCl(%)	Temp.(°C)
1		JJM1	Yellow	+	-	1.0 - 7.0	10 - 40
2		JJM32	Orange	-	+	1.0 - 10	10 - 37
3		JJM33	Orange	-	+	1.0 - 7.0	4 - 37
4		JJM59	Yellow	+	+	0 - 12	4 - 40
5		JJM60	Orange	-	+	1.0 - 10	10 - 37
6		JJM61	Orange	-	+	1.0 - 7.0	4 - 37
7	Site C-8	JJM82	Green	-	+	1.0 - 7.0	10 - 37
8		JJM83	Yellow	-	+	1.0 - 6.0	4 - 37
9		JJM84	Orange	-	+	1.0 - 6.0	4 - 37
10		JJM85	Pink	-	-	1.0 - 12	10 - 40
11		JJM86	Bright Orange	+	+	1.0 - 14	10 - 40
12		JJM87	Orange	+	+	1.0 - 14	10 - 40
13		JJM119	Orange	-	+	1.0 - 7.0	4 - 37
14		JJM120	Yellow	-	-	2.0 - 5.0	4 - 30
15		JJM121	Yellow	-	+	0 - 4.0	10 - 37
16		JJM122	Creamy	-	-	1.0 - 12	10 - 37
17	Site C-9	JJM123	Orange	+	+	0 - 14	10 - 45
18		JJM124	Pale yellow	+	+	0 - 14	10 - 45
19		JJM125	Orange	-	+	1.0 - 12	4 - 40
20		JJM135	Brown	-	+	1.0 - 9.0	10 - 37
21		JJM134	Orange	-	-	0 - 5.0	4 - 37
22		JJM2	Creamy	-	+	1.0 - 6.0	10 - 35
23		JJM34	Yellow	-	+	1.0 - 9.0	10 - 37
24		JJM35	Light Green	-	+	1.0 - 10	10 - 37
25		JJM62	Deep Yellow	-	-	1.0 - 7.0	4 - 40
26	Site C-10	JJM63	Yellow	-	+	0 - 5.0	10 - 37
27		JJM88	Bright Green	-	+	1.0 - 7.0	15 - 40
28		JJM89	Yellow	-	-	1.0 - 7.0	4 - 40
29		JJM90	Green	-	+	1.0 - 6.0	4 - 30
30		JJM91	Incarnadine	-	+	1.0 - 8.0	4 - 40

Table 10. Bacteria strain isolated in site D.

No.	Isolation site	Strain No.	Colony color	Gram stain	Motility	Growth at	
						NaCl(%)	Temp.(°C)
1		JJM4	Orange-yellow	+	+	2.0 - 10	10 - 40
2		JJM19	Beige	+	+	0 - 7.0	4 - 40
3		JJM20	Creamy	+	+	1.0 - 12	10 - 40
4		JJM21	Creamy	+	+	1.0 - 10	10 - 40
5		JJM22	Creamy	+	+	1.0 - 10	10 - 40
6		JJM46	Orange-yellow	-	+	1.0 - 7.0	4 - 37
7		JJM47	Orange-yellow	-	+	1.0 - 7.0	4 - 37
8		JJM48	Bright red	-	+	0 - 6.0	4 - 40
9		JJM49	Red	-	+	1.0 - 6.0	4 - 30
10		JJM50	Yellow	-	+	1.0 - 9.0	10 - 37
11		JJM51	Yellow	-	+	0.5 - 10	10 - 37
12		JJM68	Pink	-	+	1.0 - 8.0	4 - 30
13	Site	JJM69	Orange	-	+	1.0 - 6.0	4 - 30
14	D-11	JJM70	Pink	-	+	1.0 - 10	10 - 37
15		JJM71-1	Green	-	+	1.0 - 12	4 - 37
16		JJM71-2	Pink	-	+	1.0 - 8.0	4 - 30
17		JJM72	Yellow	-	+	1.0 - 6.0	10 - 40
18		JJM73	Yellow	-	+	1.0 - 6.0	10 - 40
19		JJM74	Ivory	-	+	1.0 - 6.0	10 - 40
20		JJM105	Bright red	-	+	0 - 6.0	4 - 40
21		JJM106	Creamy	-	+	1.0 - 8.0	10 - 40
22		JJM107	Pink	-	+	1.0 - 10	10 - 37
23		JJM108	Yellow	+	+	1.0 - 12	10 - 45
24		JJM109	Yellow	+	+	1.0 - 12	10 - 45
25		JJM110	Red	-	+	0.5 - 10	10 - 37
26		JJM111	Yellow	+	-	1.0 - 7.0	10 - 40
27		JJM23	Creamy	+	-	1.0 - 14	10 - 40
28		JJM52	Yellow	-	+	0.5 - 10	10 - 37
29	Site	JJM53	Green	-	+	1.0 - 10	10 - 37
30	D-12	JJM54	Pink	-	+	1.0 - 7.0	10 - 40
31		JJM55	Yellow	-	+	0 - 7.0	4 - 40
32		JJM75	Orange	-	+	1.0 - 9.0	10 - 37

Table 10. Continue.

No.	Isolation site	Strain No.	Colony color	Gram stain	Motility	Growth at	
						NaCl(%)	Temp.(°C)
33		JJM76	Bright yellow	-	+	3.0 - 14	10 - 40
34		JJM112	Yellow	-	+	2.0 - 12	10 - 40
35		JJM113	Yellow	-	+	1.0 - 6.0	4 - 30
37	Site D-12	JJM114	Orange	-	+	1.0 - 7.0	10 - 40
38		JJM115	Yellow	-	+	3.0 - 14	10 - 40
39		JJM116	Orange	-	+	1.0 - 6.0	4 - 30
40		JJM140	Yellow	-	+	0.5 - 10	10 - 37

Table. 11. Physiological characteristics of pigment-producing isolates.

Strain No.	Oxi	Cat	Hydrolysis of:						Utilization of:			
			Gelatin	Starch	Urea	Agar	Tween 40	Tween 80	Man	Suc	Glu	Lac
JJM24	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
JJM25	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
JJM56	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
JJM57	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
JJM77	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
JJM78	+	+	-	+	-	-	-	-	+/-	+	+	-
JJM133	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
JJM26	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
JJM27	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
JJM28	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
JJM79	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
JJM80	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM117	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
JJM118	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM29	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM30	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
JJM58	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
JJM3	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
JJM6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM7	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
JJM8	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
JJM9	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
JJM10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
JJM11	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
JJM12	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM36	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
JJM37	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
JJM38	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
JJM39	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
JJM64	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
JJM65	-	+	-	+	-	-	+	+	+/-	-	+	-
JJM66	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
JJM92	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-

Table 11. Continue.

Strain No.	Oxi	Cat	Hydrolysis of:						Utilization of:				
			Gelatin	Starch	Urea	Agar	Tween	Tween	Man	Suc	Glu	Lac	
							40	80					
JJM93	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	
JJM94	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
JJM95	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM126	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
JJM127	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
JJM14	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
JJM15	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
JJM16	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM40	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
JJM41	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
JJM42	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
JJM43	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
JJM67	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
JJM96	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
JJM97	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
JJM98	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
JJM99	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
JJM100	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
JJM128	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
JJM129	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
JJM136	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
JJM137	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
JJM138	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
JJM17	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
JJM18	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
JJM44	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
JJM45	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
JJM102	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
JJM103	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
JJM104	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM130	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
JJM131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
JJM132	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
JJM139	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
JJM1	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM32	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
JJM33	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
JJM59	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
JJM60	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
JJM61	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
JJM82	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
JJM83	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
JJM84	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-

Table 11. Continue.

Strain No.	Oxi	Cat	Hydrolysis of:						Utilization of:			
			Gelatin	Starch	Urea	Agar	Tween	Tween	Man	Suc	Glu	Lac
							40	80				
JJM85	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM86	+	+	-	+	-	-	-	-	+/-	+	+	-
JJM87	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
JJM119	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
JJM120	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
JJM121	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
JJM122	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
JJM123	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
JJM124	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
JJM125	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
JJM134	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
JJM135	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
JJM2	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
JJM34	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
JJM35	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
JJM62	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
JJM63	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
JJM88	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM89	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
JJM90	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
JJM91	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
JJM4	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
JJM19	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
JJM20	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
JJM21	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
JJM22	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
JJM46	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
JJM47	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
JJM48	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JJM49	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
JJM50	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
JJM51	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
JJM68	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
JJM69	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
JJM70	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
JJM71-1	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
JJM71-2	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
JJM72	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-

Table 11. Continue.

Strain No.	Oxi	Cat	Hydrolysis of:						Utilization of:			
			Gelatin	Starch	Urea	Agar	Tween 40	Tween 80	Man	Suc	Glu	Lac
JJM73	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
JJM74	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
JJM105	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
JJM106	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
JJM107	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
JJM108	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
JJM109	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
JJM110	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
JJM111	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM23	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
JJM52	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
JJM53	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
JJM54	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
JJM55	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
JJM75	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
JJM76	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM112	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM113	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
JJM114	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
JJM115	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJM116	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
JJM140	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-

*Abbreviations: Oxi, oxidase; Cat, catalase; Man, mannose; Suc, sucrose; Glu, glucose; Lac, lactose.

3.3.1.1. 분리균주의 색소 특성

제주도 조간대에 서식하는 생물 및 모래, 저질토에서 일반적인 평판배양법으로 배양하였을 때 배지상에서 자라는 colony 색상으로 판단하여 색소를 생성하는 136균주를 분리하였다. 분리균주의 색소는 추출한 뒤 spectrophometer (survey scan)로 350-900 nm 범위에서 흡광도를 측정하여 carotenoid 또는 bacteriochlorophyll의 유무를 확인하였다(Fig. 2, Table 12). 카로티노이드는 자연계에서 가장 광범위하게 산재하는 색소군으로 노란색, 오렌지색, 빨간색 등을 나타낸다. 카로티노이드는 전형적으로 C₄₀ 탄화수소 골격으로 이루어져 있으며 그 중에는 산소를 포함하고, 이 관능기로 인해 cyclic 또는 acyclic의 xanthophyll을 형성하기도 한다. 미생물에 있어서, carotenoid는 호기성 또는 비호기성의 광합성 세균과 조류, 그리고 많은 균류 등에 존재한다. Carotenoid는 비타민 A의 전구물질로 작용을 하며, 또한 최근에 유해 활성 산소를 제거하는 항산화 효과가 기존에 알려진 비타민 E 보다 500배 뛰어난 것이 밝혀지면서 카로티노이드의 연구가 최근 활발히 진행되고 있다. 현재까지는 몇 종의 몇몇 카로티노이드 (β -carotene, lycopene, astaxanthin, canthaxanthin, β -apo-8-carotenal, β -apo-8-carotenal-ester)만이 화학적으로 합성 또는 발효를 통해 생산되고, 자연계에서는 단지 적은 개체에서만 추출되어 상업적으로 생산되어 왔다. 제주도 조간대 미생물 다양성에 관한 본 연구에서 확보된 색소형성 미생물 136균주 중 57균주가 carotenoid의 흡광 범위인 450-540 nm에서 peak를 나타내었다(Fig. 3). 반면 Chlorophyll은 중앙에 마그네슘(Mg)이 있는 사이클릭 테트라피롤(cyclic tetrapyrrole)구조이며 막 단백질과 비공유적으로 연결되어 있다. Cyanobacteria의 chlorophyll은 chlorophyll a로서 고등식물과 같은 진핵의 광합성 생물체에서 발견되는 것과 같다. Purple 및 green bacteria는 다른 진핵의 광합성 생물체에 존재하지 않는 bacteriochlorophyll을 가지고 있다. Bacteriochlorophyll은 화학적 구조에 따라 a, b, g와 c, d, e의 2개의 class로 나눌 수 있다. Purple bacteria는 종에 따라 bacteriochlorophyll a나 bacteriochlorophyll b중 한 가지 형태만을 가지고 있다. 이 중 일부는 pigment antenna에 존재하고, 나머지는 reaction center에 존재한다. Green bacteria는 두 가지 형태의 bacteriochlorophyll이 다른 양으로 존재하

는데, 주된 형태는 bacteriochlorophyll c, d 또는 e로서 이것은 광을 흡수하는 역할을 하며 소수의 형태는 bacteriochlorophyll a로써 이것은 reaction center에 존재한다.

Green bacteria의 3개의 bacteriochlorophyll(bacteriochlorophyll c, d, 및 e)이 화학적으로 차이를 나타내지만 분광학적 성질은 모두 cyanobacteria의 chlorophyll a와 매우 유사하다(흡수치의 범위는 약 800-900 nm). 대조적으로 purple bacteria의 bacteriochlorophyll a는 C₃와 C₄ 위치에, bacteriochlorophyll b는 C₃에 부가적인 H와의 결합으로 C₃, C₄ 사이에 이중 결합이 아닌 단일 결합이 형성되어 있으며 (saturated; 포화되어있으며), 이것 때문에 다른 chlorophyll과는 다른 분광학적 성질을 나타낸다. 하지만 조사된 전체균주에 대해서 Bacteriochlorophyll의 흡광 범위에 해당하는 흡광 peak는 나타나지 않았다.

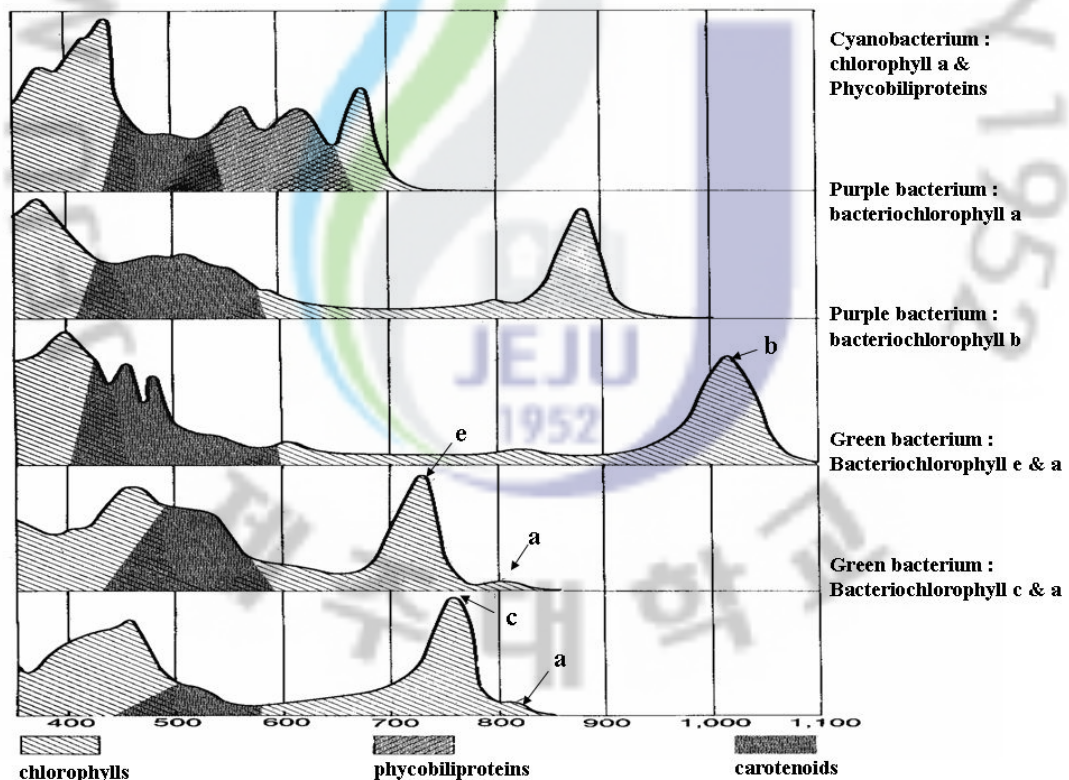


Fig. 2. Absorption spectra of various pigments showing the differences in absorption maxima.

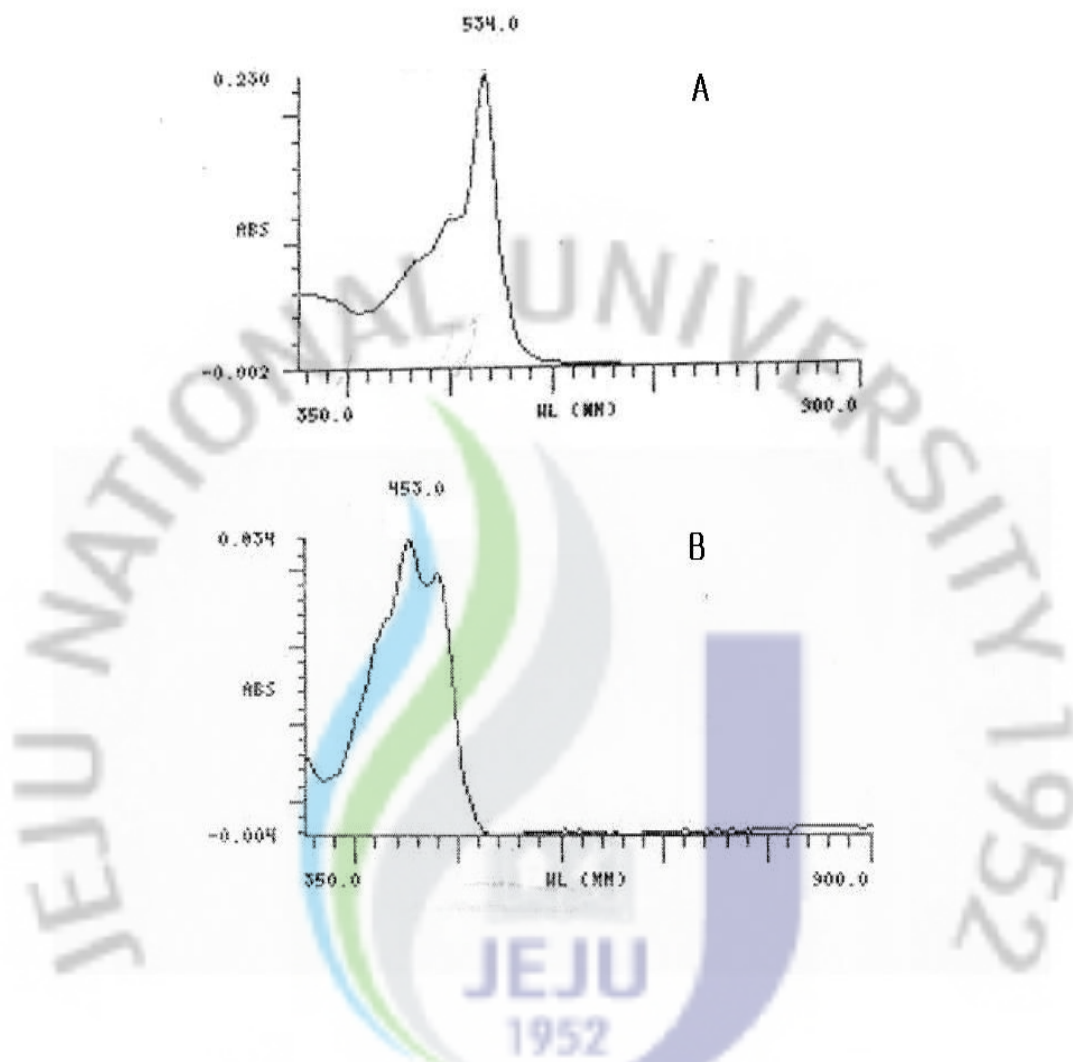


Fig. 3. Absorption spectra of methanolic extracts of isolates having carotenoids. A: JJM49 (red-colored colony), B: JJM62 (yellow-colored colony)

Table 12. Absortion spectrum of methanolic extracts of the isolates.

NO.	Strain No.	Amax(nm)	NO.	Strain No.	Amax(nm)	NO.	Strain No.	Amax(nm)
1	JJM24	453	47	JJM96	ND	93	JJM63	ND
2	JJM25	ND	48	JJM97	453	94	JJM88	ND
3	JJM56	453	49	JJM98	ND	95	JJM89	ND
4	JJM57	453	50	JJM99	ND	96	JJM90	ND
5	JJM77	453	51	JJM100	ND	97	JJM91	ND
6	JJM78	ND	52	JJM128	526	98	JJM4	453
7	JJM133	ND	53	JJM129	ND	99	JJM19	ND
8	JJM26	ND	54	JJM136	ND	100	JJM20	ND
9	JJM27	ND	55	JJM137	ND	101	JJM21	ND
10	JJM28	453	56	JJM138	453	102	JJM22	ND
11	JJM79	453	57	JJM17	453	103	JJM46	ND
12	JJM80	453	58	JJM18	ND	104	JJM47	ND
13	JJM117	453	59	JJM44	450	105	JJM48	ND
14	JJM118	453	60	JJM45	450	106	JJM49	534
15	JJM29	ND	61	JJM102	453	107	JJM50	453
16	JJM30	ND	62	JJM103	453	108	JJM51	453
17	JJM58	ND	63	JJM104	526	109	JJM68	ND
18	JJM3	453	64	JJM130	ND	110	JJM69	ND
19	JJM6	ND	65	JJM131	ND	111	JJM70	ND
20	JJM7	ND	66	JJM132	ND	112	JJM71-1	ND
21	JJM8	ND	67	JJM139	534	113	JJM71-2	ND
22	JJM9	ND	68	JJM1	ND	114	JJM72	453
23	JJM10	453	69	JJM32	ND	115	JJM73	453
24	JJM11	453	70	JJM33	453	116	JJM74	ND
25	JJM12	453	71	JJM59	453	117	JJM105	456
26	JJM36	526	72	JJM60	453	118	JJM106	ND
27	JJM37	526	73	JJM61	526	119	JJM107	ND
28	JJM38	ND	74	JJM82	ND	120	JJM108	ND
29	JJM39	ND	75	JJM83	ND	121	JJM109	ND
30	JJM64	453	76	JJM84	ND	122	JJM110	456
31	JJM65	453	77	JJM85	ND	123	JJM111	ND
32	JJM66	453	78	JJM86	526	124	JJM23	ND
33	JJM92	ND	79	JJM87	526	125	JJM52	ND
34	JJM93	ND	80	JJM119	ND	126	JJM53	534
35	JJM94	ND	81	JJM120	ND	127	JJM54	ND
36	JJM95	ND	82	JJM121	ND	128	JJM55	ND
37	JJM126	526	83	JJM122	ND	129	JJM75	453
38	JJM127	453	84	JJM123	453	130	JJM76	ND
39	JJM14	ND	85	JJM124	ND	131	JJM112	453
40	JJM15	ND	86	JJM125	ND	132	JJM113	453
41	JJM16	526	87	JJM135	ND	133	JJM114	ND
42	JJM40	453	88	JJM134	ND	134	JJM115	ND
43	JJM41	470	89	JJM2	ND	135	JJM116	ND
44	JJM42	470	90	JJM34	453	136	JJM140	ND
45	JJM43	ND	91	JJM35	453			
46	JJM67	470	92	JJM62	453			

*Abbreviations: ND, not detect; Amax, absorbance maxima.

3.3.1.2. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 및 계통분석

제주도 조간대에서 분리된 색소생성 미생물의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 계통분류학적으로 어떤 division에 속하는지를 확인 하여 본 결과 제주도 동부지역 조간대에서 분리된 색소형성 미생물들은 *Proteobacteria* (문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Pseudoalteromonas*속 3균주 (JJM24, JJM56과 JJM58), *Shewanella*속 8균주 (JJM25, JJM27, JJM29, JJM30, JJM77, JJM79, JJM117과 JJM133) *Oceanisphaera*속 1균주 (JJM57), *Vibrio*속 1균주 (JJM28), *Proteobacteria* (문)/*Alphaproteobacteria*(강)의 *Kordiimonas*속 1균주(JJM26), *Firmicutes*(문)/*Bacilli* (강)의 *Bacillus*속 1균주 (JJM78), *Bacteroidetes*(문)/*Flavobacteria*(강)의 *Tenacibaculum*속 2균주 (JJM80과 JJM118)가 분리되었다(Fig. 4). Blast search를 통해 회수된 가장 근연종과의 염기서열 유사도 값은 Table 13과 같다. 제주도 동부지역 중 Site A-4 지역에서는 색소생성 미생물이 분리가 되지 않았다. JJM24, JJM56과 JJM58은 *P. marina* (AY563031), *P. atlantica* (AF173963) 및 *P. haloplanktis* (X67024)와 각각 99.0%, 99.5%과 99.0%의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보여 주었다. *Shewanella* 속 균주 JJM25 (*S. baltica* (AJ000214)), JJM27 (*S. pacifica* (AF500075)), JJM29 (*S. oneidensis* (AY881235)), JJM30 (*S. gaetbuii* (AY190533)), JJM77 (*S. gaetbuii* (AY190533)), JJM79 (*S. waksmanii* (AY170366)), JJM117 (*S. gaetbuii* (AY190533))과 JJM133 (*S. japonica* (AF145921)) 각각의 표준 종과 염기서열 유사도를 계산하였을 때 JJM25 균주를 제외하고는 99%이상 similarity 값을 나타내었다. 반면 JJM25는 *S. baltica* (AJ000214)와 97.02%의 염기서열 유사도를 나타내 신종 후보임을 시사하였다. JJM57은 *O. donghaensis* (DQ190441) 그리고 *O. litoralis* (AJ550470)와 각각 98.02%, 97.70%의 염기서열 유사도를 나타내어 또 다른 신종 후보임을 보여 주었다. JJM28은 *V. comitans* (DQ922915)와 99.80%, JJM26은 *K. gwangyangensis* (AY682384)와 99% 그리고 JJM78은 *B. hwajinpoensis* (AF541966)와 100% 유사도를 보여주었다. JJM80과 JJM118은 각각 *T. discolor* (AM411030)와 99.06%, 99.08%의 유사도를 나타내었고 JJM80과 JJM118 사이에서는 99.72%의 유사도를 보여주어 JJM80과 JJM118은 *T. discolor*에 소속된 균주들임을 시사하였다.

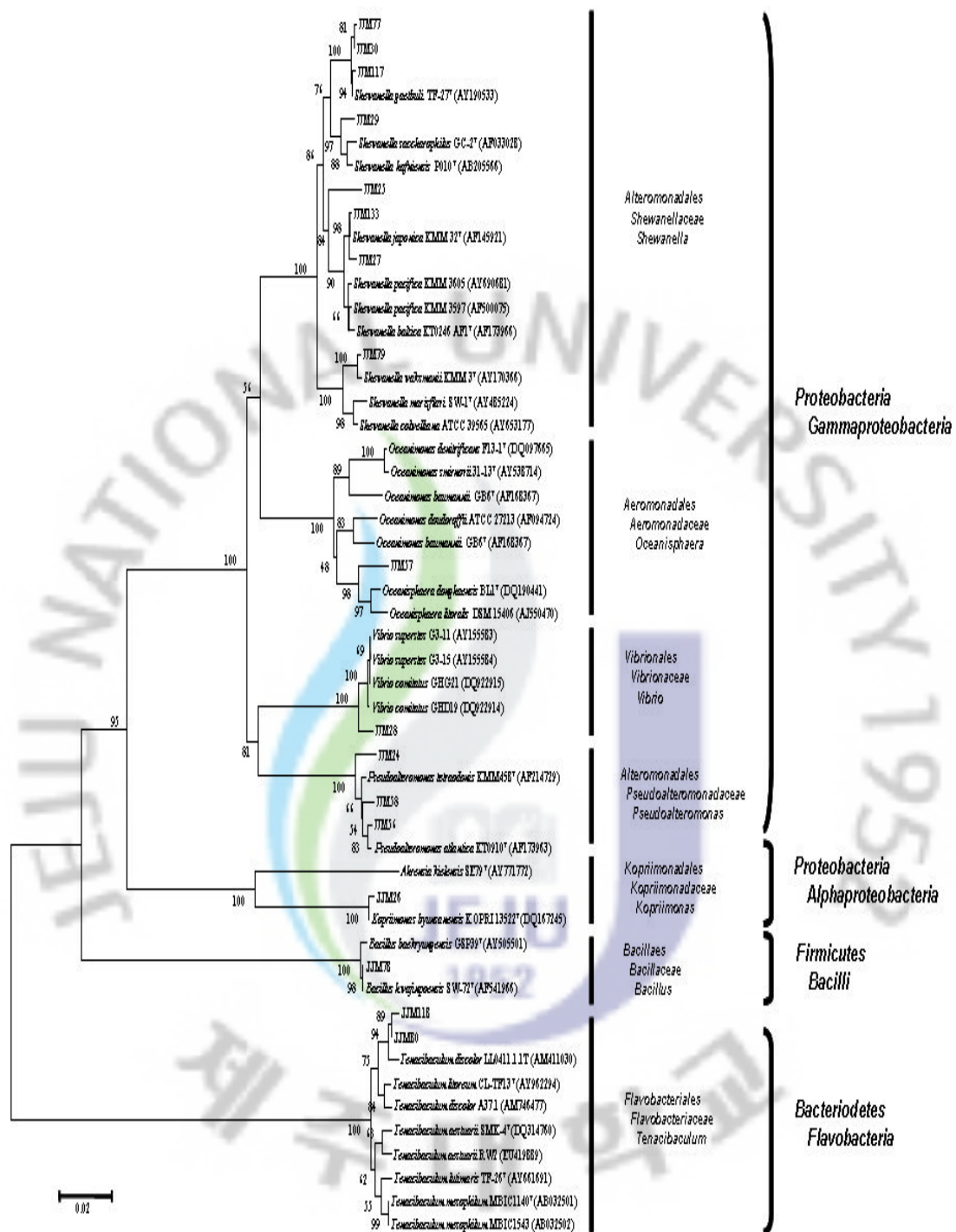


Fig. 4. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of pigment-producing bacteria Isolated from Site A(1, 2, 3, 4). The sequences were collected from 17 pigment-producing bacteria isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database.

Table 13. 16S rRNA gene sequence similarity values between pigment-producing bacteria (Site A) between their closest relatives.

Strain No.	Isolation site	Isolation sample	The closest species	Similarity (%)
JJM24		<i>Ulva pertusa</i>	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	98%
JJM25		<i>Laurencia okamurae</i>	<i>Shewanella baltica</i>	96%
JJM56		<i>Omphalius pfeifferi carpenteri</i>	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	98%
JJM57	A-1	<i>Laurencia okamurae</i>	<i>Oceanisphaera litoralis</i>	96%
JJM77		<i>Laurencia okamurae</i>	<i>Shewanella gaetbuli</i>	98%
JJM78		<i>Ulva pertusa</i>	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	98%
JJM133		<i>Laurencia okamurae</i>	<i>Shewanella japonica</i>	98%
JJM26		<i>Actinia equina</i>	<i>Kordiimonas gwangyangensis</i>	98%
JJM27		Sea sand	<i>Shewanella pacifica</i>	98%
JJM28		<i>cellana toreuma</i>	<i>Vibrio comitans</i>	98%
JJM79	A-2	Sea sand	<i>Shewanella waksmanii</i>	98%
JJM80		Sea sand	<i>Tenacibaculum discolor</i>	97%
JJM117		Sea sand	<i>Shewanella gaetbuli</i>	98%
JJM118		<i>Monodonta labio confusa</i>	<i>Tenacibaculum discolor</i>	97%
JJM29		<i>Monodonta neritoides</i>	<i>Shewanella oneidensis</i>	98%
JJM30	A-3	<i>Monodonta neritoides</i>	<i>Shewanella gaetbuli</i>	98%
JJM58		<i>Hizikia fusiformis</i>	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	98%

제주시 서부지역 조간대에서는 *Proteobacteria*(문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Pseudoalteromonas*속 16균주(JJM11, JJM17, JJM39, JJM44, JJM64, JJM65, JJM66, JJM94, JJM98, JJM126, JJM127, JJM129, JJM131, JJM136, JJM137과 JJM138), *Galciicola*속 1균주(JJM10), *Shewanella*속 8균주(JJM36, JJM38, JJM41, JJM67, JJM93, JJM97, JJM100과 JJM132), *Vibrio*속 3균주(JJM92, JJM103과 JJM128), *Alteromonas*속 3균주(JJM99, JJM130과 JJM139), *Proteobacteria*(문)/*Alphaproteobacteria*(강)의 *Loktanella*속 1균주(JJM6), *Tateyamaria*속 1균주(JJM9), *Roseobacter*속 1균주(JJM14), *Rhodovulum*속 1균주(JJM15), *Pseudovibrio*속 1균주(JJM42), *Phaeobacter*속 1균주(JJM18), *Bacteroidetes*(문)/*Flavobacteria*(강)의 *Winogradskyella*속 1균주(JJM3), *Cellulophaga*속 1균주(JJM8), *Formosa*속 1균주(JJM37), *Tenacibaculum*속 4균주(JJM7, JJM16, JJM95과 JJM104), *Polaribacter*속 3균주(JJM40, JJM43, JJM45), *Actinobacteria*(문)/*Actinobacteria*(강)/*Actinobacteridae*(sub강)의 *Micrococcus*속 1균주(JJM12), *Firmicutes*(문)/*Bacilli*(강)의 *Bacillus*속 1균주(JJM96), *Exiguobacterium*속 1균주(JJM102)가 분리되었다(Fig. 5-7). Blast search를 통해 회수된 가장 근연종과의 염기서열 유사도 값은 Table 14와 같다.

분리된 색소생성 균주 각각의 16S rRNA 염기서열을 Jukes & Cantor 모델을 이용하여 표준 종과 유사도를 계산하였을 때 JJM11 [(*P. spongiae* (AY769918)], JJM17 [(*P. flavipulchra* (AF297958)], JJM39 [(*P. haloplanktis* (X67024)], JJM44 [(*P. spongiae* (AY769918)], JJM64 [(*P. haloplanktis* (X67024)], JJM65 [(*P. flavipulchra* (AF297958)], JJM66 [(*P. flavipulchra* (AF297958)], JJM94 [(*P. tunicata* (DQ005908)], JJM98 [(*P. piscicida* (X82215)], JJM126 [(*P. flavipulchra* (AF297958)], JJM127 [(*P. spongiae* (AY769918)], JJM129 [(*P. marina* (AY563031)], JJM131 [(*P. haloplanktis* (X67024)], JJM136 [(*P. spongiae* (AY769918)], JJM137 [(*P. luteoviolacea* (X82144)], JJM138 [(*P. flavipulchra* (AF297958)]중 JJM39, JJM131과 JJM137을 제외하고는 표준균주와 99.42%이상 일치하였다. JJM39와 JJM131은 type strain인 *P. haloplanktis* (X67024)과 각각 97.05%의 염기서열 유사도를 나타내어 신종 후보임을 시사하였다. 또한 JJM39와 JJM131은 서로 99.50% 염기서열 유사도를 나타내어 동일종의 균주들로 판단된

다.

JJM137은 type strain *P. luteoviolacea* (X82144)와 97.0% 염기서열 유사도를 나타내어 또 다른 신종후보로 보여 진다. *Shewanella*속 8균주 JJM36, JJM38, JJM41, JJM67, JJM93, JJM97, JJM100과 JJM132은 *S. japonica* (AF145921)와 JJM(36, 41과 93)은 *S. gaetbuii* (AY190533)와 JJM(38, 100과 102)은 *S. waksmanii* (AY170366)와 JJM(67과 97)은 16S rRNA 염기서열이 각각 99.45 % 이상 일치하였다. 또한 JJM(36, 41과 93), JJM(38, 100과 102), JJM(67과 97)은 각각의 염기서열에 대해 99.80%, 99.70%, 99, 50% 일치하였다. *Vibrio*속 3균주 JJM92, JJM103과 JJM128은 *V. comitans* (DQ922915), *V. parahaemolyticus* (DQ164802) 및 *V. shilonii* (AF007115)와 각각 99.50%, 100%, 99.80% 일치하였다. *Alteromonas*속 3균주 JJM99, JJM130과 JJM139은 *A. macleodii* (AJ414399) 그리고 *A. genoviensis* (AM885866)와 각각 99.80%, 99.50% 일치하였고 JJM130와 JJM139는 서로 99.80% 염기서열 유사도를 나타내어 동일종의 균주들로 판단된다. *Loktanella*속 균주인 JJM6은 *L. agnita* (AY682198)와 99.89% 일치하였다. *Tateyamaria*속 균주 JJM9, *Roseobacter*속 균주 JJM14, *Rhodovulum*속 균주 JJM15, *Pseudovibrio*속 균주 JJM42, *Phaeobacter*속 균주 JJM18, *Winogradskyella*속 균주 JJM3, *Cellulophaga*속 균주 JJM8, *Formosa*속 균주 JJM37, *Micrococcus*속 균주 JJM12, *Bacillus*속 균주 JJM96 그리고 *Exiguobacterium*속 균주 JJM102는 각각의 표준균주인 *T. omphalii* (AB193438), *R. gallaeciensis* (Y13244), *R. sulfidophilum* (D16423), *P. ascidiaceicola* (AB175663), *P. inhibens* (AY177712), *W. eximia* (AY521225), *C. lytica* (D12666), *F. algae* (AY771766), *M. luteus* (AF542073), *B. infantis* (AY904032) 그리고 *E. oxidotolerans* (AB105164)와 99.50% 이상 일치하였다. *Tenacibaculum*속 균주 JJM7은 *T. mesophilum* (AB032501)과 99.70%, JJM16은 *T. mesophilum* (AB032501)과 98.20%, JJM95는 *T. gallaicum* (AM176578)과 98.20%, JJM104은 *T. mesophilum* (AB032501)과 98.10%의 염기서열 유사도를 나타내었다. JJM7과 JJM16, JJM7과 JJM104의 염기서열 유사도는 각각 98.80%, 98.75% 그리고 JJM16과 JJM104는 99.80%로 JJM16과 JJM104는 동일종의 균주들로 판단된다. *Polaribacter*속 3균주 JJM40, JJM43과 JJM45는 *P. dokdonensis* (DQ004686)와 각각 98.30%, 99.90%, 98.30% 일치하였으며 JJM40과

JJM45는 99.90% 일치하여 동일종의 균주들로 판단된다.

*Galciicola*속 균주인 JJM10은 *G. nitratrieducens* (AY787042)와 96.01%, *G. pallidula* (U85854)와 95.43% 그리고 *G. punicea* (U85853)와 93.63% 염기서열 유사도를 나타내어 *Galciicola*속의 신종일 가능성을 시사한다. 이에 화학적 분석과 분자생물학적 방법을 적용하여 기존에 보고되어진 *Galciicola*속 근연종들과 비교 분석이 요구되어진다.



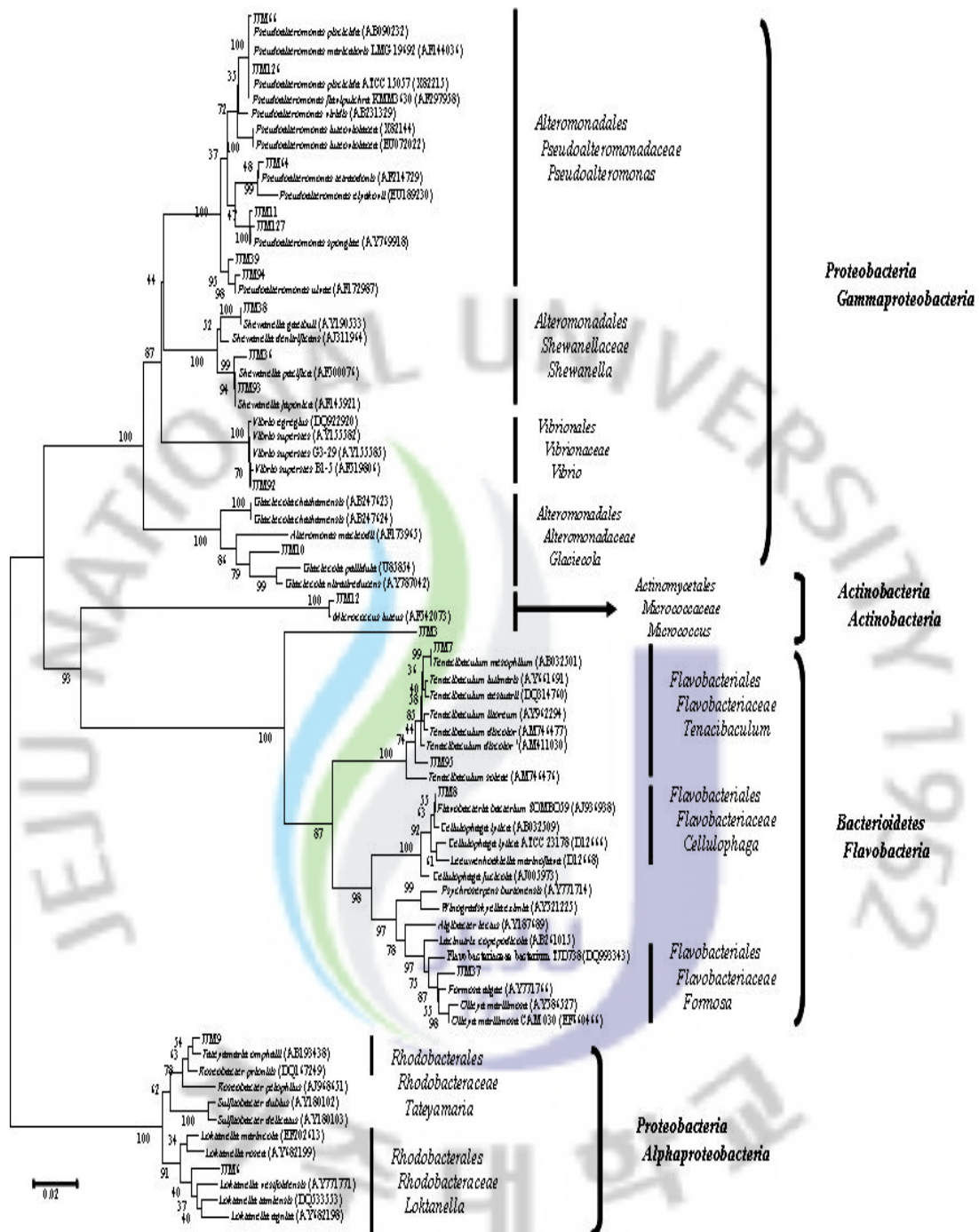


Fig. 5. Neighbor-joining tree of based on 16S rRNA gene sequences pigment-producing bacteria isolated from Site B-5. The sequences were collected from 21 pigment-producing bacteria isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database.

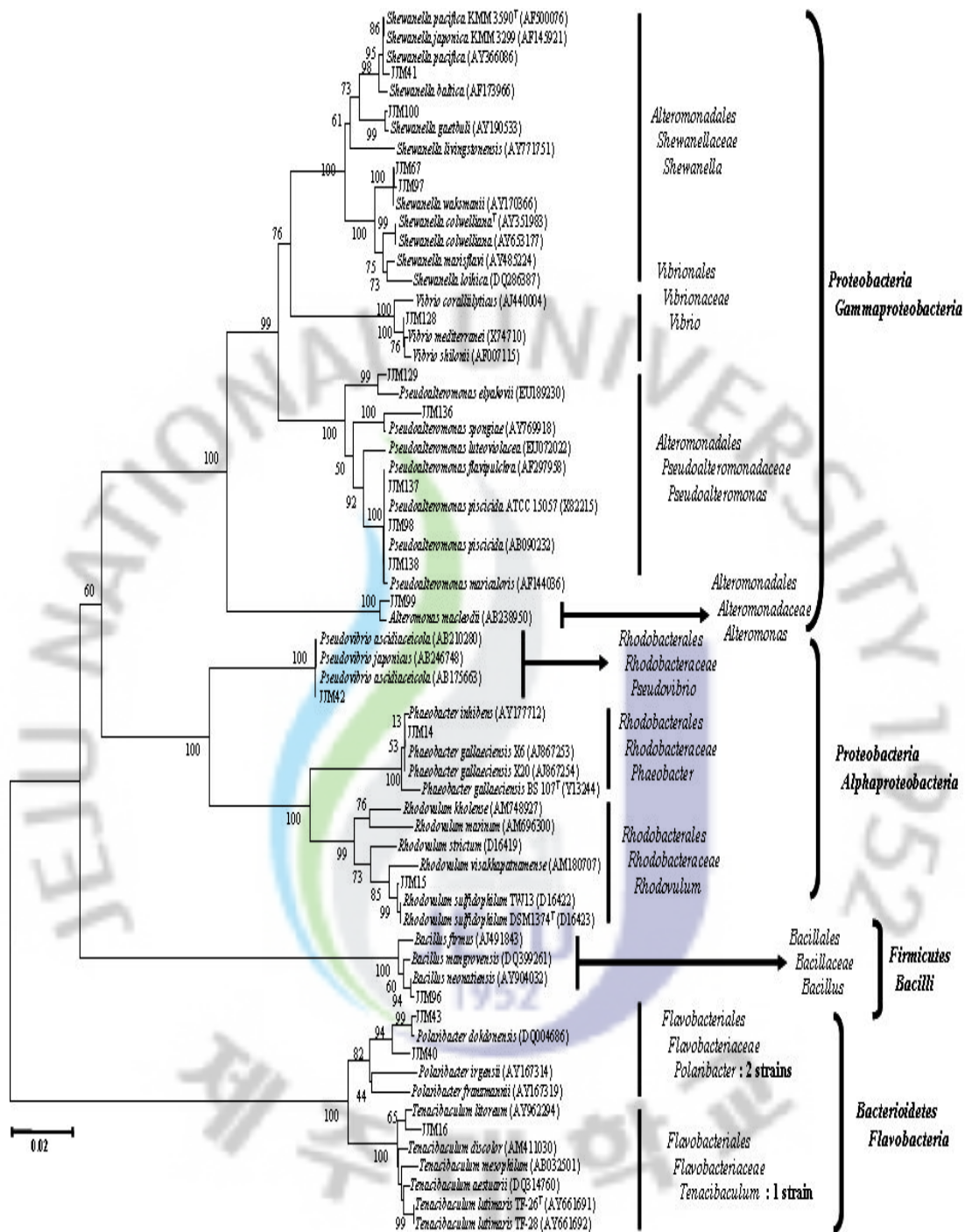


Fig. 6. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of pigment-producing bacteria isolated from Site B-6. The sequences were collected from 18 pigment-producing bacteria isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database.

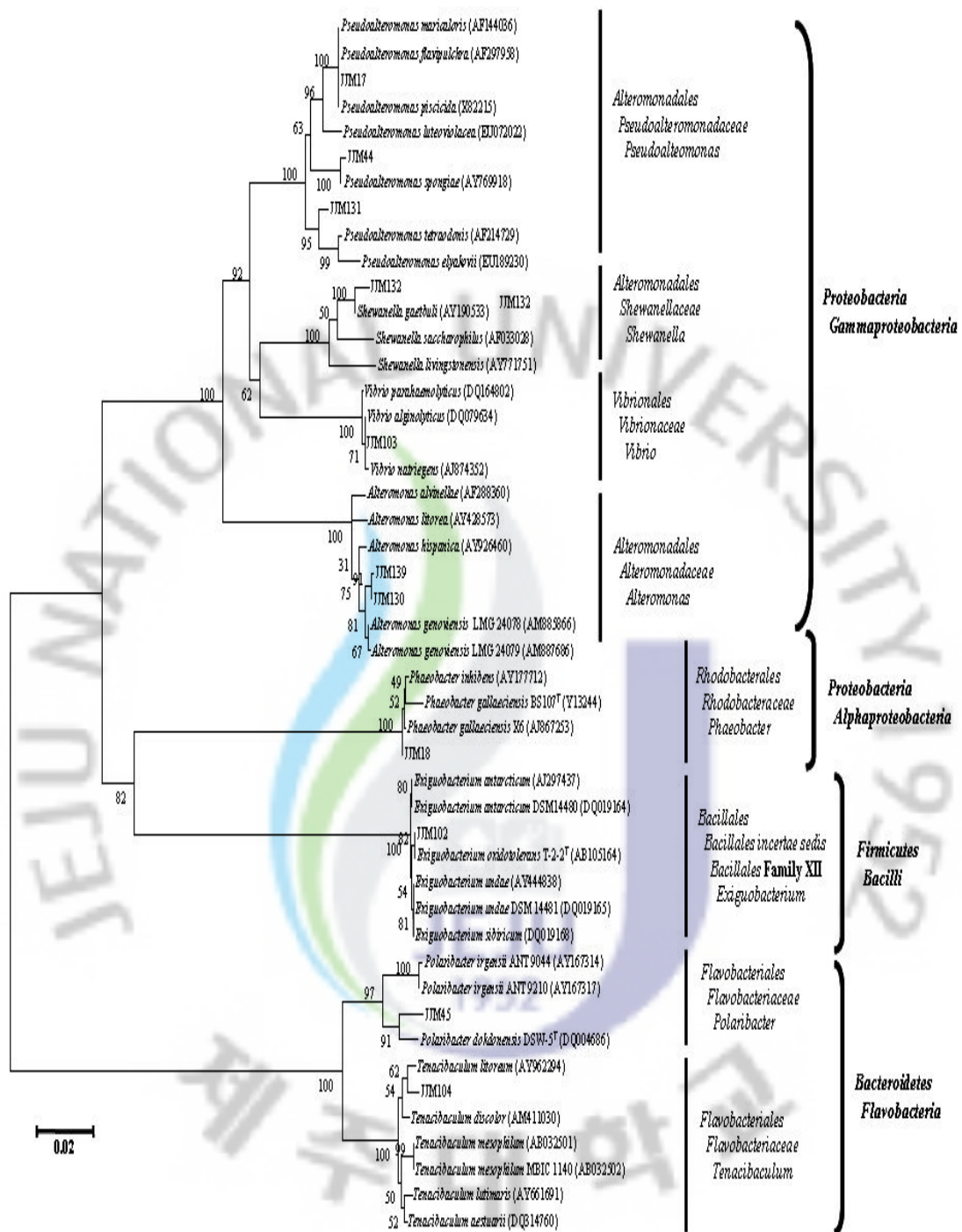


Fig. 7. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of pigment-producing bacteria isolated from Site B-7. The sequences were collected from 11 pigment-producing bacteria isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database.

Table 14. 16S rRNA gene sequence similarity values between pigment-producing bacteria (Site B) between their closest relatives.

Strain No.	Isolation site	Isolation sample	The closest species	Similarity (%)
JJM3		Sea sand	<i>Winogradskyella eximia</i>	98%
JJM6		Sea sand	<i>Loktanelia agnita</i>	99%
JJM7		Sea sand	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	98%
JJM8		Sea sand	<i>Cellulophga lytica</i>	99%
JJM9		Sea sand	<i>Tateyamaria omphalii</i>	98%
JJM10		<i>Balanus albicostatus</i>	<i>Glaciecola nitratireducens</i>	94%
JJM11		<i>Ischnochiton comptus</i>	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>	98%
JJM12		<i>Hypselodoris festiva</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	99%
JJM36		Sea sand	<i>Shewanella japonica</i>	97%
JJM37		<i>Balanus albicostatus</i>	<i>Formosa algae</i>	97%
JJM38	B-5	<i>Balanus albicostatus</i>	<i>Shewanella gaetbuli</i>	98%
JJM39		<i>Hypselodoris festiva</i>	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	96%
JJM64		<i>Hypselodoris festiva</i>	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	98%
JJM65		<i>Hypselodoris festiva</i>	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	99%
JJM66		<i>Hypselodoris festiva</i>	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	99%
JJM92		Sea sand	<i>Vibrio comitans</i>	99%
JJM93		<i>Balanus albicostatus</i>	<i>Shewanella japonica</i>	98%
JJM94		<i>Balanus albicostatus</i>	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i>	96%
JJM95		<i>Cucumaria chronhjelmi</i>	<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	96%
JJM126		<i>Cucumaria chronhjelmi</i>	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	99%
JJM127		<i>Hypselodoris festiva</i>	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>	98%
JJM14		<i>Halichondria japonica</i>	<i>Roseobacter gallaeciensis</i>	99%
JJM15		<i>Petrosia ushitsuensis</i>	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>	98%
JJM16		<i>Chromodoris orientalis</i>	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	96%
JJM40		Sea sand	<i>Polaribacter dokdonensis</i>	97%
JJM41		<i>Petrosia ushitsuensis</i>	<i>Shewanella japonica</i>	98%
JJM42	B-6	<i>Petrosia ushitsuensis</i>	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	98%
JJM43		<i>Ophiarachnella gorgonia</i>	<i>Polaribacter dokdonensis</i>	99%
JJM67		<i>Petrosia ushitsuensis</i>	<i>Shewanella waksmanii</i>	99%
JJM96		Sea sand	<i>Bacillus infantis</i>	98%
JJM97		<i>Lithophyllum okamurae</i>	<i>Shewanella waksmanii</i>	98%

Table 14. Continue

Strain No.	Isolation site	Isolation sample	The closest species	Similarity (%)
JJM98		<i>Codium arabicum</i>	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	99%
JJM99		<i>Halichondria japonica</i>	<i>Alteromonas macleodii</i>	98%
JJM100		<i>Petrosia ushitsuensis</i>	<i>Shewanella gaetbuli</i>	98%
JJM128		<i>Petrosia ushitsuensis</i>	<i>Vibrio shilonii</i>	99%
JJM129	B-6	<i>Chromodoris orientalis</i>	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	99%
JJM136		<i>Petrosia ushitsuensis</i>	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>	96%
JJM137		<i>Petrosia ushitsuensis</i>	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	93%
JJM138		<i>Petrosia ushitsuensis</i>	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	99%
JJM17		Sea sand	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	99%
JJM18		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Phaeobacter inhibens</i>	98%
JJM44		<i>Colpomenia sinuosa</i>	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>	98%
JJM45		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Polaribacter dokdonensis</i>	97%
JJM102		Sea sand	<i>Exgubacterium oxidotolerans</i>	99%
JJM103	B-7	<i>Colpomenia sinuosa</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99%
JJM104		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	96%
JJM130		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Alteromonas genoviensis</i>	98%
JJM131		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	96%
JJM132		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Shewanella gaetbuli</i>	97%
JJM139		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Alteromonas genoviensis</i>	98%

서귀포 동부지역에서 분리되어진 색소생성 미생물을 분류해 본 결과 *Proteobacteria* (문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Pseudoalteromonas*속에 포함되는 6균주(JJM32, JJM34, JJM35, JJM60, JJM125와 JJM134), *Shewanella*속 4균주(JJM33, JJM61, JJM90과 JJM119), *Pseudomonas*속 2균주(JJM63과 JJM121), *Microbulbifer*속 1균주(JJM122), *Vibrio*속 2균주(JJM91과 JJM120), *Alteromonas*속 1균주(JJM82)가 분리되었다. *Proteobacteria*(문)/*Alphaproteobacteria*(강)의 *Loktanellella*속에서 1균주(JJM85), *Paracoccus*속 3균주(JJM62, JJM89와 JJM135)가 분리되었다. Firmicutes(문)/Bacilli(강)의 *Bacillus*속에서 3균주(JJM86, JJM123과 JJM124), *Exiguobacterium*속 1균주(JJM59), *Marinibacillus*속 1균주(JJM87)가 분리되었다. *Actinobacteria*(문)/*Actinobacteria* (강)/*Actinobacteridae*(아강)의 *Micrococcus*속에서는 1균주(JJM1)가 분리되었다. *Bacteroidetes* (문)/*Flavobacteriia*(강)의 *Polaribacteriia*속 1균주(JJM83), *Donghaeana*속 1균주(JJM84), *Winogradskyella*속 1균주(JJM2), *Tenacibaculum*속에서 1균주(JJM88)가 분리 되었다 (Fig. 8). Table 15는 blast search를 통해 나타난 가장 근연종과의 염기서열 유사도 값을 나타내었다. 분리된 색소생성 균주 각각의 16S rRNA 유전자 염기서열을 Jukes & Cantor 모델을 이용하여 각 근연종의 표준균주와 비교하여 본 결과 *Pseudoalteromonas*속 균주 JJM32, JJM34, JJM35, JJM60, JJM125와 JJM134는 *P. haloplanktis* (X67024), *P. piscicida* (X82215), *P. atlantica* (AF173963), *P. spongiae* (AY769918)와 각각 99.20% 이상 서열이 일치하였다. 그 중 JJM32, JJM35와 JJM60는 blast search상에서 *P. haloplanktis* (X67024)와 근연종으로 검색이 되었는데 각각의 분리 균주끼리 염기서열 염기서열 유사도를 계산하여 보았을 때 서로 99.60%이상 일치하여 동일종의 균주들로 판단된다. *Shewanella*속 균주로 분류된 JJM33, JJM61과 JJM119는 *Shewanella*속 *S. gaetbuii* (AY190533)와 각각 92.30%, 99.50%, 99.54%의 염기서열 유사도를 나타내었다. JJM33 같은 경우는 *Shewanella*속의 신종일 가능성을 시사한다. JJM61과 JJM119는 *S. gaetbuii* (AY190533)와 동일종의 균주로 판단이 된다. JJM90은 *S. waksmanii* (AY170366)의 16S rRNA 유전자 서열과 99.50 % 일치하였다.

*Pseudomonas*속 균주 JJM63과 JJM121, *Microbulbifer*속 균주 JJM122, *Vibrio*속 균주 JJM91과 JJM120, *Alteromonas*속 균주 JJM82, *Paracoccus*속 균주 JJM62, JJM89와 JJM135, *Bacillus*속 균주 JJM86, JJM123과 JJM124, *Exiguobacterium*속 균주 JJM59,

*Marinibacillus*속 균주 JJM87, *Micrococcus*속 균주 JJM1, *Polaribacteria*속 균주 JJM83, *Tenacibaculum*속 균주 JJM88는 각각의 표준균주인 *P. oryzihabitans* (AF288732), *P. argentinensis* (AY691118), *M. cystodytense* (AJ620879), *V. harveyi* (EU251520), *V. shilonii* (AF007115), *A. macleodii* (AJ414399), *P. kamogawaensis* (AB275604), *P. marcusii* (AF194399), *B. aquimaris* (AF483625), *E. oxidotolerans* (AB105164), *M. marinus* (AJ237708), *M. luteus* (AF542073), *P. dokdonensis* (DQ004686), *T. mesophilum* (AB032501)와 각각 99.45% 이상 서열이 일치하였다.

반면 *Donghaeana*속 균주 JJM84와 *Winogradskyella*속 균주 JJM2는 각각의 표준균주인 *D. dokdonensis* (DQ017015)와 *W. eximia* (AY521225) 16S rRNA 유전자 염기서열과 95.00% ~ 96.02%의 염기서열 유사도를 나타내어 신종일 가능성을 시사하였다. 또한 JJM85 같은 경우는 *Loktanella*속의 species로 보고되어진 *L. hongkongensis* (AY600300)와 95.99%, *L. marincola* (EF202613)와 94.1%, *L. rosea* (AY682199)와 93.88%, *L. koreensis* (DQ34498)와 93.88%, *L. agnita* (AY682198)와 93.79%, *L. salsilacus* (AJ440997)와 93.73%, *L. fryxellensis* (AJ582225)와 93.35%, *L. atrilutea* (AB246747)와 93.58% 그리고 *L. vestfoldensis* (AY771771)와 93.12% 염기서열 유사도를 나타내어 신종후보 균주로 판단된다.

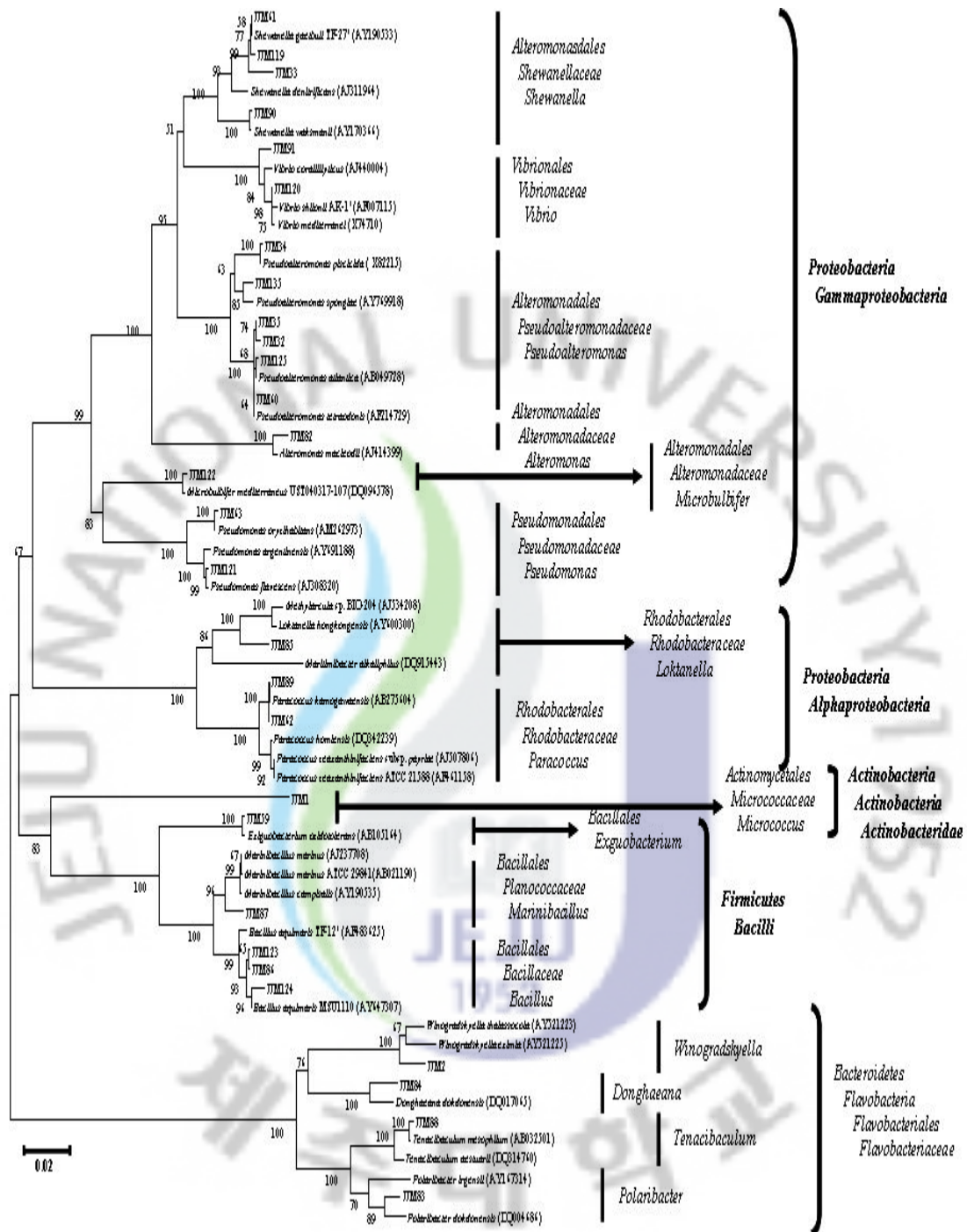


Fig. 8. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of pigment-producing bacteria isolated from Site C(8, 9, 10). The sequences were collected from 30 pigment-producing bacteria isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database.

Table 15. 16S rRNA gene sequence similarity values between pigment-producing bacteria (Site C) between their closest relatives.

Strain No.	Isolation site	Isolation sample	The closest species	Similarity (%)
JJM1		<i>Lomentaria catenata</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	98%
JJM32		<i>Heminerita Japonica</i>	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	98%
JJM33		<i>Heminerita Japonica</i>	<i>Shewnella gaetbuli</i>	90%
JJM59		Sea sand	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	98%
JJM60		<i>Nassarius livescens</i>	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	99%
JJM61		<i>Nassarius livescens</i>	<i>Shewnella gaetbuli</i>	98%
JJM82	C-8	<i>Nassarius livescens</i>	<i>Alteromonas macleodii</i>	98%
JJM83		<i>Batillus cornutus</i>	<i>Polaribacter dokdonensis</i>	97%
JJM84		<i>Batillus cornutus</i>	<i>Donghaeana dokdonensis</i>	95%
JJM85		Sea sand	<i>Loktanella hongkongensis</i>	94%
JJM86		Sea sand	<i>Bacillus aquimaris</i>	99%
JJM87		Sea sand	<i>Marinibacillus marinus</i>	98%
JJM119		<i>Nassarius livescens</i>	<i>Shewnella gaetbuli</i>	98%
JJM120		<i>Batillus cornutus</i>	<i>Vibrio shilonii</i>	99%
JJM121		Sea sand	<i>Pseudomonas argentinensis</i>	98%
JJM122		Sea sand	<i>Microbulbifer hydrolyticus</i>	98%
JJM123	C-8	Sea sand	<i>Bacillus aquimaris</i>	98%
JJM124	C-8	Sea sand	<i>Bacillus aquimaris</i>	98%
JJM125		<i>Aplysia kurodai</i>	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	99%
JJM134		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>	97%
JJM135		<i>Batillus cornutus</i>	<i>Paracoccus marcusii</i>	99%
JJM2		<i>Aplysia kurodai</i>	<i>Winogradskyella sp.</i>	95%
JJM34		<i>Lithophyllum okamurae</i>	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	98%
JJM35		<i>Aplysia kurodai</i>	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	98%
JJM62		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Paracoccus kamogawaensis</i>	98%
JJM63	C-9	<i>Aplysia kurodai</i>	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	98%
JJM88		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	99%
JJM89		Sea sand	<i>Paracoccus kamogawaensis</i>	99%
JJM90		<i>Aplysia kurodai</i>	<i>Shewnella waksmanii</i>	98%
JJM91		<i>Aplysia kurodai</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	98%

서귀포 서부지역 조간대에서 분리되어진 색소생성 미생물은 *Proteobacteria* (문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Pseudoalteromonas*속의 12균주(JJM46, JJM47과 JJM50, JJM51, JJM52, JJM53, JJM70, JJM75, JJM106, JJM107, JJM110과 JJM140), *Shewanella*속 6균주(JJM49, JJM68, JJM69, JJM71-2, JJM113과 JJM116), *Alteromonas*속 3균주(JJM72, JJM73과 JJM74), *Serratia*속 2균주(JJM48과 JJM105), *Vibrio*속 1균주(JJM55)가 분리 되었다. *Firmicutes*(문)/*Bacilli*(강)의 *Bacillus*속 6균주(JJM4, JJM20, JJM21, JJM22, JJM108과 JJM109), *Sporosarcina*속 1균주(JJM19), *Bacteroidetes*(문)/*Flavobacteria*(강)의 *Tenacibaculum*속 3균주(JJM76, JJM112와 JJM115), *Bacteroidetes*(문)/*Sphingobacteria*(강)의 *Flexibacter*속 1균주(JJM71-1), *Persicobacter*속 2균주(JJM54와 JJM114)가 분리되었다(Fig. 9). Table 16은 blast search를 통해 나타난 가장 근연종과의 염기서열 유사도 값을 나타내었다. 분리된 색소생성 미생물 각각의 16S rRNA 유전자 염기서열은 Jukes & Cantor 모델을 이용하여 각 근연종의 표준균주들과 비교하여 본 결과 JJM46, JJM47, JJM50, JJM51, JJM52, JJM53, JJM70, JJM75, JJM106, JJM107, JJM110과 JJM140는 *Pseudoalteromonas*속 *P. citrea* (AF083563), *P. piscicida* (X82215), *P. flavipulchra* (AF297958), *P. viridis* (AB231329), *P. luteoviolacea* (X82144), *P. spongiae* (AY769918)와 99.25% ~ 99.89%까지 염기서열 유사도를 보여 주었다. JJM49, JJM68, JJM69, JJM71-2, JJM113과 JJM116는 *Shewanella*속 *S. waksmanii* (AY170366), *S. fidelia* (AY170369)와 99.80%이상 16S rRNA 유전자 서열의 일치하였다. JJM72, JJM73과 JJM74는 *Alteromonas*속 *A. litorea* (AY428573)과 99.69% 이상 일치하였고 JJM72, JJM73과 JJM74 서로의 염기서열 유사도는 99.50% ~ 99.89% 일치하여 동일종의 균주로 판단된다. JJM48과 JJM105는 *S. marcescens* (AY927645) 16S rRNA 유전자 염기서열과 99.89% 일치하여 동일종의 균주로 판단된다.

*Vibrio*속 균주 JJM55, *Sporosarcina*속 균주 JJM19, *Tenacibaculum*속 균주 JJM76, JJM112, JJM115), *Flexibacter*속 균주 JJM71-1, *Persicobacter*속 균주 JJM54, JJM114는 각각의 표준균주인 *V. parahaemolyticus* (DQ164802), *S. saromensis* (AB243859), *T. cellulophagum* (AF469612), *T. mesophilum* (AB032501), *Flexibacter echinica* (AY006466), *Persicobacter diffluens* (M58765)와 99.65%

일치하여 동일종의 균주로 판단되어진다. *Bacillus*속으로 분류되어진 균주 JJM4는 *B. aquimaris* (AF483625)와 99.80% JJM20은 *B. megaterium* (EU169176)와 99.78%, JJM21과 JJM22는 *B. pumilus* (AB098578)와 99.88%, JJM108과 JJM109는 *B. circulans* (EU124560)와 99.78%의 염기서열 유사도를 나타내었다. 또한 JJM21과 JJM22의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도가 99.89%, JJM108과 JJM109는 99.90%의 염기서열 유사도를 나타내어 동일종의 균주로 판단된다.



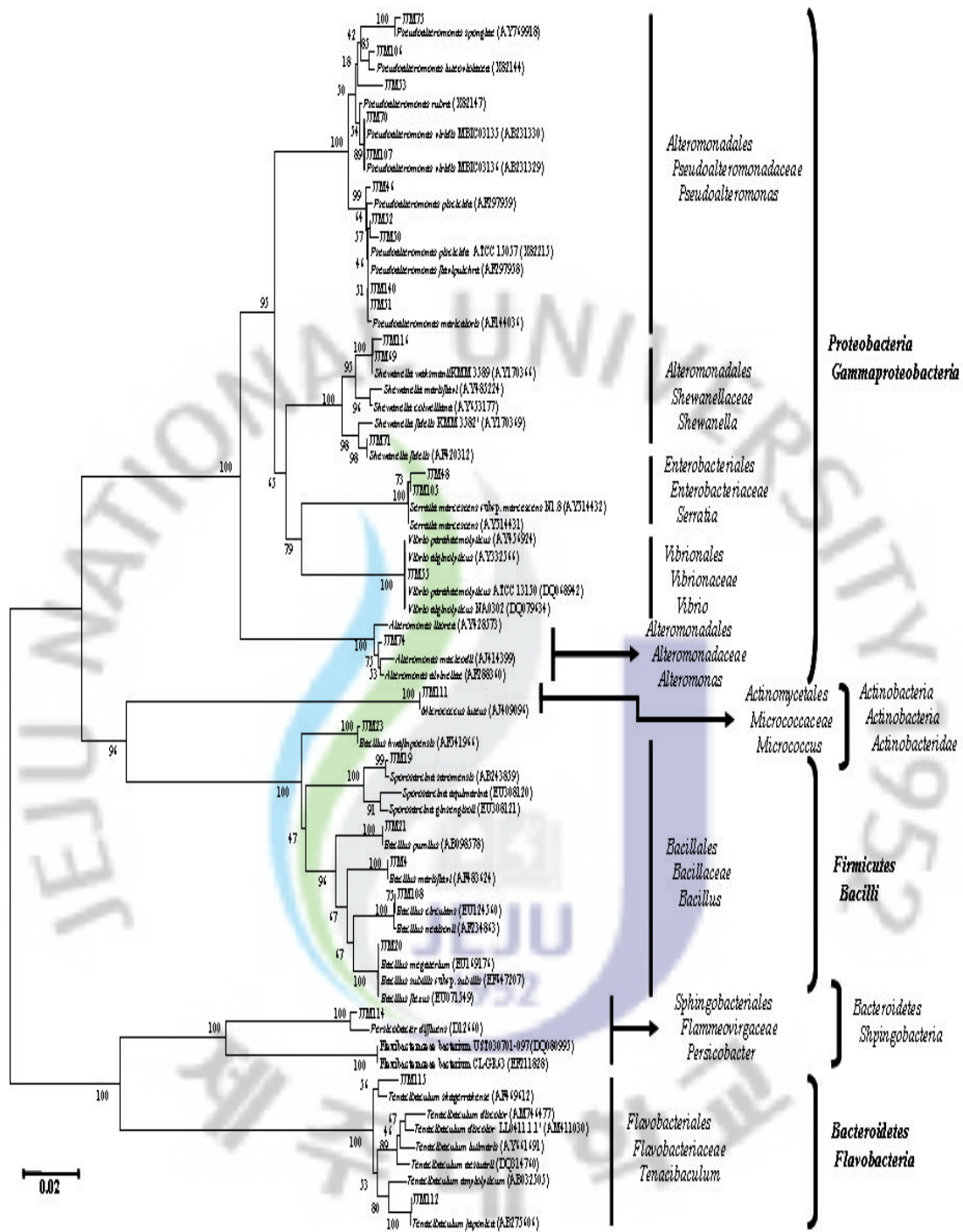


Fig. 9. Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of pigment-producing bacteria isolated from Site D(11, 12). The sequences were collected from 38 pigment-producing bacteria isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database.

Table 16. 16S rRNA gene sequence similarity values between pigment-producing bacteria (Site D) between their closest relatives.

Strain No.	Isolation site	Isolation sample	The closest species	Similarity (%)
JJM4		Sea sediment	<i>Bacillus aquimaris</i>	100%
JJM19		Sea sediment	<i>Sporosarcina saromensis</i>	99%
JJM20		Sea sediment	<i>Bacillus megaterium</i>	99%
JJM21		Sea sand	<i>Bacillus pumilus</i>	99%
JJM22		Sea sand	<i>Bacillus pumilus</i>	99%
JJM46		<i>Sargassum thunbergii</i>	<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	99%
JJM47		<i>Sargassum thunbergii</i>	<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	98%
JJM48		<i>Aplysia juliana</i>	<i>Serratia marcescens</i>	98%
JJM49		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Shewnella waksmanii</i>	99%
JJM50		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	98%
JJM51		<i>Nerita(Heminerita) Japonica</i>	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	98%
JJM68		<i>Anthopleura midori</i>	<i>Shewnella fidelia</i>	99%
JJM69	D-11	<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Shewnella waksmanii</i>	99%
JJM70		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Pseudoalteromonas viridis</i>	99%
JJM71-1		<i>Halichondria japonica</i>	<i>Flexibacter echinocida</i>	99%
JJM71-2		<i>Halichondria japonica</i>	<i>Shewnella fidelia</i>	99%
JJM72		<i>Haliclona permollis</i>	<i>Alteromonas litorea</i>	99%
JJM73		<i>Nerita(Heminerita) Japonica</i>	<i>Alteromonas litorea</i>	98%
JJM74		<i>Nerita(Heminerita) Japonica</i>	<i>Alteromonas litorea</i>	98%
JJM105		<i>Sargassum thunbergii</i>	<i>Serratia marcescens</i>	99%
JJM106		Sea sediment	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	98%
JJM107		<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Pseudoalteromonas viridis</i>	99%
JJM108	<i>Halichondria japonica</i>	<i>Bacillus circulans</i>	99%	
JJM109	<i>Halichondria japonica</i>	<i>Bacillus circulans</i>	99%	
JJM110	Sea sand	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	99%	
JJM111	<i>Nerita(Heminerita) Japonica</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	99%	
JJM23		Sea sand	<i>Bacillus baekryungensis</i>	99%
JJM52		Sea sand	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	98%
JJM53	D-12	Sea sand	<i>Pseudoalteromonas viridis</i>	97%
JJM54		<i>Ischnochiton comptus</i>	<i>Persicobacter diffluens</i>	98%
JJM55		<i>Halichondria panicea</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99%

Table 16. Continue.

Strain No.	Isolation site	Isolation sample	The closest species	Similarity (%)
JJM75		Sea sand	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>	98%
JJM76		<i>Ischnochiton comptus</i>	<i>Tenacibaculum cellulophagum</i>	97%
JJM112		Sea sand	<i>Tenacibaculum japonica</i>	99%
JJM113		Sea sand	<i>Shewnella waksmanii</i>	99%
JJM114	D-12	<i>Ischnochiton comptus</i>	<i>Persicobacter diffluens</i>	97%
JJM115		<i>Ischnochiton comptus</i>	<i>Tenacibaculum cellulophagum</i>	97%
JJM116		<i>Halichondria panicea</i>	<i>Shewnella waksmanii</i>	99%
JJM140		<i>Halichondria panicea</i>	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	99%

제주도 조간대 4개 지역 총 12개 지점에서 분리되어진 136개의 색소 생성 미생물 중 대부분의 미생물은 *Proteobacteria/Gammaproteobacteria* 그룹(64%)에 속하였으며 다음으로 *Bacteroidetes/Flavobacteria* 그룹(13.0%), *Proteobacteria/Alphaproteobacteria*(8.0%), *Firmicutes/Bacilli* 그룹(10.8%), *Bacteroidetes/Sphingobacteria* 그룹(2.1%) 그리고 *Actinobacteria* 그룹(2.1%) 그룹에 속하는 것으로 나타났다(Fig 10).

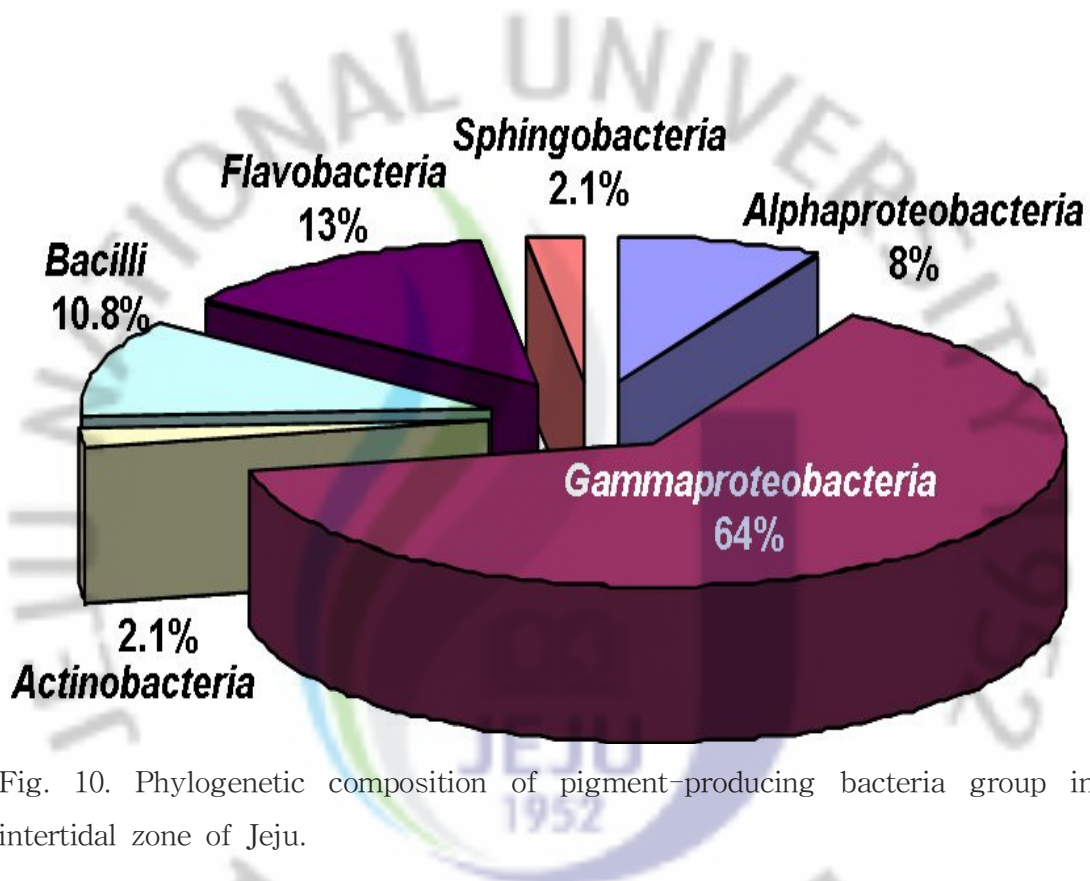


Fig. 10. Phylogenetic composition of pigment-producing bacteria group in intertidal zone of Jeju.

각각의 분류 그룹을 genus 별로 나누어 보면 다음과 같이 나누어 볼 수 있다. 이번 연구에서 분리되어진 색소생성 미생물에서 가장 많은 균주가 분리(64.0%) 되어진 *Proteobacteria*문의 *Gammaproteobacteria* 강 내에서는 *Pseudoalteromonas* 속이 42.0%를 차지하고 다음으로 *Shewanella*속이 29.5%, *Alteromonas*속과 *Vibrio* 속이 10.2%를 차지하고 나머지 속은 3% 미만이었다(Fig. 11).

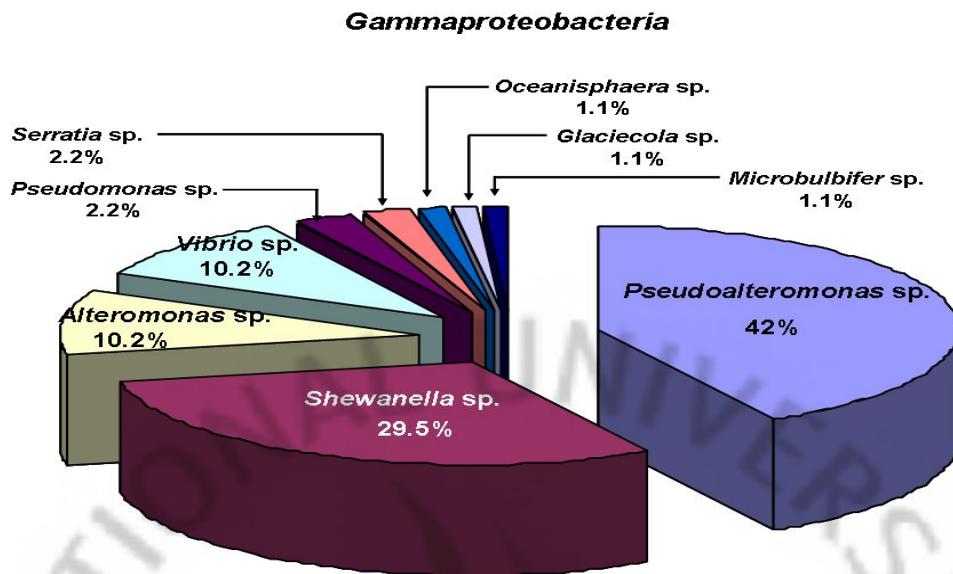


Fig. 11. Phylogenetic composition of *Gammaproteobacteria* group among pigment-producer.

제주도 조간대에서 분리 되어진 미생물 중 13.0%를 차지하는 *Bacteroidetes*문의 *Flavobacteria* 장 내에서는 *Tenacibaculum*속의 50.0%로 가장 많은 부분을 차지하고 있다. 다음으로 *Polaribacter*속이 22.2%를 차지하였다(Fig. 12).

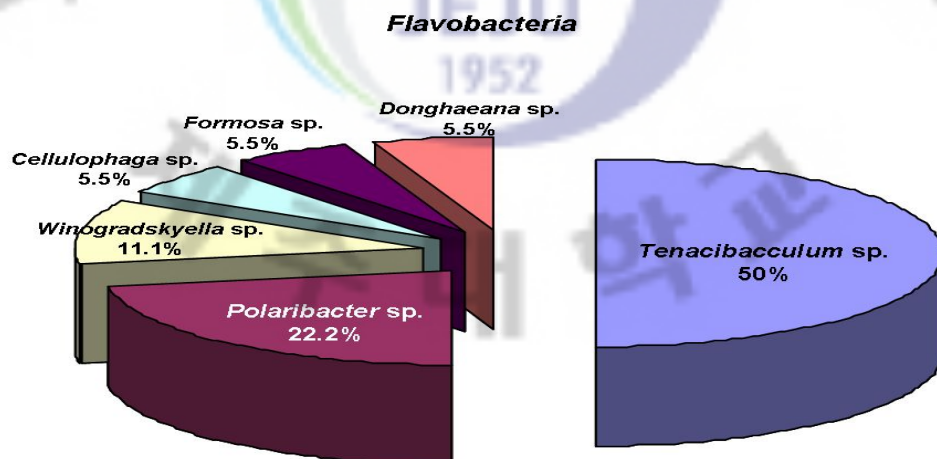


Fig. 12. Phylogenetic composition of *Flavobacteria* group among pigment-producer.

제주도 조간대에서 분리 되어진 미생물 중 10.8%를 차지하는 *Firmicutes*문의 *Bacilli* 강에서는 *Bacillus*속의 73.3%로 가장 많은 부분을 차지하고 다음으로 *Exiguobacterium*속의 13.3%를 차지하였다. *Marinibacillus*속과 *Sporosarcina* 속은 각각 6.7%를 차지하였다(Fig. 13).

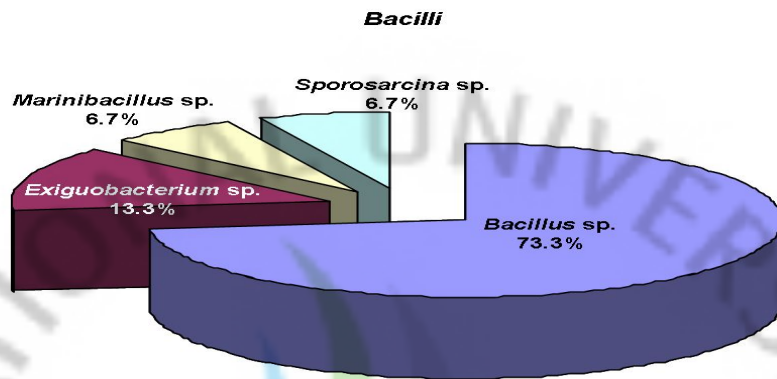


Fig. 13. Phylogenetic composition of *Bacilli* group among pigment-producer.

제주도 조간대에서 분리 되어진 미생물 중 8 %를 차지하는 *Proteobacteria*문의 *Alphaproteobacteria* 강 내에서는 *Paracoccus* 속의 27.2%, *Loktanella*속의 18.2%, *Kordiimonas*속, *Tateyamaria*속, *Roseobacter*속, *Rhodovulum*속, *Pseudovibrio*속, *Phaeobacter*속의 각각 9.1%를 차지하였다(Fig. 14).

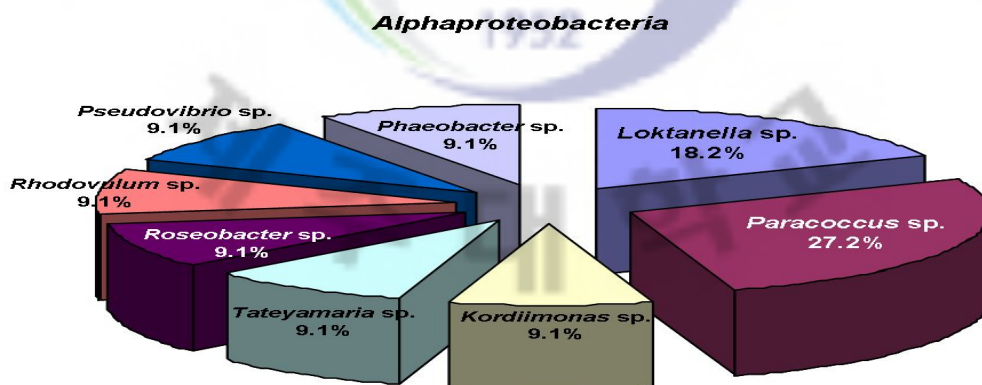


Fig. 14. Phylogenetic composition of *Alphaproteobacteria* group among pigment-producer.

분리 되어진 미생물 중 2.1%를 차지하는 *Bacteroidetes*문의 *Sphingobacteria* 강 내에서는 *Persicobacter*속의 66.6%, *Flexibacter*속이 33.4%를 차지하고 *Actinobacteria*문의 *Actinobacteria* 강 내에서는 *Micrococcus*속의 *Micrococcus leuteus* 3균주가 분리 되었다.



3.3.2. 생리적 특성군

3.3.2.1 단백질 분해효소 생성 미생물의 특성

단백질 분해효소(Protease)는 동물, 식물 및 미생물계에 광범위하게 분포되어 있으며, 모든 생체기능에 직·간접적으로 관여한다. 그러나 이상 환경에 의하여 다양한 질병 유발과정에 관여하며, 생명현상과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다 (Barrett and Salvesen, 1986). 또한 단백질 분해효소는 다른 단백질의 아미노산 간 peptide 결합을 가수분해하는 효소이며 전 세계적으로 공업효소 판매량의 60% 를 차지하고 있다(Rao *et al.*, 1998). 현재 산업적으로 사용되는 대부분의 단백질 분해효소는 생물 공학적 응용에 필요한 모든 특성을 만족시켜 주는 미생물 유래의 효소가 많이 사용되며(Godfrey and West, 1996) 상업적으로 *Bacillus* 로부터 생산되는 중성 또는 알칼리성 효소들이 대부분 이용된다. 미생물 유래의 알칼리성 효소들은 세제산업에 이용되어 최적 온도가 60 °C로 높은 반면, 중성효소들은 낮은 열안정성과 반응속도가 빠르지 않아 단백질의 가수분해정도를 조절할 수 있고, 가수분해시 쓴맛을 적게 내어 식품공업에서 많이 이용되고 있다(Rao *et al.*, 1998). *Bacillus* sp. 외에도 *Vibrio* (Denkin and Nelson, 1999., Kothary and Kreger, 1985), *Serratia* (Kwon *et al.*, 1993), *Pseudomonas* (Fukushima *et al.*, 1989), *Pseudoaltermonas* (차 등, 2007., Lee *et al.*, 2002), *Streptomyces* (Henderson *et al.*, 1987), *Brevibacterium* (Rattray *et al.*, 1995), *Kocuria* sp. (Hinrichsen *et al.*, 1994)의 균주들과 치즈류에서도 체외 단백질 분해효소를 분비하는 *Micrococcus* sp. (Fernsdez *et al.*, 1996., Prasad *et al.*, 1986)의 균주가 분리보고 되었다.

이번 연구에서는 새로운 생물자원의 보고로서 관심을 받고 있는 제주도 조간대에 서식하고 있는 다양한 생물들(Table 2, 3, 4, 5)을 채집하여 생육조건이 까다롭지 않으면서 세포외부로 단백질 분해효소를 분비하는 세균을 분리하였다. 알칼리성 단백질 분해효소를 분비하는 미생물을 분리하기 위하여 skim milk를 첨가한 한천평판배지에 각각의 세균 희석액을 도말하여 배양한 후 투명환을 형성하는 콜로니들을 선별하였고, 이중 단백질 분해효소 활성이 가장 높은 35균주(투명

환 직경 > 20 mm)를 순수 분리하였다(Table 17). 분리 균주들의 colony 색상은 creamy, beige 혹은 pale yellow 등이었으며 그람 양성균 2균주를 제외하고는 모두 그람 음성균이었다. 운동성 실험에서는 총 35균주 중에 33균주가 운동성을 가지고 있었다. 분리 균주들은 4°C ~ 40°C의 범위에서 성장이 가능하였다. 염 농도 실험에서는 다양한 염분 농도에서도 성장이 가능하였다. 최저 0.5 %에서 최대 11.0 %의 염 농도에서도 성장이 가능한 광염성 미생물과 초기 생육 배지 염분 농도가 2 % 이상이 되어야만 성장이 가능한 호염성 미생물도 존재하였다. pH 성장 실험에서는 최저 pH 6.0에서 최고 pH 12.0에서도 성장이 가능한 균주도 있었다. 이 결과로 조건대에서 분리된 미생물은 다양한 온도, 높은 염 농도 및 넓은 범위의 pH에서도 성장이 가능하다는 것을 확인할 수가 있었다(Table 17).

Table. 17. Physiological characteristics of protease-producing isolates.

Strain	Site	Colony color (ZS medium)	Gram stain	Motility	Growth at		
					NaCl (%)	Temp.(°C)	pH
No45	A-1	beige	-	+	1 - 4	10 - 30	6 - 10
No47	A-1	creamy	-	+	1 - 5	10 - 37	6 - 10
No64	C-9	beige	-	+	1 - 5	10 - 30	7 - 10
JJ46	D-11	pale yellow	-	+	1 - 6	10 - 37	6 - 10
No49	A-2	whitish	-	+	1 - 9	5 - 37	7 - 11
No67	C-10	creamy	-	+	1 - 9	5 - 37	6 - 11
JJ15	D-11	creamy	-	+	1 - 10	5 - 40	6 - 12
JJ56	D-11	creamy	-	+	0.5 - 10	5 - 45	6 - 12
JJ67	D-12	creamy	-	+	1 - 10	10 - 40	6 - 11
No55	B-5	beige	-	+	1 - 11	5 - 37	6 - 10
No51	A-3	creamy	-	+	1 - 8	10 - 37	7 - 11
No61	B-7	creamy	-	+	1 - 7	10 - 37	6 - 11
No53	A-4	beige	-	+	1 - 8	4 - 37	7 - 10
No60	B-7	beige	-	+	1 - 8	4 - 37	6 - 11
No62	C-8	beige	-	+	1 - 8	4 - 37	6 - 11
No66	C-10	beige	-	+	1 - 8	4 - 37	7 - 11
No57	B-5	creamy	-	+	1 - 10	4 - 30	7 - 11
JJ57	D-11	creamy	-	+	1 - 10	4 - 30	7 - 10
JJ68	D-12	creamy	-	+	1 - 10	4 - 30	7 - 11
JJ71	D-12	creamy	-	+	1 - 10	4 - 30	6 - 11
No52	A-3	beige	-	+	1 - 8	4 - 30	6 - 10
No63	C-8	beige	-	+	1 - 8	4 - 30	6 - 10
No58	B-7	creamy	-	+	1 - 7	10 - 40	6 - 11
JJ45	D-11	creamy	-	+	1 - 7	10 - 37	6 - 11
JJ47	D-11	creamy	-	+	1 - 8	10 - 40	7 - 11
JJ58	D-12	creamy	-	+	1 - 8	10 - 37	6 - 11
No48	A-2	creamy	-	+	2 - 10	4 - 37	7 - 11
JJ73	D-12	creamy	-	+	2 - 10	4 - 37	6 - 11
No54	B-5	creamy	-	+	1 - 8	10 - 30	6 - 10
No56	B-5	creamy	-	+	1 - 8	10 - 37	7 - 11
No68	C-10	beige	-	-	1 - 7	4 - 30	6 - 10
No50	A-3	white	-	+	2 - 10	4 - 40	5 - 12
JJ14	C-10	brownish	-	+	1 - 7	10 - 30	6 - 10
No65	C-8	creamy	+	+	1 - 6	4 - 40	6 - 10
JJ13	C-10	pale yellow	+	-	1 - 5	10 - 40	7 - 9

Table 17. Continue.

Strain No.	Oxi	Cat	Hydrolysis of:						Utilization of:			
			Gelatin	Starch	Urea	Agar	Tween 40	Tween 80	Man	Suc	Glu	Lac
No45	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
No47	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
No64	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
JJ46	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
No49	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
No67	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
JJ15	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
JJ56	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
JJ67	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
No55	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
No51	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
No61	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
No53	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
No60	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
No62	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
No66	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
No57	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
JJ57	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
JJ68	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
JJ71	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
No52	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
No63	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
No58	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
JJ45	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
JJ47	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
JJ58	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
No48	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JJ73	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No54	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
No56	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
No68	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
No50	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
JJ14	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
No65	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JJ13	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Abbreviations: Oxi, oxidase; Cat, catalase; Man, mannose; Suc, sucrose; Glu, glucose; Lac, lactose.

3.3.2.2. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 및 계통분석

제주도 조간대에서 분리된 단백질분해효소 생성 미생물의 35 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 계통분류학적으로 어떤 division에 속하는지를 확인 하여 본 결과 *Proteobacteria*(문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Pseudoalteromonas*속 10 균주, *Vibrio*속 21균주, *Ferrania*속 1균주, *Proteobacteria*(문)/*Alphaproteobacteria*(강)의 *Phaeobacter*속 1균주, *Firmicutes*(문)/*Bacilli*(강)의 *Bacillus*속 2균주가 분리되었다(Fig. 15, 16, 17, Table 18).

단백질분해효소를 생성하는 A group은 생리화학적 특성이나 16S rRNA 염기서열로 미루어 *Pseudoalteromonas* 속에 소속된 균주로 생각이 되며 분리균주의 염기서열과 *Pseudoalteromonas* sp.의 표준균주 염기서열과의 유연관계를 조사한 결과 *Pseudoalteromonas elyakovii* O22^T (AF116188)와 염기서열 유사도가 99.80 ~ 99.89%로 가장 가까운 근연종으로 나타났다. B group은 NCBI의 Blastn 검색을 통해 유사도를 조사한 결과 *P. ganghwensis*와 99.95 ~ 99.95 % 이상 일치하였으나 이 종의 16S rRNA 유전자 염기서열만 보고가 되어있고 특성에 관한 보고는 찾을 수가 없었다. 다음으로 가장 가까운 종은 *P. mariniglutinosa* KMM 3635^T (AJ507251)로 98.98 ~ 99.12% 일치하였다. C group은 *P. flavipulchra* NCIMB 2033^T (AF297958)와 생리화학적 특성이나 16S rRNA 염기서열 similarity(99.79 ~ 99.84%)가 가장 가까웠다. No55는 *P. atlantica* IAM 12927^T (X82134)와 16S rRNA 염기서열이 99.89%로 일치하였다. *Pseudoalteromonas* sp.는 해양미생물로 다양한 생리화학적 특성을 가지며 인간에 대한 병원성에 대한 보고가 없으며 생육을 위해 염분을 필요로 하는 특성을 가진다(Gauthier *et al.*, 1995).

일부 해양세균은 진핵의 단세포 조류(algae)와 상호작용하며 경우에 따라 조류를 죽이는 살조제(algicide)의 특성을 나타낸다고 보고되었다(Doucette, 1995., Mayali and Azam, 2004). *Pseudoalteromonas* sp.이 경우에도 살조제의 특성을 보이며(Lee *et al.*, 2000., Lovejoy *et al.*, 1998) 그 원인이 체외단백질분해효소와 연관이 있다는 보고가 있다(Lee *et al.*, 2000). 그러므로 이번 연구에서 확보된 *Pseudoalteromonas* 속의 분리균주들도 생물학적 방제수단으로의 이용 가능성에

대해 앞으로 연구가 필요하다고 생각되어진다.

이번 연구에서 분리된 단백질분해효소 생성 미생물 중 가장 많은 수(21균주, 60%)를 차지하는 D ~ I group과 No54, No56과 No68은 생리화학적 특성이나 16S rRNA 유전자 염기서열로 미루어 *Vibrio* 속에 속하는 균주들로 판단된다. 16S rRNA 유전자 염기서열에 기초한 계통학적 유연관계를 조사한 결과 D group은 *Vibrio harveyi* ATCC 14126^T (X56578)와 99.97 ~ 99.90%, E group은 *V. parahaemolyticus* ATCC 17802^T (X56580)와 99.85 ~ 99.98%, F group은 *V. alginolyticus* ATCC 17749^T (X56576)와 99.83 ~ 99.90%, G group은 *V. gigantis* CAIM 25^T (EF09488)와 99.80 ~ 99.84%, H group은 *V. proteolyticus* ATCC 15338^T (X56579)와 99.82 ~ 99.89%, I group은 *V. cyclitrophicus* LMG 21359^T (AM162565)와 99.86 ~ 99.87%, No54는 *V. coralliilyticus* LMG 20984^T (AJ440005)와 99.87%, No56은 *V. splendidus* ATCC 33125^T (X74724)와 98.86%, No68은 *V. comitatus* GHG21^T (DQ922915)와 99.89%의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보여 주었다.

현재까지 해양에서 분리되어진 *Vibrio* 유래 단백질 분해효소에 관한 연구보고는 *Vibrio anguillarum* (Denkin and Nelson, 1999)과 *Vibrio vulnificus* (Kothary and Kreger, 1985, Kawase *et al.*, 2004, Chang *et al.*, 2005)과 같이 어류질병 유래 세균들에서 나타나는 세포외 단백질 분해효소에 관한 것이다. 이는 어류의 아가미나 체표면에 부착한 후 표면 단백질을 분해하여 수포 발생 등을 유도하는 중요한 감염기작의 일환인 경우이다. 이번에 분리된 균주들도 대부분 어류질병 유래 미생물로 분류되어진다. I group에 속하는 *Vibrio cyclitrophicus* LMG 21359^T (Brian and James, 2001)는 목재방부제용 오일(creosote)에 오염된 해양 저질토에서 처음 분리된 세균으로 단백질 분해효소를 생성함은 물론 다환방향족 탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons(PAH))를 분해하는 해양미생물로 알려져 있다. 따라서 본 연구에 의해 확보되어진 I group 균주들은 향후 PAH 분해 가능성에 대한 연구가 필요하다고 생각되어진다.

Proteobacteria(문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Ferrania*속으로 현재까지 분류 보고되어진 균은 *Ferrania halotolerans* MACL01^T (AY551089) 가 유일한 종이다. No50 균주는 *F. halotolerans* MACL01^T와 16S rRNA 유전자 염기서열과

98.36%의 유사도를 나타내었다.

JJ14는 *Proteobacteria*(문)/*Alphaproteobacteria*(강)의 *Phaeobacter*속에 속하는 *Phaeobacter gallaeciensis* X6^T (AJ867253)와 99.85 %의 염기서열 유사도를 나타내었다. *Phaeobacter gallaeciensis* 같은 경우는 Ruiz-Ponte *et al.* (1998)에 의해 처음 *Rhodobacterales*목 *Rhodobacteraceae*과의 *Roseobacter gallaeciensis*로 보고되어 졌으나 Torben *et al.* (2006)에 의해 동일 family(과)내 신속인 *Phaeobacter gallaeciensis*로 재분류되어진 균이다.

No65와 JJ13은 각각 *Bacillus subtilis*와 *B. hwajinpoensis*와 99.10%, 99.28%의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보여주었다.

Protease는 동·식물과 세균, 곰팡이, 효모 등 다양한 미생물에서 생산되는데, 동물과 식물로부터 유래한 protease는 다양한 산업적 수요를 충족하기에 공급이 제한되어 있다. 그러므로 안정성과 생산성, 비용절감 등 경제적인 면이나 공업적 규모의 활용측면에서 많은 장점이 있는 미생물 유래의 protease를 생산하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다. *Bacillus* 속 균주는 생육이 양호하고 다양한 특성을 가지고 있어서 유전자 및 효소 수준, 그리고 산업적으로 폭넓게 연구되고 있으며, *Bacillus* 속으로부터 알칼리성 protease가 발견된 이후 효소 활성이 높고 넓은 pH 범위에서 활성을 나타내며 열안정성이 우수한 효소를 생산하는 균주의 탐색 및 선별에 많은 연구가 시도되고 있다. 상업적 응용을 목적으로 생산되고 있는 세균 유래의 protease는 대부분 *Bacillus* 속 유래의 중성 또는 알칼리성 효소들이다. 알칼리성 protease에 관한 연구로는 Horikoshi (1971)가 *Bacillus* sp.를 분리하여 효소학적 특성을 발표한 이후, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. cereus* 등을 포함한 여러 *Bacillus* 속 균주가 알려지고 있다(Banerjee *et al.*, 1999., Banika *et al.*, 2004., Dhandapani *et al.*, 1994). 본 연구에서 분리된 *Bacillus* 균주 같은 경우도 성장 범위가 중성과 알칼리 영역의 pH에서 성장이 더 잘 이루어지는 것으로 나타났다. 그러므로 활성에 대하여 좀 더 연구가 이루어진다면 산업적으로 유용한 protease를 찾아낼 수 있을 것으로 보여진다.

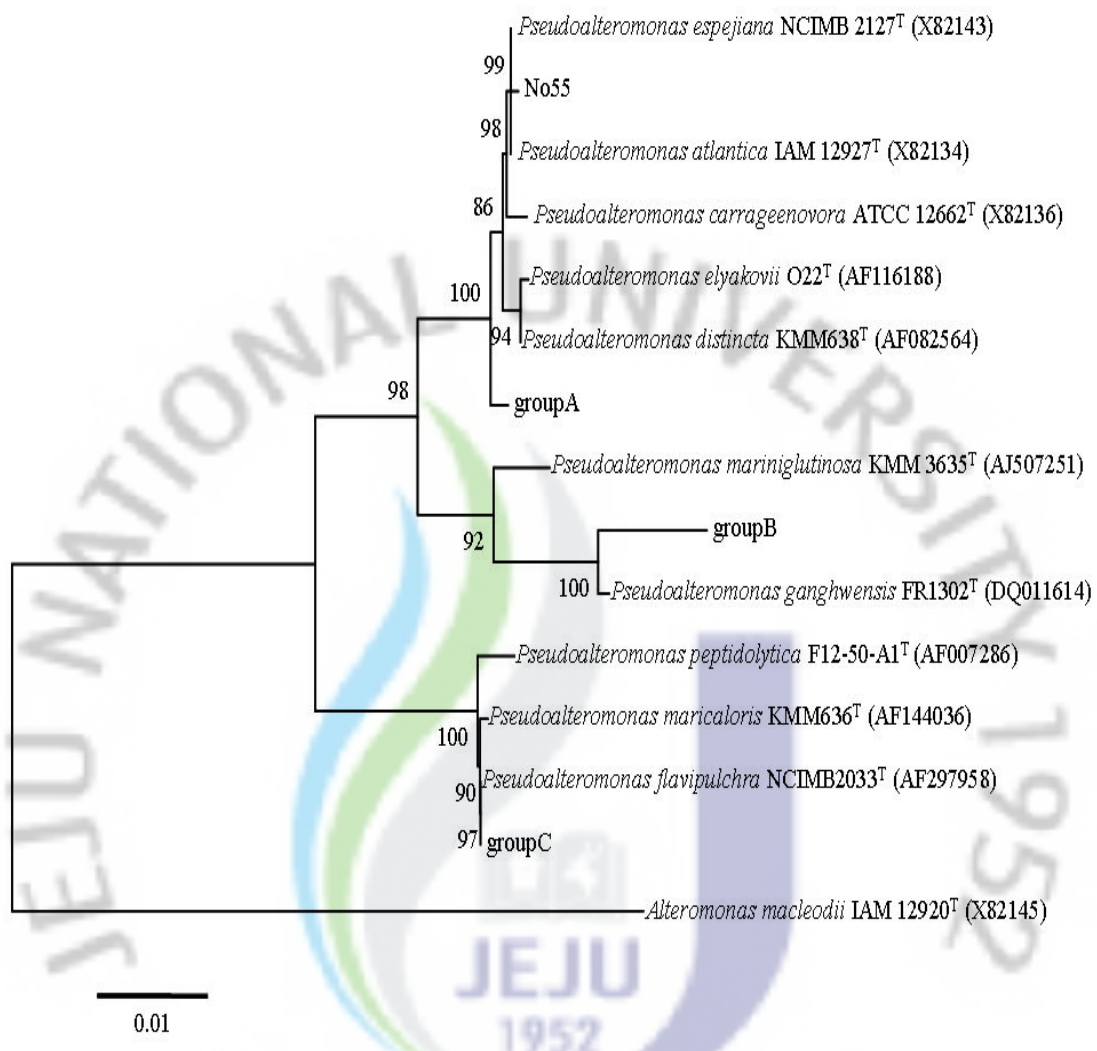


Fig. 15. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic position of *Pseudoalteromonas*-like protease-producers, based on 16S rRNA gene sequencers. The tree was constructed from evolutionary distances by using neighbour-joining method (Saitou & Neil, 1987) and the model of Juke & Cantor (1969). The sequence of *Alteromonas macleodii* IAM 12920^T (X82145) was used an outgroup. Bootstrap support values (>50%) are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

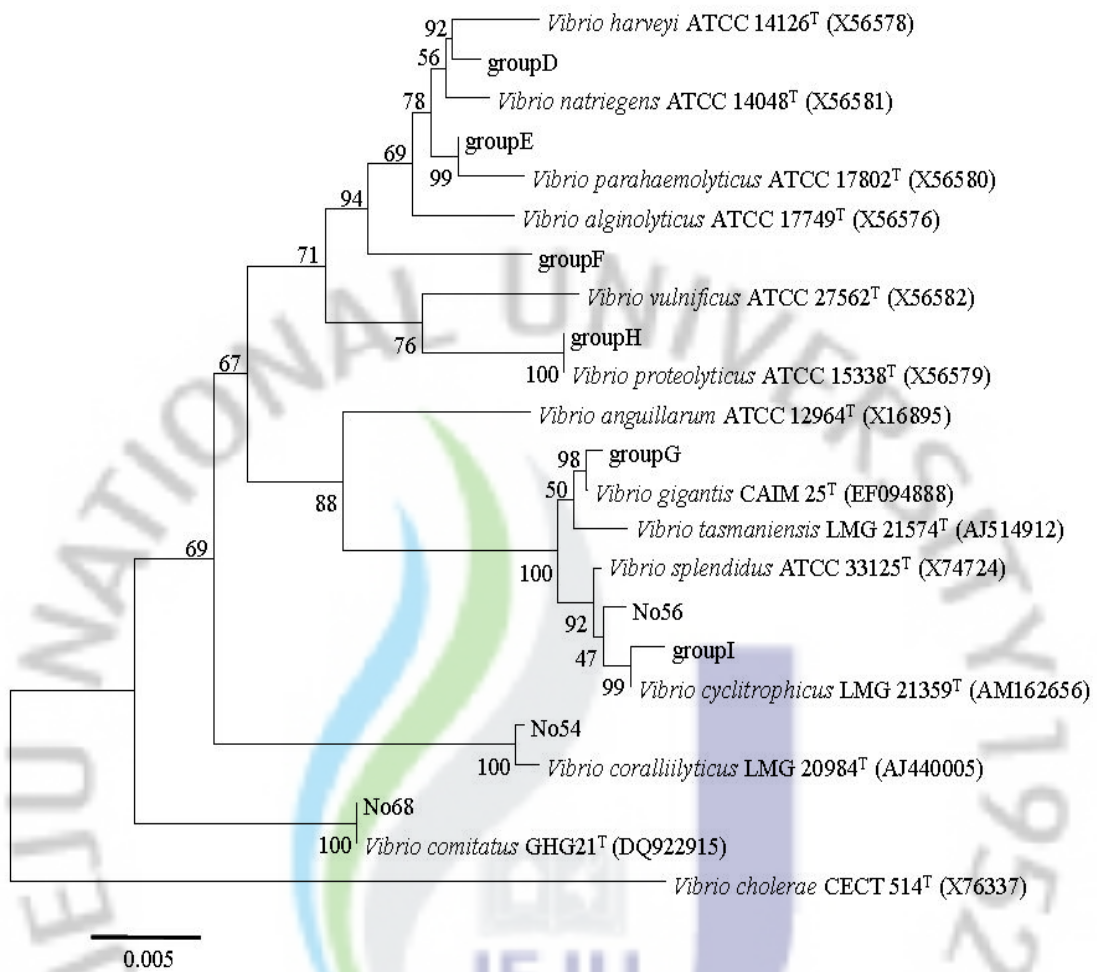


Fig. 16. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic position of *Vibrio*-like protease-producers, based on 16S rRNA gene sequencers. The tree was constructed from evolutionary distances by using neighbour-joining method (Saitou & Neil, 1987) and the model of Juke & Cantor (1969). The sequence of *Vibrio cholerae* CECT 514^T (X76337) was used an outgroup. Bootstrap support values (>50%) are shown at branch points. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

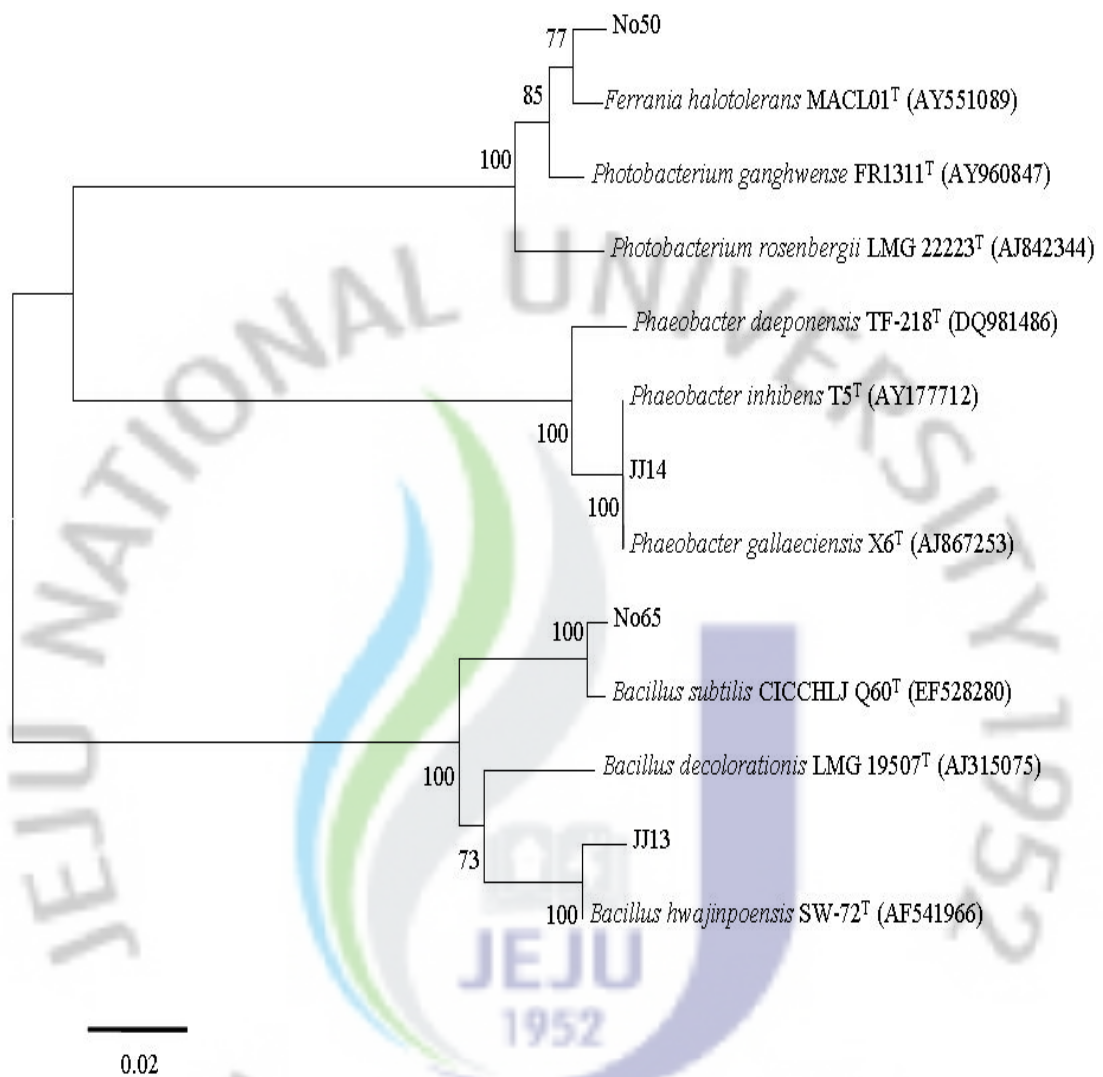


Fig. 17. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic position of *Bacillus*-, *Phaeobacter*-, and *Ferrania*-like protease-producers, based on 16S rRNA gene sequencers. The tree was constructed from evolutionary distances by using neighbour-joining method (Saitou & Neil, 1987) and the model of Juke & Cantor (1969). Bootstrap support values (>50%) are shown at branch points. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

Table 18. Levels of 16S rRNA gene sequence similarity between protease-producers and their closest neighbors.

Strain	Site	Species name	The closest species	Similarity (%)
No45	A-1	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> (A)	99.80
No47	A-1	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> (A)	99.80
No64	C-9	<i>Batillus cornutus</i>	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> (A)	99.89
JJ46	D-11	<i>Sargassum thunbergii</i>	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> (A)	99.80
No49	A-2	<i>Capitulum mitella</i>	<i>Pseudoalteromonas ganghwensis</i> (B)	99.98
			<i>Pseudoalteromonas mariniglutinosa</i>	99.12
No67	C-10	<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Pseudoalteromonas ganghwensis</i> (B)	99.95
			<i>Pseudoalteromonas mariniglutinosa</i>	98.98
JJ15	D-11	<i>Sargassum thunbergii</i>	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> (C)	99.84
JJ56	D-11	<i>Hypselodoris festiva</i>	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> (C)	99.85
JJ67	D-12	<i>Ischnochiton comptus</i>	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> (C)	99.79
No55	B-5	<i>Ischnochiton comptus</i>	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	99.89
No51	A-3	<i>Chondracanthus tenellus</i>	<i>Vibrio harveyi</i> (D)	99.90
No61	B-7	<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Vibrio harveyi</i> (D)	99.97
No53	A-4	<i>Capitulum mitella</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (E)	99.98
No60	B-7	<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (E)	99.87
No62	C-8	<i>Capitulum mitella</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (E)	99.85
No66	C-10	Sea sand	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (E)	99.90
No57	B-5	<i>Ischnochiton comptus</i>	<i>Vibro alginolyticus</i> (F)	99.89
JJ57	D-11	<i>Hypselodoris festiva</i>	<i>Vibro alginolyticus</i> (F)	99.83
JJ68	D-12	<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Vibro alginolyticus</i> (F)	99.85
JJ71	D-12	<i>Halichondria panicea</i>	<i>Vibro alginolyticus</i> (F)	99.90
No52	A-3	<i>Chondracanthus tenellus</i>	<i>Vibrio gigantis</i> (G)	99.84
No63	C-8	<i>Capitulum mitella</i>	<i>Vibrio gigantis</i> (G)	99.80
No58	B-7	<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Vibrio proteolyticus</i> (H)	99.89
JJ45	D-11	<i>Sargassum thunbergii</i>	<i>Vibrio proteolyticus</i> (H)	99.82
JJ47	D-11	<i>Hypselodoris festiva</i>	<i>Vibrio proteolyticus</i> (H)	99.87
JJ58	D-12	<i>Ischnochiton comptus</i>	<i>Vibrio proteolyticus</i> (H)	99.89
No48	A-2	<i>Actinia equina</i>	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> (I)	98.80
JJ73	D-12	<i>Halichondria panicea</i>	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> (I)	98.86
No54	B-5	<i>Sargassum horneri</i>	<i>Vibrio corallilyticus</i>	98.87
No56	B-5	<i>Ischnochiton comptus</i>	<i>Vibrio splendidus</i>	98.86
No68	C-10	<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Vibrio comitatus</i>	98.89
No50	A-3	<i>Hizikia fusiformis</i>	<i>Ferrania halotolerans</i>	98.36
JJ14	C-10	<i>Aplysia kurodai</i>	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	99.85
No65	C-8	<i>Batillus cornutus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99.10
JJ13	C-10	<i>Aplysia kurodai</i>	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	99.28

3.3.2.3. 지질 분해효소 생성 미생물의 특성

현대 산업사회가 발달함에 따라 각종 효소의 이용도가 급격히 증가하고 있는 가운데 지질 분해효소인 lipase는 양조제품의 향기증진이나 유제품의 숙성, 야채류의 발효 시 유리 지방산 증가 등의 식품산업, 소화제 등의 제약산업, 피혁가공, 세제산업, 화학공업 등 여러 분야에 걸쳐 광범위하게 이용될 수 있다.

Lipase(glycerol ester hydrolase EC 3.1.1.3), estrase(carboxyl esterase EC 3.1.1.1)와 다양한 지질 분해효소들은 미생물에서부터 인간에 이르기까지 넓은 범위의 생물에서 발견되어진다(Rhee *et al.*, 2005). 일반적으로 estrase는 물-수용성 기질에 작용하여 아실기의 탄소원자가 10개 이하인 기질의 가수분해를 촉진시키는 반면, lipase는 물-지용성 기질에 작용하여 10개 이상의 탄소원자를 가진 기질의 가수분해를 촉진시키고 estrase 기질도 가수분해 할 수 있다. 또한 lipase는 지질과 물의 현탁 상태에서 triglyceride의 ester 결합을 가수분해하여 glycerol과 fatty acid의 생성을 촉진하는 작용을 하는 효소로서 많은 연구자들에 의해 동물, 식물 및 미생물로부터 분리 연구되어져 왔다(Marangoni and Rousseau, 1995). 미생물에 대한 lipase 연구는 주로 *Pseudomonas* (Lu and Liska, 1969, Lin *et al.*, 1996, Choo *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 2005)에 집중되어 있었다. lipase는 미생물 중에서도 source에 따라 그 특성이 다양하다(Jaeger *et al.*, 1994). 지질 분해효소는 수용성인 acylglycerol 또는 단일 에스테르 기질의 가수분해를 선호하지만, 실제로 기질은 물에서 불용성을 지니고 있어 일반적으로 기질의 micelle (극성의 말단기(hydrophilic)는 물 분자와의 친화력 때문에 바깥쪽에 모이게 되고, 물 분자와 반발력이 있는 hydrophobic의 비극성 말단기는 안쪽으로 모이게 되는 현상으로 인해 형성되는 구조) 또는 유화액에 접촉하여 가수분해하며, 기질 특이성, 영역 특이성, 키랄 특이성, 온도 및 유기용매 안정성 등의 특성을 가지고 있어 생물학적 촉매제로 주목받고 있다(Lee *et al.*, 2004). 특히 미생물 유래 지질 분해효소는 식물이나 동물 유래의 지질 분해효소보다 높은 열 안정성을 가지고 있고, 현재 화학공정으로 인한 환경문제나 경제적인 문제를 해결 할 수 있는 생물학적인 응용측면에서 잠재적인 무한한 가치를 지니고 있다고 해도 과언이 아닐 것이다. 그리하여 지질 분해효소의 산업 전반적인 응용을 위해 새로운 미생물

로부터 효소의 자원개발에 대한 기대가 크다. 이러한 이유로 제주도 조간대에 서식하고 있는 다양한 생물들(Table 2, 3, 4, 5)을 채집하여 생육조건이 까다롭지 않으면서 세포외부로 지질 분해효소를 분비하는 세균을 분리하였다. 체외 지질 분해효소를 분비하는 미생물을 분리하기 위하여 기질로 tributyrin(Sigma)을 사용하여 plate assay법(Kouker *et al.*, 1987)으로 한천평판배지에 각각의 시료 희석액을 도말하여 배양하였다. 배양에 따라 clear zone을 형성하는 colony들을 선별하였고, 이중 체외 지질 분해효소 활성이 가장 높은 균주 즉 clear zone이 직경 20 mm 이상 나타내는 9균주를 순수 분리하였다(Table 19). 분리된 균주들의 colony 색상은 creamy, beige, pale yellow, brown 혹은 white 등이었으며 모두 운동성을 가진 그람음성균이었다. 분리 균주들은 4℃ ~ 40℃의 범위에서 성장이 가능하였다. 분리균주들은 또한 다양한 염분 농도에서도 성장이 관찰되었으며, 최저 0%에서 최대 12.0%의 염 농도에서도 성장이 가능한 내염성 미생물과 초기 생육 배지 염분 농도가 2 ~ 3 % 이상이 되어야만 성장이 가능한 호염성 미생물도 존재하였다. pH 생장 실험에서는 pH 6.0에서 pH 11.0에서도 성장이 가능한 균주도 있었다. 그리고 lipase에 의한 지질분해능(lipolytic activity)을 관찰하는 Tween 실험에서는 모두 양성을 나타내었다. 이 결과로 조간대에서 분리된 지질 분해효소 생성 미생물은 다양한 온도, 광범위한 염 농도 및 산성 및 알칼리성 pH에서도 성장이 가능하다는 것을 확인할 수가 있었다(Table 19).

Table. 19. Physiological characteristics of lipase-producing isolates.

Strain	Site	Colony color (ZT medium)	Gram stain	Motility	Growth at		
					NaCl (%)	Temp.(°C)	pH
No69	C-8	brown	-	+	0 - 8	4 - 30	6 - 10
No70	C-9	beige	-	+	1 - 8	4 - 30	6 - 10
No72	C-9	creamy	-	+	1 - 8	10 - 37	7 - 11
No73	C-9	creamy	-	+	1 - 10	10 - 37	6 - 9
No74	C-9	white	-	+	1 - 10	4 - 37	6 - 10
No76	D-11	pale yellow	-	+	3 - 12	4 - 37	6 - 8
No77	D-11	white	-	+	1 - 8	4 - 37	6 - 9
No78	D-11	creamy	-	+	2 - 5	4 - 40	6 - 9
No81	D-12	white	-	+	1 - 5	4 - 40	5 - 9

Table 19. Continue.

Strain No.	Oxi	Cat	Hydrolysis of:						Utilization of:			
			Gelatin	Starch	Urea	Agar	Tween 40	Tween 80	Man	Suc	Glu	Lac
No69	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+
No70	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
No72	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
No73	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
No74	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
No76	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
No77	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
No78	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
No81	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+

*Abbreviations: Oxi, oxidase; Cat, catalase; Man, mannose; Suc, sucrose; Glu, glucose; Lac, lactose.

3.3.2.4. 16S rDNA 염기서열 분석 및 계통분석

현재 까지 연구되어 실제로 산업적으로 이용되고 있는 미생물 유래 지질 분해효소는 *Fungi*(계)/*Ascomycota*(아문)/*Saccharomycetes*(목)에 속하는 *Candida* sp., *Fungi*(계)/*Ascomycota*(아문)/*Leotiomyces*(강)에 속하는 *Sclerotinia* sp., *Fungi*(계)/*Mucoromycotina*(아문)/*Mucorales*(목)에 속하는 *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Fungi*(계)/*Ascomycota*(문)/*Eurotiomyces*(강)에 속하는 *Aspergillus* sp., *Firmicutes*(문)/*Bacilli*(강)에 속하는 *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Proteobacteria*(문)/*Gammaproteobacteria*(강)에 속하는 *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Acinetobacter* sp.에 속하는 미생물에서 분리되었는데 이들은 정교한 chemoselectivity, regioselectivity, stereoselectivity를 나타내며 특별한 조효소가 필요 없이 반응이 이루어지므로 산업적으로 가치가 큰 효소로서 생물공학 분야에서 중요한 역할을 하고 있다(Jaeger *et al.* 1994., Arpigny and Jaeger, 1999, Janger and Eggert, 2002).

제주도 조간대에서 분리된 지질분해효소 생성 미생물 9균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 계통분류학적으로 어떤 division에 속하는지를 확인 하여 본 결과 *Proteobacteria*(문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Pseudoalteromonas*속 1균주, *Vibrio*속 2균주, *Alteromonas*속 4균주, *Paeudoalteromonas*속 1균주, *Agarivorans*속 1균주가 분리되었다(Fig. 18, Table 20).

지질 분해효소를 생성하는 Jno69는 생리화학적 특성이나 16S rRNA 염기서열로 미루어 *Proteobacteria*/*Gammaproteobacteria*/*Alteromonadales*/*Shewanellaceae* *Shewanella* 속에 속하는 균주로 생각이 되며 결정된 염기서열과 *Shewanella* 속의 type strain들과의 유연관계를 조사한 결과 *Shewanella frigidimarina* ACAM 591^T (U85903)와 염기서열 유사도가 99.20 %로 가장 가까운 근연종으로 나타났다. *S. frigidimarina* ACAM 591^T는 Bowman *et al.*, (1997)에 의해 Antarctic sea ice에서 처음 분리되어 Eicosapentaenoic Acid (20:5 ω 3)를 생성함은 물론 protease와 lipase를 생성하는 미생물로 보고가 되었다. Jno69 같은 경우는 *S. frigidimarina* ACAM 591^T와 거의 같은 생리화학적 특성을 나타내었으나 생육가능 온도에서는 type strain보다 높은 30 °C에서도 성장이 가능하였다. 그러므로 분리 균주 Jno69

은 lipase 뿐만 아니라 EPA, protease 생성능에 대하여 표준균주와 비교분석이 요구되어진다.

Jno70과 Jno72는 NCBI의 Blastn 검색을 통해 유사도를 조사한 결과 *Gammaproteobacteria*의 *Vibrio* 속에 속하는 균주로 나타났으며 *Vibrio* sp.의 표준균주들과의 유연관계를 조사한 결과 각각 *V. gigantis* CAIM 25^T (EF094888)와 *V. harveyi* ATCC 14162^T (X56578)와 염기서열 similarity가 99.90 %, 99.29 %로 가장 가까운 근연종으로 나타났다. *V. gigantis*는 Le Roux *et al.*, (2005)에 의해 참굴(*Crassostrea gigas*)에서 처음 분리 보고되었는데 현재까지 *V. gigantis*에서 lipolytic activity에 관한 연구 보고는 없다. *V. harveyi*는 Johnson and Shunk (1936)에 의해 새우에 질병을 일으키는 미생물로 처음 보고되었는데 Liu *et al.*, (1996)는 *V. harveyi*가 어류에 질병을 일으킬 수 있는 이유로 강력한 세포 외 효소를 생산해 내기 때문인데 이 효소가 proteases, haemolysins, chitinases, lipases 그리고 phospholipases라고 보고하였다. 분리균주 Jno70과 근연종인 *V. gigantis*에 대해서 현재까지 연구가 많이 이루어지지 않았다. 그렇기 때문에 효소활성 탐색에 대해 향후 연구하여할 것이 많을 것으로 생각되어진다.

지질 분해효소를 생성하는 Jno73, Jno74, Jno78 그리고 Jno81은 생리화학적 특성이나 NCBI의 Blastn 검색을 통해 유사도를 조사한 결과 *Gammaproteobacteria*의 *Alteromonas* 속에 속하는 균주로 나타났으며 결정된 염기서열과 *Alteromonas* sp.의 표준균주들과의 유연관계를 조사한 결과 *A. stellipolaris* LMG 21861^T (AJ295715), *A. addita* RIOSW13^T (AY682202), *A. marina* SW-47^T (AF529060)와 각각 99.80 %, 99.30 %, 99.40 % , 99.10 %의 염기서열 유사도를 나타내었다. 이 중 Jno78과 Jno81은 *A. marina* SW-47^T와 가장 가까운 근연종으로 각각 99.40 % , 99.10 %의 유사도 값을 보여 주었고 분리균주 사이의 유사도는 98.70 %로 나타났다. *Alteromonas* 속은 Baumann *et al.* (1972)에 의해 처음으로 보고되었지만 이번 연구에서 분리된 균주들의 근연종들은 최근에 분리 보고된 종(Yoon *et al.*, 2003, Van Trappen *et al.*, 2004, Elena *et al.*, 2005)들로서 현재까지는 기본적인 생리화학적 특성에 대한 연구만 이루어져 있다. 또한 현재까지 *Alteromonas*는 지질 분해효소 활성화에 대해 거의 연구가 진행되지 않았다. 그러므로 이번 연구에서 지질 분해효소 활성을 갖고 있는 분리

미생물 Jno73, Jno74, Jno78 그리고 Jno81에 대하여 좀 더 세부적인 활성 실험이 절실히 요구되어진다.

분리균주 Jno76은 조간대 서식 생물인 구멍뿔고둥 (*Chlorostoma turbinata*)에서 확보되어진 미생물로 NCBI의 Blastn 검색을 통해 유사도를 조사한 결과 *Gammaproteobacteria*의 *Pseudoalteromonas* 속에 속하는 균주로 나타났으며 결정된 염기서열을 가지고 *Pseudoalteromonas* sp.의 표준균주들과의 유연관계를 조사한 결과 *P. marina* mono4^T (AY563031)와 99.90 %의 염기서열 유사도를 나타내었다. *P. marina* mono4^T는 최근에 우리나라 충남 대천 갯벌에서 분리되어 보고(Nam *et al.*, 2007)된 미생물이다. 분리 균주 Jno76같은 경우는 생리화학적 특성이나 16S rRNA 염기서열 유사도 면에서 *P. marina* mono4^T와 동일종의 균주로 판단된다. 현재까지 *Pseudoalteromonas* 균주에서 지질 분해효소와 관련된 연구는 미비한 실정이다. 그러므로 분리균주 Jno76는 지질분해효소에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

Jno77은 또다른 지질 분해효소활성을 갖고 있는 또다른 분리균주로 NCBI의 Blastn 검색을 통해 유사도를 조사한 결과 *Gammaproteobacteria*의 *Agarivorans* 속에 속하는 균주로 나타났으며 *Agarivorans*의 표준균주들과의 유연관계를 조사한 결과 *Agarivorans albus* MKT106^T (AB076561)와 16S rRNA 염기서열이 99.50%의 similarity를 나타내었다. *Agarivorans*속에는 현재까지 *A. albus* MKT106^T (Kurahashi and Yokota, 2004) 한 종만이 분리 보고되어 있다. 하지만 Jno77의 생리화학적 특성이나 16S rRNA 염기서열에 기초하여 *A. albus*의 다른 균주로 여겨진다.

미생물 유래의 지질 분해효소는 serine hydrolysis와 catalytic moiety로써 일치하는 sequence인 G-X1-S-X2-G (G=glycine, S=serine, X1=histidine 그리고 X2=glutamic or aspartic acid)를 포함한다. 그런데 active domain이 주로 G-X1-S-X2-G의 순으로 된 아미노산 배열만이 거의 같을 뿐 그 외의 배열은 전혀 달라서 각기 다른 기질 특이성을 보이게 되는 특성 때문에 응용분야가 실로 무궁무진하다. 또한 그람음성세균에서 얻어진 지질 분해효소는 대부분의 *Pseudomonas*속에서 발견이 되었다. 이번 연구에서는 *Pseudomonas*속과는 다른 그람음성세균중에서 지질분해효소 활성을 갖는 미생물들이 확보되었기 때문에

향후 연구해 볼 가치가 있다고 판단된다.



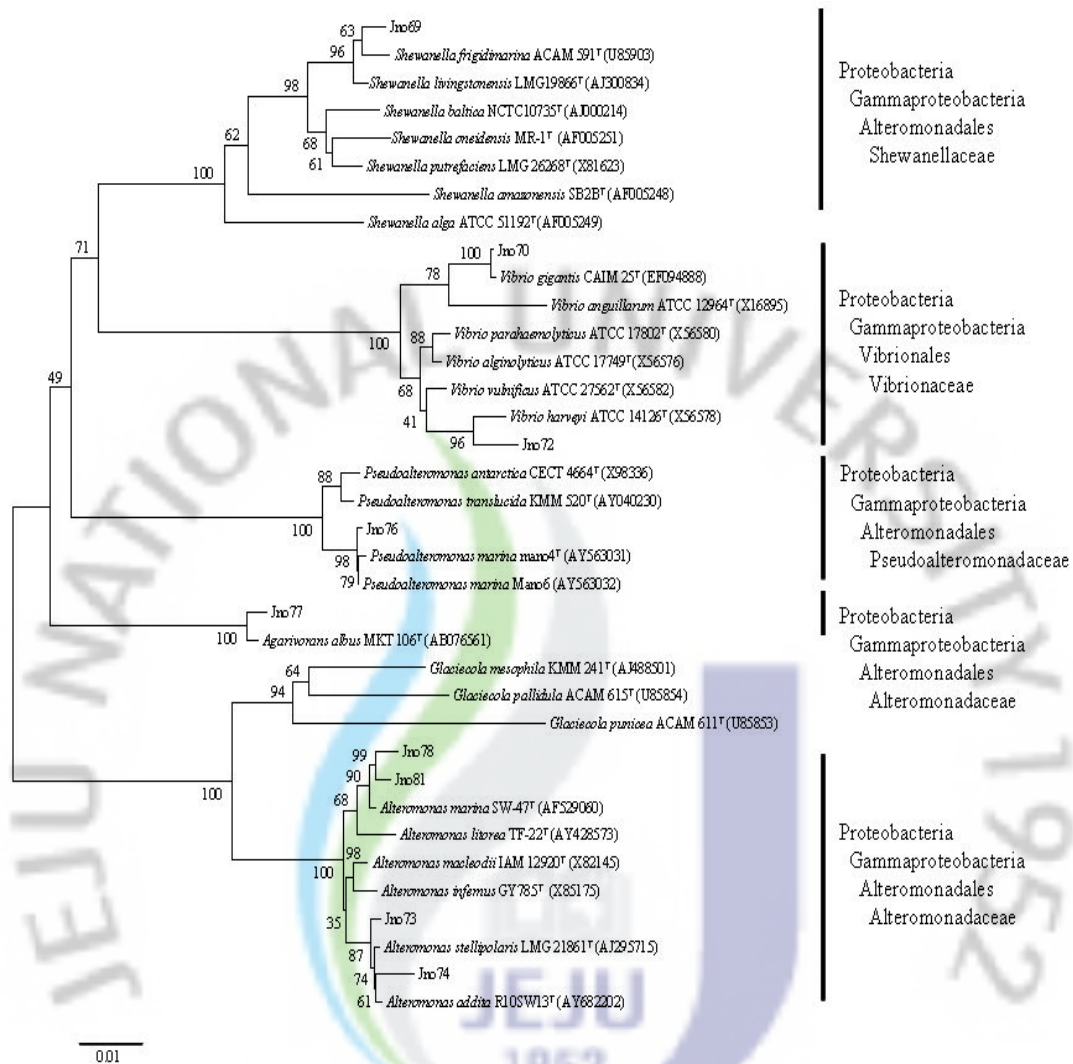


Fig. 18. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the position of lipolytic enzyme-producers within the radiation including representatives of the class *Gammaproteobacteria*. The tree was constructed from evolutionary distance matrix by using neighbour-joining method (Saitou & Neil, 1987) and the model of Juke & Cantor (1969). Bootstrap support values (>50%) are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

Table 20. 16S rRNA gene sequence identities between lipolytic enzyme-producers and their closest relatives.

Strain	Site	Species name	The closest species	Similarity (%)
No69	C-8	<i>Capitulum mitella</i>	<i>Shewanella frigidimarina</i>	99.20
No70	C-9	<i>Nassarius livescens</i>	<i>Vibrio gigantis</i>	99.90
No72	C-9	<i>Nassarius livescens</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	99.29
No73	C-9	<i>Batillus cornutus</i>	<i>Alteromonas stellipolaris</i>	99.80
No74	C-9	<i>Batillus cornutus</i>	<i>Alteromonas addita</i>	99.30
No76	D-11	<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	99.90
No77	D-11	<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Agarivorans albus</i>	99.50
No78	D-11	<i>Chlorostoma turbinata</i>	<i>Alteromonas marina</i>	99.40
No81	D-12	<i>Ischnochiton comptus</i>	<i>Alteromonas marina</i>	99.10

3.4. 신종 후보 미생물

제주도 조간대에서 분리 되어진 색소생성 미생물, 단백질분해효소 생성 미생물 및 지질분해효소 생성 미생물의 16S rRNA 유전자 염기서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 분석하여 보았을 때 97 %미만의 유사도를 보이는 균주들의 염기서열은 다시 한번 Genbank와 EMBL Nucleotide Sequence Database에 있는 염기서열과 비교하여 유사한 염기서열을 회수하였다. 염기서열들은 PHYDIT program에 포함된 Clustal W multiple alignment로 정렬하였으며, 계통분석은 CLUSTAL X software를 이용하여 Neighbor-joining 방법에 의해 수행되었다. Bootstrap 분석은 1000회의 resampling을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기 서열간 유전적 거리는 Jukes & Cantor 모델을 이용하여 계산하였다(Table 21). Table 21에서와 같이 분리된 색소생성 미생물 중 총 8균주가 새로운 종일 가능성이 매우 높게 나타났다. 이들에 대해서는 향후 근연종의 type strain을 분양받아 배양 특성, 형태적 특성, 생리·생화학적 특성, 화학적 특성, 분자생물학적 특성에 관한 연구가 요구되어진다.

Table 21. Candidates for novel species on the basis of 16S rRNA sequences.

Strain No.	The closest species	16S rRNA sequence similarity (%)
	<i>Glaciecola nitratreducens</i> (AY787042)	96.00
JJM10	<i>Glaciecola pullidula</i> (U85854)	95.43
	<i>Glaciecola punicea</i> (U85853)	93.63
JJM25	<i>Shewanella baltica</i> (AJ000214)	97.02
JJM33	<i>Shewanella gaetbuii</i> (AY190533)	92.30
JJM39	<i>Pseudoalteromonas haloplankis</i> (X67024)	97.05
	<i>Oceanisphaera litoralis</i> (AJ500470)	97.70
JJM57	<i>Oceanisphaera donghaensis</i> (DQ190414)	97.02
JJM84	<i>Donghaeana dokdonensis</i> (DQ017015)	95.00
	<i>Loktanella hongkongensis</i> (AY600300)	95.99
	<i>Loktanella marincola</i> (EF202613)	94.10
	<i>Loktanella rosea</i> (AY682199)	93.88
	<i>Loktanella koreensis</i> (DQ34493)	93.88
JJM85	<i>Loktanella agnita</i> (AY682198)	93.79
	<i>Loktanella salsilacus</i> (AJ440997)	93.79
	<i>Loktanella fryxellensis</i> (AJ582225)	93.35
	<i>Loktanella atrilutea</i> (AB264742)	93.53
	<i>Loktanella vestfoldensis</i> (AY771771)	93.12
JJM137	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> (AY217773)	93

4. 요약

이번 연구에서는 제주도 해안에 형성되어 있는 암반 조간대에서 여름철 서식하는 생물, 저질토 및 모래를 채집하여 그로부터 분리되어지는 미생물의 다양성을 연구하였다. 연구를 수행하기 위해 시료를 채집한 지역은 제주도 해안가를 중심으로 제주시 지역과 서귀포시 지역으로 나누어 제주시 지역은 동부와 서부지역으로 서귀포시 지역 또한 서부 지역과 동부 지역으로 구분하여 각 지역 마다 형성된 암반 조간대에서 시료를 채집 하여 미생물을 분리하였다. 미생물을 분리하기 위해 생물 시료를 채집한 지역의 환경요인을 조사한 본 결과 수온, 염분농도, 용존산소, 화학적 산소요구량, 영양염류는 평균값과 큰 차이를 나타내지 않았으며 해수의 pH는 약알카리성을 나타내었다. 제주도 조간대에서 시료를 채취하여 색소를 생성하는 미생물을 분리하였다. 또한 생리적 특성균으로 단백질 분해효소 생성 미생물 및 지질 분해효소 생성 미생물을 분리하여 분리균의 특성 및 16S rRNA 분석을 통하여 분리균의 계통학적 분석을 한 결과 제주도 조간대 4개 지점 12개 지역에서 분리된 미생물은 총 850균주를 분리하였는데 그 중 색소를 형성하는 미생물은 136 균주를 분리하였다. colony의 색상은 yellow, red, orange, pink, violet 등으로 다양했으며 대체적으로 그람 음성균이 많이 분포하고 있었다. 운동성 실험에서는 총 136균주 중에 118균주가 운동성을 가지고 있었다. 또한 다양한 온도와 높은 염 농도에서도 성장이 가능하다는 것을 확인 할 수가 있었다. 분리된 136균주의 색소를 추출한 뒤 carotenoid 또는 bacteiochlorophyll의 유무를 확인한 결과 57균주가 carotenoid의 흡광도 측정 범위인 400 ~ 540 nm에서 peak를 나타내었다. 반면 bacteriochlorophyll에 상응하는 파장범위에서는 흡광도 peak를 나타내는 균은 없었다. 제주시 동부지역 조간대에서 분리된 색소형성 미생물들은 *Proteobacteria/ Gammaproteobacteria*의 *Pseudoalteromonas*속 3균주, *Shewanella*속 8균주, *Oceanisphaera*속 1균주, *Vibrio*속 1균주, *Proteobacteria/Alphaproteobacteria*의 *Kordiimonas*속 1균주, Firmicutes/ Bacilli의 *Bacillus*속 1균주, *Bacteroidetes/Flavobacteria*의 *Tenacibaculum*속 2균주가 분리되었다. 제주시 서부지역 조간대에서는 *Proteobacteria/Gammaproteobacteria*의 *Pseudoalteromonas*속 16균주, *Galciicola*속 1균주, *Shewanella*속 8균주, *Vibrio*속 3균

주, *Alteromonas*속 3균주, *Proteobacteria/Alphaproteobacteria*의 *Loktanella*속 1균주, *Tateyamaria*속 1균주, *Roseobacter*속 1균주, *Rhodovulum*속 1균주, *Pseudovibrio*속 1균주, *Phaeobacter*속 1균주, *Bacteroidetes/Flavobacteria*의 *Winogradskyella*속 1균주, *Cellulophaga*속 1균주, *Formosa*속 1균주, *Tenacibaculum*속 4균주, *Polaribacter*속 3균주, *Actinobacteria/Actinobacteria/Actinobacteridae*의 *Micrococcus*속 1균주, *Firmicutes/Bacilli*의 *Bacillus*속 1균주, *Exiguobacterium*속 1균주가 분리되었다. 서귀포 동부지역에서 분리되어진 색소생성 미생물을 분류해 본 결과 *Proteobacteria/Gammaproteobacteria*의 *Pseudoalteromonas*속에 포함되는 6균주, *Shewanella*속 4균주, *Pseudomonas*속 2균주, *Microbulbifer*속 1균주, *Vibrio*속 2균주, *Alteromonas*속 1균주가 분리되었다. *Proteobacteria/Alphaproteobacteria*의 *Loktanella*속에서 1균주, *Paracoccus*속 3균주가 분리되었다. *Firmicutes/Bacilli*의 *Bacillus*속에서 3균주, *Exiguobacterium*속 1균주, *Marinibacillus*속 1균주가 분리되었다. *Actinobacteria/Actinobacteria/Actinobacteridae*의 *Micrococcus*속에서는 1균주가 분리되었다. *Bacteroidetes/Flavobacteria*의 *Polaribacter*속 1균주, *Donghaeana*속 1균주, *Winogradskyella*속 1균주, *Tenacibaculum*속에서 1균주가 분리되었다. 서귀포 서부지역 조간대에서 분리되어진 색소생성 미생물은 *Proteobacteria/Gammaproteobacteria*의 *Pseudoalteromonas*속의 12균주, *Shewanella*속 6균주, *Alteromonas*속 3균주, *Serratia*속 2균주, *Vibrio*속 1균주가 분리되었다. *Firmicutes/Bacilli*의 *Bacillus*속 6균주, *Sporosarcina*속 1균주, *Bacteroidetes/Flavobacteria*의 *Tenacibaculum*속 3균주, *Bacteroidetes/Sphingobacteria*의 *Flexibacter*속 1균주, *Persicobacter*속 2균주가 분리되었다. 제주도 조간대 4개 지역 12개 지점에서 분리되어진 136개의 색소 형성 미생물 중 대부분의 미생물은 *Proteobacteria/Gammaproteobacteria* 그룹(64%)에 속하였으며 다음으로 *Bacteroidetes/Flavobacteria* 그룹(13%), *Proteobacteria/Alphaproteobacteria* 그룹(8%), *Firmicutes/Bacilli* 그룹(10.8%), *Bacteroidetes/Sphingobacteria* 그룹(2.1%) 그리고 *Actinobacteria* 그룹(2.1%)에 속하는 것으로 나타났다.

생리적 특성균으로 단백질 분해효소 생성 미생물은 체외 단백질 분해효소 활성이 가장 높은 균주 즉 clear zone이 직경 20 mm 이상 나타내는 35균주를 순수 분리하였다. 분리된 균주들의 배지상에서 자랐을 때 colony의 색상은 creamy, beige, pale yellow 등이었으며 그람음성균이 대부분이었으며 33균주가 운동성을 가지고 있었다. 또한 분리된 미생물들은 다양한 온도, 높은 염 농도 및 pH에서

도 성장이 가능하다는 것을 확인 할 수가 있었다. 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 단백질 분해효소 생성 미생물의 계통분류학적으로 어떤 division에 속하는지를 확인 하여 본 결과 *Proteobacteria/Gammaproteobacteria*의 *Pseudoalteromonas* 속 10균주, *Vibrio* 속 21균주, *Ferrania* 속 1균주, *Proteobacteria/Alphaproteobacteria*의 *Phaeobacter* 속 1균주, *Firmicutes/Bacilli*의 *Bacillus* 속 2균주가 분리되었다. 이번 연구에서 분리된 단백질 분해효소 생성 미생물 중 *Vibrio*속이 가장 많은 수(21균주, 60 %)를 차지하였다. 지질 분해효소 생성 미생물 또한 체외 지질 분해효소 활성이 가장 높은 균주 즉 clear zone이 직경 20 mm 이상 나타내는 9균주를 순수 분리하였다. 균주들의 배지상에서 자랐을 때 colony의 색상은 creamy, beige, pale yellow, brown, white 등이었으며 분리된 모든 균주는 그람음성균이었다. 운동성 실험에서는 9균주 모두 운동성을 가지고 있었다. 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 지질 분해효소 생성 미생물의 계통분류학적으로 어떤 division에 속하는지를 확인 하여 본 결과 *Proteobacteria/Gammaproteobacteria*의 *Pseudoalteromonas* 속 1균주, *Vibrio*속 2균주, *Alteromonas*속 4균주, *Paeudoalteromonas*속 1균주, *Agarivorans*속 1균주가 분리되었다.

제주도 조간대에서 분리 되어진 색소 생성 미생물, 단백질분해효소 생산 미생물 및 지질분해효소 생산 미생물의 16S rRNA 염기서열을 분석하여 본 결과 색소형성 미생물 중 총 8균주가 새로운 종일 가능성이 매우 높게 나타났다. 이들에 대해서는 앞으로 근연속의 근연종 즉 type strain을 분양받아 배양 특성, 형태적 특성, 생리·생화학적 특성, 화학적 특성, 분자생물학적 특성을 비교 분석할 필요가 절실히 요구된다.

PART II

신규 미생물 *Loktanalla pyoseonensis* sp. nov. 의
다상적 분류

Polyphasic taxonomy of *Loktanalla pyoseonensis* sp.
nov. in the family *Rhodobacteraceae*



ABSTRACT

A Gram-negative, aerobic, heterotrophic, rod-shaped bacterium, designated strain JJM85^T, was isolated from beach sand in Republic of Korea. Colonies of the cell were pink in colour, convex, smooth and entire edge. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences of the organism within the *Rhodobacter* group of the α -subclass of the Proteobacteria. The nearest neighbours were members of the genus *Loktanella*, with sequences similarity values ranging from 94.5 to 95.5 %. The G+C content of the DNA was 68.9 mol%. The major fatty acid was C18:1 *ω*7c (87.4%). Data on G+C and fatty acid contents support the affiliation to the genus *Loktanella*. The organism grows at pH 5.0–10.0 and 4–30°C, respectively and requires natural seawater for growth. The phenotypic features and phylogenetic evidence show that isolate constitutes a members of a novel species within the genus *Loktanella*. The name *Loktanella pyoseonensis* sp. nov. is proposed, with the type strain JJM85^T (= KCTC 22372^T = DSM 21424^T).

1. 서론

1.1. 새로운 미생물의 중요성

생명의 한계는 미생물에 의해서 결정된다고 생각되어진다. 지구 생물량의 약 60%를 차지하는 미생물은 지구상에 출현한 최초의 생물이며, 이 지구를 서식지로 하여 35억년이상 생존해 오고 있다. 이러한 미생물은 지구상의 어떤 환경에서도 존재한다. 다른 생물은 살 수 없는 혹한의 남극 얼음 속에도, 뜨거운 온천수나 심해저의 열수구에서도, 엄청나게 높은 압력이 미치는 심해저에서도, 빛이 전혀 없는 동굴 속과 토양, 바다 속에도 미생물은 살고 있다. 또한 높은 방사능에 노출되어도, 높은 농도의 염분이나 강산성 또는 알칼리 용액에서도, 무기물만이 유일한 영양공급원인 환경에서도 곳곳하게 살아가는 미생물이 있다. 연안의 경우에도 해수, 해저퇴적층, 갯벌, 부유물질의 표면, 해양생물 표피나 내부기관에는 다양한 형태와 생리적 특성을 지닌 해양미생물들이 존재하고 있다. 해양에서 새로운 미생물들이 발견되고 또 새로운 대사물질이 발견됨에 따라 해양 미생물의 종 다양성뿐만 아니라 생태계의 다양성은 새로운 물질의 탐색 대상으로서 깊은 관심을 받게 되었다. 생태계의 다양성은 생물군집의 양상과 상호 작용하는 시스템의 차이로 구분되며, 일반적으로는 특정 서식지의 특성으로 대변된다. 또한 물질과 에너지의 순환, 시스템의 재생력 등 생태계의 평형유지기능을 하나의 통합된 개념으로서 정의한다. 따라서 생태계 다양성은 정적 상태이기보다는 시, 공간적인 동적 상태로 이해해야 할 것이다. 특히 연안이나 하구 같은 생태계에 서식하는 미생물들은 물질순환에 아주 중요한 역할을 맡고 있으며 환경의 지속적인 보전에 기여하고 있다. 그러나 미생물은 생명공학에 있어 중심적인 역할을 함에도 불구하고 미생물의 실제 다양성에 대하여는 알려진 것이 많지 않다.

미생물 생태학자들의 연구결과에 의하면 자연계에 존재하는 미생물은 약 1% 미만만이 현재의 기술로서 배양이 가능한 것으로 알려져 있다 (Cowan, 2000). 아직 밝혀지지 않은 미생물들은 대부분 통상적인 조건에서 배양할 수 없는 것들로써, 특히 유용한 미생물이 많이 서식하는 것으로 알려진 극한 환경의 경우에는

난배양성 미생물이 더 많은 비율을 차지할 것으로 알려지고 있다. 미생물의 종의 수는 현재 약 300,000에서 1,000,000종으로 추정되고 있으며, 1995년까지 학계에서 인정되고 있는 미생물은 4,000종을 약간 상회하고 있는 것으로 밝혀진바 있다. 현재까지 식물 및 동물 종의 약 50% 그리고 동물 중 곤충의 경우 약 20% (약 80만종) 정도가 알려져 있는 것에 비하면 미생물 다양성이나 자원에 대한 연구는 비교적 매우 뒤쳐져있는데, 이러한 원인 중 가장 큰 문제점으로서 대부분의 미생물이 우리가 지금까지 알고 있는 방법으로는 배양이 불가능하다는 점에 기인한다. 선진국 등에서는 이러한 단점을 보완하기 위해 자연 생태계로부터 배양을 거치지 않고 직접 DNA를 분리하고, 이로부터 현재 미생물 분류의 토대가 되고있는 16S ribosomal RNA 유전자(16S rDNA)를 확보하여 시료 내 종 다양성을 연구하여 미생물 자원을 파악하려는 방법이 많이 사용되고 있다(Tiedje and Zhou, 1996). 다양한 환경에서 행해진 이들 연구에 의하면 현재까지 알려져 있지 않은 미생물이 존재하며, 대부분의 경우 이들이 미생물 군집구성에 있어서 대다수를 차지하고 있는 것을 알 있다. 예를 들면, 미국 Yellowstone의 열천수에서 수행된 연구에 의하면, 이곳 한곳에서만 12개의 새로운 Bacteria 문(division)을 발견하였는데(Hugenholtz *et al.* 1998), 이는 그 전까지 발견된 문의 수의 50%에 해당되는 숫자이다. 자연계는 우리의 추측이나 상상을 초월할 정도의 다양성으로 구성된 생물체 및 이들의 생명현상으로 유지 진화되고 있다고 밝혀진 바 있다. 따라서 자연생태계에 대한 기초적/근본적인 연구 역시 여러 가지 분자적 요소와 세포 수준의 요소 및 이들의 상호관계로 구성된 생명현상, 생명현상의 통합체로서의 개체, 각 개체군들이 모여 형성되는 군집들로 이루어진 이 생태계를 체계적으로 이해하기 위한 관점이 필수적이며 선진국에서 이러한 과학적 배경 아래 생물 및 미생물 자원의 수집과 확보에 많은 노력을 기울이고 있다. 미생물자원은 생물 산업은 물론, 화학 산업, 제지, 펄프, 식품분야, 사료, 피혁 및 에너지 산업 분야에 폭넓게 활용되어 미래 생물 산업의 근간을 이룰 것으로 기대된다. 특히, 극한 환경미생물로부터 얻어진 극한효소는 고온이나 유기용매 존재 하에서도 매우 높은 안정성을 유지하므로 이를 기존의 화학공정을 대체하여 환경 친화적이고 경제적인 새로운 공정을 개발하는데 주도적으로 활용될 것이다.

이들 배양 가능한 미생물이나 배양 불가능한 미생물이 가지고 있는 고유한 유

전자원은 그 다양성과 대사능력이 무한히 크기 때문에 인류 복지를 위한 활용가치는 무궁무진하다고 할 수 있다.

1.2. 미생물의 진화

생물학자들의 이전에는 생물계를 다섯 개의 계(kingdom), 즉, 식물(plants), 동물(animals), 균류(fungi), 원생생물(protists) 그리고 모네라(monera) [원핵생물(prokaryotes)]로 그룹 지었다. 그러나 분자계통학에 이 다섯 개의 계는 다섯의 주요 진화계열을 나타내는 것이 아니라는 사실이 밝혀졌다.

지구상의 세포 생명체는 도메인(domain)이라 불리우는 3가지 주요 계통을 따라 진화하였으며, 그 중 둘은 오직 오직 미생물과 원핵세포로만 구성되어 있다 (Fig. 1)(<http://rdp.cme.msu.edu>). 세 번째 계통에 진핵생물이 포함되며, 모네라를 제외한 원래의 다섯 계를 모두 포함하고 있다. 두 원핵 그룹은 세균(Bacteria)과 고세균(Archaea)이며, 진핵 도메인은 진핵생물(Eukarya)이라 불린다. 이들 용어는 생물의 3개 도메인을 정의하며 도메인은 가장 상위의 생물 분류군이다. 따라서 식물, 동물, 균류, 원생생물은 모두 진핵생물 도메인내의 계(kingdom)에 속한다.

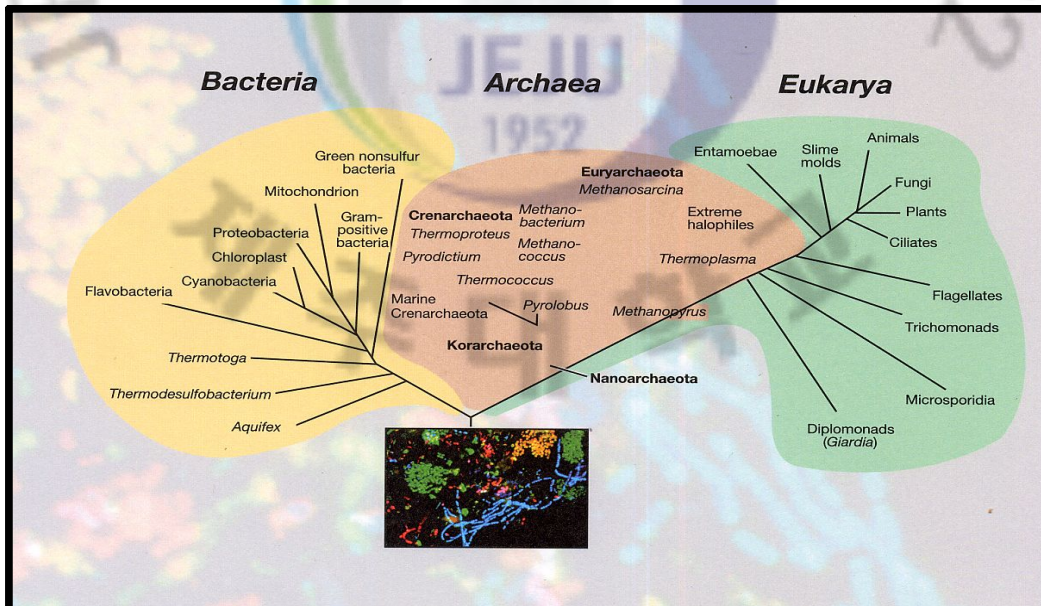


Fig. 1. The phylogenetic tree of cellular organisms

Fig. 1에서 나타내는 계통수는 모든 생물에 관한 진화적 역사를 나타내며, 또 세 도메인(domain)을 분명히 나타내고 있다. 전체 계통수의 뿌리(root)는 지구상에 현존하는 모든 생명체가 하나의 공통조상, 즉 전체조상(universal ancestor)을 공유했던 진화 역사상의 한점을 나타낸다(Michael, T. Madigan and John M. Martinko. 2006). 오늘날 살아있는 생물과 전체계통수 (Fig. 1))에 그려진 어떤 생물도 원시(primitive)생물은 아니다. 현존하는 모든 생물체는 현대(modern)생물이며, 그들의 생태적 지위에 잘 적응하여 생존에 성공한 것이다. 이들 생물 중 어떤 것은 사실 원시생물과 표현양식(phenotypically)으로 비슷하며, 초고온성 원핵생물 (최적 성장 온도 >80 °C)이 그 좋은 예이다. Aquifex와 Methanopyrus는 각각 세균과 고세균의 도메인 내에서 계통수의 뿌리에서 비교적 가깝게 자리를 차지하고 있다(Fig. 1). 이 두 생물들은 모두 매우 높은 온도에서 성장할 수 있는데, 이 조건은 고온 상태의 지구에서 성장하던 조상 생물들이 처했던 환경조건과 유사하다. 그럼에도 불구하고 초기에 분기되어 나온 것으로 밝혀진 생물 자신들이 원시 생물은 아니다. 이들은 현대생물이며, *Proteobacteria* [세균(Bacteria)]나 극호염성 생물 [고세균(Archaea)]처럼 계통수의 위 부분으로 분기된 생물에 비해 단순히 계통적으로 덜 파생된 생물들이다.

세균(Bacteria)

세균(Bacteria) 도메인에는 적어도 40개의 문 (phyla라 하며, 단수는 문)이 이제까지 발견되었으며 몇몇의 중요한 세균문이 Fig. 1의 세균계통수에 나타나 있다. 많은 세균 문들이 오직 환경시료의 염기서열 만으로 정의되어 있다(Fig. 2). 세균(Bacteria) 도메인에 있는 일부계통은 형태나 생리와 같은 표현형적으로 일관성이 결여된 종들로 구성된다. *Proteobacteria*가 좋은 예인데, 이 그룹의 세균들이 가지고 있는 생리적 특성은 지금까지 알려진 미생물들의 온갖 특징을 가지고 있다. 이것은 미생물의 생리적 특성과 계통발생은 반드시 연관성이 있는 것이 아니라는 것은 보여준다. 진핵생물의 소기관은 분명히 세균(Bacteria)의 주요 그룹인 *Proteobacteria* (Fig. 1), 구체적으로 *Rhizobium*과 *Rickettsias*와 같은 세균으로부터 발생하였다. 흥미롭게도 이 생물들은 미토콘드리아처럼 세포내에서 생존하거나 혹은 식물 혹은 동물의 세포내에서 산다. 시안세균과 엽록체 모두가 산소

발생형 광합성을 하는데서 예측 할 수 있듯이, 엽록체는 시안세균 문(phylum)에서 발생하였다.(Fig. 1). 적어도 세균의 18가지 주요 계통(phylum)이 실험실 배양의 연구로부터 알려져 있으며, 자연 서식처로부터 리보솜 RNA 유전자의 회수 및 서열분석을 통해 많은 것들이 확인되고 있다. Fig. 2 는 세균의 계통학적 개요를 보여주고 있다 (Michael, T. Madigan and John M. Martinko. 2006). 이 계통수는 세포질에 있는 리보솜의 소단위(ssu)에서 얻어진 16S rRNA 염기서열을 바탕으로 만들어진 것이다.

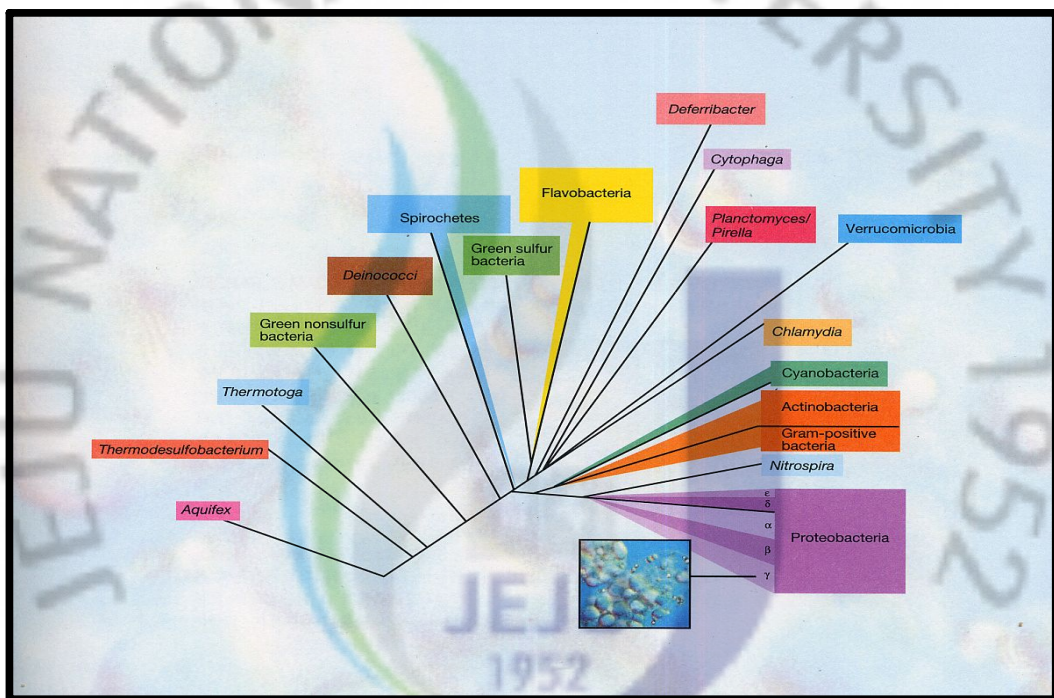


Fig. 2. The phylogenetic tree of Domain Eubacteria

고세균 (Archaea)

계통학적 관점에서 고세균(Archaea) 도메인은 Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota의 4개 문으로 구성된다 (Fig. 1), 전체 계통수의 뿌리에서 매우 가깝게 분기되어 나온 것은 Thermoproteus, Pyrolobus, pyrodictium과 같은 초고온성 Crenarchaeota이다. 그 다음에 메탄생성 원핵생물과 극 호염성 생물 그룹인 Euryarchaeota가 있다. 호산성, 호염성의 세포벽이 없는 원핵생물인 Thermoplasma는 극호염성 생물 그룹과 다소 연관되어있다. Cranarchaeota 계통

(Fig. 1) (<http://rdp.cme.msu.edu>)중 일부는 자연 환경에서 채집한 리보솜 유전자를 통해서만 알려져 있다. 그러나 흥미롭게도, 이러한 서열들은 지금까지 Crenarchaeota의 서식지로 알려진 온천이나 심해의 바다 열수분출공에 비해 훨씬 낮은 온도의 극지 빙하를 비롯한 대양에 서식하는 생물들에서 유래되었다. 또 다른 Crenarchaeota 서열들은 토양과 담수의 군집 채집에서 나타났다. 잠정적으로 Korarchaeota라 불리우고 있는 고세균(Archaea) 문 전체는 옐로스톤 국립공원(Yellowstone National Park) (미국 Wyoming 주)에 있는 고온 온천(Obsidian pool)에서 냉환경 적응 Crenarchaeota와 마찬가지로 미생물 군집분석에 의해서 동정되었다. Korarchaeota가 초고온성이라는 사실을 분명히 알 수 있다. 그러므로 이들은 초고온성 Crenarchaeota와 유사한 대사적 특성을 가질 것이다. Korarchaeota의 아래에 위치하고 있는 것은 Nanoarchaeota로 이제까지는 오직 Nanoarchaeum이라는 한 종만이 알려져 있다. 이 조그만 세균은 Ignicoccus라 불리는 다른 고세균의 기생체이며, 알려진 모든 원핵생물의 유전체중 가장 작은 유전체를 가진다 (Michael, T. Madigan and John M. Martinko. 2006). Fig. 3. 계통수는 세포질에 있는 리보솜의 소단위(small subunit, SSU)에서 얻어진 16S rRNA 염기서열을 바탕으로 만들어진 것이다.

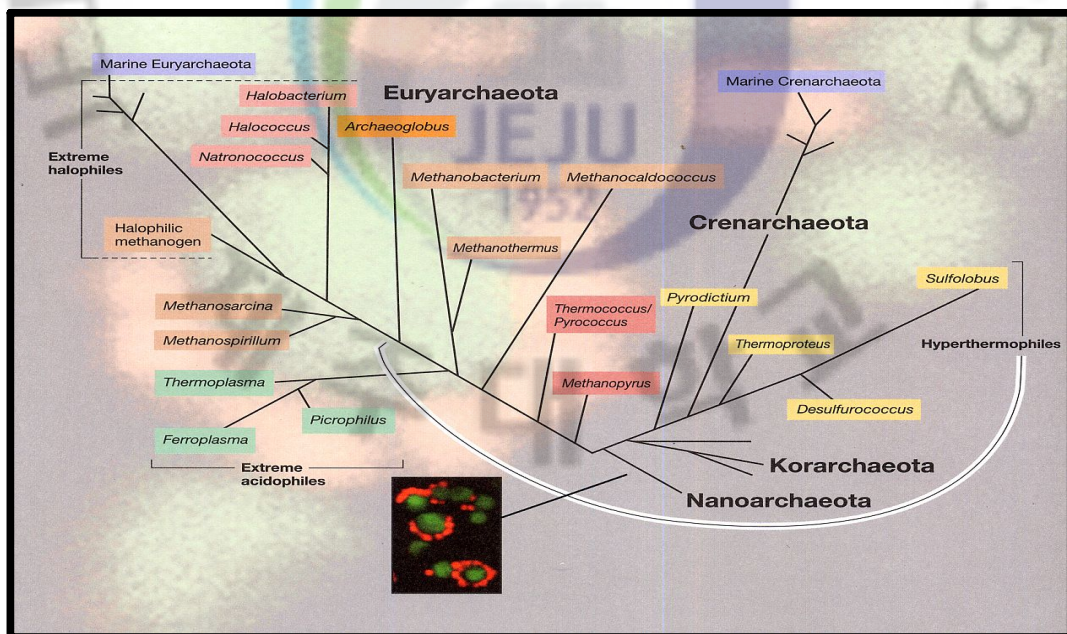


Fig. 3. The phylogenetic tree of Domain Archaea

진핵생물(Eukarya)

진핵생물(Eukarya) 도메인에 속하는 종의 계통수는 16S rRNA와 동일한 기능을 갖는 진핵세포의 세포질 리보솜인 18S rRNA 염기서열로부터 작성되었다. 초기의 진핵생물은 지금의 microsporidia와 diplomonads와 유사했을 것이다. 이 생물들은 모두 미생물에서 인간에 이르기까지 다양한 그룹의 진핵생물과 연계해서 살아가는 절대 기생성 생물이다(예, 인간 병원체인 Giardia는 diplomonads 그룹에 속한다). 흥미롭게도, microsporidia와 diplomonads는 막으로 둘러싸인 핵은 가지고 있으나 미토콘드리아는 없다. 이런 점에서 이들은 안정된 내부 공생자를 최초로 수용했던 세포형과 비슷하다. 더욱 계통학적으로 분화된 진핵생물에는 다세포생물의 포함되어 있으며, 다세포 생물은 가장 크고 구조적으로도 가장 복잡한 진핵생물인 식물과 동물에 이르러 그 절정을 이룬다(Fig. 1). 진핵생물은 세균보다는 고세균과 더 밀접한 관계를 가지고 있다. 이러한 진핵생물의 계통학은 세포질 리보솜의 소단위에서 얻어진 18S rRNA의 염기서열 비교연구를 통해 추론되었다(Fig. 4) (Michael, T. Madigan and John M. Martinko. 2006). 대부분의 미생물 학자들은 염기서열의 비교연구, 특히 SSU rRNA에 기초한 분자 계통수가 현재로서는 미생물 계통학의 타당한 그림을 그리는데 적합하다고 한다. 그러나 이는 진핵세포보다는 원핵세포 도메인-세균과 고세균에서 훨씬 더 강하다.

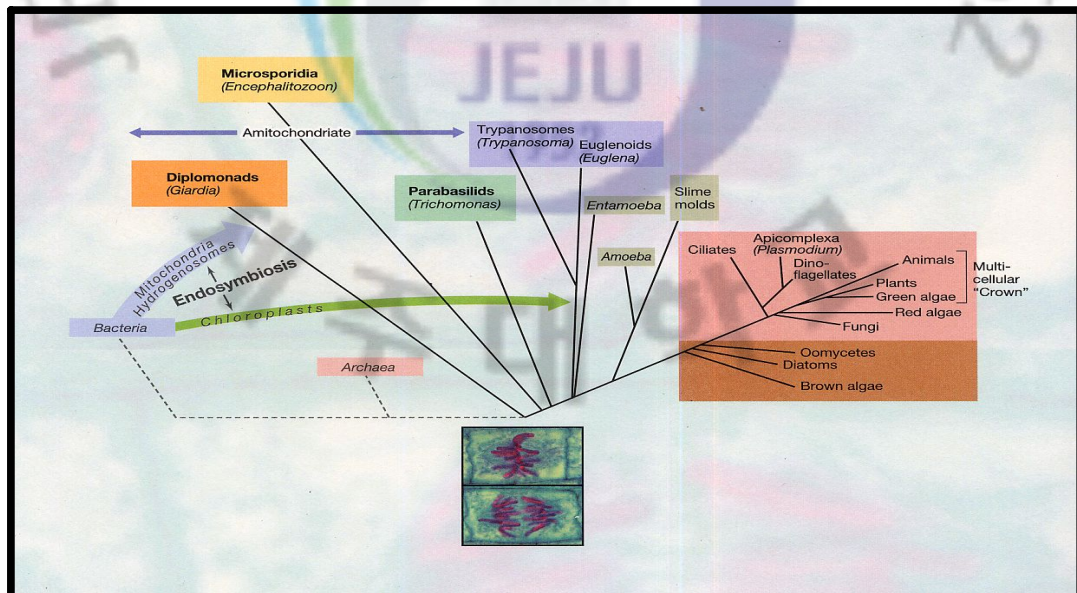


Fig. 4. The phylogenetic tree of Domain Eukarya

1.3. 미생물 분류(Microbial taxonomy)

미생물을 분류(classification) 혹은 분류학(taxonomy)은 미생물학의 주요 분야이다. 학자들은 분류를 통하여 서로 다른 미생물간의 유연관계를 비교하고, 미생물의 명명을 위한 체계적인 절차를 개발한다. 분류학은 분류에 관한 학문으로 동정(identification)과 명명(nomenclature)의 두 주요 분과로 나뉜다. 분류학(taxonomy)을 계통학(phylogeny)과 구분하는 것은 매우 중요하다. 분류학과 계통학 이 두 용어에 의미가 사실은 다르기 때문이다. 미생물을 분류하는 방법은 전통적으로 표현형(phenotypic)의 분석에 의존하며, 여기에는 미생물의 모양, 에너지 대사, 효소 그리고 다른 여러 가지 특징들이 포함된다. 이를 고전적 분류법(classical taxonomy)이라 한다.

고전적 분류(classical taxonomy)에는 여러 가지 표현형적 특징들을 분석하고 그 데이터를 종(species)에서 도메인(domain)까지 분류 계급으로 생물들을 그룹짓는데 사용한다. 이때 널리 사용되는 분류학적 특징들에는 형태, 영양, 생리, 서식지가 포함된다. 즉, 미생물을 분류하기 위해서는 일반적인 것에서 특수한 것까지 여러 가지 표현형적인 특징들을 분석하여야 한다. 이렇듯 고전적 분류는 단일적 분류(monothetic classification)로 분류 체계가 복잡하게 이루어져 있다. 그리고 이에 대한 정보량도 적으며 돌연변이나 시험 오차(test error)에 의한 균주변화(strain variation)를 쉽게 수용할 수 없다는 단점을 가지고 있다(Sneath, 1962). 그러나 표현형의 분석을 미생물의 동정과 분류에 있어서 여전히 중요한 역할을 하고 있다. 하지만 고전적 분류의 문제점을 해결하기 위해 몇 가지의 분류방법이 개발되었다. 많은 미생물들을 동등한 중요도(weight)가 부여된 여러 단위형질(unit character)에 대해 시험하고 컴퓨터를 이용해 수리적으로 분류하는 수리 분류법(unmerical taxonomy), 세포나 세포 분획물을 화학적으로 분석하여 얻은 정보를 분류 및 동정에 이용하는 화학적 분류법(chemotaxonomy)(이, 1984), 16S rRNA의 염기서열을 비교하거나 rDNA-DNA hybridization 등의 방법을 이용하여 분자간의 유사도를 비교분석하여 미생물의 유연관계를 분석하는 분자생물학적 분류(molecular systematics) 등이 최근에 미생물의 분류에 이용되고 있다.

수리 분류법(unmerical taxonomy)은 1950년대에 이르러 컴퓨터의 발전에 따라 미생물의 형태적 특성, 생리 생화학적 특성, 분해능, 생육조건, 탄소원 및 질소원 요구성 등 다양한 특성을 조사하여 얻어진 결과를 컴퓨터를 이용하여 미생물들의 유사성을 기초로 하여 군집화 혹은 분류하는 방법(Sneath, 1978) 으로 고전적 분류법보다 객관적이고 안정적인 분류를 할 수 있다. 수리 분류는 분류 대상 생물(Operational Taxonomic Unit, OTU)에 대해 많은 형질(Characteristics)을 관찰 측정하고, 수치처리나 통계적 처리를 하여 분류군을 찾아내는 작업이다. 통계 처리에는 OTU의 수와 형질의 종류가 충분하게 많은 것이 바람직하며, 일단 OTU로서 50종류 이상, 형질의 종류로서는 100종류 이상이 기준이 된다(Sneath, 1973). 수리 분류를 적용하는 전단계로서, 집단의 규모뿐만 아니라 집단의 질에도 유의할 필요가 있다. 해석 대상의 OTU에는 신규 미생물뿐만 아니라, 분류 체계 상 정의되어 있는 표준균주나 참조균주를 포함 시킬 필요가 있다. 이들 미생물은 일반적으로 세계 각국에 있는 미생물 보존기관에서 입수할 수 있다. 또한, 분석 결과의 신뢰성을 평가하기 위해서 동일 균주를 중복해서 분석하는 것이 바람직하다(Sneath, 1972). 분석하려는 형질은 colony, 형태, 생육조건, 생화학적 특성, 탄소나 질소원의 이용도, 혈청, 화학적 분류 지표, 유전학적 특성 등에서 폭넓게 서로 상관이 없는 독립형질을 선택한다. 또한 데이터가 집단내에서 적절히 분산하고 있는 형질이 바람직하지만, 중복하여 시험한 동일 OTU의 데이터가 빈번히 달라 재현성이 떨어지는 분석항목은 분석 대상에서 제외하여야 한다. 기존의 분류 체계를 염두에 두면, 분류의 기준이 될 것 같은 형질에 미리 무게를 두고 싶어지지만 수리분류의 제일 단계에서는 모든 형질에 대해 중요도를 평가하지 않는다. 즉 각 형질을 등가로 취급하여, 분류군을 식별하는데 유용한 형질을 수리적으로 구하는 쪽이 보다 객관적인 결론을 얻을 수 있다.

화학적 분류법(chemotaxonomy)은 1970년대 이르러 생리 생화학적 분석 방법이 발전함에 따라 어떤 특정 균체 성분 (세포나 세포 분획물)에 대하여 생화학적, 분자생물학적 방법을 이용하여 그 구성 성분을 비교함으로써 미생물간의 유연성을 비교, 분류하는 방법이다. 따라서 분류의 지표가 되는 균체 성분은 대상 미생물에 널리 존재하면서 편차가 풍부하여야 한다. 즉, 미생물의 생명현상의 근간이 되면서 환경변화 등에 대하여 영향을 받지 않는 안정한 것이 좋다. 현재 미생물

의 화학적 분류 지표로 많이 활용되어지고 있는 것으로는 세포벽 성분, 세포내 당, 균체 지질, 단백질의 아미노산 조성 등이 있다. 화학적 분류 방법은 기존의 형태적 분류방법과 비교하여 신속, 정확하며 분자 유전학적 방법에 비하여 경제적이다.

분자생물학적 분류(molecular systematics, molecular biological classification)는 생물의 진화를 분자 수준에서 연구하는 분자진화학 (molecular phylogeny)이 급속하게 발전하면서 현존하는 미생물이 어떤 경로를 통하여 과거로부터 현재에 이르게 되었는지에 관심을 갖게 되면서 핵산 분석 자료들 즉 GC content, DNA-DNA pairing, 16S 및 5S rRNA 분석 자료들을 이용하여 미생물의 분류 및 동정 그리고 계통관계 (진화학적 관계)를 규명하고자 하는 방법이다(Fox and Stackbrandt, 1987). 세균의 세포질 내에는 유전정보를 가지고 있는 DNA와 단백질 합성에 필요한 RAN가 있는데 G-C contents (G-C mol%)은 세균의 genome을 구성하는 DNA의 전 염기량에 대한 Guanine과 Cytosine의 합계의 비율로서 Tm (Melting Temperature)법, 염화세슘(CsCl)을 사용한 밀도 균배 원심 침전법, PI-nuclease를 사용한 HPLC법 등으로 측정할 수 있다. 대체적으로 세균의 DNA G-C contents는 25~75% 범위 내에 있고 그 값은 각각의 균주에서 일정하다(Fig. 5). G-C contents가 10% 이상 다른 균주는 유전학적으로 동일종이라고 할 수 없다. 그러나 유전학적 유의도가 높은 두 균주 간에 G-C contents가 비슷하다고 해서 두 균주의 DNA 염기배열이 같다고는 보장할 수 없다.

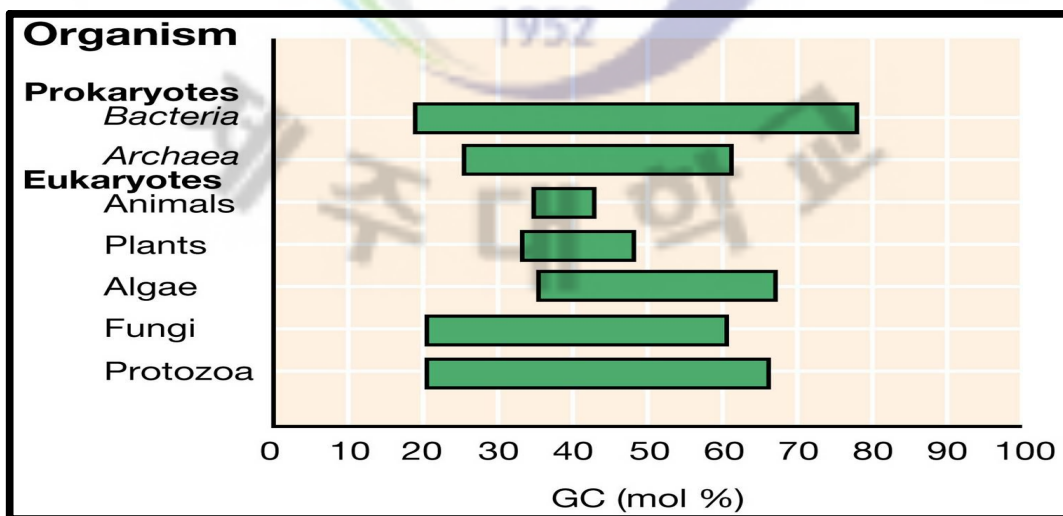


Fig. 5. G-C (or guanine-cytosine content) contents

따라서 DNA 염기배열의 상동성을 알아보기 위해 DNA-DNA hybridization을 하게 된다(Fig. 6). DNA hybridization 연구는 균종의 개념을 명확하게는 하였으나 동일 균종으로 간주하기 위한 DNA 상동치의 하한선을 어디로 할 것인가를 확정지을 수는 없다. 그러나 1987년 국제 세균 분류 명명 위원회의 특별부 회의에서 미생물 분류학상의 종 (species)에 대하여 “종은 현재 계통적으로 정의가 가능한 분류학상의 유일한 단위이며, 정량적 DNA 상동성의 결과 70% 혹은 그 이상의 균주를 포함 한다”라고 정의 하였다 (박, 1992). 대조적으로 두 생물을 같은 속(genus)으로 주장하기 위해서는 적어도 25% 이상의 상동성 값을 가져야 한다(Fig. 7)(Johnson, 1973). RNA 상동치는 rRNA가 생물간의 계통을 나타내는데 유용하게 이용되어지는데 그 이유는 rRNA는 세포질 무계의 대부분을 차지하여 모든 생물로부터 쉽게 분리해 낼 수 있고 단백질 합성 기작 요소로서 모든 생물에 있어서 매우 중요하며 구조가 conservative하여 그 크기에 따라 쉽게 분리해 낼 수 있다. 뿐만 아니라 conservative한 rRNA 특성으로 인하여 다양한 생물의 비교가 가능하며 통계학적으로 비교할 수 있을 정도의 염기배열을 가지고 있다는 점이다. 특히 rRNA 중 5S rRNA 와 16S rRNA가 계통분류에 주로 사용되어지고 있다.

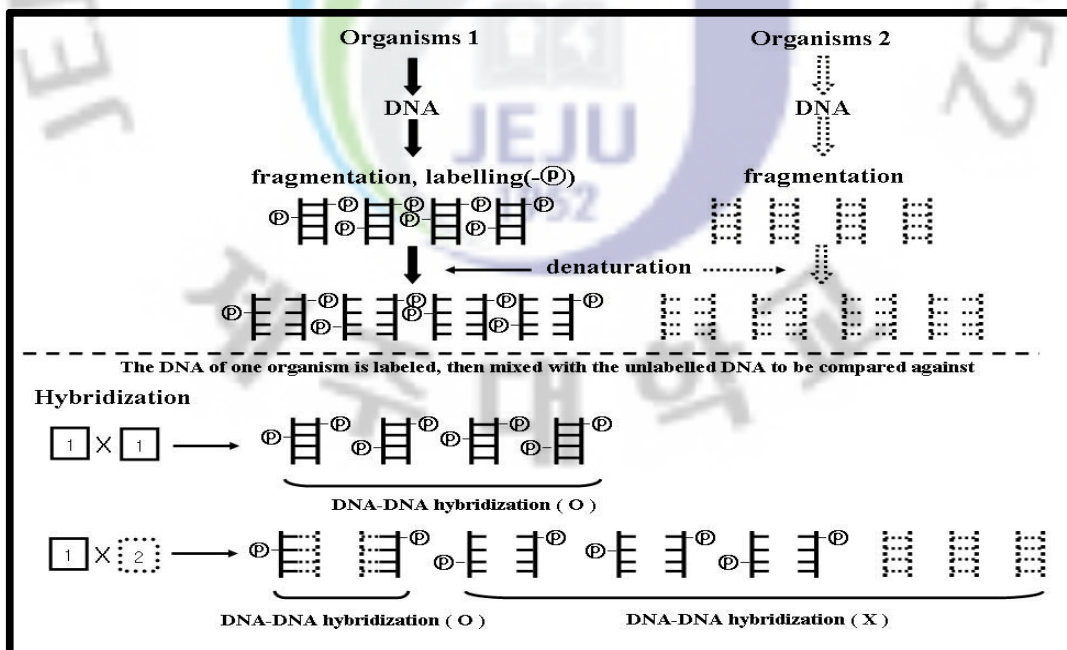


Fig. 6. DNA-DNA hybridization

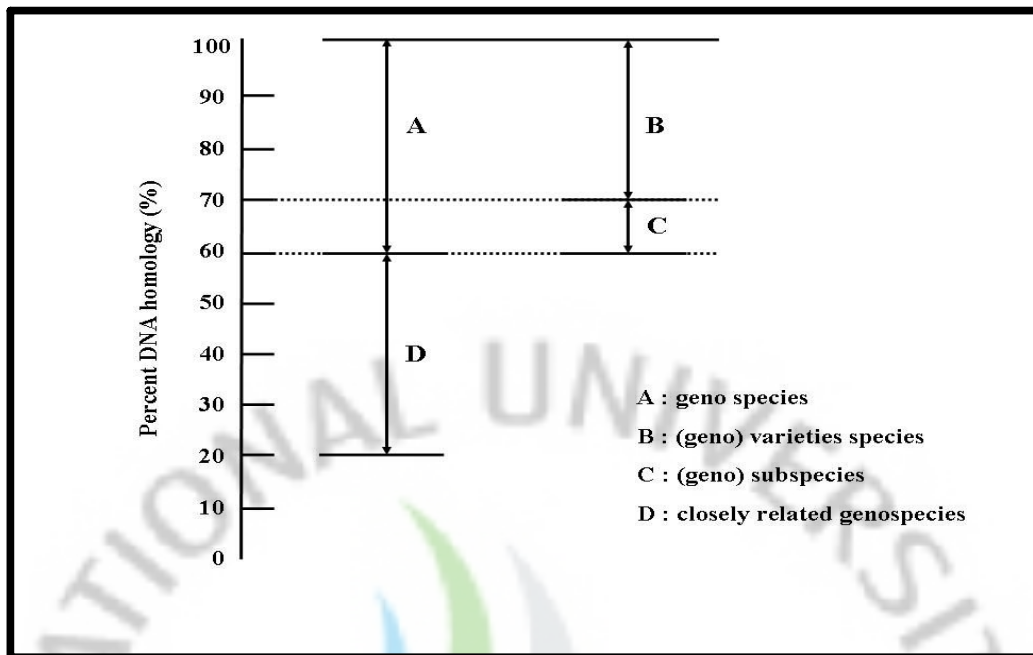


Fig. 7. Proposed taxonomic groupings based upon DNA homology data.

Phylogenetic tree (계통수, 계통진화구조)는 시간을 기준으로 하여 많은 세균의 진화적 분포관계를 기록한 것으로 Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), least squares (Maidak et al., 1996) maximum parsimony method (Kloge & Farris, 1969) 연산법을 사용하여 만들며 이를 토대로 미지의 미생물 특성을 예측할 수 있다. Neighbor-joining은 전통적인 cluster analysis에서 유래하나 각 계통이 동일한 속도로 진화했다는 가정을 두지 않으며, 가장 근연연관관계가 가까운 종부터 묶어나가는 방식으로 계통수 (Tree)를 만든다.

하지만 생물 또는 미생물을 한 측면에서 판단하여 식별하는 것은 위험하다. 분류체계는 하나라도 더 많은 독립된 특성을 조합하고 특성간의 연관성을 고려하여 구축해야 한다. 유전자 profile도 예외가 아니며 다면적으로 사고함으로써 분류의 확실성을 높이고, 기존의 개념에 들어가지 않는 신규 미생물을 발견할 기회도 증가한다. 다상분류학(polyphasic taxonomy)의 개념은 Colwell(1970)에 의해 제안되었고, 최근 Vandamme *et al.*, (1996)에 의해 다시 사용되기 시작하였다. Fig. 8에 나타낸 바와 같이 분류학적 특징은 분류계급과도 대응하여 그 유용성을 나타내고 있어 신속 동정법 개발에도 다상 분류학의 개념을 활용할 수 있다.

유전자를 이용한 분석 기술을 빠르게 진보되고 있으며, 게다가 최근의 분자유전학 및 분자생물학적 방법들도 점점 분류학에 이용되고 있다. 이와 병행하여 방대한 데이터 처리 기술 기술과 국제적인 데이터베이스의 구축은 유전자를 이용한 해석 기술의 보급에 크게 공헌하고 있다.

한편 자연계에 존재하는 모든 미생물 중에 비하면, 분리되어 인간이 확보하고 있는 것은 불과 몇 퍼센트라고 알려져 있다(Hawksworth, 1991). 분류 기술의 진보는 새로운 미생물의 탐색 기술과 병행하여, 미생물의 잠재력을 끌어내는 출구로서 점차 기대가 높아지고 있다.

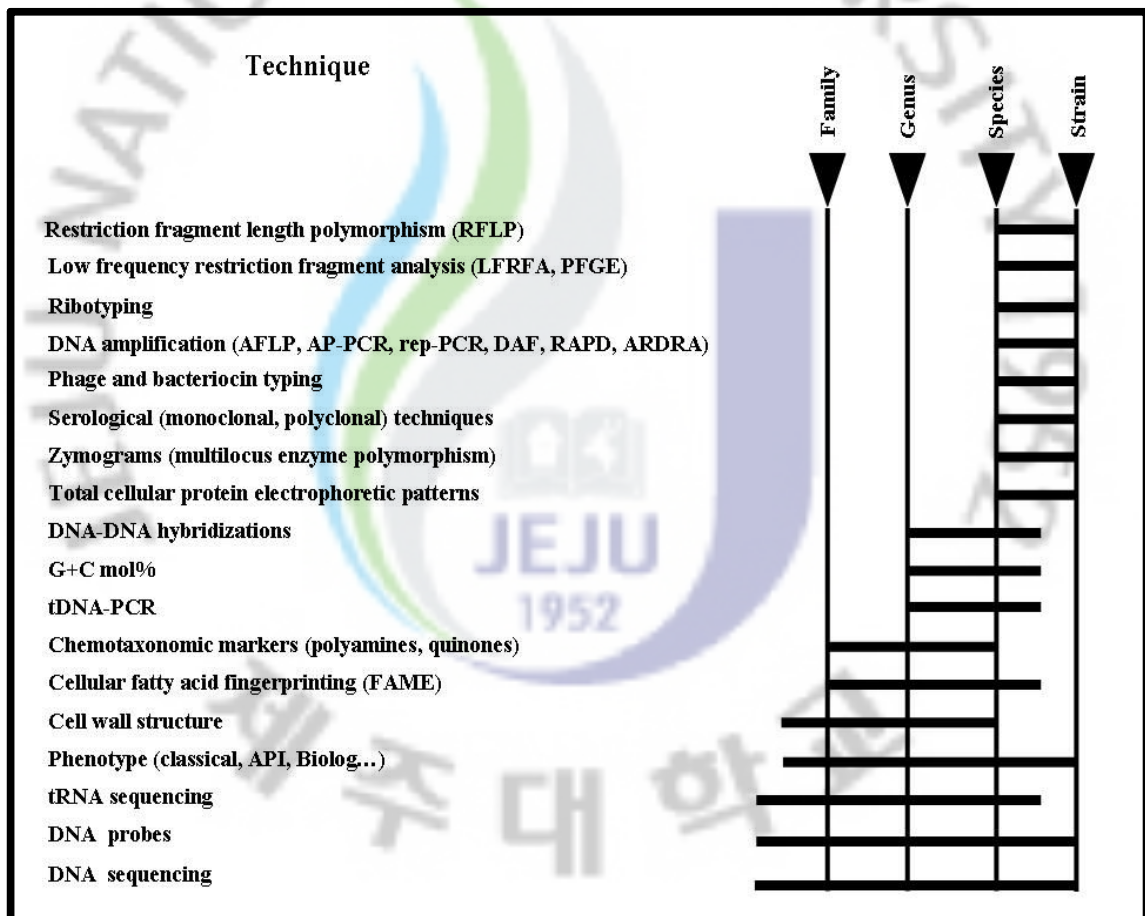


Fig. 8. Taxonomic resolution of some of the currently used technique.

1.4. 분자생물학적 접근의 필요성

자연 생태계 내에 존재하는 미생물은 0.001% ~ 3% 정도만 배양이 가능한 정도이며 (Table 1), 97 ~ 99% 이상의 미생물들이 전통적인 방법으로는 배양될 수 없어 자연 상태의 미생물 군집 구조 및 다양성에 대한 충분한 정보를 제시하지 못하고 있다(이 등, 2001; Amann *et al.*, 1995; Gray and Herwig 1996; Snaidr *et al.*, 1997). 따라서 최근에는 배양하지 않고 자연 생태계 내의 미생물 군집을 연구하는 방법들이 개발되고 있으며, 특히 핵산을 이용한 분자 생물학적 방법의 널리 이용되고 있다(한국해양연구원, 1998; Liobert-Bross *et al.*, 1998). 그 중 주로 SSU rRNA 분자에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. rRNA는 단백질 합성에 관여하며, 바이러스를 제외한 세포로 이루어진 모든 생물체에 존재하기 때문에 널리 이용되고 있다. 그 중 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 다른 미생물과의 연관성을 밝히고, 계통분류학적 위치를 결정하여 진화 관계를 추정할 수 있다(김 등, 2001; Giovannoni and Rappe, 2000). 또한 Ribosomal Database Project (RDP)와 Genbank 등에 등록되어 있는 16S rRNA database는 계통 분류학적 관점에서 비교가 가능하도록 정리되어 있어서 이를 이용하여 다양한 환경에 존재하는 미생물 군집을 규명하는데 유용하게 이용되고 있다.

Table 1. Culturability determined as a percentage of culturable bacteria in composition with total cell counts (Amann *et al.*, 1995).

Habitat	Culturability (%) ^a
Sea water	0.001 - 0.1
Fresh water	0.25
Mesophilic lake	0.1 - 1
Unpolluted estuarine waters	0.1 - 3
Activated sludge	1 - 25
Sediments	0.25
Soils	0.3

^a Culturable bacteria are measured as CFU

1.5. Phylum *Proteobacteria*

*Proteobacteria*는 이름도 형태를 다양하게 변화시킬 수 있는 성질 때문에 그리스어 신 Proteus에서 유래하게 되었다. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol, 2/2e (Part B) 전체가 종종 홍색세균이라고 불리우는 *Proteobacteria*에 관한 내용이다. 이는 자색의 광합성을 하는 세균이 여러 소그룹(subgroup)에 널리 퍼져 분포하기 때문이다. 즉, *Proteobacteria*는 가장 크고 가장 다양한 세균 그룹이다(Madigan M; Martinko J. 2005) 16S rRNA 연구에 의해 서로 계통발생학적으로 연관관계가 있다는 것이 밝혀지긴 했지만 *Proteobacteria*는 여러 측면에서 서로 현저하게 다르다(Lansing *et al.*, 2003). 이들 그람 음성균의 모양은 짧은 간균이나 구균인 것에서부터 prosthecace나 싹눈, 심지어 자실체를 갖는 것까지 매우 다양하다. 또한 이들 세균은 형태학적, 생리학적으로도 매우 다양하다. 광독립영양생물 (Photoautotrophy), 화학무기영양생물 (Chemolithotroph), 화학종속영양생물 (Chemoheterotroph) 등이 모두 존재한다. *Proteobacteria*의 대사방식, 형태, 생식방식에는 전반적으로 뚜렷한 양상이 없다. Fig. 1을 보면 *Proteobacteria*는 세균 계통수 상에서 마지막 문(phylum)이다. 이 그룹은 현재까지 모든 세균의 가장 큰 그룹이다 (Fig. 9, Michael and John. 2006). 16S rRNA 염기서열을 비교해 보면 *Proteobacteria*에는 5개의 세부 강(강)으로 구성되는데 각 강(class)에는 α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria*, δ -*Prptebacteria*, ϵ -*Proteobacteria*가 있고 그 안에 40개의 목(order), 94개 과(family), 627개 속(genus) 그리고 557개의 종(species)이 분포한다.

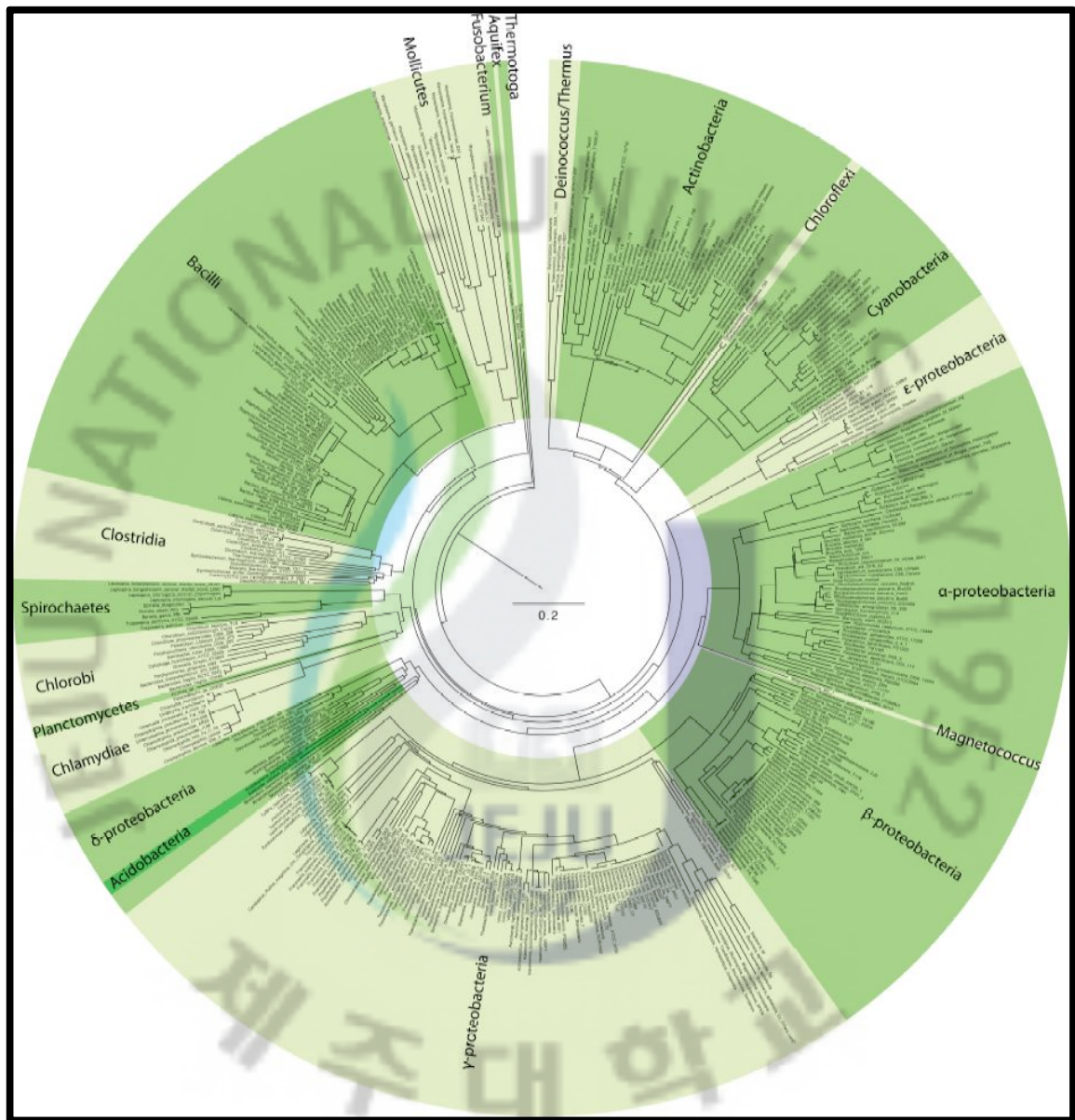


Fig. 9. The phylogenetic tree of the phylum *Proteobacteria* and related taxa.

Class : α -*Proteobacteria*

α -*Proteobacteria*는 대부분이 영양부족생물(영양분이 적은 상태에서 자랄 수 있는 생물)이다. 어떤 종류는 특별한 대사 방식을 갖는다. 예를 들면 *Methylobacterium*의 경우 메탄올 산화하는 세균인데 형태학적으로 매우 다양하며 메탄 외에 탄소 함유 산화 가능 물질을 에너지 발생에 필요 전자공여체로 이용한다. methane monooxygenase 보유하고 있어서 methane을 methanol로 산화시킨다. *Nitrobacter*의 경우에는 화학무기영양생물 (Chemolithotroph)이고, *Rhizobium* 같은 경우는 질소를 고정하는 능력을 갖는다. *Rickettsia*나 *Brucella* 같은 경우는 병원성 미생물이다. 실제로 *Rickettsia*는 절대 세포내 기생 미생물이다. α -*Proteobacteria* 강에는 8개의 목, 21개의 과, 197개 속 그리고 167개의 종이 분포한다(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001).

Class : β -*Proteobacteria*

β -*Proteobacteria*의 대사는 α -*Proteobacteria*의 대사와 유사한 면이 있지만 서식처의 혐기성 지역에서 유기물의 부패되면서 흘러나오는 물질을 사용하는 경향이 있다. β -*Proteobacteria*에 속하는 몇몇 종의 세균은 수소, 암모니아, 메탄, 방향성 지방산과 유사한 물질을 사용한다. α -*Proteobacteria*처럼 상당히 다양한 종류의 대사과정을 가지고 있다.

β -*Proteobacteria*에는 화학독립영양생물 (Photoautotrophs), 광무기영양생물 (Photolithoautotrophy), 메탄올산화세균 (*Methylobacterium*), 화학무기영양생물 (Chemolithotroph) 있다. 그리고 *Neisseria* 속과 *Bordetella* 속 같은 사람 병원체도 포함하고 있다. β -*Proteobacteria* 강에는 7개의 목, 12개의 과, 120개 속 그리고 80개의 종이 분포한다(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001).

Class : γ -*Proteobacteria*

γ -*Proteobacteria*는 무척 다양한 생리학적 유형을 가지고 있는 *Proteobacteria*의 가장 큰 소그룹이다. 많은 주요 속이 화학유기영양생물 (Chemolithotroph)이며 조건부혐기성 (Facultative anaerobe)이다. DNA-DNA hybridization 실험결과에 의하면 γ -*Proteobacteria*는 몇 종류의 가지(branch)가 깊은 그룹으로 구성되

어 있다. 한 그룹에는 홍색유황세균 (purple sulfur bacteria)이 포함되어 있고 두 번째 그룹에는 세포내 기생생물인 *Legionella*와 *Coxiella*가 속한다. 가장 큰 두 그룹에는 광합성을 하지 않는 다양한 속이 속한다. 리보솜 RNA superfamily I 을 대표하는 과(family)는 *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae* 과이다. 이들 세균은 당분해 대사와 5탄당 인산경로(Pentose Phosphate Pathway)를 이용해 탄수화물을 이용한다. 대부분이 조건부혐기성 생물이다. 리보솜 RNA superfamily II에는 대부분이 혐기성세균 (anaerobe bacteria)이 포함이 되는데 이들은 Entner-Doudoroff Pathway(EDP)와 5탄당 인산경로를 이용해 여러 종류의 많은 유기분자를 사용한다. *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Moraxella*, *Xanthomonas*와 *Acinetobacter*가 이 superfamily에 속한다. γ -*Proteobacteria* 강에는 15개의 목, 35개의 과, 220개 속 그리고 275개의 종이 분포한다(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2001).

Class : δ -*Prptepbacteria*

δ -*Prptepbacteria*는 여러 속이 포함되는 큰 그룹은 아니지만 그럼에도 불구하고 형태학적 또는 생리학적으로 다양성이 상당히 존재한다. 이들 세균은 대개 일반적인 그룹으로 나눌 수 있는데 모두가 화학유기영양생물(Chemolithotroph)이다. *Bdellovibrio*와 *Myxobacteria*와 같은 속은 먹이를 포식하는 포식자이다. 다른 것은 혐기성으로 유기영양분을 산화하는 동안 황하물에서 황과 황산염을 만들어낸다. δ -*Prptepbacteria* 강에는 8개의 목, 22개의 과, 74개 속 그리고 19개의 종이 분포한다(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2001).

Class : ϵ (epsilon)-*proteobacteria*

ϵ -*proteobacteria*는 5개의 *Proteobacteria* 강에서 가장 작다. 이 그룹에 속하는 모든 세균이 가느다란 그람 음성 간균으로 끝은 모양이거나 굽은 모양, 나선형 모양인 것도 있다. ϵ -*proteobacteria*에는 *Campylobacteraceae*와 *Nautiliales*라는 2개의 목, 4개의 과, 16개 속 그리고 14개의 종이 분포 한다. 그 중 2개의 가장 중요한 속인 *Campylobacter*와 *Helicobacter*라는 미세호기성이며 운동성이 있는 나선형 또는 간균이 있다.

1.6. *Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Loktanella*

최근 몇 년 동안 *Proteobacteria* 하위 분류인 *Alphaproteobacteria*에 속하는 새로운 해양 및 담수 미생물에 대한 분리 및 보고가 증가하고 있으며 이렇게 분리되어진 새로운 미생물들은 계통발생학적으로 *Rhodobacter* 속과 관련이 있었다. *Rhodobacter* 속의 미생물의 많아지면 수중 환경에 있어서 적조(algal blooms)를 일으키는 것과 상당한 관계를 가지고 있다. 그리고 이들은 황 순환(sulfur cycling)에 있어 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다(González *et al.*, 1999, 2000). 그리고 남극의 서식지로부터 *Alphaproteobacteria*에 속하는 여러 종의 새로운 미생물이 발견이 되었다. *Antarctobacter heliothermus*(Labrenz *et al.*, 1998), *Roseovarius tolerans*(Labrenz *et al.*, 1999), Ekho Lake에서 *Staleyia guttiformis* and *Sulfitobacter brevis*(Labrenz *et al.*, 2000)가 polar sea ice와 해수에서 *Octadecabacter arcticus*와 *Octadecabacter antarcticus* (Gosink *et al.*, 1997)가 분리 되었다. 최근에 *Alphaproteobacteria* 강 *Rhodobacterales* 목 *Rhodobacteraceae* 과에서 새로운 2개의 속(Genus)이 발견이 되었는데, 하나의 속에서 2개의 종이 보고되었는데 L-sorbose 2-keto-L-gulonic acid를 산화하는 *Ketogulonigenium vulgare*, *Ketogulonigenium robustum* (Urbance *et al.*, 2001) 이고 나머지는 북해에서 발견된 *Jannaschia helgolandensis* (Wagner-Döbler *et al.*, 2003)이다.

Loktanella 속은 *Proteobacteria* 문 5개의 강 중 *Alphaproteobacteria* 강에 속하는 8개의 목 중 *Rhodobacterales* 목에 있는 *Rhodobacteraceae* 과(family)에 속한다. *Loktanella* 속에는 2008년 현재까지 밝혀진 종은 총 9종이 있다. *Loktanella* 속은 Van Trappen, S. *et al.*, (2004)에 의해 MICROMAT project (November 1998 to February 2001)에서 처음으로 *Loktanella* 속이 보고되었으며 *Loktanella salsilacus*, *Loktanella fryxellensis* 그리고 *Loktanella vestfoldensis* 3종이 등록되었다. 그 이후 *Loktanella hongkongensis* (Lau *et al.*, 2004), *Loktanella agnita*, *Loktanella rosea* (Ivanova *et al.*, 2005), *Loktanella koreensis* (Weon *et al.*, 2006), *Loktanella maricola* (Yoon *et al.*, 2007) 그리고

Loktanella atrilutea (Hosoya and Yokota, 2007)가 가장 최근에 보고되어졌다.

이번 연구에서 발견된 미생물은 제주도 표선면에 위치한 조간대 조수웅덩이 모래에서 분리되었는데 NCBI BLAST search를 해 본 결과 *Loktanella hongkongensis*와 96% 일치하여 새로운 종일 가능성이 나타나 고전적 분류(classical taxonomy)에 속하는 미생물의 형태, 영양, 생리, 생화학적인 특성등과 화학적 분류법(chemotaxonomy)인 세포벽 지방산 분석 등 그리고 분자생물학적 분류 특성인 G-C mol%, 16S rRNA gene sequence 분석 등을 종합하여 본 결과 새로운 종으로 밝혀졌다.



2. 재료 및 방법

2.1. 미생물 분리 및 보존

이번 연구에서 분리된 JJM85는 제주도 표선면 해안도로에 위치한 조간대(Fig. 10) 조수 웅덩이 모래에서 분리 되었다. 미생물의 분리는 채집된 모래 0.1 g을 0.85% 멸균생리식염수를 이용해 10배 희석하여 Marine agar 2216 (MA, Difco, USA)에 도말하여 25℃에서 2일간 배양 후 분리하였다. 분리된 균주 JJM85는 Marine broth 2216 (MB, Difco, USA)에 배양한 후 20% (v/v) glycerol 용액에 현탁 하여 -80 ℃에 보관하면서 실험에 이용하였다.

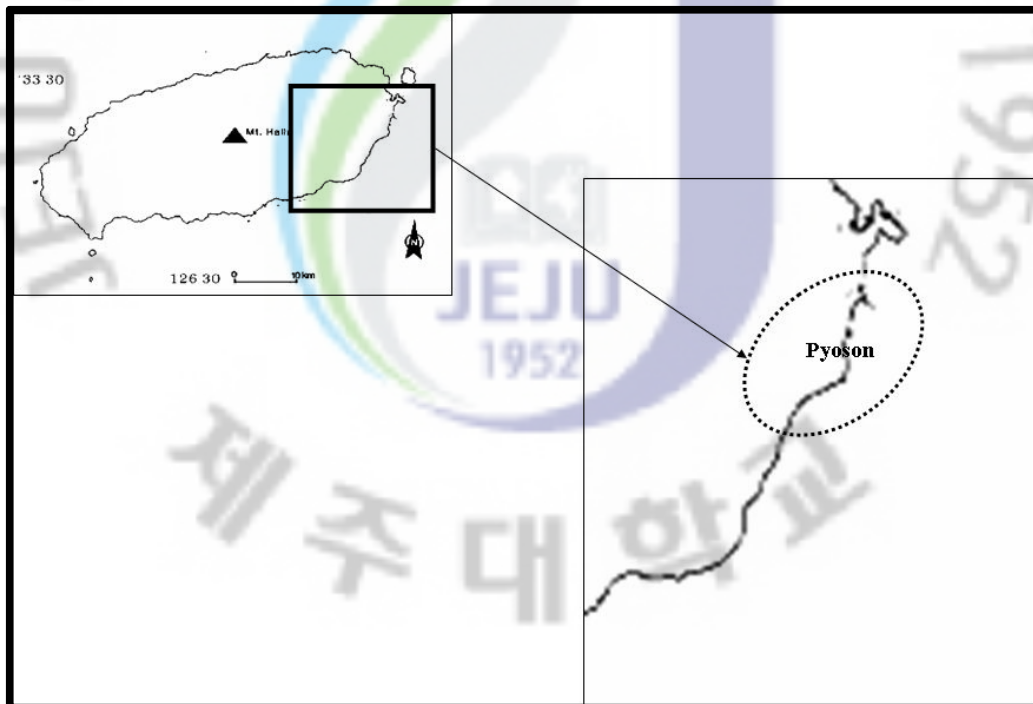


Fig. 10. Map for an organisms collection in Segwipo-si, Jeju Island. The dotted circle in the map indicates the sampling site

2.2. 표현형적 특성 분석

2.2.1. 표준균주 및 참조균주

분리균주 JJM85와 가장 유사한 염기서열 상동성을 나타내는 *Loktanella hongkongensis* NRRL 41039은 BCCM/LMG BACTERIA COLLECTION(Belgium)에 분양 받았으며 나머지 *Loktanella* 속은 각각 다음과 같이 발표 되어진 논문을 참조 인용하였다. *Loktanella salsilacus*, *Loktanella fryxellensis* 그리고 *Loktanella vestfoldensis*은 Van Trappen, S. *et al.*, (2004), *Loktanella hongkongensis* (Lau *et al.*, 2004), *Loktanella agnita*, *Loktanella rosea* (Ivanova *et al.*, 2005), *Loktanella koreensis* (Weon *et al.*, 2006), *Loktanella maricola* (Yoon *et al.*, 2007) 그리고 *Loktanella atrilutea* (Hosoya and Yokota, 2007)에 논문을 참조하였다.

2.2.2. 형태적 특성 분석

2.2.2.1 Gram staining

Gram staining은 Buck(1982)의 방법으로 염색약을 사용하지 않고 3% KOH 시약을 이용하여 측정하였다. 대조균주로는 그람양성인 *Bacillus subtilis* IAM 12188^T와 그람음성인 *E. coli* KCTC 1116을 이용하였다.

2.2.2.2. 운동성 실험

분리된 미생물의 운동성 관찰은 반고체 배지법(semi-solid medium)과 현적표본법(hanging drop) 2가지를 사용하여 2가지 방법에서 모두 양성으로 나타나면 운동성이 있는 것으로 판단하였다. 반고체 배지법은 agar를 0.3 ~ 0.5% 첨가한 반고체 배지를 사용하며, 배지가 혼탁 되었을 때 운동성이 있고, 천자부분만 균이

자라면 운동성이 없는 것으로 균 감별 하였다. 그리고 현적표본법은 cover glass 네 모퉁이에 baseline을 조금씩 바른 후 cover glass 중앙부에 12시간 배양한 균 부유액을 1 방울을 떨어뜨려 오목 파여진 slide glass(hole slide glass) 중앙의 홈 부분에 균 액이 있는 중앙에 오게 덮고서 즉시 뒤로 젖혀 100배 ~ 400배로 관찰하여 운동성을 판단하였다.

2.2.2.3. Scanning Electron Microscopy (SEM)

현재 이용하고 있는 미생물 전 처리법은 대표적으로 고행배지에서의 시료 전 처리법, 액상배지에서의 시료 전 처리법 2가지 방법이 있다. 이 2가지 대표적인 방법은 각각 시료의 손상, 전 처리시간, 시료의 오염 등의 많은 문제를 가지고 있어 기존의 고행배지·액상배지에서의 전 처리법을 보완한 고행 배지의 장점만 이용한 전 처리법의 응용으로 고행 배지에 직접 세균을 증식시키지 않고, 고행 배지위에 filter paper나 Membrane filter(유기용매에 견딜 수 있는)를 얹어서 필터위에서 증식을 시키거나, 필터페이퍼에 직접 배지를 흡수하게 하여, filter paper 자체를 배지로 사용하여 필터위에 증식된 세균(필터에 부착된 세균)을 취해서 전 처리를 수행하므로 시료의 오염, 탈수과정에서의 시료의 위축, 건조과정에서의 건조불량 및 시료의 비틀림 등을 해소함으로써 보다 쉽고, 보다 빠르고, 깨끗한 이미지를 얻으므로 해서 질적으로 우수한 결과물을 얻을 수 있다고 사료되어 이 방법을 이용하였다.

SEM 관찰에 전체적인 순서는 다음과 같다. 시료채취 - 고정 - 탈수 - 임계건조 - 코팅 - 전자현미경 관찰 순으로 진행이 되는데 먼저 시료 채취(Sampling)는 균주가 배양된 filter를 가능한 한 작게 잘라서(1 × 1 × 0.5 cm) 신속히 고정액에 담그는데 전 고정은 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer solution)에서 2시간 동안 4℃에서 고정 후 완충액으로 10 ~ 20분 (shaking 2회) 간격으로 3회 수세하고, 후 고정에 사용되는 액은 용기 내에 1 g OsO₄ 앰플을 넣고 깨뜨린 후 증류수 50 ml를 넣어 녹여서 2 % stock solution을 제조하여 냉장 보관하여 사용 시 같은 양의 2 % OsO₄ 용액과 완충액을 섞어서 최종 0.05 M phosphate buffer 의 1 % OsO₄ 용액으로 제조하여 1~2시간 동안 냉장온도에서 고정 후 역시 완

충액으로 10~20분 간격으로 3회 수세하였다. 탈수는 조직의 성질과 크기 등에 따라 다르나 가능한 한 짧은 시간 내에 실시하여야 한다. 그 이유는 탈수시간이 너무 길면 조직으로부터 물질의 유출(extraction)과 조직의 수축증이 일어날 수 있기 때문이다. 그리하여 본 연구에서는 다음과 같이 ethylalcohol -50% (5~20분, 1~2회), -60% (5~20분, 1~2회), -70% (5~20분, 1~2회), -90% (5~20분, 1~2회), -100% (5~20분, 3회)에서 탈수를 시켰다.

건조과정은 탈수시킨 filter를 isoamyl acetate에 담근 후, 액체 CO₂로 isoamyl acetate를 날려 건조를 시킨 후 금박 코팅(Au Coating)을 하여 주사전자 현미경(SEM): Jeol, JSM-6300 (or Hitachi S-2500C)을 사용하여 이미지화 시켰다.

2.2.3. 생리·생화학적 특성 분석

2.2.3.1. Oxidase and Catalase test

Oxidase 활성은 Bactident-Oxidase test strips(Merck)을 이용하여 측정하였다. 대조균주로는 양성은 *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750^T를 음성은 *E. coli* KCTC 1116을 이용하였다. Catalase 활성은 3% H₂O₂를 이용하여 측정하였는데 3% H₂O₂를 1-2 방울 적하 하였을 때 기포가 발생하는 것을 양성으로 판단하였다. 대조균주로는 *E. coli* KCTC 1116을 이용하였다.

2.2.3.2. 성장 온도 및 pH 실험

실험균주의 성장 온도(4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40℃) 및 pH(3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) 범위는 Marine agar(MA, BD)와 Marine broth(MB, BD)을 이용하여 25℃에서 24시간 배양하면서 관찰하였다.

2.2.3.3. 염분 실험

실험균주 성장에 미치는 염분 농도 및 절대 해양성 미생물인지를 알아보기 위해 염분이 첨가되어 있지 않은 Nutrient agar(NA, BD)(beef extract 3.0 g, peptone 5.0 g, agar 15.0 g)에 NaCl을 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14%를 첨가하여 균주 성장을 조사하였다.

2.2.3.4. Agar, DNA 그리고 Starch 분해 실험

분리된 균주의 agar, DNA 그리고 starch 분해 실험은 Smibert & Krieg (1994) 방법을 사용하였다.

2.2.3.5. Casein 가수분해 실험

분리된 균주의 casein 가수분해 실험은 Norris *et al.* (1985) 방법을 사용하였다.

2.2.3.6. Cellulose 가수분해 그리고 Flexirubin pigment 생산 실험

분리된 균주의 Cellulose 가수분해 그리고 Flexirubin pigment 생산 실험은 Bowman (2000) 방법을 사용하였다.

2.2.3.7. Chitin, Tweens 20, 40 그리고 80 가수분해 실험

분리된 균주의 Chitin, Tweens 20, 40 그리고 80 가수분해 실험은 Baumann & Baumann (1981) 방법을 사용하였다. Tween 20, 40 그리고 80이 함유된 한천배지(heart infusion agar)에 균을 접종하고 30 °C에서 24시간 배양한 후 colony 주위에 혼탁환 (opaquehalo)이 나타나는데 이것을 Tween 20, 40 그리고 80이 가수분해 된 것으로 판단한다. 양성 대조균주로 *Serratia marcescens* (KCCM 21204)와 음성 대조균주로 *Escherichia coli* (KCCM 40880)을 사용하였다.

2.2.3.8. API kit을 이용한 생리, 생화학적 특성 조사

분리된 균주의 biochemical test, assimilation test 그리고 fermentation test를 하기 위해 API 20NE, API 50CH, API ZYM microtest system(bioMerieux)을 이용하여 생리, 생화학적 특성을 조사하였다.

2.3. 지방산 분석

표준균주 및 분리주의 균체를 적정한 배지에 배양한 후 회수 한 후 다음과 같은 방법으로 분석한다(Fig 11).

첫 번째 Saponification 과정은 회수한 균체 약 100 mg (wet weight) Teflon-lined screw cap tube (13 x 100mm, pyrex)에 옮긴 후, reagent 1을 1 ml 첨가하여 5-10 초간 vortex 한 후 100℃에서 5분간 중탕한 다음 다시 vortex(5-10 초) 한 후 100℃에서 25분간 중탕 하였다. 다음으로 Methylation은 첫 번째 단계 산물에 reagent 2를 2 ml 첨가한 후 80℃에서 10분간 중탕 한 후 급냉 시켰다. Extration은 두 번째 단계 산물에 reagent 3을 1.25 ml 첨가한 후 10분간 혼합하여 실온에 방치하여 반응액이 2개의 층으로 분리되면 하층액을 제거하고, 마지막으로 Base wash 단계인데 세 번째 단계 산물에 reagent 4를 3 ml 첨가하여 5분간 혼합 하였다. 그리고 난 후 2000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액의 2/3를 GC sample vial tube에 옮긴 후 MIDI 분석 전까지 4 ℃에서 보관하였다.

Fatty acid methyl ester analysis (FAME)는 Sherlock Microbial Identification System인 HP 5890 II & MIDI(Hewlett-Packard Co., USA)을 사용하여 분석하였다.

Reagent 1 : Saponification reagent (NaOH in aqueous methanol)

Sodium hydroxide 45 g

Methanol 150 ml

Deionized distilled water 150 ml

Add NaOH pellets to water and methanol while stirring. Stir until pellets are dissolved.

Reagent 2 : Methylation reagent (Hydrochloric acid in aqueous methanol)

6 N Hydrochloric acid 325 ml

Methanol 275 ml

Add acid to methanol while stirring.

Reagent 3 : Extraction solvent (Hexane / MTBE)

Hexane (HPLC grade) 200 ml

Methyl-tert Butyl Ether (MTBE) 200 ml

Add MTBE to hexane and stir.

Reagent 4 : Base wash (Dilute NaOH)

Sodium hydroxide 10.8 g

Deionized distilled water 900 ml

Add pellets to water while stirring. Stir until pellets are dissolved.

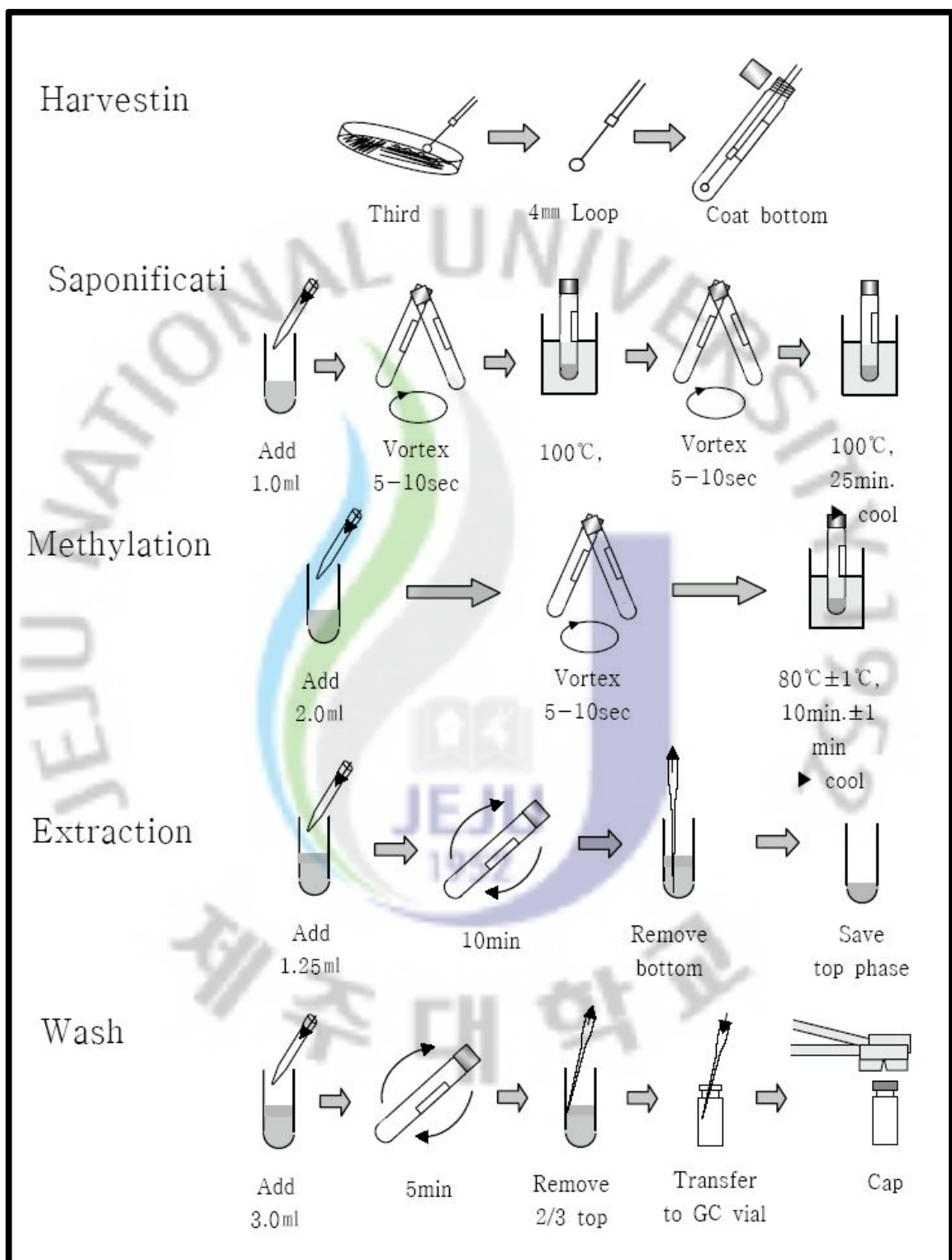


Fig. 11. Sample preparations for the analysis of cellular fatty acid.

2.4. G+C 함량(mol/%) 분석

DNA는 adenine(A), cytosine(C), guanine(G), thymine(T)의 4종류의 염기로 구성되어 있고, 그 서열에 의해 유전정보가 기록되어 있다. DNA는 A와 T, G와 C의 수소 결합에 의해 이중 나선을 형성하고 있으므로, A와 T, C와 G는 각각 같은 mole로 존재하게 된다. DNA 염기 조성은 보통 mol % G+C로 표기하며, 미생물의 전체 DNA 염기 조성에서 guanine(G)과 thymine(T)이 차지하는 상대적 비율을 나타낸다. 미생물은 각각 고유의 DNA 염기 조성을 가지고 있으므로 분류학적 특징 중 하나로서 사용되며, 미생물의 속(genus)과 종(species)을 기술하는 최소 요건 중의 하나로 이용되어지고 있다. 보통 세균에서는 DNA 염기 조성이 24 ~ 76mol %의 차이를 보여 준다. 일반적으로 DNA 염기 조성의 G+C 함량의 차이가 5 % 이상이면 다른 종으로, 10 % 이상이면 다른 속으로 간주되어진다(Mesbah *et al.*, 1989).

JJM85의 DNA G+C 함량 측정은 Mesbah *et al.*, (1989)에 HPLC method을 사용하였다.

2.5. 16S rRNA 유전자 염기서열 결정

분리된 미생물의 16S rRNA 분석은 각각 1.5% NaCl이 첨가된 MB(Difco, USA) 배지 5 ml에 접종하여 Shacking incubator를 이용하여 25 °C에서 200 rpm으로 24시간 배양한 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮겨서 16000 xg에서 1분간 원심분리 하여 상등액을 제거한 후 모아진 bacteria pellet을 수집하여 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)을 사용하여 genomic DNA를 분리 한 후, Unicam UV/VIS Spectrophotometer (Helios β, Unicam Ltd, United Kingdom)를 사용하여 파장 260 nm에서 DNA농도를 측정하였다. PCR 반응은 bacterial genomic DNA 100 ng, 1 μM에 universal primer pairs (27F forward primer; 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R reverse primer; 5' -GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 10 mM dNTPs, 10X

PCR buffer, 5 Unit Taq polymerase (TAKARA, Japan)) 혼합액에 멸균된 증류수를 첨가하여 최종부피를 50 μ l로 맞추고, PTC-150 Minicycler (MJ Research)를 사용하여 증폭하였다. ISR 증폭 과정은 94°C predenaturation 2분, 94°C denaturation 45초, 55°C annealing 45초, 72°C extension 1분의 반응을 29회 동안 수행하였고, 마지막 72°C에서 5분간 extension을 실시하였다. 증폭된 PCR 반응 산물은 (주)솔젠타사 (Dajeon, Korea)에 의뢰하여 16S rRNA 염기서열을 분석하였다(Yoon *et al.*, 1998).

2.6. 계통 분석

염기서열간의 유사도를 확인하기 위해 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Genbank와 EMBL Nucleotide Sequence Database에서 유사한 염기서열을 비교하였다. Clone의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program (ver 3.2; <http://plaza.snu.ac.kr/~iphydit/phydit>)을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하였으며, 염기서열 분석은 CLUSTAL X software (Thompson *et al.*, 1997)을 이용하여 Neighbor-joining(Saitou and Nei, 1987) 방법에 의해 Bootstrap 분석 시 1000회의 resampling을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기서열간 유전적 거리는 Jukes & Cantor(Jukes and Cantor, 1969) 모델을 이용하여 계산하였다. 그리고 분리군의 염기서열은 EMBL Nucleotide Sequence Database에 등록하였다.

대조군주의 16S rDNA 염기는 다음과 같이 GenBank accession number를 가지고 있다: *Loktanella salsilacus* LMG 21507^T (AJ44099), *Loktanella atrilutea* NCIMB 14280^T (AB246747), *Loktanella fryxellensis* LMG 22007^T (AJ582225), *Loktanella agnita* R10SW5^T (AY682198), *Loktanella vestfoldensis* LMG 22003^T (AJ582226), *Loktanella hongkongensis* UST950701-009P^T (AY600300), *Loktanella marincola* DSW-18^T (EF202613), *Loktanella rosea* Fg36^T (AY682199), *Loktanella koreensis* GA2-M3^T (DQ344498), *Roseobacter litoralis*

ATCC 49566^T (X78312), *Sulfitobacter pontiacus* ChLG-10^T (Y13155), *Staleyia guttiformis* EL-38^T (Y16427), *Antarctobacter heliothermus* EL-219^T (Y11552), *Thalassobacter stenotrophicus* CECT 5294^T (AJ631302), *Jannaschia helgolandensis* DSM 14858^T (AJ438157) 그리고 out group으로 *Stappia stellulata* IAM12621^T (D88525)를 정하였다.



3. 결과 및 고찰

3.1. 표현형적 특성 분석

JJM85^T의 표현형적 특성을 표준균주인 *Loktanella hongkongensis* NRRL 41039와 참조균주인 *Loktanella salsilacus*, *Loktanella fryxellensis*, *Loktanella vestfoldensis*은 Van Trappen, S. *et al.*, (2004), *Loktanella hongkongensis* (Lau *et al.*, 2004), *Loktanella agnita*, *Loktanella rosea* (Ivanova *et al.*, 2005), *Loktanella koreensis* (Weon *et al.*, 2006), *Loktanella maricola* (Yoon *et al.*, 2007) 그리고 *Loktanella atrilutea* (Hosoya and Yokota, 2007)와 비교분석한 결과 다음과 같이 나타났다(Table 2).

JJM85^T는 그람 음성에 호기성 간균이다. 배지에서 자라는 colony 형태는 round형을 나타내며 핑크색을 나타낸다. 성장 온도는 4 - 30°C 범위에서 자랐으며 pH 5.0 -10.0에서 성장을 하였다. 염분농도 실험에서는 1 - 12%까지 광범위한 농도에서 성장하였고 최적 염분 농도는 2 - 5%로 나타났다. Catalase, oxidase, nitrate reduction 그리고 glucose fermentation에서 양성 반응을 나타내었으며, hydrogen sulfide production, arginine dihydrolase, indole production 그리고 VogesProskauer 반응에서는 음성을 나타냈다. Nutrient agar와 trypticase soy agar에서는 성장을 하지 않았다. Aesculin을 가수분해 하였고 Agar, DNA, starch, Tween 80, tyrosine과 urea 분해 실험에서는 음성 반응을 보였다. API ZYM strips으로 분석한 효소 이용실험에서는 alkaline phosphatase, leucine arylamidase, trypsin에 대해서는 강한 활성을 나타내었으며 esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), valine arylamidase, cystine arylamidase, acid phosphatase, α -chymotrypsin, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β -galactosidase 그리고 N-acetyl- β -glucosaminidase 반응에서는 약한 활성을 나타내었다. 그러나 α -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -mannosidase 그리고 α -fucosidase 음성 반응을 나타내었다.

Table 2. Characteristics differentiating strain JJM85^T from nine recognized species of the genus *Loktanella*.

Taxa: 1, JJM85^T 2, *L. salsilacus* 3, *L. fryxellensis* 4, *L. vestfoldensis* 5, *L. hongkongensis* 6, *L. agnita* 7, *L. rosea* 8, *L. koreensis* 9. *L. maricola* 10. *L. atrilutea*. Data taken from Van Trappen *et al.* (2004), Lau *et al.* (2004), Ivanova *et al.* (2005), Weon *et al.* (2006), Yoon *et al.* (2007), Hosoya *et al.* (2007) and this study. +, Positive -, negative W, weakly; ND, not determined, V, variable reaction depending on strain. All strains are Gram-negative and grow at 10–30 °C. They are positive for catalase but negative for hydrolysis of agar and starch, arginine dihydrolase, hydrogen sulfide and indole production.



Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Motility	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Colony colour	Pink	Beige	Pink-beige	Pink	Pink-white	Whitish	Pink	Beige	Light orange	Beige
Diffusible pigment	-	-	-	-	Brown	-	-	-	-	-
Growth on										
TSA	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-
NA	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-
Temperature range for growth (°C)	4-30	5-30	5-25	5-37	8-44	8-35	4-35	5-30	4-34	8-30
NaCl range for growth (% w/v)	1-12	0-10	0-5	0-10	2-14	3-6	1-12	1-5	1-7	0-8
Nitrate reduction	+	-	-	-	-	W	-	+	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+
Hydrolysis of:										
Urea	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	W	-	ND
Aesculin	+	+	+	+	ND	ND	ND	+	-	ND
Tween 80	-	+	+	+	-	-	W	-	W	+
Enzyme activity										
α -Galactosidase	+	+	-	-	ND	+	-	-	-	+
β -Galactosidase	W	-	+	W	ND	ND	ND	W	-	-
β -Glucosidase	-	W	+	W	ND	ND	ND	W	-	-
Trypsin	+	-	-	+	ND	-	-	-	-	-
Carbohydrate metabolism	-	-	-	-	V	-	-	-	+	V

+, positive reaction, -, negative reaction, W; weak reaction, ND; not detection, V; variation reaction

3.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

균의 형태학적 특성은 25°C에서 2일간 배양한 후 SEM을 통해 관찰하였으며 JJM85^T는 간균의 형태를 보였으며 길이는 1.8 - 2.0 μm, 폭은 0.8 - 1.5 μm로 나타났다(Fig. 12).

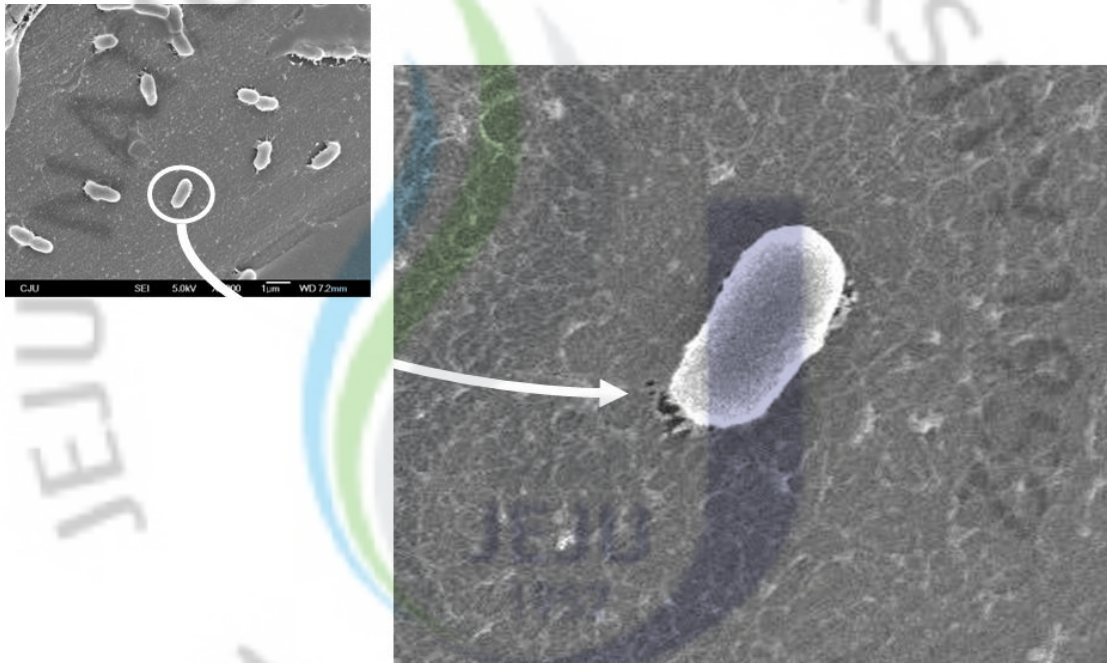


Fig. 12. Scanning electron micrography of cells of strain JJM85^T. Bar, 1 μm.

3.3. 지방산 분석

JJM85^T를 비롯한 대상균주들의 세포 지방산 분석(Fig. 13) 결과는 Table. 3과 같았다. 모든 균주에서 unsaturated fatty acid에 cis- 11 octadecenoic acid (C_{18:1} ω7c, 전체 지방산 구성의 66 - 87%), palmitic acid (C_{16:0}; 2.7 - 10.4%), 3-hydroxydecanoate (C_{10:0} 3-OH; 1.0 - 6.1%), stearic acid (C_{18:0}; 1.3 - 9.3%)를 가지고 있었다. JJM85^T 균주와 *Loktanella hongkongensis* NRRL 41039 다른 균주와 달리 3-hydroxydodecanoate (C_{12:0} 3-OH; 1.2 - 1.8%)를 가지고 있었다. 반면 JJM85^T는 *L. hongkongensis* NRRL 41039이 가지고 있지 않은 palmitoleic acid (C_{16:1} ω7c; 1.9%)를 가지고 있었다. 지방산 분석 결과를 보았을 때 *Loktanella*속의 메인 지방산은 9-octadecenoic acid (C_{18:1} ω7c)이었으며 실험 균주인 JJM85^T는 *Loktanella*속에 포함된다는 것을 알 수가 있다.

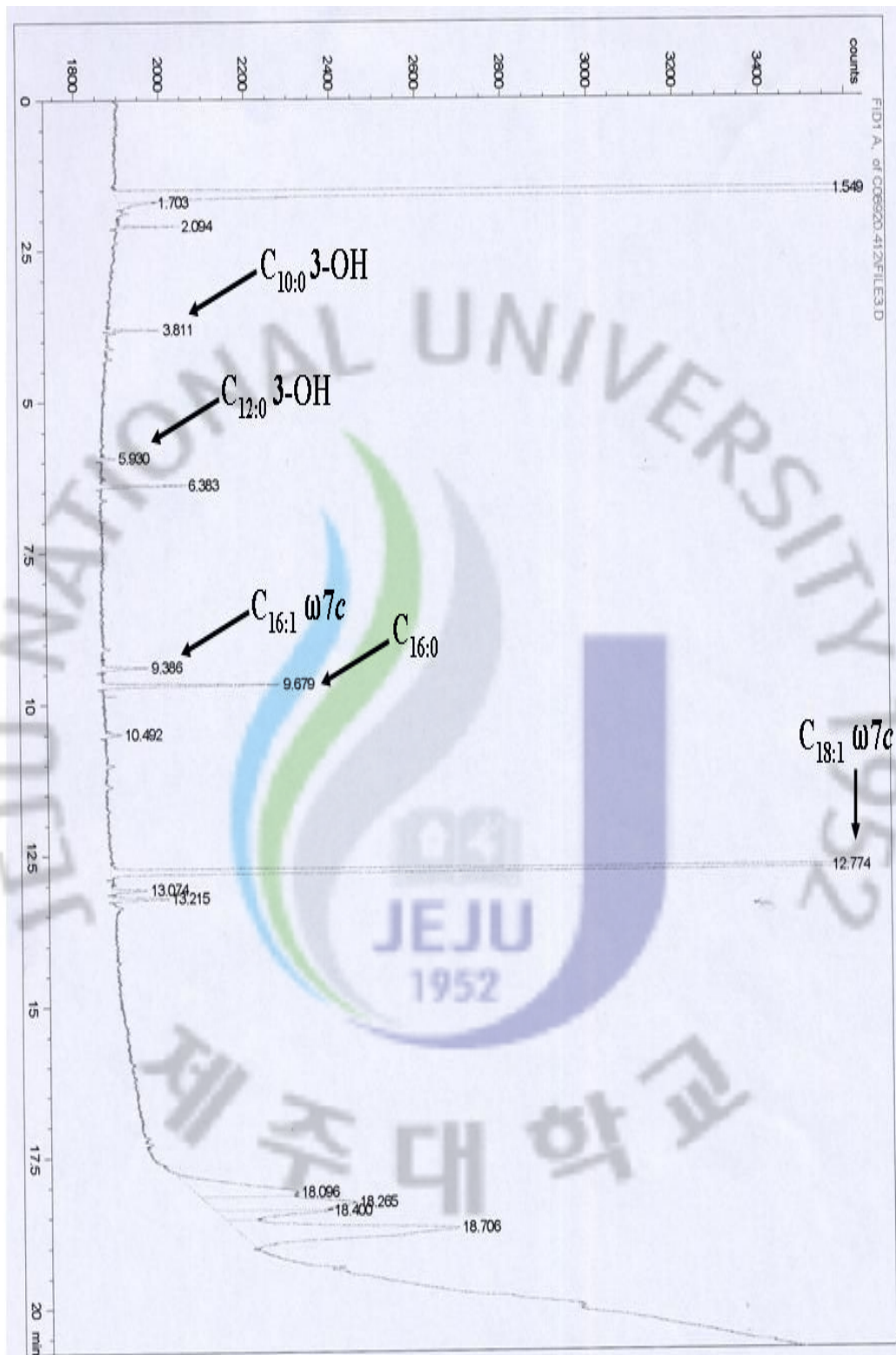


Fig. 13. Fatty Acid Methyl Ether (FAME) profile of strain JJM85^T

Table 3. Fatty acid compositions of strain JJM85^T and type strains of recognized *Loktanella* species.

Taxa: 1, Strain JJM85^T 2, *L. salsilacus* 3, *L. fryxellensis* 4, *L. vestfoldensis* 5, *L. hongkongensis* 6, *L. agnita* 7, *L. rosea*, 8, *L. koreensis* 9. *L. maricola* 10. *L. atrilutea*. Data from Van Trappen *et al.* (2004), Lau *et al.* (2004), Ivanova *et al.* (2005), Weon *et al.* (2006), Yoon *et al.* (2007), Hosoya *et al.* (2007) and this study. Values less than 1 % of total fatty acid were omitted. - Not detected or not described.



Fatty acid	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C _{10:0} 3-OH	1.4	2.4±0.7	3.7±1.1	6.1±1.5	1.8±0.3	1.0	1.2±0.1	2.4	-	1.5
C _{12:0} 3-OH	1.2	-	-	-	1.8±0.2	-	-	-	-	-
C _{12:1} 3-OH	-	-	-	5.6±1.4	-	-	-	3.4	2.9	-
C _{14:0}	-	-	-	-	-	4.6	-	-	-	-
C _{14:1}	-	-	-	-	-	4.6	-	-	-	-
C _{15:0}	-	-	-	-	-	4.6	-	-	-	-
C _{16:0}	6.5	2.9±0.9	2.7±1.1	2.9±0.7	4.0±4.0	4.6	10.4±1.8	6.9	3.9	9.5
C _{17:0}	-	-	-	-	-	1.7	-	-	0.7	-
C _{18:0}	1.3	1.4±0.8	1.6±0.9	1.8±0.3	3.0±1.2	-	3.6±0.5	9.3	2.9	2.2
C _{18:2}	-	-	-	-	-	1.8	4.2±1.4	-	-	-
C _{19:1} cyclo	-	-	-	-	-	1.7	1.2±10.2	-	-	-
C _{16:1} cis9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{16:1} ω7c	1.9	-	-	-	-	1.9	1.3±0.3	-	-	-
C _{17:1} cis9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{18:1} cis9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{18:1} ω7c	87.4	87.7±1.9	84.9±3.7	74.1±3.1	85.6±3.6	79.0	70.4±2.0	66.6	75.9	74.4
C _{18:1} ω9	-	-	-	-	-	4.4	6.4±2.0	-	-	-
C _{18:1} ω7c 11-methyl	-	-	-	1.9±0.8	1.1±1.1	-	-	8.7	10.2	6.3
C _{16:0} iso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{17:0} anteniso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Summed feature 2*	-	-	1.7±0.7	-	-	-	-	-	-	3.8
Summed feature 3*	-	2.8±0.9	-	-	-	-	-	-	1.3	-
Summed feature 7*	-	1.2±1.0	4.7±2.0	4.7±0.7	-	-	-	1.0	-	1.0
Unknown 11.799	-	-	-	2.3±1.2	-	-	-	-	-	-

*Summed features consist of one or more that could not be separated by the Microbial Identification System. Summed feature 2: C_{12:0} aldehyde, C_{16:1} iso I, C_{14:0} 3-OH and/or unknown 10.928. Summed feature 3: C_{15:0} iso 2-OH, C_{17:0} iso 3-OH and/or C_{16:1} ω7c. Summed feature 7: C_{19:1} ω6c and/or unknown 18.846.

3.4. G+C contents (mol%)

JJM85^T와 대상 균주들의 G+C 함량을 조사한 결과 JJM85^T는 68.9 mol%(Fig. 14), *L. salsilacus*, *L. fryxellensis*, *L. vestfoldensis*, *L. hongkongensis*, *L. agnita*, *L. rosea*, *L. koreensis*, *L. maricola*, *L. atrilutea*는 59 - 66.3 mol% 범위 내에서 DNA base composition을 가지고 있었다.

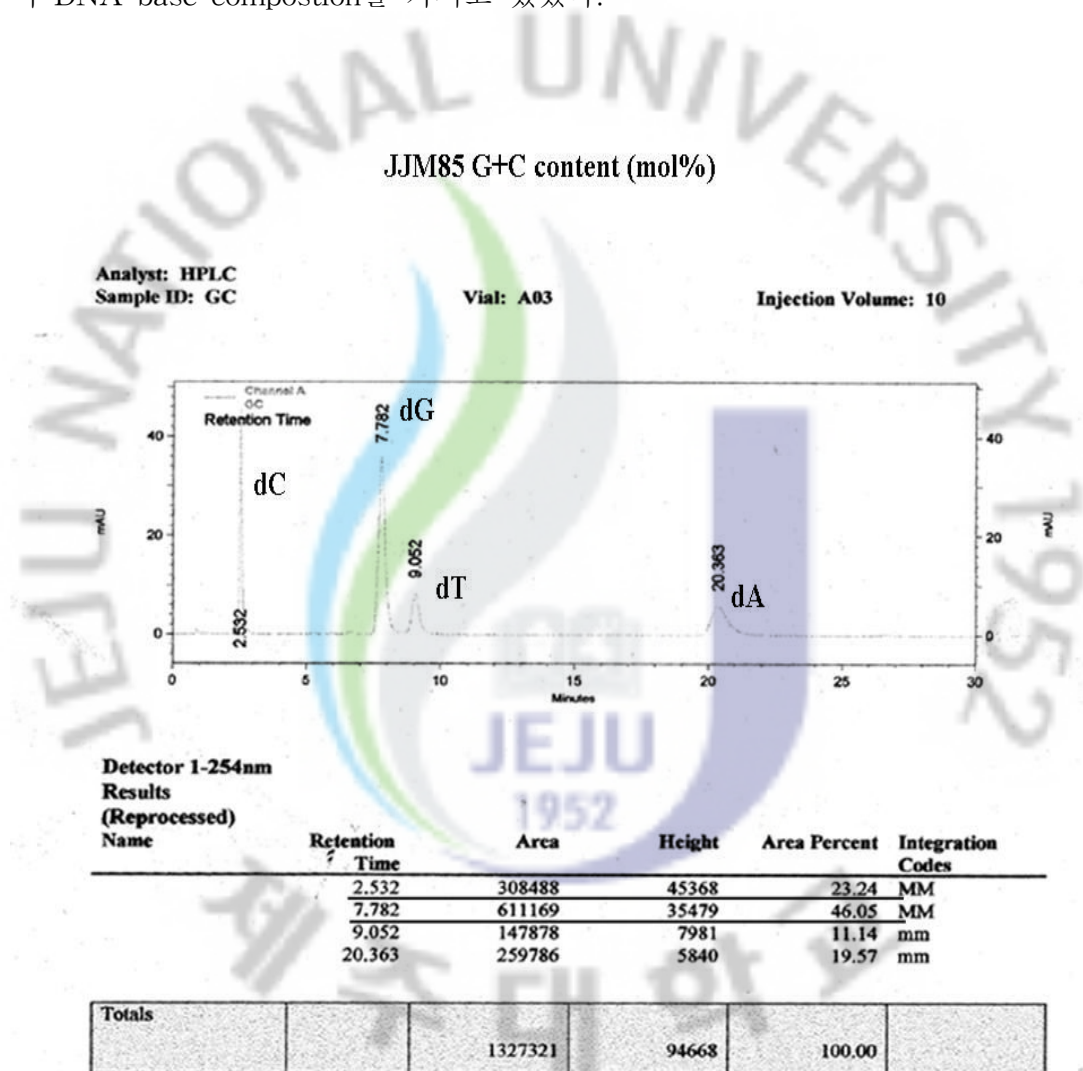


Fig. 14. HPLC chromatogram of 4 type of nucleosides from genomic DNA of strain JJM85^T

3.5. 16S rRNA 유전자 염기서열 및 계통 분석

Type strain JJM85^T의 16S rRNA 염기서열(1338 bp)은 Table 4에 나타내었다. 염기서열은 EMBL Nucleotide Sequence Database에 등록하여 accession number를 부여 받았다. Strain JJM85^T의 accession number는 AM983542이다.

Table 4. 16S rRNA gene sequence of *Loktanella pyoseonensis* JJM85^T. The EMBL accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain JJM85^T is AM983542.

```
CACATGCAAGTCGAGCGAAGCCTTCGGGCTTAGCGGCGGACGGGTTAGTAACG
CGTGGGAACGTGCCTCTCTGTACGGAACAGTCCCGGGAAACTGGGTTTAATAC
CGTATACGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGCAGAGAGATCGGCCCGGTCTG
ATTAGATAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGTCGACGATCAGTAGCTGGTT
TGAGAGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGCGCAAGCCTGATCTAGCCATGCC
GCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTCGTAAAGCTCTTTCGCTGGGGAAGATAA
TGACGGTACCCAGTAAAGAAACCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGGAGGGGGTTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGC
GGATCGGAAAGTTGGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACGGCCTCCA
AAACTATCGGTCTAGAGGTCGAGAGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGTAGAGG
TGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGGCTCACTGGCT
CGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCCAGACGTCGGGGGGCTTGCCCTTC
GGTGTACACCTAACGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAT
TAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATCCCGGGACCGCCAG
AGAGATCTGGTTTTCACTTCGGTGACCCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCG
TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACA
CCCCTAGTTGCCAGCATTTGGTTGGGCACTCTAGGGGAACTGCCCGTGATAAG
CGGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGTTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGTGCCTACAGTGGGTTAATCCCCAAAAGGCATCTCA
GTTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC
GCGTAAACAGCATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
CACACCATGGGAGTTGGGTTTACCCGACGGCCGTGCGCTAACCTT
```

JJM85^T 16S rDNA 염기서열을 NCBI Blast를 통해 검색한 결과 Fig. 15에서처럼 JJM85^T와 가장 가까운 속과 종은 *Loktanella hongkongensis* strain UST950701-009P으로 blast 상에서 96%의 유사도를 나타내어 JJM85^T가 *Loktanella* 속에 새로운 종일 가능성을 나타냈다. 그래서 *Loktanella* 속에 보고되어진 균주들의 염기서열을 NCBI Gene Bank database에서 찾아 JJM85^T 염기서열과 비교분석하였다.. 다음은 *Loktanella* 속 균주의 accession unnumber이다: *L. salsilacus* LMG 21507^T (AJ44099), *L. atrilutea* NCIMB 14280^T (AB246747), *L. fryxellensis* LMG 22007^T (AJ582225), *L. agnita* R10SW5^T (AY682198), *L. vestfoldensis* LMG 22003^T (AJ582226), *L. hongkongensis* UST950701-009P^T (AY600300), *L. marincola* DSW-18^T (EF202613), *L. rosea* Fg36^T (AY682199), *L. koreensis* GA2-M3^T (DQ344498). Clone의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하여, CLUSTAL X software (Thompson *et al.*, 1997)를 이용하여 서열을 분석하였다. Neighbor-joining(Saitou and Nei, 1987) 방법에 의해 Bootstrap 분석 시 1000회의 resampling을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기서열간 유전적 거리는 Jukes & Cantor(Jukes and Cantor, 1969) 모델을 이용하여 계산하였다. *Loktanella* 속 내 각 표준균종과 선별균주들간의 유사도를 조사한 결과 *L. hongkongensis* UST950701-009P^T (95.99 %), *L. marincola* DSW-18^T (94.1%), *L. rosea* Fg36^T (93.88%), *L. koreensis* GA2-M3^T (93.88%), *L. agnita* R10SW5^T (93.79%), *L. salsilacus* LMG 21507^T (93.73%), *L. fryxellensis* LMG 22007^T (93.35%), *L. atrilutea* NCIMB 14280^T (93.58%) 그리고 *L. vestfoldensis* LMG 22003^T (93.12%)로 나타났다(Table 5)(Fig. 16). 그 중 *L. hongkongensis* UST950701-009P^T와 가장 높은 유사도의 염기서열 상동성을 보여 주었다.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov - NCBI Blast|cl|30724 (1320 letters) - Microsoft Internet Explorer

파일(F) 편집(E) 보기(V) 즐겨찾기(S) 도구(I) 도움말(H)

주소(D) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AJ534208.1	Methylococcus sp. BIO-204 16S rRNA gene, isolate BIO-204	2206	2206	100%	0.0	96%	
AB302359.1	Alpha proteobacterium A18 gene for 16S rRNA, partial sequence	2194	2194	99%	0.0	96%	
EU143344.1	Loktaneella sp. J1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2183	2183	100%	0.0	96%	
DQ412070.1	Methylococcus sp. KBB-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2183	2183	99%	0.0	96%	
EF092218.1	Uncultured Roseobacter sp. clone B255 26a 16S ribosomal RNA	2182	2182	100%	0.0	96%	
DQ412076.1	Methylococcus sp. SPB-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2178	2178	99%	0.0	96%	
AB302358.1	Alpha proteobacterium A02 gene for 16S rRNA, partial sequence	2174	2174	99%	0.0	96%	
EU143345.1	Loktaneella sp. J20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2172	2172	100%	0.0	96%	
AJ534207.1	Methylococcus sp. BIO-24 16S rRNA gene, isolate BIO-24	2156	2156	99%	0.0	96%	
AY536563.1	Methylococcus sp. WED1.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2141	2141	98%	0.0	96%	
AY600300.1	Loktaneella hongkongensis strain UST950701-009P 16S ribosomal RNA	2137	2137	99%	0.0	96%	
AY600301.1	Loktaneella hongkongensis strain UST950701-009W 16S ribosomal RNA	2134	2134	99%	0.0	95%	
DQ915609.1	Loktaneella hongkongensis strain NRPL B-41039 16S ribosomal RNA	2128	2128	98%	0.0	96%	
AY515412.1	Uncultured alpha proteobacterium GWS-BW-H43M 16S ribosomal RNA	2121	2121	97%	0.0	96%	
AY841784.1	Rhodobacteraceae bacterium H43-35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2121	2121	97%	0.0	96%	
AY515418.1	Rhodobacteraceae bacterium GWS-BW-H55M 16S ribosomal RNA	2052	2052	98%	0.0	95%	
AM268741.1	Uncultured prokaryote partial 16S rRNA gene, clone IIB76	2049	2049	99%	0.0	94%	
AY576770.1	Ruegeria sp. 3X/A02/236 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2039	2039	100%	0.0	94%	
AF136846.1	Ketozoonoqueniun vulgareum strain 266-13B small subunit ribosomal RNA	2039	2039	99%	0.0	94%	
AF136848.1	Ketozoonoqueniun vulgareum strain 62A-12A small subunit ribosomal RNA	2039	2039	99%	0.0	94%	
AF136847.1	Ketozoonoqueniun sp. 291-19 small subunit ribosomal RNA, partial sequence	2039	2039	99%	0.0	94%	
AY654838.1	Mucus bacterium 40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2034	2034	99%	0.0	94%	
DQ334348.1	Bacterium CWISO10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2034	2034	98%	0.0	94%	
DQ234240.2	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone DS158 16S ribosomal RNA	2034	2034	99%	0.0	94%	
DQ234218.2	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone DS136 16S ribosomal RNA	2034	2034	99%	0.0	94%	
DQ234211.2	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone DS128 16S ribosomal RNA	2034	2034	99%	0.0	94%	
DQ234153.2	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone DS069 16S ribosomal RNA	2034	2034	99%	0.0	94%	
DQ234126.2	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone DS042 16S ribosomal RNA	2034	2034	99%	0.0	94%	

Fig. 15. NCBI blast search of the 16S rRNA gene sequence of JJM85^T. The list of closely related species were show as the NCBI blast result.

Table 5. Similarity matrix based on 16S rRNA gene sequence comparisons.

Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	100.0									
2	95.99	100.0								
3	93.35	94.47	100.0							
4	93.73	94.93	98.49	100.0						
5	93.58	94.40	98.11	98.42	100.0					
6	93.79	94.69	94.71	95.16	94.41	100.0				
7	93.12	94.85	95.62	96.15	95.17	97.20	100.0			
8	94.10	94.25	94.34	94.49	94.26	95.24	95.40	100.0		
9	93.88	94.55	94.87	94.87	94.42	95.92	95.70	98.42	100.0	
10	93.88	93.64	94.11	94.49	93.96	95.62	94.42	96.83	96.51	100.0

1; JJM85^T, 2; *L. hongkongensis* UST950701-009P^T (AY600300), 3; *L. fryxellensis* LMG 22007^T (AJ582225), 4; *L. salsilacus* LMG 21507^T (AJ44099), 5; *L. atrilutea* NCIMB 14280^T (AB246747), 6; *L. agnita* R10SW5^T (AY682198), 7; *L. vestfoldensis* LMG 22003^T (AJ582226), 8; *L. marincola* DSW-18^T (EF202613), 9; *L. rosea* Fg36^T (AY682199), 10; *L. koreensis* GA2-M3^T (DQ344498)

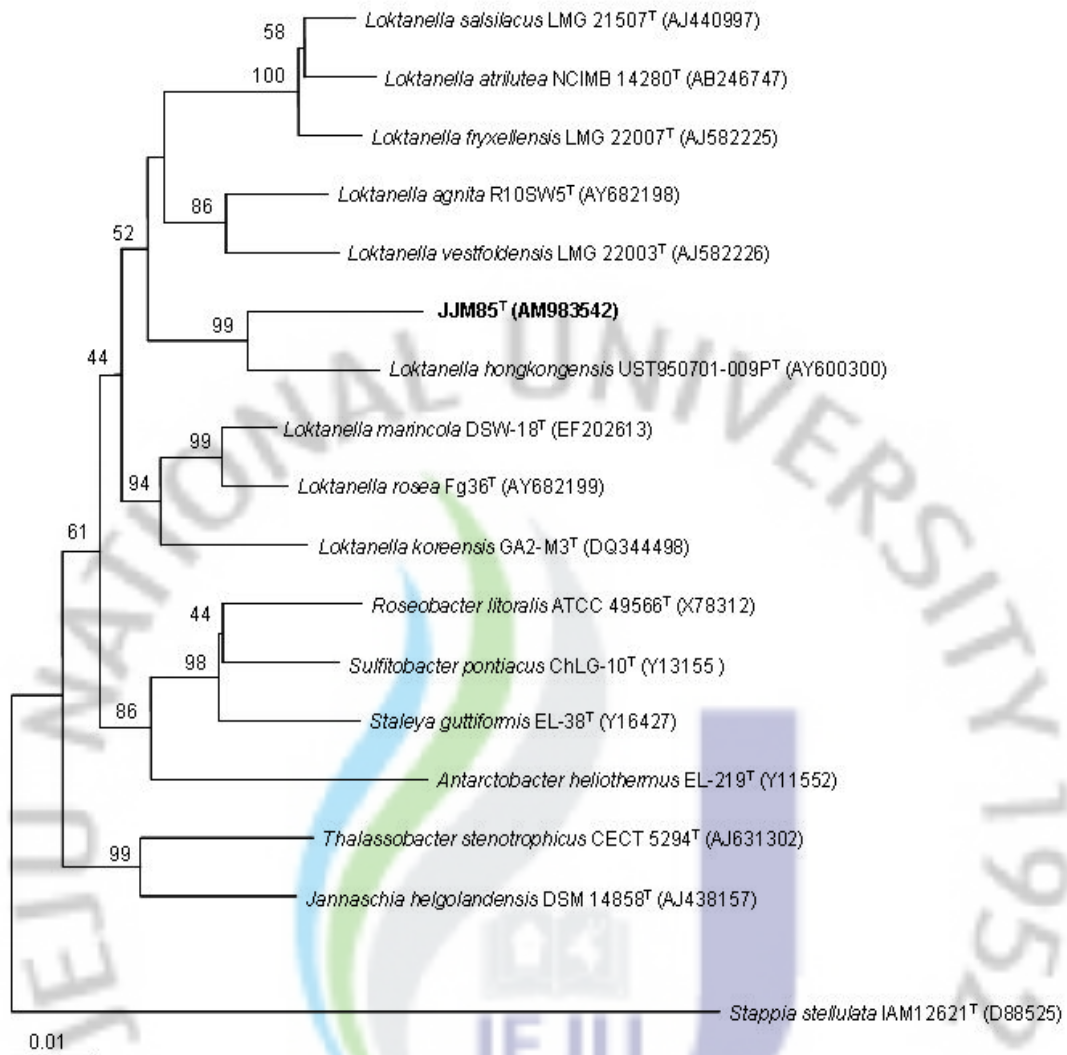


Fig. 16. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain JJM85^T within the radiation of the genus *Loktanella* and related taxa. The tree was constructed from evolutionary distances by using neighbour-joining method (Saitou & Neil, 1987) and the model of Juke & Cantor (1969). *Stappia stellulata* IAM 12621^T (D88525) was used as an outgroup. Bootstrap support values (>50%) are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

생리 생화학적 특성 실험 및 16S rRNA 염기서열 분석을 통한 유사도 분석, 계통분석, 지방산 그리고 G+C 함량분석 결과를 종합해 본 결과 JJM85^T는 신종임을 확인할 수 있었다. 이에 JJM85^T를 *Loktanella pyoseonensis* 로 명명하여 국내 생물자원센터인 KCTC(Korean Collection for Type Culture)와 독일에 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)에 균주를 기탁하여 각각 균주 등록 번호를 받았다(KCTC 22372^T, DSM 21424^T).



4. 요약

Description of *Loktanella pyoseonensis* sp. nov.

Loktanella pyoseonensis (pyo.seon'en.sis. N.L. gen. n. *pyoseonensis*, referring to Pyoseon Beach, Jeju, Republic of Korea, which the type strain was isolated).

분리된 균주는 그람 음성의 균주로서 1.8 - 2.0 x 0.8 - 1.5 μm 크기의 호기성 간균이다. Spore는 형성하지 않으며, 운동성을 가지고 있다.

평판배지 상에서 colony 형태는 둥근 원형에 불룩한 모양을 하고 있으며 색상을 pink를 띤다. 성장 온도는 4°C에서 30°C에서 성장을 하며 35°C에서는 성장을 하지 못한다. 그리고 성장 pH 범위는 pH 5.0 - 10.0이다. 성장에 필요한 염분농도는 1 - 12%이며, 최적 농도는 2 - 5 % 사이이다. Catalase와 oxidase test에서 양성 반응을 나타내며, nitrate reduction, glucose fermentation test에서 양성 반응을 나타내었다. 그러나 hydrogen sulfide production, arginine dihydrolase, indole production 그리고 VogesProskauer reaction test에서 음성반응을 나타내었다. Nutrient agar와 trypticase soy agar에서는 염분이 첨가되지 않았을 때는 생장이 이루어 지지 않았다. 결과적으로 JJM85^T는 염분이 없었을 때는 생장이 안 되는 절대 해양성 세균인 것을 알 수가 있다. Aesculin는 가수분해를 할 수 있으나 agar, DNA, starch, Tween 80, tyrosine 그리고 urea는 가수분해 하지 못했다.

API ZYM strips kit을 이용하여 효소이용활성을 실험한 결과, alkaline phosphatase, esterase(C4) (weak), esterase lipase(C8) (weak), lipase (C14)(weak), leucine arylamidase, valine arylamidase (weak), cystine arylamidase (weak), trypsin, acid phosphatase (weak), α -chymotrypsin (weak), naphthol-AS-BI-phosphohydrolase (weak), β -galactosidase (weak) and N-acetyl- β -glucosaminidase (weak)에서는 반응을 나타내었으나, α -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -mannosidase

and α -fucosidase 에서는 반응이 일어나지 않았다. JJM85^T의 세포벽내 지방산 조성을 분석한 결과 JJM85^T에 주요 지방산은 C18:1 *n*-7c (87.4%)로 분석이 되었다. G+C contents를 분석한 결과는 68.9 mol%로 나타났다.

표준균주 JJM85^T (=KCTC 22372^T=DSM 21424^T)는 서귀포시 표선해수욕장에서 채집된 모래에서 분리되어졌다.



종 합 요약

이번 연구는 제주도 하계 암반 조간대 미생물 다양성을 보기위해 암반 조간대 및 조수 웅덩이에서 서식하고 있는 생물, 저질토 그리고 모래를 채집하여 색소, 단백질분해효소 및 지질분해효소 생성 미생물을 분리하여 생육특성, 생리·생화학적 특성, 색소의 특성 그리고 16S rRNA 유전자 염기서열을 통하여 계통학적인 특성을 분석하였다. 조간대 4개 지점 12개 지역에서 분리된 미생물은 총 850 균주를 분리하였는데 그 중 색소를 생성하는 미생물은 136 균주가 분리되었다. 분리된 균주들은 yellow, red, orange, pink 혹은 violet 등으로 색상이 다양했으며 대체적으로 그람음성균이 많이 분포하고 있었다. 운동성 실험에서는 총 136균주 중에 118균주가 운동성을 가지고 있었다. 분리된 미생물은 다양한 온도와 높은 염 농도에서도 성장이 가능하다는 것을 확인 할 수가 있었다. 색소를 추출한 뒤 carotenoid 또는 bacteiochlorophyll의 유무를 확인 한 결과 57균주가 carotenoid의 흡광 범위인 450 ~ 540 nm에서 peak를 나타내었다.

제주도 조간대에서 분리된 색소생성 미생물의 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 계통분류학적으로 어떤 division에 속하는지를 확인 하여 본 결과 제주도 제주시 동부지역에서 분리된 색소생성 미생물들은 *Proteobacteria*(문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Pseudoalteromonas*속 3균주, *Shewanella* 속 8균주, *Oceanisphaera*속 1균주, *Vibrio*속 1균주, *Proteobacteria*(문)/*Alphaproteobacteria*(강)의 *Kordiimonas*속 1균주, *Firmicutes*(문)/*Bacilli*(강)의 *Bacillus*속 1균주, *Bacteroidetes*(문)/*Flavobacteria*(강)의 *Tenacibaculum*속 2균주가 분리되었다. 제주시 서부지역에서는 *Proteobacteria*(문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Pseudoalteromonas*속 16균주, *Galciicola*속 1균주, *Shewanella* 속 8균주, *Vibrio*속 3균주, *Alteromonas*속 3균주, *Proteobacteria*(문)/*Alphaproteobacteria*(강)의 *Loktanella*속 1균주, *Tateyamaria*속 1균주, *Roseobacter*속 1균주, *Rhodovulum*속 1균주, *Pseudovibrio*속 1균주, *Phaeobacter*속 1균주, *Bacteroidetes*(문)/*Flavobacteria*(강)의 *Winogradskyella*속 1균주, *Cellulophaga*속 1균주, *Formosa*속 1균주, *Tenacibaculum*속 4균주, *Polaribacter*속 3균주, *Actinobacteria*(문)/*Actinobacteria*(강)/*Actinobacteridae*(아강)의 *Micrococcus*속 1균주(JJM12), *Firmicutes*(문)/*Bacilli*(강)의 *Bacillus*속 1균주, *Exiguobacterium* 속 1균주가

분리되었다. 서귀포 동부지역에서 분리되어진 색소생성 미생물을 분류해 본 결과 *Proteobacteria*(문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Pseudoalteromonas*속에 포함되는 6균주, *Shewanella*속 4균주(JJM33, JJM61, JJM90, JJM119), *Pseudomonas*속 2균주, *Microbulbifer*속 1균주, *Vibrio*속 2균주, *Alteromonas*속 1균주가 분리되었다. *Proteobacteria*(문)/*Alphaproteobacteria*(강)의 *Loktanella*속에서 1균주, *Paracoccus*속 3균주가 분리되었다. *Firmicutes*(문)/*Bacilli*(강)의 *Bacillus*속에서 3균주, *Exiguobacterium*속 1균주, *Marinibacillus*속 1균주가 분리되었다. *Actinobacteria*(문)/*Actinobacteria*(강)/*Actinobacteridae*(아강)의 *Micrococcus*속에서는 1균주가 분리되었다. *Bacteroidetes*(문)/*Flavobacteria*(강)의 *Polaribacteria*속 1균주, *Donghaeana*속 1균주, *Winogradskyella*속 1균주, *Tenacibaculum*속에서 1균주가 분리 되었다. 서귀포 서부지역에서 분리되어진 색소생성 미생물은 *Proteobacteria*(문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Pseudoalteromonas*속의 12균주, *Shewanella*속 6균주, *Alteromonas*속 3균주, *Serratia*속 2균주, *Vibrio*속 1균주가 분리 되었다. *Firmicutes*(문)/*Bacilli*(강)의 *Bacillus*속 6균주, *Sporosarcina*속 1균주, *Bacteroidetes*(문)/*Flavobacteria*(강)의 *Tenacibaculum*속 3균주, *Bacteroidetes*(문)/*Sphingobacteria*(강)의 *Flexibacter*속 1균주, *Persicobacter*속 2균주가 분리되었다. 분리 된 136개의 색소 형성 미생물 중 대부분의 미생물은 *Proteobacteria/Gammaproteobacteria*그룹 (64%)에 속하였으며 다음으로 *Bacteroidetes/Flavobacteria*그룹 (13%), *Proteobacteria/Alphaproteobacteria* (8%), *Firmicutes/Bacilli* 그룹 (10.8%), *Bacteroidetes/Sphingobacteria* 그룹 (2.1%) 그리고 *Actinobacteria* 그룹 (2.1%)에 속하는 것으로 나타났다. 각각의 분류 그룹을 genus 별로 나누어 보면 다음과 같이 나누어 볼 수 있다. 이번 연구에서 분리되어진 색소생성 미생물에서 가장 많은 균주가 분리(64%) 되어진 *Proteobacteria*의 *Gammaproteobacteria* 그룹 내에서는 *Pseudoalteromonas* 속이 42%를 차지하고 다음으로 *Shewanella* 속이 29.5%, *Alteromonas* 속과 *Vibrio* 속이 10.2%를 차지하고 나머지 속은 3% 미만이었다. 제주도 조간대에서 분리 되어진 미생물 중 13%를 차지하는 *Bacteroidetes*의 *Flavobacteria* 그룹 내에서는 *Tenacibaculum* 속의 50%로 가장 많은 부분을 차지하고 있다. 다음으로 *Polaribacter* 속이 22.2%를 차지하였다. 제주도 조간대에서 분리 되어진 미생물 중 10.8 %를 차지하는 *Firmicutes*의 *Bacilli* 그룹에서는 *Bacillus* 속의 73.3%로 가장 많은 부분을 차지하고 다음으로

Exiguobacterium 속의 13.3%를 차지하였다. *Marinibacillus* 속과 *Sporosarcina* 속은 각각 6.7%를 차지하였다. 제주도 조간대에서 분리 되어진 미생물 중 8%를 차지하는 *Proteobacteria*의 *Alphaproteobacteria* 그룹 내에서는 *Paracoccus*속의 27.2%, *Loktanella*속의 18.2%, *Kordiimonas*속, *Tateyamaria*속, *Roseobacter*속, *Rhodovulum*속, *Pseudovibrio*속, *Phaeobacter*속의 각각 9.1%를 차지하였다. 분리 되어진 미생물 중 2.1%를 차지하는 Bacteroidetes의 *Sphingobacteria* 그룹 내에서는 *Persicobacter*속의 66.6%, *Flexibacter*속이 33.4%를 차지하고 Actinobacteria의 Actinobacteria강 Actinobacteridae 그룹 내에서는 *Micrococcus*속의 *Micrococcus leuteus* 3균주가 분리가 되었다.

생리적 특성균으로는 단백질분해효소 활성이 높은 35균주를 분리하였는데 대부분의 그람음성균이었으며, 운동성 실험에서는 총 35균주 중에 33균주가 운동성을 가지고 있었다. 분리된 균주들은 다양한 온도, 높은 염 농도 및 pH에서도 생장이 가능하다는 것을 확인 할 수가 있었다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 한 결과 *Proteobacteria*(문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Pseudoalteromonas*속 10균주, *Vibrio* 속 21균주, *Ferrania*속 1균주, *Proteobacteria*(문)/*Alphaproteobacteria*(강)의 *Phaeobacter*속 1균주, *Firmicutes*(문)/*Bacilli*(강)의 *Bacillus*속 2균주가 분리되었다. 이번 연구에서 분리된 단백질 분해효소 생성 미생물 중 *Vibrio* 속이 가장 많은 수(21균주, 60%)를 차지하고 있었다. 또한 지질분해효소 생성 미생물 9균주를 분리하였다. 분리균주 모두 운동성을 가지는 그람음성균이었다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 한 결과 *Proteobacteria*(문)/*Gammaproteobacteria*(강)의 *Pseudoalteromonas*속 1균주, *Vibrio*속 2균주, *Alteromonas*속 4균주, *Paeudoalteromonas*속 1균주, *Agarivorans*속 1균주가 분리되었다. 그람음성세균에서 얻어진 지질분해효소는 대부분의 *Pseudomonas*속에서 발견이 되었다. 이번 연구에서는 *Pseudomonas*속과는 다른 그람음성세균중에서 지질분해효소 활성을 갖는 미생물들이 확보되었기 때문에 향후 연구해 볼 가치가 있다고 판단된다. 또한 색소생성 미생물 중 총 8균주가 새로운 종일 가능성이 매우 높게 나타났다. 이들에 대해서는 향후 근연종의 표준균주를 분양받아 배양 특성, 형태적 특성, 생리·생화학적 특성, 화학적 특성, 분자생물학적 특성에 관한 연구가 요구되어진다.

또한 이번 연구에서 제주도 표선면에 위치한 해수욕장 모래에서 분리되어진

JJM85^T는 NCBI BLAST search를 해 본 결과 *Loktanella hongkongensis*와 96% 일치하여 새로운 종일 가능성이 나타나 *Loktanella* 속 내 표준균주들과 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 분석해 본 결과 *L. hongkongensis* UST950701-009P^T (95.99%), *L. marincola* DSW-18^T (94.1%), *L. rosea* Fg36^T (93.88%), *L. koreensis* GA2-M3^T (93.88%), *L. agnita* R10SW5^T (93.79%), *L. salsilacus* LMG 21507^T (93.73%), *L. fryxellensis* LMG 22007^T (93.35%), *L. atrilutea* NCIMB 14280^T (93.58%) 그리고 *L. vestfoldensis* LMG 22003^T (93.12%)로 나타났다. 그 중 *L. hongkongensis* UST950701-009P^T와 가장 높은 유사도의 염기서열 상동성을 보여 주었다. 생리 생화학적 특성 실험 및 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통한 유사도 분석, 계통분석, 지방산 그리고 G+C 함량분석 결과를 종합해 본 결과 JJM85^T는 신종임을 확인할 수 있었다. 이에 JJM85^T를 *Loktanella pyoseonensis* 로 명명하여 국내 생물자원센터인 KCTC(Korean Collection for Type Culture)와 독일 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)에 균주를 기탁하여 각각 균주 등록 번호를 받았다(KCTC 22372^T, DSM 21424^T). 염기서열은 EMBL Nucleotide Sequence Database에 등록하여 accession number를 부여 받았다. Strain JJM85^T의 accession number는 AM983542이다.

참고문헌

- 고유봉, 1998. 제주의 바다 (편집). 제주도수산해양개발협의회, 제주. 196pp.
- 권오길, 박갑만, 이준상, 1993. 원색 한국패류도감, 아카데미서적.
- 김진복, 김치경, 안태석, 송홍규, 이동훈. 2001. 폐놀이 첨가된 생태계에서 세균 군집구조 변화의 분석. 한국미생물학회지. **37**, 72-79.
- 김훈수, 장천영. 1984. 제주도산 갑각류 (십각류)의 분류학적 연구. 한국산 동식물의 종속지적 연구 (I): 2-31.
- 노분조, 서지은. 1984. 제주도산 해산 태충류의 분류학적 연구. 한국산 동식물의 종속지적 연구 (I): 32-73.
- 문화부, 1992. 제주도 해역의 조간대 및 아조대의 생물상 조사보고서. 244pp.
- 박용하, 1992. 방선균 분류학의 최근 동향, 한국방선균 생물학 연구 (I). 한국 방선균 생물학 연구회. 1-26.
- 부성민. 1988. 제주해역 해조류의 분포론적 고찰. 제주도연구. **5**: 97-114.
- 서귀포시. 2000. 서귀포 시립해양공원의 종합적인 보존·보호방안을 위한 해양생태계 조사 보고서. 119pp.
- 오윤식, 이인규, 이용필. 1990. 제주도 해산 녹조 대마디말속 (*Cladophora*) 식물 3종의 분류학적 주해. 한국식물학회지. **33**: 127-134.
- 유종생. 1976. 원색 한국패류도감, 일지사.
- 이기완, 고신자. 1991. 제주도 주변 유인도의 해조상. 제주문화방송 제주 유인도 학술조사: 239-269.
- 이명숙, 홍순규, 이동훈, 김치경, 배경숙. 2001. 16S rRNA 유전자 분석에 의한 전남 순천만 갯벌의 세균 다양성. 한국미생물학회지. **37**, 137-144.
- 이용필, 고용덕, 윤상용. 1990. 제주도 주변 무인도의 해조류상. 제주문화방송 제주 무인도 학술조사: 175-200.
- 이용필, 이인규. 1976. 제주도 조간대 해조군락에 대하여. 1. 춘계 해조류의 군락 조사. 한국식물학회지. **19**: 111-118.
- 이인규, 부성민. 1993. 해조류를 중심으로한 제주도의 해양식물상. 생물과학 심포지움, 제14집: 132-149.

- 이인규, 안영신. 1984. 제주도산 해산 녹조류의 분류학적 연구. 한국산 동식물의 종속지적 연구 (I): 74-95.
- 이준백, 좌종현, 김일수, 1991. 제주도 해안선 주변 부착규조류의 종 조성 및 분포. 제주대학교 해양연구소 연구보고. **15**: 61-72.
- 차인태, 임형준, 노동현. 2007. 동해 심층수로부터 *Pseudoaltermonas* sp. HJ47의 분리 및 체외단백질분해효소 특성. 한국생명과학회지 **17**, 272-278.
- 최병례. 1992. 한국동식물도감 제 33권 동물편(연체동물 II), 교육부.
- 하영철. 1978. 진해만 해양기초보고서. 서울대학교 미생물학과.
- 한국해양연구소. 1995. 제주도 남부 해역의 생물상에 관한 연구. 보고서 BSPE 00454-794-3. 155pp.
- 한국해양연구원. 1998. 제한절편말단분석법(T-RELP)을 이용한 해양퇴적물의 세균군집 분석. p. 97.
- 현대 미생물학, 탐구당. pp. 45-57.
- 환경부. 1995. 환경오염공정시험법(해수편).
- Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- APHA, AWWA. WPCF. 1993. Standard methods for the examination of water and waste water(18th ed.). APHA Washington, D.C. 1134pp.
- Arpigny, J. L. and Jaeger, K. E. 1999. Bacterial lipolytic enzyme: classification and properties. *Biochem. J.* **343**. 177-183.
- Banerjee, U. C., Sani, R. K., Azmi, W. and Soni, R. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem.* **35**, 213-219.
- Banika, R. M. and Prakash, M. 2004. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiol. Res.* **159**, 135-140.
- Barlow, R. G., Mantoura, R. F. C., Cummings, D. G., Pond, D. W. and Harris, R. P. 1998. Evolution of phytoplankton pigments in mesocosm

- experiments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. **46**, 15–22.
- Barrett, A. J. and G. Salvesen. 1986. *Proteinase inhibitors*. pp. 3–18, Elsevier Science Publishers B. V.
- Baumann, L., Baumann, P., Mandel, M. and Allen, R. D. 1972. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J Bacteriol*. **110**. 402–429.
- Baumann, P. and Baumann, L. 1981. The marine gram-negative eubacteria: genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes*. In *The Prokaryotes*, vol. pp. 1331. Edited by M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows & H. Schlegel. Berlin: Springer.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Nichols, D. S., Skerratt, J. H., Rea, S. M., Nichols, P. D. and McMeekin, T. A. 1997. *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., Novel Antarctic Species with the Ability To Produce Eicosapentaenoic Acid (20:5 ω 3) and Grow Anaerobically by Dissimilatory Fe(III) Reduction. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **47**, 1040 – 1047.
- Bowman, J. P. 2000. Description of *Cellulophaga algicola* sp. nov., isolated from the surfaces of Antarctic algae, and reclassification of *Cytophaga uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Cellulophaga uliginosa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1861–1868.
- Brock, T. D. 1997. Microbial activities in nature. pp.406–456. In *Biology of Microorganisms* (8th ed.). Prentice-Hall, Inc., Engle Wood Cliffs, New Jersey.
- Brown, A. C. and McLachlan, A. 1990. Ecology of sandy shores, *Elsevier*, 328 pp.
- Buck, J. D. 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **44**, 992–993.
- Carberg, S. R. 1972. International council for the exploration of the sea charlortenland Denmark. pp. 305–315.
- Chang, A. K., Kim, H. Y., Park, J. E., Acharya, P., Park, I. S., Yoon, S. M.,

- You, H. J., Hahm, K. S., Park, J. K. and Lee, J. S. 2005. *Vibrio vulnificus* secretes a broad-specificity metalloprotease capable of interfering with blood homeostasis through prothrombin activation and fibrinolysis. *J. Bacteriol.* 187. 6909–6816.
- Choa, J. H. and Lee, J. B. 2000. Bioecological characteristics of coral habitats around Moonsom, Jeju island, Korea: 1. Environment properties and community structures of phytoplankton. *Journal of the Korean Society of Oceanography.* 5, 59–69.
- Choi, B. D. and Jeong, Y. K. 1999. The stability of carotenoids extracted from halophilic bacteria. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 28, 1405–1407.
- Choo, D. W., Kurihara, T., Suzuki, T., Soda, K. and Esaki, N. 1998. A Cold-Adapted Lipase of an Alaskan Psychrotroph, *Pseudomonas* sp. Strain B11-1: Gene Cloning and Enzyme Purification and Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64. 486–491.
- Collins, M. D and Jones, D. 1981. A note on the separation of natural mixture of bacteria ubiquinones using reverse-phase partition thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography. *J. Appl. Bacteriol.* 51, 129–134.
- Connell, J. H. 1975. Some mechanisms producing structure in natural communities: a model and evidence from field experiments In: Ecology and evolution of communities (ed. by Cody, M. and Diamond, J.). pp. 460–490. Harvard Univ. Press.
- Colwell, P. R. 1970. Polyphasic taxonomy of bacteria. Iizuka, H. Hasegawa, T. (ed) Proc. First Int. Conf. Culture Collections. University of Tokyo Press. Tokyo. pp 421–436.
- Cowan. 2000. Microbial genomes– The untapped resource. *Trends Biotechnol.* 18, 14–16.
- Dayton, P. K. 1971. Competition, distribution and community organization: The

- provision and subsequent utilization of space in a rocky intertidal community. *J. Ecol. Monography*. **41**, 351-389.
- Denkin, S. M. and Nelson, D. R. 1999. Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3555-3560.
- Dhandapani, R. and Vijayaragvan, R. 1994. Production of thermophilic, extracellular alkaline protease by *Bacillus stearothermophilus* AP-4. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 33-35.
- Doucette, G. J. 1995. Interactions between bacteria and harmful algae: a review. *Nat. Toxins.* **3**, 65-74.
- Fernsdez, J. A., Mohedano, F., Polanco, M. J., Medina, M. and Nunez, M. 1996. Purification and characterization of an extracellular cysteine proteinase produced by *Micrococcus* sp. INIA 528. *J. Appl. Microbiol.* **81**, 27-34.
- Fox, G. E. and Stackerbrandt, E. 1987. The applicability of 16S and 5S rRNA sequencing in bacterial systematics. In "Methods in Microbiology" Vol. 19, pp. 405-418. Academic Press, London.
- Fukushima, J., Yamamoto, S. Morihara, K. Atsumi, Y. Takeuchi, H. Kawamoto, S. and Okuda, K. 1989. Structural gene and complete amino acid sequence of *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455 elastase. *J. Bacteriol.* **171**, 1698-1704.
- Gauthier, G., Gauthier, M. and Christen, R. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**. 755-761.
- George M. G., Matthew, W. and Denise B. S. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol, 2/2e.

- Giovannoni, S. and Rappe, M. 2000. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. pp. 48. In Kirchman, D. L.. Microbial ecology of the oceans. Wiley-Liss Co., Canada.
- Godfrey, T. and West, S. 1996. Industrial enzymology, 2nd ed. Macmillan Publisher Inc., New York, USA.
- Goldberg, E. D., 1994. Coastal Zone Space-Prelude to conflict?, UNESCO.
- González, J. M., Kiene, R. P. and Moran, M. A. 1999. Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the alpha-subclass of the gamma Proteobacteria. *Appl Environ Microbiol.* **65**, 3810 - 3819.
- González, J. M., Simo, R., Massana, R., Covert, J. S., Casamayor, E. O., Pedros-Alio, C. and Moran, M. A. 2000. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Appl Environ Microbiol.* **66**, 4237 - 4246.
- Gosink, J. J., Herwig, R. P. and Staley, J. T. 1997. *Octadecabacter arcticus* gen. nov., sp. nov., and *O. antarcticus* sp. nov., nonpigmented, psychrophilic gas vacuolate bacteria from polar sea ice and water. *Syst Appl Microbiol.* **20**, 356 - 365.
- Gray, J. R. and Herwig, R. P. 1996. Phylogenetic Analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4049-4059.
- Gustafson, K., Roman, M. and W. Fenical. 1989. The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7519-7524.
- Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance and conservation. *Mycol. Res.* **95**, 641-655.
- Henderson, G., Krygsman, P., Liu, C. J., Davey, C. C. and Malek, L. T. 1987. Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **169**, 3778-3784.

- Hedlund, B. P. and Staley, J. T. 2001. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 61-66.
- Honrichsen, L. L., Montel, M. C. and Talon, R. 1994. Proteolytic and lipolytic activities of *Micococcus roseus*, *Halomonas elongata* and *Vibrio* sp. isolated from Danish bacon curing brines. *Int. J. Food Microbiol.* **22**, 115-126.
- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms, Part I, alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 1407-1414.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L. and Pace, N. R. 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* **180**, 366-376.
- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2006, 2007, 2008.
- IUCN, 1993, Towards the Wise Use of Wetlands, Ramsar Convention Bureau.
- Ivanova, E. P., Bowman, J. P., Lysenko, A. M., Zhukova, N. V., Gorshkova, N. M., Sergeev, A. F. and Mikhailov, V. V. 2005. *Alteromonas addita* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**. 1065-1068.
- Ivanova, E. P., Zhukova, N. V., Lysenko, A. M., Gorshkova, N. M., Sergeev, A. F., Mikhailov, V. V. and Bowman, J. P. 2005. *Loktanella agnita* sp. nov. and *Loktanella rosea* sp. nov., from the north-west Pacific Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**, 2203 - 2207.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Heuvel, M. and Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**. 29-63.
- Jaeger, K. E. and Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**. 390-397.
- Johnson, F. H. and Shunk, I. V. 1936. An interesting new species of luminous bacteria. *J Bacteriol.* **31**. 585-592.

- Johnson, J. L. 1973. Use of Nucleic-Acid Homologies in the Taxonomy of Anaerobic Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**, 308-315.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.
- Kawase, T., Miyoshi, S., Sultan, Z. and Shinoda, S. 2004. Regulation system for protease production in *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **240**, 55-9.
- Kim, T. H. 1997. Coastal landform on the Jeju island. *Tamla culture.* **18**, 381-397.
- Kloos, W. E. and Schleifer, K. H. 1986. Genus *Staphylococcus*, in Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. II, Sneath, P. H., Mair, N. S., Sharpe, M. E and Holt, J. C., Eds., Williams and Wilkins, Baltimore. 1013.
- Kludge, A. G. and Farris, F. S. 1969. Quantitative phyletics anurans. *Syst. Zool.* **18**, 1-32.
- Kothary, M. H. and Kreger, A. S. 1985. Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **50**, 534-540.
- Kronberg, I., 1988. Structure and adaptation of the fauna in the black zone(littoral fringe) along rocky shores in northern Eorope, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **49**, 95-106.
- Kurahashi, M., and Yokota, A. *Agarivorans albus* gen. nov., sp. nov., a gamma-proteobacterium isolated from marine animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 693-697.
- Kwon, Y.-T., Lee, H.-H. and Rho, H.-M. 1993. Cloning, expression and sequencing of the minor protease encoding gene from *Serratia marcescens* ATCC 21074. *Gene* **125**, 75-80.
- Labrenz, M., Collins, M. D., Lawson, P. A., Tindall, B. J., Braker, G. and

- Hirsch, P. 1998. *Antarctobacter heliothermus* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium from hypersaline and heliothermal Ekho lake. *Int J Syst Bacteriol.* **48**, 1363 - 1372.
- Labrenz, M., Collins, M. D., Lawson, P. A., Tindall, B. J., Schumann, P. and Hirsch, P. 1999. *Roseovarius tolerans* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium with variable bacteriochlorophyll *a* production from hypersaline Ekho lake. *Int J Syst Bacteriol.* **49**, 137 - 147.
- Labrenz, M., Tindall, B. J., Lawson, P. A., Collins, M. D., Schumann, P. and Hirsch, P. 2000. *Staleyella guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov., α -3-Proteobacteria from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho lake. *Int J Syst Evol Microbiol.* **50**, 303 - 313.
- Lansing, M. P., Donald, A. K. and John, P. H. 2003. Microbiology, 5/e. pp 445-472.
- Lau, S. C. K., Tsoi, M. M. Y., Li, X., Plakhotnikova, I., Wu, M., Wong, P.-K. and Quin, P.-Y. 2004. *Loktanella hongkongensis* sp. nov., a novel member of the α -Proteobacteria originating from marine biofilms in Hong Kong waters. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**, 2281 - 2284.
- Lee, J. B., Shynn, B. and Lee, M. H. 2001. Seasonal dynamics of microalgal assemblage at tidepools in the southern intertidal zone of Jeju island, Korea. *Algae.* **16**, 197-207.
- Lewis, J. R., 1964. The ecology of rocky shores. Hodder and Stoughton, London. 323 pp.
- Lee, J. B., Choa, J. H., Kang, D. W., Go, Y. B. and Oh, B. C. 2002. Bioecological characteristics of coral habitats around Moonsom, Jeju island, Korea: 2. Community dynamics of phytoplankton and primary productivity. *Algae.* **15**, 37-47.
- Le Roux, F., Goubet, A., Thompson, F. L., Faury, N., Gay, M., Swings, J. and Saulnier, D. 2005. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *Int. J. Syst. Evol.*

- Microbiol.* **55**, 2251–2255.
- Lee, H. K., Chun, J., Moon, E. Y., Ko, S. H., Lee, D. S., Lee, H. S. and Bae, K. S. 2001. *Hahella chejuensis* gen. nov., sp. nov., an extracellular-polysaccharide-producing marine bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**, 661–666.
- Lee, S. H., Lee, S. Y. and Park, B. C. 2005. Cell Surface Display of Lipase in *Pseudomonas putida* KT2442 Using OprF as an Anchoring Motif and Its Biocatalytic Applications. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8581–8586.
- Lee, S. O., Kato, J., Nakashima, K., Kuroda, A., Ikeda, T., Takiguchi, N. and Ohtake, H. 2002. Cloning and characterization of extracellular metal protease gene of the algicidal marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1366–1369.
- Lee, S. O., Kato, J., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ikeda, T., Mitsutani, A. and Ohtake, H. 2000. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4334–4339.
- Lee, S. W., Won, K. H., Lim, H. K., Kim, J. C., Choi, G. J. and Cho, K. Y. 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 720–726.
- Lin, S. F., Chiou, C. M., Yeh, C. M. and Tsai, Y. C. 1996. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1093–1095.
- Liu, P. C., Lee, K. K. and Chen, S. N. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**, 413–416.
- Llobet-Brossa, E., R. Rossello-Mora and R. Amann. 1988. Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2691–2696.

- Lovejoy, C., Bowman, J. P. and Hallegraeff, G. M. 1998. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (강 Proteobacteria, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2806-2813.
- Lu, J. Y. and Liska, B. J. 1969. Lipase from *Pseudomonas fragi*. II. Properties of the Enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **18**, 108-113.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th Ed., p.553-535, Prentice Hill, USA.
- Maidak, B. L., Olsen, G. J., Larsen, N., Overbeek, R., MaCaughey, M. J. and Woese, C. R. 1996. The Ribosomal Database Project (RDP). *Nucleic acids Res.* **24**, 82-85.
- Marangoni, A. G. and Rousseau, D. 1995. Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. *Trends. Food Sci. Technol.* **6**, 329-335.
- Martens, T., Heidorn, T., Pukall, R., Simon, M. Tindall, B. J. and Brinkhoff, T. 2006. Re강ification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte *et al.* 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., re강ification of *Ruegeria algicola* (Lafay *et al.* 1995) Uchino *et al.* 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. *J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1293-1304.
- Mayali, X. and Azam, F. 2004. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**, 139-144.
- Mesbah, M., Premachandran, U. and Whitman, W. B. 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159-167.
- Metaxas, A. and Scheibling, R. E. 1994. Changes in phytoplankton abundance in tidepools over the period of tidal isolation. *Botanica Marina.* **37**,

301-314.

- Michael, T. M. and John M. M. 2006. Brock Biology of Microorganisms 11th. World Science.
- Nam, Y-D., Chang, H-W., Park, J. R., Kwon, H-Y., Quan, Z-X., Park, Y-H., Lee, J-S., Yoon, J-H. and Bae, J-W. 2007. *Pseudoalteromonas marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flats of the Yellow Sea, and reclassification of *Pseudoalteromonas sagamiensis* as *Algicola sagamiensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**. 12-18
- Norris, J. R., Ribbons, D. W. and Varma, A. K. 1985. Methods in Microbiology, vol. 18. London: Academic Press.
- Prasad, R., Malik, R. K. and Mathur, D. K. 1986. Purification and characterization of an extracellular caseinolytic enzyme of *Micrococcus* sp. MCC-315 isolated from cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **69**, 633-642.
- Ramsar Convention Bureau, 1993, The Ramsar Convention on the Conservation of Wetlands.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 597-635.
- Rattray, F. P., Bockelmann, W. and Fox, P. F. 1995. Purification and characterization of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3454-3456.
- Rhee, J. K., Ahn, D. G., Kim, Y. G. and Oh, J. W. 2005. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**. 817-825.
- Ruiz-Ponte, C., Cilia, V., Lambert, C. and Nicolas, J. L. 1998. *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. *Int J Syst. Bacteriol.* **48**, 537-542.

- Ryu, B. H. and Kim, M. J. 2000. Production of red pigment from marine bacterium utilizing colloidal chitin. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 264-269.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4**, 406-425.
- Shoichi, H. and Akira Y. 2007. *Loktanella atrilutea* sp. nov., isolated from seawater in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**, 1966-1969.
- Sohn, J. H. Lee, J-H. Yi, H. Chun, J. S. Bae, K. S. Ahn, T-Y. and Kim, S-J. 2004. *Kordia algicida* gen. nov., sp. nov., an algicidal bacterium isolated from red tide. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**, 675-680.
- Smibert, R. M. and Krieg, N. R. 1994. Phenotypic characteristics. In *Methods for General and Molecular Biology*, pp.654. Edited by P. Gerhardt, R.G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington: American Society for Microbiology.
- Snaird, J. R. Amann, I. Huber, W. Ludwig, and K-H Schleiger. 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2884-2896.
- Sneath, P. H. A. 1962. The construction of taxonomy group, *symposia of the society of Gen. Microbiol.* **12**, 289-297.
- Sneath, P. H. A. 1978. Classification of microorganisms. In "Essays in Microbiology", pp. 1-31. ed. by Norris. J. R. and M. H. Richmond, Wiley; Chichester.
- Sneath, P. H. A. 1973. Numerical Taxonomy, Freeman, London.
- Sneath, P. H. A. 1972. The influence on numerical taxonomy similarities of errors in microbiological tests. *J. Gen. Microbiol.* **72**, 377-392.
- Son, M. H and S. Y. Hong, 2003. Field guide to rockyshore invertebrates.
- Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of sea water analysis Bull. Fish. Res. Bd. Con. No. 167. Fisheries Reserch Borad of Canada, Qtawa. pp.1-311.

- Swinbanks, D. D. 1982. Intertidal exposure zones: a way to subdivide the shore. *J. Ecol. Mar. Biol. Ecol.* **62**, 69–86.
- Tait, R. V. 1972. Elements of marine ecology, Butterworth, 314 pp.
- Tapiolas, D. M., Roman, M., Fenical, W., Stout, T. J. and Clardy, J. 1991. Octalactins A and B: cytotoxic eight-membered ring lactones from a marine bacterium streptomyces sp. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4682–4683.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **24**, 48764882.
- Tiedje, J. M. and Zhou, J. 1996. Analysis of nonculturable bacteria. pp. 53–65. In Methods for the examination of organismal diversity in soils and sediments. Geoffrey S. Hall (ed.), CAB International.
- Urbance, J. W., Bratina, B. J., Stoddard, S. F. and Schmidt, T. M. 2001. Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen. nov., sp. nov. and *Ketogulonigenium robustum* sp. nov., which oxidize L-sorbose to 2-keto-L-gulonic acid. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**, 1059 - 1070.
- Valiela, I., 1984. Marine ecological processes, Springer-Verlag, 546 pp.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Vos, P. D., Kersters, K. and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**, 407–438.
- Van Trappen, S., Tan, T.-L., Yang, J., Mergaert, J. and Swings, J. 2004. *Alteromonas stellipolaris* sp. nov., a novel, budding, prosthecate bacterium from Antarctic seas, and emended description of the genus *Alteromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**. 1157–1163.
- Van Trappen, S., Mergaert, J. and Swings, J. 2004. *Loktanella salsilacus* gen. nov., sp. nov., *Loktanella fryxellensis* sp. nov. and *Loktanella vestfoldensis* sp. nov., new members of the *Rhodobacter* group, isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**,

1263 - 1269.

- Viles, H. and Spencer, T. 1994. Coastal problems: geomorphology, ecology and society at the coast, Edward Arnold.
- Wagner-Döbler, I., Rheims, H., Felske, A., Pukall, R. and Tindall, B. J. 2003. *Jannaschia helgolandensis* gen. nov., sp. nov., a novel abundant member of the marine *Roseobacter* clade from the North Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**, 731 - 738.
- Weinberg, S. 1978. The minimal area problem in invertebrate communities of mediterranean rocky substrates, *Mar. Biol.* **49**. 33-40.
- Weiner, R. M., Cowell, R. R., Jarman, R. N., Stein, D. C., Somervill, C. C. and Bonar, D. B. 1985. Applications of biotechnology to the production recovery and use of marine polysaccharides. *Biotechnol.* **3**. 899-902.
- Weon, H.-Y., Kim, B.-Y., Yoo, S.-H., Kim, J.-S., Kwon, S.-W., Go, S.-J. and Stackebrandt, E. 2006. *Loktanella koreensis* sp. nov., isolated from sea sand in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**, 2199 - 2202.
- Yoon, J. H., Lee, S. T. and Park, Y. H. 1998. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S rDNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 187-194.
- Yoon, J.-H., Kim, I.-G., Kang, K. H., Oh, T.-K. and Park, Y.-H. 2003. *Alteromonas marina* sp. nov., isolated from seawater of the East Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**. 1625-1630.
- Yoon, J. H., Kang, S. J. Lee, S. Y. and OH, T. K. 2007. *Loktanella maricola* sp. nov., isolated from seawater of the East Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**, 1799-1802.

감사의 글

제가 많은 분들의 따뜻한 관심과 애정 어린 질책 속에 또 다시 한층 성숙해질 수 있는 기회를 맞이하였습니다. 진정한 이 시대의 지식인으로서 소양과 자세를 일깨워준 모든 분들께 한 분씩 찾아뵙지 못하고 이렇게 지면으로나마 감사의 인사를 드리고자 합니다.

본 논문이 완성되기까지 자상하게 인도해 주시고 연구방향에 대하여 넓은 안목으로 키워주시며 지도해주신 허문수 교수님께 먼저 고개 숙여 감사드립니다. 짧다면 짧은 시간이었지만, 이 시간을 통해 교수님으로부터 참된 연구자의 마음가짐과 삶에 대한 성실한 태도를 마음 깊이 새길 수 있었습니다. 학문과 삶에 대한 교수님의 진심 어린 말씀 하나 하나 새겨가며 교수님의 가르침을 잊지 않고 이제 새롭게 출발하는 마음으로 다시 시작하겠습니다.

그리고 연구와 강의로 바쁘신 가운데도 제 학위논문 심사를 흔쾌히 맡아주시고 많은 도움말과 격려를 해주신 제주대학교 과학교육과 이순동 교수님과 수산생명의학과 송춘복 교수님, 이제희 교수님 그리고 해양생명과학과 최광식 교수님께 감사드립니다. 학부과정에서부터 박사과정을 마치는 지금까지 저를 지켜보시면서 인생의 선배로서 또는 선배 연구자로서 많은 지도와 격려 그리고 도움을 주신 여인규 교수님과 전유진 교수님께도 감사드립니다. 그리고 제가 미생물학이란 학문에 관심을 가질 수 있게 길을 터주시고 많은 조언과 격려를 아낌없이 해주신 제주특별자치도 해양수산자원연구소 강봉조 박사님, 고흥범 박사님 그리고 김필연 연구사님께도 감사드립니다. 또한 가장 가까이에서 서로에게 격려와 조언을 아끼지 않고 해 주며 가장 큰 버팀목이 되어주었던 해양미생물학연구실 진창남 선배님, 고대희 선배님, 양병규 선배님, 강철영 선배님 그리고 언제나 나에게 힘이 되어준 특별한 후배 김만철, 김주상, 장태원, 김민주, 김윤범, 전봉근, 장익수, 한용재, 송창영, 박동민, 또한 부족했던 저에게 실험관련 하여 많은 도움을 주셨던 과학교육과 이동완, 서성해, 인생의 선배로서 많은 조언과 도움을 주신 이치훈 선배님, 박창범 선배님, 언제나 항상 그 자리에 있으면서 내가 힘들어 할 때나 기뻐할 때 항상 힘을 보태주고 믿어주었던 나의 영원한 친구인 오영빈, 강영관, 허수진, 강지연, 양문휴 그리고 이번에 같이 박사학위논문 준비하고 발표하

는 동안 많은 도움을 준 96학번 동기인 오철홍, 김맹진 그리고 어릴 때부터 지금까지 또한 앞으로 영원히 서로에 버팀목이 되어 줄 친구들(강태규, 강상봉, 강동권, 강민형, 강승혁, 강호철, 김현주, 문재운, 현동효, 현종철, 황찬식)에게 믿음과 감사의 뜻을 전합니다.

항상 공부한다는 핑계로 가족에게 소홀했던 이 못난 저에게는 항상 든든하고 믿음직스러운 형제들이 있습니다. 영민이 형, 동생 영부 그리고 쌍둥이 여동생 영혜, 미혜에게 앞으로 더 열심히 살아가겠다는 약속과 함께 작지만 이 지면을 빌어 저를 지금까지 믿어주고 격려해 준 것을 감사드립니다.

그리고 제 모든 힘의 원천이며 살아가는 원동력인 사랑하는 부모님께 감사드립니다. 두 분의 헤아릴 수 없이 가득한 사랑과 관심, 인내가 없었다면 지금의 저는 결코 있을 수 없었을 것입니다. 그 무엇으로도 다 표현할 수 없을 만큼의 헌신적인 두 분의 사랑으로 이렇게 결실을 맺을 수 있었습니다. 두 분의 사랑에 항상 감사하며 최선을 다해 열심히 살아가겠습니다. 아버지, 어머니 사랑합니다.

더불어 부족한 이 사위를 항상 믿고 염려해 주시고 격려를 잊지 않고 해 주시는 장인, 장모님께도 감사의 마음을 전합니다. 항상 건강하세요. 또한 큰형님과 작은 형님께도 저에 대한 믿음 감사드립니다. 그리고 언제나 저의 어깨를 다독거리며 어떠한 상황에서도 할 수 있다는 믿음을 가지면 못할게 없다는 정신과 힘을 불어넣어 주신 작은 아버지, 명수형님, 외삼촌을 비롯한 친척 가족 분들에게도 감사에 마음을 전합니다.

마지막으로, 20살이란 어린 나이에 만나 지금까지 항상 나의 곁을 지키며 힘들 때나 기쁠 때 그 어느 누구보다 앞장서서 나에게 격려와 조언 그리고 기쁨을 주었던 나의 천사, 학생 신분으로 결혼을 하면서 많은 어려움이 있는데도 항상 밝은 웃음과 마음으로 이렇게 결실을 맺을 수 있도록 무한한 신뢰, 믿음 그리고 사랑을 주고 있는 사랑하는 나의 아내 김지연 그리고 아들 정우에게 진심으로 사랑한다는 말을 전합니다.

이 외에 제가 미처 언급하지 못한 고마운 분들이 너무나 많습니다. 그 분들의 이름을 모두 되새기지 못함을 죄송하게 생각하며, 대신 제 깊은 감사의 말로 이 글을 마칠까 합니다. “모두들 진심으로 감사드립니다”.