



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

*Callyspongia elegans*에서의
세균군집 분석 및 항균활성탐색

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

朴 昭 炫

2012年 8月

*Callyspongia elegans*에서의
세균군집 분석 및 항균활성탐색

指導教授 許文洙

朴昭炫

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2012 年 8 月

朴昭炫의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 김 기 영 _____ (印)

委 員 _____ 정 준 범 _____ (印)

委 員 _____ 허 문 수 _____ (印)

濟州大學校 大學院

2012 年 8 月

Bacterial community analysis and bacteria
screening involving antimicrobial activity in
Callyspongia elegans

So-Hyun Park
(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

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

Department of Marine life science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

August, 2012

목 차

목 차	i
List of Tables	iii
List of Figures	iv
Abstract	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
2.1. 시료채집	4
2.2. 미생물의 분리 및 배양	5
2.2.1. 미생물의 분리·배양 및 보관	5
2.3. 표현형질에 따른 특징	8
2.3.1. 배양상 특징	8
2.3.2. 형태학적 특징	8
2.4. 분자생물학적 방법	9
2.4.1. Genomic DNA 분리	9
2.4.2. 16S rDNA 유전자 증폭	10
2.4.3. 유전자 cloning 및 형질전환	11
2.4.4. 염기서열 분석 및 계통학적 분석	12
2.5. 항균물질 탐색	13
2.5.1. 항균활성 유전자 탐색	13
2.5.2. 분리 균주의 항균활성 측정	14

III. 결 과	16
3.1. <i>C. elegans</i> 미생물의 순수분리	16
3.1.1. 세균수 측정	16
3.2. 표현형질에 따른 특징	17
3.2.1. 분리균주의 배양상 및 형태학적 특성	17
3.3. 16S rDNA 염기서열의 계통학적 분석	23
3.3.1. <i>C. elegans</i> 내 세균군집의 계통학적 특성	23
3.3.2. <i>C. elegans</i> bacteria 군집분석	33
3.4. 항균물질 탐색	36
3.4.1. 항균활성유전자 탐색	36
3.4.2. 분리균주의 항균활성 측정	38
IV. 요 약	40
V. 참고 문헌	42
VI. 감사의 글	49

List of tables

Table 1. Composition of Marine agar (MA)	6
Table 2. Compositions of R2A	7
Table 3. Compositions of ISP2	7
Table 4. polymerase chain reaction(PCR) Primers used in this study.	10
Table 5. List of strains used of antibacterial experiment	14
Table 6. Composition of <i>E. coli</i> & <i>E. tarda</i> medium (NA)	15
Table 7. Composition of <i>S. iniae</i> medium (BHIA)	15
Table 8. Phenotypic characteristics of <i>C. elegans</i> bacteria	18
Table 9. The phylogenetic relatives of <i>C. elegans</i> bacteria	27
Table 10. Category of <i>C. elegans</i> strains according to taxonomic heirarchy ·	35
Table 11. Antibacterial activity by isolated strain	39

List of figures

Fig. 1. Marine sponge ' <i>C. elegans</i> '	4
Fig. 2. Serial dilution method for isolation of <i>C. elegans</i> bacteria	5
Fig. 3. Gram's staining for isolate strain of <i>C. elegans</i>	8
Fig. 4. Isolate strains percent of <i>C. elegans</i> on medium	16
Fig 5. Diversity and structure of bacterial community of <i>C. elegans</i>	34
Fig 6. Genus of bacterial community of <i>C. elegans</i>	34
Fig. 7. Phylogenetic analysis of <i>PKS</i> sequences.	37

Abstract

The aim of this study was to investigate the Bacterial community analysis and Screening of bacteria with antibacterial activities from *Callyspongia elegans*. In marine bacteria were isolated from the marine sponge *C. elegans* using marine agar. The resulting 112 isolated pure cultures were then used for further study. The characterization of the bacteria was done through microscopic and molecular analysis. Some of the isolated strains were determined to be novel bacterial species through taxonomic identification and classification .

A total of 112 culturable strains were isolated. They were characterized by determining morphological characteristics through, Gram' staining. The colony pigments of bacterial isolates were characterized as yellow, brown, ivory, and white. Thirty-seven strains were found to be Gram-positive and 75 strains were Gram-negative. Seventy-nine strains of all isolates were coccus-shaped, while 16 strains were rod-shaped.

The isolated strains were selected for phylogenetic investigation through a 16S rDNA gene sequence analysis. The bacterial genomic DNA was isolated and 16S rDNA regions were amplified using the primers 27F and 1522R. The sequences were then compared with the sequences in the NCBI Genbank database and a BLAST analysis was performed. On the basis of the results of the comparative analyses of 16S rDNA gene sequences, the 112 isolated bacteria were divided into 5 major groups: *α-proteobacteria* (39%), *γ-proteobacteria* (22%), *Actinobacteria* (14%), *Fimicutes* (9%), and *Bacteroidetes* (6%).

All of the isolated strains were tested for antibacterial activity using agar spot assays and amplifications of Polyketide synthase (*PKS*) genes. To detect the *PKS* genes, PCR was carried out using the genomic DNA of these

strains as templates, as well as two oligonucleotides that bind specifically to the ketosynthase (KS) domains of *PKS*. PCR with the genomic DNA from all 16 strains yielded about 700 bp DNA fragments, which were the expected size for the PCR product. The results showed that KS , domains of *PKS* from 3 strains that had appeared to be novel actually had identities as *Pseudovibrio* sp. (90%) in the databases. Isolates demonstrating antibacterial activity represented 33% of the total. Twenty-eight strains also showed antibacterial activity against *E. tarda*.

It is strongly suggested that fifteen isolates are candidates for a new genus or species, based on the analyses of 16S rDNA gene sequences.

I. 서론

해면은 오랜 진화적 역사를 갖는 다세포 여과섭식 무척추동물로써 지금까지 약 8,000여 종이 알려져 있으며, 해양 및 담수에 서식하는 것으로 알려져 있다. 해면은 해양에서 열대, 온대, 극지에 이르기까지 범지구적인 넓은 분포를 나타내고 있으며, 이 중 열대지역의 해양에 가장 많은 종이 분포하는 반면, 담수에는 1% 이하의 해면만이 서식하는 것으로 알려져 있다(Thomas *et.al.*, 2010). 해면은 *Calcarea*, *Demospongiae*, *Hexactinellida* 3 개의 주요 강으로 나뉘며, 가장 많은 해면 종들은 *Demospongiae* 강에 속하는 것으로 보고 되어 있다(Hentschel *et.al.*, 2006).

이러한 해양 무척추동물인 해면은 세포내 혹은 세포외에 많은 미생물을 포함하는 것으로 알려져 있다(Selvin, J., 2009). 해면은 여과 섭식 동물로써 주변의 해수 혹은 담수의 여과를 통하여 먹이원을 공급받으며(Thomas *et.al.*, 2010), 해면 생체량의 40% 이상에 달하는 세균을 비롯한 고세균, 시아노박테리아, 녹조류, 홍조류, 규조류 등 많은 미생물을 포함하고 있다. 이러한 해면은 bacteriosponges 혹은 high-microbial abundance sponge라 불리운다(Hentschel *et.al.*, 2006, Hardoim *et al.*, 2009, Levina *et.al.*, 2005, Thiel *et.al.*, 2007).

해면에 서식하는 공생미생물은 해면의 표면, 혹은 해면 세포내에 서식하며, 일시적이거나 영구적인 공생관계를 유지하는 것으로 알려져 있으며(Park *et.al.*, 2009), 그 수와 종류에 있어 매우 방대하다 (Hentschel *et.al.*, 2006, Zhang *et.al.*, 2006). 세균은 해면의 공생미생물 중 가장 많은 분포를 나타낸다(Thompson *et.al.*, 1994). *Pseudomonas denitificans* 와 같이 여러 종의 해면에서 우점종으로 발견되는 경우(Hentschel *et.al.*, 2002, Enticknap *et.al.*, 2006)도 있으나, 외부의 환경 변화에도 불구하고 숙주 해면과의 공생관계가 영구적인 세균종이 있다는 보고(Muscholl Silberhorn *et.al.*, 2008, Friedrich *et.al.*, 2001)도 있다.

해면동물의 소화과정과 면역반응에 저항하며 성공적으로 공생하는 세균은 이차 대사산물의 생합성에 관련되어 있어(Cho *et.al.*, 2009, Thoms *et.al.*, 2003) 여과

섭식자인 해면동물의 먹이원이기도 하지만, 해면의 면역 반응에 중요한 역할을 하기도 한다. 이때 미생물과의 공생을 통하여 영양원을 얻거나 골편의 안정화, 질소고정과 질화작용, 노폐물의 가공을 수행하고 혹은 숙주의 화학적 방어 작용, UV 조사에 대한 보호 작용, 미생물 감염에 저항하기 위하여 많은 종류의 이차 대사산물을 생성하는 것으로 알려져 있다(Thomas *et.al.*, 2010, Li *et.al.*, 2006).

해양 생태계에서 해면의 서식에 중요한 역할을 하는 이러한 이차 대사산물에는 항바이러스, 항세균, 항암물질, 세포독성, 항염증성 물질 등 의학적으로 중요한 물질들이 포함된다. 실제 해양으로부터 유래하는 생물의약품 중 대부분이 무척추 동물로부터 유래하며, 그 중 해면으로부터 가장 많은 종류의 생리활성물질이 생산되는 것으로 알려져 있다(Thomas *et.al.*, 2010). 또한 해면으로부터 항암제, 항생제, 콜레스테롤 합성저해제, 효소를 비롯한 많은 생리활성 물질들이 분리되면서 (Dai J *et.al.*, 2007, Dalisay *et.al.*, 2009, Selvin *et.al.*, 2009, Taylor *et.al.*, 2004), 최근 새로운 의약품 개발을 위한 해양 생물자원으로써 해면에 많은 관심이 집중되고 있다.

폴리케타이드는 방선균 등이 생산하는 중요한 천연물로 coenzyme A-activated carboxylic acid의 중합화로 형성된다. 폴리케타이드의 생합성은 polyketide synthase (PKS) 다기능 효소로서 천연물의 다양한 구조를 가지며, 많은 의약의 풍부한 공급원이 되고 있다 (Hutchinson, 2003). 항생제 erythromycin, tetracycline, methymycin, 항암제 doxorubicin, enediyne, 면역억제제 rapamycin, FK506, antiparasitic 제제 avermectin, nemadectin, 항진균제 amphotericin, griseofulvin, 심장순환기약제 lovastatin, compactin 그리고 동물약품 monensin, tylosin이 그 산업적 예이며 rapamycin과 FK506은 세포의 signal transduction 규명에 사용되기도 했다(Schreiber, 1998).

해면의 공생미생물은 폴리케타이드를 포함한 천연 의약품과 또한 해면으로부터 유도하여 물질을 생산한다(Proksch *et.al.*, 2002). 게다가 해면 *P. clavata*에서 분리된 *Salinispora bacteria*는 rifamycin 항생제라는 새로운 물질을 생산하였으며, 이는 PKS system에 의해 생산되어졌다고 보고되었다(Kim *et al.*, 2006). 많은 천연 폴리케타이드 물질은 해면에서 분리되어지지만(fontana *et al.*, 1998), 해양 미생물의 PKS 유전자의 대한 연구는 아직 초기 단계이다(Piel *et al.*, 2004;

Fieseler *et al.*, 2007).

이처럼 해면으로부터 분리되는 다수의 생리활성물질들이 공생하는 미생물에 의해 생산되는 것으로 보고가 증가되는 실정이다(Guangyi *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2009; Lafi *et al.*, 2005; Tamaki *et al.*, 2005, Mohamed *et al.*, 2008). 이러한 해면의 생리활성물질들이 공생하는 세균에 의해 생산되는 것으로 추정되면서 해면공생세균의 다양성 및 군집구조에 관한 연구가 매우 증가하고 있는 추세이며(Lee *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007; Radwan *et al.*, 2010; (16s rDNA-RFLP 28), 군집구조의 분석은 해면에 공생하는 전체 미생물의 군집을 평가하는데 있어 매우 중요하다(Alam *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2004).

본 연구에서는 16S rDNA를 이용하여 *Callyspongia elegans*의 세균의 군집 구조를 분석하고, PCR를 통해 *PKS* 유전자를 스크리닝하여 항균활성을 탐색하고자 한다.

II. 재료 및 방법

2.1. 시료채집

본 연구에서 해면 *C. elegans* (Fig. 1)은 2011년 11월 7일 제주도 문섬 앞바다 수심 10 m에서 스쿠버 다이빙에 의해 채집하였으며, 채집한 해면은 즉시 해수가 담겨진 멸균된 용기에 보관하여 운반하였으며, 4℃보관 후 미생물을 분리하는 데에 사용하였다.



Fig 2. Marine sponge '*C. elegans*'

2.2. 미생물의 분리 및 배양

2.2.1. 미생물 분리·배양 및 보관

채집한 해면은 멸균된 인공해수에 세척 후, 해면의 안쪽을 1 g 정도 잘라 멸균된 0.85% NaCl 용액에 넣어 homogenizer로 균질화 시켰다. 균질화 된 시료는 연속 희석법(Fig.2)으로 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 배로 희석 후 현탁액을 Marine Agar (MA, Difco, USA), R2A (Difco, USA) 배지에 도말 한 후 25°C에 7일간 배양하였다. 각 평판 배지에서 분리된 집락을 선정하여 배지에 2-3회 계대배양 하여 순수 분리하였다. 방선균은 ISP Medium 2 (ISP2, Difco, USA) 배지에 계대배양 하였다. 배지의 조성은 Table 1-3과 같다. 분리된 미생물은 20% (v/v) Glycerol에 현탁하여 초저온 냉동고 (-80°C)에 동결 보관하였다.

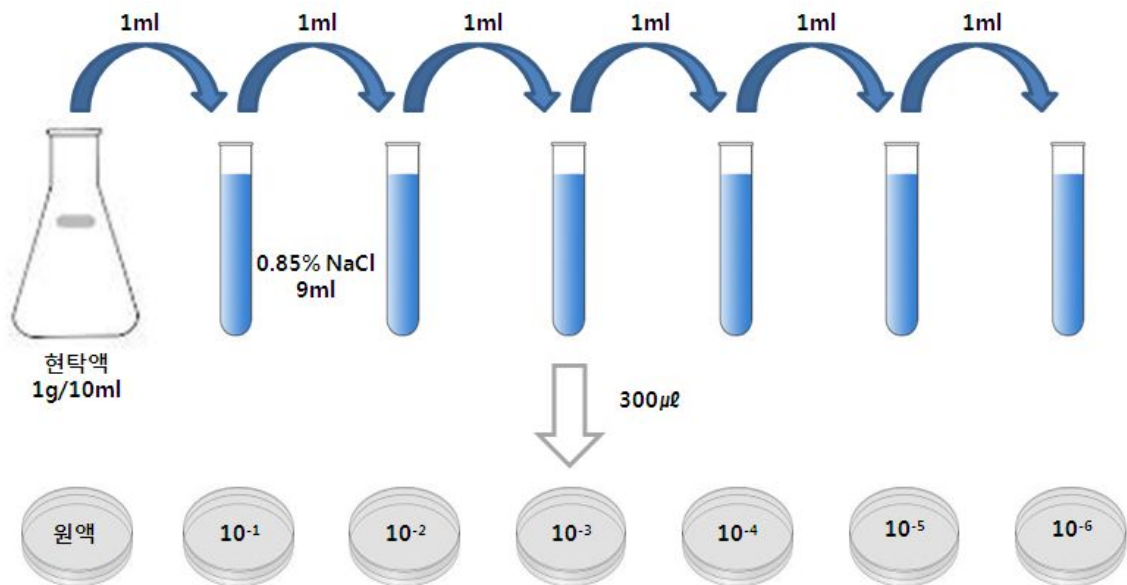


Fig 3. Serial dilution method for isolation of *C. elegans* bacteria

Table 1. Composition of Marine agar (MA)

Ingredient	Amounts
Peptone	5.0 g
Yeast extract	1.0 g
Ferric citrate	0.1 g
Sodium chloride	19.45 g
Magnesium chloride	8.8 g
Sodium sulfate	3.24 g
Calcium chloride	1.8 g
Potassium chloride	0.55 g
Sodium bicarbonate	0.16 g
Potassium bromide	0.08 g
Strontium chloride	34.0 mg
Boric acid	22.0 g
Sodium silicate	4.0 g
Sodium fluoride	2.4 g
Ammonium nitrate	1.6 g
Disodium phosphate	8.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L

Table 2. Composition of R2A

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

Table 3. Composition of ISP Medium 2

Ingredient	Amounts
Yeast Extract	4.0 g
Malt Extract	10.0 g
Dextrose	4.0 g
Agar	20.0 g
Distilled water	1 L

2.3. 표현형질에 따른 특징

2.3.1. 배양상 특징

순수 배양된 세균들은 MA, R2A 평판배지에 2~3일 배양한 후 집락의 색상을 기록하였다. 또한, 방선균은 ISP2 배지에서 7~10일 배양 후 포자의 색상을 기록하였다.

2.3.2. 형태학적 특징

균주들의 형태학적 특징은 그람염색으로 그람양성균과 그람음성균을 구분하였다. 그람염색은 Color Gram 2 kit (bioMérieux)를 이용하여 균체를 슬라이드 글라스에 열고정하고, 크리스탈 바이올렛으로 1분 염색 후 세척, 요오드 용액으로 1분간 고정, 알콜로 15초간 탈색 후 사프라닌으로 다시 45초 염색하는 과정을 통해 수행하였다. 염색 후 광학현미경 (AX10SCOPE A1, ZEISS)을 통해서 그람양성균과 그람음성균을 관찰하였다.

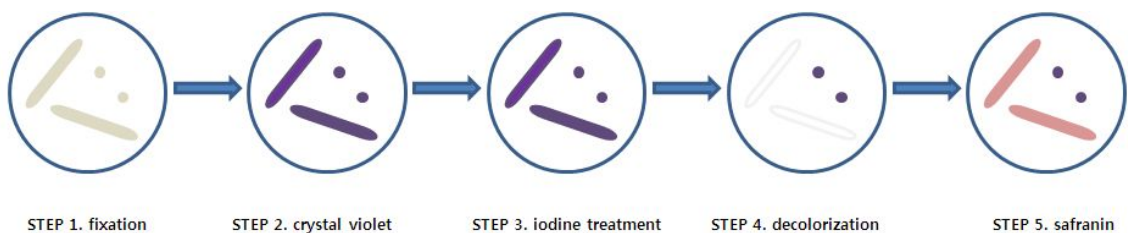


Fig 4. Gram's staining for isolate strain of *C. elegans*

2.4. 분자생물학적 방법

2.4.1. Genomic DNA 분리

Genomic DNA를 분리하기 위해 균주들은 액체배지에 접종하여 배양 후 원심분리로 상층액을 제거 후 모아진 pellet을 사용하였다. TE buffer 567 μ l를 넣고 용해시킨 후 lysozyme (100 mg/ml)을 10 μ l을 첨가하여 잘 섞어 주고 실온에서 5분간 반응시켰다. 단백질을 제거는 10% SDS와 proteinase K (10 mg/ml)를 첨가 후 37°C에서 1시간 배양하였다. 5 M NaCl를 첨가 후 잘 섞어주고 CTAB/ NaCl solution을 첨가 후 65°C에서 10분간 반응 시켰다. DNA 추출 및 침전을 위해서 Phenol/ Chloroform/ Isoamylalcohol (25:24:1)를 700 μ l를 첨가 후 부드럽게 섞어 준 후, 5분간 원심분리(13,000 rpm, 5분)하였다. 깨끗한 상층액을 새 마이크로 튜브에 옮겨주고, 옮겨진 부피의 2배의 chloroform/ isoamyl alcohol (24:1)를 첨가하여 부드럽게 섞어 준 뒤, 다시 원심분리 하였다. 다시 새 튜브에 상층액을 조심스럽게 옮겨주고 600 μ l isopropanol를 첨가하여 상하로 부드럽게 흔들어서 흰색의 DNA를 확인하였다. 원심분리 하여 상층액을 버리고 모아진 DNA를 세척하기 위해 70% ethanol 700 μ l를 첨가 후 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 실온에서 pellet 을 건조하여 ethanol을 제거한다. pellet의 양의 따라서 TE buffer 50-100 μ l와 RNase (10mg/ml)을 첨가하여 실온에서 녹였다. DNA가 완전히 녹은 것을 확인 후에 UV-VisSpectrophotometer (UV, mini1240, Shamdzu)로 DNA 농도를 측정하고, 농도가 측정된 DNA는 4°C에 보관하였다.

2.4.2. 16S rDNA 유전자 증폭

16S rDNA 분석은 추출된 genomic DNA를 사용하였다. 16S rDNA 유전자 증폭에 사용된 primer는 27 Forward primer와 1522 Reverse primer를 사용하였다 (Table 4). 추출된 DNA 1 μ l에, 10 pmol/primer 1 μ l, 10 mM dNTPs, 10X PCR buffer, 5 Unit Taq polymerase (TAKARA, Japan), Bioneer D.W를 혼합하여 최종부피 25 μ l로 맞추어 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 초기 변성단계 (Initial denaturation) 5분, 30 cycle동안 94°C에서 변성단계 (denaturation) 1분, 55°C에서 결합단계 (annealing) 1분, 72°C에서 합성단계 (extention) 3분을, 72°C분간 최종 합성단계 (final extention)로 , PCR (Thermal cycler, Bio-RAD) 반응을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose에서 전기영동 (Mupid®-ex, ADVANCE)하여 확인하였다.

Table 4. polymerase chain reaction (PCR) Primers used in this study.

PCR reaction	Primer	Sequence(5'-3')
16S rDNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S rDNA	1522R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA
PKS	GBF	RTRGAYCCNCAGCAICG
PKS	GBR	VGTNCCNGTGCCRTG

2.4.3. 유전자 클로닝 및 형질전환

pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA)을 이용하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 2× Rapid Ligation Buffer 5 μ l, pGEM-T Easy vector (50 ng) 1 μ l, T4 DNA ligase 1 μ l, 증폭된 PCR산물 3 μ l를 섞어준 후, 4°C에서 하룻동안 반응시켜 ligation하였다. JM109 Competent cell 50 μ l를 첨가하여 얼음에 꽂은 후 20분간 반응 시키고, 42°C에서 45초정도 열 충격(Heat shock)하여 즉시 얼음에 꽂아 2분간 반응시켰다. LB broth를 950 μ l 첨가 후, 37°C에서 1시간 정도 배양시켰다. LB/ ampicillin (50 mg/ml)/ isopropyl 1-thio- β -D-galactoside (IPTG, 0.1 M)/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal, 40 mg/ml) 평판배지에서 도말 후, 37°C, 1일 동안 배양하여 흰 집락을 선별하였다. 선별한 집락을 LB broth/ ampicillin (50 mg/ml)에 접종하여 16시간 배양하여 plasmid DNA를 분리하였다. plasmid DNA 분리는 DNA-spin Plasmid DNA extraction kit (iNtRON, korea)를 사용하였다. 배양된 균체를 원심분리 하여 모아진 균체를 resuspension buffer 250 μ l를 넣고 균체를 잘 풀어준 후, lysis buffer 250 μ l 첨가 후, 상하로 2~3회 잘 섞어준다. 그리고 neutralization buffer를 350 μ l를 넣어주고 또다시 상하로 잘 섞어 준 후, 4°C에서 5분간 반응시킨다. 원심분리(13,000 rpm, 10분)하여 최대한 불순물을 제거하고 상층액을 spin column에 옮겨준 뒤 다시 원심분리(13,000 rpm, 1분)하였다. washing buffer A와 B로 불순물을 세척 후 elution buffer로 DNA를 elution했다. 분리된 DNA는 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

2.4.4. 염기서열 분석 및 계통학적 분석

16S rDNA 유전자는 (주)제노텍 (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search program을 이용하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Genbank database와 EzTaxon server (Chun et al, 2007)에서 유사한 염기서열을 비교하고, 가장 근연속이나 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 본 연구에 의해서 결정된 염기서열과 database에서 회수된 표준미생물 염기서열은 Mega 4.0 software (Tamura et al, 2007)에 포함된 Clustal W 프로그램을 이용하여 multiple alignment 로 정렬하였다.

2.5. 항균물질 탐색

2.5.1. 항균활성 유전자 탐색

PolyKetide Synthase (*PKS*) 유전자를 증폭하기 위해 GB Forward와 GB Revers primer를 (주)제노텍 (Daejeon, Korea)에 주문하여 10 pmol로 희석 후 사용하였다. 10 pmol/primer 1 μ l, Template DNA 1 μ l, 10 mM dNTPs, 10X PCR buffer, 5 Unit Taq polymerase (TAKARA, Japan), Bioneer D.W를 혼합하여 최종부피 25 μ l로 맞추어 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 초기 변성단계 (Initial denaturation) 5분, 35 cycle동안 94°C에서 변성단계 (denaturation) 1분, 55°C에서 결합단계 (annealing) 1분, 72°C에서 합성단계 (extention) 2분으로 하였고, 72°C에서 10분간 최종 합성단계 (final extention)으로 PCR (CI100 Thermal cycler, Bio-RAD) 반응을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 유전자를 확인하기 위해 1% agarose gel에서 전기영동 하여 확인하였다. PCR 증폭된 산물은 pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA)을 이용하여 ligation을 수행하고, JM109 Competent cell을 이용하여 형질전환 하였다. 형질전환 한 Plasmid DNA 분리는 DNA-spin Plasmid DNA extraction kit (iNtRON, korea)를 사용하여 분리하였다.

염기서열 분석은 (주)제노텍 (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 BLAST search program을 이용하여 NCBI의 Genbank database의 유사한 염기서열을 비교하였다. 본 연구에 의해서 결정된 염기서열과 database에서 회수된 염기서열은 MEGA 4.0 software (Tamura et al., 2007)에 포함된 Clustal W 프로그램을 이용하여 multiple alignment 로 정렬하였다. 진화적 거리는 같은 프로그램에서 Jukes- Cantor (Munro, 1969) 방법을 인용하여 neighbor-joining방법 (NJ; Saitou and Nei, 1987)과 maximum-likelihood (ML; Felsenstein, 1981)을 이용하여 계통수를 작성하였다.

2.5.2. 분리균주의 항균활성 측정

분리된 112 균주들을 대상으로 Agar spot assay를 사용하여 항균활성을 탐색하였다. 시험균주로는 인체유해세균 3종, 어류 질병 유발균 3종을 Korean Collection for Type Culture (KCTC)와 Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM)에서 분양 받아 실험에 사용하였다(Table 5). 분리된 균주들을 MA와 R2A에 3일간 배양하였다. 시험균주는 Spectrophotometer (UV-VISIBLE S-3100, Scinco)를 사용하여 600 nm에서 optical density (O.D) 값 0.4 (10^6 CFU/ml)로 흡광도를 조절하였다. 억제환의 생성여부와 크기를 측정하기 위해서 pour-plate method에 따라 0.3% Top agar에 시험균주 현탁액을 넣고 잘 섞은 후, 접종한 평판배지에 골고루 분주하였다. 시험균주의 각 배양온도에서 24시간 배양 후에 생육저지대 (Clear Zone)를 형성하는 균을 선별하였다. 항균용 실험배지는 다음과 같다.

Table 5. List of strains used of antibacterial experiment

Strain	Strain NO.	Media	Temp.(°C)
<i>Escherichia coli</i>	KCCM 40880	NA	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC 1927	TSA	37
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCCM 11965	MA	25
<i>Edwardsiella tarda</i>	KCTC 12267	NA	37
<i>Streptococcus iniae</i>	KCTC 3657	BHIA	37
<i>Vibrio alginolyticus</i>	KCCM 40513	MA	37

Table 6. Composition of *E. coli* & *E. tarda* media (NA)

Ingredient	Amounts
Beef Extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L

Table 7. Composition of *S. iniae* media (BHIA)

Ingredient	Amounts
Calf Brains, Infusion from 200g	7.7 g
Beef Heart, Infusion from 250g	9.8 g
Proteose Peptone	10.0 g
Dextrose	2.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Disodium Phosphate	2.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L

III. 결과 및 고찰

3.1. *C. elegans* 미생물의 순수 분리

3.1.1. 평판배양법에 의한 세균수 측정

평판배지에 희석한 시료를 도말하여 배양 후 단일 집락의 수를 측정하는 것으로 평판계수법 (plate count) 또는 집락계수법 (colony count)이라고도 한다. 평판배지에 형성된 집락 수가 30~300개가 있을 때 신뢰성이 있다.

*C. elegans*에서 MA와 R2A 배지에 배양한 결과, MA 배지에서는 분리한 세균은 4.8×10^4 CFU/g, R2A 배지에는 2.0×10^4 CFU/g의 세균수가 관찰되었다. MA보다 R2A 배지에서 세균수가 훨씬 낮게 관찰되었다. MA 배지에서 R2A 배지보다 2배 정도 높은 세균 수를 나타내었다.

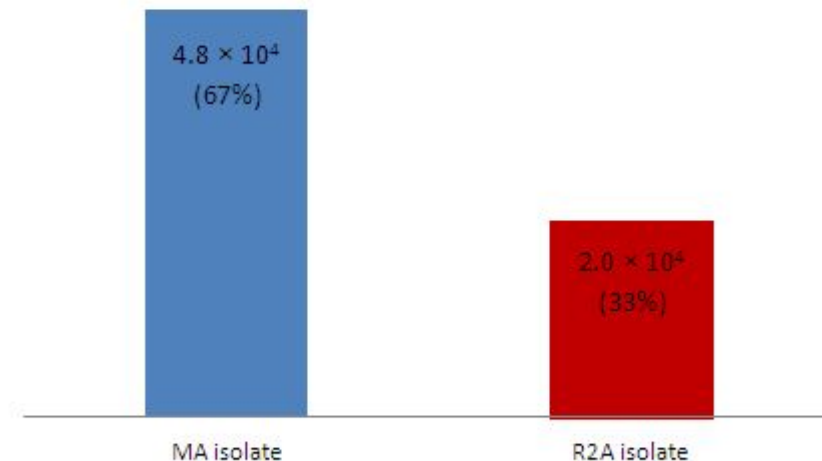


Fig 5. Colony forming unit per gram (CFU/g) of *C. elegans* sample on medium

3.2. 표현형질에 따른 특징

3.2.1. 분리균주의 배양상 및 형태학적 특성

*C. elegans*에서 배양 가능한 미생물은 총 112균주가 분리되었다. 그람염색법으로 확인한 결과로 그람양성균은 37균주, 그람음성균은 75균주로 그람음성균이 더 많이 분포하는 것으로 나타났다. 배지상으로는 MA 배지에서는 그람음성균이 90% 차지하는 것으로 나타나는 반면, R2A 배지에서는 90% 이상이 그람 양성균으로 나타났다. 균주들의 집락의 색깔은 아이보리색, 노란색, 흰색, 갈색 등으로 다소 제한적으로 나타남을 알 수 있었다. 갈색 계열의 균주들 중 일부는 배양시간이 길어짐에 따라 점점 진한 색을 띄었다. 균주의 형태는 간균 (Rods)이 79균주가 관찰되었고, 구균 (coccus)이 16균주, 간균과 구균의 형태 모두 가지는 균주는 11균주, 포자형태 (spore) 6균주가 관찰되었다.

Table 8. Phenotypic characteristics of *C. elegans* bacteria

No.	Name	Gram stain	Color of colony on medium	Morphology	Motility
1	CE1	N	Yellow	R	+
2	CE2	N	Reddish Brown	R	+
3	CE3	N	Light-Yellow	R	+
4	CE4	P	White	R	+
5	CE5	N	Beige	C	+
6	CE6	N	Brown	R	+
7	CE7	N	Ivory	R	+
8	CE8	N	Beige	R	+
9	CE9	N	Brown	R	+
10	CE10	N	Brown	R	+
11	CE11	N	Beige	C	+
12	CE12	N	Brown	R	+
13	CE13	N	Ivory	R	+
14	CE14	N	Brown	C	+
15	CE16	N	Ivory	R	+
16	CE17	N	Yellow	R	+
17	CE19	N	Light Yellow	R/C	-
18	CE20	N	Brown	C	+
19	CE21	N	Ivory	R/C	-
20	CE22	N	Reddish Brown	C	+
21	CE23	N	Brown	C	+
22	CE24	N	Reddish Brown	R	+
23	CE24-1	N	Brown	R	+
24	CE25	N	Dark Yellow	R	+
25	CE26	N	Brown	C	+
26	CE27	N	Yellow	R	+

Table 8. Continue

No.	Name	Gram stain	Color of colony on medium	Morphology	Motility
27	CE28	N	Dark Brown	C	+
28	CE29	N	Brown	R	+
29	CE30	N	Brown	C	+
30	CE31	N	Ivory	R	+
31	CE32	N	apricot	R	+
32	CE33	N	Ivory	R/C	-
33	CE34	N	Light Brown	R	+
34	CE35	N	Ivory	R/C	-
35	CE36	N	Ivory	R/C	-
36	CE37	N	Ivory	R	+
37	CE38	N	Ivory	R	-
38	CE39	N	Light Brown	C	+
39	CE40	N	Ivory	R	-
40	CE41	N	apricot	R	+
41	CE42	N	Reddish Brown	C	+
42	CE43	N	Dark Ivory	R/C	-
43	CE44	N	Ivory	R/C	-
44	CE45	N	Brown	C	+
45	CE46	P	Ivory	R	+
46	CE47	P	Ivory	R	+
47	CE49	N	Ivory	R	+
48	CE50	N	Brown	R	+
49	CE51	P	Hot pink	R	+
50	CE52	N	Dark Ivory	R/C	-
51	CE53	N	Ivory	R/C	-
52	CE54	N	Light Yellow	R	+

Table 8. Continue.

No.	Name	Gram stain	Color of colony on medium	Morphology	Motility
53	CE55	N	Ivory	R	+
54	CE56	N	Light apricot	R/C	-
55	CE57	N	Ivory	R	-
56	CE58	N	Green-Brown	R	+
57	CE59	N	Reddish Brown	R	+
58	CE63	P	apricot	C	-
59	CE64	N	Light Brown	C	+
60	CE65	N	Ivory	R	+
61	CE66	N	Ivory	R	+
62	CE67	N	Light-Yellow	R	+
63	CE68	N	Brown	R	+
64	CE69	N	Ivory	R	+
65	CE70	N	Khaki	R	+
66	CE72	N	Ivory	R/C	-
67	CE73	N	Ivory	R	-
68	CE74	N	Light-Yellow	R	+
69	CE74-1	N	Dark-Yellow	R	+
70	CE75	N	Light-Yellow	R	+
71	CE76	N	Ivory	R	-
72	CE77	P	Ivory	R	+
73	CE78	N	Yellow	R	+
74	CE79	N	Brown	R	+
75	CE80	N	Dark-Ivory	R	+
76	CE81	N	Yellow	R	+
77	CE82	P	Green-Yellow	R	-
78	CE83	N	Dark-Yellow	R	+

Table 8. Continue.

No.	Name	Gram stain	Color of colony on medium	Morphology	Motility
79	CE84	P	Ivory	R	+
80	CE85	N	Ivory	R	-
81	CR2	P	Yellow	R	+
82	CR3	N	Green-Yellow	R	+
83	CR4	N	Yellow	R	+
84	CR5	P	White	R	+
85	CR6	P	Yellow	R	+
86	CR7	P	Ivory	R	+
87	CR8	P	Yellow	R	-
88	CR9	P	Ivory	R	-
89	CR10	P	White	R	+
90	CR12	P	White	R	+
91	CR13	P	Orange	C	-
92	CR14	P	Green-Yellow	R	-
93	CR15	P	Ivory	R	+
94	CR16	P	White	R	+
95	CR17	P	Yellow	R	+
96	CR18	P	Yellow	R	+
97	CR19	P	White	R	+
98	CR20	P	White	R	+
99	CR21	P	Colorless	R	+
100	CR23	P	Light-apricot	C	-
101	CR24	P	White	R	-
102	CR25	P	apricot	R	-
103	CR26	N	Colorless-White	R	-
104	CR27	P	Colorless-White	R	+

Table 8. Continue.

No.	Name	Gram stain	Color of colony on medium	Morphology	Motility
105	CR28	P	Green-Yellow	R	-
106	IC2	P	Ivory	spore	
107	IC5	P	Gray	spore	
108	IC6	P	Ivory	spore	
109	IC10	P	Dark-Gray	spore	-
110	IC11	P	Gray	spore	
111	IC12	P	Dark-Brown	spore	
112	IC14	P	Light-apricot	R	-

3.3. 16S rDNA 염기서열의 계통학적 특징

3.3.1. *C. elegans* 내 세균군집의 계통학적 특징

16S rDNA 유전자는 rRNA를 만드는 유전자로 돌연변이가 잘 일어나지 않아 세균을 분류하는데 매우 중요하다. 많은 연구가들에 의한 세균들의 rDNA 염기서열에 대한 자료가 축적되어 가고 있고, 16S rDNA 염기서열 분석법의 자동화로 인해 더 쉽고 정확하게 세균을 분류 할 수 있게 되었다.

*C. elegans*에서 분리된 112 균주의 분석되어진 16S rDNA 염기서열은 염기서열 간의 유사도를 확인하기 위해 BLAST search program을 이용하여 NCBI의 Genbank와 EzTaxon server에서 유사한 염기서열을 비교하였다.

염기서열 분석한 결과, 주요 분류군으로 *Actionobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*의 4개의 문 (Phylum)이 확인되었으며, *Proteobacteria*는 α -*Proteobacteria*와 γ -*Proteobacteria*의 2 개의 강 (Class)가 나타내었다 (Fig 5).

Actinobacteria (phylum)/ *Actinobacteria* (class)/ *Actinomycetales* (order)에서는 *Microbacteriaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Nocardioideaceae*, *Sanguibacteraceae*, *Streptomycetaceae* 의 6개의 과(family)를 나타냈다(Tabel 9).

*Microbacteriaceae*에서는 *Microbacterium* (genus)가 5균주(CE82, CR8, CR14, CR28)들이 분리되었다. CE82, CR8, CR14는 *Microbacterium binotii* CIP 101303^T(EF567306), CR28은 *Microbacterium mitrae* M4-8^T와 99% 이상 16S rDNA 유전자 염기서열 유사도를 보였다.

*Mycobacteriaceae*에는 *Mycobacterium* (genus)에 속하는 1균주 (CR25)로 *Mycobacterium frederiksbergense* DSM 44346^T에 99% 16S rRNA 염기서열 유사도를 나타내었다.

Nocardiaceae (family)는 *Rhodococcus*, *Nocardia*의 2개의 속 (genus)이 분리되었고, 각각 *Rhodococcus* (genus)에 속하는 2균주(CE63, CR23)로 CE63은 *Rhodococcus erythropolis* NBRC 100887^T 100%, CR23는 *Rhodococcus equi* DSM

20307^T 99%의 염기서열 유사도를 보였다. *Nocardia* (genus)에 속하는 1균주인 IC14로 균사생성 방선균인 *Nocardia spelunca* N2-11^T와 99%의 염기서열 유사도를 보였다.

*Nocardioideae*에서는 *Marmoricola* (genus)에 속하는 1균주 (CR13)로 분리되었으며, CR13은 해양 퇴적물에서 분리된 *Marmoricola aequoreus* SST-45(T)에 98%의 염기서열 유사도를 나타내었다.

Sanguibacteraceae (family)/ *Sanguibacter* (genus)에 속하는 1균주 (CR6)와 , *Streptomycetaceae* (family)/ *Streptomyces* (genus)에 속하는 2균주 (IC2, IC5, IC6, IC10, IC11, IC12)가 분리되었다. CR6은 *Sanguibacter keddiei* DSM 10542(T), *Streptomyces* 분리균주들은 *Streptomyces cirratus* NRRL B-3250(T), *Streptomyces spororaveus* LMG 20313(T), *Streptomyces platensis* JCM 4662(T), *Streptomyces beijiagensis* NBRC 100044(T), *Streptomyces olivochromogenes* NBRC 3178(T), *Streptomyces griseochromogenes* NBRC 13413(T) 사이에 99% 이상의 염기서열 유사도를 보였다.

Bacteroidetes (phylum)/ *Flavobacteriia* (class)/ *Flavobacteriales* (order)/ *Flavobacteriaceae* (family)에는 *Actibacter* (genus)에 속하는 1균주 (CE81)와 *Tenacibaculum* (genus)에 속하는 6균주 (CE17, CE25, CE27, CE67, CE78, CE83, CE24-1)가 분리되었다. CE81은 *Actibacter sediminis* JC2129(T) (EF670651)와 91.9% 유사도를 *Tenacibaculum* 분리균주들은 *Tenacibaculum crassostreae* JO-1(T), *Tenacibaculum litopenaei* B-I(T), *Tenacibaculum litoreum* CL-TF13(T) 사이에 91.8-94.5% 낮은 염기서열 유사도를 나타내었다.

Firmicutes (phylum)/ *Bacilli* (class)/ *Bacillales* (order)에서는 *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae*의 2개의 과(family)와 *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*의 4개의 속 (genus)이 확인되었다.

Bacillaceae (family)에는 *Bacillus* (genus)에 속하는 14균주 (CR24, CR5, CR20, CE51, CR21, CR16, CR17, CR18, CE47, CR15, CE4, CE46, CR10, CE77)와 *Lysinibacillus* (genus)에 속하는 3균주(CE84, CR7, CR27)가 분리되었다. *Bacillus* 분리균주들은 *Bacillus acidicer* CBD 119(T), *Bacillus anthracis* Ames, *Bacillus aquimaris* TF-12(T), *Bacillus cibi* JG-30(T), *Bacillus drentensis* LMG 21831(T),

Bacillus luciferensis LMG 18422(T), *Bacillus marisflavi* TF-11(T), *Bacillus oceanisediminis* H2(T), *Bacillus stratosphericus* 41KF2a(T), *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792(T), *Brevibacterium frigoritolerans* DSM 8801(T) 사이에 99.0-100%의 염기서열 유사도는 보여주었다. CE84는 *Lysinibacillus massiliensis* 4400831(T) 97.2%, CR7과 CR27은 *Lysinibacillus xylanilyticus* XDB9(T) 99% 16S rRNA 염기서열 유사도를 보였다.

*Paenibacillaceae*에는 *Brevibacillus* (genus)에 속하는 1균주 (CR19)와 *Paenibacillus* (genus)에 속하는 3균주 (CR2, CR9, CR12)가 분리되었다. CR19는 *Brevibacillus fluminis* CJ71(T)와 99.4%, CR2는 *Paenibacillus barcinonensis* BP-23(T)와 99.1%의 염기서열 유사도를 나타내었으며, CR9, CR12는 각각 *Paenibacillus chondroitinus* DSM 5051(T), *Paenibacillus telluris* PS38(T)와 96.8%와 95.1%의 낮은 유사도는 나타내었다.

위에 언급했듯이 *proteobacteria*는 *α-proteobacteria*와 *γ-proteobacteria*의 2개의 강으로 나뉘졌음을 보여주었다. *α-proteobacteria* (class)에는 *Rhodobacterales*, *Rhizobiales*의 2개의 목(order)과 *Rhodobacteraceae*, *Rhizobiaceae*의 2개의 과(family), 그리고 *Labrenzia*, *Pseudovibrio*, *Rhizobium*, *Ruegeria*의 4개의 속(genus)으로 분리되었다. *γ-proteobacteria* (class)에는 *Alteromonadales*, *Oceanospirillales*, *Pseudomonadales*, *Xanthomonadales*의 4개의 목 (order), *Alteromonadaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Hahellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*의 5개의 과 (family)로 나타내었다.

α-proteobacteria (class)/ *Rhodobacterales* (order)/ *Rhodobacteraceae* (family)에는 *Labrenzia* (genus) 2균주 (CE4, CR24), *Pseudovibrio* (genus) 33균주(CE37, CE49, CE65, CE69, CE5, CE11, CE14, CE20, CE22, CE23, CE26, CE28, CE30, CE39, CE42, CE45, CE64, CE79, CE2, CE6, CE8, CE9, CE10, CE12, CE24, CE29, CE34, CE50, CE55, CE58, CE59, CE68, CE70, CR26), *Ruegeria* (genus) 6균주 (CE57, CE38, CE40, CE73, CE76, CE85)로 분리되었다. *Labrenzia* (genus)의 CE4와 CR24는 *Labrenzia alba* CECT 5094(T), *Labrenzia alexandrii* DFL-11(T)에 대해서 99.4%, 96.4%의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보여주었다. *Pseudovibrio* 분리균주는 *Pseudovibrio japonicus* WSF2(T), *Pseudovibrio ascidiaceicola* F423(T),

Pseudovibrio denitrificans DN34(T) 사이에서 99.0-100%의 염기서열 유사도를 나타내었다. *Ruegeria* (genus)의 CE57은 *Ruegeria lacuscaerulensis* ITI-1157(T)와 98.2%, CE38, CE40, CE73, CE76, CE85는 *Ruegeria atlantica* IAM 14463(T) 99% 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보여주었다.

γ -proteobacteria (class)/ *Alteromonadales* (order)에서는 *Alteromonadaceae* (family)/ *Microbulbifer* (genus)에 속하는 11균주(CE19, CE21, CE33, CE44, CE56, CE72, CE35, CE36, CE43, CE52, CE53)와 *Pseudoalteromonadaceae* (family)/ *Pseudoalteromonas* (genus)에는 6균주(CE3, CE7, CE13, CE16, CE41, CE1)가 분리되었다. *Microbulbifer* 속 분리균주는 *Microbulbifer epialgicus* F-104(T) 98.7% 99.2%, *Microbulbifer variabilis* Ni-2088(T)와 99% 염기서열 유사도를 보여주었다. CE3은 *Pseudoalteromonas flavipulchra* NCIMB 2033(T)와 99.5%를, CE7, CE13, CE16, CE41는 *Pseudoalteromonas lipolytica* LMEB 39(T)와 97.7-100% 염기서열 유사도를 보여주었다.

γ -proteobacteria (class)/ *Oceanospirillales* (order)/ *Hahellaceae* (family)/ *Endozoicomonas* (genus)로 5균주(CE32, CE66, CE74, CE54, CR4)와 *Pseudomonadales* (order)/ *Pseudomonadaceae* (family)/ *Pseudomonas* (genus)는 1균주(CR4)분리 되었다. CE32와 CE66, CE74는 *Endozoicomonas elysicola* MKT110(T)과 93%의 낮은 염기서열 유사도를 보여주었으며, CE54는 *Endozoicomonas montiporae* CL-33(T)와 97.1%의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보여주었다. CR4는 *Pseudomonas marincola* KMM 3042(T) 100%로 16S rRNA 유전자 염기서열이 일치하였음을 보여주었다.

Xanthomonadales (order)/ *Xanthomonadaceae* (family)/ *Lysobacter* (genus)에서 1균주(CR3), *Stenotrophomonas* (genus)에서는 1균주 (CE74-1)가 분리되었으며, CR3은 *Lysobacter soli* DCY21(T)와 99.5%, CE74-1은 *Stenotrophomonas pavanii* ICB 89(T)과 99.9% 염기서열 유사도가 보였다.

그리고 16S rDNA 유전자 염기서열 비교를 통한 계통분석을 통해서 분리된 112균주 중 15균주가 표준균주와 유전자 염기서열의 97% 이하의 상동성을 보여 새로운 속 또는 종으로 보고될 가능성이 있다고 판단 되어진다. 향후 표준균주들과 함께 실험이 신중 실험이 수행되어야 할 것이다.

Table 9. The phylogenetic relatives of *C. elegans* bacteria

Marine isolate	Phylum	Closest relative species	Sequence similarity
CE82	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium binotii</i>	99.7
CR8		<i>Microbacterium binotii</i>	99.9
CR14		<i>Microbacterium binotii</i>	99.9
CR25		<i>Mycobacterium frederiksbergense</i>	99.5
CR28		<i>Microbacterium mitrae</i>	99.2
IC14		<i>Nocardia spelunca</i>	99.9
CR23		<i>Rhodococcus equi</i>	99.9
CE63		<i>Rhodococcus erythropolis</i>	100.0
CR13		<i>Marmoricola aequoreus</i>	98.6
CR6		<i>Sanguibacter keddiei</i>	99.7
IC2		<i>Streptomyces cirratus</i>	99.7
IC5		<i>Streptomyces spororaveus</i>	99.9
IC6		<i>Streptomyces platensis</i>	99.6
IC10		<i>Streptomyces beijiangensis</i>	100.0
IC11		<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	99.2
IC12		<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	99.0
CE81	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Actibacter sediminis</i>	91.9
CE24-1		<i>Marinitalea sucinacia</i>	91.5
CE83		<i>Tenacibaculum crassostreae</i>	92.0
CE25		<i>Tenacibaculum litopenaei</i>	91.5
CE27		<i>Tenacibaculum litopenaei</i>	91.5
CE67		<i>Tenacibaculum litopenaei</i>	92.1
CE78		<i>Tenacibaculum litopenaei</i>	91.8

Table 9. continue.

Marine isolate	Phylum	Closest relative species	Sequence similarity
CR24	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus acidiceler</i>	99.5
CR5		<i>Bacillus anthracis</i>	99.6
CR20		<i>Bacillus anthracis</i>	99.4
CE51		<i>Bacillus aquimaris</i>	99.6
CR21		<i>Bacillus cibi</i>	99.6
CR16		<i>Bacillus drentensis</i>	99.4
CR17		<i>Bacillus luciferensis</i>	99.2
CR18		<i>Bacillus marisflavi</i>	100.0
CE47		<i>Bacillus oceanisediminis</i>	100.0
CR15		<i>Bacillus stratosphericus</i>	100.0
CE4		<i>Bacillus thuringiensis</i>	100.0
CE46		<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.6
CR10		<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.7
CE77		<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	99.9
CE84		<i>Lysinibacillus massiliensis</i>	97.2
CR7		<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	99.6
CR27		<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	99.9
CR19		<i>Brevibacillus fluminis</i>	99.4
CR2		<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	99.1
CR9		<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	96.8
CR12		<i>Paenibacillus telluris</i>	95.1

Table 9. continue.

Marine isolate	Phylum	Closest relative species	Sequence similarity
CE31	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Labrenzia alba</i>	99.9
CE80		<i>Labrenzia alexandrii</i>	96.4
CE5		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	100.0
CE11		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	99.9
CE14		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	99.9
CE20		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	100.0
CE22		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	100.0
CE23		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	100.0
CE26		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	100.0
CE28		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	100.0
CE30		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	100.0
CE39		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	100.0
CE42		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	100.0
CE45		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	100.0
CE64		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	100.0
CE2		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.5
CE6		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.2
CE8		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.7
CE9		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.6
CE10		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.1
CE12		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.9
CE17		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.9
CE24		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.6

Table 9. continue.

Marine isolate	Phylum	Closest relative species	Sequence similarity
CE29	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.6
CE34		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.6
CE50		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.6
CE55		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.6
CE58		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.6
CE59		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.6
CE68		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.6
CE70		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.6
CE79		<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	99.6
CE37		<i>Pseudovibrio japonicus</i>	99.6
CE49		<i>Pseudovibrio japonicus</i>	99.7
CE65		<i>Pseudovibrio japonicus</i>	99.2
CE69		<i>Pseudovibrio japonicus</i>	99.6
CE38		<i>Ruegeria atlantica</i>	99.7
CE40		<i>Ruegeria atlantica</i>	99.7
CE73		<i>Ruegeria atlantica</i>	99.6
CE76		<i>Ruegeria atlantica</i>	99.9
CE85		<i>Ruegeria atlantica</i>	99.9
CE57		<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	98.2
CR 26		<i>Rhizobium huautlense</i>	97.1

Table 9. continue.

Marine isolate	Phylum	Closest relative species	Sequence similarity
CE32	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Endozoicomonas elysicola</i>	93.6
CE74		<i>Endozoicomonas elysicola</i>	93.7
CE75		<i>Endozoicomonas elysicola</i>	93.8
CE66		<i>Endozoicomonas elysicola</i>	93.7
CE54		<i>Endozoicomonas montiporae</i>	96.2
CE19		<i>Microbulbifer epialgicus</i>	99.9
CE21		<i>Microbulbifer epialgicus</i>	99.2
CE33		<i>Microbulbifer epialgicus</i>	98.7
CE44		<i>Microbulbifer epialgicus</i>	98.7
CE56		<i>Microbulbifer epialgicus</i>	99.1
CE72		<i>Microbulbifer epialgicus</i>	99.2
CE35		<i>Microbulbifer variabilis</i>	99.1
CE36		<i>Microbulbifer variabilis</i>	98.9
CE43		<i>Microbulbifer variabilis</i>	99.1
CE52		<i>Microbulbifer variabilis</i>	99.1
CE53		<i>Microbulbifer variabilis</i>	99.2
CE7		<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	100.0
CE13		<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	100.0
CE16		<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	97.4
CE41		<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	97.8
CE1		<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	100.0
CE3		<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	99.5
CR4		<i>Pseudomonas marincola</i>	100.0
CR3		<i>Lysobacter soli</i>	99.5

Table 9. continue.

Marine isolate	Phylum	Closest relative species	Sequence similarity
CE74-1	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99.9

3.3.2. *C. elegans* bacteria 군집분석

*C. elegans*에서 배양 가능한 112 분리균주의 16S rDNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 그 결과, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fimicutes*, *proteobacteria*로 4개의 주요 계통군을 확인 하였다. 62%로 *Proteobacteria* (39% *α-proteobacteria*, 23% *γ-proteobacteria*)가 우점을 이루었으며, *Fimicutes*는 19%, *Actinobacteria*는 14%, 그리고 *Bacteroidetes*가 7%에 속하는 것으로 나타났다(Fig 5). 계통군을 분석한 결과 5개의 강(Class), 9개의 목(order), 15개의 과(Family), 그리고 23개의 속(Genus)으로 구성되었다. *γ-proteobacteria* 문 (phylum)에는 4개의 목(order), 5개의 과(family), 5개의 속(genus)으로 *Actionobacteria* 문 (phylum)에서는 5개의 과, 6개의 속(genus) 등 다양한 분류군이 나타났다(Table 13). 속 (genus)은 *Pseudovibrio* 30%, *Bacillus* 13%, *Microbulbife* 10%, *Pseudoalteromonas*, *Streptomyces*, *Ruegeria* 5%, *Mycobacterium*와 *Tenacibaculum* 그리고 *Endozoicomonas*는 4%, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* 3%이며, *Rhodococcus* 2%, *Nocardia*, *Marmoricola*, *Sanguibacter*, *Actibacter*, *Marinitalea*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Lysobacter*, *Stenotrophomonas*, *Labrenzia*, *Rhizobium*는 1% 순으로 구성되어 있으며, *Pseudovibrio* (34균주), *Bacillus* (14균주), *Microbulbifer* (11균주)로 나타났다(Fig 6).

Proteobacteria 계통군은 다시, *α-proteobacteria*, *γ-proteobacteria* 계통군에 각각 39%와 23%에 속하였음을 확인하였으며, *Proteobacteria*가 우점하는 것을 알 수 있었다. 비배양 혹은 배양법에 의해 밝혀진 해면 세균군집에서 *Proteobacteria*가 우점하는 것으로 보고되고 있다. 그리고 기존 *C. elegans* 종에서 세균 군집 분석한 결과와 달리 다른 주요 문으로 분류되어지며, 세균의 군집 또한 해양환경에 의해 달라질 수 있다고 사료되어 진다.

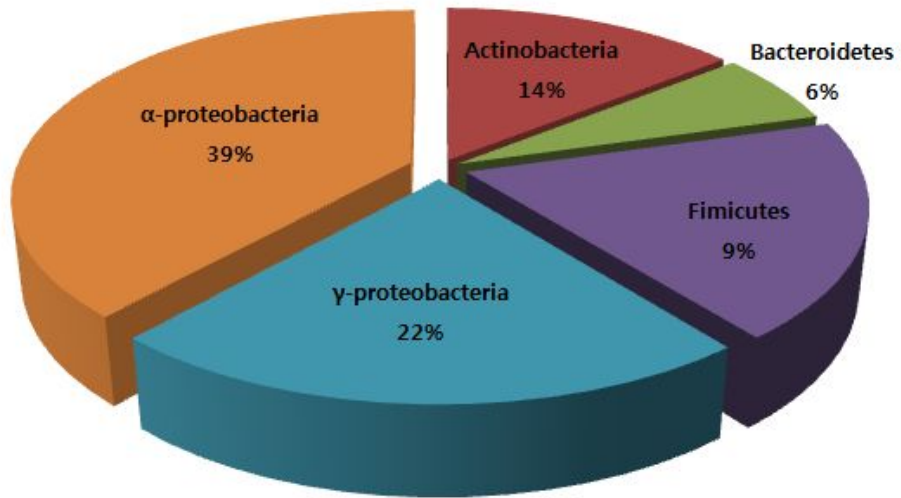


Fig 6. Diversity and structure of bacterial community of *C. elegans*

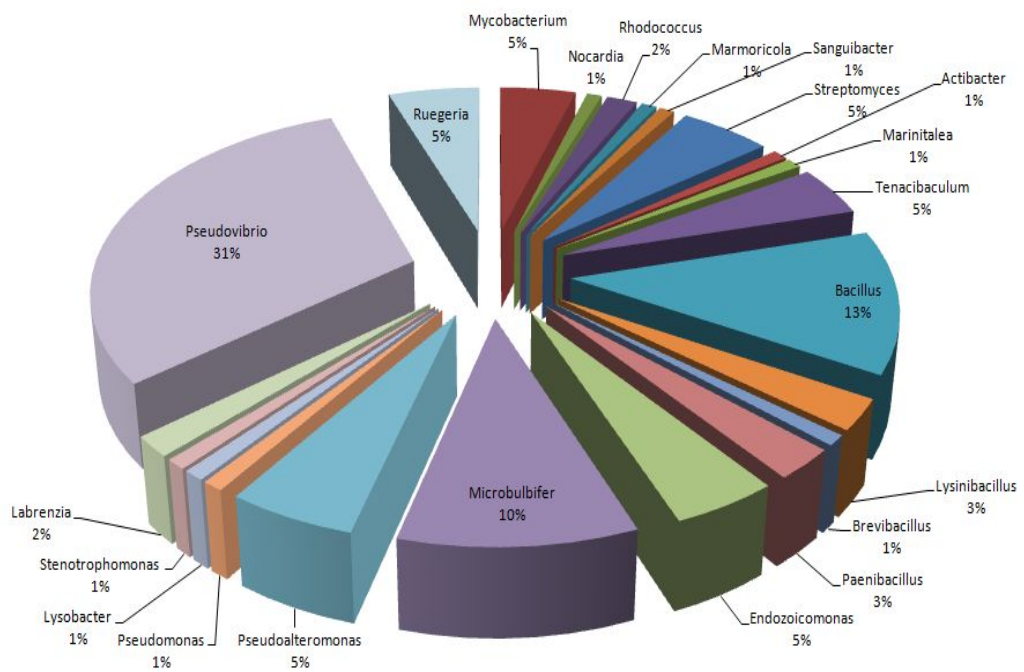


Fig 7. Genus of bacterial community of *C. elegans*

Table 10. Category of *C. elegans* strains according to taxonomic hierarchy

Phylum	Class	Order	Family	Genus	N O.	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>	5	
			<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	1	
				<i>Rhodococcus</i>	2	
			<i>Nocardioideae</i>	<i>Marmoricola</i>	1	
			<i>Sanguibacteraceae</i>	<i>Sanguibacter</i>	1	
			<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	6	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Actibacter</i>	1	
				<i>Marinitalea</i>	1	
				<i>Tenacibaculum</i>	5	
<i>Fimicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	14	
				<i>Lysinibacillus</i>	3	
			<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Brevibacillus</i>	1	
				<i>Paenibacillus</i>	3	
<i>Proteobacteria</i>	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Labrenzia</i>	2	
				<i>Pseudovibrio</i>	34	
				<i>Ruegeria</i>	6	
		<i>Rhizobiales</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i>	1	
	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Hahellaceae</i>	<i>Endozoicomonas</i>	5	
			<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Microbulbifer</i>	11
				<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	6
			<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	1
		<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Lycobacter</i>	1	
				<i>Stenotrophomonas</i>	1	

3.4. 항균물질 탐색

3.4.1. 항균활성 폴리케타이드 유전자 탐색

배양 가능한 112 분리균주를 항균활성유전자인 PolyKedide Synthase (*PKS*)를 탐색하기 위해 *PKS* 유전자 중 KS domain 부분을 primer로 제작하여 분석하였다. . *PKS* 유전자가 있는 PCR 산물은 700bp의 사이즈를 가진다. 유전자 증폭한 결과, 700bp를 나타낸 균주는 112중 16균주에서 나타내었다. BLAST search program을 이용하여 NCBI의 Genbank database의 염기서열을 비교한 결과, *Pseudovibrio* sp. 에 90%의 유사도를 보였다. CE5와 CE37 균주는 *Pseudovibrio* sp. Ad26 clone (HQ647097)의 KS domain에 96%의 유사도를 보였고, CE28 균주는 *Bacterium* H333 clone (AY857396)에 93%의 유사도를 나타내었다(Fig. 2). *Pseudovibrio* sp.는 해양 환경에서 seawater, coral, sponge에 많이 분포하는 것으로 보고 되어져 있으며 (Hentschel et al., 2006; Hosoya and Yokota 2007; Kennedy et al., 2009; Rypien et al., 2010; Shieh et al., 2004; Webster and Hill 2001), 이 중 sponge 유래한 *Pseudovibrio* sp.에서 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

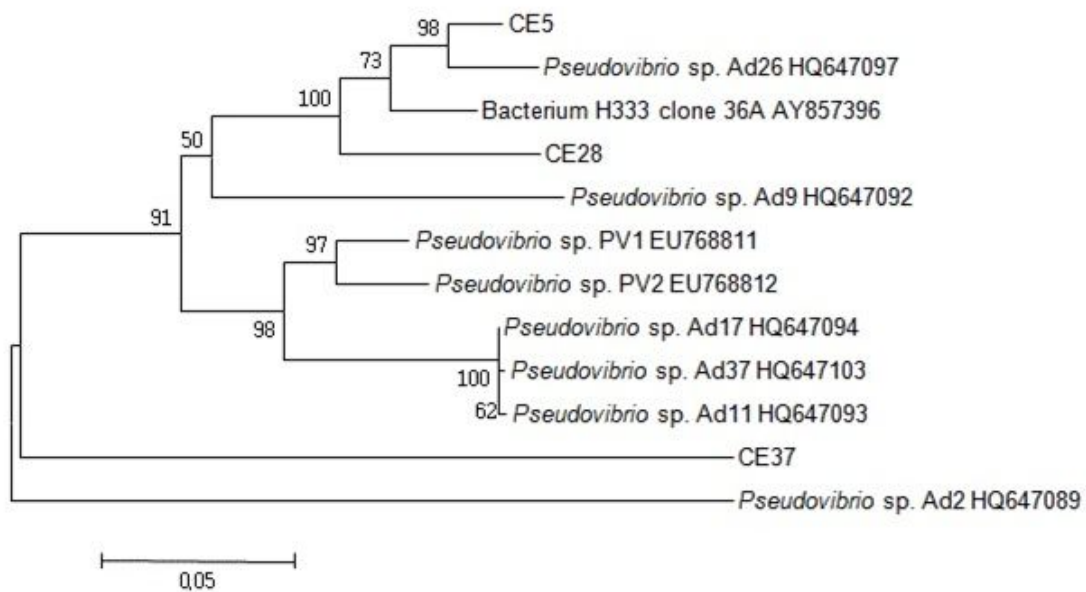


Fig 8. Phylogenetic analysis of *PKS* sequences. Only the bootstrap values (expressed as percentages of 1,000 replications) greater than 50% are indicated at the nodes. Cloned PCR fragments $\leq 67\%$ identical to the reported amino acid sequences in the database are shaded and those 96% - 100% identical to known *PKS* genes are boxed. Scale bar, 0.05 substitutions per nucleotide position.

3.4.2. 분리균주의 항균활성 측정

항균활성을 알아보기 위해 *PKS* 유전자를 가지고 있는 균주를 포함한 112 분리균주에 대해서 항균활성을 측정하였으며, 어류질병 3종, 인체 유해균 3종에 대해서 활성을 검토하였다. 그 결과, 112균주 중 37균주가 활성을 보였으며, 어병세균 *Edwardsiella tarda*에서 28균주(CE2, CE5, CE6, CE8, CE9, CE10, CE14, CE16, CE20, CE22, CE24, CE24-1, CE26, CE28, CE29, CE30, CE33, CE35, CE36, CE39, CE42, CE43, CE45, CE50, CE57, CE58, CE59, CE64, CE68, CE70, CE71, CE79, CR5, CR15, CR18)가 나타났으며, *Staphylococcus aureus*에서는 6균주(CE33, CE35, CE36, CE43, CR15, CR18), *Escherichia coli*에서 1균주(CE2), *Streptococcus iniae*에서 1균주(CR5), *Vibrio parahaemolyticus*에서 1균주(CE57)가 항균활성이 나타났다. CE2는 *E.tarda*와 *E.coli*에 대해서 각각 직경 13mm와 8mm의 억제환이 나타났다. CR15와 CR18은 *S. aureus*에 대해서 각각 직경 17mm와 12mm 으로 억제환이 나타났다. *PKS* 유전자를 가지고 있는 균주 CE5와 CE28은 *E. tarda*에서만 활성이 각 12mm의 억제환이 보여졌으며, 다른 시험균주에는 억제환이 나타나지 않았다.

전체 균주 중 33%가 항균활성을 가지고 있었음을 알 수 있었고, 그 중 72%가 *Vibrio* 속(genus)이었으며, 나머지 8%는 *Bacillus* 속 (genus)으로 많이 속해 있음을 알 수 있었다. 주로 *Vibrio*에서 항균활성이 나타났으며, *Vibrio* 종은 해양환경에서 많이 분포되어 있고, 그 중 해면동물에서 유래한 *Pseudovibrio* sp.에서 항균활성이 나타나 있다고 알려져 있다 (Hentschel et al., 2006; Hosoya and Yokota 2007; Kennedy et al., 2009; Rypien et al., 2010; Shieh et al., 2004; Webster and Hill 2001).

그리고 CE57은 *V. alginolyticus*에 대해서 가장 높은 활성을 보여주었으며, CR5, 15, 18은 역시 *S. iniae*에 대해 높은 활성을 보여주며, 추가적인 실험을 수행하여 할 것이다.

Table 11. Antibacterial activity by isolated strain

Marine isolate	<i>E. tarda</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. iniae</i>	<i>V. alginolyticus</i>
CE2	+	-	+	-	-
CE5	+	-	-	-	-
CE6	+	-	-	-	-
CE8	+	-	-	-	-
CE9	+	-	-	-	-
CE10	+	-	-	-	-
CE14	+	-	-	-	-
CE16	+	-	-	-	-
CE20	+	-	-	-	-
CE22	+	-	-	-	-
CE23	+	-	-	-	-
CE24	+	-	-	-	-
CE24-1	+	-	-	-	-
CE26	+	-	-	-	-
CE28	+	-	-	-	-
CE29	+	-	-	-	-
CE30	+	-	-	-	-
CE33	-	+	-	-	-
CE35	-	+	-	-	-
CE36	-	+	-	-	-
CE39	+	-	-	-	-
CE42	+	-	-	-	-
CE43	-	+	-	-	-
CE45	+	-	-	-	-
CE50	+	-	-	-	-
CE57	-	-	-	-	+++
CE58	+	-	-	-	-
CE59	+	-	-	-	-
CE64	+	-	-	-	-
CE68	+	-	-	-	-
CE70	+	-	-	-	-
CE71	+	-	-	-	-
CE79	+	-	-	-	-
CR5	-	-	-	++	-
CR15	-	++	-	+	-
CR18	-	+	-	+	-

IV. 요약

이 논문은 *C. elegans*에서 배양가능한 미생물을 분리한 후 16S rDNA 유전자 염기서열 분석을 통해 세균군집을 분석하고 분리된 균주에 대해 항균활성을 탐색하였다. Marine agar 배지를 사용하여 해면동물 *C. elegans*로부터 미생물을 분리하였다. 배양가능한 112균주를 분리·배양하였으며 현미경 및 분자생물학적 분석법으로 균주의 형질을 관찰하였다. 또한 분리균주는 분류방법을 적용하여 분류·동정을 수행하였다.

총 112균주의 배양가능한 미생물을 분리하였으며, 그람염색법, 형태학적 분석을 통해 표현형질에 따른 특성을 측정하였다. 분리균주들의 집락 색소는 노란색, 갈색, 아이보리색, 흰색으로 나타났다. 그람염색결과, 37균주는 그람양성균이었으며, 75균주는 그람음성균이었다. 균주의 형태는 분리균주 중 79균주는 구균 형태로 관찰되었고, 16균주는 간균 이었다.

16S rDNA 유전자 염기서열 분석을 통해 분리균주들의 계통학적 특성을 파악하였다. 균주의 genomic DNA를 분리하여 27F와 1522R primer를 사용하여 16S rDNA 유전자를 증폭하였다. 그리고 NCBI Genbank database와 BLAST 분석 프로그램을 통해 염기서열을 분석하여 비교하였다. 그 결과, 분리된 112균주는 5개의 주요 계통군이 확인되었다. *α-proteobacteria*는 39% , *γ-proteobacteria*는 22%, *Actinobacteria*는 14%, *Fimicutes*는 9%, *Bacteroidetes*는 6%에 속하는 것으로 나타났다.

모든 분리균주들은 Agar spot assay과 PKS 유전자를 증폭하여 항균활성을 탐색하였다. PKS 유전자를 탐색하기 위해 genomic DNA와 특정 primer를 사용하여 PCR하여 PKS의 KS domain을 증폭시켰다. 분리균주 중 16균주에서 PKS 유전자 700bp size가 나타내었고, 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 3균주에서 PKS의 KS domain을 확인하였으며, database에서 알려진 *Pseudovibrio* sp.의 KS domain 유전자와 90% 유사도를 보였다. 항균활성의 탐색 결과, 112균주 중 37균주(33%)가 항균활성이 나타났다. 항균활성은 주로 *Vibrio* 속(72%), *Bacillus*속(8%)에 나타났음을 알 수 있었다. 그 중 28 균주는 *E. tarda*에서만 활성이 보여

졌으며, 다른 시험균주에는 억제환이 나타나지 않았다.

그리고 16S rDNA 유전자 염기서열을 통해 계통분석 결과 15균주가 새로운 속 또는 종으로 분류될 가능성을 나타냈으며, 앞으로 추가적인 실험이 필요한 실정이다.

V. 참고 문헌

- Alam, N., W. Wang, J.G. Hong, C.O. Lee, K.S. Im, and J.H. Jung. 2002. Cytotoxic sphingosine 4-Sulfates from the sponge *Spirastrella abata*. J. Nat. Prod. 65, 944-945.
- Beom seok Kim, T. Ashton Cropp, Galina Florova, Yuko Lindsay, David H. Sherman and Kevin A. Reynolds (2002) An Unexpected Interaction between the Modular Polyketide Synthases, Erythromycin DEBS1 and Pikromycin PikAIV, Leads to Efficient Triketide Lactone Synthesis , Biochem. 41,10827-10833
- Cho, H.H. and J.S. Park. 2009. Comparative analysis of the community of culturable bacteria associated with sponges, *Spirastrella abata* and *Spirastrella panis* by 16S rDNA-RFLP. Kor. J. Microbiol. 45, 155-162.
- Cho, H.H., E.J. Shim, and J.S. Park. 2010. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponges, *Spirastrella abata* and *Cinachyrella* sp. Kor. J. Microbiol. 46, 177-182.
- Chun, J.S., J.H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B.K. Kim, and Y.W. Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int.J.Syst .Evol. Microbiol. 57,2259-2261.

- Dai J., Y. Liu, Y.D. Zhou, and D.G. Nagle. 2007. Hypoxia-selective antitumor agents: norsesiterterpene peroxides from the marine sponge *Diacarnus levii* preferentially suppress the growth of tumor cells under hypoxic conditions. *J. Nat. Prod.* 70, 130-133.
- Dalisay, D.S. and T. Molinski. 2009. Structure elucidation at the nanomole scale. 2. Hemi-phorboxazole A from *Phorbas* sp. *Org. Lett.* 11, 1967-1970.
- Enticknap, J.J., M. Kelly, O. Peraud, and R.T. Hill. 2006. Characterization of a culturable alphaproteo bacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge Larvae *Microb. Ecol.* 55, 94-106.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J.Mol.Evol.* 17, 368-376.
- Friedrich, A.B., J. Hacker, I. Fischer, P. Proksch, and U. Hentschel. 2001. Temporal variations of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38, 105-113
- Guangyi, W. 2006. "Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia." *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 545-551."
- Hardoim, C.C.P., R. Costa, F.V. Araujo, E. Hajdu, R. Peixoto, U.Lins, A.S. Rosado, and J.D. van Elsas 2009. Diversity of bacteria in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3331-3343.

- Hentschel, U., J. Hopke, M. Horn, A.B. Friedrich, M. Wagner, J. Hacker, and B.S. Moore. 2002. "Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans." *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3724–3732.
- Hentschel, U., K.M. Usher, and M.W. Taylor. 2006. Marine sponges as microbial fermenters *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 167–177
- Hosoya, S. and Yokota, A. (2007) *Pseudovibrio japonicus* sp. nov., isolated from coastal seawater in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1952 - 955.
- Kennedy, J., P. Baker, C. Piper, P.D. Cotter, M. Walsh, M.J. Mooij, M.B. Bourke, M.C. Rea, P.M. O'Connor, R.P. Ross, C. Hill, F.O'Gara, J.R. Marchesi, and A.D.W. Dobson. 2009. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish Waters. *Mar. Biotechnol.* 11, 384–396.
- Lafi, F.F., M.J. Garson, and J.A. Fuerst. 2005. Culturable bacterial symbionts isolated from two distinct sponge species (*Pseudoceratina clavata* and *Rhabdastrella globostellata*) from the great barrier reef display similar phylogenetic diversity. *Microb. Ecol.* 50, 213–220.
- Lee, O.O., Y.H. Wong, and P.Y. Qian. 2009. Interand intraspecific variations of bacterial communities associated with marine sponges from San Juan Island, Washington. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3513–3521.
- Levina, E.V., A.I. Kalinovskiy, P.V. Andriyashenko, P.S. Dmitrenok, D.L. Aminin, and V.A. Stonik. 2005. Phrygiasterol, a cytotoxic cyclopropane-containing polyhydroxysteroid, and related compounds from the pacific starfish *Hippasteria phrygiana*. *J. Nat. Prod.* 68, 1541–1544.

- Li, Z., L. He, and X. Miao. 2007. Cultivable bacterial community from South China Sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. *Curr. Microbiol.* 55, 465-472.
- Li, Z.-Y., L.M. He, J. Wu, and Q. Jiang. 2006. Bacterial community diversity associated with four marine sponges from the South China Sea based on 16S rDNA-DGGE fingerprinting. *J. Exp. Mar.Biol. Ecol.* 329, 75-85.
- Mohamed, N.M., V. Rao, M.T. Hamann, M. Kelly, and R.T. Hill. 2008. Monitoring bacterial diversity of the marine sponge *Ircinia strobilina* upon transfer into aquaculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4133-4143.
- Munro, H.N. 1969. Evolution of protein molecules. Mammalian Protein Metabolism, pp. 21-132. In H.N. Munro (ed.). Academic Press, New York, N.Y., USA.
- Muscholl-Silberhorn, A., V. Thiel, and J.F. Imhoff. 2008. Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38, 105-113.
- Park, J.S., J.J. Sim, and K.D. An. 2009. Park, J.S., J.J. Sim, and K.D. An. 2009. Community structure of bacteria associated with two marine sponges from Juju Island based on 16S rDNA-DGGE profile. *Kor. J. Microbiol.* 45, 170-176.
- Radwan, M., A. Hanora, J. Zan, N.M. Mohamed, D.M. Abo Elmatty, S.H. Abou-El-Ela, and R.T. Hill. 2010. Bacterial community analyses of two red sea sponges. *Mar. Biotechnol.* 12, 350-360.

- Ramm, W., W. Schatton, I. Wagner-Dobler, V. Wray, M. Nimtz, H. Tokuda, F. Enjyo, H. Nishino, W. Beil, R. Heckmann, V. Lurtz, and S. Lang. 2004. Diglucosyl-glycerolipids from the marine sponge-associated *Bacillus pumilus* strain AAS3: Their production, enzymatic modification and properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 497-504.
- Rypien, K.L., Ward, J.R. and Azam, F. (2010) Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. *Environ Microbiol* 12, 28 - 9.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.*4,406-425.
- Selvin, J. 2009. "Exploring the antagonistic producer *Streptomyces* MSI051: implications of polyketide synthase gene type II and a ubiquitous defense enzyme phospholipase A2 in the host sponge *Dendrilla nigra*." *Curr. Microbiol.* 58, 459-463.
- Selvin, J. 2009. Exploring the antagonistic producer *Streptomyces* MSI051: Implications of polyketide synthase gene type II and a ubiquitous defense enzyme phospholipase A2 in the host sponge *Dendrilla nigra*. *Curr. Microbiol.* 58, 459-463.
- Sung, Hye Ri and Sa-Youl Ghim, Bacterial Diversity and Distribution of Cultivable Bacteria Isolated from Dokdo Island. 2010, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 38, No. 3, 263 - -272 (2010)

- Tamaki, H., Y. Sekiguchi, S. Hanada, K. Nakamura, N. Nomura, M. Matsumura, and Y. Kamagata. 2005. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2162-2169.
- Taylor, M.W., P.J. Schupp, I. Dahllf, S. Kjelleberg, and P.D. Steinberg. 2004. Host specificity in marine sponge-associated bacteria and potential implications for marine microbial diversity." *Environ. Microbiol.* 6, 121-130."
- Taylor, M.W., P.J. Schupp, I. Dahllf, S. Kjilleberg, and P.D. Steinberg. 2004. Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environ. Microbiol.* 6, 121-130.
- Thakur, N.L. and A.C. Anil. 2000. Antibacterial activity of the sponge *Ircinia ramosa*: Importance of its surface-associated bacteria. *J. Chem. Ecol.* 26, 57-71.
- Thiel, V., S.C. Neulinger, T. Staufenger, R. Schmaljohann, and J.F. Imhoff. 2007. "Spatial distribution of sponge-associated bacteria in the Mediterranean sponge *Tethya aurantium*." *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4431-4440.
- Thomas, T.R.A., D.P. Kavlekar, and P.A. LokaBharathi. .2010. Marine drugs from sponge-microbe association-a review. *Mar. Drugs.* 8, 1417-1468.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

Thoms, C., M. Horn, W. Wagner, U. Hentschel, and P. Proksch. 2003. Monitoring microbial diversity and natural products profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Mar. Biol.* 142, 685-692.

Zhang, H., Y.K. Lee, W. Zhang, and H.K. Lee. 2006. "Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perlevei*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis." *Antonie van Leeuwenhoek* 90, 159-169.

전태웅, 2011, 16S rDNA 염기서열 분석을 이용한 세균 동정법에 관한 문헌 고찰, 석사학위논문, 3-4

이동완, 2009, 제주 Scoria 미생물의 종다양성과 생리활성 물질에 관한 연구, 석사학위논문, 1-90

VI. 감사의 글

제가 대학원에 들어와 공부한지 2년이라는 세월이 지나고 어느덧 석사학위를 졸업하게 되었습니다. 타과에서 온 저를 석사과정 생으로 받아 무사히 마칠 수 있도록 해주신 허 문수 교수님께 진심으로 감사의 말씀 드립니다. 대학원 생활 동안 교수님의 많은 조언과 가르침 덕분에 제가 이만큼 성장할 수 있었던 같습니다. 또한 바쁘신 가운데도 논문심사를 위해 애써주시고 격려해주신 김 기영 교수님과 정 준범 교수님께 감사드립니다. 그리고 많은 가르침을 주신 송 춘복 교수님, 최 광식 교수님, 전 유진 교수님, 여 인규 교수님, 이 경준 교수님, 이 제희 교수님, 이 승헌 교수님, 정 석근 교수님께도 진심으로 감사의 말씀을 드립니다.

제가 대학원 생활동안 적응할 수 있도록 신경써주고 졸업하기까지 많은 도움을 준 익수오빠 너무나 감사드립니다. 실험실 식구인 창영오빠, 승현, 동휘, 민선, 경미, 지운, 지현, 다예에게 이 글을 빌어 감사의 말을 전합니다.

또 제가 연구소에서 일하면서 대학원 진로를 선택하고 졸업하기까지 많은 지원과 도움을 주신 김영주 박사님! 진심으로 감사합니다. 저에게 많은 실험을 가르쳐주시고 졸업하기까지 많이 애써주신 지영언니, 저에게 많은 조언과 격려 해주신 정민오빠, 효선언니에게도 감사드립니다. 연구소 생활을 시작하면서 부터 지금까지 많은 추억을 함께한 명석오빠, 지현언니, 유미언니, 아림이, 수경이, 그 밖의 연구소 식구들에게 고마운 마음을 전합니다.

지금은 서로 다른 길을 가고 있지만 존재만으로도 서로에게 힘이 되는 성미, 나리, 민주, 지남오빠, 주혜, 선아, 그리고 5년 동안 내 옆에 변함없이 있어준 재영씨에게도 감사드립니다.

마지막으로 하늘에서 지켜봐주시고 보살펴 주시는 아버지, 제 결정을 항상 존중해주시고 응원해주고 뒷바라지 해주신 우리 엄마께 그리고 새로운 가정을 꾸리고 아빠가 되는 재현이, 언니 뒤편까지 엄마에게 효도하는 이쁜 소희, 미우나 고우나 사랑스런 막둥이 현희에게 감사의 맘을 전하며, 사랑하는 우리 가족에게 이 논문을 바칩니다.