



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](#)

博士學位論文

해면에서 분리된 *Bacillus megaterium*의  
Probiotics 특성과 넘치의  
면역반응 증강 효과

濟州大學校大學院

海洋生命科學科

朴 昭 炫

2020年 2月



# 해면에서 분리된 *Bacillus megaterium*의 Probiotics 특성과 넘치의 면역반응 증강 효과

指導教授 許 文 洙

朴 昭 炫

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2020年 2月

朴昭炫의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長	최 학 선	
委 員	김 기 영	
委 員	정 준 범	
委 員	진 창 남	
委 員	허 문 수	

濟州大學校 大學院

2020年 2月

Probiotics Properties of *Bacillus megaterium*  
Isolated from Marine Sponges and Effect of  
Enhance Immune Response in Olive flounder  
*Paralichthys olivaceus*

SoHyun Park  
(Supervised by professor MoonSoo Heo)

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

Department of Marine Life Science  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## 목 차

목 차 .....	I
Abstract .....	V
List of Tables .....	IX
List of Figures .....	XI

### 제 1장. 제주 해면에서 분리된 세균의 세균군집 구조 분석 및 신종후보균주의 분류학적 연구 및 동정

1.1. 서론 .....	1
1.2. 재료 및 방법	
1.2.1. 시료채집 .....	3
1.2.2. 해양세균 분리 및 배양 .....	3
1.2.3. 16S rRNA 염기서열 분석 및 계통학적 분석 .....	5
1.2.4. 해면에서 분리된 신종후보균주의 다상학적 분석	
1.2.4.1. 16S rRNA 염기서열 분석 및 계통학적 분석 .....	8
1.2.4.2. 형태학적 분석 .....	9
1.2.4.3. 생리학적 및 생화학적 분석 .....	11
1.2.4.4. 화학분류학적 분석 .....	13
1.2.4.5. Genomic 분석 .....	16
1.3. 결과 및 고찰	
1.3.1. 해면 내 분리세균의 16S RNA 염기서열 및 계통학적 분석	
1.3.1.1. 보라예쁜이해면 .....	17
1.3.1.2. 굽은나선별해면 .....	24
1.3.1.3. 호박해면 .....	30

1.3.1.4. 주황해변해면 .....	36
1.3.2. 주요 세균군집구조 분석 .....	42
1.3.3. 해면에서 분리된 신종후보균주의 다상학적 분석	
1.3.3.1. 계통학적 분석 .....	44
1.3.3.2. 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성 .....	46
1.3.3.3. <i>pufLM</i> gene .....	48
1.3.3.4. 화학분류학적 특성 .....	49
1.3.3.5. 균주기탁 .....	53
1.3.3.6. GenBank Accession Number .....	53
1.3.4. Description of <i>Labrenzia callyspongiae</i> sp. nov., .....	54

## 제 2장. 해면에서 분리된 세균의 항균활성 탐색 및 Probiotics 특성 연구

2.1. 서론 .....	57
2.2. 재료 및 방법	
2.2.1. 분리된 세균의 어류질병에 대한 항균활성 탐색 .....	58
2.2.2. 용혈성 및 유해효소 생성 .....	60
2.2.3. pH, NaCl, 온도 .....	61
2.2.4. 고분자 유기물질 분해능 .....	62
2.2.5. 인공위액과 인공담즙에서의 생존력 .....	63
2.2.6. API 50CHB 시험 .....	64
2.2.7. 항생제 감수성 시험 .....	65
2.2.8. 배양액 물질분석 .....	66
2.3. 결과 및 고찰	
2.3.1. 어류질병세균에 대한 항균활성 탐색 .....	67
2.3.2. 용혈성과 유해효소 생성여부 확인 .....	69
2.3.3. 고분자 유기물질 분해능 .....	70
2.3.4. pH, NaCl, 온도 .....	72

2.3.5. 인공위액과 담즙내성 .....	74
2.3.6. Probiotics 균주 선정 .....	74
2.3.7. API 50CHB 시험 .....	75
2.3.8. 항생제 감수성 시험 .....	76
2.3.9. 배양액 물질분석 .....	77
2.3.10. 최종 선별균주 동정 및 계통수 작성 .....	78

**제 3장. *Bacillus megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가사료를 급이시 넓치의 비특이적  
면역반응과 질병저항성에 미치는 영향**

3.1. 서론 .....	80
3.2. 재료 및 실험방법	
3.2.1. 실험사료 제작 .....	82
3.2.2. 어류 준비 및 사육조건 .....	82
3.2.3. 성장도 조사 및 혈액학적 분석 .....	83
3.2.4. 식세포 활성 .....	84
3.2.5. Lysozyme 활성 .....	85
3.2.6. Myeloperoxidase 활성 .....	86
3.2.7. Superoxide dismutase (SOD) activity .....	87
3.2.8. RNA 추출 .....	88
3.2.9. cDNA 합성 .....	90
3.2.10. qRT-PCR .....	91
3.2.11. 인위감염에 대한 질병 저항성 .....	92
3.2.12. 유의학적 통계분석 .....	92
3.3. 결과 및 고찰	
3.3.1. 성장도 조사 .....	93
3.3.2. 혈액학적 분석 .....	94
3.3.3. 식세포 활성 .....	97

3.3.4. Lysozyme 및 Myeloperoxidase 활성 .....	98
3.3.5. Superoxide dismutase (SOD) 활성 .....	100
3.3.6. qRT-PCR을 통한 면역관련 유전자 발현 .....	101
3.3.7. 인위감염에 대한 질병 저항성 .....	104
국문요약 .....	105
참고문헌 .....	108
감사의 글 .....	125

## Abstract

The ocean is a vast ecosystem that is home to more than 80% of living organisms, and is one of the most valuable biological resources. Marine organisms found in the ocean are indigenous to special environments compared to those living on land, in terms of salinity, temperature, and chlorophyll, and thus have the ability to produce unique substances and can produce various biologically active substances. Of all the marine life forms, sea sponges are important resources for studying new materials. The emergence of antibiotic resistant bacteria strains has led to an increase in the research for new substances, and the number of bioactive substances that are isolated from marine sponges is also on the rise. These bioactive substances have been reported to be produced by commensal bacteria existing in the sponges. Bacteria in sponges account for more than 40% of their biomass, and amongst the various microorganisms, some of them have been identified as *Bacillus* species.

*Bacillus* is Gram-positive bacteria that have a bacilli form. *Bacillus* is also known to produce a variety of substances. *Bacillus* produces lipopeptides, and the most well-known are surfactin, iturin, and fengycin. These Bacilli are widely used in the aquaculture industry as probiotics. Probiotics produce digestive enzymes that increase digestibility and aid in growth. They also improve immunity and have inhibitory effects on microbes that cause diseases. In order to develop such probiotics, they should not have hemolytic activities, should produce antimicrobial substances, and must survive in strongly acidic digestive juices such as gastric acid and bile acid.

In this study, marine-derived bacteria isolated from marine sponges

were used to investigate antimicrobial activities, the suitability and stability as a probiotic strain were confirmed, and the probiotic *Bacillus megaterium* PPR15<sup>T</sup>, which was chosen for the final selection, was added to halibut feed to examine the potential as a feed additive by observing the growth, non-specific immune response, and disease resistance of the halibuts. In addition, novel candidate strains isolated from marine sponges were classified and identified to confirm that they are indeed new types of strains.

As a result of testing for antimicrobial activity of flora isolated from four species of sea sponges against bacteria that cause diseases in fish mainly in inland aquatic farms of Jeju Island, a total of 20 bacterial strains showed a high level of antimicrobial activity. Zones of inhibition were observed as follows: 17 mm for strain PPR15<sup>T</sup> *Edwardsiella tarda*, 25 mm for *Streptococcus iniae*, 21 mm for *Streptococcus parauberis*, and 20 mm for *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. In addition, investigation of strain PPR15<sup>T</sup> on human health hazard showed that strain PPR15<sup>T</sup> did not produce urease, which is a known harmful metabolic enzyme, nor did there appear to be pathogenic  $\beta$ -hemolysis. PPR15<sup>T</sup> could also be cultivated in NaCl of 1-10% concentration, was resistant to acid and base, with the cultivation pH range between 4.0 and 11.0, and was able to grow in a wide temperature range of 10-50 °C. In addition, resistance was confirmed in a culture medium of pH 2.0 and 3.0 with pepsin and a culture medium with 0.3% and 1% bile salts. As a result of testing for degradation ability of macromolecular organic matter, DNase, cellulase, amylase, digestive enzyme of casein, and lipase activity were confirmed.

In addition, the results of phylogenetic analysis confirmed 100% nucleotide sequence similarity with *B. megaterium*. As a new probiotic, the suitability and safety of strain PPR15<sup>T</sup> isolated from marine sponges,

therefore, were corroborated by excellent antibacterial activity against fish diseases, absence of harmful enzymes or hemolytic activity, high viability against low pH and bile acids, and high ability to degrade polymeric organic substances.

Accordingly, the strain was named *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>. It is, therefore, considered to be of value as a halibut feed additive in the future, and further experiments on the effects of fish growth, congenital immunity, disease resistance, and so on, were carried out by conducting fish feeding experiments for development as a probiotic. After eight weeks of testing *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> additive feeding on halibuts, the growth rate, hematological analysis, non-specific immune response, and disease resistance were investigated. As a result, the increase rate, daily growth rate, and feed conversion efficiency of *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>-added group turned out to be higher than the control group. In addition, hematological analysis results showed that ALT, AST, glucose, and triglyceride levels decreased compared to the control group, while those of total protein increased. Also, the phagocytotic activity in serum was maintained at high levels from the second week of the experiment until the final eighth week. Lysozyme activity showed a sharp increase in eight weeks of the *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> supplement group compared to the control, and MPO and SOD activities showed the highest activity in six weeks. RNA was extracted from the kidney, intestine, liver, and spleen of the halibut, and the expression levels of immunity genes were examined through qRT-PCR. In the kidney and intestine, the genes of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and CD4-1 were expressed higher in the *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> group compared to the control group. In addition, only the TNF- $\alpha$  gene in the liver and CD4-1 gene in the spleen showed high expression.

From the comprehensive results, therefore, this study confirmed that

*B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> isolated from sea sponges is suitable as a probiotic, and it is believed that *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> in feed has potential as probiotics to increase disease resistance in fish by improving the growth of fish and their non-specific immune responses. Also, further experiments are called for to determine the physiological activity produced by *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>.

A Gram-staining-negative, aerobic, light brown pigment bacterium, designated strain CE80<sup>T</sup> was isolated from marine sponge *Callyspongia elegans* in Jeju Island, Republic of Korea. Strain CE80<sup>T</sup> grew optimally 25°C, in the range of pH 5.0-11.0 (optimum 7.0-8.0), and with 1-5% NaCl (optimum 1-3% (w/v)). Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequence showed that strain CE80<sup>T</sup> belonged to the genus *Labrenzia* and was closely related to *L. suaedae* YC6927<sup>T</sup> (98.3%), *L. alexandrii* DFL-11<sup>T</sup> (96.6%), *L. aggregata* IAM 12614<sup>T</sup> (96.6%) *L. marina* mano18<sup>T</sup> (96.5%) and *L. alba* CECT 5094<sup>T</sup> (96.2%). The major fatty acids of strain CE80<sup>T</sup> were C<sub>18:1</sub> ω7c, and summed feature. The Polar lipid were diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylmonomethylethanolamin (PMME), one unidentified aminolipid (AL), one phospholipid (PL) and four unidentified lipids (L). The DNA G+C content of strain CE80<sup>T</sup> was 55.9 mol%. The major respiratory quinone was Q-10. DNA-DNA relatedness values between strain CE80<sup>T</sup> and *L. suaedae* YC6927<sup>T</sup> was 56.1±2.8%. On the basis of, physiological and biochemical characterization, phylogenetic and chemotaxonomic analysis, strain CE80<sup>T</sup> represents a novel species of the *Labrenzia*, for which the name *Labrenzia callyspongiae* sp. nov., is proposed. The type strain is CE80<sup>T</sup> (=KCTC 42849<sup>T</sup> =JCM 31309<sup>T</sup>).

## LIST OF TABLES

### 제 1장. 제주 해면에서 분리된 세균의 세균군집 구조 분석 및 신종후보균주의 분류학적 연구 및 동정

Table 1.1. Composition of R2A .....	4
Table 1.2. Composition of Marine agar (MA) .....	4
Table 1.3. composition of ligation reaction .....	7
Table 1.4. Composition of buffers used fatty acid extraction .....	14
Table 1.5. Bacterial diversity associated with <i>C. confoerderata</i> .....	20
Table 1.6. Closest relative species to bacterial strains isolated from <i>C. confoerderata</i> . .....	21
Table 1.7. Bacterial diversity associated with <i>S. insignis</i> .....	26
Table 1.8. Closest relative species to bacterial strains isolated from <i>S. insignis</i> .....	27
Table 1.9. Bacterial diversity associated with <i>Cliona celata</i> .....	32
Table 1.10. Closest relative species to bacterial strains isolated from <i>Cliona celata</i> .....	33
Table 1.11. Bacterial diversity associated with <i>H. sinapium</i> .....	38
Table 1.12. Closest relative species to bacterial strains isolated from <i>H. sinapium</i> .....	39
Table 1.13. Comparisons of phenotype characteristics of strain CE80 <sup>T</sup> and closely related type strains of the genus <i>Labrenzia</i> .....	47
Table 1.14. Cellular fatty acid compositions(%) of strain CE80 <sup>T</sup> and closely related type strains of the genus <i>Labrenzia</i> .....	50

## 제 2장. 해면에서 분리된 세균의 항균활성 탐색 및 Probiotics 특성 연구

Table 2.1. Fish pathogene and experimental conditions used in antibacterial activity test .....	58
Table 2.2. Composition of <i>E. tarda</i> media (NA) .....	59
Table 2.3. Composition of <i>S. iniae</i> media (BHIA) .....	59
Table 2.4. Antibiotic resistant and sensitivity of selected strains .....	65
Table 2.5. Antimicrobial Activity of Sponges Isolated against fish disease pathogens .....	68
Table 2.6. Evaluation of enzymes activity for organic matters and haemolytic activity in selected bacteria isolated from each marine sponge .....	71
Table 2.7. NaCl range for growth of selected strains .....	73
Table 2.8. pH range for growth of selected strains .....	73
Table 2.9. Temperature range for growth of selected strains .....	73
Table 2.10. Resistance of selected strains to artificial bile acid and gastric juice .....	74
Table 2.11. Carbohydrates utilization of <i>B. megaterium</i> PPR15 <sup>T</sup> .....	75
Table 2.12. Antibiotics susceptibility of <i>B. megaterium</i> PPR15 <sup>T</sup> .....	76

## 제 3장. *Bacillus megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가사료를 급이시 넙치의 비특이적 면역 반응과 질병저항성에 미치는 영향

Table 3.1. Solution and buffer volumes in each well .....	87
Table 3.2. Volume of buffer for cDNA synthesis .....	90
Table 3.3. Gene specific primers of olive flounder $\beta$ -actin and immune related genes used in this study .....	91
Table 3.4. Growth of olive flounder fed the diet containing <i>B. megaterium</i> PPR15 <sup>T</sup> for 8 weeks .....	93

# LIST OF FIGURES

## 제 1장. 제주 해면에서 분리된 세균의 세균군집 구조 분석 및 신종후보균주의 분류학적 연구 및 동정

Figure 1.1. Serial dilution method .....	3
Figure 1.2. Gram's staining protocol .....	10
Figure 1.3. Fatty acid extraction methods .....	15
Figure 1.4. Fatty acid analysis .....	15
Figure 1.5. Diversity and structure of bacterial community of <i>C. confoerdata</i> .....	19
Figure 1.6. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rDNA gene sequences of bacteria isolated from <i>C. confoerdata</i> and some other related taxa .....	23
Figure 1.7. Diversity and structure of bacterial community of <i>S. insignis</i> .....	25
Figure 1.8. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rDNA gene sequences of bacteria isolated from <i>S. insignis</i> and some other related taxa .....	29
Figure 1.9. Diversity and structure of bacterial community of <i>Cliona celata</i> .....	31
Figure 1.10. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rDNA gene sequences of bacteria isolated from <i>Cliona celata</i> and some other related taxa .....	35
Figure 1.11. Diversity and structure of bacterial community of <i>H. sinapium</i> .....	37
Figure 1.12. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rDNA gene sequences of bacteria isolated from <i>H. sinapium</i> and some other	

related taxa .....	41
Figure 1.13. Structure analysis of bacterial community isolated from each marine sponge .....	43
Figure 1.14. Neighbour-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA gene sequences, for strain CE80 <sup>T</sup> and genus <i>Labrenzia</i> .....	45
Figure 1.15. Transmission electron micrograph of cells of strain CE80 <sup>T</sup> .....	46
Figure 1.16. Polar lipid profiles of strain CE80 <sup>T</sup> were detected with a), ninhydrin reagent; b), zinzadze reagent; c), molybdophosphoric acid reagent; d), $\alpha$ -naphthol reagent .....	51
Figure 1.17. Two-dimensional TLC plate patterns of the total polar lipids of strain CE80 <sup>T</sup> and related species .....	52

## 제 2장. 해면에서 분리된 세균의 항균활성 탐색 및 Probiotics 특성 연구

Figure 2.1. LC/MS analysis of (A) surfactin (B) componets produced by the <i>B. megaterium</i> PPR15 <sup>T</sup> .....	77
Figure 2.2. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S RNA gene sequences of strain PPR15 <sup>T</sup> and other related taxa .....	79

## 제 3장. *Bacillus megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가사료를 급이시 넙치의 비특이적 면역 반응과 질병저항성에 미치는 영향

Figure 3.1. Procedure of RNA extraction .....	89
Figure 3.2. Serum biochemical parameters (ALT, AST) of olive flounder fed with control and <i>B. megaterium</i> PPR15 <sup>T</sup> diets for 8 weeks .....	95

Figure 3.3. Serum biochemical parameters (Glucose, total protein, triglyceride) of olive flounder fed with control and <i>B. megaterium</i> PPR15 <sup>T</sup> diets for 8 weeks .....	96
Figure 3.4. NBT activity of olive flounder fed with control and <i>B. megaterium</i> PPR15 <sup>T</sup> diets for 8 weeks .....	97
Figure 3.5. Lysozyme and Meloperoxidase activity of olive flounder fed with control and <i>B. megaterium</i> PPR15 <sup>T</sup> diets for 8 weeks .....	99
Figure 3.6. Superoxide dismutase (SOD) activity of olive flounder fed with control and <i>B. megaterium</i> PPR15 <sup>T</sup> diets for 8 weeks .....	100
Figure 3.7. Immune related gene expression in each tissue as kidney, intestine after 8 weeks fed with control and <i>B. megaterium</i> PPR15 <sup>T</sup> diets .....	102
Figure 3.8. Immune related gene expression in each tissue as liver, spleen after 8 weeks fed with control and <i>B. megaterium</i> PPR15 <sup>T</sup> diets	103
Figure 3.9. Cumulative mortality rate of olive after challenge with <i>E. tarda</i> ( $1.42 \times 10^6$ CFU/ml) .....	104

## 제 1장. 제주 해면에서 분리된 세균의 세균군집 구조 분석 탐색 및 신종후보균주의 분류학적 연구 및 동정

### 1.1. 서론

해면 스폰지(Porifera)는 7억 8천만 년이라는 오랜 진화적 역사를 갖는 단순한 다세포 여과섭식 무척추 동물이며 [1], 생체량의 40-60%에 달하는 고밀도의 다양한 미생물 (세균, 시아노박테리아 등)을 포함하고 있으며 [2], 이러한 미생물은 많은 생리활성물질을 대량 생산한다고 보고되어졌다 [3]. 해양환경은 약물과 같이 잠재적인 생리활성물질의 근원이 되고 다양하고 풍부한 물질 공급원으로 간주되어 왔다. 해양환경은 육지 환경과는 달리 복잡한 특성을 가지고 있어, 박테리아나 곰팡이와 같은 해양미생물은 염분, 압력, 온도, 빛, 산소, pH 독특한 조건의 환경에서 서식하며, 극한 서식지 및 환경에 적응할 수 있는 생화학 및 생리학적 생체시스템을 가지고 있어 미생물은 독특한 이차대사산물을 생성한다. 또한 이렇게 생산되는 이차대사산물은 많은 사람들이 제약 및 생명공학 분야에서 가치를 보여주었다 [4]. 항암, 항종양과 및 항생제 성질과 같은 상이한 작용을 하는 다양한 생리활성물질은 해양미생물에서 분리되어졌다 [5-7].

해면은 해면동물의 먹이원으로 영양과정에 도움이 되는 세균에게 영양분과 서식처를 제공함으로써 공생 관계를 유지한다 [8-9]. 또한 이러한 공생을 통해 세균은 해면의 미생물 감염에 저항하기 위하여 많은 생리활성물질을 생산한다고 알려져 있으며, 일반적으로 해양 무척추동물과 식물에 부착된 미생물은 많은 생리활성을 가지고 있어 무척추 동물과 미생물의 공생에 관련하여 많은 연구가 되고 있다 [1, 10-11].

*Labrenzia* 속은 Alphaproteobacteria 강(Class), Rhodobacteraceae 과(Family)에 속해 있으며, Biebl *et al.* 에 의해 보고되었다 [12]. 현재시점까지 *L. suaedae* [13]와 *L. salina* [14] 2종을 포함하여 현재까지 보고된 *Labrenzia* 속은 6 균주이며, 주로 염생식물의 근권, 와편모조류, 해양 서식지에서 주로 분리되었다. *Labrenzia*속 그룹들은 그람 음성균으로 호기성이며 대부분의 종은 glycolipid

sulphoquinovosuldiacylglyceride (SQDG) 나타내는 특징이 있다. 또한 일부 종은 bacteriochlorophyll a (*BChl a*)을 합성한다.

이전에 *Agrobacterium* 속은 Stapp & Knosel [15], Ruger & Hofle [16]에 처음 보고되어졌으며, Ahrens [17]에 의해 기술된 *Agrobacterium aggregatum*은 분류학적 위치가 재평가되었으며, *Agrobacterium* 속의 2 종은 새로운 속 *Stappia*으로 분류되었다. *Stappia aggregata* 및 *Stappia stellulata* [18]로 최종적으로 Bieble *et al.*에 의해 *Labrenzia aggregata*로 재분류되었다 [1]. Pujalte 등의 의해 보고된 *Stappia alba* [19] 및 Kim 등에 의해 기술된 *Stappia marina* [20]는 *Labrenzia alba*와 *Labrenzia marina*로 재분류되었다 [12].

본 연구에서는 해양생물인 해면 4 종에서 배양 가능한 세균을 분리하여 16S rRNA 유전자 서열의 계통학적 분석을 통해 세균 군집구조를 파악하고, 신종후보 균주에 대해 형태학적, 생리학적 및 생화학적 분석, 16S rRNA 유전자 서열의 계통학적 분석, 화학분류학적 분석을 통해 정확한 분류학적 위치와 신종임을 확인하고자 한다.

## 1.2. 재료 및 방법

### 1.2.1. 시료채집

본 연구에서는 제주 조천, 우도 등에서 보라예쁜이해면(*Callyspongia con foerderata*), 굵은나선별해면(*Spirastrella insignis*), 호박해면(*Cliona celata*), 주황해면(*Hymeniacidon sinapium*)을 스쿠버다이빙을 하여 수심 10-20m에서 채집하였고, 멸균된 지퍼백에 냉장보관하여 실험실로 옮긴 후, 균주분리에 사용하였다.

### 1.2.2. 해양세균 분리 및 배양

인공해수로 해면을 2회 세척하여, 불순물을 제거하였고, 해면을 1 g정도 잘라 멸균된 0.85% NaCl을 첨가하여 균질화하였다. 균질화된 시료를 연속희석법 (그림 1.1)으로 10배씩 희석하였으며, 희석액을 각 배지에 300  $\mu$ l씩 분주하여 Marine Agar, R2A agar (표 1.1-1.2), 1/10 marine agar plate에 도말한 후 25°C에서 7일간 배양하였다. 배양된 균주는 형태학적 특징으로 순수분리하고, 3회 정도 계대 배양하여 순수 분리하였고, 순수 분리된 균주는 20% glycerol 용액(v/v)에 현탁하여 stock을 제조한 뒤, -80°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

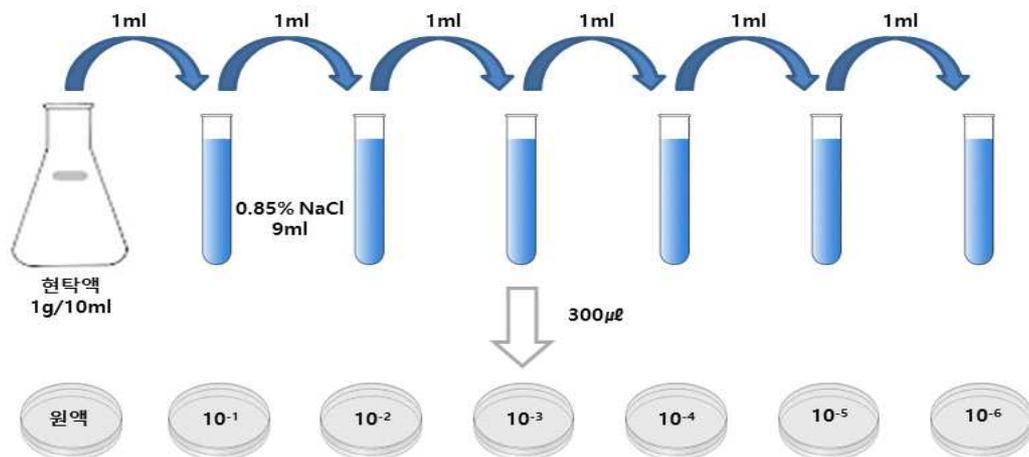


Fig 1.1. Serial dilution method.

Table 1.1. 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 1.2. 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

### 1.2.3. 16S rRNA 염기서열 분석 및 계통학적 분석

분리된 균주는 Genomic DNA를 추출하여 유전자 분석을 위해 사용하였다. Genomic DNA는 Plate에 배양된 균을 회수하여 1 × PBS buffer용액으로 12,000 rpm, 4°C에서 1분간 원심분리하여 2회 세척하였다. PBS 용액을 제거하고, TE buffer를 574 µl 넣고 균체가 잘 풀어지도록 현탁하였다. 현탁 후 lysozyme (100 mg/ml)을 10 µl 첨가하고, inverting 한 뒤, 실온에서 5분간 반응시킨다. 단백질을 제거하기 위해 10% SDS 용액 30 µl와 proteinase K (10 mg/ml) 6 µl 첨가 후 37°C에서 1시간 배양하였다. 배양 후 5M NaCl (w/v) 용액을 80 µl 첨가하고 잘 섞어준 뒤, CTAB/NaCl 용액을 80 µl 첨가 한 뒤 65°C에서 10분간 반응시키고, Phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 용액을 반응액의 동량만큼 첨가하고 잘 섞어준 뒤 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 5분)한다. 깨끗한 상층액을 새 microtube에 옮겨주고, 상층액의 동량만큼 chloroform/ isoamyl alcohol (24:1)을 첨가한 뒤 5분간 원심분리한다. 원심분리 후 상층액을 또다시 새 microtube에 옮겨주고, 상층액의 0.6배의 isopropanol를 첨가 후 inverting하면서 DNA를 확인하였다. 5분간 원심분리한 뒤 튜브 바닥에 모아진 DNA가 떨어지지 않게 조심히 상층액을 제거시킨다. 70% 에탄올을 첨가하여 세척한 뒤 5분간 원심분리 한다. 상층액을 버리고 남아있는 에탄올이 제거되게끔 건조시켜준 뒤 TE buffer와 RNase (10 mg/ml) 용액을 첨가 후 잘 섞어준 뒤 37°C에서 overnight 하여 DNA를 녹여준다. 추출된 genomic DNA 농도를 확인하기 위해 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

추출된 genomic DNA를 사용하여 16S rDNA 유전자를 증폭하기 위해 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') primer와 1522R (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') primer를 사용하였다. PCR 반응의 조성은 다음과 같이 수행하였다 : 추출된 DNA 1 µl, 10 pmol/primer 1µl, 10 mM dNTPs, 10 × PCR buffer, 5 Unit Taq polymerase (TaKaRa, Japan), D.W를 혼합, 최종부피 25 µl로 맞춰주었다. PCR 반응 조건은 초기 변성단계 (Initial denaturation) 95°C에서 5분간, 30cycle 동안 95°C에서 변성단계(denaturation) 1분, 55°C에서 결합단계( annealing) 1분, 72°C에서 신장단계(extension) 3분, 72°C에서 최종 신

장단계(final extension) 10분간 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose에서 전기영동(Mupid®-ex, ADVANCE)하여 확인하였다.

증폭된 PCR 산물을 클로닝 하기 위해 pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA)을 이용하였다. 다음 (그림 1.3)과 같이 ligation reaction을 조성하였고 피펫으로 잘 섞어준 뒤 4°C에서 overnight하여 배양하였다. 형질전환을 하기 위해 4°C에서 배양한 ligation reaction을 얼음에 꽂고 1.5 ml microtubedp 2 µl씩 옮겨준다. JM109 competent cell을 50 µl씩 첨가하여 섞어준 뒤 얼음에서 30분간 반응시키고 42°C water bath에서 45초정도 heat shock 뒤 즉시 얼음에 꽂고 2분간 반응시켰다. 그 다음 SOC medium을 950 µl 첨가하여 37°C에서 150 rpm으로 1시간 30분 배양하였다. 배양액을 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 모아진 pellet에 SOC medium을 첨가하여 현탁한 뒤 LB/ampicillin/X-Gal plate에 100 µl씩 도말 후 37°C에서 24시간 배양하여 white colony를 선별하였다.

선별된 white colony는 LB broth 10 µl에 배양하였고 DNA로 사용하였다. colony PCR을 위해 primer M13F, M13R을 사용하여 PCR하였고, 전기영동을 통해 잘 발현이 되었는지 확인하기 위해 ampicillin이 포함된 LB broth에 접종하여 16시간 배양하였고, DNA-spin Plasmid DNA Extraction Kit (iNtRON, Korea)를 사용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 우선 LB 배지에 배양된 균을 1.5 ml microtube에 분주하여 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 모아진 pellet에 resuspension buffer 250 µl씩 첨가하여 현탁하였다. 그 다음 Lysis buffer 250 µl 첨가하여 잘 섞어준 뒤 neutralization buffer 350 µl 첨가하였다. 5분간 4°C에서 배양하였고, 원심분리 (13,000 rpm, 4°C, 10분)하였다. microtube에 column을 장착하였고, 깨끗한 상층액을 옮긴 후 원심분리 하였다. washing buffer A를 500 µl을 첨가하여 다시 원심분리하였다. 용액을 버리고, washing buffer B를 700 µl 첨가하여 원심분리 하였고 남아있는 에탄올을 건조하기 위해 또다시 원심분리 하였다. column을 새 microtube에 옮기고 elution buffer 30 µl를 column에 분주하여 1분간 반응하였다. 원심분리하여 plasmid DNA를 분리하였고, 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

분리된 plasmid DNA는 (주)제노텍(Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석 하였다.

분석된 염기서열은 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)와 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 이용하여 유사한 염기서열을 비교하여 가장 근연속이나 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 분석된 염기서열과 근연종의 염기서열을 EzBioCloud에서 얻어 Clustal W 프로그램 [21] 을 이용하여 multiple alignment로 정렬하였다. 정렬된 염기서열들의 gap은 BioEdit program [22]를 통해 수정하여 MEGA 7.0 software [23] 이용하여 maximum-likelihood [24], maximum-parsimony [25], neighbor-joining [26]방법을 통해 계통수를 작성하였다. 계통수 topology는 1000회 반복하여 bootstrap 분석시 평가하였다 [27].

**Table 1.3. Composition of ligation reaction.**

<b>Reaction component</b>	
DNA (PCR product)	3ul
2XRapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5ul
pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1ul
T4 DNA Ligase	1ul
<b>Final volume</b>	<b>10ul</b>

#### 1.2.4. 해면에서 분리된 신종후보균주의 다상학적 분석

##### 1.2.4.1. 16S rRNA 염기서열 분석 및 계통학적 분석

16S rRNA 유전자 [28]를 분석하기 위해 Genomic DNA는 Wilson K. 방법 [29]에 따라 추출하였고, 27F, 1522R 프라이머를 사용하여 PCR하였다. 증폭된 유전자 산물은 TOPO cloning kit (Invitrogen)를 사용하여 클로닝하였으며, 제노텍에 분석 의뢰하였다. 16S rRNA 유전자의 Full 염기서열은 SeqMan software (DNASTAR)를 이용하고 GenBank와 EzTaxon-e server을 통해 가장 가까운 근연종의 염기서열을 얻었다 [30]. CE80<sup>T</sup>와 표준균주의 16S rRNA 염기서열은 CLUSTAL\_X program BioEdit program을 사용하여 염기서열을 정렬하고 [21], gap을 수정 후 [22], MEGA 7.0 software package로 계통수를 작성하였다 [23]. 계통수는 maximum-likelihood [24], maximum-parsimony [25] and neighbor-joining [26] 방법으로 bootstrap 분석시 [27] 1000회 반복하여 적용하였다. 진화 거리 (Evolutionary distances)는 calculated using Jukes-Cantor model [31]을 사용하여 평가하였다.

CE80<sup>T</sup>의 whole genome sequence 분석은 마이크로젠에 의뢰하여 분석하였다. sequencing library는 기관 매뉴얼에 따라 TruSeq DNA PCR Free kit를 사용하였으며, genome sequence data는 illumine HiSeq 400 platform을 사용하였고, SPAdes version 3.13.0의 de novo [32]로 정렬하였다. 또한 average nucleotide identity (ANI)는 ANI calculator ([www. Ezbiocloud.net/tool/ani](http://www.Ezbiocloud.net/tool/ani))를 사용하여 평가하였다 [33].

#### 1.2.4.2. 형태학적 분석

Gram's 염색은 manufacturer's instructions에 따라 Gram-staining Kit (BBL, Difco, USA)를 사용하여 실험하였다 (그림 1.2). 운동성(Gliding motility)은 Schaal [34] 방법을 이용하여 실험하였다.

분리된 신종후보균주의 주사전자현미경으로 관찰하기 위해 다음과 같이 전처리를 수행하였다. 배양된 분리균주를 membrane filter에 도말하고 건조시켜준다. 핀셋을 이용하여 2시간동안 2.5% glutaraldehyde 용액에 담가 고정하고, 1 × sodium phosphate buffer에서 5분씩 3회 세척하였다. 세척 후 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 에탄올에 순차적으로 탈수과정을 거치고, isoamyl acetate-ethanol (0.5:1, v/v) 용액에 1시간 처리, isoamyl acetate-ethanol (1:1, v/v) 용액에 1시간 처리, isoamyl acetate-ethanol (1:0.5, v/v) 용액에 1시간 처리하였다. 그 후 isoamyl acetate에 1시간 처리 후 CO<sub>2</sub>로 건조시켜 스퍼터 코터 기계를 이용하여 금박으로 코팅 (20mA, 90초)하였다. 그리고 제주대학교 공동실습실험관의 Field Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM, TESCAN, Czech)을 이용하여 관찰하였다.

편모의 유무를 확인하기 위해 PBS 1 ml에 균체를 풀어주고 살살 피펫팅 해준다. 파라필름 위에 현탁액을 10 µl 떨어뜨리고 copper grid 표면을 시료에 닿게 올려준다. 1분정도 올려놓고 그리드를 핀셋으로 잡아 묻어있는 액체를 닦아주고, uranyl acetate에 1분간 올려주고 D.W에 2번 세척하고 건조시킨 후 120 kV Transmission electron microscope (TEM, Tecnai 12, FEI)으로 관찰하였다.

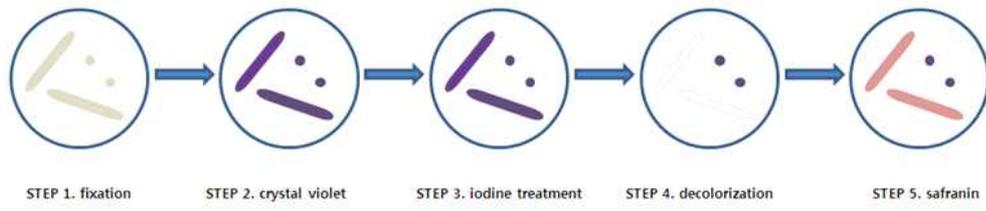


Fig 1.2. Gram's staining protocol.

#### 1.2.4.3. 생리학 및 생화학 분석

신종후보균주는 MA에서 배양하였으며, 생장 가능한 온도를 확인하기 위해 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45°C 범위로 설정하여 확인하였다. 생장 가능한 pH 범위는 5.0-11.0로 marine agar 배지에 제조하여 균을 접종하여 확인하였다. NaCl 농도별 생장범위를 확인하기 위해 Zobell 배지에 1-10% (간격 1%씩, w/v)로 첨가하여 제조 후 배양하였다.

Oxidase activity는 균주가 배양된 plate에 1% (w/v) tetramethyl p-phenylenediamin (Merck, USA)를 떨어뜨려 보라색으로 발색유무를 확인하였으며, Catalase activity는 3% (v/v) hydrogen peroxide를 떨어뜨려 거품 생성을 관찰하였다.

가수분해(hydrolysis) 실험은 MA배지에 Casein, starch, Tween 20, 40, 60, 80, Urease, carboxymethylcellulose를 각각 1%씩 첨가하여 배지를 제조하였다. 각각의 배지에 분리균주를 접종하여 배양한 뒤 25°C에서 48시간 배양한 뒤 분해능을 확인하였다 [35].

Anaerobic test는 marine agar에 균을 접종하고, jar에 AnaeroPack (Oxoid, UK) 담아 혐기상태를 만들어 4주 동안 배양하여 관찰하였다.

API ZYM은 미생물의 19가지 효소활성을 검사하기 위해 수행하였다. suspension medium (2 ml)에 균주를 5~6 McFaland로 탁도를 맞춰주고, 65 µl씩 각각 큐플에 접종시킨다. 25°C에서 48시간 배양 후 ZYM A와 ZYM B 시약을 각각의 큐플에 한 방울씩 떨어뜨린 후, 5분 동안 반응 시키고 결과를 판독하였다. API 20NE는 0.85% NaCl medium (5 ml)에 sea salt의 농도가 2-3%가 되게끔 첨가하여 균주를 0.5 McFaland로 탁도를 맞춰주었다. API AUX Medium에 접종액 200 µl를 첨가하여 혼합 후 나머지 큐플과 튜브에 채워주었다. 혐기적인 조건인 튜브에는 mineral oil로 채워 혐기적인 조건으로 만들어 배양한다. 그리고 나서

24-48시간 동안 배양한다. API 20NE의 생화학적 반응을 관찰하기 위해 JAMES, NIT1, NIT2, Zinc 등의 보조시약을 첨가하여 결과를 판독한다.

#### 1.2.4.4. 화학분류학적 분석

Polar lipid 추출하기 위해 동결건조한 균체 50 mg에 0.3% NaCl 용액 (w/v)/methanol (10:100) 과 hexane를 각각 2 mL 첨가하고 실온에서 15분 동안 섞어주었다. 그리고 13000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 하층액에 hexane 1 mL를 첨가한 후 15분 동안 섞어주고 원심분리하여 또다시 상층액을 제거하였다. 하층액은 100°C에서 5분 동안 끓여준 뒤 찬물에 5분간 식혀주고, chloroform-methanol-0.3% NaCl 용액 (w/v) (50:100:40, v/v)을 750 µL 첨가 후 30분 동안 잘 섞어주었다. 원심분리 후 상층액을 모아 chloroform과 0.3% NaCl 용액을 각각 1.3 mL 넣고 잘 섞어준 뒤 원심분리하였다. 두 층으로 나뉜 용액에 하층액을 모아 37°C에서 건조시켜 분석에 사용하였다. 추출된 polar lipid는 two-dimensional TLC (Thin Layer Chromatography) 방법으로 분석하였다 [36]. 추출된 polar lipid는 chloroform/methanol (2:1) 용액에 50 µL를 넣고 녹인 후 TLC (Merck, USA)에 5 µL씩 점적하여 건조시킨 후 1차 전개액 chloroform-methanol-water (65:25:4, v/v), 2차 전개액 chloroform-methanol-acetic acid-water (40:7.5:6:2, v/v)에 각각 최소 30분 이상 전개하였다. TLC 상에 분리된 polar lipid는 발색시약으로 사용하여 동정하였다. 사용된 발색시약은 molybdophosphoric acid 시약 (10% molybdophosphoric acid w/v; total lipids), 0.2% ninhydrin (w/v, Merck, USA; amino group lipids), zinznadze 용액, Glycolipid 검출에는  $\alpha$ -naphthol (15% w/v) 용액을 사용하였다 [37].

지방산(fatty acid)의 추출방법은 다음(그림 1.3, 표 1.4)과 같다.

- Harvesting : 고체배지에 배양된 균체 40-60 mg을 test tube 바닥에 얇게 펴 발라주고,
- Saponification : Reagent 1 용액을 1 mL 첨가하여 30초 동안 혼합시켜준다. 100°C에서 5분 동안 끓여주고 5-10초간 다시 섞어준다. 그리고 또다시 100°C에서 25분간 끓여준 뒤, 37°C에서 식혀주어 비누화(saponification)시킨다.
- Methylation : Reagent 2 용액을 2 mL 첨가하여 5-10초간 섞어준다. 80°C에서

10분간 끓여준 뒤 식혀주어 시료의 휘발성 증가를 위해 지방산의 메틸화 반응을 유도시켜준다.

- Extraction : 그 다음, Reagent 3 용액을 1.25 ml 첨가하여 10분간 rotate 시켜, 유리피펫을 이용하여 하층액을 제거해 지방산을 추출한다.

- Wash : 지방산을 세척하기 위해 Reagent 4 용액 3 ml을 첨가하고 다시 5분간 rotate 시킨 후 포화 NaCl 용액을 첨가하여 깨끗한 지방산을 회수한다. 추출된 지방산은 shelock Microbial Identification System (MIDI: version 6.1)와 TSB6 라이브러리, 가스크로마토그래피(GC 7890A, Agilent, USA)를 이용하여 균주의 주요 지방산 구성을 분석하였다 (그림 1.4) [38].

Table 1.4. Composition of buffers used fatty acid extraction.

<b>Reagent 1- Saponification</b>
sodium hydroxide 45 g + methanol 150 ml + distilled water 150 ml
<b>Reagent 2 - Methylation</b>
60N hydrochloric acid 325 ml + methyl alcohol 275 ml
<b>Reagent 3 - Extraction</b>
hexane 200 ml + methyl tert-butyl ether 200 ml
<b>Reagent 4 - Sample cleanup</b>
sodium hydroxide 10.8 g + distilled water 900 ml

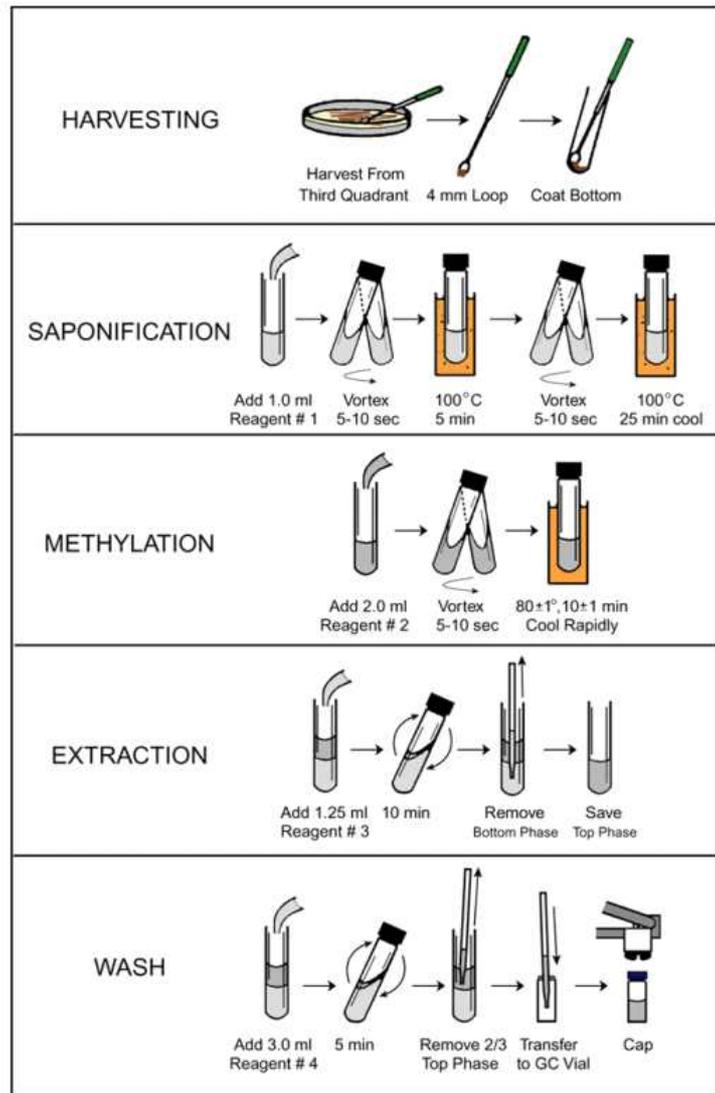


Fig 1.3. Fatty acid extraction methods.

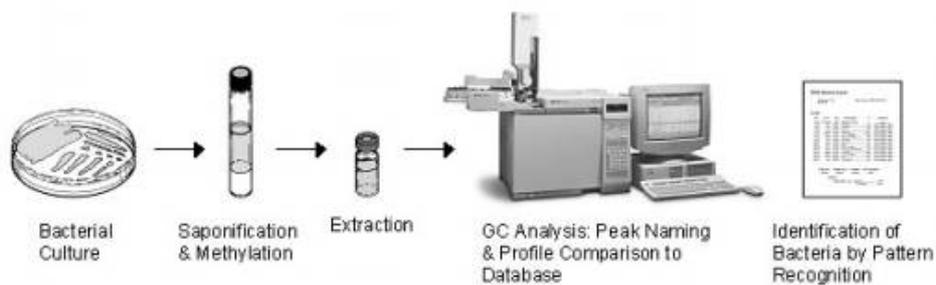


Fig 1.4. Fatty acid analysis.

#### 1.2.4.5. Genomic 분석

CE80<sup>T</sup>의 DNA G+C content는 Korean Culture Center of Microorganism (KCCM)에서 HPLC analysis 방법을 사용하여 검출하였다 [39]. 또한 DNA-DNA 혼성화는 CE80<sup>T</sup>와 표준균주 *L. suaedae* YC6927T의 Genomic DNA에서 Ezaki *et al.* [40]의 photobiotin-labelled DNA probes와 microplate hybridization 방법으로 실험을 진행하였다. 실험은 5반복으로 평균값으로 DNA-DNA relatedness 값을 평가하였다.

또한 *pufLM* gene은 bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*)의 생성유무와 관련된 유전자의 발현을 검출하기 위해 Kim *et al.*의 방법으로 특정 primer를 사용하여 증폭시켰다.

### 1.3. 결과 및 고찰

#### 1.3.1. 해면 내 분리세균의 16S rRNA 염기서열 및 계통학적 분석

##### 1.3.1.1. 보라예뿐이해면

보라예뿐이해면(*Callyspongia confoerderata*)에서 배양가능한 세균은 총 47 균주가 분리되었다. 분리된 47 균주의 분석된 16S rRNA 염기서열을 NCBI의 Genbank와 EzCloud를 이용하여 유사한 염기서열을 비교한 결과 주요 분류군으로 Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Beta-, Gamma-)의 4개의 문(Phylum)이 확인되었으며 (그림 1.5), 6개의 강(class), 12개의 목(order), 15개의 과(family), 17개의 속(genus), 그리고 30 종(species)이 확인되었다 (표.1.5). Proteobacteria가 62% (Alpha-proteobacteria 26%, Beta-proteobacteria 2%, Gamma-proteobacteria 36%)로 우점을 이루었으며, Firmicutes 23%, Actinobacteria 22%, Bacteroidetes 2%가 속하는 것으로 나타났다. 분리균주의 16S rRNA 염기서열은 EzCloud에서 표준균주의 염기서열과 비교하여 상동성을 표.1.6에 나타냈으며, 계통수는 다음 (그림 1.6)과 같다.

분리된 47 균주 중 31 균주는 proteobacteria 문으로 Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria 3개의 강으로 나타났다. 그 중 18균주는 Gamma-proteobacteria 강으로 Cellvibrionales, Oceanospirillales, Pseudomonadales, Vibrionales의 4개의 목과 Microbulbiferaceae, Halomonadaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionales 5개의 과, 그리고 *Microbulbifer*, *Cobetia*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio*으로 5개의 속이 분류되었다.

Gamma-proteobacteria 강/ Cellvibrionales 목/ Microbulbiferaceae 과에는 *Microbulbifer* 속이 5 균주로 *Microbulbifer* sp. 와 99% 16S rRNA 염기서열 유사도를 보였다. 특히, PPM17 균주는 *M. marinus* Y215<sup>T</sup>와 97.6%, PPM11, 12, 20은 *M. rhizosphaerae* Cs16b<sup>T</sup>와 97%의 염기서열 유사를 보였다.

Oceanospirillales 목/ Halomonadaceae 과/ *Cobetia* 속이 1 균주로 *Cobetia amphilecti* KMM 1561<sup>T</sup>와 99.4% 염기서열 상동성을 보였다. Pseudomonadales 목/ Moraxellaceae 과/ *Psychrobacter* 속에 속하는 6 균주는 *Psychrobacter* sp.에 98.1-99.6% 염기서열 유사도를 보였다. Pseudomonadaceae 과/ *Pseudomonas* 속에 속하는 2 균주는 *P. zhaodongensis* NEAU-ST5-22<sup>T</sup>와 99%의 염기서열 유사도를 보였다. Vibrionales 목/ Vibrionaceae 과/ *Vibrio* 속에 속하는 3 균주는 *V. coralliirubri* Corallo1<sup>T</sup>와 99%의 염기서열 유사도를 보여주었으며, 그 중 PPM3은 *V. gigantis* CAIM 25<sup>T</sup>와 92%의 낮은 16S rRNA 염기서열 유사도를 보여주었다.

Alpha-proteobacteria 강으로 Corynebacteriales, Micrococcales, Micromonosporales의 3개의 목, Nocardiaceae, Microbacteriaceae, Micromonosporaceae의 3개의 과, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Micromonospora* 3개의 속으로 분리되었다. Corynebacteriales 목/ Nocardiaceae 과/ *Rhodococcus* 속에 속하는 1 균주는 *Rhodococcus sovatisensis* H004<sup>T</sup>와 99% 16S rRNA 염기서열 유사도를 나타냈다. Micrococcales 목/ Microbacteriaceae 과/ *Microbacterium* 속에 속하는 3 균주는 *Microbacterium* sp. 와 Micromonosporales 목/ Micromonosporaceae 과/ *Micromonospora* 속에 속하는 1 균주는 *M. aurantiaca* ATCC 27029<sup>T</sup>와 각각 99-100%의 염기서열 유사도를 보였다.

Betaproteobacteria 강에는 Burkholderiales 목/ Comamonadaceae 과/ *Comamonas* 속에 속하는 1 균주는 *C. aquatilis* SB30-Chr27-3<sup>T</sup>와 99% 염기서열 유사도를 보였다.

Firmicutes 문/ Bacilli 강/ Bacillales 목에는 Bacillaceae, Paenibacillaceae의 2개의 과와 *Bacillus*, *Paenibacillus*의 2개의 속이 확인되었다. Bacillaceae 과/ *Bacillus* 속에 속하는 10 균주는 *Bacillus* sp. 와 Paenibacillaceae 과/ *Paenibacillus* 속에 속하는 1 균주는 *P. cucumis* AP-115<sup>T</sup>와 각각 99-100%의 염기서열 유사도를 보였다.

Actinobacteria 문/ Actinobacteria 강에는 Corynebacteriales, Micrococcales, Micromonosporales의 3개의 목, Nocardiaceae, Microbacteriaceae, Micromonosporaceae의 2개의 과, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Microm-*

*onospora*의 3개의 속이 확인되었다. Corynebacteriales 목/ Nocardiaceae 과/ *Rhodococcus* 속에 속하는 1 균주는 *Rhodococcus sovatusis* H004<sup>T</sup>와 99%, Micrococcales 목/ Microbacteriaceae 과/ *Microbacterium* 속에 속하는 3 균주는 *Microbacterium* sp.과 99-100%, Micromonosporales 목/ Micromonosporaceae 과/ *Micromonospora* 속에 속하는 1 균주는 *M. aurantiaca* ATCC 27029<sup>T</sup>와 99%의 유사한 염기서열이 나타났다.

Bacteroidetes 문/ Flavobacteriia 강/ Flavobacteriales 목/ Flavobacteriaceae 과/ *Joostella* 속에 속하는 1 균주는 *Joostella marina* DSM 19592<sup>T</sup>와 94%의 낮은 염기서열 유사도를 나타냈다.

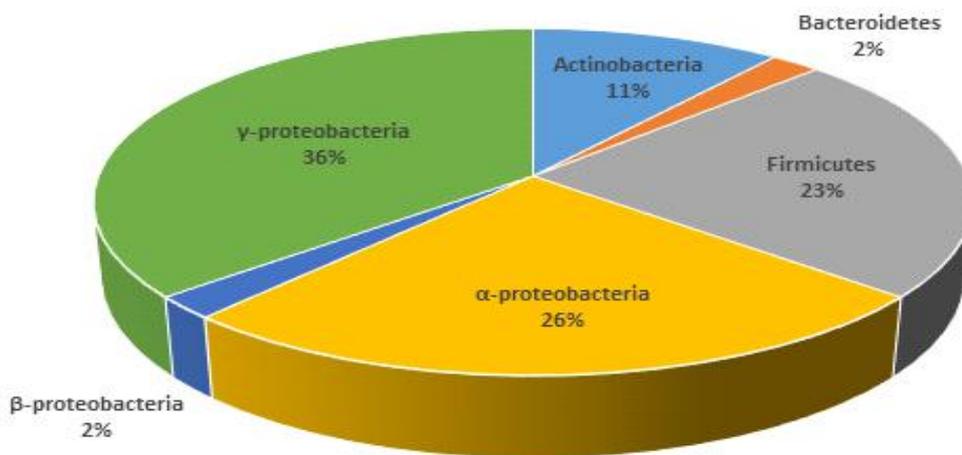


Fig. 1.5. Diversity and structure of bacterial community of *C. confoerderata*.

Table 1.5. Bacterial diversity associated with *C. confoerderata*.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	No.
Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	1
		Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	2
		Micromonosporales	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>	1
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Joostella</i>	1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	10
			Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	1
Proteobacteria	$\alpha$ -proteobacteria	Rhizobiales	Aurantimonadaceae	<i>Aurantimonas</i>	1
			Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	1
		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>	1
				<i>Pseudovibrio</i>	8
				<i>Ruegeria</i>	1
	$\beta$ -proteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>	1
	$\gamma$ -proteobacteria	Cellvibrionales	Microbulbiferaceae	<i>Microbulbifer</i>	5
			Oceanospirillales	Halomonadaceae	<i>Cobetia</i>
		Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Psychrobacter</i>	6
			Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	2
Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	3		

Table 1.6. Closest relative species to bacterial strains isolated from *C. confoerdata*.

Strain	Category (Phylum)	Closest relative species	Similarity (%)	
PPR7	Actinobacteria	<i>Rhodococcus sovatus</i> H004 <sup>T</sup>	99.1	
PPT8		<i>Microbacterium flavum</i> YM18-098 <sup>T</sup>	100.0	
PPR14		<i>Microbacterium maritopicum</i> DSM 12512 <sup>T</sup>	99.0	
PPR6		<i>Microbacterium oxydans</i> DSM 20578 <sup>T</sup>	99.7	
PPR11		<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029 <sup>T</sup>	99.5	
PPT11	Bacteroidetes	<i>Joostella marina</i> DSM 19592 <sup>T</sup>	93.9	
PPR15T	Firmicutes	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>T</sup>	100.0	
PPT4		<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>T</sup>	99.5	
PPT7		<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>T</sup>	99.2	
PPR22		<i>Bacillus praedii</i> FJAT-25547 <sup>T</sup>	99.9	
PPT3		<i>Bacillus pseudomycooides</i> DSM 12442	98.3	
PPT16		<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 <sup>T</sup>	99.0	
PPR13		<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 <sup>T</sup>	99.7	
PPR5		<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 <sup>T</sup>	99.5	
PPT5		<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 <sup>T</sup>	99.7	
PPR8		<i>Bacillus velezensis</i> CR-502 <sup>T</sup>	99.4	
PPR16		<i>Paenibacillus cucumis</i> AP-115 <sup>T</sup>	99.6	
PPR25		$\alpha$ -proteobacteria	<i>Aurantimonas coralicida</i> DSM 14790 <sup>T</sup>	99.9
PPT6			<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20 <sup>T</sup>	99.4
PPR18			<i>Paracoccus oceanense</i> JLT1679 <sup>T</sup>	99.2
PPM1	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>		99.2	
PPM10	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>		99.2	
PPM15	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>		98.6	
PPM2	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>		99.6	
PPM4	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>		99.6	
PPM8	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>		99.6	
PPM9	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>		99.6	

Strain	Category (Phylum)	Closest relative species	Similarity (%)
PPM13	$\alpha$ -proteobacteria	<i>Pseudovibrio hongkongensis</i> KCTC 42383 <sup>T</sup>	96.7
PPM16		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.7
PPT9	$\beta$ -proteobacteria	<i>Comamonas aquatilis</i> SB30-Chr27-3 <sup>T</sup>	99.3
PPM14	$\gamma$ -proteobacteria	<i>Microbulbifer echini</i> AM134 <sup>T</sup>	99.2
PPM17		<i>Microbulbifer marinus</i> Y215 <sup>T</sup>	97.6
PPM11		<i>Microbulbifer rhizosphaerae</i> Cs16b <sup>T</sup>	97.7
PPM12		<i>Microbulbifer rhizosphaerae</i> Cs16b <sup>T</sup>	97.7
PPM20		<i>Microbulbifer rhizosphaerae</i> Cs16b <sup>T</sup>	97.7
PPM7		<i>Cobetia amphilecti</i> KMM 1561 <sup>T</sup>	99.4
PPT12		<i>Psychrobacter celer</i> SW-238 <sup>T</sup>	98.0
PPT13		<i>Psychrobacter celer</i> SW-238 <sup>T</sup>	98.1
PPT14		<i>Psychrobacter celer</i> SW-238 <sup>T</sup>	97.9
PPT15		<i>Psychrobacter celer</i> SW-238 <sup>T</sup>	98.1
PPR24		<i>Psychrobacter nivimaris</i> 88/2-7 <sup>T</sup>	99.6
PPR17		<i>Psychrobacter proteolyticus</i> 116 <sup>T</sup>	98.9
PPR2		<i>Pseudomonas zhaodongensis</i> DSM 27559 <sup>T</sup>	99.8
PPT2		<i>Pseudomonas zhaodongensis</i> DSM 27559 <sup>T</sup>	99.8
PPM5		<i>Vibrio coralliirubri</i> Corallo1 <sup>T</sup>	99.3
PPM6		<i>Vibrio coralliirubri</i> Corallo1 <sup>T</sup>	98.8
PPM3		<i>Vibrio gigantis</i> CAIM25 <sup>T</sup>	92.3

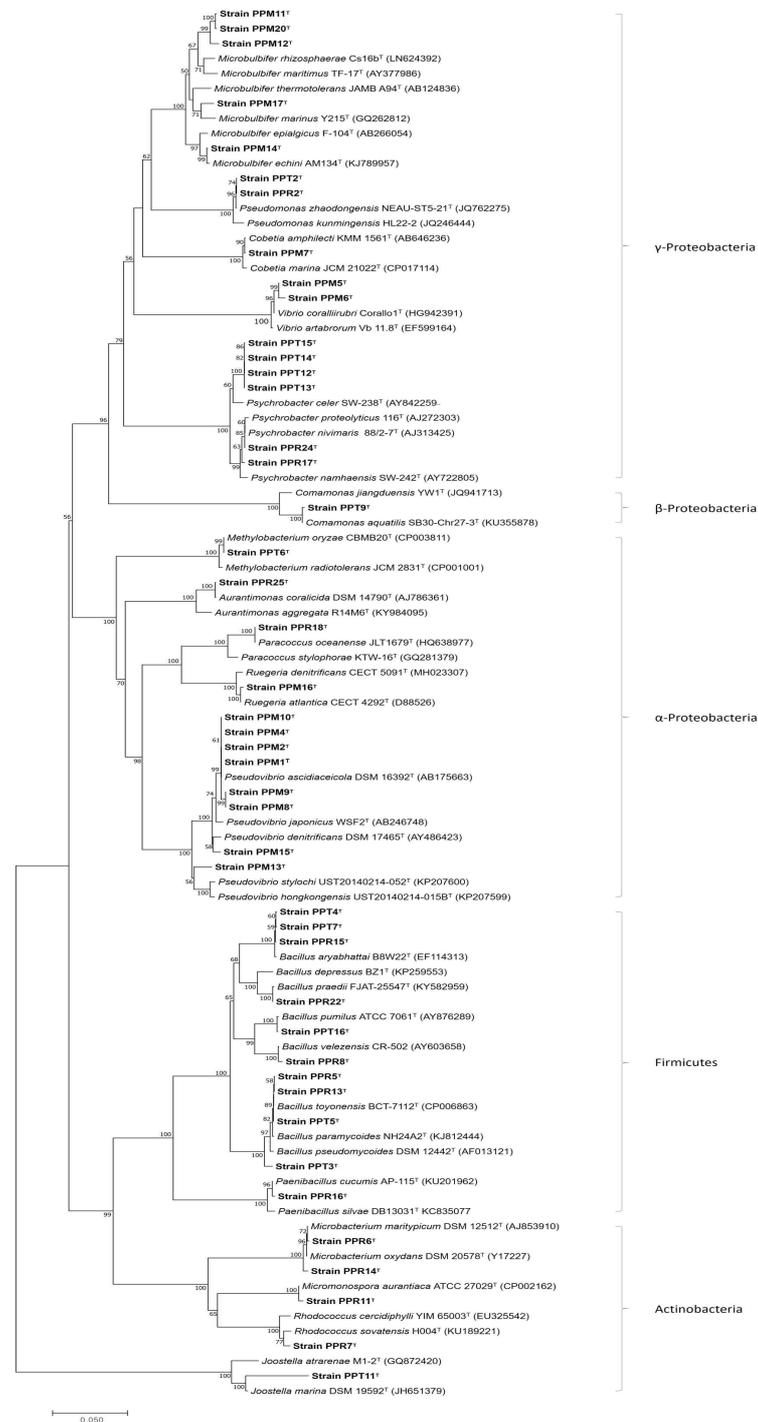


Fig 1.6. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rDNA gene sequences of bacteria isolated from *C. confoerderata*. and some other related taxa. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bootstrap values (>50%) based on 1,000 replications are shown. Bar 0.02 nucleotide substitutions per nucleotide position.

### 1.3.1.2. 굽은나선별해면

굽은나선별해면(*Spirastrella insignis*)에서 배양가능한 세균은 총 33 균주가 분리되었다. 분리된 33 균주의 분석된 16S rRNA 염기서열을 NCBI의 Genbank와 EzCloud를 이용하여 유사한 염기서열을 비교한 결과 주요 분류군으로 Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Gamma-)의 3개의 문(Phylum)이 확인되었으며 (그림 1.7), 4개의 강(class), 6개의 목(order), 9개의 과(family), 11개의 속(genus), 그리고 17 종(species)이 확인되었다 (표 1.7). Proteobacteria가 58% (Alpha-proteobacteria 43%, Gamma-proteobacteria 15%)로 우점을 이루었으며, Firmicutes 30%, Actinobacteria 12%가 속하는 것으로 나타났다. 분리균주의 16S rRNA염기서열은 EzCloud에서 표준균주의 염기서열과 비교하여 상동성을 표 1.8에 나타냈으며, 계통수는 다음 (그림 1.8)과 같다.

분리된 33 균주 중 19 균주는 Proteobacteria 문으로 Alpa-proteobacteria (class)/ Rhodobacterales (order)/ Rhodobacteraceae (family)/ *Phaeobacter*, *Pseudovibrio*의 2개의 속이 확인하였다. *Phaeobacter* 속의 1 균주는 *Phaeobacter inhibens* DSM 16374<sup>T</sup>의 염기서열과 99%의 유사도를 보였고, *Pseudovibrio* 속(genus) 12 균주는 *P. ascidiaceicola* DSM 16392<sup>T</sup>와 99-98%의 염기서열 유사도를 보였다. 특히, SIM25 균주는 97.5%의 낮은 유사도를 보여 주었다.

Proteobacteria 문/ Gamma-proteobacteria 강은 Alteromonadales, Cellvibrionales의 2개의 목, Shewanellaceae, Microbulbiferaceae의 2개의 과, 그리고 *Shewanella*, *Microbulbifer*의 2개의 속이 확인되었다. *Shewanella* 속에 속해있는 1 균주는 *Shewanella marinintestina* IK-1<sup>T</sup>와 *Microbulbifer* 속에 속해있는 4 균주는 *M. echini* AM134<sup>T</sup>와 98.7-99.7% 염기서열 유사도를 보여주었다.

Firmicutes 문/ Bacilli 강/ Bacillales 목/ Bacillaceae, Paenibacillaceae의 2개의 과와 *Bacillus*, *Paenibacillus*의 2개의 속이 확인되었다. Bacillaceae 과/ *Bacillus* 속에 속하는 9 균주는 *Bacillus* sp. 와 Paenibacillaceae 과/ *Paenibacillus* 속에 속하는 1 균주는 *P. taichungensis* BCRC 17757<sup>T</sup>와 각각

99-100%의 염기서열 유사도를 보였다. 특히, SIM6, 15는 *B. halosaccharovorans* E33<sup>T</sup>와 각각 97%와 94%로의 낮은 염기서열 유사도를 보였다.

Actinobacteria 문/ Actinobacteria 강에는 Corynebacteriales, Micrococcales, Mycobacteriales의 3개의 목, Gordoniaceae, Nocardiaceae, Micrococaceae, Mycobacteriaceae의 4개의 과, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*의 4개의 속이 확인되었다. Corynebacteriales 목에는 Gordoniaceae 과/ *Rhodococcus* 속에 속하는 1 균주는 *Gordonia hong-kongensis* HKU50<sup>T</sup>와 99%, Nocardiaceae 과/ *Rhodococcus* 속에 속하는 1 균주는 *Rhodococcus cerastii* C5<sup>T</sup>와 99%의 염기서열 유사도를 보여줬다. Micrococcales 목/ Micrococaceae 과/ *Micrococcus* 속에 속하는 1 균주는 *Micrococcus yunnanensis* DSM 21948<sup>T</sup>과 99.3%, Mycobacteriales 목/ Mycobacteriaceae 과/ *Mycobacterium* 속에 속하는 1 균주는 *M. frederiksenbergense* DSM 44346<sup>T</sup>와 98.6%의 유사한 염기서열이 나타났다.

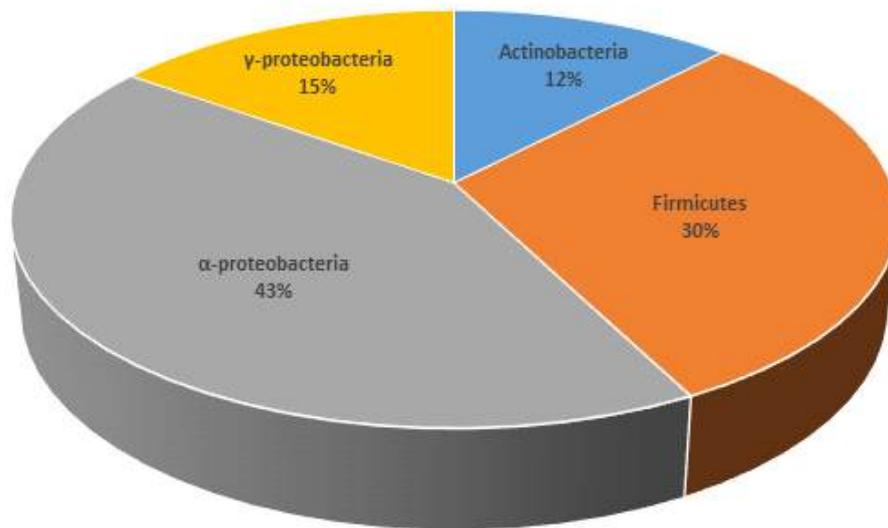


Fig 1.7. Diversity and structure of bacterial community of *S. insignis*.

Table 1.7. Bacterial diversity associated with *S. insignis*.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	No.
Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Gordoniaceae	<i>Gordonia</i>	1
			Mycobacteriaceae	<i>Mycolicibacterium</i>	1
			Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	12
			Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	1
Proteobacteria	$\alpha$ -proteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Phaeobacter</i>	1
				<i>Pseudovibrio</i>	12
				<i>Ruegeria</i>	1
	$\gamma$ -proteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	<i>Shewanella</i>	1
			Cellvibrionales	Microbulbiferaceae	<i>Microbulbifer</i>
	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	1	

Table 1.8. Closest relative species to bacterial strains isolated from *S. insignis*.

Strain	Category (Phylum)	Closest relative species	Similarity (%)	
SIR2	Actinobacteria	<i>Rhodococcus cerastii</i> C5 <sup>T</sup>	99.3	
SIT10		<i>Micrococcus yunnanensis</i> DSM21948 <sup>T</sup>	99.3	
SIR6		<i>Mycobacterium frederiksbergense</i> DSM44346 <sup>T</sup>	98.6	
SIR3		<i>Gordonia hongkongensis</i> HKU50( <sup>T</sup> )	99.3	
SIM2	Firmicutes	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b <sup>T</sup>	99.8	
SIT3		<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b <sup>T</sup>	99.1	
SIM6		<i>Bacillus halosaccharovorans</i> E33 <sup>T</sup>	96.8	
SIM15		<i>Bacillus halosaccharovorans</i> E33 <sup>T</sup>	93.6	
SIR8		<i>Bacillus halosaccharovorans</i> E33 <sup>T</sup>	99.4	
SIR1		<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 <sup>T</sup>	98.6	
SIT2		<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 <sup>T</sup>	99.1	
SIT6		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Stercoris</i> D7XPN1 <sup>T</sup>	99.6	
SIT7		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Stercoris</i> D7XPN1 <sup>T</sup>	99.5	
SIT4		<i>Paenibacillus taichungensis</i> BCRC 17757 <sup>T</sup>	99.5	
SIM19		$\alpha$ -proteobacteria	<i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 16374 <sup>T</sup>	99.7
SIM1			<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM16392 <sup>T</sup>	98.7
SIM4	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM16392 <sup>T</sup>		99.1	
SIM7	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM16392 <sup>T</sup>		99.8	
SIM8	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM16392 <sup>T</sup>		99.2	
SIM14	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM16392 <sup>T</sup>		99.1	
SIM22	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM16392 <sup>T</sup>		99.9	
SIM25	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM16392 <sup>T</sup>		97.5	
SIM27	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM16392 <sup>T</sup>		98.6	
SIM29	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM16392 <sup>T</sup>		99.8	
SIM30	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM16392 <sup>T</sup>		99.1	
SIM28	<i>Pseudovibrio axinellae</i> Ad2 <sup>T</sup>		97.8	

Strain	Category (Phylum)	Closest relative species	Similarity (%)
SIM5	$\alpha$ -proteobacteria	<i>Pseudovibrio hongkongensis</i> KCTC 42383 <sup>T</sup>	96.8
SIM16		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	100.0
SIM9	$\gamma$ -proteobacteria	<i>Shewanella marinintestina</i> IK-1 <sup>T</sup>	99.2
SIM13		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 <sup>T</sup>	98.7
SIM18		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 <sup>T</sup>	99.7
SIM20		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 <sup>T</sup>	98.7
SIM21		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 <sup>T</sup>	99.7

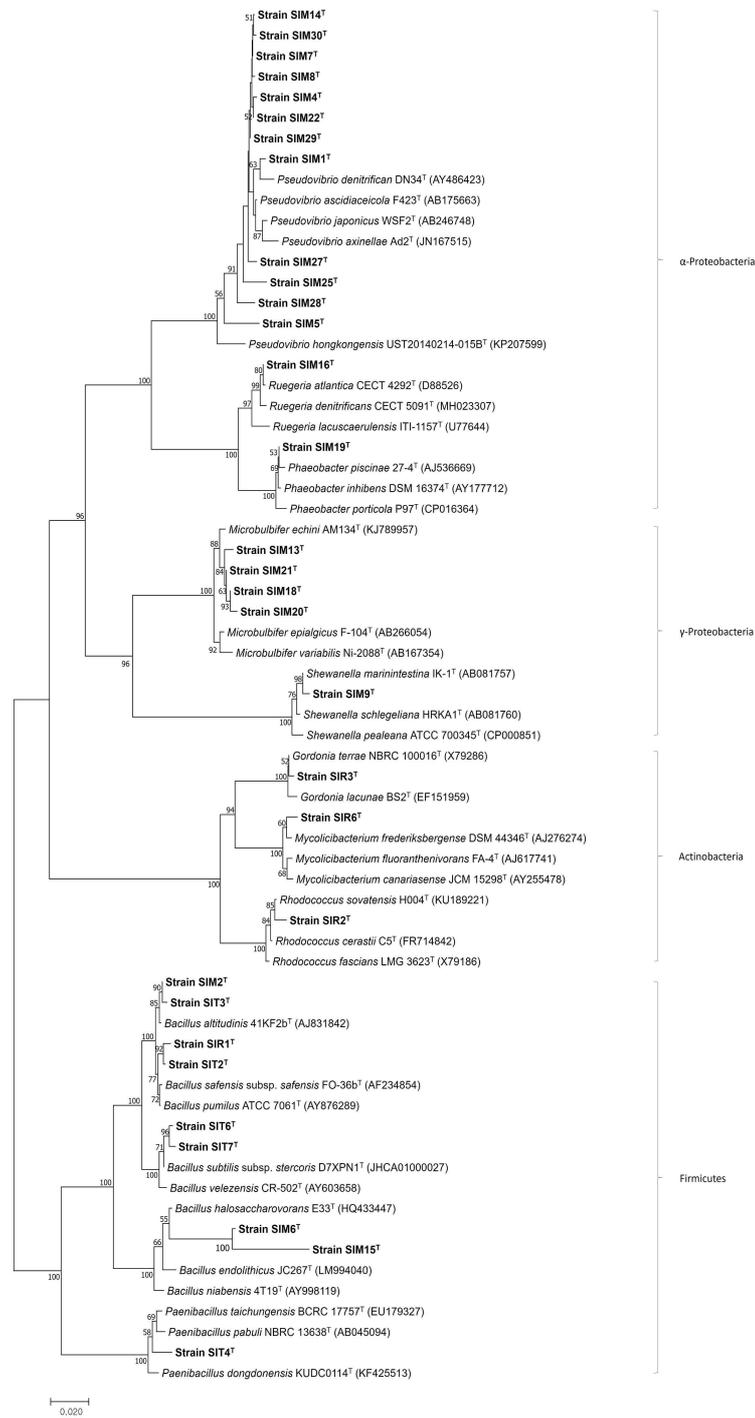


Fig 1.8. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rDNA gene sequences of bacteria isolated from *S. insignis* and some other related taxa. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bootstrap values (>50%) based on 1,000 replications are shown. Bar 0.02 nucleotide substitutions per nucleotide position.

### 1.3.1.3. 호박해면

호박해면(*Cliona celata*)에서 배양가능한 세균은 총 48 균주가 분리되었다. 분리된 48 균주의 분석된 16S rRNA 염기서열을 NCBI의 Genbank와 EzCloud를 이용하여 유사한 염기서열을 비교한 결과 주요 분류군으로 Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Beta-, Gamma-)의 4개의 문(Phylum)이 확인되었으며 (그림 1.9), 5개의 강(class), 9개의 목(order), 11개의 과(family), 13개의 속(genus), 그리고 21 종(species)이 확인되었다 (표 1.9). Proteobacteria가 85% (Alpha-proteobacteria 58%, Beta-proteobacteria 4%, Gamma-proteobacteria 23%)로 우점을 이루었으며, Firmicutes 11%, Actinobacteria 4%가 속하는 것으로 나타났다. 분리균주의 16S rRNA 염기서열은 EzCloud에서 표준균주의 염기서열과 비교하여 상동성을 표 1.10에 나타냈으며, 계통수는 다음 (그림 1.10)과 같다.

분리된 48 균주 중 41 균주는 Proteobacteria 문으로 Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria 3개의 강으로 나타났다. 그 중 28 균주는 Alpha-proteobacteria 강으로 Rhizobiales, Rhodobacterales, Sphingomonadales의 4개의 목, Methylobacteriaceae, Rhodobacteraceae, Erythrobacteraceae, Sphingomonadaceae의 4개의 과, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudo-vibrio*, *Ruegeria*, *Erythrobacter*, *Sphingomonas*의 6개의 속으로 확인하였다.

Alpha-proteobacteria 강/ Rhizobiales 목/ Methylobacteriaceae 과/ *Methylobacterium* 속에 속해 있는 3 균주 (JCR11, JCR26, JCR29)가 *Methylobacterium* sp.에 93-96%의 낮은 염기서열 유사도를 나타냈다. Rhodobacterales 목/ Rhodobacteraceae 과에는 *Paracoccus* 속에 속하는 균주가 1 균주로 *Paracoccus oceanense* JLT1679<sup>T</sup>와 *Pseudovibrio* 속에 속하는 12 균주는 *Pseudovibrio* sp.와 *Ruegeria* 속의 4 균주는 *Ruegeria* sp.와 99-100%의 염기서열의 상동성을 나타냈다.

Gamma-proteobacteria 강/ Cellvibrionales 목/ Microbulbiferaceae 과에는 *Microbulbifer* 속이 6 균주로 *Microbulbifer* sp.와 98-99% 16S rRNA 염기서열

유사도를 보였다. Pseudomonadales 목/ Moraxellaceae 과/ *Acinetobacter* 속은 5 균주로 *Acinetobacter* sp. 와 16S rRNA 염기서열 유사도를 보였다

Actinobacteria 문/ Actinobacteria 강에는 Corynebacteriales, Micrococcales의 2개의 목, Nocardiaceae, Microbacteriaceae의 2개의 과, *Rhodococcus*, *Agrococcus*의 2개의 속이 확인되었다. Corynebacteriales 목/ Nocardiaceae 과/ *Rhodococcus* 속에 속하는 1균주는 *Rhodococcus sovatisensis* H004<sup>T</sup>와 99%, Micrococcales 목/ Microbacteriaceae 과/ *Agrococcus* 속에 속하는 1균주는 *A. baldri* IAM 15147<sup>T</sup>와 99%의 유사한 염기서열이 나타났다.

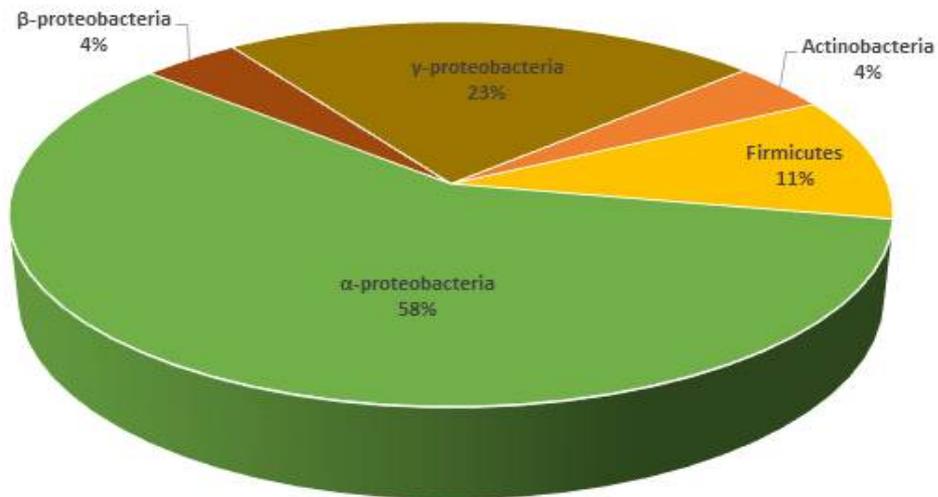


Fig 1.9. Diversity and structure of bacterial community of *Cliona celata*.

Table 1.9. Bacterial diversity associated with *Cliona celata*.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	No.
Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	1
		Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Agrococcus</i>	1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	4
			Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	1
Proteobacteria	$\alpha$ -proteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	3
			Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>
		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Pseudovibrio</i>	12
			Rhodobacteraceae	<i>Ruegeria</i>	4
	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	<i>Erythrobacter</i>	1	
		Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	7	
	$\beta$ -proteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Variovorax</i>	2
	$\gamma$ -proteobacteria	Cellvibrionales	Microbulbiferaceae	<i>Microbulbifer</i>	6
Pseudomonadales			Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	5

Table 1.10. Closest relative species to bacterial strains isolated from *Cliona celata*.

Strain	Category (Phylum)	Closest relative species	Similarity (%)
JCR34	Actinobacteria	<i>Rhodococcus sovatus</i> H004 <sup>T</sup>	98.9
JCM25		<i>Agrococcus baldri</i> IAM 15147 <sup>T</sup>	98.8
JCM4	Firmicutes	<i>Bacillus hwajinpoensis</i> SW-72 <sup>T</sup>	99.4
JCM37		<i>Bacillus algicola</i> KMM 3737 <sup>T</sup>	99.4
JCR2		<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b <sup>T</sup>	99.7
JCR7		<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>T</sup>	99.6
JCR12		<i>Paenibacillus tritici</i> RTAE36 <sup>T</sup>	98.7
JCR11	$\alpha$ -proteobacteria	<i>Methylobacterium currus</i> PR1016A <sup>T</sup>	93.1
JCR26		<i>Methylobacterium platani</i> PMB02 <sup>T</sup>	95.9
JCR29		<i>Methylobacterium mesophilicum</i> JCM 2829 <sup>T</sup>	94.9
JCR8		<i>Paracoccus oceanense</i> JLT1679 <sup>T</sup>	99.6
JCM10		<i>Pseudovibrio denitrificans</i> DSM 17465 <sup>T</sup>	98.9
JCM9		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.8
JCM14		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.7
JCM20		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.4
JCM21		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.5
JCM23		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.2
JCM24		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.2
JCM29		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.6
JCM30		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.7
JCM31		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.6
JCM33		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.9
JCM35		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.8
JCM13		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.4
JCM16		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.8
JCM17		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.8
JCM27		<i>Ruegeria denitrificans</i> CECT 5091 <sup>T</sup>	99.3

Strain	Category (Phylum)	Closest relative species	Similarity (%)
JCR21	$\alpha$ -proteobacteria	<i>Erythrobacter citreus</i> RE35F/1 <sup>T</sup>	98.8
JCR9		<i>Sphingomonas aquatilis</i> JSS7 <sup>T</sup>	99.8
JCR16		<i>Sphingomonas aquatilis</i> JSS7 <sup>T</sup>	99.8
JCR5		<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC13937 <sup>T</sup>	99.9
JCR18		<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC13937 <sup>T</sup>	99.7
JCR20		<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC13937 <sup>T</sup>	99.9
JCR23		<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC13937 <sup>T</sup>	99.9
JCR25		<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC13937 <sup>T</sup>	99.7
JCR13	$\beta$ -proteobacteria	<i>Vario vorax</i> NBRC 15149 <sup>T</sup>	98.7
JCR15		<i>Vario vorax</i> NBRC 15149 <sup>T</sup>	98.9
JCM3	$\gamma$ -proteobacteria	<i>Microbulbifer echini</i> AM134 <sup>T</sup>	99.6
JCM5		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 <sup>T</sup>	99.7
JCM6		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 <sup>T</sup>	99.1
JCM7		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 <sup>T</sup>	99.7
JCM22		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 <sup>T</sup>	97.8
JCM28		<i>Microbulbifer echini</i> AM134 <sup>T</sup>	97.9
JCR3		<i>Acinetobacter pittii</i> CIP 70.29 <sup>T</sup>	99.6
JCR4		<i>Acinetobacter pittii</i> CIP 70.29 <sup>T</sup>	99.5
JCR6		<i>Acinetobacter pittii</i> CIP 70.29 <sup>T</sup>	99.5
JCR36		<i>Acinetobacter pittii</i> CIP 70.29 <sup>T</sup>	99.4
JCR37		<i>Acinetobacter pittii</i> CIP 70.29 <sup>T</sup>	99.5

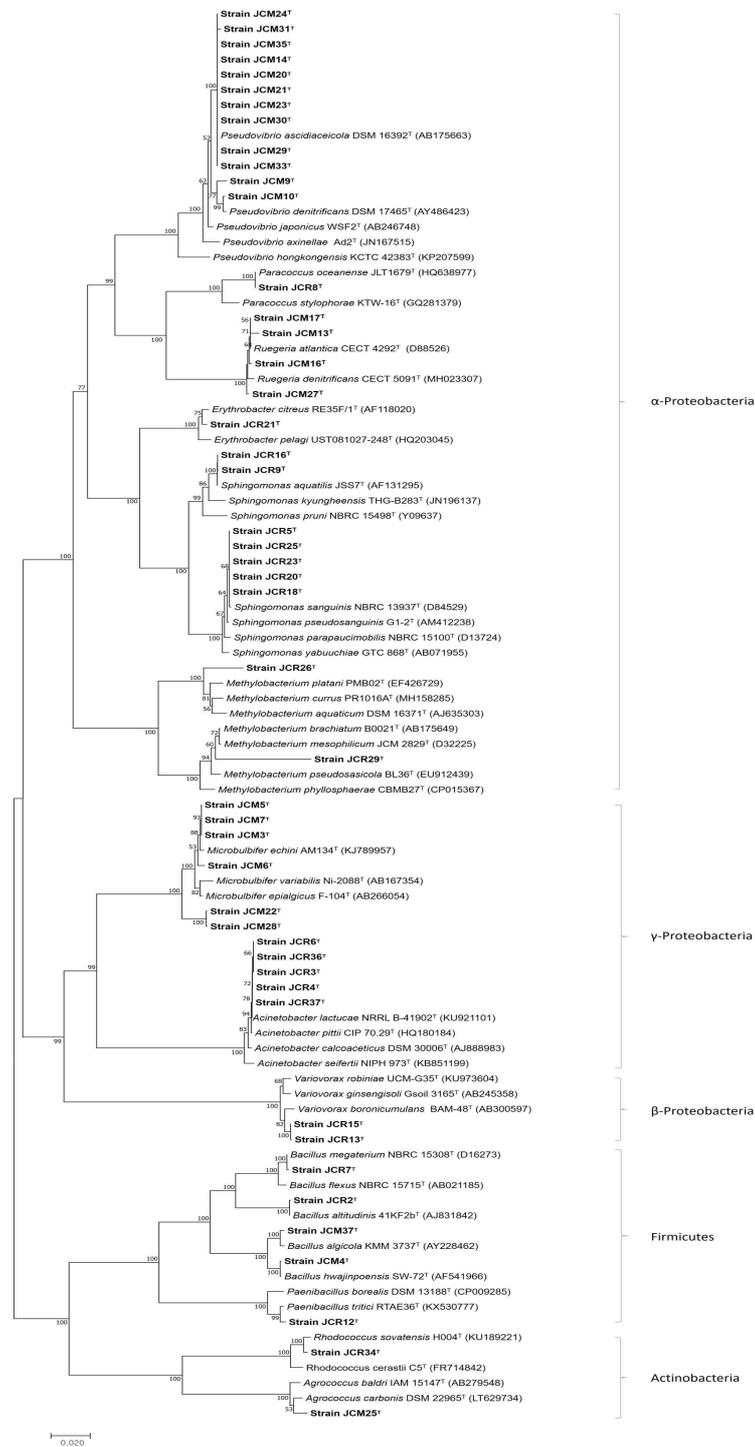


Fig 1.10. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rDNA gene sequences of bacteria isolated from *Cliona celata* and some other related taxa. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bootstrap values (>50%) based on 1,000 replications are shown. Bar 0.02 nucleotide substitutions per nucleotide position.

#### 1.3.1.4. 주황해변해면

주황해변해면(*Hymeniacidon sinapium*)에서 배양가능한 세균은 총 43 균주가 분리되었다. 분리된 43 균주의 분석된 16S rRNA 염기서열을 NCBI의 GenBank와 EzCloud를 이용하여 유사한 염기서열을 비교한 결과 주요 분류군으로 Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Gamma-)의 3개의 문(Phylum)이 확인되었으며 (그림 1.10), 4개의 강(class), 6개의 목(order), 7개의 과(family), 9개의 속(genus), 그리고 14 종(species)이 확인되었다 (표 1.11). Proteobacteria가 91% (Alpha-proteobacteria 86%, Gamma-proteobacteria 5%)로 우점을 이루었으며, Firmicutes 5%, Actinobacteria 4%가 속하는 것으로 나타났다. 분리균주의 16S rRNA 염기서열은 EzCloud에서 표준균주의 염기서열과 비교하여 상동성을 표 1.12에 나타냈으며, 계통수는 다음 (그림 1.12)과 같다.

분리된 43 균주 중 39 균주는 proteobacteria 문으로 Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria 3개의 강으로 나타났다. 그 중 35 균주는 Alpha-proteobacteria 강으로 Rhizobiales, Sphingomonadales의 2개의 목, Rhodobacteraceae, Erythrobacteraceae, Sphingomonadaceae의 3개의 과, *Phaeobacter*, *Pseudovibrio*, *Ruegeria*, *Erythrobacter*, *Sphingomonas*의 5개의 속로 확인하였다.

Alpha-proteobacteria 강/ Rhizobiales 목/ Rhodobacteraceae 과/ *Phaeobacter* 속에 속해 있는 1 균주는 *Phaeobacter italicus* CECT 7645<sup>T</sup>와 99%, *Pseudovibrio* 속에 속해있는 20 균주는 *Pseudovibrio* sp.와 99%, 그리고 *Ruegeria* 속에 속해있는 14 균주는 *Ruegeria* sp.와 99%의 염기서열 유사도를 보여줬다. Sphingomonadales 목/ Erythrobacteraceae 과/ *Erythrobacter* 속에 속해 있는 1 균주는 *E. aquimaris* SW-110<sup>T</sup>와 *Sphingorhabdus* 속에 1 균주는 *S. litoris* FR1093<sup>T</sup>와 98%의 염기서열 유사도를 나타냈다.

Gamma-proteobacteria 강에는 Alteromonadales, Oceanospirillales의 2개의 목, Pseudoalteromonadaceae, Halomonadaceae의 2개의 과, 그리고 *Pseudoalteromonas*, *Halomonas*의 2개의 속이 확인되었다. *Pseudoalteromonas*, *Halomonas* 속에는 각각 1 균주가 분리되었으며, *P. shioyasakiensis* SE3<sup>T</sup>와 *H.*

*litopenaei* SYSU ZJ2214<sup>T</sup>와 98-99%의 염기서열 유사도를 보여주었다.

Actinobacteria 문에는 Actinobacteria 강/ Corynebacteriales 목/ Mycobacteriaceae 과/ *Mycolicibacterium* 속이 확인되었으며, *Mycolicibacterium* sp.와 99-100% 유사한 염기서열이 확인되었다.

Firmicutes 문에는 Bacilli 강/ Bacillales 목/ Bacillaceae 과/ *Bacillus* 속에 2 균주 분리되었으며, *B. siamensis* KCTC 13613<sup>T</sup>와 99%의 염기서열 유사도를 보여줬다.

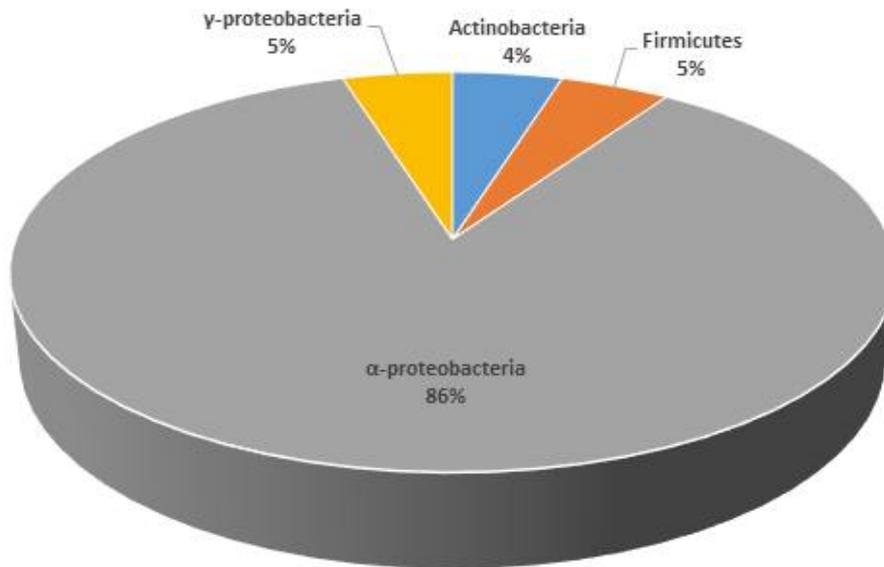


Fig 1.11. Diversity and structure of bacterial community of *H. sinapium*.

Table 1.11. Bacterial diversity associated with *H. sinapium*.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	No.
Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	<i>Mycolicibacterium</i>	2
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	2
Proteobacteria	$\alpha$ -proteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Phaeobacter</i>	1
				<i>Pseudovibrio</i>	20
				<i>Ruegeria</i>	14
		Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	<i>Erythrobacter</i>	1
			Sphingomonadaceae	<i>Sphingorhabdus</i>	1
	$\gamma$ -proteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i>	1
	Oceanospirillales	Halomonadaceae	<i>Halomonas</i>	1	

Table 1.12. Closest relative species to bacterial strains isolated from *H. sinapium*.

Strain	Category (Phylum)	Closest relative species	Similarity (%)
JHR17	Actinobacteria	<i>Mycolicibacterium hippocampi</i> BFLP-6 <sup>T</sup>	99.0
JHR20		<i>Mycolicibacterium poriferae</i> ATCC 35087 <sup>T</sup>	100.0
JHR18	Firmicutes	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 <sup>T</sup>	99.8
JHR19		<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 <sup>T</sup>	99.9
JHM7	$\alpha$ -proteobacteria	<i>Phaeobacter italicus</i> CECT 7645 <sup>T</sup>	99.6
JHM10		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.3
JHM14		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.5
JHM16		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.0
JHM18		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	98.9
JHM19		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.6
JHM20		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.3
JHM22		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.6
JHM23		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.1
JHM24		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.6
JHM27		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.6
JHM28		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.9
JHM32		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.6
JHM33		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.9
JHM42		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.5
JHM43		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.7
JHM46		<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> DSM 16392 <sup>T</sup>	99.6
JHM3		<i>Pseudovibrio denitrificans</i> DSM 17465 <sup>T</sup>	99.3
JHM12		<i>Pseudovibrio denitrificans</i> DSM 17465 <sup>T</sup>	99.6
JHM15		<i>Pseudovibrio denitrificans</i> DSM 17465 <sup>T</sup>	99.6
JHM34	<i>Pseudovibrio japonicus</i> WSF2 <sup>T</sup>	99.9	

Strain	Category (Phylum)	Closest relative species	Similarity (%)
JHM8	α-proteobacteria	<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.9
JHM17		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.9
JHM29		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.8
JHM30		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.9
JHM35		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.9
JHM37		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.8
JHM38		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.7
JHM44		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.5
JHM40		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.8
JHM47		<i>Ruegeria atlantica</i> CECT 4292 <sup>T</sup>	99.8
JHM21		<i>Ruegeria arenilitoris</i> CECT 8715 <sup>T</sup>	99.5
JHM39		<i>Ruegeria arenilitoris</i> CECT 8715 <sup>T</sup>	99.8
JHM45		<i>Ruegeria arenilitoris</i> CECT 8715 <sup>T</sup>	99.7
JHM41		<i>Ruegeria denitrificans</i> CECT 5091 <sup>T</sup>	99.8
JHM26		<i>Erythrobacter aquimaris</i> SW-110 <sup>T</sup>	98.1
JHM48		<i>Sphingorhabdus litoris</i> FR1093 <sup>T</sup>	98.5
JHM31		γ-proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i> SE3 <sup>T</sup>
JHM5	<i>Halomonas litopenaei</i> SYSU ZJ2214 <sup>T</sup>		99.8

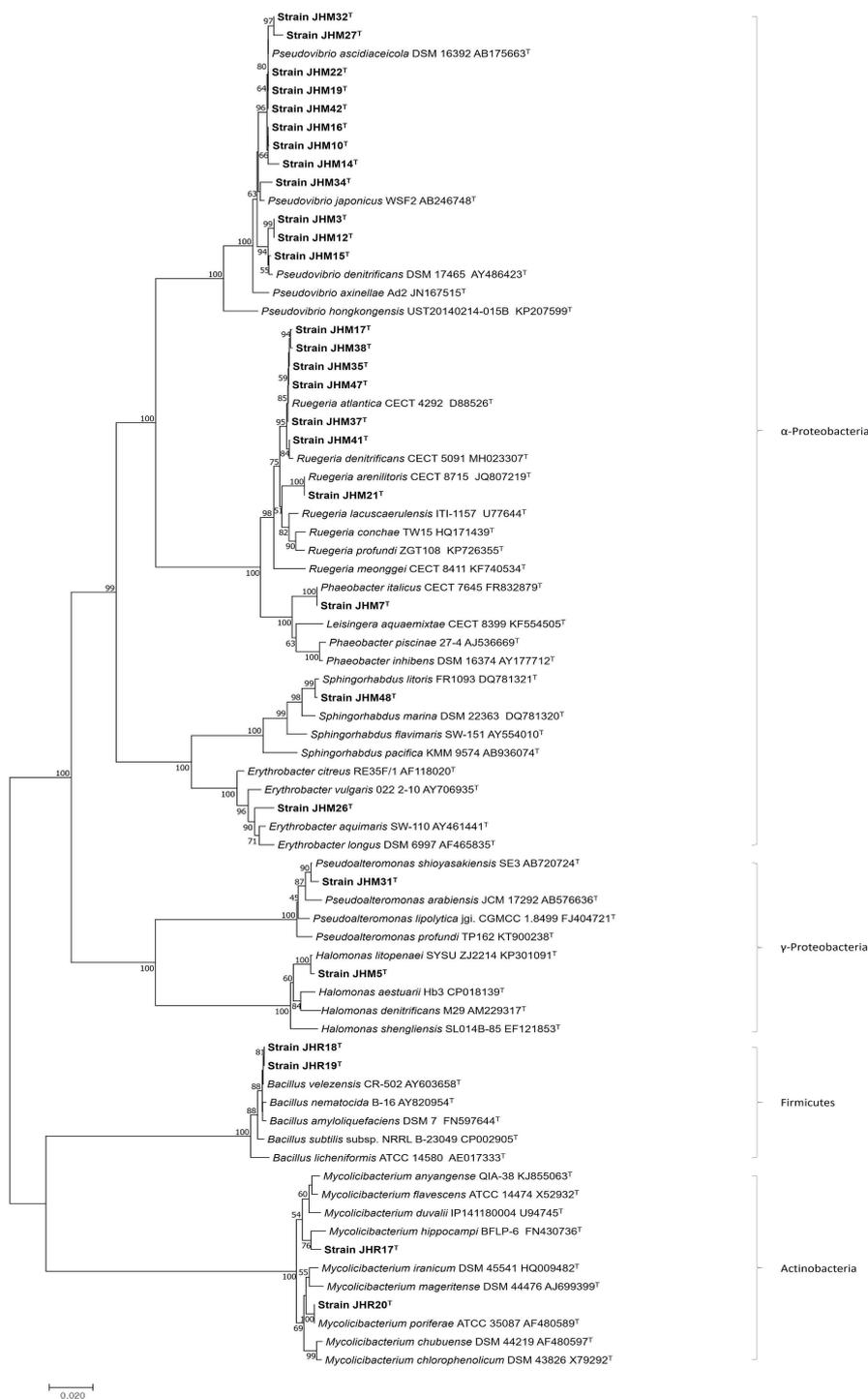


Fig 1.12. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rDNA gene sequences of bacteria isolated from *H. sinapium* and some other related taxa. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bootstrap values (>50%) based on 1,000 replications are shown. Bar 0.02 nucleotide substitutions per nucleotide position.

### 1.3.2 주요 세균군집분석

해면에서 분리된 세균의 16S rRNA gene 염기서열을 분석한 결과, 4종의 해면에서 나타난 세균 군집구조는 보라예쁜이해면(*C. confoerderata*)에서 주요 분류군으로 Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Beta-, Gamma-)의 4개의 문 (Phylum), 굽은나선별해면(*S. insignis*)에서는 Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Gamma-)의 3개의 문 (Phylum), 호박해면(*Cliona celata*)에서는 Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Beta-, Gamma-)의 4개의 문 (Phylum), 그리고 주황해면(*H. sinapium*)에서는 Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Gamma-)의 3개의 문 (Phylum)에 속하는 세균군집이 파악되었다 (그림 1.13). 이러한 해면 4종에서 공통적으로 나타나는 세균그룹은 Actinobacteria, Proteobacteria (Alpha-, Gamma-)로 나타났다. 또한 공통적으로 Alpha-proteobacteria이 우점세균 그룹으로 나타났다. 이는 또한 해면 공생세균 군집에서 Alpha-proteobacteria와 Gamma-proteobacteria 우점한다는 보고와 일치한다 [41, 42]. 또한 *Callyspongia eleganse*에서 분리된 세균군집과 비교하였을 때 Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria (Alpha-, Beta-, Gamma-)의 4개의 문 (Phylum) 그룹으로 이루어졌다는 결과와 일치했다 [43].

표준균주와 97% 이하의 유전자 염기서열의 유사도를 나타는 분리균주는 추후 표준균주와 함께 신종실험을 통해 신속 또는 신종으로 보고될 가능성이 있다고 판단된다.

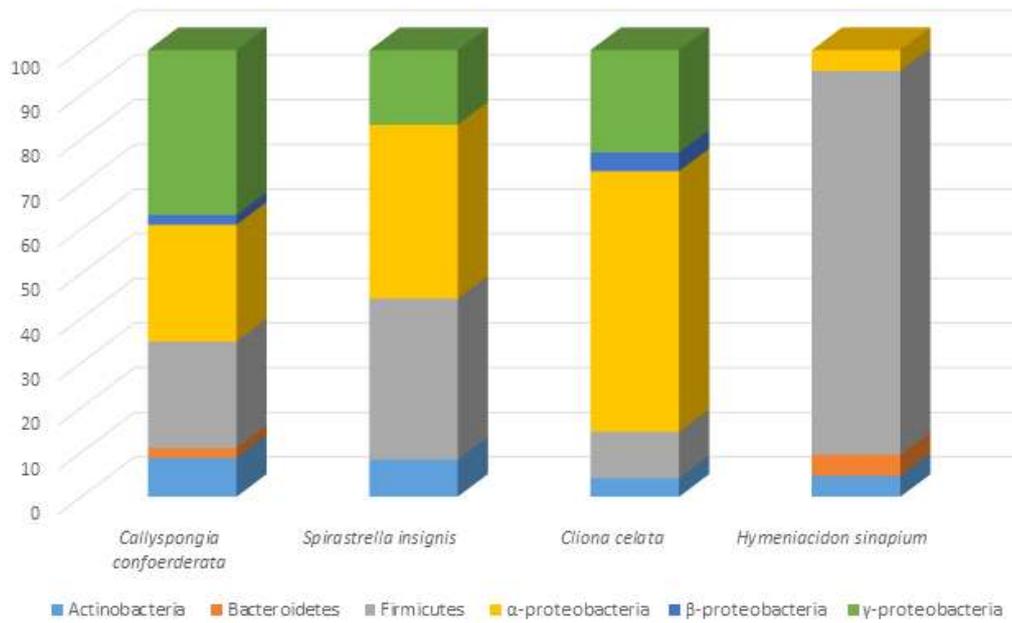


Fig 1.13. Structure analysis of bacterial community isolated from each marine sponge.

### 1.3.3. 해면에서 분리된 신종후보균주의 분류학적 연구 및 동정

#### 1.3.3.1. 계통학적 분석

CE80<sup>T</sup>의 full-length 16S rRNA 유전자 염기서열은 1384 bp로 계통학적 분석 결과, *Labrenzia* 속의 *L. suaedae* YC6927<sup>T</sup> (98.3%), *L. alexandrii* DFL-11<sup>T</sup> (96.6%), *L. aggregata* IAM 12614<sup>T</sup> (96.6%), *L. marina manol18*<sup>T</sup> (96.5%) 그리고 *L. alba* CECT 5094<sup>T</sup> (96.2%) 의 종과 가장 가까운 염기서열 유사도를 나타냈다. 계통수는 다음 그림 1.14와 같이 나타났다.

또한 CE80<sup>T</sup>의 Draft assembled genome size는 4,737,804 bp로 7개의 contig를 가지고 있었고, N50 length는 2,393,935 bp를 나타냈다. CE80<sup>T</sup>와 표준균주 *L. suaedae* YC6927<sup>T</sup> 사이의 ANI 값은 83.7%로 종 동정시 기준이 되는 95-96% 값보단 적게 나타났으며 [44], 신종임을 확인하였다.

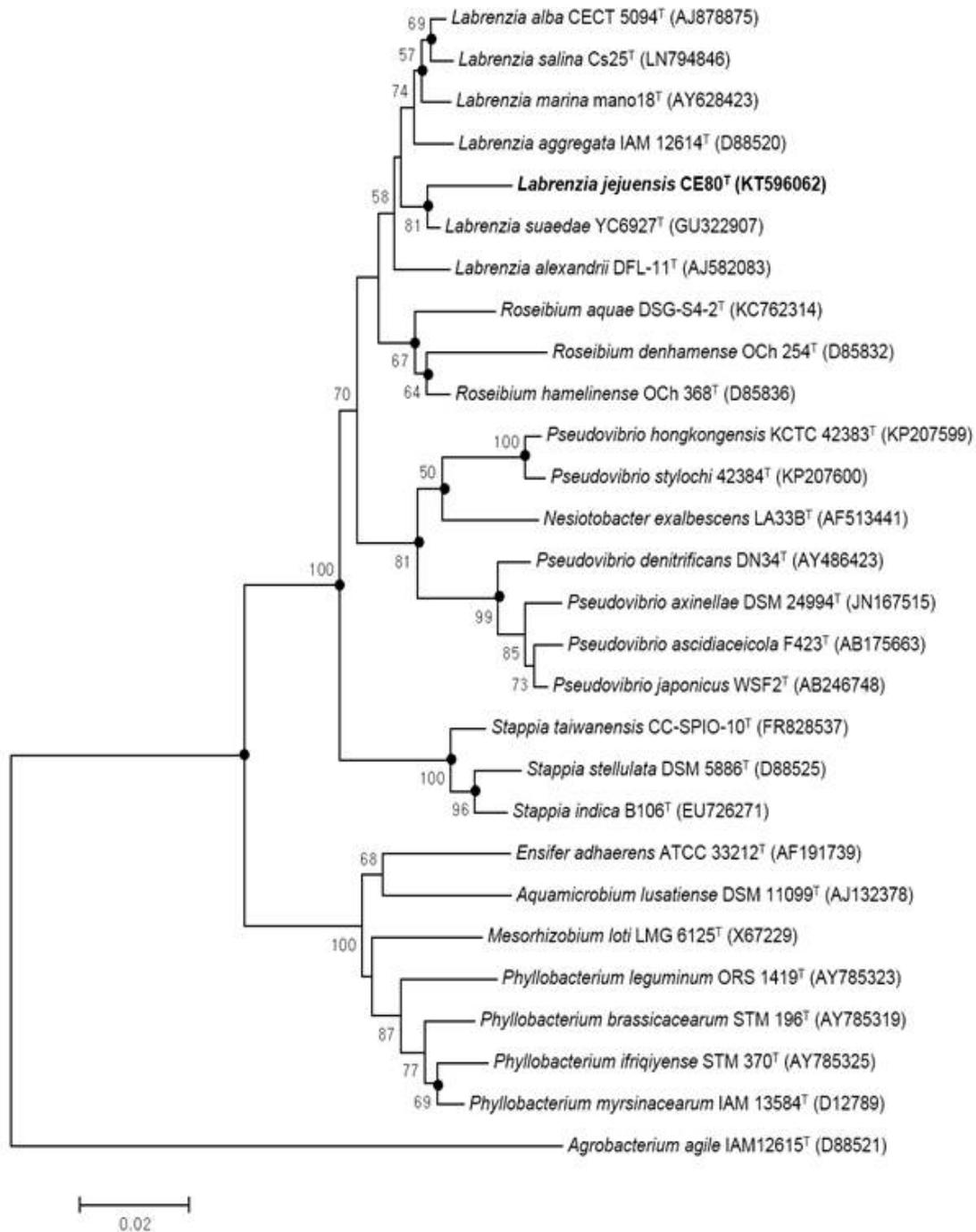


Fig 1.14. Neighbour-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA gene sequences, for strain CE80<sup>T</sup> and genus *Labrenzia*. *Agrobacterium agile* IAM 12615<sup>T</sup>(D88521) was used as an outgroup. Numbers at branch nodes are bootstrap percentages based on 1000 resamplings; only values greater than 50% are shown. Filled circles indicate branches found in phylogenetic consensus trees generated with the Maximum-Likelihood and Maximum-Parsimony method. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

### 1.3.3.2. 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특징

CE80<sup>T</sup>는 그람음성으로, 호기성이며 밝은 갈색의 색소를 가졌다. 간균으로 폭 0.56-0.74  $\mu\text{m}$ , 길이 1.5-2.7  $\mu\text{m}$ 의 크기로 운동성을 가지고 있다 (그림 1. 15). 생장온도는 10-37°C의 범위로 나타났으며 최적온도는 25°C이다. 생장 가능한 pH 범위는 5.0-11.0이며 최적 pH는 7.5이며, 생장 NaCl의 범위는 1-5% (w/v)로 최적 NaCl은 1-3%로 나타났다. CE80<sup>T</sup>와 표준균주에 대한 형태학적 및 생리학적 결과를 표 1.13에 비교하여 나타냈다.

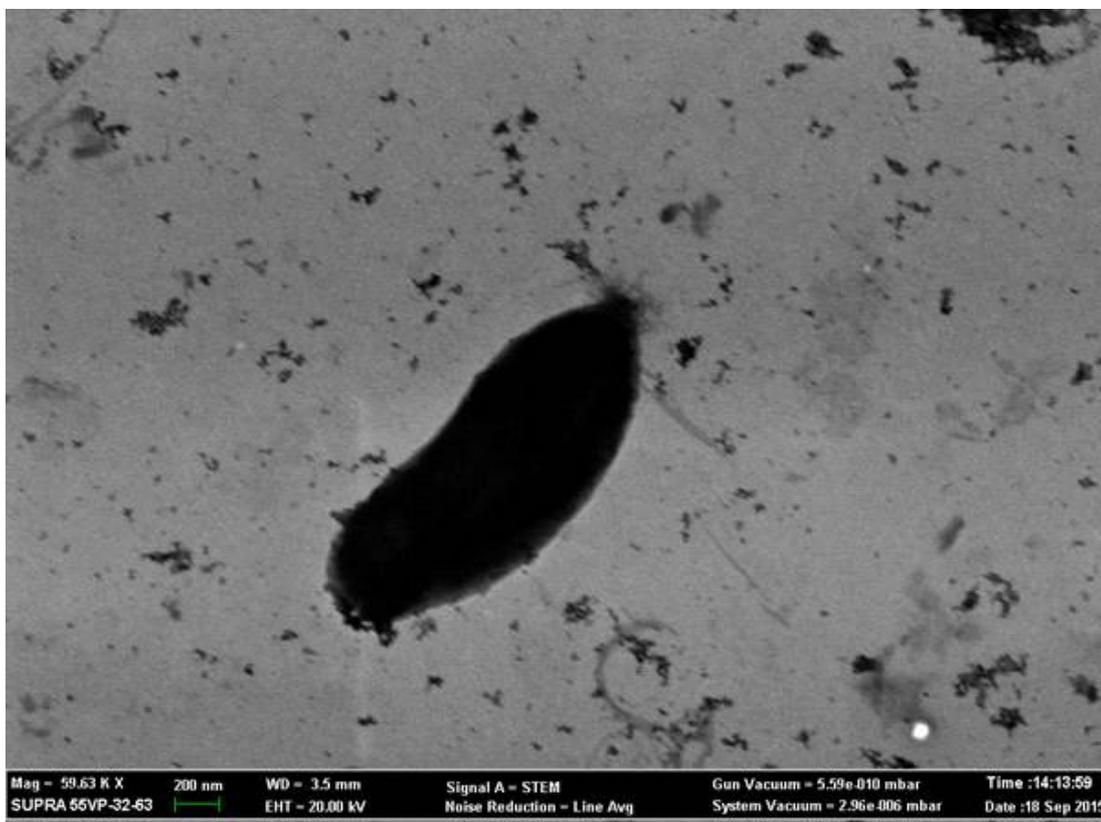


Fig 1.15. Transmission electron micrograph of cells of strain CE80<sup>T</sup>

**Table 1.13. Comparisons of phenotype characteristics of strain CE80<sup>T</sup> and closely related type strains of the genus *Labrenzia*.** Strains: 1, Strain CE80<sup>T</sup>(this study); 2, *L. suaedae* KACC 13772; 3, *L. marina* KCTC 12288<sup>T</sup>; 4, *L. alba* DSM 18320<sup>T</sup>; 5, *L. aggregate* KACC 15203<sup>T</sup>; 6, *L. alexandrii* DSM 17067<sup>T</sup>. All strains are positive for motility, oxidase, catalase, reduction of nitrates to nitrites, hydrolysis of gelatin, assimilation of  $\beta$ -galactosidase, activities of alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, cysteine arylamidase, trypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and  $\alpha$ -galactosidase. All strains are negative for: hydrolysis of starch, casein, Tween 20, 60, cellulose, indole production, glucose fermentation; arginine dihydrolase, assimilation of D-maltose, caprate, adipate, phenylacetate; lipase (C14) and Naphthol-AS-BI- $\beta$  D-glucuronide activities.

Characteristic	1	2	3	4	5	6
<b>Growth at/with</b>						
0% NaCl	-	+	-	-	+	-
10% NaCl	-	-	-	-	+	-
<b>Hydrolysis of :</b>						
DNA	+	-	+	+	-	-
Aesculin	-	+	+	+	+	+
<b>API ZYM</b>						
Cystine arylamidase	+	+	+	-	-	+
$\alpha$ -chymotrypsin	-	+	-	-	-	+
$\beta$ -glucuronidase	-	+	-	+	-	-
$\alpha$ -glucosidase	-	+	+	+	-	+
$\beta$ -glucosidase	-	+	-	-	-	-
N-acetyl-b-glucosamidase	-	+	+	+	-	-
$\alpha$ -mannosidase	-	+	-	+	-	-
$\alpha$ -fucosidase	-	+	-	-	-	-
<b>API 20NE</b>						
D-Glucose	-	+	-	-	-	+
D-Arabinose	-	+	-	-	-	+
D-mannose	-	+	-	-	-	+
D-Mannitol	-	+	-	-	-	+
N-acetyl-D-glucosamine	-	+	-	-	-	+
Gluconate	-	+	-	-	-	+
malate	-	+	-	-	-	+
Citrate	-	+	-	-	-	+
<b>Presence of pufLM genes</b>	-	+	+	ND	-	+
<b>presence of SQDG</b>	-	-	+	**	**	**
<b>DNA G+C content</b>	55.9	58.5*	60*	ND	59*	56*

\*Date taken from Bibi et al. (2014)

#### 1.3.3.3. *pufLM* genes

*pufLM* 유전자의 존재는 광합성 반응 센터를 합성하는 능력을 평가할 수 있다. CE80<sup>T</sup>에 대해 *pufLM* 유전자를 확인하기 위해 특정 primer를 사용하였지만 검출되지 않았다. 이 결과는 *L. alexandrii*, *L.marina*, *L.suaedae*, 그리고 *L. salina* 연구서 밝혀진 것처럼 광합성 반응센터가 본 균주에서는 기능하지 못할 수 있음을 보여주었다 [12,13,14,20].

#### 1.3.3.4. 화학분류학적 특성

CE80<sup>T</sup> 균주의 지방산 분석 결과, C<sub>18:1</sub> ω7c (66.7%), summed feature 2 (C<sub>14:0</sub> 3-OH/ iso-C<sub>16:1</sub> I) (10.2%), C<sub>18:0</sub> (4.7%) 11-methyl C<sub>18:1</sub> ω7c (4.4%), C<sub>20:1</sub> ω7c (2.6%), 그리고 C<sub>18:0</sub> 3-OH (2.2%)이다. CE80<sup>T</sup>와 표준균주 *L. suaedae* YC6927<sup>T</sup>의 주요 지방산은 C<sub>18:1</sub> ω7c와 summed features 2로 나타났으며, CE80<sup>T</sup>에서는 C<sub>18:1</sub>ω9c과 C<sub>20:1</sub> ω7c이 검출됐지만 *L. suaedae* YC6927<sup>T</sup>서는 나타나지 않았다 (표 1.14). 퀴논은 ubiquinone 10 (Q-10)이다.

CE80<sup>T</sup>의 주요 polar lipid는 diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylmonomethylethanolamin (PMME), 1개의 unknown aminolipid, 1개의 unknown phospholipid, 그리고 4개의 unknown lipids가 검출되었다 (그림 1.16). *Labrenzia* 속의 그룹에서 대부분 비슷한 패턴의 polar lipid가 나타났다. Sulphoquinovosyldiacylglyceride (SQDG)의 검출은 *Labrenzia* 속의 특징이라고 볼 수 있다. 본 연구에서 2개의 표준균주와 동시에 polar lipid 실험을 진행하였을 때 CE80<sup>T</sup>와 *L. suaedae* YC6927<sup>T</sup>에서는 SQDG가 검출되지 않았으며, *L. marina* KCTC 12288<sup>T</sup>에서는 SQDG가 검출되었다 (그림 1.17).

CE80<sup>T</sup>의 DNA G+C content는 55.9 mol%이며, 기존에 밝혀진 *Labrenzia* 속의 그룹보다 낮게 나타났다[78, 79, 80, 85, 86]. CE80<sup>T</sup>와 표준균주의 DNA-DNA 혼성화는 56.1±2.8값으로 나타났으며, 이 값은 70% 미만일 때 신종으로 간주하는 조건에 충족하였다 [45]. 계통학적, 표현형질, 생화학적, 화학분류학적 분석 결과, CE80<sup>T</sup>는 *Labrenzia* 속의 새로운 종임을 확인하였고, *Labrenzia callyspongiae* sp. nov., 라고 명명하였다.

Table 1.14. Cellular fatty acid compositions (%) of strain CE80<sup>T</sup> and closely related type strains of the genus *Labrenzia*. Strains: 1, strain CE80<sup>T</sup> (this study); 2, *L. suaedae* KACC 13772<sup>T</sup>; 3, *L. marina* KCTC 12288<sup>T</sup>; 4, *L. alba* DSM 18320<sup>T</sup>; 5, *L. aggregate* KACC 15203<sup>T</sup>; 6, *L. alexandrii* DSM 17067<sup>T</sup>. All data were obtained from this study. Values are percentages of total fatty acids (less than 2% are not show); tr, Traces (<2.0%); -, not detected.

Fatty acid	1	2	3	4	5	6
<b>Saturated</b>						
C <sub>10:0</sub>	tr	2.1	tr	tr	tr	tr
C <sub>16:0</sub>	tr	2.1	tr	tr	tr	tr
C <sub>18:0</sub>	4.7	tr	6.2	6.4	3.5	3.2
<b>Unsaturated</b>						
C <sub>18:1</sub> $\omega$ 7c	66.8	66.4	55.9	70.5	69.9	67.7
C <sub>20:1</sub> $\omega$ 7c	2.6	-	4.7	7.5	7.4	14.3
11-methyl C <sub>18:1</sub> $\omega$ 7c	4.5	3.2	9.9	6.8	8.0	5.7
Cyclo C <sub>19:0</sub> $\omega$ 8c	-	-	6.2	-	-	-
<b>Hydroxy</b>						
C <sub>18:0</sub> 3-OH	2.3	6.7	2.0	tr	tr	tr
<b>Summed features</b>						
2	10.3	8.8	3.1	3.7	4.1	3.7
3	tr	tr	8.5	-	tr	tr

\*Summed features represent groups of two or three fatty acids that cannot be separated by gas chromatography with the MIDI system. Summed features 2 comprised C14:03-OH and/or iso-C16:11:3, C16:1 $\omega$ 7c and/or iso-C15:02-OH.

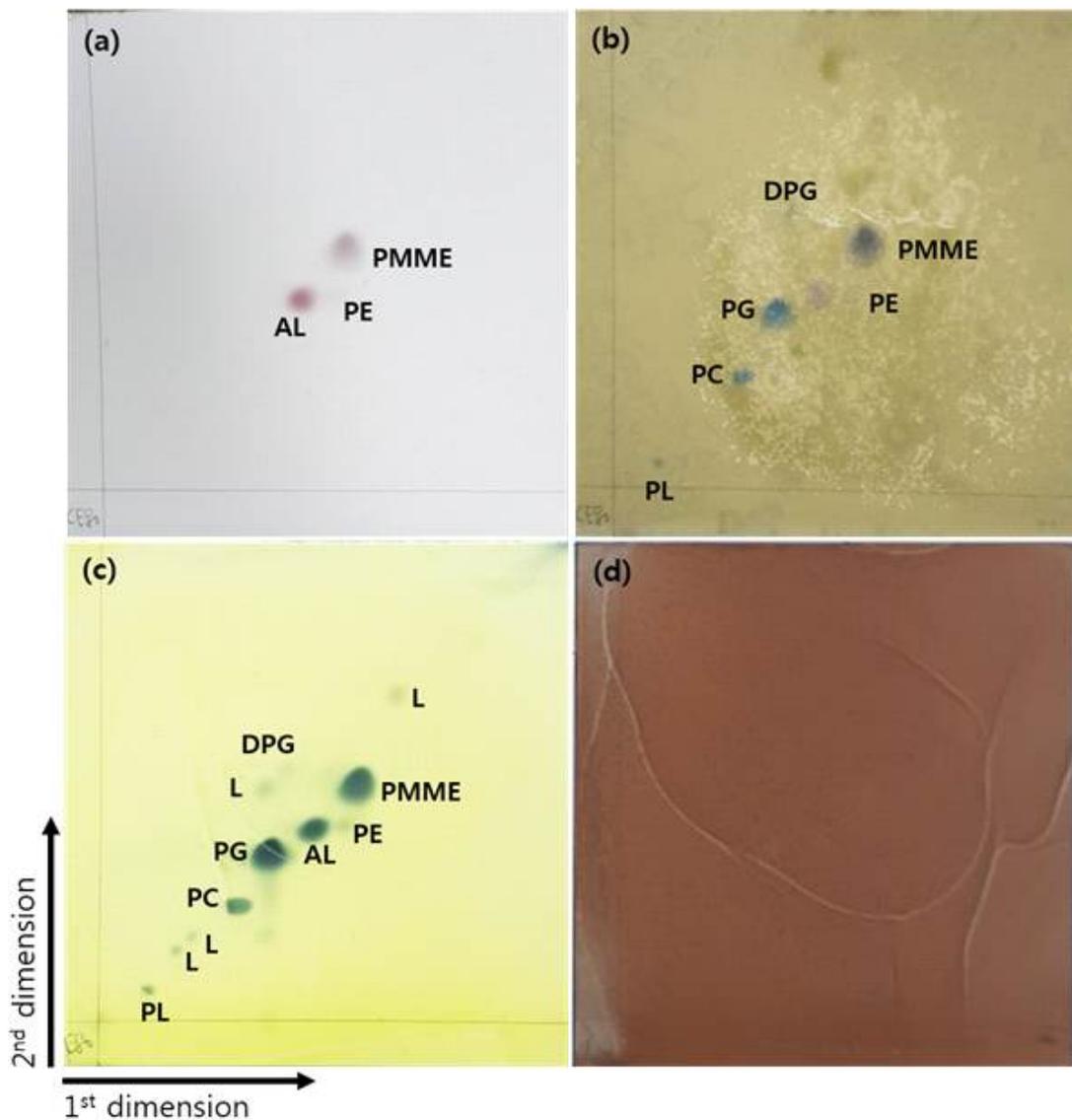


Fig 1.16. Polar lipid profiles of strain CE80<sup>T</sup> were detected with a), ninhydrin reagent; b), zinzadze reagent; c), molybdophosphoric acid reagent; d),  $\alpha$ -naphthol reagent. Two-dimensional TLC plate patterns of the total polar lipids of 1, strain CE80<sup>T</sup>; 2, *L. suaeda* KACC 13772<sup>T</sup>; 3, *L. marina* KCTC 12288<sup>T</sup>. DPG, Diphosphatidylglycerol; PC, phosphatidyl- choline; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PMME, phosphatidylmono-methylethanolamin; AL, unknown amino lipids; PL, unknown phospholipid; L, unknown lipids.

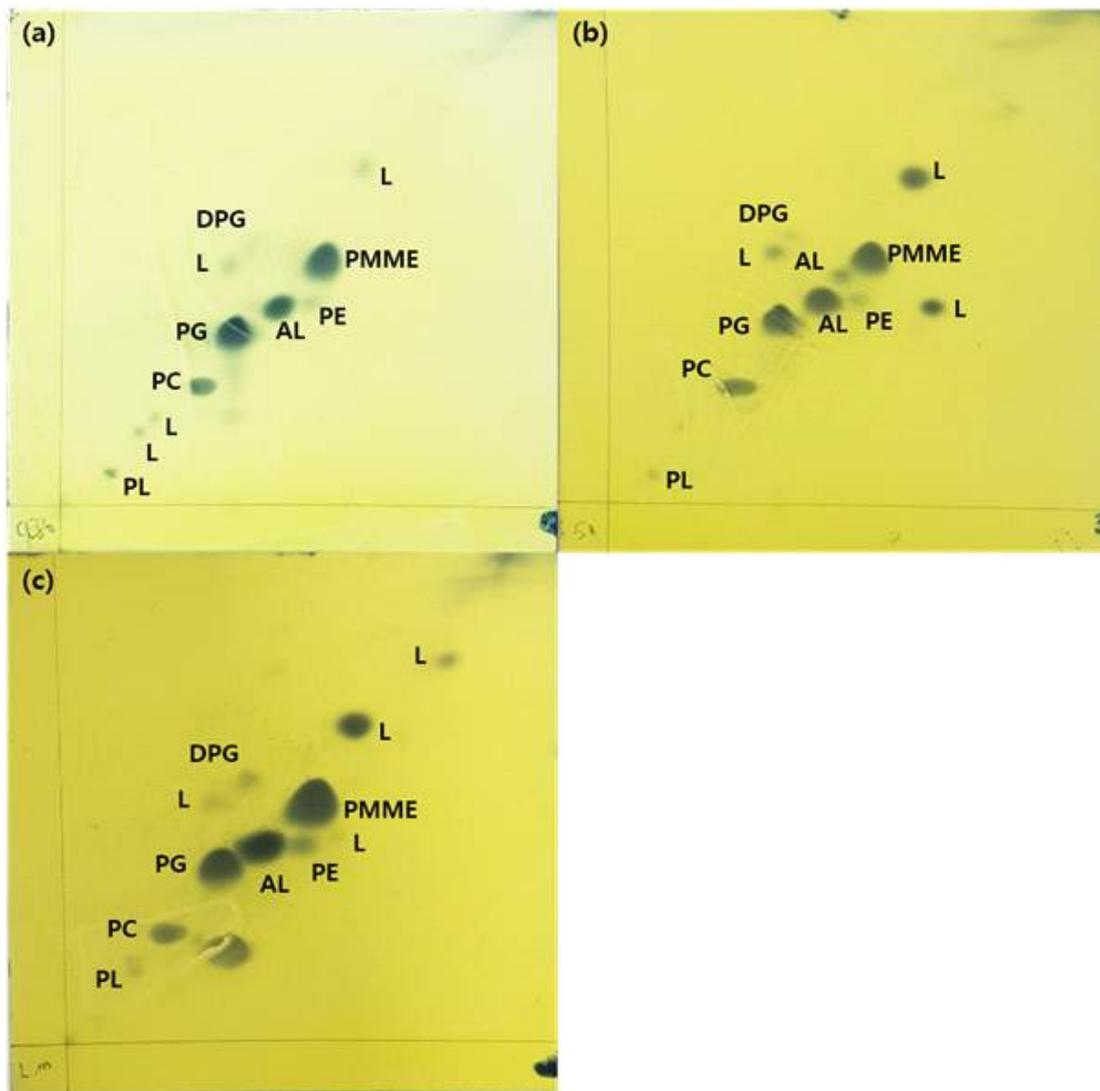


Fig 1.17. Two-dimensional TLC plate patterns of the total polar lipids of strain CE80<sup>T</sup> and related species. (a), CE80<sup>T</sup>; (b), *L. suaedae* KACC 13772<sup>T</sup>; (c), *L. marina* KCTC 12288<sup>T</sup>. DPG, Diphosphatidylglycerol; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidyl-ethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PMME, phosphatidylmono-methylethanolamin; SQDG, sulphoquinovosyldiacylglyceride; AL, unknown amino lipids; PL, unknown phospholipid; L, unknown lipids.

#### 1.3.3.5. 균주기탁

CE80<sup>T</sup>는 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)와 Japan Collection of Microorganisms (JCM)에 기탁하여 기탁번호 KCTC 42849<sup>T</sup>, JCM 31309<sup>T</sup>를 각각 부여받았다.

#### 1.3.3.6. GenBank Accession Number

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA gene sequence and whole genome sequence of *Labrenzia callyspongiae* CE80<sup>T</sup> are KT596062 and WAJT00000000.

#### 1.3.4. Description of *Labrenzia callyspongiae*. nov.

*Labrenzia callyspongiae* (cal.ly.spon'gi.ae. N.L. gen. n. callyspongiae of the sponge *Callyspongia*).

Strain CE80<sup>T</sup> are Gram-negative, aerobic and exhibited gliding motility. The colony were light-brown, rod-shaped, approximately 0.56-0.74  $\mu\text{m}$  wide and 1.51-2.69  $\mu\text{m}$  long and translucent after 3 days of incubation at 25°C on MA. Growth occurs at 10-37°C (the optimum temperature is 25°C), pH 5.0-11.0 (the optimum pH is 7.5) and in the 1-5% of NaCl (w/v) (optimum at 1-3%, w/v), respectively. The catalase and oxidase test are positive. Nitrate Reduced to nitrite. Positive for hydrolysis of gelatin, Tween 80, urea and DNA but starch, casein, cellulose, aesculin, Tween 20, 40 and 60 was negative. In the 20NE tests, positive for assimilated of  $\beta$ -galactosidase, but indole production, glucose fermentation, arginine dihydrolase, assimilated of D-glucose, D-arabinose, D-mannose, D-mannitol, N-acetyl-D-glucosamine, D-maltose, gluconate, caprate, adipate malate, citrate and phenylacetate are negative. In the API ZYM tests, alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucinearylamidase, valinearylamidase, cysteine arylamidase, trypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -galactosidase are present, but lipase (C14),  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosamidase,  $\alpha$ -mannosidase and  $\alpha$ -fucosidase are absent. The main fatty acids of strain CE80<sup>T</sup> are C<sub>18:1</sub>  $\omega$ 7c, and Summed feature 2. The polar lipids were profile consists of were diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylmonomethylethanolamin (PMME), one unidentified aminolipid (AL), one phospholipid (PL) and four unidentified lipids (L). The major respiratory lipoquinone was ubiquinone 10 (Q-10) and the DNA G+C content is 55.9

mol %.

The type strain, CE80<sup>T</sup> (=KCTC 42849<sup>T</sup>=JCM 31309<sup>T</sup>), was isolated from marine sponge *Callyspongia elegans* in the Jeju Island, Republic of Korea.

## 제 2장. 해면에서 분리된 세균의 어류질병에 대한 항균활성 탐색 및 프로바이오틱스 특성 연구

### 2.1. 서론

많은 해면의 미생물 중 일부로 *Bacillus* 종이 알려져 있다 [46-49]. *Bacillus*는 다양한 생물 활성 화합물을 생산하는 능력으로 잘 알려져 있다 [50,51]. 내생 포자 형성 박테리아인 *Bacillus*는 발효 식품 제조에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 양식업에서 Probiotics로 광범위하게 사용되고 있다 [8-11, 46-56]. 해양 스펀지에서 분리된 생물활성물질을 생산하는 *Bacillus*에 관한 많은 연구에도 불구하고, 항균물질에 관한 성공적인 동정은 미비한 실정이다 [57-59].

해양 환경으로부터의 새로운 항균성 화합물에 대한 연구는 항생제에 대한 광범위한 내성 및 새로운 약물 내성 병원체에 출현을 계기로 이루어졌다 [60]. 항균제는 일반적으로 토양 유래 미생물에서 발견되어 왔지만, 해양 유기체, 특히 해양 스펀지에서 분리된 생물 활성 대사산물의 수는 최근 몇 년 동안 급격히 증가했다 [1.8.9]. 또한 양식생물의 질병억제를 위해 사용되는 항생제 대신 친환경적이며 숙주의 성장률 및 선천성 면역에 효과가 있다고 알려진 Probiotics의 관심이 높아지고 있다 [61].

최근 어류양식분야에서는 Probiotics를 양식현장에 적용하여 영양분의 소화 및 흡수를 돕고, 사육수의 수질을 개선시키며 수산자원의 대량 생산 및 친환경적인 양식에 이바지하고 있다 [62-65]. Probiotics 균주는 용혈능이 없어야 하며, 유해물질 생산 가능성이 낮아야 하며 안전성을 갖춰야한다 [66]. 또한 체내에 유입되어 식도와 위장을 통과하는 동안 강한 산성인 위액과 쓸개즙 분해효소를 분비하여 소장 내에서도 생존이 가능해야한다. 또한 유해세균을 저해할 수 있는 항균물질을 생산해야한다 [67].

## 2.2. 재료 및 방법

### 2.2.1. 어류질병세균에 대한 항균활성 탐색

실험에 사용된 어류질병세균은 한국생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture; KCTC)에서 분양 받았다 (표 2.1). 분리된 균주가 어류질병세균에 대한 항균활성을 확인하기 위해 McFarland No. 0.5로 희석된 어류질병세균을 멸균된 면봉을 이용하여 Muller Hitone Agar (MHA, Difco, USA)에 도말하고, 멸균된 paper disc (8 mm)에 분리 균주의 배양액을 50  $\mu$ l씩 분주하여 건조시킨 후 접종하였다. 접종된 plate는 30°C에서 24-48시간 배양하여 투명환을 측정하였다.

Table 2.1. Fish pathogene and Experimental conditions used in antibacterial activity test.

Pathogenic strain	Strain No.	Growth conditions
<i>Edwardsiella tarda</i>	KCTC 12267	NA, 37°C
<i>Streptococcus iniae</i>	KCTC 3657	1.5% NaCl+BHIA, 37°C
<i>Streptococcus parauberis</i>	KCTC 3651	1.5% NaCl+BHIA, 37°C
<i>Vibrio alginolyticus</i>	KCTC 2472	MA, 25°C
<i>Listonella anguillarum</i>	KCTC 2711	MA, 25°C
<i>Vibrio harveyi</i>	KCTC 12724	MA, 25°C
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCTC 2729	MA, 25°C
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	KCTC 2734	MA, 25°C

Table 2.2. Composition of *E. tarda* media (NA)

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

Table 2.3. 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

### 2.2.2. 용혈성 및 유해효소 생성

항균활성이 나타는 분리균주의 용혈성 여부를 확인하기 위해 sheep blood agar에 streaking하여 30°C에서 48시간 배양하여 균체의 주위에 투명환을 확인하였다. 균체 주변의 투명환의 종류에 따라  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 로 구별하여 측정하였다. urea가 첨가된 배지에 접종된 균주 주변에 적색으로 변했을 경우 양성으로 판정하였다.

### 2.2.3. pH, NaCl, 온도

분리균주의 생장 pH의 범위에 대해 알아보기 위해 TSB 배지에 1 N HCl과 0.1 M NaOH로 pH 4.0-12.0으로 조정하였고, agar (15 g/L)를 첨가하여 고체배지로 제조하였다. 고체배지에 분리균주를 접종하여 생육을 관찰하였다.

NaCl 생장범위를 확인하기 위해 0-10% (간격 1%씩) NaCl로 TSA에 첨가하여 배지를 제조하였고, 분리균주를 접종하여 생육을 관찰하였다.

배양조건은 모두 TSA에서 배양하였으며, 온도는 25°C에서 2-3일간 배양하였다. 분리균주의 생장온도 범위를 확인하기 위해 5-50°C (간격 5°C씩)에서 배양하여 확인하였다.

#### 2.2.4. 고분자 유기물질 분해능

분리균주의 유기물질 분해능을 확인하기 위해 TSA배지에 Casein, starch, Tween 20, 40, 60, 80, Urea, carboxymethylcellulose, DNase를 각각 1%씩 첨가하여 배지를 제조하였다. 각각의 배지에 분리균주를 접종하여 배양한 뒤 25°C에서 48시간 배양한 뒤 분해능을 확인하였다.

DNA 분해능 실험은 DNase agar배지에 분리균주를 접종하여 확인하였다. 분리균주가 접종된 plate에 1 N HCl를 분주하여 균주 주변의 투명환의 형성유무로 양성으로 판단하였다. 1% Skim milk가 첨가된 casein 배지에서 배양된 분리균주 주변에 투명대가 형성되는지를 확인하였다. 1% starch가 첨가된 배지에서 배양된 분리균주 주변에 iodine을 떨어뜨려 투명대가 나타난 경우 양성으로 판정하였다. Tween 20, 40, 60, 80 첨가배지에서는 접종된 균주 주변이 혼탁하게 변한 경우 양성으로 판정하였다. cellulase 생성여부를 확인하기 위해서는 분리균주가 배양된 배지에 0.1% congo red 용액으로 염색한 뒤 1M NaCl로 세척하여 균주 주변의 투명대 형성을 확인하였다.

#### 2.2.5. 인공위액과 인공담즙에서의 생존력

분리균주의 인공위액과 인공담즙의 내성을 확인하기 위해 다음과 같이 실험하였다. 우선 TSB 배지에 분리균주를 접종하여 25°C, 120 rpm으로 48시간 배양하였다. 배양액을 원심분리(12,000 rpm, 4°C)를 10분간 하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 PBS로 2회 원심분리하여 세척하였고, O.D값이 0.4가 되도록 현탁하여 사용하였다.

인공위액의 내성을 확인하기 위해, 0.85% NaCl에 1 N HCl을 첨가하여 pH를 2.0, 3.0으로 조정하여 각각 3 mg/ml의 농도로 pepsin을 첨가하였다. 제조된 인공위액 1 ml에 현탁한 균체를 100 µl 첨가하여 30°C에서 3시간 배양하여 TSA 배지에 100 µl씩 도말하여 생존율을 확인하였다.

인공담즙산에 대한 내성을 확인하기 위해 TSB의 pH 4.0으로 조정된 뒤 Bile salt를 0.5%, 1%, 2% 각각 첨가하였고, 균주를 1% (배양액 100 µl) 접종하여 25°C에서 3시간 동안 배양하여 TSA 배지에 100 µl씩 도말하여 생존율을 확인하였다.

#### 2.2.6. API 50CHB 실험

분리균주의 효소활성과 carbohydrates의 산화, 발효 등 탄수화물 대사를 검사하기 위해 API 50CHB Strip을 사용하였다. API 50CHB는 49가지의 탄수화물의 발효여부를 연구하는데 사용된다. strip에 pH indicator가 들어 있어 색의 변화로 결과를 판독할 수 있다. Sterile saline 1 ml에 균을 탁도가 매우 진하게 현탁하고, API 0.85% NaCl medium (5 ml)과 API 50CHB/E medium 10 ml에 현탁액을 첨가하여 2 McFarland로 맞춰준다. 현탁액이 첨가된 API 50CHB/E medium은 50CH strip 튜브에 분주하여 30°C에서 24-48시간동안 호기적으로 배양시키고 결과를 판독하였다.

### 2.2.7. 항생제 감수성 시험

분리균주의 항생제 감수성 시험하기 위해 디스크 확산법 (Disc diffusion method)을 사용하였다. 분리균주를 액체배지에 배양하고, 배양된 균을 MacFarland 0.4 농도로 맞춘 뒤, TSA배지에 멸균된 면봉을 이용하여 도말하였다. 분리균주가 도말된 배지에 항생제 paper disc를 올려놓고 25°C에서 24시간 배양하여 항생제 감수성을 조사하였다. 사용된 항생제는 다음 표 2.4와 같다.

Table 2.4. Antibiotic resistant and sensitivity of selected strains.

Antibiotic substance	Concentrations
Ampicillin (10 ug)	10 ug
Lincomycin (2 ug)	2 ug
Sterptomycin (10 ug)	10 ug
Tetracycline 30 ug)	30 ug
Polymyxin B (300 IU)	300 IU
Gentamicin (10 ug)	10 ug
Kanamycin (30 ug)	30 ug
Neomycin (30 ug)	30 ug
Chloramphenicol (30 ug)	30 ug
Novobiocin (30 ug)	30 ug
Erythromycin(15 ug)	15 ug
Oxytetracycline (30 ug)	30 ug

#### 2.2.8. 물질 분석

분리균주의 항균성 물질을 분석하기 위해 2 L의 TSB 배지에 균주를 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 36시간 배양하였다. 균체를 제거하기 위해 12,000 rpm에서 원심분리 하였으며, 배지 상층액은 동량의 유기용매인 에틸아세테이트 (ethylacetate)를 이용하여 3회 추출하였다. 추출액은 40°C 내 수조에서 감압농축하였다. LC-MS 분석조건은 acetomitrile과 물을 이용하여 LC를 수행하였다. 표준 물질로 surfactin (Sigma, USA)를 사용하였다.

## 2.3. 결과 및 고찰

### 2.3.1. 어류질병세균에 대한 항균활성 탐색

해면 4종에서 분리된 분리균주에서 어류질병세균에 대한 항균활성을 측정하였다. 어류질병세균은 *S. parauberis*, *S. iniae*, *E. tarda*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *Pho. damsela*로 총 8 균주를 사용하였다. 어류질병에 대한 넓은 항균 스펙트럼을 가지고 활성이 높은 총 20 균주의 분리균주를 선발하였다. 항균활성 결과는 표 2.5와 같다.

해면에서 분리된 세균의 어류질병 세균에 대해서 항균활성 실험 결과, 20 균주가 항균활성을 가지는 것으로 나타났으며, 대부분은 Firmicutes (11 균주), Actinobacteria (5 균주), Alpha-proteobacteria (2 균주), Gamma-proteobacteria (2 균주)였다. 어류질병에 대한 항균활성 조사 결과, 총 항균활성이 가장 많은 세균그룹은 Firmicutes로 *Bacillus* sp. 와 *Paenibacillus* sp. 으로 이루어졌다.

특히, PPR15<sup>T</sup> 균주는 *E. tarda*에 대해서 17 mm, *S. iniae*에 대해선 25 mm, *S. parauberis*에 대해서 21 mm, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*에 대해서 20 mm의 억제환이 나타났다.

Table 2.5. Antimicrobial Activity of Sponges Isolated against fish disease pathogens.

1, *S. parauberis*; 2, *S. iniae*; 3, *E. tarda*; 4, *V. alginolyticus*; 5, *V. anguillarum*; 6, *V. harveyi*; 7, *V. parahaemolyticus*; 8, *Pho. damsela*.

Strain	Clear zone (mm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
JCR 2	18	18	-	-	-	23	17	-
JCR 3	-	17	16	-	-	-	13	-
JCR 12	-	16	15	-	-	-	-	-
JCR 16	-	19	16	-	-	-	-	-
JHR 17	14	15	14	-	-	-	-	-
JHR 18	18	22	20	13	11	19	24	20
JHR 19	21	27	23	13	17	13	24	16
JHR 20	18	19	22	-	-	-	-	-
SIM 2	20	16	-	-	-	-	21	16
SIM 5	28	21	11		15	13	22	18
SIR 1	26	23	13	13	13	15	24	22
SIR 2	26	23		12	15	12	21	25
SIR 8	20	24	18	-	-	12	18	13
SIT 6	26	22	14	-	11	12	15	22
SIT 7	24	17	13	-	-	11	15	24
PPR 2	25	22	-	13	-	14	24	25
PPR 7	20	24	12	-	-	11	11	20
PPR 8	15	17	-	10	-	12	15	14
PPR 15	21	25	17	-	10	15	15	20
PPT 8	-	18	21	-	-	-	-	-

### 2.3.2. 용혈성과 유해효소 생성여부 확인

Probiotics으로서 적합성을 확인하기 위해 본 연구에서는 항균활성이 나타는 분리균주에서 용혈독 생성 여부를 확인하기 위해 sheep blood agar에 streaking하여 30°C에서 48시간 배양한 결과 선별된 20 균주 중 11 균주가  $\beta$ -용혈독을 생성하였으며, 2 균주는  $\alpha$ -용혈독, 7 균주는  $\gamma$ -용혈독을 생산하는것을 확인하였다.

또한 유해효소인 urease는  $\beta$ -용혈독을 생성하는 11 균주에서 모두 나타났다 [표 2.6].

Probiotics 안정성 평가에서 용혈능은 균주의 선택 과정에서 중요한 요건이다. 용혈은 미생물에 의해 만들어지는 독성물질로 병원성 미생물에 빈번하게 나타나는 경우도 있다 [68].  $\alpha$ -용혈독과  $\beta$ -용혈독을 생성하는 동시에 urease와 같은 유해효소를 생성하는 균주를 제외한 7 균주를 선별하여 고분자 유기물질 분해능 시험, 내산성, 내염성, 내열성 실험을 진행하였다.

### 2.3.3. 고분자 유기물질 분해능 시험

선별균주에 대한 고분자 유기물질 분해능 결과는 다음과 같이 표 2.6에 나타냈다. TSA 배지에 Starch, casein, DNA, cellulose, Tween 20, 40, 60, 80을 첨가하여 선별한 균주를 접종하여 고분자 유기물질 분해능에 관련된 DNase, cellulase, amylase, protease, lipase 효소 활성이 있는지 조사하였다.

Casein의 가수분해능은 선별한 20 균주 중 16 균주에서 양성반응을 보였다. cellulose 분해능은 14 균주에서 활성이 나타났다. Starch, DNase는 SIR8, PPR15, PPT7의 3 균주에서, SIR8, PPR15, PPT8의 3 균주에서만 활성이 나타났다. 또한 Tween 20, 40, 60, 80 모두 분해하는 균주는 SIT6, SIT7로 2 균주에서 나타났다. Protease, amylase, cellulase, Dnase, lipase 생성하는 균주는 SIR8, PPR15로 *Bacillus* sp. 으로 확인되었다. *Bacillus*는 Probiotics로서 소화와 면역을 촉진한다는 연구 결과가 있으며, Probiotics로 잘 알려진 *Bacillus subtilis*는 당 분해효소, 리파아제 등 다양한 효소를 생산할 수 있으며 이로 인해 숙주의 자연적인 소화활동에 도움을 주는 것으로 알려져 있다 [69-70].

Table 2.6. Evaluation of enzymes activity for organic matters and haemolytic activity in selected bacteria isolated from each marine sponge.

Isolate	Hemolysis	Urea	Starch	Casein	DNase	Cellulose	Tween20	Tween40	Tween60	Tween80
JCR2	$\beta$	+	-	+	-	+	-	-	-	-
JCR3	$\alpha$	-	-	-	-	-	+	+	+	-
JCR12	$\alpha$	-	-	+	-	+	-	-	-	-
JCR16	$\gamma$	-	-	-	-	+	+	-	+	+
JHR17	$\gamma$	-	-	-	-	-	+	+	+	-
JHR18	$\beta$	+	-	+	-	+	+	-	+	-
JHR19	$\beta$	+	-	+	-	+	+	+	+	-
JHR20	$\gamma$	+	-	-	-	-	+	+	+	+
SIR1	$\beta$	+	-	+	-	-	-	-	-	-
SIR2	$\beta$	+	-	+	-	-	+	+	-	-
SIR8	$\gamma$	-	+	-	+	+	-	+	+	+
PPR2	$\beta$	+	-	+	-	+	-	-	-	-
PPR7	$\gamma$	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PPR8	$\beta$	+	-	+	-	-	-	-	+	-
PPR15T	$\gamma$	-	+	+	+	+	-	-	-	-
SIM2	$\beta$	-	-	+	-	+	+	-	-	-
SIM5	$\beta$	+	-	+	-	+	+	-	-	-
SIT6	$\beta$	+	-	+	-	+	+	+	+	+
SIT7	$\beta$	+	-	+	-	+	+	+	+	+
PPT8	$\gamma$	-	-	+	+	-	-	-	-	-

#### 2.3.4. pH, NaCl, 온도

용혈성 시험에서  $\alpha$ -,  $\beta$ - 용혈독을 생성하는 균주를 제외한 7 균주의 NaCl, pH, 온도에 대한 생장 특성 결과는 다음 표 2.7-2.9에 나타냈다.

대부분의 선별균주는 0% NaCl에서 잘 자랐지만, 1%-10% 농도의 NaCl에서는 자라지 않았다. PPR15 균주에서만 1-10% NaCl가 첨가된 배지에서 모두 배양되었다. 또한 PPR7과 SIR8는 1-7% NaCl 범위에서 생장을 확인할 수 있었다.

Probiotics의 조건으로 산성조건의 pH에 생존이 가능해야한다. 실험 결과 선별균주 중 거의 6.0 이하에서는 생장이 관찰되지 않았다. PPR15 균주에서만 pH 4.0-pH 11.0에서 생장이 관찰되었으며, 이는 내산성과 내염기에 대한 내성이 우수한 것으로 보여진다.

선별균주의 대부분이 4°C에 자라지 않았으며, 대부분은 25-30°C에서 최적 온도를 알 수 있었다. 또한 최적 생장온도를 확인한 결과 PPR15 균주는 5-50°C의 넓은 온도에서 생장을 확인하였다. JCR16, JHR17, PPR7 균주는 10-35°C 범위에서 생장을 나타냈다.

Table 2.7. NaCl range for growth of selected strains.

Isolate	NaCl (%)					
	0	1	3	5	7	10
JCR 16	+	-	-	-	-	-
JHR 17	+	-	-	-	-	-
JHR 20	+	-	-	-	-	-
SIR 8	+	+	+	+	+	-
PPR 7	+	+	+	+	-	-
PPR 15	+	+	+	+	+	+
PPT 8	+	+	-	-	-	-

Table 2.8. pH range for growth of selected strains.

Isolate	pH							
	4	5	6	7	8	9	10	11
JCR 16	-	-	+	+	+	+	+	-
JHR 17	-	-	-	+	+	+	-	-
JHR 20	-	-	-	+	+	+	-	-
SIR 8	-	-	-	+	+	+	+	+
PPR 7	-	-	+	+	+	+	+	-
PPR 15	+	+	+	+	+	+	+	+
PPT 8	-	-	+	+	+	+	+	-

Table 2.9. Temperature range for growth of selected strains.

Isolate	Temperature(°C)									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
JCR16	W	+	+	+	+	+	+	-	-	-
JHR17	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
JHR20	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
SIR8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
PPR7	+	+	+	+	+	+	+	W	-	-
PPR15T	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PPT8	W	+	+	+	+	+	+	+	-	-

### 2.3.5. 인공위액과 담즙 내성

Probiotics로 적합하다고 판단한 PPR15, SIR8, PPR7 균주에 대해 인공위액과 담즙에 대한 생존력을 측정하였다. 그 결과로 표 2.10에 나타냈다.

Table 2.10. Resistance of selected strains to artificial bile acid and gastric juice.

Isolate	Bile salt (%)			pepsin (3mg/ml)	
	0.5	1	2	pH 2.0	pH 3.0
SIR 8	-	+	-	-	-
PPR 7	W	W	+	W	W
PPR 15	+	+	+	W	+

### 2.3.6. Probiotics 선정

어류질병에 대한 항균력, 용혈능, 고분자 유기물질 분해능, 온도, NaCl, pH, 인공위액, 인공담즙에 대한 생존능 결과를 토대로 *Bacillus megaterium* PPR15를 Probiotics 균주로 선정하였다. 선정된 *B. megaterium* PPR15 균주에 대한 탄수화물 분해능과 효소활성을 알아보기 위해 API 50CHB test를 진행하였다.

### 2.3.7. API 50CHB 실험

*B. megaterium* PPR15 균주의 효소활성과 당 이용능을 분석한 결과는 다음 표 2.11에 나타냈다. *B. megaterium* PPR15 균주는 starch, glucose, xylose, sucrose, manitol을 포함한 37종의 당을 이용하는 것을 확인하였고, Logan와 Berkeley [71], Aruwa와 Olatope [72] 보고한 *B. megaterium* 과 유사한 결과이다.

Table 2.11. Carbohydrates utilization of *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>. +, positive, -, negative.

Carbohydrate	Result	Carbohydrate	Result
Glycerol	+	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-arabinose	week	Maltose	+
L-arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-xylose	+	Sucrose	+
L-xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	+	Inulin	-
Methyl-B-D-Xylopyranside	-	Melezitose	+
Galactose	+	Raffinose	+
Glucose	+	Starch	+
Fructose	+	Glycogen	+
Mannose	+	Xylitol	-
Sorbose	+	Gentiobiose	+
Rhamnose	+	D-turanose	+
Dulcitol	+	D-lyxose	-
Inositol	+	D-tagatose	+
Mannitol	+	D-fucose	-
Sorbitol	+	L-fucose	+
Ethyl- $\alpha$ -,D-mannopyranside	-	D-arabitol	+
Methyl- $\alpha$ -,D-glucoside	+	L-arabitol	+
N-acethyl-glcusamine	+	Gluconate	-
Amygdalin	-	2-keto-gluconate	-
Arbutin	+	5-keto-gluconate	-
Esculin	+		

### 2.3.8. 항생제 감수성 시험

최종선별균주 *B. megaterium* PPR15 균주에 대해서 항생제 12종에 대한 감수성을 측정하였다. 측정결과 *B. megaterium* PPR15 균주는 Lincomycin에 내성을 가지는 것을 확인했으며, 나머지 11종에 대하여 생육이 저해됨을 확인하였다 [표 2.12]

Table 2.12. Antibiotics susceptibility of *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>.

Antibiotic substance	Susceptibility (mm)
Ampicillin (10 ug)	22
Lincomycin (2 ug)	-
Sterptomycin (10 ug)	20
Tetracycline 30 ug)	21
Polymyxin B (300 IU)	16
Gentamicin (10 ug)	27
Kanamycin (30 ug)	30
Neomycin (30 ug)	25
Chloramphenicol (30 ug)	30
Novobiocin (30 ug)	25
Erythromycin(15 ug)	30
Oxytetracycline (30 ug)	25

### 2.3.9. 배양액 물질분석

*B. megaterium* PPR15 균주의 배양액에서 항균물질 분석 결과, 지표물질 Surfactin과 동일한 위치에 피크 형성하였으며, 이는 분리균주 또한 surfacin 계열의 물질을 생산된다고 추측된다.

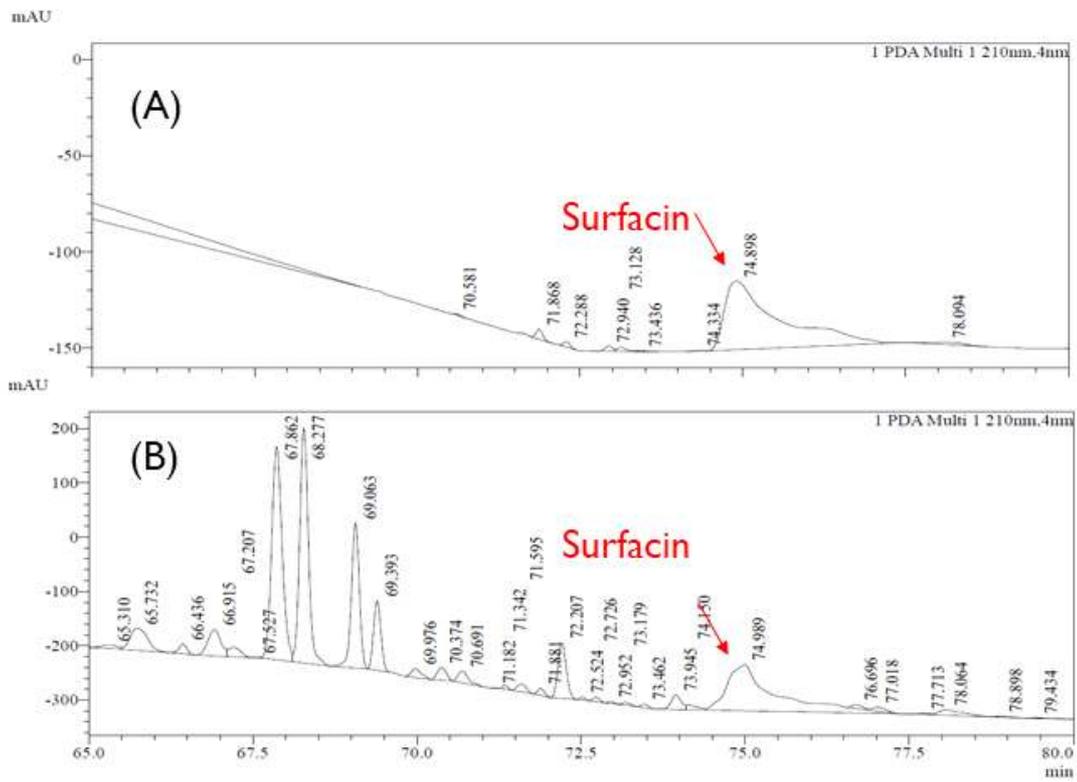


Fig 2.1. LC/MS analysis of (A) surfactin (B) components produced by the strain *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>.

### 2.3.10. 최종 선별균주 동정 및 계통수 작성

최종적으로 선정된 *B. megaterium* PPR15 균주는 보라예쁜이해면에서 분리된 균주로, 16S rRNA 염기서열 분석한 결과 1420 bp의 염기서열을 얻었으며, EZCloud와 NCBI BLAST search를 통해 *Bacillus megaterium* NBRC 15308<sup>T</sup>와 100%, *Bacillus aryabhatai* B8W22<sup>T</sup>과 99.86%, *Bacillus flexus* NBRC 15715<sup>T</sup>와 98.91%의 상동성을 확인했다. EzCloud에서 PPR15 균주와 가장 가까운 근연종의 염기서열을 비교 분석하여 계통수를 작성하였다 (그림 2.2).

해양에서 *Bacillus* sp.는 여러 해양생물에 존재하는 것으로 알려져 있다 [73-74]. 따라서 *B. megaterium* PPR15 균주를 신규 Probiotics 균주로서 적합함을 확인하였으며, *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>로 명명하였다. 이에 따라 넙치 사료첨가제로써의 가치가 있다고 사료되며, 생균제로서 개발을 위해 어류급이 실험을 수행하여 어류 성장에 미치는 효과, 선천성 면역 및 질병 저항성 등에 대한 추가실험을 진행하였다.

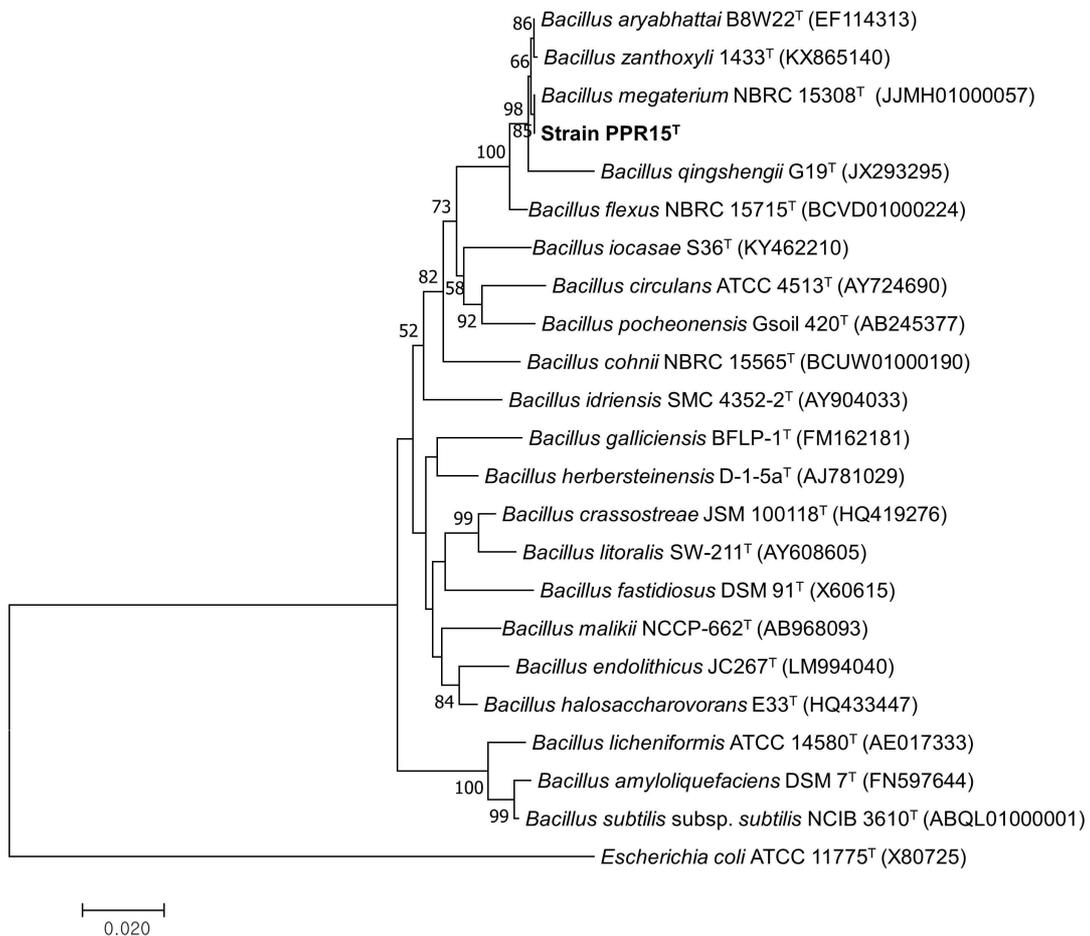


Fig 2.2. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S RNA gene sequences of strain PPR15<sup>T</sup> and other related taxa. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bootstrap value(>50%) based on 1,000 replications are shown. *Escherichia coli* ATCC11775<sup>T</sup> was used as an out-group. Bar, 0.02 nucleotide substitutions per nucleotide position.

### 제 3장. *Bacillus megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가사료를 급이시 넉치의 비특이적 면역반응과 질병저항성에 미치는 영향

#### 3.1. 서론

수산 양식업에서 질병발생은 주요 장애물이 된다 [75]. 질병을 통제하기 위해 화학적 요법인 항생제를 사용하였지만, 최근 항생제의 잔류 등 식량안전문제와 항생제 내성균주의 출현 등으로 항생제의 사용은 부정적인 영향을 미쳤다 [76-77].

또한 항생제 사용에 대한 엄격한 규제로 질병관리에 대한 친환경적인 개발에 관심이 높아졌으며, 질병 예방을 위해 항생제의 대체제로 친환경 대안으로 양식업에서 Probiotics의 사용이 중요해지고 있다 [78].

Probiotics는 적절한 양으로 투여 될 때 숙주에 건강상의 이점을 제공하는 살아 있는 미생물이며 [79], Reda and Selim [80]에서, Probiotics는 안전한 사료 첨가제로 양식에 사용되어 성장을 강화하고 이용률을 향상시키고, 미생물 군집화를 조절하며 면역 반응을 개선시킨다. 또한 소화 효소 활동과 소화력을 향상시켜 숙주의 건강을 향상시켜 수질 개선과 및 질병도 제어하여 숙주에 유익한 효과를 가져다준다.

*Bacillus* 속은 일반적으로 물과 토양에서 발견된다 [81-82]. 주로 양식업에서 사용되는 것은 어류의 장관, 연못, 그리고 토양에서 분리된 것이다 [81-86]. *Bacillus* 종은 발견된 많은 Probiotics 중에 포자를 형성하며, 많은 미생물에 대해 활성적인 항미생물질을 생산하는 능력에 기인하여 더 나은 생균제 특성을 갖는 것이 입증되었으며, *Lactobacillus* 종과 같이 다른 Probiotics와 비교하였을 때 다양한 환경 안에서 내열성과 생존력을 가진다 [87-91].

또한 *Bacillus* 종은 소화 효소 활성, 항산화 효소 활성, 면역 관련 유전자의 발현 및 스트레스 관련 유전자를 향상시키고 무엇보다도 병원성 미생물에 대한 어류의 저항력을 향상시키는 것으로 보고되어있다 [91-93]. 또한 본 연구에서 분리된 *Bacillus* 종은 protease와 amylase 같은 세포 외 효소를 생산하는 능력이 있는 것으로 알려져 있으며 [94], Probiotics로 사료 내에 *Bacillus megaterium*

PTB1.4<sup>T</sup> 첨가는 장내 미생물 균형을 유지하고 소화효소의 활동과 메기의 성장을 증가시켰다고 보고되었다 [95].

숙주 면역의 강화는 Probiotics의 중요한 장점 중 하나이며 [92], 체액성 면역 반응의 조절과 면역 관련 유전자의 발현을 통해 선천적 면역을 조절할 수 있다 [96].

또한 *Bacillus* 제제는 환경에 내성이 있고, 수명이 길며 양식 분야에서 이러한 박테리아 종의 유익한 역할이 잘 확립되어있다 [97]. 어류의 면역계는 비특이적 면역과 특이적 면역으로 나눌 수 있다. 비특이적 면역체계는 lysozyme, peroxidase, SOD, MPO 등 면역 매개체가 미생물에 대해 강력한 살균작용을 함으로써 면역을 증가시킨다 [92].

본 연구에서는 사료 내 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가가 넙치의 성장과 비특이적 면역반응을 향상시켜 Probiotics로서의 가능성을 알아보고자 한다.

## 3.2. 재료 및 방법

### 3.2.1. 실험사료 제작

넙치 실험에 사용된 사료는 제주 양식수협에서 구입하였다. 실험사료의 성분은 조단백질 54%, 조지방 10%, 조섬유 3%, 조회분 15% 칼슘 1.5%, 인 2.7%으로 동물성 단백질류 (어분, 크릴분) 81%이상, 식물성 단백질 (서류전분, 소맥분) 12% 이하, 어유 4%, 비타민, 미네랄 타우린 외 3% 이상으로 조성되었다.

Probiotics 첨가 사료를 제조하기 위해 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>을 액체 배양하였고,  $2 \times 10^6$  CFU/100 g의 농도로 사료에 첨가하였다. 대조구에는 기본사료를 급이하였다.

### 3.2.2. 어류 준비 및 사육조건

사료 급이 실험은 제주도 함덕리에 위치한 제주대학교 해양과환경연구소에서 실험을 수행하였다. 실험어는 넙치로 양식넙치를 구입하여 연구소로 운반하였으며 3톤 FRP 수조에 2개의 그룹을 설정하고 무작위로 넙치를 선택하여 배치하였다. 환경에 적응시키기 위해 2주간 기본사료를 급이하면서 순치시키고 실험하였다. 모든 실험 수조에 에어스톤을 설치하여 용존 산소가 유지되게끔 하였으며 실험기간 동안 18.2-22°C로 자연수온에 의존했으며, 염분은  $31 \pm 0.1\text{‰}$ , pH는  $8.15 \pm 0.1$ 였다. 어류의 초기 평균무게는 43.0 g, 전장은 평균 18.5 cm였다. 사료공급은 어체중의 2%로 하루에 2번 (am 09:00, pm 17:00)로 공급하였으며, 실험사육은 8주 동안 진행하였다.

### 3.2.3. 성장도 조사 및 혈액학적 분석

실험어의 성장도 조사와 채혈 2주 간격으로 진행하였으며, 넙치실험 종료되는 8 주동안 측정하였다. 실험어는 채혈하기 전 24시간 절식시킨 후 100 ppm농도의 2-phenoxyethanol (Sigma, USA)로 마취시켜 측정하였다. 성장도는 각 실험구에서 실험어를 무작위로 5마리씩 선발하여 무게와 길이를 측정하여 평균치를 측정하였다. 무게와 길이 측정이 끝난 어류는 혈액 성분 분석을 위하여 미부 정맥에서 1 ml 실린지를 이용하여 혈액을 채혈하였다. 채혈된 혈액은 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 사용하였으며, 분리된 혈청은 혈액생화학분석기 (VetTest, Idexx Laboratories, USA)를 이용하여 혈액 성분을 분석하였다. 분석 항목은 Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Total protien (TP), Glucose (GLU), Triglyceride (TRIG)를 조사하였다.

#### 3.2.4. 식세포활성

혈청 대식세포 분석은 유리관에 혈청 25  $\mu\text{l}$ 와 NBT (Nitroblue tetrazolium, sigma-aldrich,usa) 175  $\mu\text{l}$  섞어 28°C에서 2시간 반응시킨다. 그런 다음 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 100% 메탄올을 이용하여 5분간 고정 시킨후 70% (v/v) 메탄올 125  $\mu\text{l}$  첨가하여 2번 세척하여 건조시킨다. 125  $\mu\text{l}$ 의 2 N KNO와 150  $\mu\text{l}$ 의 DMSO를 첨가하여 용해시킨 다음 650 nm에서 흡광도를 측정하였다 [98].

### 3.2.5. Lysozyme 활성

Lysozyme activity [99] turbidimetric assay를 이용했다. 우선 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5)에 *M. lysodeikticus*를 0.2 mg/ml 농도로 현탁시켜 제조하였다. 혈청 50  $\mu$ l와 *M. lysodeikticus* 현탁액 950  $\mu$ l로 최종 volume이 2 ml이 되게끔 혼합하여 25°C에서 수행하였고, 0.5분 5.5분 후에 흡광도 530 nm에서 측정하였다. Lysozyme 활성은 0.001/min의 흡광도가 감소될 때 나타내는 값으로 1 unit으로 나타냈다.

### 3.2.6. Myeloperoxidase 활성

혈청 내 myeloperoxidase 활성은 Sahoo *et al.* [100] 방법을 사용하여 분석하였다. 혈청 10  $\mu\text{l}$ 와  $\text{Ca}^+/\text{Mg}^{2+}$ 가 제거된 Hank's balanced salt solution (HBSS) 90  $\mu\text{l}$ 를 혼합한다. 그리고 나서 35  $\mu\text{l}$ 의 20 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride (TMB)와 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 첨가하였다. 색반응을 정지시키기 위해 35  $\mu\text{l}$ 의 4 M sulphuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 첨가하고 2분간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 450 nm의 흡광도에서 측정하였다.

### 3.2.7. Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD assay kit (Dojindo, Japan)를 사용하여 측정하였다 (표 3.1). 우선 혈청을 20 µl씩 각 sample well과 blank 2 well에 분주하고 20 µl의 ddH<sub>2</sub>O를 blank 1과 blank 3 well에 첨가한다. WST Working Solution은 각 well에 200 µl씩 첨가하고 피펫으로 잘 섞어준다. 그리고 Dilution buffer는 blank 2와 blank 3 well에 20 µl씩 첨가해주고 Enzyme Working Solution 20 µl은 sample과 blank 1 well에 20 µl씩 첨가하고 37°C에서 20분간 반응시킨다. Microplate reader에서 450 nm 흡광도로 측정하였고, SOD 활성 (inhibition rate, %)은 다음과 계산식으로 평가하였다.

SOD activity (Inhibition rate %) =

$$\{[A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}] - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})] / [A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}]\} \times 100$$

Table 3.1. Solution and buffer volumes in each well

	Sample	Blank1	Blank2	Blank3
Sample (Serume)	20 ul	-	20 ul	-
ddH <sub>2</sub> O		20 ul		20 ul
WST Working Solution				
Dilution Buffer	200 ul	200 ul	200 ul	200 ul
Enzyme Working Solution	20 ul	20 ul	-	-

### 3.2.8. RNA 추출

넙치의 간, 신장, 비장, 장 조직에서 Total RNA를 분리하기 위해 Hybrid-R™ Kit (GeneAll®, Korea)를 사용하였다 (그림 3.1). 우선, 1 ml BioEx™에 >100 mg의 조직 sample을 넣어 균질화 하였다. 균질화된 조직 sample은 상온에서 5분간 반응시키고, 4°C에서 12,000 rpm로 10분간 원심분리하여 상층액을 새 microtube에 옮겨주었다. 옮겨진 상층액에 200 µl의 Chloroform을 첨가하고 15초간 잘 섞어주고, 상온에서 2분간 반응시켰다. 그리고 나서 4°C에서 15분간 원심분리 (12,000 rpm)하여 상층액을 새 microtube에 옮겨준다. 상층액의 동량인 RB1 buffer를 첨가하여 혼합해주고, 혼합액을 mini column에 옮겨 원심분리 (10,000 rpm, 30초)하여 RNA를 binding을 시킨 후 SW1 buffer 500 µl을 column에 첨가하여 원심분리하였다. RNW buffer 500 µl을 다시 분주하여 원심분리 후 collection tube에 담긴 용액을 제거하여 column membrane을 washing 하는 과정을 진행하였다. column의 남아있는 ethanol을 제거하기 위해 다시 한번 1분간 원심분리 하였고, column을 새 microtube에 장착하여 50-100 µl의 Nuclease -free water를 넣고 1분간 반응시켜 RNA elution을 진행하였다. 이렇게 얻어진 Total RNA는 cDNA를 합성하기 위해 사용하였다.

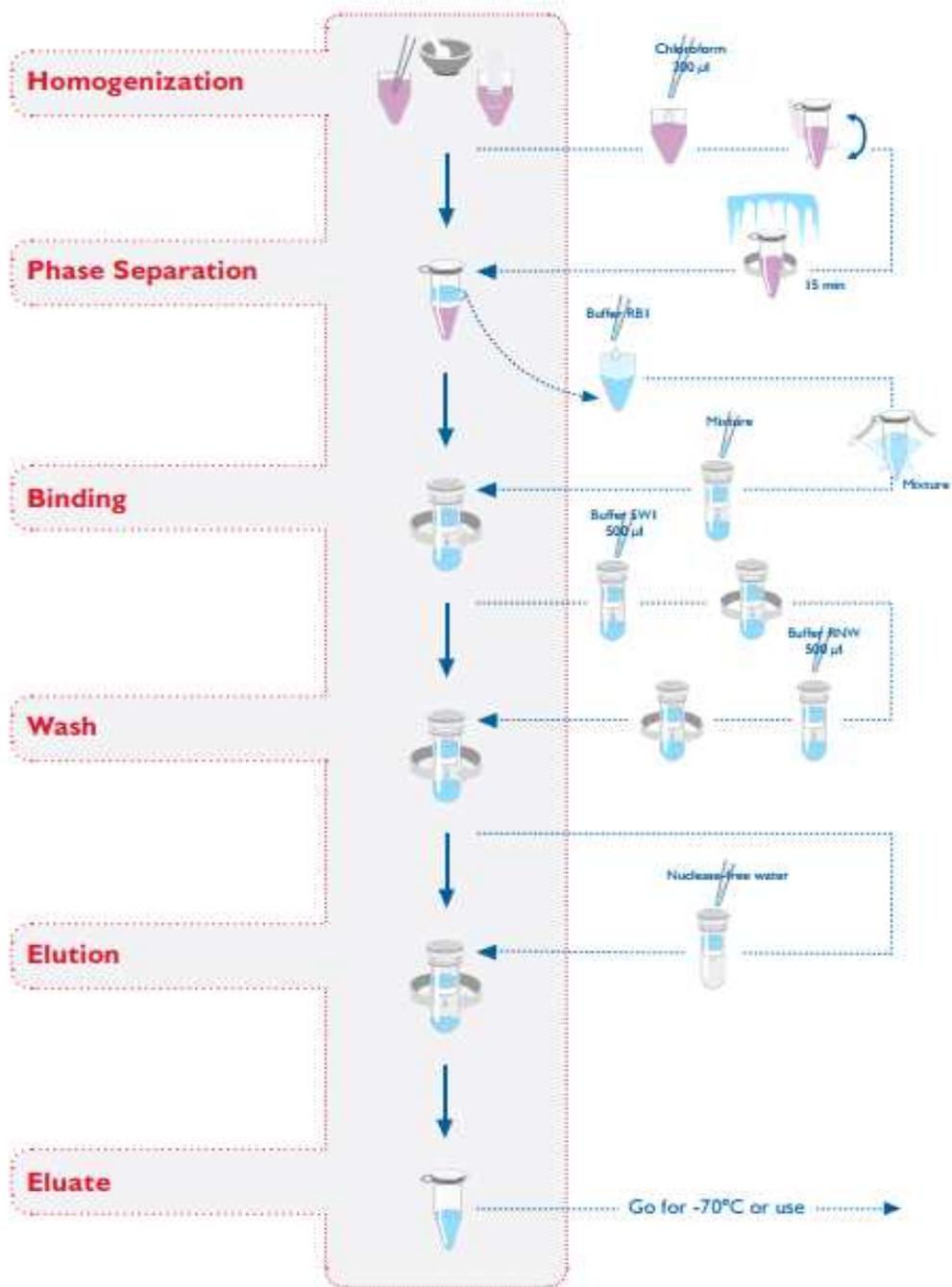


Fig 3.1. Procedure of RNA extraction.

### 3.2.9. cDNA 합성

Total RNA를 이용하여 cDNA 합성을 하기 위해 ReverTra Ace- $\alpha$ - First strand cDNA Synthesis Kit (TOYOBO, Japan)을 사용하였다. 표 3.2와 같이 reaction solution을 준비하였다. 그런 다음 30°C에서 10분, 42°C에서 20분 반응 시킨다. 99°C에서 5분간 열처리해준 뒤 4°C에 보관한다.

Table 3.2. Volume of buffer for cDNA synthesis.

Component	Volume
5 x RT buffer	4 $\mu$ l
dNTP Mixture (10 mM each)	2 $\mu$ l
Template RNA (< 1 $\mu$ g)	x $\mu$ g
RNase inhibitor (10 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Random Primer (25 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
RNase Free dH <sub>2</sub> O	x $\mu$ l
ReverTra Ace- $\alpha$	1 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

### 3.2.10. qRT-PCR

넙치 조직에서 면역유전자 (표 3.3) 발현 분석을 위해 5 × HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix와 유전자증폭기를 사용하였다. PCR tube에 HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix 4 μl, Forward primer와 Reverse primer를 각각 0.5 μl, DEPC-distilled water 14 μl, cDNA 1 μl를 첨가하여 수행하였다. real time PCR 조건은 Initial denaturation 단계에서는 95°C, 12분 반응시키고, 45 cycle 동안 95°C에서 Denaturation 단계 10초, 60°C에서 Annealing 단계 15초, 72°C에서 Elongation 단계 30초간 수행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel 전기영동하여 발현을 확인하였다.

Table 3.3. Gene specific primers of olive flounder β-actin and immune related genes used in this study.

Gene	Sequence(5'-3')	Base Pair (bp)	Acession No.
β-actin F	CATCAGGGAGTGATGGTGGGTA	107	HQ386788.1
R	ATACCGTGCTCGATGGGGTACT		
TNF-α F	CAGCAGCGTCACTGCAGAGTTA	120	AB040448.1
R	GTTACCACCTCACCCACCATT		
IL-1β F	CATCACCACTGTCTGCTGGAAA	122	KF025662.1
R	GCTACTCAACAACGCCACCTTG		
CD4-1 F	AGGTGCCAGTGAGGTGGTTTAT	112	AB716323.1
R	GCCGTCCTGTTTACCAAAACTC		

### 3.2.11. 인위감염에 대한 질병 저항성

사료 내 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가가 어류의 질병 저항성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 그 양식장의 주요 질병원인균인 *E. tarda*를 이용하여 인위감염 실험을 진행하였다. 균액은  $1.42 \times 10^6$  CFU/ml의 농도가 되도록 멸균 생리식염수에 희석한 후 주사기를 통해 0.1 ml씩 넙치 복강에 주입하였다. 인위감염 실험은 8주간 굵이 실험이 종료 후 실시하였으며, 각 수조당 무작위로 20마리씩 선정하여 제주대학교 감염실험용 수조에서 진행하였으며, 생존율을 측정하였다.

#### Relative percentage of survival (RPS)

$$= 100 - 100 \times (\text{test mortality} / \text{control mortality}).$$

### 3.2.12. 유의학적 분석

모든 분석 결과는 SPSS (SPSS Inc., version 18.0) 프로그램을 이용하여 통계 처리하였다. 일일배치 분산분석 (One-way ANOVA-test)로 통계 분석을 진행하였다. Tukey 테스트 t-test ( $p < 0.05$ )를 사용하여 대조구와 실험구의 평균을 비교하였으며, 데이터는 평균값  $\pm$  표준편차 (mean  $\pm$  SE)로 나타냈다.

### 3.3. 결과 및 고찰

#### 3.3.1. 성장도 조사

8주간 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>를 첨가한 사료를 섭취한 넙치의 성장은 다음과 같이 표 3.4에 나타냈다. *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>를 첨가하지 않은 대조구에서는 8주동안 증증량이 114.6g으로 나타났으며, *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서는 증증량이 146.7g으로 대조구보다 증가함을 알 수 있다. 대조구와 비교했을 때 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서는 증체율(weight gain), 일간성장률(specific growth rate), 사료전환효율(feed conversion ratio)대조구에 비해 더 높음을 확인할 수 있었지만 유의적인 차이는 없었다.

Table 3.4. Growth of olive flounder fed the diet containing *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> for 8 weeks.

	IW <sup>1</sup>	FW <sup>2</sup>	WG <sup>3</sup>	SGR <sup>4</sup>	FCR <sup>5</sup>
Control	43.3±1.3	216.6±2.0	399.6±3.2	1.10±0.1	1.24±0.2
<i>Bacillus</i> diet	45.6±3.3	228.8±0.5	403.2±2.2	1.11±0.6	1.31±0.1

<sup>1</sup>IW, initial weight (g/fish)

<sup>2</sup>FW, final weight (g/fish)

<sup>3</sup>WG, weight gain (%) = (final weight-initial weight)/initial weight × 100

<sup>4</sup>SGR, Specific growth rate(%day) = [(log final weight-log initial weight)/days] × 100

<sup>5</sup>FCR, Feed consumed / weight gain.

### 3.3.2. 혈액학적 분석

AST와 ALT는 독성물질이나 스트레스로 의해 유발된 간 손상을 감지하는데 지표이며, 어류에 대해서 매우 중요한 효소이다. 넙치의 혈액학적 분석 결과는 다음 그림 3.2-3.3 나타내었다. ALT 분석결과, 2주차에 대조구와 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 증가 되었지만, 4주차, 6주차, 8주차에서 점점 감소하였다. 대조구와 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구를 비교하였을 때 유의적인 차이가 없었다. 이는 환경적인 요소로 인해 수질의 변화로 어류의 생리상태가 안 좋아 일시적으로 증가하였다가 점차 감소되었다고 보여진다. AST 수치는 대조구에서만 2주차에 증가하고 시간이 지남으로써 AST 수치도 감소하였다. 대조구와 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구를 비교했을 때 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

대조구와 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구의 Glucose 농도를 분석한 결과 8주차에 대조구와 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구를 비교했을 때 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구는 감소됨으로써 유의적 차이를 보였다. 또한 2주차에는 영향을 2개의 실험구의 Glucose는 별 차이가 없었지만, 4주차부터는 대조구에는 시간이 지남에 따라 glucose 함량이 유의적으로 증가하였고, 반면, *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 점차 유의적으로 감소함을 알 수 있었다.

Total protein 분석결과 대조구와 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 2주차와 8주차를 비교했을 때 유의적으로 증가를 보여주었으며, 4주부터 8주차까지는 total protein 함량이 유지되는 상태를 보여주었다. 대조구와 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구 사이에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Triglyceride 분석 결과, 8주차에 대조구와 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구 사이에 유의적인 차이를 보였다.

이러한 결과를 볼 때 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서는 혈액의 생화학적 매개에 영향을 미치지 않았으며, 간 손상, 스트레스 또는 독소가 없다고 사료된다.

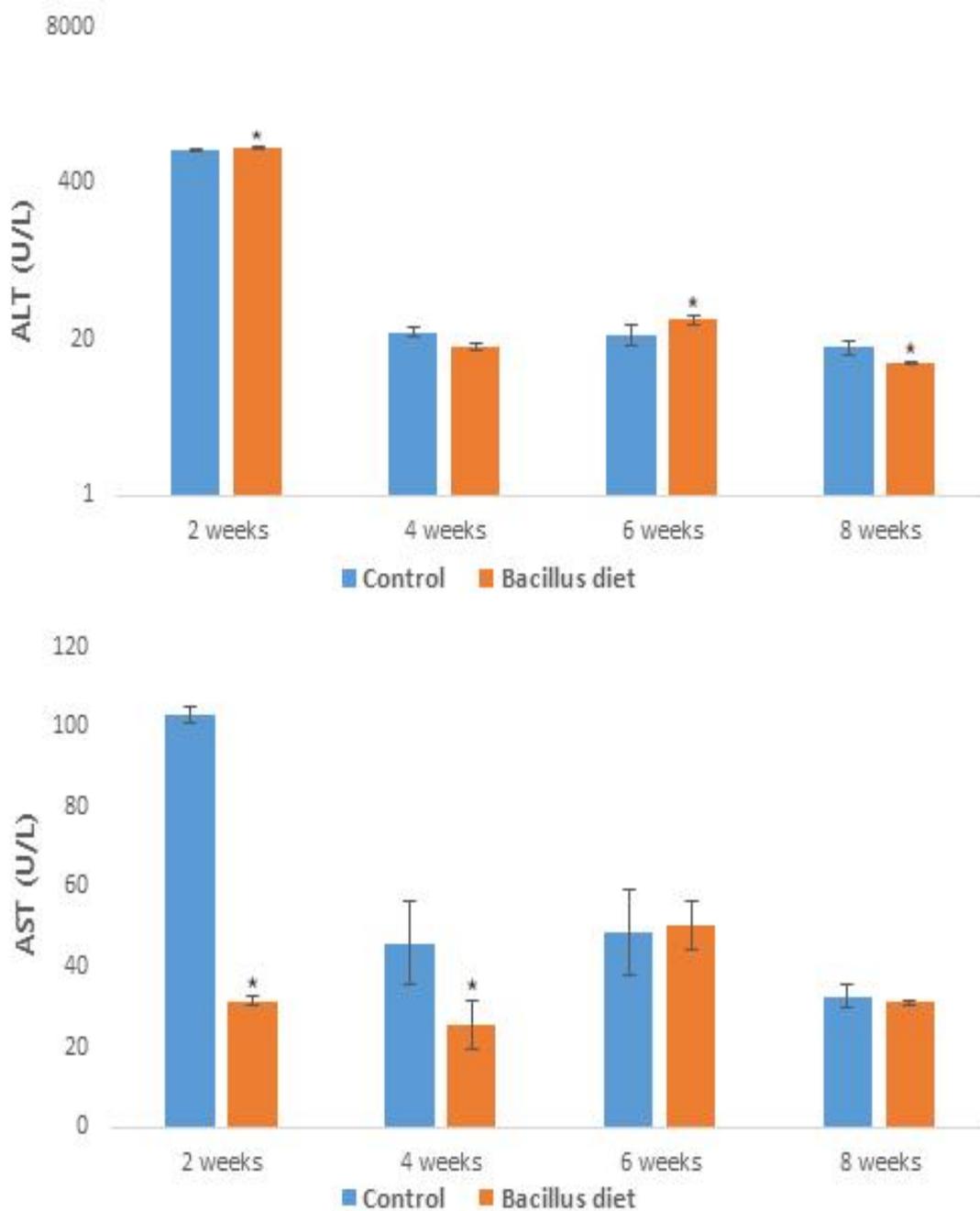


Fig 3.2. Serum biochemical parameters (ALT, AST) of olive flounder fed with control and *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> diets for 8 weeks. Values are mean  $\pm$  SE (n=3).

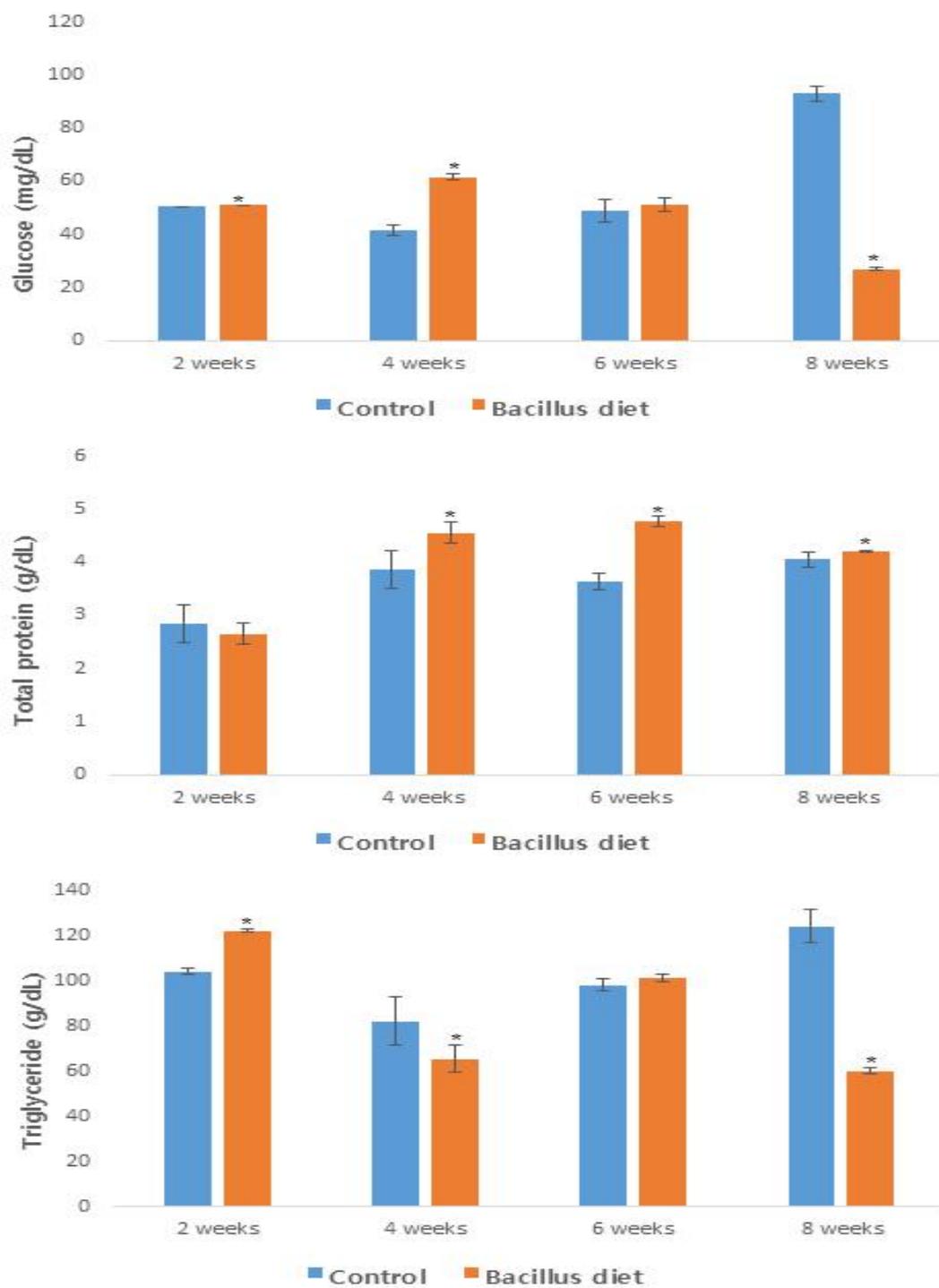


Fig 3.3. Serum biochemical parameters (Glucose, total protein, triglyceride) of olive flounder fed with control and *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> diets for 8 weeks. Values are mean ± SE (n=3).

### 3.3.3. 식세포 활성

식세포는 활성산소를 생성시켜 박테리아를 죽인다. 식세포 활성을 측정할 결과, 대조구보다 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 높은 식세포 활성이 나타났다 (그림 3.4). 특히 실험 4주차에 대조구 ( $0.83 \pm 0.05$ ) 와 비교했을 때 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> ( $0.99 \pm 0.05$ ) 첨가구에서 유의적 차이를 보여주었다. *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 실험기간동안 식세포활성이 높게 유지되는 것을 알 수 있다. 식세포 활성의 증가는 어류의 비특이적 면역 반응을 향상시켰음을 의미한다.

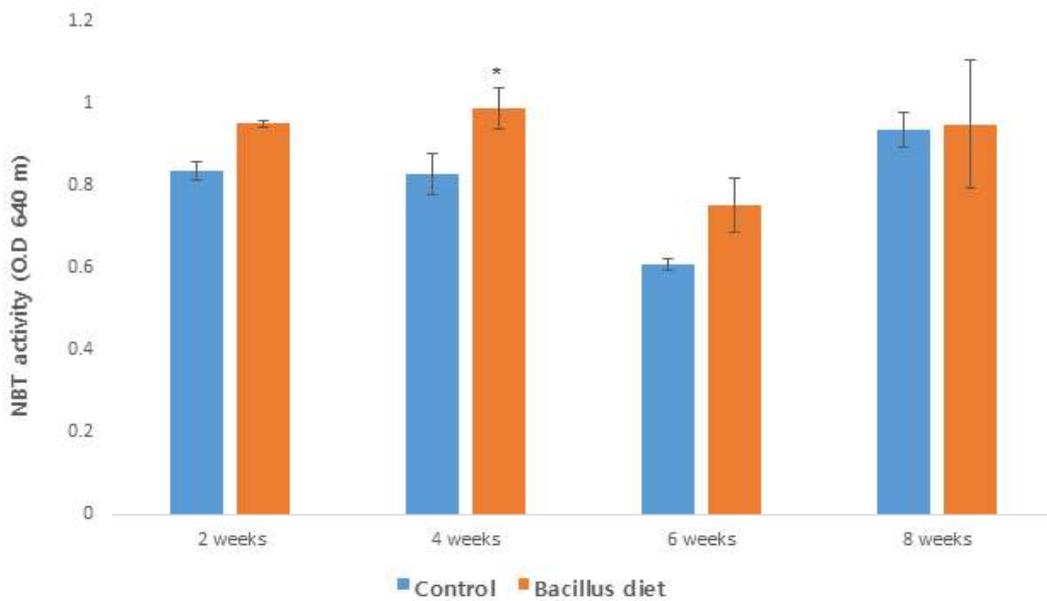


Fig 3.4. NBT activity of olive flounder fed with control and *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> diets for 8 weeks. Values are mean  $\pm$  SE (n=3).

#### 3.3.4. Lysozyme 및 Myeloperoxidase 활성

Lysozyme은 어류에 널리 분포된 체액성 비특이적 방어 단백질이며 주로 그람양성균과 음성균을 보체와 함께 공격한다고 알려져 있다 [101]. 또한 Lysozyme은 세균 세포벽의 펩티도글리칸 층을 가수분해한다. 또한 Myeloperoxidase는 감염과 염증에 반응하는 효소로서 숙주가 감염되었을 때 독소를 내보내 병원균을 사멸한다. 본 실험에서 Lysozyme 활성을 측정한 결과, 대조구와 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 유의적 차이가 나타나지 않았지만, 실험 8주차 대조구 ( $5.89 \pm 1.15$  unit/ml)보다 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 높은 활성 ( $22.67 \pm 0.82$  unit/ml)이 나타나 유의적 차이를 보여주었다 (그림 3.5). Probiotics은 식세포, lysozyme과 보체의 활성을 증가시킨다 [102-103]. *L. rhamnosus*가 첨가된 사료를 30일 동안 급이한 무지개 송어에서 혈청 lysozyme 활성이 유의하게 증가했으며, 이 연구에서 Probiotics을 첨가한 그룹에서 6주 후에 높은 수준의 lysozyme 활성을 보여 주었고, 실험이 끝날 때까지 유지되었다고 보고되었다 [103]. 이러한 결과는 본 연구의 결과와 일치함을 알 수 있었다.

Myeloperoxidase 활성결과 대조구와 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구를 비교했을 때 유의적 차이가 없었다 (그림 3.5).

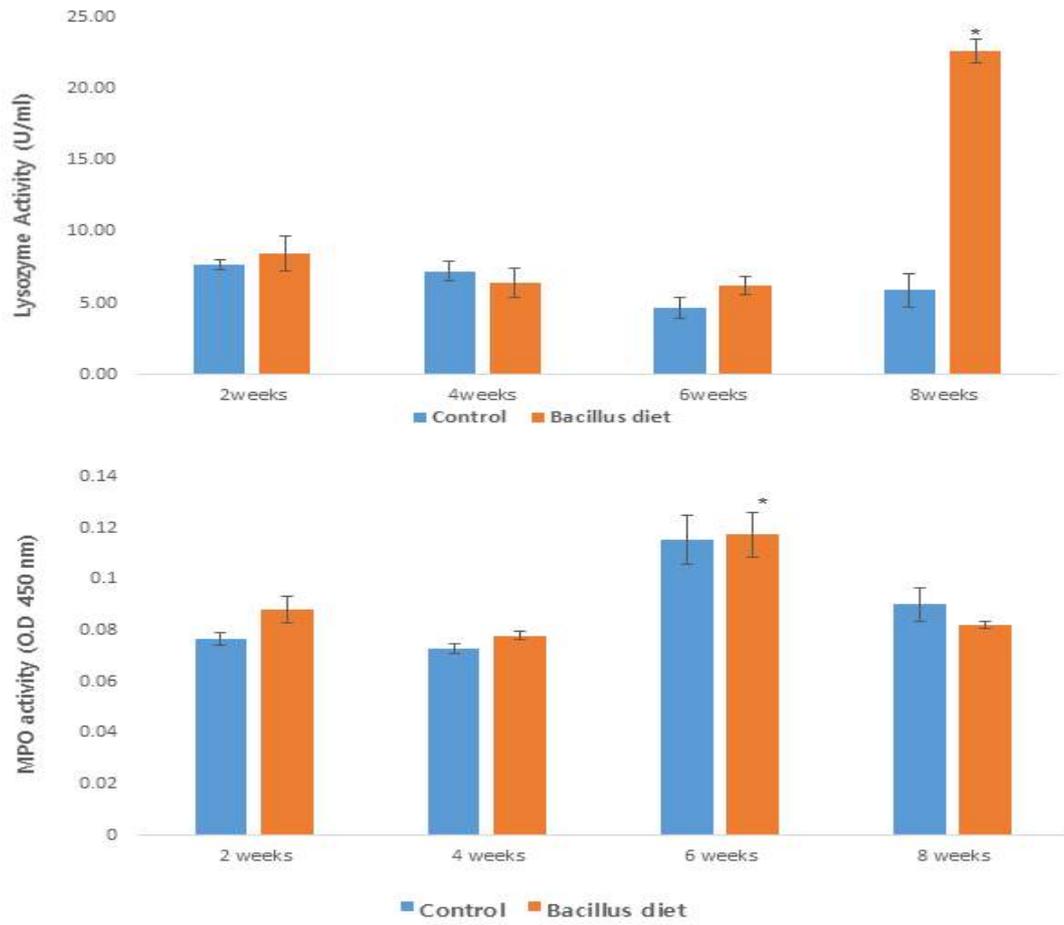


Fig 3.5. Lysozyme and Meloperoxidase activity of olive flounder fed with control diet and *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> diets for 8 weeks. Values are mean  $\pm$  SE (n=3).

### 3.3.5. Superoxide dismutase (SOD) 활성

SOD 활성은 대표적인 항산화 효소로서 산소와 과산화수소로 바꿔주는 반응을 촉매하며, 체내에 침입한 병원체를 살균기작으로 제거하는 역할을 한다. 대조구와 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구와 비교했을 때 6주차에서 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구가 가장 높은 활성을 보였다 (그림 3.6). SOD 결과와 MOP값과 비슷한 경향인 것을 알 수 있다.

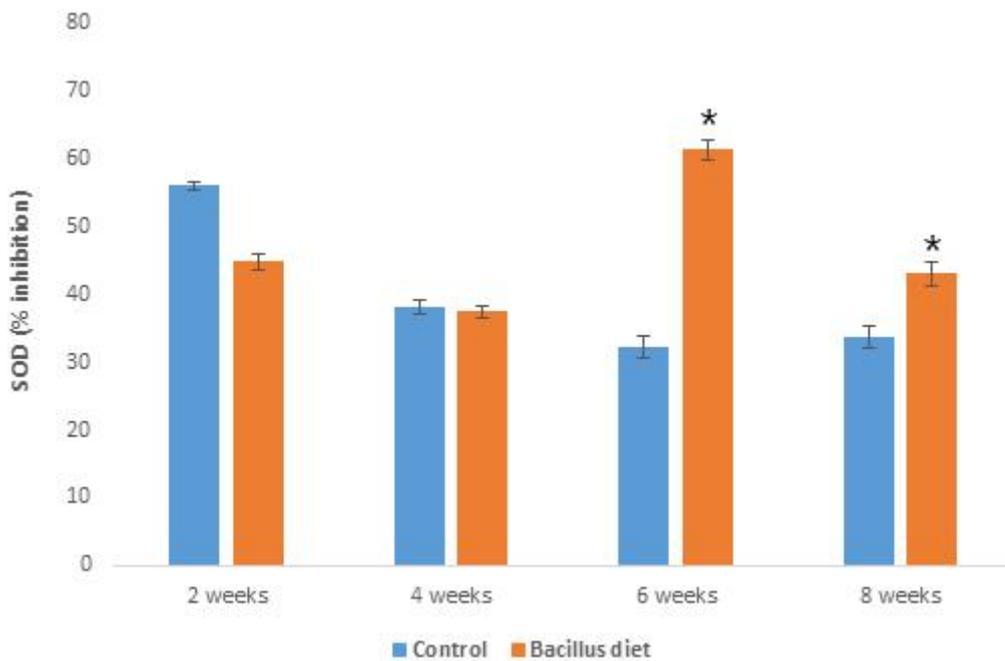


Fig 3.6. Superoxide dismutase (SOD) activity of olive flounder fed with control and *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> diets for 8 weeks. Values are mean  $\pm$  SE (n=3).

### 3.3.6. qRT-PCR 통한 면역관련 유전자 발현

실험이 끝난 8주차에 대조구와 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구의 각 신장(kidney), 장(intestine), 간(liver), 비장(spleen) 조직에서 RNA를 추출하고 qRT-PCR을 통해 면역관련 유전자의 발현량을 측정하였다.

그 결과, 신장에서는 대조구와 비교했을 때 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CD4-1 유전자가 대조구에 비해 각각 2.6배, 1.9배, 1.1배 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 신장에서의 유의한 증가는 장에서도 나타났으며, 대조구에 비해 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CD4-1 유전자가 각 1.7배, 2.2배, 1.5배 증가하였다 (그림 3.7).

간에서는 대조구에 비해 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  유전자가 각각 2.6배, 1.8배, 1.1배 증가하였지만, CD4-1 유전자는 감소됨을 확인하였다. 비장에서는 CD4-1 유전자가 대조구에 비해 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 6.3배로 가장 높게 나타났고, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  유전자는 각각 2배, 1.9배 증가하였다 (그림 3.8).

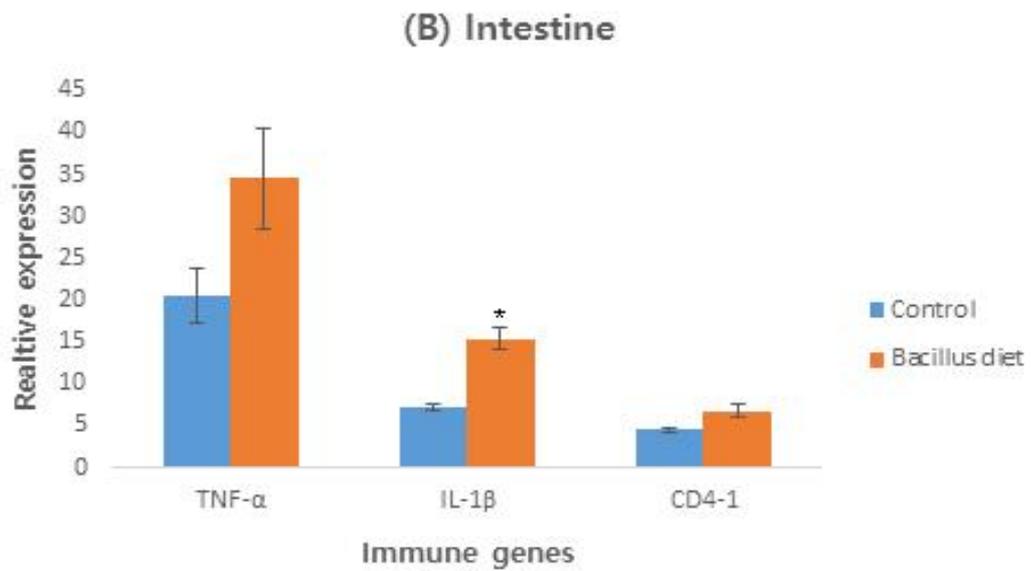
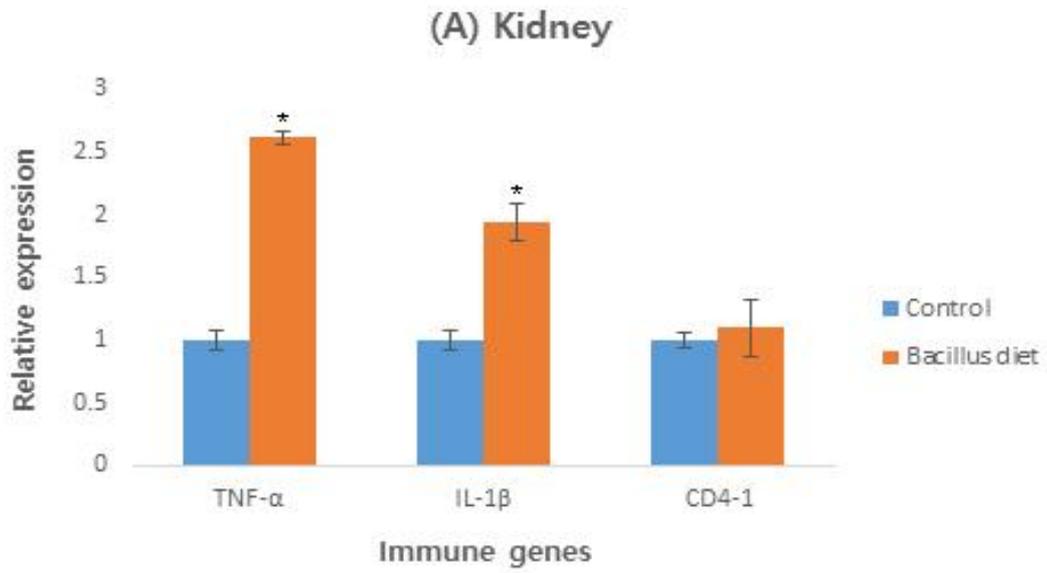


Fig 3.7. Immune related gene expression in each tissue as kidney, intestine after 8 weeks fed with control and *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> diets. Values are mean  $\pm$  SE (n=3).

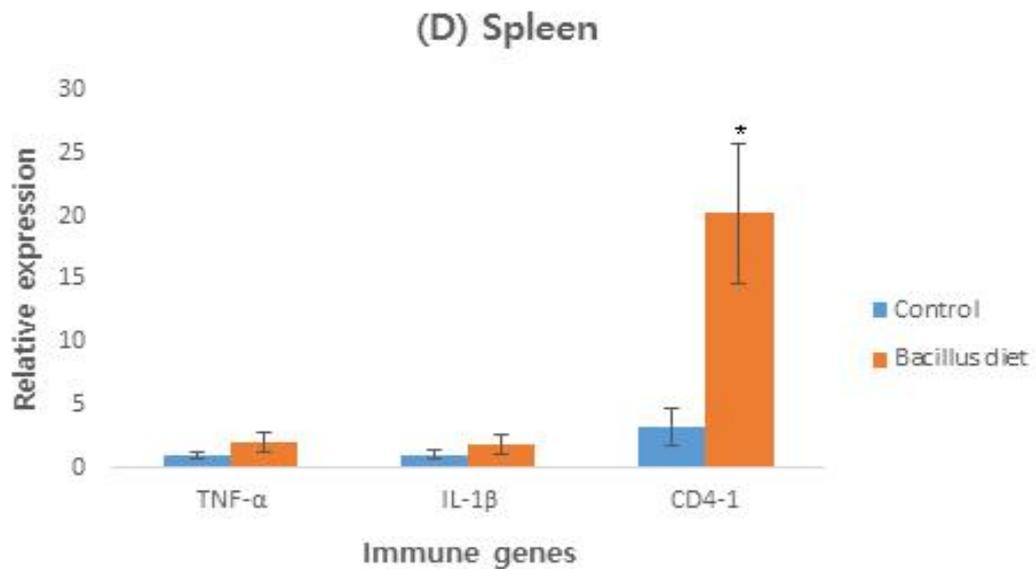
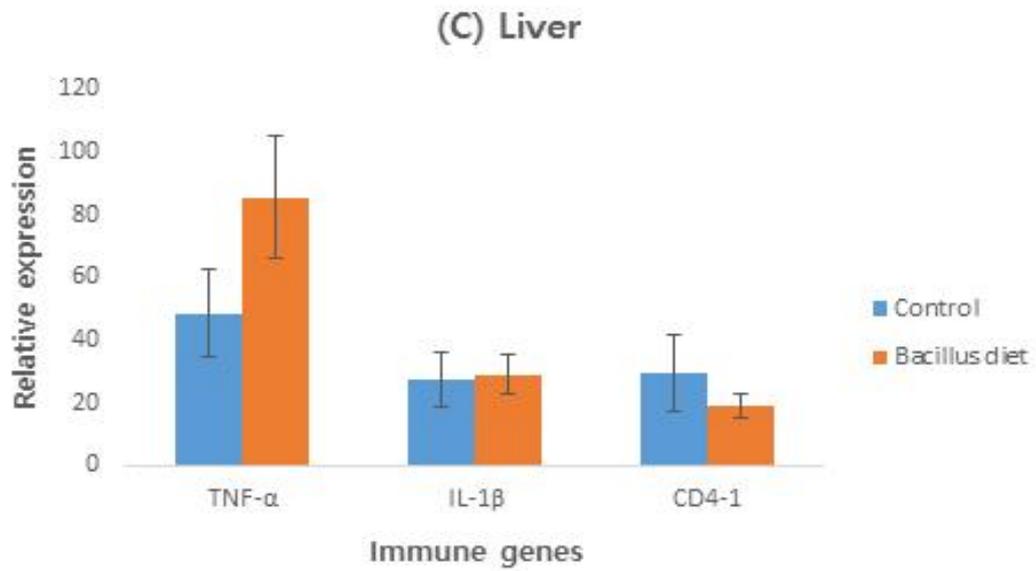


Fig 3.8. Immune related gene expression in each tissue as liver, spleen after 8 weeks fed with control and *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> diets. Values are mean  $\pm$  SE (n=3).

### 3.3.7. 인위감염에 대한 질병저항성

2주 동안 인위감염 실험 결과, control에서는 85% 폐사율을 보였으며, *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서는 50%의 폐사율을 보여주었다 (그림 3.9). 이러한 결과는 대조군과 비교하였을 때, *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 *E. tarda*에 대한 질병저항성이 높음을 알 수 있었다.

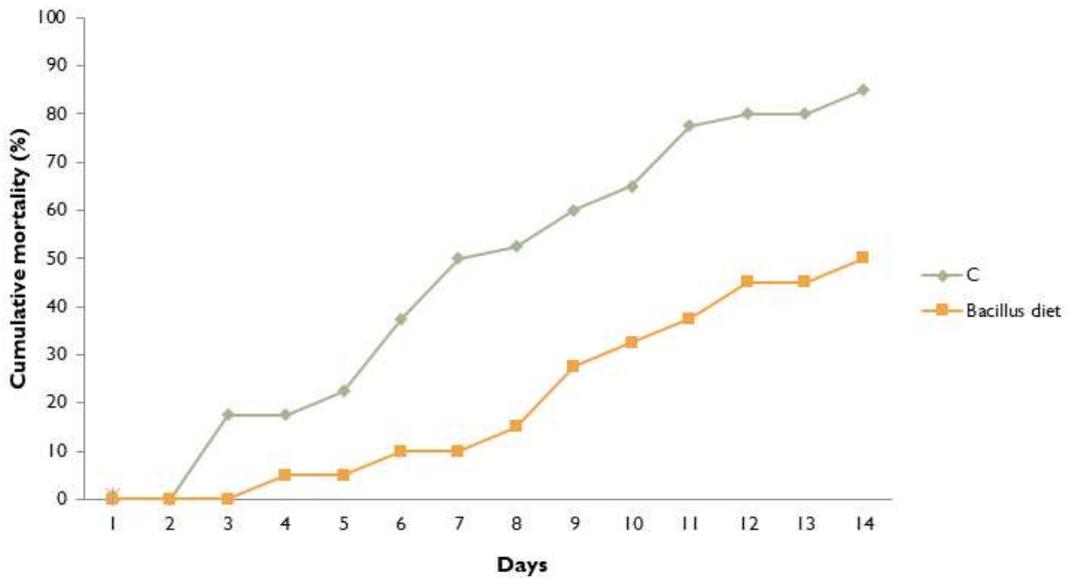


Fig 3.9. Cumulative mortality rate of olive after challenge with *E. tarda* ( $1.42 \times 10^6$  CFU/ml).

## 국 문 요 약

해양은 거대한 생태계로 살아있는 생물의 80% 이상이 서식하고 있으며, 생물학적 자원 중 하나이다. 해양에서 서식하는 해양생물은 염분, 온도, 염록소와 같은 육상과 다른 특수한 환경에 서식하고 있어, 독특한 물질을 생성하는 능력을 가지고 있으며, 다양한 생리활성물질을 생성할 수 있다. 해양생물 중 해면은 새로운 물질을 연구하는데 중요한 자원이다. 항생제 내성균주의 출현으로 새로운 물질에 대한 연구는 증가하며, 해면에서 분리되는 생리활성 물질의 수도 증가되는 추세이다. 이러한 생리활성물질은 해면에서 공생하는 세균에 의해 만들어진다고 보고되었다. 해면은 생체량의 40%이상의 세균을 포함하고 있으며, 많은 미생물 중 일부로 *Bacillus* 종이 알려져 있다. *Bacillus*는 그람양성균으로 간균형태를 하고 있는 세균이다. 이러한 *Bacillus*는 다양한 물질을 생산한다고도 알려져 있다. *Bacillus*는 lipopeptide 물질을 생산하며, 대표적으로 잘 알려진 물질은 surfactin, iturin, fengycin 등이 있다. 이러한 *Bacillus*는 Probiotics로 양식업에서 많이 사용되고 있다. Probiotics는 소화효소를 생산하여 소화율을 높여주고, 성장에도 도움을 준다. 또한 면역을 향상시켜주어 질병세균에 대한 억제 능력도 가지고 있다. 이러한 Probiotics로 개발하기 위해서는 용혈능이 없고 항균물질을 생산하며, 위산과 담즙산과 같은 강산의 소화액에서도 생존해야한다.

본 연구에서는 해면에서 분리된 해양유래 세균을 이용하여 어류 질병세균에 대해서 항균활성을 탐색하였고, Probiotics 균주로서의 적합성과 안정성을 확인하였으며, 최종 선발된 *Bacillus megaterium* PPR15<sup>T</sup>를 넙치 사료에 첨가하였을 때 넙치의 성장, 비특이적 면역반응 및 병 저항성을 확인하여 사료첨가제로서의 가능성을 알아보하고자 한다. 또한 해면에서 분리된 신종후보균주에 대해 분류·동정하여 신종임을 확인하였다.

4종의 해면에서 분리된 균주를 제주도 육상 양식장에서 주로 발생하는 어류 질병 세균에 대한 항균활성을 확인한 결과, 총 20 균주가 모두 높은 항균활성을 나타냈다. PPR15<sup>T</sup>는 *Edwardsiella tarda*에 17 mm, *Streptococcus iniae*에 25

mm, *Streptococcus parauberis*에 21 mm, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*에 대해서 20 mm의 억제환이 나타났다.

또한 PPR15<sup>T</sup>의 인체유해성 조사결과 유해대사산물로 알려진 urease를 생성하지 않았으며, 병원성인 β-용혈현상이 나타나지 않았다. 또한 1-10% 농도의 NaCl에서도 생육이 가능하였으며, 생육 pH 범위는 4.0-11.0으로 내산성과 내염기에 강했으며, 10-50°C의 넓은 온도 범위에서도 생장이 가능했다. 또한, pH 2.0과 3.0에서 pepsin이 첨가된 배지와 0.3%와 1% bile salt가 첨가된 배지에서 내성을 확인되었다. 고분자유기물질 분해능을 실시한 결과 DNase, cellulase, amylase, casein 분해효소, lipase활성을 확인하였다. 또한 계통학적 분석 결과 *Bacillus megaterium*과 100%의 염기서열 유사도를 확인하였다.

따라서 해면에서 분리된 PPR15<sup>T</sup>는 어류질병에 항균활성이 우수하며 유해효소와 용혈현상이 나타나지 않았고 낮은 pH와 담즙산에 높은 생존능력을 가지고 있고, 고분자 유기물질분해능이 뛰어나므로 신규 Probiotics 균주로서 적합성과 안전성을 확인하였으며, *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>로 균주를 명명하였다.

이에 따라 넙치 사료첨가제로써의 가치가 있다고 사료되며, 생균제로서 개발을 위해 어류 급이 실험을 수행하여 어류성장에 미치는 효과, 선천성 면역 및 질병 저항성 등에 대한 추가실험이 진행하였다. 8주간 넙치를 대상으로 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가 사료 급이 실험 후 성장도, 혈액학적 분석, 비특이적 면역반응, 질병 저항성에 대해 조사하였다. 그 결과, 대조구와 비교했을 때, *Bacillus megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구의 증체율, 일간성장률, 사료전환효율이 높아짐을 확인하였다. 또한 혈액학적 분석 결과, ALT, AST, glucose, triglyceride가 대조구에 비해 감소하였으며, total protein은 증가하였다. 또한 혈청의 식세포 작용은 실험 시작 2주차부터 끝나는 8주차까지 높은 활성이 유지되었다. Lysozyme은 대조구와 비교했을 때 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup> 첨가구에서 8주차에 급격히 증가함을 보였으며, MPO와 SOD 활성은 6주차 가장 높은 활성을 나타냈다. 넙치의 신장, 장, 간, 비장에서 RNA를 추출하였고, qRT-PCR을 통해 면역유전자의 발현량을 조사하였다. 신장과 장에서는 대조구보다 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>에서 TNF-α, IL-1β, CD4-1의 유전자가 높은 발현량을 나타냈다. 또한 간에서는 TNF-α, 비장에서는 CD4-1의 유전자만 높은 발현량을 나타냈다.

따라서 종합적인 결과를 볼 때, 본 연구에서는 해면에서 분리된 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>가 Probiotics로의 적합함을 확인하였으며, 사료 내 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>는 어류의 성장과 비특이적 면역반응을 향상시켜 어류질병세균에 대한 저항성을 높일 수 있는 Probiotics으로서 가능성이 있다고 사료된다. 또한 *B. megaterium* PPR15<sup>T</sup>이 생산하는 생리활성을 파악하고자 추가적인 실험이 필요하다고 된다고 판단된다.

또한 해면 *Callyspongia elegans*에서 분리된 신종후보균주 CE80<sup>T</sup>은 그람음성균으로 호기성이며, 밝은 갈색을 띄고 있다. 신종후보균주 CE80<sup>T</sup>균주는 pH 범위 5.0-11.0 (최적 7.0-8.0), NaCl 범위는 1.0-5.0% (최적 1-3% (w/v)), 최적온도 25°C에서 성장했다. 16S RNA 염기서열 (1384 bp)을 기초한 계통학적 분석 결과 *Labrenzia* 속의 균주들과 높은 유사도를 보여주었으며, *L. suaedae* YC6927<sup>T</sup> (98.3%), *L. alexandrii* DFL-11<sup>T</sup> (96.6%), *L. aggregata* IAM 12614<sup>T</sup> (96.6%), *L. marina* mano18<sup>T</sup> (96.5%) 그리고 *L. alba* CECT 5094<sup>T</sup> (96.2%)와 가까운 유사도를 보여주었다. CE80<sup>T</sup>의 Draft assembled genome size는 4,737,804 bp로 확인된 contig는 7개로, N50 length는 3,393,935 bp를 얻었다. Strain CE80<sup>T</sup>과 표준균주 *L. suaedae* YC6927<sup>T</sup> 사이의 ANI (average nucleotide identity) values은 83.7%로 종 동정에 대한 95-96% 기준치보단 낮게 나왔으며 신종으로 여겨진다. 주요지방산은 C<sub>18:1ω7c</sub> (66.7%), summed feature 2 (C<sub>14:0</sub>3-OH/iso-C<sub>16:1</sub>) (10.2%)이다. 또한 주요 polar lipid는 diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylmonomethylethanolamin (PMME)과 하나의 알려지지 않은 aminolipid와 알려지지 않은 2개의 lipid를 확인하였다. CE80<sup>T</sup>의 DNA G+C content 결과 55.9 mol%이며, 쿨론은 Q-10으로 분석되었다. CE80<sup>T</sup>와 *L. suaedae* YC6927<sup>T</sup> 사이의 DNA-DNA hybridization 실험 결과 56.1±2.8%으로 확인하였다. 이 값은 70% 미만으로 나타날 경우 신종으로 보고될 수 있다. 계통학적, 형태학적, 생화학적 및 화학분류학적 분석 결과를 토대로 strain CE80<sup>T</sup>는 *Labrenzia* 속의 새로운 종임을 확인하였으며, 이를 *Labrenzia callyspongiae* 로 명명하였다.

## 참 고 문 헌

1. Thomas, T.R. Kavlekar, D.P. LokaBharathi, P.A. 2010. Marine drugs from sponge-microbe association—A review. *Mar Drugs*. **8**: 1417-1468.
2. Hentschel U, Usher KM, Taylor MW. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS microbiol Ecol*. **55**: 167-.77.
3. Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Cotter, P.D., Walsh, M., Mooij, M.J., Bourke, M.B., Rea, M.C., O'Connor, P.M., Ross, R.P. 2009. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. *Mar. Biotechnol.* (NY) **11**: 384-396.
4. Wenzel, S. C., & Müller, R. 2005. Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology* **16(6)**: 594-606.
5. Villa, F. A., & Gerwick, L. 2010. Marine natural product drug discovery: Leads for treatment of inflammation, cancer, infections, and neurological disorders. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. **32(2)**: 228-237.
6. Mayer, A. M., Rodríguez, A. D., Berlinck, R. G., & Fusetani, N. 2011. Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial,

anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **153(2)**: 191-222.

7. Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R. 2011. Marine natural products. *Natural Product Reports*. **28(2)**: 196-268.
8. Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Mol Biol Rev*. **71(2)**: 295-.347
9. Cho, H. H., Shim, E. J., & Park, J. S. (2010). Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponges, *Spirastrella abata* and *Cinachyrella* sp. *The Korean Journal of Microbiology*. **46(2)**: 177-182.
10. Bonar DB, Weiner RM, Colwell RR. 1986, Microbial-invertebrate interactions and potential for biotechnology. *Microb Ecol*. **12**: 101-110.
11. Okami Y. 1986. Marine microorganisms as a source of bioactive agents. *Microb Ecol*. **12**: 65-78.
12. Biebl H, Pukall R, Lünsdorf H, Schulz S, Allgaier M et al. 2007. Description of *Labrenzia alexandrii* gen. nov., sp. nov., a novel alphaproteobacterium containing bacteriochlorophyll a, and a proposal for reclassification of *Stappia aggregata* as *Labrenzia*

*aggregata* comb. nov., of *Stappia marina* as *Labrenzia marina* comb. nov., and of *Stappia alba* as *Labrenzia alba* comb. nov., and emended descriptions of the genera *Pannonibacter*, *Stappia* and *Roseibium*, and of the species *Roseibium denhamense* and *Roseibium hamelinense*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**: 1095-1107.

13. Bibi F, Jeong JH, Chung EJ, Jeon CO, Chung YR. 2014. *Labrenzia suaedae* sp. nov., a marine bacterium isolated from a halophyte, and emended description of the genus *Labrenzia*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **64**: 1116-1122.
14. Camacho M, Redondo-Gómez S, Rodríguez-Llorente I, Rohde M, Spröer C et al. 2016. *Labrenzia salina* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **66**: 5173-5180.
15. Stapp C, Knösel D. 1954. Zur Genetik sternbildender Bakterien. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 2.* **108**: 243-259 (in German).
16. Rüger HJ, Höfle MG. 1992. Marine star-shaped-aggregate-forming bacteria: *Agrobacterium atlanticum* sp. nov.; *Agrobacterium meteori* sp. nov.; *Agrobacterium ferrugineum* sp. nov., nom. rev.; *Agrobacterium gelatinovororum* sp. nov., nom. rev.; and *Agrobacterium stellulatum* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol.* **42**: 133-143.
17. Ahrens R. 1968. Taxonomische Untersuchungen a sternbildenden *Agrobacterium*-Arten aus der westlichen Ostsee. *Kiel Meeresforsch.* **24**: 147-173 (in German).

18. Uchino Y, Hirata A, Yokota A, Sugiyama J. 1998. Reclassification of marine *Agrobacterium* species: proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. nov., *Ruegeria algicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *J Gen Appl Microbiol.* **44**: 201-210.
19. Pujalte M. J., Macián M. C., Arahál D. R., Garay E. 2005. *Stappia alba* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. *Syst Appl Microbiol.* **28**: 672-678.
20. Kim BC, Park JR, Bae JW, Rhee SK, Kim KH et al. 2006. *Stappia marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from the Yellow Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**: 75-79.
21. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
22. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* **41**: 95-98.
23. Kumar S., Stecher G., and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* **33**: 1870-1874.

24. Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum-likelihood approach. *J Mol Evol.* **17**: 368-376.
25. Kluge AG, Farris FS. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst Zool.* **18**: 1-32
26. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4**: 406-425.
27. Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**: 783-791.
28. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* **173**: 697-703.
29. Wilson, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria in Current protocol. *Molecular Biology.* 2-4.
30. Yoon SH, Ha SM, Kwon SJ, Lim J, Kim Y et al. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome. *Int J Syst Evol Microbiol.* **67**: 1613-1617.
31. Jukes, T. H., & Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. Mammalian protein metabolism, **3(21)**: 132.

32. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M et al. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* **19**: 455- 47710.
33. Yoon SH, Lim JM, Kwon SJ, Chun J. 2017. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek.* **110**: 1281-1286.
34. Schaal, KP. 1986. Genus *Acinomyces* Harz 1877, 133AL. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp. 1383-1418. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
35. Cowan, S. T., & Steel, K. J. (1965). Manual for the identification of medical bacteria. Manual for the Identification of Medical Bacteria.
36. Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M et al. 1984. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods.* **2**: 233-241.
37. Komagata K, Suzuki K. 1987. Lipids and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol.* **19**: 161-207.
38. Sasser M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, *MIDI Technical Note.* **101**: MIDI Inc
39. Tamaoka J, Komagata K. 1984. Determination of DNA base composition by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett.* **25**: 125-128.

40. Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol.* **39**: 224-229.
41. Braekman, J. and D. Daloz. 2004. Chemical and biological aspects of sponge secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* **3**: 275-282.
42. 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.
43. Park SH., Kim JY., KIM YS., Heo MS. 2014. Phylogenetic Diversity of Bacterial Community Inhabited in *Callyspongia elegans*. *Korean Journal of Microbiology.* **50**: 152-157.
44. Richter M, Rosselló-Móra R. 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106**: 19126-19131.
45. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O et al. 1987. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.* **37**: 463-464.
46. Muscholl-Silberhorn, A.; Thiel, V.; Imhoff, J.F. 2008. Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the

- Mediterranean sea. *Microb. Ecol.* **55**: 94-106.
47. Zhu, P.; Li, Q.; Wang, G. 2008. Unique microbial signatures of the alien Hawaiian marine sponge *Suberites zeteki*. *Microb. Ecol.* **55**: 406-414.
48. Lee, O.O.; Wong, Y.H.; Qian, P.Y. 2009. Inter- and intraspecific variations of bacterial communities associated with marine sponges from san juan island, washington. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 3513-3521.
49. Menezes, C.B.; Bonugli-Santos, R.C.; Miqueletto, P.B.; Passarini, M.R.; Silva, C.H.; Justo, M.R.; Leal, R.R.; Fantinatti-Garboggini, F.; Oliveira, V.M.; Berlinck, R.G.; Sette, L.D. 2009. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of Sao Paulo state, Brazil. *Microbiol. Res.* **165**: 466-482.
50. Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* **56**: 845-857.
51. Westers, L.; Westers, H.; Quax, W.J. 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: A biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1694**: 299-310.
52. Kim, T.W.; Kim, Y.H.; Kim, S.E.; Lee, J.H.; Park, C.S.; Kim, H.Y. 2010. Identification and distribution of *Bacillus* species in doenjang by whole-cell protein patterns and 16S rRNA gene sequence analysis. *J.*

*Microbiol. Biotechnol.* **20**: 1210-1214.

53. Kim, T.W.; Lee, J.H.; Park, M.H.; Kim, H.Y. 2010. Analysis of bacterial and fungal communities in Japanese- and Chinese-fermented soybean pastes using nested PCR-DGGE. *Curr. Microbiol.* **60**: 315-320.
54. Barbosa, T.M.; Serra, C.R.; La Ragione, R.M.; Woodward, M.J.; Henriques, A.O. 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 968-978.
55. Hong, H.A.; Le Duc, H.; Cutting, S.M. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 813-835.
56. Lalloo, R.; Maharajh, D.; Gorgens, J.; Gardiner, N.; Gorgens, J.F. 2009. High-density spore production of a *B. cereus* aquaculture biological agent by nutrient supplementation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**: 59-66.
57. Anand, T.P.; Bhat, A.W.; Shouche, Y.S.; Roy, U.; Siddharth, J.; Sarma, S.P. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiol. Res.* **161**: 252-262.
58. Hentschel, U.; Schmid, M.; Wagner, M.; Fieseler, L.; Gernert, C.; Hacker, J. 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 305-312.

59. Pabel, C.T.; Vater, J.; Wilde, C.; Franke, P.; Hofemeister, J.; Adler, B.; Bringmann, G.; Hacker, J.; Hentschel, U. 2003. Antimicrobial activities and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *Bacillus* isolates from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Mar. Biotechnol.* **5**: 424-434.
60. Pelaez, F. 2006. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products-can history repeat? *Biochem. Pharmacol.* **71**: 981-990.
61. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals, a review. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.
62. Bidhan CD, Meena DK, Behera BK, Das P, Mohapatra PD, Sharma AP. 2014. Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiol Biochem.* **40**: 921-971.
63. Taoka Y, Maeda H, Jo JY, Jeon MJ, Bai SC, Lee WJ, Yuge K, Koshio S. 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish Aquatic Sci.* **72**: 310-321.
64. Kim JK, Kim DH, Yoo MS, Yang MH. 2005. Ultrastructure of Gametogenesis of the Surf Clam (*Tresus keenae*)(Mactridae: Bivalvia). *Korean J Fish Aquat Sci.* **38**: 94-99.
65. Xie F, Zhu T, Zhang F, Zhou K, Zhao Y, Li Z. 2013. Using *Bacillus amyloliquefaciens* for remediation of aquaculture water. *Springerplus.* **2**: 119.

66. Salminen S, Von-Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, De Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T. 1988. Demonstration of safety of probiotics—a review. *Int. J. Food Microbiol.* **44**: 93-106.
67. Gueimonde, M., & Salminen, S. 2006. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease.* **38**: S242-S247.
68. Yun HJ, Lee YJ, Yeo SH, Park HD, and Baek SY. 2013. Isolation and characterization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from Korean soy sauce and soybean paste. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 190-197.
69. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Res.* **64**: 655-671.
70. Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A., and Shakourie, M. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture.* **252**: 516-524.
71. Logan NA, Berkeley RC. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J Gen Microbiol.* **130(7)**:1871-82.

72. Aruwa, C. E., & Olatope, S. O. A. 2015. Characterization of *Bacillus* species from convenience foods with conventional and API Kit Method: A comparative analysis. *Journal of Applied Life Sciences International*. **3(1)**: 42-48.
73. Kennedy, S.B., Tucker, J.W., Neidig, C.L., Vermeer, G.K., Cooper, V.R., Jarrell, J.L., and Sennett, D.G. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish : a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bull. Mar. Sci.* **62**: 573-588.
74. Hovda, M.B., Sivertsvik, M., Lunestad, B.T., Lorentzen, G., and Rosnes, J.T. 2007. Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE. *Food Microbiol.* **24**: 362-371.
75. R. Meidong, K. Khotchanalekha, S. Doolgindachbaporn, T. Nagasawa, M. Nakao, K. Sakai, S. Tongpim. 2018. Evaluation of probiotic *Bacillus aerius* B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Plamong *Pangasius bocourti*. *Fish Shellfish Immunol.* **73**: 1-10.
76. T.H. Tu, F. Silvestre, A. Bernard, C. Douny, T.N. Phuong, T.C. Tao, G. Maghuin-Rogiste, P. Kestemont. 2008. Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system. *Aquaculture.* **285**: 244-248.
77. Bricknell, R.A. Dalmo. 2005. The use of immunostimulants in fish

- larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* **19(5)**: 457-472.
78. Wang, Y. B., Li, J. R., & Lin, J. 2008. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture.* **281(1-4)** 1-4.
79. Nayak, S. K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.* **29(1)**: 2-14.
80. K.M. Selim, R.M. Reda, 2015. Improvement of immunity and disease resistance in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by dietary supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Fish Shellfish Immunol.* **44**: 496-503.
81. X. Zhou, Y. Wang, W. Li. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture.* **287**: 349-353
82. H. Liu, S. Wang, Y. Cai, X. Guo, Z. Cao, Y. Zhang, S. Liu, W. Yuan, W. Zhu Y. Zheng, Z. Xie, W. Guo, Y. Zhou. 2017. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* **60**: 326-333.
83. M. Venkateshwarlu, R.N.A. T, P. Kumara. 2013. Research article influence of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of common carp (*Cyprinus carpio*) Ecology, College of Fisheries, Mathsyanagar. *Int. J. Curr. Res.* **5**: 1696-1700.

84. H. Sankar, B. Philip, R. Philip, I.S.B. Singh. 2017. Effect of probiotics on digestive enzyme activities and growth of cichlids, *Etroplus suratensis* (Pearl spot) and *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Aquacult. Nutr.* **23**: 852-864.
85. T.J. Adorian, H. Jamali, H.G. Farsani, P. Darvishi, S. Hasanpour, T. Bagheri, R. Roozbehfar. 2018. Effects of probiotic bacteria *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activity, and hematological parameters of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *probiotics antimicrob, Proteins.* **11(1)**: 248-255
86. M.S. Sumon, F. Ahmmed, S.S. Khushi, M.K. Ahmmed, M.A. Rouf, M.A.H. Chisty, M.G. Sarower. 2018. Growth performance, digestive enzyme activity and immune response of Macrobrachium rosenbergii fed with probiotic Clostridium butyricum incorporated diets. *J. King Saud Univ. Sci.* **30**: 21-28.
87. M. Kavitha, M. Raja, P. Perumal. 2018. Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp. isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). *Aquac. Reports.* **11**: 59-69.
88. H. Abriouel, C.M.A.P. Franz, N. Ben Omar, A. Galvez. 2011. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 201-232.
89. X. Geng, X.H. Dong, B.P. Tan, Q.H. Yang, S.Y. Chi, H.Y. Liu, X.Q. Liu. 2012. Effects of dietary probiotic on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron*

- canadum*. *Aquac. Nutr.* **18**: 46-55.
90. Y.-Z. Sun, H.-L. Yang, R.-L. Ma, W.-Y. Lin. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol.* **29**: 803-809.
91. Buruiana, C. T., Profir, A. G., & Vizireanu, C. 2014. Effects of probiotic *Bacillus* species in aquaculture—an overview. *The Annals of the University of Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI. Food Technology.* **38(2)**: 9.
92. S.K. Nayak. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.* **29**: 2-14.
93. J.H. Cha, S. Rahimnejad, S.Y. Yang, K.W. Kim, K.J. Lee. 2013. Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. *Aquaculture.* 402-403.
94. Moriarty DJW. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture.* **164**: 351-8.
95. Wahyu Afrilasari, Widanarni, Anja Meryandini. 2019. Effect of Probiotic *Bacillus megaterium* PTB 1.4 on the Population of Intestinal Microflora, Digestive Enzyme Activity and the Growth of Catfish (*Clarias* sp.). *Journal of Biosciences.* **23**: 168-172.

96. L. Verschueren, G. Rombaut, P. Sorgeloos, W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 655-671.
97. M. Amin, Z. Rakhisi, A.Z. Ahmady. 2015. Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. *Avicenna J Clin Microb Infec.* **2**: 10-13.
98. Seconbes, C. J., Flecher, T. C., 1992. The role of phagocytes in the protective mechanism in fish. Annual. *Review of Fish Diseases.* **2**: 53-71.
99. Ellis, A. E. 1990. Lysozyme assays. *Techniques in fish immunology.* **1**: 101-103.
100. Kumari K and Sahoo PK. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. *Fish and Shell fish Immunol.* **19**, 307-316.
101. Lie, Ø. 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis Aquat Organ*, **6**: 1-5.
102. E.J. Schiffrin, D. Brassart, A.L. Servin, F. Rochat, A. 1997. Donnet-Hughes Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr.* **66**: 515-520.

103. Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., & Sugita, H. 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary immunology and immunopathology*. **102(4)**: 379-388.

## 감사의 글

금방 끝날 줄 알았던 박사과정이 많은 분들의 도움으로 무사히 잘 마칠 수 있었습니다. 박사과정 동안 항상 아낌없이 조언해주시고 지도해주신 허문수 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 바쁘신 가운데 미흡한 논문을 위해 애써주시고 격려해주신 김기영 교수님, 정준범 교수님, 진창남 박사님, 최학선 박사님께 감사드립니다. 그리고 학문적으로 많은 가르침을 주신 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 전유진 교수님, 여인규 교수님, 이경준 교수님, 이제희 교수님, 이승현 교수님, 정석근 교수님, 박상률 교수님, 이영돈 교수님께도 진심으로 감사의 말씀을 드립니다.

바다 속에서 시료 구해주신다고 고생하신 김동삼 박사님, 연구소 다닐 때부터 지금까지 함께 해오며 같이 연구하고 실험이 막힐 때마다 도움을 주시는 지영언니, 너무 감사드립니다. 덕분에 제가 걱정없이 실험할 수 있었던 것 같습니다. 진심어린 조언과 관심을 주신 김영주 박사님, 송관필, 이동헌 박사님 감사드립니다.

박사학위 준비하면서 실험에 많은 도움을 준 동휘와 승현, 그리고 우리 실험실 후배 경미, 원선, 영수, 졸업한 하리, 지현, 해리, 실험실 선배인 만철오빠, 주상오빠, 익수오빠, 준석오빠, 동민오빠, 정용오빠, 해여남 모임의 준상오빠, 창수오빠, 대준오빠에게도 감사드립니다.

항상 저를 믿고 응원해주신 우리엄마 김혜정 여사님, 재현, 소희, 소민, 제부, 율케, 사랑스런 조카들, 첫손주라고 사랑 듬뿍 주시는 우리 할머니, 외삼촌, 이모, 이모부 감사드립니다. 제가 학업에 집중할 수 있도록 지원해주시고, 농사일도 바쁘신 가운데도 세운이 봐주신다고 고생하신 시부모님, 그리고 아주버님, 형님께 감사하다는 말씀을 꼭 드리고 싶습니다.

마지막으로 졸업 준비하면서 같이 넘치 사료도 주러 같이 고생하면서 힘들어도 내색하지 않고 모든 걸 함께 해준 내사랑 남편 진우씨와 딸 세운에게 이 논문을 바칩니다.