



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

구멍갈파래(*Ulva pertusa*)의  
세균군집구조 분석 및 항균활성 탐색

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

崔河理

2017年2月



구멍갈파래(*Ulva pertusa*)의  
세균군집구조 분석 및 항균활성탐색

指導教授 許文洙

崔河理

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2016 年 12 月

崔河理의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ 김 기 영 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_ 이 승 현 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_ 허 문 수 \_\_\_\_\_



濟州大學校 大學院

2016 年 12 月

Study on bacterial community analysis and  
antibacterial activity in *Ulva pertusa*

Ha-Ri Choi

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

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

Department of Marine life science  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2017

# 목 차

목 차 .....	i
List of Tables .....	iv
List of Figures .....	vi
Abstract .....	vii
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
2.1. 시료채집 .....	4
2.2. 미생물의 분리 및 배양 .....	4
2.3. 순수 분리한 균주의 DNA분석 .....	7
2.3.1. 16S rRNA 유전자 증폭 .....	7
2.3.2. 16S rRNA 유전자의 RFLP 분석 .....	9
2.4. 염기서열 분석 및 계통학적 분석 .....	10
2.5. 항균활성 탐색 .....	11
2.6. UR11 <sup>T</sup> 균주의 동정 .....	13
2.6.1. 계통분류학적 동정 .....	13
2.6.1.1. 신종균주의 NCBI Genbank 등록 및 기탁 .....	13
2.6.1.2. 16S rRNA 염기서열을 이용한 계통분석 .....	14
2.6.1.3. DNA-DNA hybridization .....	15
2.6.1.4. DNA G+C content .....	16
2.6.2. UR11 <sup>T</sup> 균주의 형태학적 동정 .....	17

2.6.2.1. Gliding motility 및 그람염색 .....	17
2.6.2.2. SEM 및 TEM .....	17
2.6.3. 생리학적·생화학적 동정 .....	18
2.6.3.1. 온도·pH·NaCl·산소에 따른 성장특성 .....	18
2.6.3.2. Catalase 및 Oxidase .....	18
2.6.3.3. 가수분해능 .....	18
2.6.3.4. API 20NE 및 ZYM test .....	19
2.6.4. 화학분류학적 동정 .....	20
2.6.4.1. Fatty acid .....	20
2.6.4.2. Polar lipid .....	11
2.6.4.3. Quinone .....	22
III. 결과 및 고찰 .....	23
3.1. 배양 가능한 미생물의 순수분리 및 PCR-RFLP .....	23
3.2. 16S rRNA 염기서열의 계통학적 분석 .....	24
3.2.1. <i>Ulva pertusa</i> 에서의 세균군집의 계통학적 특성 .....	24
3.2.2. <i>Ulva pertusa</i> 의 세균군집 분석 .....	35
3.3. 항균활성을 갖는 미생물의 탐색 .....	40
3.4. UR11 <sup>T</sup> 균주 특성 .....	43
3.4.1. 계통분류학적 특성 .....	43
3.4.2. 형태학적 특성 .....	48
3.4.3. 생리·생화학적 특성 .....	49
3.4.4. 화학분류학적 특성 .....	52
IV. 요약 .....	55

V. 참고 문헌 .....	57
VI. 감사의 글 .....	65

## List of tables

Table 1. Composition of Marine agar .....	5
Table 2. Composition of R2A agar .....	6
Table 3. PCR Primers used in this study .....	8
Table 4. PCR condition of this study .....	8
Table 5. Restriction enzyme used in this study .....	9
Table 6. Strains used of antibacterial study .....	11
Table 7. Composition of medium for antibacterial study .....	12
Table 8. Type strain used in this study .....	13
Table 9. The phylogenetic relatives of <i>U. pertusa</i> bacteria in R2A .....	29
Table 10. The phylogenetic relatives of <i>U. pertusa</i> bacteria in MA .....	31
Table 11. Bacterial diversity associated with <i>Ulva pertusa</i> .....	37
Table 12. The antibacterial activity by isolated strains Supernatant liquid from <i>Ulva pertusa</i> .....	41
Table 13. The antibacterial activity by isolated strains Pellet from <i>Ulva</i>	



*pertusa* ..... 42

Table 14. Sequence similarity between UR11<sup>T</sup> and *F. jejuensis* EC11<sup>T</sup> ..... 45

Table 15. Biochemical characteristics of strain UR11<sup>T</sup> and related type strains  
..... 50

Table 16. Cellular fatty acid composition of strain UR11<sup>T</sup> and type strains 53

## List of figures

- Fig. 1. Representative agarose gel electrophoresis patterns of *Hae*III (A) and *Rsa* I (B) digested amplified 16S rRNA genes of bacterial strains isolated from *U. pertusa*. ..... 23
- Fig. 2. Phylogenetic tree of the 16S rRNA gene sequences of bacterial strain isolated from *Ulva pertusa* and other related taxa. .... 34
- Fig. 3. Pie-diagram of various bacterial genus isolated from *Ulva pertusa*. · 39
- Fig. 4. Pie-diagram showing the community structure and diversity of bacterial strains isolated from *Ulva pertusa*. ..... 39
- Fig 5. 16S rRNA sequence of the *Flavobacterium* sp. UR11<sup>T</sup>. ..... 44
- Fig 6. Phylogenetic tree of the 16S rRNA gene sequences of strain UR11<sup>T</sup> and other related taxa. .... 47
- Fig 7. Scanning electron microscopy (SEM) (A) and Transmission electron microscopy (TEM) (B) of strain UR11<sup>T</sup>. ..... 48
- Fig 8. Two dimensional thin-layer chromatogram of total polar lipids of strain UR11<sup>T</sup>. ..... 54

## Abstract

The present study was carried out to evaluate the diverse bacterial community in association with *Ulva pertusa*, the sea weed collected in and around Jeju Island, by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) marker method. About 145 bacterial strains associated with *Ulva pertusa* were screened and cultured in Marine agar and R2A agar. The 16S rRNA gene fragment from all the isolated strains were cut with molecular scissors like *Hae*III and *Rsa*I restriction enzymes and based on their restriction pattern each isolates were classified into different groups. Selected strains showed more than 91% 16S rRNA gene sequence similarity with that of known bacterial species which include 4 phyla namely *proteobacteria* (63%), *firmicutes* (11%), *actinobacteria* (4%) and *bacteroidetes* (22%) along with 7 classes (*actinobacteria*, *flavobacteriia*, *cytophagia*, *bacilli*, *α-proteobacteria*, *β-proteobacteria*, *γ-proteobacteria*), 13 orders, 18 families, and 27 genera. Present results confirmed the broad spectrum of diversified bacterial communities were in association with *Ulva pertusa* when compared with other regions. About 12 strains, which shows <97% 16S rRNA sequence similarity to previously identified bacteria, could be identified as noble species. However more experiments on morphological, physiological, and biochemical indices are further needed to confirm the novelty.

Among 104 strains, the supernatant and pellet of 21 and 14 strains respectively, showed antimicrobial activity. particularly, most strains showed strong activity against Gram - negative bacteria than Gram - positive bacteria.

A bacterial strain, labeled UR11<sup>T</sup> was isolated from green alga *Ulva pertusa* collected from Jeju Island, Korea. UR11<sup>T</sup> was identified as a gram-negative, rod-shaped, motile by gliding and aerobic bacterial strain with

yellow colonies on R2A plates. The strain UR11<sup>T</sup> grew over at temperature range of 10°C to 30°C (optimally at 25°C), a pH range of 6.0–11 (optimally at pH 7.0) and a NaCl range of 0.5–5% NaCl (w/v). Hydrolyses DNA, casein, tween 40 and tween 60, but not hydrolyses cellulose, starch, tween 20, tween 80. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences revealed that strain UR11<sup>T</sup> was a member of the genus *Flavobacterium*. Strain UR11<sup>T</sup> shared close similarity with *Flavobacterium jejuensis* EC11<sup>T</sup>(98.0%) *Flavobacterium jumunjinense* HME7102<sup>T</sup>(96.11%), *Flavobacterium haoranii* LQY-7<sup>T</sup>(95.27%), *Flavobacterium dongtanense* LW30<sup>T</sup>(95.08%), and *Flavobacterium ahnfeltiae* 10Alg 130<sup>T</sup>(94.91%). The major fatty acids (>5%) were iso-C<sub>15:0</sub>(33.93%), iso-G<sub>15:1</sub>(12.40%), iso-C<sub>17:0</sub>3OH(8.96%), iso-C<sub>16:0</sub>(7.00%) and iso-C<sub>15:0</sub>3OH(6.34%). The major polar lipids were phosphatidylethanolamine, seven unknown aminolipids, two unknown aminopolarlipids and two unknown lipids. Based on phenotypic, chemotaxonomic and phylogenetic evidence, strain UR11<sup>T</sup> represents a novel species of the genus *Flavobacterium*. The type strain is *Flavobacterium* sp. UR11<sup>T</sup> (=KCTC 52377<sup>T</sup> =JCM 31512<sup>T</sup>).

## I. 서론

해양은 지구의 약 70%를 차지하며, 지구 전체 생물은 약 80%가 서식한다고 알려져 있다(Abraham, 2004; Andersen and Sørensen, 1986; Hamann and Scheuer, 1993). 미생물, 식물, 해조류, 산호 등 많은 종들이 해양환경에서 서식하고, 해양은 마그네슘, 철, 칼륨 등의 다양한 무기물이 존재하며 고염, 고압, 저온 등의 육상과는 다른 환경을 갖기 때문에 해양생물은 육상생물과 다른 생리학적 특성을 바탕으로 생리활성 물질을 생산한다(Haygood *et al.*, 1999; Kelecom, 2002; Laatsch, 2006; Lam, 2006; Riyanti and Radjasa., 2009).

해양 생물 중 해조류(macroalgae)는 연안지역 생태계에 중요한 일차생산자로 녹조류(green algae), 갈조류(brown algae), 홍조류(red algae)로 나뉘며, 해양생물에게 먹이원이 되고 있다. 또한, 천연항균제나 천연항산화제 등의 생리활성물질의 연구와 함께 alginic acid, fucoidan 등의 다당류 등의 물질에 대해 연구되고 있다(Karabay-Yavasoglu *et al.*, 2007; Kuznetsova *et al.*, 2003; Park *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 1989; Taskin *et al.*, 2007).

녹조류이며, 갈파래과인 구멍갈파래는 단독 또는 2-3가닥씩 무리를 형성하고 10-30 cm 또는 그 이상으로 성장한다. 최근 제주도 해안에 대량으로 번식된 우점종으로, 녹조현상을 유발시키고 해안경관을 훼손시키는 등 다양한 문제를 일으킴으로써 이를 해결하기 위해 많은 인력과 비용을 소비하고 있다(Han *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Ko *et al.*, 2013). 이러한 이유로 최근 구멍갈파래에 관심이 집중되면서 구멍갈파래를 이용한 바이오에탄올의 생성, 추출물을 이용한 생리활성 물질 또는 사료 제작 등 폐기물인 구멍갈파래를 고부가가치 자원으로 활용하려는 많은 연구가 진행되고 있다(Kim *et al.*, 2011; Pengzhan *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2005, 2006).

이러한 해양생물에 서식하는 해양미생물은 항암제나 항바이러스, 항균작용을 하는 항생물질을 생산한다고 보고되고 있다. 이 결과는 해양생물과 공생하는 미생물이 생산하는 대사산물이라는 것으로 알려졌으며, 해양 유래 미생물에 대한 연

구가 증가되고 있다(Berdy, 2005; Bernan *et al.*, 1997; Bull *et al.*, 2000; Haefner, 2003; Koehn and Carter 2005). 또한 해조류에 서식하는 미생물과의 상호작용을 통해 긍정적인 효과를 갖는다는 보고도 있다. (Alongi, 1998; Beleneva and Zhukova, 2006; Bolinches *et al.*, 1988; Burke *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1994; Wiese *et al.*, 2009).

그러나 자연 생태계 내 존재하는 미생물 배양은 현재까지 단 1% 미만으로 배양 가능한 세균의 수는 극히 일부분으로 알려져 있다. 비배양법은 세균의 특성이 불분명하고 제한적인 예측을 할 수 있기 때문에 문제가 생길 수 있다. 따라서 미생물의 배양에 의한 분리는 기초 연구에 중요하다고 볼 수 있다(Amann *et al.*, 1995; Kim, 2011; Staley and Konopka, 1985). 미생물 중 다양성분석에 이용되는 분자생물학적 방법은 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 등이 있다(Brim *et al.*, 1999; Diez *et al.*, 2001; Smit *et al.*, 1997; Tiedje *et al.*, 1999; Widjoatmodjo *et al.*, 1994). RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)는 restriction enzyme을 사용하여 rRNA 단편을 잘라 pattern을 분석하는 방법으로, 실험방법이 빠르고 간단하며, 사용하는 restriction enzyme 종류에 따라 다른 pattern이 관찰되므로 미생물의 속 (genus)과 종 (species)의 구분에 이용되고 있다(Jeong *et al.*, 2010; Rohit *et al.*, 2016; Urakawa *et al.*, 1997).

본 연구에서는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)에서 서식하는 세균을 분리·배양하여 세균의 군집구조 분석 및 어류질병세균과 인체유해세균에 대한 항균실험을 진행하였고, 분리된 균주 중 신종후보균주인 *Flavobacterium* sp. UR11<sup>T</sup>를 동정하고자 기존에 보고된 *Flavobacterium* 속의 표준균주들과 비교·분석하여 신종실험을 수행하였다. *Flavobacterium* 속은 그람음성, 간균, 호기성으로 배지 상에서 노란색 집락을 띄는 균으로 해조류 (Miyashita *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2015), 토양 (Hu *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016), 담

수( Li *et al.*, 2016; Shin *et al.*, 2016), 해수(Nogi *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2011) 등 다양한 곳에서 발견된다.

## II. 재료 및 방법

### 2. 1. 시료채집

본 연구에 사용된 구멍갈파래 (*Ulva pertusa*)는 2015년 7월 15일 제주도 제주시 조천 신흥리에서 채집하였으며, 지퍼백에 담아 운반한 후 즉시 실험에 사용하였다.

### 2. 2. 미생물의 분리 및 배양

채집한 구멍갈파래는 인공해수로 1회 세척 후, 잘게 잘라 멸균한 0.85% 생리식염수에 넣어 균질화 시켰다. 균질화한 시료는 연속희석법으로  $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$  배로 희석한 후 Marine agar (MA, Difco, USA)와 R2A agar (Difco, USA) 배지에 도말하여 25°C에서 7일간 배양하였다. 각 배지에 자라난 colony는 육안으로 보여지는 형태학적 특징에 따라 선별하였으며, 선별된 colony는 3회 계대배양을 거쳐 순수 분리하였다. 분리된 균주는 20% (v/v) Glycerol에 현탁한 후 -80°C에 보관하였다.



Table 1. Composition of Marine agar

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

Table 2. Composition of R2A agar

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

## 2. 3. 순수 분리한 균주의 DNA분석

### 2. 3. 1. 16S rRNA 유전자 증폭

분리한 균주의 DNA를 추출하기 위해 2.5% Chelex (Chelex<sup>®</sup> Molecular Biology Grade Resin, Biorad, USA)에 분리된 균주를 접종한 후 95°C에 5분 동안 끓인 후 4°C에 보관하였다.

추출한 DNA는 Universal primer 27 Forward primer와 1522 Reverse primer를 사용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다(Table 3.). DNA 1  $\mu$ l, 각 primer의 10 pmol/primer 1  $\mu$ l, 멸균증류수 22  $\mu$ l를 AccuPower<sup>™</sup> PCR PreMIx (Bioneer, USA)에 첨가한 후, 최종부피 25  $\mu$ l를 맞추어 PCR를 수행하였다. PCR 조건은 Initial denaturation 5분 반응 후 94°C에서 Denaturation 1분, 55°C에서 Annealing 1분, 72°C에서 Extension 1분 반응을 30 cycle 수행한 후 72°C Final extension을 10분으로 PCR (Base for Gene Pro Thermal cycler, BIOER) 반응을 하였다 (Table 4.).

Table 3. PCR Primers used in this study

Primer	Sequence
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1522R	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

Table 4. PCR condition of this study

Step	Temperature	Time	Number of cycle
Initial denaturation	95°C	5	1
Denaturation	94°C	1	30
Annealing	55°C	1	
Extension	72°C	1	
Final extension	72°C	10	1
	4°C	∞	

### 2. 3. 2. 16S rRNA 유전자의 RFLP 분석

RFLP분석을 위해 *Hae*III (Enzynomics, korea)와 *Rsa*I (Enzynomics, korea)을 사용하였다(Table 5.). PCR 산물 10  $\mu$ l, 제한효소 1  $\mu$ l, EZ Buffer IV 2  $\mu$ l, 멸균 증류수 7 $\mu$ l를 멸균된 1.5ml micro tube에 최종 부피 20  $\mu$ l가 되도록 혼합한 후 37°C에서 2시간 30분 반응을 시켰다. 반응시킨 20  $\mu$ l는 2.5% agarose gel에서 2시간 30분 동안 50 vol에 전기영동(Sub-Cell<sup>®</sup> Agarose Gel Electrophoresis Systems, BIO-RAD)을 하여 PCR-RFLP 패턴을 확인하고 균주를 선정하였다.

Table 5. Restriction enzyme used in this study

Restriction enzyme	Cleavage site
<i>Hae</i> III	5'-GG ↓ CC-3'
	3'-CC ↑ GG-5'
<i>Rsa</i> I	5'-GT ↓ AC-3'
	3'-CA ↑ TG-5'

## 2. 4. 염기서열 분석 및 계통학적 분석

패턴에 따라 선정된 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 위해 (주) 제노텍 (Daejeon, Korea)에 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Genbank database와 EzTaxon server (Chun *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012)에서 유사한 염기서열을 비교하였으며, 가장 가까운 속 또는 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 본 연구에서 결정된 염기서열과 database에서 나타난 표준균주의 염기서열은 Clustal X 프로그램을 이용하여 multiple alignment을 결정하고, 계통수는 Mega 6.0 software (Tamura *et al.*, 2013)을 사용하여 Jukes and Cantor (1969) 방법으로 계산하고 neighbor-joining 방법을 사용하였고, 신뢰성 평가는 1,000회의 replication을 적용한 bootstrap 분석으로 하였다.

## 2. 5. 항균활성탐색

항균실험에 사용된 어류질병세균과 인체유해세균은 KCTC (Korean Collection for Type Cultures), KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)와 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받아 사용하였다 (Table 6.). 분양받은 균주들을 각 배지에 배양 후 배양액을 0.85% 생리식염수에 Optical Density (O.D)값이 0.4가 되도록 희석한 뒤 멸균한 면봉으로 Mueller Hinton Agar (MHA, Difco, USA)에 도말하였다(Table 7.). 분리된 균주들은 각 배지에 배양한 후, 12000rpm, 10동안 원심 분리하여 상층액을 paper disc (8 mm, ADVANTEC, Japan)에 50  $\mu$ l를 점적한 뒤 25°C에 건조시켰다. 건조된 disc를 병원균이 도말된 배지에 올려놓고 적정온도에 24시간 배양시킨 후 형성된 clear zone (mm)을 확인하였다.

Table 6. Strains used of antibacterial study

Strain	Gram staining	Medium	Temp.
Fish pathogenic bacteria			
<i>Edwardsiella tarda</i> KCTC 12267	-	1.5% BHIA	25°C
<i>Tenacibaculum maritimum</i> ATCC 43398	-	MA	25°C
<i>Streptococcus iniae</i> KCTC 3657	+	1.5% BHIA	25°C
<i>Streptococcus parauberis</i> KCTC 3651	+	1.5% BHIA	25°C
Human clinical bacteria			
<i>Escherichia coli</i> KCCM 40880	-	TSA	37°C
<i>Vbrio vulnificus</i> KCCM 41665	-	1% TSA	30°C
<i>Streptococcus mutans</i> KCCM 40105	+	BHIA	37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> KCCM 40307	+	1.5% BHIA	37°C

Table 7. Composition of medium for antibacterial study

Mueller Hinton Agar	
Ingredient	Amounts
Beef Extract Powder	2.0 g
Acid Digest of Casein	17.5 g
Starch	1.5 g
Agar	17.0 g
D.W	1 L

Brain Heart Infusion Agar	
Ingredient	Amounts
Calf Brains, Infusion from 200 g	7.7 g
Beef Heart, Infusion from 250 g	9.8 g
Proteose Peptone	10.0 g
Dextrose	2.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Disodium Phosphate	2.5 g
Agar	15.0 g
D.W	1 L

Tryptic Soy Agar	
Ingredient	Amounts
Pancreatic Digest of Casein	15.0 g
Papaic Digest of Soybean	5.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	15.0 g
D.W	1 L



## 2. 6. UR11<sup>T</sup> 균주의 동정

### 2. 6. 1. 계통분류학적 동정

#### 2. 6. 1. 1. 신종균주의 NCBI Genbank 등록 및 기탁

신종후보균주 UR11<sup>T</sup>의 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에 등록하였고, KCTC (Korean Collection for Type Cultures)와 JCM (Japan Collection of Microorganisms)에 기탁하였다. 표준균주들은 KCTC에서 분양받아 실험에 사용하였다(Table 8).

Table 8. Type strain used in this study

Type strain	KCTC NO.
<i>F. jejuensis</i>	42149
<i>F. jumunjinense</i>	23618
<i>F. haoranii</i>	23008
<i>F. dongtanense</i>	15621
<i>F. ahmfeltiae</i>	32467

## 2. 6. 1. 2. 16S rRNA 염기서열을 이용한 계통분석

Genomic DNA는 Wilson (1987)방법을 이용하여 추출하였고 universal primer Universal primer 27 Forward primer와 1522 Reverse primer을 사용하여 PCR을 수행하였다(Table 3, 4). PCR product는 TOPO Cloning kit (Invitrogen)을 사용하여 cloning을 하였고 AccuPrep<sup>®</sup> Nano-Plus Plasmid Mini Extraction kit (Bioneer)를 이용하여 Plasmid DNA를 추출한 후, (주)제노텍 (Dajeon, Korea)에 의뢰하여 분석을 하였다. 분석된 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Genbank database와 EzTaxon server (Chun *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012)에서 상동성을 비교하였으며, 가장 가까운 속 또는 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 본 연구에서 결정된 염기서열과 database에서 나타난 표준균주의 염기서열은 Clustal X 프로그램을 사용하여 multiple alignment을 결정하고, 계통수는 Mega 6.0 software (Tamura *et al.*, 2013)을 사용하여 Jukes and Cantor (1969) 방법으로 계산하고 neighbor-joining 방법을 사용하였으며, 신뢰성 평가는 1,000회의 replication을 적용한 bootstrap 분석으로 하였다.

### 2. 6. 1. 3. DNA-DNA hybridization

DNA 200  $\mu$ l (0.1mg/ml)를 100°C에서 10분간 끓인 직후 얼음에 꽂는다. PBS M buffer (2X PBS 1 ml, 증류수 0.6 ml, MgCl<sub>2</sub> (1 M) 0.2 ml) 1.8 ml를 첨가한 후 96 well Black Immunoplate well에 100  $\mu$ l씩 분주 후 37°C에서 3시간 반응시켰다. Solution 제거 후 200  $\mu$ l 1X PBS buffer로 1회 세척을 해주고 45°C에서 overnight 해준 후 Pre-hybridization (20X SSC 1 ml, 열 변성한 salmon sperm 1 ml, 50X Denhart solution 1 ml, Foramide 5 ml, 증류수 2 ml) 용액을 200  $\mu$ l 분주 후 1시간동안 반응시켰다. 표식 DNA제조를 위해 DNA 10  $\mu$ l (1 mg/ml)에 10  $\mu$ l photobiotin (1 mg/ml)을 혼합 하여 100°C, 5분 반응한 후 얼음에 5분 동안 급냉하였다. 0.1M Tris-HCl (pH 9.0) 200  $\mu$ l를 첨가하고 1-butanol 100  $\mu$ l와 혼합한 후 1분 원심분리 (12,000 rpm, 1분, 4°C)하여 상층액을 제거해주었다. 다시 1-butanol 100  $\mu$ l를 첨가한 후 원심분리하여 제거 후 100°C에서 5분 동안 반응 후 얼음에 꽂았다. Hybridization 용액 1176  $\mu$ l와 표식 DNA 24  $\mu$ l를 첨가한 후 잘 섞어주었다. 1시간 반응시킨 Pre-hybridization 용액을 버리고 표식 DNA를 Hybridization 용액을 100  $\mu$ l 분주 후 38°C에 반응하였다. 2시간 30분 후 용액을 버리고 200  $\mu$ l의 2X SSC로 2회 세척 후 Solution 1(Bovine serum albumin 0.05 g, Triton X-100 10  $\mu$ l, 1X PBS 10 ml) 200  $\mu$ l를 각 well에 분주 후 실온에 10분 동안 반응하였다. Solution 1 제거 후 Solution 2(Bovine serum albumin 0.05 g, Triton X-100 10  $\mu$ l, 1X PBS 10 ml, Streptavidine- $\beta$ -galactosidase 10  $\mu$ l)를 100  $\mu$ l 분주하여 37°C에서 30분 반응하였다. 1X PBS 200  $\mu$ l로 2회 세척한 후 4-MUF-Gal solution (1M MgCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ l, 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranoside 1 mg, 1X PBS 10 ml, N,N-dimethyl formamide 100  $\mu$ l) 100  $\mu$ l를 각 well에 분주 후 0분, 5분, 10분, 15분마다 여기파장 340nm, 방사파장 460nm에서 형광광도를 측정하였다(Ezaki *et al.*, 1989).

#### 2. 6. 1. 4. DNA G+C content

분리균주의 DNA G+C 함량을 분석하기 위해 R2A agar배지에 3일간 25°C에 배양 후 한국미생물보존센터 (KCCM)에 의뢰하여 분석하였다.

## 2. 6. 2. UR11<sup>T</sup> 균주의 형태학적 동정

### 2. 6. 2. 1. Gliding motility 및 그람염색

Gliding motility 확인을 위해 0.5% agar가 함유된 R2A Broth배지에 분리된 균주를 백금이로 긁어 배지 윗부분 약 5mm 깊이에 접종했다. 25°C에서 일주일동안 배양 후 균이 확산되면 양성으로 판단한다.

그람염색 kit (BBL, Difco, USA)를 사용하여 분리균주를 슬라이드글라스에 열고정하고 Crystal Violet으로 1분간 염색 후 세척한 뒤 Iodine으로 1분간 고정시켰다. 다시 세척 후 95% Ethanol로 20초간 탈색을 거쳐 Safranin으로 1분간 염색시킨 뒤 현미경으로 관찰하였다.

### 2. 6. 2. 2. SEM 및 TEM

분리균주의 형태관찰을 위해 R2A agar (Difco, USA) 배지에 계대하여 25°C에 3일간 배양하였다. Scanning electron Microscope을 위해 단독 colony를 배지와 함께 잘라 glutaraldehyde 용액에 담근 후 실온에 2시간 반응시켰다. 1X PBS buffer로 2회 세척한 뒤 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% Ethanol로 각각 1시간씩 탈수한 후, Reagent 1 (Isoamyl acetate 0.5 ml, Ethanol 1.5 ml)에 1시간, Reagent 2 (Isoamyl acetate 1 ml, Ethanol 1 ml)에 1시간, Reagent 3 (Isoamyl acetate 1.5 ml, Ethanol 0.5 ml)에 1시간, 100% Isoamyl acetate 2 ml에 1시간씩 처리하였다. 그 후 CO<sub>2</sub> gas로 건조시킨 뒤 금박처리를 하여 관찰하였다(SUPRA<sup>TM</sup> 55VP, ZEISS).

### 2. 6. 3. 생리학적·생화학적 동정

#### 2. 6. 3. 1. 온도·pH·NaCl·산소에 따른 성장특성

온도에 따른 성장을 알기 위해 R2A agar (Difco, USA)에 도말한 뒤 5-45°C(간격 5°C)에서 일주일간 배양하였다. pH에 따른 성장을 알기 위해 R2A agar (Difco, USA)에 1N HCl과 NaOH를 사용하여 pH 5.0-11.0(간격 pH 1.0)을 보정한 후 균을 도말하여 25°C에서 14일간 배양하였다. NaCl에 따른 성장을 알기 위해 R2A agar (Difco, USA)에 NaCl의 농도를 각 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7% (w/v)로 하여 균을 도말한 후 25°C에서 14일간 배양하였다. 혐기성 조건에서 균이 성장하는지 알아보기 위해 R2A agar (Difco, USA)에 균을 도말한 후 anaerobic jar에 AnaeroPack (Oxoid)을 넣은 후 25°C에서 4주간 배양하여 관찰하였다.

#### 2. 6. 3. 2. Catalase 및 Oxidase

Catalase test를 위해 R2A agar에 25°C에 3일간 배양한 후 분리균주에 Catalase reagent (BioMerieux, UK)를 떨어트려 기포가 발생하면 양성으로 판단하였고, Oxidase test는 Filter paper (Advantec®, Japan)에 균을 바른 후 Oxidase reagent (BioMerieux, UK)를 떨어트려 보라색으로 변하면 양성으로 보았다.

#### 2. 6. 3. 3. 가수분해능

R2A agar에 starch 3% (w/v), Tween 20, 40, 60, 80 1% (w/v), cellulose 1% (w/v), DNase 1% (w/v)로 농도로 각 각 첨가한 후 제조하였다. casein 1% (w/v), 제조된 배지에 균주를 도말하여 25°C에서 3일간 배양하였다.

casein과 cellulose는 배양 후 투명환이 생기면 양성으로 판단하였으며, Tween 20, 40, 60, 80은 혼탁환이 생기면 양성으로 판단하였다. starch은 iodine을 떨어

트렸을 때 투명환이 생기면 양성으로 판단하였고, DNase test는 1M HCl을 떨어트렸을 때 투명환이 생기면 양성으로 판단하였다.

#### 2. 6. 3. 4. API 20NE 및 ZYM test

기질이용 및 효소활성 등 균의 생리·생화학적 특성을 알아보기 위해 R2A agar 배지에 25°C에서 3일간 배양한 균을 사용하여 API 20NE와 ZYM kit (BioMerieux, UK)를 제조사에 지침에 따라 실험하였다.

## 2. 6. 4. 화학분류학적 동정

### 2. 6. 4. 1. Fatty acid

표준균주와 분리균주는 R2A agar 배지에 도말하여 25°C에서 3일간 배양하였다. 배양한 균체 약 40mg을 시험관에 모은 후 Reagent 1 (Sodium hydroxide 45 g, Methanol 150 ml, 증류수 150 ml)을 1 ml씩 분주하여 vortexing 후 100°C, 5분 동안 반응한다. 다시 5초간 vortexing 후 100°C에서 25분간 반응한다. 37°C에서 1분간 식혀준 뒤 Reagent 2 (6N HCl 325 ml, Methanol 275 ml)을 2 ml 첨가 후 vortexing하여 뚜껑과 시험관을 sealing한다. 80°C, 10분 반응 후 37°C, 1분간 식혀준 후 Reagent 3 (Hexane 200 ml, Methyl tert-butyl ether 200 ml) 1.25 ml 첨가한 후 10분간 rotation 해준다. 하층액은 제거한 뒤 Reagent 4 (Sodium hydroxide 10.8 g, 증류수 900 ml) 3 ml씩 분주 후 5분간 rotation 한다. 2/3의 상층부분을 GC vial에 취한 후 Sherlock Microbial Identification System (MIDI)사의 절차에 따라 TSBA 5.0 library (version 4.5)를 사용하여 분석하였다(Sasser, 1990).



## 2. 6. 4. 2. Polar lipid

세포막의 polar lipid는 two-dimensional TLC 방법을 이용해 분석하였다. 균주는 R2A Broth 배지에 25°C, 3일간 진탕배양 후 12,000 rpm으로 원심분리하여 균체를 모으고 동결건조하여 사용하였다. 건조된 균체 50 mg을 시험관에 옮긴 후 MeOH와 0.3% NaCl을 100:10(v/v)으로 혼합한 후 2 ml와 Petroleum ether 2 ml 분주 후 15분 동안 rotation해준다. 3000 rpm, 10분 원심분리하여 상층액은 제거 후 Petroleum ether 1 ml 분주 후 15분간 rotation 하여 잘 섞어준다. 다시 3000 rpm, 10분 원심분리하여 상층액을 제거한다. 남은 부분은 100°C, 5분간 가열하고 37°C에서 식힌 후 chloroform: methanol: 0.3% NaCl (90:100:30, v/v/v) 용액을 2.3 ml 분주하여 1시간 rotation한다. 3000rpm, 5분간 원심분리하여 상층액은 새로운 15 ml conical tube에 옮긴다. 남은 부분에 chloroform: methanol: 0.3% NaCl (50:100:40, v/v/v) 0.75 ml 첨가하여 잘 섞어준 뒤 3000rpm, 10분 원심분리하여 상층액을 전 단계에 옮겨놓은 상층액과 혼합한다. chloroform과 0.3% NaCl을 각 1.3 ml씩 첨가하여 vortexing해주고 3000rpm, 10분 원심분리하여 상층액은 제거하고 Polar lipid가 추출된 하층액은 37°C에서 농축하여 사용했다. 농축한 polar lipid는 chloroform: methanol (2:1, v/v) 50  $\mu$ l에 녹인 후 TLC plate (silica gel 60 plate 10 × 10 cm, Merck)의 모서리 1 cm × 1 cm에 5  $\mu$ l 점적하였다. solvent 1 (chloroform: methanol: water = 65: 25: 4, v/v)으로 30분 전개 후 30분 말리고 solvent 2 (chloroform: methanol: acetic acid: water = 80: 12: 15: 4, v/v)으로 30분 전개 후 30분 말린다. 5% Phosphomolybdic acid (total lipid), ninhydrin reagent (amino group), molybdenum blue reagent (phosphate),  $\alpha$ -naphthol-sulphuric acid (glycolipid) 4가지 발색시약을 사용하여 polar lipid를 조사하였다(Minnikin *et al.*, 1984).

### 2. 6. 4. 3. Quinone

퀴논은 Minnikin *et al.* (1984) 기술된 방법으로 추출하였으며, 추출된 퀴논은 Tamaoka, (1986)가 제안한 방법으로 분석하였다.

실험균주는 R2A Broth 배지에 3일 동안 25°C에서 진탕배양한 후, 12,000 rpm으로 원심분리하여 균체를 모으고 동결건조했다. 건조된 균체 50 mg을 15ml tube에 옮긴 후 MeOH와 0.3% NaCl을 100:10(v/v)으로 혼합한 용액 2 ml와 Hexan 2 ml를 분주하고 15분간 rotation해줬다. 10분간 3000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 퀴논을 분석하는데 사용하였다. 분석을 위해 MeOH와 isoprophyl ether를 4:1(v/v)로 혼합한 용액에 용출한 후, Spherisorb 5 $\mu$ m ODS2 column (250 × 4.6 mm; Waters)으로 여과하고 reversed-phase HPLC을 이용해 분석하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 3. 1. 배양 가능한 미생물의 순수분리 및 PCR-RFLP

*Ulva pertusa*에서 분리된 배양 가능한 세균은 MA배지에서 82개의 균주와 R2A agar배지에서 63개의 균주로 총 145개의 균주가 분리되었다. MA배지에서 분리한 82개의 균주 2종의 제한효소를 이용하여 RFLP한 결과, *Hae* III에서 39 type, *Rsa* I에서 36 type이 관찰되었고, R2A agar배지에서 분리한 63개의 균주는 *Hae* III에서 32 type, *Rsa* I에서 33 type이 관찰되었다(Fig. 1). 분석결과, 104개의 균주를 선별하였다.

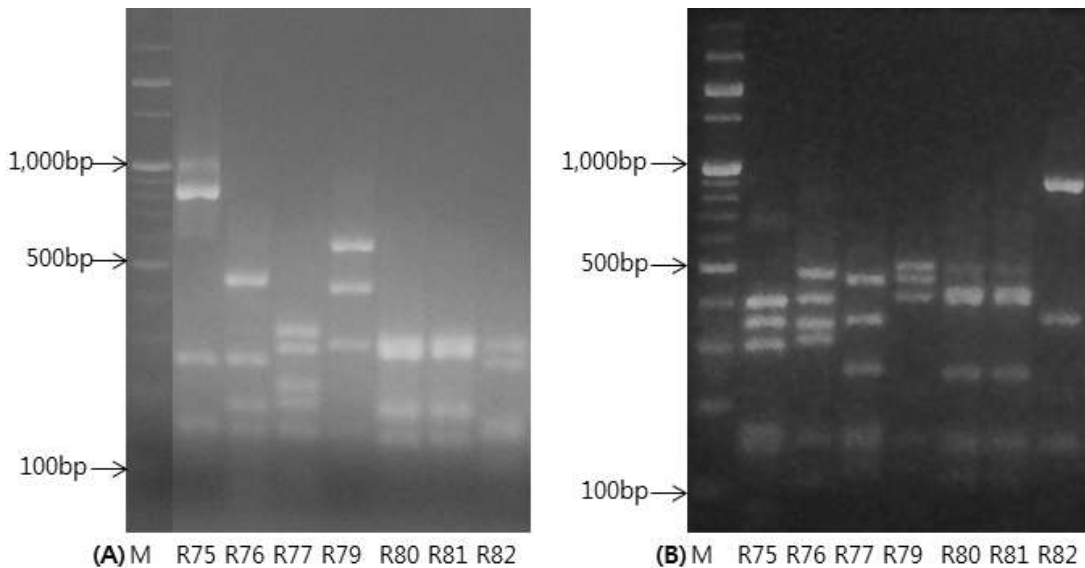


Fig. 1. Representative agarose gel electrophoresis patterns of *Hae*III (A) and *Rsa*I (B) digested amplified 16S rRNA genes of bacterial strains isolated from *U. pertusa*.

### 3. 2. 16S rRNA 염기서열의 계통학적 분석

#### 3. 2. 1. *Ulva pertusa*에서의 세균군집의 계통학적 특성

16S rRNA는 돌연변이가 거의 일어나지 않아 유사한 염기서열을 비교하여 세균을 분류하는데 유용하다. 많은 연구자들로부터 세균들의 rRNA 염기서열에 관한 자료가 축적되어 가고 있으며, 16S rRNA 염기서열 분석법의 자동화로 정확하면서도 쉽게 세균을 분류 할 수 있게 되었다.

104개의 균주의 16S rRNA 염기서열은 NCBI Genbank와 EzTaxon server에서 유사한 염기서열을 비교하고 가장 가까운 속이나 종을 확인하고 계통수를 작성하였다(Fig. 2).

염기서열 분석 결과, 구멍갈파래에서의 주요 분류군은 *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*로 4개의 Phylum이 확인되었다.

*Actinobacteria* (Phylum)는 *Actinobacteria* (Class), *Micrococcales* (Order), *Microbacteriaceae* (Family), *Microbacterium* (Genus)로 1개의 속이 나타내었다. *Microbacterium* 속의 균주는 3균주(R24, R45, R93)들이 분리되었으며, R24은 *Microbacterium aurantiacum* CIP 105730<sup>T</sup>, R93은 *Microbacterium aurantiacum* DSM 12506<sup>T</sup>와 98% 이상의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보였고, R45는

*Microbacterium aquimaris* JS54-2<sup>T</sup>와 99% 이상의 염기서열 유사도를 보였다.

*Bacteroidetes* (Phylum)는 *Flavobacteriia*와 *Cytophagia*의 2개의 강(Class)이 나타내었다.

*Bacteroidetes* (Phylum), *Cytophagia* (Class), *Cytophagales* (Order), *Leadbetterella* (Family), *Lacihabitans* (Genus)로 R44 균주가 *Lacihabitans soyangensis* HME6675<sup>T</sup>와 91.09%의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보였다.

*Bacteroidetes* (Phylum), *Flavobacteriia* (Class), *Flavobacteriales* (Order), *Flavobacteriaceae* (Family)에서는 *Cellulophaga*, *Nonlabens*, *Maribacter*,

*Olleya*, *Flavobacterium*의 5개의 속(Genus)이 분리되었고, *Cellulophaga* 속에 속하는 M40, M95, M88 균주는 *Cellulophaga geojensis* M-M6<sup>T</sup>, *Nonlabens* 속에 속하는 M75, M89, M99, M111은 *Nonlabens arenilitoris* M-M3<sup>T</sup>, M81은 *Nonlabens ulvanivorans* PLR<sup>T</sup>, *Maribacter* 속에 속하는 M100은 *Maribacter dokdonensis* DSW-8<sup>T</sup>, *Olleya* 속에 속하는 M71, M83, M97은 *Olleya marilimosa* CAM030<sup>T</sup>와 98~99% 이상의 염기서열 유사도를 보였다. *Flavobacterium* 속에 속하는 R11 균주는 *Flavobacterium jejuensis* EC11<sup>T</sup>와 98%의 염기서열 유사도를 보였고, R39, R54, R91, R92균주는 각각 *Flavobacterium omnivorum* JCM 11313<sup>T</sup>, *Flavobacterium pectinovorum* DSM 6368<sup>T</sup>, *Flavobacterium pectinovorum* DSM 6368<sup>T</sup>, *Flavobacterium pectinovorum* DSM 6368<sup>T</sup>와 97% 이하의 염기서열 유사도를 보였으며, R61, R63균주는 각각 *Flavobacterium ahnfeltiae* 10Alg 130<sup>T</sup>와 *Flavobacterium ponti* GSW-R14<sup>T</sup>에 99% 이상의 염기서열 유사도를 보였다.

*Firmicutes* (Phylum), *Bacilli* (Class)는 *Bacillales*, *Lactobacillales*로 2개의 목 (Order)으로 분리되었으며, *Bacillales* 목은 *Bacillaceae*, *Exiguobacteriaceae*로 2개의 과(Family)로 나타났다.

*Firmicutes* (Phylum), *Bacilli* (Class), *Bacillales* (Order), *Bacillaceae* (Family), *Bacillus* (Genus)에 속하는 R55, M116 균주는 각각 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429<sup>T</sup>, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610<sup>T</sup>와 99% 이상의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보여주었으며, *Firmicutes* (Phylum), *Bacilli* (Class), *Bacillales* (Order), *Exiguobacteriaceae* (Family), *Exiguobacterium* (Genus)에 속하는 R5는 *Exiguobacterium indicum* HHS31<sup>T</sup>, R68, R90은 *Exiguobacterium oxidotolerans* JCM 12280<sup>T</sup>와 99% 이상의 염기서열 유사도를 보였다.

*Firmicutes* (Phylum), *Bacilli* (Class), *Lactobacillales* (Order), *Streptococcaceae* (Family), *Streptococcus* Genus)에 속하는 M86, M107 균주는 *Streptococcus parauberis* NCFD 2020<sup>T</sup>와 99% 이상의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 나타내었다.

*Proteobacteria* 문(phylum)은  $\alpha$ -*proteobacteria*,  $\beta$ -*proteobacteria*,  $\gamma$

*-proteobacteria* 3개의 강(Class)으로 분리되고, *α-proteobacteria* 강은 *Rhodobacterales*, *Sphingomonadales*의 2개의 목(Order)로 나뉘고, *Rhodobacterales* 목의 *Rhodobacteraceae* 과(Family)는 *Ruegeria*, *Loktanella*, *Paracoccus*, *Leisingera*, *Octadecabacter*로 5개의 속(Genus)으로 분리되었고, *Sphingomonadales* 목의 *Erythrobacteraceae* 과(Family)는 *Erythrobacter*로 1개의 속(Genus)으로 나타내었다. *Ruegeria* 속에 속하는 M28, M29, M43, M50, M51, M57, M62 균주는 *Ruegeria mobilis* NBRC 101030<sup>T</sup>, *Loktanella* 속에 속하는 R37, R38 균주는 *Loktanella salsilacus* LMG 21507<sup>T</sup>와 99% 이상의 염기서열 유사도를 나타냈고, *Paracoccus* 속의 M66 균주는 *Paracoccus homiensis* DD-R11<sup>T</sup>, *Leisingera* 속의 M84 균주는 *Leisingera daeponensis* TF-218<sup>T</sup>, *Octadecabacter* 속의 M117 균주는 *Octadecabacter temperatus* SB1<sup>T</sup>와 97% 이하의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보여주었다. *Erythrobacter* 속에 속하는 M74 균주는 *Erythrobacter aquimaris* SW-110<sup>T</sup>와 98% 이상의 염기서열 유사도를 나타내었다.

*Proteobacteria* 문(phylum)의 *β-proteobacteria* 강(Class)은 *Burkholderiales* 목(Order), *Comamonadaceae* 과(Family), *Hydrogenophaga* 속(Genus)으로 R33, R36, R72, R73 균주가 분리되었으며 *Hydrogenophaga taeniospiralis* ATCC 49743<sup>T</sup>와 98% 이상의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보여주었다.

*Proteobacteria* 문(phylum)의 *γ-proteobacteria* 강(Class)은 *Oceanospirillales*, *Alteromonadales*, *Pseudomonadales*, *Vibrionales*, *Aeromonadales* 5개의 목(Order)으로 분리되며, *Oceanospirillales* 목은 *Halomonadaceae*, *Oceanospirillaceae*로 2개의 과(Family)로 분리되며, *Alteromonadales* 목은 *Alteromonadaceae*, *Shewanellaceae*, *Pseudoalteromonadaceae* 과로 분리되며, *Pseudomonadales* 목은 *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* 과로 분리되며, *Vibrionales* 목은 *Vibrionaceae* 과, *Aeromonadales* 목은 *Aeromonadaceae* 과로 나타내었다.

*Halomonadaceae* 과의 *Cobetia* 속에 속하는 M3 균주는 *Cobetia marina* DSM 4741<sup>T</sup>, *Oceanospirillaceae* 과의 *Oceanospirillum* 속에 속하는 M7 균주는 *Oceanospirillum linum* ATCC 11336<sup>T</sup>와 99% 이상의 염기서열 유사도를 보여주

었다.

*Alteromonadaceae* 과의 *Alteromonas* 속에 속하는 M37, M48, M58, M63 균주는 *Alteromonas marina* SW-47<sup>T</sup>, M52, M72 균주는 *Alteromonas macleodii* ATCC 27126<sup>T</sup>, M64, M80 균주는 *Alteromonas litorea* TF-22<sup>T</sup>, M87, M109 균주는 *Alteromonas mediterranea* DE<sup>T</sup>, M68 균주는 *Alteromonas gracilis* 9a2<sup>T</sup>와 97~99% 이상의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 나타내었다. *Alteromonadaceae* 과의 *Paraglaciecola*속에 속하는 M102 균주는 *Paraglaciecola aquimarina* GGW-M5<sup>T</sup>와 95.60%의 염기서열 유사도를 보여주었다.

*Shewanellaceae* 과의 *Shewanella* 속의 R34, R56, R88, M38, M44, M56, M61, M67, M70, M82, M91, M108, M113, M115 균주는 *Shewanella basaltis* J83<sup>T</sup>와 99% 이상의 염기서열 유사도를 나타내었다.

*Pseudoalteromonadaceae* 과의 *Pseudoalteromonas* 속의 M2, M4, M6, M12, M18, M30, M34, M47 균주는 *Pseudoalteromonas piscicida* IAM12932<sup>T</sup>, M1 균주는 *Pseudoalteromonas tetraodonis* IAM 14160<sup>T</sup>, M14 균주는 *Pseudoalteromonas rubra* ATCC 29570<sup>T</sup>, M16 균주는 *Pseudoalteromonas shioyasakiensis* SE3<sup>T</sup>, M93 균주는 *Pseudoalteromonas marina* Mano4<sup>T</sup>와 99% 이상의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보여주었다.

*Pseudomonadaceae* 과의 *Pseudomonas* 속의 R9 균주는 *Pseudomonas monteilii* NBRC 103158<sup>T</sup>, R14 균주는 *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21<sup>T</sup>, R18 균주는 *Pseudomonas taiwanensis* BCRC 17751<sup>T</sup>, R19 균주는 *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21<sup>T</sup>, M39 균주는 *Pseudomonas pachastrellae* KMM 330<sup>T</sup>와 98% 이상의 염기서열 유사도를 나타내었고, *Moraxellaceae* 과의 *Actinobacter* 속의 R1, R6, R75 균주는 *Acinetobacter venetianus* RAG-1<sup>T</sup>와 99% 이상의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보여주었다.

*Vibrionaceae* 과의 *Vibrio* 속의 M8, M9, M20, M23 균주는 *Vibrio neocaledonicus* NC470<sup>T</sup>, M11 균주는 *Vibrio parahaemolyticus* NBRC 12711<sup>T</sup>와 99% 이상의 염기서열 유사도를 나타내었으며, *Aeromonadaceae* 과의 *Aeromonas* 속의 R3, R67 균주는 *Aeromonas bivalvium* CECT 7113<sup>T</sup>, R22 균주

는 *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* LMG 19707<sup>T</sup>, R23 균주는 *Aeromonas taiwanensis* A2-50<sup>T</sup>와 99% 이상의 16S rRNA 유전자 염기서열 유사도를 보여주었다.

16S rRNA 유전자 염기서열 유사도 비교결과, 분리된 104개의 균주 중 12개의 균주가 표준균주와 97% 이하의 상동성을 보여 새로운 속 또는 종으로 보고될 가능성이 높은 신종후보균주라 생각되며, 앞으로 표준균주 (Type strain)와 함께 신종 실험이 진행되어야 할 것으로 판단된다(Table 9, 10.).



Table 9. The phylogenetic relatives of *U. pertusa* bacteria in R2A

Marine isolate	Closest relative species	Sequence similarity
R1	<i>Acinetobacter venetianus</i>	99.7
R3	<i>Aeromonas bivalvium</i>	99.9
R5	<i>Exiguobacterium indicum</i>	99.7
R6	<i>Acinetobacter venetianus</i>	99.8
R9	<i>Pseudomonas monteilii</i>	99.7
R11	<i>Flavobacterium jenuensis</i>	98.0
R14	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	98.6
R18	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	99.7
R19	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	98.5
R22	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i>	99.9
R23	<i>Aeromonas taiwanensis</i>	99.7
R24	<i>Microbacterium aurantiacum</i>	98.5
R33	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>	98.3
R34	<i>Shewanella basaltis</i>	99.7
R36	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>	98.0
R37	<i>Loktanella salsilacus</i>	99.6
R38	<i>Loktanella salsilacus</i>	99.6
R39	<i>Flavobacterium omnivorum</i>	97.1
R44	<i>Lacihabitans soyangensis</i>	91.1
R45	<i>Microbacterium aquimaris</i>	99.7
R54	<i>Flavobacterium pectinovorum</i>	97.2
R55	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	99.7
R56	<i>Shewanella basaltis</i>	99.8

Table 9. Continue.

Marine isolate	Closest relative species	Sequence similarity
R61	<i>Flavobacterium ahnfeltiae</i>	99.8
R63	<i>Flavobacterium ponti</i>	99.2
R67	<i>Aeromonas bivalvium</i>	99.8
R68	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	99.2
R72	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>	98.2
R73	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>	98.2
R75	<i>Acinetobacter venetianus</i>	99.5
R88	<i>Shewanella basaltis</i>	99.9
R90	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	99.6
R91	<i>Flavobacterium pectinovorum</i>	97.1
R92	<i>Flavobacterium pectinovorum</i>	97.3
R93	<i>Microbacterium aurantiacum</i>	98.4

Table 10. The phylogenetic relatives of *U. pertusa* bacteria in MA

Marine isolate	Closest relative species	Sequence similarity
M1	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	99.9
M2	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	100
M3	<i>Cobetia marina</i>	99.4
M4	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	99.9
M6	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	99.9
M7	<i>Oceanospirillum linum</i>	99.4
M8	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	99.6
M9	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	99.9
M11	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99.5
M12	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	99.9
M14	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	99.9
M16	<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i>	98.6
M18	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	100
M20	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	99.7
M23	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	99.9
M28	<i>Ruegeria mobilis</i>	99.4
M29	<i>Ruegeria mobilis</i>	100
M30	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	99.9
M34	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	99.9
M37	<i>Alteromonas marina</i>	98.5
M38	<i>Shewanella basaltis</i>	99.9
M39	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	99.5
M40	<i>Cellulophaga geojensis</i>	99.9

Table 10. Continue.

Marine isolate	Closest relative species	Sequence similarity
M43	<i>Ruegeria mobilis</i>	99.5
M44	<i>Shewanella basaltis</i>	99.9
M47	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	100
M48	<i>Alteromonas marina</i>	98.3
M50	<i>Ruegeria mobilis</i>	99.8
M51	<i>Ruegeria mobilis</i>	99.8
M52	<i>Alteromonas macleodii</i>	99.5
M56	<i>Shewanella basaltis</i>	99.8
M57	<i>Ruegeria mobilis</i>	99.4
M58	<i>Alteromonas marina</i>	99.7
M61	<i>Shewanella basaltis</i>	99.8
M62	<i>Ruegeria mobilis</i>	99.9
M63	<i>Alteromonas marina</i>	99.2
M64	<i>Alteromonas litorea</i>	97.4
M66	<i>Paracoccus homiensis</i>	97.5
M67	<i>Shewanella basaltis</i>	99.7
M68	<i>Alteromonas gracilis</i>	99.9
M70	<i>Shewanella basaltis</i>	99.9
M71	<i>Olleya marilimosa</i>	98.9
M72	<i>Alteromonas macleodii</i>	99.6
M74	<i>Erythrobacter aquimaris</i>	98.7
M75	<i>Nonlabens arenilitoris</i>	99.9
M80	<i>Alteromonas litorea</i>	97.4

Table 10. Continue.

Marine isolate	Closest relative species	Sequence similarity
M81	<i>Nonlabens ulvanivorans</i>	99.9
M82	<i>Shewanella basaltis</i>	99.8
M83	<i>Olleya marilimosa</i>	98.9
M84	<i>Leisingera daeponensis</i>	97.2
M86	<i>Leisingera daeponensis</i>	99.5
M87	<i>Alteromonas mediterranea</i>	97.4
M88	<i>Cellulophaga geojensis</i>	99.9
M89	<i>Nonlabens arenilitoris</i>	99.9
M91	<i>Shewanella basaltis</i>	99.8
M93	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	99.6
M95	<i>Cellulophaga geojensis</i>	99.9
M97	<i>Olleya marilimosa</i>	99.2
M99	<i>Nonlabens arenilitoris</i>	99.9
M100	<i>Maribacter dokdonensis</i>	99.8
M102	<i>Paraglaciecola aquimarina</i>	95.6
M107	<i>Streptococcus parauberis</i>	99.9
M108	<i>Shewanella basaltis</i>	99.8
M109	<i>Alteromonas mediterranea</i>	98.6
M111	<i>Nonlabens arenilitoris</i>	99.9
M113	<i>Shewanella basaltis</i>	99.9
M115	<i>Shewanella basaltis</i>	99.8
M116	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	99.7
M117	<i>Octadecabacter temperatus</i>	97.8

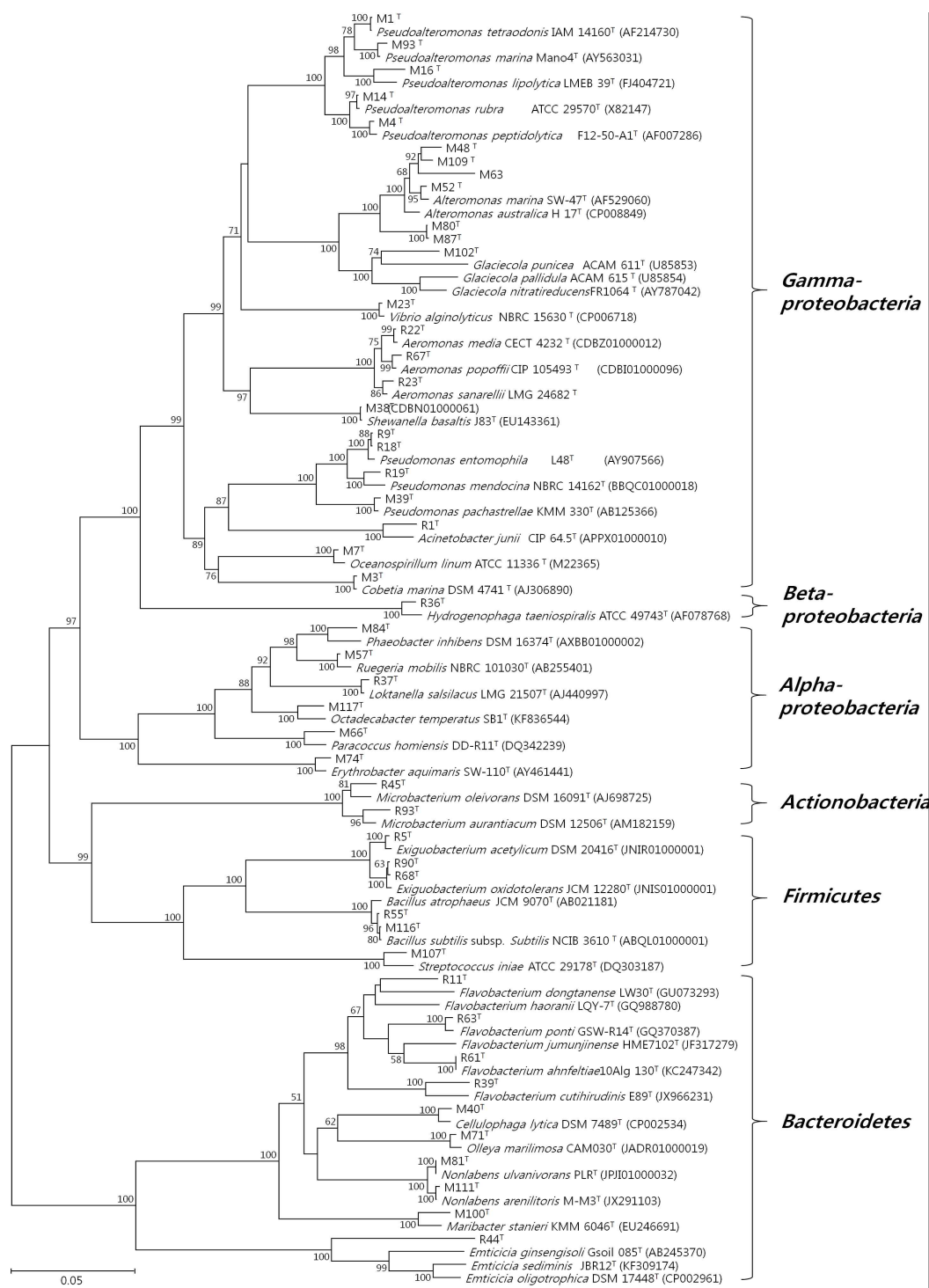


Fig. 2. Phylogenetic tree of the 16S rRNA gene sequences of bacterial strain isolated from *Ulva pertusa* and other related taxa. GenBank accession numbers are placed in parentheses. Bootstrap values (>50%) are based on 1,000 replications. Bar 0.05 nucleotide substitutions per nucleotide position.

### 3. 2. 2. *Ulva pertusa*의 세균군집분석

구멍갈파래에서 분리한 배양 가능한 104 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과, 4개의 문(Phylum), 7개의 강(Class), 13개의 목(Order), 18개의 과(Family), 27개의 속(Genus)으로 나타났다(Table 10.). 분류된 속은 *Actinbacter*, *Cellulophaga*, *Cobeta*, *Erythrobacter*, *Hydrogenophaga*, *Lacihabitans*, *Leisingera*, *Loktanella*, *Maribacter*, *Nonlabens*, *Oceanospirillum*, *Octadecabacter*, *Olleya*, *Paracoccus*, *Paraglaciecola*, *Ruegeria*, *Shewanella*, *Streptococcus* 각각 2%, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Vibrio* 각각 4%, *Aeromonas*, *Microbacterium* 각각 6%, *Pseudomonas* 8%, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* 각각 10%, 그리고 *Flavobacterium* 12%로 구성되어있다 (Fig. 3.).

*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*의 주요 계통군으로 *Proteobacteria* 문은  $\alpha$ -*proteobacteria*,  $\beta$ -*proteobacteria*,  $\gamma$ -*proteobacteria* 강으로 구성되었다. *Actinobacteria* 문은 1개의 강, 1개의 목, 1개의 과, 1개의 속으로 4%, *Bacteroidetes* 문은 2개의 강, 2개의 목, 2개의 과, 6개의 속으로 22%, *Firmicutes* 문은 1개의 강, 2개의 목, 3개의 과, 3개의 속으로 11%에 속하는 것으로 나타났다. *Proteobacteria* 문의  $\alpha$ -*proteobacteria* 강은 2개의 목, 2개의 과, 6개의 속으로 22%,  $\beta$ -*proteobacteria* 강은 1개의 목, 1개의 과, 1개의 속으로 4%,  $\gamma$ -*proteobacteria* 강은 5개의 목, 9개의 과, 10개의 속으로 37%에 속하는 것으로 나타났다. 따라서 *Proteobacteria* 문은 주요 계통군에서 총 63%로 우점을 이루었다(Fig. 4.).

대부분의 해양환경에서 *Proteobacteria*와 *Bacteroidetes*문이 우점으로 나타났으며, 기존에 연구되었던 *Ulva* sp.에서는 *Proteobacteria* 문이 우점하는 것으로 보고되어 있다. 또한 기존 연구결과 *Ulva* sp.에서는 *Proteobacteria* ( $\alpha$ -*proteobacteria*,  $\gamma$ -*proteobacteria*)와 *Bacteroidetes*로 2개의 문(Phylum)으로 나타났다지만 본 연구에서는 *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* ( $\alpha$ -*proteobacteria*,  $\beta$ -*proteobacteria*,  $\gamma$ -*proteobacteria*) 4개의 문(Phylum)으로 더 다양한 분류군이 관찰되었다. 이러한 결과는 배양조건 및 환

경 등에 따라 세균군집구조가 달라지는 것으로 볼 수 있다.



Table 11. Bacterial diversity associated with *Ulva pertusa*

Phylum	Class	Order	Family	Genus
<i>Atinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Cellulophaga</i>
				<i>Nonlabens</i>
				<i>Maribacter</i>
				<i>Olleya</i>
	<i>Cytophagia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Leadbetterella</i>	<i>Lacihabitans</i>
<i>Fimicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>
			<i>Exiguobacteriaceae</i>	<i>Exiguobacterium</i>
			<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Ruegeria</i>
				<i>Loktanella</i>
				<i>Paracoccus</i>
				<i>Leisingera</i>
				<i>Octadecabacter</i>
		<i>Sphingomonadales</i>	<i>Erythrobacteraceae</i>	<i>Erythrobacter</i>
	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Hydrogenophaga</i>
	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Halomonadaceae</i>	<i>Cobetia</i>
			<i>Oceanospirillaceae</i>	<i>Oceanospirillum</i>
<i>Alteromonadales</i>			<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Alteromonas</i>
			<i>Paraglaciecola</i>	

	<i>Shewanellaceae</i>	<i>Shewanella</i>
	<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>
<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Actinbacter</i>
<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>

---

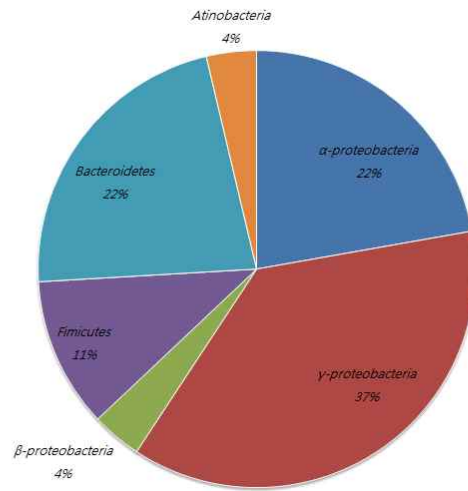


Fig. 3. Pie-diagram of various bacterial genus isolated from *Ulva pertusa*.

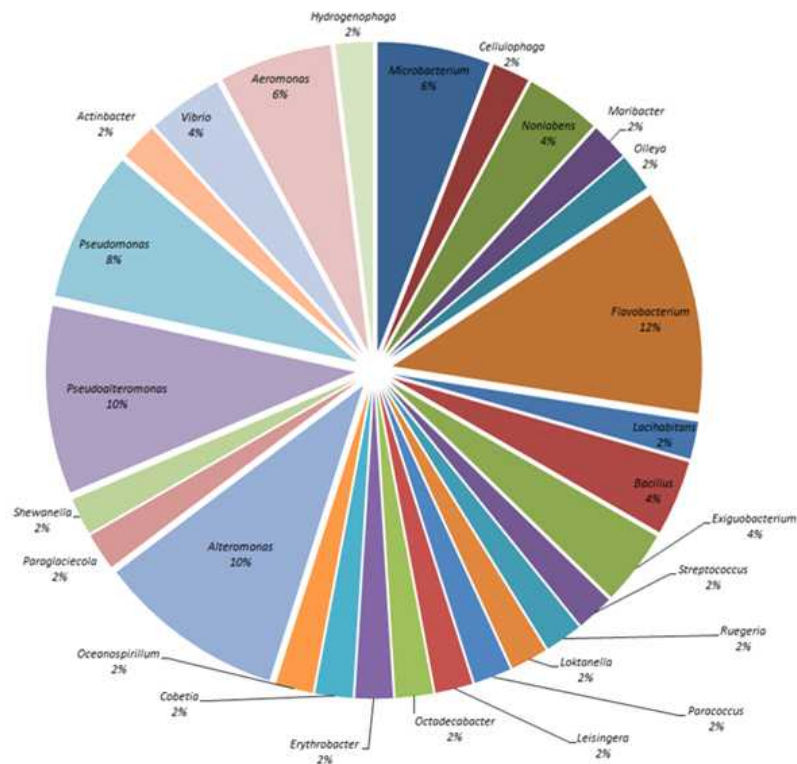


Fig. 4. Pie-diagram showing the community structure and diversity of bacterial strains isolated from *Ulva pertusa*.

### 3. 3. 항균활성을 갖는 미생물의 탐색

어류질병세균 4종과 인체유해세균 4종에 대해 구멍갈파래에서 분리한 균주의 상층액과 균체를 사용하여 각 각 항균활성 결과를 측정하였다(Table 12, 13). 그 결과, 총 104개의 균주 중 상층액에서는 21개의 균주, 균체에서는 14개의 균주로, 균체보다 상층액에서 보다 많은 균주가 항균활성을 나타냈다.

대부분의 분리균주들은 그람양성균과 비교하여 그람음성균에 대하여 항균활성이 강하게 나타났다. 어류질병세균 *Edwardsiella tarda*에서는 R1, R22, M2, M4, M7, M8, M9, M20, M23, M47로 총 10개의 균주가 활성을 보였으며, *Streptococcus iniae*에서는 M8, M9, M20, M23으로 총 4개의 균주, *Streptococcus parauberis*에서는 M12균주, *Tenacibaculum maritimum*에서는 R18, R19, M6, M7, M8, M9, M11, M20, M23, M47로 총 10개의 균주가 활성을 보였다. 인체유해세균 *Escherichia coli*에서는 M47, *Streptococcus mutans*에서는 M7, M8, M9, M11로 총 4개의 균주, *Vibrio vulnificus*에서는 R1, R3, R5, R6, R14, R18, R19, R22, R93, M2, M6, M18, M47로 총 13개의 균주가 항균활성이 나타났다.

특히 상층액 실험결과, 분리균주 M8과 M9는 *E. tarda*, *S. iniae*, *T. maritimum*, *S. mutans*로 총 4종의 병원균에서 광범위하게 활성을 보였으며, M7균주는 *S. mutans*, M8균주는 *S. iniae*, *T. maritimum*, M12균주는 *S. parauberis*, M47균주는 *E. coli*로 각각의 병원균에서 항균활성이 가장 높게 나타내었다. 균체 실험결과, 분리균주 M47은 *E. tarda*, *T. maritimum*, *E. coli*로 총 3개의 병원균에서 광범위한 활성을 보였으며, M2균주는 *E. tarda*, M6균주는 *V. vulnificus*로 각 병원균에서 가장 높은 항균활성을 보였다.

104개의 균주 중 총 21개로 약 22%로 항균활성을 보였으며, *Pseudoalteromonas* 속이 29%, *Vibrio* 속이 24%로 많이 속한 것을 알 수 있었다. *Pseudoalteromonas* 속은 생리활성물질을 분비한다는 기존 연구에 따라 본 연구에서 분리한 균주도 가능성이 있다고 보여지며, 추가적인 실험을 해야 할 것으로 사료된다(Bowman, 2007; Chen *et al.*, 2012; Hentschel *et al.*, 2001; Sivasubramanian *et al.*, 2011; Thomasetal., 2008; Vynne *et al.*, 2012).

Table 12. The antibacterial activity by isolated strains Supernatant liquid from *Ulva pertusa*

Supernatant liquid Strain NO.	Fish pathogenic bacteria (mm)				Human clinical bacteria (mm)			
	1	2	3	4	5	6	7	8
R1	15	-	-	-	-	-	-	12
R3	-	-	-	-	-	-	-	22
R5	-	-	-	-	-	-	-	17
R6	-	-	-	-	-	-	-	18
R14	-	-	-	-	-	-	-	21
R18	-	-	-	15	-	-	-	20
R19	-	-	-	12	-	-	-	22
R22	-	-	-	-	-	-	-	12
R93	-	-	-	-	-	-	-	23
M2	24	-	-	-	-	-	-	18
M4	28	-	-	-	-	-	-	-
M6	-	-	-	21	-	-	-	21
M7	20	-	-	18	-	-	15	-
M8	21	20	-	20	-	-	12	-
M9	20	20	-	18	-	-	13	-
M11	-	-	-	11	-	-	13	-
M12	-	-	12	-	-	-	-	-
M18	-	-	-	-	-	-	-	24
M20	20	18	-	19	-	-	-	-
M23	20	17	-	18	-	-	-	-
M47	27	-	-	17	15	-	-	-

1; KCTC 12267 *E. tarda*, 2; KCTC 3657 *S. iniae*, 3; KCTC 3651 *S. parauberis*, 4; ATCC 43398 *T. maritimum*, 5; KCCM 40880 *E. coli*, 6; KCCM 40307 *L. monocytogenes*, 7; KCCM 40105 *S. mutans*, 8; KCCM 41665 *V. vulnificus*

Table 13. The antibacterial activity by isolated strains Pellet from *Ulva pertusa*

Pellet Strain NO.	Fish pathogenic bacteria (mm)				Human clinical bacteria (mm)			
	1	2	3	4	5	6	7	8
R1	-	-	-	-	-	-	-	15
R5	-	-	-	-	-	-	-	15
R6	-	-	-	-	-	-	-	17
R14	-	-	-	-	-	-	-	21
R18	-	-	-	-	-	-	-	25
R19	-	-	-	-	-	-	-	22
R22	28	-	-	-	-	-	-	14
R93	-	-	-	-	-	-	-	25
M2	30	-	-	-	-	-	-	20
M4	29	-	-	-	-	-	-	-
M6	-	-	-	21	-	-	-	28
M18	-	-	-	-	-	-	-	21
M47	25	-	-	17	-	-	-	25

1; KCTC 12267 *E. tarda*, 2; KCTC 3657 *S. iniae*, 3; KCTC 3651 *S. parauberis*, 4; ATCC 43398 *T. maritimum*, 5; KCCM 40880 *E. coli*, 6; KCCM 40307 *L. monocytogenes*, 7; KCCM 40105 *S. mutans*, 8; KCCM 41665 *V. vulnificus*

### 3. 4. UR11<sup>T</sup>균주 특성

#### 3. 4. 1. 계통분류학적 특성

UR11<sup>T</sup>균주의 Plasmid DNA PCR 결과, 1510 bp의 염기서열을 얻었고(Fig. 5), NCBI에 유전자등록을 하여 KX24431의 accessin number을 받았으며, KCTC와 JCM에 기탁을 하여 각각 KCTC 52377<sup>T</sup>, JCM 31512<sup>T</sup>로 균주번호를 받았다. 1510 bp의 염기서열을 NCBI Genbank와 EzTaxon database에서 분석한 결과, 16S rRNA 염기서열 유사도가 높은 균주를 선정하여 계통수를 작성하였으며(Fig. 6), *Flavobacterium jejuensis* EC11<sup>T</sup>와 98%로 가장 높은 상동성을 보였고(Table 14), *Flavobacterium jumunjinense* HME7102<sup>T</sup>, *Flavobacterium haorani* LQY-7<sup>T</sup>, *Flavobacterium dongtanense* LW30<sup>T</sup>, *Flavobacterium ahnfeltiae* 10Alg 130<sup>T</sup>와 각각 96%, 95%, 95%, 95%으로 상동성을 보여 표준균주로 선정하여 이후 실험에 사용하였다. 그 결과 *Flavobacterium* 속의 계통수와 묶였고 기존 균주들과는 다른 분기(Clade)를 형성하여 새로운 종으로 보고될 가능성이 있다고 판단된다. 새롭게 분리된 신종을 확인하기 위해 16S rRNA 분석을 통한 동정결과를 보충하는 방법으로 DNA-DNA hybridization을 실시하고 있다. 분리균주 UR11<sup>T</sup>은 *F. jejuensis* EC11<sup>T</sup>와 약 58%의 상동성으로 분석되었다. DNA-DNA hybridization 실험결과 상동성이 70% 미만이면 신종으로 볼 수 있는데 실험결과 70% 미만으로 분석되어졌으므로 새로운 종으로 확인하였다(Wayne *et al.*, 1987).

```

1 AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG GATGAACGCT AGCGGCAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGG
061 GGTAGAGGAA GCTTGCTTCC TTGAGACCGG CGCACGGGTG CGTAACGCGT ATGCAATCTA
121 CCTTGTACAG AGGGATAGCC CAGAGAAATT TGGATTAATA CCTCATAGTA TCTTTGCCTG
181 GCATCGGGTG ATTATTAAG TTCCAACGGT ACAAGATGAG CATGCGTCCC ATTAGTTAGT
241 TGGTAAGGTA ACGGCTTACC AAGACGATGA TGGGTAGGGG TCCTGAGAGG GAGATCCCCC
301 ACACTGGTAC TGAGACACGG ACCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGAGG AATATTGGAC
361 AATGGGCGCA AGCCTGATCC AGCCATGCCG CGTGCAGGAA GACGGCCCTA TGGGTTGTAA
421 ACTGCTTTTA TACAGGAAGA AACACTCCCT CGTGAGGGAG CTTGACGGTA CTGTAGGAAT
481 AAGGATCGGC TAACTCCGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG GAGGATCCAA GCGTTATCCG
541 GAATCATTGG GTTTAAAGGG TCCGTAGGCG GCCTTATAAG TCAGTGGTGA AATCTCCTAG
601 CTCAACTAGG AAAC TGCCAT TGATACTGTA GGGCTTGAAT TTTTGTGAAG TAACTAGAAT
661 ATGTAGTGTA GCGGTGAAAT GCTTAGATAT TACATGGAAT ACCAATTGCG AAGGCAGGTT
721 ACTAACAAAC GATTGACGCT GATGGACGAA AGCGTGGGTG GCGAACAGGA TTAGATACCC
781 TGGTAGTCCA CGCTGTA AAC GATGGATACT AGCTGTTCGG TTTTCGGATT GAGTGGCTAA
841 GCGAAAGTGA TAAGTATCCC ACCTGGGGAG TACGCACGCA AGTGTGAAAC TCAAAGGAAT
901 TGACGGGGGC CCGCACAAGC GGTGGAGCAT GTGGTTTAAAT TCGATGATAC GCGAGGAACC
961 TTACCAGGGC TTAAATGGGA GACGACGTAC TTGGAAACAG GTATTTCTTC GGACGTCTTT
1021 CAAGGTGCTG CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GCCGTGAGGT GTCAGGTAA GTCCTATAAC
1081 GAGCGCAACC CCTGTCGTTA GTTGCCAGCG AGTCATGTCG GGAAC TCTAA CGAGACTGCC
1141 GGTGCAAACC GTGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAATCAT CACGGCCCTT ACGTCCTGGG
1201 CCACACACGT GCTACAATGG CCGGTACAGA GGGCAGCTAC CTAGTGATAG GATGCGAATC
1261 TTAAAACCG GTCTCAGTTC GGATCGGAGT CTGCAACTCG ACTCCGTGAA GCTGGAATCG
1321 CTAGTAATCG GATATCAGCC ATGATCCGGT GAATACGTTC CCGGGCCTTG TACACACCGC
1381 CCGTCAAGCC ATGGAAGCTG GGGGTGCCTG AAGTCGGTGA CCGCAAGGAG CTGCCTAGGG
1441 TAAAAC TAGT AACTAGGGCT AAGTCGTAAC AAGGTAGCCG TACCGGAAGG TCGCGCTGGA
1501 TCACCTCCTT

```

Fig. 5. 16S rRNA sequence of the *Flavobacterium* sp. UR11<sup>T</sup>.



Table 14. Sequence similarity between UR11<sup>T</sup> and *F. jejuensis* EC11<sup>T</sup>

UR11 <sup>T</sup>	AGAGTTTGTATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGG
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	-----CTAGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGG *****
UR11 <sup>T</sup>	GGTAGAGGAAGCTTGCTTCCTTGAGACCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATGCAATCTA
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	GGTATAGGAAGCTTGCTTCCTAGAGACCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATGCAATCTA **** *****
UR11 <sup>T</sup>	CCTTGTACAGAGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGATTAATACCTCATAGTATCTTTGCCGTG
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	CCTTGTACAGAGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGATTAATACCTCATAGTATCTTCGGAGG ***** * *
UR11 <sup>T</sup>	GCATCGGGTGATTATTAAAGTTCCAACGGTACAAGATGAGCATGCGTCCCATTAGTTAGT
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	GCATCTTCTGATTATTAAAGTTCCAACGGTACAAGATGAGCATGCGTCCCATTAGTTAGT *****
UR11 <sup>T</sup>	TGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGACGATGATGGGTAGGGGTCCTGAGAGGGAGATCCCC
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	TGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGACAATGATGGGTAGGGGTCCTGAGAGGGAGATCCCC *****
UR11 <sup>T</sup>	ACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGAC
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	ACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGAC *****
UR11 <sup>T</sup>	AATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACGGCCCTATGGGTTGTAA
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	AATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACGGCCCTATGGGTTGTAA *****
UR11 <sup>T</sup>	ACTGCTTTTATACAGGAAGAAACACTCCCTCGTGAGGGAGCTTGACGGTACTGTAGGAAT
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	ACTGCTTTTATACAGGAAGAAACACTCTCTACGTGTAGAGACTTGACGGTACTGTAGGAAT ***** * * * * *
UR11 <sup>T</sup>	AAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCG
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	AAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCG *****
UR11 <sup>T</sup>	GAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGCCTTATAAGTCAGTGGTGAATCTCCTAG
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	GAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGCCTTATAAGTCAGTGGTGAATCTCCTAG *****
UR11 <sup>T</sup>	CTCAACTAGGAACTGCCATTGATACTGTAGGGCTTGAATTTTTGTGAAGTAACTAGAAT
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	CTCAACTAGGAACTGCCATTGATACTGTAGGGCTTGAATTTTTGTGAAGTAACTAGAAT *****
UR11 <sup>T</sup>	ATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATTACATGGAATACCAATTGCGAAGGCAGGTT
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	ATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATTACATGGAATACCAATTGCGAAGGCAGGTT *****
UR11 <sup>T</sup>	ACTAACAAACGATTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	ACTAACAAACGATTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC *****
UR11 <sup>T</sup>	TGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGGATACTAGCTGTTCCGTTTTCCGATTGAGTGGCTAA
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	TGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGGATACTAGCTGTTCCGATTGAGTGGCTAA *****
UR11 <sup>T</sup>	GCGAAAGTGATAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAAT
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	GCGAAAGTGATAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAAT *****
UR11 <sup>T</sup>	TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACC
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACC *****
UR11 <sup>T</sup>	TTACCAGGGCTTAAATGGGAGACGACGTACTTGGAAACAGGTATTTCTTCGGACGTCCTT
<i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	TTACCAGGGCTTAAATGGGAGACGACAGATTTGGAAACAGATTTTCTTCGGACGTCCTT ***** * * * * *

Table 14. Continue.

UR11 <sup>T</sup> <i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	CAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCAGGTTAAGTCCTATAAC CAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCAGGTTAAGTCCTATAAC *****
UR11 <sup>T</sup> <i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	GAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTTGCCAGCGAGTCATGTCGGGAACCTAACGAGACTGCC GAGCGCAACCCCTGTCGTTAGTTGCCAGCGAGTCATGTCGGGAACCTAACGAGACTGCC *****
UR11 <sup>T</sup> <i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	GGTGCAAACCGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGTCCTGGG GGTGCAAACCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGTCCTGGG *****
UR11 <sup>T</sup> <i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	CCACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCAGCTACCTAGTGATAGGATGCGAATC CCACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCAGCTACCTAGTGATAGGATGCGAATC *****
UR11 <sup>T</sup> <i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	TTTAAAACCGGTCTCAGTTCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCG TTTAAAACCGGTCTCAGTTCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCG *****
UR11 <sup>T</sup> <i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	CTAGTAATCGGATATCAGCCATGATCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC CTAGTAATCGGATATCAGCCATGATCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC *****
UR11 <sup>T</sup> <i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	CCGTCAAGCCATGGAAGCTGGGGGTGCCTGAAGTCGGTGACCGCAAGGAGCTGCCTAGGG CCGTCAAGCCATGGAAGCTGGGGGTGCCTGAAGTCGGTGACCGTAAGGAGCTGCCTAGGG *****
UR11 <sup>T</sup> <i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	TAAAACTAGTAACTAGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGA TAAAACTAGTAACTAGGGC----- *****
UR11 <sup>T</sup> <i>F. jejuensis</i> EC11 <sup>T</sup>	TCACCTCCTT -----

\*, same nucleotide; -, sequence not available; GAP, different nucleotide

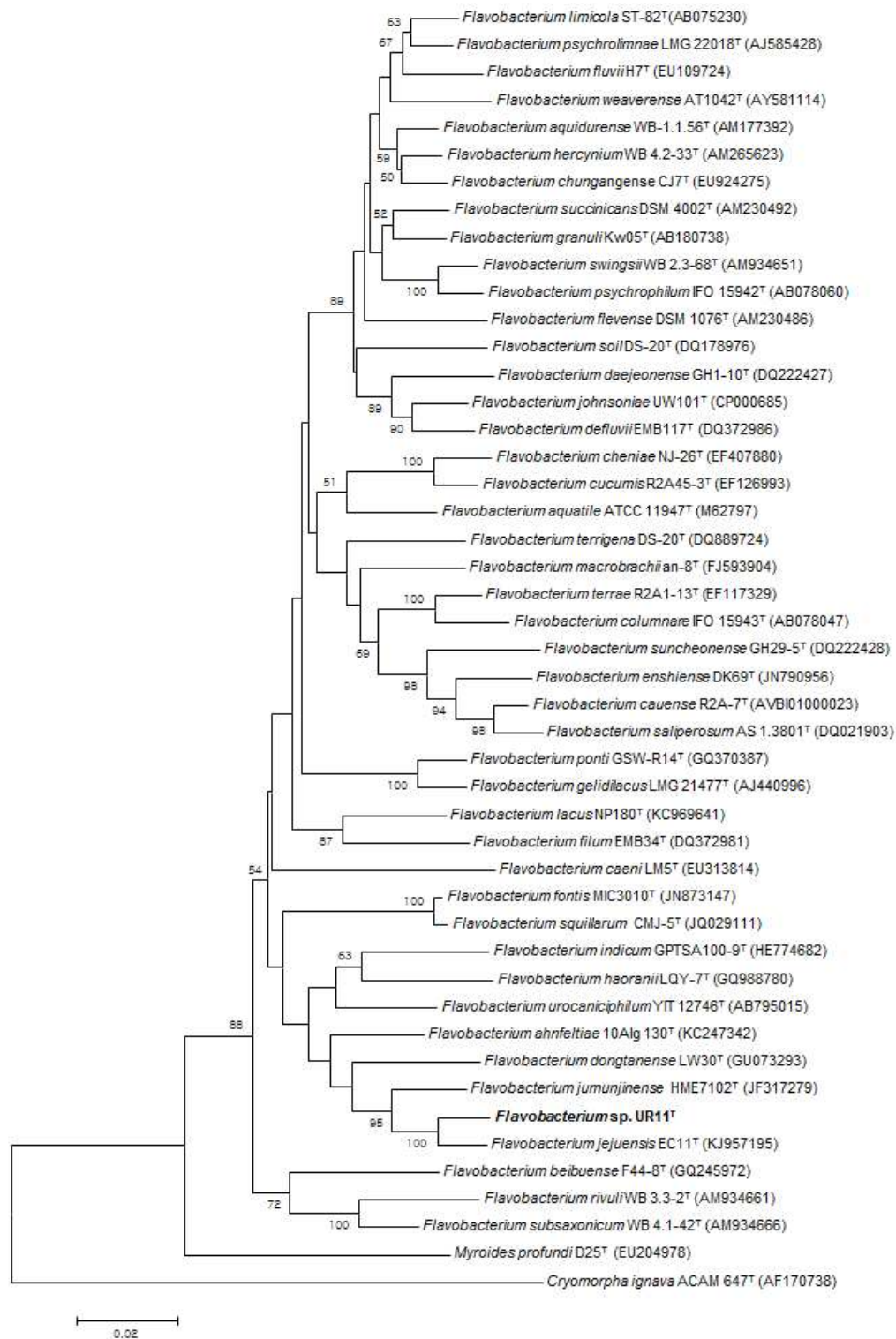


Fig. 6. Phylogenetic tree of the 16S rRNA gene sequences of strain UR11<sup>T</sup> and other related taxa. GenBank accession numbers are placed in parentheses. Bootstrap values (>50%) are based on 1,000 replications. Bar 0.02 nucleotide substitutions per nucleotide position.

### 3. 4. 2. 형태학적 특성

R2A agar 배지에서 노란색 colony를 형성하며, Gliding motility는 양성, 세포모양은 간균으로 포자와 편모는 발견되지 않았으며, 세포 길이는 1.43-1.62  $\mu\text{m}$ , 세포 폭은 0.16-0.23  $\mu\text{m}$ 로(Fig. 7.), 그람음성균이다.

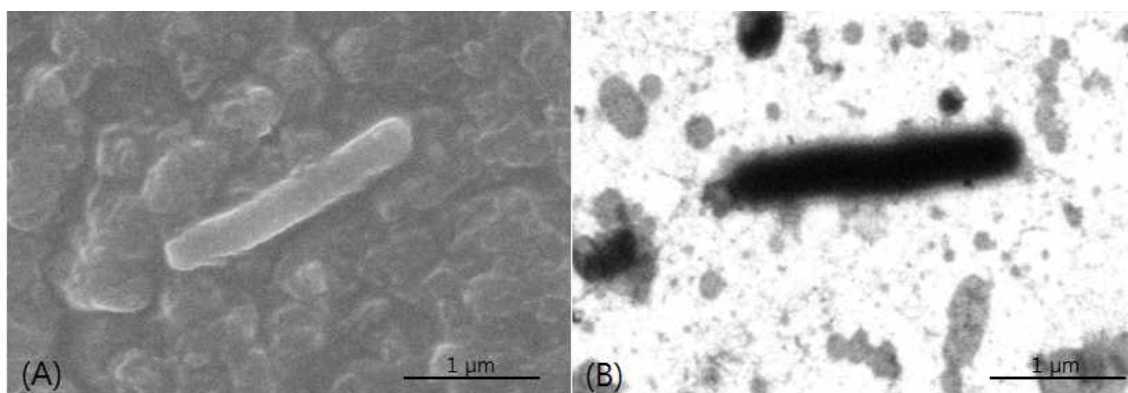


Fig. 7. Scanning electron microscopy (SEM) (A) and Transmission electron microscopy (TEM) (B) of strain UR11<sup>T</sup>.

### 3. 4. 3. 생리·생화학적 특성

UR11<sup>T</sup>균주의 Catalase와 Oxidase 모두 양성으로 생장온도는 5-35°C, 생장 pH는 6.0-10.0, 생장 NaCl 농도는 0-5% (w/v)이며, 최적 온도는 25°C, 최적 pH는 7.0, 최적 NaCl 농도는 0%로 나타났으며, 혐기적 조건에서는 성장하지 못하였다. 표준균주인 *F. jejuensis* EC11<sup>T</sup>과는 다르게 35°C에서 성장한다는 점과 pH 5.0, 11.0에서는 성장하지 못한 점에서 차이가 보였다. 가수분해결과, UR11<sup>T</sup>균주는 Casein, DNase, Gelatin, Tween 40, Tween 60은 가수분해하였으나, Aesculin, Cellulose, Starch, Tween 20, Tween 80, Urea는 가수분해하지 못하였다. 기질이용에서는 *D*-Glucose, *D*-mannose, *N*-acetyl-*D*-glucosamine, Adipate, malate, Citrate에서 양성반응이 보였고, *D*-Arabinose, *D*-Mannitol, *D*-maltose, Gluconate, Caprate, Adipate, malate, Citrate, Phenylacetate에서는 음성반응이 보였다. 분리균주와는 다르게 표준균주 *F. jejuensis* EC11<sup>T</sup>은 *N*-acetyl-*D*-glucosamine, Adipate, malate, Citrate에서 음성반응을 보였다. 효소활성에서는 Alkaline phosphatase, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Crystine arylamidase, Trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, Acid phosphatase, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, *N*-acetyl- $\beta$ -glucosamidase, 에서는 양성반응을 보였고, Lipase (C14),  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\alpha$ -fucosidase에서는 음성반응을 보였다. 반면 표준균주 *F. jejuensis* EC11<sup>T</sup>는  $\beta$ -glucuronidase와 *N*-acetyl- $\beta$ -glucosamidase에서 음성반응을 보여 분리균주 UR11<sup>T</sup>와 차이를 보였다(Table 15.).

Table 15. Biochemical characteristics of strain UR11<sup>T</sup> and related type strains Strain: 1, UR11<sup>T</sup> 2, *F. Jejuensis* KCTC42149<sup>T</sup> 3, *F. jumunjinense* KCTC23618<sup>T</sup> 4, *F. haoranii* KCTC23008<sup>T</sup> 5, *F. dongtanense* KCTC15621<sup>T</sup> 6, *F. ahnfeltiae* KCTC32467<sup>T</sup>. All data were obtained in this study as +, Positive; -, negative. All strains are gram-negative, motile by gliding. All strains were positive for gelatin, Alkaline phosphatase, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8), Leucinearylamidase, Valinearylamidase, Crystinearylamidase, Trypsin, Acidphospatase and Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase. All strains were negative for Indole production, Glucose fermentation, Arginine dihydrolase, Urease, Caprate, Phenylacetate, Lipase (C14),  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -mannosidase and  $\alpha$ -fucosidase.

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Temp. range for growth (°C)	5-35	5-30	5-30	15-35	5-35	5-30
pH range for growth	6.0-	5.0-	6.0-	6.0-	6.0-	5.0-
Salinity range for growth (% NaCl)	10.0	11.0	11.0	10.0	10.0	11.0
	0-5	0-5	0-5	0-5	0-3	0-5
Oxidase	+	+	+	-	-	-
Catalase	+	+	+	-	+	+
<b>Hydrolysis of :</b>						
DNA	+	+	-	-	-	-
Casein	+	+	+	+	-	+
Tween 80	-	-	+	+	+	+
<b>API 20NE test</b>						
Nitrate reduction	-	+	-	-	-	+
Esculin degradation	+	+	+	+	-	+
D-Glucose	+	+	+	+	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	+	-
D-mannose	+	+	+	+	-	+

Table 15. Continue.

Characteristic	1	2	3	4	5	6
<i>D</i> -Mannitol	-	-	-	-	-	+
<i>N</i> -acetyl- <i>D</i> -glucosamine	+	-	-	-	-	+
<i>D</i> -maltose	+	+	+	+	-	+
Gluconate	-	-	-	-	-	+
Adipate	+	-	+	+	-	+
malate	+	-	-	-	-	-
Citrate	+	-	-	+	-	-
<b>API ZYM test</b>						
$\alpha$ -chymotrypsin	+	+	-	+	+	-
$\beta$ -glucuronidase	+	-	-	+	-	-
$\alpha$ -glucosidase	+	+	-	+	-	-
$\beta$ -glucosidase	+	+	-	+	-	-
<i>N</i> -acetyl- $\beta$ -glucosamidase	+	-	-	-	-	-
<b>G+C mol (%)</b>	32.6	28.1 <sup>a</sup>	36.5 <sup>b</sup>	34 <sup>c</sup>	30 <sup>d</sup>	34.3 <sup>e</sup>

Data from <sup>a</sup>Park *et al.* (2015); <sup>b</sup>Joung *et al.* (2013); <sup>c</sup>Zhang *et al.* (2010); <sup>d</sup>Xiao *et al.* (2011);  
<sup>e</sup>Nedashkovskaya *et al.* (2014).

### 3. 4. 4. 화학분류학적 특성

UR11<sup>T</sup>균주의 지방산 분석 결과, iso-C<sub>15:0</sub> (33.9%), iso-C<sub>15:1</sub>G (12.4%), iso-C<sub>17:0</sub> 3-OH (9.0%), iso-C<sub>16:0</sub> (7.0%)와 iso-C<sub>15:0</sub> 3-OH (6.3%)로 주요 지방산이 확인되었다. 표준균주 *F. jejuensis* EC11<sup>T</sup>에서는 iso-C<sub>15:0</sub> (41.4%), iso-C<sub>15:1</sub>G (9.8%), iso-C<sub>17:0</sub> 3-OH (8.96%), iso-C<sub>16:0</sub> (3.8%)와 iso-C<sub>15:0</sub> 3-OH (7.6%)로 조성의 차이를 보였으며 *Flavobacterium*속에 속하는 종들의 주된 지방산인 iso-C<sub>15:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, summed feature 3 (comprising iso-C<sub>15:0</sub> 2-OH / C<sub>16:1</sub> ω7c)으로 확인된 점이 일치하였다(Table 16.).

UR11<sup>T</sup>균주의 주요 Polar lipid는 phosphatidylethanolamine (PE), unknown aminolipids (AL), unknown aminopolarlipids (PL), unknown lipids (L)로 확인되었고(Fig. 8) 주요 Quinone은 MK-6로 나타났으며 DNA G+C content 분석 결과, UR11<sup>T</sup>균주는 32.6 mol %로 표준균주인 *F. jejuensis* EC11<sup>T</sup>보다 높은 함량을 보였다. 이와 같은 결과는 *Flavobacterium*속의 종에서 발견되는 주요 Polar lipid는 phosphatidylethanolamine (PE)이며 주된 Quinone은 MK-6이고 DNA G+C content는 30-52 mol %라는 기준에 보고된 결과와 일치하였다(Table 15.).



Table 16. Cellular fatty acid composition of strain UR11<sup>T</sup> and type strain Strain: 1, UR11<sup>T</sup> 2, *F. Jejuensis* KCTC42149<sup>T</sup> 3, *F. jumunjinense* KCTC23618<sup>T</sup> 4, *F. haoranii* KCTC23008<sup>T</sup> 5, *F. dongtanense* KCTC15621<sup>T</sup> 6, *F. ahnfeltiae* KCTC32467<sup>T</sup>

All data incurred in this study are recorded as -, not detected; TR, trace amount (<0.5%) All strains were incubated in R2A agar plate at 25°C for 3days Fatty acids that account <0.5% of the total fatty acids in all strains were deleted

Fatty acid	1	2	3	4	5	6
Saturated						
C <sub>14:0</sub>	0.6	TR	0.6	TR	1.2	0.6
C <sub>16:0</sub>	0.6	TR	0.8	1.0	3.7	1.2
Hydroxylated						
C <sub>15:0</sub> 3-OH	1.1	-	-	1.0	0.8	0.8
C <sub>16:0</sub> 3-OH	0.9	TR	0.6	0.8	1.1	1.2
C <sub>17:0</sub> 3-OH	0.6	-	-	-	-	TR
iso-C <sub>14:0</sub> 3-OH	0.6	TR	TR	0.6	-	TR
iso-C <sub>15:0</sub> 3-OH	6.3	7.6	8.8	4.5	15.3	11.6
iso-C <sub>16:0</sub> 3-OH	3.9	2.6	1.0	4.0	TR	1.2
iso-C <sub>17:0</sub> 3-OH	9.0	11.2	10.8	8.6	TR	10.9
Branched						
iso-C <sub>13:0</sub>	1.0	0.9	1.0	0.9	TR	1.5
iso-C <sub>14:0</sub>	3.2	-	-	-	-	0.8
iso-C <sub>15:0</sub>	33.9	41.4	39.9	32.2	TR	44.9
iso-C <sub>15:1</sub> G	12.4	9.8	13.9	20.3	8.9	10.0
iso-C <sub>16:0</sub>	7.0	3.8	2.2	5.3	1.4	1.3
iso-C <sub>16:1</sub> H	2.4	2.4	1.3	-	-	-
iso-C <sub>17:1</sub> ω9c	1.2	2.4	4.4	1.3	3.0	3.7
anteiso-C <sub>15:0</sub>	1.5	1.5	1.8	8.0	1.6	3.3
Unsaturated						
C <sub>15:1</sub> ω6c	4.1	3.3	3.3	1.0	TR	0.9
C <sub>17:1</sub> ω6c	1.1	0.9	0.8	0.2	-	-
Summed Feature						
3	TR	TR	2.9	1.0	TR	1.1

\*Summed features 3, iso-C<sub>15:0</sub> 2-OH/ C<sub>16:1</sub> ω7c

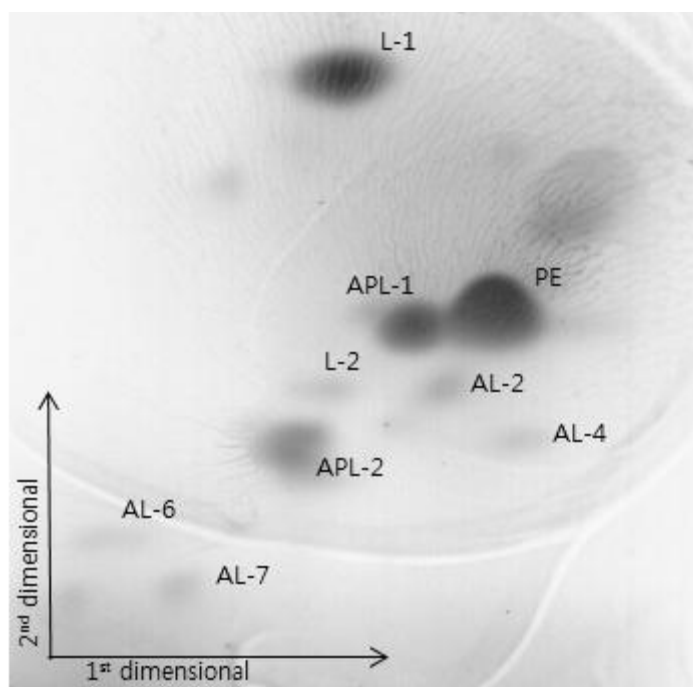


Fig. 8. Two dimensional thin-layer chromatogram of total polar lipids of strain UR11<sup>T</sup>. Total polar lipids were identified by spraying with molybdophosphoric acid reagent. PE, phosphatidylethanolamine; AL1-7, unknown aminolipids; APL1-2, unknown aminopolarlipids; L 1 - 2, unknown lipid.

## IV. 요약

이 논문은 제주도에서 채집한 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)를 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)를 이용하여 세균군집을 조사하고, 분리된 균주로 어류질병세균과 인체유해세균에 대해 항균활성을 평가하였다.

Marine agar배지와 R2A배지를 사용하여 총 145개의 배양 가능한 미생물이 분리되었으며 RFLP 분석을 위해 DNA를 추출하고 27F와 1522R primer를 사용하여 16S rRNA를 증폭하였다. 증폭된 16S rRNA를 제한효소 *Hae*III와 *Rsa*I 을 이용하여 RFLP 분석을 실시하였다. RFLP 패턴 결과로부터 총 104개의 균주를 선별하여 16S rRNA 유전자 염기서열 분석하였고, 분석된 염기서열을 NCBI Genbank database와 EzTaxon server에서 가장 유사한 염기서열을 비교·분석하였다. 그 결과, 이미 알려진 균주의 염기서열과 91% 이상의 유사도를 보였다. 주요 계통군으로 *Proteobacteria* (*α-proteobacteria*, *β-proteobacteria*, *γ-proteobacteria*) (63%), *Bacteroidetes* (22%), *Firmicutes* (11%), *Actinobacteria* (4%)로 4개의 문이 관찰되었고, 7개의 강, 13개의 목, 18개의 과, 27개의 속이 관찰되었다. 계통학적 분석 결과, 12균주가 97% 이하의 상동성으로 나타나 새로운 속이나 종으로 분류될 가능성이 높게 나타났다.

104개의 균주의 상층액과 균체를 사용한 항균활성은 각각 21개, 14개로 활성을 보였다. 대부분의 균주들은 그람양성균에 비교하여 그람음성균에 강한 활성을 보였다.

분리된 균주 중 UR11<sup>T</sup>균주를 신종후보균주라 추정하고 분류동정을 하였다. UR11<sup>T</sup>균주는 그람음성, 간균으로 노란색 집락을 띄었으며 최적생장은 NaCl이 포함되지 않은 R2A배지에서 25°C, pH 7.0이었다. 16S rRNA 염기서열 분석에 따라 *F. jenuensis* EC11<sup>T</sup>과 98%의 가장 높은 상동성을 보여 Type strain으로 선정하여 실험을 진행하였다. UR11<sup>T</sup>균주의 주요 퀴논은 MK-6이고 *F. jenuensis* EC11<sup>T</sup>과 비교되는 효소활성 및 기질이용성을 보였으며, 주요 세포막의 극성지질로는 PE (phosphatidylethanolamine), AL (unknown aminolipids), PL (unknown aminopolarlipids), L (unknown lipids)로 확인되었으며, 주요 지방산으로는 iso-C<sub>15:0</sub> (33.9%), iso-C<sub>15:1</sub>G (12.4%), iso-C<sub>17:0</sub> 3-OH (9.0%), iso-C<sub>16:0</sub> (7.0%)와 iso-C<sub>15:0</sub>

3-OH (6.3%)로 나타났다. DNA-DNA hybridization 결과, *F. jenuensis* EC11<sup>T</sup>와 58%의 상동성을 보여 신종으로 생각되어, KCTC (=KCTC 52377<sup>T</sup>)와 JCM (=JCM 31512<sup>T</sup>)에 기탁을 하였다.

## V. 참고 문헌

- Abraham, T. J. 2004. Antibacterial marine bacterium deter luminous vibriosis in shrimp larvae. *NAGA, WorldFish Center Quarterly* **27**(3-4), 28-31.
- Alongi, D. M. 1998. Coastal ecosystem processes.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**(1), 143-169.
- Andersen, P. and Sørensen, H. M. 1986. Population dynamics and trophic coupling in pelagic microorganisms in eutrophic coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **33**(2), 99-109.
- Beleneva, I. A. and Zhukova, N. V. 2006. Bacterial communities of some brown and red algae from peter the great bay, the sea of Japan. *Microbiology* **75**, 348-357.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* **58**(1), 1.
- Bernan, V. S., Greenstein, M. and Maiese, W. M. 1997. Marine microorganisms as a source of new natural products. *Adv. Appl. Microbiol.* **43**, 57-90.
- Bolinches, J., Lemos, M. L. and Barja, J. L. 1988. Population dynamics of heterotrophic bacterial communities associated with *Fucus vesiculosus* and *Ulva rigida* in an estuary. *Microb. Ecol.* **15**, 345-357.
- Bowman J. P. 2007. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar. Drugs* **5**, 220 - 241.
- Brim, H., Heuer, H., Krögerrecklenfort, E., Mergeay, M. and Smalla, K. 1999. Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil. *Can. J. Microbiol.* **45**, 326-338.
- Bull, A. T., Ward, A. C., & Goodfellow, M. 2000. Search and discovery

- strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**(3), 573–606.
- Burke, C., Thomas, T., Lewis, M., Steinberg, P. and Kjelleberg, S. 2011. Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *ISME J.* **5**, 590–600.
- Chen, Y. H., Kuo, J., Sung, P. J., Chang, Y. C., Lu, M. C., Wong, T. Y. and Kuo, F. W. 2012. Isolation of marine bacteria with antimicrobial activities from cultured and field-collected soft corals. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 3269 - 3279.
- Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. and Lim, Y. W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**(10), 2259–2261.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T. L. and Massana, R. 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2942–2951.
- EZAKI, T., HASHIMOTO, Y. and YABUUCHI, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid–deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **39**(3), 224–229.
- Haefner, B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov. Today* **8**(12), 536–544.
- Hamann, M. T. and Scheuer, P. J. 1993. Kahalalide F: a bioactive depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia rufescens* and the green alga *Bryopsis* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **115**(13), 5825–5826.
- Han, J. G., Ha, J. H., Choi, Y. B., Go, J. L., Kang, D. H. and Lee, H. Y. 2009. The Comparison of extraction process for enhancement of immunomodulating

- activities of *Ulva pertusa kjellman*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **41**, 380–385.
- Haygood, M. G., Schmidt, E. W., Davidson, S. K. and Faulkner, D. J. 1999. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**(1), 33–43.
- Hentschel U., Schmid M., Wagner M., Fieseler L., Gernert C. and 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.
- Hu, G., Zhang, J., Yang, G., Li, Y. Y., Guan, Y. T., Wang, J. and Hong, Q. 2013. *Flavobacterium yanchengense* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**(8), 2848–2852.
- Hwang, W. M., Kim, D., Kang, K. and Ahn, T. Y. 2016. *Flavobacterium eburneum* sp. nov., isolated from reclaimed saline land soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Jensen, P. R., Kauffman, C. A. and Fenical, W. 1996. High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Mar. Biol.* **126**, 1–7.
- Jeong, E. J., Im, C. S. and Park, J. S. 2010. A comparison of bacterial diversity associated with the sponge *Spirastrella abata* depending on RFLP and DGGE. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 366–374.
- Jones, C. G., Lawton, J. H. and Shachak, M. 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* **69**, 373–386.
- Joung, Y., Kim, H., & Joh, K. 2013. *Flavobacterium jumunjinense* sp. nov., isolated from a lagoon, and emended descriptions of *Flavobacterium cheniae*, *Flavobacterium dongtanense* and *Flavobacterium gelidilacus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**(11), 3937–3943.
- Karabay Yavasoglu, N. U., Sukatar, A., Ozdemir, G. and Horzum, Z. 2007. Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*. *Phytother Res* **21**(2), 153–156.

- Kelecom, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. *An. Acad. Bras. Cienc.* **74**(1), 151-170.
- Kim, J. D., Yoon, Y. H., Shin, T. S., Kim, M. Y., Byun, H. S., Oh, S. J. and Seo, H. J. 2011. Bioethanol production from seaweed *Ulva pertusa* for environmental application. *KSBB J.* **26**, 317-322.
- Kim, J. S. 2011. Review and future development of new culture methods for unculturable soil bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **47**(3), 179-187.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H. and Won, S. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**(3), 716-721.
- Ko, H. J., Kim, G. B., Lee, D. H., Lee, G. S. and Pyo, H. B. 2013. The effect of hydrolyzed Jeju *Ulva pertusa* on the proliferation and type I collagen synthesis in replicative senescent fibroblasts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **39**, 177-186.
- Koehn, F. E. and Carter, G. T. 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **4**(3), 206-220.
- Kuo, I., Saw, J., Kapan, D.D., Christensen, S., Kaneshiro, K.Y., and Donachie, S.P. 2013. *Flavobacterium akiainvivens* sp. nov., from decaying wood of *Wikstroemia oahuensis*, Hawai'i, and emended description of the genus *Flavobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 3280 - 3286.
- Kuznetsova, T. A., Besednova, N. N., Mamaev, A. N., Momot, A. P., Shevchenko, N. M. and Zvyagintseva, T. N. 2003. Anticoagulant activity of fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* of the Okhotsk Sea. *Bull. Exp. Biol. Med.* **136**(5), 471-473.
- Laatsch, H. 2006. Marine bacterial metabolites. *Frontiers in marine biotechnology* 225-288.
- Lam, K. S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes.



*Curr. Opin. Microbiol.* **9**(3), 245-251.

- Li, A. H., Liu, H. C. and Zhou, Y. G. 2016. *Flavobacterium orientale* sp. nov., isolated from lake water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Lim, C. S., Oh, Y. S., Lee, J. K., Park, A. R., Yoo, J. S., Rhee, S. K. and Roh, D. H. 2011. *Flavobacterium chungbukense* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**(11), 2734-2739.
- Minnikin, D. E., O'donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. and Parlett, J. H. 1984. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J. Microbiol. Methods* **2**(5), 233-241.
- Miyashita, M., Fujimura, S., Nakagawa, Y., Nishizawa, M., Tomizuka, N., Nakagawa, T. and Nakagawa, J. 2010. *Flavobacterium algicola* sp. nov., isolated from marine algae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**(2), 344-348.
- Nedashkovskaya, O. I., Balabanova, L. A., Zhukova, N. V., Kim, S. J., Bakunina, I. Y., & Rhee, S. K. 2014. *Flavobacterium ahnfeltiae* sp. nov., a new marine polysaccharide-degrading bacterium isolated from a Pacific red alga. *Arch. Microbiol.* **196**(10), 745-752.
- Ngo, H.T., Kook, M., and Yi, T.H. 2015. *Flavobacterium daemonensis* sp. nov., isolated from Daemo Mountain soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 983 - 989.
- Nogi, Y., Soda, K. and Oikawa, T. 2005. *Flavobacterium frigidimaris* sp. nov., isolated from Antarctic seawater. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**(4), 310-315.
- Park, S. H., Kim, J. Y., Kim, Y. J. and Heo, M. S. 2015. *Flavobacterium jejuensis* sp. nov., isolated from marine brown alga *Ecklonia cava*. *J. Microbiol.* **53**(11), 756-761.
- PARK, Y. B., KIM, I. S., YOO, S. J., AHN, J. K., LEE, T. G., PARK, D. C. and KIM, S. B. 1998. Elucidation of anti-tumor initiator and promoter derived from seaweed-2: investigation of seaweed extracts suppressing mutagenic activity of PhIP and MeIQx. *Kor J Fish Aquat Sci* **31**(4), 581-586.

- Pengzhan, Y., Ning, L., Xiguang, L., Gefei, Z., Quanbin, Z. and Pengcheng, L. 2003. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacol. Res.* **48**, 543-549.
- Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Chen, R., Zhang, H., Niu, X. and Li, Z. 2005. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*. *Int. J. Biol. Macromol.* **37**, 195-199.
- Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Hu, R., Zhang, K. and Li, Z. 2006. In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 2441-2445.
- Riyanti, W. J. and Radjasa, O. K. 2009. Isolation and screening of antimicrobial producing-Actinomycetes symbionts in Nudibranch. *Indones J Biotechnol* **14**(1), 1132-1138.
- Rohit, A., Maiti, B., Shenoy, S. and Karunasagar, I. 2016. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Indian J. Med. Res.* **143**, 72-78.
- Ryu, B. H., Kim, D. S., Cho, K. J. and Sin, D. B. 1989. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J. Food Sci. Technology* **21**, 595-600.
- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids.
- Shin, S. K., Ha, Y., Cho, Y. J., Kwon, S., Yong, D. and Yi, H. 2016. *Flavobacterium gilvum* sp. nov., isolated from stream water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Sivasubramanian K., Ravichandran S. and Vijayapriya M. 2011. Antagonistic activity of marine bacteria *Pseudoalteromonas tunicata* against microbial pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.* **5**, 562 - 567.
- Smit, E., Leeflang, P. and Wernars, K. 1997. Detection of shifts in microbial

- community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**, 249-261.
- Staley, J. T. and Konopka, A. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**(1), 321-346.
- Tamaoka, J. 1986. Analysis of bacterial menaquinone mixtures by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* **123**, 251-256.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729.
- Taskin, E., Ozturk, M. and Kurt, O. 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *Afr. J. Biotechnol.* **6**(24), 2746.
- Thomas T., Evans F. F. and Schleheck D. 2008. Analysis of the *Pseudoalteromonas tunicata* genome reveals properties of a surface-associated life style in the marine environment. *PLoS ONE* **3**, e3252.
- Tiedje, J. M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T. L. and Flynn, S. J. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* **13**, 109-122.
- Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K. and Ohwada, K. 1997. 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family Vibrionaceae. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**, 125-132.
- Vynne N. G., Mansson M., Gram L. 2012. Gene sequence based clustering assists in dereplication of *Pseudoalteromonas luteoviolacea* strains with identical inhibitory activity and antibiotic production. *Mar. Drugs* **10**, 1729 - 1740.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I. and Starr, M. P. 1987. Report of the ad hoc committee on

- reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **37**(4), 463-464.
- Widjojoatmodjo, M. N., Fluit, A. C. and Verhoef, J. 1994. Rapid identification of bacteria by PCR-Single-Strand conformation polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 3002-3007.
- Wiese, J., Thiel, V., Nagel, K., Staufenger, T. and Imhoff, J. F. 2009. Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea. *Mar. Biotechnol.* **11**, 287-300.
- Wilson, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr Protoc Mol Biol* 2-4.
- Xiao, Y. P., Hui, W., Lee, J. S., Lee, K. C. and Quan, Z. X. 2011. *Flavobacterium dongtanense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of a wetland reed. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**(2), 343-346.
- Yoon, J. H., Park, S., Kang, S. J., Oh, S. J., Myung, S. C. and Kim, W. 2011. *Flavobacterium ponti* sp. nov., isolated from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**(1), 81-85.
- Zhang, G., Xian, W., Chu, Q., Yang, J., Liu, W., Yang, L. and Li, W. 2016. *Flavobacterium terriphilum* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Zhang, J., Jiang, R. B., Zhang, X. X., Hang, B. J., He, J., & Li, S. P. 2010. *Flavobacterium haoranii* sp. nov., a cypermethrin-degrading bacterium isolated from a wastewater treatment system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**(12), 2882-2886.

## VI. 감사의 글

우선 학부 시절부터 대학원까지의 학교생활에 도움을 주신 허 문수 교수님께 감사의 인사를 드립니다. 그리고 논문심사를 위해 아낌없는 조언으로 격려해주신 김 기영 교수님과 이 승헌교수님께 감사드립니다. 또한, 지금까지 많은 가르침을 주신 송춘복 교수님, 최 광식 교수님, 전 유진 교수님, 이 경준 교수님, 이 제희 교수님, 여인규 교수님, 정 준범 교수님, 정 석근 교수님, 박 상울 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다.

실험실 생활에 많은 도움을 주신 동휘오빠, 항상 감사하는 저의 수호천사 소현언니, 지영언니, 항상 재미있는 4차원 경미언니, 민선언니, 지운언니, 늘 친절한 dharan과 귀염둥이들인 지현이와 해리에게도 감사의 말을 전합니다.

Amy(오수연), Jamie(김정연), 짜리, 회원, 하얀, 문수, 다미야 대학원 생활에 큰 도움이 되줘서 너무 고마워.

끝으로 항상 제 의견을 존중해 주시고 아낌없는 사랑으로 보살펴 주시는 엄마, 아빠, 영원한 막내둥이 내 동생 유리, 고맙고 사랑합니다. 그리고 늘 저를 이뻐해주는 외할머니와 친할머니께도 감사의 마음을 전하며, 소중하고 사랑하는 우리 가족에게 이 논문을 바칩니다.