

Analysis of Hemolytic Microflora from the Ark Shell (*Scapharca broughtonii*)Dong-Gyun Kim¹, Bo-Hye Nam¹, Hee Jeong Kong¹, Woo-Jin Kim¹, Bong-Seok Kim¹, Young-Ju Jee¹, Sang-Jun Lee¹, Choon Goo Jung², Mi-Sun Kong^{1,3} and Young-Ok Kim^{1*}¹Biotechnology Research Division, NFRDI, Busan 619-705, Korea²South East Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Tongyeong 619-705, Korea³Department of Biological Science, Purdue University, West Lafayette, IN, USA

Received March 6, 2012 / Revised April 2, 2012 / Accepted April 4, 2012

The southern coast of Korea is important for the ark shell (*Scapharca broughtonii*) aquaculture, but the productivity was rapidly reduced during the previous decade by mass mortality. To overcome this economic loss, investigations only focused on environmental factors, and microbiological researches were performed insufficiently. In this study, two sites (Gangjin and Jinhae bay) were selected for their high and low rate of mortality, respectively, and the existence of microflora from underwater sediments in the bodies of *S. broughtonii* was analyzed. We screened the whole body of each sample and chose unique colonies, which exhibit alpha- and beta-hemolytic activity, for identification. The microflora in *S. broughtonii* was less variable than sediments, and restricted species were isolated. We identified 17 genera of 88 species and 16 genera of 64 species from the two bays, respectively. A major proportion was comprised of *Bacillus* species, with the *Bacillus cereus* group being the most common species among the *Bacillus* strains, while *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, and *Vibrio* species were the second most abundant species. At the genus level, there were no significant microbial differences between the two coastal regions. 64 species were isolated from rare site (Jinhae bay), but more species (88) with greater variety were isolated from the frequent site (Gangjin bay). Therefore, it was assumed that the cause of mass mortality lay in the difference in specie-level diversity, and conducting investigations on the diagnosis of pathogenic species by challenging tests using isolated unique species.

Key words : Ark shell (*Scapharca broughtonii*), hemolysis, mass mortality, microbial diversity

서 론

피조개는 돌조개과 패류로, 우리나라 남해 내해 또는 내만의 펄바닥에서 서식하며, 꼬막류 중에서 가장 크고 육질이 연하며 강정식으로도 알려져 전량이 일본으로 수출되는 등 수산양식업적으로 매우 중요한 품종이다[4,16]. 이러한 피조개는 1970년대부터 대량 양식을 시작하여 1986년에 약 60,000 여 톤에 달하는 최고의 수확량을 기록하였으나, 1980년대 말부터 급격한 생산량 감소를 보여 2007년의 경우 약 3,000 여 톤으로 줄어들었으며, 생존율의 경우 3-5%를 기록할 정도로 낮다[14,24]. 이러한 생산량의 감소는 다양한 원인이 있으나, 주로 대량폐사의 형태가 가장 큰 원인이다[20,24]. 그러나 아직까지 대량 폐사의 정확한 원인은 밝혀져 있지 않으며, 많은 연구자들이 대량폐사에 대한 원인을 찾고자 수온, 염도 및 빈산소 수괴 등의 연안해역의 수해양적 환경요인과 이로 인한 피조개의 생리적 변화 또는 영향 등에 대하여 연구하였지만[20,24] 피조개에 공생 또는 공존하는 미생물과의 상관관계에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 피조개 양식환경인 해저 퇴적물과 피조개 체내에 존재하는 미생물의 분석 및 다양성 조사를 통하여 피조개 대량폐사의 원인 규명에 접근하고자 하였다.

환경에 존재하는 미생물 평가방법은 다양하나 그 중 pyro-sequencing 방법을 이용한 메타게놈 분석법은 난배양성 미생물(viable but non-culturable, VBNC)의 존재도 밝혀 낼 수 있기 때문에 최근 매우 유용한 방법으로 알려져 있다[11,23]. 그러나 이러한 연구방법은 원인 미생물의 미생물학적, 생화학적 특성을 밝혀내기가 힘들다는 단점 때문에 특정 후보원인 균을 탐색하고 검증이 필요한 실험에서는 적합하지 않다[7,11,15,19,26,27,28]. 따라서 배양 가능한 모든 균주의 분리와 분석을 동시에 수행함으로써 남해안 피조개 양식장의 미생물 군집 특성을 분석하였고 이러한 미생물 자원을 수집하여 정확한 폐사원인을 규명하고자 하였다.

본 연구에서는 남해안의 피조개 양식장 중 폐사율이 높으며 대량폐사가 자주 보고되는 지역(강진만)과 폐사의 발생빈도가 낮은 지역(진해만)을 선정하여 해저퇴적물과 피조개 내의 미생물을 비교 분석하였다[13]. 또한, 두 지역의 표층해수 온도는 4월부터 상승하여 8월에 가장 높았으나, 피조개가 서식하는 저층수온은 4월에서 6월까지 상승, 일정한 온도를 유지하다가 10월부터 감소하는 특징을 보였으며, 따라서 저층의 수

*Corresponding author

Tel : +82-51-720-2455, Fax : +82-51-720-2456

E-mail : yokim@nfrdi.go.kr

온이 가장 먼저 고온에 도달하는 6월의 해저 퇴적물 및 피조개 내의 미생물 균총을 분석 하였다(Data not shown).

대부분의 해양 갑각류나 연체동물은 혈액 내 산소운반 작용을 하는 혈장성분으로써 헤모시아닌(hemocyanin)을 가지며 이러한 성분은 공기중의 산소와 반응시 구리성분에 의한 청색을 나타내게 된다[5,29]. 그러나 피조개의 경우 다른 갑각류나 이매패류와는 다르게 혈액내의 산소운반 역할을 헤모글로빈(hemoglobin)이 수행하기 때문에 붉은색의 혈장 성분을 가지고 있으며, 이러한 특징 때문에 생리적 변화 또는 환경에 대한 영향을 평가 할 때 체내 헤모글로빈의 변화를 판단지표로 사용한다[20]. 헤모글로빈의 변화는 피조개의 혈색소 변화와도 관련이 있으며, 혈색소에 따라서 폐사의 징후나 환경에 대한 저항력 판단지표로써 삼으며, 이는 곧 피조개의 상품성으로도 연관된다[20]. 따라서 대량폐사에 대한 다양한 원인 중 병원성 미생물에 의한 헤모글로빈의 용혈현상이 피조개의 생리활성 및 대량폐사의 주요원인이라고 판단하여 샘플에서 분리한 다양한 균주 중에서 헤모글로빈의 용혈현상에 영향을 미칠 수 있는 알파(alpha) 또는 베타(beta) 용혈 활성을 보이는 균주만을 분리, 선별하여 16S rDNA 서열 정보로써 각각의 모든 균주를 동정하였다. 그리고 이러한 결과를 바탕으로 남해안 피조개 양식장 환경의 미생물 다양성을 분석하였으며, 이를 통하여 차후에 대량폐사 원인 균주를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시료채집, 미생물의 배양 및 보존

해저 퇴적물 및 피조개 샘플시료는 강진만 연안의 피조개

양식장 3지점과 진해만의 피조개 양식장 3지점에서 각각 채취 하였으며(Fig. 1), 채취 직후 무균상태에서 marine 고체배지 (Difco, USA), 1/10 marine 고체배지, R2A 고체배지(Difco, USA), 그리고 1/10 R2A 고체배지에 직접 도말 및 phosphate buffered saline (PBS)과 동량으로 희석하여 도말 하였다. 각각의 고체배지는 20℃에서 24시간 단위로 배양하며 배지상에 생겨난 균체 및 균락을 분리하여 배양 가능한 미생물로 선별 하였다. 선별한 미생물은 각각의 액체배지에서 배양하여 실험을 수행하였으며, 선별한 균주의 보관은 glycerol 보존법을 이용하여 -80℃에서 보관하였다.

용혈성 테스트

분리한 모든 미생물을 각각 분리된 marine 또는 R2A 액체 배지에 20℃에서 24시간 단위로 배양한 뒤 Manns 등[17]의 변형된 방법으로 용혈활성을 확인하였다. 혈액고체배지 (Micro media Co. Ltd., Korea)에 구멍을 내어 배양액을 떨어 뜨린 뒤 20℃에서 19시간 동안 반응하여 구멍 주위의 투명한 유무 및 환 주변의 색깔로써 알파, 베타 또는 감마 용혈 활성의 유무를 평가하였으며, 베타 용혈 활성의 경우 활성 정도의 세기를 투명한 크기로써 판단하였다.

Chromosomal DNA의 분리 및 16S rDNA amplification

Alpha- 또는 beta-hemolytic activity를 보이는 균주만을 선별한 뒤 각각의 marine 또는 R2A 액체배지를 이용하여 20℃에서 1-4일 배양 후 원심분리를 통하여 집균하였다. 집균한 균체를 Magnetic isolation kit (TNT, Japan)의 lysis 용액을 이용하여 현탁 한 뒤 protease K와 37℃에서 16-20시간 반응

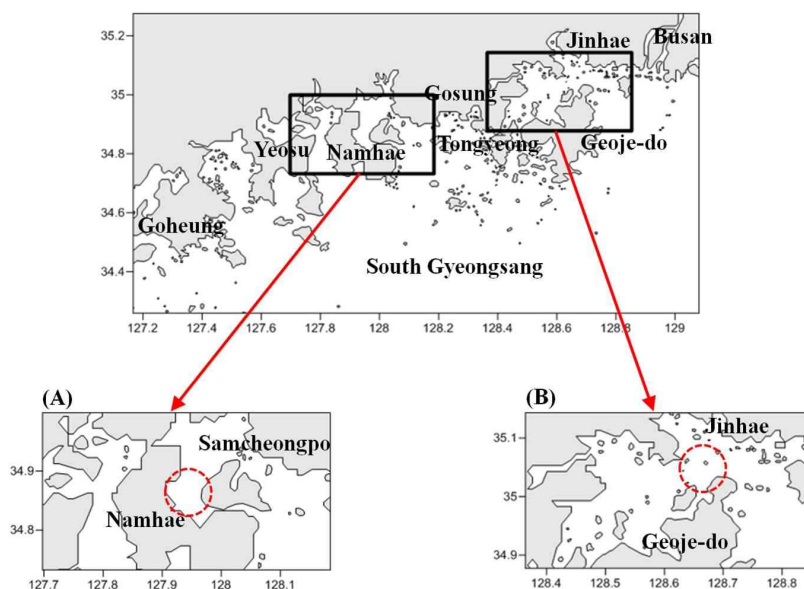


Fig. 1. A map showing the location of sampling sites. A site, Gangjin bay; B site, Jinhae bay. Opened circles in A and B sites indicate samples collected regions.

후 핵산 추출 자동화 기기(MFX-6100, TOYOBO, Japan)를 이용하여 total chromosomal DNA를 순수하게 분리하였다. 순수하게 분리한 DNA의 농도를 분광광도계로 순도 및 농도를 측정 후, Weisburg 등[30]의 방법을 응용하여 목적인 16S rDNA를 증폭하였다. 분리한 chromosomal DNA를 주형으로 사용하여 forward primer (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 reverse primer (5'-ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3') primer를 이용한 PCR 방법으로 16S rDNA 부분만을 증폭하였으며, PCR 증폭의 조성은 주형으로 chromosomal DNA 0.1 µg, 10 pM primer set, 2.5 mM dNTPs, reaction buffer, 1 U ExTaq (Takara, Japan)을 넣은 뒤 최종 부피 20 µl가 되도록 하여 반응 하였으며, 반응 조건은 initial denaturation 94°C 2분 뒤, denaturation 94°C 20초, annealing 55°C 20초, extension 72°C 1분을 총 30회 반응한 뒤 72°C에서 5분간 반응 하였다.

16S rDNA sequencing 및 미생물 다양성 분석

16S rDNA 증폭산물의 유무와 크기를 ethidium bromide (EtBr)를 포함하는 1% agarose gel 전기영동으로 band를 확인 한 뒤, QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, German)를 이용하여 PCR 산물을 정제하고 순도 및 농도를 계산하였으며, 3130XL Genetic analyzer (Applied Biotechnology, USA) DNA sequencing 기기를 이용하여 16S rDNA의 염기서열을 결정하였다. 획득한 염기 서열은 BioEdit (7.0.0 version)을 이용하여 비교, 분석 및 정리를 하였으며, EzTaxon (server 2.1) program (<http://www.eztaxon.org/>)과 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search를 이용한 NCBI (National Center for Biotechnology Infromation)의 GeneBank database 를 이용하여 가장 유사도가 높은 미생물을 선정하였다[3].

결과 및 고찰

배지에 따른 균주의 다양성

특정 미생물을 다른 미생물과 분리·동정하거나, 미생물 군집의 다양성을 연구하는 방법은 매우 다양하다. 일반적으로 환경 샘플에서 미생물을 분리할 때, 균체의 형태학적 특징 또는 생화학적 특징 등의 표현형질로써 분리하고 있으나, 많은

연구 결과에서 균체의 표현형질로써 균주를 분별하는 방법은 그 위험성이 매우 크다고 알려져 있으며, 이러한 방법은 형태학적 표현형이 같더라도 전혀 다른 균으로 밝혀지거나 특징의 패턴이 알려지지 않았다면 균의 동정이 어렵다고 보고되고 있다[33]. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하고자 두 연안 양식장의 퇴적물과 피조개 샘플에서 획득한 배양이 가능한 모든 미생물을 분리, 선별하였고 이러한 균주의 16S rDNA 염기서열을 이용하여 미생물 군총의 다양성을 분석하고자 하였다.

미생물 군총 연구를 위한 다양한 배지가 알려져 있으며, 그 중에서 marine 또는 R2A배지는 해양환경유래의 미생물의 연구를 위해 가장 추천되는 배지이다[6]. 따라서 두 종류의 배지를 이용하여 두 해역의 퇴적물 및 피조개 체내에서 배양 가능한 약 2,000여 점의 미생물을 분리하였으며, 그 중 1,052개의 개체에서 알파 또는 베타 용혈활성을 확인하였다(Table 1). 1,052개의 개체 중 marine배지에서 287개의 알파 또는 베타 용혈활성을 보이는 미생물을, R2A배지에서 765개의 알파 또는 베타 용혈활성을 나타내는 미생물을 선별하였으며, 선별된 1,052개의 균주 중에는 1,050개의 샘플은 다양한 세기의 베타 용혈활성을 보였으며, 단 두 개의 샘플에서만 알파 활성을 확인할 수 있었다(Table 1). Marine배지를 이용하여 분리한 균주의 경우 강한 베타용혈활성을 보이는 샘플은 163개였으며, 알파용혈활성을 보이는 샘플은 없었으나 124개의 샘플에서 약한 베타 용혈활성을 나타내었다(Table 1). R2A 배지의 경우 486개 균주에서 강한 베타 활성을 보이고 두 균주에서 알파 활성을 보였으며, 나머지 277 균주의 샘플에서는 약한 베타 활성을 보임을 알 수 있었다(Table 1).

용혈활성으로써 선별, 분리된 균주는 같은 종의 균주로 중복되는 경우도 많았지만 최종적으로 marine 배지에서는 62종, 그리고 R2A 배지에서는 81종이 분리, 동정 되었다. 또한 *Bacillus* spp. (19 sp.), *Brevibacterium* sp. (1 sp.), *Lysinibacillus* spp. (4 sp.), *Paenibacillus* sp. (1 sp.), *Pseudomonas* sp. (1 sp.)와 같이 marine과 R2A 배지 두 균테에서 모두 배양이 가능한 미생물이 있는가 하면, *Citricoccus* sp. (1 sp.), *Exiguobacterium* sp. (1 sp.), *Loktanella* sp. (1 sp.), *Pantoea* sp. (1 sp.), *Paracoccus* sp. (1 sp.), *Photobacterium* spp. (6 sp.), *Planomicrobium* sp. (1 sp.), *Psychrobacter* sp. (1 sp.), *Shewanella* spp. (3 sp.),

Table 1. List of isolates, which exhibited hemolytic activities, from two bay and ark-shell body

Media	Activity	Gangjin-bay	Jinhae-bay
Marine	Alpha	0	0
	Weak-beta	68	57
	Strong-beta	119	44
R2A	Alpha	2	0
	Weak-beta	160	118
	Strong-beta	235	249
Total		1,052	

Thalassomonas sp. (1 sp.), 그리고 *Vibrio* spp. (4 sp.)는 marine 배지에서만, *Brevibacillus* sp. (1 sp.), *Brevundimonas* sp. (1 sp.), *Massilia* spp. (3 sp.), *Naxibacter* sp. (1 sp.), *Paenisporosarcina* sp. (1 sp.), *Staphylococcus* spp. (2 sp.), 그리고 *Viridibacillus* sp. (1 sp.)는 R2A 배지에서만 배양되어, 특정 균주의 경우 두 배지 중 하나의 배지에서만 배양이 가능함을 알 수 있었다.

피조개 체내에서 분리한 균주의 다양성

용혈활성을 보이는 균주의 chromosomal DNA를 분리하여 약 1.5 kb의 길이의 16S rDNA를 증폭하였고, 증폭산물의 염기서열분석 작업 후 NCBI의 BLAST search를 이용한 GeneBank와 EzTaxon server 2.1 사이트를 이용하여 염기서열 간의 유사도를 분석, 유사도가 가장 높은 type strain 균주로 분류하였다 [3]. 1,052개의 모든 균주 샘플을 분석하였으며 근연종과의 평균 유사도는 98% 이상으로 밝혀졌다. 강진만 퇴적물, 진해만 퇴적물, 그리고 강진만 피조개 샘플 내 균주의 유사도는 평균 98.5% 이상 나왔으나 진해만 피조개 샘플에서 분리한 균체의 분석결과는 95.4%로써 다른 표본보다 많이 낮은 서열 유사도를 알 수 있었다. 이는 지역에 따른 피조개내의 미생물 군총이 다르며, 같은 지역의 퇴적물과 피조개내에서도 미생물 군총이 많은 차이가 있음을 알 수 있었으며, 추후 다양한 미생물학적 실험을 수행한다면 새로운 종을 발견할 수 있을 것으로 생각된다.

피조개 체내에서 분리한 균주는 두 지역의 해저 퇴적물에서 획득한 균주보다 적은 수의 균주 및 다양성을 보였다(Table 2). 강진만에서 채취한 피조개 내에는 2목 2과 7속 20종으로 *Bacillus* spp. (8 sp.), *Citricoccus* sp. (1 sp.), *Massilia* spp. (6 sp.), *Photobacterium* sp. (1 sp.), *Planomicrobium* sp. (1 sp.), *Pseudomonas* sp. (1 sp.), 그리고 *Vibrio* spp. (2 sp.)가 존재하였으며, 진해만의 경우 2목 2과 2속 15종으로 *Bacillus* spp. (14 sp.)와 *Brevundimonas* sp. (1 sp.), 단 2 genera로써 존재하여 강진만에서 수집한 피조개보다 매우 적은 수의 속이 존재하며 다양성도 매우 낮음을 알 수 있었다(Table 2). 특히하게도 강진만과 진해만의 피조개 내에는 다수의 *Bacillus* species (7 sp.)가 존재함을 알 수 있었으며, 강진만 피조개 내에서만 *Bacillus* sp. (1 sp.), *Citricoccus* sp. (1 sp.), *Massilia* spp. (6 sp.), *Photobacterium* sp. (1 sp.), *Planomicrobium* sp. (1 sp.), *Pseudomonas* sp. (1 sp.), 그리고 *Vibrio* spp. (2 sp.)가 존재하였으며 진해만 피조개에는 강진만 샘플에 존재하지 않는 *Bacillus* spp. (6 sp.)와 *Brevundimonas* sp. (1 sp.)가 존재하였다.

강진만 피조개 내에서는 퇴적물에 존재하지 않는 *Citricoccus alkalitolerans*, *Massilia aerolata*, *Massilia jejuensis*, *Massilia suwonensis*, *Planomicrobium okeanokites*, 그리고 *Vibrio comitans*?가 분리되었으며, 진해만 피조개 내에는 *Bacillus coahuilensis*와 *Brevundimonas vesicularis*이 특이하게 존재하였다. 이러한 균주는 대기, 전복의 내장, 호수, 그리고 해수 등에서 존재함이 보고되어 해저 퇴적물이 아닌 강진만 또는 진해만의 해수 내에 지역 특이적으로 존재하는 균주가 피조개의 여과섭식으로 인하여 체내에 존재하는 것으로 생각된다[1,2,9,22,31,32].

퇴적물에서 분리한 균주의 다양성 분석

강진만에서 분리한 해저퇴층의 퇴적물에는 3목 5과 15속 82종이 존재하였으며, *Bacillus* spp. (30 sp.), *Brevibacillus* sp. (1 sp.), *Brevibacterium* sp. (1 sp.), *Loktanella* sp. (1 sp.), *Lysinibacillus* spp. (4 sp.), *Massilia* spp. (3 sp.), *Naxibacter* sp. (1 sp.), *Paenibacillus* spp. (24 sp.), *Photobacterium* spp. (6 sp.), *Pseudomonas* sp. (1 sp.), *Psychrobacter* sp. (1 sp.), *Shewanella* spp. (3 sp.), *Thalassomonas* sp. (1 sp.), *Vibrio* spp. (4 sp.), 그리고 *Viridibacillus* sp. (1 sp.) 임이 확인되었다 (Table 2). 진해만 퇴적물 내에는 *Acinetobacter* spp. (3 sp.), *Bacillus* spp. (31 sp.), *Brevibacillus* sp. (1 sp.), *Brevibacterium* sp. (1 sp.), *Exiguobacterium* sp. (1 sp.), *Lysinibacillus* spp. (4 sp.), *Massilia* sp. (1 sp.), *Paenibacillus* spp. (10 sp.), *Paenisporosarcina* sp. (1 sp.), *Pantoea* sp. (1 sp.), *Paracoccus* sp. (1 sp.), *Pseudomonas* sp. (1 sp.), *Sporosarcina* spp. (2 sp.), *Staphylococcus* spp. (2 sp.) 그리고 *Vibrio* spp. (2 sp.)로 3목 5과 15속 62종이 존재하여 해저 퇴적물 내에는 피조개의 체내보다 더욱 다양한 미생물이 존재함을 알 수 있었다(Table 2). 강진만과 진해만의 퇴적물에서 분리한 균주의 경우, 두 군데 모두에서 피조개 체내에서와 같이 *Bacillus* species가 가장 많은 수로 동정되었으며, 이러한 현상은 해수, 갯벌 그리고 해저 퇴적물 등의 다양한 연구에서도 이미 보고되었다 [8,12,18,25]. 많은 연구결과에서는 환경샘플로부터 배양, 분리, 그리고 동정의 과정으로 획득한 균주를 샘플 내에 존재하는 미생물의 총군총으로 설명, 분류하는 경우가 많으나, 이러한 해석은 배양 가능한 수준의 균주를 분석한 일부의 군총 일뿐 차질 특정 환경내의 총군총에 대한 연구로 확대 해석될 수 있기 때문에 이러한 연구는 더욱 많은 연구를 필요로 한다. 따라서 본 연구 결과는 배양 가능한 분리 균주 수준에서

Table 2. Taxonomic affiliation of isolates collected from sediments and ark shell of two coast bay samples

Sample sites	Phylum	Class	Genus	Species	Isolates
Sediment from Gangjin-bay	3	5	15	82	521
Sediment from Jinhae-bay	3	5	15	62	437
Ark shell from Gangjin-bay	2	2	7	20	62
Ark shell from Jinhae-bay	2	2	2	15	32

미생물의 다양성을 확인 및 비교를 한 결과이며 *Bacillus* species가 두 연안지역의 해저 퇴적물 내 배양가능 미생물의 우점종이라고 해석하기 위해서는 좀 더 다양한 분자생물학적 연구가 더욱 뒷받침이 되어야 된다고 생각한다. 두 지역의 퇴적물에서 분리한 다양한 *Bacillus* species 중에서도 *Bacillus cereus* group에 속하는 균주가 특이적으로 많이 분리되었다. *Bacillus cereus* group은 보통 6균주로 나누어지며 *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis*, 그리고 *B. weihenstephanesis*로 알려져 있다[10,21]. 본 실험에서도 *Bacillus cereus* group이 1,052개의 배양 가능 균주 샘플 중 516개가 확인되어 가장 많은 샘플 수를 기록하였으며, 특히 *B. anthracis*가 가장 많이 분석되었으며(250 isolates) 그 다음으로 *B. thuringiensis* (120 isolates), *B. cereus* (47 isolates), *B. pseudomycooides* (41 isolates), *B. weihenstephanesis* (41 isolates), *B. mycooides* (17 isolates) 순 이었다. *Bacillus cereus* group의 종 외에도 *Paenibacillus* spp. (4 sp.)와 *Lysinibacillus* spp. (4 sp.)가 두 지역의 퇴적물 내에 상당수 존재하였다(Fig. 2).

Massilia 속, *Photobacterium* 속, *Vibrio* 속, *Shewanella* 속이 강진만에서만 확인되었고 *Acinetobacter* 속, *Sporosarcina* 속, *Staphylococcus* 속은 진해만에서만 확인되어 이러한 균주의 차이가 지역에 따른 미생물 다양성 차이임을 알 수 있었다(Fig. 2). 또한 속의 범위에서는 강진만 또는 진해만의 퇴적물

에서 모두 분리·동정 되어 차이점을 알 수 없었지만 종의 수준에서는 두 지역에 따른 균주의 다양성을 알 수 있었다(Fig. 2). 따라서 목(phylum), 과(class) 또는 속(genus)의 수준에서의 미생물 다양성 연구는 두 지역에 따른 미생물의 다양성 차이를 알 수가 없었으며(두 지역 모두 3목 5과 15속), 목, 과 또는 속의 수준에서 특정 지역의 미생물 다양성을 연구하는 것은 가능하나, 특정 지역 간의 다양성 차이를 종 수준이 아닌 범위에서 분석, 차이점을 발견하는 것은 어려운 것으로 사료된다(Table 3).

강진만과 진해만의 샘플에서 분리한 모든 균주를 분석하였을 때에 118종의 미생물이 존재하였고 이러한 종은 25개의 속, 5 과, 그리고 3개의 목으로 분류 되었다(Table 4). 또한 폐사의 빈도가 높은 강진만에서만 특이적으로 동정된 *Bacillus* spp. (8 sp.), *Brevibacillus* sp. (1 sp.), *Citricoccus* sp. (1 sp.), *Loktanella* sp. (1 sp.), *Massilia* spp. (5 sp.), *Naxibacter* sp. (1 sp.), *Paenibacillus* spp. (20 sp.), *Photobacterium* spp. (6 sp.), *Planomicrobium* sp. (1 sp.), *Psychrobacter* sp. (1 sp.), *Shewanella* spp. (3 sp.), *Thalassomonas* sp. (1 sp.), *Vibrio* spp. (4 sp.), 그리고 *Viridibacillus* sp. (1 sp.)의 54종은 폐사의 빈도가 낮은 진해만에서는 발견되지 않은 종임을 알 수 있었으며, 차후 이러한 후보균주의 생화학적, 미생물학적인 연구 및 감염실험을 통한 폐사유발 균주를 추측할 수 있을 것으로 예측 된다(Fig. 2). 이와 같이 지역에 따른 미생물의 다양성 또는 분포를 분석

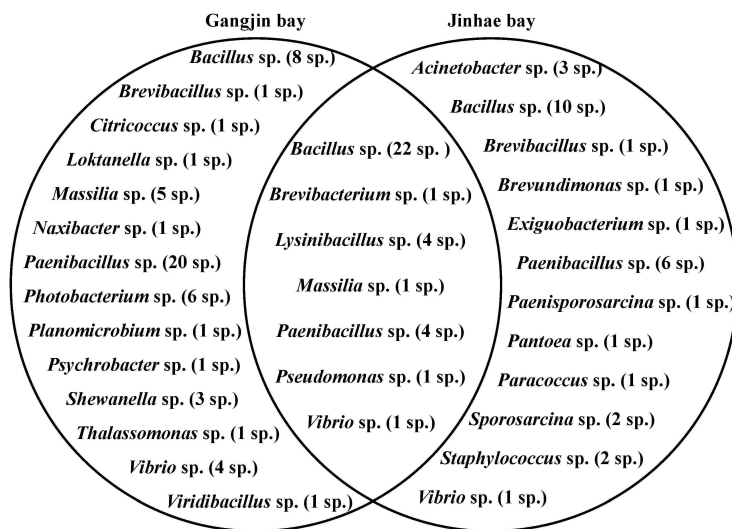


Fig. 2. Venn diagram describes the distribution of isolated and identified samples collected from two bays. Words in marks of parentheses display the number of identified species.

Table 3. Distribution and abundance of identified samples obtained from two coast bay samples

Sample sites	Phylum	Class	Genera	Species	Isolates
Gangjin-bay	3	5	17	88	583
Jinhae-bay	3	5	16	64	469
Total	3	5	25	118	1,052

Table 4. Summarized phyla, classes, genera and species list of cultured bacteria samples from two bays

Phylum	Class	Genus	Species	Isolates
Firmicutes	Bacilli	<i>Bacillus</i> spp.	40	805
		<i>Brevibacillus</i> spp.	2	2
		<i>Exiguobacterium</i> sp.	1	1
		<i>Lysinibacillus</i> spp.	4	64
		<i>Paenibacillus</i> spp.	30	70
		<i>Paenisporosarcina</i> sp.	1	1
		<i>Planomicrobium</i> sp.	1	1
		<i>Sporosarcina</i> spp.	2	5
		<i>Staphylococcus</i> spp.	2	3
		<i>Viridibacillus</i> sp.	1	1
Proteobacteria	Alpha-proteobacteria	<i>Brevundimonas</i> sp.	1	1
		<i>Loktanella</i> sp.	1	2
		<i>Paracoccus</i> sp.	1	1
	Beta-proteobacteria	<i>Massilia</i> spp.	6	21
		<i>Naxibacter</i> sp.	1	3
	Gamma-proteobacteria	<i>Acinetobacter</i> spp.	3	6
		<i>Pantoea</i> sp.	1	1
		<i>Photobacterium</i> spp.	6	9
		<i>Pseudomonas</i> sp.	1	27
		<i>Psychrobacter</i> sp.	1	2
<i>Shewanella</i> spp.		3	4	
<i>Thalassomonas</i> sp.		1	1	
<i>Vibrio</i> spp.	6	15		
Actinobacteria	Actinobacteridae	<i>Brevibacterium</i> sp.	1	5
		<i>Citricoccus</i> sp.	1	1
3 phyla	5 classes	25 genera	118 spp.	1,052

하여 폐사의 발생 빈도가 다른 지역간의 균총을 비교, 분석함으로써 폐사와 관련된 후보원인 균주의 예측이 가능하다고 생각되며, 차후 후보 균주의 검증과정을 통하여 대량폐사 원인균주의 구명이 가능하다고 생각된다. 또한 이러한 실험은 남해안 피조개 대량폐사 원인규명과 관련한 최초의 미생물학적 평가라는 측면에서 다양한 의미를 부여할 수 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물품질관리원(양식패류의 외부 스트레스에 대한 바이오 모니터링 기법 개발, FR 11-BT-11-01)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Beilstein, F. and Dreiseikelmann, B. 2006. Bacteriophages of freshwater *Brevundimonas vesicularis* isolates. *Res. Microbiol.* **157**, 213-219.
- Cerritos, R., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Herrera-Estrella, L., Alcaraz-Peraza, L. D., Arvizu-Gómez, J. L., Olmedo, G., Ramirez, E., Siefert, J. L. and Souza, V. 2008. *Bacillus coahuilensis* sp. nov., a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 919-923.
- Chun, J. S., 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**, 2259-2261.
- Chun, Y. Y., Na, G. H. and Choi, W. J. 1991. Mass mortality of arkshell, *Anadara broughtonii*, SCHRENCK seeding with marine ecological characteristics. *Bull. Korean Fish. Soc.* **24**, 70-78.
- Cuff, M. E., Miller, K. I., van Holde, K. E. and Hendrickson, W. A. 1998. Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. *J. Mol. Biol.* **278**, 855-870.
- Difco laboratories. 1998. Culture media and ingredients, dehydrated. pp. 302-303, 421-422, 11th eds., Difco laboratories. Division of Becton Dickinson and Company. Maryland. U.S.A.
- Donachie, S. P., Christenson, B. W., Kunkel, D. D., Malahoff, A. and Alam, M. 2002. Microbial community in acidic hydrothermal waters of volcanically active White Island, New Zealand. *Extremophiles* **6**, 419-425.
- Ettoumi, B., Raddadi, N., Borin, S., Daffonchio, D., Boudabous, A. and Cherif, A. 2009. Diversity and phylogeny of culturable spore-forming Bacilli isolated from marine sediments. *J. Basic Microbiol.* **49**, S13-S23.

9. Fritz, I., Strömpl, C., Nikitin, D. I., Lysenko, A. M. and Abraham, W. R. 2005. *Brevundimonas mediterranea* sp. nov., a non-stalked species from the Mediterranean Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 479-486.
10. Gonzales, J. M., Brown, B. J. and Carlton, B. C. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmid coding for gamma-endotoxin among strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 6951-6955.
11. Hoff, K. J., Tech, M., Lingner, T., Daniel, R., Morgenstern, B. and Meinicke, P. 2008. Gene prediction in metagenomic fragments: a large scale machine learning approach. *BMC Bioinformatics* **9**, 217-230.
12. Ivanova, E. P., Vysotskii, M. V., Svetashev, V. I., Nedashkovskaya, O. I., Gorshkova, N. M., Mikhailov, V. V., Yumoto, N., Shigeri, Y., Taguchi, T. and Yoshikiwa, S. 1999. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Int. Microbiol.* **2**, 267-271.
13. Kim, B. H., Min, B. H., Choi, N. J., Oh, B. S., Park, K. Y. and Min, K. S. 2008. Seasonal changes of species composition and standing crop of phytoplankton in the ark shell *Scapharca broughtonii* farming area of Jinhae bay. *J. Aquaculture* **21**, 157-166.
14. Kim, B. H., Shin, Y. K., Park, K. Y., Choi, N. J., Oh, B. S. and Min, B. H. 2008. Growth and survival of the spat of arkshell, *Scapharca broughtonii* in intermediate culture with different shape of protective net and type of preventive net of spat loss. *Korean J. Malacol.* **24**, 131-136.
15. Kim, B. K., Park, Y. D., Oh, H. M. and Chun, J. 1993. Identification and characterization of metagenomic fragments from tidal flat sediment. *J. Microbiol.* **47**, 402-410.
16. Koh, B. H., Lee, W. D., Ann, S. K., Kim, J. H. and Lee, M. S. 1997. Effect of storage temperature on the survival of *Vibrio mimicus* K-1 in seawater and arkshell. *J. Korean Fish. Soc.* **30**, 277-281.
17. Manns, J. M., Mosser, D. M. and Buckley, H. R. 1994. Production of a Hemolytic Factor by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **62**, 5154-5165.
18. Olafsen, J. A., Mikkelsen, H. V., Gjaever, H. M. and Hansen, G. H. 1993. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1848-1854.
19. Palleroni, N. J. 1997. Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**, 3-19.
20. Park, M. S., Lim, H. J. and Kim, P. J. 1998. Effect of environmental factors on the growth, glycogen and hemoglobin content of cultured arkshell, *Scapharca broughtonii*. *J. Korean Fish. Soc.* **31**, 176-185.
21. Priest, F. G., Goodfellow, M. and Todd, C. 1988. A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1847-1882.
22. Sawabe, T., Fujimura, Y., Niwa, K. and Aono, H. 2007. *Vibrio comitans* sp. nov., *Vibrio rarus* sp. nov. and *Vibrio inusitatus* sp. nov., from the gut of the abalones *Haliotis discus discus*, *H. gigantea*, *H. madaka* and *H. rufescens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 916-922.
23. Schmidt, T. M., DeLong, E. F. and Pace, N. R. 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* **173**, 4371-4378.
24. Shin, Y. K., Kim, B. H., Choi, N. J., Jung, C. G. and Park, M. W. 2008. Influence of temperature, salinity and hypoxia on survival and metabolic rate in the arkshell, *Scapharca broughtonii*. *Korean J. Malacol.* **24**, 59-65.
25. Siefert, J. L., Larios-Sanz, M., Nakamura, L. K., Slepecky, R. A., Paul, J. H., Moore, E. R., Fox, G. E. and Jurtschuk, J. P. 2000. Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. *Curr. Microbiol.* **41**, 84-88.
26. Sorokin, V. A., Gelfand, M. S. and Artamonova, I. I. 2010. Evolutionary dynamics of clustered irregularly interspaced short palindromic repeat systems in the ocean metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2136-2144.
27. Stuart, P. D., Shaobin, H., Todd, S. G., Alexander, M. and Maqsdul, A. 2003. *Idiomarina loihiensis* sp. nov., a halophilic c-Proteobacterium from the Lō'ihi submarine volcano, Hawai'i. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1873-1879.
28. Suzuki, M. T., Rappé, M. S., Haimberger, Z. W., Winfield, H., Adair, N., Ströbel, J. and Giovannoni, S. J. 1997. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene cloned and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 983-989.
29. Topham, R., Tesh, S., Westcott, A., Cole, G., Mercatante, D., Kaufman, G. and Bonaventura, C. 1999. Disulfide bond reduction: A powerful, chemical probe for the study of structure-function relationships in the hemocyanins. *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 261-266.
30. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697-703.
31. Weon, H. Y., Kim, B. Y., Son, J. A., Jang, H. B., Hong, S. K., Go, S. J. and Kwon, S. W. 2008. *Massilia aerilata* sp. nov., isolated from an air sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1422-1425.
32. Weon, H. Y., Yoo, S. H., Kim, S. J., Kim, Y. S., Anandham, R. and Kwon, S. W. 2010. *Massilia jejuensis* sp. nov. and *Naxilacter suwonensis* sp. nov., isolated from air samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **8**, 1938-1943.
33. Woo, P. C., Ng, K. H., Lau, S. K., Yip, K. T., Fung, A. M., Leung, K. W., Tam, D. M., Que, T. L. and Yuen, K. Y. 2003. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1996-2001.

초록 : 패류(*Scapharca broughtonii*) 유래의 용혈활성 미생물 다양성 분석

김동균¹ · 남보혜¹ · 공희정¹ · 김우진¹ · 김봉석¹ · 지영주¹ · 이상준¹ · 정춘구² · 공미선^{1,3} · 김영옥^{*}

(¹국립수산과학원 전략양식연구소 생명공학과, ²국립수산과학원 남동해수산연구소, ³퍼듀대학교 생물학과)

남해연안지역은 피조개(*Scapharca broughtonii*) 양식으로 매우 중요한 지역이나 최근 대량폐사로 인하여 생산량이 급격히 감소하였다. 이러한 대량폐사의 원인을 구명하기 위하여 다양한 환경요인들에 대한 연구는 수행되었으나, 미생물학적인 연구는 미비한 실정이다. 본 연구에서는 폐사율이 높은 강진만과 폐사발생이 적은 진해만 연안 피조개 양식장의 해저 퇴적물과 피조개 체내에서 분리한 미생물 균총에 대하여 분석하였다. 각각의 샘플에서 배양 가능한 모든 미생물을 분리하였으며, 분리한 미생물 중 알파 또는 베타 용혈활성을 보이는 미생물을 모두 동정하였다. 피조개 체내에 존재하는 용혈미생물의 균총은 해저 퇴적물 보다 낮은 다양성을 보였으며, 극히 한정된 종의 미생물이 존재함을 알 수 있었다. 강진만에서는 17속(genus) 88종(species)의 미생물을, 그리고 진해만에서는 16속 64종의 미생물을 분리할 수 있었다. 샘플 내에는 *Bacillus* 속의 미생물이 가장 많이 분리 되었으며, 그 중 *Bacillus cereus* group의 종이 가장 많고, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, 그리고 *Vibrio* 종 등이 그 다음으로 많이 존재하였다. 속(genus) 수준에서는 두 지역의 특별한 차이를 발견할 수 없었으나, 진해만 연안에서는 64종이 발견되었고 강진만에서는 88종이 분리되어, 강진만이 좀 더 종 수준에서의 높은 다양성을 알 수 있었다. 따라서 피조개 대량폐사의 원인은 이러한 균주의 종 수준에서의 차이에서 기인하는 것 이라고 가정할 수 있었으며, 폐사 지역에서 발견되는 미생물을 이용한 감염실험을 통하여 피조개의 대량폐사 원인 균을 구명 할 예정이다.