

Diversity and Phylogenetic Analysis of Culturable Marine Bacteria Isolated from Rhizosphere Soils of *Suaeda japonica* Makino in Suncheon Bay

Young-Hyun You^{1,3†}, Jong Myong Park^{2†}, Yoon-Jong Nam¹, Hyun Kim¹, Myung-Chul Lee³ and Jong-Guk Kim^{1*}

¹School of Life Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²LOTTE R&D Center, Seoul 150-096, Korea

³National Agrobiodiversity Center, NAAS, RDA, Jeonju 560-500, Korea

Received January 6, 2015 / Revised January 29, 2015 / Accepted February 2, 2015

Bacterial diversity was studied in the rhizosphere of *Suaeda japonica* Makino, which is native to Suncheon Bay in South Korea. Soil samples from several sites were diluted serially, and pure isolation was performed by subculture using marine agar and tryptic soy agar media. Genomic DNA was extracted from 29 pure, isolated bacterial strains, after which their 16S rDNA sequences were amplified and analyzed. Phylogenetic analysis was performed to confirm their genetic relationship. The 29 bacterial strains were classified into five groups: phylum *Firmicutes* (44.8%), *Gamma proteobacteria* group (27.6%), *Alpha proteobacteria* group (10.3%), phylum *Bacteroidetes* (10.3%), and phylum *Actinobacteria* (6.8%). The most widely distributed genera were *Bacillus* (phylum *Firmicutes*), and *Marinobacterium*, *Halomonas*, and *Vibrio* (*Gamma proteobacteria* group). To confirm the bacterial diversity in rhizospheres of *S. japonica*, the diversity index was used at the genus level. The results show that bacterial diversity differed at each of the sampling sites. These 29 bacterial strains are thought to play a major role in material cycling at Suncheon Bay, in overcoming the sea/mud flat-specific environmental stress. Furthermore, some strains are assumed to be involved in a positive interaction with the halophyte *S. japonica*, as rhizospheric flora, with induction of growth promotion and plant defense mechanism.

Key words : Coastal salt marsh, marine bacteria, Suncheon Bay, *Suaeda japonica* Makino

서 론

해안 염습지(coastal salt marsh)란 내륙생태계와 해상생태계의 전이대로서 강과 바다로부터 유기물이 침전되는 해변과 하구 접점에 주로 형성되며, 해수에 의해 발달한 지역이다 [4]. 국내의 경우 이와 유사한 지리적 특성을 보이는 곳은 서남해안으로, 조석간만의 차가 크고 수심이 얕으며 경사가 완만한 해안염습지가 잘 발달해 있다. 이러한 특성을 가지는 서남해안에는 세계 5대 연안습지이며 국내 대표적인 갯벌인 순천만이 자리잡고 있으며, 이는 2006년에 “람사르 습지”로 등재되었다. 순천만은 원형에 가까운 형태의 만으로 면적은 약 22.6 km²에 달하고, 상류로부터 유입되는 담수, 남해로부터 유입되는 해수 및 파랑에 의해 공급되는 부유물질이 퇴적되어

독특한 생태적 특징을 가진다. 또한 모래와 모래갯벌 및 갯벌의 토양형태로 이루어져 [15], 다양한 염생식물(Halophyte)이 자생하고 있으며 [17], 풍부한 생물종 다양성을 보이는 것으로 알려져 있다 [18]. 순천만에 자생하는 대표적인 염생식물은 갈대(*Phragmites australis*), 칠면초(*Suaeda japonica*), 나문재(*Suaeda asparagoides*), 해홍나물(*Suaeda maritima*), 통통마디(*Salicornia europaea*) 등이 있으며 [14], 우점종으로 갈대와 칠면초가 자생하고 있지만 칠면초의 개체수가 더 넓게 많이 분포하고 있다.

이러한 염생식물은 다양한 미생물과 상호관계를 형성하는데, 이들 미생물은 염생식물의 생장과 고온, 건조, 염과 같은 환경 스트레스에 대한 저항성 및 면역활성에 기여한다고 알려져 있으며 [32, 38], 염습지로 유입되는 오염물질을 분해한다고 알려져 있다 [8]. 그러나 국내에서 해안염습지에 대한 연구가 많이 이루어 지지는 않았으며, 규모에 비해 순천만에 자생하는 미생물 연구는 거의 없는 실정이다. 최근 순천만 자생 염생식물과 상호관계에 있는 내생균류에 대한 연구가 점차적으로 이루어지고 있는데 반하여 [33, 42] 해양세균(marine bacteria)에 대한 연구 등은 전혀 없는 실정이다. 우리나라 최대 규모의 해안염습지로 알려져 있지만, 해양세균의 종 다양성 연구가 이루어져야 할 것이다.

† Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5379, Fax : +82-53-955-5379

E-mail : Kimjg@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

따라서 본 연구에서는 순천만에 우점종으로 알려져 있는 칠면초의 근권으로부터 다양한 해양세균을 분리·동정하였으며, 이들의 다양성과 유연관계를 확인하였다. 또한 계통학적 분석을 실시하여 해안복원 및 갯벌 고유의 기능을 부여하는 염생식물과 상호작용할 것으로 추측되는 유용 세균자원을 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

근권토양 채취 및 배양가능한 세균 분리

순천만 자생 *S. japonica*의 근락지 2곳을 선발하여 그들의 근권 토양을 채취하였다(Table 1). 채취된 토양시료는 멸균 tube에 담아 4℃를 유지하여 실험실로 운반되었으며, 멸균된 0.85% NaCl 용액과 토양시료를 9:1로 섞어 40 rpm으로 30분간 교반 및 현탁하였다. 토양 현탁액 상등액을 100 µl씩을 덜어 내어 standard serial dilution technique (10^{-4} ~ 10^{-6} 배)을 실시하였으며, marine broth (MB; Difco, USA) 및 tryptic soy broth (TSB; Difco, USA) 에 한천을 첨가한 고체배지에 평판도말 후 25℃에서 5일간 배양하였다. 배지상 형성된 집락들은 형태학적으로 분류, 선발되었으며 각각 동일 배양조건하에서 획선도말을 반복하여 순수분리 되었다[16, 36, 41].

분리균주 16S rDNA 유전자 염기서열 결정

형태학적으로 특징적인 모양, 크기, 색깔 등을 보인 각 균주가 순수분리 되었다. 이들을 각각 원분리 배지인 marine broth (Difco, USA) 및 tryptic soy broth (Difco, USA) 액체배지에서 진탕배양한 후 원심분리를 통해 균체를 수집하였다(10,000x g, 10 min). genomic DNA의 추출을 위해 Chelex Resin (Bio-RAD, USA)을 활용한 boiling method를 사용하였으며, 16S rDNA 서열 증폭을 위해 5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'를 forward primer로, 5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'을 reverse primer로 사용하여 PCR을 수행하였다[40]. PCR 조건 및 수행방법으로, 우선 initial denaturation (95℃, 15 min)을 시행 후, denaturation (95℃, 20 sec), annealing (50-58℃, 40 sec), elongation (72℃, 90 sec)를 30회 반복한 후 최종적으로 elongation (72℃, 5 min)을 실시하였다[20, 41]. 그리고 증폭된 PCR 산물은 ethanol precipitation method를 사용하여 증폭된 서열만을 얻어내기 위해 ethanol (65%) 및 sodium acetate (3 M, pH 4.6)을 각각의 PCR products에 첨가하여 상온에서 방치하였으며(15 min), 원심분리 실시하여 PCR products만을

침강하였다(2000× g, 45 min). 그 후 paper towel을 이용해 상층액을 제거한 뒤 70% ethanol을 첨가한 후 원심분리 하는 과정을 7~8회 반복하였다(10,000x g, 10min). 이후 분리된 PCR products를 product purification kit (SGP27-S150 Gel & PCR Extraction system-UB)을 이용하여 정제하였으며, 이들의 염기서열 분석은 ABI 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 해독을 실시하였다[37].

16S rDNA 유전자 염기서열 계통분석 및 다양성 분석

분리주들의 부분동정을 위해 16S rDNA 유전자 염기서열 간 similarity 확인을 위해 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search를 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank와 Ez-Taxon server (<http://eztaxon.org>)의 database 로 부터 유사 염기서열을 비교, 분석하였다. 분리된 DNA로부터 결정된 염기서열과 database에서 얻어진 염기서열은 유연관계 확인을 위해 16S rDNA 영역을 Clustal X program으로 다중정렬 후, BioEdit Sequence Alignment Editor를 사용해서 염기서열을 재차 정렬하고 Mega 6.0 Neighbor-Joining Tree 기능을 Kimura 2-parameter model에 따른 분석법으로 계통수를 작성하였다[9, 26, 41]. 이에 더하여 종 풍부도의 도출에는 Margalef's richness (Dmg) [27] 및 Menhinick's index (Dmn) [39]를 적용하였고, 종 다양성 지수의 도출에는 Shannon's diversity index (H') [22, 31], Simpson's index (D) [22, 35]를 적용하여 시료채취 지역의 근권 세균 다양성 지수를 분석하였다[10, 13, 40].

결과 및 고찰

순천만 갯벌 근권세균의 분리 및 부분동정

순천만에 균락을 이루며 자생하는 *S. japonica*의 근권토양 2개 지점에서 총 29개의 세균을 순수분리 하였다(Table 2). 3차례에 걸친 순수분리 과정을 통해 육안으로 확인하였을 때 형태학적으로 집락의 형태, 색깔, 크기 등의 현저한 차이를 보이는 개체를 선발하여 분리하였다[16, 36].

우선 순수분리에 사용된 배지별로 분리균의 차이가 보였는데, MB 배지에서 22개의 균주가, TSB 배지에서 7개의 균주가 분리되었다(Table 2). MB 배지에서만 분리된 균주로는 주로 해양세균으로 보고된 *Marinobacterium*, *Halomonas*, *Vibrio* 속의 종들이 분리되었으며, 이들은 TSB 고체배지에서는 분리되지 않는 경향을 보였다. TSB 고체배지에서 분리된 세균 속은 대

Table 1. Geographic coordinates of the sampling locations at the Suncheon Bay

Site no.	Plant names	GPS Coordinates	Genus	Species
1	<i>Suaeda japonica</i>	34°51'59.83"N, 127°31'06.24"E	7	9
2		34°51'59.73"N, 127°31'06.36"E	9	10

Soil samples were collected from around roots of *S. japonica* species native to the Suncheon Bay.

Table 2. Partial identification of marine bacteria isolated from the rhizosphere soils of *S. japonica* in Suncheon Bay

(Site 1)

Site no.	Strain no.	Isolates name	Isolated media	Closest relative based on 16S rDNA sequence	Accession no.	Similarity (%)	Phylogenetic group
1	1-Sj-4-3-2-M	KNUSC3039	MB	<i>Gordonia terrae</i> (X79286)	KP342134	99.9	Actinobacteria
	1-Sj-4-7-2-M	KNUSC3042	MB	<i>Labrenzia aggregata</i> (AAUW01000037)	KP342242	99.6	(HighG+C, Grampositive)
	1-Sj-4-4-3-M	KNUSC3040	MB	<i>Gramella forsetii</i> (CU207366)	KP342133	98.8	Alpha-proteobacteria
	1-Sj-2-1-3-T	KNUSC3029	TSB	<i>Bacillus anthracis</i> (AB190217)	KP342144	99.9	Bacteriodetes
	1-Sj-2-1-1-M	KNUSC3026	MB	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)	KP342147	99.5	Firmicutes
	1-Sj-2-1-1-T	KNUSC3027	TSB	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)	KP342146	98.9	
	1-Sj-2-2-2-T	KNUSC3031	TSB	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)	KP342142	99.4	
	1-Sj-2-6-2-M	KNUSC3035	MB	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)	KP342138	99.7	(Low G+C, Gram positive)
	1-Sj-2-7-5-T	KNUSC3036	TSB	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)	KP342137	99.8	
	1-Sj-2-7-6-T	KNUSC3037	TSB	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)	KP342136	99.8	
	1-Sj-2-2-2-M	KNUSC3030	MB	<i>Bacillus taeanensis</i> (AY603978)	KP342143	99.9	
	1-Sj-2-3-1-M	KNUSC3033	MB	<i>Bacillus taeanensis</i> (AY603978)	KP342140	99.3	
	1-Sj-2-6-1-M	KNUSC3034	MB	<i>Bacillus taeanensis</i> (AY603978)	KP342139	100.0	
	1-Sj-4-1-3-M	KNUSC3038	MB	<i>Halomonas ventosae</i> (AY268080)	KP342135	98.0	Gamma-proteobacteria
	1-Sj-2-1-3-M	KNUSC3028	MB	<i>Marinobacterium rhizophilum</i> (EF192391)	KP342145	100.0	
	1-Sj-4-6-1-M	KNUSC3041	MB	<i>Marinobacterium rhizophilum</i> (EF192391)	KP342241	99.9	
	1-Sj-2-2-3-M	KNUSC3032	MB	<i>Microbulbifer maritimus</i> (AY377986)	KP342141	99.3	

(Site 2)

2	2-Sj-4-3-1-M	KNUSC3053	MB	<i>Demequina aestuarii</i> (DQ010160)	KP342253	98.7	Actinobacteria
	2-Sj-4-3-3-M	KNUSC3054	MB	<i>Erythrobacter nanhaisediminis</i> (FJ654473)	KP342254	98.9	(High G+C, Gram positive)
	2-Sj-2-6-1-M	KNUSC3048	MB	<i>Yangia pacifica</i> (AJ877265)	KP342248	98.8	Alpha-proteobacteria
	2-Sj-3-7-1-M	KNUSC3050	MB	<i>Tamlana crocina</i> (AM286230)	KP342250	97.3	Bacteriodetes
	2-Sj-4-1-4-M	KNUSC3052	MB	<i>Cylcobacterium jeungdonense</i> (GU291862)	KP342252	99.1	Firmicutes
	2-Sj-2-3-3-T	KNUSC3044	TSB	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)	KP342244	99.8	
	2-Sj-2-4-3-T	KNUSC3046	TSB	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)	KP342246	99.3	
	2-Sj-2-6-5-M	KNUSC3049	MB	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)	KP342249	99.3	(Low G+C, Gram positive)
	2-Sj-2-3-4-M	KNUSC3045	MB	<i>Alteromonas halophila</i> (EU583725)	KP342245	98.3	Gamma-proteobacteria
	2-Sj-3-7-2-M	KNUSC3051	MB	<i>Halomonas denitrificans</i> (AM229317)	KP342251	99.3	
	2-Sj-2-5-2-M	KNUSC3047	MB	<i>Halomonas nitroreducens</i> (EF613113)	KP342247	98.7	
	2-Sj-2-3-3-M	KNUSC3043	MB	<i>Vibrio azureus</i> (AB428897)	KP342243	99.2	

Twenty-nine bacterial strains were isolated from the rhizosphere soils of *S. japonica*.

MB: marine broth; TSB: tryptic soy broth

부분 식물과 상호작용하는 균주로서 주로 식물내생 세균 (Endophytic bacteria) 혹은 근권세균(Rhizosphere bacteria)으로 보고되며, low G+C, gram positive에 속하는 *Bacillus* 속의 균주가 주를 이루었다. 특히 순수분리 당시 형태학적으로 서로 상이하며, *Bacillus aryabhatai*와 상동성이 높은 *Bacillus* 속의 분리균들은 TSB 배지뿐 아니라 MB 배지에서도 집중 분리되는 경향을 보였다. MB 배지가 해양세균의 분리를 위해 최적화된 배지임을 감안할 때 이들 *B. aryabhatai* 연관종들은 갯벌이라는 해양환경에 적응해 가면서 순천만 우점 식물인 *S. japonica*와 어떠한 상호작용을 수행할 것으로 추측된다.

시료채취 지점별로는 유사한 수준의 종 개수를 보였으며, 대체적으로 다양한 종의 세균이 분리되었으나 미생물 생장에

필요한 여러 가지 환경적 요인들을 고려했을 때 실험실에서 배양 가능한 미생물은 1~2% 미만이므로, 실제로 존재하는 미생물의 종류나 수는 이보다 훨씬 많을 것으로 추측된다[1, 29, 43].

이와 별개로, Ez-Taxon database상에서 유사염기서열과 비교·분석한 결과 98.5% 미만의 유사도를 보이는 2개의 분리균주 *Alteromonas halophila* 및 *Halomonas ventosae*는 신종후보로의 가능성을 보였다(Table 2) [40]. 순천만 갯벌은 일반적인 육지, 해양과 다른 독특한 환경을 가지고 있으며, 지리·역사적 특성으로 미생물상에 대한 연구사례가 거의 없음을 볼 때 보고되지 않은 신종세균이 다양하게 분포할 것으로 생각되어 추가적인 조사가 필요할 것이다.

종 조성 및 계통학적 분석

29개 분리주에 대해 16S rDNA 염기서열을 분석하고 NCBI genbank database 및 Ez-Taxon server의 database의 유사 염기서열과 비교한 결과, 크게 4개 문(phylum), 11개 목(order), 14개 속(genus)에 속함을 알 수 있었다(Table 3). 이들에 대해 모두 NCBI의 GenBank로부터 accession No.를 제공받았다(Table 2). 순천만 자생식물인 *S. japonica* 근락 근권에서 *gamma-proteobacteria* group 중 Alteromonadales 목에 속하는 *Alteromonas* (A.)속, *Marinobacterium* (M.)속, *Microbulbifer* (M.)속의 다양한 종들이 확인되었고, Oceanospirillales 목에 속하는 *Halomonas* (H.)속이, Vibrionales 목에 속하는 *Vibrio* (V.)속이 확인되었다. *alpha-proteobacteria* group 에 속하는 Rhodobacterales 목에서는 *Labrenzia* (L.)속 및 *Yangia* (Ya.) 속이 분리되었으며, Sphingomonadales 목에 속하는 *Erythrobacter* (E.)속의 균주가 분리되었다. Low G+C contents, gram positive의 특성을 보이는 *Firmicutes* 문에서는 Bacillales 목의 *Bacillus* (B.)속, *Planococcus* (P.) 속의 종들이 분리되었다. *Actinobacteria* 문에 속하는 *Corynebacteriales* 목에서는 *Gordonia* (Gor.)속이, *Actinomycetales*문에서는 *Demequina* (D.) 속의 균주들이 분리되었다.

분리된 근권세균의 다양성 분석

채취지점과 관계없이 29개 전체 분리군 중 13개의 분리군이 gram positive, low G+C contents의 특징을 가진 *firmicutes* 문에 속하였으며(44.8%), 8개의 분리군이 *gamma-proteobacteria* group (27.6%) 에, 3개 분리군이 *alpha-proteobacteria* group (10.3%)에, 3개 분리군이 *bacteroidetes* 문(10.3%)으로, 2개 분리군이 gram positive, high G+C contents 특성을 가진 *actino-*

bacteria 문(6.8%)에 속하였다(Table 2, Fig. 1). 본 연구를 바탕으로 순천만 자생식물인 *S. japonica*의 근권에서 *firmicutes* 문과 *gamma-proteobacteria* group에 속하는 근권세균이 많이 존재함을 확인 할 수 있었다(Fig. 1).

일반적으로 각 환경적 특징에 의해 우점하는 phylum은 특징적인 패턴을 보인다. 해수에서는 *alpha-*, *gamma proteobacteria* group이 우점하는 것으로[6, 7, 12], 강이나 호수 등 담수 환경에서는 *beta-proteobacteria* group이, 해양 침적지에서는 *delta-proteobacteria* group이 우점하는 것으로 보고되고 있다[2, 6, 7, 11, 25, 28]. 그러나 Fig. 1에서 나타난 바와 같이, 본 연구에서는 *firmicutes* 문의 세균이 절반 이상의 우점을 차지하고 있는 것으로 나타났으며, 다음으로 *gamma-proteobacteria* group 이 높은 비율을 보였다(Fig. 1). 특히 국내 갯벌에서 우점종으로 보고된 황환원을 수행하는 세균의 속들과 유연관계가 큰 *delta-proteobacteria* group은 분리되지 않았다[18]. 또한 냉용수나 심해 열수구나 같은 극한 해양환경에서 주로 분리되는 *epsilon-proteobacteria* group도 본 연구에서 분리되지 않았다[2]. 따라서 갯벌의 지정학적 위치 및 그에 따른 환경요인, 식물상 등에 따라 우점하는 세균 문(phylum)은 다른 것으로 판단되며, 갯벌의 이러한 특성에 따라 그에 적합한 대사특성을 가진 세균 문이 우점화되어 갯벌 고유의 기능이 유지되는 것으로 사료된다. 추후 국내 다양한 지역의 갯벌 미생물상에 대해 조사 및 고찰을 실시하여 주변환경과 연관된 갯벌기능에 대한 탐구가 필요하다.

Fig. 1에서 높은 우점을 보인 *firmicutes* 문, *gamma-proteobacteria* group에 속하는 세균들 중 *Bacillus* 속의 경우 많은 균주들이 식물 내생균으로 토양환경과 상호작용하며 식물의 생장에 긍정적 영향을 주는 것으로 보고되고 있다. 특히 이들 중

Table 3. Taxonomic composition of marine bacteria isolated from rhizosphere soils of the *S. japonica* in Suncheon Bay

Phylum	Order	Genus	Distribution ratio (%)
<i>Actinobacteria</i> (HighG+C, Grampositive)	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Gordonia</i>	3.4
	<i>Actinomycetales</i>	<i>Demequina</i>	3.4
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Gramella</i>	3.4
	<i>Cyclobacteriaceae</i>	<i>Cyclobacterium</i>	3.4
	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Tamlana</i>	3.4
<i>Firmicutes</i> (LowG+C, Grampositive)	<i>Cytophagales</i>	<i>Bacillus</i>	44.8
<i>Alpha-proteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Labrenzia</i>	3.4
	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Yangia</i>	3.4
		<i>Erythrobacter</i>	3.4
<i>Gamma-proteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonas</i>	3.4
		<i>Marinobacterium</i>	6.9
	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Microbulbifer</i>	3.4
		<i>Halomonas</i>	10.3
		<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrio</i>

The isolated microorganisms were classified into nineteen species. The table shows the distribution ratio of all isolated bacterial strains, identified to the phylum, order and genus (%).

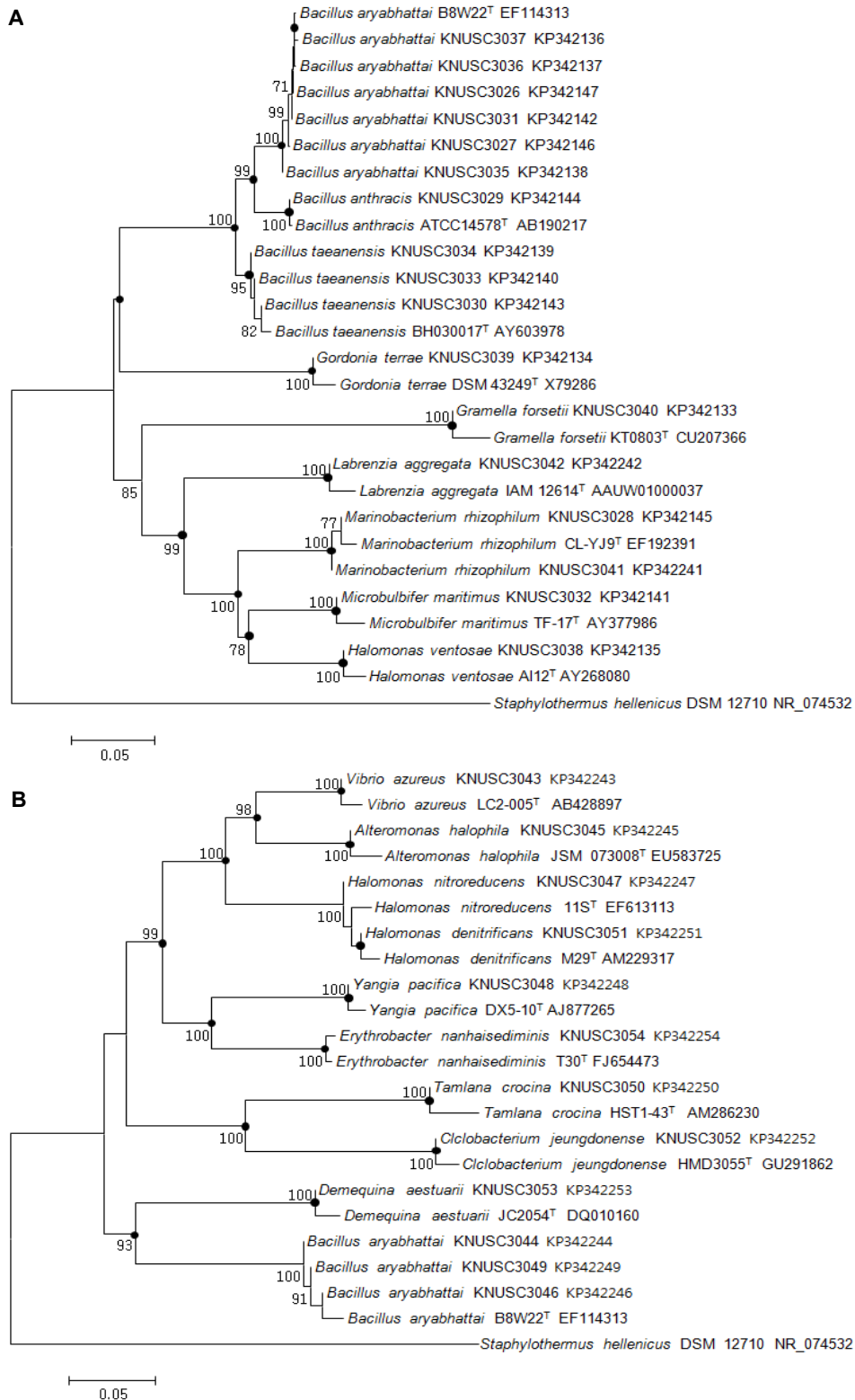


Fig. 1. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of marine bacteria and representatives of other species related taxa. Only bootstrap values (expressed as percentages of 1,000 replications) greater than 70% are shown at branching points. Filled circles indicate that the corresponding nodes were also recovered in the trees generated with the maximum-parsimony and maximum-likelihood algorithms. *Staphylothermus hellenicus* DSM 12710 (GenBank accession number, NR_074532) was used as an outgroup. Bar, 0.05 substitutions per nucleotide position. A) Marine bacteria isolated from site 1; B) Marine bacteria isolated from site 2.

Table 4. Diversity index and distribution of marine bacteria isolated from the rhizosphere soils of *S. japonica* in Suncheon Bay

Genera	Site 1	Site 2
<i>Alteromonas</i>	0	1
<i>Bacillus</i>	10	3
<i>Cylcobacterium</i>	0	1
<i>Demequina</i>	0	1
<i>Erythrobacter</i>	0	1
<i>Gordonia</i>	1	0
<i>Halomonas</i>	1	2
<i>Labrenzia</i>	1	0
<i>Marinobacterium</i>	2	0
<i>Microbulbifer</i>	2	0
<i>Vibrio</i>	0	1
<i>Yangia</i>	0	1
<i>Tamlana</i>	0	1
Total	17	12
Margalef's richness (Dmg)	1.765	3.219
Menhinick's index (Dmn)	1.455	2.598
Shannon's diversity index (H')	1.397	2.095
Simpson's index (D)	0.346	0.061

Marine bacterial strains were analyzed using four diversity index (H') at the genus level.

*B. aryabhatai*의 주된 역할로 gibberellins, abscisic acid, indole butyric acid 등 식물생장 관련 다양한 물질을 분비하는 것으로 보고 되었으며[34], 특히 해안의 salt stress condition 하에서 식물뿌리신장(Root elongation), 식물생장촉진(Plant growth promotion) [23], 항 진균 활성 등이 보고되었다[30]. 일반적으로 *Bacillus* 및 연관 속들이 극한환경에서 내성을 가지며, 다양한 물질대사에 관여하는 점을 볼 때 이들 균주들은 순천만 갯벌에서 조수간만으로 인한 염분, 온도, 직사광선 차이 등 변화하는 환경을 극복하며 물질 분해 및 순환에 관여하고 식물생장에 관여하는 것으로 판단된다. 한편, *Bacillus taeanensis*는 최근 염전에서 분리된 호염성 신종 세균으로[24], 아직 해양 환경에서 그 역할이 밝혀지지는 않았다. 또한 일반적으로 해양환경에서 우점한다고 알려진 *gamma-proteobacteria* group 중 높은 비중을 보인 *Marinobacterium* 속은 국내 간석지에서 특징적으로 *S. japonica* 군락 근권에서 분리·보고되었다[21]. 더불어 본 연구에서도 분리되었음을 볼 때 식물 생장과 관련하여 갯벌환경에 적응하며 진화된 균주로서 *S. japonica* 생장과 관련된 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다. *Microbulbifer maritimus*는 최근 서해안 갯벌에서 신종 세균으로 보고된 agarase 활성을 보이는 균주로서 해양환경에서 1차적 분해자의 역할을 수행할 것으로 생각된다. *Halomonas nitroreducens* 역시 고도 호염성 세균(extremely halophilic bacteria)으로, *H. denitrificans*는 안면도 갯벌에서 신종세균으로 보고된 호염성 세균(halophilic bacteria)이다[3, 19]. *Alteromonas halophila* 또한 최근 해양동물(sea anemone)에서 신규 보고된 세균이며 순천만

에서 분리된 *A. halophila* 또한 신종세균의 가능성을 보였다[5]. 전반적으로 최근 신종 세균으로 보고된 연관종들이 순천만에서 분리되었음을 볼 때, 갯벌이 수행하는 복합적인 역할 및 환경조건으로 인해 다양한 신종 후보균이 존재할 것으로 생각 된다.

순천만 갯벌의 *S. japonica* 근권에서 분리된 근권세균의 유전학적 다양성을 확인하기 위하여 sampling 지점별로 다양한 다양성 지수를 이용하여 확인하였다(Table 4) [10, 13, 40]. 이들의 다양성 지수는 Margalef's richness (site 1: 1.765, site 2: 3.219), Menhinick's index (1.455, 2.598), Shannon's diversity index (1.397, 2.095) 및 Simpson's index (0.346, 0.061)으로 분석되었다. 종 풍부도와 종 다양성 지수에서 site 2가 site 1보다 상대적으로 높은 지수를 나타내었는데, 이는 site 1이 site 2에서 보다 훨씬 많은 균주가 분리되었으나, site 1의 경우 분리균들이 *Bacillus* 속에 치우쳐 결과적으로 값이 상대적으로 낮게 나온 것으로 판단된다. 또한 site 2의 경우 분리균의 수는 적으나 전체적으로 다양한 속의 세균들이 분리되었으므로 지수가 상대적으로 높게 도출된 것으로 판단된다. 각 지수마다 나타내는 척도가 조금씩 상이하므로 4종류의 지수들을 모두 도출하였으며, 본 다양성 지수들을 종합해 볼 때 순천만 갯벌 중 채취지점에 따라 유전적 다양성이 상이할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 “람사르 습지”로 등재된 순천만 갯벌에서 자생하는 *S. japonica* 근권에서 정주하는 세균을 분리, 부분동정을 실시하였으며, 이로서 근권세균의 분포 및 다양성을 확인하였다. 본 연구 결과로서 갯벌이라는 특수한 해양환경에서 적응하면서 물질순환 및 식물생장에 긍정적 영향을 미치는 유용 세균자원 확보의 기초자료로 활용될 수 있다.

감사의 글

본 연구는 환경부 “차세대 에코이노베이션기술개발사업”으로 지원 받은 연구이며, 연구비 지원에 감사를 드립니다.

References

- 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**, 143-169.
- Campbell, B. J., Engel, A. S., Porter, M. L. and Takai, K. 2006. The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 458-468.
- Cervantes-Uc, J. M., Catzin, J., Vargas, I., Herrera-Kao, W., Moguel, F., Ramirez, E., Rincón-Arriaga, S. and Lizama-Uc, G. 2014. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium, *Halomonas nitroreducens*, isolated from hypersaline ponds. *J. Appl. Microbiol.* **117**, 1056-1065.

4. Chapman, V. J. 1974. Salt marshes and salt deserts of the world in *Ecology of halophytes*. Academic Press, New York. pp. 3-22.
5. Chen, Y. G., Xiao, H. D., Tang, S. K., Zhang, Y. Q., Borrathybay, E., Cui, X. L., Li, W. J. and Liu, Y. Q. 2009. *Alteromonas halophila* sp. nov., a new moderately halophilic bacterium isolated from a sea anemone. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**, 259-266.
6. Cottrell, M. T. and Kirchman, D. L. 2000. Natural assemblages of marine proteobacteria and members *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1692-1697.
7. Cottrell, M. T. and Kirchman, D. L. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5116-5122.
8. Dai, J., Sun, M. Y., Culp, R. A. and Noakes, J. E. 2009. A laboratory study on biochemical degradation and microbial utilization of organic matter comprising a marine diatom, land grass, and salt marsh plant in estuarine ecosystems. *Aquat. Ecol.* **43**, 825-841.
9. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
10. Fierer, N. and Jackson, R. B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 626-631.
11. Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. and Aman, R. 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence- in situ-hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3721-3726.
12. Gonzalez, J. M. and Moran, M. A. 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α -subclass of the class *Proteobacteria* in coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4237-4242.
13. Hill, T. C., Walsh, K. A., Harris, J. A. and Moffett, B. F. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**, 1-11.
14. Ihm, B. S., Leem, J. S., Kim, J. W., Kim, H. S. and Ihm, H. B. 1998. Studies on the vegetation at the wetland of Suncheonman. *Bull Inst Litt Envi Mokpo Nat. Univ.* **15**, 1-8.
15. Jang, S. K. and Cheong, C. J. 2010. Characteristics of grain size and organic matters in the tidal flat sediments of the Suncheon Bay. *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Eng.* **13**, 198-205.
16. Jeon, S. A., Sung, H. R., Park, Y. M., Park, J. H. and Ghim, S. Y. 2009. Analysis of endospore-forming bacteria or nitrogen-fixing bacteria community isolated from plants rhizosphere in Dokdo Island. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 189-196.
17. Jeong, S. M. and Lee, M. B. 2004. Change of estuary landscape in Suncheon Bay, South Coast of Korea. *J. Kor. Geomorphological Association* **11**, 127-139.
18. Kim, B. S., Oh, H. M., Kang, H., Park, S. and Chun, J. 2004. Remarkable bacterial diversity in the tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 205-211.
19. Kim, K. K., Jin, L., Yang, H. C. and Lee, S. T. 2007. *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 675-681.
20. Kim, Y. E., Yoon, H. J., You, Y. H., Kim, H., Seo, Y. G., Kim, M., Woo, J. R., Nam, Y. J., Irina, K., Lee, G. M., Song, J. H., Jin, Y. J., Kim, J. G. and Seu, Y. B. 2014. Diversity and characteristics of rhizosphere microorganisms isolated from the soil around the roots of three plants native to the Dokdo Islands. *J. Life Sci.* **24**, 461-466.
21. Kim, Y. G., Jin, Y. A., Hwang, C. Y. and Cho, B. C. 2008. *Marinobacterium rhizophilum* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the coastal tidal-flat plant *Suaeda japonica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 164-167.
22. Lambshead, P. J. D., Platt, H. M. and Shaw, K. M. 1983. Detection of differences among assemblages of marine benthic species based on assessment of dominance and diversity. *J. Nat. Hist.* **17**, 859-874.
23. Lee, S., Ka, J. O. and Song, H. G. 2012. Growth promotion of *Xanthium italicum* by application of rhizobacterial isolates of *Bacillus aryabhatai* in microcosm soil. *J. Microbiol.* **50**, 45-49.
24. Lim, J. M., Jeon, C. O. and Kim, C. J. 2006. *Bacillus taeanensis* sp. nov., a halophilic Gram-positive bacterium from a solar saltern in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2903-2908.
25. Maidak, B. L., Cole, J. R., Parker, T. G., Jr, C. T., Saxman, P. R., Stredwick, J. M., Garrity, G. M., Li, B., Olsen, G. H., Parani, S., Schmidt, T. M. and Tiedje, J. M. 2000. The RDP (Ribosomal Database project) continues. *Nucleic Acids Res.* **28**, 73-174.
26. Mani, A., Arga, C. A., Jane, D., Nithyalakshmy, R., Kaveh, E. and Ehsan, M. 2012. Carbohydrate degrading bacteria closely associated with *Tetraselmis indica*: influence on algal growth. *Aquat. Biol.* **15**, 61-71.
27. Margalef, R. 1958. Information theory in ecology. *Gen. Syst.* **3**, 36-71.
28. Méthé, B. A., Hiorns, W. D. and Zehr, J. P. 1998. Contrasts between marine and freshwater bacterial community composition: analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes. *Limnol. Oceanogr.* **43**, 368-374.
29. Oslen, G. J., Land, D. J., Giovannoni, S. J. and Pace, N. R. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RND approach. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**, 337-365.
30. Park, J. M., Park, S. J., Kim, W. J. and Ghim, S. Y. 2012. Application of antifungal CFB to increase the durability of cement mortar. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1015-1020.
31. Pielou, E. C. 1975. Ecological diversity. John Wiley, New York. p 165.
32. Rodriguez, R. J., Henson, J., Van, V. E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Kim, Y. and Redman, R. S. 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME J.* **2**, 404-416.
33. Seo, Y., Kim, M., You, Y. H., Yoon, H., Woo, J. R. Lee, G. and Kim, J. G. 2012. Genetic diversity of endophytic fungi isolated from the roots of halophytes naturally growing in

- Suncheon Bay. *Kor. J. Mycol.* **40**, 7-10.
34. Siddikee, M. A., Chauhan, P. S., Anandham, R., Han, G. H. and Sa, T. M. 2010. Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1577-1584
 35. Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature* **163**, 688.
 36. Sung, H. R. and Ghim, S. Y. 2010. Bacterial diversity and distribution of cultivable bacteria isolated from Dokdo Island. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 263-272.
 37. Tang, Y. W., Von, G. A., Waddington, M. G., Hopkins, M. K., Smith, D. H., Li, H., Kolbert, C. P., Montgomery, S. O. and Persing, D. H. 2000. Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1676-1678.
 38. Waller, F., Achatz, B., Baltruscha, T. H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hckelhoven, R., Neumann, C., Wettstein, D. V., Franken, P. and Kogel, K. H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to saltstress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13386-13391.
 39. Whittaker, R. H. 1977. Evolution of species diversity in land communities. *Evol. Biol.* **10**, 1-67.
 40. Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, H. and Yuen, K. Y. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 908-934.
 41. Yoon, J. H., Kang, S. J., Lee, S. Y., Lee, M. H. and Oh, T. K. 2005. *Virgibacillus dokdonensis* sp. Nov., isolated from a Korean island, Dokdo, located at the edge of the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1079-1086.
 42. You, Y. H., Yoon, H., Kang, S. M., Shin, J. H., Choo, Y. S., Lee, I. J., Lee, J. M. and Kim, J. G. 2012. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1550-1557.
 43. Zhiyong, L., He, L. and Miao, X. 2007. Cultivable bacterial community from south China sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. *Curr. Microbiol.* **55**, 654-672.

초록 : 순천만 칠면초의 근권으로부터 분리된 해양세균의 다양성 및 계통학적 분석

유영현^{1,3*} · 박종명^{2†} · 남윤종¹ · 김 현¹ · 이명철³ · 김종국^{1*}

(¹경북대학교 생명과학부, ²롯데중앙연구소, ³농촌진흥청 국립농업과학원)

순천만 일대 칠면초 군락의 근권 토양에 존재하는 근권 세균의 다양성 분석을 위해 몇 개 지점을 선정한 후 샘플링을 실시하였다. 채취한 토양시료는 marine broth, tryptic soy broth 한천배지를 이용하면서 세균 집락 간 형태학적인 구분을 통해 순수분리 되었다. 분리된 세균의 genomic DNA를 획득한 후, 각각의 16S rDNA 염기서열을 증폭·분석하여 총 29 strain이 부분동정 되었다. 이들의 유연관계 확인을 위해 계통수를 작성한 결과, 이들은 각각 *firmicutes*문 (44.8%), *gamma-proteobacteria* group (27.6%), *alpha-proteobacteria* group (10.3%), *bacterioidetes* 문 (10.3%), *actinobacteria* 문(6.8%)에 속하였다. 최우점하는 *firmicutes* 문에서는 *Bacillus* 속이, 차 우점하는 *gamma-proteobacteria* group에서는 각각 *Marinobacterium*, *Halomonas*, *Vibrio* 속이 집중 분포하는 것으로 나타났다. 또한 채취 지점별로 몇 가지 척도를 사용하여 다양성 지수를 도출하였을 때, 채취 지점 간 지수의 차이를 보여 전체 순천만 갯벌 중 위치에 따라 상이한 미생물상을 가지는 것으로 추측된다. 분리된 균들 중 일부는 갯벌 특유의 극한환경을 극복하면서 칠면초 근권에서 생존하며 물질순환, 식물생장 촉진 및 병원체 방어작용 유도 등 식물생장에 긍정적인 역할을 수행할 것으로 생각된다.