

단 보

곰소 염전에서 분리한 호염성 고세균의 특성 분석

고현우¹ · 김소정² · 이성근^{2*} · 박수제^{1*}

¹제주대학교 생물학과, ²충북대학교 미생물학과

Isolation and characterization analysis of the halophilic archaea isolated from solar saltern, Gomso

Hyeon-Woo Koh¹, So-Jeong Kim², Sung-Keun Rhee^{2*}, and Soo-Je Park^{1*}

¹Department of Biology, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

²Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

(Received August 26, 2015; Accepted October 2, 2015)

ABSTRACT: Most of halophilic archaea are found in the various hypersaline environments including solar saltern, salt lake with very high salt concentration. The present study is about isolation and characterization of halophilic archaea from Gomso solar saltern known as a representative high salt environment in Korea. In order to isolate the halophilic archaea, we prepared and used high salt medium. Finally, total 7 strains obtained were tentatively identified based on comparative similarity analysis for 16S rRNA gene sequence and physiological traits. All halophilic archaea belonged to *Halorubrum*, *Halogeometricum*, *Halobacterium*, and *Haloarcula* genera. These isolates were all Gram-staining negative, and growth was not observed using nitrate as an alternative electron acceptor under anaerobic conditions. In addition, all isolates required about 12–30% (w/v, NaCl) salt. This case study might provide basic information on microbial isolation technologies and related research in halophilic microorganisms from domestic halophilic environments, and contribute to obtaining useful indigenous halophilic archaea in a variety of extreme environmental conditions.

Key words: Gomso solar saltern, halophilic archaea

지구상의 생물분류체계는 Carl Woese에 의해서 3개의 도메인(Eukarya, Bacteria, Archaea)으로 확립되었으며(Woese and Fox, 1977; Woese *et al.*, 1990), 이 중 고세균(Archaea)의 경우, *Euryarchaeota*와 *Crenarchaeota* (Woese *et al.*, 1990), 두 개의 주요 문(Phylum)으로 구성되어 있다고 보고되었다. 그러나, 현재는 난배양성 미생물의 배양기술 및 차세대시퀀싱 기법(next-generation sequencing techniques; NGS) 등을 활용한 분자생태학적 기법의 발달로 인하여, *Korarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Woesearchaeota*, *Parvachaeota*, *Aigarchaeota* 그리고 *Pacearchaeota* 등으로 세분화되어 분류되고 있다(Brochier-Armanet *et al.*, 2008; Guy and Ettema,

2011; Spang *et al.*, 2013; Castelle *et al.*, 2015).

*Euryarchaeota*는 생리적으로 다양한 고세균 그룹으로 구성되어 있으며, 메탄생성균(methanogen), 호염성 고세균(haloarchaea), 호산성 고온균(acido-thermophiles) 및 일부 초고온성균(hyperthermophiles)을 포함한다. 이에 비하여 *Crenarchaeota*의 경우 대부분 초고온성균(hyperthermophiles)들로 구성되어 있다. 특히, 중온성 ammonia-oxidizing archaea의 경우 *Crenarchaeota*에 속하였으나, 분리배양 및 유전체 분석에 따라, 현재 *Thaumarchaeota* 그룹으로 재분류되었다. 그 외에, *Pacearchaeota*, *Woesearchaeota*, *Korarchaeota* 등에 속하는 미생물의 경우, 아직까지 순수배양된 배양체는 없는 상황이며, 주로 NGS를 기반으로 한 분자생태학적 기법을 통하여 이들 미생물의 존재를 확인하고 있는 실정이다.

지금까지 고세균에 대한 연구는, 주로 methanogen과 극한 환경에 서식하는 극한미생물에 대한 순수배양 및 이들 미생물

*For correspondence. (S.J. Park) E-mail: sjpark@jejunu.ac.kr;
Tel.: +82-64-754-3524; Fax: +82-64-756-3541
(S.K. Rhee) E-mail: rhees@chungbuk.ac.kr;
Tel.: +82-43-261-2300; Fax: +82-43-264-9600

을 이용한 응용성에 대한 연구가 주를 이루고 있다. 국내의 경우, 극한미생물의 배양, 순수분리에 대한 연구가 비교적 활발한 상황이다. 이에 따라, 본 연구진은 국내의 대표적 극한환경 중 하나인, 염전 및 주변 퇴적물에 서식하고 있는 다양한 호염성 고세균의 분리, 동정을 시도하고, 특성을 규명하고자 하였다. 호염성 고세균들은 비교적 높은 염분을 성장에 필요로 하고 있으며(최소 NaCl 1.5 M)(Ventosa *et al.*, 1998), 상당한 양의 소금으로 절인 어류와 육류 표면과 같은 인공적인 염분 서식지를 포함하여, 다양한 고염환경에서 발견되고 있다(Oren, 2014, 2015). 현재까지 40개가 넘는 속(genus)이 고염환경으로부터 분리 및 보고되고 있으며(<http://www.bacterio.net>), 몇몇 속을 제외하고는 대부분 적은 종(species)수를 지니고 있다.

본 실험을 위하여, 국내의 대표적 염전인, 곰소염전으로부터 시료를 채취하였다. 곰소염전은 전라북도 부안군 진서면 곰소리(35°35'44.6"N 126°37'02.5"E)에 위치하고 있으며, 시료는 염전물과 주변의 퇴적층으로부터 멸균된 50 ml conical tube에 채취하였다. 채취한 염전물 시료의 염도를 측정된 결과 20~25%인 것을 확인하였다. 시료는 채취 후 실험 전까지 4°C에서 냉장 보관하였다. 채취한 염전시료로부터 호염성 고세균을 배양하기 위해서 변형된 S-G (modified S-G, MSG) 배지와 MH2 배지를 이용하였다. MSG 배지의 조성은 다음과 같다. 증류수 1리터 당 200 g sodium chloride, 7.5 g acid hydrolyzed casein, 10 g yeast extract (Difco), 3 g trisodium citrate, 20 g magnesium sulfate, 2 g potassium chloride, 0.05 g ferrous sulfate를 각각 넣어주었다. MH2 배지는, 증류수 1리터당 200 g sodium chloride, 4 g casamino acid (Difco), 2 g yeast extract (Difco), 2 g L-glutamic acid, 2 g trisodium citrate, 5 g potassium sulfate, 20 g magnesium chloride, 1 g ammonium chloride, 1 g potassium phosphate monobasic, 0.004 g ferrous sulfate를 각각 넣어 제작하였다(Sehgel and Gibbons, 1960; Ventosa *et al.*, 1982). pH는 MGS 배지의 경우 1 N NaOH, MH2 배지의 경우 1 N KOH를 각각 사용하여, 7.0~7.5로 조절하였으며, 고형화를 위하여, 아가(Bacto agar, Difco)를 최종 1.5% (w/v)로 넣어 주었다. 제작 직후 배지는 1.5기압, 121°C에서 20분간 고압증기 멸균을 하였다. 멸균이 끝난 후, MH2 배지에는 2 ml trace element solution을 넣어 주었다(Widdel and Bak, 1992).

MSG 액체배지를 사용하여, 채취한 염전시료를 연속희석법을 이용하여 희석한 후, 10^2 ~ 10^4 희석액을 100 µl씩 고형배지에 도말한 후 37°C 배양기에서 2주간 배양하였다. 배양후, 빨강색의 균집락(red-pigment)(Grant *et al.*, 2001)들만을 선별하여 동일한 배지와 조건에서 희석 평판법을 이용하여 순수분리를 시도하였다. 순수분리된 미생물들을 아래에 기술한 분자

생물학적 방법으로 계통 분류학적 분석을 실시하고, 생리·생화학적 실험을 통하여 분리된 미생물의 동정을 실시하였다.

분리된 고세균의 분자계통학적 분석을 위해 genomic DNA extraction kit (GeneAll)를 사용하여, 분리된 미생물의 genomic DNA를 추출하였으며, 16S rRNA 유전자는 고세균 16S rRNA 유전자 primer 세트인 20F (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCRG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하여 PCR 증폭하였다(Weisburg *et al.*, 1991; DeLong, 1992). 이를 위하여, Dyne ready-2X-Go (DYNEBIO) 10 µl 와 3차 증류수 7 µl, forward primer와 reverse primer를 각각 10 pmol씩 넣고, genomic DNA를 1 µl 넣어, 총 20 µl의 PCR 반응액을 만들었다. PCR 수행방법으로, 94°C에서 5분 동안 변성(denaturation) 과정을 거친 후 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 60초를 1회로 하여, 총 30회 반복 수행을 한 후 마지막으로 72°C에서 5분간 최종 신장(extension) 과정을 수행하였다. 증폭된 PCR 생성물은 1.5% (w/v) agarose gel 전기영동법을 이용하여 PCR산물의 크기를 확인하였다. 그 후에 증폭된 PCR 생성물은 PCR purification kit (Cosmo Genetech)를 이용하여 정제하였으며, 정제된 산물은 Cosmo Genetech에서 염기서열 분석을 진행하였다. 염기서열 정보는 SeqMan software (DNA Star)를 이용하여 편집하였다. 편집된 염기서열은 Ez-biocloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)와 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 blast (Basic Local Alignment Search Tool)을 이용하여 연관성이 높은 유전자 서열을 획득, 비교 및 분석하였다. BioEdit program (Hall, 1999)을 이용하여 염기서열을 정렬(alignment)하고, 계통수는 MEGA6 program (Tamura *et al.*, 2013)에서 제공하는 neighbor-joining 방법 (Saitou and Nei, 1987), maximum-likelihood 방법(Felsenstein, 1981), 그리고 maximum-parsimony 방법(Fitch, 1971)을 이용하여 그렸다. 분리된 호염성 미생물의 16S rRNA 유전자의 상동성은 Ez-biocloud를 통해 계산하였다.

본 연구를 통해 분리된 호염성 고세균의 16S rRNA 유전자 염기서열은 NCBI GenBank에 등록하였으며(KP030742, KP030743, KP030744, KP030745, KP030746, KT426885, KT426886), 분리된 균주들은 국립생물자원관에 기탁하였다.

본 연구진은 염전으로부터 채취한 염전시료로부터 30~40개의 red-pigment를 지니는 균집락을 획득할 수 있었으며, 계통학적 분석을 통하여 중복되는 종을 최대한 배제하여 총 7종의 서로 다른 호염성 미생물을 분리하였다: *Halorubrum* 속 4종, *Halogeometricum* 속 1종, *Halobacterium* 속 1종, *Haloarcula* 속 1종(Table 1). *Halorubrum*, *Halogeometricum*, *Halobacterium*, *Haloarcula* 속의 미생물 들은 대부분 염호수와 천일염전, 염

Table 1. Characteristic of halophilic archaea. Data are from this study. All strains are Gram reaction-negative, and growth optimum temperature is 37°C. All strains were positive for utilization of acetate and succinate. All strains were negative for utilization of starch and lactose

	meg4	meg5	meg10	A5	S9-29	A10	meg6
Closest related strain	<i>Halorubrum chaoviator</i> HALO-G ^T	<i>Halorubrum chaoviator</i> HALO-G ^T	<i>Halorubrum californiense</i> SF3-213 ^T	<i>Halorubrum kocurii</i> BG-1 ^T	<i>Halogeometricum rufum</i> RO1-4 ^T	<i>Halobacterium noricense</i> JCM 15102 ^T	<i>Haloarcula vallismortis</i> J.F.54 ^T
16S rRNA similarity (%)	99.2	99.2	99.5	98.2	99.8	99.1	99.3
Temperature range (°C)	25-50	25-55	25-45	25-55	25-55	25-50	20-50
pH range	6.5-8.5	6.5-8.5	7.0-8.5	6.0-9.0	6.0-9.0	5.0-7.5	6.0-8.5
pH optimum	7.5	7.5	7.5	7.5	7.0	7.0	7.5
NaCl range (% w/v)	12-30	12-30	15-30	12-29	12-30	12-30	15-30
Mg ²⁺ requirement	+	+	-	-	+	+	-
Morphology	Coccus/Rod	Coccus/Rod	Coccus	Rod	Rod	Rod	Rod
Hydrolysis:							
gelatin	+	+	+	-	-	-	+
Utilization of:							
D-Glucose	+	+	+	-	+	-	+
D-Maltose	+	+	+	-	+	-	+
D-Mannose	-	-	-	+	+	+	-
D-Mannitol	-	-	-	+	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	+	-	-
L-Arginine	-	-	-	+	-	+	-
L-Lysine	-	-	-	+	-	+	-
Fumarate	-	-	-	+	-	+	-
Sucrose	-	-	-	+	-	+	-
Malate	-	-	-	+	+	+	-
Lactate	-	-	+	+	+	+	-
Glycine	-	-	-	+	-	+	-
Glycerol	-	-	-	+	+	+	-
Pyruvate	+	+	+	+	-	+	+
Sorbitol	-	-	-	+	-	+	-
Malic acid	-	-	-	+	+	-	-
Citrate	-	-	-	+	+	-	-
NIBR accession No.	NIBRBA000011 5040	NIBRBA000011 5041	NIBRBA000011 5043	NIBRBAC0000 03993	NIBRBA000011 5045	NIBRBAC0000 03994	NIBRBA000011 5042

전토양 등과 같이 높은 염분의 환경에서 발견되었으며, 이는 본 연구에서 채취한 염전시료의 환경과 유사함을 알 수 있다. 본 연구를 통하여 발견한 각각의 *Halorubrum* 속의 미생물들은 16S rRNA 유전자 분석 결과를 통하여 국외에서 분리되어 보고된 미생물들과 98.2-99.5%의 상동성이 관찰되었다. 계통학적 분석을 통한 미생물들의 유연관계는 Fig. 1A에서 제시하였다. *Halogeometricum*, *Halobacterium*, *Haloarcula* 속 미생물은 16S rRNA 분석 결과를 통해 기존에 국외에서 배양되어 알려진 균주들과 각각 99.8%, 99.1%, 99.3%의 상동성을 보여주었다. 계통학적 분석을 통한 각 미생물의 유연관계는 Fig.

1B-D에서 제시하였다. 학계에서 제시하는 16S rRNA 유전자의 유사성이 97%를 새로운 종의 기준으로 정하기 때문에, 분리한 미생물들을 가장 가까운 해당종의 새로운 균주(strain)로 분류하였다. 본 미생물들은 국외에서는 배양되어 보고되었지만, 국내에서는 배양된 적이 없는 ‘국내 미기록종’으로써, 최근 나고야의정서가 발효되면서, 국내외적으로 자생생물 조사 발굴이 가속화 되고 있기 때문에, 국내 환경에 적응한 고유한 생리학적 특징을 지닌 생물자원으로서 주요하게 이용될 수 있다고 사료된다.

분리된 호염성 고세균의 생리학적 실험은 일반적으로 MSG

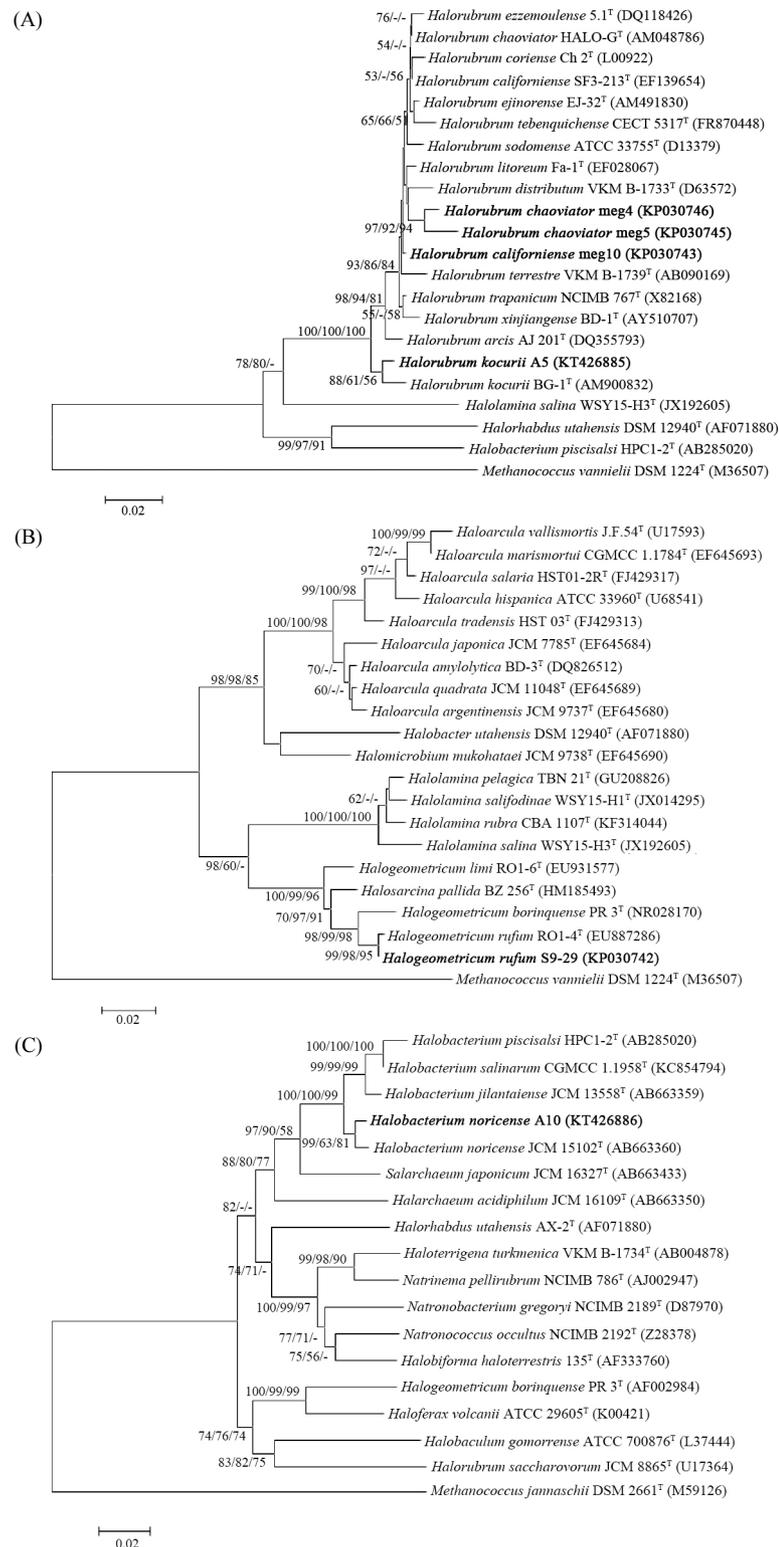


Fig. 1. Phylogenetic tree showing phylogenetic position of (A) isolated *Halorubrum* spp. within the genus *Halorubrum*, (B) isolated *Halogeometricum* spp. within the genus *Halogeometricum*, (C) isolated *Halobacterium* spp. within the genus *Halobacterium*, and (D) isolated *Haloarcula* spp. within genus *Haloarcula* based on 16S rRNA gene sequences. Bootstrap percentages $\geq 50\%$ (based on 1,000 replicates) from the neighbor-joining, maximum-likelihood, maximum parsimony methods, respectively, are shown at branch points.

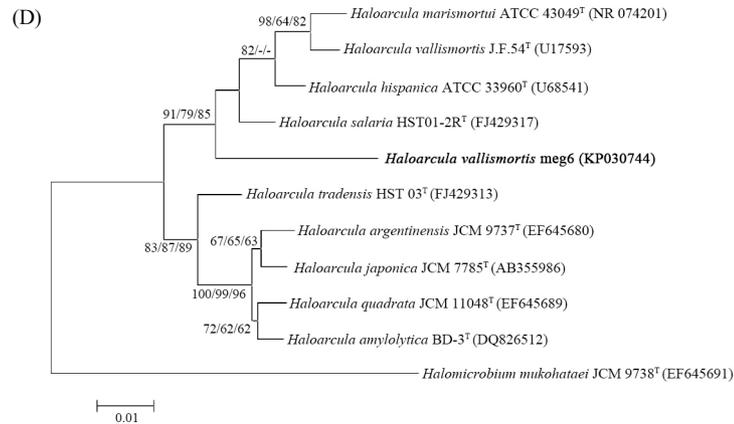


Fig. 1. Continued.

혹은 MH2 배지에서 이루어졌다. 분리된 호염성 고세균은 Gram stain kit (BD)를 사용하여 그람염색을 실시하였다. 그람 염색 후 광학현미경(Nikon)을 통하여 결과를 관찰하였으며, 분리된 모든 미생물은 그람 음성으로 염색되는 것을 확인할 수 있었다. 성장 온도 실험은 MSG 혹은 MH2 고형배지를 이용하여 10, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 45, 50 그리고 60°C에서 진행하였고 (NaCl 농도 20-25%, w/v), 성장 pH 실험은 MSG 혹은 MH2 액체배지 10 ml에서 pH 5.0-10.0 (pH 0.5 간격)으로 진행하였다. 다양한 NaCl 농도를 가진 MSG, MH2 액체배지를 이용하여 NaCl 성장 농도 실험을 진행하였다(NaCl 5-30%, 5% 간격). 또한 MgSO₄·7H₂O를 제외한 MSG, MH2 액체배지를 이용하여 0, 0.01, 0.05, 0.5, 1, 2, 5, 50, 100, 그리고 500 mM에서 미생물이 magnesium 이온의 필요 여부를 확인하는 실험을 진행하였다. Nitrate를 이용한 탈질화 수행 여부는 MSG 혹은 MH2 배지에 nitrate를 넣고, 혐기적으로 배양하여 관찰하였다. 분리된 미생물의 기질 사용특성 분석 실험은 yeast extract, acid hydrolyzed casein, casamino acid, L-glutamic acid, trisodium citrate 등이 제외된 MSG 또는 MH2 고형 배지를 이용하였으며, 필요할 경우 액체배지를 사용하였다. 다양한 21 개의 기질을 사용하였으며, 각 기질은 1 L당 5 g의 농도를 사용하였다: glucose, maltose, mannose, mannitol, L-arabinose, L-lysine, L-arginine, acetate, fumarate, sucrose, starch, malate, lactate, glycine, glycerol, lactose, succinate, pyruvate, sorbitol, malic acid과 trisodium citrate. 미생물 배양체는 1-2주일간 각 균주의 최적 온도에서 배양되었다. Gelatin 가수분해실험은 Smibert와 Krieg의 방법(1994)에 의해 수행되었다. 분리된 모든 미생물은 멸균된 증류수 및 NaCl 10% (w/v) 이하에서 세포 용해(cell lysis)를 관찰할 수 있었다(Oren *et al.*, 1997). 항생제 내성 실험은 Oren 등(1997)의 방법에 의해 수행되었다. 실험

은 MSG 혹은 MH2 고형배지에서 이루어졌으며, 항생제 디스크(streptomycin 10 µg, penicillin 10 IU, clindamycin 2 µg, tetracycline 30 µg, gentamicin 10 µg, ampicillin 10 µg)를 사용하여 1주일간 최적 온도에서 배양되었다.

각 균주의 특성에 대한 자세한 분석결과는 아래와 같다.

Euryarchaeota 문; *Halobacteria* 강; *Halobacteriales* 목; *Halobacteriaceae* 과; *Halorubrum* 속.

Halorubrum chaoviator meg4

Halorubrum chaoviator meg4 미생물은 *Halorubrum chaoviator* Halo-G와 99.2%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *Halorubrum chaoviator* meg4 미생물은 coccus/rod 형태이다. 성장온도는 25-50°C이며, 최적온도는 37°C이고, 성장 pH는 6.5-8.5이며, 최적 pH는 7.5이다. 성장 NaCl 농도는 12-30% (w/v)이고, 최소 50 mM의 magnesium 이온을 필요로 한다. Gelatin을 가수분해하고, nitrate 환원을 하지 않으며, D-glucose, D-maltose, acetate, succinate, 그리고 pyruvate를 기질로 사용이 가능하다. *Halorubrum chaoviator* meg4 미생물의 항생제 내성 실험 결과 streptomycin, penicillin, clindamycin, tetracycline, gentamicin, 그리고 ampicillin에 저항성을 가지고 있다.

Halorubrum chaoviator meg5

Halorubrum chaoviator meg5 미생물은 *Halorubrum chaoviator* Halo-G와 99.2%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *Halorubrum chaoviator* meg5 미생물은 coccus/rod 형태이다. 성장온도는 25-55°C이며, 최적온도는 37°C이고, 성장

pH는 6.5-8.5이며, 최적 pH는 7.5이다. 성장 NaCl 농도는 12-30% (w/v)이고, 최소 50 mM의 magnesium 이온을 필요로 한다. Gelatin을 가수분해하고, nitrate 환원을 하지 않으며, D-glucose, D-maltose, acetate, succinate, 그리고 pyruvate를 기질로 사용이 가능하다. *Halorubrum chaoviator* meg5 미생물의 항생제 내성 실험 결과 streptomycin, penicillin, clindamycin, tetracycline, gentamicin, 그리고 ampicillin에 저항성을 가지고 있다.

Halorubrum californiense meg10

Halorubrum californiense meg10 미생물은 *Halorubrum californiense* SF3-213과 99.5%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *Halorubrum californiense* meg10 미생물은 coccus 형태이다. 성장온도는 25-45°C이며, 최적온도는 37°C이고, 성장 pH는 7.0-8.5이며, 최적pH는 7.5이다. 성장 NaCl 농도는 15-30% (w/v)이고, magnesium 이온을 필요로 하지 않는다. Gelatin을 가수분해하고, nitrate 환원을 하지 않으며, D-glucose, D-maltose, acetate, succinate, lactate, 그리고 pyruvate를 기질로 사용이 가능하다. *Halorubrum californiense* meg10 미생물의 항생제 내성 실험 결과 streptomycin, penicillin, clindamycin, tetracycline, gentamicin, 그리고 ampicillin에 저항성을 가지고 있다.

Halorubrum kocurii A5

Halorubrum kocurii A5 미생물은 *Halorubrum kocurii* BG-1과 98.2%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *Halorubrum kocurii* A5 미생물은 rod 형태이다. 성장온도는 25-55°C이며, 최적온도는 37°C이며, 성장 pH는 6.0-9.0이며, 최적 pH는 7.5이다. 성장 NaCl 농도는 12-29% (w/v)이고, magnesium 이온을 필요로 하지 않는다. Gelatin을 가수분해하지 않고, nitrate 환원을 하지 않으며, D-mannose, D-mannitol, L-lysine, L-arginine, acetate, fumarate, sucrose, malate, lactate, glycine, glycerol, succinate, pyruvate, sorbitol, malic acid, 그리고 trisodium citrate를 기질로 사용이 가능하다. *Halorubrum kocurii* A5 미생물의 항생제 내성 실험 결과 streptomycin, penicillin, clindamycin, tetracycline, gentamicin, 그리고 ampicillin에 저항성을 가지고 있다.

*Euryarchaeota*문; *Halobacteria*강; *Halobacteriales*목; *Halobacteriaceae*과; *Halogeometricum*속.

Halogeometricum rufum S9-29

Halogeometricum rufum S9-29 미생물은 *Halogeometricum rufum* RO1-4와 99.8%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *Halogeometricum rufum* S9-29 미생물은 rod 형태이다. 성장온도는 25-55°C이며, 최적온도는 37°C이고, 성장 pH는 6.0-9.0이며, 최적 pH는 7.0이다. 성장 NaCl 농도는 12-30% (w/v)이고, 최소 50 mM의 magnesium 이온을 필요로 한다. Gelatin을 가수분해하지 않고, nitrate 환원을 하지 않으며, D-glucose, D-maltose, D-mannose, L-arabinose, acetate, malate, lactate, glycerol, succinate, malic acid, 그리고 trisodium citrate를 기질로 사용이 가능하다. *Halogeometricum rufum* S9-29 미생물의 항생제 내성 실험 결과 streptomycin, penicillin, clindamycin, tetracycline, gentamicin, 그리고 ampicillin에 저항성을 가지고 있다.

*Euryarchaeota*문; *Halobacteria*강; *Halobacteriales*목; *Halobacteriaceae*과; *Halobacterium*속.

Halobacterium noricense A10

Halobacterium noricense A10 미생물은 *Halobacterium noricense* A1과 99.1%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *Halobacterium noricense* A10 미생물은 rod 형태이다. 성장온도는 25-50°C이며, 최적온도는 37°C이고, 성장 pH는 5.0-7.5이며, 최적 pH는 7.0이다. 성장 NaCl 농도는 12-30% (w/v)이고, 최소 500 mM의 magnesium 이온을 필요로 한다. Gelatin을 가수분해하지 않고, nitrate 환원을 하지 않으며, D-mannose, L-lysine, L-arginine, acetate, fumarate, sucrose, malate, lactate, glycine, glycerol, succinate, pyruvate, 그리고 sorbitol를 기질로 사용이 가능하다. *Halobacterium noricense* A10 미생물의 항생제 내성 실험 결과 streptomycin, penicillin, clindamycin, tetracycline, gentamicin, 그리고 ampicillin에 저항성을 가지고 있다.

*Euryarchaeota*문; *Halobacteria*강; *Halobacteriales*목; *Halobacteriaceae*과; *Haloarcula*속.

Haloarcula vallismortis meg6

Haloarcula vallismortis meg6 미생물은 *Haloarcula vallismortis* J.F.54와 99.3%의 16S rRNA 유전자 상동성을 가지고 있다. *Haloarcula vallismortis* meg6 미생물은 rod 형태이다. 성장온도는 20-50°C이며, 최적온도는 37°C이고, 성장 pH는

6.0-8.5이며, 최적 pH는 7.5이다. 성장 NaCl 농도는 15-30% (w/v)이고, magnesium 이온을 필요로 하지 않는다. Gelatin을 가수분해하고, nitrate 환원을 하지 않으며, D-glucose, D-maltose, acetate, succinate, 그리고 pyruvate를 기질로 사용이 가능하다. *Haloarcula vallismortis* meg6 미생물의 항생제 내성 실험 결과 streptomycin, penicillin, clindamycin, tetracycline, gentamicin, 그리고 ampicillin에 저항성을 가지고 있다.

현재까지 16S rRNA 유전자를 기본적인 바탕으로 한 분자-생태학적 기술을 통해서 극한환경을 비롯한 다양한 환경에 존재하는 미생물들이 확인되고 있다. 특히 극한환경에서 배양되는 미생물의 경우, 특히 호염성 고세균, 그 산업적 응용성에 있어 국외적으로 미생물 배양 및 그들의 특징분석에 많은 관심을 두고 있는 실정이다(Oren, 2015). 또한, 호염성 고세균에 의한 방향족 탄화수소의 생분해에 대한 연구도 진행되어 보고되고 있어(Bonfa *et al.*, 2011), 이들 호염성 고세균의 다양한 생리-생태학적 기능을 지니고 있을 것으로 판단된다. 본 연구에서는 국내에서는 보고 되지 않은 총 7종의 호염성 고세균을 염분이 높은 환경인 천일염전으로부터 분리하여 동정하고 미생물의 특성분석을 진행하였다. 본 연구를 통하여 국내의 다양한 호염성 고세균의 자원을 확보하였으며, 본 연구를 통하여 확보한 호염성 미생물의 분리 기술 및 균주 특징들은 앞으로 국내의 극한환경에서 다양한 생물자원을 확보하는데 기여할 것이다.

적 요

대부분의 호염성 고세균은 고염환경으로 알려진 천일염전 (solar saltern), 염호수(salt lake)를 비롯한 다양한 환경에서 서식하고 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는, 한국의 대표적인 고염환경으로부터 분리배양을 통하여 호염성 고세균의 특성 분석을 실시하였다. 호염성 미생물들을 분리하기 위하여, 고염배지를 제작하고, 총 7개의 순수 배양체를 확보하였다. 분리된 호염성 미생물들의 16S rRNA 유전자 서열에 대한 계통학 및 상동성 분석을 실시하여 *Halorubrum* 속의 미생물 4종, *Halogeometricum* 속의 미생물 1종, *Halobacterium* 속의 미생물 1종, *Haloarcula* 속의 미생물 1종을 각각 확보 할 수 있었다. 이들 호염성 고세균들은 모두 그람 음성균이며, nitrate를 전자 수용체로 사용한 혐기적 조건에서 성장이 관찰되지 않았다. 또한, 분리된 모든 미생물들은 12-30% (w/v, NaCl) 염분을 필요로 하였다. 본 연구는 국내의 호염환경으로부터 호염성미생물의 분리기술 및 관련 연구에 대한 기초적 정보를 제공하

며, 국내의 다양한 극한환경에서 서식하는 미생물 배양체 확보를 통하여 국내 생물자원 확보에 기여할 것으로 기대한다.

감사의 말

이 논문은 환경부의 재원으로 국립생물자원관 자생생물 조사 발굴사업의 지원, 2014년도 충북대학교 학술연구지원사업과 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단-C1가스리파이너리사업(No. NRF-2015M3D3A1A01064881)의 연구비 지원을 받아 수행하였습니다.

References

- Bonfa, M.R., Grossman, M.J., Mellado, E., and Durrant, L.R. 2011. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by *Haloarchaea* and their use for the reduction of the chemical oxygen demand of hypersaline petroleum produced water. *Chemosphere* **84**, 1671-1676.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., and Forterre, P. 2008. Mesophilic *Crenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 245-252.
- Castelle, C.J., Wrighton, K.C., Thomas, B.C., Hug, L.A., Brown, C.T., Wilkins, M.J., Frischkom, K.R., Tringe, S.G., Singh, A., Markillie, L.M., *et al.* 2015. Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Curr. Biol.* **25**, 690-701.
- DeLong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5685-5689.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**, 368-376.
- Fitch, W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**, 406-416.
- Grant, W.D., Kamekura, M., McGenity, T.J., and Ventosa, A. 2001. Class III. *Halobacteria* class. nov. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. In Boone, D.R., Castenholz, R.W., and Garrity, G.M. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 (ed.)Vol. 1, pp. 294-334. Springer-Verlag, New York, USA.
- Guy, L. and Ettema, T.J. 2011. The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends Microbiol.* **19**, 580-587.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Oren, A. 2014. Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles* **18**, 825-834.
- Oren, A. 2015. Halophilic microbial communities and their environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **33**, 119-124.

- Oren, A., Ventosa, A., and Grant, W. 1997. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **47**, 233–238.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Sehgel, S.N. and Gibbons, N.E. 1960. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* **6**, 165–169.
- Smibert, R.M. and Krieg, N.R. 1994. Phenotypic characterization. In Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., and Krieg, N.R. (eds.), *Methods for general and molecular bacteriology*, Vol. 1325, pp. 607–654. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA.
- Spang, A., Martijn, J., Saw, J.H., Lind, A.E., Guy, L., and Eftema, T.J. 2013. Close encounters of the third domain: the emerging genomic view of archaeal diversity and evolution. *Archaea* **2013**, 202358.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipki, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729.
- Ventosa, A., Nieto, J.J., and Oren, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 504–544.
- Ventosa, A., Quesada, F., Rodniguez, F.V., Ruiz, B.Q.F., and Ramos, C.A. 1982. Numerical taxonomy of moderately Gram negative rods. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1959–1968.
- 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.
- Widdel, F. and Bak, F. 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, pp. 3352–3378. In Balows, A., Trüper, H., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H. (eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York, USA.
- Woese, C.R. and Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5088–5090.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576–4579.