

단 보

독도 해안식물로부터 분리된 호염성 세균들의 특성 및 계통학적 분석

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

¹경북대학교 생명과학부, ²롯데중앙연구소, ³농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터

Characterization and phylogenetic analysis of halophilic bacteria isolated from rhizosphere soils of coastal plants in Dokdo islands

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

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

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

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

(Received February 23, 2015; Accepted March 16, 2015)

ABSTRACT: To study the halobacterial diversity at the rhizospheric soil of coastal plant native to Dokdo islands, several host plant were selected and its rhizospheric soil was sampled. Soil sample was diluted serially and pure isolation was done by sub-culture using marine agar media. 26 halophilic strains cultivable at the marine medium containing concentration of 9.0% sodium chloride were selected among total 161 isolates. Their partial 16S rRNA gene sequences extracted from genomic DNA were analyzed and partially identified. Furthermore, to identify their genetic relationship, phylogenetic tree was deduced. Total 26 strains were belongs to *Firmicutes* (30.8%), *Gamma proteobacteria* (53.8%), *Bacteroidetes* (7.7%), *Alpha proteobacteria* (7.7%), and *Actinobacteria* (7.7%). These results showed the specific difference from previous researches which has been reported the microbial flora of soil or sea water around the Dokdo islands. Furthermore, 4 among 26 halophilic strains grew at above 12.0% NaCl concentrated marine broth, and 2 strains *Idiomarina abyssalis* LM4H23 and *Halomonas huangheensis* AS4H13 grew at 15.0% concentration. These halophilic strains thought to overcoming the severe stress like high salt concentration or variation derived from Dokdo-specific climate and might have unknown, specific relationship with their host coastal plant native to Dokdo islands.

Key words: coastal plant, Dokdo islands, halophilic bacteria, phylogenetic analysis

독도(Dokdo islands)는 해양성 화산도로서 북서태평양 연해인 동해 중남부, 울릉군 죽변면에서 217 km 떨어진 곳에 위치하고 있다. 동도와 서도로 구분되며 그 외 크고 작은 89개의 바위섬으로 이루어지며(Sung and Ghim, 2010), 대부분 40° 이상의 급경사로 이루어져 있다(Ham *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2009). 한류와 난류가 접하는 완대류 해역에 속해 연평균 12°C의 기온분포를 보이며, 강우량이 많아 온난·다습한 기후를 보인다. 대한민국 해안선에서 멀리 위치한 관계로 강한 자외선 조사, 극심한 건조, 강한 바람, 강우로 인한 유기영양분의 유실 및 부족과 같은 토양 특성을 보여 육상생태계와 차별화된 식

물상을 형성한다(Shin *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2009). 이러한 환경적 영향에 따라 특징화된 48분류군의 식물이 서식한다고 보고되었으며(You *et al.*, 2011a), 특히 해안식물(coastal plants)이 우점하고 있다. 독도 자생식물에 대한 연구는 지속적으로 수행되었지만, 독도서식 미생물에 관한 연구는 많이 이루어져 있지 않으며, 신종세균 분리(Yoon *et al.*, 2005), 근권세균(Jeon *et al.*, 2009; Sung and Ghim, 2010), 자생식물 내생균류(You *et al.*, 2011a, 2011b, 2013) 연구는 점차적으로 이루어지고 있다.

식물학계에서는 독도 특유의 환경, 즉 태풍에 의한 높은 파고 및 상시로 발생하는 해무, 갯이갈매기 등의 서식활동으로 인해 토양 무기물 및 염분함량이 매우 높은 것으로 알려져 있다(Jeon *et al.*, 2009). 또한 염분을 체내에 축적하는 해안식물이 생장과 사멸을 반복하는 동시에, 최근까지 실시된 탐색세

[†]These authors contributed equally to this work.

*For correspondence. E-mail: kimjg@knu.ac.kr;
Tel.: +82-53-950-5379; Fax: +82-53-955-5379

와 같은 독도 외래 염생식물 제거사업을 통해 독도 토양의 염분은 지속적으로 축적되었을 것이라 생각된다.

독도 토양에서 생존하며 식물 성장을 촉진하는 일반적인 토양세균에 대한 연구는 진행되고 있으나, 위와 같은 극한의 고염분 환경에서 호염성을 나타낼 수 있는 세균자원에 대한 연구는 독도 뿐만 아니라 국내에서도 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 첫째, 독도에 자생하는 해안식물의 근권에서 다양한 세균을 순수 분리한 후 이들 중 호염성 세균만을 선별하여 부분동정 및 계통분석을 수행하였다. 둘째, 이들 호염성 세균 특히 극호염성 균주에 대해 염 농도 변화에 따른 생장 곡선을 도출하였다. 최근 해안식생 복원, 염해 농경지 복원에 대한 연구분야에서 해안 염생식물과 상호작용하며 식물생장 촉진 및 식물면역성을 유도하는 해양 미생물자원과 관련된 연구가 증가하고 있는 바(Ham *et al.*, 2009; You *et al.*, 2011a, 2011b, 2013), 본 연구에서는 독도 해안에서 자생식물과 상호작용할 것으로 추측되는 다양한 근권의 호염성 세균을 분리하고 계통수를 확인하여 유용 미생물 자원을 확보하고자 하였다. 우선 샘플링 및 배양 가능한 세균의 분리를 위해 다음과 같은 과정을 거쳤다. 독도의 동도에 자생하는 해안식물인 땅재송화(*Sedum oryzifolium* Makino; plant code: SO), 갯까치수영(*Lysimachia mauritiana* Lamarck; plant code: LM), 해국(*Aster spathulifolius* Maximowicz (Maxim.); plant code: AS) 균락 하부의 근권토양을 채취하였다. 채취한 토양시료는 10 개체의 식물을 채집하여 뿌리에 붙은 토양을 멸균된 tube (SPL life science, Korea)에 각각 100 ml씩을 채취하였으며, 약 4°C의 아이스박스에 보관해서 연구실로 운반하여 실험재료로 사용하였다.

채취한 토양시료를 sterilized 0.85% NaCl 용액과 토양시료를 9:1로 섞어 1분간 vortex 하였다. 이로서 균질화된 시료를 10^{-1} ~ 10^{-7} 으로 serial dilution을 실시하였다(Jeon *et al.*, 2009). 자생식물들이 독도의 해수가 드나드는 해안에서 자생함을 감안하여, 근권 세균의 순수분리를 위해 marine broth (Difco) 한천배지를 사용하였다. 희석액을 도말한 후 25°C 항온환경에서 3-5일 간 배양을 실시하였으며, 형태학적으로 상이한 콜로니를 최대한 선별한 후 동일 배지 및 성장조건에서 계대배양을 반복하여 순수분리 하였다(Sung and Ghim, 2010). 일반적으로 해안 염생식물 균락 구조상 균락을 구성하는 개체와 개체 간의 뿌리가 얽혀있거나 접한 경우가 대부분이므로 같은 host plant 내에서 각각의 개체별로 독립된 형태학적 순수분리 결과를 도출하지는 않았다. 그러나 순수분리를 위해 샘플 희석 후 최초 도말 단계에서는 최대한 다양한 균주를 정확히 분리하기 위해 개체별로 각각 따로 도말을 실시하였으며, 10개

개체에서 순수분리된 균주를 희석도말하여 형태학적으로 유사한 경우는 제외하고 상이한 콜로니를 보일 경우만을 선별하여 모두 합쳐 동일한 host plant에서의 순수분리 결과로 도출하였다.

순수분리된 이들 161개 균주들 중에서 호염균의 선발을 위해 다음과 같은 과정을 거쳤다. 일반적으로 세균이 성장가능한 염농도에 따라 비호염균(non halophile: 0.2 M 이하), 내호염균(halo-tolerant: 0-2.5 M), 저호염균(slight halophile: 0.2-0.5 M), 중호염균(moderate halophile: 0.5-2.5 M), 그리고 고호염균(2.5-5.2 M, 포화농도)으로 분류되고 있다(Kushner, 1985). 따라서 호염성균의 분리를 위해 1차적으로 염농도 9.0% (1.54 M)로 조정된 marine agar (MB; Difco)에 도말하여(Na *et al.*, 2011) 25°C 항온조건에서 48시간 배양한 후, 성장가능한 균주 26개를 선별할 수 있었다(Table 1). 분리된 161 균주 중에서 50균주(31.1%)가 내호염균에 포함되었고, 63균주(39.1%)가 저호염균에 속하는 균주로 확인 되었으며, 22균주는 중호염균에 속하였지만 염농도 1.2 M (7%) 이상에서는 생장을 못하였다. 그리고 선별된 26균주는 염농도 9.0% (1.54 M)의 배지상에서 생장하였으며, 이들 26개 호염성 균주들을 제외한 나머지 분리균주들 중 50균주들은 독도 해안이라는 특수한 환경에서 높은 염분농도에서 내염성(halotolerance)을 확보하여 생존하는 종들로 판단된다. 이들의 partial 16S rRNA gene sequence 분석을 통한 호염세균의 부분동정을 위해(Baati *et al.*, 2010; Vijayanand *et al.*, 2010) 분리한 세균을 marine broth를 사용하여 25°C에서 48시간동안 진탕배양한 후 원심분리하여 일정량 이상의 균체를 취하였다(10,000 × g, 5 min). 이후 QIAamp DNA mini kit (QIAGEN)을 사용하여 total genomic DNA를 추출하였으며, 이들 중 16S rRNA gene sequence 증폭을 위해 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')를 forward primer로, 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 reverse primer로 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건 및 수행방법으로, initial denaturation (95°C, 15 min), denaturation (95°C, 20 sec), annealing (50°C, 40 sec), elongation (72°C, 90 sec)를 35회 반복한 후 마지막으로 elongation (72°C, 5 min) 과정을 거쳤다(Yoon *et al.*, 1998, 2005). 이후 PCR products는 product purification kit (SGP27-S150 Gel & PCR Extraction system-UB)을 이용하여 정제하였으며, 염기서열 분석은 ABI 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 실시하였다. 결정된 서열은 Ez-Taxon server (<http://eztaxon.org>)의 database 및 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 blast (Basic Local Alignment Search Tool) search를 이용하여 GenBank로부터 상동성이 높은 염기서열

Table 1. Partial identification of marine halophilic bacteria isolated from the rhizosphere soils of three coastal plants native to Dokdo islands

Plant code	Closest relative based on partial 16S rRNA gene sequences	Isolates name	Accession No.	Phylogenetic group	Similarity (%)
SO	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831T AB010863	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> SO4H21	KP706804	<i>Firmicutes</i>	100.00%
	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22T EF114313	<i>Bacillus aryabhatai</i> SO4H51	KP706808	<i>Firmicutes</i>	100.00%
	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831T AB010863	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> SO4H62	KP706805	<i>Firmicutes</i>	100.00%
	<i>Oceanobacillus picturae</i> LMG19492T AJ315060	<i>Oceanobacillus picturae</i> SO4H71	KP706806	<i>Firmicutes</i>	99.93%
	<i>Kytococcus sedentarius</i> DSM20547T X87755	<i>Kytococcus sedentarius</i> SO5G151	KP706821	<i>actinobacteria</i>	99.93%
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC29970T L37600	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> SO6G13	KP706822	<i>Firmicutes</i>	99.78%
LM	<i>Salinicola socius</i> SMB35T DQ979342	<i>Salinicola socius</i> LM4H21	KP706809	<i>gamma proteobacteria</i>	99.70%
	<i>Idiomarina abyssalis</i> KMM227T AF052740	<i>Idiomarina abyssalis</i> LM4H23	KP706811	<i>gamma proteobacteria</i>	99.85%
	<i>Halomonas huangheensis</i> BJGMM-B45T JQ716246	<i>Halomonas huangheensis</i> LM4H53	KP706812	<i>gamma proteobacteria</i>	100.00%
	<i>Halomonas cupida</i> DSM4740T L42615	<i>Halomonas cupida</i> LM4H63	KP706813	<i>gamma proteobacteria</i>	99.55%
	<i>Salinicola socius</i> SMB35T DQ979342	<i>Salinicola socius</i> LM4H72	KP706814	<i>gamma proteobacteria</i>	99.93%
	<i>Salinicola socius</i> SMB35T DQ979342	<i>Salinicola socius</i> LM4H73	KP706815	<i>gamma proteobacteria</i>	98.66%
	<i>Leeuwenhoekiella marinoflava</i> LMG1345T AF203475	<i>Leeuwenhoekiella marinoflava</i> LM4G53	KP706823	<i>bacteroidetes</i>	98.95%
	<i>Salinicola socius</i> SMB35T DQ979342	<i>Salinicola socius</i> LM4G72	KP706824	<i>gamma proteobacteria</i>	99.03%
	<i>Paracoccus saliphilus</i> YIM90738T DQ923133	<i>Paracoccus saliphilus</i> LM4G82	KP706825	<i>alpha proteobacteria</i>	98.50%
	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> FP5T AM295006	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> LM4G111	KP706826	<i>Firmicutes</i>	98.69%
	<i>Idiomarina baltica</i> OS145T AJ440214	<i>Idiomarina</i> sp. AS4G63	KP706827	<i>gamma proteobacteria</i>	96.04%
	<i>Joostella marina</i> DSM19592T JH651379	<i>Joostella marina</i> AS4G71	KP706828	<i>bacteroidetes</i>	99.92%
AS	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TRT NR074933	<i>Idiomarina loihiensis</i> AS4G81	KP706829	<i>gamma proteobacteria</i>	99.70%
	<i>Bacillus berkeleyi</i> KMM6244T JN187498	<i>Bacillus berkeleyi</i> AS4G101	KP706830	<i>Firmicutes</i>	99.63%
	<i>Halomonas huangheensis</i> BJGMM-B45T JQ716246	<i>Halomonas huangheensis</i> AS4H13	KP706816	<i>gamma proteobacteria</i>	100.00%
	<i>Bacillus megaterium</i> IAM13418T D16273	<i>Bacillus megaterium</i> AS4H22	KP706817	<i>Firmicutes</i>	99.85%
	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCCBAA-803T AF212204	<i>Halomonas sulfidaeris</i> AS4H24	KP706818	<i>gamma proteobacteria</i>	99.55%
	<i>Idiomarina baltica</i> OS145T AJ440214	<i>Idiomarina</i> sp. AS4H25	KP706807	<i>gamma proteobacteria</i>	95.97%
	<i>Salinicola salarius</i> M27T AM229316	<i>Salinicola salarius</i> AS4H43	KP706819	<i>gamma proteobacteria</i>	99.27%
	<i>Halomonas huangheensis</i> BJMGMM-B45T JQ716246	<i>Halomonas huangheensis</i> AS4H51	KP706820	<i>gamma proteobacteria</i>	100.00%

을 비교 및 분석하였다(Maidak et al., 2000). 그 결과, 26개의 호염균들은 분리된 host plant에 관계없이 크게 4개 문(phylum), 11개 속(genus)에 속함을 알 수 있었다(Table 2). 이들은 각각 *Firmicutes* 문에 속하는 *Oceanobacillus* 속, *Bacillus* 속, *Staphylococcus* 속, *Halobacillus* 속에 속하는 다양한 종의 세균들과 *Gamma proteobacteria*에 속하는 *Halomonas* 속, *Idiomarina* 속, *Salinicola* 속의 세균, *bacteroidetes* 문에 속하는 *Leeuwenhoekiella* 속, *Joostella* 속의 세균들, *Alpha proteobacteria*에 속하는 *Paracoccus* 속 및 *actinobacteria* 문에 속하는 *Kytococcus* 속의 세균들과 높은 유사도를 나타내었다. 호염성 균주에 속하는 이들 26균주에 대해 NCBI의 GenBank에 등록하였다(Table 1).

특히, 본 연구에서 분리된 호염성 세균인 *Oceanobacillus* 속, *Kytococcus* 속, *Salinicola* 속, *Idiomarina* 속, *Leeuwenhoekiella*

속, *Joostella* 속의 세균들은 지금까지 보고된 독도 토양 및 해수 미생물상 관련 선행연구에서는 분리된 적이 없다(Jeon et al., 2009; Sung and Ghim, 2010).

이는 호염성 세균이라고 할 지라도 본 연구 및 선행연구에서 일반적인 세균분리용 배지에서 분리되었음을 감안할 때, 단순히 독도의 해안지대에서 토양과 해수 분포 세균들이 함께 분리될 수 있다는 것이 아니라, 독도 해안식물 근권이라는 특수한 환경에서 특이적인 미생물 상이 형성되어 있는 것으로 해석될 수 있다. 이와 별개로 98.5% 미만의 낮은 상동성을 보인 *Idiomarina* 속 1개의 분리균은 신종세균으로의 가능성을 보였으며, 추가적인 연구가 필요하다(Table 1) (Woo et al., 2008). 실제로 독도의 특수한 기후환경으로 인해 2015년 2월 현재까지 총 40건의 이상의 신종세균 보고가 이루어 졌고, 독도가 생태학적으로 다양한 신종세균의 보고임이 밝혀져 왔음

Table 2. Taxonomic composition of marine halophilic bacteria isolated from the rhizosphere soils of three coastal plants native to Dokdo islands

Phylum	Genus	Species	Number	Ratio (%)	
Firmicutes	<i>Oceanobacillus</i>	<i>ihyensis</i>	2	7.7	
		<i>picturae</i>	1	3.8	
		<i>aryabhatai</i>	1	3.8	
	<i>Bacillus</i>	<i>berkeleyi</i>	1	3.8	
		<i>megaterium</i>	1	3.8	
	<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>	1	3.8	
	<i>Halobacillus</i>	<i>alkaliphilus</i>	1	3.8	
	gamma proteobacteria	<i>Salinicola</i>	<i>socius</i>	4	15.4
			<i>salarius</i>	1	3.8
			<i>abyssalis</i>	1	3.8
<i>Idiomarina</i>		<i>baltica</i>	2	7.7	
		<i>loihiensis</i>	1	3.8	
<i>Halomonas</i>		<i>cupida</i>	1	3.8	
		<i>sulfidaeris</i>	1	3.8	
bacteroidetes	<i>Leeuwenhoekella</i>	<i>marinoflava</i>	1	3.8	
	<i>Joostella</i>	<i>marina</i>	1	3.8	
alpha proteobacteria	<i>Paracoccus</i>	<i>saliphilus</i>	1	3.8	
actinobacteria	<i>Kytococcus</i>	<i>sedentarius</i>	1	3.8	

을 볼 때, 다양한 호염성 신종 미생물 또한 존재할 것이라 생각된다(Sung and Ghim, 2010).

분리된 DNA로부터 결정된 염기서열과 데이터베이스에서 얻어진 염기서열은 유연관계 확인을 위해 partial 16S rRNA gene sequence 영역을 Clustal X program으로 다중정렬 후, BioEdit Sequence Alignment Editor를 사용해서 염기서열을 재차 정렬하고 Mega 6.0 Neighbor-Joining 방법과 Kimura 2-parameter 모델을 이용하여 계통수를 작성하였다(Felsenstein, 1985; Saitou and Nei, 1987). 그 결과 Site 1의 땅채송화 근권 및 주변토양에서는 Firmicutes 목이 대부분을 차지하였으나, 오히려 Site 2, 3의 해국 및 갯까치수영 근권, 주변토양에서는 Gamma proteobacteria가 집중 분포하는 것으로 나타났다. 이는 같은 해안식물이라고 하더라도 host plant에 따라 특이적인 문, 특이적인 종들이 분포하고 있음을 보여준다. 분리된 지점과는 관계없이, 총 14개의 호염성균주가 Gamma proteobacteria에 속하는 것으로(53.8%), 8개의 균주가 Gram-positive, low G+C contents의 특징을 가진 Firmicutes 문에 속하는 것으로 (30.8%), 2개 분리균이 Bacteroidetes 문에(7.7%), Alpha proteobacteria 와 Actinobacteria 문에 각각 1개 균주(3.8%)가

속하는 것으로 나타났다. 일반적으로 각 환경적 특징에 의해 분리되는 phylum은 특징적인 패턴을 보이는데 해수에서는 Alpha, Gamma proteobacteria 순으로 발견되는 것으로(Felsenstein, 1985; Cho and Azam, 1988; Gonzalez and Moran, 1997; Cottrell and Kirchman, 2000a, 2000b), 강이나 호수 등 담수환경에서는 Beta proteobacteria가, 해양 침적지에서는 Delta proteobacteria가 주로 분리되는 것으로 보고되고 있다(Amann et al., 1995; Cho and Azam, 1988; Méné et al., 1998; Cottrell and Kirchman, 2000b; Lee et al., 2008; Kim et al., 2014). 또한 냉용수나 심해 열수구나 같은 극한 해양환경에서는 주로 Epsilon proteobacteria 가 분리된다(Campbell et al., 2006). 또한 특히 기존의 독도 환경 미생물상 연구에서 독도주변 해수에서는 호염균을 분리하기 위한 배양조건이 아닌 일반적인 순수분리 배지로서 marine broth 혹은 tryptic broth 한천배지를 활용하였으며, 그로서 순수분리를 실시한 결과로 주로 Gamma, Alpha proteobacteria 순으로 분리되었으나(Jeon et al., 2009; Sung and Ghim, 2010), 본 연구에서 독도 해안식물 근권에서 생존하는 호염성 세균은 오히려 Gamma proteobacteria, Firmicutes 문의 순으로 분리되었다. 또한 선행연구에서 일반배지인 tryptic broth 한천배지를 사용하여 순수분리를 실시한 결과 기존 독도 토양에서는 Firmicutes 문의 세균들이 집중 분리되는 점은 일치하나, 위에서 언급한 대로 종 단위로 비교해 볼 때 대부분 Bacillus, Paenibacillus 균주가 대부분을 차지하였던 결과(Jeon et al., 2009)와는 명확히 다른 분리 종 조성을 보여주고 있다. 이는 독도 해안식물 근권에서 고염분의 분리배지를 이용한 호염균 분리를 위한 본 연구가 유의적이었음을 의미한다. 특히 Fig. 2의 phylogenetic tree에 표시된, 본 연구에서 분리된 균주들과 상동성이 높은 표준균주(type strain) Bacillus aryabhatai, Bacillus megaterium 등은 식물생장 및 면역성 유도과 관련되어 있는 균주이며, Oceanobacillus ihyensis, Oceanobacillus picturae 등은 독도해안과 유사한 환경을 보이는, 해안과 삼림이 접하는 해안토양에서 분리 보고된 종들이다(Lee et al., 2006, 2012; Lu et al., 2001; Siddiquee et al., 2010; Kang et al., 2014; Porcel et al., 2014). 우리나라 일반적인 해안 유형으로 경사가 완만한 갯벌, 강의 하구 등지에 서식하는 식물근권 미생물상은 연구된 사례가 다수 있었으나(Kim et al., 2005; Lim et al., 2006; Seo et al., 2012; You et al., 2012), 해안 토양이 급격한 경사를 이루며 험한 파도 등으로 해수와 바로 접하는 지형에서의 해안식물 미생물상에 관한 연구는 이루어진 사례가 없었다. 이러한 점들을 종합해 볼 때, 이들 호염성 균은 독도 해안가 해안식물 근권에서 독도 특유의 극심한 염분 변화 및 높은 염농도에 적응하며 해안식물과 어떠한 특이적

Table 3. Growth section of halophilic Dokdo bacteria in MB medium containing serial concentration of NaCl from 3.5% to 20.0% Red line shows the criteria for classification of non halophile, slight, moderate and extreme halophile (Kushner, 1985).

NaCl Percentage (%)	below the 3.5%	3.5%	5.0%	7.0%	9.0%	12.0%	15.0%	20.0%	
Molarity (mol/L)	below the 0.60 M	0.60 M	0.86 M	1.20 M	1.54M	2.054 M	2.57 M	3.42 M	
non halophile	0.2 M								
Kushner (1985)	slight halophile	0.2 M 0.5 M							
	moderate halophile				0.5 M				
	extreme halophile					1.5 M			
								5.2 M	
Dokdo isolates	<i>I. abyssalis</i> LM4H23 (Fig.1A)								2.57 M
	<i>H. huangheensis</i> AS4H13 (Fig.1B)								2.57 M
	<i>S. socius</i> LM4H73 (Fig.1C)								2.054 M
	<i>H. sulfidaeris</i> AS4H24 (Fig.1D)								2.054 M
									2.054 M

상호작용을 하고 있는 것으로 판단되어, 후행연구가 필요하다.

분리된 호염성 균주 26개에 대해 염 농도에 따른 생장특성 확인 및 극호염성 세균의 유무 판별을 위해 각각의 균주별로 NaCl (sodium chloride)의 농도를 각 비율에 따라 조정하여 진탕배양을 실시하였다(Kushner, 1985). 이들 위해 기본배지로서 250 ml의 marine broth 액체배지를 사용하였으며, 각각 염분농도를 Table 3에 표시된 바에 따라 조정하여 121℃ 15 lb로 고온가압멸균 후 냉각하여 본배양액으로 사용하였다. 선발된 26개 균주를 각각 10 ml의 marine broth에 접종한 후 25℃에서 16시간 동안 180 rpm으로 전배양한 후, 다양한 염분 농도로 조정된 본배양액에 1 ml씩을 접종하여 25℃에서 180 rpm으로 24시간 동안 진탕배양을 실시하였다. 최초 접종 후, 120분 간격으로 배양액 각 200 µl씩을 취하여 660 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 이를 바탕으로 염분농도 구별별로 growth curve을 작성하였다(microtiter plate reader at 580 nm, Merck Co.) (Park and Jeong, 1996). 그 결과, 26균주 중에서 22균주는 NaCl 농도 9.0% (1.54 M) 까지만 생장 및 증식이 가능하였으며, 나머지 4개 균주인 *Halomonas sulfidaeris* AS4H24, *Salinicola socius* LM4H73, *Idiomarina abyssalis* LM4H23과 *Halomonas huangheensis* AS4H13 균주는 12.0% 염농도에서 까지 생장이 가능하였다. 그들 중 *H. sulfidaeris* AS4H24을 제외한 나머지 3개 균주는 15.0% 농도에서 증식하였으며, 20.0%에서는 4개 균주 모두 증식이 이루어 지지 않는 것으로 관찰되

었다. Fig. 1에서 이들 4개 균주의 growth curve를 보면, *S. socius* LM4H23 균주의 경우 3.5%에서 15.0%까지 광범위한 농도에서 생장이 가능하였다(Fig. 1A). 또한, 염농도 9.0%에서도 낮은 염농도에서와 유사한 시간대의 lag phase를 보였으나, 12.0%~15.0%에서 부터는 lag phase가 2~3배 길어졌으며, 서서히 stationary phase로 접어드는 것으로 나타났다. 염농도 20.0%까지 증가하였을 때에는 생장하지 못하는 것으로 나타났다(Fig. 1A). *H. huangheensis* AS4H13 균주의 경우 *S. socius* LM4H23 균주와 기본적인 lag phase는 유사하고, 역시 3.5~15.0%까지 광범위한 염농도에서 증식이 가능하였다. 저농도의 염(3.5%)에서보다는 7.0% 내외 염농도에서 stationary phase (12 h)에 일찍 도달하는 것으로 관찰되었다(Fig. 1B). 그러나 12.0% 이상의 염농도에서는 lag phase가 서서히 길어졌으며 특히 15.0% 농도에서는 서서히 stationary phase로 접어드는 것으로 나타났다. 20.0% 염농도에서는 더 이상 증식하지 못하였다. *S. socius* LM4H73 균주의 경우 기본적인 lag phase (6 h)에서 낮은 염농도에서보다 7.0%, 9.0% 염농도에서 오히려 stationary phase에 빨리 도달하였다. 그러나 12%에서는 낮은 염농도보다 lag phase가 길어지는 경향을 보였으나, 3.5%에서보다 stationary phase에 일찍 도달하는 것으로 나타났다. 15.0% 염농도에서는 낮은 농도에서보다 exponential phase에서 curve가 천천히 증가하였으나, 생장이 가능한 것으로 판단된다(Fig. 1C and D). 이들 2 균주도 20.0%에서는 생장을 하지 못하는 것으로 나타났다. *H. sulfidaeris* AS4H24 균주의 경우

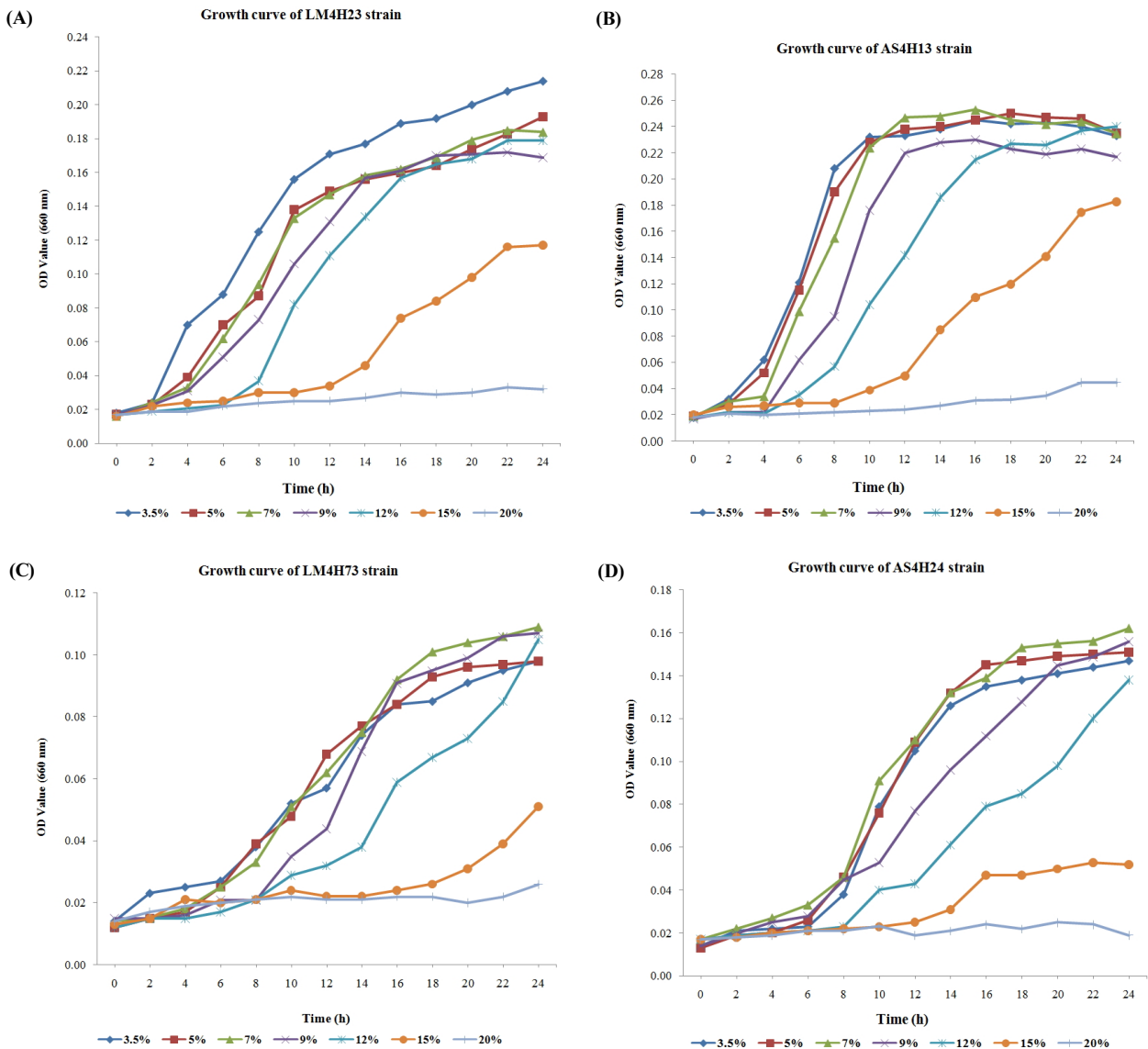


Fig. 1. Growth profile of halophilic bacteria in MB medium containing serial concentration of NaCl from 3.5% to 20% Biomass was spectrophotometrically measured during 24hr incubation. A) *I. abyssalis* LM4H23; B) *H. huangheensis* AS4H13; C) *S. socius* LM4H73; D) *H. sulfidaeris* AS4H24.

역시 기본적인 lag phase (6 h)에서 낮은 염농도에서보다 7.0%, 9.0% 염농도에서 오히려 stationary phase에 빨리 도달하였다. 그러나 12%에서는 낮은 염농도보다 lag phase가 길어지는 경향을 보였으며, 저농도에서보다 느리게 stationary phase에 도달하였다. 15.0% 염농도 이상에서는 증식하지 못하는 경향을 보였다. 결론적으로 *S. socius* LM4H73 (Fig. 1C) 및 *H. huangheensis* AS4H13 (Fig. 1B) 균주의 경우 12.0% 미만에서, *H. sulfidaeris* AS4H24 (Fig. 1D) 균주의 경우 9.0% 이하의 염농도에서는 각각 염농도가 증가할수록 급격한 저농도의 염에서보다 빠른 속도로 stationary phase에 도달하는 것으로 보

아, 최적 생장을 위해 환경상에서 일정 농도 이상의 NaCl이 요구되는 호염성의 특성을 보여주고 있다(Simbert and Kreig, 1981; Javor, 1984; Grand and Larsen, 1989). 또한 *S. socius* LM4H23 (Fig. 1A), *S. socius* LM4H73 (Fig. 1C) 및 *H. huangheensis* AS4H13 (Fig. 1B) 균주의 경우 15.0% 염농도에서 생장이 가능하므로, 이들은 고호염성 세균에 속하는 것으로 판단된다(Table 3) (Kushner, 1985). 그러나 *H. sulfidaeris* AS4H24 균주의 경우 15.0% 염농도에서는 거의 증식이 이루어지지 않음을 볼 때 극호염성에는 해당하지 않는 것으로 판단된다. 그러나 이러한 극호염성의 해당 유무와 관계없이,

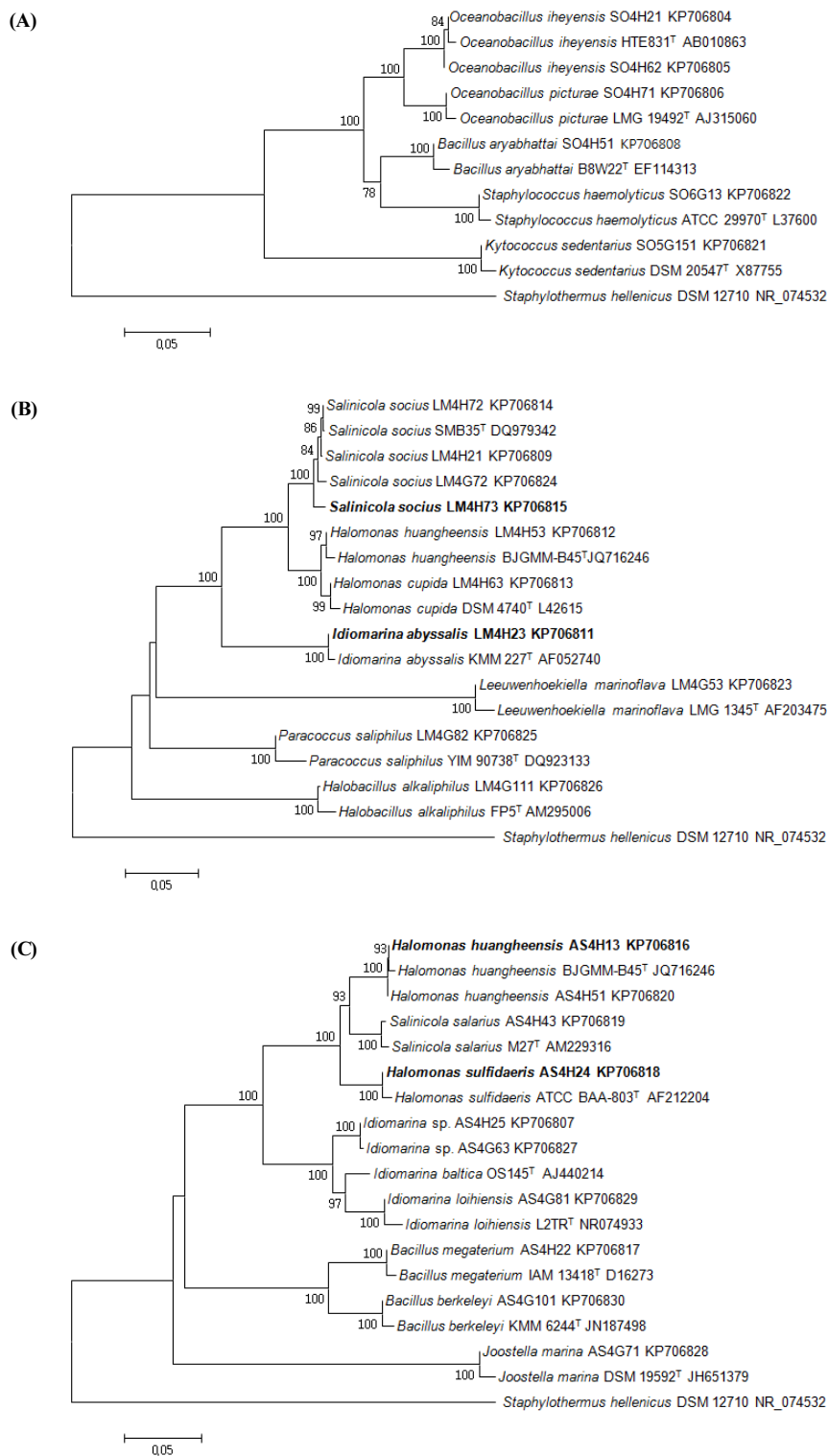


Fig. 2. Neighbour-joining phylogenetic tree based on partial 16S rRNA gene sequences showing the positions of marine bacteria and representatives of other species related taxa. Only bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) greater than 70% are shown at branching points. *Staphylothermus hellenicus* DSM 12710 (GenBank accession number, NR_074532) was used as an outgroup. Bar, 0.05 substitutions per nucleotide position. The marine halophilic bacteria isolated from rhizosphere soils of coastal plants (A) *S. oryzifolium*; (B) *L. mauritiana*; (C) *A. spathulifolius*.

염 농도가 3.0%인 순수 분리배지 marine broth에서 생장이 가능한 점, 이에 더하여 Table 3를 참고하면 위의 4균주 모두 광범위한 NaCl 농도에서 생장이 가능한 것을 보여준다. 이는 급격한 각도를 보이는 독도 경사면과 해수가 접하는 지점에서 강우, 태풍, 상시 발생하는 해무, 해양 반사광으로 인한 건조, 토양 염분조절을 담당하는 염생식물의 성장과 사멸로 인해 해안식물 근권 염분농도의 변화가 극심한 환경(Choo *et al.*, 2009)에 적합하도록 호염성 세균들이 적응해 온 결과로 생각된다. Fig. 2의 phylogenetic tree에 표시된 이들 4균주와 상동성이 가장 높은 표준균주(type strain)는 모두 암염, 소금사막, 바다에서 분리된 호염성 신종세균으로 보고 되었다(Ivanova *et al.*, 2000; Kaye *et al.*, 2004; Anan'ina *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2013). 그러나 신종보고 혹은 분류학적 계통관계에 관한 기초적 연구 이후 이들 호염성 세균에 대해 거의 연구된 바가 없다. 독도 특유의 가파른 지형에 의해 독도의 식생은 해수와 바로 접해 있으며, 종종 발생하는 높은 풍속으로 인한 풍랑으로 경사가 완만한 일반적 해안가보다 염분의 유입이 극심하다. 분리된 균주들이 해양환경에서 분리된 균이기는 하나, 본 연구의 샘플링 시점이 여름철 태풍이 지나간 이후 1주일이 지난 시점에서 실시되었으며, 태풍 이후 풍랑이 발생할만한 날씨변화가 없었던 점을 감안할 때 분리된 4종의 고호염균은 단순히 해수에만 존재하는 것이 아니라 토양에서 정주가 가능한 것으로도 볼 수 있으며, 이들이 독도의 해안식물 근권에서 정주하면서 식물과 긍정적 상호작용을 할 가능성이 높은 것으로 예측된다. 따라서 이들이 식물과 관련하여 구체적으로 어떠한 긍정적 역할을 수행하는지에 대한 후행 연구가 필요하다.

적 요

독도의 해안에 군락을 이룬 해안식물 근권에서 호염성 및 염 내성을 가지는 세균의 분리를 위해 3종의 해안식물의 군락을 선정 후 각 식물의 근집 하부에서 토양시료를 채취하였다. 시료는 marine broth 한천배지를 이용하여 형태학적인 구분을 통해 순수분리 되었다. 분리된 161개 세균들을 NaCl 9.0% 농도로 조정된 배지에서 생존하는 26개 균주를 선발하여 genomic DNA를 얻은 후, 16S rRNA gene sequence를 증폭하여 부분동정 하였다. 이들의 유연관계 확인을 위해 계통수를 작성한 결과, 이들은 각각 Firmicutes (30.8%), Gamma proteobacteria (53.8%), Bacteroidetes (7.7%), Alpha proteobacteria (7.7%), Actinobacteria (7.7%)에 속하였으며, 이는 기존의 독도 토양 및 해수 미생물상 연구와 특징적 차이를 보인다. 또한, 분리된

세균의 종 조성도 기존 독도 토양 및 해양연구와 유의적으로 상이함을 보였다. 이에 더하여 선발된 26개 균주들 중에서 4균주가 12.0% 이상의 염농도에서 성장하였으며, 이들 중에서 3개 균주가 15.0% 이상의 염농도에서 성장하여 극호염성의 특성을 나타내었으며, 광범위한 염분농도에서도 성장하는 특성을 보였다. 이들은 해안식물 근권에서 독도 특유의 고염분 및 염분변화라는 환경적 스트레스를 극복하며 해안식물과 어떠한 상호작용을 하는 것으로 생각된다.

감사의 말

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

References

- Amann, R.L., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Anan'ina, L.N., Plotnikova, E.G., Gavrish, Elu, Demakov, V.A., and Evtushenko, L.I. 2007. *Salinicola socius* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a naphthalene-utilizing microbial association. *Mikrobiologiya* **76**, 369-376.
- Baati, H., Guermazi, S., Gharsallah, N., Sghir, A., and Ammar, E. 2010. Microbial community of salt crystals processed from Mediterranean seawater based on 16S rRNA analysis. *Can. J. Microbiol.* **56**, 44-51.
- 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.
- Cho, B.C. and Azam, F. 1988. Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature* **332**, 441-443.
- Choo, Y.S. 2009. Chapter IV. Soil environment of Dokdo island. pp. 108-127, Natural heritage of Korea, Dokdo. Research Institute for Ulleungdo & Dokdo Islands of Kyungpook Nat'l Univ. S.Korea
- Cottrell, M.T. and Kirchman, D.L. 2000a. 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.
- Cottrell, M.T. and Kirchman, D.L. 2000b. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5116-5122.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.

- 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.
- Grand, W.D. and Larsen, H.** 1989. Extremely halophilic archaeobacteria. Order halobacteriales ord. nov., pp. 2216–2233. In Pfennig, N. (ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol 3. Willans and Kilkins. Baltimore.
- Ham, M.S., Park, Y.M., Sung, H.R., Ryu, C.M., Park, S.H., Sumayo, M., and Ghim, S.Y.** 2009. Characterization of *Rhizobacteria* isolated from Family Solanaceae plants in Dokdo Island. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 110–117.
- Ivanova, E.P., Romanenko, L.A., Chun, J., Matte, M.H., Matte, G.R., Mikhailov, V.V., Svetashev, V.I., Huq, A., Mangel, T., and Colwell, R.R.** 2000. *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 901–907.
- Javor, B.J.** 1984. Growth potential of halophilic bacteria isolated from solar salt environments: carbon sources and salt requirements. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 352–360.
- 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.
- Kang, S.M., Radhakrishnan, R., You, Y.H., Joo, G.J., Lee, I.J., Lee, K.E., and Kim J.H.** 2014. Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard plant growth. *Indian J. Microbiol.* **54**, 427–433.
- Kaye, J.Z., Márquez, M.C., Ventosa, A., and Baross, J.A.** 2004. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 499–511.
- Kim, B.S., Oh, H.M., Kang, H., Park, S., and Chun, J.** 2005. Archaeal diversity in the tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J. Microbiol.* **43**, 144–151.
- 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., et al.** 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.
- Kushner, D.J.** 1985. The halobacteriaceae. pp. 171–224. In the *Bacteria*. Vol. 8. Academic Press. New York, USA.
- 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.
- Lee, D.S., Kim, Y.S., Jeong, S.Y., Kang, C.K., and Lee, W.J.** 2008. Environmental characteristics and distributions of marine bacteria in the surface sediments of Kamak Bay in winter and summer. *J. Environ. Sci.* **17**, 755–765.
- Lee, J.S., Lim, J.M., Lee, K.C., Lee, J.C., Park, Y.H., and Kim, C.J.** 2006. *Virgibacillus koreensis* sp. nov., a novel bacterium from a salt field, and transfer of *Virgibacillus picturae* to the genus *Oceanobacillus* as *Oceanobacillus picturae* comb. nov. with emended descriptions. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 251–257.
- 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.
- Lu, J., Nogi, Y., and Takami, H.** 2001. *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the *Iheya Ridge*. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**, 291–297.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, C.T., Saxman, P.R., Stredwick, J.M., Garrity, G.M., Li, B., Olsen, G.J., Paraniik, S., et al.** 2000. The RDP (Ribosomal Database project) continues. *Nucleic Acids Res.* **28**, 173–174.
- 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.
- Miao, C., Jia, F., Wan, Y., Zhang, W., Lin, M., and Jin, W.** 2013. *Halomonas huangheensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline-alkali soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 915–920.
- Na, J.M., Kang, M.S., Kim J.H., Jin, Y.X., Je, J.H., Kim, J.B., Cho, Y.S., Kim, J.H., and Kim, S.Y.** 2011. Distribution and identification of halophilic bacteria in solar salts produced during entire manufacturing process. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 133–139.
- Park, H.S. and Jeong, M.J.** 1996. Isolation and identification of an extremely halophilic bacterium from solar salt. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 671–677.
- Porcel, R., Zamarreño, Á.M., García-Mina, J.M., and Aroca, R.** 2014. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. *BMC Plant Biol.* **25**, 14–36.
- Saitou, N. and Nei, M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Seo, S.T., Kim, K.H., Kim, M.J., Hong, J.S., Park, J.H., and Shin, S.C.** 2009. Diversity of fungal endophytes from *Pinus koraiensis* leaves in Korea. *Korean J. Mycol.* **37**, 108–110.
- Seo, Y., Kim, M., You, Y.H., Yoon, J.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.
- Shin, H.T., Park, S.J., Kang, K.H., and Yoo, J.H.** 2004. The establishment of conservation area and conservation strategy in Ulnung island (II)-flora and management in Dokdo island, South Korea. *Korean J. Environ. Ecol.* **18**, 221–230.
- Siddiquee, M.A., Chauhan, P.S., Anandham, R., Han, G.H., and Sa, T.** 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.
- Simbert, R.M. and Kreig, N.R.** 1981. General characterization. pp. 409-443. Manual of methods for general bacteriology. American society for Microbiology. Washington, D.C., USA.
- 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.
- VijayAnand, S., Hemapriya, J., Selvin, J., and Kiran, S.** 2010. Production and optimization of haloalkaliphilic protease by an extremophile *Halobacterium* sp. JS1, isolated from thalassohaline environment. *Global J. Biotech. Biochem.* **5**, 44-49.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Teng, J.L., 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.
- 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.* **55**, 1833-1837.
- Yoon, J.H., Lee, S.T., and Park, Y.H.** 1998. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Norcardioides* and related taxa based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 187-194.
- 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**, 1549-1556.
- You, Y.H., Yoon, H.J., Kim, H., Lim, S.H., Shin, J.H., Lee, I.J., Choo, Y.S., and Kim, J.G.** 2013. Plant growth-promoting activity and genetic diversity of endophytic fungi isolated from native plants in Dokdo Islands for restoration of a coastal ecosystem. *J. Life Sci.* **23**, 95-101.
- You, Y.H., Yoon, H.J., Lee, G.S., Woo, J.R., Shin, J.H., Lee, I.J., Rim, S.O., Choo, Y.S., and Kim, J.G.** 2011b. Diversity and plant growth-promotion of endophytic fungi isolated from the roots of plants in Dokdo Islands. *J. Life Sci.* **21**, 992-996.
- You, Y.H., Yoon, H.J., Woo, J.R., Seo, Y.G., Kim, M., Choo, Y.S., and Kim, J.G.** 2011a. Plant growth-promoting activity of endophytic fungi isolated from the roots of native plants in Dokdo Islands. *J. Life Sci.* **21**, 1619-1624.