

# 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 장관의 배양 및 비배양 방법에 의한 세균의 다양성

김아란 · 김도형\*

부경대학교 수산생명의학과

## Diversity of Cultured and Uncultured Bacteria in the Gut of Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Ahran Kim and Do-Hyung Kim\*

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

We determined the optimal culture conditions for obtaining the maximum number of intestinal bacteria from the olive flounder *Paralichthys olivaceus*, and studied bacterial diversity using both culture-dependent and culture-independent methods. Using six culture conditions, mean bacterial numbers were greater than  $10^6$  per gram of gut mucus, regardless of the medium. However, the bacterial diversity, based on colony morphology, appeared much higher on Marine agar (MA) and Zobell 2216 agar than on other media. We found eight and 17 cultured bacterial phylotypes with 99% minimum similarity in gut mucus grown on MA and tryptic soy agar, respectively. Furthermore, we used genomic DNA extracted from gut mucus to generate 78 random clones, which were grouped into 25 phylotypes. Of these, six were affiliated with Firmicutes, Actinobacteria, and Verrucomicrobia, and were not found using our culture-dependent methods. Consequently, we believe that Marine agar and Zobell 2216 agar are optimal media for culturing diverse intestinal microbes; we also discovered several novel sequences not previously recognized as part of the gut microbiota of olive flounder.

Key words: Olive flounder, Microbial diversity, 16S rRNA gene, Fish disease, Intestine

### 서 론

동물의 장관에 서식하고 있는 고유한 장내미생물의 대부분은 숙주에 유익한 영향을 미치거나 무해하다. 일반적으로 장내미생물은 장관으로 침입하는 병원체로부터 숙주를 보호하며, 섭취된 음식으로부터 영양성분과 에너지를 얻고 정상적인 면역 기능을 수행하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Sonnenburg et al., 2005; Candela et al., 2008; Fukuda et al., 2011; Olszak et al., 2012; Yatsunenکو et al., 2012). 최근 장내미생물이 숙주의 체중 증가 또는 비만에 미치는 영향을 이해하기 위한 연구가 많이 진행되고 있다(Ley et al., 2006; Angelakis et al., 2012). 또한 차세대 염기서열 분석방법을 이용한 장내 미생물 생태계의 특징과 이해를 위한 연구가 매우 활발히 수행되고 있지만(Eckburg et al., 2005), 아직도 많은 부분이 이해되지 않고

있다. 사실 어류에서도 장내미생물의 중요성이 점점 인식되고 있지만, 사람이나 다른 포유동물에 비해서는 그와 관련된 연구가 매우 드문 편이다(Gatesoupe, 2010). 다른 동물과 마찬가지로 장내 마이크로바이옴이 어류에 미치는 영향을 이해하기 위해서는 어떤 종류의 고유한 미생물이 어류의 장관 내에 서식하는지를 이해하는 것이 우선시 되어야 할 것이다. 그럼에도 불구하고 우리나라 최대 양식어종인 넙치의 장내세균의 다양성에 관한 연구는 매우 제한적이다(Sugita et al., 2002; Sugita and Ito, 2006; Kim and Kim, 2013). 이번 연구의 목적은 배양되는 넙치 장내미생물 다양성 이해를 위한 최적의 배양조건을 탐색하고, 그 조건에 따른 미생물 다양성을 비교하며 16S rRNA gene clone library를 제작하여 비배양 의존적 방법을 이용한 미생물의 다양성을 이해하고자 하였다.

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0447>



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.

Korean J Fish Aquat Sci 48(4) 447-453, August 2015

Received 9 July 2015; Revised 31 July 2015; Accepted 4 August 2015

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5945 Fax: +82. 51. 629. 5938

E-mail address: dhkim@pknu.ac.kr

## 재료 및 방법

### 넙치 장관으로부터 배양되는 세균의 분리 및 계수

이번 연구에서는 배합사료만 급여한 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*) ( $n=10$ ; 평균 체중=100 g)를 사용하였다. 배양되는 세균의 분리를 위해서 넙치 5마리로부터 무균적으로 장관을 적출해 세로방향으로 길게 잘라 배설물과 유사한 장 내용물을 제거한 후 장 점액만을 1.5 mL microcentrifuge tube에 모았다. 이를 멸균 생리식염수에 균질화한 후 단계희석( $10^2$ 과  $10^3$ )하여, 0.5%의 NaCl이 첨가된 brain heart infusion agar [BHIA(0.5)], 1.5%의 NaCl이 첨가된 BHIA [BHIA(1.5)], 1.5%의 NaCl과 0.3%의 yeast extract가 첨가된 tryptic soy agar (TNY), Marine agar (MA), Zobell 2216 agar (ZA)와 thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS)에 100  $\mu$ L를 도말한 후 25°C에서 배양하였다. 7일 후에 배지에 자란 세균 집락을 계수하였고, 집락의 성장과 그람 염색을 통해 배양되는 세균의 다양성을 측정하였다. 구분된 각각의 세균들을 순수 분리하여 tryptone soya broth (TSB; Oxoid)에 배양 후 glycerol을 첨가하여 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

### 세균의 genomic DNA 분리

Marine agar와 TNY (1.5%의 NaCl과 0.3%의 yeast extract가 첨가된 TSA)에서 분리된 세균들을 25°C에서 24시간 동안 배양한 이후 3,000 g에 10분 동안 원심분리 한 후 genomic DNA를 추출하는데 사용하였고, 16S rRNA gene clone library 제작을 위해 5마리의 넙치의 장점액으로부터 DNA를 분리하였다. DNA 분리에는 DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen)가 사용되었으며 제조사의 실험 방법을 따랐다.

### Polymerase chain reaction (PCR)

각 분리균주와 장점액으로부터 추출한 DNA를 Table 1에 제시된 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. PCR의 조건은 다음과 같이 수행하였다; 94°C에서 3분 동안 initial denaturation을 수행하고, 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분의 과정을 30회 반복한 후, 72°C에서 7분간 final extension하였다. 증폭 산물은 ethidium bromide (1 ng/mL)가 첨가된 1% (w/v) agarose gel 상에서 전기영동하여 분석하였다.

### 16S rRNA clone library 제작

장점액으로부터 추출한 DNA를 9F와 1492R primer (Table 1)를 사용하여 PCR로 증폭시켰다. 정제된 PCR product를 pGEM®-T vector (Promega)와 *E. coli* XL1-blue를 이용하여 클로닝하였다. DNA농도는 insert:vector가 3:1의 비율이 되도록 32.5 ng/ $\mu$ L로 조정하였다. 2× Rapid Ligation Buffer 5  $\mu$ L, pGEM®-Teasy Vector (50 ng) 1  $\mu$ L, T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, PCR product 2  $\mu$ L와 11  $\mu$ L의 멸균 MilliQ water를 넣은 혼합물을 4°C에 overnight 하였다. Positive control로 insert DNA를 2  $\mu$ L를 넣어 사용하였다. 각 ligation reaction의 2  $\mu$ L를 멸균 microcentrifuge tube에 넣고, 50 또는 100  $\mu$ L (positive control의 경우)의 competent cell을 tube에 옮겨 20분 동안 얼음 위에 꽂아 둔 후, 42°C로 맞춰진 항온수조에 1분 동안 heat shock을 주었다. 이후 즉시 얼음위로 옮겨 2분 동안 반응을 정지 시켰고, 950 또는 900  $\mu$ L의 SOC 배지를 첨가한 후 37°C에서 1.5시간 동안 진탕배양하였다(~150 rpm). 이후 세포들을 1,000 g에 10분 동안 원심분리하여 집균하였고, 200  $\mu$ L의 SOC 배지에 재현탁하여 그 중 100  $\mu$ L를 ampicillin (최종농도 100  $\mu$ g/ $\mu$ L, Sigma), 100  $\mu$ L의 100 mM IPTG와 20  $\mu$ L의 X-gal이 미리 도말된 LB (Luria-Bertani) agar에 도말하였고 2반복으로 수행하였다. 37°C, 암실에서 24시간 동안 배양한 후 자란 흰색 집락만을 selection하여 24시간 LB broth에 배양한 이후 plasmid DNA를 AccuPrep® Plasmid mini extraction kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 제조사의 절차에 따라 분리하였다.

### 염기서열 분석

배양된 세균과 insertion을 가진 plasmid DNA의 정제된 PCR product의 sequencing reaction은 이전에 서술되었던 것과 같이 Big Dye Terminator cycle sequencing kit와 ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 수행하였다(Han et al., 2011). DNA sequence의 quality 확인을 위하여 Bioedit (version 7.0.9.0)과 Genetyx version 7.0.3 packed program (Software Development Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 또한, 16S ribosomal DNA clone library의 염기서열은 online tool인 DECIPHER (Wright et al., 2012)를 사용하여 chimeric construct의 유무를 확인하였고, 3'과 5' 말단에 있는 부정확한 염기서열 또한

Table 1. Primers used for PCR and sequencing in this study

Primer designation	Sequence (5'→3')	Use(s)	Reference(s)
9F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	Cloning	Lane (1991)
1492R	GG(C/T)TACCTTGTTACGACTT		
63F	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	Sequencing	Marchesi et al. (1998)
1387R	GGGCGG(A/T)GTGTACAAGGC		

제거하였다. 1% 이하의 염기서열 상동성을 가진 경우 동일한 phylotype (operational taxonomic units)으로 간주하여 분석을 진행하였고, 각 phylotype과 가장 근접한 표준균주를 결정하기 위해 RDP SEQMATCH program (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) (Cole et al., 2013)을 이용하였다. 계통수 제작에는 ClustalX (version 1.83)와 MEGA6(Saitou and Nei, 1987; Tamura et al., 2011) 프로그램이 이용되었으며, Kimura-2-parameter distances에 기초하여 neighbor-joining tree를 만들었으며 1,000번의 re-sampling을 통해 bootstrap value를 결정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 넙치 장관의 배양되는 세균의 수

넙치 장점액 분리 후 단계 희석하여 BHIA (0.5), BHIA (1.5), TNY, MA, ZA, TCBS에 배양한 결과를 Table 2에 나타내었다. TCBS를 제외한 모든 배지에서  $10^4$ - $10^7$  CFU/g gut mucus의 세균이 배양되었으며, TCBS에서는  $7.3 \pm 8.8 \times 10^4$  CFU/g gut mucus으로 나타나 배양되는 세균 중에서 *Vibrio* 과에 속하는 세균이 많이 존재하고 있음을 확인 할 수 있었다(Table 2). 이 결과는 이전 넙치의 연구 결과(Kim and Kim, 2013)와 매우 유사하였다. Senegales sole *Solea senegalensis*의 장내세균은 MA에서  $2.3 \times 10^5$ - $6.7 \times 10^6$  CFU/g, TCBS에서  $5.0 \times 10^3$ - $3.9 \times 10^5$  CFU/g의 수로 배양되는 것으로 나타났으며(Martin-Antonio et al., 2007), 그 외 grouper *Epinephelus coioides* (Sun et al., 2009)와 rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Kim et al., 2007)도 약  $10^6$  CFU/g gut content로 나타나 어종이나 서식지와 관계없이 배양되는 세균의 수는 유사한 것으로 나타났다. 그러나 이번 연구결과와 같이 이전 연구에서도 넙치의 개체에 따라 배양되는 세균의 수에 큰 차이가 났는데 일부 개체에서  $10^8$  CFU/g 이상의 세균이 분리되기도 하였다(Sugita et al., 2002; Sugita and Ito, 2006). Sugita and Ito (2006)의 연구에서는 배지의 구성 성분이 장내세균의 배양에 영향을 미칠 수 있음을 의미하나, 이번 연구에서는 TCBS를 제외한 다양한 배지에

서 배양되는 세균의 수에 큰 차이가 나지 않아 넙치 장내세균의 배양에 배지성분이 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다.

#### 넙치 장관의 배양되는 세균 종

넙치의 장내세균의 다양성에 관한 이전 연구가 존재하지만 매우 드물다(Sugita and Ito, 2006; Kim and Kim, 2013). 이번 연구에서는 6종류의 배지를 이용하여 넙치 장내세균의 다양성 연구에 최적의 배지를 탐색하고자 하였으며, 그 중 4종류의 배지에서 관찰된 결과를 Table 3에 나타내었다. 분별된 세균 집락의 종류는 Marine agar와 Zobell 2216 agar에서 가장 많았으며, 개체에 따라 서로 1 또는 2개 정도의 차이 밖에 나지 않아 그 다양성은 유사하였다. BHIA와 TNY배지에서는 MA와 ZA와 달리 다양한 세균 집락이 배양되지 않았다. 유전적으로 99% 이상의 상동성을 가지는 경우 동일한 phylotype으로 간주하였을 때, TNY와 MA에서 각각 8과 17개의 phylotype이 나타났으며 그 결과를 Fig. 1에 계통수로 나타내었다. TNY 배지에서 분리된 8개의 phylotype은 모두 Proteobacteria 그룹에 포함되었으며, 이 중 6개가 Vibrionaceae, 나머지는 Rhodobacteraceae와 Flavobacteriaceae에 각각 속하였다(Fig. 1a). 이에 반해 MA 배지에서는 TNY에서보다 더 다양한 세균이 분리되었다(Fig. 1b). 17개의 분리된 세균 중 Proteobacteria 그룹에 속하는 phylotype은 12개로 우점적이었으며, Vibrionaceae와 Pseudoalteromonadaceae에 각각 4개와 2개의 phylotype이

Table 3. Differential colony counts appeared on varying media

Fish no.	Marine agar	Zobell 2216 agar	Brain heart infusion agar <sup>1</sup>	Tryptic soy agar <sup>2</sup>
1	10	10	5	6
2	2	3	1	2
3	6	5	3	3
4	7	6	2	2
5	10	8	2	2

<sup>1</sup>supplemented with 1.5% NaCl; <sup>2</sup> supplemented with 1.5% NaCl and 0.3% yeast extract

Table 2. Microbial colony counts of gut microbes grown on varying culture media

Fish no.	Bacterial counts on (CFU g <sup>-1</sup> gut mucus)					
	BHIA <sup>1</sup> (0.5)	BHIA <sup>1</sup> (1.5)	MA <sup>2</sup>	ZA <sup>3</sup>	TNY <sup>4</sup>	TCBS <sup>5</sup>
1	$1.8 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$1.23 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$	$3.4 \times 10^5$	$4.0 \times 10^3$
2	$9.5 \times 10^4$	$9.0 \times 10^4$	$3.1 \times 10^4$	$2.3 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$1.0 \times 10^4$
3	$1.4 \times 10^6$	$1.9 \times 10^6$	$8.3 \times 10^5$	$2.3 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$	$6.3 \times 10^4$
4	$1.7 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	$5.6 \times 10^6$	$1.7 \times 10^7$	$1.7 \times 10^7$	$4.4 \times 10^4$
5	$1.2 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$	$5.0 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$	$2.4 \times 10^5$
Mean count	$4.0 \pm 6.6 \times 10^6$	$3.4 \pm 5.1 \times 10^6$	$2.2 \pm 2.0 \times 10^6$	$5.1 \pm 6.0 \times 10^6$	$4.4 \pm 6.3 \times 10^6$	$7.3 \pm 8.8 \times 10^4$

<sup>1</sup>brain heart infusion agar supplemented with 0.5% or 1.5% NaCl; <sup>2</sup>marine agar; <sup>3</sup>Zobell 2216 agar; <sup>4</sup>tryptic soy agar supplemented with 1.5% NaCl and 0.3% yeast extract; <sup>5</sup>thiosulfate citrate bile salts sucrose agar

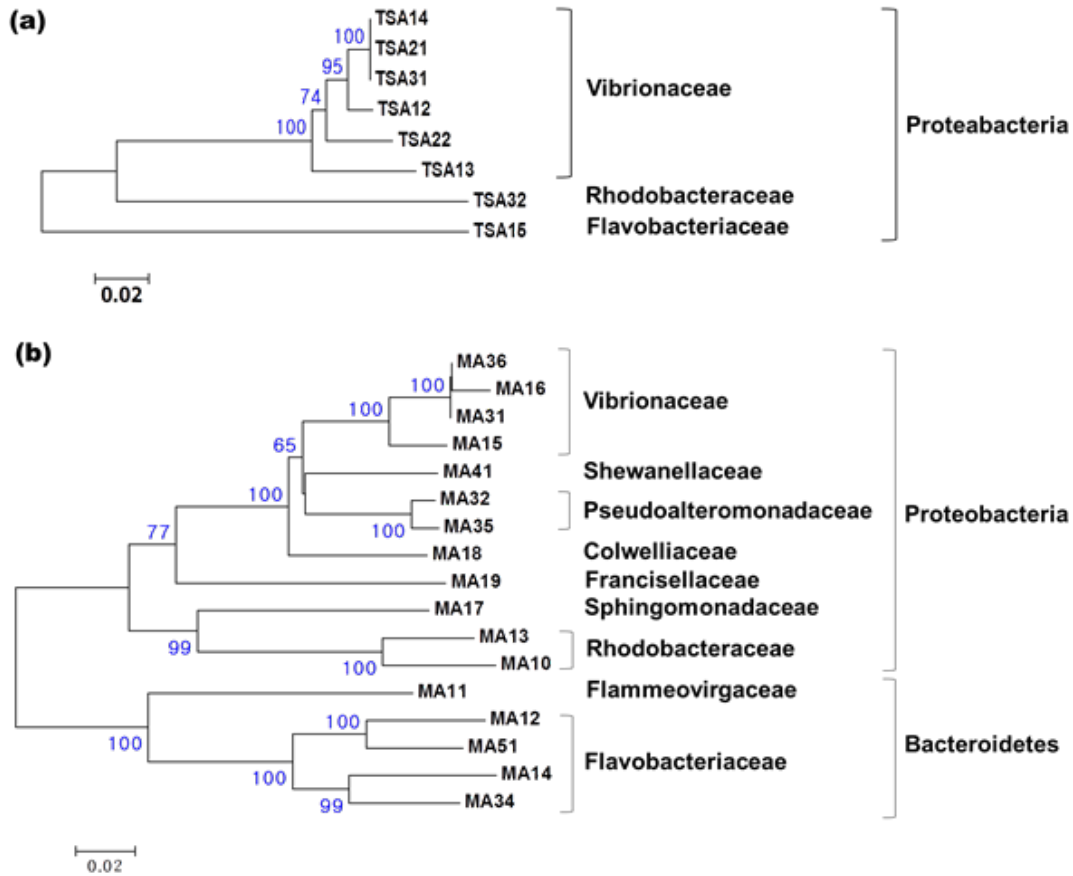


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree showing the relationship of 8 and 17 16S rRNA gene sequences of cultured bacteria grown on tryptic soy agar (supplemented with 1.5% NaCl and 0.3% yeast extract) (a) and on marine agar (b), respectively, retrieved from gut mucus of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Bootstrap values based on 1,000 re-samplings display the significance of the interior nodes, and are shown at branch points; only values displaying >50% are given. The scale bar represents a 2% estimated difference in nucleotide sequences.

포함되었고, Shewanellaceae, Colwelliaceae, Francisellaceae, Sphingomonadaceae, Rhodobacteraceae에 각각 하나의 phylotype이 속하였다. 나머지 5개의 phylotype은 TNY에서 배양된 세균에서는 관찰되지 않은 Bacteroidetes 그룹에 속하였으며, 이 중 4개와 1개의 phylotype이 각각 Flavobacteriaceae와 Flammeovirgaceae에 포함되었다. 일반적으로 TNY와 BHIA, nutrient agar는 기본 영양 배지로 세균 배양 시 많이 사용되지만, 배양되는 장내세균의 다양성 연구에는 Marine agar 또는 Zobell 2216 agar가 가장 적합한 것을 확인하였다.

#### 16S rRNA gene clone library의 염기서열 분석으로 확인된 세균 종

이번 연구에서는 총 78개 clone의 염기서열을 분석하여 25개의 phylotype을 얻었으며 가장 근접한 세균 종(기존의 염기서열이 밝혀진 표준균주)의 결과를 Table 4에 나타내었다. 결론적으로 clone library에서 도출된 많은 염기서열은 이전에 어류의 장내세균으로는 알려지지 않은 새로운 세균 종의 서열임이 드

러났다. 이 25개의 phylotype은 Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria 및 Verrucomicrobia에 속하였으며, phylotype의 대부분(약 76%)이 Proteobacteria로 가장 많은 비율을 차지하였다(Fig. 3). Proteobacteria 그룹 중에서는 Vibrionaceae가 가장 우점적(약 55%)이었으며, 다음으로 Rhodobacteraceae, Moraxellaceae가 각각 약 19%와 12%의 비율을 차지하였다(Fig. 3). 이외에도 Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Moraxellaceae, Methylococcaceae, Comamonadaceae, Sphingomonadaceae에 속하는 세균들이 분리되었다(Fig. 2 and Table 4). 양식산과 자연산 넙치 장관의 세균 다양성을 조사한 연구에서 각각 38개와 47개의 phylotype이 분리되었고 Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria와 Bacteroidetes 그룹에 속하였다(Kim and Kim, 2013). 이 중 Proteobacteria가 양식산 어류에서 60.5%, 자연산 어류에서는 51.1%로 가장 우점적이었으며, 이번 연구에서처럼 Vibrionaceae가 가장 높은 비율을 차지하였다(Kim and Kim, 2013).



Table 4. Representative sequences of a clone library isolated from the intestinal mucus of farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus*

	Phylogenetic group	Code	Closest type strain (determined by RDP SEQMATCH)	Identity (%)	Length (bp)	no. of clones	Accession no.
Actinobacteria	Propionibacteriaceae	8EP-73	<i>Propionibacterium acnes</i> ; ATCC6919; AB042288	99.9	1488	6	KT275137
	Cytophagaceae	8EP-75	<i>Hymenobacter soli</i> ; PB17; AB251884	97.4	1477	1	KT275139
Bacteroidetes		8EP-57	<i>Polaribacter dokdonensis</i> ; DSW-5; DQ004686	95.0	1487	2	KT275143
	Flavobacteriaceae	8EP-58	<i>Persicivirga dokdonensis</i> ; DSW-6; DQ017065	98.0	1489	1	KT275144
		8EP-60	<i>Gilvibacter sediminis</i> ; Mok-1-36; AB255368	91.5	1489	3	KT275148
	Carnobacteriaceae	8EP-28	<i>Granulicatella elegans</i> ; DSM 11693; AF016390	98.7	1514	1	KT275156
Firmicutes	Streptococcaceae	8EP-24	<i>Lactococcus plantarum</i> ; DSM 20686; EF694029	99.5	1512	1	KT275153
	Peptoniphilaceae	8EP-77	<i>Fingoldia magna</i> ; CCUG 17636; AF542227	99.2	1486	1	KT275140
Proteobacteria	Moraxellaceae	8EP-34	<i>Acinetobacter guillouiae</i> ; DSM 590; X81659	98.0	1502	7	KT275159
	Pseudomonadaceae	8EP-74	<i>Pseudomonas oleovorans</i> ; RS1; DQ842018	99.2	1559	1	KT275138
		8EP-70	<i>Pseudomonas japonica</i> ; IAM 15071; AB126621	99.5	1500	1	KT275147
	Vibrionaceae	8EP-25	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> ; DSM 14397T; AJ421445	99.5	1510	14	KT275154
		8EP-5	<i>Photobacterium damsela</i> ; NCIMB 2058; X78105	97.9	1528	2	KT275152
		8EP-16	<i>Photobacterium damsela</i> ; ATCC33539; AB032015	99.9	1515	15	KT275133
		8EP-37	<i>Aliivibrio fischeri</i> ; ATCC774T; X74702	99.9	1516	1	KT275134
	Enterobacteriaceae	8EP-45	<i>Escherichia/Shigella flexneri</i> ; X96963	99.5	1504	1	KT275135
		8EP-49	<i>Serratia liquefaciens</i> ; CIP 103238T; AJ306725	99.4	1503	1	KT275145
	Comamonadaceae	8EP-68	<i>Hydrogenophaga atypica</i> ; BSB 41.8; AJ585992	92.2	1499	2	KT275146
Methylococcaceae	8EP-55	<i>Methylobacter luteus</i> ; NCIMB 11914; AF304195	89.5	1501	1	KT275141	
Sphingomonadaceae	8EP-27	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> ; IFO 15102; D13728	98.8	1450	1	KT275155	
Pelobacteraceae	8EP-62	<i>Pelobacter acidigallici</i> ; DSM 2377T; X77216	83.7	1486	1	KT275150	
Rhodobacteraceae	8EP-46	<i>Roseovarius halocynthiae</i> ; MA1-10; HQ852039	96.3	1423	2	KT275136	
	8EP-61	<i>Phaeobacter arcticus</i> ; 20188; DQ514304	98.9	1423	9	KT275149	
Verrucomicrobia	Puniceococcaceae	8EP-56	<i>Puniceicoccus vermicola</i> ; IMCC1545; DQ539046	87.2	1503	1	KT275142
	Verrucomicrobiaceae	8EP-32	<i>Rubritalea spongiae</i> ; YM21-132; AB297805	93.8	1494	2	KT275157

이번 연구에서는 *Vibrio ichthyoenteri*와 *Photobacterium damsela*와 같은 어류 병원체가 매우 높은 비율(각각 14/78개와 15/78개의 clone)로 분리되었다. 일반적으로 이러한 병원체들은 어류의 장관에서 분리·배양된다는 이전의 연구 결과(Sugita and Ito, 2006)와 일치함을 보여주며, 어류의 장관에 존재하다가 면역력이 약해진 틈을 타서 체내에 침투하는 것으로 생각된다.

Actinobacteria에 속하는 6개의 clone은 모두 Propionibacteriaceae의 *Propionibacterium acnes*로 확인되었고, Firmicutes 그룹에서는 3개의 clone이 각각 Carnobacteriaceae, Streptococcaceae, Peptoniphilaceae에 속하였다. 그 외 Bacteroidetes에는 Cytophagaceae와 Flavobacteriaceae, Verrucomicrobia에는 Puniceococcaceae와 Verrucomicrobiaceae에 속하는 세균이 확인되었다.

이상의 결과를 종합해 본 결과 넙치의 배양되는 세균의 다양

성 연구에는 Marine agar 또는 Zobell 2216 agar가 가장 적합한 것으로 나타났다. 그러나 배양 의존적인 방법은 특별한 배양 환경 및 조건이 요구되어 배양이 까다로운 미생물이거나 절대 혐기성 미생물의 배양이 배제되기 때문에 한계가 있다(Asfie et al., 2003). 이번 연구에서는 5마리의 넙치를 배양되는 세균과 또 다른 5마리의 넙치를 clone library 제작에 사용하여 배양 의존적인 방법과 비배양 의존적인 방법의 결과를 직접적으로 비교하는 것은 의미가 없다. 그렇지만 clone library에서 더 많은 phylotype이 도출되었고 이들 중 많은 염기서열이 이전 연구결과에서 드러나지 않았던 새로운 종임이 밝혀졌으므로 최신의 배양 비의존적 방법은 미생물의 다양성 연구에 매우 유용한 것임을 다시 한 번 확인할 수 있었다. 최근 들어 차세대 염기서열 분석방법(next-generation sequencing)을 적용한 다양한 연구가 진행되고 있어 이 기술을 적용한 어류의 장관세균 다양성 및 기능성 연구가 필요할 것으로 생각된다.

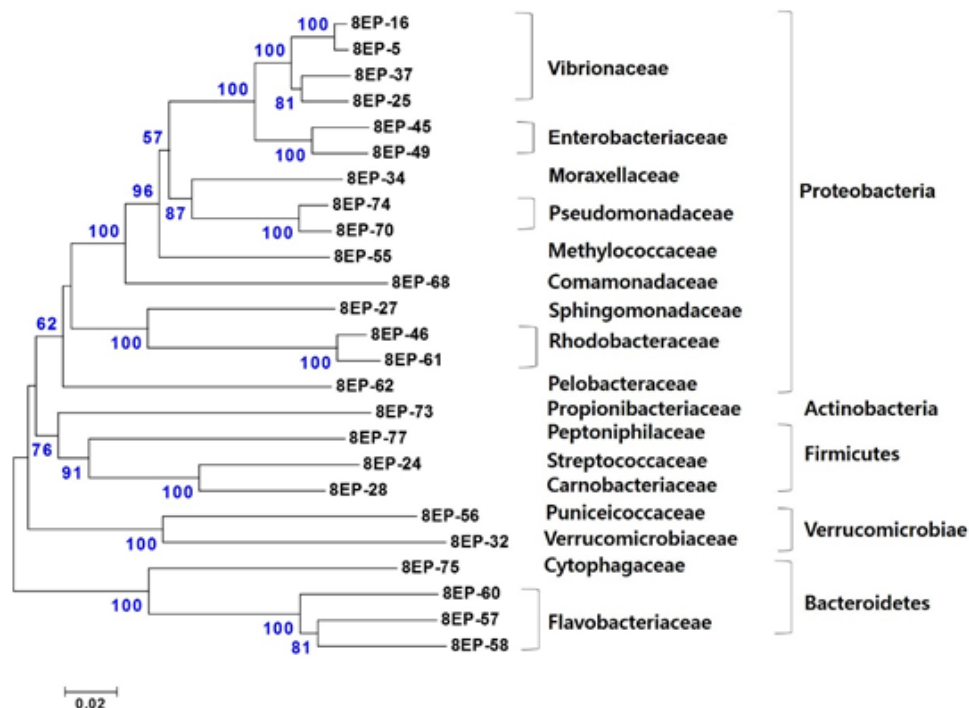


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree showing the relationship of 25 16S rRNA gene sequences derived from gut mucus (clone library). Bootstrap values based on 1,000 re-samplings display the significance of the interior nodes, and are shown at branch points; only values displaying >50% are given. The scale bar represents a 2% estimated difference in nucleotide sequences.

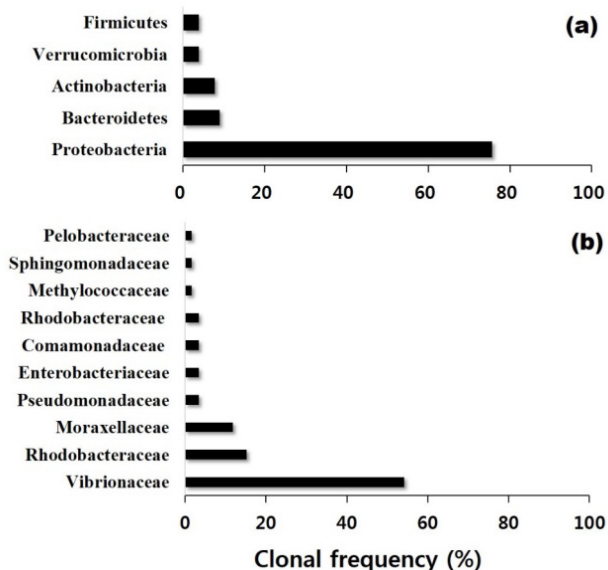


Fig. 3. Clonal frequency of microbial phylogenetic groups in a 16S rRNA gene clone library established using PCR amplification, cloning, and sequencing of 16S rRNA genes extracted from the gut mucus of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. (a) phylum-level microbial composition; (b) family-level microbial composition of Proteobacteria.

사 사

이 논문은 부경대학교 자율창의기술연구비(2014년)에 의하여 연구되었습니다.

References

Angelakis E, Armougom F, Million M and Raoult D. 2012. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol* 7, 91-109. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.11.142>.

Asfie M, Yoshijima T and Sugita H. 2003. Characterization of the goldfish fecal microflora by the fluorescent in situ hybridization method. *Fish Sci* 69, 21-26. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00583.x>.

Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M and Brigidi P. 2008. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol* 125, 286-292. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.012>.

Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR and Tiedje JM.

2013. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucl Acids Res* 42,633-642. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1244>.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE and Relman DA. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635-1638. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1110591>.
- Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Toppng DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M and Ohno H. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543-547. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09646>.
- Gatesoupe FJ. 2010. Probiotics and other microbial manipulations in fish feeds: prospective health benefits. In: *Bioactive foods in promoting health: probiotics and prebiotics*. Watson W and Preedy V R, eds. Academic Press, San Diego, U.S.A., 541-552.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp* 41, 95-98.
- Han HJ, Kim DY, Kim WS, Kim CS, Jung SJ, Oh MJ and Kim DH. 2011. Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in the black rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf, in Korea. *J Fish Dis* 34, 47-55. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01217.x>.
- Kim DH, Brunt J and Austin B. 2007. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Microbiol* 102, 1654-1664. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03185.x>.
- Kim DH and Kim DY. 2013. Microbial diversity in the intestine of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 414, 103-108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.008>.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt E. and Goodfellow M, eds, Academic Press, Chichester, UK, 115-175.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S and Gordon JI. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023. <http://dx.doi.org/10.1038/4441022a>.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ and Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64, 795-599.
- Martin-Antonio B, Manchado M, Infante C, Zerolo R, Labella A, Alonso C and Borrego JJ. 2007. Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. *Aquacult Res* 38, 1213-1222. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01790.x>.
- Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, Glickman JN, Siebert R, Baron RM, Kasper DL and Blumberg KR. 2012. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336, 489-493. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1219328>.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method-a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Sonnenburg J L, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weath-erford J, Buhler JD and Gordon JI. 2005. Glycan foraging *in vivo* by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* 307, 1955-1959. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1109051>.
- Sugita H, Okano R, Suzuki Y, Iwai D and Kanagawa F. 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fish Sci* 68, 1004-1011. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00525.x>
- Sugita H. and Ito Y. 2006. Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. *Lett Appl Microbiol* 43, 336-342. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01943.x>.
- Sun Y, Yang H, Ling Z, Chang J and Ye J. 2009. Gut microbiota of fast and slow growing grouper *Epinephelus coioides*. *Afr J Microbiol Res* 3, 713-720.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731-2739. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
- Wright ES, Yilmaz LS and Noguera DR. 2012. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 78, 717-725. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.06516-11>.
- Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominquez-Bello MG, Contreras M, Margris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R and Gordon JI. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222-227. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11053>.