

Phylogenetic Diversity and Community Analysis of Marine Bacteria Associated with *Ulva pertusa*

Ha-Ri Choi¹, So-Hyun Park¹, Dong-Hwi Kim¹, Ji-Young Kim² and Moon-Soo Heo^{1*}

¹Department of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Research institute for basic science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Received June 3, 2016 / Revised June 20, 2016 / Accepted July 7, 2016

The present study was done to assess the diversity of the bacterial community associated with *Ulva pertusa* collected from Jeju Island using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) marker analysis. For RFLP analysis, a total of 145 bacterial strains associated with *Ulva pertusa* were screened and cultivated using Marine agar and R2A agar. The PCR amplicons of the 16S rRNA gene from all the isolated strains were digested with *HaeIII* and *RsaI* restriction enzymes and then classified into different groups according to their restriction patterns. Strains selected based on the RFLP patterns showed more than 91% 16S rRNA gene sequence similarity when compared with known bacterial species, which include 4 phyla - proteobacteria (alpha-proteobacteria, beta-proteobacteria, gamma-proteobacteria - 63%), firmicutes (11%), actinobacteria (4%), bacteroidetes (22%) - as well as 7 classes (actinobacteria, flavobacteriia, cytophagia, bacilli, α -proteobacteria, γ -proteobacteria, β -proteobacteria), 13 orders, 18 families, and 27 genera. These results confirmed a wide diversity of bacterial communities as contrasted with other regions. The newly isolated 10 strains, which show 16S rRNA sequence similarity of <97% compared to previously identified bacteria, could be noble species. Further experiments, such as morphological, physiological, and biochemical classification, are necessary to confirm the novelty of the newly isolated 10 strains.

Key words : Bacterial community, phylogenetic, RFLP analysis, *Ulva pertusa*, 16S rRNA

서 론

해조류는 연안지역 생태계에 중요한 역할을 하며, 표면은 미생물이 서식할 수 있는 장소가 되고[2, 3, 12, 14, 36], 표면에 서식하는 미생물은 해조류와 상호작용을 하여 긍정적인 효과를 가져온다[5].

갈파래과에 속하는 구멍갈파래는 단독 또는 2-3가닥씩 무리를 형성하고 10-30 cm 또는 그 이상 자라며 최근 제주도 해안에서 우점하여 대량 번식하는 종으로 해안경관을 망치고 있으며, 인력과 비용문제로 인해 처리에 문제가 되고 있다[11, 15, 17]. 이러한 문제로 구멍갈파래에 관심이 집중되고 있으며 구멍갈파래의 추출물로부터 생리활성물질 연구가 진행되고 있다[23-25]. 최근 제주해양수산자원연구소는 폐기물인 구멍갈파래를 전복사료로 사용하여 자원으로써 이용할 수 있는 방법을 연구 중이다[15].

미생물 중 다양성분석에 이용되는 분자생물학적 방법으로

는 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 등이 있다[4, 6, 28, 31, 35]. RFLP는 제한효소를 이용하여 rRNA 단편을 잘라 패턴을 분석하는 방법이다. 실험방법이 간편하고 신속하며, 사용하는 제한효소 종류에 따라 패턴이 다르므로 미생물의 속과 종의 구분에 이용되고 있다[13, 26, 33].

본 연구에서는 현재 제주연안에 문제가 되고 있는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)에서 서식하는 세균을 탐색하기 위해 분리·배양하고 2종(*HaeIII*, *RsaI*)의 제한효소를 이용한 RFLP 분석과 16S rRNA를 비교하여 세균의 다양성을 파악하고자 한다.

재료 및 방법

시료채집 및 세균분리

본 연구에서 사용한 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)는 제주도 제주시 조천 신흥리에서 채집하였다. 채집한 구멍갈파래는 멸균된 핀셋을 이용하여 지퍼백에 담아 운반하여 실험에 사용하였다.

채집한 구멍갈파래는 인공해수로 1회 세척한 후, 잘게 잘라

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-756-3493

E-mail : msheo@jeju.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.

멸균한 0.85% NaCl 30ml에 넣어 homogenizer로 약 3시간 동안 균질화 하였다. 균질화한 시료를 연속희석방법으로 희석한 후, Marine Agar (MA, Difco, USA)배지와 R2A Agar (Difco, USA)배지에 도말 하여 25°C에 일주일 동안 배양하였다. 각 배지에 자라난 Colony를 모양, 크기, 색깔 등 형태적 특징에 따라 선별하여 순수분리 하였다. 분리된 균주는 -80°C에 20%(v/v) Glycerol로 동결 보관하였다.

DNA 추출 및 PCR

순수분리한 균주는 2.5% Chelex (Chelex® 100 Molecular Biology Grade Resin, BIO-RAD, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 2.5% Chelex에 분리 균주를 넣고 95°C에 5분 동안 반응시킨 후 4°C에 보관하여 사용하였다.

PCR을 하기 위해 27 Forward (5'-AGAGTTTGATCTGGC TCAG-3') primer와 1522 Reverse (5'-AAGGAGGTGATCCA GCCGCA-3') primer를 사용하였다. AccuPower™ PCR Pre-Mix (Bioneer, USA)에 DNA 1 µl를 첨가한 후 최종부피 25 µl로 맞추어 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 Initial denaturation 5분, 94°C에서 Denaturation 1분, 55°C에서 Annealing 1분, 72°C에서 Extention 1분을 30 cycle 수행한 후 72°C Final extention 10분간 PCR (Base for Gene Pro Thermal cyler, BIOER) 조건하에 실시하였다. 증폭된 PCR product는 1% agarose에서 전기영동(Mupid®-ex, ADVANCE) 하여 확인하였다.

RFLP 분석

RFLP을 위해 제한효소 *Hae*III (Ezymomics, Korea)와 *Rsa* I (Ezymomics, Korea)를 사용하였다. 증폭된 PCR산물 10 µl, 제한효소 1 µl, EZ Buffer IV 2 µl, 멸균 증류수 7 µl를 넣은 후 최종부피 20 µl로 맞추어 37°C에서 2시간 30분 반응시켰다. 반응물 20 µl을 2.5% agarose에 loading하여 50 vol에 4시간 동안 전기영동 하였다. UV로 관찰하여 총 145 균주의 PCR-RFLP 패턴을 비교하였다. RFLP 패턴결과 균주를 선정하여 (주)제노텍(Daejeon, Korea)에 16S rRNA 염기서열을 분석하였다.

분리 균주의 계통학적 분석

분석한 염기서열을 EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)[16]에서 유사한 염기서열과 비교하고, 가장 가까운 속 또는 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 본 연구에서 결정된 염기서열과 EzTaxon-e 에서 나타난 염기서열의 multiple alignment정렬은 Mega 6.0 software [29]에 포함된 Clustal X [30]프로그램을 이용하였다. Tree topology의 작성은 Jukes and Cantor (1969) 방법으로 계산하고 neighbor-joining 방법으로 작성하였다. Tree topology의 신뢰성 평가를 위해 1,000 회의 replication을 적용한 bootstrap 분석[21]을 하였다.

결과 및 고찰

순수분리 및 RFLP 분석

형태적 특징에 따라 분리된 배양 가능한 세균은 MA배지에서 82개의 균주와 R2A배지에서 63개의 균주로 총 145개의 균주가 분리되었다. MA배지에서 분리한 82개의 균주를 두 종류의 제한효소를 이용한 결과, *Hae*III에서는 39 type, *Rsa* I에서는 36 type이 관찰되었다. R2A배지에서 분리한 63개의 균주는 *Hae*III에서는 32 type, *Rsa* I에서 33 type이 관찰되었다(Fig. 1).

염기서열 분석 및 계통학적 분석

RFLP 분석에 의해 총 104개의 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 EzTaxon-e 를 이용하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하고, 계통수를 작성하였다(Fig. 2).

구멍갈파래에서 분리한 104개의 균주는 27속 50종으로 동정되었다. Proteobacteria 그룹은 기존에 보고된 염기서열과 95.60-100%의 상동성을 나타내었다. M64와 M80은 *Alteromonas litorea* TF-22^T와 97.42%, 97.39%의 유사도를 나타내고, M117은 *Octadecabacter temperatus* SB1^T와 97.81%의 상동성을 보여주었다. M87은 *Alteromonas mediterranea* DE^T와 97.44%의 유사도를 나타내었고, M66, M84은 각각 *Paracoccus homiensis* DD-R11^T, *Leisingera daeponensis* TF-218^T와 97.49%와 97.15%의 상동성을 보여주었다. M102은 *Paraglaucicola aquimarina* GCW-M5^T와 95.60%의 낮은 유사도를 나타내었다.

Firmicutes 그룹에 속해 있는 균주는 모두 기존에 보고된 염기서열과 99.21-99.73%의 상동성을 보여주며, Actinobacteria 그룹은 98.38-99.65%의 유사도를 나타내었다. Bacteroidetes 그룹에 속하는 균주는 91.09-99.93%의 상동성을 보여주며, 그 중 *Flavobacterium* 속은 낮은 유사도를 나타내었다. R11은 *Flavobacterium jumunjinense* HME 7102^T와 95.94%의 상동성을 보이고 R39는 *Flavobacterium omnivorum* JCM 11313^T와 97.10%의 유사도를 나타내었다. R54, R91, R92는 *Flavobacterium pectinovorum* DSM 6368^T와 각각 97.19%, 97.12%, 97.25%의 상

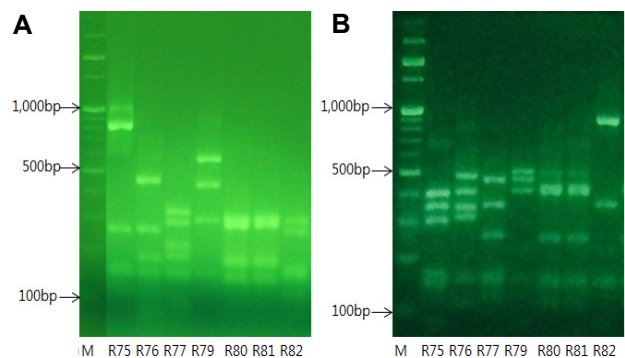


Fig. 1. Representative agarose gel electrophoresis patterns of *Hae*III (A) and *Rsa* I (B) digested amplified 16S rRNA genes of bacterial strains isolated from *U. pertusa*.

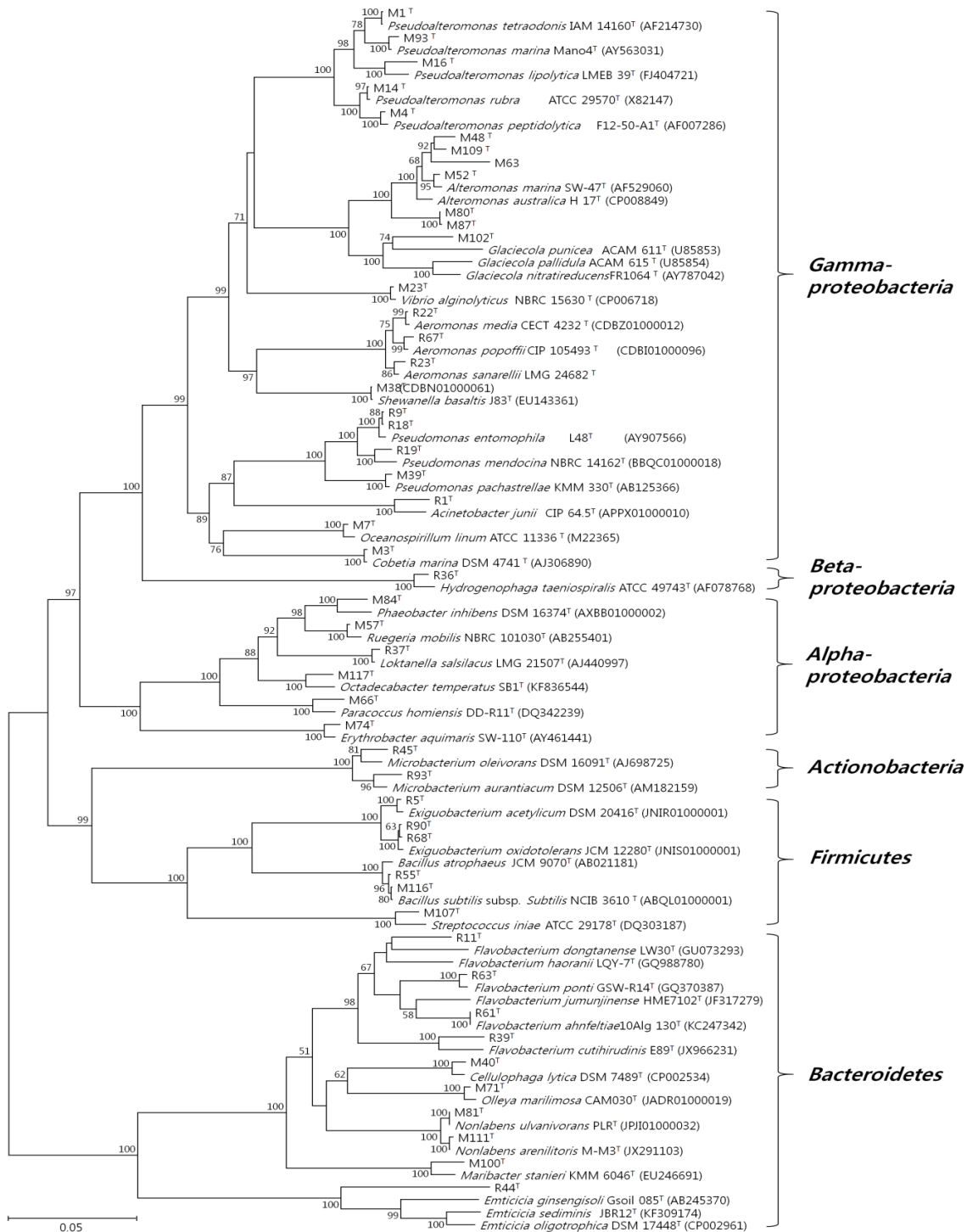


Fig. 2. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rRNA gene sequences of bacteria isolated from *Ulva pertusa* and some other related taxa. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bootstrap values (>50%) based on 1,000 replications are shown. Bar 0.05 nucleotide substitutions per nucleotide position.

동성을 보여주었다. 이와 같이 16S rRNA 유전자 염기서열과 비교한 104개의 균주 중 10개의 균주는 표준균주와 유전자 염기서열이 97% 이하의 유사도를 보여 신종 후보 균주임을 알 수 있다. 따라서 앞으로 표준균주와 함께 신종 실험이 진행

되어야 할 것으로 판단된다.

16S rRNA gene 염기서열로 세균군집 다양성을 분석하고 계통수를 작성하였다. 그 결과, 구멍갈파래의 세균 군집구조는 Proteobacteria (Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria,

Gamma-proteobacteria), Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes로 4개의 문, 7개의 강, 13개의 목, 18개의 과, 27개의 속으로 구성되었다. 그 중 Proteobacteria 문의 Alpha-proteobacteria 강은 2개의 목, 2개의 과 6개의 속으로 Gamma-proteobacteria 강은 5개의 목, 9개의 과, 10개의 속으로 Bacteroidetes 문은 2개의 강, 2개의 목, 2개의 과, 6개의 속으로 구성된 분류군이 나타났다(Table 1).

구멍갈파래의 분류군은 *Flavobacterium* 12%, *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas* 각각 10%, *Pseudomonas* 8%, *Aeromonas*, *Microbacterium* 각각 6%, *Vibrio*, *Bacillus*, *Exiguobacterium* 각각 4%, *Hydrogenophaga*, *Cellulophaga*, *Nonlabens*, *Maribacter*, *Olleya*, *Lacihabitans*, *Streptococcus*, *Ruegeria*, *Loktanella*, *Paracoccus*, *Leisingera*, *Octadecabacter*, *Erythrobacter*, *Cobeta*, *Oceanospirillum*, *Paraglaciecola*, *Shewanella*, *Actinbacter* 각각 2%로 구성되었다(Fig. 3).

Proteobacteria 분류군은 Alpha-proteobacteria 22%, Beta-proteobacteria 4%, Gamma-proteobacteria 37%에 속하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 *Ulva* sp.에는 Gamma-proteobacteria가 우점한다는 결과와 일치한다[5, 7-9, 34]. 따라서 *Ulva* sp.에서는 Proteobacteria와 Bacteroidetes가 우점하여 나

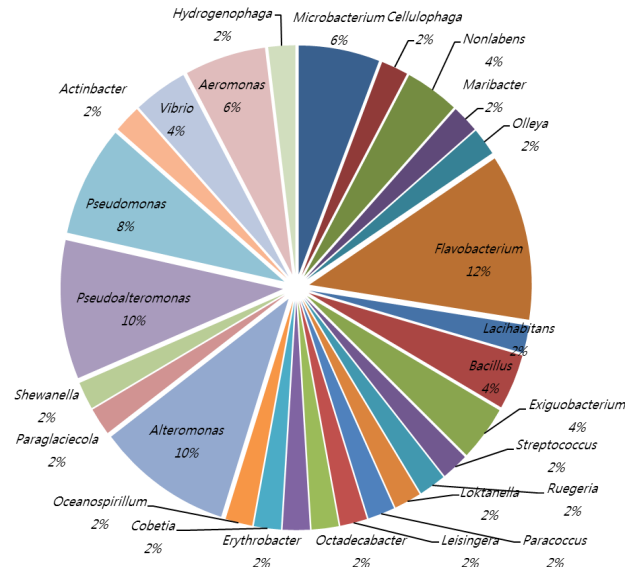


Fig. 3. Pie-diagram showing various genus of bacterial isolates from *Ulva pertusa*.

타난 것을 알 수 있었으며 이러한 결과는 대부분의 해양환경에서 Proteobacteria와 Bacteroidetes가 우점으로 존재한다는 결

Table 1. Bacterial diversity associated with *Ulva pertusa*

Phylum	Class	Order	Family	Genus
Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Microbacterium
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Cellulophaga Nonlabens Maribacter Olleya Flavobacterium Lacihabitans
Firmicutes	Cytophagia	Cytophagales	Leadbetterella	Bacillus
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
			Exiguobacteriaceae	Exiguobacterium
		Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
Proteobacteria	α -proteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Ruegeria Loktanella Paracoccus Leisingera Octadecabacter Erythrobacter
	β -proteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	Erythrobacter
	γ -proteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Hydrogenophaga
		Oceanospirillales	Halomonadaceae	Cobeta
			Oceanospirillaceae	Oceanospirillum
		Alteromonadales	Alteromonadaceae	Alteromonas Paraglaciecola Shewanella
			Shewanellaceae	Shewanella
			Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas
		Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
			Moraxellaceae	Actinbacter
		Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio
		Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas

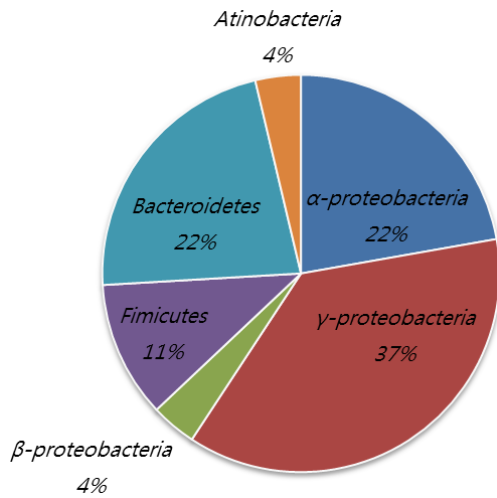


Fig. 4. Pie-diagram showing structure and the diversity of bacterial community of *Ulva pertusa*.

과와 일치한다[1, 10].

그리고 호주에서 채집한 *Ulva* sp.에서는 Proteobacteria (Alpha-proteobacteria, Gamma-proteobacteria)와, Bacteroidetes로 2개의 문에 속하는 그룹이 보고되었으나[34], 본 연구에서는 Proteobacteria (Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gammaproteobacteria), Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes로 4개의 문에 속하는 그룹이 확인되었다(Fig. 4). 이러한 결과와 비교하면 공통적으로 나타난 Proteobacteria (Alpha-proteobacteria, Gamma-proteobacteria), Bacteroidetes의 2개의 문을 제외하고는 세균의 군집구조가 서로 다르며, *U. pertusa*에서 더 다양한 세균의 군집구조를 확인 할 수 있다. 이러한 결과는 배양조건과 환경 등에 따라 세균군집이 달라지는 연구와 일치한다고 볼 수 있다[19, 20].

그리고 *Ulva* sp.에서 분리한 균주의 항균효과에 대한 연구 결과로 볼 때[18], *U. pertusa*에서 분리한 균주도 가능성이 있다고 보며, 추후 분리된 균주로부터 항균실험이 진행되어야 된다고 생각되며, 우리나라에서 해조류에 대한 군집구조의 연구는 적기 때문에 이와 관련하여 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

References

- Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glockner, F., Wille, A. and Psenner, R. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of high mountain lake by in situ hybridization. *Appl.*

- Environ. Microbiol.* **62**, 2138-2144.
- Beleneva, I. A. and Zhukova, N. V. 2006. Bacterial communities of some brown and red algae from peter the great bay, the sea of Japan. *Microbiology* **75**, 348-357.
- Bolinches, J., Lemos, M. L. and Barja, J. L. 1988. Population dynamics of heterotrophic bacterial communities associated with *Fucus vesiculosus* and *Ulva rigida* in an estuary. *Microb. Ecol.* **15**, 345-357.
- Brim, H., Heuer, H., Krögerrecklenfort, E., Mergeay, M. and Smalla, K. 1999. Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil. *Can. J. Microbiol.* **45**, 326-338.
- Burke, C., Thomas, T., Lewis, M., Steinberg, P. and Kjelleberg, S. 2011. Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *ISME J.* **5**, 590-600.
- Diez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T. L. and Massana, R. 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2942-2951.
- Dobretsov, S. V. and Qian, P. Y. 2002. Effect of bacteria associated with the green alga *Ulva reticulata* on marine micro- and macrofouling. *Biofouling* **18**, 217-228.
- Egan, S., Holmström, C. and Kjelleberg, S. 2001. *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1499-1504.
- Egan, S., Thomas, T., Holmström, C. and Kjelleberg, S. 2000. Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environ. Microbiol.* **2**, 343-347.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glöckner, F. O. and Amann, R. 2000. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3044-3051.
- Han, J. G., Ha, J. H., Choi, Y. B., Go, J. L., Kang, D. H. and Lee, H. Y. 2009. The Comparison of extraction process for enhancement of immunomodulating activities of *Ulva pertusa kjellman*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **41**, 380-385.
- Jensen, P. R., Kauffman, C. A. and Fenical, W. 1996. High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Mar. Biol.* **126**, 1-7.
- Jeong, E. J., Im, C. S. and Park, J. S. 2010. A comparison of bacterial diversity associated with the sponge *Spirastrella abata* depending on RFLP and DGGE. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 366-374.
- Jones, C. G., Lawton, J. H. and Shachak, M. 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* **69**, 373-386.
- Kim, J. D., Yoon, Y. H., Shin, T. S., Kim, M. Y., Byun, H. S., Oh, S. J. and Seo, H. J. 2011. Bioethanol production from seaweed *Ulva pertusa* for environmental application. *KSBB J.* **26**, 317-322.
- Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H. and Won, S. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 716-721.

17. Ko, H. J., Kim, G. B., Lee, D. H., Lee, G. S. and Pyo, H. B. 2013. The effect of hydrolyzed Jeju *Ulva pertusa* on the proliferation and type I collagen synthesis in replicative senescent fibroblasts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **39**, 177-186.
18. Kumar, V., Rao, D., Thomas, T., Kjelleberg, S. and Egan, S. 2010. Antidiatom and antibacterial activity of epiphytic bacteria isolated from *Ulva lactuca* in tropical waters. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 1543-1549.
19. Li, Z., He, L. and Miao, X. 2008. Cultivable bacterial community from South China Sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. *Curr. Microbiol.* **55**, 465-472.
20. Muscholl-Silberhorn, A., Thiel, V. and Imhoff, J. F. 2008. Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean Sea. *Microb. Ecol.* **55**, 94-106.
21. Park, S. H., Kim, J. Y., Kim, Y. J. and Heo, M. S. 2015. *Flavobacterium jejuensis* sp. nov., isolated from marine brown alga *Ecklonia cava*⁸. *J. Microbiol.* **53**, 756-761.
22. Patel, P., Callow, M. E., Joint, I. and Callow, J. A. 2003. Specificity in the settlement-modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha*. *Environ. Microbiol.* **5**, 338-349.
23. Pengzhan, Y., Ning, L., Xiguang, L., Gefei, Z., Quanbin, Z. and Pengcheng, L. 2003. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacol. Res.* **48**, 543-549.
24. Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Chen, R., Zhang, H., Niu, X. and Li, Z. 2005. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*. *Int. J. Biol. Macromol.* **37**, 195-199.
25. Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Hu, R., Zhang, K. and Li, Z. 2006. *In vitro* antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 2441-2445.
26. Rohit, A., Maiti, B., Shenoy, S. and Karunasagar, I. 2016. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Indian J. Med. Res.* **143**, 72-78.
27. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
28. Smit, E., Leeflang, P. and Wernars, K. 1997. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**, 249-261.
29. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipitski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729.
30. Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
31. Tiedje, J. M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T. L. and Flynn, S. J. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* **13**, 109-122.
32. Tujula, N. A., Crocetti, G. R., Burke, C., Thomas, T., Holmström, C. and Kjelleberg, S. 2010. Variability and abundance of the epiphytic bacterial community associated with a green marine *Ulva* alga. *ISME J.* **4**, 301-311.
33. Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K. and Ohwada, K. 1997. 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family Vibrionaceae. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**, 125-132.
34. Vairappan, C. S. and Suzuki, M. 2000. Dynamics of total surface bacteria and bacterial species counts during desiccation in the Malaysian sea lettuce, *Ulva reticulata* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycological Res.* **48**, 55-61.
35. Widjoatmodjo, M. N., Fluit, A. C. and Verhoef, J. 1994. Rapid identification of bacteria by PCR-Single-Strand conformation polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 3002-3007.
36. Wiese, J., Thiel, V., Nagel, K., Staufenberger, T. and Imhoff, J. F. 2009. Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea. *Mar. Biotechnol.* **11**, 287-300.

초록 : 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)에 서식하는 해양세균의 계통학적 다양성 및 군집구조 분석

최하리¹ · 박소현¹ · 김동휘¹ · 김지영² · 허문수^{1*}

(¹제주대학교 해양의생명과학부, ²제주대학교 기초과학연구소)

이 논문은 제주도에서 채집한 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)를 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)를 이용하여 세균군집을 조사하였다. RFLP 분석을 위해 Marine agar배지와 R2A배지를 사용하여 145개의 군주가 분리되었으며, 제한효소 *Hae*III와 *Rsa* I 을 이용하여 서로 다른 RFLP 패턴을 구분하였다. RFLP 패턴 결과로부터 군주를 선별하여 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과, 알려진 군주의 염기서열과 91% 이상의 유사도를 보였다. 주요 계통군은 Proteobacteria (Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria) (63%), Bacteroidetes (22%), Firmicutes (11%), Actinobacteria (4%)로 4개의 문이 관찰되었고, 7개의 강, 13개의 목, 18개의 과, 27개의 속으로 관찰되었다. 계통학적 분석 결과, 상동성이 97% 미만으로 나타난 10군주가 새로운 속이나 종으로 분류될 가능성이 높게 나타났으며, 신종 후보 군주에 대한 형태학적, 생리학적, 생화학적 등 분류·동정을 위한 추가적인 실험을 수행해야 할 것이다.