

Article

토판염전 결정지 내 세균군집의 계통학적 다양성 및 Culturomics법을 이용한 고도 호염균의 분리

조건영¹ · 한송이¹ · 황경숙^{1,2*}

¹목원대학교 미생물나노소재학과, ²목원대학교 미생물생태자원연구센터

Phylogenetic diversity of bacterial communities in a gray solar saltern and isolation of extremely halophilic bacteria using culturomics

Geon-Yeong Cho¹, Song-Ih Han¹, and Kyung-Sook Whang^{1,2*}

¹Department of Microbial & Nano Materials, College of Science & Technology, Mokwon University, Daejeon 35349, Republic of Korea

²Institute of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University, Daejeon 35349, Republic of Korea

(Received March 8, 2017; Revised March 25, 2017; Accepted March 25, 2017)

In this study, we investigated the phylogenetic diversity of the bacterial community and isolation of extremely halophilic bacteria using culturomics in a gray solar saltern. The number of bacterial living cells, enumerated in a gray solar saltern by direct fluorescence microscopy was three to four orders of magnitude greater than those enumerated by plate counts, suggesting the distribution of 'viable but non-culturable bacteria'. The biodiversity of bacterial communities in a gray solar saltern was investigated by pyrosequencing, 1,778 OTUs of bacteria were comprised of 18 phyla 46 classes 85 orders 140 families 243 genera with 6.16 diversity index. Archaea communities were composed of 3 phyla 6 classes 7 orders 7 families 38 genera with 4.95 diversity index from 643 OTUs. Totally 137 isolates were isolated by 59 different cultural methods based on culturomics considering culture media and conditions suitable for the growth of extremely halophilic bacteria. Phylogenetic analyses of extremely halophilic isolates based on 16S rRNA gene sequences, extremely halophilic isolates were composed of 4 phyla and 11 genera. *Haloterrigena* and *Haloferax* can be successfully isolated from culturomics. These culturomics were effective methods for collection of diversity of extremely halophilic bacteria.

Keywords: culturomics, extremely halophile, gray solar saltern, pyrosequencing

호염성 미생물은 소금호수, 염전, 해양 등 염분 함량이 높은 자연 환경에서 다양하게 존재하고 있으며, Bacteria, Archaea 및 Eucarya의 모든 계통군에서 발견되고 있다. 호염성 세균의 경우, *Proteobacteria*를 비롯한 *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Flavobacterium-Cytophaga* 및 *Bacteroidetes* 등의 계통군이 보고되었으며, archaea 영역은 *Euryarchaeota* 외에 *Nanoarchaeota* 등이 분리 보고되었다 (Oren, 2008; Ventosa *et al.*, 2015). 고염 환경에서 생육하는 대표적인 Eucarya는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Aspergillus nidulans* 그리고 *Rhodotorula mucilaginosa* 등이 보고되었다 (Andre *et al.*, 1988; Blomberg *et al.*, 1992; Oren 1999; Almagro *et al.*, 2000; Blomberg, 2000).

호염성 미생물은 계통학적 다양성뿐만 아니라 광합성대사, 탈질능, 황산염환원 그리고 메탄/메틸영양체 등 독특한 대사 다양성이 보고되면서 생물축매에 대한 산업적 연구도 수행되고 있다 (Pfluger *et al.*, 2003; Saum *et al.*, 2009; Pastor *et al.*, 2013). 염내성 amylase와 nuclease, protease의 개발 (Kamekura, 1986)과 더불어 호염성 세균이 생산하는 β -carotene은 항산화

*For correspondence. E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr;
Tel.: +82-42-829-7593; Fax: +82-42-829-7598

제와 식품 색소제(Ben-Amotz and Avron, 1989) 등 다양한 바이오산업 분야에서 응용되면서 호염성 세균 다양성 확보를 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

천일염은 염전에 사용한 바닥소재에 따라 장판염, 타일염 그리고 토판염으로 구분된다. 장판염은 가소성소재를 이용한 장판 바닥에서 생산된 천일염이다. 토판염은 갯벌을 단단하게 다진 결정지 판위에 여러 단계의 증발지를 거쳐 염분이 고농도로 농축된 함수를 가두어 증발시켜 소금을 생산하는 천일염으로, 소금 결정이 형성될 때 주성분인 NaCl 뿐만 아니라 갯벌 유래 다양한 무기성분이 함유되어 있는 특징을 나타내고 있다 (Park et al., 2000; Lee et al., 2007).

지금까지 천일염 유래 호염성 미생물의 군집구조 해석, 호염성 미생물의 분리 및 배양 그리고 생화학적 특성 규명 등 미생물학적 안전성 및 산업화와 관련하여 활발하게 연구는 주로 국내 장판염전을 중심으로 수행되어 왔다 (Park et al., 2005; Kim, 2015; Koh et al., 2015). 해수유래 미생물과 갯벌(토양) 유래 미생물이 공존하고 있는 토판염전의 특수한 생태계 내 미생물군집 특성에 관한 정보는 매우 미흡한 형편이다. 본 연구에서는 해수를 끌어올려 6단계의 증발지를 거쳐 고농도 함수를 증발시킨 후 소금을 생산하는 토판염전 결정지의 토양생태계에 분포하는 세균군집구조를 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing techniques; NGS) 분자기법을 이용하여 계통해석하고, 고도 호염성 세균 생육에 적합한 다양한 배양배지와 배양 조건을 적용한 대규모 배양법인 culturomics법(Lagier et al., 2012)으로 고도 호염성 세균 다양성을 확보하여 생명연구 자원으로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 채취

시료채취는 전라남도 신안군 신의도(34°34'4.61"N 126°05'2.15"E) 토판염 염전에서 토판염 생산기인 하절기 8월에 수행하였다. 갯벌을 단단하게 다진 토판염전 결정지의 5~10 cm 깊이에서 토양을 채취하였다. 채취한 토양시료는 polyethylene vinyl에 넣어 4°C에 보존한 후 48시간 이내에 실험하였다.

전세균수 측정

전세균수 측정을 위해 DNA에 친화성이 높은 ethidium bromide (EtBr)를 이용하였다. 토판염전 결정지 시료는 20% NaCl를 첨가한 식염수에 첨가하여 현탁하고 현탁액 200 μ l를 0.2 μ m nucleopore filter가 장착된 funnel에 여과한 0.01% 농

도로 조제된 EtBr을 첨가하여 3분간 염색한 후 형광현미경(Nikone ECLIPSE 80i, Nikone Co.) 하에서 주황색 형광빛을 띄는 세포수를 계수하였다. 세포수는 20개 시야에서 관찰·계수하여 평균값을 구하였다(Whang et al., 2003).

직접검경법에 의한 생균수 측정

직접 현미경 관찰을 통한 생균수 측정을 위해 CFDA (6-carboxyfluoresceindiacetate) 형광염색액을 이용하였다. 토판염전 결정지 시료는 20% NaCl를 첨가한 식염수에 첨가하여 현탁하고 현탁액 200 μ l에 2% CFDA를 1 μ l 첨가하여 30°C에서 1시간 반응하였다. 반응액 400 μ l을 0.2 μ m nucleopore filter가 장착된 funnel에 흡입여과한 후 형광현미경(Nikon ECLIPSE 80i, Nikon Co.)하에서 관찰하였다. 형광염색액 CFDA (6-carboxyfluoresceindiacetate) 분자가 세포 내 esterase에 의해 CF (6-carboxyfluorescein) 분자로 분해되어 녹색형광빛을 띄는 원리를 이용하여 생세포와 사세포를 구분하여 계수하였다. 생균수는 20개 시야에서 관찰·계수하여 평균값을 구하였다(Whang et al., 2003).

희석평판법에 의한 생균수 측정

배양법에 의한 생균수 측정을 위해 토판염전 결정지 시료를 멸균수에 순차적으로 희석한 후 marine broth agar (MA; Difco)에 3%, 10%, 25% NaCl를 각각 첨가한 배지에 100 μ l씩 도말평판법을 이용하여 접종하였다. 모든 시료는 37°C에서 7일 배양하면서 평판상에 형성된 colony수를 측정하였다.

직접 DNA 추출 및 파이로시퀀싱

토판염전 결정지 시료로부터 genomic DNA 추출은 Jiang 방법(Jiang et al., 2011)을 이용하여 직접 DNA를 추출하였다. 파이로시퀀싱 분석을 위해 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)을 이용하여 genomic DNA의 16S rRNA 유전자를 증폭하였다.

세균 16S rRNA 유전자의 정방향 primer는 V1-9F (5'-GAG TTTGATCMTGGCTCAG-3'), 역방향 primer는 V3-541R (5'-WTTACCGCGGCTGCTGG-3')을 사용하였다. Archaea는 20F (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCRG-3')와 516R (5'-GGTDTT ACCGCGGCKGCTG-3') primer를 사용하였다(Weisburg et al., 1991; DeLong, 1992; Qian et al., 2011). 증폭된 PCR 산물은 아가로스겔 전기영동을 통하여 약 500 bp 크기의 밴드를 확인한 후 QIAquick gel extraction kit (QIAGEN)로 정제하였다. 정제한 DNA는 Chunlab Inc.에 의뢰하여 454 GS FLX Titanium Sequencing System (Roche)을 이용한 파이로시퀀싱을 수행하였다.

염기서열 분석

토관염전 결정지 시료로부터 얻어진 염기서열 데이터는 CLcommunity™ 소프트웨어(Chun *et al.*, 2010)를 이용하여 염기서열의 adaptor와 PCR primer 부위를 제거하고 Mothur 프로그램 (version 1.23.1)을 이용하여 분석하였다(Schloss *et al.*, 2009). 낮은 품질의 염기서열과 키메라는 PyroNoise algorithm (Quince *et al.*, 2011)과 UCHIME를 이용해서 제거하였다(Cole *et al.*, 2009; Edgar *et al.*, 2011). 최종 얻어진 서열들은 97% 유사성을 기반으로 OTUs (operational taxonomic units)를 결정하였다. 풍부도 지수(Chao1, ACE), 종 다양성 지수(Shannon) 등은 CD-HIT 프로그램을 이용하였다(Shanon *et al.*, 2003; Li and Godzik, 2006).

Culturomics법을 이용한 고도 호염성 세균 분리

토관염전 결정지 토양 시료를 5 g씩 정량하여 45 ml의 멸균수를 넣고 homogenizer (Nikon Seiki Co.)로 15,000 rpm에서 2분간 분산시킨 다음 초음파기(VCX750; SONIC Vibra-Cell)로 30 W에서 2분간 분산 처리하고 9 ml의 멸균수에 순차적으로 희석하였다.

다양한 고도 호염성 세균 분리를 위해 다양한 배양배지 및 배양 조건을 적용한 대규모 배양방법인 Culturomics법을 이용하였다. 고도 호염성 세균 생육용 배지는 25% NaCl를 첨가한 marine broth (MB; Difco), 259-Halobacterium medium [259HM (DSMZ-97)] (250 g crude solar salts, 7.5 g casamino acid, 10 g Yeast extract, 3 g trisodium citrate, 2 g potassium chloride, 20 g magnesium sulfate, 0.05 g ferrous sulfate, 0.002 g manganese sulfate), Halobacterium medium (HM) (250 g crude solar salts, 20 g magnesium sulfate, 5 g potassium chloride, 5 g tryptone, 0.2 g calcium chloride), KCCM-Halobacterium medium (KCCM) (250 g crude solar salts, 20 g magnesium sulfate, 5 g potassium chloride, 5 g tryptone, 5 g Yeast extract, 0.2 g calcium chloride), NaCl Tri-Na-citrate (NT) 배지(250 g crude solar salts, 20 g magnesium sulfate, 10 g Yeast extract, 3 g tri-sodium citrate, 2 g potassium chloride) 그리고 NaCl Tryptone Yeast Extract (NTYE) 배지 (250 g crude solar salts, 20 g magnesium sulfate, 3 g Yeast extract, 5 g tryptone, 5 g potassium chloride)를 이용하였다(Elevi *et al.*, 2004; Braganca and Furtado, 2009; Salgaonkar *et al.*, 2011). 배양온도는 30°C, 37°C, 45°C 그리고 50°C 에서 4주간 각각 농화배양 하였다. 농화배양된 시료는 9 ml의 멸균수에 순차적으로 희석하고 25% NaCl을 첨가한 상기의 6가지 배지(MA, 259HM, HM, KCCM, NT, NTYE)에 도말접종하고

37°C, 45°C, 그리고 50°C 에서 10일~42일간 배양하면서 평판 배지 상에 형성된 세균 콜로니를 고도 호염성 세균으로 판정하고 순수분리 하였다.

고도 호염성 세균의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석

순수 배양된 단일 colony를 주형으로 사용하여 직접 PCR 증폭을 수행하였다. 세균의 경우, 27F (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-AAGGAGGTGATCC AGCCGC-3') primer를 이용하였으며, archaea의 경우, 18F (5'-ATTCCGGTTGATCCTGCC-3')과 1518R (5'-AGGAGG TGATCCAGCCGC-3') primer를 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭시켰다. PCR 반응조건은 Perkin Elmer (Gene Amp PCR system, Applied Biosystem)을 이용하여 94°C에서 2분간 반응 한 다음 94°C에서 denaturation 1분, 55°C에서 annealing 30 초, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 5분 간 final extension 하고, 4°C로 내려 종료하였다. 증폭된 PCR 반응물은 1% agarose gel (Agarose LE, Promega Co.)에서 전기영동하여 확인한 후, QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)으로 정제한 후 PCR product의 염기서열 분석을 수행하였다. 서열 정보는 DNA Star software를 이용하여 확인하고 16S rRNA 유전자 상동성은 ez-biocloud를 통해 계산하였다(<http://www.ezbiocloud.net/>).

결과 및 고찰

토관염전 결정지 내 세균 밀도

갯벌을 단단하게 다진 판 위에 여러 단계의 증발지를 거친 고농도 염분이 농축된 함수를 가두고 증발시켜 소금을 생산하는 토관염전 결정지는 해수유래 미생물과 갯벌(토양)유래 미생물이 공존 하고 있는 생태계이다. 본 연구에서는 토관염전 결정지에 서식하는 세균 밀도를 조사하였다. 전세균수(total direct count; TDC)는 핵산에 친화성이 가장 우수한 EtBr을 이용하여 결정지시료를 염색한 후 형광현미경하에서 직접 검정한 결과, 3.97×10^8 cells/g로 계수되었다. 생균수 측정법은 직접 검정법(direct viable counting; DVC)과 평판배지에서 배양을 통한 생균수 측정법(plate count; PC)으로 계수하였다. 직접검정법에 의한 생균수는 1.72×10^8 cells/g로 전세균수(TDC)의 43.3% 분포율을 나타내었다. 배양을 통한 생균수는 NaCl 3~10% 첨가한 경우, 5.5×10^4 CFUs/g로 계수되었으며, NaCl 20% 첨가하여 고도 호염균을 계수한 경우, 7.8×10^3 CFUs/g로

계수되어 직접 검경법에 비해 $10^3 \sim 10^4$ 적게 계수되었다(Fig. 1). 상기의 결과로부터 토판염전 결정지 내에는 현미경에서는 관찰되나 배양이 곤란한 세균(viable but non-culturable, VBNC)이 다수 존재해 있음으로 판단되었다.

토판염전 결정지 내 세균군집 계통해석

토판염전 결정지 내 배양이 어려운 난배양성세균을 포함한 세균군집의 계통해석을 위해 배양 비의존적 pyrosequencing 분자기법을 이용하여 분석하였다. 토판염전 결정지 토양 시료로부터 직접DNA를 추출하고 pyrosequencing 분석하여 세균 염기서열 6,838개 그리고 archaea 염기서열 11,847 개를 분석에 사용하였다. 각 염기서열을 유사도 97% 기준으로 cut-off하고 종 풍부도(richness estimator)와 다양성(diversity index)을 비교하였다. 토판염전 결정지 내 세균군집의 경우 1,778 OTUs, 다양성 지수 6.16로 나타났으며, archaea군집은 643 OTUs, 다양성 지수 4.95로 확인되었다(Table 1).

토판염전 결정지 시료로부터 확보된 세균 16S rRNA 유전자 염기서열을 RDP's pipeline를 이용하여 계통해석한 결과,

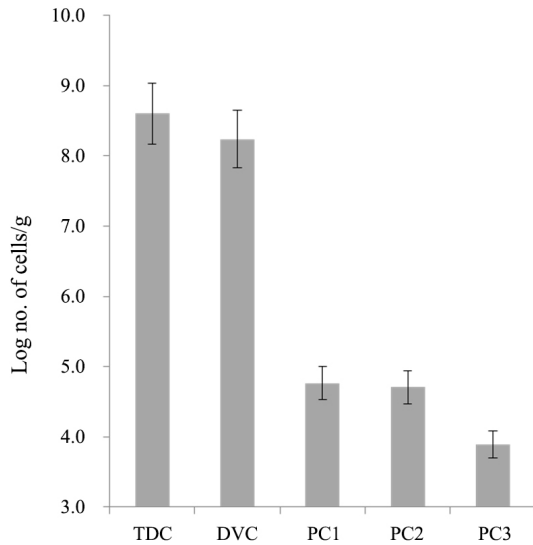


Fig. 1. Comparison of the number of prokaryotic cells obtained by direct viable counting (DVC) and plate counting (PC) collected from crystallizing pond soil of gray solar saltern. PC1, plate count containing at 3% NaCl; PC2, plate count containing at 10% NaCl; PC3, plate count containing at 20% NaCl.

Table 1. Diversity Indices for prokaryotic communities determined from gray solar saltern

Domain	Number of sequences analyzed	No. of OTUs	Chao1 richness	Ace richness	Shannon index	Simpson index	Goods Lib. Coverage
Bacteria	6,838	1,778	3779.2	5712.0	6.16	0.008	0.84
Archaea	11,847	643	850.5	855.5	4.95	0.016	0.98

세균군집은 18문 46강 85목 140과 243속으로 분류되었다. 이들 세균 계통군 중 *Proteobacteria* (60%), *Chloroflexi* (14%), *Bacteroidetes* (9%), *Firmicutes* (4%) 그리고 *Actinobacteria* (4%) 문은 주요 군집으로 분류되었다. 세균군집 중 높은 분포율을 차지하는 *Proteobacteria*계통군은 γ -*proteobacteria* (85%), α -*proteobacteria* (7%), δ -*proteobacteria* (7%), β -*proteobacteria* (1%), 그리고 ϵ -*proteobacteria* (<1%)의 순으로 나타났다(Fig.

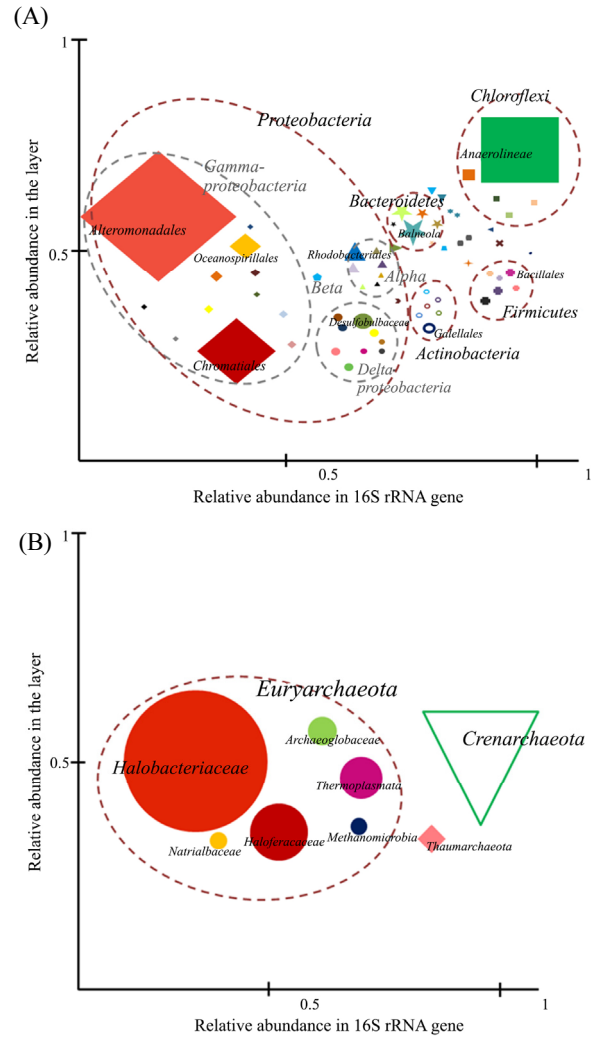


Fig. 2. Taxonomic composition at the phylum level within the (A) bacteria; (B), archaea for the 16S rRNA gene sequences retrieved in a gray solar saltern.

2A). Archaea 군집의 경우, 3문 6강 7목 7과 38속으로 분류되었으며, *Euryarchaeota* (84%)와 *Crenarchaeota* (12%) 문이 주요 군집으로 확인되었다. Archaea 군집의 *Euryarchaeota*강은 *Halobacteriaceae*과, *Haloferacaceae*과, *Thermoplasmata* 과, *Natrialbaeaceae*과, *Archaeoglobaceae*과 그리고 *Methanomicrobia* 과로 분류되었다(Fig. 2B).

본 연구에서 pyrosequencing 분자기법을 이용하여 밝힌 토판염전 결정지 내 세균군집의 특성을 국내 장관염 천일염전 결정지 내 세균군집의 계통학적 다양성에 관한 연구(Kim, 2012; Park and Lee, 2015) 결과와 비교·검토하였다. 토판염전 결정지 내 세균군집의 종 다양성 지수는 6.16로 확인되었으며, 장관염 천일염전 결정지의 다양성지수 4.73으로 확인되어 토판염전 결정지에서 장관염 천일염전 결정지 보다 더 다

양한 세균이 분포해 있음으로 판단되었다. 토판염전 결정지와 장관염 천일염전에서 *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* 그리고 *Actinobacteria*계통군이 주요군집으로 확인되었다. 토판염전 결정지는 *Alteromonadales* 목, *Chromatiales* 목, *Anaerolineales* 목, *Oceanospirillales* 목 그리고 *Balneola* 목이 우점적으로 분포하였으며, 장관염 천일염전은 *Chromatiales* 목, *Rhodobacteriales* 목, *Puniceococcales* 목, *Micrococcales* 목 그리고 *Flavobacteriales* 목이 우점적으로 분포하였다. 토판염전의 경우, 해수뿐만 아니라 토판에 존재하는 미생물 군집의 영향을 받아서 일반 천일염보다 높은 종 풍부도를 나타내었다. 현재, 16S rRNA 유전자 염기서열 해석과 같은 분자·생태학적 기술을 통해 호염성 archaea의 다양성에 대한 연구가 진행되고 있다. 세균 유전자 정보 데이터베이스인 LPSN (List of Prokaryotic Names with

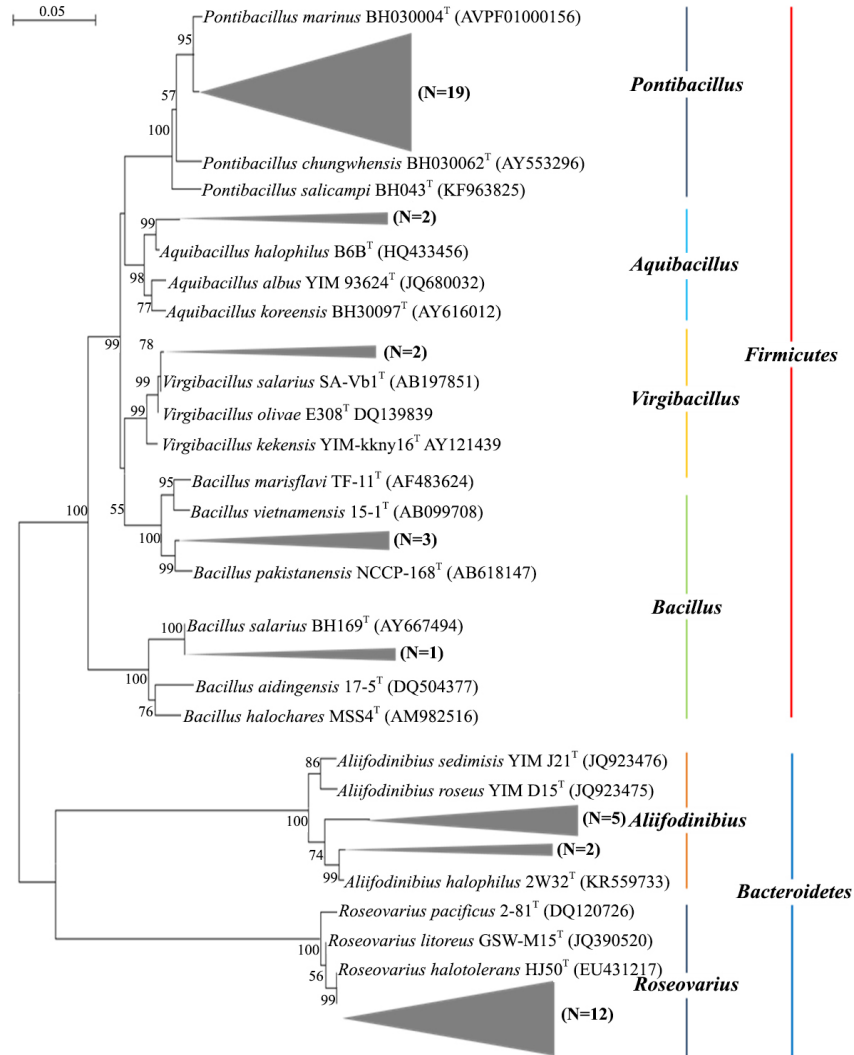


Fig. 3. Phylogenetic tree showing phylogenetic position of isolated extremely halophilic bacteria by traditional culture method based on 16S rRNA gene sequences. Bootstrap percentages $\geq 50\%$ (based on 1,000 replicates) from the neighbor-joining, maximum-likelihood is shown at nodes.

Standing in Nomenclature)과 RDP (Ribosomal Database Project)에는 12 문(phylum) 3과(family) 50속(genus) 207종(species)의 호염성 archaea 계통군이 등록 보고 되어있다. 본 연구에서 토판염전 결정지 생태계의 주요 군집으로 확인된 *Euryarchaeota* 강의 42.5%가 *Halobacterium* 속과 *Haloadaptatus*속 등을 포함하는 *Halobacteriaceae* 과 계통군으로 확인되었다.

희석평판배양법을 이용한 고도 호염균의 분리 및 계통해석

일반적으로 널리 활용되고있는 희석평판배양법을 이용하여 고도 호염균을 분리하였다. 토판염전 결정지 시료를 멸균수에 순차적으로 희석한 후 호염균 배양에 일반적으로 이용되고 있는 Marine agar (MA)에 25% NaCl를 첨가한 평판 배지에 도말 접종하고 30°C에서 14일간 배양하였다. 상기의 MA배지에 형성된 고도 호염균 46균주를 순수분리하여 16S rRNA 유전자 염기서열 분석한 결과, *Firmicutes* 문에 속하는 *Pontibacillus* 속(19균주), *Aquibacillus* 속(2균주), *Virgibacillus* 속(2균주) 그리고 *Bacillus* 속(4균주)의 균주가 확인되었다. *Bacteroidetes* 문에 속하는 *Aliifodiniibius* 속(7균주)과 *Roseovarius* 속(12균주)으로 확인되었다(Fig. 3).

상기의 연구에서 배양 비의존적 방법인 pyrosequencing 분자기법에 의거해 토판염전 결정지 내 미생물군집을 계통해석한 결과, 세균군집은 18문 46강 85목 140과 243속 그리고 archaea 군집은 3문 6강 7목 38속의 다양한 계통군이 존재함을 밝혔다. 희석평판배양법을 이용하여 고도 호염균을 순수분리한 결과, 2문 6속 8종 계통군이 확인되었다. 이상의 결과로부터 기존의 희석평판배양법으로는 다양한 호염성 세균을 확보하는데 한계가 있음을 확인하여, 고도 호염성 세균의 다양성 확보를 위한 culturomics법 개발이 요구되었다.

Culturomics법을 이용한 고도 호염균의 분리 및 계통해석

토판염전 결정지로부터 고도 호염성 세균의 다양성 확보를 위해 호염성 세균 생육에 적합한 배양배지 및 배양조건을 고려한 총 59가지 culturomics법을 고안하였다. 배양방법은 도말평판법과 농화배양법을 이용하였다. 농화배양법의 경우, 배양기간을 14일(enrichment-1), 28일(enrichment-2) 그리고 42일(enrichment-3)로 3차 계대배양을 실시하였다. 고도 호염성 세균의 배양배지는 Marine broth (MB) 이외에 *Halobacterium* medium (HM), KCCM-*Halobacterium* medium (KCCM), 259-*Halobacterium* medium [259HM (DSMZ-97)], NTYE medium (NTYE), NT medium (NT)와 같은 총 6종류의 다양한 호염성 배양배지를 이용하였다. 배양온도는 30°C, 37°C, 45°C

Table 2. Isolation of extremely halophilic bacteria and archaea using by culturomics methods

Culture methods	Initial culture conditions				Total isolates		
	Incubation	Periods	Media	Temperature (°C)			
1	Spread	14 days	NT	30	-		
2			HM	30	12		
3			259HM	30	-		
4			NTYE	30	7		
5			KCCM	30	7		
6	Enrichment-1	14 days	MA	37	5		
7				45	4		
8				50	1		
9				NT	37	1	
10					45	-	
11					50	-	
12					HM	37	5
13						45	3
14						50	-
15					259HM	37	-
16				45	-		
17				50	-		
18			NTYE	37	4		
19				45	1		
20				50	-		
21			KCCM	37	-		
22				45	-		
23				50	-		
24	Enrichment-2	28 days	MA	37	6		
25				45	5		
26				50	3		
27				NT	37	5	
28					45	3	
29					50	-	
30					HM	37	2
31						45	2
32						50	-
33					259HM	37	-
34				45	2		
35				50	5		
36			NTYE	37	8		
37				45	1		
38				50	-		
39			KCCM	37	1		
40				45	1		
41				50	-		
42	Enrichment-3	42 days	MA	37	6		
43				45	-		
44				50	3		
45				NT	37	2	
46					45	-	
47					50	1	
48					HM	37	4
49						45	1
50						50	2
51					259HM	37	9
52				45	-		
53				50	5		
54			NTYE	37	5		
55				45	-		
56				50	-		
57			KCCM	37	5		
58				45	-		
59				50	-		
Total					137		

및 50°C에서 배양하였다. 상기의 59가지 culturomics법을 이용하여 고도 호염균 총 137균주를 순수 분리하였다(Table 2).

분리된 고도 호염균 137균주의 계통해석을 위해 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 고도 호염성 세균 85균주는 *Firmicutes*에 포함되는 *Halobacillus* 속(19균주), *Pontibacillus* 속(1균주), *Alkalibacillus* 속(3균주), *Virgibacillus* 속(1균주) 그리고 *Bacillus* 속(8균주), *Proteobacteria*에 포함되는 *Pseudomonas* 속(19균주), *Arodomonas* 속(6균주) 그리고 *Halomonas* 속(26균주) 및 *Bacteroidetes* 의 *Aliifodinibius* 속(2균주)으로 분류되었다. 호염성 archaea 52균주는 *Haloferax* 속(8균주) 그리고 *Haloterrigena* 속(44균주)으로 확인되었다(Fig. 4). 대규모 배양법인 culturomics법을 통하여 희석평판배양법에서 분리되지 않았던 호염성 archaea가 성공적으로 분리되었으며, 이들 세균 중 18균주는 16S rRNA 유전자 염기서열 97% 유사도를 기준으로 신종으로 제안되어 향후, 다상분류법에 의거하여 분류동정하고, 생명연구자원으로 활용 할 수 있도록 하고자 한다.

본 연구에서 토판염전 결정지 내에 분포하는 세균군집 해석을 pyrosequencing 분자기법을 통해 분석한 결과, 총 21문 52강

92목 147과 381속의 계통학적 다양성을 밝혔다. 이들 미생물 군집을 희석평판배양법과 59가지의 culturomics법을 이용하여 고도 호염균을 분리하고 계통 해석하였다. 희석평판배양법을 통해 분리된 고도 호염균은 *Pontibacillus*속과 *Roseovarius* 속을 포함하는 6개 속으로 확인되었으며 culturomics법으로 분리한 경우, 13속의 다양한 고도 호염균이 확보되었다. 이들 13개 속 중 *Halobacillus* 속, *Alkalibacillus* 속, *Pseudomonas* 속, *Arodomona* 속, *Halomonas* 속, *Haloferax* 속 그리고 *Haloterrigena* 속은 culturomics법을 통해서 분리된 계통군으로 확인되었고 고도 호염균 다양성 확보를 위해서 culturomics법은 매우 효과적임을 알 수 있었다. Culturomics법 중 HM 배지를 이용하여 37°C에서 14일간 농화배양법(배양법 12)과 HM, 259HM 그리고 NTYE 배지를 이용하여 37°C에서 42일간 농화배양법(배양법 48, 51, 54)으로 분리된 균주는 4개 속으로 확인되어, 고도 호염균 다양성 확보에 적합한 배양법으로 밝혀졌다.

평판배양법과 농화배양법에 따른 고도 호염균의 계통군을 비교한 결과, *Bacillus* 속, *Halobacillus* 속, *Aquibacilu* 속 그리고 *Roseovarius* 속은 평판배양을 통해 분리가능한 특징적인 계

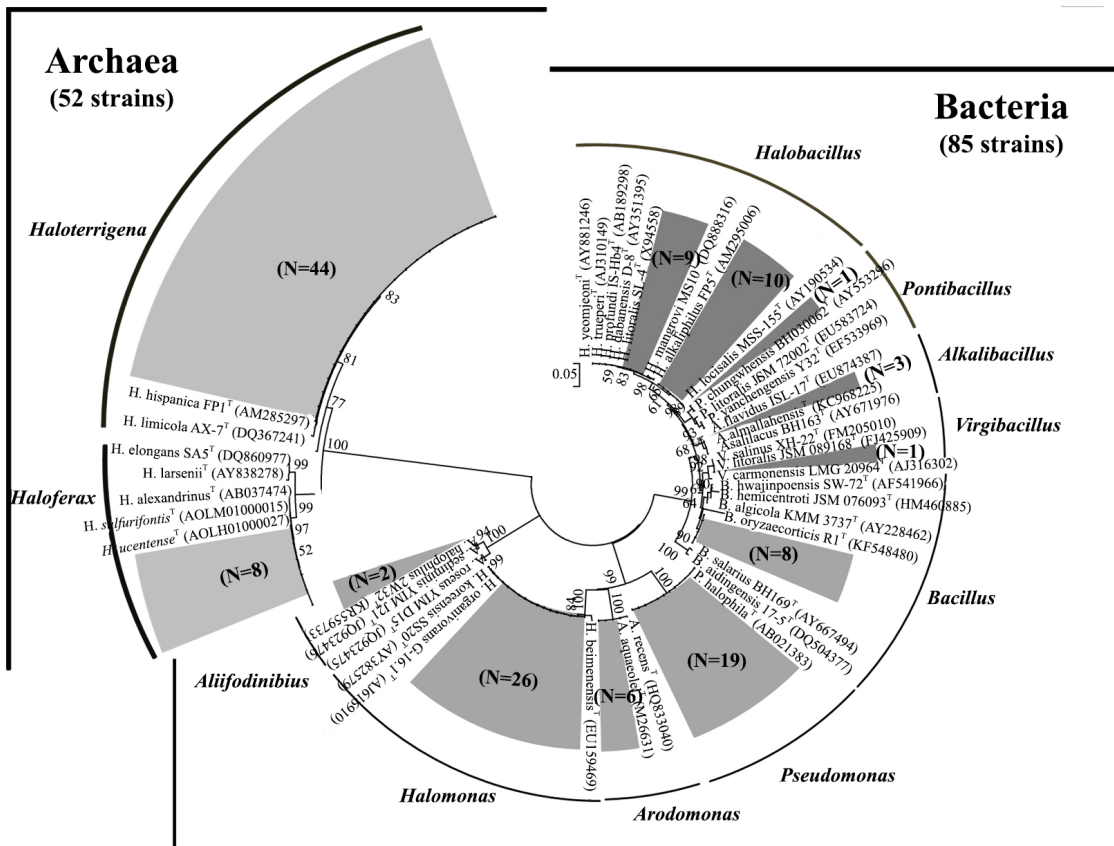


Fig. 4. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships between represent halophilic bacteria by culturomics methods and the type strains based on 16S rRNA gene sequences. Bootstrap percentages (1,000 replicates) above 50% are shown at nodes.

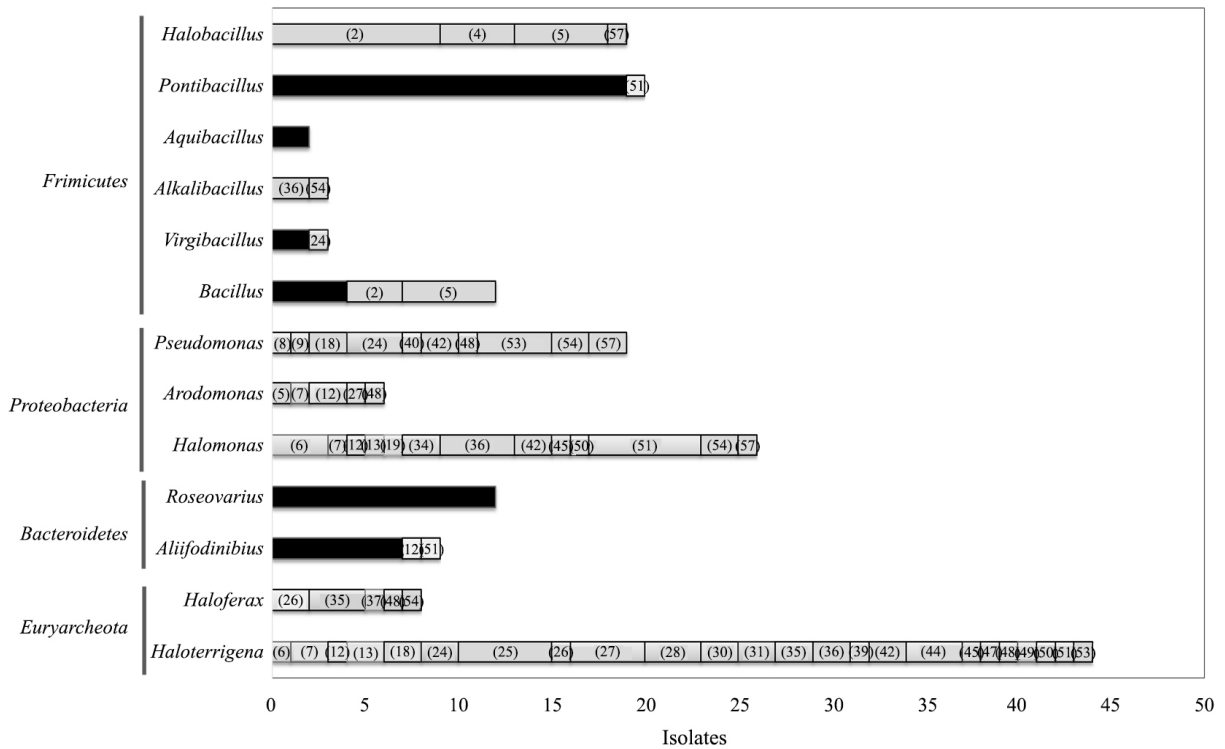


Fig. 5. Comparison of the traditional culture method and culturomics methods for detection of extremely halophilic bacteria and archaea. Black box; isolates by traditional culturomics methods, gray box; isolates by culturomics methods, each numbers in box were culturomics methods.

통균이었으며, *Virgibacillus*, *Alkalibacillus* 그리고 *Pontibacillus*의 경우, 농화배양법을 통해서 성공적으로 분리되었다. 일반적인 고도 호염균 배양법에서 분리되지 않았던 호염성 archaea *Haloterrigena* 속과 *haloferax* 속의 경우, 농화배양법을 통해 분리 가능하였다(Fig. 5).

호염성 환경에서 미생물의 다양성 및 분리에 대한 연구는 지속적으로 이루어지고 있으며, 호염성 archaea의 독특한 생리적인 특징에 대한 산업적 연구도 수행되고 있다(Oren, 2015). 호염성 archaea 계통군 *Haloferax* 속과 *Haloterrigena* 속은 alpha-amylase (*AmyA*)를 생산하며(Pérez-Pomares et al., 2003, Santorelli et al., 2016), *Haloferax* 속이 생산하는 신규 glycoproteins는 고염 농도에서 활성을 나타낸다고 보고 되고 있다(Eichler, 2000). 본 연구에서 culturomics법을 이용하여 분리된 *Haloferax* 속과 *Haloterrigena* 속 균주들은 효소산업에서 유용하게 사용될 것으로 판단되며, 호염성 미생물의 분리 기술은 국내의 고염분성 극한 환경에서 호염성 유전자원의 다양성 확보 및 신규 호염성세균 분리를 위해 널리 이용되리라 기대된다.

적 요

본 연구에서는 토판염전 결정지에 서식하는 세균군집의 계통학적 다양성을 분석하고 culturomics법에 기반하여 고도 호염균의 다양성을 확보하고자 하였다. 토판염전 내 세균밀도를 조사한 결과, 직접검경법에 의한 생균수는 평판배양법에 비해 $10^3 \sim 10^4$ 배 이상 높은 계수치를 나타내어 배양이 곤란한 세균(viable but non-culturable bacteria, VBNC)이 다수 존재해 있음으로 판단되었다. 토판염전 결정지 내 세균군집 다양성 해석을 위해 배양비의존적 방법인 pyrosequencing 분자기법을 이용하였다. 세균군집의 경우 1,778 OTUs, 다양성 지수 6.16로 나타났으며, 18문 46강 85목 140과 243속으로 확인되었다. Archaea군집은 643 OTUs, 다양성 지수 4.95로 3문 6강 7목 7과 38속이 분포해 있음이 확인되었다. 고도 호염균 생육에 적합한 배양배지 및 배양조건을 고려한 총 59가지의 다양한 배양 방법을 이용하여 137균주를 순수 분리하였다. 분리된 고도 호염균의 16S rRNA 유전자 분석결과, 총 4문 11속의 다양한 계통군으로 확인되었으며 호염성 archaea 계통군 *Haloterrigena* 속과 *haloferax* 속이 culturomics법을 통해 성공적으로 분리되었다. 고도 호염균 다양성 확보를 위해 culturomics법이 매우 효과적임을 밝혔다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 농업생명자원관리기관 운영사업 지원에 의해 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

References

- Ben-Amotz, A. and Avron, M.** 1989. The biotechnology of mass culturing *Dunaliella* for products of commercial interest, pp. 91–114. In Cresswell, R.C., Rees, T.A.V., and Shah, N. (eds.), *Algal and cyanobacterial Biotechnology*. Longman Scientific and Technical Press.
- Chun, J., Kim, K.Y., Lee, J.H., and Choi, Y.** 2010. The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2-deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. *BMC Microbiol.* **10**, 101–108.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., et al.** 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **37**, 141–145.
- DeLong, E.F.** 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5685–5689.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R.** 2011. Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200.
- Eichler, J.** 2000. Novel glycoproteins of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *Arch. Microbiol.* **173**, 445–448.
- Jiang, Y.X., Wu, J.G., Yu, K.Q., Ai, C.X., Zou, F., and Zhou, H.W.** 2011. Integrated lysis procedures reduce extraction biases of microbial DNA from mangrove sediment. *J. Biosci. Bioeng.* **111**, 153–157.
- Kamekura, M.** 1986. Production and function of enzymes from eubacterial halophiles. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 145–150.
- Kim, H.N.** 2012. The structure of microbial communities at solar saltern in Korea as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes. 51. BS thesis. Graduate School, Hankuk Univ. Foreign, Korea.
- Koh, H.W., Kim, S.J., Rhee, S.K. and Park, S.J.** 2015. Isolation and characterization analysis of the halophilic archaea isolated from solar saltern, Gomso. *Korean J. Microbiol.* **51**, 427–434.
- Lagier, J.C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., Bittar, F., Fourmou, G., Gimenez, G., Maraninchi, M., et al.** 2012. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 1185–1193.
- Lee, K.D., Park, J.W., Choi, C.R., Song, H.W., Yun, S.K., Yang, H.C., and Ham, K.S.** 2007. Salinity and heavy metal contents of solar salts produced in Jeollanamdo province of Korea. *Korean J. Food Sci. Nutr.* **36**, 753–758.
- Li, W. and Godzik, A.** 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **22**, 1658–1659.
- Oren, A.** 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* **4**, 2.
- Oren, A.** 2015. Halophilic microbial communities and their environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **33**, 119–124.
- Park, J.W., Kim, S.J., Kim, S.H., Kim, B.H., Kang, S.G., Nam, S.H., and Jung, S.T.** 2000. Determination of mineral and heavy metal contents of various salts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 1442–1445.
- Park, S.H. and Lee, G.H.** 2015. Diversity and identification of halophilic bacteria by pyrosequencing in a solar salterns of Jeungdo, Korea. *Korean J. Nat. Conservation* **9**, 149–156.
- Park, J.S., Whang, K.S., and Cheon, J.S.** 2005. Procedure of microbial classification and identification. Worldscience. Korea.
- Pastor, J.M., Bernal, V., Salvador, M., Argandoña, M., Vargas, C., Csonka, L., Sevilla, A., Iborra, J.L., Nieto, J.I., and Cánovas, M., et al.** 2013. Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Biol. Chem.* **288**, 17769–17781.
- Pérez-Pomares, F., Bautista, V., Ferrer, J., Pire, C., Marhuenda-Egea, F.C., Bonete, M.J.** 2003. Alpha-amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles* **7**, 299–306
- Pfluger, K., Baumann, S., Gottschalk, G., Lin, W., Santos, H., and Muller, V.** 2003. Lysine-2, 3-aminomutase and β -lysine acetyltransferase genes of methanogenic Archaea are salt induced and are essential for the biosynthesis of NE-acetyl- β -lysine and growth at high salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6047–6055.
- Qian, P.Y., Wang, Y., Lee, O.O., Lau, S.C.K., Yang, J.K., Lafi, F.F., Al-Suwailem, A., and Wong, T.Y.H.** 2011. Vertical stratification of microbial communities in the Red sea revealed by 16S rDNA pyrosequencing. *ISME J.* **5**, 507–518.
- Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R.J., and Turnbaugh, P.J.** 2011. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics* **12**, 38.
- Santorelli, M., Maurelli, L., Pocsfalvi, G., Fiume, I., Squillaci, G., La Cara, F., Del Monaco, G., and Morana, A.** 2016. Isolation and characterisation of a novel alpha-amylase from the extreme haloarchaeon *Haloterrigena turkmenica*. *Int. J. Biol. Macromol.* **92**, 174–184.
- Saum, R., Mingote, A., Santos, H., and Muller, V.** 2009. A novel limb in the osmoregulatory network of *Methanosarcina mazei* Go¹: Ne-acetyl- β -lysine can be substituted by glutamate and alanine. *Environ. Microbiol.* **11**, 1056–1065.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., et al.** 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community supported software for describing

and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–7541.

- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T.** 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504.
- Ventosa, A., de la Haba, R.R., Sánchez-Porro, C., and Papke, R.T.** 2015. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic

approach. *Curr. Opin. Microbiol.* **25**, 80–87.

- Whang, K.S., Yang, H.C., and Someya, T.** 2003. The detection and a quantitative evaluation of viable but non-culturable soil bacteria using a modified direct viable count method. *Korean J. Microbiol.* **39**, 181–186.
- 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.