Microbiol. Biotechnol. Lett. (2018), 46(2), 127–134
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1803.03016
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

초록갈파래(*Umbraulva japonica*)에서 분리한 세균의 군집 구조 분석 및 항균 활성

김지현, 박소현, 문경미, 김동휘, 허문수*
제주대학교 해양과학대학 수산생명의학과

Received: April 3, 2018 / Revised: May 3, 2018 / Accepted: May 9, 2018

Bacterial Community Analysis and Antibacterial Activity Isolated from *Umbraulva japonica*

Ji-Hyun Kim, So-Hyun Park, Kyung-Mi Moon, Dong-Hwi Kim, and Moon-Soo Heo*
Marine Applied Microbes and Aquatic Organism Disease Control Lab, Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

In this study, 79 bacterial isolates were collected from the surface of marine algae *Umbraulva japonica*. As a result of analysis of 16s rRNA gene sequence, the 79 isolated bacteria were divided into 4 major groups: [*Proteobacteria* (74.69%), *Actinobacteria* (2.53%), *Fimicutes* (2.53%), and *Bacteroidetes* (20.25%)] – 7 classes (*Actinobacteria, Flavobacteria, Sphingobacteria, Baciili, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria,* and *Gammaproteobacteria*), 12 orders, 17 families and 31 genera. The newly isolated 3 strains could be novel species because of less than 97% similarity in 16s rRNA sequence. Therefore, it is considered that additional experiments should be conducted together with the standard strain. Analysis of 79 bacterial antibacterial activity against human and fish pathogens, such as *Edwardsiella tarda*, *Vibrio harveyi*, *Streptococcus iniae*, *Steptococcus parauberis*, *Escherichia coli*, *Steptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes* and *Vibrio vulnificus*, was performed by using the supernatant liquid and pellet. As a result, pellet of UJT9, UJT20 and UJR17 showed antibacterial activity against *V. vulnificus*, UJR17 also showed antibacterial activity against *S. parauberis*. UJT7 and UJT20, UJR17 have been identified as *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. and it may be safely assented that it's beneficial to carry out additional experiments for various applications.

Keywords: **Antibacterial activity, bacterial community, marine algae, marine bacteria, *Umbraulva japonica***

서 론

해조류는 해양 생태계의 일차 생산자로서 물질 순환의 중심이 되며 여러 해양 생물에게 서식지와 산란장을 제공한다[1, 2]. 이러한 해조류에는 탄닌류(tannins), 카테킨류(catechins), 페놀류(phenol) 등의 기능성 물질이 함유되어 있어 항균, 항산화, 항염증, 항암과 같은 생리활성능을 나타내며, 항비만, 항치매 효과를 비롯한 혈중 콜레스테롤 저하, 수면 개선 등의 다양한 기능이 밝혀짐에 따라 식용뿐만 아니라 화장품 및 기능성 식품, 천연물 신약 개발의 원료로 주목받고 있다[3–5].

해양 미생물은 다양한 해양 환경에서 서식하고 있으며 그 중 해조류는 해양 미생물의 주요 서식지가 된다. 해조류와 해조류 표면의 미생물은 상호작용 하여 외부 환경으로부터 서로를 보호하며 영양소의 공급과 성장, 발달 및 번식에 긍정적인 효과를 미치는 것으로 알려져 있다[6–8].

해양 미생물은 고염분, 고압 등과 같은 특이한 해양환경에 노출되어 있어 육상 미생물과는 다른 대사계 혹은 생체 방어계를 가지고 있으며, 해양 미생물에 의해 생성된 대사 산물은 다양한 생리활성을 나타내고 있다[9, 10]. 해양 미생물로부터 분리되어 주목받는 생리활성 물질로는 marinostatin, aplasmomycin, marinactam, istamycin, biopolymer, glycine betaine 등이 있으며, 이러한 물질은 항균, 항암, 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이처럼 해양 미생물은 다

***Corresponding author**
Tel: +82-64-754-3473, Fax: +82-64-756-3493
E-mail: msheo@jejunu.ac.kr
© 2018, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

양한 생리활성을 나타내며 화장품, 식품, 제약 등 여러 산업 분야에서의 적용이 확대될 것이라 기대된다[11–13].

초록갈파래는(*Umbraulva japonica*)는 갈파래과(*Ulvaceae*)에 속하는 녹조류로 조하대의 수심 10–20 m에서 서식하며, 한국과 일본, 중국 등 북태평양 서안 등지에 분포한다. 초록갈파래는 식용 해조류로 분류되지만 많이 활용되지 않고 있다. 최근 초록갈파래가 일본 해양지역에서 광범위한 성장으로 엄청난 생산량을 보였지만, 활용이 어려워 악취와 경관훼손 등의 문제 원인이 되었다. 이를 해결하기 위해 일본에서는 초록갈파래를 이용하여 불소 또는 중금속 이온 제거를 위한 흡착겔로서의 활용 가능성에 대하여 연구를 진행하였고[14, 15] 국내에서는 탈모 방지 예방 및 발모 촉진 대한 연구가 이루어졌다[16]. 이러한 노력에도 불구하고 전 세계적으로 초록갈파래와 초록갈파래에 서식하는 미생물에 대한 연구가 부족한 실정이다. 따라서 다양한 분야에서 해조류를 더욱 효율적으로 이용하기 위해서는 해조류와 밀접한 관계를 가지는 해양 미생물의 연구 또한 중요하다고 할 수 있다.

본 연구에서는 초록갈파래로부터 세균을 분리·배양하여 세균 군집을 파악하고, 어류 질병 및 인체 유해 세균에 대한 항균 활성을 확인함으로써 분리된 미생물의 활용 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

시료채집 및 세균의 분리·배양

본 연구에서 사용된 초록갈파래(*Umbraulva japonica*)는 제주도 비양도 바다에서 채집하였으며, 멸균된 지퍼백에 담아 4℃에 보관·운반하였다. 채집한 초록갈파래는 멸균된 인공 해수로 세척한 뒤 잘게 잘라 멸균된 0.85% 생리식염수에 넣어 균질화 시켰다. 균질화된 시료는 연속 단계 희석법으로 10^{-1}–10^{-5}배로 희석한 후 Marine Agar (MA, Difco., USA)와 MA를 10배 희석한 1/10 MA, R2A Agar (Difco., USA)에 도말 한 후 25℃에서 배양하였다. 7일 후 각 배지에서 형태학적 특징에 따라 colony를 선별하여, 각각의 배지에 2–3회 계대 배양하여 순수 분리하였다. 순수 분리된 균주는 20% (v/v) glycerol에 현탁한 후 −80℃에 동결 보관하여 실험에 사용하였다.

DNA 분리 및 16s rRNA 염기서열 분석

분리한 균주의 DNA를 추출하기 위하여 2.5% Chelex (Chelex® 100 Molecular Biology Grade Resin, BIO-RAD, USA)를 사용하였다. 균주를 2.5% Chelex에 접종하고 95℃ boiling 방법으로 genomic DNA를 추출한 뒤 4℃에 보관하여 실험에 사용하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 27 Forward (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') primer와 1522 Reverse (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') primer를 사용하였다. AccuPower™ PCR Premix (Bioneer, USA)에 DNA 1 μl를 첨가한 후 최종 부피 25 μl로 맞추어 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95℃에서 초기 변성 단계(Initial denaturation) 5분 반응을 시킨 후 94℃ 변성단계(Denaturation) 1분, 55°에서 결합단계(Annealing) 1분, 72℃에서 합성단계(Extention) 1분 반응을 30 cycle 반복 진행하였고 75℃에서 최종 합성단계(Final extention) 10분으로 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose에서 전기 영동(Sub-Cell® Agarose Gel Electrophoresis System, Bio-rad)을 하여 밴드를 확인하였다.

증폭이 확인된 16S rDNA 유전자는 솔젠트(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 분석한 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 및 EzBioCloud (https://www.ezbiocloud.net/)에서 유사한 염기서열을 비교하였고 가장 근 연속이나 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 본 연구에서 결정된 염기서열과 NCBI 및 EzBioCloud에서 확인된 표준 미생물 염기서열은 Clustal X program [17]으로 multiple alignment를 수행하였고, Mega 6.0 software [18]를 이용하여 neighbor-joining과 Jukes-Cantor model, Pairwise deletion 방법을 사용하여 계통수를 작성하였다. 계통수의 신뢰성 조사는 1,000회 replication을 적용한 bootstrap 분석으로 진행하였다[19].

Table 1. List of the strains of fish pathogenic and Human clinical bacteria.

	Strain	Strain no	Growth conditions
Fish pathogenic bacteria	*Edwardsiella tarda*	KCTC 12267	1.5% BHIA, 25℃
	Streptococcus iniae	KCTC 3657	1.5% BHIA, 25℃
	Streptococcus parauberis	KCTC 3651	1.5% BHIA, 25℃
	Vibrio harveyi	KCTC 12724	MA, 24℃
Human clinical bacteria	*Escherichia coli*	KCTC 1682	TSA, 37℃
	Streptococcus mutans	KCCM 40105	BHIA, 37℃
	Vibrio vulnificus	KCCM 41665	1% TSA, 30℃
	Listeria monocytogenes	KCCM 40307	1.5% BHIA, 37℃

항균 활성 균주의 선별

순수 분리된 균주를 대상으로 인체유해세균과 어류질병세균에 대한 항균 활성 실험을 수행하였다. 항균 활성 효과는 paper disc method [20]를 이용하였으며 실험에 사용된 각 병원균들은 한국생물자원센터(Korea Collection for Type Culture, KCTC)와 한국미생물보존센터(Korea Culture Center of Microorganisms, KCCM)로부터 분양받았다 (Table 1).

분양받은 병원균은 각각의 최적배지에서 배양하였으며, 배양된 병원균은 생리식염수로 희석하여 McFarland No. 0.5 농도로 제조하였다. 멸균된 면봉을 사용하여 희석한 병원균을 Mueller Hinton Agar (MHA, Difco., USA)에 도말하였다. 순수 분리한 세균은 Marine Broth (MB, Difco., USA), 1/10 Marine Broth와 R2A Broth (Difco., USA)에 배양한 후 배양액을 10분동안 원심분리(14,240 ×*g*) 하여 상층액과 균체를 획득하였다. 상층액과 균체를 각각 8 mm paper disc에 100 μl씩 분주한 뒤 25℃ 배양기에서 건조하였다. 건조된 paper disc를 병원균이 도말된 MHA 배지에 올려놓고 적정온도에서 48시간 배양한 후 paper disc 주변에 형성된 생육저해환을 측정하였다.

결과 및 고찰

염기서열 분석 및 계통학적 분석

해조류에서 분리한 세균의 16S rRNA 유전자 염기서열은 NCBI 및 EzBioClod를 이용하여 분석하고 계통수를 작성하였다(Fig. 1).

초록갈파래(*U. japonica*)에서 분리한 79개의 균주는 31속 46종으로 동정되었다. *Proteobacteria* 문(Phylum)은 기존에 보고된 염기서열과 97.39–100%의 상동성을 나타내었다. *Proteobacteria* 문(Phylum)에 속한 *Acinetobacter* 98.81%, *Altererythrobacter* 98.37–98.53%, *Brevundimonas* 99.04–99.41%, *Comamonas* 97.50%, *Enhydrobacter* 98.81–99.02%, *Erythrobacter* 97.39–98.95%, *Loktanella* 98.97%, *Neisseria* 100%, *Novoshingobium* 98.68%, *Pantoea* 99.27%, *Paracoccus* 99.04%, *Pseudoaltermonas* 99.71–99.72%, *Pseudomonas* 99.23–99.93%, *Psychrobacter* 99.30–99.93%, *Ruegeria* 98.23–99.04%, *Shewanella* 98.02–98.09%, *Sphingobium* 99.49–99.71%, *Sphingorhabdus* 98.84%, *Sulfitobacter* 98.82–99.33%, *Vibrio* 98.34–100%의 상동성을 보여주었다.

Firmicutes 문(Phylum)에 속한 *Bacillus*는 기존의 염기서열과 98.48–99.10%의 상동성을 보여주었으며, *Actinobacteria* 문(Phylum)에 속하는 *Microbacterium*와 *Citricoccus*은 각각 98.57%, 98.31%의 유사성을 나타내었다. 그리고 *Bacteroidetes*

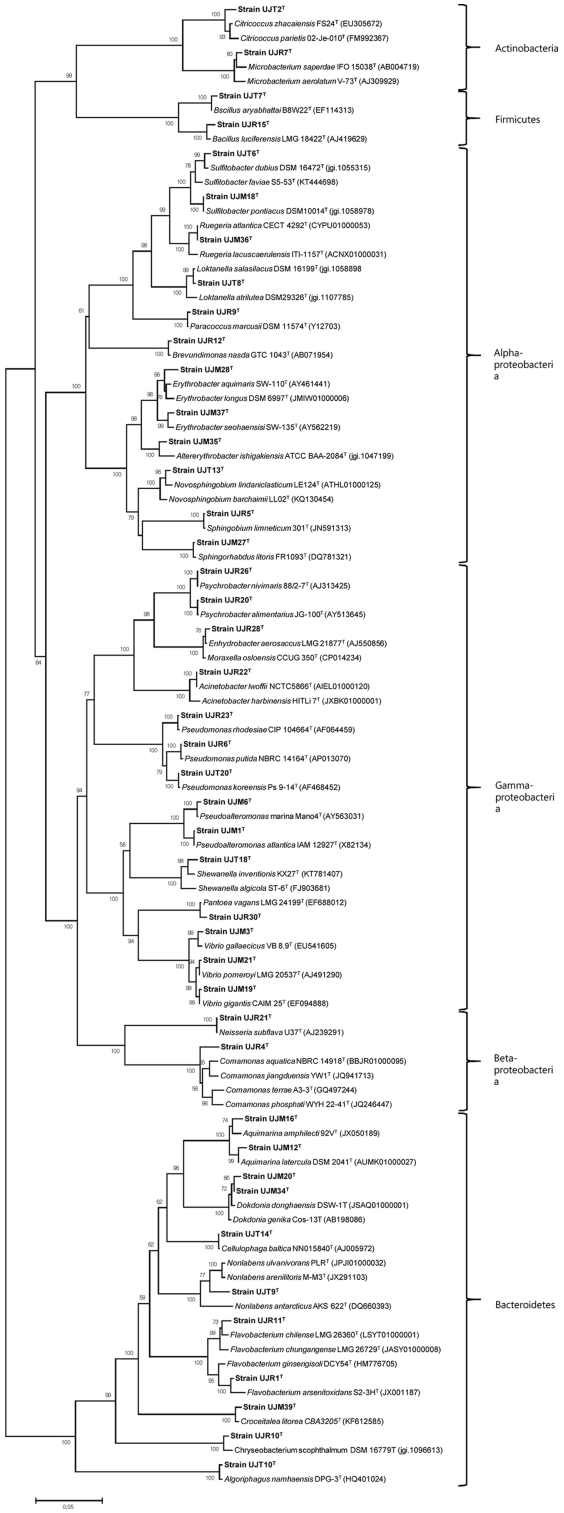

Fig. 1. Phylogenetic tree analysis of 16s rRNA gene sequences of bacteria isolated from *Umbraulva japonica* and some other related taxa. Numbers above branches indicate boostrap values of neighbor-joining analysis (>50%) from 1,000 replication. Bar 0.05 nucleotide substitution per nucleotide position.

문(Phylum)은 기존 염기서열과 97.07–99.65%의 상동성을 나타내었는데, *Aquimarina* 98.64–99.65%, *Cellulophage* 99.08%, *Chryseobacterium* 98.70%, *Croceitalea* 98.72%, *Dokdonia* 98.97–99.50%, *Flavobacterium* 98.21–98.65%, *Nonlabens* 97.01%, *Algoriphagus* 99.22%의 유사성을 보여주었다. *Proteobacteria* 문(Phylum)에 속하는 UJM28은 *Erythrobacter longus* DSM6997^{T}와 97.39%, UJR4는 *Comamonas jiangduensis* YW1^{T}와 97.50%, *Bacteroidetes* 문에 속하는 UJT9는 *Nolabense arenilitoris* M-M3^{T}와 97.09%의 낮은 상동성을 나타내었다. 이와 같이 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과를 비교한 결과 79균주 중 3균주가 표준 균주의 유전자 염기서열과 97% 이하의 상동성을 보여 신속 또는 신종으로 보고될 가능성이 있다고 여겨지며, 향후 표준균주들과 함께 추가적인 신종 실험이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

16S rRNA 유전자 염기서열로부터 세균 군집 다양성을 분석하였다. 그 결과, 초록갈파래의 세균군집구조는 *Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes*의 4개의 문(Phylum), 7개의 강(Class), 12개의 목(Order), 17개의 과(Family), 31개의 속(Genus)으로 구성되었다(Table 2). 그 중 *Proteobacteria* 문의 *Alpha-proteobacteria* 강은 3개의 목, 4개의 과, 10개의 속이, *Gamma-proteobacteria* 강에서는 4개의 목, 6개의 과, 8개의 속 등 다양한 분류군이 나타났다.

Table 2. Bacterial diversity associated with *Umbraulva japonica*.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	No.
Actinobacteria	*Actinobacteria*	*Actinomycetales*	*Microbacteriaceae*	*Microbacterium*	1
			Micrococcineae	*Citricoccus*	1
Bacteroidetes	*Flavobacteria*	*Flavobacteriales*	*Flavobacteriaceae*	*Aquimarina*	4
				Cellulophage	1
				Chryseobacterium	1
				Croceitalea	1
				Dokdonia	3
				Flavobacterium	4
				Nonlabens	1
	Cytophagis	*Cytophagales*	*Cyclobacteriaceae*	*Algoriphagus*	1
Firmicutes	*Bacilli*	*Bacillales*	*Bacillaceae*	*Bacillus*	2
Proteobacteria	*Alphaproteobacteria*	*Caulobacterales*	*Caulobacteraceae*	*Brevundimonas*	2
		Rhodobacterales	*Rhodobacteraceae*	*Loktanella*	1
				Paracoccus	1
				Ruegeria	3
				Sulfitobacter	4
		Sphingomonadales	*Erythrobacteraceae*	*Altererythrobacter*	7
				Erythrobacter	2
			Sphingomonadaceae	*Novosphingobium*	1
				Sphingobium	3
				Sphingorhabdus	1
	Betaproteobacteria	*Bukholderiales*	*Comamonadaceae*	*Comamonas*	1
		Neisseriales	*Neisseriaceae*	*Neisseria*	1
	Gammaproteobacteria	*Altermonadales*	*Pseudoaltermonadaceae*	*Pseudoaltermonas*	3
			Shewanellaceae	*Shewanella*	2
		Enterobacteriales	*Enterobacteriaceae*	*Pantoea*	1
		Pseudomonadales	*Moraxellaceae*	*Acinetobacter*	1
				Enhydrobacter	4
				Psychrobacter	5
			Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*	11
		Vibrionales	*Vibrionaceae*	*Vibrio*	5

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1803.03016

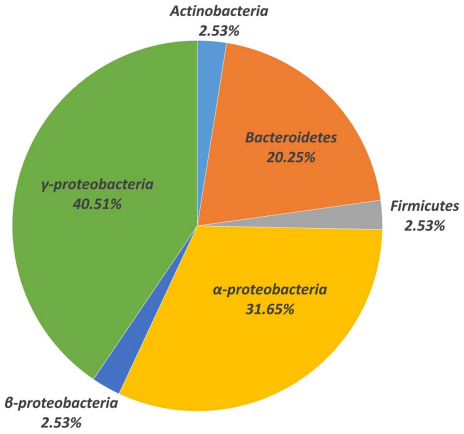

Fig. 2. Pie-diagram showing structure and the diversity of bacterial community of *Umbraulva japonica*.

분리된 균주의 속은 *Pseudomonas* 13.92%, *Altererythrobacter* 8.86%, *Psychrobacter*와 *Vivrio* 각각 6.33%, *Aquimarine*, *Flavobacterium*, *Sulfitobacter*, *Enhydrobacter* 5.06%, *Dokdonia*, *Ruegeria*, *Sphingobium*, *Pseudoaltermonas* 각각 3.80%, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Erythrobacter*, *Shewanella* 2.53%, 그 외 *Microbacterium*, *Citriccoccus*, *Cellulophage*, *Chryseobacterium*, *Croceitalea*, *Nolabense*, *Algoriphagus*, *Loktanella*, *Paracoccus*, *Novosphingobium*, *Comamonas*, *Neisseria*, *Pantoea*, *Acinetobacter* 각각 1.27%로 나타났다.

Proteobacteria 분류군에서는 Gamma-proteobacteria 40.51%, *Alpha-proteobacteria* 31.65%, *Beta-proteobacteria* 2.53%로 나타났으며 *Bacteroidetes* 분류군은 20.25%로 나타났다 (Fig. 2). 이는 해양생태계에서 일반적으로 *Proteobacteria (Alpha-proteobacteria, Gamma-proteobacteria)* 문과 *Bacteroidetes* 문이 우점으로 서식한다는 결과와 일치한다 [21, 22]. 하지만 수심 200 m 이내의 해역에서는 대체적으로 *Alpha-proteobacteria* (50%)가 *Gamma-proteobacteria* (30%)보다 높은 비율로 분포한다는 Zinger *et al.* [23]과 달리, 수심 10–20 m 서식하는 초록갈파래에서 분리한 세균의 군집 구조 분석 결과에서는 *Gamma-proteobacteria* (40.51%)가 *Alpha-proteobacteria* (31.65%)보다 더 높은 비율을 차지하는 것을 확인할 수 있었다.

말레이시아에 서식하는 *ulva* sp.에서는 *Protoobacteria* (*Gamma-proteobacteria*)에 속하는 그룹이 확인되었고, 호주에서 서식하는 *ulva* sp.에서는 동일한 종임에도 불구하고, 한 연구에서는 *Proteobacteria* (*Alpha-proteobacteria, Gamma-proteobacteria*), *Bacteroidetes, Planctomycetes*로 3개의 문에 속하는 그룹이, 다른 연구에서는 *Proteobacteria (Alpha-proteobacteria, Gamma-proteobacteria), Actinibacteria* 2개의 문이 확인되었다. 반면, 같은 호주 지역에서 분리된 홍조류 *Delisea pulchra*에서는 *Proteobacteria (Alpha-proteobacteria, Gamma-proteobacteria), Bacteroidetes, Firmicutes*에 속하는 3개의 문으로, 동일한 지역이지만 더 다양한 모습을 보였다[24–26]. 본 연구와 동일한 지역에서 채집한 구멍갈파래에서는 *Proteobacteria (Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria), Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes*로 4개의 문에 속하는 그룹으로 본 연구와 같은 결과를 보였다[27]. 같은 종의 해조류라도 서식하는 지역에 따라, 같은 지역이라 할지라도 해조류에 따라 세균의 군집 구조는 다르거나 동일한 모습을 보인다. 한 연구에서는 각각 다른 지역에서 채취한 *Ulva* sp.에서 분리한 세균의 군집 구조를 분석하였다. 그 중 군집 구조를 이루는 대부분의 세균이 숙주 종류와 지리적으로 무관하게 일관된 형태를 보였고, 30%에 해당하는 세균만이 서로 다르게 관찰되었다. 이는 해조류에 부착하여 공생하는 세균의 일부분만이 숙주 특이성 및 지리적 영향과 관련이 있는 것으로 보여진다[28]. 이러한 결과들을 미루어 볼 때, 해조류 표면의 세균 군집 구조는 세균이 부착하여 공생하는 해조류나 서식하는 주위의 해양 환경을 비롯하여 실험방법, 배양 조건 등에 따라 달라질 수 있다는 것을 시사하며, 해조류에 서식하는 공생 세균의 데이터베이스 구축을 위해 다양하고 많은 해조류의 세균 군집 구조의 비교·분석 연구가 필요하다고 사료된다.

항균 활성 탐색

초록갈파래로부터 분리한 세균을 이용하여 인체유해세균과 어류질병세균에 대한 항균 활성 결과, 인체유해세균 중 *V. vulnificus*에서 UJT7, UJT20, UJR17이 항균 활성 효과를 나타내었으며, 어류질병세균에서는 *S. parauberis*에 대해 UJR17이 항균 활성이 있음을 확인하였다. 나머지 세균에서는 인체유해세균과 어류질병세균에 대한 항균 활성 효과가 관찰되지 않았다.

항균 활성을 나타내는 UJT7, UJT20, UJR17을 배양하여 항균 활성을 측정한 결과는 다음과 같다(Table 3). *V. vulnificus*에 대해 UJT7, UJT20, UJR17의 균체현탁액에서만 항균 활성을 관찰하였다. UJT7은 20 mm, UJT20은 13 mm, UJR17은 18 mm의 생육저해환을 나타내어 UJT7이 세 균주 중 항균 활성이 가장 높은 것을 확인하였다. UJT7과 UJT20이 *S. parauberis*에 대해서는 항균 활성을 나타내지 않은 반면 UJR17의 균체현탁액에서 18 mm의 생육저해환이 관찰되었으며, UJR17이 *V. vulnificus*과 *S. parauberis*에 대하여 활성이 있는 것으로 확인되었다.

항균 활성을 나타내는 세 균주는 항균 펩타이드를 생산하는 것으로 사료된다. 자연계의 생명체들은 스스로를 보호하

Table 3. Antibacterial activity of UJT7, UJT20, UJR 17 against pathogenic bacteria.

	Isolated strain		Diameter of inhibition zone (mm)	
	Closet relative	Similarity	*V. vulnificus*	*S. parauberis*
UJT7	*Bacillus aryabhattai* B8E22^T	99.10%	20	-
UJT20	*Pseudomonas koreensis* Ps9-14^T	99.51%	13	-
UJR17	*Pseudomonas putida* NBRC14164^T	99.44%	18	18

기 위해 항균 펩타이드를 분비하는 것으로 알려져 있다. 그 중 미생물이 생산하는 항균 펩타이드를 통칭하여 박테리오신이라 하며 기존의 항생제 내성 문제를 극복할 수 있는 대안으로 여겨지고 있다. 이러한 박테리오신은 세포막 투과, 핵산 분해, 단백질 합성 저해 등 다양한 메커니즘을 통해 항균 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 항균 활성을 가지는 항균 펩타이드는 향후 항바이러스제, 항암제, 생체기능을 모방한 의료용 소재 개발의 적용과 생물학적 보존제 및 천연 항생제로 활용이 가능하기 때문에 이에 대한 추가적인 연구가 필요로 하다고 사료된다[29, 30].

UJT7은 1/10MA에서 분리된 세균으로 *Bacillus aryabhattai* B8E22^{T}와 99.10%의 상동성을 나타내었다. *Bacillus* sp.에 속하는 세균은 곰팡이와 세균에 대하여 광범위한 억제 화합물을 생산한다. 특히 *B. subtilis*는 그람 양성균의 성장을 저지하는데 효과적이라고 알려져 있다[31, 32]. 인체 유해 세균뿐만 아니라 식물과 어류에 질병을 일으키는 세균에 대하여 항균 활성 효과가 보고되었으며[33–35], *B. subtilis*를 비롯한 *B. licheniformis, B. polymyxa, B. laterosporus, B. circulans*는 대하와 어류의 성장과 면역에 긍정적인 영향을 미치는 프로바이오틱스로 활용이 되고 있다[36, 37]. 1/10 MA에서 분리된 UJT20과 R2A에서 분리된 UJR17은 각각 *Pseudomonas koreensis* Ps9-14^T 99.51%, *Pseudomonas putida* NBRC14164^T 99.44%의 상동성을 나타내었다. *Pseudomonas* sp.에 속하는 세균 또한 질병을 일으키는 다양한 세균에 대하여 항균 활성을 가지는 것으로 보고 되었으며[38], 식물 성장에 도움을 주고 폐놀을 분해하는 것으로 알려져 있다[39, 40]. 따라서 초록갈파래에서 분리한 *Bacillus* sp.와 *Pseudomonas* sp. 또한 다양한 활용을 위한 추가적인 실험을 수행한 후 유익하게 이용 될 수 있을 것이라 사료된다.

요 약

본 연구에서는 해조류인 *Umbraulva japonica*의 표면에서 79개의 세균을 분리하였다. 16s rRNA 유전자 분석 결과, 주요 계통군은 *Proteobacteria* (74.69%), *Actinobacteria* (2.53%), *Fimicute* (2.53%), *Bacteroidetes* (20.25%)로 4개의 문(Phylum)이 관찰되었고, 7개의 강(Class), 13개의 목(Order), 17개의 과(Family), 31개의 속(Genus)을 확인하였다. 계통학적 분석 결과 3개의 균주가 표준균주와 97% 이하의 유사성을 보여 신속 또는 신종으로 보고될 가능성이 있다고 여겨지며, 향후 표준균주들과 함께 추가적인 신종 실험이 수행되어야 할 것으로 사료된다. 분리된 79 균주를 이용하여 인체 및 어류 병원균을 대상으로 항균 활성을 확인하였다. UJT7, UJT20, UJR17의 균체 현탁액이 *Vibrio vulnificus*에 대하여 항균 활성을 나타냈으며 UJR17의 균체 현탁액은 *V. vulnificus*와 *Streptococcus parauberis*에 항균 활성능이 있음을 확인하였다. UJT7은 *Bacillus* sp., UJT20과 UJR17은 *Pseudomonas* sp.로 확인되었으며 다양한 활용을 위한 추가적인 실험을 수행한 후 유익하게 이용 될 수 있을 것이라 사료된다.

Acknowledgments

This research was supported by the 2018 scientific promotion program funded by Jeju National University.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Yoo JW, KIM HJ, Lee HJ, Lee CG, Kim CS, Hong JS, *et al.* 2007. Interaction between invertebrate grazers and seaweed in the East coast of Korea. *J. Korean Soc. Oceanogr.* **12**: 125-132.
2. Cho JK, Lim YS, Hong D, Kim JK. 2012. Modeling algae transport in costal areas with marine afforestation. *J. Korean Soc. Mar. Environ. Eng.* **15**: 1-8.
3. Son HJ, Um MY, Kim IH, Cho SM, Han DS, Lee CH. 2016. In vitro Screening for anti-dementia activities of seaweed extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **45**: 966-972.
4. Lee MS, Lee YK. 2014. Effects of seaweed consumption on obesity and food intake. *Korean Contents Association* **14**: 478-485.
5. Kim JH, Kim YH, Kim SK, Kim BW, Nam SW. 2011. Properties and industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. *J. Korean Microbial. Biotechnol.* **39**: 189-199.
6. Campbell AH, Marzinelli EM, Gelber J, Steinberg PD. 2015. Spatial variability of microbial assemblages associated with a dominant habitat-forming seaweed. *Front. Microbiol.* **6**: 230. doi:

10.3389.
7. Duan D, Xu L, Fei X, Xu H. 1993. Short Communication: Marine organisms attached to seaweed surfaces in Jiaozhou Bay, China. *World J. Microb. Biot*. **11**: 351-352.
8. Marshall K, Joint I, Callow ME, Callow JA. 2006. Effect of marine bacterial isolates on the growth and morphology of axenic plantlets of the green alga *Ulva linza*. *Microbial Ecology* **52**: 30-310.
9. Yun KJ, Yang G, Feng Z, Nenkep VN, *et al*. 2010. Screening on receptor tyrosin kinase inhibitory activity of marine algae-derived symbiotic microorganisms. *Korean T. Pharmacogn*. **41**: 43-47.
10. Li Y, Li X, Son BW, Choi HD. 2003. Screening of antimicrobial activity from the marine-derived fungus. *Korean J. Phamacogn*. **34**: 142-144.
11. Choi JD, Park UK. 1993. Identification of the marine microorganisms producing bioactives. *Bull. Korean Fish. Soc*. **26**: 305-300.
12. Choi HJ, Jung MJ, Jeong YK. 2000. Isolation and identification of a marine bacterium producing an immunostimulant. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**:1145-1150.
13. Kim DH, Park SH, Kim JH, Lee HR, Heo MS. 2017. Screening of antimicrobial activity of marine-derived biomaterials against fish pathogens. *J. Life. Sci*. **45**: 250-256.
14. Ghimire KN, Katsutoshi I, Keisuke O, Hayashida T. 2007. Adsorptive separation of metallic pollutants onto waste seaweeds, *Porphyra Yezoensis* and *Ulva Japonica*. *Separ. Sci. Technol*. **42**: 2003-2018.
15. Paudyal H, Pangeni B, Inoue K, Kawakita H, Ohto K, Ghimire KN. 2013. Preparation of novel alginate based anion exchanger from *Ulva japonica* and its application for the removal of trace concentrations of fluoride from water. *Bioresource. Technol.* **148**: 221-227.
16. Jeju National University Industry-Academic Cooperation Foundation, JeJu Technopark. Composition comprising the extract of *Ulva japonica* for prevention of hair loss or promoting hair growth. Korea patent 10-2016-0073042.
17. Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochem. Sci*. **23**: 403-405.
18. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol*. **30**: 2725-2729.
19. Park SH, Kim JY, Kil YJ, Heo MS. 2014. Pylogenic diversity of bacterial community inhabited in Callyspongia Elegans. *J. Korean Microbiol*. **50**: 152-157.
20. Valgas C, Souza SM, Smania EFA. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbial*. **38**: 1678-4405.
21. Alfreider A, Pernthaler J, Amann R, Sattler B, Glockner F, Wille A, *et al.* 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.
22. Eilers H, Pernthaler J, Glöckner FO, Amann R. 2000. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol*. **66**: 3044-3051.
23. Zinger L, Amaral-Zettler LA, Fuhrman JA, Horner-Devin MC, Huse SM, Welch DB, *et al*. 2011. Global patterns of bacteria beta-diversity in seafloor and ecosystems. *PLoS One* **6**: e24570.
24. Vairappan CS, 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.
25. Burke C, Thomas T, Lewis M, Steinberg P, Kjelleberg S. 2011. Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *ISME J.* **5**: 590-600.
26. Pensyan A, Marshall-Jones Z, Holmstrom C, Kjelleberg S, Egan S. 2009. Antimicrobial activity observed among cultured epiphytic bacteria reflects their potential as source of new drugs. *FEMS Microbial Ecol.* **69**: 11-124.
27. Choi HR, Park SH, Kim DH, Kim JY, Heo MS. 2016. Phylogenetic diversity and community analysis of marine bacteria associated with *Ulva pertusa*. *J. Life Sci*. **26**: 819-825.
28. Roth-Schulze AJ, Pintado J, Zozaya-Valdes E, Cremades J, Ruiz P, Kjelleberg S, *et al.* 2018. Functional biogeography and host specificity of bacterial communities associated with the Marine Green Alga *Ulva* spp. *Mol. Ecol*. Doi: 10.1111/mec.14529.
29. Cha YK, Kim YS, Choi YS. 2012. Antimicrobial peptide as natural antibiotic materials. *Biotechnol. Bioprocess Eng*. **27**: 9-15.
30. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Cjikindas ML. 2001. Bacteriocin: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbial*. **71**: 1-20.
31. Baruzzi F, Quintieri L, Morea M, Caputo L. 2011. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food, pp. 1102-1111. *In* Vilas AM (ed.), Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances, Formatex: Badajoz, Spain.
32. Yilmaz M, Soran H, Beyatli Y. 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiol. Res*. **161**: 127-131.
33. Amin A, Khan MA, Ehsanullah M, Haroon U, Azam SMFAH. 2012. Production of peptide antibiotics by *Bacillus* SP. GU 057 indigenously isolated from saline soil. *Braz. J. Microbiol*. **43**: 1340-1346.
34. Berić T, Kojić M, Stanković S, Topisirović LJ, Degrassi G, Myers M, *et al.* 2012. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **50**: 25-31.
35. Chen Y, Li J, Xiao P, Zhu W, Mo Z. 2016. The ability of marine *Bacillus* spp. isolated from fish gastrointestinal tract and culture pond sediment to inhibit growth of aquatic pathogenic bacteria. *Iran J. Fish. Sci.* **15**: 701-714.
36. Arığ N, Suzer C, Gökvardar A, Başaran F, Çoban D, Yıldırım S, *et al.* 2013. Effects of probiotic (*Bacillus* sp.) supplementation during larval development of gilthead sea bream (*Sparus aurata, L.*). *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* **13**: 407-414.
37. Zuenko VA, Laktionov KS, Pravdin IV, Kravstsova LZ, Ushakova

NA. 2017. Effect of *Bacillus subtilis* in feed probiotic on the digestion of fish cultured in cages. *Iran J. Ichthyol.* **57**: 152-157.
38. Vachee A, Mossel DA, Leclerc H. 1997. Antimicrobial activity among *Pseudomonas* and related strains of mineral water origin. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 652-658.
39. Degrassi G, Aguilar C, Bosco M, Zahariev S, Pongor S, Venturi V. 2002. Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. *Curr. Microbiol.* **45**: 250-254.
40. Kumar A, Kumar S, Kumar S. 2005. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem. Eng. J.* **22**: 151-159.

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1803.03016