

Analysis of Intestinal Microbial Communities of Topshell (*Turbo cornutus*) from Coast of Jeju Island, Korea by 16S rDNA Sequence Analysis

Min-Sun Kim¹, Song-Hun Han¹, Jung Hwa Choi¹, Moon Soo Heo² and Jun-Chul Ko^{1*}

¹Jeju Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Jeju 63068, Korea

²College of Ocean Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

Received July 29, 2022 / Revised September 8, 2022 / Accepted September 14, 2022

This study investigated the diversity of intestinal microbial communities isolated from the intestine of topshell (*Turbo cornutus*) from the coast of Jeju Island (Beobhwan, Seogwipo city). Pure cultivation using the standard marine agar (MA) medium showed the most significant number of clusters. Aerobic and anaerobic culture allowed isolation of strains of 1.8×10^5 CFU·g⁻¹ and 0.4×10 CFU·g⁻¹ on average, respectively. The microbial population in the topshell intestine was classified into 4 phyla, 12 families, 26 genera, and 67 species. The microbes in the topshell intestine were detected by homology with 93~100% with standard strains. The microbes in the topshell intestine consisted of Proteobacteria 39%, Firmicutes 34%, Actinobacteria 21%, and Bacteroidetes 6%. The identified families were Alteromonadaceae (1), Shewanellaceae (4), Vibrionaceae (12), Phyllobacteriaceae (1), Rhodobacteraceae (8), Bacillaceae (21), Paenibacillaceae (2), Cellulomonadaceae (1), Mycobacteriaceae (6), Nocardiaceae (4), Streptomycetaceae (3) and Flavobacteriaceae (4). *Bacillus* sp. and *Vibrio* sp. accounted for the greatest portion of the separated strains. Among the isolated microorganisms, some strains had probiotic functions.

Key words : Intestinal microbial communities, marine bacteria, *Turbo cornutus*

서 론

장내세균(Intestinal microorganisms)은 숙주의 건강, 질병, 면역 및 대사 관계에 중추적인 역할을 하며, 장내세균의 구성은 숙주의 서식환경과 먹이로부터 큰 영향을 받는 것으로 알려져있다. 장내세균 다양성에 관한 연구는 숙주의 섭식, 생리적 특성 및 주변 환경 요소를 이해하는데 필요한 지표로 사용되기도 한다[7].

육상과는 다른 환경의 해양은 생물학적 다양성이 크며 [24], 다양한 미생물 군집을 이루고 있다. 이러한 이유로 최근 수년에 걸쳐 미생물 군집에 대한 연구가 진행되고 있다[18, 19, 24].

해양동물의 장내세균에 관한 연구는 해양척추동물인 어류를 대상으로한 연구가 꾸준히 이행되고 있다[4, 8, 12, 13, 23, 25, 28]. 해양무척추동물의 연구 사례로 붉은명게의 장내세균으로부터 새로운 항생물질이 발견됐으며[17],

오분자기의 장내세균이 인체 질병균에 대한 억제효과를 나타내어 새로운 항생물질의 발견 가능성을 확인할 수 있었다[14]. 그러나 이후 불가사리, 소라, 오분자기, 붉은명게[6, 11, 14, 17, 21] 등 상대적으로 미비하다.

본 연구는 경제적 가치가 높은 대표 해양무척추동물인 소라(*Turbo cornutus*)의 장내세균 다양성을 조사하였다. 한국보건산업진흥원(KHIDI)에 따르면 우리나라는 소라 섭취량이 높게 나타났다[26]. 이는 소라 섭취에 따른 소라 유래 미생물에 대한 노출도가 높은 것을 의미하며 인간의 건강에도 영향을 미칠 수 있어 연구의 필요성이 크다.

소라는 원시복족목(Archaeogastropoda), 소라과(Turbiniidae)에 속하는 연체동물로 자웅이체이고, 5-8월에 산란하며 우리나라 제주 연안, 통영, 여수 등 남해 연안과 일본 및 중국에 주로 서식한다[2]. 2000년대 초반까지 소라의 성장과 생식에 관한 연구가 진행되었으며, 이후 포항 죽도에서 어획된 소라 장에서 분리된 *Bacillus* sp. 에서 polysaccharidase 생성능이 밝혀졌고[6], 우리나라 서해안에서 채집한 소라에서 인체유해질병을 억제하는 동시에 프로바이오틱 기능을 갖는 *Lactobacillus* sp.가 분리 되었다 [11]. 그러나 이후, 소라 공생세균은 물론 장내세균에 대한 연구는 매우 미비한 실정이다.

*Corresponding author

Tel : +82-64-750-4372, Fax : +82-64-743-5884

E-mail : kjc3410@korea.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.

재료 및 방법

소라 채집

이번 연구에 사용된 소라는 제주도 서귀포시 법환동 연안에서 채집된 시료이며(Fig. 1) 평균 각고 95.96±1.22 mm, 패각 포함 평균 무게 182.6±1.19 g, 패각을 제거한 육중량 평균 무게 69.06±1.08 g로 총 3개체를 실험에 사용하였다.

소라 장내세균 분리 및 배양

소라 장내세균의 다양성을 조사하기 위하여, 멸균시킨 해부도구로 패각을 제거하고 내장 1 g을 적출하였다. 적출한 검체는 0.85% 생리식염수에 혼탁하여 homogenizer (UB32-50, Korea)로 분쇄 및 균질화 시킨 후, 10⁻¹ ~ 10⁻⁴ 배로 단계희석을 하였다. 단계희석한 희석액을 100 ul씩 평판배지에 적하하여 도말한 후, 25°C에 최대 3주간 incubator (JSGI-100T, JSR, Korea)에서 일반 배양을, CO₂ incubator (MC5-15AC, Sanyo, Japna)에서 혐기 배양하였다. 배지는 일반 미생물 증식 영양배지인 Brain Heart Infusion Agar (Difco, USA), Tryptone Soy Agar (Difco, USA), 저온 일반세균 배지인 Reasoner's 2A agar (Difco, USA), 유산균 분리 및 배양 전용 배지인 Lactobacilli MRS Agar (Difco, USA), 장내 *Vibrio* 균 검출을 위해 Thiosulfate-Citrate-Bile salt-Sucrose agar Agar (Difco, USA) 배지를 사용하였다. 소라의 서식환경을 고려하여 각 배지마다 NaCl (Sigma, USA)를 1%씩 첨가하였으며, 추가로 해양 미생물 증식배지인 Marine agar (Difco, USA)를 사용하였다.

각 배지에서 생육한 세균의 크기, 색깔, 모양 등 형태학적 특성을 육안으로 관찰한 후, 동일 배지에 계대배양을 반복하여, 순수 분리 하였다. 세균수는 CFU·g⁻¹ (Colony

Forming unit)으로 환산하였으며, 분리된 균주는 24% (v/v) Glycerol (Sigma, USA)에, *Vibrio* sp.는 DMSO (Sigma, USA)에 현탁한 뒤, -85°C Deep freezer (Ilshinbiobase, Korea)에 냉동 보관하여 추후 실험에 사용하였다.

분리균주의 DNA 분리 및 PCR 증폭

각각의 분리균주를 평판배지와 같은 성분의 액체배지에서 동일한 조건으로 배양하였다(VS-8480, Korea). 추후, 배양액을 12,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 균체를 분리하고 Accuprep Genomic DNA extraction kit (Bioneer, Korea)을 사용하여 Genomic DNA를 추출하였다. 추출된 Genomic DNA 1 ul, 27 Forward primer (5'-AGAGTTTGAT CMTGGCTCAG-3'), 1492 Reverse primer (5'-TACGGYTA CCTTGTACGACTT-3') 각각 0.5 μM씩, 20 ul Premix (DNA polymerase, dNTPs, reaction buffer) (Bioneer, Korea)를 사용하여 PCR (US/MYGein32, MJ RESEARCH, USA)반응을 수행하였다. 반응 주기는 94°C에서 7분간 initial denaturation, 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension 과정을 총 30회 반복하였으며, 최종적으로 다시 한번 72°C에서 10분간 extension 시켰다. 각 분리균주의 증폭된 PCR산물은 정제 및 DNA의 농도를 측정된 후, 1.5% agarose gel (Lonza, SWISS)에 0.5 μg/ml ethidium bromide (EtBr) (Sigma, USA)로 염색한 뒤 전기영동을 수행하여 band를 확인하였다.

16S rDNA 염기서열 분석 및 계통수 작성

증폭된 16S rDNA PCR 산물은 ㈜제노텍(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열은 미국 국립생물정보센터 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search

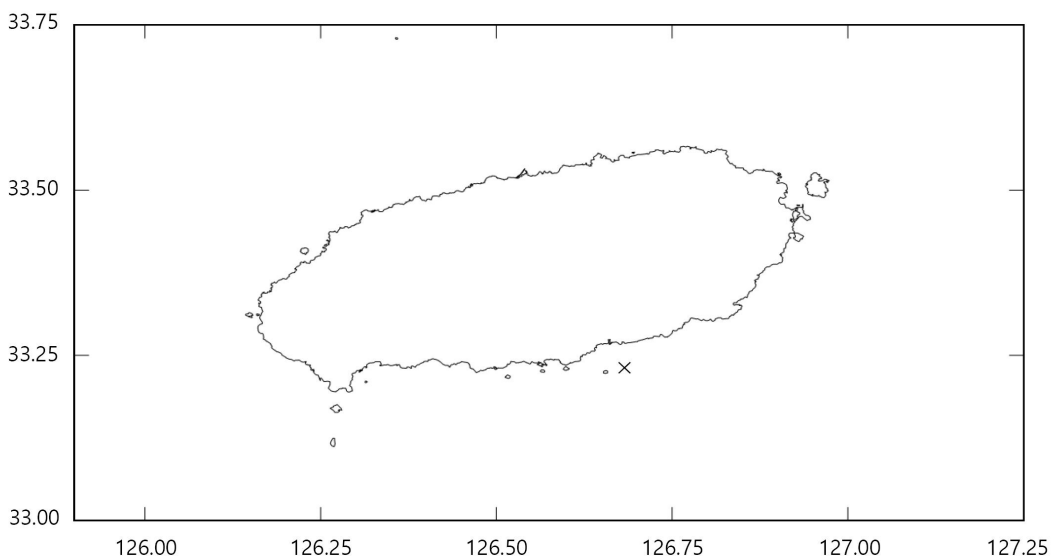


Fig. 1. Map for collection of topshell (*Turbo cornutus*) in jeju island. Dotted 'x' indicate the sampling sites.

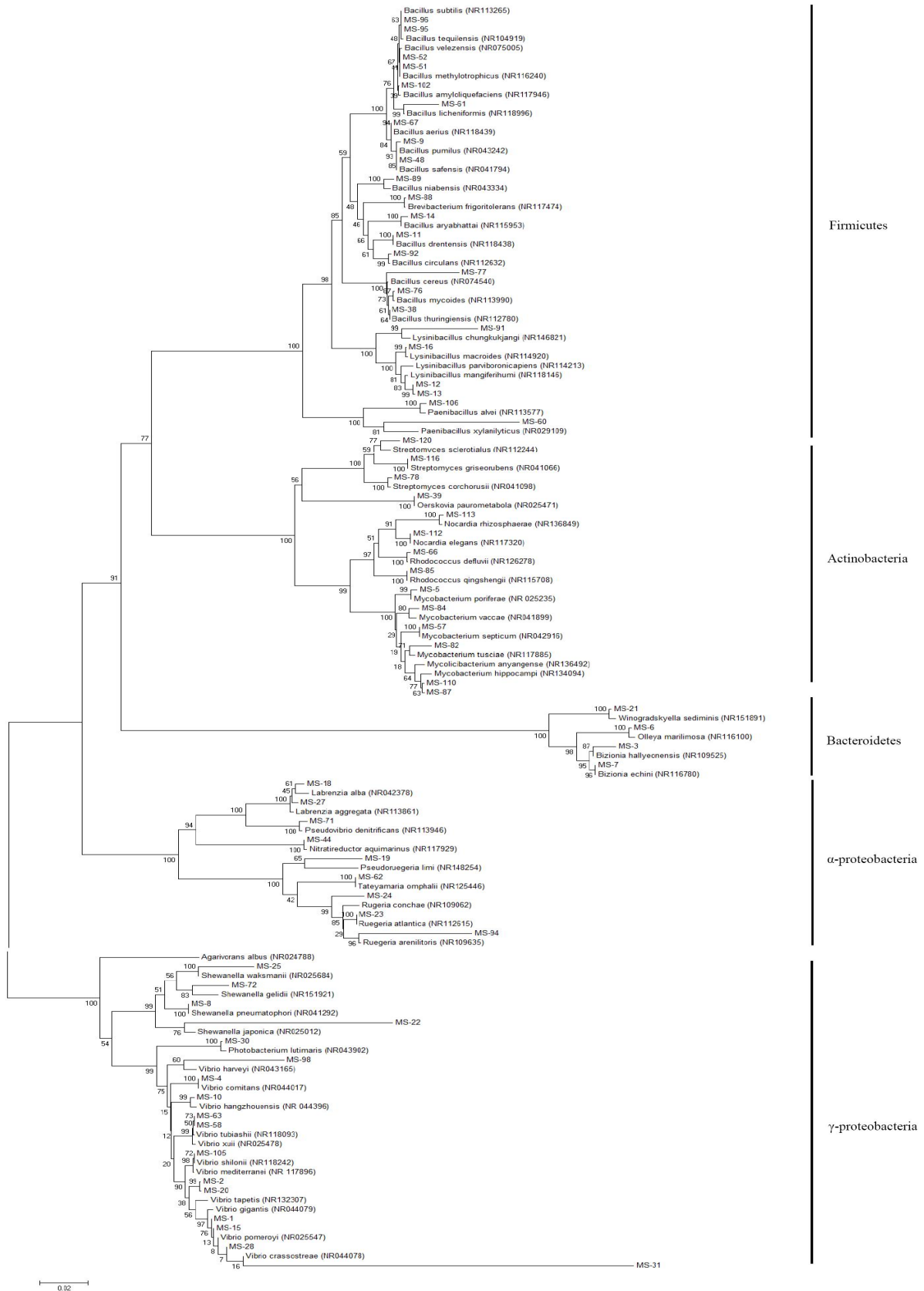


Fig. 2. Neighbour-joining phylogenetic tree determined from the 16S rDNA sequences of bacteria isolated from intestine of topshell (*Turbo corntus*).

Tool) program Genbank의 database를 참고하여 기존 등록된 미생물들의 염기서열과 비교 분석하였다. 계통수 작성은 ClustalW software로 Multiple alignment를 한 후 Mega 6.0 program을 이용하였다. Bootstrap을 1,000회 반복실행하여 신뢰도를 확보하였다.

결과 및 고찰

소라 장내세균 분리

각각의 평판배지상에서 생육한 집락의 모양, 색상 등 형태학적 특징을 육안으로 구분 및 순수 분리하여 각 배지별 CFU·g⁻¹으로 나타내었다(Table 1). 소라의 내장 1g 당 평판배지상 호기성 세균은 평균 1.8×10⁵으로 나타났으며, 혐기성 세균은 평균 0.4×10⁵으로 나타났다. 호기 배양시 최대 집락 개수는 4.4×10⁵으로 MA 배지에서 관찰되었으며 이후 염기서열 분석 결과 또한 MA 배지에서 가장 다양한 종류의 균주가 나타났다.

혐기 배양은 0.7×10 CFU·g⁻¹으로 1% NaCl 가 첨가된 BHIA 배지로 나타났다.

소라 장내세균 다양성 연구에 최적인 배지는 MA로 나타났으며 이러한 결과는 이전 보고된 해양 동물 유래 세균의 배양학적 결과와 같았다[12-14].

16S rDNA 염기서열의 계통학적 분석

소라의 내장으로부터 분리한 세균 군집으로부터 도출된 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 NBLAST program을 분석한 결과, 4문(phyla) 12과(Families) 26속(Genera) 67종(Species)으로 분류되었다(Fig. 2). Proteobacteria (Class: α-proteobacteria 13%, γ-proteobacteria 26%)문이 가장 우점하였으며, Firmicutes문 34%, Actinobacteria문 21%, Bacteroidetes문 6%로 각각 나타났다(Table. 2).

본 연구결과에서 출현한 일부 세균군(*Shewanella* sp., *Ruegeria* sp., *Vibrio* sp., *Bacillus* sp., *Mycobacterium* sp.)은 이전 보고된 제주 연안 유래 해양 동물의 장내세균과 공통적으로 존재하는 것을 확인할 수 있었다[13, 14, 21].

Proteobacteria문 중 α-proteobacteria장은 *Labrenzia* sp., *Nitratireductor* sp., *Pseudoruegeria* sp., *Pseudovivbrio* sp., *Ruegeria* sp., *Tateyamaria* sp. 총 9개 균주로 분류 되었다. 표준균주와 염기서열 상동성을 확인한 결과, 95-99%의 유사율을 보였다. 그 중 *Pseudoruegeria* sp., *Ruegeria* sp.는 우리나라 전 연안에 존재하는 해양 유래 세균 속으로 주로 불가사리, 오분자기, 전복에서 우점종으로 나타났으며 [14, 15, 21], 본 실험에서 분리된 MS-19 (*P. limi*, 95%), MS-24 (*R. conchae*, 97%), MS-94 (*R. arenilitoris*, 97%) 각각 표준균주와 낮은 유사율로 나타났다.

γ-Proteobacteria장은 *Agarivorans* sp., *Shewanella* sp., *Photobacterium* sp., *Vibrio* sp. 총 17개 균주로 분류되었다. 표준균주와 94-99% 유사율 범위를 보였으며, 그 중 *Vibrio* sp.는 총 11개 균주가 분리되어 가장 우점하였다. *Vibrio* sp.는 대부분이 해양 동물들의 주요 질병원이며, 수중 전역에 넓게 분포되어 있어 모든 해양 동물 장내세균군에서 흔히 발견된다[7, 9]. 특히, *V. harveyi*는 해양무척추동물 장내세균군의 한 종류로 출현범위가 넓고[9], 기회감염을 일으키는 병원균이나 아직 소라에서 병원성 감염 사례는 보고된 바 없다. 본 실험에서 분리된 MS-98은 표준균주 *V. harveyi*와 유사율이 94% 미만으로 매우 낮게 나타났다. 소라의 장내세균 중 Proteobacteria문의 우점은 해양동물 유래 세균의 대부분이 Proteobacteria문에 속하는 연구결과와 일치한다[7, 9, 19].

Bacteroidetes문은 *Bizionia* sp., *Olleya* sp., *Winogradskyella* sp. 총 4개 균주로 모두 Flavobacteria과로 해양 유래 세균군으로 나타났다. 모두 표준균주와 99%의 유사율을 보였다.

Actinobacteria문은 *Oerskovia* sp., *Mycobacterium* sp., *Mycolicibacterium* sp., *Nocardia* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp. 총 14개 균주로 분리되었다. 표준균주와 98-100%의 유사율을 보였다.

Firmicutes문은 *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Lysinibacillus* sp., *Paenibacillus* sp. 총 23개 균주로 분리 됐으며, 표준균주와 93-100%의 유사율을 보였다. 그 중 *Bacillus* sp.가 15개 균주로 가장 우점하였으며 96-100%의 유사율

Table 1. Colony forming unit (CFU) values of microbial communities isolated from intestine of topshell (*Turbo cornutus*)

Culture	<i>T.cornutus</i> No.	Medium					mean counts
		MA	1% BHIA	1% TSA	1% R2A	1% TCBS	
Aerobic	1	3.9×10 ⁵	4.0×10 ⁵	7.9×10 ⁴	3.7×10 ⁴	1.5×10 ²	1.8×10 ⁵
	2	4.4×10 ⁵	3.9×10 ⁵	8.2×10 ⁴	3.2×10 ⁴	1.4×10 ²	1.9×10 ⁵
	3	3.9×10 ⁵	3.7×10 ⁵	8.1×10 ⁴	3.5×10 ⁴	1.1×10 ²	1.7×10 ⁵
	mean counts	4.0×10 ⁵	3.8×10 ⁵	8.0×10 ⁴	3.4×10 ⁴	1.3×10 ²	1.8×10 ⁵
Anaerobic (CO ₂)	1	0.4×10	0.2×10	0.6×10	0.5×10	0.2×10	0.2×10
	2	0.7×10	1.4×10	0.1×10	0.9×10	0.1×10	0.6×10
	3	0.5×10	0.8×10	0.4×10	0.3×10	ND	0.4×10
	mean counts	0.5×10	0.8×10	0.3×10	0.5×10	0.1×10	0.4×10

Table 2. Comparisons of 16S rDNA sequence among the isolated microbes and standard strains

Phylogenetic group	Sample no.	Closest type strain (determined by NBLAST)	Similarity (%)	Sequence length	
Proteobacteria					
α-proteobacteria					
<i>Phyllobacteriaceae</i>	MS-44	<i>Nitratireductor aquimarinus</i> (NR_117929)	99	1417	
<i>Rhodobacteraceae</i>	MS-27	<i>Labrenzia aggregata</i> (NR_113861)	98	1408	
	MS-18	<i>Labrenzia alba</i> (NR_0423783)	98	1477	
	MS-19	<i>Pseudoruegeria limi</i> (NR_148254)	95	1383	
	MS-71	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> (NR_113946)	99	1407	
	MS-94	<i>Ruegeria arenilitoris</i> (NR_109635)	97	1384	
	MS-23	<i>Ruegeria atlantica</i> (NR_112615)	99	1385	
	MS-24	<i>Ruegeria conchae</i> (NR_109062)	97	1384	
	MS-62	<i>Tateyamaria omphalii</i> (NR_125446)	99	1386	
γ-proteobacteria					
<i>Alteromonadaceae</i>	MS-1	<i>Agarivorans albus</i> (NR_024788)	97	1454	
<i>Shewanellaceae</i>	MS-72	<i>Shewanella gelidii</i> (NR_151921)	96	1506	
	MS-22	<i>Shewanella japonica</i> (NR_036023)	99	1434	
	MS-8	<i>Shewanella pneumatophori</i> (NR_041292)	99	1515	
	MS-25	<i>Shewanella waksmanii</i> (NR_025684)	97	1540	
	<i>Vibrionaceae</i>	MS-30	<i>Photobacterium lutimaris</i> (NR_043902)	98	1508
MS-4		<i>Vibrio comitans</i> (NR_044017)	99	1432	
MS-28		<i>Vibrio crassostreae</i> (NR_044078)	99	1496	
MS-98		<i>Vibrio harveyi</i> (NR_043165)	94	1436	
MS-31		<i>Vibrio gigantis</i> (NR_044079)	96	1498	
MS-10		<i>Vibrio hangzhouensis</i> (NR_044396)	99	1475	
MS-2		<i>Vibrio mediterranei</i> (NR_117896)	97	1471	
MS-15		<i>Vibrio pomeroyi</i> (NR_025547)	99	1507	
MS-105		<i>Vibrio shilonii</i> (NR_118242)	99	1450	
MS-20		<i>Vibrio tapetis</i> (NR_132307)	98	1533	
MS-58		<i>Vibrio tubiashii</i> (NR_118093)	99	1471	
MS-63		<i>Vibrio xuii</i> (NR_025478)	99	1435	
Bacteroidetes					
<i>Flavobacteriaceae</i>	MS-7	<i>Bizionia echini</i> (NR_116780)	99	1478	
	MS-3	<i>Bizionia hall yeonesis</i> (NR_109525)	99	1448	
	MS-6	<i>Olleya marilimosa</i> (NR_116100)	99	1458	
	MS-21	<i>Winogradskyella sediminis</i> (NR_151891)	99	1423	
Actinobacteria					
<i>Cellulomonadaceae</i>	MS-39	<i>Oerskovia paurometabola</i> (NR_025471)	99	1486	
<i>Mycobacteriaceae</i>	MS-87	<i>Mycobacterium anyangense</i> (NR_136492)	98	1420	
	MS-110	<i>Mycobacterium hippocampi</i> (NR_134094)	98	1473	
	MS-82	<i>Mycobacterium tusciae</i> (NR_117885)	98	1472	
	MS-84	<i>Mycobacterium vaccae</i> (NR_041899)	98	1439	
	MS-5	<i>Mycolicibacterium poriferae</i> (NR_025235)	99	1450	
	MS-57	<i>Mycolicibacterium septicum</i> (NR_042916)	100	1483	
	<i>Nocardiaceae</i>	MS-112	<i>Nocardia elegans</i> (NR_117320)	99	1439
MS-113		<i>Nocardia rhizosphaerae</i> (NR_136849)	99	1425	
MS-66		<i>Rhodococcus defluvii</i> (NR_126278)	99	1371	
MS-85		<i>Rhodococcus jialingiae</i> (NR_115708)	99	1489	
<i>Streptomycetaceae</i>		MS-78	<i>Streptomyces corchorusii</i> (NR_041098)	99	1471
		MS-116	<i>Streptomyces griseorubens</i> (NR_041066)	99	1476
	MS-120	<i>Streptomyces sclerotialis</i> (NR_112244)	98	1476	

Table 2. Continued

Phylogenetic group	Sample no.	Closet type strain (determined by NBLAST)	Similarity (%)	Sequence length
Firmicutes				
<i>Bacillaceae</i>				
	MS-67	<i>Bacillus aerius</i> (NR_118439)	100	1466
	MS-14	<i>Bacillus aryabhatai</i> (NR_115953)	99	1533
	MS-102	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (NR_117946)	99	1448
	MS-77	<i>Bacillus cereus</i> (NR_074540)	96	1512
	MS-92	<i>Bacillus circulans</i> (NR_112632)	99	1473
	MS-11	<i>Bacillus drentensis</i> (NR_118438)	99	1469
	MS-93	<i>Bacillus licheniformis</i> (NR_118996)	98	1545
	MS-51	<i>Bacillus methylotrophicus</i> (NR_116240)	99	1445
	MS-76	<i>Bacillus mycoides</i> (NR_113990)	99	1477
	MS-89	<i>Bacillus niabensis</i> (NR_043334)	98	1478
	MS-9	<i>Bacillus pumilus</i> (NR_043242)	99	1434
	MS-48	<i>Bacillus safensis</i> (NR_041794)	99	1434
	MS-95	<i>Bacillus subtilis</i> (NR_113265)	99	1472
	MS-96	<i>Bacillus tequilensis</i> (NR_104919)	99	1456
	MS-38	<i>Bacillus thuringiensis</i> (NR_112780)	99	1477
	MS-52	<i>Bacillus velezensis</i> (NR_070005)	99	1550
	MS-88	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (NR_117474)	99	1503
	MS-91	<i>Lysinibacillus chungkukjangi</i> (NR_146821)	95	1510
	MS-16	<i>Lysinibacillus macroides</i> (NR_114920)	99	1504
	MS-12	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i> (NR_118146)	99	1452
	MS-13	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i> (NR_114213)	98	1477
<i>Paenibacillaceae</i>				
	MS-106	<i>Penibacillus alvei</i> (NR_113577)	98	1476
	MS-60	<i>Panibacillus xylanilyticus</i> (NR_029109)	93	1546

을 보였다. *Lysinibacillus* sp.는 기존 *Bacillus* sp.에서 새로 분리된 속(genus)으로 아직 해양과 관련된 정보는 미비하다. 본 실험에서 분리된 MS-91균주는 발효식품에서 최초 분리된 *Lysinibacillus chungkukjangi* [16]와 유사도가 95%로 가장 가깝게 나타났다.

대부분의 모든 해양동물은 물에 직접적으로 노출되어 많은 영향을 받고 있기 때문에, 사실상 수중에 존재하는 세균의 분포도가 높다[9, 18]. 일본 연안산 소라의 장내세균군의 상위 우점군(*Bacillus* sp., *Vibrio* sp.) 또한 대부분이 해양 유래 세균으로 나타났다[10].

우리나라 포항에서 어획된 소라 장내세균에서 갈조류 소화와 관여하는 다당류 분해효소(polysaccharidase)를 생산하는 갖는 3개 균주가 검출되었다[6]. 그리고 먹이(해조류)가 동일한 오분자기, 전북의 장내세균에서도 해조류 유래(*Microbulbifer* sp., *Microbacterium* sp.) 및 알긴산 분해능을 갖는(*Vibrio* sp.) 균주가 분리 되었다[14, 30]. 본 연구에서 분리된 MS-1 (*A. albus*, 97%), MS-16 (*Lysinibacillus macrolides*, 99%), MS-21 (*W. sediminis*, 99%), MS-22 (*Shewanella japonica*, 99%), MS-28 (*V. crassostreae*, 99%), MS-31 (*V. gigantis*, 96%), MS-93 (*Bacillus licheniformis*, 98%)은 해조류 유래 균주로서 해조류의 주요 구성성분인

식물 유래 다당류인 알긴산과 한천 분해능을 갖고 있는 균주이며[5, 6, 10, 20, 29-32], 특히 MS-1, MS-21의 경우 배양시 한천이 액화되는 강한 한천 분해능이 관찰되었다. 또한 MS-16, MS-93은 숙주 생물의 장내 식이성 알긴산을 분해하며, 소화를 돕는 프로바이오틱 기능을 갖는다[27]. 이처럼, 먹이가 동일한 동물에서 유사 균주들의 출현은 숙주의 섭식특성이 장내세균 군집 형성에 영향을 미친다는 결과를 뒷받침한다[6, 7, 22].

MS-1 (*A. albus*, 97%), MS-2 (*V. mediterranei*, 97%), MS-19 (*Pseudoruegeria limi*, 95%), MS-24 (*Ruegeria conchae*, 97%), MS-25 (*Shewanella waksmanii*, 97%), MS-31 (*V. gigantis*, 96%), MS-60 (*Paenibacillus xylanilyticus*, 93%), MS-72 (*Shewanella gelidii*, 96%), MS-77 (*Bacillus cereus*, 96%), MS-91 (*Lysinibacillus chungkukjangi*, 95%), MS-94 (*Ruegeria arenilitoris*, 97%) 및 MS-98 (*V. harveyi*, 94%)은 모두 표준 균주와 97% 이하의 유사도를 보였다. 같은 종의 분리균주와 표준균주와의 유사도가 낮은 이유는 집단 내 혼합되어 자라난 세균은 같은 종일지라도 단독으로 자라난 균과는 생리적 특성이 다르다. 여러 복잡한 상호작용과 대사과정으로 인하여 언제든지 생리적, 유전적, 화학적인 변화가 가능하기 때문이다[9]. 반면, 세균의 신종 여부는 1994년

Goebel에 의해 다음과 같이 입증되었다. 16S rDNA 유전자의 유사도가 97% 미만일 때 사실상 DNA-DNA의 유사도는 70% 미만으로 신 균주로 간주하였다[3]. 이에 따라 표준균주와 유사한 분리균주가 환경에 따른 ‘유전적 변이’ 인지에 대한 추가 연구가 필요하다.

최근 들어, 미생물 군집 조사로 차세대 염기서열 분석 방법(Next-generation sequencing)을 적용하여 다양한 연구가 진행되고 있다[1]. 하나의 개체로 방대한 유전정보를 도출할 수 있고 시간이 절약되며 난배양성세균까지 동정할 수 있는 장점이 있지만, 고가 비용의 문제로 실질적인 활용이 어렵다. 그러나 자연계로부터 아직 분리되지 않은 균주들의 형태학적, 생화학적 조사에 있어 배양 분리 방법 또한 기초연구로서 중요하며 꾸준히 이행되어야 한다.

본 연구는 제주 연안 소라의 장내세균 다양성 조사 및 분리균주의 유전학적 데이터 확보에 의의를 두었으며, 앞으로 해양 유래 동물 관련 공생세균 및 장내세균 연구에 기초자료로 활용하고자 수행하였다.

감사의 글

이 논문은 2022년도 국립수산물과학원 수산시험연구소 사업 「제주주변 연근해 어업 및 환경생태 조사(R2022038)」의 지원으로 수행된 연구입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Barriuso, J., Valverde, J. R. and Mellabo, R. P. 2011. Estimation of bacterial diversity using next generation sequencing of 16S rDNA: a comparison of different workflows. *BMC Bioinformatics* **12**, 473.
- Chang, D. S. 2002. Studies on the stock assessment and management of the turban shell, *Batillus cornutus* in jeju coastal waters, korea. Ph.D. dissertation, Jeju University, Jeju, Korea
- EaBMG, S. and Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition on bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 846-849.
- Einar, R. G., Sigmund, S., Reider, M. B., Stale, R. and Ashild, K. 2006. Characterisation of the microbiota associated with intestine of atlantic cod (*Gadus morhua* L.): the effect of fish meal, standard soybean meal and a bio-processed soybean meal. *Aquaculture* **261**, 829-841.
- Elena, P. I., Tomoo, S., Nataliya, M. G., Vassillii, I. S., Valery, V. M., Dan, V. N. and Richard, C. 2001. *Shewanella japonica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1027-1033.
- Gomare, S., Kim, H. A., Ha, J. H., Lee, M. W. and Park, J. M. 2011. Isolation of the polysaccharidase-producing bacteria from the gut of sea snail, *Batillus cornutus*. *Kor. J. Chem. Eng.* **28**, 1252-1259.
- Harris, J. M. 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb. Ecol.* **25**, 1995-231.
- Hasen, G. H., Strom, E. and Olafsen, J. A. 1992. Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 461-470.
- Hirak, R. D., Neelam, M., Jaya, C., Supriya, K. and Surajit, D. 2013. Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 561-571.
- Ito, M., Watanabe, K., Maruyama, T., Mori, T., Niwa, K., Chow, S. and Takeyama, H. 2018. Enrichment of bacteria and alginate lyase genes potentially involved in brown alga degradation in the gut of marine gastropods. *Nature* **9**, 2129.
- Kang, C. H., Shin, Y. J., Kim, Y. G. and So, J. S. 2016. Isolation of Lactobacillus strains from shellfish for their potential use as probiotics. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **21**, 46-52.
- Kim, A. R. and Kim, D. H. 2015. Diversity of cultured and uncultured bacteria in the gut of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Aquat. Sci.* **48**, 447-453.
- Kim, M. S., Lee, S. J. and Heo, M. S. 2018. Research on the diversity of intestinal microbial communities of red tilefish (*Branchiostegus japonicus*) by 16S rDNA sequence analysis. *J. Life Sci.* **28**, 361-368.
- Kim, M. S., Lee, S. J. and Heo, M. S. 2018. Investigation of microbial communities in *Sulculus diversicolor super-tecta* through 16S rRNA sequencing and antibacterial monitoring of harmful Strains. *J. Life Sci.* **28**, 1477-1488.
- Kim, S. H., Lee, C. H., Song, Y. B., Kim, B. Y., Hyun, S. Y. and Lee, Y. D. 2012. Reproductive cycle of small abalone, *Haliotis diversicolor aquatilis* in jeju coastal waters. *J. Dev. Reprod.* **16**, 145-153.
- Kim, S. J., Jang, Y. H., Hamada, M., Ahn, J. H., Weon, H. Y., Suzuki, K. I., Whang, K. S. and Kwon, S. W. 2013. *Lysinibacillus chungkukjangi* sp. nov., isolated from chungkukjang korean fermented food. *J. Microbiol.* **51**, 400-404.
- Kim, Y. O., Nam, B. H., Kim, D. G., An, C. M., Lee, J. S. and Kim, W. J. 2016. Novel microorganism having antibacterial activity and method for producing pseudane using same. Korea patent 10-2015-0056985.
- Koh, H. W., Rani, S., Hwang, H. B. and Park, S. J. 2016. Microbial community structure analysis from jeju marine sediment. *Kor. J. Microbiol.* **52**, 3.
- Kurahashi, M. and Yokota, A. 2002. A preliminary report of phylogenetic diversity of bacterial strains isolated from marine creatures. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **48**, 251-259.
- Kurahasi, M. and Yokota, A. 2004. *Agarivorans albus* gen.

- nov., sp. nov., a γ -proteobacterium isolated from marine animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 693-697.
21. Lee, H. R., Park, S. H., Kim, D. H., Moon, K. M. and Heo, M. S. 2018. Microbial community analysis isolated from red starfish (*Certanardoa semiregularis*) gut. *J. Life Sci.* **28**, 955-961.
 22. Mani, S. R., Vijanya, K., Jacob, J. P., Vijayakumar, S. and Kandhasamy, S. 2021. Evaluation of probiotic properties of *Lysinibacillus marcroides* under *in vitro* conditions and culture of *Cyprinus carpio* on growth parameters. *Arch. Microbiol.* **203**, 4705-4714.
 23. Moon, Ch. Y., Ko, J. C., Kim, M. S. and Heo, M. S. 2020. Phylogenetic diversity and antibacterial activity in bacterium from ballon fish (*Diodon holocanthus*) of jeju island. *J. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 57-63.
 24. Moon, Y. G. 2009. Diversity of marine microorganisms isolated from intertidal zone in the summer season of jeju island. Ph.D. dissertation, Jeju University, Jeju, Korea
 25. Nielsen, S., Walburn, J. W., Verges, A., Thomas, T. and Egan, S. 2017. Microbiome patterns across the gastrointestinal tract of the rabbitfish *Siganus fuscescens*. 2017. *PeerJ.* **5**, e3317.
 26. KHIDI. 2019. National nutrition statistics. cheongju, korea: korea health industry development institute. <https://www.khidi.or.kr/kps/dhraStat/result2?menuId=MENU01653&year=2019>
 27. Park, Y. J., Kim, H. H., Won, S. H., Ali, H., Hasan, M. T., Kong, I. S. and Bai, S. C. 2019. Effects of two dietary probiotics (*Bacillus subtilis* or *licheniformis*) with prebiotics (manna or fructooligosaccharide) in japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* **26**, 316-327.
 28. Parris, D. J., Brooker, R. M., Morgan, M. A., Dixson, D. L. and Swewart, F. J. 2016. Whole gut microbiome composition of damselfish and cardinalfish before and after settlement. *PeerJ.* **4**, e2412.
 29. Shang, Q., Jiang, H., Cai, C., Hao, J., Li, G. and Yu, G. 2018. Gut microbiota fermentation of marine polysaccharides and its effects on intestinal ecology: an overview. *Carbohydr. Chem.* **179**, 173-185.
 30. Tanaka, R., Shibata, T., Miyake, H., Mori, T., Tamaru, Y., Ueda, M. and Bossier, P. 2016. Temporal fluctuation in the abundance of alginate degrading bacteria in the gut of abalone *Haliotis gigantean* over 1year. *Aquac. Res.* **47**, 2899-2908.
 31. Wang, M., Chen, L., Zhang, Z., Wang, X., Qin, S. and Yan, P. 2017. Screeening of alginate lyase-excrting microorganisms from the surface of brown algae. *AMB Express* **7**, 74.
 32. Zhang, D. C., Liu, Y. X., Huang, H. J. Weber, K. and Margesin, R. 2016. *Winogradskyella sediminis* sp. Nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 3157-3163.

초록 : 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 제주연안 소라(*Turbo cornutus*) 장내세균 다양성 조사

김민선¹ · 한송현¹ · 최정화¹ · 허문수² · 고준철^{1*}

(¹국립수산과학원 제주수산연구소, ²제주대학교 해양과학대학 수산생명의학과)

본 논문은 제주연안에서 채집한 소라(*Turbo cornutus*)의 장내세균을 분리하고 군집의 다양성을 조사하였다. 표준배지를 사용하여 순수 정체 배양 결과 MA agar에서 가장 많은 군집을 나타냈다. 일반 배양 CFU값은 평균 1.8×10^5 , 혐기 배양 CFU값은 평균 0.4×10^6 으로 보다 적게 나타났다. 기존 표준균주와 16S rDNA sequence 유사도 비교 분석 결과 크게 4문 12과 26속 67종으로 분류되었다. 표준균주와의 상동성 범위는 93-100%로 나타났다. 소라장내세균 군집은 크게 Proteobacteria 39% (α -proteobacteria; Phyllobacteriaceae (1), Rhodobacteraceae (8) / γ -proteobacteria; Alteromonadaeaceae (1), Shewanellaceae (4), Vibrionaceae(12))로 가장 우점하였고, Firmicutes 34% (Bacillaceae (21), Paenibacillaceae (2)), Actinobacteria 21% (Cellulomonadaceae (1), Mycobacteriaceae (6), Nocardiaceae (4), Streptomycetaceae (3)), Bacteroidetes 6% (Flavobacteriaceae (4))로 각각 나타났다. *Bacillus* sp., *Vibrio* sp.이 가장 우점 하였으며, 그 외 대부분의 분리 균주는 해양 유래 관련 균주로 나타났다. 이전 보고된 제주 연안에 서식하는 해양동물 장내세균군과 비슷한 양상을 보였다. 분리된 일부 균주가 단당류(Cellulose), 다당류(alginate, agar)분해능을 갖고 있는 것으로 나타났는데, 대부분이 해조류 유래 세균으로 소라의 섭이가 장내세균군과 관련됨을 알 수 있었다. 동시에 probiotics 기능을 갖고 있는 일부 균주도 분리되었다.