

피조개 양식장 내 용혈성 미생물의 다양성 분석

권병근 · 김영옥 · 남보혜 · 김우진 · 공희정 · 김봉석 · 지영주 · 이상준 · 안철민 · 김동균[†]

국립수산물학원 전략양식연구소 생명공학과

Analysis of diversity of hemolytic microbiome from aquafarm of arkshell, *Scapharca broughtonii*

Byeong-Geun Gwon, Young-Ok Kim, Bo-Hye Nam, Woo-Jin Kim, Hee Jeong Kong, Bong-Seok Kim, Young-Ju Jee, Sang-Jun Lee, Cheul Min An and Dong-Gyun Kim[†]

Biotechnology Research Division, NFRDI, Busan, 619-705, Korea

The ark shell, *Scapharca broughtonii* is a marine bivalve mollusks belonging to the family Arcidae and important seafood for Korean and Japanese, and southern coast is brisk bays for the ark shell aquaculture. However, productivity of ark shell from these regions were rapidly reduced during the last decade due to mass mortality. The reason of this great damage has not yet been identified. To overcome this economic loss, diverse investigations were focused on environmental factors that affects in the physiology of *S. broughtonii*, but microbiological researches were performed insufficiently. Hemoglobin is one of the major blood component of ark shell and is damaged by some species of bacterial toxins. We concentrated on this red pigment because hemolysis could be the cause of ark shell mortality. In this study, we analyzed microbial diversity of underwater sediments in coastal regions and also existences in the body of *S. broughtonii*. We investigate about 4,200 isolates collected from June to September for microbial diversity of sediments and ark shell. We screened all of culturable microorganisms, and identified 25 genera 118 species, 24 genera 89 species, 30 genera 109 species and 39 genera 141 species, and selected 140 unique colonies for identification and challenge assay.

Key words : Ark shell, *Scapharca broughtonii*, Mass mortality, Microbial diversity, Hemolytic microbiome

고막류는 우리나라 남동부 해안과 동북 태평양 연안에서 서식하는 돌조개 과에 속하는 조개류로서 주 산란시기는 8월과 9월 사이이다(Yoo, 1986). 주요 산업적인 고막류는 고막, *Tegillarca granosa*, 새고막, *Scapharca subcrenata*, 큰이랑피조개, *Scapharca satowi* 그리고 피조개, *Scapharca broughtonii*가 있으며, 그 중 피조개는 맛이 좋아 어가에서는 예로부터

중요한 패류로 여겼으며, 시장 가격이 비싸 양식을 위한 많은 연구가 이루어졌다(Yoo, 1986). 그 중에서 남해안 지방의 피조개는 고막류 중 크기가 가장 크고 생장이 빠르며 육질이 연하고 맛이 좋기 때문에 가장 비싼 패류에 속하고, 현재 남해연안 해역에서 활발하게 양식이 이루어지고 있다(Yoo, 1986). 또한, 일본산과 중국산 피조개에 비해 질적으로 우수하여 상품으로써 경쟁력이 높으며 대부분 일본 등으로 수출되고 있다(Yoo, 1986). 예로부터 진해만, 거제만, 고성만,

[†]Corresponding author: Dong-Gyun Kim

Tel: +82-51-720-2454, Fax: +82-51-720-2456

E-mail: combikola@korea.kr

남해도 내만, 나로도 내만, 여자만, 득량만 및 영일만 등이 피조개 주요 양식지이며, 그 중에서도 진해만산은 육질이 연하고 품질이 좋은 것으로 유명하다(Yoo, 1986). 피조개의 생산량은 1980년대까지 꾸준히 증가하다가 1990년대 이후 여름철에 주로 발생하는 대량 폐사 때문에 5% 이하로 생산량이 급격히 감소하였으며 이로 인한 어가의 경제적인 피해가 매우 심각하다(Kim *et al.*, 2008b; Shin *et al.*, 2008).

현재까지 피조개 대량폐사 현상과 관련한 연구는 고수온, 저염분 및 빈산소 수괴 등과 같은 피조개 양식장의 환경적인 인자들과 피조개의 생리의 연관성 분석 정도만이 보고되어 있을 뿐 생육 환경의 미생물 균총 또는 기생 미생물과의 연관관계에 대한 연구는 전무한 실정으로, 대량폐사의 원인은 아직도 명확하게 규명 되지 않고 있다(Shin *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012). 또한, 본 연구팀은 미생물 균총의 다양성 조사와 함께 폐사가 자주 발생하는 강진만 연안 양식장과 폐사 빈도가 낮은 진해만 연안 양식장의 환경인자들 중 피조개의 폐사에 영향을 미칠 수 있는 해수 및 해저저층의 온도, 해수의 산소포화도, 영양염류와 염도 등을 함께 모니터링 하였으나 대량폐사 빈도에 영향을 미칠 만큼의 큰 차이를 보이는 지역 특이적인 환경요인을 찾지는 못하였다(Data not shown). 따라서 여름철 남해안 피조개 양식장에서 자주 발생하는 대량폐사 연구를 위하여 이전에 연구되지 않은 미생물학적인 관점에서 원인규명 또는 분석이 필요한 실정이다.

많은 연구에서는 미생물 균주의 비교 또는 분석 시 가장먼저 균주들의 군집 형태(morphology of colony)로써 균총의 분석을 수행하는 경우가 있으며, 최근에는 환경유전체라는 메타게놈(metagenome) 분석 방법을 통하여 환경 시료 내에 존재하는 미생물 군집을 모두 분석하는 연구들이 많이 수행되고 있다(Schmidt *et al.*, 1991; Hoff *et al.*, 2008). 하지만 이러한 방법 중 미생물 군집의 표현형으로써 균주를 비교·

분석하는 경우 미생물마다 매우 비슷한 형태적 특징을 나타내기 때문에 이러한 특징으로써 균주를 비교하는 것은 정확하지 않은 방법으로 알려져 있다(Woo *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2012). 또한 메타게놈 분석법의 경우 미생물 유래의 유용 유전자를 찾거나 활용하는 연구에서는 유용한 방법이지만, 본 연구와 같이 폐사 원인 균주 구명과 관련한 연구에서는 중 수준의 미생물 다양성 분석은 매우 힘들며, 원인 미생물의 병원성 규명 및 미생물학적인 특징을 밝히는 것은 거의 불가능하다(Kim *et al.*, 1993; Palleroni *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997; Donachie *et al.*, 2002; Stuart *et al.*, 2003; Hoff *et al.*, 2008; Sorokin *et al.*, 2010).

본 연구에서는 폐사가 자주 발생하는 여름철 고수온기에 피조개 양식장 해저 저층과 피조개 체내에 존재하는 배양이 가능한 모든 미생물을 분리한 후, 용혈활성을 보이는 균주만을 선별하여 16S rDNA 염기서열 정보를 분석함으로써 균주를 동정하고자 하였다. 그리고 동정한 미생물의 정보로써 월별, 지역별 미생물 균총의 다양성을 비교, 분석하여 피조개의 대량폐사 원인 균주를 규명하고자 하였다. 또한 속(genus) 이상의 과(family) 또는 목(order) 수준의 미생물 다양성 분석은 너무 많은 미생물을 포함하는 분류학적 집합이라서 모든 샘플에서 비슷한 결과가 나왔기 때문에 속 이하의 범위에서 미생물의 다양성을 비교하여 지역에 따른 정확한 미생물 다양성을 분석하고자 하였다(Kim *et al.*, 2012). 이러한 자료를 토대로 미생물 균총의 다양성과 후보원인 균주의 미생물학적인 특징을 규명하고, 나아가 피조개 대량폐사 및 패류의 대량 폐사 원인관계를 밝히는 연구에 기초적인 자료가 되고자 하였다.

재료 및 방법

샘플의 채취, 후보 미생물 분리, 배양 및 보존
월별 양식장 퇴적물 환경 및 피조개 체내 미생물

다양성을 분석하기 위하여 피조개 양식장에서 각각 해저 퇴적물과 피조개를 채취하였다. 폐사 발생 빈도가 잦은 강진만 연안의 양식장내 3지점과(동경 127.9-128도, 북위 34.8-34.9도) 폐사 발생 빈도가 낮은 진해만 연안 양식장(동경 128.6-128.7도, 북위 35-35.1도)의 3지점에서 해저 퇴적물과 피조개 샘플을 6월에서 9월까지 매월 각각 채집하여 실험에 사용하였다(Kim *et al.*, 2008a). 다양한 배지 가운데서 marine 배지(Difco, USA)와 R2A 배지(Difco, USA)의 경우 수해양 미생물을 분석에 최적 배지라고 알려져 있어 두 배지를 이용하여 퇴적물과 조개 체내에 존재하는 미생물을 분리 하였다(Difco, 1998). 수집한 해저 퇴적물은 무균 상태에서 phosphate-buffered saline (PBS)를 이용하여 marine 고체배지(Difco, USA), R2A 고체배지(Difco, USA), 1/10 marine 고체배지와 1/10 R2A 고체배지에 각각 도말 하였으며, 피조개 샘플들은 패각 내부의 조직만을 적출 후 균질화하여 도말하였다. 20℃에서 24시간 단위로 배지의 표면상의 배양된 균주를 분리하여 배양이 가능한 모든 균주를 선별하였다. 분리된 균주는 동일한 고체배지에서 배양과정을 거쳐 하나의 순수 colony를 선별하는 과정을 수행한 뒤 실험에 사용하였으며, 각각의 미생물은 액체배양 후 glycerol 보존방법을 이용하여 -80℃에서 보관하였다.

용혈 활성 테스트

순수하게 분리한 배양가능 미생물은 각각 분리된 marine 또는 R2A 액체배지에 20℃에서 100rpm으로 배양한 뒤 배양액을 Manns (1994) 등의 수정된 방법을 통하여 용혈활성을 확인하였다. 분리균주 배양액 50μl를 미리 구멍을 낸 혈액한천평판배지(Micro media Co. Ltd., Korea)에 떨어뜨려 반응 후 환 주위의 특성을 통하여 알파, 베타 또는 감마 용혈 활성의 정도를 평가하였다. 각각의 분리 미생물 중에서 알파와 베타 용혈활성을 보이는 균주들만을 선별하고,

DNA 분석을 실시하여 지역별 용혈활성 미생물 군집의 다양성을 평가하였다.

16S rDNA의 분리 및 증폭을 위한 미생물 유전자의 추출

알파 또는 베타 용혈활성을 보이는 균주만을 선별한 뒤, 후보 균주들은 각각 분리된 marine 또는 R2A 액체배지에서 14일 배양 후 원심분리를 통하여 충분한 양의 균체만을 순수하게 집균하였다. 집균한 후보 균주들의 균체는 protease K를 첨가한 magnetic isolation kit (TNT, Japan)의 lysis 용액을 이용하여 현탁 한 뒤 37℃에서 16-20시간 반응하여 lysis 시킨 후 핵산 추출 자동화기기(MFX-6100, TOYOBO, Japan)를 이용하여 total chromosomal DNA를 순수하게 분리하였다. 순수하게 정제한 DNA를 분광광도계로 순도 및 농도를 측정한 후, Weisburg (1991) 등의 방법을 응용하여 목적한 16S rDNA를 증폭하였다. 이 때, 분리한 chromosomal DNA를 주형으로 forward primer (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 reverse primer (5'-ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3')를 이용하여 약 1.5 kbp 정도의 16S rDNA 부분만을 특이적으로 증폭하였다. 반응조성은 chromosomal DNA 0.1 μg, 10 pM primer set, 2.5 mM dNTPs, reaction buffer, 그리고 1 U ExTaq (Takara, Japan)을 넣은 뒤 최종 부피 20 μl가 되도록 하여 증폭을 실시하였으며, 반응 조건은 초기변성단계 94℃ 2분 뒤, 변성단계 94℃ 20초, 결합반응 55℃ 20초, 증폭반응 72℃ 1분을 총 25회 반응한 뒤 72℃에서 5분간 반응하였다.

16S rDNA 염기서열 판독을 통한 미생물 군집의 다양성 분석

Ethidium bromide (EtBr)이 포함된 1% agarose gel을 이용한 전기영동 분석을 통하여 PCR 과정으로 증폭된 16S rDNA 증폭된 산물들을 확인하고, QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, German)를 이용하여

정제한 뒤 순도 및 농도를 측정하였다. 정제된 16S rDNA를 주형으로 하여 3130XL Genetic analyzer (Applied Biotechnology, USA) DNA sequencing 기기로써 16S rDNA의 염기서열을 분석하였다. 획득한 염기 서열은 BioEdit (7.0.0 version) 프로그램을 이용하여 비교, 분석 및 정리를 하였으며 그 결과를 EzTaxon (server 2.1) program (<http://www.eztaxon.org/>) 과 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search를 이용한 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GeneBank database를 이용하여 서열정보가 가장 유사한 미생물들을 선정하였다(Chun *et al.*, 2007).

지역별 각 지점의 월별 미생물 군집 다양성

16S rDNA 염기서열 정보를 기반으로 분석한 미생물은 가장 근연종으로 판별한 뒤 각 지역별, 월별에 따른 미생물 다양성을 분석 하였으며, 종(species) 수준의 정도에서 폐사 빈도에 따른 월별, 지역별 미생물 다양성의 차이를 비교하였다.

결 과

용혈 미생물 분리

Marine 또는 R2A 배지를 이용하여 4개월 동안 강진만과 진해만 피조개 양식장에서 채집한 샘플로부터 약 10,000점의 배양 가능한 미생물을 분리하였다. 6월에는 25속 118종 1,052점, 7월에는 24속 89종 700점, 8월에는 30속 109종 1,116점 그리고 9월에는 39속 141종 1,252점인 약 4,120점의 분리 미생물이 알파 또는 베타 용혈활성을 나타내었다(Table 1). Marine 배지와 R2A 배지 모두 해양환경에 존재하는 미생물을 분석하는데 적합한 배지라고 알려져 있으나, 본 실험 결과 marine 배지에서는 균체의 생장속도가 높으나 R2A 배지에서 좀 더 많은 수의 배양이 가능한 분리균주를 얻을 수 있었으며, 용혈활성의 세기 또는 종류를 관찰한 결과 좀 더 다양한 미생물이 R2A 배지에서 획득할 수 있었다(Table 1).

월별 미생물 다양성 분석

6월 강진만 에서는 *Bacillus* 30종 이외 14속 59종이, 진해만에서는 *Acinetobacter* 3 종 외에 15속 61 종이 발견되었다(Fig. 1A). 두 지역 공통적으로 *Bacillus* 속이 42종으로 가장 많이 분리되었으며, *Massilia* 속 (6 종), *Paenibacillus* 속 30 종, *Photobacterium* 속 6종,

Table 1. List of isolates, which expressed hemolytic activity, from two bay sediments and ark-shell bodies.

Month	Media	Isolates	Beta activity (strong)	Beta activity (weak)	Alpha activity
June	Marine	287	163	124	0
	R2A	765	486	277	2
July	Marine	265	146	119	0
	R2A	435	229	206	0
August	Marine	341	116	225	0
	R2A	775	354	394	27
September	Marine	355	42	313	0
	R2A	897	110	787	0
Total		4,120	1,646	2,445	29

Vibrio 속 6종이 다수 발견 되었다(Fig. 1A). 또한 강진만 연안 피조개 양식장의 해저 퇴적물에서는 15속 83종이, 그리고 7속 20종의 미생물이 피조개 체내에서 분리되었다(Table 2). 진해만 양식어장의 해저 퇴적물에서는 15속 62종의 미생물이 있었으며, 피조개 내에는 2속 14종의 미생물이 발견되었다(Table 2). 두 지역의 용혈활성을 보이는 미생물은 피조개 체내 보다는 퇴적물에서, 그리고 진해만 보다는 폐사 빈도가 높은 강진만 지역의 샘플이 좀 더 높은 다양성을 보이는 것을 알 수 있었으며, 속(genus)의 수준에서는 비슷한 다양성을 보이더라도, 종(species)의 수준에서는 그 다양성이 더욱 차이가 남을 알 수 있었다(Table 2).

7월 강진만에서는 *Acinetobacter* 2 종 외 24속 80종이 발견되었고, 진해만에서는 *Bacillus* 5 종을 제외한 6속 12종의 미생물을 분리하여 특히 낮은 다양성을 보였다(Fig. 1B). 진해만에서 분리한 균주의 경우 강진만에서 공통적으로 분리되는 균주를 제외하고는 3속 7종만이 발견 될 만큼 매우 적은 수의 미생물 다양성을 기록하였다(Fig. 1B). 두 지역에서 배양된 미생물들은 *Bacillus* 속이 27종으로 가장 다양한 종류의 미생물이 발견되었고, *Paenibacillus* 속 11종, *Pseudomonas* 속 6종 그리고 *Vibrio* 속 15종의 미생물 다양성을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1B). 강진만 샘플에서는 21속 74종의 미생물이, 8속 18종의 미생물이 각각 해저 퇴적물과 피조개에서 분리 되었다(Table 2). 진해만 샘플을 분석한 결과 7속 16종과 2속 3종이 각각 퇴적물과 피조개의 미생물 총을 이루고 있었다(Table 2). 강진만 지역의 미생물 다양성은 6월과 비슷한 결과를 알 수 있었으나 진해만의 경우 퇴적물뿐만 아니라 피조개 체내 미생물의 다양성도 매우 낮음을 알 수 있었으며, 조사가 진행된 시기의 강진만 샘플에서 가장 낮은 다양성을 보였다(Table 2).

8월 강진만에서는 *Acinetobacter* 2 종 외 22속 72종이, 진해만에서는 *Acinetobacter* 1 종 외 18속 66종의

균총을 확인하였다(Fig. 1C). 8월 강진만 지역의 미생물 다양성은 조사가 이루어진 4개월 중 중 수준에서 가장 낮았으며, 진해만 미생물 다양성의 경우는 7월에 비하여 매우 증가하였다(Table 2). 두 지역 모두 *Bacillus* 속이 28종으로 가장 다양한 종을 기록하였으며, *Paenibacillus* 속 21 종, *Vibrio* 속 14 종, *Aeromonas* 속 5 종 그리고 *Shewanella* 속 5 종이 분리 되었다(Fig. 1C). 강진만 퇴적물에서는 12속 42종이, 피조개 체내에서는 16속 37종의 미생물이 존재하였으며, 진해만 양식장에서는 퇴적물 내에 17속 59종, 피조개 내에는 8속 18종을 확인하였다(Table 2). 특이하게도 8월 강진만 퇴적물 내에는 속과 종 수준에서 4개월 중 가장 낮은 수의 미생물 종이 분리되었으며, 강진만과 진해만의 피조개 체내에서 분리한 미생물의 다양성은 연구가 이루어진 월 중에서 가장 높은 다양성을 기록하였다(Table 2). 또한 진해만 지역의 퇴적물과 피조개 체내 미생물의 다양성이 6월 수준으로 회복되었음을 알 수 있었다(Table 2).

9월 강진만에서는 *Acinetobacter* 1 종 외 31속 109종이 분리되었고, 진해만에서는 *Acinetobacter* 1 종 외 20속 79종의 미생물이 분리되었다(Fig. 1D). 9월 두 지역에서는 *Bacillus* 속 45 종, *Paenibacillus* 속 22종, *Pseudomonas* 속 10종 그리고 *Vibrio* 속 9종이 분리되었다(Fig. 1D). 21속 89종, 15속 33종의 미생물이 각각 9월 강진만 퇴적물과 피조개 샘플에서 분리 되었으며, 20속 80종, 4속 15종의 미생물을 각각 진해만 양식장 해저 퇴적물과 피조개에서 확인 하였다(Table 2). 강진만 피조개 체내 미생물 균총은 8월보다 감소하였지만 6월과 7월에 비하여 높은 수준임을 알 수 있었으며, 강진만 퇴적물은 속과 종 수준에서 가장 높은 월별 미생물 다양성을 기록하였다(Table 2). 이러한 현상은 진해만 지역의 샘플에서도 비슷하게 확인되어 9월이 두 지역의 미생물 다양성이 가장 풍부한 시기임을 알 수 있었다(Table 2).

Table 2. Monthly microbial taxonomic affiliation of ark-shell farming two bay.

Month	Samples	Media	Genus	Species	Genus	Species	Genus	Species
June	Gang-Jin bay sediment	Marine	11	48	15	83	17	89
		R2A	10	57				
	Gang-Jin bay ark-shell	Marine	6	11	7	20		
		R2A	3	13				
	Jin-hae bay sediment	Marine	9	27	15	62	16	64
		R2A	10	51				
	Jin-hae bay ark-shell	Marine	1	4	2	14		
		R2A	2	15				
July	Gang-Jin bay sediment	Marine	14	47	21	74	25	82
		R2A	13	41				
	Gang-Jin bay ark-shell	Marine	6	12	8	18		
		R2A	3	8				
	Jin-hae bay sediment	Marine	3	7	7	16	7	17
		R2A	5	10				
	Jin-hae bay ark-shell	Marine	1	2	2	3		
		R2A	1	1				
August	Gang-Jin bay sediment	Marine	7	23	12	42	23	74
		R2A	7	29				
	Gang-Jin bay ark-shell	Marine	10	15	16	37		
		R2A	12	27				
	Jin-hae bay sediment	Marine	7	27	17	59	19	67
		R2A	12	39				
	Jin-hae bay ark-shell	Marine	3	6	8	18		
		R2A	5	12				
September	Gang-Jin bay sediment	Marine	17	55	21	89	32	110
		R2A	9	51				
	Gang-Jin bay ark-shell	Marine	7	12	15	33		
		R2A	9	21				
	Jin-hae bay sediment	Marine	10	41	20	79	21	80
		R2A	13	53				
	Jin-hae bay ark-shell	Marine	3	3	4	15		
		R2A	3	13				

Figure 1(A).

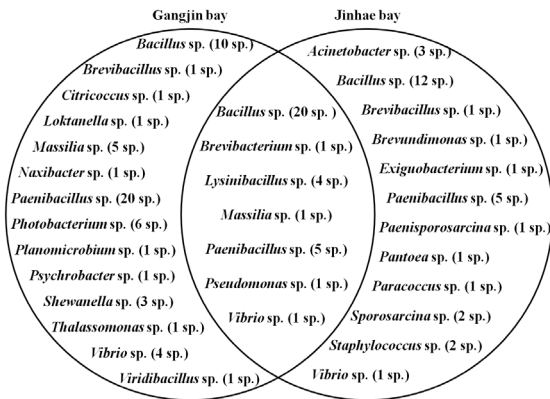


Figure 1(B).

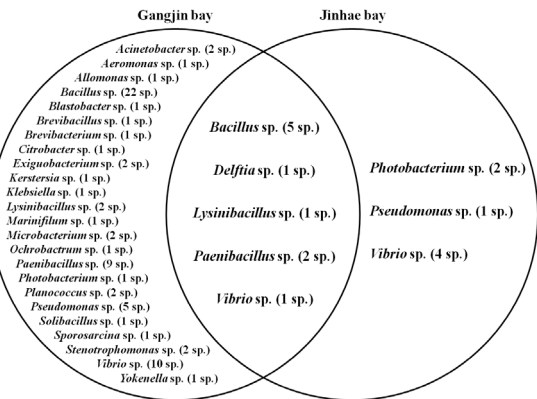


Figure 1(C).

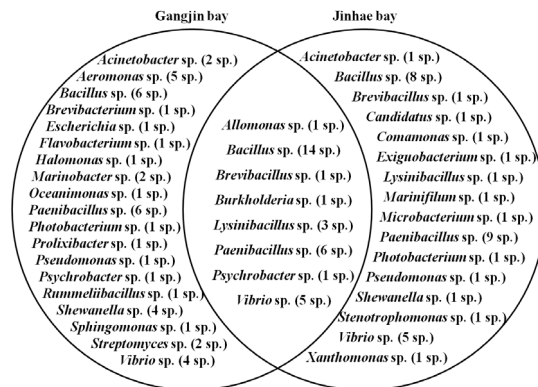


Figure 1(D).

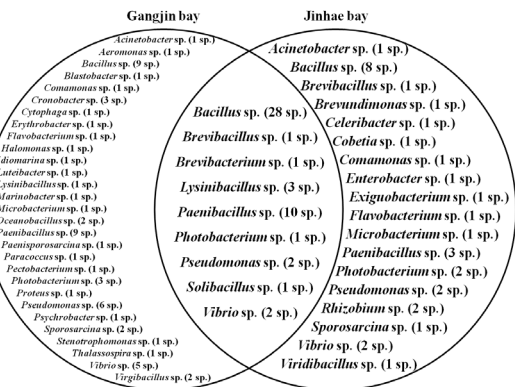


Fig. 1. Microbial diversities of isolated and identified samples collected from Gang-Jin bay and Jin-Hae bay. Numbers in marks of parentheses mean the number of identified species. (A) June, (B) July, (C) August, (D) September

두 지역에서 분리한 미생물의 다양성을 분석한 결과, 피조개 체내에 존재하는 미생물은 매우 단순한 균총을 이루고 있으며, 양식장 해저 퇴적물에 존재하는 미생물의 군집이 훨씬 다양함을 알 수 있었다 (Table 2). 조사가 진행된 4개월 동안의 모든 샘플에서 폐사가 빈번히 발생하는 강진만 지역이 훨씬 다양한 종의 미생물 군집을 형성함을 알 수 있었으며, 높은 미생물 다양성 현상과 대량폐사와의 관계는 더욱 연구가 필요하지만 높은 상관관계가 있을 것으로 사료된다. 7월에 수집한 강진만과 진해만 샘플의 경우 분석기간인 4개월 동안 샘플들 중에서 속과 종 수준

에서 지역별 미생물 다양성의 차이가 가장 많이 발생한 달이었다(Table 2). 월별 미생물 다양성의 명확한 유의적 관계를 찾을 수는 없었으나, 강진만의 경우 8월 미생물 다양성이 약간 감소하지만 전체적인 다양성은 증가하는 추세이고 진해만의 경우 7월에 감소하다가 8월과 9월동안 다양한 미생물이 나타남을 알 수 있었다(Table 2). 또한 6월에서 9월사이의 두 연안지역의 미생물 균총은 9월에 가장 높은 다양성을 보였다(Table 2).

폐사지역에서만 분리되는 미생물 분석

용혈활성을 보이는 미생물의 16S rDNA 정보를 기초로 미생물 다양성을 조사하였고, 이러한 정보를 비교 및 분석하여 폐사가 빈번한 강진만 지역에서는 분리가 되었으나 폐사 빈도가 낮은 진해만 지역에서는 발견이 되지 않는 균주를 조사함으로써 피조개 대량폐사 원인 균주를 분석하고자 하였다. 그 결과 53속 140종의 미생물이 오직 강진만 지역의 퇴적물 또는 피조개 체내에서만 존재함을 알 수 있었다 (Table 3). 일부 미생물의 경우 강진만 에서만 발견되는 속의 미생물들이지만, 특이하게도 두 지역에서 공통적으로 가장 많이 발견되었던 *Bacillus* 속 21종, *Vibrio* 속 12종 그리고 *Paenibacillus* 속 12종에 포함되는 균주들이 강진만 에서만 존재함이 발견되었다 (Table 3). 하지만 이러한 현상은 위에서 언급한 것과 같이 세 미생물이 수해양 환경에서 가장 쉽게 분리 및 배양이 가능한 미생물이기 때문에 분리된 지역 특이적인 균주가 세 가지 속(genus)에 포함됨을 뒷받침하는 결과로 사료된다(McSpadden, 2004; Lal and Tabacchioni, 2009).

고 찰

피조개는 몸의 일부 및 대부분을 바닥에 잠입하고 식물성 플랑크톤을 여과 섭식하기 때문에 흙질이 부드러운 양식장 바닥에서 서식한다(Yoo, 1986). 본 연구에서는 피조개의 이러한 습성을 고려하여 피조개 체내에 존재하는 미생물과 함께 양식장 해저 퇴적물에 존재하는 병원성 후보 미생물의 균총을 비교, 분석을 함으로서 대량 폐사의 원인 균주를 규명 하고자 하였다. 또한 피조개 양식장에서 대량 폐사가 발생하는 정확한 시기는 알려져 있지 않고 여름철 고수온기 및 산란 후인 6월에서 9월 사이 주로 발생한다고 알려져 있어 고온기인 6월에서 9월 사이의 피조개 양식장 저층 및 피조개 체내의 미생물 군집을 분석하였다

(Kim *et al.*, 2012).

피조개가 속하는 이매패류 및 상위 분류군인 연체 동물들은 혈액 내 산소운반 인자로써 구리성분의 보조인자를 가지기 때문에 푸른색을 띠는 헤모시아닌(hemocyanin)을 이용한다(Cuff *et al.*, 1998; Topham *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2012). 그러나 피조개의 경우 연체동물의 특징인 헤모시아닌이 아닌 헤모글로빈(hemoglobin)을 산소전달 인자로 사용하기 때문에 혈액성분이 생체 외부로 노출 되었을 때 붉은색을 나타낸다(Park *et al.*, 1998). 그리고 이러한 붉은색 혈장 성분은 피조개의 정상적인 대사활동을 판가름하는 생체신호로 사용되며, 다양한 외부 환경에 대한 피조개 개체의 반응을 평가하는 연구에서 지표로 해석된다(Park *et al.*, 1998). 또한 이러한 헤모글로빈의 파괴 또는 손상현상은 주로 알파와 베타 용혈활성이기 때문에 고수온기 폐사가 자주 발생하는 지점과 빈도가 낮은 지점에서 분리한 미생물 중에서 알파 또는 베타 용혈활성을 보이는 균주들을 선별하였으며, 용혈활성을 보이는 균주들 중 두 지역에서 차이가 나는 종을 비교함으로써 대량 폐사 원인 균주를 구명하고자 하였다.

4개월 동안 두 지역의 용혈활성이 있는 미생물을 분석한 결과 특이하게 배지 내에 영양성분이 적은 R2A 배지에서 더욱 높은 미생물 다양성을 관찰 할 수 있었는데 이러한 결과는 marine 배지와 R2A 배지를 이용한 다른 연구결과에서도 볼 수 있었으며 marine 배지와 같은 배지에서는 높은 영양성분으로 인하여 특정 균이 못지라거나, 성장 속도가 빠른 일부 균주의 상대적인 증식속도로 인하여 다른 균주가 자라지 못한 현상으로 판단된다(Cho and Giovannoni, 2004). 특히 분리된 균주들 중에서는 marine 배지와 R2A 배지 모두에서 자랄 수 있는 균주도 있었으나, 일부 균주의 경우 marine 또는 R2A 배지에서만 자랄 수 있음을 확인할 수 있었는데 이러한 현상은 해양 미생물의 다양성을 연구하는 다른 연구에서도 쉽게 관찰 할 수 있었다(Cho and Giovannoni, 2004; Kim

Table 3. Distribution of identified samples isolated only Gang-Jin bay.

Kingdom	Phylum	Class	Genus	Species
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Brevibacterium</i>	1
			<i>Citricoccus</i>	1
			<i>Microbacterium</i>	3
			<i>Streptomyces</i>	2
	Bacteroidetes	Bacterioidia	<i>Prolixibacter</i>	1
		Cytophagia	<i>Cytophaga</i>	1
		Flavobacteria	<i>Flavobacterium</i>	2
	Firmicutes	Bacilli	<i>Exiguobacterium</i>	2
			<i>Oceanobacillus</i>	2
			<i>Paenibacillus</i>	12
			<i>Virgibacillus</i>	2
			<i>Paenisporosarcina</i>	1
			<i>Planococcus</i>	2
			<i>Viridibacillus</i>	1
			<i>Rummeliibacillus</i>	1
			<i>Bacillus</i>	21
			<i>Lysinibacillus</i>	1
			<i>Sporosarcina</i>	1
			<i>Brevibacillus</i>	1
			<i>Planomicrobium</i>	1
	Proteobacteria	Alpha	<i>Blastobacter</i>	1
			<i>Ochrobactrum</i>	1
			<i>Erythrobacter</i>	1
			<i>Loktanella</i>	1
			<i>Paracoccus</i>	1
			<i>Thalassomonas</i>	1
			<i>Thalassospira</i>	1
			<i>Sphingomonas</i>	1
		Beta	<i>Kerstersia</i>	1
			<i>Burkholderia</i>	1
			<i>Comamonas</i>	1
			<i>Massilia</i>	5
			<i>Naxibacter</i>	1

Bacteria	Proteobacteria	Gamma	<i>Aeromonas</i>	7
			<i>Oceanimonas</i>	1
			<i>Marinobacter</i>	2
			<i>Citrobacter</i>	1
			<i>Cronobacter</i>	3
			<i>Escherichia</i>	1
			<i>Klebsiella</i>	1
			<i>Pectobacterium</i>	1
			<i>Proteus</i>	1
			<i>Yokenella</i>	1
			<i>Halomonas</i>	2
			<i>Idiomarina</i>	1
			<i>Acinetobacter</i>	4
			<i>Psychrobacter</i>	3
			<i>Pseudomonas</i>	9
			<i>Shewanella</i>	7
			<i>Photobacterium</i>	4
			<i>Vibrio</i>	12
			<i>Luteibacter</i>	1
			<i>Stenotrophomonas</i>	2

et al., 2012). 또한, 두 지역의 퇴적물과 피조개 체내에 존재하는 미생물 중 용혈 활성을 보이는 균주의 경우 주로 베타용혈 활성을 보이며, 알파용혈 활성을 보이는 균주는 매우 드물게 있었다(Table1).

두 지역의 미생물 분포 및 다양성을 16S rDNA 서열의 정보를 기반으로 분석한 결과 *Bacillus* 종, *Paenibacillus* 종 그리고 *Vibrio* 종은 두지역의 모든 샘플에서 매우 다양한 종이 분리되었으며, 특히 *Bacillus* 종은 본 연구에서 수집한 모든 샘플에서 배양 가능한 균주 중 가장 다양하고 고르게 분포하였다(Fig. 1). *Bacillus* 균주의 경우 많은 연구에서 토양, 해수, 해저 퇴적물, 공기 및 생물의 체내 등에 가장 다양하고 광범위하게 존재하는 미생물로 잘 알려져 있어 본 연구 결과도 이러한 보고와 같은 결과를 나타내는 것이라고 생각된다(Kim *et al.*, 2012). *Paenibacillus*

종의 경우 1993년에서야 *Bacillus* 속에서 새로운 속으로 분리될 만큼 *Bacillus* 종과 매우 비슷한 미생물학적 특징을 보이며, 다양한 환경에서 존재함이 보고되었다(Ash *et al.*, 1993; McSpadden, 2004; Montes *et al.*, 2004; Lal and Tabacchioni, 2009). *Vibrio* 종은 수해양 환경에 존재하는 가장 대표적인 미생물로서, 본 연구 또한 *Vibrio* 균주가 자주 분리 된다고 보고된 해저 퇴적물과 패류의 체내 미생물을 연구하였기 때문에 샘플 내에서 *Vibrio* 균주가 다수 분리되는 것은 매우 합당한 결과로 생각된다(Thompson *et al.*, 2005). 세 균주의 경우는 수해양 환경에서 가장 쉽게 분리 및 배양이 가능하다고 알려져 있으며, 특히 *Bacillus* 속과 *Paenibacillus* 속의 미생물은 생장 속도가 매우 빠르기 때문에 실험균주들 사이에서 가장 우점균을 이루는 것과 같은 결과를 나타내고 있으며, 이러한

결과로 인하여 다른 난배양성 미생물에 비하여 훨씬 다양한 종이 분리가 가능했을 것으로 사료된다 (McSpadden, 2004; Lal and Tabacchioni, 2009). 최근 일부 분리균주의 정보로써 특정지역의 균총을 해석하는 연구가 자주 보고되고 있으나 이러한 결과는 특정 지역에서 분리와 배양이 가능한 미생물의 정보 또는 다양성을 설명하는 것일 뿐 우점종을 이루는 균주 또는 총균총을 평가하고 결론을 내리기에는 좀 더 다양한 분자생물학적인 연구가 필요하다(Kim *et al.*, 2012). 따라서 본 연구에서 분리된 *Bacillus*, *Paenibacillus* 그리고 *Vibrio* 균주가 매우 다양하게 분포하는 것은 빠른 성장 속도 및 배양방법에 따른 배양 가능 균주 중에서 많은 종류의 종이 분리 되었을 뿐이며, 이러한 결과로써 두 지역의 해저 퇴적물 및 피조개 체내에서 차지하는 균총의 우점종 또는 전체적인 평가 등을 보고하기에는 좀 더 연구가 필요하다.

강진만 에서만 분리되는 균주들은 Actinobacteria 강 4속 7종, Alphaproteobacteria 강 8속 8종, bacilli 강 13속 48종, Bacterioidia 강 1속 1종, Betaproteobacteria 강 5속 9종, Cytophagia 강 1속 1종, Flavobacteria 강 1속 2종 그리고 Gammaproteobacteria 강 20속 64종이 있었으며, 특이하게도 강진만 에서만 분리되는 균주들 중 가장 다양한 종을 보이는 미생물은 Gammaproteobacteria 와 Bacilli 문의 균주였다(Table 3). 다양한 강(phylum)의 미생물 중에서 Bacilli 문(class)과 Gammaproteobacteria 문이 속하는 Firmicutes 강과 Proteobacteria 강이 가장 많은 종의 미생물을 포함하기 때문에 이러한 결과가 나오는 것으로 해석 되지만, 다양한 연구에서 Bacilli 문과 Gammaproteobacteria 문이 토양, 해수 또는 병원성 샘플에서 많이 존재하는 환경 미생물로 자주 보고되고 있다(WoRMS, 2013; Conenye *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2010). 또한 이러한 지역 특이균주가 속하는 Gammaproteobacteria 또는 Bacilli 속에서는 매우 다양한 병원성 균주가 알려져 있으며, 그 중 본 연구에서 분리한 *Aeromonas* 종, *Pseudomonas* 종, *Shewanella*

종 그리고 *Vibrio* 종은 병원성 미생물임이 이미 많이 보고되어 있어 본 연구 결과와 무관하지 않음을 알 수 있었으며, 대량 폐사 원인 균주와의 상관성을 뒷받침하는 결과이다(WoRMS, 2013; Paillard *et al.*, 2004; Anju *et al.*, 2010; Rui *et al.*, 2013). 이러한 균주들은 용혈독소 이외 단백질분해효소, aerolysin 그리고 enterotoxin 등의 매우 다양한 독성인자를 생산하고 다양한 종의 굴, 대합, 가리비 등의 양식 이매패류와 해양 연체동물에 폐사를 유발하며, 수인성 질병의 원인 미생물임이 많은 연구에서 밝혀져 유력한 폐사 원인 후보 균주다(Paillard *et al.*, 2004; Anju *et al.*, 2010; Rui *et al.*, 2013). 그러나 4 속의 미생물 이외의 지역 특이적인 종의 균주 또한 폐사 원인균주의 후보이기 때문에 분리된 모든 지역 특이적인 균주를 이용한 병원성의 검증 및 특성 분석이 절대 필요하다.

최근 미생물 다양성 연구의 결과는 미생물의 16S rDNA의 정보만을 가지고서 특정 지역 미생물 군집의 다양성을 설명하기 때문에 대부분 염기서열 자료를 이용한 계통발생학상의 분류표를 이용한 균주의 분포를 설명하는 정도였다. 그러나 본 연구에서는 균주의 16S rDNA 정보와 함께 배양이 가능한 균주를 보관하고 있기 때문에 미생물의 동정, 분류 및 분석 후 미생물학적 그리고 생화학적인 분석이 가능하다. 따라서 이러한 지역적인 특이 균주를 이용한 미생물학적, 생화학적인 연구 및 감염실험과 병리학적인 연구를 통하여 피조개 대량 폐사원인 균주 및 후보균주를 규명 할 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 나아가 본 연구의 미생물 정보를 이용한 패류의 대량폐사 및 질병발생과 관련한 매우 유용한 연구 자료가 될 것으로 기대한다.

요약

피조개, *Scapharca broughtonii*는 돌조개 과에 속하는 이매패류로 한국과 일본에서 매우 중요한 수산식

품이며, 주로 국내 남해안 지역에서 양식되고 있다. 그러나 피조개 생산량은 여름철 대량폐사로 인하여 지난 10년 동안 급격하게 감소하였다. 대량폐사로 인한 경제적인 손실을 해결하기 위하여 피조개의 생리에 영향을 미치는 다양한 환경 인자에 대한 연구가 집중적으로 수행되어 왔으나 미생물학적인 연구는 미진한 실정이다. 본 연구에서는 피조개의 주요 혈액 성분인 헤모글로빈이 미생물의 병원성인자에 의하여 피해를 받아 발생하는 용혈현상과 피조개의 폐사와의 연관성을 규명하기 위하여 피조개 양식장의 용혈활성 미생물을 중심으로 분석하였다. 여름철 고수온기인 6월부터 9월까지 강진만과 진해만 피조개 양식장의 해저퇴적물과 피조개 체내에서 분리한 약 4,200여점의 배양가능 용혈성 미생물의 다양성 및 지역 특이적인 미생물을 분석하였다. 6월에 25속 118종, 7월에 24 속 89종, 8월에 30속 109종, 그리고 39속 141종의 미생물을 분리하였으며, 16S rDNA 정보를 통하여 지역별 미생물 다양성을 분석한 결과 폐사빈발 지역에서만 특이적으로 존재하는 140종의 미생물을 분리하였다. 이러한 지역 특이적 미생물 균총 연구는 피조개 대량폐사 원인 규명의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료되며 나아가 다양한 패류의 폐사연구에도 기여할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 수산시험연구사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Anju, P., Milind N. and Santosh, K.D.: Hemolysin, protease, and EPS producing pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain An4 shows antibacterial activity against marine bacterial fish pathogens. *J. Marine Biol.* 2010:1-9, 2010.
- Ash, C., Priest, F.G. and Collins, M.D.: Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 64:253-260, 1993.
- Cho, J.C., and Giovannoni, S.J.: Cultivation and Growth Characteristics of a Diverse Group of Oligotrophic Marine Gammaproteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:432-440, 2004.
- Chun, J.S., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K. and Lim, Y. W.: EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57:2259-2261, 2007.
- Coenye, T., Vancanneyt, M., Cnockaert, M.C., Falsen, E., Swings, J. and Vandamme, P.: *Kerstersia gyiorum* gen. nov., sp. nov., a novel *Alcaligenes faecalis*-like organism isolated from human clinical samples, and reclassification of *Alcaligenes denitrificans* R ger and Tan 1983 as *Achromobacter denitrificans* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53:1825-1831, 2003.
- Cuff, M.E., Miller, K.I., van Holde, K.E. and Hendrickson, W.A.: Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. *J. Mol. Biol.*, 278:855-870, 1998.
- Difco laboratories. Culture media and ingredients, dehydrated. pp. 302-303, 421-422, 11th eds., Difco laboratories. Division of Becton Dickinson and Company. Maryland. 1998.
- Donachie, S.P., Christenson, B.W., Kunkel, D.D.,

Anju, P., Milind N. and Santosh, K.D.: Hemolysin, protease, and EPS producing pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain An4 shows antibacterial activity against marine bacterial

- Malahoff, A. and Alam, M.: Microbial community in acidic hydrothermal waters of volcanically active White Island, New Zealand. *Extremophiles.*, 6:419-425, 2002.
- Hoff, K.J., Tech, M., Lingner, T., Daniel, R., Morgenstern, B. and Meinicke, P.: Gene prediction in metagenomic fragments: a large scale machine learning approach. *BMC Bioinformat.*, 9:217-230, 2008.
- Kelly, P.W., Joseph, J.G., Bruno W.S.S., Eric K.N., Eric E.S., Joshua M.S. and Allan W.D.: Phylogeny of gammaproteobacteria. *J. Bacteriol.* 192:2305-2314, 2010.
- Kim, B.H., Min, B.H., Choi, N.J., Oh, B.S., Park, K.Y. and Min, K.S.: Seasonal changes of species composition and standing crop of phytoplankton in the ark shell *Scapharca broughtonii* farming area of Jinhae bay. *J. Aquaculture.*, 21:157-166, 2008a.
- Kim, B.H., Shin, Y.K., Park, K.Y., Choi, N.J., Oh, B.S. and Min, B.H.: Growth and survival of the spat of ark shell, *Scapharaca broughtonii* in intermediate culture with different shape of protective net and type of preventent of spat loss. *Kor. J. Malacol.*, 24:131-136, 2008b.
- Kim, B.K., Park, Y.D., Oh, H.M. and Chun, J.: Identification and characterization of metagenomic fragments from tidal flat sediment. *J. Microbiol.*, 47:402-410, 1993.
- Kim, D.G., Nam, B.H., Kong, H.J., Kim, W.J., Kim, B.S., Jee, Y.J., Lee, S.J., Jung, C.G., Kong, M.S. and Kim, Y.O.: Analysis of hemolytic microflora from the ark shell (*Scapharca broughtonii*). *J. Life Sci.*, 22:642-649, 2012.
- Lal, S. and Tabacchioni, S.: Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*. *Indian J. Microbiol.* 49:2-10, 2009.
- Manns, J.M., Mosser, D.M. and Buckley, H.R.: Production of a Hemolytic Factor by *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 62:5154-5165, 1994.
- McSpadden, Gardener, BB: Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology.* 94:1252-1258, 2004.
- Montes, M.J., Mercade, E., Bozal, N. and Guinea, J.: *Paenibacillus antarcticus* sp. nov., a novel psychrotolerant organism from the Antarctic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1521-1526, 2004.
- Paillard, C., Le, Roux, F. and Borrego, J.J.: Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquat. Living Res.* 17:477-498, 2004.
- Palleroni, N.J.: Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72:3-19, 1997.
- Park, M.S., Lim, H.J. and Kim, P.J.: Effect of environmental foators on the growth, glycogen and hemoglobin content of cultured arkshell, *Scapharaca broughtonii*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 31:176-185, 1998.
- Rui, L., Limei, Q., Zuoan, Y., Jun, Z., Feng, Y., Lingling, W., Huan, Z., Weiming, T., Xiangfeng L. and Lisheng, S.: Identification and characterization of pathogenic *Vibrio splendidus* from Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) cultured in a low temperature environment. *J. Inverebr.*

- Pathol. 114:144-150, 2013.
- Schmidt, T.M., DeLong, E.F. and Pace, N.R.: Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. J. Biotechnol., 173:4371-4375, 1991.
- Shin, Y.K., Kim, B.H., Choi, N.J., Jung, C.G. and Park M.W.: Influence of temperature, salinity and hypoxia on survival and metabolic rate in the arkshell, *Scapharaca broughtonii*. Kor. J. Malacol., 24:59-65, 2008.
- Sorokin, V.A., Gelfand, M.S. and Artamonova, I.I.: Evolutionary dynamics of clustered irregularly interspaced short palindromic repeat systems in the ocean metagenome. Appl. Environ. Microbiol., 76 :2136-2144, 2010.
- Stuart, P.D., Shaobin, H., Todd, S.G., Alexander, M. and Maqsudul, A.: *Idiomarina loihiensis* sp. nov., a halophilic c-Proteobacterium from the Lō'ihi submarine volcano, Hawai'i. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53:1873-1879, 2003.
- Suzuki, M.T., Rappé, M.S., Haimberger, Z.W., Winfield, H., Adair, N., Ströbel, J. and Giovannoni, S.J.: Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene cloned and cellular isolates from the same seawater sample. Appl. Environ. Microbiol., 63:983-989, 1997.
- Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C.B. and Swings, J.: Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. 71:5107-5115, 2005.
- Topham, R., Tesh, S., Westcott, A., Cole, G., Mercatante, D., Kaufman, G. and Bonaventura, C.: Disulfide bond reduction: A powerful chemical probe for the study of structure-function relationships in the hemocyanin. Arch. Biochem. Biophys., 369:261-266, 1999.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol., 173:697-703, 1991.
- Woo, P.C., Ng, K.H., Lau, S.K., Yip, K.T., Fung, A.M., Leung, K.W., Tam, D.M., Que, T.L. and Yuen, K.Y.: Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. J. Clin. Microbiol., 41:1996-2001. 2003.
- WoRMS Editorial Board. World register of marine species. <http://www.marinespecies.org> at VLIZ, 2013.
- Yoo, S.K.: Coastal culture. pp.203-218, Gudeok publisher. Busan, 1986.

Manuscript Received : October 11, 2013

Revised : November 01, 2013

Accepted : November 21, 2013