

16S rDNA 염기서열에 의한 불가사리(*Asterias amurensis*) 장내에서 분리된 종속영양세균 군집의 다양성

최강국 · 이오형¹ · 이건형²

충남대학교 자연과학대학 미생물학과

¹목포대학교 자연과학대학 분자유전학전공

²군산대학교 자연과학대학 과학기술학부

적 요: 본 연구는 2000년 7월에 전남 장흥군에서 채집한 불가사리의 장내에 존재하는 종속영양세균의 다양성에 대해서 알아보았다. 불가사리 장내에 존재하는 균체수를 측정하였으며, 순수 분리된 균주를 대상으로 16S rDNA 증폭기법을 이용하여 세균의 다양성을 조사하였다. 불가사리 장내에 분포하는 종속영양세균의 균체수는 $8.65 \pm 0.65 \times 10^3$ cfu g⁻¹ 이었다. 29 균주의 세균이 순수 분리되었으며, 그 중 그람양성 세균은 분리된 균주의 59% (17 균주)를 차지하였다. 불가사리 장내에서 분리된 균주는 *Bacillus* 속, *Microbacterium* 속, 그리고 *Marinobacter* 속 등이 우점이었으며, 이외에도 *Staphylococcus* 속, *Psychrobacter* 속, *Paracoccus* 속, *Erythrobacter* 속, *Zoogloea* 속, *Kocuria* 속 과 *Arthrobacter* 속 등이 포함되었다. 분리된 균주 가운데 *Bacillus* 속에 속하는 8균주 중 3 균주는 type strain과 97% 이상의 유사도를 보인 반면, 나머지 5 균주는 유사도가 90%로 비교적 낮은 유사도를 보여 현재까지 알려지지 않은 신종일 가능성이 높다고 하겠다.

검색어: 16S rDNA, 계통수, 균체수, 불가사리(*Asterias amurensis*), 우점속

서 론

불가사리류는 극피동물의 일종으로 바다의 저서동물이다. 몸은 별 모양 또는 오각형을 하고 있으며 생존력과 번식력이 매우 강하다. 특히 아무르 불가사리(*Asterias amurensis*)는 불가사리류의 대표종으로 차가운 바다에서 서식하는 한류성 동물로, 북태평양에 널리 분포하며 우리나라의 연근해 전역에서 관찰되는 가장 흔한 종으로, 산란기는 6월경이다. 불가사리의 대부분은 육식성으로 굴·전복·조개 등을 먹으며 수산양식에 피해를 주고 있다. 하지만 아직 뚜렷한 구제 수단이 없다.

해양에 서식하는 동물에 분포하는 미생물에 대한 연구는 대부분 어류에서 이루어졌는데, 그 중에서도 다양한 어류의 표피에 분포하는 미생물의 개체수에 대한 연구가 활발하다(Horsley 1973, Gillespie and Macrae 1975). 최근에는 어류의 표피와 장내에 존재하는 신종 미생물의 탐구와 유용한 물질을 생산하는 미생물을 찾는 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Ringo et al. 2001a, Ringo et al. 2001b, Thompson et al. 2003). 한편 무척추동물에 대한 연구는 등각류(Boyle 1978, Haack 1995), 요각류(Sleeter et al. 1978), 굴(Lovelace et al. 1968) 등에서 이루어졌으며, 최근에는 심해의 해구 근처에서 다모류에 부착되어 있는 세균에 대한 연구(Cottrell and Cary 1999)가 활발하게 이루어지고 있다.

최근 들어 미생물의 군집 구조를 분석하기 위하여 새로운 분

자생물학적기법의 사용이 폭발적으로 증가되고 있다. 이러한 새로운 기법으로는 분류학적으로 유용한 유전자의 클로닝과 서열 분석, DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)와 TRFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 같은 군집 지문 판정법(fingerprinting)에 의한 접근, 그리고 개개의 세포를 규명하는 FISH(fluorescent *in situ* hybridization) 등이 있다. 이러한 분석법들은 중금속이 오염된 하천, 청정 담수, 퇴비, 해양과 염전에서 미생물 다양성을 연구하는데 매우 광범위하게 이용되고 있으며(Fuhrman 2002, LaMontagne et al. 2002, O'Sullivan et al. 2002), 해양 척추동물의 장내에서 분리한 미생물의 다양성을 파악하는데도 이용되고 있다(Ringo et al. 2001b; Thompson et al. 2003).

본 연구에서는 불가사리를 대상으로 16S rDNA 염기서열을 이용하여 불가사리 장내에 서식하는 종속영양세균 군집의 다양성에 대하여 연구하였다. 이러한 연구는 최근 양식어장 피해의 주범 중의 하나이며, 신물질의 탐색과 칼슘 비료제의 대상으로 주목을 받고 있는 불가사리를 연구하는데 필요한 기초 자료로 활용될 것으로 기대한다.

재료 및 방법

시료 채취

본 실험에서 사용된 아무르 불가사리(*Asterias amurensis*)는

* Corresponding author; Phone: 82-63-469-4584, e-mail: ghlee@kunsan.ac.kr

2000년 7월에 전라남도 장흥군 수문리 인근 연안에서 채집하였다. 채집한 불가사리는 4°C가 유지되는 냉장 장비를 이용하여 실험실로 운반하였다.

불가사리 장내의 종속영양세균의 분리 및 배양

불가사리 장내에 분포하는 종속영양세균 수의 측정을 위하여 불가사리의 내장을 1 g 채취하여 9 ml의 생리 식염수에 넣고 교반기(Modular MS1, IKA, Germany)를 이용하여 균질한 현탁액이 될 때까지 교반하였다. 현탁액은 멸균된 희석액에 1/10단위로 희석한 후 Bacto Marine Agar 2216(Difco, USA) 평판 배지에 도말하여 25 ± 2°C에서 7일간 배양하여 형성된 균체를 측정하였다(Lee 1996). 이 때 불가사리 장내의 균체수는 cfu/g 단위로 환산하였다. 형태적으로 다른 콜로니 29개를 선별하여 Bacto Marine Agar 2216 평판 배지를 이용하여 3차에 걸쳐 순수분리를 하였다. 순수분리된 종속영양세균의 genomic DNA를 분리하기 위하여 Bacto Marine Broth 2216 (Difco USA) 배지가 든 시험관에서 2일간 배양하였다.

DNA 추출

종속영양세균이 배양된 용액 1 ml을 12,000X g에서 5분간 원심분리하여 세균을 농축하였다. 농축된 세균으로부터 genomic DNA 추출을 위하여 SDS, CTAB (cetyl-trimethyl ammonium bromide), phenol-chloroform, isopropanol 처리 과정을 거쳤다(Gerhardt 1994). 추출한 genomic DNA 시료에 RNase (최종농도가 10 µg/ml)를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응하여 RNA를 제거한 후, PCR용 DNA template로 사용하였다.

PCR 증폭 및 서열 분석

세균의 16S rDNA를 증폭하기 위하여 세균의 공통 primer인 8F (5' -AGAG-TTTGATCMTGGCTCAG-3')를 forward primer로 1492R (5' -GGTTACCTTGTTACG-ACTT-3')을 reverse primer로 사용하여 PCR을 수행하였다(Eden *et al.* 1991). PCR 조건은 10X PCR buffer (final concentrations: 50 mM KCl, 0.01% gelatin, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0)는 5 µl, 2.5 mM MgCl₂는 4 µl, 10 mM dNTP는 1 µl, 10 pmol oligonucleotide primer는 1 µl, 그리고, 1 U의 Taq polymerase (TaKaRa, Japan)를 넣은 후, 여기에 100 ng의 DNA template를 첨가하고 증류수로 최종 반응 부피를 50 µl로 맞추었다. PCR 증폭을 위하여 thermal cycler (GeneAmp PCR system 9700, Perkin Elmer, USA)를 사용하였으며, PCR 증폭 과정은 전 변성 과정을 94°C에서 4분간 수행하였고, 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 primer annealing, 72°C에서 90초간 증폭을 총 30회 반복하고, 72°C에서 7분간 최종 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 0.8 % agarose gel (SeaKem[®] LE, FMC)에서 전기 영동한 후, ethidium bromide (0.5 µg ml⁻¹) 염색을 하여 UV 분광광도계로 1.5 kb에 해당하는 DNA 밴드를 확인하였다.

16S rDNA 유전자서열을 분석하기 위해 증폭된 PCR 산물을 agarose gel에서 분리 한 후, Gel extraction Kit (Spin Kit; Nucleo-

gen, Korea)을 이용하여 정제하였다. 유전자 서열 분석은 Bio-Dye Cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)에 의하여 수행하였으며, 유전자 서열 분석을 위한 primer로는 8F를 사용하였다.

계통수 작성

불가사리의 장내에서 분리한 종속영양세균의 16S rDNA의 부분 염기 서열을 Blast network service를 이용하여 EMBL/ GeneBank database의 염기 서열을 비교하여 속명을 확정하고(Altschul *et al.* 1997), PHYDIT (version 3.1)을 이용하여 Ribosomal Database Project (RDP) II database의 표준 균주의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다(Maidak *et al.* 2000). 종속영양세균의 16S rDNA의 부분 염기 서열의 배열은 우선 CLUSTAL W를 사용하여 결정하였으며, PHYDIT을 이용하여 RDP의 대표적인 세균의 염기 서열을 참조하여 재배열을 수행하였다. 또한, 염기 서열의 키메라 여부는 CHIMERA-CHECK program을 이용하였다(Joung 2001). 계통수(phylogenetic tree)는 neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987)를 이용하는 프로그램인 NEIGHBOR (PLYLIP, version 3.5)를 사용하여 작성하였다. 그리고, SEQBOOT program (PLYLIP, version 3.5)을 이용하여 1,000번의 bootstrapped replicate resampling data set를 분석하여 bootstrap value를 계산하였다(Felsenstein 1985).

핵산 염기서열 번호(nucleotide sequence accessing numbers)

본 연구에서 분석된 29 종류의 16S rDNA 계통형에 대한 부분 염기서열을 GeneBank database에 제출하여 승인번호(AY437610 - AY437638)를 부여 받았다.

결과 및 고찰

불가사리 장내에 존재하는 세균의 분포

전라남도 장흥군 수문리 연안에서 채집한 불가사리의 장내에 분포하는 종속영양세균을 평판배지법으로 측정된 균체수는 8.65 ± 0.65 × 10³ cfu g⁻¹이었다. 이러한 측정값은 혀가자미 (*Dover sole*) 미성어의 내장에서 측정된 값(5.2 × 10⁵ ~ 9.8 × 10⁶ cell/g)과 성어의 내장에서 측정된 값(3.0 × 10⁴ ~ 2.3 × 10⁵ cell g⁻¹)(MacDonald 1986) 그리고, 굴(*Crassostrea virginica*)의 아가미에 측정된 값(1.25 × 10⁴ ~ 4.0 × 10⁵ cell g⁻¹) (Lovelace *et al.* 1968) 보다 낮았다. 또한, 굴 외투막의 액에 분포하는 균체수 (3.5 × 10⁴ ~ 2.6 × 10⁵ bacteria m⁻¹) (Lovelace 1968)와 성게 (*Echinus esculentus*)의 장에서 측정된 균체수(4.0 × 10⁵ ~ 2.1 × 10⁷ cell g⁻¹) (Unkles 1977)보다 본 연구에서 측정된 불가사리의 장내에 존재하는 종속영양세균의 균체수가 약간 낮게 측정되었다. 해양 동물의 표피와 장내에 존재하는 미생물의 수는 측정 방법에 따라 많은 차이를 보이며, 현재까지 많은 논란이 되고 있다. 이전의 보고(Amann 1995)와 같이 본 연구에서도 해수에 분포하는 균체수보다 불가사리의 장내에 존재하는 균체수가 높게

나타났는데, 이는 미생물의 생존에 영향을 주는 환경요인의 변화가 해수보다 불가사리의 장내가 적기 때문인 것으로 사료되었다.

PCR 증폭 및 16S rDNA의 염기서열

불가사리 장내에 존재하는 종속영양세균의 균체수를 측정하기 위한 평판배지에서 콜로니의 형상에 따라 29 균주를 선별하고, 평판 도말법을 이용하여 각각의 종속영양세균을 순수 분리하였다. 순수 분리된 종속영양세균으로부터 genomic DNA를 추출하고, 추출된 genomic DNA를 template로 이용하였다. 세균의 공통 primer인 8F와 1492R을 사용하여 PCR 증폭을 수행하여 1.5 kb의 PCR 산물을 얻었다. 30 개의 PCR 산물을 gel extraction kit을 이용하여 정제한 후, autosequencer를 이용하여 16S rDNA의 부분 염기 서열을 파악하였다.

계통 분류

불가사리 장내에서 분리된 29 종류의 세균으로부터 얻은 염기 서열을 GeneBank database의 염기 서열과 비교한 결과 10 개 그룹으로 분류되었다(Table 1). 불가사리 장내에서 분리된 균주는 *Bacillus* 속이 8 균주로 가장 많았으며, *Marinobacter* 속은 5 균주, 그리고 *Microbacterium* 속은 4 균주가 존재하였다. *Staphylococcus* 속은 3 균주였으며, *Psychrobacter* 속, *Paracoccus* 속과 *Erythrobacter* 속은 각각 2 균주씩 존재하였고, *Zoogloea* 속, *Kocuria* 속, *Arthrobacter* 속은 각각 1 균주씩 존재하였다. 불가사리 장내에 존재하는 종속영양세균은 low G+C 그람 양성미 37.9% (11 균주)를, high G+C 그람 양성미 20.7% (6 균주)를 차지하여, 그람양성세균이 차지하는 비율은 분리된 균주의 58.6% 이었다. 그람음성세균의 경우에는, γ -Proteobacteria (7 균주), α -Proteobacteria (4 균주), β -Proteobacteria (1 균주) 순으로 존재하였다(Table 2). 산(acid)의 농도가 높은 환경에서 잘 성장하는 *Bacillus*, *Staphylococcus*와 같은 low G+C 그람양성세균이 불가사리 장내에서 분리된 균주의 우점을 차지하였고, 또한 산의 독성에 민감한 군집으로 알려진 high G+C 그람양성세균도 분리된 균주의 상당수를 차지하였다. 이와 같은 결과는 불가사리 장내 환경이 상당히 다양함을 시사한다. 다양한 대사능과 다양한 형태를 지닌 α -Proteobacteria (Glockner *et al.* 1999)와 영양배지에서 분리된 세균의 대부분을 차지하는 γ -Proteobacteria (Wagner *et al.* 1994)가 많이 존재하는 반면, 빈영양상태의 호수, 바이칼 호수의 심층수에서 우점하거나, 많이 존재하는 β -Proteobacteria (Weiss *et al.* 1996; Glockner *et al.* 1999)는 단 한 균주만이 존재하였다. 이와 같은 결과는 장내의 환경이 미생물들이 서식하기에 좋은 고영양의 상태임을 간접적으로 보여주는 결과라고 하겠다.

불가사리의 장내에 분포하는 미생물은 이전에 Austin 등 (1987)이 발표한 이매패류와 성게(*Echinus esculentus*)의 장내에 존재하는 균주들(*Caluobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Hypomicrobium*, *Pseudomonas*)과는 상당한 차이를 보였으나, 연어의

Table 1. The results of Blast search of heterotrophic bacteria isolated from starfish, *Asterias amurensis*

Lab. No.	Genus	Subdivision	Similarity (%)	Sequence length (nt)
AI-1	<i>Psychrobacter</i> sp.	γ -Proteobacteria	94.21	840
AI-2	<i>Psychrobacter</i> sp.	γ -Proteobacteria	93.73	840
AI-3	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram+	97.68	800
AI-4	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram+	90.84	800
AI-5	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram+	90.69	800
AI-6	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram+	90.94	800
AI-7	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram+	99.01	700
AI-8	<i>Arthrobacter</i> sp.	high G+C Gram+	99.14	710
AI-9	<i>Staphylococcus</i> sp.	low G+C Gram+	99.64	840
AI-10	<i>Marinobacter</i> sp.	γ -Proteobacteria	94.49	880
AI-11	<i>Staphylococcus</i> sp.	low G+C Gram+	97.78	360
AI-12	<i>Marinobacter</i> sp.	γ -Proteobacteria	99.54	860
AI-13	<i>Kocuria</i> sp.	high G+C Gram+	95.13	510
AI-14	<i>Paracoccus</i> sp.	α -Proteobacteria	96.23	710
AI-15	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram+	91.45	800
AI-16	<i>Erythrobacter</i> sp.	α -Proteobacteria	96.35	770
AI-17	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram+	98.51	620
AI-18	<i>Marinobacter</i> sp.	γ -Proteobacteria	95.86	535
AI-19	<i>Marinobacter</i> sp.	γ -Proteobacteria	94.20	860
AI-20	<i>Zoogloea</i> sp.	β -Proteobacteria	98.37	860
AI-21	<i>Paracoccus</i> sp.	α -Proteobacteria	92.30	890
AI-22	<i>Staphylococcus</i> sp.	low G+C Gram+	99.43	870
AI-23	<i>Erythrobacter</i> sp.	α -Proteobacteria	97.41	850
AI-24	<i>Marinobacter</i> sp.	γ -Proteobacteria	94.01	730
AI-25	<i>Microbacterium</i> sp.	high G+C Gram+	98.42	894
AI-26	<i>Microbacterium</i> sp.	high G+C Gram+	98.54	810
AI-27	<i>Bacillus</i> sp.	low G+C Gram+	90.52	800
AI-28	<i>Microbacterium</i> sp.	high G+C Gram+	97.24	800
AI-29	<i>Microbacterium</i> sp.	high G+C Gram+	98.96	670

내장에 분포하는 균주들의 일부와는 일치하는 속도 존재하였다 (Holben *et al.* 2002). 이는 숙주에 따라 장내에 기생하는 미생물의 종류에 차이가 많음을 시사한다.

17 균주의 그람양성세균과 12 균주의 그람음성세균의 16S rDNA의 부분적인 염기서열에 대하여 PHYDIP (version 3.1)

Table 2. Relative abundance of heterotrophic bacteria among unique phylogenetic groups from internal organs of starfish, *Asterias amurensis*

Phylogenetic groups	Number and percentage of clones
α - Proteobacteria	4 (13.8 %)
β - Proteobacteria	1 (3.5 %)
γ - Proteobacteria	7 (24.1 %)
High G+C Gram positive bacteria	6 (20.7 %)
Low G+C Gram positive bacteria	11 (37.9 %)

program을 이용하여 연관된 표준 균주와 비교하여 염기 서열의 배열을 정리하였고, 배열된 자료로부터 NEIGHBOR program을 이용하여 계통수(Phylogenetic tree)를 나타내었다(Fig. 1과 Fig. 2).

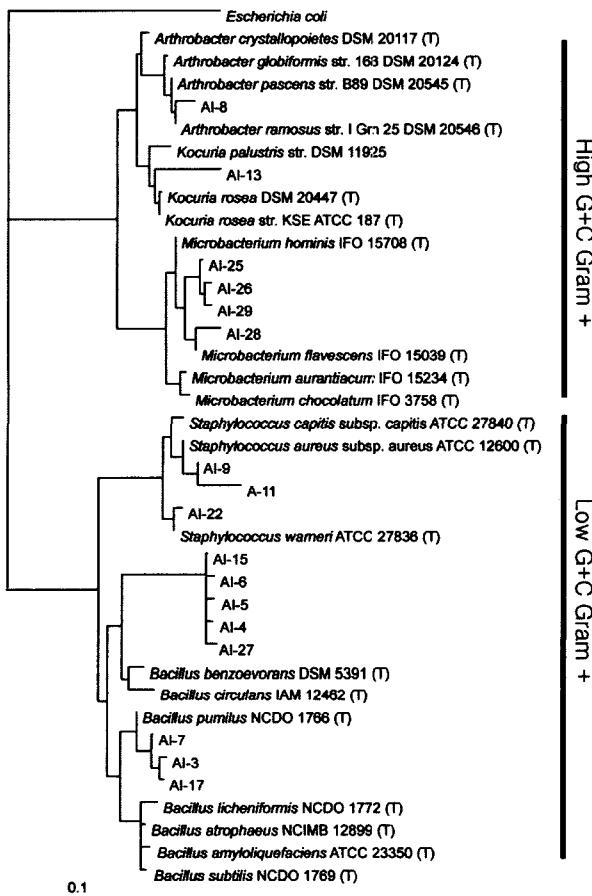


Fig. 1. Phylogenetic tree showing the relationships among 17 Gram positive bacteria in the internal organs of starfish, *Asterias amurensis*, to the major lineages within the Domain Bacteria based on analysis of aligned 16S rDNA sequences. The scale bar represents 0.1 substitutions per base position.

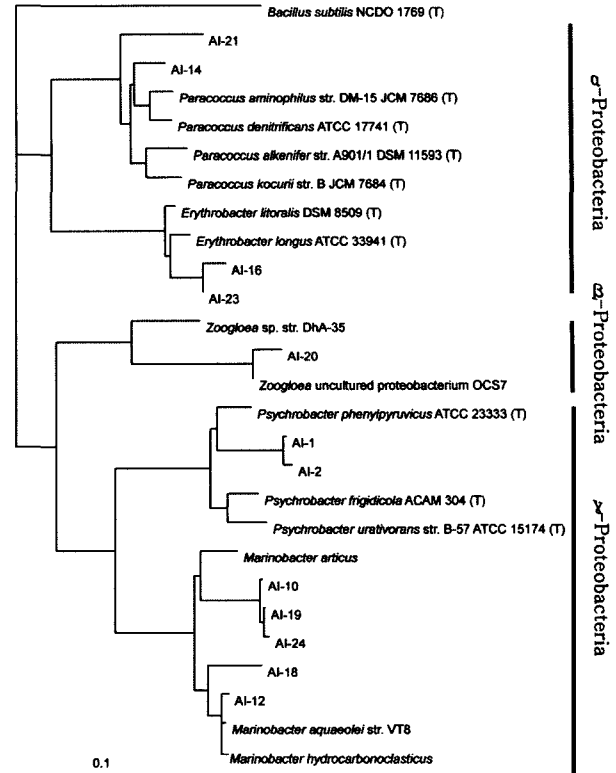


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the relationships among 12 Gram negative bacteria in the internal organs of starfish, *Asterias amurensis*, to the major lineages within the Domain Bacteria based on analysis of aligned 16S rDNA sequences. The scale bar represents 0.1 substitutions per base position.

Low G+C 그람양성세균으로 분리된 12 균주 가운데 *Bacillus* 속에 속하는 8 균주 중 3 균주(AI-3, 7, 17)는 *Bacillus pumilus* NCDO1766 (T)와 97.7, 99.0, 98.5%의 유사도(similarity)를 보인 반면, 5 균주(AI-4, 5, 6, 15, 27)의 경우에는 *Bacillus pumilus* NCDO1766(T)과 가장 높은 유사성을 보였으나, 유사도는 90.5~91.5%로 나타나 현재까지 알려지지 않은 신종일 가능성이 높다고 하겠다. 나머지 3 균주(AI-9, 11, 22)는 *Staphylococcus* 속과 유사성이 있었다. AI-9와 AI-11은 *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 (T)와 유사성이 각각 99.6%와 97.8%로 상당히 높았으며, AI-22는 *Staphylococcus warneri* ATCC 27836 (T)와 99.4%의 유사성을 보였다. High G+C 그람양성세균으로 분리된 6 균주 중 *Microbacterium* sp.에 속하는 4 균주(AI-25, 26, 28, 29)는 *Microbacterium hominis* IFO 15708 (T)와 97.2~99.0%의 유사성을 보였으며, AI-8은 *Arthrobacter ramosus* DSM 20546(T)와 99.1%의 높은 유사성을 보였다. 그러나, AI-13은 *Kocuria rosea* DSM 20447(T)와는 95.1%의 낮은 유사성을 보였는데, 이는 비교되는 염기서열의 길이가 513 bp로 짧기 때문에 비보존영역(variable region)에 대한 비교만이 이루어진 결과라고 생각된다.

그람음성세균 중 β -Proteobacteria는 1 균주(AI-20)만이 존재

하였으며, *Zoogloea uncultured proteobacterium* OCS7과 98.4%의 유사도를 보였다. α -Proteobacteria에 속하는 4균주(AI-14, 16, 21, 23) 중 AI-14와 AI-21은 각각 *Paracoccus amiophilus* JCM 7686 (T) (96.2%)와 *Paracoccus kocurii* JCM 7684 (T) (92.3%)와 높은 유사성을 보였으며, AI-16과 AI-23은 *Erythrobacter litoralis* DSM 8509 (T) (각각 96.4 와 97.4%)와 유사성을 보였다. 나머지 7 균주는 γ -Proteobacteria에 속하는 2 개의 속으로 분류되었다. *Marinobacteria* 속에 속하는 5 균주(AI-10, 12, 18, 19, 25)는 *Marinobacteria hydrocarbonclasticus*와 가장 높은 유사성(94.0~99.5%)을 보였으나, 계통도에서는 5 균주 중 AI-10, 19, 25는 *Marinobacteria articus*와 연관성이 높은 결과를 보였다. 그리고 나머지 2 균주(AI-1과 AI-2)는 *Psychrobacter phenylpyruvicus* ATCC 23333 (T)와 94.2%와 93.7%의 유사성을 각각 보였다. 그람양성세균의 경우 *Bacillus* 속의 5 균주를 제외하고는 비교적 높은 유사도를 보인 반면, 그람음성세균의 경우에는 대부분 95%의 유사도를 보여 표준 균주와 상당히 차이를 보임을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 자연계에서 그람음성세균이 그람양성세균에 비해 유전적으로 변이율이 높음을 보여주는 결과라고 생각된다.

인용문헌

- Amann, R.I., W. Ludwig, K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59: 143-69.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Austin, B., D. Bucke, S.W. Feist and M. M. Helm. 1987. Disease problems among cultured bivalve larvae. MAFF Fisheries publication.
- Boyle, PJaRM. 1978. Absence of micro-organisms in crustacean digestive tracts. *Science* 20: 1157-1159.
- Cottrell, M.T. and S.C. Cary. 1999. Diversity of dissimilatory bisulfite reductase genes of bacteria associated with the deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1127-1132.
- Eden, P.A., T.M. Schmidt, R.P. Blakemore and N.R. Pace. 1991. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 324-325.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogeny: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fuhrman, J.A. 2002. Community structure and function in prokaryotic marine plankton. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 521-527.
- Gerhardt, P.M., W.A. Wood and N.R. Krieg. 1994. Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Gillespie, N.C. and I.C. Macrae. 1975. The bacterial flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage. *J. Appl. Bacteriol.* 39: 91-100.
- Glockner, F.O., B.M. Fuchs and R. Amann. 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: A first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3721-3726.
- Holben, W.E., P. Williams, M. Saarinen, L.K. Sarkilahti and J.H. Apajalahti. 2002. Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel *Mycoplasma phylotype* in farmed and wild salmon. *Microb. Ecol.* 44: 175-185.
- Horsly, R.W. 1973. The bacterial flora of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in relation to its environment. *J. Appl. Bacteriol.* 49: 377-386.
- Joung, P.-M., K.-S. Shin, J.-S. Lim, I.S. Lee and S.J. Park. 2001. Diversity of acid-tolerant epiphytic bacterial communities on plant leaves in the industrial area and the natural forest area based on 16S rDNA. *Kor. J. Microbiol.* 37: 265-272.
- Lee, G.-H., G.G. Choi and C.B. Baek. 1996. Distribution of aerobic/anaerobic saprophytic bacteria in the sediments of the Yellow sea near Kunsan, Koea. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 48: 227-232.
- Litchfield, C.D. and P.M. Gillevet. 2002. Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 48-55.
- Lovelace, T.E., H. Tubiash and R.R. Colwell. 1968. Quantitative and qualitative commensal bacterial flora of *Crassostrea virginica* in Chesapeake Bay. *Proc. Nat. Shellfish Association* 58: 82-87.
- MacDonald, N.L., J.R. Stark and B. Austin. 1986. Bacterial microflora in the gastro-intestinal tract of Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host. *FEMS Microbiol. Lett.* 35: 107-111.
- Maidak B.L., J.R. Cole, T.G. Lilburn, C.T. Parker, P.R. Saxman Jr., and J.M. Stredwick. 2000. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* 28: 173-174.
- O'Sullivan, L.A., A.J. Weightman and J.C. Fry. 2002. New degenerate Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 201-210.
- Ringo, E., J.B. Lodemel, R. Myklebust, T. Kaino, T.M. Mayhew and R.E. Olsen. 2001a. Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *An*

- electron microscopical study. J. Appl. Microbiol. 90: 294-300.
- Ringo, E., M.S. Wesmajervi, H.R. Bendiksen, A. Berg, R.E. Olsen, and T. Johnsen. 2001b. Identification and characterization of *Carnobacteria* isolated from fish intestine. Syst. Appl. Microbiol. 24: 183-191.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
- Sleeter, T.D., P.J. Boyle, A.M. Cundell and R. Mitchell. 1978. Relationship between marine micro-organisms and the wood-boring isopod *Limnoria tripunctata*. Mar. Biol. 45: 329-336.
- Thompson, F.L., C.C. Thompson and J. Swings. 2003. *Vibrio tasmaniensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Syst. Appl. Microbiol. 26: 65-69.
- Unkles, S.E. 1977. Bacterial flora of the sea urchin *Echinus esculentus*. Appl. Environ. Microbiol. 34: 347-350.
- Wagner, M., B. Assmus, A. Hartmann, P. Hutzler and R. Amann. 1994. *In situ* analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy. J. Microsc. 176: 181-187.
- Weiss, P., B. Schweitzer, R. Amann and M. Simon. 1996. Identification *in situ* and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates (lake snow). Appl. Environ. Microbiol. 62: 1998-2005.

(2003년 9월 20일 접수; 2003년 10월 30일 채택)

The Diversity of Heterotrophic Bacteria Isolated from Intestine of Starfish (*Asterias amurensis*) by Analysis of 16S rDNA Sequence

Choi, Gang Guk, Oh-Hyung Lee¹ and Geon-Hyoung Lee²

Dept. of Microbiology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

¹ Major in Molecular Biology & Genetics, Mokpo National University, Mokpo, 534-729, Korea

² Faculty of Science & Technology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

ABSTRACT : To study the diversity of heterotrophic bacteria isolated from intestine of starfish, *Asterias amurensis*, we collected starfishes from the coastal area near Jangheung-Gun, Jeollanam-Do, Korea during July, 2000. Population density and bacterial diversity in the intestine of starfish were measured. The results were as follows; The population densities of heterotrophic bacteria in the intestine of starfish were $8.65 \pm 0.65 \times 10^3$ cfu g⁻¹. Gram positive bacteria occupied 59% among 29 isolates. The community structure of dominant heterotrophic bacteria in the intestine of starfish consisted of *Bacillaceae* in the low G+C gram positive bacteria subphylum, *Microbacteriaceae* in the high G+C gram positive bacteria subphylum, and *Alteromonadaceae* in γ -Proteobacteria subphylum. Among eight strains of *Bacillus* spp., three strains showed more than 97% identity, but five strains showed about 90% identity with type strain on the basis of partial 16S rDNA sequence.

Key words : 16S rDNA, Dominant genus, Phylogenetic tree, Population density, Starfish (*Asterias amurensis*)
