

바이칼 호수에 서식하는 담수 스폰지 내 공생세균의 분리

조안나 · 김주영¹ · 안태석^{1,*}

극지연구소, ¹강원대학교 환경학과

Isolation of Bacteria Associated with Fresh Sponges in Lake Baikal. Cho, Ahn-na, Ju-young Kim¹ and Tae-seok Ahn^{1,*} (Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 406-840, Korea; ¹Department of Environmental Science, Kagnwon Natioal University, Chuncheon 200-701, Korea)

Abstract Sponge in Lake Baikal is an unique organism. Microorganisms in sponges are assumed as precious resources for bioactive materials. For understanding the bacterial community in Baikalian sponges by cultivation, 92 strains of bacteria were isolated from lake water and 2 species of sponges, *Baikalospingia* sp. and *Lubomirskia* sp.. Thirty five bacterial strains are isolated from ambient water near the sponge, 27 bacterial strains from *Baikalospingia* sp., 30 bacterial strains from *Lubomirskia* sp.. As a result, 78.3% and 57.6% of isolated bacterial strains has amylase and protease activity respectively, while strains with cellulose and lipase activities were 38.0% and 34.8%. By 16S rRNA sequence analysis of selected strains, 13 strains which were isolated from *Baikalospingia* sp. were belong to *Pseudomonas* spp.. Whereas, 14 strains which were isolated from *Lubomirskia* sp. were *Pseudomonas* spp., *Buttiauxella agrestis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia ruckeri*, *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus simplex*, *Brevibacterium* spp., *Acinetobacter lwoffii*. In culture media, *Pseudomonas* spp. dominance was supposed that according to allelopathy.

Key words: enzyme activity, Lake Baikal, psychrophilic bacteria, sponge

서 론

바이칼 호수는 부피 23,000 km³로 담수량이 지구 담수의 20%에 해당하며, 세계에서 가장 깊은 호수이다 (Kozhova and Izmet'eva, 1998). 지구에서 가장 오래된 바이칼 호수와 그 유역의 강에는 3,500여 종의 동·식물이 서식하고 있으며, 이 중 84%는 이 수역에만 서식하는 고유종이다 (Miyazaki, 1997). 특히, 담수 스폰지가 서식하는데, 현재까지 2과, 7속에 14종이 분류되어 알려

져 있다 (Masuda, 2009). 바이칼 스폰지 2과 중 Lubomirskiidae는 호수 전체에 널리 분포하며, 다른 한 과인 Spongillidae는 알혼섬 (Olkhon Island) 주변과 강 하구 주변에 분포한다. 바이칼 스폰지는 수심 10 m 내외에서 가장 많이 서식하고 있으며 (Masuda, 2009), 막대한 양의 호수물과 함께 체내로 유기물과 미생물을 여과 섭식하는 특징을 가진다 (Grozdanov and Hentschel, 2007; Gigliarelli *et al.*, 2008). 이러한 특징 때문에 스폰지 체내의 미생물 함유량은 해수에 비해 100~10,000배 더 높은 것으로 알려져 있으며 (Hentschel *et al.*, 2006), 스폰지 생체량의 40% (1~10⁹ cells g⁻¹)를 차지하는 것으로 조사되었다 (Webster *et al.*, 2001).

해양의 경우 스폰지 내에 존재하는 종속영양세균은 2

Manuscript received 2 August 2013, revised 8 October 2013, revision accepted 31 October 2013
* Corresponding author: Tel: +82-33-250-7331, Fax: +82-33-259-5670, E-mail: ahnts@kangwon.ac.kr

차 대사산물을 생산하고, 스폰지 골격을 안정화 시키는 역할을 담당한다 (Müller *et al.*, 1981). 스폰지와 세균의 공생 관계에 대한 기작은 정확하게 밝혀진 바는 없으나, 연안대에서 광합성 조류와의 공생 관계를 보임이 확인되었다 (Wiens *et al.*, 2009). 바이칼호에 서식하는 스폰지에도 다양한 세균이 존재할 것으로 사료된다.

생태계에서 세균군집구조를 파악하는 연구는 배양에 의존한 방법과 배양을 거치지 않는 분자생물학적 방법이 있다. 일반적으로 자연계에 존재하는 세균 중 배양이 가능한 세균 종은 겨우 1% 정도에 불과한 것으로 알려져 있다 (Amann *et al.*, 1995). 그러나 16S rRNA gene을 이용한 분자생물학적 방법은 배양을 거치지 않기 때문에 자연계 세균 전체의 군집 및 종 다양성을 파악하는데 유용한 방법이다. 세균군집 분석연구를 위한 분자생물학적 기법으로는 FISH (fluorescence *in situ* hybridization), PCR-RFLP (PCR amplified 16S rRNA Restriction Fragment Length Polymorphism)와 PCR-DGGE (PCR amplified 16S rRNA denaturing gradient gel electrophoresis), pyrosequencing 등이 사용되고 있다 (Seo *et al.*, 2007; Gliarelli *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009). 그러나 이 방법들은 살아있는 개체를 얻을 수 없다는 약점 때문에 세균의 대사 작용에 대한 조사에는 한계가 있다. 스폰지 내에 공생, 기생하는 미생물은 외부와 밀도와 종류가 전혀 다르고 (Seo *et al.*, 2007), 항생제를 분비하는 미생물의 밀도가 높으므로 배양에 기반한 군집구조의 분석을 수행할 필요가 있다.

이 연구에서는 바이칼 저온 환경의 스폰지 및 스폰지 주변 물로부터 미생물을 분리하여 이들의 기질 분해능을 분석하고 염기서열을 분석하여 동정함으로써 스폰지 내에 존재하는 세균이 호수물 세균과 어떻게 다른지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 채취

시료 채취는 러시아 Listvyanka 지역 인근의 바이칼

호수 (51° 51' 44.25"N, 104° 50' 19.19"E)에서 2009년 9월 24일에 실시하였다. 스폰지시료는 수심 8 m에서 잠수부가 직접 Lubomirskiidae과에 속하는 *Baikalospongia*속과 *Lubomirskia*속을 채집하였고, 스폰지 주변의 호수물 500 mL은 멸균된 주사기로 채수하였다. 시료 채집 및 채수 지점의 수온은 10°C이었다. 채집한 스폰지는 현장의 호수물을 첨가하여 실험실로 운반하였다.

2. 스폰지 내 세균의 분리

스폰지 내 세균을 분리하기 위하여 채집한 스폰지 (*Baikalospongia* sp.와 *Lubomirskia* sp.) 조직을 5 g씩 잘라내었다. 잘라낸 스폰지 조직 (5 g)은, 5 × Phosphate Buffered Saline (PBS)에 Tween80 (최종농도 0.06%)을 첨가하여 만든, 세균 elution buffer (Tzipori *et al.*, 2007) 50 mL과 함께 균질기 (homogenizer)에 넣고 20분간 작동시켜 균질현탁액을 얻었다.

종속영양 세균의 분리를 위하여 R2A Agar 배지를, 방선균 분리를 위하여 SCA (Starch Casein Agar) 배지를 사용하였다. 두 가지 속의 스폰지 균질현탁액과 스폰지 주변 호수물을 각각의 배지에 200 µL씩 도말한 후, 10°C에서 72 ~ 120시간 배양하였다. 형태와 크기가 다른 colony를 선별하여 종속영양 세균은 R2A Agar, SCA 배지에서 나타난 colony는 YMA (Yeast Extract Malt Extract Agar) 배지에서 순수 분리하였다.

3. 분리한 세균의 효도활성도 측정

분리한 저온성 세균의 기질 분해능 (cellulase, amylase, protease, lipase)은 각각의 기질을 함유한 평판배지에 분리한 균주를 접종하여 10°C에서 48시간 동안 배양한 후 분해도를 평가하였다 (Table 1).

4. 분리한 세균의 GTG₅ Genomic Fingerprinting

분리한 세균을 염기서열의 유사도에 따라 분류하기 위하여 Genomic Fingerprinting (Chokesajjawatee *et al.*, 2008)을 실시하였다. 각각의 분리균주에서 AccuPrep

Table 1. The measurement of hydrolytic activities.

	Cellulase	Amylase	Protease	Lipase
Substrate	1% CMC	2% starch	1% skim milk	1% Tween 80
Indicator	0.1% (w/v) Congo-red 1 M NaCl	Iodine 130 mg mL ⁻¹	—	—
Identification	Yellow halo	Clear zone	Clear zone	White precipitate
Activity		> 4.1 mm ; + + +, 2.1 ~ 4.0 mm; + +, < 2.0 mm; +, none; —		

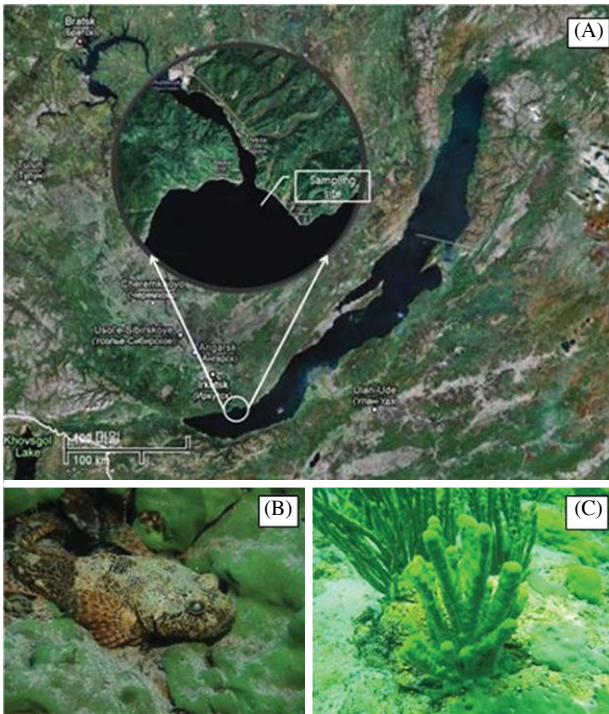


Fig. 1. Map of the sampling site of lake Baikal in Russia (A). Sponge of *Baikalospongia* sp. (B) and *Lubomirskia* sp. (C). Courtesy of Limnological Institute, Russia Academy of Science.

Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)로 DNA를 추출한 후, DNA 농도를 정량(UV spectrophotometer; JP/UV-1601, Shimazu, Japan)하여 $30 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 로 맞추고 (GTG)₅ primer (Cillers *et al.*, 1997)를 이용하여 PCR반응을 수행하였다. PCR반응 조건은 95°C에서 5분 동안 초기 열처리 후, 94°C에서 45초 동안 변성시키고, 40°C에서 1분간 annealing 후 65°C에서 10분간 신장시키는 반응을 35회 수행한 뒤, 최종 신장을 위하여 65°C에서 20분간 반응하였다. PCR반응 산물은 1% agarose gel을 이용하여 100 V에서 140분 동안 전기영동하였다.

5. 선별 세균의 16S rRNA 염기서열 분석

선별된 colony의 동정을 위하여 추출된 DNA 주형으로 9-27F와 1542R을 이용하여 PCR을 수행한 뒤 16S rRNA gene 염기서열을 분석하였다(Liesack *et al.*, 1991). PCR 수행 조건은 94°C에서 5분간 반응 후, 94°C에서 30초간 변성, 40°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 증폭하는 일련의 과정을 35회 반복하고 72°C에서 7분간 최종 반응을 시켰다. 증폭된 PCR산물의 염기서열 분석은 BigDye Terminator과 ABI 3730xl Capillary

electrophoresis로 수행하였고, Classifier (Wang *et al.*, 2007)와 RNA Database Project Release 10.9 (Cole *et al.*, 2009)와 대조하였으며, Taxonomic Outline for Bacteria and Archaea, Release 7.7 (Garrity *et al.*, 2007)에 따라 동정하였다.

결 과

1. 스폰지 내 세균의 분리 및 기질 분해능 측정

현장온도(10°C)에서 R2A Agar와 SCA 배지에 72~120시간 배양하여 선별한 균주는 스폰지 주변 호수물에서 35균주, *Baikalospongia* sp. 균질현탁액에서 27균주, *Lubomirskia* sp. 균질현탁액에서 30균주로 총 92균주를 분리하였다.

분리된 전체 균주 중 섬유소, 전분, 단백질 그리고 지방에 대해 분해능을 가진 균주는 각각 35개, 72개, 53개, 32개로 전분 분해능을 가진 균주가 가장 많았다(Table 2). 두 종류 이상의 기질에서 분해 활성도를 보인 균주는 호수물에서 분리한 균주에서 22개, *Baikalospongia*와 *Lubomirskia*는 각각 24개, 21개로 72.8%가 두 가지 이상의 기질에서 분해능을 갖는 것으로 확인되었다, 특히 호수에서 분리된 세 균주와 *Baikalospongia*에서 분리된 세 균주, *Lubomirskia*에서 분리된 한 균주는 네 종류 기질 모두에서 활성을 보여, 효소 활성도가 우수한 균주로 나타났다.

기질별로, 섬유소의 경우 전체 분리균주의 38%만이 분해효소를 내는 것으로 나타났으며, 78.3%의 균주가 전분에 대한 분해능을 보였다. 특히 *Baikalospongia*에서 분리된 모든 균주가 전분 분해 활성을 나타냈는데, *Lubomirskia*에서 분리된 균주는 절반인 15개 균주만이 전분 분해능을 보였다. 또한, *Baikalospongia*와 *Lubomirskia* 내부에서 단백질을 분해하는 균주들은 각각 63.0%, 66.7%로 호수물에서 분리된 단백질 분해 균주(45.7%)보다 많았다. 그러나 단백질 분해능이 우수한 균주는 호수물에서 검출 되었다. 지방 분해 활성 균주의 경우 호수물에 더 높은 비율로 존재하는 것으로 나타났으나 전분이나 단백질에 비하여 분해 가능한 균주의 수는 적었다.

2. 분리한 균주의 GTG₅ Genomic Fingerprinting 및 염기서열 분석

분리한 균주들의 GTG₅ PCR 수행 후 나타난 밴드 패턴을 Cluster (Pearson Correlation - Neighbor Joining) 분

Table 2. Hydrolytic activities of isolated strains.

Enzyme activity		Water	<i>Baikalospongia</i>	<i>Lubomirskia</i>	Total
Isolated colony		35	27	30	92
Cellulase	+	11 (31.4)	16 (59.3)	8 (26.7)	35 (38.0)
	+	30 (85.7)	24 (88.9)	15 (50.0)	69 (75.0)
Amylase	++	–	3 (11.1)	–	3 (3.3)
	Total	30 (85.7)	27 (100.0)	15 (50.0)	72 (78.3)
Protease	+	9 (25.7)	16 (59.3)	16 (53.3)	41 (44.6)
	++	6 (17.1)	1 (3.7)	4 (13.3)	11 (12.0)
	+++	1 (2.9)	–	–	1 (1.1)
	Total	16 (45.7)	17 (63.0)	20 (66.7)	53 (57.6)
Lipase	+	13 (37.1)	6 (22.2)	4 (13.3)	23 (25.0)
	++	2 (5.7)	2 (7.4)	5 (16.7)	9 (9.8)
	+++	–	1 (3.7)	–	1 (1.1)
	Total	15 (42.9)	9 (33.3)	9 (30.0)	33 (35.9)
The number of substrates	None	2 (5.7)	–	4 (13.3)	6 (6.5)
	One	11 (31.4)	3 (11.1)	5 (16.7)	19 (20.7)
	Two	8 (22.9)	9 (33.3)	15 (50.0)	32 (34.8)
	Three	11 (31.4)	12 (44.4)	5 (16.7)	28 (30.4)
	Four	3 (8.6)	3 (11.1)	1 (3.3)	7 (7.6)

The value in parenthesis means percentage of strains with enzyme activity

No activity; –, Low activity (~2.0 mm); +, medium activity (2.1~4.0 mm); ++, high activity (4.1~ mm); +++

석한 결과 전체적으로 분리한 균주는 각 시료(스폰지 주변 호수물과 스폰지 2종)별로 그룹화 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Finger printing 밴드의 상동성이 높은 균주들 간의 기질분해능을 비교한 결과, 밴드의 상동성이 높은 균주인 BR049와 50, LR060과 61, WR32와 33은 동일한 기질분해능을 보였다. 또한 밴드 패턴의 상동성에 따라 균주 간의 그룹을 나누었을 때 같은 그룹에 속하는 WR042, WR044, WR073, WR075, WR076, WR077균주들 가운데, 패턴이 동일하게 나타난 WR073과 WR077균주, WR075와 WR076균주, WR042와 WR044균주는 서로 동일한 기질분해능을 보였다. 따라서 밴드패턴이 같은 균주는 염기서열이 동일한 균주로 판단하여 패턴이 상이하게 나타난 31균주에 대하여 염기서열분석을 실시하였다.

염기서열을 분석하여 동정한 결과, 총 31균주 중 12균주는 *Pseudomonas* sp.로 동정되었고, *Pseudomonas fluorescens* 2균주, *Pseudomonas putida* 1균주 그리고 *Pseudomonas migulae*가 3균주로 총 18균주가 *Pseudomonas* 속으로 동정되는데, *Baikalospongia* sp.에서 분리한 13균주가 모두 *Pseudomonas* 속이었다. 반면 *Lubomirskia* sp.에서 분리한 14균주는 *Pseudomonas* sp.를 비롯하여 *Buttiauxella agrestis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersi-*

nia ruckeri, *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus simplex*, *Brevibacterium* sp., *Acinetobacter lwoffii*로 다양하게 동정되었다.

고 찰

바이칼 호수는 여름철 평균수온이 10°C로 차가운 호수로 알려져 있으며 빈영양 상태이다(Parfenova *et al.*, 2008). 스폰지 2속(*Baikalospongia*와 *Lubomirskia*)과 스폰지 주변의 호수물 시료로부터 총 92균주를 분리하였으며, 이들의 기질 분해능을 측정한 결과, 61균주는 2개 이상의 기질을 분해 하는 것으로 나타났다. 네 가지 기질 섬유질, 전분, 단백질, 지방 가운데 전분과 단백질에 대한 분해 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 반면, 섬유소와 지방에 대한 분해 능력을 가진 균주는 각각 38.0%, 34.8%로 낮게 나타났다. 이는 유기물의 유입이 극히 빈약한 빈영양 상태인 바이칼 호수를 고려하여 볼 때(Parfenova *et al.*, 2008; 정 등, 2011), 섬유소와 지방에 대한 외부 유입률이 낮아 바이칼 내부의 세균들이 기질로서 이용이 어려웠기 때문으로 판단된다. 따라서 세균의 기질 분해 능력이 전분과 단백질에 비하여 섬유소와 지방의 분해 능력이 다소 낮은 것으로 확인되었

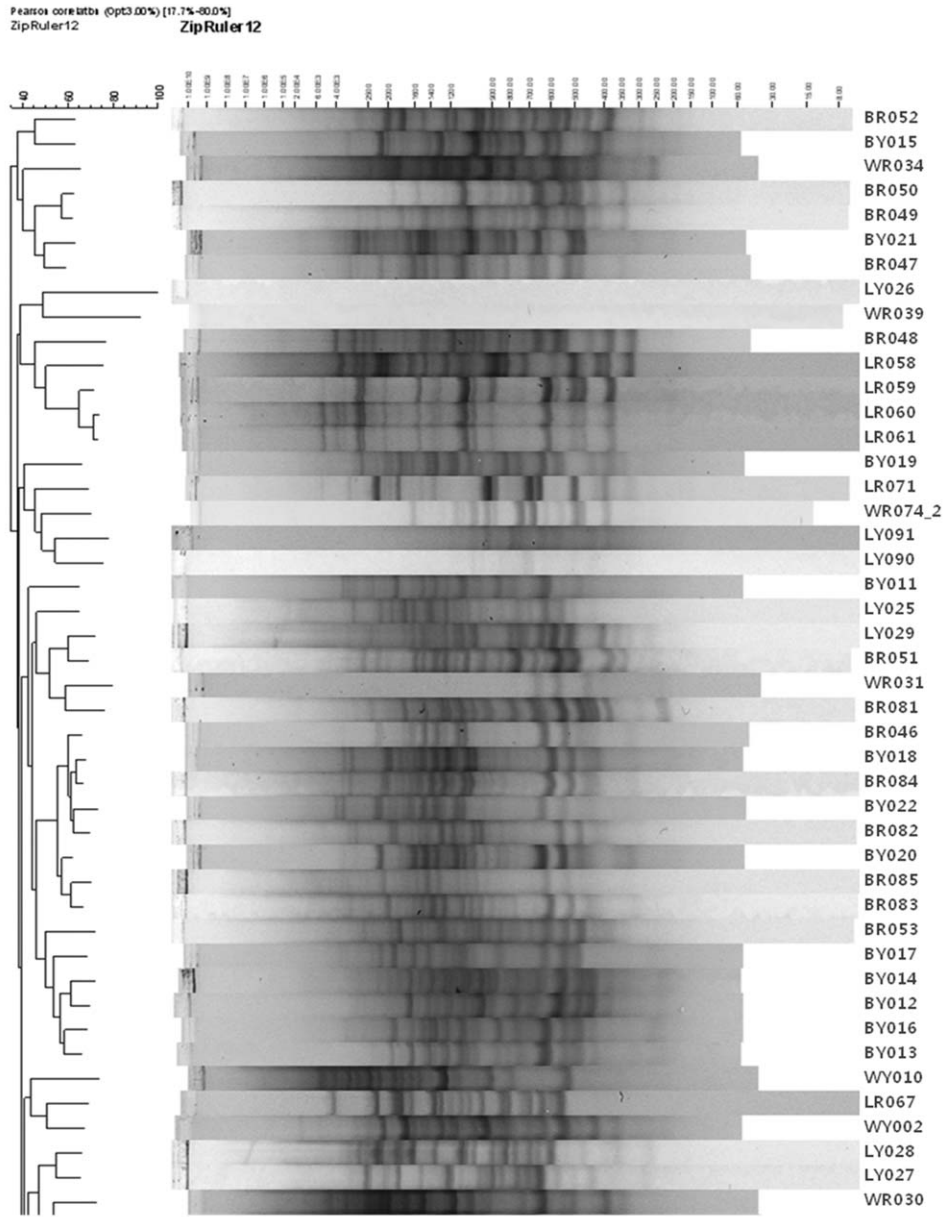


Fig. 2. Genomic Fingerprinting Using Long-Range Repetitive Element Sequence-Based PCR (W=water, B=*Baicalospongia* sp., R=*Lubomirskia* sp., Y=YMA medium, R=R2A medium).

다. 향후 바이칼 스폰지에서 우수 균주를 선별할 경우 전분과 단백질 분해균주를 선별함이 유리할 것으로 사료된다.

분리한 균주의 동정결과는 Lee *et al.* (2004)의 바이칼 호수에서의 빈영양 세균의 검출 연구 결과와 일치함을 보였다. 분리한 세균 중 58%를 차지한 *Pseudomonas*속은 유럽의 빈영양 호수에서 수행한 세균 검출 연구와 바이칼 호수의 종속영양세균의 검출 연구 결과와 일치하였다 (Parfenova *et al.*, 2008). *Pseudomonas*속은 호냉

균 (psychrophile)으로 최적생장온도는 20°C 이하이며, 자연계에 광범위하게 분포하는 세균으로 널리 알려져 있다. 또한 비타민류의 자기 합성능력이 있으며, 단백질 분해력 (다량의 암모니아 생성)이 있다 (Fairbairn and Law, 1986; Makevitt *et al.*, 1989). 이 연구에서 *Pseudomonas*속으로 동정된 균주의 기질 분해능 측정 결과 역시 다른 기질에 비하여 단백질에 대하여 높은 분해 능력을 보였다. 스폰지동물 *Baicalospongia*와 *Lubomirskia*에서 각각 1균주씩 동정된 *Pseudomonas fluorescens*는 형광

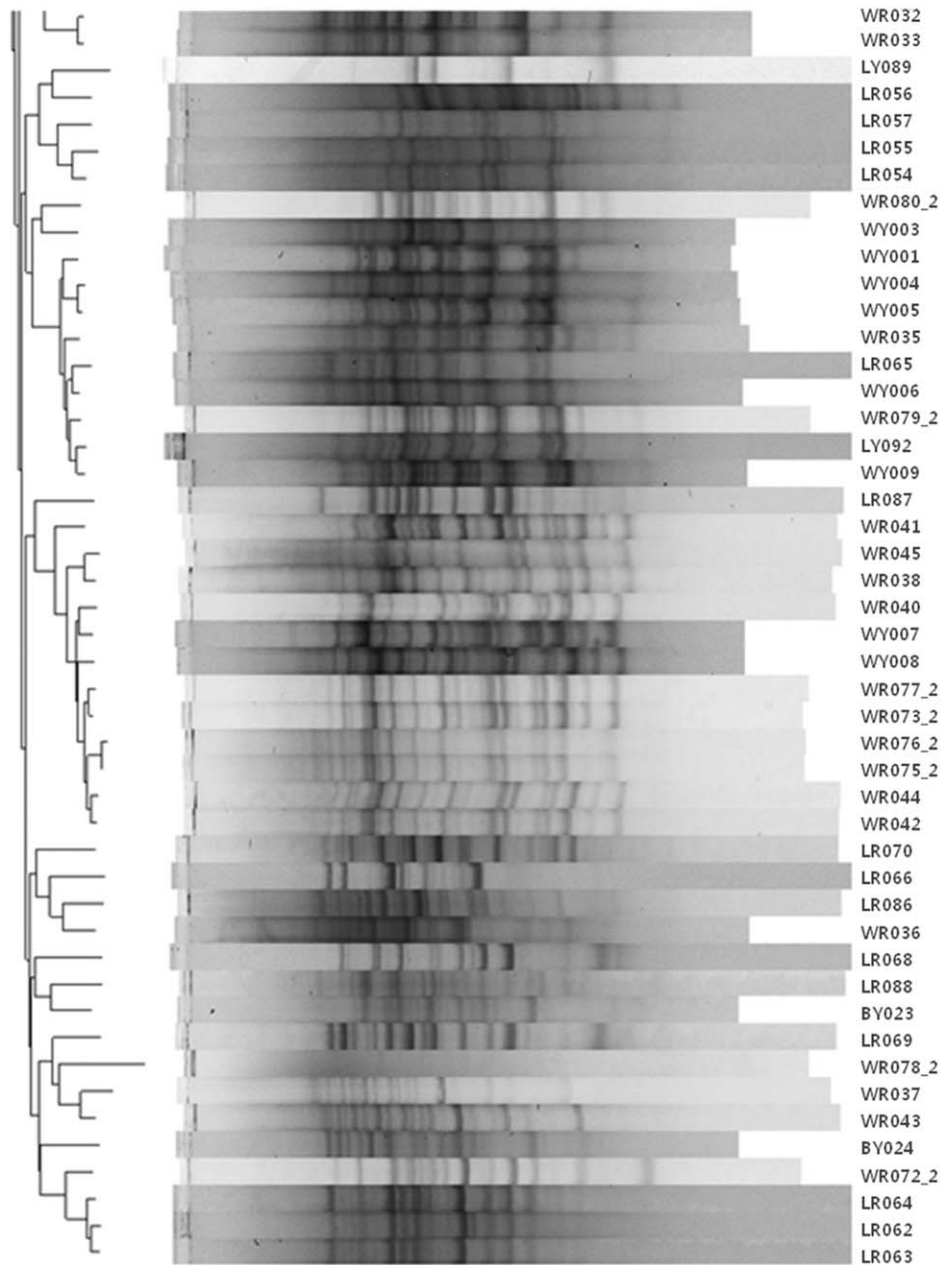


Fig. 2. Continued.

균으로 알려져 있으며, 포도당에서 2-ketogluconic acid를 생성한다 (Stainer *et al.*, 1966; Meyer and Abdallah, 1978). *Pseudomonas putida* 종은 포도당에서 글루콘산을 생성하는 것으로 알려져 있다. 스폰지 내에서 *Pseudomonas*속은 포도당과 아미노산을 이용하여 2차 대사산물을 제공할 것으로 사료된다.

두 종의 스폰지에서 분리한 세균을 비교하였을 때 *Baikalospongia*에서는 *Pseudomonas*속만이 동정된 반

면, *Lubomirskia*에서는 다양한 세균이 분리되었다. *Pseudomonas*속은 다른 세균에 비하여 성장이 빠르며, 고체배지 표면에 콜로니나 biofilm을 빠르게 형성하며 타감작용 (allelopathy)에 의하여 다른 세균의 colony 색 상 발현 및 성장을 저해한다 (Mu *et al.*, 2005; Oldak and Trafny, 2005). 따라서 실제로 스폰지 내부에 존재하는 다른 세균종은 배양법으로 검출되지 않았을 것으로 판단된다.

Table 3. Identification of isolated strains by 16S rRNA sequence analysis (W=water, B=Baicalospongia, L=Lubomirskia, Y=YMA medium, R=R2A medium).

Source	Strains	Homologous Microorganism	Identity (%)
Water	WY004	<i>Pseudomonas</i> sp.	100
	WY008	<i>Acinetobacter</i> sp.	100
	WY009	<i>Pseudomonas</i> sp.	99
	WY010	<i>Acinetobacter</i> sp.	100
Baikalospongia sp.	BY011	<i>Pseudomonas</i> sp.	89
	BY015	<i>Pseudomonas</i> sp.	100
	BY017	<i>Pseudomonas</i> sp.	100
	BY018	<i>Pseudomonas</i> sp.	99
	BY021	<i>Pseudomonas</i> sp.	100
	BY023	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100
	BY024	<i>Pseudomonas putida</i>	100
	BR046	<i>Pseudomonas</i> sp.	99
	BR047	<i>Pseudomonas migulae</i>	97
	BR048	<i>Pseudomonas migulae</i>	100
	BR049	<i>Pseudomonas migulae</i>	99
	BR053	<i>Pseudomonas</i> sp.	99
	BR081	<i>Pseudomonas</i> sp.	100
Lubomirskia sp.	LY026	<i>Pseudomonas</i> sp.	100
	LY028	<i>Buttiauxella agrestis</i>	85
	LR055	<i>Pseudomonas</i> sp.	100
	LR056	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100
	LR058	<i>Yersinia ruckeri</i>	99
	LR059	<i>Yersinia ruckeri</i>	100
	LR061	<i>Yersinia ruckeri</i>	99
	LR066	<i>Bacillus</i> sp.	99
	LR067	<i>Paenibacillus</i> sp.	99
	LR069	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
	LR070	<i>Bacillus simplex</i>	100
	LR071	<i>Brevibacterium</i> sp.	99
	LR086	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	100
	LR087	<i>Paenibacillus</i> sp.	99

*Lubomirskia*에서 확인된 종 가운데, *Paenibacillus* sp.은 ampicillin, tetracycline, spectinomycin 그리고 streptomycin과 같은 항생제 약물에 내성을 나타내는 세균으로 (Evans, 2003), *Lubomirskia*의 식균작용에 대한 내성을 가지고 있을 것으로 사료된다. 또한, Friedrich *et al.* (1999)의 연구에 따르면 해면 내부에 서식하는 세균은 다층의 세포막과 두꺼운 세포벽으로 둘러싸여 있어 해면의 식균작용에 저항한다고 알려져 있다. 한편, *Brevibacterium*은 *Actinomycetales*의 속으로 *Lubomirskia*의 항상성유지를 도울 것으로 판단되었다.

환경에 있는 대부분의 미생물은 일반적인 배양법으로는 배양되지 않는 한계점이 있다 (Handelsman *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2005). 일반적인 고체배지를 이용한 배양법에서는 성장이 빠른 세균들이 먼저 성장하면서

배지 표면에 biofilm을 생성하게 되고 이들이 우점함으로써 성장이 느린 균들은 성장이 억제되는 것으로 알려져 있다 (Bollmann *et al.*, 2007). 따라서 스폰지 내 세균의 계통학적인 다양성을 확인하고 스폰지와 세균의 공생관계에서 세균의 역할을 밝히기 위하여 향후에 스폰지의 서식처와 세균의 검출 방법에 대하여 보다 다양한 심층적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

적 요

바이칼호에 서식하는 2종의 스폰지 체내 및 주변 물로부터 92개의 저온성 균주를 분리하고 각 균주들의 기질 분해능을 조사하였다. 그 결과 섬유소와 지방에 대한 분해 활성도를 갖는 균주는 38.0, 34.8%로 비교적 적었으나 전분과 단백질 분해 활성도를 갖는 균주는 78.3, 57.6%로 높은 비율로 나타났다. 분리한 세균을 염기서열의 유사도에 따라 분류하기 위하여 Genomic Fingerprinting을 실시한 후 31개 균주를 선별하여 동정한 결과, *Baikalospongia* sp.에서 분리한 13균주는 모두 *Pseudomonas*속으로 확인된 반면, *Lubomirskia* sp.에서 분리한 14균주는 *Pseudomonas* ssp., *Buttiauxella agrestis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia ruckeri*, *Bacillus* ssp., *Paenibacillus* ssp., *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus simplex*, *Brevibacterium* ssp., *Acinetobacter lwoffii*로 다양하게 동정되었다. 그러나 총 31개 균주 중 18개가 *Pseudomonas*속으로 동정된 것은 타감작용에 의한 다른 세균 성장의 방해 때문으로 평가되며, 이러한 일반적인 배양 방법의 한계점을 극복하기 위해서는 스폰지의 서식처와 세균의 검출 방법에 대하여 보다 다양한 심층적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구 논문은 극지연구소 “극지 고유생물 유래 대사체 실용 연구(과제번호: PE12040)”의 지원으로 작성되었습니다.

REFERENCES

Amann, R.I., W. Ludwig and K. Schleifer. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews*

- 59: 143-169.
- Bollmann, A., K. Lewis and S.S. Epstein. 2007. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 6386-6390.
- Chokesajjawatee, N., Y.G. Zo and R.R. Colwell. 2008. Determination of Clonality and Relatedness of *Vibrio cholerae* Isolates by Genomic Fingerprinting, Using Long-Range Repetitive Element Sequence-Based PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 5392-5401.
- Cilliers, F.J., R.M. Warren, J.H. Hauman, I.J.F. Wiid and P.D. Van Helden. 1997. Oligonucleotide (GTG)₅ as an Epidemiological Tool in the Study of Nontuberculous Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 1545-1549.
- Cole, J.R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R.J. Farris, A.S. Kulam-Syed-Mohideen, D.M. McGarrell, T. Marsh, G.M. Garrity and J.M. Tiedje. 2009. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* **37**: 141-145.
- Davis, K.E., S.J. Joseph and P.H. Janssen. 2005. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 823-834.
- Evans, J.D. 2003. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of invertebrate Pathology* **33**: 46-50.
- Fairbairn, D.J. and B.A. Law. 1986. Purification and characterization of the extracellular proteinase of *Pseudomonas fluorescences* NCDO 2085. *Journal of Dairy Research* **53**: 457-466.
- Friedrich, A.B., H. Merkert, T. Fendert, J. Hacker, P. Proksch and U. Hentschel. 1999. Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Marine Biology* **134**: 461-470.
- Garrity, G.M., T.G. Lilburn, J.R. Cole, S.H. Harrison, J. Euzéby and B.J. Tindall. 2007. Taxonomic outline of the bacteria and archaea, release 7.7. Michigan State University Board of Trustees, East Lansing, MI, USA.
- Gigliarelli, L., L. Lucentini, A. Palomba, G. Sgaravizzi, H. Lancioni, L. Lanfaloni, P. Willenz, E. Gaino and F. Panara, 2008. Applications of PCR-RFLPs for differentiating two freshwater sponges: *Ephydatia fluviatilis* and *Ephydatia mülleri*. *Hydrobiologia* **605**: 265-269.
- Grozdanov, L. and U. Hentschel. 2007. An environmental genomics perspective on the diversity and function of marine sponge-associated microbiota. *Current Opinion in Microbiology* **10**: 215-220.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**: 669-685.
- Hentschel, U., K.M. Usher and M.W. Taylor. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiology Ecology* **55**: 167-177.
- Jung, Y.J., Y.C. Joung and T.S. Ahn. 2011. Characterization of Actinomyces Isolated from Freshwater Sponges in Lake Baikal. *Korean Journal of Microbiol.* **47**: 130-136.
- Kozhova, O.M. and L.R. Izmet'seva, 1998. Lake Baikal - Evolution and Biodiversity, pp. 3-80, Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Lee, G.H., M.S. Bae, S.H. Park, H.G. Song and T.S. Ahn. 2004. Sole-Carbon-Source Utilization Patterns of Oligotrophic and Psychrotrophic Bacteria Isolated from Lake Baikal. *Korean Journal of Microbiol.* **40**: 248-253.
- Liesack, W., H. Weyland and E. Stackebrandt. 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microbial Ecology* **21**: 191-198.
- Makevitt, A.L., S. Bajaksouzian, J.D. Klinger and D.E. Woods. 1989. Purification and characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas cepacia*. *Infection and Immunity* **57**: 771-778.
- Masuda, Y. 2009. Studies on the taxonomy and distribution of freshwater sponges in Lake Baikal. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* **47**: 81-110.
- Meyer, J.M. and M.A. Abdallah. 1978. The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens* : Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *Journal of General Microbiology* **107**: 319-328.
- Miyazaki, N. 1997. Animal community, environment and phylogeny in Lake Baikal. Otsuchi Marine Research Center, Ocean Research Institute, The University of Tokyo.
- Müller, W., E.G. Zahn, R.K. Kurelec, B.C. Lucu, I. Miller and G. Uhlenbruck. 1981. Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. *Journal of Bacteriology* **145**: 548-558.
- Mu, X., C. Yang and S. Wang. 2005. Allelopathy of *Pseudomonas fluorescens*: a preliminary study. *The Journal of Applied Ecology* **16**(4): 778-779.
- Oldak, E. and E.A. Trafny. 2005. Secretion of Proteases by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 3281-3288.
- Park, J.S., C.J. Sim and K.D. An. 2009. Community Structure of Bacteria Associated with Two Marine Sponges from Jeju Island Based on 16S rDNA-DGGE Profiles. *Korean Journal of Microbiol.* **45**: 170-176.
- Parfenova, V.V., I.A. Terkina, T.I. Kostornova, I.G. Nikulina, V.I. Chernykh and E.A. Maksimova. 2008. Microbial community of freshwater sponges in Lake Baikal. *Biology Bulletin* **35**: 374-379.
- Seo, E.Y., M.R. Kim and T.S. Ahn. 2007. Community Analysis of the Bacteria in Sponges of Lake Baikal by FISH Method. *Korean Journal of Microbiol.* **43**: 14-18.
- Stainer, R.Y., N.J. Palleroni and M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads : A taxonomic study. *Journal of General Microbiology* **43**: 159-271.

- Tzipori, S.R., D. Walt and U. Zuckermann. 2007. Development and Evaluation of an Innovative System for the Concentration and Quantitative Detection of CCL Pathogens in Drinking Water. National Center For Environmental Research.
- Wang, Q., G.M. Garrity, J.M. Tiedje and J.R. Cole. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5261-5267.
- Wiens, M., P. Wrede, V.A. Grebenjuk, O.V. Kaluzhnaya, S.I. Belikov, H.C. Schröder and W.E. Müller. 2009. Towards a molecular systematics of the Lake Baikal/Lake Tuva sponges. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* **47**: 111-144.
- Webster, N.S., K.J. Wilson, L.L. Blackall and R.T. Hill. 2001. Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 434-444.