

## 8. 해양 바이러스에 대한 엽록소 a 와 박테리아 abundance의 상관관계

최은석, 김소정, 오로라, 신경순, 장만, 이택건  
한국해양연구원 남해연구소

### 요 약

광양만내 해양바이러스양은  $2.0 \times 10^8$  particles/ml로 매우 풍부했다. 각 계절별 바이러스의 밀도는 여름에 최대  $9.0 \times 10^8$  particles/ml에서 겨울에는 최소값인  $0.7 \times 10^6$  particles/ml을 기록했다. 광양만 내의 바이러스, 박테리아, 식물플랑크톤 생물량의 공간적 분포는 open ocean system에 해당하는 정점 28, 38, 42, 46, 51에서 보다 closed estuarine system에 해당하는 정점 2, 5, 10, 12, 16, 20에서 많은 것으로 나타났다. 그리고, 다른 closed estuarine system에 해당하는 정점 22, 26, 32, 34는 높은 바이러스 밀도를 보였지만 상대적으로 open ocean system에 비해서 낮은 박테리아와 식물플랑크톤의 생물량을 나타냈다. 몇몇 정점의 수심 깊이에서는 박테리아의 밀도가 바이러스의 밀도를 100배 정도 초과했다. 해양 바이러스와 그들의 host system의 계절별 밀도는 역동적으로 변화했으며, 그들의 계절별 변화는 밀접한 상호연관성을 가졌다. 여름에 바이러스와 박테리아의 밀도는 증가된 반면 식물플랑크톤의 엽록소-a 농도는 평균값을 유지하였다. 겨울에는 바이러스와 박테리아의 밀도가 급속하게 줄어들었고, 마찬가지로 엽록소-a 농도 역시 감소하다가, 곧 다시 증가했다. 바이러스의 밀도는 2001년 8월에 최고점에 도달했으며, 박테리아의 밀도는 2001년 8월과 2002년 6월에 최고값을 가졌다. 반면에 엽록소-a의 농도는 2002년 4월에 최대치에 도달했다. 전체 host와 바이러스 밀도로 볼 때, 그들의 pool은 바이러스에 의한 mortality에 의해서 steady-state 상태로 유지되고, 바이러스의 밀도 또한 steady-state를 유지하는 것으로 보였다. 이러한 시도는 우리 나라 광양만 내에 존재하는 해양 바이러스의 생태적 분포 연구를 다루는 첫 번째 실험으로 사료된다.

### 서 론

해수에는  $10^2$ - $10^9$  particles/ml에 달하는 기록적인 범위의 매우 높은 양의 virus 또는 virus-like particles (VLP)이 함유되어 있음이 보고되었다 (Bergh *et al.*, 1989). 해양환경내에서 해양바이러스의 농도는 해양 박테리아의 농도보다 10배 정도 더 높은 것으로 알려졌다. 일반적으로 바이러스는 바다 내에서 가장 평범한 생물학적 agents이다. 그러나, 해양 미생물의 사멸과 그들의 유전적 조성의 조절이라는 측면에서는 매우 중요한 effector이다 (Fuhrman *et al.*, 1998). 해양 microbial food web에서, 바이러스의 역할은 specific host와 관계가 있다. 그리고, 그들은 host에 감염하고, host 유전자의 변화를 초래하고, host 안에서 바이러스의 life cycle 등을 통해서 host의 사멸에 영향력을 미친다.

최근의 결과들은 바이러스가 해양에서 일차생산의 78%에 달하는 양을 환원시키며, heterotrophic bacterial population의 사멸에서 10-20%의 매우 중요한 비율을 책임지고 있는 것으로 보고했다 (Fuhrman, 1999; Wommack and colwell, 2000). 현재 해양 바이러스는 aquatic ecosystem에서 생물학적으로 active하며,

도처에 존재하는 매우 풍부한 components로써 조명되고 있다. 이러한 바이러스의 activity는 dissolved organic materials (DOMs)의 steady-state의 유지와 같은 nutrient cycling이나 harmful algal blooms 의 조절에 적용하는 것이 가능하다. 보고에 따르면, harmful algal blooms의 종료가 비슷한 virus-like particles들이 매우 많은 수로 나타나는 것과 연관이 있다 (Bratbak *et al.*, 1993). 그들의 크기와 algicidal activities의 특수성은 또한 eukaryotic algae를 감염시키는 거대 dsDNA algal virus인 *phycodnaviridae*에 대한 많은 연구에서 진단되어지고 있다 (Cottrell and Suttle, 1995; Guixa-Boixereu *et al.*, 1999; Milligan and Cosper, 1994; Nagasaki *et al.*, 1999; Suttle *et al.*, 1991).

해양 환경내 바이러스의 군집은 박테리아나 식물플랑크톤, eukaryotic organism 같은 해양 미생물인 host species의 군집과 깊이, 계절, water column의 상태 등 많은 parametric factor들에 의존하게 된다. 따라서, 해양 바이러스의 direct counts에 의해서 바이러스의 공간적 분포와 계절적 패턴을 조사하는 것과 이를 통해 microbial food web, nutrient factor, geochemical factor등의 그들의 특수한 환경조건내에서 해양 바이러스의 생태학적 역할을 설정하는 것은 매우 중요하다.

본 연구는 국내에서 연구가 거의 이루어지고 있지 않은 해양 바이러스의 분포도 조사 및 형태 관찰에 관한 연구이며, 특히 광양만에서의 해양 바이러스 분포도 조사와 더불어 해양 바이러스와 해양 박테리아, 해양 바이러스와 엽록소-a와의 상관관계를 분석함으로써 광양만에서의 microbial food web의 역학적 특징을 규명해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 연구 정점

해수는 우리 나라 남해의 광양만내 15개 위치에서 2001년부터 2002년까지 채수하였다. 광양만의 깊이는 5 m에서 30 m로 다양했다. 그림 1.에서 보여지듯이 지질학적 측면에서 광양만의 aquatic system은 매우 매력적인 여러 가지의 특징을 가지고 있다. 정점 2, 5, 10, 12, 16과 20은 closed estuarine coastal water system이며 특별히 정점 2는 강의 아래쪽에 위치해 있다. 또한 정점 22, 26, 32와 34는 closed estuarine water system이며, 정점 22는 fresh water system에 해당하는 섬진강의 바깥쪽에 위치해 있다. 다만, 이들 정점들은 묘도 같은 섬에 의해서 해류의 흐름이 막히지 않았다는 차이가 있다. 정점 28, 30, 42, 45, 51은 open ocean system이다. 광양만을 포함하고 있는 남해는 연중 쿠로시오 해류의 영향을 받기 때문에, 이 정점들은 매우 동적이며 개별적인 특징을 가진 지역이다.

## 샘플 채수

해수는 niskin 채수기 또는 bucket을 이용하여, 광양만의 15개 정점의 각 깊이에서 5 liter씩 2001년 6월부터 2002년 6월까지 두달 간격으로 채수하였다. 채수한 샘플중 500 ml을 47 mm 0.45  $\mu\text{m}$  poresize GF/F prefilter (Whatman Co.)를 이용하여 약 12 kPa의 압력을 걸어 연구선상에서 여과하였으며, acid-rinsed 50 ml polypropylene centrifuge tube 두 개에 나누어 분주하고 0.02  $\mu\text{m}$  filtered 2% formalin (최종농도)를 가지고 즉시 고정한 뒤, 샘플이 담긴 tube를 4  $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 또한 엽록소 a 농도 측정을 위해서 여과에 사용한 47 mm 0.45  $\mu\text{m}$  poresize GF/F prefilter를 47 mm 직경의 acid-rinsed polypropylene petri-dish 에 옮긴 후 parafilm을 이용하여 sealing하고 -70  $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

## SYBR Gold를 이용한 박테리아와 바이러스의 염색

바이러스와 박테리아 샘플을 위해서는 Noble과 Fuhrman (1988)에 의한 SYBR-Green I 을 사용한 염색방법을 변화시켜 SYBR-Gold 염색약을 이용하여 염색하는 방법을 사용하였다. 해수 샘플 각각 5 ml을 25 mm 0.02  $\mu\text{m}$  filter (Anodisc, Whatman Co.)로 여과하였다. 최적 조건의 염색을 위해서, SYBR Gold 10,000X stock (Molecular Probes Co.) 용액 10  $\mu\text{l}$ 를 0.02  $\mu\text{m}$  filtered ddH<sub>2</sub>O 3,990  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 희석시켰다. Filter를 slide glass에 올린 뒤 희석된 25X SYBR Gold 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 filter에 떨군 후 15분 동안 실온에서 빛이 차단된 상태로 염색을 실시했다. 염색후 filter에 남아있는 수분은 3MM paper를 이용 흡습하여 제거하고, 빛이 차단된 상태로 실온에 두어 5분 동안 건조시킨 후 fading 현상을 막기 위해서 antifade mounting solution으로써 Slowfade 한 방울을 떨구었다. 20 mm squared cover glass를 이용하여 filter 위에 덮고 형광현미경에서 샘플을 관찰하기 전까지 각각의 slide는 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

## Epifluorescence microscopy를 이용한 박테리아와 바이러스의 direct counts

Prepared slide 샘플은 Axioplan2(Carl Zeiss Co.) epifluorescence microscope로 blue excitation하에서  $\times 100$  objective lens를 통해 관찰되었다. Photographic analysis를 위해서, 컴퓨터 소프트웨어에 의해서 작동하는 MC 200 camera module (Carl Zeiss Co.)을 현미경상에 장착하고, Kodak Supra 400 필름 (ASA 400, color negative films for professional)을 바이러스와 박테리아의 direct counts에 사용하였다. 박테리아와 바이러스양의 짐작을 위해서, 최소 40개 체이상의 박테리아와 400개체이상의 바이러스를 직접 counting 하였다.

## 엽록소 a 농도의 측정

필드 상에서 해수 샘플 500 ml을 여과한 47 mm 0.45  $\mu\text{m}$  poresize GF/F prefilter를 15 ml polypropylene tube에 잘 접어서 옮긴 후에 엽록소 a 추출은

90% acetone 용액 안에서 24시간 동안 빛이 차단된 상태로 4 °C에서 실시하였다. 그리고, UV-Vis spectrophotometric scanning system (Agilent 8453 System, Hewlet Packard Co.)을 이용하여 파장 630, 647, 664와 750에서 각각의 흡광도를 측정하였다. 각각의 흡광도값들을 위해서 영점은 90% acetone 용액을 이용하였다.

또한 엽록소 a의 농도 계산을 위해서, 다음 식이 이용되었다.

$$\begin{aligned} & \text{Concentration of Chlorophyll } a \text{ (ug/l)} \\ & = \frac{C \times \text{Volume of acetone solutions (15 ml)}}{\text{Volumes of filtered seawater samples (l)} \times L} \end{aligned}$$

그리고, 각각의 값을 계산하기 위해서는 다음 식들이 사용되었다.

$$\begin{aligned} C &= (11.85 \times E_{664}) - (1.54 \times E_{647}) - (0.08 \times E_{630}) \\ E_{664} &= A_{664} - A_{750} \text{ (for chlorophyll a)} \\ E_{647} &= A_{647} - A_{750} \text{ (for chlorophyll b)} \\ E_{630} &= A_{630} - A_{750} \text{ (for chlorophyll c)} \\ L &= \text{length of cell cuvette (cm)} \end{aligned}$$

## 결과 및 토의

### Spatial distribution of virus-like particles

이 연구에서, 광양만내 해양바이러스의 밀도는 평균  $2.0 \times 10^8$  particles/ml로 매우 풍부했다. 표 1. 은 샘플 채수를 실시한 각각의 정점에서 평균 virus 분포량과 계절별 virus의 분포량을 보여주고 있다. 결과는 전세계의 다른 지역의 바다환경에서 진행된 실험결과와 마찬가지로 다른 지역의 해양내 바이러스의 분포량과 비슷한 양의 바이러스가 광양만에도 분포하고 있음을 나타냈다. 광양만내 바이러스의 수심별 분포는 평균값과 비교했을 때 큰 변화양상이 없는 비슷한 양으로 존재하고 있음을 보이는 데, 이것은 광양만의 수심이 낮고, 비교적 ecosystem의 구조에서 큰 변화가 있지 않음을 보이는 것이다. 이것은 연중 쿠로시오 해류에 의한 영향과 광양만이 closed estuarine aquatic ecosystem을 형성하기 때문으로 보이며, 따라서 전체적인 virus의 양은 일정하게 유지되고 있음을 의미한다. 특히 정점 2, 5, 10, 12, 16, 20은 그림 2.에서 보여지듯이 상대적으로 높은 바이러스 양이 분포하고 있음을 알 수 있다. 특히 육지로부터 광양만으로 유입되는 바이러스의 양과 더불어 광양만의 안쪽에 위치한 안정한 system에 의한 것으로 보인다. 이러한 특징은 전체적인 바이러스량 측면에서 다른 지역에 비해 바이러스 평균량보다 높게 분포하는 이유가 되고 또한 박테리아의 분포양상과 엽록소 a의 농도에서도 마찬가지로임을

알 수 있다. 즉 host의 분포양상에 의해서 바이러스의 개체수가 어느 정도 결정되고 있음을 짐작할 수 있게 한다.

### 바이러스와 박테리아 ecosystem의 계절별 양상

그림 4.에서 보여주듯이 바이러스의 분포는 평균적으로 8월에 최대값을 가지며 이것을 엽록소-a의 농도와 비교하면 그림 2.의 박테리아 분포와 비교했을 때 각각의 바이러스 양이 박테리아의 생물량과 식물플랑크톤의 생물량과 밀접한 연관을 가지고 있음을 알 수 있다. 8월에 박테리아 양이 매우 높게 분포하고 있고, 플랑크톤의 밀도는 평균값을 유지하고 있지만, 상대적으로 바이러스의 양은 매우 높게 나타났다. 몇몇 정점의 깊이에서, 박테리아의 밀도는 바이러스의 밀도를 100배 이상 초과했다. 이것은 해양바이러스에 의해 감염된 host의 lysis로부터 생겨난 dissolved organic materials (DOMs)가 해양환경내에 풍부해지면서 최적의 organic condition하에서 해양 박테리아의 빠른 성장을 가능하게 한 현상으로 보여진다. 즉, 해양환경내에서 그들의 host에 대한 바이러스의 조절에 관한 가설을 보여주는 예가 될 수 있을 것이다. 각각의 바이러스와 host 상호작용은 바이러스의 lysis 작용에 의해 형성된 dissolved organic materials (DOMs)를 순환시키며, 이러한 바이러스의 밀도는 dissolved organic materials 박테리아의 밀도와 플랑크톤의 생물량을 조절하는 것으로 보인다.

### 광양만내 해양바이러스의 역학적 특징

광양만내 해양 바이러스의 밀도는 다른 aquatic estuarine ecosystem에서처럼 일반적으로 대부분 높은 분포를 갖고 있었다. 결과는 해양 바이러스가 30 m 수심깊이를 갖는 open ocean system 보다 closed estuarine aquatic system에 평균적으로 더 많은 바이러스가 존재하고 있음을 보인다.

일반적으로 외국에서 실시된 200 m 수심깊이에서의 해양바이러스에 대한 direct counting과 비교했을 때, 광양만이 갖는 system들을 깊은 바다보다 바이러스의 양이 10배정도 더 많았다. 이러한 사실은 closed estuarine system이 deep open ocean system보다 더욱 더 활동적인 microbial biomass를 가지고 있음을 암시한다. 특별히 광양만내에서 박테리아의 밀도를 비교했을 때 해양 바이러스는 microbial food webs의 평형상태 유지를 위한 좋은 controller 역할을 수행하고 있음을 알 수 있다.

### 참 고 문 헌

- Alonso MC, Gomez FJ, Rodriguez J, Borrego JJ (2001) Distribution of virus-like particles in an oligotrophic marine environment (Alboran Sea, Western Mediterranean). *Microb Ecol* 42:407-415
- Bergh O, Børsheim KY, Bratbak G, Heidal M (1989) High abundance of

- viruses found in aquatic environments. *Nature* 340:467-468
- Boehme J, Frischer ME, Jiang SC, Kellogg CA, Pichard S, Rose JB, Steinway C, Paul JH (1993) Viruses, bacterioplankton, and phytoplankton in the southeastern Gulf of Mexico: distribution and contribution to oceanic DNA pools. *Mar Ecol Prog Ser* 97:1-10
- Bratbak G, Egge JK, Heldal M (1993) Viral mortality of the marine alga *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Mar Ecol Prog Ser* 93:39-48
- Chen F, Lu JR, Binder BJ, Liu YC, Hodson RE (2001) Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR Gold. *Appl Environ Microbiol* 539-5457.
- Cochlan WP, Wikner j, Steward GF, Smith DS, Azam F (1993) Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll a in neritic, oceanic and estuarine environments. *Mar Ecol Prog Ser* 78:1-9
- Cochran PK, Paul JH (1998) Seasonal abundance of lysogenic bacteria in a subtropical estuary. *Appl Environ Microbiol* 64:2308-2312
- Cottrell MT, Suttle CA (1995) Dynamics of a lytic infecting the photosynthetic marine picoflagellate *Micromonas pusilla*. *Limnol Oceanogr* 40(4): 730-739
- Drake LA, Choi KH, Haskell AGE, Dobbs FC (1998) Vertical profiles of virus-like particles and bacteria in the water column and sediments of Chesapeake Bay, USA. *Aquat Microb Ecol* 16:17-25
- Fuhrman JA (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399:541-548
- Fuhrman JA, Suttle CA (1993) Viruses in marine planktonic systems. *Oceanography* 6(2): 51-63
- Guixa-Boixereu N, Lysnes K, Pedro' s-Alio' C (1999) Viral lysis and bacterivory during a phytoplankton bloom in a coastal water microcosm. *Appl Environ Microbiol* 65:1949-1958
- Hennes KP, Simon M (1995) Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a Mesotrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 61:333-340
- Hennes KP, Suttle CA, Chan AM (1995) Fluorescently labeled virus probes show that natural virus population can control the structure of marine microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 61:3623-3627
- Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol* 33:1225-1228
- Maranger R, Bird DF (1995) Viral abundances in aquatic sys-tems: a

comparison between marine and fresh waters. *Mar Ecol Prog Ser* 121:217-226

- Mathias CB, Kirschner AKT, Velimirov B (1995) Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube River. *Appl Environ Microbiol* 61:3734-3740
- Milligan KLD, Cosper EM (1994) Isolation of virus capable of lysing the brown tide microalga, *Aureococcus anophagefferens*. *Science* 266:805-807
- Murray AG, Jackson GA (1992) Viral dynamics: a model of the effects of size, shape, motion and abundance of single celled planktonic organisms and other particles. *Mar Ecol Prog Ser* 89:103-116
- Noble RT, Fuhrman JA (1998) Use of SYBR Green I for rapid epi-fluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat Microb Ecol* 14:113-118
- Parsons TR, Maita Y, Lalli CM (1984) Determination of chlorophylls and total carotenoids: spectrophotometric method. In: *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Pergamon Press, pp101-107
- Smith DC, Steward GF, Azam F, Hollibaugh JT (1992) Virus and bacteria abundances in the Drake Passage during January and August 1991. *Antarct J US* 27:1020-1021
- Suttle CA (1994) The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microb Ecol* 28:237-243
- Suttle CA, Chan AM (1994) Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Synechococcus* spp. *Appl Environ Microbiol* 60:3167-3174
- Wilhelm SW, Suttle CA (1999) Viruses and nutrient cycles in the sea. *Bioscience* 49:781-788
- Wommack KE, Colwell RR (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol and Mol Biol Rev* 64:69-114.
- Wommack KE, Hill RT, Kessel M, Russ DK, Cohen E, Colwell RR (1992) Distribution of viruses in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 58:2965-2970

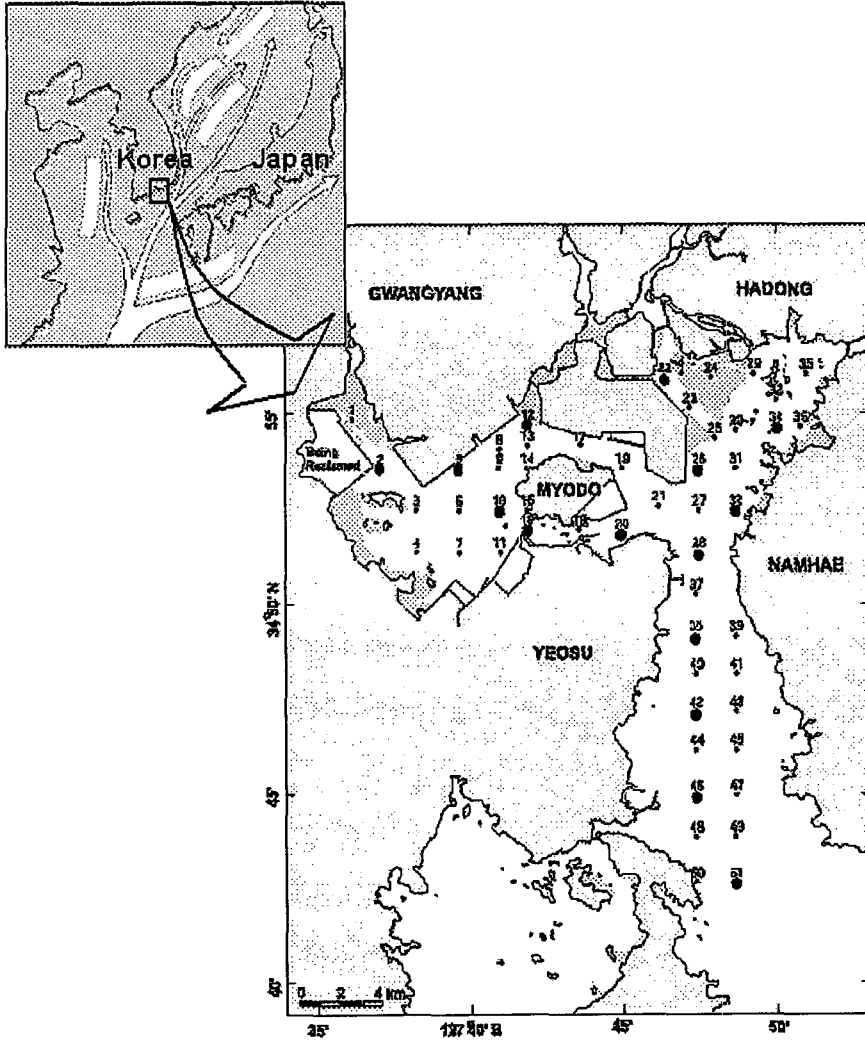


그림 1. 광양만내 정점의 위치. 위쪽의 지도에서 굵은 화살표는 쿠로시오 해류와 그것에 영향을 받는 다른 해류들을 나타낸다. ● : Sampling, ○ : CTD



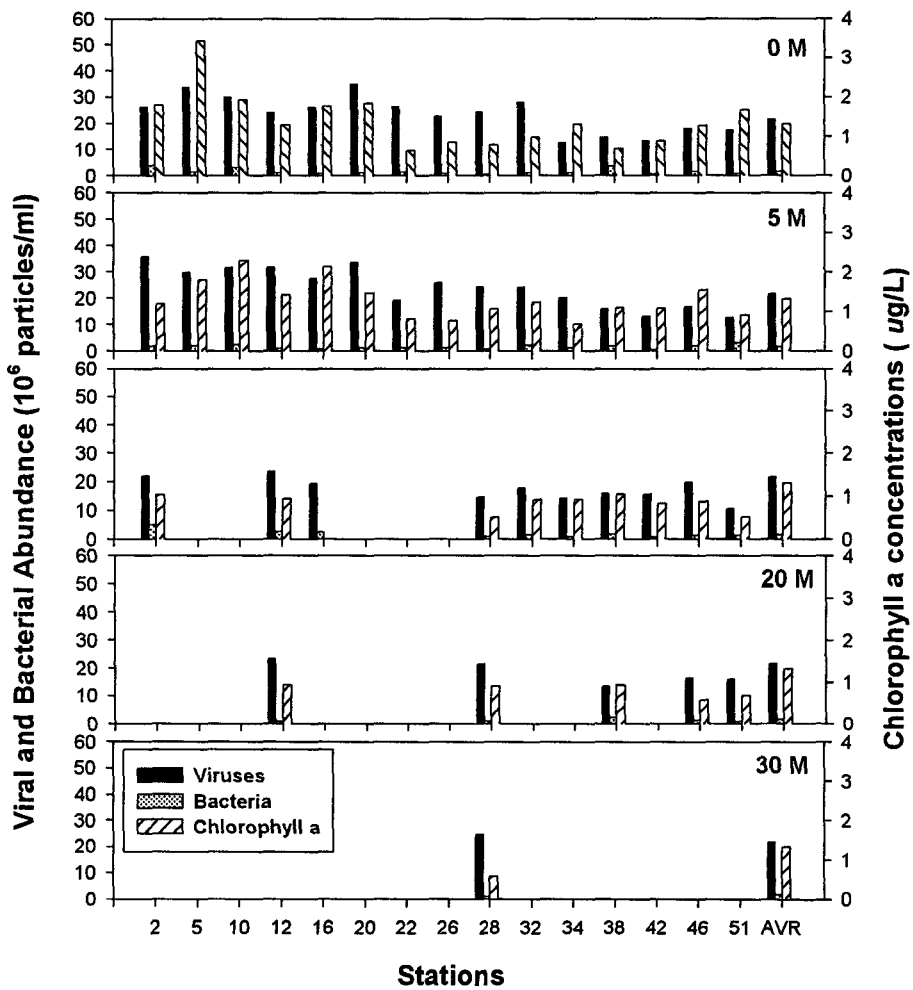


그림 2. 각 정점의 깊이별 바이러스와 박테리아의 밀도 및 엽록소 a의 농도

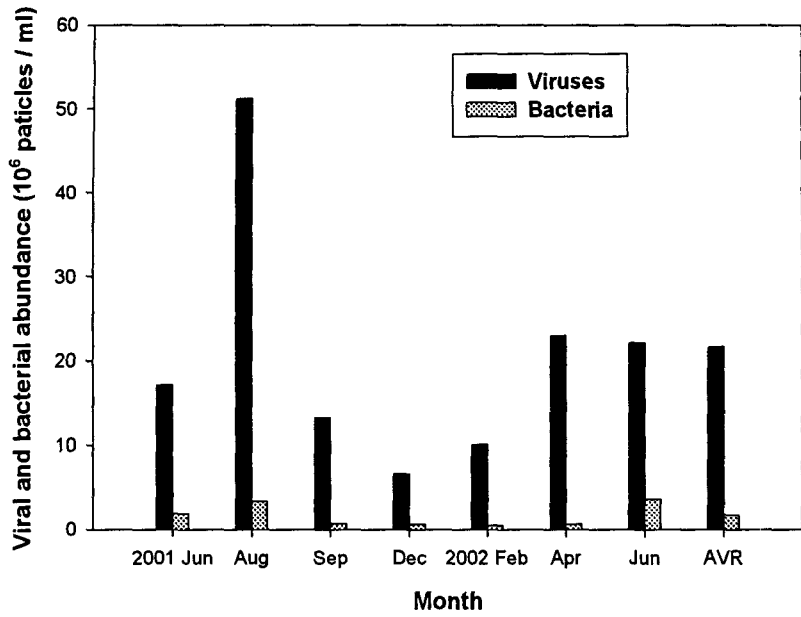


그림 3. 계절에 따른 바이러스와 박테리아의 밀도 분포량 변화

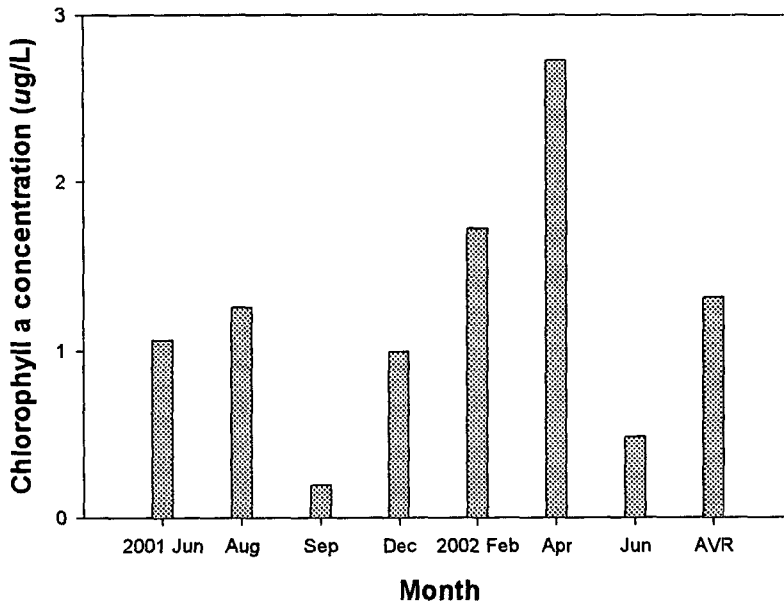


그림 4. 계절에 따른 엽록소 a의 농도의 변화

표 1. 광양만내 해양 바이러스의 각 채수 정점별 평균 농도와 계절에 따른 변화

Station	Depth (m)	Viral Density (particles·ml <sup>-1</sup> )	
		Average	Seasonal variation
Station 2	11 m	2.9×10 <sup>8</sup>	1.0-65×10 <sup>7</sup>
Station 5	5 m	3.2×10 <sup>8</sup>	0.7-93×10 <sup>7</sup>
Station 10	6 m	3.1×10 <sup>8</sup>	2.1-82×10 <sup>7</sup>
Station 12	21 m	2.6×10 <sup>8</sup>	1.7-92×10 <sup>7</sup>
Station 16	12 m	2.4×10 <sup>8</sup>	3.9-96×10 <sup>7</sup>
Station 20	6 m	3.4×10 <sup>8</sup>	3.9-63×10 <sup>7</sup>
Station 22	6 m	2.3×10 <sup>8</sup>	4.9-42×10 <sup>7</sup>
Station 26	6 m	2.4×10 <sup>8</sup>	2.1-66×10 <sup>7</sup>
Station 28	32 m	2.2×10 <sup>8</sup>	3.6-65×10 <sup>7</sup>
Station 32	12 m	2.3×10 <sup>8</sup>	1.1-83×10 <sup>7</sup>
Station 34	13 m	1.6×10 <sup>8</sup>	4.5-71×10 <sup>7</sup>
Station 38	19 m	1.5×10 <sup>8</sup>	4.3-49×10 <sup>7</sup>
Station 42	10 m	1.4×10 <sup>8</sup>	5.5-56×10 <sup>7</sup>
Station 46	22 m	1.8×10 <sup>8</sup>	4.1-66×10 <sup>7</sup>
Station 51	23 m	1.4×10 <sup>8</sup>	3.7-50×10 <sup>7</sup>