

바이칼 호 Sponge에 서식하는 세균 군집 구조의 분석

서은영 · 김미리 · 안태석*

강원대학교 환경학과

바이칼 호에 서식하는 있는 2속(genus *Baikalospongia*와 *Lubomirskia*)(5, 13)의 해면 내에 서식하고 있는 세균 군집 구조를 조사하기 위하여 *fluorescent in situ hybridization* (FISH) 방법을 적용하였다. *Baikalospongia*와 *Lubomirskia* 속에 속하는 해면에 서식하는 총세균수는 각각 7.2×10^7 - 4.2×10^8 cells/ml과 1.2×10^8 - 1.6×10^8 cells/ml였다. 인근 호숫물의 총세균수는 2.3 - 7.7×10^5 cells/ml 범위로 해면에 서식하는 총세균수가 약 10^3 - 10^4 배 더 높았다. 총세균수에 대한 세균 군집 구조의 비율은 α , β , γ -*Proteobacteria* group과 *Cytophaga-Flavobacterium* group의 다른 세균군이 genus *Baikalospongia*는 42.0-60.3%, *Lubomirskia*에서는 40.7-51.9%로, 호수물에서는 22.6-46.3%와 같이 나타났다. 이는 일반 담수에서 특정 군집이 우점하는 경향과는 다른 것으로써, 바이칼의 호숫물과 해면에 있는 세균들은 독특한 군집구조를 이루고 있음을 확인하였다.

Key words □ bacteria community, FISH, lake Baikal

해면은 약 60억 년 전 전캄브리아기의 후생동물과 계통 발생적으로 깊은 관계를 가지고 있는 것으로써, 단세포 동물이나 후생동물에서 분화하는 중에 진화가 멈춘 동물이다(16, 23). 체벽이 많은 관로를 가진 water canal system으로 구성되어 있고, 신경 조직과 기관, 근육이 없는 대신, 투수공을 자유롭게 통과하는 아메바 모양의 세포를 가진다(9). 현재 약 9,000여종의 해면이 열대 해양, 온난 지역 담수 등 다양한 지역에서 발견되고 있으며(11) 대부분의 해면이 해양에서 발견되는 반면 담수 환경에서는 약 150 여종의 해면이 발견되고 있다(4). 해면은 방대한 양의 물과 함께 수체 내 유기물을 흡수하여 배수공으로 물만 여과하는 정화 기능(20)을 가지고 있으며, 식세포 작용에 의하여 세균을 흡입하여 내부에 높은 밀도의 세균을 가지고 있다. 해면 내부에서 우점하고 있는 세균을 전자현미경으로 관찰했을 때, 세균은 해면의 식균 작용에 저항하기 위하여 얇은 막으로 싸여져 있고, 다층의 세포막과 형태학적으로 두꺼운 세포벽을 가지고 있는 것으로 확인되었다(6). 이러한 세균과 해면의 상호관계는 매우 다양하다. 해면은 mesohyl 내부에 있는 세포에 서식하는 세균과 편리 공생(4) 및 기생(15)의 관계를 갖는다. 세균은 독립영양생물 역할을 하면서 질소 고정 및 질산화 작용(21)을 하고, 해면 골격을 안정화 시키는 역할(22)을 담당한다. 독일 Staffelsee 호수에 서식하는 담수 해면으로 알려진 *Spongilla lacustris*의 세균 군집을 조사한 결과 α -*Proteobacteria*가 51%, β -*Proteobacteria*가 5%로 보고되었다(4). 여러 해양 해면에서는 *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Acidobacteria*, δ -*Proteobacteria*, *Nitrospira*와 *Bacteroidetes*가 다양하게 검출되었다(9, 17). 지중해 연안에서 서

식하는 해면 *Chondrosia reniformis*를 분석 시 α , γ , δ -*Proteobacteria*의 존재를 확인할 수 있었다(12). 이처럼 해면 내 서식하는 세균의 군집이 각 서식지마다 다를 수 있다. Baikal 호는 독특한 생태계로 가장 오래되고(2천 5백만년), 깊고(1637 m), 가장 큰 담수량을 가지며, 서식하는 동식물상의 75%가 고유종으로 이루어져 있고(14), 최대 18-20여 종의 해면을 가지는(6) 바이칼 호수의 해면 내 세균군집을 조사하는 것은 중요한 의미가 있다. 하지만 현재까지 담수 해면의 세균 군집구조를 조사하기 위한 FISH 방법의 적용은 부족한 상태이다. 그러므로 본 연구에서는 바이칼 호수에서 서식하는 담수 해면의 세균 군집구조를 일반 담수에서 높은 비율로 관찰되는 *Bacteria*의 α , β , γ *Proteobacteria*와 *Cytophaga-Flavobacterium* group (7, 8)과 비교 분석하기 위하여 분자생물학적 방법인 FISH를 적용하여 비교 분석하였다.

재료 및 방법

조사 지역과 시기 및 조사 대상

2004년 7월 7일 Lystvianka 인근에서 잠수부를 이용하여, *Baikalospongia* 속과 *Lubomirskia* 속을 채취하였고, 동시에 해면 채취 지점에서 가까운 인근 임의의 세 지점을 선정하여 호숫물을 채수, 세균의 군집 구조를 비교 관찰 하였다. *Bacteria* 계의 *Proteobacteria* 강에 속하는 세균 α , β , γ group과 그 외 *Bacteroidetes* 강에 해당하는 *Cytophaga-Flavobacterium* group을 관찰하였고, 실험은 3회 반복하여 분석하였다. 사용한 probes은 *Bacteria* 와 결합하는 EUB 338 및 각각 α , β , γ -*Proteobacteria* group 및 *Cytophaga-Flavobacterium* group과 결합하는 ALF1b, BET42a, GAM42a와 CF probe이었다. Probe sequence는 Table 1과 같다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-33-250-8574, Fax: 82-33-251-3991
E-mail: ahnts@kangwon.ac.kr

Table 1. The description of oligonucleotide probes used to examine the composition of bacterial communities

Probe	Specificity	Sequence of probe (5' → 3')	Target rRNA	<i>E. coli</i> positions
EUB338	Bacteria 16S rRNA	5'-GCTGCCTCCCCTAGGAGT-3'	16S	
ALF1b	α-subclass	5'-CGTTCG(C/T)TCTGAGCCAG-3'	16S	19-35
BET42a	β-subclass	5'-GCCTTCCCACATTCGTTT-3'	23S	2043-2059
GAM42a	γ-subclass	5'-TGGTCCGTGTCTCAGTAC-3'	23S	1027-1043
CF319a	Cytophaga-Flavobacterium	5'-GCCTTGCGACCATACTCCC-3'	16S	1027-1043
Non beta42a	γ-subclass	GCCTTCCCACATTCGTTT	23S	
Non gam42a	β-subclass	GCCTTCCCACATTCGTTT	23S	

시료의 고정과 전처리 및 세균의 관찰

채취한 해면은 현장에서 body 자체를 4% paraformaldehyde에 잠기게 고정한 한 것(이하 soaking)과 내부 내용물을 얻기 위하여 해면을 압착(이하 squeezing) 한 후 4% paraformaldehyde로 고정된 것을 냉장 상태로 유지하여 실험실로 운반하였다. 세균의 총세균수를 관찰하기 위하여 DAPI (4'-6-diamidino-2-phenyl-indole-2HCl, Sigma)로 염색하였고(10), 세균의 군집구조를 파악하기 위한 전처리 및 실험은 Alfreider 등(1996)에서 보고된 방법에 따라 rRNA probe를 제작한 후 Amann 등(1995)의 방법에 따라 수행했다. 단, 해면에서 채취한 시료는 유기물과 세균을 분리하기 위하여 최종농도가 0.2%인 Tween 80을 넣고 30분 동안 soaking (28KHz, 400W) 한 후, 25분간 침전시켜, 상등액을 취하였다. 형광 현미경(Olympus BH2, exciting filter: U; 총세균수, G; 군집구조 barrier filter: 0590, Lamp: mercury lamp HBO 100W/2)을 이용하여 세균을 계수하였으며, 각 세균 수는 최소 20개 이상의 화상에서 측정된 값을 평균하여 사용하였다. 각 group의 비율은 DAPI로 측정된 값의 백분율을 구하여 사용하였다.

결 과

총 세균수

바이칼 호수에 서식하는 해면의 총세균수는 *Baikalospongia* 속의 경우, soaking과, squeezing 방법 시 각각 7.2×10^7 cells/ml, 4.2×10^8 cells/ml (Table 2)로, squeezing 시료가 soaking 시료보다 약 6배 정도 높은 값을 보였다. *Lubomirskia* 속의 총 세균수는 위와 같은 방법으로 비교하였을 때, 각각 1.2×10^8 cells/ml과 1.6×10^8 cells/ml (Table 2)로 비슷하였다. 이에 반해 인근 바이칼 호숫물의 총 세균수는 3개 지점에서 각각 7.7×10^5 cells/ml, 3.5×10^5 cells/ml, 2.3×10^5 cells/ml이었다(Table 2). 이 결과 해면에 서식하는 총 세균수가 호숫물 보다 약 10^3 - 10^4 배 더 높게 측정되었음을 확인하였다.

총 세균수에 대한 Bacteria의 비율

Baikalospongia 속의 경우 총 세균 수에 대한 Bacteria 세균에 속하는 세균의 비율은 42.0-60.3%로 조사되었고(Fig. 1), *Lubomirskia* 속의 경우 그 비율이 40.7-52.0%로 확인되었다(Fig. 2). 바이칼 호숫물의 경우는 그 비율이 49.5-59.7%로 해면에 서식하는 세균과 유사한 분포를 보였다(Fig. 3).

Table 2. The number of total bacteria in lake water and sponge (*Baikalospongia* and *Lubomirskia*) of Lake.Baikal (Total bacterial number : 10^5 cells/ml).

Lake water	Site1	Site2	Site3
	7.7 (0.06)	3.5 (0.04)	2.3 (0.09)
Sponge	<i>Baikalospongia</i>		<i>Lubomirskia</i>
Soaking	720 (70)		1200 (220)
Squeezing	4200 (50)		1600 (280)

*soaking : 해면 body 자체를 4% paraformaldehyde 에 잠기게 고정 한 후 sonication
 squeezing : 해면 체내의 내부 내용물을 얻기 위하여 압착 하여 고정 한 후 sonication

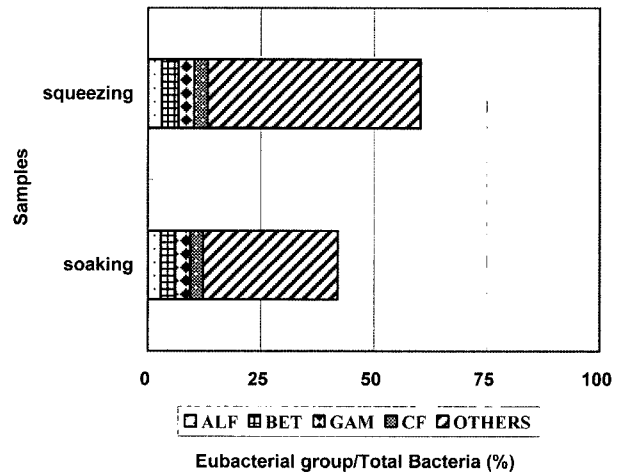


Fig. 1. Composition of bacterial communities at the genus *Baikalospongia* sponge in the Lake Baikal. (ALF, BET & GAM, α-, β- & γ-Proteobacteria; CF, *Cytophaga-Flavobacterium* group; OTHERS, unknown Bacteria)

Bacteria의 군집구조

해면에 서식하는 Bacteria 수의 세균 군집 비율을 그림 1과 2에 나타내었다. *Baikalospongia* 속과 *Lubomirskia* 속에서 α-, β-, γ-Proteobacteria group과 *Cytophaga-Flavobacterium* group이 각각 2.9-3.1%, 3.1-3.6%, 3.4-3.5%, 2.8-3.0%과 4.6-5.7%, 3.3-4.1%, 3.5-4.3%, 3.3-3.8%로 매우 낮은 값으로 관찰된 반면, 다

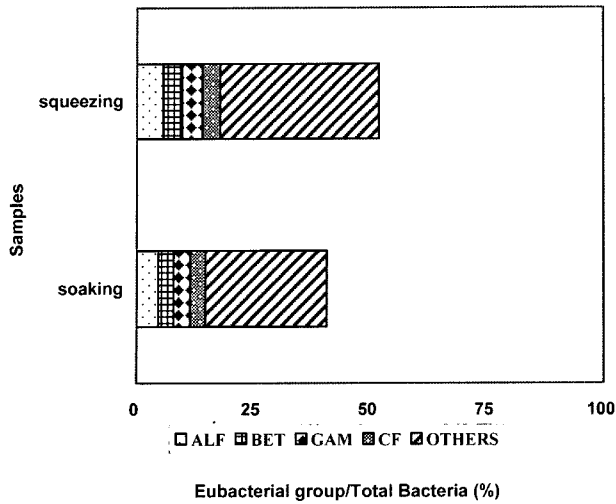


Fig. 2. Composition of bacterial communities at the genus *Lubomirskia* sponge in the Lake Baikal. (symbols are same as in Fig. 1)

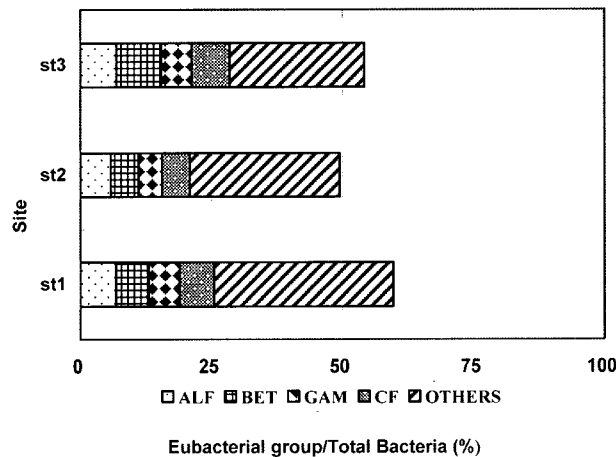


Fig. 3. Composition of bacterial communities at 2m depth in Lake Baikal. (symbols are same as in Fig. 1)

른 세균군은 *Baikalosporgia* 속과 *Lubomirskia* 속에서 각각 42.0-60.3%과 40.7-51.9%로 매우 높은 비율을 차지하고 있었다(Fig. 1, 2). 바이칼 호수 물에서도 전체적으로 다른 세균군이 정점 세 지점 모두에서 25.6-34.2%로 다른 group에 비해 상대적으로 높은 비율을 나타내었다(Fig. 3). 호숫물에서 α , β , γ Proteobacteria 와 *Cytophaga-Flavobacterium* group의 비율은 각각 5.9-7.0%, 5.3-8.5%, 4.5-6.0%, 5.2-7.3%로 해면에 서식하는 세균 각 비율 보다는 약간 높은 값을 나타내었다.

고찰

바이칼 호수에서 채취한 해면 내에 서식하는 총세균수는 바이칼 호수 물의 총세균수 보다 10^3 - 10^4 배 높은 값이었다(Table 2). 이는 하루 1 kg당 24,000 liter의 바닷물을 여과함으로써 수 환경

에서는 세균의 개체수가 낮지만 고농도로 농축 시키는 해면의 특징(25) 때문이라고 사료된다. 또한 해면 전처리 방법에 따른 총세균수는 squeezing이 soaking보다 약 6배 높은 값을 나타내었는데 이는 해면 생체량은 그 조직 속에 있는 세균이 40%를 차지한다는 보고(25)에 따라 조직 속에 있는 세균이 squeezing 과정에서 체외로 많이 빠져 나온 것으로 사료된다. 바이칼 호수에 서식하는 해면의 Bacteria에 대한 세균군집구조의 비율은 α , β , γ Proteobacteria와 *Cytophaga-Flavobacterium* group이 다른 세균군에 비해서 낮은 비율로 검출되었고, 다른 세균군은 26.0-47.1%로 높게 검출되었다. 이는 일반 담수 해면인 *spongilla lacustris*의 세균 군집 조사 시 α , β Proteobacteria가 50% 이상 우점된 결과와는 다른 결과였다(4). 바이칼 호숫물의 세균군집구조는 해면과 마찬가지로 다른 세균군이 우점하였다. 이는 *spongilla lacustris*가 서식하는 독일 Staffelsee의 주위 호숫물을 해면의 군집구조와 비교했을 때, α , β Proteobacteria가 각각 54%, 5%로 해면과 호숫물이 비슷한 경향으로 나온 결과와(4) 같은 양상이었다. 그러므로 해면 체내의 세균 군집 구조는 해면이 서식하는 수 환경에 영향을 받는다는 것을 알 수 있다.

바이칼 호수에 해면 내에 서식하는 다른 세균군은 해면에게 유용한 대사산물이나 영양분을 제공하고(24), 해면의 식균 작용에 대하여 저항성을 가지며, 숙주인 해면 안에 서식할 수 있는 공생 관계(15)를 형성 할 수 있는 세균으로 구성 될 것으로 사료된다. 해면에서 발견된 세균으로는 비호기성 세균(micro-aerophilic)과 Acklins 섬, Jamaica 만에 있는 해면에서 검출된 통성혐기성 세균(18)그리고 황환원 세균(12)도 존재 할 것으로 사료된다. 해면 내 세균의 군집 구조는 특징적인 2차 대사산물에 따라서도 달라지는데 *Aplysina aerophoba*는 brominated alkaloids를 *Theonella swinhoei*는 peptides와 polyketides를, 그리고 *Rhopaloeides odorabile*는 diterpenes을 2차 대사산물로 생산한다(9). 이러한 결과는 해면이 생산해 내는 2차 대사산물을 선택적으로 이용(19) 할 수 있는 세균이 우점하게 된다는 현상을 부가적으로 설명하는 매우 흥미 있는 결과라 할 수 있다. 그러므로 해면의 종류를 알고, 그 해면이 지니는 특징적인 대사산물을 연구하면 해면 내에 서식, 우점하는 세균의 군집구조를 더 확실하게 평가할 수 있을 것이라고 사료된다.

바이칼 호수는 아직 오염되지 않은 깨끗한 호수이고, 호수 내에는 약 1,200종의 식물과 800여종의 동물이 서식하며, 이 중 75%가 고유종으로 이루어져있어(14), 이들과 상호 작용하는 독특한 생태학적 특성을 가지는 세균이 많이 존재하기 때문에 일반 담수, 일반 해수와는 다른 독특한 세균 군집 구조를 가진 것으로 사료된다. 또한 바이칼 호는 연중 수온이 10°C로 낮고 심층으로 갈수록 압력이 증가하므로, 이러한 환경에 적응할 수 있는 호저 온성, 호고압성 세균도 존재(1) 할 수 있을 것으로 사료된다. 그러므로 바이칼 호수에 서식하는 해면 내의 세균 군집구조 분석 시 해면의 종류와 특징적 대사산물을 연구하고, 특정 세균을 검출하기 위한 probe를 혼합하여 사용한다면 보다 정확하게 군집구조를 파악 할 수 있을 것이다. 또한 바이칼 호수가 갖고 있는 생태학적 기능과 특성을 지속적으로 파악하기 위하여 세균의 역

할과 세균의 군집에 관한 다양한 변화를 측정하는 미생물 생태학적인 분자생물학적 연구가 지속적으로 이루어져야 한다고 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2002년 과학기술부의 21세기 프론티어 사업인 미생물 유전체 활용기술 개발사업 연구비(과제번호: MG 02-0101-002-2-2-0)로 수행되었음.

참고문헌

- 홍선희. 2001. 담수생태계에서 세균 군집 구조의 분석. 이학박사 학위논문. 강원대학교.
- Alfreider, A., J. Pernthaler, R. Amann, B. Sattler, F.-O. Glckner, A. Wille, and R. Psenner. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2138-2144.
- Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Christine, G., F.O. Glckner, G. Krohne, and U. Hentschel. 2005. Microbial diversity of the freshwater sponge *spongilla lacustris*. *Microbiol. Ecol.* 50, 206-212.
- Efremova, S.M. 2004. New genus and new species of sponges from family *Lubomirskiidae Rezvoy*, p. 1261-1278. Index of Animal species inhabiting lake Baikal and its catchment area. Lake Baikal Book 1. *Nauka. Nobosibirka*. 1936.
- 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). *Mar. Biol.* 134, 461-470.
- Friedrich, U., M. Schallenberg, and C. Holliger. 1999. Pelagic bacteria-particle interactions and community-specific growth rates in four lakes along a trophic gradient. *Microb. Ecol.* 34, 49-61.
- Glckner, F.O., B.M. Fuchs, and R.I. Amann. 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: A first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3721-3726.
- Hentschel, U., J. Hopke, M. Horn, A.B. Friedrich, M. Wagner, J. Hacker, and B.S. Moore. 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4431-4440.
- Hicks, R., R.I. Amann, and D.A. Stahl. 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4, 6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2158-2163.
- Hopper, J.N. An and R.W.M. van Soest. 2002. *Systema Porifera. A guide to the classification of sponges*. Plenum Publishers. New York, vol. 1.
- Manz, W., G.G. Arp, G. Schumann-Kindel, U. Szewzyk, and J. Reitner. 2000. Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescent in situ hybridization to show the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. *J. Microbiol. Meth.* 40, 125-134.
- Masuda, Y., V.B. Itskovich, E.V. Veinberg, and S.M. Efremova. 1999. Perspective studies of freshwater sponges in Lake Baikal. *Berliner geowiss. Abh.* E30, 329-332.
- Miyazaki, N. 1997. Animal community, environment and phylogeny in Lake Baikal. Otsuchi Marine Research Center, Ocean Research Institute, the University of Tokyo, Japan.
- Miller, 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. *J. Bacteriol.* 145, 548-558.
- Miller, W., M. Bohm, Bo. Grebenjuk, A. Skorokhod, I. Muller, and V. Gamulin. 2002. Conservation of the positions of metazoan introns from sponges to humans. *Gene* 295, 299-309.
- Osinga, R., J. Tramper, and R.H. Wijffels. 1999. Cultivation of marine sponges. *Mar. Biotechnol.* 1, 509-532.
- Santavy, D.L., P. Willenz, and R.R. Colwell. 1990. Phenotypic study of bacteria associated with the Caribbean sclerosponge *Ceratoporella nicholsoni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1750-1762.
- Schmid, M., U. Twachtmann, M. Klein, M. Strous, S. Juretschko, M.S.M. Jetten, J.W. Metzger, K.H. Schleifer, and M. Wagner. 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 93-106.
- Wehrl, M. 2001. Master thesis. Universitt Wrzburg. Wrzburg. Germany.
- Wilkinson, C.R. and P. Fay. 1979. Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic cyanobacteria. *Nature* 279, 527-529.
- Wilkinson, C.R., M. Nowak, B. Austin, and R.R. Colwell. 1981. Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and great barrier reef sponges. *Microb. Ecol.* 7, 13-21.
- Vacelet, J. 1975. Etude en microscopie electronique de l'association entre bacteries et spongiaires du genre *Verongia Dictyocera-icda*. *J. Microsc. Biol. Cell* 23, 271-288.
- Vacelet, J., N. Boury-Esnault, A. Fiala-Medioni, and C.R. Fisher. 1995. A methanotrophic carnivorous sponges. *Nature* 377, 296.
- Vogel, S. 1977. Current-induced flow through living sponges in nature. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 2069-2071.

(Received February 5, 2007/Accepted March 22, 2007)

ABSTRACT: Community Analysis of the *Bacteria* in Sponges of Lake Baikal by FISH Method

Eun Young Seo, Mi Ree Kim, and Tae Seok Ahn* (Dept. of Environmental Science, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea)

The bacterial community structures at 2 sponge species belonging to the genus *Baikalospongia* and *Lubomirskia* in Lake Baikal were analyzed with fluorescent *in situ* hybridization (FISH) method. The total bacterial numbers in the genus *Baikalospongia* ranged from 7.2×10^7 to 4.2×10^8 cells/ml, and those in *Lubomirskia* from 1.2×10^8 to 1.6×10^8 cells/ml, while those of lake water were from 2.3 to 7.7×10^5 cells/ml. Total bacterial numbers in the sponges were 10^3 - 10^4 times higher than those of lake water. In the genera *Baikalospongia* and *Lubomirskia*, the proportions of other unidentified bacterial groups to the *Bacteria* were 42.0-60.3% and 40.7-51.9%, respectively. These proportions were similar to those in lake water (22.6-46.3%). These results suggest that bacterial compositions in Lake Baikal water and sponges are highly unique.