

## 울릉도 연안 수심 1500 m에 서식하는 해양미생물군집의 분포

김미경<sup>1</sup> · 강용호<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>영남대학교 생명공학연구소 해양연구센터

<sup>2</sup>영남대학교 생명공학부

### Marine Prokaryotic Diversity of the Deep Sea Waters at the Depth of 1500 m Off the Coast of the Ulleung Island in the East Sea (Korea)

Mi-Kyung Kim<sup>1</sup> and Yongho Khang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Marine Science Research Center, Institute of Biotechnology

<sup>2</sup>School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan, 712-749, Republic of Korea

(Received November 21, 2012 / Accepted December 26, 2012)

Microbial diversity in the 1500 m depth sea waters off the coast of Ulleung island of the East Sea, Korea, was investigated. Genomic DNAs were extracted directly from the marine microbes filtered through ultramembrane filters. Pyrosequencing of 16S rDNAs of these microbes resulted in 13,029 reads, of which uncultured bacteria consisted of 54.1%, alphaproteobacteria 23.4%, and gammaproteobacteria 22.3%. Other classes such as flavobacteria, actinobacteria, and epsilonproteobacteria were distributed within 0.2% of total reads. Among the cultivable bacteria, it was found that *Rhodobacteraceae* family of alphaproteobacteria, *Alteromonadaceae*, *Halomonadaceae*, and *Piscirickettsiaceae* families of gammaproteobacteria were mostly distributed in the deep-sea waters.

**Keywords:** deep seawater, East Sea, marine microbe, pyrosequencing, Ulleng Island

바다에는 육지보다 훨씬 더 많은 종류의 미생물이 서식하고 있지만 배양기술의 한계로 그 동안 해양미생물에 대한 연구가 활발하게 진행되지 못하였으나, 최근 next-generation sequencing (NGS) 기술의 등장으로 다양한 해양미생물의 생태를 파악하는 것이 가능하게 되었다(Weber *et al.*, 2010). 일반적으로 해양 표층수에는 alphaproteobacteria와 gammaproteobacteria에 속한 광합성세균들이나 bacterioplankton 등이 주로 서식하고 있으며 (Pontarpet *et al.*, 2012; Ritchie and Johnson, 2012), 수심 500 m 이상의 해저에 있는 침적토에는 용존산소의 부족으로 황환원균 (*Desulfobacteraceae*)이나 메탄균(*Methanobacteriales*)과 같은 혐기성 미생물 등이 주로 서식하고 있다(Anderson *et al.*, 2011; Edgcomb *et al.*, 2011). 심해 열수구 부근에는 *Methanocaldococcus* 같은 메탄균이 서식하는데, 이들 주변에 존재하는 바이러스들은 해양미생물들의 유전자를 전달하는 중요한 매개체 역할을 하고 있다(VerEecke *et al.*, 2012; Yoshida-Takashima *et al.*, 2012).

태양광이 도달하지 못하는 수심 200 m 이상의 해양심층수는 수온이 연중 3°C 이하이고 질산염, 인산염 및 규산염 등의 영양염

류가 풍부하나 용존산소가 부족하여 혐기적인 환경을 이루고 있다. 해양심층수는 청정성과 미네랄성 등의 특성 때문에 식품분야, 의료분야, 농업분야, 환경분야, 수산분야 뿐만 아니라 표층수와 심해의 온도차를 이용한 열에너지 자원으로도 이용되고 있다(Joo, 2011; Kim *et al.*, 2012a). 울릉도에서는 수심 1500 m 지역의 해양심층수를 개발하여 산업적으로 이용하고 있으나 해양심층수에 분포하는 미생물들의 생태환경에 대한 이해는 부족한 편이다. 심해에 분포하는 해양미생물 군집의 생태를 파악하면 해양환경관리나 저온성 효소나 생리활성물질 등을 개발하기 위한 연구에 도움이 될 수 있다(Heidelberg *et al.*, 2010; Imhoff *et al.*, 2011; McGenity *et al.*, 2012). 본 연구는 울릉도 연안의 해양심층수에 서식하는 미생물군집의 분포를 이해하기 위하여 16S rRNA gene을 기준으로 각 균주에 해당하는 염기서열을 pyrosequencing 방법으로 분석하여 1500 m 심해에 존재하는 해양미생물의 생태분포를 조사하였다(Weber *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2011).

해양심층수 시료는 2009년 5월에 수심 1500 m에서 채취한 울릉도의 해양심층수를 사용하였다. 미생물군집은 해양심층수 20 L를 한 장의 Ultramembrane filter (cutoff 10,000 Da, Millipore)에 여과하여서 수집하였다. 필터표면에 여과된 미생물군집의 밀도를 파악하기 위하여 Transmission Electron Microscope (TEM)

\*For correspondence. E-mail: ykhkhang@ynu.ac.kr; Tel.: +82-53-810-3051; Fax: +82-53-810-4663

전자현미경(Model H-7600, Hitachi)을 사용하였다(Fig. 1).

Ultramembrane filter에 여과된 해양미생물은 Genomic DNA kit (Qiagen)를 사용하여 미생물군집의 DNA를 분리정제하였다. Primers는 미생물들의 16S rRNA gene의 V3영역을 증폭할 수 있는 27F (5'-AGTCACTGACGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 518R (5'-AGTCACTGACWTTACCGCGGCTGCTGG-3')을 사용하였다. Polymerase Chain Reaction (PCR) 조건은 10X buffer 5 µl, 10 mM dNTPs 1 µl, DNA template (100 ng) 1 µl, Taq polymerase (5 U/µl Roche, USA) 0.25 µl, 20 pmole/µl primers (forward/reverse) 2 µl를 넣고 총 부피가 50 µl가 되도록 조정하였다. PCR 반응은 95°C에서 5분간 pre-denature 시킨 후, denaturation (94°C, 45초), annealing (55°C, 60초), extension (72°C, 90초) 단계를 35회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물의 pyrosequencing 분석은 Macrogen (주)에서 수행하였으며, 미생물들의 16S rDNA sequence는 National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST를 이용하여 DNA database와 97% 이상의 유사한 생물정보를 검색하였다. Phylogenetic tree를 위한 multiple alignments는 MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; <http://www.megasoftware.net/mega.php>)의 maximum-parsimony algorithm을 이용하였다.

해양심층수에 분포하는 미생물들의 16S rRNA 유전자를 증폭하여 얻어진 총 13,029개의 염기서열 정보를 분석한 결과, 울릉도 지역의 해양심층수(1500 m)에 서식하는 미생물들은 uncultured bacteria가 54.1%로 과반수를 차지하였으며, alphaproteobacteria와 gammaproteobacteria가 각각 23.4%와 22.3%로 비슷한 비율로 분포하였다(Fig. 2).

해안에서도 담수에서는 alphaproteobacteria 수가 gammaproteobacteria 수보다 많으나, 해수 쪽으로 갈수록 gammaproteobacteria 수가 증가하여 alphaproteobacteria와

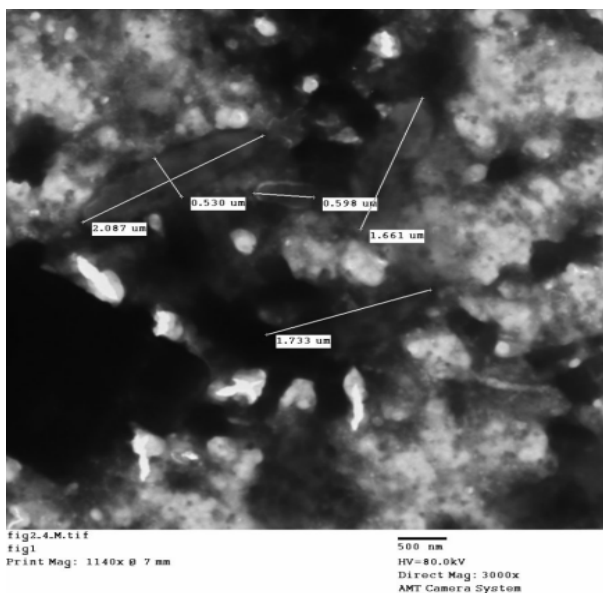


Fig. 1. Transmission electron micrograph of microbes at the 1500 m depth sea waters off the Ulleng Island of the East Sea.

gammaproteobacteria 비슷하게 분포하였다(Bolhuis and Stal, 2011). 북극지역의 바다(Arctic Ocean)와 온화한 지역의 바다에 서식하는 해양미생물의 분포 패턴도 유사한 것으로 보고되었다 (Galand *et al.*, 2009).

배양이 가능한 균주의 16S rRNA 유전자 정보를 중심으로 울릉도의 해양심층수 채취 지역의 해양미생물의 생태분포를 살펴 보면, 세계의 온화한 지역의 표층수에 많이 분포하고 있는 것으로 알려져 있는 alphaproteobacteria인 *Rhodobacterales*목(Order)이 총 reads수의 15.6%로 가장 많이 나타났다(Dang *et al.*, 2008; Slightom and Buchan, 2009). 그 다음은 gammaproteobacteria인 *Alteromonadales*, *Oceanospirillales*, *Thiotrichales*, *Pseudomonadales*, *Vibrionales*목 순으로 많았으며, 기타 다른 목에 해당하는 미생물들은 0.2% 이하의 분포를 보였다(Table 1).

미생물 분류상 각 목(Order)에 해당하는 미생물들의 생물정보를 다시 속(Genus)으로 세분하여 분석해보면, 울릉도 연안의 심해에 서식하는 alphaproteobacteria인 *Rhodobacterales*목 중에는 *Roseovarius* sp. (63.2%), *Roseobacter* sp. (14.2%), *Rhodobacter* sp. (8.0%) 순으로 많았고, 기타 *Loktanella* sp. (6.3%), *Sulfitobacter* sp. (2.4%), *Octadecabacter* sp. (2.3%), *Phaeobacter* sp. (1.1%), *Thalassobius* sp. (0.8%), *Paracoccus* sp. (0.6%), *Ruegeria* sp. (0.5%), *Leisingera* sp. (0.2%), *Marinovum* sp. (0.1%) 등의 순으로 분포하였다.

Gammaproteobacteria인 *Alteromonadales*목 중에는 *Marinobacter* sp. (78.5%)가 가장 많았으며, 기타 *Teredinibacter* sp. (9.0%), *Colwellia* sp. (5.8%), *Moritella* sp. (3.2%), *Alteromonas* sp.

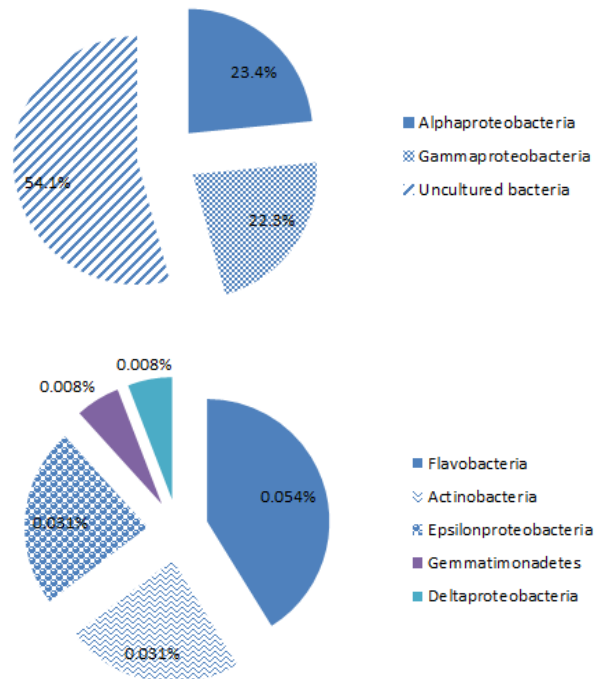


Fig. 2. Marine prokaryotic diversity at the 1500 m depth sea waters off the Ulleng Island of the East Sea (total reads=13,029).

**Table 1.** Diversity of cultivable bacteria at the 1500 m depth sea waters off the Ulleng Island of the East Sea (total reads = 13,029)

Class	Order	Family	Genus	% of total reads
Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Roseovarius	15.56
Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	7.83
Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	2.80
Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Piscirickettsiaceae	Cycloclasticus	1.48
Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	0.58
Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio	0.46
Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingopyxis	0.20
Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	0.19
Flavobacteria	Flavobacteria	Flavobacteriaceae	Tenacibaculum	0.05
Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Thalassospira	0.05
Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Thiobacillus	Thiobacillus	0.04
Actinobacteria	Actinomycetales	Corynebacterineae	Nocardiaceae	0.03
Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Lysobacter	0.01

(2.4%) *Saccharophagus* sp. (0.8%), *Shewanella* sp. (0.2%), *Microbulbifer* sp. (0.1%) 등이 존재하였다. *Marinobacter* sp.는 심해열수구 등 다양한 해양 환경에서 서식하며 오염된 원유를 분해할 능력이 있는 균주로 밝혀졌다(Kaye *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

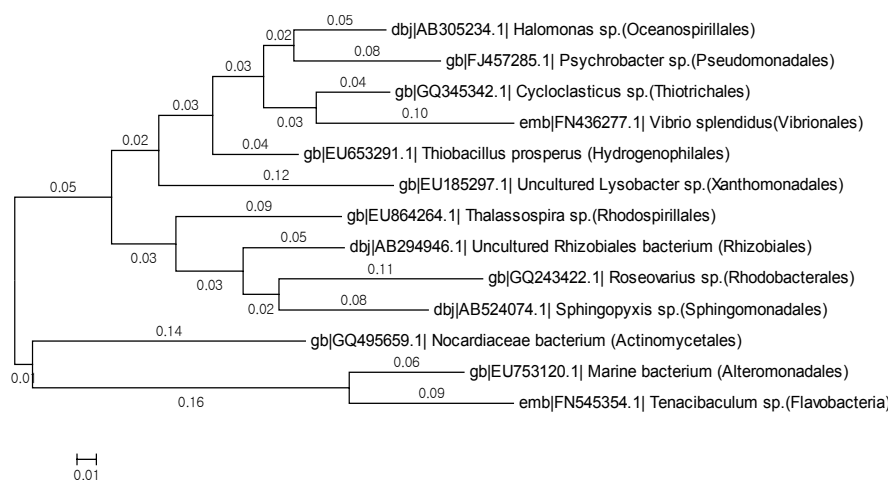
*Oceanospirillales*목 중에는 해수의 salt stress에 내성이 강한 *Halomonas* sp. (49.9%)가 가장 많았고, 원유(crude oil)의 long chain alkanes를 잘 분해하는 것으로 알려진 *Alcanivorax* sp. (30.0%)이 두번째로 많았다(Kumari *et al.*, 2011; Ceylan *et al.*, 2012). 기타 다른 속은 *Marinomonas* sp. (6.9%), *Neptunomonas* sp. (4.4%), *Oceanobacter* sp. (3.6%), *Oceanospirillaceae* sp. (3.6%), *Cobetia* sp. (1.7%) 순으로 분포하였다.

*Thiotrichales*목 중에는 원유에 포함된 방향족화합 물질을 잘 분해하는 것으로 알려진 *Cycloclasticus* sp. (99%)가 대부분이었다(Teramoto *et al.*, 2010). *Pseudomonadales*목에는 저온(-10° ~ 42°C) 환경에서도 잘 성장할 수 있는 *Psychrobacter* sp. (40.0%)가 우점종을 이루었고, 기타 *Pseudomonas* sp. (37.3%)와 *Acinetobacter* sp. (22.7%)가 다수 분포하였다(Kim *et al.*, 2012b).

*Vibrionales*목에는 oyster pathogen으로 잘 알려진 *Vibrio splendidus* (28.3%)가 우점종이었으며, 나머지는 대부분 종이 알려지지 않은 *Vibrio* sp. (71.7%)이었다(Duperthuy *et al.*, 2011).

각 목들의 분포 가운데 가장 우점하는 속(genus)의 16S rDNA reads 염기서열을 사용하여 계통도(pylogenetic tree)를 작성하였다. 계통도 분석에 의하면 *Marinobacter*와 *Tenacibaculum*속 그룹이 *Halomonas*, *Psychrobacter*, *Thiobacillus*, *Cycloclasticus*, *Vibrio*속 그룹, *Thalassospira*, *Shpingopyxis*, *Rhizobiales*, *Roseovarius*속 그룹과 큰 차이를 보였다(Fig. 3). 울릉도의 심층수 채취지역에서 우점종을 보이고 있는 이런 해양미생물들은 nitrogen, iron, methane, sulfur 등을 이용하는 혐기성 균주나 저온성 균주들이며 다른 심해지역에서도 많이 분포하고 있다(Sylvan *et al.*, 2012). 이런 결과는 울릉도 지역의 심해환경이 다른 지역의 심해 환경과 크게 다르지 않은 청정지역이라는 것을 의미한다.

결론적으로 울릉도의 해양심층수에는 배양이 가능한 미생물로서는 alphaproteobacteria와 gammaproteobacteria가 각각 20% 정도로 우점종을 이루고 있었으며, 기타 beta-, delta-, epsilon-proteobacteria나 actinobacteria, bacteroidetes, flavobacteria,



**Fig. 3.** Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the phylogenetic relationship among the orders of cultivable bacteria at the 1500 m depth sea waters off the Ulleng Island of the East Sea. Bootstrap values are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

gemmatimonadetes 등에 속하는 해양미생물들의 분포는 무시할 수 있을 정도로 매우 낮게 나타났다.

## 적 요

울릉도 연안의 심해(1500 m)에 서식하는 미생물의 다양성을 조사하였다. Ultramembrane filter를 사용하여 해양미생물을 여과한 다음 미생물군집 DNA를 정제하여 16S rDNA를 증폭하였다. Pyrosequencing 방법으로 염기서열을 분석한 결과 총 13,029 reads를 얻었으며, 이중에 54.1%가 uncultured bacteria, 23.4%가 alphaproteobacteria, 22.3%가 gammaproteobacteria이었고 flavobacteria, actinobacteria, epsilonproteobacteria 등이 0.2% 이내에서 분포하고 있었다. 울릉도 지역의 해양심층수에서 배양이 가능한 것으로 알려진 미생물로서는 *alphaproteobacteria*의 *Rhodobacteraceae*과 (family), *gammaproteobacteria*의 *Ateromonadaceae*, *Halomonadaceae*, *Piscirickettsiaceae*과가 주로 분포하였다.

## 감사의 말

본 연구는 국토해양부소관(경북씨그랜트사업단) 연구개발사업의 연구비지원에 의해 수행되었습니다. 울릉도의 해양심층수 (주)파나블루에서 제공하였습니다.

## 참고문헌

- Anderson, R.E., Brazelton, W.J., and Baross, J.A. 2011. Is the genetic landscape of the deep subsurface biosphere affected by viruses? *Front Microbiol.* **2**, 219–234.
- Bolhuis, H. and Stal, L.J. 2011. Analysis of bacterial and archaeal diversity in coastal microbial mats using massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. *ISME J.* **5**, 1701–1712.
- Ceylan, S., Yilan, G., Akbulut, B.S., Poli, A., and Kazan, D. 2012. Interplay of adaptive capabilities of *Halomonas* sp. AAD12 under salt stress. *J. Biosci. Bioeng.* **114**, 45–52.
- Dang, H., Li, T., Chen, M., and Huang, G. 2008. Cross-ocean distribution of *Rhodobacteriales* bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 52–60.
- Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F., Lautrédou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorgeril, J., and *et al.* 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 2993–2998.
- Edgcomb, V.P., Leadbetter, E.R., Bourland, W., Beaudoin, D., and Bernhard, J.M. 2011. Structured multiple endosymbiosis of bacteria and archaea in a ciliate from marine sulfidic sediments: a survival mechanism in low oxygen, sulfidic sediments? *Front. Microbiol.* **2**, 55–70.
- Galand, P.E., Casamayor, E.O., Kirchman, D.L., and Lovejoy, C. 2009. Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 22427–22432.
- Heidelberg, K.B., Gilbert, J.A., and Joint, I. 2010. Marine genomics: at the interface of marine microbial ecology and biodiversity. *Microb. Biotechnol.* **3**, 531–543.
- Hong, P.Y., Wheeler, E., Cann, I.K., and Mackie, R.I. 2011. Phylogenetic analysis of the fecal microbial community in herbivorous land and marine iguanas of the Galápagos Islands using 16S rRNA-based pyrosequencing. *ISME J.* **5**, 1461–1470.
- Imhoff, J.F., Labes, A., and Wiese, J. 2011. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. *Biotechnol. Adv.* **29**, 468–482.
- Joo, D.-S. 2011. Changes in quality of salted and dried brown-croaker product prepared with deep seawater salt. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 235–244.
- Kaye, J.Z., Sylvan, J.B., Edwards, K.J., and Baross, J.A. 2011. *Halomonas* and *Marinobacter* ecotypes from hydrothermal vent, seafloor and deep-sea environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**, 123–133.
- Kim, J.-H., Kim, G.T., Park, S.-H., Oh, W.-Y., and Kim, H.-J. 2012a. A feasibility study on thermal energy resource in deep ocean water. *J. Kor. Soc. Marine Environ. Eng.* **15**, 9–18.
- Kim, S.J., Shin, S.C., Hong, S.G., Lee, Y.M., Choi, I.G., and Park, H. 2012b. Genome sequence of a novel member of the genus *Psychrobacter* isolated from antarctic soil. *J. Bacteriol.* **194**, 2403.
- Kumari, R., Tecon, R., Beggah, S., Rudler, R., Arey, J.S., and van der Meer, J.R. 2011. Development of bioreporter assays for the detection of bioavailability of long-chain alkanes based on the marine bacterium *Alcanivorax borkumensis* strain SK2. *Environ. Microbiol.* **13**, 2808–2819.
- McGenity, T.J., Folwell, B.D., McKew, B.A., and Sanni, G.O. 2012. Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquat. Biosyst.* **8**, 10–18.
- Pontarp, M., Canbäck, B., Tunlid, A., and Lundberg, P. 2012. Phylogenetic analysis suggests that habitat filtering is structuring marine bacterial communities across the globe. *Microb. Ecol.* **64**, 8–17.
- Ritchie, A.E. and Johnson, Z.I. 2012. Abundance and genetic diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria of coastal regions of the Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2858–2866.
- Slightom, R.N. and Buchan, A. 2009. Surface colonization by *Marine Roseobacters*: Integrating genotype and phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 6027–6037.
- Sylvan, J.B., Toner, B.M., and Edwards, K.J. 2012. Life and death of deep-sea vents: bacterial diversity and ecosystem succession on inactive hydrothermal sulfides. *MBio.* **3**, e00279-11.
- Teramoto, M., Suzuki, M., Hatmantani, A., and Harayama, S. 2010. The potential of *Cycloclasticus* and *Altererythrobacter* strains for use in bioremediation of petroleum-aromatic-contaminated tropical marine environments. *J. Biosci. Bioeng.* **110**, 48–52.
- VerEecke, H.C., Butterfield, D.A., Huber, J.A., Lilley, M.D., Olson, E.J., Roe, K.K., Evans, L.J., Merkel, A.Y., Cantin, H.V., and Holden, J.F. 2012. Hydrogen-limited growth of hyperthermophilic methanogens at deep-sea hydrothermal vents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 13674–13679.
- Wang, H., Li, H., Shao, Z., Liao, S., Johnstone, L., Rensing, C., and Wang, G. 2012. Genome sequence of deep-sea manganese-oxidizing bacterium *Marinobacter manganoxydans* MnI7-9. *J. Bacteriol.* **194**, 899–900.
- Weber, M., Teeling, H., Huang, S., Waldmann, J., Kassabgy, M., Fuchs, B.M., Klindworth, A., Klockow, C., Wichels, A., Gerdt, G., Amann, R., and Glöckner, F.O. 2010. Practical application of self-organizing maps to interrelate biodiversity and functional data in NGS-based metagenomics. *ISME J.* **5**, 918–928.
- Yoshida-Takashima, Y., Nunoura, T., Kazama, H., Noguchi, T., Inoue, K., Akashi, H., Yamanaka, T., Toki, T., Yamamoto, M., Furushima, Y., Ueno, Y., Yamamoto, H., and Takai, K. 2012. Spatial distribution of viruses associated with planktonic and attached microbial communities in hydrothermal environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1311–1320.