

DGGE에 의한 남태평양 해면 *Dactylospongia metachromia*의 공생세균 다양성

정인혜 · 박진숙*

한남대학교 생명시스템과학과

Bacterial Diversity of the South Pacific Sponge, *Dactylospongia metachromia* Based on DGGE Fingerprinting

In-Hye Jeong and Jin-Sook Park*

Department of Biological Science and Biotechnology, Hannam University, Daejeon 305-811, Republic of Korea

(Received December 12, 2013 / Accepted December 27, 2013)

The bacterial community structures of the marine sponge, *Dactylospongia metachromia*, collected from Chuuk of Micronesia on February 2012, were analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The DGGE fingerprints of two individuals of *D. metachromia*, CH607 and CH840 showed the same band patterns. The sequences derived from DGGE bands revealed 93~100% similarities with known bacterial species in the public database and high similarity with uncultured bacterial clones. The bacterial community structures of both *D. metachromia* sponges (CH607, CH840) were composed of 6 phyla, 8 classes: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*. DGGE fingerprint - based phylogenetic analysis revealed that the bacterial community profiles were identical in two individuals of the same sponge species collected from the same geographical location.

Keywords: *Dactylospongia metachromia*, bacterial diversity, DGGE, sponge

해면(Pylum:Porifera)은 600만년 전부터 존재하는 고대 후생 동물로서 현재까지 10,000종이 넘는 해면이 존재하는 것으로 알려져 있고 해양에서 담수 그리고 열대, 온대, 극지에 이르기까지 광범위한 분포를 나타내며 그 중 열대 해양에 풍부한 종이 분포하는 것으로 알려져 있다(Li *et al.*, 1998). 해면의 대부분이 여과 섭식을 하며, 하루에 수 천 리터의 해수를 여과하면서 해면 세포 내외에 많은 양의 다양한 세균을 포함한다(Li *et al.*, 2007; Piel, 2009). 세균은 해면동물의 먹이원이기도 하나 해면동물의 소화 과정과 면역반응에 저항하여 성공적으로 서식하는 공생세균은 이차 대사 산물의 생합성과 관련되어 있어 생물공학적인 잠재력이 매우 큰 것으로 알려져 있다(Guangyi, 2006; Dupont *et al.*, 2013). 해면의 생리활성물질들의 원생산자가 공생세균으로 알려지면서 해면공생세균의 다양성 및 군집구조에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다(Kennedy *et al.*, 2009; Haber and Ilan, 2013; Schöttner *et al.*, 2013).

미생물 군집구조의 분석에는 16S rDNA에 기반한 PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis), T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism),

pyrosequencing 등 다양한 분자적 방법들이 이용되고 있으며, 배양(culture-dependent)과 비배양(culture-independent)에 근거하여 군집 분석이 이루어지고 있다(Jackson *et al.*, 2012; White *et al.*, 2012). 해면 공생미생물은 그 수와 종류에 있어 매우 풍부하고 다양하여 29개의 문에 이른다(Dupont *et al.*, 2013). 자연계의 미생물 중 실제 배양 가능한 종류는 전체 미생물 군집의 0.1-11% 정도에 국한되는 것으로 추정되고 있어(Olson and McCarthy, 2005), 해면공생미생물의 다양성 및 군집구조에 관한 연구에 있어 비배양에 근거한 연구는 전체 공생세균 군집구조를 파악하는데 있어 중요하다. PCR-DGGE의 경우 특정 유전자 부위를 증폭한 PCR 산물을 polyacrylamide gel 상에서 전기영동에 의해 확인하는 방법으로써, 하나 이상의 염기서열이 달라도 서로 다른 밴드로 구분되므로 자연환경의 미생물을 배양하지 않고 군집 구조를 쉽게 파악할 수 있으며 실험 방법이 비교적 간단하여 주요 세균 군집을 파악하는데 효율적이다(Friedrich *et al.*, 2001). 따라서 본 연구에서는 PCR-DGGE를 이용하여 해면 공생세균의 다양성을 파악하고자 하였다.

*D. metachromia*는 Demospongiae 강(class), Dictyoceratida 목(order)에 속하는 해면으로 중서태평양에 흔하게 분포하는 것으로 알려져 있으며, 현재는 동남아시아 해역에서 대량 채집되어 특히 필리핀에서 목욕용 스펀지로 판매되고 있다(Handley *et*

*For correspondence. E-mail: jspark@hnu.kr; Tel.: +82-42-629-8771; Fax: +82-42-629-8769

al., 2003). 또한 당뇨병성 세포혈관증에 관여하는 aldose reductase 인 ALR2에 대하여 억제 작용을 갖는 화합물을 생산하는 것으로 보고되어 의약적으로도 중요성을 갖는 해면으로써(De La Fuente and Manzanaro, 2003; Wang *et al.*, 2009), 이 해면의 공생세균 다양성에 관한 연구는 차후의 응용 연구에 중요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 비배양법에 기초한 16S rRNA gene-DGGE 방법을 이용하여 남태평양에 위치한 마이크로네시아의 축(Chuuk)주에서 채집한 해양 해면 *D. metachromia* 두 개체를 사용하여 공생세균의 주요 군집구조를 조사하고 동일한 지역에서 채집한 동종 이 개체에 따른 해면 공생세균 군집구조의 차이를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

해면 시료의 채집

해양 해면 *Dactylosporgia metachromia*의 공생세균의 다양성을 조사하기 위하여 2012년 2월 남태평양 마이크로네시아 축(Chuuk)주(07°27'41.65"N, 151°53'14.49"E; 07°27'25.49"N, 151°54'27.17"W)에서 스쿠버 다이빙을 이용하여 약 20-25 m 깊이의 바다에서 해면을 채집하였다. 연구에 사용한 *D. metachromia* 두 개체의 해면은 CH607과 CH840으로 멸균된 인공해수(ASW : artificial sea water)로 3회 세척 후 -20°C에서 동결하여 운반하였다.

Total genomic DNA 추출

채집된 해면은 -70°C에서 24시간 예비 동결한 다음 동결 건조기에서 -50°C, 0.033 M bar 기압으로 24시간 건조하였다. 동결 건조된 해면은 멸균된 막자 사발에 넣고 분쇄하였다. 분쇄한 해면 powder 15 mg에 DW 600 µl을 넣어 1분간 초음파 처리 한 후 lysozyme (Sigma, Germany) 10 mg을 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 이어 5 µl 10% SDS를 넣어 65°C에서 5분간 처리한 후 phenol:chloroform (1:1, Sigma, USA)을 넣고 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액으로부터 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 DNA를 추출한 후 DGGE를 위한 PCR 반응의 주형으로 사용하였다.

16S rRNA gene의 DGGE-PCR 증폭

GC clamp가 추가된 341f (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')와 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')의 primer쌍을 이용하여 16S rRNA gene의 V3 영역을 증폭하였다. PCR 반응 혼합물의 조성은 5 µl 10× reaction buffer, 1 µl의 10 mM dNTPs, 5 unit/µl Taq polymerase (Solgent, Korea), 각각의 primer 10 pmol, 그리고 100 ng의 시료 DNA를 1 µl 첨가하여 최종부피 50 µl이 되도록 하여 PCR 반응을 수행하였다. My Cycler™ thermal cycler (Bio-Rad, USA)를 이용하여 94°C에서 40초간 변성, 65°C (1회 당 0.5°C touch down)에서 40초간 냉각, 72°C에서 1분간 신장, 이 과정을 30회 반복 수행한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 신장시켰다. 증폭된 DNA의 확

인을 위해 PCR 반응액 2 µl를 취하여 2% 아가로즈젤(Biopure, Canada)을 이용하여 Mupid-ex (ADVANCE, Japan)로 100 V에서 25분간 1× TAE 완충용액(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 전기영동 하였다. 전기영동 후, EtBr (ethidium bromide, 50 ng/ml)에 10분간 염색하여 Gel Logic 200 (Kodak, USA)을 이용하여 자외선 조사로 확인하였다. 증폭된 DNA의 크기를 확인하기 위한 marker로는 100 bp ladder (Intron, Korea)를 사용하였다.

DGGE 전기영동

DGGE는 Bio-Rad Dcode system (Bio-Rad)을 이용하여 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 bis acrylamide (Bio-Rad)를 포함한 8% polyacrylamide를 이용하여 30%에서 70%의 농도 구배 조성(7 M urea, 40% formamide)으로 전기영동을 수행하였다. Polyacrylamide 젤은 크기 20 × 13 (W × H cm), 두께 1 mm로 작성하여 PCR 시료는 2× loading dye와 혼합하여 40 µl의 시료를 loading하였다. 1× TAE 완충용액을 사용하여 60°C, 30 V에서 1시간 안정화시킨 후 60 V로 전압을 올려 14시간 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후 DGGE 젤은 EtBr로 30분간 염색 후 Gel Logic 200을 이용, 자외선 조사로 확인하였다. 각 밴드의 단일 밴드 여부는 최초 DGGE와 동일한 조건으로 DGGE를 재수행하여 확인하였다.

DGGE 밴드의 동정

DGGE 젤 상에서 분리된 밴드 중, 각 밴드를 젤에서 잘라내어 50 µl의 DW가 담긴 1.5 ml tube에 담아 상온에 하루 동안 정치하여 DNA를 추출하였다. 이것을 주형으로 GC가 제거된 primer 341f와 518r을 사용하여 위와 동일한 조건으로 PCR을 수행하였다. 증폭된 산물을 정제한 후 염기서열 분석(Macrogen, Korea)을 의뢰하였다.

계통학적 분석 및 계통수 작성

DGGE 결과로 얻어진 염기서열은 NCBI (the National Center for Biotechnology Information)에 등록된 염기서열을 대상으로 Blast search를 수행하였다. 각 염기서열의 alignment는 CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994)를 이용하여 정렬하였고 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0을 이용하여(Tamura *et al.*, 2007) neighbor-joining 방법(Saitou and Nei, 1987)에 의해 진화거리를 계산하고 계통수를 추론하였다. 1,000회 반복 bootstrap 분석에 의해 계통수를 확인하였다.

결과 및 고찰

DGGE 밴드 양상

남태평양 마이크로네시아 축(Chuuk)주에 서식하는 해양 해면 *D. metachromia*의 공생세균의 계통학적 다양성을 알아보기 위하여 CH607과 CH840의 두 개체의 해면을 이용하여 해면 시료로부터 추출한 유전체 DNA를 주형으로 16S rRNA gene의 V3영역을 증폭하여 194 bp의 예상된 크기의 PCR 산물을 얻었

Table 1. Phylogenetic affiliation of re-amplified DGGE bands derived from the marine sponges *D. metachromia* CH607 (D1) and CH840 (D2)

DGGE band	Nearest relative	Accession no.	% Sequence similarity	Phylum
D1-1	Uncultured chloroflexibacterium	GU732290	99	<i>Chloroflexi</i>
D1-2	Uncultured cyanobacterium	HQ270357	93	<i>Cyanobacteria</i>
D1-3	Uncultured spirochaetesbacterium	JN596755	94	<i>Spirochaetes</i>
D1-4	Uncultured cyanobacterium	HQ270357	93	<i>Cyanobacteria</i>
D1-5	Uncultured betaproteobacterium	EF076241	96	<i>Betaproteobacteria</i>
D1-6	Uncultured spirochaetesbacterium	JN596734	100	<i>Spirochaetes</i>
D1-7	Uncultured actinobacterium	FN556253	95	<i>Actinobacteria</i>
D1-8	Uncultured gammaproteobacterium	FJ949286	93	<i>Gammaproteobacteria</i>
D1-9	Uncultured gammaproteobacterium	HQ270412	96	<i>Gammaproteobacteria</i>
D1-10	Uncultured betaproteobacterium	EF076241	93	<i>Betaproteobacteria</i>
D1-11	Uncultured alphaproteobacterium	JF824774	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
D1-14	Uncultured actinobacterium	FN556232	100	<i>Actinobacteria</i>
D1-15	Uncultured actinobacterium	FN556244	93	<i>Actinobacteria</i>
D1-16	Uncultured actinobacterium	JN392390	98	<i>Actinobacteria</i>
D1-18	Uncultured acidobacteria bacterium	JQ809487	94	<i>Acidobacteria</i>
D2-1	Uncultured chloroflexibacterium	GU732290	99	<i>Chloroflexi</i>
D2-2	Uncultured cyanobacterium	JN098341	99	<i>Cyanobacteria</i>
D2-3	Uncultured spirochaetesbacterium	JN596755	100	<i>Spirochaetes</i>
D2-4	Uncultured cyanobacterium	HQ270357	93	<i>Cyanobacteria</i>
D2-5	Uncultured betaproteobacterium	EF076241	95	<i>Betaproteobacteria</i>
D2-8	Uncultured gammaproteobacterium	FJ949286	93	<i>Gammaproteobacteria</i>
D2-9	Uncultured gammaproteobacterium	HQ270412	96	<i>Gammaproteobacteria</i>
D2-10	Uncultured betaproteobacterium	EF076241	94	<i>Betaproteobacteria</i>
D2-11	Rhodospirillaceae bacterium	AB539976	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
D2-12	Uncultured betaproteobacterium	EF076241	96	<i>Betaproteobacteria</i>
D2-13	Uncultured actinobacterium	FN556246	98	<i>Actinobacteria</i>
D2-14	Uncultured actinobacterium	FN556232	100	<i>Actinobacteria</i>
D2-15	Uncultured actinobacterium	FN556232	99	<i>Actinobacteria</i>
D2-16	Uncultured actinobacterium	FN556244	93	<i>Actinobacteria</i>
D2-17	Uncultured actinobacterium	JN392390	100	<i>Actinobacteria</i>
D2-18	Uncultured acidobacteria bacterium	JQ809487	94	<i>Acidobacteria</i>

다. 두 개체의 동종 해면에서 동일한 DGGE 밴드 패턴이 나타났으며 각각 18개의 밴드가 관찰되었다(Fig. 1). *D. metachromia* CH607에서 15개, *D. metachromia* CH840에서 16개의 주요 밴드를 적출하여 세균 다양성을 파악하기 위하여 16S rRNA gene의 부분 염기서열을 분석하였다.

염기서열 분석 및 계통학적 분석

세균 군집의 다양성을 분석하기 위하여 DGGE 밴드로부터 DNA를 추출하여 341f와 518r을 이용하여 재 증폭하여 염기서열을 분석하였다. 염기 서열을 결정된 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 총 31개의 주요 밴드에 대하여 부분 염기서열을 확인할 수 있었으며, 동일위치의 밴드는 동일한 세균 문(phylum)으로 확인 되었다(Fig. 1 and Table 1). 이 서열들을 blast search를 통하여 기존의 보고된 서열들과 상동성(similarity)을 검색하였다. 두 해면의 결정된 서열들은 기존에 알려진 염기서열과 93%에서

100%의 상동성을 나타내었다. DGGE 밴드 패턴은 다양하였으나, D2-11를 제외한 모든 밴드로부터 밝혀진 서열들은 배양되지 않은 세균 클론(uncultured bacterial clone)들과 높은 상동성을 나타내었다.

DGGE 밴드에서 D1-1과 D2-1은 uncultured *Chloroflexi* (GU732290)와 99% 상동성을 나타내었고, D1-2, D1-4, D2-2 그리고 D2-4는 uncultured *Cyanobacteria* (HQ270357, JN098341)와 93%에서 99%의 상동성을 나타내었다. DGGE 밴드 D1-3, D2-3 그리고 D1-6은 uncultured *Spirochaetes* (JN596755, JN596734)와 각각 94%와 100%의 상동성을 나타내었다. DGGE 밴드 D1-5, D1-10, D2-5, D2-10 그리고 D2-12은 uncultured *Betaproteobacteria* (EF076241)와 93%에서 96%의 상동성을 보였으며, D1-7, D1-14, D1-15, D1-16, D2-13, D2-14, D2-15, D2-16 그리고 D2-17는 uncultured *Actinobacteria* (FN556253, FN556232, FN556244, JN392390)와 93에서 100% 상동성을

나타내었다. D1-8, D1-9, D2-8 그리고 D2-9은 uncultured *Gammaproteobacteria* (FJ949286, HQ270412)와 93에서 96% 상동성을 각각 나타내었다. DGGE 밴드 D1-11은 uncultured *Alphaproteobacteria* (JF824774)와 100%, D2-11는 *Rhodospirillaceae bacterium* (AB539976)과 98% 상동성을 각각 나타내었다. DGGE 밴드 D1-18 그리고 D2-18은 uncultured *Acidobacteria* (JQ809487)와 94%의 상동성을 나타내었다.

각각의 DGGE 밴드에서 유래한 염기서열을 이용하여 계통학적 다양성을 분석한 결과, 동 종의 두 개체 *D. metachromia* CH607 과 CH840의 공생세균 군집구조는 동일하였으며 *Alphaproteobacteria* (5.6%), *Betaproteobacteria* (16.6%), *Gammaproteobacteria* (11.1%), *Acidobacteria* (5.6%), *Actinobacteria* (33.3%), *Chloroflexi* (5.6%), *Cyanobacteria* (11.1%) 그리고 *Spirochaetes* (11.1%)로 총 6문 8강으로 구성되었다(Fig. 2). 각각의 DGGE 밴드에서 유래한 염기서열을 이용하여 계통수를 작성한 결과는 Fig. 3과 같다. 본 연구에서 사용된 *D. metachromia* 해면과 동일하게 Dictyoceratida 목에 속하며 지역적으로 축(Chuuk)에 근접한 남태평양 Palau에서 채집된, Dictyoceratida 해면 4종에 관한 공생세균 다양성 연구에서 이들은 *Cyanobacteria*와 *Rhodobacter*를 포함한 *Alphaproteobacteria* 그리고 *Gammaproteobacteria*가 존재함을 보고하였는데(Ridley *et al.*, 2005), *D. metachromia*의 공생세균 군집은 위의 세균 강을 모두 포함하며 그 외 *Betaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi* 문을 포함하는 것으로 나타나 보다 더 다양한 세균 문을 포함함을 알 수 있었다(Fig. 3). 또한 Dictyoceratida 목에 속하며 풍부한 2차 대사산물을 생성하는 것으로 알려진, 축(Chuuk)에서 채집된 *Hyrtios erectus* 해면의 경우 6문 7강(*Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*)의 세균

군집구조를 나타내어 *D. metachromia* 해면과 유사한 군집구조를 나타내었다(Park, 2010). 그러나 *Betaproteobacteria*와 *Spirochaetes* 문은 포함하지 않아 *D. metachromia* 해면의 세균 다양성이 좀 더 풍부한 것으로 나타났다. Palau 지역에 서식하는 또 다른 열대 해면 *Theonella swinhoei* (Lithistida 목)의 경우 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*를 포함하여(Hentschel *et al.*, 2002). *D. metachromia* 해면과는 달리 *Deltaproteobacteria*, *Bacteroidetes*의 세균그룹을 포함하는 것으로 나타났다. 반면 *D. metachromia*의 경우에는 *Betaproteobacteria*를 포함하는 것으로 나타났다. 서로 다른 열대 해면 종들에 있어 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*와 같은 공통의 세균 문들을 포함하였으나, 해면 종에 따라 공생세균 군집의 차이를 나타냄을 알 수 있었다.

D. metachromia 해면의 두 개체간의 공생세균 군집 구조(Figs. 2 and 3)의 차이를 파악한 결과, 총 6문 8강으로 강(class) 수준에서 동일한 군집구조를 나타내었으며 두 개체 모두 동일한 DGGE 밴드양상과 공생세균의 분포를 나타냄을 알 수 있었다. *D. metachromia*의 공생세균의 군집구조는 *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-) 문이 총 33.3%를 차지하여, *Actinobacteria* (33.3%)와 함께 우점하는 문이었다. *Proteobacteria* 문은 해양 환경에서 흔하게 분포하며(Imhoff, 2001; Sekiguchi *et al.*, 2002; Wagner-Döbler *et al.*, 2002) 해양 식물(Weidner *et al.*, 2000)이나 동물(Lau *et al.*, 2002)과 항상 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 *Proteobacteria* 문에 속하는 세균은 숙주의 생식능력(Stouthamer *et al.*, 1999)을 조절하고 질소고정(Burnett and McKenzie, 1997) 등과 같이 해면숙주의 대사에 다양한 영향을 미치며, 다당류와 단백질 분해에 관련하는 높은 수준의 효소를 생산하는 것으로도 알려져 있다(Groudieva *et al.*, 2004). *Proteobacteria* 중 *Alphaproteobacteria*와 *Gammaproteobacteria*는 일반적으로 해면 공생세균으로 가장 많은 분포를 보이는 그룹이며 *D. metachromia* 해면에서 나타난 *Betaproteobacteria*는 드물게 발견되는 세균 그룹 중의 하나이다. *D. metachromia* 해면에서 *Proteobacteria* 문과 함께 우점하는 것으로 나타난

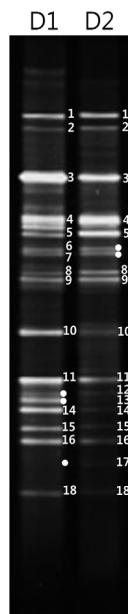


Fig. 1. DGGE banding patterns of amplified 16S rRNA gene obtained from *D. metachromia* CH607 (D1) and CH840 (D2).

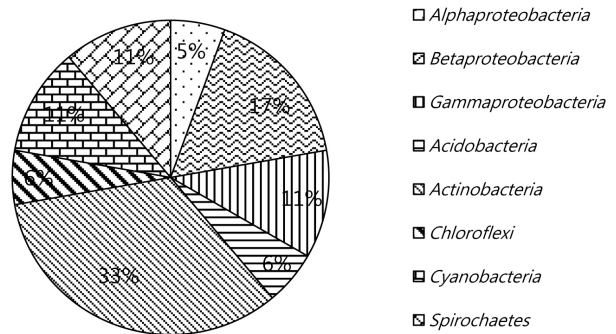


Fig. 2. Phylum distribution of bacterial 16S rRNA gene sequences derived from *D. metachromia* CH607 and CH840. The bacterial communities found in two individuals of the marine sponge, *D. metachromia* were identical.

*Actinobacteria*는 해양 무척추동물, 해수, 그리고 해양 퇴적토와 같은 다양한 해양 서식지에서 분리되며, 많은 생리활성 화합물을 만들어 내는 것으로 알려져 있다(Newman and Cragg, 2004). *Chloroflexi*와 *Spirochaetes*는 흔히 혐기성 세균 문으로 배양법보다는 비배양법에 의해 자주 발견되는 공생세균 그룹이다(Jeong *et al.*, 2013).

5종의 남극해면을 이용한 해면공생세균 군집구조 분석에서 동종 해면을 이용한 반복 실험 결과에 따르면 해면 종에 따라 세균군집이 일정한 것으로 나타나 개체에 따른, 유의성 있는 차이는 없는 것으로 보고되어(Webster *et al.*, 2004) 본 실험 결과와 일치하는 결과였다. 동일지역에서 채집한 *D. metachromia* 해면 종 두 개체를 이용한 본 실험의 결과, *D. metachromia* 해면의 경우 6문 8강에 이르는 매우 다양한 세균그룹을 포함하며, 동종 이 개체 간의 공생세균 군집 구조는 동일한 것으로 나타나 해면 종에 따른 공생세균 군집구조는 일정함을 확인할 수 있었다.

적요

2012년 2월 미크로네시아의 चुुक(Chuuk)주에서 채집한 해양 해면 *Dactylospongia meachromia*의 공생세균의 주요 군집구조

를 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 방법을 이용하여 분석하였다. *D. metachromia*의 두 개체 CH607과 CH840를 이용하여 DGGE 분석을 수행한 결과, 동종의 두 개체 해면에서 동일한 밴드 패턴을 나타내었다. DGGE 밴드로부터 DNA를 추출하여 염기서열을 분석한 결과, 알려진 염기서열들과 93-100%의 유사도를 나타내었으며 밴드로부터 밝혀진 모든 서열들은 배양되지 않은 세균 클론들과 높은 상동성을 나타내었다. *D. metachromia* (CH607, CH840)의 공생세균 군집구조는 *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*로 총 6문 8강으로 구성되었으며 동일한 지역에서 채집한 같은 종의 해면은 동일한 공생세균 군집구조를 나타냄을 확인하였다.

감사의 말

이 논문은 2013년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원(JJT200254)의 지원과 2013년 한남대학교 학술연구조성비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

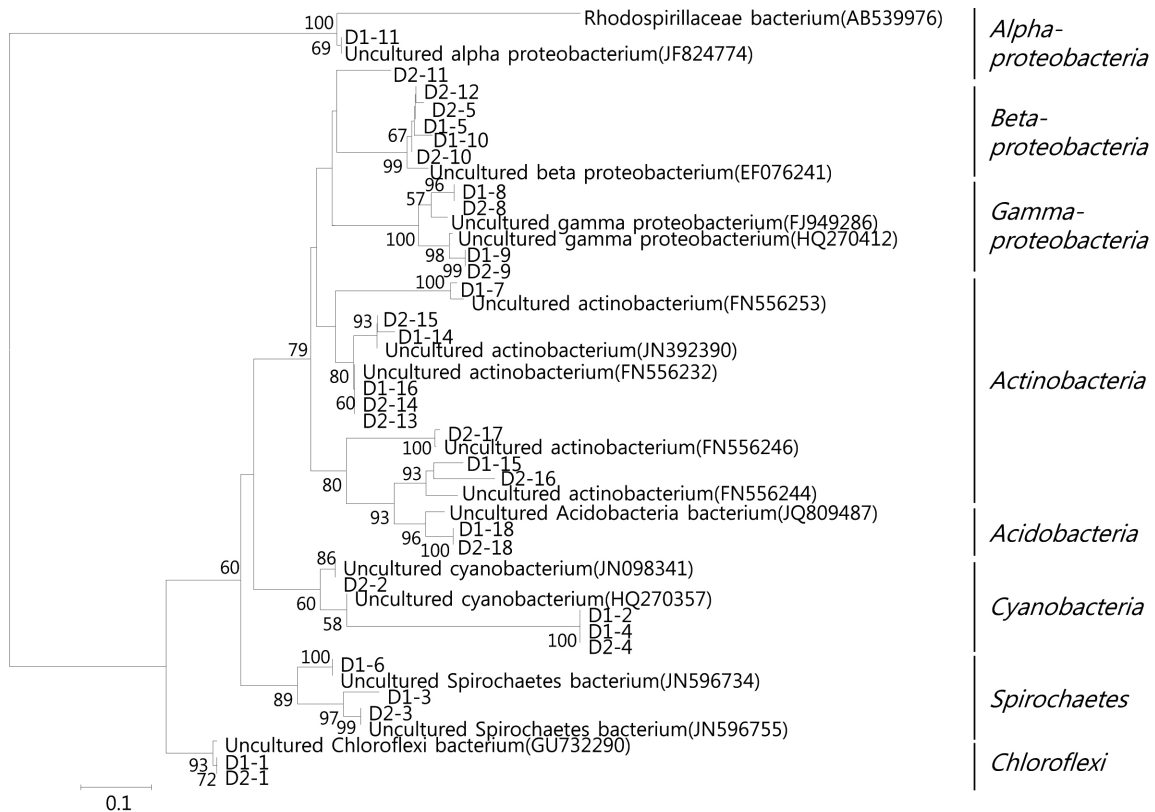


Fig. 3. Phylogenetic tree from analysis of 16S rRNA gene sequences of DGGE bands from *D. metachromia* CH607 (D1) and CH840 (D2). Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis from 1,000 replicates. Only values >50% are shown. The scale bar represents 0.1 substitution per nucleotide position.

참고문헌

- Burnett, W.J. and McKenzie, J.D. 1997. Subcuticular bacteria from the brittle star *Ophiactis ball* (Echinodermata): Ophiuroidea represent a new lineage of extracellular marine symbionts in a subdivision of the class *Proteobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1721–1724.
- De La Fuente, J.Á. and Manzanaro, S. 2003. Aldose reductase inhibitors from natural sources. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 243–251.
- Dupont, S., Corre, E., Li, Y., Vacelet, J., and Bourguet-Kondracki, M.L. 2013. First insights into the microbiome of a carnivorous sponge. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**, 520–531.
- Friedrich, A.B., Fischer, L., Proksch, P., Hacker, J., and Hentschel, U. 2001. Temporal variation of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**, 105–113.
- Groudieva, T., Kambourova, M., Yusef, H., Royter, M., Grote, R., Trinks, H., and Antranikian, G. 2004. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen. *Extremophiles* **8**, 475–488.
- Guangyi, W. 2006. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 545–551.
- Haber, M. and Ilan, M. 2013. Diversity and antibacterial activity of bacteria cultured from Mediterranean *Axinella* spp. sponges. *J. Appl. Microbiol.* Doi: 10.1111/jam.12401
- Handeley, S., Kelly, S., and Kelly, M. 2003. Non-destructive video image analysis method for measuring growth in sponge farming: Preliminary results from the New Zealand bath-sponge *Spongia (Heterofibria) manipulatus*. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* **37**, 613–621.
- Hentschel, U., Hopke, J., Hom, M., Friedrich, A.B., Wagner, M., Hacker, J., and Moore, B.S. 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4431–4440.
- Imhoff, J.F. 2001. True marine and halophilic anoxygenic phototrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* **176**, 243–254.
- Jackson, S.A., Kennedy, J., Morrissey, J.P., O'Gara, F., and Dobson, A.D. 2012. Pyrosequencing reveals diverse and distinct sponge-specific microbial communities in sponges from a single geographical location in Irish waters. *Microb. Ecol.* **64**, 105–116.
- Jeong, I.H., Kim, K.H., and Park, J.S. 2013. Analysis of bacterial diversity in sponges collected off Chujado, an Island in Korea, using barcoded 454 pyrosequencing: Analysis of a distinctive sponge group containing *Chloroflexi*. *J. Microbiol.* **51**, 570–577.
- Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Cotter, P.D., Walsh, M., Mooij, M.J., Bourke, M.B., Rea, M.C., O'Connor, P.M., Ross, R.P., and *et al.* 2009. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish Waters. *Mar. Biotechnol.* **11**, 384–396.
- Lau, W.W.Y., Jumars, P.A., and Armbrust, E.V. 2002. Genetic diversity of attached bacteria in the hindgut of the deposit-feeding shrimp *Neotrypaea* (formerly *Callianassa*) californiensis (Decapoda: *Thalassinidae*). *Microb. Ecol.* **43**, 455–466.
- Li, C.W., Chen, J.Y., and Hua, T.E. 1998. Precambrian sponges with cellular structures. *Science* **279**, 879–882.
- Li, Z., Hu, Y., Liu, Y., Huang, Y., He, L., and Miao, X. 2007. 16S rDNA clone library-based bacterial phylogenetic diversity associated with three South China Sea sponges. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1265–1272.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M. 2004. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod.* **67**, 1216–1238.
- Olson, J.B. and McCarthy, P.J. 2005. Associated bacterial communities of two deep-water sponges. *Aquat. Microb. Ecol.* **39**, 47–55.
- Park, J.S. 2010. Bacterial community diversity associated with two marine sponges from the South Pacific Ocean based on 16S rDNA-DGGE analysis. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 255–261.
- Piel, J. 2009. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 338–362.
- Ridley, C.P., Faulkner, D.J., and Haygood, M.G. 2005. Investigation of *Oscillatoria spongeliae*-dominated bacterial communities in four Dictyoceratid sponges. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7366–7375.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Schöttner, S., Hoffmann, F., Cárdenas, P., Rapp, H.T., Boetius, A., and Ramette, A. 2013. Relationships between host phylogeny, host type and bacterial community diversity in cold-water coral reef sponges. *PLoS One* **8**, e5550.
- Sekiguchi, H., Koshikawa, H., Hiroki, M., Murakami, S., Xu, K., Watanabe, M., Nakahara, T., Zhu, M., and Uchiyama, H. 2002. Bacterial distribution and phylogenetic diversity in the Changjiang estuary before the construction of the three gorges dam. *Microb. Ecol.* **43**, 82–91.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J.A.J., and Hurst, G.D.D. 1999. Wolbachia pipiensis: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 71–102.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596–1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.
- Wagner-Döbler, I., Beil, W., Lang, S., Meiners, M., and Laatsch, H. 2002. Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **74**, 207–238.
- Wang, Z., Ling, B., Zhang, R., Suo, Y., Liu, Y., Yu, Z., and Liu, C. 2009. Docking and molecular dynamics studies toward the binding of new natural phenolic marine inhibitors and aldose reductase. *J. Mol. Graph. Model.* **28**, 162–169.
- Webster, N.S., Negri, A.P., Munro, M.M., and Battershill, C.N. 2004. Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environ. Microbiol.* **6**, 288–300.
- Weidner, S., Arnold, W., Stackebrandt, E., and Pühler, A. 2000. Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with leaves of the seagrass *Halophila stipulacea* by a culture-independent small-subunit rRNA gene approach. *Microb. Ecol.* **39**, 22–31.
- White, J.R., Patel, J., Ottesen, A., Arce, G., Blackwelder, P., and Lopez, J.V. 2012. Pyrosequencing of bacterial symbionts within *Axinella corrugata* sponges: diversity and seasonal variability. *PLoS One* **7**, e38204.