

## 고성 심해에서 수심에 따른 해양미생물의 다양성 비교

강용호

영남대학교 생명공학부

### Comparison of Bacterial Diversity in the Water Columns of Goseong Deep Seawaters

Yongho Khang

School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Republic of Korea

(Received June 11, 2013 / Accepted July 18, 2013)

Microbial diversities in the 300 m and 500 m deep seawaters near Goseong, Gangwon Province (South Korea), were investigated. Pyrosequencing of 16S rRNA genes of marine microbes resulted in 19,474 reads from the 300 m deep seawaters, which consisted of *Alphaproteobacteria* (57.41%) and *Gammaproteobacteria* (38.85%), and 82,806 reads from the 500 m deep seawaters, which consisted of *Gammaproteobacteria* (99.64%) mostly. *Rhodobacterales* (57.31%) were dominant in the 300 m deep seawaters, but *Alteromonadales* (45.65%) and *Oceanospirillales* (34.61%) were dominant in the 500 m deep seawaters. On the bases of operational taxonomic units and diversity indexes (Shannon and Simpson), biodiversity of marine bacteria in the 500 m deep seawaters was shown to be higher than that in the 300 m deep seawaters.

**Keywords:** deep seawaters, diversity index, marine microbes, operational taxonomic unit, pyrosequencing

해양심층수는 태양광이 도달하지 않는 수심 200 m 이하의 해수를 말하는데, 각종 불순물을 함유한 표층해수와는 달리 광합성 세균의 결여와 유기물의 침전 등에 의하여 마그네슘, 칼슘, 칼륨과 같은 미네랄과 질산염, 인산염과 같은 무기영양분 함량이 높다(Katsuda *et al.*, 2008). 해양심층수는 청정성과 양질의 미네랄 함유 때문에 우리나라를 포함하여 미국, 일본, 노르웨이 등에서 식품, 의료, 농업, 환경, 수산 분야에 사용하고 있으며, 표층수와 심해의 온도차를 이용한 열에너지 자원으로도 개발되고 있다(Joo, 2011; Kim *et al.*, 2012). 수심 350 m의 해양심층수는 동물의 blood LDL cholesterol 수치를 감소시키고, 혈액순환을 개선하는데 효과가 있다고 보고되었다(Miyamura *et al.*, 2004; Katsuda *et al.*, 2008).

지구 표면적의 70.8%를 차지하고 있는 바다는 육지보다 훨씬 더 많은 종류의 미생물을 포함하고 있지만 높은 수압하의 환경에서 서식하는 해양미생물을 분리·배양하는 것이 어려워 해양미생물에 대한 연구가 활발하게 진행되지 못하였다. 그러나 최근 DNA pyrosequencing 기술의 등장으로 표층해수는 물론, 심해의 극한환경에 서식하는 해양미생물의 다양성 분석이 가능하게 되었다(Huber *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2010).

바다는 해수의 깊이에 따라 epipelagic (200 m 이하), mesopelagic

(200-1000 m), bathypelagic (1000-4000 m), abyssalpelagic (2000-6000 m), hadalpelagic (6000 m 이상) 지역으로 구분하고 있다. 수심에 따라 다르게 분포하는 해양미생물 군집의 생태변화를 파악하면 국지적인 해양환경관리나 지구 온난화에 의한 해양환경모니터링에 도움이 될 수 있다(Heidelberg *et al.*, 2010; Imhoff *et al.*, 2011; McGenity *et al.*, 2012).

대서양과 태평양 지역에 걸쳐 적도 부근의 표층해수에 서식하는 미생물의 분포가 조사되었으며(Rusch *et al.*, 2007), 북극, 남극, 아메리카, 아프리카, 하와이 등에서 수심 5500 m에 이르는 해양심층수, 해저토양, 해저열수구 등에 서식하는 해양미생물의 분포도 보고되었다(Zinger *et al.*, 2011).

먼 바다의 표층수에는 광합성을 할 수 있는 *Cyanobacteria*가 많이 분포하고 있으나, 해안 가까이 있는 표층수에는 *Flavobacteria*가 많이 분포하고 있다(Zinger *et al.*, 2011). 수심이 200 m 이내인 해역에서는 대체적으로 *Alphaproteobacteria* (50%)가 *Gammaproteobacteria* (30%) 보다 좀더 많이 분포하지만, 수심이 깊어질수록 *Gammaproteobacteria*가 차지하는 분포비율이 점차 증가한다. 용존산소가 거의 없는 심해나 해저의 토양에서는 *Gammaproteobacteria* (50%)가 *Alphaproteobacteria* (10%) 보다 훨씬 더 많이 분포하였다(Zinger *et al.*, 2011).

수심이 1,000 m 이상인 멕시코만 침적토에는 *Bacteria* (95-97%), *Archaea* (2.2-4.2%), *Eukaryotes* (0.8-0.6%) 비율로 분포하였고, *Bacteria* 중에는 *Proteobacteria* (60-65%), *Bacteroidetes* (11%),

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

**Table 1.** Operational taxonomic unit (OTU) analysis of marine bacteria located at the 300 m (G300) and the 500 m (G500) depth seawaters of Goseong

Similarity	Sample	Reads	OTU	Shannon index <sup>a</sup>	Simpson index <sup>a</sup>
90%	G300	19,474	46	1.78±0.03	0.34±0.01
	G500	82,806	46	2.16±0.02	0.16±0.01
94%	G300	19,474	71	1.86±0.04	0.34±0.01
	G500	82,806	76	2.26±0.02	0.16±0.01
97%	G300	19,474	95	2.03±0.04	0.32±0.01
	G500	82,806	115	2.47±0.02	0.15±0.01

<sup>a</sup> 95% confidence interval

*Firmicutes* (9%), *Actinobacter* (7%) 비율로 분포하였다(Kimes *et al.*, 2013). 울릉도 근해의 수심 1,500 m인 심층해수에서는 *Rhodobacteraceae*, *Alteromonadaceae*, *Halomonadaceae* 등이 다수 분포하고 있었으며(Kim and Khang, 2012), 세계의 다른 지역의 수심 2,000 m 이상의 심층해수에서는 10-80 MPa 이상의 높은 수압에서 서식하는 *Colwelliaceae*, *Psychromonadaceae*, *Moritellaceae*, *Vibrionaceae*, *Shewanellaceae* 등이 있었다 (Eloe *et al.*, 2011a, 2011b). 수심 6,000 m 이상에 위치한 열수구(hydrothermal vent) 주변에는 *Epsilonproteobacteria* (30%)가 다량 증식하여 *Gammaproteobacteria* (30%)와 비슷한 분포비율로 존재하였으며, *Alphaproteobacteria*와 *Deltaproteobacteria*는 10% 이하로 분포하였다(Zinger *et al.*, 2011).

우리나라는 동해지역에 깊은 바다가 있어서 고성, 강릉, 울진, 울릉도 인근 해역에서 해양심층수를 개발하고 있다. 그러나 심층수 개발로 인하여 발생할 수 있는 심해의 해양미생물들의 생태 변화에 대한 이해는 부족한 편이다. 본 연구는 고성 근해에서 수심 300 m와 500 m의 심층수에 서식하는 해양미생물을 16S rRNA gene pyrosequencing 방법으로 분석하여 수심에 따른 해양미생물의 분포를 비교하였다.

시료는 강원도 고성군에 있는 한국해양연구원 해양심층수연구센터에서 취수하여 해양심층수로 개발하고 있는 심해수를 사용하였다. 2009년 6월에 고성군 오호리 근해의 수심 300 m와 500 m에서 취수한 해양심층수는 고성에서 경산에 있는 실험실로 운반한 즉시 냉장고(2°C)에 보관하였으며, 한 장의 Ultramembrane filter (cutoff 10,000 Da, Millipore)에 해양심층수 20 L를 여과하였다. Genomic DNA kit (Qiagen, USA)를 사용하여 Ultramembrane filter에 여과된 해양미생물들의 DNA를 분리·정제하였다. 해양미생물 16S rRNA gene의 증폭은 종류가 다른 tag를 붙인 V1-V3 영역의 27F와 518R primers를 사용하였다. 심층수 300 m의 시료에는 27Fa (5'-ATCGTACGACGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 518Ra (5'-ATCGTACGACWTTACCGCGGCTGCTGG-3'), 심층수 500 m의 시료에는 27Fb (5'-ACACGACTACGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 518Rb (5'-ACACGACTACWTTACCGCGGCTGCTGG-3')를 각각 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, 60초) 단계를 30회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물의 DNA pyrosequencing과 염기서열 정보를 이용한 Operational Taxonomic Unit (OTU), Shannon index, Simpson index, Taxonomic assignments에 대한 분석은 모두 Macrogen (주)에서 수행하였다.

해양미생물의 16S rRNA gene 유전자를 증폭하여 염기서열을 pyrosequencing한 결과, 심해 300 m 시료에서는 19,474 reads (G300), 500 m 시료에서는 82,806 reads (G500)를 얻었다. 이들 자료를 DNA database (GenBank, EMB, DBJ)와 비교한 결과 수심 300 m에서는 uncultured bacteria로 등록된 정보가 31%를 차지하였으나, 수심 500 m에서는 62%를 차지하였다(자료 미제시). 이는 수심이 300 m에서 아래로 200 m 더 깊어짐에 따라 uncultured bacteria에 대한 정보량은 두 배 정도 증가하였음을 시사한다.

수심 300 m와 수심 500 m는 총 reads 수에서는 4배 정도 차이가 있음에도 불구하고, sequence similarity를 기반으로 하여 측정된 종의 수(Operational Taxonomic Unit, OTU)를 비교해보면 similarity 90%, similarity 94%, similarity 97%로 수치가 높아짐에 따라 수심 500 m와 수심 300 m의 OTU 값의 차이가 조금씩 증가하고 있다(Table 1).

종이 얼마나 풍부하고 각 종에 속하는 개체수가 얼마나 고르게 분포하는가를 나타내는 다양도 지수(Shannon index)는 수심 500 m의 값이 수심 300 m 값보다 높게 나왔으나, 종 개체수에 대한 각 종이 차지하는 비율을 나타내는 우점도 지수(Simpson index)는 수심 500 m의 값이 수심 300 m 값보다 낮게 나왔다. Shannon index가 높을수록, 또 Simpson index가 낮을수록 종의 다양성이 증가한다는 점을 고려하면 고성의 심해에서는 수심 500 m 지역이 수심 300 m 지역보다 더 다양한 해양미생물들이 균등하게 분포하고 있는 것으로 보인다.

본 연구에서 분석한 16S rDNA reads 염기서열을 활용하여 Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)로 분석한 결과들을 살펴보면, 수심 300 m에서는 *Alphaproteobacteria* (57.41%)와 *Gammaproteobacteria* (38.85%) 많이 분포하였으며, 기타 *Epsilonbacteria* (2.22%)와 *Flavobacteria* (1.51%)가 분포하였다. 그러나 수심 500 m에서는 *Gammaproteobacteria*가 99.64%로 대부분을 차지하였으며 *Alphaproteobacteria* (0.30%)와 *Flavobacteria* (0.04%)는 극히 소량 분포하였다(Fig. 1). 따라서 고

성의 심해 300 m 이하에서는 수심이 깊어질수록 *Alphaproteobacteria* 수는 급격하게 줄어들고 *Gammaproteobacteria* 수가 증가한다는 것을 알 수 있다.

고성 심해의 해양미생물들에 대한 분포를 세분해 보면, 수심 300 m에서는 *Rhodobacterales* (57.31%), *Alteromonadales* (17.65%), *Oceanospirillales* (11.70%), *Aeromonadales* (7.96%), *Campylobacteriales* (2.22%), *Flavobacteriales* (1.51%), *Vibrionales* (1.01%) 등의 순으로 분포하였고, 수심 500 m에서는 *Alteromonadales* (45.65%), *Oceanospirillales* (34.61%), *Aeromonadales* (17.07%), *Chromatiales* (1.36%) 등의 순으로 분포하였다(Fig. 1). 수심 300 m에서 높은 밀도를 보이고 있는 *Rhodobacterales*와 *Alteromonadales* 분포는 40% 정도 차이가 나지만, 수심 500 m에서 높은 밀도를 보이고 있는 *Alteromonadales*와 *Oceanospirillales* 분포 비율은 11% 정도 차이가 났다. 이런 분포비율의 차이를 고려하면 수심 300 m에서는 *Rhodobacterales*에 해당하는 종들이 고밀도로 분포하고, 수심 500 m에서는 *Alteromonadales*와 *Oceanospirillales*에 해당하는 종들이 비슷한 밀도로 분포하고 있다고 추정할 수 있다. 다양성을 수치로 표시하는 Shannon index와 Simpson index 값을 고려하더라도 수심 300 m 지역에서는 특정그룹의 해양미생물들이 높은 밀도로 분포하고 있고, 수심 500 m 지역에서는 다수그룹의 해양미생물들이 균등한 밀도로 분포하고 있다고 판단된다.

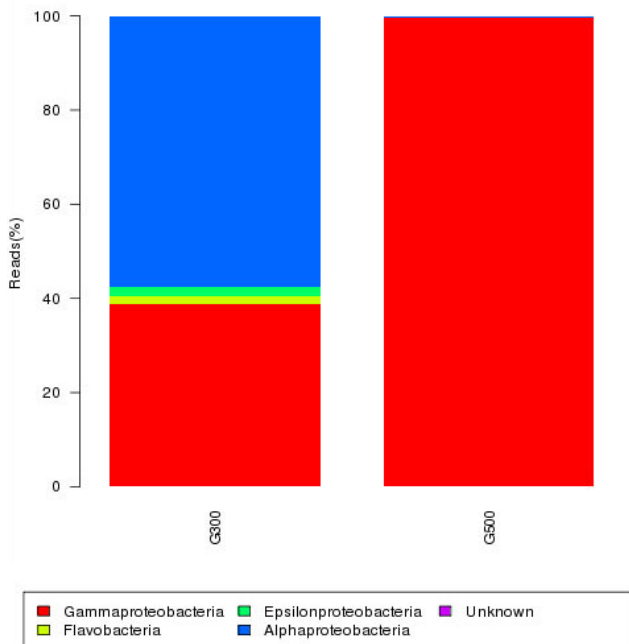
고성의 심해에서 *Rhodobacterales* 목(order)에 해당하는 해양미생물들의 분포를 다시 세분해 보면 *Roseovarius*, *Roseobacter*, *Loktanelia* 속이 우점하고 있었다(자료 미제시). *Alteromonadales* 목에 해당하는 해양미생물들은 *Moritella*, *Pseudoalteromonas*,

*Colwellia*, *Alteromonas*, *Glaciecola*, *Marinobacter*, *Agarivorans*, *Shewanella* 속이 우점하였고, *Oceanospirillales* 목에 해당하는 해양미생물들은 *Oleispira*, *Neptunomonas*, *Marinomonas*, *Amphritea*, *Alcanivorax* 속이 우점하였다. *Vibrionales* 목에는 *Vibrio splendidus*가 우점종이었다.

고성의 심해에 분포하는 해양미생물과 다른 바다에 분포하는 해양미생물을 비교해보면 고성의 수심 300 m에서 분포하고 있는 *Alphaproteobacteria*의 *Rhodobacterales* 목은 세계의 온대와 북극지역의 냉대 표층수 해역에 널리 분포하고 있다(Dang et al., 2008; Slightom and Buchan, 2009; Fu et al., 2013). 고성 근해의 수심 300 m 지역은 태양광이 도달하지 않는 심해이긴 하지만 표층 해수에서 존재하는 *Alphaproteobacteria*가 여전히 높은 비율로 분포하고 있었다. 그러나 수심 500 m 지역에서는 *Alphaproteobacteria*가 거의 검출되지 않았다는 점을 고려하면 수심 300 m와 수심 500 m 지역에서의 해양미생물의 서식 환경은 크게 다른 것으로 추정된다.

심해지역의 해양환경 변화는 해양미생물의 분포변화를 측정하여 모니터링 할 수 있다. 미국 멕시코만(Deepwater Horizon)에서 2010년도에 해저 원유 유출사고가 발생했을 때 심해 1,000 m 지역에서 서식하는 해양미생물의 분포변화를 조사한 결과, *Oceanospirillales* 목의 분포비율이 평균 5%에서 90%로 크게 증가하였다(Hazen et al., 2010). 그러므로 *Gammaproteobacteria*의 *Oceanospirillales* 목은 심해에서 원유와 같은 탄수화물을 분해하는 능력이 우수하다고 볼 수 있다. 고성의 심해 500 m에서도 *Oceanospirillales* 목에 해당하는 미생물이 다수 분포하는 것으로 보아서 이 지역의 심해환경에 탄수화물과 같은 유기물질의

(A) Proportion of Class Division



(B) Proportion of Order Division

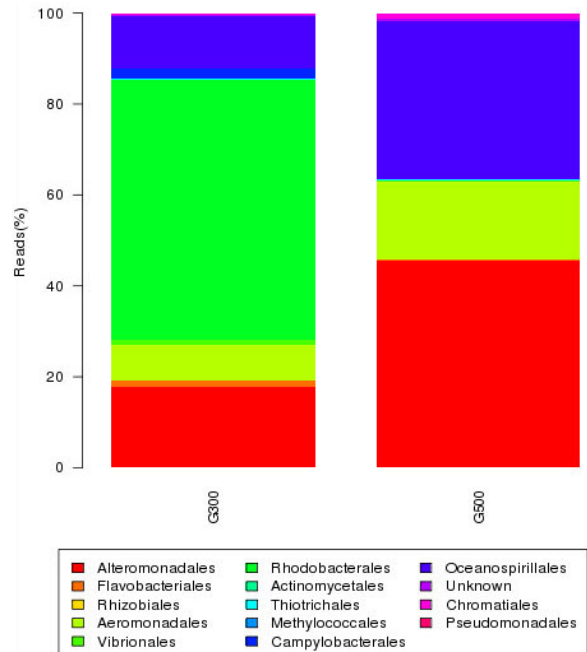


Fig. 1. Comparison of taxonomic assignments of marine bacteria located at the 300 m (G300) and the 500 m (G500) depth of Goseong seawaters.

성분이 존재할 가능성이 높은 것 같다.

## 적 요

강원도 고성군 근해에서 수심 300 m와 500 m의 심층수에 서식하는 해양미생물 분포를 조사하였다. 심해미생물을 16S rRNA genes pyrosequencing 방법으로 분석한 결과 300 m 심층수 시료에서 얻은 19,474 reads에서 *Alphaproteobacteria*와 *Gammaproteobacteria*가 각각 57.41%와 38.85%의 분포 비율을 보였다. 심해 500 m의 시료에서 얻은 82,806 reads에서는 *Gammaproteobacteria*가 99.64%로 대부분을 차지하였다. 수심 300 m에서는 *Rhodobacterales* (57.31%)가 우점하였고, 수심 500 m에서는 *Alteromonadales* (45.65%)와 *Oceanospirillales* (34.61%)가 우점하였다. Operational Taxonomic Units와 diversity indexes (Shannon과 Simpson)를 기준으로 할 때 해양미생물의 다양성은 수심 500 m지역이 수심 300 m지역보다 더 높게 나타났다.

## 감사의 말

본 연구는 국토해양부소관(경북씨그랜트사업단) 연구개발사업의 연구비지원에 의해 수행되었습니다. 해양심층수는 강원도 고성군에 있는 한국해양연구원 해양심층수 연구센터에서 제공하였습니다.

## 참고문헌

- Dang, H., Li, T., Chen, M., and Huang, G. 2008. Cross-ocean distribution of *Rhodobacterales* bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 52–60.
- Eloe, E.A., Fadrosch, D.W., Novotny, M., Zeigler Allen, L., Kim, M., Lombardo, M.J., Yee-Greenbaum, J., Yooseph, S., Allen, E.E., Lasken, R., and *et al.* 2011a. Going deeper: metagenome of a hadopelagic microbial community. *PLoS One* **6**, e20388.
- Eloe, E.A., Malfatti, F., Gutierrez, J., Hardy, K., Schmidt, W.E., Pogliano, K., Pogliano, J., Azam, F., and Bartlett, D.H. 2011b. Isolation and characterization of a psychropiezophilic alphaproteobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 8145–8153.
- Fu, Y., Keats, K.F., Rivkin, R.B., and Lang, A.S. 2013. Water mass and depth determine the distribution and diversity of *Rhodobacterales* in an Arctic marine system. *FEMS Microbiol. Ecol.* **84**, 564–576.
- Hazen, T.C., Dubinsky, E.A., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Piceno, Y.M., Singh, N., Jansson, J.K., Probst, A., Borglin, S.E., Fortney, J.L., and *et al.* 2010. Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science* **330**, 204–208.
- 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.
- Huber, J.A., Mark Welch, D.B., Morrison, H.G., Huse, S.M., Neal, P.R., Butterfield, D.A., and Sogin, M.L. 2007. Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science* **318**, 97–100.
- 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.
- Katsuda, S., Yasukawa, T., Nakagawa, K., Miyake, M., Yamasaki, M., Katahira, K., Mohri, M., Shimizu, T., and Hazama, A. 2008. Deep-sea water improves cardiovascular hemodynamics in Kurosawa and Kusanagi-Hypercholesterolemic (KHC) rabbits. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 38–44.
- Kim, M.-K. and Khang, Y. 2012. 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). *Kor. J. Microbiol.* **48**, 328–331.
- Kim, J.-H., Kim, G.T., Park, S.-H., Oh, W.-Y., and Kim, H.-J. 2012. A feasibility study on thermal energy resource in deep ocean water. *J. Kor. Soc. Marine Environ. Eng.* **15**, 9–18.
- Kimes, N.E., Callaghan, A.V., Aktas, D.F., Smith, W.L., Sunner, J., Golding, B., Drozdowska, M., Hazen, T.C., Sufliya, J.M., and Morris, P.J. 2013. Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill. *Front Microbiol.* **4**, 50.
- 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.
- Miyamura, M., Yoshioka, S., Hamada, A., Takuma, D., Yokota, J., Kusunose, M., Kyotani, S., Kawakita, H., Odani, K., Tsutsui, Y., and *et al.* 2004. Difference between deep seawater and surface seawater in the preventive effect of atherosclerosis. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1784–1787.
- Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J.A., Hoffman, J.M., Remington, K., and *et al.* 2007. The sorcerer II global ocean sampling expedition: Northwest atlantic through eastern tropical pacific. *PLoS Biol.* **5**, e77.
- Slightom, R.N. and Buchan, A. 2009. Surface colonization by marine Roseobacters: Integrating genotype and phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 6027–6037.
- Weber, M., Teeling, H., Huang, S., Waldmann, J., Kassabgy, M., Fuchs, B.M., Klindworth, A., Klockow, C., Wichels, A., Gerdtts, G., and *et al.* 2010. Practical application of self-organizing maps to interrelate biodiversity and functional data in NGS-based metagenomics. *ISME J.* **5**, 918–928.
- Zinger, L., Amaral-Zettler, L.A., Fuhrman, J.A., Horner-Devine, M.C., Huse, S.M., Welch, D.B., Martiny, J.B., Sogin, M., Boettius, A., and Ramette, A. 2011. Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS One* **6**, e24570.