

## 제주도에 서식하는 *Petrosia corticata* 해면의 배양가능한 공생세균 군집구조의 계절적 차이

# Seasonal Differences of Cultivable Bacterial Communities Associated with the Marine Sponge, *Petrosia corticata*, Collected from Jeju Island

정중빈, 박진숙\*

Jong-Bin Jeong, Jin-Sook Park\*

한남대학교 생명시스템과학과, 대전시 유성구 유성대로 1646, 34054, 대한민국

Department of Biological Science and Biotechnology, Hannam University, Daejeon 34054, Republic of Korea

(Received 28 December 2015, Revised 1 January 2016, Accepted 4 January 2016)

**Abstract** The community structure of cultivable bacteria associated with the marine sponge, *Petrosia corticata*, collected from Jeju Island in summer (September) of 2012 and winter (January) of 2013, were compared by the PCR-ARDRA method. Bacterial strains were cultured for 4 days at 26 °C on Zobell medium and marine agar medium. After PCR amplification of 16S rRNA gene of individual strains, the restriction enzymes *MspI* and *HaeIII* were used to make restriction patterns. As a result, 24 ARDRA patterns from the summer sponge and 20 ARDRA patterns from the winter sponge were obtained. The sequencing result of 1-3 selected strains from each pattern showed over 98% similarities with the known sequences from the public database. At the phylum level, the bacterial community structures of both sponges (summer and winter) were identical qualitatively and composed of 4 phyla : *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Firmicutes*. *Alphaproteobacteria* accounted for 42.5% of total in summer sponge and 25.2% in winter, decreasing in the winter sample. *Gammaproteobacteria* accounted for 27.5% of total in summer sponge and 35.2% in winter, increasing in the winter sample. At the genus and species level, summer sponge had more diverse bacterial communities than winter sponge. *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Firmicutes* increased in the winter sample.

**Keywords** : 16S rRNA gene, ARDRA, Bacteria, *Petrosia corticata*, Sponge

### 서 론

해면(sponge)은 다양한 공생 미생물 군집을 함유하는 다세포 무척추동물로써 고착성의 저서생물이다. 또한 filter feeding을 하는 생물로 미생물을 먹이

로 하거나 미생물과 공생을 하며 살아간다. 이 과정에서 풍부하고도 다양한 생물학적 활성을 갖는 천연물을 생산하는 것으로 알려져 있다[8].

*Petrosia corticata* 해면은 항암, 항균, 세포독성 등의 생리활성을 갖는 대사산물을 생산하며 이에 관한

\* Corresponding author  
Phone: 82-10-8799-7498 Fax: 82-42-629-8751  
E-mail: jspark@hnu.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>)

많은 연구가 진행되고 있다. 특히 이들로부터 분리된 corticatic acids, petrocortynes, petrotetraydiols, petrosiacetyenes 등의 구조 및 약리 작용에 대한 많은 연구 보고가 이루어지고 있다[9, 13, 14, 17, 19]. 우리나라 거문도에서 채집한 *Petrosia* 해면 중으로부터 세포독성을 갖는 polyacetylene이 보고되기도 하였다 [7, 11]. 이들 해면 유래 생리 활성물질이 해면 공생 세균에 의해 생산되는 것으로 알려지면서[4, 8], 해면 공생미생물의 다양성과 천연물 profiles에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다[16, 18, 22]. 해면공생세균의 균집구조 및 다양성에 관한 연구는 배양되지 않는 공생세균까지 검출 가능한 pyrosequencing, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 등 분자적 방법이 주로 이용되고 있으나 천연물 profiles에 관련되는 세균다양성에 관한 연구는 천연물의 산업적 생산 등을 고려하여 배양 가능한 세균을 포함하여 이루어지고 있다[12, 16].

본 연구에서는 제주도에서 *P. corticata* 해면을 각각 여름과 겨울에 채집하여 이들의 배양 가능한 공생세균 다양성을 조사하고 계절에 따른 차이를 파악하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 해면 시료의 채집 및 환경조건

해양 해면 *P. corticata*에 공생하는 세균 균집의 계절적 변화를 조사하기 위하여 2012년 9월(여름)과, 2013년 1월(겨울)에 각각 제주도 서귀포시 대정읍 무릉아치에서 스쿠버 다이빙을 이용하여 해면을 채집하였다. 채집한 해면은 멸균된 인공해수(ASW)로 3회 세척 후 4°C에서 운반하여 12시간 이내에 실험에 사용하였다. 여름철과 겨울철의 채집 장소는 동일지역으로 각각의 GPS는 33° 15' 08" N, 126° 11' 36" E와 33° 15' 03" N, 126° 11' 44" E이었으며, 여름철 해면 채집 일의 수온은 22.7°C, 염도 32.1 PSU이었으며, 겨울철 채집 일의 수온은 14.4°C, 염도 33.3 PSU이었다.

### 해면 공생세균의 분리 및 배양

해면 조각을 멸균된 인공해수로 3회 세척 후, 해면의 안쪽을 1 cm<sup>3</sup> 크기로 잘라 인공해수 3 ml 넣어

균질화시킨 다음 10분간 초음파 처리하였다. 10<sup>-1</sup>부터 10<sup>-4</sup>까지 순차 희석한 후 변형된 ZoBell 배지 (peptone 5 g, yeast extract 1 g, FePO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01 g, NaCl 23.6 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.94 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 4.53 g, CaCl<sub>2</sub> 1.3 g, KCl 0.64 g, agar 15 g, DW 1 L, pH 7.2)와 MA 배지 (marine agar 2216, Difco, USA)에 100 µl씩 도말하여 26°C에서 4일간 배양하였다. 여름과 겨울에 각각 채집된 해면으로부터 여름 해면에서 129개, 겨울 해면에서 130개의 세균 균주를 각각 분리하고 분리된 균주들의 순수 분리를 위하여 동일한 배지에서 계대 배양하여 단일 콜로니를 얻었다.

### DNA 추출 및 16S rRNA gene의 PCR 증폭

염색체 DNA는 분리된 세균 균주의 각 콜로니로부터 gDNA Isolation kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 분리하였으며 분리된 DNA는 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 16S rRNA gene의 증폭에는 27f (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG)와 1492r (TAC GGY TAC CTT GTT ACG AC)의 universal primer 쌍을 사용하였다. PCR 반응은 100 ng의 주형 DNA와 5U *e-Taq* polymerase (Solgent, Korea), 10 mM dNTP, 10× *e-Taq* buffer, 10 pmol primer를 최종 반응량이 50 µl가 되도록 혼합하여 수행하였다. GeneAmp PCR system 2700 thermal cycler (Applied Biosystems, Version 2.0, USA)를 이용하여 94°C에서 5분간 초기 변성시킨 후, 94°C에서 40초간 변성, 55°C에서 40초간 냉각, 72°C에서 1분간 신장, 이 과정을 30 cycle 반복 수행한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 신장시켰다. 증폭된 DNA의 확인을 위해서 PCR 반응액 3 µl를 취하여 1% agarose gel (Bio-Rad, USA)을 이용하여 Mupid-ex (ADVANCE, Japan)로 100 V, 25분간 1×TAE buffer (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 UV하에서 약 1.5 kb 단편을 확인하였다.

### ARDRA 분석

Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) 분석을 위해 2종의 제한효소 Fast Digest *Hae*III (Thermo Scientific, Lithuania)와 Fast Digest

*MspI* (Thermo Scientific, Lithuania)을 사용하였다. PCR 산물에 각각의 제한 효소를 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응물은 3% agarose gel을 사용하여 1×TAE buffer로 100 V, 30분간 전기 영동한 후 EtBr로 염색하여 Gel Logic 200을 이용하여 UV하에서 관찰하여 각 균주의 밴드유형을 확인하였다. ARDRA type의 패턴 분석을 위해 FPQuestTM (Bio-Rad, Belgium) software를 이용하였다.

**염기서열 결정 및 계통수 작성**

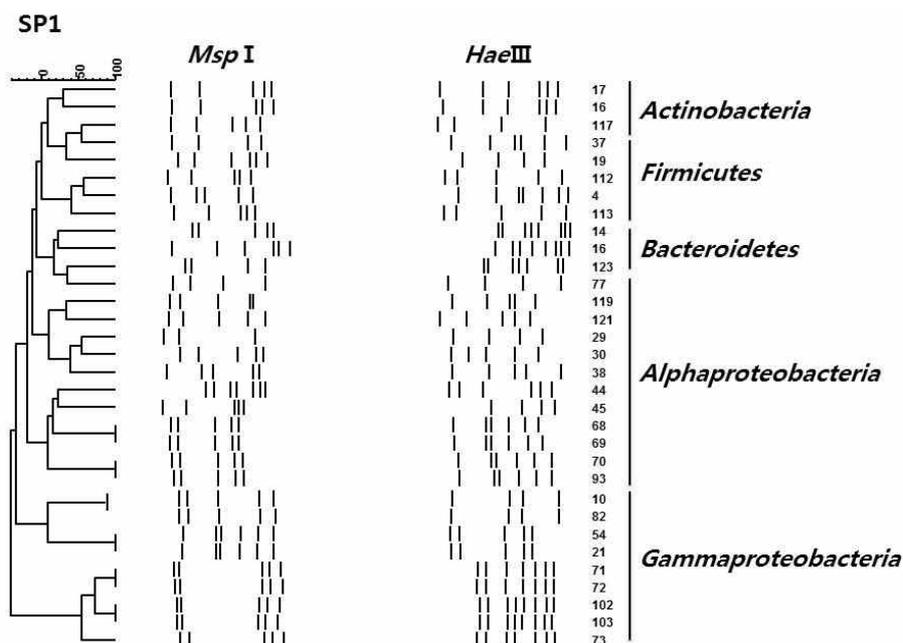
16S rRNA gene-ARDRA fingerprinting type에 따라 각각의 type별로 1-3개의 분리 균주를 선택하여 여름 해면에서 33균주, 겨울해면에서 28균주, 총 61균주의 부분 염기 서열(500 bp 이상)을 분석하였다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)을 이용하여 정제한 후 염기서열 분석(Macrogen, Korea)을 의뢰하였다. 결정된 16S rRNA 유전자의 염기서열은 기 등록된 염기서열을 대상으로 Blast search를 수행하였다. 각 염기서열의 alignment는 CLUSTAL W [23]를 이용하여 정렬하였고 Molecular Evolutionary Genetics Analysis

(MEGA) software version 6.0 [20]로 neighbor-joining 방법을 이용하여 각각의 계통수를 작성하였다. 1,000회 반복 bootstrap 분석에 의해 계통수의 견고성을 확인하였다.

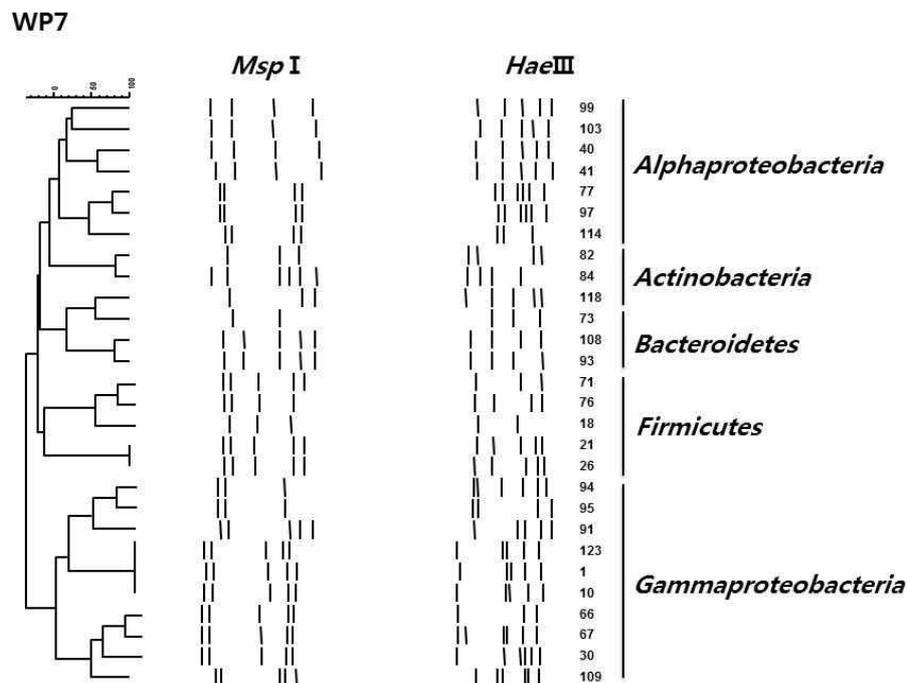
**결과 및 고찰**

**해면공생세균의 분리 및 ARDRA 분석**

해면 *P. corticata*의 계절에 따른 배양 가능한 공생 세균 군집 구조의 변화를 관찰하기 위하여 각각 여름과 겨울에 채집된 *P. corticata*로부터 배양 가능한 균주를 총 259균주를 분리하여 16S rRNA gene의 ARDRA 분석을 수행하였다. 두 종의 제한 효소를 사용하여 16S rRNA gene-ARDRA 분석을 수행한 결과(Fig. 1 and 2), 여름 해면의 경우 *MspI*에 의해 17개의 type, *HaeIII*에 의해 24 type을 얻었으며, 이를 근거로 분석한 결과, 총 24개의 서로 다른 ARDRA type으로 구분되었다(Table 1). 겨울 해면의 경우 *MspI*에 의해 15개의 type, *HaeIII*에 의해 20개의 type을 얻었으며, 이를 근거로 분석한 결과, 총 20개의 서로 다른 ARDRA type을 얻을 수 있었다(Table 2).



**Figure 1.** Dendrogram showing the relationship among bacterial isolates based on the 16S rRNA gene-ARDRA profiles from the marine sponge *P. corticata* SP1 collected in summer.



**Figure 2.** Dendrogram showing the relationship among bacterial isolates based on the 16S rRNA gene-ARDRA profiles from the marine sponge *P. corticata* WP7 collected in winter.

**Table 1.** ARDRA fingerprinting types and sequence similarities of 16S rRNA gene from bacterial strains isolated from the marine sponge *P. corticata* SP1 collected in summer.

ARDRA type <sup>a</sup>	Strain No. <sup>b</sup>	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum or Class
1a	SP1-16	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	Y17231	99	<i>Actinobacteria</i>
2b	SP1-117	<i>Janibacterhoylei</i>	FR749912	99	
3c	SP1-7	<i>Erythrobacter vulgaris</i>	AY706935	99	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>a</i>
4d	SP1-29	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	AB175663	100	
5e	SP1-63	<i>Roseovarius crassostreae</i>	AF114484	98	
6f	SP1-68	<i>Ruegeria atlantica</i>	D88526	99	
6g	SP1-70	<i>Ruegeria atlantica</i>	D88526	99	
7h	SP1-77	<i>Phaeobacter inhibens</i>	AY177712	98	
8i	SP1-119	<i>Labrenzia alba</i>	AJ878875	100	
9j	SP1-14	<i>Spongibacterium flavum</i>	FJ348473	98	<i>Bacteroidetes</i>
10k	SP1-4	<i>Bacillus nanhaiensis</i>	GU477780	100	<i>Firmicutes</i>
11l	SP1-19	<i>Bacillus aryabhatai</i>	EF114313	100	
12m	SP1-37	<i>Planococcus donghaensis</i>	EF079063	99	
13n	SP1-112	<i>Oceanobacillus profundus</i>	DQ386635	100	
14o	SP1-113	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	GQ292772	99	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>ria</i>
15p	SP1-10	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>	AY769918	100	
16r	SP1-21	<i>Vibrio harveyi</i>	X74706	99	
17s	SP1-54	<i>Microbulbifer epialgicus</i>	AB266054	99	
16t	SP1-71	<i>Vibrio fortis</i>	AJ514916	99	
16u	SP1-72	<i>Vibrio pelagius</i>	AJ293802	99	
16v	SP1-73	<i>Vibrio harveyi</i>	X74706	99	
15q	SP1-82	<i>Pseudoalteromonas phenolica</i>	AF332880	99	
16w	SP1-102	<i>Vibrio chagasii</i>	AJ316199	100	
16x	SP1-103	<i>Marinobacter vinifirmus</i>	DQ235263	98	

<sup>a</sup>, Arabian number and alphabetic abbreviation present ARDRA types with the restriction enzymes *MspI* and *HaeIII* respectively.

<sup>b</sup>, Strains used in phylogenetic tree constructed.

**Table 2.** ARDRA fingerprinting types and sequence similarities of 16S rRNA gene from bacterial strains isolated from the marine sponge *P. corticata* WP7 collected in winter.

ARDRA type <sup>a</sup>	Strain No. <sup>b</sup>	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum or Class
1a	WP7-99	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
2b	WP7-77	<i>Ruegeria atlantica IAM</i>	D88526	99	
2c	WP7-114	<i>Ruegeria halocynthiae</i>	HQ852038	98	
3d	WP7-82	<i>Agrococcus baldri</i>	AB279548	99	<i>Actinobacteria</i>
4e	WP7-84	<i>Kocuria palustris</i>	Y16263	100	
5f	WP7-118	<i>Kytococcus sedentarius</i>	CP001686	100	
6g	WP7-73	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	EF416572	100	<i>Bacteroidetes</i>
7h	WP7-108	<i>Vitellibacter aestuarii</i>	EU642844	98	
8i	WP7-71	<i>Bacillus tequilensis</i>	HQ223107	98	<i>Firmicutes</i>
9j	WP7-76	<i>Bacillus marisflavi</i>	AF483624	98	
10k	WP7-18	<i>Oceanobacillus picturae</i>	AJ315060	100	
11l	WP7-21	<i>Bacillus aryabhatai</i>	EF114313	100	
12m	WP7-94	<i>Shewanella sairae</i>	AB094597	98	
12n	WP7-95	<i>Shewanella waksmanii</i>	AY170366	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
13o	WP7-91	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	AY563031	100	
14p	WP7-123	<i>Psychrobacter celer</i>	AY842259	100	
14q	WP7-66	<i>Psychrobacter marincola</i>	AJ309941	99	
14r	WP7-67	<i>Psychrobacter maritimus</i>	AJ609272	99	
14s	WP7-30	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	AJ313425	100	
15t	WP7-109	<i>Colwellia aestuarii</i>	DQ055844	99	

<sup>a</sup>, Arabian number and alphabetic abbreviation present ARDRA types with the restriction enzymes *MspI* and *HaeIII* respectively.

<sup>b</sup>, Strains used in phylogenetic tree constructed.

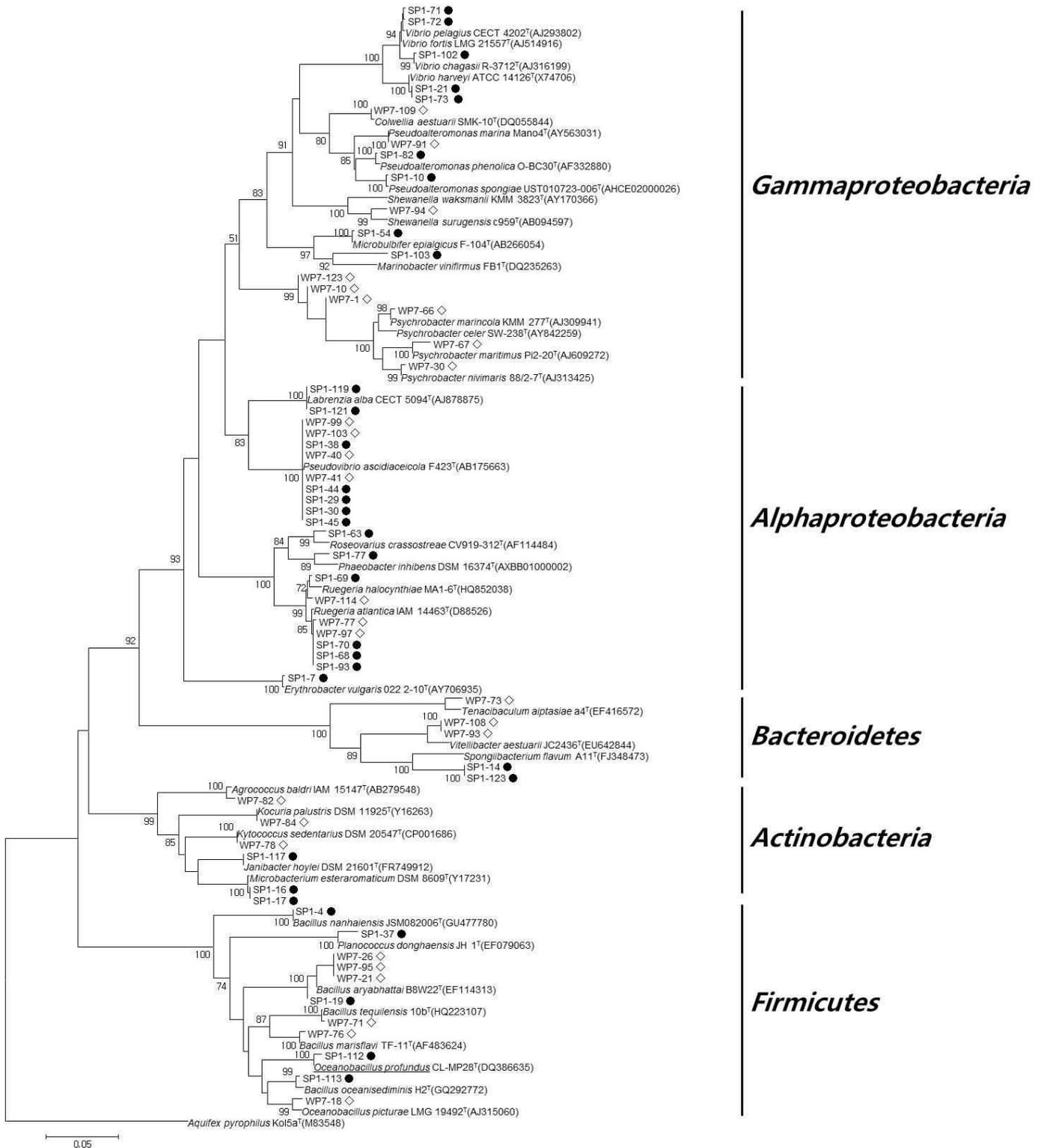
### 염기서열 분석 및 계통학적 분석

ARDRA 분석에 의해 여름 해면의 24개의 type, 겨울 해면의 20개의 type으로 나뉘는, *P. corticata* 해면으로부터 분리된 세균들에 대하여 각 ARDRA type 별로 1-3개의 분리 균주를 선별하여 16S rRNA gene 부분 염기서열을 분석하였다. 여름 해면의 경우 33 균주, 겨울 해면의 경우 28개의 균주에 대하여 염기서열을 분석하였으며 염기서열이 분석된 총 61개의 분리 균주는 모두 기존에 보고된 세균 종과 98% 이상의 유사도를 나타내었다(Tables 1 and 2). 염기서열이 분석된 균주들의 동정 결과와 이들의 ARDRA type을 근거로 하여 처음 ARDRA 분석에 쓰여 졌던 259개의 균주들을 분석하고 이들의 분석 결과에 근거하여 군집의 차이를 분석하고 계통수를 작성하였다(Fig. 3).

두 계절의 해면으로부터 분리된, 배양 가능한 공생세균은 모두 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, 4문(phylum) 5강(class)으로 동일하게 나타났다(Fig. 4).

*Alphaproteobacteria*는 여름에 42.5%가 관찰되어 여름해면에 가장 우점 하는 세균 군집으로 나타났으

며, *Gammaproteobacteria*는 겨울에 35.2%가 관찰되어 겨울 해면에 가장 우점 하는 세균군집이었다 (Table 3). 여름에 비해 겨울에 *Alphaproteobacteria*는 감소하고(25.2%) *Gammaproteobacteria*는 증가(35.2%) 하는 차이를 나타내었으나 전체적으로 *Proteobacteria*는 이 해면에서 우점종이었다. 이는 Li 등[10]에 의해 남중국해에 서식하는 4종 해면의 혼합배양에 의한 공생세균 군집구조 분석에서 *Proteobacteria*가 우점 한다는 결과와 일치하였으며, 일반적으로 해면공생 세균 군집구조에서 가장 높은 비율을 차지하는 것으로 알려져 있다[6, 26]. *Alphaproteobacteria*의 종 구성에서는 두 계절 모두 *Pseudovibrio*와 *Ruegeria* 속의 종이 우점 하였다. 반면 *Gammaproteobacteria*의 종 구성에서 겨울철에 *Psychrobacter* 속의 세균이 우점하며 여름철에는 *Vibrio* 속의 세균이 우점 하는 경향을 나타내었다(Table 3). 일반적으로 *Psychrobacter* 속의 균주는 극지방의 영구동토층과 얼음에서 자주 발견되는 속으로 추운 환경에서 자주 발견되는 것을 볼 수 있다[15]. *Vibrio* 속의 균주들은 주로 여름철에 증가하는 경향을 나타내며[2] 이 실험에서도 동일한 결과를 볼 수 있었다. *Bacteroidetes* 문에 속하는



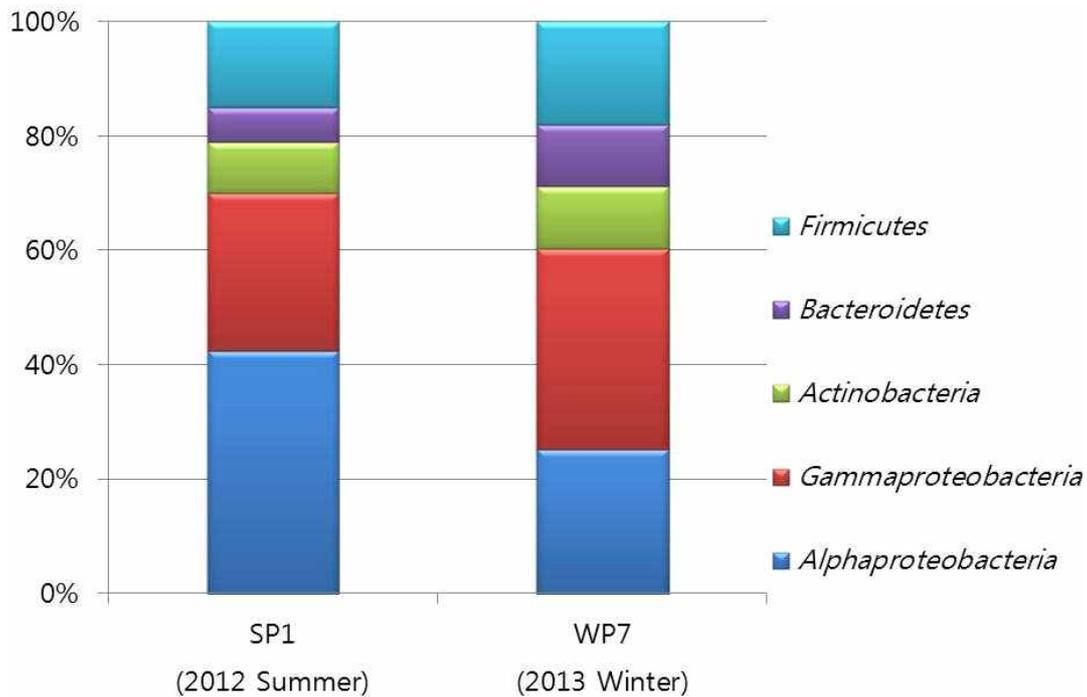
**Figure 3.** Phylogenetic relationships were determined by the 16S rRNA gene sequences of the bacterial isolates from the marine sponge *P. corticata*. Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis (> 50%) from 1,000 replicates. The scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position. *Aquifex pyrophilus* was used as an out group. Filled circle denotes summer sponges; opened diamond denotes winter sponges.

**Table 3.** Relative abundance of bacterial species in marine sponges of *P. corticata*.

Phylum or Class	Bacterial species	SP1	WP7
		(Summer)	(Winter)
<b><i>Actinobacteria</i></b>		<b>9.0<sup>a</sup></b>	<b>10.8</b>
	<i>Agrococcus baldri</i>		3.6 <sup>b</sup>
	<i>Kocuria palustris</i>		3.6
	<i>Kytococcus sedentarius</i>		3.6
	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	6.0	
	<i>Janibacter hoylei</i>	3.0	
<b><i>Bacteroidetes</i></b>		<b>6.0</b>	<b>10.8</b>
	<i>Spongiibacterium flavum</i>	6.0	
	<i>Vitellibacter aestuarii</i>		7.2
	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>		3.6
<b><i>Firmicutes</i></b>		<b>15.0</b>	<b>18.0</b>
	<i>Bacillus aryabhatai</i>	3.0	7.2
	<i>Bacillus marisflavi</i>		3.6
	<i>Bacillus nanhaiensis</i>	3.0	
	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	3.0	
	<i>Bacillus tequilensis</i>		3.6
	<i>Oceanobacillus profundus</i>	3.0	
	<i>Oceanobacillus picturae</i>		3.6
	<i>Planococcus donghaensis</i>	3.0	
<b><i>Alphaproteobacteria</i></b>		<b>42.5</b>	<b>25.2</b>
	<i>Erythrobacter vulgaris</i>	3.0	
	<i>Labrenzia alba</i>	7.1	
	<i>Phaeobacter inhibens</i>	3.0	
	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	16.2	14.4
	<i>Roseovarius crassostreae</i>	3.0	
	<i>Ruegeria atlantica</i>	10.1	7.2
	<i>Ruegeria halocynthiae</i>		3.6
<b><i>Gammaproteobacteria</i></b>		<b>27.5</b>	<b>35.2</b>
	<i>Marinobacter vinifirmus</i>	3.0	
	<i>Microbulbifer epialgicus</i>	3.0	
	<i>Pseudoalteromonas marina</i>		3.6
	<i>Pseudoalteromonas phenolica</i>	3.0	
	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>	3.0	
	<i>Psychrobacter celer</i>		10.0
	<i>Psychrobacter maricola</i>		3.6
	<i>Psychrobacter maritimus</i>		3.6
	<i>Psychrobacter nivimaris</i>		3.6
	<i>Psychrobacter piscatorii</i>	6.5	
	<i>Vibrio chagasii</i>	3.0	
	<i>Vibrio fortis</i>	3.0	
	<i>Vibrio harveyi</i>	3.0	
	<i>Shewanella waksmanii</i>		3.6
	<i>Shewanella sairae</i>		3.6
	<i>Colwellia aestuarii</i>		3.6

<sup>a</sup>, The number represents percentage (%) of each phylum in total bacterial community.

<sup>b</sup>, The number represents percentage (%) of each species in total bacterial community.



**Figure 4.** Seasonal comparison among the major bacterial groups of the cultivable bacterial communities from the marine sponge, *P. corticata*.

*Spongiibacterium flabum* 종은 제주도에서 채집한 *Halichondria oshor* 해면으로부터 분리 되었으며, 국내 연구진이 처음 발견한 신속, 신종 균주이다[28]. 이번 실험을 통해 이 균주가 *P. corticata*에서도 분리 되어 해면 특이적으로 존재하는 균주임을 알 수 있었다. *Actinobacteria*와 *Firmicutes* 문의 경우 여름에 채집한 해면에 비해 겨울에 채집한 해면에서 증가되는 것으로 나타났는데 두 세균 그룹은 세포벽이 두 겹이거나 환경이 변화함에 따라 포자를 생성하여 내성을 가지는 그람 양성 세균 그룹으로 세균이 잘 자라는 여름철에 비해 온도가 낮아지고 염도가 높아지는 겨울철에 높은 비율을 나타낸 것으로 추정된다.

전체적으로 *Alphaproteobacteria*를 제외한 나머지 세균 그룹은 모두 겨울에 비율이 증가하고 여름에는 감소하는 패턴을 나타내었으나(Fig. 4), 종 수준과 속 수준에서 분석한 결과 여름 해면이 겨울 해면에 비해 좀 더 다양한 종으로 구성된 것을 알 수 있었다 (Table 3). 따라서 계절에 따른 *P. corticata* 두 개체를 PCR-ARDRA 방법을 이용하여 배양 가능한 공생세균 군집구조를 비교한 결과 문 수준에서는 동일하였으나 종 수준에 있어서는 다양하였으며 각 세균 그

룹별로 차지하는 비율이 계절적으로 차이가 있음을 알 수 있었다.

이는 DGGE 방법을 이용하여 온도 변화에 따른 *Rhopaloeides odorabile* 해면의 공생세균 군집구조를 비교하였을 때 공생세균의 군집구조에서 변화가 관찰되었으며[25], pyrosequencing 방법을 이용하여 2009년부터 2010년까지 미국 플로리다에서 채집한 *Axinella corrugata* 해면의 계절에 따른 공생세균 군집구조 변화를 연구한 결과에서 계절에 따른 변화가 관찰된다는 보고[27]와도 일치하는 결과이다. 또한 한국의 조간대에 서식하는 주황해면해면 (*Hymeniacidon sinapium*)의 경우에도 계절에 따른 공생세균 군집구조의 변화가 보고된 바 있다[6].

그러나 북서지중해에서 채집한 *Ircinia* spp. 해면으로부터 1년 6개월간 T-RFLP방법을 이용하여 계절에 따른 공생세균 군집구조를 분석한 결과 주기적으로 매우 안정적인 군집구조를 나타낸다는 결과가 보고되었으며, 남극해면과 열대해면을 이용한 해면공생세균 군집구조의 분석 결과에 의하면 동종 해면의 공생세균 군집구조는 숙주 특이적이며 일정한 환경변화에도 안정성을 유지하는 것으로 나타나 본 실험결과와는

차이를 나타내었다[3, 26]. 또한 pyrosequencing 방법을 이용하여 뉴질랜드에서 채집한 해면 *Ecionemia alata*와 *Tethya bergquistae*해면의 온도에 따른 공생 세균 군집구조 변화를 관찰한 결과 숙주 특이적인 군주가 있어 환경변화에도 안정적인 결과를 보이는 것으로 나타났다[1].

해면과 공생세균 사이의 상호작용에 관한 연구는 충분히 이루어지지 않고 있다[1, 12]. 더욱이 계절변화에 따른 해면공생세균 군집구조 변화에 대해서는 오랜 시간 추적 조사가 필요하다. 또한 공생세균의 군집구조는 같은 해면종이라도 지리적 분포에 따라 달라지거나[21], 혹은 실험방법에 따라 달라지는 경향이 있다[5]. 또한 배양법에 근거한 ARDRA 방법을 통해 해면 공생세균의 전체 군집구조를 파악하는 경우 자연계에서 배양 가능한 세균은 0.1%-1%정도로 국한되므로 전체 세균 군집구조의 파악에는 한계가 있으며[6], 이론적으로 배양이 어려운 세균 종까지 파악이 가능한 것으로 알려진 DGGE 방법 역시 샘플에서 세포가 차지하는 비율이 전체의 1% 이상을 구성하는 세균종인 경우에만 검출 가능한 것으로 알려져 있다[10]. 해면에 존재하는 전체 공생세균 군집구조의 규명은 장기간에 걸쳐 다양한 방법을 조합하여 군집구조를 분석하고 파악할 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 결론

여름과 겨울에 채집한 2 개체 해면 *P. corticata*의 배양 가능한 공생세균 군집구조를 PCR-ARDRA 방법에 의해 분석한 결과 여름에 채집한 해면에서는 24개, 겨울에 채집한 해면에서는 20개의 ARDRA type을 얻을 수 있었다. 각 type별로 1-3개의 분리군주를 선정하여 16S rRNA gene의 부분 염기서열을 분석한 결과, 공생세균 군집구조는 문 수준에서 두 개체의 해면 모두 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, 4문(phylum) 5강(class)으로 동일하게 나타났으나 여름에 채집한 해면에서는 *Alphaproteobacteria*가 우점 하는 반면 겨울에 채집한 해면에서는 *Gammaproteobacteria*가 우점하는 패턴을 보였다. 또한 속 및 종 수준에서의 공생세균 군집구조는 겨울 해면에 비해 여름 해면에서 다양하였으며 *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*문의 세균 그룹

은 겨울에 증가하였다.

## 감사의 글

2015년 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

1. Cardenas, C. A., Bell, J. J., Davy, S. K., Hoggard, M., and Taylor, M. W. 2014. Influence of environmental variation on symbiotic bacterial communities of two temperate sponges. *FEMS Microbiol. Ecol.* **88**, 516-527.
2. Davis, J. W. and Sizemore, R. K. 1982. Incidence of *Vibrio* species associated with blue crabs (*Callinectes sapidus*) collected from Galveston Bay, Texas. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1092-1097.
3. Erwin, P. M., Pita, L., Lopez-Legentil, S., and Turon, X. 2012. Stability of sponge-associated bacteria over large seasonal shifts in temperature and irradiance. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 7358-7368.
4. Imhoff, J. F. and Stöhr, R. 2003. Sponge-associated bacteria: general overview and special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*. In *Sponges (Porifera)*. Springer Berlin Heidelberg. **37**, 35-57.
5. Jeong, I. H. and Park, J. S. 2012. Phylogenetic analysis of bacterial diversity in the marine sponge, *Asteropus simplex*, collected from Jeju island. *Korean J. Microbiol.* **48**, 275-283.
6. Jeong, J. B. and Park, J. S. 2012. Seasonal differences of bacterial communities associated with the marine sponge, *Hymeniacidon sinapium*. *Korean J. Microbiol.* **48**, 262-269.
7. Kim, J. S., Lim, Y. J., Im, K. S., Jung, J. H., Shim, C. J., Lee, C. O., Hong, J., and Lee, H. 1999. Cytotoxic polyacetylenes from the marine sponge *Petrosia* sp. *J. Nat. Prod.* **62**, 554-559.
8. Lee, Y. K., Lee, J. H., and Lee, H. K. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. *J. Microbiol.* **39**, 254-264.
9. Li, H. Y., Matsunaga, S., and Fusetani, N. 1994. Corticatic acids A-C, antifungal acetylenic acids from the marine sponge, *Petrosia corticata*. *J. Nat. Prod.* **57**, 1464-1467.
10. 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.
11. Lim, Y. J., Park, H. S., Im, K. S., Lee, C. O., Hong, J., Lee, M. Y., Kim, D. K., and Jung, J. H. 2001. Additional cytotoxic polyacetylenes from the marine sponge *Petrosia* species. *J. Nat. Prod.* **64**, 46-53.
  12. Montalvo, N. F., Davis, J., Vicente, J., Pittiglio, R., Ravel, J., and Hill, R. T. 2014. Integration of culture-based and molecular analysis of a complex sponge-associated bacterial community. *PLoS one.* **9**, e90517.
  13. Nishimura, S., Matsunaga, S., Shibasaki, M., Suzuki, K., Harada, N., Naoki, H., and Fusetani, N. 2002. Corticatic acids D and E, polyacetylenic geranylgeranyl transferase type I inhibitors, from the marine sponge *Petrosia corticata*. *J. Nat. Prod.* **65**, 1353-1356.
  14. Noda, A., Sakai, E., Kato, H., Losung, F., Mangindaan, R. E., de Voogd, N. J., Yokosawa, H., and Tsukamoto, S. 2015. Strongylophorines, meroditerpenoids from the marine sponge *Petrosia corticata*, function as proteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 2650-2653.
  15. Rodrigues, D. F., da C Jesus, E., Ayala-del-Rio, H. L., Pellizari, V. H., Gilichinsky, D., Sepulveda-Torres, L., and Tiedje, J. M. 2009. Biogeography of two cold-adapted genera: *Psychrobacter* and *Exiguobacterium*. *ISME J.* **3**, 658-665.
  16. Santos, O. C. S., Soares, A. R., Machado, F. L. S., Romanos, M. T. V., Muricy, G., Giambiagi deMarval, M., and Laport, M. S. 2015. Investigation of biotechnological potential of sponge associated bacteria collected in Brazilian coast. *Lett. Appl. Microbiol.* **60**, 140-147.
  17. Sasaki, S., Tozawa, T., Van Wagoner, R. M., Ireland, C. M., Harper, M. K., and Satoh, T. 2011. Strongylophorine-8, a pro-electrophilic compound from the marine sponge *Petrosia (Strongylophora) corticata*, provides neuroprotection through Nrf2/ARE pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **415**, 6-10.
  18. Sun, W., Zhang, F., He, L., Karthik, L., and Li, Z. 2015. Actinomycetes from the South China Sea sponges: isolation, diversity, and potential for aromatic polyketides discovery. *Front. Microbiol.* **6**, doi: 10.3389/fmicb.2015.01048
  19. Takada, K., Okada, S., and Matsunaga, S. 2014. Structural reappraisal of corticatic acids, biologically active linear polyacetylenes, from a marine sponge of the genus *Petrosia*. *Fish. Sci.* **80**, 1057-1064.
  20. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729.
  21. Taylor, M. W., Schupp, P. J., De Nys, R., Kjelleberg, S., and Steinberg, P. D. 2005. Biogeography of bacteria associated with the marine sponge *Cymbastela concentrica*. *Environ. Microbiol.* **7**, 419-433.
  22. Thoms, C., Horn, M., Wagner, M., Hentschel, U., and Proksch, P. 2003. Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Mar. Biol.* **142**, 685-692.
  23. 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.
  24. Wang, G. 2006. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 545-551.
  25. Webster, N. S., Cobb, R. E., and Negri, A. P. 2008. Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge. *ISME J.* **2**, 830-842.
  26. 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.
  27. 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.
  28. Yoon, B. J. and Oh, D. C. 2012. *Spongiibacterium flavum* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the marine sponge *Halichondria oshoro*, and emended descriptions of the genera *Croceitalea* and *Flagellimonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 1158-1164.