

보 문

## ARDRA와 DGGE를 이용한 *Halichondria panicea* 해면의 공생세균 다양성

박진숙\*

한남대학교 생명시스템과학과

### Bacterial diversity of the Marine Sponge, *Halichondria panicea* by ARDRA and DGGE

Jin-Sook Park\*

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

(Received December 23, 2015; Accepted December 24, 2015)

**ABSTRACT:** Culture-dependent ARDRA and culture-independent DGGE were employed to investigate the bacterial community associated with the marine sponge *Halichondria panicea* collected from Jeju Island. A total of 120 bacterial strains associated with the sponge were cultivated using modified Zobell and Marine agar media. PCR amplicons of the 16S rRNA gene from the bacterial strains were digested with the restriction enzymes *Hae*III and *Msp*I, and then assigned into different groups according to their restriction patterns. The 16S rRNA gene sequences derived from ARDRA patterns showed more than 96% similarities compared with known bacterial species, and the isolates belonged to four classes, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Firmicutes*, of which *Alphaproteobacteria* was dominant. DGGE fingerprinting of 16S rRNA genes amplified from the sponge-derived total gDNA showed 14 DGGE bands, and their sequences showed 100% similarities compared with the sequences available in GenBank. The sequences derived from DGGE bands revealed high similarity with the uncultured bacterial clones. DGGE revealed that bacterial community consisted of seven classes, including *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, and *Chloroflexi*. According to both the ARDRA and DGGE methods, three classes, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, and *Bacteroidetes*, were commonly found in *H. panicea*. However, overall bacterial community in the sponge differed depending on the analysis methods. Sponge showed more various bacterial community structures in culture independent method than in culture-dependent method.

**Key words:** *Halichondria panicea*, 16S rRNA gene, ARDRA, bacterial diversity, DGGE, marine sponge

해면 *Halichondria panicea*는 전세계의 해양에 분포하고 (Barthel and Wolfrath, 1989; Althoff *et al.*, 1998) 우리나라에서는 제주도 해안에서 흔히 발견된다. 이 해면은 주로 조간대와 조하대에서 얇게 혹은 20 cm 가 넘는 두꺼운 덩어리로 성장하며 밝은 노랑색이나 연녹색 혹은 회녹색을 띠며, 여러 가지 생리활성 물질을 생산하는 것으로 알려져 있다. 특히 해면과 공생하는 세균들에 의해 생산되는 것으로 보고된 것에는 aryl carotenoid,  $\gamma$ -pyrones, mayamycin, glycosphingolipids, 신경활성물질 등이 있어(Nagle *et al.*, 1992; Perovic *et al.*, 1998; Imhoff and Stöhr, 2003; Schneemann *et al.*, 2010a) 해면과 공

생하는 세균의 다양성 분석은 중요해지고 있다. 해면은 복합 생리 활성물질의 분리를 위한 풍부한 원천 중의 하나이며 (Taylor *et al.*, 2007) 그에 공생하는 세균은 신약 개발을 위한 잠재적인 소재로서 대량생산 및 생명공학기술을 적용하기에 용이하다. 해면은 각종 미생물 군집의 서식지로 알려져 있으며, 이 미생물들은 해면 부피의 40% 이상을 차지하기도 한다 (Hentschel *et al.*, 2006). 이들 세균의 군집은 매우 풍부하고 다양한 것으로 알려져 있지만 배양 가능한 세균은 단지 1%에 불과하다. 특히 해면공생세균과 2차 대사산물 프로파일을 비교하기 위하여 해면 공생 세균의 비배양 계통분석과 더불어 배양 가능한 분리 균주의 계통분석은 매우 중요하다(Schneemann *et al.*, 2010b). 이 연구에서는 2011년 여름 제주도 용머리 해안에

\*For correspondence. E-mail: [jspark@hnu.kr](mailto:jspark@hnu.kr);  
Tel.: +82-42-629-8771; Fax: +82-42-629-8769

서 채집한 해면 *H. panicea*를 대상으로 배양에 근거한 ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) 방법과 비배양에 의한 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 방법을 이용하여 공생세균의 다양성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 해면 시료의 채집

해면 *H. panicea*의 공생세균의 다양성을 조사하기 위해 2011년 8월에 제주도 서귀포시 안덕면 사계리 용머리해안 조간대에서 해면을 채집하였다. 채집한 해면은 4°C에서 운반하여 12시간 이내에 실험실로 옮긴 후 멸균된 인공해수로 3회 세척 후 실험에 사용하였다. 해면 채집지의 GPS는 33° 14' 01"N, 126° 18' 55"E이었으며, 해면 채집 일의 수온은 21.3°C, 염도는 27.9 PSU이었다.

### 해면공생세균의 배양 및 분리

해면을 1 cm<sup>3</sup> 크기로 잘라 멸균된 인공해수로 3회 세척 후 인공해수 3 ml을 넣어 균질화 한 다음 10<sup>-1</sup>부터 10<sup>-4</sup>까지 희석하여 변형된 Zobell 배지(Peptone 5 g, Yeast extract 1 g, FePO<sub>4</sub>·H<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 Marine agar 배지(Difco)에 100 µl씩 도말 하였다. 해면 균질액이 도말 된 배지는 26°C에서 7일간 배양하였다. 각각의 해면으로부터 120개의 균주를 분리하고 순수분리를 위해 동일한 배지에서 계대 배양하여 단일 콜로니를 얻었다.

### DNA 추출 및 16S rRNA gene의 증폭

분리된 세균의 DNA는 각각의 콜로니로부터 gDNA isolation kit (Qiagen)를 이용하여 분리하였다. 분리한 DNA를 PCR 반응의 주형으로 이용하여 16S rRNA gene을 증폭하였다. 증폭에는 27f(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492r(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG AC-3') primer 쌍을 사용하였다. PCR 반응의 혼합물 조성은 5 µl 10× reaction buffer, 1 µl의 10 mM dNTPs, 5 unit/µl *Taq* polymerase (Solgent), 각각의 primer 10 pmol, 그리고 100 ng의 시료 DNA를 1 µl 첨가하여 최종 부피 50 µl이 되도록 하여 PCR 반응을 수행하였다. GeneAmp PCR system 2700 thermal cycler (Applied Biosystems, Version 2.0)를 사용하여 94°C에서 5분간 초기변성 후 94°C에서 40초간 변성, 55°C에서 40초간 냉각, 72°C에

서 1분간 신장하는 과정을 30 cycle 반복 후 최종적으로 72°C에서 10분간 신장시켰다. 16S rRNA gene의 증폭을 확인하기 위해 1% agarose gel (Roche)를 이용하여 PCR 반응물 3 µl를 취해 Mupid-ex (ADVANCE)로 100 V, 25분간 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 전기영동 하였다. 전기영동 후 agarose gel은 EtBr (ethidium bromide, 50 ng/ml)에 10분간 염색하여 Gel Logic 200 (Kodak)을 이용하여 UV하에서 약 1.5 kb 단편을 확인하였다.

### ARDRA 분석

PCR 산물의 ARDRA 분석을 위해 2종의 제한효소 *MspI* (Thermo Scientific)과 *HaeIII* (Thermo Scientific)를 사용하였다. 증폭된 산물에 각각의 제한 효소를 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 반응물은 3% agarose gel을 사용하여 100 V, 30분간 1× TAE buffer에서 전기영동 한 후 EtBr로 염색한 다음 Gel Logic 200을 이용하여 각 균주의 밴드유형을 확인하였다. ARDRA type의 패턴분석을 위해 FPQuest (Bio-Rad) software를 이용하였다. 분석 후 16S rRNA gene-ARDRA 타입에 따라 각각의 타입 별로 1-2개의 균주들을 선별하였다. 선별된 균주들의 증폭된 PCR 산물은 MG<sup>TM</sup> PCR DNA purification kit (Macrogen)를 이용하여 정제하였으며, 27f 프라이머를 이용한 염기서열 분석(Macrogen)을 의뢰하였다.

### Total genomic DNA 추출

해면을 1 cm<sup>3</sup> 크기로 잘라 멸균된 인공해수로 세척 후 -70°C에서 24시간 예비동결 한 다음 동결건조기에서 -50°C, 0.033 M bar기압으로 24시간 건조하였다. 동결 건조된 해면은 멸균된 막자 사발에 넣고 분쇄하였으며, 분쇄 후 멸균된 류루수 500 µl를 넣어 -80°C와 상온에서 냉동과 해동을 3회 반복하였다. 반복 후 Dneasy blood & tissue kit (Qiagen)를 이용하여 제조사의 방법대로 추출한 후 DGGE를 위한 PCR 반응의 주형으로 사용하였다.

### 16S rRNA gene의 DGGE-PCR 증폭

Primer는 GC clamp가 추가된 341f (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')와 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')을 이용하여 GeneAmp PCR system 2700 thermal cycler에 의해 16S rRNA gene을 증폭하였다. PCR 반응 혼합물의 조성은 앞에서 설명한 16S rRNA gene의 PCR 증폭의 경우와 동일하게 하였으며 PCR 조건은 94°C에서 40초

간 변성, 65°C (1 cycle 당 0.5°C touch down)에서 40초간 냉각, 72°C에서 1분간 신장, 이 과정을 30 cycle 반복 수행한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 신장시켰다. 증폭된 DNA의 확인을 위해 PCR 반응액 2 µl를 취하여 2% agarose gel (Bio-Rad)을 이용하여 Mupid-ex로 100 V에서 25분간 1× TAE buffer에서 전기영동 하였다. 전기 영동 후 EtBr로 염색하여 Gel Logic 200을 이용, 자외선 조사로 확인하였다. 증폭된 DNA의 크기를 확인하기 위한 marker로는 100 bp ladder (Intron)를 사용하였다.

### DGGE 전기영동

DGGE는 Bio-Rad Dcode system (Bio-Rad)을 이용하여 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 bis acrylamide (Bio-Rad)를 포함한 10% polyacrylamide를 이용하여 30%에서 70%의 농도 구배 조성(7 M urea, 40% formamide)으로 전기영동을 수행하였다. Polyacrylamide gel은 크기 20 × 13 (W × H cm), 두께 1 mm로 작성하여 PCR 시료는 2× loading dye와 혼합하여 40 µl의 시료를 loading하였다. 1× TAE buffer를 사용하여 60°C, 30 V에서 1시간 안정화시킨 후 60 V로 전압을 올려 15시간 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후 DGGE gel은 EtBr (50 ng/ml)로 1시간 염색 하여 Gel Logic 200을 이용, 자외선 조사로 확인하였다.

### DGGE band의 동정

DGGE gel 상에서 분리된 band 중, 각 band를 gel에서 잘라내어 Gel extraction kit (Qiagen)을 이용하여 DNA를 회수하였다. 염기서열 분석을 위해 band로부터 회수된 DNA를 주형으로 사용하였다. Primer는 341f와 518r을 이용하여 위와 동일한 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 증폭산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega)을 이용하여 정제한 후 염기서열 분석(Macrogen)을 의뢰하였다.

### 계통학적 분석 및 계통수 작성

선택된 균주들의 결정된 16S rRNA gene 염기서열은 GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된 염기서열을 대상으로 Blast search를 수행하였다. 각 염기서열의 alignment는 CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994)를 이용하여 정렬하였고 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 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 계통수

를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 해면 공생세균의 분리 및 ARDRA 분석

제주도 용머리 해안에서 채집된 *H. panicea* 해면의 배양 가능한 공생세균 군집구조를 16S rRNA gene의 PCR-ARDRA 방법에 의해 조사하기 위하여 총 120균주를 분리하고 분리된 균주에 대하여 두 종류의 제한효소를 이용하여 16S rRNA gene의 ARDRA type을 분석하였다(Fig. 1). ARDRA type은 각각 *HaeIII*를 이용한 경우 20개, *MspI*의 경우 19개의 type이 관찰되었으며, 두 효소를 이용하여 총 22개의 서로 다른 ARDRA type이 구분 되었다(Table 1).

### DGGE band 양상

비배양법에 기초한 16S rRNA gene의 PCR-DGGE를 수행하여 *H. panicea*의 해면 공생세균의 계통학적 다양성을 알아 보았다. 해면 시료로부터 추출한 genomic DNA를 주형으로 16S rRNA gene의 V3영역을 증폭하여 180 bp의 예상된 크기의 PCR 산물을 얻었다. *H. panicea*의 DGGE band pattern 분석

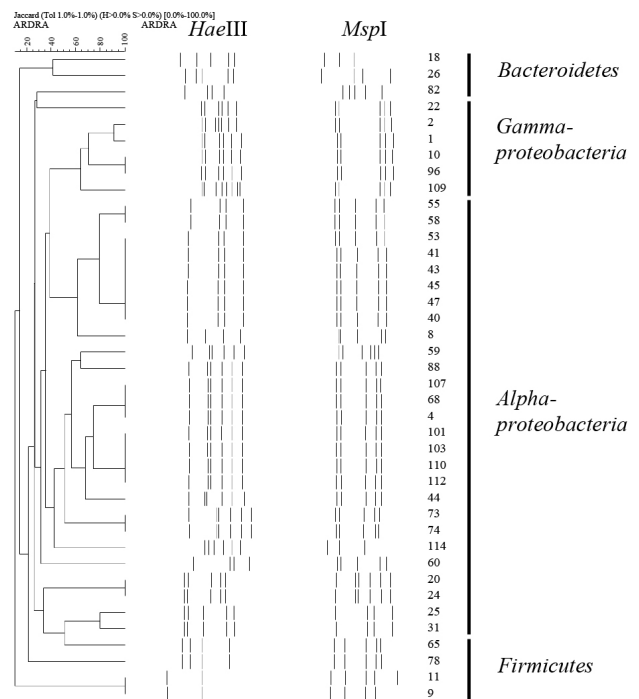


Fig. 1. Dendrogram showing the 16S rRNA gene-ARDRA profiles and the relationship among bacterial strains isolated from the marine sponge, *Halichondria panicea*.

**Table 1.** ARDRA types and relative abundance of major groups in cultivable bacterial community of the marine sponge, *Halichondria panicea* (RH)

ARDRA type <sup>a</sup>	Representative strain	Closest species <sup>b</sup>	Accession No.	Similarity (%)	Phylum	Percentage
1a	RH7-18	<i>Aureibacter tunicatorum</i>	AB572584	98		
2b	RH7-26	<i>Flammeovirga aprica</i>	AB247553	99	<i>Bacteroidetes</i>	7.5
3c	RH7-82	<i>Vitellibacter vladvostokensis</i>	AB071382	100		
4d	RH7-22	<i>Vibrio owensii</i>	GU018180	99		
5d	RH7-2	<i>Vibrio owensii</i>	GU018180	100	<i>γ-proteobacteria</i>	15.0
6e	RH7-1	<i>Shewanella ircinia</i>	DQ180743	96		
7f	RH7-109	<i>Vibrio hippocampi</i>	FN421434	98		
8g	RH7-55	<i>Ruegeria atlantica</i>	D88526	99		
9g	RH7-53	<i>Ruegeria atlantica</i>	D88526	99		
10h	RH7-25	<i>Ruegeria atlantica</i>	D88526	99		
9i	RH7-47	<i>Ruegeria halocynthiae</i>	HQ852038	100		
11j	RH7-8	<i>Ruegeria mobilis</i>	AB255401	100		
12k	RH7-59	<i>Pseudovibrio japonicus</i>	AB246748	100	<i>α-proteobacteria</i>	67.5
13l	RH7-88	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	AB175663	100		
14l	RH7-44	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	AB175663	100		
15m	RH7-73	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	AB175663	100		
16n	RH7-20	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	AB175663	100		
17o	RH7-114	<i>Kiloniella laminariae</i>	AM913907	98		
18p	RH7-60	<i>Ruegeria halocynthiae</i>	HQ852038	100		
19q	RH7-65	<i>Bacillus tequilensis</i>	HQ223107	99		
20r	RH7-9	<i>Staphylococcus warneri</i>	L37603	100	<i>Firmicutes</i>	10.0
20s	RH7-11	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	L37605	100		

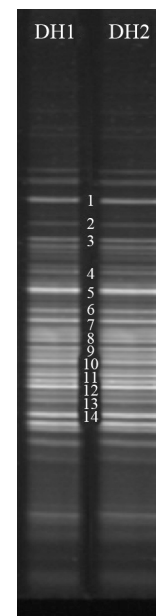
<sup>a</sup> Each combination of number and alphabet represents ARDRA types of the restriction enzymes: *Hae*III and *Msp*I

<sup>b</sup> All strains used for comparison of sequence similarities were type strains.

결과, 총 14개 이상의 band를 확인할 수 있었으며 이 패턴은 2회의 실험을 통해 동일한 패턴을 얻어 재현성을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이 해면 종의 DGGE band가 나타내는 세균 다양성을 파악하기 위하여 16S rRNA gene의 부분 염기서열을 분석하였다.

### 염기서열 분석 및 계통학적 분석

16S rRNA gene-ARDRA 분석에 의해 22개의 type으로 나뉜, *H. panicea*에서 분리된 세균들에 대해 각 ARDRA type 별로 1-2개의 분리 균주를 선별하여 부분 염기서열을 분석하였다. 염기서열이 분석된 총 40개의 분리 균주는 모두 기준에 보고된 세균 종과 96% 이상의 유사도를 나타내었다(Table 1). 염기서열이 분석된 22개의 ARDRA type은 15개의 세균 종을 나타내었으며(Table 1), 이 결과를 근거로 처음 ARDRA 분석에 쓰여진 120균주들을 분석하고 이들의 분석 결과에 근거하여 다양성의 차이를 분석하였다. 16S rRNA gene의 ARDRA 분석에 의해 *H. panicea* 해면의 공생세균은 *Alphaproteobacteria*



**Fig. 2.** DGGE fingerprints of the bacterial community associated with *Halichondria panicea* (DH); DH1 and DH2 present the DGGE profiles from independent experiments using the same sponge sample.

(67.5%), *Gammaproteobacteria* (15.0%), *Bacteroidetes* (7.5%), *Firmicutes* (10.0%) 등 3문(phylum) 4강(class)에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 본 연구에서는 *Alphaproteobacteria*가

장 우점하고 이어 *Gammaproteobacteria*가 우점하였으나 주 황해변해면(*Hymeniacidon sinapium*)의 경우 *Alphaproteobacteria*, 16.3%, *Gammaproteobacteria*, 67.4%를 나타내어



**Fig. 3.** Phylogenetic relationship was determined by the 16S rRNA gene sequences of the isolated bacterial strains from the marine sponge, *Halichondria panicea* (RH). Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis (>50%) from 1,000 replicates. The scale bar represents 0.05 substitution per nucleotide position. *Thermococcus celer* was used as an out group.

**Table 2.** Phylogenetic affiliation of re-amplified denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) bands derived from the sponge, *Halichondria panicea* (DH)

DGGE band	Closest relative	Accession no.	Similarity (%)	Phylum
DH7-1	Uncultured cyanobacterium	KT880412	100	<i>Cyanobacteria</i>
DH7-2	Uncultured cyanobacterium	KT880368	100	<i>Cyanobacteria</i>
DH7-3	Uncultured alpha proteobacterium	AB054179	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
DH7-4	Uncultured Chloroflexi bacterium	KF286135	100	<i>Chloroflexi</i>
DH7-5	<i>Endozoicomonas eumiceicola</i>	NR109684	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
DH7-6	Uncultured Bacteroidetes bacterium	JN038256	100	<i>Bacteroidetes</i>
DH7-7	Uncultured Chloroflexi bacterium	KF597121	100	<i>Chloroflexi</i>
DH7-8	Uncultured Acidobacteria bacterium	JN210661	100	<i>Acidobacteria</i>
DH7-9	Uncultured Chloroflexi bacterium	KF286193	100	<i>Chloroflexi</i>
DH7-10	Uncultured Chloroflexi bacterium	KF597121	100	<i>Chloroflexi</i>
DH7-11	Uncultured Chloroflexi bacterium	KF286175	100	<i>Chloroflexi</i>
DH7-12	Uncultured Chloroflexi bacterium	JN596673	100	<i>Chloroflexi</i>
DH7-13	Uncultured actinobacterium	KT880382	100	<i>Actinobacteria</i>
DH7-14	Uncultured cyanobacterium	KT880412	100	<i>Cyanobacteria</i>

해면 종에 따라 공생세균 군집의 차이가 있음을 알 수 있었다 (Jeong and Park, 2012b). 한편 동일한 해면 속에 속하는 *Halichondria okadai*의 454 pyrosequencing 이용한 세균군집구조 분석 결과에서는 *Alphaproteobacteria* 74.5%, *Gammaproteobacteria* 6.9%를 나타내어 주요 세균 군집이 본 실험 결과와 매우 유사하였다(Abe et al., 2012).

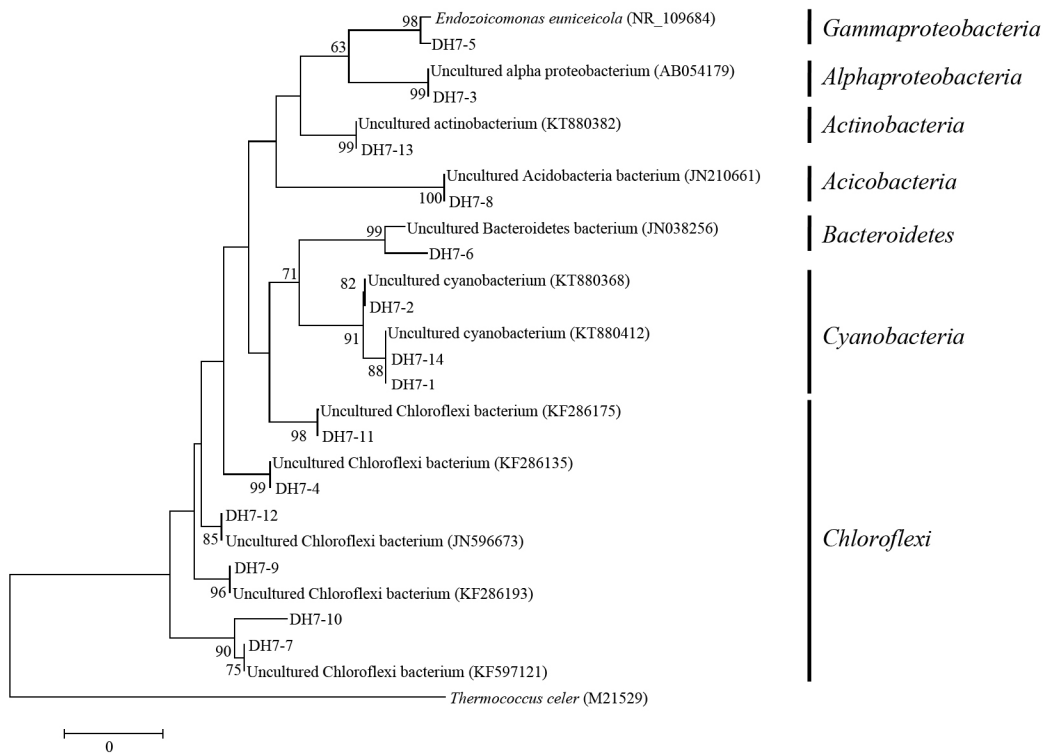
본 연구 결과 *H. panicea* 해면의 가장 우점하는 공생세균 문은 *Proteobacteria* (82.5%)였으며, 지금까지 보고된 대부분의 해면에서 나타나는 주요 공생세균 문은 *Proteobacteria* (Webster et al., 2004)로 알려져 있는 바, 이는 여과 섭식하는 해면의 특성상 공생(sponge-associated)세균 군집이 일반적으로 해양의 표영세균 중 가장 우점하는 그룹인 *Proteobacteria*와 일정한 상관관계가 있음을 시사한다.

*Alphaproteobacteria*에서는 *Rugeria* 종이 우점하였으며 *Gammaproteobacteria* 중에서는 *Vibrio* 종이 우점하였다. 이는 *Asteropus simplex*에서 조사된 그룹 별 각각의 우점종과 동일한 것이었다(Jeong and Park, 2012a).

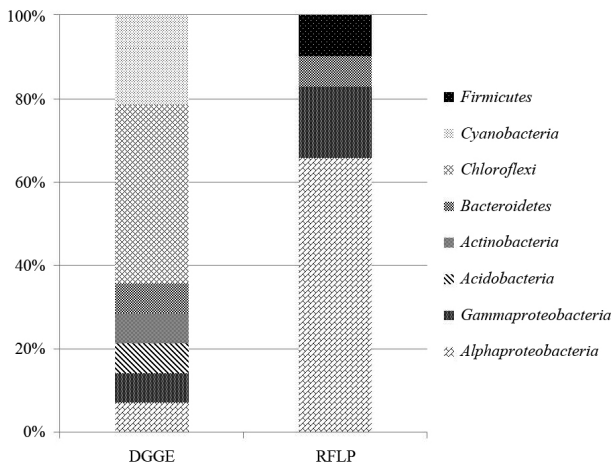
DGGE banding pattern으로부터 세균군집의 다양성을 분석하기 위해 DGGE band에서 DNA를 추출하여 341f와 518r을 이용하여 재 증폭하여 염기서열을 분석한 결과, 14개의 band에 대한 염기서열을 확인할 수 있었으며(Table 2), DGGE band로부터 결정된 서열들은 모두 알려진 서열들과 100%의 상동성을 나타냈다. DGGE band로부터 밝혀진 대부분의 서열들은 배양되지 않은 세균(uncultured bacteria)들과 높은 상동성을 나타내었다. DGGE band에서 DH7-1, DH7-2와 DH7-14는 Uncultured Cyanobacterium (KT880412, KT880368)과

100%의 상동성을 보였으며, DH7-3은 Uncultured alpha proteobacterium (AB054179)과 100% 상동성을 나타내었다. DH7-4, DH7-7, DH7-9, DH7-10, DH7-11과 DH7-12는 Uncultured Chloroflexi bacterium (KF286135, KF597121, KF286193, KF286175, JN596673)과 100%의 상동성을 보였으며, DH7-5는 *Endozoicomonas eumiceicola* (NR109684)와 100% 상동성을 나타내었다. DH7-6은 Uncultured Bacteroidetes bacterium (JN038256)과 DH7-8은 Uncultured Acidobacteria bacterium (JN210661)과 각각 100% 상동성을 보였으며, DH7-13은 Uncultured actinobacterium (KT880382)과 100%의 상동성을 나타내었다.

DGGE 밴드의 염기서열 분석에 근거하여 계통수를 작성한 결과, *H. panicea*의 주요 공생세균 그룹은 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* 그리고 *Cyanobacteria*로 6문 7장으로 나타났다(Fig. 4). DGGE를 이용한 *H. panicea*의 세균군집구조 분석 결과에서 *Alphaproteobacteria*의 *Roseobacter* 그룹이 해면 종 특이적 그룹으로 보고된 바 있으며(Schneemann et al., 2010c), 또한 이 해면의 공생세균 군집구조에 관한 또 다른 연구에서 *Alphaproteobacteria*의 *Rhodobacter* 그룹이 우점종임을 제시하였으나(Wichels et al., 2006), 본 연구에서는 이와 같은 특정 세균 그룹은 검출되지 않았다. *H. panicea*의 경우와 달리 *Asteropus simplex*의 경우 비배양 DGGE에 의해 *Chloroflexi*를 제외한 *Betaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Deltaproteobacteria*와 *Nitrospira*가 발견되어 해면 종에 따른 차이를 나타내었다 (Jeong and Park, 2012a). ARDRA에 의한 배양 가능한 공생세



**Fig. 4.** Phylogenetic tree from analysis of 16S rRNA gene sequences of DGGE bands from *Halichondria panicea* (DH). Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis (>50%) from 1,000 replicates. The scale bar represents 0.05 substitution per nucleotide position. *Thermococcus celer* was used as an out group.



**Fig. 5.** Comparison of the bacterial community based on 16S rRNA gene-ARDRA and DGGE in the marine sponge *Halichondria panicea*.

균 군집의 경우 3개의 문이 발견된 데 비해 비배양에 기초한 DGGE법에 의한 경우 6개의 문이 나타나 공생세균 군집 구조에 있어 방법에 따른 차이를 나타내었다(Fig. 5).

결론적으로 ARDRA와 DGGE의 서로 다른 두 가지 방법에 의해 조사된 *H. panicea*의 전체 공생세균 다양성은 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actino-*

*bacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria* 그리고 *Firmicutes* 총 7문 8강으로 나타났다. 두 가지 실험 방법을 적용한 경우, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*가 공통 세균 그룹으로 나타났다. *Firmicutes*는 ARDRA 방법에 의해서만 발견되었으며 *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* 그리고 *Cyanobacteria*는 비배양 DGGE에 의해서만 발견되었다. 비배양에 의한 경우 세균군집이 더 다양함을 알 수 있었으며 배양법에 의한 경우 공생세균 다양성이 매우 저평가됨을 알 수 있었다(Jackson *et al.*, 2012). 분석 방법에 따라 검출되는 해면공생세균의 다양성은 차이를 나타내었으며 배양법인 경우 배양조건에 따른 제약(Li *et al.*, 2007; Sipkema *et al.*, 2011)과 비배양인 경우 DNA 추출 효율 및 DGGE band의 전기영동에 따른 분리 등이 결과에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 최근의 대량염기서열분석방법인 pyrosequencing에 의하면 보다 다양한 군집구조 분석이 가능할 것이다.

해면공생세균의 다양성은 분석방법에 따른 차이를 나타내므로 제한된 몇 가지의 방법에 의한 결과로 군집구조를 일반화하기는 어렵다. 그러나 대부분 조사된 해면공생세균은 거의 모든 해면에 분포하는 일반적인 종과 해면 종 특이적 세균종

들이 존재하는 것으로 보고되어있다(Schmitt *et al.*, 2012; Kennedy *et al.*, 2014). 해면공생세균의 다양성 분석은 주로 분자적 방법에 의해서 이루어지며 생리활성 연구를 위해서는 배양의존적 방법에 의해 연구가 수행되고 있다(Schneemann *et al.*, 2010b). 특히 해면 공생세균으로부터의 생리활성물질 연구에서는 화학적 분석과 더불어 배양 가능한 세균다양성 연구가 동시에 수행되어, 공생세균 군집과 생리활성 물질 프로파일 간의 상관관계 분석이 이루어지고 있다(Schneemann *et al.*, 2010b). 많은 해양 천연물들이 해면공생세균에 의해 생산되므로 이들의 활용과 해양환경에서의 공생세균의 생태학적 이해를 위해서는 다양한 해면 중에 대한 분자적 방법과 아울러 배양의존적 방법에 의해 공생세균 다양성에 관한 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

## 적 요

제주도에서 채집한 해양 해면 *Halichondria panicea*의 공생세균 군집구조를 배양에 의한 ARDRA와 비배양에 의한 DGGE 분석 방법에 의하여 조사하였다. 16S rRNA gene-ARDRA 분석을 위해 변형된 Zobell 배지와 Marine agar를 이용하여 120균주를 선별하고 제한효소, *HaeIII*와 *MspI*를 사용하여 ARDRA type을 구분하였다. ARDRA type으로부터 유래한 16S rRNA gene 염기서열 분석 결과, 알려진 세균 종과 96% 이상의 유사도를 나타내었으며 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* 등 3문 4강이 관찰되었다. 그 중 *Alphaproteobacteria*가 우점하였다. 같은 해면, *H. panicea*의 DGGE 분석을 위해 total genomic DNA로부터 16S rRNA gene를 증폭하여 DGGE fingerprinting을 수행한 결과 14개의 밴드가 관찰되었다. 각 밴드의 16S rRNA gene 염기서열은 알려진 세균의 염기서열과 100%의 유사성을 나타내었으며 대부분의 염기서열은 uncultured bacteria에 속하였다. DGGE 분석으로부터 미생물의 군집은 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi* 등 6문 7강으로 나타났다. ARDRA와 DGGE 방법에 의해 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*가 공통적으로 발견되었으나 전체적인 공생세균의 군집구조는 분석방법에 따라 차이를 나타내었다. 배양에 의한 방법보다 비배양 방법에서 더 다양한 세균군집구조를 나타내었다.

## 감사의 말

이 논문은 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원에 의해 수행된 해양생명자원기탁등록보존기관 사업(2009B413-GV-R-0101-S000100)과 2014년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 일반연구자지원사업(2010-0007405)의 결과이며 이에 감사드립니다.

## References

- Abe, T., Sahin, F.P., Akiyama, K., Naito, T., Kishigami, M., Miyamoto, K., Sakakibara, Y., and Uemura, D. 2012. Construction of a metagenomic library for the marine sponge *Halichondria okadai*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 633-639.
- Althoff, K., Schütt, C., Steffen, R., Batel, R., and Mueller, W.E. 1998. Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria?. *Mar. Biol.* **130**, 529-536.
- Barthel, D. and Wolfrath, B. 1989. Tissue sloughing in the sponge *Halichondria panicea*: a fouling organism prevents being fouled. *Oecologia* **78**, 357-360.
- Hentschel, U., Usher, K.M., and Talor, M.W. 2006 Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**, 167-177.
- Imhoff, J.F. and Stöhr, R. 2003. Sponge-associated bacteria: general overview and special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*, pp. 35-57. In Muller, W.E.G. (eds.), *Sponges (Porifera)*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, USA.
- Jackson, S.A., Kennedy, J., Morrissey, J.P., O'Gara, F., and Dobson, A.W. 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. and Park, J.S. 2012a. Phylogenetic analysis of bacterial diversity in the marine sponge, *Asteropus simplex*, collected from Jeju Island. *Korean J. Microbiol.* **48**, 275-283.
- Jeong, J.B. and Park, J.S. 2012b. Seasonal differences of bacterial communities associated with the marine sponge, *Hymeniacidon sinapium*. *Korean J. Microbiol.* **48**, 262-269.
- Kennedy, J., Flemer, B., Jackson, S.A., Morrissey, J.P., O'Gara, F., and Dobson, A.D. 2014. Evidence of a putative deep sea specific microbiome in marine sponges. *PLoS* **9**, e91092.
- Li, Z., He, L., and Miao, X. 2007. Cultivable bacterial community from South China sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. *Curr. Microbiol.* **55**, 465-472.
- Nagle, D.G., McClatchey, W.C., and Gerwick, W.H. 1992. New glycosphingolipids from the marine sponge *Halichondria*



- panicea*. *J. Nat. Prod.* **55**, 1013–1017.
- Perovic, S., Wichels, A., Schütt, C., Gerdtts, G., Pahler, S., Steffen, R., and Müller, W.E.** 1998. Neuroactive compounds produced by bacteria from the marine sponge *Halichondria panicea*: activation of the neuronal NMDA receptor. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **6**, 125–133.
- Saitou, N. and Nei, M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Schmitt, S., Tsai, P., Bell, J., Fromont, J., Ilan, M., Lindquist, N., Perez, T., Rodrigo, A., Schupp, P.J., Vacelet, J., et al.** 2012. Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *ISME J.* **6**, 564–576.
- Schneemann, I., Kajahn, I., Ohlendorf, B., Zinecker, H., Erhart, A., Nagel, K., Wiese, J., and Imhoff, J.F.** 2010a. Mayamycin, a cytotoxic polyketide from a *Streptomyces* strain isolated from the marine sponge *Halichondria panicea*. *J. Nat. Prod.* **73**, 1309–1312.
- Schneemann, I., Nagel, K., Kajahn, I., Labes, A., Wiese, J., and Imhoff, J.F.** 2010b. Comprehensive investigation of marine *Actinobacteria* associated with the sponge *Halichondria panicea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3702–3714.
- Schneemann, I., Ohlendorf, B., Zinecker, H., Nagel, K., Wiese, J., and Imhoff, J.F.** 2010c. Nocapyrones A–D,  $\gamma$ -pyrones from a *Nocardiopsis* strain isolated from the marine sponge *Halichondria panicea*. *J. Nat. Prod.* **73**, 1444–1447.
- Sipkema, D., Schippers, K., Maalcke, W.J., Yang, Y., Salim, S., and Blanch, H.W.** 2011. Multiple approaches to enhance the cultivability of bacteria associated with the marine sponge *Haliclona (gellius)* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2130–2140.
- 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.
- Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D., and Wagner, M.** 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 295–347.
- 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.
- 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.
- Wichels, A., Würtz, S., Döpke, H., Schütt, C., and Gerdtts, G.** 2006. Bacterial diversity in the breadcrumb sponge *Halichondria panicea* (Pallas). *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**, 102–118.