

보 문

열대 해양 해면 *Cinachyrella* sp.와 *Plakortis* sp.의 공생세균 군집의 계통학적 다양성

정종빈 · 박진숙*

한남대학교 생명시스템과학과

Phylogenetic diversity of bacterial community associated with the tropical marine sponges, *Cinachyrella* sp. and *Plakortis* sp.

Jong-Bin Jeong and Jin-Sook Park*

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

(Received March 3, 2015; Accepted March 25, 2015)

ABSTRACT: The bacterial community structures of two marine sponges, *Cinachyrella* sp. and *Plakortis* sp., collected from Chuuk in the South Pacific in February 2012 were analyzed by PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) fingerprinting. After isolation of the total genomic DNAs from the sponges, the V3 regions of the 16S rRNA genes were amplified and subjected to DGGE profiling. The two species of sponges displayed different DGGE band patterns. The sequences derived from the DGGE bands revealed 85-100% similarities to known bacterial species in the public database. The bacterial community of *Cinachyrella* sp. was composed of 6 classes: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, and *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Gamma*-, *Delta*-). The bacterial community of *Plakortis* sp. included 7 classes: *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Spirochaetes*, and *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Gamma*-, *Delta*-). Though *Actinobacteria*, *Chloroflexi* and *Proteobacteria* were commonly found in both sponges, the predominant bacterial communities differed between the two. Namely, the predominant bacterial groups in *Cinachyrella* sp. and *Plakortis* sp. were *Proteobacteria* and *Chloroflexi*, respectively. The sponge-associated bacteria are sponge host-specific, as each of the tested sponges from the same geographical location had different predominant bacterial diversity.

Key words: *Cinachyrella* sp., *Plakortis* sp., bacterial community, PCR-DGGE, sponge

해면(*Porifera*)은 화석 기록으로 635만년 전부터 존재하는 계통학적으로 가장 오래된 후생동물 문류의 하나로서 전 세계의 저서 생태계에 중요한 요소가 되는 것으로 알려져 있다(Brück *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). 또한 전 세계적으로 10,000종 이상이 보고되었고 담수와 해수 그리고 열대에서 극지에 이르기까지 다양한 환경에서 서식하며, 주로 여과섭식을 위하여 하루 수 천 리터의 물을 여과한다(Hentschel *et al.*, 2006). 여과를 통해 해수에 있는 다양한 미생물이 해면 내로 유입되어 해면의 먹이원이 되거나 화학적 방어, 물질대사, 노폐물 처리 등에 관여하거나 혹은 해면의 물리적 구조에 기여하는 것으로 알려져 있다(Wang, 2006). 특히 해면이 생산하는 2차 대사산

물의 실제 생산자가 공생하는 세균이라는 연구가 보고되면서 해면 공생세균의 군집구조와 다양성에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다(Kenedy *et al.*, 2009; Haber and Ilan, 2014). 해면공생세균은 배양법과 비배양법에 의해 연구되고 있으며(Sun *et al.*, 2010), 배양법의 경우 초기 실험실 환경에서는 적은 수의 세균 종만이 배양되었으나, 배양조건과 방법이 개발되면서 다양한 종의 세균이 배양 가능하게 되었다(Dupont *et al.*, 2013). 그러나 이러한 배양법에도 한계가 있어 16S rRNA gene에 기반한 T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), clone library, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), 454 pyrosequencing 등 다양한 분자적 방법을 활용하여 난배양 세균을 포함한 해면 공생세균 군집의 구조를 규명하고 있다(Lee *et al.*, 2010). 다양한 방법을 통

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

해 밝혀진 해면공생세균은 지금까지 29문(phylum)이 발견되었으며, 이 중 *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Nitrobacteria*, *Poribacteria*, 6개의 문은 해면으로부터 자주 관찰되는 세균그룹이다(Dupont *et al.*, 2013). *Cinachyrella* 속 해면은 해면동물 중 가장 많은 종을 포함하는 *Demospongiae* 강(class)에 속하는 해면으로 *Cinanthrenol A*, *Cinachyramine*과 같은 다양한 천연물질을 생산하는 것으로 알려져 있으며(Shimogawa *et al.*, 2006; Machida *et al.*, 2014), *Plakortis* 속 해면은 *Homoscleromorpha* 강, *Homosclerophorida* 목(order), *Plakonidae* 과(family)에 속하는 해면으로 이 과의 해면은 alkaloids, glycolipids 그리고 polyketides를 포함하여 구조적으로 새로운 생리활성물질들이 발견이 되고 있어 천연물화학자들에게 많은 주목을 받고 있다(Oh *et al.*, 2013). 본 연구에서는 남태평양에 위치한 마이크로네시아 축(Chuuk)주의 동일지역에서 채집한 *Cinachyrella*와 *Plakortis* 속의 열대 해양 해면을 대상으로 비배양에 근거한 16S rRNA gene PCR-DGGE 방법을 이용하여 공생세균의 계통학적 다양성을 밝히고 군집구조 차이를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

해면 시료의 채집

해양 해면 *Cinachyrella* sp.와 *Plakortis* sp.에 공생하는 세균의 다양성을 조사하기 위하여 남태평양 마이크로네시아 축(Chuuk)주에서 2012년 2월에 스쿠버 다이빙을 이용하여 약 21-25 m 깊이의 바다에서 해면을 채집하였다. 연구에 사용한 두 종의 해면은 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 처리한 후 lysozyme (Sigma) 10 mg을 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 이어 5 µl의 10% SDS를 넣어 65°C에서 5분간 처리한 후 phenol:chloroform (1:1, Sigma)을 넣고 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)로 DNA 추출한 후 DGGE를 위한 PCR 반응의 주형으로 사용하였다.

16S rRNA gene의 PCR-DGGE 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), 각각의 primer 10 pmol, 그리고 100 ng의 시료 DNA를 1 µl 첨가하여 최종부피 50 µl이 되도록 하여 PCR 반응을 수행하였다. My Cyclor™ thermal cycler (Bio-Rad)를 이용하여 94°C에서 40초간 냉각, 65°C (1회 당 0.5°C touch down)에서 40초간 변성, 72°C에서 1분간 신장, 이 과정을 30회 반복 수행한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 신장시켰다. 증폭된 DNA의 확인을 위해 PCR 반응액 2 µl를 취하여 2% 아가로즈젤 (Biopure)을 이용하여 Mupid-ex (ADVANCE)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)을 이용하여 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 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.

DGGE 밴드의 동정

DGGE 젤 상에서 분리된 밴드를 젤에서 잘라내어 50 µl의 증류수가 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)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 CLUSTALW (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

2012년 2월 남태평양 마이크로네시아의 चुुक(Chuuk)의 동일 지역에 서식하며 서로 다른 속(genus)에 속하는 두 개체의 해양 해면 *Cinachyrella* sp.와 *Plakortis* sp.의 공생세균의 계통학적 다양성을 알아보기 위하여 16S rRNA gene PCR-DGGE 방법을 사용하여 조사하였다. 해면 시료로부터 추출한 유전체 DNA를 주형으로 16S rRNA gene의 V3영역을 증폭하여 194 bp의 예상된 크기의 PCR 산물을 얻었다. 동일 개체의 해면인

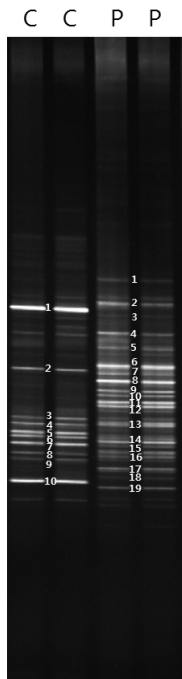


Fig. 1. DGGE banding patterns of amplified 16S rRNA gene obtained from *Cinachyrella* sp. (C) and *Plakortis* sp. (P).

경우 동일한 DGGE 밴드 패턴을 나타내어 이 실험의 재현성을 확인할 수 있었다(Fig. 1). DGGE 밴드 유형은 서로 다른 두 속의 해면 *Cinachyrella* sp.와 *Plakortis* sp.에서 서로 다른 패턴을 나타내었으며, *Cinachyrella* sp.에서 10개, *Plakortis* sp.에서 19개의 주요 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 1). DGGE 밴드가 나타내는 세균 다양성을 파악하기 위하여 16S rRNA gene의 부분 염기서열을 분석하였다.

염기서열 분석

DGGE의 밴드 패턴으로부터 공생세균 군집구조를 분석하기 위하여, 확인된 DGGE의 밴드에서 DNA를 추출하여 염기서열을 분석하였다. 총 29개 밴드에 대한 염기서열을 확인할 수 있었으며, 결정된 서열들은 기존에 알려진 염기서열과 85%에서 100%의 상동성을 나타내었다(Table 1). DGGE 밴드로부터 분석된 대부분의 서열들은 배양되지 않은 세균(uncultured bacterium)들과 높은 상동성을 나타내었다. 일반적으로 자연계에서 실제 배양 가능한 종은 전체 미생물 군집의 1-10% 이하인 것으로 알려진 바와 같이 본 연구에서 조사된 두 종의 해면에 존재하는 공생세균 역시 배양되지 않은 세균이 높은 비율로 존재하는 것을 알 수 있었다.

해면 *Cinachyrella* sp.의 공생세균의 염기서열은 기존에 알려진 염기서열과 87-100%의 상동성을 나타내었다(Table 1). DGGE 밴드에서 C-1과 C-9는 uncultured chloroflexibacterium과 각각 97%와 95%의 상동성을 나타내었으며 C-2와 C-6은 각각 uncultured deltaproteobacterium과 95%와 98%의 상동성을 나타내었다. DGGE 밴드 C-3과 C-5는 uncultured gammaproteobacterium과 각각 96%, 95%의 상동성을, C-4는 uncultured bacteroidetesbacterium과 100%, C-7은 uncultured alphaproteobacterium과 90%, 그리고 C-10은 uncultured actinobacterium과 87%의 상동성을 나타내었다.

해면 *Plakortis* sp.의 공생세균의 염기서열은 기존에 알려진 염기서열과 85-100%의 상동성을 나타내었다(Table 1). DGGE 밴드 P-1은 uncultured spirochaetesbacterium과 94%의 상동성을 나타내었고, P-2, P-3, P-4, P-8, P-10, P-11, P-12, P-13, P-15, P-16, P-17 그리고 P-18은 uncultured chloroflexibacterium과 89-100%의 상동성을 나타내었다. DGGE 밴드 P-5는 uncultured deltaproteobacterium과 97%, P-6은 uncultured chromatiaaceae bacterium과 85% 그리고 P-7은 uncultured actinobacterium과 87%의 상동성을 각각 나타내었다. DGGE 밴드 P-9는 uncultured firmicutesbacterium과 91%, P-14는 uncultured *Kordiimonas* sp.와 87% 그리고 P-19는 uncultured alphaproteobacterium과 97%의 상동성을 각각 나타내었다.

Table 1. Phylogenetic affiliation of re-amplified DGGE bands derived from the marine sponges *Cinachyrella* sp. (C) and *Plakortis* sp. (P)

DGGE band	Closest relative	Accession no.	% Sequence similarity	Phylum
C-1	Uncultured chloroflexi bacterium	JN596753	97	<i>Chloroflexi</i>
C-2	Uncultured deltaproteobacterium	HQ532205	98	<i>Deltaproteobacteria</i>
C-3	Uncultured gammaproteobacterium	HQ270412	96	<i>Gammaproteobacteria</i>
C-4	Uncultured bacteroidetes bacterium	HM593585	100	<i>Bacteroidetes</i>
C-5	Uncultured gammaproteobacterium	JF948717	95	<i>Gammaproteobacteria</i>
C-6	Uncultured deltaproteobacterium	AM259927	95	<i>Deltaproteobacteria</i>
C-7	Uncultured alphaproteobacterium	JX843936	90	<i>Alphaproteobacteria</i>
C-8	Uncultured geobacteraceae bacterium	EF669382	94	<i>Deltaproteobacteria</i>
C-9	Uncultured chloroflexibacterium	KC200490	95	<i>Chloroflexi</i>
C-10	Uncultured actinobacterium	JN392336	87	<i>Actinobacteria</i>
P-1	Uncultured spirochaetesbacterium	JN596755	94	<i>Spirochaetes</i>
P-2	Uncultured chloroflexibacterium	JN596753	100	<i>Chloroflexi</i>
P-3	Uncultured chloroflexibacterium	AM905027	98	<i>Chloroflexi</i>
P-4	Uncultured chloroflexibacterium	JN210605	99	<i>Chloroflexi</i>
P-5	Uncultured deltaproteobacterium	HQ270236	97	<i>Deltaproteobacteria</i>
P-6	Uncultured Chromatiaceae bacterium	HQ003533	85	<i>Gammaproteobacteria</i>
P-7	Uncultured actinobacterium	EU818989	87	<i>Actinobacteria</i>
P-8	Uncultured chloroflexibacterium	AY534092	99	<i>Chloroflexi</i>
P-9	Uncultured firmicutesbacterium	GU826564	91	<i>Firmicutes</i>
P-10	Uncultured chloroflexibacterium	JN596750	98	<i>Chloroflexi</i>
P-11	Uncultured chloroflexibacterium	JN596725	98	<i>Chloroflexi</i>
P-12	Uncultured chloroflexibacterium	JN596720	100	<i>Chloroflexi</i>
P-13	Uncultured chloroflexibacterium	JN596671	100	<i>Chloroflexi</i>
P-14	Uncultured <i>Kordiimonas</i> sp.	DQ917831	87	<i>Alphaproteobacteria</i>
P-15	Uncultured chloroflexibacterium	JN596673	89	<i>Chloroflexi</i>
P-16	Uncultured chloroflexibacterium	EU819048	100	<i>Chloroflexi</i>
P-17	Uncultured chloroflexibacterium	JN596746	95	<i>Chloroflexi</i>
P-18	Uncultured chloroflexibacterium	JN596657	98	<i>Chloroflexi</i>
P-19	Uncultured alphaproteobacterium	EU361505	97	<i>Alphaproteobacteria</i>

계통학적 분석

각 DGGE 밴드에서 유래한 16S rRNA gene의 염기서열로부터 계통수를 작성하고 계통학적 다양성을 분석하였다. 결과, 두 해면에서 유래한 세균그룹은 전체 6문(phylum) 8강(class)으로 나뉘어졌으며(Fig. 2), 해면 *Cinachyrella* sp.의 주요 공생세균 군집은 *Alphaproteobacteria* (10%), *Gammaproteobacteria* (20%), *Deltaproteobacteria* (30%), *Actinobacteria* (10%), *Bacteroidetes* (10%), *Chloroflexi* (20%), 4문 6강으로 구성되며, 해면 *Plakortis* sp.의 주요 공생세균의 군집구조는 *Alphaproteobacteria* (11%), *Gammaproteobacteria* (5%), *Deltaproteobacteria* (5%), *Actinobacteria* (5%), *Chloroflexi* (63%), *Firmicutes* (5%), *Spirochaetes* (5%)의 5문 7강으로 구성된 것

으로 나타났다(Fig. 3).

두 종의 해면에서 *Actinobacteria*, *Chloroflexi* 그리고 *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Gamma*-, *Delta*-)는 공통적으로 발견되었으며(Figs. 2 and 3), 이 3개의 문은 지금까지 밝혀진 해면공생세균 29개의 문 중 자주 관찰되는 6개의 문에 속하는 세균그룹이다(Dupont *et al.*, 2013). *Proteobacteria*의 경우, 해면 *Cinachyrella* sp.에서는 60%로 나타나 우점 세균그룹이었는데 비하여 *Plakortis* sp.에서는 21%만을 점유하였다. 한편, *Plakortis* sp. 해면의 우점 세균 그룹은 *Chloroflexi* (63%)로, 두 종의 해면에서 우점 세균그룹에 있어 차이를 나타내었다. 해양 해면의 공생세균 그룹 중 많은 생리활성 물질을 생산하는 것으로 알려진 *Actinobacteria* (Imamura *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 2012)는 본 실험에 사용된 두 종의 열대 해면에서 공통적으로

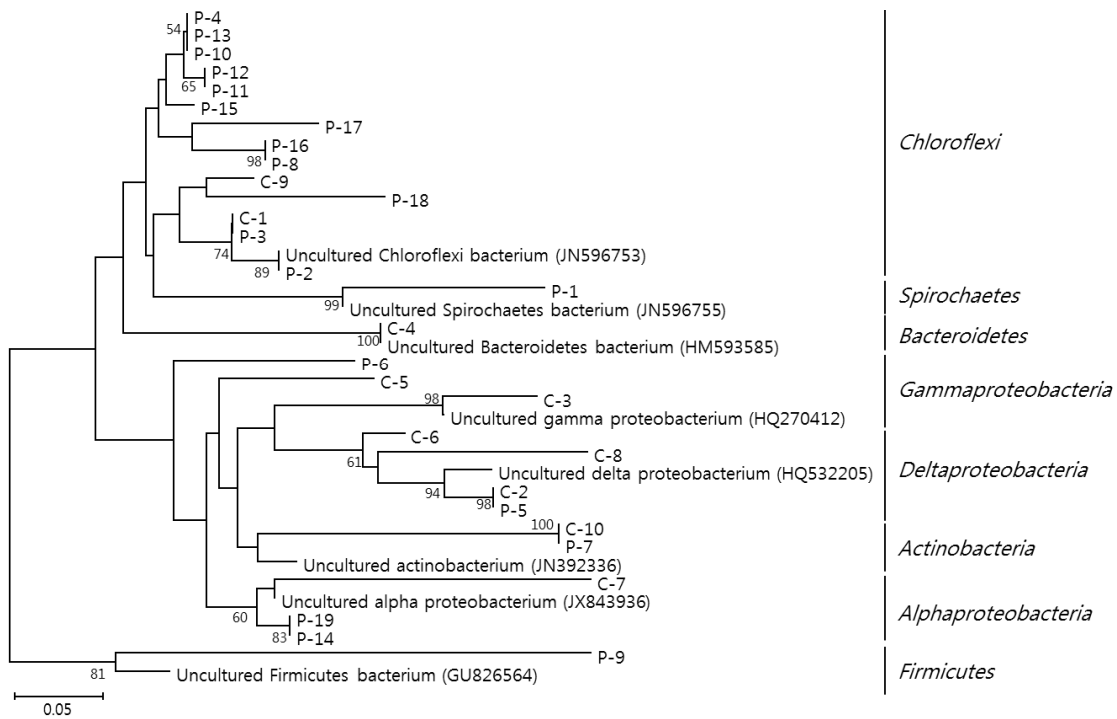


Fig. 2. Phylogenetic tree from analysis of 16S rRNA gene sequences of DGGE bands from *Cinachyrella* sp. and *Plakortis* sp. Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis (>50%) from 1,000 replicates. The scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position.

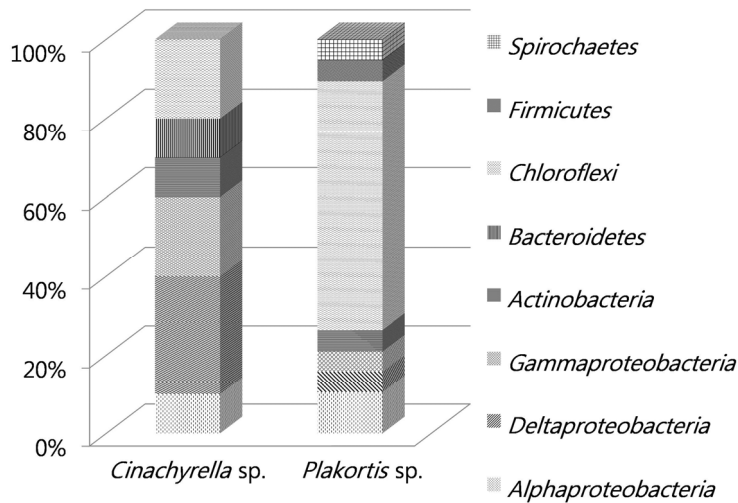


Fig. 3. Comparison of bacterial community based on 16S rRNA gene-V3 in *Cinachyrella* sp. and *Plakortis* sp.

발견되었는데 두 종의 해면에서 다양한 생리 활성물질이 생산된다는 것은 위에서 설명한 바와 같다. 공통 세균 그룹의 하나인 *Chloroflexi*는 해면에서 3-hydroxypropionate pathway를 통해 무기물을 유기물로 바꾸는 영양동화작용을 돕는 것으로 알려져 있다(Brock *et al.*, 1984; Brück *et al.*, 2012).

Cinachyrella sp. 해면은 주요 공통 세균 그룹 외에 *Bacteroidetes*

를 더 포함하는 것으로 나타났다. 이 문에 속하는 세균은 해양 생태계에서 매우 다양하고 풍부하게 존재하며 고분자 유기물질을 분해하는 주요 세균 그룹으로 알려져 있다(Cottrell and Kirchman, 2000; O’Sullivan *et al.*, 2006). *Plakortis* sp. 해면의 경우, *Firmicutes*와 *Spirochaetes* 세균 그룹을 더 포함하여 *Cinachyrella* sp.와는 다른 공생세균 군집구조를 갖는 것으로

나타났다. 즉, 동일 서식지에서 채집된 *Cinachyrella* sp.와 *Plakortis* sp.의 공생세균 군집구조는 해면 종에 따른 차이를 나타내었다.

남태평양 축(Chuuk)의 동일지역에서 채집한 두 종의 해면의 공생세균 군집 다양성에 관한 Park (2010)의 연구에 따르면, *Callyspongia* sp. 해면에서는 3문 4강이, *Hyrtios* sp. 해면에서는 6문 7강이 검출되어 공생세균 군집구조에서 차이를 나타내었다. 또한 홍해에서 채집한 *Hyrtios erectus*와 *Amphimedon* sp. 해면의 공생세균 군집구조의 분석 결과(Radwan *et al.*, 2010)에서도 각각 7문 9강, 5문 7강의 세균 문이 발견되어 해면 종에 따른 차이를 나타내었다. 이는 동일 서식지의 해면이라도 종에 따라 공생세균의 군집구조가 서로 다르게 나타난 본 연구 결과와 일치하는 것이다.

한편, 우리나라 제주도에서 채집한 *Cinachyrella* sp. (Cho *et al.*, 2010)와 본 연구에 사용된 마이크로네시아 축(Chuuk)에서 채집한 *Cinachyrella* sp.의 공생세균 군집구조를 비교하면 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* 그리고 *Actinobacteria*가 공통으로 존재하였으나, 마이크로네시아에서 채집한 해면의 경우 *Deltaproteobacteria*, *Bacteroidetes* 그리고 *Chloroflexi* 세균그룹이 더 존재하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 동일한 속의 해면일지라도 공생세균은 서식지에 따른 지리적 군집을 형성하며(Zhang *et al.*, 2014), 주변 환경과 생태학적 필요에 따라 숙주 특이적인 세균의 일부 문이 선택된다는 연구 결과(Radwan *et al.*, 2010)에 상응하는 것으로 볼 수 있다.

pyrosequencing 방법을 이용한 Cuvelier 등(2014)의 연구에 따르면 대서양에서 채집한 *Cinachyrella*속 해면 6개체의 공생 미생물의 군집구조에서 우점 세균그룹으로 *Proteobacteria*가 검출되어 본 실험에 사용한 *Cinachyrella* 해면의 우점 세균그룹과 일치하였다. 반면, 전체 군집구조에 있어서는 이들의 연구에서는 17개의 세균그룹이 더 검출된 바, 이는 방법에 따른 차이를 반영한 것으로 생각된다. Pyrosequencing에 의한 경우 0.07% 이상 점유하는 세균 그룹들은 검출이 가능한 것으로 (Cuvelier *et al.*, 2014) 알려져 있다.

*Plakortis*속 해면 중 카리브해에서 채집된 *P. halichondrioides*의 경우(Della Sala *et al.*, 2014), 본 실험에 사용한 *Plakortis* sp.의 공생세균 군집구조와 비교할 때 *Proteobacteria*, *Acidobacteria* 그리고 *Chloroflexi*의 공통 세균그룹 외에 *Acidobacteria*, *Nitrospira* 그리고 *Gemmatimonadetes*가 더 검출되었다. 반면 본 실험에 사용한 *Plakortis* sp.의 경우 *Firmicutes*와 *Spirochaetes*가 더 검출되어 주요 세균군집 구조에 있어 차이를 나타내었다. 결론적으로 동일지역에서 채집한 서로 다른 두 종의 해면은 각각 다른 공생세균 군집구조를 나타내어 해면 종에 따른

숙주 특이적 분포를 나타내는 것으로 판단할 수 있다.

공생세균의 숙주특이적 분포의 경향성을 파악하기 위해서는 다양한 방법을 통하여 다양한 지역으로부터 해면을 채집하여 분석할 필요가 있다. 본 실험에 사용한 16S rRNA gene에 근거한 PCR-DGGE 방법은 해면공생세균의 군집구조를 분석하는데 신속하고 비용 대비 효과적인 방법(Bauvais *et al.*, 2015)이나 DNA추출 방법에 따라 우점 그룹이 달라진다는 연구가 제시되었고(Hardoim *et al.*, 2009), 최근 pyrosequencing과 같은 high-throughput method를 이용할 경우 매우 광범위한 미생물 군집의 검출이 가능하다. 그러나 젤 전기영동의 밴드 패턴의 차이를 가시적으로 확인할 수 있는 DGGE 방법은 여전히 해면 공생 세균의 대략적인 군집 구조를 파악하는 데 매우 유용하다(Poppell *et al.*, 2014). 해면 공생세균 군집구조의 다양성에 관한 연구는 전 세계 해역으로부터 채집한 다양한 종의 해면을 대상으로 진행되고 있으며(Della Sala *et al.*, 2014; Dupont *et al.*, 2014), 이는 해면으로부터 생산되는 유용 생리활성물질을 안정적으로 획득하기 위한 선행 연구로써 매우 중요하다.

적 요

2012년 2월 남태평양 마이크로네시아 축(Chuuk)에서 채집한 두 종의 해양해면 *Cinachyrella* sp.와 *Plakortis* sp.의 공생세균의 군집구조를 PCR-DGGE 방법을 사용하여 조사하였다. *Cinachyrella* sp.와 *Plakortis* sp. 해면의 total genomic DNA에서 16S rRNA gene-V3 부분을 증폭하여 DGGE를 수행하였으며, 두 종의 해면에서 서로 다른 밴드 패턴이 나타났다. DGGE 밴드로부터 16S rRNA gene의 부분 염기서열을 분석한 결과, 알려진 균주의 염기서열들과 87-100%의 유사도를 나타내었다. *Cinachyrella* sp.의 공생세균 군집구조는 *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, 그리고 *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Gamma*-, *Delta*-), 6강으로 구성되었다. *Plakortis* sp.의 공생세균 군집구조는 *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Spirochaetes* 그리고 *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Gamma*-, *Delta*-), 7강으로 구성되었다. 두 종의 해면에서 *Actinobacteria*, *Chloroflexi*와 *Proteobacteria*가 공통적으로 존재하였으나 주요 세균군집은 서로 다른 것으로 나타났다. 즉 *Cinachyrella* sp.의 경우 *Proteobacteria*가, *Plakortis* sp.의 경우, *Chloroflexi*가 주요 세균 군집이었다. 동일지역에서 채집한 서로 다른 두 종의 해면은 각각 다른 공생세균 군집구조를 나타내어 해면 종에 따른 숙주 특이적 분포를 보이는 것으로 나타났다.

감사의 말

이 논문은 2013년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원(PJT200254)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Bauvais, C., Zirah, S., Piette, L., Chaspoul, F., Domart-Coulon, I., Chapon, V., Gallice, P., Rebuffat, S., Perez, T., and Bourguet-Kondracki, M.L. 2015. Sparging up metals: Bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. *Mar. Environ. Res.* **104**, 20–30.
- Brock, T.D., Madigen, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 1984. Biology of microbiology. Prentice Hall, International (UK) London.
- Brück, W.M., Reed, J.K., and McCarthy, P.J. 2012. The bacterial community of the lithistid sponge *Discodermia* spp. as determined by cultivation and culture-independent methods. *Mar. Biotechnol.* **14**, 762–773.
- Cho, H.H., Shim, E.J., and Park, J.S. 2010. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponges, *Spirastrella abata* and *Cinachyrella* sp. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 177–182.
- Cottrell, M.T. and Kirchman, D.L. 2000. Natural assemblages of marine *Proteobacteria* and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1692–1697.
- Cuvelier, M.L., Blake, E., Mulheron, R., McCarthy, P.J., Blackwelder, P., Thurber, R.L.V., and Lopez, J.V. 2014. Two distinct microbial communities revealed in the sponge *Cinachyrella*. *Front. Microbiol.* **4**, doi: 10.3389/fmicb.2014.00581.
- Della Sala, G., Hochmuth, T., Teta, R., Costantino, V., and Mangoni, A. 2014. Polyketide synthases in the microbiome of the marine sponge *Plakortis halichondrioides*: A metagenomic update. *Mar. Drugs* **12**, 5425–5440.
- Dupont, S., Carré-Mlouka, A., Descarrega, F., Ereskovsky, A., Longeon, A., Mouray, E., Florent, I., and Bourguet-Kondracki, M.L. 2014. Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge *Phorbastenia tenacior* (Porifera, Demospongiae). *Let. Appl. Microbiol.* **58**, 42–52.
- 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.
- Haber, M. and Ilan, M. 2014. Diversity and antibacterial activity of bacteria cultured from Mediterranean *Axinella* spp. sponges. *J. Appl. Microbiol.* **116**, 519–532.
- Hardoim, C.C., Costa, R., Araujo, F.V., Hajdu, E., Peixoto, R., Lins, U., Rosado, A.S., and van Elsas, J.D. 2009. Diversity of bacteria in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3331–3343.
- Hentschel, U., Usher, K.M., and Taylor, M.W. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**, 167–177.
- Imamura, N., Nishijima, M., Adachi, K., and Sano, H. 1993. Novel antimycin antibiotics, urauchimycins A and B, produced by marine actinomycete. *J. Antibiot.* **46**, 241–246.
- 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., 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.
- Khan, S.T., Takagi, M., and Shin-ya, K. 2012. Actinobacteria associated with the marine sponges *Cinachyrella* sp., *Petrosia* sp., and *Ulosa* sp. and their culturability. *Microbes Environ.* **27**, 99–104.
- Lee, O.O., Wang, Y., Yang, J., Lafi, F.F., Al-Suwailam, A., and Qian, P.Y. 2010. Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. *ISME J.* **5**, 650–664.
- Machida, K., Abe, T., Arai, D., Okamoto, M., Shimizu, I., de Voogd, N.J., Fusetani, N., and Nakao, Y. 2014. Cinanthrenol A, an estrogenic steroid containing phenanthrene nucleus, from a marine sponge *Cinachyrella* sp. *Org. Lett.* **16**, 1539–1541.
- O'Sullivan, L.A., Rinna, J., Humphreys, G., Weightman, A.J., and Fry, J.C. 2006. Culturable phylogenetic diversity of the phylum 'Bacteroidetes' from river epilithon and coastal water and description of novel members of the family *Flavobacteriaceae*: *Epilithonimonas tenax* gen. nov., sp. nov. and *Persicivirga xylanidelens* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 169–180.
- Oh, J.S., Hwang, B.S., Kang, O.H., Kwon, D.Y., and Rho, J.R. 2013. New constituents from the Korean sponge *Plakortis simplex*. *Mar. Drugs* **11**, 4407–4418.
- 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.
- Poppell, E., Weisz, J., Spicer, L., Massaro, A., Hill, A., and Hill, M. 2014. Sponge heterotrophic capacity and bacterial community structure in high- and low-microbial abundance sponges. *Mar. Ecol.* **35**, 414–424.
- Radwan, M., Hanora, A., Zan, J., Mohamed, N.M., Abo-Elmatty, D.M., Abou-El-Ela, S.H., and Hill, R.T. 2010. Bacterial community analyses of two Red Sea sponges. *Mar. Biotechnol.* **12**, 350–360.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Shimogawa, H., Kuribayashi, S., Teruya, T., Suenaga, K., and Kigoshi, H. 2006. Cinachyramine, the novel alkaloid possessing a hydrazone and two aminals from *Cinachyrella* sp. *Tetrahedron Lett.* **47**, 1409–1411.

- Sun, W., Dai, S., Jiang, S., Wang, G., Liu, G., Wu, H., and Li, X.** 2010. Culture-dependent and culture-independent diversity of *Actinobacteria* associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve* from the South China Sea. *Antonie van Leeuwenhoek*. **98**, 65–75.
- 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. CLUSTALW: 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.
- Wang, G.** 2006. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 545–551.
- Wang, X., Brandt, D., Thakur, N.L., Wiens, M., Batel, R., Schröder, H.C., and Müller, W.E.** 2013. Molecular cross-talk between sponge host and associated microbes. *Phytochem. Rev.* **12**, 369–390.
- Zhang, F., Pita, L., Erwin, P., Abid, S., Lopez-Legentil, S., and Hill, R.** 2014. Symbiotic archaea in marine sponges show stability and host specificity in community structure and ammonia oxidation functionality. *FEMS Microbiol. Ecol.* **90**, 699–707.