

Article

해양 원형 규조류 *Cyclotella meneghiniana* 성장 연관 미생물 군집구조 분석:  
배양단계에 따른 증거

최원지 · 박범수 · 곽야옥 · 기장서\*

상명대학교 생명공학과  
(03016) 서울특별시 종로구 홍지문2길 20

Associated Bacterial Community Structures with the Growth of the Marine  
Centric Diatom *Cyclotella meneghiniana*: Evidence in Culture Stages

Won-Ji Choi, Bum Soo Park, Ruoyu Guo, and Jang-Seu Ki\*

Department of Biotechnology, Sangmyung University  
Seoul 03016, Korea

**Abstract** : There are a number of pieces of evidences that suggest a link between marine diatoms and microorganisms, but knowledge about related microbial communities is greatly lacking. The present study investigated the microbial community structures related to the growth of the marine diatom *Cyclotella meneghiniana*. We collected free-living bacteria (FLB) and particle-associated bacteria (PAB) at each growth stage (e.g., lag, exponential, stationary and death) of the diatom, and analyzed their bacterial 16S rDNA using pyrosequencing. Metagenomics analysis showed that community structures of FLB and PAB differed considerably with the progress of growth stages. FLB showed higher diversity than PAB, but variation in the different growth stages of *C. meneghiniana* was more evident in PAB. The proportion of the genus *Hoeflea*, belonging to the order Rhizobiales, was dominant in both FLB and PAB, and it gradually increased with the growth of *C. meneghiniana*. However, *Enhydrobacter* clade tended to considerably decrease in PAB. In addition, *Marinobacter* decreased steadily in FLB, but first increased and then decreased in PAB. These results suggest that *Hoeflea*, *Enhydrobacter*, and *Marinobacter* may be closely related to the growth of diatom *C. meneghiniana*.

**Key words** : *Cyclotella meneghiniana*, bacterial community structure, free-living bacteria, particle-associated bacteria

1. 서 론

해양생태계 내에서 식물플랑크톤은 광합성을 통해 무기물을 유기물로 변형시키는 기초생산자의 역할을 하며, 이들에 의해 생성된 유기물은 종속영양미생물의 주요 먹이원으로 알려져 있다(Behrenfeld et al. 2005; Taylor et al. 2014). 따라서, 식물플랑크톤은 미생물의 군집구조 및 현

존량을 결정하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 흥미로운 사실은 미생물도 공생 혹은 기생과 같은 다양한 방식으로 식물플랑크톤의 성장에 영향을 줄 수 있다는 점이다(Buchan et al. 2014). 그 예로, 공생 미생물에서 분비되는 물질(예, 비타민 B 및 시테로포어)이 식물플랑크톤의 성장 촉진이 가능하며(Amin et al. 2009; Cruz-López and Maske 2016), 해양에서 발생하는 식물플랑크톤의 대량번식과 사멸과정에 미생물이 밀접하게 연관되어 있다는 사실이 다양한 연구를 통해서 밝혀졌다(Mayali and Azam

\*Corresponding author. E-mail : kijos@smu.ac.kr

2004; Cruz-López and Maske 2016; Park et al. 2016).

식물플랑크톤은 종에 따라, 지방산, 단백질, 핵산 및 당과 같은 생화학적 조성의 비율 다르기 때문에, 분비되는 용존 유기물(dissolved organic matter, DOM) 및 입자성 유기물(particle organic matter, POM)은 식물플랑크톤 종에 따라 다른 spectra를 나타낼 수 있다(Fernández et al. 1992; Reitan et al. 1994; van Rijssel et al. 2000). 따라서, 식물플랑크톤 종에 따른 DOM과 POM의 변화는 자유유영 미생물(free-living bacteria) 및 부착 미생물(particle-associated bacteria)의 활성 및 군집구조의 변화를 유도할 수 있다. 세포부착 미생물은 뿐만 아니라, 식물플랑크톤의 성장 단계에 따라 DOM과 POM의 변화가 나타날 수 있기 때문에 미생물은 식물플랑크톤의 성장단계와 생리적 상태에 따라서도 그들의 군집구조에 변화가 나타날 수 있다(Grossart et al. 2005). 흥미로운 사실은 식물플랑크톤에 부착된 미생물의 군집구조는 세포 주변의 자유유영미생물 군집과 계통발생학적으로 뚜렷이 구별 될 뿐만 아니라, 식물플랑크톤과의 종 특이적 연관성 또한 자유유영생물과 비교했을 때, 더 강하다는 점이다(DeLong et al. 1993; Crump et al. 1999; Jasti et al. 2005; Rooney-Varga et al. 2005). 따라서 식물플랑크톤 연관된 미생물의 군집 구조 및 역할을 보다 면밀히 규명하기 위해서는 자유유영미생물 및 부착미생물의 군집구조를 동시에 연구하는 것이 중요할 것으로 사료된다.

규조류는 전 세계 해양 및 담수 환경에서 발견되는 단세포 진핵생물이며, 식물플랑크톤의 주요 그룹으로 수서 생태계 먹이사슬의 기반을 형성한다. 또한 규조류는 규산염 껍질을 갖고 있어 퇴적층에 오랫동안 보존되며 수질변화에 민감하게 반응하므로 환경변화를 모니터링 하는 지표생물로 널리 이용되어 왔다(Armbrust et al. 2004). 최근 연구를 통해, 규조류와 미생물은 상호작용을 통해 해양에서 유기 물질과 영양소 순환에 중요한 역할을 수행함이 밝혀졌으나(Grossart et al. 2005), 규조류 성장과 연관된 특정 미생물 군집 및 생물간 상호작용관계는 아직까지도 명확하게 규명되지 않았다. 특히, 부착 미생물의 경우, 식물플랑크톤과 밀접한 종 특이적 상호관계를 나타내어, 연구 가치가 매우 높음에도 불구하고, 해양 생태계 내 다양한 식물플랑크톤 종의 분포로 인해, 현장 시료를 활용한 특정 종과 부착 미생물 사이의 상호관계를 분석하는 것은 매우 어렵다. 최근 이에 대한 대안적 방법으로, 식물플랑크톤 배양체를 활용한 성장연관 미생물 군집 구조와 이들의 상호작용에 대한 연구가 수행된 바 있다(Park et al. 2017).

본 연구에서는 해양 규조류의 성장과 관련이 있는 미생물 군집을 파악하기 위해, 배양이 용이하고 실험실환경에도 형태적 변이가 거의 없어 연구소재로 널리 활용되어

온(Finlay et al. 2002) *Cyclotella meneghiniana* 배양주를 활용하여, 이들의 성장과 연관된 미생물 군집 구조를 분석하고자 하였다. 이를 위해, 실험실에서 배양 된 규조류 *C. meneghiniana*의 성장 단계(유도기, 지수기, 안정기, 사멸기)에서 자유유영 미생물과 세포부착 미생물 시료를 확보하였고, 차세대유전체분석기법(next generation sequencing, NGS)을 이용하여 이들 미생물 군집구조를 조사하였다. 이후, NGS 분석으로 나타난 주요 미생물 종 중에서, *C. meneghiniana*의 성장 단계에 따라 특이적으로 비율이 변화하는 종을 대상으로 식물플랑크톤과 관련 미생물간의 상관관계를 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 규조류 배양주 확보 및 세포 배양

배양주 *C. meneghiniana* (B-407)는 한국해양미세조류은행(부경대학교, 부산)에서 분양 받았으며, 이들 세포는 f/2 배지에서, 염분도 32 psu, 20°C, 12:12시간 명:암 주기를, 그리고 65  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 의 빛 조건에서 배양되었다. 자유유영 미생물과 세포부착 미생물 분리를 위해, *C. meneghiniana*의 성장 곡선을 분석한 후 유도기(2일째), 지수기(10일째), 안정기(21일째) 그리고 사멸기(26일째)에 도달한 배양주를 수확하였다. 세포부착 미생물을 얻기 위해 100 mL의 샘플을 2.0  $\mu\text{m}$  (pore-size)의 멤브레인 필터(Millipore, Cork, Ireland, 직경 47 mm)를 이용하여 여과하고, 여과 된 세포를 멸균된 f/2 배지로 세척하여 자유유영 미생물을 제거하였다. 이후, 여과 액을 0.2  $\mu\text{m}$  (pore-size)의 필터(직경 47 mm)에 통과시켜 자유유영 미생물을 확보하였다. 각각의 필터는 800  $\mu\text{L}$ 의 추출 완충액(100 mM Tris-HCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 100 mM 인산 나트륨, 1.5 M 염화나트륨, 1% CTAB)이 들어있는 2 mL 튜브(Axygen Sciences, CA, USA)에 넣어 DNA가 추출되기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

### DNA 추출

Park et al. (2014)에 사용된 cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 방법으로 모든 시료의 genomic DNA (gDNA)를 추출하였다(Park et al. 2014). 간략히 서술하면, 멤브레인 필터와 DNA 추출용 완충용액이 들어있는 2 mL 마이크로튜브를 액체 질소에 넣어 동결시킨 후, 65°C 수조에서 급속히 해동하는 과정을 3회 반복하여 세포를 용해시켰다. 단백질을 분해효소인 Proteinase K를 TE 완충액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8)에 10 mg mL<sup>-1</sup> 농도로 첨가하여 만든 용액을 8  $\mu\text{L}$ 를 시료에 첨가하여, 37°C에서 30분 동안 처리 후, 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) 80  $\mu\text{L}$ 를 넣어주고, 65°C에서 2시간 동안 반응시켰

다. 이후 같은 부피의 클로로포름-이소아밀 알코올(24:1)로 진탕시킨 후,  $10,000 \times g$ 에서 5분간 원심 분리하였다. 하층액을 3 M 아세트산 나트륨(pH 5.1) 88.8  $\mu$ L를 함유하는 새로운 2 mL 튜브에 옮긴 후, 587  $\mu$ L의 이소프로판올( $\geq 99\%$ )을 첨가한 후,  $14,000 \times g$ 에서 20분간 원심 분리하고, 상층액을 조심스럽게 제거하였다. 마지막으로, 냉각된 70% 에탄올 1 mL를 첨가하고,  $14,000 \times g$ 에서 15분간 원심 분리 후, 상층액을 제거하였다. 실온에서 완전 건조 후, 얻어진 pellet은 100  $\mu$ L의 TE 완충액에 용해시킨 후,  $-20^\circ\text{C}$  냉동고에서 보관하였다.

### 차세대염기분석(NGS) 기법을 활용한 16S rRNA gene 분석

16S rRNA 유전자 염기서열 분석은 NGS 기법을 사용하여 수행하였다. 우선, 추출한 gDNA로부터 미생물 16S rDNA를 범용 프라이머(27F: 5'-GAG TTT GAT CMT GGC TCA G-3', Lane 1991; 518R: 5'-TTA CCG CGG CTG CTG G-3', Muyzer et al. 1993; Lane 1991)와 중합효소연쇄반응(PCR)을 사용하여 증폭하였다. 각 프라이머는 다중 프라이머 식별자(multiple identifier, MID)를 5' 말단에 표지하였으며, 파이로시퀀싱에서 생성된 염기서열을 분류하는데 활용하였다. 또한, MID와 연결된 27F와 518R은 각각 파이로시퀀싱 프라이머 5'-CGT ATC CCC CCC CCA TCA G-3' 및 5'-CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA G-3'를 붙여서 제작하였다. 메타게노믹스 PCR은 2  $\mu$ L의  $10 \times$  Ex Taq 완충액(TaKaRa, Kyoto, Japan), dNTP 혼합액(4 mM) 2  $\mu$ L, 각 프라이머(10 pM) 1  $\mu$ L, 0.2  $\mu$ L Ex Taq 효소(2.5 U), 그리고 0.1  $\mu$ g만큼의 환경 gDNA로 구성된 20  $\mu$ L 용량의 반응액으로 수행하였다. PCR 사이클은 iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서  $94^\circ\text{C}$ 에서 5분간 DNA를 변성하고, 이어서  $94^\circ\text{C}$ 에서 20초,  $52^\circ\text{C}$ 에서 40초,  $72^\circ\text{C}$ 에서 1분간 총 35 사이클 반복하였으며, 최종으로  $72^\circ\text{C}$ 에서 10분 처리한 후 반응을 종료하였다. 생성된 PCR 산물을 1.0% 아가로오스 겔에서 전기 영동하고, Et-Br (Ethidium bromide) 용액으로 염색한 후, 자외선 하에 관찰하였다.

파이로시퀀싱 과정 전, 증폭된 PCR 산물(각 성장단계로부터 분리된 자유유형 미생물과 세포부착 미생물 샘플)을 PCR 정제 키트(Bionics, Seoul, Korea)를 사용하여 정제한 후, 각각 동일한 양의 정제된 PCR 산물을 함께 혼합하였다. MID-표지 PCR 산물의 파이로시퀀싱은 마크로젠의 상용 서비스를 통하여 454 GS FLX Titanium (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 수행하였다.

### 파이로시퀀싱 처리 및 분석

파이로시퀀싱 염기서열 분석과정이 완료된 후, FLASH

ver. 1.2.11 (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>), CD-HIT-OTU (<http://weizhongli-lab.org/cd-hit-otu/>), 그리고 QIIME (<http://qiime.org>)의 소프트웨어를 이용하여 단편서열 ( $\leq 150$  bp), 저품질 서열, 엽록체 서열 및 미미생물 리보솜 서열을 제거하였다. 이후, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)와 Silva rRNA 데이터베이스(Quast et al. 2012)를 이용하여 유의한 16S rDNA 서열을 확보하였다. 본 연구에서 각각의 염기서열 Operational Taxonomic Unit (OTU)를 0.001 미만의 E 값 수준에서 가장 높은 유사도를 갖는 분류군과 비교하여 속과 종 명을 파악하였다. CD-HIT-OTU 소프트웨어를 이용하여 OTU 클러스터링(97%)을 실시하였고(Li et al. 2012), Mothur 소프트웨어를 이용하여 Shannon-Weaver 다양성 지수와 Chao richness 추정에 사용하였다(Schloss et al. 2009).

### 자유유형 미생물과 세포부착 미생물의 진화적 유연관계 분석

본 연구에서 분석된 각각의 시료의 미생물 분류군중에서 상대적 분포비율이 1% 이상이 되는 OTU를 대상으로 분자계통학적 유연관계를 분석하였다. 이를 위해, 본 연구에서 분석된 OTU 염기서열과 이들과 유사도가 높은 염기서열을 Silva rRNA 데이터베이스로부터 얻은 후, Clustal W 1.8 프로그램을 활용하여, 이들 염기서열을 군집화(alignment)하였다(Thompson et al. 1994). 이후, 양 끝을 동일한 크기로 자르고 불확실하게 정렬된 염기를 제거하여 최종 데이터 행렬을 구성하였다. 분자계통분석은 MEGA6 프로그램내의 neighbor-joining (NJ) 알고리즘을 기반으로 수행하였으며(Tamura et al. 2013), 계통수 분기 지점의 신뢰도를 분석하기 위해 1,000번 반복샘플링을 통해 bootstrap 값을 계산하였다.

### 통계 분석

배양주 *C. meneghiniana* 성장 단계별 미생물의 군집 구조 변화를 조사하기 위해, Bray-Curtis 유사성 데이터의 단일방향 테스트(ANOSIM)와 nonparametric multi-dimensional scaling (nMDS) 분석을 통계 소프트웨어 PRIMER ver. 6 (Clarke and Warwick 2001) 프로그램을 이용하여 수행하였다. 또한, Bray-Curtis 유사도 행렬에서 생성된 nMDS 플롯을 활용하여, 2차원 공간에서 성장 단계별 미생물 군집구조의 차이를 거리로 나타냈다.

## 3. 결 과

### 해양 규조류 *Cyclotella meneghiniana* 배양체 내 미생물의 군집 구조

규조류 *C. meneghiniana*는 실험실 배양조건에서 S자

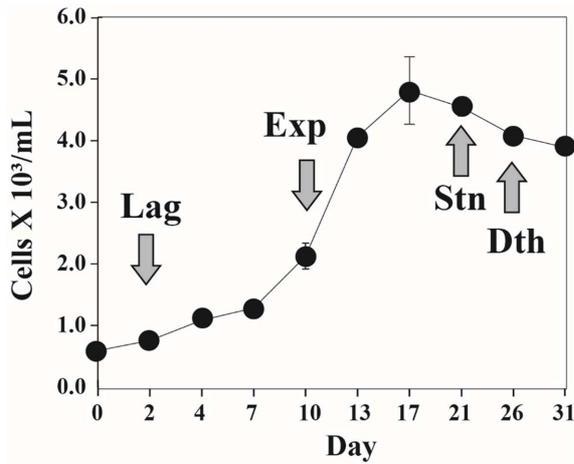


Fig. 1. A growth curve of *Cyclotella meneghiniana*. Arrows represent each sampling point

성장 곡선 모양의 전형적인 생물성장을 하였다(Fig. 1). 자유유형 미생물과 세포부착 미생물의 군집 구조를 결정하기 위해 *C. meneghiniana*의 각 성장단계 별(유도기, 지수기, 안정기, 사멸기)로 시료를 수확하였다.

파이로시퀀싱 분석 결과, 각각의 시료로부터 4,800–11,600개의 염기서열 단편(sequencing reads)을 발굴하였

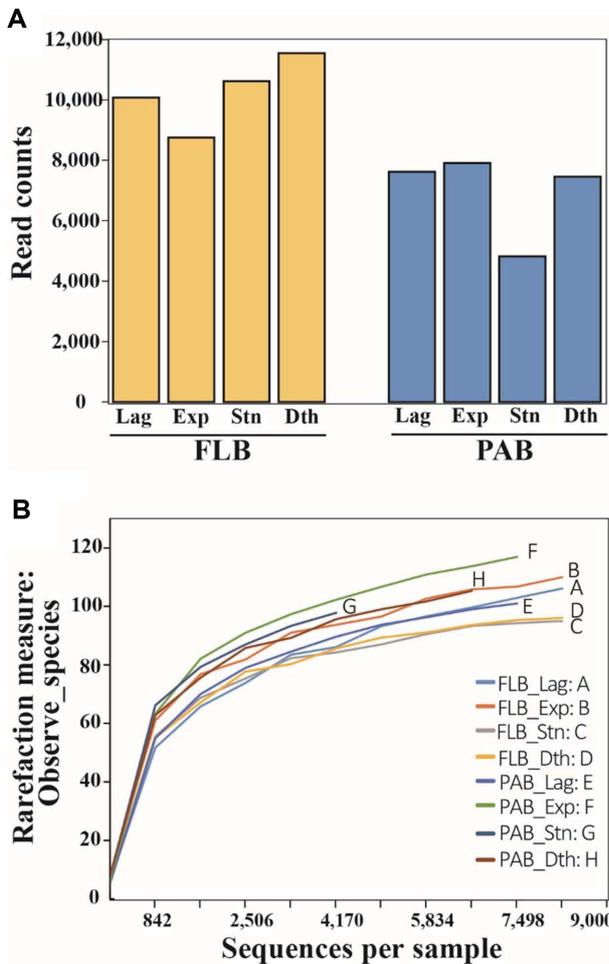


Fig. 2. Read counts (A) and rarefaction curve (B) of lag, exponential (Exp), stationary (Stn) and death (Dth) growth phase of *Cyclotella meneghiniana*. Abbreviations: FLB, free-living bacteria; PAB, particle-associated bacteria

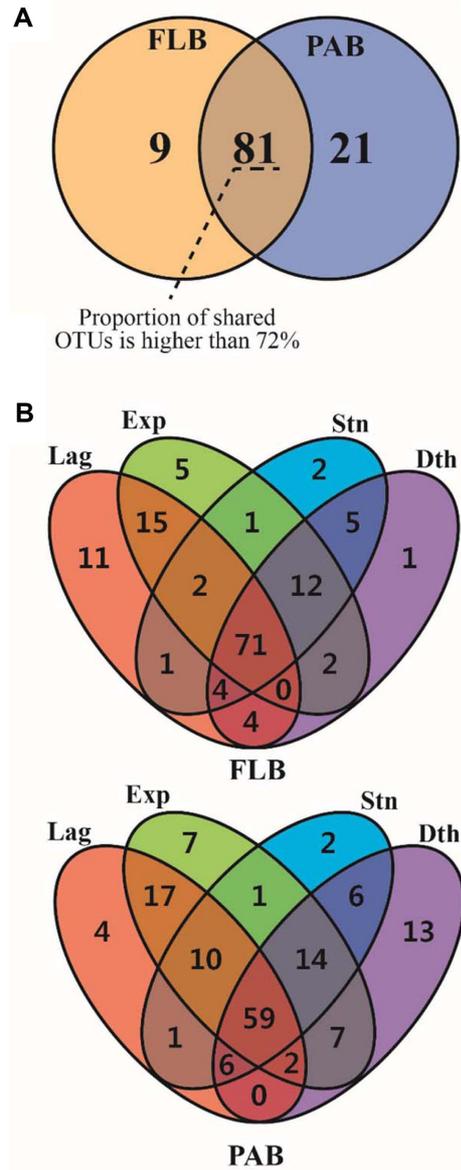


Fig. 3. Bacterial OTU Venn diagrams. Venn diagrams enumerate FLB and PAB OTUs (A), and those shared by and exclusive to lag, exponential (Exp), stationary (Stn) and death (Dth) growth phase of *Cyclotella meneghiniana* (B). The proportion of shared bacteria between FLB and PAB appears in lower-left corner of Venn diagrams (A). Abbreviations: FLB, free-living bacteria; PAB, particle-associated bacteria

으며(Fig. 2A), 희박화 곡선(rarefaction curve)은 모두 포화점에 도달한 것을 확인하였다(Fig. 2B). 이는 파이로시퀀싱으로 분석된 각각의 성장단계 시료별 미생물 군집구

조 자료가 신뢰성을 가지고 있다는 것을 의미한다.

규조류 *C. meneghiniana*의 성장단계별 자유유형 미생물과 세포부착 미생물의 OTU 갯수는 각각 90, 108개로

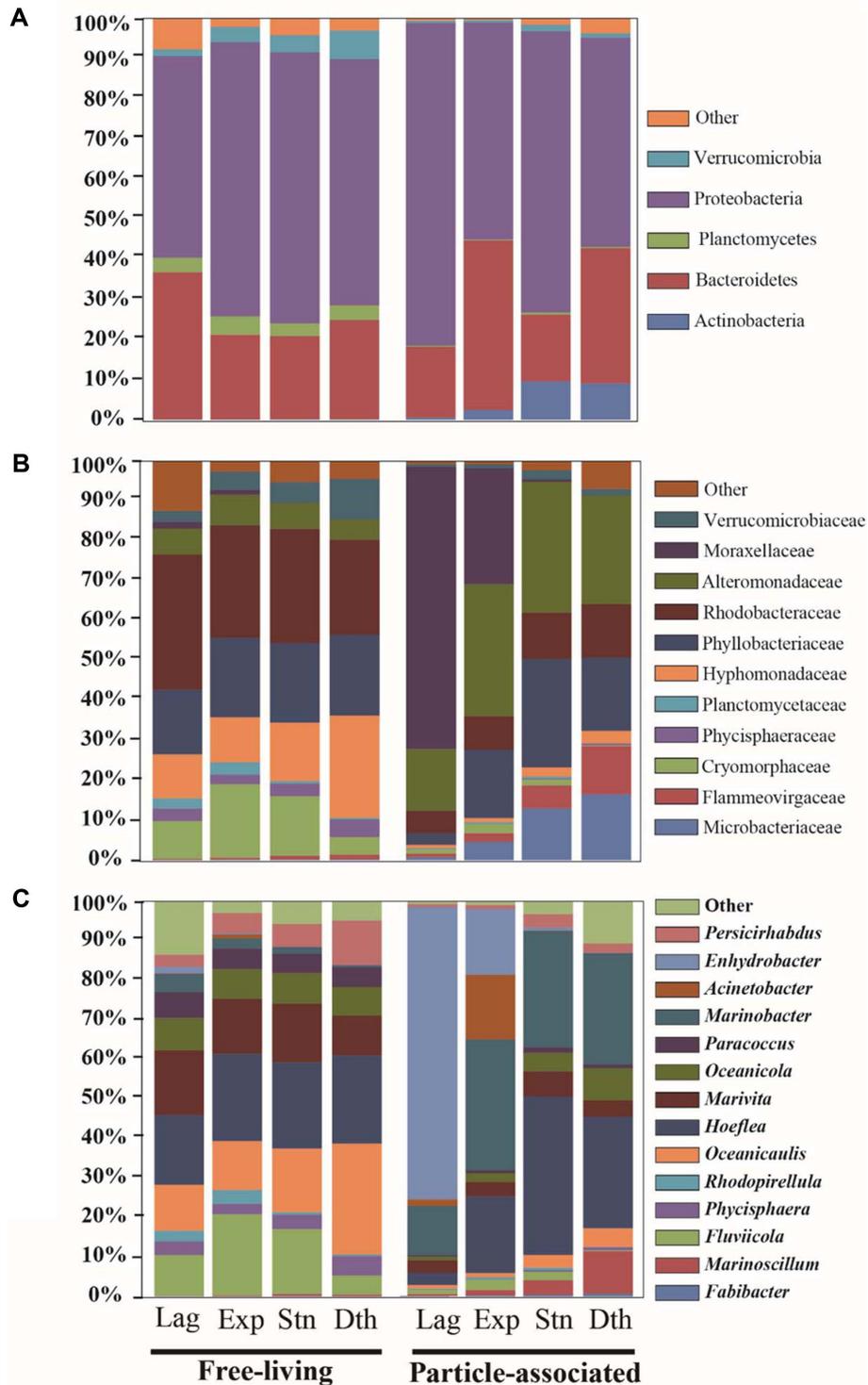


Fig. 4. FLB and PAB community composition in lag, exponential (Exp), stationary (Stn) and death (Dth) growth phase of *Cyclotella meneghiniana*. A: Phylum, B: Family, and C: Genus level

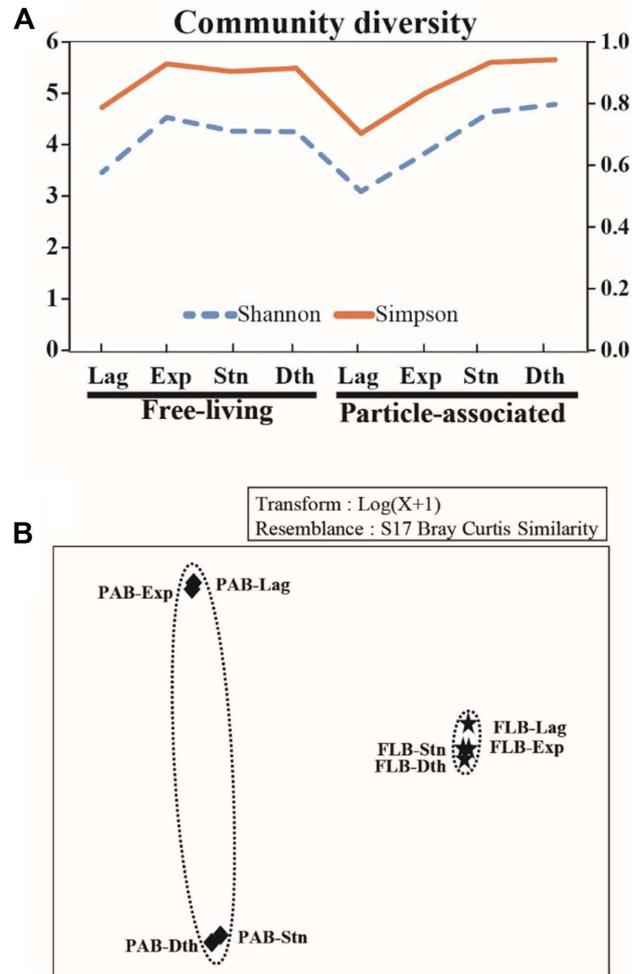
조사 되었으며, 이 중 두 그룹 모두 출현하는 OTU는 81개로 이들의 미생물 군집 내 점유율이 72%로 확인되었다 (Fig. 3). 세포부착 미생물에서만 검출된 OTU는 21개로 자유유형 미생물의 9개 보다 높은 비율(2.3배)을 갖는 것으로 파악되었다. 규조류의 성장단계별 미생물 OTU수는 자유유형 미생물에서 109(유도기), 109(지수기), 98(안정기), 99(사멸기)이며, 세포부착 미생물의 경우 99(유도기), 117(지수기), 99(안정기), 107(사멸기)로 확인된다. 자유유형 미생물과 세포부착 미생물 모두 지수기에서 측정된 미생물 OTU의 개수가 다른 성장 단계들에 비해 높게 측정되었다.

**Cyclotella** 배양체 내 자유유형 미생물과 세포부착 미생물의 군집 차이

규조류 *C. meneghiniana*의 성장단계별 미생물 군집 비율을 각각의 분류군별로 파악하였다(Fig. 4). 각각의 분류군 별로 군집 비율을 확인한 결과, 자유유형 미생물의 경우 Hyphomonadaceae과, Phyllobacteriaceae과, 그리고 Rhodobacteraceae과가 우세한 비율을 차지하며, 세포부착 미생물에서는 Phyllobacteriaceae과, Alteromonadaceae과, 그리고 Moraxellaceae과가 우세한 것으로 확인되었다. 전체적으로, 자유유형 미생물 및 세포부착 미생물군집구조는 *C. meneghiniana*의 성장 단계에 따라 변화가 일어났으며, 그 중 세포부착 미생물 군집 구조는 자유유형 미생물에 비하여 *C. meneghiniana*의 성장 단계에 따라 더 많은 변화를 보였다. 자유유형 미생물에서 대부분의 미생물들이 규조류의 성장단계에 따라 일정한 수준의 비율을 유지하지만 Verrucomicrobiaceae과의 *Persicirhabdus*속 (3.0–11.3%)과, Hyphomonadaceae과의 *Oceanicaulis*속 (11.7–28.1%)은 세포 수가 높아질 수록 증가하는 경향을 나타냈다. 또한, Planctomycetaceae과의 *Rhodopirellula*와 Alteromonadaceae과의 *Marinobacter*는 규조류의 성장단계가 지수기 때 증가하였으나, 이 후 비율이 점차적으로 감소하였다.

세포부착 미생물의 경우 Moraxellaceae과의 *Enhydrobacter*속은 *C. meneghiniana*의 성장단계가 유도기 였을 때 높은 비율로 나타났으나(74%), 지수기 때 큰 폭으로 감소(17%)했으며, 이 후 지속적으로 비율이 감소하였다. 반면, *Marinobacter*, *Oceanicola*, *Hoeflea* 그리고 *Oceanicaulis*속은 성장단계가 지남에 따라, 분포 비율이 점차적으로 증가하였다. 특이점으로는 Moraxellaceae과의 *Actinobacter*속이 규조류의 성장단계가 지수기였을 때 급격한 증가가 관찰되었으나, 이후 큰 폭으로 감소하여 사멸기에서는 매우 낮은 비율로 분포하였다.

Shannon과 Simpson 지수를 비교해 보았을 때 규조류의 각각 성장 단계에 따라 자유유형 미생물의 군집 구조는

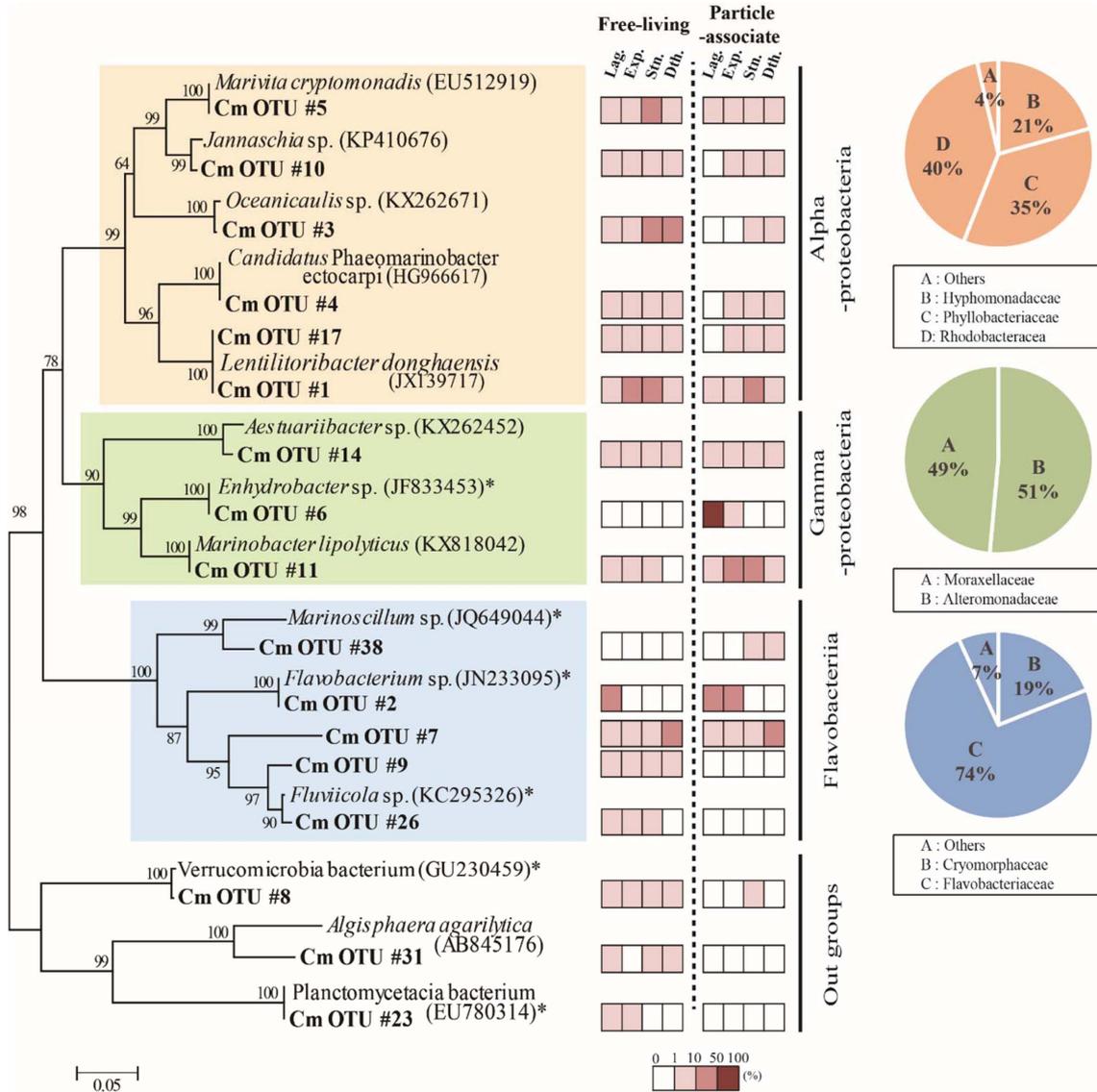


**Fig. 5.** Free-living and particle-associated bacterial community diversity in lag, exponential (Exp), stationary (Stn) and death (Dth) of *Cyclotella meneghiniana* (A), and a NMDS plot (Bray–Curtis similarity) for analysis of differences within FLB and PAB community structures in each growth phase (B)

세포부착 미생물보다 상대적으로 적은 변화가 나타났다 (Fig. 5A). 또한, nMDS 분석에서 자유유형 미생물과 세포부착 미생물이 뚜렷하게 분리되었으며, 세포부착 미생물은 성장 단계별로 매우 거리가 있는 반면, 자유유형 미생물은 매우 가까운 것이 확인되었다(Fig. 5B).

**분자 계통분석과 상대적 출현 양 비교**

규조류 *C. meneghiniana*의 성장과 연관된 미생물의 분류학적 위치를 파악하기 위해, 각 시료에서 분석된 미생물 군집 중 1% 이상의 출현빈도를 갖는 미생물 분류군을 선별 후(17개의 OTUs), 이를 대상으로 NJ tree 분석을 진행하였다(Fig. 6). 그 결과, 여러 미생물 군집 중에서 Alphaproteobacteria에 속하는 미생물이 다른 미생물 분류



**Fig. 6. Phylogenetic affiliations and relative abundance of OTUs in FLB and PAB that collected from each growth phase of *Cyclotella meneghiniana*, as well as proportion of bacterial taxa (class level) belonging to each phylum. The dendrogram was constructed by using the Neighbor-Joining algorithm of nucleotide substitution. Bootstrap scores more than 50% for branching are shown. Lag, Exp, Stn, and Dth indicate lag, exponential, stationary, and death growth phase. GenBank accession Nos. are placed after species name. Asterisk (\*) represents uncultured bacteria**

군과 비교하였을 때, 상대적으로 다양한 OTU들이 분포하는 것으로 조사되었다.

자유유형 미생물과 세포부착 미생물에서 Cm OTU #3 (6.4–16.7%)과 Cm OTU # 6 (0.0–53.6%)이 각각 제 1 우점종으로 나타났으며, 이 두 개의 OTU는 계통학적으로 *Oceanicaulis* sp.와 *Enhydrobacter* sp.와 진화적으로 가장 유사한 것으로 파악되었다. 세포부착 미생물 군집구조에서 Alphaproteobacteria에 속하는 OTUs (Cm OTU #1, 3, 4, 5, 17)는 규조류의 세포수가 증가함에 따라 이들의 점유율

이 점차적으로 증가하였던 반면, Gammaproteobacteria (Cm OTU #6, 11)는 비율이 감소하였다. 특히, Cm OTU #6은 규조류의 성장단계가 유도기였을 때, 가장 높은 점유율 (61.1%)을 나타냈으나, 지수기 때(9.1%) 큰 폭으로 감소하였다. Cm OTU #1, 17은 *Lentilitoribacter donghaensis*, Cm OTU #4는 *Candidatus Phaeomarinobacter ectocarpi*, 그리고 Cm OTU #5와 #11은 각각 *Marivita cryptomonadis*, *Marinobacter lipolyticus*에 속하였다(Fig. 6). Alphaproteobacteria에 속하는 종들을 과 수준에서 확인한 결과

Rhodobacteraceae (40%), Phyllobacteriaceae (35%), Hyphomonadaceae (21%), 그리고 기타 (4%) 순으로 분포하였다. Gammaproteobacteria는 Alteromonadaceae (51%), Moraxellaceae (49%)과가 분포하고 있으며, Flavobacteriia에서는 Flavobacteriaceae (74%), Cryomorphaeae (19%), 기타 (7%)의 순서대로 분리되었다.

#### 4. 토 의

해양 생태계 내에서 식물플랑크톤 군집의 복잡성으로 인해 특정 식물플랑크톤 종과 상호관계를 가지는 미생물, 특히 상호 관계를 가지는 세포부착미생물 군집을 명확하게 규명하는 것은 매우 어렵다. 실험실내 식물플랑크톤 배양체에서도 현장에서와 유사하게, 식물 플랑크톤의 성장 단계와 생리학적 상태에 따라 유기물의 변화가 나타나며, 이는 미생물 군집에 변화에 영향을 미친다(Fernandez et al. 1992). 뿐만 아니라, 실험실내 배양체의 미생물 군집 구조에 따라, 식물플랑크톤의 성장의 변화가 나타날 수 있다(Bolch et al. 2017). 이러한 이유로, 식물플랑크톤과 상호 관계에 있는 미생물을 규명하기 위해, 다양한 배양체 (*Alexandrium catenella*, *Chattonella marina*, *Cochlodinium polykrikoides* 및 규조류 *Pseudo-nitzschia multiseriata*)가 사용되어 왔다(Bates et al. 2004; Amaro et al. 2005; Park et al. 2014, 2016, 2017). 따라서, 본 연구에서는 규조류 *C. Meneghiniana* 배양체의 성장 단계 별 미생물의 군집구조를 파이로시퀀싱 기법을 활용하여 분석함으로써, 규조류의 성장과 연관있는 미생물 군집을 조사하고자 하였다.

기존의 식물플랑크톤 관련 미생물 군집조성에 관한 연구 결과에 따르면(DeLong et al. 1993; Crump et al. 1999; Jasti et al. 2005; Rooney-Varga et al. 2005), 해양 규조류의 자유유형 미생물과 세포부착 미생물 군집 구조의 차이가 관찰 될 것으로 예상되었다. 실제, 본 연구의 메타게노믹스 분석으로 규조류 *C. meneghiniana*의 4가지 성장 단계에서 자유유형 미생물과 세포부착 미생물 군집의 조성 과 변동이 뚜렷하게 다른 것으로 파악되었으며, 이전의 식물플랑크톤 연구와 유사한 결과를 보였다(Jasti et al. 2005; Rooney-Varga et al. 2005). 규조류 *C. meneghiniana*의 성장단계에 따른 자유유형 미생물에서 *Marivita*, *Hoeflea*, *Oceanicaulis*가 가장 우세한 비율을 차지하고 있으며, 세포부착 미생물의 경우 *Hoeflea*와 *Enhydrobacter*, 그리고 *Marinobacter*가 우점하는 것으로 확인되었다. 자유유형 미생물과 달리, 세포부착 미생물은 다른 미생물들의 활동이나 그들이 생산해 내는 효소를 필요로 하며 식물플랑크톤은 이러한 뚜렷한 미세 서식지를 제공 할 수 있다(Worm and Søndergaard 1998; Bagatini et al. 2014). 이것은 자유유형 미생물 및 세포부착 미생물 군집 구조의 차

이를 유도할 수 있다.

미생물 군집 구조는 실험실과 현장 연구에서 볼 수 있듯이(Bagatini et al. 2014), 식물플랑크톤의 성장 단계와 생리적 상태에 따라 바뀔 수 있다는 것을 제시한다. 또한 미생물은 상리공생에서 기생에 이르는 상호작용을 통해 식물플랑크톤의 성장에 영향을 줄 수 있는데(Buchan et al. 2014), 이와 같은 근거들을 바탕으로, 본 연구결과는 해양 규조류 *C. meneghiniana*의 성장단계와 관련이 있는 미생물의 군집구조를 파악함으로써 식물플랑크톤과 미생물의 상호작용 가능성을 강하게 제시하여 준다.

본 연구에서의 nMDS 분석 결과, 규조류의 각각 성장 단계에 따라 자유유형 미생물의 군집 구조는 세포부착 미생물보다 상대적으로 적은 변화가 나타났다. 아마도 세포부착 미생물은 수서환경에 존재하는 불특정 물질과 식물플랑크톤 자체에서 분비되는 수생 입자에 의해 유도된 특정 미세 환경과 서식지에 의존하기 때문인 것으로 생각된다(Sternberg et al. 1999; Baty et al. 2000; Kiørboe et al. 2001; Simon et al. 1999). 따라서, 상이한 성장 단계는 *C. meneghiniana* 세포의 변화로 인한 미세 환경 조건의 변화로 이어지며, 이로 인해 네 가지 성장 단계를 따라 세포부착 미생물 군집 구조가 급격히 변할 수 있음을 확인할 수 있었다.

자유유형 미생물의 경우 *Oceanicaulis*는 성장단계가 진행될수록 점차 증가하는 경향을 보이지만, 이외의 대부분의 미생물이 *Cyclotella*의 성장이 진행됨에 따라 일정한 수준의 비율을 유지되었다. 세포부착 미생물의 경우 *Enhydrobacter*의 비율이 초반에 특이적으로 매우 높지만, 성장 단계가 진행될수록 큰 폭으로 그 비율이 감소하였다. 그에 반하여 *Marinobacter*, *Hoeflea*는 모든 성장 단계에서 비교적 많은 비율을 차지하며, 시간이 경과함에 따라 비율이 증가하다가 사멸기에 그 비율이 감소하는 것이 확인되었다. *Rhizobiales* 목에 속하는 *Hoeflea*는 자유유형 미생물과 세포부착 미생물 군집에서 모두 높은 비율을 차지하는데, *Hoeflea* 속은 옥신을 제공함으로써 식물플랑크톤의 성장을 촉진시킬 수 있는 것으로 알려져 있으며(Ashen et al. 1999; Seyedsayamdost et al. 2011), 해양 규조류와 공생관계를 가지고 있는 것으로 알려진 *Marinobacter*속 역시 조류 성장에 필수적으로 요구 되는 미량원소 중 하나인 용존성 철분(III)을 공급 할 수 있는 비브리오페린(vibrioferrin)을 분비하는 것으로 알려져 있다(Amin et al. 2012). 따라서, 이를 종합하면, 미생물 군집 중 높은 점유율의 *Hoeflea*와 *Marinobacter*속은 *C. meneghiniana*의 성장에 긍정적으로 기여 할 수 있음을 알 수 있다.

*Pseudomonadales*목에 속하는 *Enhydrobacter*는 자유유형 미생물에서 상대적으로 거의 확인되지 않는(약 0.4%)

반면, 세포부착 미생물에서는 성장단계에 따른 변화를 파악하기에 충분한 비율(약 33.8%)을 차지하였다. 또한 세포부착 미생물에서는 *C. meneghiniana*의 성장에 따라 매우 뚜렷하게 변화하였는데, 특히 *C. meneghiniana*의 성장 유도기 단계에서 그 비율이 약 74.4%으로 매우 높았으며, 지수기에서는 약 12.8%를 차지하며 비율이 크게 감소하다가 안정기와 사멸기에서는 거의 존재하지 않는다. 이로써 *Enhydrobacter*가 세포부착 미생물로서 *C. meneghiniana*의 초기성장과 관련이 있는 것으로 사료되며, 특히 세포의 성장의 결과로 분비되는 물질들에 의해 야기되는 주변 수서 환경의 화학적 조성 변화에 대응하여 *Enhydrobacter*가 경쟁적으로 적응하고 있는 것으로 판단된다(Park et al. 2017).

해양 생태계의 풍부한 1차 생산자 중 하나인 규조류는 수질변화와 같은 환경 변화에 민감하므로 생태적 스트레스의 초기 지표로 간주될 수 있다(Carvalho et al. 2011). 이러한 생태적 중요성과 해양 생태계에서 식물플랑크톤과 미생물 사이의 상호작용이 알려져 왔음에도 불구하고, 특정 미생물과 *C. meneghiniana*의 연관성은 거의 연구되지 않았다. 이번 연구는 NGS 분석을 사용하여 규조류 *C. meneghiniana*와 관련된 미생물 군집을 조사한 최초의 연구이다. 이 연구에 따르면 세포부착 미생물 군집은 자유유영 미생물 군집보다 *C. meneghiniana*의 성장 단계에 더 큰 영향을 받았다. 자유유영 미생물과 세포부착 미생물 군집 구조가 크게 다르더라도, *Hoeflea*와 *Enhydrobacter*, 그리고 *Marinobacter*는 두 미생물의 군집구조에서 *C. meneghiniana*의 성장과 밀접한 관계를 보였다. 이 미생물들은 성장 촉진 물질(비타민 B, 옥신 및/또는 비브리오펜롤 등) 분비를 통해 규조류의 성장에 기여할 수 있으며, 향후 *C. meneghiniana*의 성장을 촉진 또는 억제시키는 메커니즘을 밝혀 내기 위한 연구가 필요하다. 또한 *C. meneghiniana*와 미생물이 밀접한 관계를 유지한다는 점을 더욱 확실하게 하기 위하여, 다수의 규조류 배양체에서 공통적으로 나타나는 미생물 종이 어떤 것이 있는지에 대한 연구 또한 필요하다.

## 5. 요약 및 결론

해양 규조류는 미생물과 상호작용을 통해 살아가고 있으나, 구체적인 미생물 군집구조와 역할은 명확하지 않다. 본 연구는 해양 규조류 *C. meneghiniana*의 성장과정과 관련 있는 미생물 군집구조를 조사하기 위해, *C. meneghiniana* 배양체의 각 성장 단계별 자유유영 미생물과 세포부착 미생물을 파이로시퀀싱 기법으로 분석하였다. 그 결과, 자유유영 미생물과 세포부착 미생물의 군집 구조가 뚜렷하게 다르게 나타났으며, 자유유영 미생물 군집이 세포부착 미

생물군집보다 군집 구조가 다양하게 나타났다. 반면, *C. meneghiniana*의 성장 단계에 걸친 미생물 군집구조 변화는 세포부착 미생물에서 더 많이 관찰되었다. Rhizobiales의 *Hoeflea* 속이 자유유영 미생물과 세포부착 미생물에서 모두 우점하였으며, *C. meneghiniana*의 성장에 따라 그 비율이 점차적으로 증가하였다. 반면, *Enhydrobacter* 속은 감소하는 경향을 보였다. *Marinobacter*는 자유유영 미생물에서 꾸준히 감소하였으나, 세포부착 미생물에서는 일시적으로 큰 폭으로 증가했다가 감소하였다. 이러한 결과는 *Hoeflea*와 *Enhydrobacter*, 그리고 *Marinobacter*가 규조류 *C. meneghiniana* 성장과 밀접하게 관련되어 있음을 시사한다.

## 사 사

이 논문은 2017년도 상명대학교의 지원을 받아 수행된 연구입니다. 이 논문에 좋은 심사 의견을 주신 익명의 심사자에게 감사 드립니다.

## 참고문헌

- Amaro AM, Fuentes MS, Ogalde SR, Venegas JA, Suárez-Isla BA (2005) Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *J Eukaryot Microbiol* **52**(3):191–200
- Amin SA, Green DH, Hart MC, Küpper FC, Sunda WG, Carrano CJ (2009) Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism. *P Natl A Sci USA* **106**:17071–17076
- Amin SA, Green DH, Al Waheeb D, Gärdes A, Carrano CJ (2012) Iron transport in the genus *Marinobacter*. *Biometals* **25**:135–147
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Brzezinski MA (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* **306**:79–86
- Ashen JB, Cohen JD, Goff LJ (1999) GC-SIM-MS detection and quantification of free indole-3-acetic acid bacterial galls on the marine alga *Prionitis lanceolata* (Rhodophyta). *J Phycol* **35**:493–500
- Bagatini IL, Eiler A, Bertilsson S, Klaveness D, Tessarolli LP, Vieira AAH (2014) Host-specificity and dynamics in bacterial communities associated with bloom-forming freshwater phytoplankton. *PLoS One* **9**:e85950
- Bates SS, Gaudet J, Kaxzmarzka I, Ehrman JM (2004) Interaction between bacteria and the domoic-acid-producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Hasle) Hasle; can

- bacteria produce domoic acid autonomously? *Harmful Algae* **3**:11–20
- Baty AE, Eastburn CC, Techkarnjanaruk S, Goodman AE, Geesey GG (2000) Spatial and temporal variations in chitinolytic gene expression and bacterial biomass production during chitin degradation. *Appl Environ Microb* **66**:3574–3585
- Behrenfeld MJ, Boss E, Siegel DA, Shea DM (2005) Carbon-based ocean productivity and phytoplankton physiology from space. *Global Biogeochem Cy* **19**:GB1006. doi:10.1029/2004GB002299
- Bolch CJ, Bejoy TA, Green DH (2017) Bacterial associates modify growth dynamics of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Front Microbiol* **8**:670. doi:10.3389/fmicb.2017.00670
- Buchan A, LeClerc GR, Gulvik CA, González JM (2014) Master recycler: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat Rev Microbiol* **12**:686–698
- Carvalho RN, Bopp SK, Lettieri T (2011) Transcriptomics responses in marine diatom *Thalassiosira pseudonana* exposed to the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene. *PLoS One* **6**:e26985
- Clarke KR, Warwick RM (2001) Change in marine communities : an approach to statistical analysis and interpretation. Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, 176 p
- Crump BC, Armbrust EV, Baross JA (1999) Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl Environ Microb* **65**:3192–3204
- Cruz-López R, Maske H (2016) The vitamin B<sub>1</sub> and B<sub>12</sub> required by the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* can be provided by its associated bacterial community in culture. *Front Microbiol* **7**:1–13
- DeLong EF, Franks DG, Alldredge AL (1993) Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs free-living marine bacterial assemblages. *Limnol Oceanogr* **38**:924–934
- Fernández E, Serret P, Demadariaga I, Harbour DS, Davies AG (1992) Photosynthetic carbon metabolism and biochemical composition of spring phytoplankton assemblages enclosed in microcosms: the diatom-*Phaeocystis* sp. succession. *Mar Ecol-Prog Ser* **90**:89–102
- Finlay BJ, Monaghan EB, Maberly SC (2002) Hypothesis: the rate and scale of dispersal of freshwater diatom species is a function of their global abundance. *Protist* **153**:261–273
- Grossart HP, Levold F, Allgaier M, Simon M, Brinkhoff T (2005) Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environ Microbiol* **7**:860–873
- Jasti S, Sieracki ME, Poulton NJ, Giewat MW, Rooney-Varga JN (2005) Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium* spp. and Other Phytoplankton. *Appl Environ Microb* **71**:3483–3494
- Kjørboe T, Ploug H, Thygesen UH (2001) Fluid motion and solute distribution around sinking aggregates. 1. Small-scale fluxes and heterogeneity of nutrients in the pelagic environment. *Mar Ecol-Prog Ser* **211**:1–13
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: E Stackebrandt, M Goodfellow (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester, United Kingdom, pp 115–175
- Li W, Fu L, Niu B, Wu S, Wooley J (2012) Ultrafast clustering algorithms for metagenomic sequence analysis. *Brief Bioinform* **13**:656–668
- Mayali X, Azam F (2004) Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *J Eukaryot Microbiol* **51**:139–144
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microb* **59**(3):695–700
- Park BS, Joo JH, Baek KD, Han MS (2016) A mutualistic interaction between the bacterium *Pseudomonas asplenii* and the harmful algal species *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Harmful Algae* **56**:29–36
- Park BS, Wang P, Kim JH, Kim JH, Gobler CJ, Han MS (2014) Resolving the intra-specific succession within *Cochlodinium polykrikoides* populations in southern Korean coastal waters via use of quantitative PCR assays. *Harmful Algae* **37**:133–141
- Park BS, Guo R, Lim W-A, Ki J-S (2017) Importance of free-living and particle-associated bacteria for the growth of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*: evidence in culture stages. *Mar Freshwater Res*. doi:10.1071/MF17102\_AC (in press)
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**:D590–D596
- Reitan KI, Rainuzzo JR, Olsen Y (1994) Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J Phycol* **30**:972–979
- Rooney-Varga JN, Giewat MW, Savin MC, LeGresley M, Martin JL (2005) Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine

- environment. *Microb Ecol* **49**:163–175
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009) Introducing mothur: open-source, platformindependent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microb* **75**:7537–7541
- Seyedsayamdost MR, Case RJ, Kolter R, Clardy J (2011) The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nat Chem* **3**:331–335
- Simon M, Glockner FO, Amann R (1999) Different community structure and temperature optima of heterotrophic picoplankton in various regions of the Southern Ocean. *Aquat Microb Ecol* **18**:275–284
- Sternberg C, Christensen BB, Johansen T, Nielsen AT, Andersen JB, Givskov M, Molin S (1999) Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Appl Environ Microb* **65**:4108–4117
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**:2725–2729
- Taylor JD, Cottingham SD, Billinge J, Cunliffe M (2014) Seasonal microbial community dynamics correlate with phytoplankton-derived polysaccharides in surface coastal waters. *ISME J* **8**:245–248
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (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**:4673–4690
- van Rijssel M, Janse I, Noordkamp DJB, Gieskes WWC (2000) An inventory of factors that affect polysaccharide production by *Phaeocystis globosa*. *J Sea Res* **43**:297–306
- Worm J, Søndergaard M (1998) Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria). *Aquat Microb Ecol* **14**:19–28

---

Received Aug. 22, 2017

Revised Nov. 24, 2017

Accepted Nov. 28, 2017