

## 제주연안 갯녹음(백화) 지역의 해수에 분포하는 세균군의 분자생물학적 분석

강봉조 · 김미란<sup>1</sup> · 윤병준<sup>1</sup> · 이동현<sup>1</sup> · 오덕철<sup>1,2</sup> · 강형일<sup>1,2\*</sup>

제주도해양수산자원연구소, <sup>1</sup>제주대학교 생명과학과, <sup>2</sup>제주대학교 기초과학연구소

본 연구에서는 갯녹음(백화)현상이 세균생태계와 어떤 관련이 있는 지에 대한 기초자료 및 정보를 얻기 위하여 갯녹음 현상이 일어난 제주도 성산과 강정지역 연안의 해수에 존재하는 세균군을 16S rRNA 증폭기법을 이용하여 조사하였다. 강정지역에서는 *Alcanivorax*, *Paracoccus*, *Damsela*, *Pseudomonas*, *Rhodovulum*, *Silicibacter*, *Sulfitobacter*, *Roseobacter* 등 다양한 종류의 세균이 분포되어 있었으며, *Alcanivorax*가 20%의 빈도로 가장 많이 나타났다. 반면, 성산 지역에서는 *Pseudomonas*속 균주가 우점종으로서 존재하였으며, *Pseudomonas tolaasii* (혹은 *Pseudomonas corrugata*)와 유연관계가 가까운 세균은 44%, *Pseudomonas mandeli*와 가까운 세균이 24%, *Verrucomicrobiales*와 가까운 세균은 4%, 기타 동정되지 않은 세균은 세 group으로 구분되었으며, 각각 8%, 8%, 12%를 차지하여, 두 곳에 분포되어 있는 세균군상이 상당한 차이점이 있음을 확인하였다. 갯녹음 지역인 강정과 성산 해수의 8 월(표품 채집시기)의 수온은 27°C~27.4°C, 염분의 농도는 30.24~30.60‰, pH는 8.23~8.36, 용존산소량(DO)은 각각 7.20~7.28로, 두 지역에서 매우 비슷한 것으로 조사된 바 있는데, 이는 수온이나 염분의 농도, 또는 pH보다는 다른 원인에 의하여 두 갯녹음 지역에 분포하는 세균군의 차이를 가져왔음을 제시해 주었다.

Key words □ bacterial community, Gangjeong, Jeju coastal area, sea whitening, Seongsan

갯녹음(백화) 현상은 여러 가지 원인에 의하여 바다의 암초지대에 서식하고 있는 대형해조류인 다시마, 감태, 대황 등 조류식물의 해조군락이 소멸되고 무절석회조류가 번식하여 바위 표면이 홍색 또는 백색(일반적으로 무절석회조류의 사후에 나타나는 색의 변화)으로 관찰될 때 일컬어지는 용어이다(4-6). 갯녹음 현상의 원인으로는 해수 중의 칼슘의 양, 수온, pH, 압력, 질소, 인, 담수유입, 수질오염 등 다양한 요인들이 관여하는 것으로 알려져 있으나, 분명한 원인을 규명하지 못하는 실정이다(1,3-4,10-12). 최근에는 수온이 상승하는 계절인 봄뿐만 아니라 사계절에 걸쳐 매년 광범위한 지역에서 나타나는 것으로 보고되고 있어 이에 대한 연구가 시급한 실정이다. 국립수산진흥원의 조사한 바에 따르면, 1999년 현재, 제주지역의 연안어장의 약 20%가 이러한 갯녹음 현상으로 인하여 경제적 피해를 비롯한 여러 가지 문제를 야기하고 있는 것으로 알려져 있다(1). 그 중, 본 연구에서 조사한 강정지역을 중심으로 한 서귀포 지역 연안의 약 36%가, 성산, 표선을 비롯한 남제주군 연안 어장의 약 31%가 갯녹음으로 인한 심각한 피해를 보고 있는 것으로 나타났다(Fig. 1). Fig. 2에서 보이는 것처럼, 본 연구를 위해 표품을 채집한 시기인 2001년 8월에, 두 지역에서 갯녹음 현상이 광범위하게 이루어지고 있음을 관찰할 수 있었다. 이들 갯녹음으로 인해 나타나는 가장 큰 피해는 무엇보다도 해양생물 다양성의 감소이다.

다양한 바다생물의 먹이가 되는 해양식물인 많은 조류의 감소와 무절석회조류의 증가로 인한 지속적인 갯녹음의 발생은 바다의 황폐화를 가져오고, 궁극적으로 인류에게 큰 피해를 가져올 수 있다는 점에 주목해 볼 필요가 있다. 최근의 가장 큰 문제는 계절에 상관없이 나타나는 갯녹음 현상의 지속성으로서, 과거에 있었던 갯녹음과 끝녹음의 순환이 주기적으로 이루어지던 현상과는 다르게 관찰되고 있다는 점이다. 따라서, 이러한 갯녹음 지역

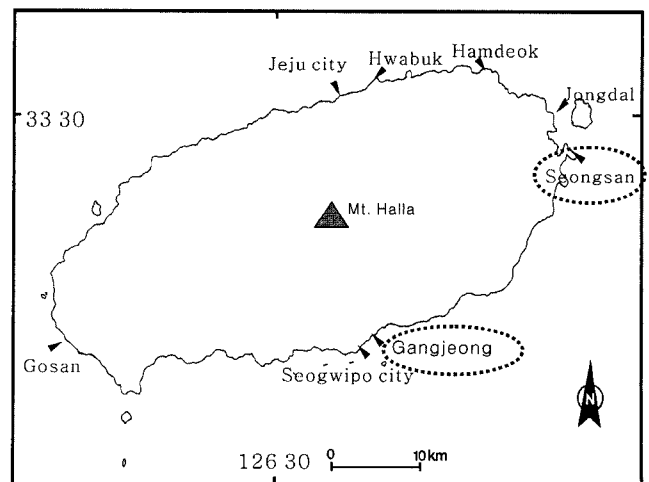


Fig. 1. The whitening sea areas of Gangjeong and Seongsan, Jeju-do marked in dotted line was used for analysis of bacterial communities in this study.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 064-754-3998, Fax: 064-756-3541  
E-mail: kahng@cheju.ac.kr

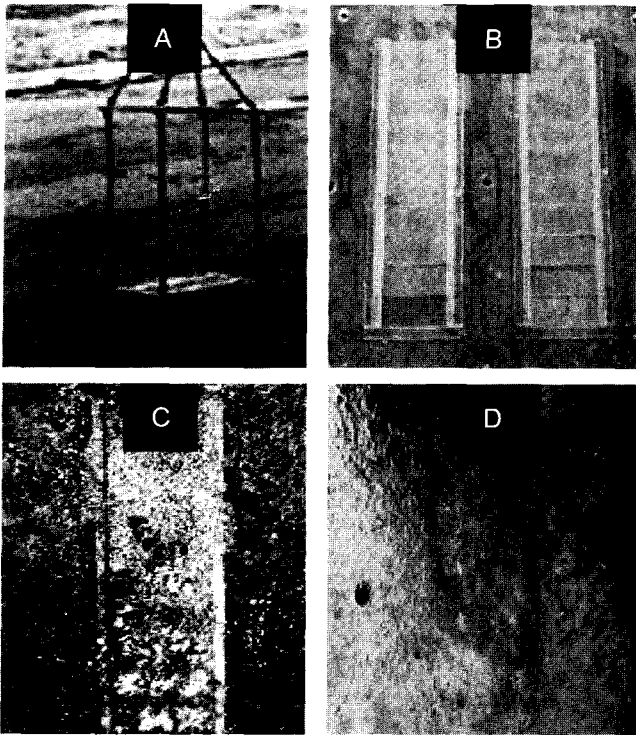


Fig. 2. Several sterilized slide glasses were prepared and fixed as shown in panels A and B. Panels C and D show samples attached to a slide glass withdrawn from the whitening sea areas of Gangjeong and Seongsan, respectively after two-weeks of slide submergence.

에서 특정 환경에서 가장 빠르게 적응해서 생존해 나갈 수 있는 미생물의 생태계를 파악하는 것은 갯녹음 현상에 따른 해양생태계의 변화를 좀 더 이해하고 갯녹음의 해결책에 대한 방안을 도출시킬 수 있다는 점에서 그 의의가 매우 크다고 할 수 있다. 본 연구에서는 갯녹음의 현상을 이해하기 위한 노력의 일환으로, 갯녹음이 일어난 성산과 강정지역의 해수에 존재하는 세균군을 조사하여, 향후 갯녹음 표품의 세균군을 분석하는데 있어 기초자료를 얻기위해 수행하였다.

재료 및 방법

슬라이드 부착법(Slide-attached technique)에 의한 갯녹음 지역의 해수 표품의 채집

본 실험을 위한 대상 해역은 갯녹음이 심하게 일어난 것으로 알려져 있는 성산과 강정의 두 지역의 해수를 사용하였다. 본 연구에서 사용할 표품은 해수의 운동에 의해 자연스럽게 이동되는 미생물을 얻기 위하여, Fig. 2와 같은 장치를 이용하여 2 주일 동안 멸균된 슬라이드글라스를 해수에 위치시켜 여러 가지 부착물을 획득하였다. 또한 주기적으로 해수를 채취하여 4°C에 보관하고, 표품 채취의 마지막 날에 같은 지역에서 온 모든 표품(슬라이드글라스 부착물 및 해수)을 모아서 원심분리하여 모아진 표품을 세균군의 분석을 위한 시료로 사용하였다(Fig. 3). 준비된 해수를 포함하는 표품에서 나타나는 세균군의 분석은 Fig. 3의 절차에 따라 수행하였다.

DNA의 분리

슬라이드글라스에 부착된 표품을 멸균된 이쑤시개를 이용하여 긁어내고, 같은 지역의 해수 30 ml에 담근 후, 6,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상정액을 버리고, 모아진 표품을 30 ml potassium phosphate buffer (40 mM, pH 6.8)에서 두 번 세척한 후 핵산을 분리하는데 사용하였다. Phenol/chloroform 용출기법을 이용하여 DNA를 얻고 1% agarose 겔 전기영동법으로 DNA를 확인하였다. 확인된 DNA를 10 ml cesium chloride 용액에서 녹인 후 ethidium bromide를 첨가하고, 102,000×g에서 20 시간 동안 초원심분리하였다. 초원심분리 후, genomic DNA band를 회수하고, cesium chloride와 ethidium bromide를 제거하기 위하여 0.05 μm membrane filter를 이용하여 30 분간 투석하였다. 투석 후 DNA액을 회수하고, 16S rRNA를 증폭하기 위한 표품으로 사용하였다.

PCR 증폭

16S rRNA를 증폭하는데 27f와 1522r primer set와 함께, 다양한 농도(10 ng~100 ng)의 DNA를 사용하였다. 95°C 5 분간 변성

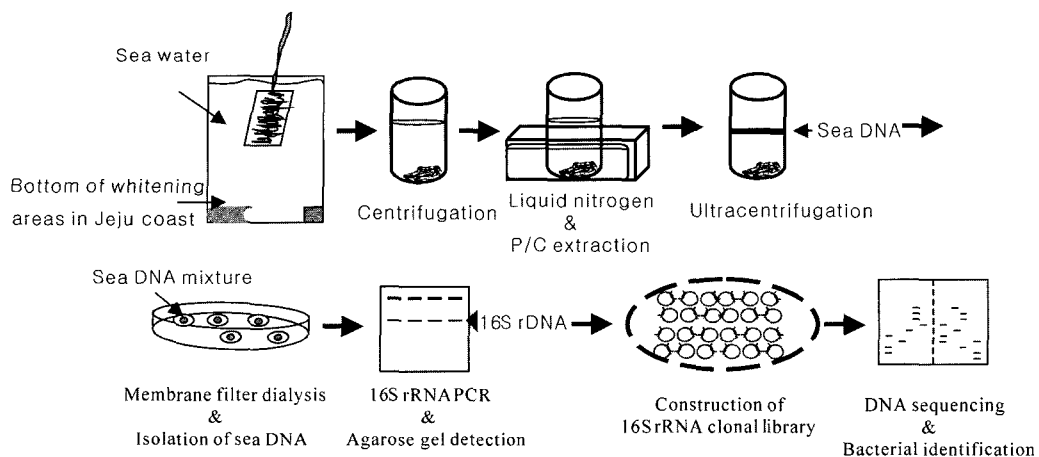


Fig. 3. A scheme for analysis of bacterial communities in the whitening sea areas of Gangjeong and Seongsan.

후 95°C, 1 분-55°C, 1 분-72°C 1 분의 주기로 33 번 순환한 후 최종 72°C에서 10 분간 extension하였다. 1% agarose 겔에서 전기영동하여 예상되는 DNA 증폭산물을 확인하고, 16S rRNA clonal library를 만드는데 사용하였다. 기타 언급하지 않은 방법은 이미 알려진 방법(7)에 따라 수행하였다.

**16S rRNA clonal library의 제조 및 DNA sequencing**

다양한 해양 미생물로부터 기원되었을 것으로 생각되는 회수된 PCR산물을 pGEM-T vector에 ligation한 후 *E. coli* JM109를 형질전환하였다. 성상 및 강정에서 얻은 형질전환된 수 많은 clone중 각 25 개를 임의적으로 선별한 후 T7 promoter primer 나 SP6 promoter primer를 이용하여 DNA sequencing을 수행하였다. DNA sequencing은 ABI 377 자동염기서열 분석기를 이용하였다. 기타, 언급하지 않은 방법은 Maniatis방법(9)에 따라 수행하였다.

**염기서열분석**

밝혀진 염기서열의 분석은 DNA star program과 GenBank의 blast search의 database를 이용하였다. 염기의 계통학적 관계를 밝히기 위하여, 이미 알려진 방법(8)에 따라 Lasergene의 Megalign program을 이용하여 분석하였으며, 이 때 Clustal method에 의해 수행하였다.

**해수의 수질분석**

해수의 수질분석은 해양환경공정시험방법(2)에 따라 수온, pH, 염분의 농도, 용존산소량(DO), 화학적산소요구량(COD), 부유물질(SS)의 농도, 총질소량(암모니아성 질소, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N; 아질산성 질소, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N; 질산성질소, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N), 총인(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P) 농도 등을 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**서귀포시 강정 갯녹음 지역 해수의 세균 군 분포**

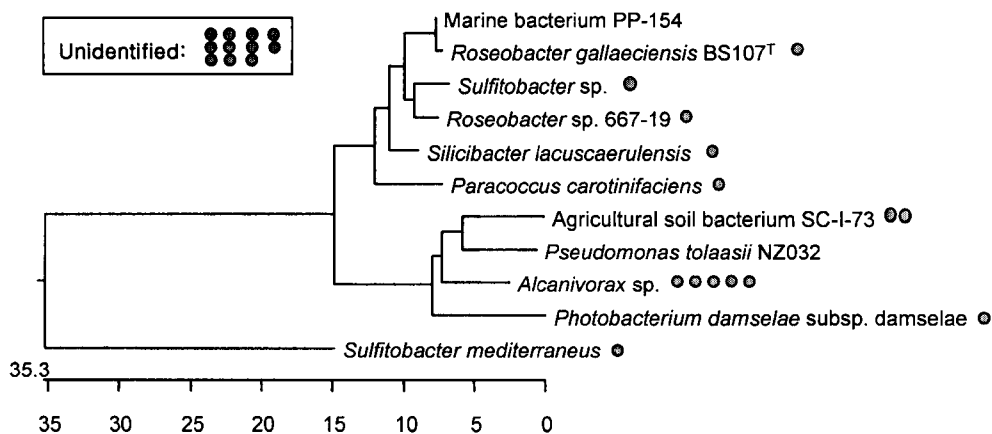
강정 갯녹음 지역 해수의 세균 표품에서 얻어진 해수 DNA를

**Table 1.** Bacteria in the sea water of whitening areas of Gangjeong and Seongsan

Bacteria	% Occurrence	
	Gangjeong	Seongsan
<i>Alcanivorax</i> sp.	20	
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	4	0
<i>Photobacterium damsela</i>	4	0
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	0	4
<i>Pseudomonas mandelii</i>	0	24
<i>Pseudomonas tolaasii</i> (or <i>P. corrugata</i> )	8	44
<i>Roseobacter</i> sp.	8	0
<i>Silicibacter</i> sp.	4	0
<i>Sulfitobacter</i> sp.	8	0
Unidentified A	0	8
Unidentified B	0	8
Unidentified C	0	12
ND (Not determined)	44	0

The percentage occurrence of a specific bacterial organism in both areas of Gangjeong and Seongsan was determined based on the number of appearance of a specific 16S rDNA nucleotide sequence of twenty five clones analyzed in this study.

사용하여 얻어진 16S rRNA의 clone들에 대한 염기서열 분석을 통해 강정지역에서는 *Pseudomonas*를 비롯한 다양한 세균의 분포가 확인되었다(Table 1 및 Fig. 4). *Alcanivorax*, *Paracoccus*, *Damsela*, *Pseudomonas*, *Rhodovulum*, *Silicibacter*, *Sulfitobacter*, *Roseobacter* 등의 분포가 확인되었다. *Alcanivorax* sp.와 가장 가까운 유연관계를 보인 종이 약 20%로 가장 많이 나타났고 *Pseudomonas* 16%, *Sulfitobacter* 8%의 순으로 나타났다. 하지만, 약 48%의 clone이 동정되지 않아 이에 대한 자세한 분석의 필요성이 제기 되어졌다. 표품을 채집할 2001년 8월의 강정지역 해수의 평균 수온, 27°C, 염분 농도, 30.24‰, pH, 8.36, 용존산소량(DO), 7.28 mg/l로 조사되었다. 같은 시기 성산연안 갯녹음

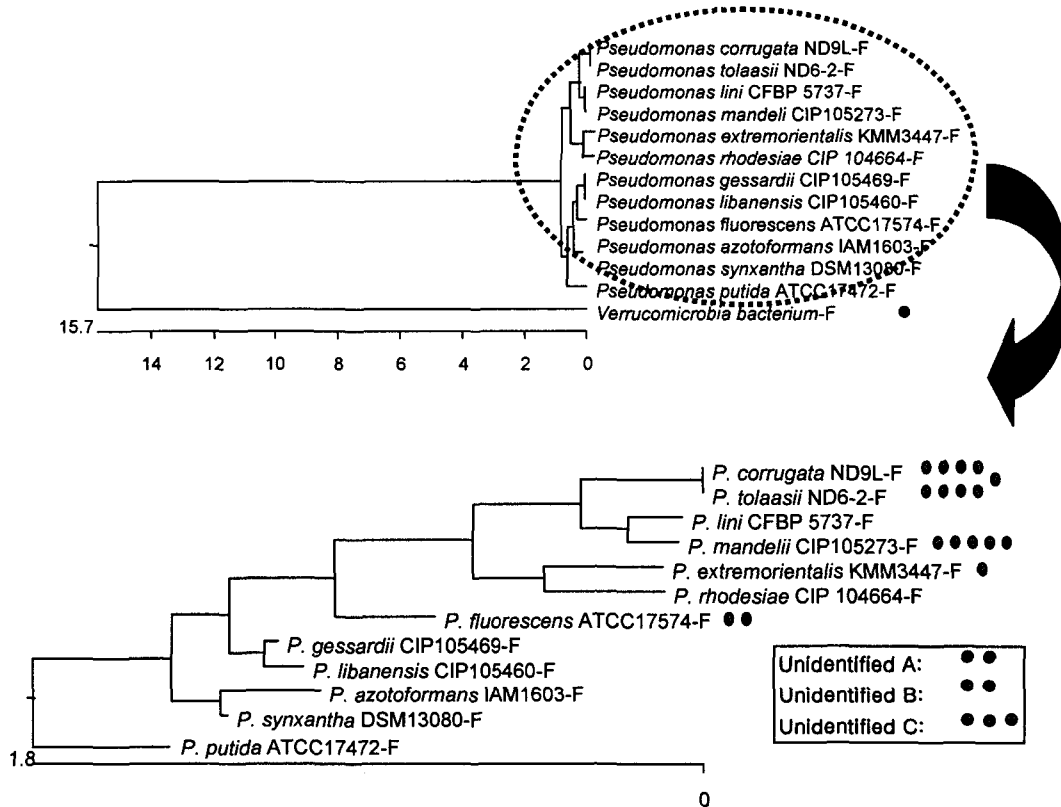


**Fig. 4.** Dendrogram showing the divergence of bacteria in the whitening sea area of Gangjeong.

**Table 2.** Sea water quality of whitening areas of Gangjeong and Seongsan

Area	T (°C)	S (%)	pH	COD (mg/l)	T-N (mg/l)	P (mg/l)	DO (mg/l)	SS (mg/l)*
Gangjeong	27	30.24	8.36	0.92	0.043	0.014	7.28	3.03
Seongsan	27.4	30.60	8.23	0.80	0.051	0.011	7.20	4.40

Sea water quality was examined in August, 2001 in this study according to the instruction provided by Ministry of Marine Affairs and Fisheries. The uppercase (\*) indicates followings. T, temperature; S, saline, COD; chemical oxygen demand; T-N, sum of total nitrogen originated from NH<sub>3</sub>, NO<sub>3</sub>, and NO<sub>2</sub>. P, inorganic phosphorus; DO, dissolved oxygen; SS, suspended solid.



**Fig. 5.** Dendrogram showing the divergence of bacteria in the whitening sea area of Seongsan.

지역 해수의 평균 수온, 염분 농도, pH, 용존산소량은 각각 27.4°C, 30.60%, 8.23, 7.20 mg/l로 강정지역과 매우 비슷하게 나타났다(Table 2). 이러한 사실은 수온, 염분 농도, pH, 또는 용존 산소량이 미생물 분포상에 차이점을 가져오는 요인으로 크게 작용하지 않았음을 제시해 주었다.

**남제주군 성산 갯녹음 지역 해수의 세균 군 분포**

성산의 갯녹음 지역 해수에서는 *Pseudomonas* 균주가 우세하게 존재하는 것으로 조사되었으며, 대표적인 균으로는 *Pseudomonas tolaasii*로 조사한 clone의 44%를 차지하였다(Fig. 5). 그 다음으로, *Pseudomonas mandelii*로 약 24%, *Pseudomonas extremorientalis*가 4%의 빈도로 나타났다. 일반적으로 *Pseudomonas*는 다양한 환경에서 생존할 수 있는 능력을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 특히, 환경오염이 심한 토양이나 강 혹은 하천에서 우세하게 나타나는 것으로 보고되고 있다. 본 연

구에서 사용한 성산의 해수표본은 폐수가 많이 흘러내리는 곳으로 심하게 갯녹음 현상이 일어난 곳에서 채취하였다. 따라서, *Pseudomonas* 균주의 우세한 분포는 갯녹음 지역 수질의 환경오염과 밀접한 관계가 있을 것으로 추정된다. 두 지역 해수의 부유물질농도(SS)는 성산지역에서 훨씬 높게 나타난 반면, 총질소량, 화학적 산소요구량(COD) 등은 약간의 차이는 있었으나 두 지역 세균 생태계의 차이를 가져올 만한 요인으로는 여겨지지 않았다(Table 2). 따라서, 해수를 구성하는 조사된 요인 외에 다른 환경요인이 세균분포상의 차이를 가져올 가능성도 있으며, 이의 확인을 위한 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

**결론**

1. 본 연구를 통하여 제주 연안의 대표적 갯녹음 지역인 성산과 강정의 해양세균의 분포를 밝힘으로서 갯녹음 지역에서의

미생물 생태계에 대한 기초자료를 부분적으로나마 제시하였다. 성산의 갯녹음지역의 해수에서는 *Pseudomonas* 균주가 우세하게 존재하는 것으로 조사되었으며, 대표적인 균으로는 *Pseudomonas mandeli*와 *Pseudomonas tolaasii* (또는 *Pseudomonas corrugata*)였다.

2. 강정지역에서는 *Alcanivorax*, *Paracoccus*, *Damselae*, *Pseudomonas*, *Rhodovulum*, *Silicibacter*, *Sulfitobacter*, *Roseobacter* 등 여러 세균의 분포가 확인되었으며, 기타 미동정된 다양한 균주의 발견은 이 지역의 세균상이 성산지역보다 다양하다는 사실을 보여 주었다.

3. 갯녹음 지역인 강정과 성산 해수의 8 월(표품 채집시기)의 수온, 염분의 농도, pH, 용존산소량은 매우 비슷한 것으로 조사되어, 수온이나 염분의 농도, 또는 pH보다는 다른 원인에 의하여 두 갯녹음 지역에 분포하는 세균 군의 차이를 가져왔음을 제시해 주었다.

4. 본 연구에서 이루어진 세균군의 분석은 여러 가지 제한적인 여건 때문에 각 지역에서 얻은 많은 16S rRNA clone 중 25 clone들을 임의적으로 선별하여, 그 clone들에 대한 분석을 기초로 하여 도출해낸 결과로 전체적인 한 생태계내의 세균의 분포를 설명하기에는 미흡한 점이 있음을 기억해 둘 필요가 있다. 그럼에도 불구하고, 본 연구에서 얻어진 결과는 처음으로 갯녹음 지역의 세균 분포에 대한 분석을 시도하여 갯녹음 지역의 세균 생태에 대한 자료를 얻어냄으로서, 그 의의가 크다 하겠다.

## 감사의 글

본 연구는 제주대학교 BK21 산학협동공동연구과제의 연구비로 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. 국립수산진흥원. 1999. 제주지역 23개 마을어장에 대한 잠

수 표본조사 보고서.

2. 해양환경공정시험방법. 1998. 해양수산부.
3. 제주대학교 해양과학대학 BK21 사업단. 2002. 제주도 갯녹음(백화)현상의 발생요인과 복원.
4. 한국해양연구소. 1997. 한국천해 경성저질에서의 백화현상에 대한 연구.
5. Austin, B. 1988. *Marine Microbiology*, Cambridge University Press, New York.
6. Jorgensen, B.B. 1980. Mineralization and the bacterial cycling of carbon, nitrogen, and sulfur in marine sediments. p.2 39-252. In D.C. Ellwood, J.N. Hedger, M.J. Latham, J.M. Lynch, and J.H. Slater, (ed.). *Contemporary Microbial Ecology*, Academic Press, London.
7. Kahng, H.-Y., J.J. Kukor, and K.-H. Oh. 2000. Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline. *FEMS Microbiol. Lett.* 190, 215-221.
8. Kahng, H.-Y., J.C. Mainverni, M.M. Majko, and J.J. Kukor. 2001. Genetic and functional analysis of the *tbc* operons for catabolism of alkyl- and chloroaromatic compounds in *Burkholderia* sp. JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4805-4816.
9. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1991. *Molecular cloning-A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
10. Taniguchi, T. 1991. Marine afforestation of *Eisenia bicyclis* (Laminariaceae: Phaeophyta). NoAA Technical Report NMFS 102, 45-57.
11. Tenger, M.J. and P.K. Dayton. 1987. El Nino effects on southern California kelp forest communities. *Adv. Ecol. Res.* 17, 243-279.
12. Yokohama, Y., J. Tanaka, and M. Chihara. 1987. Productivity of the *Ecklonia cava* community in a bay of Izu peninsula on the Pacific coast of Japan. *Bot. Mag. Tokyo* 100, 129-141.

(Received May 16, 2002/Accepted June 16, 2002)

---

**ABSTRACT: Molecular Analysis of Bacterial Communities Distributed in Sea Water of Whitening Areas of Jeju Coast**

**Bong-Jo Kang, Mi-Ran Kim<sup>1</sup>, Byoung-Jun Yoon<sup>1</sup>, Dong-Heon Lee<sup>1</sup>, Duck-Chul Oh<sup>1,2</sup>, and Hyung-Yeol Kahng<sup>1,2\*</sup>** (Jeju Province Fisheries Resource Research Institute, <sup>1</sup>Department of Life Science, <sup>2</sup>Research Institute for Basic Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea)

In this study, the bacterial communities distributed in sea water of the whitening areas of Gangjeong and Seongsan, Jeju-do have been analyzed using the PCR amplification of 16S rRNA to obtain fundamental data and information on relationship of the whitening phenomenon and microbial ecosystem. In Gangjeong, diverse bacteria such as *Alcanivorax*, *Paracoccus*, *Damselae*, *Pseudomonas*, *Rhodovulum*, *Silicibacter*, *Sulfitobacter*, and *Roseobacter* have been found, and *Alcanivorax* was the most abundant clone. The most abundant clone from Seongsan was *Pseudomonas*, of which *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas mandeli* were most abundantly occurred in the frequency of approx 44% and 24%, respectively. Approx 4% of the bacterial clones closest to *Verrucomicrobiales* and other unidentified clones were also found in Seongsan, suggesting there is a great discrepancy between bacterial communities from the whitening areas of Seongsan and Gangjeong. The mean temperature, chlorine concentration, pH, and dissolved oxygen (DO) of the sea water of Gangjeong and Seongsan in August of 2001 (sampling period) was 27°C~27.5°C, 30.24~30.60‰, pH 8.23~8.36, 7.20~7.28 mg/l, suggesting other environmental factors except for the factors mentioned above might result in difference of bacterial communities distributed in both areas.