

## 16S rRNA 유전자의 454 파이로서열 분석을 이용한 해삼(*Apostichopus japonicus*)과 새우(*Litopenaeus vannamei*)의 장내 세균의 다양성 연구

노은수 · 김영삼 · 김동현 · 김경호\*

부경대학교 미생물학과

### Bacterial Diversity in the Guts of Sea Cucumbers (*Apostichopus japonicus*) and Shrimps (*Litopenaeus vannamei*) Investigated with Tag-Encoded 454 Pyrosequencing of 16S rRNA Genes

Eun Soo Noh, Young-Sam Kim, Dong-Hyun Kim, and Kyoung-Ho Kim\*

Department of Microbiology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Republic of Korea

(Received July 2, 2013 / Accepted September 25, 2013)

Bacterial diversities in the guts of sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) and shrimps (*Litopenaeus vannamei*) were investigated using barcoded or tag-encoded 454 pyrosequencing of 16S rRNA genes. In sea cucumbers, most of sequences were related to two genera, the genus *Propionigenium* in the phylum *Fusobacteria* and an unclassified genus in the family *Flavobacteriaceae* of phylum *Bacteroidetes*. Shrimps showed various kinds of genera including *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Prochlorococcus*, and *Vibrio* as well as the unclassified genera in the families, *Flavobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, and *Helicobacteraceae* and in the order *Mycoplasmatales*. Unclassified genera containing environmental sequences only are more than half of genera from sea cucumbers and shrimps. Sea cucumbers and shrimps could be unexplored sources of novel microbes and the bacterial diversity of them was revealed by high throughput 454 pyrosequencing.

**Keywords:** bacterial diversity, sea cucumber, shrimp, tag-encoded 454 pyrosequencing

해양 생물의 미생물을 연구하는 방법은 대부분 배양을 통한 연구방법이 주로 이루어지고 있으나(Holben *et al.*, 2002) 환경에 존재하는 미생물의 99% 이상이 실험실에서 배양되기 어려우므로 배양을 통해서 밝힐 수 있는 미생물의 수는 매우 제한되어 있다(Amann *et al.*, 1995). 이를 극복하기 위해서 16S rRNA 유전자를 PCR을 통하여 증폭하고 이를 분석하는 비배양 연구가 진행되어 왔다(Holben *et al.*, 2002). 클로닝을 이용하거나(Holben *et al.*, 2002), TRFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 나 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)와 같은 미생물 군집 지문법(microbial community fingerprinting) 등이 널리 사용되어왔다(Hovdaa *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012). 그러나 이러한 방법은 정확한 분석이 어렵거나 한 시료에서 알아낼 수 있는 미생물 종류가 제한되어 있다는 단점이 있다(Ercolini, 2004).

차세대 서열 분석법의 하나인 병렬 대용량 파이로서열 분석(parallel high throughput pyrosequencing) 기술은 DNA가 합성될 때 생기는 파이로인산(pyrophosphate)을 루시퍼효소(luciferase)

로 검출하는 방식으로 서열분석에 들어가는 비용을 최소화하여 적은 비용으로 수십만-수백만의 서열을 한번에 읽을 수 있는 방법이다(Margulies *et al.*, 2005). 파이로서열 분석은 다른 차세대 서열 분석 방법에 비해 긴 길이의 서열을 읽을 수 있기 때문에 미생물 생태학 분야에 적용되고 있으며, PCR을 통한 유전자 분석 등에 많이 이용이 되고 있다(Edwards *et al.*, 2006). 꼬리표를 이용한 파이로서열 분석(Binladen *et al.*, 2007)을 통하여 토양(Acosta-Martinez *et al.*, 2008), 장내(Dowd *et al.*, 2008), 발효식품(Roh *et al.*, 2010) 등 다양한 환경에서 미생물의 다양성이 분석되어왔다. 해삼(*Apostichopus japonicus*)의 경우에는 오랜 기간 한국, 중국, 일본, 러시아 등에서 건강식품으로 소비되고 있으며(Seo *et al.*, 2009) 중국의 생활 수준의 향상과 소비의 증진으로 해삼의 양식이 급격하게 증가하고 있다(Deng *et al.*, 2009). 해삼의 양식이 증가함에 따라 해삼의 질병과 병원균에 대한 연구가 진행되고 있으며 그 예로 피부궤양(skin ulceration disease)과 내장방출증(viscera ejection syndrome)의 주요 원인균으로 비브리오 등이 배양, 분리되었다(Deng *et al.*, 2009). 하지만 해삼과 공생하는 미생물에 대한 연구는 거의 행해지고 있지 않다.

흰다리 새우(White shrimp, *Litopenaeus vannamei*)는 질병에

\*For correspondence. E-mail: kimkh@pknu.ac.kr; Tel.: +82-51-629-5611; Fax: +82-51-629-5619

대한 내성이 강하고 성장률이 우수하여 2003년도에 국내에 도입된 이래로 2007년에 새우 양식량의 62.5%를 차지하고 있을 정도로 많이 양식되고 있다(Jang et al., 2008). 새우와 미생물에 대한 연구 또한 새우의 양식 방법이나 병원성 바이러스 또는 세균에 대한 연구가 많이 진행되고 있는 실정이다(Castroverde et al., 2006; Robert-Pillot et al., 2010; Lightner, 2011). 미생물의 플락(floc)을 이용하여 수질을 보존하고 병원균의 감염을 방지하고 새우에게 먹이를 공급하는 새우의 고밀도 양식에 대한 연구(Jang et al., 2008; Crab et al., 2010) 등이 진행되고 있으나 공생 미생물의 다양성 자체를 살펴보는 연구는 거의 없는 실정이다. 최근 TRFLP를 이용한 흰다리 새우의 유생이 가지는 미생물의 다양성에 대한 연구가 진행되었으나(Pangastuti et al., 2010) 밝혀진 미생물의 종류와 다양성은 매우 제한되었다.

수산 동물에 존재하는 공생 미생물들은 숙주의 성장과 생존을 증진한다고 알려져 있다(Verschuere et al., 2000). 이러한 미생물은 소화 효소를 분비하거나, 면역체계에 도움을 주거나, 병원성균이 생존하지 못하게 우점하거나, 숙주가 필요로 하는 영양물질을 제공하는 등의 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Verschuere et al., 2000). 하지만 아직까지 수산 동물과 공생 또는 상호작용하는 미생물들의 역할에 대한 연구가 본격적으로 행해지고 있지 않는 실정이다. 해삼과 새우의 생리적 특성과 생태를 이해하기 위하여 공생미생물에 대한 연구가 필요하며 이런 연구의 결과는 양식 과정에서의 해삼과 새우의 질병을 방지하고 생산력을 높일 수 있는데도 도움을 줄 수 있을 것이다. 이에 따라 본 연구에서는 해양 무척추동물 중 산업적, 경제적 가치가 높은 해삼 및 새우를 선택하여 그 장(intestines)에 존재하는 세균의 다양성을 꼬리표를 이용한 파이로서열 분석을 통하여 분석하였다. 이러한 연구결과는 새우와 해삼과 상호작용하는 세균들의 종류와 그 특성을 이해하는데 많은 도움을 줄 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 해삼과 새우의 장 DNA 추출

해삼(*Apostichopus japonicus*) 시료는 부산시 수영구 민락동 인근(위도 35°09'13"N, 경도 129°07'55"E)에서 해녀에 의해서 채취(SC1, SC2, SC3; 2011년 10월, SC4, SC5, SC6; 2011년 11월)된 것을 구입하여 사용하였으며 살아 있는 상태로 실험실로 운반하여 사용하였다. 멸균된 가위와 수술용 칼을 이용하여 멸균증류수로 세척한 해삼을 절단하고 위장과 항문 사이의 장(intestines) 전체를 채취하였다. 새우(*Litopenaeus vannamei*)의 경우에는 전라남도 신안군에 있는 6곳의 다른 양식장(SH2; 위도 34°44'13"N, 경도 126°05'03"E, SH4; 35°02'55"N, 126°08'23"E, SH6; 35°01'56"N, 126°11'59"E, SH12; 34°44'55"N, 126°08'46"E, SH17; 34°46'06"N, 126°08'08"E, SH18; 34°45'23"N, 126°09'16"E)에서 시료를 채취(2011년 9월)하였으며 냉동상태로 실험실까지 운반하였다. 멸균된 가위와 수술용 칼을 이용하여 세척한 새우의 등을 가르고 위장과 항문 사이의 장 전체를 채취하였다. 채취된 장은 DNA를 추출하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.

해삼의 경우 두 번의 시료 구입과정에서 각각 3마리씩의 해삼을 선택하여 총 6마리의 해삼, 새우는 각각의 양식장에서 한 마리씩의 개체를 선택하여 총 6마리를 사용하였으며 Power Soil DNA Extraction Kit (MOBIO, USA)를 이용하여 500 mg의 장 내용물에서 DNA를 추출하였다.

### 16S rRNA 유전자 증폭과 염기서열 결정

추출된 DNA는 꼬리표 서열을 포함한 프라이머를 이용하여 증폭하였다. 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 338R (5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') 프라이머를 사용하여 16S rRNA 유전자의 V1-V2 부분을 증폭하였다. 같은 꼬리표 서열을 포함한 순방향과 역방향 프라이머를 한 세트 사용하였다. 추출된 DNA (1 µl)와 순방향(10 pmol, 1 µl)과 역방향 프라이머(10 pmol, 1 µl)를 각각 PCR 혼합액(Accupower PCR premix, Bioneer, Korea)에 첨가하여 총 20 µl의 PCR 반응액을 제조하여 PCR 과정을 수행하였다. PCR은 94°C에서 7분 초기 열처리를 한 후에 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 45초씩 32회 반복하였으며 최종적으로 72°C에서 10분간 반응을 수행하였다. 각각의 시료는 각기 다른 꼬리표를 가지는 프라이머들을 이용하여 증폭하였으며 증폭된 PCR 산물은 PCR 정제 키트(Accuprep PCR purification kit, Bioneer, Korea)를 사용하여 정제하였다. 흡광광도계(Nanodrop, ACTGene, USA)을 이용하여 DNA의 농도를 측정하였으며 각각의 PCR 증폭 산물을 같은 농도로 맞추어 모두 합하여 서열분석을 수행하였다. 대용량 서열 분석은 서열분석기관에 의뢰하여(NICEM, Korea) 454 pyrosequencing 방식의 Genome Sequencer FLX titanium 기기(Roche, USA)를 이용하여 수행하였다. 얻어진 서열들을 GenBank의 SRA 데이터베이스에 기탁번호 SRR988098으로 기탁하였다.

### 염기서열 분석

서열 길이가 300 bp 이상이고 'N'으로 표현되는 애매한 염기를 포함하고 있지 않은 염기서열만 분석에 사용하였다. 대용량 서열 분석 도구모음인 mothur (Schloss et al., 2009)를 이용하여 서열 분석을 수행하였으며 chimera.uchime 명령어를 이용하여 키메라 서열을 확인하고 제거하였다. 약 1.5% 정도의 서열이 전처리 과정에서 제거되었다.

전처리된 서열은 하나의 파일로 합하여 taxonomy based clustering (TBC) 프로그램(Lee et al., 2012)을 이용하여 97% 서열 유사도를 기준으로 OTU (operational taxonomic unit)를 나누는 클러스터링 분석을 수행하였다. 이에 따라 각각 시료에 따른 OTU의 빈도를 결정하고 각각의 OTU의 대표서열을 결정하였다. QIIME 분석도구모음(Kuczynski et al., 2012)을 이용하여 대표 서열을 분석하였다. 염기서열의 분류는 Greengenes (McDonald et al., 2012)에서 2012년 10월에 배포된 gg\_12\_10 데이터베이스를 이용하여 BLAST 방식으로 분류학적 동정을 수행하였으며 e-value 기준으로  $10^{-30}$  이하가 나온 것들만을 인정하였다. Ace, Chao, Shannon index와 같은 다양성 지수는 mothur 분석도구모음을 이용하여 계산하였다(Schloss et al., 2009).

**Table 1.** Sample information and diversity indexes according to the samples

Species	Sample	Total reads	Subsampled reads <sup>a</sup>	OTUs	Ace	Chao	Shannon	Coverage
Sea Cucumber ( <i>Apostichopus japonicas</i> )	SC1	4915	1927	141	315	260	2.16	0.96
	SC2	5177	1927	107	346	215	1.90	0.97
	SC3	6924	1927	206	563	403	3.22	0.94
	SC4	4697	1927	298	1023	638	3.38	0.91
	SC5	3933	1927	159	421	312	1.78	0.95
	SC6	1927	1927	245	687	496	3.00	0.93
Shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	SH02	2404	1927	340	926	676	3.88	0.90
	SH04	2121	1927	137	349	253	1.93	0.96
	SH06	2262	1927	258	549	444	4.19	0.94
	SH12	3276	1927	318	820	631	4.36	0.91
	SH17	10657	1927	92	255	170	2.53	0.98
	SH18	2511	1927	384	1287	820	4.68	0.88

<sup>a</sup> Subsampling was conducted based on the smallest number (1927 reads of sample SC6) of reads among samples.

**결 과**

**다양성 지수 비교**

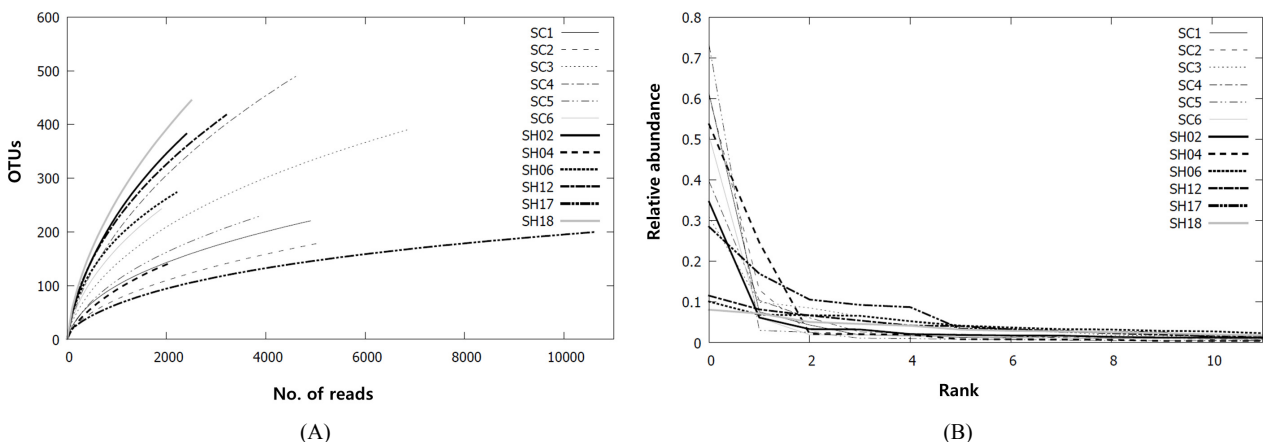
전 처리를 거친 총 50,804개의 염기서열(평균길이 345 bp)을 확보하여 분석하였다. 각각의 시료에 따라서 가장 작은 시료는 1,927개의 염기서열을 가지고, 가장 큰 시료는 10,657개의 염기서열을 얻을 수 있었다. 다양성 지수를 비교하기 위하여 가장 작은 크기의 시료의 염기서열 개수인 1,927개에 맞추어 다양성 지수를 새로 계산하였으며 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 모집단이 정규분포를 이루고 모분산이 다르다는 가정하에 t-검정을 수행하여 비교하였을 때 해삼과 새우간에 다양성 지수의 평균의 차이는 없는 것으로 나타났다( $P>0.01$ ). 이는 해삼 및 새우의 집단 내 다양성의 차이가 매우 크기 때문인 것으로 사료된다. 즉 Shannon index의 경우에 해삼이 개체에 따라 1.78-3.38까지 큰 변화를 보이는 것과 마찬가지로 새우의 경우에도 1.93-4.68까지의 큰 변화를 나타내어 그룹간의 다양성을 비교하기에는 한계가 있었다. 뿐만 아니라 다른 종간의 개체 내의 미생물 다양성을 비

교하는 것이며, 채취 방법에 따라 세균 다양성의 차이가 있기 때문에 비교에 한계가 있을 것으로 사료된다.

**OTUs의 희박화 곡선(rarefaction curve)과 순위존재비곡선(rank abundance curve)**

OTUs의 수는 180-490개 정도로 계산이 되었으며 희박화 곡선에 따르면 각각 시료의 서열의 수가 증가함에 따라서 OTU의 개수가 증가하는 속도가 시료 별로 차이가 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1A). 증가하는 속도가 가장 느린 것은 SH17 시료이며 10,000개가 넘는 서열에서도 200개 정도의 OTU만 존재하는 것으로 나타났다. 가장 증가하는 속도가 빠른 것은 2,500개 정도의 서열에서 450개 정도의 OTU가 존재하는 SH18이다. 그러나 전체 시료의 서열 개수에 비해 OTU의 수는 그리 높지 않은 것을 볼 때 충분한 서열 분석이 이루어졌다고 할 수 있었다.

순위존재비곡선은 각 시료에서 모든 OTU를 그 존재비가 높은 순서대로 등수를 매기고 이러한 등수에 따라서 각각의 존재비를 나타낸 그래프이다. Fig. 1B에서는 각각의 시료에서 존재



**Fig. 1.** (A) Rarefaction curve with number of OTUs versus number of reads and (B) rank-abundance curve of top 11 OTUs of each sample.

비가 가장 높은 11개의 OTU들을 나타낸 것으로 소수의 OTU가 매우 높은 비율을 가지고 있는 것을 볼 수 있었다. 특히 이는 해삼의 경우에 두드러진 특성이며 새우의 경우에는 SH04를 제외하고는 해삼에 비해 OTUs의 비율이 균일하게 분포하고 있는 것을 볼 수 있었다.

**엽록체 서열의 분석**

해삼과 새우에서 각각 0.6–25.1%(평균 8.3%), 0.1–14.9%(평균 5.7%) 가량의 서열이 엽록체의 16S rRNA 서열로 밝혀졌다. 16S rRNA 유전자를 바탕으로 한 세균 다양성 분석에서 많은 경우 엽록체의 서열도 함께 검출이 되기 때문에 세균의 다양성을 분석할 때 이들을 고려해야 한다. 조류 *Stramenopiles*의 엽록체가 해삼에서는 가장 많이 발견되는 것을 볼 수 있었다. *Stramenopiles*는 규조류를 포함한 다양한 조류를 포함하고 있는 그룹으로 알려져 있으며 이는 해삼의 먹이가 다양한 조류인 것을 고려하면 설명이 가능하다. 새우의 경우에는 좀 더 다양한 종류의 엽록체 그룹을 관찰할 수 있었다. *Chlorophyta*, *Rhodophyta*, *Streptophyta*와 그 외 알려지지 않는 그룹에 속하는 서열들이 존재하는 것을 볼 수 있었다. 이는 새우의 경우 다양한 위치의 양식장에서 채취가 되었기 때문에 양식장의 위치 및 제공 받은 사료의 종류에 따라 엽록체의 종류가 다른 것으로 판단된다.

**문과 강 수준에서의 분류 결과의 비교**

문과 강 수준에서 해삼의 경우에는 비교적 적은 수의 분류군에 대부분의 염기서열이 몰려 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2). 해삼에 가장 많이 존재하는 것은 *Fusobacteria* 문의 *Fusobacteria* 강으로 평균 51.3%의 비율을 보인다. SC4만 *Fusobacteria* 강이 0.3% 밖에 되지 않아 다른 개체와 큰 차이를 보이거나, 다른 개체의 경우에는 최소 47% 이상의 양을 차지하는 우점종이라고 할 수 있었다. SC4에서 가장 많이 발견되는 그룹은 *Bacteroidetes* 문의 *Flavobacteria* 강으로 60.6%를 차지하였다. *Flavobacteria* 강은 다른 개체에도 7.0–26.8%까지 존재하고 있어 해삼 장내 세

균 군총에서 두번째 우점종이라고 할 수 있다. *α-Proteobacteria* 강이 세번째 우점종(평균 6.5%)으로 나타나지만 해수에서 발견되는 양만큼 되지는 않는다. 또한 해수에서 우점으로 발견되는 *γ-Proteobacteria* 강은 많이 발견되지 않아 해수와는 전혀 다른 세균 군총을 이루는 것을 알 수 있었다.

새우의 경우 문과 강 수준에서 해삼보다 다양한 분류군이 존재하는 것을 볼 수 있었다. 해삼의 경우 특정 문이나 강이 높은 비율로 존재하면서 다른 문이나 강의 비율은 낮은 편이나 새우의 경우 여러 문과 강이 골고루 분포하고 있는 것을 볼 수 있었다. 그러나 개체에 따라서 분류군의 종류와 비율의 편차가 심한 것을 볼 수 있었다. 새우 시료 사이에서 공통적으로 관찰되는 분류군으로 2.1–20.7% (평균 11.6%)를 차지하는 *γ-Proteobacteria* 강과 2.6–20.9% (평균 9.7%)를 차지하는 *Bacilli* 강과 2.9–10.5% (평균 7.0%)를 차지하는 *Flavobacteria* 강이 있었다. 이 밖에도 *α-Proteobacteria* 강(평균 9.0%), *δ-Proteobacteria* 강(평균 6.8%), *Actinobacteria* 강(평균 4.2%) 등이 비교적 상당한 비율로 존재하는 분류군이라고 할 수 있었다. 반면에 평균적으로 가장 높게 존재하는(평균 16.0%) *Cyanobacteria* 문의 *Synechococcophycidae* 강은 처음 3 개체에서는 25.1–37.5%의 비율로 우점하고 있으나 다른 세 개체에서는 1.9% 미만으로 존재하여 개체간의 편차가 매우 큰 것을 볼 수 있었다. 특이하게 3 개체의 새우(SH04, SH17, SH18)에서는 *Tenericutes* 문의 *Mollicutes* 강의 비율이 각각 55.0%와 31.8%와 6.5%로 매우 높은 것을 볼 수 있었다.

**속 수준의 분류 결과 비교**

Figure 3은 해삼과 새우의 장내 세균 다양성을 속 수준에서 비교해 본 것으로 적어도 하나의 시료에서 1% 이상의 비율을 보이는 속들만 나타낸 그림이다. Figure 3에서 분류군의 이름에서 f\_\_ , g\_\_ 와 같이 나타내진 것은 각각 family (과), genus (속) 수준에서 미분류군(unclassified group)을 나타낸다. 이는 주로 비배양적인 분석을 통하여 환경에서 얻어진 서열만 존재하는 집단이라는 것을 의미한다(McDonald et al., 2012). Figure 3의 전체

Phylum; Class	SC1(%)	SC2(%)	SC3(%)	SC4(%)	SC5(%)	SC6(%)	SH02(%)	SH04(%)	SH06(%)	SH12(%)	SH17(%)	SH18(%)
p_Actinobacteria; c_Acidimicrobia	0.1	0.3	0.9	1.2	0.5	0.8	1.9	0.6	1.5	2.0	0.4	3.1
p_Actinobacteria; c_Actinobacteria	0.2	0.1	0.7	4.6		12.9	2.3	3.8	8.6	5.6	1.5	3.2
p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia		0.9	1.2	0.6	2.7	4.3	1.7	0.6	3.6	6.1		2.6
p_Bacteroidetes; c_Flavobacteria	15.1	18.8	26.8	60.6	7.0	9.2	5.8	2.9	9.5	10.5	9.7	3.6
p_Bacteroidetes; c_Sphingobacteria	0.9	0.6	0.7	0.4	1.3	0.7	1.3	0.2	1.0	0.6	0.1	0.7
p_Chloroflexi; c_Anaerolineae			0.1	0.1		0.1	2.9	0.7	2.7	1.4	0.1	1.7
p_Cyanobacteria; c_Nostocophycidae							3.1	0.1	0.2	0.1		0.6
p_Cyanobacteria; c_Oscillatorophycidae			0.7			0.1	1.3		9.2	0.3	0.4	1.2
p_Cyanobacteria; c_Synechococcophycidae							37.5	25.1	28.1	0.5	3.0	1.9
p_Firmicutes; c_Bacilli	0.2	0.2	0.9	3.9	0.1	2.0	8.2	2.6	5.9	5.8	20.9	14.9
p_Firmicutes; c_Clostridia	0.4	0.1	1.3	3.5	0.8	3.3	1.1	0.4	0.6	1.1	0.2	6.8
p_Fusobacteria; c_Fusobacteria	66.6	66.9	47.0	0.3	77.1	50.1					8.9	0.5
p_Lentisphaerae; c_Lentisphaeria	0.2	1.2	0.3		0.1	0.1						
p_Proteobacteria; c_Alphaproteobacteria	10.6	0.8	7.7	10.1	2.5	7.4	8.3	3.3	7.1	18.7	0.8	15.6
p_Proteobacteria; c_Betaproteobacteria			0.1	0.1		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1.0	0.8
p_Proteobacteria; c_Deltaproteobacteria	0.6	1.3	2.4	3.1	2.3	2.5	9.1	1.1	8.3	12.9	0.1	9.1
p_Proteobacteria; c_Epsilonproteobacteria	2.3	3.5	4.7	5.8	1.2	2.8	0.2		4.6	18.7		2.5
p_Proteobacteria; c_Gammaproteobacteria	1.6	4.9	3.8	4.2	3.5	2.9	8.8	2.1	5.9	11.7	20.1	20.7
p_Tenericutes; c_Mollicutes	0.3			0.1			1.6	55.0	0.1	0.4	31.8	7.2

Fig. 2. Classification of reads in the phylum-class level according to samples. The taxonomic group equal or more than 1% in at least one sample was indicated. Bar shows the relative ratio of the taxonomic group in each sample.

속 중에 미분류 속의 비율은 해삼과 새우에서 각각 전체 62%, 59%를 보이고 미분류 과의 경우에는 각각 34%, 19%의 비율을 보이는 것을 확인 할 수 있었다.

문과 강 수준의 분류와 마찬가지로 해삼의 경우는 몇몇 속이 전체 비율의 대부분을 차지하고 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3A). 해삼에서 가장 많이 존재하는 속은 *Propionigenium*이며

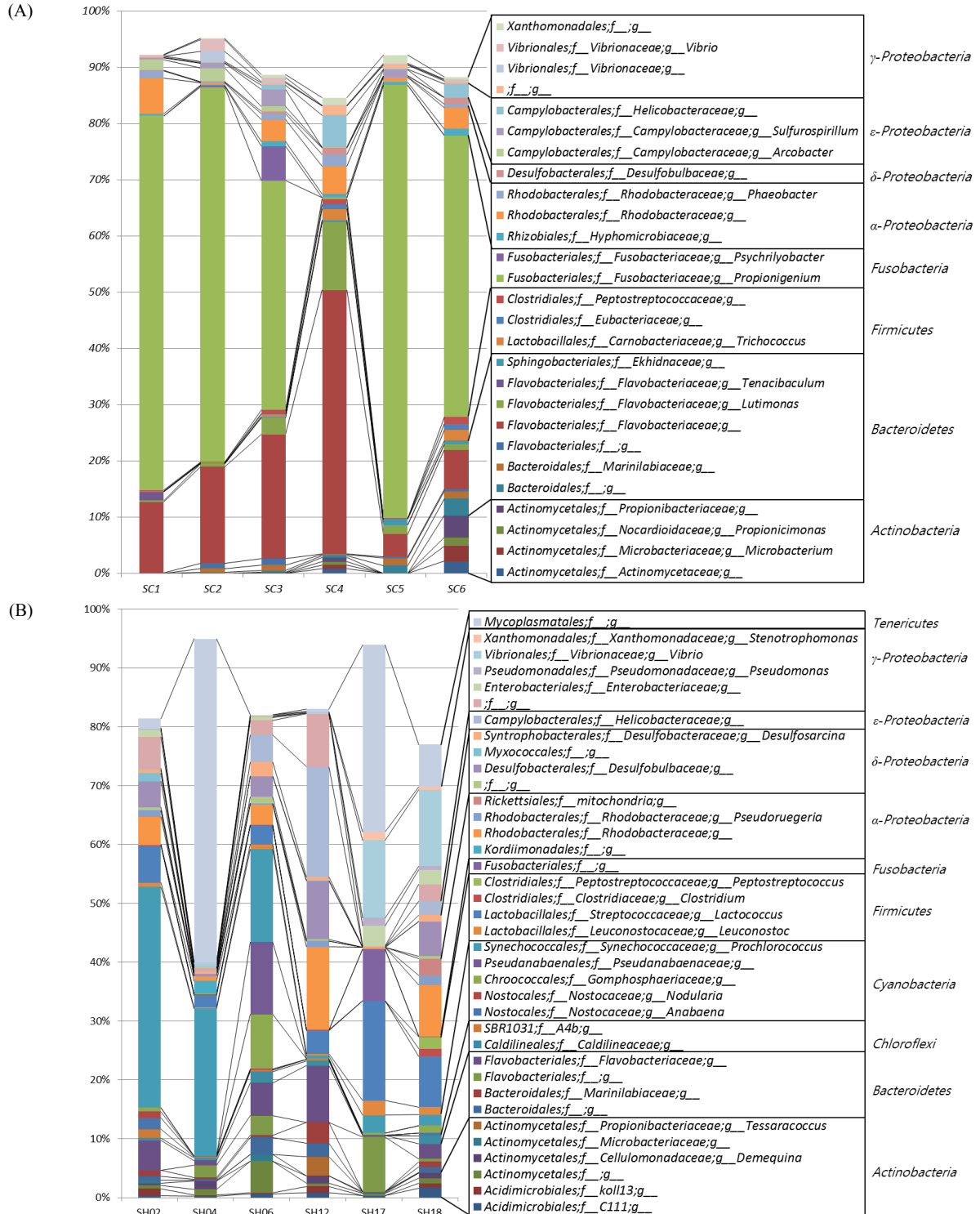


Fig. 3. Classification of reads in the level of genus from (A) sea cucumbers and (B) shrimps. The genera more than 1% in at least one sample were shown.

SC4를 제외하면 40-77%까지 매우 많은 양을 차지하고 있다. SC4의 경우에는 0.6%로 적은 양을 나타내었다. *Fusobacteria* 문의 대부분은 *Propionigenium* 속에 속한다는 것을 확인할 수 있었다. *Flavobacteriaceae*에 속해 있는 속 수준의 미분류군이 높은 비율로 존재하였다(4-46.9%). SC4의 경우에는 *Flavobacteriaceae*의 속이 가장 많은 양(46.9%)을 차지하고 있을 뿐만 아니라 같은 과에 속하는 속인 *Lutimonas*가 12.1%로 많은 양을 차지하였다. 특히하게도 SC4와 SC6에는 *Helicobacteraceae*에 속하는 미분류 속이 각각 5.7%과 2.5%로 상당량 존재하는 것을 볼 수 있었다.

새우의 경우(Fig. 3B), 해삼과 다르게 매우 다양한 분포를 보여주고 있다. *Lactococcus* 속의 경우 전체 새우에 모두 2% 이상 최대 16.9%까지 존재하였다. 그 외로 *Leuconostoc*과 같은 유산균이 비록 소량(0.2-2.5%)이지만 새우에 전체적으로 분포하고 있었다. *Rhodobacteraceae* 과의 미분류 속(0.3-14.1%)이 비교적 높은 비율로 존재하고 있으며, 해삼에서 우점종으로 존재하는 *Bacteroidetes* 문의 *Flavobacteria* 강에 속하는 속들도 상당량으로 발견되었다. *Flavobacteriaceae* 과에 속하는 알려지지 않은 속(0.4-9.6%) 뿐만 아니라 *Flavobacteriales* 목에 속하는 알려지지 않은 속(4개체, 0.5-9.3%) 또한 많이 존재하고 있는 것을 볼 수 있었다.  $\delta$ -*Proteobacteria* 문에 속하는 *Desulfobulbaceae* 과에 속하는 그룹도 비교적 높은 비율로 발견되었다(4개체, 4-9.9%). *Prochlorococcus* 속(3개체, 15.8-37.5%), *Mycoplasmatales* 목의 과수준의 미분류군(3개체, 7.2-55%)과 *Helicobacteraceae*의 미분류 속(3개체, 2.4-18.7%), *Vibrio* 속(2개체 13-13.2%) 등이 존재하는 것을 볼 수 있었다. 그 외로 특정 개체에만 높은 비율로 존재하는 분류 군들이 관찰이 되었다.

**분류군의 관찰 빈도수 비교**

해삼과 새우의 속과 강 수준의 분류군의 분포와 관찰 빈도수를 벤다이어그램으로 나타내었다(Fig. 4). 12개의 모든 시료에서 관찰되는 속은 *Vibrio* 속 하나 밖에 없었으며 *Phaeobacter*, *Pseudoruegeria*, *Lactococcus*, *Clostridium*과 같은 속들은 해삼과 새우에서 공통적으로 높은 비율(총 75% 이상)로 관찰되었다. 다른 속들은 해삼과 새우에 각기 존재하거나 해삼과 새우에서 발견되는 빈도수가 높지 않았다. 강 수준에서의 분류군의 분포를 살펴보면 공통

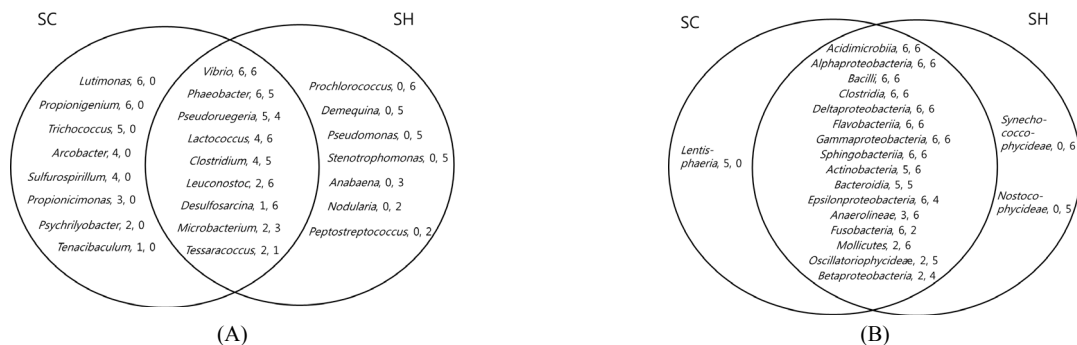
적으로 발견되는 강이 많이 존재하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4B). 총 19개의 강 중 3개의 강 만이 해삼 또는 새우에만 존재하며, 해삼의 경우 *Lentisphaeria*가, 새우의 경우 *Synechococcophycidae*와 *Nostocophycidae*가 특이적으로 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

**고찰**

해삼에서 가장 우점하고 있는 두 속 중 하나인 *Propionigenium*은 공식적으로 분류된 종이 2종 밖에 없으며 절대 혐기성 균으로 알려져 있었다(Both et al., 1991; Janssen and Liesack, 1995). *Propionigenium maris*의 경우 갯벌의 진흙에서 분리되었으며 혐기성 발효를 하는 것으로 알려져 있으며(Janssen and Liesack, 1995) 저서생물인 해삼의 특성을 고려하면 해삼의 장에 존재하는 *Propionigenium* 균들이 진흙에서 유래했을 수 있으며, 장내에서 혐기성 발효에 관여할 수 있을 것으로 예측된다.

또 다른 우점종인 *Flavobacteria*의 경우 동물의 공생자로 알려져 있으며 기회감염균으로도 알려져 있다(Bernardet and Nakagawa, 2006). 일반적으로 호기성으로 알려져 있으나 혐기성인 속들도 많이 알려져 있다(Bernardet and Nakagawa, 2006). SC4에 많이 나타난 *Flavobacteria*의 다른 균인 *Lutimonas*의 경우 절대 호기성 균으로 알려져 있다(Yang et al., 2007). SC4와 같은 경우는 장내 특성 변화로 인하여 호기성 균이 많이 자라서 다른 해삼과 다른 세균 군집을 가지고 있을 가능성도 있다.

*Propionigenium* 속과 *Flavobacteria*의 미분류 속은 서로 음의 상관관계를 가지고 있는 것을 관찰 할 수 있는데 *Flavobacteria*의 미분류 속이 호기적 특성을 가지고 있다고 가정하면 해삼 내 장내 산소 농도의 변화 등에 따라서 세균의 특성이 달라졌다고 가정할 수 있을 것이다. 이는 SC4에서 상당량의 *Helicobacteraceae*에 속한 미분류 균이 관찰되는데 일반적으로 이들은 미호기성(microaerophilic)인 것으로 알려져 있기 때문에(Bury-Mone et al., 2006) 장내 산소의 농도의 변화가 관여되었을 가능성도 있다. *Helicobacteraceae* 과는 또한 숙주에 기생하여 질병을 일으키는 것으로 알려져 있기 때문에 이들이 해삼에게 미치는 영향에 대한 연구가 필요할 것이다.



**Fig. 4.** Venn diagrams showing the distribution and detection frequency of taxa in the level of (A) genus and (B) class for sea cucumbers (SC) and shrimps (SH). The first number following taxon name is the detection frequency in sea cucumbers and the second number is in shrimps. Unclassified taxon is not included.

새우의 경우에 많은 양의 *Lactococcus* 속이 발견이 되고, *Leuconostoc* 속도 비록 소량이지만 골고루 발견되는 것은 새우의 장내에 유산균이 존재할 수 있는 혐기성 환경이 유지되고 있는 것을 보여주고 있다. 또한 *Desulfosarcina*와 같은 황산염환원균의 서열이 발견되는 것을 보면 장내에서 절대 혐기성 환경이 존재하고 있다는 것을 보여주고 있다. 특히 유산균의 경우 유익균으로서 다른 병원성 균들의 생장을 억제하거나 장내 면역반응 등을 활성화하는 특성을 가지고 있기 때문에 산업적 응용가능성을 보여줄 수 있는 것들이라고 할 수 있다. 일부 개체에서 *Mycoplasmatales* 목의 미분류 속이 높은 비율로 발견되는데 *Mycoplasma*에 속하는 속은 숙주세포에 기생하는 것으로 잘 알려져 있으며 이는 새우의 병원성과 연관지어 특기할만하다. 또한 연어에서도 *Mycoplasma*가 보고된 바 있다(Holben *et al.*, 2002). 새우의 경우에는 많은 종류의 속들이 다양하게 존재하는 것을 볼 수 있으며 개체에 따라서 서로 다른 분포를 나타내고 있다. 이는 새우가 양식장 환경에 영향을 많이 받고 있다는 것을 나타내는 것으로 새우에 공통적으로 존재하는 세균을 찾아보기 위해서 좀 더 많은 양의 시료가 필요할 것이다.

세균의 16S rRNA 유전자를 분석하다 보면 많은 양의 엽록체의 16S rRNA가 발견이 되기도 한다. 이러한 엽록체의 서열은 분석시 주로 제거되거나 무시된다. 그러나 미생물 군집의 다양성을 분석할 때 엽록체의 서열이 너무 많은 양을 차지하게 되면 다양성 분석과정에서 영향을 미칠 수 있다. 또한 엽록체 서열 분석을 통하여 해양 동물의 식물성 또는 조류 먹이의 다양한 면을 보여주는 기능도 가능하다.

해삼과 새우에서 상당부분의 서열들은 아직까지 분류가 되지 않은 군들, 다시 말하면, 환경에서 얻어진 서열만으로 이루어진 군들과 가까운 것으로 나타났다. 이는 해삼과 새우에 존재하는 많은 미생물들이 아직까지 배양이 되지 않았으며 새로운 분류군으로 분류될 수 있는 것들이 많이 존재하고 있다는 것을 의미한다. 현재 세균의 경우 배양을 통하지 않는 연구를 통하여 약 60여 개 이상의 문(phylum)이 알려져 있으나 이중 배양이 된 균주를 가지고 있는 문은 아직까지도 절반 정도 밖에 되지 않다(Rinke *et al.*, 2013). 이는 해삼과 새우에서 미분류군이 많은 이유를 설명해 준다. 실제로 해면과 같은 해양 무척추 동물의 경우에도 기존에 분류학적으로 알려지지 않은 많은 수의 서열들이 발견되고 있다(Schmitt *et al.*, 2012). 예를 들어 “*Poribacteria*”와 같은 그룹은 해면에서만 특이적으로 발견되는 문으로서 아직까지 순수 배양이 된 균주가 없기 때문에 후보 문(candidate phylum)으로만 정의 되어 있다(Fieseler *et al.*, 2004). 새우나 해삼 등의 장내 세균들에 아직까지 그 특성이 밝혀지지 않은 많은 세균들이 존재한다는 점에서 새로운 미생물자원으로 이용될 수 있을 것이다. 본 연구는 경제 산업적으로 중요한 해양 무척추동물인 해삼과 새우의 장내 세균의 다양성을 대용량 서열 분석법으로 살펴본 연구로서 기존에 알지 못했던 해삼과 새우의 공생 미생물의 다양성을 살펴볼 수 있었으며 장내 미생물과 해양 생물간의 상호작용에 대한 기본 자료를 제공하는 연구라고 할 수 있다.

## 적 요

16S rRNA 유전자를 대상으로 454 파이로서열 분석법을 이용하여 해삼(*Apostichopus japonicus*)과 새우(*Litopenaeus vannamei*)의 장내 세균의 다양성을 분석하였다. 해삼의 경우, 대부분의 서열은 두 개의 속과 연관성이 있는 것으로 나타났다. 하나는 *Fusobacteria* 문의 *Propionigenium* 속이며, 다른 하나는 *Bacteroidetes* 문의 *Flavobacteriaceae* 과에 속하는 미분류 속이었다. 새우는 해삼에 비해 다양한 속들을 포함하고 있었으며 *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Prochlorococcus*, *Vibrio* 속들과 *Flavobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, *Helicobacteraceae* 과와 *Mycoplasmatales* 목에 속하는 미분류 속들을 포함하고 있었다. 해삼과 새우의 속들의 절반 이상이 환경에서 비배양적으로 얻어진 서열만 존재하는 미분류된 속인 것으로 확인되었다. 대용량 454 파이로서열 분석법을 통하여 해삼과 새우의 장내 세균의 다양성을 밝힐 수 있었으며, 그 결과 해삼과 새우는 아직까지 밝혀지지 않는 새로운 미생물을 많이 포함하고 있는 것을 알 수 있었다.

## 감사의 말

이 논문은 2010학년도 부경대학교의 지원을 받아 수행된 연구임 (PKS-2010-0534).

## 참고문헌

- Acosta-Martínez, V., Dowd, S., Sun, Y., and Allen, V. 2008. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 2762–2770.
- Amann, R.L., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143–169.
- Bernardet, J.-F. and Nakagawa, Y. 2006. An Introduction to the Family *Flavobacteriaceae*. Vol. 7, pp. 455–480. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. In Rosenberg, E., Stackebrandt, E., Thompson, F., Lory, S., and DeLong, E.F. (eds.), Springer, New York, USA.
- Binladen, J., Gilbert, M.T., Bollback, J.P., Panitz, F., Bendixen, C., Nielsen, R., and Willerslev, E. 2007. The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. *PLoS One* **2**, e197.
- Both, B., Kaim, G., Wolters, J., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., and Ludwig, W. 1991. *Propionigenium modestum*: a separate line of descent within the eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **62**, 53–58.
- Bury-Mone, S., Kaakoush, N.O., Asencio, C., Megraud, F., Thibonnier, M., De Reuse, H., and Mendz, G.L. 2006. Is *Helicobacter pylori* a true microaerophile? *Helicobacter* **11**, 296–303.
- Castroverde, C.D., San Luis, B.B., Monsalud, R.G., and Hedreyda, C.T. 2006. Differential detection of vibrios pathogenic to shrimp by multiplex PCR. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **52**, 273–280.
- Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., and Verstraete, W. 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *J. Appl.*

- Microbiol.* **109**, 1643–1649.
- Deng, H., He, C., Zhou, Z., Liu, C., Tan, K., Wang, N., Jiang, B., Gao, X., and Liu, W.** 2009. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture* **287**, 18–27.
- Dowd, S.E., Sun, Y., Wolcott, R.D., Domingo, A., and Carroll, J.A.** 2008. Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned Salmonella-infected pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* **5**, 459–472.
- Edwards, R.A., Rodriguez-Brito, B., Wegley, L., Haynes, M., Breitbart, M., Peterson, D.M., Saar, M.O., Alexander, S., Alexander Jr, E.C., and Rohwer, F.** 2006. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics* **7**, 57.
- Ercolini, D.** 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods* **56**, 297–314.
- Fieseler, L., Horn, M., Wagner, M., and Hentschel, U.** 2004. Discovery of the novel candidate phylum "Poribacteria" in marine sponges. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3724–3732.
- Holben, W.E., Williams, P., Gilbert, M., Saarinen, M., Sarkilahi, L.K., and Apajalahti, J.H.** 2002. Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel *Mycoplasma* phylotype in farmed and wild salmon. *Microb. Ecol.* **44**, 175–185.
- Hovdaa, M.B., Lunestad, B.T., Fontanillas, R., and Rosnes, J.T.** 2007. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **272**, 581–588.
- Jang, I., Kim, J., Cho, K., Seo, H., Cho, Y., Gopalakannan, A., and Kim, B.** 2008. Intensive culture of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited water exchange. I. Indoor nursery culture of postlarvae. *J. Aquaculture* **21**, 339–345.
- Janssen, P.H. and Liesack, W.** 1995. Succinate decarboxylation by *Propionigenium maris* sp. nov., a new anaerobic bacterium from an estuarine sediment. *Arch. Microbiol.* **164**, 29–35.
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W.A., Gonzalez, A., Caporaso, J.G., and Knight, R.** 2012. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter 1, Unit 1E 5.
- Lee, J.H., Yi, H., Jeon, Y.S., Won, S., and Chun, J.** 2012. TBC: a clustering algorithm based on prokaryotic taxonomy. *J. Microbiol.* **50**, 181–185.
- Li, X., Yu, Y., Feng, W., Yan, Q., and Gong, Y.** 2012. Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae. *J. Microbiol.* **50**, 29–37.
- Lightner, D.V.** 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J. Invertebr. Pathol.* **106**, 110–130.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bembien, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., and *et al.*** 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376–380.
- McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R., and Hugenholtz, P.** 2012. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* **6**, 610–618.
- Pangastuti, A., Suwanto, A., Lestari, Y., and Suhartono, M.T.** 2010. Bacterial communities associated with white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at early developmental stages. *Biodiversitas* **11**, 65–68.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, L.J., Cheng, J.F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B.K., Gies, E.A., and *et al.*** 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* **499**, 431–437.
- Robert-Pillot, A., Copin, S., Gay, M., Malle, P., and Quilici, M.L.** 2010. Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: fast and reliable quantification by real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **143**, 190–197.
- Roh, S.W., Kim, K.H., Nam, Y.D., Chang, H.W., Park, E.J., and Bae, J.W.** 2010. Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *ISME J.* **4**, 1–16.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., and *et al.*** 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–7541.
- Schmitt, S., Tsai, P., Bell, J., Fromont, J., Ilan, M., Lindquist, N., Perez, T., Rodrigo, A., Schupp, P.J., Vacelet, J., and *et al.*** 2012. Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *ISME J.* **6**, 564–576.
- Seo, J.Y., Kim, D.G., Kim, G.U., Cho, S.S., Park, H.G., and Lee, S.M.** 2009. Effect of different substrates in the rearing tank on growth and body composition of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *J. Aquaculture* **22**, 118–121.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W.** 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 655–671.
- Yang, S.J., Choo, Y.J., and Cho, J.C.** 2007. *Lutimonas vermicola* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the marine polychaete *Periserrula leucophryna*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1679–1684.