

동해 남부 해역 퇴적물과 저층 해수 세균 군집 조성의 계절적 변화 연구

최동한^{1,2} · 김병모^{3,4} · 최태섭³ · 이정석^{3,*} · 노재훈^{2,5} · 박영규⁶ · 강성길⁷

¹한국해양과학기술원 해양바이오연구부

²과학기술연합대학원대학교

³(주)네오엔비즈 환경안전연구소

⁴세종대학교 지구환경과학과

⁵한국해양과학기술원 해양생태계연구부

⁶한국해양과학기술원 해양순환·기후연구부

⁷한국해양과학기술원 부설 선박해양플랜트연구소 해양CCS연구단

Seasonal Variation of Bacterial Community Composition in Sediments and Overlying Waters of the South East Sea

DONG HAN CHOI^{1,2}, BYEONG-MO GIM^{3,4}, TAE SEOB CHOI³, JUNG-SUK LEE^{3,*}, JAE HOON NOH^{2,5},
YOUNG-GYU PARK⁶ AND SEONG-GIL KANG⁷

¹Marine Biotechnology Research Division, Korea Institute of Ocean Science and Technology (KIOST),
787 Haean-ro, Sangnok-gu, Ansan-si, Gyeonggi-do 426-744, Korea

²Korea University of Science and Technology, 217 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-333, Korea

³NeoEnBiz Co. Daewoo Technopark A-1306, Dodang-dong, Bucheon-si, Gyeonggi-do 420-806, Korea

⁴Department of Earth & Environmental Sciences, Sejong University, 209 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 143-747, Korea

⁵Marine Ecosystem Research Division, Korea Institute of Ocean Science and Technology (KIOST),
787 Haean-ro, Sangnok-gu, Ansan-si, Gyeonggi-do 426-744, Korea

⁶Ocean Circulation and Climate Research Division, Korea Institute of Ocean Science and Technology (KIOST),
787 Haean-ro, Sangnok-gu, Ansan-si, Gyeonggi-do 426-744, Korea

⁷Offshore CCS Research Unit, Korea Research Institute of Ships and Ocean Engineering,
32 1312beon-gil, Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea

해양 환경에서 세균은 다양한 생지화학적 순환에 있어서 중요한 역할을 수행하고 있으며, 그들의 다양성에 대한 정보는 생태계에서 세균의 생지화학적 기능을 이해하는데 중요하다. 본 연구는 CO₂ 해양지중저장의 후보지인 동해 남부해역의 표층 퇴적물과 퇴적물 위의 저층 해수에서 최신 연구 기법인 pyrosequencing을 통하여 세균의 계절적 다양성을 분석함으로써, 동해 퇴적물 세균상의 특성을 이해하고자 하였다. 퇴적물에서는 대부분의 시기에 *Gammaproteobacteria*가 우점한 반면, 저층 해수에서는 *Alphaproteobacteria*가 우점하여 두 서식처에서 세균의 다양성은 큰 차이를 보였다. 또한 속 수준의 다양성 분석에서도 저층 해수에서는 대부분의 시기에 SAR11 그룹에 속하는 *Pelagibacter*가 가장 우점한 반면, 퇴적물 시료에서는 *Gammaproteobacteria*에 속하는 미동정 속이 가장 우점하였다. 그러나 두 서식처 모두에서 5% 이상의 점유율을 보인 속의 수는 10 속 미만으로 소수였으며, 낮은 점유율을 갖는 많은 종류의 세균들이 군집 내에 공존하는 공통적인 특성이 나타났다. 본 연구의 세균 다양성 연구는 동해 저층 해수 및 퇴적물의 세균 다양성에 대한 특성의 이해와 더불어 CO₂ 해양지중저장 사업의 진행에 따른 세균의 다양성 및 기능 변화에 대한 사전 자료 및 해역이용영향평가 배경 자료로 활용될 수 있을 것이다.

Bacteria play an important role in biogeochemical cycles in marine environments and their functional attributes in ecosystems depend primarily on species composition. In this study, seasonal variation of bacterial diversity was investigated by pyrosequencing of 16S rDNA in surface sediment and overlying seawater collected in the south East Sea, planned for the site of CO₂ sequestration by the carbon capture and storage (CCS) project. *Gammaproteobacteria* was dominant in the sediment in most seasons, whereas *Alphaproteobacteria*

was a most dominant group in the overlying water. Thus, the bacterial diversity greatly differ between sediment and seawater samples. On the genus level, bacterial diversity between two habitats was also different. However, the number of genera found over 5% were less than 10 in both habitats and the bacterial community was composed of a number of diverse minor or rare genera. Elevation of CO₂ concentration during a CO₂ storage process, could result in change of bacterial diversity. Thus, this study will be very useful to access the effect of CO₂ on bacterial diversity and to predict functional change of the ecosystem during the process of CCS project.

Key words: Bacteria, Carbon capture and storage, East Sea, Diversity, Pyrosequencing, 16S rDNA, Seawater, Sediment

서 론

해양 퇴적물에서 세균은 높은 다양성을 보이며 전체 미생물의 55-85%가 존재하는 것으로 여겨진다(Whitman *et al.*, 1998; Torsvik *et al.*, 2002). 이들 미생물은 침강하는 유기물을 분해하여 재순환시켜 지구적 탄소 순환에서 매우 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 질소 및 황 등의 주요 원소들의 생지화학적 순환에도 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Henriksen 1980; Tiedje 1988; Ward 1986; Arrigo 2005). 이러한 세균의 생지화학적 기능은 각각의 과정에 참여하는 세균의 종류 및 양적 분포가 중요하며, 이들 기능 그룹의 분포가 생태계의 상대적인 생지화학적 과정을 결정하는 것으로 여겨진다. 따라서, 세균의 다양성에 대한 이해는 세균의 생지화학적 기능적 측면을 이해하기 위한 출발점으로 인식된다. 이러한 중요성에도 불구하고, 우리나라 주변 해역의 퇴적 환경에서 세균의 다양성에 대한 연구는 매우 제한적이며(이 등, 2001; 김 등, 2010; Lee *et al.*, 2013), 대부분 PCR-cloning-sequencing 방법을 통해 분석되어 왔다. 최근 차세대염기서열 분석법의 발전으로 고효율, 저비용으로 대량의 염기서열의 분석이 가능해졌으며, 이를 통해 미생물 다양성에 대한 심도 깊은 결과들이 얻어지고 있다(Huse *et al.*, 2007; Roesch *et al.*, 2007; Acosta-Martínez *et al.*, 2008). 이러한 대량염기서열 분석은 해양 미생물 군집이 많은 수의 '상대적으로 낮은 점유율을 갖는 종(rare species)'이 존재하며, 세균 다양성이 매우 높음을 밝혀냈다(Pedros-Alió 2006; Galand *et al.*, 2009). 이러한 결과는 미생물의 다양성을 이해하기 위해서는 많은 수의 염기서열 정보가 필요하며, 전통적인 '클론 라이브러리' 연구는 매우 제한적인 다양성 정보만 얻을 수 있으므로 pyrosequencing과 같은 대량 염기서열 분석 방법을 적용할 필요성을 시사한다.

국내에서는 해양의 퇴적층을 대상으로 한 이산화탄소 지중저장 기술(Carbon dioxide Capture and Storage, CCS)이 2020년 이후 실용화를 목표로 연구되고 있다. 저장된 CO₂는 안전한 해저 지층 구조에 저장하더라도 CCS 사업 과정 또는 중장기적인 지질학적 구조 변형으로 인해 저장된 CO₂가 해양 환경으로 누출될 가능성이 존재한다(Monastersky, 2013). 누출된 CO₂는 대기에 비해 확산이 느리고 해수의 화학적 특성을 변화시킬 수 있으므로 장기적으로 해양 생물 및 생태계에 대해 피해를 초래할 가능성이 있다. 예를 들면, 주변 환경이 거의 변하지 않는 심해에 서식하는 생물의 대부분은 누출된 CO₂에 의한 pH 변화로 인해 주변 해수의 pH가 0.1 정도만 변해도 유의한 생리적인 영향을 받을 수 있다는 연구 결과가 있으며(Seibel and Walsh, 2003), 상대적으로 pH 변화에 잘 적응하는 연안 생물의 경우에도 pH가 1.0 이상 급격하게 변화하게

되면 피해를 받을 수 있다(Knutzen, 1981). 따라서, CCS 사업 추진 과정에서 환경 및 생태계의 보존과 유지에 각별한 노력을 기울여야 하며, 이에 대한 환경 감시 프로그램이 필요하다. 따라서, 본 연구는 최근 이산화탄소 해양지중저장 가능 지역으로 발표된 동해 남부해역(MLTM, 2012)의 해양 미생물 특성 파악을 위해 수행하였다. 대상 해역의 표층 퇴적물과 퇴적물 위의 저층 해수에서 최신 연구 기법인 pyrosequencing을 통하여 세균의 계절적 다양성을 분석하여 동해 퇴적물 세균상의 특성을 이해하고, 또한 이산화탄소 해양지중저장사업의 진행에 따른 세균의 다양성 및 기능 변화를 평가하기 위한 사전 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

연구 해역 및 시기

동해 남부해역 인근은 2012년 4월에 50억 톤 규모의 이산화탄소 지중 저장 가능한 지역으로 발표되었다(MLTM, 2012). 본 연구에서는 발표된 지역의 중앙부에 위치한 2개 정점을 선정하여 조사하였다(Fig. 1). 조사 정점인 정점 K01과 K02는 수심이 약 160 m 와 140 m로 비교적 완만한 경사를 갖는 해역에 위치하였다. 조사 해역의 퇴적물의 조성은 모래와 찰니가 각각 83~99%와 0.1~9.9%를

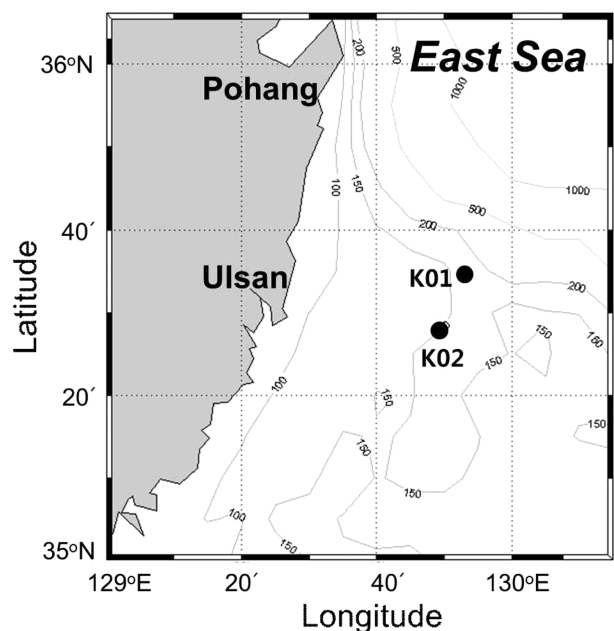


Fig. 1. A map showing the sampling stations.

차지하여 사질의 특성을 나타내었다. 시료는 2012년 5월, 9월과 11월 및 2013년 2월에 걸쳐 총 4회 채취하여 계절적 변동을 파악하고자 하였다.

시료 채취 및 DNA 추출

세균의 다양성 분석은 퇴적물과 퇴적물로부터 약 5 m 위에 있는 저층 해수 시료에 대해서 수행되었다. 퇴적물은 스미스 맥킨타이어 그랩(Smith McIntyre Grab, 표면 면적: 0.1 m²)을 이용하여 채취하였으며, 표층 0.5 cm 퇴적물을 멸균된 50 ml 플라스틱 튜브에 넣어 냉동 보관하였다. 해수는 니스킨 채수기를 이용하여 채수하였으며, DNA 분석을 위해 해수 2 l를 0.2 μm 막여과지(cellulose acetate, 지름 47 mm, Macherey-Nagel)에 여과한 후, 여과지를 냉동(-70 °C) 보관하였다.

퇴적물 및 수층 시료의 DNA는 FastDNA SPIN kit(Cat. No. 6560-200, MP Biomedicals)를 이용하여 추출하였다. 2013년 2월 정점 K01의 수층 시료는 추출된 DNA 양이 많지 않아 분석되지 않았다.

16S rRNA 유전자의 pyrosequencing 및 염기서열 분석

세균의 다양성 분석을 위해 16S rRNA 유전자의 v1~v3 부위를 PCR 증폭한 후 pyrosequencing 방법으로 시퀀스 정보를 얻었다. 세균의 증폭을 위한 프라이머 및 PCR 조건은 Chun *et al.*(2010)과 Jeon *et al.*(2013)의 방법에 따랐다. Pyrosequencing을 통한 염기서열의 분석은 GS-Junior 및 GS-FLX Titanium을 이용하여 분석하였으며, 각각 다른 barcode 염기서열을 붙인 프라이머를 이용하여 증폭한 2-8개의 시료를 섞어 pyrosequencing 분석을 수행하였으며, 총 7회 pyrosequencing을 수행하였다. 얻어진 reads는 먼저 시료에 특이적인 barcode의 염기서열을 이용하여 시료별로 구분한 후, 길이가 짧거나(300 bp 이하), 2개 이상의 N을 포함한 read들을 제거하여 시퀀싱 오류의 가능성이 있는 read를 제거하였다. 이후, 각 reads에서 프라이머 서열 부분을 제거하였으며, Blastn과 EzTaxon-e 데이터베이스를 이용하여 박테리아 16S rDNA 이외의 비특이적으로 증폭된 reads를 제거하였다. homopolymer는 Jeon *et al.*(2013)의 방법에 따라 교정하였으며, 추가적으로 PCR 과정에서 생성될 수 있는 chimera를 Bellerophon의 방법(Huber *et al.*,

2004)을 이용하여 제거하였다. 각 시퀀스의 분류학적 동정은 EzTaxon-e 데이터베이스의 계층적 분류 정보와 'pairwise global sequence alignment'를 이용하여 동정되었다(Jeon *et al.*, 2013). 서로 97% 이상의 유사도를 갖는 시퀀스들을 하나의 OTU(operational taxonomic unit)로 정의하였으며, 시료 사이의 다양성을 비교하기 위해 시료당 2,181개의 시퀀스를 무작위로 추출하여 시료 당 시퀀스의 수를 표준화하였다. Rarefaction 분석, Good's coverage, 다양성지수(diversity indices)와 종풍부도(species richness)는 Mothur package를 이용하여 계산하였다(Schloss *et al.*, 2009). 시료 간 다양성의 차이는 CLcommunity™ (<http://www.chunlab.com/community>) 프로그램에서 Fast UniFrac 알고리즘(Hamady *et al.*, 2010)을 이용하여 분석하였다. 본 연구에서 얻어진 시퀀스 정보는 NCBI의 SRA 데이터베이스(accession number, SRX528300)에 등록하였다.

결과 및 고찰

Pyrosequencing 자료의 특성

총 15개의 시료로부터 103,671개의 시퀀스 정보가 얻어졌다. 시료 당 얻어진 시퀀스의 개수는 2,671-13,064개 범위(평균 6,911개)로 5배의 차이를 나타냈다. 각 시료들에서 염기서열의 평균 길이는 442-482 bp 범위를 보여 시퀀싱 결과는 질적으로 양호하였다. 위에 제시된 필터링 과정 동안 5-18%의 염기서열이 제거되어 최종적으로 얻어진 세균의 16S rRNA 유전자 시퀀스의 수는 시료 당 2,181-12,584개 범위를 보였다.

비교적 많은 수의 시퀀스가 얻어졌음에도 불구하고, rarefaction 분석에서 OTU 수는 대부분의 시료에서 얻어진 시퀀스의 수에 따라 지속적으로 증가하는 양상을 나타내었으며 이러한 경향은 퇴적물에서 더 크게 나타나(Fig. 2), 전체적인 세균 다양성을 규명하기 위해서는 훨씬 더 많은 수를 시퀀싱할 필요가 있는 것으로 파악되었다.

종 풍부도(richness) 및 다양성(diversity) 지수

시료 간 얻어진 염기서열 수의 차이에 의한 다양성의 편차를 제거하기 위해 2,181개의 염기서열을 무작위로 추출한 후 다양성 분

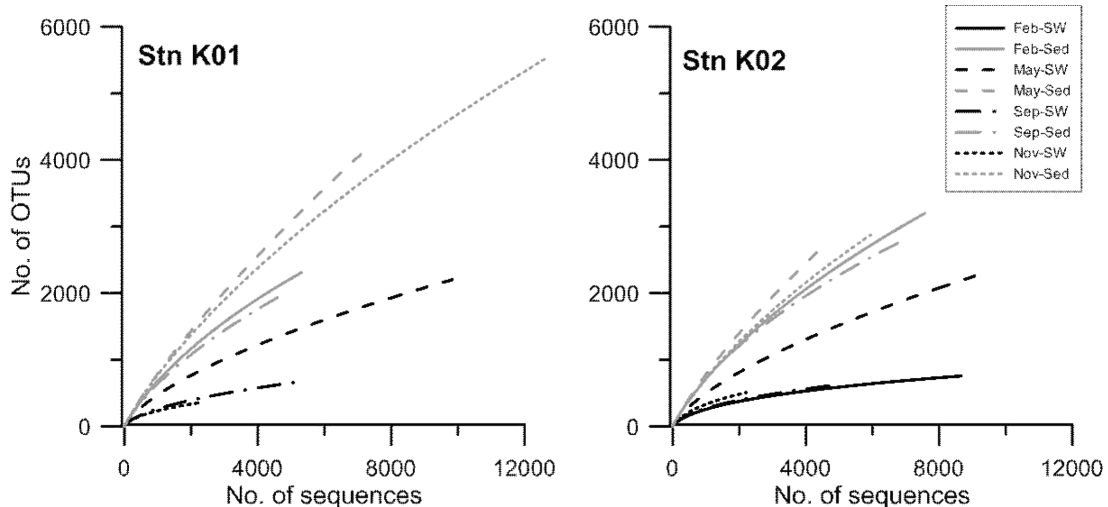


Fig. 2. Rarefaction analysis for the sediment (gray) and seawater (black) samples. The curves were generated for 97% similarity levels of OTUs.

Table 1. The number of OTUs, Good's coverage and diversity indices obtained in each sample

Habitat	Date	Station	OTUs	Good's Coverage	Diversity index			
					Ace	Chao1	Shannon	Simpson
Sediment	May, 2012	K01	1491	0.42	22238	7777	6.93	0.002
		K02	1468	0.45	11954	6667	6.97	0.001
	Sep, 2012	K01	1102	0.63	4929	3146	6.41	0.004
		K02	1225	0.61	5255	3020	6.76	0.002
	Nov, 2012	K01	1405	0.48	12475	5783	6.88	0.002
		K02	1353	0.52	9473	4518	6.82	0.002
	Feb, 2013	K01	1197	0.59	7070	3589	6.60	0.003
		K02	1246	0.56	9045	4337	6.67	0.002
Bottom water	May, 2012	K01	694	0.78	3716	2004	5.42	0.014
		K02	752	0.76	4489	2531	5.61	0.010
	Sep, 2012	K01	378	0.90	1202	764	4.32	0.046
		K02	363	0.91	926	685	4.46	0.038
	Nov, 2012	K01	343	0.93	724	572	4.49	0.032
		K02	485	0.89	990	787	5.04	0.023
	Feb, 2013	K02	296	0.93	747	512	4.21	0.043

석을 수행하였다. 얻어진 OTU의 수는 퇴적물에서 1,102-1,491개로 저층 해수에서의 296-752개 보다 2-4배까지 많았다(Table 1). 시료에서 얻어진 염기서열이 해당 시료의 다양성을 얼마나 대표하는지를 나타내는 Good's coverage는 퇴적물에서 0.42-0.63으로 저층 해수에서의 0.76-0.93보다 낮았으며(Table 1), 비교적 많은 수의 시퀀스를 얻을 수 있는 pyrosequencing 방법을 적용하였음에도 불구하고 전체적인 다양성을 규명하기에는 시퀀스의 수가 충분하지 않은 것으로 나타났다. 종 풍부도를 나타내는 ACE(Chao and Lee, 1992)와 Chao1(Chao, 1984) 추정치는 모든 시기에 퇴적물에서 해수보다 10배 이상까지 높아 퇴적물에서 매우 높은 종 풍부도를 갖는 것으로 추정되었으며, Shannon 다양성 지수와 Simpson 다양성 지수 모두 퇴적물에서 높은 다양성을 갖는 것으로 나타났다(Table 1). 지구적 규모에서 수행된 연구에서도 연안역의 수층에서 97%의 염기서열 유사도 기준에서 얻어진 OTU의 수는 2만개 정도로 본 연구의 연안 퇴적물에서 얻어진 6만개 정도에 비해 낮았다(Zinger *et al.*, 2011).

퇴적물에서의 높은 다양성은 전체 종 조성에서 1% 미만의 낮은 점유율을 보인 rare species들의 높은 비율 때문으로 파악되었다. 퇴적물에서 이들 rare species는 전체 종수의 96-99%를 차지하였으며, 점유율의 합은 60-80%를 차지하여, 저층 해수에서 얻어진 95-97%의 종수 비율과 31-57%의 점유율에 비해 높았다(Fig. 3). 이 때 하나의 시퀀스만 갖는 종(singleton)이 퇴적물과 저층 해수 시료의 전체 종수에서 차지하는 비율은 각각 39%와 37%를 보여, 이전 다양한 시료의 연구에서 나타난 50% 가량의 값(Zinser *et al.*, 2011) 보다 다소 낮았으나 이러한 높은 rare species의 기여도가 해양 환경에서 일반적으로 나타남을 시사하였다.

박테리아 군집의 계통분류학적 다양성

EzTaxon-e 데이터베이스를 이용한 시퀀스의 계통 분석은 퇴적물과 저층 해수에서 얻어진 시퀀스들이 각각 141개와 70개의 강(class)에 속해 비교적 높은 다양성을 갖는 것으로 나타났다(자료 미제시). 하지만, 최소 한 시료에서 5% 이상 우점한 강은 퇴적물

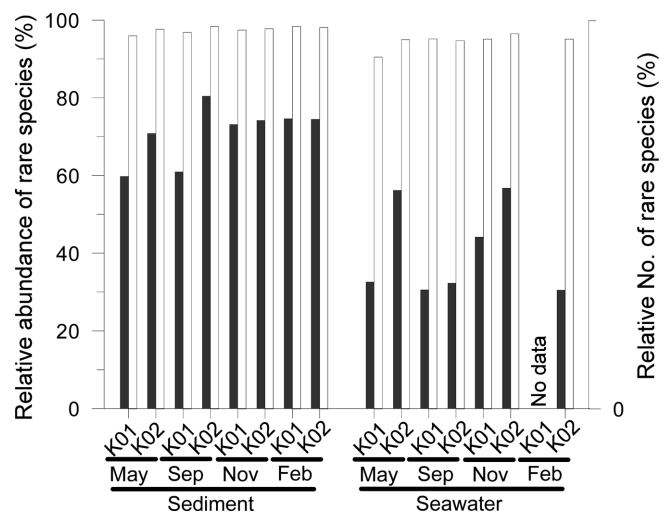


Fig. 3. Relative abundance (gray bar) and relative number (open bar) of rare species in each sample. Rare species was defined as species found at a frequency of <1% in each sample.

에서 Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Flavobacteriia, Planctomycetacia 및 Actinobacteria로 6개였으며, 저층 해수에서는 Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Flavobacteriia 및 Actinobacteria 5개로 나타나 퇴적물에 나타난 Planctomycetacia를 제외하면 강 수준에서의 우점 그룹의 다양성은 두 서식처에서 거의 동일하였다. 한편, 이들 강이 차지하는 비율은 퇴적물에서 72-80%, 저층 해수에서 81-91%를 차지하여 이들을 제외한 대부분의 강은 매우 낮은 비율로 분포하였다(Fig. 4). 세균 다양성 분포는 시기 및 서식처에 따라 다소 차이를 나타내었다. Gammaproteobacteria는 5월에 저층 해수(53-64%)와 대부분 시기의 퇴적물(18-48%)에서 가장 우점하는 세균 그룹으로 나타났다. 반면 저층 해수에서 2월에는 Alphaproteobacteria가 68%를 차지하여 18%의 비율을 보인 Gammaproteobacteria에

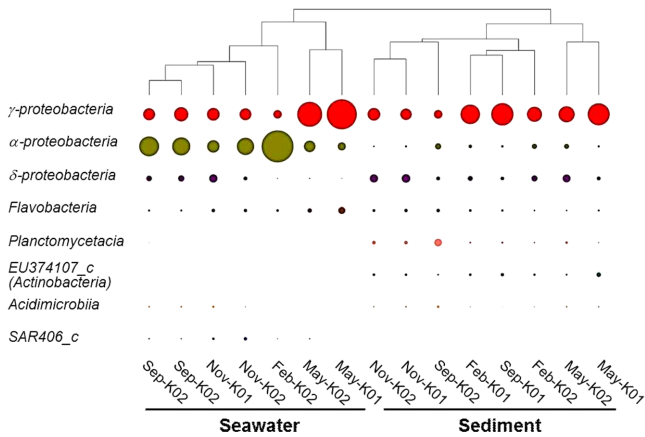


Fig. 4. Heatmap showing the percent relative abundance of major classes found over 5% in at least one sample. Dendrogram was obtained using Fast Unifrac distance matrix. Largest circle = 68%.

비해 월등히 높아 5월과는 대조적인 경향을 보였다. 그 밖의 시기에도 *Alphaproteobacteria*는 27-43%의 비율로 나타나, 25-30%의 비율을 보인 *Gammaproteobacteria*에 비해 유사하거나 다소 높은 경향을 보였다. 그러나, 퇴적물에서는 비록 점유율이 저층수에 비해 낮았음에도 불구하고, *Gammaproteobacteria*가 모든 시기에 가장 우점하는 그룹으로 나타났다. *Alphaproteobacteria*는 수층에서 18-68% 비율을 보여 퇴적물(4-13% 범위)에 비해 월등히 높게 나타났다(Fig. 4). 다음으로는 *Deltaproteobacteria*가 퇴적물과 저층 해수에서 각각 8-18%와 1-18%의 비율로 우점하였다. 퇴적물에서 이들의 계절적 변이는 크지 않았으나, 저층 해수에서는 2월과 5월에 1-2%의 낮은 값을 보인 반면 9월과 11월에는 8-18%로 퇴적물에서와 유사한 비율을 나타내어, 수층에서 계절적 변이가 크게 나타났다. 일반적으로 외양에 비해 연안 환경에서 더 높은 비율로 나타나는 것으로 알려진 *Flavobacteriia*는(Zinser et al., 2011) 퇴적물에서 3-8%의 비율을 보였으며, 저층 해수에서는 4-15%의 비율로 나타나, 해수에서 다소 높은 범위를 보였으나, 5월 저층 해수의 7-15%를 제외하면 퇴적물과 유사한 범위를 나타냈다. 유사하게 *Actinobacteria*에 속하는 *Acidimicrobia*도 퇴적물과 저층 해수에서 각각 2-6%와 0.3-5%의 비율로 출현하여 저층 해수에서 다소 낮은 범위를 보였으나, 5월과 2월 저층 해수 시료에서의 낮은 값을 제외하면 저층 해수와 퇴적물에서 유사한 비율로 출현하였다.

하지만 *Planctomycetacia*, 배양체가 없는 ‘EU374107_c’와 ‘SAR406_c’ 그룹들은 퇴적물과 해수에서 뚜렷이 구별되는 분포 양상을 나타냈다. *Planctomycetacia*는 퇴적물에서 3-17% 범위의 비율로 모든 시료에서 출현한 반면, 해수에서는 미검출-2% 범위로 퇴적물에서 우세한 분포를 나타냈다. 유사하게 ‘EU374107_c’ 그룹도 퇴적물에서 4-10% 범위로 비교적 높게 나타난 반면, 저층 해수에서는 전혀 검출되지 않아 퇴적물에 특이적인 분포 양상을 나타냈다. 이외는 대조적으로 해양 중층 및 심층대에서 높은 비율로 출현하는 ‘SAR406_c’ 그룹(Gallagher et al., 2004; Pham et al., 2008)은 저층 해수에서 0.2-8%로 나타났으나 퇴적물에서는 거의 나타나지 않았다. 이러한 퇴적물과 저층 해수에서 구별되는 세균 조성은 Fast-Unifrac을 이용한 베타다양성 분석에서도 나타났는데

(Fig. 4), 저층 해수와 퇴적물 시료들이 각각 독립적인 그룹으로 묶여 세균의 군집 조성이 두 서식처에서 뚜렷하게 구별됨을 보여주었다(Fig. 4). 한편, 베타다양성 분석에서 5월의 퇴적물과 저층 해수의 다양성은 각각 다른 시기와 구별되는 분포 양상이 나타났는데(Fig. 4), 동해의 춘계 대변성이 4월에 일어남을 고려하면(Kim 2006), 상층으로부터 다량의 유기물의 침강과 연관된 것으로 사료된다. 실제로 해수에 유기물을 첨가할 때, *Gammaproteobacteria*의 비율이 증가한 보고(Teira et al., 2010)와 식물플랑크톤의 대변성기에 *Flavobacteriia*가 양적으로 증가한다는 연구(Riemann et al., 2000; Fandino et al., 2001; Pinhassi et al., 2004)를 고려하면, 저층 해수에서 5월에 상층으로부터의 유기물 공급으로 높은 유기물 농도를 선호하는 *Gammaproteobacteria*와 *Flavobacteriia*의 비율이 다른 시기에 비해 증가한 것으로 파악된다. 그러나, 퇴적물에서 5월에 이들 그룹의 증가는 뚜렷하지 않았는데, 이는 유기물 공급량 보다는 서식처 특성이 세균 군집에 더 큰 결정 요인으로 작용하였기 때문으로 여겨진다. 그럼에도 불구하고, 5월의 퇴적물 세균상은 다른 시기와 구별되는 양상이 나타나, 수층의 생산력이 저층의 세균 조성에 영향을 미쳤음을 시사하였다. 이러한 추정은 수층의 일차생산에 의한 고형성 유기물의 이용성이 해양 환경에서 저서 생물의 다양성에 가장 중요한 결정 요인으로 여겨진다는 기존 연구(Levin et al., 2001; Rex et al., 2006; Ruhl et al., 2008)로도 뒷받침 되었다.

본 연구 해역에서 강 수준의 다양성 분포는 기존에 다양한 해역에서 수행된 연구에서와 대체로 유사하였다. *Gammaproteobacteria*는 지구적 규모의 다양한 해역의 퇴적물 시료에서 가장 우점하며 수층에서는 *Alphaproteobacteria* 다음으로 우점하는 것으로 보고되었고(Zinger et al., 2011), 또한 *Gammaproteobacteria*는 남중국해의 다양한 깊이의 퇴적물, 동지중해와 북동태평양의 심해 퇴적물에서도 가장 우점하는 그룹으로 나타났다(Polymerakou et al., 2005; Kouridaki et al., 2010; Zhu et al., 2013). *Alphaproteobacteria*도 북해와 지중해의 연안 환경이나 식물플랑크톤의 대변성 시기 또는 빈영양 환경에 높은 비율로 출현하는 세균으로 *Roseobacter* 그룹과 SAR11 그룹이 연안과 외양의 수층에서 우점하여 나타나는 것으로 알려졌으나(Alonso-Sáez et al., 2007; Sapp et al., 2007; Feingersch et al., 2010). 남중국해의 퇴적물에서는 5-20% 범위의 비율로 *Gammaproteobacteria* 보다 훨씬 낮은 비율을 보여(Zhu et al., 2013) 본 연구 해역의 분포 양상과 유사하였다. 본 연구에서 퇴적물에서는 *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Planctomycetacia* 및 *Actinobacteria*가 수적으로 우점하였는데, 이들 박테리아 그룹은 저산소 및 무산소 환경에 적응하는 많은 종속영양 및 독립영양세균과 황산염환원세균도 포함하고 있어 깊이에 따른 산소 농도 구배가 크게 변화하는 환경에 상대적으로 잘 적응하였기 때문으로 여겨진다(Zinger et al., 2011).

속(genus) 수준에서의 다양성 변화

연구 기간 동안 퇴적물과 저층 해수의 한 시료 이상에서 5% 이상의 비율로 출현한 속은 17개로 나타났다(Fig. 5). 각 시료에서 이들 속이 세균 군집에서 차지하는 비율은 퇴적물에서 13-32%를 보였으며, 저층 해수에서는 45-69%를 차지하였는데, 퇴적물에서 낮은 비율은 앞에서 언급한 바와 같이 세균의 높은 다양성에 기

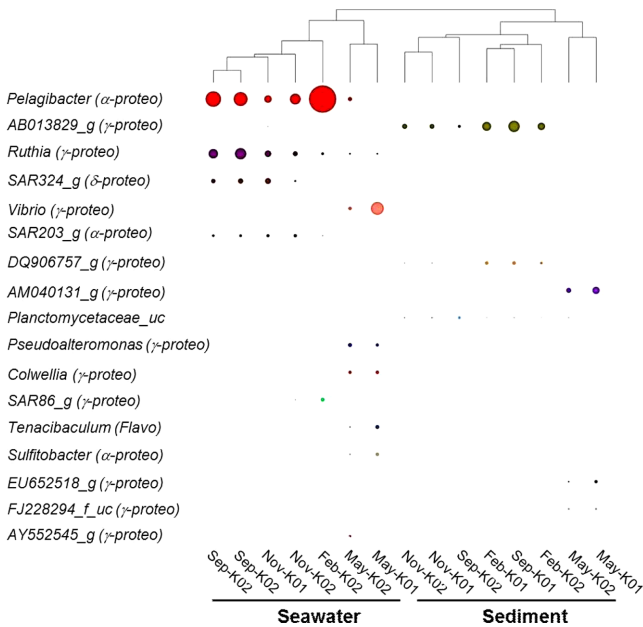


Fig. 5. Heatmap showing the percent relative abundance of major genera found over 5% in at least one sample. Dendrogram was obtained using Fast Unifrac distance matrix. Largest circle = 53%.

인한 때문으로 보인다. 강 수준에서 출현 그룹의 유사성에도 불구하고, 속 수준의 분석은 퇴적물과 저층 해수에 우점하는 세균의 속이 전혀 다르다는 점이었다(Fig. 5). 퇴적물과 저층 해수의 세균 군집의 차이는 종 구성에서도 뚜렷하게 나타났는데, 퇴적물과 저층 해수에서 나타난 전체 종들 중 302개 종만(퇴적물 종수의 15%와 해수 종수의 24%) 두 서식처에 공통으로 나타나(Fig. 6), 각 서식처에 특이적으로 적응한 세균들이 우점하고 있음을 시사하였다.

해수 시료에서는 *Alphaproteobacteria* 강에 속하는 SAR11 그룹의 *Pelagibacter*가 5월을 제외한 모든 시기에 가장 우점하는 세균이었다(Fig. 6). SAR11 그룹은 전지구적으로 가장 우점하는 세균으로 ‘genome streamlining’을 통해 영양염의 요구성을 최소화함으로써 빈영양 환경에서도 잘 성장할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Giovannoni *et al.*, 2005). 따라서, 빈영양성의 쿠로시오의 지류의 영향 범위에 있는 연구 해역(Chang *et al.*, 2004)의 수층에서 *Pelagibacter*가 우점할 수 있었을 것으로 여겨진다. 그러나, 5월에

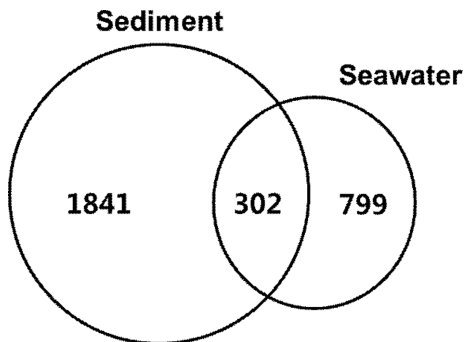


Fig. 6. Venn diagram of shared species between the sediment and overlying seawater samples.

이들의 비율이 크게 감소한 반면 다른 시기에 우점하지 않은 *Gammaproteobacteria*인 *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* 및 *Colwellia* 속, *Flavobacteriia*인 *Tenacibaculum* 속과 *Alphaproteobacteria*인 *Sulfitobacter* 속이 우점한 점은 앞에 언급한 바와 같이 식물플랑크톤이 춘계 대변성으로 저층으로의 유기물 플럭스가 증가한 것과 연관된 것으로 여겨진다. 한편, 5월에 퇴적물 시료에서도 다른 시기에 거의 나타나지 않았던 *Gammaproteobacteria*에 속하는 ‘AM040131_g’와 ‘EU652518_g’ 및 ‘FJ228294_g’ 속이 5% 이상의 비율로 나타난 반면 다른 시기에 우점했던 ‘AB013829_g’ 속은 나타나지 않아, 춘계 대변성에 의한 수층의 높은 생산성이 퇴적물의 세균 구성에 직접적으로 영향을 미칠 수 있음(coupling)을 시사하였다.

결론

연구 해역의 표층 퇴적물과 저층 해수는 매우 다양한 종류의 세균들로 구성되어 있었으며, 서식처에 따라 매우 큰 조성의 차이가 나타났다. 특히 5% 이상의 비율로 나타난 세균의 종류는 각 서식처에서 5개 속 미만으로 나타났으며, 이들이 차지하는 평균 비율은 퇴적물과 저층 해수에서 각각 22%와 57%만을 차지하여, 세균의 군집의 조성이 매우 복잡하고 생태계에서 이들의 기능이 매우 다양한 종류의 세균에 의해 유지되고 있음을 시사하였다.

이산화탄소의 해저 지중저장은 지구 온난화로부터 지구환경을 보호하기 위한 한 방법으로 진행되고 있다. 그러나, 지중 저장의 과정 동안에 이산화탄소가 누출되거나 해저의 갈라진 틈을 통해 지속적으로 이산화탄소가 누출될 가능성이 존재하며(Monastersky, 2013), 다량의 이산화탄소 농도는 인접 생태계에 인위적인 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 본격적인 사업이 진행되기 전에 생태계의 구조 및 기능에 대한 사전 조사는 이산화탄소 지중 저장 사업의 진행과 완료 후의 생태계의 안정성을 평가하는데 매우 중요한 자료가 될 것이다. 또한, 이산화탄소 해양지중저장사업의 실용화 과정에서 요구되는 해양환경평가 및 해역이용영향평가 등의 기초자료로 활용될 수 있을 것이다. 다만, 본 연구에서는 다양성 측면에 대해서 연구하였으나, 매우 복잡한 세균 다양성을 고려하면, 각각의 생태학적 기능을 담당하는 많은 세균들이 공존하고 있는 것으로 보이며, 다양성의 변화가 반드시 생태계 기능의 변화를 의미하지 않을 수 있다. 따라서, 메타유전체 연구 등을 통한 생태 기능적 측면의 추가적인 연구도 필요할 것으로 여겨진다.

사사

본 연구는 2013년 해양수산부의 재원으로 한국해양과학기술진흥원(CO₂ 해양지중저장기술개발)의 지원과 일부 한국해양과학기술원(PE99202)의 지원으로 수행되었습니다. 이에 감사드립니다. 또한 논문을 면밀히 심사해주신 두분의 심사위원께도 감사드립니다.

참고문헌(References)

이명숙, 홍순규, 이동훈, 김치경, 배경숙, 2001. 16S rRNA 유전자 분석에 의한 전남 순천만 갯벌의 세균 다양성. Kor J

- Microbiol **37**: 137–144.
- 김보배, 조혜연, 현정호, 2010. 16S rRNA 유전자 분석방법을 이용한 동해 울릉분지 심해 퇴적물 내 고세균 군집 구조 및 다양성의 수직분포 특성연구. *Ocean Polar Res* **32**: 309–319.
- Acosta-Martínez, V., S. Dowd, Y. Sun, and V. Allen, 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.
- Alonso-Sáez, L., V. Balagué, E. Sà, O. Sánchez, J.M. González, J. Pinhassi, R. Massana, J. Pernthaler, C. Pedrós-Alió, and J.M. Gasol, 2007. Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: Assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 98–112.
- Arrigo, K.R., 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* **437**: 349–355.
- Chang, K.-I., W.J. Teague, S.J. Lyu, H.T. Perkins, D.-K. Lee, D.R. Watts, Y.-B. Kim, D.A. Mitchell, C.M. Lee, and K. Kim, 2004. Circulation and currents in the southwestern East/Japan Sea: Overview and review. *Prog Oceanogr* **61**: 105–156.
- Chao, A., 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat* **11**: 265–270.
- Chao, A. and S.-M. Lee, 1992. Estimating the number of classes via sample coverage. *J Am Stat Assoc* **87**: 210–217.
- Chun, J., K.Y. Kim, J.-H. Lee, and Y. Choi, 2010. The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2-deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. *BMC Microbiol* **10**: 101.
- Fandino, L.B., L. Riemann, G.F. Steward, R.A. Long, and F. Azam, 2001. Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquat Microb Ecol* **23**: 119–130.
- Feingersch, R., M.T. Suzuki, M. Shmoish, I. Sharon, G. Sabehi, F. Partensky, and O. Béjà, 2010. Microbial community genomics in eastern Mediterranean Sea surface waters. *ISME J* **4**: 78–87.
- Galand, P.E., E.O. Casamayor, D.L. Kirchman, and C. Lovejoy, 2009. Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 22427–22432.
- Gallagher, J.M., M.W. Carton, D.F. Eardly, and J.W. Patching, 2004. Spatio-temporal variability and diversity of water column prokaryotic communities in the eastern North Atlantic. *FEMS Microbiol Ecol* **47**: 249–262.
- Giovannoni, S.J., H.J. Tripp, S. Givan, M. Podar, K.L. Vergin, D. Baptista, L. Bibbs, J. Eads, T.H. Richardson, M. Noordewier, M.S. Rappé, J. Short, J.C. Carrington, and E.J. Mathur, 2005. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science* **309**: 1242–1245.
- Hamady, M., C. Lozupone, and R. Knight, 2010. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J* **4**: 17–27.
- Henriksen, K., 1980. Measurement of in situ sites of nitrification in sediment. *Microb Ecol* **6**: 329–337.
- Huber, T., G. Faulkner, and P. Hugenholtz, 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**: 2317–2319.
- Huse, S.M., J.A. Huber, and H.G. Morrison, 2007. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol* **8**: R143.
- Jeon, Y.-S., J. Chun, and B.-S. Kim, 2013. Identification of household bacterial community and analysis of species shared with human microbiome. *Curr Microbiol* **67**: 557–563.
- Kim, H.-C., 2006. A study of surface chlorophyll variation in the East Sea using ocean color remote sensing data. Ph. D. thesis, Seoul National University. pp 121.
- Knutzen, J., 1981. Effects of decreased pH on marine organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, Vol. 12, pp. 25–29.
- Kouridaki, I., P.N. Polymenakou, A. Tselepides, M. Mandalakis, K.L. Jr. Smith, 2010. Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the deep Northeastern Pacific Ocean: a comparison with the deep Eastern Mediterranean Sea. *Int Microbiol* **13**: 143–150.
- Lee, J.-W., K.K. Kwon, A. Aqil, H.-M. Oh, W. Kim, J.-J. Bahk, D.-H. Lee, and J.-H. Lee, 2013. Microbial community structures of methane hydrate-bearing sediments in the Ulleung Basin, East Sea of Korea. *Mar Petrol Geol* **47**: 136–146.
- Levin, L.A., R.J. Etter, M.A. Rex, A.J. Gooday, C.R. Smith, J. Pineda, C.T. Stuart, R.R. Hessler, and D. Pawson, 2001. Environmental influences on regional deep-sea species diversity. *Ann Rev Ecol Syst* **32**: 51–93.
- Minister of Land, Transport and Maritime Affairs (MLTM) 2012. Press Release by Marine Conservation Division of MLTM on 2012. 4. 4.
- Monastersky, R., 2013. Seabed scars raise questions over carbon-storage plan. *Science* **504**: 339–340.
- Pedrós-Alió, C., 2006. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol* **14**: 257–263.
- Pham, V.D., K.T. Konstantinidis, T. Palden, and E.F. DeLong, 2008. Phylogenetic analyses of ribosomal DNA-containing bacterioplankton genome fragments from a 4000m vertical profile in the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ Microbiol* **10**: 2313–2330.
- Pinhassi, J., M.M. Sala, H. Havskum, F. Peters, Ö. Guadayol, A. Malits, and C. Marrasé, 2004. Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6753–6766.
- Polymenakou, P.N., S. Bertilsson, A. Tselepides, E.G. Stephanou, 2005. Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S ribosomal DNA clone libraries. *Microb Ecol* **50**: 447–462.
- Rex, M.A., R.J. Etter, J.S. Morris, J. Crouse, C.R. McClain, N.A. Johnson, C.T. Stuart, J.W. Deming, R. Thies, and R. Avery, 2006. Global bathymetric patterns of standing stock and body size in the deep-sea benthos. *Mar Ecol Progr Ser* **317**: 1–8.
- Riemann, L., G.F. Steward, and F. Azam, 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl Environ Microbiol* **66**: 578–587.
- Roesch, L.F.W., R.R. Fulthorpe, A. Riva, G. Casella, A.K.M. Hadwin, A.D. Kent, S.H. Daroub, F.A.O. Camargo, W.G. Farmerie, E.W. Triplett, 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* **1**: 283–290.
- Ruhl, H.A., J.A. Ellena, K.L. Smith Jr., 2008. Connections between climate, food limitation, and carbon cycling in abyssal sediment

- communities. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 17006–17011.
- Sapp, M., A. Wichels, and G. Gerdtts, 2007. Impacts of cultivation of marine diatoms on the associated bacterial community. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3117–3120.
- Schloss, P.D., S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewsk, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Van Horn, and C.F. Weber, 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7537–7541.
- Seibel, B.A. and P.J. Walsh, 2003. Biological impacts of deep sea carbon dioxide injection inferred from indices of physiological performance. *J Exp Biol* **206**: 641–650.
- Teira, E., S. Martínez-García, A. Calvo-Díaz, and X.A.G. Morán, 2010. Effects of inorganic and organic nutrient inputs on bacterioplankton community composition along a latitudinal transect in the Atlantic Ocean. *Aquat Microb Ecol* **60**: 299–313.
- Tiedje, J.M., 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Zehnder A.J.B. (ed) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, New York, pp 179–243.
- Torsvik, V., L. Øvreås, and T.F. Thingstad, 2002. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics and controlling factors. *Science* **296**: 1064–1066.
- Ward, B.B., 1986. Nitrification in marine environments. In: Prosser J.I. (ed) *Nitrification*. IRL Press, Oxford, England, pp 157–184.
- Whitman, W.B., D.C. Coleman, and W.J. Wiebe, 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6578–6583.
- Zinger, L., L.A. Amaral-Zettler, J.A. Fuhrman, M.C. Horner-Devine, S.M. Huse, D.B.M. Welch, J.B.H. Martiny, M. Sogin, A. Boetius, and A. Ramette, 2011. Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater Ecosystems. *Plos One* **9**: e24570.
- Zhu, D., S.-H. Tanabe, C. Yang, W. Zhang, and J. Sun, 2013. Bacterial community composition of South China Sea sediments through pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Plos One* **8**: e78501.

2014년 2월 18일 원고접수

2014년 4월 29일 수정본 접수

2014년 4월 30일 수정본 채택

담당편집위원: 현정호