Article

16S rRNA 유전자 분석방법을 이용한 동해 울릉분지 심해 퇴적물 내
고세균 군집 구조 및 다양성의 수직분포 특성연구

김보배 · 조혜연 · 현정호*

한양대학교 과학기술학부 해양환경과학과
(426-791) 경기도 안산시 상록구 사3동 1271

Community Structure, Diversity, and Vertical Distribution of Archaea
Revealed by 16S rRNA Gene Analysis in the Deep Sea
Sediment of the Ulleung Basin, East Sea

Bo Bae Kim, Hye-Youn Cho, and Jung-Ho Hyun*

Department of Environmental Marine Sciences Division of Science and Technology
Hanyang University, Ansan 426-791, Korea

Abstract : To assess community structure and diversity of archaea, a clone sequencing analysis based on an archaeal 16S rRNA gene was conducted at three sediment depths of the continental slope and Ulleung Basin in the East Sea. A total of 311 and 342 clones were sequenced at the slope and basin sites, respectively. Marine Group I, which is known as the ammonia oxidizers, appeared to predominate in the surface sediment of both sites (97.3% at slope, 88.5% at basin). In the anoxic subsurface sediment of the slope and basin, the predominant archaeal group differed noticeably. Marine Benthic Group B dominated in the subsurface sediment of the slope. Marine Benthic Group D and Miscellaneous Crenarchaeotal Group were the second largest archaeal group at 8-9 cm and 18-19 cm depth, respectively. Marine Benthic Group C of *Crenarchaeota* occupied the highest proportion by accounting for more than 60% of total clones in the subsurface sediments of the basin site. While archaeal groups that use metal oxide as an electron acceptor were relatively more abundant at the basin sites with manganese (Mn) oxide-enriched surface sediment, archaeal groups related to the sulfur cycle were more abundant in the sulfidogenic sediments of the slope. Overall results indicate that archaeal communities in the Ulleung Basin show clear spatial variation with depth and sites according to geochemical properties the sediment. Archaeal communities also seem to play a significant role in the biogeochemical carbon (C), nitrogen (N), sulfur (S), and metal cycles at each site.

Key words : archaeal diversity, 16S rRNA gene, marine group, Ulleung Basin, East Sea

1. 서 론

지구상에 존재하는 다양한 생명체를 구성하는 세 가지
도메인 중 하나인 고세균(Archaea)은 약 30년 전에 처음

으로 진정세균(Eubacteria)과 구분된다는 것이 확인되었다
(Woese and Fox 1977). 통상적으로 고세균들은 고온, 고
압, 고염 등의 매우 특수한 환경이나 극한 환경에서 주로
분리되고 연구되었으며(Yayanos et al. 1979; Belkin and
Jannasch 1985), 일반적인 생태 환경에서 미생물의 다양성
에 대한 연구는 고세균보다 진정세균에 초점이 맞춰져 진

*Corresponding author. E-mail : hyunjh@hanyang.ac.kr

행되어왔다(Gray and Herwig 1996; Ravenschlag et al. 1999). 그러나 최근 분자생태기술의 발달을 통하여 제한된 환경에서만 서식한다고 알려져 있던 고세균이 일반 해양 환경 및 심해 퇴적물(Vetriani et al. 1999; Reed et al. 2002; Inagaki et al. 2003; Newberry et al. 2004; Biddle et al. 2006; Inagaki et al. 2006), 남극 퇴적물(Bowman and McCuaig 2003; Kendall et al. 2007), 냉용수(cold seep)지역(Knittel et al. 2005; Arakawa et al. 2006), 메탄 누출(methane seep)지역(Lloyd et al. 2006; Dang et al. 2009), 해저 열수구(hydrothermal vent)지역(Takai and Horikoshi 1999; Reysenbach et al. 2000; Teske et al. 2002), 빈영양(organic-poor)해역(Sørensen et al. 2004), 갯벌(tidal flat)(Wilms et al. 2006) 및 염습지(salt marsh)(Nelson et al. 2009)와 같은 다양한 해양환경에서 광범위하게 분포하고 있음이 밝혀졌으며, 이를 바탕으로, 고세균도 진정세균과 마찬가지로 해양 퇴적물에서 생지화학적 물질순환에 중요한 역할을 담당하는 것으로 인식되고 있다(Knittel et al. 2005; Biddle et al. 2006; Hallam et al. 2006; Nicol and Schleper 2006).

외국의 경우 다양한 해양 환경에서 미생물에 의한 물질 순환에 대한 연구와 함께 16S rRNA 유전자 분석을 통하여 해양 저층 퇴적물에서 고세균 군집 다양성에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Vetriani et al. 1999; Reed et al. 2002; Inagaki et al. 2003; Newberry et al. 2004; Biddle et al. 2006; Inagaki et al. 2006). 이에 비해, 국내에서는 주로 연안이나 갯벌에서 진정세균의 다양성에 대한 연구가 다수 진행되었으나, 고세균에 대한 연구는 갯벌과 동해 연안의 수심 500-650 m 정도의 퇴적물에서 암모니아 산화와 관련한 연구에 불과한 실정이다(이 등 2001; 조 등 2004; Kim et al. 2005; Park et al. 2008). 또한, 최근 들어 동해 울릉분지의 심해 퇴적물에서 생지화학적 물질순환에 관한 연구들이 보고되고 있지만(Lee et al. 2008; Hyun et al. 2010), 동해 심해 퇴적물 내 생지화학적 물질순환에 필수적으로 관여하는 고세균의 생태 및 다양성에 대한 연구는 상대적으로 지극히 부진한 실정이다. 본 연구의 목적은 고세균의 16S rRNA 유전자 분석을 통해: (1) 아직 알려지지 않은 동해 심해 퇴적물 내에 분포하는 고세균의 수직적 군집구조와 다양성을 파악하고; (2) 대륙사면과 울릉분지 지역 퇴적물의 생지화학적 특성의 차이와 연관된 고세균 군집의 분포특성을 이해하기 위한 것이다.

2. 재료 및 연구방법

연구지역 및 시료채취

동해는 북서태평양에 위치한 대륙주변부 해양(marginal sea)으로 평균수심이 1684 m인 심해환경 이다(Fig. 1). 동

Fig. 1. Sampling sites at the continental slope (M1) and Ulleung Basin (M2) in the East Sea. JB, YB and UB indicate Japan Basin, Yamato Basin, and Ulleung Basin.

해의 지형은 크게 3개의 분지(일본분지, 야마토 분지 및 울릉분지)로 이루어져 있는데, 생태학적 관점에서 울릉분지는 한반도 남동부에서 생기는 용승 작용의 영향으로 수층의 생물 생산력이 동해의 다른 지역에 비해 높게 나타난다(Hyun et al. 2009). 또한, 울릉분지의 가장자리를 따라 시계방향으로 형성된 와류(anticyclonic eddy)는 연안의 높은 생산력을 울릉분지의 중앙부로 이동시켜(Hyun et al. 2009), 울릉분지 퇴적물 내 유기물 함량이 2.5%로 높게 나타난다(Lee et al. 2008). 이로 인해 울릉분지 퇴적물 내의 황산염 환원력에 의한 유기물 분해는 칠레, 페루와 같은 세계적으로 잘 알려진 용승 지역과 견줄 정도로 높게 나타나는 것으로 보고된 바 있다(Hyun et al. 2010).

연구를 위한 퇴적물 시료는 2008년 5월에 울릉분지 내 대륙사면(정점 M1: 36°10'N; 130°10'E)과 분지(정점 M2: 36°40'N; 130°30'E)의 두 곳에서 채집되었다. 대륙사면에 위치한 정점 M1의 수심은 약 1450 m이며, 분지에 위치한 정점 M2의 수심은 약 2050 m이다. 퇴적물 시료는 한국해양연구원의 연구선(온누리호)에 장착된 박스코어(box core)를 이용하여 채취하였고, 선상에서 아크릴 코어를 이용하여 수직으로 분취(sub-sampling)하였다. 공극수와 퇴적물의 지화학적 성분 분석을 위해 1 cm 간격으로 퇴적물 시료를 채취하였으며(유 등 2010), 고세균 군집 및 다양성 분석을 위한 퇴적물 시료는 정점 M1에서 측정된 퇴적물 내 황산염 환원의 수직적 분포 양상(Hyun et al. 2010)에 따라 상대적으로 산화된 표층 0-1 cm 깊이, 표층 아래의 황산염 환원이 높게 나타나는 8-9 cm 및 하부의 18-19 cm 깊이에서 시료를 채취하였으며, 정점 M2에서는 정점 M1

과 비교되는 세 깊이(0-1 cm, 8-9 cm, 13-14 cm)에서 채취하였다. 이때 오염을 최소화하기 위해 코어의 가운데 부분의 시료를 채집한 후, 멸균된 용기에 담아서 분석 때까지 냉동상태(-70°C)로 보관하였다.

전체 Genomic DNA 추출 및 16S rRNA 유전자 증폭 및 정제

퇴적물 내 전체 핵산은 MOBIO사의 Powersoil™ DNA isolation Kit를 이용하여 제조사의 방법대로 처리하여 추출하고 이를 고세균의 16S rRNA 유전자 증폭을 위한 주형으로 이용하였다. 퇴적물 내 고세균의 16S rRNA 유전자를 증폭시키기 위하여 primer 21F (5'-TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA-3')와 958R (5'-AAT TGG AKT CAA CGC CGGR-3')을 사용하였다(DeLong 1992).

Polymerase Chain Reaction(PCR) 조건은 1X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 5% DMSO, 0.1% BSA, 0.2 μM primer, 2.5 U Taq DNA polymerase, template는 약 10-100 ng으로 하였다. 반응부피 50 μl 용량으로 핵산 증폭기(Eppendorf® Master cycler)를 이용하여 96°C에서 10분간 반응 후, 95°C에서 1분, 52°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 35회 반복 반응시킨 후 72°C에서 7분간 더 반응시켰다. PCR 산물을 분석하기 위해서 0.8% agarose gel에 PCR 반응액 5 μl를 전기영동(0.5X TAE buffer, 100 V)하여, EtBr 용액에 10분간 염색하고 증류수에 10분간 탈색시킨 후 UV Illuminator로 관찰하였다.

전기영동하여 확인한 PCR 산물을 PCRquick-spin™ (iNtRON Biotechnology Inc.)을 이용하여 정제 하였으며, 약 900 bp의 증폭 산물을 고세균 군집 다양성 분석을 위한 주형으로 이용하였다.

16S rRNA 유전자 Cloning

정제된 900 bp 크기의 증폭산물을 pGEM T-Easy vector (Promega, USA)에 제조사의 방법대로 ligation 하였다. 형질 전환체를 얻기 위하여 *E.coli* DH5-α에 형질 전환시킨 후, 이를 ampicillin이 포함된 LB 한천평판배지에서 배양시켜, Blue-White colony 선별법에 의해서 클론을 선별하였다. 무작위로 선별된 클론들을 주형으로 하여 primer M13F (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3')와 M13R (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3')를 이용하여 vector 내의 insert 부분을 증폭하여 이를 염기서열 분석을 위한 주형으로 이용하였다.

정점 M1(대륙사면)에서는 0-1 cm 깊이의 퇴적물에서 73개, 8-9 cm 깊이에서 110개 그리고 18-19 cm 깊이의 퇴적물에서 128개 등 세 깊이에서 총 311개의 클론을 무작위로 선택하여 염기서열을 분석하였다. 정점 M2(분지)에

서는 0-1 cm 깊이에서 104개, 8-9 cm에서 128개, 13-14 cm에서 110개 등 세 층을 대상으로 총 342개의 클론에 대한 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다.

유전자 서열 분석과 계통학적 분류

16S rRNA 유전자의 염기서열 분석은 솔젠트 사(solgent, Korea)에 의뢰하여 수행하였으며, 약 900 bp의 염기서열을 얻었다. 결정된 16S rRNA 유전자 염기서열들은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST 검색을 통해 클론과 가장 가까운 그룹을 조사하여 참조서열을 확보하였다. 유사도를 97% 이상 갖는 클론들은 같은 phylotype으로 구분하였으며, 염기서열의 정렬은 Clustal X program을 이용하였다. 염기서열 간의 유전적 거리와 phylogenetic tree는 Jukes & Cantor distance model과 neighbor-joining method에 의해 추정하여 분석하였으며, neighbor-joining data의 bootstrap 분석 시에 1000회의 resampling을 적용하여 500 이상의 값을 가지는 것은 백분율로 나타내어 phylogenetic tree에 표시하였다(Fig. 2-5).

Accession Number

동해 심해 퇴적물에서 분석된 총 653개의 클론 중 154개의 대표 클론에 대해 결정된 부분 염기서열들은 NCBI GenBank로 부터 accession number(HM998397-HM998550)를 부여 받았다.

3. 결 과

본 연구지역에서 고세균 16S rRNA 유전자 클론의 염기서열 분석 결과 동해 심해 퇴적물에서 나타나는 고세균은 크게 *Crenarchaeota*와 *Euryarchaeota* 두 그룹으로 나뉘어졌다. *Crenarchaeota*에서는 Marine Group I(MG I), Marine Benthic Group B(MBG B), Marine Benthic Group C(MBG C), Miscellaneous *Crenarchaeotal* Group (MCG)에 속하는 클론들이 주로 나타났으며, 낮은 비율로 Marine Hydrothermal Vent Group(MHVG)과 관련된 클론도 나타났다(Table 1). *Euryarchaeota*에서는 Marine Benthic Group D(MBG D)가 우세하게 나타났으며, Terrestrial Miscellaneous *Euryarchaeotic* Group(TEMG) 및 *Methanosarcinales*와 연관된 클론들도 낮은 비율로 나타났다(Table 1).

Marine Group I

*Crenarchaeota*에 속하는 MG I은 대륙사면인 정점 M1과 울릉분지인 정점 M2의 표층(0-1 cm)에서 각각 97.3%, 88.5%의 압도적인 비율로 우점하였고, 두 정점 모두 깊이

Table 1. Number and relative contribution (%) of archaeal communities based on 16S rRNA gene clone libraries in deep sea sediments at Slope (M1) and Basin (M2)

Location	Water depth (m)	Depth (cm)	Crenarchaeota					Euryarchaeota		
			MG I	MBG B / DSAG	MBG C	MCG	MHVG	MBG D	TEMG	other
M1 (Slope)	1453	0-1	71 (97.3)	1 (1.4)	-	1 (1.4)	-	-	-	-
		8-9	9 (8.2)	40 (36.4)	11 (10.0)	11 (10.0)	1 (0.9)	35 (31.8)	3 (2.7)	-
		18-19	3 (2.3)	48 (37.5)	17 (13.3)	33 (25.8)	-	26 (20.3)	1 (0.8)	-
M2 (Basin)	2050	0-1	92 (88.5)	-	6 (5.8)	1 (1.0)	-	4 (3.8)	-	1 (1.0)
		8-9	3 (2.3)	14 (10.9)	92 (71.9)	17 (13.3)	-	2 (1.6)	-	-
		13-14	3 (2.7)	19 (17.3)	69 (62.7)	7 (6.4)	2 (1.8)	10 (9.1)	-	-

MG I; Marine Group I.

MBG B/DSAG; Marine Benthic Group B/ Deep Sea Archaeal Group.

MBG C; Marine Benthic Group C.

MCG; Miscellaneous Crenarchaeotal Group.

MHVG; Marine Hydrothermal Vent Group.

MBG D; Marine Benthic Group D.

TEMG; Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotic Group.

Fig. 2. Phylogenetic tree showing the Marine Group I of the *Crenarchaeota* (M#-#Ar##: Site-depth Ar clone No.).

가 깊어짐에 따라 비율이 약 2%까지 크게 감소하였다 (Table 1). 정점 M1의 표층에서 총 73개의 클론 중 71개의 클론(5 phylotype)이 MG I에 속하는 것으로 나타났으며, 이 중 42개의 클론은 하나의 phylotype으로 구분되었고(전체 클론의 57.5%), 이 phylotype의 대표 클론인 M1-1

Ar01은 동해(Japan Sea)의 냉용수(cold seep) 지역에서 나온 클론(AB239073)(Arakawa et al. 2006)과 99%의 유사성을 보였다(Fig. 2). 깊이 8-9 cm에서는 표층과 달리 9개의 클론만이 MG I에 포함되었으며(전체 클론의 8.2%), 깊이 18-19 cm에서는 3개의 클론만이 관찰되었다(Table 1).

정점 M2의 표층에서는 총 104개의 클론 중 92개의 클론이 MG I에 속하였으며, 이 중 63개의 클론이 하나의 phylotype(대표 클론: M2-1 Ar01)으로 구분되었고(전체 클론의 59.56%), 이 클론은 오희츠크 해(Okhotsk Sea)의 메탄 누출지(methane seep) 퇴적물에서 나온 클론(EU713908) (Dang et al. 2009)과 99%의 유사성을 보였다(Fig. 2). 정점 M2의 8-9, 13-14 cm 깊이에서는 MG I에 속하는 클론이 각각 3개씩 나타났다. 일반적으로 MG I에 속하는 고세균들은 호기성이며 암모니아를 아질산염(nitrite)으로 산화시키는 화학합성세균인 것으로 알려져 있다(Konneke et al. 2005). 본 연구에서 관찰된 MG I도 암모니아 산화세균인 *Nitrosopumilus maritimus*(DQ085097)와 높은 유연관계를 가지는 것으로 나타났다(Fig. 2). 또한 *candidatus Nitrososphaera gargensis*와 연관된 클론도 정점 M2의 13-14 cm 깊이에서 1개의 클론이 나타났다.

Marine Benthic Group B(MBG B)

이 그룹은 deep-sea archaeal group(DSAG)라고도 불리며, 대부분 심해 저층 환경에서 광범위하게 나타난다(Takai and Horikoshi 1999; Vetriani et al. 1999; Reed et al. 2002; Inagaki et al. 2003). 본 연구에서 MBG B는 대륙사면인 정점 M1의 표층(0-1 cm)에서는 단 하나의 클론

만 나타났지만 저층의 두 깊이(8-9, 18-19 cm)에서는 모두 약 40%의 비율을 차지하여(Table 1) 전체 클론 중 가장 우점하는 그룹으로 나타났다. 깊이 8-9 cm 경우, 40개의 클론(6 phylotype)이 나타났으며, 특히 클론 M1-9 Ar25의 경우 30개의 클론이 하나의 phylotype으로 구분되었다(전체 클론의 27.3%). 이 클론은 오희츠크 해의 냉용수 지역에서 나온 클론(EU713883)(Dang et al. 2009)과 높은 유사도를 보였다(Fig. 3). 깊이 18-19 cm에서도 48개의 클론(5 phylotype)이 나타나, 가장 우점 하는 그룹으로 나타났다(Table 1). 클론 M1-19 Ar13은 오희츠크 해의 냉용수 지역에서 나온 25H-0S-25(EU713883) 클론(Dang et al. 2009)과 유사성을 보였으며, 총 28개의 클론이 하나의 phylotype을 형성하였다. 또한 M1-19 Ar16 클론은 Eel River Basin의 메탄 누출지에서 나타난 Mn3b-A65 클론(FJ264536)(Beal et al. 2009)과 연관되었으며, 총 16개의 클론이 포함되었다(Fig. 3).

한편 정점 M2의 표층(0-1 cm)에서 MBG B는 나타나지 않았고, 깊이 8-9, 13-14 cm에서는 각각 10.9%, 17.3%의 비율로 정점 M1에 비해 미미하게 나타났다(Table 1).

Marine Benthic Group C

MBG C는 MCG에 속하는 것으로 알려지고 있는데

Fig. 3. Phylogenetic tree showing the Marine Benthic Group B and Marine Hydrothermal Vent Group of the Crenarchaeota.

(Vertriani et al. 1999) 본 연구에서도 계통분류학적으로 봤을 때 연관이 있는 것으로 나타났다(Fig. 4). 정점 M1의 표층에서 MBG C는 나타나지 않았으며, 깊이 8-9 cm에서는 10%, 깊이 18-19 cm에서는 13.3%의 비율로 나타났다(Table 1). 정점 M2의 표층에서 MBG C는 5.8%의 비교적 낮은 비율을 보였지만, 저층의 깊이 8-9, 13-14 cm에서 각각 71.9%, 62.7%의 높은 비율로 존재했다. 정점 M2에서 나타난 MBG C에 속하는 클론들은 크게 Live control Archaea 그룹과 Manganese Archaea 그룹(Beal et al. 2009)으로 나누어졌다(Fig. 4).

Miscellaneous Crenarchaeotal Group

이 그룹은 두 정점 모두 표층(0-1 cm)에서는 1%의 낮은 비율을 보이지만 정점 M1에서는 깊이가 깊어질수록 10.0%(8-9 cm), 25.8%(18-19 cm)의 비율로 증가하는 것으로 나타났다. 하지만 정점 M2의 깊이 8-9 cm에서는 13.3%, 깊이 13-14 cm에서는 6.4%의 비율로 나타났다(Table 1). 본 연구에서 나타난 클론의 대부분이 오희츠크 해의 냉용수 지역(Dang et al. 2009)과 Eel River Basin(Beal et al. 2009)에서 나타난 클론과 높은 유사성을 나타내었다(Fig. 4). 이 그룹은 해양 뿐 아니라 육상에서도 광

범위하게 나타나는 그룹이다(Chandler et al. 1998; Stein et al. 2002).

Marine Hydrothermal Vent Group

정점 M1의 깊이 8-9 cm에서 1개 클론과 정점 M2의 깊이 13-14 cm에서 2개의 클론만 관찰 되었다(Table 1). 이 그룹은 주로 열수 환경(Takai and Horikoshi 1999)에서 나타났던 그룹이지만, 본 연구에서 나타난 클론들은 멕시코 만(Mexico Gulf)과 오희츠크 해의 냉용수 지역에서 나온 클론들과 연관되어 나타났다(Fig. 3).

Marine Benthic Group D

*Euryarchaeota*에 속하는 MBG D는 정점 M1의 표층(0-1 cm)에서는 나타나지 않았고, 깊이 8-9 cm에서 31.8%, 깊이 18-19 cm에서 20.3%의 비율로 나타났다(Table 1). 정점 M2의 표층에서는 4개의 클론이 나타났으며, 깊이 8-9, 13-14 cm에서는 각각 2개, 10개의 클론이 정점 M1 보다 현저히 낮은 비율로 관찰되었다. 이 그룹에 속하는 고세균은 산소가 적은 지역에서 항상 발견되고 있지만 *Thermoplasmatales*와 연관이 있다. 해양의 퇴적물에서는 잘 나타나지 않는 그룹이지만, 본 연구에서 나타난 클론의 대

Fig. 4. Phylogenetic tree showing the Marine Benthic Group C and Miscellaneous Crenarchaeotal Group of the *Crenarchaeota*.

Fig. 5. Phylogenetic tree showing the Marine Benthic Group D and Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotic Group of the Euryarchaeota.

부분이 오희츠크 해의 냉용수 지역(GU270131)(Dang et al. 2010)과 Eel River Basin에서 나타난 클론(GQ356805) (unpublished)과 유연관계를 맺었다(Fig. 5).

Other Euryarchaeota

Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group(TMEG)은 정점 M1의 표층(0-1 cm)에서는 나타나지 않았고 저층에서만 나타났는데 깊이 8-9 cm에서는 3개, 깊이 18-19 cm에서는 단 1개의 클론만 나타났다. 이 그룹은 주로 육상에서만 나타나는 그룹이다. 정점 M2에서는 TMEG와 관련한 클론은 나타나지 않았고, 표층에서 *Methanosarcinales*와 관련한 클론이 1개 나타났다.

4. 고찰

본 연구에서 16S rRNA 유전자 분석방법을 이용하여 동해 심해 퇴적물 내의 고세균 군집구조와 다양성을 분석한 결과, (1) 다양한 고세균 그룹이 울릉분지 심해 퇴적물 내에 서식하는 것으로 나타났으며, (2) 울릉분지 내 서로 다른 두 환경(대륙사면 vs 분지) 및 각 환경의 깊이에 따른 고세균의 군집구조가 다르다는 것을 확인하였고 (3) 대부분의 클론들이 배양 가능한 미생물 그룹과 일치하지 않

은 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 심해 퇴적물 내의 고세균 생태 연구에서 배양 방법을 이용한 연구는 다양한 고세균 그룹을 이해하기에 많은 제한이 있으며, 심해환경의 미생물 생태 및 생지화학적 물질순환과 연관된 고세균 그룹의 중요성과 역할에 대한 충분한 정보를 획득하기 위해서는 분자생물학적 방법을 이용한 해석이 필수적이다.

Marine group I과 질소 순환

연구지역인 정점 M1과 정점 M2의 표층(0-1 cm)에서 나타난 MG I은 각각 97.3%와 88.5%의 비율을 보이며 압도적으로 우세한 것으로 나타났지만, 두 정점의 저층에서는 2.3-8.2%의 낮은 비율로 감소함을 보였다. MG I에 속하는 고세균들은 암모니아 산화세균(ammonia oxidizer)으로 알려져 있다(Konneke et al. 2005).

미생물에 의해서 암모니아가 질산염으로 전환되는 질산화 작용은 전 지구적인 질소 순환에서 핵심이 되는 중요한 과정이다. 수년 전까지만 해도 소수의 진정세균들만이 이러한 반응을 하는 것으로 알려져 있었다. 하지만 질산화 작용에서의 핵심 효소인 ammonia monooxygenase의 subunit인 *amoA* 유전자에 대한 분석을 통해서 진정세균 뿐만 아니라 고세균도 질산화 작용에 관여한다는 사실을

알게 되었다. Leininger et al. (2006)의 연구에서는 기후가 다른 세 지역의 토양으로부터 서로 다른 12개의 유전자 타입이 확인되었으며, *Crenarchaeota*에 속하는 고세균의 *amoA* 유전자 카피 수가 진정세균보다 3000배 정도 더 많은 것으로 보고되었다. 또한 Park et al. (2008)의 연구에 의하면 동해 해양 퇴적물의 표층에서도 진정세균의 *amoA* 유전자보다 고세균의 *amoA* 유전자가 더 우세하게 나타났음이 확인되었다. 게다가 최근 Martens-Habben et al. (2009)에 의한 연구에 따르면 SCM1(candidatus *Nitrosopumilus maritimus*)으로 알려진 해양의 고세균이 진정세균의 암모니아 산화효소보다 훨씬 높은 친화력을 가지고 있는 것으로 확인되었으며, 이를 통해서 기존에 알려진 암모니아 산화세균(ammonia-oxidizing bacteria)보다 고세균이 해양의 질소 순환에 훨씬 더 우세하게 관여하는 것을 알 수 있다. 결론적으로 본 연구에서 MG I에 속하는 클론들이 암모니아 산화 미생물인 *Nitrosopumilus maritimus*와 높은 유연관계를 맺으며, 정점 M1(대륙사면)과 정점 M2(울릉분지)의 표층에서 우세하게 나타난 것으로 미루어 이들이 동해 심해 퇴적물 표층에서 질소 순환과 연관된 중요한 그룹으로 인식되었다.

대륙사면과 울릉분지 지역 간의 고세균 군집 특징

최근에 Hyun et al. (2010)은 울릉분지의 대륙사면과 분지가 지화학적으로 많은 차이가 있음을 규명하였다. 예로써, 대륙사면인 정점 M1과 울릉분지인 정점 M2의 퇴적물을 깊이 0-10 cm까지 누적한 황산염 환원력은 각각 8.07과 3.18 mmol m⁻² d⁻¹로 대륙사면이 분지보다 2.5배 이상 높은 것으로 나타났다. 이는 울릉 분지의 표층 퇴적물 내에 산화된 철이나 망간이 높은 농도로 존재하여, 상당량의 유기물 분해가 망간 및 철 환원 작용에 의해 일어나 황산염 환원이 억제된 결과이다. 황산염 환원의 산물로서 본 연구와 동시에 측정된 총 환원황(total reduced sulfur; TRS)의 농도 역시 대륙사면이 분지보다 약 5배 높은 것으로 나타났다(유 등 2010). 이러한 지화학적 성분들의 분포는 대륙사면이 울릉분지보다 상대적으로 더 환원된 환경을 시사한다.

본 연구에서 정점 M1과 정점 M2 모두 표층(0-1 cm)에서는 *Crenarchaeota*에 속하는 MG I이 압도적으로 우세함을 보였으나, 두 정점의 표층 아래 퇴적물에서는 고세균 그룹의 분포와 조성에서 확인한 지역적 차이를 보였다. 대륙사면에 있는 정점 M1의 저층(8-9, 18-19 cm)에서는 *Crenarchaeota*에 속하는 MBG B/DSAG가 약 37%의 비율로 가장 우점하는 그룹으로 나타났는데, 이 그룹은 주로 오희츠크 해와 난카이 해구(Nankai Trough) 지역, 페루(ODP Leg 201, site 1227, 1230)와 카스카디아 대륙 주변부(Cascadia margin)(ODP Leg 201, site 1244, 1245,

1251)의 저층 퇴적물의 혐기성 환경에서 우세하게 나타나는 것으로 보고되었다(Reed et al. 2002; Inagaki et al. 2003; Biddle et al. 2006; Inagaki et al. 2006; Sørensen and Teske 2006). 본 연구에서 나타난 MBG B/DSAG 그룹에 속하는 클론들은 주로 오희츠크 해의 냉용수 지역과 Eel River Basin의 메탄 누출지 등 저층의 혐기성 조건에서 나타난 클론들과 연관되어 나타나는 것으로 조사되었다(Fig. 3).

*Euryarchaeota*에 속하는 MBG D는 대륙사면인 정점 M1의 깊이 8-9, 18-19 cm에서 각각 31.8%, 20.3%의 비율을 보이며 두 번째로 우점하는 그룹으로 나타났다. 반면 울릉분지인 정점 M2에서는 모든 깊이에서 1.6-9.1%의 비교적 낮은 비율로 존재하였으며, 두 정점의 저층에서 MBG D는 확연한 지역적 차이를 보였다. 본 연구에서 나타난 MBG D에 속하는 클론들은 *Thermoplasma*와 연관이 있음이 조사되었다(Fig. 5). *Thermoplasma*는 호열성, 극호산성(acidophilus)의 특징을 가지며 황(sulfur)호흡(황 환원)을 하는 고세균으로 알려져 있다(Madigan and Martinko 2006). 퇴적물 내의 산소 농도가 감소하면서 혐기성 환경으로 변하게 되면 산화-환원 전위차에 따라 질산염 환원, 망간 환원, 철 환원, 황산염 환원 및 메탄 생성이 뚜렷이 구분된다. 이때 황 환원은 일반적으로 혐기성 조건에서 일어나는 과정으로, 전자수용체로 황(S⁰) 원소를 이용하며 이를 환원시켜 황화수소(HS⁻)를 만든다. 황 환원에 의해 배출되는 황화수소는 금속 이온과 결합하여 금속 황 화합물(metal sulfide)을 형성하여 퇴적물 내에 저장하여 이들의 거동에 영향을 주며 해양환경에서 생지화학적 물질순환에 있어 주요한 역할을 수행한다(현 등 2003). 한편, Beal et al. (2009)의 연구에서 의하면 아무것도 넣지 않고 배양한 Eel River 퇴적물에서 MBG D는 전체 클론의 약 40%의 비율로 고세균 중 가장 우점하는 그룹으로 나타났지만, 망간 산화물을 첨가하여 배양한 퇴적물에서는 약 35%의 비율로 감소한 반면, 황산염을 넣고 배양한 퇴적물에서는 약 45%로 증가하는 것으로 나타나, MBG D 그룹은 황 원소 순환에 관련된 고세균 군집일 것으로 여겨진다. 따라서 본 연구에서 MBG D에 속하는 클론들이 울릉분지(M2)에 비해 상대적으로 환원된 환경인 대륙사면(M1) 퇴적물에서 높은 비율로 나타나는 것은 대륙사면의 높은 황산염 환원(Hyun et al. 2010)과 연관이 있는 것으로 사료된다.

한편 울릉분지 정점인 M2의 저층(8-9, 13-14 cm) 환경에서는 *Crenarchaeota*에 속하는 MBG C가 63-72%의 높은 비율로 우점함을 보였다(Table 1). 정점 M2에서 나타난 MBG C는 크게 Manganese Archaea 그룹과 Live control Archaea 그룹으로 나누어진다(Beal et al. 2009)(Fig. 4). Manganese Archaea 그룹은 Eel River 퇴적물에

Table 2. MBG C of *Crenarchaeota* from Ulleung Basin (M2)

Station M2 sediment layer (cm)	Manganese Archaeal clones		Live control Archaeal clones	
	No. of clone	% of total clone	No. of clone	% of total clone
0-1	3	2.9	3	2.9
8-9	50	39.1	42	32.8
13-14	22	20	47	42.7

망간 산화물을 첨가하여 배양한 퇴적물에서 검출된 Mn3b-A78(FJ264526) 클론과 유연관계를 가지는 그룹이다. 정점 M1에서 Manganese Archaea 그룹으로 나타난 클론들은 8개에 불과하지만, 산화된 망간이 높은 농도로 존재하는 정점 M2의 깊이 8-9, 13-14 cm에서 관찰된 각각 41개, 19개의 클론이 모두 하나의 *phylo*type으로 구분되어 나타났다(Fig. 4). 따라서 울릉분지 초입인 정점 M2에서 높은 비율로 나타난 Manganese Archaea 그룹은 환경 내 존재하는 망간 산화물을 이용하여 대사 작용을 하는 고세균 그룹일 것으로 여겨진다(Table 2). Live control Archaea 그룹은 Eel River 퇴적물에 아무것도 넣지 않고 배양한 퇴적물 시료에서 검출된 Live control A56(FJ264805) 클론과 유연관계를 맺는 그룹이다. Live control Archaea 그룹에 속하는 거의 모든 클론이 정점 M2에서 검출되었다(Fig. 4). 비록 망간산화물을 첨가하지 않은 대조군 시료에서 나온 클론과 유연관계를 맺지만 이 클론 그룹은 산화된 환경을 더욱 선호하는 것으로 여겨진다.

이상의 결과들로 볼 때, 대륙사면인 정점 M1과 울릉분지인 정점 M2의 혐기성 환경에서 우점하는 고세균 군집이 매우 다르게 나타남을 알 수 있다. 정점 M1에서는 MBG B/DSAG와 MBG D가 정점 M2에서보다 우세한 비율로 나타난 반면 정점 M2에서는 MBG C가 주로 나타났다. 이것은 정점 M1과 정점 M2에서 나타나는 지화학적 성분들의 분포들이 고세균의 군집구조에 영향을 주기 때문인 것으로 생각된다. 이를 통해 MBG B/DSAG와 MBG D는 환원된 환경을 선호하는 것으로 여겨지며, 상대적으로 MBG C는 좀 더 산화된 환경에서 나타남을 알 수 있다.

5. 결 론

본 연구의 결과 동해 울릉분지와 대륙사면의 심해 퇴적물 내 서식하는 고세균 군집은 퇴적 깊이에 따라 다르게 나타나며 다양한 고세균 그룹이 서식하는 것으로 나타났다. 그 중 암모니아 산화세균(ammonia-oxidizer)으로 알려진 MG I이 표층 퇴적물 내에서 85% 이상의 압도적인 비

율로 나타나, 본 연구지역에서 질소 순환과 관련하여 중요한 역할을 수행하고 있을 것이라 여겨진다. 또한 지화학적 특성 차이로 인해 대륙사면에서는 황 원소 순환과 관련된 고세균 군집이 우세하게 나타났으며, 상대적으로 산화된 환경인 울릉분지에서는 환경 내에 존재하는 금속 산화물을 이용하여 대사 작용을 하는 고세균 그룹이 상대적으로 우세하게 나타났다. 앞으로 본 연구에서 나타난 계통분석을 지지할 수 있는 고세균과 진정세균들 간의 상호작용 및 퇴적물과 공극수의 지화학적 환경들과의 상호작용에 대한 연구가 필요하다.

사 사

본 연구는 국토해양부의 EAST-I 사업과 한국학술진흥재단의 기초연구과제지원사업(KRF-2007-313-C00790)의 지원을 받아 이루어 졌습니다. 본 논문의 심사를 맡아 논문의 틀을 바로 잡아주신 심사위원들께 감사드립니다.

참고문헌

- 유옥래, 목진숙, 김성한, 최동립, 현정호 (2010) 동해 울릉분지에서 대륙사면과 분지 퇴적물의 지화학적 특성에 따른 황산염 환원 비교. *Ocean Polar Res Submitted*
- 이명숙, 홍순규, 이동훈, 김치경, 배경숙 (2001) 16S rRNA 유전자 분석에 의한 전남 순천만 갯벌의 세균 다양성. *한국미생물학회지* **37**:137-144
- 조혜연, 이정현, 현정호 (2004) 16S rDNA 분석을 이용한 강화도 장화리 갯벌 퇴적물 내 미생물 군집구조 및 다양성. *한국미생물학회지* **40**:189-198
- 현정호, 이홍금, 권개경 (2003) 해양환경의 황산염 환원을 조절요인 및 유기물 분해에 있어 황산염 환원의 중요성. *바다* **8**:210-224
- Arakawa S, Sato T, Sato R, Zhang J, Gamo T, Tsunogai U, Hirota A, Yoshida Y, Usami R, Inagaki F, Kato C (2006) Molecular phylogenetic and chemical analysis of the microbial mats in deep-sea cold seep sediments at the northeastern Japan Sea. *Extremophiles* **10**:311-319
- Beal EJ, House CH, Orphan VJ (2009) Manganese- and iron-dependent marine methane oxidation. *Science* **325**:184-187
- Belkin S, Jannasch HW (1985) A new extremely thermophilic sulfur-reducing heterotrophic marine bacterium. *Arch Microbiol* **141**:181-186
- Bowman JP, McCuaig RD (2003) Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl Environ Microbiol* **69**:2463-2483
- Biddle JF, Lipp JS, Lever MA, Lloyd KG, Sorensen KB,

- Anderson R (2006) Heterotrophic archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:3846-3851
- Chandler DP, Brockman FJ, Bailey TJ, Fredrickson JK (1998) Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in a deep subsurface paleosol. *Microb Ecol* **36**:37-50
- Dang H, Luan X, Zhao J, Li J (2009) Diverse and novel *nifH* and *nifH*-like gene sequences in the deep-sea methane-seep sediments of the Okhotsk Sea. *Appl Environ Microbiol* **75**:2238-2245
- Dang H, Luan XW, Chen R, Zhang X, Guo L, Klotz MG (2010) Diversity, abundance and distribution of *amoA*-encoding archaea in deep-sea methane seep sediments of the Okhotsk Sea. *FEMS Microbiol Ecol* **72**(3):370-85
- DeLong EF (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:5685-5689
- Gray JP, Herwig RP (1996) Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediment. *Appl Environ Microbiol* **62**(11):4049-4059
- Hallam SJ, Konstantinidis KT, Putnam N, Schleper C, Watanabe Y, Sugahara J, Preston C, de la Torre J, Richardson PM, Delong EF (2006) Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:18296-18301
- Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M (2008) A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:2134-2139
- Hyun JH, Kim D, Shin CW, Noh JH, Yang EJ, Mok JS, Kim SH, Kim HC, Yoo S (2009) Enhanced phytoplankton and bacterioplankton production coupled to coastal upwelling and an anticyclonic eddy in the Ulleung basin, East Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **54**:45-54
- Hyun JH, Mok JS, You OR, Kim D, Choi DL (2010) Variations and controls of sulfate reduction in the continental slope and rise of the Ulleung Basin off the southeast Korean upwelling system in the East Sea. *Geomicrobiol J* **27**:212-222
- Inagaki F, Suzuki M, Takai K, Oida H, Sakamoto T, Aok K, Nealson KH, Horikoshi K (2003) Microbial communities associated with geological horizons in coastal seafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7224-7235
- Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S, Teske A, Lever MA, Lauer A, Suzuki M, Takai K, Delwiche M, Colwell FS, Nealson KH, Horikoshi K, D'Hondt S, Jørgensen BB (2006) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments in the Pacific ocean margin. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:2815-2820
- Kim BS, Oh HM, Kang H, Chun J (2005) Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J Microbiol* **43**:144-151
- Kendall MM, Wardlaw GD, Tang CF, Bonin AS, Liu Y, Valentine DL (2007) Diversity of Archaea in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **73**(2):407-414
- Knittel K, Losekann T, Boetius A, Kort R, Amann R (2005) Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol* **71**:467-479
- Konneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**:543-546
- Lee T, Hyun JH, Mok JS, Kim D (2008) Organic carbon accumulation and sulfate reduction rates in slope and basin sediments of the Ulleung Basin, East/Japan Sea. *Geo-Marine Lett* **28**:153-159
- Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C (2006) Archaea predominate among ammonia -oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**:806-809
- Lloyd KG, Lapham L, Teske A (2006) An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Appl Environ Microbiol* **72**:7218-7230
- Madigan MT, Martinko JM (2006) *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall, USA
- Martens-Habben W, Berube PM, Urakawa H, de la Torre JR, Stahl DA (2009) Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature* **461**:976-979
- Nelson KA, Moin NS, Bernhard AE (2009) Archaeal diversity and the prevalence of Crenarchaeota in salt marsh sediments. *Appl Environ Microbiol* **75**:4211-4215
- Newberry CJ, Webster G, Weightman AJ, Fry JC (2004) Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling program Leg 190. *Environ Microbiol* **6**:274-287
- Nicol GW, Schleper C (2006) Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiol* **14**:207-212
- Park SJ, Park BJ, Rhee SK (2008) Comparative analysis of archaeal 16S rRNA and *amoA* genes to estimate the abundance and diversity of ammonia -oxidizing archaea in marine sediments. *Extremophiles* **12**:605-615
- Ravenschlag K, Sahm K, Pernthaler J, Amann R (1999)

- High bacterial diversity in permanently cold, marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **65**:3982-3989
- Reed D, Fujita Y, Delwiche ME, Blackwelder DB, Sheridan PP, Uchida T, Colwell FS (2002) Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. *Appl Environ Microbiol* **66**:3798-3806
- Reysenbach AL, Longnecker K, Kirshtein J (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an in-situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* **66**:3798-3806
- Sørensen KB, Lauer A, Teske A (2004) Archaeal phylotypes in a metal-rich, low-activity deep subsurface sediment of the Peru Basin, ODP Leg 201, Site 1231. *Geobiology* **2**: 151-161
- Sørensen KB, Teske A (2006) Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. *Appl Environ Microbiol* **72**:4596-4603
- Stein LY, Jones G, Alexander B, Elmund K, Wrightjones C, Nealson KH (2002) Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. *FEMS Microbial Ecol* **42**:431-440
- Takai K, Horikoshi K (1999) Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* **152**: 1285-1297
- Teske A, Hinrichs KU, Edgcomb V, Gomez AdV, Kysela D, Sylva SP, Colwell FS (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl Environ Microbiol* **68**:1994-2007
- Vetriani C, Jannasch HW, MacGregor BJ, Stahl DA, Reysenbach AL (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4375-4384
- Wilms R, Sass H, Köpke B, Köster J, Cypionka H, Engelen B (2006) Specific Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic Communities in Tidal-Flat sediments along a Vertical profile of Several meters. *Appl Environ Microbiol* **72**(4): 2756-2764
- Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5088-5090
- Yayanos AA, Dietz AS, Van Boxtel R (1979) Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science* **205**:808-810

Received Aug. 11, 2010

Revised Aug. 31, 2010

Accepted Sep. 13, 2010