

碩士學位論文

계절 변화에 따른 제주도 해면의 공생세균 다양성 연구

Seasonal Shift of Bacterial Diversity in Jeju Sponges

2015. 2.

韓南大學校 大學院

생명시스템과학과

鄭 鐘 斌

계절 변화에 따른 제주도 해면의 공생세균 다양성 연구

지도교수 박 진 숙

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2015년 2월

한남대학교 대학원

생명시스템과학과

정 중 빈



정종빈의 석사 학위논문으로 확인함

심 사 위 원 장 박 경 량 ①

심 사 위 원 박 진 숙 ①

심 사 위 원 최 순 용 ①

2015년 2월

한남대학교 대학원

목차

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재 료	4
1-1. 해면시료의 채집	4
2. 방 법	10
2-1. 해면공생세균의 분리 및 배양	10
2-2. DNA 추출 및 16S rRNA gene의 증폭	10
2-3. RFLP 분석	11
2-4. Total genomic DNA 추출	11
2-5. 16S rRNA gene의 DGGE-PCR 증폭	11
2-6. DGGE 전기영동	12
2-7. DGGE 밴드의 동정 및 계통학적 분석	12
III. 결과	14
1. RFLP를 이용한 <i>Petrosia corticata</i> 해면의 계절에 따른 공생세균 군집 구조 비교	14
1-1. 해면공생세균의 분리 및 RFLP 분석	14
1-2. 염기서열 분석 및 계통학적 분석	25
2. DGGE를 이용한 조간대해면 <i>Hymeniacidon flavia</i> 의 계절에 따른 공생 세균 군집구조 비교	34
2-1. DGGE 밴드 양상	34
2-2. 염기서열 분석 및 계통학적 분석	36
3. DGGE를 이용한 <i>Callyspongia elegans</i> 해면의 계절에 따른 공생세균 군집 구조 비교	40
3-1. DGGE 밴드 양상	40

3-2. 염기서열 분석 및 계통학적 분석	42
4. DGGE를 이용한 <i>Cliona</i> sp. 해면의 계절에 따른 공생세균 군집구조 비교	48
4-1. DGGE 밴드 양상	48
4-2. 염기서열 분석 및 계통학적 분석	50
IV. 고찰	54
V. 참고문헌	61
VI. 적요	68
VII. Abstract	69

I. 서론

해면은 지구상에 존재하는 가장 오래된 후생동물(metazoan)로 조간대부터 심해까지 다양한 환경에 부착하여 살아가는 가장 단순한 고착성 다세포 동물이다(Van Soest *et al.*, 2012; Dupont *et al.*, 2014). 또한 여과섭식자로서 많은 양의 해수를 통과 시켜 해수의 부유물을 제거한다(Duckworth *et al.*, 2006). 해면은 전 세계적으로 8,000종 이상이 보고되었으며 이 중 150종은 담수해면이며 나머지 전체는 해양해면으로 알려져 있다(Gernert *et al.*, 2005; Hentschel *et al.*, 2006). 해면 조직에는 *Cyanobacteria*, 종속영양세균, 고세균과 같은 다양한 세균 그룹이 존재하며, 40문(phylum) 정도의 미생물이 존재하는 것으로 확인되었다(Brück *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). 나아가 최근 해면에 공생하는 세균의 계통학적 연구에 따르면 해면은 주변 해수와는 다르게 구성되는 미생물 군집을 포함 하는 것으로 알려져 있다(Thomas *et al.*, 2010b). 해면 내에 존재하는 세균은 해면 부피의 40%까지 차지하고 있으며 다양한 종류의 세균 중에서 일부는 해면의 먹이원으로 이용이 되고, 다른 일부의 세균들은 해면에 영구히 존재하여 해면 내에서 골편의 안정화 등 물리적 구조에 기여하거나, 화학적 방어, 노폐물 대사 등 다양한 기능을 수행하며 함께 살아간다(Friedrich *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006; Wang, 2006; Sacristán-Soriano *et al.*, 2011). 이러한 해면공생세균에 관한 연구는 배양에 의한 방법부터 16S rRNA gene에 기반을 둔 T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism), FISH (fluorescence *in situ* hybridization), clone library, PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gel electrophoresis), pyrosequencing 등 분자적 기법들을 이용한 비배양법까지 다양한 분석 방법을 통해 이루어지고 있다(Jackson *et al.*, 2012; Dupont *et al.*, 2014).

해면동물은 다양한 생리활성물질 즉, 항암제, 항진균제, 항바이러스제, 면역억제제 등을 생산하는 것으로 보고되고 있으며 전 세계적으로 천연물연구에 이용되고 있다(Guangyi, 2006; Kennedy *et al.*, 2009; Joseph and Sujatha, 2011; Pérez-López *et al.*, 2014).

해면으로부터 추출되는 천연물을 분리하기 위하여 해양 환경에서 해면을 지속적으로 채취는 할 수 없기 때문에, 해면의 지속적인 공급을 위한 수산양식(aquaculture) 연구를 수행하고 있으며(Page *et al.*, 2011) 또한 해면에 존재하는 천연물의 실제 생산자가 공생하는 세균이라는 것이 알려지면서 공생세균의 군집 구조 및 변화를 분석하는 연구도 함께 수행되고 있다(Thomas *et al.*, 2010b; Bergman *et al.*, 2011; Jeong and Park, 2012). 따라서 이러한 보고들에 근거하여 천연물 산업에 공생세균, 혹은 공생미생물을 이용할 경우, 경제적이고 안정적으로 생산할 수 있다는 장점에서 최근 해면공생 미생물에 관한 연구는 증가하고 있는 추세이다(Mohamed *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2010a; Papaleo *et al.*, 2013; Lopanik, 2014). 또한 세균은 변화되는 환경 조건에서 매우 빠르게 반응하기 때문에 해양 시스템 변화에 대한 이상적인 지표가 될 수 있어(Webster *et al.*, 2008), 해면공생세균 군집구조에 대한 연구는 산업적 응용과 생태계적 기능을 규명하는데 있어 매우 중요하다(Taylor *et al.*, 2005; Park, 2010).

국내 제주지역은 해안선이 단순하지만 다양한 형태의 기질이 존재하며, 난류의 영향을 크게 받으며 계절에 따라 여러 해류의 영향 또한 동시에 받고 있어 생물 다양성이 높을 수 있는 여건을 갖추고 있다. 이러한 특이성 때문에 많은 연구자들이 제주도 해양생물에 대한 조사를 수행하였으며, 특히 저서동물에 대한 조사가 많이 진행되었다(Je *et al.*, 2013). 해면동물의 경우 최근 2008년부터 2011년까지 제주도에 7종의 신종이 발견되어(국토해양부, 2011) 서해나 동해에 비해 해면 종의 다양성이 높을 것으로 추정된다. 이렇게 생물 다양성이 높은 해양 환경은 조석과 파랑, 폭우, 육상으로부터 담수의 유입, 해류의 영향 온도 차 등 육지에 비해 환경 변화가 다양하며 이러한 변화는 생물상의 변화에도 직접적인 영향을 주고 있다(Kim, 2010). 따라서 계절에 따른 해면공생세균의 군집구조 및 분포에 차이가 있을 것으로 추정하고 이들의 다양성 분석을 행하였다. 이 연구 결과는 제주도 해면을 이용한 천연물 연구나 미생물 자원 확보에 있어 중요한 기초자료가 될 것으로 사료된다.

본 연구의 목적은 16S rRNA gene을 이용하여 배양법에 기초한 PCR-RFLP 방법과 비배양법에 기초한 PCR-DGGE 방법을 통해 제주도

무릉아치와 용머리 해안에서 채집한 4종 15개체 해면을 대상으로 해면 공생세균 군집구조와 계절적 차이를 규명하는데 있다. (1) RFLP를 이용한 *Petrosia corticata* 해면의 계절에 따른 공생세균 군집구조 비교; (2) DGGE를 이용한 조간대해면 *Hymeniacidon flavia*의 계절에 따른 공생세균 군집구조 비교; (3) DGGE를 이용한 *Callyspongia elegans* 해면의 계절에 따른 공생세균 군집구조 비교; (4) DGGE를 이용한 *Cliona* sp. 해면의 계절에 따른 공생세균 군집구조를 비교 하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1-1. 해면시료의 채집

계절에 따른 해면의 공생세균 군집구조를 조사하기 위해 2012년 1월부터 2014년 6월까지 제주도 서귀포시 대정읍 무릉아치에서 스쿠버다이빙 방법과 안덕면 사계리 용머리해안 조간대에서 채집도구를 이용하여 해면을 채집하였다. 무릉아치의 경우 여름철에는 평균 수온은 23.5℃, 염도는 30.6PSU이며, 겨울철의 평균 수온은 16.2℃, 염도는 33.1 PSU였다. 용머리해안의 경우 여름철의 온도는 31.5℃, 염도는 28.6PSU이며, 겨울철의 온도는 10.1℃, 염도는 31.9PSU였다(Table 1 and Fig. 1).

본 연구에 사용한 총 4종 15개체의 해면(Table 2 and Fig. 2)은 멸균된 인공해수(ASW : artificial sea water)로 3회 세척 후 -20℃를 유지하며 24시간 이내 실험실로 운반하였다.

Table 1. Sponge samples used in this study.

Collection No.	Sponge	Location	Depth (m)	Collection date	salinity (PSU)	Temp. (°C)
121mur16	<i>Petrosia corticata</i>	E126°12 ' 02 " N 33°14 ' 52 "	20-25	2012. 01. 10	32.9	15.6
129mur1	<i>Petrosia corticata</i>	E126°11 ' 36 " N 33°15 ' 08 "	20-25	2012. 09. 20	31.7	22.5
131mur7	<i>Petrosia corticata</i>	E126°11 ' 44 " N 33°15 ' 03 "	20-25	2013. 01. 23	34.0	14.4
138mur1	<i>Petrosia corticata</i>	E126°11 ' 45 " N 33°15 ' 03 "	20-25	2013. 08. 20	29.9	26.4
138Y4	<i>Hymeniacidon flavia</i>	E126°18 ' 54 " N 33°14 ' 00 "	조 간대	2013. 08. 20	28.6	31.5
1312Y5	<i>Hymeniacidon flavia</i>	E126°18 ' 49 " N 33°13 ' 54 "	조 간대	2013. 12. 17	31.9	10.1
131mur20	<i>Callyspongia elegans</i>	E126°11 ' 44 " N 33°15 ' 03 "	20-25	2013. 01. 23	34.0	14.4
138mur2	<i>Callyspongia elegans</i>	E126°11 ' 45 " N 33°15 ' 03 "	20-25	2013. 08. 20	29.9	26.4
138mur3	<i>Callyspongia elegans</i>	E126°11 ' 45 " N 33°15 ' 03 "	20-25	2013. 08. 20	29.9	26.4
138mur4	<i>Callyspongia elegans</i>	E126°11 ' 45 " N 33°15 ' 03 "	20-25	2013. 08. 20	29.9	26.4
1312mur1	<i>Callyspongia elegans</i>	E126°11 ' 44 " N 33°15 ' 04 "	20-25	2013. 12. 17	32.5	18.6
146mur8	<i>Callyspongia elegans</i>	E126°11 ' 44 " N 33°15 ' 02 "	20-25	2014. 06. 24	30.3	21.7
146mur11	<i>Callyspongia elegans</i>	E126°11 ' 44 " N 33°15 ' 02 "	20-25	2014. 06. 24	30.3	21.7
129mur2	<i>Cliona</i> sp.	E126°11 ' 36 " N 33°15 ' 08 "	20-25	2012. 09. 20	31.7	22.5
131mur11	<i>Cliona</i> sp.	E126°11 ' 44 " N 33°15 ' 03 "	20-25	2013. 01. 23	34.0	14.4

Table 2. Collection site and dates for sponge samples in this study.

Sponge	date	2012	2012	2013	2013	2013	2014	Samling site	Experimental Method
		01	09	01	08	12	06		
<i>Petrosia corticata</i>		O	O	O	O	X	X	Mureung arch	RFLP
<i>Hymeniacidon flavia</i>		X	X	X	O	O	X	Youngmeori coast	DGGE
<i>Callyspongia elegans</i>		X	X	O	O	O	O	Mureung arch	DGGE
<i>Cliona</i> sp.		X	O	O	X	X	X	Mureung arch	DGGE

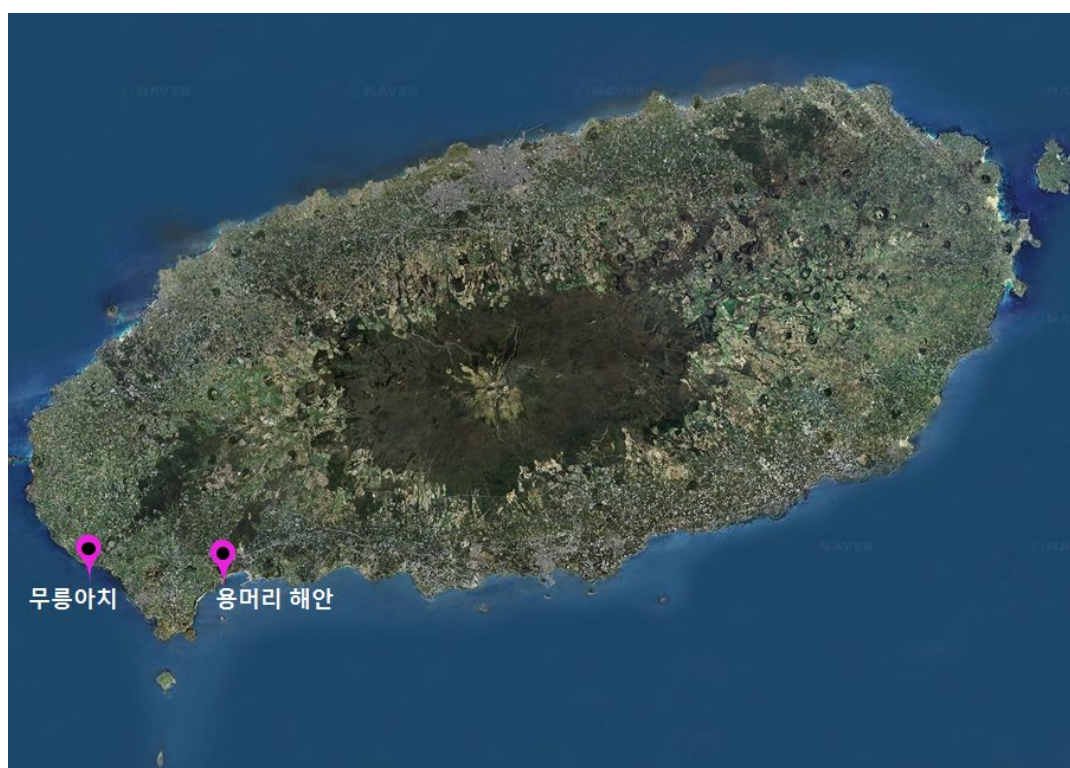


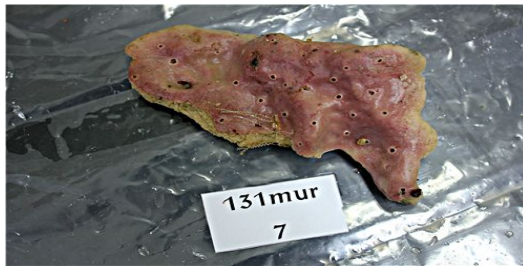
Fig. 1. Collection site of the sponges used in this study.



Petrosia corticata 121mur16



Petrosia corticata 129mur1



Petrosia corticata 131mur7



Petrosia corticata 138mur1



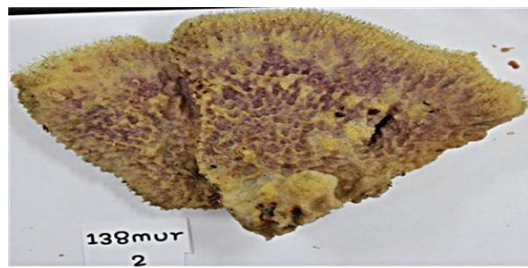
Hymeniacidon flavia 138Y4



Hymeniacidon flavia 1312Y5



Callyspongia elegans 131mur20



Callyspongia elegans 138mur2



Callyspongia elegans 138mur3



Callyspongia elegans 138mur4

Fig. 2. Photographs of sponge samples tested in this study.



Callyspongia elegans 1312mur1



Callyspongia elegans 146mur8



Callyspongia elegans 146mur11



Cliona sp. 129mur2



Cliona sp. 131mur11

Fig. 2. Continued.

2. 방법

2-1. 해면공생세균의 분리 및 배양

채집한 해면은 멸균된 인공해수로 3회 세척 후 1cm³ 크기로 잘라 인공해수 3 ml을 넣어 멸균된 막자와 막자사발을 이용하여 균질화한 다음 10⁻¹부터 10⁻⁴까지 희석하여 변형된 ZoBell배지(Peptone 5 g, Yease extract 1 g, FePO₄ · 4H₂O 0.01 g, NaCl 23.6 g, MgSO₄ · 7H₂O 5.94 g, MgCl₂ · 6H₂O 4.53 g, CaCl₂ 1.3 g, KCl 0.64 g, agar 15 g, DW 1 L, pH 7.2)와 Marine Agar (Difco, USA) 배지에 100 µl씩 도말 하였다. 해면 균질액이 도말된 배지는 26℃에서 7일간 배양하였다. 각각의 해면으로부터 균주의 표현형적 특징을 기준으로 비율별로 분리하고 순수분리를 위해 동일한 배지에서 계대 배양하여 단일 콜로니를 얻었다.

2-2. DNA 추출 및 16S rRNA gene의 증폭

분리된 세균의 DNA는 각각의 콜로니로부터 DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 분리하였다. 분리한 DNA는 PCR 반응의 주형으로 이용하여 16S rRNA gene을 증폭하였으며 증폭에는 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492r (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG AC-3') 프라이머 쌍을 사용하였다. PCR 반응의 혼합물 조성은 5 µl 10× reaction buffer, 1 µl의 10 mM dNTPs, 5 unit/µl Taq polymerase (Solgent, Korea), 각각의 프라이머 10 pmol, 그리고 100 ng의 시료 DNA를 1 µl 첨가하여 최종 부피 50 µl이 되도록 하여 PCR 반응을 수행하였다. GeneAmp PCR system 2700 thermal cycler (Applied Biosystems, Version 2.0, USA)를 사용하여 94℃에서 5분간 초기변성 한 후 94℃에서 40초간 변성, 55℃에서 40초간 냉각, 72℃에서 1분간 신장하는 과정을 30 cycle 반복 후 최종적으로 72℃에서 10분간 신장시켰다. 16S rRNA gene의 증폭을 확인하기 위해 1% agarose gel (Roche, Spain)를 이용하여 PCR 반응물 3 µl를 취해 Mupid-ex (ADVANCE, Japan)으로 100 V, 25분간 1× TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 전기영동 하였다. 전기영동 후 agarose gel은 EtBr (ethidium bromide, 50 ng/ml)에 10분간 염색하여 Gel Logic 200 (Kodak, USA)을 이용해 UV하에서 약 1.5 kb 단편을 확인하였다.

2-3. RFLP 분석

PCR 산물의 RFLP 분석을 위해 제한효소 2종 *Msp* I (Thermo Scientific, Lithuania)과 *Hae*III (Thermo Scientific, Lithuania)를 사용하였다. PCR 산물에 각각의 제한효소를 첨가하여 37℃에서 5분간 반응 후 반응물은 3% agarose gel (Roche, Spain)을 사용하여 1× TAE buffer로 100V, 30분간 전기영동 한 후 EtBr에 염색하여 Gel Logic 200을 이용해 UV하에서 관찰하여 각 밴드의 유형을 확인하였다. 16S rRNA gene-RFLP fingerprint 타입에 따라 각각 RFLP 타입별로 1-3개의 분리균 주들을 선택하여 부분 염기서열을 분석하였다. 증폭된 PCR 산물은 ExpinTM PCR SV DNA Purification kit (GeneAll, Korea)를 이용하여 정제하였으며, 27f 프라이머를 이용한 염기서열 분석(Macrogen)을 의뢰하였다.

2-4. Total genomic DNA 추출

멸균된 인공해수로 3회 세척한 해면을 1cm³로 잘라 -70℃에서 24시간 예비 동결 후 동결 건조기에서 -50℃, 0.033 M bar 기압으로 24시간 건조하였다. 동결 건조된 해면을 멸균된 막자사발을 이용하여 powder 상태로 준비하였으며, powder sample 30 mg을 멸균된 증류수 600μl에 현탁시킨 후 10mg/ml의 lysozyme(Sigma, USA)을 넣어 37℃ 항온수조에서 20분 동안 반응시켜 세포벽을 용해하였다. 여기에 10% SDS를 1/10 vol.으로 넣어 65℃에서 5분간 처리하여 단백질 및 세포의 파편들을 침전시키고 동량의 phenol/chloroform(1:1)을 넣고 현탁한 후 13,000rpm, 4℃, 4분 동안 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액으로 DNeasy Blood & Tissue Kit를 이용하여 DNA를 추출한 다음 DGGE를 위한 PCR 반응의 주형으로 사용하였다.

2-5. 16S rRNA gene의 DGGE-PCR 증폭

해면 시료로부터 추출한 total genomic DNA를 주형으로 GC clamp가 추가된 341f (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')와 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')의 프라이머 쌍을 이용하여 16S rRNA gene의 V3 영역을 증폭하였다. PCR 반응의 혼합물 조성은 5μl 10×

reaction buffer, 1 μ l dNTP, 5 units/ μ l Taq polymerase, 각각의 프라이머 10 pmol, 그리고 100ng의 시료 DNA 1 μ l를 첨가하여 최종 부피가 50 μ l이 되도록 하였다. PCR 수행은 My CyclorTM thermal cycler (Bio-Rad, USA)를 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 40초간 변성, 65 $^{\circ}$ C (1회 당 0.5 $^{\circ}$ C touch down)에서 40초간 냉각, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 신장, 이 과정을 30회 반복 수행한 후 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 신장시켰다. 증폭된 DNA의 확인을 위해 PCR 반응액 2 μ l를 취하여 2% agarose gel (Roche, Spain)을 이용하여 Mupid-ex로 100 V에서 25분간 1 $\times$ TAE buffer에서 전기영동 하였다. 전기영동 후, EtBr에 10분간 염색하여 Gel Logic 200을 이용하여 자외선 조사로 확인하였다. 증폭된 DNA의 크기를 확인하기 위한 marker로는 100 bp ladder (Solgent, Korea)를 사용하였다.

2-6. DGGE 전기영동

DGGE는 Bio-Rad Dcode system (Bio-Rad, USA)을 이용하여 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 bis acrylamide (Bio-Rad, USA)를 포함한 8% polyacrylamide를 이용하여 30-70% 농도 구배 조성(7M urea, 40% formamide)으로 전기영동을 수행하였다. Polyacrylamide gel 크기는 20 $\times$ 13 (W $\times$ H cm), 두께 1mm로 제작하였고 PCR 산물은 2 $\times$ loading dye와 혼합하여 시료를 loading 하였다. 1 $\times$ TAE buffer를 사용하여 60 $^{\circ}$ C, 30V에서 1시간 안정화시킨 후 60V로 전압을 올려 14시간 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후 gel 은 EtBr에 30분간 염색하여 Gel Logic 200을 이용, 자외선 조사로 DGGE 밴드 패턴을 확인하였다.

2-7. DGGE 밴드의 동정 및 계통학적 분석

DGGE 젤 상에서 분리된 각각의 밴드를 잘라내어 50 μ l의 증류수가 담긴 1.5 ml tube에 담아 하루 동안 정치하여 DNA를 추출하였다. 이것을 주형으로 GC clamp가 제거된 341f 프라이머와 518r 프라이머를 사용하여 위와 동일한 조건으로 PCR을 수행한 후 증폭된 산물을 정제하여 염기서열 분석을 의뢰하였다. DGGE 결과로 얻어진 염기서열은 NCBI (the National Center for Biotechnology Information)에 등록된 염기서열을 대상으로 BLAST search를 수행하였으며, 각 염기서열의 alignment 는 CLUSTAL W(Thompson *et al.*, 1994)를 이용하여 정렬하였다. Molecular

Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software 6.0을 이용하여 (Tamura *et al.*, 2013) neighbor-joining 방법(Saitou and Nei, 1987)에 의해 진화거리를 계산하고 계통수를 추론하였으며, 1,000회 반복 bootstrap 분석에 의해 계통수를 확인하였다.

Ⅲ. 결과

1. RFLP를 이용한 *Petrosia corticata* 해면의 계절에 따른 공생세균 군집 구조 비교

1-1. 해면공생세균의 분리 및 RFLP 분석

해양해면 *Petrosia corticata*의 계절에 따른 배양 가능한 공생세균 군집 구조 변화를 관찰하기 위해 121mur16해면으로부터 120균주, 129mur1해면으로부터 129균주, 131mur7해면으로부터 130균주 그리고 138mur1해면으로부터 120균주를 분리하였으며, 분리된 전체 499균주를 16S rRNA gene-RFLP 분석을 수행하였다. 두 종의 제한효소를 사용하여 분석을 수행한 결과 겨울에 채집한 해면 121mur16에서 분리한 120균주로부터 *MspI*에 의해 23개의 타입, *HaeIII*에 의해 21개의 타입을 얻었으며, 해면 131mur7에서 분리한 130균주로부터 *MspI*에 의해 15개의 타입, *HaeIII*에 의해 20개의 타입을 얻었다(Table 4 and 6). 여름에 채집한 해면 129mur1에서 분리한 129균주로부터 *MspI*에 의해 16개의 타입, *HaeIII*에 의해 25개의 타입을 얻었으며, 138mur1에서 분리한 120균주로부터 *MspI*에 의해 11개의 타입, *HaeIII*에 의해 16개의 타입을 얻었다(Table 5 and 7). 이를 근거로 분석한 결과 겨울에 채집한 해면에서는 각각 26개와 20개의 서로 다른 RFLP 타입으로 구분되었으며(Fig. 3), 여름에 채집한 해면에서는 각각 24개와 19개의 서로 다른 RFLP 타입이 구분되었다(Fig. 4).

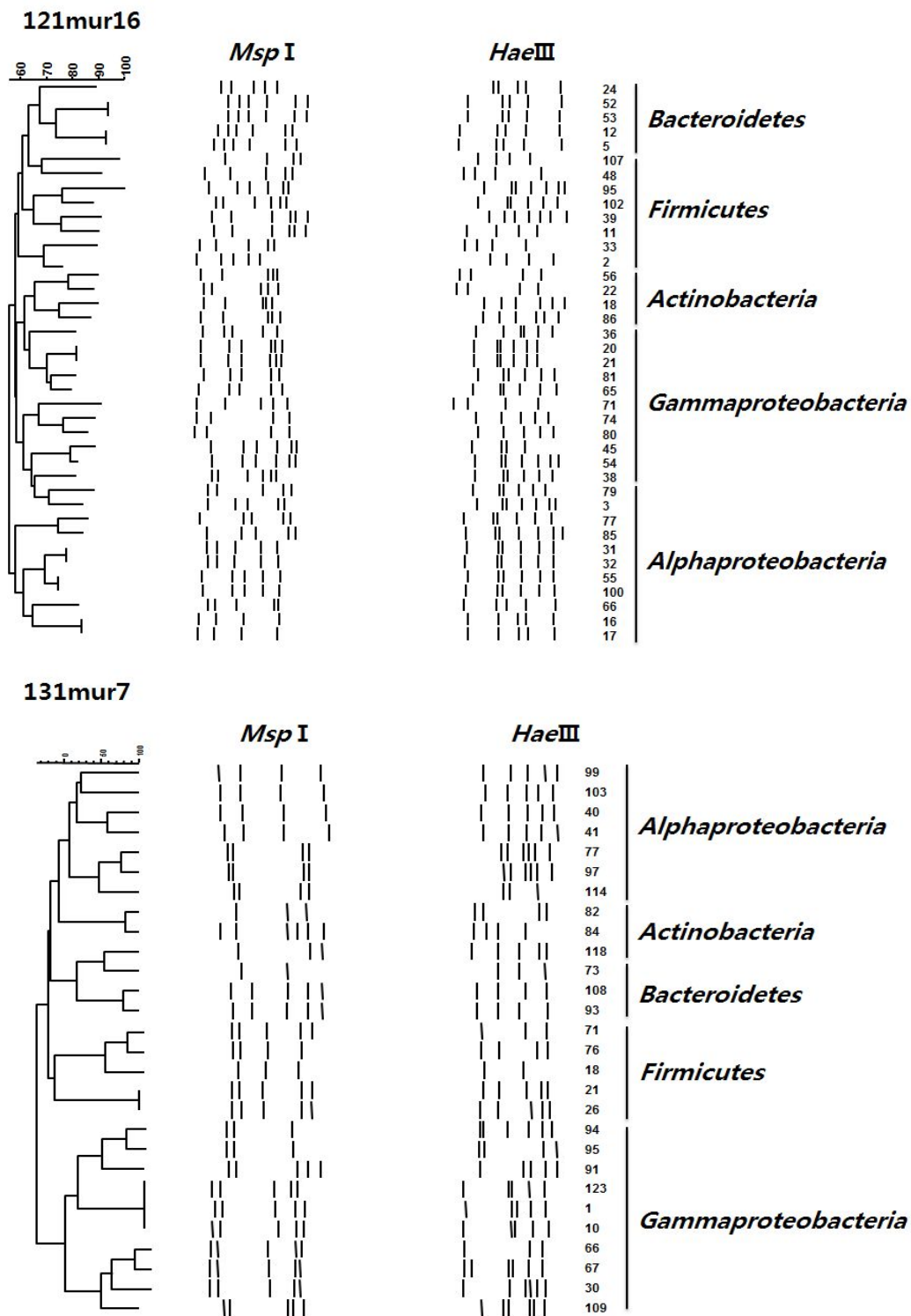


Fig. 3. Dendrogram showing the relationship among bacterial isolates based on the 16S rRNA gene-RFLP profiles from the marine sponge *P. corticata* collected in winter 121mur16(up) and 131mur7(down).

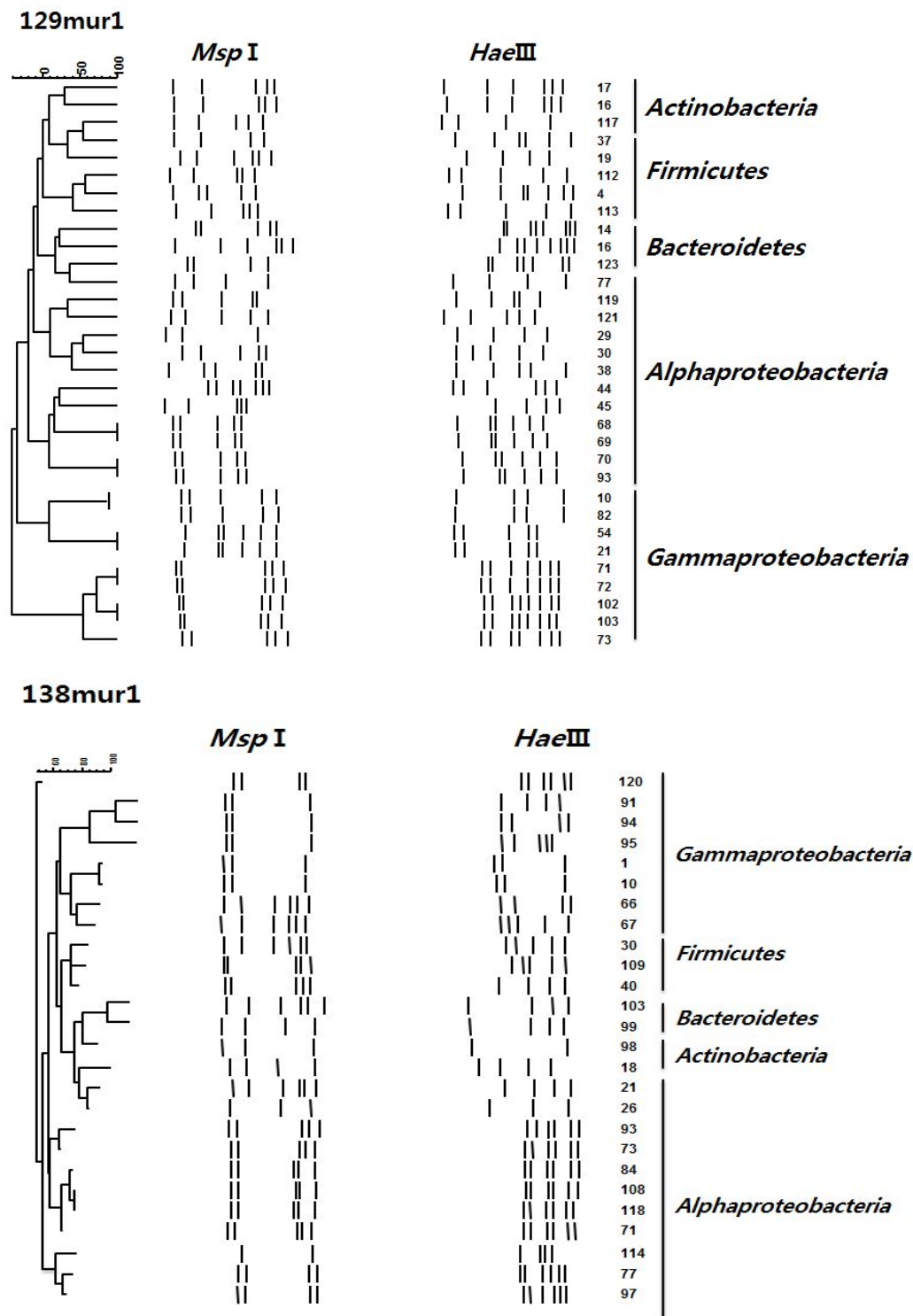


Fig. 4. Dendrogram showing the relationship among bacterial isolates based on the 16S rRNA gene-RFLP profiles from the marine sponge *P. corticata* collected in summer 129mur1(up) and 138mur1(down).

Table 4. RFLP fingerprinting types and sequence similarities of 16S rRNA gene from bacterial strains isolated from the marine sponge, *P. corticata* 121mur16.

RFLP type ^a	Strain No. ^b	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum
1a	121mur16 -18	<i>Kytococcus sedentarius</i> DSM 20547 ^T	CP001686	100	<i>Actinobacteria</i>
1a	121mur16 -86	<i>Kytococcus sedentarius</i> DSM 20547 ^T	CP001686	100	<i>Actinobacteria</i>
2b	121mur16 -22	<i>Agrococcus baldri</i> IAM 15147 ^T	AB279548	99	<i>Actinobacteria</i>
3b	121mur16 -56	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 ^T	Y16263	100	<i>Actinobacteria</i>
4c	121mur16 -3	<i>Paracoccus tylophorae</i> KTW-16T ^T	GQ281379	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
5d	121mur16 -16	<i>Ruegeria atlantica</i> IAM 14463 ^T	D88526	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
5d	121mur16 -17	<i>Ruegeria halocynthiae</i> MA1-6 ^T	HQ852038	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
6e	121mur16 -31	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
6e	121mur16 -32	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
6e	121mur16 -55	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
6e	121mur16 -66	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
7e	121mur16 -77	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AY486423	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
6e	121mur16 -100	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
8f	121mur16 -79	<i>Erythrobacter pelagi</i> ST08102118Y7-248 ^T	HQ203045	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
7e	121mur16 -85	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> DN34 ^T	AY486423	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
9g	121mur16 -5	<i>Vitellibacter aestuarii</i> JC2436 ^T	EU642844	97	<i>Bacteroidetes</i>
9g	121mur16 -12	<i>Vitellibacter aestuarii</i> JC2436 ^T	EU642844	98	<i>Bacteroidetes</i>
9g	121mur16 -52	<i>Vitellibacter aestuarii</i> JC2436 ^T	EU642844	98	<i>Bacteroidetes</i>
9g	121mur16 -53	<i>Vitellibacter aestuarii</i> JC2436 ^T	EU642844	98	<i>Bacteroidetes</i>
10h	121mur16 -24	<i>Maribacter dokdonensis</i> DSW-8 ^T	AY960749	100	<i>Bacteroidetes</i>
11i	121mur16 -2	<i>Planococcus halocryophilus</i> Or1 ^T	JF742665	98	<i>Firmicutes</i>
12j	121mur16 -11	<i>Bacillus berkeleyi</i> KMM 6244 ^T	JN187498	100	<i>Firmicutes</i>
13k	121mur16 -33	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	EF114313	100	<i>Firmicutes</i>

Table 4. Continued

RFLP type	Strain No.	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum
12l	121mur16 -39	<i>Bacillus tequilensis</i> 10b ^T	HQ223107	98	<i>Firmicutes</i>
13m	121mur16 -48	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 ^T	ACNF01000156	100	<i>Firmicutes</i>
14n	121mur16 -95	<i>Planococcus antarcticus</i> CMS 26or ^T	AJ314745	99	<i>Firmicutes</i>
14n	121mur16 -102	<i>Planococcus antarcticus</i> CMS 26or ^T	AJ314745	99	<i>Firmicutes</i>
15k	121mur16 -107	<i>Planococcus maritimus</i> TF-9 ^T	AF500007	100	<i>Firmicutes</i>
16o	121mur16 -20	<i>Psychrobacter marincola</i> KMM 277 ^T	AJ309941	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
16o	121mur16 -21	<i>Psychrobacter marincola</i> KMM 277 ^T	AJ309941	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
17p	121mur16 -36	<i>Psychrobacter piscatorii</i> T-3-2 ^T	AB453700	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
18e	121mur16 -65	<i>Psychrobacter nivimaris</i> 88/2-7 ^T	AJ313425	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
19e	121mur16 -38	<i>Psychrobacter nivimaris</i> 88/2-7 ^T	AJ313425	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
18e	121mur16 -81	<i>Psychrobacter nivimaris</i> 88/2-7 ^T	AJ313425	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
20q	121mur16 -45	<i>Psychrobacter maritimus</i> Pi2-20 ^T	AJ609272	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
20r	121mur16 -54	<i>Psychrobacter adeliensis</i> SJ 14 ^T	AJ539105	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
21s	121mur16 -71	<i>Pseudoalteromonas marina</i> Mano4 ^T	AY563031	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
22t	121mur16 -74	<i>Microbulbifer epialgicus</i> F-104 ^T	AB266054	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
22t	121mur16 -80	<i>Microbulbifer epialgicus</i> F-104 ^T	AB266054	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
23u	121mur16 -88	<i>Psychrobacter celer</i> SW-238 ^T	AY842259	100	<i>Gammaproteobacteria</i>

^a Arabian number and alphabetic abbreviation present RFLP types with the restriction enzymes *MspI* and *HaeIII* respectively.

^b Strains used in phylogenetic tree constructed.

Table 5. RFLP fingerprinting types and sequence similarities of 16S rRNA gene from bacterial strains isolated from the marine sponge, *P. corticata* 129mur1.

RFLP type ^a	Strain No. ^b	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum
1a	129mur1-16	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> DSM8609 ^T	Y17231	99	<i>Actinobacteria</i>
1a	129mur1-17	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> DSM8609 ^T	Y17231	99	<i>Actinobacteria</i>
2b	129mur1-117	<i>Janibacter hoylei</i> DSM21601 ^T	FR749912	99	<i>Actinobacteria</i>
3c	129mur1-7	<i>Erythrobacter vulgaris</i> 0222-10 ^T	AY706935	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
4d	129mur1-29	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
4d	129mur1-30	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
4d	129mur1-38	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
4d	129mur1-44	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
4d	129mur1-45	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
5e	129mur1-63	<i>Roseovarius crassostreae</i> CV919-312 ^T	AF114484	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
6f	129mur1-68	<i>Ruegeria atlantica</i> IAM14463 ^T	D88526	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
6f	129mur1-69	<i>Ruegeria atlantica</i> IAM14463 ^T	D88526	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
6g	129mur1-70	<i>Ruegeria atlantica</i> IAM14463 ^T	D88526	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
7h	129mur1-77	<i>Phaeobacter inhibens</i> T5 ^T	AY177712	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
6f	129mur1-93	<i>Ruegeria atlantica</i> IAM14463 ^T	D88526	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
8j	129mur1-119	<i>Labrenzia alba</i> CECT5094 ^T	AJ878875	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
8j	129mur1-121	<i>Labrenzia alba</i> CECT5094 ^T	AJ878875	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
9k	129mur1-14	<i>Spongiibacterium flavum</i> A11 ^T	FJ348473	98	<i>Bacteroidetes</i>
9k	129mur1-123	<i>Spongiibacterium flavum</i> A11 ^T	FJ348473	98	<i>Bacteroidetes</i>

Table 5. Continued

RFLP type	Strain No.	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phy lum
10l	129murl-4	<i>Bacillus nanhaiensis</i> JSM082006 ^T	GU477780	100	<i>Firmicutes</i>
11m	129murl-19	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	EF114313	100	<i>Firmicutes</i>
12n	129murl-37	<i>Planococcus</i> <i>donghaensis</i> JH1 ^T	EF079063	99	<i>Firmicutes</i>
13o	129murl-112	<i>Oceanobacillus</i> <i>profundus</i> CL-MP28 ^T	DQ386635	100	<i>Firmicutes</i>
14p	129murl-113	<i>Bacillus</i> <i>oceanisediminis</i> H2 ^T	GQ292772	99	<i>Firmicutes</i>
15q	129murl-10	<i>Pseudoalteromonas</i> <i>spongiae</i> UST010723-006 ^T	AY769918	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
16s	129murl-21	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC14126 ^T	X74706	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
17t	129murl-54	<i>Microbulbifer</i> <i>epialgicus</i> F-104 ^T	AB266054	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
16u	129murl-71	<i>Vibrio fortis</i> LMG21557 ^T	AJ514916	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
16v	129murl-72	<i>Vibrio pelagius</i> CECT4202 ^T	AJ293802	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
16w	129murl-73	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC14126 ^T	X74706	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
15r	129murl-82	<i>Pseudoalteromonas</i> <i>phenolica</i> O-BC30 ^T	AF332880	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
16x	129murl-102	<i>Vibrio chagasii</i> R-3712 ^T	AJ316199	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
16y	129murl-103	<i>Marinobacter</i> <i>vinifirmus</i> FB1 ^T	DQ235263	98	<i>Gammaproteobacteria</i>

^a Arabian number and alphabetic abbreviation present RFLP types with the restriction enzymes *MspI* and *HaeIII* respectively.

^b Strains used in phylogenetic tree constructed.

Table 6. RFLP fingerprinting types and sequence similarities of 16S rRNA gene from bacterial strains isolated from the marine sponge, *P. corticata* 131mur7.

RFLP type ^a	Strain No. ^b	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum
1a	131mur7-99	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
1a	131mur7-103	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
1a	131mur7-40	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
1a	131mur7-41	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
2b	131mur7-77	<i>Ruegeria atlantica</i> IAM 14463 ^T	D88526	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
2b	131mur7-97	<i>Ruegeria atlantica</i> IAM 14463 ^T	D88526	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
2c	131mur7-114	<i>Ruegeria halocynthiae</i> MA1-6 ^T	HQ852038	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
3d	131mur7-82	<i>Agrococcus baldri</i> IAM 15147 ^T	AB279548	99	<i>Actinobacteria</i>
4e	131mur7-84	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 ^T	Y16263	100	<i>Actinobacteria</i>
5f	131mur7-118	<i>Kytococcus sedentarius</i> DSM 20547 ^T	CP001686	100	<i>Actinobacteria</i>
6g	131mur7-73	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i> a4 ^T	EF416572	100	<i>Bacteroidetes</i>
7h	131mur7-108	<i>Vitellibacter aestuarii</i> JC2436 ^T	EU642844	98	<i>Bacteroidetes</i>
7h	131mur7-93	<i>Vitellibacter aestuarii</i> JC2436 ^T	EU642844	97	<i>Bacteroidetes</i>
8i	131mur7-71	<i>Bacillus tequilensis</i> 10b ^T	HQ223107	98	<i>Firmicutes</i>
9j	131mur7-76	<i>Bacillus marisflavi</i> TF-11 ^T	AF483624	98	<i>Firmicutes</i>
10k	131mur7-18	<i>Oceanobacillus picturae</i> LMG 19492 ^T	AJ315060	100	<i>Firmicutes</i>
11l	131mur7-21	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 ^T	EF114313	100	<i>Firmicutes</i>
11l	131mur7-26	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 ^T	EF114313	100	<i>Firmicutes</i>

Table 6. Continued

RFLP type	Strain No.	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phy lum
12m	131mur7-94	<i>Shewanella sairae</i> SM2-1 ^T	AB094597	98	<i>Gammaproteobacteria</i>
12n	131mur7-95	<i>Shewanella waksmanii</i> KMM 3823 ^T	AY170366	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
13o	131mur7-91	<i>Pseudoalteromonas</i> <i>marina</i> Mano4 ^T	AY563031	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
14p	131mur7-123	<i>Psychrobacter celer</i> SW-238 ^T	AY842259	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
14p	131mur7-1	<i>Psychrobacter celer</i> SW-238 ^T	AY842259	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
14p	131mur7-10	<i>Psychrobacter celer</i> SW-238 ^T	AY842259	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
14q	131mur7-66	<i>Psychrobacter</i> <i>marincola</i> KMM 277 ^T	AJ309941	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
14r	131mur7-67	<i>Psychrobacter</i> <i>maritimus</i> Pi2-20 ^T	AJ609272	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
14s	131mur7-30	<i>Psychrobacter</i> <i>nivimaris</i> 88/2-7 ^T	AJ313425	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
15t	131mur7-109	<i>Colwellia aestuarii</i> SMK-10 ^T	DQ055844	99	<i>Gammaproteobacteria</i>

^a Arabian number and alphabetic abbreviation present RFLP types with the restriction enzymes *MspI* and *HaeIII* respectively.

^b Strains used in phylogenetic tree constructed.

Table 7. RFLP fingerprinting types and sequence similarities of 16S rRNA gene from bacterial strains isolated from the marine sponge, *P. corticata* 138mur1.

RFLP type ^a	Strain No. ^b	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum
1a	138mur1-98	<i>Janibacter hoylei</i> DSM 21601 ^T	FR749912	100	<i>Actinobacteria</i>
2b	138mur1-18	<i>Serinicoccus chungangensis</i> CAU 9536 ^T	HM068886	99	<i>Actinobacteria</i>
3c	138mur1-103	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i> a4 ^T	EF416572	100	<i>Bacteroidetes</i>
2c	138mur1-99	<i>Tenacibaculum mesophilum</i> MBIC1140 ^T	AB032501	99	<i>Bacteroidetes</i>
4d	138mur1-30	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	EF114313	100	<i>Firmicutes</i>
5e	138mur1-109	<i>Bacillus marisflavi</i> TF-11 ^T	AF483624	98	<i>Firmicutes</i>
5f	138mur1-40	<i>Planococcus halocryophilus</i> Or1 ^T	JF742665	98	<i>Firmicutes</i>
6g	138mur1-26	<i>Erythrobacter vulgaris</i> 0222-10 ^T	AY706935	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
7h	138mur1-93	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
7h	138mur1-73	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
7h	138mur1-84	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
7h	138mur1-108	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
7h	138mur1-118	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
7h	138mur1-71	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
8i	138mur1-77	<i>Ruegeria atlantica</i> IAM 14463 ^T	D88526	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
8i	138mur1-97	<i>Ruegeria atlantica</i> IAM 14463 ^T	D88526	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
9j	138mur1-114	<i>Ruegeria halocynthiae</i> MA1-6 ^T	HQ852038	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
9f	138mur1-21	<i>Kiloniella laminariae</i> LD81 ^T	AM913907	98	<i>Alphaproteobacteria</i>

Table 7. Continued

RFLP type	Strain No.	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum
4k	138murl-66	<i>Pseudoalteromonas marina</i> Mano4 ^T	AY563031	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
4l	138murl-67	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i> UST010723-006 ^T	AY769918	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
10f	138murl-91	<i>Vibrio chagasii</i> R-3712 ^T	AJ316199	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
10m	138murl-94	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC14126 ^T	X74706	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
10n	138murl-1	<i>Vibrio pomeroi</i> LMG 20537 ^T	AJ491290	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
10n	138murl-10	<i>Vibrio pomeroi</i> LMG 20537 ^T	AJ491290	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
10o	138murl-95	<i>Vibrio tasmaniensis</i> LMG 21574 ^T	AJ514912	98	<i>Gammaproteobacteria</i>
11p	138murl-120	<i>Psychrobacter maritimus</i> Pi2-20 ^T	AJ609272	99	<i>Gammaproteobacteria</i>

^a Arabian number and alphabetic abbreviation present RFLP types with the restriction enzymes *Msp*I and *Hae*III respectively.

^b Strains used in phylogenetic tree constructed.

1-2. 염기서열 분석 및 계통학적 분석

RFLP 분석에 의해 겨울 해면에서 각각 26개, 20개의 타입, 여름 해면에서 각각 24개, 19개의 타입으로 나뉜, *P. corticata* 해면으로부터 분리된 세균들에 대하여 각 RFLP 타입 별로 1 - 3개의 분리 균주를 선별하여 부분 염기서열을 분석하였다. 121mur16해면의 경우 40균주, 129mur1해면의 경우 33균주, 131mur7해면의 경우 28균주 그리고 138mur1해면의 경우 26개의 균주에 대하여 염기서열을 분석하였으며 염기서열이 분석된 총 127개의 분리 균주는 모두 기존에 보고된 세균 종과 97% 이상의 유사도를 나타내었다.

선별된 균주들의 염기서열 분석 결과 *Agrococcus baldri* (121mur16-22, 131mur7-82), *Kocuria palustris* (121mur16-56, 131mur7-84), *Kytococcus sedentarius* (121mur16-18, 121mur16-86, 131mur7-118), *Microbacterium esteraromaticum* (129mur1-16, 129mur1-17), *Janibacter hoylei* (129mur1-117, 138mur1-98), *Serinicoccus chungangensis* (138mur1-18), *Maribacter dokdonensis* (121mur16-24), *Spongiibacterium flavum* (129mur1-14, 129mur1-123), *Vitellibacter aestuarii* (121mur16-5, 121mur16-12, 121mur16-52, 121mur16-53, 131mur7-93, 131mur7-108), *Tenacibaculum aiptasiae* (131mur7-73, 138mur1-103), *Tenacibaculum mesophilum* (138mur1-99), *Bacillus aryabhattai* (121mur16-33, 129mur1-19, 131mur7-21, 131mur7-26, 138mur1-30), *Bacillus berkeleyi* (121mur16-11), *Bacillus marisflavi* (131mur7-76, 138mur1-109), *Bacillus nanhaiensis* (129mur1-4), *Bacillus oceanisediminis* (129mur1-113), *Bacillus tequilensis* (121mur16-39, 131mur7-71), *Bacillus thuringiensis* (121mur16-48), *Oceanobacillus profundus* (129mur1-112), *Oceanobacillus picturae* (131mur7-18), *Planococcus antarcticus* (121mur16-95, 121mur16-102), *Planococcus donghaensis* (129mur1-37), *Planococcus halocryophilus* (121mur16-2, 138mur1-40), *Planococcus maritimus* (121mur16-107), *Erythrobacter pelagi* (121mur16-79), *Erythrobacter vulgaris* (129mur1-7, 138mur1-26), *Labrenzia alba* (129mur1-119, 129mur1-121), *Paracoccus stylophorae* (121mur16-3), *Phaeobacter*

inhibens (129mur1-77), *Pseudovibrio ascidiaceicola* (121mur16-31, 121mur16-32, 121mur16-55, 121mur16-66, 121mur16-77, 121mur16-100, 129mur1-29, 129mur1-30, 129mur1-38, 129mur1-44, 129mur1-45, 131mur7-40, 131mur7-41, 131mur7-99, 131mur7-103, 138mur1-71, 138mur1-73, 138mur1-84, 138mur1-93, 138mur1-108, 138mur1-118), *Pseudovibrio denitrificans* (121mur16-85), *Roseovarius crassostreae* (129mur1-63), *Ruegeria atlantica* (121mur16-16, 129mur1-68, 129mur1-69, 129mur1-70, 129mur1-93, 131mur7-77, 131mur7-97, 138mur1-77, 138mur1-97), *Ruegeria halocynthiae* (129mur16-17, 131mur7-114, 138mur1-114), *Marinobacter vinifirmus* (129mur1-103), *Microbulbifer epialgicus* (121mur16-74, 121mur16-80, 129mur1-54), *Colwellia aestuarii* (131mur7-109), *Kiloniella laminariae* (138mur1-21), *Pseudoalteromonas marina* (121mur16-71, 131mur7-91, 138mur1-66), *Pseudoalteromonas phenolica* (129mur1-82), *Pseudoalteromonas spongiae* (129mur1-10, 138mur1-67), *Psychrobacter adeliensis* (121mur16-54), *Psychrobacter celer* (121mur16-88, 131mur7-1, 131mur7-10, 131mur7-123), *Psychrobacter maricola* (121mur16-20, 121mur16-21, 131mur7-66), *Psychrobacter maritimus* (121mur16-45, 131mur7-67, 138mur1-120), *Psychrobacter nivimaris* (121mur16-38, 121mur16-65, 121mur16-81, 131mur7-30), *Psychrobacter piscatorii* (121mur16-36), *Shewanella sairae* (131mur7-94), *Shewanella waksmanii* (131mur7-95), *Vibrio chagasii* (129mur1-102, 138mur1-91), *Vibrio fortis* (129mur1-71), *Vibrio harveyi* (129mur1-21, 129mur1-73, 138mur1-94), *Vibrio pelagius* (129mur1-72), *Vibrio pomeroyi* (138mur1-1, 138mur1-10), *Vibrio tasmaniensis* (138mur1-95)로 나타났다(Table 2, Table 3, Table 4 and Table 5).

이를 근거로 두 계절의 해면으로부터 분리된 배양 가능한 공생세균은 모두 *Proteobacteria*(*Alpha*-, *Gamma*-), *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, 4개의 문(phylum)에 포함되었다(Fig. 5). *Gammaproteobacteria*는 겨울에 가장 우점하는 세균 군집이었으며, *Alphaproteobacteria*는 여름에 가장 우점하는 세균 군집이었다. 특히, *Gammaproteobacteria*에서 겨울에

채집한 해면에서 *Psychrobacter*속의 세균 그룹이 우점하는 반면 여름에 채집한 해면에서는 *Vibrio*속의 세균 그룹이 우점하였다(Fig. 7). *Pseudovibrio*속의 세균은 계절에 관계없이 *Alphaproteobacteria*에서 가장 우점하는 세균 그룹으로 나타났다. *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*는 여름에 비해 겨울에 더 높은 비율을 나타내었다(Table 8 and Fig. 6).

Table 8. Relative abundance of bacterial species in marine sponges, *P. corticata*.

Phylum	Bacterial species	121mur16	129mur1	131mur7	138mur1
		(Winter)	(Summer)	(Winter)	(Summer)
<i>Actinobacteria</i>		10.0	9.0	10.8	7.4
	<i>Agrococcus baldri</i>	2.5		3.6	
	<i>Kocuria palustris</i>	2.5		3.6	
	<i>Kytococcus sedentarius</i>	5.0		3.6	
	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>		6.0		
	<i>Janibacter hoylei</i>		3.0		3.7
	<i>Serinicoccus chungangensis</i>				3.7
<i>Bacteroidetes</i>		12.5	6.0	10.8	7.4
	<i>Maribacter dokdonensis</i>	2.5			
	<i>Spongiibacterium flavum</i>		6.0		
	<i>Vitellibacter aestuarii</i>	10.0		7.2	
	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>			3.6	3.7
	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>				3.7
<i>Firmicutes</i>		20.0	15.0	18.0	11.2
	<i>Bacillus aryabhatai</i>	2.5	3.0	7.2	3.7
	<i>Bacillus berkeleyi</i>	2.5			
	<i>Bacillus marisflavi</i>			3.6	3.7
	<i>Bacillus nanhaiensis</i>		3.0		
	<i>Bacillus oceanisediminis</i>		3.0		
	<i>Bacillus tequilensis</i>	2.5		3.6	
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2.5			
	<i>Oceanobacillus profundus</i>		3.0		
	<i>Oceanobacillus picturae</i>			3.6	
	<i>Planococcus antarcticus</i>	5.0			
	<i>Planococcus donghaensis</i>		3.0		
	<i>Planococcus halocryophilus</i>	2.5			3.7
	<i>Planococcus maritimus</i>	2.5			
<i>Alphaproteobacteria</i>		27.5	42.5	25.2	44.4
	<i>Erythrobacter pelagi</i>	2.5			
	<i>Erythrobacter vulgaris</i>		3.0		3.7
	<i>Labrenzia alba</i>		7.1		
	<i>Paracoccuss tylophorae</i>	2.5			
	<i>Phaeobacter inhibens</i>		3.0		
	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>	15.0	16.2	14.4	22.2

Table 8. Continued.

Phylum	Bacterial species	121mur16	129mur1	131mur7	138mur1
		(Winter)	(Summer)	(Winter)	(Summer)
	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	2.5			3.7
	<i>Roseovarius crassostreae</i>		3.0		
	<i>Ruegeria atlantica</i>	2.5	10.1	7.2	7.4
	<i>Ruegeria halocynthiae</i>	2.5		3.6	3.7
	<i>Kiloniella laminariae</i>				3.7
	<i>Gammaproteobacteria</i>	30.0	27.5	35.2	29.6
	<i>Marinobacter vinifirmus</i>		3.0		
	<i>Microbulbifer epialgicus</i>	5.0	3.0		
	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	2.5		3.6	3.7
	<i>Pseudoalteromonas phenolica</i>		3.0		
	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>		3.0		3.7
	<i>Psychrobacter adeliensis</i>	2.5			
	<i>Psychrobacter celer</i>	2.5		10.0	
	<i>Psychrobacter marincola</i>	5.0		3.6	
	<i>Psychrobacter maritimus</i>	2.5		3.6	3.7
	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	7.5		3.6	
	<i>Psychrobacter piscatorii</i>	2.5	6.5		
	<i>Vibrio chagasii</i>		3.0		3.7
	<i>Vibrio fortis</i>		3.0		
	<i>Vibrio harveyi</i>		3.0		3.7
	<i>Vibrio pomeroyi</i>				7.4
	<i>Vibrio tasmaniensis</i>				3.7
	<i>Shewanella waksmanii</i>			3.6	
	<i>Shewanella sairae</i>			3.6	
	<i>Colwellia aestuarii</i>			3.6	

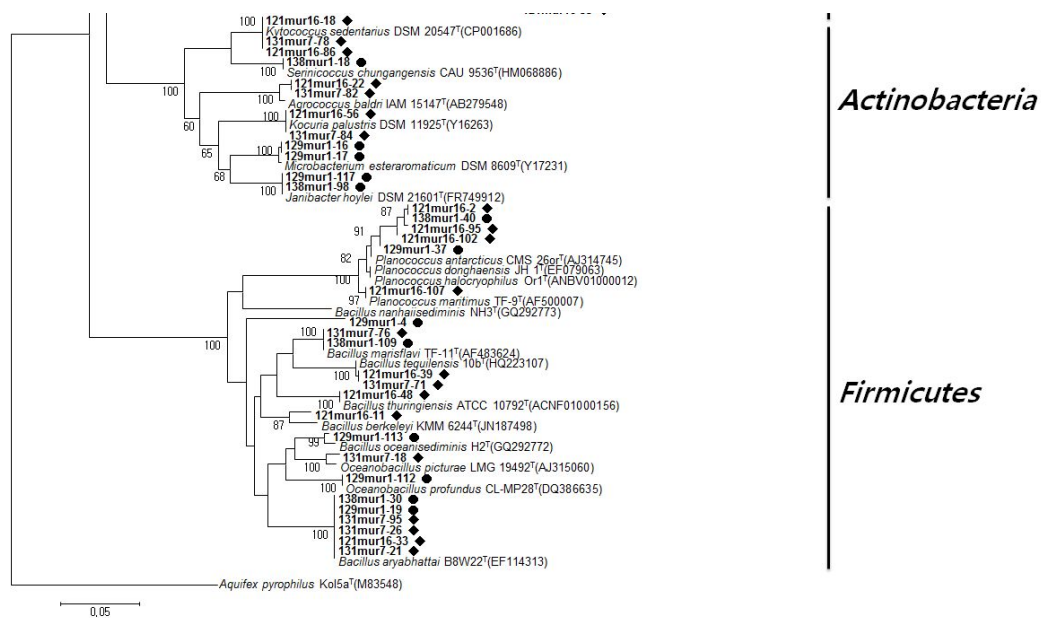


Fig. 5. Phylogenetic relationships were determined by the 16S rRNA gene sequences of the bacterial isolates from the marine sponge *P. corticata*. Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis (50%) from 1,000 replicates. The scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide position. *Aquifex pyrophilus* was used as an out group. Filled circle denotes summer sponges; filled diamond denotes winter sponges.

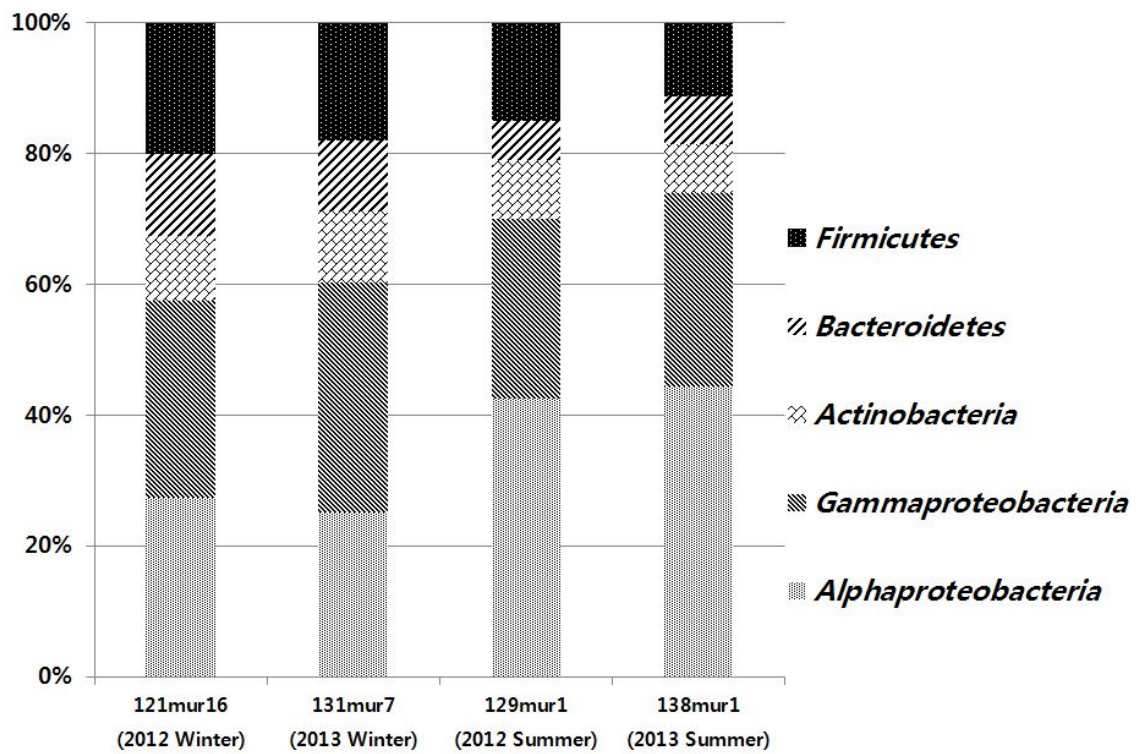


Fig. 6. Seasonal comparison among the major bacterial groups of the cultivable bacterial communities from the marine sponge, *P. corticata*.

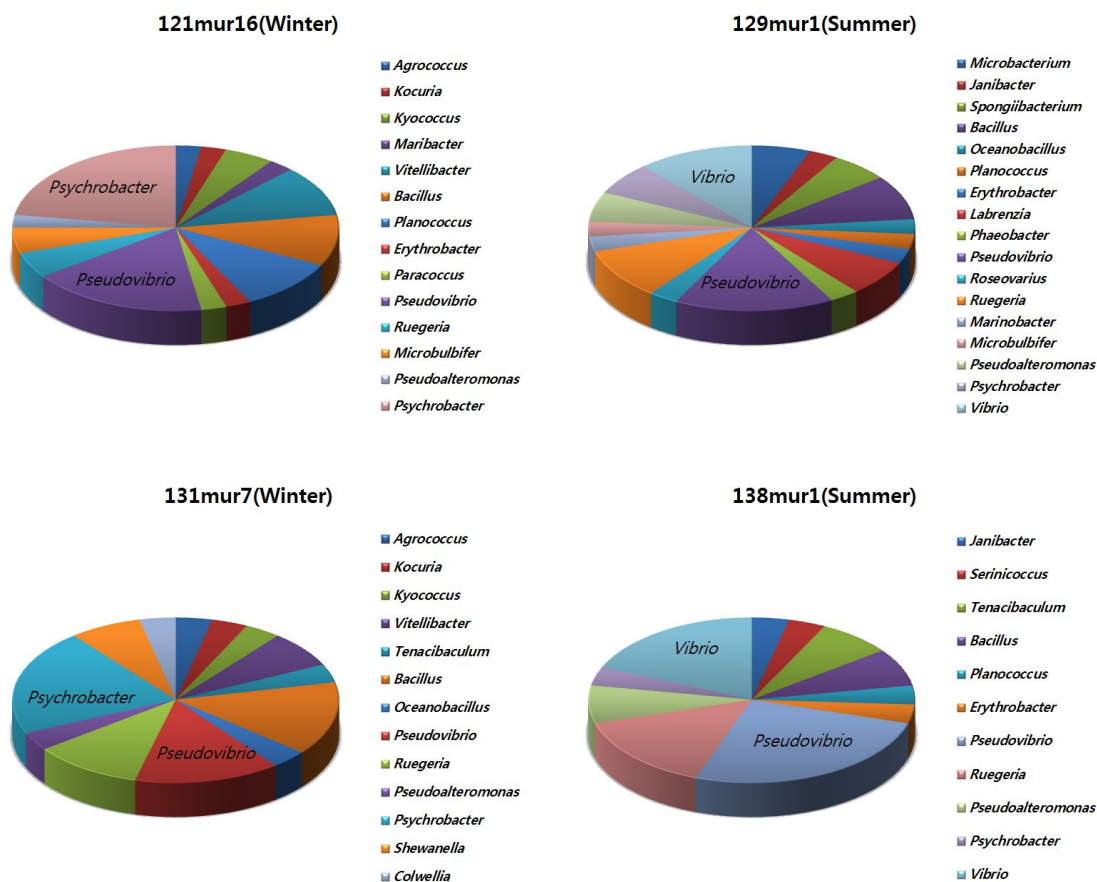


Fig. 7. Taxonomic composition at the genus level based on 16S rRNA gene retrieved from the four sponge samples.

2. DGGE를 이용한 조간대해면 *Hymeniacidon flavia*의 계절에 따른 공생 세균 군집구조 비교

2-1. DGGE 밴드 양상

2013년 8월과 12월 제주도 용머리해안 조간대에서 채집한 같은 종의 해면 *H. flavia*의 계절에 따른 공생세균 군집구조를 알아보기 위하여 16S rRNA gene의 PCR-DGGE 방법을 사용하여 조사하였다. 해면 시료로부터 추출한 total genomic DNA를 주형으로 16S rRNA gene을 증폭하여 DGGE를 수행하고 재현성을 확인한 결과 동일 계절의 해면인 경우 동일한 DGGE 밴드 패턴을 나타내었으며, 두 계절 사이에는 유사한 밴드 패턴을 나타내었다. 여름에 채집한 해면(138Y4)에서 5개, 겨울에 채집한 해면(1312Y5)에서 8개의 밴드가 나타나 총 13개의 주요 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 8). 같은 지역에서 채집한 서로 같은 해면 종에서 계절적 차이가 나는 밴드와 전체 세균 다양성을 파악하기 위하여 16S rRNA gene의 부분 염기서열을 분석하였다.

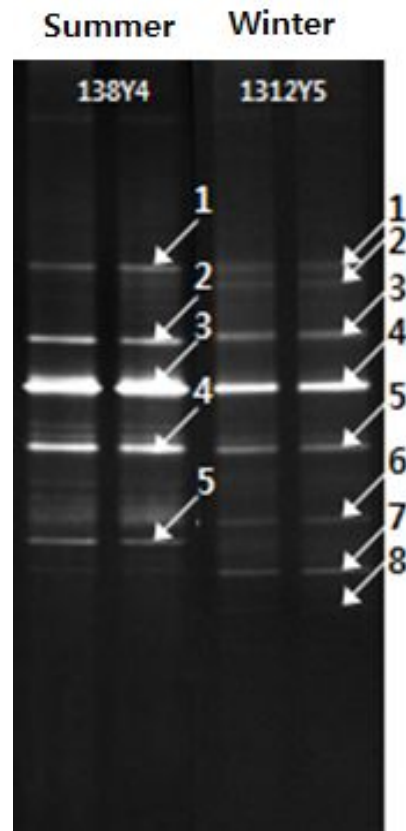


Fig. 8. DGGE banding patterns of amplified 16S rRNA gene obtained from *H. flavia* 138Y4 and 1312Y5.

2-2 염기서열 분석 및 계통학적 분석

계절에 따른 해면공생세균의 군집구조를 분석하기 위해 DGGE의 밴드를 적출하여 염기서열을 분석한 결과 총 13개의 밴드에 대한 염기서열을 확인 할 수 있었으며, 기존에 알려진 염기서열과 87%에서 100%의 상동성을 나타내었다. 밴드로부터 분석된 모든 염기서열들이 배양되지 않은 세균(uncultured bacteria)과 높은 상동성을 나타내었다(Table 9).

DGGE 밴드에서 138Y4-1은 *Gammaproteobacteria*와 87%의 상동성을 나타내었고, 138Y4-2와 1312Y5-3은 Uncultured alpha proteobacterium (FR670357)과 91%에서 97%의 상동성을 보였으며 138Y4-3, 1312Y5-1, 1312Y5-2 그리고 1312Y5-4는 Uncultured alpha proteobacterium (EU315495)과 100%의 상동성을 나타내었다. 138Y4-4, 138Y4-6 그리고 1312Y5-7은 Uncultured gamma proteobacterium (JF824776)과 96%에서 97%의 상동성을 나타내었으며, 138Y4-5는 *Alphaproteobacteria*에 속하는 Uncultured *Sphingopyxis* sp. (JX525340)와 99%의 상동성을 나타내었다. 1312Y5-5와 1312Y5-6은 Uncultured alpha proteobacterium (KF583330, AB054182)과 98%에서 100%의 상동성을 나타내었으며 1312Y5-8은 *Firmicutes* 문에 속하는 Uncultured *Lactobacillus* sp. (AB853270)와 89%의 상동성을 나타내었다(Table 9).

동종 두 개체 해면 *H. flavia*로부터 계절에 따른 군집구조 분석 결과 여름에 채집한 해면의 공생세균 군집구조는 *Alphaproteobacteria* (50%)와 *Gammaproteobacteria* (50%)로 1문 2강으로 나타났으나(Fig. 9) 겨울에 채집한 해면은 *Alphaproteobacteria* (75%), *Gammaproteobacteria* (12.5%) 그리고 *Firmicutes* (12.5%)로 2문 3강으로 나타나(Fig.9) 계절적인 차이가 나타남을 알 수 있었다(Fig. 10).

Table 9. Phylogenetic affiliation of re-amplified denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) bands derived from the sponge *H. flavia* 138Y4 and 1312Y5.

DGGE band	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum
138Y4-1	Uncultured gamma proteobacterium	EU315459	87	<i>Gammaproteobacteria</i>
138Y4-2	Uncultured alpha proteobacterium	FR670357	91	<i>Alphaproteobacteria</i>
138Y4-3	Uncultured alpha proteobacterium	EU315495	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
138Y4-4	Uncultured gamma proteobacterium	JF824776	96	<i>Gammaproteobacteria</i>
138Y4-5	Uncultured gamma proteobacterium	JF824776	97	<i>Gammaproteobacteria</i>
138Y4-6	Uncultured <i>Sphingopyxis</i> sp.	JX525340	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
1312Y5-1	Uncultured alpha proteobacterium	EU315495	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
1312Y5-2	Uncultured alpha proteobacterium	EU315495	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
1312Y5-3	Uncultured alpha proteobacterium	FR670357	97	<i>Alphaproteobacteria</i>
1312Y5-4	Uncultured alpha proteobacterium	EU315495	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
1312Y5-5	Uncultured alpha proteobacterium	KF583330	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
1312Y5-6	Uncultured alpha proteobacterium	AB054182	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
1312Y5-7	Uncultured gamma proteobacterium	JF824776	97	<i>Gammaproteobacteria</i>
1312Y5-8	Uncultured <i>Lactobacillus</i> sp.	AB853270	89	<i>Firmicutes</i>

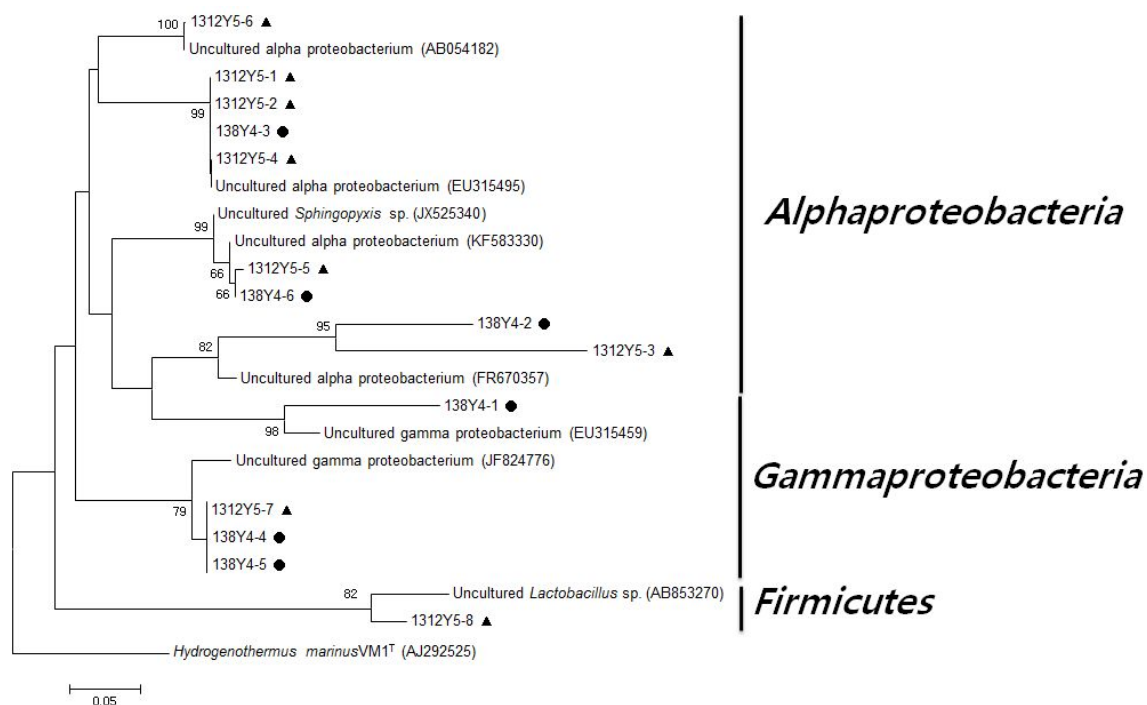


Fig. 9. Phylogenetic tree from analysis of 16S rRNA gene sequences of DGGE bands derived from the sponge, *H. flavia*. Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis (>50%) from 1,000 replicates. *Hydrogenothermus marinus* was used as an out group. Filled circle denotes summer sponge; filled triangle denotes winter sponge.

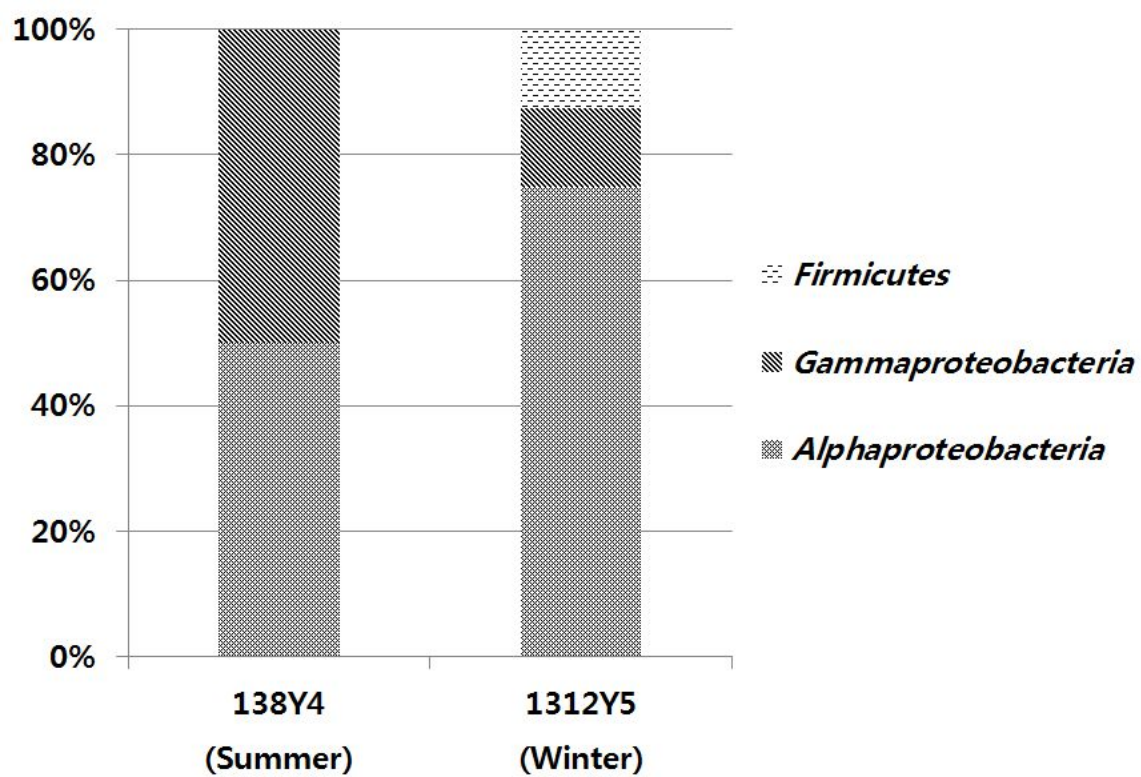


Fig. 10. Composition of the bacterial community among the sponge based on 16S rRNA gene-V3 in *H. flavia* 138Y4 and 1312Y5.

3. DGGE를 이용한 계절에 따른 *Callyspongia elegans* 해면의 공생세균 군집구조 비교

3-1. DGGE 밴드 양상

2013년 1월과 8월, 2014년 6월 제주도 서귀포시 대정읍 무릉아치에서 채집한 같은 종의 해양 해면 *C. elegans*의 계절에 따른 공생세균 군집구조를 알아보기 위하여 PCR-DGGE 방법을 사용하여 조사하였다. 7개체의 해면 시료로부터 추출한 total genomic DNA를 주형으로 16S rRNA gene의 V3영역을 증폭하여 DGGE를 수행한 결과 두 계절 사이에는 다른 밴드 패턴을 나타내었다. 겨울에 채집한 해면 131mur20에서 12개, 1312mur1에서 11개, 여름에 채집한 해면 138mur2, 138mur3 그리고 138mur4에서 각각 8개, 8개, 9개 그리고 146mur8, 146mur11에서 각각 7개씩의 밴드가 나타나 총 62개의 주요 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 11). 동일 지역에서 채집한 같은 종의 해면에서 계절적 차이가 나는 밴드와 전체 세균 다양성을 파악하기 위하여 16S rRNA gene의 부분 염기서열을 분석하였다.

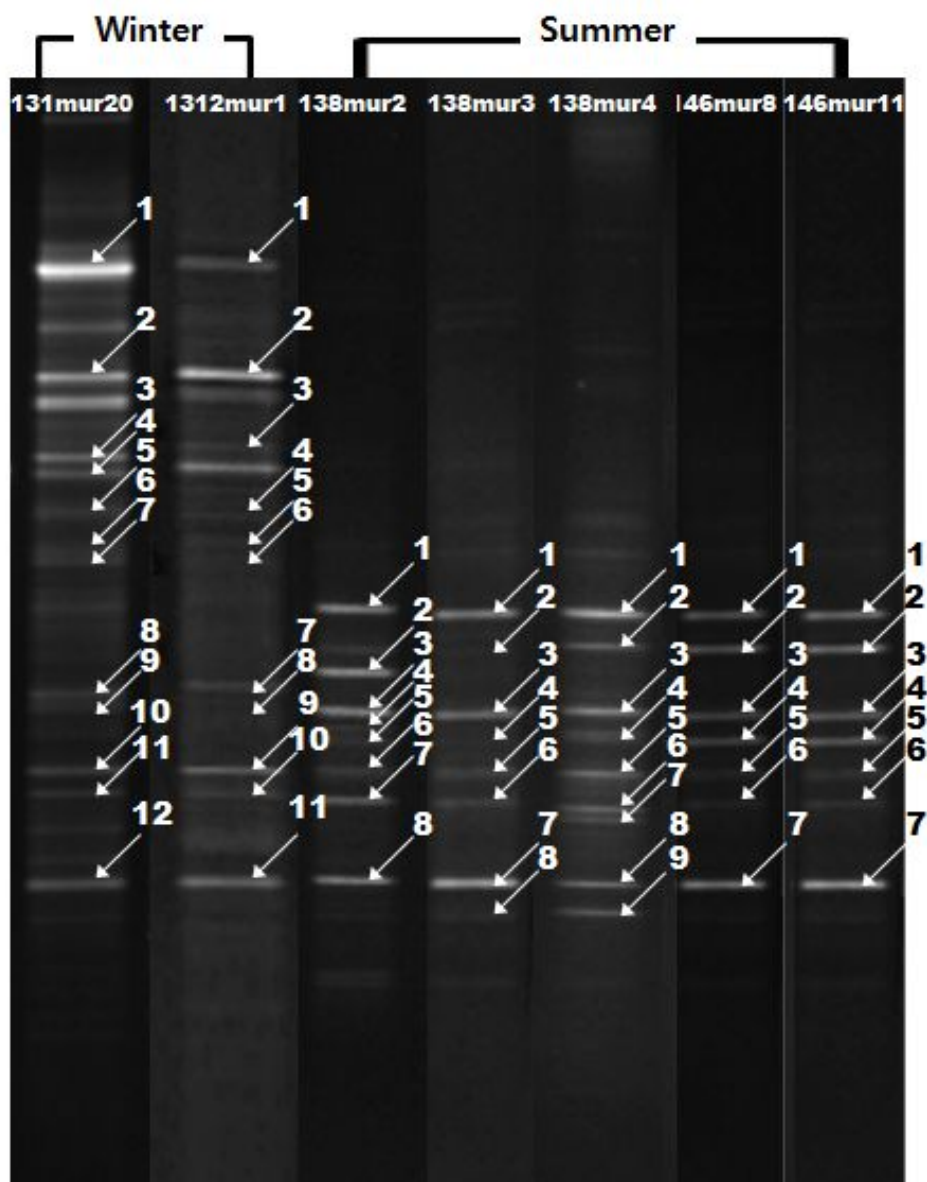


Fig. 11. DGGE banding patterns of amplified 16S rRNA gene obtained from *C. elegans* (131mur20, 138mur2, 138mur3, 138mur4, 1312mur1, 146mur8 and 146mur11).

3-2 염기서열 분석 및 계통학적 분석

C. elegans 해면의 계절에 따른 해면공생세균 군집구조를 분석하기 위해 DGGE의 밴드로부터 염기서열을 분석한 결과 총 37개의 밴드에 대한 염기서열을 확인 할 수 있었으며, 기존에 알려진 염기서열과 81%에서 100%의 상동성을 나타내었다(Table 10).

2013년 1월과 12월에 채집한 *C. elegans*의 공생세균 군집구조는 *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Chloroflexi* 그리고 *Cyanobacteria*로 3문 6강으로 구성되었으며, 2013년 8월과 2014년 6월에 채집한 *C. elegans*의 공생세균 군집구조는 *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* 그리고 *Cyanobacteria*로 2문 4강으로 구성되어 세균 군집구조는 각각의 계절별로 일정하였으며 같은 시기에 채집한 다른 개체 해면에서도 공생세균 군집구조가 동일하게 구성됨을 알 수 있었다(Fig. 13).

겨울에 채집한 *C. elegans*의 경우 *Alphaproteobacteria*가 우점하는 것으로 나타났으나 여름에 채집한 해면의 경우 주로 *Gammaproteobacteria*가 우점 하였다. 또한 겨울에 채집한 *C. elegans* 해면은 여름에 채집한 해면에 비해 *Deltaproteobacteria*와 *Chloroflexi*문을 포함하고 있어 더 다양한 세균 군집을 포함하였다(Fig. 12 and 13).

Table 10. Phylogenetic affiliation of re-amplified denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) bands derived from the sponges *C. elegans* (131mur20, 138mur2, 138mur3, 138mur4, 1312mur1, 146mur8 and 146mur11).

DGGE band	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum
131mur20-1	Uncultured beta proteobacterium	KC492704	90	<i>Betaproteobacteria</i>
131mur20-2	Uncultured cyanobacterium	HQ270357	81	<i>Cyanobacteria</i>
131mur20-3	Uncultured gamma proteobacterium	GQ274304	97	<i>Gammaproteobacteria</i>
131mur20-4	Uncultured alpha proteobacterium	JQ917688	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
131mur20-5	Uncultured cyanobacterium	GU049043	96	<i>Cyanobacteria</i>
131mur20-6	Uncultured alpha proteobacterium	FJ620844	87	<i>Alphaproteobacteria</i>
131mur20-7	Uncultured Anaerolineae bacterium	KC200512	97	<i>Chloroflexi</i>
131mur20-8	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp.	JQ063104	92	<i>Gammaproteobacteria</i>
131mur20-9	Uncultured alpha proteobacterium	EU300582	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
131mur20-10	Uncultured alpha proteobacterium	HM475006	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
131mur20-11	Uncultured delta proteobacterium	JN825509	98	<i>Deltaproteobacteria</i>
131mur20-12	Uncultured alpha proteobacterium	JQ917688	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
138mur2-1	Uncultured cyanobacterium	JN098341	100	<i>Cyanobacteria</i>
138mur2-2	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KF057994	89	<i>Gammaproteobacteria</i>
138mur2-3	Chroococcales cyanobacterium	HE805959	95	<i>Cyanobacteria</i>
138mur2-4	Uncultured <i>Endozoicomonas</i> sp.	KF428209	95	<i>Gammaproteobacteria</i>
138mur2-5	Uncultured <i>Vibrio</i> sp.	KF758722	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
138mur2-6	Uncultured <i>Pelagibacter</i> sp.	JQ515496	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
138mur2-7	Alpha proteobacterium	JX439615	97	<i>Alphaproteobacteria</i>
138mur2-8	Uncultured beta proteobacterium	DQ889936	92	<i>Betaproteobacteria</i>

Table 10. Continued.

DGGE band	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum
138mur3-1	Uncultured gamma proteobacterium	JF949610	98	<i>Gammaproteobacteria</i>
138mur3-2	Uncultured cyanobacterium	DQ398266	99	<i>Cyanobacteria</i>
138mur3-3	Uncultured <i>Endozoicomonas</i> sp.	KF428209	95	<i>Gammaproteobacteria</i>
138mur3-4	Alpha proteobacterium	JX439616	97	<i>Alphaproteobacteria</i>
138mur3-5	Uncultured gamma proteobacterium	GQ348055	92	<i>Gammaproteobacteria</i>
138mur3-6	<i>Listonella</i> sp.	AB793229	90	<i>Gammaproteobacteria</i>
138mur3-7	Uncultured beta proteobacterium	DQ889936	94	<i>Betaproteobacteria</i>
138mur3-8	Uncultured alpha proteobacterium	EU300582	98	<i>Alphaproteobacteria</i>
138mur4-1	Uncultured cyanobacterium	KF724065	100	<i>Cyanobacteria</i>
138mur4-2	Uncultured cyanobacterium	HQ270357	99	<i>Cyanobacteria</i>
138mur4-3	Uncultured <i>Shewanella</i> sp.	KC917604	94	<i>Gammaproteobacteria</i>
138mur4-4	<i>Vibrio splendidus</i>	KC534427	81	<i>Gammaproteobacteria</i>
138mur4-5	Alpha proteobacterium	JX439616	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
138mur4-6	Alpha proteobacterium	JX439615	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
138mur4-7	Uncultured <i>Vibrio</i> sp.	KF758710	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
138mur4-8	Uncultured beta proteobacterium	DQ889936	93	<i>Betaproteobacteria</i>
138mur4-9	Uncultured alpha proteobacterium	EU300582	96	<i>Alphaproteobacteria</i>
1312mur1-1	Uncultured beta proteobacterium	KC492704	90	<i>Betaproteobacteria</i>
1312mur1-2	Uncultured cyanobacterium	EU882210	96	<i>Cyanobacteria</i>
1312mur1-3	Uncultured Gamma proteobacterium	JX439134	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
1312mur1-4	Uncultured cyanobacterium	GU049043	96	<i>Cyanobacteria</i>
1312mur1-5	Uncultured alpha proteobacterium	GQ348104	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
1312mur1-6	Uncultured Anaerolineae bacterium	KC200512	97	<i>Chloroflexi</i>
1312mur1-7	<i>Spongiobacter</i> sp.	FJ457275	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
1312mur1-8	Uncultured alpha proteobacterium	JQ772310	99	<i>Alphaproteobacteria</i>
1312mur1-9	Uncultured alpha proteobacterium	AB254309	93	<i>Alphaproteobacteria</i>
1312mur1-10	Uncultured delta proteobacterium	JN825509	98	<i>Deltaproteobacteria</i>
1312mur1-11	Uncultured alpha proteobacterium	KF183105	97	<i>Alphaproteobacteria</i>

Table 10. Continued.

DGGE band	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum
146mur8-1	Uncultured gamma proteobacterium	HE803928	97	<i>Gammaproteobacteria</i>
146mur8-2	<i>Cyanobium</i> sp.	KM218863	100	<i>Cyanobacteria</i>
146mur8-3	Uncultured gamma proteobacterium	HE803928	97	<i>Gammaproteobacteria</i>
146mur8-4	Uncultured alpha proteobacterium	AB900958	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
146mur8-5	Uncultured alpha proteobacterium	LC003810	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
146mur8-6	Uncultured beta proteobacterium	DQ889936	93	<i>Betaproteobacteria</i>
146mur8-7	Uncultured alpha proteobacterium	EU300582	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
146mur11-1	Uncultured gamma proteobacterium	HE803928	97	<i>Gammaproteobacteria</i>
146mur11-2	Uncultured cyanobacterium	JX671894	100	<i>Cyanobacteria</i>
146mur11-3	Uncultured gamma proteobacterium	HE803928	96	<i>Gammaproteobacteria</i>
146mur11-4	Uncultured alpha proteobacterium	LC003810	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
146mur11-5	Uncultured alpha proteobacterium	AB900958	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
146mur11-6	Uncultured beta proteobacterium	DQ889936	93	<i>Betaproteobacteria</i>
146mur11-7	Uncultured alpha proteobacterium	EU300582	100	<i>Alphaproteobacteria</i>

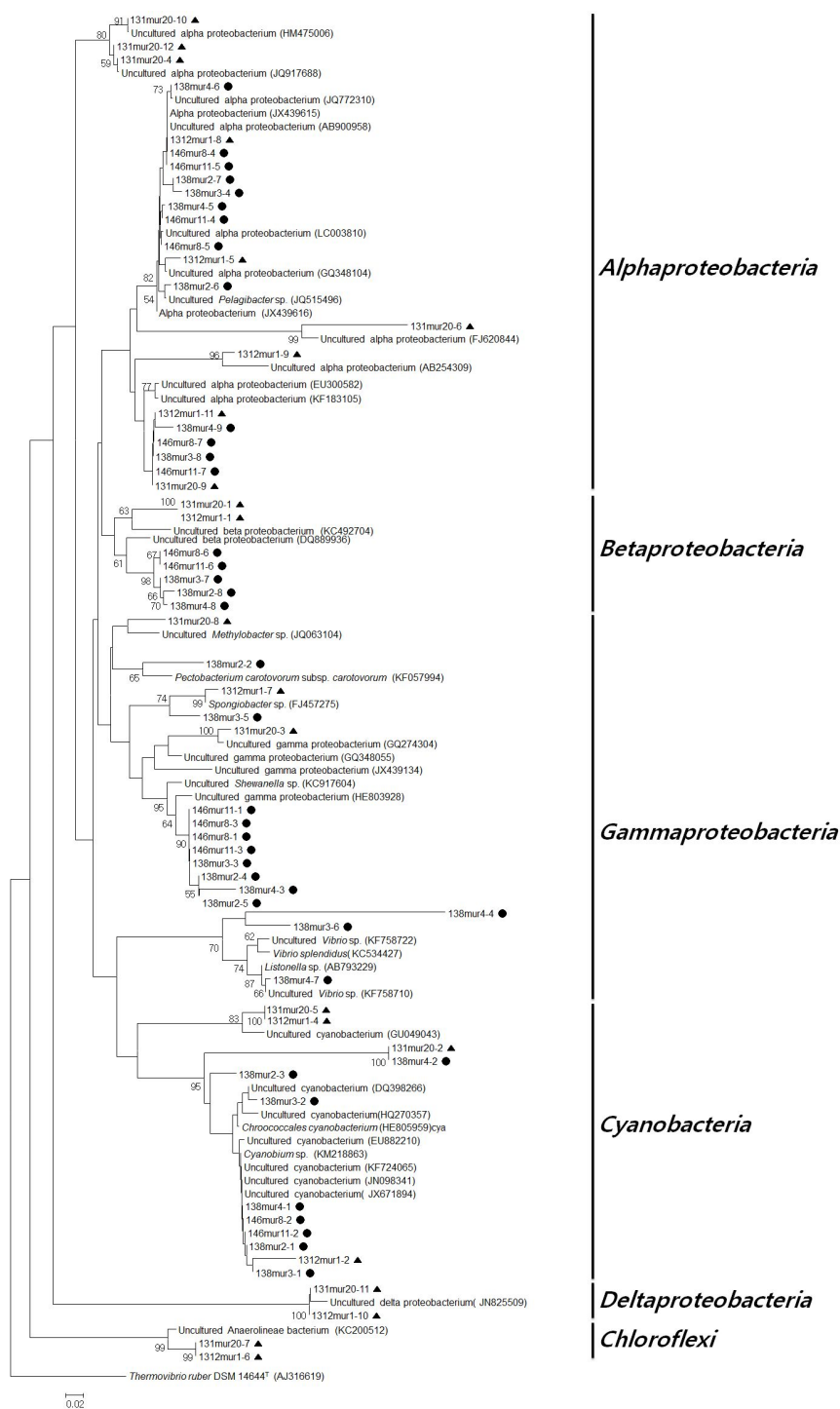


Fig. 12. Phylogenetic tree from analysis of 16S rRNA gene sequences of DGGE bands derived from the sponge, *C. elegans*. Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis (>50%) from 1,000 replicates. *Thermovibrio ruber* was used as an out group. Filled circle denotes summer sponges; filled triangle denotes winter sponges.

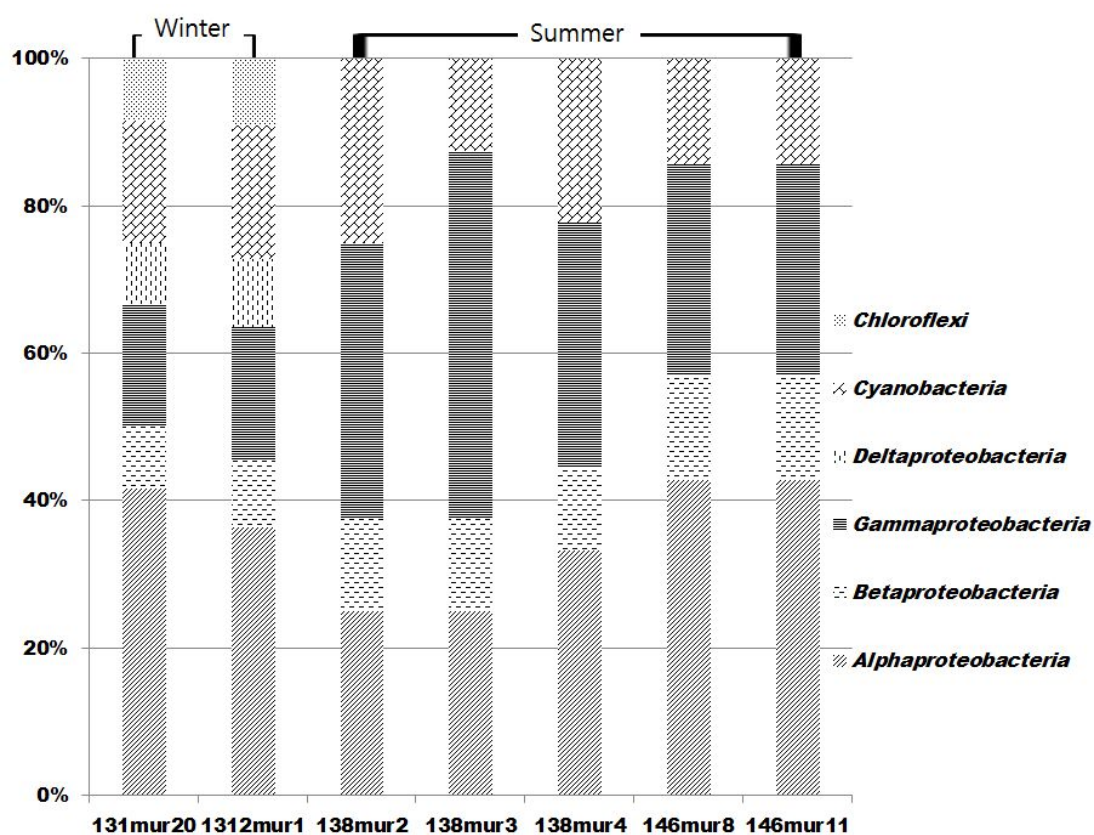


Fig. 13. Composition of the bacterial community among the sponges based on 16S rRNA gene-V3 in *C. elegans* (131mur20, 138mur2, 138mur3, 138mur4, 1312mur1, 146mur8 and 146mur11).

4. DGGE를 이용한 계절에 따른 *Cliona* sp. 해면의 공생세균 군집구조 비교

4-1. DGGE 밴드 양상

2012년 9월과 2013년 1월 제주도 서귀포시 대정읍 무릉아치에서 채집한 해양 해면 *Cliona* sp.의 계절에 따른 공생세균 군집구조를 알아보기 위하여 PCR-DGGE 방법을 사용하여 조사하였다. 해면 시료로부터 total genomic DNA를 추출하여 이를 주형으로 16S rRNA gene을 증폭하여 DGGE를 수행한 결과 두 계절 사이에는 다른 밴드 패턴을 나타내었다. 여름에 채집한 해면(129mur2)과 겨울에 채집한 해면(131mur11)에서 각각 6개씩 총 12개의 주요 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 14). 동일지역에서 채집한 같은 속의 해면에서 계절적 차이가 나는 밴드와 세균 다양성을 파악하기 위해 16S rRNA gene의 부분 염기서열을 분석하였다.

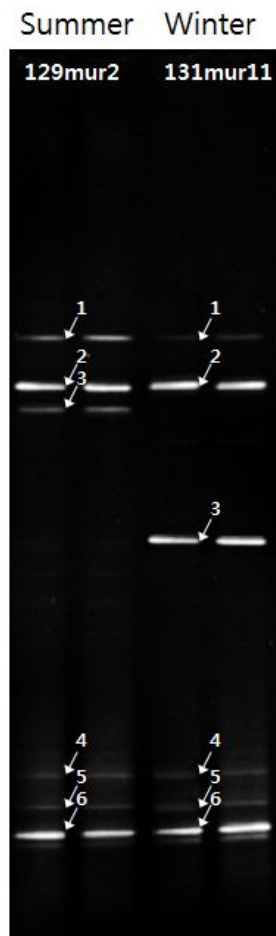


Fig. 14. DGGE banding patterns of amplified 16S rRNA gene obtained from *Cliona* sp. 129mur2 and 131mur11.

4-2 염기서열 분석 및 계통학적 분석

계절에 따른 해면공생세균의 군집구조를 분석하기 위해 DGGE 밴드를 적출하여 염기서열을 분석 하였다. 각 계절에 채집한 해면으로부터 각각 6개씩 총 12개의 밴드에 대한 염기서열을 확인 할 수 있었으며, 기존에 알려진 염기서열과 91%에서 100%의 상동성을 나타내었다. 밴드로부터 분석된 염기서열들이 배양되지 않은 세균(uncultured bacteria)과 높은 상동성을 나타내었다(Table 11).

DGGE 밴드에서 129mur2-1과 131mur11-1은 *Alphaproteobacteria*에 속하는 Uncultured *Rhodovulum* sp. (JN210824)와 각각 93%의 상동성을 나타내었으며 129mur2-2와 131mur11-2는 Uncultured cyanobacterium (JN098341)과 100%의 상동성을 보였다. 129mur2-3은 Uncultured cyanobacterium (DQ398266)과 100%의 상동성을 나타내었으며 129mur2-4와 131mur11-4는 Uncultured beta proteobacterium (DQ889936)과 91%에서 92%의 상동성을 나타내었다. 129mur2-5와 131mur11-5는 Uncultured Chloroflexi bacterium (KF286045)과 100%의 상동성을 나타내었으며 129mur2-6과 131mur11-6은 *Chloroflexi* 문에 속하는 Uncultured Anaerolineae bacterium (KC200512)와 99%의 상동성을 나타내었다. 131mur11-2는 *Gammaproteobacteria*에 속하는 *Pseudoalteromonas marina* (KJ630917)와 100%의 상동성을 나타내었다 (Table 11).

두 개체 해면으로부터 계절에 따른 군집구조 분석 결과 여름에 채집한 해면의 공생세균 군집구조는 *Alphaproteobacteria* (16.7%), *Betaproteobacteria* (16.7%), *Chloroflexi* (33.3%) 그리고 *Cyanobacteria* (33.3%)로 3문 4강으로 나타났으며(Fig. 15) 겨울에 채집한 해면은 *Alphaproteobacteria* (16.7%), *Betaproteobacteria* (16.7%), *Gammaproteobacteria* (16.7%) *Chloroflexi* (33.2%) 그리고 *Cyanobacteria* (16.7%)로 3문 5강으로 나타나 공생세균 군집구조에 있어 계절적인 차이가 나타남을 알 수 있었다(Fig. 15 and 16).

Table 11. Phylogenetic affiliation of re-amplified denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) bands derived from the sponges *Cliona* sp. (129mur2 and 131mur11).

DGGE band	Description	Accession No.	Similarity (%)	Phylum
129mur2-1	Uncultured <i>Rhodovulum</i> sp.	JN210824	93	<i>Alphaproteobacteria</i>
129mur2-2	Uncultured cyanobacterium	JN098341	100	<i>Cyanobacteria</i>
129mur2-3	Uncultured cyanobacterium	DQ398266	100	<i>Cyanobacteria</i>
129mur2-4	Uncultured beta proteobacterium	DQ889936	91	<i>Betaproteobacteria</i>
129mur2-5	Uncultured Chloroflexi bacterium	KF286045	100	<i>Chloroflexi</i>
129mur2-6	Uncultured Anaerolineae bacterium	KC200512	99	<i>Chloroflexi</i>
131mur11-1	Uncultured <i>Rhodovulum</i> sp.	JN210824	93	<i>Alphaproteobacteria</i>
131mur11-2	Uncultured cyanobacterium	LC002641	100	<i>Cyanobacteria</i>
131mur11-3	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	KJ630917	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
131mur11-4	Uncultured beta proteobacterium	DQ889936	92	<i>Betaproteobacteria</i>
131mur11-5	Uncultured Chloroflexi bacterium	KF286045	100	<i>Chloroflexi</i>
131mur11-6	Uncultured Anaerolineae bacterium	KC200512	99	<i>Chloroflexi</i>

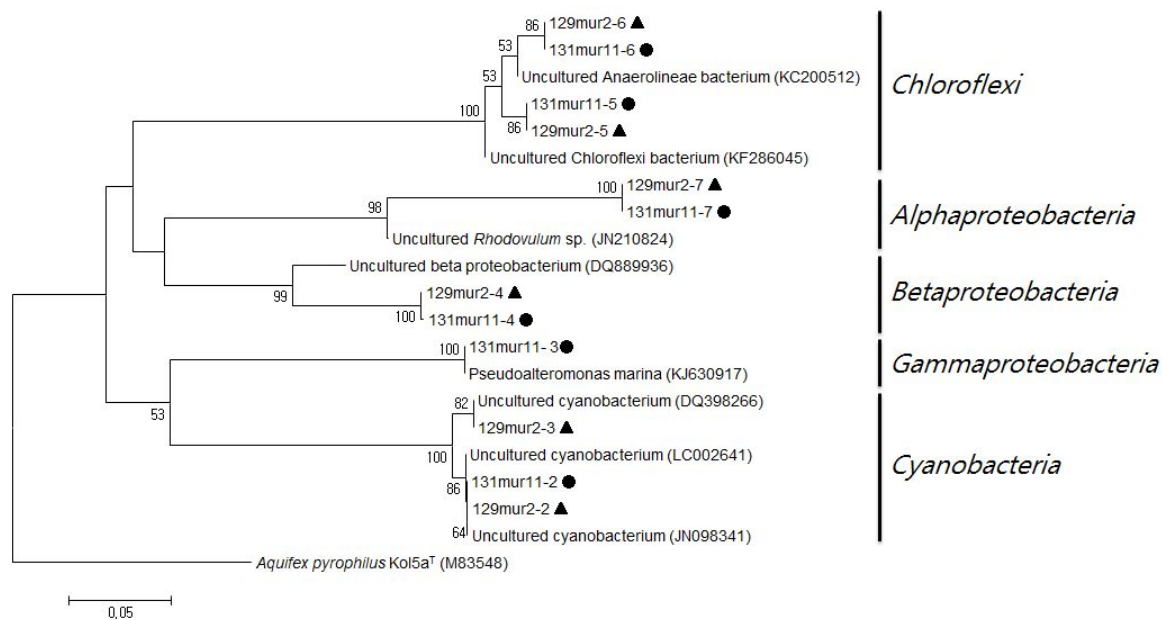


Fig. 15. Phylogenetic tree from analysis of 16S rRNA gene sequences of DGGE bands derived from the sponge, *Cliona* sp.. Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis (>50%) from 1,000 replicates. *Aquifex pyrophilus* was used as an out group. Filled circle denotes summer sponge; filled triangle denotes winter sponge.

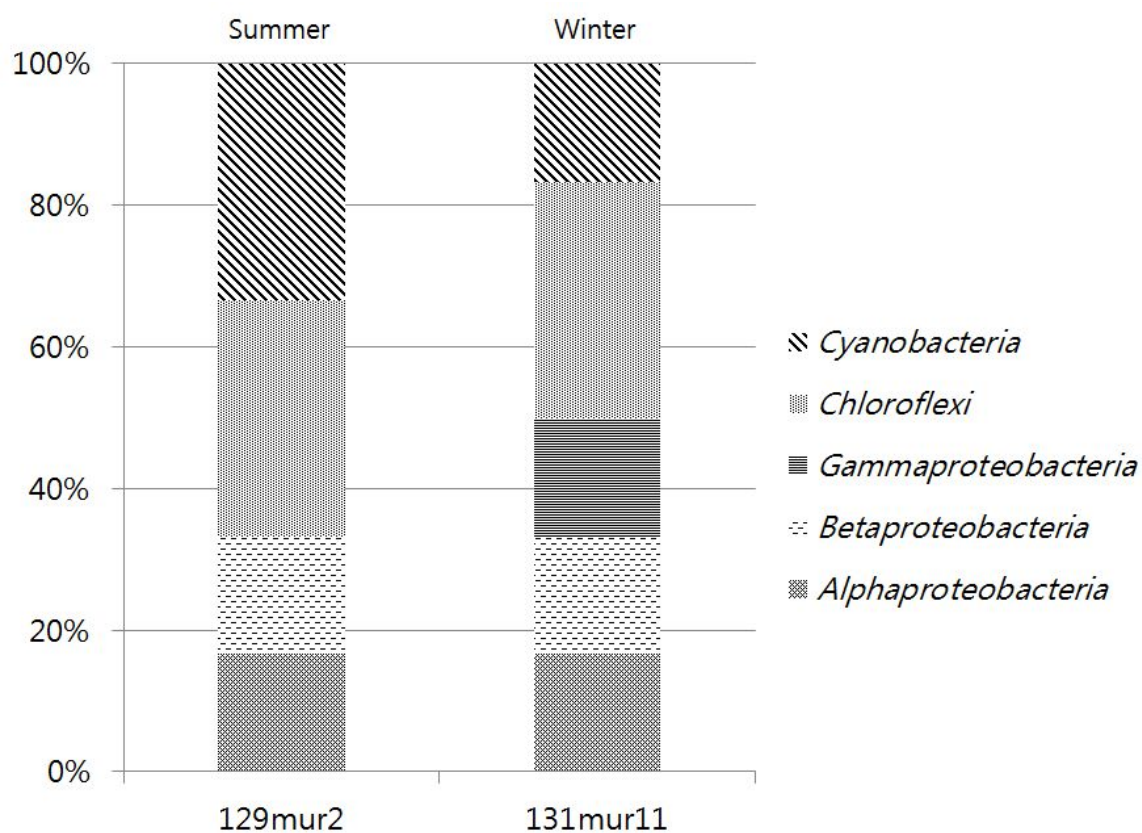


Fig. 16. Composition of the bacterial community among the sponges based on 16S rRNA gene-V3 in *Cliona* sp. 129mur2 and 131mur11.

IV. 고찰

2012년부터 2014년도에 걸쳐 제주도 무릉아치와 용머리해안에서 채집한 해면의 계절에 따른 공생세균 군집구조를 16S rRNA gene 유전자를 이용하여 배양법 및 비배양법을 기초로 한 PCR-RFLP와 PCR-DGGE 방법으로 분석하였다. 본 연구에서는 제주도에서 채집한 총 4종 15개체의 해면을 이용하여 계절에 따른 해면공생세균 군집구조의 차이 및 계통학적 다양성을 분석하였다.

1. RFLP를 이용한 *Petrosia corticata* 해면의 계절에 따른 공생세균 군집구조 비교

겨울과 여름에 채집한 4 개체 해면 *P. corticata*의 배양 가능한 공생세균 군집구조를 PCR-RFLP 방법에 의해 분석한 결과 겨울에 채집한 해면에서는 각각 26개와 20개, 여름에 채집한 해면에서는 각각 24개와 19개의 RFLP 타입으로 나뉘었으며, 각 타입별로 1-3개의 분리균주를 선정하여 16S rRNA gene의 부분 염기서열을 분석한 결과 문 수준에서 공생세균 군집구조는 네 개체 해면 모두 4문 5강으로 동일하게 나타났으며, 모든 해면에서 *Proteobacteria*가 우점하였다. 이는 Li 등(2007)에 의해 남중국해에 서식하는 4종 해면의 혼합배양에 의한 공생세균 군집구조 분석에서 *Proteobacteria*가 우점 한다는 결과와 일치하였으며, 일반적으로 해면공생세균 군집구조에서 가장 높은 비율을 차지하는 것으로 알려져 있다 (Webster *et al.*, 2004). 특히 겨울에 채집한 해면에서는 *Gammaproteobacteria*가 우점하는 반면 여름에 채집한 해면에서는 *Alphaproteobacteria*가 우점하는 반복적인 패턴을 보였다. 그리고 *Alphaproteobacteria*를 제외한 나머지 세균 그룹은 모두 겨울에 비율이 증가하고 여름에는 감소하는 계절적으로 동일하게 반복적인 패턴을 나타내었다. *Gammaproteobacteria*의 종 구성에서 겨울철에 *Psychrobacter* 속의 세균이 우점하며 여름철에는 *Vibrio* 속의 세균이 우점하는 경향을 나타내었다. 일반적으로 *Psychrobacter* 속의 균주는 극지방의 영구동토층과 얼음에서 자주 발견되는 속으로 추운 환경에서 자주 발견되는 것을 볼 수

있다(Rodrigues *et al.*, 2009). *Vibrio* 속의 균주들은 주로 여름철에 증가하는 경향을 나타내며 이 실험에서도 동일한 결과를 볼 수 있었다(Davis and Sizemore, 1982). *Bacteroidetes* 문에 속하는 *Spongiibacterium flabum* 종은 제주도에서 채집한 *Halichondria oshor* 해면으로부터 분리가 되었으며, 국내 연구진이 처음 발견한 신속, 신종 균주이다(Yoon and Oh, 2012). 이번 실험을 통해 이 균주가 *P. corticata*에서도 분리되어 해면 특이적으로 존재하는 균주임을 알 수 있었다. *Actinobacteria*와 *Firmicutes* 문의 경우 여름에 채집한 해면에 비해 겨울에 채집한 해면에서 더 다양한 공생세균 종이 포함되는 것으로 나타났는데 두 세균 그룹은 세포벽이 두 겹거나 환경이 변화함에 따라 포자를 생성하여 내성을 가지는 그람 양성 세균 그룹으로 세균이 잘 자라는 여름철에 비해 온도가 낮아지고 염도가 높아지는 겨울철에 높은 비율을 나타내는 것을 볼 수 있었다.

전반적으로 *Alphaproteobacteria*를 제외한 모든 세균 그룹이 여름 해면에 비해 겨울 해면에서 높은 비율을 나타냈으며, 종 수준에서도 겨울 해면이 여름 해면에 비해 더 다양한 종으로 구성된 것을 알 수 있었다. 따라서 계절에 따른 *P. corticata* 네 개체를 PCR-RFLP 방법을 이용하여 공생세균 군집구조를 비교한 결과 문 수준에서는 모두 동일한 군집구조를 구성하지만 종 수준에 있어 다양성과 각 세균 그룹별로 차지하는 비율이 계절적으로 차이가 있음을 알 수 있었다.

2. DGGE를 이용한 계절에 따른 조간대해면 *Hymeniacidon flavia*의 공생세균 군집구조 비교

조간대 지역인 제주도 용머리해안에서 채집한 *H. flavia*해면의 계절에 따른 공생세균 군집구조를 PCR-DGGE방법을 이용하여 분석하였다. *H. flavia*해면은 Demospongiae 강(Class), Halichondrida 목(Order), Halichondriidae 과(Family)에 속하는 해면으로 우리나라 제주도 조간대에서 처음 발견이 되었다(Sim and Lee, 2003). 또한 이 해면에 공생하는 신종 공생세균도 발견이 되어(Park *et al.*, 2011; Yoon and Oh, 2011) 미생물 자원 발굴 및 확보 있어 학술적으로 많은 가치를 지니고 있다.

제주도 용머리해안에서 서식하는 *H. flavia* 해면의 계절에 따른 공생세균 군집구조를 비교한 결과 여름에 채집한 해면에서는 1문 2강, 겨울에 채집

한 해면에서는 2문 3강으로 구성되었다. 두 종의 해면에서 *Alphaproteobacteria*와 *Gammaproteobacteria*가 공통적으로 존재하였으며, 여름에 채집한 해면에서는 *Alphaproteobacteria* (50%)와 *Gammaproteobacteria* (50%)가 동일한 비율로 존재하는 반면 겨울에 채집한 해면에서는 *Alphaproteobacteria* (75%)가 우점하는 것으로 나타났다. Yoon(2008)의 연구에 의하면 *Alphaproteobacteria* 중에서 *Sphingopyxis* 속의 균주는 주로 배양법을 통해 제주도에 서식하는 해면에서 우점하는 것으로 나타났으나 *H. flavia* 해면에서는 배양이 되지 않았다. 그러나 이번 비배양 실험을 통해 *H. flavia* 해면에서도 그 존재를 확인할 수 있었다. *Firmicutes* 문의 경우 겨울에 채집한 해면에서 나타났는데, 이 문의 세균은 주로 겨울철의 낮은 온도, 높은 염분과 같이 환경변화가 심한 조건에서 포자를 형성하여 변화되는 환경에 내성을 가질 수 있는 세균 그룹으로 특히 조간대 지역은 조석현상으로 인해 해면이 공기 중에 노출되어 물리적 환경 변화가 매우 심하여 온도변화에 기인한 공생세균 군집구조의 변동을 반영한 것으로 생각된다. 또한 최근 연구에 의하면 *Firmicutes* 문에 속하는 세균 종들은 해양환경에서 beta-glucosidase inhibitor를 생산하며, *Actinobacteria* 속에 속하는 세균보다 더 다양한 종이 있는 것으로 알려져 흥미로운 세균 그룹이라 할 수 있다(Pandey *et al.*, 2013). 제주도 조간대에서 채집한 해면 *H. flavia*의 공생세균 군집구조는 문 수준에서 계절에 따른 차이를 나타내었다. 특히 같은 *Hymeniacidon*속의 해면 중 우리나라 서해안 조간대에서 채집한 *H. sinapium*을 이용하여 계절에 따른 공생세균 군집구조를 비교한 보고에 따르면, 여름철에 비해 봄철의 공생세균 군집이 더 다양하게 나타났고 이번 실험에 사용된 해면 *H. flavia*역시 여름에 비해 겨울에 더 다양한 군집구조가 나타나 기존의 보고와 일치하는 결과였다(Jeong and Park, 2012b). 이 해면은 지난 몇 년간 지속적인 채집이 이루어지지 않아 앞으로 연속적인 채집을 통해 계절에 따른 공생세균 군집구조의 변화를 관찰해야 할 것으로 사료된다.

3. DGGE를 이용한 계절에 따른 *Callyspongia elegans* 해면의 공생세균 군집구조 비교

Callyspongia elegans 131mur20, 138mur2, 138mur3, 138mur4, 1312mur1, 146mur8 그리고 146mur11 총 7 개체를 이용하여 해양에 서식하는 해면의 계절에 따른 공생세균 군집구조 차이를 규명하고자 비배양법에 근거한 PCR-DGGE 방법을 이용하여 조사하였다. 각 계절별로 채집한 해면의 DGGE 밴드 패턴은 비슷한 경향을 보였으나, 여름에 채집한 해면과 겨울에 채집한 해면의 밴드 패턴은 각각 계절별 유사한 패턴을 보인 반면 계절변동에 따라 서로 다른 밴드패턴을 나타내었다.

밴드로부터 DNA를 추출하여 염기서열을 분석한 결과 겨울해면 131mur20과 1312mur1 해면의 공생세균 군집구조는 *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Chloroflexi* 그리고 *Cyanobacteria*로 3문 6강으로 구성되었고 여름해면 138mur2, 138mur3, 138mur4, 146mur8 그리고 146mur11의 경우 *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* 그리고 *Cyanobacteria*로 2문 4강으로 구성되었다. *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* 그리고 *Cyanobacteria* 문은 두 계절에 걸쳐 공통적으로 존재하는 세균 그룹이었으며, 겨울에 채집한 해면의 경우 *Alphaproteobacteria*가 우점하는 반면 여름에 채집한 해면의 경우 *Gammaproteobacteria*가 우점하는 것으로 나타났다. 또한 같은 시기에 채집된 동종의 해면에서 세균 그룹별 차지하는 비율에 차이는 나타났으나 동일한 군집구조를 보였으며, 계절에 따라서도 동일한 군집구조를 보여 실험의 재현성을 확인하였다.

기존에 배양법을 통해 밝혀진 *C. elegans* 해면의 공생세균 군집구조는 *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* 그리고 *Firmicutes*로 4문 5강으로 되어(Park *et al.*, 2014) 실험 결과의 세균 군집구조와는 차이를 보여 연구 방법에 따라 세균 그룹의 군집구조가 다르다는 결과를 뒷받침 하였다(Park *et al.*, 2014; Jeong and Park, 2012a). *Betaproteobacteria*와 *Cyanobacteria*는 해면에서 드물게 발견되는 세균 그룹 중 하나이며, 특히 *Cyanobacteria*는 *Proteobacteria*와 함께 LMA (Low Microbial Abundance) 해면에 우점하는 문으로 확인되었다(Dupont *et al.*, 2014, Giles *et al.*, 2013). 또한 해면과 공생하는 *Cyanobacteria*의 경우 저서 환경에 서식하는 해면에 영양순

환과 생태계 기능의 핵심 요소를 제공하는 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Keesing *et al.*, 2012). 겨울 해면의 경우 공통적으로 존재하는 세균 그룹 이외에 *Deltaproteobacteria*와 *Chloroflexi* 세균 그룹을 더 포함하였는데 *Chloroflexi* 세균 그룹은 해면에서 3-hydroxypropionate pathway를 통해 무기물을 유기물로 전환하는 동화작용을 돕는 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 배양법을 이용한 군집구조 분석에는 높은 빈도로 검출이 되나 배양법에 의현 경우 발견 빈도가 매우 낮은 것으로 알려져 있다(Brock *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2010; Erwin *et al.*, 2011; Brück *et al.*, 2012). 따라서 일곱 개체의 해면을 이용한 본 실험 결과 동일지역 동일 계절에 채집한 해면의 경우 문 수준에서의 세균 군집구조는 동일하였으나 세균 그룹별 차지하는 비율에 차이를 나타내었으며, 동일 지역에 서식하는 동종 해면이라도 계절에 따른 공생세균 군집구조에는 차이가 있는 것을 알 수 있었다.

4. DGGE를 이용한 계절에 따른 *Cliona* sp. 해면의 공생세균 군집구조 비교
 Demospongiae 강(Class)에 속하는 *Cliona* 해면은 돌, 조개껍데기, 산호와 같은 다양한 석회질에 부착하여 살며 그람 양성세균에 항균 활성을 보이는 Storniamides A-D를 생산하는 것으로 보고되어 있다(Palermo *et al.*, 1996). 이러한 특이적인 성장을 고려할 때 해면 공생세균 군집구조의 다양성에 관한 연구는 다양한 생리활성물질 탐색을 위한 연구에 있어 매우 중요하다. *Cliona* sp. 129mur2 해면과 131mur11해면을 이용하여 계절에 따른 공생세균 군집구조를 비교하였다. 16S rRNA gene PCR-DGGE 방법을 사용하여 조사한 결과 밴드 패턴은 유사하게 나타났으나 계절적으로 차이가 나타나는 밴드가 존재하였다(Fig. 14; 129mur2-3, 131mur11-3). 129mur2 해면의 군집구조는 3문 4강, 131mur11 해면의 군집구조는 3문 5강으로 구성되었다. 두 개체의 해면에서 *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Chloroflexi* 그리고 *Cyanobacteria*가 공통적으로 존재하였으며, 129mur2 해면에서는 *Chloroflexi* (33.3%)와 *Cyanobacteria* (33.3%)가 우점하는 반면, 131mur11 해면에서는 *Chloroflexi* (33.2%)가 우점하는 것으로 나타났다. 131mur11 해면의 경우 129mur2 해면과 공통적으로 존재하는 세균 그룹 이외에

*Gammaproteobacteria*의 세균 그룹을 포함하는 것으로 관찰되어 공생세균의 군집구조에서 계절에 따른 차이를 나타내었다. 특히 *Gammaproteobacteria*에서 나타난 *Pseudoalteromonas marina*는 *Pseudoalteromonadaceae*과(family)에 속하며 이 속의 많은 종들이 해양 환경으로부터 분리되는 것으로 알려져 있다(Nam *et al.*, 2007). *Alphaproteobacteria*에서 나타난 배양되지 않은 *Rhodovulum* sp. 속의 균주들은 주로 광 영양에 의해 살아가는 세균으로 알려져 있으나 이번 연구를 통해 빛이 많이 들어오지 않는 해양환경에서도 발견됨을 알 수 있었다(Nupur *et al.*, 2014; Srinivas *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). 이 해면 또한 연속적으로 채집이 이루어지지 않아 계절변화에 따른 공생세균 군집구조의 일반적인 추이를 파악하기는 어려웠다. 앞으로 연속적인 채집을 통해 계절에 따른 공생세균 군집구조의 변화를 관찰해야 할 것으로 사료된다.

본 연구 결과, 제주도에 서식하는 해면의 공생세균 군집구조는 계절에 따른 차이가 나타남을 알 수 있었으며, 본 실험에 사용된 4종의 해면 모두 여름에 비해 겨울에 더 다양한 군집구조를 가지는 것으로 나타났다. 이는 DGGE 방법을 이용하여 온도 변화에 따른 *Rhopaloeides odorabile* 해면의 공생세균 군집구조 변화를 비교하였을 때 해면이 포함하고 있는 공생세균의 군집구조에 변화가 관찰되었으며(Webster *et al.*, 2008), pyrosequencing 방법을 이용하여 2009년부터 2010년까지 미국 플로리다에서 채집한 *Axinella corrugata* 해면의 계절에 따른 공생세균 군집구조 변화를 연구한 결과 온도의 차이가 나타나는 계절변화와 같이 물리적인 차이가 존재하는 지역에 서식하는 해면의 경우 해면 공생세균이 계절에 따라 변화가 나타난다는 보고(White *et al.*, 2012)와 일치하는 결과이다.

그러나 북서지중해에 서식하는 *Ircinia* spp. 해면으로부터 1년 6개월간 T-RFLP방법을 이용하여 계절에 따른 공생세균 군집구조를 분석한 결과 주기적으로 매우 안정적인 군집구조를 나타낸다는 결과가 보고되었으며(Erwin *et al.*, 2012), 또한 남극해면과 열대해면을 이용한 해면공생세균 군집구조의 분석 결과에 의하면 동종 해면의 공생세균 군집구조는 숙주 특이적이며 일정한 환경변화에도 안정성을 유지하는 것으로 나타나 본 실험

협과는 차이를 나타내었다(Webster *et al.*, 2004; Erwin *et al.*, 2012; Jeong and Park, 2014).

현재 해면공생세균의 다양성에 대한 정보는 여전히 단편적이고, 해면과 공생세균 사이의 상호작용에 관하여 많은 연구가 이루어지지 않았다(Wang *et al.*, 2006; Cárdenas *et al.*, 2014).

더욱이 계절변화에 따른 해면공생세균 군집구조 변화에 대해서는 오랜 시간이 소요되며, 같은 해면종이라도 지리적 분포에 따라 공생세균의 군집구조가 다르거나(Taylor *et al.*, 2005), 실험방법에 따라 달라지는 경향이 있다(Jeong and park, 2012a). 또한 배양법에 근거한 RFLP 방법을 통해 해면 공생세균의 전체 군집구조를 파악하기에는 자연계에서 배양 가능한 세균은 0.1%-1%정도로 국한이 되며(Jeong and Park, 2012b), 이론적으로 배양이 어려운 세균 종까지 파악이 가능한 DGGE 방법은 샘플에서 세포가 1% 이상을 구성하는 세균종일 경우에만 적당하여(Li *et al.*, 2007) 해면에 존재하는 전체 공생세균 군집구조 연구는 장기적으로 다양한 방법을 조합하여 군집구조를 분석하고 파악할 필요가 있을 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. Bergman, O., Haber, M., Mayzel, B., Anderson, M.A., Shpigel, M., Hill, R.T., and Ilan, M. 2011. Marine-based cultivation of *Diacarnus* sponges and the bacterial community composition of wild and maricultured sponges and their larvae. *Mar. Biotechnol.* 13(6), 1169-1182.
2. Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 1984. Biology of microbiology. *Prentice Hall, International* (UK) London.
3. Brück, W.M., Reed, J.K., and McCarthy, P.J. 2012. The bacterial community of the lithistid sponge *Discodermia* spp. as determined by cultivation and culture-independent methods. *Mar. Biotechnol.* 14(6), 762-773.
4. Cárdenas, C.A., Bell, J.J., Davy, S.K., Hoggard, M., and Taylor, M.W. (2014). Influence of environmental variation on symbiotic bacterial communities of two temperate sponges. *FEMS microbiol. ecol.* 88(3), 516-527.
5. Davis, J.W., and Sizemore, R.K. 1982. Incidence of *Vibrio* species associated with blue crabs (*Callinectes sapidus*) collected from Galveston Bay, Texas. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(5), 1092-1097.
6. Duckworth, A.R., Brück, W.M., Janda, K.E., Pitts, T.P., and McCarthy, P.J. 2006. Retention efficiencies of the coral reef sponges *Aplysina lacunosa*, *Callyspongia vaginalis* and *Niphates digitalis* determined by Coulter counter and plate culture analysis. *Mar. Biol. Res.* 2(4), 243-248.
7. Dupont, S., Carre Mlouka, A., Domart Coulon, I., Vacelet, J., and Bourguet Kondracki, M.L. 2014. Exploring cultivable Bacteria from the prokaryotic community associated with the carnivorous sponge *Asbestopluma hypogea*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88(1), 160-174.
8. Erwin, P.M., Olson, J.B., and Thacker, R.W. 2011. Phylogenetic diversity, host-specificity and community profiling of

- sponge-associated bacteria in the northern Gulf of Mexico. *PLoS one*. 6(11), e26806.
9. Erwin, P.M., Pita, L., López-Legentil, S., and Turon, X. 2012. Stability of sponge-associated bacteria over large seasonal shifts in temperature and irradiance. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(20), 7358-7368.
 10. Friedrich, A.B., Fischer, I., Proksch, P., Hacker, J., and Hentschel, U. 2001. Temporal variation of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38(2-3), 105-115.
 11. Giles, E.C., Kamke, J., Moitinho Silva, L., Taylor, M.W., Hentschel, U., Ravasi, T., and Schmitt, S. 2013. Bacterial community profiles in low microbial abundance sponges. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83(1), 232-241.
 12. Guangyi, W. 2006 Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(7), 545-551.
 13. Hentschel, U., Usher, K.M., and Taylor, M.W. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55(2), 167-177.
 14. Jackson, S.A., Flemer, B., McCann, A., Kennedy, J., Morrissey, J.P., O’Gara, F., and Dobson, A.D. 2013. *Archaea* appear to dominate the microbiome of *Inflatella pellicula* deep sea sponges. *PloS one*, 8(12), e84438.
 15. Jackson, S.A., Kennedy, J., Morrissey, J.P., O’Gara, F., and Dobson, A.D. 2012. Pyrosequencing reveals diverse and distinct sponge-specific microbial communities in sponges from a single geographical location in Irish waters. *Microb. Ecol.* 64(1), 105-116.
 16. Je, J., Koo, B.J., Lee, H., Kim, B., Shin, S., Lee, S., and Lee, J. 2013 Habitats and zoobenthic species diversity in the coast of Jeju island, Korea : As a baseline study for conserving coastal and marine biological diversity. *Underwater Science and Technology*.

- 3(1), 90–110.
17. Jeong, E.J., Im, C.S., and Park, J.S. 2010. A comparison of bacterial diversity associated with the sponge *Spirastrella abata* depending on RFLP and DGGE. *Korean J. Microbiol.* 46(4), 366–374.
 18. Jeong, I.H., and Park, J.S. 2012a. Phylogenetic analysis of bacterial diversity in the marine sponge, *Asteropus simplex*, collected from Jeju island. *Korean J. Microbiol.* 48(4), 275–283.
 19. Jeong, J.B., and Park, J.S. 2012b. Seasonal differences of bacterial communities associated with the marine sponge, *Hymeniacidon sinapium*. *Korean J. Microbiol.* 48(4), 262–269.
 20. Joseph, B., and Sujatha, S. 2011. Pharmacologically important natural products from marine sponges. *J. Nat. Prod.* 4, 5–12.
 21. Keesing, J.K., Usher, K.M., and Fromont, J. 2012. First record of photosynthetic cyanobacterial symbionts from mesophotic temperate sponges. *Mar. Freshw. Res.* 63(5), 403–408.
 22. Kennedy, J., Baker, P. Piper, C., Cotter, P.D., Walsh, M., Mooij, M.J., Bourke, M.B., Rea, M.C., O'Connor, P.M., Ross, R.P. Hill, C., O'Gara, F., Marchesi, J.R., and Dobson, A.D.W. 2009. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish Waters. *Mar. Biotechnol.* 11(3), 384–396.
 23. Kim, M. 2010. M. S. thesis University of Hannam, Daejeon, Korea
 24. Li, Z., Hu, Y., Liu, Y., Huang, Y., He, L., and Miao, X. 2007. 16S rDNA clone library-based bacterial phylogenetic diversity associated with three South China Sea sponges. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23(9), 1265–1272.
 25. Li, Z.Y., He, L.M., Wu, J., and Jiang, Q. 2006. Bacterial community diversity associated with four marine sponges from the South China Sea based on 16S rDNA–DGGE fingerprinting. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 329(1), 75–85.
 26. Lopanik, N.B. 2014. Chemical defensive symbioses in the marine environment. *Funct. Ecol.* 28(2), 328–340.

27. Mohamed, N.M., Rao, V., Hamann, M.T., Kelly, M., and Hill, R.T. 2008. Monitoring bacterial diversity of the marine sponge *Ircinia strobilina* upon transfer into aquaculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(13), 4133-4143.
28. Nam, Y.D., Chang, H.W., Park, J.R., Kwon, H.Y., Quan, Z.X., Park, Y.H., Lee, J.S., Yoon, J.H., and Bae, J.W. 2007. *Pseudoalteromonas marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flats of the Yellow Sea, and reclassification of *Pseudoalteromonas sagamiensis* as *Algicola sagamiensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(1), 12-18.
29. Nupur, P., Srinivas, T.N.R., Takaichi, S., and Kumar, P.A. 2014. *Rhodovulum mangrovi* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from a mangrove forest sediment sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64(Pt 9), 3168-3173.
30. Page, M.J., Handley, S.J., Northcote, P.T., Cairney, D., and Willan, R.C. 2011. Successes and pitfalls of the aquaculture of the sponge *Mycale hentscheli*. *Aquaculture*. 312(1), 52-61.
31. Palermo, J.A., Rodríguez Brasco, M.F., and Seldes, A.M. 1996. Storniamides A-D: Alkaloids from a patagonian sponge *Cliona* sp.. *Tetrahedron* 52(8), 2727-2734.
32. Pandey, S., Sree, A., Dash, S.S., Sethi, D.P., and Chowdhury, L. 2013. Diversity of marine bacteria producing beta-glucosidase inhibitors. *Microb. Cell Fact.* 12, 35.
33. Papaleo, M.C., Romoli, R., Bartolucci, G., Maida, I., Perrin, E., Fondi, M., Orlandini, V., Mengoni, A., Emiliani, G., and Tutino, M.L., *et al.* 2013. Bioactive volatile organic compounds from Antarctic (sponges) bacteria. *N. biotechnol.* 30(6), 824-838.
34. Park, J.S. 2010 Bacterial community diversity associated with two marine sponges from the South Pacific Ocean based on 16S rDNA-DGGE analysis. *Korean J. Microbiol.* 46(3), 255-261.
35. Park, S., Kim, J., Kim, Y., and Heo, M. 2014. Phylogenetic diversity of bacterial community inhabited in *Callyspongia elegans*.

- Korean J. Microbiol.* 50(2), 152–157.
36. Park, S., Yokota, A., Itoh, T., and Park, J.S. 2011. *Sphingomonas jejuensis* sp. nov., isolated from marine sponge *Hymeniacidon flavia*. *J. Microbiol.* 49(2), 238–242.
 37. Pérez-López, P., Ternon, E., González-García, S., Genta-Jouve, G., Feijoo, G., Thomas, O.P., and Moreira, M.T. 2014. Environmental solutions for the sustainable production of bioactive natural products from the marine sponge *Crambe crambe*. *Sci. Total Environ.* 475, 71–82.
 38. Rodrigues, D.F., da C Jesus, E., Ayala-del-Río, H.L., Pellizari, V.H., Gilichinsky, D., Sepulveda-Torres, L., and Tiedje, J.M. 2009. Biogeography of two cold-adapted genera: *Psychrobacter* and *Exiguobacterium*. *ISME J.* 3(6), 658–665.
 39. Sacristán-Soriano, O., Banaigs, B., Casamayor, E.O., and Becerro, M.A. 2011. Exploring the links between natural products and bacterial assemblages in the sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied and environmental microbiology*, 77(3), 862–870.
 40. Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4), 406–425.
 41. Sim, C.J., and Lee, K.J. 2003. A new species of the genus *Hymeniacidon* (Demospongiae: Halichondrida: Halichondriidae) from Korea. *Korean J. Biol. Sci.* 7(3), 187–189.
 42. Srinivas, A., Kumar, B.V., Sree, B.D., Tushar, L., Sasikala, C., and Ramana, C.V. 2014. *Rhodovulum salis* sp. nov. and *Rhodovulum viride* sp. nov., phototrophic *Alphaproteobacteria* isolated from marine habitats. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64(Pt 3), 957–962.
 43. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12), 2725–2729.
 44. Taylor, M.W., Schupp, P.J., De Nys, R., Kjelleberg, S., and Steinberg, P.D. 2005. Biogeography of bacteria associated with the

- marine sponge *Cymbastela concentrica*. *Environ. Microbiol.* 7(3), 419-433.
45. Thomas, T.R.A., Kavlekar, D.P., and LokaBharathi, P.A. 2010a. Marine drugs from sponge-microbe association—A review. *Mar. drugs.* 8(4), 1417-1468.
 46. Thomas, T., Rusch, D., DeMaere, M.Z., Yung, P.Y., Lewis, M., Halpern, A., Heidelberg, K.B., Egan, S., Steinberg, P.D., and Kjelleberg, S. 2010b. Functional genomic signatures of sponge bacteria reveal unique and shared features of symbiosis. *ISME J.* 4(12), 1557-1567.
 47. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22), 4673-4680.
 48. Van Soest, R.W., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N.J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M., and Hooper, J.N. 2012. Global diversity of sponges (*Porifera*). *PLoS One.* 7(4), e35105.
 49. Wang, G. 2006. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(7), 545-551.
 50. Webster, N.S., Cobb, R.E., and Negri, A.P. 2008. Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge. *ISME J.* 2(8), 830-842.
 51. Webster, N.S., Negri, A.P., Munro, M.M., and Battershill, C.N. 2004. Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environ. Microbiol.* 6(3), 288-300.
 52. White, J.R., Patel, J., Ottesen, A., Arce, G., Blackwelder, P., and Lopez, J.V. 2012. Pyrosequencing of bacterial symbionts within *Axinella corrugata* sponges: Diversity and seasonal variability. *PLoS One.* 7(6), e38204.

53. Wu, W., Swanner, E.D., Hao, L., Zeitvogel, F., Obst, M., Pan, Y., and Kappler, A. 2014. Characterization of the physiology and cell - mineral interactions of the marine anoxygenic phototrophic Fe(II) oxidizer *Rhodovulum iodosum* - implications for Precambrian Fe(II) oxidation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88(3). DOI: 10.1111/1574-6941.12315
54. Yoon, B. J. 2008. Ph. D. thesis University of Jeju, Jeju, Korea.
55. Yoon, B.J., and Oh, D.C. 2011. *Formosa spongicola* sp. nov., isolated from the marine sponge *Hymeniacidon flavia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61(2), 330-333.
56. Yoon, B. J., and Oh, D. C. (2012). *Spongiibacterium flavum* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the marine sponge *Halichondria oshoro*, and emended descriptions of the genera *Croceitalea* and *Flagellimonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62(Pt 5), 1158-1164.
57. 연합뉴스. 2011. “바다서 새 생물 10종, 미기록종 11종 발굴” 1월 7일.

VI. 적 요

2012년 1월부터 2014년 6월까지 제주도 무릉아치와 용머리해안에서 채집한 4종 15개체의 해양 해면을 이용하여 배양법과 비배양법을 통하여 계절에 따른 공생세균 군집구조를 조사하였다.

배양법을 이용하여 *Petrosia corticata*의 계절에 따른 공생세균 군집구조를 비교한 결과 4문 5강으로 구성되어 문 수준에서는 동일한 군집구조를 나타내었으나 종 수준에서는 겨울 해면이 여름 해면에 비해 더 다양한 군집구조를 나타내었다.

비배양법을 이용하여 계절에 따른 공생세균 군집구조를 비교한 결과 조간대에 서식하는 *Hymeniacidon flavia* 해면은 여름 해면에서 1문 2강, 겨울 해면에서 2문 3강으로 구성되었으며, *Callyspongia elegans* 해면은 겨울 해면에서 3문 6강, 여름 해면에서 2문 4강으로 나타났으며, *Cliona* sp. 해면은 여름 해면에서 3문 4강, 겨울 해면에서 3문 5강으로 구성되어 본 연구에 사용된 해면에서 공생세균 군집구조는 계절에 따른 차이를 나타내었다. 여름에 채집한 해면에서는 *Alphaproteobacteria*가, 겨울에 채집한 해면에서는 *Alphaproteobacteria*와 *Gammaproteobacteria*가 공통적으로 존재하였다.

본 연구 결과, 제주도에 서식하는 해면의 공생세균 군집구조는 계절에 따른 변화가 있음을 확인하였으며 해면 종에 따라 군집구조의 변화의 폭이 다양함을 알 수 있었다. 또한 실험에 사용된 모든 해면에서 여름에 비해 겨울에 더 다양한 공생세균 군집의 구조를 나타냄을 확인할 수 있었다.

VI. Abstract

The seasonal comparison of bacterial community structure of fifteen individual marine sponges collected from Jeju Mureungarch and Youngmeori coast, from January 2012 to June 2014, were analyzed by culture-dependent and culture-independent method.

By culture-dependent method, seasonal composition of the bacterial communities associated with the marine sponge, *Petrosia corticata*, were identical and composed of 4 phyla, 5 classes at the phylum level. At the genus level, the community structures of winter sponges were more diverse than that of summer sponges.

In culture-independent method, the bacterial communities associated with *Hymeniacidon flavia*, a marine sponge living in the intertidal zone, collected in summer was composed of 1 phylum 2 classes and another sponge collected in winter was composed of 2 phyla 3 classes. The bacterial community structure of marine sponge, *Callispongia elegans*, collected in winter composed of 3 phyla 6 classes and 5 individuals sponges collected in summer composed of 2 phylum 4 classes. Marine sponge, *Cliona* sp., collected in summer was composed of 3 phyla 4 classes and another sponge collected in winter was composed of 3 phyla 5 classes. Therefore, they showed the seasonal differences. *Alphaproteobacteria* was found from all sponges and *Gammaproteobacteria* was found only from winter sponges.

As a conclusion, the bacterial community structure of marine sponge samples, collected from Jeju island, showed seasonal variation and the wide varieties of community structure were also found among sponges. Also, there were more diverse winter sponge bacterial community structures than those of summer.