

동해 울릉분지 메탄 하이드레이트 퇴적토의 미생물 군집 특성

신지혜¹ · 남지현² · 이진우^{1,3} · 이동훈^{1*}

¹충북대학교 미생물학과, ²경성대학교 생물학과, ³한국해양과학기술원

Characteristics of Microbial Community Structures of the Methane Hydrate Sediments in the Ulleung Basin, East Sea of Korea

Ji-Hye Shin¹, Ji-Hyun Nam², Jin-Woo Lee^{1,3}, and Dong-Hun Lee^{1*}

¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

²Department of Biology, Kyungsung University, Busan 608-736, Republic of Korea

³Marine Biotechnology Research Division, Korea Institute of Ocean Science and Technology Ansan 425-600, Republic of Korea

(Received May 27, 2014 / Accepted July 28, 2014)

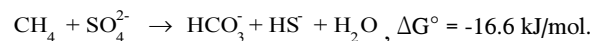
Gas hydrates play a significant role in the global carbon cycle and climate change because methane, a greenhouse gas, can be released from the dissociation of gas hydrate. Anaerobic oxidation of methane (AOM) is an important process that consumes more than 90% of the methane released into the hydrosphere and atmosphere. In this study, the microbial community associated with the methane gas hydrate sediment in the Ulleung basin, East Sea of Korea (UBGH) was analyzed by phylogenetic analysis of the *mcrA* and 16S rRNA gene libraries. A vertical stratification of the dominating anaerobic methane oxidizer (ANME)-1 group was observed at the surface and the sulfate methane transition zone (SMTZ). The ANME-2c group was found to be dominant in the high methane layer. The archaea of marine benthic group B, which is commonly observed in the AOM region, accounted for more than 50% of the identifications in all sediments. Nitrate reducing bacteria were predominant at SMTZ (*Halomonas*: 56.5%) and high methane layer (*Achromobacter*: 52.6%), while sulfate reducing bacteria were not found in UBGH sediments. These results suggest that the AOM process may be carried out by a syntrophic consortium of ANME and nitrate reducing bacteria in the gas hydrates of the Ulleung Basin of the East Sea.

Keywords: anaerobic oxidation of methane, East Sea, methane hydrate, nitrate reducing bacteria, Ulleung basin

메탄 가스 하이드레이트는 고압(3 MPa 이상)과 저온(0°C 이하) 상태에서 물의 고체상 격자구조 안에 갇혀있는 천연가스 결정체로, 90% 이상이 메탄가스로 기화된다(Kvenvolden, 1999). 메탄 가스 하이드레이트는 미래의 에너지원으로 사용될 수 있지만, 가스 하이드레이트에 결합되어있던 메탄의 갑작스런 방출이 해저 산사태 등을 유발하여 쓰나미 등의 지질학적 위험을 야기시킬 수 있으며(Young and Bryant, 1992), 이산화탄소보다 약 20 배 이상 큰 지구온난화 잠재력을 가지고 있기 때문에 지구 기후 변화에 중요한 요인으로 작용할 수 있다(Canfield *et al.*, 2005).

혐기적 메탄산화(Anaerobic oxidation of methane: AOM) 과정으로 인해 해양 퇴적토에는 황산염 메탄 전이대(Sulfate methane transition zone: SMTZ)가 형성된다. 혐기적 메탄산화 고세균(Anaerobic methane oxidizer: ANME)은 SMTZ에서 주로 서식하며 생물학적으로 생성된 메탄의 90%를 소비시킨다(Knittel

and Boetius, 2009). 혐기적 메탄산화 고세균과 황산염 환원 세균(Sulfate reducing bacteria: SRB)이 함께 콘소시움을 이루며 수행하는 것으로 알려져 있는 혐기적 메탄산화반응은 황산염을 최종 전자수용체로 사용하며 이에 따른 반응식은 다음과 같다(Nauhaus *et al.*, 2002).



혐기적 메탄산화 고세균은 ANME-1, ANME-2, ANME-3의 세가지 그룹으로 나뉘며 분리동정된 세균 중 메탄생성세균인 *Methanosarcinales* 또는 *Methanomicrobiales*와 가장 가까운 유연 관계를 갖는다(Knittel and Boetius, 2009). ANME-1과 ANME-2는 주로 *Desulfosarcina/Desulfococcus* 그룹과 함께 혐기적 메탄산화 반응이 일어나는 지역에서 관찰되었고(Knittel *et al.*, 2005), ANME-3는 *Desulfobulbus* 그룹과 콘소시움을 이루는 것이 확인되었다(Niemann *et al.*, 2006).

최근에는 높은 농도의 질산염이 함유된 담수 퇴적토 시료에서

*For correspondence. E-mail: donghun@chungbuk.ac.kr; Tel.: +82-43-261-3261; Fax: +82-43-264-9600

탈질과정과 연관된 혐기적 메탄산화과정에 대한 연구도 진행되고 있다(Raghoebarsing *et al.*, 2006; Ettwig *et al.*, 2010; Haroon *et al.*, 2013). Raghoebarsing 등(2006)은 ANME-2와 가까운 고세균과 새로운 문의 세균이 공생하며 질산염에 의존한 혐기적 메탄산화(Anaerobic methane oxidation coupled to denitrification: ANME-D)에 관여함을 최초로 보고하였다. 또한, 혐기적인 환경에서 아질산염 환원을 통해 산소를 생산하며(intra-aerobic) 호기적 메탄산화를 수행하는 세균 *Candidatus Methyloirabilis oxypera* (Ettwig *et al.*, 2010) 및 질산염 환원반응과 혐기적 메탄산화 반응을 동시에 수행할 수 있는 혐기적 메탄산화 고세균 *Candidatus Methanoperedens nitroreducens* (Haroon *et al.*, 2013)가 각각 담수 퇴적토로부터 농화배양되어 탈질과정과 연계된 혐기적 메탄산화 과정에 대한 이론이 새롭게 대두되고 있다. 현재 해양 퇴적토에서는 탈질과정과 연계된 혐기적 메탄산화 과정에 대해 밝혀진 바가 없는 실정이다.

동해는 아시아 동북부에 위치한 북서태평양 연해로 평균수심이 2,000 m 이상인 심해환경으로 일본, 야마토, 울릉 분지를 포함한다(Hyun *et al.*, 2010). 동해 울릉분지는 최근 메탄 가스 하이드레이트의 부존이 확인되어(Ryu *et al.*, 2009) 주변의 세균 군집이나 혐기적 메탄산화 과정에 관한 연구가 진행되고 있다(Kim *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013a, 2013b). Lee 등(2013a)은 동해 울릉분지 퇴적토내 혐기적 메탄산화 과정에 ANME-1b와 고세균인 JS1 그룹이 직, 간접적으로 관계가 있을 것이라 보고하였다. JS1 그룹은 동해의 퇴적토에서 처음 확인되었으며(Rochelle *et al.*, 1994), 높은 농도의 메탄을 함유하고 있는 하이드레이트에서 주로 관찰된다(Inagaki *et al.*, 2006). 또한, Lee 등(2013b)은 동해 울릉분지의 두 지점에서 고세균의 지질성분인 *sn*-2-hydroxyarchaeol과 archaeol의 비율을 분석함으로써 지역적인 차이에 따라 다른 종류의 혐기적 메탄산화 고세균이 서식하는 것을 밝힌바 있다. 그러나 동해 울릉분지 퇴적토의 지역적 특성에 따른 혐기적 메탄산화 관련 미생물 군집에 관한 연구는 아직 활발히 진행되지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 동해 울릉분지 퇴적토에 서식하는 세균, 고세균, 혐기적 메탄산화 고세균의 군집 구조를

Table 1. Physicochemical characteristics of sampling sites

Site	Section	Depth (mbsf)	Methane (mM)	Sulfate (mM)
UBGH2-3	Surface	0.45	1.6	7.9–13.5
	SMTZ	1.15	5.1	1.6–2.9
	High Methane	1.85	34.9	1.8–2.2
UBGH2-10	Surface	0.85	0.0	24.3–27.5
	SMTZ	6.80	4.9–6.2	2.3–2.8
	High Methane	77.78	40.6	0.02–0.07

분석하고 이를 바탕으로 동해 울릉분지 퇴적토의 혐기적 메탄산화 과정의 특성을 이해하고자 한다.

재료 및 방법

시료 채취

UBGH (Gas Hydrate Drilling Expedition in the Ulleung Basin) 프로젝트의 일환으로 2010년 8월 피스톤 코어 방식으로 시추된 동해 울릉분지 메탄 가스 하이드레이트 퇴적토 UBGH2-3 (35° 41' 0.5"N, 130° 20' 57.2"W)과 UBGH2-10 (36° 55' 34.7"N, 130° 3' 59.4"W) 시료를 한국해양과학기술원(Ansan, Korea)으로부터 제공받았다(Fig. 1).

동해퇴적토 UBGH2-3 지역의 수심은 약 914 m이며, 상부에 가스 하이드레이트가 존재하고 가스 침니를 포함하는 특징을 갖는다. UBGH2-3 표층의 메탄농도는 1.6 mM로 UBGH2-10의 표층(0 mM)에 비해 높은 수준이었으며, SMTZ와 high methane 층 또한 1.1 mbsf (meters below sea floor), 1.8 mbsf로 표층에 비교적 가깝게 분포하고 있다(Table 1). UBGH2-10의 수심은 약 2,140 m로 UBGH2-3에 비해 깊은 편이며, 비침니 지역으로 SMTZ가 6.8 mbsf 근처에, high methane 층은 77.8 mbsf에 분포하고 있다.

미생물 군집 DNA 추출

퇴적물로부터 핵산을 추출하기 위해 PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Ltd Co, USA)를 이용하였다. 총 3 g (0.25 g/tube)의 시료에서 kit의 사용방법을 따라 genomic DNA를 추출하였으며, QIAamp® DNA Micro Kit (QIAGEN, USA)를 이용해 정제하였다. Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen, USA)를 이용하여 DNA 농도를 측정하였으며, genomic DNA는 -20°C에 보관하였다.

16S rRNA 유전자 및 *mcrA* 유전자의 증폭

세균 및 고세균 군집의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 eubacterial primer 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3'), archaeal primer Arch21F (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3')와 Arch958R (5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3')을 사용하였다(Lane, 1991; DeLong, 1992). PCR 반응물은 1X 반응용액 (100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 µg/ml

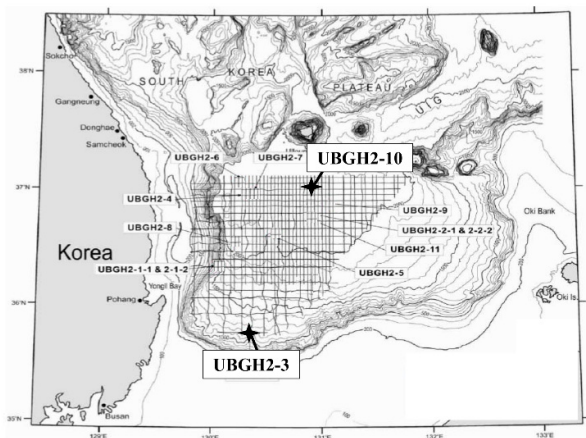


Fig. 1. Map of UBGH sampling sites in the Ulleung basin, East Sea. The asterisks indicate sampling sites for microbial diversity analysis.

BSA, pH 8.3), 160 μ M dNTPs, 0.5 μ M primer, 정제된 DNA (10–15 ng/ μ l)와 1 unit의 *Taq* polymerase를 첨가하여 총 50 μ l의 혼합물로 조성하였다. PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 초기 열처리한 후, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반복하였고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다.

환경에서 methanogen과 함께 혐기적 메탄산화 고세균을 검출하는데 유용하게 사용하는 Methyl coenzyme M reductase 유전자 (*mcrA*)를 증폭하기 위하여 MLf (5'-GGTGGTGTGTTGGATTCA CACARTAYGCWACAGC-3')와 MLr (5'-TTCATTGCRTAG TTWGGRTAGTIT-3') primer를 사용하였다(Juottonen *et al.*, 2006). PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 초기 열처리한 후, 95°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 40회 반복하였고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. 증폭된 핵산은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하고, PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen)로 정제 및 농축하였다.

16S rRNA 유전자 및 *mcrA* 유전자의 clone library 구축

세균 및 고세균의 16S rRNA와 *mcrA* 유전자로부터 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T vector (Promega, USA)에 ligation 한 후 *E. coli* DH10B에 Sambrook과 Russell (1989)의 방법에 따라 형질 전환 시켰다. 형질전환된 균을 선별, 배양하기 위해서 Luria-Bertani agar plate (trypton 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L, agar 15 g/L)에 50 μ g/ml의 ampicillin, 40 μ g/ml의 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), 40 μ g/ml의 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside)을 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. Blue-white colony 선별법에 의해 시료 당 약 100개의 재조합 클론을 선별하였다. 각 유전자 증폭에 이용된 reverse primer와 T-vector 삽입자리의 염기서열에 상보적인 prGTF (5'-TACGACTCACTATAGGGCGA-3') primer 쌍을 사용하여 direct amplified PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물의 크기를 전기영동으로 확인하여 5'-3' 방향으로 삽입된 재조합 클론을 2차 선별하였다. 선별된 재조합 클론들은 ABI 3730XL Capillary DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 분석하였다. 주요 유전자의 염기서열은 DDBJ (DNA Data Bank of Japan; <http://www.ddbj.nig.ac.jp>)에 등록하였다(고세균 16S rRNA 유전자: AB948224 - AB948461, 세균 16S rRNA 유전자: AB948462 - AB948669, *mcrA* 유전자: AB970847 - AB970952).

16S rRNA 유전자 및 *mcrA* 유전자의 계통분류학적 분석

세균과 고세균의 16S rRNA 유전자 library 클론의 염기서열과 Ribosomal Database Project (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu>) 데이터베이스로부터 확인된 염기서열을 ClustalX (version 1.83) 프로그램을 이용하여 정렬하였다. *mcrA* 유전자 library 클론의 염기서열과 GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)의 데이터베이스로부터 확인된 염기서열도 동일한 프로그램을 이용하여 정렬하였다. 정렬된 염기서열은 MEGA6 프로그램(Tamura *et al.*, 2013)을 이용하여 Jukes-Cantor distance model과 neighbor-joining

method에 의해 염기서열간의 진화적 거리와 계통도를 추론하였고, bootstrap 분석은 1,000회에 걸쳐 실시하였다.

결 과

동해퇴적토의 세균 군집분석

동해 UBGH2-3, UBGH2-10의 퇴적토 시료에서 총 208개의 eubacterial 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였고 16개 속(genus)이 확인되었다. 두 지역에서 모두 *Proteobacteria* 문(phylum)이 가장 우점하였으며, 그 외 *Bacteroidetes*, *Firmicute* 등이 관찰되었다(Figs. 2A and 3).

UBGH2-3 지역의 표층, SMTZ, high methane 층에서

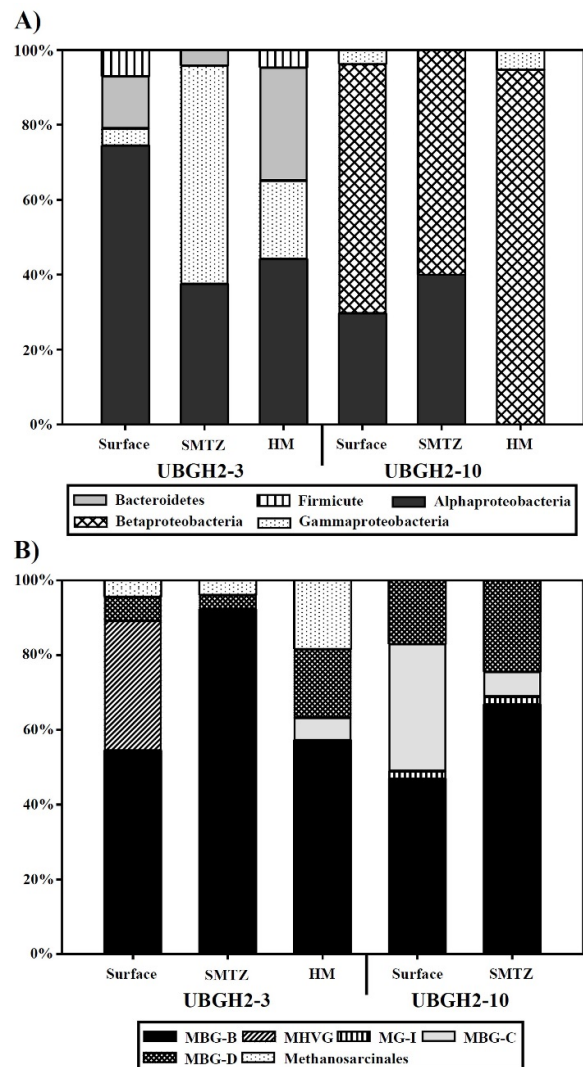


Fig. 2. Community structures of domains Bacteria (A) and Archaea (B) from UBGH2-3 and UBGH2-10. HM, High Methane; MBG-B, Marine Benthic Group-B; MHVG, Marine Hydrothermal Vent Group; MG-I, Marine Group-I; MBG-C, Marine Benthic Group-C; MBG-D, Marine Benthic Group-D.

Alphaproteobacteria 강(class)은 군집의 51.8%를 차지하였으며, *Gammaproteobacteria* (29.5%), *Bacteroidetes* (15.1%), *Firmicute* (3.6%) 문도 관찰되었다. *Alphaproteobacteria* 강에 포함되는 *Sulfitobacter* 속은 표층에서 64.4%를 차지하여 가장 우점하였

으며, SMTZ와 high methane 층으로 깊이가 깊어지면서 39.6%로 비율이 감소하였다(Fig. 3). *Gammaproteobacteria*에 속하는 *Halomonas* 속은 표층에서는 관찰되지 않다가 SMTZ에서 56.5%를 차지하며 우점하였고, high methane 층에서 14.6%로 감소하

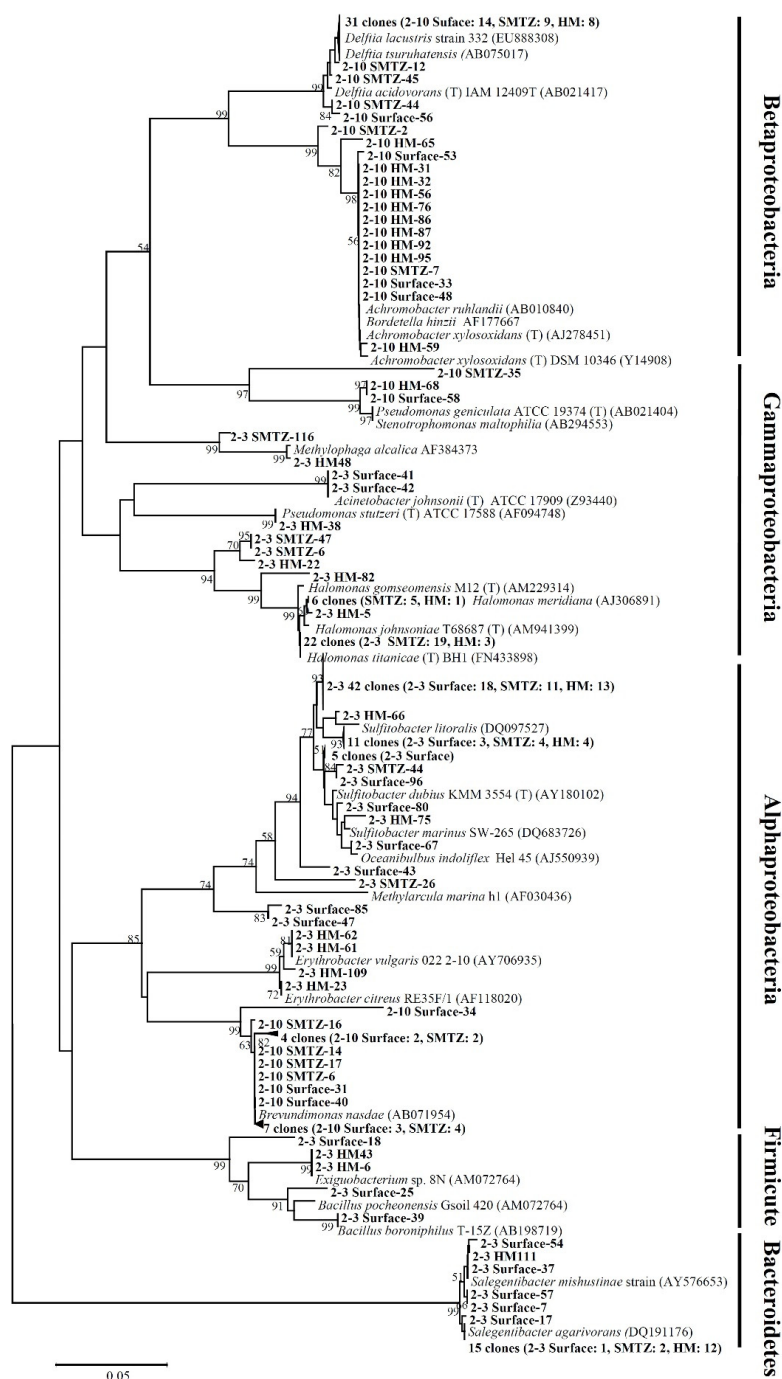


Fig. 3. Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA genes from UBGH2-3 and UBGH2-10 sediments. Names in bold face indicate clones obtained during this study. The tree was inferred by neighbor joining method and Jukes-Cantor model with 1,000 bootstrap replicates. Bootstrap values of <50% are not shown. The scale bar represents 5% sequence divergence. The 16S rRNA gene of *Methanothermobacter defluvii* (X99046) was used as an outgroup (not shown). H.M: high methane.

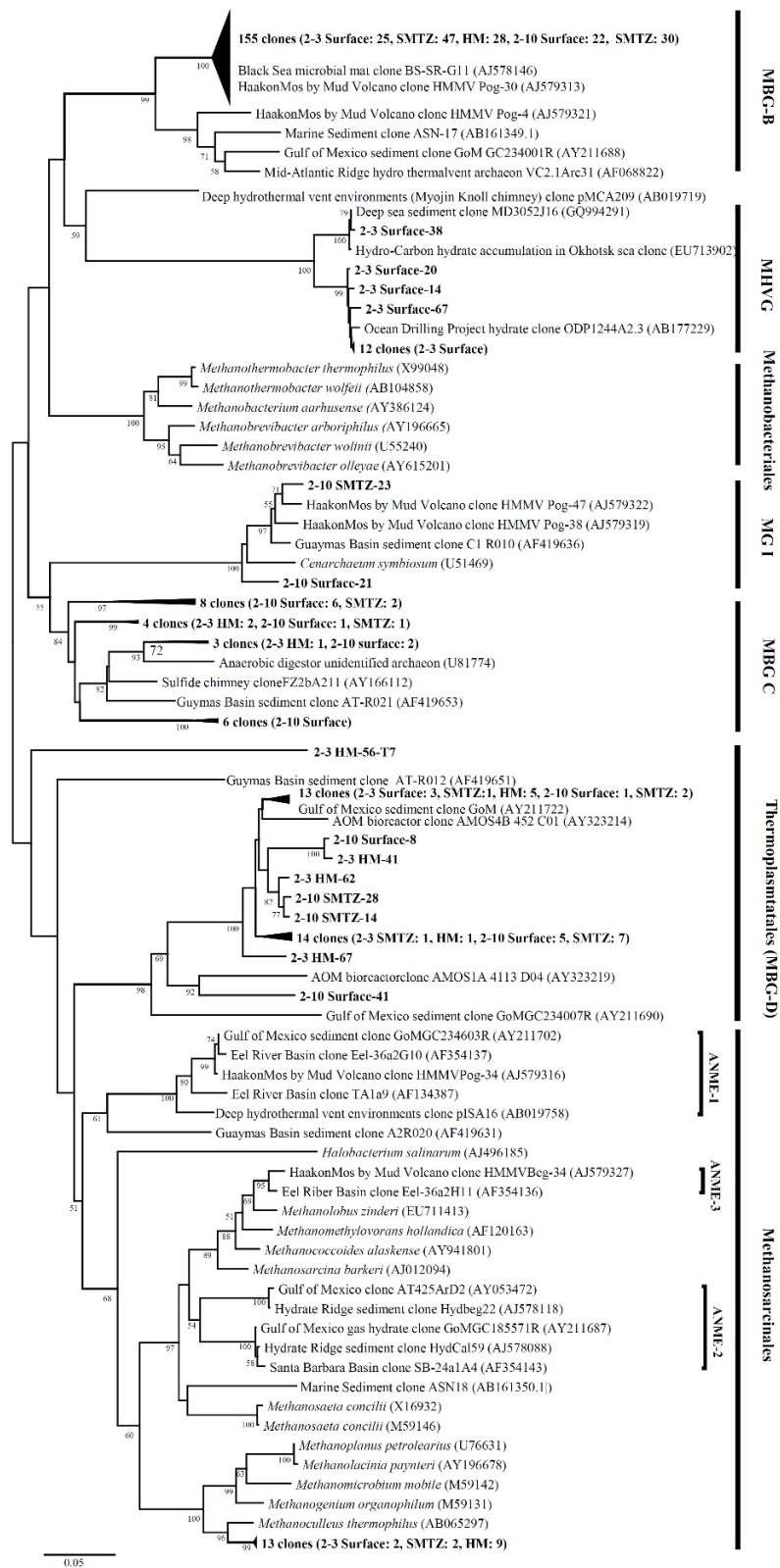


Fig. 4. Phylogenetic tree of archaeal 16S rRNA genes from UBGH2-3 and UBGH2-10 sediments. Names in bold face indicate clones obtained during this study. The tree was inferred by neighbor joining method and Jukes-Cantor model with 1,000 bootstrap replicates. Bootstrap values of <50% are not shown. The scale bar represents 5% sequence divergence. The 16S rRNA gene of *E. coli* (X80725) was used as an outgroup (not shown). H.M: high methane.

였다. *Bacteroidetes* 문에 속하는 *Salegentibacter* 속은 표층에서 13.3%의 비율을 차지하다가 SMTZ에서 4.3%로 감소하였으나 high methane 층에서 27.1%를 차지하며 다시 우점하였다. 이외에도 type I methanotroph에 속하는 *Methylophaga*가 UBGH2-3 지역의 SMTZ 및 high methane 층에서 관찰되었다.

UBGH2-10 지역은 *Betaproteobacteria* 강이 전체 군집의 72.4%를 차지하며 우점하였다. 그 외 *Alphaproteobacteria*가 24.6%, *Gammaproteobacteria* 2.9%로 UBGH2-3에 비해 비교적 단순한 세균 군집을 보였다. *Betaproteobacteria*에 속하는 *Delftia* 속은 세 층에서 가장 우점하였다(표층: 57.7%, SMTZ: 50.0%, high methane: 42.1%). *Achromobacter* 속은 표층 11.5%, SMTZ 8.3%의 비율을 보이다 high methane 층에서 52.6%로 급격히 증가하였다. *Alphaproteobacteria* 강에 속하는 *Brevundimonas* 속의 경우 표층과 SMTZ에서 각각 26.9%, 41.7%를 차지하였으나 high methane 층에서는 존재가 확인되지 않았다.

고세균 군집분석

동해퇴적토 UBGH2-3, UBGH2-10의 퇴적토 시료에서 얻어진 총 238개의 archaeal 16S rRNA 유전자 염기서열은 6개의 그룹으로 나뉘는 것을 확인하였다. UBGH2-10의 high methane 층의 경우 archaeal 16S rRNA 유전자가 증폭되지 않아 표층과 SMTZ 만을 분석하였다. 두 지역에서 모두 Crenarchaeota에 속하는 Marine benthic group-B (MBG-B)가 우점하였으나 이를 제외한 다른 그룹의 분포는 상이하게 나타났다.

MBG-B는 UBGH2-3의 표층에서 54.3%로 존재하다가 SMTZ에서 92.2%로 급격히 증가하였으며, high methane 층에서 57.1%로 다시 감소하는 양상을 보였다(Fig. 2B). UBGH2-10의 경우 표층에서 46.8%로 존재하다가 SMTZ에서는 66.7%로 증가하였다. 또한 MBG-B에 속하는 서열은 모두 Black Sea microbial mat에서 분리된 클론(AJ578146) 및 Haakon Mosby의 Mud Volcano 클론(AJ579313)의 서열과 가장 유사하였다.

Marine benthic group-C (MBG-C)는 UBGH2-10의 표층에서 34.0%의 비율을 보이다가 SMTZ에서 6.7%로 감소하였고 UBGH2-3에서는 확인되지 않았다. 또한 Euryarchaeota에 속하는 Marine Hydrothermal Vent Group (MHVG)은 UBGH2-3의 표층에서 34.8%의 비율을 보였으나 깊이가 깊어지면서 검출되지 않았으며, UBGH2-3의 표층에서 낮은 수준으로 존재하던 Marine benthic group-D (MBG-D) (6.5%)와 *Methanosarcinales* 목(order) (4.3%)은 high methane 층에서 비율이 모두 18.4%로 증가하였다. UBGH2-10의 MBG-D의 경우 표층에서 17.0%, SMTZ에서 24.4%를 차지하였다.

mcrA 유전자의 계통분류학적 분석

mcrA 유전자 염기서열을 이용하여 동해퇴적토에 서식하는 혐기성 메탄산화 고세균의 다양성을 분석하였다. UBGH2-3과 UBGH2-10 지역에서 총 108개의 염기서열을 얻었고 이는 4그룹으로 분류되었다. UBGH2-10은 SMTZ 시료만 염기서열 분석이 가능하였다.

UBGH2-3의 표층에서는 ANME-1a가 80%로 가장 우점하였으

나, SMTZ에서 5.3%로 급격히 감소하는 양상을 보이고, high methane 층에서는 확인되지 않았다. 표층에서 확인된 ANME-1a는 멕시코의 걸프만 퇴적토에서 분리된 클론(DQ521862), Carolina에 위치한 Blake ridge의 퇴적토에서 분리된 클론(AY324366), 몬트레이 협곡 퇴적토 클론(AY324363) 등과 그룹을 형성하였다(Fig. 5).

ANME-1b의 경우 표층에서 20%의 비율로 존재하다 SMTZ에서 94.7%로 급격히 증가하였다. UBGH2-10의 SMTZ에서도 ANME-1b가 100%를 차지하며 우점하는 것이 확인되었다. UBGH2-3의 SMTZ에서 나타난 ANME-1b의 대부분은 Santa Barbara basin에서 분리된 클론(AF456011)과 유사한 서열로 나타났다. UBGH2-10의 경우는 Napoli mud volcano의 중심부에 위치한 퇴적토에서 분리된 클론(AF005027)과 유사한 것으로 두 지역간 혐기성 메탄산화 고세균 군집의 차이를 확인할 수 있었다. UBGH2-3 지역의 high methane 층에는 ANME-2c가 78.9%로 가장 우점하였고 ANME-1b가 15.8%, *Methanogenium* 속이 5.3%로 낮은 비율을 보였다. High methane 층의 ANME-2c의 60.0%는 Cascadia 대륙 주변부 퇴적토 클론(AF525699)과 유사하였다.

고 찰

세균군집 특성

동해퇴적토 UBGH2-3과 UBGH2-10은 공통적으로 *Proteobacteria* 문이 우점하였으나, 강 수준에서는 차이를 보였다. 해양 퇴적토 미생물 군집연구에서 *Proteobacteria* 문은 메탄 하이드레이트 퇴적토(Inagaki et al., 2006; Harrison et al., 2009)를 포함하는 다양한 해양 퇴적토에서 우점하는 것이 보고된 바 있다(Inagaki et al., 2003; He et al., 2012). UBGH2-3의 표층과 high methane 층에서는 *Alphaproteobacteria*가, SMTZ 구역에는 *Gammaproteobacteria*가 우점하였으나, UBGH2-10에서는 세 구역에서 모두 *Betaproteobacteria*가 우점하였다. UBGH2-3의 표층에서 우점한 *Alphaproteobacteria* 강에 포함되는 *Sulfitobacter*는 화학유기영양세균으로 Black Sea의 황화수소와 산소층의 접점에서 처음으로 분리 보고되었으며, 연안과 대양의 바다환경에 많이 분포하는 것으로 알려져 있다(Pukall et al., 1999). 화학유기영양세균임에도 아황산염을 산화시킬 수 있는 특징을 가지고 있으며 해양환경에서 유기 황 순환에 많은 기여를 하는 것으로 보고되었다(Long et al., 2011). 표층에서 특히 우점하고(65.1%), SMTZ, high methane 층에서도 많은 비율을 차지하고 있는 것으로 볼 때 동해울릉분지 UBGH2-3 퇴적토의 표층은 *Sulfitobacter*의 아황산염 산화로 인해 황산염의 농도가 다른 층에 비해 높은 것으로 생각된다(Table 1).

Inagaki 등(2003)은 오후츠크해의 해저 화산재층의 퇴적토에서 세균 군집을 분석한 결과 전체 클론의 82%가 *Gammaproteobacteria* 강에 속하였고 그 중 45.7%가 *Halomonas* 속과 유사한 것을 확인하였다. *Halomonas* 속은 메탄 가스 하이드레이트를 포함하는 해양 퇴적토에서도 발견된 바 있는데 이 속은 넓은 범위의 염분 농도에서도 생장이 가능하기 때문에 해양환경에서 자주 발견되는 것으로 알려져 있다(Köpke et al., 2005; Inagaki et al., 2006).

UBGH2-3에서 가장 우점한 *Halomonas*는 표층에서는 관찰되지 않다가 SMTZ에서 개체수가 급격하게 증가하였고 high methane 층에서도 14.6%의 비율로 존재하였다. *Halomonas* 속은 8%의 NaCl 농도에서도 생존할 수 있는 호염성 세균으로 보통 호기적으로 생활하지만, 질산염, 아질산염 등을 전자 수용체로 사용하여 혐기적으로도 생존이 가능한 종도 포함하고 있다(Mata *et al.*, 2002).

Delftia 속은 *Betaproteobacteria* 강에 속하며 UBGH2-10의 표층, SMTZ 및 high methane 층에서 모두 우점하였다(Fig. 3). 메탄과 황산염의 농도변화와 무관하게 표층과 SMTZ에서 40%

이상의 비율로 우점한 것을 볼 때 혐기적 메탄산화과정과 직접적인 관련은 없을 것이라 생각되나, 일부 종은 유기물을 전자공여체로 하는 질산염 환원능을 갖는 것으로 알려져 있다(Shigematsu *et al.*, 2003).

Achromobacter 속은 혐기적 환경에서 질산염을 아질산염 또는 질소로 환원시킬 수 있으며(Yabuuchi *et al.*, 1998), 표층 및 SMTZ에 비해 high methane 층에서 비율이 급격히 증가하였다. 반대로 대부분이 질산염을 환원시킬 수 없는 *Brevundimonas* 속(Segers *et al.*, 1994)은 high methane 층에서 검출되지 않았다. 서로 다른 두 지역(UBGH2-3, UBGH2-10)에서 종류는 다르지

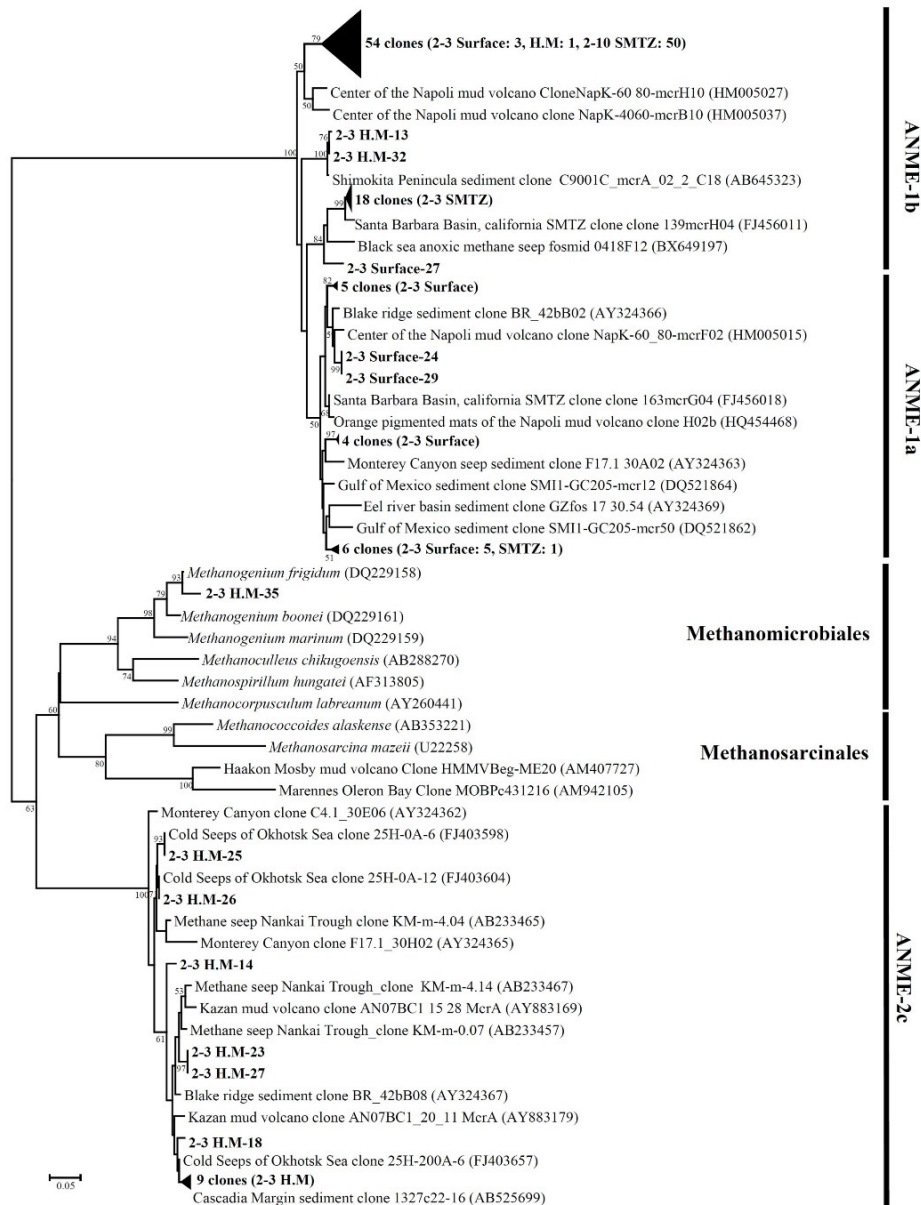


Fig. 5. Phylogenetic tree of *mcrA* genes from UBGH2-3 and UBGH2-10 sediments. Names in bold face indicate clones obtained during this study. The tree was inferred by neighbor joining method and Jukes-Cantor model with 1,000 bootstrap replicates. Bootstrap values of <50% are not shown. The scale bar represents 5% sequence divergence. The *mcrA* gene of *Methanopyrus kandleri* (AF414042) was used as an outgroup (not shown). H.M: high methane.

만 에너지 대사과정에서 질산염을 환원시키는 세균이 퇴적토의 깊이가 깊어지면서 우점하는 것으로 볼 때 표층에서 high methane 층으로 갈수록 혐기성 환경이 조성되기 때문에 대부분의 세균들은 유기물을 전자 공여체로 하여 질산염을 최종 전자 수용체로 이용하는 무기호흡(anaerobic respiration)을 하고 있다고 예상된다.

고세균 군집 특성

UBGH2-3 및 UBGH2-10에서 우점한 MBG-B는 북대서양의 심해 평원과 대륙사면(Vetriani *et al.*, 1999), 메탄을 소비하는 Black Sea의 microbial mat (Knittel *et al.*, 2005) 및 멕시코만의 메탄 퇴적토(Lloyd *et al.*, 2006), Nankai 해구의 하이드레이트 퇴적물(Inagaki *et al.*, 2006) 등 심해 환경에서 광범위하게 나타나 Deep-Sea Archaeal Group (DSAG)이라고도 불린다(Fig. 4). MBG-B의 경우 일반적으로 하이드레이트 상부로 메탄이 방출되는 얇은 퇴적토에서 풍부하다고 밝혀진바 있으며(Inagaki *et al.*, 2006), 메탄이 생성되는 혐기성 퇴적토에서 발견되는 경우가 있어 직접 또는 간접적으로 황산염에 의존한 혐기성 메탄산화와 관련이 있을 것이라는 보고가 있다(Sørensen and Teske, 2006). 본 연구에서도 상대적으로 메탄농도가 높은 UBGH2-3 지역에서 UBGH2-10에 비하여 더 많은 비율로 나타났는데(Fig. 2B) 동해울릉분지 퇴적토의 혐기적 메탄산화에 일정부분 기여를 하고 있을 것이라고 생각된다. 그러나 Jiang 등(2008)에 의하여 이 그룹이 가스 하이드레이트나 메탄을 포함하지 않는 지역에서도 서식하는 것이 확인됨에 따라 MBG-B 그룹이 반드시 메탄산화와 관련이 있다는 것은 논란의 여지가 있다.

MHVG는 일본의 심해 열수공 근처에서 처음 보고 되었으며(Inagaki *et al.*, 2003), 표층 하부에서 군집을 이루며 살아가는 것이 Sørensen과 Teske (2006)에 의해 밝혀진 바 있다. 본 연구에서도 표층부위에 메탄 가스 하이드레이트가 존재하는 UBGH2-3 지역에서만 MHVG가 분포하였다.

UBGH2-3의 high methane 층에서 나타난 *Methanosarcinales* 목에 속하는 *Methanoculleus* 속은 메탄생성 고세균의 일종으로 절대 혐기성 고세균이다. 그 중 *Methanoculleus thermophilus* (AB005297)와 가장 유사하였고, 이 세균은 아세테이트를 탄소원으로 하여 성장하는 특징이 있다(Spring *et al.*, 2005). UBGH2-3 지역에 분포하는 메탄은 대부분이 CO₂ 환원에 의한 생물기원 가스이다(Lee *et al.*, 2013b). 표층과 SMTZ에서 약 4%를 차지하다가 메탄농도가 급격히 증가하는 high methane 층에서 18%로 우점한 것으로 볼 때, 동해 퇴적물의 메탄생성에 관여하는 고세균일 가능성이 높다.

혐기적 메탄산화 고세균 군집 특성

Methyl coenzyme reductase (MCR)은 methanogen에 의한 메탄생성과정의 마지막 단계에서 이산화탄소를 메탄으로 전환시키는 효소이며 혐기적 메탄산화 고세균에 의한 역 메탄생성반응(reverse methanogenesis)에도 관여한다(Hallam *et al.*, 2004). MCR은 α , β , γ 소단위체로 구성되고 각각 *mcrA*, *mcrB*, *mcrC* 유전자로 암호화 되어있다(Reeve *et al.*, 1997).

Knittel 등(2005)은 ANME-1 그룹이 ANME-2 보다 산소에 더욱 민감하여 절대 혐기성의 조건에서 서식한다고 보고하였는데, 동해퇴적토 UBGH2-3 및 UBGH2-10의 표층과 SMTZ에서 우점한 혐기적 메탄산화 고세균은 대부분이 ANME-1 그룹에 속하였고 UBGH2-3의 high methane 층은 ANME-2c 그룹과 연관이 있었다(Fig. 5). 동해 퇴적토는 표층부터 혐기적 환경이 조성되어 있었을 것이라 생각된다. Lee 등(2013b)은 동해 울릉분지 해양 퇴적토 UBGH2-3과 UBGH2-10에서 고세균의 지질 성분인 *sn*-2-hydroxyarchaeol과 archaeol의 비율을 측정하여 두 지역에 존재하는 ANME가 다른 군집으로 구성(UBGH2-3: ANME-1과 ANME-2, UBGH2-10: ANME-1)되어 있으며 이는 퇴적토에서 배출되는 메탄 때문이라고 설명하였다. 하지만 동해퇴적토 UBGH2-3과 UBGH2-10은 표층부터 메탄 농도의 차이가 있음에도 불구하고 본 연구에서는 두 지점의 SMTZ에서 ANME-1이 우점하는 것이 확인됨에 따라 혐기성 메탄산화 고세균은 메탄농도에 많은 영향을 받지 않는다는 것을 예상할 수 있다. 또한, ANME-1과 ANME-2가 다양한 환경에서 넓은 범위의 메탄 농도에서도 발견되는 것을 보면, 메탄농도는 ANME의 서로 다른 그룹을 선택적으로 조절하는데 중요한 인자가 아니고(Pachiadaki *et al.*, 2011), 전체 ANME의 생물량(biomass)을 조절하는 역할을 한다는 주장(Constan, 2009)이 타당하다. Roalkvam 등(2012)은 Nyegga 퇴적토에 존재하는 혐기적 메탄산화 고세균의 수직적인 분포를 조사하였는데 메탄 유선속(fluid flux)에 의한 영향보다 퇴적토내 황화물의 농도 또는 다른 인자에 의한 영향을 더욱 받는다고 보고하였다. 따라서 동해퇴적토에서도 혐기적 메탄산화 고세균 군집 구조는 메탄 및 산소 외에도 황산염과 같은 전자수용체로 작용하는 물질에 의한 영향도 받을 것이라 예상할 수 있다.

동해울릉분지 SMTZ에서 확인된 ANME-1b의 염기서열 중 UBGH2-3의 서열은 각각 Santa Barbara 분지의 SMTZ에서 분리된 클론(FJ456011)과 그룹을 이루었고, UBGH2-10은 Napoli mud volcano의 중심 퇴적토 SMTZ 상부에서 분리된 클론(MH005027)과 그룹을 형성하며 조사지점에 따라 구분되었다(Fig. 5). UBGH2-3과 Santa Barbara 분지의 경우 1,000 m 이하의 수심에 분지가 위치하고 있고, UBGH2-10과 Napoli mud volcano 중심 퇴적토는 2,000 m 근처에 위치한다는 공통점이 있다. 따라서 해양 퇴적토가 위치하고 있는 수심도 혐기적 메탄산화 고세균의 선택적 성장에 영향을 주는 요인이 될 수 있을 것이다.

UBGH2-3의 high methane 층에서 관찰된 *Methanogenium* 속의 고세균은 *Methanogenium frigidum* (DQ229158)과 가장 유사한 것으로 나타났다(Fig. 5). *M. frigidum*은 아세테이트를 탄소원으로 하는 메탄생성 고세균이므로 앞서 16S rRNA 유전자를 이용하여 분석한 고세균 군집에서 관찰되었던 *Methanoculleus* 속과 같이 동해 퇴적토 high methane 층에서 메탄을 생성하는 역할을 할 것이라 생각된다. Inagaki 등(2006)은 메탄 생성 고세균의 경우, 메탄 가스 하이드레이트 지역에 확실히 존재하지만 개체군의 크기가 작아 universal primer를 사용함에도 잘 검출되지 않는다고 보고하였다. 동해 퇴적토의 high methane 층도 생물기원인 메탄이 많이 존재하는 구간이지만 메탄 생성 고세균의 개체군이 매우 작을 것이라 생각된다.

동해퇴적토의 혐기적 메탄산화과정

동해 퇴적토에서 일어나는 혐기적 메탄산화 과정은 최종 전자수용체의 종류에 따라 두가지로 나누어 볼 수 있다. ANME와 황산염 환원 세균의 공생메커니즘은 혐기성 메탄산화 고세균이 두 분자의 메탄으로부터 아세테이트와 수소를 생산하고, 생산된 수소와 아세테이트는 *Desulfosarcina*와 *Desulfococcus* 그룹과 같은 황산염 환원 세균의 전자공여체로 이용되는 것이다 (Caldwell *et al.*, 2008). 동해 퇴적토 UBGH2-3, UBGH2-10에서도 이와 유사한 반응이 일어날 가능성이 있으나, 세균 16S rRNA 유전자 분석결과 황산염 환원 세균과 관련있는 군집은 확인되지 않았다. 대신에 두 지역에서 질산염 환원세균과 연관있는 세균(*Halomonas*, *Achromobacter* 등)이 우점하였다(Fig. 3).

Raghoebarsing 등(2006)은 혐기적 메탄산화 과정이 탈질과정과 연계되어 있을 가능성을 제시하였다(Anaerobic methane oxidation coupled to denitrification: ANME-D). 이러한 경우에 황산염 대신 질산염이 메탄산화의 산화제 역할을 하고, ANME-2와 유연관계가 가까운 혐기적 메탄산화 고세균이 관여함을 보고 하였다. 메탄산화 고세균에 의해 생성된 아세테이트나 메탄을 등은 질산염 환원세균에 전자공여체로 이용되고, 메탄산화 고세균은 질산염을 최종전자 수용체로 하여 혐기적으로 메탄을 산화시킬 수 있을 것이다(Costa *et al.*, 2000). 동해 퇴적토 UBGH2-3, UBGH2-10의 세균군집 분석결과 질산염을 활용하는 *Halomonas* 속과 *Achromobacter* 속이 우점하는 것이 관찰되었는데, 이 균주들이 혐기적 메탄산화 고세균과 콘소시움을 이루며 질산염을 최종전자 수용체로 하는 동해울릉분지 퇴적토의 특이적인 혐기적 메탄산화 과정에 관여할 것이라고 생각된다.

적 요

가스 하이드레이트는 높은 지구 온난화 잠재력을 가지고 있는 메탄가스를 해수 또는 대기 중으로 유입시킬 수 있어 전 지구적 탄소순환과정과 기후 변화에 중요한 역할을 한다. 따라서 해양 또는 대기로 방출되는 메탄의 90% 이상을 미생물 반응을 통해 산화시킬 수 있는 혐기적 메탄산화 과정이 매우 중요하다. 본 연구에서는 동해 울릉분지내 메탄 가스 하이드레이트 퇴적토에서 서식하는 미생물 군집의 *mcrA* 유전자와 16S rRNA 유전자를 분석하였다. 혐기적 메탄산화 고세균(Anaerobic methane oxidizer: ANME) 군집의 수직적 분포를 조사한 결과, 표층과 황산염 메탄 전이대(Sulfate methane transition zone: SMTZ)에서는 ANME-1 그룹이, high methane 층에서는 ANME-2c 그룹이 우점하였다. 16S rRNA 유전자를 이용한 고세균의 군집분석 결과, 혐기적 메탄산화가 일어나는 지역에서 주로 발견되는 marine benthic group-B가 50% 이상의 비율로 우점하였다. 세균의 경우 질산염을 환원시킬 수 있는 세균이 SMTZ (*Halomonas* 속: 56.5%)와 high methane 층(*Achromobacter* 속: 52.6%)에서 우점하였으며 황산염 환원 세균 군집은 확인되지 않았다. 동해 울릉분지 메탄 가스 하이드레이트의 혐기적 메탄산화과정은 일반적으로 해양 퇴적토에서 알려진 혐기적 메탄산화 고세균과 황산염 환원 세균과의 공생에 의한 반응이 아닌 혐기적 메탄산화 고세균과 질산

염 환원세균에 의한 반응이 주도할 것이라 생각된다.

감사의 말

본 연구는 국토교통부 소관 해양생명공학기술개발사업 및 2012년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Caldwell, S.L., Laidler, J.R., Brewer, E.A., Eberly, J.O., Sandborgh, S.C., and Colwell, F.S. 2008. Anaerobic oxidation of methane: mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 6791-6799.
- Canfield, D.E., Kristensen, E., and Thamdrup, B. 2005. The Methane Cycle, pp. 383-418. In Canfield, D.E., Kristensen, E., and Thamdrup, B. (eds). *Advances in Marine Biology*. Academic Press, Orlando, USA.
- Constan, L. 2009. Ms. thesis. The University of British Columbia, Vancouver, Canada.
- Costa, C., Dijkema, C., Friedrich, M., Garcia-Encina, P., Fernandez-Polanco, F., and Stams, A. 2000. Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 754-762.
- DeLong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5685-5689.
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M., Schreiber, F., Dutilh, B.E., Zedelius J., and de Beer, D. 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* **464**, 543-548.
- Hallam, S.J., Putnam, N., Preston, C.M., Detter, J.C., Rokhsar, D., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. 2004. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* **305**, 1457-1462.
- Haroon, M.F., Hu, S., Shi, Y., Imelfort, M., Keller, J., Hugenholtz, P., Yuan, Z., and Tyson, G.W. 2013. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature* **500**, 567-570.
- Harrison, B.K., Zhang, H., Berelson, W., and Orphan, V.J. 2009. Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara Basin, California). *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1487-1499.
- He, R., Wooller, M.J., Pohlman, J.W., Quensen, J., Tiedje, J.M., and Leigh, M.B. 2012. Diversity of active aerobic methanotrophs along depth profiles of arctic and subarctic lake water column and sediments. *ISME J.* **6**, 1937-1948.
- Hyun, J., Mok, J., You, O., Kim, D., and Choi, D. 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., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M., Colwell, F.S., and *et al.* 2006. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 2815-2820.
- Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. 2003. Microbial communities

- associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the sea of Okhotsk. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7224–7235.
- Jiang, H., Dong, H., Yu, B., Ye, Q., Shen, J., Rowe, H., and Zhang, C. 2008. Dominance of putative marine benthic Archaea in Qinghai Lake, north-western China. *Environ. Microbiol.* **10**, 2355–2367.
- Juottonen, H., Galand, P.E., and Yrjälä, K. 2006. Detection of methanogenic Archaea in peat: comparison of PCR primers targeting the *mcrA* gene. *Res. Microbiol.* **157**, 914–921.
- Kim, B., Cho, H., and Hyun, J. 2010. 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. *Ocean Polar Res.* **32**, 309–319.
- Knittel, K. and Boetius, A. 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 311–334.
- Knittel, K., Losekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. 2005. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 467–479.
- Köpke, B., Wilms, R., Engelen, B., Cypionka, H., and Sass, H. 2005. Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7819–7830.
- Kvenvolden, K.A. 1999. Potential effects of gas hydrate on human welfare. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3420–3426.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 125–175. In Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Lee, D., Kim, J., Bahk, J., Cho, H., Hyun, J., and Shin, K. 2013b. Geochemical signature related to lipid biomarkers of ANMEs in gas hydrate-bearing sediments in the Ulleung Basin, East Sea (Korea). *Mar. Pet. Geol.* **47**, 125–135.
- Lee, J., Kwon, K.K., Azizi, A., Oh, H., Kim, W., Bahk, J., Lee, D., and Lee, J. 2013a. Microbial community structures of methane hydrate-bearing sediments in the Ulleung Basin, East Sea of Korea. *Mar. Pet. Geol.* **47**, 136–146.
- Lloyd, K.G., Lapham, L., and Teske, A. 2006. An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7218–7230.
- Long, C., Lu, X.L., Gao, Y., Jiao, B.H., and Liu, X.Y. 2011. Description of a *Sulfitobacter* strain and its extracellular cyclodipeptides. *Evid. Base. Compl. Alternat. Med.* **2011**, 393752.
- Mata, J.A., Martínez-Cánovas, J., Quesada, E., and Béjar, V. 2002. A Detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 360–375.
- Nauhaus, K., Boetius, A., Krüger, M., and Widdel, F. 2002. *In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environ. Microbiol.* **4**, 296–305.
- Niemann, H., Lösekann, T., de Beer, D., Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K., Amann, R., Sauter, E.J., Schlüter, M., Klages, M., and *et al.* 2006. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* **443**, 854–858.
- Pachiadaki, M.G., Kallionaki, A., Dählmann, A., De Lange, G.J., and Kormas, K.A. 2011. Diversity and spatial distribution of prokaryotic communities along a sediment vertical profile of a deep-sea mud volcano. *Microb. Ecol.* **62**, 655–668.
- Pukall, R., Buntfuss, D., Fruhling, A., Rohde, M., Kroppenstedt, R.M., Burghardt, J., Lebaron, P., Bernard, L., and Stackebrandt, E. 1999. *Sulfitobacter mediterraneus* sp. nov., a new sulfite-oxidizing member of the alpha-Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49** Pt 2, 513–519.
- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I.C., Schouten, S., Damsté, J.S.S., Op den Camp, H.J.M., and *et al.* 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440**, 918–921.
- Reeve, J.N., Nolling, J., Morgan, R.M., and Smith, D.R. 1997. Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first? *J. Bacteriol.* **179**, 5975–5986.
- Roalkvam, I., Dahle, H., Chen, Y., Jørgensen, S.L., Haflidason, H., and Steen, I.H. 2012. Fine-scale community structure analysis of ANME in Nyegga sediments with high and low methane flux. *Front. Microbiol.* **3**, 216.
- Rochelle, P.A., Cragg, B.A., Fry, J.C., Parkes, R.J., and Weightman, A.J. 1994. Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine-sediments by 16S ribosomal-RNA gene sequence-analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**, 215–225.
- Ryu, B., Riedel, M., Kim, J., Hyndman, R.D., Lee, Y., Chung, B., and Kim, I. 2009. Gas hydrates in the western deep-water Ulleung Basin, East Sea of Korea. *Mar. Pet. Geol.* **26**, 1483–1498.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed., p. 213. Cold spring harbor laboratory press, New York, USA.
- Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettinck, D., Falsen, E., Kersters, K., and De Vos, P. 1994. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov., and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 499–510.
- Shigematsu, T., Yumihara, K., Ueda, Y., Numaguchi, M., Morimura, S., and Kida, K. 2003. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1479–1483.
- Sørensen, K.B. and Teske, A. 2006. Stratified communities of active Archaea in deep marine subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4596–4603.
- Spring, S., Schumann, P., and Sproer, C. 2005. *Methanogenium frittonii* Harris *et al.* 1996 is a later synonym of *Methanoculleus thermophilus* (Rivard and Smith 1982) Maestrojuan *et al.* 1990. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1097–1099.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729.
- Vetriani, C., Jannasch, H.W., MacGregor, B.J., Stahl, D.A., and Reysenbach, A.L. 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4375–4384.
- Yabuuchi, E., Kawamura, Y., Kosako, Y., and Ezaki, T. 1998. Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian *et al.*) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Rüger and Tan) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* **42**, 429–438.
- Young, R. and Bryant, E. 1992. Catastrophic wave erosion on the southeastern coast of Australia: Impact of the Lanai tsunamis ca. 105 ka? *Geology* **20**, 199–202.