


동해 동근성게의 장내 미생물 군집 구조 분석 및 비교

김민지¹ · 차인태² · 박수제^{1*} 

¹제주대학교 생물학과, ²국립생물자원관 미생물자원과

The gut microbiota of the globular sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*, from its natural habitat

Minji Kim¹, In-Tae Cha², and Soo-Je Park^{1*} 

¹Department of Biology, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

²Microorganism Resources Division, National Institute of Biological Resources, Incheon 22689, Republic of Korea

(Received April 14, 2022; Revised June 14, 2022; Accepted June 16, 2022)

Marine invertebrates have been well-known a symbiotic relationship with marine microorganisms obtained during sea water filtering. Among the marine invertebrate species, the sea urchin grazes on seaweed. Although sea-urchin barren may occur, there is limited ecological knowledge. The gut bacterial population of six urchins collected from the Dokdo and Ulleungdo was studied in this work using the 16S rRNA gene amplicon technique and analyzed using operational taxonomic unit (OTU) method. Because of the high frequency of unclassified groups, these studies at the phylum and genus level were able to predict the presence of uncultivated bacterial species on the urchin gut. The genus *Sulfurospirillum*, which can use sulfur compounds and nitrogen oxides, was also abundant among Ulleungdo's urchins. The urchin gut microbial communities were clustered with their habitat as a result of the beta-diversity (PCoA and UPGMA). Furthermore, the diversity indices for the urchin gut microbial community obtained using the OTU were comparable those of amplicon sequence variant method. Despite the fact that each study approach was subordinated to the clustering method and the reference database employed, the microbial community structures were similar. In conclusion, we detected microbial diversity and community structure in the gut of urchins in this study and found no significant differences between the OTU and ASV analysis methods.

Keywords: East sea, gut, microbiota, urchin

해양 환경은 전체 지구 표면의 약 70%를 차지하고 있으며, 기수역, 해양 퇴적층, 심해 열수구를 비롯하여 극지방까지 매우 다양한 물리적/화학적 환경이 존재한다. 이러한 해양 환경에서 서식하는 생물의 다양성은 높은 것으로 알려져 있으며, 해양 환경에서만 발견되는 독특한 미생물을 비롯하여 해양무척추동물이 지닌 유용물질 연구가 진행되고 있다(Hu *et al.*, 2011). 이미 해면동물로부터 새로운 천연물들이 보고되었으며, 원천물질로서 신약개발 등으로 연계되고 있다(Thomas *et al.*, 2010). 특히 해양무척추동물은 해수를 걸러서 식이하는 장관 시스템을 지니고 있어, 먹이를 섭취하는 과정에서 독특한 해양미생물과 접촉하며 이들 미생물과 영양 공급원, 노폐물 제거 혹은 화학적 방어 등과 같은 다양한 공생관계를 유지한다고 알려져 있다(Wilkinson and Garrone, 1980; Wilkinson *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 2001).

다양한 다당류를 포함하고 있는 해조류는 해양 자원의 보고라고 알려져 있으며, 이들 해조류는 단세포성 미세조류(microalgae)와 다세포성 거대조류(macroalgae)로 구별된다. 이들 다세포성 거대조류는, 색소조성에 따라, 녹조류, 홍조류와 갈조류로 분류가 되며, 최근 분자생물학적 접근을 통하여 식품 및 의약품 분야 등 그 응용성이 부각되고 있다(Wells *et al.*, 2017). 해조류 유래, 알긴산, 카라기난, 한천, 후코이단 등 다양한 다당류가 이미 기능성 소재로 보고되어 있다(Chudasama *et al.*, 2021). 그러나, 이들 해조류 유래 다당류 등은 유용성분 추출에 대하여 경제적 문제점이 존재하고 있으며, 다당류의

*For correspondence. E-mail: sjpark@jejunu.ac.kr;
Tel.: +82-64-754-3524; Fax: +82-64-756-3541

저분자화 및 해조 올리고당의 기능적 연구에 대한 요구가 증가하고 있다(Trigueros et al., 2021; Wassie et al., 2021). 특히, 다당류 분해 효소를 생성 및 분비하는 미생물의 분리하여 해조 다당류의 저분자화 혹은 올리고당의 생산에 대한 연구가 진행되고 있다(Kim et al., 2011).

특히, 해조류를 주 영양원으로 섭취하고 있는 성게는 전세계 연안에서 쉽게 발견되는 해양 무척추동물이다. 국내 전 해역에서 서식하고 있으며, 약 30여종이 서식하고 있다고 알려져 있다. 특히 독도의 고립된 심해 환경에서는 최근까지 조식성 극피동물인 둥근성게(*Strongylocentrotus nudus*)가 밀도 높게 서식하는 것이 관찰되어 보고되고 있다. 지구온난화로 인한 독도 주변 해역의 표층에서 나타난 급격한 수온 변화에 대해 높은 적응력을 보이고 있고(Sin et al., 2019), 탄산칼슘 양이 줄어들고 산성화되는 바다에 새로운 개체들이 빠르게 적응하고 있다는 연구 결과가 보고되었다(Kelly et al., 2013). 이러한 환경 적응력은 성게가 독도의 독특한 환경에서 서식하는데 있어 많은 이점이 되었을 것으로 보인다. 게다가, 성게는 백화(갯녹음) 현상을 촉진하는 원인 중 하나라고 알려져 있으나, 이들의 명확한 생태학적 특성에 대한 연구결과는 미비한 실정이다(Kim et al., 2012).

차세대 염기서열(NGS, next-generation sequencing)분석 등의 발전에 따라, 다양한 육상 및 해양에 서식하는 동물의 장내 미생물 연구는 숙주의 성장, 발달, 대사 및 소화생리학 뿐만 아니라 포식자로부터 보호 및 적응 적합성에서 보다 다양한 미생물 역할들이 밝혀지고 있다. 본 연구에서는 동해(울릉도와 독도)에 서식하는 성게로부터 위에서 설명한 차세대 염기서열 분석법을 활용하여 성게 장내 미생물 군집 구조를 분석 및 비교하여 장내 미생물의 다양성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

샘플 채취 및 DNA 추출

본 연구는 2017년 4월, 독도(n=4, SD1-4)와 울릉도(n=2, SD5와 SD6) 인근의 바다에서 채취한 둥근 성게(*Strongylocentrotus nudus*)를 사용하였다. 독도 둥근 성게는 동도와 서도 사이의 수심 15 m의 암반지대에서 채집하였고, 울릉도 둥근 성게는 저동 북저바위 수심 20 m의 암반 경사면에서 채집하였다(37° 14' 24"N 131° 51' 36"E; 37° 30' 07"N 130° 55' 11"E). 울릉도와 독도의 경우 국가지질공원(2012년 12월 27일)으로 지정되어 있어, 허가된 장소에서 제한된 수의 생물체를 채집하였다. 채집한 성게는 낮은 온도(4°C)를 유지하며 살아있는

상태로 실험실까지 운반하였다. 운반된 성게로부터 내장을 채취하기 위하여, 해양환경공정시험기준(<https://www.law.go.kr/admRulLsInfoP.do?admRulSeq=2000000109042>)에 준하여 멸균된 해부용 칼을 이용하여 다른 장기 및 외부와의 접촉을 최소화하며 멸균된 50 ml conical tube에 채취하였다. Genomic DNA (gDNA)는 Power Soil kit (Mo Bio Laboratories)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 추출하였다. NGS 분석을 위해, 341F와 785R 프라이머를 사용하여 미생물의 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 유전자의 V4 영역을 증폭 및 정제하였다(Kim et al., 2015). 정제된 증폭 산물의 NGS 수행은 MacroGen에 의뢰하였으며, MiSeq (Illumina, Inc.) 장비를 사용하여 진행되었다. 모든 서열들은 NCBI의 Sequence Read Archive (SRA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>)에 등록하였다(SRX15155618-SRX15155623).

미생물 군집 및 다양성 분석

미생물 군집 구조를 분석하기 위하여 operational taxonomic unit (OTU)와 amplicon sequence variant (ASV)를 기반으로 각각 분석하였다. OTU 기반 분석은 mothur (version 1.45.3) (Schloss et al., 2009)를 이용하였다. Mothur에서 제공하는 *make.contig* 명령어를 이용하여 raw read를 조립하고 이들 중에서 quality checking을 통해 정상적으로 증폭, 시퀀싱된 것만 분석에 사용하였으며, 키메라 서열과 미생물 이외의 염기서열(미토콘드리아와 엽록체)들을 제거하여 분석의 신뢰도를 향상하였다. 미생물 군집 구조 분석을 위하여, 염기서열을 Silva 데이터베이스(version 138.1)를 참고하여 97% 유사도를 기준으로 미생물 분류 및 동정 과정을 수행하였다(Koh et al., 2015). 추가적으로 수행한 ASV를 기반으로 하는 염기서열 분석을 위해, raw read 조립 후 각 서열의 오류율을 통해 예상 오류율을 계산하여 오류율이 낮은 read들을 선별하고, 예상 오류율이 높은 read들은 제거하였다. 남은 서열들에 대해서는 R의 DADA2 파이프라인을 이용하여 오류 모델을 만들어 오류를 보정하고, chimera를 제거한 뒤 서열이 100% 일치하는 서열들을 하나로 묶어 ASV를 구성하였다. 서열 정보를 바탕으로 한 미생물의 분류는 NCBI 16S ribosomal RNA database를 참고하였으며, 미생물 군집 구조 분석은 데이터 분석 프로그램인 Quantitative insights into microbial ecology (QIIME, version 1.9) (Caporaso et al., 2010)를 이용하였다(Prodan et al., 2020).

샘플 내 군집 다양성 분석을 위하여, OTU와 ASV 분석 모두 Chao1, Shannon, Inverse Simpson 지수를 사용하여 alpha-diversity를 분석하였다. 또한 샘플 간의 군집 다양성 분석을

위한 beta-diversity 분석은 weighted unifrac 거리 분석 방법을 이용하여 각각 unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA) 계통수와 주좌표 분석(Principle coordinates analysis, PCoA) 방법으로 시각화하였다.

결과 및 토의

성계 장내 미생물 다양성

Raw read 전처리 후, 평균 46천여개의 염기서열을 확보하여 OTU 방식으로 울릉도와 독도 내 성계의 장내 미생물 군집을 분석하였다(Table 1). Good's coverage는 90% 이상이였으며, 종다양성 지수는 독도 그룹이 울릉도 그룹에 비하여 높은 것을 관찰할 수 있었다. 다만, 울릉도 그룹의 SD5 샘플은 다른 샘플에 비하여 다양성 지수가 낮게 관찰되었다. 이는 해당 샘플에서만 높은 비율로 발견되었던 Fusobacteria 문과 연관이 있을 것으로 보인다.

종풍부도 추정(Chao1)의 경우, SD1 샘플이 SD5 샘플에 비하여 낮은 값이 관찰되었으며, 관찰된 species (i.e., OTU)보다 chao1의 값이 약 3배 높게 확인되었다.

각 샘플 간의 장내 미생물 군집 유사도 등을 비교하기 위하여, beta-diversity 분석 결과를 PCoA과 UPGMA 계통수로 나타내었다(Figs. 1~2). PCoA 및 UPGMA 결과를 바탕으로, 독도와 울릉도 지역별로 그룹화가 되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 독도 그룹의 경우, 샘플별로 밀집되어 있음을 관찰할 수 있었다. 비록 비교적 적은 수의 샘플 수를 활용한 비

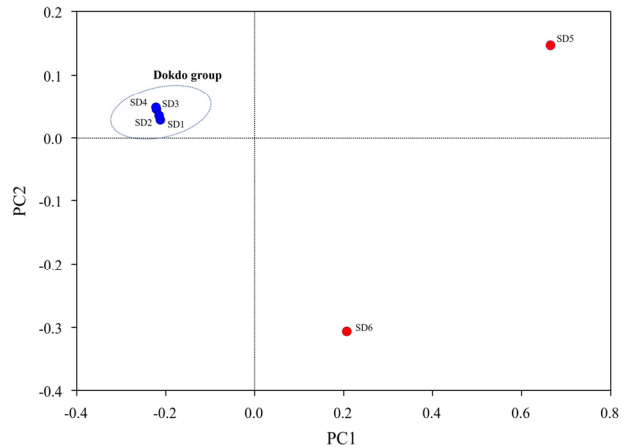


Fig. 1. The relationships between the gut microbiota profiles represented by a principal coordinates analysis (PCoA) plot from a weighted UniFrac analysis for operational taxonomic units (OTUs). Blue and red coloring denote the sea urchin collected from Dokdo and Ulleundgo, respectively. Dokdo group is highlighted with blue dot-oval.

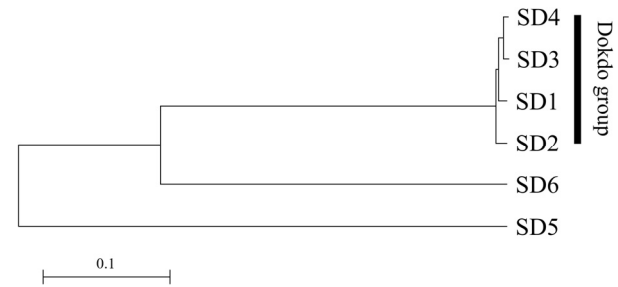


Fig. 2. Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) trees showing clustering of gut bacterial communities estimated by OTU analysis method. The scale bar indicates the distance between clusters in UniFrac units.

Table 1. Sample statistics estimated by OTU and ASV analysis corresponding to the six samples analyzed in this study, determined V4 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene sequenced by Illumina MiSeq platform. For inverse Simpson diversity, the value closer to 1 might be considered more diverse

Analysis method	Sample	OTU/ASV	Chao1	Shannon	Inverse Simpson	Good's coverage
OTU	SD1	4,710	13,064.92	6.15	0.99	0.92
	SD2	5,597	16,775.62	6.24	0.99	0.91
	SD3	6,780	19,147.24	6.30	0.99	0.92
	SD4	5,807	17,414.20	6.20	0.99	0.92
	SD5	5,658	17,223.50	5.59	0.95	0.92
	SD6	5,299	16,428.76	6.08	0.98	0.91
ASV	SD1	663	663.10	7.40	0.98	0.99
	SD2	735	735.71	7.48	0.99	0.99
	SD3	795	799.13	7.50	0.99	0.99
	SD4	746	747.44	7.42	0.98	0.99
	SD5	536	537.15	4.89	0.84	0.99
	SD6	709	709.48	6.70	0.95	0.99

교이나(Hakim et al., 2016), 이를 통해 성계의 장내 미생물이 서식지에 따라 다른 형태의 군집을 형성하고 있는 것으로 판단하였다.

미생물 군집 구조 비교

각 그룹 내 샘플의 미생물 군집 구성을 문(phylum) 수준에서 상대적 풍부도를 분석하였다(Fig. 3). 미분류군 그룹(Bacteria_unclassified)을 포함하여 27개 문이 확인되었다.

가장 높은 비율을 차지하는 문은 분석한 샘플 모두 Proteobacteria (27.6~38.5%)로 확인되었다. 그 뒤로 독도 그룹에 속하는 성계 샘플(SD1-4) 간 큰 차이 없이, Bacteroidota, Planctomycetota, Firmicutes, Patescibacteria, Actinobacteriota, Verrucomicrobiota 등의 순으로 우점하고 있는 것으로 나타났다(각 샘플 내 3% 이상의 풍부도). 이에 비하여, 울릉도 그룹인 SD5 샘플은 Fusobacteriota, Campylobacterota, Bacteroidota 순으로(샘플 내 10% 이상), SD6 샘플은 Bacteroidota, Campy-

lobacterota, Firmicutes 순으로(샘플 내 7% 이상) 나타났다. 울릉도 그룹의 두 성계 샘플은 Fusobacteria (SD5 우점종, 21.1%)와 Campylobacterota (SD5와 SD6 우점종, 각각 12.4와 10.3%)를 제외하면 독도 그룹과 비슷한 미생물 군집 구조가 확인되었다.

높은 분류 단계인 문 수준에서, 미분류군 그룹 (Bacterial_unclassified)이 발견되었다. 이는 일반적인 자연환경에 비하여, 비교적 격리되어 있는 장내 환경 내에 아직까지 알려지지 않은 난배양성 혹은 미분류군 그룹내의 미생물 존재를 예측할 수 있다.

앞서 언급한바, 비록 울릉도 그룹의 경우 적은 수의 샘플 확보로 제한된 정보를 제공하고 있으나, SD5 샘플은 다른 샘플들과 달리 Fusobacteria 문의 비율이 매우 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 같은 울릉도 그룹에 속해 있는 SD6 샘플과도 유사하지 않은 형태이다. Fusobacteria 문은 탄수화물 또는 아미노산을 발효시켜 다양한 유기산을 생산하는 혐기성 호흡을 하

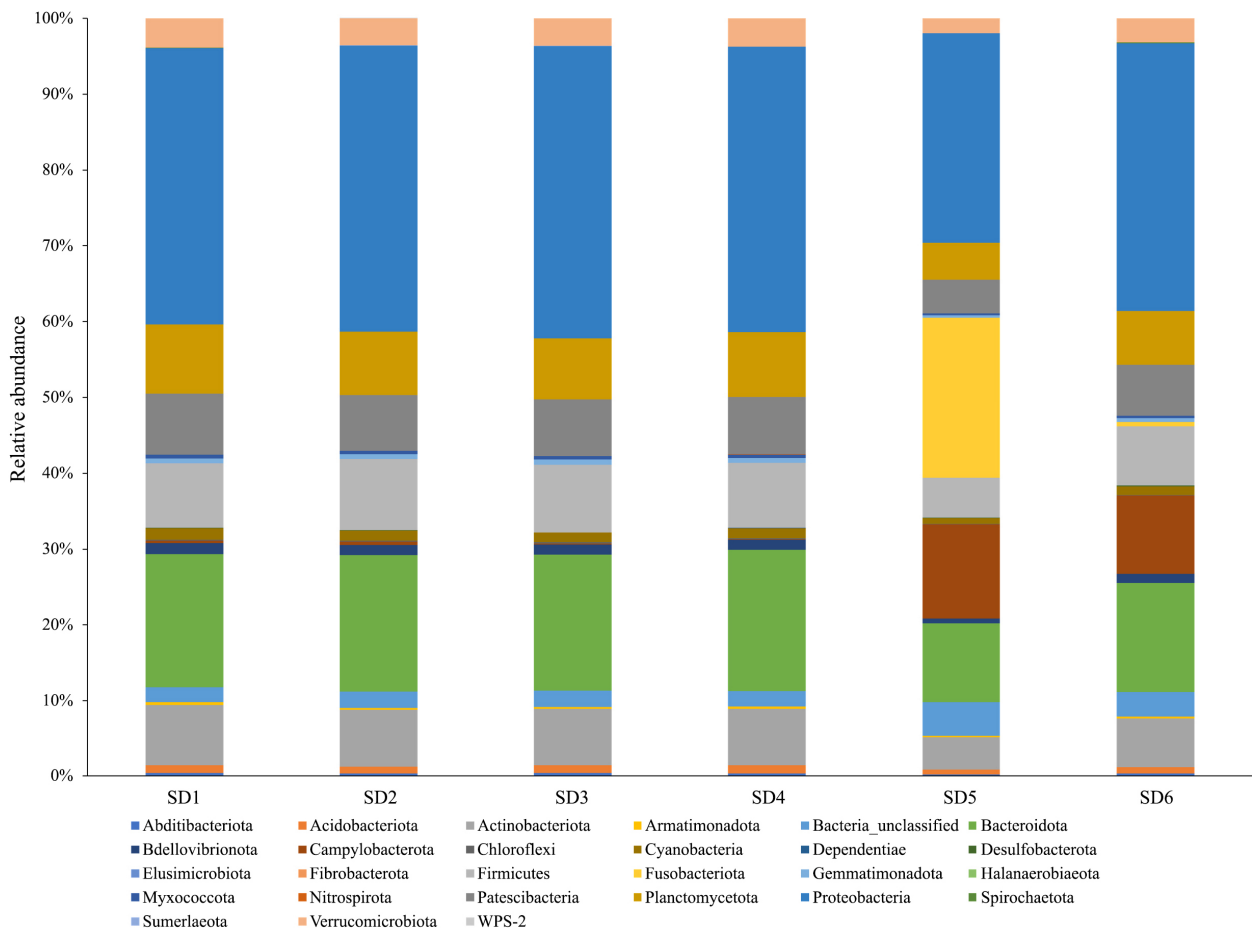


Fig. 3. Relative abundances evaluated at the phylum level in gut bacterial communities of the sea urchin. Bacterial taxa are clustered and identified by OTU analysis.

는 분류군으로 알려져 있다(Bennett and Eley, 1993; Potrykus *et al.*, 2007). 또한 인간을 포함한 동물의 소화기 및 장내와 퇴적물에서 서식하는 것으로 알려져 있어(Suau *et al.*, 2001; Kapratral *et al.*, 2002; Nagaraja *et al.*, 2005), SD5 샘플에서만 높은 비율로 존재하고 있는 것이 이동 및 실험 상의 문제는 아닐 것으로 예상된다. 다만, 몇몇 숙주의 건강(질병)과의 상관 관계에 있어, *Fusobacteria* 문이 높은 비율로 존재하고 있음이 확인되고 있어, 분석에 사용된 성계의 경우 분석을 위한 채취 시 이미 예측되지 않은 질병에 노출되어 있었을 가능성을 조심스럽게 예측할 수 있다(Roberts, 2000).

각 그룹 내 샘플의 미생물 군집 구성을 속(genus) 수준에서, 상대적 풍부도를 분석하였다(Fig. 4). 미분류군 속으로 확인된 것을 포함하여 65개 속이 확인되었다. 상대적 비교를 위하여, 각 샘플 별로 전체의 1% 이상 존재하는 속만 선택하여 분석을

진행하였다. 분석 결과, 독도 그룹은 미분류된 그룹(*Bacteria_unclassified*)이 가장 우점하고 있었고(8.2~8.9%), 그 뒤를 이어 LWQ8_ge, *Sphingomonadaceae_unclassified* 순으로 우점하고 있었다. 울릉도 그룹에서는 SD5 샘플은 *Psychrilyobacter* (20.26%), *Campylobacterales_unclassified*과 *Bacteria_unclassified* 순으로, SD6 샘플은 *Campylobacterales_unclassified* (10.27%), *Bacteria_unclassified*, LWQ8_ge 순으로 우점하고 있었다.

독도 샘플(SD1-4)에서 *Sphingomonadaceae_unclassified*가 우점종 중 하나로 확인되었다. *Sphingomonadaceae* 과는 다양한 동물의 장내에서 높은 비율로 발견되며, 면역 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다(Chalifour and Li, 2021; Lau *et al.*, 2021). 특히 질병에 걸린 물고기 경우 *Sphingomonadaceae* 과가 장내 미생물 군집에서 존재하는 비율이 확연히 낮아지는 것이 확인되었으며(Lau *et al.*, 2021), 그 밖에도 새우에서 긍정

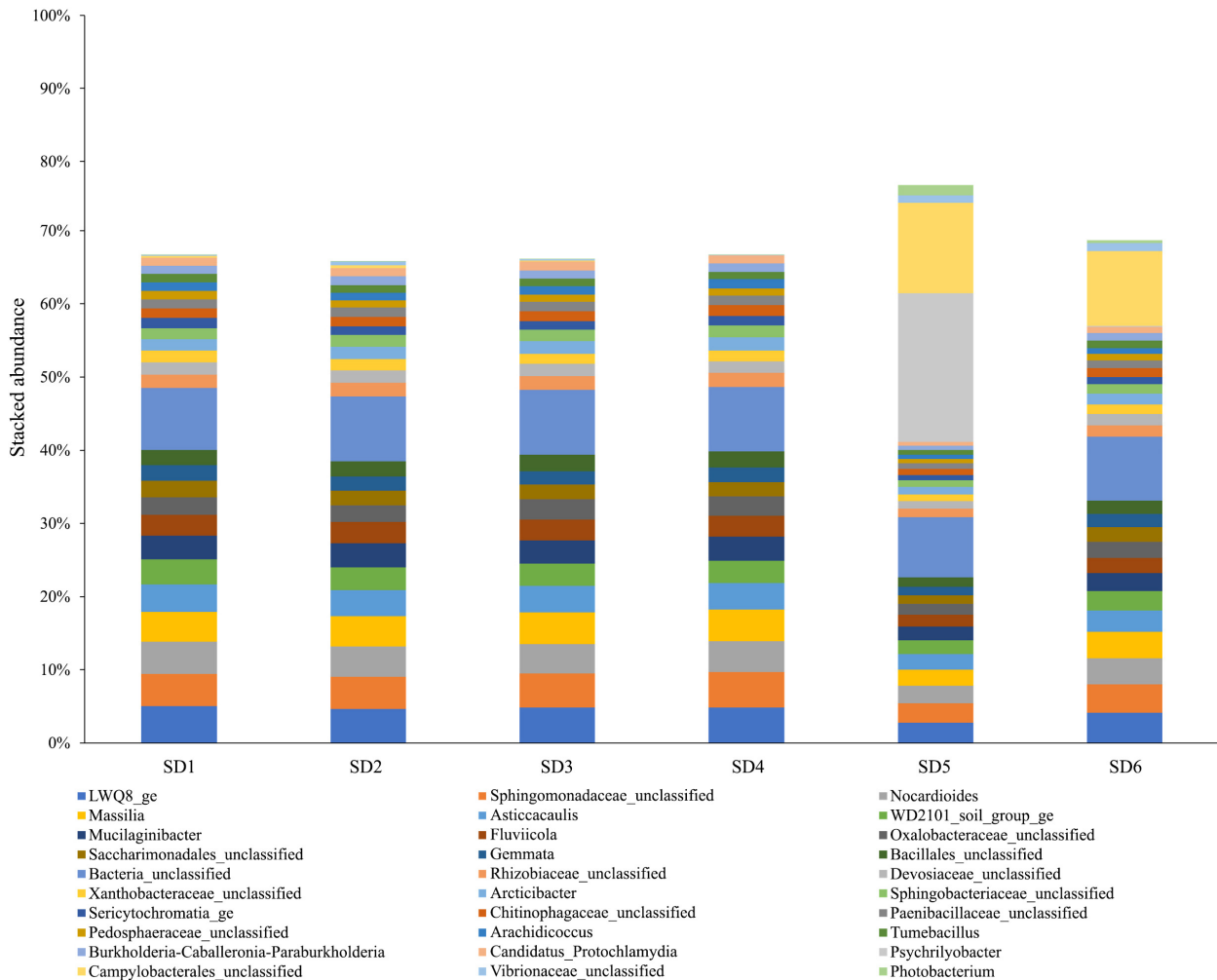


Fig. 4. Stacked abundances of the selected bacterial taxa (more than 1% of the total reads) present at the genus level of the sea urchin. Bacterial taxa are clustered and identified by OTU analysis.

적인 영향을 미치는 공생 미생물로 예측되었다(Chen et al., 2017).

SD5 샘플에서는 Fusobacteria 문에 속하는 *Psychrilyobacter* 속이 우점(20.3%) 하는 것으로 확인되었다. *Psychrilyobacter* 속은 해양 퇴적물에서 중요한 단백질 또는 아미노산 분해자일 가능성이 DNA-비방사선 동위원소(DNA-SIP) 실험과 유전체 분석을 통해 예측되었다(Pelikan et al., 2021). 이러한 사실은 성계의 장내에서 *Psychrilyobacter* 속이 단백질 분해 및 주요 물질 분비(i.e., formate, acetate, propionate 혹은 butyrate)을 분비하며, 중요한 대사적 공생체로 존재할 가능성을 조심스럽게 예측할 수 있다. 또한 *Psychrilyobacter* 속이 태평양 굴(Pacific oysters, *Crassostrea giga*)의 미생물 군집분석 결과, 높은 비율로 존재하며 질병 저항성과 관련이 있다는 연구도 보고되어 있어(King et al., 2019), 앞서 언급한 바, 분석에 이용된 성계가 질병에 감염되었을 가능성을 보다 예측할 수 있다. 다만 *Psychrilyobacter* 속이 성계에 직접적으로 영향을 미친다는 실험적 연구결과는 전무한 실정이며, 다른 해양 동물에 미치는 영향에 대해 알려진 바도 적어 *Psychrilyobacter* 속이 해양 동물에 있어 어떠한 역할을 하는지에 대해서는 추후 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Psychrilyobacter 속 다음으로 울릉도 그룹에서는 Campylobacteriales_unclassified가 높은 비율을 차지하고 있다. 녹색성계(*Lytechinus variegata*)의 장내 미생물 군집연구에 따르면, Campylobacteriales 목에 속해 있는 *Arcobacter* 속이 매우 높은 비율로 존재하고 있는 것을 확인되었다(Hakim et al., 2015, 2016; Green et al., 2021). *Arcobacter* 속 역시 심해 열수구 환경에서 황산화 및 질소 고정 등을 물질대사능력을 지닌 것으로 알려져 있다(Wirsén et al., 2002; Pati et al., 2010). 더불어 본 연구를 통하여 확인된 *Sulfurospirillum* 속 역시 질소 고정, 아세트산 생성(acetogenesis)을 포함하여 발효관련 대사과정이 유전체 분석을 통하여 확인되었다(Freedman et al., 2017). 비록 Hakim et al. (2016)은, 녹색성계 장내 미생물 군집 구조로부터, 탄수화물, 아미노산 및 지질 등에 대한 대사과정에 대한 중요성에 대하여 언급하였으나, 이들 분석을 군집구조를 바탕으로 한 대사능력의 예측으로 Campylobacteriales 목과 관련된 직접적인 증거는 아니다. 이러한 결과들을 바탕으로, 해양환경에서 발견되는 Campylobacteriales 목(Epsilonproteobacteria 강 혹은 Campylobacterota 문)에 속하는 미생물의 대사능력과 성계를 포함한 해양생물체의 성장 혹은 증식 등에 어떠한 연관이 있는지는 아직까지 알려진 바가 없어, 이들 미생물에 대한 배양, 전장유전체 및 기능적 연구가 필요하다(Hakim et al., 2021).

ASV 분석 결과

추가적으로, 최근 많이 사용되고 있는 분석 방법인 ASV 방식을 이용하여 성계 장내 미생물 군집 분석을 수행하였다. 종 다양성 지수 비교 결과 독도 그룹이 울릉도 그룹에 비해 높은 값을 나타내고 있으나, 울릉도 그룹의 SD5 샘플만 낮은 다양성 지수를 보이고 있었다(Table 1). 또한 beta-diversity를 분석하여 PCoA와 UPGMA 계통수로 나타낸 결과, 독도와 울릉도 지역별로 그룹화를 이루고 있음이 관찰되었다(data not shown).

ASV 방식을 이용하여 미생물 군집을 문과 속 수준에서 상대적 풍부도를 분석한 결과, 18개 문과 318개 속이 확인되었다. 문 수준의 분석에서 가장 높은 비율을 차지하는 문은 모든 샘플에서 Proteobacteria (39.1~53.9%)로 확인되었다. 그 뒤로 독도 그룹(SD1-4)에서는 Bacteroidetes (Bacteroidota), Firmicutes 순으로 우점하고 있었다. 울릉도 그룹에서는 SD5 샘플은 Fusobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes 순으로, SD6 샘플은 독도 그룹과 동일하게 Bacteroidetes, Firmicutes 순으로 나타났다.

속 수준의 분석에서 독도 그룹은 미분류된 속 그룹(12.85~13.76%), *Massilia*, *Asticcacaulis* 순으로 우점하고 있었다. 울릉도 그룹에서는 SD5 샘플은 *Psychrilyobacter* (32.54%), *Sulfurospirillum*, Bacteria_unclassified 순으로, SD6 샘플은 *Sulfurospirillum* (20.45%), Bacteria_unclassified, *Massilia* 순으로 우점하고 있었다.

ASV 방식을 이용한 분석 결과와 OTU 방식을 이용한 분석 결과를 비교하였을 때, 두 분석 결과가 유사한 경향을 보였다. Alpha-diversity 결과에서 Shannon, Inverse Simpson 등 다양성 지수는 두 분석 방법 모두 유사한 경향성을 보였으며, beta-diversity 결과에서 분석 방법에 무관하게 지역별로 그룹화를 이루고 있음이 관찰되었다. 또한 문과 속 수준의 분석에서는 비율의 차이는 있으나 전체적으로 유사한 분류군으로 분류된 것이 확인되었다. 따라서 분석 방법에 따라 분석 결과의 차이는 있지만, 전체적인 미생물 군집 구조는 비슷하게 나타나고 있으며, 방법론적으로 분석 결과에 유의미한 영향은 거의 없는 것으로 판단된다(Glassman and Martiny, 2018).

본 연구에서는 OTU와 ASV 방법을 통하여 성계 장내 미생물의 군집구조 등을 분석하였다. 그 결과, 샘플들의 장내 미생물 군집이 지역별로 그룹화된 것이 확인되었으며, 미분류군 그룹이 높은 비율로 존재하고 있음이 관찰되었다. 장내 미생물 군집의 그룹화는 울릉도와 독도에 서식하는 해조류의 차이에 기인할 수 있다. 다만, 울릉도와 독도 해역의 해조류 군집 등에 대한 비교 연구는 매우 제한된 내용이 발표되어 있으나, 이들 연구에 따르면 울릉도의 경우 홍조류(-64.9%)가 독도의 경우 갈조류(-67%)의 분포도가 상대적으로 높은 것으로 나타났다(Kim and Kim,

2000; Kim *et al.*, 2004, 2016). 다만, Kim *et al.* (2016)은 연구 시기, 정점 및 방법 등에 따라 해조류 출현 종수의 차이를 보이고 있어, 단순한 비교는 큰 의미가 없다고 서술한 바 있다(Kim *et al.*, 2016). 본 연구를 통하여, 해양무척추동물의 다양한 장내 미생물의 존재를 확인하였으며, 이들과 해양미생물 간 상호작용을 비롯하여 해양미생물 자원화에 대한 기초 정보로 제공될 것이다. 또한, 울릉도와 독도의 경우 해수온의 상승과 지구 온난화에 의한 수환경의 변화에 의하여 갯녹음 현상이 보고되어 있어, 급격한 해조류 군집의 변화는 이를 주식으로 하는 극피동물의 장내미생물 군집 구조의 변화에도 영향을 미칠 것으로 예상되어, 기후변화 예측 등의 생물학적 지표로 활용될 수 있을 것이다.

적 요

해양무척추동물의 일부인 극피동물은 수관계라고 불리는 특유의 세관계로 순환계와 호흡계를 구성한다. 수관계 내부에는 해수와 체강액이 섞여 흐르고 있으며, 이러한 해수의 출입을 통해 다양한 해양미생물과 접촉하며 공생 관계를 가진다고 알려져 있다. 극피동물에 속하는 성게는 국내 전연안에서 해조류를 먹고 서식하며, 갯녹음 현상의 원인이라고 알려져 있으나 관련된 생태학적 연구는 부족하다.

Operational taxonomic unit (OTU) 분석 방법을 기반으로 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하여 독도와 울릉도에 서식하고 있는 성게 여섯 마리의 장내 미생물 군집을 분석하였다. 문(phylum)과 속(genus) 수준의 분석 결과, 미분류군이 높은 비율로 존재하고 있어 성게의 장내에서 서식하는 난배양성 미생물의 존재를 예측할 수 있었으며, 울릉도에서 서식하던 성게에서는 황 화합물과 산화된 질소를 이용할 수 있는 *Sulfurospirillum* 속이 높은 비율로 존재하였다. Beta-diversity (PCoA와 UPGMA) 분석 결과, 성게의 장내 미생물 군집이 서식 지역에 따라 그룹화를 이루고 있음을 확인하였다. 또한 추가적으로 amplicon sequence variant (ASV) 분석 방법을 이용하여 성게의 장내 미생물 군집을 분석 및 비교한 결과, OTU 분석 방법의 다양성 지수값과 유사한 경향을 보였다. 본 연구를 통하여 성게 장내 미생물의 다양성과 군집 구조를 확인할 수 있었다.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the National Institute of Biological Resources funded by the Ministry of Environment (No. NIBR202206104 and NIBR 202227102).

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to report.

References

Bennett KW and Eley A. 1993. Fusobacteria: new taxonomy and related diseases. *J. Med. Microbiol.* **39**, 246–254.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JL, *et al.* 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **7**, 335–336.

Chalifour B and Li J. 2021. Characterization of the gut microbiome in wild rocky mountainsnails (*Oreohelix strigosa*). *Anim. Microbiome* **3**, 49.

Chen CY, Chen PC, Weng FC, Shaw GT, and Wang D. 2017. Habitat and indigenous gut microbes contribute to the plasticity of gut microbiome in oriental river prawn during rapid environmental change. *PLoS ONE* **12**, e0181427.

Chudasama NA, Sequeira RA, Moradiya K, and Prasad K. 2021. Seaweed polysaccharide based products and materials: an assessment on their production from a sustainability point of view. *Molecules* **26**, 2608.

Freedman AJE, Tan B, and Thompson JR. 2017. Microbial potential for carbon and nutrient cycling in a geogenic supercritical carbon dioxide reservoir. *Environ. Microbiol.* **19**, 2228–2245.

Glassman SI and Martiny JBH. 2018. Broad-scale ecological patterns are robust to use of exact sequence variants versus operational taxonomic units. *mSphere*. **3**, e00148-18.

Green GBH, Hakim JA, Chen JW, Koo H, Morrow CD, Watts SA, and Bej AK. 2021. The gut microbiota of naturally occurring and laboratory aquaculture *Lytechinus variegatus* revealed differences in the community composition, taxonomic co-occurrence, and predicted functional attributes. *Appl. Microbiol.* **1**, 201–224.

Hakim JA, Green GBH, Watts SA, Crowley MR, Morrow CD, and Bej AK. 2021. Microbial composition and genes for key metabolic attributes in the gut digesta of sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Strongylocentrotus purpuratus* using shotgun metagenomics. *Curr. Issues Mol. Biol.* **43**, 978–995.

Hakim JA, Koo H, Dennis LN, Kumar R, Ptaček T, Morrow CD, Lefkowitz EJ, Powell ML, Bej AK, and Watts SA. 2015. An abundance of Epsilonproteobacteria revealed in the gut microbiome of the laboratory cultured sea urchin, *Lytechinus variegatus*. *Front. Microbiol.* **6**, 1047.

Hakim JA, Koo H, Kumar R, Lefkowitz EJ, Morrow CD, Powell ML, Watts SA, and Bej AK. 2016. The gut microbiome of the sea urchin, *Lytechinus variegatus*, from its natural habitat demonstrates selective attributes of microbial taxa and predictive metabolic profiles. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**, fiw146.

Hu GP, Yuan J, Sun L, She ZG, Wu JH, Lan XJ, Zhu X, Lin YC, and Chen SP. 2011. Statistical research on marine natural products

- based on data obtained between 1985 and 2008. *Mar. Drugs* **9**, 514–525.
- Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, Reznik G, Los T, Lykidis A, Bhattacharyya A, Bartman A, Gardner W, Grechkin G, et al.** 2002. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J. Bacteriol.* **184**, 2005–2018.
- Kelly MW, Padilla-Gamino JL, and Hofmann GE.** 2013. Natural variation and the capacity to adapt to ocean acidification in the keystone sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Glob. Chang. Biol.* **19**, 2536–2546.
- Kim ST, Hwang K, Park GJ, and Choi CG.** 2016. Benthic algal community of Ulleungdo, East coast of Korea. *J. Korean Soc. Fish. Mar. Edu.* **28**, 83–90.
- Kim MK and Kim KT.** 2000. Studies on the seaweeds in the islands of Ullungdo and Dokdo: I. Decrease of algal species compositions and changes of marine algal flora. *Algae* **15**, 119–124.
- Kim JH, Kim YH, Kim SK, Kim BW, and Nam SW.** 2011. Properties and industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 189–199.
- Kim YS, Kim J, and Park SJ.** 2015. High-throughput 16S rRNA gene sequencing reveals alterations of mouse intestinal microbiota after radiotherapy. *Anaerobe* **33**, 1–7.
- Kim YD, Park MS, Yoo HI, Min BH, and Jin HJ.** 2012. Seasonal variations of seaweed community structure at the subtidal zone of Bihwa on the East coast of Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* **45**, 262–270.
- Kim MK, Sin JG, and Cha JH.** 2004. Variation of species composition of benthic algae and whitening in the coast of Dokdo island during Summer. *Algae* **19**, 69–78.
- King WL, Siboni N, Williams NLR, Kahlke T, Nguyen KV, Jenkins C, Dove M, O'Connor W, Seymour JR, and Labbate M.** 2019. Variability in the composition of Pacific oyster microbiomes across oyster families exhibiting different levels of susceptibility to OsHV-1 μ var disease. *Front. Microbiol.* **10**, 473.
- Koh HW, Kim MS, Lee JS, Kim H, and Park SJ.** 2015. Changes in the swine gut microbiota in response to porcine epidemic diarrhea infection. *Microbes Environ.* **30**, 284–287.
- Lau MML, Kho CJY, Lim LWK, Sia SC, Chung HH, Lihan S, and Apun K.** 2021. Microbiome analysis of gut bacterial communities of healthy and diseased Malaysian mahseer (*Tor tambroides*). *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.12.08.471852>.
- Lee YK, Lee JH, and Lee HK.** 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. *J. Microbiol.* **39**, 254–264.
- Nagaraja TG, Narayanan SK, Stewart GC, and Chengappa MM.** 2005. *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Anaerobe* **11**, 239–246.
- Pati A, Gronow S, Lapidus A, Copeland A, Glavina Del Rio T, Nolan M, Lucas S, Tice H, Cheng JF, Han C, et al.** 2010. Complete genome sequence of *Arcobacter nitrofigilis* type strain (CI^T). *Stand. Genomic Sci.* **2**, 300–308.
- Pelikan C, Wasmund K, Glombitza C, Hausmann B, Herbold CW, Flieder M, and Loy A.** 2021. Anaerobic bacterial degradation of protein and lipid macromolecules in subarctic marine sediment. *ISME J.* **15**, 833–847.
- Potrykus J, Mahaney B, White RL, and Bearn SL.** 2007. Proteomic investigation of glucose metabolism in the butyrate-producing gut anaerobe *Fusobacterium varium*. *Proteomics* **7**, 1839–1853.
- Prodan A, Tremaroli V, Brolin H, Zwinderman AH, Nieuwdorp M, and Levin E.** 2020. Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLoS ONE* **15**, e0227434.
- Roberts GL.** 2000. Fusobacterial infections: an underestimated threat. *Br. J. Biomed. Sci.* **57**, 156–162.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, et al.** 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–7541.
- Sin E, Min WG, Kim YB, and Kim TW.** 2019. Respiration of the sea urchin *Mesocentrotus nudus* in response to large temperature fluctuations. *Mar. Environ. Res.* **144**, 178–185.
- Suau A, Rochet V, Sghir A, Gramet G, Brewaeys S, Sutren M, Rigottier-Gois L, and Doré J.** 2001. *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**, 139–145.
- Thomas TR, Kavlekar DP, and LokaBharathi PA.** 2010. Marine drugs from sponge-microbe association—a review. *Mar. Drugs* **8**, 1417–1468.
- Trigueros E, Alonso-Riaño P, Ramos C, Diop CIK, Beltrán S, and Sanz MT.** 2021. Kinetic study of the semi-continuous extraction/hydrolysis of the protein and polysaccharide fraction of the industrial solid residue from red macroalgae by subcritical water. *J. Environ. Chem. Eng.* **9**, 106768.
- Wassie T, Niu K, Xie C, Wang H, and Xin W.** 2021. Extraction techniques, biological activities and health benefits of marine algae *Enteromorpha prolifera* polysaccharide. *Front. Nutr.* **8**, 747928.
- Wells ML, Potin P, Craigie JS, Raven JA, Merchant SS, Helliwell KE, Smith AG, Camire ME, and Brawley SH.** 2017. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J. Appl. Phycol.* **29**, 949–982.
- Wilkinson CR and Garrone R.** 1980. Ultrastructure of siliceous spicules and microsclerocytes in the marine sponge *Neofibularia irata* N. SP. *J. Morphol.* **166**, 51–63.
- Wilkinson CR, Nowak M, Austin B, and Colwell RR.** 1981. Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and great barrier reef sponges. *Microb. Ecol.* **7**, 13–21.
- Wirsen CO, Sievert SM, Cavanaugh CM, Molyneaux SJ, Ahmad A, Taylor L, DeLong E, and Taylor CD.** 2002. Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 316–325.