

동해 심부 퇴적물 내 메탄 대사관련 기능성 유전자
다양성 분석

Metagenomic Analysis of Deep Core Sediments Harboring
Methane Hydrate from Ulleung-Basin

한국해양연구원

한국지질자원연구원

제 출 문

한국지질자원연구원장 귀하

본 보고서를 “동해 심부 퇴적물 내 메탄대사관련 기능성 유전자 다양성 분석” 사업의 최종보고서로 제출합니다.

2011 . 11 . 30

위탁연구기관명 : 한국해양연구원

위탁연구책임자 : 이 정 현

연 구 원 : 권개경, 이진우

 " : Azizi Aqil

요 약 문

I. 제 목

동해 심부 퇴적물 내 메탄 대사관련 기능성 유전자 다양성 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

연구개발의 필요성

- 가스하이드레이트는 차세대 청정 에너지원으로 주목받는 반면, 온실효과를 일으키므로 가스하이드레이트의 개발 단계부터 생태계에 대한 영향 검토가 우선되어야 함.
- 심해 퇴적물로부터 방출되는 메탄의 80-90%가 황산염-메탄 전이대(Sulfate-Methane Transition Zone; SMTZ)에서 미생물에 의해 메탄이 소비됨.
- 메탄의 혐기적 산화 기작은 황환원 세균(Sulfate reducing bacteria; SRB)과 혐기적 고세균 메탄영양체 (Anaerobic methanotrophic archaea ; ANME)의 영양공생(syntroph)에 의하여 일어남(Hinriches and Boetius, 2002).
AOM reaction : $\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$ $\Delta G^{0'} = -16.67 \text{ kJ/mol}$
- 현재 메탄의 혐기적 산화 기작에 관한 연구는 ANME 그룹과 황환원 세균 그룹이 컨소시움을 이룬다는 것만 확인되었을 뿐 어떠한 유전자가 메탄의 혐기적 산화기작에 관여하는지 알려진 바가 거의 없음.
- AOM 기작을 통하여 얻는 에너지는 미생물이 성장하기 위한 최소의 에너지만을 제공하기 때문에 ANME 그룹의 생장은 매우 제한적임.
- 메탄의 혐기적 산화와 관련된 미생물의 기작을 이해하기 위해서는 환경유전체(Metagenome) 분석이 요구되며, 이를 통하여 메탄의 혐기적 산화 기작에 대한 궁금증을 해결할 수 있는 실마리를 마련할 수 있음.
- 동해 울릉분지에 존재하는 가스 하이드레이트 퇴적물 내 미생물 군집 변화 및 구조에 관한 연구가 필요함.
- Pyrosequencing을 통한 환경 시료의 분석은 새로운 유전자와 기능성 유전자원을 획득할 수 있으며(Schlüter *et al.*, 2008), 미생물 다양성 분석에서 높은 분석 수의 대용량 데이터를 바탕으로 높은 재현성을 보임.
- 가스하이드레이트의 개발 및 활용에 요구되는 해양생태계의 장기적 모니터링을 위해서 메탄의 생성 및 분해에 관련된 미생물 다양성과 유전적 변화의 기

초 데이터 확보가 요구됨.

연구개발의 목적

- 환경유전체 분석을 통한 메탄의 대사과정과 관련된 유전자원 탐색
- 동해 심부 퇴적토의 미생물 다양성 분석
- 기능성 유전자를 이용한 미생물의 분포 특성 분석
- 메탄의 생성 및 산화와 관련된 미생물의 분리·동정

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 메탄의 혐기적 산화에 관여하는 미생물의 다양성 규명
 - Pyrosequencing을 이용한 세균과 고세균의 다양성 확인
 - 메탄의 혐기적 산화와 관련된 Methyl coenzyme M reductase (*mcr*) 및 Dissimilatory sulfite reductase (*dsr*) 유전자의 특이성 분석
- 메탄의 혐기적 산화 기능 수행 미생물 군집의 환경유전체 분석
 - 메탄의 생성 및 산화와 관련된 미생물 염기서열 확보
 - 유전자풀의 생물 정보 및 기능 분석을 통한 functional category 작성
- 메탄의 혐기적 산화와 관련된 후보 미생물 배양

IV. 연구개발결과

- 세균 군집 분석
 - SMTZ 분획에서 δ -*Proteobacteria*의 비율이 높게 관찰되었으며, δ -*Proteobacteria*에 속하는 염기서열들은 *Desulfobacterales* 목의 황산염 환원 세균으로 확인됨.
 - *Chloroflexi* 그룹에 속하는 염기서열은 가스하이드레이트가 발견된 분획에서 우점하였으며, *Dehalococcidetes* 목의 세균들이 가스하이드레이트의 부존과 연관이 있다고 예상됨.
 - Candidate division JS1 그룹은 가스하이드레이트가 발견된 분획에서 우점하는 경향을 보임.
 - α -*Proteobacteria*에 속하는 염기서열은 표층 분획에 주로 존재하며, *Bradyrhizobium* sp.와 유연관계가 있는 세균들로서 질소 고정에 관여할 것이라 예상됨.
 - γ -*Proteobacteria*에 속하는 염기서열들은 *Chromatiales*와 *Methylococcales* 목과 유연관계가 있었으며, 황 순환과 호기적 메탄산화에 관여하는 세균으로 추정됨.

- 고세균 군집 분석
 - *Thaumarchaeota*에 속하는 혐기서열은 *Nitrosopumilus* sp.와 유연관계를 보이며, 질소 순환에 관여한다고 추정됨.
 - *Thermoplasmata* 그룹의 비율은 황산염의 농도에 따라 변화하였음.
 - MBG-B 그룹은 메탄 농도의 변화에 따라 군집에서 차지하는 비율도 변화함.
 - UBGH2-10 site의 6.1 mbsf 분획에서 1.52%의 비율로 ANME-1 그룹이 관찰되었으며, Eel River Basin에서 발견된 클론(AY714817)과 유사함.
- 황산염 환원세균과 혐기성 메탄산화 고세균의 분포 분석
 - *dsrAB* 이용한 황산염 환원세균 분석 결과, *Desulfococcus oleovorans*와 유연관계를 보이는 혐기서열이 우점함.
 - SMTZ 분획에서는 내생포자를 형성 및 에너지-보존 대사 전환능력을 가지고 있는 *Firmicute* (orthologus)-like 그룹이 관찰됨.
 - *mcrA*를 이용한 혐기성 메탄 산화 고세균 군집 분석 결과, ANME-1 그룹에 속하는 것으로 확인되었으며 Center of the Napoli mud volcano에서 분리된 HM004976 서열과 87~93%의 유연관계를 보임.
- 가스하이드레이트 퇴적물의 환경유전체 분석
 - 황산염 환원율의 측정값을 바탕으로 UBGH2-10 site의 표층과 SMTZ, high methane 분획을 선정 후 MDA 반응을 통한 전체 유전체의 증폭을 수행함.
 - 비특이적 DNA 합성과 환경유전체의 왜곡을 제거할 수 있는 적합한 실험조건을 탐색 중.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 미생물에 의한 메탄 질소 순환의 기초적 이해
- 극한 환경에 존재하는 다양한 미생물의 기능 및 역할에 관련된 학술연구의 기초 자료로 활용
- 환경유전체 분석 실험을 위한 실험 조건 확립의 기반 자료로 활용
- 환경유전체 분석을 통한 새로운 유전자의 탐색 및 활용

S U M M A R Y

I. Title

Metagenomic Analysis of Deep Core Sediments Harboring Methane Hydrate from Ulleung-Basin

II. R&D needs and goals

- Geophysical survey and drilling were conducted in Korea shows that gas hydrate naturally exists in deep sea over 1,500 m water depth in the East Sea.
- Even though, methane hydrate is used for alternative energy source in the future, it contains a high green house effect gas which is higher than 20 times of carbon dioxide.
- 80% of the CH₄ produced annually in marine sediments is consumed mostly in sulfate methane transition zone (SMTZ) by anaerobic oxidation of methane (ANME).
- The AOM reaction seems to be mediated by a consortium of anaerobic methanotroph (ANME) and sulfate-reducing bacteria (SRB).
AOM reaction : $\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O} \quad \Delta G^{\circ} = -16.67 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
- However, the principal of microbial processes and their key agents remain poorly understood.
- The metagenomic analysis provides both taxonomic and functional information, as well as the widest view of microbial community structure and genome repertoire in the environment.
- Metagenomic approach is required for understanding the AOM reaction caused by microorganisms in functional level.
- We need a detailed analysis of microbial communities in the sediments of Ulleung-Basin, since the microbial community structure is very different from the type of gas hydrate bearing sediments.

III. R&D items and scopes

- Metagenomic analysis of microbial community related with production and consumption of methane

- Microbial community analysis of Deep sea sediments in Ulleung-Basin
- Isolation and culture the microbial strains of related methane from the sediments

IV. R&D results

- Bacterial community analysis
 - The proportion of *δ-Proteobacteria* was higher in SMTZ, the sequences of *δ-Proteobacteria* was affiliated with *Desulfobacterales*.
 - *Chloroflexi* was the most predominated in gas hydrate layer and the sequences was closely related with *Dehalococcidetes*.
 - *Dehalococcidetes* might be responsible for the present of gas hydrate.
 - Candidate division JS1 was dominated in gas hydrate layer, this group was detected in marine sediment bearing high concentration of methane.
 - *α-Proteobacteria* was detected in surface layer, the sequences was belong to *Bradyrhizobium* sp. which is possibly responsible for nitrogen fixation.
 - The sequences of *γ-Proteobacteria* was affiliated with *Chromatiales* and *Methylococcales*, those two order might be involved in sulfur cycle and oxidation of methane.
- Archaeal community analysis
 - The sequences of *Thaumarchaeota* was belong to *Nitrosopumilus* sp., which involved in nitrogen cycle with *α-Proteobacteria*.
 - The proportion of *Thermoplasmata* group depend on the concentration of methane and this group might be using sulfur respiration.
 - The proportion of MBG-B group increase along with the increase of methane concentration, this group perhaps closely related with gas hydrate.
 - ANME-1 was found in the SMTZ of UBGH2-10 site, the sequences of ANME-1 group showed high similarity (99-100%) to AY714817 from Eel River Basin.
- The analysis of *dsrAB* and *mcrA*
 - *dsrAB* genes was detected mostly belong to *Desulfococcus oleovorans*, which is acetate-oxidizing SRB.
 - *Firmicute* (orthologus)-like group which is capable of making endospore and energy conserved was dominated in SMTZ.

- The sequences of *mcrA* which is belong to ANME-1 showed 87-93% similarity to HM004976 from center of the Napoli mud volcano.
- Metagenomic analysis
 - Sample selection was performed based on the result of sulfate reduction rate.
 - Since the concentration of DNA after purification was very low, so whole genome amplification was performed using MDA.

V. R&D benefits

- To understand the role of microorganisms during the methane and nitrogen cycle in gas hydrate sediment
- Proving basic data on the interpretation of the role of microorganisms in extreme environment
- Exploration and utilization of de novo genes using metagenomics

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction	10
Chapter 2. R&D status	14
Section 1. The investigation of microbial community	14
Section 2. Metagenomic approach and AOM reaction	17
Chapter 3. Results	19
Section 1. Materials and methods	19
Section 2. Results and discussion	29
Chapter 4. Achievements	54
Chapter 5. Utilization plans	55
Chapter 6. References	56

목 차

제 1 장 서론	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황	14
1절 미생물 군집 연구	14
2절 메타게놈 분석 및 메탄의 혐기적 산화 기작 이해	17
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	19
1절 연구 재료 및 방법	19
2절 결과 및 고찰	29
제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	54
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	55
제 6 장 참고문헌	56

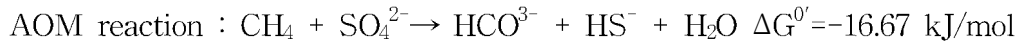
제 1장 서론

가스하이드레이트는 고압(3 MPa이상), 저온(0°C 이하) 상태에서 물의 고체상 격자 구조 안에 천연가스들이 갇혀있는 구조의 결정체로써 기화 시 발생하는 가스의 90% 이상이 메탄으로 이루어져 메탄하이드레이트라고 불린다(Keith *et al.*, 1999). 가스 하이드레이트는 매우 청정한 에너지원으로써 연소 시 1 mol 당 802 kJ의 높은 열량을 낼뿐만 아니라 이산화탄소 발생량이 기존 화석연료가 배출하는 이산화탄소의 절반에도 미치지 않는다(Matsumoto *et al.*, 1994). 우리나라에서는 지난 수년 동안 기초 탐사를 통하여 동해 울릉분지 지역의 수심 1,500 m 이상의 심해에서 약 6억 톤의 가스하이드레이트 매장 가능성을 확인하였으며(박근필, 2008), 2010년 가스하이드레이트 경제성 평가 탐사를 통하여 에너지 자원으로써의 이용가치를 확인하고 있다.

차세대 에너지원으로 주목 받고 있는 가스하이드레이트의 주성분인 메탄은 이산화탄소보다 20배 높은 지구온난화 잠재력(Global warming potential)을 가지고 있어(Kvenvolden, 1999; Mitchell *et al.*, 1989; Kreysa *et al.*, 2009) 가스하이드레이트의 개발 과정에서 일어날 수 있는 환경변화 및 생태계 파괴에 관한 우려가 증가하고 있다. 해저에 존재하는 가스 하이드레이트는 지구상에 존재하는 메탄 저장고로서의(Kvenvolden *et al.*, 1993; Gornitz and Fung, 1994) 역할을 하고 있다. 이러한 가스하이드레이트가 해리되어 해수 또는 대기 중으로 유입 될 경우, 지구기후변화와 전 지구적 탄소순환 사이클이 파괴될 위험이 크기 때문에(Nisbet, 1989; Paull *et al.*, 1991; Dickens *et al.*, 1997) 'Hydrate gun hypothesis'라고 불리는 가스하이드레이트에 의한 기후변화 및 생태계 파괴를 우려하는 목소리가 높아지고 있다(Sloan, 2003). 이외에 가스하이드레이트로 인한 급격한 지형의 변화를 우려하는 학자들도 적지 않다. 가스하이드레이트에 결합되어 있던 메탄이 갑작스럽게 방출되면 해저 산사태 또는 megaturbidities 등을 형성하여 대형 쓰나미와 같은 재앙을 불러 올 수도 있다는 연구 결과도 제시되었다(Dawson *et al.*, 1988; Young and Bryant, 1992).

가스하이드레이트는 기후 변화 및 에너지 자원으로써의 중요성뿐만 아니라 미생물과 관련된 기초학문 분야에서도 중요한 의미를 지닌다. 가스하이드레이트에서 방출되는 메탄의 80-90%는 황산염-메탄 전이대(Sulfate-methane transition zone; SMTZ)에서 미생물에 의하여 혐기적으로 산화(Anaerobic Oxidation of Methane; AOM)되는 것으로 알려져 있다(Treude *et al.*, 2005). 메탄의 혐기적 산화가 일어나는 지역에서는 퇴적토의 깊이가 증가할수록 메탄의 농도는 증가하며 황산염의 농도는 감소하는 특성을 보인다. 황산염과 메탄의 상반되는 패턴은 미생물에 의한 메탄의 혐기적 산화 기작 때문인 것으로 확인되었다. 메탄의 혐기적 산화 기작을 일으키는 미생물은 황환원 세균(Sulfate reducing bacteria; SRB)과 혐기적 고세균 메탄영양체 (Anaerobic methanotrophic archaea ; ANME)로 알려져 있으며, 두 그룹사이의 영양공생(syntroph)에 의하여 다음과 같은 기작으

로 일어나게 된다(Hinrichs and Boetius, 2002).



메탄의 혐기적 산화 반응을 통하여 미생물이 얻을 수 있는 자유에너지 값은 약 $-22 \sim -35 \text{ kJ/mol}$ 로 이는 네 분자의 양성자를 이용하여 1분자의 ATP를 생산할 수 있는 최소한의 에너지양이다. 따라서 메탄의 혐기적 산화 반응은 자연적으로는 일어나기 어려운 반응이지만 ANME 그룹과 SRB 그룹의 영양공생 관계를 통하여 에너지 불균형을 극복하게 된다(Caldwell *et al.*, 2008).

메탄의 혐기적 산화 과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 ANME 그룹은 크게 ANME-1과 ANME-2, 3 그룹으로 나뉜다. 분류학적으로 ANME-1 그룹은 *Methanosarcinales*와 *Methanomicrobiales*와 유사한 것으로 알려져 있는 반면, ANME-2 그룹은 ANME-2a, 2b, 2c 그룹으로 세분화되며 *Methanosarcinales* 그룹과 유연관계가 있는 것으로 확인되었다(Hinrichs *et al.*, 1999; Nauhaus, 2005; Knittel *et al.*, 2005; Meyerdierks *et al.*, 2010). 해양 퇴적토에서 ANME-1 그룹은 단일 세포나 단일특이성 체인(monospecific chain)의 형태를 보이며 황산염 환원 세균과 느슨한 유대관계를 이루는데 반하여 ANME-2, 3 그룹은 황산염 환원 세균과 구 모양이나 shell-type과 같은 긴밀한 관계를 가지고 있는 것으로 확인되었다(Michaelis *et al.*, 2002; Knittel *et al.*, 2005). 또한 환경의 특성에 따라 존재하는 ANME group의 종류도 달라진다는 것을 확인하였다(Knittel and Boetius, 2009)(Table 1). 황산염-메탄 전이대에는 ANME-1 group이 우점하는 반면, 상대적으로 메탄의 농도가 높은 메탄 방출 지역에서는 ANME-2 그룹과 ANME-3 그룹이 관찰되는 것을 확인하였다.

ANME 그룹과 영양공생의 컨소시움을 이루는 황산염 환원 세균은 ANME 그룹에 따라 다르다(Raghoebarsing *et al.*, 2006). ANME-1, 2 그룹은 δ -*Proteobacteria*의 황산염 환원 세균 중 *Desulfosarcina/Desulfococcus* 그룹과 컨소시움을 이루는 반면, ANME-3 그룹은 *Desulfobulbus*와 컨소시움을 이루는 것으로 확인되었다(Michaelis *et al.*, 2002; Caldwell *et al.*, 2008). ANME 그룹과 황산염 환원 세균과의 영양공생 메커니즘 및 생리적 기능 등은 아직 규명되지 않았지만 미생물 다양성 연구를 기반으로 이들의 상호관계를 추론하고 있는 실정이다.

미생물에 의한 메탄의 혐기적 산화 기작을 이해하기 위해서는 순수 배양된 ANME 그룹이 필요하나 ANME 그룹의 미생물들은 배양하기 어려운 난 배양성 미생물로서 현재까지 ANME 그룹의 배양을 성공한 사례가 없다. 따라서 이러한 난 배양성 미생물의 생리학적 특성이나 에너지, 물질대사 등의 생리·생태학적 요소를 이해하는데 더 없이 적합한 방법인 '환경에 존재하는 모든 미생물의 유전체 집합'으로 정의되는 환경유전체(metagenome) 분석을 통한 접근이 요구된다. 환경유전체 분석은 환경 시료에 존재하는 모든 유전자를 서열화하여 미생물의 분

Table 1. Overview of ANME habits (Knittel and Boetius 2009)

Character	Sampling site	ANME group					Reference
		1	2a	2b	2c	3	
SMTZ and surface sediments	Aarhus Bay sediments/ 1.56 mbsf	○					Thomsen <i>et al.</i> , 2001.
	Cascadia margin ODP204, site 1251/ 22.7 mbsf	○					Inagaki <i>et al.</i> , 2006.
	Okhotsk Sea subseafloor pelagic clay/ 14.7 mbsf	○					Inagaki <i>et al.</i> , 2003.
	Skagerrak subsurface sediments/1.39 mbsf		○			○	Parkes <i>et al.</i> , 2007.
	Skan Bay sediments	○	○			○	Kendall <i>et al.</i> , 2007.
Seeps	Eastern Mediterranean mud volcano Amsterdam sediments	○	○	○	○	○	Heijs <i>et al.</i> , 2006.
	Eastern Mediterranean mud volcano Chefren sediments		○		○	○	Omoregie <i>et al.</i> , 2008.
	Black Sea microbial mat	○					Tourova <i>et al.</i> , 2002.
	Sagami Bay sediments		○		○		Fang <i>et al.</i> , 2006.

류학적, 생리학적 정보를 제공하며, 16S rRNA 유전자의 증폭으로 인한 미생물군집의 왜곡을 막아 미생물 군집의 다양성에 관한 정확한 정보를 제공할 수 있다 (Hugenholtz and Tyson, 2008.; Biddle *et al.*, 2008). 또한 차세대 시퀀싱(Next Generation Sequencing; NGS)으로 주목 받고 있는 pyrosequencing을 통한 환경 유전체 분석은 대용량의 데이터를 바탕으로 새로운 유전자와 기능성 유전자원을 획득할 수 있다(Schlüter *et al.*, 2008). Pyrosequencing을 통한 환경 유전체 분석은 클로닝으로 인한 왜곡을 제거할 수 있어 재현성 높은 데이터를 획득할 수 있을 뿐만 아니라 한 번의 조작으로 약 400,000 read의 염기서열을 획득할 수 있어 물질 대사와 관련된 수많은 서로 다른 유전자원의 획득이 가능하다. 또한, GS FLX Titanium 454 pyrosequencer의 경우, 다른 NGS 기기들과는 달리 300 bp이상의 염기서열을 얻을 수 있기 때문에 참고유전자의 정보가 턱없이 부족한 환경 유전체분석에서 *de novo* 유전자를 찾기 가장 용이하다(Timothy and Thomas, 2007).

동해 울릉분지에는 약 6억 톤의 가스 하이드레이트가 매장되어 있을 것으로 추정하고 있으며, 2000년부터 2004년까지 동해 전 해역의 가스 하이드레이트 기초탐사 및 정밀탐사를 통하여 수심 약 1,500 m 이상의 동해지역에서 초대형 가스 하이드레이트 구조를 발견하는데 성공하였다(박근필, 2008; 이정환 외, 2009).

본 연구에서는 2010년 8월부터 9월까지 실시한 UBGH2 가스하이드레이트 탐사 기간 동안 약 250 mbsf (meters below seafloor) 길이의 가스 하이드레이트 심부 시추를 통하여 채취한 심해 퇴적토를 이용하여 미생물 군집구조에 관한 연구를 실시하였으며, 메탄 특이적 미생물의 분포를 확인하기 위하여 기능성 유전자인 *dsrAB*와 *mcrA*를 이용하였고 환경 유전체의 확보 및 분석을 통하여 메탄의 혐기적 산화와 관련된 미생물 기작을 이해하기 위한 발판을 마련하고자 하였다. 또한, 메탄 형성 및 메탄의 혐기적 산화와 관련된 미생물의 농후 배양을 위하여 다양한 조건을 적용하여 미생물의 분리를 시도하였다.

제 2장 국내외 기술개발 현황

국내에서는 주로 가스하이드레이트의 부존 여부에 관한 연구가 이루어졌으며, 2000년부터 2004년까지 동해 전 해역의 가스 하이드레이트 기초탐사 및 정밀탐사를 통하여 가스하이드레이트의 부존 가능성을 시사하는 다섯 가지 탄성과 자료인 해저모방반사면(BSR), 탄성과침니/칼럼(seismic chimney/column), 음향공백대(acoustic blanking zone), 증폭반사면(enhanced reflection), 가스 분출(gas seepage)을 모두 확인하였다(유동근 외, 2008). 또한, 수심 약 1,500 m 이상의 동해지역에서 초대형 가스 하이드레이트 구조를 발견하는데 성공하였다(박근필, 2008; 이정환 외, 2009). 2010년에는 UBGH2 가스하이드레이트 심부 시추 탐사를 통하여 동해 울릉분지에 존재하는 가스하이드레이트의 경제성 평가를 실시하는 등 동해 울릉분지에 가스하이드레이트의 부존 여부 및 경제성 평가에 관한 연구가 지속적으로 이루어졌다. 이에 반하여, 가스하이드레이트와 관련된 미생물에 관한 연구는 2007년과 2009년 동해 퇴적토를 이용하여 미생물 균집 분석을 실시한 결과가 전부이지만 황산염 환원율(Sulfate reduction rate; SRR)등과 같은 지화학적 연구를 지속적으로 수행하고 있다. Hyun 등(2009)에 의하면 울릉분지의 사면과 분지의 황산염 환원율을 비교한 결과, 사면이 분지보다 약 2배 이상 황산염 환원율이 높게 나타남을 확인하였다. 또한, 계절적 변화에서 항상 여름보다 봄에 황산염 환원율의 값이 높게 나타났으며 이는 동해의 황산염 환원작용이 수층에 존재하는 생물 유래의 유기물 양과 밀접한 관련이 있다고 주장하였다.

1절. 미생물 균집 연구

1. 가스 하이드레이트의 미생물 균집 구조

Reed 등 (2002)은 미생물 균집구조 분석으로 가스하이드레이트가 위치하고 있는 부분의 주변 퇴적토에서는 *Bacteroidetes*와 *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi* 등의 세균과 Euryarchaeota와 Crenarchaeota 도메인의 고세균 균집이 우점함을 보고하였다. Mills 등(2003)은 멕시코 만에서 채취한 시료에서 δ -와 ϵ -*Proteobacteria*, *Firmicutes*의 세균이 우점함을 확인하였으며, δ -*Proteobacteria*와 *Firmicutes*에 속하는 세균의 80% 이상은 황산염 환원 세균 그룹이었다고 보고하였다. 고세균 균집에서는 *Methanosarcinales*와 *Methanomicrobiales*, ANME 그룹이 우점함을 관찰하였으며 ANME 그룹의 대부분은 ANME-2 그룹인 것으로 보고하였다. Harrison 등(2009)은 캘리포니아의 Santa Barbara 분지에서 SMTZ 주변 퇴적토의 미생물 균집구조를 분석한 결과, SMTZ 윗부분에서는 *Planctomycetes*와 β -, γ -*Proteobacteria*의 세균들과 Euryarchaeota 도메인의 MBG-D 그룹의 고세균이 우점하는 것을 확인하였고

SMTZ 부분에서는 *δ-Proteobacteria*와 candidate division JS1 그룹, MBG-B와 ANME-1 그룹의 고세균이 우점 한다고 보고하였다.

다양한 환경조건의 가스 하이드레이트 퇴적물에서 SMTZ에 존재하는 미생물의 군집구조를 비교한 결과, 알래스카의 Skan Bay나 Peru margin, 캘리포니아의 Santa Barbara Basin, Mexico의 Gulf Basin 등의 미생물 군집은 ANME 그룹과 *δ-Proteobacteria*의 미생물 군집이 증가하는 것은 공통적으로 확인되었지만 이러한 그룹 이외의 미생물 군집은 시료마다 우점종이 다르게 관찰되었다. 세균 군집의 경우, *Planctomycetes*와 Candidate division JS1 그룹, *Chloroflexi* 문이 SMTZ 부근의 퇴적토 혹은 하이드레이트를 포함하는 퇴적토에서 공통적으로 높은 비율을 차지하였으며, 이러한 결과로 미루어 위의 세균군집들은 메탄의 혐기적 산화에 중요한 역할을 하는 세균군집이라고 추정하였다(Harrison *et al.*, 2009). 고세균 군집은 환경 조건마다 우점하는 그룹이 달랐으나 MBG-B와 MBG-D 그룹이 높은 비율을 보이는 경향은 동일하게 관찰되었다(Kendall *et al.*, 2007; Sørensen *et al.*, 2006; Harrison *et al.*, 2009; Inagaki *et al.*, 2006). *Crenarchaeota*의 MBG-B 그룹은 Peru margin (Biddle *et al.*, 2006; Sørensen and Teske, 2006)과 Santa Barbara basin (Harrison *et al.*, 2009), Marennes-Oléron Bay (Roussel *et al.*, 2009)의 SMTZ 위치에서 동일하게 관찰되었으며, *Euryarchaeota* MBG-D 그룹의 *Thermoplasmatales*는 하이드레이트를 포함하고 있는 퇴적토에서 공통적으로 관찰되었다(Inagaki *et al.*, 2006). 메탄의 혐기적 산화와 직접적으로 관련된 ANME와 황산염 환원세균 그룹의 미생물들은 가스하이드레이트를 포함하고 있는 환경에서 공통적으로 관찰되며, SMTZ의 위치 및 환경의 특성에 따라 우점하고 있는 그룹이 각각 다르게 관찰되었다.

ANME 그룹과 황산염 환원세균 그룹의 영양공생 관계에 관한 의문점을 풀기 위하여 다양한 연구가 이루어졌다. Nauhaus 등(2002)에 의하면 심해 퇴적토에 ¹³C으로 표지되어있는 메탄을 주입하고 메탄과 황산염의 농도를 측정된 결과, 1:1의 비율로 메탄과 황산염이 CO₂와 H₂S로 전환됨을 확인하였다. 또한 Orcutt와 Meile (2008)은 hydrate ridge에서 shell 형태의 ANME와 SRB 그룹의 콘소시움은 1:3의 비율로 존재함을 확인하였다. 현재까지는 두 미생물의 관계에 관한 직접적인 반응 기작을 규명하지는 못하였으나 다양한 방법을 이용하여 두 미생물 사이의 연관관계를 추론하고 있다.

가스하이드레이트를 포함하고 있는 심해 퇴적토의 미생물 다양성 분석 외에 ANME 그룹과 황산염 환원 세균의 집합체를 관찰하는 연구나, 신진대사에 따른 미생물 군집의 차이를 규명하는 연구도 활발히 진행되었다. 흑해에서 채취한 시료에서 Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)과 Scanning Electron Microscopy (SEM) 방법을 이용하여 관찰한 결과, 고세균과 황산염 환원 세균이 집합체를 이루고 있음을 관찰하였으며, 고세균 그룹 중 ANME-1, 2 그룹이 우점하고 있음을 확인하였다(Knittel *et al.*, 2005). 게다가 ANME-1 그룹은 표층부분

에서는 전체 군집의 1% 미만의 낮은 비율을 차지하지만 퇴적토의 깊이가 증가할수록 군집내의 비율이 증가하는 경향을 확인하였다. 이를 바탕으로 ANME-1 그룹은 ANME-2 그룹에 비하여 산소에 더 민감하여 절대 혐기성의 조건에서만 발견된다고 주장하였다. Mills 등(2005)은 가스하이드레이트 퇴적물의 DNA와 RNA를 추출하여 세균과 고세균의 군집을 분석한 결과, *δ-Proteobacteria*의 비율이 16S rDNA에서 유래된 군집 (20-27%)보다 16S rRNA에서 유래된 군집 (86-90%)이 약 4배 이상 높게 나타났으며, 이는 황산염 환원 기작이 일반적인 16S rDNA 유래의 분석 결과보다 높음을 확인하였다. 황산염 환원 세균 그룹과 ANME 그룹에 존재하는 특이적인 유전자인 Dissimilatory sulfite reductase (*dsr*)와 Methyl coenzyme M reductase (*mcr*) 유전자를 이용하여 가스 하이드레이트 내에서 미생물 군집의 변화를 관찰하는 연구도 진행되었다. *dsrA*와 *mcrA* 유전자는 황산염 환원 세균과 methanogen에 특이적인 유전자인 동시에 각 분류군에서 중요한 기능을 담당하는 중요 유전자이며, 하나의 세포 당 한 copy만을 가지고 있기 때문에 환경에 존재하는 세포수를 정량적으로 측정할 수 있다는 장점이 있다. Wilms 등(2007)은 황산염과 메탄의 농도에 따라 미생물 군집이 변하는 것을 확인하였으며, SMTZ이라 예상되는 위치의 미생물 군집은 다른 위치의 군집과는 확연한 차이를 보이는 것을 관찰하였다. 황산염 환원 세균의 DGGE profile을 분석한 결과, 이러한 군집의 변화는 *Desulforhopalus*와 *Desulfobacca*, *Desulfonatronum* 속에 속하는 황산염 환원 세균에 의한 것이라고 주장하였다. Leloup 등(2007)은 *dsrAB* 유전자를 이용하여 해저 퇴적물에서 황산염 환원 세균의 개체수를 정량적으로 측정하였다. 0-150 cmbsf의 황산염 지역과 250-400 cmbsf의 메탄 지역에서는 총 세균 개체수에서 황산염 환원 세균의 개체수가 차지하는 비율이 10% 내외였던 것에 반하여 200-250 cm의 SMTZ에서는 15-35%의 높은 비율을 보이는 것을 확인하였다.

Nunoura 등(2006)은 일본의 남해 해구의 메탄 방출 지역에서 약 25 cmbsf 깊이의 시료를 채취하여 *mcrA* 유전자를 이용한 methanogen의 수를 정량적으로 측정하였다. ANME-1 그룹은 표층에서 6.2×10^7 /g의 세포수가 존재하는 반면, 25 cm의 깊이에서는 7.3×10^8 /g까지 증가하였으며 ANME-2 그룹의 개체수는 ANME-1 그룹에 비하여 상대적으로 적다고 보고하였다. 따라서 이러한 차이는 ANME-1, 2 그룹의 산소 민감도와 황산염 환원 세균과의 집합체 형성에 기인한다고 주장하였다. 이러한 결과는 Knittel 등(2004)과 동일한 결과로써 ANME 그룹의 분류에 따른 생리학적 특성을 나타내고 있다.

2절. 환경유전체 분석 및 메탄의 혐기적 산화 기작 이해

1. 환경유전체를 이용한 분석

Hoehler 등(1998)은 메탄의 혐기적 산화가 메탄 형성 반응의 역반응(reversal methanogenesis)을 통하여 일어난다고 가정하였으며, 이러한 반응은 메탄 형성 반응에 사용되는 효소와 매우 유사한 효소 및 동일한 기작 반응을 통하여 일어난다고 제안하였다. Biddle 등(2008)은 Peru margin의 ODP site 1229에서 심해 퇴적물의 황산염 환원 구간과 메탄 생성 구간의 퇴적토를 이용하여 약 61.9 Mb의 염기서열을 획득하여 분석하였다. 표층에서는 약 20%정도 차지하던 Crenarcheota 그룹이 시료의 깊이가 깊어지면 50-80%까지 차지하는 것으로 미루어 심해 심부 퇴적물은 매우 제한적인 미생물만이 성장할 수 있는 극한의 환경이라 제안하였다.

Meyerdierks 등(2010)은 Black Sea에서 methanotrophic bacterial mat를 이용하여 환경유전체 분석을 실시하였다. 포스미드 라이브러리를 구축하여 총 3.4 Mb의 염기서열을 획득하였으며 획득된 염기서열의 82-90%가 ANME-1 그룹의 유전체임을 확인되었다. 또한, 아세테이트와 포름산의 전자를 운반할 수 있는 운반체를 발견하였으며, [NiFe]-hydrogenase를 대체하는 [FeFe]-hydrogenase와 상동성이 있는 유전자가 존재함을 확인하였다. 환경유전체 분석을 통하여 나타난 결과를 바탕으로 메탄의 혐기적 산화 과정의 기작에 관한 draft pathway를 작성하였으며, ANME 그룹과 황산염 환원 세균 그룹의 영양공생 관계에서 전자가 직접적으로 ANME 그룹으로부터 c-type cytochrome을 통하여 황산염 환원 세균으로 그룹으로 전달된다는 이론을 제안하였다.

메탄의 혐기적 산화 이외에 ANME 그룹에 의한 질소 순환에 관한 연구도 진행되었다. Miyazaki 등(2009)은 심해 퇴적토의 메탄 방출 지역에서 ANME-2 그룹으로부터 유래된 *nifH* (nitrogen fixation enzyme) 유전자를 분석하였으며, ANME-2c 그룹의 고세균은 심해 퇴적토의 표층에서 탄소 순환뿐만 아니라 질소고정과 같은 질소 순환에도 중요한 역할을 한다고 제안하였다.

2. 메탄형성 및 산화에 관한 연구

Caldwell 등(2008)은 메탄농도가 높은 환경에서 메탄 산화 고세균에 의해 메탄 형성 역 반응이 발생한다고 주장하였으며 반응 중 형성되는 물질에 따라 아세테이트와 메탄올, 포름산 형성반응으로 구분하였다. 아세테이트 형성반응은 *Methanosarcinales*에 의해 일어나는 반응으로 두 분자의 메탄으로부터 아세테이트와 수소를 생산하고 생산된 수소와 아세테이트는 *Desulfosarcina*와 *Desulfococcus* 그룹과 같은 황산염 환원 세균에 의해 전자 공여체로 사용된다. 메탄올 형성반응은 한 분자의 메탄으로부터 한 분자의 메탄올을 생성하며 *Methanosarcinales*만이 중간물질로 메탄올을 형성하는 것으로 알려져 있다

(Hinrichs and Boetius, 2003). 포름산 형성 반응은 한 분자의 메탄으로부터 네 분자의 포름산을 형성하며 *Methanobacteriales*와 *Methanococcales*에 의해 이러한 반응이 형성되는 것으로 알려져 있다.

Welander 등(2008)은 이미 배양된 고세균인 *Methanosarcina barkeri*의 특정 유전자를 결손 시켜 메탄의 생성과 메탄의 산화 기작에 대하여 연구하였다. Methyl-tetrahydromethanoprotein (H_4MPT):coenzyme M (CoM) methyltransferase-encoding operon (Δmtr)과 methylene- H_4MPT reductase-encoding gene (Δmer), methylene- H_4MPT dehydrogenase-encoding gene (Δmtd), formyl-methanofuran: H_4MPT formyl-transferase-encoding gene (Δftr)을 결손 시킨 결과, 메탄올이나 H_2/CO_2 를 기질로 이용하지 못하였으며 위 유전자들은 탄소 하나짜리 물질(C1 compound)의 산화와 환원에 관련된 유전자임을 확인하였다. 특히, *mtd*와 *ftr* 유전자를 결손 시킨 경우, 메탄올을 이용하여 메탄을 생산하지는 못하지만 *mtr*과 *mer* 유전자만을 결손 시켰을 때에는 메탄올을 기질로 이용하여 메탄을 생산하였다. 따라서 메탄생성 기작에 네 종류의 유전자 모두 중요하나 *mtr*과 *mer* 유전자가 결손 되었을 때에는 이를 대신할 수 있는 새로운 반응이 존재함을 보고하였다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

1절 연구 재료 및 방법

1. 시료 채취 및 전처리

2010년 8월 8일부터 동년 9월 30일까지 약 54일 동안 한국지질자원연구원은 영국 심해시추선인 'Fugro synergy호'를 이용하여 동해안 일대의 가스 하이드레이트 시추탐사를 실시하였다(Fig. 1). 드릴링 쉽(drilling ship)을 이용하여 해저 표면으로부터 약 250 mbsf 깊이까지의 심부시추를 진행하였으며, 총 10개의 site 중 UBGH2-1_1 site와 UBGH2-3, UBGH2-7, UBGH2-10 4개의 site는 미생물 분석을 실시하였다. 확보된 코어는 선상에서 깊이에 따라 20 cm씩 절단하였으며, 혐기성 및 호기성 미생물의 배양과 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), 미생물 다양성 분석, 환경유전체 분석을 위해 절단된 코어를 실험실로 옮겨 각 실험의 목적에 따라 소분 및 전 처리하였다.

2. 동해 울릉분지 심부 시추 퇴적물 확보

미생물 분석을 위한 네 site의 심부 퇴적토 중 UBGH2-1_1과 UBGH2-10은 일반적인 심부 퇴적물로서 시료의 회수가 원활히 이루어진 반면, UBGH2-3과 UBGH2-7은 표층에 가스 하이드레이트가 존재하는 vent site로 코어 회수과정 중 가스 하이드레이트의 해리로 인해 시료의 회수가 원활히 이루어지지 않았다.

UBGH2 가스 하이드레이트 심부 시추를 통하여 환경 유전체 분석을 위한 시료와 메탄 특이적 미생물의 분리를 위한 냉장 시료, 미생물의 분포 형태를 확인하기 위한 FISH 시료, 호기적, 혐기적 미생물 배양을 위한 시료를 확보하였으며, 심해 퇴적물 시료에서 미생물 분석 시료 선정을 위한 메탄과 황산염 농도 변화는 한국지질자원연구원의 지화학팀과 협업하여 프로파일을 구축하였다. 심부 시추 퇴적물의 메탄과 황산염 프로파일을 기반으로 시료를 선정하였다.

UBGH2-1_1에서 표층부터 217 mbsf까지의 시료 중 환경유전체 분석을 위한 심부 퇴적토 시료 74개와 FISH 시료 51개, 배양 시료 43개를 확보하였다. UBGH2-3에서는 0-105 mbsf의 심해 퇴적물 중 심부 퇴적토 시료 15개, FISH 시료 13개, 배양시료 24개를 확보하였으며, UBGH2-7에서는 심부 퇴적토 시료 21개와 FISH 시료 13개, 균주 분리용 시료 26개를 0-236 mbsf까지의 심부 시추 퇴적물에서 확보하였다. UBGH2-10에서는 58개의 심부 퇴적물 시료와 혐기적 배양을 위한 7개의 시료를 확보하였다.

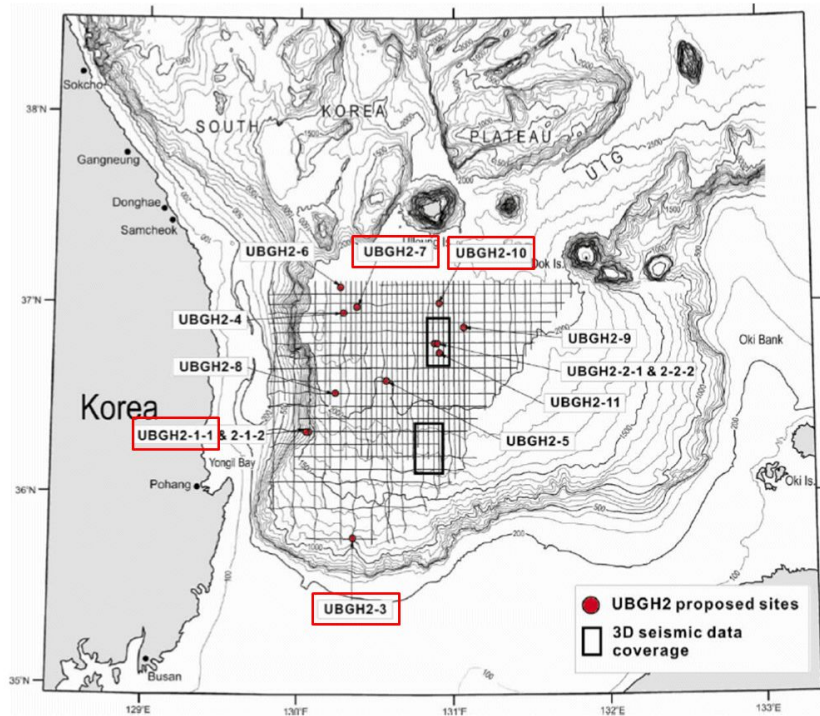


Fig. 1. Map of UBGH2 sampling area and sampling sites in the Ullung-basin, East Sea. The red box indicated sampling site for microbial analysis

3. 가스하이드레이트 퇴적물의 미생물 다양성 분석

미생물 다양성 및 환경유전체분석을 위하여 선상에서 획득한 각 분획의 시료는 오염가능성을 제거하기 위하여 PVC와 접촉한 상부와 하부 1-2 cm 부분과 분획의 가장자리 부분을 제거한 후 멸균된 용기에 담아 실험실에서 분석 전까지 -80℃에서 보관하였다.

가. Genomic DNA 추출

UBGH2-1_1과 UBGH2-10 site에서 각각 15개와 12개 분획에서 genomic DNA를 추출하였다. Genomic DNA 추출방법은 Hurt 등(2001)의 방법을 변형하여 수행하였다. 각각의 시료 약 8 g을 멸균된 막자사발로 옮긴 후 퇴적토를 2 ml의 denaturing 용액(1 mM EDTA, 4 M guanidine isothiocyanate, 10 mM Tris HCl [pH 7.0], 0.5% 2-mercaptoethanol)과 액체 질소를 첨가해 냉각시켰다. 퇴적토는 물리적인 힘을 가해 파쇄하고, 다시 냉각시키는 과정을 3회 반복한 후 50 ml 튜브에 옮겨 담아 9 ml의 extraction 완충액(100 mM sodium phosphate [pH 7.0], 100 mM Tris HCl [pH 7.0], 100 mM EDTA [pH 8.0], 1.5 M NaCl, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide [CTAB], 2% SDS)을 첨가하였다. 파쇄액이 포함된 완충액을 교반한 후 65℃에서 2시간동안 반응시키며 매 10분마다 교반하였다. 파쇄액을 1,800 x g 에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 회수한 후 동량의 chloroform:isoamylalcohol (24:1)을 첨가하였다. 1,800 x g에서 30분간 원심 분리한 후 상등액을 취하였으며, 상등액 부피의 0.6배 isopropanol을 첨가하고, 상온에서 한 시간 반응시켜 핵산을 침전시켰다. 1,800 x g에서 20분간 원심 분리하여 얻은 침전물에 70% ethanol 용액을 첨가해 세척하고, 자연건조 한 후 1 ml의 멸균한 TE 완충용액(20 mM Tris HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0])에 침전물을 녹였다. 추출된 genomic DNA로부터 PCR 저해 성분인 부식산(humic acid)을 제거하기 위해 QIAamp DNA micro kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용해 정제 후 -20℃에 보관하였다. 정제된 genomic DNA는 0.8% agarose gel과 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen-Molecular Probes, USA)를 이용하여 정량하였다(Table 2 and 3).

나. Pyrosequencing

각 시료에 존재하는 세균과 고세균의 군집 구조를 확인하기 위하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. Primer set은 이후 진행될 pyrosequencing 단계에서 시료를 구분하기 위하여 'barcode' 혹은 'tag' (4-8 bp의 염기서열이 AC linker에 의해 primer에 결합되어 있는 표시자)가 붙어있는 primer set을 사용하였다(Table 4 and 5).

PCR 조건은 주형 DNA 10-100 ng, 0.2 mM dNTPs, 0.1% Bovain Serum Albumin (Roche, Germany), 5% Dimethyl Sulfoxide (Sigma, USA), 0.2 μM

Table 2. Concentration of extracted genomic DNA in UBGH2-1_1 site

Site	Section	Depth (mbsf)	Sediment wet weight (g)	Before purification			After purification			Character
				Conc. of genomic DNA (ng/ul)	Elution vol. (ul)	Total genomic DNA (ng)	Conc. of genomic DNA (ng/ul)	Elution vol. (ul)	Total genomic DNA (ng)	
UBGH2-1_1	1H-1a	0.1	8.67	130.00	60	7,800	2.73	30	81.9	Surface
	1H-1c	0.4	8.66	502.50	60	30,150	4.73	30	141.9	
	1H-3g	3.9	8.43	45.25	60	2,715	1.99	30	59.7	Above SMTZ
	1H-5e	8.8	8.41	7.55	60	453	2.32	30	69.6	
	2H-2b	12.8	8.49	11.40	60	684	1.22	30	36.6	SMTZ
	2H-4b	15.8	8.41	5.87	60	3,522	1.81	30	54.3	
	5H-2b	36.8	8.09	5.31	60	318.6	0.92	30	27.6	High methane (109.13 mM)
	12H-4c	94.6	8.30	3.75	60	224.7	1.98	30	59.4	Sand layer (30%)
	13H-2b	100.1	8.42	3.35	60	200.7	1.85	30	55.5	Hydrate (GS: 22%)
	23H-2b	132.8	8.13	3.76	60	225.6	1.77	30	53.1	Hydrate (GS: 43%)
	23H-3d	134.6	8.18	4.56	60	273.6	2.59	30	77.7	Hydrate (GS: 43%)
	26H-3a	158.3	8.08	3.82	60	229.2	2.28	30	68.4	High methane (32.51 mM)
	29H-2b	186.2	8.06	1.44	60	86.4	0.91	30	27.3	Middle deep sediment
	32H-3b	214.9	8.07	3.46	60	207.6	1.8	30	54.0	Deep sediment
32H-5b	217.9	8.38	2.45	60	146.7	1.16	30	34.8		

Table 3. Concentration of extracted genomic DNA in UBGH2-10 site

Site	Section	Depth (mbsf)	Sediment wet weight (g)	Before purification			After purification			Character
				Conc. of genomic DNA (ng/ul)	Elution vol. (ul)	Total genomic DNA (ng)	Conc. of genomic DNA (ng/ul)	Elution vol. (ul)	Total genomic DNA (ng)	
UBGH2-10	1H-1d	0.8	170.3	55.9	1,500	83,850	27.08	178	4,820	Surface
	1H-4f	5.7	255.0	54.4	880	47,872	-		-	
	1H-5a	6.1	253.9	58.9	880	51,832	-		-	
	1H-5c	6.4	377.0	55.4	2,120	117,448	-		-	SMTZ
	1H-5e	6.8	259.0	47.3	1440	68,112	18.36	200	3,670	
	3H-2c	24.7	30.6	-	3,000	-	7.94	40	317.6	middle deep sediment
	7H-3a	77.7	275.2	1.03	800	825.6	-	-	-	High methane (40.45 mM)
	14H-5b	109.2	30.2	-	3,000	-	0.15	40	6.0	Animal sample
	16H-4b	126.3	31.7	-	3,000	-	1.68	40	67.2	Middle deep sediment
	7H-5c	141.1	29.4	-	3,000	-	0.1	40	4.0	
	11H-2b	171.6	31.7	-	3,000	-	1.24	40	49.6	High methane (41.33 mM)
	15H-5a	203.9	31.2	-	3,000	-	0.12	40	4.8	Deep sediment

Table 4. Multiplex identifier (tag or barcode) sequences used for bacterial community and number of total reads in gas hydrate bearing sediments

Site	Section	Depth (mbsf)	Bacterial barcode sequence			Total reads
			Conc. of PCR product (ng/ul)	Reverse	Sequence (5'-3')	
UBGH2-1_1	1H-1a	0.1	118.4	B16-7-1	TCGTCAT	2,102
	1H-1c	0.4	140.3	B16-7-4	AGAGCTG	2,481
	1H-3g	3.9	129.9	B16-7-7	TCAGATG	2,478
	1H-5e	8.8	95.6	B16-7-8	CGATGAG	2,185
	2H-2b	12.8	86.7	B16-7-12	TCTGCAG	2,044
	2H-4b	15.8	97.3	B16-7-13	AGCGATG	558
	5H-2b	36.8	101.5	B16-8-3	ATGCTGAG	833
	12H-4c	94.6	11.6	B16-8-18	ATCGTGTG	3,806
	13H-2b	100.1	116.7	B16-8-21	CTACACAG	711
	23H-2b	132.8	43.2	B16-8-24	TAGCTACG	3,136
	23H-3d	134.6	44.8	B16-8-27	TCGAGTAG	2,058
	26H-3a	158.3	22.4	B16-9-4	CGTGTA CTG	5,123
	29H-2b	186.2	21.8	B16-9-5	CTGTCTACG	3,999
	32H-3b	214.9	58.8	B16-9-8	AGTCACTAG	8,598
32H-5b	217.9	38.2	B16-9-12	AGCTCACTG	5,626	
Total reads						45,738
UBGH2-10	1H-1d	0.9	22.1	B16-9-15	ATACGTACG	4,839
	1H-4f	5.7	79.7	B16-9-21	CACTATGTG	3,614
	1H-5a	6.1	81.3	B16-10-1	CACACGATAG	951
	1H-5c	6.5	27.8	B16-10-2	ATGTGTCTAG	3,615
	1H-5e	6.8	60.5	B16-10-3	ATGTACGATG	5,617
	3H-2c	24.8	15.1	B16-10-4	ATCGTCTGTG	3,093
	7H-3a	77.8	48.4	B16-10-5	ATCGTAGCAG	2,135
	14H-5b	109.3	65.8	B16-11-1	TCATATACGCG	1,888
	16H-4b	126.3	89.1	B16-11-2	TAGATAGTGCG	10,346
	7H-5c	141.2	35.5	B16-11-3	ACGTCTCTACG	8,110
11H-2b	171.6	151.3	B16-11-6	ATACACGAGCG	14,792	
15H-5a	203.9	108.8	B16-11-23	CTCGATAGACG	951	
Total reads						60,231

Table 5. Multiplex identifier (tag or barcode) sequences used for archaeal community and number of total reads in gas hydrate bearing sediments

Site	Section	Depth (mbsf)	Archaeal barcode sequence			Total reads
			Conc. of PCR product (ng/ul)	Reverse	Sequence (5'-3')	
UBGH2-1_1	1H-1a	0.1	32.5	A16-7-11	TCGTCAT	3,540
	1H-1c	0.4	17.9	A16-7-18	AGAGCTG	1,315
	1H-3g	3.9	65.5	A16-7-19	TCAGATG	3,981
	1H-5e	8.8	40.3	A16-7-22	CGATGAG	1,693
	2H-2b	12.8	40.6	A16-7-25	TCTGCAG	619
Total reads						11,148
UBGH2-10	1H-1d	0.9	17.9	A16-9-20	ATACGTACG	1,693
	1H-4f	5.7	30.5	A16-9-24	CACTATGTG	683
	1H-5a	6.1	40.6	A16-10-55	CACACGATAG	1,707
	1H-5c	6.5	72.1	A16-10-56	ATGTGTCTAG	2,257
	1H-5e	6.8	122.5	A16-10-57	ATGTACGATG	858
Total reads						7,198

primer, 1 x Ex Taq buffer, 1.0 U Ex Taq polymerase (Takara, Japan)를 첨가하여 전체 증폭 반응물의 부피가 30 ul 용량이 되도록 하였다. 핵산 증폭기 모델 T1 Thermocycler (Biometra, Germany)를 이용해 94°C에서 5분간 반응 후, 94°C에서 60초, 55°C에서 60초, 72°C에서 90초씩 30회 반복하였고, 마지막에 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. PCR 산물을 분석하기 위해 0.8% agarose gel에 PCR 반응액 5 μ l를 전기영동(TAE 완충용액, 100 V/cm)하여, EtBr (0.5 ug/ml)에 10분간 염색하고 15분간 탈색한 후 UV Illuminator (SeouLin, Korea)로 관찰하였다. 증폭된 500 bp 크기의 DNA 절편은 AccuPrep® PCR Purification system (Bioneer, Korea)을 이용하여 정제하였고, 최종 부피는 30 ul가 되게 하였다. 증폭된 PCR 산물은 정량 분석을 위해 1.5% agarose gel과 NanoDrop (Nanodrop, USA)을 사용했고, 최종 확인 된 PCR 산물은 -20°C에 보관하였다.

Pyrosequencing은 (주)천랩(Chunlab, Korea)에 의뢰하여 GS FLX Titanium 454 (Roche, Germany) sequencer의 사용법에 따라 염기서열을 획득하였다. 각기 다른 barcode가 결합되어 있는 primer로 PCR을 수행한 37개의 PCR 산물을 동량 섞은 후 단일가닥 DNA 한 분자를 'DNA capture bead'에 고정시킨다. 단일가닥 DNA가 고정된 DNA capture bead는 emulsion-based clonal amplification (emPCR) 과정을 거쳐 한 종류의 DNA가 결합되어있는 bead를 제작한다. 이렇게 제작된 다수의 bead들은 PicoTiterPlate의 각 well에 들어가 증폭과정을 거치며 발생하는 형광을 측정하여 염기서열을 획득하였다.

다. 데이터 분석

Pyrosequencing을 통해 획득한 각 시료의 염기서열을 barcode를 이용하여 시료별로 분류한 다음 barcode와 primer 서열을 제거하였다. 각각의 염기서열의 길이를 확인한 후 분석의 정확도를 높이기 위하여 300 bp보다 짧거나 16S rDNA 서열이 아닌 염기서열은 분석에서 제외하였다. 이러한 선별과정을 거친 염기서열은 EzTaxon-e database (<http://www.eztaxon-e.org>)의 BLASTN 알고리즘을 이용하여 각 클론의 염기 서열에 대한 검색을 실시하였으며, 97% 이상의 염기서열 유사도를 보이는 균주 및 비배양 클론의 염기서열을 취하여 문 및 강 수준에서 분석하였다. 각각의 염기서열은 pyrosequencing 데이터 분석 프로그램인 CLcommunity Ver. 2.58 (Chunlab, Korea)를 이용하여 분석을 진행하였다.

4. 황산염 환원세균과 혐기성 메탄산화 고세균의 분포 분석

UBGH2-10 site의 표층(0.8 mbsf)과 SMTZ (6.8 mbsf) 시료 속에 존재하는 황산염 환원세균의 dissimilatory sulfite reductase AB (*dsrAB*) 유전자를 증폭하기 위하여 *dsrAB* 서열의 primer DSR1F (5'-ACS CAC TGG AAG CAC G-3')와 DSR1334R (5'-TYT TCC ATC CAC CAR TCC-3')을 사용하였다. PCR 반응

은 95°C에서 5분간 초기 열처리한 후, 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 35회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. 시료 속에 존재하는 메탄산화세균의 Methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) 유전자를 증폭하기 위하여 *mcrA* 서열의 primer MLf (5'-GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC-3')와 MLr (5'-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT-3')을 사용하였다. PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 초기 열처리한 후, 95 °C에서 30초, 50 °C에서 30초, 72 °C에서 30초씩 40회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동 하여 확인하고, PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA)로 PCR product를 정제 및 농축하였다.

*mcrA*와 *dsrAB*의 PCR 산물은 SolGent T-blunt vector (SolGent, Korea)를 이용하여 ligation한 후 *E. coli* DH10B에 Sambrook과 Russell (2001)의 방법에 따라 형질전환 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 ug/ml의 ampicillin, 40 ug/ml의 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside), 40 ug/ml의 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)을 첨가하여 37°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 재조합 클론들은 blue-white colony 선별법에 의해 시료 당 약 100개씩을 선별한 후 T-blunt vector에 존재하는 염기서열에 상보적인 M13R (5'-GTC CTT TGT CGA TAC TG-3') primer와 각각 PCR 산물에 사용된 MLf primer, DSR1F primer를 사용하여 direct amplified PCR을 수행하여 방향성을 확인하였다.

선별된 재조합 클론들은 ABI 3730XL Capillary DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 분석하였다. 또한, 각 유전자의 clone library의 다양성 지수로 Shannon-Weiner diversity index (H), Simpson dominance index (D)를 계산하였다.

mcrA 유전자와 *dsrAB* 유전자 library 클론의 염기서열과 GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)의 database로부터 확인된 염기서열을 ClustalX (version 1.83) 프로그램을 이용하여 정렬하였다. 정렬된 염기서열은 PHYLIP package (version 3.69)를 이용하여 Jukes & Cantor distance model과 neighbor-joining method에 의해 염기서열간의 진화적 거리와 계통도를 추론하였다.

5. 가스하이드레이트 퇴적물의 환경유전체 분석

가. 환경유전체 분석을 위한 genomic DNA의 추출 및 정제

환경유전체 분석을 위한 genomic DNA는 Hurt 등(2001)의 방법을 변형하여 UBGH2-10 site의 1H-1d (표층 분획; 0.8 mbsf), 1H-5e (SMTZ 분획; 6.8

mbsf), 7H-3a (High methane zone; 77.78 mbsf) 총 3개 분획에서 추출하였다. 환경유전체 분석을 위해서는 높은 순도(A260/280 1.8이상)를 가진 5.5 ug 이상의 DNA가 요구된다. 따라서 퇴적토에서 genomic DNA를 추출 후 균집분석용의 DNA와는 다른 방법을 이용하여 DNA 정제를 실시하였다. 추출된 DNA는 Herrick 등(1993)의 방법에 따라 polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (Sigma, USA)를 이용하여 정제하였다. PVPP는 환경에서 추출한 DNA에 존재하는 humic acid 등의 불순물을 잡아 전기영동 시 DNA와 함께 떨어져가지 못하도록 하는 역할을 한다. 0.7% agarose gel에 1%의 PVPP 를 첨가하여 gel을 제작한 후 DNA를 loading 할 부분의 2-3 cm 정도만을 남기고 남은 부분은 제거하였다. NuSieve® GTG® Agarose (Cambrex, USA)를 이용하여 0.6%의 low-melting agarose gel을 제작한 후 1%의 PVPP gel의 남은 부분에 부어 온전한 gel을 제작하였다. 제작된 gel의 각 well 당 80 ul의 DNA를 loading dye와 함께 섞어 loading 한 후 15V, 1시간동안 전기영동 한 후 30V 16시간동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 size marker 부분만을 잘라 EtBr 염색 후 DNA를 확인하였으며, 4-23 kb 크기의 DNA가 위치하는 gel을 잘라 DNA elution을 수행하였다.

Low-melting agarose gel을 70°C에서 10분간 방치하여 gel을 녹인 후 45°C에서 1 unit의 gelase (Epicentre, USA) 첨가 후 2시간동안 방치하며 agarose gel을 분해하였다. gelase 처리가 완료된 시료는 최종 농도가 0.5 M이 되도록 5 M ammonium acetate를 첨가하고 2배 볼륨의 100% ethanol을 첨가하여 15시간 이상 상온에서 DNA를 침전시켰다. 1,800 x g로 30분간 원심 분리하여 DNA를 회수 한 후, 상온에서 건조하였다. 건조된 DNA는 TE buffer에 녹인 후 -20°C에 보관하였다.

나. Whole genome amplification (WGA)

환경 유전체 분석을 위하여 시료속의 전체 유전자를 비특이적으로 증폭하는 multiple displacement amplification (MDA)를 진행하였다. RFPLI-g Screening kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 사용법에 따라 MDA를 수행하였다. 10 ng 이상의 정제된 genomic DNA를 1.5 ml e-tube 혹은 PCR tube에 첨가한 후 17 ul의 SB1 buffer를 첨가한다. Genomic DNA와 SB1 buffer를 잘 섞어준 후 65°C에서 5분간 반응시켜 genomic DNA를 denaturation 시킨다. 반응이 완료된 DNA는 상온에서 식힌 후 17 ul의 SB2 buffer와 1 ul의 REPLI-g Mini DNA polymerase (Φ 29 polymerase)를 첨가한다. 30°C에서 10-16시간 동안 증폭 반응시킨 후 65°C에서 3분 동안 REPLI-g Mini DNA polymerase를 불활성화 시켰다. 반응이 완료된 genomic DNA는 0.8% agarose gel을 이용하여 확인한 후 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen-Molecular Probes, USA)를 이용하여 정량하였다.

2절. 결과 및 고찰

1. 가스 하이드레이트 퇴적물의 미생물 군집 분석

가. 16S rRNA 유전자를 이용한 미생물 군집 분석

가스 하이드레이트를 포함하고 있는 UBGH2-1_1과 UBGH2-10 site에서 채취된 퇴적물의 세균 군집을 분석하였다. 미생물 군집 분석을 위한 시료는 메탄 및 황산염의 농도 변화와 가스하이드레이트의 존재 등 지화학적 조건에 따라 미생물 군집의 변화를 관찰할 수 있을 것이라 예상되는 시료들을 선별하였다. 두 종류의 코어에서 황산염과 메탄의 농도를 고려하여 표층부터 약 200 mbsf까지 시료를 선정하여 genomic DNA를 추출하였으며, UBGH2-1_1 site의 경우 시료의 깊이가 증가할수록 시료 1 g 당 추출되는 DNA의 양이 줄어드는 경향을 보였다 (Table 2). 높은 압력과 높은 메탄 농도 등 미생물이 증식하기에 불리한 환경이기 때문에 미생물의 개체수가 낮아 추출된 DNA의 농도도 낮은 것이라 추정된다. GS FLX Titanium 454 (Roche, Germany) sequencer를 이용하여 획득한 염기서열들은 Eztaxon-e database를 이용하여 보고된 서열들과 97% 유사도를 기준으로 각 염기서열의 계통분류를 분석하였으며, 분석된 염기서열들은 문(phylum)과 강(Class) 수준에서 분석하였다.

(1) UBGH2-1_1 site의 미생물 군집 분석

(가) 세균 군집 분석

UBGH2-1_1 site의 심해 퇴적토의 15개 분획으로부터 pyrosequencing을 이용하여 총 45,738개의 세균 16S rDNA 염기서열 가닥을 획득하였다. 대부분의 염기서열들은 환경시료에서 분자생물학적 방법으로만 관찰되는 분리·동정되지 못한 난배양성 미생물로 확인되었다. 세균의 염기서열을 문과 강 수준에서 분석한 결과, α -, γ -, δ -*Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Candidate division JS1* 등 다양한 문에 속하는 염기서열들이 관찰되었다(Fig. 2).

α -*Proteobacteria*에 속하는 염기서열들은 표층(0.1-3.9 mbsf) 분획에서 7.77-2.66%의 비율로 존재하다가 8.8-36.8 mbsf의 SMTZ와 high methane 분획에서는 약 20%정도의 비율을 유지하였다. 이후 분획에서는 시료의 깊이가 증가할수록 α -*Proteobacteria*의 비율도 감소하는 경향을 보였다. α -*Proteobacteria*의 염기서열들은 대부분 *Rhizobiales* 목으로 확인되었다(Table 6). *Rhizobiales* 목의 80% 이상은 *Bradyrhizobium* sp.에 속하였다. *Bradyrhizobium* sp.의 세균은 대기 중이나 환경 내에 존재하는 질소를 암모니아(NH₃)나 암모늄(NH₄⁺)으로 고정하는 역할을 하며, *nif* (nitrogenfixation) 유전자가 질소고정에 중요한 역할을

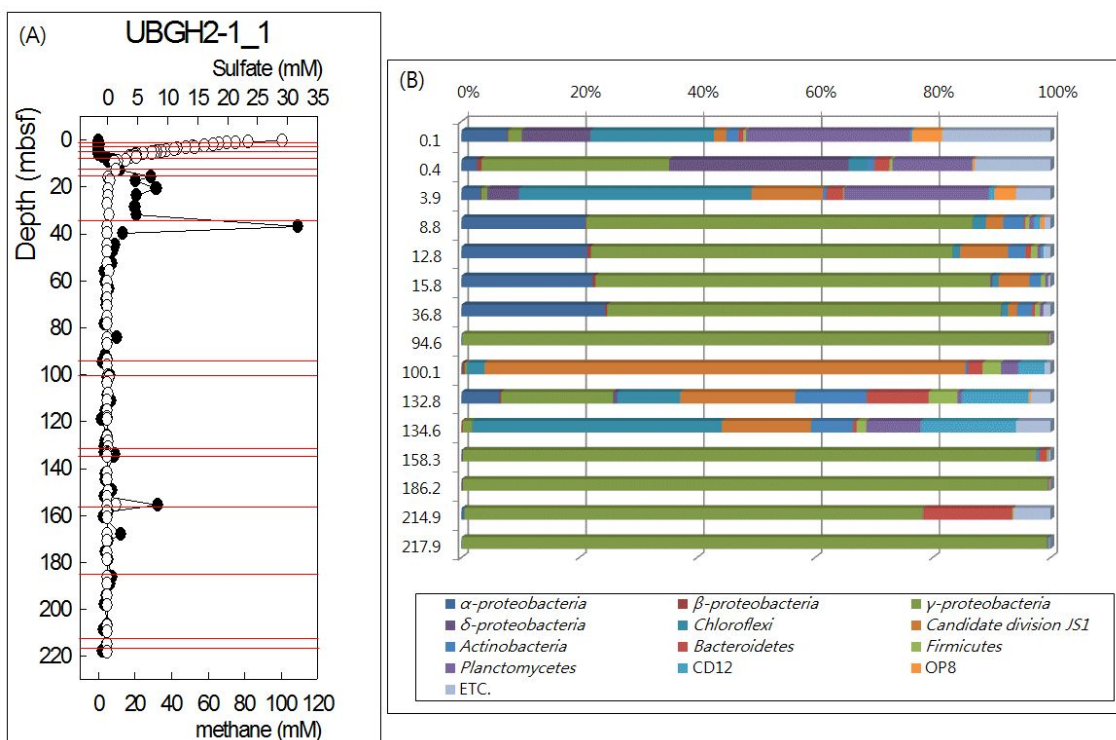


Fig. 2. Geochemical profiles (A) and bacterial community structure (B) of UBGH2-1_1 site. The red line indicated analyzed section. The relative abundance was calculated as follows: $(n/N) \times 100$, where n is the number of reads belonging to the same phylum and N is the total number of clones in a library.

Table 6. The change of major bacteria in UBGH2-1_1 site

Depth (mbsf)	Total reads	<i>α-Proteobacteria</i>		<i>δ-Proteobacteria</i>		<i>Chloroflexi</i>		
		<i>Rhizobiales</i> % (reads)	<i>α-Proteobacteria</i> % (reads)	<i>Desulfobacterales</i> % (reads)	<i>δ-Proteobacteria</i> % (reads)	<i>Dehalococcoidetes</i> % (reads)	<i>Anaerolineae</i> % (reads)	<i>Chloroflexi</i> % (reads)
0.1	2,102	6.57 (138)	7.75 (163)	6.90 (145)	11.66 (245)	10.56 (222)	10.09 (212)	20.93 (440)
0.4	2,481	1.69 (42)	2.66 (66)	17.94 (445)	30.43 (755)	1.17 (29)	1.98 (49)	3.31 (82)
3.9	2,478	3.03 (75)	3.27 (81)	1.37 (34)	5.37 (133)	34.38 (852)	4.88 (121)	39.43 (977)
8.8	2,185	20.73 (453)	21.05 (460)	0.00 (0)	0.05 (1)	1.60 (35)	0.69 (15)	2.29 (50)
12.8	2,044	20.99 (429)	21.38 (437)	0.00 (0)	0.00 (0)	1.13 (23)	0.10 (2)	1.27 (26)
15.8	558	21.33 (119)	22.22 (124)	0.00 (0)	0.36 (2)	0.90 (5)	0.18 (1)	1.08 (6)
36.8	833	24.25 (202)	24.37 (203)	0.00 (0)	0.12 (1)	0.96 (8)	0.00 (0)	1.08 (9)
94.6	3,806	0.11 (4)	0.13 (5)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.08 (3)	0.00 (0)	0.08 (3)
100.1	711	0.14 (1)	0.14 (1)	0.00 (0)	0.00 (0)	2.67 (19)	0.00 (0)	2.95 (21)
132.8	3,136	0.67 (21)	6.44 (202)	0.06 (2)	0.70 (22)	10.20 (320)	0.45 (14)	10.68 (335)
134.6	2,058	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	42.37 (872)	0.00 (0)	42.37 (872)
158.3	5,123	0.08 (4)	0.16 (8)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.20 (11)	0.00 (0)	0.21 (11)
186.2	3,999	0.05 (2)	0.13 (5)	0.00 (0)	0.03 (1)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)
214.9	8,598	0.07 (6)	0.47 (40)	0.00 (0)	0.01 (1)	0.02 (2)	0.00 (0)	0.02 (2)
217.9	5,626	0.07 (4)	0.09 (5)	0.00 (0)	0.02 (1)	0.14 (8)	0.00 (0)	0.14 (8)

한다고 알려져 있다(Bradburne *et al.*, 1994).

*γ-Proteobacteria*에 속하는 혐기서열들은 표층 분획에서 1-2%의 낮은 비율을 차지하였으나 황산염의 농도가 급격하게 감소하는 0.4 mbsf의 분획에서는 31.87%의 비율을 차지하였다. 이후 8.8-94.6 mbsf의 분획에서는 61.40-66.87%의 높은 비율을 차지하다가 100.1-134.6 mbsf의 하이드레이트 분획에서는 0.42-18.99%의 비율을 보였으며, 가장 깊은 분획인 158.3-217.9 mbsf의 분획에서 높은 비율을 차지하였다. *γ-Proteobacteria*의 비율이 높게 관찰되는 8.8-94.6 mbsf, 158.3-217.9 mbsf의 분획은 *E. coli* 그룹이 높은 비율로 관찰되었다. *E. coli* 그룹은 실험실 환경에서 많이 존재하는 세균이며, 높은 압력, 절대 혐기적인 특성을 가진 시료에서 존재할 가능성이 매우 낮다. 이러한 결과가 나타난 이유는 낮은 농도의 DNA 시료를 이용하여 발생된 실험상의 오류라고 판단되어 세균 군집분석에서는 제외하였다. 표층에 존재하는 *γ-Proteobacteria*의 혐기서열들은 *Chromatiales*, *Methylococcales* 목에 속하는 것으로 확인되었다. *Chromatiales* 목에 속하는 세균들은 cold seep environments, 가스하이드레이트 퇴적토, 대양의 퇴적토 표면 등에서 관찰되는 세균으로 세포 안에 황 소구체를 형성하여 황화물(sulfide)을 황산염(sulfate)으로 산화시키는 황 순환에 관여하는 세균으로 알려져 있다(Pachiadaki *et al.*, 2010). *Methylococcales* 목에 속하는 세균들은 생장하는데 필요한 탄소원과 에너지를 메탄으로부터 얻는 type I 메탄영양체(methanotroph)로서 메탄을 포름알데하이드(formaldehyde)로 산화시킨다. Chen 등(2010)에 의하면 *Methylococcales* 목은 cold seep sediment 등에서 관찰되며, 충분한 양의 메탄이 산소가 존재하는 표층부위까지 도달할 경우 산소를 이용한 메탄의 산화가 일어나 *Methylococcales* 목의 비율이 증가한다고 보고하였다.

*δ-Proteobacteria*는 0.1 mbsf와 3.9 mbsf의 분획에서는 각각 11.67%와 5.37%의 비율을 보이는데 반하여, 황산염의 농도가 급격히 감소하는 0.4 mbsf의 분획에서는 30.46%의 높은 비율을 차지하였다. 하지만 황산염의 농도가 1.2 mM 이하인 8.8 mbsf 이상의 깊이를 가진 분획에서는 0.00-0.12% 극히 낮은 비율로 존재하였다. *δ-Proteobacteria*에 속하는 대부분의 혐기서열이 황산염 환원과 관련된 *Desulfobacterales* 목으로 확인되었다. *Desulfobacterales* 목에 속해있는 세균들은 혐기성 환경에서 황산염을 마지막 전자 수용체로 이용하는 황환원 세균 그룹으로 알려져 있다(Leloup *et al.*, 2007). Arakawa 등(2006)에 의하면 *Desulfobacterales* 목은 해양에 존재하는 황환원 세균으로 SMTZ 위치의 윗부분에서 황산염 환원을 일으킨다고 주장하였다. 따라서 황산염의 농도가 1.2 mM 이하로 존재하는 8.8 mbsf 이하의 시료에서는 *Desulfobacterales* 목의 비율이 감소하여 *δ-Proteobacteria*의 비율도 급격히 감소한 것이라 예상된다.

Chloroflexi 문에 속하는 혐기서열은 표층 분획에서 3.31-39.47%의 비율로 존재하다가 이후 분획에서는 1.08-2.29%의 낮은 비율을 보였으며 가스하이드레이트가 발견된 100.1-134.6 mbsf의 hydrate 분획에서 2.95-42.37%의 높은 비율로

관찰되었다. 가스하이드레이트를 포함하고 있는 퇴적물에서는 *Anaerolinaeles*와 *Dehalococcoides* 목과 유연관계가 있는 서열들이 관찰되었다. *Anaerolinaeles*와 *Dehalococcoides* 목에 속하는 혐기서열들은 표층 분획에서 1:1 (212 reads : 222 reads)의 비율로 존재하였으나 12.8 mbsf 이상의 깊이를 갖는 시료에서는 *Dehalococcoides* 목과 유연관계가 있는 혐기서열만이 관찰되었다. 특히, 가스하이드레이트가 발견된 100.1-134.6 mbsf의 시료에서는 *Chloroflexi* 문 전체가 *Dehalococcoides* 목에 속하는 혐기서열들로 이루어져 있음을 확인하였다. *Chloroflexi* 문은 난배양성 세균으로 특성이나 특정 환경에서의 역할을 규명하기 힘들지만 *Chloroflexi* 문에 속하는 세균은 지열이 발생하는 지역이나 토양, 담수 생태계 등에서 관찰되는 것으로 알려져 있으며(Morris *et al.*, 2004), Chilean margin, Santa Barbara Basin, Mediterranean Sea, Gulf of Mexico 등과 같은 메탄이 풍부한 환경의 SMTZ 이하의 시료에서 많이 발견된다고 알려져 있다(Reed *et al.*, 2006; Heijs *et al.*, 2006; Hamdan *et al.*, 2008; Harrison *et al.*, 2009). Inagaki 등 (2006)은 *Chloroflexi* 문의 우점도는 심해 퇴적토에 하이드레이트의 존재 유무를 판명하는 중요한 생물학적 요소라는 연구 결과를 제안하기도 하였다.

Candidate division JS1에 속하는 혐기서열은 표층 분획부터 SMTZ 분획까지 0.00-8.12%의 낮은 비율을 보인 반면, 가스하이드레이트 분획에서는 15.11-81.58%의 높은 비율을 차지하였다. 특히, 가스하이드레이트가 발견된 100.1 mbsf의 분획에서는 81.58%의 높은 비율을 보이며 가스하이드레이트가 포함된 퇴적토에서 우점하는 경향을 나타내었다. Candidate division JS1의 경우, 분자생물학적 방법을 통해서만 환경에서 발견되는 그룹으로 현재까지 분리·동정된 세균이 존재하지 않아 생화학적 기작이 전혀 연구되지 못하였다. 하지만 메탄이 존재하는 퇴적층에서 많게는 50% 이상이 검출되는 주요 메탄 관련 세균으로 candidate division JS1 그룹이 검출되는 지역은 가스하이드레이트가 존재할 것이라는 주장을 제기하였다(Reed *et al.*, 2002; Inagaki *et al.*, 2003; Inagaki *et al.*, 2006). Inagaki 등(2006)과 Webster 등(2007)은 다양한 환경에 존재하는 candidate division JS1의 분포를 연구한 결과, 혐기적이고 유기물이 풍부한 환경, 가스하이드레이트가 포함된 환경, 매우 높은 황산염 환원력을 가진 혐기적 환경에서 발견된다고 주장하였으며, Webster 등(2006)과 Parkes 등 (2007)에 의하면 메탄의 양과 낮은 황산염의 농도에 의해 candidate division JS1 그룹의 양이 조절된다고 제안하였다. Roalkvam 등(2011)은 Nyegga 지역에서 퇴적토를 채취하여 ANME-1, 2 그룹과 candidate division JS1 그룹간의 상호 연관성을 correlation test를 통하여 분석한 결과, ANME-1 그룹과는 상호 연관성을 확인하지 못하였으나 ANME-2 그룹이 많이 존재하는 환경에서 candidate division JS1의 비율은 비례관계에 있음을 주장하였다.

(나) 고세균 군집분석

UBGH2-1_1 site의 심해 퇴적토의 5개 분획으로부터 pyrosequencing을 이용하여 총 11,148개의 고세균 16S rDNA 염기서열 가닥을 획득하였다. 고세균 군집에서는 *Thaumarchaeota*, *Thermoplasmata*, The Marine Benthic Group B (MBG-B), 등이 주요 고세균으로 관찰되었다(Fig. 3.).

*Thaumarchaeota*에 속하는 염기서열들은 0.1 mbsf분획에 27.63%로 존재하다가 황산염이 급격하게 감소하는 분획인 0.4 mbsf 시료에서 84.56%의 높은 비율을 보였다. 이후 시료의 깊이가 증가 할수록 전체 군집에서 차지하는 비율이 급격하게 감소하여 12.8 mbsf의 분획에서는 4.55%의 낮은 비율을 보였다. UBGH2-1_1 site의 0.1-8.8 mbsf 분획에서 관찰된 *Thaumarchaeota*의 88-94%는 *Nitrosopumilus* sp.에 속하는 것으로 확인되었다. *Nitrosopumilus* sp.에 속하는 고세균은 빈영양환경의 해수에서 일반적으로 발견되는 고세균으로 현재 *Nitrosopumilus maritimus*만이 분리·동정 되었으며, 호기적으로 암모니아(NH_3)를 아질산염(NO_2^-)으로 산화시키는 것으로 알려져 있다(Könneke *et al.*, 2005).

Thermoplasmata 그룹의 고세균과 유연관계를 가지고 있는 염기서열은 시료의 깊이가 증가함에 따라 군집에서 차지하는 비율이 감소하는 경향이 관찰되었다. 29.29 mM의 황산염 농도를 보이는 표층 분획에서는 45.37%의 비율로 존재하던 *Thermoplasmata* 그룹들은 황산염의 농도가 감소함에 따라 군집에서 차지하는 비율도 점차 감소하여 12.8 mbsf (황산염: 1.49 mM)의 시료에서는 표층에 비하여 상대적으로 낮은 비율을 보였다. *Thermoplasmata* 그룹의 고세균들은 The Marine Benthic Group D (MBG-D) 그룹에 속하는 고세균으로 토양에서 심해 퇴적토까지 매우 다양한 서식지를 갖고 있으며(Teske and Sørensen, 2008), 호열성, 극호산성의 특징을 가지고 황 호흡(sulfur respiration)을 하는 고세균으로 알려져 있다(Madigan and Martinoko, 2006). Inagaki 등(2006)은 태평양의 가스하이드레이트 퇴적토의 미생물 다양성을 연구한 결과, *Thermoplasmata* 그룹들은 가스하이드레이트를 포함하는 퇴적토에서 빈번히 관찰되는 그룹이라고 주장하였다. 따라서 본 연구에서 관찰된 *Thermoplasmata* 그룹의 고세균들은 메탄의 혐기적 산화와 관련이 있는 고세균이라 예상되며, *Thermoplasmata* 그룹의 비율 변화는 황산염의 농도변화에 기인한다고 추정된다.

MBG-B 그룹의 고세균 염기서열들은 메탄의 농도가 매우 낮은(0.00-0.024 mM) 표층 분획에서 1.06-8.28%의 낮은 비율로 존재하다가 메탄의 농도가 증가함에 따라(8.01-11.91 mM) 군집에서 차지하는 비율도 증가하는 경향을 보였다. 이 그룹은 Deep-Sea Archaeal Group이라고도 불리며, 대부분 심해 저층 환경에서 광범위하게 나타난다(Takai and Horikoshi 1999; Vetriani *et al.* 1999; Reed *et al.* 2002; Inagaki *et al.* 2003).

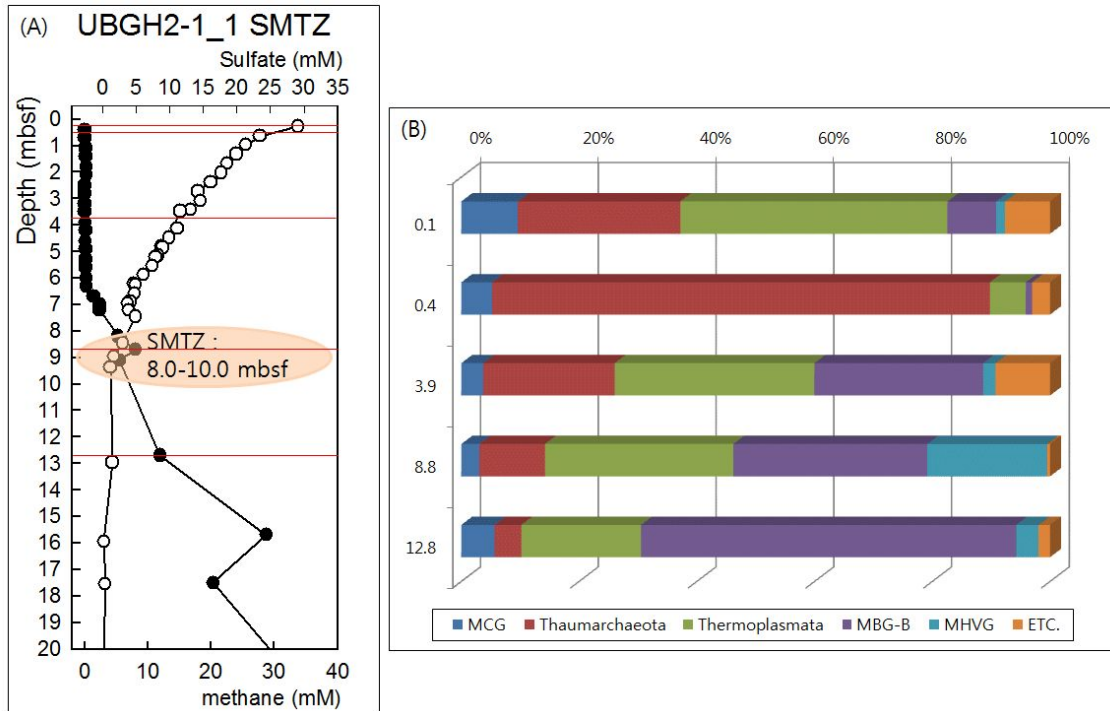


Fig. 3. Geochemical profiles (A) and archaeal community structure (B) of UBGH2-1_1 site. The red line indicated analyzed section. The relative abundance was calculated as follows: $(n/N) \times 100$, where n is the number of reads belonging to the same phylum and N is the total number of clones in a library.

(2) UBGH2-10 site의 미생물 군집 분석

(가) 세균 군집분석

UBGH2-10 site의 심해 퇴적토를 표층과 SMTZ, 메탄의 농도가 가장 높게 측정되었던 High methane zone, 시료 채취 깊이에 따른 특징들로 분류하여 총 12개 분획을 선정 후 pyrosequencing을 이용하여 총 60,231개의 세균 16S rDNA 염기서열 가닥을 획득하였다. UBGH2-10 site에서는 α -, γ -, δ -*Proteobacteria*의 *Proteobacteria* 문의 세균들과 *Chloroflexi*, Candidate division JS1 그룹과 유연관계가 있는 세균의 염기서열이 확인되었다(Fig. 4).

α -*Proteobacteria*는 표층에서 7.32%의 비율로 존재하다가 시료의 깊이가 증가할수록 감소하는 경향이 나타났다. 그러나 SMTZ 분획인 6.8 mbsf와 high methane 분획인 77.8 mbsf 시료에서 각각 15.83과 12.12%의 비율을 보이며 특정 분획에서 α -*Proteobacteria*의 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. α -*Proteobacteria*와 유연관계를 보이는 염기서열들은 UBGH2-1_1 site의 분석 결과와 동일하게 *Rhizobiales* 목의 *Bradyrhizobium* sp.인 것으로 확인되었으며, 표층 및 SMTZ 분획에서 *Bradyrhizobium* sp.에 의한 질소 고정이 일어난다고 추정된다(Table 7). UBGH2-10 site의 표층 분획에서는 아주 낮은 비율(0.06%)이지만 *Methylobacterium aquaticum*과 유연관계를 보이는 염기서열이 관찰되었다. *Methylobacterium aquaticum*은 개미산(formate)과 포름알데하이드(formaldehyde), 메탄올(methanol), 메탄(methane) 등과 같은 탄소 하나짜리 물질을 탄소원과 에너지원으로 이용하여 성장하는 메탄 산화세균으로 알려져 있다(Gallego *et al.*, 2005). 따라서 *Methylobacterium aquaticum*은 SMTZ 분획에서 미처 산화되지 못한 미량의 메탄을 호기적으로 산화하며 성장 할 것으로 추정된다.

γ -*Proteobacteria*와 유연관계를 가지고 있는 염기서열들은 대부분의 분획에서 3.89-14.34%의 비율을 나타내었으나 SMTZ 분획 중 하나인 6.8 mbsf와 77.8-171.6 mbsf의 시료에서 높은 비율로 관찰되었다. γ -*Proteobacteria*에 속하는 염기서열들을 분석한 결과, *Enterobacteriales* 목에 속하는 *Serratia* sp.와 *E. coli* 그룹으로 확인되었다. UBGH2-1_1 site의 세균군집 결과와 유사하게 γ -*Proteobacteria*의 비율이 높게 관찰된 분획들의 DNA 양이 매우 적어 심해 퇴적토에서 성장 할 수 없는 미생물들이 검출되었다고 생각되며, 이 분획들은 세균 군집 분석에서 제외하였다.

δ -*Proteobacteria*는 황산염의 농도가 높은 (2.77-27.46 mM) 0.8-6.5 mbsf의 시료에서는 4.26-8.91%의 비율을 보이다가 황산염이 감소하는 6.8 mbsf (2.3 mM 이하) 이하의 시료에서는 0.00-0.29%의 낮은 비율을 보였다. δ -*Proteobacteria*에 속하는 염기서열 중 80%는 *Desulfobacteriales* 목과 유연관계가 있는 염기서열이었으며, UBGH2-1_1 site의 결과와 동일하게 δ -*Proteobacteria*의 황환원 세균

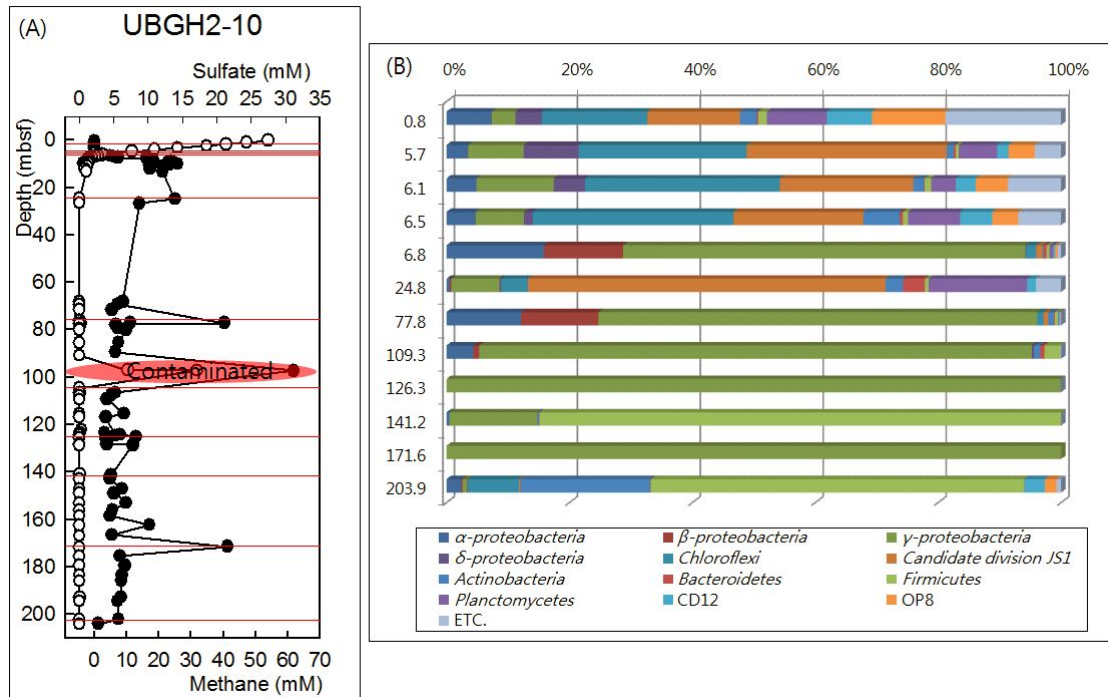


Fig. 4. Geochemical profiles (A) and bacterial community structure (B) of UBGH2-10 site. The red line indicated analyzed section. The relative abundance was calculated as follows: $(n/N) \times 100$, where n is the number of reads belonging to the same phylum and N is the total number of clones in a library.

Table 7. The change of major bacteria in UBGH2-10 site

Depth (mbsf)	Total reads	<i>α-Proteobacteria</i>		<i>δ-Proteobacteria</i>		<i>Chloroflexi</i>		
		<i>Rhizobiales</i> % (reads)	<i>α-Proteobacteria</i> % (reads)	<i>Desulfobacterale</i> s % (reads)	<i>δ-Proteobacteria</i> % (reads)	<i>Dehalococcoidetes</i> % (reads)	<i>Anaerolineae</i> % (reads)	<i>Chloroflexi</i> % (reads)
0.85	4,839	7.09 (343)	7.32 (354)	1.32 (64)	4.26 (206)	12.28 (594)	3.14 (152)	17.19 (832)
5.72	3,614	3.35 (121)	3.49 (126)	8.11 (293)	8.91 (322)	25.95 (938)	1.41 (51)	27.37 (989)
6.1	951	4.73 (45)	4.84 (46)	4.21 (40)	5.05 (48)	30.07 (986)	1.58(15)	31.76 (302)
6.45	3,615	4.45 (161)	4.70 (170)	0.28 (10)	1.41 (51)	29.24 (1,057)	3.29 (119)	32.67 (1,181)
6.8	5,617	0.23 (13)	15.83 (889)	0.09 (5)	0.11 (6)	1.64 (92)	0.05 (3)	1.69 (95)
24.75	3,093	0.29 (9)	0.48 (15)	0.00 (0)	0.29 (9)	4.36 (135)	0.00 (0)	4.36 (135)
77.78	2,415	7.66 (185)	10.77 (260)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.87 (21)	0.00 (0)	0.95 (23)
109.26	1,888	1.06 (20)	4.34 (82)	0.00 (0)	0.37 (7)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)
126.31	10,346	0.00 (0)	0.01 (1)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)
141.17	8,110	0.07 (6)	0.44 (36)	0.00 (0)	0.01 (1)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)
171.64	14,792	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.01 (1)	0.00 (0)	0.01 (1)
203.93	951	0.42 (23)	2.42 (23)	0.00 (0)	0.11 (1)	7.99 (76)	0.11 (1)	8.31 (79)

그룹인 *Desulfobacteriales* 목이 혐기적 메탄 산화에 중요한 역할을 한 것이라 추정된다.

Chloroflexi 문에 속하는 혐기서열들은 표층 분획부터 SMTZ 분획까지 시료의 깊이가 증가 할수록 세균 군집에서 차지하는 비율이 17.19-32.67%로 증가하는 경향이 관찰되었으나, 6.8 mbsf 이상의 깊이에서 채취한 시료에서는 0.00-8.31%의 비율을 보이며 상대적으로 군집에서 차지하는 비율이 감소하였다. *Chloroflexi* 문에 속하는 혐기서열은 *Anaerolineales*와 *Dehalococcoides* 강과 유연관계가 있는 서열들로 나뉘어졌다. *Anaerolineales* 강과 유연관계를 보이는 혐기서열들은 0.8 mbsf 분획에서 전체 *Chloroflexi* 문의 18.27%를 차지하였으나 시료의 깊이가 증가 할수록 *Chloroflexi* 문에서 차지하는 비율이 감소하여 203.9 mbsf의 분획에서는 *Chloroflexi* 문의 1.27%만을 차지하였다. 이와는 반대로 *Dehalococcoides* 강과 유연관계를 보이는 혐기서열들은 0.8 mbsf의 표층 분획에서는 *Chloroflexi* 문의 71.39%를 차지하다가 시료의 깊이가 증가 할수록 비율이 증가하여 5.7 mbsf 이상의 분획에서는 대부분의 *Chloroflexi* 문에 속하는 혐기서열들이 *Dehalococcoides* 강으로 확인되었다. 이러한 결과는 UBGH2-1_1 site와 동일한 결과로 *Dehalococcoides* 강이 가스하이드레이트 부존과 밀접한 관계가 있음을 시사한다.

0.8-6.5 mbsf의 분획에서 전체 군집의 15.07-32.54%를 차지하던 candidate division JS1 그룹은 이후 깊이의 시료에서는 군집에서 차지하는 비율이 감소하다가 24.8 mbsf의 분획에서 58.20%의 높은 비율을 차지하며 특정 분획에서 우점하는 경향을 보였다. 24.8 mbsf 분획의 메탄농도는 24.92 mM로 다른 분획에 비하여 메탄의 농도가 높지는 않았으나, 29.22-66.37 mbsf 분획의 시료 채취 시 가스하이드레이트 해리로 인하여 원활한 시료 채취가 이루어지지 않았다. 따라서 24.8 mbsf의 분획에서 candidate division JS1이 우점하는 이유는 29.22-66.37 mbsf 사이의 분획에 존재하는 가스하이드레이트 때문인 것으로 추정된다.

(나) 고세균 군집분석

UBGH2-10 site의 표층 분획부터 SMTZ 분획까지 총 5개 분획으로부터 pyrosequencing을 이용하여 고세균에 속하는 총 7,198개의 16S rDNA 혐기서열 가닥을 획득하였다. *Thaumarchaeota*, *Thermoplasmata*, MBG-B 그룹이 관찰되었으며, 6.1 mbsf 분획에서 ANME-1 그룹이 관찰되었다(Fig. 5.).

*Thaumarchaeota*에 속하는 혐기서열들은 0.8 mbsf의 분획에서 12.88%의 비율을 보였으나, 이후 SMTZ 분획에서 6.20-17.32%의 비율을 보이며 시료의 깊이가 증가 할수록 군집에서 차지하는 비율이 감소하는 경향을 보였다. UBGH2-1_1 site의 결과와 동일하게 *Thaumarchaeota*에 속하는 혐기서열들의 대부분이 *Nitrosopumilus* sp.와 *Nitrososphaera* sp.와 유연관계를 보였다. *Nitrosopumilus* sp.와 *Nitrososphaera* sp.에 속하는 고세균들은 암모니아 산화 고세균(*Ammonia*

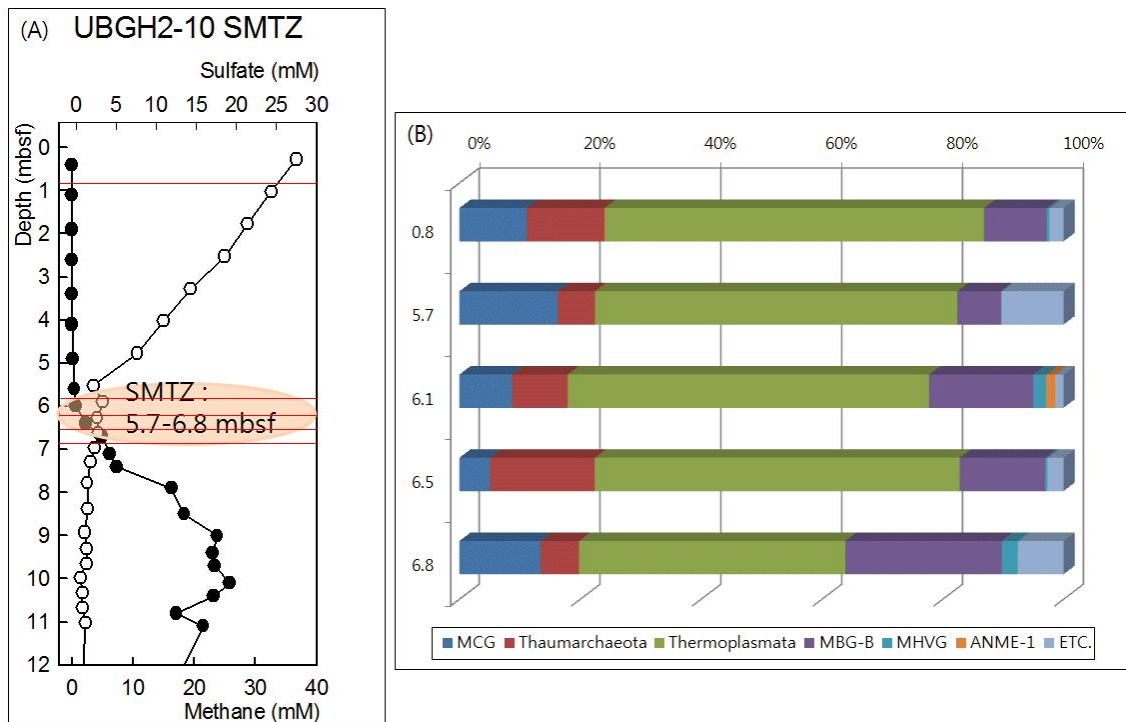


Fig. 5. Geochemical profiles (A) and archaeal community structure (B) of UBGH2-10 site. The red line indicated analyzed section. The relative abundance was calculated as follows: $(n/N) \times 100$, where n is the number of reads belonging to the same phylum and N is the total number of clones in a library.

Oxidizing Archaea; AOA)으로 암모니아 혹은 요소(Urea)를 에너지원으로 이용하여 성장한다(Touma *et al.*, 2011). UBGH2-10 site의 0.8-6.8 mbsf 분획에 존재하는 암모니아의 농도는 0.2-2.5 mM로 깊이가 증가 할수록 암모니아의 농도도 증가하는 경향을 보였다. 이러한 암모니아의 농도 변화는 *Thaumarchaeota*의 암모니아 산화에 기인한다고 추정된다. 표층 이외의 분획에서는 산소의 농도가 낮아 *Thaumarchaeota*에 의한 암모니아의 호기적 산화가 일어나지 못한 반면, 표층에서는 *Thaumarchaeota*에 의해서 호기적으로 암모니아 산화가 일어나 암모니아의 농도가 낮아졌다고 생각된다.

*Thermoplasmata*와 유연관계를 갖는 고세균은 모든 분획에서 44.06-62.81%의 비율을 보이며 우점 하였다. UBGH2-1_1 site에서는 시료의 깊이가 증가 할수록 *Thermoplasmata*와 유연관계를 보이는 혐기서열의 비율이 감소하는 경향이 관찰 되었으나, UBGH2-10 site에서는 분석시료가 표층과 SMTZ 분획에 집중되어 이러한 결과는 관찰할 수 없었다. 그러나 황산염의 농도가 24.34 mM 이상인 0.8 mbsf 분획에서 *Thermoplasmata*의 비율이 가장 높게 관찰된 점과 황산염의 농도가 2.23-3.36 mM인 5.72-6.80 mbsf의 분획에서 *Thermoplasmata*의 비율이 일정하게 나타난 점으로 미루어 UBGH2-1_1 site에서 관찰된 *Thermoplasmata*의 역할과 동일하게 혐기적 환경에서 황 호흡을 통하여 성장하는 고세균으로 추정 된다.

MBG-B 그룹과 유연관계를 가지고 있는 혐기서열은 0.8 mbsf 분획인 표층시료에서는 10.40%의 비율을 보이다가 메탄의 농도가 증가하기 시작하는 SMTZ 분획에서 시료의 깊이가 증가 할수록 MBG-B 그룹의 비율이 증가하는 경향을 보였다. 특히, 2.20 mM의 메탄 농도를 보이는 6.45 mbsf 분획과 4.90 mM의 메탄농도가 관찰된 6.80 mbsf의 분획에서 MBG-B 그룹의 비율이 각각 14.13%에서 25.87%로 약 2배 가까이 증가한 것으로 미루어보아 MBG-B 그룹은 메탄의 농도와 밀접한 관련이 있을 것이라 추정된다.

UBGH2-10 site에서는 메탄의 혐기적 산화와 직접적으로 관련이 있는 ANME-1 그룹이 관찰되었다. ANME 그룹은 6.1 mbsf의 분획에서 1.52% (26 read)의 비율을 보였다. ANME-1 그룹에 속하는 혐기서열들은 Eel River Basin 에서 발견된 클론(AY714817)과 99-100%의 유사도를 보였다. ANME-1 그룹은 ANME-2 그룹에 비하여 상대적으로 산소에 대한 내성이 약하고 절대 혐기적 환경에서 황산염 환원 세균과 영양 공생을 이루어 메탄을 혐기적으로 산화 시킨다고 알려져 있다. 하지만 최근의 연구에 따르면 황산염 환원 세균과 밀접한 영양 공생관계를 이루는 ANME-2 그룹과는 다르게 ANME-1 그룹은 황산염 환원 세균과 느슨한 영양공생 관계를 이루고 있다고 보고되고 있다. ANME-1 그룹은 단일 특이성 체인(monospecific chain)의 특징을 보이며(Treude *et al.*, 2007), ANME-1 그룹이 우점하고 있는 환경에서 황산염 환원 세균의 비율이 2% 이하로 매우 낮게 관찰된다고 알려져 있다(Roalkvam *et al.*, 2011). 본 연구에서도

6.1 mbsf 분획의 δ -*Proteobacteria* 비율은 5.05%로 다른 분획에 비하여 특징적으로 높은 δ -*Proteobacteria*의 비율을 보이지는 않았다.

나. 황산염 환원세균과 혐기성 메탄산화 고세균의 분포 분석

(1) 황산염 환원세균의 분포 분석

황산염 환원세균의 분포를 알아보기 위하여 UBGH 2-10 site의 표층 분획과 SMTZ 분획에서 구축한 library를 이용하여 각각 46개와 35개의 클론을 선별 후 염기서열을 분석하였다(Table 8). 표층 분획에서 분석된 염기서열은 모두 δ -*Proteobacteria*에 속하였으며, 이 중 63%가 *Desulfobacteraceae*-like 과의 *Desulfococcus oleovorans*와 가장 유사하였다(Fig. 6.). 또한, *Desulfobacteraceae*-like 과의 *Desulfobacterium anilini*-like 그룹이 23.9%, *Syntrophobacteraceae*-like 과의 *Desulfacinum infernum* 그룹이 13.1%를 차지하였다. *Desulfococcus oleovorans* 는 혐기적으로 alkane을 fatty acid로 분해하는 특징을 가지는 황산염 환원 세균이며(So *et al.*, 1991), *Desulfobacterium anilini*는 Black Sea (Vetriani *et al.*, 2003) 및 Gulf of Mexico (Mills *et al.*, 2005) 등 다양한 해양 환경에서 검출되고 있다. *Desulfacinum infernum*는 북해의 석유저장고에서 분리된 고온 황산염 세균으로, 아황산염(sulfite)과 티오아황산이온(thiosulfite)를 전자 수용체로 이용한다고 알려져 있다.

SMTZ 분획의 경우, δ -*Proteobacteria*가 69.3%, 그람양성 세균인 *Firmicute* (orthologus)-like 그룹이 30.6%를 차지하였다. δ -*Proteobacteria*에 속하는 클론의 경우, 63.8%가 *Desulfobacteraceae* 과의 *Desulfococcus oleovorans*와 가장 유사 하였으며, *Desulfobacterium anilini*-like 그룹과 *Syntrophobacteraceae*-like 그룹이 각각 2.8%를 차지하였다 (Fig. 7.). *Firmicute* (orthologus)-like 그룹의 황산염 환원세균은 내생포자를 형성할 뿐 아니라 에너지-보존 대사의 전환능력을 가지고 있어 황산염의 농도가 낮은 지역이나 메탄이 존재하는 지역에서 우점하는 것으로 알려져 있다 (Leloup *et al.*, 2009). Leloup 등(2007)은 *dsrAB*를 이용하여 해저 퇴적토에서 황환원세균의 개체수를 정량적으로 측정된 결과, 총 세균과 황환원세균의 개체수는 깊이가 증가할수록 감소하는 경향을 보이나 SMTZ에서는 15-35%의 높은 비율로 존재하는 것을 확인하였다. 즉, 동해 퇴적토의 표층과 달리 황산염의 농도가 낮고 메탄의 농도가 증가하는 SMTZ 시료에서 30.6%로 *Firmicute* (orthologus)-like 그룹의 우점은 선행 연구의 결과와 일치함을 알 수 있었다.

δ -*Proteobacteria*에 속하는 세균들은 혐기성 환경에서 황산염을 마지막 전자 수용체로 이용하는 황환원세균 그룹과 연관이 있다. 고온성(thermophilic) 황환원세균을 제외한 황환원세균 그룹은 크게 6개의 그룹으로 나뉘며 각 그룹에 따라 생리적 특징이 다르다. 일반적으로는 해양 퇴적물 표층의 1-2 cm에서 황환원 세

Table 8. Community structure of sulfate-reducing bacteria based on comparative sequence analysis of *dsrA*

Community Structure	Surface	SMTZ
Cluster affiliation (% clones)		
<i>Desulfobacteraceae</i> -like	63.0	63.8
<i>Desulfobacterium anilini</i> -like	23.9	2.8
<i>Syntrophobacteraceae</i> -like	13.1	2.8
<i>Firmicute</i> (orthologus group)-like	0	30.6
Diversity index		
Shannon-Weiner diversity index (H) ^a	1.43	1.23
Simpson dominance index (D) ^b	0.44	0.49

Cluster affiliations are presented as percentage of each cluster based on *dsrA* sequences.

^aShannon-Weiner diversity index (H) = $-\sum(P_i)(\log_2 P_i)$

^bSimpson dominance index (D) = $\sum(P_i)^2$, where P_i is the proportion of *dsrA* clones



Fig. 6. *dsrA* consensus tree showing the relationship of operational taxonomic units (OTUs) from surface of UBGH2-10 to the selected sequences of sulfate reducing bacteria. The tree was inferred using the Neighbor-Joining method and the Jukes-Cantor method.

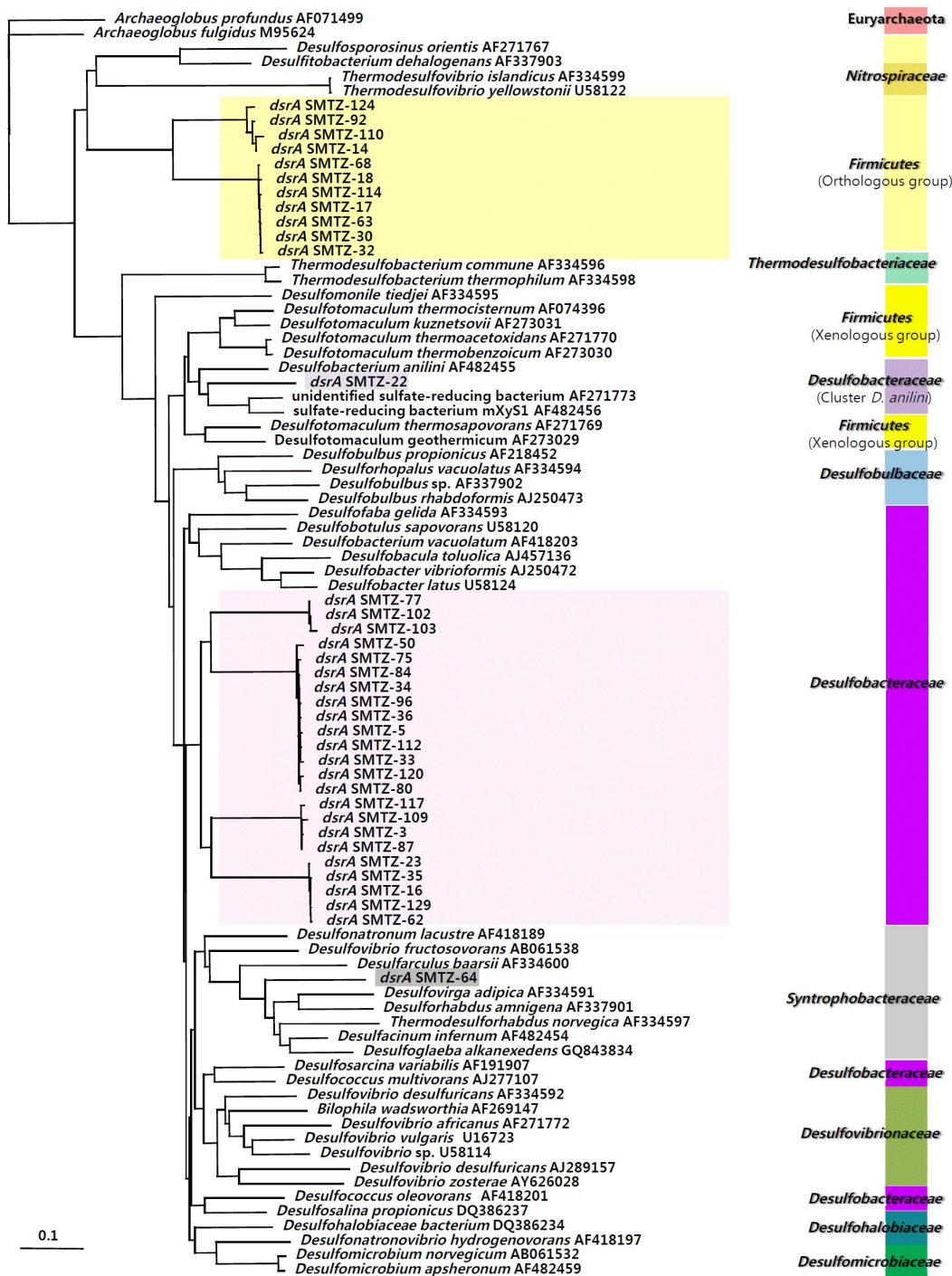


Fig. 7. *dsrA* consensus tree showing the relationship of operational taxonomic units (OTUs) from SMTZ of UBGH2-10 to the selected sequences of surface reducing bacteria. The tree was inferred using the Neighbor-Joining method and the Jukes-Cantor method.

균의 활성이 가장 높지만 가스 하이드레이트가 존재하는 퇴적물에서는 SMTZ의 위치에 따라 황환원 세균의 활성이 높은 위치가 변화한다고 알려져 있다(Leloup, 2007). δ -*Proteobacteria*의 *Desulfosarcina*와 *Desulfococcus*는 ANME 그룹과 함께 메탄의 혐기적 산화에 관여한다고 알려져 있으며(Hinrichs and Boetius, 2003), *Desulfobacteraceae* 과는 다양한 물질 이용능력과 성장 특징 등에 의해 해양 퇴적토의 표층부분에서 주로 관찰된다고 알려져 있다(Klein *et al.*, 2001).

동해 퇴적토의 표층 분획과 SMTZ 분획에서 모두 우점한 *Desulfobacteraceae* 와 *Desulfobacterium anilini*는 acetate-oxidizing 황환원세균으로 광범위한 전자공여체를 이용할 수 있으며, 매우 다양한 해양 환경에서 군락을 형성한다고 연구되었다(Leloup *et al.*, 2009). 또한, *Desulfobacteraceae* 과에는 *Desulfococcus* 속과 *Desulfosarcina* 속이 포함되어있는데, 이들은 ANME-1, 2 그룹과 영양공생관계를 이루는 것으로 알려져 있다(Michaelis *et al.*, 2002).

각 시료의 다양성지수와 우점도지수를 비교해 본 결과, 황산염과 메탄의 농도에 따른 차이를 확인할 수 없었으며 (Table 8), 이는 *dsrAB* 유전자로 황산염 환원 세균의 군집구조를 DGGE와 클론 라이브러리로 분석한 Leloup 등(2009)의 결과와 일치하였다.

(2) 혐기성 메탄산화 고세균 군집구조 분석

UBGH2-10 site의 SMTZ 분획에서 *mcrA*를 이용하여 구축한 라이브러리 중 47개 클론을 선별하여 염기서열을 분석한 결과, 모든 염기서열들이 ANME-1 그룹에 속하였다(Fig. 8.). ANME-1 그룹에 속하는 클론의 염기서열은 지중해의 Center of the Napoli mud volcano에서 분리한 HM004976 서열과 87~93%의 유연관계를 보이며 분지를 형성하는 것을 확인하였다.

분류학적으로 *Methanosarcinales*와 *Methanomicrobiales*와 가장 유사한 혐기성 메탄산화 고세균인 ANME-1 (Nauhaus, 2005)은 낮은 황산염 농도의 시료에서 주로 발견된다. ANME-1 그룹은 ANME-2 그룹에 비하여 산소에 더 민감하여 절대 혐기성의 조건에서만 발견되고(Knittel *et al.*, 2009), 해양 퇴적토에서 황산염 환원 세균과 구 모양이나 shell-type으로 긴밀한 관계를 가지는 ANME-2, 3과 달리 단일 세포나 단일특이성 체인(monospecific chain)의 형태를 보이며 황산염 환원 세균과 느슨한 유대관계를 이루는 것으로 확인되었다(Michaelis *et al.*, 2002; Knittel *et al.*, 2005).

Caldwell 등(2008)은 메탄형성 역반응은 반응 중 형성되는 물질에 따라 아세테이트와 메탄올, 포름산염 형성반응으로 구분되며, *Methanosarcinales*에 의해 일어나는 반응으로 두 분자의 메탄으로부터 아세테이트와 수소를 생산하고, 생산된 수소와 아세테이트는 *Desulfosarcina*와 *Desulfococcus* 그룹과 같은 황산염 환원 세균의 전자공여체로 이용된다고 보고하였다. 이러한 결과는 동해 퇴적토의 SMTZ에서 관찰된 결과와 매우 유사하다. SMTZ 분획의 경우, *mcrA*를 이용한

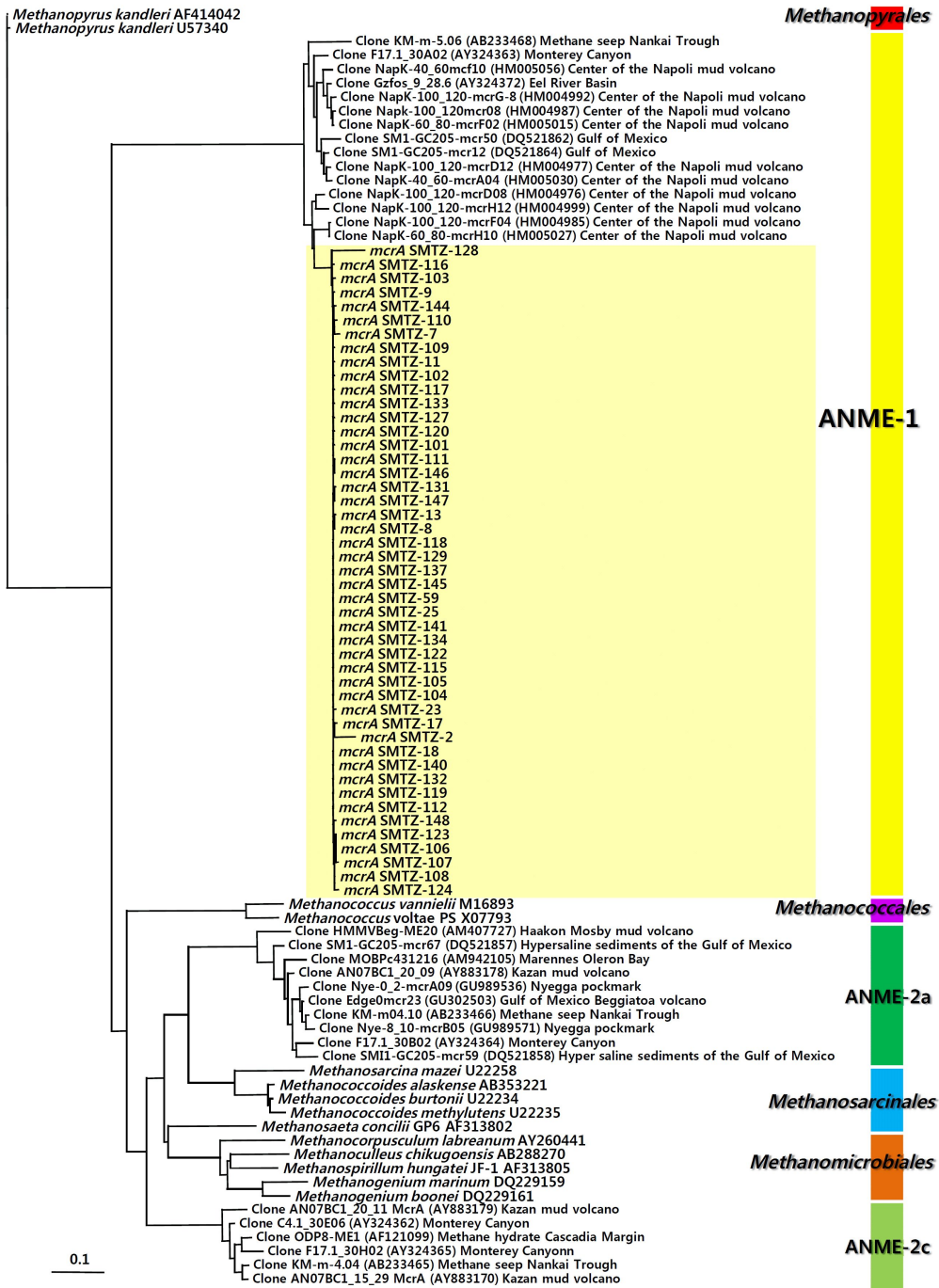


Fig. 8. *mcrA* consensus tree showing the relationship of operational taxonomic units (OTUs) from SMTZ of UBGH2-10 to the selected sequences of methane-oxidizing archaea. The tree was inferred using the Neighbor-Joining method and the Jukes-Cantor method.

혐기성 메탄산화 고세균군집 분석 결과 *Methanosarcinales*와 가장 유사한 ANME-1 그룹이 우점 하였으며, 황산염 환원세균의 *Desulfobacteraceae*와 *Desulfobacterium anilini*가 ANME-1이 생성한 acetate를 전자 공여체로 이용함으로써 영양공생관계를 형성하여 혐기적 메탄-산화 과정이 이루어진다고 추정된다.

2. 가스 하이드레이트 퇴적물 환경유전체 분석

가. 환경유전체 분석을 위한 시료 선정

환경유전체 분석을 위한 시료는 한양대학교 현정호 교수 팀의 황산염 환원율 데이터를 참고하여 황산염 환원율이 가장 높은 시료를 선정하였다(Fig. 9.). 메탄의 혐기적 산화는 ANME 그룹과 황산염 환원세균의 영양공생에 의하여 일어나므로 가스하이드레이트를 포함하고 있는 심해 퇴적토에서 황산염 환원율과 메탄의 혐기적 산화는 매우 밀접한 관련이 있다(Hoehler *et al.*, 2000; Borowski *et al.*, 1996, 1999). Site 중 UBGH2-7 site는 가스하이드레이트의 해리로 인하여 시료채취가 원활히 이루어지지 않아 황산염 환원율을 분석하지 못하였다. 세 site에서 황산염 환원율이 가장 높은 분획은 UBGH2-10 site의 6.45-6.80 mbsf 분획이었다. 다른 세 site의 표층 분획의 황산염 환원율은 13.89-20.27 nmol/cm³/d로 유사하게 관찰되었으나, UBGH2-10 site에서 6.45-6.80 mbsf 분획의 황산염 환원율은 20.06-33.46 nmol/cm³/d로 황산염의 농도가 월등하게 높은 표층 분획보다도 약 1.5배 높은 측정값을 보였다. 따라서 메탄의 혐기적 산화와 관련된 미생물의 환경유전체 분석을 위하여 UBGH2-10 site의 두 분획 중 메탄과 황산염의 농도가 동시에 존재하고 황산염 환원율이 높은 6.8 mbsf 분획을 선정하였다. 또한, 동일한 site에서 질소 순환 및 호기적 메탄 산화 기작에 관한 분석을 위해 0.8 mbsf의 표층 분획과 메탄의 농도가 40.45 mM로 가장 높게 관찰된 77.9 mbsf의 분획을 환경유전체 분석을 위한 시료로 선정하였다.

나. 환경유전체의 증폭(Whole Genome Amplification; WGA)

환경 시료에서 추출된 DNA에는 다량의 humic acid가 존재하며, 이러한 humic acid는 DNA 분석에 저해요인이 될 뿐만 아니라 이후 진행될 효소반응의 저해제로 작용하여 원활한 실험 및 분석이 이루어지지 못한다(Harry *et al.* 1999; Miller *et al.* 1999). 특히, GS FLX Titanium 454 (Roche, Germany) sequencer와 같은 차세대 염기서열 분석 장치(Next generation sequencer; NGS)를 이용하는 환경유전체 분석을 위해서는 높은 순도를 가진 (1.8 이상의 A260/280 측정값) 많은 양의 DNA (5.5 ug 이상)가 필요하다(Chunlab, Korea).

환경 시료에 존재하는 DNA를 최대한으로 추출하기 위하여 Hurt 등(2001)의 방법을 변형하여 추출하였다. 세 분획에서 추출된 DNA는 각각 표층 분획에서

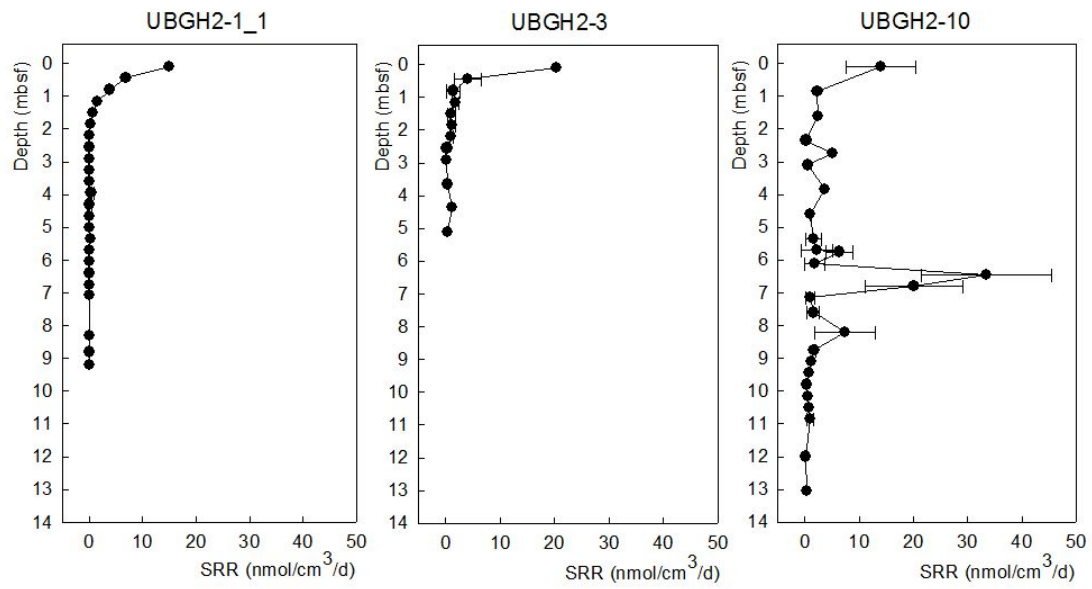


Fig. 9. Relationship between sulfate reduction rate and sediment depth in the Ulleung-Basin. Data from Hanyang university

83.85 ug, SMTZ 분획에서 68.11 ug, high methane 분획에서 0.825 ug의 DNA를 추출하였다(Table 3). 이러한 DNA 양은 high methane 분획을 제외하고는 환경유전체 분석을 위한 DNA 양은 만족하지만 추출된 DNA에 많은 양의 humic acid가 포함되어있어 정제 과정이 필요하다.

PVPP와 low melting agarose gel을 이용하여 humic acid를 제거한 결과, humic acid는 제거되어 순도는 만족하였으나 DNA 총량이 현저하게 감소하였다. 표층 분획인 0.8 mbsf DNA와 SMTZ 분획의 DNA의 경우, 정제 후 DNA 농도는 각각 4.82 ug과 3.67 ug으로 정제 전 DNA 농도의 약 6%정도만이 회수되었다. 정제 후 DNA 농도는 GS FLX Titanium 454 (Roche, Germany) sequencer를 이용한 환경유전체 분석에는 DNA 양이 부족하기 때문에 정제된 genomic DNA를 이용하여 전체 유전자를 비특이적으로 증폭하는 Multiple Displacement Amplification (MDA) 방법을 이용하여 증폭하였다.

MDA 방법을 이용하여 증폭된 DNA 양을 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen-Molecular Probes, USA)를 이용하여 정량한 결과, 표층 분획에서는 406.2 ng의 정제된 genomic DNA를 이용하여 16.9 ± 0.095 ug의 DNA를 획득하였으며, SMTZ 분획은 275.4 ng의 정제된 genomic DNA를 이용하여 15.8 ± 0.95 ug의 DNA를 획득하였다(Table. 9). 두 genomic DNA의 MDA 증폭 효율은 각각 41.6배와 57.3배로 평균 50배의 증폭 효율을 확인하였다. MDA 증폭 과정에서 목적으로 하는 가스하이드레이트 퇴적물의 미생물 유전체 이외에 다른 오염물질에 의한 증폭유무를 확인하기 위하여 시료의 genomic DNA를 첨가하지 않은 negative control 시료를 추가하여 수행하였다. MDA 과정에서 negative control의 시료에도 DNA band가 확인되었고 negative control에서 증폭된 DNA가 다른 미생물로부터의 오염인지 확인하기 위하여 세균과 고세균의 16S rRNA 유전자를 PCR을 통하여 증폭하였다(Fig. 10.). 각 시료에서 16S rRNA 존재 유무를 확인한 결과, 환경유전체를 첨가한 표층과 SMTZ 분획의 시료에서는 약 500 bp의 16S rRNA 유전자가 증폭되었으나, MDA negative control 시료에서는 16S rRNA 유전자가 증폭되지 않았다.

MDA에 의한 비특이적 DNA 합성은 이전의 연구에서도 지속적으로 제기되었던 문제로 MDA 과정에서 primer dimer에 의한 비특이적 증폭과 MDA로 인한 환경유전체의 왜곡이 일어날 가능성이 높다고 주장하였다(Dean *et al.*, 2001; 2002; Hosono *et al.*, 2003). Raghunathan 등 (2005)에 의하면 단일 세균(*E. coli* cells; ATCC 10798 K-12 strain)을 이용하여 MDA를 수행한 결과, 증폭된 DNA의 70%는 비특이적 DNA 합성에 의한 산물이었으며 단 30%만이 단일 세균으로부터 유래된 DNA라고 주장하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 본 연구에서 MDA를 이용하여 증폭된 DNA도 다량의 비특이적 증폭산물을 포함하고 있는 것으로 생각되며, 이러한 DNA를 이용하여 NGS를 이용한 환경유전체 분석을 실시할 경우 환경유전체 염기서열을 얻기가 매우 힘들 것이라 생각된다. 따라서 비

Table 9. The concentration of whole genome amplified DNA using MDA

Type	Given Conc. (ng/ul)	Dilution fold	Calc. Conc. (ng/ul)	Final Conc. (ng/ul)	Elution vol. (ul)	Total amount of DNA (ug)
Standard	2.000	-	1.931	1.931	-	-
	1.000	-	1.017	1.017		
	0.500	-	0.498	0.498		
	0.100	-	0.094	0.094		
	0.050	-	0.064	0.064		
	0.010	-	0.013	0.013		
	0.001	-	0.012	0.012		
	0.000	-	0.001	0.001		
Surface (0.8 mbsf)	Unknown	1/100	1.810	181	93	16.9 ± 0.095
		1/200	0.911	182.2		
		1/500	0.367	183.5		
		1/1000	0.182	182		
SMTZ (6.8 mbsf)	Unknown	1/100	1.700	170	93	15.8 ± 0.95
		1/200	0.813	162.6		
		1/500	0.348	174		
		1/1000	0.187	187		

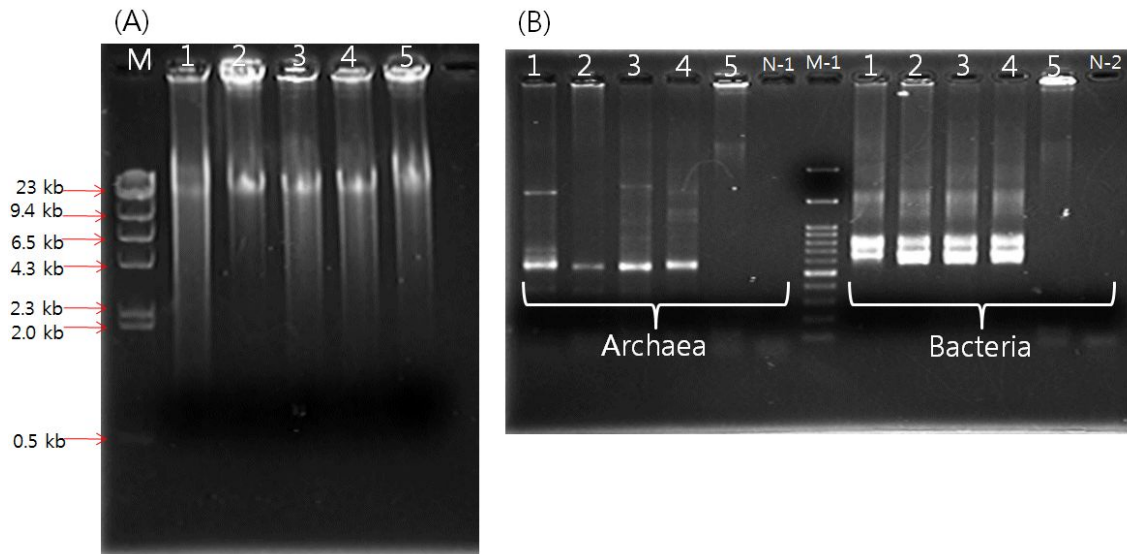


Fig. 10. Whole genome amplified DNA (A) and 16S rRNA gene PCR for contamination check resolved by agarose gel electrophoresis.

M: λ Hind III size marker; 1 and 2: UBGH2-10 1H-1d (surface); 3 and 4: UBGH2-10 1H-5e (SMTZ); 5: Negative control for MDA; M-1: 100 bp size marker; N-1: PCR negative control for archaea; N-2: PCR negative control for bacteria

특이적 증폭 산물과 환경유전체의 왜곡을 줄이기 위해서는 반응시간과 반응 볼륨을 줄이는 것과 primer의 변화를 유도하는 방법이 최선의 방법이다(Marcy *et al.*, 2007). 다양한 방법을 적용하여 환경유전체의 왜곡과 비특이적인 산물의 증폭을 제거할 수 있는 조건을 탐색하여 적용한 후 대용량의 염기서열을 획득 할 수 있는 NGS를 사용하여 환경에 존재하는 염기서열을 획득 및 분석할 예정이다.

제 4장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

본 연구는 심부 시추를 통하여 최대 250 mbsf까지의 심해 퇴적토를 획득하고 획득된 가스하이드레이트 퇴적물 내 메탄의 혐기적 산화와 메탄 형성에 관련된 미생물의 다양성 및 기작에 관하여 연구하고자 하였다. 가스하이드레이트에 존재하는 미생물의 다양성은 대용량의 염기서열 획득 방법인 pyrosequencing 방법으로 분석하여 결과의 신뢰성을 높였으며, 이를 통하여 메탄과 관련된 미생물은 물론 동해 울릉분지에 존재하는 미생물의 특성과 기능을 해석하기 위한 목적으로 진행되었다. 또한, 메탄의 혐기적 산화와 관련된 유전자를 분석함으로써 환경에 존재하는 다양한 미생물들을 기능성 유전자를 이용하여 분석하였으며, 연구결과를 바탕으로 특수한 환경에 존재하는 미생물을 심도 깊게 분석하였다. 메탄 특이적 환경에 존재하는 미생물의 환경유전체를 획득하고 해독하여 전 지구적인 메탄 순환과정에서 미생물의 역할을 규명하고자 하였다.

제 5장 연구개발 결과의 활용계획

본 연구는 메탄과 황산염 농도에 따른 세균과 고세균의 군집변화 및 메탄의 혐기적 산화와 관련 있는 두 유전자를 이용한 미생물의 분포에 관한 정보를 제공하였다. 본 연구 결과는 동해 울릉분지 심해 퇴적물이라는 특이 생태계에 존재하는 다양한 미생물에 대한 지식 및 관련 학술연구의 기초자료로 활용할 수 있을 것이라 기대된다. 동해의 울릉분지라는 특수한 환경에 존재하는 가스 하이드레이트 퇴적물의 미생물 다양성 분석은 앞으로 가스하이드레이트 관련 연구들이 진일보 할 수 있는 계기가 될 수 있을 것이라 생각된다. 또한, 환경유전체 분석을 위한 실험 기반을 확립하고자 하였으며 이러한 연구결과를 이용하여 제한적으로만 실시되었던 다양한 분석에 관한 해결 방법을 제공 할 수 있을 것이라 사료된다. 본 연구 결과를 바탕으로 심부 시추 퇴적물에서의 메탄의 혐기적 산화반응 및 메탄 특이적인 유전자원의 탐색을 통해 미생물 기작을 이해하고 미생물의 분포 특성을 파악하여 메탄과 관련된 생지화학적 순환과정을 이해하기 위한 연구가 진행되어야 할 것이다.

제 6장 참 고 문 헌

1. 박근필. 2008. 가스 하이드레이트 개발 *한국지구시스템공학회지*, 5: 590-600.
2. 유동근, 강동효, 구남형, 김원식, 김길영, 김병엽, 정순홍, 김영준, 이호형, 박근필, 이광훈, 박수철. 2008. 동해 울릉분지의 가스하이드레이트 부존 지구물리증거. *지질학회지*, 44(5): 645-655.
3. 이정환, 박승수, 주우성, 신창훈, 이영수. 2009. 에너지자원으로서의 가스하이드레이트 개발가능성 및 가치. *한국지구시스템공학회지*, 46: 490-497.
4. Kim, B. B., Cho, H., and Hyun, J. 2010. 16S rRNA 유전자 분석방법을 이용한 동해 울릉분지 심해 퇴적물 내 고세균 군집 구조 및 다양성의 수직분포 특성연구. *O.P.R.* 32: 309-319.
5. Arakawa, S., Sato, T., Sato, R., Zhang, J., Gamo, T., Tsunogai, U., Hirota, A., Yoshida, Y., Usami, R., Inagaki, F., and Kato, C. 2006. Molecular phylogenetic and chemical analyses of the microbial mats in deep-sea cold seep sediments at the northeastern Japan Sea. *Extremophiles*. 10(4): 311-319.
6. Biddle, J. F., Fitz-Gibbon, S., Schuster, S. C., Brenchley, J. E., and House, C. H. 2008. Metagenomic signatures of the Peru Margin seafloor biosphere show a genetically distinct environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 29(105): 10583-10588.
7. Borowski, W. S., Paull, C. K., and Ussler III, W., 1996. Marine porewater sulfate profiles indicate in situ methane flux from underlying gas hydrate. *Geology* 24: 655- 658.
8. Borowski, W. S., Paull, C. K., and Ussler, III, W., 1999. Global and local variations of interstitial sulfate gradients in deep-water, continental margin sediments; sensitivity to underlying methane and gas hydrates. *Mar. Geol.* 159: 31-154.
9. Bradburne, J. A., Mathis, J. N., and Israel, D. W. 1994. nif gene expression in a Nif+, Fix- Bradyrhizobium japonicum variant. *FEMS*.

Microbiol. Lett. 123(1-2):91-98.

10. 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.
11. Chen, Y., Ussler, W. III., Haflidason, H., Lepland, A., Rise, L., Hovland, M. and Hjelstuen, B. O. 2010. Sources of methane inferred from pore-water $\delta^{13}C$ of dissolved inorganic carbon in Pockmark G11, offshore Mid-Norway. *Chem. Geol.* 275: 127-138.
12. Dawson, A. G., Long, D., and Smith, D. E. 1988. The Storegga Slides: evidence from eastern Scotland for a possible tsunami. *Mar. Geol.* 82:271-276.
13. Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L., and Lasken, R. S. 2001. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiplyprimed rolling circle amplification. *Genome Res.* 11: 1095 - 1099.
14. Dean, F. B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A. F., Bray-Ward, P., Sun, Z., Zong, Q., Du, Y., Du, J., Driscoll, M., Song, W., Kingsmore, S. F., Egholm, M., and Lasken, R. S. 2002. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 5261 - 5266.
15. Dickens, G. R., Castillo, M. M., and Walker, J. C. G., 1997. A blast of gas in the latest Paleocene: simulating first-order effects of massive dissociation of oceanic methane hydrate. *Geology* 25:259-262.
16. Fang, J. S., Shizuka, A., Kato, C., and Schouten, S. 2006. Microbial diversity of cold-seep sediments in Sagami Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene and lipid analyses. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57: 429-441.
17. Gallego, V., García, M. T., and Ventosa, A. 2005. *Methylobacterium*

- hispanicum* sp. nov. and *Methylobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from drinking water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(1): 281-287.
18. Gornitz, V., and Fung, I. 1994. Potential distribution of methane hydrates in the world's oceans. *Global Biogeochemical Cycles* 8: 335-347.
 19. Hamdan, L. J., Gillevet, P. M., Sikaroodi, M., Pohlman, J. W., Plummer, R. E., and Coffin, R. B. 2008. Geomicrobial characterization of gas hydrate-bearing sediments along the mid-Chilean margin. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 65(1): 15-30.
 20. 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.
 21. Harry, M., Gambier, B., Bourezgui, Y. and Garnier-Sillam, E. 1999. Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances. *Analisis* 27: 439 - 442.
 22. Heijs, S. K., Aloisi, G., Bouloubassi, I., Pancost, R. D., Pierre, C., Sinninghe, Damsté, J. S., Gottschal, J. C., van, Elsas, J. D., and Forney, L. J. 2006. Microbial community structure in three deep-sea carbonate crusts. *Microb. Ecol.* 52: 451-462.
 23. Herrick, J. B., Madsen, E. L., Batt, C. A., and Ghiorse, W. C. 1993. Polymerase chain reaction amplification of naphthalene-catabolic and 16S rRNA gene sequences from indigenous sediment bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(3): 687-694.
 24. Hinrichs, K. U., and Boetius, A. 2003. The anaerobic oxidation of methane: new insights in microbial ecology and biogeochemistry. In: Wefer G, Billet D, Hebbeln D, Jørgensen BB, Schlueter M&Weering TV (Eds) *Ocean Margin Systems*, Springer Verlag, Heidelberg.
 25. Hinrichs, K. U., Hayes, J. M., Sylva, S. P., Brewer, P. G., and DeLong, E. F. 1999. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments.

- Nature* 398: 802-805.
26. Hoehler, T. M., Alperin, M. J., Albert, D. B., and Martens, C. S. 1994. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Glob. Biogeochem. Cycles* 8:451 - 464.
 27. Hoehler, T. M., Borowski, W. S., Alperin, M. J., Rodriguez, N. M., and Paull, C. K., 2000. Model, stable isotope, and radiotracer characterization of anaerobic methane oxidation in gas hydrate-bearing sediments of the Blake Ridge. In: Paull, C. K., Matsumoto, R., Wallace, P. J., Dillon, W. P. (Eds.), Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results, vol. 164. Ocean Drilling Program, College Station, TX, pp. 79 - 85.
 28. Hosono, S., Faruqi, A. F., Dean, F. B., Du, Y., Sun, Z., Wu, X., Du, J., Kingsmore, S. F., Egholm, M., and Lasken, R. S. 2003. Unbiased wholegenome amplification directly from clinical samples. *Genome. Res.* 13: 954-964.
 29. Hugenholtz, P., and Tyson, G. W., 2008. Microbiology: metagenomics. *Nature* 455: 481 - 483.
 30. Hurt, R. A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., and Zhou, J. 2001. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4495-4503.
 31. Hyun, J. H., Kim, D., Shin, C. W., Noh, J. H., Yang, E. J., Mok, J. S., Kim, H. S., Kim H. C., and Yoo, S. 2009. Enhanced phytoplankton and bacterioplankton production coupled to coastal upwelling and an anticyclonic eddy in the Ulleung basin, East Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 54: 45-54.
 32. 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.

33. Inagaki, F., Kuypers, M. M., Tsunogai, U., Ishibashi, J., Nakamura, K., Treude, T., Ohkubo, S., Nakaseama, M., Gena, K., Chiba, H., Hirayama, H., Nunoura, T., Takai, K., Jørgensen, B. B., Horikoshi, K., and Boetius, A. 2006. Microbial community in a sediment-hosted CO₂ lake of the southern Okinawa Trough hydrothermal system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103: 14164-14169.
34. Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M., Colwell, F. S., Nealson, K. H., Horikoshi, K., D'Hondt, S., and Jørgensen, B. B. 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.
35. Knittel, K. and Boetius, A. 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 311-334.
36. Kendall, M. M., Wardlaw, G. D., Tang, C. F., Bonin, A. S., Liu, Y., and Valentine, D. L. 2007. Diversity of Archaea in Marine Sediments from Skan Bay, Alaska, Including Cultivated Methanogens, and Description of *Methanogenium boonei* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 407-414.
37. Klein, M., Friedrich, M., Roger, A. J., Hugenholtz, P., Fishbain, S., Abicht, H., Blackall, L. L., Stahl, D. A., and Wagner, M. 2001. Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *J. Bacteriol.* 183(20):6028-6035.
38. Knittel, K., Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. 2005. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 467-479.
39. Könneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., and Stahl, D. A. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437(7058): 543-546.
40. Kreysa G. 2009. Climate Protection by an Alternative Use of Methane-

The Carbon Moratorium. *Chem. Sus. Chem.* 2: 49-55.

41. Kvenvolden, K. A. 1993. Gas hydrates—geological perspective and global change. *Rev. Geophysics.* 31: 173-187.
42. Kvenvolden, K. A. 1999. Potential effects of gas hydrate on human welfare. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 3420 - 3426.
43. Lee, T., Hyun, J. H., Mok, J. S., and Kim, D. 2008. Organic carbon accumulation and sulfate reduction rates in slope and basin sediments of the Ulleung Basin, East/Japan Sea. *Geo-Marine Lett.* 28: 153-159
44. Leloup, J., Fossing, H., Kohls, K., Holmkvist, L., Borowski, C., and Jørgensen, B. B. 2009. Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation. *Environ. Microbiol.* 11: 1278-1291.
45. Leloup, J., Loy, A., Knab, N. J., Borowski, C., Wagner, M. and Jørgensen, B. B. 2007. Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ. Microbiol.* 9: 131-142.
46. Madigan, M. T. and Martinko, J. M. 2006. Brock biology of microorganisms. Prentice Hall. USA
47. Marcy, Y., Ishoey, T., Lasken, R. S., Stockwell, T. B., Walenz, B. P., Halpern, A. L., Beeson, K. Y., Goldberg, S. M., and Quake, S. R. 2007. Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells. *PLoS. Genet.* 3(9): 1702-1708.
48. Martens, C. S., and Berner, R. A., 1977. Interstitial water chemistry of anoxic Long Island sediment. 1. Dissolved gases. *Limnology and Oceanography* 22: 10-25.
49. Matsumoto, R., Okuda, Y., and Aoki, Y., 1994, Methane hydrate, Tokyo Nikkei Science Publishers.

50. Meyerdierks, A., Kube, M., Kostadinov, I., Teeling, H., Glöckner, F. O., Reinhardt, R., and Amann, R. 2010. Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-I group. *Environ. Microbiol.* 12: 422–439.
51. Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V., Blumenberg, M., Knittel, K., Gieseke, A., Peterknecht, K., Pape, T., Boetius, A., Amann, R., Jørgensen, B. B., Widdel, F., Peckmann, J., Pimenov, N. V., and Gulin, M. B. 2002. Microbial Reefs in the Black Sea Fueled by Anaerobic Oxidation of Methane. *Science* 297:1013–1015.
52. Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. and Ghiorse, W. C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4715 - 4724.
53. Mills, H. J., Hodges, C., Wilson, K., Macdonald, I. R., and Sobecky, P. A. 2003. Microbial diversity in sediments associated with surface-breaching gas hydrate mounds in the Gulf of Mexico. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 46: 39–52.
54. Mills, H. J., Martinez, R. J., Story, S., and Sobecky, P. A. 2005. Characterization of microbial community structure in Gulf of Mexico gas hydrates: comparative analysis of DNA- and RNA-derived clone libraries. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3235–3247.
55. Mitchell, J. B. F. 1989. The "greenhouse" effect and climate change. *Rev. Geophysics* 27: 115–139.
56. Miyazaki, J., Higa, R., Toki, T., Ashi, J., Tsunogai, U., Nunoura, T., Imachi, H., and Takai, K. 2009. Molecular characterization of potential nitrogen fixation by anaerobic methane-oxidizing archaea in the methane seep sediments at the number 8 Kumano Knoll in the Kumano Basin, offshore of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(22): 7153–7162.
57. Morris, R. M., Rappé, M. S., Urbach, E., Connon, S. A., and Giovannoni, S. J. 2004. Prevalence of the Chloroflexi-related SAR202 bacterioplankton

- cluster throughout the mesopelagic zone and deep ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5): 2836–2842.
58. 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.
 59. Nauhaus, K., Treude, T., Boetius, A., and Krüger, M. 2005. Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environ. Microbiol.* 7: 98–106.
 60. Nisbet, E. G. 1989. The end of the ice age. *Canadian Journal of Earth. Science*, 27: 148–157.
 61. Nunoura, T., Oida, H., Toki, T., Ashi, J., Takai, K., and Horikoshi, K. 2006. Quantification of *mcrA* by quantitative fluorescent PCR in sediments from methane seep of the Nankai Trough. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 57: 149–157.
 62. Omoregie, E. O., Mastalerz, V., de Lange, G., Straub, K. L., Kappler, A., Røy, H., Stadnitskaia, A., Foucher, J. P., and Boetius, A. 2008. Biogeochemistry and community composition of iron and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefren Mud volcano (Nile Deep Sea Fan, Eastern Mediterranean). *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3198–3215.
 63. Orcutt, B. and Meile, C. 2008. Constraints on mechanisms and rates of anaerobic oxidation of methane by microbial consortia: process-based modeling of ANME-2 archaea and sulfate reducing bacteria interactions. *Biogeosciences* 5:1587 - 1599.
 64. Pachiadaki, M. G., Lykousis, V., Stefanou, E. G., and Kormas, K. A. 2010. Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). *FEMS. Microbiol. Ecol.* 72(3): 429–444.

65. Parkes, R. J., Cragg, B. A., Banning, N., Brock, F., Webster, G., Fry, J. C., Hornibrook, E., Pancost, R. D., Kelly, S., Knab, N., Jørgensen, B. B., Rinna, J. and Weightman, A. J. 2007. Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark). *Environ. Microbiol.* 9: 1146–1161.
66. Parkes, R. J., Cragg, B. A., Banning, N., Brock, F., Webster, G., Fry, J. C., Hornibrook, E., Pancost, R. D., Kelly, S., Knab, N., Jørgensen, B. B., Rinna, J., and Weightman, A. J. 2007. Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark). *Environ. Microbiol.* 9: 1146–1161.
67. Paull, C. K., Ussler, W. III, and Dillon, W. P. 1991. Is the extent of glaciation limited by marine gas hydrates? *J. Geophysical Res.* 18: 432–434.
68. Raghunathan, A., Ferguson, H. R. Jr., Bornarth, C. J., Song, W., Driscoll, M., and Lasken, R. S. 2005. Genomic DNA amplification from a single bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3342 - 3347.
69. Raghoebarsing, A. A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K. T., Smolders, A. J., Ettwig, K. F., Rijpstra, W. I., Schouten, S., Damsté, J. S., Op den Camp, H. J., Jetten, M. S., and Strous, M. 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, 440: 918–921.
70. Reed, D. W., Y. Fujita, M. E. Delwiche, D. B. Blackwelder, P. P. Sheridan, T. Uchida, and F. S. Colwell. 2002. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3759–3770.
71. Roalkvam, I., Jørgensen, S. L., Chen, Y., Stokke, R., Dahle, H., Hocking, W. P., Lanzén, A., Haflidason, H., and Steen, I. H. 2011. New insight into stratification of anaerobic methanotrophs in cold seep sediments. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 78(2): 233–243.

72. Roussel, E. G., Sauvadet, A. L., Allard, J., Chaduteau, C., Richard, P., Cambon, Bonavita, M. A., and Chaumillon, E. 2009. Archaeal methane cycling communities associated with gassy subsurface sediments of Marennes-Oléron Bay (France). *Geomicrobiol. J.* 26: 31-43.
73. Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N. N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Krahn, I., Krause, L., Krömeke, H., Kruse, O., Mussnug, J. H., Neuweger, H., Niehaus, K., Pühler, A., Runte, K. J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Tilker, A., Viehöver, P., and Goesmann, A. 2008. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J. Biotechnol.* 31;136(1-2): 77-90.
74. Sloan, E. D. Jr. 2003. Fundamental principles and applications of natural gas hydrates. *Nature* 426: 353-363.
75. So, C. M., Phelps, C. D., and Young, L. Y. 2003. Anaerobic Transformation of Alkanes to Fatty Acids by a Sulfate-Reducing Bacterium, Strain Hxd3. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3892-3900.
76. Sørensen, K. B., and Teske, A. 2006. Stratified communities of active Archaea in deep marine subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4596-4603.
77. Takai, K., and Horikoshi, K. 1999. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* 152: 1285-1297.
78. Teske, A., Hinrichs, K. U., Edgcomb, V., de Vera Gomez, A., Kysela, D., Sylva, S. P., Sogin, M. L., and Jannasch, H. W. 2002. Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin: Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1994-2007.
79. Teske, A., and Sørensen, K. B. 2008. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME. J.* 2: 3-18.
80. Thomsen, T. R., Finster, K., and Ramsing, N. B. 2001. Biogeochemical

- and molecular signatures of anaerobic methane oxidation in a marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1646 - 1656.
81. Timothy, H. and Thomas, J. 2007. Metagenomics analysis using the Genome SequencerTM FLX system *Nature Methods* 4.
 82. Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schloter, M., Wagner, M., Richter, A., and Schleper, C. 2011. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(20): 8420-8425.
 83. Tourova, T. P., Kolganov, T. V., Kuznetsov, B. B., and Pimenov, N. V. 2002. Phylogenetic diversity of the archaeal component in microbial mats on coral-like structures associated with methane seeps in the Black Sea. *Microbiology* (translated from Mikrobiologiya) 71: 230-236.
 84. Treude, T., Knittel, K., Blumenberg, M., Seifert, R., and Boetius, A. 2005. Subsurface microbial methanotrophic mats in the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6375-6378.
 85. Treude, T., Orphan, V., Knittel, K., Gieseke, A., House, C. H., and Boetius, A. 2007. Consumption of methane and CO₂ by methanotrophic microbial mats from gas seeps of the anoxic Black Sea. *Appl Environ Microbiol.* 73(7): 2271-2283.
 86. Vetriani, C., Tran, H. V., and Kerkhof, L. J. 2003. Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea. *Appl Environ Microbiol.*, 69: 6481-6488.
 87. 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.
 88. Webster, G., Parkes, R. J., Cragg, B. A., Newberry, C. J., Weightman, A. J., and Fry, J. C. 2006. Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep seafloor sediments from the Peru

- Margin. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 58: 65-85.
89. Webster, G., Yarram, L., Freese, E., Köster, J., Sass, H., Parkes, R. J., and Weightman, A. J. 2007. Distribution of candidate division JS1 and other Bacteria in tidal sediments of the German Wadden Sea using targeted 16S rRNA gene PCR-DGGE. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 62:78-89.
 90. Welander, P. V., and Metcalf, W. W. 2008. Mutagenesis of the C1 oxidation pathway in *Methanosarcina barkeri*: new insights into the Mtr/Mer bypass pathway. *J. Bacteriol.* 190: 1928-1936.
 91. Wilms, R., Sass, H., Köpke, B., Cypionka, H., and Engelen, B. 2007. Methane and sulfate profiles within the subsurface of a tidal flat are reflected by the distribution of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 59: 611-621.
 92. Young, R. W., and Bryant, E. A. 1992. Catastrophic wave erosion on the southeastern coast of Australia: impact of the Lanai tsunamis ca 105 ka? *Geology.* 20: 199-202.

주 의

1. 이 보고서는 한국지질자원연구원에서 주요사업으로 수행하는 과제의 위탁 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 한국지질자원연구원에서 수행한 주요사업의 위탁연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.