

16S rRNA 유전자 분석에 의한 전남 순천만 갯벌의 세균 다양성

이명숙^{1,2} · 홍순규¹ · 이동훈² · 김치경² · 배경숙^{1*}

¹한국생명공학연구원 유전자은행, ²충북대학교 미생물학과

순천만 갯벌의 세균 군집의 다양성을 조사하기 위해 16S rDNA의 다양성을 조사하였다. 갯벌로부터 전체 핵산을 분리한 후, 세균에 상보적인 universal primer로 증폭된 16S rDNA로부터 클론 라이브러리를 만들었다. 총 111개의 클론으로부터 *HaeIII*를 이용하여 amplified rDNA restriction analysis (ARDRA)를 수행하고, GelCompar II 프로그램 이용하여 pattern을 clustering하였다. 111개의 클론 중 100가지의 서로 다른 RFLP type이 조사되었고, 이들 중 전체 클론 라이브러리를 대표할 수 있는 20개의 클론을 선별하여 부분적인 염기서열을 분석하여 세균 다양성을 분석하였다. 20개의 클론중에는 RDP와 GenBank에서 제공하는 small subunit RNA database와 동일한 클론은 존재하지 않았으며, 이미 알려진 배양 가능한 세균의 16S rRNA 염기서열과 비교 하였을 때 77~96.8%의 유사도를 보였다. 또한 이들 20개의 클론은 *alpha*-, *delta*-, *gamma-Proteobacteria*, low G+C Gram positive bacteria, high G+C Gram positive bacteria, *Sphingobacteria (Cytophaga)*, *Cyanobacteria (Chloroplast)* 등 주요한 7개 lineage에 속했으며, 클론들 중 *Proteobacteria*가 우점종을 차지하고 있었다.

Key words □ ARDRA, bacterial diversity, mud flat, *Proteobacteria*, 16S rDNA

서 론

갯벌은 육상환경과 해양환경이 접촉하는 곳으로 조수의 간만에 의해 육지로 드러나는 모래나 썩은 평평한 해저로서, 간만의 차이가 크고 지형이 완만한 연안해역에서 생성된다. 이렇게 형성된 갯벌은 육지와 바다를 서로 이어주는 연안생태계의 완충지대로서 생물다양성이 매우 풍부하고, 각종 어패류의 서식지로서 산란과 생육장소를 제공하며, 높은 자정능력을 가지고 있어 육지에서 발생하는 각종 오염물질을 정화하는 기능을 가지고 있다(22,30). 지구상의 대부분 미생물의 서식처는 퇴적토나 토양이며, 토양 1g에는 수천종의 미생물이 존재한다(39). 특히 세균은 해양환경이나 퇴적토에서 여러 종류의 가수분해 효소들을 생산하여 고분자 유기물의 수용화를 촉진시켜 물질순환을 일으키고, 수층, 저질토, 해양, 토양 등의 다양한 생태계에서 유기물의 분해자로 중요한 역할을 한다(22,23). 그러나 자연 생태계 전체에 존재하는 모든 세균을 배양, 동정하는 것은 불가능하다(42). 실제로 배양 가능한 세균은 0.001~1% 정도이며, 99% 이상의 세균들이 전통적인 방법으로 배양될 수 없다고 보고되어 있다(4,16,41). 따라서 최근에는 자연생태계에 존재하는 미생물 군집을 배양하지 않고 이해하기 위한 방법들이 개발되고 있으며, 그중 하나가 핵산을 이용한 분자생물학적인 방법이다. 미생물생태학 연구는 환경에서 분자지표로 16S rRNA 유전자(16S rDNA)를 사용하여 다양한 환경의 미생물 군집구조를 분자생물학적 관점에서 분석

하고 있다(44). 이러한 분석방법은 과거 전통적인 배양기술의 제한성을 해결할 수 있으며 미생물 군집의 변화와 다른 환경요인의 영향을 배제한 상태에서 속 수준으로의 미생물 군집구조를 거의 정확하게 분석할 수 있다(21). 특히 세균군집의 구조와 다양성을 이해하는데 있어서 응용하는 방법은 주로 16S rDNA의 염기서열 해독이며, 이를 이용한 계통분석은 다양한 환경에 존재하는 미생물 군집을 규명하는데 이용되어 왔다(5).

순천만의 지리적 환경은 동쪽으로는 여수반도와 서쪽으로는 고흥반도에 둘러싸여 있으며 순천을 관통하는 동진과 상사호의 방류수가 흐르는 이사천이 합류하여 기수역에서 해룡천과 합류한다. 순천만의 해안선 길이는 39.8 Km²에 이르며 갯벌 21.6 Km²과 갈대밭 5.4 Km²이 조성되어 있고, 평균 수심은 1.5 m이며, 갯벌은 미사(silt)와 점토(clay)가 99% 이상으로 구성되어 있다(3). 이러한 순천만은 우리나라 갯벌 가운데 염습지가 남아 있는 유일한 갯벌로서 바다에 가까운 아래쪽에는 염생식생의 일종인 칠면초 군락이 형성되어 있어 자연생태계 측면에서 그 가치가 매우 높으며, 국제보호조인 동시에 국내 천연기념물인 조류 및 희귀식물이 다량 서식하고 있어 습지보전협약(RAMSAR)에 보존습지로 보호가치가 있는 지역으로 대두되고 있으며, 갯벌의 보존상태 또한 완벽하다고 보고하고 있다(2).

본 연구에서는 전남 순천만의 갯벌토양으로부터 직접 DNA를 추출하고 eubacteria의 16S rDNA 증폭용 universal primer를 사용하여 16S rDNA 클론 라이브러리를 제작하여 amplified rDNA restriction analysis (ARDRA)를 수행하였고, 이들 중 일부를 선별하여 16S rDNA partial sequence를 분석하여 DNA database와 함께 비교하고 계통분석을 통하여 순천만 갯벌의 미생물군집의 다양성을 조사하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel : 042-860-4610, Fax : 042-860-4677
E-mail : ksbae@mail.kribb.re.kr

재료 및 방법

시료채집 및 Total DNA 추출과 정제

갯벌의 채집은 2000년 5월에 실시하였으며, 전남 순천시 대대동에 위치한 갯벌을 채취하였다(Fig. 1). 채취한 갯벌로부터 전체 핵산을 추출하기 위하여 Elsas와 Smalla (13)의 방법을 다음과 같이 변형하여 이용하였다. 먼저 염농도를 낮추기 위해 시료 30 g이 들어있는 50 ml polypropylene tube에 15 ml의 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)를 넣고 수초동안 vortexing 한 후 실온에서 10,000×g로 15분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 다시 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)로 충분히 분산시키고, 375 mg lysozyme을 넣고 균질화시킨 후 37°C 수조에서 15분 간격으로 vortex를 이용하여 섞어주면서 1시간 동안 반응시켰다. Lysozyme을 처리한 시료를 얼음 속에 담가 10분 동안 냉각시키고 12 ml의 20% SDS를 첨가하여 실온에 20분 동안 방치한 후 액체질소와 65°C 수조에서 각 10분씩 번갈아 넣어 주어 얼림과 녹임을 3회 반복하였다. Phenol과 chloroform/isoamylalcohol (24:1)으로 핵산을 추출한 후 ethanol로 침전시켜 crude DNA를 회수하였다. Total DNA의 정제를 위해 2 ml의 crude DNA에 2 g의 CsCl를 첨가한 후 실온에서 1-3시간동안 방치하고 10,000×g로 20분간 원심분리한 후 상층액을 새 튜브에 옮겼다. 여기에 8 ml의 멸균수를 첨가하고 6 ml의 iso-propanol로 침전시킨 후 pellet은 500 µl TE buffer (pH 8.0)에 녹였다. 100 µl의 8M potassium acetate를 넣고, 실온에서 15분 동안 방치 한 후 원심분리(10,000×g, 15 min, 실온)하여 상층액을 모았다. 0.6 volume의 iso-propanol로 침전시키고, 70% ethanol로 세척하여 건조시킨 후 500 µl의 멸균수에 녹여 0.75% Seaplaque GTG agarose (FMC BioProducts, Rockland, Maine) gel에 전기영동(5 V/cm)하여 23 kb에 위치하는 chromosomal DNA를 PCR반응의 주형으로 이용하기 위해 gel을 절단한 후

agarase (Boehringer GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 2 차 정제를 수행하였다.

16S rDNA 증폭 및 클로닝

분리한 total DNA에서 eubacterial 16S rDNA를 증폭시키기 위하여 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG' (8F: positions 8 to 27nt, *E. coli* 16S rDNA numbering)을 forward primer로 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACTT' (1492R: positions 1510 to 1492nt, *E. coli* 16S rDNA numbering)를 reverse primer로 사용하여 PCR을 수행하였다(12). PCR 조건은 200 ng의 template DNA와 0.2 µM primers, 200 µM dNTPs, 10× PCR buffer, 2.5U *Taq* DNA polymerase를 넣고 최종 반응 부피를 100 µl로 하여 95°C에서 7분간 pre-denature 시킨 후, 총 35 cycles (denaturation at 95°C for 45 sec, annealing at 55°C for 45 sec, extension at 72°C for 1 min 30 sec)을 반응시킨 후 72°C에서 7분간 더 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 분리하였으며, 분리된 DNA를 pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, Wis.)에 ligation 한 후 *E. coli* JM109에 형질전환시켜, ampicillin (50 µg/ml)이 포함된 LB agar plate에서 blue-white colony 선별법에 의해 recombinant 클론을 선별하였다.

Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA)

각각의 형질 전환된 클론들은 5'-TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA-3' (prGTf)를 forward primer로 5'-ACT CAA GCT ATG CAT CCA AC-3' (prGTt)를 reverse primer (8)로 사용하여 direct reamplified PCR을 수행하여 약 1.5 kb의 PCR 산물을 얻었다. PCR 반응조건은 반응 부피를 50 µl로 하여 94°C에서 5분간 pre-denature 시킨 후, 총 25 cycles (denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min)로 반응시킨 후 72°C에서 10분간 더 반응시켰다. 증폭된 rDNA의 RFLP분석은 *Hae*III (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하였으며, 반응조건은 최종부피를 10 µl로 하였고, PCR산물(최종부피 50 µl) 7 µl, 제한효소(*Hae*III) 3 unit로 처리하여 37°C에서 overnight 반응시킨 후 4% agarose gel + EtBr (10 mg/ml)을 이용하여 7.5 V/cm로 전기영동 하였다. 50~100 bp ladder (BMA, Rockland, Maine)를 DNA marker로 사용하였고, multi-lane screener program (GelCompar II; Applied Maths, Belgium)을 이용하여 DNA fragment pattern을 clustering하였다. 클론의 RFLP 분석에 의해서 얻어진 genetic diversity를 추정하기 위해 coverage value (C)를 계산하였다(19).

$C = [1 - (n/N)] * 100$ *n*: the number of unique clones, *N*: the total number of clones.

유전자 서열 분석과 phylogentic analysis

ARDRA의 결과로부터 유사도 값이 50% 이상에서 구분되는 monophyletic group을 중심으로 9개의 cluster로 나누었고, 각 cluster에서 최소한 1개 이상의 클론을 선별하였으며, ARDRA의 유사도와 16S rDNA 염기서열간의 상관관계를 조사하기 위하여

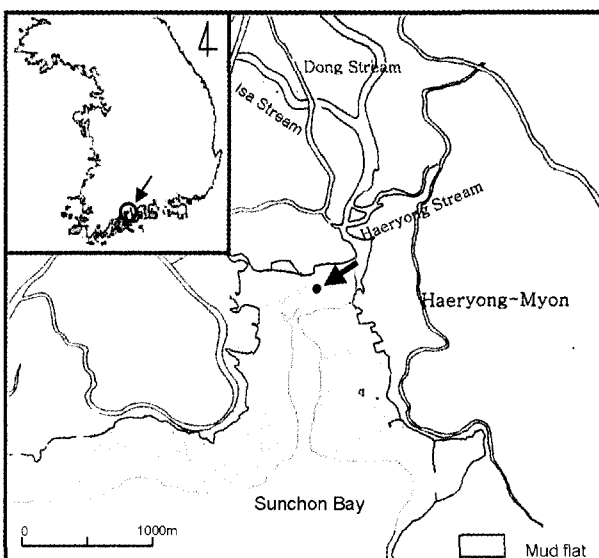


Fig. 1. Map showing the sampling site in Suncheon Bay.

유사도 값에 따라서 클론을 선별하여 총 20개의 클론에 대하여 염기서열을 분석하였다. rDNA 유전자서열을 분석하기 위해 prGTF, prGTr로 증폭된 PCR산물을 DNA PrepMate™ (BIO-NEER, Cheongwon, Korea)로 정제하였다. 유전자 서열분석은 Big-Dye Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) 와 ABI Prims 310 Genetic analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)에 의해 수행하였으며, 유전자 서열 분석을 위해 8F primer를 사용하였다. RDP (Ribosomal Database Project)에서 제공하는 CHECK_CHIMERA 프로그램에 의해 chimera artifact를 확인하였고, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST search program과 RDP를 이용하여 DNA database와 유사한 sequence를 비교하였다(29). 여기에서 얻어진 염기서열과 클론들의 염기서열은 Phydit program(7)을 사용하여 2차 구조에 바탕을 두고 정렬하였으며, 분석된 클론의 염기서열 길이가 다를 경우 가장 짧은 것을 기준으로 하였고, 나머지 부분은 계통분석에서 제외하였다. 계통분석은 PHYLIP 3.5 package (15)를 이용하여 Jukes & Cantor distance model (24)과 neighbor-joining method (36)에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 phylogentic tree를 추론하였다. 또한 bootstrap 값은 1,000회의 resampled data로부터 추론하였으며 (14), 20개의 클론에 대해 결정한 부분적인 염기서열들은 GenBank sequence database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)에 등록(Access-ion number: AF369709-AF369728) 하였다.

결과 및 고찰

Total DNA의 추출 및 정제

토양미생물의 유전적 구조의 다양성을 이해하기 위한 접근 방법중의 하나가 자연상태의 시료로부터 핵산을 직접적으로 추출하여 분자생물학적인 방법을 이용하는 것인데, 토양으로부터 핵산을 직접 추출하는데 있어서 크게 두 가지 문제점이 따른다. 하나는 충분한 DNA의 양을 확보해야 한다는 것이며, 다른 하나는

충분히 정제된 DNA를 얻는 것이다. 특히 토양에서 추출된 핵산에는 humic compound나 효소저해 물질들이 함께 존재한다(26). 이들 humic compound나 효소저해 물질들은 PCR 및 제한효소 반응을 저해하는 것으로 알려져 있다(38,43). 따라서 자연상태에 존재하는 미생물의 정확한 분석을 위해서는 클로닝과 염기서열의 분석, 또는 hybridizing probing 방법을 사용하기 위해 자연상태의 시료로부터 편중되지 않은 핵산의 추출과 회수가 필수적이다. 본 연구에서는 갯벌로부터 전체 핵산을 추출하기 위하여 Elsas와 Smalla (1995)의 방법을 변형하여 이용하였다. Ethanol 침전시에는 갯벌자체에 염농도가 매우 높으므로 NaCl을 넣지 않았으며, CsCl와 potassium acetate 침전에 의해 정제된 전체 핵산에서는 고농도의 염이 완전히 제거되었고, yield는 60~66 µg/g (wet weight)이었으며, A₂₆₀/A₂₈₀ 비율은 1.36~1.49였다. 또한 핵산의 단편화도 적게 일어났다. 그러나 CsCl 와 potassium acetate 침전에 의해 정제된 DNA는 갈색을 띠었으며, PCR이 수행되지 않았다(data not shown). 따라서 humic compound들이 전기영동상에서 DNA에 비해 약 2배정도 빠르게 이동하는 성질(6)을 이용하여 DNA의 2차 정제를 수행하였으며, 이후 얻어진 DNA는 PCR, 제한효소 처리, 클로닝을 수행하기에 적합하였다.

Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA)에 의한 diversity 조사

Eubacterial 16S rDNA를 증폭시키기 위하여 8F와 1492R primer를 사용하여 약 1.5 kb에 해당하는 PCR 반응산물을 확인하였고, PCR 산물을 pGEM-T Easy Vector에 삽입하여 총 111개의 클론을 얻었다. 각 클론들의 ARDRA pattern을 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means) 방법에 의해 분석한 결과 50% 정도의 RFLP 유사도에 따라 9개의 cluster로 나뉘어졌으며, 100 개의 서로 다른 RFLP type으로 조사되었고(Fig. 2), clone number ratio [(RFLP types clone number/total clone number)×100]은 90.1%로 대부분이 single type의 클론이었다. Moyer 등(1994)은 ARDRA에 의해 심해 열수구의

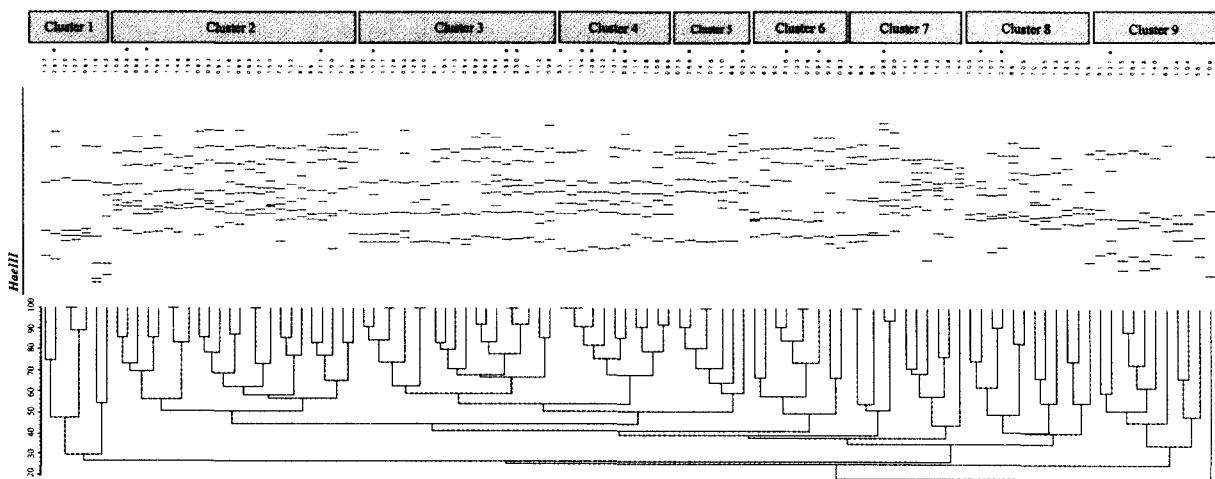


Fig. 2. Dendrograms constructed from the results of ARDRA pattern and distance matrix calculated by the UPGMA method using GelCompar II. The diversity within 16S rDNA clone libraries was further investigated by ARDRA with one restriction endonuclease (*Hae*III). Dots show the positions of sequenced clones.

microbial mat community를 조사하였는데, 48개의 클론들로부터 12개의 서로 다른 RFLP type을 얻었으며 이들 중 2가지 클론 type이 우세하다는 보고를 했다. 실험결과가 현장에 실제로 존재하는 세균 군집을 반영하는 비율을 의미하는 coverage value (C)도 순천만의 경우 19%로 매우 낮았다. Urakawa 등(40)은 SA, SB, TK의 marine sediment로부터 ARDRA pattern을 조사한 결과 SA에서는 72 클론들 중 57개의 서로 다른 RFLP type을, SB에서는 62 클론들 중 17개의 RFLP type, TK에서는 58 클론들 중 21개의 RFLP type을 나타낸다고 보고했으며, 이들의 coverage value (C)를 계산한 결과 SB와 TK는 각각 84%, 74%로 비슷한 value를 나타내었으나, SA에서는 45%로 낮았다고 보고하고 있다. 이들의 지역적인 특징은 TK는 산업폐수와 생활하수가 유입되어 매우 오염되어 있고, 물의 흐름이 느려 부영양화가 일어나는 곳이며, SB는 TK의 남서쪽에 위치하고 있으며 Pacific Ocean과 Kuroshio Current가 앞 바다에서 잘 연결되어 물의 흐름이 좋은 편이고 Bay의 서쪽은 가파른 절벽이며, Izu Peninsula 북동쪽의 측면이다. SA는 이 절벽의 아래부분에 위치하고 있어 물의 흐름이 매우 활발한 곳이다. Rath (33)는 marine snow sample로부터 microbial diversity의 coverage value를 계산한 결과 5.3%로 매우 낮은 coverage value를 보고했다.

위의 연구들이 2~3개의 제한효소를 사용해서 얻어진 결과인데

반하여 본 실험에서는 한 종류의 제한효소를 사용했는데도 거의 모든 클론들이 다른 pattern으로 나타나는 것으로 보아 갯벌내 미생물의 genetic diversity가 매우 높은 것으로 조사되었다. 일반적으로 미생물 군집구조는 화학적 또는 물리적인 스트레스에 대한 반응으로서 diversity가 감소하게 되거나 변하게 된다(28). 그러나 순천만의 경우 순천만으로 유입되는 생활하수가 상사호의 방류수와 합류하여 순천만으로 유입되지만 염생식물과 갯벌 등의 활발한 자정작용(1)으로 인하여 갯벌의 오염을 최소화시키는 것으로 사료되며, 갯벌내에 존재하는 미생물군집도 매우 다양한 것으로 추정할 수 있었다.

계통분석에 의한 미생물군집 조사

ARDRA의 결과부터 dendrogram에 따라 20개의 클론을 선별하여 partial sequencing을 수행한 결과 길이는 약 466~678 bp 정도였다. 환경시료에서 분리한 DNA로부터 16S rDNA를 증폭할 경우 chimeric artifact를 형성할 수 있으며, 이러한 현상은 혼합되어 있는 16S rDNA의 단편들이 hybrid molecule을 형성하여 이것을 주형으로 하는 PCR 반응에서 증폭되어 나타나게 된다(27). 따라서 RDP에서 제공하는 CHECK_CHIMERA 프로그램에 의해 chimera artifact를 조사한 결과 20개의 클론 sequence에서는 조사되지 않았다. Partial sequence는 phytid program으로 정

Table 1. Nearest neighbour of the 16S rDNA clones

Clone No.	Accession No.	Length of sequence (bp)	phylogentic group ^a	Closest relative based on partial sequence homology ^b	Similarity (%)
38	AF369715	502	<i>alpha</i> Proteobacteria	<i>Azospirillum lipoferum</i> (Z29619)	86
266	AF369716	510	<i>alpha</i> Proteobacteria	<i>Sagittula stellata</i> (U58356)	95
16	AF369717	572	<i>gamma</i> Proteobacteria	<i>Dechloromarinus chlorophilus</i> NSS (AF170359)	88
26	AF369718	579	<i>gamma</i> Proteobacteria	<i>Neptunomonas naphthovorans</i> (AF053734)	91
97	AF369719	555	<i>gamma</i> Proteobacteria	<i>Dechloromarinus chlorophilus</i> NSS (AF170359)	87.3
123	AF369720	678	<i>gamma</i> Proteobacteria	<i>Dechloromarinus chlorophilus</i> NSS (AF170359)	85.5
277	AF369721	550	<i>gamma</i> Proteobacteria	<i>Dechloromarinus chlorophilus</i> NSS (AF170359)	89.3
25	AF369722	579	<i>delta</i> Proteobacteria	<i>Pelobacter venetianus</i> (U41562)	80.5
53	AF369723	631	<i>delta</i> Proteobacteria	<i>Desulfobacterium cetonicum</i> (AJ237603)	89
131	AF369724	620	<i>delta</i> Proteobacteria	<i>Desulfosarcina variabilis</i> (M26632)	86.3
134	AF369725	489	<i>delta</i> Proteobacteria	<i>Desulfosarcina variabilis</i> (M26632)	86.4
136	AF369726	481	<i>delta</i> Proteobacteria	<i>Desulfotalea arctica</i> LSv514 (AF099061)	87
224	AF369727	630	<i>delta</i> Proteobacteria	<i>Desulfosarcina variabilis</i> (M26632)	87
296	AF369728	632	<i>delta</i> Proteobacteria	<i>Pelobacter venetianus</i> (U41562)	88.3
37	AF369709	537	High G+C Gram positive bacteria	<i>Promicromonospora enterophila</i> (X83807)	77
41	AF369710	526	Low G+C Gram positive bacteria	<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i> (X58351)	82
155	AF369711	466	Low G+C Gram positive bacteria	<i>Thermohalobacter berrensis</i> CTT3 (AF113543)	79
230	AF369712	676	Low G+C Gram positive bacteria	<i>Thermohalobacter berrensis</i> CTT3 (AF113543)	78
103	AF369713	645	Sphingobacteria	<i>Cytophaga fermentans</i> (M58766)	82.1
291	AF369714	506	Cyanobacteria	Chloroplast <i>Navicula salinicola</i> (U96446)	96.8

^aBased on *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition

^bThe closest matching sequence from a cultivated and characterized strain was identified using the Blast search.

렬한 후, RDP database와 GenBank database를 이용하여 배양 가능한 미생물의 알려진 16S rDNA sequence와 비교했을 때 어떠한 organism과도 일치하지 않았으며, 배양 가능한 미생물과의 sequences similarity는 77~96.8%였다(Table 1). 그리고 ARDRA의 결과부터 cluster된 클론들은 UPGMA 분석시 유사도 85% 이상(cluster 4: clone 53, 134, 136)에서는 염기서열분석 결과(Fig 3; clone 53, 134, 136)와 어느 정도 일치하였으나, 80%이하에서 cluster된 클론들은 염기서열분석 결과에 있어서는 서로 다른 lineage로 나누어져 일관되지 않았다. 따라서 ARDRA에 의해 grouping을 할 경우 유사도 값이 85% 이상에서만 유의성을 가지는 것으로 판단된다.

20개의 클론들을 계통분석한 결과 *alpha*-, *delta*-, *gamma*-*Proteobacteria*, low G+C Gram positive bacteria, high G+C Gram positive bacteria, Sphingobacteria (*Cytophaga*), Cyanobacteria (Chloroplast) 등 7개의 주요한 lineage로 나누어졌다(17). 이들 중 14개의 클론이 *Proteobacteria* (*alpha*, *delta*, *gamma*)에 속했으며, *delta Proteobacteria*의 내부분은 sulfur-reducing에 관여하는 bacteria와 유연관계를 가지고 있었으며, similarity value는

86~89%였다. 또한 *gamma Proteobacteria*는 blast search 결과 대부분이 sulfur-oxidizing symbiotic bacteria와 관계되었으나 배양 가능한 균주 중에서는 계통분류학적으로 유사한 균주가 없기 때문에 생리적인 특성을 정확히 예측할 수 없었다(Fig. 3). 클론 38, 266은 계통분석에서 *alpha Proteobacteria*에 속했으며, 클론 38은 식물의 뿌리에 뿌리혹을 형성하게 한 후 질소를 고정하게 하는 박테리아로 열대성 단자엽식물의 뿌리와 공생하는 종류로 알려진 *Azospirillum lipoferum* (Z29619)과 86%의 유사도를 나타냈다(31). 최근 연구결과에 의하면 *Azospirillum lipoferum*은 뿌리에 기계적으로 침투한 후 뿌리의 세포사이를 통하여 번식(intercellular growth)하는 것으로 알려져 있다(31). 그리고 클론 266은 최근에 보고된 Rhodobacteraceae에 속하고 배양가능한 균주 중 유일하게 알려진 *Sagittula stellata* (U58356)(18)와 95%의 유사도를, *Antarctobacter heliothermus* (Y11552)(25)와는 94%의 높은 유사도를 나타냈으며, bootstrap 값도 90%를 유지하였다(Fig. 3). *Antarctobacter heliothermus*는 Vestfold Hills (East Antarctica)의 Ekho Lake의 42m 깊이에서 채취한 water에서 분리된 세균이며(25). *Sagittula stellata*는 Georgia 해안의 해수에서 분리된 세균이다(18). 이들 genus는 아직까지 해안의 mud flat나 marine sediment로부터 보고된 것은 없으며, 환경으로부터 얻어진 유사한 클론도 보고된 바가 없고, 본 연구 결과가 처음이다. 그리고 서식지가 광범위한 *Proteobacteria* 중 본 실험에서 선별된 클론들 중에서는 *beta*, *epsilon Proteobacteria*가 관찰되지 않았으나, Urakawa 등(40)은 marine sediment로부터 *epsilon Proteobacteria*를, Cifuentes 등(9)은 *Zostera noltii*-colonized marine sediment로부터 *beta*, *epsilon Proteobacteria*를 보고한 바 있다.

클론 41은 low G+C Gram-positive bacteria group에 포함되었으며, 절대혐기성 세균인 *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (X58351)와 가장 가까운 유연관계를 나타내었다. 또한 *Clostridium acetireducens* (X79862)와의 유연관계도 높게 나타났으며, 이들은 각각 91%와 75%의 bootstrap 값으로 지지되었다. 클론 155와 230은 ARDRA 분석에서 동일한 제한효소 절단모양을 나타낸 클론으로서 염기서열 분석에서 96.5%의 유사도를 나타내었으며, 클론 41과 마찬가지로 low G+C Gram positive bacteria group에 포함되는 것으로 나타났다. 이 두 클론은 *Thermohalobacter berrensis* (AF113543)와 각각 78%와 79%의 염기서열 유사도로서 현재까지 알려진 세균 중에서는 가장 높은 염기서열 유사도를 보였으나, 계통분석에서는 유연관계가 높지 않은 것으로 나타났고, 또한 cold marine(34)으로부터 얻어진 uncultured *HolophagalAcidobacterium* (AJ241003)과도 86%의 낮은 유사도를 나타내었다(Fig. 4). 클론 37은 high G+C Gram-positive bacteria group과 가까운 유연관계를 보였으며, 배양 가능한 미생물과의 염기서열 분석시 유사도가 가장 높은 세균은 *Promicromonospora enterophila* (X83807)로 조사되었으나 77%의 낮은 유사도를 나타냈다. 또한 blast search 결과 가장 높게 조사된 arid soil(11)로부터 얻어진 uncultured soil bacterium (AF128648)과의 유사도를 조사하였으나 79%로 매우 낮았고, bootstrap 값도 51%로 높지 않았다(Fig. 4).

Sphingobacteria의 gliding mobility와 다양한 고분자 유기물을

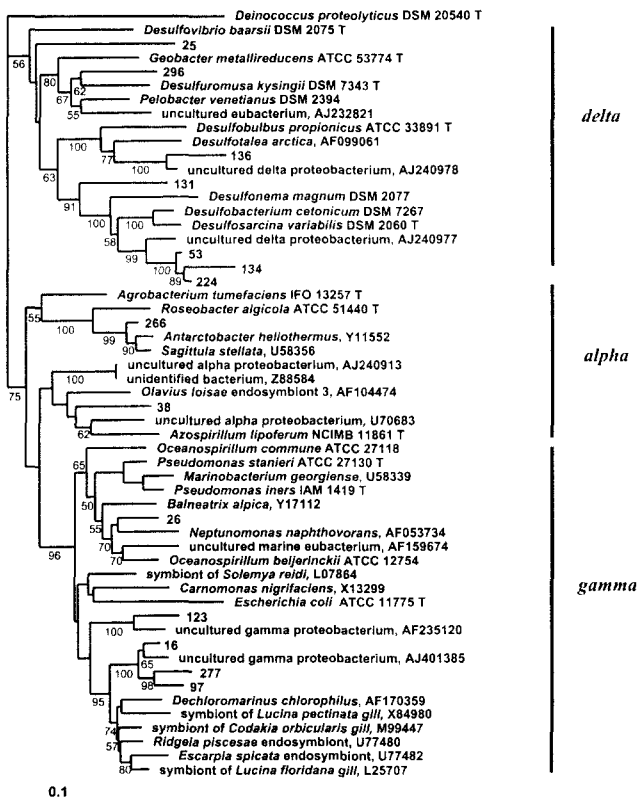


Fig. 3. Phylogenetic tree showing the affiliations of 16S rDNA clone sequences to selected reference sequence of the *Proteobacteria*. The tree was constructed from a distance matrix by the Neighbour-Joining analysis. Bootstrap percentages higher than 50% are placed alongside the node considered. The bar represents 0.1 estimated sequence divergence. *Deinococcus proteolyticus*, a member of the *Proteobacteria*, served as the outgroup.

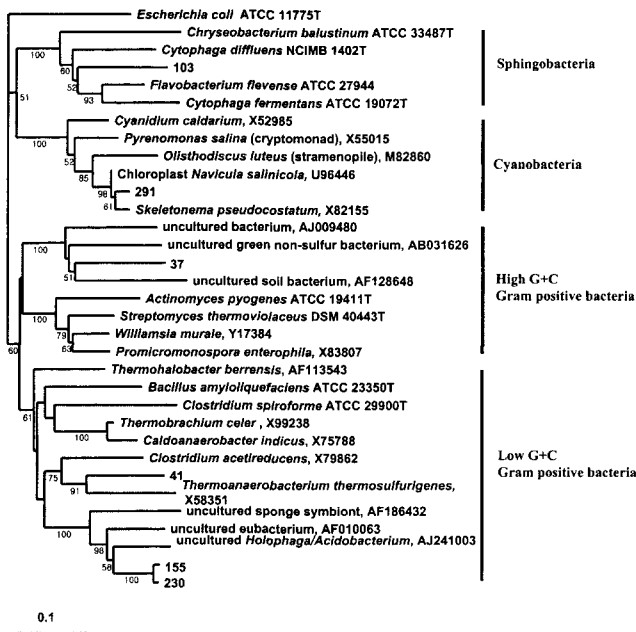


Fig. 4. Phylogenetic tree showing the affiliations of 16S rDNA clone sequences to selected reference sequence of the Gram positive bacteria, Cyanobacteria and Sphingobacteria. The tree was constructed from a distance matrix by the Neighbour-Joining analysis. Bootstrap percentages higher than 50% are placed alongside the node considered. The bar represents 0.1 estimated sequence divergence. *E. coli* ATCC 11775T served as the outgroup.

분해할 수 있는 능력이 있는 *Cytophaga* (35.45)에 속하는 클론 (clone 103)을 조사하였으나, 염기서열 분석시 *Cytophaga fermentans* (M58766)와 82.1%의 유사도를 나타내었고, *Cytophaga diffluens*와도 유연관계를 나타내었으나, bootstrap 값은 52%로 높지 않았다(Fig. 4).

또한 phytoplankton bloom 후에 발생하는 것으로 예상되고, sampling 시간에 의존하는 allochthonous microorganisms(34)에 속하는 1개의 chloroplast 클론(clone 291)도 조사되었는데, 이는 염기서열 분석시 *Navicula salinicola* (U96446)의 chloroplast와 96.8%의 높은 유사도를 나타내었으며, bootstrap 값도 98%로 높게 나타났다(Fig 4).

Gray와 Herwing (20)은 marine sediment로부터 미생물 군집을 조사했을 때 6개의 주요한 bacteria group으로, Urakawa 등(40)은 5개의 주요한 bacteria group으로 나누었으며, 이들의 결과에 의하면 marine sediment에서는 *gamma Proteobacteria*와 Gram-positive bacteria가 우세하다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 분자생물학적인 방법을 이용하여 순천만 갯벌내의 미생물 군집을 조사한 결과 *delta Proteobacteria*와 *gamma Proteobacteria*가 우점종을 차지하고 있었고, *alpha Proteobacteria*도 확인할 수 있었으며, ARDRA의 결과 genetic diversity도 marine sediment보다 더 다양하다는 것을 추정할 수 있었다. 그러나 미생물 군집구조 분석 및 시·공간적 역동성을 파악하기 위해서는 클론과 염기서열의 대상수가 많아야 하고 또한 이를 분석하기 위해 소요되는

시간과 비용이 많이 든다는 단점과 미생물 다양성을 분석하는데 있어서 매우 다양한 관점 즉, 영양상태, 생리적 또는 기능적 다양성, 종내, 종간 또는 상위분류군의 계통 다양성 등에 대한 모든 level에서 고려되어야 한다(10)는 관점에서 볼 때 보다 더 구체적인 군집구조를 제시하지는 못했다. 그러나 미생물의 배양과 분리 없이 특정 생태계내의 세균군집의 구조와 다양성을 이해하는데 분자생물학적인 방법을 이용한 단일 클론에서 부분적인 염기서열은 전체 염기서열을 분석한 결과와 계통유전학적으로 매우 유사한 결과를 나타낸다(37)는 것으로 볼 때 분석시간과 비용을 줄이는 장점은 있었다.

본 연구 결과로 볼 때 일반적으로 미생물 군집구조가 화학적 또는 물리적인 스트레스에 대한 반응으로서 diversity가 감소하게 되거나 변하게 된다(28)는 보고와는 달리 순천만의 경우 생활하수 등이 지속적으로 유입됨에도 불구하고 genetic diversity나 species phylogenetic diversity가 매우 높았으며, 16S rDNA partial sequence 결과 갯벌내에 존재하는 미생물군집 대부분이 배양되지 않는 미생물로 조사되었다. 따라서 순천만의 갯벌생태계에 존재하는 미생물 군집의 구조와 기능이 매우 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며, 본 실험을 통하여 순천만 생태계의 세균군집에 대한 미생물 군집의 가시적인 구조를 보여줌으로 순천만 갯벌에 대한 미생물 생태계를 이해하는데 도움이 될 것이라고 사료된다.

참고문헌

1. 순천대학교 지역개발연구소. 1999. 순천만 생태계조사 보고서. p. 22-200.
2. 전국습지보전연대회. 1998. 한국습지 보고서(초안).
3. 환경부. 1998. 서남해안갯벌 생태조사보고서. p. 108-124.
4. Amann, R., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1994. Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. *ASM News* 60, 360-365.
5. Amann, R., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
6. Chandler, D.P., R.W. Schreckhise, J. Smith, and H. Bolton Jr. 1997. Electroelution to remove humic acids from soil DNA and RNA extracts. *J. Microbiol. Methods* 28, 11-19.
7. Chun, J. 1995. Computer-assisted classification and identification of Actinomycetes. Ph. D. Thesis. University of Newcastle, UK.
8. Chun, J., A. Huq, and R.R. Colwell. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2202-2208.
9. Cifuentes, A., J. Anton, S. Benloch, A. Donnelly, R.A. Herbert and F. Rodriguez-Valera. 2000. Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1715-1719.
10. DeLong, E.F. 1996. Diversity of naturally occurring prokaryotes. p. 125-133. In R.R. Colwell, U. Simidu, K. Ohwada (ed.), *Microbial Diversity in Time and Space*, Plenum Press, New York.
11. Dunbar, J., S. Takala, S.M. Barns, J.A. Davis, and C.R. Kuske. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1662-1669.

12. Eden P.A., T.M. Schmidt, R.P. Blakemore, and N.R. Pace. 1991. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 324-325.
13. Elsas, J.D. and K. Smalla. 1995. Extraction of microbial community DNA from soils. p. 1.3.3:1-11. In Antoon D.L. Akkermans, Jan Dark Van Elsas, and J. D. Vau de Bruijn(ed.), *Molecular Microbial Ecology Manual-1995*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
14. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
15. Felsenstein, J. 1995. PHYLIP-Phylogeny inference package (version 3.5). University of Washington.
16. Ferguson, R.L., E.N. Buckley, and A.V. Palumbo. 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 49-55.
17. George, M.G. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
18. Gonzalez J.M., F. Mayer, M.A. Moran, R.E. Hodson, and W.B. Whitman. 1997. *Sagittula stellata* gen. nov., sp. nov., a lignin-transforming bacterium from a coastal environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 773-780.
19. Good, I.J. 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40, 237-264.
20. Gray, J.P. and R.P. Herwig. 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4049-4059.
21. Han, S.K., I.G. Lee, and T.Y. Ahn. 1998. Bacterial diversity of the Han river as determined by 16S rRNA gene analysis. *Kor. J. Microbiol.* 34, 197-199.
22. Hoppe, H.G. 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferoly substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11, 299-308.
23. Jakob, P., F.O. Glockner, S. Unterholzner, A. Alfreider, R. Psenner, and R. Amann. 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4299-4306.
24. Jukes, T. H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. p. 21-132. In H.N. Munro(ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York.
25. Labrenz, M., M.D. Collins, P.A. Lawson, B.J. Tindall, G. Braker, and P. Hirsch. 1998. *Antarctobacter heliothermus* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium from hypersaline and heliothermal Ekho Lake. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1363-1372.
26. Liesack, W. and E. Stackebrandt. 1992. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* 174, 5072-5078.
27. Liesack, W., H. Weyland, and E. Stackebrandt. 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microb. Ecol.* 21, 191-198.
28. Lindstrom, E., R.P. Barry, and J.F. Braddock. 1999. Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. *Soil Biology Biochem.* 31, 1677-1689.
29. Maidak, B.L., J.R. Cole, T.G. Lilburn, C.T. Jr Parker, P.R. Saxman, J.M. Stredwick, G.M. Garrity, B. Li, G.J.Olsen, S. Pramanik, T.M. Schmidt, and J.M. Tiedje. 2000. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* 28,173 -174.
30. Malcolm, S.T. and S.D. Stanley. 1982. The sediment environment. p. 1-14. In P. B. Nedwell and C. M. Brown(ed.), *Sediment Microbiology*. Society for General Microbiology, London.
31. Michael T.M., M.M. John, and P. Jack. 1997. *Biology of Microorganisms*. 8th ed., p. 602-603. Prentice Hall International, Inc.
32. Moyer, C.L., F.C. Dobbs, and D.M. Karl. 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 871-879.
33. Rath, J., K.Y. Wu, G.J. Herndl, and E.F. DeLong. 1998. High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. *Aquat. Microb. Ecol.* 14, 261-269.
34. Ravensschlag, K., K. Sahn, J. Pernthaler, and R. Amann. 1999. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3982-3989.
35. Reichenbach, H., and M. Dworkin. 1992. The order Cytophagales. p. 3416-3478. In A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Jarder, and K.-H. Schleifer(ed.), *The prokaryotes*, vol. 4. Springer-Verlag, New York.
36. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
37. Schmidt, T.M., E.F. DeLong, and N.R. Pace. 1991. Analysis of a marine phytoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* 173, 4371-4378.
38. Tebbe, C.C. and W. Vahjen. 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2657-2665.
39. Torsvik, V., J. Glksoyr, and F.L. Daac. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782-787.
40. Urakawa H, K. Kita-Tsukamoto, and K. Ohwada. 1999. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 145, 3305-3315.
41. Ward, D.M., R. Weller, and M.M. Bateson. 1990. 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well studied thermal community. *FFMS Microbiol. Rev.* 6, 105-115.
42. Wayne, L.G., K.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.P. Starr, and H.G. Truper. 1987. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 463-464.
43. Wilson, I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1623-1629.
44. Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.
45. Woses, C.R., D. Yand, L. Mandelco, and K.O. Stetter. 1990. The flexibacter-flavobacter connection. *Syst. Appl. Microbiol.* 13, 161-165.

(Received March 14, 2001/Accepted April 23, 2001)

ABSTRACT : Bacterial Diversity in the Mud Flat of Suncheon Bay, Chunnam Province, by 16S rRNA Gene Analysis

Myung-Sook Lee^{1,2}, Soon Gyu Hong¹, Dong-Hun Lee², Chi-Kyung Kim², and Kyung Sook Bae^{1*}(¹Korean Collection for Type Cultures, KRIBB, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, ²Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

In order to investigate the diversity of bacterial community in the mud flat of Suncheon Bay, Chunnam province, diversity of amplified 16S rDNA was examined. Total DNA was extracted from sediment soils and 16S rDNAs were amplified using PCR primers based on the universally conserved sequences in bacteria. Clonal libraries were constructed and 111 clones were examined by amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) using *Hae*III. Clones were clustered based on restriction patterns using computer program, GelCompar II. One hundred different RFLP types were detected from 111 clones. The 20 clones were selected and sequenced according to dendrograms derived from ARDRA, to cover most of the bacterial diversity in the clone libraries. None of the clones were identical to any representatives in the Ribosomal Database Project small subunit RNA databases and GenBank. All sequences showed between 77 and 96.8% similarity to the known 16s rRNA sequence from cultured organisms. The 20 clones sequenced fell into seven major lineages of the domain Bacteria: *alpha*-, *delta*-, *gamma-Proteobacteria*, low G+C Gram positive bacteria, high G+C Gram positive bacteria, Sphingobacteria (*Cytophaga*) and Cyanobacteria (chloroplast). Among the clones, the *Proteobacteria* were dominant.