

## 페놀이 첨가된 생태계에서 세균 군집구조 변화의 분석

김진복 · 김치경 · 안태석<sup>1</sup> · 송홍규<sup>2</sup> · 이동훈\*

충북대학교 미생물학과 및 충북대학교 유전공학연구소 · <sup>1</sup>강원대학교 환경과학과, <sup>2</sup>강원대학교 생명과학부

폐수 처리장의 방류수에 페놀을 첨가한 후 terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 방법을 이용하여 세균군집의 구조와 변화를 조사하였다. 시료로부터 얻은 16S rRNA gene은 eubacterial primer로 증폭하였으며, 한 primer는 5' 말단에 biotin을 부착하였다. 증폭된 product는 *HaeIII*와 *AluI*으로 각각 절단하였고, 절단된 단편 중에서 terminal restriction fragment (T-RF)를 streptavidin paramagnetic particle을 이용하여 분리하였다. 분리된 T-RF는 전기영동과 silver staining을 통하여 확인하였다. 본 실험의 유용성을 검증하기 위하여 표준 균주 10 균주를 대상으로 실험하였고, 균주마다 특징적인 T-RF를 가지는 것과 그 크기가 Ribosomal database project (RDP)의 자료로부터 계산된 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 대조군으로 사용된 페놀을 첨가하지 않은 방류수 시료에서는 *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* 속 등이 우점종을 차지하고 있었고, 페놀 (최종농도 250 mg · l<sup>-1</sup>)을 첨가한 방류수 시료에서는 *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Cytophaga*, *Pseudomonas* 속 등이 우점종을 차지함을 알 수 있었다. Gel에서 분리한 *Acinetobacter*와 *Cytophaga*에 해당되는 T-RF는 재증폭 및 염기 서열 분석이 가능하였는데, database의 염기서열과 비교한 결과 *Acinetobacter junii*와 유연관계가 가깝다는 것을 확인하였다.

**Key words** □ 16S rRNA, bacterial community, PCR, phenol, T-RFLP

자연 생태계에 서식하는 복잡한 미생물 군집 안에서의 종 다양성을 신속하게 분석하는 일은 미생물 생태학에 있어서 매우 중요한 과제로 대두되고 있다. 특히 미생물 종의 정성적 분석 (richness)과 정량적 분석(evenness)을 함으로써 자연 생태계의 미생물 군집 구성의 차이점을 더욱 잘 이해할 수 있다(2). 배양 방법을 이용하지 않고 미생물 군집을 이해하기 위한 접근 방법 중의 하나가 분자생물학적 방법을 이용하는 것이다(1). 다양한 유전자를 대상으로 분자생물학적 방법을 응용할 수 있지만, 16S rRNA를 분석 대상으로 활발한 연구가 진행되고 있다. 16S rRNA 유전자는 세균들을 종 수준으로 구분할 수 있는 정보를 담고 있는 영역이며, 염기 서열의 변화는 미생물간의 유연관계를 파악하는 데에 유용하다(25). 또한 축적된 자료가 비교적 많기 때문에 rRNA database의 정보를 특정 세균의 분류 및 동정에 이용할 수 있으며 다양한 분류군 수준에서의 PCR primer 및 DNA probe의 설계가 가능하기 때문이다(12,20).

세균 군집의 구조와 다양성을 이해하는데 있어서 분자생물학적인 방법을 응용한 분야는 주로 16S rRNA 유전자의 염기서열 해독과 16S rRNA의 특정한 염기서열을 목표로 하는 DNA probe를 이용한 hybridization이 있다(1). 그러나 이 방법은 많은 시간과 노력을 필요로 하기 때문에 많은 시료를 분석해야 하는 생태학적 연구에 적용하기가 어렵다. 이러한 문제점들을 극복하기 위한 다른 새로운 방법들이 개발되었다. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (17), restriction fragment length

polymorphism (RFLP) (16), single strand conformation polymorphism (SSCP) (8), 그리고 terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) (10,11,15) analysis와 같은 community fingerprinting 방법은 sequencing이나 hybridization보다는 얻을 수 있는 정보가 제한되지만, 복잡한 미생물 군집을 대상으로 하는 실험인 경우에는 실험 과정에서 소요되는 시간과 노동력을 훨씬 더 줄일 수 있다.

RFLP 분석 방법은 현장 시료에서 핵산을 추출하고 PCR을 통해 증폭시킨 다음에 제한효소를 처리한 후 전기영동하면 gel에서 여러 가지 band 패턴을 확인할 수 있는데, 이렇게 나타나는 band의 총 합계는 시료의 종 다양성을 나타낸다고 할 수 있다. 그러나 분리된 절편의 크기와 수만으로는 미생물의 종 수와 상대적 양을 정확하게 확인할 수 없다. 이와 같은 RFLP 분석의 문제점을 보완하기 위한 방법으로 T-RFLP 분석 방법이 제시되었다(10). 이것은 제한 효소에 의해 절단된 여러 개의 단편 중 말단의 단편만을 분리하여 분석하는 방법으로, 하나의 terminal (5' or 3') restriction fragment가 하나의 분류군을 대표하는 것이다. 이로 인해 복잡한 자연 생태계의 군집을 구성하는 미생물 종의 정성적 분석과 정량적 분석이 가능해진다. Moeseneder 등 (14)은 복잡한 해양 미생물 군집을 DGGE와 T-RFLP 방법으로 비교 분석한 결과, T-RFLP 방법이 DGGE 보다 훨씬 더 많은 정보를 제공하였으며, T-RFLP 방법이 bacterioplankton 군집의 구조와 생지질학적인 역할을 평가하기 위한 매우 신속하고 유용한 방법이라고 주장하였다. 배양 기술과 16S rDNA cloning 방법으로 4개의 토양 시료의 미생물 군집을 분석한 결과(3)와 T-RFLP 방법으로 동일한 토양 시료를 분석한 결과를 비교했을 때

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel : (043) 261-3261, Fax : (043) 264-9600  
E-mail : donghun@chungbuk.ac.kr

T-RFLP 방법이 더 효과적이었다는 최근 보고(2)도 있다. 한편, T-RFLP 방법은 주로 16S rRNA gene을 대상으로 실험하는데, 최근에는 nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene (22)이나 ammonia-oxidase (*amoA*) gene (6)과 같은 functional gene까지 그 이용 범위가 확대되고 있다.

본 실험에서는 biotinylated primer와 streptavidin paramagnetic particle을 이용한 T-RFLP 방법을 적용하여 미생물 군집 구조를 분석하였다. Biotin이 streptavidin paramagnetic particle과 결합하는 성질을 이용하여 말단의 단편(terminal restriction fragment, T-RF)만을 자석으로 쉽게 분리할 수 있었다. 기존의 T-RFLP 분석 방법은 형광 표식된 primer와 automatic sequencer를 이용한 것으로, 고가의 장비가 필수적이며 전용 프로그램을 통해서만 분석이 가능하다는 단점을 지니고 있다. 그리고 T-RF의 크기에 관한 정보만을 얻을 수 있다. 그러나 본 실험 방법은 T-RF의 크기에 관한 정보뿐만 아니라, gel에서 분리한 T-RF의 재증폭 및 염기서열 분석이 가능하였다. 본 연구 방법의 유용성을 확인하기 위하여 폐수 처리장 방류수에 서식하는 세균 군집의 구조와 폐놀을 첨가하였을 때 유발되는 군집의 변화를 분석하였다. 산불지역에서는 산불 후에 폐놀과 같은 잔존 화학물이 남으며, 이 잔존물은 토양 미생물의 군집구조에도 영향을 준다. 이 연구는 산불 지역에서 미생물 군집 구조에 미치는 폐놀 등의 영향을 파악하기 위한 연구 방법 개발의 목적으로 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 표준 균주

현장 시료의 세균 군집 구조를 분석하기에 앞서 16S rDNA의 T-RFLP 방법을 이용한 분석 방법의 적용 가능성을 확인하기 위하여 표준 균주 10 균주를 대상으로 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 균주는 *Bacillus subtilis* (KCTC 1021), *Acinetobacter calcoaceticus* (KCTC 2357<sup>T</sup>), *Bacillus megaterium* (KCTC 3007<sup>T</sup>), *Staphylococcus aureus* (KCTC 1916), *Burkholderia cepacia* (KCTC 2475), *Micrococcus luteus* (KCTC 1056<sup>T</sup>), *Zoogloea ramigera* (KCTC 2531), *Enterobacter pyrinus* (KCTC 2520<sup>T</sup>), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 53545), 그리고 *Escherichia coli* (KCTC 1039)였으며, 생명공학연구원 유전자는 행으로부터 분양 받아 제시된 배양 조건과 배지에서 24시간 동안 배양한 후 핵산을 추출하였다. 표준 균주로부터 추출한 핵산은 TE 완충용액에 녹여 -20°C에서 보관하였다.

### Microcosm

충북 청주시 공단 폐수 처리장의 방류수를 5 L 채수하여 냉장 상태로 운반하였다. 4개의 bottle에 각각 채수된 시료를 1 L씩 채워 넣었다. 실험군으로 설정된 두 개의 bottle (P1, P2)에는 phenol을 250 mg · l<sup>-1</sup>이 되도록 첨가하였고, 폐놀을 처리하지 않은 다른 두 시료는 대조군(C1, C2)으로 사용하였다. C1, C2, P1, P2는 모두 시료 채취 현장 온도인 27°C에서 교반 배양 (120 rpm)하였다. P1과 C1은 2주 후에, P2와 C2는 3주 후에 핵산을 추출하였다. 폐놀을 처리한 시료에서의 폐놀 분해 정도는

spectrophotometer를 이용하여 흡광도 270 nm 값을 측정하여 계산하였다.

### 핵산 추출

표준 균주 및 현장 시료로부터 핵산을 추출하기 위하여 Rochelle 등(19)의 방법을 변형하여 이용하였다. 현장 시료인 경우, 시료로부터 직접 DNA를 추출하기 위하여, Sterivex-GV filter (Millipore, USA)를 사용하여 농축하였다. 농축된 시료가 들어있는 filter unit에 lysozyme buffer (150 mM NaCl, 100 mM EDTA, 15 mg · ml<sup>-1</sup> lysozyme, pH 8.0) 1.0 ml를 첨가하여, 37°C 항온 중탕기 속에서 1시간 동안 반응시켰으며 15분 간격으로 흔들어서 침전된 시료를 용액과 섞어 주었다. Lysozyme 용액을 처리한 시료를 얼음 속에 담가 냉각시킨 후에 SDS solution (100 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, pH 8.0, SDS 4%) 1.0 ml를 넣고 65°C에서 15분 동안 반응시킨 후, -70°C에서 얼리고, 65°C에서 녹이는 과정을 3회 반복하였다. 멸균된 3 ml 주사기를 이용하여 micro tube로 옮긴 후 동량의 phenol (Tris-buffered, pH 8.0)을 처리하고 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1), chloroform:isoamylalcohol (24:1)을 순서대로 각 1회 처리하였다. 상층액을 취하여 동량의 cold isopropanol과 sodium acetate (최종 농도 0.3 M)를 첨가하고 -20°C에서 12시간 이상 방치하여 핵산을 침전시켰다. 원심분리 (14,000×g, 15 min)한 후, 에탄올로 세척하고, 건조시켜 DNA pellet을 얻었다. 표준 균주는 plate의 colony를 멸균된 이쑤시개로 옮긴 후에 lysozyme buffer 300 μl, SDS solution 300 μl를 처리해 주고, 이후의 과정은 위의 방법과 동일하게 하여 DNA pellet을 얻었다. 현장시료와 표준균주로부터 추출된 핵산은 DNA PrepMate (Bioneer, Korea)로 정제하였다. 정제된 핵산은 TE 완충용액으로 녹인 후, 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며 -20°C에서 보관하였다.

### 핵산의 증폭

16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 eubacterial primer는 27F (*E. coli* numbering 8-27: 5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3')와 785R (*E. coli* numbering 785-804: 5'-ACTACCRGGGTATCTAATCC-3')를 사용하였다(1). T-RF 분리를 위하여 27F는 biotinylated primer로 사용하였다. PCR 반응물의 조성은 1X 반응 용액(100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 μg · ml<sup>-1</sup> BSA, pH 8.3), 200 μM dNTPs, 0.1 μM primer, 그리고 2.5 u의 Taq polymerase를 첨가하여 총 50 μl의 혼합물을 만들고, DNA 양이 100~150 ng이 되도록 첨가한 후 반응을 진행시켰다. PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 초기 열 처리한 후, 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR product는 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, DNA PrepMate (Bioneer, Korea)로 정제하고 -20°C에서 보관하였다.

### 16S rDNA T-RFLP

표준 균주의 PCR product에 제한효소 *HaeIII*를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Microcosm의 PCR product에는 제한효소 *HaeIII*와 *AluI*으로 각각 반응시켰다. 제한 효소에 의한 절단된 DNA에 0.5X SSC 완충용액으로 3번 세척한 streptavidin paramagnetic particle (Promega, USA)과 1X SSC를 첨가하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. Magnetic stand로 분리된 streptavidin paramagnetic particle은 0.1X SSC 완충용액으로 세척한 후, 0.2 M NaOH를 첨가하여 5분간 반응시킴으로써 biotinylated ssDNA T-RF만을 회수하였다. 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$ 를 넣고 65°C에서 15분간 반응시켜 streptavidin으로부터 DNA를 분리시켰다. 원심분리(14,000×g, 5 min)하여 상층액만 취한 후, 20분 동안 진공 건조하여 암모니아를 제거하였다. T-RFLP 패턴은 6% polyacrylamide gel (7.0 M Urea, 1X TBE)에서 전기영동하여 확인하였다. Sample 2.5  $\mu\text{l}$ 와 loading dye buffer (95% formamide, 10 mM NaOH, 20 mM EDTA, 0.02% bromphenol blue, 0.02% xylene cyanol FF) 1.5  $\mu\text{l}$ 를 섞어 3분 동안 95°C에서 denature시킨 후, 얼음에 식혔다. 1X TBE 완충용액 (90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.0)으로 완충된 6% denaturing acrylamide gel에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝나면 10% acetic acid로 30분 동안 fixing 한 후, 3차 증류수로 3번 행구고, silver staining solution (0.1%  $\text{AgNO}_3$ , 0.055% formaldehyde)으로 30분 동안 염색하였다. Developing reagent (3.0%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 2.0  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , 0.055% formaldehyde)으로 3-5분 동안 발색 반응시켰다. Band가 나타나면 fixing에 사용하였던 10% acetic acid를 마지막으로 처리함으로써 반응을 정지시켰다.

### T-RF의 염기서열 분석

Silver staining 후에 polyacrylamide gel에서 나타난 뚜렷한 product (band)는 멸균된 주사기 바늘로 잘라내어 으갠 후, 멸균된 증류수를 넣고 30°C에서 12 시간 교반시켰다. 상층액을 template로 하여 eubacterial primer인 27F (*E. coli* numbering 8-27: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 263R (*E. coli* numbering 246-263: 5'-TTACCCACCAACTAGCT-3')로 재증폭 하였다. DNA 염기서열 분석을 위해서 DNA PrepMate (Bioneer, Korea)로 PCR product를 정제한 후에 ABI PRISMTM automatic sequencer (Perkin Elmer)를 사용하여 sequencing을 수행하였다.

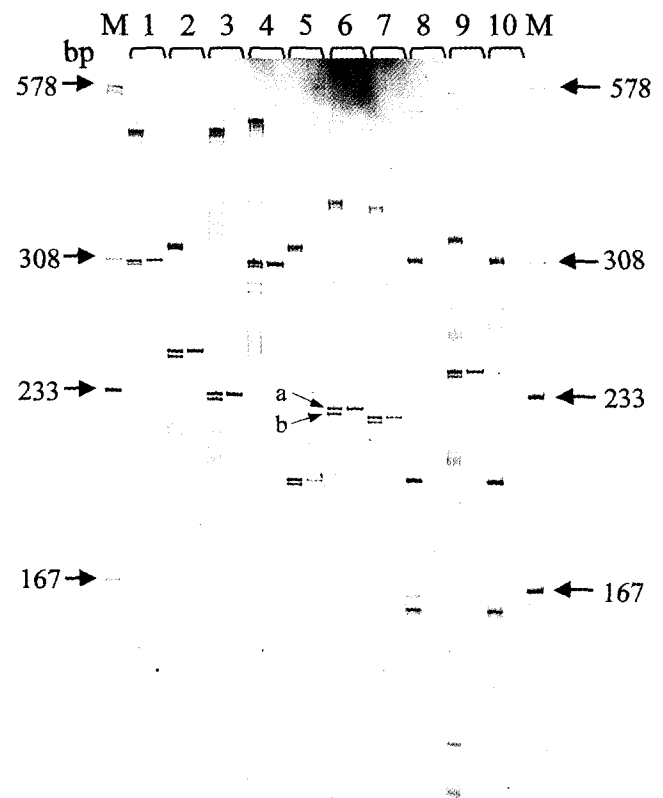
### 염기서열을 이용한 유연관계 분석

현장 시료의 염기서열과 Ribosomal database project (RDP)의 database로부터 염기서열을 확보한 후 Clustal X 프로그램(23)을 이용하여 정렬(alignment)하였다. 이 때 secondary structure도 고려하였다. Distance matrix는 Phylip package (4)의 DNADIST 프로그램으로 작성하였고, Jukes와 Cantor의 방법(7)을 사용하였다. Fitch-Margoliash 프로그램으로 계통수를 작성하였고, *Bacillus subtilis*를 outgroup으로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 표준 균주의 RFLP와 T-RFLP

먼저, biotinylated primer와 streptavidin paramagnetic particle을 이용한 T-RFLP 방법의 정확도를 확인하기 위하여 표준 균주 10 균주를 대상으로 실험을 수행하였다. 표준 균주들의 *HaeIII*로 절단된 RFLP와 T-RFLP 패턴은 6% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 확인하였다(Fig. 1). RDP database (12)의 16S rRNA 염기서열로부터 해당 균주의 5' T-RF의 길이를 계산하였을 때, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Micrococcus luteus*, *Zoogloea ramigera*, *Lactobacillus acidophilus*의 예상되는 5' T-RF의 길이는 각각 308, 252, 233, 310, 202, 228, 226, 246 bp였다. Fig. 1에서 보는 것 같이 5' T-RF를 나타내는 lane에서 모두 하나의 band만을 확인할 수 있었는데, gel에서 확인된 5' T-RF의 길이는 각각 308, 253, 233, 309, 202, 229, 227, 246 bp로 균주마다 서로 다른 고유한 T-RF를 보였다. *Enterobacter pyrinus*와 *Escherichia coli*를 제외하고는 database로부터 계산된 길이와 비교했을 때 오차가  $\pm 1$  bp로 거의 차이가 없었다. 실험 결과로 예상되는 5' T-RF 길이가 39 bp인 *Enterobacter pyrinus*와 *Escherichia coli*의 경우에는 5' T-RF를 gel에서 확인할 수 없



**Fig. 1.** RFLP and T-RFLP analysis of the reference strains. Lanes M, Size marker; 1, *B. subtilis*; 2, *A. calcoaceticus*; 3, *B. megaterium*; 4, *S. aureus*; 5, *B. cepacia*; 6, *M. luteus*; 7, *Z. ramigera*; 8, *E. pyrinus*; 9, *L. acidophilus*; 10, *E. coli*. The left lane with multiple bands and right lane with single band under lane number represent RFLP and T-RFLP of each strains, respectively. The PCR products were digested with *HaeIII*. a: biotinylated ssDNA of 5' T-RF, b: complementary strand of the biotinylated ssDNA of 5' T-RF.

있는데, 이것은 6% polyacrylamide gel에서는 70~500 bp 범위의 DNA를 분리하기에 적합하기 때문이다(21). 이 점을 보완하기 위해서 농도를 증가시킨 polyacrylamide gel을 사용하고 전기영동 시간을 조절하면 70 bp 이하의 길이를 충분히 확인할 수 있을 것이다. 또한 다른 종류의 제한효소를 처리하면 다른 크기의 T-RF를 만들게 됨으로 6% polyacrylamide gel 상에서도 확인이 가능하게 된다. *Enterobacter pyrinus*와 *Escherichia coli*의 경우처럼 두 균주가 하나의 제한 효소에 의해 절단되어 생긴 5' T-RF의 길이가 똑같은 경우에도 다른 종류의 제한 효소를 선택해서 처리하면 두 균주를 구별할 수 있게 된다. 따라서 복잡한 자연 생태계 안에서의 미생물 군집에 적용할 때에도 두 종류 이상의 제한 효소를 이용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

T-RFLP 분석 방법에서 주로 사용하는 제한 효소로는 *AluI*, *BstUI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *MspI*, *RsaI* 등이 있다(10). 제한효소의 선택은 T-RFLP 분석 방법에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있는데, RDP database의 16S rRNA 염기서열로부터 계산하여 나올 수 있는 ribotype이나 5' T-RF와 3' T-RF의 가능한 수를 참고하여 선택할 수 있다. 27F와 926R을 primer 쌍으로 했을 때에는 *HhaI*과 *MspI*로 처리했을 때, 27F와 536R을 primer 쌍으로 했을 때에는 *HaeIII*를 선택했을 때, 가장 많은 수의 고유한 5' T-RF 길이를 보였다(10). 따라서 본 실험에서는 *HaeIII*를 제한 효소로 사용하였으며, RDP database에서의 증폭 가능한 균주의 수도 많고, gel에서 DNA를 분리하기에 적당한 크기이기 때문에 27F와 785R을 primer 쌍으로 선택하였다.

표준 균주의 RFLP에서도 RDP database의 16S rRNA 염기서열로부터 계산된 길이와 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 한 균주에 대해서 여러 개의 band를 가지는 것을 볼 수 있었는데, 이것은 단일 균주일 때는 큰 문제가 되지 않지만, 두 균주 이상이 섞여 있는 자연 생태계의 시료인 경우에는 gel에서 여러 개의 band가 나타나기 때문에 시료의 미생물 군집의 복잡한 정도만 확인할 수 있을 뿐 시료 안에서의 정성적 분석과 정량적 분석이 불가능하다. 그러나 T-RFLP 방법을 이용한 실험 결과처럼 하나의 분류군이 고유한 T-RF를 가짐으로써 여러 미생물이 복잡하게 섞여 있는 자연 생태계의 시료인 경우에도 쉽고 신속하게 정성적 분석과 정량적 분석이 가능하게 되었다. 특히 본 연구에서는 T-RF를 분리하기 위하여 biotinylated primer와 streptavidin paramagnetic particle를 이용하였는데, 절단된 여러 개의 단편 중에서 biotinylated ssDNA T-RF만이 streptavidin paramagnetic particle과 결합하는 성질을 이용하여 균주마다의 독특한 T-RF를 자석으로 쉽게 분리해 낼 수 있었다.

한편, Fig. 1의 RFLP lane에서 a와 b로 표시된 두 band가 있는데, a로 표시된 위쪽 band는 biotinylated ssDNA T-RF이며, b로 표시된 아래쪽 band는 a에 상보적인 single-stranded DNA이다. 이러한 결과가 나오는 이유는 두 strand가 primer에 결합된 biotin의 분자량의 차이로 인해 denaturing gel에서 서로 분리되기 때문인 것으로 생각된다.

**Microcosm에서의 폐놀 분해**

Microcosm의 폐놀 분해 양상을 spectrophotometer를 통해 3주

동안 관찰하였다. 채취한 방류수 시료에 폐놀의 최종 농도가 250 mg · l<sup>-1</sup>이 되도록 첨가하였는데, 시료에 폐놀을 첨가하기 전의 흡광도를 측정한 결과, 채취해 온 방류수 시료에는 실험 결과에 영향을 줄 만큼의 폐놀의 양은 확인되지 않았다. 270 nm에서 측정되는 폐놀의 양은 시간에 따라 점차적으로 감소하는 양상을 보였고, 3주 후 대부분 분해된 것을 확인하였다(Fig. 2). Microcosm의 폐놀 분해 속도는 4.6 % · day<sup>-1</sup>였다. 배양 1일 후에 microcosm 시료가 노란색을 띠기 시작했는데, 이 노란색은 2일 후에 가장 진하게 보이다가 3일 후부터 흐려졌다. 그리고 A<sub>270</sub> 값이 감소함에 따라 A<sub>275</sub>와 A<sub>360</sub> 값은 점점 높아졌다가 다시 낮아지는 것을 확인하였다. 폐놀이 분해되면서 catechol과 2-hydroxymuconic semialdehyde라는 중간 대사 산물이 생기는 것으로 알려져 있는데, 이러한 물질들이 노란색을 보이며 각각 275 nm와 360 nm에서 흡광도를 보이는 것으로 알려져 있다. Catechol이 2-hydroxymuconic semialdehyde로 되는데 관여하는 효소인 catechol dioxygenase gene을 탐색할 수 있는 primer (5' CatE2 (5'-GAACACYTCGTTGCGGTTTCC-3')와 CatE3 (5'-GGCKGTGCGTTTCGACCAC-3'))으로 증폭 한 결과, C1, C2, P1, P2에서 모두 증폭되는 것을 확인할 수 있었다 (결과 data는

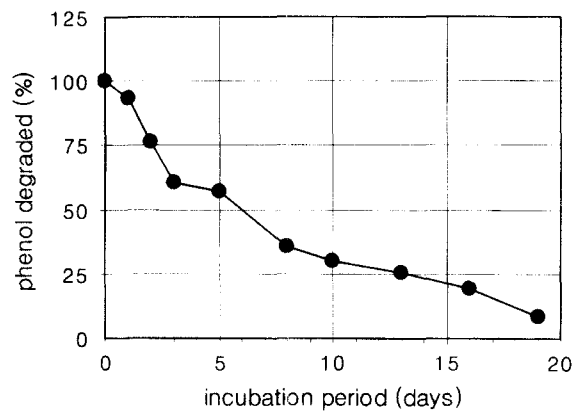


Fig. 2. Degradation of phenol by indigenous bacteria in the microcosm. Degradation of phenol was monitored by a spectrophotometer(A<sub>270</sub>).

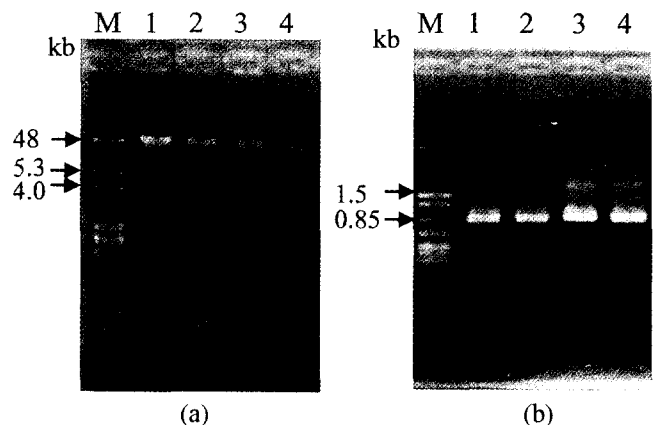


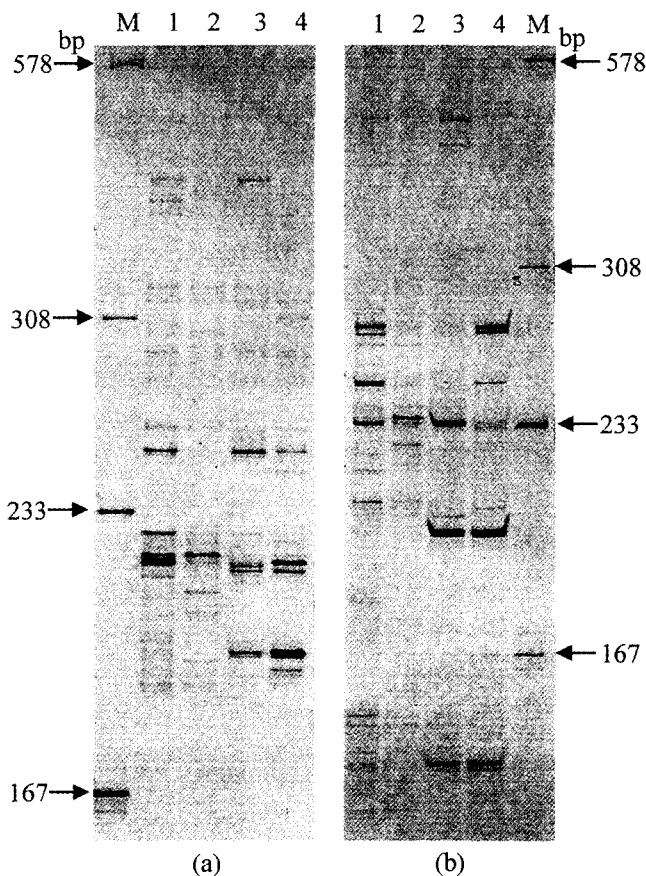
Fig. 3. Genomic DNA and PCR products of the effluent water. (a) Extraction of the total DNA, (b) PCR amplification of 16S rRNA gene. Lane M, size marker; 1, C1; 2, C2; 3, P1; 4, P2.

제시하지 않았음). 이 결과에서 방류수 시료 안에 방향족 화합물의 분해에 중요한 catechol dioxygenase gene을 가지고 있는 미생물이 있다는 사실을 짐작할 수 있었다.

**Microcosm 세균 군집의 T-RFLP 분석**

Microcosm C1, C2, P1, P2로부터 추출한 genomic DNA와 PCR products는 0.7% agarose gel에서 확인하였으며(Fig. 3), 세균 군집의 변화는 표준 균주의 T-RFLP 실험 결과로부터 유용성이 확인된 biotinylated primer와 streptavidin paramagnetic particle를 이용한 T-RFLP 방법으로 분석할 수 있었다(Fig. 4).

Fig. 4에서 보는 것과 같이, 4개의 microcosm 시료가 서로 다른 T-RF profile을 나타내었다. 측정된 T-RF의 길이는 Fig. 5에 나타내었다. *HaeIII*와 *AluI*에 의해서 만들어진 T-RF profile에서 T-RFs의 길이는 각각 188-539 bp, 154-503 bp의 범위였으며, *HaeIII* profile에는 총 43개의 단편이 포함되었고 *AluI* profile에는 총 30개의 T-RF를 포함하고 있었다. Gel에 나타난 T-RF 중에서 전체 면적의 2% 이상을 차지하는 것을 “+”로 표현하고, 20% 이상인 것은 “++”로 표현하였다(Fig. 5). *HaeIII* C1에서는 254, 227, 222, 220 bp가, C2에서는 222 bp가 진한 band로 보여



**Fig. 4.** T-RFs profiles of the effluent water (lane 1, 2) and microcosm added with phenol (lane 3, 4). (a) The PCR products were digested with *HaeIII*, (b) The PCR products were digested with *AluI*. Lane M, size marker; 1, C1; 2, C2; 3, P1; 4, P2.

T-RF No.	Size (bp)	C1	C2	P1	P2	T-RF No.	Size (bp)	C1	C2	P1	P2
1	539	+				1	503	+	+	+	+
2	502	+	+	+		2	484	+	+	+	+
3	479			+		3	449	+	+	+	+
4	451		+	+	+	4	418	+	+	+	+
5	435	+	+	+	+	5	285	+	+	+	
6	429	+	+	+	+	6	283	+	+	+	
7	421	+	+	+	+	7	276	++	+	+	++
8	412	+	+	+	+	8	273	+	+	+	+
9	398	+	+	+	+	9	267	+	+	+	+
10	373	+				10	250	++	+	+	+
11	334	+	+	+		11	242			+	
12	332	+	+	+	+	12	240	+	+	+	
13	321	+	+	+	+	13	239	+	+	+	
14	316			+		14	236	+	++		
15	307			+	+	15	233	++	+	++	+
16	301	+	+			16	226		+		+
17	295		+			17	223	+			
18	292	+	+	+	+	18	219		+	+	
19	280	+	+	+	+	19	218	+			
20	269		+	+	+	20	217				
21	263	+	+	+	+	21	210	+	+		
22	261			+		22	206	+	+	+	+
23	258			+		23	206	+	+	+	+
24	254	++		++	+	24	204	+	+	+	+
25	247				+	25	199	+		++	++
26	241			+		26	198	+		+	+
27	227	++	+	+	+	27	193	+		+	
28	225	+	+	+	+	28	189	+			
29	222	++	++	+	+	29	180	+			
30	220	++	+	++	++	30	154	+	+	++	++
31	217	+		+	+						
32	216	+		+							
33	214			+							
34	212		+								
35	206	+	+								
36	200	+	+	+	+						
37	197			++	++						
38	196			+	+						
39	195	+	+								
40	193				+						
41	192				+						
42	190	+	+								
43	188	+									

(b)

**Fig. 5.** T-RFs identified in the T-RFLP analysis. (a) Digested with *HaeIII*, (b) Digested with *AluI*. ‘+’ symbol represents the bands whose area is greater than 2%, ‘++’ symbol represents the bands whose area greater than 20%.

졌다. P1에서는 254, 220, 197 bp가 진하게 보였고, P2에서는 220과 197 bp가 특히 진하게 보였다. C1과 C2에서는 거의 보이지 않았던 197 bp의 T-RF가 P1, P2에서는 진한 band로 나타나는 것을 확인하였다.

*AluI* profile에서 T-RF의 수는 *HaeIII* profile의 70% 수준으로 더 적은 수의 T-RF를 보였고, 크기 범위도 위 아래로 30 bp가 작게 나타나는 것을 확인하였다. 이것은 Liu 등이 RDP database로부터 분석하여 발표한 보고 내용과 일치하는 결과였다(10). *AluI* profile의 C1에서는 276, 250, 233 bp가, C2에서는 236 bp가 진한 band로 보였으며, P1에서는 233, 199 bp의 T-RF가 특히 진하게 보였다. 그리고 154 bp의 T-RF도 비교적 진하게 보여졌다. P2에서는 233 bp가 P1에 비해서 아주 흐려지고 199 bp는 P1 만큼 특히 진하게 나타났다. 그리고 199와 154 bp는 C1과 C2에서는 거의 보이지 않았으나 페놀을 첨가한 시료에서는 상대적으로 양이 증가한 것으로 보여졌다. 위에서 언급한 C1, C2, P1, P2에서의 진한 band에 해당하는 예상 균주들은 RDP database로부터 분석하여 각각 Table 1과 2에 나타내었다. C1과 C2에서 *HaeIII* profile에서의 254, 227, 222, 220 bp에 해당되는 균주에는 *Acinetobacter*, *Cytophaga*, *Lactobacillus*, *Propionigenium*, *Alcaligenes*, *Micromonospora*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Planctomyces*

**Table 1.** Putative bacterial genera of the major T-RFs in the effluent water

Enzyme*	No.	T-RF size (bp)	Putative genera
HaeIII	24	254	<i>Acinetobacter</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Propionigenium</i>
	27	227	<i>Alcaligenes</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Lactobacillus</i>
	29	222	<i>Pseudomonas</i> , <i>Planctomyces</i>
	30	220	<i>Pseudomonas</i> , <i>Planctomyces</i>
AluI	7	276	<i>Pseudomonas</i>
	10	250	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i>
	14	236	<i>Bacillus</i> , <i>Acinetobacter</i>
	15	233	<i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>

\*The T-RF numbers are the same with Fig. 5.

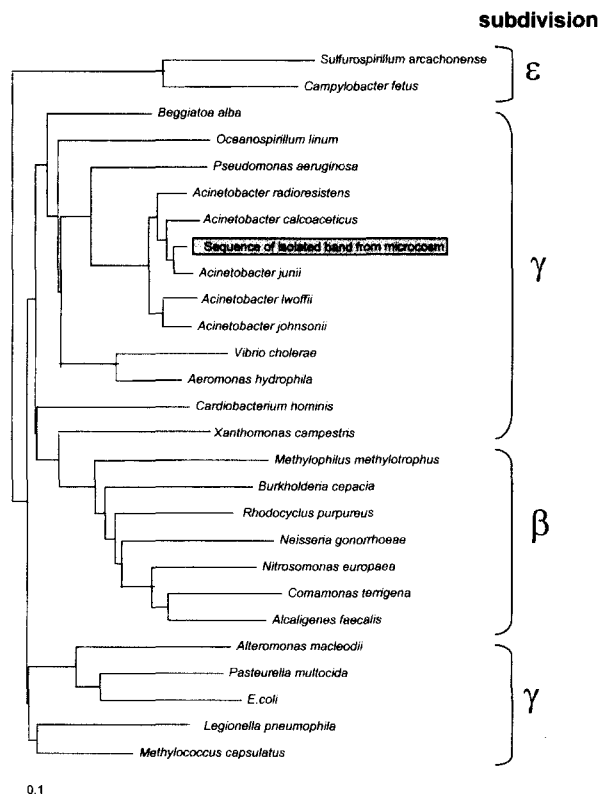
**Table 2.** Putative bacterial genera of the major T-RFs in the effluent water added with phenol

Enzyme*	No.	T-RF size (bp)	Putative genera
HaeIII	24	254	<i>Acinetobacter</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Propionigenium</i>
	30	220	<i>Pseudomonas</i> , <i>Planctomyces</i>
	37	197	<i>Alcaligenes</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Comamonas</i>
AluI	7	276	<i>Pseudomonas</i>
	15	233	<i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>
	25	199	<i>Arthrobacter</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Cytophaga</i>
	30	154	<i>Comamonas</i>

\*The T-RF numbers are the same with Fig. 5.

다. 그리고 P1, P2인 경우에는 HaeIII profile에서 *Acinetobacter*, *Cytophaga*, *Lactobacillus*, *Propionigenium*, *Pseudomonas*, *Planctomyces*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas* 등이 254, 220, 197 bp를 나타낼 수 있었고, AluI profile에서의 276, 233, 199, 154 bp에는 *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Cytophaga*, *Comamonas* 등이 해당되었다(Table 2). 여기에서 중복되는 균주로는 *Acinetobacter*, *Cytophaga*, *Comamonas*, *Pseudomonas*로, 이러한 균주들이 페놀 분해에 관여하는 것으로 생각되어진다. 특히 P1 시료의 HaeIII profile에서 확인된 T-RF 중에서 *Acinetobacter*, *Cytophaga*에 해당되는 254 bp 크기의 band를 분리하여 염기서열을 분석한 결과, proteobacteria  $\gamma$  group에 속하는 *Acinetobacter junii*와 유사성이 높은 것을 확인하였다(Fig. 6). 따라서 T-RF의 크기로 판단한 해당 분류군의 정보(Table 2)에 오류가 없음을 알 수 있었다. 더욱 정확한 정보를 얻기 위해 여러 종류의 제한효소를 사용하는 방법이 효과적이었지만, T-RF의 염기서열을 분석함으로써 종 수준의 더욱 자세한 정보를 얻을 수 있었다. 한편 P1은 C1과 C2보다 더 많은 T-RF 수를 보였다. 그러다가 7일 후인 P2에서는 다시 약 20% 정도 감소한 것을 볼 수 있었다. 이것은 페놀 분해 과정에 관여하는 미생물들이 대사가 활발해지면서 양적·수적으로 증가했다가, 페놀이 완전히 분해된 후에는 다시 미생물의 양과 수가 감소했다는 것을 짐작해 볼 수 있다. 페놀의 독성이 미생물 성장에 불리하게 작용하겠지만, 이 시료가 일반 하천 시료가 아니라 공단 폐수 처리장의 방류수라는 점을 고려해 본다면 예측 가능한 결과라고 할 수 있겠다.

형광 표식된 primer와 automatic sequencer를 이용한 기존의 T-RFLP 분석 방법은 고가의 장비와 분석용 프로그램을 필요로 한다는 단점을 지니고 있으며, T-RF를 따로 분리해 낼 수 없기 때문에 T-RF의 크기에 관한 정보만을 얻을 수 있다. 그러나 분 실험 방법은 T-RF의 크기에 관한 정보뿐만 아니라, gel에서 분리한 T-RF의 재증폭 및 염기서열 분석이 가능하였다. 물론 시료 안에 적은 농도로 존재하는 핵산은 silver staining 과정에서 나타나지 않는 경우가 많고, gel에서 분리할 수 있는 DNA 크기도 제한되어 있기 때문에 automated sequencer를 이용한 방법에 비해서 아직 문제점이 많다고 할 수 있지만, biotinylated primer와



**Fig. 6.** Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of the division proteobacteria and T-RFLP band amplified from microcosm P1. The scale bar indicates 0.1 substitution per nucleotide.

등이 있다. 그리고 AluI profile의 276, 250, 236, 233 bp에 해당되는 균주는 *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* 등이 있다. 두 제한 효소의 profile에서 중복되는 균주에는 *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* 등이 있었다(Table 1). 이 균주들은 시료 (C1, C2)에 특정 탄소원을 제공하지는 않았지만 원래 시료 안에 들어있는 미량의 영양분을 이용하여 생존한 것으로 추측되어진

streptavidin paramagnetic particle를 이용한 T-RFLP 방법을 생태계 안에서의 세균 군집 구조 분석에 도입하였을 때, 신속하며 경제적이었던 점에서 매우 유용한 방법이라고 할 수 있겠다.

미생물 군집의 구조와 다양성을 이해하기 위한 분자생물학적인 방법의 개발은 지금도 계속되고 있다. 그러나 이러한 방법들도 cell lysis와 핵산 추출 과정이 효율적으로 이루어지지 않은 경우에는 미생물 군집 전체를 반영하지 못하게 된다(13). 많은 보고서에서 자연계의 시료로부터의 cell lysis와 핵산 추출의 문제점에 대해 발표(18,24,26)한 바 있다. 분자 생물학적 방법들도 더 정확한 세균 군집 분석을 위해서 cell lysis의 효율, 핵산 추출의 효율, 핵산의 증폭 기술, 그리고 염색 방법 등의 개선과 개발이 반드시 병행되어야 할 것이다. 그리고 미생물 군집에 대한 많은 정보를 제공할 뿐 아니라 시간과 노동력을 줄일 수 있는 연구 방법의 개발은 생태학 연구에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있으며, 앞으로 산불 지역의 미생물 생태계 분석에 응용될 수 있다.

### 감사의 글

이 연구는 과학기술부에서 시행하는 중점국가연구개발사업의 하나인 자연재해방재기술개발사업으로 수행된 것입니다.

### 참고문헌

- Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Dunbar, J., L.O. Ticknor, and C.R. Kuske. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2943-2950.
- 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.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.5p). Dept. of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Heinaru, E., J. Truu, U. Stottmeister, and A. Heinaru. 2000. Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 195-205.
- Horz, H.P., J.H. Rotthauwe, T. Lukow, and W. Liesack. 2000. Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amoA PCR products. *J. Microbiol. Methods.* 39, 197-204.
- Juke, T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, pp. 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press. New York, N. Y.
- Lee, D.H., Y.G. Zo, and S.J. Kim. 1996. Non-radioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3112-3120.
- Leser, T.D., R.H. Lindecrona, T.K. Jensen, B.B. Jensen, and K. Moller. 2000. Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3290-3296.
- Liu, W.T., T.L. Marsh, H. Cheng, and L.J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516-4522.
- Lukowl, T., P.F. Dunfield, and W. Liesack. 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32, 241-247.
- Maidak, B.L., J.R. Cole, T.G. Lilburn, C.T. Parker Jr, 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.
- Marsh, T.L., P. Saxman, J. Cole, and J. Tiedje. 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3616-3620.
- Moeseneder, M.M., J.M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter, and G.J. Herndl. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3518-3525.
- Moeseneder, M.M., C. Winter, J.M. Arrieta, and G.J. Herndl. 2001. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. *J. Microbiol. Methods.* 44, 159-172.
- 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.
- Muyzer, G., E.C. De Waal, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- Ogram, A. 1998. Isolation of nucleic acids from environmental samples. In R. S. Burlage, R. Atlas, D. Stahl, G. Geesey, and G. Saylor (ed.), *Techniques in microbial ecology*. Oxford University Press, New York, N. Y.
- Rochelle, P.A., J.C. Fry, R.J. Parkes and A.J. Weightman. 1992. DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. *FEMS Microbiol. Letters.* 100, 59-66.
- Salama, M., W. Sandine, and S. Giovannoni. 1991. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1313-1318.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Scala, D.J. and L.J. Kerkhof. 2000. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1980-1986.
- Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

24. Wintzingerode, F.V., U.B. Göbel, E. Satackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213-229.
25. Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.
26. Zhou, J., M.A. Bruns, and J.M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316-322.

(Received February 20, 2001/Accepted March 2, 2000)

---

**ABSTRACT : Characterization of Bacterial Community in the Ecosystem Amended with Phenol**  
**Jin-Bock Kim, Chi-Kyung Kim, Tae-Seok Ahn<sup>1</sup>, Hong-Kyu Song<sup>2</sup>, and Dong-Hun Lee\***(Department of Microbiology, and Research Institute for Genetic Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, <sup>1</sup>Department of Environmental Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, <sup>2</sup>Devison of Biological Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea)

The effect of phenol on the change of bacterial community in the effluent water from a wastewater treatment plant was analyzed by PCR and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). The fragments of 16S rDNA were amplified by PCR with bacterial primers, where one of the primers was biotinylated at the 5'-end. After digestion with restriction enzymes, *Hae*III and *Alu*I, the biotinylated terminal restriction fragments (T-RFs) of the digested products were selectively isolated by using streptavidin paramagnetic particles. The single-stranded DNA of T-RFs was separated by electrophoresis on a polyacrylamide gel and detected by silver staining technique. When 10 standard strains were analyzed by our method, each strain had a unique T-RF which corresponded to the calculated size from the known sequences of RDP database. The T-RFLP fingerprint generated from the effluent water was very complex, and the predominant T-RFs corresponded to members of the genus *Acinetobacter*, *Bacillus* and *Pseudomonas*. In addition, the perturbation of bacterial community was observed when phenol was added to the sample at the final concentration of 250 mg · l<sup>-1</sup>. The number of T-RFs increased and the major bacterial population could be assigned to the genus *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Cytophaga* and *Pseudomonas*. A intense band assigned to the putative genera of *Acinetobacter* and *Cytophaga* was eluted, amplified, and sequenced. The nucleotide sequence of the T-RF showed close relationship with the sequence of *Acinetobacter junii*.