

< 단 보 >

PCR을 이용한 지하수 내의 탈질화 세균의 검출

신규철^{1,3} · 서미연² · 한명수^{1,2,3} · 최영길^{*1,3}¹한양대학교 자연과학대학 생명과학과, ²환경과학과, ³국가지정 불환경생태복원연구실

Detection of Denitrifying Bacteria in Groundwater by PCR

Kyu-Chul Shin^{1,3}, Mi Yeon Suh², Myung-Soo Han^{1,2,3} and Yong-Keel Choi^{*1,3}¹Department of Life Science and ²Environmental Science Hanyang University, Seoul 133-791 Korea, ³National Research Laboratory for Water Environmental & Restoration

Abstract - Groundwater samples were collected at 6 sites in Seoul area. DNA extraction from the sample was performed by the boiling method. Samples were boiled with guanidinium thiocyanate and phenol-chloroform. One set of primer was designed for amplification of 16S rDNA. For detection of denitrifying bacteria in groundwater sample, the author used primer sets consensus regions in gene sequences encoding the two forms of nitrite reductase (NIR), a key enzyme in the denitrification pathway. Two sets of PCR primer were designed to amplify *cd₁*- and *Cu-nir*. We confirmed the existence of denitrifying bacteria in 3 sites using *cd₁-nir* primer and in 4 sites using *Cu-nir* primer.

Key words : denitrification, groundwater, nitrite reductase, PCR

지하수 생태계에서도 미생물은 물질순환과 에너지 흐름 과정에 매우 중요한 역할을 담당하고 있으며 이는 거의 대부분 중속영양 미생물에 의해 수행되고 있다. 이러한 미생물의 기능은 지하수 환경으로 유입되는 각종 오염물질에 대한 분해력을 나타내어 지하수 생태계의 자정능력을 담당하고 있으므로, 중속영양세균 및 오염물질 분해기능 세균군집의 분포와 동태를 분석하는 것은 지하수 환경을 종합적으로 이해하는데 매우 중요하다.

국외에서는 최근 들어 지하수에 서식하고 있는 미생물의 특성에 관한 연구가 활발하다. 지하수 미생물은 토양 미생물과 관련하여 다양한 종이 폭 넓게 분포하고 있고, 지화학적 순환(geochemical process)에 영향을 미쳐 물질순환에 기여하고 있으며, 환경 오염물질의 전이와 분해에 관여하고 있어 지하수 수질과 깊은 관계가

있기 때문이다(Balkwill *et al.* 1997).

지금까지 국내 지하수 관련 연구는 지하 지질을 다루는 응용지질학적 접근, 지하수 체계 해석을 위한 수문수리학적 접근, 지하수의 화학적 조성, 물리화학적 특성을 해석하는 수문화학적 접근에 집중되어 왔다(이 등 1997; 정 등 1997; 지 등 1997). 그러나 지하수 자원의 오염방지와 오염 지하수의 치유를 위해서는 지하수 생태계를 반영하는 중요한 지표로서 미생물의 분포와 기능에 대한 연구가 동반 수행되어야 한다. 미생물의 분포와 기능이 주어진 조건 및 환경하에서 어떠한 영향을 받고 있는가를 규명함으로써 오염이 된 경우 오염의 진행을 저지하고 차후 가능한 복구방법의 도출 및 관리체계의 활용에 도움이 될 수 있다(안 등 1995; 안 등 1998; 안 등 1999).

따라서 본 논문에서는 이러한 기능성미생물을 탐지하는데 있어서 기존의 배양이나 현미경적인 관찰을 통한

* Corresponding author: Yong-Keel Choi, Tel. 02-2290-0952, Fax. 02-2293-9230, E-mail. ykchoi@hanyang.ac.kr

방법들에서 벗어나 지하수 시료에서 직접 bacteria의 DNA를 추출하여 PCR기법을 이용하여 기능성 미생물의 존재 여부를 파악하는 방법론의 확립을 위하여 서울시 지하수를 대상으로 탈질화세균의 분포에 관하여 연구하였다. 또한 기존의 지하수내 미생물의 포집과 핵산 추출 과정의 복잡함을 개선하기 위하여 효율적인 핵산 추출법을 적용하고자 하였으며 이와 함께 지하수 내의 탈질화 세균의 확인에 적합한 PCR Primer를 선정하고자 하였다.

지하수 시료는 서울시 지하수 관리 계획 기본 보고서(서울특별시 1996)를 기초로 하여 질소 화합물의 오염이 있거나 오염의 가능성이 보이는 네 개의 정점과 비교적 청정한 지역으로 판단되는 두 개의 정점을 선별하여 선정하였다(Table 1).

Chomzynski and Sacchi (1987)의 방법을 변형하여 시료로부터 DNA를 추출하였다. 본 기법은 RNA를 추출하는 방법으로 개발되어진 기법이나 지하수내의 소량 미생물들의 DNA를 추출하는데 적합하도록 변형하여 활용하였다. 시료 200 μ l를 취하여 여기에 Guanidine thiocyanate를 사용하여 준비한 Lysis buffer 400 μ l를 넣어 섞어준 후 이를 95°C에서 10분간 반응시켜 준 후 이를 상온에서 방치하였다. 충분히 식혀준 후 600 μ l의 P:C:I (Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol)를 넣어 약하게 vortex한 후 microfuge로 상온에서 1분간 12,000 rpm으로 원심분리하였다. 상등액을 동량의 C:I와 섞어준 후 이를 약하게 vortex하고 상온에서 1분간 12,000 rpm으로 원심분리하였다.

상등액을 취하여 새로운 1.5 ml tube로 옮기고 여기에 0.1배의 3 M sodium acetate와 2.5배의 100% ethanol을 첨가시킨 후 -20°C에서 30분간 반응시켜 DNA를 침전시킨 후 4°C에서 10분간 12,000 rpm으로 원심분리하여 DNA pellet을 형성하였다. DNA pellet을 70% ethanol로 세척하여 준 후 상온에서 20분간 방치하여 건조하고 20 μ l TE buffer를 사용 용해시켰다.

지하수 세균에서 16S rDNA를 증폭하기 위해서 primer는 Lane (1991)이 제작한 primer를 사용하였다.

Table 1. Sites and Locations of surveyed groundwater in Seoul

SITE	장소명	위 치
G1	파초여관	구로구 구로5동 571-19
G2	나비유치원	구로구 오류1동 14
G3	근린공원	구로구 고척동
G4	북한산 여관	은평구 진관내동61
G5	비닐하우스	송파구 문정동 비닐하우스 집단단지
G6	대청마루(음식점)	서초구 내곡동

Table 2. Primer sequences for amplification of 16S rDNA and gene encoding nitrite reductase

Primer	Sequence*
16S rDNA	Sense 5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'
	Antisense 5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'
<i>cd₁-nir</i>	Sense 5'-TAY CAC CCS GAR CCG C-3'
	Antisense 5'-CGT TGA ACT TCR CGG TSG G-3'
<i>Cu-nir</i>	Sense 5'-ATC ATG GTS CTG CCG CG-3'
	Antisense 5'-GCC TCG ATC AGR TTG TGG TT-3'

*W, A and T; R, A and G; S, C and G; Y, C and T

Table 3. Four key enzymes for denitrification. They are involved in a stepwise reduction of nitrate to dinitrogen

Enzyme	Function
Nitrate reductase (NAR)	NO ₃ → NO ₂
nitrite reductase (NIR)	NO ₂ → NO
nitric oxide reductase (NOR)	NO → N ₂ O
nitrous oxide reductase (NOS)	N ₂ O → N ₂

이 primer에 의해 증폭된 16S rDNA 분자량은 1320 bp 정도이다 (Marchesi *et al.* 1998). Primer의 염기서열은 Table 2에 제시하였다.

PCR 증폭 과정은 Marchesi 등(1998)의 방법을 변형해서 수행했다. PCR 반응물 100 μ l 내에는 200 mM Tri-Cl (pH 8.8), 50 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 25 mM MgSO₄, 5% DMSO, 5% Glycerol과 5 mM deoxynucleoside triphosphate (MBI Fermentas), 100 pmol primer, 10 ng DNA 주형, 5 U Taq polymerase (Promega, USA)를 첨가했다. 모든 PCR 증폭 과정에는 DNA 주형을 제외한 negative control을 포함시켰다. PCR 반응은 35회 반복으로 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (TaKaRa, Japan)로 수행하였다.

첫 번째 반응은 95°C 3분 동안 DNA를 변성시키고 각 단계에서는 94°C 1분 DNA를 변성시키고, 68°C에서 2분 동안 16S rDNA를 증폭하는 반응을 35번 반복하고 마지막으로 72°C 3분 동안 16S rDNA를 증폭한 후 4°C에서 보관하였다.

탈질화에 관여하는 효소는 모두 네 종류이다 (Table 3). 이 중 *nir*은 nitrite를 독성을 가지는 nitric oxide로 환원시키는 nitrite reductase를 암호화하고 있다 (Walter 1997). 이 *nir*을 증폭하기 위한 primer로 Glockner 등 (1993)이 제작한 두 종류의 primer를 이용하였다 (Table 2). 이 두 primer는 각각 *cd₁-nir* gene과 *Cu-nir* gene을 특이적으로 증폭한다 (Glockner *et al.* 1993).

PCR 증폭 과정은 Hallin and Lindgren (1999)의 방법

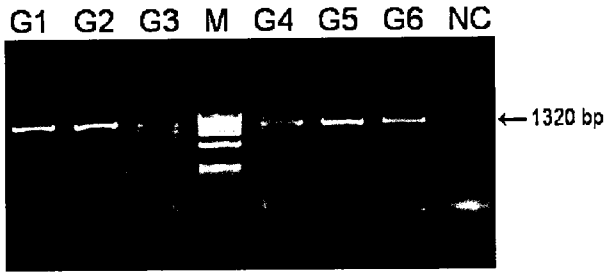


Fig. 1. PCR amplification of DNA Samples with 16S rDNA universal primer (M:Marker DNA, NC: Negative Control)

을 변형하여 수행하였다. PCR 반응물 100 µl 안에는 200 mM Tri-Cl (pH 8.8), 50 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 25 mM MgSO₄, 5% DMSO, 5% Glycerol, 각각 5 mM deoxy-nucleoside triphosphate (MBI Fermentas), 100 pmol primer, 10 ng DNA 주형, 5 U Taq polymerase (Promega, USA)를 첨가했다. 모든 PCR 증폭 과정에는 DNA 주형을 제외한 negative control을 포함시켰다. PCR 반응은 35회 반복으로 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (TaKaRa, Japan)로 수행하였다.

첫 번째 반응은 94°C 3분 동안 DNA를 변성시키고 각 단계에서는 94°C 1분, 57°C 1분, 73°C 1분 동안 DNA를 증폭하는 반응을 35번 반복하고 마지막으로 75°C 5분 동안 DNA를 증폭한 후 4°C에서 보관하였다.

정점 1과 정점 2는 주거 밀집지역으로 현재는 질소 화합물의 오염이 보이지 않으나 앞으로 오염이 예상되는 지역이고, 정점 5와 정점 6은 현재 경작지로 이용되는 지역으로 질소 화합물의 오염이 보고된 지역이다. 이에 반해 정점 3과 정점 4는 공원지역으로 현재 질소 화합물의 오염이 보고된 바 없고 앞으로도 오염의 가능성이 희박하다고 판단되는 지역으로 사료되어 선별하였다.

강한 산화력을 갖고 있는 Guanidine thiocyanate를 포함한 Lysis Buffer와 높은 온도에서 반응시켜 주는 방법으로 지하수내 Bacteria의 DNA를 추출하여 이 DNA를 주형으로 하여 16S rDNA를 증폭한 결과 모든 시료에서 1,320 bp 정도의 PCR 결과물을 얻었다 (Fig. 1). 이것으로 보아 기존의 지하수 시료에서의 세균의 DNA 추출시 이용되던 filtering을 통한 bacteria cell의 농축 과정을 거치지 않고도 PCR 기법을 수행할 만한 충분한 양의 DNA를 이 방법을 이용하여 얻을 수 있음을 증명하였다.

이와 함께 nir 유전자에 대한 두 종의 primer를 선정하여 지하수내의 탈질화 세균의 존재 유무를 확인하고자 PCR을 수행하였고 cd₁-nir primer의 경우 정점 2와

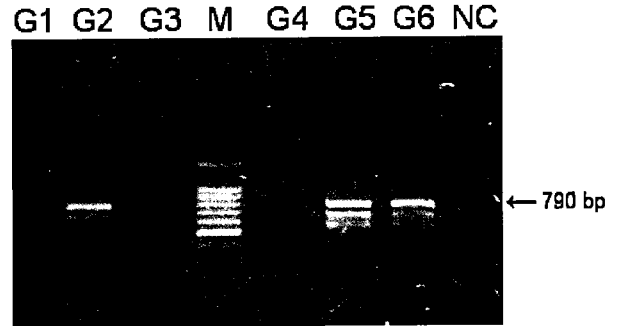


Fig. 2. PCR amplification of DNA Samples with cd₁-nir primer. (M: Marker DNA, NC: Negative Control)

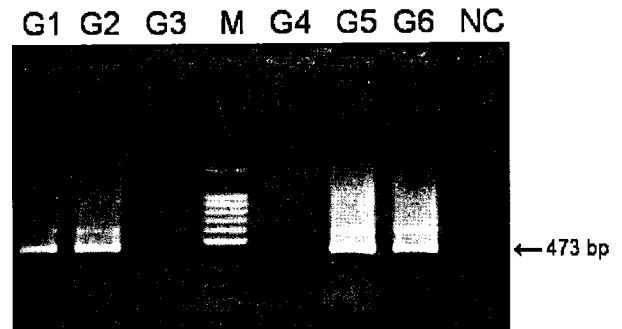


Fig. 3. PCR amplification of DNA Samples with Cu-nir primer. (M: Marker DNA, NC: Negative Control)

정점 5, 정점 6에서 탈질화 세균의 존재를 PCR 결과를 통하여 확인할 수 있었다 (Fig. 2). Cu-nir primer의 경우 정점 3과 정점 4를 제외한 네 개의 정점에서 탈질화 세균의 존재를 확인하였다 (Fig. 3). 즉 본 연구에서 채택한 정점 중 질소 화합물의 오염이 예상되던 지역에서는 모두 탈질화 세균의 존재를 확인할 수 있었고 청정지역으로 선택한 두 정점에서는 탈질화 세균이 존재하지 않는 것으로 확인되었다.

현재 지하수 시료에 적용되고 있는 DNA 추출 방법은 Fuhrman 등이 이용한 filtering method가 보편적으로 이용되고 있다. 그러나 이 방법은 대량의 시료를 필요로 하고 filtering에 많은 시간과 인력을 요구한다. 그러나 본 연구에서 이용한 boiling method는 filtering method에 비해 극히 소량의 시료로부터 직접적으로 DNA를 추출하기 때문에 시간과 인력의 낭비를 줄일 수 있어서 많은 시료를 동시에 검정하기에 매우 유리한 방법이다.

더욱이 16S rDNA를 증폭하는 primer의 경우 universal primer로 거의 대부분의 세균에 적용될 수 있도록 제안되어 있기 때문에 세균 세포의 수확과 DNA 추출과정이 복잡할수록 오염의 가능성이 높다. 그리고 이러한

원치 않는 세균 세포의 오염을 감지하거나 복구할 수 있는 방법이 거의 없는 실정이다. 그러므로 16S rDNA의 증폭과 같이 광범위한 세균을 대상으로 하는 실험 과정에서는 가능한 실험 절차를 간략하게 하여 오염을 방지하는 것이 정확한 결과의 도출에 유리하다.

자연계 시료 내에서 특정미생물의 검출은 그 미생물이 가지는 고유한 유전자의 증폭을 가능하게 하는 primer의 선정이 중요하며 이러한 primer의 조합을 통하여 여러 가지 환경의 상태를 분자생물학적인 방법을 통하여 진단하고 monitoring 할 수 있을 것이다.

적 요

일반적으로 지하수환경은 세균의 수가 적기 때문에 세균의 핵산을 추출하기 위해서는 지하수 시료의 여과를 통하여 대량의 세균을 획득하는 것이 우선적으로 요구되어왔다. 그러나 이러한 여과법은 많은 시간과 인력의 낭비 뿐만 아니라 실험 과정의 특수성으로 인하여 오염의 위험성이 높다. 따라서 본 논문에서는 구아니딘 열탕법을 이용하여 소량의 지하수 시료로부터 핵산증폭 실험에 적용할 수 있는 충분한 양의 핵산의 추출을 시도하였다. 지하수 시료는 서울시 내의 질소화합물 오염 지역, 오염 예상지역, 청정지역으로 구분하여 각각 2개의 정점을 선별하여 총 6개의 정점으로부터 채수하였다. 구아니딘 열탕법을 이용하여 얻은 핵산으로 지하수에서 탈질화세균의 존재 여부를 검정한 결과 청정지역을 제외한 4개의 정점에서 탈질화 세균의 존재를 확인하였다.

사 사

본 연구는 2000년도 한양대학교 교내연구비와 과학기술부 국가지정연구실 사업의 과제(2000-N-NL-01-C-290)에 의하여 수행됨.

인 용 문 헌

- 서울특별시. 1996. 서울특별시 지하수 관리계획 기본조사보고서-제2권 지하수 기본조사 및 지하수 보전. 서울특별시. pp. 783-811.
- 안연준, 민병래, 최영길. 1995. 지하수 미생물과 환경요인의 상호관계. 지하수환경. 2(2):85-92.
- 안영범, 김여원, 이대영, 민병래, 최영길. 1998. 지하수 세균 군집에 미치는 폴리화학적 환경요인의 영향. 지하수환경. 5(4):215-222.
- 안영범, 김여원, 이대영, 민병래, 최영길. 1999. 지하수 세균 군집의 탄소원 기질 이용능 변화. 육수학회지. 32(2):152-161
- 이종운, 전효택, 전용원. 1997. 국내 화강암질내 심부지하수의 지구화학적 특징. 지하수환경. 4(4):199-211.
- 정상용, 권해우, 이강근, 김윤영. 1997. 부산 석대 폐기물 매립지 일원의 수질 환경. 지하수환경. 4(4):175-184.
- 지상우, 김선준, 안지현. 1997. 문경 단봉탄광 폐석장 유출수의 조성변화. 지하수환경. 4(4):169-174.
- Balkwill DL. 1989. Numbers, diversity, and morphological characteristics of aerobic, chemoheterotrophic bacteria in deep subsurface sediments from a site in South Carolina. Geomicrobiol. J. 7:33-52.
- Chomczynski P and N Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Biochemistry 162:156-159.
- Glockner AB, A Jungst and WG Zumft. 1993. Copper-containing nitrite reductase from *Pseudomonas aureofaciens* is functional in a mutationally cytochrome cd1 free background (NirS 2) of *Pseudomonas stutzeri*. Arch. Microbiol. 160:18-26.
- Marchesi JR, T Sato, AJ Weightman, TA Martin, JC Fry, SJ Hiom and WG Wade. 1998. Design and Evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify gene coding for bacterial 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 64(2):795-799.
- Walter G Zumet. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61(4):533-616.

(Received 20 November 2001, accepted 24 December 2001)