

cpcBA-Intergenic Spacer Region을 이용한 Cyanobacteria의 다양성 분석

최강국¹ · 박용하¹ · 안치용 · 배명숙 · 오희목*

한국생명공학연구원 환경생명공학연구소, '생물자원센터

대청호에서 수화 발생이 빈번한 추소리 수역에서 2005년 3월 15일에 채취한 시료를 대상으로 유전자 분석에 의한 cyanobacteria의 다양성을 조사하였다. *cpcBA*-Intergenic Spacer (IGS)는 cyanobacteria에 특징적 색소인 phycocyanin을 합성하는 유전자와 유전자 사이의 부분으로, 환경시료에서 cyanobacteria의 다양성을 조사하기에 매우 유용한 기능 유전자이다. *cpcBA*-IGS를 이용하여 restriction fragment length polymorphism (RFLP)으로 cyanobacteria의 다양성을 분석한 결과 *Phormidium* 속은 58 clones, *Anabaena* 속은 14 clones, *Microcystis* 속은 4 clones, *Spirulina* 속은 1 clone 그리고 uncultured cyanobacteria 2 clones가 존재하였다. 전반적으로 *Phormidium* 속이 우점하였으며, 여름철에 수화를 일으키는 *Anabaena* 속과 *Microcystis* 속도 많이 분포하였다. 따라서 cyanobacteria는 *cpcBA*-IGS와 같은 기능 유전자에 의한 종 동정 및 군집분석이 가능함을 보였다.

Keywords □ community analysis, *cpcBA*-IGS, cyanobacteria, diversity, PCR-RFLP

Cyanobacteria는 담수, 해수, 사막, 온천, 빙산 등 다양한 환경에 널리 분포하며, 수생태계에서 1차 생산자로서 중요한 구성 요소이다(14). Cyanobacteria를 포함한 미세조류(microalgae)에 대한 군집 분석은 현미경을 이용한 형태분석에 기초를 두고 있다. 이와 같은 형태적 분석은 조류 분류의 전문지식을 필요로 하며 많은 시간이 소요된다. 특히 조류 종(species)의 동정은 전자현미경을 이용하거나, 생리적인 특성을 조사하여야 하는 경우도 있다. 이와 같은 어려움을 해결하기 위하여 최근에 분자생물학적 방법을 이용한 미세조류 동정, 군집분석 등이 다양하게 시도되고 있다. 실제로 gene sequencing analysis, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (11, 26, 29), thermal gradient gel electrophoresis (TGGE) (21, 22), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (3, 18, 20), fluorescence *in situ* hybridization, slot-blot membrane hybridization (24), microarray technique (9, 19) 등이 이용되고 있다.

유전자 분석에 기초한 분자생물학적 방법은 특정 균주의 탐지 및 동정에 매우 유용하고, 신속하다는 장점이 있다. 또한 형태적으로 유사한 종의 구분에 매우 유용하다. 분자생물학적 방법 중 가장 일반적으로 사용되는 DGGE는 재현성, 분리된 band의 서열분석 등 많은 문제가 있다. 그러므로 최근에는 세균과 Archaea의 군집분석에 RFLP방법을 이용하고, 얻어진 clones의 염기서열을 분석하는 방법이 많이 사용되고 있다(13, 15). 일반적으로 PCR-RFLP 방법은 일부 세균 그룹들의 종 특이적 동정 방법으로 사용될 뿐만 아니라, 다양한 미생물이 서식하고 있는 생태계의 군집분석에 이용되고 있다(16, 17).

일반적으로 cyanobacteria에 대한 군집분석을 위해 16S rRNA gene을 이용한 PCR 증폭산물을 이용하였으나, cyanobacteria에 대한 primer의 특이성이 떨어져 세균의 증폭이 유도되는 문제가 있다. 그러므로 cyanobacteria에 특징적으로 존재하는 보조색소인 phycocyanin을 coding하는 유전자를 이용한 cyanobacteria의 종 동정 및 군집분석에 대한 연구가 증가하고 있다. Phycocyanin은 광합성 기구에 chlorophyll *a* (Chl-*a*)와 같이 존재하며, cyanobacteria의 남색을 결정하는 요인이다. *cpcBA*-Intergenic spacer (IGS)는 phycocyanin operon 내에서 phycobilisome subunit (*cpcB* and *cpcA*) 사이의 유전자 서열 변화가 매우 심한 부분을 포함하고 있다. 실제로, 환경시료에서 세균에 비해 적은 수로 존재하는 cyanobacteria를 쉽고 신속하게 찾고 동정하기 위한 여러 가지 연구가 시도되고 있다(4, 5, 7, 23). 유럽의 아고산성 호수에서 분리된 picocyanobacteria의 계통분석과 cyanobacteria의 순수 배양시 오염을 확인하기 위하여 *cpcBA*-IGS가 사용된 바 있다(4, 5).

본 연구는 여름철 *Microcystis* 속에 의해 수화가 빈번히 발생하는 대청호의 추소리 수역에서 분자생물학적 방법으로 *cpcBA*-IGS와 PCR-RFLP를 이용하여 cyanobacteria의 다양성을 조사하고, 다른 *TaqI* RFLP 패턴을 보인 clone의 *cpcBA*-IGS 염기서열을 분석하여 계통분석을 실시하였다.

재료 및 방법

시료의 채취와 수질 분석

조사지점은 대청호의 중부에 위치한 충청북도 옥천군 군북면 추소리이며, 여름철에 *Microcystis* 속에 의한 수화가 빈번하게 발생하는 수역이다(Fig. 1). 물 시료는 2005년 3월 15일 채집하였

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-860-4321, Fax: 042-860-4594
E-mail: heemock@kribb.re.kr

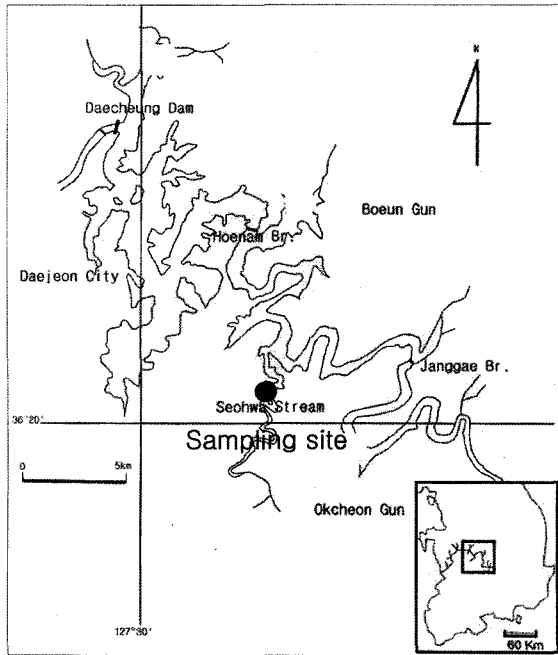


Fig. 1. Sampling site in the Daechung Reservoir (Chuso-ri).

고, 채집된 시료는 4°C 냉장 상태를 유지하여 실험실로 운반하였다. 수온, DO 및 pH는 현장에서 YSI meter (63/100 FT, YSI Inc, Yellow Springs, USA)를 사용하여 측정하였다. Chl-*a*는 chloroform-methanol mixture (2:1, vol:vol)로 추출하고, Wood (28)의 방법에 따라 Fluorometer (Turner 450, Branstead/Thermolyne, Dubuque, USA)를 사용하여 측정하였다.

핵산 추출

Cyanobacteria의 genomic DNA를 추출하기 위하여 채취한 시료 4 L를 0.22 µm pore size filter (Millipore system, USA)로 여과하여 농축하였다. 여과지에 걸러진 cyanobacteria를 떼어내기 위하여 TE buffer (pH 8.0) 20 ml을 넣고 30초간 sonication 하여 현탁한 후, 원심분리기(6,000xg, 5 min)를 이용하여 cyanobacteria를 농축하였다. 농축된 cyanobacteria의 genomic DNA를 회수하기 위하여 Genomic DNA isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하였다.

cpcBA-IGS의 증폭 및 cloning

Cyanobacteria의 다양성을 확인하기 위하여 환경시료로부터 얻은 genomic DNA를 주형으로 cyanobacteria에만 존재하는 phycocyanin을 coding하고 있는 *cpcB*와 *cpcA*의 flank region인 *cpcBA*-IGS부분을 PCR을 통하여 증폭하였다. 사용된 primer는 *cpcB*의 3' 쪽의 PC1F (5'-GGC KGC YTG YYT RCG YGA CAT GGA-3')와 *cpcA*의 5' 쪽의 PC1R (5'-AAR CGN CCT TGR GEA TCD GCG C-3')이다. PCR 반응물의 조성은 1X 반응용액, 50 ng의 genomic DNA, dNTP (final conc. 200 µM each), 10 µM primers 그리고 2.5 units *Taq* polymerase (*n-taq*)를

첨가하여 최종 부피가 50 µl가 되도록 하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 열처리를 한 후, 94°C에서 1분간 변성 과정과 annealing과 신장을 위하여 55°C와 72°C에서 1분간 반응시키는 과정을 30회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 7분간 처리하였다. PCR 증폭산물은 0.8% agarose gel에 전기영동하여 확인하였고, 증폭된 450 bp 크기의 *cpcBA*-IGS는 PCR quick-spin kit (Intron Biotechnology, Korea)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 증폭산물은 p-Drive vector (Quiagen, Hilden, Germany)에 cloning 한 후, *Escherichia coli* DH5α에 형질전환시켜 kanamycin (30 µg/µl)이 포함된 LB 평판배지에서 blue-white colony 선별법에 의해 재조합 clone을 선별하였다.

PCR 증폭 산물의 *Taq*I RFLP 분석

선별된 재조합 clone으로부터 DNA-spin plasmid DNA extraction kit (Intron Biotechnology, Korea)를 이용하여 plasmid를 회수하였다. 회수된 plasmid 10 µl (200 ng/µl)를 4 염기서열을 인지하는 제한효소 *Taq*I (T¹CGA Roche, USA)을 첨가하고 최종 부피를 20 µl로 하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. Restriction fragment (RF) pattern은 2% agarose gel (Qbiogene, France)로 50 V에서 1시간 동안 전기영동하여 확인하였다.

각 RF의 크기를 계산하여 RFLP pattern의 유사성이 높은 clone의 cluster를 확인하였고, clone 라이브러리의 다양성 지수로 coverage value (C), richness (S), Shannon-Weiner diversity index (H), Pielou's evenness index (e), Simpson dominance index (D)를 계산하였다(6).

염기서열 및 유연관계 분석

무작위로 얻어진 총 79개의 clones를 대상으로 제한효소 *Taq*I을 처리하여 RFLP pattern을 보았으며, RFLP pattern의 차이를 보인 14 clones에 대한 염기서열은 automatic DNA sequencer (Model 377, Applied Biosystems, Foster, USA)를 이용하여 결정하였다. 결정된 염기서열들은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST 검색을 통해 clone과 가장 가까운 그룹을 조사하여 참조 서열을 확보하였다. 염기서열의 편집과 정렬은 ClustalX v1.83 프로그램을 이용하였고, evolutionary distance matrices들은 PHYLIP package v3.6 (8)을 이용하여 Neighbor-Joining method (25)에 의해 염기서열간의 유전적인 거리와 계통도(phylogenetic tree)를 추론하였다. 계통도내 분지의 안정도를 조사하기 위하여 1000번의 bootstrap 재구성(resampling) 분석을 실시하여 500 이상의 값을 표시하였다. 14개의 clones에 대해 결정된 부분 염기서열은 NCBI GenBank로부터 accession number (DQ112228~DQ112241)를 부여 받았다.

결 과

이화학적 수질분석

추소리에서 2005년 3월 15일에 채집한 물시료의 이화학적 수질분석 결과 수온은 5.6°C, pH는 8.5를 나타냈다. 일반적으로

cyanobacteria의 최적 생장 수온은 25°C 전후로 시료 채취 시기에는 수온이 낮아 cyanobacteria의 최적 생장 기간은 아니었으며, pH 값 또한 약 알칼리를 유지하고 있었다. 또한 DO는 14.2 mg/L를, Chl-*a*는 14.5 µg/L를 나타내어 식물플랑크톤이 많이 분포하고 있음을 보였다.

Clone 라이브러리의 구축과 남세균군집 다양성 분석

추소리 수역의 물시료에서 추출된 cyanobacteria의 genomic DNA를 주형으로 하고 primer PC1F와 PC1R을 이용하여 *cpcBA*-IGS에 대한 PCR을 수행하였으며, 0.8% agarose gel을 이용하여 약 450 bp에 해당하는 증폭산물을 확인하였다(자료 미제시). Agarose gel로부터 증폭산물을 정제하여 pDrive vector에 삽입하고, *E. coli* DH5α에 형질전환하여 79개의 재조합clones를 얻었다.

각 재조합 clones의 *Taq*I RFLP pattern을 분석한 결과, 14개의 서로 다른 RFLP phylotype이 관찰되었다(Table 1). Clone number ratio [(total number of RFLP phylotypes/total clone number) × 100]는 17.8%로 특정 RFLP phylotype에 속하는 재조합 clone이 우세하였다. 또한 coverage value(현장의 미세조류 군집을 라이브러리가 반영하는 비율)는 82.3%로 전체 다양성의 50% 이상을 반영한 것이다. 또한 clone 라이브러리의 다양성 지수를 조사하기 위하여 richness (S), Shannon-Weiner diversity index (H), evenness (e), Simpson dominance index (D)를 분석한 결과, 추소리 수역의 물시료에서는 cyanobacteria의 다양성이 매우 낮게 나와 특정 cyanobacteria 군집이 우점함을 알 수 있었다(Table 1).

***cpcBA*-IGS 서열을 이용한 계통분류학적 분석**

79개의 재조합 clones에 대하여 RFLP phylotype의 분석에 의해 상이한 pattern (Fig. 2)을 보인 14개의 재조합 clones에 대해

Table 1. Diversity indices based on RFLP phylotypes in the *cpcBA*-IGS clone libraries generated from the Chuso-ri

| Parameter | Number or Index |
|--|-----------------|
| Total number of clones (N) | 79 |
| No. of unique clones (n) | 14 |
| No. of RFLP phylotypes (R) | 14 |
| % Coverage (C) ¹ of clone library | 82.3 |
| Richness (S) ² of RFLP phylotypes | 6.85 |
| Shannon-Weiner diversity (H) ³ | 0.65 |
| Evenness (e) ⁴ | 0.56 |
| Simpson dominance (D) ⁵ | 0.41 |

¹Calculated as $C = [1 - (n/N)] \times 100$, where *n* is the number of unique clone and *N* is the total number of clones.

²Calculated as $S = (R - 1) / (\log N)$, Where *R* is the total number of RFLP phylotypes and *N* is the total number of clones.

³Calculated as $H = -\sum(P_i)(\log P_i)$, where *P_i* is the proportion of clones belonging to *i*th RFLP phylotype.

⁴Calculated as $e = H / (\log R)$, where *H* is Shannon-Weiner diversity index and *R* is the total number of RFLP phylotypes.

⁵Calculated as $D = \sum(P_i)^2$, Where *P_i* is the proportion of clones belonging to *i*th RFLP phylotype.

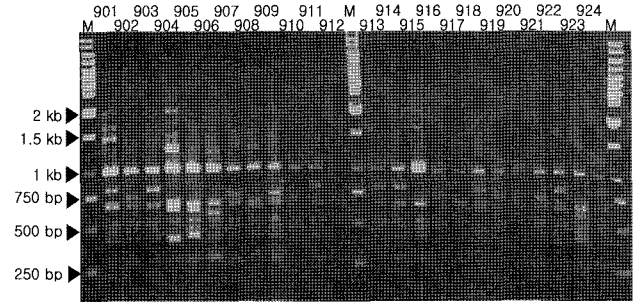


Fig. 2. RFLP pattern analysis of partial clones, inserted the *cpcBA*-IGS region, digested with *Taq*I. M: 1kb ladder marker. Lane numbers correspond to the clone number.

서 *cpcBA*-IGS의 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열들은 NCBI의 BLAST 검색을 이용하여 GenBank에 등록되어있는 cyanobacteria들의 *cpcBA*-IGS 염기서열과 비교하였다(Table 2). 분석된 재조합 clone 염기서열의 14.2%가 배양이 보고되지 않은 cyanobacteria의 서열과 유사도가 99.2%와 99.7%로 매우 높았다. Clone 901은 *Phormidium autumnale*과 85.6%의 낮은 유사도를 가지며, 분석된 cyanobacteria의 62.0%를 차지하여 본 조사 수역에서 우점하였다. 또한 14개 clones 중 5개 clones (924, 938, 947, 949, 1027)는 *P. autumnale*과 82.3~85.8%의 비교적 낮은 유사도를 보였다. 추소리의 조사 수역에서 *Phormidium* 속이 조사한 재조합 clones의 73.4%를 차지하여 우점하였다. Clones 912, 926, 그리고 1021은 *Anabaena compacta*와 93.2~96.6%의 유사도를 보였으며, 14개 재조합 clones로 전체 재조합 clones의 17.7%를 차지하였다. Clone 1029는 *Spirulina* sp.와 99.3%의 높은 유사도를 보였다. *cpcBA*-IGS에서 IGS의 염기 수에서도 속에 따라 상당한 차이를 보였다. *P. autumnale*와 유사성이 높은 clones는 IGS의 염기 수에 따라 두 그룹 나뉘었다. 한 그룹 (Clones 901, 924, 938, 949)의 IGS의 염기수는 102 bp이고, 다른 그룹 (Clones 947, 1027)의 IGS의 염기수는 103 bp이었다. *A. compacta*와 유사성을 보인 그룹 (Clones 912, 926, 1021)의 경우 IGS는 103 bp인 반면, *Microcystis novacekii*와 *Microcystis wesenbergii*와 높은 유사성을 보인 Clone 927, Clone 1013의 IGS의 염기 수는 각각 65 bp와 66 bp로 가장 짧았다. *Spirulina* sp.와 유사성이 높은 Clone 1029는 111 bp의 IGS 염기 수를 보여 가장 길었으며, uncultured cyanobacteria와 유사성이 높은 Clone 939와 Clone 1033은 77 bp의 비교적 짧은 IGS의 염기 수를 보였다.

Clones의 염기서열과 GenBank에 등록된 cyanobacteria들의 염기서열을 바탕으로 phylogenetic tree를 작성하였다(Fig. 3). BLAST 분석 결과에서 *P. autumnale*에 가장 유사성을 가진 clones는 phylogenetic tree 분석에서 두 개의 그룹으로 나뉘었다. 한 그룹은 Clones 901, 924, 938 그리고 949로 이루어져 있으며, clone 사이의 유사도는 98.8%를 보였으며, Clone 947과 Clone 1027의 다른 그룹의 유사도는 98.5%를 보였다. 그러나 두 그룹간의 유사성은 85.3%로 낮게 나와 계통분류적으로 두 그룹은 상당한 거리가 있는 것으로 보인다. Clone 1013은 BLAST 분석 결과 *M.*

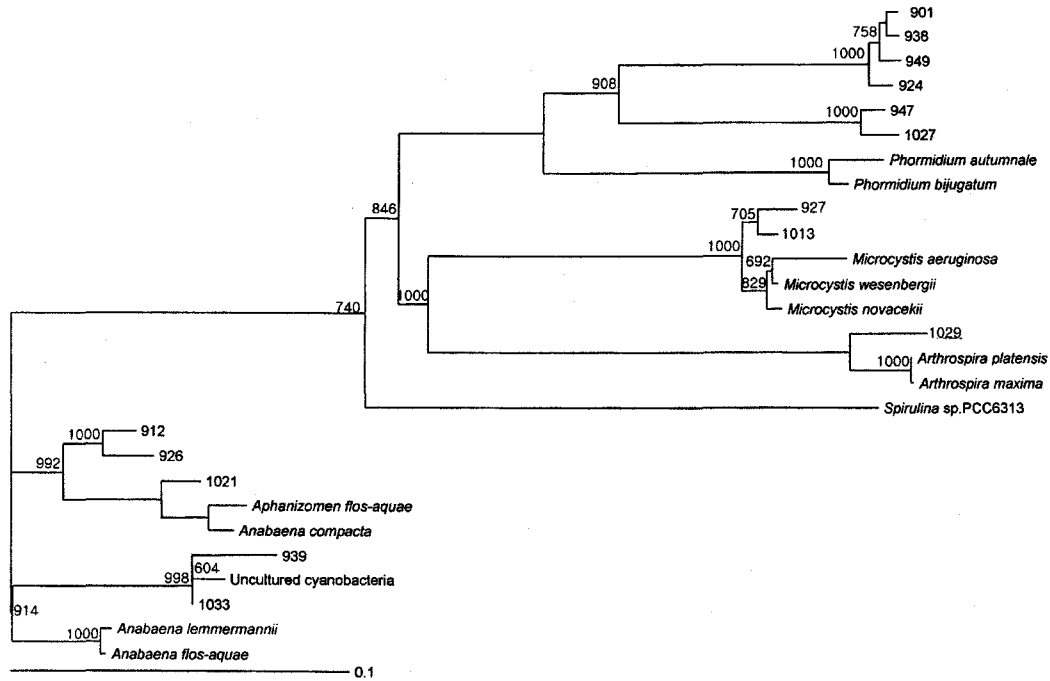


Fig. 3. Neighbor-joining dendrogram showing the sequence similarities of the *cpcBA*-IGS sequences of isolated clones and related organisms. Bootstrap values, expressed as a portion of 1000 replications, are given at branching points, when 50% or more.

*wesenbergii*와 99.5%의 유사도를 보였으나, phylogenetic tree 분석 결과 Clone 927과 grouping되어 *M. novacekii*와 가까운 것으로 보였다. Clone 1029의 경우 BLAST 검색 결과는 *Spirulina* sp.와 제일 높은 값(99.3%)을 보였으나, phylogenetic tree 분석 결과 *Arthrospira platensis*와 가깝게 나왔다. Clones 912, 926 그리고 1021은 BLAST 검색 결과 *A. compacta*와 유사도가 가장 높은 것으로 나왔으나, phylogenetic tree 분석 결과 Clone 1021은 *A. compacta*와 grouping되지만 Clone 912와 Clone 926은 다른 그룹으로 나뉘었으며, Clone 912는 Clone 926과는 97.2%의 유사도를 보이지만 Clone 1021과는 92.7%의 유사도를 보여 상당한 거리가 있음을 나타내었다. Clone 939와 Clone 1033은 배

양되지 않은 cyanobacteria과 같은 그룹으로 분리 되었으며, 두 clones는 *Anabaena flos-aquae*와 93.7%의 유사도를 보였다.

고찰

2005년 3월 15일 추소리 수역에서 채집한 물시료의 pH는 8.5로 한강 양수리 육각지에서 *Microcystis* 속에 의해서 수화가 발생했을 때의 pH 9.7 (27)에 비하여 상당히 낮은 값을 보였다. 일반적으로 cyanobacteria에 의하여 수화가 발생하는 시점에는 pH가 높아지는 경향을 보인다. 따라서 상대적으로 낮은 pH 값은 시기적으로 cyanobacteria의 개체수가 적게 존재함을 나타내는

Table 2. Closest relative and IGS of the representative clones obtained from Chuso-ri based on *cpcBA*-IGS sequences

| Clone | bp | Nearest relative | Similarity (%) | Distribution (%) | IGS (bp) |
|-------|-----|---|----------------|------------------|----------|
| 901 | 438 | <i>Phormidium autumnale</i> (AY446127) | 85.6 | 62.0 | 102 |
| 938 | 435 | <i>Phormidium autumnale</i> (AY446127) | 85.8 | 3.8 | 102 |
| 949 | 437 | <i>Phormidium autumnale</i> (AY446127) | 85.4 | 2.5 | 102 |
| 924 | 436 | <i>Phormidium autumnale</i> (AY446127) | 85.3 | 1.3 | 102 |
| 947 | 439 | <i>Phormidium autumnale</i> (AY446127) | 84.8 | 2.5 | 103 |
| 1027 | 438 | <i>Phormidium autumnale</i> (AY446127) | 82.3 | 1.3 | 103 |
| 912 | 439 | <i>Anabaena compacta</i> (AY702239) | 93.9 | 13.9 | 103 |
| 926 | 438 | <i>Anabaena compacta</i> (AY702239) | 93.2 | 2.5 | 103 |
| 1021 | 439 | <i>Anabaena compacta</i> (AY702239) | 96.6 | 1.3 | 103 |
| 927 | 402 | <i>Microcystis novacekii</i> (AY271739) | 98.4 | 3.8 | 65 |
| 1013 | 402 | <i>Microcystis wesenbergii</i> (AY271728) | 99.5 | 1.3 | 66 |
| 1029 | 442 | <i>Spirulina</i> sp. (AY244670) | 99.3 | 1.3 | 111 |
| 939 | 383 | Uncultured cyanobacteria (AY942910) | 99.2 | 1.3 | 77 |
| 1033 | 413 | Uncultured cyanobacteria (AY942910) | 99.7 | 1.3 | 77 |

것이다.

RFLP 분석 방법은 종간의 정성적, 정량적 분석에 대한 정확한 정보를 제공하기에는 부족하지만 군집간의 유사도와 분포에 대한 정보를 얻기에 비교적 신속하고, 효과적인 방법이다. 따라서 세균과 Archaea의 군집분석에 폭 넓게 이용되고 있다(12). 전체 clones 중 RFLP phylotype의 비를 구하는 clone number ratio는 17.8%로 Lee 등(16)이 하수 시료에서 60.7%와 산업폐수 시료에서 보고한 24.4%보다 낮은 값으로 특정 종이 우점하는 결과를 보였다. Clone 라이브러리의 다양성을 보여주는 여러 가지 지수의 값도 매우 낮게 나와 특정 cyanobacteria가 우점함을 보였다. 위의 결과는 조사 수역의 cyanobacteria 군집구조가 매우 단순하고 clone 라이브러리의 크기가 작았기 때문이라고 생각된다. 조사된 총 clones의 수가 79개로 통계적으로 처리하기에는 적은 양으로 생각된다.

16S rDNA를 이용한 분자생물학적 방법은 환경 시료에서 세균과 Archaea의 종 동정 및 군집분석에 매우 유용하게 사용되고 있다. 그러나 16S rDNA의 경우 진화적으로 매우 느리게 변했기 때문에 속(genus)간의 구분은 가능하지만 종(species)간에서는 구분이 어렵다. 특히 균주(strains)간의 구분에 적용은 어렵다는 보고가 많다(23). 또한 본 연구에서 사용된 cpcBA-IGS를 이용하여 cyanobacteria와 세균이 동시에 존재하는 현장 시료에서 특이적으로 cyanobacteria만을 찾아낼 수 있으며, PCR-RFLP 방법을 이용하여 cyanobacteria의 다양성을 쉽게 분석할 수 있었다. 그러나 GenBank의 BLAST 검색 결과와 phylogenetic tree 분석 결과에서 보는 바와 같이 *P. autumnale*과 84.8~85.6%의 유사성을 보인 5개 clones의 경우 두 그룹으로 나뉘는 결과를 보였으며, 또한 *A. compacta*와 93.2~96.6%의 유사성을 보인 3개의 clones도 두 개의 그룹으로 나뉘었다(Table 2, Fig. 3). Phylogenetic tree에서 다른 그룹으로 분리되면서도 GenBank database에서는 비슷한 결과를 보인 것은 현재까지 cyanobacteria에 대한 cpcBA-IGS에 대한 database가 적어서 연관관계를 밝히는데 한계가 있다고 생각된다. 그러나 기능 유전자를 이용한 연구가 계속 진행되고 많은 양의 database가 축적되면, 기능 유전자를 이용한 계통발생학적인 연구가 체계적으로 확립될 것으로 판단된다.

전 등(1)이 온도와 희석률이 식물플랑크톤의 증식에 미치는 영향에 대한 조사결과에 따르면 5°C, 10°C와 같은 낮은 온도에서는 cyanobacteria 중 *Phormidium* 속이 우점한다는 보고와 일치하는 결과이다. 대청호에서 우점하는 cyanobacteria의 종은 조사 시기에 따라 차이를 보였다. Ahn 등(2)은 2003년 여름에 cyanobacteria의 수화를 일으키는 종으로는 *Microcystis* 속과 *Anabaena* 속으로 보고한 반면, Go 등(10)은 2004년 여름에는 우점하는 cyanobacteria는 *Microcystis* 속, *Chroococcus* 속, *Oscillatoria* 속, *Phormidium* 속이었다고 보고하였다. 따라서 대청호에서 봄에 cyanobacteria의 다양성에 대한 고찰이 필요하다고 판단되어, 분자생물학적인 방법을 통하여 cyanobacteria의 다양성을 알아보았다. 본 연구 결과 특정 종(*Phormidium* 속)이 우점함을 보였고, *Anabaena* 속도 관찰되었다. 해마다 *Microcystis* 속의 수화가 발생하는 수역인데, 두 개의 clones만이 검출되는

이유는 온도가 낮은 시기에는 균체수가 적게 존재함을 시사하고 있다. 또한 본 연구를 통해서 대청호에 *Arthrospira* 속의 존재를 확인하였다.

본 실험에서 picocyanobacteria의 검출이 되지 않은 이유는 첫째로 picocyanobacteria에 대한 cpcBA-IGS에 대한 정보가 적어서 현재까지 보고된 cpcBA-IGS의 염기서열만으로 만들어진 primer에 의해서는 검출이 되지 않았거나, 둘째로 핵산을 추출하는 방법이 일반적으로 Gram negative bacteria의 genomic DNA를 추출하는 방법의 사용으로 인하여 picocyanobacteria의 genomic DNA의 추출이 제대로 되지 않았을 수 있다고 판단되어, genomic DNA의 회수 방법에 대한 고찰이 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 21세기 프런티어연구개발사업 및 KRIBB 기관고유사업의 지원에 의한 연구 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 전만식, Y. Watanabe, 김범철. 1998. 하천수중에서 식물플랑크톤의 증식에 대한 희석율과 온도의 영향. 한국육수학회지 31, 328-336.
2. Ahn, C.-Y., H.-S. Kim, B.-D. Yoon, and H.-M. Oh. 2003. Influence of rainfall on cyanobacterial bloom in Daechung reservoir. *Korean J. Limnol.* 36, 413-419.
3. Bruns, A., U. Nubel, H. Cypionka, and J. Overmann. 2003. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1980-1989.
4. Crosbie, N.D., M. Pockl, and T. Weisse. 2003. Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and cpcBA-intergenic spacer sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5716-5721.
5. Crosbie, N.D., M. Pockl, and T. Weisse. 2003. Rapid establishment of clonal isolates of freshwater autotrophic picoplankton by single-cell and single-colony sorting. *J. Microbiol. Methods* 55, 361-370.
6. 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.
7. Dyble, J., H.W. Paerl, and B.A. Neilan. 2002. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and cpcBA-IGS nucleotide sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2567-2571.
8. Felsenstein, J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. The web distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
9. Francois, E., D.Y. Wang, R. Fulthorpe, S.N. Liss, and E.A. Edwards. 2003. DNA microarrays for detecting endocrine-disrupting compounds. *Biotechnol. Adv.* 22, 17-26.
10. Go, S.-R., S.-J. Park, C.-Y. Ahn, A. Choi, J.-S. Lee, H.-S. Kim, B.-

- D. Yoon, and H.-M. Oh. 2004. Analysis of microbial communities during cyanobacterial bloom in Daechung Reservoir by DGGE. *Kor. J. Microbiol.* 40, 205-210.
11. Gonzalez, J.M., A. Ortiz-Martinez, M.A. Gonzalez-delValle, L. Laiz, and C. Saiz-Jimenez. 2003. An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rDNA sequences from complex environmental communities. *J. Microbiol. Methods* 55, 459-463.
 12. Hartmann, M., B. Frey, R. Kolliker, and F. Widmer. 2005. Semi-automated genetic analyses of soil microbial communities: comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. *J. Microbiol. Methods* 61, 349-360.
 13. Horz, H.P., M.T. Yimga, and W. Liesack. 2001. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4177-4185.
 14. Janse, I., M. Meima, W.E. Kardinaal, and G. Zwart. 2003. High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6634-6643.
 15. Kim, J.-H. and H.-Y. Jang. 2004. 16S rDNA-PCR and RFLP analysis for rapid identification of spoilage bacteria from low salt cucumber brine. *Korean J. Biotech. Bioeng.* 19, 72-77.
 16. Lee, H.K., J.H. Kim, C.K. Kim, and D.H. Lee. 2004. Molecular characterization of the bacterial community in activated sludges by PCR-RFLP. *Kor. J. Microbiol.* 40, 307-312.
 17. Lee, S.Y. and S.H. Kim. 2003. Genetic variation and discrimination of Korean arkshell *Scapharca* species (*Bivalvia*, *Arcoidea*) based on mitochondrial COI gene sequences and PCR-RFLP. *Korean J. Genetics* 25, 309-315.
 18. Lepp, P.W. and T.M. Schmidt. 2004. Changes in *Synechococcus* population size and cellular ribosomal RNA content in response to predation and nutrient limitation. *Microb. Ecol.* 48, 1-9.
 19. Liu, W.T. and L. Zhu. 2005. Environmental microbiology-on-a-chip and its future impacts. *Trends Biotechnol.* 23, 174-179.
 20. Lyra, C., S. Suomalainen, M. Gugger, C. Vezie, P. Sundman, L. Paulin, and K. Sivonen. 2001. Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 513-526.
 21. Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 317-322.
 22. Muyzer, G. and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
 23. Robertson, B.R., N. Tezuka, and M.M. Watanabe. 2001. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 861-871.
 24. Rudi, K., J. Treimo, H. Nissen, and G. Vegarud. 2003. Protocols for 16S rDNA array analyses of microbial communities by sequence-specific labeling of DNA probes. *TheScientificWorldJOURNAL* 3, 578-584.
 25. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
 26. Savin, M.C., J.L. Martin, M. LeGresley, M. Giewat, and J. Rooney-Varga. 2004. Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods. *Microb. Ecol.* 48, 51-65.
 27. Suh, M.Y., B.H. Kim, and M.S. Han. 2005. Distribution of cyanotoxin microcystin-LR in Han River system and ecological park in Seoul and Kyunggi districts. *Korean J. Limnol.* 38, 237-248.
 28. Wood, L.W. 1985. Chloroform-methanol extraction of chlorophyll-*a*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 38-43.
 29. Zwart, G., M.P. Kamst-van Agterveld, I. van der Werff-Staverman, F. Hagen, H.L. Hoogveld, and H.J. Gons. 2005. Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake. *Environ. Microbiol.* 7, 365-377.

(Received August 18, 2005/Accepted October 18, 2005)

ABSTRACT: Cyanobacterial Diversity Analysis Using *cpcBA*-Intergenic Spacer Region

Gang-Guk Choi¹, Yong-Ha Park¹, Chi-Yong Ahn, Myoung-Sook Bae, and Hee-Mock Oh*

(Environmental Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea, ¹Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea)

The cyanobacterial diversity was analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of PCR-amplified *cpcBA*-Intergenic Spacer (IGS) genes and *cpcBA*-IGS gene sequencing with a sample collected at Chuso-ri in Daechung Reservoir on March 15, 2005. The Shannon-Weiner diversity index was 0.65, indicating that the cyanobacterial community structure was simple. PCR-RFLP profiles obtained were *Phormidium* spp. (58 clones), *Anabaena* spp. (14 clones), *Microcystis* spp. (4 clones), *Spirulina* sp. (1 clone) and uncultured cyanobacteria (2 clones). The PCR-RFLP of *cpcBA*-IGS revealed that *Phormidium* spp. and *Anabaena* spp. dominated in the invested sample. As a consequence, it seems that the analysis of functional genes such as *cpcBA*-IGS can be used for the species identification and community analysis of cyanobacteria.