

배양법과 DGGE에 의한 해양세균 군집의 비교분석

김 말 남* · 방 효 주

상명대학교 생물학과

Comparison of Culture-dependent and DGGE based Method for the Analysis of Marine Bacterial Community

Mal Nam Kim* and Hyo Joo Bang

Department of Biology, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

Abstract - Seasonal variation of marine bacterial community was analyzed in the surface sea water collected from one of the stations locating at Tongyeong coastal area, Korea. The results obtained by the culture method through identification with the VITEK Microbe ID system after pure culture in the selective medium were compared with those obtained by the DGGE based 16S rRNA PCR method. The composition of the marine bacterial community in the sea water samples harvested in September, 2004, November, 2004, January, 2005, May, 2005 and August, 2005 determined by the culture method showed 5, 5, 4, 6, and 10 strains respectively. *Pseudomonas fluorescens* and *Acinetobacter lwoffii* were detected in all seasons. The other strains were identified to be *Pseudomonas stutzeri*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Burkholderia mallei* and *Chryseobacterium indologenes*. In contrast, the 16S rRNA PCR-DGGE method detected 10, 11, 6, 9 and 13 populations respectively in the same sea water samples and the strains were identified to be *Acinetobacter lwoffii*, *Burkholderia mallei*, *Pseudomonas fluorescens*, *Actinobacillus ureae*, *Burkholderia* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Roseobacter* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Sphingomonas paucimobilis* and *Rugeria algocolus*. This results indicated that the DGGE based 16S rRNA PCR method was more efficient than the culture method for the grasp of the characteristics of the marine bacterial community.

Key words : Marine bacteria, Sea water, Culture method, DGGE

서 론

해양미생물은 물질 순환의 담당자로서 육상에서 유입된 유기물을 정화하며 석유의 분해와 CO₂의 고정 및 유화수소와 메탄의 산화에 관여한다. 따라서 해양미생물은 오탁 유기물에 의한 연안 어장과 어패류 양식장의

환경 피해를 방지하고 적조발생을 방제하는데 이용될 수 있으며, 새로운 bioactive화합물 자원으로도 사용될 수 있다.

해양환경은 육상과는 달리 저온, 고압 열수, 염분환경이 많고 빈영양상태인 경우가 많아 미생물의 수가 적으므로 (10⁴~10⁶ cells mL⁻¹) 한천배지에 배양한 세균수가 배양하지 않고 현미경 하에서 계수하는 수의 10⁻²~10⁻³ 정도에 지나지 않는다(Nakagawa *et al.* 2002).

자연환경으로부터 미생물을 검출하는 전통적인 방법

* Corresponding author: Mal Nam Kim, Tel. 02-2287-5150, Fax. 02-2287-0070, E-mail. mnkim@smu.ac.kr

은 선택배지를 이용하는 배양법이다. 배양법은 환경에 존재하는 미생물 중 1% 이하 정도만을 검출할 수 있다고 알려져 있으며 (Schabereiter-Gurtner *et al.* 2001; Clegg *et al.* 2002) 배양시간이 오래 걸리고 미생물의 배양과정에서 원래의 환경조건이 바뀌어 미생물군집의 구조를 정확하게 반영하지 못할 수도 있다 (Liu *et al.* 1997). 배양법의 이러한 여러 단점 때문에 최근에는 자연환경 내에서 미생물 다양성을 조사할 때 종조성을 파악하기 위하여 Phospholipid Fatty Acid (PLFA) profiling과 16S rRNA를 이용하는 DNA-based identification techniques가 소개되었으며, 이들 방법은 culture-independent method로서 특정 환경 내에 존재하는 culturable and non-culturable microorganisms의 분석이 가능하다 (Muyzer 1999; Gurtner *et al.* 2000; Horiuchi *et al.* 2003). 군집분석에 의한 미생물 다양성 조사에서는 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)와 Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE), Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) 등과 같은 DNA-based identification techniques가 이용되고 있다. 이들 방법은 토양과 수계와 같은 자연환경 뿐만 아니라 벽화 등에서 미생물군집의 다양성 및 군집 변화를 분석하기 위해서 자주 사용되어 왔다 (Díez *et al.* 2001; Schabereiter-Gurtner *et al.* 2001). 이 중 DGGE는 universal primer로 증폭된 16S rRNA fragments가 melting profiles에 따라 denaturing gradient gel에서 분리되는 것을 이용하는 것으로 단 하나의 염기 차이까지도 분리가 이루어지기 때문에 미생물군집의 분포특성을 정확하게 설명할 수 있다. 이 방법은 적은 DNA 양으로도 PCR로 증폭함으로써 생물군집의 다양성을 더 정밀하게 표현할 수 있는 방법으로 알려져 있다 (Farnleitner *et al.* 2004). 또, 염기서열 분석을 통한 종 유사도의 확인이 가능하고, DGGE 결과 나타나는 band의 수에 따라 시료 속에 존재하는 개체군을 파악할 수 있으므로 시료 간의 DGGE bands를 상호비교하면 개체군의 우점종 분석이 가능하다 (Muyzer *et al.* 1993; Watanabe *et al.* 2001; Nakagawa *et al.* 2002). 다양한 DGGE band pattern은 시료 내 미생물의 다양성을 나타내며 하나의 band는 하나의 개체군을 나타내기 때문에 (Muyzer *et al.* 1993), band 수가 많은 경우는 시료 내 미생물 군집의 다양성이 크며 band의 수가 2~3개 이하로 적으면 미생물군집의 다양성이 작다는 것을 의미한다 (Röllerke *et al.* 1999).

본 연구에서는 대한민국 남해안 통영연안에서 채취한 표층해수 내 세균 군집을 배양법으로 분리하여 VITEK Microbe ID system으로 동정하여 종조성을 조사한 결과와 동일 군집을 16S rRNA PCR-DGGE로 분석하였을 때

의 해양세균 군집의 분포 특성을 비교분석하였다.

재료 및 방법

1. 해수시료

통영연안 1개 정점 (128°E 22'64", 34°46'00")에서 표층 수심 1 m 사이의 표층해수를 채수하여 실험에 사용하였다. 계절별 해양세균 군집의 변화를 조사하기 위하여 2004년 9월, 11월 및 2005년 1월, 5월, 8월의 해수시료를 사용하였다.

2. 해양세균의 개체수 측정

해수시료 100 μ L를 Seawater Nutrient Agar (SWNA)배지 (김과 이 1998)에 도말한 후 15°C에서 5±2일간 배양하였다. 배양 후 배지 상에 출현한 콜로니를 평판계수법에 따라 계수하였으며 반복실험을 실시하여 평균값±표준편차를 제시하였다.

3. 배양법에 의한 해양세균 군집 분석

해수시료 100 μ L를 SWNA배지에 도말한 후 15°C±2에서 5일간 배양하였다. 그 후 순수분리하여 VITEK Microbe ID system (Vitek JR., BioMérieux)으로 동정하여 종조성을 분석하였다.

4. 16S rRNA PCR-DGGE에 의한 해양세균 군집 분석

1) DNA의 추출

Watanabe 등 (2001)의 방법에 따라 해수시료 5~6 L를 cetyltrimethylammoniumbromide을 이용하여 DNA를 추출하였다. DNA의 농도와 순도는 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)로 분석하였다.

2) 16S rDNA fragments의 PCR 증폭

16S rRNA 부분의 증폭에 사용한 primer는 Muyzer 등 (1993)에 따랐으며 PCR은 최종 volume을 50 μ L로 하여 GeneAmp® PCR system 2400 (Applied Biosystems, USA)을 사용하였다. 온도 프로그램은 pre-denaturation step은 95°C, 10분, denaturation step은 95°C, 1분, annealing step은 55°C에서 1분으로 10 cycles마다 5°C씩 줄여 최종 45°C로 touch down하였으며, extension step은 72°C, 3분, post-denaturation step은 72°C, 10분으로 총 30 cycles를 시행하였다. PCR products는 1.5% agarose gel을 이용하여 100 V에서 25분간 전기영동하였고 ethidium bromide

로 염색하였다.

3) DGGE에 의한 PCR products의 분석

Bio-Rad D Code system (Bio-Rad, UK)을 이용하여 Muzyer *et al.* (1993)의 방법에 따라 DGGE에 의한 PCR products를 분석하였다. Denaturant gradient는 30~60%의 농도변화를 갖는 8% (wt/vol) polyacrylamide gel에 PCR products를 loading한 후 60°C, 130 V로 9시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 후 polyacrylamide gel을 ethidium bromide (1.0 mg L⁻¹)로 30분간 염색하고 30분간 탈염색한 후 UV 하에서 분리된 각각의 band를 관찰하였다. 분리된 각각의 band는 gel에서 잘라내어 GC clamp가 제거된 동일 primer를 사용하여 증폭 후 동일 DGGE gel에서 band를 확인하였다. 확인된 band는 QIA-quick™ PCR purification kit (Qiagen)를 사용하여 정제 후 염기서열 분석에 사용하였다.

4) 16S rDNA fragments의 sequencing

염기서열은 ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, USA)와 ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, USA)로 분석하였다.

5) Comparative sequence analysis에 의한 해양세균의 동정

염기서열 분석결과 얻은 partial 16S rDNA gene sequences의 중 유사도는 BLAST software (Altschul *et al.* 1997)와 Ribosomal Database Project (RDP) (Cole *et al.* 2003)의 SIMILARITY RANK tool을 사용하여 구하였다. 16S rDNA sequences는 DS Gene v1.1 (<http://www.accelrys.com>)에 있는 Clustal W를 이용하여 정렬하였다 (Thompson *et al.* 1994). 계통수 작성은 neighbour-joining algorithm에 의해 TREECON을 이용하여 작성하였다 (Peer and Wachter 1997).

6) Nucleotide sequence accession numbers

본 실험에서 얻은 partial 16S rRNA sequences는 GenBank nucleotide database에 등록하여 AJ23659~AJ23677의 accession number를 얻었다.

결과 및 고찰

1. 배양법에 의한 해양세균 군집 분석 및 개체수 측정

통영연안 표층해수로부터 분리한 해양세균의 개체수 측정결과와 VITEK Microbe ID system으로 동정한 군집의 종조성 분석결과를 Table 1과 Table 2에 각각 제시하였다. 계절별 종조성은 2004년 9월에는 5종, 11월은 5종, 2005년 1월은 4종, 5월은 6종 및 8월은 10종이었다. 2005년 8월에는 *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas*

Table 1. Viable cell number of marine bacteria (CFU · mL⁻¹)

Sep., 2004	Nov., 2004	Jan., 2005	May, 2005	Aug., 2005
454 ± 16	129 ± 27	14 ± 2	1,530 ± 210	7,610 ± 340

Table 2. Identification of marine bacteria by VITEK Microbe ID system

Identified name	Isolated strain				
	Sampling date				
	Sep., 2004	Nov., 2004	Jan., 2005	May, 2005	Aug., 2005
TY1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
TY2			<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
TY3	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
TY4	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
TY5		<i>Burkholderia mallei</i>		<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Burkholderia mallei</i>
TY6	<i>Pasteurella haemolytica</i>				<i>Pasteurella haemolytica</i>
TY7			<i>Pasteurella multocida</i>		<i>Pasteurella multocida</i>
TY8					<i>Comamonas acidovorans</i>
TY9		<i>Actinobacillus ureae</i>			<i>Actinobacillus ureae</i>
TY10	<i>Chryseobacterium indologenes</i>			<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Chryseobacterium indologenes</i>

stutzeri, *Acinetobacter lwoffii*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Burkholderia mallei*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Comamonas acidovorans*, *Actinobacillus ureae* 및 *Chryseobacterium indologenes*의 10종이 분리되어 가장 다양한 종조성을 보였으며, 개체수 또한 $7,610 \pm 340$ CFU · mL⁻¹로 가장 많았다. 이는 8월 하계가 타 계절보다 수온이 높은 것이 그 원인으로 사료되며, Stabili *et al.* (2004)도 이태리 북부 이오니아해의 세균수는 해수온도에 가장 큰 영향을 받는다고 보고하였다. 2005년 1월의 해수에서는 *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter lwoffii* 및 *Pasteurella multocida*의 4종이 분리되어 가장 적은 종수가 조사되었으며, 개체수도 14 ± 2 CFU · mL⁻¹로 가장 적게 검출되었다.

Zaccone *et al.* (2002)은 이태리 북부 아드리아해의 7월 표층수에서 $68,900$ CFU · mL⁻¹, 1월 표층수에서 $2,700$ CFU · mL⁻¹의 해양세균을 검출하였다. 이로 부터 통영 연안 표층해수에는 아드리아해의 표층해수에 비하여 더 적은 수의 해양세균이 분포함을 알 수 있다.

*Pseudomonas fluorescens*와 *Acinetobacter lwoffii*는 2004년 9월, 11월 및 2005년 1월 5월, 8월의 통영연안 표층해수 모두에서 검출되었으며, *Sphingomonas paucimobilis*는 2004년 9월과 11월 및 2005년 5월과 8월에는 검출되었으나 2005년 1월에는 검출되지 않았다. 한편 *Chryseobacterium indologenes*는 2004년 9월 및 2005년 5월과 8월에 채수한 해수에서만 검출되었으며, *Burkholderia mallei*는 2004년 11월 및 2005년 5월과 8월에만 검출되었다. 한편 *Pasteurella multocida*는 2005년 1월과 2005년 8월의 해수에서만 검출되었으며, *Comamonas acidovorans*는 2005년 8월의 해수에서만 검출되었다.

Sartory (2004)는 영국의 Wevern Trent지역의 표층해수에서 본 실험의 통영연안 표층해수에서 검출된 것과 동일한 균주인 *Pseudomonas fluorescens*와 *Acinetobacter lwoffii*의 출현을 보고하였으며, 최 등 (2000)은 1999년 군산 내만에서 *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Escherichia*, *Bondetella*, *Alcaligenesis*, *Staphylococcus* 및 *Flavobacterium*속의 출현을 보고한 바 있다.

2. 16S rRNA PCR-DGGE법에 의한 해양세균 군집 분석

각 계절별로 채취한 해수로부터 직접 추출한 genomic DNA의 partial 16S rRNA 증폭을 통하여 획득한 PCR products를 DGGE에 적용한 결과는 Fig. 1에 제시한 바와 같이 6~13개의 bands를 나타내었다. 계절별 결과를 보면 2004년 9월의 해수는 10 bands, 11월은 11 bands,

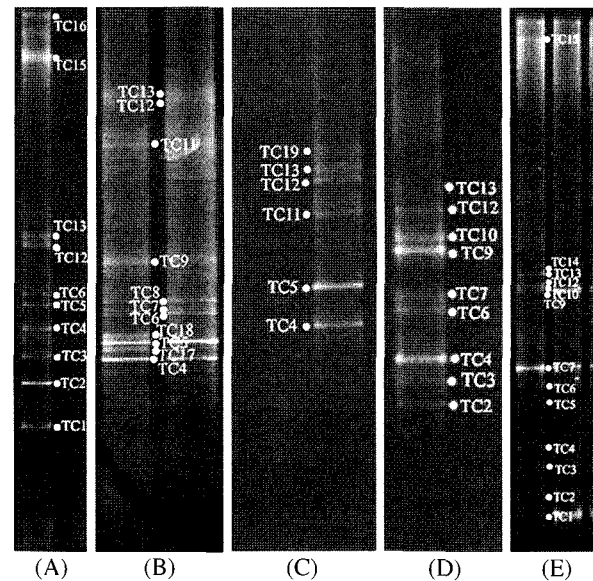


Fig. 1. DGGE band profile of the PCR amplification products of the marine bacterial community. (A) Sep., 2004 (B) Nov., 2004 (C) Jan., 2005 (D) May, 2005 (E) Aug., 2005.

2005년 1월은 6 bands, 5월은 9 bands 및 8월에는 13 bands를 나타내었다. 2005년 8월에 채취한 통영연안 표층해수의 해양세균 군집을 나타내는 band는 TC1~TC7, TC9, TC10 및 TC12~TC15의 총 13개이었으며, 본 연구에서 조사한 모든 통영연안 표층해수에서 공통적으로 나타나는 band는 모두 3개 (TC4, 12 및 13)이었다. 군집 내 각각의 개체군은 DGGE 분석 시 여러 개의 분리된 band의 형태로 나타나므로 (Muyzer *et al.* 1993; Farnleitner *et al.* 2004) 서로 다른 위치에서 나타나는 band는 서로 다른 개체군으로 볼 수 있다. 또한 조사된 모든 계절의 해수에서 공통적으로 존재하는 3개의 bands (TC4, 12, 13)는 통영연안 표층해수에서 그 출현 빈도가 높은 개체군이라 할 수 있다.

DGGE band 수의 증가 또는 감소는 개체군의 증감에 따른 변화를 반영하는 것이라고 설명한 Muyzer (1993)의 보고에 따르면 본 실험의 해양세균 군집에 대한 DGGE band 수의 증가와 감소를 통해 군집의 종조성 변화를 확인한 것으로써 band 수는 또한 해양세균 각 개체군을 반영하는 것이라고 할 수 있다. DGGE의 band profile을 계절별로 보면 배양법에서와 같이 2005년 8월 해수의 개체군이 13개로 가장 다양성이 높고, 1월 해수의 개체군은 6개로 가장 낮은 다양성을 보였다.

배양법에 의한 각 계절별 해양세균 군집의 종조성 분석결과는 2004년 9월 해수에서는 5종, 11월은 5종, 2005년 1월은 4종, 5월은 6종 및 8월은 10종이 조사된 반면 16S rRNA PCR-DGGE에 의한 해양세균 군집 분석결과

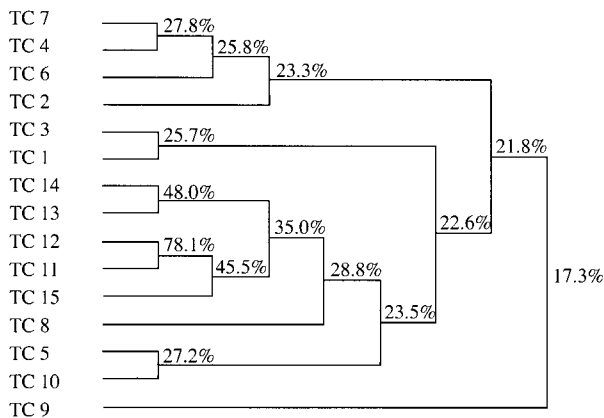


Fig. 2. Neighbour-joining tree of partial 16S rDNA sequence recovered by DGGE bands.

는 2004년 9월은 10개체군, 11월은 11개체군, 2005년 1월은 6개체군, 5월은 9개체군 및 8월에는 13개체군이 조사되어 DGGE를 이용한 군집 분석이 배양을 통해서만 표현되지 않는 개체군까지도 나타낼 수 있음을 확인하였다. 이 결과로부터 해양세균 군집의 특성을 파악하는데는 16S rRNA PCR-DGGE가 배양법보다 더 효율적임이 판명되었다.

Bosshard *et al.* (2006)은 호기성 gram-negative nonfermenter 2653 분리균주를 대상으로 16S rRNA gene분석과 VITEK-2 ID-GNB card분석을 통하여 동정한 결과를 비교하였을 때, 16S rRNA gene분석으로 전체 분리균의 92%는 종 수준까지, 8%는 속 수준까지 동정한 반면, VITEK-2ID의 경우는 전체 분리균의 53%는 종 수준까지, 1%는 속 수준까지 동정하였으나 나머지 46%는 동정할 수 없었으므로 16S rRNA gene분석이 VITEK-2ID보다 nonfermenting gram-negative bacilli의 동정에 더 효과적이었다고 보고한 것은 본 실험의 결과와 유사하다.

3. DGGE bands의 염기서열 분석

Genebank의 BLAST search database를 이용하여 16S rRNA의 sequence를 alignment한 결과 Table 3에 제시한 바와 같이 88~99%의 유사도를 나타내었다. 16S rRNA sequence를 이용한 군집의 종조성 분석 결과 다양한 분류군의 clone과 다양한 bacterial species와 그 유연관계가 가깝게 나타났으며 동정된 해양세균은 주로 α -와 γ -proteobacteria에 속하며 TC2와 TC6은 β -proteobacteria에 속하는 것으로 나타났다.

TC2는 *Burkholderia mallei* ATCC 23344 91%, TC3은

Table 3. 16S rDNA clone sequence of DGGE bands

Sampling date	Clone	Length of sequence (bp)	Similarity (%)	Phylogentic group	Nearest neighbor	Accession number
Sep., 2004 / Aug., 2005	TC1	190	91%	α	Marine alpha proteobacterium BBAT1	AJ23659
Sep., 2004 / May, Aug., 2005	TC2	256	91%	β	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	AJ23660
Sep., 2004 / May, Aug., 2005	TC3	234	96%	γ	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain VUN10	AJ23661
Sep., Nov., 2004 / Jan., May, Aug., 2005	TC4	201	98%	γ	<i>Acinetobacter lwoffii</i> ATCC 15309 Cpn60	AJ23662
Sep., Nov., 2004 / Jan., Aug., 2005	TC5	208	98%	γ	<i>Actinobacillus ureae</i> CCUG 2139 initiation factor	AJ23663
Sep., Nov., 2004 / May, Aug., 2005	TC6	240	97%	β	<i>Burkholderia</i> sp. VUN10	AJ23664
Nov., 2004 / May, Aug., 2005	TC7	274	88%	γ	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 11607	AJ23665
Nov., 2004	TC8	611	87%	α	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium	AJ23666
Nov., 2004 / May, Aug., 2005	TC9	366	94%	γ	Uncultured marine bacterium ZD0405	AJ23667
May, Aug., 2005	TC10	273	95%	γ	Uncultured actinobacterium MB11C06	AJ23668
Nov., 2004 / Jan., 2005	TC11	160	98%	α	Uncultured <i>Ruegeria</i> sp. clone SIMO-83	AJ23669
Sep., Nov., 2004 / Jan., May, Aug., 2005	TC12	376	97%	α	Uncultured alpha proteobacterium	AJ23670
Sep., Nov., 2004 / Jan., May, Aug., 2005	TC13	302	92%	α	Uncultured alpha proteobacterium	AJ23671
Aug., 2005	TC14	308	91%	α	<i>Roseobacter</i> sp. WHOI JT-01	AJ23672
Sep., 2004 / Aug., 2005	TC15	301	94%	α	Uncultured <i>Synechococcus</i> sp.	AJ23673
Sep., 2004	TC16	205	89%	γ	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AJ23674
Nov., 2004	TC17	490	98%	α	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	AJ23675
Nov., 2004	TC18	260	99%	α	Uncultured <i>Ruegeria</i> sp. clone SIMO-846	AJ23676
Jan., 2005	TC19	272	98%	α	<i>Ruegeria algocolus</i>	AJ23677

Pseudomonas fluorescens strain VUN10 96%, TC4는 *Acinetobacter lwoffii* ATCC 15309 Cpn60 98%, TC5는 *Actinobacillus ureae* CCUG 2139 initiation factor 98%, TC6은 *Burkholderia* sp. VUN10 97%, TC7는 *Pseudomonas stutzeri* ATCC 11607 88% 및 TC17은 *Sphingomonas paucimobilis* 98%의 유사도를 나타내었으며 이들은 배양법에 의한 종조성 조사(Table 2)에서 제시된 것과 일치되는 종이였다.

개체군 간의 유사도를 비교해보면 TC11과 TC12가 78.1%로 유연관계가 가장 높으며, TC11은 uncultured *Ruegeria* sp. clone SIMO-83으로 동정되었으며, TC12는 uncultured alpha proteobacterium으로 동정되었다. 또한 uncultured alpha proteobacterium으로 동정된 TC13과 *Roseobacter* sp. WHOI JT-01로 동정된 TC14의 유사도는 48%로써 TC11과 TC12 다음으로 유연관계가 높았다. 나머지 대부분 개체군들은 22~35%의 유연관계를 나타내어 개체군 간의 유연관계가 적었다. 개체군 간의 유연관계가 적을 경우 집단 내에 존재하는 개체군의 조성이 다양하다고 설명한 보고(Muyzer *et al.* 1999)에 따르면 통영연안 표층해수에 존재하는 해양세균 군집 개체군 간의 유연관계가 비교적 낮게 나타난 것은 군집의 종조성이 매우 다양하다는 것을 반영한다고 할 수 있다.

적 요

2004년 9월과 11월, 2005년 1월, 5월 및 8월의 총 5회에 걸쳐 대한민국 통영연안의 1개 정점에서 표층해수를 계절별로 채취하여 해양세균 군집을 분석하였다. 선택배지에서 순수분리하여 VITEK Microbe ID system으로 동정한 배양법과 16S rRNA PCR-DGGE로 분석한 결과를 상호비교하였다. 배양법에 의한 각 계절별 해양세균 군집의 종조성은 2004년 9월은 5종, 11월은 5종, 2005년 1월은 4종, 5월은 6종 및 8월은 10종으로 조사되었고, *Pseudomonas fluorescens*와 *Acinetobacter lwoffii*는 계절과 관계없이 모두 검출되었으며, 그 외에 *Pseudomonas stutzeri*, *Sphingomonas paucimobilis* 및 *Burkholderia mallei* 등이 동정되었다. 16S rRNA PCR-DGGE에 의한 군집분석 결과는 2004년 9월은 10개체군, 11월은 11개체군, 2005년 1월은 6개체군, 5월은 9개체군 및 8월에는 13개체군이 조사되었고, *Acinetobacter lwoffii*, *Burkholderia mallei*, *Pseudomonas fluorescens*, *Actinobacillus ureae*, *Burkholderia* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Roseobacter* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Sphingomonas paucimobilis* 및 *Ruegeria algocolus* 등이 동정되었다. 이로부터 해

양세균 군집의 분포특성을 파악하는 데는 16S rRNA PCR-DGGE가 배양법보다 더 효율적임이 판명되었다.

사 사

본 연구는 2006년도 상명대학교 자연과학연구소 학술연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 김상진, 이건형. 1998. 해양미생물학. 동화기술.
- 최민순, 심현빈, 정경민. 2000. 군산 내만의 해양수에서 분리되는 세균의 분포. 한국어병학회지. 13:67-73.
- Altschul SF, TL Madden, AA Schaffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller and DJ Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, Boddingtonhaus B, Altwegg M and Bottger EC. 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 44:1359-1366.
- Clegg CD, RDL Lovell and PJ Hobbs. 2002. The impact of grassland management regime on the community structure of selected bacterial groups in soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43:263-270.
- Cole JR, B Chai, TL Marsh, RJ Farris, Q Wang, SA Kulam, S Chandra, DM McGarrell, TM Schmidt, GM Garrity and JM Tiedje. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 31:442-443.
- Díez B, CP Alió, TL Marsh and R Massana. 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2942-2951.
- Farnleitner AH, F Zibuschka, MM Burtscher, G Lindner, G Reischer and RL Mach. 2004. Eubacterial 16S-rDNA amplicon profiling: a rapid technique for comparison and differentiation of heterotrophic plate count communities from drinking water. *Int. J. Food Microbiol.* 92:333-375.
- Gurtner C, J Heyrman, G Pinar, W Lubitz, J Swings and S Rölleke. 2000. Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *Int. Biodet. Biodeg.* 46:229-239.

- Horiuchi JI, K Ebie, K Tada, M Kobayashi and T Kanno. 2003. Simplified method for estimation of microbial activity in compost by ATP analysis. *Bioresour. Technol.* 86:95-98.
- Liu WT, TL Marsh, H Cheng and LJ Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4516-4522.
- Muyzer G, EC de Waal and AG 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.
- Muyzer G. 1999. DGGE/TGGE A method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:317-322.
- Nakagawa T, S Sato, Y Yamamoto and M Fukui. 2002. Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulfate-reducing consortium. *Water Res.* 36:2813-2823.
- Peer YV and R Wachter. 1997. Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Comp. Appl. Biosci.* 13:227-230.
- Rölleke S, C Gurtner, U Drewello, R Drewello, W Lubitz and R Weissmann. 1999. Analysis of bacterial communities on historical glass by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *J. Microbiol. Methods.* 36:107-114.
- Sartory DP. 2004. Heterotrophic plate count monitoring of treated drinking water in the UK : A useful operation tool. *Int. J. Food Microbiol.* 92:297-306.
- Schabereiter-Gurtner C, G Piñar, W Lubitz and S Rölleke. 2001. An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *J. Microbiol. Methods.* 45:77-87.
- Stabili L, MI Acquaviva and RA Cavallo. 2004. *Mytilus galloprovincialis* filter feeding on the bacterial community in a Mediterranean coastal area (Northern Ionian Sea, Italy). *Water Res.* 39:469-477.
- Thompson JD, DG Higgins and TJ Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Watanabe K, Y Kodama and S Harayama. 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J. Microbiol. Methods.* 44:253-262.
- Zaccone R, G caruso and C Cali. 2002. Heterotrophic bacteria in the northern Adriatic sea : seasonal changes and ectoenzyme profile. *Mar. Environ. Res.* 54:1-19.

Manuscript Received: March 29, 2006
Revision Accepted: August 18, 2006
Responsible Editor: Seung Bum Kim