

DGGE 방법과 Pyrosequencing 방법을 이용한 지렁이 장내미생물의 다양성 분석

김은성 · 홍성욱 · 정건섭*
연세대학교 생명과학기술학부

Received : August 29, 2011 / Revised : November 22, 2011 / Accepted : November 23, 2011

Comparative Analysis of Bacterial Diversity in the Intestinal Tract of Earthworm (*Eisenia fetida*) using DGGE and Pyrosequencing. Kim, Eun Sung, Sung Wook Hong, and Kun Sub Chung*. Division of Biological Science and Technology, Yonsei University, Wonju, Korea – The beneficial effects of *Eisenia fetida* on soil properties have been attributed to their interaction with soil microorganisms. The bacterial diversity of the intestinal tract of *E. fetida* was investigated by culture-dependent and culture-independent methods including denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and pyrosequencing analyses. In a pure culture, *Lysinibacillus fusiformis* (51%), *Bacillus cereus* (30%), *Enterobacter aerogenes* (21%), and *L. sphaericus* (15%) were identified as the dominant microorganisms. In the DGGE analyses, *B. cereus* (15.1%), *Enterobacter* sp. (13.6%), an uncultured bacterium (13.1%), and *B. stearothermophilus* (7.8%) were identified as the dominant microorganisms. In the pyrosequencing analyses, *Microbacterium soli* (26%), *B. cereus* (10%), *M. esteraromaticum* (6%), and *Frigoribacterium* sp. (6%) were identified as the dominant microorganisms. The other strains identified were *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Borrelia* sp., *Cellulosimicrobium* sp., *Klebsiella* sp., and *Leifsonia* sp. The results illustrate that culture independent methods are better able to detect unculturable microorganisms and a wider range of species, as opposed to isolation by culture dependent methods.

Keywords: Bacterial diversity, pure culture, DGGE, pyrosequencing

서 론

지렁이는 전 세계적으로 3,500종에 이르며 사막과 극지를 제외한 대부분의 지역에 분포하고 토양 물리적 특성의 변화, 토양 유기물의 혼합과 분해, 토양 질소의 전이, 유효 인 함량의 증가, 그리고 중금속의 흡착과 같은 토양의 화학적인 조성에 영향을 준다[25]. 지렁이의 장은 영양물질의 증가, pH, 수분함량 및 온도 등과 같은 미생물 생육에 있어서 최적의 환경을 제공하므로 미생물의 생육이 촉진된다고 알려져 있다[9]. 지렁이 중에서 *Lumbricus terrestris*와 *Aporrectodea caliginosa*의 장을 통과한 세균은 더 빠르게 증식하며, 세균 뿐만 아니라 곰팡이도 지렁이 장을 통과하면서 개체수가 증가한다고 보고되어 있다[17, 19].

지렁이는 유기물을 자체적으로 소화 및 흡수하는 소화기능이 덜 발달되어 있어 미생물의 도움을 받는 것으로 알려져 있고, 이러한 지렁이 장내 미생물 군집을 조사하기 위해 배양방법을 이용한 연구가 진행되어 왔다[4, 8, 10, 23]. 하지만 지렁이 장내에는 미확인된 많은 종류의 미생물들이 존재하며, 지렁이와 장내미생물 간의 상호작용 및 장내미생물이

생산하는 대사산물의 역할, 그리고 지렁이 장내미생물상(microflora)에 대하여 정확하게 밝혀지지 못하고 있는데 그 이유는 미생물의 분리과 동정이 쉽지 않기 때문이다.

일반적으로 자연계의 미생물 중에서 배양 가능한 미생물은 전체 미생물의 1% 이하인 것으로 알려져 있어[21], 배양 방법의 한계를 극복하고자 미생물 군집 분석에 분자생물학적 방법들이 많이 이용되고 있다. 그 중에서 denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) 방법은 생물체가 가지고 있는 유전자 중에서 보존적 결합서열(conserved region)인 16S rDNA를 확인 및 비교하여 동정하는 방법으로 하나의 염기 차이까지도 분리가 이루어지기 때문에 군집의 다양성을 더 정밀하게 표현할 수 있는 방법으로 알려져 있다[6, 15]. 또한, pyrosequencing 방법은 기존 염기서열 분석방법인 Sanger method가 dideoxynucleotide를 이용하여 DNA 염기서열을 결정하는데 반해, 염기중합 반응시 방출되는 pyrophosphate(PPi)와 효소반응을 이용하여 염기서열을 결정하는 방법으로[3], 대량의 염기서열을 얻을 수 있어 최근 하수처리 생물반응기의 미생물 군집 분석[12] 등의 군집 분석뿐만 아니라 품종 감별[14], 유전자형 검사[24] 등의 다양한 분야에 널리 응용되고 있다.

본 연구에서는 지렁이 장으로부터 배양방법을 사용하여 장내미생물을 분리 및 동정하고 동시에 비배양방법인 DGGE

*Corresponding author

Tel: +82-33-760-2252, Fax: +82-33-760-2183

E-mail: kschung@yonsei.ac.kr

와 pyrosequencing 방법을 이용한 지렁이 장내미생물 군집의 분포를 조사하여 배양방법에 의한 미생물 군집조사의 한계점을 보완하고 지렁이 장내미생물 군집에 대한 기초자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

지렁이와 먹이원

본 실험에서 사용된 지렁이는 지렁이 농장(강원도 홍천)에서 구입한 *Eisenia fetida*를 사용하였고, 제지 슬러지, 도축 폐기물, 키틴, 키토산을 먹이원으로 하여 톱밥과 1:4로 혼합한 후 5주 동안 교반 발효하여 20~25°C의 온도를 유지하면서 16주 동안 지렁이를 사육하였다.

지렁이 장내 미생물의 분리 및 동정

지렁이 장을 채취하기 위해 16주 동안 사육하면서 8주와 16주 사육지렁이의 장을 채취하였으며, 지렁이 장내미생물 분리는 지렁이(3개)의 표면을 70% ethanolo로 소독하고 화염 멸균한 후, clean bench내에서 지렁이를 메스로 절개하여 장을 취해 0.85% NaCl에 넣고 현탁하였다[10]. 현탁액 1 mL를 취하여 멸균 생리식염수로 단계별로 희석한 후 brain heart infusion(BHI; Difco, Sparks, MD, USA) agar plate에 100 µL씩 도말하고 30°C에서 24시간동안 배양하여 100개 전후로 얻어진 agar plate의 colony를 모두 분리하였다. 분리한 colony의 16S rDNA 염기서열 분석을 위해 genomic DNA를 추출하여 universal primer인 27F(5'-AGAGTTTGA-TCATGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGATACCTTGTACG-ACTT-3')를 이용해 PCR증폭하였다. 2% agarose gel에서 전기영동을 수행 후 관찰된 band에서 DNA를 extraction 하여 염기서열 분석을 하였다. 얻어진 염기서열을 NCBI의 BLAST program(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 ribosomal DNA gene sequencing과 비교하여 동정하였다.

지렁이 장내 미생물의 genomic DNA 추출 및 DNA 증폭

지렁이 장을 취하여 0.85% NaCl에 현탁한 상등액을 원심 분리(4,000×g/10 min) 하여 균체를 취하고 멸균된 생리식염수에 균체를 2회 세척한 후, DNeasy tissue kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 16S ribosomal DNA gene 증폭을 위하여 GC clamp(5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGG-GCACGGGGG-3')가 부착된 341F(5'-CCTACGGGAGGC-AGCAG-3')와 518R(5'-ATTACCGCGTCTGCTGG-3')를 이용하였다[18,25]. PCR 반응은 0.4 mM dNTP, 0.5 units Taq polymerase, 4 mM Mg²⁺이 함유된 Takara Perfect Premix (Takara, Japan) 10 µL에 DNA template(20 µg/mL) 1 µL, 1.0 µM forward primer와 1.0 µM reverse primer를 각각 1

µL씩 넣고 나머지는 증류수를 첨가하여 총 부피가 20 µL가 되도록 제조하였다. PCR 조건은 denaturation(95°C, 5분) 시킨 후, denaturation(94°C, 30초), annealing(54°C, 30초), extension(72°C, 45초) 단계를 40회 반복하고, 마지막으로 extension(72°C, 5분)하는 조건으로 반응시켰으며 얻어진 PCR 산물을 이용하여 DGGE 분석에 사용하였다.

DGGE 분석 및 염기서열 분석

PCR을 이용하여 증폭된 DNA는 Bio-Rad DCode™ Universal Mutation Detection System(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 urea와 formamide의 첨가량을 달리한 40%(urea, 3.36 g/formamide, 3.2 mL) - 80%(urea, 6.72 g/formamide, 6.4 mL) 8%(w/v) polyacrylamide gradient gel을 만든 다음, loading하여 60 V, 60°C에서 12시간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 GreenStar™ Nucleic Acid Staining(1:10,000 dilution)(Bioneer, Seoul, Korea)으로 염색하고 UV-transilluminator(Korea Bio-Tech Co., Korea)를 이용하여 DNA band를 확인하였다. Denaturing gradient gel 상에서 DNA 단편들을 회수하기 위하여 각각의 band를 잘라낸 후, 증류수 50 µL를 첨가하고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 이를 template DNA로 하여 GC clamp가 부착되지 않은 341F와 518R primer를 이용하여 재증폭을 수행하였으며, PCR 산물은 PCR purification kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)로 정제한 후 염기서열 분석을 하였다. 얻어진 염기서열은 NCBI의 BLAST program(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 ribosomal DNA gene sequencing과 비교하여 동정하였다.

Pyrosequencing 분석

지렁이 장으로부터 추출한 DNA를 주형으로 사용하여, 16S rDNA gene의 증폭을 위하여 fusion primer인 B16S-F(5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGACG-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 B16-7-4(5'-CCATCTCAT-CCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGAGCTGACWTTACC GCGGCTGCTGG-3')을 사용하였다. PCR 반응은 10×buffer + MgCl₂ 5 µL, 10 mM dNTPs 1 µL, 20 pmole/µL primers (forward/reverse) 2 µL, 5 U/µL Taq Polymerase(Roche, Brandord, USA), 0.25 µL, DNA template(100 ng) 1 µL를 넣고 총 부피가 50 µL가 되도록 dH₂O를 넣어 PCR 증폭을 하였다. PCR 반응은 Touch-down program을 사용하여 denaturation(94°C, 5분), denaturation(94°C, 30초), annealing(60°C, 45초), extension(72°C, 90초) 단계를 10회 반복하면서 각 단계마다 annealing 온도를 0.5°C씩 낮추면서 실시한 후, denaturation(94°C, 30초), annealing(55°C, 45초), extension(72°C, 90초) 단계를 20회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물을 template로 한 개의 bead당 한 개의 DNA fragment

가 부착되도록 하여 PCR을 하고 필요한 기질 및 효소와 함께 PicoTiterPlate의 well에 첨가한 뒤 GS FLX Titanium system(Roche, Brandord, USA) 염기 서열 분석기를 이용하여 pyrosequencing 반응을 진행시켰다. 얻어진 염기서열은 EzTaxon(<http://www.eztaxon.org>)의 16S rDNA sequence와 비교하여 동정하였다.

결과 및 고찰

배양방법을 이용한 지렁이 장내미생물의 분리 및 동정

지렁이를 8주와 16주동안 사육한 후 장을 추출하여 BHI agar plate에 배양한 결과, 134개와 97개의 single colony를 각각 분리하였다. 8주동안 사육한 지렁이의 장내미생물을 동정한 결과, *Lysinibacillus fusiformis*(33%), *Bacillus cereus*(29%), *Enterobacter aerogenes*(21%), *L. sphaericus*(5%), *Pseudomonas nitroreducens*(3%), *B. thuringiensis*(2%), *Klebsiella pneumoniae*(2%), *P. putida*(2%), *Aeromonas hydrophila*(1%), *Bacillus sp.*(1%), *Pseudomonas alcaligenes*(1%)로 확인되었고, 16주 사육 지렁이 장내미생물을 동정한 결과, *L. fusiformis*(51%), *B. cereus*(30%), *L. sphaericus*(15%), *B. thuringiensis*(1%), *B. horikoshii*(1%), *B. pumilus*(1%), *B. pichinoty*(1%)로 확인되었다(Fig. 1).

지렁이 장에서는 분리한 미생물 중에서 *Lysinibacillus*와 *Bacillus* 속으로 동정되어 이들 미생물이 지렁이 장내에 우점하고 있는 미생물임을 확인하였다. *Lysinibacillus* 속 균주는 Ahmed 등[1]이 제안하여 *Bacillus* 속으로부터 재분류된 미생물로서 대부분의 *Bacillus*속 세균들은 세포벽 구성 성분인 peptidoglycan type이 A1γ인 반면에 *Lysinibacillus*속 세균들은 A4α type인 lysine(Lys)-aspartic acid(Asp)으로 구성된 interpeptide bridge를 가지고 있어 *Bacillus*속으로부터 재

분류 되었으며, 표준 균주로는 *L. boronitolerans*, *L. fusiformis*, *L. sphaericus* 그리고 *L. parviboronicapiens*[16, 22] 등이 알려져 있다. Kim 등[10]이 *E. fetida*의 장내 미생물을 조사한 결과 *B. thuringiensis*, *B. vallismortis* 등 *Bacillus* 속 미생물이 지렁이 장내 우점미생물이라고 보고하였으며, 이는 본 연구 결과와 유사하였다. Parthasarathi 등[19]은 식양토와 가축분을 먹이원으로 사용하여 사육한 *E. fetida*의 장내미생물을 분석한 결과, *Klebsiella pneumoniae*와 *Morganella morganii*미생물이 우점하는 것으로 알려져 있으나 이는 본 연구와 상이한 결과를 나타내었다. 또한, *Lampito mauritii*, *Eudrius eugeniae*, *Eisenia fetida*, *Perionyx excavatus* 각각 지렁이와 먹이원별 지렁이 장내미생물을 연구한 결과, 지렁이 장을 통과하면서 미생물의 개체수가 증가하는 것과 먹이원에는 존재하지만 지렁이 장과 배설물인 분변토에서 확인되지 않은 *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *B. subtilis*, 그리고 *B. cereus* 등의 미생물은 지렁이 장속에서 완전히 소화된다고 보고하였다. 반면에, Byzov 등[2]과 Ihssen 등[9]은 각각 *E. fetida*와 *Aporrectodea caliginosa*를 사용한 지렁이 장내 미생물 분석에서 *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, 그리고 *Bacillus sp.* 등의 미생물이 존재한다고 보고하였다. 이는 동일한 종의 지렁이도 먹이원 속에 포함된 유기물의 종류와 각 유기물 분해에 관여하는 미생물의 종류가 다양하기 때문에 지렁이 장내에 우점하는 미생물 군집이 먹이원에 따라 차이가 있는 것으로 사료된다. 또한, 8주 사육 지렁이 장내 미생물과 16주 사육 지렁이 장내 미생물의 배양 결과에서 우점미생물인 *L. fusiformis*, *B. cereus*, *E. aerogenes* 뿐만 아니라 *P. nitroreducens*, *K. pneumoniae*가 지렁이의 사육시간이 길어지면서 분리되지 않는 것으로 보아 먹이원의 차이뿐만 아니라 지렁이 사육시간에 의해서도 지렁이 장내에 우점하는 미생물의 종류가 변화되어 지렁이 장내미생물의 군

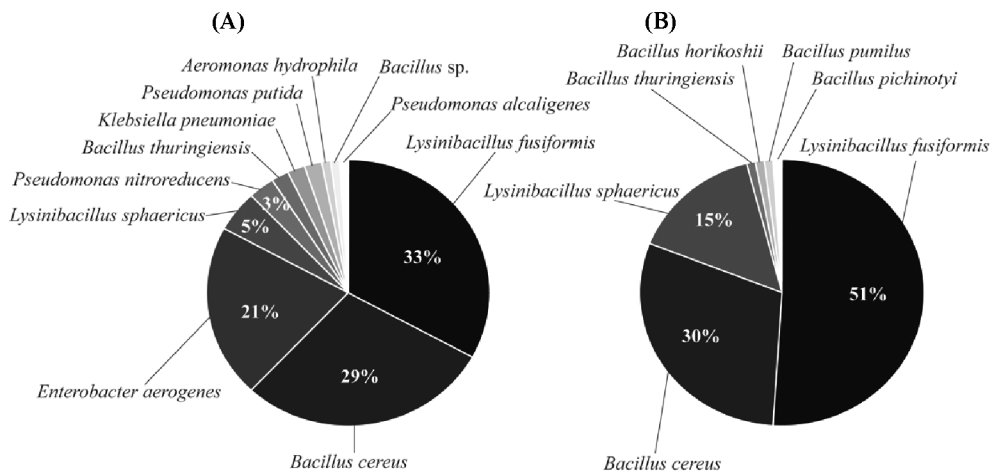


Fig. 1. Identification and proportion of isolated microorganisms from the intestinal tract of earthworm. Dilutions of the intestinal tract of the earthworm were cultured on brain heart infusion agar plate at 30°C for 24 h after cultivation for 8 weeks (A) and 16 weeks (B). The 16S rDNA sequences from the all isolated strains were sequenced by use of a PCR-based technique. Sequences were aligned with the GenBank reference sequences for 16S rDNA by using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

집이 다르게 나타나는 것으로 사료된다. *Lysinibacillus*속 세균들도 *Bacillus*속 세균들과 마찬가지로 그람 양성, 포자를 형성하는 세균으로 *Bacillus* 속과 유사한 생화학적 특성을 가진다. 배양방법에서 분리한 세균들의 16S rDNA 분석 결과 모든 미생물이 *Lysinibacillus* 혹은 *Bacillus* 속 세균들로 동정이 되었는데, Parle[17]은 이용 가능한 영양분의 증가, 습도 및 pH 등의 물리적 환경 변화 등으로 *Bacillus* 속이 지렁이 장 후반부로 갈수록 포자의 germination이 증가하여 영양세포의 수가 증가한다고 보고하였다. 따라서 지렁이 사육 기간 동안 포자화된 *Bacillus* 속 세균들이 지렁이 장을 통과 하면서 포자의 germination이 증가로 인해 분리한 지렁이 장 내 미생물에서 *Bacillus*와 *Lysinibacillus* 속 세균들의 비율이 높아진 것으로 사료된다.

DGGE 방법을 이용한 지렁이 장내 미생물의 동정

8주와 16주동안 사육한 지렁이로부터 장내미생물을 배양하지 않고 직접 DNA를 추출하여 DGGE 전기영동한 결과, 8주 사육 지렁이에서는 10개의 band로 분리되었고 *Borrelia burgdorferi*, *Enterobacter* sp., *Microbacterium* sp., uncultured bacterium, *Bacillus* sp., Gamma proteobacterium, uncultured soil bacterium, uncultured bacterium으로 확인하였다. 16주 사육 지렁이에서는 12개의 band로 분리되었고 *Photobacterium luminescens*, *Enterobacter* sp., gamma proteobacterium, uncultured Enterobacteriales bacterium, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, uncultured gamma proteobacterium, *B. stearothermophilus*, uncultured bacterium, uncultured *Escherichia* sp., *Sporosarcina pasteurii*로 확인하였다(Fig. 2, Table 1).

DGGE band의 intensity가 높다는 것은 개체군의 수가 많다는 것을 의미하는데, 본 연구결과에서는 DGGE band의 intensity가 높은 *Enterobacter* sp.와 *B. cereus* 균주가 지렁이 장내 우점미생물로 확인되었다. DGGE gel 상에서 band의 intensity가 변화하는 것으로 보아 지렁이의 사육시간에 따라 우점하는 미생물도 변화하는 것으로 사료된다. 또한 배양방법과 동일한 genus에 속하는 세균뿐만 아니라 배양방법에서는 확인되지 않던 미생물인 *B. burgdorferi*, *Microbacterium* sp., *S. pasteurii*, *P. luminescens* 등이 확인되었다. Farnleitner 등[5]은 DGGE 방법은 적은 양의 DNA를 PCR로 증폭하고 증폭된 DNA를 이용함으로써 종 다양성을 더 정밀하게 확인할 수 있는 방법이라고 보고하였고, Kim 등[11]은 더 다양한 미생물뿐만 아니라 배양을 통해서도 표현되지 않는 미생물까지도 확인할 수 있다고 보고하였다. Knapp 등[13]도 DGGE 방법을 이용하여 먹이원의 종류에 따라 지렁이 장내미생물 군집을 조사하였는데, *A. hydrophila*, uncultured gamma proteobacterium, *Mannheimia* sp., *Celivibrio fulvus*, *Spiroplasma* sp가 먹이원의 종류별로 우점하는 미생물임을 확인하였으며, 먹이원의 종류에 따라 우점하

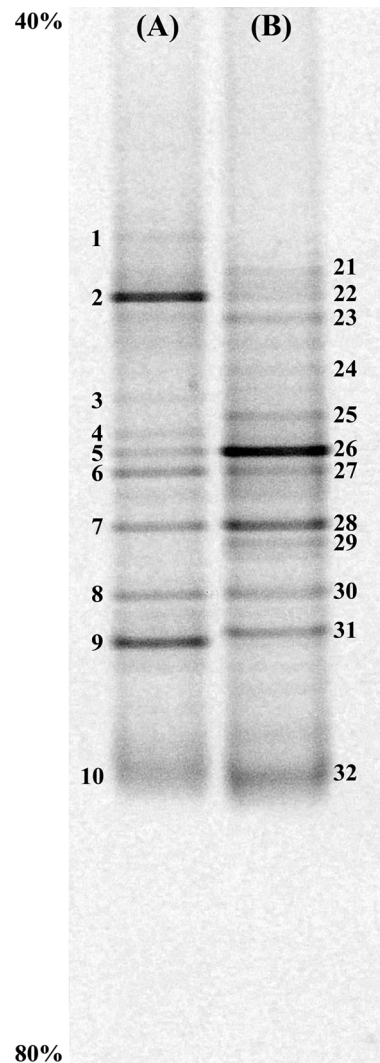


Fig. 2. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of PCR-amplified 16S rDNA fragments from the intestinal tracts of earthworm. Lane (A), Intestinal tract of earthworm cultured for 8 weeks; Lane (B), Intestinal tract of earthworm cultured for 16 weeks. PCR amplification of the 16S rDNA sequences was performed with the primers 341F-GC and 518R for 40 cycles. DGGE analysis was performed between 40% and 80% denaturing gradient.

는 미생물도 변화된다고 보고하였다.

Hong 등[7]은 DGGE 방법을 이용하여 지렁이 장내 미생물과 효소생산 미생물의 지렁이에 대한 효과를 연구한 결과, 지렁이 장내에 *Entomoplasma somnilux*와 *B. licheniformis*가 우점하는 것으로 확인하였고, 효소생산이 우수한 미생물을 지렁이의 먹이원으로 섭취하게 하였을 때 지렁이 장내에 지속적으로 존재하는 반면 지렁이의 생육에도 효과가 있다고 하였다. 또한 DGGE 방법을 이용하여 *E. somnilux*와 같은 신규 미생물을 규명하였는데, DGGE 방법은 배양방법의 한계를 극복하여 지렁이 장내의 다양한 미생물 군집을 조사

Table 1. Diversity of the microorganisms identified in the intestinal tract of earthworm by denaturing gradient gel electrophoresis analysis.

| Lane | Band no. | 16S rDNA sequence results | GenBank accession no. | BLAST homology | Band intensity |
|------|----------|--|-----------------------|----------------|----------------|
| A | 1 | <i>Borrelia burgdorferi</i> | HQ433610 | 94% | 2.4% |
| | 2 | <i>Enterobacter</i> sp. | HQ876771 | 99% | 11.1% |
| | 3 | <i>Microbacterium</i> sp. | DQ646511 | 99% | 3.2% |
| | 4 | Uncultured bacterium | JF018065 | 99% | 2.5% |
| | 5 | <i>Bacillus</i> sp. | FJ215792 | 98% | 3.0% |
| | 6 | Gamma proteobacterium PZ-5 | AB545809 | 97% | 4.4% |
| | 7 | Uncultured soil bacterium | HQ404634 | 98% | 4.3% |
| | 8 | Uncultured bacterium | GQ202681 | 98% | 5.1% |
| | 9 | Uncultured bacterium | JF018065 | 99% | 10.1% |
| | 10 | Uncultured bacterium | GQ476419 | 97% | 9.0% |
| B | 21 | <i>Photorhabdus luminescens</i> | DQ518589 | 96% | 3.4% |
| | 22 | <i>Enterobacter</i> sp. | HQ876771 | 97% | 1.6% |
| | 23 | Gamma proteobacterium | AJ699169 | 99% | 3.3% |
| | 24 | Uncultured Enterobacteriales bacterium | EU434894 | 99% | 2.8% |
| | 25 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | FJ655837 | 98% | 4.1% |
| | 26 | <i>Bacillus cereus</i> | HQ333012 | 97% | 14.3% |
| | 27 | Uncultured gamma proteobacterium | EU810923 | 95% | 4.5% |
| | 28 | <i>Bacillus stearothermophilus</i> | FR719729 | 94% | 7.5% |
| | 29 | Uncultured bacterium | HM566439 | 97% | 3.2% |
| | 30 | Uncultured <i>Escherichia</i> sp. | AM712054 | 96% | 4.1% |
| | 31 | <i>Sporosarcina pasteurii</i> | FR719721 | 96% | 5.5% |
| | 32 | Uncultured bacterium | HQ320349 | 97% | 12.9% |

할 수 있을 뿐만 아니라 신규 미생물을 규명하는데도 유용한 방법이라고 하였다. 배양방법과 동일하게 Parthasarathi 등 [19]이 지렁이 장내에서 완전히 소화된다고 보고하였던 *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *B. subtilis*, 그리고 *B. cereus*가 비배양방법인 DGGE 방법에서도 확인이 되어 지렁이 장내 미생물의 군집과 우점하는 미생물의 종류가 달라진다는 근거가 되는 것으로 생각된다. 이처럼 DGGE 방법은 미생물 군집을 조사하는데 있어 우점하는 미생물과 그렇지 않은 미생물을 구분할 수 있을 뿐만 아니라 신규 미생물을 확인할 수 있는 유용한 방법으로 배양방법의 한계점을 보완하고 미생물 군집의 다양성을 표현하는데 적합한 방법으로 사료된다.

Pyrosequencing방법을 이용한 지렁이 장내미생물의 동정

Pyrosequencing 방법으로 지렁이 장내미생물 군집을 분석한 결과, 8주 사육 지렁이는 16,803개(average length = 448.6 bp)와 16주 사육 지렁이는 3,204개(average length = 437.1 bp)의 16S rDNA gene sequence를 획득하였다. 그리고 8주와 16주 지렁이 장내미생물 군집의 종 다양성(species richness)을 비교하기 위해 rarefaction curve를 나타내었다(Fig. 3). Operational taxonomic unit(OTU)은 분류의 대상이 되는 생물체의 개체 또는 군을 나타내고 일반적으로 종을 말하는데, 8주와 16주 사육 지렁이 장내미생물 군집의 분

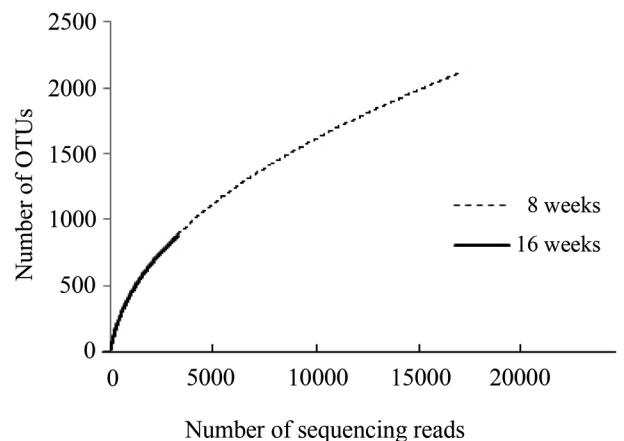


Fig. 3. Rarefaction curves of OTUs defined by sequence variations in the intestinal tract of earthworm. The X-axis shows the number of sequences in each sample, while the Y-axis shows the numbers of operational taxonomic units (OTU) encountered.

석 결과를 비교하였을 때, 두 그래프의 기울기가 유사한 것으로 나타났다. Rarefaction curve는 그래프가 수렴하게 되면 시료 수를 늘려 pyrosequencing을 해도 더 이상 개체군이 발견되지 않는다는 것을 의미하는데, 두 개의 곡선 모두 그래프가 수렴하지 못해 미생물 군집 분석에 이용된 sequence의 수가 지렁이 장내에 포함된 모든 종을 확인하기

에는 부족한 것으로 사료된다.

Genus 수준에서 비교한 결과, 8주와 16주 사육 지렁이의 장내미생물 군집을 비교한 결과, 8주에서 16주까지 사육시간에 따라 *Microbacterium*이 46%에서 2%로, *Cellulosimicrobium*이 5%에서 1%로 감소하였다. 반면에, *Bacillus*(1%에서 13%로), *Frigoribacterium*(1%에서 8%로), 그리고 *Demequina*(1%에서 6%로)가 사육시간에 따라 개체수가 증가하여 지렁이 장내 우점미생물은 사육시간에 따라 변화되는 것으로 사료된다. Species 수준에서 비교한 결과, 8주 사육 지렁이는 *Microbacterium soli*가 26%로 우점하는 미생물로 확인되었고, 그 뒤를 이어 *Microbacterium_uc* 6%, *Microbacterium esteraromaticum* 6%, *Microbacterium arabinogalactanolyticum* 4%, *Cellulosimicrobium funkei* 4%, *Spirochaetales* 2%, *Leifsonia psychrotolerans* 2%, *Cellulosimicrobium* 1%, *Citrobacter* 1%, *Leucobacter* 1%, *Escherichia coli* 1%, *Microbacterium invictum* 1%, *Enterobacter soli* 1%, Microbacteriaceae 1%, 그밖에 1% 미만의 미생물은 전체 중 43%로 확인되었다. 16주 사육 지렁이는 *Bacillus cereus*가 10%로 우점하는 미생물로 확인되었고, 그 뒤를 이어 *Frigori-*

bacterium 6%, *Demequina* 6%, *Saxeibacter* 3%, *Microbacteriaceae* 2%, AF268996 2%, *Bacillus thuringiensis* 2%, Micrococcales 1%, *Humicoccus* 1%, EU800550 1%, *Leifsonia* 1%, AY345503 1%, *Frigoribacterium* 1%, *Microbacterium* 1%, *Flavobacterium* 1%, *Nocardioides* 1%, 그 밖에 1% 미만의 미생물은 전체 중 60%로 확인되었다(Fig. 4).

Pyrosequencing의 분석결과, 지렁이 장내미생물의 전체 군집 중에서 1% 미만인 균주들이 차지하는 비율이 8주와 16주 사육 지렁이 장내미생물에서 각각 43%와 60%로 높게 나타났는데, 이는 분석하고자 하는 sequence의 수(8주: 16,803개, 16주: 3,204개)가 많기 때문에 species 수준에서 분석할 경우 1% 미만 균주들의 비율이 높아지는 것으로 생각되며, 8주에서 16주로 지렁이 사육시간이 경과함에 따라 *Bacillus sp.* 뿐만 아니라 *Frigoribacterium sp.*, *Demequina sp.* 등 8주 사육 지렁이에서 낮은 비율의 미생물들이 16주로 갈수록 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

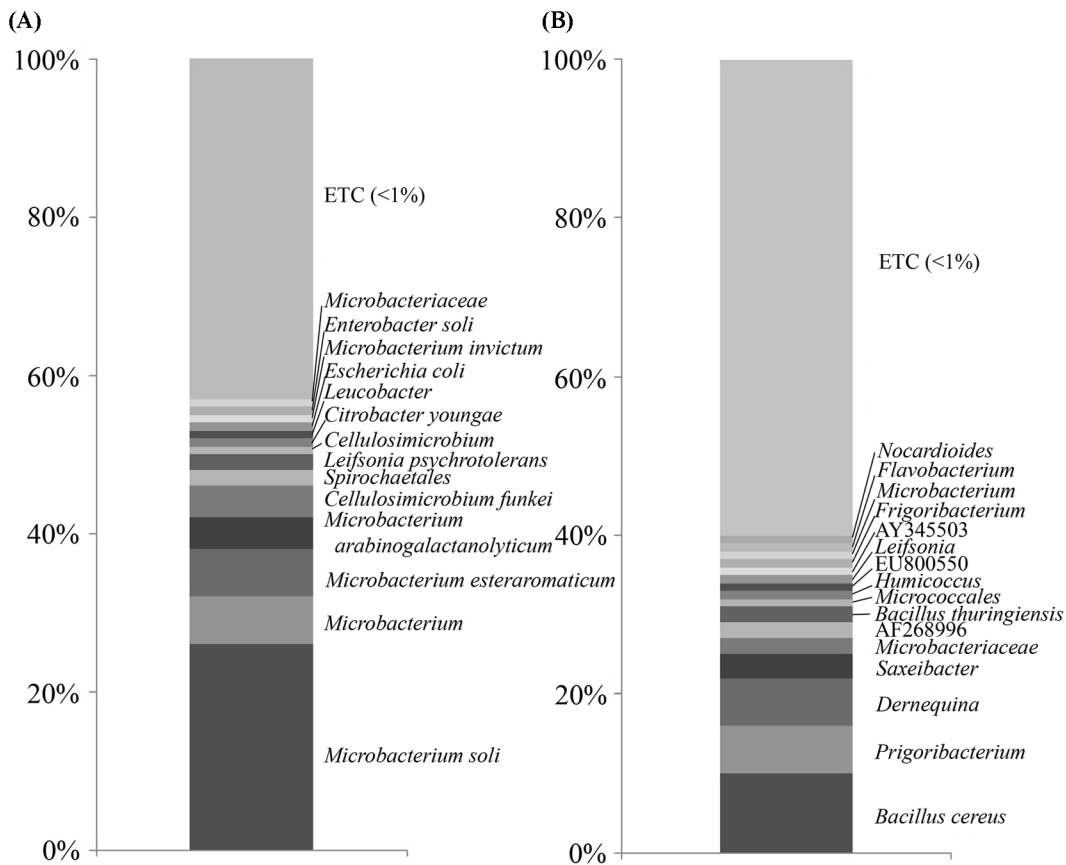


Fig. 4. Composition of bacterial diversity in the intestinal tract of earthworm by pyrosequencing analysis. (A), Intestinal tract of earthworm cultured for 8 weeks; (B), Intestinal tract of earthworm cultured for 16 weeks. Relative abundance of operational taxonomic units classified to each taxon was determined with partial sequences of bacterial 16S rDNA genes from the intestinal tract of earthworm by EzTaxon.

DGGE와 pyrosequencing 방법에 의한 미생물 군집 조사 비교

배양방법에 의한 미생물의 분포조사는 자연계에 존재하는 미생물의 생육환경을 재현할 수 없기 때문에 전체 미생물의 배양이 불가능하고, 시료를 희석하는 과정에서 소수로 존재하는 미생물은 배양되지 못하기 때문에 전체적인 미생물을 분리할 수 없다. 이러한 단점을 보완하기 위해 시료로부터 DNA를 추출하여 16S rDNA gene sequence를 증폭한 후 이를 분석하는 분자생물학적 방법은 배양 단계를 거치지 않고 PCR 산물을 이용하여 sequence를 분석하기 때문에 군집 내 미생물의 다양성과 군집 내 우점종 확인이 가능하다[21].

DGGE 방법의 경우 universal primer를 사용하여 16S rDNA gene을 증폭한 후 chemical denaturant인 urea와 formamide를 포함한 denaturing gradient gel에서 분리되는 것을 이용하는 것으로, 배양을 하지 않고 PCR 증폭을 함으로써 시료 속에 소수로 존재하는 미생물도 검출이 가능하다는 장점이 있다. 하지만 PCR을 통해 DNA를 증폭을 하여도 상대적으로 개체수가 많은 종들이 존재하고, 전기영동 후 염색시 적은 양의 DNA fragments는 염색이 되지 않아 검출되지 않을 수 있으며 염색이 되어도 육안으로 확인이 되지 않는 문제점이 발생할 수 있다. 또한, DGGE의 특성상 PCR을 통해 증폭된 16S rDNA fragments가 500bp 이상이 되면 DNA band의 분리가 잘 이루어지지 않아 DGGE 수행 시 어려움이 따르고, 이로 인해 증폭된 16S rDNA fragment의 길이가 제한이 되어 16S rDNA 분석시 정확한 sequencing이 되지 않을 수 있다[9].

Pyrosequencing 방법은 DGGE와 마찬가지로 PCR 증폭한 후 sequence 분석을 하게 되는데, DGGE와는 달리 denaturing gradient gel을 이용하지 않고 DNA fragments로부터 직접적인 sequencing을 함으로써 더 다양한 미생물의 확인이 가능하다. 또한, 16S rDNA gene은 V1-V9로 구분이 되고 각 부분은 50~100 bp 정도의 길이가 되며 이 부위의 sequence를 분석함으로써 미생물의 동정을 할 수 있는데 pyrosequencing은 평균적으로 350 bp 이상의 sequence를 얻을 수 있어 분석 가능한 sequence의 길이가 길어져 다양한 부위의 분석을 할 수 있기 때문에 종 다양성을 표현하는데 효율적이다[20].

DGGE와 pyrosequencing의 sequencing 결과 genus 단위 혹은 그 보다 더 큰 분류군으로 동정되는 경우도 있는데, 이는 두 방법 모두 sequencing이 가능한 염기 서열의 길이가 제한적이기 때문에 생겨나는 결과로 보여지며, 앞으로 sequence 길이의 제한점을 보완한다면, species 수준의 감별력이 더욱 높아져 미생물 군집조사가 더욱 정확해 질 것으로 생각된다. 또한, DGGE와 pyrosequencing와 같은 비배양 방법은 16S rDNA gene을 이용하여 미생물 군집을 분석하므로 미생물의 배양이 불가능하다는 단점이 있으며, sequencing을 위한 database는 이미 알려진 16S rDNA gene

sequence의 database를 이용하여 동정하기 때문에 분자생물학적 방법도 미생물 군집을 분석하는데 있어서 제한점을 가지게 된다 [22]. 배양한 미생물을 이용하여 생화학적 특성 조사, 유용물질의 생산 등 직접적인 이용이 가능한 배양방법과 16S rDNA gene을 이용하여 다양한 미생물의 군집을 조사할 수 있는 비배양 방법은 독립적이지 않고 병행되어야 좀 더 정확한 군집조사가 가능할 것으로 사료된다.

요 약

미생물과의 상호작용을 통하여 토양의 특성을 변화시킬 수 있는 지렁이 *Eisenia fetida*의 장내미생물 군집을 조사하기 위하여, 배양방법과 비배양방법인 DGGE와 pyrosequencing을 이용하여 8주와 16주 사육 지렁이의 장내미생물 군집을 분석하였다. 배양방법에서는 *L. fusiformis*(51%), *B. cereus*(30%), *E. aerogenes*(21%), 그리고 *L. sphaericus*(15%) 등이 우점미생물로 확인되었다. DGGE 분석에서는 *B. cereus*(15.1%), *Enterobacter* sp.(13.6%), uncultured bacterium(13.1%), 그리고 *B. stearothermophilus*(7.8%)가 우점미생물로 확인되었다. Pyrosequencing 분석에서는 *Microbacterium soli*(26%), *B. cereus*(10%), *M. esteraromaticum*(6%), 그리고 *Frigoribacterium* sp.(6%)가 우점미생물로 확인되었다. 그 외에도 *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Borrelia* sp., *Cellulosimicrobium* sp., *Klebsiella* sp., and *Leifsonia* sp. 등의 미생물도 확인이 되었으며, 비배양 방법을 이용한 장내 미생물 군집 조사는 배양이 불가능한 미생물을 확인할 수 있을 뿐만 아니라 더 다양한 미생물 군집도 확인할 수 있었다.

Acknowledgement

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2010-0006708).

REFERENCES

- Ahmed, I., A. Yokota, A. Yamazoe, and T. Fujiwara. 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1117-1125.
- Byzov, B. A., T. Nechitailo, B. K. Bumazhkin, A. V. Kurakov, P. N. Golyshin, and D. G. Zvyagintsev. 2009. Culturable microorganisms from the digestive tract of earthworm. *Mikrobiolgiia.* **78**: 404-413.
- Droege, M. and H. Brendon. 2008. The genome sequencer

- FLX™ System—longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J. Biotechnol.* **136**: 3-10.
4. Edwards, C. A. and K. E. Fletcher. 1988. Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown. *Agric. Ecosyst. Environ.* **24**: 235-247.
 5. Farnleitner, A. H., F. Zibuschka, M. M. Burtscher, G. Lindner, G. R. L. 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.
 6. Fisher, S. G. and L. S. Lerman. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1579-1583.
 7. Hong, S. W., J. S. Lee, and K. S. Chung. 2011. Effect of enzyme producing microorganisms on the biomass of epigeic earthworms (*Eisenia fetida*) in vermicompost. *Biore-sour. Technol.* **102**: 6344-6347.
 8. Ihssen, J., M. A. Horn, C. Matthies, A. Gössner, A. Schramm, and H. L. Drake. 2003. N₂O-Producing microorganisms in the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* are indicative of ingested soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1655-1661.
 9. Kathrin, F., D. Hanhn, W. Honerlage, and J. Zeyer. 1997. Effect of passage through the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. on *Bacillus megaterium* studied by whole cell hybridization. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 1149-1152.
 10. Kim, H. J., K. H. Shin, C. J. Cha, and H. G. Hur. 2004. Analysis of aerobic and culturable bacterial community structures in earthworm (*Eisenia fetida*) intestine. *Agric. Chem. Biotechnol.* **47**: 137-142.
 11. Kim, M. N. and H. J. Bang. 2006. Comparison of culture-dependent and DGGE based methods the analysis of marine bacterial community. *Kor. J. Environ. Biol.* **24**: 307-313.
 12. Kim, T. S., H. S. Kim, S. D. Kwon, and H. D. Park. 2010. Analysis of bacterial community composition in waste water treatment bioreactors using 16 rRNA gene-based pyrosequencing. *Kor. J. Microbiol.* **46**: 352-358.
 13. Knapp, B. A., J. Seeber, S. M. Podmirseg, E. Meyer, and H. Insam. 2008. Application of denaturing gradient gel electrophoresis for analysing the gut microflora of *Lumbricus rubellus* Hoffmeister under different feeding conditions. *Bull. Entomol. Res.* **98**: 271-279.
 14. Kwon, K. R. and J. C. Seo. 2004. Genetical identification of Korean wild ginseng and american wild ginseng by using pyrosequencing method. *Kor. J. Herbology* **19**: 45-50.
 15. Miller, K. M., T. J. Ming, A. D. Schulze, and R. E. Withler. 1999. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations. *Biotechniques* **27**: 1016-1018.
 16. Miwa, H., I. Ahmed, A. Yokota, and T. Fujiwara. 2009. *Lysinibacillus parviboronicapiens* sp. nov., a low-boron-containing bacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 1427-1432.
 17. Parle, J. N. 1963. Microorganisms in the intestines of earthworms. *J. Gen. Microbiol.* **31**: 1-11.
 18. Park, J. S., C. J. Sim, and K. D. An. 2009. Community structure of bacteria associated with two marine sponges from Jeju Island based on 16S rDNA-DGGE profiles. *Kor. J. Microbiol.* **45**: 170-176.
 19. Parthasarathi, K., L. S. Ranganathan, V. Anandi, and J. Zeyer. 2007. Diversity of microflora in the gut and casts of tropical composting earthworms reared on different substrates. *J. Environ. Biol.* **28**: 87-97.
 20. Petrosino, J. F., S. Highlander, R. A. Luna, A. G. Richard, and J. Versalovic. 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin. Chem.* **55**: 856-866.
 21. Rondon, M. R., R. M. Goodman, and J. Handelsman. 1999. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends Biotechnol.* **17**: 403-409.
 22. Schleifer, K. H. and O. Kandler. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477.
 23. Shin, K. H., H. Yi, J. S. Chun, C. J. Cha, I. S. Kim, and H. G. Hur. 2004. Analysis of the anaerobic bacterial community in the Earthworm (*Eisenia fetida*) intestine. *Agric. Chem. Biotechnol.* **47**: 147-152.
 24. Song, E. Y., J. K. Noh, Y. M. Yoon, Y. S. Choi, S. S. Park, E. K. Ra, and K. S. Han. 2006. ABO genotyping by pyrosequencing analysis. *Korean J. Blood Transfusion.* **17**: 106-115.
 25. Walter, J., G. W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, D. M. Loach, K. Munro, and T. Alatossava. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 297-303.