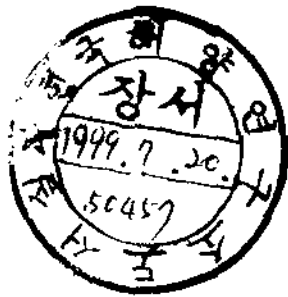


제한절편말단분석법(T-RFLP)을 이용한 해양퇴적물의 세균군집분석

Bacterial community analysis of marine
sediments using T-RFLP(terminal-restriction
fragment length polymorphism)

한국해양연구소



제 출 문

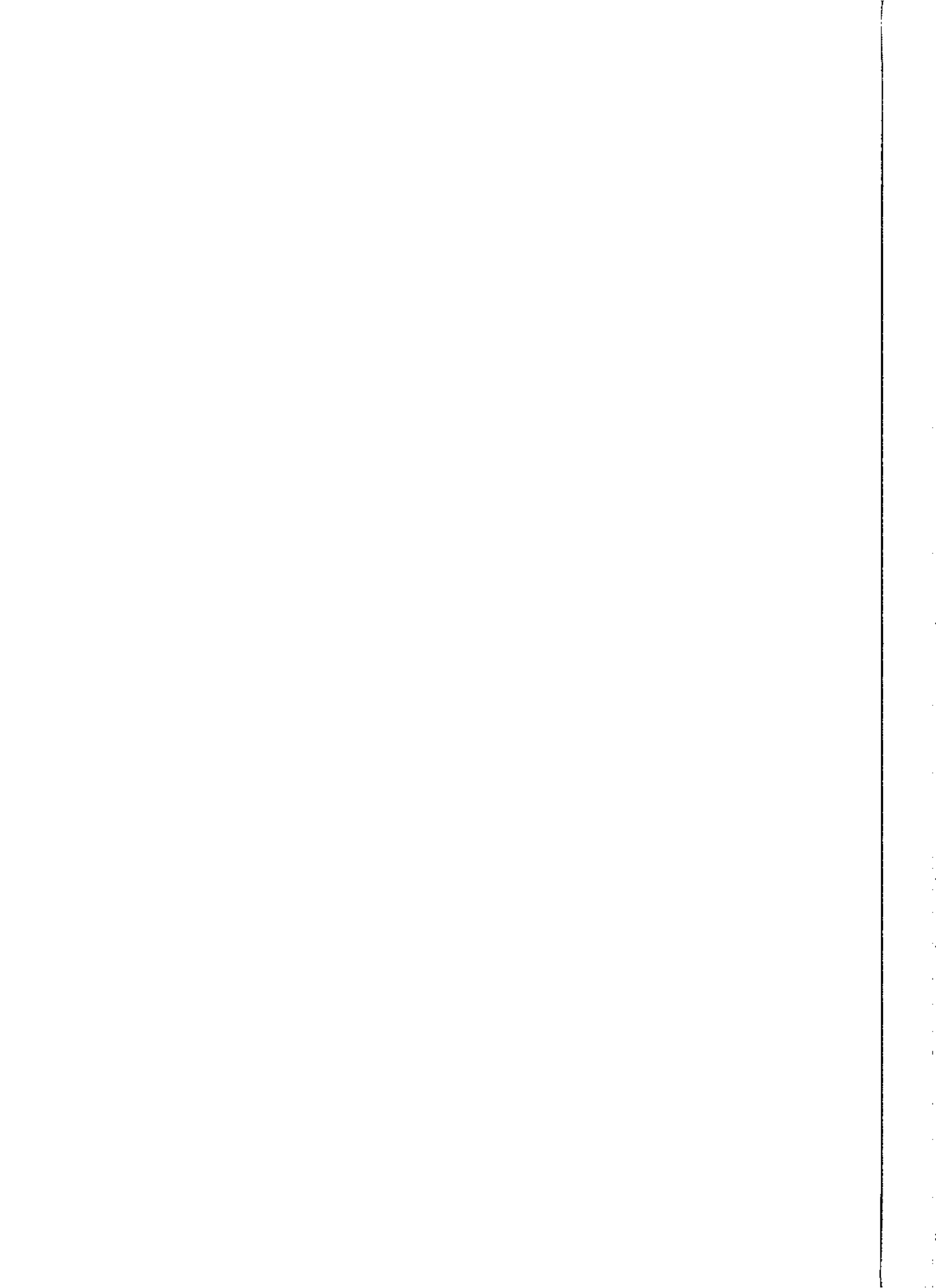
한국해양연구소장 귀하

본 보고서를 “제한절편말단분석법(T-RFLP)을 이용한 해양퇴적물의 세균군
집분석” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1999년 7월

연구책임자 : 이정현

참여연구원 : 김상진, 이홍금, 권계경
신현희, 손재학, 윤광미
정성영



공자생물학적 방법으로 미생물 생태학의 연구에 강력한 수단이 되었으며, 이러한 접근은 핵산증폭반응(PCR)과 rRNA 유전자에 기초한 세물학이 적용되어 미생물 다양성을 연구하고 배양되지 않는 종의 동정에 이용되고 있다. 방법론을 단계적으로 살펴보면, 전체 균체의 핵산을 분리하고 이를 증폭하여, 16S rRNA 유전자의 유니버설 혹은 도메인 수준의 primer를 이용하여 핵산증폭반응을 시킨다. 다음으로 16S rRNA 유전자 클론 라이브러리를 만들고 염기서열의 차이 혹은 제한효소(RFLP: restriction fragment length polymorphism)를 이용해 탐색과정을 거쳐 서로 다른 클론을 얻는다. 언어진 클론으로부터 미생물 균체에서의 종 다양성과 상대적인 클론이 서로 다른 ribotype의 빈도수로 측정된다. 이 방법은 배양의 과정은 필요로 하지 않지만 클론 라이브러리의 탐색과정을 거쳐 많은 도메인 요구된다. 최근에는 핵산의 단일 가닥의 형태 다형성(SSCP: single strand conformation polymorphism)과 핵산의 용융특성을 이용한 D(T)GGE(denaturing (temperature) gradient gel electrophoresis) 방법이 개발되어 라이브러리 세조의 과정을 요구하지 않는다. 이러한 방법론은 균질 구조를 알아내고 종 다양성을 개략적으로 측정하는데 적용되었다. 그러나 이러한 방법론은 민감하지 않은 염색 기술로 인해 복잡한 미생물 균체에 대한 정보의 양이 제한적이다. 제한효소(RFLP) 분석법은 rDNA의 비코딩 영역의 짧은 수단으로 염기를 인지하는 제한효소를 이용하고, 핵산력이 감소하여서 아가로스겔을 이용한다. 미생물 균체 분석을 위해 많은 수의

II. 연구개발의 목적 및 중요성

제한효소분해단 분석법(T RFLP)을 이용한 해양 미생물의 세균군집분석

1. 서론

요약문

확인하기 위해 16S rRNA 유전자 클론을 얻고 염기서열을 결정하여 결과의 도양시표에 대해 미생물군집을 비교하였다. 이러한 방법들을 결정하고 미생물군집의 구조변화를 조사하였다. 그리고 특성이 다른 조건대 지역들에 대해 집단제한편분석법으로 미생물군집을 분석 비교하여 오염에 대해 집단제한편분석법을 이용하여 분석하였다. 오염정도가 다른 해양적 경시표로 해양적률, 그리고 조건대 지역의 도양 시표의 미생물군집에 대한 연구에서는 모델미생물군집을 이용하여 방법론을 최적화시키고 자연화

수 있다. 중 집단제한편분석법을 이용하면 미생물군집을 좀 더 정확하게 분석할 수 있다. 따라서 미생물군집을 분석하기 위해 다종의 제한효소를 처리한다. 제한효소를 이용하면 각 효소에 의해 특정적인 크기의 집단제한편이 생에도 불구하고 같은 크기의 집단제한편이 생성될 수 있지만, 서로 다른 군집내의 각 미생물종들이 단순화된 형태로 나타나게 된다. 서로 다른 종들이 만들어지는 것은 아니다. 그러나 집단제한편만을 분석함으로써 미생물 집단제한편의 분석에 의하면 한 종의 미생물에 의해 하나의 집단제한편 군집을 비교 분석하는 것이 가능하다. 16S rDNA의 염기서열에 기초한 편에서 각각의 집단제한편이 하나의 생물종으로 인지되면 통계적으로 각 서열을 서로 표지된 집단제한편의 전술에 의해 만들어진다. 이 분석법 터내는 피크의 양상이 전기영동에 의한 분리와 자동염기서열장치를 이용해 환경시표의 복잡한 미생물군집분석에 이용되고 있다. 유전적인 다양성을 나타내서 각 미생물종을 동정하고 염기서열 데이터베이스를 이용해서 자연 표지된 집단제한편만을 분석하는 것이다. 이 방법을 사용하여 모델미생물 클로 표지하여 핵산증폭산물을 얻고 이를 제한효소로 처리하여 핵산증폭제로 한 분석법은 핵산증폭반응에 이용되는 primer를 좀 더 높은 정확도에 핵산증폭화적 그물을 전술하는 데는 제한이 있다. 집단제한편다형성을 이용 그러나 집단제한편다형성분석법은 미생물종의 다양성과 분포를 파악하고 특

를 비교분석하였다.

III. 연구개발의 목표 및 내용

1. 모델미생물군집에 대한 말단제한절편분석법의 수립
2. 모델미생물군집을 이용한 핵산증폭반응의 최적화
3. 말단제한절편분석법을 이용한 해양퇴적물과 조간대지역 토양의 미생물 군집 분석
4. 16S rRNA 유전자 클론의 염기서열 결정에 의한 말단제한절편분석법의 검정 및 비교
5. 해양퇴적물의 오염진행에 따른 미생물군집구조의 변화분석

IV. 연구개발의 결과 및 활용에 대한 건의

1. 다양한 환경에서의 미생물군집을 분석하는 신속한 분자생물학적 방법을 확립하였다. 핵산 증폭반응시 전위 primer의 5' 말단에 형광물질을 표지하여 모델미생물군집 및 자연 환경 시료의 전체 핵산으로부터 16S rRNA 유전자만을 증폭시켰다.

2. 핵산증폭산물에 대해 4 염기를 인지하는 제한효소로 절단하여, 형광물질로 표지된 5' 말단 제한절편의 정확한 길이를 자동염기서열장치를 이용하여 결정하였다.

3. 기존에 염기서열이 밝혀진 미생물종으로 구성된 모델미생물군집을 이용하여 핵산증폭반응 및 분석의 최적조건을 구하였다.

4. 해양퇴적물과 조간대 지역의 토양에 대해 말단제한절편분석법을 이용하여 미생물군집을 분석하였다.

5. 자연환경시료의 특성, 즉 퇴적물의 오염정도에 따른 미생물군집의 구조가 상이하였다.

6. 16S rRNA 유전자 클로닝과 염기서열을 얻고 이의 분석을 통해 말단제한 절편분석법을 검증하였다.

7. 본 연구의 결과로 말단제한절편분석법이 서로 다른 생태계의 미생물 군집구조와 다양성을 신속하게 비교할 수 있는 방법론임을 증명하였으며, 이를 이용하면, 환경변화 특성에 따른 미생물군집구조의 시간적, 공간적 동역학을 규명하는데 활용될 수 있다.

Summary

I. Title

Bacterial community analysis of marine sediments using T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) of 16S rRNA genes

II. Objectives and Significance

Several molecular approaches provide powerful tools to study microbial ecology. One approach in particular that couples PCR and rRNA gene based phylogeny has been effective in the exploration of microbial environments and the identification of uncultured organisms. The stepwise strategy of this approach is to isolate total community DNA and use this DNA as a template for PCR amplification of 16S rRNA genes with universal or domain level primers. This is usually followed by construction of a clone library for genes encoding rRNA (rDNAs) and rapid screening of the library based on sequence differences or by determining restriction fragment length polymorphisms (RFLP) of the rDNAs. The richness and evenness of a community are qualitatively estimated based on the number of unique clones and the relative frequencies of the various ribotypes detected. While this approach obviates the requirement for cultivation, construction and screening of clone libraries are laborious. More recently, techniques dependent on DNA melting behavior of single-strand DNA conformation (SSCP; single strand conformation polymorphism) and D(T)GGE

(Denaturing (Temperature) gradient gel electrophoresis) have been developed as a means of circumventing library construction. These methods have been employed to assess community structure and to provide relatively crude estimates of species diversity, but are limited by the comparatively insensitive staining technologies employed and do not provide information concerning the specific phylogenetic groups the comprise a microbial community. RFLP analysis of 16S rDNA (or ARDRA; amplified rDNA restriction analysis), has been used for several years as a method for rapid comparison of rDNAs. The rDNAs are obtained by PCR amplification by using universal primers, and the product is digested with restriction enzymes with 4-bp recognition sites. The typical analysis of restriction digests for isolates or clones is performed on relatively low-resolution agarose gels. For community analysis, the potentially large number of fragments can be resolved by using polyacrylamide gels to produce a community-specific pattern. The RFLP method is of limited use for demonstrating the presence of specific phylogenetic groups or for estimating species richness and evenness. In this method, fluorescent-labeled PCR, in which forward primer carrying a 5' fluorescent molecule, can be followed by restriction enzyme digestion to produce fluorescent-labeled terminal restriction fragments (TRFs). This technique was previously evaluated with in vitro cultures as a means of identifying individual bacteria, and its utility for complex samples was modeled using a sequence database. Patterns reflecting genetic diversity are produced by electrophoretic separation and detection of only the labeled TRFs on automatic DNA sequencer. In this patterns, each TRF can be used as a data point for community comparison via statistics. Using 16S rDNA sequences for

differentiating bacteria based on TRF length cannot produce the ideal of one data point per species. A TRF pattern produced from amplified 16S rDNA is a simplified representation of the community. Different species, regardless of taxon, may produce identical length TRFs with a given restriction enzyme. However, organisms that produce identical TRFs with one restriction enzyme may produce unique TRFs with a different restriction enzyme. Thus, a more accurate community representation may be achieved by combining multiple T-RFLP derived from different restriction enzyme digests.

Here we report the use of T-RFLP for the analysis of different microbial communities; in vitro model communities, marine sediments, and soil samples of intertidal zone. In vitro control communities were used to optimize methodology, while marine sediments and soil samples of an intertidal zone were examined as an example of complex microbial communities. It was shown that microbial community structures in the marine sediments were different with the extent of contamination by the duration of aquaculture. The T-RFLP analysis of marine sediments was verified by the cloning and sequencing of rDNA clones.

III. Contents and Scope

1. Establishment of T-RFLP analysis of in vitro model bacterial community
2. Optimizing PCR condition using a model bacterial community
3. Bacterial community analysis of marine sediments and soil samples of

an intertidal zone

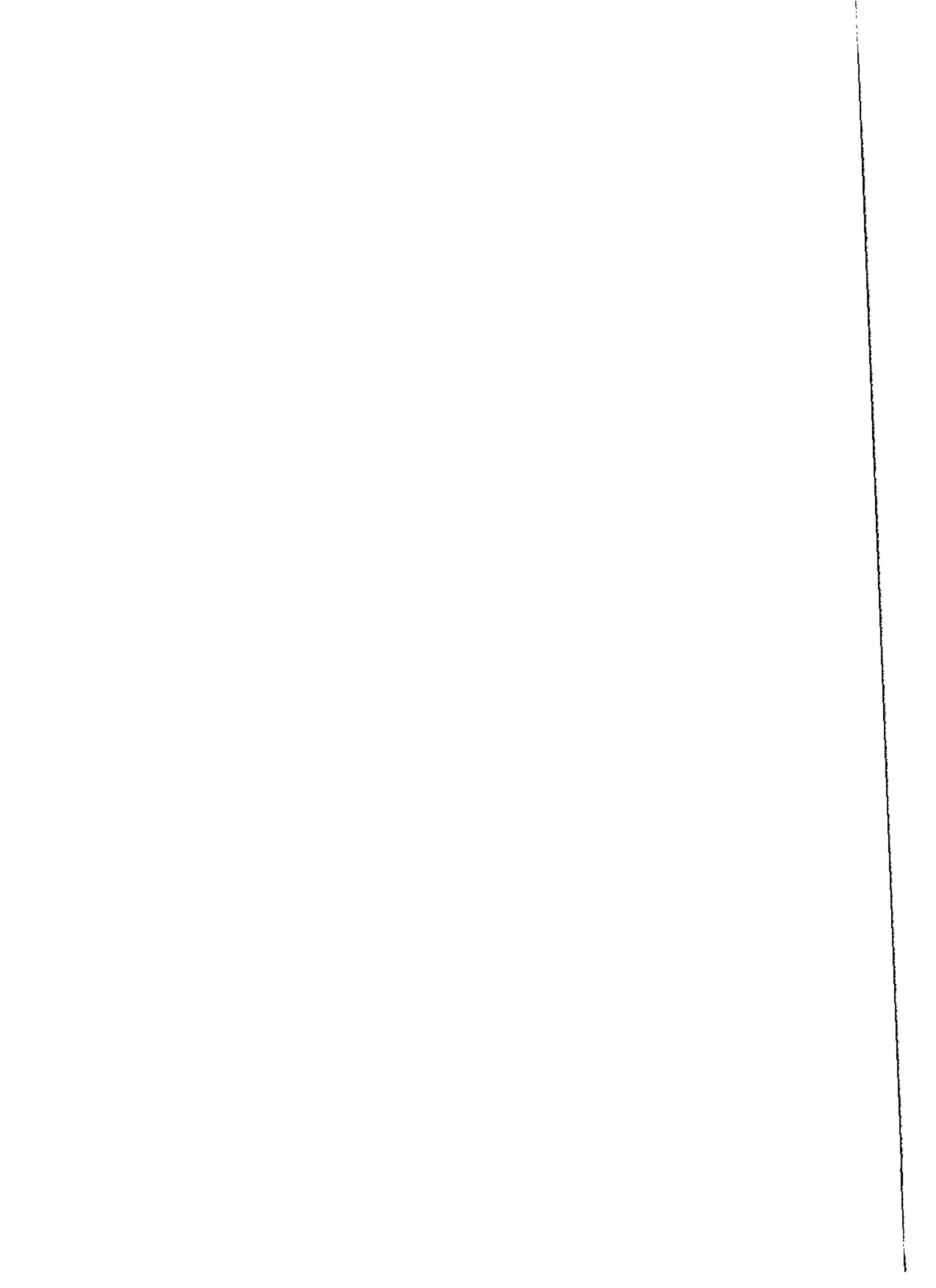
4. Verifying the T-RFLP analysis by comparison cloning and sequencing of rDNA clone
5. Comparative analysis of microbial community of marine sediments

IV. Results and Suggestions

1. A quantitative molecular technique was developed for rapid analysis of microbial community diversity in various environments.
2. The technique employed PCR in which the forward primer was fluorescently labeled at the 5' end and was used to amplify a selected region of bacterial genes encoding 16S rRNA from total community DNA.
3. The PCR product was digested with tetrameric restriction enzymes, and the fluorescently labeled terminal restriction fragment was precisely measured by using an automated DNA sequencer.
4. PCR conditions were optimized using in vitro model community of known microorganisms.
5. Analysis of complex bacterial community with T-RFLP was made between marine sediments and soil samples in intertidal zone.
6. Analysis of the natural environmental samples using T-RFLP has shown that microbial community was different with the characteristics of the samples.
7. The results by T-RFLP were verified by cloning and sequencing of

16S rRNA gene clones from marine sediments.

8. This result demonstrated that T RFLP is a powerful tool for assessing the diversity of complex bacterial communities and for rapidly comparing the microbial community structure of temporally or spatially different ecosystems.



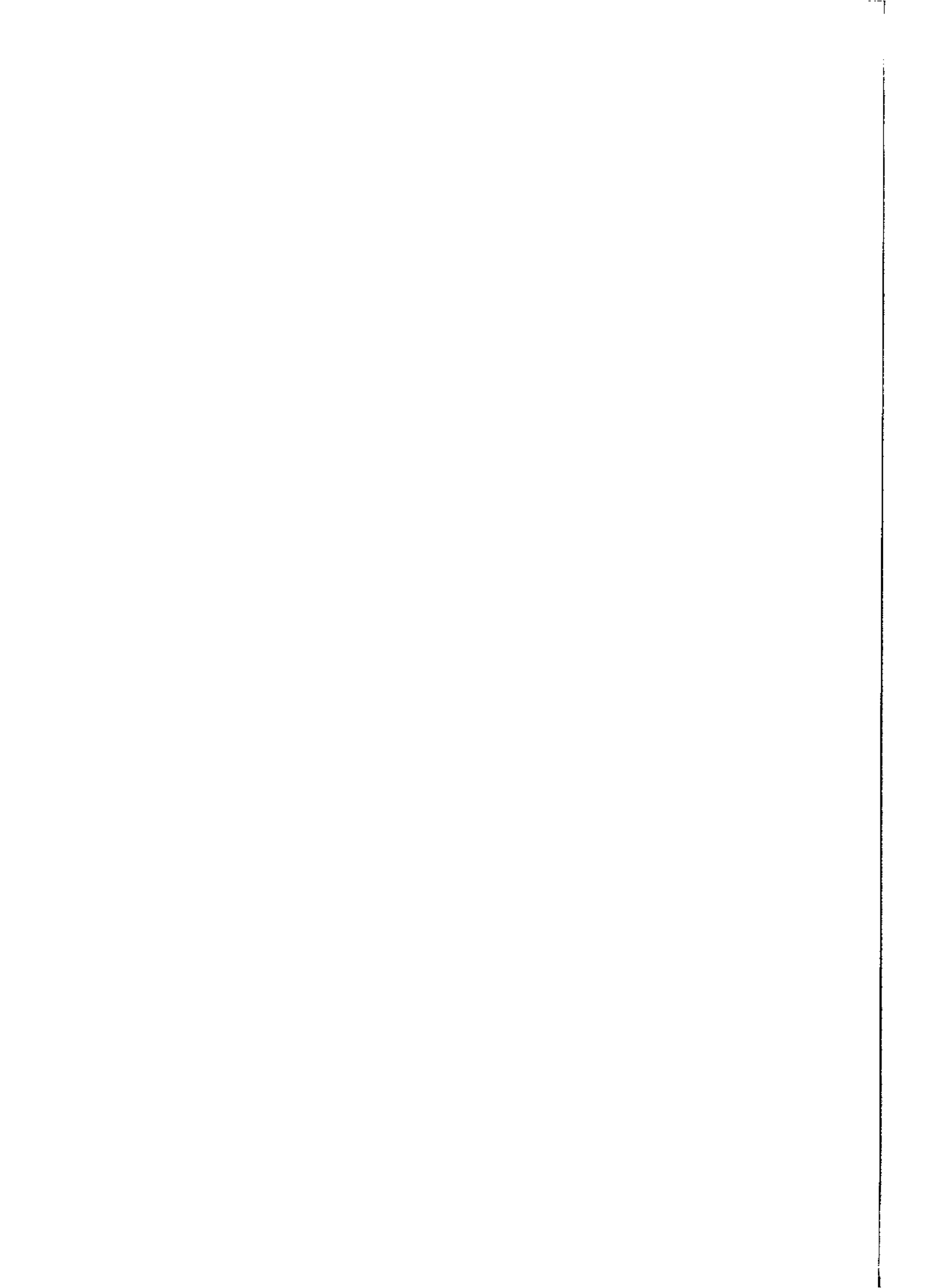
목 차

요약문	3
표목차	15
그림목차	17
제 1 장 서론	21
제 2 장 재료 및 방법	31
2.1. 시료 채취 및 분석	31
2.2. 해양퇴적물의 전체 핵산 (DNA) 추출	33
2.3. 모델군집 및 핵산 분리	35
2.4. 16S rDNA 증폭 및 클로닝	35
2.5. T-RFLP of 16S rDNA	36
2.6. 핵산 정량	38
제 3 장 연구결과 및 고찰	39
3.1. 해양퇴적물의 분석	39
3.2. 모델미생물군집의 말단제한절편분석	45
3.3. 모델미생물군집의 분석	52
3.3.1. PCR annealing 온도의 영향	53
3.3.2. PCR 반응반복수의 영향	53
3.3.3. 최적 PCR 반응조건에서의 T-RFLP방법을 이용한 모델세균군집분석	56
3.4. 모델미생물군집에 대한 제한효소를 달리한 말단제한절편 분석	62
3.5. 해양퇴적물시료의 미생물군집 분석	64
3.6. 갯벌시료의 미생물군집 분석	85
3.7. 말단제한절편분석법의 민감도	85

제 4 장 결 론	89
제 5 장 참고문헌	91

List of tables

Table 1. Culturability determined as a percentage of culturable bacteria in comparison with total cell counts.	23
Table 2. Alignment of sequences of amplimers 27f and 1522r with database sequences of 16S rRNA genes of strains used for model community.	47
Table 3. The tetrameric restriction enzymes and their recognition sites used for terminal RFLP analysis.	48
Table 4. Observed and expected lengths of 5'-terminal restriction fragment (5'-TRF) for bacterial strains in model microbial community.	51
Table 5. T-RFLP analysis of model bacterial community.	58
Table 6. Effect of genome size and copy number of 16S rRNA genes on the T-RFLP analysis.	61
Table 7. Prediction of 5' TRF and their inferred phylogenetic group of sequenced 16S rDNA clones from a B-1 sediment sample.	73
Table 8. Prediction of 5' TRF and their inferred phylogenetic group of sequenced 16S rDNA clones from a D-1 sediment sample.	77
Table 9. Prediction of 5' TRF and their inferred phylogenetic group of sequenced 16S rDNA clones from a E-1 sediment sample.	81
Table 10. Characteristics of soil samples from intertidal zone.	84



List of figures

- Figure 1. Schematic drawing of a universal rRNA tree showing the relative positions of evolutionary pivotal groups on the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya. 25
- Figure 2. The secondary structure of *E. coli* 16S rRNA molecule (A) and schematic of the secondary structure (B), highlighting primary sequence domains of nearly universal conservation (thick lines), intermediate conservation (normal lines), or hypervariability (dashed lines). Numbers indicate the positions of nucleotides from the 5' end, according to the *E. coli* 16S rRNA sequence. 27
- Figure 3. A map showing study area and sediment sampling sites in the southern coast of Tongyoung, Korea. 32
- Figure 4. Distribution of total bacterial number at each site of study area. 40
- Figure 5. Distribution of viable bacterial number at each site of study area. 42
- Figure 6. Distribution of bacterial productivity at each site of study area measured by the method of ¹⁴C-leucine incorporation 44
- Figure 7. Electropherograms of the 5'-TRF of *AluI* digested 16S rDNA amplified from each genomic DNA of six bacterial strains consisting model community. 49

Figure 8. Effect of PCR annealing temperature on the 5'-RFLPs of *HhaI* digested 16S rDNAs amplified from bacterial model community (mixture of genomic DNA from each six bacterial strains consisting model community).54

Figure 9. Effect of PCR cycle numbers on the 5'-RFLPs of *HhaI* digested 16S rDNAs amplified from bacterial model community (mixture of genomic DNA from each six bacterial strains consisting model community).55

Figure 10. Analysis of 5' T-RFLP of *HhaI* digested 16S rDNAs amplified from a model community consisted of six bacterial strains using optimized PCR condition.57

Figure 11. Electropherograms of 5' T-RFLP of the model community subjected to five restriction enzymes.63

Figure 12. Electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *HhaI* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of marine sediments.65

Figure 13. Comparison of electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *HhaI* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of marine sediments B-1, D-1, and E-1.68

Figure 14. Comparison of electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *MspI* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of marine sediments B-1, D-1, and E-1.69

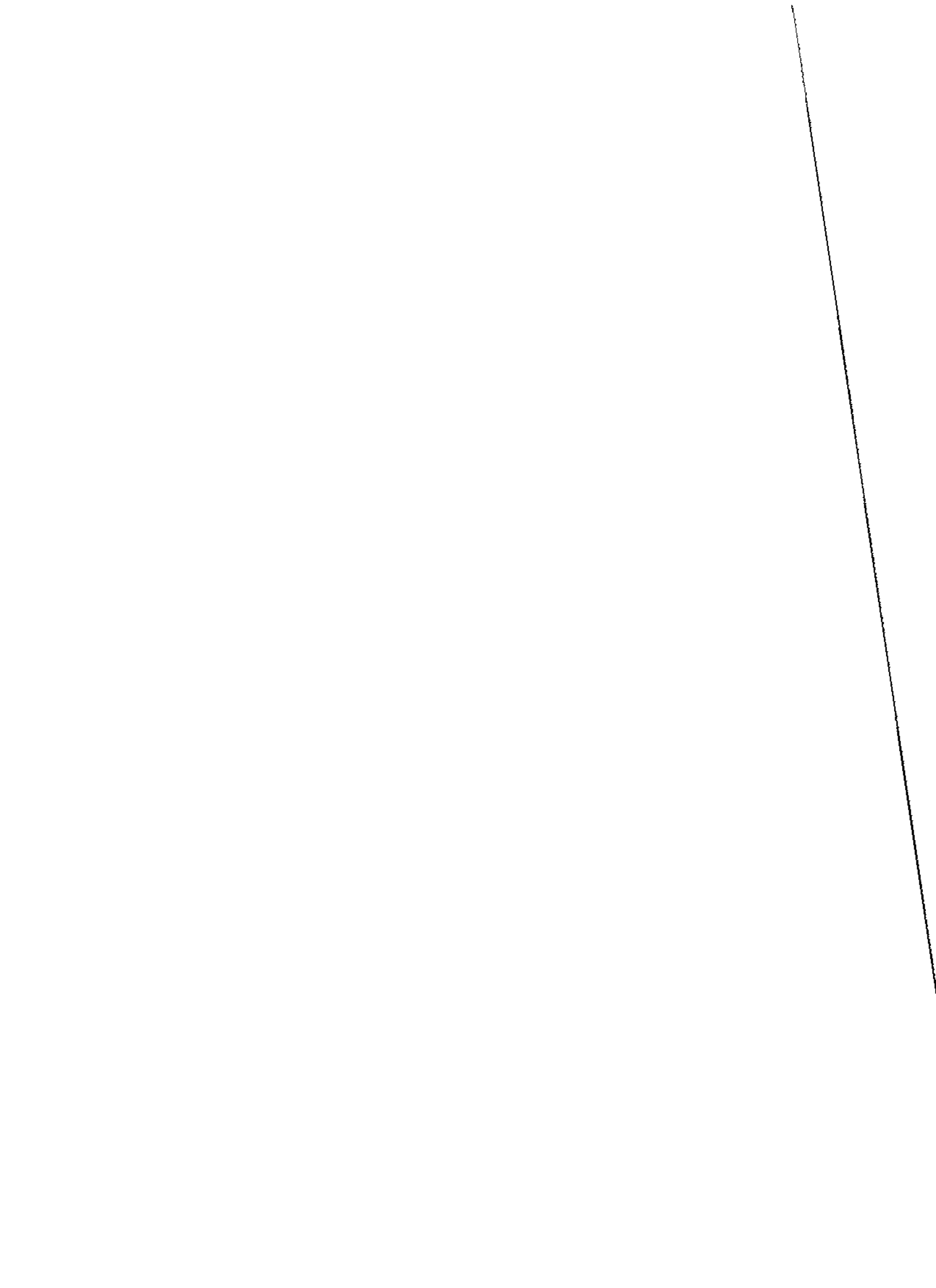
Figure 15. Comparison of electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *AluI* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of marine sediments B-1, D-1, and E-1.70

Figure 16. Comparison of electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *RsaI* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of marine sediments B-1, D-1, and E-1.71

Figure 17. Comparison of electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *HaeIII* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of marine sediments B-1, D-1, and E-1.72

Figure 18. Comparison of electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *HhaI* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of soil samples from intertidal zone.83

Figure 19. Electropherograms (A) and close-up (B) of the 5' T-RFLPs derived from *HhaI* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of sands inoculated with *Corynebacterium* IC-10 in different quantity.86



제 1 장 서 론

생물계에 있어서 생산 및 분해에 관련된 일련의 동작 혹은 과정은 전적으로 미생물의 활성에 의존한다고 할 수 있다. 극한환경을 포함한 자연 생태계에서 생산자와 소비자로 이어지는 일방적인 물질 흐름을 미생물 군집이 분해자의 역할을 수행함으로써 순환적인 흐름으로 전환시키며, 생태계 내의 한정적인 물질자원의 이용을 극대화시키는데 기여한다. 특히, 빠른 대사 능력을 갖는 미생물은 해양을 포함한 수계 생태계에서 다른 생물들이 이용할 수 없는 용존된 유기물을 흡수하여 생체 물질로 전환할 수 있으며, 동물 플랑크톤에 포식됨으로써 탄소 순환에도 적극적으로 기여한다. 또한 놀라운 미생물의 다양성에 비추어, 새로운 기능의 미생물을 발견하고, 이로부터 생물공정에 응용하고, 자원으로 개발하는 가능성은 전에 비해 훨씬 커졌다. 극히 일부분의 환경에 대해서만 연구된 현 상황에서 자연생태계의 미생물 군집의 구조, 기능, 역할에 대한 우리의 이해 수준은 아직 초보적인 단계라 할 수 있다.

미생물의 계통학적인 형질 (계통형질; phylotypes)의 존재와 그들의 자연 환경 군집에서의 분포는 다양한 환경 시료에서 직접 핵산을 분리하고 그로부터 rRNA 유전자의 염기서열을 정하는 것으로부터 얻어진다. 따라서 핵산의 염기서열에 기초한 연구방법론은 미생물다양성 연구에 있어서도 빠르고 포괄적인 수단을 제공해주는 것이다. 환경 시료로부터 얻어진 라이보솜 RNA 유전자는 그 환경에서 어떠한 생물종들이 존재하며, 얼마나 많은 서로 다른 유전적인 형식이 존재하는지, 그리고 어떤 생물종이 유용하고 흥미 있을 경우 그것을 더 연구할 필요성을 제시하여 준다. 이러한 방법은 미생물 생태계 및 분류학적인 분석 외에도 hybridization 탐침을 이용한 자연 생태계의 미생물들을 확인하고 모니터링 하는데 이용되고 있다. 따라서 분자생태학적인 방법은 기존의 미생물 군집분석의 문제점을 해결해 줄 뿐 아니라 계통도의 분석을 통해 주어진 미생물의 주제를 정의할 수 있는 수단



을 제공해주며, 환경에서의 미생물의 분포와 역할을 이해하는데 기본적인 수단으로 필요하다.

미생물 군집은 개체크기가 작고, 생존주기가 짧고, 그리고 점유하는 공간이 매우 크므로 시간적, 공간적 역동성을 파악하는데 어려움이 있다. 또한 미생물은 크기가 작아 형태적으로 구분하기가 매우 어려우며, 그 종류가 다양하기 때문에 생태계 전체에 존재하는 모든 미생물 종을 배양, 동정하는 일은 거의 불가능하다. 아직까지 자연계에 존재하는 세균 군집 중에서 분리되고 그 특성이 알려진 것은 20%가 되지 못하는 것으로 알려져 있다 (Wayne *et al.*, 1987). 그러나 이러한 추정도 지나치게 높은 값으로써 또 다른 입장에서는 자연계내의 세균들 중에서 99% 이상의 세균들이 전통적인 방법으로는 배양될 수 없다는 보고도 있다 (Amann *et al.*, 1994). 현재 수계 생태계에서 현미경을 통하여 관찰된 총 세균 수에 비하여 1% 미만의 세균만이 배양되는 사실로도 이와 같은 주장은 타당성을 갖고 있다. 이러한 실험 결과들은 현재 사용하고 있는 배지나 배양조건이 모든 미생물의 생장과 분열을 위한 조건을 충족시키지 못하고 있기 때문에 나타나는 현상으로 생각되고 있다. 따라서 배양을 통하여 분리된 세균들이 현장에 존재하는 미생물의 비율을 대변한다고 보기 어려우며, 상대적으로 부영양 상태인 배지가 세균의 분리에 이용되기 때문에 자연계에서 대부분을 차지하고 있는 빈영양 세균을 분리할 가능성이 매우 낮다. 이 같은 선택적 배지를 이용한 배양방법은 자연 생태계 군집의 이해에 있어서 많은 한계를 갖고 있다 (Fuhrman *et al.*, 1992, 1993). 실제로 몇 가지의 환경 시료의 연구에 의하면, 현미경상에서 관찰되는 미생물의 99-99.99%가 기존의 방법으로는 배양될 수 없음이 밝혀졌다(표 1). 따라서 자연 생태계 안에 서식하는 미생물 군집의 구조 및 역할 그리고 역동성을 파악하려는 연구가 방법적인 한계점을 가지므로 이를 극복하기 위한 많은 노력이 시도되었다. 자연 생태계의 미생물 군집을 이해하기 위한 접근으로, 직접 배양을 통하지 않고 분자생물학적 방법을 이용하는 것이다. 즉 세포의 구성 성분 특히 라이보솜 RNA

Table 1. Culturability determined as a percentage of culturable bacteria in comparison with total cell counts

Habitat	Culturability (%) ^a
Seawater	0.001-0.1
Freshwater	0.25
Mesotrophic lake	0.1-1
Unpolluted estuarine waters	0.1-3
Activated sludge	1-15
Sediments	0.25
Soil	0.3

^aCulturable bacteria are measured as CFU.

(rRNA)의 염기 서열을 분석 비교하여, 미생물 군집 내에서 미생물의 종류를 알아내고 각각의 미생물에 대한 정량화를 실시함으로써 미생물군집의 구조와 기능을 밝히고, 간접적으로 생태계 특성을 이해할 수 있다 (Aman *et al.*, 1995).

분자 생물학적인 방법이 개발되기 전 진화적인 추론을 통해 생명체를 5가지의 군 즉 동물, 식물, 균류, protist (원생동물), 그리고 monera (세균류)로 분류하였다. 그리고 생물은 핵막을 가지고 있는 진핵 생물 (eukaryotes) 과 핵막이 없고 진핵 생물의 조상으로 여겨지는 원핵생물 (prokaryotes)로 나뉘어 지는데, 전통적인 다섯가지의 분류군 중에서 네 분류군이 다세포 생물인 진핵생물군에 속하게 된다 (Whittaker, 1969). 생물체의 분자생물학적인 rRNA 분자의 연구에서 예리한 통찰력으로 형식화하여 모든 생물체의 관련성을 밝히고 생명체의 역사를 재조정할 수 있는 방법을 수립하였다. 즉 분자생물학적인 서열 (핵산의 염기서열)에 기초하여, 생물체를 지금은 잘 알려진 세 개의 진화적인 계통군 (urkingdom 혹은 domain), 즉 Eucarya (진핵생물류; eukaryotes), Bacteria (세균류; 초기에 eubacteria로 명명), 그리고 Archaea (고세균류; 초기에 archaeobacteria로 명명)로 분류하였다 (그림 1) (Woese *et al.*, 1990).

생물체의 SSU rRNA (small subunit rRNA) 염기 서열에 기초한 현재의 생물체의 계통도의 구축은 이론적으로 간단하다. 서로 다른 생물체의 rRNA 염기서열 쌍을 배열하여 서열상의 차이를 계산하고 이로부터 생물체간의 진화적인 거리를 측정하는 것이다. 거기에는 시간적인 고려는 되지 않았고, 다만 염기서열의 차이만을 보게된다. 이러한 방법으로 많은 생물체간의 쌍으로부터 서열 차이를 구하여 같이 각 생물체간의 서열에 대한 진화적인 경로를 보여주는 계통도, 혹은 계통지도를 추론하게 된다. 특히 고미생물인 도메인 Archaea의 경우, 특이한 생태학적 서식지나 혹은 극한 환경에서 많이 존재하기 때문에 상대적으로 연구가 소홀했었다. 그러나 이들 그룹은 해양환경의 초고온성, 저온성, 호염성, 황 혹은 산화황 환원 세균,

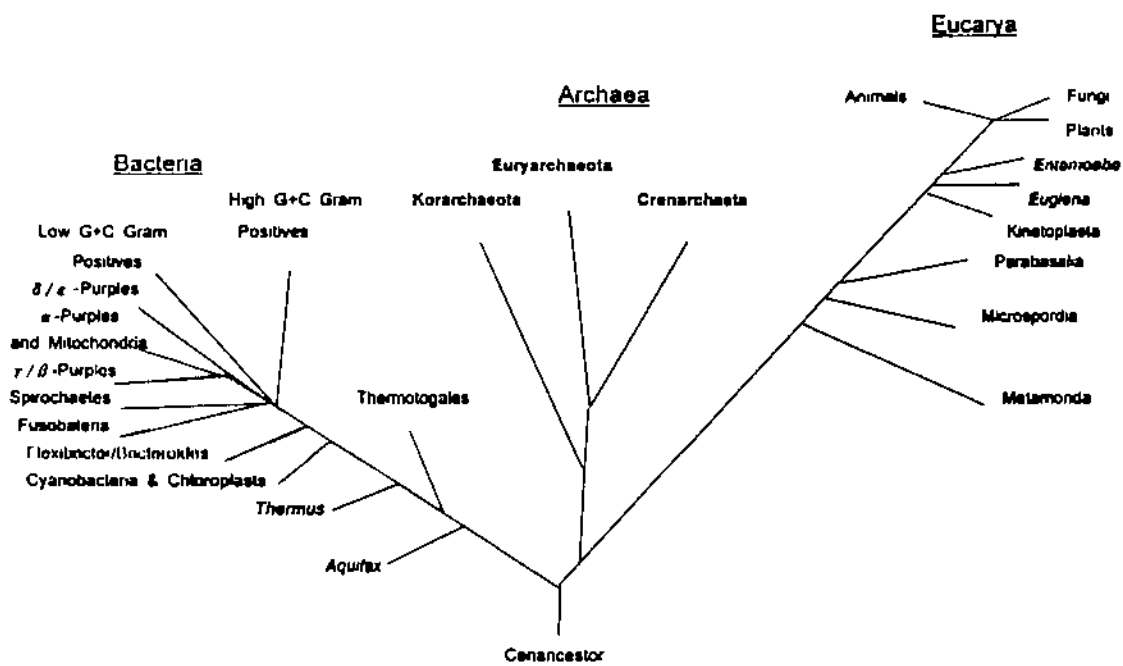


Figure 1 Schematic drawing of a universal rRNA tree showing the relative positions of evolutionary pivotal groups on the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya.

고온성 종속영양세균, 메탄생성 세균등으로 구성되어 있으며, 최근의 분자 생물학적 방법을 이용한 계통학적 분석에 의하면 Archaea 그룹은 생리적 특성이 훨씬 더 다양하며, 다양한 환경조건에 존재하는 것으로 밝혀졌다 (Arahal *et al.*, 1996; McInerrey *et al.*, 1995; Preston *et al.*, 1996; DeLong *et al.*, 1994).

분자생태학적 연구의 주대상인 rRNA는 단백질 합성에 관여하며, 바이러스를 제외한 세포로 이루어진 거의 모든 생물체에 존재하고 있기 때문에 염기 서열 분석을 통하여 다른 미생물과의 연관성을 밝히고, 계통학적 위치를 결정하여 진화 관계를 추정할 수 있다 (Woese, 1987; Bintrim *et al.*, 1997). 그리고, rRNA의 염기 서열 정보는 데이터 베이스화 되어 있어, 약 3,000종 이상의 세균에 대해 16S rRNA의 염기서열이 알려져 있으며, 지금도 많은 종의 배양된 혹은 배양할 수 없는 미생물에 대해 rRNA의 염기서열이 밝혀지고 있다 (Maidak *et al.*, 1997; Olsen *et al.*, 1991). 분자생태학적인 연구는 rRNA 분자의 작은 subunit인 16S rRNA (진핵 세포의 경우, 18S rRNA)에 대해 많이 이루어지고 있으며, 크기가 큰 subunit인 23S rRNA (진핵 세포의 경우, 28S rRNA)와 ITS (Internal transcribed sequence)에 대해서도 부분적으로 연구가 이루어지고 있다 (Ludwig *et al.*, 1994). 16S rRNA는 잘 보존된 2차 구조로 이루어져 있으며 (그림 2 (A), (B)), 1차 구조의 염기 서열은 보존성 정도를 달리하는 도메인의 모자이크 (mosaic)로 되어 있어, 도메인의 보존성 정도를 이용하여 모든 생물체, 특정 미생물 그룹 그리고 특정 미생물 각각에 대한 부분적인 염기 서열을 사용하여 탐침 제작도 가능하다 (Alm *et al.*, 1996; Raskin *et al.*, 1994; Burggraf *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1996).

분자 생태학적 접근방법은 전체 균집의 핵산을 분리하고 이를 PCR의 template로 사용하여 universal 혹은 domain에 특이한 primer를 이용하여 16S rRNA 유전자 (rDNA)를 증폭시키는 과정을 밟는다. 다음 단계로 rDNA의 클론 라이브러리를 만들고 각 클론들의 염기서열의 차이를 직접

A Secondary Structure: small subunit ribosomal RNA

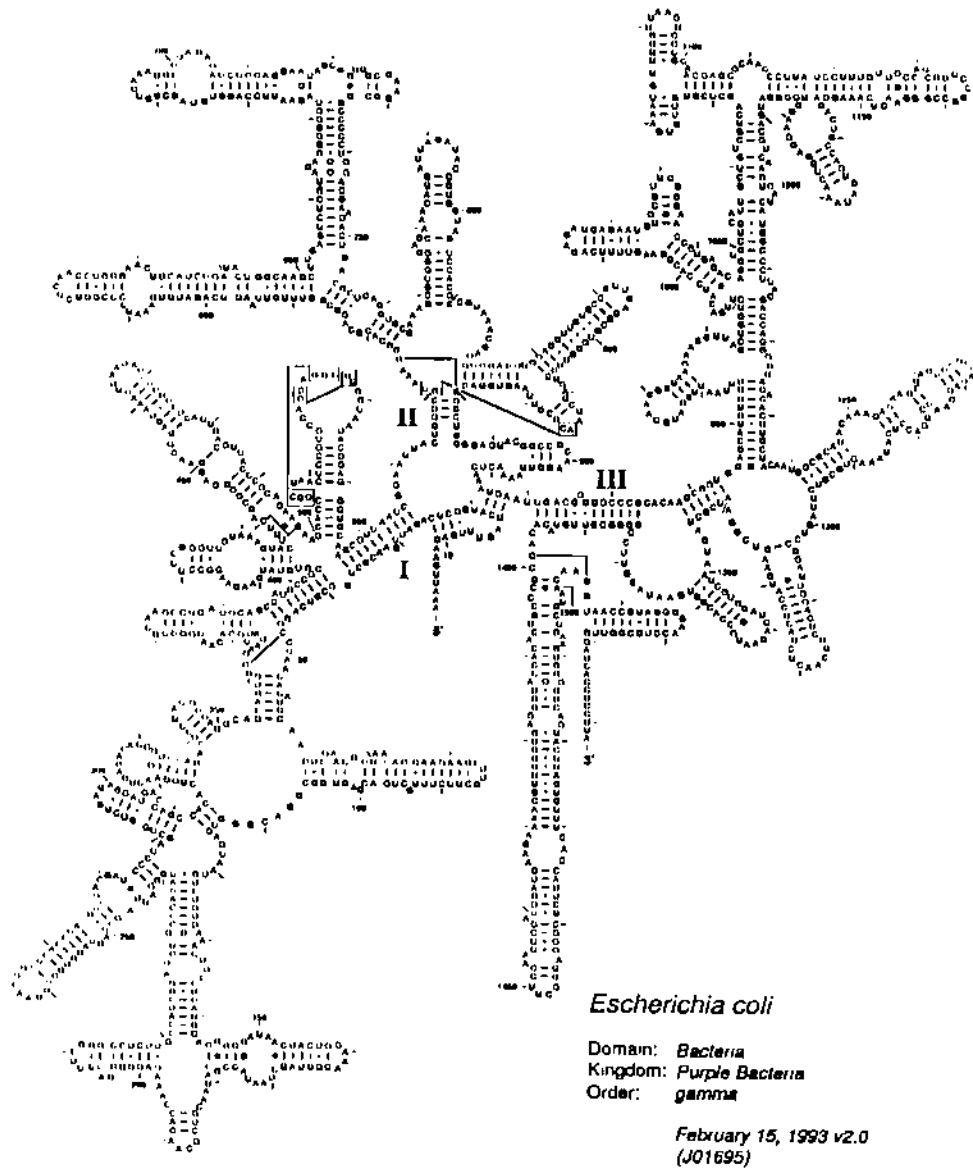


Figure 2. The secondary structure of *E. coli* 16S rRNA molecule (A) and schematic of the secondary structure (B), highlighting primary sequence domains of nearly universal conservation (thick lines), intermediate conservation (normal lines), or hypervariability (dashed lines). Numbers indicate the positions of nucleotides from the 5' end, according to the *E. coli* 16S rRNA sequence.

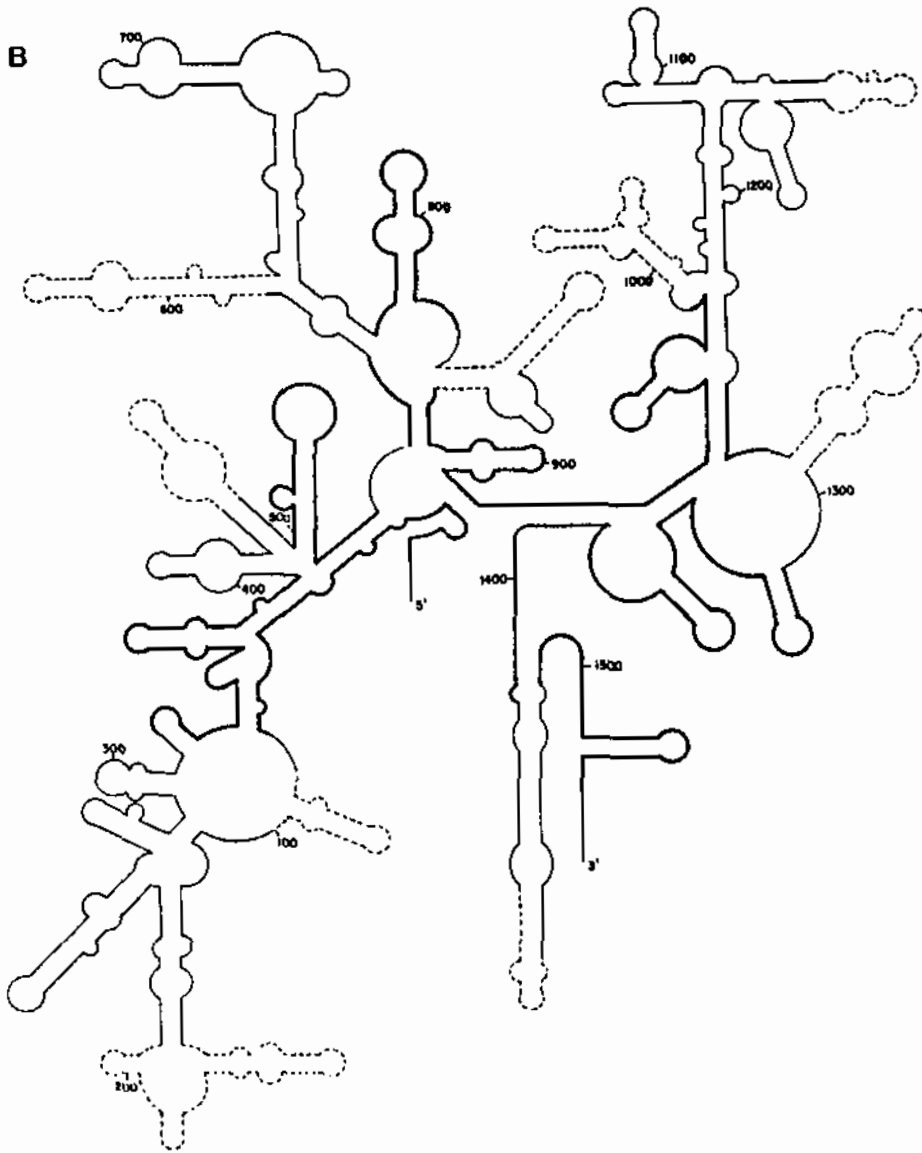


Figure 2.-Continued

염기서열을 결정하든지 아니면 RFLP (restriction fragment length polymorphism)와 같은 분석법을 이용하여 밝혀내는 것이다. 한 군집내의 미생물종의 다양성, 각 미생물종의 개체크기는 다양한 라이보솜의 형식 (ribotype)의 클론 개수와 그 빈도에 의해 측정될 수 있다. 이 방법은 배양 단계를 거치지 않지만 클론 라이브러리를 만들고, 탐색하는 과정의 많은 수고가 요구된다. 최근에는 이러한 수고를 덜기 위해 PCR후 클로닝 단계를 거치지 않고 핵산의 melting 특징을 이용한 DGGE/TGGE (denaturing (temperature) gradient gel electrophoresis), single-stranded 핵산의 형태적 차이를 이용한 SSCP (single strand conformation polymorphism) 방법 등이 개발되었다 (Fischer *et al.*, 1979; Felske *et al.*, 1998; Muyzer *et al.*, 1993; Schwieger and Tebbe, 1998). 이러한 방법들은 군집의 구조와 종다양성을 대략적으로 측정하는데 이용되고 있으나, 민감하지 않은 염색 기술로 인한 제한성과 미생물 군집을 이루고 있는 각각의 특이한 계통학적인 그룹에 관련된 정보는 제공해주지 못하는 단점이 있다. 최근에는 기존의 기술을 확장시켜 세균의 동정 및 복잡한 미생물 군집을 분석하기 위한 정량적인 방법인 말단제한절편다형성 (T-RFLP; terminal-RFLP)이 개발되었다 (Avaniss Aghajani *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 1998). 즉 RFLP (Restriction fragment length polymorphism; ARDRA; Amplified rDNA restriction analysis) 분석법을 발전시킨 것으로 PCR 과정시 형광물질로 표지된 primer ('3' 혹은 '5' 중의 하나)를 이용하여 rDNA를 증폭시킨 다음 4염기에 특이한 제한효소를 사용하여 핵산 조각을 얻고, 가능한 서로 다른 많은 종류의 형광 물질로 표지된 핵산 조각을 길이의 차이를 분별해 내기 위해 염기서열 결정용 폴리아크릴아마이드젤을 사용하여 자동염기서열 장치를 이용할 수 있도록 하였다. DGGE, SSCP 그리고 T-RFLP 방법들은 비교적 실험조작이 간단하고 동시에 여러 시료를 처리할 수 있다는 장점이 있어 미생물 군집의 시간적인 변화 및 동력학을 추적하는데 유용하다 (Fantroussi *et al.*, 1999).

분자 생태학 방법은 미생물 생태학 분야에서 강력하고도 중요한 방법이 되었으며 토양, 공생 생물, 병원성 미생물, 온천수, 심해저, 열수, 퇴적물, 해수등의 다양한 환경의 미생물 군집을 분석 연구하는데 이용되고 있다 (Barns *et al.*, 1994; Haddad *et al.*, 1995; Laguerre *et al.*, 1996; Fuhrman *et al.*, 1993; Weller *et al.*, 1991; Arahall *et al.*, 1996; Britschgi and Giovannoni, 1991; Chsholm *et al.*, 1988; Giovannoni, 1990; Schmidt, 1991). 그러나 강하구, 해양의 연안지역에 존재하는 미생물들은 생지화학적인 물질 순환 특히, 분해과정에 중요한 역할을 담당하고 있으며, 생물정화 기술 혹은 다른 생물공학적인 응용에 이용될 수 있는 잠재적 가치를 가지고 있음에도 불구하고 미생물의 군집구조는 그다지 잘 알려져 있지 않았다 (Gray and Herwig, 1996). 따라서 본 연구에서는 해양환경 특히 연안의 퇴적물에서의 미생물의 구조와 기능을 이해하기 위해서 분자 생태학 방법론을 구축하고 이를 실제의 해양 환경 시료의 미생물 군집 분석에 적용하였다.

제 2 장 재 료 및 방 법

2.1. 시 료 채 취 및 분 석

시료는 1998년 8월 12, 13일 양일에 걸쳐 경남 통영시 미륵도 앞바다에서 퇴적물을 채취하였다. 연구대상 지역은 육지에 가까운 연안 지역으로 가두리 양식장과 거리가 많이 떨어진 오염이 진행되지 않은 대조구 정점(D-1), 새로이 가두리 양식장이 설치되어 오염이 진행되는 정점(B-1), 그리고 오염이 상당히 진행된 오래된 양식장 지역의 정점(E-1)을 택하여 총 9개 정점을 선정하였다 (Fig. 3). 퇴적물은 van Veen Grab sampler를 이용하여 채취한 후 표층시료를 100 ml 용량의 멸균된 시료용기에 옮겨 담았다.

총세균수 측정을 위한 시료의 준비과정은 Dye(1983)의 방법을 부분적으로 변형하여 사용하였다. 총세균수의 측정을 위하여 1 ml의 시료를 19 ml의 5% formalin으로 현장에서 고정하였다. 고정된 시료를 vortex mixer로 1분간 잘 섞어준 후 1 ml를 취하여 0.01% Triton X-100이 함유된 99 ml의 여과 멸균된 해수와 함께 Two speed blender(Waring Co.)로 1분씩 2회 섞어주었다. 준비된 시료 0.5~1 ml를 0.2 μ m pore size의 polycarbonate filter(Nuclepore)로 여과한 다음 5mg/l의 DAPI용액 1 ml로 5분간 염색하였다(Fry, 1990). 염색이 끝난 후 형광현미경(Axioplan, Carl Zeiss Germany)하에서 최소 7화면 300개체 이상을 측정하여 총세균수를 구하였다.

종속영양세균수 측정을 위하여 시료를 적당한 농도로 희석한 후 3M사의 일반세균용 Petrifilm배지에 1 ml씩 농도별로 3장씩 접종하였다. 20 $^{\circ}$ C에서 2주일간 배양한 후 형성된 집락의 수를 계수하였으며 희석배수를 곱하여 종속영양세균수를 구하였다.

세균생산력은 14 C-leucine이 동화되는 양으로부터 측정하였다

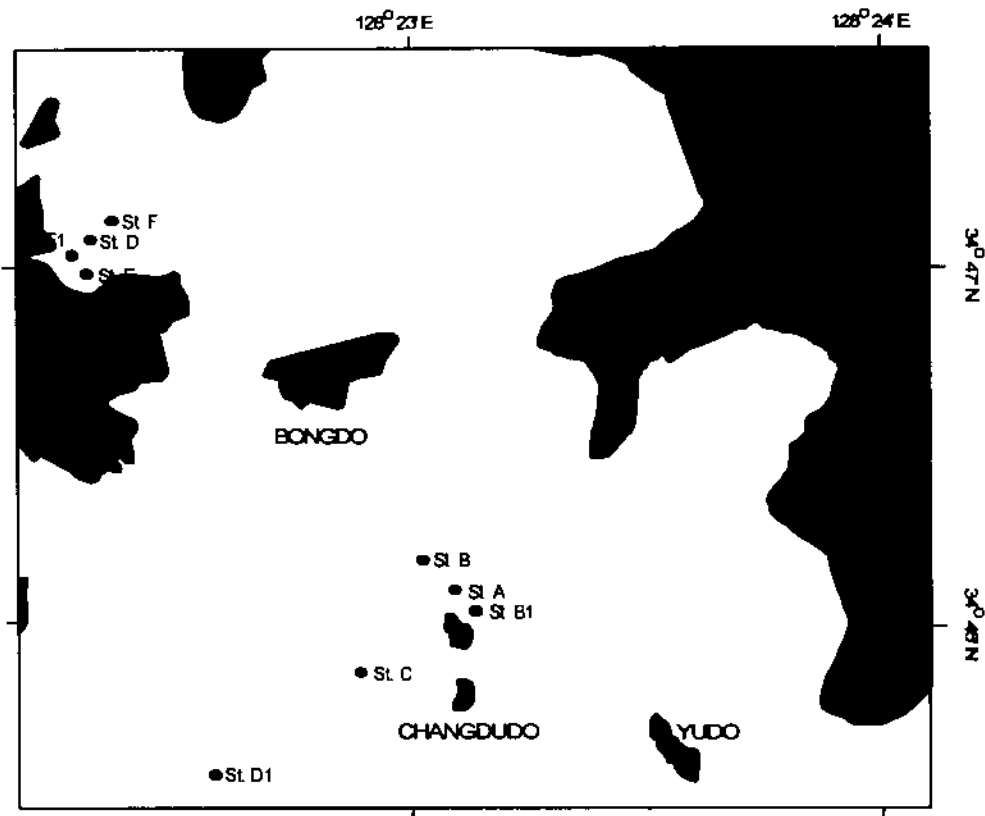


Fig. 3. A map showing study area and sediment sampling sites in the southern coast of Tongyeong, Korea.

(Kirchman, 1993). 시료 2 cm³를 취하여 17 ml의 멸균수에 희석하였다. 이 중 0.95 ml를 4개의 8 ml 용량의 vial에 준비한 후 기질로 ¹⁴C-leucine을 100 nM 농도로 첨가하였다. 1시간 후 formalin 100 μl를 첨가하여 배양을 중단시켰다. 배양에 앞서 1개의 vial에는 formalin 100 μl를 첨가하여 control로 삼았다. 배양이 끝난 시료는 0.2 μm의 막여과지로 여과 한 후 Liquid Scintillation Counter(Lackbeta II, Wallac)로 방사선량을 측정하여 기질전환율과 생산력을 계산하였다. 생산력 계산에 이용한 식은 다음과 같다 (Kirchman, 1993).

$$P = \text{Leucine} \times 131.2 \times 0.86 / 0.073$$

Leucine = Amount of leucine uptaked(pM/ml-sediment)

131.2 = Formula weight of leucine

0.86 = Carbon/protein ratio

0.073 = Fraction of leucine in protein

2.2. 해양퇴적물의 전체 핵산 (DNA) 추출

해양의 퇴적물 시료는 채취한 후, 현장에서 멸균된 주사기를 사용하여 약 0.5 ml씩 무균적으로 2.0 ml-용량의 미량원심분리용 Eppendorf 튜브 (508-GRD; QSP Co. USA)에 5개씩 분주하여 드라이아이스에 바로 얼리고 실험실로 운반 후, 핵산을 추출할 때까지 -70℃에서 보관하였다. 핵산을 추출하는 기본적인 방법은 Kuske *et al.*, (1998)의 것을 취하였다. 핵산 추출 과정의 시간을 단축하고 효율적인 수확을 위하여, 기존의 방법을 수정 혹은 새로운 과정을 추가하였다. 퇴적층 시료 0.5 ml이 들어있는 2.0 ml 용량의 미량원심분리용 튜브에 1.0 ml의 0.1 M sodium phosphate 완충용액 (pH 8.0)을 첨가한 후, 수초동안 vortexing하여, 퇴적층 시료를 분산 시켰다. 부

착된 미생물을 유리시키기 위해 튜브를 실온에서 초음파세척기 (Branson 8210; Branson Ultrasonics Corp. CT, USA)에서 3분간 초음파처리를 하였다. 퇴적층 분산액을 $12,000 \times g$ 에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 1.0 ml의 2×TENS 용액 (100 mM TrisHCl, 40 mM Na₂EDTA, 200 mM NaCl, 2% SDS, pH 8.0)에 분산시키고, 멸균된 glass beads (150-212 μ m, Sigma) 500 mg을 넣고 3 분간 bead-beating (BioSpec Products, Inc.; 3110BX)을 실시하였다. 핵산이 포함된 과쇄액을 $12,000 \times g$ 에서 10분간 상온에서 원심 분리하고 상층액을 새로운 튜브에 옮긴다. 동량의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 용액을 넣어주고, 튜브를 뒤집으며 섞어준 다음 $12,000 \times g$ 에서 5분간 원심 분리하여 층을 분리하였다. 페놀성분을 제거하기 위해 상층액 (약 0.9 ml)을 취하여 새로운 튜브에 넣어준 후, 동량의 chloroform 혼합용액 (chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1)을 첨가하여, 잘 섞어준 후 원심분리 ($12,000 \times g$, 5분)하였다. 다시 상층액 (약 0.8 ml)을 취하여 새로운 튜브에 옮긴 후, 동량의 isopropanol (-20°C)을 첨가하여, -20°C 에서 1시간 이상 방치하여, 전체 핵산을 침전시킨 후, 원심분리 ($12,000 \times g$, 15 분)하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 70% 에탄올 용액으로 세척하고 건조시켰다. Humic acid의 오염으로 인한 갈색의 핵산 침전물을 100 μ l의 TE 완충용액 (20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 녹인다음, RNA를 제거하기 위해 pancreatic RNase A (Sigma Chem. Co.)를 0.2 mg/ml 농도로 처리하여, 37°C 에서 1시간 반응시키고 -20°C 에서 보관하며, 이후 humic 물질을 제거하기 위한 핵산추출 시작시료로 사용하였다. PCR의 저해물질로 알려진 Humic 물질을 제거하기 위해 PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone; Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) microspin column을 이용하였다 (Lee *et al.*, 1998). 분말의 PVPP를 3 N HCl 용액으로 세척하고 증류수로 수회 세척하

고 다시 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액으로 세척하여 pH 8.0이 되도록 조정하고, PVPP slurry를 멸균 (121°C, 15 psi, 15 min) 하였다. PVPP microspin column을 만들기 위해 멸균된 Micro Bio-Spin Column (Bio-Rad Lab., Hercules, CA) 에 PVPP slurry를 약 1.0 ml 정도를 충전시킨 후, 12,000 × g 에서 1분간 상온에서 원심분리 하여 완충액을 제거한 후, 새로운 튜브에 컬럼을 옮기고 핵산 조추출액 (100 μl)을 loading 하여, 12,000 × g 에서 2 분간 원심분리 하여, 핵산을 수확하였다. 추출된 핵산은 0.8% 아가로즈젤 상에서 순도 및 양을 확인하였다.

2.3. 모델균집 및 핵산 분리

모델 미생물 균집은 6종의 세균종 (*Arthrobacter globiformis* str. 168 DSM 20124 (T) (KCTC 9101), *Bacillus megaterium* DSM 32 (KCTC 3007), *Bacillus subtilis* KCTC 3135, *Escherichia coli* ATCC 25922 (KCTC 1682), *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 (KCTC 1750), *Sphingomonas* KH3-2)으로 구성되어 졌다. 이들 세균 균주는 *Sphingomonas* KH3-2를 제외하고 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행 (Korean Collection for Type Cultures; KCTC)으로부터 분양을 받았다. 그리고 *Corynebacterium* IC-10 균주는 검출을 위한 시험균주로 이용하였다. 각 균주를 KCTC 매뉴얼에 따라 소량 (16 mm × 100 mm; 2 ml) 배양하고 Promega사의 Wizard Genomic DNA Purification System을 사용하여 genomic DNA를 분리하였다.

2.4. 16S rDNA 증폭 및 클로닝

세 가지의 해양 퇴적물 시료의 핵산 (B-1, D-1, E-1 정점)은 T RFLP 분석을 비교, 검증하기 위하여 블로팅과 염기서열결정을 실시하였다. 16S

rRNA 유전자를 증폭시키기 위하여 primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1522R (5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3')을 사용하였다 (Giovannoni, 1991). PCR 조건은 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% TritonX-100, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, primers 0.2 μ M, *Taq* DNA polymerase (Promega Corp., Madison, WI) 2.5 U, Template 약 100-10 ng으로 하고 반응 부피 50 μ l 용량으로 핵산증폭기 모델 2400 (PE Applied Biosystems)을 이용하여 94°C에서 5분간 반응 후, 94°C에서 1분 55°C에서 1분 72°C에서 2분으로 30회 반복 반응시킨후 72°C에서 7분간 더 반응시켰다. PCR 산물을 분석하기 위해 0.8% 아가로즈 겔에 PCR 반응액 5 μ l를 전기영동 (TAE 완충용액, 7.5 V/cm) 하여, EtBr (0.5 μ g/ml) 에 1 시간 염색하고 30 분간 탈색시킨 후 UV Eluminator (Vilber Lourmat, Cedex, France)로 관찰하였다.

PCR 반응후 아가로즈 전기영동한 후 16S rRNA 유전자에 해당하는 약 1.5 kb 크기의 DNA 절편을 PCR Preps DNA Purification System (Promega)을 이용하여 분리하였다. 분리된 DNA를 pGEM-T Easy Vector (Promega Corp.)에 ligation 한후 *E. coli* JM109에 형질전환시켜 형질전환체를 얻었다. 각각의 형질전환된 *E. coli* JM109의 배양액 (2 ml)으로부터 플라스미드 분리 kit (Wizard Plus SV Miniprep Kit; Promega)을 사용하여 플라스미드를 분리하였다. 각각의 분리된 플라스미드로부터 1.5 kb 크기의 DNA 절편이 벡터내에 존재하는지의 여부를 알기 위해 제한효소 *EcoRI* (Promega)로 처리하여 아가로즈 겔상에서 확인하였다.

2.5. T-RFLP of 16S rDNA

PCR 조건은 형광물질로 표지된 상위 primer의 사용과 primer 농도를 0.5 μ M로 조정하는 것 만 제외하고 위의 조건과 동일하게 하였다. 상위

primer는 27F primer의 5' 말단에 phosphoramidite dye인 5-hexachlorofluorescein 으로 표지된 HEX-27F를 제작 의뢰하여 사용하였다 (PE Applied Biosystems). Template는 각 균주의 분리된 핵산 (50 ng/ μ l)의 농도인 핵산을 100 μ l 반응 부피에서 2 μ l 사용), 핵산혼합물 (모델 세균군집; 각 균주의 핵산이 각각 50 ng/ μ l 씩 혼합된 핵산혼합물을 100 μ l 반응 부피에서 6 μ l 사용), 그리고 자연 시료의 핵산 (100 μ l 반응 부피에 약 100 ng)을 사용하였다. 모델 세균군집에 대해서 PCR 조건을 최적화하기 위해 annealing 온도는 50, 55, 60 $^{\circ}$ C에서 반응 반복 횟수는 25, 30, 35로 바꾸면서 PCR을 실시하였다. 이후 자연 시료의 PCR 조건은 55 $^{\circ}$ C에서 그리고 30 회 반복조건으로 하여 실시하였다. 형광물질로 표지된 PCR 산물 (100 μ l)을 Wizard PCR purification kit (Promega)를 사용하여 분리하였고 최종 부피는 50 μ l로 하였다. 분리된 PCR 산물 (균주의 genomic DNA 혹은 모델군집 시료의 분리된 PCR 산물은 5 μ l, 자연시료는 10 μ l)을 4 염기서열을 인지하는 제한효소 (Promega)로 최종 부피 20 μ l로 하여 제조사의 방법대로 처리하였다. 반응이 끝난 후 생성된 말단제한절편 (TRF: terminal restriction fragment)의 크기를 정확히 측정하기 위해 자동 염기서열장치 (모델 377; Applied Biosystems Instrument)를 사용하였다. 제한효소처리액 1 μ l와 loading용 용액 (deionized formamide : loading dye : DNA 절편 길이 standard(Rox 2500; ABI) = 10:1:1) 2 μ l를 섞어준다. 이때 사용된 형광물질로 표지된 DNA standard의 길이는 37, 94, 109, 116, 172, 186, 222, 233, 238, 269, 286, 361, 470, 490, 536, 827, 1,115, 1,181, 1,722, 2,008, 2,162, 2,465, 2,481, 2,860, 4,529, 5,099, 그리고 14,079 bp이다. 이 혼합액을 잘 섞어 주고 95 $^{\circ}$ C에서 2 분간 중탕하여 denature시키고 즉시 열음 위에 위치시킨다. 분석은 자동염기서열장치 ABI 377을 사용하여 혼합액 2.0 μ l를 36 cm 6% denaturing 폴리아크릴아마이드겔에 loading하고

GS Run 36D-2400 윤선으로 4시간 전개시킨 후 형광물질로 표지된 5' 말단 제한절편의 크기를 기준하여 GeneScan 프로그램을 이용하여 크기를 비교하여 결정하였다.

26. 핵산 정량

핵산의 정량은 260 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였고, $A_{260/280}$ 의 값으로 그순도를 확인하였다 (Sambrook *et al.*, 1989). Humic 물질의 오염으로 흡광도에 의해 핵산 정량이 어려운 경우 아가로즈 전기영동후 각 핵산의 밴드를 표준 핵산양과 비교하여 정량하였다.

제 3 장 연구결과 및 고찰

3.1. 해양퇴적물의 분석

저서환경에서 미생물의 분포와 활성에 영향을 주는 요인으로 유기물의 양과 수분함량, 입도 등의 요인을 들 수 있는데 이 중 조사정점의 입도 분포를 살펴보면 다음과 같다. 1998년 5월에 조사정점들에서 측정된 입도 분포를 보면 정점 C와 D1의 평균 입도는 각각 9.5phi와 9.6phi, silt와 clay의 함량이 90%를 넘는 세립질인 것으로 나타났으며 정점 A와 B의 경우에도 평균입도가 각각 9.4, 9.8phi로 유사한 수준을 보였다. 가두리가 위치하는 정점 B1에서는 평균 8.0phi의 입도를 보였는데 정점 B1에 가까운 정점들에서 상대적으로 sand의 함량이 높았으며 granule들도 부분적으로 포함되어 있었다. 특히 정점 B1의 경우 양식장 설치 이후 사질에서 사니질로 조성이 변하고 있는 것으로 나타났다(해양수산부, 1998).

조사정점 전체의 총세균수는 $5.84 \times 10^{10} \sim 1.58 \times 10^{11}$ cells/cm²-sed.의 분포범위를 보였다(Fig. 4). 설치된지 2년 이내인 가두리가 있는 정점 B1을 중심으로 한 정점들의 표층에서는 $6.03 \times 10^{10} \sim 1.01 \times 10^{11}$ cells/cm²-sed.의 총세균수 분포를 보였으며 오래된 가두리인 정점 E1을 중심으로 한 정점들의 경우 표층의 총세균수가 $8.72 \times 10^{10} \sim 1.58 \times 10^{11}$ cells/cm²-sed.의 분포를 보여 표층의 경우에는 전체 정점에서의 총세균수 분포범위와 큰 차이를 볼 수 없었다. 상대적으로 정점 E1 주변에서 정점 B1 주변보다 높은 세균수의 분포를 보였으나 그 차이는 크지 않았다.

깊이에 따른 총세균수의 분포를 보면 양식장에서 멀리 떨어진 정점인 정점 D1에서는 $7.47(1\sim 2\text{cm}) \times 10^{10} \sim 1.41(4\sim 6\text{cm}) \times 10^{11}$ cells/cm²-sed., 정점 B1에서 $5.84(2\sim 3\text{cm}) \sim 9.22(3\sim 4\text{cm}) \times 10^{11}$ cells/cm²-sed.의 분포를 보였으며 정점 E1에서는 $8.72(0\sim 1\text{cm}) \times 10^{10} \sim 1.45(4\sim 6\text{cm}) \times 10^{11}$

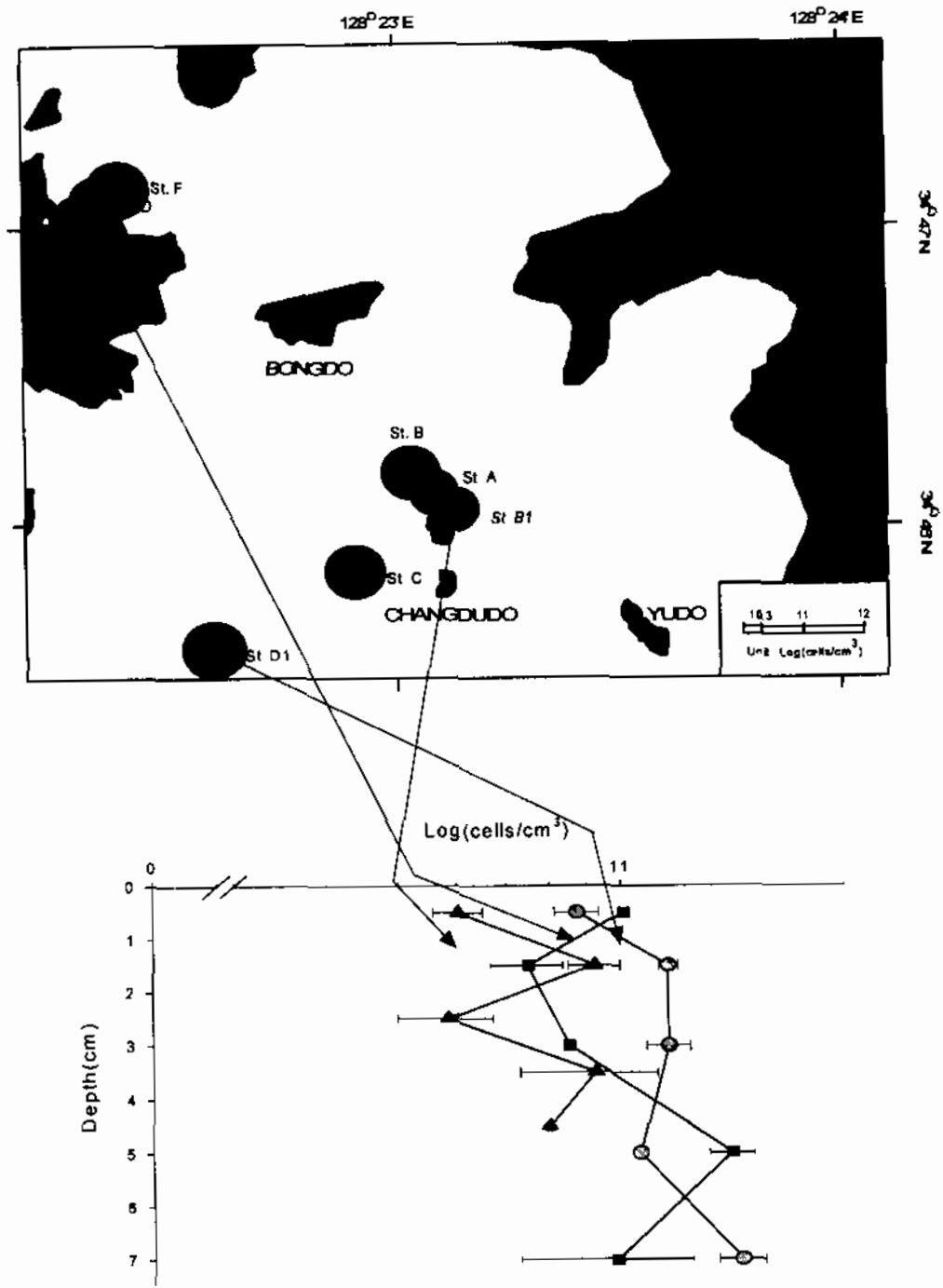


Fig. 4. Distribution of total bacterial number at each site of study area.

cells/cm³-sed.의 분포를 보여 가장 높은 총세균수의 분포를 보였다. 깊이에 따른 총세균수의 분포경향을 보면 정점 D1에서는 5 cm깊이에서 최고치를 보였지만 깊이에 따른 증감현상은 뚜렷하지 않았다. 반면 정점 B1과 E1에서는 표층에서 상대적으로 총세균수가 적고 깊이가 깊어지면서 증가하는 경향을 보였다.

조사정점 전체의 종속영양세균수는 $4.00 \times 10^4 \sim 1.80 \times 10^6$ CFU/cm sed.의 분포범위를 보였다(Fig. 5). 정점 B1을 중심으로 한 정점들의 표층에서는 $1.83 \sim 6.67 \times 10^5$ CFU/cm³-sed.의 종속영양세균수 분포를 보였으며 정점 E1 부근의 정점들에서는 $1.00 \sim 4.53 \times 10^5$ CFU/cm³-sed.의 분포를 보여 정점 B1 부근의 정점들에서 조금 높은 편이었다. 가두리양식장이 위치한 정점 B1주변에서는 양식장에서의 거리가 멀어질수록 종속영양세균수가 감소하는 경향을 보여 가두리양식장이 유기물의 공급원 역할을 하고 있는 것으로 생각된다. 반면에 정점 E1 주변에서는 양식장에서의 거리가 멀어질수록 종속영양세균수가 많은 것으로 나타났다. 정점 E1에서는 퇴적물에서 황화수소가 지속적으로 발생하고 있는 것을 관찰할 수 있었는데 이미 황산염환원과 같은 무산소호흡과정을 통해 에너지를 얻는 미생물들이 우점하고 있는 것으로 생각된다. 본 실험과정에서는 시료를 유산소 상태에서 처리하였는데 이 과정에서 절대혐기성세균은 사멸하였을 것으로 생각되며 그 결과 오랜 기간동안 유기물오염이 지속된 정점 E1 부근에서는 양식장과 거리가 멀어질수록 호기성의 종속영양세균이 생존할 수 있는 가능성이 높았던 것으로 생각된다.

깊이별 분포를 보면 정점 D1에서 깊이에 따라 $4.00 \times 10^4 \sim 1.93 \times 10^5$ CFU/cm³-sed., 정점 B1에서 $6.85 \times 10^4 \sim 1.80 \times 10^6$ CFU/cm³-sed.의 분포를 보였으며 정점 E1에서는 $6.73 \times 10^4 \sim 2.97 \times 10^5$ CFU/cm³-sed.의 분포를 보였다. 정점 E1의 경우에는 총세균수의 경우와 마찬가지로 깊이

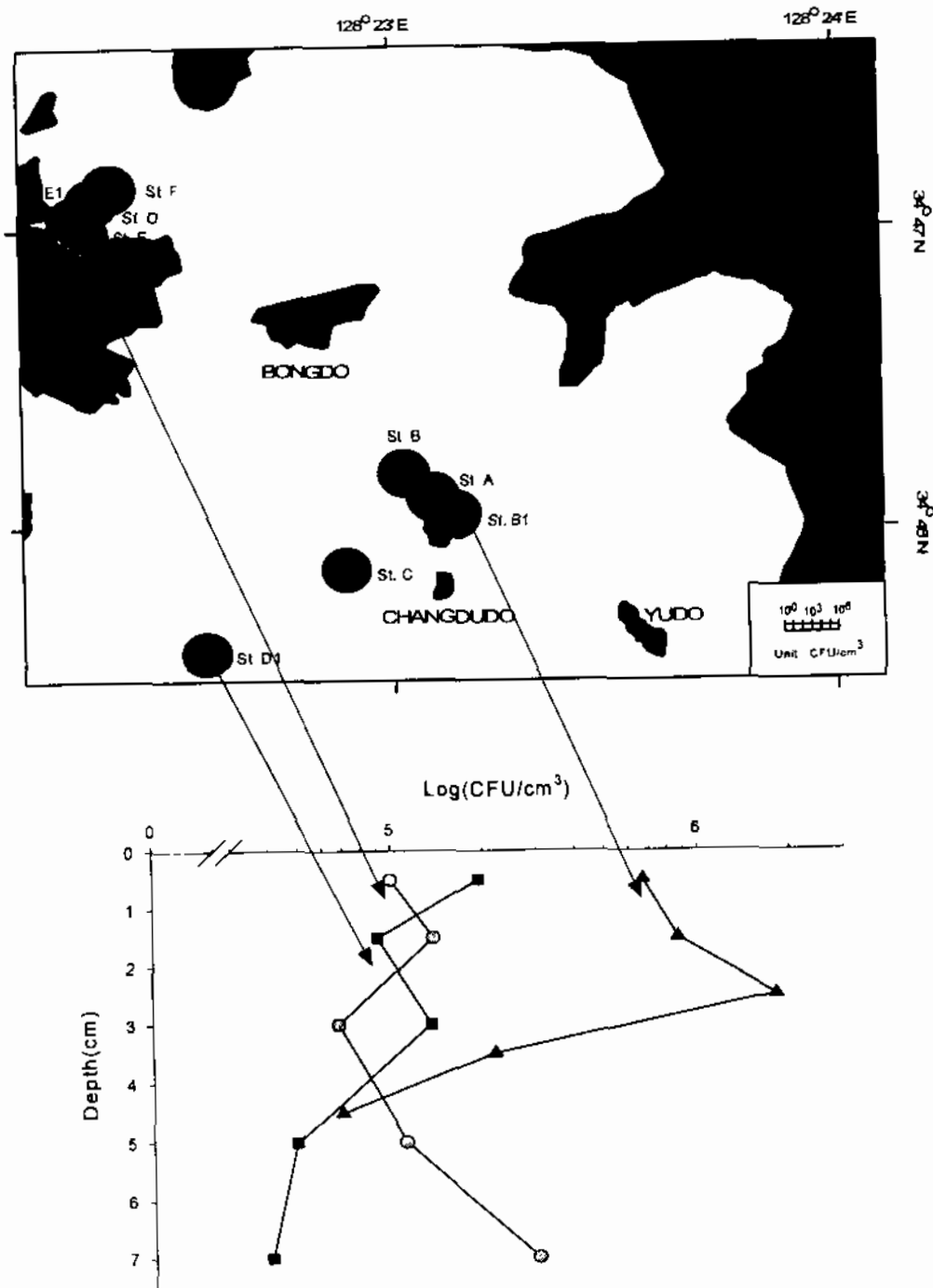


Fig. 5. Distribution of viable bacterial number at each site of study area.

가 증가함에 따라 종속영양세균수가 증가하였으나 정점 D1과 B1에서는 3 cm 이상의 깊이에서는 깊어질수록 종속영양세균수가 감소하는 경향을 보였다. 크기에 있어서는 오염이 안 된 정점 D1과 오염이 오래 지속된 정점 E1에 비해 새롭게 오염이 시작된 정점인 B1에서 가장 많은 종속영양세균수를 보였다. 정점 D1의 경우에는 이용가능한 유기물의 양이 상대적으로 적어 종속영양세균수가 적게 나온 것으로 생각된다.

표층 퇴적도의 종속영양세균수는 $1.3 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^7$ CFU/g-dry wt. 수준을 보인 1996년 8월의 대부도갯벌(권 등, 1998), 1.2×10^5 CFU/g-dry wt. 수준을 보인 서천연안퇴적토(최와 이, 1996), $1.7 \times 10^7 \sim 1.7 \times 10^9$ CFU/g-dry wt.의 분포를 보인 낙동강 하구(김 등, 1985)와 남해퇴적토에서 측정된 $3.0 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^7$ CFU/g-dry wt.(김과 이, 1992) 등에 비해 낮은 편에 속했으며 $6.7 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$ CFU/g dry wt.의 분포를 보인 금강하구(이, 1986)에 비해서는 조금 높은 수준의 분포를 보였다.

조사정점 전체의 세균생산력은 $2.18 \sim 13.61 \mu\text{g-C}/\text{cm}^2\text{-sed./hr}$ 의 분포 범위를 보였다(Fig. 6). 정점 B1을 중심으로 한 정점들의 표층에서는 $4.88 \sim 13.61$ (평균 9.43) $\mu\text{g-C}/\text{cm}^2\text{-sed./hr}$, 정점 E1 부근의 정점들에서는 $6.41 \sim 11.28$ (8.45) $\mu\text{g-C}/\text{cm}^2\text{-sed./hr}$ 의 세균생산력을 보여 정점 B1을 중심으로 한 정점들에서의 세균생산력이 조금 더 높게 나타났다. 종속영양세균수의 분포와는 달리 세균생산력은 양식장과의 거리가 멀어질수록 상대적으로 높은 생산력을 보였다. 깊이에 따른 생산력의 분포는 정점 D1에서 $2.48 \sim 12.54 \mu\text{g-C}/\text{cm}^2\text{ sed./hr}$, 정점 B1에서 $5.94 \sim 11.35 \mu\text{g-C}/\text{cm}^2\text{-sed./hr}$ 의 분포를 보였으며 정점 E1에서 $2.18 \sim 12.14 \mu\text{g-C}/\text{cm}^2\text{ sed./hr}$ 의 분포를 보여 정점 B1과 E1의 경우 깊이 3 cm 이내에서의 세균생산력이 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 정점 B1의 세균생산력 분포경향은 종속영양세균수의 분

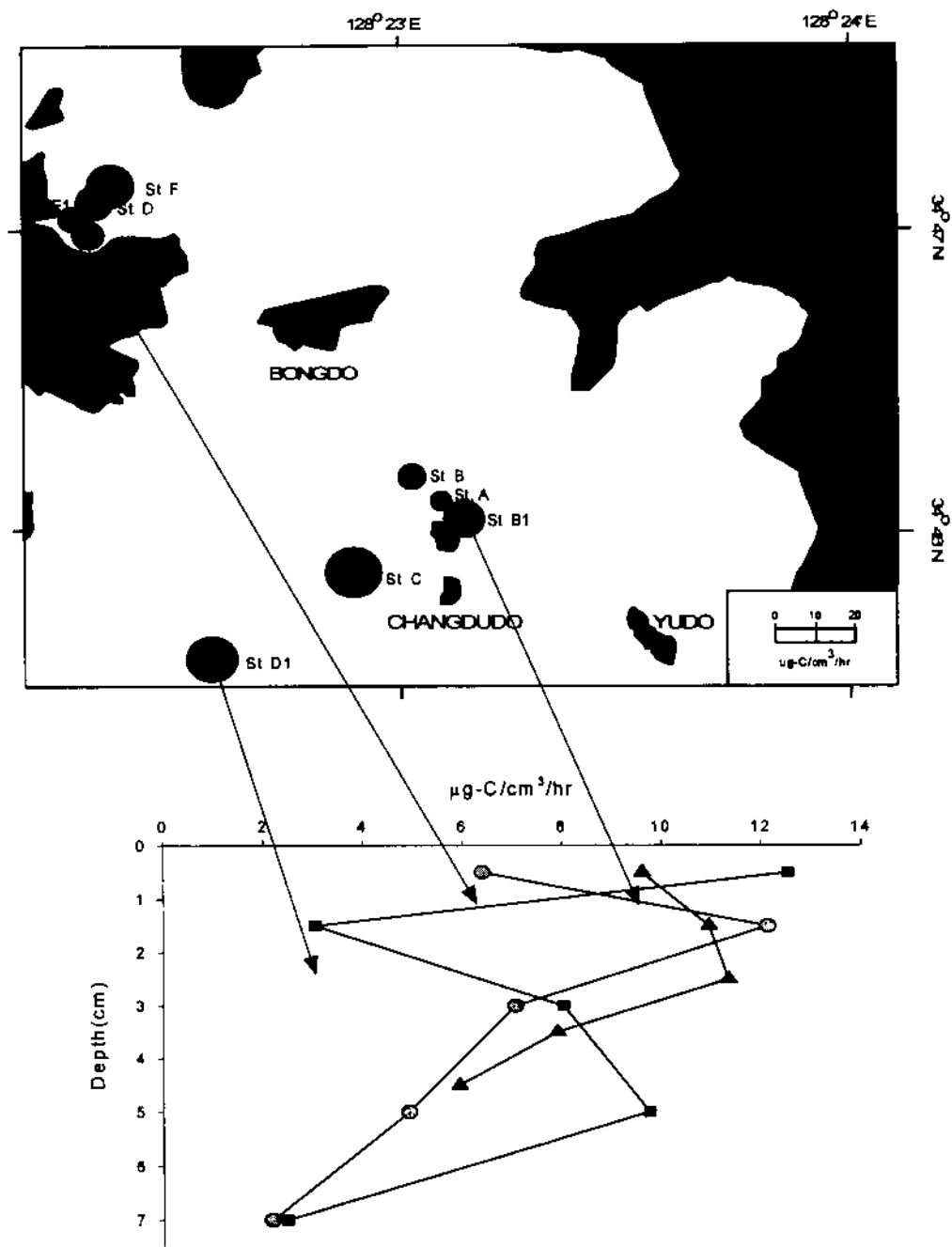


Fig. 6 Distribution of bacterial productivity at each site of study area measured by the method of ¹⁴C-leucine incorporation.

포와 유사한 경향을 보였으나 정점 E1의 경우에는 깊이가 깊은 곳에서 총 세균수, 종속영양세균수가 증가하는 것과는 달리 3 cm보다 깊어지면 생산력이 감소하는 것으로 나타나 차이를 보였다. 정점 D1의 경우에는 세균생산력의 분포경향이 총세균수와 비슷한 경향을 보였는데 5 cm 깊이에서도 상대적으로 높은 생산력을 보였다.

1995년 통영에 위치하는 한국해양연구소의 시험양식장 저층에서 측정된 결과에 따르면 양식장 저층으로 유입되는 입자성 유기물의 양은 $3.2 \text{ g C} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$ 에 이르며 이 중 약 60% 정도가 퇴적되는 것으로 나타났으며 이들 유기물을 분해하는 과정에서 24시간 이내에 주변해수의 무산소화를 초래하는 것으로 밝혀졌다(심 등, 1997). 또한 Wellsbury 등(1996)은 무산소호흡을 통해 에너지를 얻는 세균들의 경우 유기물 분해력은 높지만 산소호흡을 통해 성장하는 세균에 비해 생산력이 떨어짐을 보고한 바 있다. 본 조사정점들에서도 유기오염의 지속정도에 따른 세균의 군집구조 변화가 총세균수 및 종속영양세균수의 분포와 생산력 분포에 영향을 미치고 있는 것으로 생각된다.

3.2. 모델미생물군집의 말단제한절편(terminal restriction fragment) 분석

말단제한절편 길이의 차이를 이용한 미생물종의 동정의 가능성을 확인하기 위해, 기존에 16S rDNA 염기서열이 알려진 7종의 세균에 대해 5가지의 4염기 인지 제한효소에 의한 5' 말단제한절편의 길이를 예상하고, 실제의 관찰된 값을 비교하고자 하였다. 세균종 *Arthrobacter globiformis* str. 168 DSM 20124 (T), *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* str. 168, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071의 16S rRNA 염기서열은 RDP (Ribosomal database project)에서 취하였고, *Sphingomonas* sp. KH3-2, *Corynebacterium* sp. IC-10의 경우 본 연구실

에서 16S rDNA의 염기서열이 결정되었다.

PCR시 primer는 27f와 1522r로 많은 연구자들에 의해 자연환경시료에서 16S rRNA 유전자 클론을 얻을 때 사용되는 것으로 본 말단제한절편분석법의 효능을 판단하기 위해 클로닝 및 염기서열결정의 분석법과의 비교를 위해 같은 primer 세트를 이용하였다. 이용된 primer 세트의 염기서열과 각 세균종의 16S rDNA 염기서열을 정렬하여 비교하였다 (표 2). 그 결과 전위 primer인 27f의 경우 20 mer중 하나의 mismatching (A/C)이 존재하였고, 후위 primer는 20-mer에서 하나의 mismatching이 존재하였으며 primer에 의한 선택적 핵산증폭을 방지하기 위해 degenerate primer 27f와 1522r을 이용하였다.

사용된 제한효소는 4염기를 인지하는 5종 (*AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *MspI*, *RsaI*)으로 Liu 등(1997), Brunk 등(1996)과 Moyer 등(1996)에 의해서 컴퓨터 시뮬레이션을 이용한 분석에 이용되었고, 그 결과로 5' 말단절편의 길이에 기초한 각 세균종에 대한 분리력이 우수한 효소를 선택하였다. 표 3에서는 분석에 이용된 제한효소와 각 효소의 인지서열을 정리하였다.

각각의 세균은 순수배양 후, genomic DNA를 분리하여, primer 쌍 (형광물질 HEX로 5' 말단에 표지된 27f 와 1522r)을 이용하여 16S rDNA를 증폭하고, 분리된 PCR 산물을 5 가지의 4 염기-인지 제한효소를 처리하였다. 이 각각의 반응액을 형광물질로 표지된 내부표준물질(Rox 2500; Perkin Elmer)과 함께 자동염기서열장치 (ABI Prism 377, PE Applied Biosystems)와 GeneScan 모듈 (version 3.1)을 이용하여 5' 말단의 길이를 결정하였다. 분석의 한 예로 6종의 세균에 대한 16S rDNA PCR 산물에 대해 제한효소 *AluI*로 처리된 시료의 분석 결과를 그림 7에 나타내었다.

이러한 방법으로 모델세균군집에 이용된 각 세균에 대해 5종의 제한효소로 16S rDNA PCR 산물의 말단제한절편(terminal restriction fragment)

Table 2. Alignment of sequences of amplimers 27f and 1522r with database sequences of 16S rRNA genes of strains used for model community.

Strain	27f	1522r
	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'	
<i>Arthrobacter globiformis</i> str. 168 DEN 20124 (T)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	TGCGGCTGGATCACCTCCTT
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	NA ^a
<i>Bacillus subtilis</i> str. 168	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	TGCGGCTGGATCACCTCCTT
<i>Escherichia coli</i>	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	TGCGGTTGGATCACCTCCTT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	TGCGGCTGGATCACCTCCTT
<i>Sphingomonas</i> KB3-2	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	TGCGGCTGGATCACCTCCTT
<i>Corynebacterium</i> IC-10	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	TGCGGCTGGATCACCTCCTT
		3' ACRCNACCTAGTGGAGGA5'

a; NA, not available

Table 3. The tetrameric restriction enzymes and their recognition sites used for terminal-RFLP analysis.

Restriction enzymes	Recognition sites (5'→3')
<i>AluI</i>	AG▼CT
<i>HaeIII</i>	GG▼CC
<i>HhaI</i>	GCG▼C
<i>MspI</i>	C▼CGG
<i>RsaI</i>	GT▼AC

▼ : restriction site

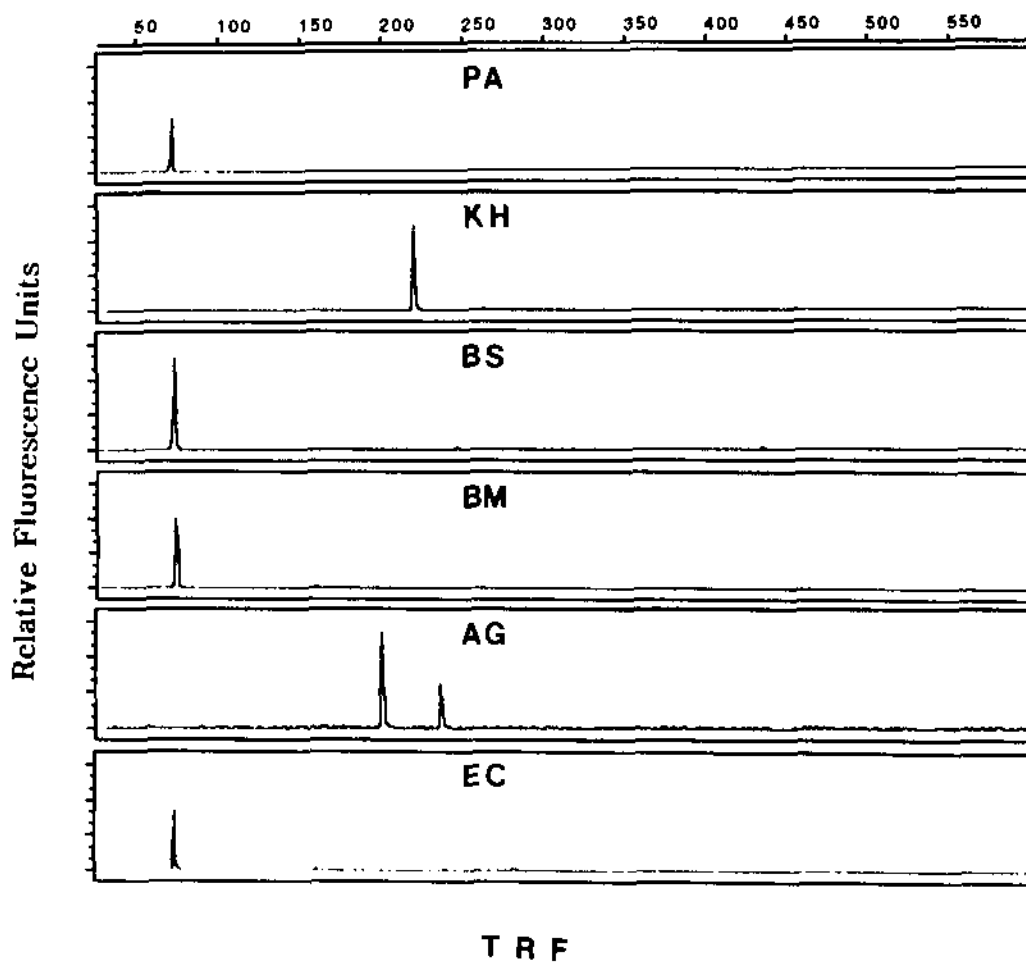


Figure 7. Electropherograms of the 5'-TRF for *AluI* digestions of 16S rDNAs amplified from each genomic DNA of six bacterial strains consisting model community.

PA; *Pseudomonas aeruginosa*, KH; *Sphingomonas* sp. KH3-2, BS; *Bacillus subtilis*, BM; *Bacillus megaterium*, AG; *Arthrobacter globiformis*, EC; *Escherichia coli*.

길이를 결정하였나 (표 4). 예상되는 말단제한절편의 길이는 38 염기에서 839 염기로 나타났으며, 실제 측정된 길이는 -1에서 +5 염기의 편차 이내에서 모두 일치함을 알 수 있었다. 가장 큰 +5 편차를 나타낸 경우는 *Pseudomonas aeruginosa*의 16S rDNA의 PCR 산물로 예상 크기는 644 bp 이었으나, 실측 값은 649 bp이었다. 이경우를 제외하면, -1에서 +3 염기 편차내에서 예상값과 실험값이 일치하였고, 각 균주와 제한효소의 35 경우 중 17 경우 (48.6%)가 편차 없이 일치하였다.

표 4에서 보듯이 두 경우에 (*Arthrobacter globiformis*에서 제한효소 *AluI*, *Bacillus subtilis*에서 *RsaI* 효소의 경우) 예상되는 말단제한절편이외에, 비록 주요 피크보다 형광강도는 낮지만 또 다른 절편의 피크가 동정되었다. 이러한 비 특이적 피크는 T-RFLP를 이용한 미생물군집의 분석에서 다른 종류의 미생물이 존재한다고 잘못 인지 될 수 있기 때문에 이러한 비 특이적 제한절편이 생기지 않도록 해야 한다. 이러한 비특이적 절편의 생성의 이유는 크게 세가지로 추정할 수 있다. 첫째로 각 세균이 균일하지 않은 16S rRNA 유전자를 가질 가능성이 (heterogeneity of 16S rRNA gene sequences) (Pettersson 등, 1994; Wang *et al.*, 1997). 즉 하나의 균주가 서로 다른 16S rDNA 염기서열을 가지는 경우로 자연계에 존재하는 모든 세균의 heterogeneity를 다 조사할 수 없기 때문에 이 문제를 해결할 방법은 지금의 방법으로는 불가능하다. 다만 계속 축적되는 데이터베이스를 활용하면 어느 정도의 해석은 가능할 것이다. 그리고 이 결과를 역으로 이용한다면 T-RFLP 방법을 활용하여 세균의 16S rDNA 염기서열의 heterogeneity를 조사하는 것이 가능할 것이다. 두 번째의 가능성은 실제 실험 조건에서도 관찰되었듯이, 불완전한 제한효소의 반응으로 5' 말단으로부터 제 2의 인지서열에서 잘리어지는 경우로 생각할 수 있다. 특히, 제 2의 제한절편이 예상되는 길이보다 길어지는 경우로 *Arthrobacter globiformis*에서 제한효

Table 4 Observed and expected lengths of 5'-terminal restriction fragment (5'-TRF) for bacterial strains in model microbial community.

Strain	Woese grouping	Observed (expected) 5' TRF(s) in base ^a				
		<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>
<i>Aerobacter globiformis</i> KCTC9101	Gram positive, high G+C	201, 237(201)	229(229)	474(472)	67(67)	459(456)
<i>Bacillus megaterium</i> KCTC 3007	<i>Bacillus-Lactobacillus-</i> <i>Streptococcus</i> subdivision	75(74)	234(233)	581(578)	167(167)	461(458)
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC3135	<i>Bacillus-Lactobacillus-</i> <i>Streptococcus</i> subdivision	74(73)	310(308)	241(239)	145(144)	458 , 477(455)
<i>Escherichia coli</i> KCTC1682	γ - <i>Proteobacteria</i>	75(75)	38(39)	373(373)	497(496)	430(427)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1750	γ - <i>Proteobacteria</i>	73(72)	38(39)	155(155)	143(143)	649(644)
<i>Shingomonas</i> sp. KIB-2	α - <i>Proteobacteria</i>	220(220)	239(239)	82(82)	150(150)	839(839)
<i>Orynebacterium</i> sp. IC-10	Gram positive, high G+C	218(218)	67(67)	369(366)	163(163)	82(82)

a; Bold numbers denote main peak.

소 *AluI* 처리에서 제 2의 절단 위치에 의해 237 bp의 절편이 생길 수 있는 것으로 예상되어 이의 결과는 불완전한 제한효소의 반응으로 유래되었을 가능성도 있는 것으로 보여진다. *Bacillus subtilis*에서 *RsaI* 효소의 경우에서도 마찬가지로 제 2의 예상되는 절편 (474 bp)과 비슷한 절편 (477 bp)이 관찰되었다. 비록 이러한 추정을 확인할 수는 없지만, 제한절편말단분석법을 이용할 때, 제한 효소의 반응시 완전 반응조건을 만족시키는 주의가 요구된다. 셋째는 핵산중폭반응시 발생하는 하이브리드 PCR 산물에 의한 것으로 이에 대한 토의는 뒤에서 언급이 될 것이다.

3.3 모델미생물군집의 분석

분석하고자 하는 핵산 시료는 자연환경에서 얻어지는 것으로 세균류, 균류 그리고 다양한 진핵생물로부터 유래된 핵산을 포함하고 있다. 따라서 여러 가지의 genomic DNA가 존재하기 때문에 이의 영향을 보기 위해 위에 사용된 각 genomic DNA를 혼합하여 모델군집을 조성하였다. 모델미생물군집은 6가지의 세균종, *Arthrobacter globiformis* KCTC9101, *Bacillus megaterium* KCTC3007, *Bacillus subtilis* KCTC3135, *Escherichia coli* KCTC1682, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC1750, *Sphingomonas* sp. KH3-2에서 분리된 genomic DNA (각각의 농도를 50 $\mu\text{g/ml}$)를 동량씩 혼합하여 만들어 졌다. 결과적으로 DNA의 농도는 50 $\mu\text{g/ml}$ 이고 각 세균종의 genomic DNA 농도는 약 8 $\mu\text{g/ml}$ 이다. 균질하지 않은 혼합된 핵산에 대해 핵산의 양에 따라 PCR에 의해 각각의 세균종에 특이한 피크의 생성 및 각 피크의 상대적인 비율을 비교하고자 하였다. 이를 위해 모델미생물군집에 대해 다양한 조건에서 PCR후, 제한효소 *HhaI*으로 처리된 말단제한절편의 길이의 다형성을 분석하였다.

3.3.1. PCR시 annealing 온도의 영향

PCR 조건의 최적화를 위해 3가지의 서로 다른 annealing 온도 (50, 55, 60°C)에서 PCR을 행한후 각 PCR 산물에 대해 *HhaI*으로 처리하고 말단제한절편의 길이의 다형성을 비교하였다 (그림 8). 그림에서 보듯이 6가지의 세균종에 대한 각각의 말단제한절편의 피크가 확인되었고 PCR의 annealing 온도를 달리하였을 때 각 피크의 양상은 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 온도에 상관없이 각 세균종에 대한 피크의 상대적인 높이는 크게 차이남을 알 수 있었다. 즉 가장 낮은 형광강도를 보인 경우는 *A. globiformis*이며, *B. subtilis*의 경우 가장 높은 형광강도를 보여주었다. 이러한 차이가 핵산증폭반응시 선택적인 PCR에 의한 결과인지를 뒤에서 분석하였다. 이 결과로부터 PCR시 큰 영향을 미칠 수 있는 주요한 요인인 annealing 온도의 영향을 분석한 결과, 큰 차이는 발견되지 않았지만, 다른 연구자들이 흔히 이용하는 55°C를 사용하기로 결정하였다.

3.3.2. PCR의 반응반복수의 영향

PCR 조건의 최적화를 위해 모델세균군집의 핵산에 대해 3가지의 서로 다른 반응반복수 (25, 30, 35회)에서 PCR을 행한후 각 PCR 산물에 대해 *HhaI*으로 처리하고 말단제한절편의 길이의 다형성을 비교하였다 (그림 9). PCR 반응반복 횟수가 증가함에 따라 말단제한절편 길이의 다형성은 큰 차이가 없었다. 생성된 각 피크의 형광강도의 경우도 *B. subtilis*의 피크인 240 base의 형광강도가 906 (25회), 815 (30회) 그리고 1033 (35회)로 증감되는 양상없이 비슷하였다. 다만 PCR 반응반복 횟수가 증가함에 따라 각 세균종을 나타내지 않는 비특이적 피크가 증가 (600 base 이하의 피크수가 13개 (25회), 14개 (30회), 그리고 17개 (35회))되는 경향을 보여주었다. 따라서, PCR 반응반복수의 증가가 PCR 산물이 증가되는 결과를 나타내지 않

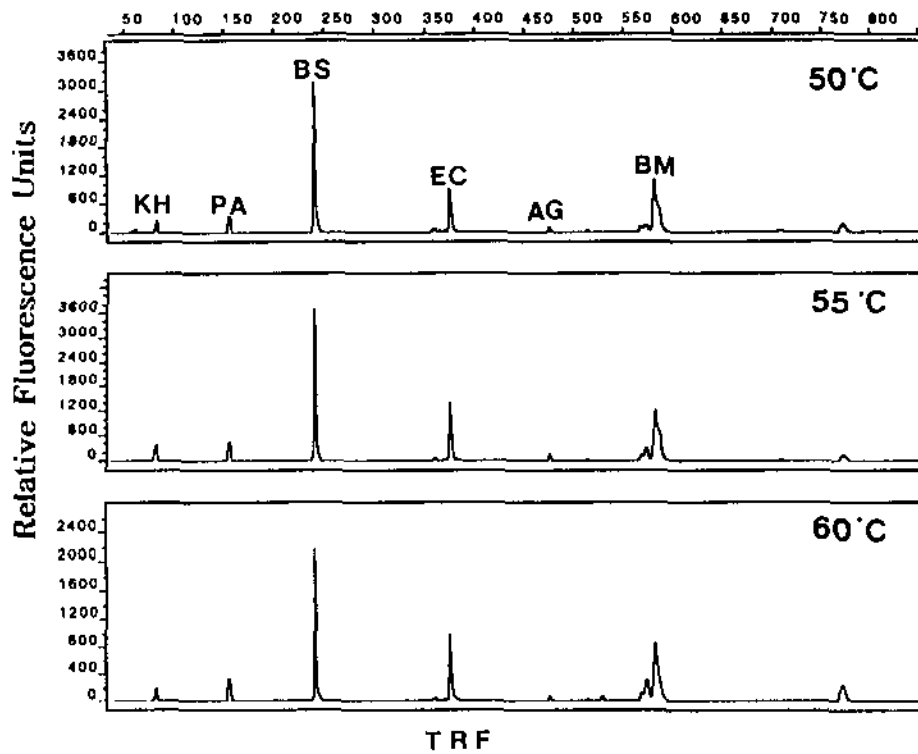


Figure 8. Effect of PCR annealing temperature on the 5' T-RFLPs for *HhaI* digestions of 16S rDNAs amplified from bacterial model community (mixture of genomic DNA from each six bacterial strains consisting model community). PA: *Pseudomonas aeruginosa*, KH: *Sphingomonas* sp. KH3-2, BS: *Bacillus subtilis*, BM: *Bacillus megaterium*, AG: *Arthrobacter globiformis*, EC: *Escherichia coli*.

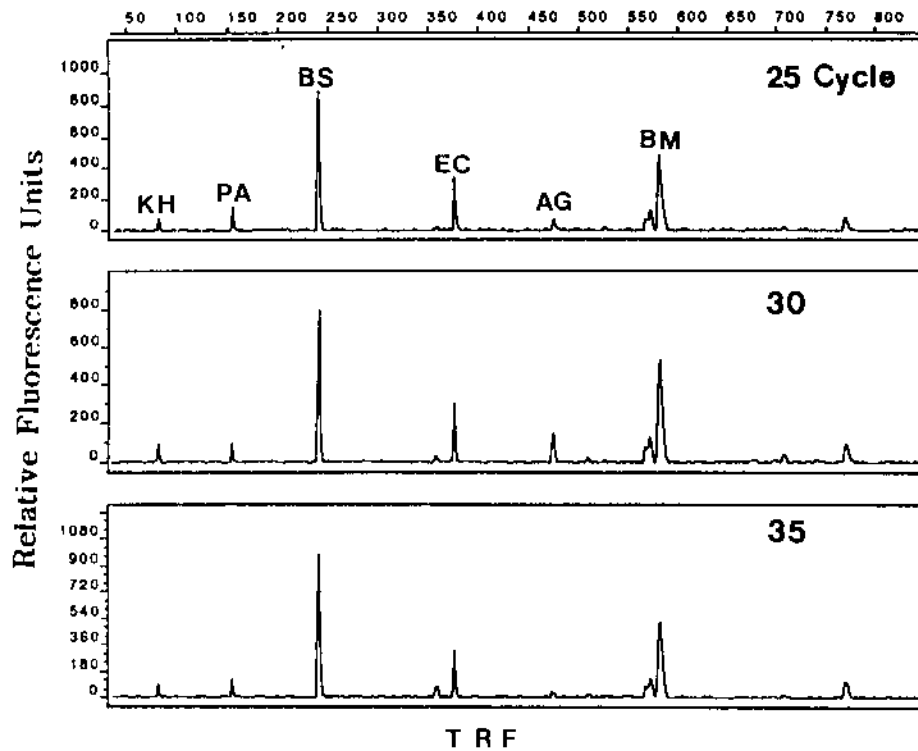


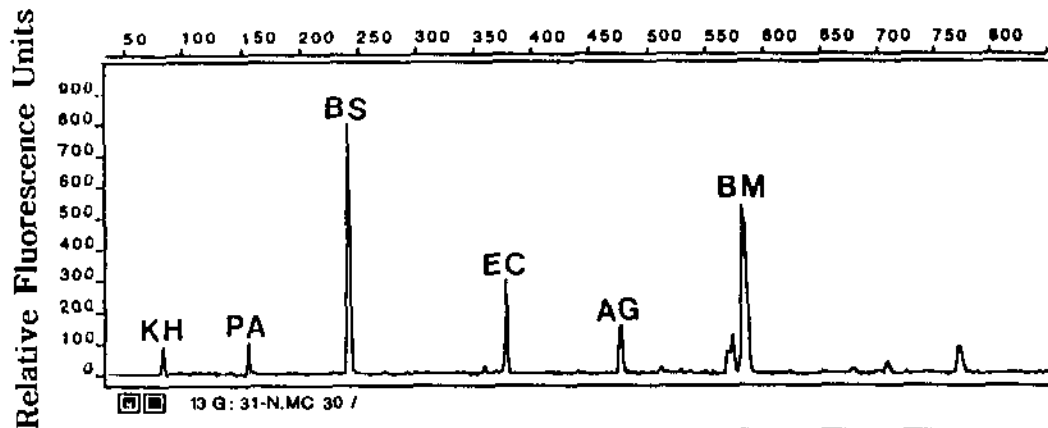
Figure 9 Effect of PCR cycle numbers on the 5' T-RFLPs for *HhaI* digestions of 16S rDNAs amplified from bacterial model community (mixture of genomic DNA from each six bacterial strains consisting model community).

PA *Pseudomonas aeruginosa*, KH; *Spingomonas* sp. KH3-2, BS; *Bacillus subtilis*, BM. *Bacillus megaterium*, AG; *Arthrobacter globiformis*, EC; *Escherichia coli*

으며, 오히려 비특이적 핵산증폭반응이 일어날 수 있음을 보여주어, 본 연구에서는 최적 반응반복수를 30회로 정하였다.

3.3.3. 최적 PCR 반응조건에서의 T-RFLP방법을 이용한 모델세균군집분석

위에서 정해진 최적의 PCR 조건 (annealing 온도; 55°C, Cycle No.; 30)에서 모델세균군집으로부터 얻어진 *HhaI* 효소에 의한 T-RFLP 분석 결과를 그림 10과 표 5에 나타내었다. 이때의 자동염기서열장치 (ABI 377) 조건은 4.8% PAGE PLUS (19:1) 폴리아크릴아마이드, 36 cm, 6 M Urea, 1 × TBE, 51 °C에서 GS Run 36D-2400 모듈로 4시간 전개시켰고, 분석시 피크의 검출 세기는 50, Smooth option은 'None', Min. Peak half width는 3 포인트로 하였다. 말단제한절편의 길이 분석의 결과는 850 base 까지 실시하였다. 그 결과 검출된 피크의 수는 18개로 나타났고, 850 base 이하의 피크 수는 17개 이었다. 즉 각 세균종에서 유래된 6개의 피크를 제외하면, 피크의 형광세기는 낮지만 비 특이적 5' 말단제한절편이 11종 존재하였다. 이들 중 피크 4는 피크 3보다, 피크 6은 피크 5 보다 피크 13, 14는 피크 12보다 각각 2 base 큰 피크로, 그리고 피크 8은 피크 7보다 1 base 큰 피크로, 주 피크세기의 12-64% 정도로 나타났다. 이러한 부수적인 피크의 형성이 주 피크로부터 PCR시 생성된 것인지 아니면 기계적인 분석과정에서 파생된 것인지는 알 수 없었다. 이러한 결과는 microsatellite loci의 PCR 과정시 생성되는 부수적인 PCR 산물 (stutter)이 생성되는 현상과 비슷하게 보여지나 repeat 염기서열이 아니기 때문에 이와는 다른 요인으로 판단된다. 이와는 반대로 각 세균주의 genomic DNA만을 template로 이용했을 때는 7 균주 중 5경우에서, 1 base가 오히려 적은 부수적인 피크가 주 피크세기의 약 4% 수준으로 검출되었다. 이러한 주 피크 주위에 관찰되는 작은 피크의 출현 외에도 피크 9, 10, 11 이 2 base 차이로 피크 15, 16, 17 는 1



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
13G, 1	37.52	82.34	108	471	1407
13G, 2	53.79	155.00	113	646	2017
13G, 3	74.85	240.48	815	6933	2807
13G, 4	75.39	242.51	146	1294	2827
13G, 5	109.55	375.30	303	2982	4108
13G, 6	110.00	377.10	56	494	4125
13G, 7	134.37	474.17	162	1450	5039
13G, 8	134.61	475.11	77	980	5048
13G, 9	155.97	566.63	79	835	5849
13G, 10	156.45	568.83	76	924	5867
13G, 11	157.04	571.52	132	1960	5889
13G, 12	158.93	580.29	538	6709	5960
13G, 13	159.33	582.15	349	4231	5975
13G, 14	159.76	584.15	217	3289	5991
13G, 15	194.85	767.00	82	467	7307
13G, 16	195.04	768.08	95	922	7314
13G, 17	195.20	769.01	74	943	7320
13G, 18	237.39		364	11814	8902

Figure 10. Analysis of 5' T-RFLP for *HhaI* digestions of 16S rDNAs amplified from a model community consisted of six bacterial strains using optimized PCR condition. PA: *Pseudomonas aeruginosa*, KH: *Shingomonas* sp. KH3-2, BS: *Bacillus subtilis*, BM: *Bacillus megaterium*, AG: *Arthrobacter globiformis*, EC: *Escherichia coli*

Table 5. T-RFLP analysis of model bacterial community.

Strain	Observed(expected) terminal restriction fragment(base)	Difference (base)	Peak height	Peak area
<i>A. globiformis</i>	474.17(472)	-2.17	162	1450
<i>B. megaterium</i>	580.29(578)	-1.71	538	6709
<i>B. subtilis</i>	240.46(239)	-0.54	815	6933
<i>E. coli</i>	375.30(373)	-2.3	303	2982
<i>P. aeruginosa</i>	155.00(155)	0	113	646
<i>Sphingomonas</i> sp. KH3-2	82.34(82)	-0.34	108	471

base 차이로 서로 함께 나타나는 것이 관찰되었다. 이러한 작은 피크의 세기는 전체 피크세기 합에 각각 1.6-10.2% 사이로 나타났다. 비 특이적 피크의 출현이 PCR 단계에서 형성된 것인지 기기분석상의 문제 (주 피크 전후의 피크의 경우)인지는 확실하지 않다. PCR 단계에서 형성되었을 가능성은 위에서도 잠깐 언급되었지만 서로 다른 DNA로부터 파생될 수 있는 chimeric PCR 산물일 가능성이 존재한다. 이러한 가능성은 Wang 등 (1997)에 의해 이미 보고된 바가 있으며 분자생물학적 방법의 적용에서 주의해야 할 것이다.

비특이적 피크의 형성은 미생물군집분석에 큰 영향을 미칠 수 있기 때문에 가능한한 비특이적 피크가 생성되지 않도록 PCR 조건 및 제한효소 반응을 최적화 시켜야 할 것이다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 말단제한절편의 분석 범위를 35-600 base로 결정하였으며, 이는 자동염기서열장치 (ABI 377)가 비교적 정확하게 말단제한절편의 크기를 분석할 수 있는 범위이다 (Liu 등, 1997). 그러나 이 범위를 벗어난 말단제한절편은 동정될 수 없는 단점을 지니게 된다. 또 하나의 방법으로 비 특이적 피크의 형광세기가 낮으므로 GS 분석시 피크의 검출 세기를 조정하는 것이다. 즉 이 경우 100으로 조정하면 비특이적 피크가 11개에서 4개로 줄어든다. 그러나 검출세기를 올리게 되면, 검출 민감도가 감소하는 결과를 낳게 된다. 또한 GS 분석시 피크의 검출 세기를 얼마로 조정하는가 하는 문제가 되며, 이는 loading 되는 DNA의 양에 의존된다. 즉 loading되는 DNA의 양이 증가함에 따라 같은 조건의 시료에서도 검출되는 피크는 증가하게 되므로, GS 작동시 DNA loading 양을 정확하게 조절하든지 아니면, 결과에 따라 검출세기를 조정해야하며, 그것은 경험적으로 판단될 수 밖에 없다.

모델미생물군집의 각 세균종에 대한 피크의 상대적인 높이를 비교하여 상대적인 분포비율을 알아보고자 하였다. 상대적인 비율을 알기 위해서 전

기경동의 특성상 나중에 검출되는 피크는 넓어지는 양상을 보이므로, 각 피크의 면적을 비교하는 것이 합리적이라 판단되나 방법의 특성상 피크의 높이로 분석하였다. 모델미생물군집의 핵산 혼합물에는 각 미생물종에 해당하는 genomic DNA를 동량 넣어주었기 때문에 각 피크의 높이가 비슷할 것으로 예상하였으나, 그림 10과 표 5에서 보듯이 가장 낮은 형광강도를 보인 경우는 *Sphingomonas* sp. KH3-2이며, *B. subtilis*의 경우 가장 높은 형광강도를 보여주었고 그 차이가 11배에 이르렀다. 이러한 요인을 분석하기 위해서 게놈의 크기, 16S rRNA 유전자의 복제수가 밝혀진 *P. aeruginosa*, *E. coli*, 그리고 *B. subtilis*에 해당하는 피크를 분석하였다 (표 6). *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*의 genome 크기는 각각 4,595 kb, 4,164 kb, 5,900 kb이고 16S rRNA 유전자 복제수는 각각 7, 4, 10이었다 (Cloe 과 Girons 1994). 이로부터 동량의 DNA를 PCR에 이용하였으므로 선택적인 반응이 일어나지 않았다고 가정했을 때, 예상되는 각 절편의 상대적인 비율은 *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*에 해당하는 각 피크 높이의 비율은 각각 52, 33, 15%이나, 실험적인 값은 각각 66, 25, 9%이었다. 즉 *B. subtilis*의 경우는 27%가 증가하였고, *E. coli*와 *P.aeruginosa*는 각각 24, 40% 감소한 것으로 나타났다. Farrelly 등(1995)은 서로다른 두 가지의 세균쌍을 이용하여 16S rRNA 유전자 복제수의 PCR에 대한 영향을 조사한 결과 그 편차가 71%에 이르렀다. 이러한 선택적인 PCR의 원인은 primer의 선택성, template의 2차 구조, G+C 함량, template DNA의 flanking 등의 영향을 받을 수 있으나 정확한 이유는 잘 밝혀져 있지 않다 (Hansen 등 1998). Farrelly 등(1995)은 각 세균주의 G+C 함량보다는 *rrn* 오페론의 비율과 분포에 의한 것으로 추정하고 있다. 이러한 결과는 PCR 과정에서 선택적인 PCR이 일어났음을 보여주는 것으로 자연시료로부터 PCR을 이용한 미생물군집의 분석에서 각 생물종의 상대적인 분포에 대한 정확한 정량적

Table 6. Effect of genome size and copy number of 16S rRNA genes on the T-RFLP analysis.

Strain	Genome size (kb)	16S rDNA copy	16S rDNA copy per equivalent of each bacterial genome and Percentage of predicted peak height(%)	Observed peak height and percentage of the peak height (%)	Deviation from predicted value (%)
<i>B. subtilis</i>	4,165	10	1.56(52)	815(66)	27
<i>E. coli</i>	4,595	7	1(33)	303(25)	24
<i>P. aeruginosa</i>	5,900	4	0.44(15)	113(9)	40

모텔미생물군집에 대해 *HhaI* 외에 *MspI*, *AclI*, *RsaI*, 그리고 *HaeIII*에 대해 란단제한효소 분석을 실시하였고 각 피크에 대한 각 세균종의 위치를 증명하여 그 결과를 그림 11에 나타내었다. 그림에서 보면, *HhaI*에 의한 란단제한효소 분석은 각 피크가 중복되지 않고 분포되었으나, *MspI*, *AclI*과 *RsaI*의 경우 시각적인 모습으로는 각 세균종에 대한 피크의 중복성이 나타났다. *AclI*의 경우, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli*, 그리고 *P. aeruginosa*의 예상되는 피크의 크기는 74, 73, 75, 그리고 72로 각각 나타났고 분석결과 72, 72, 74, 75의 피크가 검출되었으나, 각 피크의 핵외세

다.
 체를 해결하기 위한 방법으로 여러 제한효소를 이용하여 분석하고자 하였단 제한효소를 생성시켜 미생물 다양성을 저평가할 수 있다. 따라서 이런 문제가 있다고 판단할 수 없기 때문에 즉 서로 다른 미생물종이 같은 크기의 란단제한효소 분석시 하나의 란단효소의 크기가 한종의 미생물에 의한

3.4. motel미생물군집에 대한 제한효소를 탐리한 란단제한효소 분석

필요가 있다.
 용 유도, 분석범위의 조절, 그리고 기기분석시 피크의 인지체기를 조정할 수 있도록 하였으며, 이들의 생성을 최소화 시키기 위하여, 제한효소의 완전한 상대적인 높이의 비는 40% 정도의 편차를 나타내었다. 첫째, 비특이적 피크 편차내에서 정확하게 관찰되었다. 둘째, 각 세균주에 대한 대응되는 피크의 있었다. 첫째, motel군집에 포함된 각 세균주에 특이한 란단효소가 2 base motel미생물군집의 란단제한효소 분석에서 다음과 같은 결론을 얻을 수 (Reysenbach 등, 1992) 방법들이 고려되어야 할 것이다.

primer의 교안 2) PCR의 denaturing 시약인 acetamide등의 첨가 인 판단이 어렵다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위한 방법으로 1) 새로운

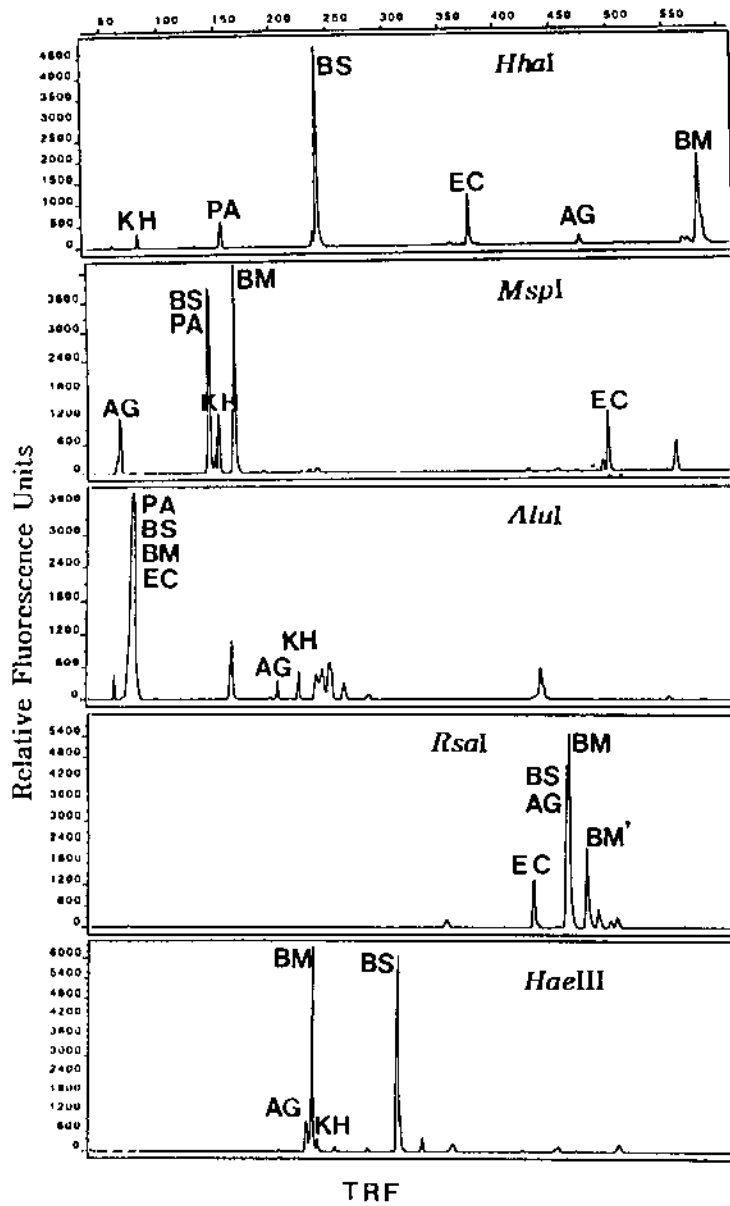


Figure 11. Electropherograms of 5' T-RFLP of the model community subjected to five restriction enzymes (*HhaI*, *MspI*, *AluI*, *RsaI*, *HaeIII*). PA: *Pseudomonas aeruginosa*, KH: *Sphingomonas* sp. KH3-2, BS: *Bacillus subtilis*, BM: *Bacillus megaterium*, AG: *Arthrobacter globiformis*, EC: *Escherichia coli*

위에서 정해진 PCR의 최적조건 (annealing 온도: 55°C, PCR 반응반복 수: 30)에서 돌연의 7 가지의 해양퇴적물시료에서 직접 핵산용 분리하고 이로부터 PCR후, *HhaI*에 의한 판단제한편분석을 실시하였다 (그림 12). 대략적인 결과를 살펴볼 때 B-1, D-1, E-1 점점의 피크 생생 양상이 현저한 차이를 보여 주었다. 본 연구에서 가두리 양식장에 의한 퇴적물 오염에 의한 미생물군점의 양상을 살펴보고 어떠한 미생물종이 오염의 진행을 보일 수 있는 지표로 이용될 수 있는지의 여부가 중요한 관점이었다. B-1, E 1 점점을 제외한 5 점점의 피크 양상이 매우 비슷하였으며, 특히하게도 5 점점은 가두리 양식장과 떨어진 지역이다. 이 시료중에서 D-1 시료는 현안

3.5. 해양퇴적물시료의 미생물군점 분석

유용한 것으로 판단된다.

위의 결과로부터 전체적인 세균군점분석의 분석에서 Clement 등(1998) 이 제안한 것처럼 다중의 판단제한편의 분석을 이용하면 분석의 해상력을 높일 수 있을 것으로 추정된다. 또한 각 제한효소에서 각 미생물종에 대한 판단제한편의 테이터베이스가 만들어진다면, 이 분석만으로 미생물종의 계통학적인 분석도 가능한 것으로 보인다. 따라서 본 방법은 미생물군점의 분석시 각 군점의 유사성 판단, 군점의 동력학의 변화를 추정하는데

단제에서 불완전한 반응에 의해 파생된 것으로 여겨진다.

가야 비는 거의 1:1:1:1로 나타나 *HhaI* 에서의 형광세기 비의 결과와 일치되지 않는다. 이는 자동염기서열장치의 전기영동법이 비록 1 base의 차이를 인지하지만 앞서 언급되었던 피크 앞뒤에 1, 2 base 차이로 생성되는 부수적인 피크에 의해 형광세기의 비가 달라진 것으로 보인다. 그리고 각 세균종에 대응하지 않는 비 특이적 피크의 생성도 일어났다. 특히, *AluI* 의 경우 많은 비 특이적 피크의 출현이 있었으며, 이는 PCR 후의 제한효소반응

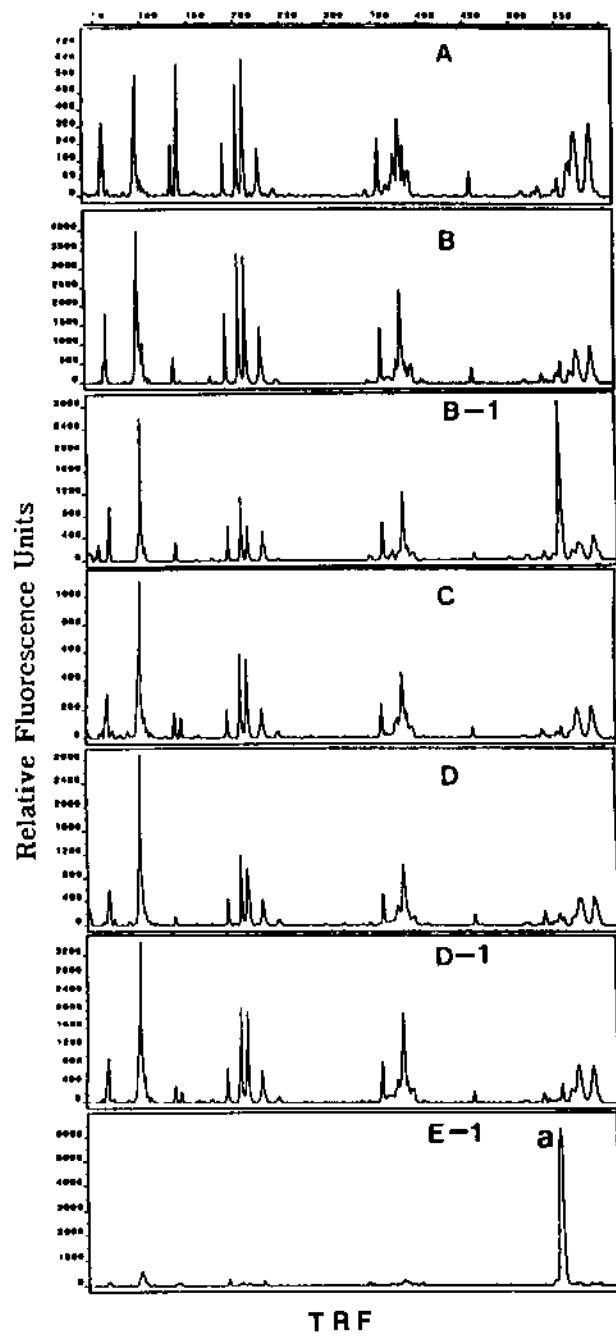


Figure 12. Electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *HhaI* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of marine sediments.

첫째로 제한효소를 이용한 분석에서 D-1, B-1, 그리고 E-1 정점에 대해 *HhaI*, *MspI*, *AclI*, *RsaI*, 그리고 *HaeIII*에 의한 말단제한체편분석의 결과를 그림 13, 14, 15, 16, 그리고 17에 각각 나타내었다. *HhaI*에 의한 말단제한체편분석 그림 13의 피크 a와 피크 b를 자세히 분석하고자 하였다. 피크 a는 B 1, E-1 정점에서 각각 549.12 (피크폭이 2876), 550.57 (1971)와 549.55 (6422), 551.14 (6053)의 두 피크로 구성되어 B-1과 E-1의 피크가 같은 것으로 추정되었다. 이 피크는 E-1 정점에서 *MspI*에 의해서 476

다. 둘째 세 정점에서의 PCR 산물에 대해 클로닝 및 부분염기서열을 결정 분석에 이용된 4가지의 제한효소에 대한 말단제한체편분석을 실시하였을 뿐이었다. 첫째로, 피크 생성 양상의 차이를 확인하기 위해 *HhaI* 외에 분석을 확인하기 위해서 D-1, B-1, 그리고 E-1 정점에 대해서 더 자세한 분석을 행한 결과와 관련된 미생물군집의 변화를 추적하고 위의 분석의 결과

다. 지 차이점을 나타낸 몇 가지 미생물종이 존재하는지의 여부를 알 수 없음을 알 수 있었다. 그러나 이 분석법을 통하여 얻어지는 정보는 유사성 내 차이를 통하여 오염의 진행과 미생물군집변화가 상당한 관세성을 가지고 있는 행과 어떤 연관성이 존재하는 것으로 추정된다. 따라서 본 말단제한체편 분석이 매우 약하나, B-1, E-1 정점에서 가장 세기가 큰 피크로 오염의 진행하지 않았다. 가장 두드러진 차이는 피크 a의 경우, D-1 정점에서는 피크에서 보듯이 선체적인 피크의 생성 패턴은 E-1을 제외하고 크게 차이를 보이지 않던지 오래되어 오염이 상당히 진행된 정점으로 판단하였다. 그림 12처럼만 되지 않아 오염이 진행중인 정점으로, 그리고 E-1 시료는 양식장으로 하였고, B-1 시료는 해양연구소 양식장이 위치해 있는 곳으로 원지로부터 양식장으로 부터 멀리 떨어진 비교적 오염이 진행되지 않은 대조구

base, *AluI*에 의해서 74 base 와 284 base, *RsaI*의 경우 459 base와 69 base 그리고 *HaeIII*에 의해서 559 와 69 base 의 피크가 등장되었다 (그림 14, 15, 16, 17). 따라서 피크 a는 5종의 제한효소에 의한 말단제한절편분석에서 두 종의 phylotype으로 구성되어 있는 것으로 추정된다. 그러나 D 1, B 1 정점의 경우 피크의 종류가 많기 때문에 위와 같은 추적은 어려울 것이다.

둘째로, 말단제한절편분석법을 검정하고 확인하기 위해 B-1, D-1, 그리고 E 1 정점의 16S rRNA 유전자 클론을 얻어 약 600 base 까지 염기서열을 결정하고 이로부터 가능한 말단제한절편의 길이를 계산하여 각 피크에 대한 각 클론의 계통학적인 위치와 가장 가까운 종을 RDP를 이용하여 추정하였다. B 1, D 1, E 1 정점에서 얻어진 클론에 대해 5 종의 제한효소를 이용한 말단제한절편의 길이를 분석한 결과를 표 7, 8, 9, 에 나타내었다.

E 1 클론의 경우, 얻어진 29 클론중에서 *HhaI* 에 의한 말단제한절편의 길이가 539 552 인 클론은 18 클론이었다. 이들 클론들은 1 클론을 제외하고 모두 ϵ -*Proteobacteria* 에 속하며 *Campylobacter*, 공생 혹은 epibiont 와 가장 가까운 특성을 나타내었다. 이들 클론들은 B-1 클론중에서도 발견되었으나 D 1 클론에서는 하나도 발견되지 않았다. 이 결과는 E-1 정점의 말단제한절편의 분석에서 548 염기의 피크가 주된 것임과 일치한다. 따라서 말단제한절편분석에 의해 오염이 가장 심하게 진행된 E 1 정점과 비교적 약하게 오염된 B-1 정점에서만 검출되는 피크는 오염과 관련된 특징적인 것으로 추정이 된다.

오염이 진행되지 않은 D-1 정점에서는 다양한 크기의 *HhaI* 말단제한절편이 검출되었으며, 이는 클론으로부터 다양한 계통학적 그룹에 속하는 결과와 부합된다. D-1 정점의 클론의 분석 결과 γ -*Proteobacteria* 의 *Colwellia* 속에 속하는 클론들이 59 클론중 13 클론이 검출되었다.

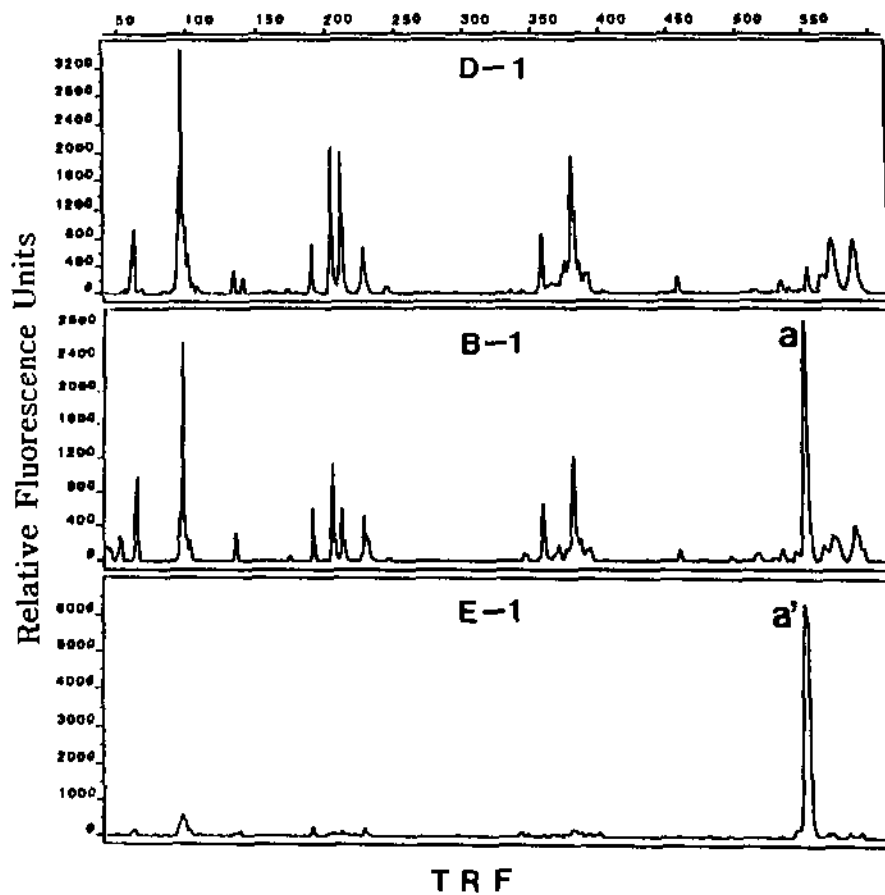


Figure 13 Comparison of electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *HhaI* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of marine sediments, B-1, D-1, and E-1

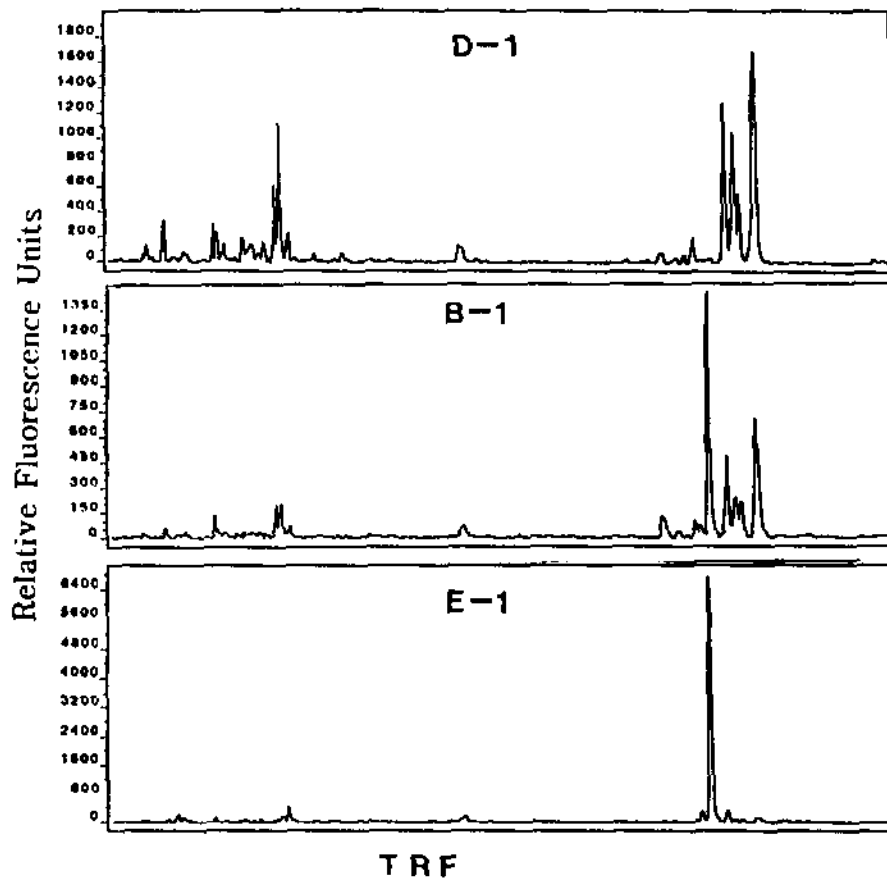


Figure 14. Comparison of electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *Msp*I digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of marine sediments B-1, D-1, and E-1.

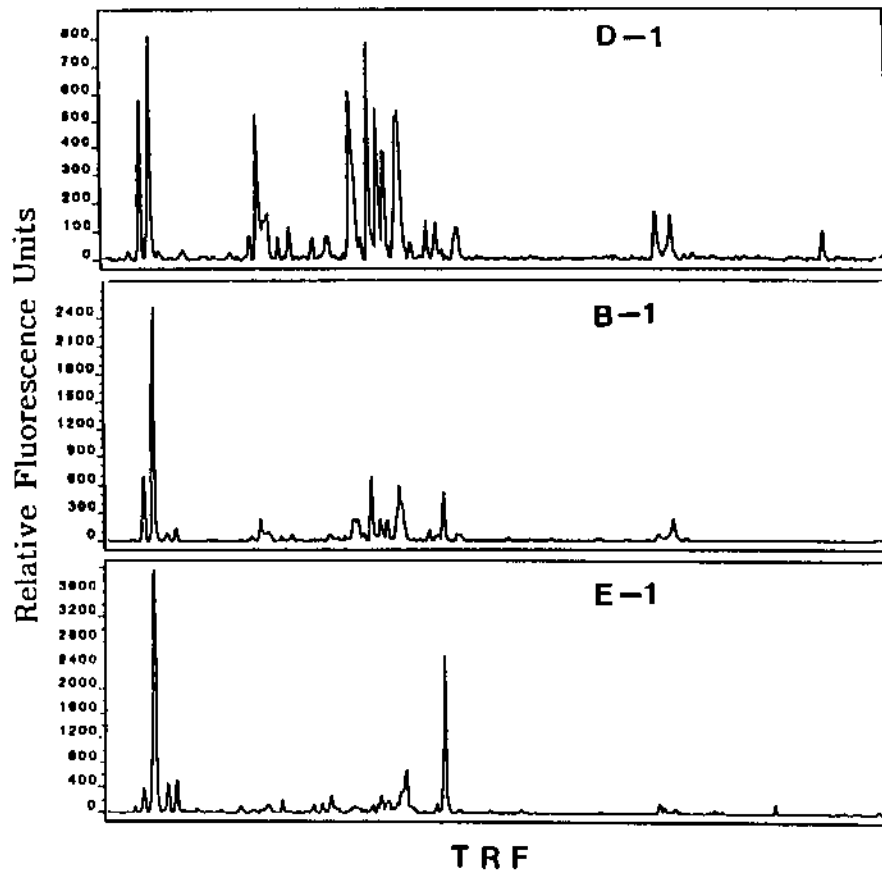


Figure 15. Comparison of electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *AclI* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of marine sediments B-1, D-1, and E-1

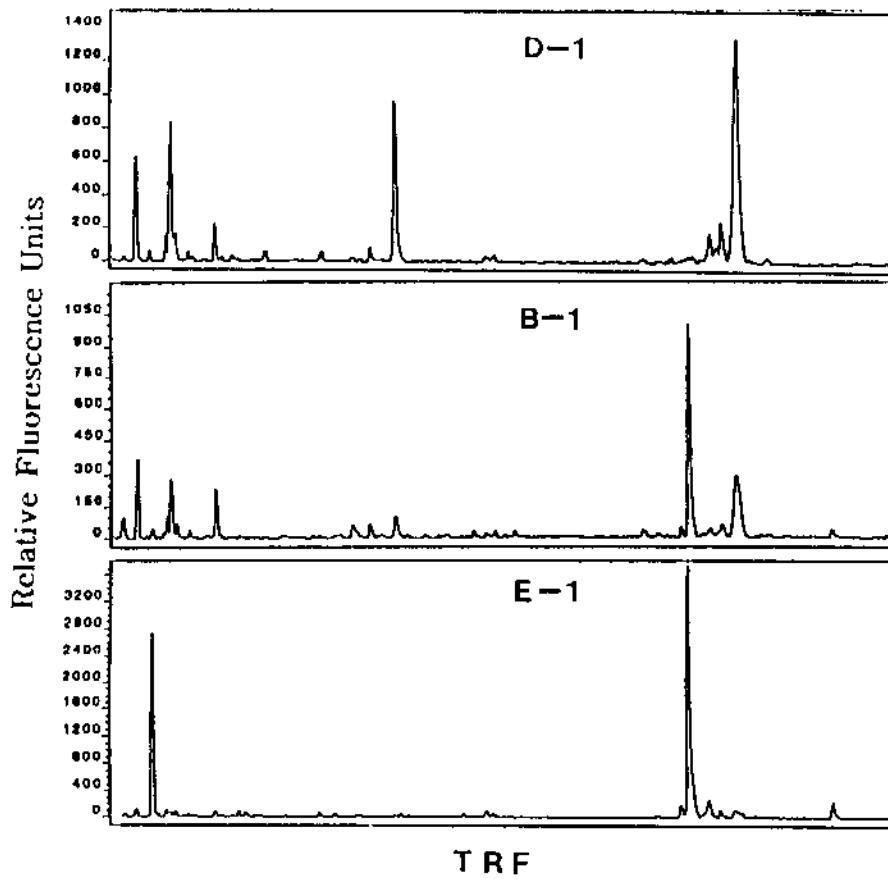


Figure 16 Comparison of electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *RsaI* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of marine sediments B-1, D-1, and E 1.

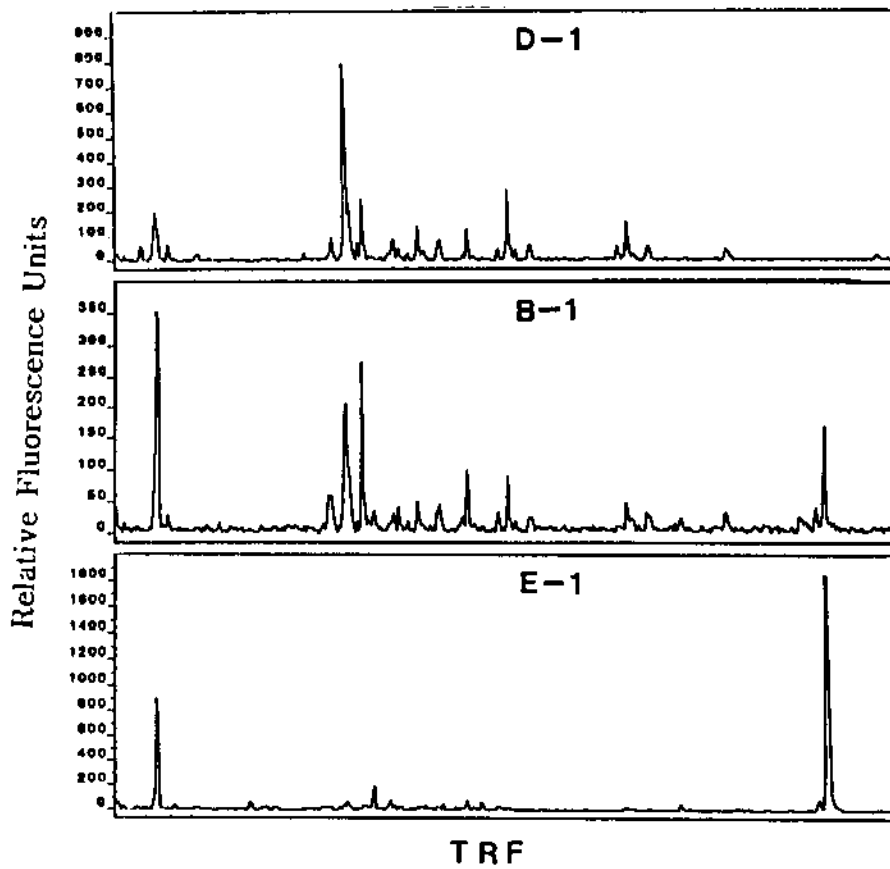


Figure 17. Comparison of electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *HaeIII* digests of 16S rDNAs amplified from total DNA of marine sediments B-1, D-1, and E-1.

Table 7 Prediction of 5' TRF and their inferred phylogenetic group of sequenced 16S rDNA clones from a B 1 sediment sample.

Clone	Terminal Restriction Fragment Length					Presumptive phylogenetic group	Nearest neighbor
	<i>Hha</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I		
B-14		146	175	474	65	Gram positive, Eubacteria	<i>Clostridium litorale</i>
B-37		74	69	472	455	ϵ -Proteobacteria	<i>Campylobacter</i> sp.
B-6		229	221	132		Gram positive, High G+C	<i>Arthrobacter nicotianae</i> str. 94
B-64	59	252	77	155		Green non-sulfur bacteria	<i>Thermus</i> sp. str. isolate Fiji 3A.1
B-5	61	252	195	441		α -Proteobacteria	<i>Roseobacter algicola</i> str. FF2
B-78	61	250	193	439		α -Proteobacteria	<i>Roseobacter algicola</i> str. FF2
B-70	61	146	198	452	250	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Solemya reidi</i> gill
B-17	61	250	193	439		α -Proteobacteria	<i>Paracoccus aminophilus</i> str. DM-15
B-81	61	252	506	441	110	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
B-21	67	74	204	495		γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Lucina nassula</i>
B-75	93	244	330	500	474	δ -Proteobacteria	<i>Chondromyces crocatus</i> str. Cm c6
B-63	95	67	218	510	58	δ -Proteobacteria	<i>Pelobacter acetylenicus</i> str. WoAcyl
B-84	95	219	205	164	226	δ -Proteobacteria	<i>Desulforhopalus vacuolatus</i> str. Itk10
B-71	95	67	218	510	58	δ -Proteobacteria	<i>Pelobacter acetylenicus</i> str. WoAcyl
B-67	95	67	218	510	58	δ -Proteobacteria	<i>Pelobacter acetylenicus</i> str. WoAcyl

Table 7 Continued

Clone	Terminal Restriction Fragment Length					Presumptive phylogenetic group	Nearest neighbor
	<i>Hha</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I		
B-82	95	219	206	164	244	δ -Proteobacteria	<i>Desulfofustis glycolicus</i> str. PerGlys
B-77	95	220	207	164	245	δ -Proteobacteria	<i>Desulfofustis glycolicus</i> str. PerGlys
B-47	98	251	69	461	489	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Solemya reidi</i> gill
B-55	98		288	494	132	Flexibacter-Cytophaga	<i>Cytophaga uliginosa</i> str. Zobell553
B-54	101	75	228		58	Gram-positive, High G+C	Marine snow associated bacterium Adriatic31
B-65	129	256	226	169	471	Gram-positive	<i>Clostridium cellulolyticum</i>
B-10	189	221	208	160	493	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Solemya reidi</i> gill
B-36	199	461	289	337	396	δ -Proteobacteria	<i>Bdellovibrio stolpii</i> str. UKi2
B-50	204	152	401	487	82	γ -Proteobacteria	<i>Aeromonas</i> sp. str. BB8
B-32	204		401	487	82	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Codakia costata</i> gill
B-61	204	152	403	489	82	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Lucina floridana</i> gill
B-58	204	152	250	488	82	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Codakia orbicularis</i> gill
B-68	205	68	153	177	482	δ -Proteobacteria	<i>Pelobacter carbinolicus</i> str. GraBd1
B-25	208	470	298	346	450	Gram-positive	<i>Spiroplasma citri</i> str. R8A2HP
B-44	210	202	222	167	310	Gram-positive, High G+C	<i>Arthrobacter polychromogenes</i> str. 2568

Table 7 Continued

Clone	Terminal Restriction Fragment Length					Presumptive phylogenetic group	Nearest neighbor
	<i>Hha</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I		
B-79	211	74	323	494		γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Thyasira flexuosa</i> gill
B-20	220	211	238	153	86	δ -Proteobacteria	intracellular ileal symbiont of <i>Mesocricetus</i>
B-31	225	201	77	152	86	β -Proteobacteria	<i>Nitrosomonas</i> sp. str. Nm84
B-3	226	253	219	463	491	γ -Proteobacteria	<i>Achromatium oxaliferum</i>
B-16	232	259	180	211	488	Nitrospina	<i>Holophaga foetida</i> str. TMBS4-T
B-66	341	250	227	439	118	α -Proteobacteria	<i>Rhodobacter capsulatus</i> str. ATH
B-60	355	231	197	487	82	γ -Proteobacteria	<i>Methylobacter luteus</i>
B-57	355	231	197	487	82	γ -Proteobacteria	<i>Methylobacter luteus</i>
B-85	362	155	257	540	478	δ -Proteobacteria	<i>Pelobacter carbinolicus</i> str. GraBd1
B-7	371	155	257	494	477	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Lucina nassula</i>
B-69	371	73	191	494		γ -Proteobacteria	<i>Oceanospirillum commune</i>
B-80	371	74	408	464	492	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Codakia costata</i> gill
B-34	372	239	207	161		Spirochaeta isovalerica	<i>Spirochaeta isovalerica</i> str. MA-2
B-1	377	75	263	500	483	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Lucina nassula</i>
B-11	377	253	238	340	119		

Table 7- Continued

Clone	Terminal Restriction Fragment Length					Presumptive phylogenetic group	Nearest neighbor
	<i>Hha</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I		
B-46	532	74	196	82		γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Solemya reidi</i> gill
B-19	537	227	93	144	444	Gram-positive	<i>Clostridium thermocellum</i>
B-22	540	84	551	466	449	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
B-9	540	84		466	449	ϵ -Proteobacteria	<i>Campylobacter</i> sp.
B-48	544	84	534	467	450	ϵ -Proteobacteria	<i>Campylobacter</i> sp.
B-43	546	74		472	455	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
B-73	546	74	69	472	455	ϵ -Proteobacteria	<i>Campylobacter</i> sp.
B-33	546	74	69	472	455	ϵ -Proteobacteria	<i>Campylobacter</i> sp.
B-4	546	74	69	472	455	ϵ -Proteobacteria	epibiont of <i>Alvinella pompejana</i> str. APB13b
B-51	547	74		472	455	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
B-56	547	74		472	455	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
B-62	547	74	557	472	69	ϵ -Proteobacteria	<i>Campylobacter</i> sp.
B-26	547	74		472	455	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
B-15	547	74		472	455	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
B-12	547	74	537	472	69	ϵ -Proteobacteria	<i>Campylobacter</i> sp.
B-76	548	74	559	472	69	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
B-45	583	174	272	162		γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Solemya reidi</i> gill

Table 8. Prediction of 5' TRF and their inferred phylogenetic group of sequenced 16S rDNA clones from a D-1 sediment sample.

Clone	Terminal Restriction Fragment Length					Presumptive phylogenetic group	Nearest neighbor
	<i>Hha</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I		
D-51		74	225	601	273	Gram-Positive, High G+C	Marine snow associated bacterium Adriatic31
D-1		253	209	112	132	Planctomyces	<i>Pirellula</i> sp. str. Schlesner1
D-53		264	207	127	36	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Lucina pectinata</i> gill
D-60		74	225	598	273	Gram-Positive, High G+C	Marine snow associated bacterium Adriatic31
D-23		271	441	163	511	α -Proteobacteria	Viikki forest soil DNA str.1
D-44	61	80	219	176	494	ϵ -Proteobacteria	<i>Helicobacter trogontum</i> str. LRB 8581
D-20	61		190	173	119		
D-75	93	244	330	500	84	δ -Proteobacteria	<i>Chondromyces crocatus</i> str. Cm c6
D-38	94	156	67	143	245	δ -Proteobacteria	<i>Geobacter hydrogenophilus</i>
D-73	94	156	217	294	491	Gram-Positive, High G+C	
D-40	94	66	230	143		Gram-Positive, High G+C	Marine snow associated bacterium Adriatic31
D-30	95	219	205	164	244	δ -Proteobacteria	<i>Desulfofustis glycolicus</i> str. PerGlyS
D-57	95	67	204	508	243	δ -Proteobacteria	<i>Desulfofustis glycolicus</i> str. PerGlyS
D-15	95	219	205	164	244	δ -Proteobacteria	<i>Desulforhopalus vacuolatus</i> str. 1tk10
D-2	96	157	206	452	132	α -Proteobacteria	<i>Aquaspirillum itersonii</i>

Table 8-Continued

Clone	Terminal Restriction Fragment Length					Presumptive phylogenetic group	Nearest neighbor
	<i>Hha</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I		
D-13	97	73	240	166	58	δ -Proteobacteria	<i>Desulfacinum infernum</i> str. BalphaG1
D-48	100	260	279	177	127		
D-58	103	251	213	141	243	δ -Proteobacteria	<i>Pelobacter acetylenicus</i> str. WoAcyl
D-69	173	155	202	174	84	Gram-positive High G+C	<i>Sporichthya polymorpha</i>
D-54	187	158	205	295		β -Proteobacteria	<i>Nitrosomonas</i> sp. str. Nm84
D-41	189	221	208	160		γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Solemya reidi</i> gill
D-7	195	204		147	420	Gram-positive	<i>Bacillus thuringiensis</i>
D-52	203	152	315	486		γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Lucina nassula</i>
D-49	203	230	315	486	81	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Lucina floridana</i> gill
D-77	204	231	197	487	82	γ -Proteobacteria	<i>Achromatium oxaliferum</i>
D-39	204	152	401	120	82	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Codakia costata</i> gill
D-76	204	231	316	487	82	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Lucina floridana</i> gill
D-68	204	152	316	487	68	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Codakia orbicularis</i> gill
D-61	204	231	69	487	150	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Codakia costata</i> gill
D-34	204	231	316	487	82	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Lucina floridana</i> gill

Table 8.-Continued

Clone	Terminal Restriction Fragment Length					Presumptive phylogenetic group	Nearest neighbor
	<i>Hha</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I		
D-32	204	231	197	486	82	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Codakia orbicularis</i> gill
D-35	204	231	316	487	82	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Lucina floridana</i> gill
D-27	204	152	250	487	82	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Lucina nassula</i>
D-55	205	152	181	516	447	β -Proteobacteria	<i>Nitrosomonas</i> sp. str. Nm84
D-21	208	73	254	460		γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Lucina nassula</i>
D-22	210	158	222	205	310	Gram-positive	<i>Clostridium lituseburense</i>
D-9	213	75	235	129	477	Gram-positive ,high G+C,	Marine snow associated bacterium AdriaticR19
D-72	216	243	193	130	457	Gram-positive ,high G+C	<i>Microthrix parvicella</i>
D-14	226	157	77	125	492	Nitrospina	<i>Nitrospina gracilis</i> str. Nb-211
D-26	226	253	338	509		γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Codakia costata</i> gill
D-78	226	253	219	510	482	β -Proteobacteria	<i>Nitrosomonas</i> sp. str. Nm84
D-25	227	257	77	125	494	Nitrospina,	<i>Nitrospina gracilis</i> str. Nb-211
D-37	355	452	197	487	82	γ -Proteobacteria	<i>Methylobacter luteus</i>
D-4	360	236	255	279	476	Gram-positive ,high G+C	<i>Heliobacterium chlorum</i>
D-28	366	154	318	489	68	γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Codakia costata</i> gill

Table 8.-Continued

Clone	Terminal Restriction Fragment Length					Presumptive phylogenetic group	Nearest neighbor
	<i>Hha I</i>	<i>Alu I</i>	<i>HaeIII</i>	<i>Msp I</i>	<i>Rsa I</i>		
D-11	370	74	203	82	476	γ -Proteobacteria	<i>Ectothiorhodospira vacuolata</i> str. BN 9512
D-6	370	73	146	143	486	γ -Proteobacteria	<i>Chromohalobacter marismortui</i> str. A-49
D-59	371	74	257	494		γ -Proteobacteria	<i>Achromatium oxaliferum</i>
D-3	371	74	190	155		γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Codakia costata</i> gill
D-56	375	143	243	125	491	β -Proteobacteria	<i>Nitrosomonas</i> sp. str. Nm84
D-36	378	131	207	164	494	δ -Proteobacteria	<i>Pelobacter acetylenicus</i> str. WoAcyl
D-29	399	66	314	181	191		
D-71	535	76	199	84		β -Proteobacteria	<i>Nitrosomonas</i> sp. str. Nm84
D-5	540	167	215	174	445		
D-8	550	239	213	138			
D-12	567	147	299	283	542		
D-47	568	73	191	143		γ -Proteobacteria	<i>Methylomicrobium pelagicum</i>
D-31	582	253	272	509		γ -Proteobacteria	symbiont of <i>Codakia orbicularis</i> gill
D-33	584	251	67	294	80	β -Proteobacteria	<i>Nitrosomonas</i> sp. str. Nm84

Table 9. Prediction of 5' TRF and their inferred phylogenetic group of sequenced 16S rDNA clones from a E-1 sediment sample.

Clone	Terminal Restriction Fragment Length					Presumptive phylogenetic group	Nearest neighbor
	<i>Hha</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I		
E-15	90	67	207	164	492	Gram-Positive	<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i> str. 4B
E-44	93	67	330	500	474	δ -Proteobacteria	<i>Polyangium</i> sp. str. PI 4943
E-28	93	155	27	131	81	δ -Proteobacteria	<i>Geobacter sulfurreducens</i> str. PCA
E-42	96	68	219	510	59	δ -Proteobacteria	<i>Pelobacter acetylenicus</i> str. WoAcyl
E-12	373	74	206	145	579	β -Proteobacteria	<i>Nitrosomonas</i> sp. str. Nm84
E-27	375	148	177	476	459	Gram-Positive	<i>Clostridium putrificum</i> str. 2318
E-45	385	177		184	58		
E-43	476	209	243	345	127		
E-41	476	209	243	345	127		
E-36	533	75	197	83		β -Proteobacteria	<i>Nitrosomonas</i> sp. str. Nm84
E-13	539	74		472	455	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
E-19	540	84	551	466	449	ϵ -Proteobacteria	epibiont of <i>Alvinella pompejana</i> str. APB13b
E-30	545	73	98	471	454	ϵ -Proteobacteria	epibiont of <i>Alvinella pompejana</i> str. APB13b
E-1	546	75	536	472	455	ϵ -Proteobacteria	<i>Campylobacter</i> sp
E-48	546	74		472	455	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>

Table 9. *Continued*

Clone	Terminal Restriction Fragment Length					Presumptive phylogenetic group	Nearest neighbor
	<i>Hha</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I		
E-23	546	74	554	472	455	ϵ -Proteobacteria	epibiont of <i>Alvinella pompejana</i> str. APB 13b
E-17	546	74	557	472	455	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
E-35	546	73	557	471	454	ϵ -Proteobacteria	<i>Campylobacter</i> sp.
E-16	546	74	69	472	455	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
E-32	547	74	69	472	455	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
E-31	548	74	559	473	69	ϵ -Proteobacteria	<i>Campylobacter</i> sp.
E-33	548	74	538	472	455	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
E-40	548	74	69	473	456	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
E-14	548	74	538	472	455	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
E-7	549	74	539	473	456	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
E-49	549	74	539	473	456	Gram-Positive	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> str. CD2
E-47	550	75	69	474	457	ϵ -Proteobacteria	symbiont of <i>Rimicaris exoculata</i>
E-29	552	76	71	474	456	ϵ -Proteobacteria	<i>Campylobacter</i> sp.
E-18	599	200	71	203	84	Gram-Positive, HIGH G+C	<i>Streptomyces thermovulgaris</i> str. ISP5444

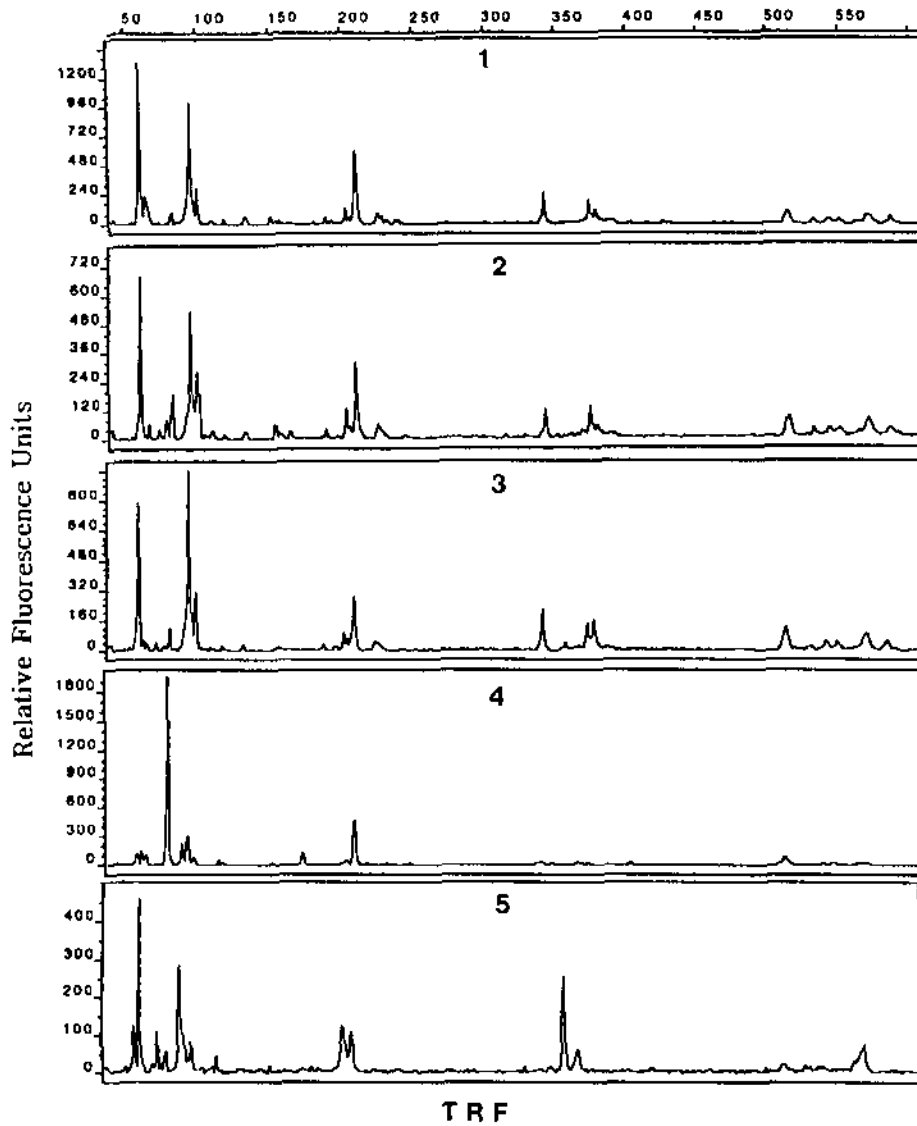


Figure 18. Comparison of electropherograms of the 5' T-RFLPs derived from *Hha*I digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of soil samples from intertidal zone.

Table 10. Characteristics of soil samples from intertidal zone.

Soil sample	Site	총속영양세균
1	갈대군락사이	3.05×10^7 CFU/cm ³
2	갈대군락사이의 지표하 10-12 cm	4.65×10^8 CFU/cm ³
3	갈대군락과 군락사이의 노출된 표면	1.80×10^7 CFU/cm ³
4	담수와 모세달 사이의 갯벌	1.22×10^7 CFU/cm ³
5	모세달군락사이	1.54×10^8 CFU/cm ³

생물정화와 같은 기준의 적용에서 자연환경에 처리된 미생물을 검출하는 것이 요구된다. 판단제한편분분석법을 이용해서 환경에 처리된 특정미생물의 동태 추적의 가능성을 조사하였다. 본 실험에서는 멸균되지 않은 모래에 석유탄화수소 분해 세균인 *Corynebacterium* IC-10를 양분 탈리하여 정육한 후 위와 같은 세균 도메인 수준의 primer 쌍을 이용하여 PCR 하여 *HhaI*에 의한 판단제한편분분석법으로 IC-10 균주에 대응한 피크의 존재 여부를 추적하였다. IC-10 균주의 *HhaI*에 의한 예상된 판단제한편분의 크기는 366 base이다. 판단제한편분의 분석에서 369 base의 피크가 10^7 , 10^6 으로 접종된 시료에서 형광세기가 감소는 하였지만 검출되었다 (그림 19). 이는 다른 방법과 비교할 때 검출민감도는 떨어지는 것으로 보인다. 따라서 민감도를 개선할 수 있는 방법을 고안하면, 판단제한편분분석법은 특정미생물의 동태 추적에도 활용될 수 있을 것으로 보인다.

3.7. 판단제한편분분석법의 민감도

생물정화와 같은 기준의 적용에서 자연환경에 처리된 미생물을 검출하는 것이 요구된다. 판단제한편분분석법을 이용해서 환경에 처리된 특정미생물의 동태 추적의 가능성을 조사하였다. 본 실험에서는 멸균되지 않은 모래에 석유탄화수소 분해 세균인 *Corynebacterium* IC-10를 양분 탈리하여 정육한 후 위와 같은 세균 도메인 수준의 primer 쌍을 이용하여 PCR 하여 *HhaI*에 의한 판단제한편분분석법으로 IC-10 균주에 대응한 피크의 존재 여부를 추적하였다. IC-10 균주의 *HhaI*에 의한 예상된 판단제한편분의 크기는 366 base이다. 판단제한편분의 분석에서 369 base의 피크가 10^7 , 10^6 으로 접종된 시료에서 형광세기가 감소는 하였지만 검출되었다 (그림 18). 각 시료의 채취지역 및 특성을 표 10에 나타내었다. 예상한대로 시료 1, 2, 3은 매우 비슷한 세균군집으로 구성된 환경으로 판단되며, 시료4와 5는 담수의 영향을 받아 세균군집의 구조가 서로 다른 것으로 판단된다.

3.6. 개별시료의 미생물군집 분석

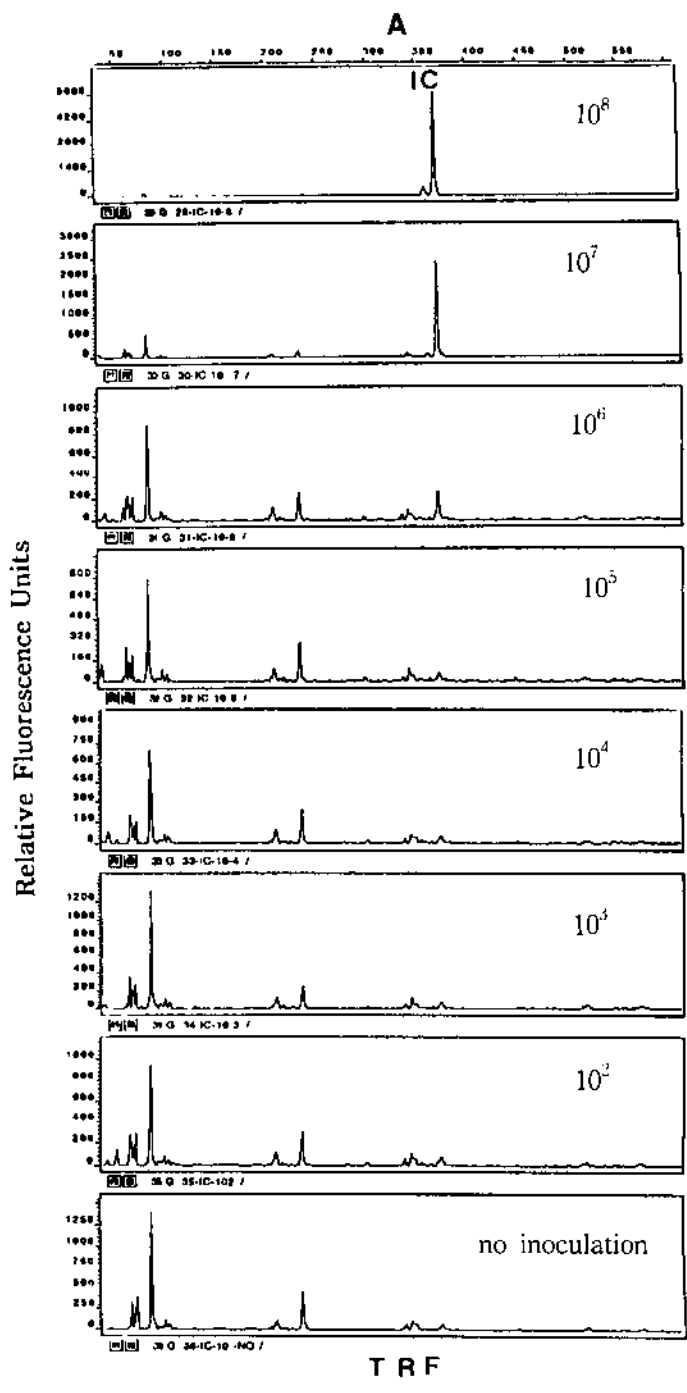


Figure 19. Electropherograms (A) and close-up (B) of the 5' T-RFLPs derived from *HhaI* digestions of 16S rDNAs amplified from total DNA of sands inoculated with *Corynebacterium* IC-10 in different quantity.

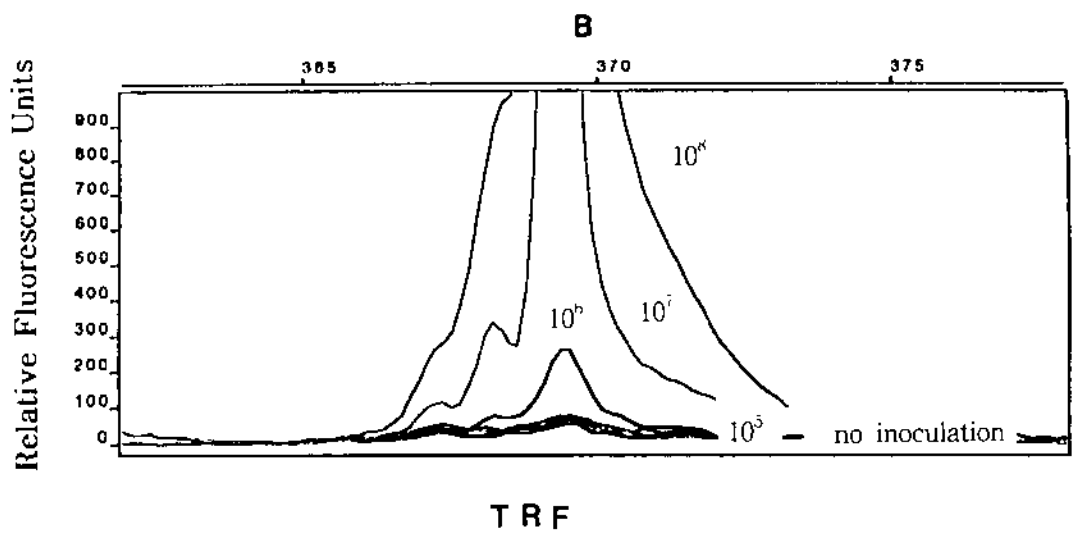
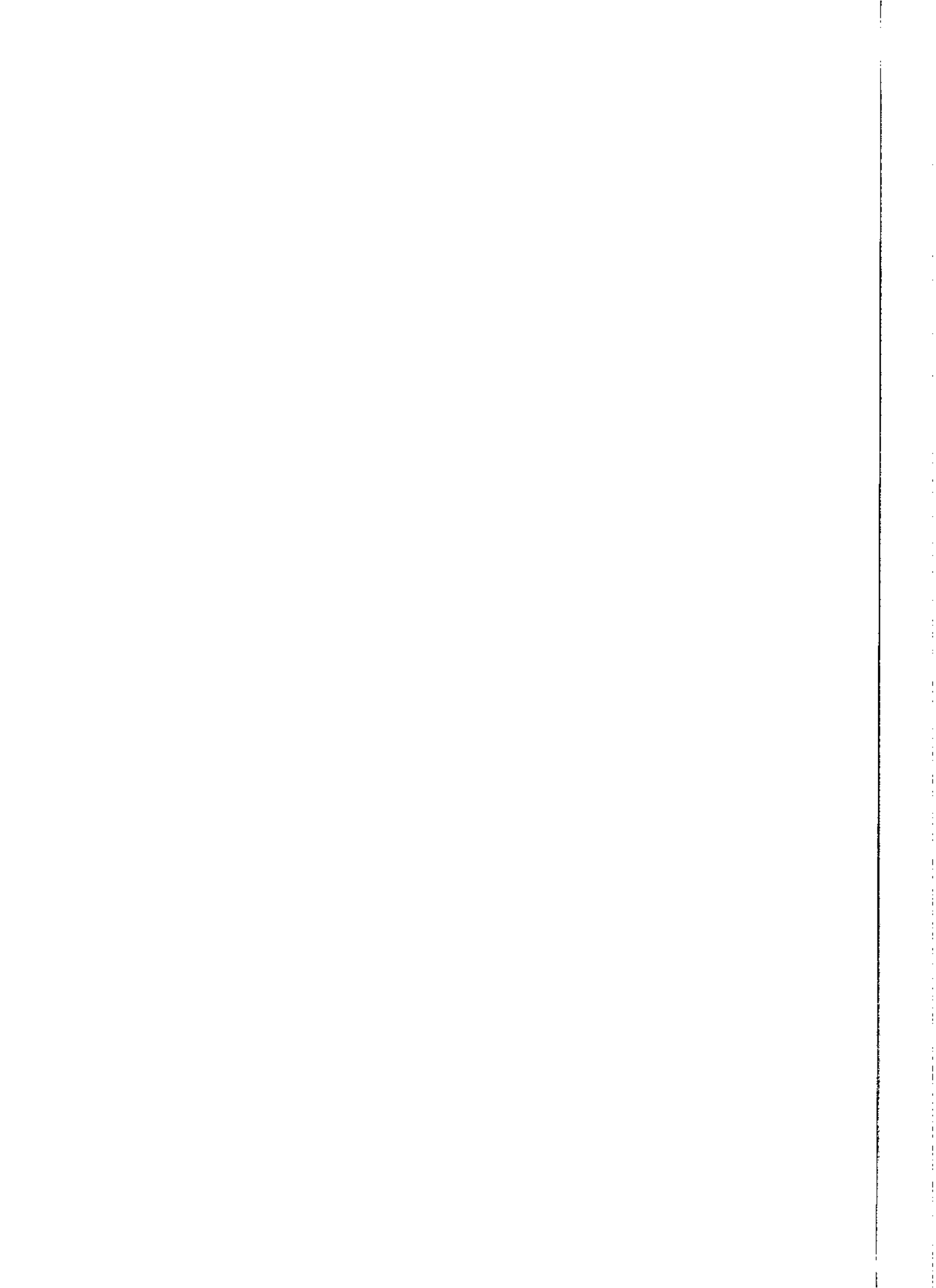
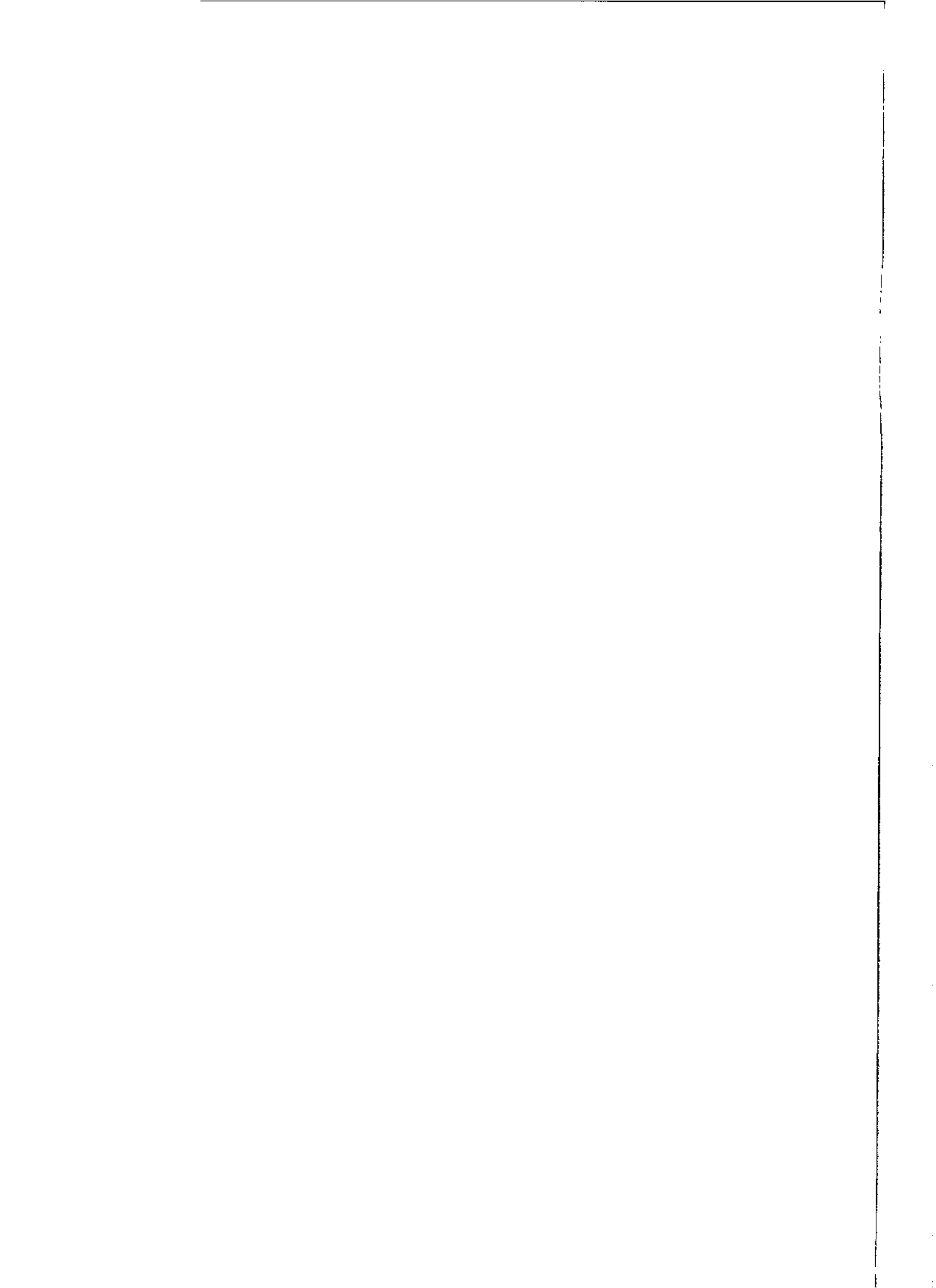


Figure 19. - *Continued*



다양한 환경시표에서의 미생물군집을 분석하는 신속한 분자생물학적방법인 [단편제한절편다형성 (TRFLP: terminal-restriction fragment length polymorphism)]을 이용한 분석법을 확립하였다. 핵산중복반응시 전위 primer의 5' 단단에 형광물질을 표지하여 모델미생물군집 및 자연 환경 시료의 전체 핵산으로부터 16S rRNA 유전자만을 증폭시켰다. 핵산중복산물에 대해 4 염기를 인지하는 제한효소로 절단하여, 형광물질로 표지된 5' 말단에 염기서열이 밝혀진 미생물종으로 구성된 모델미생물군집을 이용하여 핵산중복반응 및 분석의 최적조건을 구하였고 해양퇴적물과 조간대지역의 표양에 대해 [단편제한절편분석법]을 이용하여 미생물군집을 분석하였다. 해양의 퇴적물로부터 얻어진 전체 핵산에서 [단편제한절편분석법]을 이용하여 다양한 환경시표의 특성, 즉 오염의 진행에 따라 미생물군집의 구조가 상이하였던 16S rRNA 유전자 클로닝과 염기서열을 얻고 이의 분석을 통해 [단편제한절편분석법]을 검증하고 확인하였다. 본 연구의 결과로 [단편제한절편분석법]이 서로 다른 생태계의 미생물군집구조와 다양성을 신속하게 비교할 수 있는 방법임을 증명하였다.

제 4 장 결 론



제 5 장 참고문헌

- 권개경, 조한운, 이홍금. 1998. 대부도 갯벌에서의 종속영양세균수, 황산염 환원세균 및 세포외효소활성의 수직분포. *해양연구* 20(S2):73-80.
- 김상종, 홍순우, 이윤, 최성찬. 1985. 낙동강 하구 간석지에 존재하는 세균의 분포 및 생리적 활성도. *미생물학회지*, 23 : 215-220.
- 김상진, 이건형. 1992. 남해 퇴적토에서 종속영양세균의 분포 및 세포외 효소활성. *미생물학회지*, 30 : 383-390.
- 심정희, 강영철, 최진우. 1997. 남해연안 통영지역 가두리양식장 해수 퇴적물 경계면에서의 chemical fluxes. *한국해양학회지 「바다」* 2(2): 151-159.
- 이건형. 1987. 금강하구 퇴적토에서의 종속영양세균의 분포에 미치는 환경요인과 계절적 우점속에 관하여. *미생물학회지*, 25 : 137-143.
- 최강국, 이건형. 1996. 서천 연안 퇴적토에서 종속영양세균의 분포와 세포외 효소활성과의 관계. *미생물과 산업*, 22 : 119-126.
- 해양수산부. 1998. 통영해역의 바다목장 연구개발용역사업 보고서. pp 176-183.
- Alm, E. W., D. B. Oerther, N. Larsen, D. A. Stahl and L. Raskin. 1996. The oligonucleotide probe database. *Appl. Env. Microbiol.* 62:3557-3559.
- Aman, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and insitu detection of individual microbial cells without cultivation. *Micobiol. Rev.* 59:143-169.
- Amann, R., W. Rudwig and K. H. Schleider. 1994. Identification of uncultured bacteria: A challenging task for molecular taxonomists. *ASM news* 60:360-365.
- APHA, AWWA, WPCF. 1985. pp 97-98. In *Standard methods for the examination of water and waste water*.
- Arahal, D. R., F. E. Dewhirst, B. J. Paster, B. E. Volcani and A. Ventosa. 1996. Phylogenetic analysis of some extremely halophilic

- archaea isolated from Dead Sea water, Determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Appl. Env. Microbiol.* 62:3779-3786.
- Avaniss-Aghajani, E., K. Jones, D. Chapman, and C. Brunk. 1994. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *BioTechniques.* 17:144-149.
- Barns, SM, 1994 Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 1609-1613.
- Bintrim, S., T. J. Donohue, J. Handelsman, G. P. Roberts and R. M. Goodman. 1997. Molecular phylogeny of archaea from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:277-282.
- Britschgi, T. B. and S. J. Giovannoni. 1991. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Env. Microbiol.* 57:1707-1713.
- Brunk, C. F., E. Avaniss-Aghajani, and C. A. Brunk. 1996. A computer analysis of primer and probe hybridization potential with bacterial small-subunit rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:872-879.
- Burggraf, S., T. Mayer, R. Amann, S. Schadhauer, C. R. Woese and K. O. Stetter. *Appl. Env. Microbiol.* 60:3112-3119.
- Chisholm, S. W. , R. J. Olson, E. R. Zettler, J. Esterbury, R. Goericke, and N. Welschmeyer. 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature (London)* 334:340-343.
- Clement, B. G., L. E. Kehl, K. L. DeBord, and C. L. Kitts. 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J. Microbiol. Meth.* 31:135-142.
- Cole, S. T. and I. S. Giron. 1994 Bacterial genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 14:139-160.
- DeLong, E. F., L. Y. Wu, B. B. Prezelin and R. V. M. Jovine. 1994. *Nature (London)* 371:695-697

- Dye, A. H., 1983. A method for the quantitative estimation of bacteria from mangrove sediments. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 17: 207-212.
- Fantroussi, S. E., L. Verschuere, W. Verstraete, and E. M. Top. 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:982-988.
- Farrelly, V., F. A. Rainey, and E. Stackebrandt. 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2798-2801.
- Felske, A., A. D. L. Akkermans, and W. M. De Vos. 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4581-4587.
- Fischer, S. G. and L. S. Lerman. 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell.* 16:191-200.
- Fry, J. C., 1988. Determination of biomass. In *Methods in Aquatic Bacteriology*, edited by B. Austin. John Wiley & Sons, Chichester, 27-72 pp.
- Fuhrman, J. A., K. McCallum and A. A. Davis. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature(London)* 356:148-149.
- Fuhrman, J. A., K. McCallum and A. A. Davis. 1993. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Env. Microbiol.* 59:1294-1302.
- Giovannoni, S. J. 1991. The polymerase chain reaction, p. 177-201. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
- Giovannoni, S.J., 1990 Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton

- Nature 345(6270), 60-63 (1990)
- Gray, J. P. and R. P. Herwig. 1996. Phlogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4049-4059.
- Haddad, A. . 1995 Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1679-1687.
- Hansen, M. C., T. Tolker-Nielsen, M. Givskov, and S. Molin. 1998. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. 26:141-149.
- Kirchman, D.L. 1993. Chapter 58 Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria. pp 509-512 *In* (Kemp P.F., B.F. Sherr, E.B. Sherr and J.J. Cole eds.) *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Pub. Boca Raton, Florida, USA.
- Kuske, C. R., K. L. Banton, D. L. Adorada, P. C. Stark, K. K. Hill, and P. J. Jackson. 1998. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2463-2472.
- Laguerre, G, 1996 Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl. Environ. Microbiol.* 62. 2029-2036.
- Lee, J.-H., H.-H. Shin, H.G. Lee, K. K. Kwon, and S.-J. Kim. 1998. Efficient removal of humic substances in preparing DNA extract from marine sediments. *Kor. J. Microbiol.* 34:132-136.
- Liu, W.-T., T. L. Marsh, H. Cheng, and L. J. Forney. 1997. Characerization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4516-4522.

- Ludwig, W., 1994 PCR-based preparation of 23S rRNA targeted group-specific polynucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3234-3244.
- Maidak, B. L., G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. McCaughey, C. R. Woese. 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 25(1):109-111
- McInerrey, J. O., M. Eilkinson, J. W. Patching, T. M. Embley and R. Powell. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1646-1648;
- Moyer, C. L., J. M. Tiedje, F. C. Dobbs, and D. M. Karl. 1996. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2501-2507.
- Muyzer, G., E. C. De Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
- Olsen, G. J., N. Larsen, C. R. Woese. 1991, The ribosomal RNA data base project. *Nuc. Acid Res.* 19:2017-2021.
- Pettersson, B., K. E. Johansson, and M. Uhlen. 1994. Sequence analysis of 16S rRNA from mycoplasmas by direct solid-phase DNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2456-2461.
- Preston, C. M., K. Y. Wu, T.F. Molinski and E. F. DeLong. 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. UdSA.* 93:6241-6246.
- Raskin, L., J. M. Stromley, B. E. Rittmann and D. A. Stahl. 1994. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Env. Microbiol.* 60:1232-1240.
- Reysenbach, A.-L., L.J. Giver, G. S. Wickham, and N. R. Pace. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3417-3418.
- Sambrook, J. E., F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning.* Cold

- Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.
- Schmidt, T.M., 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* 173:4371-4378.
- Schwieger, F. and C. C. Tebbe. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4870-4876.
- Suzuki, M. T. and S. J. Giovannoni. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:625-630.
- Wang, G. C.-Y. and Y. Wang. 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4645-4650.
- Wang, Y., Z. Zhang, and N. Ramanan. 1997. The Actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. *J. Bacteriol.* 179:3270-3276.
- Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr and H. G. Truper. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:463-464.
- Weller, R., J. W. Weller and D. M. Ward. 1991. 16S rRNA sequences of uncultivated hot spring cyanobacterial mat inhabitants retrieved as randomly primed cDNA. *Appl. Env. Microbiol.* 57:1146-1151.
- Wellsbury, P., R.A. Herbert and R.J. Parkes. 1996. Bacterial activity and production in near-surface estuarine and freshwater sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19 : 203-214.
- Whittaker, R. H., 1969. *Science* 163:150.
- Woese, C. R., O. Kandler, and M. L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and

Eucarys. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4576-4579.

Zheng, D., E. W. Alm, D. A. Stahl and L. Raskin. 1996.
Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes
for qualitative molecular microbial ecology studies. Appl. Env.
Microbiol. 62:4504-4513.

