

## 수계 생태계에서의 세균 군집 구조의 분자생물학적 분석

이동훈 · 김상종<sup>1</sup>

생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행, <sup>1</sup>서울대학교 미생물학과 및 분자미생물연구센터

생태계의 기본적 특성 중 하나는 시간적, 공간적인 역동성(dynamics)을 갖는다는 점이다. 생태계의 역동성은 기후, 지형과 같은 기본적인 요소와 생태계의 구성 성분으로서 물리 화학적 항목, 그리고 생물 군집의 상호관계가 복합적으로 작용하기 때문에 나타난다. 자연 생태계 내에서 생산자와 소비자로 이어지는 일방적인(unidirectional) 물질 흐름을 미생물 군집이 분해자의 역할을 수행함으로써 순환적인 흐름으로 전환시키며 한정적인 물질 자원의 이용을 극대화시키는데 기여한다. 또한 빠른 대사 능력을 갖는 미생물은 수계 생태계에서 다른 생물들이 이용할 수 없는 용존성 유기물을 흡수하여 생체 물질로 전환할 수 있으며 동물 플랑크톤에 포식됨으로써 미생물 순환고리(microbial loop)를 통한 탄소 순환에도 적극적으로 기여한다(76). 따라서 자연 생태계에서 미생물 군집의 구조와 기능을 파악하는 일은 물질순환의 관점에서 매우 중요한 일이기 때문에 미생물 군집의 구조와 다양성을 정량적으로 이해하기 위한 노력은 미생물 생태학에 있어서 핵심적인 과제였다.

미생물 군집의 역동성은 수계 생태계 내에서 다른 생물 군집에 비하여 더욱 큰 것으로 알려져 있다. 미생물 군집은 작은 개체 크기, 짧은 생존 주기(life cycle)를 가지며 또한 일정 공간 내에서 점유하는 군집의 크기가 매우 크므로 시간적, 공간적 역동성을 파악하는데 어려움이 있다(7). 식물이나 동물 군집은 군집 크기가 비교적 작아 전체 군집을 파악할 수 있으며, 군집 분석방법으로서 형태적 특징에 따른 분류가 가능하다. 그러나 미생물은 형태적으로 매우 단순하여 구분이 힘들기 때문에 분류는 주로 생리적, 생화학적 특성에 의존하고 있으며, 각 분류군의 분포는 viable plate count 방법과 최적확수법(most-probable-number technique)을 이용하고 있으나, 실제로 생태계 전체에 존재하는 모든 균주를 배양, 동정하는 것은 불가능하다. 아직까지 자연계에 존재하는 세균 군집 중에서 분리(isolate)되고 특성이 파악된 것은 20%가 되지 못하는 것으로 알려져 있다(75). 그러나 이러한 추정도 지나치게 높은 값으로서 또 다른 입장에서는 자연계 내의 세균들 중에서 99% 이상의 세균들이 전통적인 방법으로는 배양될 수 없다는 보고도 있다(4). 현재 수계 생태계에서 현미경을 통하여 관찰된 총세균수에 비하여 1% 미만의 세균만이 배양되는 사실로도 이와 같은 주장은 타당성을 갖고 있다(18, 68). 이와 같은 실험 결과들은 현재의 배지나 배양 조건이 특정 미생물의 성장과 분열을 위한 조건을 충족시키지 못하고 있으며, 자연 생태계의 세균

군집은 미지의 세균 외에도 특정 환경에서 배양이 불가능한 상태로 전이된 균주가 다수 포함되어 있기 때문에 나타나는 현상으로 생각되고 있다(52, 57). 또한 배양을 통하여 분리된 세균들이 현장에 존재하는 군집 비율을 대변한다고 보기 힘들며, 상대적으로 부영양 상태인 배지가 세균의 분리에 이용되기 때문에 자연계에서 대부분을 차지하고 있는 빈영양 세균을 분리할 가능성이 매우 낮다. 이같이 선택적 배지를 이용한 배양방법은 자연 생태계 군집의 이해에 있어서 많은 한계를 갖고 있다(20, 73).

또한 특정 생태계에 서식하는 미생물 군집의 특성은 다양성(diversity)이라는 항목에 의해서도 파악 가능하다. 다양성은 생태계 안정성(stability)의 기초가 되며 주로 생리적 특성에 따라 분류된 종(species), 또는 속(genus)의 기준에 의해 측정되고 있다. 다양성이 높을수록 생태계 내에 나타날 수 있는 외부적 혼란을 극복할 수 있는 가능성이 커지며 이와 같은 안정성은 곧바로 생태계의 항상성(homeostasis)과 직결된다(6). 그러나 종다양성을 이해하는 접근방법은 특정 균주의 동정(identification)과 유연관계(relationship)를 파악하는 분류 체계(classification system)에 의존적일 수밖에 없다. 과거의 분류 체계는 배양 특성과 같은 표현 형질(phenotypic property)에 기초를 두고 있으며, 특정 세균의 기능과 성장 특성 등 표현 형질을 이용한 연구에서는 연구 대상의 순수 분리와 배양이 필수적이다. 따라서 배양이 어려운 군집뿐만 아니라 현재까지 파악되지 못한 미지의 군집이 다수 포함되어 있는 자연 생태계를 대상으로 미생물 군집의 구조와 다양성을 총체적으로 파악하려는 연구에는 기존의 방법만으로는 한계점이 많으며 이를 극복하기 위한 많은 노력이 시도되고 있다.

자연 생태계의 미생물 군집을 배양을 통하지 않고 이해하기 위한 접근방법 중의 하나가 최근 개발된 분자생물학적 방법을 이용하는 것이다. 다양한 유전자를 대상으로 분자생물학적 방법을 응용할 수 있지만, 안정적인(stable) RNA를 대상으로 활발한 연구가 진행되고 있다. Ribosomal RNA gene은 세균 분류 및 진화에서 많은 연구가 이루어졌으며 축적된 자료가 비교적 많다. 따라서 rRNA database의 정보를 특정 세균의 분류 및 동정에 이용할 수 있으며 다양한 분류군 수준에서의 PCR primer 및 DNA probe의 설계가 가능하다. 특히 세포 내에 많은 양의 rRNA를 유지하므로 추적성이 용이하다는 장점이 있다. 실험상의 편리성 때문에 5S rRNA를 이용하여 세균 군집을 이해하려는 연구가 처음에

시도되었으나(33, 67), 최근의 연구에서는 16S rRNA를 분석 대상으로 설정한 사례가 더 많이 있다.

16S rRNA를 분석한 연구들은 자연 생태계에서 추출한 핵산을 이용하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하거나 특정 DNA probe를 이용한 hybridization 실험이 주류를 이루어 왔다. 특히 PCR 기법이 개발됨에 따라 적은 양의 시료를 대량으로 손쉽게 증폭시킬 수 있어 다양한 분야에 응용되고 있다. 세균 군집의 구조를 이해하는데 있어서 PCR 방법의 적용 대상은 주로 16S rRNA 유전자의 염기서열 해독 분야이며 해양 생태계를 대상으로 많은 연구 결과가 보고되었다(11, 13, 21, 26). 한편 자연 생태계의 개별적 미생물 분류군들을 검출하기 위한 특정 oligonucleotide probe의 개발방법들은 미생물 군집의 유전적 다양성에 대한 정보 파악 이외에 배양이 어려운 혐기성 세균과 같은 특정 세균들의 동정에도 이용되고 있다(3, 24, 55). 본고에서는 세균 군집의 구조와 다양성을 연구하는데 적용 가능한 rRNA 분석방법들을 수계 생태계를 중심으로 살펴보고자 한다.

### 5S rRNA 분석방법

세균의 5S rRNA는 염기서열의 크기가 작기 때문에 실험이 용이하다는 이점이 있으며 자연 환경의 생태계를 대상으로 분자생물학적인 방법을 사용함으로써 새로운 종을 확인할 수 있었던 최초의 연구 결과도 5S rRNA 염기서열의 분석이었다(66, 67). 미국 Yellowstone National Park의 Octopus Spring에서 채집된 시료('pink filaments')를 대상으로 5S rRNA 염기서열을 분석한 결과 기존에 보고된 세균들과는 전혀 다른 염기서열을 확인할 수 있었다. 그 이후에 진행된 연구에서 16S rRNA의 염기서열을 비교 분석한 결과 이들은 *Aquificales*에 속하는 것으로 밝혀졌으며, 일부 배양에 성공한 균주들의 특성을 참고하면 수소산화세균의 일종인 것으로 추정되었다(56). 최근에는 인위적으로 5S rRNA를 변형시킴으로써 genetically engineered microorganisms (GEMs)의 추적에 이용할 수 있다는 보고도 있다(54).

초기에 진행된 5S rRNA의 염기서열 분석방법 외에도 Höfle는 low molecular weight(LMW) RNA profile을 이용하는 새로운 분석방법을 제시한 바 있다(32, Fig. 1). 세균의 경우에 5S rRNA 염기서열은 107-131 nt의 크기를 나타내며, clover-leaf secondary structure의 extra arm에 의해서 구분되는 class 2 tRNA와 class 1 tRNA는 각각 83-96 nt, 72-79 nt의 크기 변화를 보인다(17, 65). 따라서 LMW RNA profile을 특정 종의 molecular fingerprint로 이용할 수 있다. 시료로부터 추출된 5S rRNA와 tRNA를 고농도(14%)의 polyacrylamide gel로 크기에 따라 분리한 후에 silver staining 또는 방사성 동위원소를 이용하여 분석하였을 때, 한 균주에서 10-20 band가 관찰되며 세균 종에 따라 각기 특정 위치에서 5S rRNA와 tRNA를 확인할 수 있었다. *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*를 시료로 이용한 실험에서 5S rRNA의 profile은 속 수준에서 구별되는 결과를 보였으며, class 2 tRNA는 종 수준에서 구분되는 profile을 나타내었으나 아종(subspecies)과 strain 수준에서의 구분은 불가능

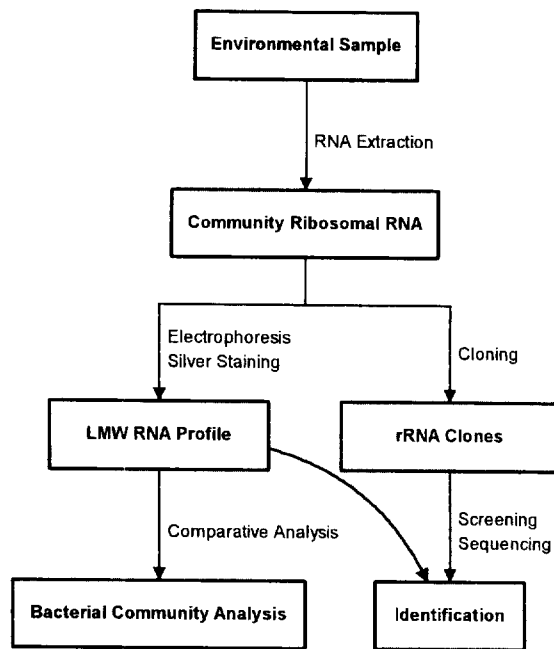


Fig. 1. Strategies for characterizing microbial communities with LMW rRNA.

하였다. 특히 동일 종을 대상으로 배지 조건과 성장 단계가 각기 다른 시료를 이용한 실험결과 profile의 차이를 관찰할 수 없었다. 따라서 LMW RNA profile을 이용하면 빠른 시간 내에 효율적인 균주의 동정이 가능하며 자연 생태계에 서식하는 세균 군집의 연구에도 적용할 수 있다. 실제로 현장 실험에서 호수 생태계에 서식하는 중속영양 세균 군집을 낮은 유기물 농도의 배지에서 배양한 후에 LMW RNA profile을 통하여 분석한 결과 humic lake에서는 *Arthrobacter*와 *Pseudomonas*가, clear lake에서는 *Arthrobacter*와 *Cytophaga*가 우점하는 결과를 확인하였다(33).

또한 독일의 Plußsee 호수에서 mesocosm을 설치한 후에 많은 양의 *E. coli*, *Pseudomonas putida*, nutrient broth를 첨가하고 mesocosm내의 세균 군집의 변화를 일정한 시간 간격으로 LMW RNA profile을 이용하여 조사하였다(34). 실험 결과 외부에서 유입된 세균(*E. coli*, *P. putida*)은 세균 군집에 영향이 없었으며 오히려 첨가된 영양물질의 영향이 큰 것으로 확인되었다. 유기 영양물질이 추가된 mesocosm에서는 2일 이후 세균 이차 생산이 최고가 되었으며 다음날 heterotrophic nanoflagellate가 증가하였다. 특히 대조군에서는 1주일 동안 120 nt의 크기를 갖는 band가 진한 농도로 확인된 반면에 영양물질이 첨가된 시료에서는 1일 후부터 118 nt의 band로 우점 이동이 관찰되었다. 또한 nutrient broth가 첨가된 mesocosm에서는 세균 군집의 종다양성이 감소되었으며, *Aeromonas hydrophila*와 *Cytophaga johnsonae*가 우점하였다. 이러한 결과는 수계 생태계에 유기 영양물질이 갑자기 유입되었을 때에 특정 중속영양 세균 군집의 대량 번식이 가능함을 시사한다.

LMW RNA profile 방법은 해양 생태계에서도 적용된 사례가 있으며, Baltic Sea를 대상으로 연구가 집중되었다(35,

36). 두 해에 걸쳐 여름에 유광층(euphotic zone)의 시료를 채취한 후에 분석한 결과 아주 유사한 RNA profile을 확인하였으며, 이것은 수층의 세균 군집 구조가 상당히 안정적임을 나타낸다. 또한 여름에 채취된 시료의 LMW RNA profile을 수심별로 분석한 결과 metabolic activity가 가장 높았던 유광층(10 m)의 시료와 oxic-anoxic 경계면(120-140 m)의 시료에서 가장 높은 종다양성이 관찰되었으며 특정 세균 군집들의 공간적 격리가 확인되었다. 그 예로 5S rRNA band 중에서 121 nt의 크기를 갖는 band는 모든 수심에서 관찰될 반면에 119 nt의 band는 수심 120 m까지의 산소층에서만 확인되었고, 112 nt의 band는 그 이하의 무산소층에서만 관찰되었다. 특히 그 전에 수행된 biogeochemical cycling에 관한 연구(9, 10)에서 그 존재가 예상되었으나 기존의 배지를 이용한 배양 실험으로는 확인할 수 없었던 특정 종을 확인할 수 있었다. 즉 oxic-anoxic 경계면에서 확인된 5S rRNA band(118 nt)의 염기서열을 부분적으로 분석한 결과 *Thiobacillus denitrificans*의 염기서열과 일치하였다. 한편 4가지의 배양방법으로 Baltic Sea에서 배양, 분리된 123 균주의 LMW RNA profile을 이용한 분류학적 분석 실험에서는 76%의 균주를 종 수준에서 동정하였으며 24개의 cluster를 확인할 수 있었다. 전체 균주의 87%가 Vibrionaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae(rRNA group I)에 속하였으며 우점종은 *Shewanella putrefaciens*와 *Pseudomonas*의 신종(new species)이었다.

그러나 5S RNA를 이용하는 연구방법은 간편하게 전체 세균 군집의 profile을 확인할 수 있으며 PCR 방법을 사용하지 않으므로 정보의 왜곡이 적다는 장점은 있지만 극복하기 어려운 몇 가지 문제점 역시 존재한다. 가장 큰 문제점은 분석 대상의 염기서열이 작기 때문에 얻을 수 있는 정보가 제한되며 따라서 5S RNA만으로 복잡한 세균 군집을 구분할 수 없다는 점이다(53). 실제로 많은 eubacterial 5S rRNA의 크기가 120 nt이며 비록 염기서열이 다르더라도 동일한 크기를 갖는 세균 군집은 LMW RNA profile만으로 구별할 수 없다(63). 실험대상의 정보량뿐만 아니라 현재까지 구축되어 있는 database를 살펴볼 때 16S rRNA의 database보다 축적되어 있는 정보량이 적다는 단점도 있다. 자연 생태계에서 확인되는 새로운 세균 군집을 동정하기 위해서는 기존에 보고된 염기서열 정보와 비교 분석이 필수적인데 축적된 정보의 양이 적다는 것은 실제 현장 실험에 적용하는데 많은 문제점을 내포한다. 또한 자연 생태계를 대상으로한 시료에서 DNA를 추출하는 것보다 RNA를 추출하는 것이 상대적으로 많은 주의를 요구하며, 많은 양의 시료를 농축하는 과정이 필요하므로 조사 정점이 증가할수록 실험상의 어려움이 증대된다. 실제로 세균에 있어서 5S rRNA는 한 종류(single type)이므로 1 band만이 관찰될 것으로 예상되었으나 많은 균주들에 절단이 발생한 것으로 추측되며 특히 unpaired 3' 말단의 염기에서 일어날 확률이 높다(32).

### 16S rRNA 분석방법

16S rRNA 유전자는 세균들을 종 수준으로 구분할 수 있

는 정보를 담고 있는 영역이며, 염기서열의 변화는 미생물간의 유연관계를 파악하는 데에 유용하다(4). 특히 16S rRNA의 variable region은 종과 속간의 분화에 따른 다양성이 큰 부분으로 특정 분류군에만 존재하는 염기서열을 포함하기도 한다(78). 또한 16S rRNA의 특정 부분은 진화 속도가 매우 느려 많은 생물체가 공통적으로 갖는 보존된 염기서열과 이차구조를 나타내어 다양한 분류군의 상호 비교를 가능하게 한다. 현재까지 보고된 16S rRNA 염기서열 정보는 3,000 균주 이상이며, 부분적인(partial) 염기서열 정보도 포함시킨다면 7,500 균주 이상의 자료가 database(GenBank, EMBL)에 축적되어 있으며 최근 수년 동안에 빠른 속도로 증가되고 있다(45). 축적된 염기서열 정보에는 전세계의 균주수탁기관(Culture collection)에서 배양을 유지하는 균주뿐만 아니라 다양한 자연 생태계를 대상으로 분자생물학적 방법을 적용함으로써 염기서열만이 확인된 균주('molecular isolates')도 포함되어 있다. 또한 Ribosomal Database Project(RDP)에서 제공하는 16S rRNA database는 계통분류학적 관점에서 비교가 가능하도록 정리되어 있으므로 특정 군집을 연구하기 위한 PCR primer 또는 DNA probe의 설계가 가능하다. 생

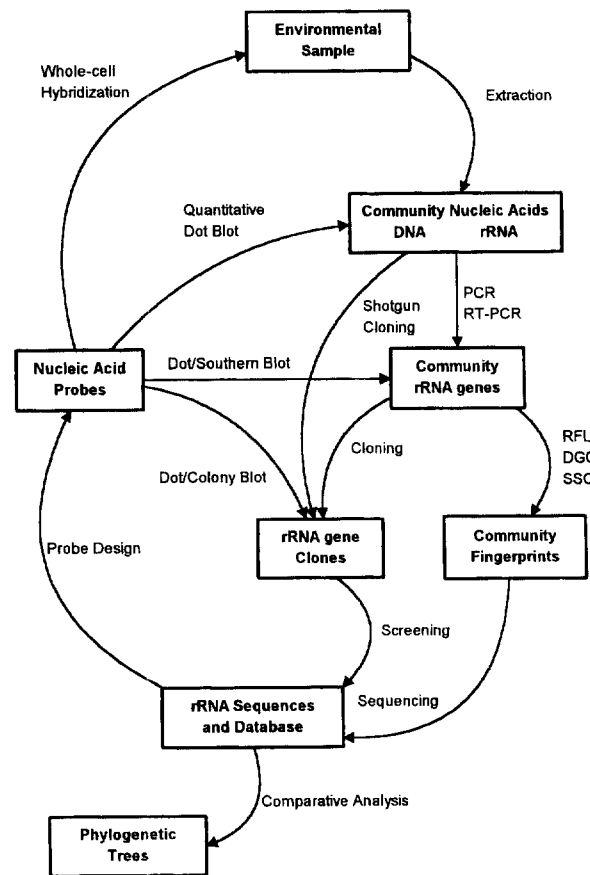


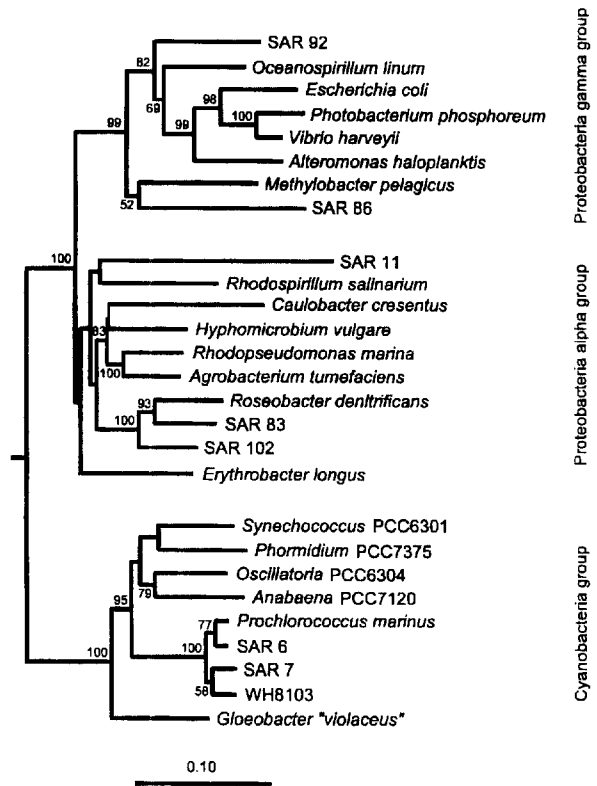
Fig. 2. Strategies for characterizing microbial communities with 16S rRNA. Abbreviations: DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis; PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism; rRNA, ribosomal RNA; RT-PCR, reverse transcription PCR; SSCP, single strand conformation polymorphism.

태학적 연구를 위해 설계된 PCR primer는 다양한 시료로부터 16S rRNA 유전자를 증폭하고 cloning한 후에 염기서열을 분석하는데 이용될 수 있다. 확인된 염기서열은 database의 정보와 비교 분석함으로써 군집 구성원의 계통분류학적 위치를 판단할 수 있으며 생태계에서의 기능 및 역할을 추정할 수 있다(Fig. 2). 또한 시료로부터 추출된 전체 rRNA를 대상으로한 hybridization 실험에 특별히 고안된 DNA probe를 이용함으로써 특정 군집의 분포와 활성을 파악할 수 있다. 이 외에도 restriction fragment length polymorphism (RFLP), denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE), single strand conformation polymorphism(SSCP) 등의 방법을 적용하여 군집 구조를 총체적으로 파악하는 연구도 가능하다.

### Sequencing

세균 군집의 구조와 다양성을 이해하는데 있어서 분자생물학적 방법을 응용한 분야는 주로 16S rRNA 유전자의 염기서열 해독이며, 시료에서 직접 추출된 핵산뿐만 아니라 다양한 수계 생태계에서 분리 배양된 균주의 16S rRNA 염기서열을 계통분류학적으로 분석함으로써 동정에 응용한 연구도 진행되고 있다. 지하 224 m에서 채취된 탄광 시료로부터 분리 배양된 74 균주를 대상으로 기존의 형태학적, 생리학적 특성을 이용한 동정 방법과 16S rRNA 염기서열에 의한 동정 방법을 비교한 연구 결과가 보고된 바 있다(8). 적용 방법에 따라 서로 다른 결과를 나타낸 균주는 22 균주였으며, 동정 결과의 불일치는 주로 운동성에 기인하였다. 두 가지 방법을 비교하면 분자생물학적 동정 방법을 사용하였을 때 미확인 균주의 수가 현저히 줄었으므로 자연 환경에서 분리된 세균의 분류 및 동정에 유용한 방법이라 판단된다. Gosink와 Staley는 남극의 호수에서 기포(gas vacuole)를 갖는 저온성의 종속영양 세균들을 분리하였으며 16S rRNA의 염기서열을 분석하여 계통분류학적 위치를 조사하였다(28). 기존의 보고된 염기서열과 비교한 결과 다양한 분류군(Proteobacteria alpha, beta, gamma group, Flavobacteria-Cytophaga group)에 위치함을 알 수 있었으나 동종으로 확인될 수준의 유사도를 나타내는 염기서열은 없었다. 기포를 갖는 특성이 성층화(stratification)가 관측되는 수환경에서의 생존에 영향을 줄 것으로 추측되지만 현재까지 수계 생태계에 서식하는 종속영양 세균 중에서 기포를 형성하는 균주는 보고된 바가 없다. 또한 Arahal 등은 Dead Sea에서 채수된 시료로부터 22 균주의 호염성(halophilic) 세균을 분리하여 16S rRNA의 염기서열을 분석하였으며 *Haloarcula*속의 신종으로 판단되는 균주들을 보고하였다(5).

1990년 대서양의 Sargasso Sea를 대상으로 16S rRNA의 염기서열을 분석한 결과, 해양 생태계에는 미지의 종이 많을 것이라는 주장(26)과 함께 SAR cluster가 제시된 이래 해양 생태계를 중심으로 proteobacteria alpha group 및 cyanobacteria에 속하는 많은 종류의 새로운 염기서열이 밝혀지고 있다(Fig. 3). Sargasso Sea에서 보고된 SAR7 cluster는 cyanobacteria에 선택적인 primer(OX1, OX2)를 이용한 PCR 반응과 cloning 과정을 거쳐 염기서열이 확인되었는데, 운동



**Fig. 3.** Phylogenetic tree showing relationships of the rDNA clones from the Sargasso Sea to representative cultivated species. The tree was calculated by the neighbor-joining method from 987 nucleotide positions. Bootstrap values below 50% are not shown. The scale bar corresponds to 10 nucleotide substitutions per 100 sequence positions. The tree was rooted with *Bacillus subtilis* as an outgroup.

성이 있으며 phycoerythrin pigment를 갖는 *Synechococcus* strain WH8103과 가장 가까운 유연관계를 나타내었다. *Synechococcus*는 유전적 다양성이 매우 높은 것으로 알려져 있으며(79), 빈영양 상태의 해양에서 광합성을 통한 탄소동화 작용의 25%를 담당하며 생리학적, 유전학적 특성이 다른 group이 동일 수층에 서식할 수 있다는 보고도 있다(74). SAR11 cluster는 Sargasso Sea에서 12.5%를 차지하였을 뿐만 아니라 Bermuda 해역의 Ferry Reach와 Florida의 Key Biscayne 등 coastal water에서도 각각 1.38%, 0.53%가 측정되었다(25, 26). 또한 태평양과 Santa Barbara 해협에서도 유사한 염기서열이 계속 확인됨에 따라 SAR11 cluster는 해양 생태계에서 넓은 분포를 가질 것으로 생각되고 있으며 국내의 소양호에서도 SAR11 cluster와 유연관계가 가까운 염기서열이 확인되었다(1). 계통분류학적 연구결과 SAR11 cluster는 proteobacteria alpha group인 것으로 판단되지만 현재까지 분리 및 배양에 성공한 사례가 없으며 유연관계가 가까운 균주의 탐색에도 실패하였으므로 16S rRNA 염기서열 외에는 밝혀진 정보가 없다.

Schmidt 등은 북태평양의 빈영양 해양 생태계를 대상으로 16S rRNA 염기서열을 분석하였다(60). 농축된 시료에서 핵산을 추출한 후에 bacteriophage lambda를 이용해 cloning하

였으며, 총 37개의 prokaryotic rDNA clone을 분석하여 cyanobacteria와 proteobacteria group에 속하는 염기서열들을 확인하였다. Proteobacteria gamma group에 속하는 염기서열들은 해양에서 분리된 종들을 포함하는 다수의 분류군으로 분산되었으나 cyanobacteria와 proteobacteria alpha group의 염기서열들은 전부 SAR7 및 SAR11 cluster와 밀접한 유연관계를 나타내었다.

Mullins 등은 Sargasso Sea에 서식하는 빈영양 해양 세균 군집의 계통분류학적 다양성을 조사하기 위하여 PCR 방법으로 증폭된 16S rRNA gene의 염기서열을 해독하였으며 해양 생태계에서 보고된 염기서열 자료와 함께 비교 분석하였다(49). 염기서열 비교 작업에 이용된 자료는 배양 가능한 균주의 자료뿐만 아니라 태평양에서 보고(60)된 37 균주의 자료와 Bermuda 해역에서 보고(21)된 29 균주의 자료를 포함하였으며 Sargasso Sea의 자료는 이미 보고(11, 26)된 자료를 포함하여 총 60 균주였다. 분석결과 해양 표층에서는 proteobacteria alpha, gamma group, cyanobacteria에 속하는 다양한 미지의 세균 군집들이 큰 개체군을 형성하고 있음을 알 수 있었으며, Sargasso Sea에서 확인된 염기서열 중 다수가 태평양과 Bermuda 해역에서 보고된 자료와 거의 동일한 종 수준의 유사도를 나타내었다. 따라서 이들 군집의 서식지가 매우 광범위할 것으로 판단되며 지역적으로 큰 차이가 있는 두 대양에서의 물질순환에 공통적인 세균 군집들이 중요한 역할을 할 것으로 추측되지만 현재 배양이 가능한 균주 중에서는 계통분류학적으로 유사한 균주가 없기 때문에 생리적 특성 등을 예측할 수는 없다. 또한 시료에서 확인된 전체 염기서열 중에서 중복된 염기서열의 출현 빈도를 이용하면 coverage value를 계산할 수 있다(27). Coverage value (C)는 실험결과가 현장에 실제로 존재하는 세균 군집을 반영하는 비율을 의미하며 아래와 같은 수식에 의해 계산된다.

$$C = 1 - (n_1/N)$$

$n_1$ : the number of unique clones,  $N$ : the total number of clones.

97% 이상의 유사도를 동일한 group의 기준으로 하였을 때 Sargasso Sea에서 분석된 염기서열의 coverage value는 81%였으며, Schmidt 등이 보고한 태평양의 자료는 68%로 비슷한 수준이었다. 특히 태평양의 자료는 shotgun cloning 방법을 사용하여 염기서열을 확인한 반면에 Sargasso Sea와 Bermuda 해역의 자료는 PCR 방법을 사용하였음을 주목할 필요가 있다. 따라서 세균 군집 연구에 각기 다른 분자생물학적 방법을 적용하였음에도 불구하고 유사한 결과가 도출된 것은 실험 과정에서 유발되는 정보의 왜곡(bias)이 매우 낮음을 암시한다.

DeLong 등은 PCR 방법으로 증폭된 16S rDNA를 cloning한 후에 염기서열을 분석함으로써 Santa Barbara 해협의 표층에 서식하는 부착(macroaggregate-attached) 세균과 부유(free-living) 세균 군집의 phylogenetic diversity를 조사하였다(13). 실험결과 부착 세균 군집과 부유 세균 군집의 시료에서 확인된 16S rDNA의 염기서열 및 RFLP pattern이 서로 상이하였으며, 수층에서 세균 군집에 미세서식지(micro-

habitat)를 제공하는 입자상 유기물의 표면에서는 부유 세균의 우점종과는 다른 세균 군집이 번식함을 알 수 있었다. Cyanobacteria를 제외한 부착 세균 군집은 *Cytophaga*와 *Flavobacterium*이 55%였으며 *Planctomyces*가 22%, proteobacteria gamma group이 11%를 차지하였다. *Cytophaga-Flavobacterium* group에 속하는 염기서열들은 *Saprospira grandis*, *Halicomenobacter hydrossis*, *Cytophaga lytica*와 유사하였다. *Cytophaga* group은 gliding motility와 다양한 고분자 유기물을 분해할 수 있는 능력이 있으며(77) 이러한 특성은 부착 세균 군집에서의 높은 분포와 관련이 있을 것으로 추측된다. 그러나 부유 세균 군집은 구성원의 대다수가 proteobacteria alpha group으로 41%였으며 proteobacteria gamma group은 16%를 차지하였다. 특히 proteobacteria alpha group에 속하는 것으로 판단된 염기서열들은 기존의 배양 가능한 세균들과는 전혀 달랐으며 오히려 Sargasso Sea(11, 26)와 태평양에서 보고(60)된 염기서열과 가까운 유연관계를 나타내었다. Fukami 등도 기존의 배양 방법을 이용하여 부착 세균 군집과 부유 세균 군집을 조사하였으며 입자상 유기물의 분해가 진행됨에 따라 두 군집이 변화하는 것을 관찰하였다(22). 그러나 Fukami 등의 실험에서는 5분류군의 세균 군집만을 확인하였으며 부착 세균과 부유 세균 군집에서 함께 확인되는 균주가 많았다. 따라서 부착 세균과 부유 세균 군집에서 중복되어 확인된 염기서열이 없었으며 다수의 분류군이 확인된 DeLong 등의 연구 결과와는 큰 차이가 있다.

16S rRNA 염기서열 해독이 유용한 분석방법이지만, 일반적으로 염기서열 분석에는 많은 시간과 노력이 요구된다. 또한 세균 군집의 구조 분석 및 시간적, 공간적 역동성을 파악하기 위해서는 많은 시료의 분석이 필요하다. 따라서 16S rRNA 염기서열 분석방법을 생태학적 연구에 폭 넓게 활용하는데 실험부담이 장애 요인으로 작용하며 조사 정점이 많을수록 어려움은 더욱 증가된다. 염기서열 분석 작업에 PCR 방법을 이용하면 시간과 노력이 많이 절약되지만 새로운 문제점들이 발생할 수 있다. Strict barophilic bacteria가 혼합 배양된 시료를 대상으로 PCR 반응을 이용하여 연구한 결과에 의하면 실제로 존재하지 않는 핵산(chimeric DNA)이 증폭될 수도 있으며 이는 혼재된 16S rRNA gene의 절편들이 hybrid molecule을 형성하고 PCR 반응으로 증폭됨으로써 발생된다(42). 비록 낮은 확률이지만 이러한 현상이 자연 생태계의 시료에서도 발생할 가능성이 있으며, 실제로 Mullins 등이 Sargasso Sea의 시료에서 확인한 염기서열 중에서도 chimeric product가 확인되어 *Alteromonas haloplanktis*와 *Cytophaga lytica*의 절편들과 유사도가 컸다(49). 또한 최근에는 시료와 PCR primer에 의해 PCR 반응이 영향을 받는다는 보고도 있다. Farrelly 등은 genome의 크기가 1,740-5,900 kb이며 16S rRNA gene의 수가 2-10인 4종의 세균으로 구성된 model community를 만들고 PCR 반응으로 16S rRNA의 절편을 증폭하는 실험을 하였다(18). 실험결과 genome의 크기와 16S rRNA gene의 수가 PCR 반응에 영향을 끼쳐 각 균주의 16S rRNA가 증폭되는 비율이 달랐다. Suzuki와 Giovannoni는 각기 다른 조합의 PCR

primer를 이용하여 두 군집의 16S rRNA를 증폭한 결과, 519F-1406R primer에서는 시료의 초기 혼합 비율이 잘 반영되었으나 27F-338R primer에서는 심한 왜곡이 발생하여 초기의 비율과 관계없이 비슷한 비율의 생성물이 증폭되는 경향이 관찰되었다(69). 따라서 자연 환경에서 추출된 핵산에 PCR 방법을 적용하여 세균 군집의 구조를 이해하려는 연구에서는 결과의 해석에 주의할 필요가 있다.

## DNA-Hybridization

환경 미생물 생태학에서 적용 가능한 분자생물학적 방법에는 16S rRNA의 염기서열을 분석하는 방법 외에도 다른 접근 방법이 있을 수 있으며, 16S rRNA의 특정한 염기서열을 목표로 하는 DNA probe를 이용한 hybridization 실험이 좋은 예이다. 특히 세포 내에서 유지되는 rRNA 분자의 수는 다른 유전자에 비해 크기( $10^3$ - $10^5$ ) 때문에 hybridization 실험에 유리하며 쉽게 확인될 수 있다. 따라서 oligonucleotide probe는 자연 생태계에 서식하는 특정 세균 군집을 연구하는데 아주 유용한 도구이며, 염기서열 분석과 달리 세균의 성장 속도와 생리적 활성도를 반영할 수 있다. 기존의 축적된 염기서열 자료를 이용하면 다양한 수준의 probe 설계가 가능하므로 추적 대상 분류군의 범위를 결정할 수 있으며, 다양한 생태계에서 확인되는 새로운 염기서열들은 새로운 probe의 설계를 가능하게 한다. 현재 subspecies(59)부터 domain(25)까지 다양한 수준의 probe가 개발되어 있으며, proteobacteria group(46) 등 특정 분류군뿐만 아니라, sulfate-reducing bacteria(14) 같은 특정 기능을 갖는 군집의 probe가 설계되어 있다. 또한 probe에 방사성 동위원소 또는 형광 물질을 부착시키면 다양한 실험이 가능하여 dot blot assay(55)에 의한 정량적인 분석과 whole-cell hybridization(72)에 의한 개체 수준의 직접적인 관찰 및 계수도 가능하다.

DeLong 등은 Santa Barbara 해협 표층 시료를 10  $\mu$ m filter로 여과함으로써 부착 생물과 부유 생물 군집을 분리하고, 각각의 시료에서 추출된 핵산을 cloning한 후 염기서열을 확인하였을 뿐만 아니라 domain-specific oligonucleotide probe를 이용하여 hybridization 실험도 하였다(13). 부유 생물 군집의 시료에서는 계절에 따라 Archæa가 1.0-2.3%를 차지하였으며 Bacteria는 52-54%를, Eucarya는 41-47%가 확인되었다. 조류(algae)가 포함된 부착 생물 군집에서는 Eucarya가 57-72%의 높은 분포를 보였으며, Bacteria는 28-36%를 차지하였다. 또한 북태평양에서도 대부분 Bacteria로 98%가 확인되었으며(12), Woods Hole에서는 Archæa가 0.1%, Bacteria는 68%, Eucarya는 7%를 차지하였다(60). Giovannoni 등도 Sargasso Sea에서 dot blot hybridization 실험으로 우점 군집을 조사하였는데 Bacteria 군집이 가장 컸으며 SAR11 cluster는 12.5%의 분포가 확인되었다(25). 따라서 해양 생태계에서는 bacteria 군집이 우세함을 알 수 있다.

염기서열 분석 작업이 집중된 해양 생태계에서는 상대적으로 hybridization 방법을 이용한 실험결과가 적은 편이며 오히려 담수 생태계에서 다양한 연구가 진행되어 magnetotactic cocci의 다양성 확인 등에 응용되었다(64). 또한

Huber 등은 미국 Yellowstone National Park의 Obsidian Hot Pool에서 확인되었던 16S rRNA 염기서열을 토대로 oligonucleotide probe를 설계하였으며, 배양액 시료를 대상으로 whole-cell hybridization 방법을 적용함으로써 염기서열만이 보고되었던 균주를 순수 분리 및 배양하는데 성공하였다(31).

자연 생태계에서 지구 구성 원소의 생물학적 전환 및 순환 과정은 군집 수준의 반응이 관여하지만 실험방법상의 제약으로 인하여 원소의 순환에 관여하는 군집의 분류학적, 생리학적 다양성에 관한 이해가 부족한 실정이다. 그러나 최근에는 고전적인 배양 방법의 한계점을 극복하기 위하여 16S rRNA를 대상으로 분자생물학적 방법을 적용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 수계 생태계의 황순환에 중요한 역할을 담당하는 황환원세균(Sulfate-reducing bacteria, SRB)은 proteobacteria delta subclass에 속하며 일반적으로 분리 배양 및 동정이 어렵지만 혐기성 생물막(anaerobic biofilm), 퇴적토 등을 대상으로 16S rRNA의 염기서열 분석결과가 많이 보고되었다. Devereux 등은 황환원 속도가 낮은 Santa Rosa Sound의 퇴적토 시료와 황환원 속도가 빠른 Chapman's Marsh의 퇴적토 시료에서 추출된 16S rRNA와 황환원세균 군집에 특이적인 DNA probe를 이용하여 황환원세균 군집의 분포와 구조를 조사하였다(15). 황환원 속도가 낮은 퇴적토에서는 SRB rRNA가 전체 rRNA의 2-5%에 불과하였으며 acetate를 electron donor로 사용할 수 없는 *Desulfovibrio*가 우점종으로 확인되었다. 그러나 황환원 속도가 높은 Chapman's Marsh의 퇴적토에서는 전체 rRNA의 8-30%까지 SRB rRNA가 확인되어 황환원세균의 분포가 많음을 알 수 있었다. 또한 Santa Rosa Sound의 시료에서 우점종으로 확인된 *Desulfovibrio* 보다는 *Desulfohalobium*가 10배 이상의 높은 분포를 갖는 우점종이었다. Chapman's Marsh에는 일차생산자의 성장이 활발하여 많은 유기물이 공급되며 sulfate-reducing activity도 매우 컸다. 따라서 두 조사 지역의 서로 다른 환경 요인이 황환원세균 군집의 분포뿐만 아니라 군집의 구조에도 영향을 끼쳤음을 알 수 있다.

또한 철( $Fe^{3+}$ )과 망간( $Mn^{4+}$ )을 환원시킬 수 있는 금속환원세균(metal-reducing bacteria)은 수계 생태계에서 금속의 순환에 관여하며 *Shewanella putrefaciens*와 *Geobacter metallireducans* 등이 알려진 바 있다(43, 44). 그러나 수층에서의 화학반응 때문에 금속환원세균 군집의 분포와 활성을  $Fe^{2+}$ 와  $Mn^{2+}$ 의 농도만으로 파악하기에는 어려움이 많았다. DiChristina와 DeLong은 *S. putrefaciens*의 16S rRNA 염기서열에 특이적인 oligonucleotide probe를 사용함으로써, 지류에서 많은 금속 성분이 유입되며 호수의 저층에서 ferromanganese nodule이 형성되는 미국의 Oneida 호수에 서식하는 금속환원세균을 조사하였다(16). 시료에서 직접 추출된 RNA를 대상으로 hybridization 실험을 한 결과 수층 시료에서는 이들 군집을 확인할 수 없었지만 퇴적토의 표층 시료에서는 전체 eubacterial rRNA 중 최고 2.2%가 *S. putrefaciens*인 것으로 나타났다.

특정한 세균 군집의 연구에 유용한 DNA-hybridization 방법은 병원균 및 지표 세균의 추적에도 활용될 수 있다. 현재

다양한 수환경을 대상으로 이용되는 분변성 오염의 지표세균은 대장균이다. 그러나 대장균을 이용한 실험결과로는 분변성 오염의 유무만을 판단할 수 있으며 축분과 인분 등 오염원의 조성에 관한 정보는 얻을 수 없다. 오염원의 조성을 파악하기 위한 방법으로 시료에 존재하는 fecal coliform과 fecal streptococci의 분포 비율을 이용함으로써 인분과 축분을 구별할 수 있는 방법이 제시되었지만, 분변이 수계에 노출된 후에 두 세균 군집의 사멸율이 다르기 때문에 오염원과의 거리가 먼 수환경을 조사하기에는 문제점이 있다(23). *Bacteroides*는 인분과 축분을 구별할 수 있는 유용한 지표세균이지만 혐기적 배양 조건과 생화학적 동정 방법이 까다롭기 때문에 실제로 수환경의 분변성 오염을 추적하는 데에는 어려움이 많다(2). 배양과 동정이 어려운 세균 군집의 연구에는 분자생물학적 방법을 적용하는 것이 유리하며, Kreader는 *Bacteroides*의 16S rRNA에 특이적인 primer와 probe를 선택하였으며 PCR 방법과 hybridization 방법을 병행하여 축분과 인분을 구별하는 실험결과를 보고하였다(37). 9개의 인분 시료와 70개의 다양한 축분 시료를 이용하여 실험한 결과 67-78%의 인분 시료가 양성 반응을 보인 반면에 축분 시료에서는 7-11%만이 양성 반응을 나타내었다. 따라서 *Bacteroides* 등 특정 지표세균의 16S rRNA를 조사하는 방법은 식수원의 분변성 오염을 추적하는데 유용한 방법으로 사용될 수 있을 것이다. 또한 Leff 등은 토양과 담수 환경에 많이 분포하며 병원균으로 작용할 수 있는 *Burkholderia cepacia*를 확인하기 위하여 기존의 방법들과 rRNA를 목표로 하는 DNA probe를 이용하는 방법을 함께 적용하였다(40). 담수에서 분리된 균주들을 API test, TB-T agar(29), fatty acid methyl ester (FAME) profile(71), species-specific probe를 사용하여 확인하였으며 각 방법의 효율성을 검토한 결과, API test를 이용하였을 때 41%의 잘못된 결과를 나타내었으며, 20% 이상의 균주가 특정 선택배지(TB-T agar)에서 성장하지 못하였으므로 두 방법은 모두 자연 환경에서 분리된 병원균의 확인에 부적절한 방법을 알 수 있었다. FAME profile 분석방법은 85% 이상의 균주를 확인할 수 있었으나 실험방법이 복잡하므로 다수의 정점을 대상으로 많은 균주를 확인하는 방법으로는 비용과 시간의 관점에서 많은 제약이 뒤따를 것으로 예상되었다. 따라서 제한된 비용과 시간 내에서 많은 시료의 분석이 요구되는 병원성 세균의 확인 작업에는 분자생물학적 접근 방법이 우수한 것으로 판단되었다.

그러나 특정 DNA probe를 이용한 실험방법은 특정 분류군, 특히 배양이 어려운 세균 군집의 연구에 적합하다는 장점은 있으나 다양성을 이해하기 위한 세균 군집 구조의 총체적인 분석에는 한계점이 있다. 높은 수준(domain)부터 낮은 수준(subspecies)까지의 다양한 probe를 차례로(top-to-bottom) 적용하면 이러한 한계점을 극복할 수 있지만 병행 실험이 적은 경우는 편중된 결과를 얻기 쉽다. 따라서 군집 구조에 대한 보다 구체적인 정보를 얻기 위해서는 많은 종류의 probe를 설정하고 그에 따른 각각의 실험을 수행하여야 하므로 염기서열의 분석과 마찬가지로 많은 시간과 노력이 필요하게 된다. 특히 형광현미경의 관찰이 필수적인

whole-cell hybridization 실험은 결과 판독이 어려우며 전문가의 많은 노동력을 요구한다. 그러므로 많은 시료를 분석해야 하는 생태학적 연구에 적용이 어렵다.

## Community Fingerprinting

다양한 생태계에 서식하는 세균 군집을 연구하기 위하여 염기서열 분석과 hybridization 실험이 집중적으로 진행되었지만 앞에서 언급된 문제점들을 극복하기 위해 다른 방법들도 시도되었다. 세균 군집의 구조와 시, 공간적 역동성을 파악하기 위해서는 많은 시료의 분석이 요구되므로 새로운 연구 방법들은 주로 실험 과정에서 소요되는 시간과 노동력을 줄이기 위해 노력하였다. Restriction fragment length polymorphism(RFLP) 분석이 이러한 접근 방법의 대표적 예라 할 수 있으며 16S rRNA clone의 염기서열 작업량을 줄이기 위한 screening에도 자주 이용되었다. RFLP pattern 분석방법은 16S rRNA clone을 구분하는 유용한 방법이며 염기서열 분석이 없이도 세균 군집의 다양성 등을 파악할 수 있게 한다. Moyer 등은 하와이의 hydrothermal vent에 서식하는 세균 군집을 조사하기 위하여 PCR 반응으로 증폭된 16S rDNA를 cloning 하였으며 RFLP pattern을 이용하여 각 clone의 16S rDNA fingerprint를 확인하였다(48). 동일한 pattern을 나타내는 clone들은 같은 operational taxonomic unit (OTU)에 속하는 것으로 가정하였을 때, 총 48 clone이 12 OTU로 구분되었으며 가장 우점하는 OTU의 점유 비율은 47%였다. 또한 Martinez-Murcia 등은 염분도(salinity)가 각기 다른 5 연못을 대상으로 세균 군집을 조사하였다(47). 이들이 사용한 실험 방법은 더욱 간단한 방법으로 현장 시료에서 증폭된 16S rDNA의 cloning 과정을 생략하였다. 다수의 rDNA가 혼합된 시료에 제한 효소를 처리한 후 전기영동을 하면 gel 상에서 확인되는 band의 총합계는 시료의 종다양성을 반영할 것으로 판단하였으며 분해능을 향상시키기 위하여 polyacrylamide gel을 이용하였다. 실험결과 eubacterial community는 염분도가 증가함에 따라 종다양성이 감소하지만 archaeobacteria는 오히려 증가하는 결과를 확인하였다. 그러나 RFLP 분석방법이 시간과 노력을 줄일 수 있으며 세균 군집의 다양성을 파악할 수 있는 간편한 방법임에는 틀림이 없으나 실험 결과 분리된 절편들의 크기만으로 얻을 수 있는 정보량이 제한되며 다양한 구성원이 혼합된 자연 생태계의 세균 군집을 대상으로 적용하기에는 아직 문제점이 많다.

염기서열의 완벽한 해독 작업없이 시료의 염기서열의 차이점을 분석하는 다른 방법에는 denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)와 single strand conformation polymorphism(SSCP) pattern 분석방법 등이 있다. DGGE 방법은 전기영동을 할 때 핵산의 이동 속도(electrophoretic mobility)는 helical form과 melted form에 따라 큰 차이를 나타내며, double stranded form이 single stranded form으로 변화되는 정도는 시료의 GC content 등 염기서열의 차이에 따라 영향을 받는다는 점을 이용한 것이다(41). 핵산의 크기는 같으나 염기서열은 각기 다른 핵산들이 혼합된 시료를 denaturing gradient를 갖는 polyacrylamide gel에 double stranded form

의 형태로 투입한 후에 전기영동을 하면 시료는 이동 거리에 따라 각기 다른 농도의 urea 또는 formamide에 노출된다. Denaturant의 영향에 의해 double stranded form의 핵산이 single stranded form으로 전환되는 정도는 염기서열(melting domain)에 의해 결정되며 따라서 gel의 특정 위치에서는 혼합된 시료 중에서 특정 염기서열을 갖는 시료만이 single stranded form의 형태를 갖게 된다. 전기영동을 할 때 핵산의 이동 속도는 single stranded form이 훨씬 작으므로, gel의 특정 위치에서 single stranded form으로 전환된 시료는 이동이 거의 정지되며 double stranded form을 유지할 수 있는 시료만이 이동을 계속한다. 그러므로 낮은 농도의 denaturant가 함유된 gel의 상단에는 낮은 melting temperature를 갖는 시료가 잔류하며 높은 melting temperature를 나타내는 시료는 gel의 하단에서 확인이 된다. 따라서 혼합된 시료에 DGGE 방법을 적용하면 동일한 크기를 갖으나 염기서열이 다른 핵산의 분리가 가능하며(51), GC-rich sequence를 PCR primer에 부착시킴으로써 분리 효율을 더욱 증대시킬 수 있다(61). Muzer 등은 세균 군집의 유전적 다양성을 분석하기 위하여 16S rRNA의 variable V3 region을 PCR 반응으로 증폭한 후 DGGE 방법으로 구분하는 방법을 제안한 바 있으며 폐수 처리장의 생물막(biofilm)에서 황환원세균(sulfate-reducing bacteria) 군집을 조사하였다(50). 또한 Teske 등도 Mariager Fjord(Denmark)에서 DGGE 방법과 염기서열 분석 방법을 함께 사용하여 황환원세균 군집을 조사하였으며 proteobacteria delta group에 속하는 새로운 황환원세균을 확인하였다(70).

SSCP pattern 분석방법은 시료의 염기서열의 차이에 따라 single strand의 secondary structure가 변화하며 그에 따른 이동성의 차이에 따라 시료의 염기서열의 차이를 분석하는 방법으로 최근에 돌연변이 등의 연구에 다수의 시료를 대상으로 염기서열의 분석을 통하지 않고 간편하게 염기서열의 차이점을 확인하는 방법으로 많이 이용되고 있다(30). SSCP pattern 분석의 실험 과정은 DGGE의 정반대라 할 수 있으며 염기성 완충용액 또는 열에 의해서 denaturation된 핵산이 neutral gel에 투입된다. Single stranded form으로 투입된 시료는 gel에서 re-folding되어 2차 구조를 형성하게 되며 이러한 과정은 염기서열에 의해 영향을 받는다. 전기영동을 할 때 핵산의 이동 속도는 염기의 길이와 분자량뿐만 아니라 핵산의 모양에 의해서도 영향을 받는 것으로 알려져 있다(80). 따라서 동일한 크기의 핵산도 염기서열에서 차이가 있으면 서로 다른 2차 구조를 형성하기 때문에 이동성의 차이를 나타내게 된다. 일반적으로 사용되는 polyacrylamide gel은 acrylamide와 N,N'-methylene-bisacrylamide의 비율이 29:1 또는 19:1이나 SSCP pattern 분석방법에서 사용되는 gel은 49:1에서 99:1까지의 비율을 갖는다. 따라서 증가된 pore의 크기가 single strand의 secondary conformation에 더욱 민감하게 반응하게 된다. 또한 SSCP pattern 분석방법에서 사용되는 gel은 glycerol(5-10%)을 포함하게 되는데 정확한 기작은 밝혀지지 않았지만 glycerol이 갖는 weak denaturing action 때문에 single-stranded nucleic acids의 보다 넓은 면적이 gel과 반응하게 함으로써 염기서열의 차이에 따

른 이동 거리의 변화를 크게 하는 작용을 할 것으로 생각하고 있다(39). SSCP 분석은 PCR로 증폭된 핵산에서 염기서열의 미세한 차이를 확인하는 간단하고 효율적인 방법으로 알려져 있으며(62), Hayashi는 염기서열에 돌연변이가 있는 시료의 97%가 이동성의 차이를 나타내었다고 보고하였다(30). Lee 등은 SSCP의 방법을 세균 군집의 연구에 적용할 것을 제안하였으며 PCR 반응으로 증폭된 16S rDNA V3 region의 SSCP pattern을 분석하였다(1, 38). 부영양(eutrophic) 상태인 연못과 빈영양(oligotrophic) 상태인 소양호를 대상으로 분석한 결과 proteobacteria gamma group에서 큰 차이가 있었으며, 부착 세균 군집과 부유 세균 군집의 군집 구조가 서로 다른 것을 확인할 수 있었다.

그러나 DGGE와 SSCP pattern 분석방법이 모두 염기서열의 차이점을 분석할 수 있는 효율적인 방법이며 분리된 각 시료는 PCR 방법으로 재증폭(re-amplification)하면 염기서열을 해독할 수 있다는 장점을 갖지만 문제점도 역시 존재한다. DGGE 방법의 경우 이미 적용된 보고가 있음에도 불구하고 gradient gel을 만드는 과정이 좀더 복잡하며 GC clamp(40 bp)가 필요하여 큰 크기의 primer를 합성해야만 한다는 단점이 있다. 또한 primer에 부착된 GC clamp가 PCR 반응에 미치는 영향이 검증되지 않았으며 혼합된 시료의 PCR 증폭 과정에서 형성되는 heteroduplex molecule은 결과의 판독을 어렵게 할 수 있다(58). 반면에 SSCP pattern 분석방법은 위와 같은 단점은 없으나 동일 핵산이 각기 다른 두 single strand로 확인되므로 gel상에서 나타난 결과를 판독하는데 곤란을 겪을 수도 있다. 또한 완벽한 염기서열의 해독과 달리 DGGE와 SSCP pattern 분석방법은 모두 핵산의 양쪽 말단 부위에서 발생하는 염기서열의 차이점은 확인하기 어렵다는 단점이 있다.

## 결론

이상과 같이 수계 생태계에 서식하는 세균 군집의 구조와 다양성을 연구하는데 유용한 분자생물학적 분석방법들을 rRNA를 중심으로 살펴보았다. 배지에서 배양된 세균만을 자연 환경에 존재하는 미생물 군집의 전부로 인식하던 시기에 형광염색 방법의 개발은 생태계에 대한 이해의 범위를 크게 확장시켰다. 과거에는 정확한 값을 측정할 수 없었던 세균 군집의 생물량(biomass) 등 새로운 정보의 축적은 미생물순환고리(microbial loop)와 같은 새로운 이론의 발전을 가능케 하였다. 미생물 생태학 분야에서 분자생물학적 방법의 개발은 이와 유사한 파급효과를 가져올 것으로 예상된다. 현재 다양한 생태계를 대상으로 총세균수, 세포의 생리적 활성도, 특정 효소의 활성도 등의 연구가 진행되고 있으며 이러한 접근 방법들은 특정 생태계에 서식하는 세균 군집에 관해 과거보다 더욱 구체적인 정보를 제공한다. 그러나 현재의 접근 방법은 세균 군집의 분포와 활성도에 관한 정보를 군집 수준에서 제공할 뿐이며 개별적인 분류군 수준에서 차별화된 정보를 얻기는 어렵다. 분자생물학적 분석방법은 형광현미경에서 존재만이 확인되던 많은 세균 군집에 접근할 수 있는 유용한 수단임에 틀림이 없으며, 다양한 생태계



에서 물질순환에 관여하는 세균 군집에 관한 새로운 수준의 정보를 제공할 수 있다. 특히 수계 생태계의 시료는 세균 군집의 밀도가 낮아 시료의 농축 과정이 필요하다는 점이 문제점으로 지적될 수 있으나 반면에 각종 효소의 반응을 억제하는 humic substance가 토양 생태계보다 적으므로 분자생물학적 방법을 적용하기에 유리하다.

그러나 어떠한 분석방법도 선택성(selectivity)을 가질 가능성이 있으며 현재까지 자연 생태계의 군집에 관한 정보를 왜곡없이 정확하게 제공할 수 있는 완벽한 방법은 없다고 보아도 무방하다. 분자생물학적 연구방법 역시 이러한 한계점이 있으며, 시료의 채취 단계와 cell lysis의 효율 및 핵산 추출의 효율, PCR 반응에서의 differential amplification 등이 주요 쟁점이 되고 있다. 따라서 이를 극복하기 위한 방법상의 개선이 필요하며 자연 생태계에 서식하는 세균 군집을 정확히 반영할 수 있는 핵산 추출방법을 개발하는 것이 가장 근본적인 문제점을 해결할 수 있는 길이다. 그 외에도 적합한 primer와 probe의 설계 등이 필요할 것이다. 또한 분자생물학적 방법을 미생물 생태학에 적용함에 있어서 현재까지 알려지지 않은 다양한 분류군의 존재를 확인하는 연구도 중요하나 특정 군집의 분포뿐만 아니라 활성 및 생리적 특성을 파악함으로써 해당 생태계에서의 기능과 역할도 함께 이해할 수 있는 연구방법의 개발이 병행되어야 할 것이다. Ribosomal RNA 외에도 수많은 유전자들이 분자생물학적 분석방법의 대상이 될 수 있으며 물질순환 등에 직접적인 관련이 있는 유전자를 분석함으로써 이러한 요구는 충족되어질 수 있을 것이다.

## 감사의 말

본 연구는 서울대학교 분자미생물학연구센터를 통한 한국 과학재단 우수연구센터 지원금에 의하여 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. 이동훈. 1995. 소양호 세균군집구조의 분자생태학적 연구. 이학박사학위논문. 서울대학교.
2. Allsop, K. and D.J. Stickler. 1985. An assessment of *Bacteroides fragilis* group organisms as indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.* **58**, 95-99.
3. Amann, R., J. Stromley, R. Devereux, R. Key, and D.A. Stahl. 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 614-623.
4. Amann, R., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1994. Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. *ASM News* **60**, 360-365.
5. Arahall, D.R., F.E. Dewhirst, B.J. Paster, B.E. Volcani, and A. Ventosa. 1996. Phylogenetic analyses of some extremely halophilic Archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3779-3786.
6. Atlas, R.M. and R. Bartha. 1993. Microbial ecology, 3rd ed. Benjamin Cummings, Redwood City.
7. Azam, F., T. Fenchel, J.G. Field, J.S. Gray, L.A. Meyer-

8. Reil, and F. Thingstad. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**, 257-263.
9. Boivin-Jahns, V., A. Bianchi, R. Ruimy, J. Garcin, S. Daumas, and R. Christen. 1995. Comparison of phenotypic and molecular methods for the identification of bacterial strains isolated from a deep subsurface environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3400-3406.
10. Brettar, I. and G. Rheinheimer. 1991. Denitrification in the central Baltic: Evidence for H<sub>2</sub>S-oxidation as motor of denitrification at the oxic-anoxic interface. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **77**, 157-169.
11. Brettar, I. and M.G. Höfle. 1993. Nitrous oxide producing heterotrophic bacteria from the water column of the central Baltic: Abundance and molecular identification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **94**, 253-265.
12. Britschgi, T.B. and S.J. Giovannoni. 1991. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1707-1713.
13. DeLong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5685-5689.
14. DeLong, E.F., D.G. Franks, and A.L. Alldredge. 1993. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol. Oceanogr.* **38**, 924-934.
15. Devereux, R., M.D. Kane, J. Winfrey, and D.A. Stahl. 1992. Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**, 601-609.
16. Devereux, R., M.E. Hines, and D.A. Stahl. 1996. S cycling: characterization of natural communities of sulfate-reducing bacteria by 16S rRNA sequence comparisons. *Microb. Ecol.* **32**, 283-292.
17. DiChristina, T.J. and E.F. DeLong. 1993. Design and application of rRNA-targeted oligonucleotide probes for the dissimilatory iron and manganese-reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4152-4160.
18. Erdmann, V.A. and J. Wolters. 1986. Collection of published 5S, 5.8S and 4.5S ribosomal RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **14**, r1-r59.
19. 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.
20. Ferguson, R.L., E.N. Buckley, and A.V. Palumbo. 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 49-55.
21. Fuhrman, J.A., K. McCallum, and A.A. Davis. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**, 148-149.
22. Fuhrman, J.A., K. McCallum, and A.A. Davis. 1993. Phylogenetic diversity of substrate marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1294-1302.
23. Fukami, K., U. Smidu, and N. Taga. 1981. Fluctuation of the communities of heterotrophic bacteria during the decomposition process of phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **55**, 171-184.

23. **Geldreich, E.E.** 1976. Fecal coliform and fecal streptococcus density relationships in waste discharges and receiving waters. *Crit. Rev. Environ. Control.* **6**, 349-368.
24. **Giovannoni, S.J., E.F. DeLong, G.J. Olsen, and N.R. Pace.** 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* **170**, 720-726.
25. **Giovannoni, S.J., E.F. DeLong, T.M. Schmidt, and N.R. Pace.** 1990. Tangential flow filtration and preliminary phylogenetic analysis of marine picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2572-2575.
26. **Giovannoni, S.J., T.B. Britschgi, C.L. Moyer, and K.G. Field.** 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**, 60-63.
27. **Good, I.J.** 1953. The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika* **40**, 237-264.
28. **Gosink, J.J. and J.T. Staley.** 1995. Biodiversity of gas vacuolate bacteria from Antarctic sea ice and water. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3486-3489.
29. **Hagedorn, C., W.D. Gould, T.R. Bardinelli, and D.R. Gustavson.** 1987. A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2265-2268.
30. **Hayashi, K.** 1991. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Applic.* **1**, 34-38.
31. **Huber, R., S. Burggraf, T. Mayer, S.M. Barns, P. Rossnagel, and K.O. Stetter.** 1995. Isolation of a hyperthermophilic archaeum predicted by in situ RNA analysis. *Nature* **376**, 57-58.
32. **Höfle, M.G.** 1988. Identification of bacteria by low molecular weight RNA profiles: a new chemotaxonomic approach. *J. Microbiol. Methods* **8**, 235-248.
33. **Höfle, M.G.** 1988. Taxonomic structure of bacterial communities in mixed cultures as measured by low molecular weight RNA profiles. *Arch. Hydrobiol. Beih.* **31**, 71-77.
34. **Höfle, M.G.** 1992. Bacterioplankton community structure and dynamics after large-scale release of nonindigenous bacteria as revealed by low-molecular-weight-RNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3387-3394.
35. **Höfle, M.G. and I. Brettar.** 1995. Taxonomic diversity and metabolic activity of microbial communities in the water column of the central Baltic Sea. *Limnol. Oceanogr.* **40**, 868-874.
36. **Höfle, M.G. and I. Brettar.** 1996. Genotyping of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea by use of low-molecular-weight RNA profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1383-1390.
37. **Kreder, C.A.** 1995. Design and evaluation of Bacteroides DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1171-1179.
38. **Lee, D.-H., Y.-G. Zo, and S.-J. Kim.** 1996. Non-radioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3112-3120.
39. **Lee, S.-T., S.-K. Park, K.-H. Lee, S.A. Holmes, and R. A. Spritz.** 1995. A non-radioactive method for simultaneous detection of single-strand conformation polymorphisms (SSCPs) and heteroduplexes. *Mol. Cells* **5**, 668-672.
40. **Leff, L.G., R.M. Kernan, J.V. McArthur, and L.J. Shimkets.** 1995. Identification of aquatic *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* by hybridization with species-specific rRNA gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1634-1636.
41. **Lerman, L.S., S.G. Fischer, I. Hurley, K. Silverstein, and N. Lumelsky.** 1984. Sequence-determined DNA separations. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **13**, 399-423.
42. **Liesack, W., H. Weyland, and E. Stackebrandt.** 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microb. Ecol.* **21**, 191-198.
43. **Lovley, D.R.** 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.* **55**, 259-287.
44. **Lovley, D.R., S.J. Giovannoni, D.C. White, J.E. Champagne, E.J.P. Phillips, Y.A. Gorby, and S. Goodwin.** 1993. *Geobacter metallireducans* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch. Microbiol.* **159**, 336-344.
45. **Maidak, B.L., N. Larsen, M.J. McCaughey, R. Overbeek, G.J. Olsen, K. Fogel, J. Blandy, and C.R. Woese.** 1994. The Ribosomal Database project. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3485-3487.
46. **Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K. H. Schleifer.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**, 593-600.
47. **Martinez-Murcia, A.J., S.G. Acinas, and F. Rodriguez-Valera.** 1995. Evaluation of prokaryotic diversity by restriction digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**, 247-256.
48. **Moyer, C.L., F.C. Dobbs, and D.M. Karl.** 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 871-879.
49. **Mullins, T.D., T.B. Britschgi, R.L. Krest, and S.J. Giovannoni.** 1995. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol. Oceanogr.* **40**, 148-158.
50. **Muyzer, G., E.C. De Waal, and A.G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695-700.
51. **Myers, R.M., T. Maniatis, and L.S. Lerman.** 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **155**, 501-527.
52. **Oliver, J.D., L. Nilsson, and S. Kjelleberg.** 1991. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2640-2644.
53. **Olsen, G.J., D.J. Lane, S.J. Giovannoni, N.R. Pace, and D.A. Stahl.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**, 337-365.
54. **Pitulle C., K.O.F. Hedenstierna, and G.E. Fox.** 1995. A

- novel approach for monitoring genetically engineered microorganisms by using artificial, stable RNAs. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3661-3666.
55. **Raskin, L., L.K. Poulsen, D.R. Noguera, B.E. Rittmann, and D.A. Stahl.** 1994. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1241-1248.
  56. **Reysenbach, A.L., G.S. Wickham, and N.R. Pace.** 1994. Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink filament community in Octopus Spring, Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2113-2119.
  57. **Rozsak, D.B., D.J. Grimes, and R.R. Colwell.** 1984. Viable but not recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* **30**, 334-337.
  58. **Ruano, G. and K.K. Kidd.** 1992. Modeling of heteroduplex formation during PCR from mixtures of DNA templates. *PCR Methods Applic.* **2**, 112-116.
  59. **Salama, M., W. Sandine, and S. Giovannoni.** 1991. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1313-1318.
  60. **Schmidt, T.M., E.F. DeLong, and N.R. Pace.** 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* **173**, 4731-4738.
  61. **Sheffield, V.C., D.R. Cox, L.S. Lerman, and R.M. Myers.** 1989. Attachment of a 40-base pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 232-236.
  62. **Sheffield, V.C., J.S. Beck, A.E. Kwitek, D.W. Sandstrom, and E.M. Stone.** 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics.* **16**, 325-332.
  63. **Specht, T., J. Wolters, and V.A. Erdmann.** 1990. Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**, s2215-s2229.
  64. **Spring, S., R. Amann, W. Ludwig, K.H. Schleifer, and N. Petersen.** 1992. Phylogenetic diversity and identification of nonculturable magnetotactic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**, 116-122.
  65. **Sprinzl, M., J. Moll, F. Meissner, and T. Hartmann.** 1985. Compilation of tRNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **13**, r1-r49.
  66. **Stahl, D.A., D.J. Lane, G.J. Olsen, and N.R. Pace.** 1984. Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science* **224**, 409-411.
  67. **Stahl, D.A., D.J. Lane, G.J. Olsen, and N.R. Pace.** 1985. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1379-1384.
  68. **Staley, J.T. and A. Konopka.** 1985. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 321-346.
  69. **Suzuki, M.T. and S.J. Giovannoni.** 1996. Bias cause by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 625-630.
  70. **Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer, and N.B. Ramsing.** 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1405-1415.
  71. **Tompson, I.P., M.J. Bailey, R.J. Ellis, and K.J. Purdy.** 1993. Subgrouping of bacterial populations by cellular fatty acid composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102**, 75-84.
  72. **Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, and K.H. Schleifer.** 1993. Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1520-1525.
  73. **Ward, D.M., M.M. Beteson, R. Weller, and A.L. Ruff-Roberts.** 1992. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Adv. Microb. Ecol.* **12**, 219-289.
  74. **Waterbury, J.B., F.W. Valois, and D.G. Franks.** 1986. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* **214**, 71-120.
  75. **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.
  76. **Weisse, T.** 1992. The microbial food web and its sensitivity to eutrophication and contaminant enrichment; a cross-system overview. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* **76**, 327-337.
  77. **Woese, C.R., D. Yang, L. Mandelco, and K.O. Stetter.** 1990. The flexibacter-flavobacter connection. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**, 161-165.
  78. **Woese, C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
  79. **Wood, M.A. and D. Townsend.** 1990. DNA polymorphism within the WH7803 serogroup of marine *Synechococcus* spp. (Cyanobacteria). *J. Phycol.* **26**, 576-585.
  80. **Yap, E.P.H. and J.O. McGee.** 1994. Non-isotopic single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of PCR products. In H.G. Griffin and A.M. Griffin, PCR technology: current innovations. (ed.), CRC Press, Boca Raton.

(Received March 15, 1997)