

## 지하수 세균 군집의 유전적 다양성

김 여 원 · 민 병 례<sup>1</sup> · 최 영 길

(한양대학교 생물학과, 서울 133-791, <sup>1</sup>상명대학교 생물학과, 서울 110-743)

**적 요** - 서울시 소재 지하수 중 중금속으로 오염되어 음용수 이외의 생활 용수로 사용하고 있는 1개 정점과 음용수로 사용하고 있는 1개 정점, 대조군으로 강화도 천연 동굴의 1개 정점을 대상으로 실험을 실시하였다. 지하수 세균군집의 유전적 다양성의 변화를 보기 위해 지하수 세균 군집에서 16S rDNA를 증폭하는 primer로 PCR(polymerase chain reaction)을 실시한 후 ARDRA(amplified ribosomal DNA restriction analysis) 지문 분석으로 비교하였다. 16S rDNA를 증폭하여 제한효소 지문분석을 한 결과 *in situ*와 음용수에서 유전적 다양성이 상대적으로 크게 나타났다. 지하수 세균 군집의 ARDRA 지문 분석은 상이한 환경과 서식지를 반영한 유전적 차이를 빠르게 비교 분석할 수 있었으며 지하수의 오염도에 따른 미생물의 다양성(천연 동굴>음용수>오염수)을 확인할 수 있었다.

### 서 론

지구상에 분포하는 물 중에는 해수가 97.2%를 차지하고 그 나머지인 2.8%가 담수로 이루어져 있으며, 그 중 2.14%는 빙하이고 0.61%가 지하수, 0.009%가 지표수, 0.005%가 토양총내 수분 등으로 구성되어 있다(Horne & Goldman 1994). 선진국의 경우 지표수 자원의 수질이 좋고 풍부할지라도 지하수 이용시설과 겹비하고 있으며, 유럽의 경우에는 지하수의 음용수 의존도가 70~95%에 까지 달하고 있다.

생태계에서 미생물은 생태계의 유지를 위한 물질순환과 에너지 흐름 과정에 매우 중요한 역할을 담당하고 있는데 이는 거의 대부분 종속영양 미생물에 의해 수행되고 있다(Chapelle 1993). 이러한 기능 자체가 지하수 환경으로 유입되는 각종 오염물질에 대한 자정 기능을 나타내어 지하수 생태계의 자기제어 기능까지도 담당하고 있으므로(Bjornstad *et al.* 1997), 종속영양세균 군집의 구조와 기능을 이해하는 것은 이들의 유기물의 분해와 흡수 등 생태적 기능을 이해하는데 매우 중요하다.

지하수 생태계에서 미생물에 대한 초기 연구는 배양에 기초하여 군집수의 계수, 대사 활성도 측정, 및 물리화학적 환경요인과 세균 군집간의 상관관계 분석 등을 시도하였다(Balkwill 1989; Fredrickson *et al.* 1989; Brockman *et al.* 1992; 안 등 1998). 그러나 지하수 생태계에서 분리와 배양에 의존하여 세균 군집을 분석하는

방법은 극히 제한적인 생태적 기능을 해석할 수 있을 뿐이다. 세균 군집의 분리와 반복적인 배양은 세균 군집의 고유의 특성을 변화시킬 수 있으며, 배양 가능한 세균이 특정 생태계의 세균 군집의 특성을 대표한다고 보기 어렵기 때문이다. 이에 선택적 배양 없이 세균 군집의 기능을 파악하기 위한 새로운 방법으로 생리, 생화학적(Garland & Mills 1991) 및 분자생물학적 방법이 적용되었다(Massol-Deya *et al.* 1995).

균주의 동정을 목적으로 하는 Biolog plate는 분리와 배양을 하지 않고, 세균 군집 수준에서 생리학적 특성 분석을 빠르고 간단하게 분석할 수 있다. 저자들은 서울시 지하수내의 오염물질 정점과 대조군 정점에 따른 세균군집의 기능성 대사 다양성을 분석한 바 있다(안 등 1999). 그러나 미생물 군집의 배양을 통해 유일 탄소원 이용능에 기초하기 때문에 미생물 군집내에서 배양이 가능한 미생물들의 생리학적 성질만 분석에 이용되는 단점이 있다.

분자생물학적인 방법은 주로 DNA fingerprinting이다. 여기에 polymerase chain reaction(PCR)의 발달로 특정 DNA 부위를 증폭하는 random amplified polymorphic DNA analysis(RAPD-PCR)(Welsh *et al.* 1990), repetitive extragenomic palindromic elements(REP-PCR)(Versalovic *et al.* 1991), enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences(ERIC-PCR)(Bruijn *et al.* 1992), amplified fragment-length polymorphism(AFLP)(Janssen *et al.* 1996), amplified rDNA restriction

analysis (ARDRA) (Massol-Deya *et al.* 1995; Vaneechoutee *et al.* 1992) 방법 등이 사용되고 있다.

특히, 16S ribosomal RNA encoding gene (rDNA) 염기서열 분석은 진핵 생물과 원핵 생물의 계통분류학적 연구에 활용되어 동정 및 군집 수준의 지문 분석에 사용되고 있다. 16S rDNA의 특정부위는 진화 속도가 매우 느려 많은 생물체가 공통으로 보존된 염기서열과 이차구조를 나타내 다양한 분류군의 상호 비교를 가능케 한다. 그리고 16S rDNA의 가변 부위(variable region)는 종과 속간의 분화에 따른 다양성이 큰 부분으로 특정 분류군에만 존재하는 염기서열을 포함한다. 16S rDNA 염기서열 분석은 자연계 시료에서 직접 추출한 DNA와 배양해서 추출한 DNA를 이용하여 세균 군집의 확인과 계통분류학적 접근 등에 이용되고 있다. 분자생물학적 방법을 통하여 계통분류학적으로 분석한 결과, 표현형적인 분석보다 더 다양하게 나타났으며 지표수의 종과는 다른 종으로 분석되었다(Boivin-Jahns *et al.* 1995).

PCR로 증폭된 rDNA로 제한효소 지문분석을 하는 방법을 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) (Vaneechoutee *et al.* 1992)라 칭한다. ARDRA는 세균 동정에 사용될 뿐만 아니라 세균 군집 분석에도 사용될 수 있다. 즉, ARDRA는 서로 다른 생태 환경을 반영해 다른 지역이나 시간차의 변화에 따른 군집의 유전형 변화를 빠르게 분석하는데 사용될 수 있다(Massol-Deya *et al.* 1995).

본 연구에서는 서울시내 오염 지하수 정점과 비오염 정점을 선정하고 대조군으로 강원도 천연동굴의 지하수를 선정하여 PCR기법으로 증폭한 세 지하수 정점 세균 군집의 16S rDNA를 ARDRA 지문 분석하여 지하수 미생물 생태계의 유전적 다양성을 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료채취

서울시 지하수 관리 계획 기본 보고서(서울특별시 1996)를 토대로 서울 시내의 지하수 음용수 기준 초과 항목을 갖고 있는 지역을 오염 정점으로 선정하였다. 이 정점은 서울시의 화력 발전소 인근 지역으로 한강과 인접하고 있다. 서울시내의 음용수 정점은 서울 시내의 주택가 밀집 지역으로 오염원이 비교적 적은 양천구 약수터이고 대조군인 정점은 강원도 평창군 대화면 대화리의 천연동굴인 광천선굴을 택해 시료를 채취하였다. 서울 시내 지하수 시료의 채취는 관정으로부터 지하수를 20분간 충분히 훌러 보낸 후 멸균된 500 ml 채수병에 채수하였다. 강원도 동굴의 시료는 고여 있는 물을 멸균

된 500 ml 채수병에 채수하였다. 세균 군집의 분석을 위한 시료는 냉장 보관하여 24시간 이내에 실험실에서 분석하였다.

### 2. 물리, 화학적 환경요인의 분석

안 등(1998)의 물리, 화학적요인 분석 방법과 동일하다.

### 3. BIOLOG GN microplate를 이용한 지하수 세균군집의 대사다양성 분석

BIOLOG system의 응용 및 통계 분석은 안 등(1999)의 방법과 같다.

### 4. DNA의 추출

#### 1) In situ DNA의 추출

시료로부터 직접 DNA를 추출하기 위해서 채수된 시료 2l를 Sterivex-GV (Millipore) filter unit를 사용하여 Leff 등(1997)의 방법을 사용하였다.

#### 2) Cultured DNA의 추출

배양된 지하수 시료로부터 DNA를 추출하기 위해서 시료 5ml에 yeast extract를 최종 농도 2.5% 되게 넣고 9시간 배양한 후, Shilhavy 등(1984)의 방법으로 세균에서 genomic DNA 추출을 실시하였다.

### 5. DNA의 정제

PCR 수행에 알맞은 지하수 시료의 genomic DNA와 16S rDNA의 정제하기 위해서 US Bioclean kit (United States Biochemical Corporation, USA)를 이용하여 Vogelstein과 Gillespie(1979)의 방법을 사용하였다.

### 6. 전기영동

전기영동상에서 genomic DNA의 존재와 분자량을 보기 위해서 0.05 µg/ml Et-Br을 포함한 0.7% agarose gel (FMC Bioproduct, USA)에 시료를 넣고 Tris-acetate EDTA Buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA pH 8.0)를 사용하여 200 V, 100 mA로 30분간 전기영동하였다.

### 7. 16S rDNA의 중합연쇄반응 (Polymerase chain reaction) 증폭

PCR 증폭 과정은 Saiki 등(1988)의 방법을 조금 변형 해서 수행하였다. PCR 반응물 100 ml 안에는 20 mM Tri-Cl (pH 8.3), 100 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% gelatin, 각각 5 mM deoxynucleoside triphosphate (MBI Fermentas, USA), 100 pmol primer, 10 ng DNA 주형, 5U Taq polymerase (Gibco BRL, France)를 첨가하였다. 모

든 PCR 증폭 과정에는 DNA 주형을 제외한 negative control을 포함시켰다. PCR 반응은 35회 반복으로 PCR Thermal Cycler MP(TaKaRa, Japan)로 수행하였다.

지하수 세균에서 16S rDNA를 증폭하기 위해서 primer는 Weisburg 등(1991)이 제작한 primer를 택한 후 약간의 변형을 가해 Bioneer에서 합성했다. forward primer가 5'-GAGTTGGATCCTGGCTCAG-3', reverse primer는 5'-AAGGAGGGGATCCAGCC-3'이다.

첫 번째 반응은 95°C 3분 동안 DNA를 변성시키고 각 단계에서는 94°C 1분 DNA를 변성시키고, 60°C 1분 동안 DNA와 primer를 불이이고, 72°C 2분 동안 16S rDNA를 증폭하는 반응을 35번 반복하고 마지막으로 72°C 3분 동안 16S rDNA를 증폭한 후 4°C chilling 하였다.

지하수 군집의 PCR 증폭산물인 16S rDNA는 0.05 µg/ml Et-Br을 포함한 0.7% agarose gel을 Tris-acetate EDTA Buffer에서 100 mA, 200 V로 전기영동하였고, UV (Arcus II, Vilber Bio I D Loumat, France)에서 확인하였다.

#### 8. PCR 증폭산물의 제한효소 처리

지하수 군집의 PCR 증폭산물인 16S rDNA는 3종의 제한효소 *Hae* III, *Msp* I, *Rsa* I(Boehringer Mannheim) (Pukall *et al.* 1998; Brunel *et al.* 1997) 20U를 37°C에서 4시간 처리하였고, 0.05 µg/ml Et-Br을 포함한 3% agarose gel(FMC Bioproduct, USA)을 TAE buffer에서 25 mA, 50 V로 2시간동안 전기영동하고 관찰하였다.

#### 9. ARDRA (Amplified rDNA restriction analysis)

제한효소로 처리된 PCR산물은 standard size marker ( $\Phi \times 174$ DNA/Hae III marker; MBI Fermentas, USA) 분자량을 기준으로 Image analyzer (Arcus II, Vilber Bio I Loumat, France)로 측정하였다. 유사도는 Dice's similarity coefficient로 유사도 지수(S)로 계산하고(Seal & Li 1979), dendrogram은 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic average)로 작성하였다 (Sneath & Sokal 1973).

$$S = 2 \cdot n_{xy} / (n_x + n_y)$$

$n_{xy}$ ; 비교하는 두 군집의 공통적인 DNA 단편수  
 $n_x / n_y$ ; 비교하는 두 군집의 각각의 상이한 DNA단편수

#### 결과 및 고찰

서울시는 산업시설의 집중화와 과밀 인구로 인한 환

**Table 1.** Physico-chemical environmental factors from two drinking groundwater and one waste groundwater in Seoul and Kangwondo

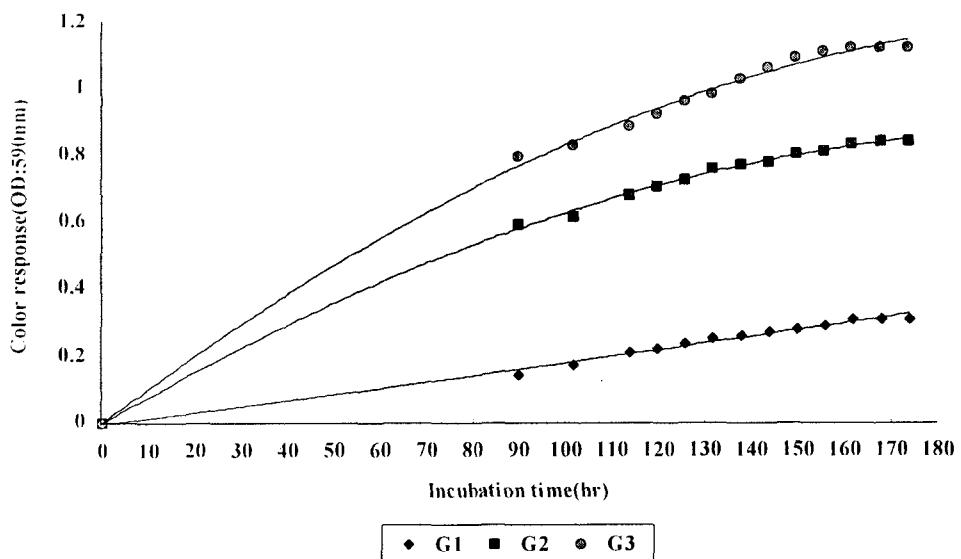
	G1	G2	G3	Criterion of drinking water
pH	6.92	7.61	7.7	5.8~8.5
Conductivity (mS · cm <sup>-1</sup> )	0.652	0.229	0.14	
Temperature(°C)	18.6	17.7	8.5	
Salinity(‰)	0.02	0	0	
F(mg · l <sup>-1</sup> )	0.79	0.12	—	<1.5
Cl(mg · l <sup>-1</sup> )	58.83	19.98	3	<150
Br(mg · l <sup>-1</sup> )	1.49	—	—	
SO <sub>4</sub> (mg · l <sup>-1</sup> )	53.81	31.98	5.98	<200
PO <sub>4</sub> (mg · l <sup>-1</sup> )	0.0031	0.0020	0.0019	
NO <sub>2</sub> (mg · l <sup>-1</sup> )	0.007	0.006	—	
NO <sub>3</sub> (mg · l <sup>-1</sup> )	2.05	1.13	6.99	<10
NH <sub>4</sub> (mg · l <sup>-1</sup> )	1.65	0.10	0.01	<0.5
TOC(mg · l <sup>-1</sup> )	1.410	0.619	0.72	
Mg(mg · l <sup>-1</sup> )	24.78	7.300	2.12	
Na(mg · l <sup>-1</sup> )	18.40	5.750	1.55	
K(mg · l <sup>-1</sup> )	5.170	3.860	5.17	
Fe(mg · l <sup>-1</sup> )	<0.005	<0.005	<0.005	<0.3
Zn(mg · l <sup>-1</sup> )	31.80	201.00	12.6	<1000
Pb(mg · l <sup>-1</sup> )	<0.50	<0.50	<0.5	50
Cd(mg · l <sup>-1</sup> )	<0.50	<0.50	<0.5	<10
Hg(mg · l <sup>-1</sup> )	<0.50	<0.50	<0.5	—
As(mg · l <sup>-1</sup> )	<0.005	<0.005	<0.005	<0.05
Se(mg · l <sup>-1</sup> )	<0.005	<0.005	<0.005	
Cr(mg · l <sup>-1</sup> )	<0.50	<0.50	<0.5	<50

G: Directly extracted microbial genomic DNA from groundwater, 1: waste groundwater in Seoul, 2: drinking groundwater in Seoul, 3: drinking groundwater in Kangwondo.

경상의 문제가 이미 야기되고 있으며 수질 잠재 오염원이 집중되어 있어 지속적인 오염이 예상되고 있다. 본 연구에서 선정한 정점은 화력 발전소 인근 지역(G1)과 양천구 주택 밀집 지역의 약수터(G2)와 대조군으로 강원도 천연 동굴의 지하수(G3)를 선정했다. 이 중 G1, G2는 잠재 오염원이 밀집되어 있어 향후 지하수 오염이 가속화 될 것으로 예상되어지는 정점이다.

#### 1. 물리, 화학적 환경요인의 변화

각 정점별 채취한 시료에서 측정된 환경요인들의 결과는 Table 1과 같다. 전기전도도는 G1, G2, G3 순으로 높게 나타났다. 전기전도도는 지하수에 용해되어있는 전해질의 차이에 의해 결정되기 때문에 오염되지 않은 지하수에 비해 오염된 지하수가 전기전도도의 값이 높게 나타난다. 용수목적별 지하수 수질 기준에 의하면 측정한 9개 항목 중 암모니아성 질소의 농도가 기준치 이상으로 측정되었다. 즉, G1 정점에서 1.65 mg/l로 먹는 물



**Fig. 1.** Color development pattern of the microbial communities of groundwater using absorbance ( $OD_{590}$ ) values of utilized substrates for each community. The plot of average well color development represents the mean color response for all 95 response wells. The symbol assignments are given in Table 1.

수질 기준치 ( $0.5 \text{ mg/l}$ )보다 1.3배 이상으로 조사되었다. 이는 조사정점 특성을 반영한 결과로 생활하수의 지하 침출에 따른 결과로 사료된다.

## 2. Biolog plate의 발색 반응 (rate color development) 변화

Biolog GN microplate의 배양 시간에 따른 정점별 평균 발색량 (AWCD)의 변화는 Fig. 1과 같다. 발색 반응이 안정화된 배양시간은 162시간 이후로 나타나, 이후 분석을 위한 자료는 162시간에 나타난 발색 반응의 결과를 이용하였다. Biolog GN microplate에서 탄소원의 이용 정도로 지하수 세균군집의 대사 다양성을 확인할 수 있었다. 평균 발색 반응 값은 천연동굴인 G3 정점, 비오염 지역인 G2 정점, 오염 지역인 G1 정점 순으로 높게 나타났다. 즉, 지하수 세균군집의 대사 다양성은 G3, G2, G1 순으로 높게 나타났다. Garland와 Mills(1991)은 탄소원의 이용능 차이가 나타나는 주요한 원인으로 개체군 수와 종 조성으로 설명하였다. 안 등(1997)은 특정 환경요인에 의한 영향을 받는 군집에서는 개체수와 종 조성의 변화 뿐만 아니라, 생리적 활성도에 의한 영향도 있는 것으로 보고하였다. 또한 안 등(1998)은 중금속 오염물질의 오염 정점에서 상대적으로 세균 개체수가 감소하는 경향을 보였다. 따라서 지하수내의 중금속 오염물질은 세균의 개체수, 종 조성 및 세포의 효소 활성도에 영향을 미치고 이에 따라 탄소원 이용 정도의 차이가 나

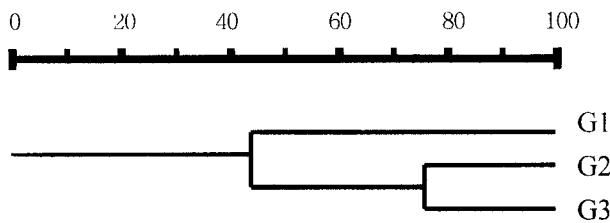
타난 것으로 판단된다.

## 3. 통계 분석에 의한 지하수 세균 군집간 유사도 분석

정점별 세균 군집은 유사성 행렬 (similarity matrix) 자료를 이용하여 cluster 분석으로 실시하였다 (Fig. 2). 그 결과 유사도 70% 이상에서 3정점의 지하수 세균 군집은 2개의 집괴로 구분되었다. 즉, 지하수 오염정점 G1과 지하수 비오염 정점 G2, G3 집단으로 구분되었다. 유사도 지수가 높다는 것은 세균 군집간의 기능적 차이가 작음으로 인해 세균 군집의 대사 다양성이 낮다는 것으로 해석한다 (Colwell and Lehman 1997). 세균 군집간의 유사도는 천연동굴과 비오염 정점이 72% 이상으로 높게 나타나 기능적으로 차이가 작은 군집이 분포한다는 것으로 해석되며, 천연 동굴과 오염 정점은 약 25%로 낮게 나타나 기능적으로 차이가 큰 세균 군집이 분포한다고 판단된다.

## 4. Genomic DNA의 추출과 정제

각 지하수 정점에서 *in situ* 핵산 추출은 지하수 응집 원이 없어서 세포 등을 축적하기가 어렵다. 그래서 지하수 군집내의 세균들을 고농축하기 위해서 Sterivex-GV filter unit를 사용하여 DNA를 추출하였다. 이런 핵산 추출 방법은 PCR과 ARDRA 과정을 수행하기에 적합하다. 이 추출 방법은 DNA의 파괴가 적어 많은 종류의 16S rDNA를 증폭 할 수 있으므로 효율적인 DNA 추출



**Fig. 2.** Dendrogram showing the relationships between the metabolic profiles of microbial communities from groundwater samples. The relationship between samples are compared in similarity index and clustered by the complete linkage method. The symbol assignments are given in Table 1.

과 DNA 파괴를 최소화 할 수 있는 방법으로 매우 중요하다(Leff *et al.* 1995). 한편, 배양된 지하수 시료로부터 DNA를 추출하기 위해서 Shilhavy 등(1984)의 방법으로 세균에서 genomic DNA 추출을 실시하였다. 추출한 DNA의 분자량은 약 23 kb였다(자료 표시 생략).

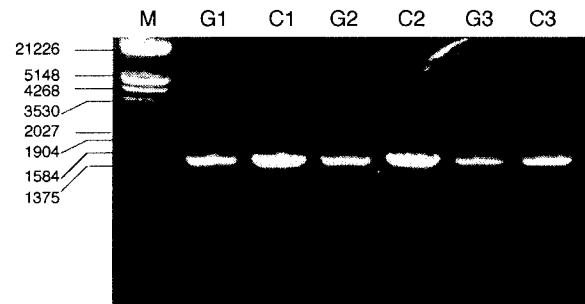
PCR 수행에 알맞은 지하수 시료의 genomic DNA와 ARDRA 수행에 알맞은 16S rDNA를 정제하기 위해서 Vogelstein과 Gillespie(1979)의 방법을 사용하였다. 이 방법은 폐놀같은 유기용매를 제거하고 ethanol 침전 과정 없이 DNA를 농축시키며, 이 DNA는 PCR과 ARDRA 적용할 수 있는 정도의 순도였다.

#### 5. 16S rDNA의 중합연쇄반응(PCR)

각 지하수내 세균 군집에서 추출한 *in situ* 핵산과 2.5%의 yeast extract로 배양한 시료에서 추출한 핵산을 eubacterial 16S rDNA primer를 사용하여 PCR 증폭을 한 결과 증폭된 16S rDNA 분자량은 약 1.5 kb이었고 (Weisburg *et al.* 1991), Fig. 3에서 PCR 증폭산물을 확인하였다. 지하수 세균에서 16S rDNA를 증폭하기 위하여 사용된 primer는 Weisburg 등(1991)이 제작한 primer에 약간의 변형을 가하였다. 이 primer는 16S rDNA 보존부위를 기초로 만들어졌고 거의 모든 세균에서 16S rDNA full-length를 증폭할 능력을 가지고 있으며, forward primer는 대부분의 세균을 reverse primer는 다수의 세균을 증폭하도록 제작되었다(Weisburg *et al.* 1991).

#### 6. 제한효소

각 지하수 시료들의 PCR 산물인 16S rDNA에 사용된 제한효소는 4-base 인식효소로 *Hae* III, *Msp* I, *Rsa* I (Boehringer Mannheim) (Brunel *et al.* 1997; Pukall *et al.* 1998)의 3종을 처리하여 절편 양상을 Fig. 4에 나타

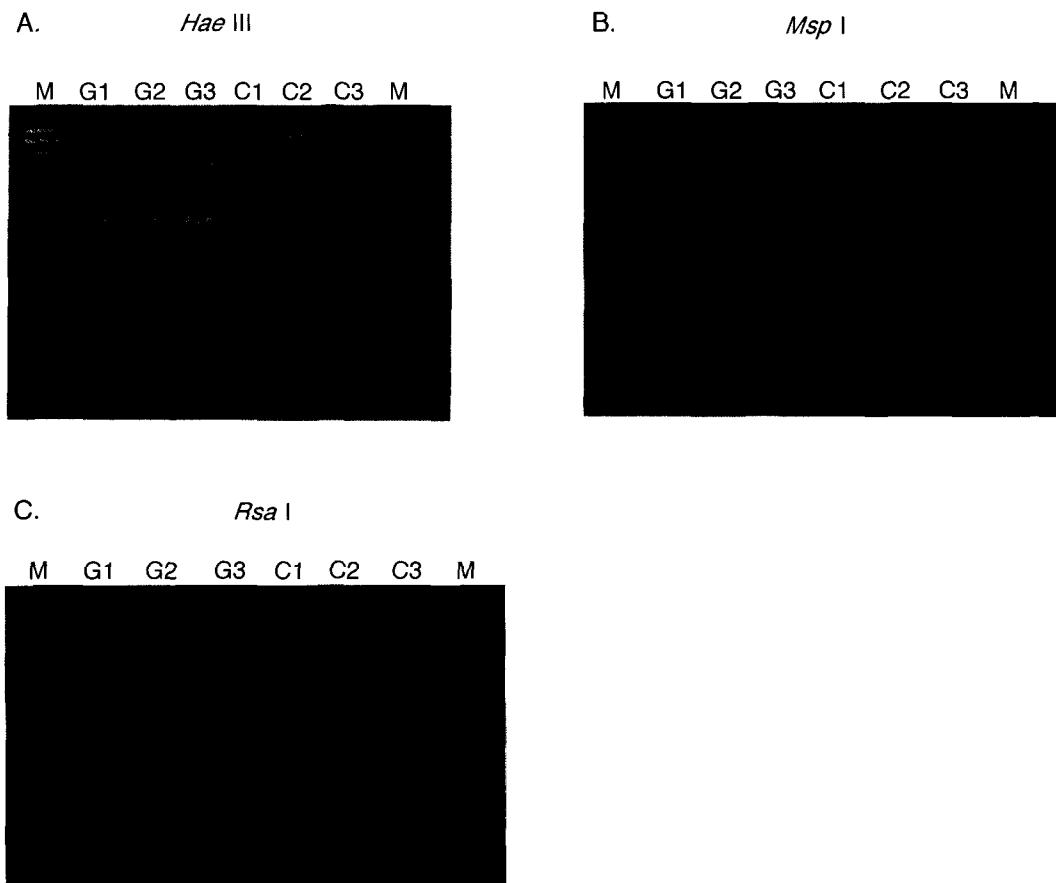


**Fig. 3.** PCR amplification of DNA Samples with eubacterial 16S rRNA universal primer. M: lambda DNA/*EcoR* I + *Hae* III marker, G: Directly extracted microbial genomic DNA from groundwater, C: Extracted microbial genomic DNA from Cultured bacteria in 2.5% yeast extract, 1: waste groundwater in Seoul, 2: drinking groundwater in Seoul, 3: drinking groundwater in Kangwondo.

내었다 이 3종 제한 효소의 우수성은 Pukall 등(1998)과 Brunel 등(1997)의 결과와 일치한다. Pukall 등(1998)은 서로 다른 계통 유전학적 집단에 속하는 40종의 세균의 16S rDNA를 39종의 제한효소로 자른 결과 14종만이 40종의 염기 모두를 자를 수 있었다. 가장 좋은 결과를 보인 4-base 인식 제한효소로 *Hae* III, *Bst* U I, *Hha* I, *Alu* I, *Rsa* I이었다. 그리고 *Hae* III는 대부분의 세균 군집의 16S rDNA를 자른다. Brunel 등(1997)은 같은 종의 16S rDNA를 *Msp* I 제한 효소로 처리한 결과 동종 이형의 절편이 생겼다. 이 실험에서도 *Hae* III는 가장 좋은 절편 형상을 보여 주었다. 이런 결과는 이 실험에 사용된 제한효소의 우수성과 일치한다.

#### 7. ARDRA 지문 분석

16S rDNA의 절편 양상은 제한 효소의 종류에 따라 다르게 나타났는데 특히, 배양한 지하수 시료 군집들에서 뚜렷한 유전적 차이의 결과를 보였다. 그리고 지하수 시료 정점간, *in situ*와 배양 군집간에 비교로 음용수와 생활 용수간의 지하수 세균 군집의 유전적 특성을 비교하였다. 직접 지하수 시료에서 추출한 핵산의 절편은 7~12개, 배양한 지하수 시료의 핵산 절편은 3~10개로 직접 지하수 시료에서 추출한 핵산 절편이 더 많이 나타났다. 이는 해수나 육수의 수계 환경에서 배양을 통해 관찰되는 세균이 총세균보다 적다는 것과 일치한다 (Aman *et al.* 1995). 지하수의 음용수 정점과 오염수 정점간에 3개의 제한 효소로 처리한 절편 양상을 비교한 결과, 지하수 음용수 정점에서 3~12개, 지하수 오염수 정점에서 4~9개의 절편으로 지하수 음용수 정점의 핵



**Fig. 4.** Restriction pattern of PCR-amplified fragment of 16S rRNA genes digested with *Hae* III (A), *Msp* I (B) and *Rsa* I (C). The symbol assignments are given in Fig. 3. Lane M:  $\Phi \times 174$ DNA/*Hae* III marker (MBI Fermentas, USA).

산 절편이 더 많았다. 이는 위의 지하수 세균 군집의 탄소원 기질 이용능에 따른 대사 다양성의 결과인 Biolog plate의 평균 발색 반응 (average well color development; AWCD)에서 천연동굴인 G3 정점, 비오염 지역인 G2 정점, 오염 지역인 G3 정점순으로 높게 나타난 결과와 일치한다. 안 등(1998)은 중금속 물질에 의한 오염 정점에서는 상대적으로 개체수가 감소하는 경향을 보였다. G1 정점이 G2, G3 정점보다 유전적 다양성이 적은 이유는 한강 수계에서 직접적으로 영향을 받을 수 있는 지질학적 위치와 중금속에 의한 영향으로 유전적 다양성이 차이가 난 것으로 판단된다. 또한 안 등(1997)은 특정 환경요인에 의한 영향을 받는 군집에서는 개체수와 종 조성의 변화 뿐만 아니라, 생리적 활성도에 의한 영향도 있는 것으로 보고하였다. 따라서 지하수내의 중금속 오염물질은 세균의 개체수, 종 조성, 세포 활성도, 탄소원의 이용 정도에 영향을 미치고 이에 따라 유전적 다양성의 차이가 난 것으로 판단된다. 이 결과로 지하수의 오염 여부에 따른 미생물의 유전적 다양성의 값(천

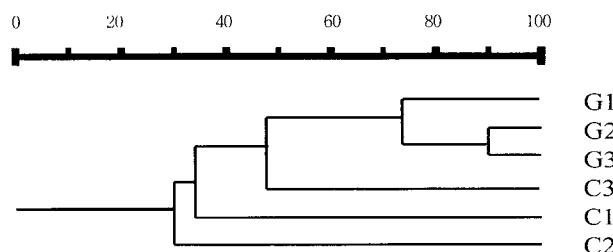
**Table 2.** Similarity matrix of pairwise genetic distances between 16S rDNA genotypes in groundwater, G1, G2, G3, C1, C2, C3 base on ARDRA analysis of PCR-amplified 16S rRNA gene

	G1	G2	G3	C1	C2	C3
G1	1.000					
G2	0.810	1.000				
G3	0.667	0.863	1.000			
C1	0.187	0.307	0.407	1.000		
C2	0.227	0.257	0.313	0.247	1.000	
C3	0.377	0.420	0.550	0.357	0.343	1.000

The symbol assignments are given in Fig. 3.

연동굴 > 음용수 > 오염수)을 확인할 수 있었다.

이들 지하수 시료의 절편 양상을 Dice's method에 의해 98% 이상의 신뢰도로 유사도 지수를 구하고 그 결과는 Table 2에 나타내었고 이를 토대로 dendrogram을 작성한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 유사도 약 50%에서 지하수 세균 군집은 *in situ* 군집과 배양 군집의 두 집과



**Fig. 5.** Dendrogram (UPGMA) of genetic relationships among 16S rDNA genotypes analyzed by PCR-ARDRA analysis in groundwater microbial community. The matrix of pairwisw genetic distances (Table 2) was used to construct the dendrogram. The symbol assignments are given in Fig. 3.

로 분류되었으며, *in situ* 군집내에서 약 90%의 유사도로 지하수 음용수 군집과 오염수 군집으로 분류되었다. ARDRA를 이용하여 유사도를 구한 결과, 지하수 시료에서 직접 추출하여 증폭한 지하수 미생물 군집의 유사도는 대사적 다양성에 의한 지하수 세균 군집간의 결과와 정도의 차이는 Biolog plate를 이용한 대사적 유사도와 일치하는 결과를 보여주었다. 그러나 배양된 지하수 군집내에서의 유전적 유사도 정도는 전체 미생물 군집내의 지하수 군집구조와는 다른 양상을 보였다. 즉, 총세균 군집과 배양세균군집의 유전적 유사도는 30% 이하의 낮은 유사도를 보였다. 그리고 배양군집의 유전적 유사도는 총세균 군집의 유전적 유사도와는 달리 천연 동굴 지하수 세균 군집과 비오염 지하수 세균 군집과의 유전적 유사도보다 천연 동굴 지하수 세균 군집과 오염 지하수 세균 군집의 유전적 유사도가 더 크게 나타났다. 이는 배양으로 인한 VBNBC (viable but non-cultured bacteria)와 필요한 영양원의 결핍, 생존 조건의 변화 등의 여러 요인에 의한 종조성과 종의 richness가 변한 것으로 사료된다.

본 연구에서는 지하수 세균 군집의 16S rDNA를 PCR 기법으로 증폭한 후 그 산물을 제한효소로 절단하는 ARDRA 지문 분석을 통한 세균 군집의 유전적 다양성을 확인하였다. 따라서 지하수 정점 세균 군집내의 상이한 환경과 서식지 차이를 반영한 유전적 다양성의 비교 분석시 세균 군집간의 분류 차이를 빠르게 나타내는 방법으로 ARDRA 방법의 적용은 유의하다고 판단된다.

## 사    사

본 연구는 1999년도 한양대학교 교내연구비에 의하여 수행되었음.

## 참 고 문 헌

- 서울특별시 (1996) 서울특별시 지하수 관리계획 기본조사보고서-제2권 지하수 기본조사 및 지하수 보전. pp. 783-811. 서울특별시, 서울.
- 안영범 (1997) 수계 세균 군집의 구조와 기능 변화에 미치는 산성화 영향 모사 분석. 한양대학교 박사학위논문.
- 안영범, 김여원, 이대영, 민병례, 최영길 (1998) 지하수 세균 군집에 미치는 물리화학적 환경 요인의 영향. 지하수환경 5(4) : 215-222.
- 안영범, 김여원, 이대영, 민병례, 최영길 (1999) 지하수 세균 군집의 탄소원 기질 이용능 변화. 육수학회지 32(2) : 152-161.
- Aman RI, W Ludwig & KH Schleifer (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59 : 143-169.
- Balkwill DL (1989) Numbers, diversity, and morphological characteristics of aerobic, chemoheterotrophic bacteria in deep subsurface sediments from a site in South Carolina. *Geomicrobiol. J.* 7 : 33-52.
- Bjornstad BN, CD Gullett & PE Long (1997) Geohydrologic and geochemical characterization. pp. 7-22. In The microbiology of the terrestrial deep subsurface (PS Amy & DL Haldeman eds.). CRC Press LLC, New York, USA.
- Boivin-Jahns V, A Bianchi, R Ruimy, J Garcin, S Daumas & R Christen (1995) Comparison of phenotypical and molecular methods for the identification of bacterial strains isolated from a deep subsurface environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 3400-3406.
- Brockman FJ, TL Kieft, JK Fredrickson, BN Bjornstad, SW Li, W Spangenburg & PE Long (1992) Microbiology of vadose zone paleosols in south-central Washington state. *Microb. Ecol.* 23 : 279-301.
- Brunel B, A Givaudan, A Lanois, AJ Akhurst & N Boemare (1997) Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(2) : 574-580.
- Bruijin FJ (1992) Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprinting the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 2180-2187.
- Chapelle FH (1993) Microbial ecology of ground-water system. pp. 130-171. In Ground-water microbiology and geochemistry (FH Chapelle ed.). John Wiley &

- Sons, Inc., New York, USA.
- Colwell FS & RM Lehman (1997) Carbon source utilization profiles for microbial communities from hydrologically distinct zones in a basalt aquifer. *Microb. Ecol.* **33**: 240–251.
- Fredrickson JK, TR Garland, RJ Hicks, JM Thomas, SW Li & KM Macfadden (1989) Lithotrophic and heterotrophic bacteria in deep subsurface sediments and their relation to sediment properties. *Geomicrobiol. J.* **7** : 53–66.
- Garland JL & AL Mills (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** : 2351–2359.
- Horne AJ & CR Goldman (1994) Limnology. pp. 26–46. McGraw-Hill, Inc. New York, USA.
- Janssen P, R Coopman, G Huys *et al.* (1996) Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* **142** : 1881–1893.
- Leff GL, JR Dana, JV McArthur & LJ Shimkets (1995) Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 1141–1143.
- Massol-Deya AA, DA Odelson, RF Hickey & JM Hiedje (1995) Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S–23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In Molecular Microbial Ecology (Aldkermans ADL, JD van Elsas & FJ de Brujn eds.). man. 3.3.2 : 1–8. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Nei M & WH Li (1979) Mathematics model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** : 5269–5273.
- Pukall R, E Brambilla & E Stackebrandt (1998) Automated fragment length of fluorescently-labeled 16S rDNA after digestion with 4-base cutting restriction enzyme. *J. Microbiol. Methods.* **32** : 55–63.
- Saiki RK, DH Gelfand, S Stoffel, SJ Scharf, R Higuchi, GT Horn, KB Mullis & HA Erlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA Thermostable DNA polymerase. *Science* **239** : 487–491.
- Shilhavy TJ, ML Berman & LW Enquist (1984) Experiments with gene fusion. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sneath PH & RR Sokal (1973) Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. WH Freeman and Co., San Francisco, Calif.
- Vanechoutte M, R De VP Rossau, D Janssen, N De RA Paepe, T Fiers, G Claeys & K Kersters (1992) Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **93** : 227–234.
- Versalovic J, T Koeuth & JR Lupski (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacterial and application to fingerprinting bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **24** : 6823–6831.
- Vogelstein B & D Gillespie (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** : 615–619.
- Weisburg WG, SM Barns, DA Pelletier & DJ Lane (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173** : 697–703.
- Welsh J & M McClelland (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18** : 7213–7218.

## The Genetic Diversity of Bacterial Communities in the Groundwater

Yeo-Won Kim, Byung Re Min<sup>1</sup> and Yong-Keel Choi

(Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133-791, and

<sup>1</sup>Department of Biology, Sangmyong University, Seoul 110-743, Korea)

**Abstract** – In order to characterize the genetic diversity of bacterial community in groundwater, samples were collected from used for drinking water and polluted with heavy metal wastewater in Seoul city and natural cave of Kangwondo. The DNA was amplified with 16S rDNA-based primers by use of the PCR, and then analysed ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis). Restriction endonuclease analysis patterns of amplified 16S rDNA in drinking water and wastewater relatively showed high genetic diversity *in situ* and drinking groundwater. The number of DNA fragments varied with *in situ* and drinking water. This method of ARDRA of bacterial communities in groundwater could be used for a quick assessment of genotypic changes between different locations reflecting different environmental conditions and the diversity reflected pollution of groundwater (natural cave water > drinking water > waste water, as in order of grade). [Genetic diversity, Groundwater, 16S rDNA, PCR, ARDRA].