

DGGE를 이용한 동굴 생태계 세균 군집 구조 분석

조 흥 범* · 정 순 오 · 최 용 근¹

서경대학교 생물공학과, ¹한국동굴생물연구소

Analysis of Bacterial Community Structure in Gossi Cave by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Hong-Bum Cho*, Soon-Oh Jeung and Yong-Gun Choi¹

Department of Biological Engineering, Seokyeong University,

¹The Korean institute of biospeleology

Abstract - The bacterial community of water stream, soil and guano in Gossi cave was examined by using PCR amplified the 16S rDNA-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). In this study, the genetic diversity and the similarity of bacterial community between open area and non-open area for cave tour were investigated, and the seasonable variation pattern was compared each other. DGGE is attractive technique, as it separate same length dsDNA according to sequence variation typical 16S rDNA genes. The diversity and similarity of bacterial community in cave was analyzed by GC341f and PRUN518r primer sets for amplification of V3 region of eubacteria 16S rDNA. The specific DGGE band profile of the cave water gives the possibility that the specific bacterial cell can be adapting to the specific cave environment and living in the cave. The DGGE band profiles of all samples with guano were compared and analyzed by image analyzer, in which mutual band profile was compared to be and the band intensity of guano was the highest. From these result, it is thought that the guano was main nutrient source and influenced on the community structure of the cave environment where is nutritionally limited. *Pseudomonas* sp. NZ060, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, uncultured *Variovorax* sp. and soli bacterium NS7 were identified to be on some sample from analysing DNA sequence of some DGGE band.

Key words : bacterial community, cave, DGGE, 16S rDNA

서 론

동굴 환경과 미생물의 생육조건은 온도, 빛, 무기염, pH 및 유기질 등과 밀접하게 연관되어 있다. 동굴의 초입지

대 및 유광지대에서는 일반적으로 육상 생물상의 성격을 나타내고 있으나 (Vandel 1965), 동굴의 내부는 비교적 낮은 온도와 유기물, 빛 등의 제한 요인 때문에 일반적으로 외부 환경보다는 군집 규모가 작고, 종 다양성 또한 낮은 것으로 알려져 왔다 (Lee *et al.* 1983).

미생물 군집은 일반적으로 생태계에서 분해자의 역할을 담당하며, 동굴 환경에서는 외부로부터 유입되는 동물

* Corresponding author: Hong-Bum Cho, Tel. 02-940-7187, Fax. 02-940-7187, E-mail. hbcho@skuniv.ac.kr

의 사체, 박쥐 등의 배설물 그리고 바람에 의해 유입된 미세한 유기질 등이 미생물에 의해 분해 됨으로써 동굴 내의 먹이 연쇄에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.* 1983). 하지만 동굴 미생물에 대한 연구는 유기 영양원의 공급원이 매우 제한적인 동굴 환경의 특성 때문에 주로 *Thiobacillus* 등과 같은 화학영양세균(lithotrophic bacteria)의 분리와 생태적 연구(Vlasceanu *et al.* 1997)에 집중되어 있는 것이 현실이다.

국내에서의 동굴 생물상에 대한 연구는 최와 남(1961)에 의해 올진 성류굴을 대상으로 시작되어 현재까지도 동물상에 대한 연구는 활발히 이루어지고 있다(남궁 1980; 남궁 1987; 최 2001). 반면 동굴 미생물에 대한 연구는 1975년 천연기념물로 지정된 성류굴에서 민(1977)이 진균을 분리한 것으로부터 시작되었고, 그 후 고수동굴 보존대책조사연구보고서(민 1980) 등이 있었지만, 동굴 미생물에 대한 체계적인 연구는 아직 없었다.

미생물 생태학의 연구는 전통적으로 미생물의 배양과 분리에 기초하였지만(Balkwill 1989; Brockman *et al.* 1993; Fredrickson *et al.* 1995), 최근에는 배양 없이 특정 생태계로부터 직접 추출된 DNA를 대상으로 세균 군집의 분포와 기능을 파악하기 위한 여러 분자생물학적 방법이 시도되고 있다(Pedersen *et al.* 1996a, b). 특히 PCR amplified 16S rDNA-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)는 복합 미생물 군집의 유전적 다양성 분석 등 미생물 생태학적 연구에 광범위하게 적용되고 있다(Muyzer *et al.* 1993; Felske and Akkermans 1998).

본 연구에서는 강원도 영월군에 소재한 고씨굴을 대상으로, 관광목적으로 개방된 지역과 보존 지역 간에 세균 군집 구조를 PCR amplified 16S rDNA DGGE 기법을 이용해 비교하였다. 아울러 계절적 요인이 동굴 세균 군집에 미치는 영향을 분석하고, 구아노와 같은 동굴 환경의 주요 유기물에 존재하는 미생물의 군집구조를 파악함으로써 동굴 미생물의 생태학적 지위와 기능을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료채취

강원도 영월군에 소재하고 있는 고씨굴은 총 연장 약 3.5 km로 이 중 900 m 구간이 1974년 5월부터 관광 목적으로 개방되어 있다. 시료는 관광 목적으로 개방되고 있는 지역과 비개방 지역으로 구분하여 동굴수(水)와 동굴 토양을 채취하였으며, 동굴수의 대조군으로는 고씨굴

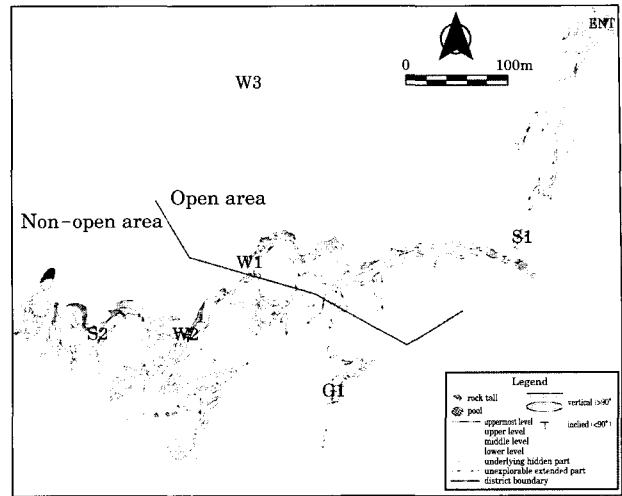


Fig. 1. Sampling site in Gossi cave. W1, cave water in open area; W2, cave water in non-open area; W3, stream water in the Namhan river; S1, cave soil in open area; S2, cave soil in non-open area; G1, guano in bat's residence.

앞으로 흐르는 남한강물을 채취하였다. 개방지역과 비개방지역, 강물에서 각각 물시료를 8l씩 멸균된 채수병에 채수하였고, 개방지역과 비개방지역의 토양시료 그리고 비개방지역의 구아노는 멸균된 polyethylene bag에 채취하였다(Fig. 1).

2. pH, 수온의 측정

pH와 수온은 현장에서 직접 pH meter (Check mate 90, Corning)를 이용하여 월별로 측정하였다.

3. 총세균수 측정

총세균수 측정을 위해 물 시료 100 ml에 중성 formalin을 현장에서 2%가 되도록 첨가한 후, Ice box에 보관하여 운반하였다. 고정된 시료에 $5.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 첨가하여 5분간 염색하고 Sudan black B로 염색된 polycarbonate membrane ($0.2 \mu\text{m}$)으로 여과하여 형광현미경(epifluorescence microscope, Axioplan, Zeiss, Germany)하에서 각 시료를 30군데 이상 계수하여 평균치로 계산하였다(Hobbie *et al.* 1977).

4. 시료의 genomic DNA 추출

물 시료로부터 DNA를 직접적으로 추출하기 위하여 Somerville (1989)의 방법을 사용하였고, 토양 및 구아노

Table 1. Sequence and target site of the primer used in this study.

Primer	Sequence	Target	Position ^d
GC 341f ^a	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	eubacteria, V3 region	341~358
PRUN 518r ^b	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	universal, V3 region	518~534
GC clamp ^c	5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG-3'		

^aForward primer, ^bReverse primer, ^cAttached to the 5' end of GC341f primer, ^dThe number of position is based on *E. coli* 16S rRNA.

시료의 DNA는 Jizhong(1996)의 방법으로 추출하였다.

5. DNA의 정제

시료들로부터 직접 추출한 DNA와 배양을 통해 각각의 정점에서 분리한 세균의 genomic DNA를 PCR 수행에 알맞은 순도로 정제하기 위해 Wizard Plus Minipreps DNA Purification system (Promega, USA)을 사용하였다. DNA 시료의 정량과 순도 확인은 spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu)로 측정하였다.

6. Touchdown PCR을 이용한 16S rDNA의 증폭

16S rDNA를 증폭하기 위한 primer는 Muyzer 등(1993)이 제안한 primer를 사용하였다. Primer의 염기서열은 Table 1에 제시하였다. PCR 반응물 50 μ l안에는 300 mM Tris-HCl (pH 8.8), 100 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 20 mM MgSO₄, 각각의 10 mM deoxynucleoside triphosphate (Takara), 20 pmol 16S rDNA primer, 20 ng DNA 주형, 1 U Taq polymerase (Han-Taq, USA)를 첨가하였다. PCR 증폭은 AMPLITRON[®]II THERMOLYNE (BARNSTEAD/ THERMOLYNE, USA)으로 수행하였다. PCR 반응은 annealing temperature가 55°C에서 45°C가 될 때까지 2 cycle당 1°C씩 떨어지는 touchdown PCR을 실시하였다. 95°C에서 5분 동안 DNA를 변성시키고 Taq polymerase를 첨가한 후, 95°C에서 1분, annealing temperature에서 1분, 72°C에서 1분 동안 DNA를 증폭하는 반응을 22회 반복하고 추가적으로 95°C에서 1분, 45°C에서 1분, 72°C에서 1분 동안 DNA를 증폭하는 반응을 18회 동안 반복하고 마지막 증폭과정에는 72°C에서 10분 동안의 extension step을 추가하여 DNA를 증폭하였다. PCR 산물의 존재와 분자량을 확인하기 위해서 1.7% agarose gel에서 전기영동하여 DNA band를 확인하였다.

7. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Denaturing gradient gel은 0%와 100% denaturant (7 M urea, 40% formamide)가 각각 포함된 6.5% (wt/vol)

acrylamide stock 용액 (acrylamide-*N,N'*-methylene-bisacrylamide, 37.5 : 1)으로 gradient maker (SG-30, Hoefer)를 이용하여 35~45%의 gradient를 가지는 6.5% (wt/vol) polyacrylamide gel을 만들었다. DGGE는 1 × TAE buffer를 running buffer로 V20-HCDC (SCIE-PLAS, England)를 이용하여 150 V, 60°C에서 6시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동 후에 denaturing gradient gel은 Et-Br로 10분간 염색한 후 30분간 탈색하여 band 양상을 확인하였다.

8. 유사지수 계산

DGGE band 양상은 분석 프로그램 (Vilber Bio ID)이 내장되어있는 Image analyzer (Arcus II, Vilber Bio ID Loumat, France)로 측정하였다. 유사도는 Dice's similarity coefficient로 유사도 지수(S)를 계산하고(Nei *et al.* 1979), dendrogram은 distant matrix에서 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean)로 작성하였다(Sneath *et al.* 1973).

9. DGGE band의 염기서열분석

DGGE band의 염기서열분석은 ØvreÅs 등(1997)의 방법을 적용하였다. 5 μ l의 DNA 용출액을 위에서 설명한 touchdown PCR의 DNA 주형으로 사용하여 동일한 반응 조건과 GC clamp가 제거된 341f와 518r Primer를 이용하여 증폭하였다. PCR 산물은 자동염기서열 분석기(ABI Prism 3100 Genetic Analyzer)를 이용하여 염기서열을 분석하였으며, Genbank의 BLAST search database를 이용하여 16S rDNA의 염기서열을 확인하였다.

결과 및 고찰

1. pH, 수온의 변화

각 정점으로부터 월별 pH를 측정된 결과 동굴수는 pH 7.63~8.51의 범위로 약 염기성을 나타내었고, 토양과 구아노의 경우에는 각각 중성(pH 6.2~7.0)과 약 산성(4.9~6.0)으로 나타났다. 동굴수의 경우 7월부터 pH가 감소

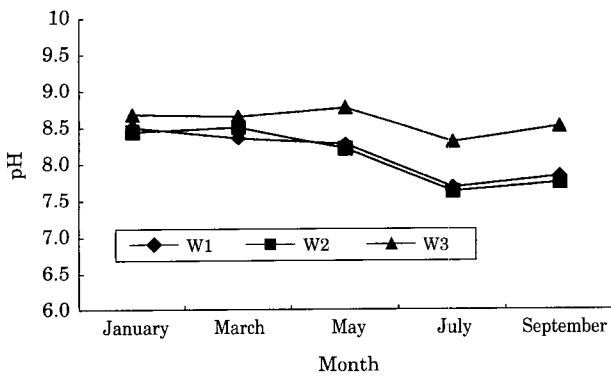


Fig. 2. Seasonal variation of hydrogen ion concentration. W1, cave water in open area; W2, cave water in non-open area; W3, stream water in the Namhan river.

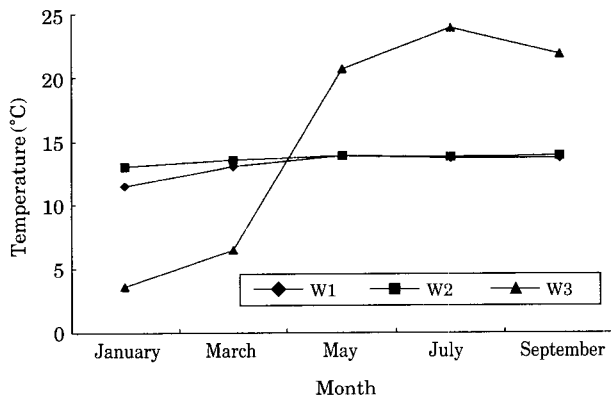


Fig. 3. Seasonal variation of water temperature. W1, cave water in open area; W2, cave water in non-open area; W3, stream water in the Namhan river.

하는 경향을 나타내었는데 (Fig. 2), 이는 우기가 시작되는 7월을 기점으로 하여 동굴내로 지하수의 유입량이 증가하여 우수의 영향을 받은 것으로 사료된다. 반면에 대조군으로 사용된 강물은 pH 8.28~8.83으로 염기성을 유지하는 경향을 나타냈다. 일반 지하수의 pH가 5.8~8.5인데 비해 동굴수의 pH가 높은 이유는 고씨동굴 부근의 지질구조가 석회질로 구성되어 있기 때문이다(우 등 2001). 수온은 동굴수가 연중 13°C 내외로 일정하게 유지되는 것에 비해 대조군으로 사용된 동굴 주변 남한강 상류의 경우에는 계절에 따른 변화가 심한 것으로 나타났다(Fig. 3).

2. 총세균수의 측정

총세균수를 계수한 결과 동굴수는 개방지역과 비개방

Table 2. Total cell density of different samples in Gossi cave

Site	January	March	May	July	September
W1 ^a	2.90×10^3	2.68×10^3	2.64×10^3	2.17×10^3	2.71×10^3
W2 ^b	6.22×10^2	6.36×10^2	6.54×10^2	6.22×10^2	6.36×10^2
W3 ^c	9.35×10^3	1.41×10^4	1.49×10^4	2.22×10^4	4.78×10^4
S1 ^d	1.74×10^5	1.73×10^5	1.74×10^5	1.74×10^5	1.75×10^5
S2 ^e	6.25×10^4	6.28×10^4	6.26×10^4	6.31×10^4	6.28×10^4
G1 ^f	4.24×10^4	3.36×10^4	3.31×10^4	3.35×10^4	3.39×10^4

^aCave water in open area; ^bCave water in non-open area; ^cStream water in the Namhan river; ^dCave soil in open area; ^eCave soil in non-open area; ^fGuano; ^{a,b,c}Represents cells ml⁻¹; ^{d,e,f}Represents cells g⁻¹.

지역이 각각 $2.17 \sim 2.90 \times 10^3$ ml⁻¹, $6.22 \sim 6.54 \times 10^2$ ml⁻¹로 개방지역의 균집규모가 다소 크게 나타났으며, 계절에 따른 균집 규모의 변화는 거의 없었다. 대조군으로 사용된 강물의 경우 $9.35 \times 10^3 \sim 4.78 \times 10^4$ ml⁻¹로 동굴수에 비해 균집 규모가 크고 계절에 따른 변화 양상을 나타내었다 (Table 2). 토양은 개방지역과 비개방지역이 각각 $1.73 \sim 1.75 \times 10^5$ ml⁻¹, $6.25 \sim 6.31 \times 10^4$ ml⁻¹ 그리고 구아노는 $3.31 \sim 4.24 \times 10^4$ ml⁻¹로 나타났다 (Table 2). 전체적으로 비개방지역에 비해 개방지역의 동굴수와 토양에서 총세균수의 규모가 큰 것으로 나타났다. 이는 관광 목적으로 개방된 동굴에서는 조명과 관광객의 수용에 의한 온도 상승 등이 미생물 생육에 유리하게 되어 개방되지 않은 동굴보다 훨씬 많은 개체수를 나타낸다는 민 (1980)의 결과와 일치한다.

3. DGGE의 분석

각 정점의 시료로부터 직접적인 방법으로 추출한 genomic DNA에서 16S rDNA 증폭을 통해 획득한 233 bp의 PCR 산물을 DGGE에 적용한 결과 6~19개의 서로 다른 band를 나타내었으며, 모든 정점에서 공통적으로 나타나는 6개의 band를 확인하였다 (Fig. 4, band a~f). DGGE에서 분리된 각각의 band는 개체군을 의미한다 (Muyzer *et al.*, 1993)는 점을 고려하면 모든 정점에서 공통적으로 존재하는 band a~f는 우점 개체군이라 할 수 있다. Gel상에서 나타난 각각의 band의 intensity는 균집내에서 특정 개체군의 상대적 풍부도를 나타낼 수 있다 (Muyzer *et al.*, 1993). Band a, b, c, d의 경우에는 구아노를 포함한 동굴내의 모든 시료에서 나타나며 구아노에서 가장 intensity가 높게 나타났다. 이는 영양원이 제한되어 있는 동굴 환경 내에서 구아노가 유기영양 공급 원으로서 미생물 생태에 영향을 미친다는 Lee 등 (1983)의 보고와 일치하는 것으로 사료된다.

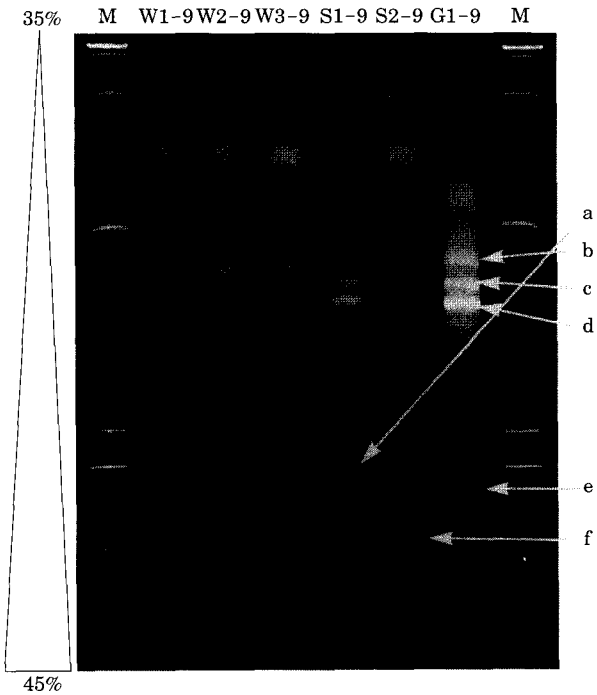


Fig. 4. DGGE profiles of 16S rDNA V3 region. The sample was collected from different sites at september. W1-9, cave water in open area; W2-9, cave water in non-open area; W3-9, stream water in the Namhan river; S1-9, cave soil in open area; S2-9, cave soil in non-open area; G1-9, guano. Percent values indicate the percentage of denaturants at each position.

4. 유사도

DGGE band 양상을 바탕으로 유사도 지수를 계산하였다. 정점간의 유사도 지수를 dendrogram으로 나타낸 결과, 개방지역과 비개방지역의 동굴수가 83%, 토양이 70%, 토양과 구아노가 60%의 유사성을 나타내었다(Fig. 5). 반면 구아노와 동굴수는 50% 미만의 낮은 유사성을 나타내었다. 이는 구아노와 토양 환경이 밀접한 관계를 이루고 있으며 토양의 미생물 군집 구조에 구아노가 큰 영향을 미치는 것으로 사료된다.

5. DGGE band의 염기서열분석

DGGE 상의 band에 대한 염기서열분석 결과 동굴 생태계 내 일부 미생물을 동정할 수 있었다. Genbank의 BLAST search database를 이용하여 band 각각의 16S rDNA의 염기서열을 alignment한 결과는 Table 3에 나타내었다. 동굴내 모든 정점에서 공통적으로 나타났던 band a와 d (Fig. 4)는 각각 *Pseudomonas sp.* NZ060과 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*로, 비개방지역의 동굴수

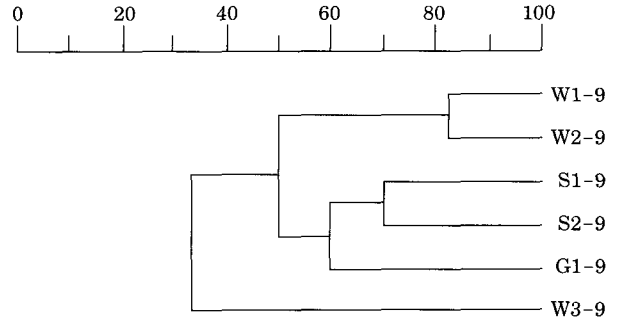


Fig. 5. Dendrogram of seasonal genetic similarity matrix value of 16S rDNA fragments of different sites at september. W1-9, cave water in open area; W2-9, cave water in non-open area; W3-9, stream water in the Namhan river; S1-9, cave soil in open area; S2-9, cave soil in non-open area; G1-9, guano.

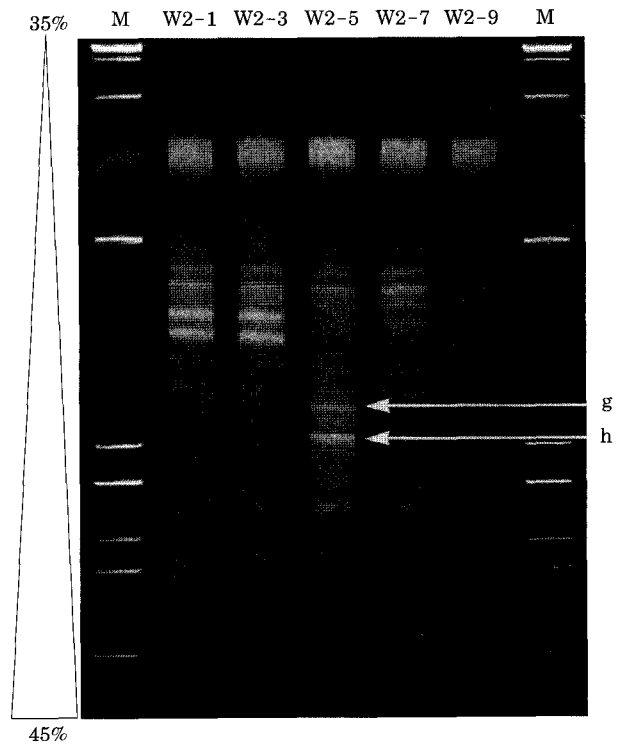


Fig. 6. DGGE profiles of 16S rDNA V3 region. The water sample was collected from non-open area in Gossi cave seasonally. M, 100 bp ladder plus marker; W2-1, cave water in non-open area at January; W2-3, cave water in non-open area at March; W2-5, cave water in non-open area at May; W2-7, cave water in non-open area at July; W2-9, cave water in non-open area at September. Percent values indicate the percentage of denaturants at each position.

에서 나타난 g, h band (Fig. 6)는 각각 uncultured *Variorax sp.*와 soil bacterium NS7로 동정되었다.

Table 3. Sequence information for the DGGE bands obtained by analyzing the cave microbial community

Band ^a	Closest relative	% Identity ^b	Accession no.
a	<i>Pseudomonas</i> sp. NZ060	99.0	AY014813
d	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	100	AF140008
g	Uncultured <i>Variovorax</i> sp.	98.0	AF408329
h	Soil bacterium NS7	98.0	AY039392

^aThe symbols correspond to the band symbol in Fig. 4 and 6.

^bPercentage of identical nucleotides in the sequence obtained from the DGGE band and the sequence of the closest relative found in the GenBank database.

본 연구를 통하여 동굴 내의 세균 군집 구조는 외부 환경에 비해 상대적으로 종 다양성이 낮으며, 군집 규모 또한 작은 것으로 확인되었다. 이는 외부 환경에 비해 상대적으로 영양 공급이 제한된 동굴 환경의 특성을 반영하는 것으로 보인다. 하지만, DGGE 상의 band 중 동굴 주변 강물에서는 나타나지 않고 동굴수에만 특이적으로 나타나는 band가 있는 것으로 보아 동굴의 환경에 특이적으로 적응하고 있는 세균의 존재 가능성도 시사하였다. 아울러 영양물질의 공급이 제한되어 있는 동굴 환경내에서 구아노가 유기 영양물질의 주요 공급원으로 작용하여 세균 군집 구조에 큰 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 향후 국내 다양한 동굴 환경으로부터 추출된 DNA 시료에 대한 rRNA 염기서열분석을 통해 동굴 고유종의 동정과 계통분류학적 유연관계 등을 규명하고(Henckel *et al.* 1999, Wise *et al.* 1999), 국내 천연동굴 내의 미생물 고유종에 대한 database 구축이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

적 요

동굴 내 정점별 세균 군집 구조를 분석하기 위하여 PCR amplified 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)를 적용하였다. DGGE는 동일한 분자량을 갖는 dsDNA band라고 할지라도, 각각의 염기서열 차이에 따라 전기영동 상에서 고유한 band 양상을 나타낼 수 있다. eubacteria의 16S rDNA V3 region을 증폭하기 위해 GC341F와 PRUN518r을 primer로 사용하여 지하수내에 미생물 군집의 다양성과 유사성을 분석하였다. DGGE band 양상을 통해 동굴내의 세균 군집 구조는 외부 환경에 비해 상대적으로 종다양성이 낮으며 동굴내에서 특이적으로 서식하는 종이 있음을 확인하였다. 또한

유기 영양물질의 공급이 제한되어 있는 동굴에서 구아노가 주요 유기 영양물질의 공급원으로서 큰 영향을 미치고 있는 것으로 파악되었다. DGGE 상의 일부 band의 염기서열분석 결과 *Pseudomonas* sp. NZ060과 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, uncultured *Variovorax* sp., soil bacterium NS7로 동정되었다.

참 고 문 헌

- 남궁준. 1980. 한국산 동굴 거미의 연구 1. 한국식물보호학회지. 19(2):113-114.
- 남궁준. 1987. 강원도의 자연동굴과 동물상. 강원도의 희귀자원 조사보고서. 한국자연보존협회.
- 민경희. 1977. 성류동굴 종합학술보고서. 한국동굴보존협회.
- 민경희. 1980. 고수동굴 보존대책조사연구보고서. 한국동굴보존협회.
- 우경식. 2001. 영월 고씨동굴 종합학술조사보고서. 강원도 영월군. pp. 44-49.
- 최기철, 남궁준. 1961. 성류동굴의 천연기념물 지정을 위한 기초조사. 문화재관리국.
- Aman RI, W Ludwig and 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.
- Brockman FJ, DB Ringelberg, DC White, JK Fredrickson, DL Balkwill, TL Kieft, TJ Phelps and WC Ghiorse. 1993. Estimates of intact but nonviable and viable but nonculturable microorganism in subsurface sediments from six boreholes located in wet and dry climatic regions of the United States. 1993 International Symposium on Subsurface Microbiology B-32.
- Felske A and ADL Akkermans. 1998. Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soils. *Microb. Ecol.* 36:31-36.
- Fredrickson JK, DL Balkwill, GR Drake, MF Romine, DB Ringelberg and DC White. 1995. Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1917-1922.
- Henckel T, M Friedrich and R Conrad. 1999. Molecular analysis of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1980-1990.

- Hobbie JE, RJ Daley and S Jasper. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1225–1228.
- Jizhong Z, MA Bruns and JM Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:316–322.
- Lee, Park, No and Hong. 1983. A Investigation of countermeasure about corruption and pollution in Go-Soo Cave. *Cave Vol 8. No 9.*
- Muyzer G, EC de Waal and A Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695–700.
- Nei M and WH Li. 1979. Mathematics model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5269–5273.
- ØvreÅs L, L Forney, FL Daae and V Torsvik. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saellen-vannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3367–3373.
- Pedersen K, J Arlinger, S Ekendahl and L Hallbeck. 1996a. 16S rRNA gene diversity of attached and unattached bacteria in boreholes along the access tunnel to the Åspö hard rock laboratory. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19: 249–262.
- Pedersen K, J Arlinger, L Hallbeck and C Pettersson. 1996b. Diversity and distribution of subterranean bacteria in groundwater at Oklo in Gabon, Africa, as determined by 16S rRNA gene sequencing. *Mol. Ecol.* 5:427–436.
- Sneath PH and RR Sokal. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman. San Francisco.
- Somerville HC, IT Knight, WL Straube and RR Colwell. 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:548–554.
- Vandel A. 1965. The biology of cavernicolous animals. Pergamon Press.
- Vlasceanu I, R Pora and BK Kinkle. 1997. Characterization of *Thiobacillus thioparus* LV43 and Its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3123–3127.
- Wise MG, JV McArthur and LJ Shimkets. 1999. Methanotroph diversity in landfill soil: isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S ribosomal DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4887–4897.

Manuscript Received: December 30, 2003
Revision Accepted: February 13, 2004
Responsible Editorial Member: Saywa Kim
(Yongin Univ.)