

16S rDNA 분석을 이용한 강화도 장화리 갯벌 퇴적물 내 미생물 군집구조 및 다양성

조혜연^{1,2} · 이정현¹ · 현정호^{1*}

¹한국해양연구원 해양생물자원연구 본부, ²인하대학교 해양학과

강화도 장화리 갯벌 퇴적물 내의 두 층(0-1 cm, 6-7 cm 깊이)에 서식하는 미생물 군집구조 및 다양성을 비교하기 위해 16S rDNA의 서열에 기초한 말단제한절편 다형성(terminal-restriction fragment length polymorphism; T-RFLP) 분석과 클론의 염기서열 분석을 실시하였다. 제한 효소 *Hha*I을 이용한 T-RFLP 분석 결과 표층(0-1 cm)에서는 다양한 크기(60(±2) bp-667(±2) bp)의 말단제한절편(T-RF)들이 고른 분포로 나타났으며, 저층(6-7 cm)에서는 60(±2) bp와 93(±2) bp의 T-RF가 우세하게 나타나 표층에 비해 미생물 군집구조가 단순한 것으로 조사되었다. 총 172개의 클론의 16S rDNA 부분 염기서열 분석 결과 98% 유사도 수준에서 98%의 클론이 GenBank에 등록된 염기서열 중 배양된 어떤 미생물과도 일치하지 않는 것으로 조사되었으며, 이 중 148개의 클론(86%)이 서로 다른 계통형(phylogroup)으로 분류되어 다양한 미생물이 서식하고 있음을 알 수 있었다. 대부분의 클론들은 α -, γ -, δ -*Proteobacteria*, *Acidobacteria/Holophaga* 그리고 green nonsulfur bacteria 그룹 내에 속하였고, 이 중 *Proteobacteria* 그룹이 표층에서는 전체의 69%, 저층에서는 46%의 높은 비율을 차지하였다. 또한 황원소의 산화와 환원에 관련된 γ -*Proteobacteria*와 δ -*Proteobacteria* 그룹이 각각 21.5%와 15.7%로 우세하게 나타나 갯벌의 미생물 군집 구조가 혐기성 환경에서의 황환원에 의해 생성된 황의 거동과 밀접한 연관이 있음을 시사하였다.

Key words □ bacterial diversity, Ganghwa, intertidal flat, microbial community structure, t-RFLP

갯벌(tidal flat)은 육상 환경과 해양 환경이 만나는 곳으로 연안해양 및 기수역의 영양염 순환 및 유기물의 분해지로서 중요한 역할을 담당한다. 이러한 갯벌 환경에서 미생물은 유기물을 분해함으로써 무기영양염이 재생산·재순환 될 수 있도록 하는 중요한 역할을 담당하고 있다(10). 퇴적물로 유입되는 상당량의 유기물이 호기성 환경에서 분해가 되지만, 유기물 유입이 많고 산소투과도가 낮은 점토질로 이루어진 갯벌 환경에서는 퇴적물 내로 산소가 공급되는 속도보다 표층에서 소비되는 속도가 더 빠르기 때문에 표층 수 mm~수 cm에 이르는 환경에서는 산소의 농도가 급격히 감소하게 된다(5). 산소가 급격히 감소하는 환경에서는 대부분의 유기물 분해 및 원소순환이 NO_3^- , MnO_2 , FeOOH , SO_4^{2-} 등 서로 다른 전자수용체를 사용하는 다양한 미생물 군에 의해 일어난다(5, 6, 9, 21, 28). 따라서 갯벌 생태계의 미생물 군집구조 및 다양성 연구는 해양 환경에서 미생물의 기능과 역할을 이해하는데 도움을 주고, 나아가 해양 생태계 내에서 생지화학적 물질 순환과정을 이해할 수 있게 하는 기반을 제공한다(8).

갯벌의 생태·환경적 기능을 보다 명확히 이해하기 위해서는 미생물에 의한 물질순환에 대한 연구와 함께 16S rRNA 유전자를 이용한 미생물 군집구조 및 다양성과의 관련성에 대한 정보

가 요구되어 진다. 외국에서는 16S rDNA 클론 분석을 통해 해양 저층 퇴적물 내 미생물 군집 다양성에 대한 많은 연구가 이루어진 바 있으며(8, 13, 16, 23, 35), 해양 퇴적물 내에서 16S rRNA의 oligonucleotide를 이용하여 미생물 군집구조를 정량화 하는 등 많은 연구가 이루어지고 있다(7, 15, 25, 29, 31). 국내의 경우 최근에 갯벌 미생물 다양성에 대한 연구들도 보고 되고 있지만(2, 3, 20) 외국에 비해 극히 부진한 실정이다. 본 연구는 우리나라 대표적인 하구 갯벌의 하나인 강화도 갯벌에서 말단제한절편분석(terminal-restriction fragment length polymorphism; T-RFLP)을 통해 미생물 군집구조를 파악하고, 16S rDNA의 염기서열 분석을 이용한 미생물 다양성 분석을 통해 서로 다른 두 층의 미생물 생태 환경을 이해하기 위한 것이다.

재료 및 방법

연구지역

강화도는 우리나라 중서부에 위치한 섬으로 위도 37° 35'~50'N, 경도 126° 21'~32'E에 위치한다(Fig. 1). 이 지역은 조수간만의 차이가 큰 지역으로, 평균조차가 7.3 m, 최대조차가 8 m에 이르며, 부근의 많은 섬들로 인해 특히 갯벌이 넓게 형성된 지역이다(34). 또한 한강과 임진강에 의해 담수와 유기물 그리고 퇴적물이 유입되는 곳으로 세균 생산력과 총 세균수가 각각 $3.76 \text{ gCm}^{-2}\text{d}^{-1}$ 와 $10^{11} \text{ cells/cm}^2$ 로 높게 나타나는 전형적인 하구 갯벌이다(4).

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-400-6244, Fax: 031-406-2495
E-mail: jhhyun@kordi.re.kr

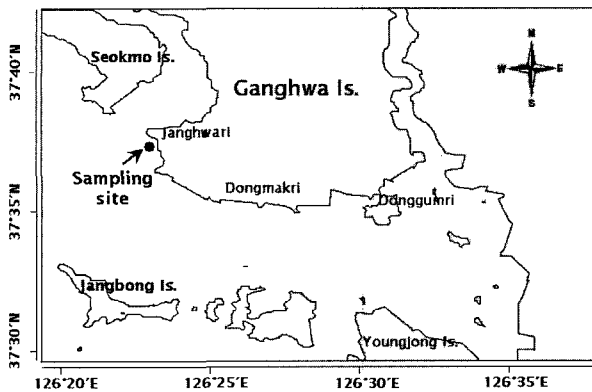


Fig. 1. A map showing the study area in the Ganghwa Island.

시료 채취

갯벌 퇴적물 시료의 채집은 2002년 7월에 실시하였으며, 채집 위치는 강화도의 남서쪽에 위치한 장화리 갯벌로 육지에서 약 50 m 떨어진 곳에서 50 ml 주사기 코어를 이용하여 현장에서 수직으로 갯벌 시료를 채취하였다. 시료의 교환에 주의하여 실험실로 운반한 후, 두 층(0-1 cm, 6-7 cm)의 퇴적물을 0.5 ml씩 2.0 ml 미량원심분리용 튜브에 분주한 후 분석 때 까지 -70°C 에 보관하였다.

전체 핵산(DNA) 추출 및 16S rDNA 증폭

핵산을 추출하는 기본적인 방법은 Kuske 등(22)의 것을 기본으로 하여 이를 약간 수정한 방법을 사용하였다(3). RNA를 제거하기 위해 RNase A solution을 0.2 mg/ml 농도로 처리 후 37°C water bath에서 30분간 반응시켰다. PCR 저해 물질로 알려진 humic acid를 제거하기 위해 PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone; Sigma St. Louis, USA) microspin column을 이용하였다(3).

퇴적물 내의 eubacterial 16S rDNA 증폭을 위해 primer 8F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1522R (5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3')를 사용하였다. PCR 조건은 1x PCR buffer, 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs, 5% DMSO, 0.1 % BSA, 0.2 μM primer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase, template는 약 10-100 ng으로 하였다. 반응 부피 50 μl 용량으로 핵산 증폭기 모델 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 95°C 에서 5분간 반응 후, 94°C 에서 1분, 55°C 에서 1분, 72°C 2분으로 35회 반복 반응시킨 후 72°C 에서 7분간 더 반응시켰다. T-RFLP 분석을 위하여 수행한 PCR은 8F primer의 5' 말단에 phosphoramidite dye인 5-hexachlorofluorescein(Hex) 으로 표지된 Hex-8F를 제작 의뢰하여 사용하였다. PCR 조건은 primer 농도를 0.5 μM 로 조정하고 나머지는 위 조건과 동일하게 하였다. PCR 산물을 분석하기 위해 0.8% 아가로스 겔에 전기영동 하여, EtBr용액에 10분간 염색하고 15분간 탈색시킨 후 UV Illuminator로 관찰하였고 PCR 산물을 정제하기 위해 AccuPrep[®] PCR Purification kit (BIONEER, Daejeon, Korea)을 이용하였다.

말단제한절편 분석 (T-RFLP)

T-RFLP 분석 방법이 비록 미생물 종의 정성적 분석(richness)과 정량적 분석(evenness)에 대한 정확한 정보를 제공하기에는 부족할 지라도 이는 미생물 군집간의 유사도와 분포를 설명하고자 할 때 비교적 신속하고, 효과적인 방법으로 알려져 있다(13, 27, 30). 정제된 PCR 산물 50 ng/ μl 을 4 염기서열을 인지하는 제한효소 *Hha*I (GCG ∇ C; Promega, Madison, USA)으로 최종 부피 20 μl 로 하여 제조사의 방법대로 처리하였다. 반응이 끝난 말단제한절편은 에탄올 추출방법으로 농축한 다음 formamide 용액과 DNA standard (ROX 2500; ABI)의 혼합물(50:1)을 10 μl 넣어 잘 섞어 준 후 95°C 에서 5분간 중탕 가열하여 denature 시킨 후 즉시 얼음 위에 위치 시켰다. 생성된 말단제한절편(T-RF; terminal restriction fragment)분석은 자동염기서열 결정 장치(모델 ABI 3100, Automated sequencer; Applied Biosystems Instrument, Foster, USA)를 사용하였다.

16S rDNA 클로닝 및 염기서열 분석

증폭된 1.5 kb 크기의 16S rDNA를 pGEM T-Easy Vector (Promega, Madison, USA)에 ligation 한 후 *E. coli* JM109에 형질전환시켜 ampicillin (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)이 포함된 LB 평판배지에서 blue-white colony 선별법에 의해 형질 전환체를 선별하였다. 무작위로 얻어진 총 172개(0-1 cm 깊이, 84개; 6-7 cm 깊이, 88개)의 클론을 대상으로 primer T7 (5'-TAA ATC CAA GAA TTT CAC C-3')과 SP6 (5'-TAT TTA GT GAC ACT ATA G-3')를 이용하여 16S rDNA부분을 증폭한 후 정제하여 이를 염기서열 분석을 위한 주형으로 이용하였다. 염기서열 분석은 Big-Dye Cycle Sequencing Kit (v.3.1)를 이용하여 제조사의 방법대로 수행하였다. 분석은 자동염기서열 결정 장치를 이용하여 유전자 서열분석을 실시하였다. 16S rDNA의 5'말단에서부터 약 500-900 base까지 염기서열을 결정하였고, RDP (Ribosomal Database Project)에서 제공하는 CHECK CHIMERA 프로그램에 의해 chimera artifact를 확인하였다. 결정된 16S rDNA 염기서열들은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST 검색을 통해 클론과 가장 가까운 그룹을 조사하여 참조 서열을 확보하였다. 염기서열 편집과 정렬은 PHYDIT (developed by Dr. J. S. Chun, version 3.2)을 이용하였고, Evolutionary distance matrices들은 Jukes and Cantor(1969)의 algorithm으로 계산하였으며, 계통도는 Neighbor-Joining method를 이용하였다. 계통도내 분지의 안정도를 조사하기 위하여 1000번의 bootstrap resampling 분석을 실시하여 500 이상의 값을 표시하였다. 172개의 클론에 대해 결정된 부분 염기서열들은 NCBI GenBank로부터 accession number (AY568762 - AY568934)를 부여 받았다.

결 과

미생물 군집구조

강화도 장화리 갯벌에서 깊이별로 나타나는 T-RFLP 분석 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 분석 결과 표층과 저층에서 나타나는 피크의 양상뿐만 아니라 각각의 T-RFs가 차지하는 상대적인 비

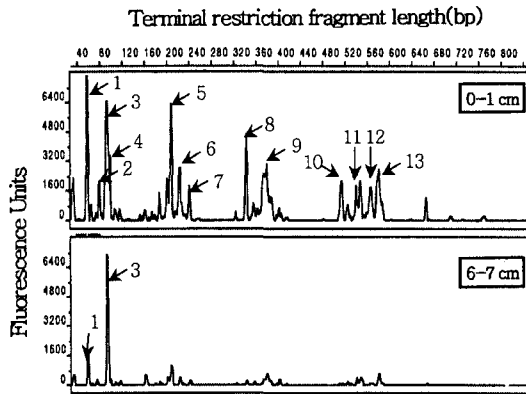


Fig 2. Comparison of electropherograms of the T-RFs for *HhaI* digestion of 16S rDNAs amplified from each genomic DNA in 0-1 cm and 6-7 cm depth at Ganghwa intertidal sediment. 1; α - or γ -*Proteobacteria*, 2; α -*Proteobacteria* (genus *Erythrobacter*), 3; δ -*Proteobacteria* or Green nonsulfur bacteria, 4; γ -*Proteobacteria*, 5; γ -*Proteobacteria*, or Green nonsulfur bacteria, 6; *Acidobacteria/Holophaga*, 7; *Acidobacteria/Holophaga*, 8; α -*Proteobacteria*, 9; γ -*Proteobacteria*, 10; α -*Proteobacteria*, 12; γ -*Proteobacteria*, 13; *Acidobacteria/Holophaga*.

올에도 차이를 보였다(Fig. 2). 표층(0-1 cm 깊이)에서는 다양한 크기의 T-RFs가 고른 분포를 보였고, 저층(6-7 cm 깊이)에서는 특정 크기의 T-RFs가 상대적으로 매우 높은 비율로 나타나 특정 그룹이 우점하고 있음을 보여주었다. T-RFLP 분석 결과와 클로닝을 통해 얻어진 염기서열에 제한효소를 처리하였을 때 예상되는 말단제한절편(T-RF)의 크기를 계산하여 비교하였다. 표층에서 가장 높게 나타나는 1번 피크(Fig. 2)는 $60(\pm 2)$ bp 정도의 크기로 주로 γ -*Proteobacteria*와 일부 α -*Proteobacteria*가 이 크기의 T-RF를 형성하였고, 3번 피크는 $93(\pm 2)$ bp 정도의 크기로 모든 δ -*Proteobacteria*와 일부 green nonsulfur bacteria들이 속한 것으로 나타났다. 또한 5번 피크의 크기는 약 211 bp 정도로 γ -*Proteobacteria*와 green nonsulfur bacteria가, 8번 피크는 약 341 bp로 α -*Proteobacteria* 그룹의 일부가 이 크기의 T-RF를 형성하는 것으로 나타났다. 4, 9, 12 번 피크는 일부 γ -*Proteobacteria* 그룹이, 6, 7, 13번은 *Acidobacteria/Holophaga* 그룹이 주로 형성하는 피크로 조사되었다. 그리고 2번 피크의 경우 81 bp의 T-RF로 α -*Proteobacteria* 그룹 내의 절대 호기성 광영양세균인 *Erythrobacter* 속이 형성하며 표층에서만 관찰되었다. 저층에서는 1번과 3번 피크가 우세하게 나타난 것으로 보아 이 환경에서는 1번 피크를 형성하는 일부 α -, γ -*Proteobacteria*와 3번 피크를 형성하는 대부분의 δ -*Proteobacteria* 그룹에 속하는 미생물들이 우점하는 것으로 여겨진다.

16S rDNA 클론 분석

퇴적 깊이 0-1 cm 와 6-7 cm 두 층을 대상으로 16S rDNA 클론의 염기서열을 분석하였다. 총 172개(표층-84개; 저층-88개)의 클론을 임의로 선택하여 500-900 bp 크기의 부분염기서열을 결정하였고, chimera artifact를 조사한 결과 chimera는 발견되지 않

았다. 분석된 부분 염기서열들은 PHYDIT 프로그램으로 정렬한 후 GenBank database를 이용하여 16S rRNA sequence와 비교하였다. 그 결과 배양 가능한 미생물과 98%이상의 유사도를 갖는 클론들은 4개에 불과하였고, 나머지 약 98%가 배양되어지지 않은 미생물로 나타났다(Fig. 3~Fig. 8). 그 중 서로 98%의 유사도를 갖는 염기서열을 같은 것 또는 같은 계통형(phylotype)이라고 보고 계산하여 본 결과(8), 148개(전체 중 86%)의 서로 다른 염기서열을 확인할 수 있어 본 연구 지역에는 다양한 미생물이 서식하는 것을 알 수 있었다. 계통 분석 시 클론 2개 이상, distance 0.15이하, bootstrap value 800 이상이 되는 것들은 같은 그룹으로 인정하였으며(8), 많은 그룹들이 배양되지 않는 미생물로 나타났기 때문에 임의대로 그룹을 명명하였다. 본 조사 지역에서 나타나는 주요 미생물 그룹을 Table 1에 나타내었다. 16S rDNA 클론의 염기서열 분석 결과 α -, γ -, δ -*Proteobacteria* 그룹, *Acidobacteria/Holophaga* 그룹 그리고 green nonsulfur bacteria 등에 속하였으며, 이 중 *Proteobacteria* 그룹이 연구지역 표층에서는 전체의 69%, 저층에서는 46%의 높은 비율로 나타났다. 또한 깊이가 깊어짐에 따라 γ -*Proteobacteria*와 α -*Proteobacteria* 그룹이 차지하는 비율은 감소하고, 주로 혐기성 환경에서 나타나는 미생물로 알려진 *Acidobacteria/Holophaga* 그룹과 green nonsulfur bacteria의 비율이 증가하는 것으로 조사되었다. BLAST 검색 결과 기존 연구들에서 나타난 어떤 클론과도 90% 이상의 유사성을 갖지 않는 클론들도 조사되었다. 계통 분석에는 약 500 base 크기의 염기서열을 갖는 클론들은 제외하였다.

Gamma *Proteobacteria* γ -*Proteobacteria*는 본 연구 지역에서 총 40개로 가장 많은 수의 클론이 나타났다(Table 1). 0-1 cm 깊이에서는 28개의 클론, 6-7 cm 깊이에서는 12개의 클론이 나타나 퇴적 깊이가 증가할수록 그 수가 감소하는 것을 알 수 있었다. 조사된 대부분의 클론은 Sva0340 그룹, B2M60 그룹, OM60 그룹 그리고 Sva0091/BPC022 그룹으로 묶이며 이들은 독립적 또는 공생하는 황산화 세균과 관계 되었으나 배양되는 미생물과는 계통분류학적으로 일치하지 않았다(Fig. 3). 황산화 세균은 주로 황화수소가스가 풍부한 환경에서 환원된 황 화합물을 산화시켜 전자공여체로 이용하는 화학 독립 영양 미생물 그룹으로(26), 이들은 환경 내에서 생물에게 독성으로 작용하는 황화수소를 산화하는 중요한 생태적 역할을 담당한다(11). 한편 0-1 cm 깊이에서 *Methylotrophs* sp.와 97%의 유사성을 보이는 클론과 *Alteromonas* sp.와 97%의 유사성을 보이는 클론이 각각 한 개씩 나타났다.

Delta *Proteobacteria* δ -*Proteobacteria* 클론은 총 34개로, 표층과 저층에서 각각 17개의 클론이 조사되었다. 대부분의 δ -*Proteobacteria* 클론들은 BLAST 검색 결과 황 환원에 관련하는 미생물과 유전관계를 가지고 있는 것으로 조사되었고(Fig. 4), 4개의 주요 그룹으로 묶였다(Table 1). 특히 *Desulfobulbaceae* 그룹과 *Desulfuromonas* 그룹에 많은 클론들이 포함되었고(Fig. 7), 그 중 가장 큰 그룹인 *Desulfobulbaceae* 에는 총 17개의 클론이 포함되었다. 이들은 일반적으로 해양 혐기환경에 널리 나타나는 그룹으로, 전자수용체인 황산염이나 황이 없는 환경에서는 여러

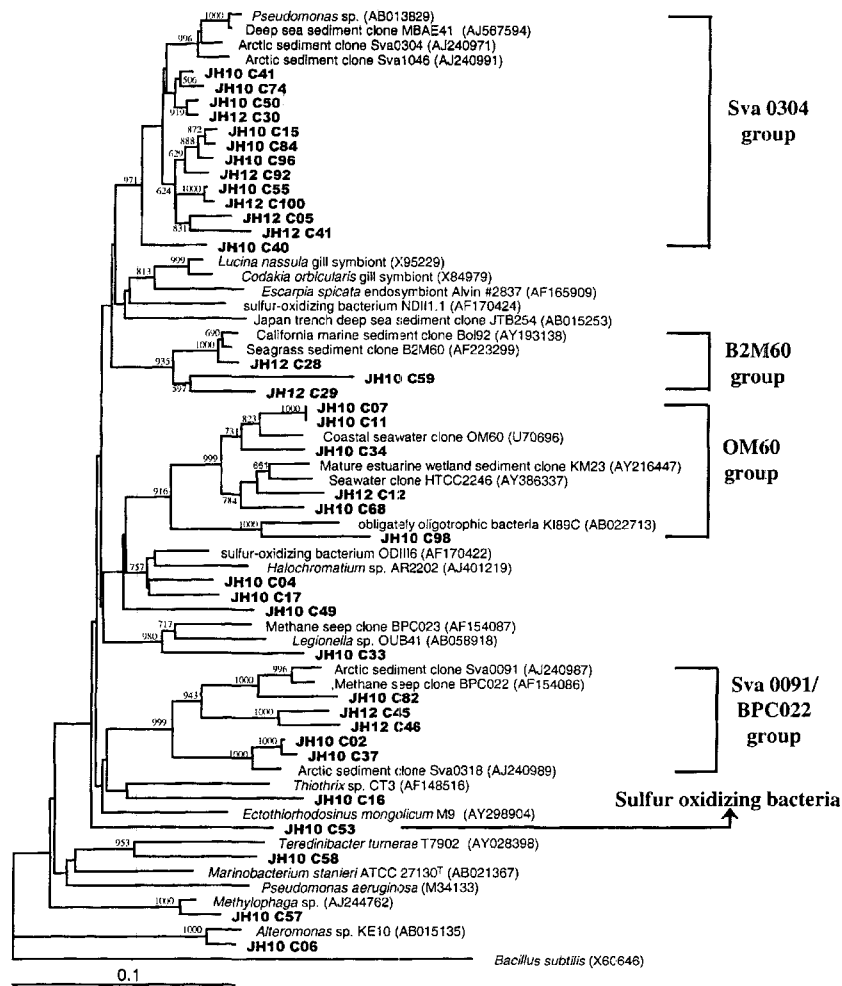


Fig. 3. A phylogenetic tree based on 16S rDNAs showing positions of the clones of intertidal sediment in gamma *Proteobacteria*. (JH10; 0-1 cm depth, JH12; 6-7 cm depth). *Bacillus subtilis* served as outgroup.

가지 유기산들을 발효시켜 성장하기도 하는 미생물 그룹으로 알려져 있다(33). 두 번째 큰 그룹은 황 원소를 전지수용체로 하는 *Desulfuromonas* 그룹으로 총 4개의 클론이 포함되었고, *Desulfococcus*와 *Desulfobacterium* 그룹에도 각각 3개, 2개의 클론이 조사되었다.

Alpha Proteobacteria 총 23개의 클론이 조사되었으며(0-1 cm 깊이에서 13개, 6-7 cm 깊이에서 10개), 주로 *Rhodobacteraceae* 그룹에 속하는 *Roseobacter*, *Ruegeria*, *Tanella vestfoldensis*, *Rhodobacter* 속과 95-99%의 유연관계를 보이는 클론들이 많이 나타났으며(Fig. 5), 이들은 산소를 발생하지 않는 광영양 미생물로 알려져 있다(1). 또한 통성호기성 호흡을 하는 *Rhodoplanes elegans*와 *Rhodobium orientis*와 유연관계를 보이는 클론들, 그리고 *Erythrobacter*와 유연관계를 보이는 클론이 나타났는데, 이 중 *Erythrobacter* 속의 미생물들은 절대 호기성 세균으로 0-1 cm 깊이에서만 관찰되었다. *Rhizobiaceae* 그룹에 속하는 클론들은 질소 고정 능력을 가진 *Rhizobium*(18)과 95% 이상의 높은 유연관계를 갖고 있다.

Acidobacteria/Holophaga 이 그룹은(Fig. 6) 0-1 cm 깊이에서

9개, 6-7 cm 깊이에서 13개의 클론이 조사되었다(Table 1). 일반적으로 혐기적 환경에서 주로 나타나는 그룹으로 본 연구 지역에서는 0-1 cm 깊이에서도 높은 비율로 나타났다. 이 그룹은 그람 음성균으로, 혐기 환경에서 acetate와 propionate 등과 같은 다양한 유기산을 이용하여 성장하며(24), 주로 호산성(acidophilic) 환경에서 화학중속영양을 하는 그룹이다. 많은 수의 클론들은 깊은 해저에서 발견된 Sva0450 그룹과 Sva0515 그룹에서 나타난 클론들과 밀접한 유연관계를 갖고(8, 28), Group I과 Group II에 속하는 클론들은 토양에서 분리된 클론들과 유사성을 보였다. 클론 JH10 C46과 JH12 C18은 두 클론 사이에 유사도 99.5%, bootstrap 값 1000으로 하나의 그룹을 형성하였다. 이들 클론은 BLAST 검색 결과 Sva0725 클론과 가장 높은 유사도를 보였으나 90% 이하, bootstrap 500 이하로 낮았다.

Green nonsulfur bacteria 0-1 cm 깊이에서 8개, 6-7 cm 깊이에서는 16개의 클론이 나타나 퇴적깊이가 증가 할수록 높은 비율로 나타났으며(Table 1), 대부분 혐기성이고, 호열성 환경에서 주로 보고 되었다(17). 계통 분석결과 크게 BD3-16/BPC110 그룹과 OPB11 그룹으로 나타나며, 두 그룹 모두 주로 심해저에

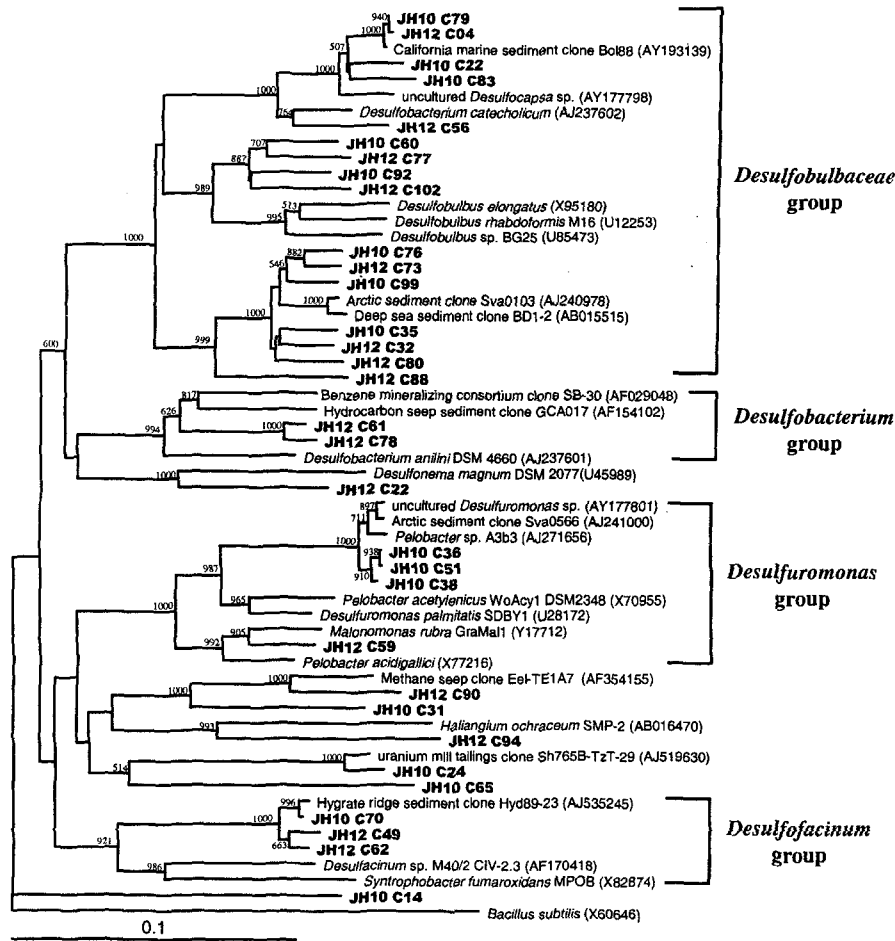


Fig. 4. A phylogenetic tree based on 16S rDNAs showing positions of the clones of intertidal sediment in delta *Proteobacteria*. *Bacillus subtilis* served as outgroup.

서 발견된 클론들과 높은 유연관계를 갖고, 배양 가능한 어떤 미생물 종과도 유연관계를 갖지 않는다(Fig. 7).

The others High G+C gram positive bacteria와 유연성을 갖는 클론들은 각 층별로 4개씩 조사되었다(Table 1, Fig. 8). 그 중 6개의 클론이 Arctic sediment clone Sva0389와 81~89%의 유사성을 보였고, 6개의 클론 모두가 일본 열수 환경의 심해 퇴적물에서 발견된 클론(AB099989)과는 90% 이상의 유사성을 보였다. 또한 6-7 cm 깊이에서 나타난 클론 JH12 C01, JH12 C03 그리고 JH12 C20은 하나의 cluster를 형성하고 있는데 BLAST 검색 결과 어떤 세균과도 80%이상의 유연관계를 보이지 않았고, 가장 높은 유사도를 보인 Arctic sediment clone Sva0389와도 79% 정도로 낮았다. *Planctomycete*와 91%의 유사도를 갖는 클론이 6-7 cm 층에서 한 개 관찰되었고, 다양한 고분자 물질을 분해할 수 있는 능력을 가진 *Cytophaga*에 속하는 클론들은 표층과 저층에서 각각 한 개씩 발견되었다. 염록체 클론들도 각 깊이에서 2개씩 조사되었는데, 이들 클론들은 *Skeletonema pseudocostatum*의 염록체와 98%의 높은 유사도를 나타내었으나 계통 분석도에서는 제외하였다.

고찰

본 연구는 16S rRNA 유전자 분석을 통해 강화도 갯벌 퇴적물 내 미생물 군집구조와 다양성을 이해하기 위한 시도로써, 퇴적깊이 0-1 cm와 6-7 cm 로 구분하여 T-RFLP 분석을 통해 두 층의 미생물 군집구조가 크게 다른 것을 확인하였고(Fig. 2), 16S rDNA 염기서열 분석 결과 갯벌에 서식하는 미생물은 매우 다양하고 98%의 클론이 배양 가능한 미생물 그룹과 일치하지 않는 것으로 조사되었다(Fig. 3~Fig. 8). 이러한 결과로 미루어 볼 때 배양 방법만을 이용한 갯벌 환경의 미생물 생태 연구 방법은 다양한 미생물 그룹들의 중요성과 역할에 대한 충분한 정보를 제시하지 못하므로 분자생물학적인 방법을 이용한 해석이 필수적이라 할 수 있다.

표층(0-1 cm 깊이)에는 호기성 호흡을 하는 미생물 이외에도 *Acidobacteria/Holophaga* 그룹, green nonsulfur bacteria 그룹 그리고 δ -*Proteobacteria* 그룹과 같이 혐기성 환경에서 나타나는 미생물들도 많이 조사되었다(Table 1). 이는 표층에서 유기물 분해율이 높아 이에 따른 산소 고갈이 빠르게 진행되는 필 갯벌의 특성에 기인한 것으로 사료된다.

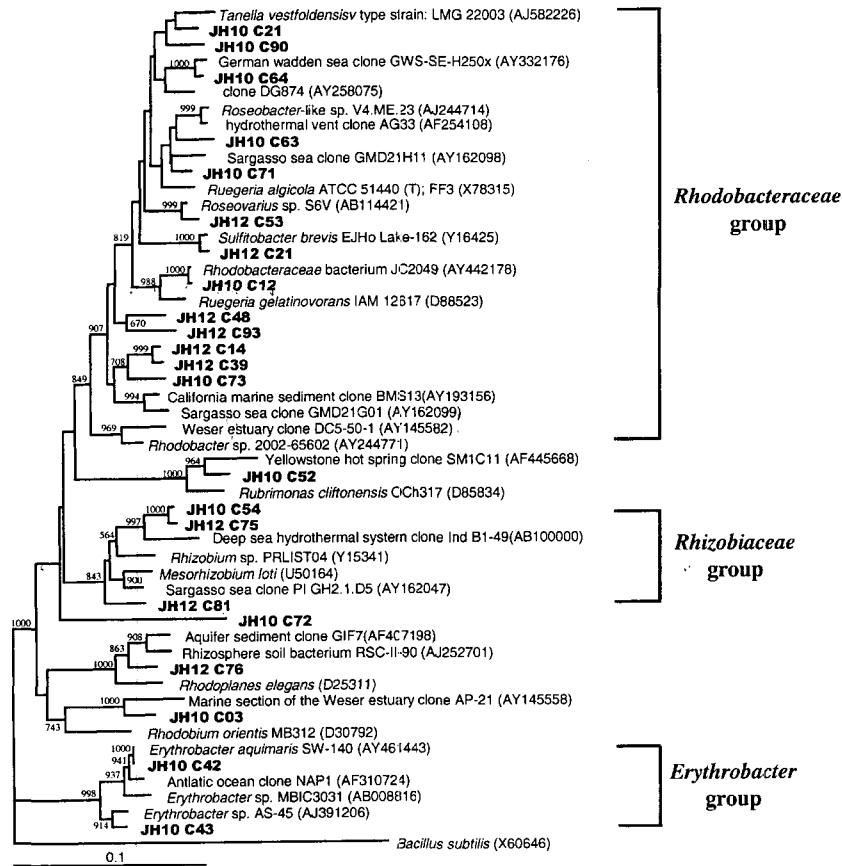


Fig. 5. A phylogenetic tree based on 16S rDNAs showing positions of the clones of intertidal sediment in alpha *Proteobacteria*. *Bacillus subtilis* served as outgroup.

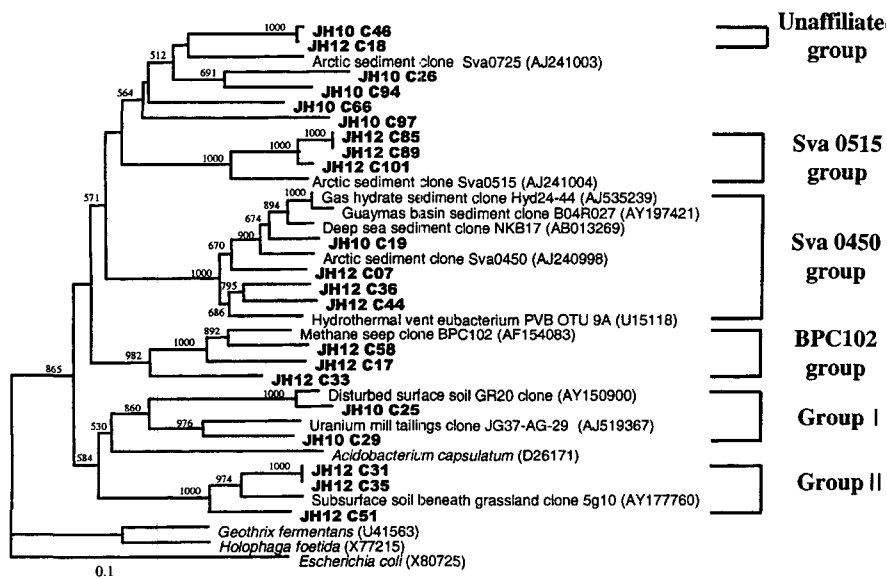


Fig. 6. A phylogenetic tree based on 16S rDNAs showing positions of the clones of intertidal sediment in *Acidobacteria/Holophaga*. *Escherichia coli* served as outgroup.

한편 많은 수의 클론들이 외양 심해 퇴적물에서 조사된 클론들과 높은 유사성을 보였으며, 호냉성 세균과도 높은 유사성을

보였다. 특히 γ -*Proteobacteria* 그룹과 *Acidobacteria/Holophaga* 그룹 그리고 green nonsulfur bacteria 그룹들이 외양 심해 클론

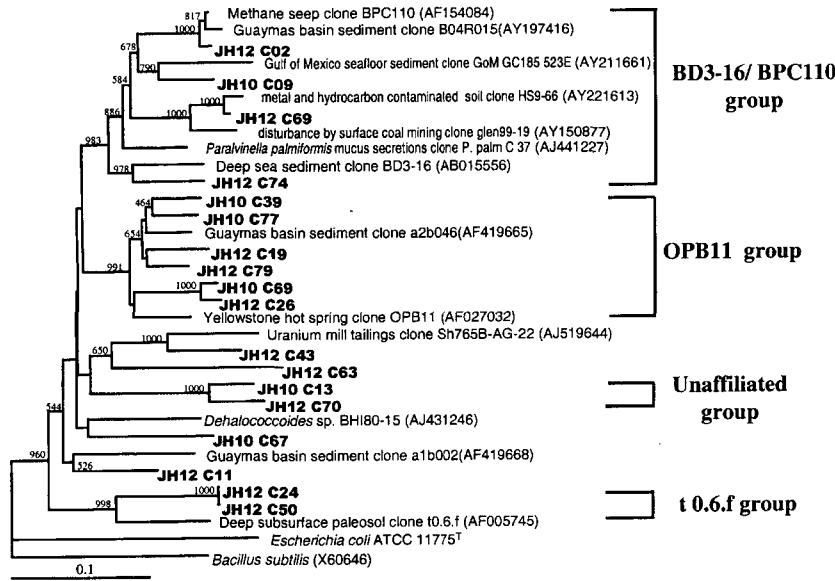


Fig. 7. A phylogenetic tree based on 16S rDNAs showing positions of the clones of intertidal sediment in green nonsulfur bacteria. *Bacillus subtilis* served as outgroup.

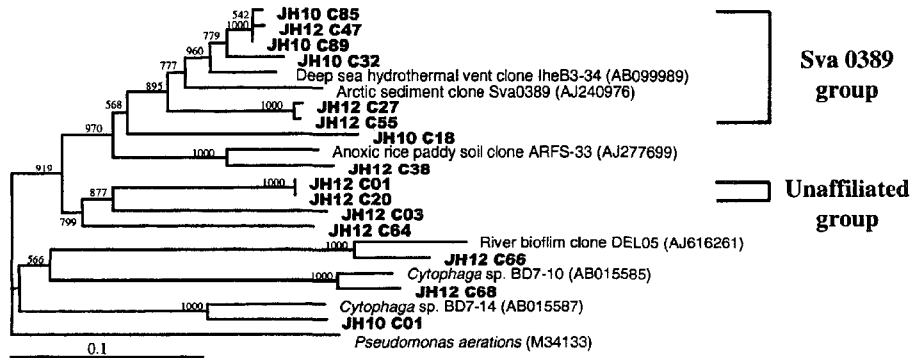


Fig. 8. A phylogenetic tree based on 16S rDNAs showing positions of the clones of intertidal sediment in other groups. *Pseudomonas aeruginosa* served as outgroup.

들이 형성하는 그룹들과 유사하였다. 이는 전반적인 해양 저층에서 나타나는 환경요소나 여러 가지 생물·화학적 작용은 유사하기 때문이라는 이론적인 설명이 제시되고 있다(8). 하지만 지금까지는 소수의 퇴적환경에 대한 연구만이 이루어져 왔으며 이에 의해 발표된 데이터의 양이 충분하지 못해서 발생하는 문제일 수도 있다. 해양 퇴적환경에서는 전반적으로 황원소 순환에 관련되는 γ , δ -*Proteobacteria* 그룹이 높은 개체수로 나타난다(2, 8, 23). 반면 어떠한 특정 미생물 그룹(예를 들면, *Planctomycetales*와 *Verrucomicrobia*)은 관찰되기도 하고 그렇지 않을 수도 있다. 이러한 그룹은 자칫 지역적 특징으로 인해 특별히 적용된 군집으로 여겨질 수도 있으나, 다른 한편으로는 이들 미생물 그룹을 분석하기 위해 필요한 표본수(sampling)가 충분하지 않기 때문이라고 해석되기도 한다(8). Finlay(14)는 미생물들의 높은 개체수, 짧은 세대시간(generation time), 작은 크기, 그리고 높은 dispersal rates(분산율)는 미생물 군집의 지역적 특이성을 소멸시키며, 지리적으로 발생하는 커다란 차이를 무시할 수 있게 한다고 주장하

였다. 따라서 우리나라 갯벌 환경에 서식하는 미생물의 실제적인 분포를 보다 정확히 알기 위해서는 더 많은 개수의 클론 분석이나 더 나은 분석 방법(예; specific oligonucleotide를 이용한 군집 분석)이 필요하다는 결론에 이른다(8).

16S rDNA 클론들의 계통 분석 결과 강화도 갯벌 퇴적물 내에는 대사과정에 황화물을 이용하는 미생물 그룹이 많이 나타나는 것으로 조사되었다. 특히, γ -*Proteobacteria* 그룹 내의 황산화 세균과 δ -*Proteobacteria* 그룹 내의 황산염 및 황환원 세균이 전체 16S rDNA 클론 중 37.2%(21.5%, 15.7%)의 높은 비율을 차지하여 중요한 기능을 담당하는 것으로 인식되었다. 해양 환경에서 황산염의 농도는 약 25~28 mM로 높게 나타나기 때문에 이를 전자수용체로 이용하는 황산염 환원 세균 그룹이 높은 비율로 나타나고(5), 이 황산염 환원 세균의 호흡작용에 의해 환원된 형태의 황화합물 또한 높게 나타나서 이를 전자공여체로 이용하는 황산화 세균 그룹 또한 많이 나타나는 것으로 여겨진다. 황산화 세균은 대부분이 대형 생물의 공생 미생물과 유사성을 가지는데

Table 1. 16S rDNA phylotype distribution from the Ganghwa intertidal sediments

Taxonomic group (No. of total clones)	No. of clones ^a		Phylotypic or taxonomic group ^b	No. of clones	
	0-1 cm	6-7 cm		0-1 cm	6-7 cm
Gamma proteobacteria (40)	28	12	Sva0304 group	9	5
			B2M60 group	1	2
			Sva0091/BPC022 group	3	2
			OM 60 group	5	1
Beta proteobacteria (1)	-	1	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	-	1
Delta proteobacteria (34)	17	17	<i>Desulfobulbaceae</i> group	8	9
			<i>Desulfobacterium</i> group	-	2
			<i>Desulfofacinum</i> group	1	2
			<i>Desulfuromonas</i> group	3	1
Alpha proteobacteria (23)	13	10	<i>Rhodobacteraceae</i> group	8	6
			<i>Rhizobiaceae</i> group	1	2
			<i>Erythrobacter</i> group	2	-
Epsilon proteobacteria (2)	-	2	Japan Seamount group	-	2
Acidobacteria/Holophaga (22)	9	13	Sva0515 group	3	-
			Sva0450 group	1	3
			BPC102 group	1	3
			Group I	2	-
			Group II	-	3
			Unaffiliated group	1	1
Green nonsulfur (24)	8	16	BD3-16/BPC110 group	1	4
			OPB11 group	3	4
			t0.6f group	-	2
			Unaffiliated group	1	1
Planctomycetales (1)	-	1	planctomycete related	-	1
Actinobacteria (8)	4	4	Sva0389 group related	3	3
Sphingobacteria (2)	1	1	<i>Cytophaga</i> sp. related	1	1
Unaffiliated (11)	2	9		-	3
Chloroplast (4)	2	2	<i>Skeletonema pseudocustatum</i>	2	2

^aNumber of clones about taxonomic group.

^bPhylotype group corresponds to the group (containing at least two clones, [distance, <0.15; bootstrap value>80%]) of similar 16S rDNAs shown in the phylogenetic trees in Fig. 3 to 8.

순수 배양이 되지 않기 때문에 이들이 황원소 순환 내에서 산화의 역할을 수행하고 있는 것으로 추측된다(28). 조사지역에서 관찰된 황환원 세균은 모두 *δ-Proteobacteria* 그룹 내에 포함되었다. 클로닝을 통해 얻어진 염기서열에 제한효소를 처리하였을 때 예상되는 말단제한절편(T-RF)의 크기를 계산하여 T-RFLP 분석결과와 비교하여 본 결과 *δ-Proteobacteria*에 속하는 모든 클론들은 갯벌 퇴적물 내에서 가장 높은 피크를 형성하여 본 연구 지역의

주요 미생물 그룹의 하나로 조사되었다(Peak 3 in Fig. 2). 황환원 세균은 황산염(SO₄²⁻)을 전자수용체로 이용한 혐기적 호흡을 통해 알칸, 톨루엔, 벤젠, PAHs 등을 포함하는 다양한 종류의 유기물을 분해하는 능력을 가지고 있어 해양 퇴적 환경에서 중요한 그룹으로 인식되어 왔다(5, 12, 19, 32). 또한 유기물 유입이 많은 연안 퇴적물에서 황산염 환원은 총 유기물 분해의 50~100%를 담당하는 것으로 보고 되어 왔으며(5, 19), 이를 뒷받침 하

는 연구로써 최근에 현 등(6)은 하계 강화리 갯벌의 혐기성 유기물 분해의 80%가 황산염 환원 세균에 의해 일어난다고 보고하였다. 이러한 결과들을 종합하여 볼 때 본 연구지역에서 황환원 세균이 주요 미생물 그룹으로 조사된 것은 타당한 결과라 여겨지며, 이는 다른 곳의 해양 퇴적물 미생물 군집을 연구한 결과와도 일치하는 바이다(8, 12, 16, 28).

본 연구의 결과 강화도 갯벌 퇴적물 내 미생물 군집은 퇴적 깊이에 따라 다르게 나타나며 매우 다양한 미생물들이 서식하는 것으로 나타났다. 그 중 황화합물을 이용하는 미생물 그룹이 전체 중 37.2%로 조사되어 본 연구지역에서는 황원소 순환에 관련된 미생물 군집이 생지화학적으로 중요한 역할을 수행하고 있을 것이라 여겨진다. 따라서 연안 퇴적 환경의 생지화학적 원소의 순환 및 조절 요인에 대한 이해를 넓히기 위해서는 황환원 세균 군집의 생태에 대한 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 한국 해양연구원 기본 연구 사업(PE87200)과 한국 과학재단 지정 인하대학교 서해환경연구센터의 지원(PN52900) 및 해양수산부의 수산특정 연구개발 사업의 지원(20010021)을 받아 이루어졌습니다. 본 연구를 위해 도와주신 목진숙, 박재현, 배승섭 연구원께 감사드립니다.

참고문헌

- 김경민, 서영훈, 신주옥, 이해영, 정인실, 조은희, 하영미. 2003. 미생물학 제 5판. 라이프사이언스 p.428-472.
- 이명숙, 홍순규, 이동훈, 김치경, 배경숙. 2001. 16S rRNA 유전자 분석에 의한 전남 순천만 갯벌의 세균 다양성. 한국미생물학회지 37, 137-144.
- 한국해양연구원. 1998. 제한질편말단분석법(T-RFLP)을 이용한 해양퇴적물의 세균군집분석 P.97.
- 한국해양연구원. 1999. 갯벌의 효율적인 이용과 보존을 위한 연구 P.841.
- 현정호, 이홍급, 권개경. 2003. 해양환경의 황산염 환원을 조절요인 및 유기물 분해에 있어 황산염 환원의 중요성. 한국해양학회지 8, 210-224.
- 현정호, 목진숙, 조혜연, 조병철, 최중기. 2004. 하계 강화도 갯벌의 혐기성 유기물 분해능 및 황산염 환원력. 한국습지학회지 6, 75-90.
- Amann, R., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Bowman, J.P. and R.D. McCuaig. 2003. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2463-2483.
- Canfield, D.E., B.B. Jørgensen, H. Fossing, R. Glud, J. Gundersen, N. B. Ramsing, B. Tramdrup, J. W. Hansen, L. P. Nielsen, and P. O. J. Hall. 1993. Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. *Mar. Geol.* 113, 27-40.
- Capone, D.G. and R.P. Kiene. 1988. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: Contrasts in anaerobic carbon catabolism. *Limnol. Oceanogr.* 33, 725-749.
- Cifuentes, A., J. Anton, S. Benloch, A. Donnelly, R.A. Herbert, and F. Rodriguez-Valera. 2000. Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1715-1719.
- Dhillon, A., A. Teske, J. Dillon, D.A. Stahl, and M.L. Sogin. 2003. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas basin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2765-2772.
- Dunbar, J., L.O. Ticknor, and C. R. Kuske. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2943-2950.
- Finlay, B. J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296, 1061-1063.
- Frischer, M.E., J.M. Danforth, M.A.N. Healy, and F.M. Saunders. 2000. Whole-cell versus total RNA extraction for analysis of microbial community structure with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes in salt marsh sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3037-3043.
- Gray, J.P. and R.P. Herwig. 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4049-4059.
- Hugenholtz, P., C. Pitulle, K.L. Hershberger, and N.R. Pace. 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* 180, 366-376.
- Jordan, D.C. 1984. Family III *Rhizobacterae* CONN 1938, 321AL. p.234. In N. R. Krieg (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 8th ed. volume 1. The Willams & Winkins Co., Baltimore, London.
- Jørgensen, B.B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction. *Nature* 296, 643-645.
- Kim, B.-S., H.-M. Oh, H.J. Kang, S.-S. Park, and J.S. Chun. 2004. Remarkable bacterial diversity in the tidal flat sediment revealed by 16S rDNA analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 205-211.
- King, G.M. 1988. Patterns of sulfate reduction and the sulfur cycle in a south Carolina salt marsh. *Limnol. Oceanogr.* 33, 376-390.
- 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.
- Li, L., C. Kato, and K. Horikoshi. 1999. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan trench. *Mar. Biotechnol.* 1, 391-400.
- Liesack, W., F. Bak, J.U. Kreft, and E. Stackebrandt. 1994. *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aroma compounds. *Arch. Microbiol.* 162, 85-90.
- Llobet-Brossa, E., R. Rossello-Mora, and R. Amann. 1998. Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2691-2696.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker. 2000. *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall. U.S.A.
- Moeseneder, M.M., J.M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter, and G.J. Herndl. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3518-3525.
- Ravenschlag, K., K. Sahm, J. Pernthaler, and R. Amann. 1999. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3982-3989.

29. Ravenschlag K., K. Sahm, C. Knoblauch, B. B. Jørgensen, and R. Amann. 2000. Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine Arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3592-3602.
30. Scala, D.J. and L.J. Kerkhof. 2000. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1980-1986.
31. Snaird J., R. Amann, I. Huber, W. Ludwig, and K-H Schleiger. 1997. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2884-2896.
32. Widdel, F. and F. Bak. 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: The prokaryotes, edited by Balows, H.G.T. A., M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer, 2nd. ed. Springer-Verlag, New York. 4, 3352-3378.
33. Widdel, F., and N. Pfenning. 1984. Section 7 Dissimilatory sulfate- of sulfur-reducing bacteria. p.663. In N. R. Krieg (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, 8th ed. volume 1. The Willams & Winkins Co., Baltimore, London.
34. Woo, H.J. and J.-G. Je. 2002. Changes of sedimentary environments in the southern tidal flat of Ganghwa Island. *Ocean Polar Res.* 24, 331-343.
35. Wright, T.D., K.L. Vergin, P. W. Boyd, and S.J. Giovannoni. 1997. A novel δ -subdivision proteobacterial lineage from the lower ocean surface layer. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1441-1448.

(Received June 9, 2004/Accepted August 13, 2004)

ABSTRACT : Bacterial Community Structure and Diversity Using 16S rDNA Analysis in the Intertidal Sediment of Ganghwa Island

Hye Youn Cho^{1,2}, Jung-Hyun Lee¹ and Jung-Ho Hyun^{1*} (¹Marine Microbiology Laboratory, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea, ²Department of Oceanography, Inha University, Incheon 402-751, Korea)

T-RFLP analysis and clone sequencing analysis based on bacterial 16S rDNA were conducted to assess bacterial community structure and diversity in two layers (0-1 cm, 6-7 cm depth) of the sediment from Janghwari intertidal flat in Ganghwa Island. The results of T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism) analysis using restriction enzyme *HhaI* showed that the T-RFs of various size (60(\pm 2) bp~667(\pm 2) bp) appeared evenly at the surface sediments but two T-RFs with 60 (\pm 2) bp and 93 (\pm 2) bp predominated at 6-7 cm depth. Analysis of partial sequences for 172 clones revealed that 98% of the clones were not matched with the sequences of cultured bacteria strains in the GenBank (\geq similarity 98%), and approximately 86% of them were classified as different phylotypes. Most clones belonged to α -, γ -, and δ -*Proteobacteria*, *Acidobacteria/Holophaga* and green nonsulfur bacteria group. *Proteobacteria* group occupied the highest proportion in both layers (69% at 0-1 cm depth and 46% at 6-7 cm depth). γ -*Proteobacteria* and δ -*Proteobacteria* that are associated with oxidation and reduction of sulfur compounds were appeared to be dominant, and comprised 21.5% and 15.7% of total clones, respectively. Overall results indicated that extremely diverse bacterial groups were inhabiting in the sediment of Ganghwa intertidal flat, and bacterial communities associated with the behaviour of sulfur seemed to play a significant role in the biogeochemical environment in this anoxic sediment.