

남해안 갯벌 미생물의 세포외효소 활성 및 16S rDNA 분석에 의한 다양성 조사

김유정 · 김성겸 · 권은주 · 백근식¹ · 김정호 · 김 훈*

순천대학교 농업생명과학대학 생물환경전공, ¹자연과학대학 생명과학전공

Microbial Population Diversity of the Mud Flat in Suncheon Bay Based on 16S rDNA Sequences and Extracellular Enzyme Activities

Yu-Jeong Kim, Sung Kyum Kim, Eun-Ju Kwon, Keun Sik Baik¹, Jungho Kim and Hoon Kim*

Department of Agricultural Chemistry, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

¹Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Received November 9, 2007; Accepted November 13, 2007

Diversity of the mud flat microbial population in Suncheon Bay was investigated by studying extracellular enzyme activities and 16S rDNA sequences. Four culturable bacterial strains with CMCase, xylanase and protease activities were isolated from the wetland and the mud flat. All the strains produced more xylanase activity than CMCase or protease activity, and the properties of the isolate enzymes from the wetland were similar to those from the mud flat. About 2,000 clones were obtained with the 16S rDNA amplified from the metagenomic DNA isolated from the mud samples. Based on the restriction pattern(s), seventeen clones were selected for base sequence analysis. Of the 17 clones, only 35% (6 clones) were found to be cultured strains and 65% (11 clones) to be uncultured strains. The similarities in the base sequences of the clones ranged from 91.0% to 99.9% with an average similarity of 97.3%. The clones could be divided into 7 groups, *Proteobacteria* (9 clones, 52.9%), *Firmicutes* (3 clones, 17.6%), *Bacteroidetes* (1 clone), *Flavobacteria* (1 clone), *Verrucomicrobia* (1 clone), *Acidobacteria* (1 clone), and *Chloroflexi* (1 clone). Most of the *Proteobacteria* clones were gamma *Proteobacteria* associated with oxidation-reduction of sulfur.

Key words: mud flat metagenome, 16S rDNA, microbial diversity, *Proteobacteria*, unculturable microorganisms

서 론

갯벌은 퇴적물의 구성에 따라 모래갯벌(sand flat)과 펄갯벌(mud flat)로 구분되고, 두 가지 특성이 함께 나타나는 것을 혼성갯벌이라고 한다. 형성된 갯벌들의 물리·퇴적학적 환경 차이는 생물상이나 생물 생산뿐만 아니라 물질순환에도 커다란 영향을 미치게 된다. 펄갯벌은 흐름이 완만한 내만이나 강 하구의 후미진 곳에 형성되며, 많은 수로를 갖고 있다. 펄갯벌에서는 칠면초나 갈대 등의 염생식물, 저서규조류 및 미생물에 의한 흡수와 분해가 일차적으로 활발히 진행되고 있다. 특히, 갯벌에 존재하는 많은 종류의 미생물들은 여러 종류의 가수분해 효소들을 생산하여 고분자 유기물의 수용화를 촉진시켜 물질순환을 일으키는 중요한 역할을 한다.^{1,2)} 이로 인하여 갯벌은 육상에서 배출되는 각종 오염물질을 정화하는 기능을 가지고 있

다. 우리나라는 연안을 따라 여러 도시와 산업지역이 형성되어 많은 오염물질을 배출하고 있으며, 이에 따라 갯벌의 정화기능을 유지하는 것이 대단히 중요하다고 판단된다. 우리나라 갯벌의 약 80%는 인천·경기지역 및 전남지역에 분포되어 있으며, 특히 순천만은 우리나라 갯벌 가운데 염습지가 남아 있는 유일한 갯벌로서 칠면초 군락이 형성되어 있어 생태학적 측면에서 그 가치가 매우 높다.

자연생태계에 존재하는 미생물의 99% 이상은 표준적인 방법으로는 배양되지 않는다고 보고되고 있다.^{3,4)} 최근에는 자연생태계에 존재하는 미생물 군집을 배양하지 않고 핵산을 이용한 분자생물학적인 방법으로 16S rDNA를 증폭하여 미생물 군집 분석에 이용하고 있다.⁵⁾ 외국에서는 16S rDNA 분석으로 갯벌 관련 미생물 군집 다양성에 관하여 특정 미생물 종류별로 또는 시료 깊이 별로 많은 연구를 하고 있다.⁶⁻¹⁰⁾ 국내에서는 최근에 갯벌의 미생물 다양성에 대하여 몇몇 연구 결과가 발표되고 있으나 이에 대한 관심은 매우 미흡한 실정이다.¹¹⁻¹⁴⁾

본 연구에서는 순천만의 갯벌토양으로부터 배양 가능한 미생물의 세포외 효소 활성을 측정하여 기본적인 특성을 분석하였

*Corresponding author

Phone: +82-61-750-3294; Fax: +82-61-752-8011

E-mail: hoon@sunchon.ac.kr

으며, 생태계에 존재하는 환경 총유전체, 즉 메타게놈을 추출하여 세균 16S rDNA 클론 라이브러리를 제작하고, 이의 염기서열을 분석하여 순천만 갯벌에 존재하는 난배양성 미생물들을 포함한 미생물군집의 다양성을 조사하였다.

재료 및 방법

시료채취. 시료는 전남 순천만의 수초지역과 갯벌지역에서 채취하였다. 각각의 시료는 표층에서 채취하였으며, conical tube에 넣어 4°C에 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

배양가능한 미생물 분리 및 세포의 효소 활성 확인. 갯벌 시료 1g을 0.9% NaCl 9ml에 넣고 잘 섞은 후 LB(Luria-Bertani) agar plate에 도말 한 후 25°C에서 24시간 배양한 후 나타난 콜로니를 분리하였다. CMC(carboxymethyl-cellulase) 활성은 1%의 CMC와 0.08%의 trypan blue가 첨가된 LB 한천배지 LBC에, xylanase 활성은 0.3%의 xylan이 포함된 LB 한천배지 LBX에, 그리고 protease 활성은 1%의 skim milk와 2 mM CaCl₂가 첨가된 LB 한천배지 LBM에 24시간 배양한 후 콜로니 주위의 투명한 환으로 확인하였다.

조효소원 효소활성 측정. CMC, xylanase, 그리고 protease 활성을 모두 보이는 콜로니를 선별하여 LB 액체 배지 200 ml에 37°C에서 12시간 배양한 후 6,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 효소원으로 사용하였다. CMC는 기질로부터 생성된 환원당을 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법¹⁵⁾으로 측정하여 효소의 활성을 정량하였다. 반응액은 0.5% CMC를 함유한 50 mM Na-citrate buffer(pH 5.5)에 적당량의 효소용액을 넣어 50°C에서 15분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁶⁾ Xylanase 활성은 CMC 대신 0.5% xylan을 함유한 반응액을 50°C에서 15분간 반응시킨 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 반응 상층액의 흡광도를 550 nm에서 측정하여 정량하였다.¹⁷⁾ Protease 활성은 1.25% azocasein(Sigma Chemical Co., USA), 2 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 그리고 적당량의 효소를 넣어 200 μl로 맞춘 후 50°C에서 30분간 반응시킨 후, 10% TCA(trichloroacetic acid) 600 μl를 넣고 반응을 정지시켰다. 반응액을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액 600 μl를 다른 tube에 옮겨 1.0 N NaOH 700 μl를 넣고 잘 섞은 후 440 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁸⁾

효소 반응의 최적 온도와 pH. 최적 온도는 각각의 효소 반응 혼합물을 40, 50, 55, 60, 65, 70 그리고 80°C에서 30분간 반응하여 효소 활성도를 측정함으로써 조사하였다. 최적 pH는 최종 농도 50 mM의 Na-citrate, Tris-HCl, Glycine-NaOH를 사용하여 반응액의 pH를 4.0~11.0로 조정하여 50°C에서 30분 동안 반응시킨 후 효소 활성을 측정함으로써 조사하였다.

메타게놈 DNA 분리 및 정제. 순천만 갯벌에서 2005년 1월에 시료들을 채취하였고 기존의 방법^{19,20)}을 약간 수정하여 이들로부터 DNA를 분리하였다. 갯벌 5g에 DNA 추출 완충용액(100 mM Tris-HCl/pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM sodium phosphate/pH 8.0, 1.5 M NaCl, 1% CTAB, 100 μl proteinase K) 13.5 ml를 첨가한 후, 37°C에서 진탕 배양하였다. 그 후, 20% SDS 1.5 ml를 넣고 65°C 수온조에서 매 20분마다 섞어주

면서 2시간 반응시킨 후 7,000 rpm에서 10분 원심분리하여 상층액만 조심스럽게 회수하였다. 남은 침전고형물은 추출완충용액 4.5 ml와 20% SDS 0.5 ml를 첨가하여 65°C에서 10분 반응시키고 원심분리하여 상층액을 다시 회수하였다. 이렇게 3번 반복하여 상층액을 모았다.

이 상층액에 동량의 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1, v/v)을 넣어준 다음 최종 부피의 0.6배의 isopropanol을 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 원심분리한 후 상층액만을 회수하였다. 회수한 상층액을 70% ethanol로 씻어 준 후 다시 한 번 원심분리하여 DNA를 확보하였다. 확보한 DNA는 완충용액(10 mM Tris-HCl/pH 8.0 + 1 mM EDTA)을 사용하여 4°C에서 하룻밤 투석하였다.

위에서 얻은 DNA를 1% low melting agarose gel에 전기영동하여 약 20 kb에 해당하는 부위를 절단한 후 50 × GELase buffer(Epicentre, USA)를 이용하여 70°C에서 3분, 45°C에서 2분 반응시킨 후 GELase(1 U/μl)를 넣고 45°C에서 30분 반응시켰다. 5 M ammonium acetate(pH 7.0)를 동량 넣고 100% ethanol을 4배 넣은 후 실온에서 1시간 반응시켰다. 15,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하고 70% ethanol로 한 번 더 세척하고 원심분리한 후 정제된 메타게놈 DNA를 얻었다.

16S rDNA 증폭 및 클로닝. 분리한 total DNA에서 16S rDNA를 증폭시키기 위하여 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG를 forward primer로, 5'-GGTACCTTGTTACGACTT를 reverse primer로 사용하여 PCR을 수행하였다.⁴⁾ PCR 조건은 160 ng의 DNA와 10 pmol primers, 2.5 mM dNTPs, 10x PCR 완충용액, 1.0 U Taq DNA polymerase를 넣고 최종 반응 부피를 20 μl로 하여 95°C에서 7분간 pre-denaturation 시킨 후 총 35회 반복(95°C에서 45초간 denaturation, 55°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 extension)한 후, 최종적으로 72°C에서 7분간 더 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 분리하였으며, 분리된 DNA를 pGEM T-Easy vector(Promega, USA)에 ligation하여 *Escherichia coli* XL1-Blue에 형질전환시켜, ampicillin(50 μg/ml)이 포함된 LB 한천평판배지에서 blue-white 콜로니 선별법에 의해 형질전환 클론을 선별하였다.

rDNA 클론 확인 및 분석. 위에서 얻은 white 콜로니를 ampicillin이 포함된 LB 배지에 접종하여 플라스미드 DNA를 추출한 후 제한효소 *Bam*HI, *Hind*III, *Ssp*I, *Eco*RV, *Hin*FI, 그리고 *Sma*I를 처리하여 밴드 패턴을 비교하여 분류할 수 있는 그룹으로 나누었으며, 각 그룹별로 한 개 클론의 염기서열을 분석하였다.

16S rDNA 염기서열의 계통 분석. 염기서열의 chimeric artifact는 RDP(Ribosomal Database Project)의 CHECK_CHIMERA program에 의해 확인하였다. 염기서열간의 유사도를 확인하기 위하여 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) search를 이용하여 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 GenBank와 EMBL database에서 유사한 염기서열을 비교하였다.²¹⁾ 클론의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program(ver 3.2; <http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit>)

을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하여 계통수 제작에 이용하였다. 염기서열간 유전적 거리는 Jukes & Cantor distance model²²⁾로 사용하여 추정하였으며, Neighbor-joining method로 계통수를 작성하였다. Neighbor-joining data의 Bootstrap 분석 시 1,000회의 resampling을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하고자²³⁾ 이를 토대로 phylogenetic tree를 결정하였다.

결과 및 고찰

수초 주변과 갯벌 내 배양 가능한 미생물의 세포의 효소 활성 비교. 세균과 곰팡이 이외의 종속영양생물들이 고분자물질을 분해하는 효소를 체외로 방출하는 경우가 거의 없고, 해양에서의 고분자물질 가수분해효소의 활성이 세균의 생물량과 밀접한 연관을 갖고 있으며,²⁴⁾ 갯벌 주변의 효소들은 대부분 세균으로부터 유래한다는 가정¹¹⁾을 토대로 수초 주변과 갯벌 내에 존재하는 미생물의 세포의 효소를 비교하기 위하여 CMCase, xylanase, 그리고 protease 활성을 조사하였다. 각 시료를 10³배 희석하여 얻은 colony를 CMCase, xylanase, 그리고 protease 활성을 조사하기 위하여 각각 LBC, LBX 그리고 LBM 배지에 옮겨 확인한 결과 수초의 경우 45.4%, 갯벌의 경우 61.3%의 균주에서 위 3종류의 효소활성을 보이는 것으로 확인되었다(Table 1).

활성이 있는 콜로니 중에서 수초와 갯벌 시료에서 각각 2개씩 총 4개의 비교적 큰 활성환을 보이는 콜로니를 선택하였다. 수초에서 2번, 3번, 갯벌시료에서 27, 30번 콜로니를 택하였다. 대조군으로는 위 3종류의 효소 활성이 없는 *E. coli* DH5 α 를 사용하였다. 이들 4개 균주의 효소 활성을 측정된 결과, 전반적으로 xylanase 활성이 높게 나타났다(Fig. 1).

배양액을 조효소원으로 사용하여 효소의 최적 온도를 조사한

Table 1. Ratio of active colonies to total colonies*

Site	Total colony	Active colony	Ratio (%)
Wetland soil	99	45	45.4
Mud flat	119	73	61.3

* active colony: colony with CMCase, xylanase and protease activity in 10⁻³ dilution sample.

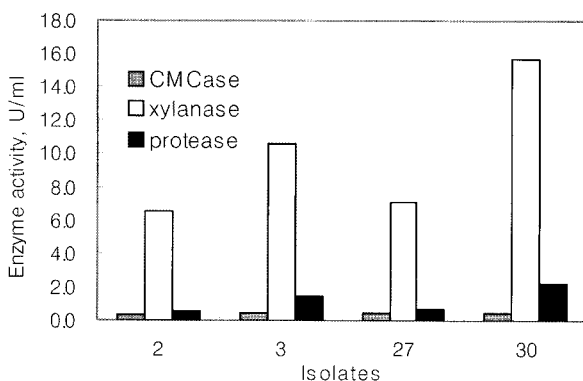


Fig. 1. Enzyme activity of the isolates 2, 3, 27, and 30 from the wetland soil and the mud flat of Suncheon Bay.

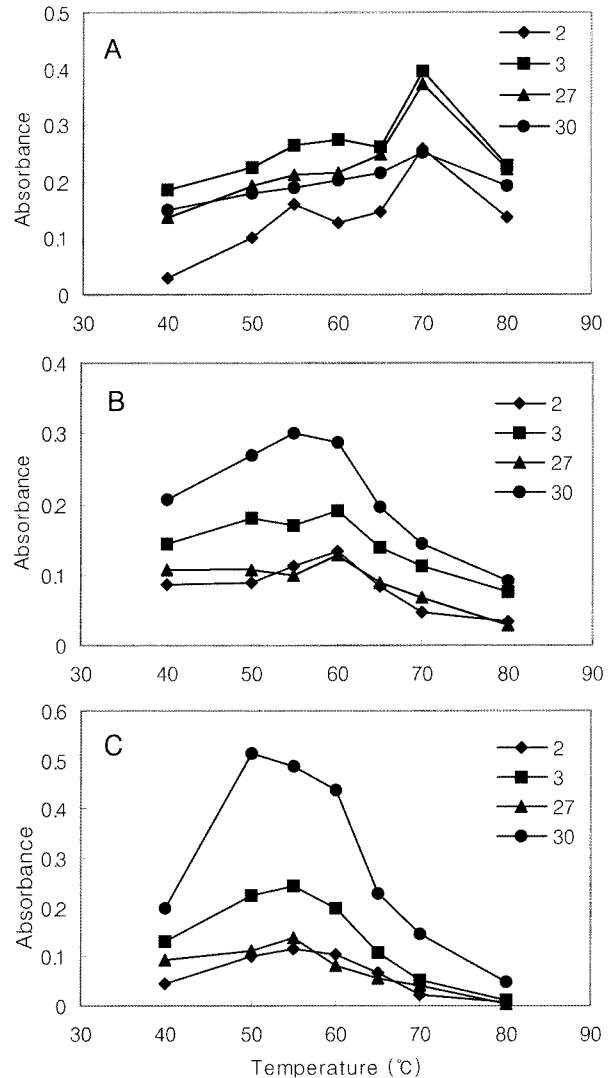


Fig. 2. Effect of temperature on the CMCase (A), xylanase (B), and protease (C) activities of the isolates 2, 3, 27, and 30 from the wetland soil and the mud flat of Suncheon Bay.

결과, 분리균 2, 3번은 CMCase 효소활성이 65°C에서 감소 후 70°C에서 다시 증가하는 것으로 나타났다. 이 결과로부터 2, 3번 균주는 최적온도가 다른 두 종류 또는 그 이상의 CMCase를 생산한다는 것을 예측할 수 있다. 분리균주 4개 모두 70°C에서 최대 활성을 보이는 비교적 열에 안정한 CMCase를 생산하였다(Fig. 2A). Xylanase 활성은 2, 3, 27번은 60°C에서 최대를 나타냈으며, 30번은 55°C에서 활성이 최대로 나타났다(Fig. 2B). Protease 활성은 30번만 50°C에서 최대로 나타났고, 2, 3, 27번은 55°C에서 최대 활성을 보였다(Fig. 2C).

CMCase 활성의 경우 분리균주 2, 3, 27, 그리고 30번 모두 비슷한 양상을 보였으며, pH 5근처에서 최대 활성을 보였으며, pH 8 이상에서 CMCase 활성이 감소하였다. Xylanase의 최적 pH는 2, 3, 27, 30번 모두 pH 4-5임을 알 수 있었다(Fig. 3). Protease는 4 균주 모두 pH 7에서 최대 활성을 나타냈다. 이들 균주가 생산하는 protease 활성은 사용된 buffer의 종류에 민감한 것으로 확인되었다. 위와 같이 미생물의 세포의 효소 활성

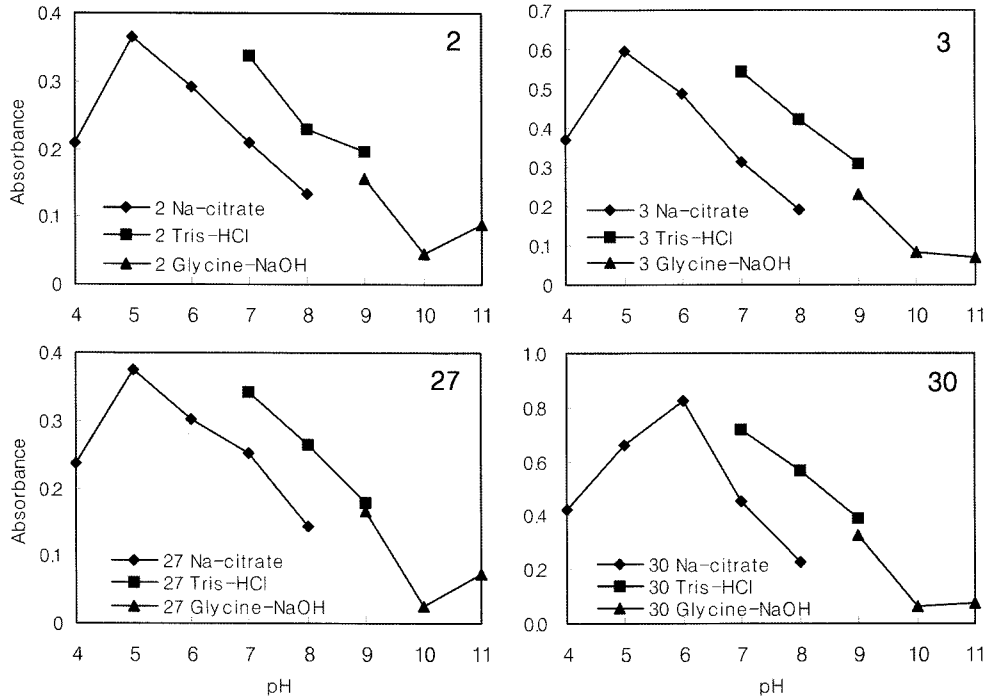


Fig. 3. Effect of pH on the xylanase activities of the isolates 2, 3, 27, and 30 from the wetland soil and the mud flat of Suncheon Bay.

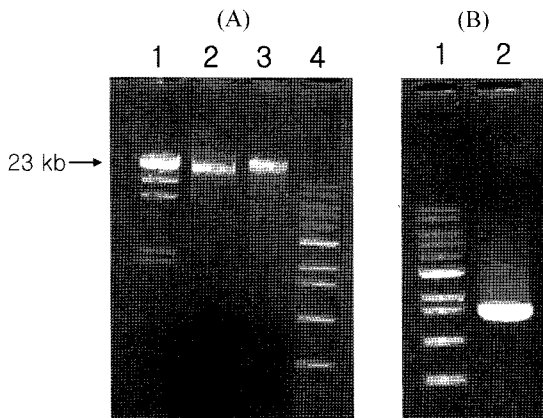


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of the total DNA extracted from the mud flat (A) and the amplified PCR products from the metagenome (B). Lane 1 in A, Lamda DNA as size markers; Lane 2 in A, metagenome isolated from the mud flat; Lane 3 in A, isolated metagenome after dialysis; Lane 4 in A and Lane 1 in B, 1 kb ladder as size markers; Lane 2 in B, the amplified 16S rDNA fragments.

을 CMCase, xylanase, 그리고 protease을 대표로 하여 분석한 결과, 수초와 갯벌에 존재하는 미생물의 종류는 큰 차이가 없는 것으로 추정할 수 있었다.

순천만 갯벌의 세균군집 분석을 위한 메타게놈 분리 및 정제. 토양 미생물의 유전적 구조의 다양성을 이해하기 위해서는 먼저 자연 상태의 시료로부터 직접적으로 충분히 정제된 DNA를 얻어야 한다. 토양에서 추출된 핵산에는 humic compound나 효소저해 물질들이 함께 존재한다. 이들 humic compound나 효소저해 물질들은 PCR 및 제한효소 반응을 저해하는 것으로 알

려져 있다.^{25,26)} Ethanol 침전 시에는 갯벌자체에 염 농도가 매우 높으므로 NaCl을 넣지 않았으나, ammonium acetate 침전에 의해 정제된 DNA는 갈색을 띠었으며, PCR이 수행되지 않았다. 따라서 humic compound들이 전기영동 상에서 DNA에 비해 약 2배 정도 빠르게 이동하는 성질을 이용하여 DNA의 2차 정제를 수행하였으며, 이후 얻어진 DNA는 PCR, 제한효소 처리 및 클로닝을 수행하기에 적합하였다. 분리된 메타게놈은 약 20 kb 이상으로 확인되었으며, 투석으로 불순물을 제거하였다 (Fig. 4A).

16S rDNA 분석. 분리된 메타게놈의 bacterial 16S rDNA를 증폭시키기 위하여 27⁹⁾와 1522r primer를 사용하였고, PCR 증폭한 결과 1.5 kb 산물을 얻었다(Fig. 4B). 이 PCR 산물을 pGEM-T Easy vector에 삽입하여 약 2,000개의 클론들을 얻었다. 이들 중 200개의 플라즈미드를 대상으로 제한효소 pattern을 분석한 결과 20개의 그룹으로 나눌 수 있었다(결과 미제시). 이들 중 3개의 그룹에 해당하는 클론은 염기서열 분석 결과가 분명하지 않아 염기서열이 확인된 17개의 클론을 대상으로 RDP의 CHECK_CHIMERA program과 NCBI의 BLAST 분석을 통하여 각각의 유사도를 분석하였다(Table 2).

1번 클론은 남중국의 심해퇴적물에서 클론된 uncultured bacterium b28r 클론과 98.4%의 유사도를 보였으며, 리그닌이 풍부한 펄프공장의 해수로부터 분리된 *Marinobacterium georgiense* KW-40 표준균주와 93.4%의 유사도를 보였다.²⁷⁾ 4번 클론은 *Staphylococcus*속에 속하는 여러 종과 16S rRNA 유전자 염기서열을 비교한 결과 매우 높은 유사도 지수(97.3-99.9%)를 보였으며, 가장 높은 유사도 지수를 보인 종은 *Staphylococcus warneri* ATCC 27836 표준균주로서 99.9%의 유사도 지수를 보였다. 5번은 해수 표면으로부터 클론된

Table 2. Nearest neighbour of the 16S rDNA clones

Clone No.	Length of sequence (bp)	Closest relative based on partial sequence homology ^a	Sources	Similarity (%)	Taxonomic rank
1	707	uncultured bacterium b28r (DQ462285)	deep-sea sediments of the South China Sea	98.6	<i>Gamma proteobacteria</i>
4	687	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T (L37603)	human skin	99.9	<i>Firmicutes</i>
5	686	uncultured marine bacterium SJC3.21 (DQ071119)	surface water	98.4	<i>Verrucomicrobia</i>
7	696	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NBRC 13719 ^T (AB271744)	soil	99.1	<i>Firmicutes</i>
9	682	bacterium DG976 (AY258126)	seawater (algal bloom, dinoflagellate)	98.0	<i>Bacteroidetes</i>
17	717	uncultured bacterium JH10_C41 (AY568798)	the intertidal flat of Ganghwa island	99.2	<i>Gamma proteobacteria</i>
22	688	uncultured bacterium JH12_C13 (AY568855)	the intertidal flat of Ganghwa island	97.2	<i>Gamma proteobacteria</i>
33	679	uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. VHS-B4-54 (DQ395002)	harbor sediment (China:Victoria Harbour, HK)	98.4	<i>Gamma proteobacteria</i>
46	663	uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium MS12 (AM712325)	biofilm at hydrothermal vent orifice (New Zealand: Brothers Seamount, Kermadec Arc)	93.2	<i>Acidobacteria</i>
81	1180	uncultured delta proteobacterium Belgica 2005/10-130-15 (DQ351760)	marine sediments	97.5	<i>Delta proteobacteria</i>
97	693	uncultured bacterium EV818BHEB5102502SAR27F42 (DQ256312)	subsurface water (South Africa: Kalahari Shield)	98.0	<i>Gamma proteobacteria</i>
98	709	uncultured bacterium JH12_C13 (AY568855)	the intertidal flat of Ganghwa island	97.5	<i>Gamma proteobacteria</i>
101	694	<i>Nitricola lacinisaponensis</i> 4CA ^T (AY567473)	decayed wood (alkaline, saline lake)	91.0	<i>Gamma proteobacteria</i>
104	693	<i>Lutibacter litoralis</i> JCM 13034 ^T (AY962293)	tidal flat sediment	98.7	<i>Flavobacteria</i>
106	591	uncultured bacterium DB-33 (DQ836753)	denitrifying bioreactor	91.2	<i>Chloroflexi</i>
107	657	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NBRC 13719 ^T (AB271744)	soil	99.5	<i>Firmicutes</i>
108	654	uncultured gamma proteobacterium Belgica 2005/10-130-12 (DQ351758)	heavy metal contaminated marine sediments	98.5	<i>Gamma proteobacteria</i>

^aThe closest matching sequence from a cultivated and characterized strain was identified using the Blast search.

uncultured marine bacterium SJC3.21와 98.4%의 유사도 지수를 보였으며, 배양가능한 *Rubritalea squalenifaciens* HOact23 표준균주와 89.02%의 낮은 유사도 지수를 보였다.²⁸⁾ 7번, 107번 클론은 그람양성 세균이며, 토양, 담수, 해수 등 자연계 전반적으로부터 분리되는 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NBRC 13719 표준균주와 각각 99.1%, 99.5%의 유사도 지수를 나타냈다. 9번 클론은 조류가 풍부한 해수로부터 클론된 bacterium DG976와 98.0%의 유사도 지수를 보였으며,²⁹⁾ 배양 가능한 균주인 *Donghaeana dokdonensis* DSW-6 표준균주와도 비교적 높은 97.1%의 유사도 지수를 나타내었다. 17번, 22번, 98번 클론들은 국내 강화 갯벌 환경의 클론들과 매우 높은 유사도 지수를 보였다. 17번은 uncultured bacterium JH10_C41 클론과 99.2% 유사도 지수를 보였고, 22번, 98번은 uncultured bacterium JH12_C13 클론과 각각 97.24%, 97.5%의 유사도 지수를 보였다. 17번은 배양 가능한 균주인 *Thioalkalivibrio denitrificans* ALJD 표준균주와 93.1%의 유사도 지수를 나타냈으며,³⁰⁾ 22번 및 98번 클론들은 진핵세포의 *Skeletonema costatum* UBS-18의 색소체(plastid)의 유전자와 각각 96.5% 및 96.2%의 유사성도 지수를 보였다. 33번 클론은 항구 퇴적으로부터 클론된 uncultured *Pseudomonas* sp. VHS-B4-54와

98.4%의 높은 유사도 지수를 보였으며, 극호염 환경에서 서식하는 호염성 황산화 세균의 일종인 *Thiohalophilus thiocyanoxidans* HRhD 2 표준균주와 91.1%로 가장 가까운 유사도 지수를 보였다.³¹⁾ 46번은 해저 열수공의 biofilm으로부터 클론된 uncultured *Acidobacteria* bacterium MS12 16S ribosomal RNA 유전자와 93.2%의 유사도를 확인할 수 있었으며, 배양 가능한 미생물 *Desulfotomaculum halophilum* SEBR 3139의 표준균주와는 82.3%로 매우 낮은 유사도 지수를 보였다. 81번은 해양퇴적토 샘플의 uncultured delta proteobacterium Belgica 2005/10-130-15의 클론과 97.5%의 유사도를 보였으며 배양 가능한 미생물 *Byssovorax cruenta* DSM 14553 표준균주와는 88.1%으로 매우 낮은 유사도 지수를 보였다.³²⁾ 97번 클론은 uncultured proteobacterium clone DR 938CH110701SACH45 16S rRNA 유전자와 96%의 염기 유사도를 보였으며, *Thioalkalivibrio denitrificans* ALJD 표준균주와는 88.7%의 유사도 지수를 보였다. 101번은 배양가능한 *Nitricola lacinisaponensis* 4CA 표준균주와 90.3%의 염기 유사도를 나타냈다.³³⁾ 104번 클론은 갯벌 퇴적으로부터 분리된 *Lutibacter litoralis* JCM 13034 표준균주 16S rRNA 유전자와 98.7%의 유사도를 보였다.³⁴⁾ 106번은 탈질반응기로부터 클론된 uncultured bacterium

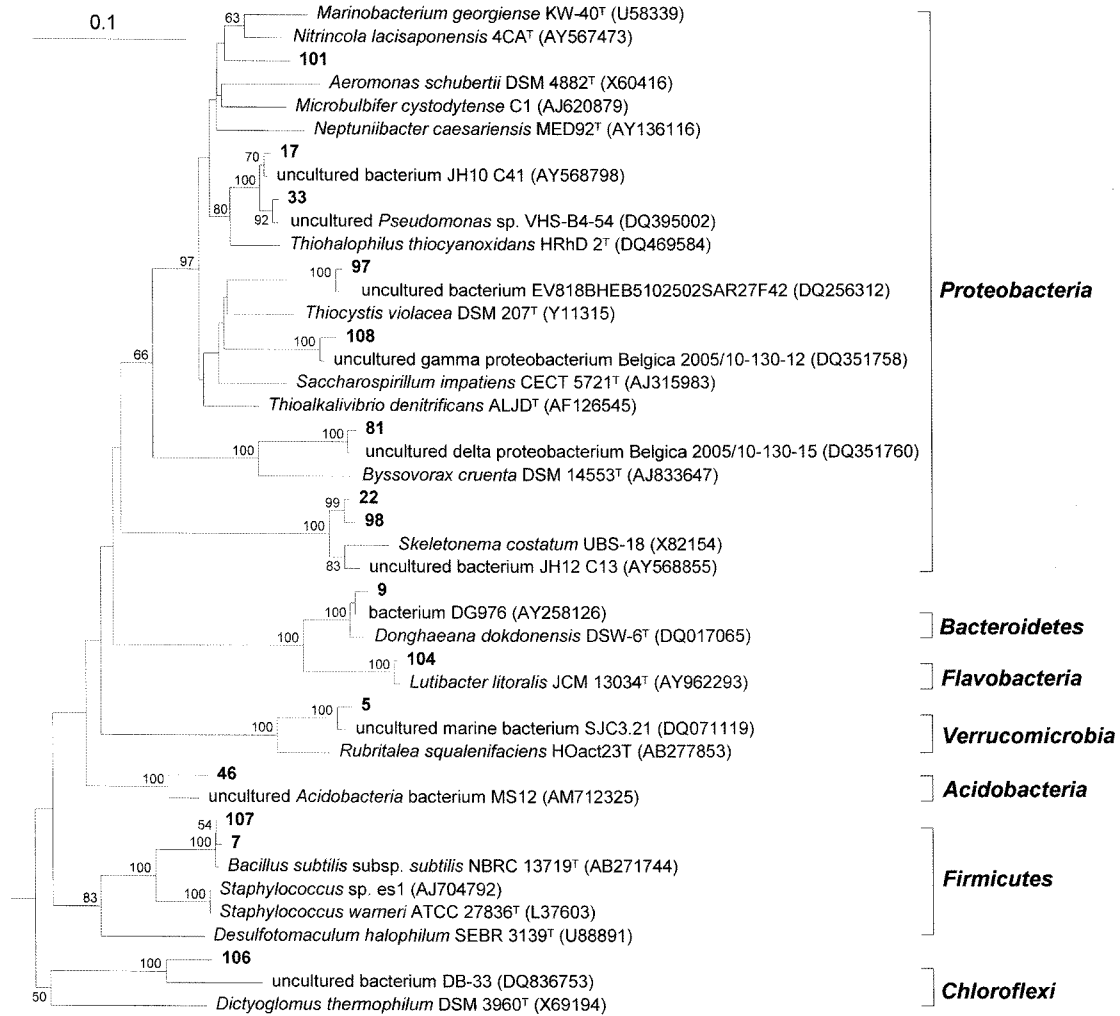


Fig. 5. Neighbor-joining tree based on the partial 16S rRNA gene sequences showing relationships between isolated strains, members of the Eubacteria. The numerals represent the rDNA clone numbers. The percentages at the nodes are the levels of bootstrap support >50% based on neighbor-joining analyses of 1,000 resampled data sets. The sequence *Methanococcus thermolithotrophicus* DSM 2095^T (M59128) was used as an outgroup (not shown). Bar, 0.1 nucleotide substitution per position.

DB-33 16S rRNA gene과 91.2%의 유사도를 보였으며, 배양균주 *Dictyoglomus thermophilum* DSM 3960와는 80.9%로 매우 낮은 유사도 지수를 보였다. 108번 클론은 중금속에 오염된 해양 퇴적토 환경의 uncultured gamma proteobacterium Belgica 2005/10-130-12 클론과 98.5%의 유사도를 보였으며, 배양균주 *Thiocystis violacea* DSM 207 표준균주와 88.7%의 유사도 지수를 보였다.

분석된 17개의 클론들의 평균 유사도는 97.3%이었으며, 그 범위는 91.0-99.9%를 보였다. 이 값은 이전에 보고된 배양 가능한 미생물과의 최고 유사도인 96.8%¹²⁾ 보다 높은 수치였다. 4번, 7번, 9번, 101번, 104번, 107번은 배양 가능한 미생물과 우선적으로 유사도를 보였으며, 이들을 제외한 나머지는 배양 가능한 미생물의 염기서열 보다는 uncultured strain들과 유사도가 가까웠다.

16S rDNA 계통 분석. 위에서 얻은 자료와 PHYDIT program을 이용한 Clustal W multiple alignment과 Neighbor-joining method로 계통수를 작성하여 이들의 계통을 분석한 결

과, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Flavobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, 그리고 *Chloroflexi* 등 7개의 lineage로 구분될 수 있었다(Table 2 & Fig. 5). 분석한 클론 수가 충분하지는 않으나 본 연구의 7개의 그룹은 이전에 보고된 해양퇴적물 내 6개³⁵⁾ 또는 5개 그룹³⁶⁾의 결과 보다 다양 또는 비슷한 수준에 있다고 추정할 수 있다. 이들 중 9개 (52.9%)의 클론은 *Proteobacteria*에 속하였으며, 이 중 1개를 제외한 8개의 클론은 *gamma Proteobacteria*에 속하였다. 본 연구에서의 전체 *Proteobacteria* 비율은 이전에 보고된 70%(20개 중 14개)의 클론이 *Proteobacteria*에 속하였다는 결과¹²⁾와 62.1%(103개 중 64개) 클론이 *Proteobacteria*에 속하였다는 결과¹³⁾ 보다는 낮게 나왔다. 황원소의 산화와 환원에 관여하는 *gamma Proteobacteria*의 비율이 전체 *Proteobacteria* 중에서 높게 나타났다. 총 클론 중 *gamma Proteobacteria*의 비율(8/17 = 47.1%)은 강화도 갯벌의 연구 결과인 21.5%¹⁴⁾와 비교할 때 높은 것으로 나타났다. 3개(17.6%)의 클론은 *Firmicutes*에 속하였으며, 나머지 lineage에는 각각 1개씩의 클론이 해당되었다.

일반적으로 미생물 군집구조가 물리 화학적 요인으로 다양성이 감소하거나 변할 수 있다는 보고³⁷⁾와는 다르게 순천만 갯벌은 미생물 다양성을 유지하고 있으며, 분석된 클론의 65% 가량이 배양되지 않은 미생물인 것으로 조사되었다. 다양성을 유지하고 있는 이 갯벌로부터 메타게놈 라이브러리를 제작하여 보다 다양한 유전자원을 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

초 록

순천만 갯벌에 존재하는 미생물의 다양성을 세포의 효소 활성과 16S rDNA 분석으로 조사하였다. 수초 주변과 갯벌에서 채취한 시료에서 얻은 배양 가능한 균 중에서 4개의 균주를 대상으로 CMCase, xylanase와 protease의 활성을 조사한 결과 2, 3, 27, 그리고 30번 4균주 모두 xylan 분해능이 가장 뛰어나다. 각각의 효소 활성의 최적 온도는 50~70°C로 나타났고, 수초 주변과 갯벌 시료에 따른 차이는 거의 없었다. 갯벌 내 세균 군집을 조사하기 위해 메타게놈 DNA를 분리한 후 증폭된 16S rDNA를 갖는 약 2,000개의 클론을 얻어 그 다양성을 조사하였다. 제한효소 절단 양상으로부터 선별된 17개의 클론을 분석한 결과 클론들의 평균 유사도는 97.3%이었으며, 그 범위는 91.0~99.9%를 보였고, 4번, 7번, 9번, 101번, 104번, 107번을 제외한 나머지 11개는 uncultured strain들로 확인되었다. 이들은 *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Flavobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, 그리고 *Chloroflexi*의 7개의 그룹으로 구분할 수 있었다. 9개(52.9%)의 클론은 *Proteobacteria*, 3개(17.6%)의 클론은 *Firmicutes*에 속하였으며, 나머지 그룹에는 각각 1개씩의 클론이 해당되었다. *Proteobacteria* 중에서는 황원소의 산화와 환원에 관여하는 *gamma Proteobacteria*의 비율이 높게 나타났다. 본 연구의 결과 순천만 갯벌은 미생물 다양성을 유지하고 있으며, 분석된 클론의 65% 가량은 배양되지 않은 미생물로 조사되었다. 이 갯벌로부터 메타게놈 라이브러리를 제작하여 보다 다양한 유전자원을 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

Key words: 갯벌 메타게놈, 16S rDNA, 다양성, *Proteobacteria*, 난배양성 미생물

감사의 글

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2003-041-F00016).

참고문헌

- Hoppe, H. G. (1983) Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl substrates. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **11**, 299-308.
- Jakob, P., Glockner, F. O., Unterholzner, S., Alfreider, A., Psenner, R. and Amann, R. (1998) Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4299-4306.
- Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Ward, D. M., Weller, R. and Bateson, M. M. (1990) 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well studied thermal community. *FEMS Microbiol. Rev.* **6**, 102-115.
- Woese, C. R., (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- Torsvik, V., Sorheim, R. and Goksoyr, J. (1996) Total bacterial diversity in soil and sediment communities - a review. *J. Ind. Microbiol.* **17**, 170-178.
- Vetriani, C., Reysenbach, A. L. and Dore, J. (1998) Recovery and phylogenetic analysis of archaeal rRNA sequences from continental shelf sediments. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**, 83-88.
- Wilms, R., Sass, H., Kopke, B., Koster, J., Cypionka, H. and Engelen, B. (2006) Specific bacterial, archaeal, and eukaryotic communities in tidal-flat sediments along a vertical profile of several meters. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2756-2764.
- Webster, G., Yarram, L., Freese, E., Koster, J., Sass, H., Parkes, R. J. and Weightman, A. J. (2007) Distribution of candidate division JS1 and other bacteria in tidal sediments of the German Wadden Sea using targeted 16S rRNA gene PCR-DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* **62**, 78-89.
- Stevens, H., Brinkhoff, T., Rink, B., Vollmers, J. and Simon, M. (2007) Diversity and abundance of Gram positive bacteria in a tidal flat ecosystem. *Environ. Microbiol.* **9**, 1810-1822.
- Baik, K. S., Choi, J. H. and Seong, C. N. (2000) Cellulose Degradation and Extracellular enzymatic activity of the mud flat in Suncheon Bay. *Kor. J. Microbiol.* **36**, 130-135.
- Lee, M. S., Hong, S. G., Lee, D. H., Kim, C. K. and Bae, K. S. (2001) Bacterial diversity in the mud flat of Suncheon Bay, Chunnam province, by 16S rRNA gene analysis. *Kor. J. Microbiol.* **37**, 137-144.
- Kim, B. S., Oh, H. M., Kang, H. J., Park, S. S. and Chun, J. S. (2004) Remarkable bacterial diversity in the tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 205-211.
- Cho, H. Y., Lee, J. H. and Hyun, J. H. (2004) Bacterial community structure and diversity using 16S rDNA analysis in the intertidal sediment of Ganghwa island. *Kor. J. Microbiol.* **40**, 189-198.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 436-428.
- Lee, K. D., Kim, J. and Kim, H. (1999) Purification and characterization of carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus* sp. KD1014. *Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 107-112.
- Shin, E. S., Yang, M. J., Jung, K. H., Kwon, E. J., Jung, J. S., Park, S. K., Kim, J., Yun, H. D. and Kim, H. (2002) Influence of the transposition of the thermostabilizing domain of *Clostridium thermocellum* xylanase (XynX) on xylan binding and thermostabilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3496-3501.
- Kim, H., Yang, M. J., Jung, K. H. and Kim, J. (2000) Cloning and characterization of the major extracellular neutral protease (NprM) from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Agric. Chem. Biotechnol.* **43**, 147-151.

19. Torsvik, V., Glksoyr, J. and Daae, F. L. (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 782-787.
20. Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 316-322.
21. Maidak, B. L., Cole, J. R., Libum, T. G., Parker, CT Jr., Saxman, P. R., Stredwick, J. M., Garrity, G. M., Li, B., Olsen, G. J., Pramanik, S., Schmidt, T. M. and Tiedje, J. M. (2000) The RDP (Ribosomal Database project) continues. *Nucleic Acids Res.* **28**, 173-174.
22. Jukes, T. H. and Cantor, C. R. (1969) Evolution of protein molecules. In *Mammalian protein metabolism*, (Munro, H. N. ed.) pp. 21-132. New York, Academic Press, USA.
23. Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evaluation.* **39**, 783-791.
24. Boetius, A. and Lochte, K. (1996) Effect of organic enrichments on hydrolytic potentials and growth of bacteria in deep-sea sediments. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **140**, 239-250.
25. Tebbe, C. C. and Vahjen, W. (1993) Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA form bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2657-2665.
26. Wilson, I. G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1623-1629.
27. Gonzalez, J. M., Mayer, F., Moran, M. A., Hodson, R. E. and Whitman, W. B. (1997) *Microbulbifer hydrolyticus* gen. nov., sp. nov., and *Marinobacterium georgiense* gen. nov., sp. nov., two marine bacteria from a lignin-rich pulp mill waste enrichment community. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 369-376.
28. Kasai, H., Katsuta, A., Sekiguchi, H., Matsuda, S., Adachi, K., Shindo, K., Yoon, J., Yokota, A. and Shizuri, Y. (2007) *Rubritalea squalenifaciens* sp. nov., a squalene-producing marine bacterium belonging to subdivision 1 of the phylum 'Verrucomicrobia'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1630-1634.
29. Green, D. H., Llewellyn, L. E., Negri, A. P., Blackburn, S. I. and Bolch, C. J. (2004) Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**, 345-357.
30. Sorokin, D. Y., Lysenko, A. M., Mityushina, L. L., Tourova, T. P., Jones, B. E., Rainey, F. A., Robertson, L. A. and Kuenen, G. J. (2001) *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov. and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 565-580.
31. Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenko, A. M. and Muyzer, G. (2006) Diversity of culturable halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. *Microbiology.* **152**, 3013-3023.
32. Reichenbach, H., Lang, E., Schumann, P. and Sproer, C. (2006) *Byssovorax cruenta* gen. nov., sp. nov., nom. rev., a cellulose-degrading myxobacterium: rediscovery of 'Myxococcus cruentus' Thaxter 1897. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2357-2363.
33. Dimitriu, P. A., Shukla, S. K., Conradt, J., Marquez, M. C., Ventosa, A., Maglia, A., Peyton, B. M., Pinkart, H. C. and Mormile, M. (2005) *Nitricola lacisaponensis* gen. nov., sp. nov., a novel alkaliphilic bacterium isolated from an alkaline, saline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 2273-2278.
34. Choi, D. H. and Cho, B. C. (2006) *Lutibacter litoralis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the *Flavobacteriaceae* isolated from tidal flat sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 771-776.
35. Gray, J. P. and Herwig, R. P. (1996) Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4049-4059.
36. Urakawa, H. K., Kita-Tsukamoto, K. and Ohwada, K. (1999) Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology.* **145**, 3305-3315.
37. Lindstrom, E., Barry, R. P. and Braddock, J. F. (1999) Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 1677-1689.