

# 염전으로부터 농화배양된 호염 메틸영양미생물 군집의 특성

김종걸 · 박수제 · 이성근\*  
충북대학교 미생물학과

## Prokaryotic Communities of Halophilic Methylotrophs Enriched from a Solar Saltern

Jong-Geol Kim, Soo-Je Park, and Sung-Keun Rhee\*

Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

(Received July 9, 2010/Accepted September 3, 2010)

**C-1 compounds are observed in anaerobic sediment of high salt environments. Thus, surface sediments and waters from these environments are therefore potential habitats for aerobic methylotrophic microorganisms. The soil samples collected from saltern and tidal flat as inoculums and methanol as carbon and energy source was supplied. After subculture depending on the salt concentration, methanol oxidizing bacteria growth condition investigated, the results of methanol oxidizing bacteria can grow in salt conditions, and the maximum concentration was 20%. Analysis based on denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA genes indicates that *Methelyophaga*-like bacteria were dominants of methylotrophs in the enrichment culture. Quantitative PCR showed that archaeal cells were about 1-10% of bacterial cells. Additionally archaea were assumed not to be involved in methanol oxidation since bacterial antibiotics completely blocked the methanol oxidation. Our results suggest that *Methelyophaga*-like bacteria could be involved in C-1 compounds oxidation in hypersaline environments although those activities are sensitive to salinity above 20%.**

**Keywords:** halophilic, methylotrophs, solar saltern

천일염전(solar salterns), 천연 염수, 호(salt lake), 및 소금으로 저린 어류와 육류의 표면과 같은 환경을 “고염분성(hypersaline)”이라고 부르며, 이들 환경에는 호염성 미생물들이 다양하게 존재한다(4). 이중 극호염성 미생물은 생장을 위하여 적어도 NaCl 1.5 M (9%) 이상이 필요하며, 적정 생장을 위하여 NaCl 2-4 M (12-23%) 이상을 필요로 한다. 어떤 종들은 NaCl 5.5 M (32%, NaCl의 포화 한도) 이상에서 생장할 수 있다. 호염성 환경에서의 미생물의 다양성 및 분리에 대한 연구는 지속적으로 이루어지고 있으며, 암염과 같은 시료로부터 고미생물학 및 지구 생물체의 진화에 대한 연구가 진행되고 있다(2, 17, 18). 또한, 호염성 세균의 독특한 생리적인 특징을 통해 고염분성 환경에서 이용할 수 있는 생물촉매에 대한 상업적 연구도 수행되도록 하고 있다(15, 16).

호기적 메탄-(methanotroph) 및 메틸영양세균(methylotrophs)은 메탄(CH<sub>4</sub>) 및 메탄올(CH<sub>3</sub>OH)을 유일한 탄소원과 에너지원으로 사용할 수 있다. C-1 화합물인 메탄올(CH<sub>3</sub>OH)은 토양에서 식물 중합체의 분해과정 동안에 생산되며, 메탄산화세균(methane

oxidizing bacteria)에 의해 메탄올이 환경으로 방출되기도 한다(1). 메탄/메틸영양체는 메탄과 메탄올이 존재하는 많은 환경에서 분리되었으며, 대부분의 호기적 메탄/메틸영양체는 *Proteobacteria*에 속한다.

최근에 고염분성 지역에 높은 비율의 메탄과 메탄올, 메틸화된 아민과 같은 환원된 탄소 화합물들이 존재한다고 알려지고 있다(11). 현재까지 알려진 호염성 메틸영양세균은 NaCl 0.2-2.5 M (1.2-15%)에서 발견되었다. 본 연구에서는 고염분성 환경, 특히 재래식 염전에서 염분 농도 차이에 따른 메틸영양 미생물의 농화 배양을 실시하였으며, 배양된 미생물군집으로부터 분자생물학기법을 통하여 세균과 고세균 유래의 고염분성 메틸영양미생물의 존재와 다양성을 알아보고자 하였다.

전라북도 부안군 진서면 곰소리(35°35'N, 125°36'E)에 위치한 곰소염전 과 상록 해변 갯벌(35°35'59.94"N, 126°28'58.90"E)에서 7곳의 퇴적층시료를 채취하였다. 퇴적층시료에서의 염도 측정 결과 2%에서 최대 28%까지 관찰할 수 있었다(Table 1 and Fig. 1).

고염환경을 조성하기 위하여 인위적인 고염배지를 다음과 같이 준비하였다. 배지 조성은 L당 24.6 g sodium chloride,

\* For correspondence. E-mail: rhees@chungbuk.ac.kr; Tel: +82-43-261-2300; Fax: +82-43-264-9600

**Table 1.** Sediment samples used as inoculums for enrichment cultures

Sediment	Salinity (%)	Methanol consumption (1 mM)		
		10% (salinity) after 3 weeks	20% (salinity) after 3 weeks	30% (salinity) after 3 weeks
Storage puddle (SP)	28	+	+	-
Crystallizing pond (CP)	17	+	-	-
Evaporating pond (EP)	4	+	+	-
Puddle (PD)	12	+	+	-
Drainageway I (DWI)	2	+	+	-
Drainageway II (DWII)	4	+	+	-
Tidal flat (Sangnok) (TF)	4	+	-	-

+, completely oxidized methanol; -, no oxidized methanol

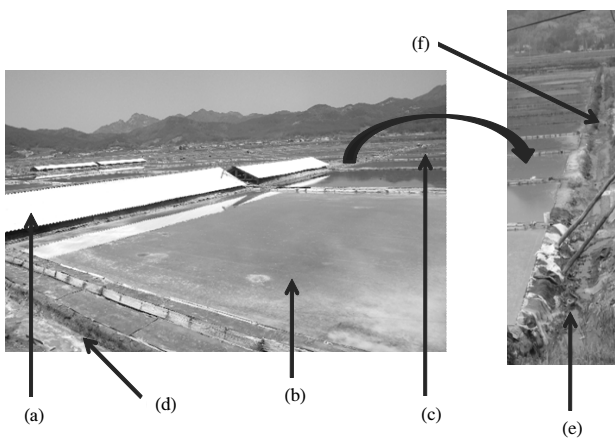
0.67 g potassium chloride, 1.36 g calcium chloride, 6.29 g magnesium sulfate, 4.66 g magnesium chloride이며, 추가적으로 0.1 mM phosphate, 3 mM bicarbonate 그리고 trace elements, vitamins를 최종 1×가 되게 넣어주고(26), 질소원으로 1 mM ammonia, 에너지 원으로는 1 mM methanol을 넣어 주었다. 다양한 염분 농도를 위하여 NaCl을 이용하여 10%, 20%, 30%로 조정하였다. 배양을 위하여 채취한 퇴적층 시료 약 5 g에 3종류의 서로 다른 염분 농도를 지닌 고염배지 20 ml에 넣어 slurry를 만들어, 25°C에서 2주간 정치 배양하였다. 2주 후 탁도와 기질소비를 기준으로 미생물의 성장을 보인 샘플을 골라 새로운 배지에 접종량을 5% (v/v)로 하여 계대 배양을 실시하였다.

배지 내 메탄올 농도를 측정하기 위하여 다음과 같은 방법을 사용하였다. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)를 dimethyl sulfoxide (Sigma, USA)에 1 mg/ml가 되도록 녹여서 TMB 용액을 만든다. 만들어진 TMB 용액은 35 ml 멸균증류수(100°C)에 희석하여 최종농도 0.067 mM로 만들었다. 상온에서 천천히 온도를 낮춘 뒤(25°C), 2.7 U alcohol oxidase와 0.2 mg peroxidase를 넣고 상온에서 90 분간 유지시켜서 반응액을 만들었다(10). 이렇게 만들어진 반응액 350 µl에 시료 10 µl를 넣고 20분간 반응시킨 후, 반응 정지를 위하여 1 N HCl을 50 µl 넣어 주었다. 그 후, 색이 완전히 변할 때까지 기다린 뒤, 분

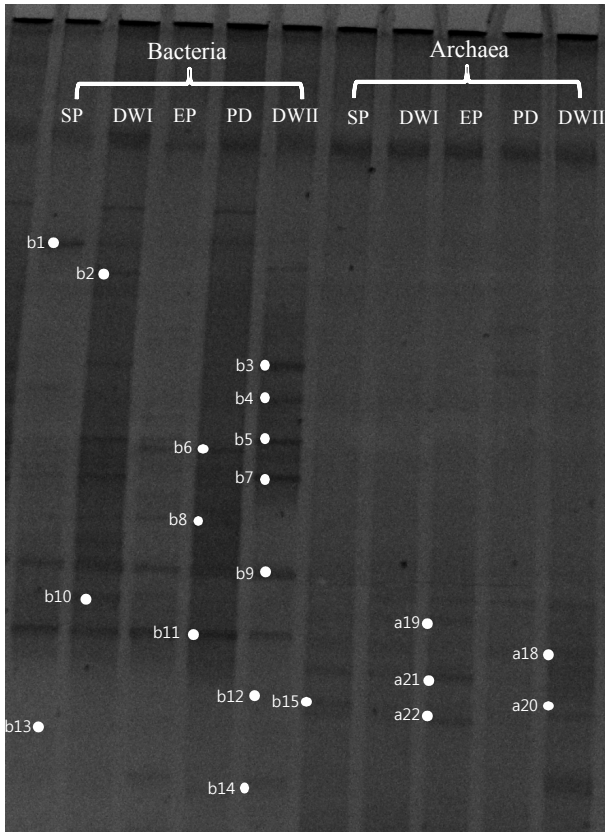
광광도계(spectrophotometer; ND-1000)을 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 사용한 분석조건에서는 포화 염분 농도에서도 메탄올 측정이 저해 받지 않는다는 것을 확인하였다.

에너지와 탄소원으로 메탄올을 넣고 배양하여 메탄올 산화를 살펴본 결과, 염분농도를 10%로 조정된 배양조건에서는 7개 샘플 중 모두, 20%로 조정된 배양 조건에서는 5개 샘플에서만 메탄올 산화가 일어난 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 염분농도를 30%로 조정된 배양조건에서는 메탄올 산화가 일어나지 않는 것을 관찰하였다. 기존의 연구문헌을 조사한 결과, 20% 이상의 염분농도 조건에서 메틸영양미생물에 대한 보고가 없었으므로, 염분농도를 20%으로 조정된 조건에서 methanol이 산화되는 시료들로부터 세균 및 고세균의 군집 및 정량 분석을 실시하였다.

염분 농도 20% 조건에서 메탄올 산화가 일어난 시료를 선택하여 변성 구배 젤 전기영동(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 기법을 통해 미생물 군집구조를 분석하였다. 고세균과 세균의 16S rRNA 유전자를 universal primer set (20F, 958R과 27F, 1492R)를 이용하여 1차 증폭하였고, 증폭된 PCR 산물을 template로 하여 GC clamp가 있는 primer를 이용하여 nested PCR (2차 증폭, 고세균과 세균의 DGGE용 universal primer set: GC clamp-519F, 727R과 GC clamp-518F, 786R)를 실시하였다. 1차 PCR 조건은; 95°C에서 5분 반응 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초 cycle을, 총 30회 실시하였다. 2차 PCR 조건은; 95°C에서 5분 반응 후, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초 cycle을, 총 20회 실시하였다. 본 분석을 위하여 D-code system (Bio-Rad Laboratories, USA)을 이용하였다. 변성 농도구배는 8% polyacrylamide (37.5:1=acrylamide:bisacrylamide)에 urea/formamide (30-60%)를 이용하여 제조하였다. 만들어진 젤을 이용하여 60°C로 유지된 1× Tris-Acetate-EDTA buffer에서 80 V로 14시간 전기영동 하였으며, 전기영동 후 1:10,000으로 희석된 SYBR green (Bioneer, Korea)을 이용해 30분간 염색을 하였다. 염색된 젤은 UV를 이용하여 관찰하였으며, 관찰된 bands를 잘라내어 0.1× TE buffer에 넣고 4°C에서 하루 동안 방치하여 DNA를 회수하였고, GC clamp가 없는 primer를 이용하여 재증폭하였다. 증폭된 산물은 정제하여 염기서열을 결정하였다.



**Fig. 1.** Description of solar saltern. (a) Storage puddle, (b) Crystallizing pond, (c) Evaporating pond, (d) Puddle, (e) Drainageway I, (f) Drainageway II



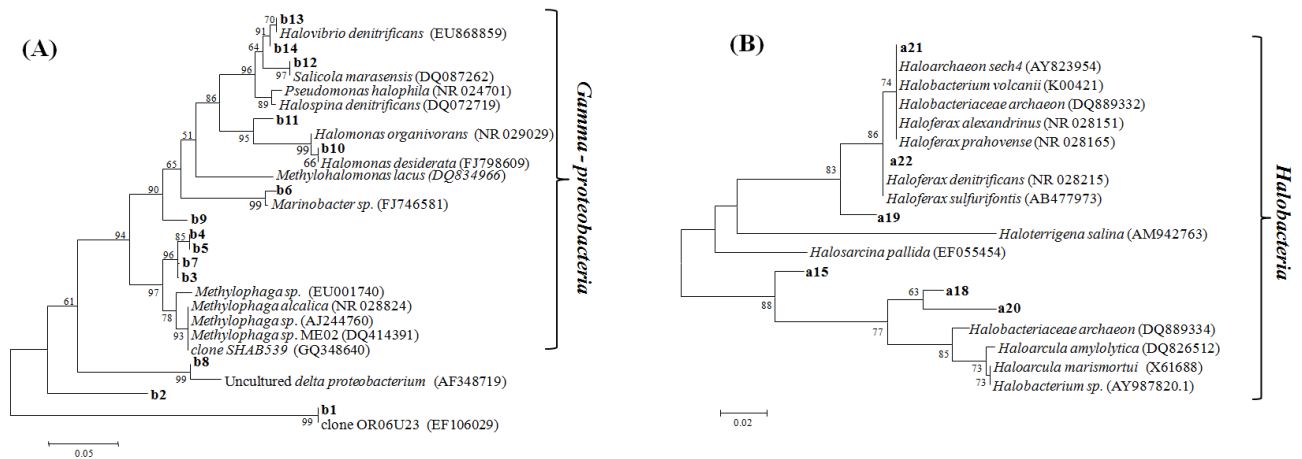
**Fig. 2.** DAGGE analysis of bacterial and archaeal 16S rRNA genes in the enrichment cultures. The bands marked were cut and sequenced for analysis and construction of phylogenetic tree in the Fig. 3.

비록 고세균에 의한 메탄을 산화가 알려진 바가 없지만, 본 배양에서의 고세균에 의한 메탄을 산화 유무를 판별하기 위하여 세균용 항생제를 접종하여 세균에 의한 메탄을 산화를 억제 시켜보았다. 세균용 항생제로는 kanamycin (50 µg/ml), strepto-

mycin (30 µg/ml)을 사용하였다. 세균용 항생제 처리결과 메탄을 산화가 완전히 저해되므로 고세균에 의한 메탄을 산화는 배제할 수 있었다.

DGGE 결과, Drainageway II (DW II)을 제외한 샘플에서 매우 단순한 세균 다양성을 지니고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). DWII은 염전 옆 하천 퇴적층시료를 접종원으로 이용한 것으로, 다른 시료에 비해 염분 농도가 낮아 세균의 다양성이 풍부한 것으로 판단된다. 고세균은 모든 시료에서 세균에 비해 적은 군집다양성을 갖고 있는 것으로 나타났다(Fig. 2).

DGGE로부터 확보된 16S rRNA 유전자의 염기서열을 이용한 계통학적 분석(phylogenetic analysis) 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 각 유전자의 염기서열은 BLAST 분석(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)을 통하여 근연관계에 있는 16S rRNA 유전자 서열을 확인하였다. 본 실험에서 확보한 염기서열과 가까운 분류군은 GenBank database으로부터 정보를 얻었고, multiple alignments는 Clustal X program (23)를 이용하여 실시하였다. Phylogenetic tree는 MEGA 3 Program (14)의 neighbour-joining (21)법을 이용하여 만들었다. 세균은 *Gamma-Proteobacteria*, *Unclassified Proteobacteria*, *Bacteroidetes* 등 3종류의 강으로 나뉘어지며, 관찰된 밴드 중 약 78%가 *Gamma-Proteobacteria*에 속하는 것을 확인할 수 있었다. Fig.1에서 bacteria의 경우, b3, b4, b5, b7, b9은 *Methylophaga* (>97% 염기서열 상동성)로 실험조건에서 다른 세균에 비해 우점하고 있는 것을 볼 수 있었다. *Gamma-Proteobacteria*에 포함되는 *Methylophaga* 속은 다양한 수서 및 육상 환경에서 발견되고 있다(13). *Methylophaga* 속은 NaCl에 내성을 지니며 메탄올, 메틸아민의 탄소를 유일한 탄소원과 에너지원으로 사용할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 또한 질소와 황, 그리고 할로젠을 포함하는 탄소순환에 중요한 역할을 하고 있다(1). 탄소동화는 리블로스 인산 경로를 이용하며 메탄을 이용하지 못하고, 다탄소 복합물인 과당은 성장기질로 이용할 수 있다(24). *Methy-*



**Fig. 3.** Phylogenetic tree of archaeal 16S rRNA gene and bacterial 16S rRNA gene sequences retrieved in this study. (A) Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA gene and reference sequences. (B) Phylogenetic tree of archaeal 16S rRNA gene and reference sequences. The clone name follows the mark of bands in the Fig. 1. Sequences from this study are indicated in boldface. The reference sequences were chosen to show the diversity of the sequences and to indicate the closest relatives to the sequences found in our study. The scale bar represents five and two substitutions per 100 nucleotide positions (bacteria and archaea, respectively). Significant bootstrap values (>50%; 1,000 replicates) are indicated

**Table 2.** Details of primers used in this study

Primer	Target	Sequences(5'→3')	Application	References
340F	Archaea	GC-clamp <sup>a</sup> -CAG CMG CCG CGG TAA	qPCR/DGGE	(19)
519R	Archaea	GST TTC RTC CCT CAC CGT	qPCR/DGGE	
338F	Bacteria	CCA GCA GCC GCG GTA AT	qPCR/DGGE	
518R	Bacteria	CTA CCA GGG TAT CTA ATC	qPCR/DGGE	
20F	Archaea	TTC CGG TTG ATC CYG CCR G	PCR	(6)
958R	Archaea	TCC GGC GTT GAM TCC AAT T	PCR	
27F	Bacteria	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	PCR	(22, 25)
1492R	Bacteria	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	PCR	

<sup>a</sup> GC-clamp sequence: 5'-GCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG-3'

*lophaga* 속은 모두 11종이 발견되어, 지금까지 6종(*M. alcalica*, *M. marina*, *M. murata*, *M. natronica*, *M. sulfidovorans*, *M. thalassica*)에 대한 연구가 보고 되었지만, 염분 농도 20%에서 분리된 바가 없기 때문에 흥미로운 결과이다(5, 7-9, 12).

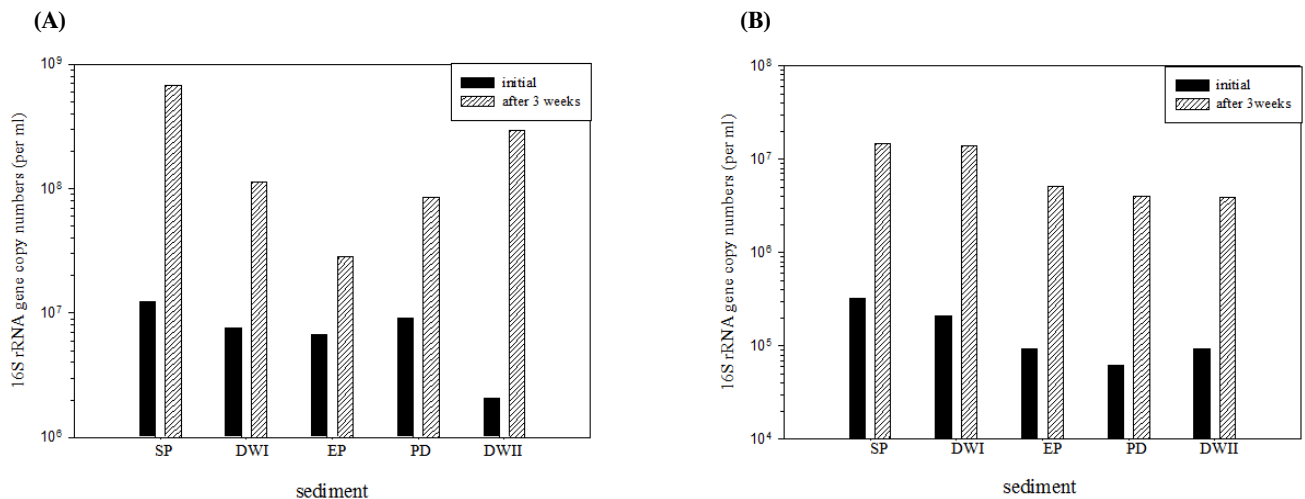
DGGE 분석 결과, b13은 *Halovibrio* (>99% 핵산 염기서열 상동성), b10은 *Halomonas* (>99% 핵산 염기서열 상동성)로 나타났으며, 극호염성 세균로 알려진 *Salinibacter ruber*는 발견되지 않았다(3). 고세균은 모두 *Halobacteria* 강에 속하고, 50%가 *Haloferax* 속에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

DGGE분석에 사용된 시료에서 고세균과 세균의 정량비교를 위하여 정량 PCR을 실시하였다. 이를 위하여, 접종 초기 샘플과 메탄을 산화가 완전히 끝난 배양 3주 후의 배양샘플을 비교하였다(Fig. 4). 농화배양된 배지 5 ml을 샘플링하여 상온에서 13,000 rpm으로 6분간 원심분리를 통하여 상층액은 버리고, pellet로부터 phenol-chloroform method (pH 8) (22)을 이용하여 genomic DNA를 얻었다. 정량 분석을 위해 사용한 primer 정보는 Table 2에 정리하였다. Template 1 µl (10 ng)와 10 pmol의 primer set (각 1 µl), FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, Germany)을 넣고 최종 20 µl 반응 혼합물을 만들어지도록 멸균증류수로 채웠으며 PCR 증폭 및 조

건은 Park 등의 방법(2008)을 따랐다. 배양 3주 후의 샘플에서 고세균과 세균의 16S rRNA 유전자의 copy는 ml당 각각 10<sup>4</sup>-10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup>으로 관찰되었고, 이는 접종 초기값에 비하여 전체 미생물이 10배에서 100배 정도가 증가하였다는 것을 의미한다. 배양 초기 값에 비하여 미생물의 16S rRNA 유전자 copy 수가 증가하는 것은 농화배양(계대배양)으로 접종원의 미생물이 단순 희석되고 있는 것이 아니라 메탄올을 이용하여 미생물이 성장하고 있음을 나타낸다.

실험 결과, 정량적으로는 세균이 고세균보다 샘플당 약 10배 이상 우점하고 있는 것으로 나타났다. 세균에 대한 항생제를 처리하였을 경우 메탄올의 산화가 일어나지 않는 것을 확인하였으며, 이러한 결과를 종합적으로 고려하면, 고세균이 메탄올을 직접적으로 사용하지 않는 것으로 추정된다(자료 미제시). 이러한 배양실험에서 고세균 및 세균 중 *Halomonas*, *Halovibrio*의 성장이 관찰된 것은 아마도 메탄올을 산화하면서 자라는 세균성 메틸영양세균의 부산물을 이용하기 때문인 것으로 추정된다.

본 연구에서는 농화배양을 통해 염전에서 고염분성 메틸영양미생물의 존재와 다양성을 알아보고자 하였다. 메탄올은 염분 농도 20% 이하에서 산화되는 것을 확인할 수 있었으며, 이 염분농도에서 메탄올을 산화하는 주요 미생물은 호염성



**Fig. 4.** Quantification of 16S rRNA gene copy numbers of (A) *Bacteria* and (B) *Archaea* in the enrichment cultures.

*Methylophaga*로 추정된다.

## 적요

C-1화합물은 고염분성 환경의 혐기적인 퇴적층에서 관찰되며, 이 퇴적층의 표면과 수면에는 호기성 메틸영양미생물의 잠재적인 서식지가 된다. 염전과 갯벌에서 채취한 토양 시료를 접종원으로 하여 메탄올을 탄소원과 에너지원으로 공급하고 염분농도에 따라 계대배양한 후 메탄올 산화 세균 성장 조건을 살펴 본 결과, 메탄올 산화 세균이 성장 할 수 있는 염분의 최대 농도는 20% 조건이었다. 변성 구배 젤 전기영동 (Denaturing gel gradient electrophoresis)을 이용하여 농화배양액 내 미생물 군집구조를 분석한 결과, 메탄올 산화 미생물인 *Methylophaga* 관련 세균이 우점하는 것으로 나타났다. 정량 PCR 결과 고세균이 세균의 1-10%로 존재하는 것으로 나타났다. 세균용 항생제 실험결과, 메탄올 산화가 억제되어 고세균이 메탄올 산화에 관여하지 않는다는 것을 추정할 수 있었다. 이번 연구를 통해, 메틸영양세균이 고염분환경(염분 농도 20%까지)에서도 C-1 화합물을 산화할 수 있음을 확인 할 수 있었다.

## 감사의 말

본 논문은 2009년도 충북대학교 교내 연구비에 의해 지원되었으며, 이에 감사 드립니다.

## 참고문헌

- Anthony, C. 1982. The biochemistry of methylophages. Academic Press, London, New York, N.Y., USA.
- Anton, J., E. Llobet-Brossa, F. Rodriguez-Valera, and R. Amann. 1999. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ. Microbiol.* 1, 517-523.
- Anton, J., A. Oren, S. Benlloch, F. Rodriguez-Valera, R. Amann, and R. Rossello-Mora. 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 485-491.
- Anton, J., R. Rossello-Mora, F. Rodriguez-Valera, and R. Amann. 2000. Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3052-3057.
- de Zwart, J.M.M., P.N. Nelisse, and J.G. Kuenen. 1996. Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans* sp. nov.: an obligately methylophagic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from a microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20, 261-270.
- DeLong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5685-5689.
- Doronina, N., T. Darmaeva, and Y. Trotsenko. 2003. *Methylophaga natronica* sp. nov., a new alkaliphilic and moderately halophilic, restricted-facultatively methylophagic bacterium from soda lake of the Southern Transbaikalian region. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 382-389.
- Doronina, N.V., T.D. Darmaeva, and Y.A. Trotsenko. 2003. *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylophagic bacterium from an East Mongolian saline soda lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 223-229.
- Doronina, N.V., Y.A. Trotsenko, and T.P. Tourova. 2000. *Methylarcula marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylarcula terricola* sp. nov.: novel aerobic, moderately halophilic, facultatively methylophagic bacteria from coastal saline environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 Pt 5, 1849-1859.
- Gonchar, M.V. and M.M. Maida. 2001. A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. *Food Technol. Biotechnol.* 39, 37-42.
- Heyer, J., U. Berger, M. Hardt, and P.F. Dunfield. 2005. *Methylohalobius crimeensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, methanotrophic bacterium isolated from hypersaline lakes of Crimea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1817-1826.
- Janvier, M., C. Frehel, F. Grimont, and F. Gasser. 1985. *Methylophaga marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylophaga thalassica* sp. nov., marine methylophages. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35, 131-139.
- Janvier, M. and P.A.D. Grimont. 1995. The genus *Methylophaga*, a new line of descent within phylogenetic branch  $\gamma$  of proteobacteria. *Res. Microbiol.* 146, 543-550.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5, 150-163.
- Margesin, R. and F. Schinner. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5, 73-83.
- Oren, A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 56-63.
- Oren, A. 1990. Estimation of the contribution of halobacteria to the bacterial biomass and activity in solar salterns by the use of bile salts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 41-48.
- Oren, A. 1990. The use of protein synthesis inhibitors in the estimation of the contribution of halophilic archaeobacteria to bacterial activity in hypersaline environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 187-192.
- Ovreaas, L., L. Forney, F.L. Daae, and V. Torsvik. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saellenannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3367-3373.
- Park, S.J., C.H. Kang, and S.K. Rhee. 2006. Characterization of the microbial diversity in a Korean solar saltern by 16S rRNA gene analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 1640-1645.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-25.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, N.Y., USA.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Urakami, T. and K. Komagata. 1987. Characterization of species of marine methylophages of the genus methylophaga. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 402-406.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier, and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.
- Widdel, F. and F. Bak. 1992. in the prokaryotes. Springer-Verlag, New York, N.Y., USA.