

16S rDNA 클론들의 RFLP 비교분석에서 얻어진 Pentachlorophenol의 혐기성 분해에 따른 미생물군집의 변화

성창수 · 권오섭¹ · 박영식*

인제대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹환경학과

Pentachlorophenol(PCP)가 첨가된 혐기성 무기배지에 혐기성 소화조슬러지와 쓰레기 매립장의 침출수를 각각 접종한 후, 활성을 보이기 전과 후의 각 시료 내에 존재하는 총유전물질로부터 16S rRNA 유전자를 PCR 증폭하여 이들에 대한 Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP) 비교분석과 계통수분석을 실시하였다. 3차에 걸친 RFLP 분석 결과 A1a와 B1d로 명명된 두 가지의 RFLP 유형이 두 가지의 활성시료 모두에서 높은 빈도로 발견되었다. 이들 유형에 속하는 모든 클론들의 5'쪽에 해당하는 180개씩의 염기서열분석을 실시하여 계통수 분석을 실시한 결과, 각각의 유형에 속하는 클론들간에는 높은 상동성을 가지는 것으로 확인되었다. 특히 B1d 유형에서는 78%에 해당하는 클론들이 동일한 염기서열을 가지는 것으로 확인되었다. 이들 A1a와 B1d 유형에 속하는 클론들은 PCP에 대한 분해활성의 결과로서 증식된 유사종의 미생물 군집에서 비롯된 것으로 추정된다. 이 두 가지 유형에 속하는 클론들 중 하나씩의 16S rDNA 전체의 염기서열을 분석한 결과 A1a의 클론은 *Clostridium ultunae* (Genbank No. Z69293)의 염기서열과 89%의 상동성을 보였으며, B1d의 클론은 *Thermobacteroides proteolyticus* (Genbank No. X69335)의 것과 97%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다.

KEY WORDS □ Pentachlorophenol, reductive dechlorination, 16S rRNA genes, PCR amplification, RFLP analysis

방향족 염소화합물(chlorinated aromatic compounds)의 과다 사용에 의한 자연 생태계의 오염은 매우 심각한 상태에 이르고 있다. Chlorophenol 화합물들은 살충제 및 각종 화학공정에 많이 이용되고 있으며, 그 중 pentachlorophenol(PCP)은 사용이 금지되기 전까지 주로 목재의 방부제로 널리 사용되었다(20). 1985년 PCP는 전세계적으로 100,000톤 이상 생산되었으며, 이중 80% 가량이 목재의 방부제로 사용되었다고 한다(24). 페놀화합물들은 염소수가 증가하면서 상대적 독성이 커지는 경향을 나타내며, 때문에 PCP 자체가 가지는 독성은 자연생태계에서의 분해를 어렵게 만들어(22), 현재 원목보관소, 제지공장, 화학공장 등의 폐수처리장, 토양, 지하수의 오염물로 검출될 뿐만 아니라, 인간을 포함한 다양한 생물체에서도 검출되고 있다(5, 7).

자연상태에서 PCP의 분해는 호기성 미생물에 의한 호기적 분해와 혐기성 미생물에 의한 혐기적 분해에 의해 이루어진다고 알려져 있다(6). 그렇지만 자연계로 유출된 PCP 및 그 분해산물들은 난용성과 맹독성으로 인해 주로 혐기성 저질층에 퇴적된다고 알려져(14), 자연상태에서의 PCP 분해는 혐기적인 조건하에서의 분해가 보다 큰 비중을 차지하고 있다고 판단되고 있다. 그리고 혐기성 환경에서 일어나는 염소화합물의 환원형 탈염소반응은 호기성 조건에서의 분해와 달리 염소 수에 제한받지 않는 장점이 있으며, 탈염소반응에 의해 염소 수가 감소하면서 그 독성과 생물학적 농축의 가능성이 줄어들고, 호기성 미생물에 의한 분해가 훨씬 용이해지는 장점을 가지고 있다고 한다(12). 혐기성미생

물들에 의한 PCP의 분해는 오래전에 확인되었지만(10), 혐기성 미생물은 순수배양이 어렵고, 환원형 탈염소 반응에는 여러 가지 종류의 미생물들이 서로 연계된 생화학적 전환에 관여하는 것으로 알려져, 지금까지 순수배양 상태에서 PCP에 대한 분해능이 확인된 혐기성미생물로는 *Desulfobacterium*속의 *frappieri* sp. nov.(2), *dehalogenans* JW/IU-CD1(21), *chlororespirans* Co23(8)와 *Desulfomonile tiedjei* DCB-1(11), 그리고 *Clostridium*-like dechlorinating bacterium DCB-2(9)만이 알려져 있다.

이와 같이 기존의 배양 방법으로는 확인이 까다로운 PCP 분해 혐기성 미생물들의 존재를 확인코자 본 연구에서는 분자생물학적 연구방법을 시도하였다. 본인들은 우선 혐기성 환경에서 채취한 시료들을 집중한 PCP-무기배지에서 PCP의 분해가 진행되는 것을 확인하고, 이들 배지에서 시간경과에 따른 특정 미생물군집의 양적인 변화를 16S rRNA 유전자의 PCR 증폭과 이들의 클론에 대한 RFLP 비교분석을 통해 알아내고자 하였다. 그리고 특정한 RFLP 유형이 각각의 다른 시료를 집중한 PCP-무기배지에서 공통적으로 나타난다면 이는 PCP에 대한 분해활성의 결과로 증식된 미생물에서 기인하는 것이라는 가정 하에, 두 가지의 다른 활성시료를 대상으로 공통적인 RFLP 유형을 추적하고 이들에 대한 16S rDNA 염기서열분석을 통해 분류를 시도하였다.

재료 및 방법

시료 채취 및 배양

PCP에 대한 분해능을 조사하기 위한 시료로는 부산광역시

*To whom correspondence should be addressed

시 장림에 위치한 하수 종말처리장의 혐기성소화조에서 혐기성 슬러지와 김해시 쓰레기 매립장의 침출수를 채취하였다. 각 시료는 공기와와의 접촉을 차단한 상태로 운반 보관되었다. PCP 분해를 관찰하기 위한 무기배지는 Balch's medium(1)을 사용하였다. 배지는 혐기성배양기(Lab-Line, Model 6550)에서 완전 환원시킨 후 100 ml 크기의 유리병에 60 ml의 부피로 넣고 teflon이 코팅된 고무마개로 막아 밀봉하였다. 이것을 멸균한 후 비타민 혼합액(무기배지 1리터당 riboflavin, thiamine hydrochloride, nicotinic acid, pantothenic acid, β -aminobenzoic acid 각각을 0.038 mg씩, biotin과 folic acid를 각각 0.015 mg씩, pyridoxine hydrochloride를 0.075 mg, 그리고 cyanocobalamine을 0.009 mg)을 첨가하였다. 여기에 채취한 혐기성 슬러지와 침출수의 상등액 각각을 3 ml씩 접종하고 100 μ M의 농도가 되도록 PCP를 첨가한 후 빛이 차단된 37°C 배양기에서 정체배양을 실시하였다.

PCP 분해능의 분석

시료의 전처리에는 Ferguson 등(4)의 방법에 의거하였다. 일회용 주사기로 시료 1 ml를 취하여 3 ml eppendorf tube에 넣고, K_2CO_3 (72 mg/ml) 25 μ l와 acetic anhydrous 25 μ l를 첨가하여 2분간 혼합한 다음 30분간 정치시켰다. 다시 Hexane 1 ml를 첨가하여 2분간 혼합한 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 hexane 층을 취하여 GC로 분석하였다.

시료 분석은 GC-ECD(HP 5890 Series II)를 이용하였으며, autoinjector(HP 7670)를 사용하여 시료를 주입하였다. 컬럼은 DB-5 capillary column(30 m \times 0.25 mm \times 0.5 μ m film thickness, J & W)을, carrier 가스는 초고순도 질소(99.999%)를 사용하였다. 시료 주입구 온도는 250°C로, detector 온도는 285°C로 유지시켰다. 오븐 온도는 초기에 120°C에서 바로 20°C/min으로 160°C까지 상승시키고, 다시 2°C/min으로 190°C까지 그리고 30°C/min으로 250°C까지 상승시킨 후, 4분간 유지하였다. 시료의 chlorophenols 정량은 적정 농도로 만든 표준 시료(AccuStandard Co., Z-006)를 동일 조건으로 분석한 chromatogram의 retention time과 area에 의해 분석하였다. 자료분석은 HP chemstation program을 이용하여 수행하였으며, 모든 시료의 분석치는 동일 조건으로 행한 두 결과의 평균치이다.

시료내의 total genomic DNA 분리

배양 중인 시료로부터 1 ml씩을 주사기로 따내어 -70°C에 보관하였다가 DNA 분석에 사용하였다. 시료는 12,000 rpm(microcentrifuge)에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 침전물에 Instagene 용액(Biorad)을 0.2 ml 첨가하여 genomic DNA를 분리하였다.

16S rRNA 유전자들의 증폭 및 클로닝

16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer 쌍은 Moyer 등(13)에 의해 고안된 것을 사용하였다. 이들은 *Escherichia coli* 16S rRNA 유전자의 49-68과 1510-1492 위치의 염기서열에 해당하는 degenerate primer들로서, 추가로 forward primer의 5' 위치에 제한효소 *Eco*RI의 인식부위를 첨가하였고, reverse primer의 5' 위치에는 *Bam*HI의 인식부위를 첨가하

였다(forward primer; 5'-AGAATTCTNANACATGCAAGTC-GAICG-3', reverse primer; 5'-GTGGATCCGGYTACCT TGT-TACGACTT-3'). PCR 반응물의 조성은 1X 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 10 pmole씩의 primer들로서 genomic DNA와 2.5 U의 *Taq* polymerase를 첨가하여 도합 50 μ l의 혼합물을 만들어 반응을 진행시켰다. DNA 증폭기(Minicycler, MJ Research)의 운행조건은 94°C에서 미리 2분간 열처리한 후, 94°C에서 1분, 50-58°C에서 1.5분, 72°C에서 3분씩 40회 반복하고 마지막에는 72°C에서 7분간 처리한 후 반응을 중단하였다.

각각의 시료에 대해 증폭된 PCR 반응물들은 Wizard PCR preps DNA purification system kit(Promega)를 사용하여 정제하였다. PCR 시발체의 양끝에는 *Eco*RI와 *Bam*HI 인식부위가 존재하지만 16S rDNA 내에 이들의 인식부위가 존재하여 잘려지기 때문에 pGEM-T vector(Promega)에 삽입하였다. 삽입된 벡터 DNA는 미리 준비한 *E. coli* XL-1 Blue competent cell에 넣어주고 X-gal과 IPTG가 첨가된 Amp+LB agar 배지에 도말하였다. Plasmid mini-prep을 통해 약 1.5 kb의 16S rDNA 존재를 확인하여 형질전환체들을 골라내었다.

RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) 분석

준비된 16S rDNA의 플라스미드들을 제한효소로 자르고 agarose gel에서 전기영동하여 잘려진 절편들의 수와 크기를 비교하여 유형별로 분류하였다. *Sac*II와 *Eco*RI를 사용한 일차분석과 *Rsa*I를 사용한 이차분석에서는 정제된 플라스미드를 직접 잘라 agarose gel 전기영동으로 분석하였다. *Alu*I를 사용한 3차 RFLP분석에서는 16S rDNA들의 클로닝에 사용된 pGEM-T vector내에 4군데 이상의 *Alu*I 인식부위가 존재하기 때문에 이들에 의해 발생하는 RFLP 분석상의 문제점을 극복하기 위하여, 각 클론내에 존재하는 16S rDNA만을 PCR로 증폭하여 *Alu*I로 처리하였다.

DNA 염기서열 분석

16S rDNA의 클론들을 제한효소로 잘라 pBluescript에 subcloning하고 *fmol* DNA sequencing kit(Promega)를 사용하여 한쪽 가닥만을 읽었다. 시발체로는 T3와 T7 universal primer들과 16S rRNA 유전자 내부의 sequencing primer들(19)을 이용하였다. 기타 DNA를 다루는데 필요한 자세한 방법은 Sambrook 등(17)에 기술된 방법을 따랐다.

결 과

PCP 분해능

장림과 김해 시료에 의한 PCP의 분해 정도를 2-3주 간격으로 분석하였다(Fig. 1). PCP는 장림 시료에 의해 배양 초기의 적응기 없이 분해되기 시작하여 10주 후 약 40% 정도 잔류하였으며, 이후에는 큰 농도 변화를 나타내지 않았다(Fig. 1A). PCP의 meta-Cl이 제거된 2,3,4,6-tetrachlorophenol(TeCP)가 배양 초기부터 1 μ M 정도 검출되었으며, 2,3,4,6-TeCP의 ortho-Cl이 제거된 2,3,4-trichlorophenol(TCP)는 배양 후

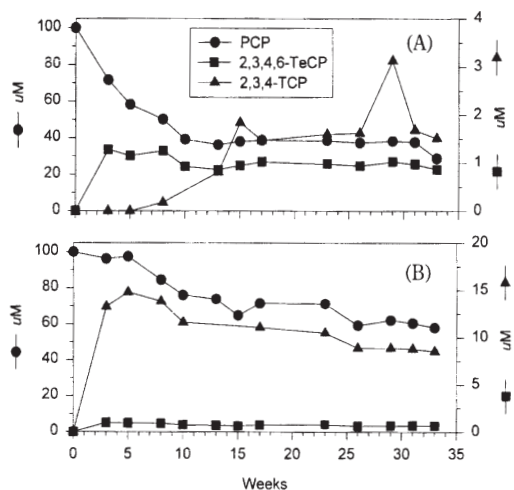


Fig. 1. Anaerobic degradation of PCP and its byproducts by the anaerobic sludge from Jangrim sewage treatment plant(A) and the leachate from Kimhae landfill site(B).

반기에 2-3 μM 검출되었다. 김해 매립장 침출수 시료는 장림 시료와 달리 PCP의 혐기성 분해시 5주 정도의 적응기가 나타났으며, 그 후 분해되기 시작하여 15주까지 0.33 $\mu\text{M/day}$ 의 매우 느린 분해 속도를 나타냈으며, 이후의 평균 농도 또한 $64.7 \pm 6.0 \mu\text{M}$ 로 장림 시료에 비해 많게 검출되었다 (Fig. 1B). 김해 시료에 의한 PCP의 환원형 탈염소 반응산물은 장림과 마찬가지로 2,3,4,6-TeCP와 2,3,4-TCP가 검출되었으며, TeCP의 분포는 장림 시료와 유사하였으나, TCP는 초기에 약 13 μM 검출되었으나 이후 서서히 감소하였다.

16S rDNA 클론들의 RFLP 분석

분석에 사용된 시료는 김해와 장림의 배양시료로서, 각각에서 PCP 분해활성이 진행 중인 집종 후 360일 지난 것들(활성시료)을 사용하였다. 대조군으로는 PCP 분해활성이 나타나기 전인 집종 후 7일 지난 시료(비활성시료)를 사용하였다. 분석시료내에 존재하는 미생물 집단으로부터 DNA를 추출하기 위하여 최근 보고된 skim milk를 사용한 방법(23)을 Instagene matrix(Biorad)를 사용한 방법과 비교한 결과, 후자를 사용한 방법이 훨씬 효율적인 것으로 확인되었다. 그리고 혼합된 미생물 시료로부터 16S rRNA들의 PCR 증폭에서는 annealing 온도에 따라 특정 미생물의 것들이 편향적으로 증폭되는 것을 피하기 위하여, 50도, 52도, 54도, 56도, 그리고 58도 각각에서 PCR을 수행하고 이들을 모아 클로닝에 사용하였다. 각 시료에 해당되는 형질전환체의 클론들로부터 플라스미드들을 정제하고, 약 1.5 kb의 16S rDNA들의 존재가 확인된 플라스미드들만을 50개씩 준비하여 RFLP 분석을 실시하였다.

*SacII*와 *EcoRI*를 사용하여 실시한 일차 RFLP 분석결과 20가지 이상의 유형들이 발견되었다. 이들을 각 유형별로 분류하고(Fig. 2B), 활성시료에서 나타나지 않은 RFLP 유형은 X 그룹으로 함께 모아 집계하였다(Fig. 2A). 비활성시료

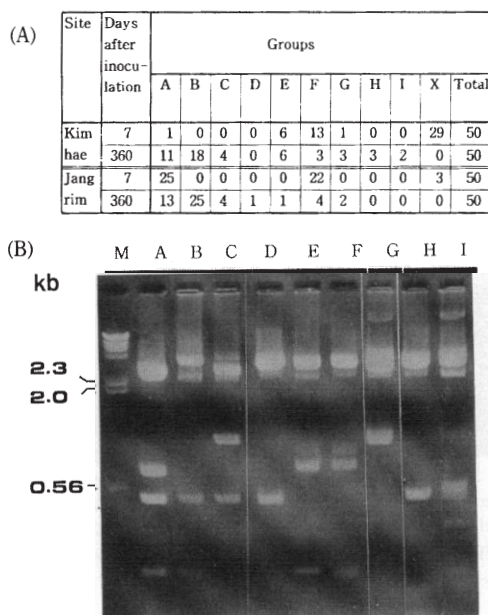


Fig. 2. The 1st RFLP analysis of 16S rDNA clones by *SacII*+*EcoRI* restriction. The RFLP types were classified and counted(A) according to their mobility patterns in 2% agarose gel(B). λ /HindIII marker is shown(lane M).

에서는 F 유형이 두 가지 시료 모두에서 높은 빈도로 나타나는 것 외에는 유사점을 찾아보기 힘들지만, 활성시료에서는 A, B, C, E, F, G 유형이 공통적으로 발견되고 있다. A 유형의 경우는 장림의 비활성시료에서도 높은 빈도로 나타나는 하지만, A와 B 유형에 속하는 클론들은 활성시료에서 공통적으로 매우 높은 빈도로 나타나고 있다. 따라서 A와 B 유형에 해당되는 클론들을 대상으로 동일성을 확인하기 위한 2차 RFLP 분석을 실시하였다.

4자리의 염기서열을 인식하는 *RsaI* 제한 효소를 사용한 이차 RFLP 분석에서 A 유형에 해당하는 50개의 클론들과 B 유형에 속하는 43개의 클론들에 대한 분석결과는 Fig. 2와 같다. A 유형은 9가지의 유형으로 세분될 수 있었으나(Fig. 3B), A1 유형을 제외한 나머지는 모두 장림의 비활성시료에서만 발견되었다(Fig. 3A). 활성시료에서만 발견된 B 유형에서는 김해와 장림 시료 모두에서 다소 이질적인 유형들이 발견되었으나, 공통적으로 B1 유형에 많은 클론들이 포함되고 있었다. 이들 A1과 B1 유형에 속하는 클론들을 다시 4자리의 염기서열을 인식하는 *AluI* 효소를 사용하여 3차 RFLP 분석을 실시한 결과(Fig. 4), 대부분의 클론들은 두 가지 시료에 공통적인 A1a와 B1d 각각의 유형에 속하는 것으로 확인되었다.

A1a와 B1d 유형에 속하는 클론들의 16S rDNA 염기서열 분석

3차에 걸친 RFLP 분석결과 동일한 유형을 보여주는 A1a와 B1d 유형의 16S rDNA 클론들간의 상동성을 직접 확

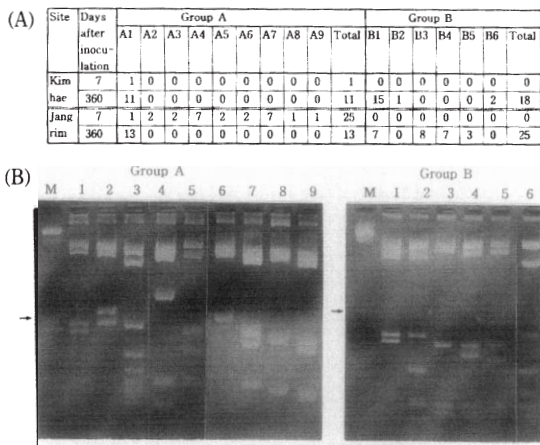


Fig. 3. The 2nd RFLP analysis of the 16S rDNA clones belonging to group A and B by *RsaI* restriction. The RFLP types were classified(A) according to their mobility patterns in 3% agarose gel(B). λ /HindIII marker was run on the parallel lanes(M) and arrows indicate the mobility of 0.56 kb marker DNA.

인하고자, A1a유형에 속하는 클론 22개 중 활성시료에서 발견된 20개의 클론들과 B1d유형에 속하는 18개의 클론들

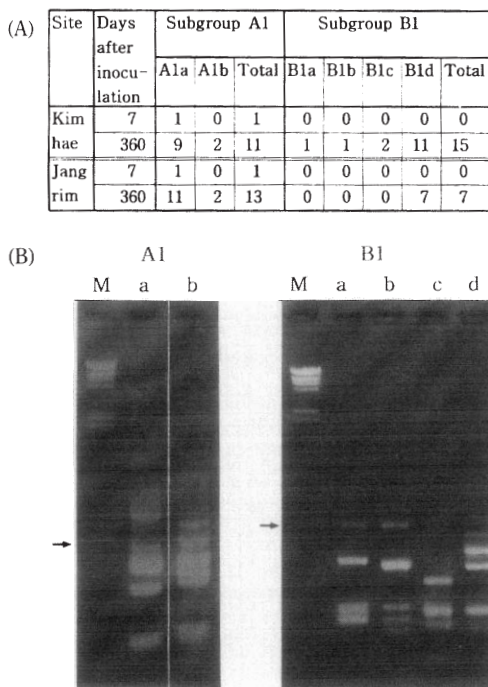


Fig. 4. The 3rd RFLP analysis of the 16S rDNA clones belonging to subgroup A1 and B1 by *AluI* restriction. The RFLP types were classified(A) according to their mobility patterns in 3% agarose gel(B). λ /HindIII marker was run on the parallel lanes(M) and arrows indicate the mobility of 0.56 kb marker DNA.

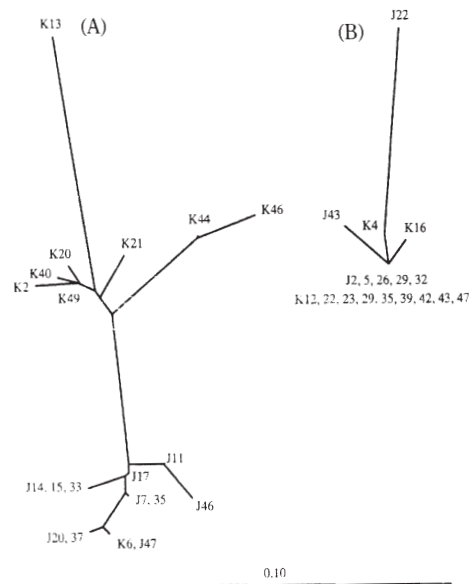


Fig. 5. Phylogenetic radiograms showing the divergence of the 16S rDNA clones belonging to A1a(A) and B1d(B) groups, respectively. Scale bar represents 0.1 substitutions per nucleotide position.

에 대해 부분적인 염기서열 분석을 실시하였다. 각 클론의 16S rDNA의 5'쪽에 해당되는 약 180 bp의 염기서열들만을 분석하여 다중배열하고(자료 미제출), Treeview 컴퓨터 프로그램(3)을 사용하여 각 유형별로 계통수를 구성한 결과는 Fig. 5와 같다. A1a 유형의 클론들은 크게 두 개의 가지를 형성하여, K6 클론을 제외한 모든 김해시료의 클론들은 장림시료의 것들과 다른 군집을 이루고 있다(Fig. 5A). 분기된 김해시료의 군집내에서는 K13 클론을 제외하고는 93-98%의 염기서열상의 상동성을 보였으며, 장림시료의 군집내에서는 최소 96%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다. 특히 J14, J15, J33 클론들의 염기서열은 서로 동일하였으며, J7과 J35, K6와 J47, 그리고 J20과 J37간에도 서로 일치되는 염기서열을 보여주었다. 그리고 김해와 장림 군집에 속하는 클론들간에도 그 염기서열상의 상동성은 89-94%에 이르고 있었다. 한편 B1d 유형에 속하는 클론들은 J22를 제외하고는 서로간에 매우 높은 상동성을 보여주었다(Fig. 5B). J22, J43, K4, 그리고 K16, 네 가지 클론을 제외한 14개의 클론들은 100%의 상동성을 보여주었으며, 가장 연관관계가 먼 J22도 다른 클론들과 95% 이상의 상동성을 보여주었다.

A1a와 B1d 클론의 전체 16S rDNA 염기서열 분석

A1a와 B1d 유형에 속하는 클론들이 어떤 미생물들에서 증폭된 것인지를 알아보기 위하여 두 유형의 클론들 중 하나씩을 택하여 전체염기서열을 분석하였다. A1a유형에서는 K2클론을, B1d유형에서는 K43을 택하여 약 1.5 Kb에 해당되는 각각의 염기서열 전체를 분석하였다. 그리고 각 염기서열과 가장 상동성이 높은 16S rDNA의 미생물을 Gen-

<i>Clostridium ultunae</i>	GAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGAATTTATCA-TGAAGCCTTCGGGTGGAATGATAA-ACT	80
A1a	-----AGAATTCTCAGACATGCAAGTCGAGCGAAGTATATCTAAGTGAAGTTTTCGGACAGCAAGCATATA	
	TCTTAGCGGCGGATGGGTGAGTAACGCGTGAGGAACCTGCCCTCCACAAGGGGATAGCCTCGGGAAACCGGGATTAATACCCATGAAACTTAGCAATCG	180
	TCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACG-GTGAGCAACCTGCCCTTCACAAAGGGATAGCCTCGGGAACTGGGATTAATACCATATAAACTTGCCCTTTCG	
	CATGATATTTAAGTTAAAGCGTTAGCGGTGGAAGATGGCTCGCGTCCCATTAGCTAGTTGGTGAGTTAAAGCTCACCAAGGCGACGATGGGTAGCCGG	280
	CATGAAAGGGAAGTCAAAGCGATAA-GGTGAAAGATGGGCTCGCGTCCCTATTAGCTAGTTGGTGAGTTAACGGCTCACCAAGGCGACGATAGGTAGCCGG	
	CTTGAGAGAGTGACCGGCCACACTGGAAGCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGAGGGAATCTGATGCA	380
	CCTGAGAGGGTAACGGGCCACACTGGAAGCTGAGACACGGTCCAGACTC-TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGAGGGAATCTGATGCA	
	GCGACGCCGCGTGAGCGATGAAGGCGCTCGGGTCGTAAGGCTCTGTCTTATGGGACGATAATGACGGTACCATAGGAGGAAGCCCGGCTAACTACGTGC	480
	GCGACGCCGCGTGAGTGAAGAACGCCCTTCGGTCGTAAG-GCTCTGTCCATGGGGAAGATAATGACGGT-CCCTAGGAGGAAGCCCGGCTAACTACGTGC	
	CAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGCGTAAAGGTCACGAGCGGTCAAATAAGTCAGATGTGAAGGCGTAGGC	580
	CAGTAGCCCGCGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGCGTAAAGGTCAGTTCGTAGCGGTTTGATAAGTCAGATGTGAAGGCGTAGGC	
	TTAACCTATGTAAGCATTTGAAACTGTTTGGCTTGAGTTAAGGAGAGGAAGTGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAGGAATAT	680
	TTAACCTATGTAAGCATATGAACTGTGAGACTTGAGGTAAAGGAGGGAAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAATATC	
	CAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGACTTAACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCAGCTGTAAACGA	780
	CAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGACTTAACTGACGCTGAGGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCAGCTGTAAACGA	
	TGAGTGCTAGGTGTCCGAGGGTAACCTTCGGTGCGAAGTTAACACATTAGCACTCCGCTGGGAGTAGCTTCGCAAGTGAAGTCAAAGGAATTTG	880
	TGAGTGCTAGGTGTCCGTTAGAAATAATCGGTGCGGAGCTAACGCAATAGCACTCCGCTGGGAGTAGTACGCAAGTATGAACTCAAAGGAATTTG	
	ACGGGACCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCGGGCGCTTATAGATAAGA	980
	ACGGGACCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCTCGGCTTACTAGAGATAGTA	
	CCTTCTC-TTCGGAGACTGAGGGACAGGTGGTGCATGGTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCT	1080
	ATTTATCATTCAGATACAGAGACACAGGTGGTGCATGGTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGAT	
	TTAGTTGCCAACAGTTAGGCTGTGCATCTAGAGGGACTGCCGATGATAAATCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTTATGTCCTG	1180
	TTAGTTGGCCAGCATTAAGTTG-GCATCTAGATAGACTGCCGTGGACAACAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTTATGTCCTG	
	GGCTACACAGTGTACAATGGTCGGTACAACGGGTAGCGACTTAGTGATAAGGAGCCAATCCCTTAAACCGATCCAGTTCGGATTGACGGCTGCAAC	1280
	GGCTACACAGTGTACAATGGTCGGTACAACGGGTAGCGACTTAGTGATAAGGAGCCAATCTCTAAAGCGGATCCAGTTCGGATTGATGGCTGCAAC	
	TGCGCTGCATGAAGCGGAGTTGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATGCGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCGCTACACCATGGGAGT	1380
	TGCGCTACATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGGAATCAGCATGTGCGGTTGAATGCGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCGCTACACCATGGGAGT	
	TAGCAATACCGAAGCCAGTGAGCCAAACCGTAA--GGGAGCAACTGTGCAAGGTAGGGTTTATGACTGGGG-----	1480
	TGTCAATACCGAAGCCAGTGAGCTAACAGAAATGGAGCGAGCTGTGCAAGGTAGGGG--GAGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGATCCAC	

Fig. 6. Alignment of 16S rDNA sequences of the A1a-K2 clone and *Clostridium ultunae*. Differences between these sequences are indicated by asterisks(*). PCR primer sequences are underlined.

Bank의 DNA database에서 찾은 결과 A1a-K2는 *Chlostridium ultunae*(Genbank No. Z69293)와 B1d-K43은 *Thermobacteriodes proteolyticus*(Genbank No. X69335)과 가장 상동성이 높은 것으로 나타났다. 이들 각각의 염기서열은 Fig. 6와 7에 배열되어 있다. A1a-K2의 경우는 *C. ultunae*와 89%의 상동성을 보였으며, B1d-K43은 *T. proteolyticus*의 염기서열과 97%의 상동성을 가지는 것으로 분석되었다.

고 찰

3차에 걸친 RFLP 분석결과 A1a와 B1d RFLP유형의 클론

들은 비활성 시료에서는 거의 나타나지 않는데 반하여, 활성시료에서는 전체 클론의 20%에 해당하는 빈도로 나타나고 있다(Fig. 4). 이러한 결과는 시간 경과에 따라 두 가지의 활성시료 모두에서 특정 미생물군집이 형성되었음을 반영하고 있는 것으로 사료된다. 더군다나 B1d 클론들의 경우는 78%의 클론들이 비록 부분적이기는 하지만 16S rDNA 염기서열 상으로 동일한 것으로 나타나 단일 종의 미생물이 증폭되었을 가능성은 매우 높아 보인다. B1d 유형내 클론들간의 유사성은 J22를 제외하고는 서로간에 97%의 상동성을 가지고 있으며, A1a 유형의 클론들도 K13을 제외하고는 서로 90% 이상의 상동성을 보여, 이들은 각각 서로 동일하거

<i>Thermobacteroides proteolyticus</i>	-----TAATGCATGCAAGTCGAGCGGGCTACAATCTTCGGATTGTAGCTTAGCGGCGAA	60
B1d.	<u>GAATTC</u> CACACATGCAAGTCGAGCGGGCTACGATCTTCGGATTGTAGCTTAGCGGCGAA	
	CGGGTGAGTAACACGTAGGTAACTACCTTTCAGAGGAGGACAACCTCAGGAAACTGAGGCTAAACCTTCATACGTTCACTGGTAGGGATACGTGGTAAG	160
	CGGGTGAGTAACACGTAGGTAACTACCTTTCAGAGGAGGACAACCTCAGGAAACTGAGGCTAAACCTTCATACGTTCACTGGTAGGGATACGTGGTAAG	
	AAAGAGTTACCGTTGAGGTAGCTGCTGAAGGATGAGCTGCGGCCCATCAGGTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGCCGAAGACGGGTAAACGGTCT	260
	AAAGAGTTACCTTAGCTGCTGCTGAAGGATGAGCTGCGGCCCATCAGGTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGCCGAAGACGGGTAAACGGTCT	
	GAGAGGATGTCGGTCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCGGAATCTTGGTCAATGGGCGAAAGCCTGACCCAGCG	360
	GAGAGGATGTCGGTCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCGGAATCTTGGCAATGGGCGAAAGCCTGACCCAGCG	
	ACGCCGCGTGAGGAGAAAGTCCTTCGGGGCGTAAACTCTCGGACTGGGGGACGAGTAAGGACGGTACCCAGTAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCA	460
	ACGCCGCGTGAGGAGAAAGTCCTTCGGGGCGTAAACTCTCGGACTGGGGGACGAGTAAGGACGGTACCCAGTAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCA	
	GCAGCCGCGTAAAACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCGGATTCTAGGTTGAAGGGCGGTAGGTGGTGTCTGTGTCTCATGTGAAACTCAGGGCTC	560
	GCAGCCGCGTAAAACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCGGATTCTAGGTTGAAGGGCGGTAGGTGGTGTCTGTGTCTCATGTGAAACTCAGGGCTC	
	AACTCTGAGATTGCGTGGGAAACTAGGCAGCTAGAGGACGGTAGAGGGAGTGAATTCCCGTGTAGCGGTAAAATGCGTAGATATCGGGAGGAACACC	760
	AACTCTGAGATTGCGTGGGAAACTAGGCAGCTAGAGGACGGTAGAGGGAGTGAATTCCCGTGTAGCGGTAAAATGCGTAGATATCGGGAGGAACACC	
	GGTGCCGAAGGCGGCTCTCTGGCCGATCTGACCTGAGGGCGGAAGCTAGGGGAGCGAACCGATTAGATACCGGGTAGTCTAGCCGTAACGAT	860
	GGTGCCGAAGGCGGCTCTCTGGCCGATCTGACCTGAGGGCGGAAGCTAGGGGAGCGAACCGATTAGATACCGGGTAGTCTAGCCGTAACGAT	
	CCCTGCTAGGTGTTGGGGGTAAAGACCTTCAGTCCGAAGCCACGCGATAGCATCCCACCTGGGGAGTACGCCGCAAGGTTGAAACTCAAGGAA	960
	*** GGGTCTAGGTGTTGGGGGTAAAGACCTTCAGTCCGAAGCCACGCGATAGCATCCCACCTGGGGAGTACGCCGCAAGGTTGAAACTCAAGGAA	
	TTGGCGGGGTCGCGACAAGCGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATGCTGTTGGTAGGAACTGAAAG	1060
	TTGGCGGGGTCGCGACAAGCGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCTGCGGAGAACCTTACCAGGGTTTGACATGCTGTTGGTAGGAACTGAAAG	
	GGGGACGACCCACCGTAAGGGAGGGAGCCAGCAGCAGGTGTTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGGCGTGAAGTGTGGGCTTAAGTGGCGTAACGAGCGCA	1160
	GGGGACGACCCACCGTAAGGGAGGGAGCCAGCAGCAGGTGTTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGGCGTGAAGTGTGGGCTTAAGTGGCGTAACGAGCGCA	
	ACCCTCATCCCTAATTGCTCTGACAGGTAAGGGTCAGAGCACAATAGGAGACCGGTGGCGAAGGCCAGAGGAAGGGAGGATGACGTCAGTCAAGTCAG	1260
	ACCCTCATCCCTAATTGCTCTGACAGGTAAGGGTCAGAGCACAATAGGAGACCGGTGGCGAAGGCCAGAGGAAGGGAGGATGACGTCAGTCAAGTCAG	
	CATGGCCTTATGCGCTGGGCTACACATGCTACAATGCAGGGTACAACGGGAAGCGAGCGAGGTGGAGCAAAATCCCCAAAAGCCTGCTCAGTT	1360
	CATGGCCTTATGCGCTGGGCTACACATGCTACAATGCAGGGTACAACGGGAAGCGAGCGAGGTGGAGCAAAATCCCCAAAAGCCTGCTCAGTT	
	CGGATCGCAGCTGAAATTCGCGTGGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAACCGTGGATCAGCAA-GCCGCGGTGAATACGTTCTCGGGCTTGACACACCG	1460
	CGGATCGCAGCTGAAATTCGCGTGGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAACCGTGGATCAGCAAAGCCGCGGTGAATACGTTCTCGGGCTTGACACACCG	
	CCCGTCAAGCCACCGAGTCGGGTTTACCAGAAGGC-GGTAACCGAAGAGGGCCGACGACGGTGTGCCTGGTAAGGAGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAG	1560
	CCCGTCAAGCCACCGAGTCGGGTTTACCAGAAGGCAGGTAACCGAAGAGGGCCGACGACGGTGTGCCTGGTAAGGAGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAG	
	CTGTACCGAAGGTGCGCTGGATACCTCTCTCTT	1596
	* CCGGATCCACA-----	

Fig. 7. Alignment of 16S rDNA sequences of the B1d-K43 clone and *Thermobacteroides proteolyticus*. Differences between these sequences are indicated by asterisks(*). PCR primer sequences are underlined.

나 연계된 생리활성을 가지는 유사종 내지는 단일종의 미생 물들로 구성되어 있는 것으로 추정된다. 실제로 PCP에 대 한 혐기적 분해능을 가지는 *Desulfitobacterium*속의 미생물 들간에 16S rDNA 염기서열상의 상동성은 서로간에 91- 97% 정도인 것으로 분석되었다. 한편으로 A1a와 B1d 유형 의 16S rRNA 유전자는 이들 유전자를 가지는 미생물의 증 식과는 무관하게 PCR 증폭과정이나 ligation 반응에서의 선 호에 의해 인위적으로 가장 높은 빈도로 발견되었을 가능성

을 생각해 볼 수 있다. 그렇지만 본 연구는 5가지의 anneal- ing 온도에서의 증폭을 통해 이러한 문제로부터 벗어나고자 하였으며, 비활성시료에서 보여주는 RFLP 유형이 활성시료 에서 나타나는 유형과 매우 다르다는 사실과 두 가지 활성 시료에서의 RFLP 유형이 A1a와 B1d 유형을 제외하고는 비교적 다양하게 나타난다는 사실은 인위적인 증폭의 가능 성을 배제시키고 있다.

이와 같이 혐기성인 조건을 제외하고는 전혀 다른 환경의

생태계에서 채취한 두 가지의 다른 시료를 접종하여 배양한 PCP-무기배지에서 동일종 내지는 유사종의 클론들이 높은 빈도로 발견되었다는 사실은 PCP를 유일한 탄소원으로 첨가한 배양조건과 어떤 연관이 있음을 보여주는 것으로 사료된다. 즉, PCP가 첨가된 배지는 비타민들만이 첨가된 무기배지로서 PCP를 일차적인 탄소원으로서 사용하지 못하는 미생물들의 증식은 기대하기 어렵다. 따라서 A1a와 B1d RFLP 유형에 속하는 16S rDNA의 염기서열을 가지는 미생물들은 PCP의 혐기적 분해와 관련된 활성을 가지는 것들로 추정된다. 다만 PCP-무기배지에 접종한 시료의 양이 배지 전체의 5%를 차지하였으므로, 접종한 시료에서 제공된 유기물이 이들의 생장에 주요인으로 작용하였을 가능성도 있다. 하지만 두 가지 시료내 존재하는 유기물의 조성은 매우 다른 것으로 추정되어, 이질적인 유기물들의 조성하에서 동일종의 미생물이 공통적으로 증식하였을 가능성은 크지 않을 것으로 사료된다. 이 문제를 해결하고, A1a와 B1d 유형의 클론들이 PCP 분해와 연관이 있음을 보다 확실히 하기 위해서는 앞으로 PCP를 첨가하지 않은 무기배지에서 증식된 미생물들에 대한 분석이 수행되어야 할 것이다.

한편 A1a RFLP유형에 속하는 클론들과 가장 높은 상동성을 보이는 것으로 확인된 *Clostridium ultunae*는 methanogenic bacterium과 공존하면서 acetate를 산화하는 미생물로 알려져 있다(18). 혐기성소화조를 접종한 PCP-배지에서 메탄생성 미생물군집의 활성화와 함께 PCP 분해가 일어난다는 사실(15)과 PCP 분해능을 가지는 혐기성미생물로서 *Clostridium*-like dechlorinating bacterium DCB-2(9)의 존재는 A1a RFLP 유형의 미생물들이 PCP 분해와 연관이 있음을 시사하는 것으로 추정되기도 한다. 한편으로 A1a-K2 클론의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *C. ultunae*와 89%의 상동성을 가지는데 그쳐, 아직까지 16S rRNA 유전자의 database에 보고되지 않은 새로운 종의 염기서열일 가능성도 배제할 수 없다. 그리고 B1d-K43과 97%의 상동성을 가지는 *Thermobacteroides proteolyticus*는 혐기성 미생물로서 그 생리적 특성에 대해서는 알려진 것이 별로 없으나(16), 높은 유사성으로 볼 때 B1d 유형의 클론들은 이 종에 속할 가능성이 매우 높아 보여, 앞으로 이 미생물의 PCP 분해활성에 대한 직접적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 PCP의 분해와 관련된 미생물들에 대한 직접적인 증거는 제시하지 못하였으나, 그 가능성과 미생물군집의 변화를 분석하는 연구방법으로서의 이용가치를 잘 보여주고 있다고 사료된다. A1a와 B1d에 속하는 클론들이 PCP의 혐기적 분해에 관여하는지에 대한 직접적인 증거는 본 연구에서 밝혀진 이들의 16S rDNA 염기서열을 이용하여 배양시료에 대한 *in situ* hybridization이나 non-PCP 접종배지에 대한 추가적인 분석 등을 통해 보완될 예정이다.

감사의 말

본 연구는 1995년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비(과제번호: 02D0683)의 지원에 의하여 수행되었음. 컴퓨터프로그램을 이용한 계통수분석에 도움을 준 한국과학기술원 생물과학과의 한운수님에게 감사드립니다.

참고문헌

1. Balch, W.E., G.E. Fox, L.J. Magrum, C.R. Woese and R.S. Wolfe. 1979. Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* **43**, 260-296.
2. Bouchard, B., R. Beaudet, R. Villemur, G. McSween, F. Lepine and J.G. Bisailon. 1996. Isolation and characterization of *Desulfobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 1010-1015.
3. Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357-358.
4. Ferguson, J.F., S.J. Komisar and P.S. Perkins. 1994. Effects of electron donors and inhibitors on reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol. *Wat. Res.* **28**, 2101-2107.
5. Forst, C., H. Simon and L. Stieglitz. 1993. Determination of chlorophenols and chlorobenzenes in leachate by headspace analysis. *Chemosphere* **26**, 1355-1369.
6. Kuhn, E.P. and J.M. Suflita. 1989. Dechlorination of pesticide by anaerobic microorganism in soils groundwater-a review. In: *Reactions and Movement of Organic chemical in Soils*. ed. by B.L. Sawhney and K. Brown, pp. 111-180. Soil Sci. Soc. Amer. and Amer. Soc. Agro., Madison, WI.
7. Lampi, P., K. Tolonen, T. Vartiainen and J. Tuomisto. 1992. Chlorophenols in lake bottom sediments: a retrospective study of drinking water contamination. *Chemosphere* **24**, 1805-1824.
8. Löffler, F.E., R.A. Sanford and J.M. Tiedje. 1996. Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfidobacterium chlororespirans* Co23. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3809-3813.
9. Madsen, T. and D. Licht. 1992. Isolation and characterization of an aerobic chlorophenol-transforming bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2874-2878.
10. Mikesell, M.D. and S.A. Boyd. 1986. Complete reductive dechlorination and mineralization of pentachlorophenol by anaerobic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 861-865.
11. Mohn, W.W. and K.J. Kennedy. 1992. Limited degradation of chlorophenols by anaerobic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2131-2136.
12. Mohn, W.W. and J.M. Tiedje. 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* **56**, 482-507.
13. Moyer, C.L., F.C. Dobbs and D.M. Karl. 1994. Estimation of diversity and community structure through RFLP distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal Vent System, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Env. Microbiol.* **60**, 871-879.
14. Muller, J.G., D.P. Middaugh, S.E. Lantz and P.J. Chapman. 1991. Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater; Chemical and biological assessment. *Appl. Env. Microbiol.* **57**, 1512-1518.
15. Nicholson, D.K., S.L. Woods, J.D. Istok and D.C. Peek. 1992. Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol-acclimated methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2280-2286.
16. Rainey, F. and E. Stackebrandt. 1993. Phylogenetic analysis of the bacterial genus *Thermobacteroides* indicates an ancient origin of *Thermobacteroides proteolyticus*. *Lett.*

- Appl. Microbiol.* **16**, 282-286.
17. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, A laboratory Manual. 2nd ed. p. 1: 25-28. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 18. Schnurer, A., B. Schink and B.H. Svensson. 1996. *Clostridium ultunae* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 1145-1152.
 19. Stackebrandt, E. and O. Charfreitag. 1990. Partial 16S rRNA primary structure of five *Actinomyces* species: phylogenetic implications and development of an *Actinomyces israelii*-specific oligonucleotide probe. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 37-43.
 20. USEPA Federal Register. 1986. PartIII, Creosote, pentachlorophenol and inorganic arsenicals; Amendment of notice of intent to cancel registration; Notice Federal Register. 51, 1334-1348.
 21. Utkin, I., D.D. Dalton and J. Wiegel. 1995. Specificity of reductive dehalogenation of substituted ortho-chlorophenols by *Desulfidobacterium dehalogenans* JW/IU-DC-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 346-51.
 22. Valo, R., J.A. Apajalahti and M.S. Salkinoja-Salonen. 1985. Studies on the physiology of microbial degradation of pentachlorophenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 313-319.
 23. Volossiouk, T., E.J. Robb and N.N. Ross. 1995. Direct DNA Extraction for PCR-Mediated Assays of Soil Organisms. *Appl. Env. Microbiol.* **61**, 3972-3976.
 24. Wild, S.R., S.J. Harrad and K.C. Jones. 1992. Pentachlorophenol in the UK environment: (1) A budget and source inventory. *Chemosphere* **24**, 833-845.

(Received May 30, 1997/Accepted June 15, 1997)

ABSTRACT: Diversity of Uncultured Microorganisms Associated with the Anaerobic Pentachlorophenol Degradation Estimated by Comparative RFLP Analysis of PCR-Amplified 16S rDNA Clones

Chang Soo Seung, O-Seob Kwon¹ and Young Shik Park (Department of Microbiology, ¹Department of Environmental Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea)

We have employed comparative RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis and molecular phylogenetic techniques to investigate the diversity of uncultured microorganisms associated with the anaerobic PCP degradation in PCP-adapted enrichment cultures inoculated by samples from anaerobic sewage sludge(Jangrim, Pusan) and leachate of landfill site(Kimhae). 16S rDNA clones were obtained by PCR amplification of mixed population DNAs extracted directly from the nonactive and active stage of each PCP-adapted culture. After three rounds of comparative RFLP analyses, two RFLP types, designated as A1a and B1d, were found prevalent and common in both active stage samples. The analysis of phylogenetic diversity based on the 5'-terminal 180 nt of sequences from whole clones of the A1a and B1d RFLP types showed close similarity among themselves. In case of B1d clones, 78% of them shared identical sequences. These results suggest that the clones of both RFLP types were originated from highly affiliated microorganisms which are enriched as a result of metabolic activity to PCP. The full-length 16S rRNA sequence of each representative clone from both RFLP types was determined, and an A1a clone was found to be related to *Clostridium ultunae*(Genbank No. Z69293) and a B1d clone to *Thermobacteroides proteolyticus*(Genbank No. X69335), with sequence similarities of 89% and 97%, respectively.