

한국 시화호와 중국 Aha호 저질토에 분포하는 이화성 아황산염 환원효소 유전자의 비교 분석

김인선¹ · 김옥선^{2,3} · 전선옥¹ · Karl-Paul Witzel³ · 안태석^{1*}

¹강원대학교 환경과학과, ²서울대학교 생명과학부, ³막스플랑크 진화생물학 연구소

한국의 시화호와 중국의 Aha호 저질토에서 서식하는 황산염 환원세균(sulfate reducing bacteria, SRB)의 깊이에 따른 군집구조를 비교하기 위하여, 이화성 아황산염 환원효소(EC 1.8.99.1; dissimilatory sulfite reductase, *dsr*) 유전자를 대상으로, polymerase chain reaction (PCR), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 및 클론 라이브러리를 이용하여 미생물의 군집구조를 분석하였다. DGGE band 양상을 분석한 결과, Aha호보다는 시화호에서 더 많은 밴드를 보여 다양성이 높았고, 깊이별 차이는 나타나지 않았다. 두 서식지에서 얻은 총 68개 클론의 염기서열을 가지고 계통학적 분석을 한 결과 시화호에서는 *Deltaproteobacteria* 그룹, *Firmicutes* 그룹에 속해있는 *Desulfotomaculum* 종과 archaeal thermophilic SRB 그룹에 속해있는 *Archaeoglobus* 종이, Aha호에서는 *Desulfotomaculum* 그룹과 유사성이 높았다. 분리된 대부분의 클론들(59%)은 배양된 황산염 환원세균과는 매우 낮은 유사도를 보였고, 환경에서 분리된 클론들과도 90% 이하의 유사도를 나타냈다. 총 클론을 88% 유사도를 기준으로 9그룹으로 나뉘었을 때 시화호와 Aha호의 각 클론은 서로 다른 그룹으로 존재하였다. 이러한 결과는 두 서식지의 이화성 아황산염 환원효소를 가지고 있는 미생물의 군집구조는 확연히 다르고 각 서식지에 특이적인 황산염 환원 미생물이 존재함을 시사한다.

Key words □ *dsr* gene, lake Aha, lake Sihwa, sediment, sulfate reducing bacteria (SRB)

황산염 환원세균은 Gram-negative mesophilic SRB, Gram-positive spore forming SRB (*Desulfotomaculum*), bacterial thermophilic SRB (*Thermodesulfobacterium*)와 archaeal thermophilic SRB 등 다양한 분류학적 그룹에 속하여 있다(7). 황산염 환원세균은 황산염이 많은 혐기성의 서식지에서 혐기성 분해의 주요 최종 분해자로 황산염(SO_4^{2-})을 최종 전자 수용체로 이용하여 황화수소(H_2S)를 생성한다(34). 최근에는 대기오염이 심해지면서 황산화물이 호수로 유입되어, 호수의 산성화를 유발하고 있으나, 황산염 환원세균의 활동으로 인하여 호수의 산성화과정이 지연된다(3). 또한, 황산염 환원세균에 의해 생성된 황화물(HS^-)은 중금속을 제거하고(9), 황산염 환원은 혐기성 분해 과정의 하나로 담수 환경에서는 총 혐기성분해의 20%, 해양의 저질토에서는 총 50% 이상이 황산염 환원세균에 의하여 일어난다(5, 14). 이와 같이, 황산염 환원세균은 저질토 생태계에서 탄소 순환, 황 순환과 오염물질 제거에 매우 중요한 역할을 하고 있다(14).

이러한 황산염 환원세균의 중요성을 이해하고 황산염 환원세균의 분포와 다양성 조사를 위하여 fluorescence in situ hybridization (FISH) (18, 22, 27), polymerase chain reaction (PCR), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (13, 16), 염기서열분석 (Sequencing) (6, 8, 23) 등 여러 가지 분자생물학적 방법으로 연구가 이루어지고 있다. 그러나 위의 16S rRNA gene을 기초로

한 분석방법들은 일반적인 미생물의 다양성과 분포에 관한 정보만 제공한다. 특히 배양이 불가능한 미생물의 경우는 대사 작용 능력에 대한 정보를 전혀 제공하지는 못한다. 이러한 한계점을 극복하는 방법으로 미생물이 가지고 있는 functional gene을 이용한 미생물군집조사 방법이 있다(20, 23, 25). 기존에 알려진 functional gene 중 이화성 아황산염 환원효소(EC 1.8.99.1; dissimilatory sulfite reductase, *dsr*)는 황산염 환원에 필수적인 효소로서 혐기성 상태에서 황산염 환원의 최종단계에 관여하여 아황산염(SO_3^{2-})을 황화물(HS^-)로 환원한다. 이 유전자는 모든 황산염 환원세균에서 발견되었고, *dsr*의 각 α -subunit (*dsrA*)과 β -subunit (*dsrB*) 부분과 두 부분 모두를 encoding하는 1.9 kb 크기의 DNA 또한 PCR에 의해 증폭될 수 있다(17, 31). 최근에 *dsr* 유전자의 염기서열 분석은 혐기성 황산염 호흡의 진화 과정(17, 19, 31)과 다양한 환경에 존재하는 황산염 환원세균의 군집(6, 12, 21, 23, 25)분석의 목적으로 연구가 진행되어 왔다.

시화호는 경기도 안산시와 시흥시에 근접한 인공 담수호로 담수면적 56.6 km², 평균 수심 3.2 m, 저수량 182백만톤, 체류 시간 200~300일이며, 여러 공장에서 발생하는 공장폐수와 근교도시에서 발생하는 생활폐수와 농업폐수 등이 시화호로 유입되어 심하게 오염되어 있다(2). 중국의 Guiyang시에 위치한 Aha호는 인공 저수지로, 담수면적, 평균수심, 저수량, 체류시간이 각각 3.4 km², 13 m, 45백만톤, 161일이다. 또한, 도시개발로 인해 생활폐수와 공장폐수 그리고 산성의 광산폐수에 의해 오염되어 있을 뿐만 아니라, 저질토와 호수물에 철, 망간, 황산염이 그대로 유입되고

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-33-250-8574, Fax: 82-33-251-3991
E-mail: ahnts@kangwon.ac.kr

있다(32). 두 호수에서 *Desulfovibrioacea*에 특이적으로 결합하는 SRB385 probe를 이용한 FISH 방법으로 황산염 환원세균 분포를 조사한 결과 두 호수에서 다르게 나타났다(1). 이 연구에서는 미생물이 가지고 있는 functional gene 중 이화성 아황산염 환원효소 (EC 1.8.99.1; dissimilatory sulfite reductase, *dsr*)를 대상으로 PCR/DGGE와 클론 라이브러리를 통하여 시화호와 Aha호의 저질토에서 *dsr* 유전자를 가진 미생물의 군집구조를 분석하였다.

재료 및 방법

조사 지역 및 시료 채취

시화호(N: 37° 17' 39.5", E: 126° 46' 33.8")에서는 2006년 9월에 반경 5 cm, 길이 50 cm의 core sampler를 이용하여 저질토를 채취하였고, 중국의 Aha호(N: 26° 32' 31.3", E: 106° 39' 0.1")에서는 2007년 4월에 Wang 등(33)이 제작한 core sampler를 이용하여 저질토를 채취하였다. 채취한 샘플은 실험실까지 냉장상태로 운반하였고, 깊이 0 cm부터 10 cm까지 각 1 cm 간격으로 총 10개의 시료를 냉동보관 하였다.

DNA의 추출

냉동 보관된 시료로부터 DNA는 Ultra Clean Soil DNA Kit (MoBio, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출하였는데 1 cm씩 자른 시료 1 g를 bead solution tube에 넣고 제조사의 방법에 따라 수행하였다. 추출된 DNA는 agarose gel에서 전기영동 하였고, ethidium bromide로 염색하여 정제상태를 확인하였다.

dsr 유전자의 PCR 증폭

dsr 유전자는 시화호와 Aha호에 추출된 DNA를 주형으로 primer set DSR1F/DSR4R, DSR1F/DSR3R, DSR2F/DSR4R (Table 1)을 이용하여 증폭하였다. PCR반응은 1×PCR buffer, dNTP mixture (200 μM), 200 nM primer, 2.5 mM MgCl₂, 1% formamide, 0.1% BSA, 1 unit/μl *Taq* DNA polymerase (Roche, Germany)를 첨가하여 최종부피가 25 μl가 되게 하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 초기 열처리를 한 후, 94°C에서 1분간 변성시키고, annealing 온도는 시화호의 시료에서 58°C, Aha호 시료는 54°C로 1분간 반응 시키고 신장을 위하여 72°C에서 90초 동안 반응한 후 이 반응을 30 cycle 더 수행한 후 4°C에서 반응을 중단시켰다. PCR 증폭산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후

ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였다.

DGGE 분석을 위하여는 적합한 크기의 DNA 단편이 필요함으로, 앞에서 생성된 *dsrAB* (1.9 kb), *dsrA* (1.1 kb), *dsrB* (1.4 kb) 유전자의 단편을 대상으로 크기가 각각 243 bp, 350 bp인 primer DSR1Fgc/DSR5R (31)와 DSRp2060F/DSR4R (13)를 이용하여 nested PCR를 수행하였다. Nested PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 초기 열처리를 한 후, 94°C에서 30초간 변성시키고, annealing 온도는 초기에 65°C에서 시작하여 매 cycle마다 0.5°C씩 감소하도록 설정하고 45초간 반응시켰다. 신장을 위하여 72°C에서 90초 동안 반응한 후 이 반응을 20 cycle 더 수행하였다. 또 다시 94°C에서 30초간 변성시키고, annealing 온도는 55°C로 45초간 반응시키고 신장을 위하여 72°C에서 90초 동안 반응한 후 이 반응을 10 cycle 더 수행한 후 4°C로 반응을 중단시켰다(24).

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

DGGE는 D-Code System (BioRad, USA)을 이용하여 수행하였다. Denaturing gradient gel은 0%와 100% denaturant (7 M Urea, 40% Formamide)가 각각 포함된 7.5% (w/v) acrylamide stock solution (37.5:1 acrylamid-bisacrylamide)을 제작하여 사용하였다. 농도구배는 시화호에서 35~65%, Aha호에서 45~65%로, 농도구배가 연속적으로 형성되도록 gel을 제작하였다. 이와 같이 제작된 gel에 nested PCR 증폭 산물을 80 μl씩 loading하여 0.5×TAE buffer 완충용액(20 mM Tris, 10 mM acetic acid, 0.5 mM EDTA, pH 8.0)에서 60°C, 200 V로 8시간 동안 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 SYBR Gold로 염색시킨 후 UV로 확인하였다.

클로닝 및 염기서열 분석

시화호와 Aha호 저질토에서 *dsr* 유전자의 생성 결과인 Table 2에 따라 두 서식지에서 공동으로 함유하고 있는 *dsrA* 유전자를 증폭하여 클로닝을 하였다. 클로닝이 잘되게 하기 위하여 PCR 수행시 *Taq* DNA polymerase (Roche, Germany) 대신 Pfu DNA polymerase (Promega, USA)를 사용하였으며, 삼배수로 수행하였다. 반응조건은 95°C에서 2분간 초기 열처리를 한 후, 80°C가 되면 Pfu DNA polymerase (Promega, USA)를 0.5 μl 넣어준 후, 94°C에서 30초간 변성시키고, annealing 온도는 시화호 시료에서 58°C, Aha호 시료에서 54°C로 45초간 반응시키고 신장을 위하여

Table 1. Sequences of the primers used for amplification of *dsr* gene

Primer	Sequence 5' → 3'	Primer combination	Expected size of product (bp)	Reference	
DSR1F	AC[C/G]CACTGGAAGCACG	DSR1F/4R	1,900	(32)	
DSR2F	CTGGAAGGA[C/T]GACATCAA				
DSR3R	GAAGAA[C/G]ATG[A/T]ACGGGTT	DSR1F/3R	1,100		
DSR4R	GTGTAGCAGTTACCGCA	DSR2F/4R	1,400		
DSR1Fgc	GC-clamp-AC[C/G]CACTGGAAGCACG	DSR2F/3R	500		
DSR5R	TGCCGAGGAGAACGATGTC	DSR1Fgc/5R	243		
DSRp2060F	GC-clamp-CAACATCGTYCAYACCCAGGG	DSRp2060F/4R	350		(13)

Table 2. Results of initial PCR amplifications and nested amplification of *dsr* genes with the 4 different primers using initial PCR products as templates

Site	Depth (cm)	<i>dsrAB</i>		<i>dsrA</i>		<i>dsrB</i>	
		Initial PCR	Nested PCR	Initial PCR	Nested PCR	Initial PCR	Nested PCR
		1F/4R	1Fgc/5R	1F/3R	1Fgc/5R	2F/4R	2060F/4R
Lake Sihwa	0-1	+	+	+	-	-	-
	1-2	+	+	+	-	-	-
	2-3	+	+	+	-	-	-
	3-4	+	+	+	-	-	-
	4-5	+	+	+	-	-	-
	5-6	+	+	+	-	-	-
	6-7	+	+	+	-	-	-
	7-8	+	+	+	-	-	-
	8-9	+	+	+	-	-	-
	9-10	+	+	+	-	-	-
Lake Aha	0-1	-	-	w	+	-	-
	1-2	-	-	w	+	-	-
	2-3	-	-	w	+	-	-
	3-4	-	-	w	+	-	-
	4-5	-	-	w	+	-	-
	5-6	-	-	w	+	-	-
	6-7	-	-	w	+	-	-
	7-8	-	-	+	+	-	-
	8-9	-	-	+	+	-	-
	9-10	-	-	+	+	-	-

+: visible product with predicted size
 w; visible product with predicted size but weak band
 -: no product

73°C에서 3분 동안 반응시켰다. 증폭횟수는 30 cycle이었다.

증폭생성물은 Gel Purification Kit (Invitrogen, USA)을 사용하여 0.8% agarose gel에서 정제된 후 Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 제조사의 방법대로 수행하였다. 배양 후 생성된 white colony를 M13F; 5'-GTA AAA CGA GGC CAG-3'와 M13R; 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' primer를 이용하여 PCR 과정을 거친 뒤 insert를 확인하였다. Ont-shot 시퀀싱은 각각 M13F와 M13R과 Bye-Dye Terminator v3.1 Cycles Sequencing Kit를 이용하였고, ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA)으로 분석하였다. 분석된 염기서열은 BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>)를 통하여 동정하였다.

계통학적 분석

계통학적 분석은 ARB software를 이용하여 분석하였고(<http://magnum.mpi-bremen.de/melecol/arb/>), 이 연구에서 얻어진 총 68 개 클론 외에 추가 *dsrA* 유전자는 NCBI (National Center for

Biotechnology Information)의 GenBank에서 수집하였다. 계통도는 Neighbor-Joining method에 의하여 PHYLIP distance method를 이용하여 제작하였고, 계통도내 분지의 신뢰도(bootstrap 값)를 조사하기 위해서는 100번의 bootstrap resampling 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

***dsr* (dissimilatory sulfite reductase) 유전자의 PCR-DGGE 양상**

dsr 유전자의 PCR 결과는 Table 2와 같다. 시화호에서는 세 개의 primer set 중 *dsrAB* primer set DSR1F/DSR4R과 *dsrA* primer set DSR1F/DSR3R를 이용한 경우 agarose gel 상에서 예상했던 1,900 bp와 1,100 bp 크기의 밴드가 나타났고, Aha호에서는 *dsrA* primer set DSR1F/DSR3R를 이용한 증폭산물에서만 밴드(1,100 bp)가 나타남을 확인하였다. Scholten 등(29)은 Mono호에서 이 연구와 같은 primer set을 이용하여 실험하였지만 증폭

산물을 얻지 못하였다. 마찬가지로 이 연구에서도 적용된 세 개의 primer set 중 *dsrB* 증폭을 위한 primer set DSR2F/DSR4R에서는 증폭산물을 얻을 수가 없었다. 이러한 결과는 앞으로 연구를 수행할 때에는 하나의 primer set보다는 더 다양하고 복합적으로 primer sets를 적용해야 할 필요성이 있는 것을 보여준다.

DGGE를 하기 위하여 초기 PCR의 모든 증폭산물을 가지고 GC-clamp가 부착된 primer set (13, 31)을 사용하여 nested PCR을 수행한 결과, 시화호에서는 *dsrAB* 증폭산물을(DSR1F/DSR4R) 주형으로 사용한 경우, 예상된 길이(243 bp)의 증폭산물에서 밴드가 나타났고, Aha호에서는 *dsrA* (DSR1F/DSR3R) 증폭산물을 주형으로 사용한 증폭 산물에서 밴드가 형성되었다(Table 2). DGGE용 primer set DSR1Fgc/5R은 시화호의 저질토에서 *dsrA* 유전자를 검출하기에는 PCR bias가 큰 것으로 사료된다. Crick (10)에 의하면, 염기서열 변형(mutation)은 16S rRNA gene 보다 functional gene에서 더 빈번히 발생한다고 가정한 것으로 보아 functional gene에 의한 primer bias 또한 큰 것으로 사료된다.

DGGE를 이용하여 시화호와 Aha호의 저질토에서 깊이에 따른 변화는 Fig. 1과 같다. 시화호와 Aha호의 저질토에서 깊이별 *dsr* 유전자의 밴드 양상은 비슷하였고, 시화호가 Aha호 보다는 많은 밴드 수를 나타내어 더 다양한 *dsr* 유전자가 존재함을 확인하였다.

***dsrA* 유전자를 이용한 계통학적 분석**

dsrA 유전자를 이용한 계통학적 분석은 조사된 두 호수의 저질토 깊이 중 DGGE 분석 시 모든 밴드를 포함하고 있는 1~2 cm, 2~3 cm, 9~10 cm 깊이의 시료를 대상으로 클론 라이브러리를 제작하였다. 클로닝 결과, 시화호에서는 57개의 클론을, Aha호에서는 11개의 클론을 수집하여 총 68개의 클론을 얻었다. *dsrA* 유전자 클론의 염기서열을 분석한 결과, 클론 모두 환경에서 분리된 클론들과 가깝게 연관되었는데 시화호에서는

Deltaproteobacteria 그룹, *Firmicutes* 그룹에 속해있는 *Desulfotomaculum* 종과 archaeal thermophilic SRB 그룹에 속하는 *Archaeoglobus* 종에, Aha호에서는 *Desulfotomaculum* 종 등에 속하였다. 총 클론 중 40개(59%)는 환경에서 분리된 클론들과 90%이하의 유사도를 보였고, 모든 클론은 배양 가능한 종과의 유사도가 65~88%로 매우 낮았다. 클로닝 과정에서 Aha호는 시화호에 비해 여러 가지 실험조건에도 불구하고 클론을 얻기가 매우 어려웠는데 이는 Aha호에 존재하는 *dsr* 유전자는 이 연구에서 사용한 primer set (DSR1F/DSR3R)에 의해서 “target”되는 염기서열 지역의 specificity (특이성)이 낮기 때문이라 사료된다. 따라서, Aha호에는 염기서열이 변형(mutation)된 다른 *dsrAB* 유전자가 존재할 가능성이 있다. 또한, 시화호의 1~2 cm 깊이의 저질토에서 분리된 염기서열이 시화호에서 얻은 모든 염기서열의 60%를 나타내어 저질토의 1~2 cm에 다양한 *dsrA* 유전자가 많이 존재함을 확인하였고, 또한 Aha호에서도 1~2 cm에서 많은 클론 수를 나타내었다. Aha호는 이전에 FISH를 적용하여 황산염 환원세균의 분포를 조사한 연구 결과에서도 1~2 cm에서 황산염 환원세균이 가장 많이 검출되어 이 연구와 일치되는 경향을 보였다(1).

Figure 2는 *dsr* 유전자를 가지는 미생물의 계통학적 분석을 나타낸 것이다. 총 68개의 염기서열은 88% 유사도를 기준으로 총 9개의 cluster (I~IX)로 나뉘었다. 시화호에서 얻은 클론들은 5개의 주요 그룹(II, III, VI, VII, VIII)으로 나뉘어졌다. 그 중 가장 많은 클론을 포함하고 있는 그룹은 DSR-VI로, 총 17개의 클론이 포함되어 있다. 이 염기서열들은 *Desulfotomaculum* sp. Lac2와 60~63%의 유사도를 보였고, 일본 심해의 저질토(15)에서 발견된 클론의 염기서열과 가깝게 연관되었다. DSR-II 그룹은 적용된 모든 깊이에서 검출된 15개의 클론을 포함하고, *Desulfacinum infernum* 종과는 69~77%의 유사도를 나타냈다. 이 클론은 뉴잉

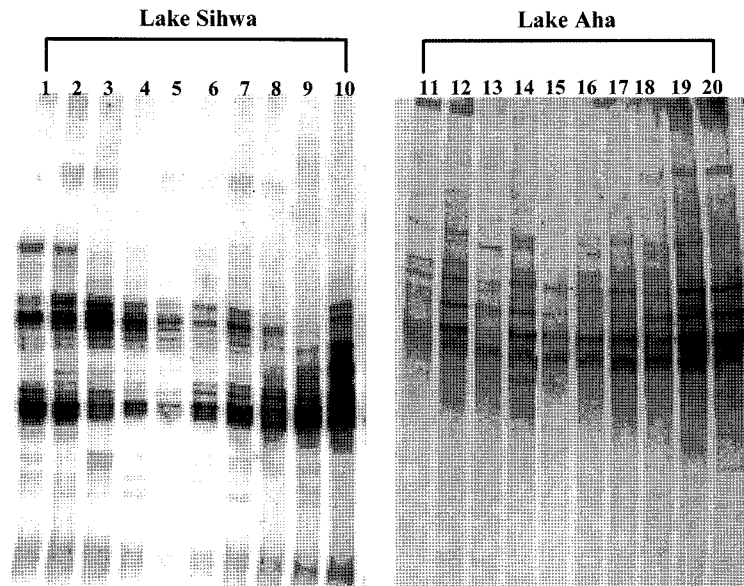


Fig. 1. DGGE band patterns of *dsrA* genes from sediments of Lakes Sihwa and Aha.

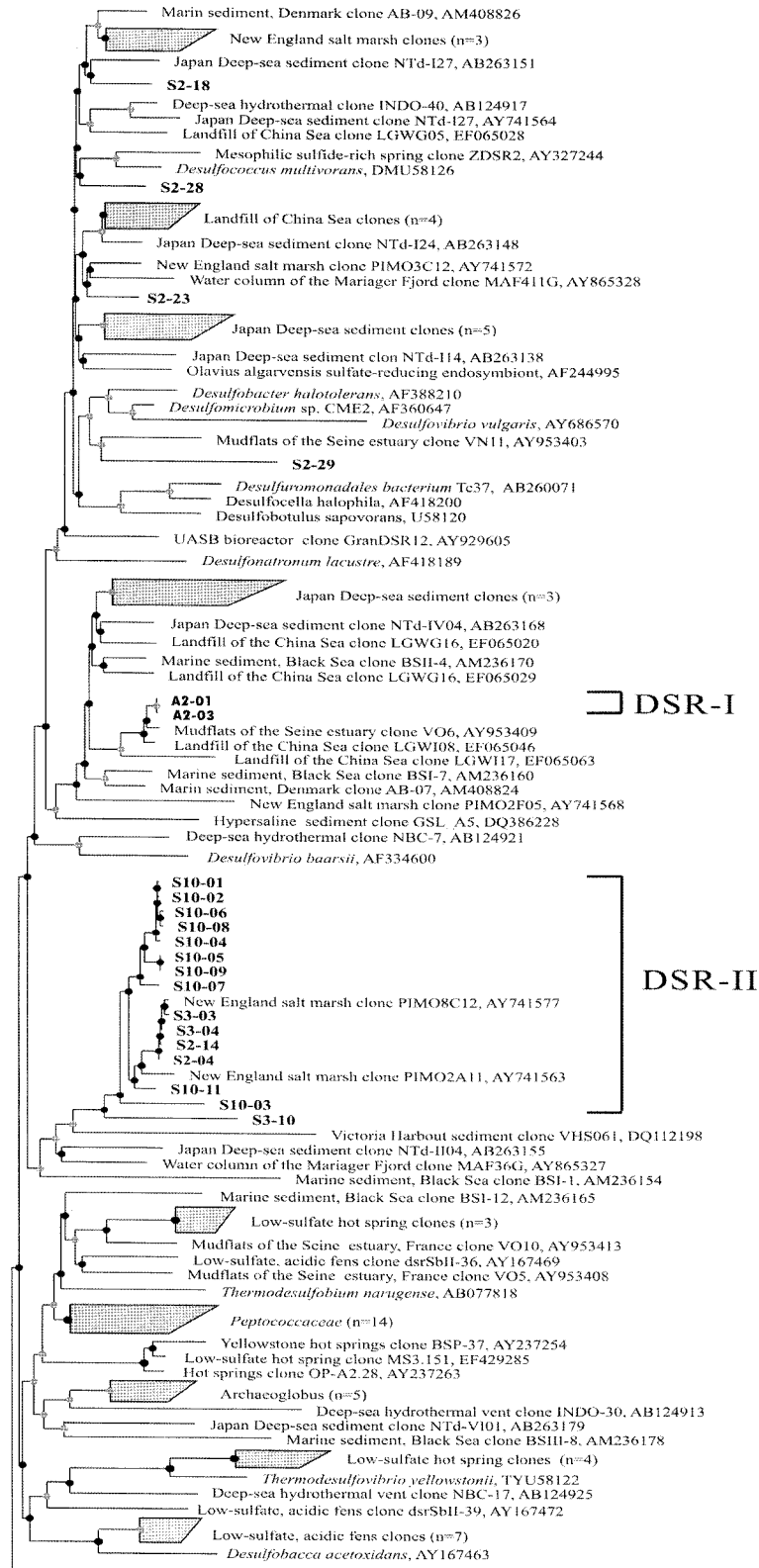


Fig. 2. Phylogenetic tree based on *dsrA* amino acids from sediment of Lake Sihwa and Aha. The tree was constructed using the neighbor-joining method in ARB. The *amoA* amino acid sequence of *Nitrosomonas europaea* (NC_004757) were used as an outgroup. Clones from this study are shown in bold and designated as S in case of Lake Sihwa and A in case of Lake Aha. Clones are coded as follows, using S2-01 as an example: S=Sihwa; 2=sediment depths of 1~2 cm; 01=number of assigned to the clone. Bootstrap values are indicated at the branch points by circles: black (100%), gray (95~99%), white (90~94%), and square with white (<90%).

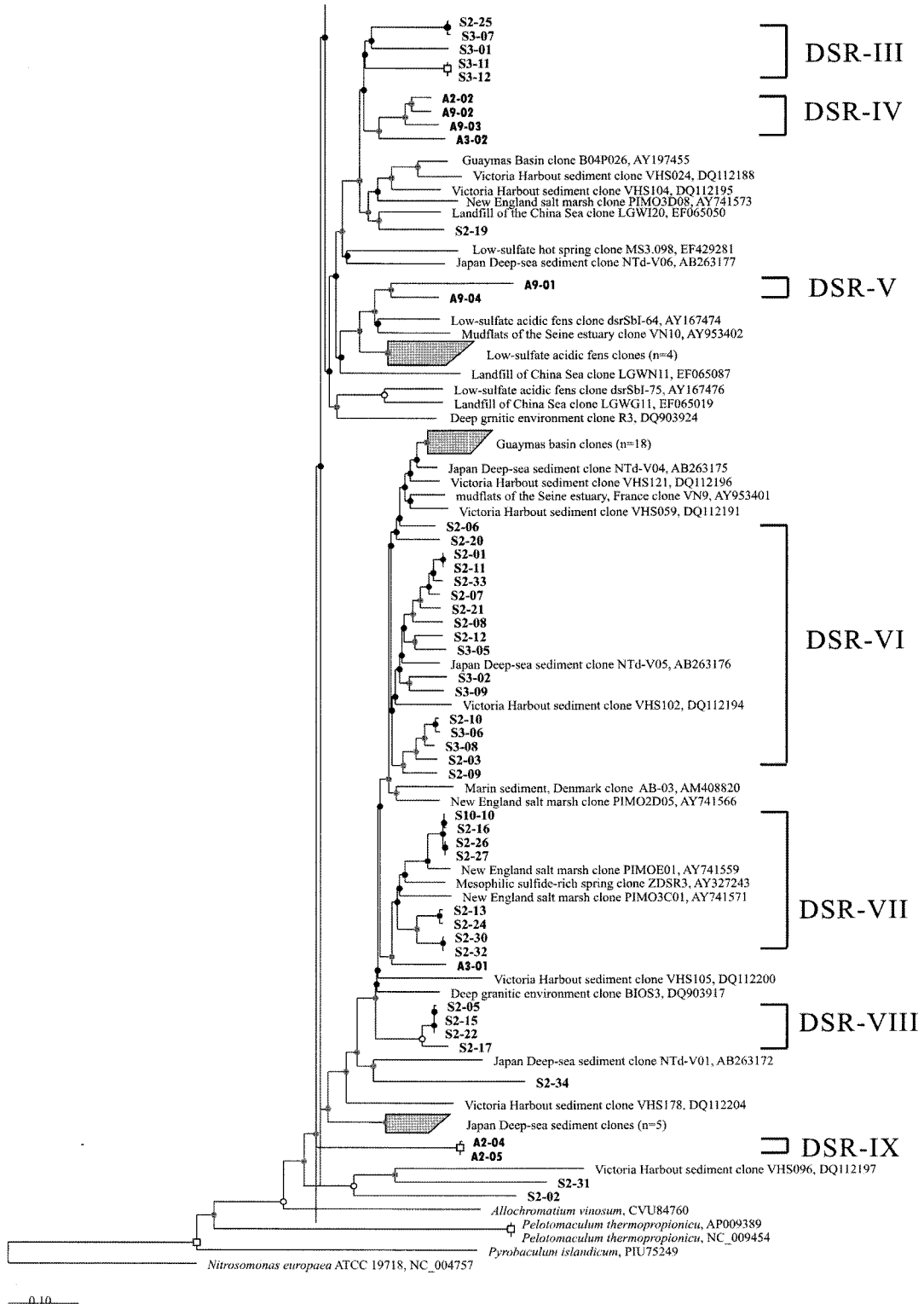


Fig. 2. Continued.

글랜드 습지에서 분리된 클론(4)과 78~100%의 유사도를 보였다. 그 중, 클론 S3-03과 S10-09는 뉴잉글랜드의 습지(4)에서 분리된 PIMO8C12 (AY741577)와 100%의 유사도를 나타냈다. 특히

DSR-III 그룹은 유일하게 시화호 1~2 cm, 2~3 cm에서만 검출된 클론만을 포함하고, 클론 S3-11, S3-12는 Guaymas Basin의 저질 토(12)에서 분리된 B04P026 (AY197455)과 76%의 유사도, 나머

지 3개의 클론(S2-25, S3-01, S3-07)은 Victoria 항구의 저질토에서 분리된 VHS104 (DQ112195)와 75%의 유사도를 나타냈다. DSR-VII 그룹은 DSR-VI 그룹과 동일하게 *Desulfotomaculum* 종과 62~64%의 유사도를 보였다. DSR-VIII 그룹은 모두 1~2 cm 깊이에서 얻은 클론(4개)만을 포함하고, *Archaeoglobus veneficus* 종과 63~64%의 유사도를 나타냈다.

DSR-I, -IV, -V, -IX는 Aha호에서 얻은 클론으로 구성된 그룹으로, 이 클론의 염기서열은 모두 *Desulfotomaculum thermocisternum* 종과 58~79%의 유사도를 보였다. 환경에서 분리된 클론들과 비교시 DSR-I 그룹은 중국 동해안의 매립지에서 발견된 클론(EF065033)과 97% 이상의 유사성을 보였고, DSR-IV 그룹은 시화호의 DSR-III 그룹과 가장 가까운 유연관계를 나타냈다(77% 유사도). DSR-V와 -VI 그룹은 각각 프랑스 Seine강의 진흙바닥(20)에서 분리된 클론(AY953402)과 80~81% 유연관계를, Guaymas Basin의 저질토(12)에서 얻은 클론(AY197458)과 65% 유연관계를 보였다.

위의 결과, 이 연구에서 분석된 68개의 클론은 현재까지 *dsr* 유전자를 가지고 있다고 알려진 배양 가능한 SRB와는 매우 낮은 유사성을 보였고, 모두 환경에서만 검출된 클론과 밀접한 관련이 있었다. 배양된 균주 중에서는 시화호와 Aha호 모두 *Desulfotomaculum* 종과 유사한 클론의 염기서열이 전체 클론의 54%로 우점하였다. 이는 독일의 대수층에서 FISH (Fluorescence in situ hybridization) 방법으로 황산염 환원세균의 군집을 알아본 연구 결과(11)와 Florida Everglades (Homestead, FL, USA)의 초기지역에서 *dsrAB*의 계통학적 분석한 연구 결과(6)에서도 *Desulfotomaculum* 종이 우점종임을 밝혀 이 연구와 일치하는 경향을 보였다.

16S rRNA gene에 특이적인 probe를 사용하여 분석하는 방법과 clone libraries를 이용한 미생물의 계통학적 연구에 의하면, 일반적으로 저질토에서 우점하는 황산염 환원세균은 *Desulfovibrioaceae* 종으로 알려져 있다(18, 28, 30). 본 저자의 이전 연구에서 동일한 샘플을 대상으로 *Desulfovibrioaceae*과를 검출할 수 있는 SRB385 probe를 이용하여 FISH 방법으로 황산염 환원세균 군집을 조사하였다(1). 그 결과, 총세균수에 대한 황산염 환원세균의 비율이 시화호에서는 10.4~25.6%, Aha호에서는 1.85~19.4%로 많은 *Desulfovibrioaceae* 과가 존재함을 밝혔다. 그럼에도 불구하고 본 연구에서는 *Desulfovibrioaceae*가 전혀 검출되지 않았다. 마찬가지로 *dsr* 유전자를 대상으로 프랑스의 Seine강의 저질토(20)와 일본 Tama강(26), 독일의 pristine aquifer (11)에서 계통학적 연구를 한 결과에서도 이 종과 유사한 클론이 검출되지 않았다. 이러한 결과는 16S rRNA gene 또는 *dsr* 유전자, 둘 중 하나의 유전자만을 대상으로 자연환경에서의 황산염환원세균의 군집구조를 분석하는 것은 한계점이 있음을 시사한다. 그러므로 향후 황산염환원세균 조사시에는 16S rRNA gene을 이용하여 자연환경 내에서의 황환원 세균의 존재를 밝혀냄과 동시에 황산염을 환원시킬 수 있는 유전자인 *dsr* 유전자를 조사하여 그들의 생태학적 역할에 대한 정보를 제공함으로써 상호보완적인 연구가 가능할 것으로 사료된다.

조사 서식지 별 황산염 환원세균의 분포특징을 요약해보면 시화호와 Aha호의 저질토에서 *dsr* 유전자의 군집은 매우 달랐고, 두 서식지 모두 깊이에 따른 군집구조는 변화가 없었다. 그리고 Aha호보다 시화호에서 다양한 *dsr* 유전자가 존재함을 알 수 있었다. 분리된 대부분의 클론들은 배양된 황산염 환원세균과는 낮은 유사도를 보였으며, 환경에서 분리된 클론들과도 90% 이하의 유사도를 나타내었다. 또한 두 서식지에서 검출된 클론을 모두 포함하고 있는 그룹이 없는 것으로 보아 두 서식지의 이화성 아황산염 환원효소를 가지고 있는 미생물의 군집구조는 확연히 다를 수 있었고, 다른 환경과의 비교에서도 두 서식지는 각 서식지에 특이적인 황산염 환원세균 군집구조를 가지고 있었다.

감사의 말

이 연구는 2007년 학술진흥재단이 주관하는 BK21 글로벌 인턴십의 지원비로 이루어졌음을 밝히며 이 연구를 수행할 수 있도록 지원을 해주신 독일 막스플랑크 진화생물학 연구소에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김인선, 남종현, 전선옥, Y. Zhao, 안태석. 2007. The vertical distribution of sulfate reducing bacteria (SRB) by Florescence In Situ Hybridization in sediments of lakes in Korea and China. *Korean J. Limnol.* 40, 553-559.
2. 현문식, 장인섭, 박형수, 김병홍, 김형주, 이홍금, 권개경. 1999. 시화호 저니(Sediment)에서의 유기물 및 중금속 농도와 혐기성 호흡세균과의 상관관계. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 3, 252-259.
3. Aron, L.M., E.B. Pamela, and T.H. Alan. 1989. Acid stress and aquatic microbial interactions, pp. 1-19. In S.R. Salem and P.D. Rao (eds.), CRC Press. Inc., Florida, USA.
4. Bahr, M., B.C. Crump, V. Klepac-Ceraj, A. Teske, M.L. Sogin, and J.E. Hobbie. 2005. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh. *Environ. Microbiol.* 7, 1175-1185.
5. Barton, L.L. and F.A. Tomei. 1995. Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. pp. 1-32. In L.L. Barton (ed.), Sulfate-reducing bacteria, Vol. 8, Peplum Press, New York, USA.
6. Castro, H., K.R. Reddy, and A. Ogram. 2002. Composition and function of sulfate-reducing Prokaryotes in eutrophic and Pristine areas of the Florida Everglades. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6129-6137.
7. Castro, H.F., N.H. Williams, and A. Ogram. 2000. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 1-9.
8. Chang, Y.J., A.D. Peacock, P.E. Long, J.R. Stephen, J.P. McKinley, S.J. Macnaughton, A.K.M.A. Hussain, A.M. Saxton, and D.C. White. 2001. Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3149-3160.
9. Colleran, E., S. Finnegan, and P. Lens. 1995. Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67, 29-46.
10. Crick, F.H. 1966. Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19, 548-555.

11. Detmers, J., H. Strauss, U. Bergmann, K. Knittel, and J. Kuever. 2004. FISH shows that *Desulfotomaculum* spp. are the dominating sulfate-reducing bacteria in a pristine aquifer. *Microb. Ecol.* 47, 236-242.
12. 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.
13. Geets, J., B. Borremans, L. Diels, D. Springael, J. Vangronsveld, D. Van Der Lelie, and K. Vanbroekhoven. 2006. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods* 66, 194-205.
14. Jørgensen, B.B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction. *Nature* 296, 643-645.
15. Kaneko, R., T. Hayashi, M. Tanahashi, and T. Naganuma. 2007. Phylogenetic diversity and distribution of dissimilatory sulfite reductase genes from deep-sea sediment cores. *Marin Biol.* 9, 429-436.
16. Karr, E.A., W.M. Sattley, M.R. Rice, D.O. Jung, M.T. Madigan, and L.A. Achenbach. 2005. Diversity and distribution of sulfate-reducing bacteria in permanently frozen lake fryxell, mcmurdo dry valleys, antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6353-6359.
17. Klein, M., M. Friedrich, A.J. Roger, P. Hugenholtz, S. Fishbain, H. Abicht, L.L. Blackall, D.A. Stahl, and M. Wagner. 2001. Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *J. Bacteriol.* 183, 6028-6035.
18. Koizumi, Y., S. Takii, M. Nishino, and T. Nakajima. 2003. Vertical distributions of sulfate-reducing bacteria and methane-producing archaea quantified by oligonucleotide probe hybridization in the profundal sediment of a mesotrophic lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 101-108.
19. Larsen, Ø, T. Lien, and N.K. Birkeland. 2001. A novel organization of the dissimilatory sulfite reductase operon of *Thermodesulfobacterium norvegicum* verified by RT-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 203, 81-85.
20. Leloup, J., L. Quillet, T. Berthe, and F. Petit. 2006. Diversity of the *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 230-238.
21. Leloup, J., L. Quillet, C. Oger, D. Boust, and F. Petit. 2004. Molecular quantification of sulfate-reducing microorganisms (carrying *dsrAB* genes) by competitive PCR in estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 207-214.
22. Li, J.H., K.J. Purdy, S. Takii, and H. Hayashi. 1999. Seasonal changes in ribosomal RNA of sulfate-reducing bacteria and sulfate reducing activity in a freshwater lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, 221-234.
23. Minz, D., J.L. Flax, S.J. Green, G. Muyzer, Y. Cohen, M. Wagner, B.E. Rittmann, and D.A. Stahl. 1999. Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4666-4671.
24. Muyzer, G., E.C. De Waal, A.G. Uitterlinden, G. Muyzer, E.C. De Waal, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
25. Perez-Jimenez, J.R., L.Y. Young, and L.J. Kerkhof. 2001. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbon-degrading consortia and pure cultures using the dissimilatory sulfite reductase (*dsrAB*) genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 145-150.
26. Purdy, K.J., D.B. Nedwell, T.M. Embley, and S. Takii. 1997. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the occurrence and selection of sulfate-reducing bacteria in response to nutrient addition to sediment slurry microcosm from a Japanese estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, 221-234.
27. Ravensschlag, 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.
28. Sahm, K., C. Knoblauch, and R. Amann. 1999. Phylogenetic affiliation and quantification of psychrophilic sulfate-reducing isolates in marine arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3976-3981.
29. Scholten, J.C.M., S.B. Joye, J.T. Hollibaugh, and J.C. Murrell. 2005. Molecular analysis of the sulfate reducing and archaeal community in a Meromictic Soda Lake (Mono Lake, California) by targeting 16S rRNA, *mcrA*, *apsA*, and *dsrAB* genes. *Microb. Ecol.* 50, 29-39.
30. Trimmer, M., K.J. Purdy, and D.B. Nedwell. 1997. Process measurement and phylogenetic analysis of the sulfate reducing bacterial communities of two contrasting benthic sites in the upper estuary of the Great Ouse, Norfolk, UK. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, 333-342.
31. Wagner, M., A.J. Roger, J.L. Flax, G.A. Brusseau, and D.A. Stahl. 1998. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.* 180, 2975-2982.
32. Wang, F., C. Liu, X. Liang, and Z. Wei. 2003. Remobilization of trace metals induced by microbiological activities near sediment-water interface, Aha Lake, Guiyang. *Chinese Science Bulletin* 48, 2352-2356.
33. Wang, Y.C., R.G. Huang, and G.J. Wan. 1998. The newly developed sample for collecting samples near the lacustrine sediment-water interface. *Geol. Geochem.* 1, 94-96.
34. Widdel, F. and F. Bak. 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3352-3378. In A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (eds.), *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y., USA.

(Received March 4, 2008/Accepted May 14, 2008)

ABSTRACT : Comparative Analysis of Dissimilatory Sulfite Reductase (*dsr*) Gene from Sediment of Lake Sihwa, Korea and Lake Aha, China**In-Seon Kim¹, Ok-Sun Kim^{2,3}, Sun-Ok Jeon¹, Karl-Paul Witzel³, and Tae-Seok Ahn^{1*}**

(¹Department of Environmental Science, Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Republic of Korea, ²School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea, ³Max Planck Institute of Evolutionary Biology, Plön, 24306, Germany)

The diversity of sulfate reducing bacteria was investigated in different depths of sediments in Lake Sihwa, Korea and Lake Aha, China by PCR amplification, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and clone libraries targeting dissimilatory sulfite reductase (*dsr*) gene. In the analysis of DGGE band patterns, the community compositions of *dsr* gene in the sediments of both lakes were significantly different whereas bands in all depths of each environment revealed similar patterns. Bands from Lake Sihwa were produced much more than those from Lake Aha, demonstrating a higher diversity of *dsr* gene in Lake Sihwa. Total 68 clones containing *dsr* gene were obtained to analyze their sequences. Sequences from the sediment of Lake Sihwa were affiliated to *Deltaproteobacteria*, the Gram-positive thermophilic sulfate reducers belonging to the genus *Desulfotomaculum* and archaeal thermophilic SRB belonging to the genus *Archaeoglobus*, whereas sequences from the sediments of Lake Aha were related to genus *Desulfotomaculum*. Clones retrieved from sediment of Lake Sihwa revealed a higher numbers than those of Lake Aha, demonstrating a higher diversity of *dsr* gene in Lake Sihwa. Most of clones (59%) were distantly related to the known cultivated SRB with 60~65% of similarity, which were clustered only the sequences from the environments showed less than 90% similarity. These habitat specific sequences suggested that the clustered *dsr* sequences represent species or groups of species that were indigenous to these environments. This study showed that these lakes have a specific bacterial communities having *dsr* gene distinct from those in other environments such as soil and marine ecosystems around the world.