

유전자지문분석법(T-RFLP)을 이용한 하천 미생물의 다양성 평가

정주용 · 이경희[†]

경기도보건환경연구원 수질연구부

Evaluation of Riverine Microbial Diversity using the Culture-Independent Genetic Fingerprinting Technique (T-RFLP)

Jeong, Ju-Yong · Lee, Kyong-Hee[†]

Department of Water Quality Research, Gyeonggido Institute of Health and Environment

(Received 7 January 2008, Accepted 26 February 2008)

Abstract

To analyze the riverine microbial community structure, genetic fingerprints and ecological indexes such as species abundances, diversity, evenness, dominance of targeted rivers in Gyeonggi Province were acquired and evaluated using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) technique. Genetic fingerprinting technique such as T-RFLP, which is able to show the microbial community clearly unlike traditional culture-dependent techniques, was thought to be useful to analyse the riverine microbial ecosystem under various factors. Riverine ecosystem evaluation using visible organisms would give biased results with time, targeted organism and researcher. But, T-RFLP, which can exclude the subjected biases such as culture condition and identification, would be an option to understand natural ecosystem by including the microorganisms that defy culture but perform important functions.

keywords : Culture-dependent, Ecological indexes, Riverine, Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

1. 서론

우리나라의 경우 하천오염 지표는 유기물질, 영양염류 등의 이화학적, 어류, 저서성 대형무척추동물, 부착조류 등의 생물학적 지표가 많이 이용되고 있다. 생물학적 지표는 과거 상당기간 동안 생태계가 외부로부터 영향을 받은 결과를 나타내 주는 것이므로 건강성을 나타내는데 유용한 것으로 인식되고 있다. 최근 들어 분자생물학의 급속한 발달에 힘입어 여러 가지 기법이 자연 생태계의 미생물 군집 분석에도 적용되고 있다. 현재 담수 생태계에서 현미경을 통해 관찰되는 미생물의 0.1~10% 정도만을 배양을 통해 확인할 수 있다는 사실이 하천 생태계 분석에 분자생물학적 기법 적용의 유용함을 보여준다(Head et al., 1998). 하천에 대한 분자 생태학적 연구는 주로 모든 미생물이 공통적으로 갖고 있는 16S rDNA를 이용하는 것으로 미생물을 직접 배양하지 않고 군집구조의 특성을 밝히는 연구로, 외국의 경우, 해양(Moeseneder et al., 1999), 심해저의 열수 분출구(Hydrothermal vent)의 고온 환경(Mehta et al., 2003), 유기물이 거의 없는 분화구 호수(Page et al., 2004), 남극의 빙하(Murray et al., 1998), 낮은 pH와 같은 특이적인 환경에 처해있는 하천에 대한 연구(Gonzales-Toris et

al., 2003), 하천수 중에 자유 유영(Free-living)과 부유물질에 부착되어 있는 세균의 비교(Crump et al., 1999) 및 오염된 하천의 생물막에 대한 연구(Brummer et al., 2000)와 같이 극한 환경을 포함한 거의 모든 자연환경에 대해 활발하게 이뤄지고 있다. 이러한 연구를 통해서 지금까지 배양을 통해서서는 확인할 수 없었던 수많은 종류의 미생물이 확인되어 미생물의 다양성은 상상했던 것보다 훨씬 크다는 사실이 밝혀지고 있다(Hugenholtz et al., 1998).

하천과 같은 물 환경에서 미생물 군집구조를 결정하는 주요 인자로는 기질 및 영양염류(질소·인)의 획득 유무, 수온, 포식자 및 해당 미생물을 숙주로 하는 바이러스의 존재 유무 등이다. 따라서 배양을 통하지 않은 분자생물학적 기법을 이용하여 하천의 생태계를 분석하면 해당 하천이 처해있는 특정한 환경 요인에 따라 독특한 미생물 군집구조와 다양성을 가질 것으로 기대된다.

본 연구에서는 분자생물학적 유전자지문 분석법 중 풍부한 데이터베이스를 갖고 특정한 미생물 종(Species)이나 군(Group)을 하나의 피크로 표현하는 T-RFLP기법을 이용하여 1) 분자생물학적인 방법에 의해 하천 생태계의 미생물 종 다양성과 유사성에 대해 평가하고, 2) 하천의 이화학적 및 오염 상황에 따른 분자 생물학적 지표의 적용 가능성을 파악하고자 하였다.

2. 연구방법

[†] To whom correspondence should be addressed.
merculee@hotmail.com

2.1. 대상시료

대상은 경기도내 경안천을 포함한 12개 주요 하천 26개 지점의 하천수이며 역사적인 수질 변화를 참고하기 위해 환경부 하천수질측정망 운영 지점 중 경기도보건환경연구원에서 담당하는 지점을 주로 선정하였다(Fig. 1).

대상 중 팔당호, 북한강, 남한강, 가평천(하류), 조종천(하류)은 비교적 오염이 덜한 하천으로 각 1개 지점을 선정하였고, 나머지에 대해서는 비교를 위해 상·중·하류의 3개 지점에서 채수하였다. 시료는 2004년 7월, 10월로 총 2회 채취하여 계절적인 변화도 파악하고자 하였다. 현장에서 수온, pH, 전기전도도 및 용존산소를 측정하고, 2 L 무균 플라스틱 용기에 4°C 이하로 유지한 상태로 실험실까지 운반하였다.

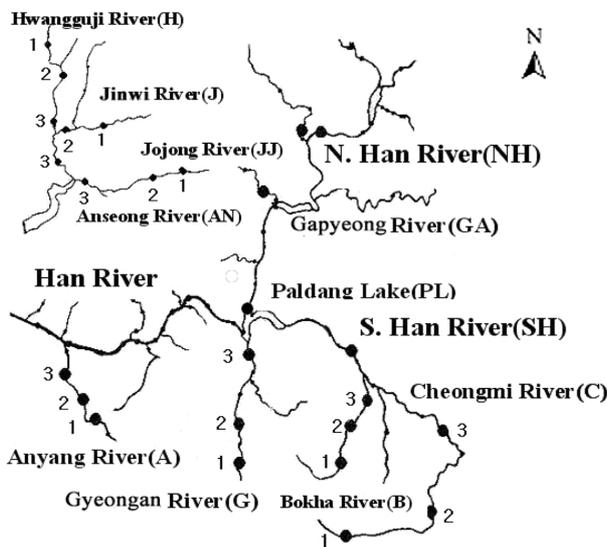


Fig. 1. Map of targeted rivers and locations, abbreviations in parentheses will be used in following figures.

2.2. 분석방법

2.2.1. DNA 추출

미생물을 농축하기 위해 Somerville 등(1989)이 제시한 방법을 참고하여 정량 펌프와 원통형 여지(Sterivex-GP, Millipore)를 이용하여 가능한 양(300~1700 mL)을 여과하였다. 음성대조군으로 증류수 약 2 L 정도를 똑같은 방법과 절차로 여과하고 약 1.0 mL CLS-TC 버퍼(Qbiogene, Carlsbad, CA.)를 가한 후 배출구에는 마개를 씌우고 주입구에는 5 mL 멸균 주사기를 끼워서 -20°C 이하로 실험시까지 보관하였다. 원통여지를 해동 후 초음파를 이용하여 필터에서 미생물을 떼어낸 후 미생물이 포함된 버퍼를 주사기로 뽑아내었고, Fast DNA kit(Qbiogene, Carlsbad, CA.)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

2.2.2. PCR

미생물 군집구조를 파악하기 위해 16S rRNA 유전자의 Universal Primer인 형광물질(FAM)로 표지된 27FB-FAM (AGRGTTYGATYMTGGCTCAG)과 1492R(GGYTACCTTG

TTACGACTT)을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위해 AccuPower PCR Premix(Bioneer)를 사용하였고, PCR 반응마다, 앞서 언급된 음성대조용 시료도 똑같은 방식으로 실험을 실시하였다. PCR 조건은 Initial Denaturation(94°C에서 3분)과 Denaturation(94°C에서 30초), Annealing(55°C에서 1분), Extension(72°C에서 2분)을 35 cycle 반응 후, Final Extension(72°C에서 6분)이었다. 최종적으로 전기영동을 통해 약 1500 bp의 PCR 산물을 100 bp DNA ladder(Bioneer)와 비교하여 확인하였다.

2.2.3. T-RFLP

T-RFLP을 위해 Qaiquick spin kit(Qiagen, Valencia, CA.)로 정제된 10 µL PCR 산물을 제한효소인 HaeIII를 이용하여 37°C에서 8~15 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 방해 물질인 염을 제거하기 위해 Nucleotide removal kit(Qiagen, Valencia CA.)를 이용해 정제하고 약 50 ng을 취해 건조하여 한국해양연구원에 의뢰하였다. 말단제한단편(TRF)의 길이는 ABI 3100 DNA sequencer(Applied Biosystem, Foster city, CA.)를 이용하여 결정되었고, GenScan Analysis Program(Ver. 3.7, Applied Biosystem, Foster city, CA.)을 통해 T-RFLP 자료를 얻었다.

2.2.4. 하천 미생물 다양성 지수

T-RFLP에서 피크로 표현되는 분류학적 단위(Operational Taxonomic Unit, OTU)는 군집구조를 나타내는 풍부도(Richness), 다양성(Shannon index), 균등도(Evenness)등으로 표현될 수 있다. 하천 미생물의 종 다양성을 표현하기 위해 7월 시료 분석결과를 이용해 시료별로 TRF의 수와 피크의 높이를 이용하여 각 지수를 계산하였다. T-RFLP 데이터를 사용하여 지수를 계산한 경우, 면적 혹은 높이를 이용하느냐에 대한 논의가 있으나(Blackwood et al., 2003) 두 방법을 비교한 결과 차이는 없었다.

서로 다른 미생물도 비슷한 크기의 TRF를 갖는 경우가 있기 때문에 특정한 크기의 TRF는 특정한 미생물 종을 나타내는 것이 아니라 하나의 OTU를 나타낸다고 가정하였다. 따라서 특정 TRF의 상대적인 면적은 각 OTU의 풍부도를 나타내는 지표로 사용하였다.

Dunbar 등(2001)이 이용한 방법에 따라 각 시료의 T-RFLP의 총 피크 면적을 계산한 후 면적이 매우 적은 피크를 제외하기 위해 전체 면적에 대한 각 피크의 상대 면적(%)을 구하였다. 시료마다 DNA양의 차이가 있기 때문에 이러한 표준화과정이 필요하다. 분석에서 전체 면적에서 차지하는 비율이 0.5% 미만이거나 높이가 상대형광단위(Relative Fluorescence Units) 75미만인 피크는 제외되었다. 생태계 다양성 지수는 단순히 종의 수를 의미하는 풍부도와는 달리 서로 다른 종 사이의 상대적인 풍부도를 고려하여 다양성을 수학적으로 표시하는 방법이다. T-RFLP에서 특정한 TRF는 하나의 생물종이나 군으로 피크가 차지하는 면적 비율은 그 종의 상대적인 풍부도로 표현되며 아래의 식을 이용하여 다양성, 균등도, 우점도 지수를 구하였다.

$$H' = - \sum (P_i \times \ln P_i) \tag{1}$$

H' : 다양성 지수(Shannon Index)

P_i : 특정피크의 면적 혹은 높이/전체 피크의 합

$$J' = \frac{H'}{\ln S} \tag{2}$$

J' : 균등도 지수

H' : 다양성 지수

S : 전체 피크의 수

$$C = \sum (P_i)^2 \tag{3}$$

C : 우점도 지수

P_i : 특정피크의 면적 혹은 높이/전체 피크의 합

3. 결과 및 고찰

3.1. T-RFLP에 의한 하천균집 구조

Fig. 2, 3은 경기도내 10개 하천 26개 지점에 대한 7월과 10월 두 차례의 T-RFLP 분석결과이다. 강우기인 7월의 경우, 강우 수일 후에 채수하였음에도 불구하고 10월의 결과와는 뚜렷이 구별되는 패턴을 보여준다. 오염도의 경우 몇 지점을 제외하고는 7월의 경우가 대체적으로 높았다.

7월의 경우, 40~400 bp 범위에 수많은 종류의 TRF가 존재하여 400 bp 이후에는 그 종류가 줄어들지만 비교적 많은 미생물 종이 하천 미생물 생태계를 구성하고 있는 것을 알 수 있다. 이것은 계절적인 영향을 반영하는 것으로 장마철에 하천 저질에 존재하는 미생물이 유속의 증가로 인해 부상하였거나 주변으로부터 비점오염원이 많이 유입되기 때문에 평상시 하천에 존재하는 미생물과 더불어 하천 저질 및 주변 토양으로부터 기원한 미생물이 많이 검출된 것으로 보인다.

10월의 미생물 균집구조는 7월과는 확연히 구별된다. 하천에서 검출되는 미생물 종수가 많이 줄어들어 적은 수의 미생물 종이 하천 미생물 생태계에서 우점하고 있는 것을 Fig. 3에서 볼 수 있다. 진위천 2, 3, 황구지천 1, 2, 3, 청미천 1, 2, 3, 북한천 1, 2, 3, 안성천 3 지점의 경우는 7월과 어느 정도 유사한 패턴을 보이거나 비교적 오염 수준이 낮은 팔당호, 북한강, 가평천, 조종천, 남한강, 진위천 1 지점 등은 앞에서도 언급되었듯이 불과 몇 종류의 미생물 균만이 하천생태계에서 우점하고 있는 것으로 판단된다. 66 bp, 602 bp, 790 bp 크기의 TRF는 거의 모든 지점에서 공통적으로 검출되고 있어서 특정한 미생물 집단은 모든 하천에 공통적으로 분포하고 있는 것으로 판단할 수 있다. 우리나라의 경우 여름철에 강우가 집중되기 때문에 계절적인 변화도 뚜렷할 것으로 보이지만, 하천 생태계에 대한

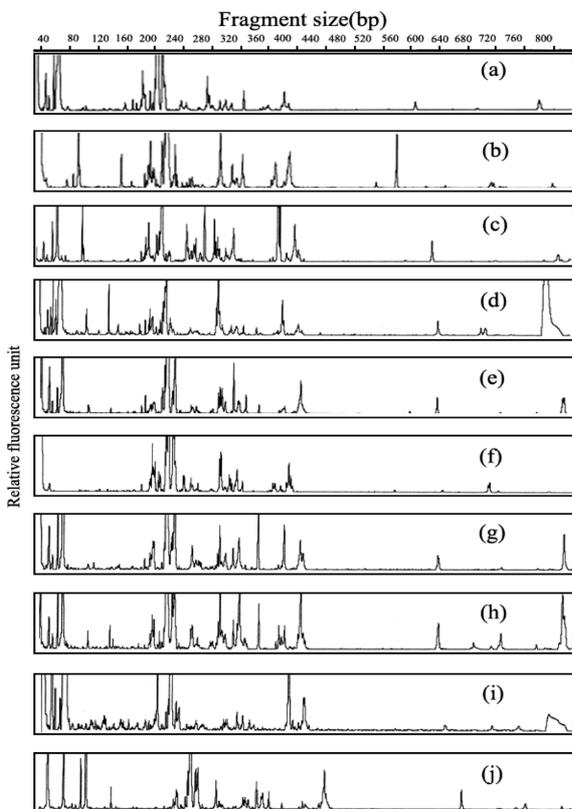


Fig. 2. T-RFLP profiles of selected sites for July. (a) Paldang Lake, (b) Gapyeong River, (c) Gyeongan River3, (d) Anyang River2, (e) Jinwi River1, (f) Hwangguji River3, (g) Cheongmi River1, (h) Cheongmi River3, (i) Bokha River3, (j) Anseong River3.

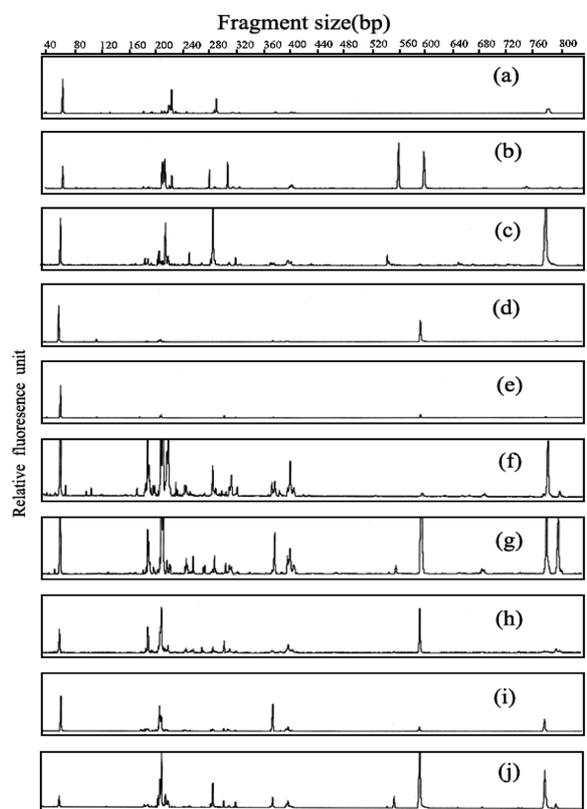


Fig. 3. T-RFLP profiles of selected sites for October. (a) Paldang Lake, (b) Gapyeong River, (c) Gyeongan River3, (d) Anyang River2, (e) Jinwei River1, (f) Hwangguji River3, (g) Cheongmi River1, (h) Cheongmi River3, (i) Bokha River3, (j) Anseong River3.

분자생물학적 연구가 거의 없는 실정이다.

T-RFLP 분석은 대상 하천의 미생물 군집 구조를 지문과 같이 명확하게 보여 주기 때문에 다양한 상황에 따른 미생물 군집 패턴 자료를 갖고 있다면 하천 생태계에 미치는 외적인 환경에 따른 하천 생태계의 반응에 대한 분석도 가능할 것으로 보인다. 이러한 미생물 군집 구조의 변화는 특정 미생물의 존재 유무뿐만 아니라 T-RFLP에서 특정 피크가 차지하는 면적의 비율로서 표현되는 특정 미생물의 수적인 변화를 통해서도 알아볼 수 있을 것이다.

3.2. 하천 미생물 군집의 다양성

Fig. 4는 각 지점별 종 풍부도를 나타낸 것이다. T-RFLP에서 종 풍부도는 하나의 TRF로 표현되는 피크 수를 말하며 두 종류의 값을 표시하였다. 첫째는 생태계 지수를 구할 때 사용한 것으로 40~610 bp 범위에서 높이 75 미만과 차지하는 면적비율이 0.5% 미만인 단편의 피크를 제외한 값이고, 둘째는 610 bp까지의 모든 피크의 수를 표시한 것이다. 지점에 따라 두 값 사이의 차이가 큰 곳과 작은 곳이 존재하며 값의 차이가 큰 곳은 높이 75 혹은 면적비율이 0.5% 미만인 TRF의 수가 많다는 것을 의미한다. Fig. 4에서 첫 번째 기준에 의한 종 풍부도의 범위는 17~46이지만 30종 전·후의 거의 유사한 값을 가지는 것으로 나타났고, 두 번째 기준에 의한 풍부도는 24~92의 범위를 가지고 각 지점마다 차이가 큰 것으로 나타났다.

T-RFLP와 비슷한 기법인 ARISA(Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)를 이용한 감조하천의 미생물 군집 분석(Hewson and Fuhrman, 2004)에 의하면 종 풍부도가 가장 높은 지점은 84~85개의 분류학적 단위(OTU)를 갖는 반면 낮은 종 풍부도를 갖는 곳은 빈 영양지점으로 39~59 OTUs를 갖는 것으로 나타났다. 이러한 미생물 풍부도의 차이는 주로 PCR을 통해 증폭된 전체 DNA의 0.1~0.5%를 차지하는 OTU에 의해 결정되는 것으로 나타났다고 한다. 이번 결과에서도 0.5% 미만의 면적과 높이 75 미만의 피크를 제외한 경우 지점마다 거의 유사한 종 풍부도를 보였으나 그러한 피크를 포함한 경우에는 각 지점별로 차이가 큰 것으로 나타났다. 따라서 지점별 종 풍부도는 적은 수로 존재하는 미생물에 의해 결정되는 것으로 판단된다.

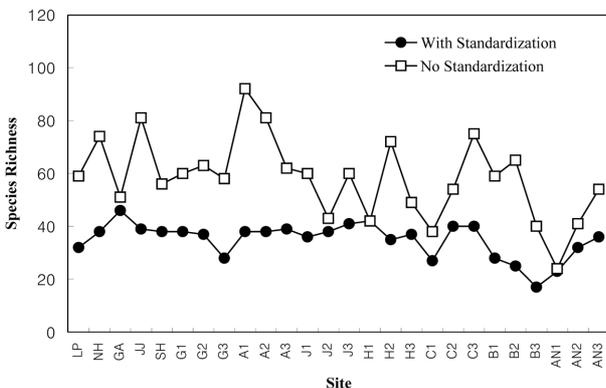


Fig. 4. Microbial species richness with/without standardization.

Fig. 5는 각 지점별 다양성 지수를 나타내며 복하천3 지점의 2.1로부터 가평천의 3.3까지 대체로 3.0 전후의 값을 갖는 것으로 나타났다. 국내의 경우, 하천 생태계를 평가하기 위해 수서곤충, 어류 등을 이용한 경우는 많으나 분자생물학적 방법을 이용한 경우는 거의 없어서 비교할 대상이 존재하지 않았다. RFLP와 클로닝을 이용하여 지하수를 대상으로 한 미생물 군집 다양성 연구(Cho and Kim, 2000)에서 축산폐수로 오염된 지하수가 4.2~4.6 범위의 값을 가지지만 오염이 안 된 지하수는 2.5~2.6 범위의 다양성 지수를 가지는 것으로 나타나 축산폐수의 유입에 의해 다양성이 증가한 것으로 나타났으나 본 연구에서는 오염도와 다양성 지수사이의 연관성을 찾아볼 수 없었다. 하지만 T-RFLP와 같은 유전자지문분석법을 이용하면, 외부로부터의 특정 오염물 유입과 같은 환경 변화에 대응하여 나타나는 하천 미생물 생태계 구조의 변화 특성 분석도 가능할 것으로 판단된다.

분자 생물학적 기법을 이용한 다양성 분석은 자연 생태계뿐만 아니라 활성 슬러지와 같은 인공적인 생태계에도 적용할 수 있다. 예를 들어, 폐놀 쇼크를 주었을 때 미생물 생태계 구조의 변화를 TGGE(Temperature Gradient Gel Electrophoresis)기법을 사용해 분석한 결과, 다양성 지수(Shannon index)가 1.13에서 0.22로 감소하여 유해 오염물질이 유입될 경우 미생물 군집 다양성이 감소하였다. 폐놀을 분해할 수 있는 유전자 변형 미생물을 접종하였을 경우에는 그 감소 정도가 줄어서 1.13에서 0.82로 감소하였다고 한다(Eichner et al., 1999). T-RFLP를 이용해 PAHs(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)가 퇴적토의 미생물 군집 구조에 미치는 영향을 조사한 권계경 등(2004)에 따르면, 미생물 군집의 구조는 오염물질인 PAHs보다는 온도, 공극률, 유기물 함량 등에 더 직접적으로 영향을 받는다고 한다.

Fig. 6, 7은 지점별 균등도와 우점도를 나타낸다. 균등도는 0.68~0.88 범위의 값을 가지며 대체로 0.80 전후의 값을 가지는 것으로 계산되었다. 우점도 값은 0.06~0.18 범위를 가지며 복하천2, 3 지점이 0.18로 가장 높은 것으로 나타났다. 균등도와 우점도는 서로 반비례 관계이기 때문에 균등도가 높으면 우점도가 낮게 된다. 앞에 언급된 Cho and Kim(2000)에 따르면, 축산폐수로 오염된 지하수의 경우 균등도가 0.93 정도로 오염이 안 된 지하수의 0.70 전후

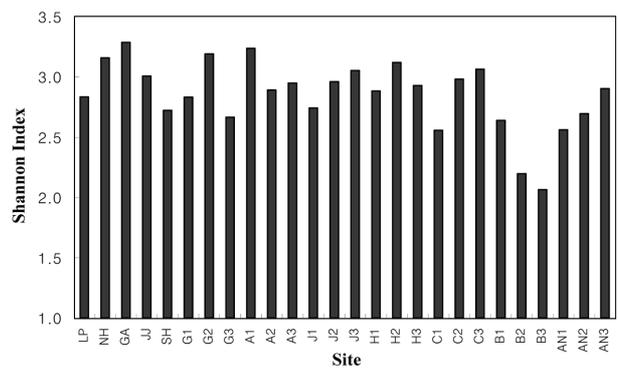


Fig. 5. Microbial diversity (Shannon index) for targeted sites.

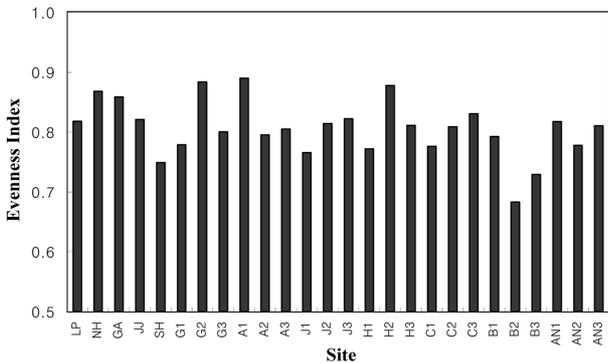


Fig. 6. Microbial evenness index for targeted sites.

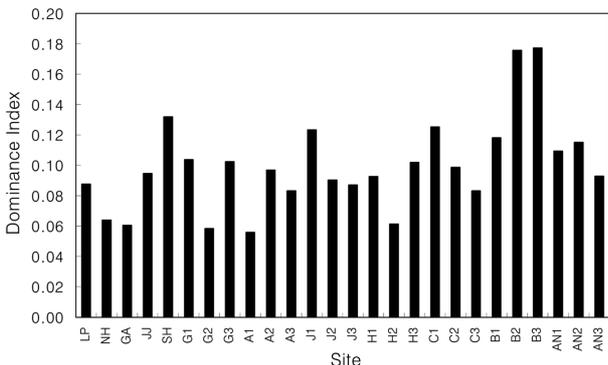


Fig. 7. Microbial dominance index for targeted sites.

값보다 균등도가 높고 우점도는 낮아 오염에 따라 균등도 값이 커지는 것으로 나타났다.

4. 결론

하천 미생물 생태구조를 파악하기 위해 하천별 유전자지문, 종 풍부도, 다양성, 균등도, 우점도 등을 도출하여 평가한 결과 분자생물학적 유전자지문분석법인 T-RFLP 기법이 하천생태계 연구에도 유용하다는 것을 확인하였다.

T-RFLP 분석은 전통적인 배양법과는 달리 대상 하천의 미생물 군집 구조를 지문과 같이 명확하게 보여 주기 때문에 계절적, 오염도 등의 다양한 상황에 따른 미생물 군집 패턴 자료를 갖고 있다면 외적인 환경 변화에 대한 하천생태계의 반응 분석도 가능할 것으로 보인다.

현재 우리나라의 하천생태계 다양성 평가는 대부분 저서성 대형무척추동물, 어류, 부착조류 등 눈에 보이는 생물을 대상으로 하고 있으나, 이러한 평가방법은 시간, 대상생물, 연구자의 판단 등 여러 요인에 따라 편향된 결과를 나타낼 수 있다. T-RFLP 같은 분자생물학적 유전자지문분석법은 배양조건이나 동정과 같은 주관적인 요인의 배제가 가능하므로 배양되지 않으나 자연 생태계에서 중요한 기능을 하고 있는 다수의 미생물을 평가에 포함시킬 수 있을 것이다.

그러나 미생물 다양성을 분석하는 도구로 T-RFLP를 포함한 유전자지문분석법은 방법의 한계성 때문에 회의적인 시각이 있는 것도 사실이다. Bent 등(2007)이 주장하는 한계점은 1)유전자지문분석법이 비교적 많이 존재하는 미생

물만을 검출하여 실제보다 풍부도를 낮게 평가하며, 2)또한 유전자지문분석법으로 미생물의 분류군을 종 수준에서 정확하게 판별해내지 못하여, 이런 방법을 이용한 미생물 군집분석을 생산적이지 못한 활동(Unproductive exercise)이라고 주장하였다.

그렇지만 대개 미생물 군집분석 목적은 대상 시료에 존재하는 모든 미생물의 수를 결정하는 것이 아니라 주로 어떤 자극에 대해 미생물 군집 변화나 비슷한 조건을 갖는 생태계의 미생물 다양성 비교 같은 비교분석을 위한 것이다. 본 연구는 하천 미생물 다양성을 평가하는 하나의 방법으로 T-RFLP를 이용하였으며 보다 장기적인 조사를 실시하고 클로닝 방법 등을 병행한다면 하천 생태계를 구성하는 미생물의 다양성과 미생물 군집을 이해하는데 하나의 대안이 될 것으로 생각된다.

참고문헌

권계경, 정성영, 이정현, 김상진, 현정호(2004). 다환방향족 탄화수소가 광양만 퇴적토의 미생물 군집구조에 미치는 영향. *환경생물학회지*, **22**, pp. 38-46.

Bent, S. J., Pierson, J. D., Forney, L. J., Danovaro, R., Luna, G. M., Dell'Anno, A. and Pietrangeli, B. (2007). Measuring species richness based on microbial community fingerprints: the emperor has no clothes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**(7), pp. 2399-2401.

Blackwood, C. B., Marsh, T., Kim, S. H. and Paul, E. A. (2003). Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(2), pp. 926-932.

Brummer, I. H., Fehr, W. and Wagner-Dobler, I. (2000). Bio-film community structure in polluted rivers: abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(7), pp. 3078-3082.

Cho, J. C. and Kim, S. J. (2000). Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(7), pp. 956-965.

Crump, B. C., Armbrust, E. V. and Baross, J. A. (1999). Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(7), pp. 3192-3204.

Dunbar, J., Ticknor, L. O. and Kuske, C. R. (2001). Phylogenetic Specificity and Reproducibility and New Method for Analysis of Terminal Restriction Fragment Profiles of 16S rRNA Genes from Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(1), pp. 190-197.

Eichner, C. A., Erb, R. W., Timmis, K. N. and Wagner-Dobler, I. (1999). Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl Environ Microbiol.*, **65**(1), pp. 102-109.

Gonzales-Toris, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E. O., Amann, R. and Amils, R. (2003). Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto river. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(1), pp. 102-109.

- Microbiol.*, **69**(8), pp. 4853-4865.
- Head, J. M., Saunders, J. R. and Pickup, R. W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial ecology*, **35**(1), pp. 1-21.
- Hewson, I. and Fuhrman, J. A. (2004). Richness and diversity of a bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton bay, Australia. *Appl. Envir. Microbiol.*, **70**(6), pp. 3425-3433.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M. and Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. of bacteriol.*, **180**(18), pp. 4764-4774.
- Mehta, M. P., Butterfield, D. A. and Baross, J. A. (2003). Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-Sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca ridge. *Appl. Envir. Microbiol.*, **69**(2), pp. 690-670.
- Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G. and Herndl, G. J. (1999). Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Envir. Microbiol.*, **65**(8), pp. 3518-3525.
- Murray, A. E., Preston, C. M., Massana, R., Taylor, L. T., Blaski, A., Wu, K. and DeLong, E. F. (1998). Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers island, Antarctica. *Appl. Envir. Microbiol.*, **64**(7), pp. 2585-2595.
- Page, K. A., Connon, S. A. and Giovannoni, S. J. (2004). Representative freshwater bacterioplankton isolated from Crater Lake, Oregon. *Appl. Envir. Microbiol.*, **70**(11), pp. 6542-6550.
- Somerville, C. C., Knight, I. T., Straube, W. L. and Colwell, R. R. (1989). Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Appl. Envir. Microbiol.*, **55**(3), pp. 548-554.