

Basic Concepts of Bacterial Taxonomy

Young Sook Kim¹, Sook-Jin Jang²

Departments of ¹Radiology, and ²Laboratory Medicine, Chosun University College of Medicine, Gwangju, Korea

The three components of taxonomy are classification, nomenclature and identification. Traditionally, bacterial classification and identification were performed based on the morphology and the biochemical data of the bacteria. In newer theories, or so-called natural concepts, the relationships between bacteria are based on the overall similarities of both the phenotypic and genotypic characteristics. The polyphasic taxonomy, or current taxonomy, describes the integration of all of the available genotypic, phenotypic, and phylogenetic information into a consensus type of general-purpose classification. When routine identi-

fication methods that are based on the biochemical tests fail, alternative procedures such as complete 16s rRNA gene sequence analysis are required. Although the results of 16s rRNA gene sequence analysis have not been fully discriminatory to differentiate closely related species, they may guide the additional analyses that are required for species identification. (Korean J Clin Microbiol 2012;15:79-87)

Key Words: Bacteria, Classification, Identification, rRNA genes, Taxonomy

서 론

분류학은 계통 분류학(systematics)의 동의어로 분류(classification), 명명법(nomenclature) 및 동정(identification)의 세 과정으로 나뉜다.

분류는 유사성(similarity)에 근거를 두어 분류학적 군(taxonomic group) 안으로 세균을 체계적으로 배열하는 것이다. 명명법은 세균의 이름을 정하는 것이고 동정이란 미지의 세균이 서술된 균종들 중 어떤 종에 속해있는지 여부를 결정하는 과정이다[1]. 모든 분류는 인간이 그 경계를 결정하여 이루어지는 인공적인 과정이다.

본 론

1. 세균의 분류

연구 기법이 기술적으로 발전함에 따라 종에 대한 개념도 진화하게 되었다. 그에 따라 박테리아의 계통 분류학에 있어서 균종을 서술하는 과정 역시 크게 변화하고 있다. 이전의 분류 체계는 주로 생화학과 형태학적 기준에 근거를 두어서 세균의 종을 서술하였다. 이러한 초기 분류의 개념이 자연적 관계에 주안을 둔 소위 자연적 개념이라고 불리는 이론에 의해서 치환이 되었는데 이는 표현형(phenetics) 및 계통발생학적인 분류법

이다[2]. 즉 표현형과 유전형적인 특성 둘 다의 전체적인 유사성에 근거를 두어 세균들 간의 관계를 기술한다. 표현학적 분류는 그들의 조상이나 진화하고는 상관없이 그들이 나타내는 표현형에 따라 분류를 하는 것을 말한다. 계통발생학적인 분류에서는 현재 보이는 특성에 따르는 것이 아니라 계보에 따라서 분류를 한다.

1) 종 서술의 기준: 종을 서술하는데 사용하는 기준은 기술이 발전함에 따라 발전하였다. 초기의 분류는 형태와 생화학적 자료에 근거를 두어서 이루어졌다. 현행 관점의 방법으로 보면 표현형에 근거한 이러한 초기의 분류 중 많은 것이 극히 이질적인 세균 집단을 포함한 것으로 보인다. 개개의 종들마다 특징적인 공통의 표현형이 있지만, 다른 종과 한 가지 또는 몇 가지의 중요한 특성이 서로 달라서 다른 종으로 인지된다.

컴퓨터 기술이 도입되면서 다수의 균주들에 대한 큰 세트의 특징들을 비교할 수 있게 되었고 그것이 표현학적 분류법의 근거를 형성한다. 표현형적인 특성의 수치적(numerical) 분석은 객관성과 안정성에 있어서 더 우월한 분류법이다. 점차 화학분류학적(chemotaxonomic) 또는 유전형적(genotypic) 기법이 분류시스템에 도입이 되었다.

1987년 세균분류법의 조정을 위한 Ad Hoc 위원회에서 분류학은 계통발생학적으로 결정되어야 한다는 것과, 종을 결정할 때 전체의 유전체 염기서열이 기준이 되어야 한다는 것이 선포되었다[3]. 현재 가능한 방법 중에서는 전체-유전체 DNA-DNA교잡(whole-genome DNA-DNA hybridization) 분석법이 염기서열 표준에 가깝기 때문에 최적의 적용 가능한 방법으로 인정받고 있다.

Received 11 February, 2012, Revised 14 March, 2012

Accepted 25 March, 2012

Correspondence: Sook-Jin Jang, Department of Laboratory Medicine, Chosun University Hospital, 588 Seoseok-dong, Dong-gu, Gwangju 501-717, Korea. (Tel) 82-62-220-3272, (Fax) 82-62-232-2063, (E-mail) sjbjang@chosun.ac.kr

세균의 종은 DNA-DNA 관련성이 70% 이상이고 ΔT_m 이 5°C 이하인 한 무리의 군주들(표준군주 포함)로 정의된다. T_m 은 혼성체(hybrid)의 용해 온도인데 단계적으로 변성을 시행하면서 T_m 을 측정한다. ΔT_m 은 표준 조건에서 형성된 동종 혼성체(homologous hybrid)와 이종 혼성체(heterologous hybrid) 사이의 T_m 값(섭씨 온도)의 차이로 정의된다[4]. 이러한 종의 정의는 DNA-DNA 교잡 데이터와 다른 특징들을 포함한 다량의 경험적인 데이터를 근거로 내려졌다. 이런 종의 정의와 화학분류학적 및 표현형적 특징들이 일치되는 것이 바람직하다.

몇 가지 단순하고 직접적인 검사들을 한 결과가 DNA-DNA 교잡(DNA-DNA hybridization) 값에 근거한 군종의 서술 내용에 합당하여 그 분류의 적합성을 보증해준다면 더 좋을 것이다.

군주의 DNA-DNA 교잡 방법에 의해서 서로 다른 종으로 기술된 군주군이 만약에 표현형적인 특성으로 감별될 수 없다면 이것은 종이라고 이름을 붙여서는 안 된다. 이와 같이 표현형적으로 유사한 유전체 종(genomic species)을 위하여 “genomovar”라는 이름이 뒤이어 도입되었다[5].

2) 다상적(polyphasic) 종 개념: Colwell[6]이 제안한 “다상적 분류학(polyphasic taxonomy)”은 유전형적, 계통발생학적, 화학분류학적(chemotaxonomic), 표현형적 특징들에 대한 수많은 다른 타입의 분석법을 적용하여 얻은 결과와 수집 가능한 모든 정보를 통합할 뿐만 아니라 각 정보간의 연관성에 대해 평가하여 공감할 수 있는 유용한 형태의 분류를 하는 것이다.

세균 분류에 이용되는 여러 방법 중 DNA 수준의 분석 방법에는 DNA 염기(base) 구성을 평가하는 것과 유전체 크기(genome size), 전체 유전체 교잡, 제한효소분석의 평가, 다양한 유전자들의 직접염기서열분석 등이 포함된다. rRNA 단편(fraction)은 계통발생학적인 표지자이기 때문에 특히 더 많이 연구되어 왔다[7].

여러 가지 화학적인 복합체로 지방산이나 미콜산(mycolic acid), 극성 지방, 다당류, 당(sugars), polyamines, 호흡성 quinones, 그리고 다수의 표현된 특징들(형태학적인, 혈청학적인, 효소학적인 연구에서 파생된 자료들)이 모두 세균들의 특성을 연구하는데 사용되어 왔다[1]. 다상적 분류학은 계통발생학에 근거를 두며, 세균분류에 사용하는 계통발생학적인 체계의 추론을 위한 rRNA의 특징적 특성(signature features)과 염기서열 분석을 사용한다. ATPase의 beta subunit, elongation factor Tu, chaperonin, 다양한 리보솜 단백질, RNA polymerase 그리고 tRNA와 같은 여러 가지 다른 고분자들이 비슷한 잠재력을 가지고 있다[7,8]. 분류 과정에서의 다음 단계는 개별적인 군종과 그 외의 분류군들을 계통발생학적 가지 안에서 도해하는 것이다. DNA-DNA 교잡은 단점이 있음에도 불구하고 군종 도해의 초석을 이루고 있다. 그러나 종 분류를 위한 기준 역치에는 상당한 변이가 있다는 것을 허용해야만 한다. 이 다상적 접근법은 경험적이고 실용적인 방법이다. 예를 들어서 *Bordetella per-*

*tussis*와 *B. parapertussis* 그리고 *B. bronchiseptica*는 DNA-DNA 교잡 수준이 80% 이상으로 매우 높지만 세 가지의 다른 종으로 여겨지는데 이는 많은 표현형적 및 화학분류학적 측면에서 그들이 서로 다르기 때문이다[9]. *Acidovorax*처럼 표현형적으로 좀 더 균질적인 다른 속(genera)에서는 DNA-DNA 교잡 수준이 최소 40%인 한 무리의 군주들을 같은 종으로 정의 내린다[10]. 군을 분류하기 위해 종을 구분하는 경계선을 선택할 때는 군 동정을 촉진할 수 있도록 역치를 유연하게 설정하는 게 필수적이다.

다상적 종 개념은 Wayne 등이 DNA-DNA 교잡 수준에 따라 기술한 종개념에 비해 덜 분명하다는 것이 확실하다. 엄격한 정의나 확고한 규칙과 가이드라인이 없기 때문에 가능한 해석이 너무 많다는 점과 상식에 바탕을 두어 결론을 도출한다는 점이 그 단점이다[4].

세균 특성을 분석하여 그들의 유전적 다양성의 구조를 도출할 때 특징적인 클론들이 안정적으로 나타나게 되는데 이렇게 클론으로 드러나는 일군의 분리주를 세균의 종이라고 부른다. 클론들은 상당한 표현형적인 일관성과 유의한 수준의 DNA-DNA 교잡, 고도의 16S rRNA 염기서열 유사성을 가지고 있다는 특징이 있다.

세균 분류학에서 종은 가장 중심적이면서 중요한 요소이다. 현재로서는 속(genus)이나 과(family), 목(order)과 같은 더 높은 계층의 계급(ranks)을 기술하는 것에 대한 어떠한 규칙이 없다. 속 수준의 분류군들이 표현형적인 기술에 의해서 지지될 수 있을 것으로 기대되긴 하지만 실제로는 더 높은 계급의 분류는 16S rRNA 염기서열비교와 그로 얻어진 군집의 안정성 분석에 근거를 두어서 기술이 되고 있는 경우가 대부분이다.

3) 새로운 종 개념: 원핵생물(prokaryotic) 군종들 간의 진화적인 관계를 평가하는데 유전체 염기서열 데이터를 사용하는 것에 대해 관심이 커지고 있다. 뉴클레오타이드 치환과 함께 다른 유전적인 변화, 예를 들면 유전자 손실, 유전자 중복, 수평적 유전자 전이, 염색체 재배열과 같은 유전적인 변화들이 유전체의 특성을 결정한다. 어떤 군주들 간에 유전체의 상당부분이 그 군주에게 독특할 수 있다는 것은 분명하다[11,12]. 다수의 전체 유전체 염기서열이 이용 가능한 군종들의 수가 증가되어가면서 밀접하게 관련된 군종들에 대한 분류학적 관계 즉 중간 및 종내 관련성을 평가하는 새로운 접근법들이 가능하게 되었다.

이들 새로운 접근법에는 유전자 정보를 분석하거나 유전자 순서, 유전자 염기서열의 비교분석법, 보존된 고분자나 다른 고분자들, 또는 전체의 유전체에 대해서 염기서열의 비교 연구를 하는 것, 그리고 유전자의 유무에 대한 분석, 뉴클레오타이드의 특징적 구성(nucleotide signature composition) 분석, 그리고 대사경로 반응내용 분석(metabolic pathway reaction content analyses) 등이 포함된다. 다수 유전자자리 염기서열 분석(multilocus sequence analysis, MLSA)은 상당히 장래성이 높은 또 다른

새로운 접근 방법이다.

MLSA와 다수 유전자자리 염기서열형 검사(multilocus sequence typing, MLST)는 세균 유전체에 있는 4-10가지 살림유전자(housekeeping gene) DNA 연쇄에 근거를 두어 분석하는 유형분석 체계이다. 각각의 살림유전자를 PCR 증폭하여 염기서열분석한 후 비교분석한다.

MLST의 목적은 연구대상 균주들이 속해있는 군종의 집단 유전학, 분자적 진화 및 역학을 밝히는 데 있는 반면 MLSA의 목적은 군종이 가진 유전자 분절의 염기서열을 증폭하여 계통 분석을 함으로서 군종 묘사를 더 잘하는데 있다[13]. 그러므로 MLST는 대부분 잘 정의된 군종에 속해있는 균주들에 적용하는 반면, MLSA는 종의 경계가 잘 알려지지 않은 경우에 더 자주 사용되며 같은 속(*genera*)이나 다른 속에 속한 서로 다른 군종을 대표하는 균주들을 대상으로 하는 경우가 흔하다. MLST에서는 각각의 살림유전자 자리마다 그 군종이 보유한 대립유전자에 따라 숫자가 할당된다. 균주간의 유사성과 차이점에 따라 대립유전자 숫자구성 내역(*allelic profiles*)이 달라진다. 유전자 자리마다 모두 같은 대립유전자를 가진 균주들은 동일한 연쇄형에 속한 것으로 간주된다. MLST에서 대부분의 하부 분석(downstream analyses)은 대립유전자 숫자와 염기서열형에 근거를 둔다. 반면 MLSA에서는 실제의 DNA 염기서열이 하부 분석에서 사용된다. MLSA에서는 얻어진 유전자 염기서열을 전통적인 계통발생학적 분석에 사용되는 소프트웨어를 사용하여 비교연구한다[13] (Fig. 1). 서로 밀접히 관련된 종에 속한 균주들 내부나 상호간의 관계를 묘사하기 위해서 이 접근법은 16S rRNA 유전자 염기서열 분석보다 우월한 해상도를 약속해 준다. 도출된 계통나무는 계통발생학적 척추(*phylogenetic*

backbone)를 제공해 줄 뿐만 아니라 16S rRNA 유전자 염기서열 비교분석으로는 더 이상 분별이 될 수 없는 수준에서도 군종 내(*intraspecies*)의 관계를 감별할 수 있게 해준다[1].

2. 분류 기법들

모든 유전형적, 표현형적, 계통발생학적인 정보는 세균을 분류하는 데 사용될 수 있다. 유전형 정보는 세포 내에 있는 핵산(DNA와 RNA)으로부터 파생되는 반면 표현형 정보는 단백질들과 그들의 기능, 서로 다른 화학 분류학적 표지자(*chemotaxonomic markers*) 및 다양한 다른 표현되는 특질들에 의해서 나온다. 여러 방법들 중에서 작업에 사용할 방법을 선택할 때 관심을 두어야 할 점은 이들 방법들이 제공하는 정보의 수준과 기술적 복잡성, 소요 시간과 작업량 등이다.

1) 유전형적 기법

(1) DNA-DNA 교잡 연구: 현재 DNA-DNA 교잡법은 종간 및 종내 관련성을 확립하는 데 있어서 표준방법으로 인정받고 있다. DNA-DNA 교잡(DNA-DNA hybridization)은 일반적으로 DNA 염기서열들 간의 유전적 유사도 정도를 측정하는 분자생물학적 기법을 지칭한다. 대개 이 기법을 사용하여 DNA 염기서열들 간의 유사도 값을 측정하여 두 군종 간의 유전적 거리를 측정할 수 있다. 유사도 검사치에 근거를 두어 산출된 계통나무로 종들 간의 관계를 파악하고 분자적 분류학을 수행할 수 있게 된다.

이 기법의 개요를 설명하면 먼저 서로 다른 종들의 DNA를 조합결합시켜 DNA 혼성체가 형성되게 한다. 이렇게 형성된 이질(異質)두가닥(*heteroduplex*)의 온도 안정성(*thermal stability*)을 검사하면 종들 유전체의 유전적 차이점(*genetic diverge-*

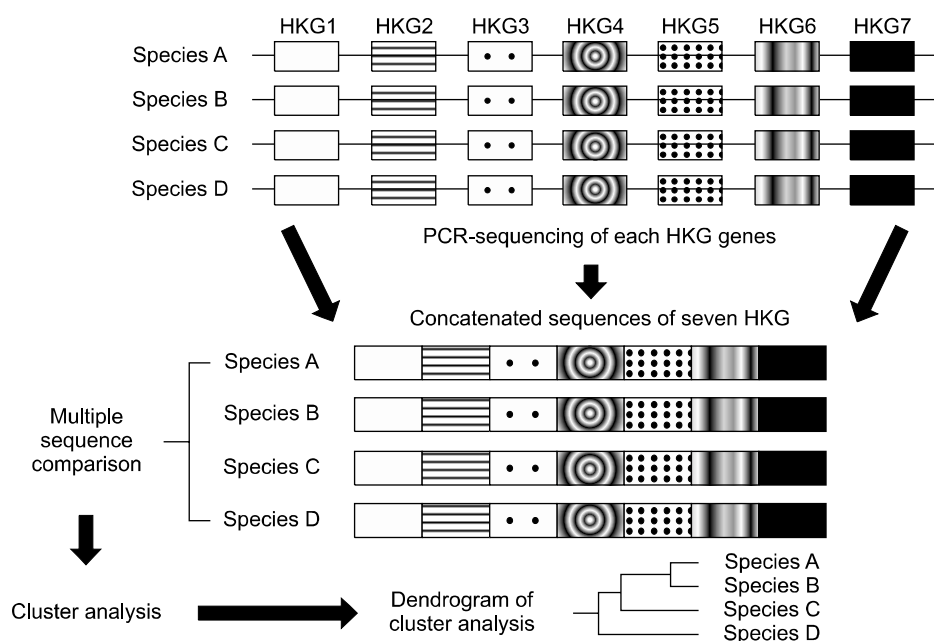


Fig. 1. Schematic diagram showing procedure of multilocus sequence analysis (MLSA). The concatenated sequences of seven house keeping genes (HKG) are used for phylogenetic analysis of four species of bacteria to improve species descriptions in this figure.

nce)를 평가할 수 있다[14]. 그 술식을 보면, 먼저 한 균종의 DNA에 표지를 붙인 후 그와 비교할 DNA와 서로 섞어준다. 그 혼합물을 DNA 가닥들이 해리되고 재결합하여 잡종 두 가닥 DNA (hybrid double-stranded DNA)가 형성되도록 놓아둔다. 상동성이 높은 잡종 연쇄들은 더 견고하게 결합하므로 그들을 분리하려면 더 많은 힘이 필요하다. 즉 DNA 용해 과정에서 비교해보면 그들은 짧지 않은 연쇄에 비해 더 높은 온도에서 가열할 때 분리된다. 용해 분석도표를 작성하기 위해 두 가닥 DNA를 검사 column에 가둬두고 혼합물을 소폭씩 단계적으로 가열한다. 가열로 용해되어 한 가닥으로 된 연쇄들은 column을 세척할 때 씻겨 내려간다. 각 온도 단계에서 용해되어 씻겨 나오는 연쇄들을 파악하여 각 이종혼성체마다 어떤 온도에서 용해되는지 기록한다. 표지된 DNA가 column을 빠져나간 온도들은 연쇄들 간의 유사도 값을 반영해 준다. 동종 혼성체 (homologous hybrid)와 이종 혼성체 (heterologous hybrid) 사이의 T_m 값의 차이인 ΔT_m 값이 낮은 경우는 혼성체 DNA가 원래의 DNA와 아주 유사하여 잘 결합하였으므로 밀접히 연관된 종에서 파생되어 나왔음을 의미한다[14] (Fig. 2).

조사대상 세균과 비교대상으로 삼은 다른 세균들의 연쇄들도 마찬가지로 과정을 거쳐서 검사한다. 이때 자신과 보합결합한 동종혼성체를 대조군으로 사용한다. 이러한 결과들을 종합하여 각 군들 간의 유전적 유사도 정도를 측정한다.

많은 DNA-DNA 교잡 프로토콜이 기술되었는데 그 교잡이 최적의 조건에서 했는지, 엄격한 조건에서 했는지, 적정 조건이 아닌 조건에서 수행했는지 분명치 않은 경우가 자주 있다. 이

방법이 표준방법이기 때문에 교잡법에 대한 적정 조건에서 검사하는 게 선호된다[15].

서로 다른 기법에 의해 산출된 교잡 값을 정량적으로 비교할 때는 주의 깊게 해야 한다. 서로 다른 방법이 사용 되었을 때는 DNA-DNA 관련성을 다음의 카테고리로 구분하는 것이 더 안전하다. 즉, '높은 DNA-DNA 관련성'이나, '낮지만 유의한 DNA-DNA 관련성', 또는 '유의하지 않은 DNA-DNA 관련성' 등으로 분류를 하는 것이다. '높은 DNA-DNA 관련성'이란 단일한 종에 속해있는 균주들 간의 관련성을 나타낸다. '낮지만 유의한 DNA-DNA 관련성'이란 종을 분리하는데 사용하는 구분값(cut off)보다는 낮은 교잡 수준이지만 의미가 있는 교잡 수준을 말한다. 이런 범위를 어떻게 정할 것인가는 주로 사용한 기법에 따라 결정을 한다. '유의하지 않은 DNA-DNA 관련성'이란 사용된 방법으로는 측정할 수 없을 정도로 너무 낮은 DNA-DNA 교잡 정도를 말한다.

(2) rRNA 유사성 연구: rRNA는 계통발생학적 관계를 연구하는 데 가장 좋은 표적(target)으로 받아들여지고 있다. 적절한 시발체들을 선택하여 일부 또는 거의 전체의 16S나 23S rRNA 분자들을 PCR 기법에 의해서 증폭하여 직접 염기서열결정 (direct sequencing)하는 것이 흔히 실행되고 있는 방법이다. 이들의 염기서열들은 현대의 세균 분류학의 척추로 사용되고 있는 계통발생학적인 골격을 제공해 주고 있다[16,17]. 검사한 보존 요소(conserved elements)의 영역이 클수록 그것들이 함유하고 있는 정보가 더 많고 거기에서 나온 결론이 좀 더 믿을 만하다. 세균 rRNA 유전자에 보편적인 염기서열의 motifs가 있기

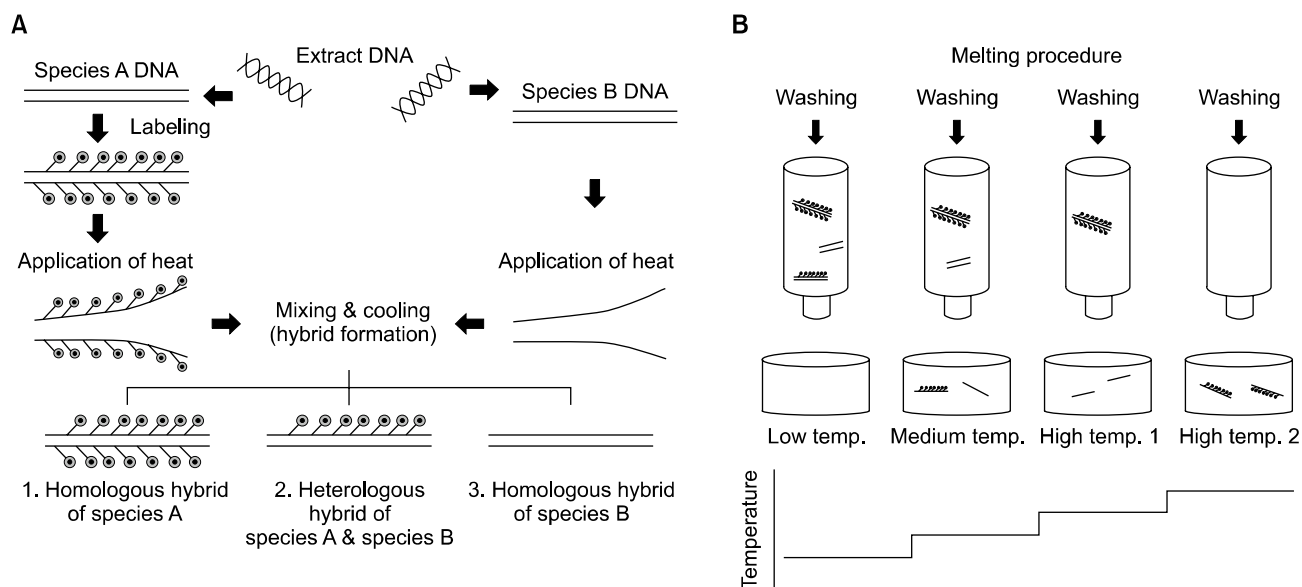


Fig. 2. Schematic diagram showing DNA-DNA hybridization procedure. (A) The DNA-DNA hybridization step. The DNA of two species of bacteria are heated and mixed together. During incubation, the DNA strands were dissociated and reannealed forming three kinds of hybrid double-stranded DNAs, (B) the melting procedure to analyze the melting profile of the hybridized DNA. The double-stranded DNA is bound to a column and the mixture is heated in small steps.

때문에 분류학자들이 배양될 수 없는 세균을 분류할 수 있게 되었고 배양하지 않은 채 각각의 세균을 있는 자리에서 검출(*in situ* detection)하고 계통발생학적 동정을 시행할 수 있게 되었다[18].

그러나 최근에 속(*genera*)이나 과(*family*), 다른 더 높은 등급의 세균들과의 관계를 측정하는 데 더 이상 rRNA 염기서열 분석만 단독으로 사용될 수 없다는 것을 알게 되었다. rRNA 염기서열 분석은 DNA-DNA 교잡을 대신하여 분류학적인 실무에서 종을 서술하기 위해서 쓰이는 경우가 자주 있다. 많은 경우에 있어서 이러한 rRNA 상동성 데이터의 적용은 부적합하다. Fox 등[19]은 표현형적으로 유사한 세 가지 *Bacillus* 균주들이 rRNA 연쇄 유사성은 99.5% 이상을 나타낸 반면 DNA-DNA 교잡 실험은 그들이 두 개의 서로 다른 종에 속해있음을 보여줬기 때문에, 16S rRNA 연쇄의 동일성이 종 동정을 보증하는데 항상 충분한 것은 아니라는 것을 보고하였다.

Stackebrandt와 Goebel[20]은 세균학에서 현재의 균종 정의에 있어서 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법과 DNA-DNA 교잡법의 위치에 대해서 보고를 하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법은 DNA-DNA교잡 방법보다 측정하기가 더 쉬우면서 연쇄분석능도 우수한 편이다. 16S rRNA의 주요 구조는 고도로 보존적이어서 DNA-DNA 교잡법 시행 시 70% 이상의 DNA 유사성을 가진 종은 대개 연쇄 상동성(sequence identity)이 97% 이상이다[20]. 그들의 광범위한 문헌 재검토는 97% 이상의 rRNA 상동성을 가진 세균들이 단일 종에 속할 수도 있고, 아닐 수도 있다는 것을 나타내 주었고, 밀접하게 연관된 세균의 관련도를 측정하기 위한 16S rRNA 유전자 염기서열 분석의 해상도는 일반적으로 낮다는 것을 드러내 주었다[18]. 97% 이하의 16S rRNA 유전자 염기서열 상동성을 가진 세균들은 검사에 이용된 DNA-DNA 교잡 방법의 종류에 상관없이 60% 이상의 DNA-DNA 교잡 수준을 보이지는 않는다[20].

검사대상 균이나 문헌에 따라 속과 종을 정의하는 해석기준이 다른 경우가 흔하기 때문에 임상 검사실에서 일관성 있고 표준화된 보고를 하기 위해 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법으로 세균을 동정하기 위한 해석 기준에 대해 합의된 문서를 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에서 발표하였다[21]. CLSI 기준이 균에 따라 다르지만 일반적으로 % 상동성이 99% 이상이면 다른 종과 0.5-0.8% 정도 이상의 차이를 보이면 종 수준까지 보고를 하고, 97% 이상이면 속 수준까지 보고한다.

rRNA 염기서열 분석에서 모든 관련된 분류군들의 rRNA 염기서열 데이터를 모아 비교했을 때 어느 균이 rRNA 상동성 수준이 97% 이하이면 새로운 종을 나타내는 것으로 볼 수 있으며 이런 경우 rRNA 염기서열 분석이 DNA-DNA 교잡 실험을 치환할 수 있는 것으로 여겨진다[1].

그러나 최근의 연구들이 *Epsilonproteobacteria*에 속해 있는

여러 종의 균주 중에서 16S rRNA 유전자의 종내(*intraspecies*) 차이가 커서 4.5%까지 이른다고 하였다[22,23].

단일 염기서열 분석에 근거를 두어서 결론을 내리는 것은 신중하게 해야 한다는 것이 분명하다. 1995년 Clayton 등[24]은 Genbank 데이터베이스에 나와 있는 중복된 rRNA 염기서열을 자세히 비교해 보았을 때, 균주들 간 및 동일 균주 내에서 예상치 않았던 높은 정도의 종내(*intraspecies*) 변이가 16S rRNA 유전자 염기서열에서 관찰이 되었다고 하였다. 이러한 변이성(*variability*)의 원인을 추정해보면 단일 균주 내부에 있는 오페론 간 변이나, 균주들 사이의(*strain-to-strain*) 변이에 기인하거나 균주 동정 오류나 염기서열결정 오류, 다른 검사 오류에 의해서도 일어날 수 있다고 본다. 그래서 데이터베이스에서 염기서열을 아주 주의 깊게 선택하고 사용하는 것이 필요하다. 최근에 Jaspers와 Overmann 등[25]이 단일 세균의 내부에 있는 16S rRNA 유전자들 간에 상이점이 있다는 것과, 서로 많이 다른 유전체나 환경생리(*ecophysiology*)에 속해 있는 세균에서 그 염기서열이 동일하다는 것을 발표하였다.

다른 대체 검사법을 개발하기 위해 수많은 다른 고분자들에 대해 그들의 생물학적인 시계(*chronometer*)로서의 잠재능에 대해서 조사가 되었다. 그들 중에서 다양한 리보솜 단백질, ATPase의 beta 소단위, elongation factor Tu, chaperonin, RNA polymerases 그리고 망간-의존성 superoxide dismutase 등이 유용한 분자적 시계로 세균분류학에서 사용될 수 있음이 드러났다. 대체용 고분자는 세균들 속에서 전반적으로 다 존재해야 되고 수평전이가 되지 않아야 하며 그들의 분자적 진화 속도가 16S rRNA 유전자와 비슷하거나 그보다 더 빨라야 된다. 그래야 이것이 서로 밀접하게 연관된 세균을 감별하는데 더 유용할 것이다[1].

2) 표현형적 기법(phenotypic method): 전통적인 표현형적 검사들은 세균 종과 아종(*subspecies*), 속(*genera*) 및 과(*family*)를 기술하는 데 근거가 되었고, 유전형적 데이터는 계통나무(*phylogenetic tree*)에 분류군들을 할당하는 데 사용되었고 분류체계 내의 주요 경계선을 긋는 데 사용이 되었다.

표현형적인 일관성은 유용한 분류 체계를 산출하는 데 필요하며 종을 감별하기 위한 구분선(*hierarchical line*)의 위치 설정에 영향을 줄 수도 있다[3,15]. 표현형적 특징의 변이성이 적어서 어떤 세균 군(*group*)에서는 분류군들을 기술하거나 감별하는데 어려움이 있다. 이러한 세균에는 다른 화학분류학적 또는 유전형적 방법들이 균주를 신뢰할 만하게 분류하기 위해 필요하다.

전통적인 표현형적 특징들은 형태학적, 생리학적, 생화학적인 특징을 포함하며 분류군들을 인지하기 위한 서술적 정보를 제공해준다. 세균의 형태는 세포형태(모양, 내포자, 편모, 봉입체, Gram 염색 특징)와 집락형태(색깔, 크기, 형태)를 같이 본다. 생리학적, 생화학적인 특징에는 서로 다른 온도에서의 성장

여부나 서로 다른 pH 조건이나, 염(salt) 농도, 공기조건하에서의 성장여부, 항생제와 같은 다양한 물질이 있는 조건하에서의 성장여부, 다양한 효소의 유무와 활성에 대한 자료, 화합물을 사용할 수 있는 능력 등이 포함이 된다. 재현성 있는 결과를 얻기 위해 고도로 표준화된 술식이 흔히 필요하다. 표현형적인 기술의 필요성이 인정되기는 하지만 합리적인 양의 노력과 시간 내에 변별력 있는 표현형적인 특성을 찾아내기가 어렵다.

(1) 수치적(numerical) 분석: 표현형적인 데이터는 컴퓨터를 이용한 수치적 비교(computer-assisted numerical comparison)방법에 의해서 최초로 분석이 됐다.

수치적 분류학은 컴퓨터가 발달되면서 나오게 되었는데 다수의 군주들에 대해서 다수의 표현형적인 특성을 비교할 수 있게 해준다[26,27]. 군주들 각 쌍 간의 유사성 정도를 보여주는 데이터 행렬들(matrices)과 군집분석(cluster analyses)에서 얻어진 계통나무로 특정 군의 군주들의 표현형적인 일관성에 대한 전체적 모습을 나타내 준다. 수많은 특성들이 유전형 정보의 상당량을 반영하기 때문에 다수의 표현형 특성을 수치적으로 분석하는 것이 분류학적으로 믿을 만하다는 것이 드러났다[1].

3) 화학적 방법(chemical method): “화학분류학”이란 명칭은 세균을 분류하기 위해서 세균의 여러 가지 생화화적인 성분에 대한 정보를 수집해서 분석방법으로 적용하는 것을 말한다.

(1) 세포지방산 분석(cellular fatty acid analysis): 300개 이상의 지방산 및 관련된 화합물이 세균 세포 내에 있다. 극성 지방이 세균막의 지방 이중층(bilayer)의 성분들이고 분류와 동정 목적으로 흔히 사용되어 왔다. 지방산 연쇄(chain)의 길이와 이중결합의 위치와 치환군(substituent groups)의 변이가 세균분류군의 특성과악에 아주 유용하다[28]. 대부분 총 세포지방산 분석을 추출하지만 극성 지방과 같은 특정 분획을 분석하기도 한다. 고도로 표준화된 배양조건을 사용하면 세포지방산 methyl ester 성분은 안정된 지표이다. 이 메틸화된 지방산이 가스액체크로마토그래피(gas-liquid chromatography)에 의해 전형적으로 분리되고 메틸화된 지방산의 유무와 상대적인 양이 세균 지방산 양상의 특징을 나타내준다. 총 세포지방산 분석이 분류학적 연구와 동정 분석 모두에 널리 사용되고 있다.

다상적 분류학에서 세포지방산 분석은 신속하고 상당히 저렴한 검색법으로서 매우 유용하게 사용되는 경우가 흔하다. 이 방법으로 다수의 군주들을 최소한의 노력으로 비교하여 군집 분석할 수 있고 군의 특성규명을 위한 기술적인 정보를 산출할 수 있다.

(2) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): MALDI-TOF MS의 두 가지 주된 연구 영역은 단백질학 분야로서 첫째, 단백질 동정과 둘째, 암이나 Alzheimer 질환, 관절염, 알레르기를 포함한 여러 질환의 생물표지자(biomarker) 검출에 흔히 사용된다[29,30]. MALDI-TOF MS에서 검체는 레이저 광선을 특이적

로 흡수하도록 선택된 기질(matrix)과 혼합된다. 여기에 레이저 빛을 가해 검체분자의 이온화를 촉진한다. 여기서 방출된 분자 이온들이 전기장이 걸린 공간(flight tube)을 이동하면서 각각의 질량대 전하(mass/charge, m/z) 비율에 따라 이동하는 거리와 비행시간들이 달라진다. 이를 측정하여 분석한 물질의 질량 스펙트럼을 해석함으로써 미지 성분의 질량 및 구조를 확인하여 검체의 정체를 동정할 수 있다[31]. 고분자량의 열에 약한 분자를 탈착(desorb)하는 잠재력, 극히 높은 정밀성과 민감도, 큰 질량 범위(1-300 kDa) 등의 장점 덕분에 MALDI-TOF MS는 복합적인 생물학적 검체들의 생분자들(biomolecules) 연구에 전도유명한 도구이다. 분석의 단순성과 신속성이 그 장점의 일부이다. 검체처리하는 세균 검체에 기질을 첨가하는 정도이고 모든 분석이 수 분 내에 수행될 수 있고 전 과정이 고도로 자동화되어 있다. 이러한 특성들은 다수의 세균분리주의 분석과 동정을 일상적으로 하는 검사실과 실험실에 특히 매력적이다. 미생물학에서 MALDI-TOF MS는 항생제내성주와 감수성주를 구분하고 단일 군중에 속한 군주들을 구별하는 데 사용되어 왔다.

3. 동정

동정은 분류학의 일부이다. 동정은 한 세균이 알려져 있는 분류군 안에서 어떤 종이냐 속에 해당하는지 파악하여 적절히 지정하는 과정이다. 즉 미지의 군의 특성을 이미 확립된 데이터베이스 특성과 비교를 하여서 미지의 군을 적절하게 명명하기 위한 것이다.

1) 동정 전략: 일상적인 진단 검사실에서는 분리된 군주의 직관적인 통찰과 생화학적 검사를 통해 얻어진 결과를 단계적으로 분석하여 동정을 한다. 그러나 만약 세균이 최소량의 시간과 비용으로 바로 동정될 수 없다면 이것은 미동정으로 남게 되는 경우가 잦다. 이러한 군주들은 계통발생학적으로 소속된 군(affiliation)이 어떤 군인지를 보고해준다.

거의 전체의 16S rRNA 유전자 연쇄들을 비교하는 기법은 미지의 세균이 계통발생학적으로 어떤 군에 가장 가까운가를 찾아내는 데 가장 강력한 도구 중 하나이다. rRNA 유전자 연쇄 분석에 근거를 둔 상용화된 동정시스템(MicroSeq500과 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit 등)이 나와 있다. 16S rRNA 유전자의 5-말단 영역의 일부분(*Escherichia coli* 번호부여 체계에서 60에서 110 위치 부분)이 가장 정보가 많고 서로 관련된 세균들 간에 가장 분별이 잘 되는 장소이다[17].

rRNA 염기서열 상동성 수준은 종을 기술하는데 한계점이 있는 반면 DNA-DNA 교잡 수준을 종 서술의 경계로 사용하자는 제안(proposal)[32]은 제안 수준에 그치는 것이 아니라 전체 유전체에 근거한 분석(Whole genome based analyses)에 의해서 지지를 받고 있다.

16S rRNA 유전자 염기서열 비교가 많은 세균 속(genera)에서 종 수준까지 정확하게 분석할 수 있게 해준다. 그러나 rRNA

염기서열의 비교 연구가 종 수준에서 균주를 동정할 만큼 충분히 민감하지 않은 경우가 흔하다는 것 역시 많은 분류학적인 연구에서 자주 드러났다. 또한 단일 종에 속한 균주들 간 (strain-to-strain)의 다양성에 대해서도 잘 모르며 단일 균주 내에서의 오페론 간(interoperon) 변이에 대한 지식도 없다.

어떤 동정되지 않은 분리주를 다른 적절한 보조적인 데이터가 없이 그 균의 16S rRNA 유전자 염기서열이 특정한 균종과 고도로 유사하기 때문에 이게 특정 균종에 속한다고 결론을 내리거나, 또는 이것이 계통나무에서 독특한 위치를 점유하고 있다가, 16S rRNA 유전자 염기서열에서 가장 가까운 이웃과 오직 97% 정도만 유사하다는 것에 근거를 두어서 그 균이 새로운 균종이라고 결론을 짓는 것은 미성숙한 결론이다. 특히 부분적(partial) 염기서열 데이터를 가지고 한다면 더더욱 그러한데 그 이유는 부분적 rRNA 유전자 염기서열 데이터는 그 분자의 제한된 정보만 알려주며, 그 유전자의 다른 부분이 별개의 분류학적 수준에 대한 정보를 함유하고 있을 수도 있기 때문이다[7,17]. 그럼에도 불구하고 16S rRNA 유전자 염기서열 분석이 새로운 균주를 동정하는 데 일반적으로 사용할 수 있는 “최적 표준(gold standard)”을 나타낸다고 잘못된 주장을 하는 의학 및 다른 미생물학적 문헌이 주기적으로 보고되고 있다 [33].

2) 진단 기법: rRNA 염기서열, 전-세포(whole-cell) 지상산 조성, ribotyping 양상, MALDI-TOF MS, 전체 유전체 염기서열 분석, microarray, 핵산 탐색자를 이용한 기법들, 핵산 증폭기법들, 또는 표현형적 특성들의 소형화된 키트 연속물(miniaturized series)에 대한 데이터베이스가 이용가능하고 많은 분리주들의 동정을 가능하게 하고 있다. 그러나 이들 데이터베이스의 성공은 또한 그 기법들의 정확도와 개별 자료 등록들이 얼마나 주의 깊게 기재되어 왔는가에 달려있다.

그러나 새로운 또는 비상례적인 분리주의 분류는 다면적 접근을 필요로 할 때가 흔하다. 즉 미지균을 적절한 분류학적 도구를 이용하여 어떤 계통발생학적 이웃에 할당할 후(전형적으로 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 이용하여 할당), 가장 근접한 계통발생학적 이웃들의 특성들과 미지균의 특성을 비교하여 미지균을 특정한 균종 동정에 할당한다. 분자적 진단기법은 생체균의 검출이나 동정에 분자적 진단기법이 필요한 균들은 생체 외에서 자랄 수 없거나, 복잡한 배지나 세포배양이 필요한 균, 배양기간이 긴 균들이다.

결 론

현재 과학적이고 경제적으로 이상적인 동정기법 개발에는 아직 도달하기 어려운 상태이다. Cowan의 직관적 접근법(미지균의 균명이 예측될 때 쓰이는 방법)과 단계적 기법(2항적 단서를 사용하는 방법)은 다수의 분리주 동정을 만족시키며 단순

하고 신속, 저렴한 생화학적 검사들만을 필요로 한다. Cowan의 관점은 현대적 기법에 쉽게 적응된다. 만약에 가장 중요한 기법이 실패를 하면 유용한 대안이 필요하며 이들이 이용 가능하다.

비록 DNA-DNA 교잡 수준을 초석으로 삼고 있는 현재의 종 개념으로서는 이 방법이 밀접하게 관련된 종을 감별하는 데 실패할 때가 자주 있긴 하지만 현재는 전체 16S rRNA 유전자 염기서열 분석이 세균에 대해서 균동정을 대강 확립할 수 있는 가장 직접적이고 분명한 선택방법이다. 그 기법의 탁월성의 대부분은 연구되는 균의 계통발생학적인 인접도를 드러내는 능력에 근거를 두는데 이는 현재 어떤 다른 동정 프로토콜로도 제공될 수 없는 정보이다. 이러한 정보는 종 수준까지 최종 동정하는 데 필요한 추가적인 분석 방향을 잡아줄 것이다[1].

감사의 글

이 논문은 2009년도 조선대학교 연구보조비 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Vandamme PAR. Taxonomy and Classification of Bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, et al. eds. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed, Washington, DC; ASM Press, 2007:275-90.
2. Goodfellow M and O'Donnell AG. Handbook of New Bacterial Systematics. London; Academic Press, 1993.
3. Wayne L, Brenner D, Colwell R, Grimont P, Kandler O, Krichevsky M, et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int J Syst Bacteriol 1987;37:463-4.
4. Young JM. Implications of alternative classifications and horizontal gene transfer for bacterial taxonomy. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:945-53.
5. Ursing JB, Rosselló-Mora RA, Garcia-Valdes E, Lalucat J. Taxonomic note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. Int J Syst Bacteriol 1995;45:604.
6. Colwell RR. Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. J Bacteriol 1970;104:410-33.
7. Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J, et al. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis 1998;19:554-68.
8. Gupta RS. Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. Microbiol Mol Biol Rev 1998;62:1435-91.
9. Vancanneyt M, Vandamme P, Kersters K. Differentiation of *Bordetella pertussis*, *B. paraptussis*, and *B. bronchiseptica* by whole-cell protein electrophoresis and fatty acid analysis. Int J Syst Bacteriol 1995;45:843-7.
10. Willems A, Falsen E, Pot B, Jantzen E, Hoste B, Vandamme P, et al. *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans*

- sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1990;40:384-98.
11. Coenye T, Gevers D, Van de Peer Y, Vandamme P, Swings J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. FEMS Microbiol Rev 2005;29:147-67.
12. Konstantinidis KT and Tiedje JM. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:2567-72.
13. Almeida NF, Yan S, Cai R, Clarke CR, Morris CE, Schaad NW, et al. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. Phytopathology 2010; 100:208-15.
14. Schmid CW and Marks J. DNA hybridization as a guide to phylogeny: chemical and physical limits. J Mol Evol 1990;30:237-46.
15. Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol Rev 1996;60:407-38.
16. Krieg N and Garrity G. On Using the Manual. In: DR Boone, RW Castenholz, GM Garrity, eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed, New York; Springer-Verlag, 2001:15-9.
17. Ludwig J and Klenk H. Overview: a Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Prokaryotic Systematics. In: Boone DR, Castenholz RW, et al. eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York; Springer-verlag, 2001:49-65.
18. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 1995;59:143-69.
19. Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P Jr. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int J Syst Bacteriol 1992;42:166-70.
20. Stackebrandt E and Goebel B. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol 1994;44: 846-9.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing: Approved Guideline. MM18-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
22. Harrington CS and On SL. Extensive 16S rRNA gene sequence diversity in *Campylobacter hyointestinalis* strains: taxonomic and applied implications. Int J Syst Bacteriol 1999;49:1171-5.
23. Vandamme P, Harrington CS, Jalava K, On SL. Misidentifying helicobacters: the *Helicobacter cinaedi* example. J Clin Microbiol 2000;38:2261-6.
24. Clayton RA, Sutton G, Hinkle PS Jr, Bult C, Fields C. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. Int J Syst Bacteriol 1995;45:595-9.
25. Jaspers E and Overmann J. Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals. Appl Environ Microbiol 2004;70:4831-9.
26. Sneath PHA. Numerical Taxonomy. In: Krieg Holt, eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1st ed, Baltimore; The Williams & Wilkins Co., 1984:111-8.
27. Sokal RR and Sneath PHA. Principles of Numerical Taxonomy. 1st ed, San Francisco; WH Freeman & Co., 1963.
28. Suzuki K, Goodfellow M, O'Donnell AG. Cell Envelopes and Classification. London; Academic Press, 1993.
29. Marvin LF, Roberts MA, Fay LB. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. Clin Chim Acta 2003;337:11-21.
30. Zaluzec EJ, Gage DA, Watson JT. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. Protein Expr Purif 1995;6:109-23.
31. Lay JO Jr. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. Mass Spectrom Rev 2001;20:172-94.
32. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev 2004;17:840-62.
33. Fontana C, Favaro M, Pelliccioni M, Pistoia ES, Favalli C. Use of the MicroSeq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. J Clin Microbiol 2005;43:615-9.

=국문초록=

세균 분류학의 기본 개념들

조선대학교 의과대학 ¹영상의학교실, ²진단검사의학교실

김영숙¹, 장숙진²

분류학의 세 구성 요소는 분류(classification), 명명법(nomenclature) 및 동정(identification)이다. 전통적으로 세균의 분류와 동정은 세균의 형태학적, 생화학적 데이터에 근거를 두어 시행되었다. 소위 자연적 개념이라고 불리는 새 이론에서는 세균들간의 관계를 표현형적, 유전형적인 특성 둘 다의 전체적인 유사성에 근거를 두어 기술한다. 현대의 분류학인 다상적 분류학(polyphasic taxonomy)은 유전형적, 표현형적, 계통발생학적인 정보들을 모두 통합하여 공감되는 형태의 일반적인 목적의 분류를 하는 것이다. 생화학적 검사에 근거를 둔 일상적인 동정법이 실패하면 전체 16s rRNA 유전자 염기서열 분석과 같은 대체동정법이 필요하다. 비록 16s rRNA 유전자 염기서열 분석법이 밀접하게 관련된 균종을 감별할 수 있을 만큼 변별력이 충분하지 못할 경우가 가끔 있지만 그 결과는 그러한 균종 동정에 필요한 추가 분석법에 대해 제시를 해줄 수도 있을 것이다. [대한임상미생물학회지 2012;15:79-87]

교신저자 : 장숙진, 501-717, 광주시 동구 서석동 588번지
조선대학교병원 진단검사의학과
Tel: 062-220-3272, Fax: 062-232-2063
E-mail: sjbjang@chosun.ac.kr