

Bacillus 속 세균을 검출하기 위한 Fluorescent In Situ Hybridization 방법의 개발

홍선희 · 김옥선 · 송홍규¹ · 이동훈² · 안태석^{3*}

강원대학교 환경과학과, ¹강원대학교 생명과학부, ²충북대학교 유전공학연구소,
³강원대학교 생물다양성연구소

Bacillus 속에 속하는 세균을 FISH 방법으로 검출하기 위한 새로운 방법을 개발하였다. LGC353b, S-G-Bacill-0597-a-A-22와 S-G-Bacill-0597-a-S-22 등 3개의 probe를 22종의 *Bacillus* 속 세균의 혼합배양액에 적용한 결과 S-G-Bacill-0597-a-A-22의 probe가 DAPI로 검출된 세균 중 95%가 FISH로도 측정되어 가장 효율이 좋은 것으로 나타났다. Hybridization 과정 전에 *Bacillus*의 영양세포와 포자의 세포벽을 파괴하기 위하여 SDS/DTT (dithiothreitol)와 lysozyme으로 순차적으로 전처리하는 방법과 lysozyme 용액으로만 전처리 하는 두 가지 방법을 사용하였다. 그 결과, *Bacillus*를 검출하기 위해서는 영양세포의 경우에는 lysozyme용액으로만 전처리 하는 방법이 가장 좋았으며, 포자는 FISH로 검출되지 않았다. 따라서 토양, 하수 처리장등의 생태계에서 *Bacillus*를 검출할 경우에는 영양세포는 lysozyme으로 전처리 하여 FISH로 검출하고 포자는 따로 포자염색으로 검출하는 두가지 방법을 병행하여야 한다.

Key words □ fluorescent in situ hybridization, genus *Bacillus*, spore

Bacillus 속(Genus *Bacillus*)에 속하는 세균들은 분류학적으로 볼 때 그람양성 간균에 속하며, 대부분 호기조건에서 성장하지만, 혐기조건일때도 성장 할 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한 환경이 불리할 때에는 포자(spore)를 형성하며 일부 *Bacillus*는 항생물질을 분비하기도 한다(16). 이러한 *Bacillus* 속에 속하는 세균들은 그 분포범위가 매우 다양하여 여러 생태계에서 쉽게 분리해 낼 수 있는데(17), 특히, 토양에서 많은 수가 관찰되며(7), 난분해성 단백질이나 전분, 지방 등을 분해시킬 수 있어, 폐수처리에도 많이 사용된다. 또한 어떤 종들은 음식물에서 기인하는 병을 유발하기도 하여(18), *Bacillus* 속에 속하는 세균들을 검출하는 것은 매우 중요하다. 그러나 *Bacillus* 속에 속하는 세균들은 배양계수법으로 검출하는 것은 쉽지 않을 뿐 아니라, 이 중 일부는 살아있지만 배양이 되지 않는 세균들(viable but unculturable)이므로, 배양계수법으로 *Bacillus*를 검출하는 방법은 적절하지 않다. 따라서 최근에는 분자생물학적법인 PCR을 이용하여 *Bacillus*를 검출하고 있긴 하지만(15), 이 경우 복잡한 과정을 거쳐야 하므로 시간이 많이 걸리는 단점이 있다.

Fluorescent in situ hybridization (FISH) 방법은 세균을 직접 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 쉽고 간단하게 세균군집을 측정할 수 있다는 장점이 있어 현재 전 세계적으로 가장 널리 사용되고 있는 방법이다. 또한 이러한 방법을 통하여 생태계에서 특정 세균을 추적하는 연구가 많이 이루어지고 있다(14,21). 이미 국내에서

도 이 방법을 이용하여 소양호나 팔당호 등 여러 생태계 내에서 세균군집의 변화를 연구한 논문이 보고되어 있다(1,2). 그러나 FISH 방법도 세포들이 먹이가 없어 굶주린 상태에서는 낮은 RNA 함량으로 인해 검출이 되지 않거나 세포벽이 두꺼운 경우 probe의 침투가 어려워서 검출이 되지 않을 수도 있는 단점이 있다(8).

Bacillus 속에 속하는 세균들의 경우 두꺼운 세포벽을 가지고 있어 probe의 침투가 매우 어려워 일반적인 FISH 방법으로 검출하기 어렵고, 특히 포자를 생성한 경우에는 더욱더 어렵다(7). 이 연구에서는 토양과 하수처리장 등의 다양한 생태계에서 *Bacillus*속에 속하는 세균을 FISH 방법으로 정확히 검출하기 위하여 새로운 방법을 개발하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 *Bacillus* 균주는 Table 1과 같으며, 이 균주들을 25°C에서 24시간 혼합 배양하여 실험재료로 사용하였다. 여기서 사용된 균주는 서울대학교 미생물연구소에서 구입하였다.

세포 고정

혼합배양된 *Bacillus* 세균들을 원심분리(10분, 4°C, 12,000×g)하여 pellet을 모은 후, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)로 세척하는 과정을 2번 반복하여 최종 얻은 pellet을 PBS 100 μ l로 재부유 시키고 4% paraformaldehyde 용액 300 μ l (세포 양

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: (033) 250-8574, Fax: (033) 251-3991
E-mail: ahnts@kangwon.ac.kr

Table 1. *Bacillus* strains used

Strains No. ^a	Species name (approved by DSMZ ^b)
12061	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
12063	<i>Bacillus benzoevernis</i>
11011	<i>Bacillus cereus</i>
12030	<i>Bacillus coagulans</i>
10020	<i>Bacillus fastidiosus</i>
12066	<i>Bacillus glucanolyticus</i>
10009	<i>Bacillus licheniformis</i>
10028	<i>Bacillus marcerans</i>
11015	<i>Bacillus megaterium</i>
12069	<i>Bacillus pabuli</i>
12072	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>
12073	<i>Bacillus pulvifaciens</i>
10038	<i>Bacillus pumilus</i>
10302	<i>Bacillus sphaericus</i>
11030	<i>Bacillus subtilis</i>
11021	<i>Bacillus subtilis</i>
11043	<i>Bacillus thuringiensis</i>

^aStrain list of Institute of Microbiology, Seoul National University

^bDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Table 2. Sequences of used probes

Probe Name	Probe Sequence
LGC353b	5'-GCGGAAGATTCCCTACTGC-3'
S-G-Bacill-0597-a-A-22	5'-GTTCCCCAGTTTCCAATGACCC-3'
S-G-Bacill-0597-a-S-22	5'-GGGTCATTGGAAACTGGGGAAC-3'

의 3배의 부피)를 첨가한 후 4°C에서 3시간 이상 고정하였다. 고정이 끝나면 원심분리와 PBS 세척 과정을 3번 반복하여 고정액을 제거한 후 4°C에서 보관된 에탄올 용액과 PBS 용액을 2배 첨가하고 -20°C에서 보관하였다.

사용한 Probe

Bacillus 속 세균의 검출에 효율적이라고 알려진 3종 (LGC353b(6), S-G-Bacill-0597-a-A-22, S-G-Bacill-0597-a-S-22(5))의 probe를 사용하였고, 각 probe의 대한 sequence는 Table 2와 같다. 또한 probe는 tetramethylrhodamine으로 표지 하였으며, 주문제작 하였다(TaKaRa, Japan).

FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

처리과정

Bacillus 속 세균들의 영양세포는 두꺼운 peptidoglycan layer를 가지고 있고 spore는 두꺼운 coat를 가지고 있어, 일반적인 FISH 전처리 과정으로는 probe가 세포 내부로 침투하지 못한다. 따라서 spore의 두꺼운 coat까지 용해한다고 알려진 SDS-DTT

(dithiothreitol)용액과 lysozyme을 처리하는 방법 A와 영양세포(vegetative cell)의 세포벽을 lysozyme만으로 처리하는 방법 B로 나누어 처리하였다(20).

① 방법 A

Well Slide glass에 고정된 세포를 3 μ l 올린 후, 열 고정하고 dehydration을 위해 50, 80, 99% 에탄올에 각각 3분씩 반응 시켰다. 세포벽을 파괴하기 위하여 SDS (10 mg \cdot ml⁻¹)와 50 mM DTT (dithiothreitol) 용액, 그리고 lysozyme 용액(37320U, lysozyme 1mg/100 mM Tris-HCl(pH 7.5)과 5 mM EDTA용액 1 ml)으로 순차적으로 처리한 후 멸균증류수로 세척하고 다시 에탄올을 처리를 하였다. 전처리가 끝난 슬라이드에 hybridization solution (630 mM NaCl, 0.01% sodium dodecyl sulfate [SDS], 10 mM Tris-HCl [pH 7.2], 1 mM EDTA, 30% formamide)을 10 μ l 첨가하고 probe (10 pmol)를 첨가한 후 45°C에서 4시간 배양하였다. 배양이 끝나면 미리 예열된 washing solution에 담구어 45°C에서 20분간 세척하고 증류수로 다시 세척한 후 건조시켰다.

② 방법 B

방법 A와 같으나, SDS/DTT 처리를 하지 않았다.

DAPI 염색

DAPI counting에 의한 세균수 측정은 FISH 방법을 적용한 후 DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole-2HCl, SIGMA)로 2차 염색하여 관찰하여 계수하였다(11). 세균 수는 20개 이상의 화상에서 평균값을 구하여 계산하였다.

형광현미경 관찰

세균의 계수는 형광 현미경(Olympus BX60, DAPI; exciting filter:U, tetramethylrhodamine; exciting filter:G, Lamp: Mercury lamp HBO 100W/2, OSRAM)을 이용하여 DAPI로 염색된 세균과 probe가 결합한 세균을 계수 하였다. 각 세균 수는 20개 이상의 화상에서 평균값을 구하였다.

포자염색

FISH 전처리 과정이 *Bacillus*의 영양세포와 포자 모두에게 적용이 가능한가를 확인하기 위하여, 인위적으로 포자화(sporulation)를 유도하고, 각각 영양세포수, 포자수를 계수하였다. 포자는 혼합 배양한 *Bacillus*를 50°C에서 24시간 방치하여 얻었다. 포자 염색은 시료 25 μ l를 슬라이드에 유침하고 건조시킨 후 열고정하여 도말부위를 여과지로 덮고 malachite green (5%)용액으로 충분히 덮고 이 용액이 마르지 않도록 계속 첨가해주면서 5분간 가열하여 염색하였다. 염색이 끝난 후 safranin O (2.5%)로 30초간 대응염색(counter staining)을 한 다음 다시 증류수로 세척하고 현미경으로 포자를 계수 하였다.

결과 및 고찰

이 연구에서 사용한 3가지의 probe를 *Bacillus* 속에 속하는 세

Table 3. The efficiencies of pretreatment for FISH

Probe name	Methods	Experiment number	DAPI ($\times 10^7$ cells/ml)	FISH ($\times 10^7$ cells/ml)	FISH/DAPI (%)
LGC 353b	A ^a	1	5.3	ND	ND
		2	4.7	ND	ND
		3	6.1	ND	ND
		4	4.2	ND	ND
		5	5.0	ND	ND
	B ^b	1	2.3	ND	ND
		2	1.7	ND	ND
		3	1.9	ND	ND
		4	2.1	ND	ND
		5	1.6	ND	ND
S-G-Bacill-0597-a-A-22	A	1	2.6	2.0	81.5
		2	2.4	2.0	75.8
		3	2.1	1.7	80.1
		4	1.8	1.3	69.7
		5	1.6	1.1	70.8
	B	1	4.0	3.8	96.0
		2	3.6	3.4	94.6
		3	5.6	5.4	97.2
		4	4.3	4.1	95.0
		5	4.2	4.0	94.3
S-G-Bacill-0597-a-S-22	A	1	1.8	ND	ND
		2	1.9	ND	ND
		3	2.1	1.5	73.5
		4	2.9	ND	ND
		5	2.4	1.9	79.5
	B	1	5.4	3.5	90.4
		2	3.9	ND	ND
		3	4.3	3.9	91.0
		4	6.1	5.4	88.0
		5	5.2	ND	ND

^aPretreatment with SDS/DTT and lysozyme^bPretreatment with lysozyme only

균들을 검출하기 위하여 hybridization 한 결과는 Table 3에 나타내었다. LGC353b probe의 경우는 DAPI로는 검출이 되었으나 FISH로는 5차례 모두 검출되지 않았다. S-G-Bacill-0597-a-A-22 probe는 DAPI와 FISH 모두 검출되었고, FISH/DAPI 비율이 평균 95.4%로 매우 높은 효율성을 나타내었다(Fig 1). S-G-Bacill-0597-a-S-22의 probe의 경우는 방법 A로 하였을 경우, 1, 2, 5회에서 방법 B의 경우는 2회와 5회 조사에서 FISH로는 검출되지 않아 S-G-Bacill-0597-a-A-22 probe와 비교할 때 온도나 pH 등 환경조건에 매우 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 또한

**Fig. 1.** Photograph of DAPI(up) and FISH(down) of mixed cultured *Bacillus* spp. Lysozyme treatment was done for FISH.

probe의 효율성을 나타내는 FISH/DAPI 비율은 방법 B로 전처리 하였을 경우 평균 89.8%로 나타났다.

Fluorescent in situ Hybridization은 다른 분자생물학적 방법들에 비해 매우 빠르고 간단하게 세균을 검출할 수 있다(12). 그러나 실험과정에서 hybridization과 washing 할 때의 온도와 이때의 습도가 적절하지 않으면, 검출이 되지 않으며, 특히, 이 과정에 첨가해주는 용액들의 pH는 매우 중요하게 작용한다. 이 연구에서는 3가지의 probe를 사용하였고, 각각의 probe에 대하여 hybridization 용액과 hybridization 온도와 시간 등을 다르게 하여 적용하였는데, S-G-Bacill-0597-a-A-22 probe가 가장 좋은 효율성을 나타내었다. S-G-Bacill-0597-a-S-22 probe는 같은 조건일 때 S-G-Bacill-0597-a-A-22 probe에 보다 환경조건에 매우 민감하게 반응할 뿐 아니라 검출효율성도 다소 작은 것으로 나타나 *Bacillus* 검출을 위해서는 S-G-Bacill-0597-a-A-22 probe를 이용하는 것이 가장 좋은 것으로 확인되었다.

Bacillus 속에 속하는 세균들은 두꺼운 세포벽을 가지고 있어 probe의 침투가 어렵다. 따라서 hybridization 과정 전에 세포벽을 파괴하는 전처리 과정이 필요하다(7). 이 연구에서는 lysozyme 용액과 dithiothreitol 용액, 그리고 이 두 가지 용액을 혼합하여 사용하였는데, lysozyme용액이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

Table 4. Bacterial numbers by spore staining and FISH with different pretreatment

Experiment Number	Vegetative cell ^a ($\times 10^7$ cells/ml)	Spore ^c ($\times 10^6$ cells/ml)	FISH ($\times 10^7$ cells/ml) (FISH/vegetative cell (%))	
			A ^a	B ^b
1	1.7	4.7	1.0 (75.0%)	1.4 (83.3%)
2	1.6	6.6	0.7 (50.0%)	1.4 (88.2%)
3	2.1	2.8	0.6 (27.8%)	2.1 (100.0%)
4	2.4	4.7	1.1 (50.0%)	2.2 (88.5%)
5	2.4	6.6	0.6 (25.0%)	2.3 (96.0%)
Average	2.0	5.1	0.8 (41.4%)	1.9 (91.7%)

^aPretreatment with SDS/DTT and lysozyme^bPretreatment with lysozyme only^cObserved by spore staining with malachite green and safranin O

특히 두 가지 용액을 혼합하여 사용하였을 경우는 세포벽이 심하게 파괴되어 세포를 구별할 수 없는 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 hybridization 온도는 42°C가 가장 적절하였으며, 배양시간은 4시간이 가장 효율성이 높은 것으로 나타났다.

포자를 FISH로 검출하기 위하여 혼합배양한 *Bacillus*를 포자화(sporulation) 시킨 후 FISH와 포자염색(spore staining)을 한 결과 포자염색에서는 평균 5.1×10^6 cells/ml 정도 관찰되었으나 FISH로는 포자를 검출할 수 없었고 영양세포는 SDS/DTT+ lysozyme으로 전처리한 방법 A의 경우에는 포자염색으로 관찰한 영양세포 중 평균 41.4%만이 FISH로 검출된 반면, lysozyme만을 처리해준 방법 B의 경우는 영양세포의 91.7%가 FISH로 측정되었다(Table 4).

FISH 방법은 세포 안으로 probe가 침투하여 세포 내 rRNA와 결합하여야 한다. 여기에서 사용하는 probe는 oligonucleotide와 형광물질(여기에서는 tetramethylrhodime)이 결합된 물질로 대개 분자량은 6,500 정도이다. paraformaldehyde로 고정된 세포의 경우 이 정도의 분자량은 충분히 침투 가능하다(3). 그러나 몇몇 그람 양성세균인 *Streptomyces*와 *Frankia* (9,10), 그리고 *Bacillus megaterium*의 경우(7)도 전처리를 해주어야만 probe가 세포 내로 침투가 가능하다.

이러한 전처리 방법으로 가장 흔히 사용되는 것이 lysozyme 처리인데(4), 이번 실험에서도 lysozyme으로 처리한 경우에는 probe가 세포 내로 잘 침투하여 뚜렷한 형광을 관찰할 수 있었다(Fig. 1참조). *Bacillus*의 포자는 소수성(hydrophobic)의 단백질로 구성되어 있으며(13), 이 단백질을 제거하기 위하여 disulfide 결합을 끊는 SDS/DTT를 사용하기도 한다. *B. megaterium*의 포자의 경우, SDS/DTT를 사용한 결과 probe의 침투력은 높아지지 않았으나 counter 염색물질로 사용하는 DAPI의 침투력은 향상된 것으로 보고되었다(7). 그러나 이 연구에서는 이러한 현상을 관찰할 수 없었으며, SDS/DTT 농도를 높이거나 반응시간을 늘리면 세포가 형태를 잃어버렸다.

SDS/DTT는 포자 coat의 일부분을 제거하여 DAPI (M.W

350.2) 같은 작은 분자의 투과성을 향상시키는 것으로 알려져 있다(18). 그러나 이 연구에서는 포자화를 유도한 후 lysozyme과 SDS/DTT를 병행하여 전처리한 경우 포자를 검출할 수 없었고, 영양세포(vegetative cell)가 찌그러들면서 형체가 변하는 현상이 나타나 FISH/vegetative cell의 비율이 매우 낮게 나타났다. 이는 이 두 가지 처리방법을 병행할 경우 영양세포의 세포벽을 과도하게 분해하여 삼투압 등에 의하여 세균 세포가 변형되는 것으로 사료된다. 즉, 세포가 변형되면서 세포내부 물질의 양이 변화되어, 형광의 강도가 강하지 못하였고 포자들에게도 probe가 침투하지 못하여 적절한 전처리과정이 아님이 확인되었다. 그러나 이 실험에서 밝힌 최적조건인 방법 B와 S-G-Bacill-0597-a-A-22 probe로 *Bacillus* 혼합배양액을 관찰한 경우에는 DAPI로 염색된 세균의 대부분이 FISH로 관찰이 되었다(Fig. 1).

이러한 결과에서 토양, 하수처리장 등의 생태계에서 *Bacillus*를 검출할 경우에는 lysozyme으로 전처리한 FISH 방법과 포자염색을 하는 두가지 방법을 병행하여야 한다.

감사의 글

이 연구는 과학기술부에서 시행하는 중점국가연구개발사업의 하나인 자연재해방재기술개발사업으로 수행된 것입니다.

참고문헌

1. 김동주, 홍선희, 안태석. 1999. 소양호에서 세균군집구조의 계절적, 수직적 변화. 한국미생물학회지 35, 242-247.
2. 홍선희, 오덕화, 전선옥, 안태석. 2000. 팔당호에서 aggregates에 부착한 세균군집구조의 변화. 한국미생물학회지 36, 292-298.
3. Amann, R.I., L. Krumbolz, and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172, 762-770.
4. Amann, R.I., B. Zarda, D.A. Stahl, and K.H. Schleifer. 1992. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3007-3011.
5. Duteau, N.M., J.D. Rogers, C.T. Bartholomay, and K.F. Reardon. 1998. Species-specific oligonucleotide for enumeration of *Pseudomonas putida* F1, *Burkholderia* sp. Strain JS150 and *Bacillus subtilis* ATCC 7003 in biodegradation experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4994-4999.
6. Felske, A., A.D.L. Akkermans, and W.M. De Vos. 1998. In situ detection of an uncultured predominant *Bacillus* in Dutch grassland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4588-4590.
7. Fischer, K., D. Hahn, W. Honerage, F. Schonholzer, and J. Zeyer. 1995. In situ detection of spores and vegetative cells of *Bacillus megaterium* in soil by whole cell hybridization. *Syst. Appl. Microbiol.* 18, 265-273.
8. Glückner, F.O., M.F. Bernhard, and R. Amann. 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3721-3726.
9. Hahn, D., R.I. Amann, and J. Zeyer. 1993a. Detection of

- mRNA in *Streptomyces* cells by whole-cell hybridization with digoxigenin-labeled probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2753-2757.
10. Hahn, D., R.I. Amann, and J. Zeyer. 1993b. Whole-cell hybridization of *Frankia* strains with fluorescence- or digoxigenin-labeled, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1709-1761.
 11. Hicks, R., R.I. Amann, and D.A. Stahl. 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4, 6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2158-2163.
 12. Jakob P., F.O. Glöckner, S. Unterholzner, A. Alfreider, R. Psenner, and R. Amann. 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4299-4306.
 13. Jenkinson, H.F., W.D. Sawyer, and J. Mandelstam. 1981. Synthesis and order of assembly of spore coat proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 123, 1-6
 14. Ka, J.O., W.E. Holben, and J.M. Tiedje. 1994. Use of gene probes to aid in recovery and identification of functionally dominant 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading population in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1116-1120.
 15. Kim, Y.R., C. John, and C.A. Batt. 2000. Development of fluorogenic probe-based PCR assay for detection of *Bacillus cereus* in nonfat dry milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1453-1459.
 16. Maruo, B. and H. Yosikawa. 1989. *Bacillus subtilis*: Molecular biology and industrial application. Elsevier, Tokyo.
 17. Naclerio, G., E. Ricca, M. Sacco, and M.D. Felice. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4313-4316.
 18. Schraft, H. and M.W. Griffiths. 1995. Specific oligonucleotide primers for detection of lecithinase-positive *Bacillus* spp. by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 98-102.
 19. Setlow, P. 1993. Spore structural proteins, pp. 801-809. In Sonenshein, A.L., Hoch, F.A., Losick, R., (eds.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washinton, D.C.
 20. Setlow, P. 1994. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 49-60.
 21. Steffan, R.J., A. Breen, R.M. Atlas, and G.S. Saylor. 1989. Application of gene probe methods for monitoring specific microbial populations in freshwater ecosystems. *J. Microbiol.* 35, 681-685.

(Received August 22, 2001/Accepted September 22, 2001)

ABSTRACT: Development of FISH Methods for Detection of Genus *Bacillus*

Sun-Hee Hong, Ok-Sun Kim, Hong-Kyu Song¹, Dong-Hun Lee,² and Tae-Seok Ahn³
 (Dept. of Environmental Science, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea,
¹Division of Biological Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, ²Research
 Institute for Genetic Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, ³Institute
 of Biodiversity Research, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea)

A technique for detection of *Bacillus* in soil and waste water treatment system was developed. Mixed cultured solutions of 22 *Bacillus* strains were applied for selection of probe and pretreatment method for FISH. Among the three probes known as useful tool for FISH method, S-G-Bacill-0597-a-A-22 was best for detection of *Bacillus*. Ninety five percent of DAPI count was observed with FISH method with S-G-Bacill-0597-a-A-22 probe. For increasing the permeability to *Bacillus* cell walls, pretreatment with lysozyme was better than that with lysozyme and SDS/DTT (dithiothreitol). *Bacillus* spore was not detected with FISH. So, *Bacillus* detection in ecosystem requires FISH with pretreatment of lysozyme and spore staining.