

## 남매지에서 Eubacteria 군집구조의 계절적 변화와 그에 영향을 미치는 환경요인

이희순 · 박정원<sup>1</sup> · 김미경<sup>1</sup> · 이영옥\*

대구대학교 생명과학부, <sup>1</sup>영남대학교 해양과학연구소

경북 경산시에 위치한 남매지에서 세균군집의 구조를 fluorescent *in situ* hybridization(FISH) 방법을 이용하여 분석하였고 아올리 세균군집크기에 영향을 주는 환경요인을 측정하여 그 상관성을 파악하고자 하였다. 담수체에 우점하는 것으로 알려진 proteobacteria( $\alpha$ · $\beta$ · $\gamma$ subclasses)와 *Cytophaga-Flavobacterium* (CF) group에 속하는 진정세균군의 연중변화를 정점별로 측정하였다. 총세균수에 대한 각 세균군집 비율은 정점간의 큰 차이 없이  $\alpha$ -subclass가 4.0~29.2%,  $\beta$ -subclass가 1.7~25.8%,  $\gamma$ -subclass가 1.8~12.8%를, 그리고 CF group은 4.9~36.3%의 군집비율을 나타냈다. 온도, SS, pH, DOC, 질산염, 조류 현존량 등 환경요인과 세균군집간의 상관관계를 분석한 결과, 총세균수는 수온, DOC, SS, eubacteria는 DOC, 녹조류 현존량,  $\gamma$ -subclass세균군은 DOC, CF group세균은 녹조류 현존량과 양의 상관성을 나타낸 반면  $\beta$ -subclass는 남세균·총 조류 현존량과 음의 상관성을 나타냈다.

**Key words** □ algae, correlation coefficient, cyanobacteria, environmental factors, eubacteria, FISH

중전에는 수계생태계에서 물질순환과 에너지흐름에 지대한 역할을 담당하는 세균군집구조 및 그 기능에 관한 연구가 배양 가능한 세균에 국한되어 왔으므로 결과의 해석에 많은 오류가 있었음이 최근 들어 세균을 동정하는데 fluorescent *in situ* hybridization (FISH) 등의 분자생물학적인 연구기법이 실용화되면서 점차 밝혀지고 있다(2,7,10,15,17,19,24,26). FISH법은 세포 내에 많이 존재하는 16S rRNA 또는 23S rRNA에 상보적인 염기 서열을 갖도록 설계된 single strand DNA (oligonucleotides probes, 약 17~34 nt)를 교잡(hybridization)시켜 배양을 통하지 않고 현장상태의 세균군집을 형광현미경을 이용해 직접 동정하고 그 개체군의 크기를 정량하는 방법이다. 이 기법은 여러 분류 계급 즉, 영역(domain)·강(class)·아강(subclass)·속(genus)·종(species) 수준에서 특유의 rRNA-targeted probe를 사용하여 지금까지 배양이 불가능했던 세균도 검출할 수 있는 장점 때문에 강, 호수, 해양(4,5,10,11) 뿐 아니라 수돗물(18), 폐수처리시스템의 슬러지(13,19,25,26) 등 다양한 생태계의 세균군집을 파악하는데 이용되고 있다. 담수환경에 존재하는 세균의 대부분이 proteobacteria와 *Cytophaga-Flavobacterium*(CF) group에 속한다고 알려져 있다(5,16).

수계의 세균군집은 수온, 용존산소, 유기물의 종류와 농도, 세균의 유기물 이용능력 등 환경요인의 영향을 받는다. 눈과 고산 지대의 산정호수와 같은 빈영양호에서는  $\beta$ -subclass가 우점하는(5) 반면  $\gamma$ -subclass는 1% 미만으로 검출되며 배지에서 자라는 세균의 대부분이  $\gamma$ -subclass에 속하고(13,24), chl-*a* 양이 높을때

$\alpha$ -subclass세균과 CF group세균이 증가한다고(21) 보고되었다. 또 생분해성 용존유기탄소(Biodegradable Dissolved Organic Carbon; B-DOC)의 변화도 세균군집에 영향을 미친다고 하였다(1). 아직 분자기법을 토대로 한 세균군집구조를 분석한 연구결과들이 충분히 축적되지 않았고 그들의 생장에 영향을 미치는 환경요인들과 상관성에 관한 연구들은 많지 않다. 우리나라에는 소양호에서 수온, pH, DOC, Chl-*a* 등의 이화학적 환경요인이 계절적인 세균군집구조에 미치는 영향에 관한 연구가 있을 뿐이다(1).

본 연구는 경북 경산시에 위치한 농업용저수지, 남매지를 대상으로 eubacteria 중 proteobacteria에 속하는  $\alpha$ · $\beta$ · $\gamma$ -subclasses와 CF group 군집 구조의 연중 변화를 모니터링하고, 세균의 생장과 증식에 영향을 미치는 환경요인들을 측정하여 eubacteria 군집구조와의 상관성을 규명하고자 했다.

### 재료 및 방법

#### 1. 조사정점 및 시료 채취

경북 경산시 영남대학교 앞에 위치한 농업용 저수지 남매지에서 3정점을 선정하여 2000년 3월 30일부터 2001년 2월 16일까지 매달 1회씩 시료를 채취하였다. 정점 1은 인근에 위치한 주거지에서 발생하는 생활하수가 유입되는 지역이고, 정점 2는 비교적 오염원의 유입이 적은 지역이며, 정점 3은 남매지의 유출구가 있는 곳이다(Fig. 1).

#### 2. FISH법을 이용한 세균군집 측정

##### 시료 고정

채취한 시료를 바로 4% paraformaldehyde solution에서 24 시

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 053- 850-6456, Fax: 053-850-6459  
E-mail: ecolomi@taegu.ac.kr

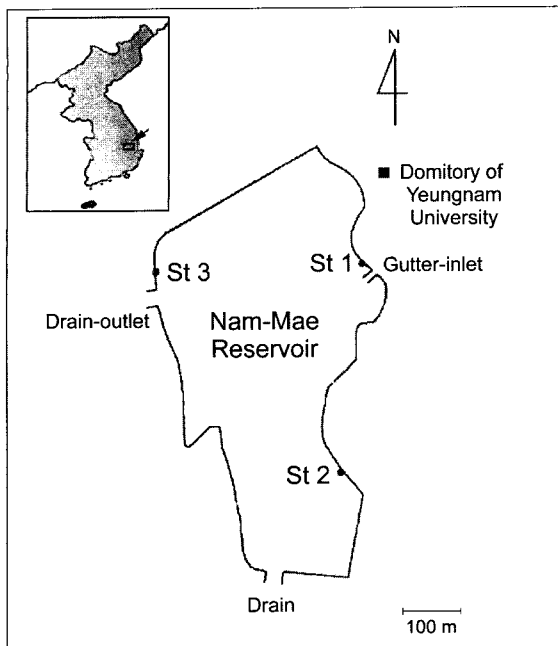


Fig. 1. Sampling stations in Nam-Mae Reservoir.

간 이상 고정하였다. 고정된 시료를 polycarbonate membrane filter (pore size 0.2  $\mu\text{m}$ ,  $\phi$ 25 mm)에 2 ml씩 여과한 후, phosphate buffered saline (1 $\times$ PBS) 1 ml을 여과하였다. 여과된 filter에 50%, 80%, 99% ethylalcohol 0.5 ml을 첨가하여 각각 3분 동안 탈수시킨 후 filter를 건조시켰다.

#### Gene probe

사용한 gene probe의 염기서열은 Table 1에서 보는바와 같이 주문 제작(TaKaRa, Japan)하여 사용하였고, 이때 probe에 붙인 형광물질은 tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate와 fluorescein-isothiocyanate (FITC)이다.

#### Fluorescent In Situ Hybridization

전처리 과정을 거친 filter는 gelatin coated slide glass에 올려 놓고 예열된 hybridization solution [0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.01% SDS, formamide (농도 EUB 0%; ALF 20%; BET · GAM 35%; CF 15%)] 16  $\mu\text{l}$ 와 gene probe 3  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여, EUB338의 경우 38°C에서 나머지 group은 46°C hybridization chamber에서 90분 동안 배양하였다. 배양 후, 배양 온도보다 2°C 높은 온도에서 예열시킨 hybridization washing solution[20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 0.01% SDS,

Table 1. Sequences, target sites, and specificities of rRNA-targeted oligonucleotide probes used for fluorescent *in situ* hybridization

Probe	Probe sequence	Target site ( <i>E. coli</i> rRNA positions)	Reference
EUB338 Domain bacteria	5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	16S (338-355)	(6)
ALF1b $\alpha$ -subclass of proteobacteria	5'-CGTTCGYTCTGAGCCAG-3'	16S (19-35)	(17)
BET42a $\beta$ -subclass of proteobacteria	5'-GCCTTCCCACTTCGTTT-3'	23S (1027-1043)	(17)
GAM42a $\gamma$ -subclass of proteobacteria	5'-GCCTTCCCAACATCGTTT-3'	23S (1027-1043)	(17)
CF319a <i>Cytophaga-Flavobacterium</i> group	5'-TGGTCCGTGTCTCAGTAC-3'	16S (319-336)	(8)

Table 2. Mean values (range) for environmental parameters of investigated stations in Nam-Mae Reservoir

	St 1	St 2	St 3
WT (°C)	23.0 (13.5~33.5)	23.1 (8.8~37.4)	23.0 (7~36)
pH	7.6 (6.91~10.06)	7.6 (7~9.91)	7.7 (7.09~10.22)
DOC (mg/l)	7.2 (3.57~15.6)	6.85 (3.43~10.47)	7.1 (3.58~10.89)
SS (mg/l)	39.5 (3.5~307.7)	24.8 (6.9~98.7)	37.5 (6.9~116.2)
NO <sub>3</sub> -N ( $\mu\text{mol/l}$ )	67.0 (0.32~87.14)	63.6 (3.55~86.24)	0.802~86.64 (67.18)
NH <sub>4</sub> -N ( $\mu\text{mol/l}$ )	74.1 (3.759~211.36)	107.7 (4.032~305.18)	86.4 (4.601~304.72)
PO <sub>4</sub> -P ( $\mu\text{mol/l}$ )	2.9 (0.09~8.43)	5.9 (0.10~30.99)	9.4 (0.02~66.23)
Chl- <i>a</i> ( $\mu\text{l}$ )	34.9 (0.46~294.76)	17.97 (0.24~134.86)	20.0 (0.24~148.79)
Chlorophyceae(cells/ml)	3065.5 (750~8080)	5797.3 (500~26900)	6781.8 (600~38200)
Cyanobacteria(cells/ml)	58173.3 (80~142900)	48200 (300~147500)	57800 (200~168400)
Bacillariophyceae(cells/ml)	15367.5 (1400~88900)	24110 (2900~108100)	20022.5 (800~112800)
Total algae(cells/ml)	56808.3 (3500~144400)	54070.8 (4200~148200)	63142.5 (3760~143400)

NaCl (농도 EUB 0.9 M; ALF 0.225 M; BET·GAM·CF 80 mM)]으로 filter를 15분간 세척하였다. *In situ* hybridization 과정은 모두 암실에서 행하였다.

**DAPI 염색**

각 세균그룹들이 포함되는 eubacteria의 총세균수 (total bacteria)에 대한 비율을 알기 위해 FISH법을 실행한 filter를 DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole)로 2차 염색한 후 계수하였다(12).

**형광현미경 형광물질**

형광물질 tetramethylrhodamine로 표지한 것은 형광현미경 (Axiolab, Zeiss, Germany) green filter (BP546/12, LP580, FT590)로 관찰하였고, 형광물질 FITC로 표지한 probe는 blue filter (450-490, LP520, FT510)로 관찰·계수하였다. 총세균수 관찰을 위한 DAPI염색은 형광현미경 UV filter (G365, LP395, FT420)에서 관찰·계수하였다. 이때 각세균수는 최소한 15개 이상의 field를 계수한 후 그 평균값을 결과치로 간주하였다(11).

**3. 이화학적 환경요인과 식물플랑크톤의 현존량**

수온과 pH는 현장에서 바로 측정하였고 (suspended solid) SS와 Chl-*a*는 Standard Method (9)에 준해 측정하였으며 용존유기물양(Dissolved Organic Carbon; DOC)은 여과된 시료를 Total Organic Carbon Analyzer (TOC 5000A, Shimadzu, Japan)로 정량하였다. 무기 영양염류인 암모니아성 질소(NH<sub>4</sub>-N), 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N)와 인산염 인(PO<sub>4</sub>-P) 등은 영양염 자동분석기 (TRAACS 2000, Bran+Luebbe, Germany)를 이용하여 분석하였다. 아울러 식물플랑크톤의 현존량은 1 l용 폴리에틸렌 용기로 채집한 시료를 Lugol's 용액으로 고정한 후 실험실에서 48~72시간 침전시켜 50 ml로 농축하고 잘 혼합한 후 Sedgwick-Rafter plankton counting chamber에 끌고루 분산시켜 단위 체적당 개체수(cells/ml)를 현존량으로 계산하였다. 출현종은 광학현미경 400~1,000배 하에서 묘화장치로 스케치하였고, 필요에 따라서는 현미경사진을 촬영하여 동정하였다(Labophot, Nikon, Japan). 종의 동정 및 분류는 Smith의 분류체계에 의거하였다(3,14,22,23).

**4. 상관관계 분석**

SPSS (statistical package for the social sciences)를 이용하여 이화학적인 환경요인과 남매지에서 우점하는 규조류, 남세균, 녹조류 그리고 총 조류 현존량과 세균군집간의 선형회귀분석(linear regression analysis)을 수행하였다.

**결과 및 고찰**

**총세균수와 eubacteria의 연중변화**

총세균수는 정점별로 큰 차이를 보이지 않으면서 0.7~4.3×10<sup>5</sup> cells/ml 범위에서 변화하였다(Fig. 2). 정점 1이 다른 정점에 비해 월별간 변화가 심한 이유는 이 지역에 간헐적으로 유입되는 생활하수의 영향 때문으로 사료된다. FISH법으로 측정된 eubacteria의 총세균수에 대한 비율도 정점간에 큰 차이 없이 정

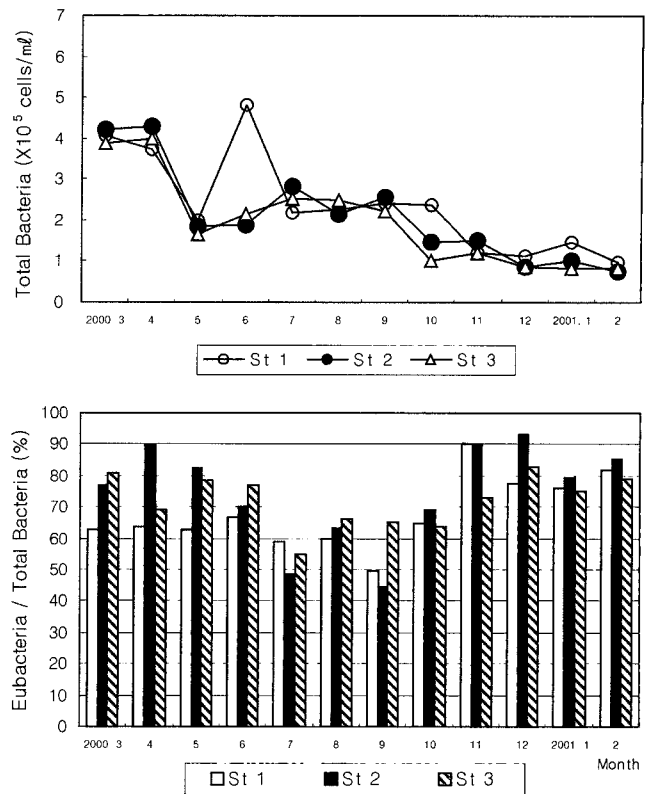
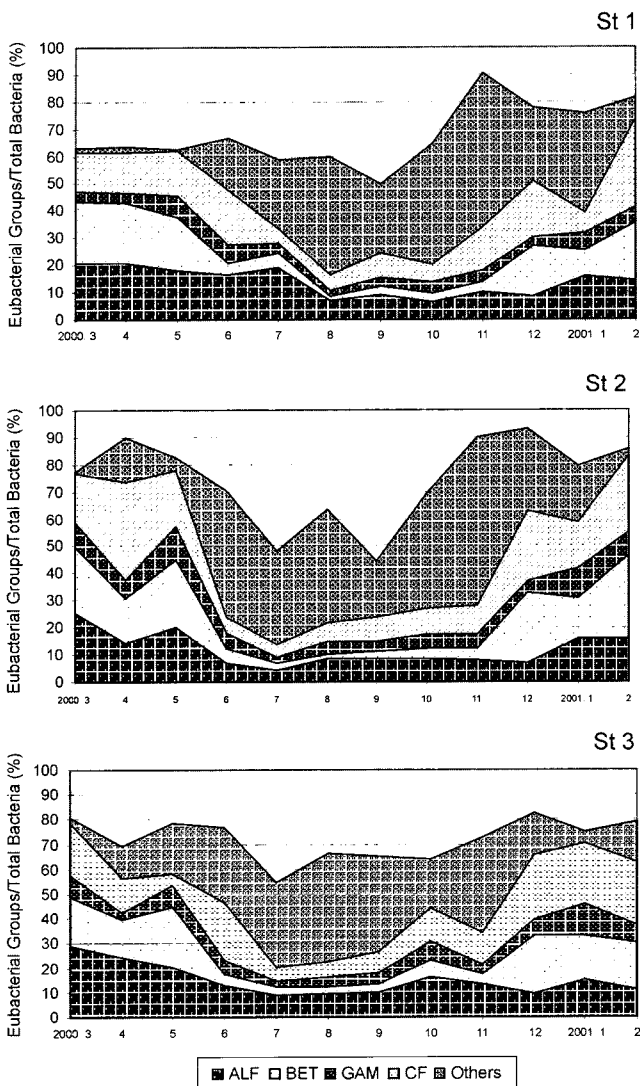


Fig. 2. Variations of total bacterial numbers (A) and ratio of eubacteria to total bacteria (B) at each station in the Nam-Mae Reservoir.

점 1에서는 49.6~90.3%, 정점 2에서는 44.5~93.3%, 정점 3에서는 54.8~82.6% 범주에서 변화하였다. FISH법을 이용하여 세균을 검출할 때 그 검출 가능성 여부는 세균내부로의 gene probe 침투력(8)과 세균에 존재하는 리보솜의 양(12,18)에 좌우된다고 한다. 즉 생리적 기능이 좋거나 빨리 자라는 세균에는 리보솜이 많이 존재하므로 FISH법에 의한 세균 검출가능성이 높는데 반해 정수처리된 음용수와 같이 기아상태에 놓인 세균의 검출가능성(총세균수에 대한 eubacteria 비율)은 40% 미만이라고 하였다(18). 남세균인 *Microcystis aeruginosa*에 의한 bloom이 발생한 시기(6~9월)와 쇠퇴하기 시작한 10월에 총세균수에 대한 eubacteria의 비율이 다른 시기에 비해 낮은 비율(44.5~69.1%)을 나타내었다. Eubacteria가 총세균수에서 차지하는 비율이 낮은 것은 세균의 rRNA함량에 달려 있고 세포당 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>개 이상의 리보솜이 존재해야 검출이 가능하기 때문이다(18). 또 배양한 세균이 자연계(연못)에서 분리한 세균보다 강한 형광을 띠는 이유는 높은 rRNA 함량 때문이다(12). 소양호에서도 남세균이 우점하는 시기에는 eubacteria의 총세균수에 대한 비가 50% 이하로 나타났는데 그 이유를 남세균이 생성하는 독성물질 때문일 것으로 추정하였다(1). 따라서 남매지에서 하절기에 eubacteria와 그 하위 분류군인 proteobacteria가 낮은 비율로 검출된 것은 *Microcystis* sp.가 생성하는 간장독소(microcystin) 등이 저해요인으로 작용했기 때문일 가능성도 배제할 수 없음을 시사해준다. 남세균과 조



**Fig. 3.** Variations of eubacterial groups detected by group-specific fluorescent probes to total bacteria (%) at each station in Nam-Mae Reservoir. (ALF= $\alpha$ -subclass, BET= $\beta$ -subclass, GAM= $\gamma$ -subclass, CF=Cytophaga-Flavobacterium group, others=other eubacteria).

류의 현존량 변화를 보면 3~5월에는 녹조류, 6~9월에는 남세균인 *Microcystis* sp., 그리고 그 외의 시기에는 규조류가 우점하였다. 아울러 Chl-a 양이 6~7월에 25~295 mg/l, 그 외의 시기에는 10 mg/l 미만의 수치를 나타냈고 이때 NO<sub>3</sub>-N도 가장 낮은 것으로 보아 bloom이 6~7월에 가장 심했던 것으로 판단된다.

**Eubacteria의 군집구조**

$\gamma$ -subclass를 제외한 proteobacteria에 속하는 세균군, 즉  $\alpha$ · $\beta$ -subclasses와 CF group의 총세균수에 대한 비율이 대략 6~11월에는 낮은 빈도(10% 미만)로 검출된 반면 그 외의 시기에는 2배 이상의 검출빈도를 나타냈다(Fig. 3).  $\gamma$ -subclass세균들은 수표면이 얼었던 2001년 1월에는 6.6%(정점 1), 11.2%(정점 2), 12.8%(정점 3)의 비교적 높은 비율을 보였지만 그 외의 시기에

는 검출한 세균군 중 가장 낮은 총세균수에 대한 비율(<10%)을 나타냈다.

**$\alpha$ -subclass**

혐기성 광합성세균인 *Rhodobacter* sp., 호기성 종속영양세균인 *Caulobacter* spp.와 *Hyphomicrobium* spp. 등 다양한 물질대사와 다양한 형태를 가진 세균군을 포괄하는  $\alpha$ -subclass (11)의 정점 1에서의 연중 변화를 보면 다른 세균군의 검출비율이 낮았던 7월에도 18.9%의 높은 비율을 나타냈다. 소양호에서는 chl-a (2.0 mg/l)와 DOC (1.5 mgC/l)가 낮은 농도를 나타낸 여름에 이 세균군이 우점했고 저농도의 유기물이용능력이 다른 세균군에 비해 좋은 것으로 추정한다고 보고되었다(1). 그러나 본 결과에서는 6월에 정점 1에서 가장 높은 chl-a (294.8 mg/l)와 DOC (15.6 mg/l) 농도를 나타냈음에도 불구하고  $\alpha$ -subclass에 속하는 세균군이 비교적 많이 검출되었다(16.3%). CF group도 이와 동일한 시기인 6월(20.2%)에 5월(16.1%)보다 많이 검출되었다. 태평양, 남극해 등의 바다와 바이칼호, 발틱호 등 여러 호수에서 FISH법으로 세균군집 구조를 분석할 결과에 의하면(11), 모든 샘플에서 CF group 세균군이  $\alpha$ -subclass보다 항상 많이 검출되었고 또 이 세균군은 다양한 환경에 서식하며 담수보다는 해수에서 더 높은 빈도로 검출된다고 했다. 본 결과에서도 이와 유사하게  $\alpha$ -subclass가 많이 검출되면 CF group 세균군도 많이 검출되는 경향을 보였다. 이는 수계에 존재하는 유기물 분해에 이 두 세균군이 서로 연계되어 있을 가능성을 시사해 주는 것으로 생각된다.

**$\beta$ -subclass**

세 정점 모두에서 6월~11월에는 1.9~5.7% (정점 1), 1.7~5.2% (정점 2), 2.8~7.2% (정점 3)의 낮은 비율을 나타냈으나 1월을 제외한 겨울철부터 봄철까지는 18.4~22.5% (정점 1), 16.6~31.1% (정점 2), 14.9~24.6% (정점 3)의 비교적 높은 비율을 보였다. *Nitrosomonas*, *Thiobacillus* 등 chemoautotrophs를 포함하는 이 세균군은 빈영양상태의 호수(5), 바이칼 호수의 심수층(11), 활성슬러지(13,19,24)에서 우점하거나 상당수 검출되었고 낮은 수온의 수계(5)에서도 우점한다고 보고되었다.

**$\gamma$ -subclass**

영양매지로 분리된 세균의 대부분을 포괄하는  $\gamma$ -subclass 세균들은(19) 계절에 관계없이 거의 10% 미만의 낮은 비율로 검출되었다. 수중의 DOC함량이 증가추세에 있던 5월(정점 1, 8.0%; 정점 2, 12.0%; 정점 3, 8.5%)과 수표면이 얼었던 1월(정점 1, 6.6%; 정점 2, 11.2%; 정점 3, 12.9%)에 비교적 높은 검출율을 보였다. 이 세균군에 포함된 세균의 다수가 분해가 용이한 유기물질을 이용해 빨리 성장하는 copiotrophs이고(19), 실제로 수계 생태계에서 이들이 차지하는 비율은 4% 미만으로 아주 낮다는 보고(11)와 일치하였다. 또 영양염류를 추가해 주면  $\beta$ -subclass에서  $\gamma$ -subclass로 세균군집의 천이가 이루어지는 것으로 미루어  $\gamma$ -subclass에 속하는 세균들이 빠르게 성장하는 세균을 포함할 것으로 추정하였다(24). 이로 미루어 볼 때 5월과 1월의 높은 수치는 수계에 존재하는 분해가 용이한 유기물질과 얼음이 깨지면서 외부에서 유입된 유기물에 기인한 것으로 추정된다. 소양호에서

**Table 3.** Correlation coefficients between environmental parameters and bacterial populations at each station of Nam-Mae Reservoir

		TC	EUB	ALF	BET	GAM	CF
WT	r	0.441*	0.272	0.153	-0.089	0.171	-0.008
	p-value	0.007	0.109	0.372	0.608	0.320	0.961
pH	r	-0.006	-0.038	-0.103	-0.171	-0.134	-0.198
	p-value	0.973	0.824	0.549	0.320	0.436	0.248
DOC	r	0.534**	0.455**	0.287	0.092	0.395*	0.301
	p-value	0.001	0.006	0.094	0.600	0.019	0.079
SS	r	0.410*	0.310*	0.185	-0.109	0.313	0.267
	p-value	0.014	0.070	0.288	0.532	0.067	0.122
NO <sub>3</sub> -N	r	-0.193	-0.121	0.025	0.186	-0.079	-0.045
	p-value	0.259	0.481	0.883	0.278	0.648	0.793
NH <sub>4</sub> -N	r	0.087	0.083	-0.079	0.004	-0.147	0.113
	p-value	0.614	0.628	0.646	0.981	0.391	0.511
PO <sub>4</sub> -P	r	0.144	0.138	-0.038	-0.069	0.017	0.195
	p-value	0.403	0.422	0.827	0.687	0.920	0.254
Chl-a	r	0.376*	0.259	0.131	-0.164	0.210	0.201
	p-value	0.024	0.128	0.446	0.339	0.220	0.239
Chl.	r	0.228	0.372*	0.159	0.151	0.195	0.493**
	p-value	0.201	0.033	0.376	0.402	0.276	0.004
Cya.	r	0.115	-0.105	-0.211	-0.451*	-0.227	-0.253
	p-value	0.577	0.609	0.300	0.021	0.266	0.212
Bac.	r	-0.152	-0.223	-0.270	-0.379	-0.145	-0.304
	p-value	0.478	0.294	0.201	0.067	0.500	0.148
total algae	r	0.146	-0.051	-0.217	-0.494**	-0.202	-0.239
	p-value	0.394	0.769	0.204	0.002	0.238	0.160

\*\* p< 0.01, \* p< 0.05, N=36; TC, Total Bacteria; Chl, Chlorophyceae; Cya, Cyanobacteria; Bac, Bacillariophyceae.

도 규조류에 의해 생성된 생분해성유기물(B-DOC)의 양이 높을 때  $\gamma$ -subclass세균이 전 수심에서 2~3배 증가했다고 하였다(1).

#### *Cytophaga-Flavobacterium* (CF) group

남세균이 우점하던 하절기(4.9~13.1%)를 제외하고는 계절과 상관없이 20.0~36.3%의 고른 분포를 나타냈고, 또 그에 속하는 세균의 대부분이 사상성(filamentous)이었다. 이와 동일하게 호수에서 CF319a probe로 검출된 CF group세균의 대부분이 사상성 세균이었으며, 이들이 심수층에 존재하는 다양한 고분자물질의 분해에 관여하는 것으로 추정되었다(11,21). 또한 이 세균군이 빈영양호에서 Chl-a가 증가했을 때 우점한다고 했는데(21), 본 결과에서는 Chl-a가 급격하게 증가한 6월에 정점 1과 3에서는 CF group이 증가하였지만 정점 2에서는 오히려 감소하였으며(Fig. 3) Chl-a와 유의성 있는 상관성을 보이지는 않았으나 녹조류의 현존량은 유의성있는 상관성( $r=0.493$ ,  $p<0.01$ )을 나타냈다(Table 3). 해양에서 고분자응집물(macroaggregate)에 부착한 세균군집구조를 분석한 결과, 다양한 고분자 유기물 분해능을 가진 이 세균군이 그 대부분을 차지하였고(10) 또 수계에 존재하는 입자상 유기물질을 제거했을 때 이 세균군의 비율이 급속히 감소했다고 한

다(1). 또한 하수구가 막힐 정도로 과다하게 생성된 응집물의 세균군집을 FISH법으로 분석해 본 결과, CF group세균이 총세균수의 43% 이상을 차지하였고 그 응집물의 대부분은 셀룰로스가 주성분인 화장실 휴지로 보고된 바 있다(20). 따라서 본 결과에 나타나는 이 세균군의 높은 우점률은 수계에 존재하는 분해가 더딘 고분자물질과 연관이 있을 것으로 생각된다.

#### 각 group 세균군집과 환경요인과의 상관성

총세균수는 수온( $r=0.441$ ,  $p<0.01$ ), DOC ( $r=0.534$ ,  $p<0.01$ ), SS ( $r=0.410$ ,  $p<0.05$ ) 그리고 chl-a ( $r=0.376$ ,  $p<0.05$ )와 유의성 있는 양의 상관성을 나타냈다. 세포내 RNA양과 관련이 있는 FISH법으로 측정된 eubacteria는 DOC ( $r=0.455$ ,  $p<0.01$ ), 녹조류의 현존량( $r=0.372$ ,  $p<0.05$ )과 양의 상관성을 보였다. 이는 DAPI 염색으로 측정하는 총세균수는 죽은 세균과 살아있는 세균 모두를 계수한 수치인 반면 FISH법으로 측정된 eubacteria는 RNA가 많은 즉, 활성이 있는 세균만이 계수 되기 때문일 것으로 추정된다. 아울러  $\gamma$ -subclass에 속하는 세균들이 유기 영양염류가 많은 곳에서 빠른 성장을 보인다는 연구결과(24)와 일치하게  $\gamma$ -subclass

세균의 검출비율은 검출한 세균군 중 가장 낮았으나(Fig. 3) DOC( $r=0.395$ ,  $p<0.05$ )와 양의 상관성을 나타냈다. 이는 앞으로 수환경 평가에  $\gamma$ -subclass 세균수 측정이 하나의 부영양화 지표로 활용될 가능성을 시사해 준다. CF group 세균은 녹조류 현존량( $r=0.493$ ,  $p<0.01$ )과 유의성있는 양의 상관성을 나타냈다.

검출한 모든 세균군( $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$  CF group)이 녹조류와는 양의 상관성을 나타낸 반면 남세균과 규조류와는 음의 상관성을 나타냈다; 특히  $\beta$ -subclass (5,11,19,25)에 속하는 세균들은 6~9월에 bloom을 일으켰던 남세균, *Microcystis aeruginosa* ( $r=0.451$ ,  $p<0.05$ ) 뿐 아니라 총조류수( $r=0.494$ ,  $p<0.01$ )와도 유의성 있는 음의 상관성을 나타냈다(Table 3).  $\beta$ -subclass세균은 규조류가 우점했던 10~11월에도 그 검출비율이 낮았으나 6~9월보다는 증가하였고 녹조류가 우점했던 4~5월에는  $\beta$ -subclass세균들이 오히려 증가한 반면, 남세균이 우점하던 시기, 특히 8월에는 모든 정점에서 연중 가장 낮은 비율(정점 1, 1.92%; 정점 2, 1.67%; 정점 3, 2.75%)로 검출되었다. 이는  $\beta$ -subclass세균들의 성장이 남세균이 분비하는 독소로 인해 저해됨을 시사해준다(1). 규조류와 남세균이 eubacterial group 세균들과 음의 상관성을 나타내는 것은 그들의 일부가  $\beta$ -subclass의 *Nitrosomonas* sp.와 같은 chemoautotrophs이어서 무기영양염류를 섭취하는데 있어 조류와 경쟁하기 때문일 가능성도 있다고 생각된다.

본 연구에서 세균군집구조의 분석에 사용한 gene probes가 group specific한 것들이어서 해당 수역의 세균 종 조성에 관한 세밀한 정보를 제공하지 못하지만 대략 어떠한 group의 세균들로 구성되어 있는지에 관한 개괄적인 정보는 제공해 준다. 군집구조에 대한 구체적인 정보를 얻으려면 속(genus)수준 probe를 가능한 한 많이 설정해서 동정해야하므로 그에 따른 많은 시간과 인력이 요구되므로 그 실행에 어려움이 있다. 이미 검증되었듯이 강, 호수, 해양 등 자연수계뿐 아니라 음용수, 폐수처리공정의 일종인 활성슬러지, 토양에 존재하는 세균군집의 개괄적인 추이를 관찰하는데는 group 수준의 세균군집구조 분석이 유용하다(5,11,13,16,18,19,24,25,26). 아직은 gene probe을 이용한 세균군집구조에 관한 연구결과들이 미미하지만 앞으로 해당생태계의 환경요인분석을 동시에 수행한 결과들이 축적되고, 또 probe 설계 등의 검출방법들이 개선된다면 FISH법 등 분자 기법을 이용하여 다양한 세균군집들의 생태적 기능을 보다 명료하게 규명할 수 있으리라 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 2000학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

### 참고문헌

1. 김동주, 홍선희, 안태석. 1999. 소양호에서 세균군집구조의 계절적, 수직적 변화. 미생물학회지 35, 242-247.
2. 이동훈, 김상중. 1997. 수계생태계에서의 세균군집 구조의 분자생물학적 분석. 미생물학회지 33, 55-67.

3. 정준. 1993. 한국담수조류도감. 아카데미 서적, 서울.
4. 홍선희, 안태석. 1998. Fluorescent *In Situ* Hybridization 방법으로 분석한 소양호 세균군집구조의 계절적 변화. 미생물학회지 34, 169-174.
5. Alfreider, A., J. Pernthaler, R. Amann, B. Sattler, F.O. Glöckner, A. Wille, and R. Psenner. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2138-2144.
6. Amann, R., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux, and D.A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919-1925.
7. Amann, R., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1994. Identification of uncultured bacteria: A challenging task for molecular taxonomists. *ASM News* 60, 360-365.
8. Amann, R., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
9. APHA, AWWA, WEF. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
10. DeLong, E.F., G.S. Wickham, and A.A. Davis. 1993. Phylogenetic diversity of substrate marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Science* 243, 1360-1363.
11. Glöckner, F.O., B.M. Fuchs, 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.
12. Hicks, R., R. 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.
13. Kämpfer, P., R. Erhart, C. Beimfohr, J. Böhringer, and M. Wagner. 1996. Characterization of bacterial communities from activated sludge: Culture-dependent numerical identification versus *in situ* identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microb. Ecol.* 32, 101-121.
14. Komarek, J. and B. Fott. 1983. Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung: Chlorococcales. Die Binnengewässer, Band XVI, 7. Heft. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
15. Lee, S.H. and J.A. Fuhrman. 1990. DNA hybridization to compare species compositions of natural bacterioplankton assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 739-746.
16. Llobet-Brossa, E., R. Rosselló-Mora, and R. Amann. 1998. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2691-2696.
17. Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: *Problems and solutions*. *System. Appl. Microbiol.* 15, 593-600.
18. Manz, W., U. Szewzyk, P. Ericsson, R. Amann, K.H. Schleifer, and T. Stenström. 1993. *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2293-2298.
19. Manz, W., M. Wagner, R. Amann, and K.H. Schleifer. 1994. *In situ* characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Wat. Res.* 28, 1715-1723.

20. Park, J.K., Y.O. Lee, J.H. Park, and M. Jang. 2001. Evaluation of excess biomass growth in sewers in Watertown, Wisconsin. Report submitted to Donohue and Associates and Fisher-Barton, Inc.
21. Pemthaler, J., 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.
22. Prescott, G. 1962. Algae of the Western Great Lakes Area. W. M. C. Brown Co. Publ., Iowa.
23. Smith, G. 1950. The fresh water algae of the United States. McGraw-Hill Book Comp., New York.
24. Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, and K.H. Schleifer. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1520-1525.
25. Wagner, M., R. Amann, P. Kämpfer, B. Assmus, A. Hartmann, P. Hutzler, N. Springer, and K.H. Schleifer. 1994. Identification and *in situ* detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *System. Appl. Microbiol.* 17, 405-417.
26. Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi, and K.H. Schleifer. 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 792-800.

(Received December 10, 2001/Accepted March 4, 2002)

---

**ABSTRACT: Seasonal Variation of Eubacterial Community Structure and Their Structure Affecting Environmental Parameters in Reservoir**

**Hee-Soon Lee, Chung-Won Park<sup>1\*</sup>, Mi-Kyung Kim<sup>1</sup>, and Young-Ok Lee** (Division of Life Science, Taegu University, Kyung-san 712-714, Korea, <sup>1</sup>Marine Science Institute, Yeungnam University, Kyung-san 712-749, Korea)

For elucidating the correlation between the eubacterial community structure and environmental parameters in Nammae Reservoir located in Kyungsan, Kyungbuk, the bacterial community structure and their structure affecting environmental parameters were analyzed using Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) monthly over year.  $\alpha$ · $\beta$ · $\gamma$ -subclasses of Proteobacteria and *Cytophaga-Flavobacterium* (CF) group known as dominant bacterial group in freshwater were detected in 3 stations over year. The ratio of each subclass to total bacteria was determined;  $\alpha$ · $\beta$ · $\gamma$ -subclasses and CF group varied in the range of 4.0~29.2%, 1.7~25.8%, 1.8~12.8%, 4.9~36.3%, respectively and there was no substantial differences between stations. In terms of the correlation between each group specific bacteria and environmental parameters such as temperature, SS, pH, DOC, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P, standing crops of algae, the results were as follows: 1) total bacterial numbers correlated positively with temperature, SS and DOC, 2) Eubacteria positively with DOC and Chl-*a*, 3)  $\gamma$ -subclass positively with DOC, and 4) CF group positively with standing crops of chlorophyceae, 5) whereas  $\beta$ -subclass bacteria correlated negatively with standing crop of cyanobacteria and that of total algae.