

## 대청호 수화발생시기의 미생물 다양성 및 계통분류학적 분석

고소라 · 안치용 · 이영기 · 오희목\*

한국생명공학연구원 환경바이오연구센터

### Dynamics of Bacterial Communities Analyzed by DGGE during Cyanobacterial Bloom in Daechung Reservoir, Korea

So-Ra Ko, Chi-Yong Ahn, Young-Ki Lee and Hee-Mock Oh\*

Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of  
Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

**Abstract** - The change of microbial communities during cyanobacterial bloom was comparatively analyzed by 16S rDNA PCR-DGGE in Daechung Reservoir during 2003~2005. Morphological analysis showed that Cyanophyceae dominated algal community in the bloom. Dominant cyanobacteria were *Microcystis*, *Planktothrix (Oscillatoria)*, *Phormidium* and *Anabaena*. We used 16S rDNA-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles and phylogenetic affiliations of the DGGE bands to analyze the community structure and diversity of the predominant microbial community. The DGGE band patterns demonstrated that the most frequent bands were identified as *Microcystis* during the monitoring periods, *Planktothrix* also dominated on September 2003 and 2004, whereas *Anabaena* was showed a peak on September 2005 and *Aphanizomenon* on August 2003. DGGE and phylogenetic analysis provided us new information that could not be obtained by traditional, morphological analysis. The relationship between cyanobacteria and other aquatic bacteria can be traced and their genetic diversity also identified in detail.

**Key words** : algal bloom, community, cyanobacteria, DGGE

## 서 론

하천이나 호수의 부영양화로 인하여 미세조류가 대량 증식하는 현상을 수화(algal bloom) 또는 녹조라고 한다. 수화가 발생하는 호수에서 가장 흔히 출현하는 남조류는 *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix (Oscillatoria)* 등이 알려져 있고, 국내 대부분의 호수에서는 *Microcystis* 속의 종들이 우점하고 있다(김 등 1999a; 이 등 2003). 특

히 여름철마다 남조류의 대량증식에 의한 수화현상은 이취미를 발생시키며, 일부 독성물질을 생산하는 종들에 의하여 수질 문제가 야기되고 있다.

대청호는 다목적댐으로 중부권지역에 상수원수를 공급하는 매우 중요한 수자원이다. 그러나 매년 초여름부터 초가을까지 *Microcystis*와 *Anabaena*가 대량 증식하여 수화현상이 자주 발생하고 있어 수자원공급에 지장을 초래하고 있다(천 등 2006). 현장연구의 대부분은 조사기간을 1년으로 하거나, 1년 중에 수화발생기간만을 설정하여 개괄적인 남조류 수화현황 및 우점종 규명, 환경요인과의 상관성 분석 등의 성과가 있었다(빙 등

\* Corresponding author: Hee-Mock Oh, Tel. 042-860-4321,  
Fax. 042-879-8103, E-mail. heemock@kribb.re.kr

2002; 박 2005; 천 등 2006). 그러나 수화발생은 매년 변화하는 기상, 수리수문 등의 외부 환경요인에 의하여 크게 좌우되지만, 이에 따른 1년 이상의 축적된 자료를 통한 연도별 남조류 변화 양상 및 수화 기작에 대한 고찰은 부족한 실정이다. 또한 수화의 원인종인 남조류는 수생태계에서 1차 생산자로서 중요하며, 분해자인 세균 등과의 상호작용에 의하여 수화의 규모가 결정되므로, 이들 미생물 군집 구조의 이해는 매우 필요하다.

남조류, 세균 등의 미생물 군집을 분석하기 위하여 생리학적 그리고 형태학적 분석을 기초로 하는 방법이 주로 사용되어 왔지만, 이들 방법은 형태에 따른 동정의 한계로 인하여 미생물 군집의 다양성을 밝히는 데 어려움이 있었다. 또한 배양 가능한 세균은 자연계에 존재하는 총 세균의 1% 이하에 불과하므로 배양에 의한 군집 해석은 왜곡된 결과를 초래할 수 있다. 이러한 한계를 극복하기 위하여, 여러 분자생물학적 방법들이 개발되고 있으며, 다양성을 확인하는데 유용한 기법인 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)가 널리 사용되고 있다(김 등 2003; Kim *et al.* 2006).

본 연구에서는 3년(2003~2005년) 동안 하절기 수화가 빈번히 발생하는 대청호에서 이화학적 수질분석을 실시하였고, 16S rDNA의 DGGE를 이용하여 시간에 따른 남조류, 세균 등 미생물의 군집 다양성을 관찰하였다. 또한 sequencing analysis를 통해 우점 남조류를 분자적으로 동정하였으며, 수질과 미생물 군집변화와의 관계를 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료채취 지역 및 기간

2003년 7월 15일부터 10월 14일까지(13주), 2004년 6월 22일부터 10월 19일까지(17주), 2005년 6월 3일부터 11월 23일까지(24주) 1주일 간격으로 대청호의 댐측에 인접한 선착장에서 호수의 표층(0~30 cm)으로부터 약 10 L의 물 시료를 채취하였다. 시료는 냉장상태로 실험실로 운반하였다.

### 2. 수질 분석

수온, pH 및 탁도는 현장에서 YSI meter (63/100 FT, YSI Inc., Yellow Springs, USA)를 사용하여 측정하였다. Chlorophyll-*a*는 chloroform-methanol mixture (2 : 1, vol/vol)로 추출하고(Wood 1985), Fluorometer (Turner 450, Barnstead/Thermolyne, Dubuque, USA)를 사용하여 측정

하였다. 강우량에 대한 자료는 기상청 자료 중 대전지역을 기준으로 이용하였다.

총질소(total nitrogen, TN)는 persulfate법에 따라 총질소를 질산염으로 산화시킨 후 분석하였다(D'Elia *et al.* 1977). 질산염은 spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 230, 225, 220 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 산정하였다(Crumpton *et al.* 1992). 총용존질소(total dissolved nitrogen, TDN)는 시료를 Whatman GF/C filter로 여과한 후 총질소와 동일한 방법으로 농도를 산정하였다. 총입자성질소(total particulate nitrogen, TPN)는 TN과 TDN의 차이로 구하였다. 총인(total phosphorus, TP)과 총용존인(total dissolved phosphorus, TDP)은 persulfate법에 따라 총인을 무기 인산염으로 산화시킨 후 분석하였다(Menzel and Corwin 1965). 총인과 Whatman GF/C filter로 여과한 총용존인의 경우 spectrophotometer를 이용하여 885 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 산정하였다. 총입자성인(total particulate phosphorus, TPP)은 TP와 TDP의 차이로 산출하였다.

### 3. 식물플랑크톤의 현존량 측정

채수 현장에서 Lugol's solution으로 고정된 후 실험실로 운반된 농축 시료를 1 mL 용량의 Sedgwick-Rafter cell에 골고루 분산시킨 후 광학현미경(Microphot-FXA, Nikon Corp., Japan) 하에서 세포 수를 계수하였다. 군체의 경우 군체 당 평균 세포 수를 계수하여 군체 수와 적산하여 세포 수를 구하였고, 담수조류도감을 참고하여 동정하였다(정 1993).

### 4. DNA 추출

시기별로 채취한 시료는 0.22  $\mu$ m pore size filter (Millipore System, USA)를 이용하여 모두 여과하였다. 여과지에 걸러진 세포를 떼어내기 위해 TE buffer (pH 7.6)를 넣고 10~20초 정도 sonication한 후, 원심분리기(6,300  $\times$  g, 10 min)를 이용하여 농축하였고, 모아진 세포는 DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하고, 1% agarose gel에서 확인한 후, -20°C에서 보관하였다(고 등 2004).

### 5. PCR 증폭

채취한 시료로부터 16S rDNA를 증폭하기 위해 실험에 사용된 primer는 universal primer로 잘 알려진 341F GC(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-

3')와 907R (5'-CCG TCA ATT CAT TTG AGT TT-3')을 각각 사용하였다 (Ishii and Fukui 2001; Jaspers *et al.* 2001). PCR 반응은 25 ng의 주형 DNA, dNTP mixture (final conc. 200  $\mu$ M each), 10  $\mu$ M primer 그리고 5 unit  $\mu$ L<sup>-1</sup> *Taq* polymerase를 첨가하여 최종 부피가 50  $\mu$ L가 되도록 하였다.

PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 초기 열처리를 한 후, 94°C에서 1분간 변성시키고, annealing 온도는 초기에 65°C에서 시작하여 매 cycle마다 0.5°C씩 감소하도록 설정하고 55°C에 도달하면 15 cycle을 더 수행하도록 하여 1분간 반응시키고 신장을 위하여 72°C에서 1분간

반응시킨 후 최종적으로 72°C에서 10분간 처리하고 반응을 중단시켰다. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다 (고 등 2004).

## 6. PCR-DGGE 분석

PCR산물은 BioRad DCode System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)으로 DGGE를 수행하여 분석하였다. Denaturing gradient gel은 6% polyacrylamide (37.5 : 1 = acrylamide : bisacrylamide)에 urea와 formamide 변성제를

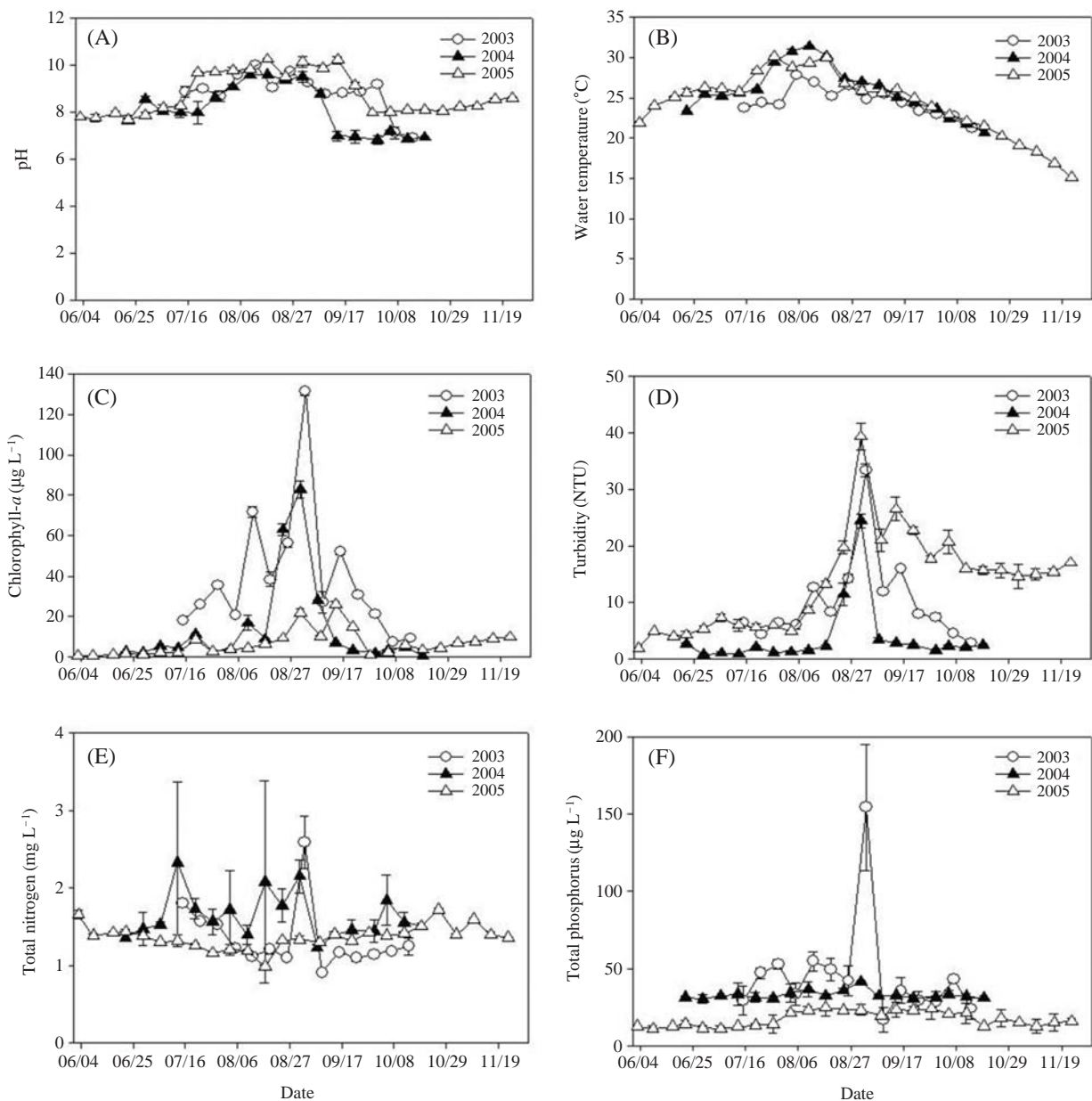


Fig. 1. Variations of pH (A), water temperature (B), Chl-*a* (C), turbidity (D), total nitrogen (E) and total phosphorus (F) in Daechung Reservoir.

30~45%까지 농도구배가 연속적으로 형성되도록 첨가하여 제작하였다. 이와 같이 제작된 gel에 PCR 증폭 산물을 25  $\mu$ L씩 loading하여 1  $\times$  TAE buffer 완충용액 (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 60°C, 200 V로 3시간 30분 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 EtBr에서 염색한 후, UV로 확인하였다 (Muyzer *et al.* 1993; 박 등 2003).

## 7. 염기서열 분석 및 계통분류학적 분석

DNA 단편들을 회수하기 위하여 각각의 밴드를 선택한 후, 잘라내어 3차 증류수 50  $\mu$ L를 첨가하고 4°C에서 하룻밤 동안 방치한 후 원심분리 (6,300  $\times$  g, 5 min)하여 상정액을 취하였다. 각 밴드에서 회수한 DNA를 주형으로 GC clamp를 포함하지 않은 341F와 907R primer를 이용하여 위와 같은 방법으로 PCR을 실시하였다. PCR 산물을 Gel extraction kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 automatic DNA sequencer (model 377, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 GenBank database를 이용하여 BLAST search program을 통해 분석하였다.

위의 방법으로 얻은 결과들을 함께 분석하여 phylogenetic tree를 완성하였다. 이를 위해 Clustal X 프로그램을 이용하여 염기서열을 정렬한 후 MEGA version 3.1의 Neighbor-joining method를 이용하여 phylogenetic tree를 완성하였다. Bootstrap 분석은 1,000회의 resampling을 통하여 조사하였다. 또한, 염기서열 간 distances 계산은 Kimura's two parameter model을 이용하여 분석하였다 (Kim *et al.* 2006).

## 결과 및 고찰

### 1. 수질분석 및 강우량 변화

이화학적 수질분석 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 조사기간 동안 대청호의 pH는 8~10의 약 알칼리성을 나타냈다 (Fig. 1A). 대청호에서 하절기에 pH의 증가는 식물플랑크톤의 광합성에 기인하는 것으로 보고되었다 (빙 등 2002). 조사기간 중 수온은 15~28°C로 조사되었으며, 남조류 수화발생기간인 7월부터 9월까지 25°C를 상회하였다 (Fig. 1B). 남조류는 다른 식물플랑크톤에 비하여 높은 수온을 요구하며 수온은 남조류 우점에 가장 중요한 요인이라고 하였다 (Kanoshina *et al.* 2003). Chl-*a*는 수화발생의 지표로서 세포의 크기, 우점종의 변화, 식

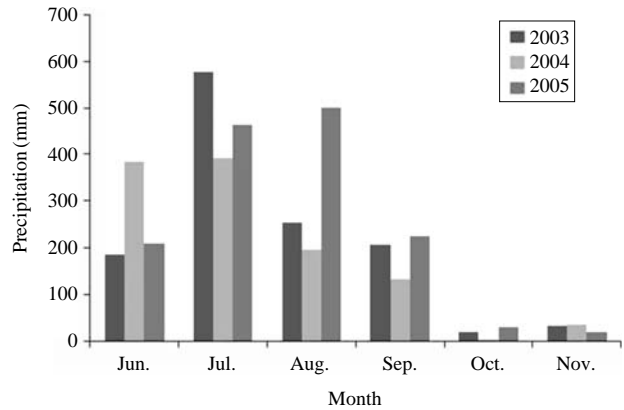


Fig. 2. Monthly sum precipitation in 2003~2005.

물군집 구조에 의해 영향을 받는다고 보고된 바 있고 (Felip and Catalan 2000), 수화발생시기인 2003년 9월 2일에 131.5  $\mu$ g L<sup>-1</sup>로 최고값을, 2005년에는 9월 14일에 26.3  $\mu$ g L<sup>-1</sup>로 상대적으로 낮은 값을 나타냈다 (Fig. 1C). 탁도는 2003년 9월 2일에 33 NTU, 2004년 8월 31일에 24 NTU 그리고 2005년 8월 31일에는 39 NTU로 수화발생시기에 모두 최고값을 나타냈다 (Fig. 1D). T-N과 T-P의 농도는 2003년 9월 2일에 각각 2.6 mg L<sup>-1</sup>, 154.3  $\mu$ g L<sup>-1</sup>로 가장 높게 나타났다 (Fig. 1E와 1F).

6월부터 11월까지의 조사기간 동안 월별 강우량을 기록하였다 (Fig. 2). 아시아 몬순기후의 직접적인 영향으로 하절기에 연평균 강우량의 약 50~60%가 집중된다. 특히적으로 8월에 2003년 254.9 mm와 2004년 198.3 mm의 강우량에 비해 2005년에는 약 2배인 499.5 mm의 강우량을 기록하였다. 이로 인하여 chl-*a*의 경우 2005년이 평균적으로 낮은 농도를 나타내었다. 또한 수온은 상대적으로 낮아지는 경향을 나타내었다. 남조류의 대발생은 강우시기 및 강우량, 수온, 일사량 등의 기상조건에 의해서 영향을 받는다고 하였다 (오와 김 1995). 집중강우는 식물플랑크톤의 최적 성장과 밀접한 관련이 있는 수온을 변화시킨다고 보고되었으며 (An and Jones 2000), 영양염류의 유입으로 인하여 수화가 촉진된다고 보고되었다 (박 2005). 정 등 (2005)은 식물플랑크톤 군집변화에 중요한 요인으로는 강우에 의한 수온 및 일사량의 감소, 그리고 수층의 불안정을 보고하였다.

### 2. 식물플랑크톤의 군집 변화-현미경 계수

조사기간 동안 대청호에 출현한 식물플랑크톤은 남조류, 규조류 및 녹조류가 주를 이루었고, 현미경으로 우점종의 변화를 관찰하였다 (Fig. 3). 일반적으로 부영양화된 호소에서의 우점종은 규조류나 남조류로 알려져 있고,

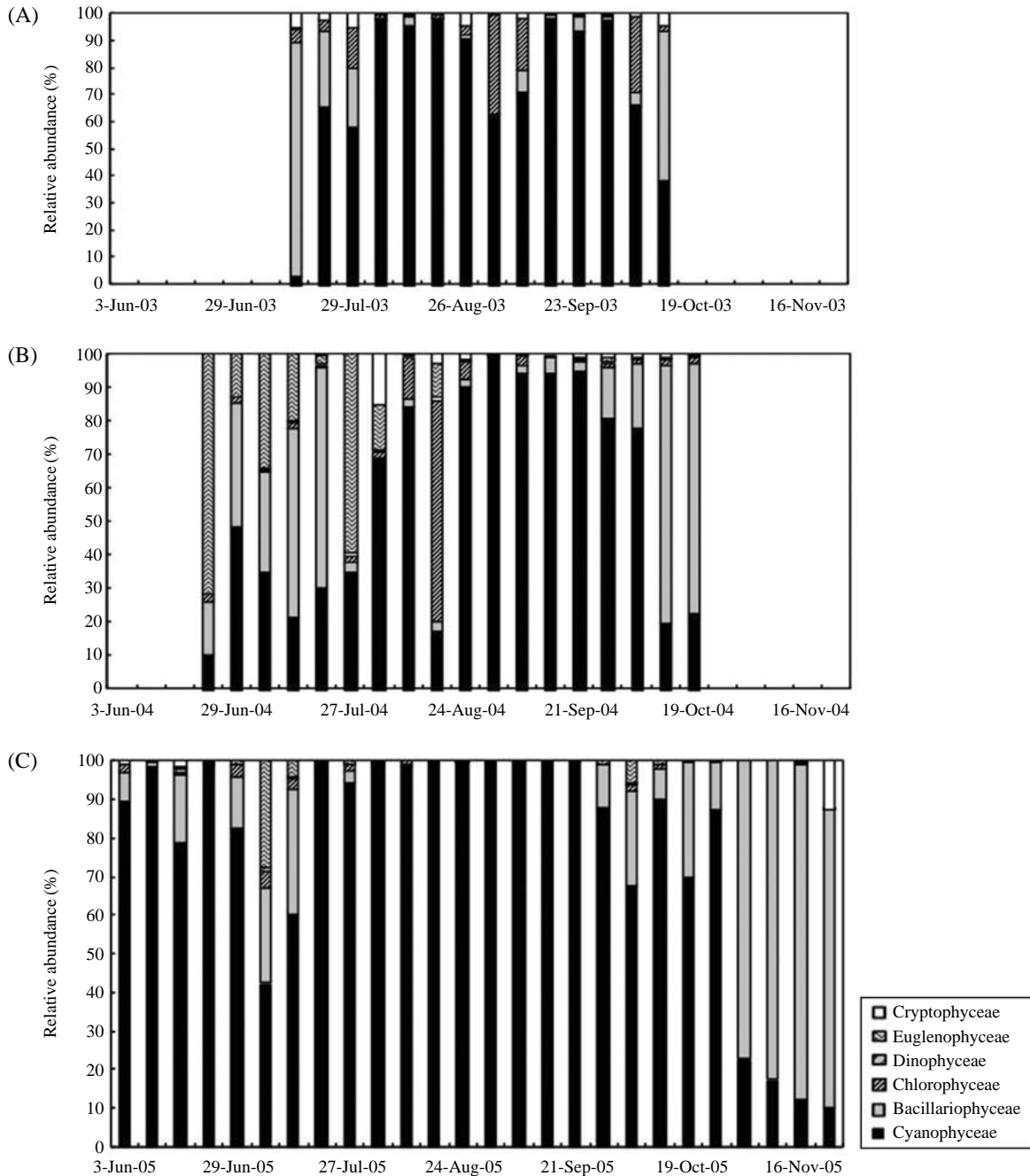


Fig. 3. Variation of relative abundance of phytoplankton in Daechung Reservoir. (A), 2003; (B), 2004; (C), 2005.

빈영양상태의 호소에서는 녹조류나 편모류가 우점종으로 알려져 있다(Negro *et al.* 2000). 또한 규조류는 불안정한 수체 및 낮은 수온에서 높은 경쟁력을 갖는 것으로 보고되었다(김 등 1995). 특히 대청호에서의 남조류 개체수는 수온과 가장 큰 상관관계에 있음이 인공신경망 모델을 통해 입증되었다(Ahn *et al.* 2011). 대청호에서는 여름에 남조류가 우점하고, 봄과 가을에는 규조류가 우점한다고 보고된 바 있다(Ahn *et al.* 2002). 이에 남조

류를 년도별로 최고로 발생된 시점에서 차지하고 있는 비율을 살펴 본 결과, 2003년 8월 19일에는 99%, 2004년 9월 14일에는 95% 그리고 2005년 7월 20일부터 9월 21일까지 94~100%로 크게 우점하고 있는 것을 확인하였다. 그러나 10월 이후에는 비율이 급격히 감소하였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이, 조사기간 동안 대청호에서 많은 종류의 남조류가 출현하였다. 이중 수화발생시기에 주로 나타나는 것으로 알려진 *Phormidium*, *Planktothrix*

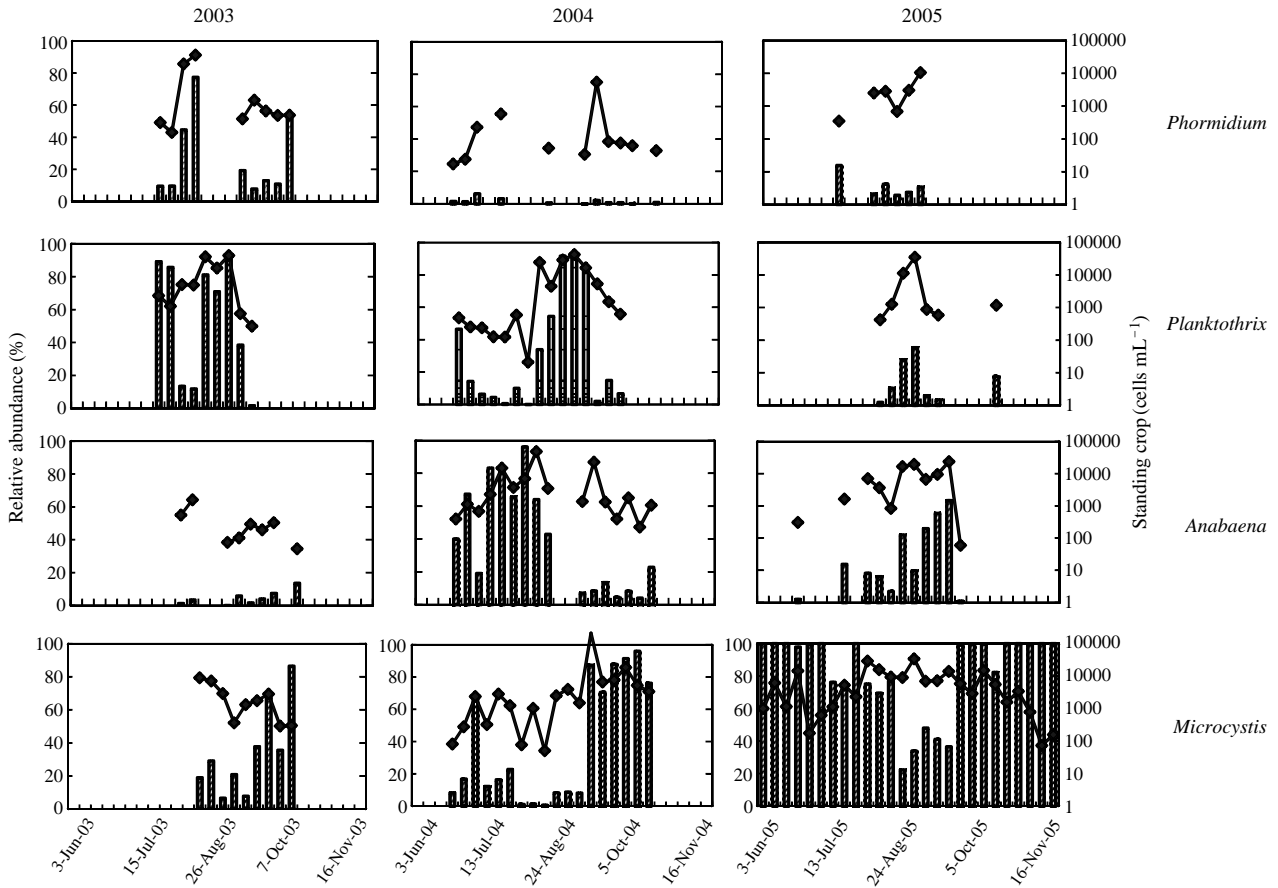


Fig. 4. Variations of relative abundance and standing crop of dominant genera of cyanobacteria communities in Daechung Reservoir in 2003~2005. Bar graph, relative abundance; line graph, standing crop.

(*Oscillatoria*), *Anabaena*, *Microcystis*를 중점적으로 계수하였다. *Phormidium*은 2003년도 8월 12일부터 9월 9일까지를 제외하고 계속적으로 관찰되었고, 8월 12일에는 최고 36,670 cells mL<sup>-1</sup>의 개체수를 보이면서 전체 군집 분포 내 74%를 차지하면서 우점하였다. 2004년도에는 9월 14일에 5,685 cells mL<sup>-1</sup>로 가장 많은 개체수를 보였으나, 조사기간 동안 전체 남조류 군집 내 10% 미만의 우점도를 보였다. 2005년도에는 전년도와 유사하게 전체 남조류 중 10% 정도의 낮은 우점도를 나타냈다. *Planktothrix* (*Oscillatoria*)는 2003년 7월 22일에 2,660 cells mL<sup>-1</sup>로 나타나기 시작하여 9월 2일에는 44,130 cells mL<sup>-1</sup>로 최고값을 보였고, 이 시기 전체 남조류 군집 내 87% 우점도를 보였다. 2005년도의 경우 8월 10일에 422 cells mL<sup>-1</sup>로 출현하기 시작하여 8월 31일에 34,872 cells mL<sup>-1</sup>로 최고값을 보였고, 전체 남조류 군집 내 35% 군집분포를 보여 2004년도에 비해 낮은 우점도를 나타내었다. *Anabaena*의 경우 2003년 8월 12일에 1,641 cells mL<sup>-1</sup>로 높은 개체수를 보였으나 남조류 군집 내 낮은

우점도를 나타냈다. 2004년도에는 6월 22일 405 cells mL<sup>-1</sup>로 출현하기 시작하여 8월 10일 46,049 cells mL<sup>-1</sup>로 최고값을 보였고, 전체 남조류에 대해 높은 우점도 (64%)를 나타냈다. 이후 8월 24일과 31일을 제외하고 조사기간 동안 지속적으로 관찰되었다. 2005년도에는 9월 21일에 23,929 cells mL<sup>-1</sup>로 나타났으며, 전체 남조류 군집 내 64%의 높은 우점도를 보였다. *Microcystis*는 2003년 8월 19일에 9,380 cells mL<sup>-1</sup>로 출현하기 시작하여 전체 남조류 군집 중 19%를 차지하였고, 이후 조사기간 동안 지속적으로 관찰되었다. 2004년도의 경우 6월과 7월에 나타났다가 8월에 감소를 보인 후, 9월 14일 227,400 cells mL<sup>-1</sup>로 전체 남조류 군집 내 87%에 해당하는 우점도를 보였고, 이후 지속적으로 관찰되었다. 2005년에는 조사기간 동안 전체 남조류 군집 내 평균 70% 이상의 우점도를 나타내며 지속적으로 관찰되었다.

### 3. 16S rDNA의 DGGE profiles 분석

군집분석에 흔히 사용되는 DGGE는 GC함량 차이에

따라 gel상에서 나뉘어진 각 밴드들의 염기서열 분석을 통해 환경시료 내에서 존재하는 의미 있는 phylotype을 모니터링할 수 있으며, 미생물 군집에서 계절적 변화를 평가할 수 있다(Diez *et al.* 2001; Gucht *et al.* 2001). 또한 DGGE profile에서 밴드들의 수는 다양한 정보를 제공한다(Demergasso *et al.* 2004). 군집 다양성 분석에 유용한 기법인 DGGE를 이용하여 조사기간 동안의 군집 다양성 변화를 조사하였다. 조사기간 동안 지속적으로 혹은 시기별로 나타나는 37개 DGGE band(2003년 11개 밴드, 2004년 12개 밴드 그리고 2005년 14개 밴드)를 선별하여 16S rDNA sequencing과 blast search 결과, *Microcystis*

수화발생시기를 기준으로 다양한 미생물 군집의 변화를 확인하였다(Fig. 5). 2003년도부터 2005년도까지 DGGE gel에서 조사기간 동안 지속적으로 혹은 시기별로 나타나는 37개 DGGE band를 선별하여 16S rDNA sequencing 후, blast search을 통해 분석하였다. 현미경 계수를 이용한 식물플랑크톤 군집변화 결과에서와 동일하게 수화발생시기에 관찰되는 *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena*가 높은 상동성(99% 이상)을 나타낸 것으로 확인되었고, 다양한 proteobacteria와 CFB group bacteria가 공존하는 것으로 확인되었다(Fig. 6).

2003년도의 경우 7월에서 10월 사이 대청호에서 가장

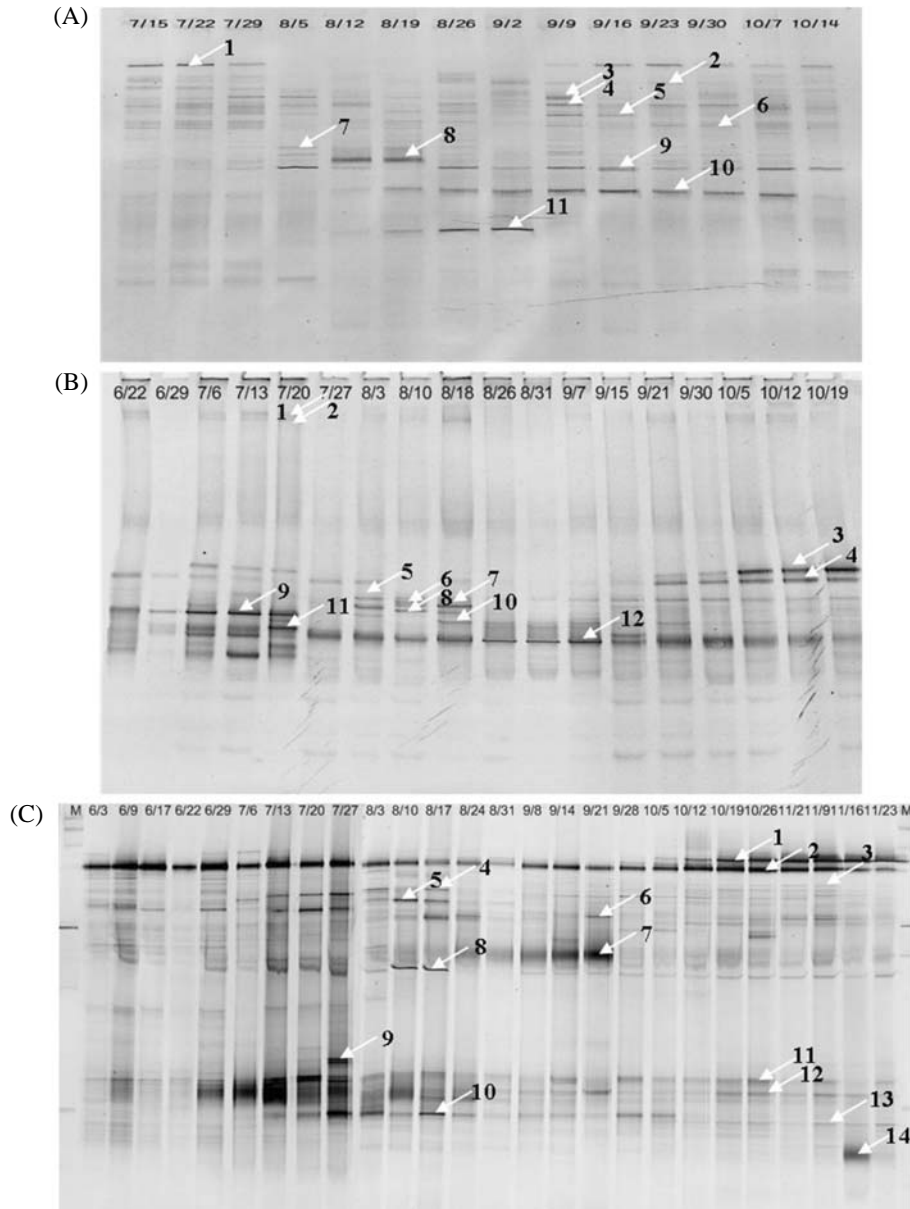
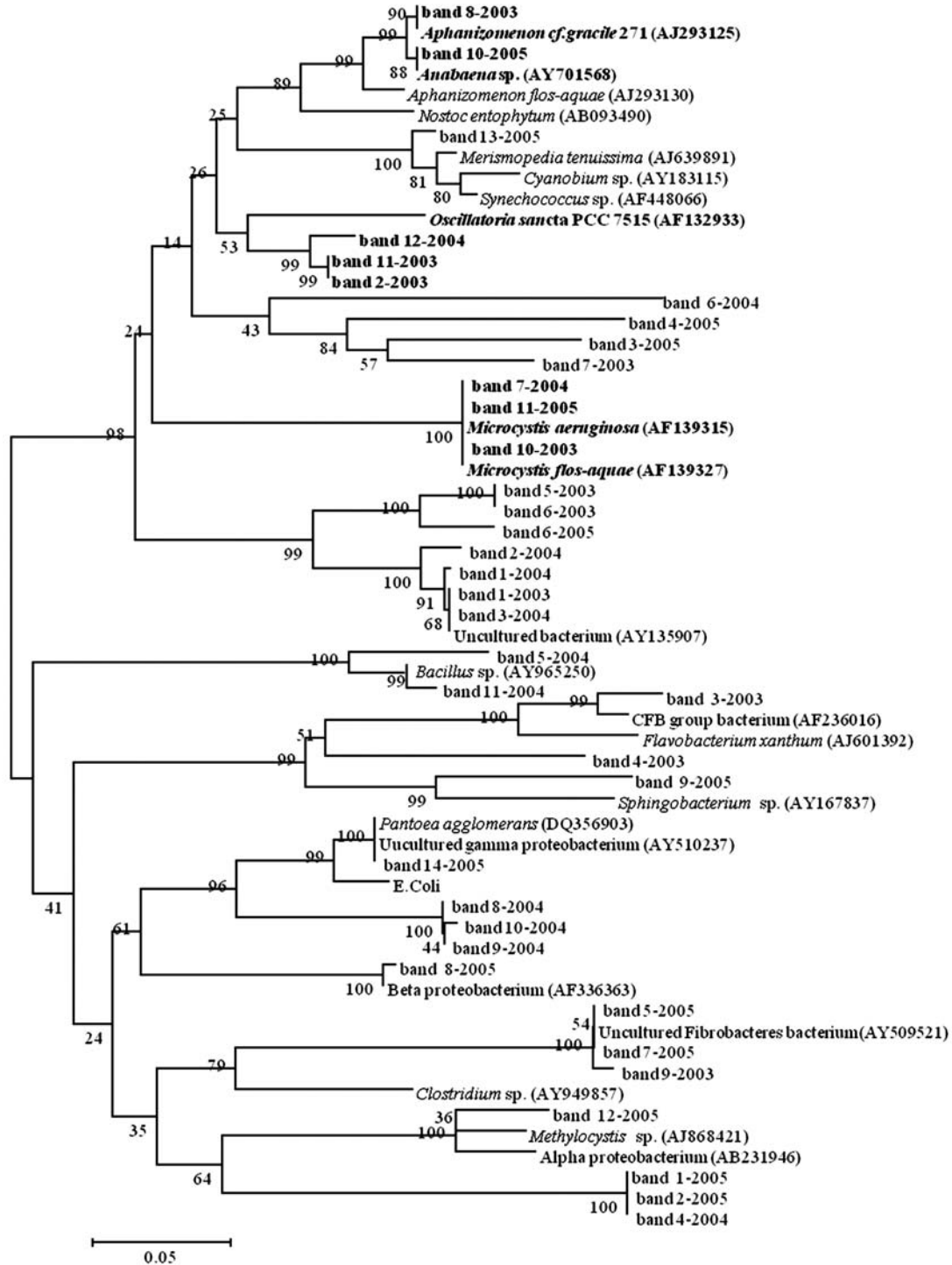


Fig. 5. DGGE profiles of microbial community for Daechung Reservoir during eutrophication seasons. (A), 2003; (B), 2004; (C), 2005.

많이 출현하는 남조류는 *Microcystis flos-aquae* (band No. 10)로 확인되었고, 수화가 발생하는 9월 2일에 특히 많이 관찰되는 것으로는 *Oscillatoria sancta* (band No. 11)로 나타났다. 특히, *Aphanizomenon flos-aquae* (band No.

8)의 경우 7월 18일부터 8월 5일까지 지속적으로 나타났다가 *Microcystis* 수화발생기간 동안 사라지는 현상을 보였다. CFB group bacterium (band No. 3, 4)의 경우 *Microcystis* 수화발생시기인 8월과 9월에 지속적으로 관



**Fig. 6.** Phylogenetic tree based on 16S rDNA-V3 sequences representing the respective DGGE bands in 2003~2005. Bootstrap analysis was based on 1000 replicates. Scale indicates 5% sequence divergence.



찰되었다. Jaspers *et al.* (2001)에 의하면 CFB group의 세균은 부영양화된 lagoon이나 규조류가 감소되는 바다에서 많이 발견되며 복잡한 거대 분자들을 분해한다고 알려졌다. 또한 식물플랑크톤이 대량 번식한 시기에 고분자 유기물질이 증가하면서 CFB group bacterium이 증가하였고, 남조류가 사멸된 후 혐기성 퇴적물에 더해질 때, 다른 세균에 비해 더 민감하게 반응한다고 보고하였다 (Kirchman 2002). 따라서 대청호에서 수화가 발생한 뒤 CFB group의 세균이 급격히 발생하는 것은 남조류의 분해와 관련되는 것으로 사료된다. 2004년도의 경우 6월에서 10월 사이 가장 많이 출현하는 남조류는 *Microcystis aeruginosa* (band No. 7)와 *Oscillatoria sancta* (band No. 12)로 확인되었다. 그 밖에 *Bacillus* sp. (band No. 5, 11)이 수화발생 전, 후에 나타나는 것을 확인하였다. *Bacillus* sp.은 수화 원인종인 남조류를 분해하며, 담수에서 biomass를 조절하는 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (Choi *et al.* 2005; Shunyu *et al.* 2006). 2005년도의 경우 6월부터 11월까지 출현 빈도가 높은 남조류는 2003년도, 2004년도와 동일한 *Microcystis aeruginosa* (band No. 11)로 확인되었고, *Oscillatoria sancta*의 경우 현미경 계수 결과와 상이하게 DGGE 상에서는 관찰하기가 어려웠다. 이는 시료로부터 DNA를 추출할 때 환경에서 나타나는 분포유형과는 상관없이 미생물 자체의 특성에 의해 핵산 추출과정에서 발생하는 실험적 오차 가능성으로 판단된다 (Amann *et al.* 1995; Felske *et al.* 1998). 또한 짧은 염기서열을 이용하여 분석할 경우 정확도가 떨어질 뿐만 아니라 남조류의 염기서열 database도 박테리아와 비교하여 전체적으로 부족하여 나타난 결과로 사료된다. 그 밖에  $\alpha$ -(band No. 12),  $\beta$ -(band No. 8),  $\gamma$ -proteobacterium (band No. 14)이 다양하게 나타나는 것을 확인하였다. 담수환경에 주로 존재하는 것으로 알려진  $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ -subclass proteobacteria는 식물플랑크톤이 왕성하게 성장할 때 적게 검출되는 음의 상관성을 나타냈다고 하였는데 (이와 이 2002), 이번 실험에서도 동일한 양상을 보였다. 생태계에서 분해자 역할을 담당하는 세균의 군집구조분석은 수계의 유기물 오염정도 및 그 정성적 분포양상을 파악하는 데 유용한 정보를 제공한다고 하였다 (김 등 1999b).

본 연구에서는, 짧은 시간에 많은 정보를 확보할 수 있고 군집의 계절별 변화를 신뢰성과 재현성 있게 분석할 수 있는 DGGE를 이용하여 대청호에서 3년간 남조류와 세균 등의 미생물 군집 변화를 추적하여 비교, 분석하였다. 2003년에서 2005년까지 *Microcystis*가 실험기간 동안 지속적으로 우점하는 것을 확인하였다. 그러나 수화시기에 우점 남조류 속의 조성이 조사시기에 따라

여러 가지 환경요인 및 식물플랑크톤의 변화에 따라 변화하는 것을 확인하였다. DGGE에 의한 미생물 군집분석 방법은 전통적인 현미경을 이용한 형태학적 연구방법 결과와 더불어 수화발생 시기에 지속적으로 우점하는 남조류에 대한 다양한 정보를 제공하였다. 또한 추가적으로 일부 CFB group bacterium, proteobacteria ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) 그리고 *Bacillus* 등 다양한 세균의 분포 및 변화를 확인하였다.

## 적 요

하절기 수화발생이 빈번한 대청호에서 2003~2005년 (3년)에 걸쳐 분자생태학적 방법의 하나인 DGGE를 이용하여 시간에 따른 미생물 군집구조의 변화를 연구하였다. 조사기간 동안 출현한 식물플랑크톤을 형태학적으로 분류한 결과 Cyanophyceae가 우점하였고, 이 중에서 *Microcystis*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Phormidium* 그리고 *Anabaena* 속이 크게 우점하였다. 분자적 군집분석 방법으로서 16S rDNA의 DGGE profile 분석과 계통학적 분류에 의하여 우점하는 미생물 군집의 구조와 다양성을 확인하였다. *Microcystis*는 조사기간 동안 지속적으로 우점하였으나, *Planktothrix*는 2003년과 2004년 9월에, *Anabaena*는 2005년 9월, 그리고 *Aphanizomenon*은 2003년 8월에 우점하였다. DGGE와 계통분류학적 분석방법은 형태학적 분석법에 의해 얻지 못하는 새로운 정보를 제공하며, 남조류와 수생 세균사이의 상관관계를 추정할 수 있고, 그들의 유전적 다양성을 보다 자세하게 확인할 수 있다.

## 사 사

본 연구는 교육과학기술부 글로벌프린티어사업 차세대바이오매스연구단과 환경부 차세대핵심환경기술개발사업 수생태복원사업단의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- 고소라, 박성주, 안치용, 최애란, 이정숙, 김희식, 윤병대, 오희목. 2004. DGGE를 이용한 대청호 수화발생시기의 세균 군집 분석. 한국미생물학회지. 40:205-210.  
 김동주, 홍선희, 안태석. 1999a. 소양호에서 세균군집구조의 계절적·수직적 변화. 한국미생물학회지. 35:242-247.

- 김 명, 전은형, 안태영. 2003. 삼교호의 세균다양성과 계통 분류학적 분석. 한국미생물학회지. 39:272-276.
- 김명운, 김민호, 조장천, 김상중. 1995. Cyanobacteria의 증식에 따른 대청호 생태계내의 생물군집 변화. 한국육수학회지. 28:1-9.
- 김범철, 김호섭, 박호동, 최광순, 박종근. 1999b. 국내 호수에서 발생한 남세균의 microcystin함량과 독성평가. 한국육수학회지. 32:288-294.
- 박정아, 허건영, 이정숙, 오윤정, 김보연, 민태익, 김치경, 안종석. 2003. 김치의 저온 발효 중 미생물 변화 양상. 한국미생물학회지. 39:45-50.
- 박종근. 2005. 대청호의 남조세균 수화 발달 특성. 환경생물. 23:304-314.
- 빙혜선, 이상욱, 황순진, 오인혜. 2002. 대청호에서 계절에 따른 세균군집 및 환경요인의 변화. 한국육수학회지. 35:71-78.
- 오희목, 김도한. 1995. 대청호의 남조류 수화발생에 대한 단기적 예측. 한국육수학회지. 28:127-135.
- 이영옥, 이희순. 2002. 농업용 저수지에서의 질화세균의 계절적인 변화. 한국육수학회지. 35:152-159.
- 이현경, 김준호, 유순애, 안태석, 김치경, 이동훈. 2003. 독소생성 *Microcystis* 검출을 위한 PCR primer의 평가. 한국미생물학회지. 39:166-174.
- 정승현, 안치용, 최애란, 장감용, 오희목. 2005. 대청호에서 강우와 식물플랑크톤 군집의 관계. 환경생물. 23:57-63.
- 정 준. 1993. 한국담수조류도감. 도서출판 아카데미서적. 서울. 496pp.
- 천세억, 이재안, 이재정, 유영복, 방규철, 이열재. 2006. 대청호 유입유량 변동과 수질 및 조류증식의 관계. 수질보전 한국물환경학회지. 22:342-348.
- Ahn CY, AS Chung and HM Oh. 2002. Rainfall, phycocyanin, and N:P ratios related to cyanobacteria bloom in a Korean large reservoir. Hydrobiologia 474:117-124.
- Ahn CY, YS Park and HM Oh. 2011. Evaluation of environmental factors on cyanobacterial bloom in eutrophic reservoir using Artificial Neural Networks. J. Phycol. 47:495-504.
- Amann RI, W Ludwig and KH Schleiffer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59:143-169.
- An KG and JR Jones. 2000. Factors regulating bluegreen dominance in a reservoir directly influenced by the Asian monsoon. Hydrobiologia 432:37-48.
- Choi HJ, BH Kim, JD Kim and MS Han. 2005. *Streptomyces neyagawaensis* as a control for the hazardous biomass of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in entrophic freshwaters. Biol. Control 33:335-343.
- Crumpton WG, TM Isenhardt and PD Mitchell. 1992. Nitrate and organic N analyses with second derivative spectroscopy. Limnol. Oceanogr. 37:907-913.
- D'Elia CF, PA Steudler and N Corwin. 1977. Determination of total nitrogen in aqueous sample using persulfate digestion. Limnol. Oceanogr. 22:760-764.
- Demergasso C, EO Casamayor, G Chong, P Galleguillos, L Escudero and C Pedrós-Alió. 2004. Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. FEMS Microbiol. Ecol. 48:57-69.
- Diez B, C Pedros-Alio, TL Marsh and R Massana. 2001. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. Appl. Environ. Microbiol. 67:2942-2951.
- Felip M and J Catalan. 2000. The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake: decoupling in their spatial and temporal maxima. J. Plankton Res. 22:91-105.
- Felske A, ADL Akkermans and WM de Vos. 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. Appl. Environ. Microbiol. 64:4581-4587.
- Gucht KV de, K Sabbe, L De Meester, N Vloemans, G Zwart, M Gillis and W Vverman. 2001. Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes. Environ. Microbiol. 3:680-690.
- Ishii K and M Fukui. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multi-template PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67:3753-3755.
- Jaspers E, K Nauhaus, H Cypionka and J Overmann. 2001. Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. FEMS Microbiol. Ecol. 36:153-164.
- Kanoshina I, U Lips and JM Leppänen. 2003. The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). Harmful Algae 2:29-41.
- Kim SG, SK Rhee, CY Ahn, SR Ko, GG Choi, JW Bae, YH Park and HM Oh. 2006. Determination of cyanobacterial diversity during algal blooms in Daechung Reservoir, Korea, on the basis of *cpcBA* intergenic spacer region analysis. Appl. Environ. Microbiol. 72:3252-3258.
- Kirchman D. 2002. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic ecosystem. FEMS Microbiol. Ecol. 39:91-100.
- Menzel DW and N Corwin. 1965. The measurement of total phosphorus in seawater based on the liberation of organically bound fractions by persulfate oxidation. Limnol. Oceanogr. 10:280-282.
- Muyzer G, EC de Waal and AG 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.
- Nergo AI, CD Hoyos and JC Vega. 2000. Phytoplankton structure and dynamics in Lake Sanabria and Valparaiso reservoir (NW Spain). *Hydrobiologia* 424:25-37.
- Shunyu S, L Yongding, S Yinwu, L Genbao and L Dunhai. 2006. Lysis of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacterium) by a bacterium *Bacillus cereus*. *Biol. Control* 39:345-351.
- Wood LW. 1985 Chloroform-methanol extraction of chlorophyll-*a*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42:38-43.

Manuscript Received: June 18, 2011

Revision Accepted: August 13, 2011

Responsible Editor: Yongsik Shin