

Pyrosequencing을 이용한 하절기 영산강 유역의 Phylum 계층의 세균 군집 조사

정진¹ · 박상정¹ · 운노타쓰야^{2*}

¹국립환경과학원, ²제주대학교 생명자원과학대학

Use of Pyrosequencing for Characterizing Microbial Community at Phylum Level in Yeongsan River Watershed during Early Summer

Jin Chung¹, Sang Jung Park¹, and Tatsuya Unno^{2*}

¹National Institute of Environmental Research, Incheon 404-708, Republic of Korea

²College of molecular life sciences, Jeju National University Jeju 690-756, Republic of Korea

(Received May 9, 2013 / Accepted June 19, 2013)

We have conducted pyrosequencing for freshwater microbial community analyses. Fourteen sites along the Yeongsan river were selected for this study, and samples were collected monthly from May to July, 2012. Total 987,380 reads were obtained from 42 samples and used for taxonomic classification and OTU distribution analysis. Our results showed that high geographical and temporal variation in the phylum level bacterial composition, suggesting that microbial community is a very sensitive parameter affected by the surrounding environments including tributaries and land use nearby. In addition, we conducted an OTU-based Microbial Source Tracking to identify sources of fecal pollution in the same region. From this study *Firmicutes* was found to be the most influential taxa in this region. Here, we report that the use of pyrosequencing based microbial community analysis may give an additional information on freshwater quality monitoring, in addition to the currently used water quality parameters, such as BOD and pH.

Keywords: microbial community, microbial source tracking (MST), non-point pollution sources, pyrosequencing, watershed

수질오염은 점 오염원(point sources)과 비점오염원(non-point sources)으로부터 발생하며, 특히 분변오염은 병원성 미생물과 관련이 깊으며, 인간의 건강과 직결되므로 많은 관심을 가져야 한다. 이러한 요인들로 인한 환경의 변화는 세균 군집구조에 영향을 줄 수가 있다.

현재 국내에서는 물 환경 관리를 위해 수질측정망을 실시하고 있다. 최근에는 수 생태계 건강성 평가를 위해 부착조류, 어류, 저서성대형무척추동물 등 생물학적 수질을 평가해오고 있으나, 이는 주로 수질에 대한 현상만을 설명하는데 그치며, 오염의 근원 및 오염기여도를 설명하기에는 부족한 면이 없지 않다. 또한 생태계 구성요인 중 하나인 세균을 다루지 않고서는 수 생태계를 완전히 이해하기에는 부족함이 있다.

세계적으로 수질 관리 관점에서 오랫동안 미생물 지표를 적용해왔으며(Scott *et al.*, 2002), 국내에서는 현재 하천 수질환경 기준으로 총 대장균 군(Total coliform)과 분원성 대장균 군(fecal coliform)이 포함 되어있다(Lee *et al.*, 2008). 이와 같이 분변오

염의 정도를 지표 값을 통해 나타내는 전통적인 방법이 있지만 최근에는 미생물지표에서 분변오염의 원인이 무엇인지를 찾아 가는 오염원 추적 기법(microbial source tracking; MST)이 주목을 받고 있다(Simpson *et al.*, 2002; Stoeckel and Harwood, 2007). 미생물 오염원 추적기법에는 크게 library-dependent와 library-independent 방법이 있으며, 이 중 차세대 염기서열 분석 방법(next generation sequencing; NGS)을 이용하여 세균군집 구조현황을 파악하거나 이를 활용한 오염원 추적기법이 서서히 관심을 끌고 있다.

NGS 기법 중 하나인 pyrosequencing은 biosolid의 미생물 군집 연구(Bibby *et al.*, 2010), wastewater treatment processes의 미생물 군집구조 연구(Lindstrom *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2012), 혐기성 소화조의 미생물 군집구조(Hu *et al.*, 2012), 토양의 미생물 군집 연구(Lauber *et al.*, 2009), reverse osmosis membrane의 biofouling 원인 추적 연구(Lee and Kim, 2011), 된장의 미생물 군집연구(Nam *et al.*, 2012), 중금속 오염을 조사하는데 사용되었다(Vishnivetskaya *et al.*, 2011). 또한 미생물의 군집 구조와 수온, pH, retention time과의 관계(Lindstrom *et al.*, 2005), Cyanobacterial bloom (Eiler and Bertilsson, 2004)과의 관계, 그

*For correspondence. E-mail: tatsu@jejunu.ac.kr; Tel.: +82-64-754-3354; Fax: +82-64-756-3351

리고 토지사용과의 관계(Foley *et al.*, 2005) 등의 여러 방법에서 미생물 군집을 연구하는데 사용되어오고 있다. 최근에 Unno 등 (2010b)은 pyrosequencing을 사용하여 MST 연구를 시도하였는데 이러한 경향을 통하여 담수의 세균 군집 구조는 환경인자의 영향을 받기 때문에 수 생태계 현황을 조사하고 수질을 조사하는데 사용될 수 있을 것으로 기대한다. 또한 영산강에서 이미 하천의 세균에 대한 선행연구가 있었기 때문에(Unno *et al.*, 2009, 2010a, 2010b, 2011; Will *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2011, 2013) 기존의 연구결과와 pyrosequencing을 이용한 결과를 비교할 수 있으므로 영산강을 선정하였다. 또한 phylum 계층을 기준으로 세균 군집현황을 분류 하므로써 충분한 다양성을 확보하였고 더 낮은 분류계층(예, genus level)을 사용하므로써 초래할 수 있는 복잡성을 줄였다.

본 연구에서는 pyrosequencing을 이용하여 하절기의 영산강 유역의 세균군집 구조 현황을 알아보려 하였다. 또한 pyrosequencing의 오염원인 추적하는 기능의 유용성과 국내 하천 수질 조사에 활용 가능성을 평가해 보고자 하였다.

재료 및 방법

시료채취 지점

본 연구는 영산강 수계를 대상으로 pyrosequencing을 이용한 세균 군집 현황을 조사하였다. 조사지점은 Fig. 1에서 보여주고 있다. 분류구간은 A, B, C ...등으로 표기하였으며, 지천구간은 A', B', E' 로 표기하였다.

A-F 지점은 농경지이며, G-K는 도시 지역으로 상업지역과 주택지를 포함하고 있다. 시료채취는 한 달에 한번, 5-7월에 실행했으며, 500 ml씩 채취하였다. 채집된 시료는 아이스박스에 보관하여 60시간 안에 실험을 수행하였다. 그 중 50 ml를 동결 건조 하고 DNA를 추출하는 데 사용하였다.

수질분석결과는 물 환경 정보 시스템(<http://water.nier.go.kr/>)의 결과를 활용하였다.

DNA 추출과 PCR

시료 50 ml를 동결 건조한 후 3 ml의 멸균수를 넣고 볼텍스를 이용하여 녹인 다음, 1.5 ml의 마이크로 튜브 2개에 나누어 옮긴 후, 다시 동결 건조하였다. 동결 건조된 분말을 200 μ l의 멸균수

로 용해시켜 1.5 ml 마이크로 튜브 하나에 옮긴 후 DNA 추출에 사용하였다. 동결 건조된 시료를 PowerSoil DNA extraction kit (MOBIO, USA)을 사용하여 DNA를 추출하였다.

세균의 V1과 V3 hyper variable regions의 16S rRNA 유전자는 PCR 증폭을 위해 프라이머 9F (5'-X-AC-GAGTTTGATCMTG GCTCAG-3')와 541R (5'-X-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3')를 이용하였다. X는 각 DNA 샘플의 8-nucleotide barcode와 AC는 barcode와 프라이머를 연결한 a linker 부위이다. PCR은 95°C에서 initial denaturation을 5분 실시하였고, 95°C 30초 denaturation 60°C에서 30초 annealing, 72°C 80초 elongation을 25회 반복, 수행하였다.

증폭된 PCR 산물은 Qiagen purification kit (USA)을 가지고 정제하였고, 각 시료 PCR 산물 1 mg을 pyrosequencing 진행하였다. Pyrosequencing은 Macrogen Inc. (Korea)이 GS FLX Titanium 454 Sequencing System (Roche, USA)을 사용하여 제조사의 매뉴얼대로 수행하였다.

또한 오염의 근원을 규명하기 위해 하천 시료 이외, 분변 시료(사람, 말 돼지, 소)도 database로 포함하였다. 동물의 분변 시료는 제주대학 농장, 그리고 사람의 분변 시료는 광주 과학기술원의 학생에게서 채취하였다.

Pyrosequencing 데이터 분석

Pyrosequencing 결과는 Schloss standard operation procedure (SOP) (Schloss *et al.* 2011)을 사용하여 실행하였고, Mothur version 1.23.1 (Schloss *et al.*, 2009)을 사용하여 분석하였다. 간단하게 모든 pyrosequencing read는 amplicon noise removal, primer sequence trimming, alignable consensus region screening, chimeric sequence removal 그리고 cyanobacteria-like sequences를 제외하였다. 세균이 아닌 모든 식물의 염기서열을 나타낼 수 있기 때문에 Cyanobacteria-like sequence는 일반적으로 제외하는 방식을 이용하였다. Cyanobacteria-like sequence을 제외하므로 미생물 군집을 분석하는데 정확성을 높일 수 있다. Taxonomic 분류는 80% cut-off 그리고 RDP (Ribosomal Database Project) training set을 가지고 Mothur를 이용하여 실행하였다. Operational taxonomic units (OTUs)은 Mothur average clustering (Schloss and Westcott, 2011) 사용하고 0.03의 distance에 근거하여 분류하였다(Supplementary data Table S1).

각 지점의 미생물 군집구조 비교

세균 군집구조를 비교하고 분석한 연구들이 있는데 그 중에서 토양(Will *et al.*, 2010)과 퇴적물(Youssef *et al.*, 2010) 내의 세균군집구조를 Chi-square test 이용하여 비교하였다. 그리하여 본 연구에서도 Chi-square test를 이용하여 지점들 간의 비교 연구를 하였다. 상대적 read 분포도는 phylum 계층에서 얻었다. 그리고 지점간의 비교를 실행하였다. Cluster 분석은 dendrogram과 heat map을 같이 그리는 free software R을 사용하였다.

미생물 오염 원인 추적 방법(MST)에 근거한 pyrosequencing

얻은 염기서열은 PyroMiST (Unno *et al.*, 2012)에 업로드를

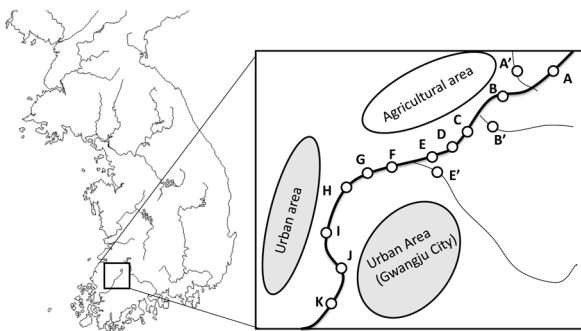


Fig. 1. Yeongsan River Sampling sites (A-K).

하고 분변오염의 원인이 될 만한 동물을 추정하는데 사용하였다.

결과 및 고찰

Taxonomic analysis - 지역특이성과 시기특이성

Pyrosequencing 결과는 RDP의 데이터베이스를 바탕으로 Taxonomic classification을 실시하였다. 월별로 세균 생태학적 군집 구성을 상류(지점 A)에서 하류(지점 K) 순으로 정리하였다.

5월의 결과(Fig. 2A)를 보면 담양시를 지나면서 지점 A는 *Proteobacteria*의 비중이 큰 것(54.6%)으로 조사 되었고, 지점 A'는 *Firmicutes*의 비중이 월등히 큰 결과(94.0%)를 보여주고 있다. 하지만 두 지점이 합류한 지점인 지점 B는 *Proteobacteria*의 비중이 큰 것(68.0%)으로 봐서, 지점 B의 상태가 지점 A' 보다 지점 A의 상태의 영향을 더 많이 받은 것으로 볼 수 있다. 지천인 지점 B'는 *Bacteroidetes*의 비중이 큰 것(60.8%)으로 조사 되었지만, 본류지점들인 지점 B와 C의 결과, *Proteobacteria*의 비중이 큰 결과(각각 68.0%와 71.2%)를 볼 수 있는데(지점 A'와 B'에서 본 것처럼), 이 점을 통해 지천의 영향이 적은 것으로 알 수 있다. 지점 E는 *Firmicutes*의 출현과 함께 그 비중이 크게(87.7%) 나온 것을 볼 수 있는데, 갑자기 출현된 상황이므로 자연적인 현상이기 보다는 비점오염의 가능성을 보여주고 있다. 지류 지점인 지점 E'는 광주호에서 흘러나온 지천으로 *Proteobacteria*의 비중이 큰 것(89.5%)으로 나왔다. 두 하천이 합류된 지점인 지점 F는 *Actinobacteria*의 비중이 증가(44.6%)하고 *Proteobacteria*는 줄어든 것(19.9%)을 보여주고 있다. 지점 F-K는 도시지역으로 전반적으로 *Actinobacteria*와 *Proteobacteria*가 본류를 이루고 있다.

6월의 경우(Fig. 2B) 5월과 비교해서 지점 A의 세균 구조에 변화를 보여주고 있다. 5월의 지점 A와 비교해서 *Bacteroidetes* (5월 5.1%; 6월 25.0%)과 *Actinobacteria* (5월 4.1%; 6월 25.7%)의 비중이 증가하였고 *Proteobacteria* (5월 54.6%; 6월 37.9%)과 *Firmicutes* (5월 32.6%; 6월 7.2%)의 비중이 줄었다. 지천인 지점 A'와 B'는 *Firmicutes*의 비중이 월등하게 컸으며(각각 97.6%와 93.7%) 합류가 되는 본류지점들인 지점들 B, C, D, E에서 *Firmicutes*의 비중이 큰 것(각각 90.4%; 77.7%; 92.7%; 81.4%)으로 보아, 지천들(지점 A'와 B')의 영향을 받은 것으로

볼 수 있다. 또한 5월과는 다른 결과를 보여주고 있다. 지점 E'에서 *Proteobacteria*의 비중이 급격하게 증가 된 결과(85.1%)는 5월과 비슷한 결과를 보여주고 있다. 도시지역에 포함되어 있는 지점 G는 *Firmicutes*의 갑작스런 증가(95.0%)를 보여주고 있다. 지점 H는 *Proteobacteria*의 갑작스런 증가(89.9%)를 보여주고 있다. 지점 I는 *Verrucomicrobia*가 출현(31.0%) 했으며 다시 지점 J는 *Proteobacteria*가 증가(82.9%)하였고, 지점 K는 *Firmicutes*가 증가(88.5%)하였다. 5월의 지점 D와 E 경우처럼 지점 G의 갑자기 증가한 *Firmicutes*는 비점오염의 가능성이 있지만 이 지역이 도시지역이며 불규칙한 날씨의 시기여서 그 원인을 추정하기에는 부족하다.

7월의 경우(Fig. 2C), 지점 A에서 6월과 비슷한 결과가 나왔으며 *Actinobacteria* (37.8%)와 *Proteobacteria* (37.5%) 군집 구조를 보여주고 있다. 6월과 마찬가지로, 지천인 지점 B'의 영향으로 지점 B는 *Firmicutes*의 비중이 컸다(91.1%). 지점 B'는 6월과는 다르게 *Proteobacteria*의 비중이 증가(89.6%)하였고 어느 정도 본류인 지점 C에 영향을 주었다. 하지만 *Firmicutes*의 비중이 큰 지점 D (84.0%)와는 상관없이 지점 C (*Proteobacteria* 35.3%)와 비슷한 군집 구조를 보이는 지점 E (*Proteobacteria* 43.6%)를 볼 때, 채수 시점이 강우시기였기 때문에, stormwater runoff 등의 비점오염원의 영향을 받은 것으로 예상된다. 지점 E'은 6월과 다른 군집 구조를 볼 때 이 지천 또한 지역적으로 비점오염의 영향을 받은 것으로 보여진다. 도시지역에 속하는 지점 G는 6월과 비슷하게 *Firmicutes*의 비중이 컸다(77.9%). 지점 H-K까지는 6월과는 다소 다른 결과를 보이고는 있지만 6월과 같이 지점 H-K까지 *Proteobacteria*가 꾸준하게 발견되는 것을 볼 수 있다.

본류 및 지천을 포함 모든 지점에서의 월별 세균 군집 구조 변화를 보면, 많은 적든 어느 정도의 변화가 관찰되었다. 이들 변화는 수온, 오염물질의 유입, 기상(비, 태풍 등) 등을 원인으로 볼 수 있다.

각 지점의 세균 군집구조 비교

Table 1과 2는 chi-square tests의 결과를 보여주고 있다. Table 1은 두 지점씩 비교하여 통계적으로 유사한지를 보여주고 있다.

5월의 결과에서 지점 B와 C 세균 군집구조가 통계적으로 유사하다는 것을 보여주며 지점 J와 K 또한 통계적으로 유사한 군집 구조를 볼 수 있다($P>0.05$). 6월의 결과에서 지점 B와 C는 세균 군집 구조가 통계적으로 유사하다는 것을 보여주며 또한 지점 D와 E의 군집 구조가 통계적으로 유사하다는 것을 보여준다($P>0.05$, Table 1). 7월의 결과에서 지점 E와 F의 군집 구조가 통계적으로 유사하다는 것을 알 수 있다($P>0.05$, Table 1).

Table 2는 각 지점들을 각 월별(두 달씩)로 비교하여 통계적으로 유사한지 보여주고 있다.

Table 2를 통해, 지점 B는 6, 7월에 통계적으로 유사한 세균 군집구조를 보여주고 있다($P>0.05$). 지점 D는 6, 7월에 통계적으로 유사한 군집구조를 보여주고 있으며, 지점 F는 6, 7월에 통계적으로 유사한 세균 군집구조를 보여주고 있다($P>0.05$). 지점 E는 5, 6월에 통계적으로 유사한 세균 군집구조를 보여주고 있

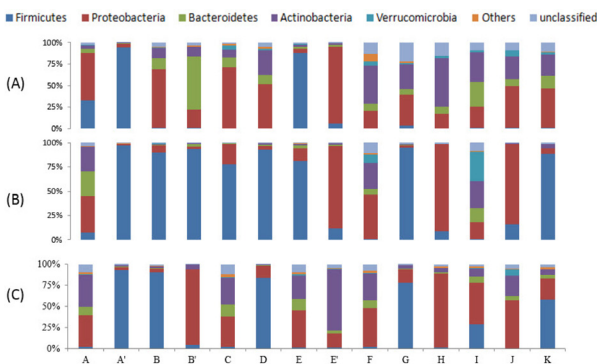


Fig. 2. Bacterial compositions at the phylum level in the Yeongsan River in May (A), June (B), and July (C).

Table 1. Chi-square test for geographical variation analysis

Month	Chi-square <i>P</i> values between two sites									
	A-B	B-C	C-D	D-E	E-F	F-G	G-H	H-I	I-J	J-K
May	0	0.474	0.006	0	0	0.005	0.002	0.002	0.002	0.68
Jun	0	0.115	0.013	0.353	0	0	0	0	0	0
Jul	0	0	0	0	0.955	0	0	0	0	0

다($P>0.05$). Table 1과 2의 결과를 통해 담수의 세균 군집 구조가 시기와 지리적 영향에 민감한 반응을 보이는 것으로 알 수 있다.

R(소프트웨어)을 사용해 phylum 데이터를 바탕으로 히트 맵을 작성하였다(Fig. 3). 히트 맵 분석은 조사지점의 세균 군집 구조에 따라 지점을 구분한다는 특징이 있다.

Chi-square 분석(Tables 1 and 2)을 통해 가까운 지점도 세균 군집 구조가 다를 수 있고, 그 변화가 점진적으로 일어난 것이 아닌 것을 볼 때, 수온과 같은 내부적인 요인 보다는 토지이용과 비점오염 같은 외부적인 요인들로 인해 지점 사이에서의 미생물 군집 구조에 변화가 있었을 것이라고 결론을 내릴 수 있었다.

5-7월의 히트 맵 분석의 결과, 이 지역을 구별하는 세균은 *Firmicutes*로서, 가장 큰 영향을 주는 Taxa인 것으로 나타났으며 지점들 A', G, E, B', C, B, K에서 많이 나타났(Fig. 3). *Proteobacteria*가 그 다음으로 영향이 큰 Taxa로 나타났고 지점들 H, J, E', I, F에서 주로 나타났고, 그 다음으로는 *Actinobacteria*로서 지점들 F, A, E'에서 볼 수 있었다(Fig. 3). *Firmicutes*이 많이 발견된 지점들과 적게 발견된 지점들(JHEIFA, 그리고 A' GDEB'CBK) 나눌 수 있었다. 깊이 더 연구를 해야 할 필요가 있겠지만 *Firmicutes*가 많이 발견된 지점과 아닌 지점이 있는 것으로 보아 Phylum *Firmicutes*가 환경요인에 영향을 받았음을 알 수 있다.

또한, 히트 맵 분석의 결과는 도시지역과 농경지지역으로 어느 정도 분류할 수 있는 점을 볼 때 이 결과 역시 지리적 영향과 관계가 있음을 보여주고 있다.

국내 지역적 특성들 중 하나는 토지이용이 명확하게 구분이

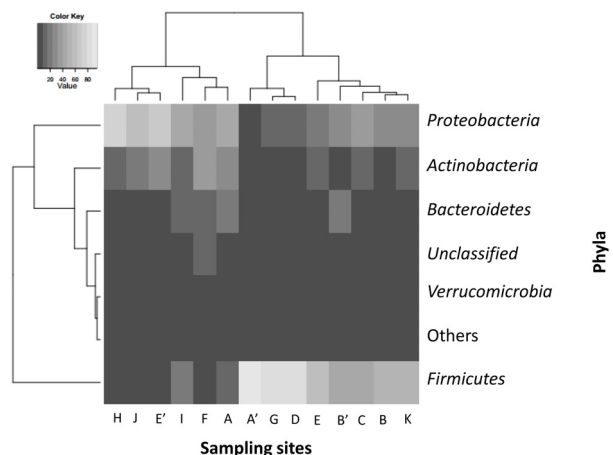


Fig. 3. Heat-map analysis of bacterial composition at the phylum level.

Table 2. Chi-square test for temporal variation analysis

Month	Chi-square <i>P</i> values between two sites										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
May-Jun	0	0	0	0	0.57	0.002	0	0	0	0	0
Jun-Jul	0.016	0.893	0	0.251	0	0.196	0.026	0.037	0	0	0

되지 않는 점이다. 공장, 상업, 도시, 농경지, 주거지 등이 섞여있는 경우들이 종종 있고, 그러한 상황은 미생물의 군집 구조를 복잡하게 한다. 본 연구 대상지역은 *Firmicutes*가 주를 이루는 군집구조로 조사되었으며 강우의 경우보다도 토지이용이 미생물 분포에 더 영향을 줄 수 있다고 추측이 된다. 그와 관련하여 Gentry-Shields 등(2012)은 특정한 marker를 사용하여 인간분변을 추적하는 점에서 도시화 된 지역이 강우 보다 영향이 더 크다는 점을 알려주고 있으며, Lee 등(2008)은 농업지대와 가축농가가 하천에 분변오염의 존재와 관련이 있음을 알려주고 있다. 이러한 점들을 볼 때 토지이용이 분변오염의 특성에 많은 영향을 주는 것으로 알 수 있다.

Pyrosequencing 이용한 미생물 오염 원인 추적

Fig. 2의 결과를 통해서 분류와 지점이 함류함으로 인해 미생물 군집구조의 변화를 볼 수 있으며 수 환경은 또한 그러한 영향으로 인해 변화할 것으로 추측할 수 있었다. 하지만 오염물의 원인을 규명한다면, phylum 계층에서의 분석으로는 지역 특이성을 정의하는 데는 한계가 있어서, genus 또는 species 계층에서 분석하는 것이 필요하다는 것을 알 수 있다. Taxonomy에 의존하지 않고 species 계층으로 분석 가능한 Operational Taxonomic Units (OTU)을 이용하는 분석법을 적용하여 개선하였다. OTU는 일반적으로 이용되는 분석 방법으로, 모든 read를 taxon에 의지하지 않고 ID를 주면서 구별이 가능하게 된다. Taxonomic classification 상에서 ‘unknown’으로 구별이 불가능한 것이라도 OTU에서는 구별이 가능하다. OTU를 이용한 분석을 통해 분변오염원을 특정하는 Online Tool, PyroMiST (Unno *et al.*, 2012)을 이용하여 분변오염원 원인 추적을 하였다. 분변 샘플에서 얻은 염기서열과 각 하천 지점에서 얻은 결과를 비교하여 분변과 하천에 모두 관찰되는 OTU를 조사하였다. Fig. 4에서는 7월의 샘플을 가지고 분석한 결과를 보여주고 있다. 지점 H에서는 돼지의 배설물로 인한 분변오염이 주요 원인임을 보여주고 있으며, 지점 J에서는 소의 배설물, 지점 D와 G에서는 오리의 배설물이 주요 원인임을 보여주고 있다.

본 연구는 Pyrosequencing을 이용하여 영산강 유역의 미생물 분포를 조사해 본 결과, 기후, 특히 강우와 시기에 따라 미생물의 군집 분포가 영향을 받은 것으로 알 수 있었다. 토지이용과 관련하여 하천에 유입되는 비점오염의 영향 또한 큰 것으로 알 수 있었다. 5-7월 사이의 히트 맵 분석 결과(Fig. 3)를 볼 때 *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* 순으로 세균 군집 분포가 관찰되었으며 *Firmicutes*가 이 지역을 구별하는 데 가장 큰 영향을 주는 taxa인 것으로 나타났다. Unno 등(2012)은 phylum *Bacteroidetes*

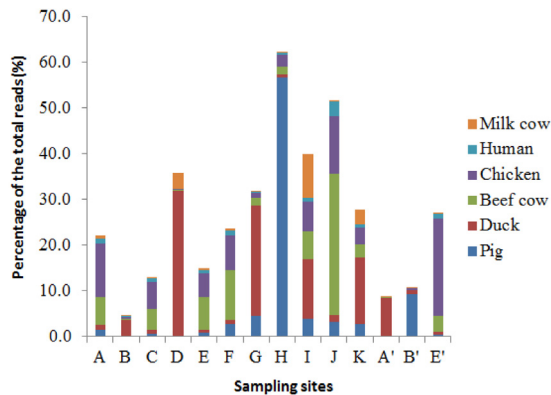


Fig. 4. Source specific-OTUs between fecal database and freshwater samples in July.

specific primer를 사용하여 한번의 pyrosequencing run에서 많은 양의 샘플을 분석하는 것이 가능하다는 것을 보여주었는데 그 결과를 볼 때 phylum *Firmicutes* specific primer과 같이 적절한 specific primer를 사용한다면 비용면에서도 효율성을 높일 수 있을 것으로 생각한다.

Pyrosequencing을 이용하여 국내하천인 영산강 유역의 세균 군집 구조를 조사해 본 결과, 분변오염 원인 추적이 가능하며 하천 주변의 토지이용, 환경에 따른 세균 군집 현황을 조사하는데 활용이 가능하였다. 그러한 조사는 하천 주변의 전반적인 세균 군집 구조를 이해하는데 유용하다는 것을 알 수 있었다.

적요

Pyrosequencing을 이용하여 영산강 유역의 세균 군집 현황을 조사하였다. 영산강 본류 및 지천 14개 지점을 선정하여 5-7월 동안 시료채취를 하였다. 총 42개의 시료를 가지고 총 989,380 reads를 얻었으며 taxonomic 분류와 OTU 분포도 분석을 실시하였다. Phylum 계층의 세균 구조 결과를 통해서 지천의 특성, 토지 이용, 시기적인 요인 등 환경적 요인에 따라 세균 군집 구조가 민감하게 변하는 경향을 나타내었다. 또한, OTU 분석을 근거한 오염원 추적기법(microbial source tracking; MST)을 통해 분변오염을 추적해보았다. *Firmicutes*가 가장 수질에 영향을 주는 taxa로 관찰되었다. 본 연구를 통해서, 현재 사용하는 수질 지표, BOD, pH 등에 더하여 pyrosequencing을 이용한 세균군집 조사 결과가 보다 효율적인 하천의 물관리 정책을 위해서 유용한 정보가 될 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 말

본 연구는 국립환경과학원 외국 박사후 연구원 연수에 의해 지원된 사업입니다.

참고문헌

Bibby, K., Viau, E., and Peccia, J. 2010. Pyrosequencing of the 16S rRNA

gene to reveal bacterial pathogen diversity in biosolids. *Wat. Res.* **44**, 4252–4260.

Eiler, A. and Bertilsson, S. 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ. Microbiol.* **6**, 1228–1243.

Foley, J.A., Defries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H.K., and *et al.* 2005. Global consequences of land use. *Science* **309**, 570–574.

Gentry-Shields, J., Rowny, J.G., and Stewart, J.R. 2012. HuBac and *nifH* source tracking markers display a relationship to land use but not rainfall. *Wat. Res.* **46**, 6163–6174.

Han, D., Unno, T., Jang, J., Lim, K., Lee, S.N., Ko, G., Sadowsky, M.J., and Hur, H.G. 2011. The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animal, and birds in South Korea. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 387–392.

Hu, M., Wang, X., Wen, X., and Xia, Y. 2012. Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresour. Technol.* **117**, 72–79.

Jang, J., Suh, Y.S., Di, D.Y., Unno, T., Sadowsky, M.J., and Hur, H.G. 2013. Pathogenic *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in the Yeongsan River basin of South Korea. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 1128–1136.

Jang, J., Unno, T., Lee, S.W., Cho, K.H., Sadowsky, M.J., Ko, G., Kim, J.H., and Hur, H.G. 2011. Prevalence of season-specific *Escherichia coli* strains in the Yeongsan River basin of South Korea. *Environ. Microbiol.* **13**, 3103–3113.

Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5111–5120.

Lee, J. and Kim, I.S. 2011. Microbial community in seawater reverse osmosis and rapid diagnosis of membrane. *Desalination* **273**, 118–126.

Lee, H., Kim, H., Park, H., Cho, Y., Ryu, S., Lee, K., Jung, J., and Ko, G. 2008. Evaluation of influent water quality using indicator microorganisms in Lake Shihwa. *J. Environ. Health Sci.* **34**, 86–94.

Lindstrom, E.S., Kamst-Van Agterveld, M.P., and Zwart, G. 2005. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8201–8206.

Nam, Y.D., Lee, S.Y., and Lim, S.I. 2012. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* **155**, 36–42.

Schloss, P.D., Gevers, D., and Westcott, S.L. 2011. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS ONE* **6**, e27310.

Schloss, P.D. and Westcott, S.L. 2011. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3219–3226.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., and *et al.* 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–7541.

Scott, T.M., Rose, J.B., Jenkins, T.M., Farrah, S.R., and Lukasik, J. 2002. Microbial source tracking: Current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5796–5803.

Simpson, J.M., Santo Domingo, J.W., and Reasoner, D.J. 2002.

- Microbial source tracking: State of the science. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 5279–5288.
- Stoeckel, D.M. and Harwood, V.J.** 2007. Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2405–2415.
- Unno, T., Han, D., Jang, J., Lee, S.N., Ko, G., Choi, H.Y., Kim, J.H., Sadowsky, M.J., and Hur, H.G.** 2009. Absence of *Escherichia coli* phylogenetic group B2 strains in humans and domesticated animals from Jeonnam Province, Republic of Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5659–5666.
- Unno, T., Han, D., Jang, J., Lee, S.N., Kim, J.H., Ko, G., Kim, B.G., Ahn, J.H., Kanaly, R.A., Sadowsky, M.J., and et al.** 2010a. High diversity and abundance of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and farm animal hosts in Jeonnam Province, South Korea. *Sci. Total Environ.* **408**, 3499–3506.
- Unno, T., Jang, J., Han, D., Kim, J.H., Sadowsky, M.J., Kim, O., Chun, J., and Hur, H.G.** 2010b. Use of barcoded pyrosequencing and shared OTUs to determine sources of fecal bacteria in watershed. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 7777–7782.
- Unno, T., Han, D., Jang, J., Widmer, K., Ko, G., Sadowsky, M.J., and Hur, H.G.** 2011. Genotypic and phenotypic trends in antibiotic resistant pathogenic *Escherichia coli* isolated from humans and farm animals in South Korea. *Microbes Environ.* **26**, 198–204.
- Unno, T., Di, D.Y.W., Jang, J., Suh, Y.S., Sadowsky, M.J., and Hur, H.-G.** 2012. Integrated online system for a pyrosequencing-based microbial source tracking method that targets bacteroidetes 16S rDNA. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 93–98.
- Vishnivetskaya, T.A., Mosher, J.J., Palumbo, A.V., Yang, Z.K., Podar, M., Brown, S.D., Brooks, S.C., Gu, B., Southworth, G.R., Crake, M.M., and et al.** 2011. Mercury and other heavy metals influence bacterial community structure in contaminated Tennessee streams. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 302–311.
- Will, C., Thurmer, A., Wollherr, A., Nacke, H., Herold, N., Schrupf, M., Gutknecht, J., Wubet, T., Buscot, F., and Daniel, R.** 2010. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6751–6759.
- Youssef, N.H., Couger, M.B., and Elshahed, M.S.** 2010. Fine-scale bacterial beta diversity within a complex ecosystem (Zodletone Spring, OK, USA): The role of the rare biosphere. *PLoS ONE* **5**, 1–12.