

Fluorescent In Situ Hybridization 방법으로 분석한 소양호 세균 군집 구조의 계절적 변화

홍선희 · 안태식

강원대학교 환경학과 및 서울대학교 분자미생물학연구센터

소양호에서 세균군집의 계절적, 수심별 변화를 파악하고자 총세균수와 EUB338, ALF1b, BET42a, GAM42a와 CF probe 등 fluorescent rRNA targeted oligonucleotide probe와 반응하는 세균 개체수를 측정하였다. 총세균수는 $0.5 \sim 2.01 \times 10^6$ cells · ml⁻¹이었으며, 2 m와 5 m 수층에서 높게 나타났다. 총세균수에 대한 Eubacteria의 비율은 22~100%이었고, Proteobacteria α -group은 Eubacteria의 2.6~66.7%, β -group은 4.5~53.5%, γ -group은 4.6~76.7%, 그리고 Cytophaga-Flavobacterium group은 2.1~35.9%이었다. 또한 세균군집은 계절별, 수심별로 다양한 변화를 보이며, 겨울철은 β -group이, 봄철과 초여름철은 γ -group이, 여름철은 α -group이 우점하였고, Cytophaga-Flavobacterium group이 특징적으로 우점하는 시기는 없었다. 이러한 세균 군집 구조의 분포로 계절별, 수심별로 호수에 대한 독특한 특징을 알 수 있었다.

KEY WORDS □ in situ hybridization, bacterial community, probe, Lake Soyang

수환경에서 세균은 유기물을 분해하여 무기물로 전환시키거나(17) 저농도로 존재하는 용존유기물질을 흡수·동화하여 상위 먹이 연쇄과정을 거치는 microbial loop의 중요한 위치를 차지한다. 이런 미생물의 분포와 생리적 활성도는 환경에 민감하게 변화하므로 간접적으로 주위 환경의 상태를 나타내는 지표로 볼 수 있지만(9), 이들에 대한 군집구조나 종구성등은 일차적으로 세균의 종 분석 자체가 매우 어렵기 때문에, 동물·식물 플랑크톤에 비해 확실하게 밝혀진 사실이 드물다.

수환경에서 세균의 군집은 주위의 온도, 동·식물 플랑크톤, 빛 등의 환경 조건에 따라 개체수와 종 조성이 달라지며, 그 변화의 폭과 주기는 다른 생물상에 비하여 매우 크고 특히 측정 방법의 어려움으로 군집구조의 시간적, 공간적 변화를 파악하는 것은 매우 어려웠다(11). 그동안 세균군집의 분석은 배양하여 측정하는 전통적인 방법과 핵산에 결합하는 형광 염료인 acridine orange(13), DAPI(19), Hoechst dye(6) 등으로 염색하며 관찰하는 방법으로 개체수 측정이 주된 연구 방법이었다. 특히 최근까지 세균 군집 중 구성 파악은 주로 배양 가능한 세균만을 대상으로 생리적인 시험을 거쳐 이루어졌다. 그러나 수중 생태계에서는 배양 가능한 세균이 직접 관찰하여 측정한 세균의 0.1-1%에 불과하므로 배양에 의한 군집 분석은 생태학적으로 큰 의미가 없다(21). Fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probe는 특정 유전자와 결합하는 특이성을 가지고 있어 생태계에서 특정 세균 군집의 시간, 공간적 변화를 파악하는 데에 많이 이용되고 있으며(23), 이러한 방법을 통하여 생태계에서 특정 세균 및 세균군집을 추적하는 연구가 많이 이루어졌다(14). 또한 16S rRNA의 특정부분은 진화 속도가 매우 느리

많은 생물체가 공통적으로 갖는 보존된 염기 서열과 이차 구조를 나타내어 다양한 분류군의 상호 비교를 가능하게 한다(25). Ribosomal Database Project(RDP)에서 제공하는 16S rRNA database는 계통 분류학적 관점에서 비교가 가능하도록 정리되어 있으므로 특정 군집을 연구하기 위한 probe의 설계가 가능하고, 따라서 16S rRNA와 23S small subunit rRNA gene probe는 세균군집을 분류하기가 쉬운 장점이 있다(10). 소양호에서 동계에 이 방법을 이용하여 조사한 결과 수심별로 세균의 군집구조가 다름을 확인하였다(5). 이 연구는 소양호에서 in situ hybridization 방법으로, 현재 probe가 설계 되어 있고 수생태계에서 eubacteria 군집의 70% 이상을 차지하는 proteobacteria group과 나머지 세균군집 중 큰 부분을 차지하는 Cytophaga-Flavobacterium group을 중심으로 계절과 수심에 따른 세균군집 변화를 측정하였다.

재료 및 방법

조사 대상 지역 및 기간

조사는 소양호의 댐 앞 수역에서 수심 0, 2, 5, 10, 30, 50 m로 나누어 실시하였고, 시료채취는 1996년 12월 14일, 1997년 4월 24일, 5월 21일, 6월 12일, 7월 2일, 8월 13일 등 6회 실시하였다.

조사 대상

Eubacteria에 속하는 세균과 Class Proteobacteria에 속하는 세균 중 α -, β -, γ -group과 Cytophaga-Flavobacterium group을 측정하였다.

총세균수

AODC(acridine orange direct count)방법으로 측정하였다.

*To whom correspondence should be addressed

세균의 군집구조 파악

시료 고정 시료 10 ml을 paraformaldehyde solution(최종 농도 4%)으로 현장에서 고정된 후 polycarbonate membrane filter(Nuclepore, pore size 0.2 μ m, ψ 25 mm)에 여과하였다. 시료를 여과한 후 phosphate buffered saline(PBS) 1 ml로 여과하였고 50%, 80%, 99%의 ethylalcohol 0.5 ml씩 차례로 여과하고, filter를 공기 중에서 건조하였다.

Gene probe 여기에서 사용한 rRNA probe의 염기 서열은 이미 보고된 방법(7,15)에 따라 주문, 제작하였고 (TaKaRa, Japan), tetramethylrhodamine으로 표지하였다. 사용한 probe들은 eubacteria와 결합하는 EUB338, α -group과 결합하는 ALF1b, β -group과 결합하는 BET42a, γ -group과 결합하는 GAM42a와 *Cytophaga-Flavobacterium* group과 결합하는 CF probe였다.

In situ hybridization Gelatin coated slide glass에 filter를 올려놓은 후에 16 μ l의 hybridization solution [0.9M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 0.01% SDS, formamide(농도 EUB 0%:ALF 20%:BET와 GAM 35%:CF 15%)]를 첨가한 후 2 μ l probe(농도 25 ng \cdot μ l⁻¹)를 첨가하였다(7). 용액들을 잘 섞은 후 hybridization chamber에 넣고 46°C에서 90분간 배양하였다. 배양 후 48°C로 미리 예열된 washing solution[(20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM EDTA, 0.01% SDS, NaCl용액(농도 EUB 0.9M:ALF 0.225M:BET와 GAM 80 mM:CF 80 mM)]에 filter를 담근 후 48°C에서 15분 동안 washing하고 꺼내어 증류수로 세척한 후 공기 중에서 건조시켰다. 특히 β -, γ -group은 서로 간섭하므로, β -group을 측정할 때는 non-labeled GAM42a 2 μ l를 함께 사용하였고, γ -group을 측정할 때는 non-labeled BET42a 2 μ l를 함께 사용하는 간섭을 배제하는 방법(15)으로 측정하였다.

관찰 형광 현미경(Olympus BH2, Exciting filter:G, Barrier filter:O590, Lamp:Mercury lamp HBO 100W/2, OS-

RAM)을 이용하여 1,250 배율 하에서 세균을 계수하였다. 세균수는 20번 이상을 계수하여 그 평균값을 구하였다.

결 과

총세균수

총세균수는 본 조사기간 동안 표층에서 높고, 심층으로 갈수록 감소하는 전형적인 분포를 나타내었다(Table 1). 0 m에서는 $0.7 \sim 1.5 \times 10^6$ cells \cdot ml⁻¹의 수준이었고 2 m수심에서는 $0.8 \sim 1.5 \times 10^6$ cells \cdot ml⁻¹이었다. 총세균수는 심층으로 갈수록 감소하여 50 m에서는 $0.5 \sim 1.1 \times 10^6$ cells \cdot ml⁻¹의 분포를 보였다.

Eubacteria의 총세균수에 대한 비율

총세균수 중 eubacteria에 속하는 세균이 점유하는 비율은 0 m에서는 50~94%, 2 m수심에서는 40~70%, 5 m에서는 30~70%를 보였으며 10 m에서는 35~80%, 30 m에서는 22~100%, 50 m에서는 50~98%의 범위를 나타내었다. 겨울철인 12월에는 0, 2 m에서 77, 90%로 비슷하였고, 5, 10 m에서는 대폭 감소하여 39, 34%의 비율로 나타났고, 30, 50 m에서는 다시 증가하였다. 4월에는 2, 5, 10 m에서 각각 39, 40, 35%로 낮은 비율을 보였고, 0, 30, 50 m는 70% 이상의 비율을 보였다. 5월에는 2와 5 m에서 각각 32, 54%로 낮은 결과를 나타내었고, 다른 수심은 70%이상의 비율을 나타내었다. 6월의 경우는 전체적으로 70%이하의 비율로 낮았으며 특히 5와 30 m에서 각각 28, 22%로 매우 낮은 결과값을 보였다. 7월은 5 m에서 70%, 50 m에서 99%로 높은 비율을 보였고, 다른 수심의 경우에는 45~52%로 낮은 비율을 나타내었다. 8월에는 0, 2, 5 m에서 각각 47, 39, 44%로 낮은 비율을 보였고, 10 m에서는 60%로 증가하였고, 30 m와 50 m에서는 각각 98%, 100%이상의 높은 결과값을 나타내었다(Table 2).

Table 1. Total bacterial number of Lake Soyang from 14 December 1996 to 13 August 1997

unit: $\times 10^6$ cells. ml⁻¹

Depth (m)	Date	Dec., 1996	Apr., 1997	May, 1997	June, 1997	July, 1997	Aug., 1997
0		0.7	1.1	1.0	0.8	1.5	1.2
2		0.8	1.3	1.4	0.8	1.2	1.5
5		1.1	1.0	1.3	2.0	1.0	1.3
10		0.9	1.2	0.9	1.0	1.2	1.2
30		0.6	0.9	0.6	0.3	1.1	0.8
50		0.5	0.5	0.5	1.1	0.6	0.5

Table 2. The ratio of Eubacteria to total bacteria of Lake Soyang from 14 December 1996 to 13 August 1997

unit: %

Depth (m)	Date	Dec., 1996	Apr., 1997	May, 1997	June, 1997	July, 1997	Aug., 1997
0		77	72	73	66	52	47
2		90	39	32	69	45	39
5		39	40	54	28	70	44
10		34	35	80	54	49	60
30		72	75	88	22	49	98
50		57	69	100	67	99	100

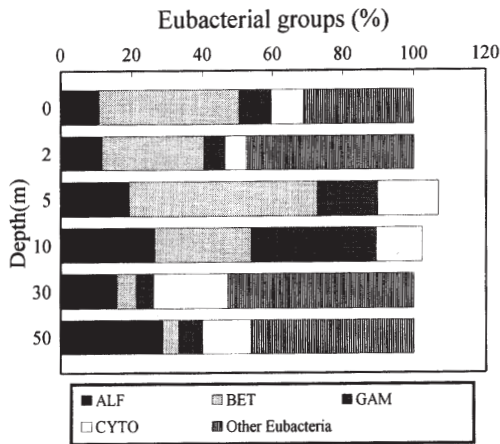


Fig. 1. Proportion of bacterial groups among Eubacteria of Lake Soyang on 14 December 1996. (ALF=Proteobacteria α -group, BET=Proteobacteria β -group, GAM=Proteobacteria γ -group, CF=Cytophaga-Flavobacterium group).

Eubacteria의 군집 구조

Eubacteria를 100%로 하였을 때의 수심별 세균의 군집 비율을 살펴보았다. 1996년 12월의 경우 α -group은 10.8~28.7%, β -group은 4.5~53.5%, γ -group은 4.9~35.5%, Cytophaga-Flavobacterium group은 6.1~21.1%를 나타내었다 (Fig. 1). 1997년 4월은 α -group이 7.0~20.0%, β -group은 8.9~29.2%, γ -group은 0, 2 m에서 40.0, 33.3%로 많은 분포를 보이고 있고 다른 수심은 11.1~20.8%를 나타내었고, Cytophaga-Flavobacterium group은 전체적으로 볼 때 2.1~23.4%를 나타내었고, 표층보다는 심층으로 갈수록 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2). 5월에 α -group은 5.0~9.7%로 여전히 낮은 결과를 나타내었고, β -group은 2 m에서 18%를 보

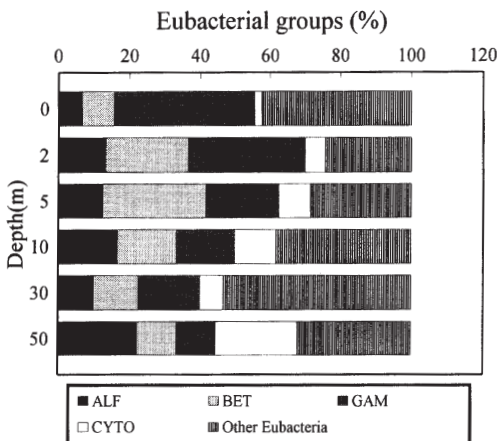


Fig. 2. Proportion of bacterial groups among Eubacteria of Lake Soyang on 24 April 1997. (ALF=Proteobacteria α -group, BET=Proteobacteria β -group, GAM=Proteobacteria γ -group, CF=Cytophaga-Flavobacterium group).

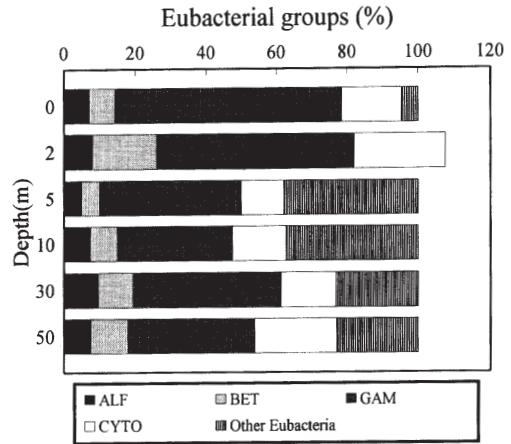


Fig. 3. Proportion of bacterial groups among Eubacteria of Lake Soyang on 21 May 1997. (ALF=Proteobacteria α -group, BET=Proteobacteria β -group, GAM=Proteobacteria γ -group, CF=Cytophaga-Flavobacterium group).

일 뿐 나머지 수심은 5.0~10.3%로 낮은 비율을 나타내었다. γ -group은 4월보다는 크게 증가하여서 전체적으로 32.5~64.3%의 값을 보였고 0, 2 m에서 56~64.3%로 표층에서 높은 값을 심층인 50 m에서는 40% 전후의 결과치를 나타내어서 표층보다는 심층이 비교적 낮은 값을 보였다. Cytophaga-Flavobacterium group은 12.1~25.5%로 전수심이 비슷한 결과를 나타내었다(Fig. 3). 6월에는 α -group이 2.6~7.3%로 여전히 낮은 비율을 나타내었고 β -group은 0, 2, 5 m에서 21.2~23.3%였고 10 m 이하 수심에서 10%가 안 되는 낮은 결과값을 보였다. γ -group은 0~10 m에서 50.0~76.7%, 30, 50 m에서 31.7~39.4%의 결과를 보여 표층보다는 심층이 비교적 낮은 비율을 보였다. Cytophaga-Flavobacterium

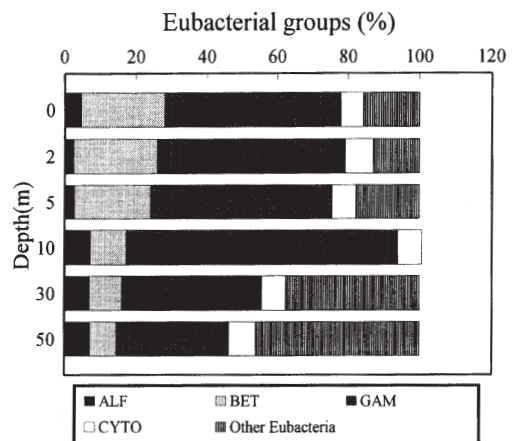


Fig. 4. Proportion of bacterial groups among Eubacteria of Lake Soyang on 12 June 1997. (ALF=Proteobacteria α -group, BET=Proteobacteria β -group, GAM=Proteobacteria γ -group, CF=Cytophaga-Flavobacterium group).

group은 6.2~7.8%로 전 수심에 걸쳐 매우 낮은 비율을 나타내었다(Fig. 4). 7월에는 α -group이 조금 증가하여 15.4~36.7%, β -group은 11.1~28.2%였고 표층보다는 심층이 낮은 결과값을 보였다. γ -group은 6월보다는 감소하였고 전체적으로 11.8~22.2%의 비율을 보였다. *Cytophaga-Flavobacterium* group은 6월에 비하여 그 값이 크게 증가하여 13.3~46.9%를 나타내었고, 특히 2 m에서 46.9%로 큰 비율을 차지하였다(Fig. 5). 8월은 α -group은 5, 10 m에서 50%를 넘는 높은 비율을 나타내었고, 다른 수심에서도 12~31%로 높은 비율을 보였다. β -group은 5 m에서 7월보다는 감소하였지만 여전히 큰 비율인 22%를 나타내었고, 다른 수심에서는 4.5~12.1%의 낮은 결과값을 나타내었다. γ -group은 2 m에서

35%로 높은 비율을 보였지만 심층은 4.8~6%로 낮은 값을 보였다. *Cytophaga-Flavobacterium* group은 표층과 심층은 18~29.5%, 중층에서는 8.8~9.5%로 중층이 표층과 심층보다 높은 결과값을 보였다(Fig. 6).

고 찰

소양호에서 총세균수의 수직적 분포는 표층에서 높고 심층으로 갈수록 감소하는 전형적인 분포를 보여 2 m, 10 m 수층에서 가장 높게 나타났으며, 조사기간동안 변화가 크지 않았음을 알 수 있다.

호수 생태계에서 배양 가능한 세균은 1% 미만에 불과하며(8), 따라서 배양한 후에 세균 군집을 파악하는 것은 의미가 없다. 실제로 활성슬러지에서 세균군집을 배양한 후 분류한 경우와 *in situ* hybridization으로 분류, 측정된 결과가 매우 상이하게 나타나 있는 보고도 있다(24).

Hicks(12)는 몇 군데의 연못에서 총세균수의 35-67%가 EUB338 probe와 반응한 결과를 얻었다. 또 수돗물에서는 부착세균의 70%, 부유세균의 40%가 EUB338과 반응하였다(16). Alps의 빈영양상태 호수에서는 eubacteria의 값이 총세균수의 64% 이었고 β -group이 우점하고 있으며(42.7%), α -group과 γ -group이 그 다음으로 많이 존재하고, *Cytophaga-Flavobacterium* group은 그 비율이 매우 작다(7). 반면 얼음 위에 쌓인 눈의 경우 eubacteria의 비율이 50%이며 β -group이 100% 가까운 점유율을 나타내었다. 이러한 보고와 이번 연구 결과와 비교하여 볼 때, 총세균수에 대한 eubacteria의 비율은 다소 낮은 비율을 보였던 때가 있었으나 비교적 앞에서 언급한 외국의 사례와 유사하게 나타났으며, 군집구조는 매우 다양한 변화가 있었던 것을 알 수 있다. 이는 본 조사기간 동안 환경조건이 계속적으로 변화하였기 때문으로 사료된다. 본 조사결과로 소양호를 계절별로 크게 나누어 살펴보면 겨울철에는 β -group이, 봄철에는 γ -group이 여름철에는 α -group이 우점하는 것으로 나타났다. 반면 *Cytophaga-Flavobacterium* group이 특정적으로 우점하는 시기는 없었다.

Proteobacteria의 각각의 group들이 갖고 있는 생태학적 기능을 살펴보면 유기물과 영양 염류의 농도가 높으면 세균 군집은 γ -group의 비율이 커지고 (24)와 빈영양호에서는 β -group의 비율이 높아진다는 보고(7) 등이 있다. 이러한 보고를 참고로 소양호의 군집구조변화에 대한 몇가지 고찰을 해 본다면 다음과 같다. 봄철 조사기간에 소양호는 가장 많은 유기물과 영양염류 등이 존재했던 것으로 사료된다. 소양호는 강우시 유역으로부터 많은 영양염류등이 유입된다(1). 또한 플랑크톤은 성장하는 동안 여러 가지 유기물을 분비하므로(22), 식물플랑크톤의 증가와 유기물의 증가는 영양염류의 증가와 관계가 깊다. 소양호와 같은 인공호에서의 유기물 기원은 식물플랑크톤의 광합성이다. 식물플랑크톤이 성장하면서 세포 안과 밖의 유기물 농도 차이로 인한 수동 확산(passive diffusion)으로 유기물이 유출되는데 이 유출 유기물을 EOC(excreted organic carbon)라 하고 이 EOC는 주로 당당류, 아미노산, 유기산 등의 저분자 유기물질로 구성되어 있다(4). 본 조사기간 봄철 소양호에는 많은 강우가 내

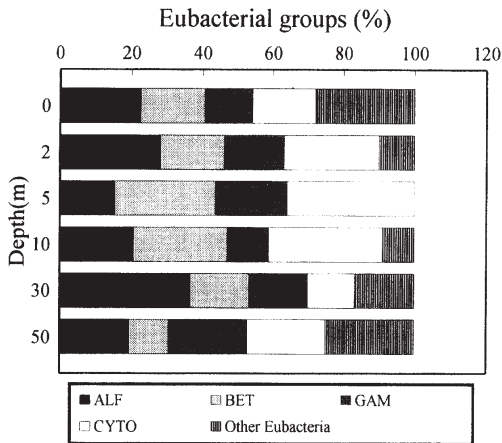


Fig. 5. Proportion of bacterial groups among Eubacteria of Lake Soyang on 24 July 1997. (ALF=Proteobacteria α -group, BET=Proteobacteria β -group, GAM=Proteobacteria γ -group, CF=Cytophaga-Flavobacterium group).

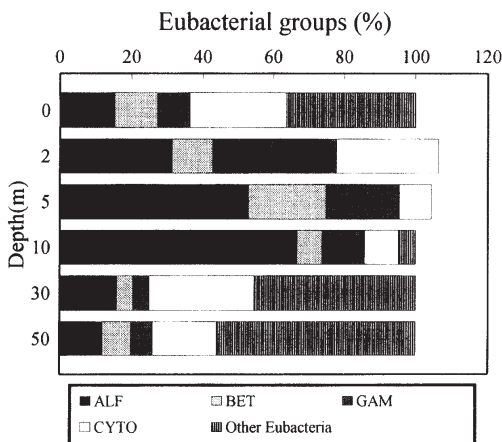


Fig. 6. Proportion of bacterial groups among Eubacteria of Lake Soyang on 13 August 1997. (ALF=Proteobacteria α -group, BET=Proteobacteria β -group, GAM=Proteobacteria γ -group, CF=Cytophaga-Flavobacterium group).

렸고, 이에 따른 유기물 유입과 봄철 식물플랑크톤의 bloom으로 봄철에 γ -group이 우점했던 것으로 사료된다. 그러나 실제로 소양호에서 DOC의 총 농도를 측정한 결과, 봄철에는 1.55~2.65 mgC/l이고 여름철에는 1.25~5.48 mgC/l로 봄철에 비해 여름철에 그 값이 높았는데(3), 최와 안(4)에 의하면 소양호에서 DOM(dissolved organic matter) pool은 가을과 겨울에는 주로 HMW(high molecular weight) 유기물인 dissolved combined carbohydrate로 구성되어 있으며 봄철에 LMW(low molecular weight) 유기물인 dissolved free carbohydrate로 구성되어 있음을 확인하였고, 이러한 결과는 Plussee호수에서 조사한 결과(20)와도 일치하는 것을 볼 때, 총 DOC의 농도만을 본다면 봄철보다는 여름철이 높은 결과를 보이지만, 실제로 세균이 이용할 수 있는 LMW유기물은 봄철이 많다는 추측을 해 볼 수 있다. 수온이 많이 상승한 여름철의 경우, 소양호는 α -group이 우점하였는데, 이것은 이(2)가 소양호 표층을 대상으로 PCR 방법을 이용하여 세균 군집을 분석한 결과 α -group이 우점하는 것과도 일치한다. Alps의 빈영양상태 호수에서 β -group이 우점하고 있으며(42.7%), α -group과 γ -group이 그 다음으로 많이 존재하는 보고(7)가 있을 뿐 α -group에 대한 특별한 보고는 나와 있지 않다. 따라서 α -group에 대한 더 많은 생태학적 연구가 필요하다고 생각된다. 겨울철에는 β -group이 우점하였는데 이 결과 또한 소양호가 겨울철에 수온이 낮고 여름보다 세균의 수와 활성도가 낮은 것을 고려하면 결과값이 비교적 이미 연구된 다른 보고들과 일치하는 것으로 사료된다. 또한 12월 5, 10 m와 5월 2 m, 8월 2, 5 m에서 각 group의 합이 100%이상 나타난 것(Fig. 1, 3, 6)은 각 group 측정의 통계적 차이에서 기인되는 것으로 사료된다. β -group과 γ -group은 probe가 서로 간섭하므로 간섭을 배제하기 위하여 non-labelled probe를 이용하였으나(15), 과다 계수되었을 가능성이 있다. 이 수심에서는 특히 총세균수에 대한 eubacteria의 비율이 6월 12일만을 제외하면 40% 이하로 낮은 값을 나타내는 등의 특징을 보였으며 군집 구조도 proteobacteria와 *Cytophaga-Flavobacterium* group이 eubacteria의 100%를 차지하는 단순한 종 구성 상태를 나타내어 다른 수층과는 다른 세균 군집 구조를 나타내었다. 이 원인은 여러 가지 있겠으나 외부에서 토양 미생물이 다량 유입되었거나, 또는 강우시 유입된 유기물이 수온약층 부분에 머물러 유기물이 증가되는 등의 변화에 의한 것으로 사료된다.

Eubacteria의 비율과 군집구조로 보아 소양호는 각 계절에 따라 수심을 나누어 볼 수 있다. 겨울철에는 0, 2 m와 5, 10 m, 그리고 30, 50 m의 3개부분으로 나눌 수 있으며 군집구조가 확연한 차이를 보인다(Fig. 1). 특히 5, 10 m 수심은 4개 group이 eubacteria의 100%를 차지하고 있어 다른 수심과는 완전히 다른 양상을 나타내었다. γ -group이 전 수심에 걸쳐 완전하게 우점하는 6월 소양호는 0, 2, 5 m와 10 m, 그리고 30, 50 m로 나눌 수 있다(Fig. 4). α -group이 우점하는 여름철인 8월은 표층의 경우 다양하게 군집구조가 변화하였으나 수온이 낮은 30, 50 m는 비슷한 군집구조 이었다(Fig. 6). 이처럼 소양호는 각 조사시기마다 수심별로 군집구조의 특성이 있었으며, 세균의 군집구조의 비교로, 수심별, 계절별로 유사성을 파악할 수 있었고, 이러한 유사성의 파

악으로 호수생태계에 대한 새로운 정보를 얻을 수 있었다.

앞으로 세균군집의 측정과 여러 환경요인의 측정을 함께 수행하여 각 group이 갖고 있는 생태학적 기능과 특성, 그리고 각 생태계에서 세균의 역할과 세균군집의 다양한 변화를 측정하는 지속된 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

이 연구는 서울대학교 분자 미생물학 연구 센터를 통한 한국 과학 재단 우수 연구 센터 지원금에 의하여 연구수행되었습니다.

참고문헌

1. 김범철, 최광순, 김동섭. 1996. 비점오염원의 홍수유출과 호수의 부영양화. Proceeding of Korea-Japan joint symposium on ecological engineering. 춘천.
2. 이동훈. 1995. 소양호 세균 군집 분자생태학적 연구. 이학박사 학위논문. 서울대학교 대학원.
3. 이유희. 1998. 소양호 용존유기물의 분포 및 분해 특성에 관한 연구. 강원대학교 이학 석사 학위논문.
4. 최승익, 안태석. 1995. 소양호에서 섬유소 기질에 부착한 미생물의 유기물 분해 활성도. 한국육수학회지. 28, 27-33.
5. 홍선희, 변명섭, 안태석. 1997. 16S와 23S rRNA에 결합하는 probe를 이용한 겨울철 소양호 세균 군집 구조의 분석. 한국미생물학회지. 33, 257-261.
6. Ahn, T.S. and S.I. Choi. 1998. Microbial enzymatic degradation of organic materials by attached bacteria on cellulose films in Lake Soyang. Verh. Verein. Internat. Limnol. 25, in printing.
7. Alfreidner, A., J. Pernthaler, R. Amman, B. Sattler, F.-O. Glockner, 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.
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. Atlas, R.M. and R. Bartha. 1986. Microbial ecology 2nd Ed. the Benjamin cummings Pub. Co. Menlo Park. 350-352.
10. DeLong, E.F., G.S. Wickham and N.R. Pace. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science. 243, 1360-1363.
11. Fuhrman, J.A., K. McCallum, and A.A. Davis. 1993. Phylogenetic diversity of substrate marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1294-1302.
12. 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.
13. Hobbie, J.E., R.J. Daley and S. Japer. 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 33, 1225-1228.
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-Dichloro phenoxyacetic acid degrading

- population in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1116-1120.
15. **Manz, W., R. Amann, W. Ludwig and M. Wagner.** 1992. Phylogentic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions. *Appl. Environ. Microbiol.* **15**, 593-600.
 16. **Manz, W., U. Szewzyk, P. Ericsson, R.I. Amann, K.-H. Schleifer and T.A. Stenstrom.** 1993. In situ identification of bacteria in drinking water and a adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2293-2298.
 17. **Munster, U. and R.J. Chrost.** 1990. Origin, composition and microbial utilization of dissolved organic matter. pp. 8-46 in Overbeck, J. and Chrost, R.J. (editors), *Aquatic Microbial Ecology; Biochemical and Molecular Approaches*. Springer Verlag, New York.
 19. **Porter, K.G. and Y.S. Feig.** 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**, 943-948.
 20. **Sell, A. F.** 1994. Phytoplankton-excreted organic carbon. In Overbeck J, Chrost R.J. (eds) *Microbial Ecology of Lake Plußsee*. Springer-Verlag, New York. pp. 81-91.
 21. **Staley, J.T. and A. Konopka.** 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. microbiol.* **39**, 321-346.
 22. **Sundh, I.** 1989. Characterization of phytoplankton extracellular products (PDOC) and their subsequent by heterotrophic organisms in a mesotrophic forest lake. *J. of Plankton Res.* **11**, 463-486.
 23. **Trebesius, K., R. Amann, W. Ludwig, K. M. Hlegger, and K.H. Schleifer.** 1994. Identification of whole fixed bacterial cells with nonradioactive rRNA targeted transcript probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3228-3235.
 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. **Woese, C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.

(Received July 30, 1998/Accepted September 19, 1998)

ABSTRACT: Seasonal Changes of bacterial community analysed by fluorescent in situ hybridization method in Lake Soyang

Sun-Hee Hong and Tae-Seok Ahn (Dept. of Environmental Science, Kangwon National University, Chunchon, 200-701 and Research Center for Molecular Microbiology Seoul National University, Seoul, 151-742)

To define the structure and diversity of bacterial communities in the aquatic ecosystem, Lake Soyang, the largest artificial reservoir in Korea, a new method, fluorescent in situ hybridization was applied. This technique relies on the specific hybridization of the nucleic acid probes to the naturally amplified intracellular rRNA. By this method, the bacterial community composition of Lake Soyang and bacterial numbers belong to eubacteria, proteobacteria and *Cytophaga-Flavobacterium* group were estimated. Total bacterial numbers ranged from $0.3 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ cells \cdot ml $^{-1}$, and vertical profile of total bacteria showed the peak at 2 and 5 m depths. The ratio of eubacteria to total bacteria were 22~100% and varied with depth and season. The percentage of Proteobacteria α -group ranged 2.6~66.7%, β -group 4.5~53.5%, γ -group 4.6~76.7% and *Cytophaga-Flavobacterium* group 2.1~35.9%. Also, bacterial community had spatial and temporal characteristics. The dominant groups were β -group in winter, γ -group in spring and early summer and α -group in summer.