

삼교호의 세균 다양성과 계통분류학적 분석

김명 · 전은형 · 안태영*
단국대학교 미생물학과

본 연구에서는 삼교호의 요인 분석과 주변 지류의 영향과 계절에 따른 세균 군집구조의 변화를 분자생태학적 접근 방법을 통해 조사하였다. 시료 채취는 5월과 8월 삼교호 방조제 앞 표층수에서 실시하였으며, 분자생태학적 접근을 위해 시료로부터 DNA를 직접 추출하고, 16S rDNA를 증폭한 후 pGEM-T easy vector에 삽입하여 클로닝을 수행하였다. 획득한 클론 라이브러리를 이용하여 RFLP (restriction fragment length polymorphism)를 분석하였으며, OTUs (operating taxonomy units)로 그룹화하였다. 측정된 종다양성 지수가 8월에 더 높게 나타났으며, 5월의 153개중 34개의 클론과 8월의 131개중 38개의 클론들을 염기서열 분석하였다. 그 결과 *Proteobacteria*, *Cytophaga*, Gram positive bacteria와 *Verrucomicrobia*가 5월과 8월에 공통적으로 분포하는 것으로 나타났으며, 특히 *Planctomyces*, 시안세균과 엽록체가 조류 대발생이 일어난 8월에 분포하는 것으로 조사되었다. 전반적인 조사 결과 삼교호는 전형적인 하구지역의 특성을 나타내었으며 주변 하천으로부터 유입되는 중속영양물질의 영향을 받는 것으로 생각된다.

Key words □ Bacterial diversity, 16S rDNA analysis, RFLP, Phylogenetic analysis.

세균 군집의 구조와 다양성을 정량적으로 이해하기 위한 노력은 미생물 생태학에 있어서는 핵심적인 과제이다(2). 자연생태계에서 배양 가능한 세균은 실제 존재하는 세균의 1% 이하에 불과하므로 배양에 의한 군집 파악은 생태학적으로 큰 의미가 없으며(5), 왜곡된 결과가 나올 수 있는 우려가 높다(20). 그러나 최근에 배양법의 제한점을 극복하기 위한 분자생물학적 방법도 도입되어 실제 환경에서 미생물 군집구조 연구에 폭넓게 응용되고 있다. 세균군집 구조 분석을 위해 많이 사용되어지는 방법으로 현재 활발하게 응용되고 있는 분자생물학적 방법은 16S ribosomal RNA 유전자를 분자 지표로 사용함으로써 미생물 군집구조를 분석하는 방법이다. 16S rRNA와 23S rRNA 유전자는 세균들을 종 수준으로 구분할 수 있는 정보를 담고 있는 영역으로 염기 서열의 변화는 미생물간의 유연 관계를 파악하는 데에 유용하게 사용 될 수 있으며(3), 16S rRNA의 특정 부분은 진화 속도가 매우 느려 많은 생물체가 공통적으로 갖는 보존된 염기 서열과 이차 구조를 나타내어 다양한 분류군의 상호 비교를 가능하게 한다(19).

삼교호는 1979년 농업 진흥공사에 의해 삼교천 하구에 방조제가 축조되어 형성된 담수호로서 총 저수량이 약 8,400만톤, 총 만수면적은 2,107 ha에 달하며, 충남 예산, 당진 지역의 농업용수와 공업용수 공급에 있어서 중추적인 역할을 하고 있는 호수이다(1). 그러나 유역면적이 164,000 ha로서 대단히 넓고 유역에 도시와 농경지 등의 각종 오염원에 심하게 노출이 되어 있어 특

별한 관리가 요구되는 호수이다. 삼교호는 꾸준히 연구되어져 왔지만 지금까지 삼교호를 대상으로 이루어진 연구는 환경 수질평가에 관련된 이화학적 조사였다(1).

본 연구에서는 16S rDNA 염기서열분석 방법을 이용하여 수 환경에서 중요한 위치를 차지하고 있는 세균 군집을 조사하였고, 또한 엽록소 a와 인산염 인과 질산성 질소등의 무기영양염류의 양을 측정하여 세균 군집이 환경요인과 어떤 상호작용을 하는지를 조사하였고, 유사성 분석을 통해 eubacteria의 계통분류학적 관계에 대해 평가하였다.

재료 및 방법

조사지역 및 기간

삼교호 방조제 앞 표층수에서 갈수기인 2001년 5월 27일과 장마가 끝난 만수기인 8월 17일에 채수하였다.

물리화학적 분석

수온은 봉상온도계로 현장에서 측정하였으며 pH는 시료를 실험실로 운반한 후 즉시 pH meter(Inolab, Germany)를 이용하여 측정하였다. 용존산소와 생물학적 산소요구량은 Standard Method (4)에 따라 Winkler-Azide 적정법을 이용하여 측정하였다. 이온농도($\mu\text{g/L}$) 측정은 $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, 그리고 $\text{PO}_4\text{-P}$ 의 정량을 실시하였으며, 모두 standard method(4)에 의한 발색법을 사용하였다.

중속영양 세균 측정은 평판 계수법을, 대장균은 most probable number test를 이용하여 분석하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-550-3451, Fax: 041-561-2210
E-mail: ahnty@dankook.ac.kr

환경시료에서 DNA 추출, 정제와 증폭

농축된 환경시료로부터 DNA를 직접 추출하였으며 Tsai와 Olson의 방법(17)을 변형하여 사용하였다. Freeze-thawing 방법을 6회 반복하여 처리하였다. Sterivex GV filter unit에서 전처리된 시료를 멸균된 tube로 옮기고 phenol extraction 방법을 시행하였으며, DNA 정제는 gene clean kit (Bio101, USA)를 사용하여 정제한 후, 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 primer인 27F (*E. coli* numbering 8~27; 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (*E. coli* numbering 1492~1510; 5'-GGYTACCTGTTACGACTT-3')를 사용하였다. PCR 반응은 Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA)을 이용하였으며 PCR 반응조건은 94°C에서 3분간 초기 열처리를 한 후, 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 2분씩 25회 반복하고 마지막에는 72°C에서 8분간 처리하였다.

염기서열 결정과 계통 분석

E. coli DH10B에 형질 도입하여, 임의로 선정한 약 150개의 clone으로부터 boiling mini-prep method (14)를 이용하여 plasmid DNA를 분리·정제하였다. M13 universal primer (M13F-40: 5'-GTTTCCAGTCACGAC-3'; M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')를 이용하여 plasmid의 insert 부분을 증폭한 후 이를 RFLP 분석에 이용하였다. Gel의 양상을 CCD camera로 RFLP 양상을 촬영하였고, Gelcompar program (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)을 이용하여 RFLP 양상의 유사도를 결정하였다. 얻어진 clone library를 가지고 5월과 8월의 molecular bacterial diversity를 계산하기 위해 richness (phylogroup의 수), Shannon-Weaver diversity, evenness (각 phylogroup relative abundance) 등을 분석하였다. RFLP 분석결과 대표적인 양상을 보이는 clone을 선정하여 염기서열을 분석하였다. Big Dye terminator와 ABI PRISM 377 DNA Sequencer (PE 377; Applied Biosystem)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. Nucleotide sequence들을 Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)의 Sequin (Ver. 3.32 for windows; NCBI)을 이용하여 Genbank sequence database에 등록하였다. 부분적인 염기서열간의 유사도를 알아보기 위하여 BLAST search를 이용하여 Genbank와 EMBL database에서 유사한 16S rDNA 염기서열을 비교·검색하였다. 여기에서 얻어진 염기서열들과 clone들의 염기서열을 clustal X program으로 비교하고 다중 정렬하였으며, TreeconW program (Ver. 1.3b, University of Antwerp, Belgium)을 사용하여 계통수를 제작하였다.

결과 및 고찰

환경요인 분석

삼교호의 수온은 5월에 23°C, 8월에 32°C로 측정되었으며, 시료를 채수한 곳이 수층의 상층부이므로 기온의 영향을 많이 받는 것으로 판단되었다(Table 1). pH는 8월에 증가되었는데, 원인으로서는 대표적인 것은 지질학적인 특이성과 활발한 광합성 활동에 의한 식물 플랑크톤의 대발생이다(11). 무기영양염류 암모니

Table 1. Analysis of environmental factors and bacterial count in Lake Sapgyo

	May, 2001	August, 2001
Temperature (°C)	23.0	32.0
pH	7.75	8.65
DO (ppm)	2.4	2.2
BOD (ppm)	5.8	4.3
NH ₄ -N (µg/L)	682	29
NO ₂ -N (µg/L)	126	79
NO ₃ -N (µg/L)	1927	1009
PO ₄ -P (µg/L)	140	49
Chlorophyll <i>a</i> (µg/L)	39.6	80.8
Heterotrophic bacteria (CFU/ml)	1.2 × 10 ⁴	6.5 × 10 ⁴
Total coliform bacteria (MPN/100ml)	93	>1100

CFU: cloning forming unit

MPN: most probability number

아성 질소의 경우, 5월의 암모니아성 질소의 농도가 더 높다. 암모니아성 질소가 증가할 수 있는 원인은 종속영양세균에 의한 유기물의 대사결과로 생성된 암모니아성 질소의 증가와 질화작용이 일어났을 경우이다(10, 15).

아질산성 질소의 경우, 5월에 측정된 값이 8월보다 높게 나타났다. 암모니아성 질소 농도와 마찬가지로 월별 농도의 차가 심하였다. 질산성 질소도 5월에 더 높은 수치를 나타내었다. 8월 장마 이후 유기물 유입이 많았을 것임에도 불구하고, 8월에 질소의 수치가 5월보다 낮게 나타나는 원인을 조류 대발생과 연관지어 생각해 볼 수도 있는데 8월에 많이 분포하는 것으로 나타난 광합성 세균인 시안세균은 질소를 효과적으로 이용하는 것으로 알려졌다(8). Nitrate, ammonium과 같은 무기성 질소에 대한 세균과 조류의 흡수 능력은 온도에 의해 좌우되기도 하는데, 온도가 낮을수록 무기성 질소에 대한 세균과 조류의 흡수 능력도 감소한다고 보고하였다(12). 따라서 23°C의 온도분포를 나타낸 5월과 32°C의 8월 질소농도를 비교해 봤을 때 세균과 조류에 의해 이용된 nitrogen 농도는 8월이 높을 것으로 추측된다. 인산염 인은 5월에 보다 높게 측정되었으며, 빈영양호에서는 10~14 µg/L, 부영양호에서는 20~30 µg/L이라는 기준에 비추어 볼 때 삼교호는 부영양호수의 기준을 훨씬 초과하는 부영양화된 수역이라고 추정된다. 엽록소 *a*의 분석결과는 8월의 양이 높게 측정되었으며, 이는 조류 대발생과 연관지어 생각해 볼 때 당연한 결과이다. 종속영양 세균수는 5월과 8월, 즉 하절기에 해당하는 시기에 실험하였기 때문에 이들과 직접적인 비교는 어려우나, 일반적인 연구 결과에 비해 높은 수의 종속영양 세균수를 유지하고 있는 것으로 판단되며, 장마이후 유기물의 유입이 예상되는 8월에 더 높은 종속영양세균수를 보이고 있었다. 총대장균 군은 갈수기였던 5월에는 낮은 값이 측정되고, 정상 수위를 회복한 8월에는 1,100 이상의 MPN을 나타내었다. 이는 강우에 의해 처리되지 않은 생활하수나 축산폐기물의 유입을 의심할 수 있는데, 대장균 군의 크기는 강우에 의해서 영향을 받는다는 결과와 일치한다(2).

RFLP pattern 분석

5월과 8월에 삼교호의 미생물 군집을 분석하기 위해서 16S rDNA를 증폭하여 pGEM-T easy vector에 삽입한 후 4염기를 인식하는 제한 효소인 *MspI*과 *HaeIII*를 사용하여 RFLP phylotype을 조사·분석하였다. 5월과 8월에 각각 153와 131개의 clone을 얻었으며, 5월의 경우 153개의 clone중 34개의 RFLP phylotype을 확인하였으며, 8월에는 131개의 clone중 44개의 RFLP phylotype을 확인하였다.

다양성 지수와 16S rDNA 염기서열 분석

5월 153개의 clone중 33개와 8월 131개의 clone중 38개의 partial sequence를 분석하였으며, 그 결과 5월과 8월 모두 *Proteobacterium*, gram positive bacteria, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, *Verrucomicrobia*에 속하는 clone들이 주로 발견되었다(Table 2). 특히 8월에는 5월에 발견되지 않았던 *Planctomyces*, 시안세균과 엽록체에 속하는 clone들이 발견되었다.

계통 분류학적 분석

1) *Proteobacteria*

5월 삼교호에는 *Proteobacteria* β-group이 우점하는 것으로 나타났다. 질소순환에 관여하는 *Nitrosomonas*와 관련된 clone들이 발견되었으며, 이들 중 다수가 컬럼비아강 하구 지역의 부유성 세균 clonal library와 높은 유사도를 보인다(Fig. 1). β-group에 속하는 clone중 가장 큰 비율을 차지하는 SG1-153은 uncultured rape rhizosphere bacterium wr0020와 높은 유사도를 나타내었다. 삼교호는 농업관개용수를 목적으로 만들어진 인공호수이며 실제 본 연구에서 농작물과 관련된 clone이 발견된 점으로 미루어 보아 주변 농경지로부터 이러한 미생물들이 유입되었을 가능성이 있으며, 계통분류학적 분석 결과 탈질화에 관여하는 분리균주 *Acidovorax temperans*와 97% 유사성을 나타내었다. γ-group에 속하는 clone도 많이 분포하는 것으로 조사되었는데 *Nevskia ramosa*와 높은 유사도를 가진 clone들도 발견되었다(Fig. 2). 반

Table 2. Relative abundance of clones from Lake Sapgyo according to the eubacterial division

Phylogenetic division	Relative clone (%)	
	SG1(May)	SG2(Aug.)
α-Proteobacteria	2.6	3.1
β-Proteobacteria	60.1	22.1
γ-Proteobacteria	14.4	29.8
δ-Proteobacteria		3.1
Total Proteobacteria	77.1	58.1
Gram positive bacteria	4.6	6.1
<i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i>	10.5	13.7
<i>Verrucomicrobia</i>	2.6	1.5
<i>Planctomycetales</i>		2.3
Cyanobacteria & Chloroplasts		11.5

면 장마가 지난 다음의 8월에는 γ-group에 속하는 clone들이 우점으로 나타났으며, 이들은 유기물이 풍부한 곳에서 선택적으로 우점한다는 보고가 있으며(18), 유기물과 관계가 있을 것으로 생각된다. 5월과 8월에 *Xanthomonas*에 속하는 clone들이 분포하는 것으로 조사되었는데, 주로 토양 세균과 식물 병원성 세균으로

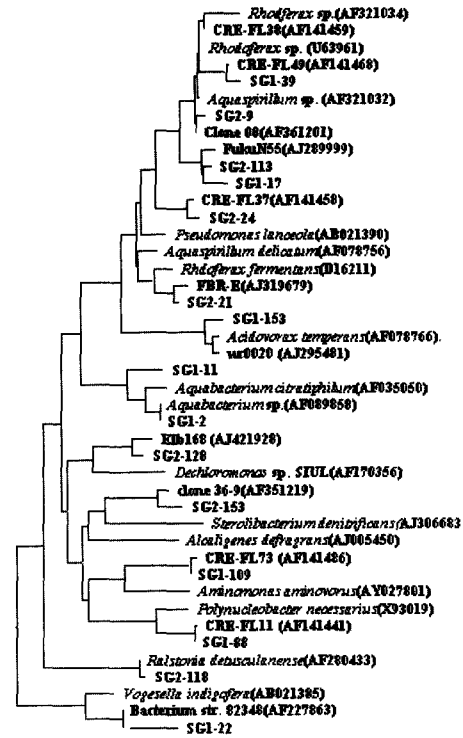


Fig. 1. Phylogenetic dendrogram of the β-proteobacteria from Lake Sapgyo and their genetic relative sequences of other environments.

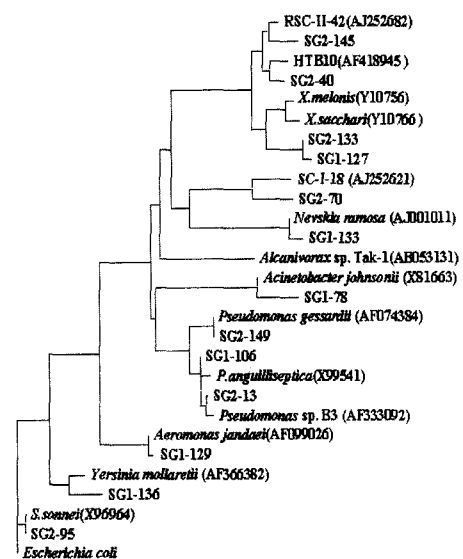


Fig. 2. Phylogenetic dendrogram of the γ-proteobacteria from Lake Sapgyo and their genetic relative sequences of other environments.

알려져 있다(16). 특히 γ -group에 속하는 clone중 가장 큰 분포를 나타내는 clone은 *E. coli*로 조사되었는데 아마도 이것은 장마 동안에 외부 오염원으로부터 장내 세균이 삼교호로 유입되었을 가능성을 보여주고 있다.

α -group은 5월과 8월 모두 비교적 낮은 분포를 보이고 있으며 주로 담수보다는 해수에서 많이 존재하는 것으로 알려져 있다. 삼교호에서는 *Sphingomonas*와 *Caulobacter* sp.에 속하는 clone들이 발견되었으며, δ -group에 속하는 clone들은 8월에만 발견되었으며, 분리되어진 균주 중 *Bdellovibrio bacteriovorus*와 가장 유사하였다. 이들은 작고, 운동성 있는 Gram-negative bacteria로 다른 Gram-negative bacteria에 침입하여 그것을 기질로써 이용한다. 토양에서 최초로 분리되었으며, 담수와 해수 등에서도 발견된다(11).

2) *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*

Cytophaga-Flavobacterium group은 거의 모든 해수와 담수에서 발견되며 삼교호의 경우에도 5월과 8월에 10.5, 13.7%의 분포로 각각 발견되었다(Fig. 3). 5월의 삼교호에서는 컬럼비아강의 부유성 세균으로 분류되는 CR-FL26과 부착성 세균으로 분류되는 CRE-PA7과 유사한 clone들이 발견되었으며, 유기물의 분해자로서 중요한 역할을 한다(6). 8월 삼교호에서는 5월과 동일한 양

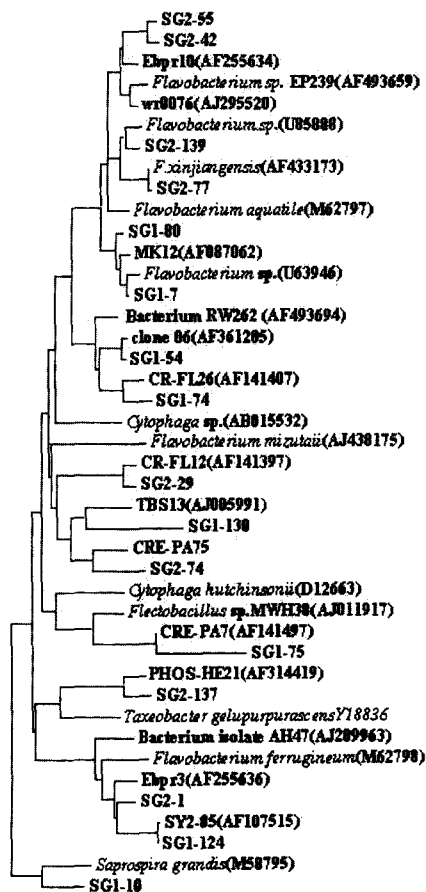


Fig. 3. Phylogenetic dendrogram of the CFB from Lake Sapgyo and their genetic relative sequences of other environments.

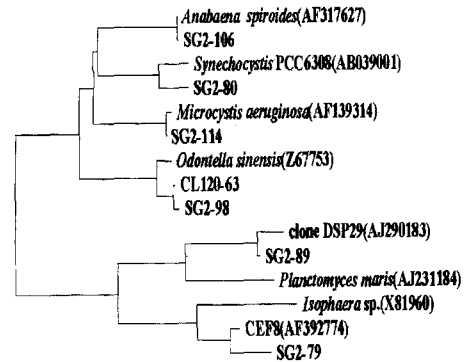


Fig. 4. Phylogenetic dendrogram of the Cyanobacteria from Lake Sapgyo and their genetic relative sequences of other environments.

상을 보였으며, enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process의 활성슬러지로부터 발견된 미생물 군집에서 유사한 clone들이 존재하는 것으로 조사되었는데 clone SG2-1, 55, 137이 유기물이 증가한 8월 삼교호에서 인 제거와 관련된 역할을 할 것으로 생각되어진다.

3) Gram positive bacteria

삼교호에서 발견된 gram positive bacteria에 속하는 clone들은 컬럼비아강 하구지역에서 발견된 clone들과 높은 유사성을 나타내었다. Actinomycete로 분류되는 ACK-4 group은 Adirondack lake에서 발견된 single monophyletic group이다(7).

4) *Verrucomicrobia*

삼교호에서 *Verrucomicrobia*에 속하는 clone들이 발견되었다. 이 계통에 속하는 다른 clone들은 태평양의 해수와 쌀, 농장 토양 등에서 발견되었으며, 환경 clone들과 관련이 있는 것으로 나타났다(9).

5) 시안세균, 엽록체와 *Planctomyces*

특히 시안세균은 호수나 저수지에서 bloom을 일으키기도 하며, 공기 중의 질소를 고정할 수 있고 nitrate를 효과적으로 흡수하는 것으로 알려졌다(8). 8월 삼교호에서는 시안세균의 분포가 비교적 높게 나타났으며(Fig. 4), 일시적으로 bloom 현상을 관찰할 수 있었으며 물리화학적 분석결과에서도 chlorophyll-a가 80.8 $\mu\text{g/L}$ 로 높게 조사되었다. 특히 *Microcystis aeruginosa*와 높은 유사도를 가진 clone들이 많이 발견되었으며 *Anabaena spiroides*와 유사한 것도 발견되었다.

삼교호에서 5월과 8월의 환경변화에 따른 세균 군집구조를 조사한 결과 삼교호가 오래 전에 형성된 담수호이지만, 아직 하구의 특성을 가지고 있는 것으로 보이며 환경적 요인뿐 아니라 주변 지류의 영향도 많이 받는 것으로 판단된다.

감사의 글

이 연구는 2003년도 단국대학교 대학 연구비 지원으로 이루어

졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 농어촌진흥공사. 1999. 삼교호 농업용수 수질개선사업 기본계획안. 농림부.
2. 이동훈, 김상중. 1997. 수계 생태계에서의 세균 군집 구조의 분자생물학적 분석. 한국미생물학회지. 33, 50-65.
3. Amann, R., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1994. Identification of uncultured bacteria: A challenging task for molecular taxonomists. *ASM News*. 60, 360-365.
4. APHA-AWWA-WPCF 1992. Standard methods for the examination of water and waste water. 18th. (ed.) AWWA. Washington DC.
5. Cottrell, M.T. and D.L. Kirchman. 2000. Community Composition of Marine Bacterioplankton Determined by 16S rRNA Gene Clone Libraries and Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5116-5122.
6. Crump, B.C., E.V. Armbrust, and J.A. Baross. 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3192-3204.
7. Hirons, W.D., B.A. Methe, S.A. Nierzwicki-Bauer, and J.P. Zehr. 1997. Bacterial diversity in Adirondack Mountain Lake as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2957-2960.
8. Hu, Q., P. Westerhoff, and W. Vermaas. 2000. Removal of nitrate from groundwater by cyanobacteria: Quantitative assessment of factors influencing nitrate uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 133-139.
9. Janssen, P.H., A. Schuhmann, E. Möschel, and F.A. Rainey. 1997. Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the Verrucomicrobiales lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1382-1388.
10. Jorgensen, N.O.G. 1986 Dissolved organic carbon(DOC) in lakes. In Carbon dynamics in eutrophic, temperate lakes. B (ed.) B. Reimann and M. Sondergaard. pp. 5-22.
11. Jurkevitch, E., D. Minz, B. Ramati, and G. Barel. 2000. Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2365-2371.
12. Reay, D.S., D.B. Nedwell, J. Priddle, and J.C. Ellis-Evans. 1999. Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake: reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2577-2584.
13. Reynolds, C.S. 1984. The ecology of freshwater phytoplankton. pp. 384 Cambridge Univ. Press.
14. Sambrook, J., and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual (3rd ed.) p. 1.47-1.50. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
15. Sharp, J.H., 1983. The distribution of inorganic nitrogen and dissolved and particulate organic nitrogen in the sea. In nitrogen in the marine environment, E.J. Carpenter and D.G. Capone ed. p.1-35. Academic Press, New York, London.
16. Sriprang, R., P. Vattanaviboon, and S. Mongkolsuk. 2000. Exposure of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. to lethal concentrations of multiple oxidants affects bacterial survival in a complex manner. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4017-4021.
17. Tsai, Y.L. and B.H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1070-1074.
18. 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.
19. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.
20. Zwart, G., R. Huismans, M.P. van Agterveld, Y.V. de Peer, P.D. Rijk, H. Eenhoorn, G. Muyzer, E.J. van Hanne, H.J. Gons, and H.J. Laanbroek. 1998. Divergent members of the bacterial division *Verrucomicrobiales* in a temperate freshwater lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 159-169.

(Received September 17, 2003/Accepted December 4, 2003)

ABSTRACT: Bacterial Diversity and its Phylogenetic Analysis in Lake Sapgyo

Myung Kim, Eun-hyoung Jeon, and Tae-young Ahn* (Dept. of Microbiology, Dankook university, Chunan 330-714, Korea)

Sapgyo Lake is an artificial freshwater reservoir which is located to the midwest of Korea and is the main water reservoir for industry and agriculture of the region. In this study we investigated environmental factors and the change of bacterial community with the influence of surrounding inflow water and the seasonal variation using the molecular ecological approach. Water samples were collected at front of the dike in May and August, 2001. Bacterial genomic DNAs were extracted directly and purified for the amplification of bacterial 16S rDNA. Clone libraries of the 16S rDNA were constructed using pGEM-T easy vector and RFLP analysis was performed to make a group as OTUs with 4 base recognizing enzymes (*MspI* and *HaeIII*). The estimated values of richness in August sample was higher than in May. Thirty-three of 153 clones in May and thirty-eight of 131 clones in August were sequenced from forward region of bacterial 16S rDNA for about 600~800 bp. *Proteobacteria*, *Cytophaga*, gram positive bacteria and *Verrucomicrobia* were observed both months. Especially, *Planctomyces*, cyanobacteria and chloroplast appeared in August when algal bloom occurred. On the whole investigation, Sapgyo lake showed a typical community structure of estuarine and was influenced by heterochthonous organic matters from the surrounding stream.