

소양호에 존재하는 새로운 *Flavobacterium*의 분포와 특징

김하늘 · 정요찬 · 강희영 · 이범일 · 장태용 · 조기성*

한국외국어대학교 생명공학과

Characterization and Distribution of Various *Flavobacterium* sp. in Lake Soyang

Haneul Kim, Yochan Joung, Heeyoung Kang, Beom-Il Lee, Tae Yong Jang and Kiseong Joh*

Department of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies,
Gyeonggi 449-791, Korea

Abstract - In this study, samples were collected from Lake Soyang in Kangwon-do in order to isolate novel *Flavobacterium* sp. strains. Totally, 21 strains of *Flavobacterium* showing 97%~98% similarity in 16S rRNA were selected and thoroughly investigated individual characteristics and ecological differences. As results, we could categorize *Flavobacterium* isolated from Lake Soyang into four major node groups, where most of *Flavobacterium* belonged to single group. Next, fatty acid analyses were performed demonstrating similar pattern of the majority of fatty acids as either iso C_{15:0} or summed feature 3 (comprised C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c) of the other *Flavobacterium*. However, other phenotypic data were different from the other *Flavobacterium* sp. Group. Our data showed that genetically related species of *Flavobacterium* have been distributed in Lake Soyang. Those *Flavobacterium* strains were phenotypically different from previously reported genus of *Flavobacterium* species. Taken together, we speculated that isolated *Flavobacterium* strains from Lake Soyang might be ecologically important members to maintain ecosystem.

Key words : Lake Soyang, bacterial diversity, novel strains, 16S rRNA

서 론

분류군 Flavobacteriaceae 과에는 *Chryseobacterium*을 비롯한 40여 속이 존재하며, 이 분류군 속중에는 2000년대 이후에 새롭게 만들어진 분류군이 많이 존재한다 (Bernardet and Bowman 2006). *Flavobacterium* 속은 Bacteroidetes 문 중에서 가장 큰 분류군으로 최근에 *F. algicola* (Miyashita et al. 2010), *F. beibuense* (Fu et al. 2011),

F. ponti (Yoon et al. 2011), *F. sinopsychrotolerans* (Xu et al. 2011) 등 많은 종이 분류되고 있다.

일반적으로 *Flavobacterium* 속은 노란색의 colony를 가지고 있으며, flexirubin pigment를 생산하는 것으로 알려져 있다 (Bernardet et al. 2002). *Flavobacterium* 속은 다양한 민물 환경에서 주로 발견되고 있다 (Bernardet et al. 2002; Bernardet and Bowman 2006). 특히 오염된 민물이 아닌 자연하천, 호수에 폭 넓게 분포하며, 심지어는 저온 환경에서도 분리되고, 민물 환경내의 다양한 생물 안에서도 발견되고 있다. 특히 *Flavobacterium columnare*는 fish에서 lethal columnaris 병과 관련이 있고, *Flavobacterium scophthalmum*은 *Scophthalmus maximus*에서 turbot

*Corresponding author: Kiseong Joh, Tel. 031-330-4271,
Fax. 031-330-4566, E-mail. ksjo@hufs.ac.kr

병과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Mudarris *et al.* 1994; Pilarski *et al.* 2008). 그 외에 여러 *Flavobacterium* 속에 속하는 여러 종이 수계내에서 어류 병원성 미생물로 관심을 받고 있다 (Tirola *et al.* 2002). 또한 *Flavobacterium* 속은 생태학적으로 호수와 강에서 다양한 효소와 2차 대사 산물을 생산해 다른 미생물 등의 성장에 이바지 하는 것으로 알려져 있다 (Pérez-Pascual *et al.* 2003). 이 *Flavobacterium* 속은 강과 호수내에서 가장 기본, 기초가 되는 분류군이지만 기존의 연구는 과단위의 분류군에 대한 군집조사가 이루어져 왔기 때문에 16S rRNA 등을 이용한 유전자 분석법으로 분석한 종과 속단위의 군집을 조사한 최근 자료는 거의 없는 실정이다.

소양호는 국내 최대의 담수호로서 많은 미생물 자원 및 생물 자원이 존재한다. 환경에 유입된 질소, 인산이 성층현상으로 인해 소양호내에서 서서히 순환되는 현상에 대한 연구가 많이 진행되어 왔으며 이러한 소양호의 미생물 군집에 대한 연구는 항상 기본적으로 이루어져 왔다.

본 연구는 우리나라 최대의 담수호인 소양호에서 4월과 6월에 시료채취를 하여 미생물을 분리하였다. 분리한 균주 중에서 특이하게 많이 발견되었던 *Flavobacterium* 을 대상으로 동정하였으며, 이 동정의 결과, 기존 논문에 보고되지 않았던 *Flavobacterium* 속의 균주를 선별하였다. 그리고 선별한 *Flavobacterium* 속의 균주들을 대상으로 생리적 특징과 세포내 지질을 조사하여 소양호 내에서의 생태학적 중요성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 채취

시료 채취 장소는 강원도 인제군의 소양호 상류에서 2지점을 선택하여 실시하였다 (Fig. 1). 온도, 전기전도도, pH는 시료 채취 후 즉시 측정하였다. 소양호에 존재하는 양이온과 음이온은 이온측정 장치를 이용하여 측정하였다. 또, 채취한 시료는 냉장보관 상태로 이동하여, nutrient agar (NA: beef extract 3 g, peptone 5 g, NaCl 7 g, agar 15 g L⁻¹)와 R2A agar (Difco)를 이용하여 10⁰부터 10⁶까지 희석한 시료를 도말하고, 20°C에서 배양하여 순수 분리하였다.

2. 선별된 균주의 16S rRNA 염기서열 분석

각 배지에서 노란색 colony를 형성한 균주를 대상으로 colony direct PCR을 실시하였다. 순수 분리된 단일



Fig. 1. Sampling sites of Lake Soyang.

colony를 Lysis Buffer (Tris-Cl pH 8.0 20%) 50 µL에 넣고 끓인 시료를 template DNA로 사용하였다. 추출된 DNA를 template로 하여 16S rRNA 증폭을 위한 PCR을 수행하였다. PCR반응은 추출한 DNA template에 TaKaRa Ex TaqTM (5 unit µL⁻¹), 10× Ex TaqTM buffer, MgCl₂ (25 mM), dNTP mixture (2.5 mM each) 그리고 27F (5'-AGR GTT YGA TYM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primer를 첨가하여 총량을 50 µL가 되게 하였다. DNA의 증폭을 위해서 denaturation은 94°C, annealing은 58°C, elongation은 72°C에서 30 cycle을 수행하였다. 증폭된 DNA는 solgent사에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다. 각 균주의 염기서열은 EzTaxon server 2.1 (<http://www.eztaxon.org>)에 따라 종명을 동정하였다. 동정된 균주들 중에서 *Flavobacterium*으로 분리된 colony를 선택하였다. 분리된 균주의 계통관계를 파악하기 위하여, EzTaxon server database (Chun *et al.* 2007)와 GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 database로부터 확인된 염기서열을 MEGA program (Tamura *et al.* 2007)을 이용하여 neighbour-joining method (Saitou and Nei 1987)를 사용하여 계통도를 작성하였다.

3. 형태 및 생화학적 특성

분리된 균주의 형태학적 특징을 알아보기 위하여 Gram staining과 oxidase와 catalase test를 실시하였다. 또, 분리된 균의 최적 성장 환경을 검토하기 위하여 온도, pH, 염분의 조건을 조절한 R2A broth에 균주 배양액을 1% (v/v)가 되도록 접종하여 균주의 생육 정도를 조사하였다. 균주 배양액은 균주를 각각 R2A broth에 접종하여 20°C에

서 2일간 배양한 후 실험에 사용하였다. R2A broth에 균주 배양액을 1%씩 접종한 후 배양온도를 4, 10, 15, 20, 25, 30, 37, 42°C로 각각 달리하여 배양하면서 24시간 간격으로 10일간 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 생장을 확인하였다. R2A broth에 NaOH 및 HCl을 이용하여 각각 pH 5, 6, 7, 8, 9로 조절한 후 균주 배양액 1%를 접종하여 20°C에서 10일간 생장을 확인하였다. R2A broth에 NaCl 농도를 0, 0.5, 1, 1.5%로 조절한 후 균주 배양액 1%를 접종하여 20°C에서 배양하며 생장을 확인하였다. 균주들의 생화학적 생리 상태를 알아보기 위하여 API 20NE kit (bioMérieux, France)를 사용하였다. 제조회사에서 제시한 실험 방법에 따라 균을 현탁하여 API 20NE strip (bioMérieux, France)에 접종한 다음 20°C에서 배양하면서 24시간, 48시간 후 미생물 증식에 의한 색의 변화 여부를 관찰하였다.

4. 균체 지방산 조성 분석

분리된 *Flavobacterium*의 지방 조성을 알아보기 위하여 지방산 추출을 하였다. 지방산 추출은 R2A 배지에서 20°C, 48시간 배양한 *Flavobacterium*을 tube에 모은 다음 1 mL의 reagent 1 (NaOH 45 g, methyl alcohol 150 mL, DW 150 mL)을 첨가하여 10초간 혼합한 후 100°C에서 5분간 끓여 주었다. 다시 10초간 혼합한 뒤 100°C에서 25분간 끓이고 1분간 식혔다. 이 tube에 2 mL의 reagent 2 (6N HCl 325 mL, methyl alcohol 275 mL)를 첨가하여 10초간 혼합한 후 80°C에서 10분간 끓인 뒤 1분간 냉각한다. Reagent 3 (Hexane 150 mL, Methyl tert-Butyl Ether 150 mL)를 1.25 mL 첨가한 후 10분간 혼합한 뒤, pasteur pipette으로 tube 바닥에 가라앉은 용액을 제거하였다. Reagent 4 (NaOH 10.8 g, DW 900 mL)를 3 mL 넣고 5분간 혼합한 다음 분리된 상층을 pasteur pipette을 이용하여 GC vial에 담았다. 분리한 지방산 분석은 GC (model 7890: Hewlett Packard)를 이용하였으며, 분석용 칼럼은 25 m × 0.2 mm phenyl methyl silicone fused silica Capillary column을 사용했고 분석온도는 Injection part: 250°C, Oven part: 170~270°C 그리고 Detection part: 300°C로 분석을 진행하였다. Sherlock software를 이용하여 GC에서 분석된 chromatogram과 data를 분석하여 이를 library와 대조하여 지방산을 명명하였다.

결과 및 고찰

소양호는 인공호로서 체류시간이 길고, 깊어마다 다양한 물 환경을 지니고 있으며, 겨울철의 수온 약층의 파

Table 1. Environmental condition of sampling station in Lake Soyang

		April	June
Temperature (°C)		9.70	22.80
pH		7.30	8.00
Anion (ppm)	F	0.18	0.23
	Cl	24.18	18.24
	NO ₂	<0.1	<0.1
	Br	<0.1	<0.1
	NO ₃	6.05	7.56
	PO ₄	1.58	1.24
Cation (ppm)	SO ₄	12.10	21.13
	Na	14.02	23.19
	NH ₄	0.34	<0.1
	K	3.53	4.22
	Ca	9.48	11.66
	Mg	2.79	2.46

괴로 수계환경의 대류 현상이 일어나고 있다(Choi *et al.* 1993). 이러한 이유로 여러가지 생물상의 변화가 다양하게 존재한다. 소양호는 다양한 민물 생태환경을 갖는 우리나라의 대표적인 담수호로서 그 동안 수많은 미생물의 분포에 대한 연구가 진행되어 왔다(이 등 1988; Ahn *et al.* 1989; Kim *et al.* 1989; Kim *et al.* 1994; Choi *et al.* 2001). 대부분의 *Flavobacterium*은 육지내의 호수 또는 강에 널리 분포하여 자라는 대표적인 미생물로 알려져 왔다. *Flavobacterium*은 환경내에서 영양분의 재순환과 분해에 관여하며, 고영양 상태의 환경이 아니라 저영양 상태의 환경에서 매우 중요한 위치를 차지하는 것으로 보고되고 있다. 또, 최근 일부의 *Flavobacterium*에서 어류에 병원성이 존재하는 것으로 보고되어, 환경 내에서의 존재와 병원성과의 관계를 연구하는 것이 시급하다(Mudarris *et al.* 1994; Pilarski *et al.* 2008). 따라서 소양호에 존재하는 *Flavobacterium*의 분포가 매우 중요하여 분리된 *Flavobacterium*의 특징을 살펴보고자 하였다.

소양호 상류지역인 강원도 인제군 인제 군축교와 상류 4 km 지역에서 두 곳을 대상으로 2010년 4월과 6월의 2 차례에 걸쳐 현탁 도말법을 이용해 분리하여 총 300여 종을 분리하였다. 이곳의 물리적 환경은 Table 1과 같다. 4월의 평균 수온은 9.7°C였으며, 6월에는 22.8°C로 많은 차이가 존재하였다. pH도 역시 각각 7.3과 8.0으로 각각 다르게 나타났다. 또, 이온 분석 결과는 질소원과 인산은 다소 낮게 나타났지만, 염소, 칼슘, 나트륨의 농도는 다소 높게 나타났다(Table 1). 시료에서 분리한 균주 중 *Flavobacterium* sp.가 60여 종으로 약 20%로 나타났다(data not shown). 그 중에서 동일한 종류를 제외한 30여 종의 균주가 *Flavobacterium*에 속하는 아변종급의 신종으로 확인이 되었으며, 21종이 서로 다른 97~98%의 16s rRNA의 상동성을 지니고 있는 것으로 분리 확인되었

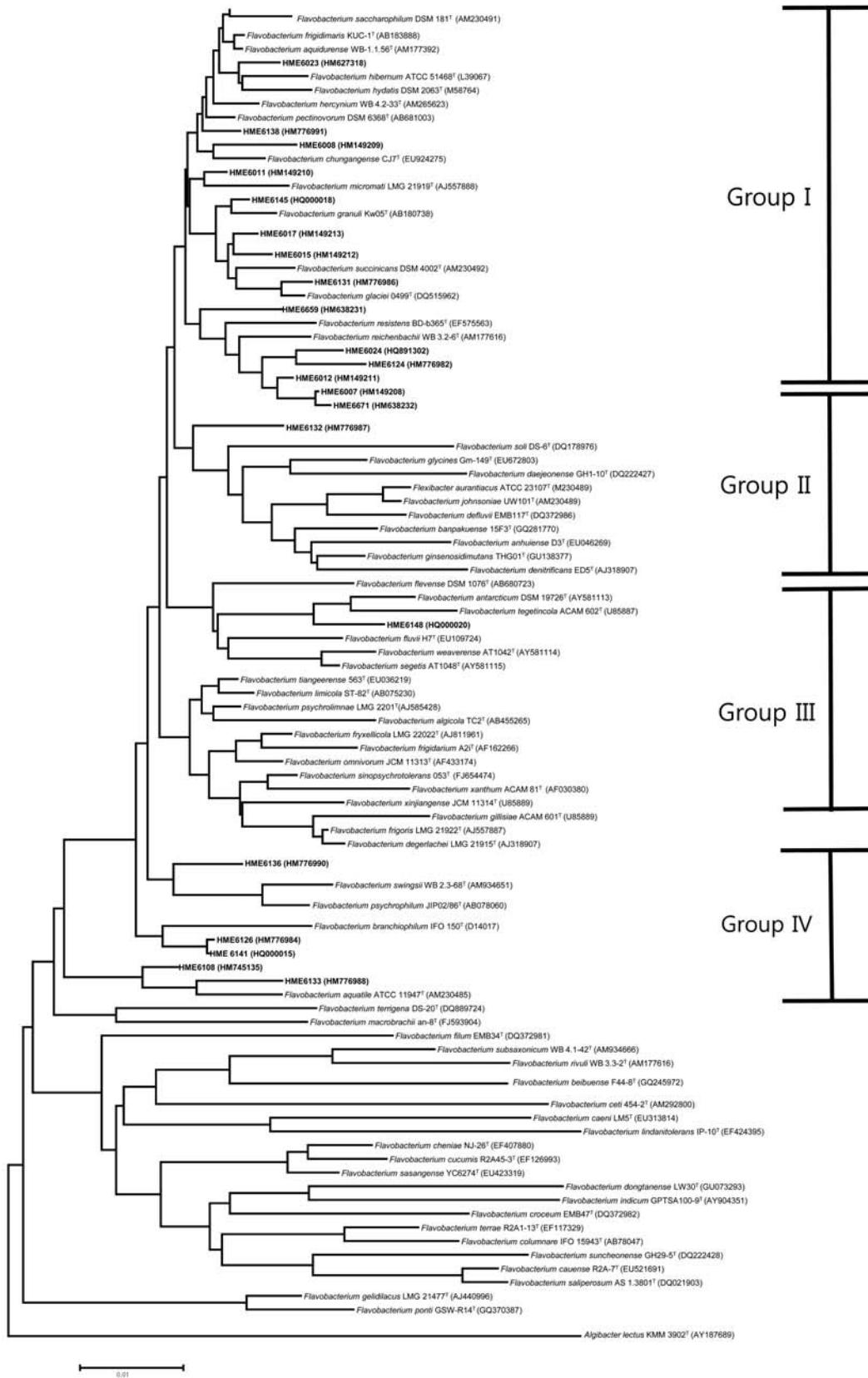


Fig. 2. Neighbour-joining phylogenetic tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences showing the relationships between isolated strains and representative members of the genus *Flavobacterium*. Bar, 0.01 nucleotide substitution per position.

다. 이 중에서 97~98%의 상동성을 지닌 종들은 16S rRNA의 염기를 통하여 새로운 신종의 가능성이 있기 때문에 더욱더 연구가 필요한 종들이다. 이렇게 높은 비율로 분리된 *Flavobacterium*의 신종을 대상으로 그 특성을 조사하였다.

먼저 소양호에서 분리된 아변종급 *Flavobacterium* 균주들의 16S rRNA를 NCBI에 유전자 등록을 하였으며 (Table 2), 그 등록된 염기서열을 바탕으로 neighbour-joining method를 이용하여 유연관계를 살펴보았다. 소양호의 *Flavobacterium*는 크게 4개의 구분되는 node에 위치하고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 그 중에서 가장 많은 *Flavobacterium*이 Group I에 HME6007과 HME6008을 비롯한 14종의 균주가 존재하고 있으며, Group IV에는 HME6136과 HME6126가 포함되는 5종, Group II와 Group III에는 1종씩의 *Flavobacterium*이 존재하였다.

소양호에서 분리된 *Flavobacterium*의 대부분은 하나인 Group I에 가장 많은 종이 포함되어 있다. 이러한 특징은 같은 생태계 내에서 동일한 먹이와 자연환경으로부터 적응된 결과로 유추할 수 있다. 소양호는 매우 다양한 깊이와 위치 등이 존재하지만 상하 대류현상 등에 의해 호수 전체가 섞이는 현상이 발생하여 전체적으로 균일화 되는 환경 적응과 더불어 환경변화가 상층되어 나타나는 현상으로 보여진다. 결국 이번엔 분리된 *Flavobacterium*이 Group I에 대부분이 존재하는 이유도 영양분, 주변 환경 등에 따라 미생물에 미치는 자극에 대한 변이의 정도가 변종 또는 아종으로 미생물의 분화에 영향을 미친다고 추측된다. 유사한 환경의 영향으로 인해 *Flavobacterium*이 하나의 Group에 위치하는 것으로 존재하며, Group I에 소양호에 존재하는 대부분의 *Flavobacterium*이 위치하는 것으로 나타났다. 그 외에 특이하게 7종이 Group II, III, IV의 node에 각각 존재하는 것으로 확인되었다.

이처럼 분리된 균주들을 대상으로 각각의 생리, 화학적 분석을 통해 각각의 *Flavobacterium*의 성질을 알아보았다. 분리된 균주의 형태는 모두 Gram negative, rod shape 이고, yellow colony pigment를 지니며, 중온에서 최대성장을 하는 전형적인 *Flavobacterium*과 유사한 특징을 지니고 있다. 각각의 분리된 균주 중 Group IV의 HME6136, HME6126, HME6108, HME6133, HME6141 균주들의 경우, 염분이 존재하면 성장에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 그러나, HME6126과 HME6141을 제외하고, HME6136, HME6108, HME6133 등은 NaCl이 첨가된 0~0.5%의 범위에서만 성장하는 것으로 나타났다. 각각의 분리된 strain들의 salt range의 차이는 다양하게 존재하는 것으로 나타났다 (Table 2). 특히 HME6108의 경우에

는 최적 salt 농도가 1%로 나타났으며, salt가 없으면 생장이 전혀 이루어지지 않는 것으로 나타났다. 14종의 아변종을 포함하고 있는 Group I의 경우에는 salt가 없는 0%에서도 잘 성장하며, HME6138, HME6141, HME6145, HME6118은 1%의 salt 농도에서 가장 잘 자라는 것으로 확인되었다.

분리된 모든 *Flavobacterium*의 균주는 대부분 중온성 미생물로서 25°C에서 최대 성장을 하는 공통적인 특징을 나타내었다. 하지만, HME6007, HME6008, HME6011, HME6012, HME6015, HME6017, HME6024 등의 균주는 4°C에서도 성장을 하는 것을 확인하였다. 이는 소양호가 계절적으로 수온의 변화가 적고, 특정 계절을 제외한 계절에서 10°C 이하의 평균 온도를 나타내는 환경적 요인과 밀접하다고 추측된다.

또 pH의 경우에 Group I의 pH 범위는 7~9로 넓게 분포하며, Group II는 pH 7에서 최적 성장을 보였으며, Group III은 pH 7~8에서 최적 성장을 보였고, Group IV는 pH 7~8에서 최적 pH를 지닌다. 각 Group 별로 온도와 pH에 대한 특이점은 나타나지 않았으며, 대부분 약 알칼리에서도 최대 성장을 보이는 것이 대부분이었다.

Group IV는 indole production과 nitrate reduction이 negative인 공통의 특징을 보이고, HME6126과 HME6136, HME6141은 esculin hydrolysis와 PNPG, HME6133은 esculin hydrolysis와 gelatinase, PNPG, HME6108은 urease와 gelatinase 반응이 positive reaction을 나타내는 등의 차이가 있었다.

분리된 균주의 Group I은 온도, pH, salt가 매우 다양하게 나타났다. 대부분은 25~30°C가 최적 온도, 0.5% NaCl 농도가 최적 염분 농도이며 pH 7, 8, 9에서 내에서 가장 성장을 잘하는 것으로 확인되었다. 육수 환경에서 식물성플랑크톤의 양이 증가할 경우 pH의 상승으로 인해 중성에서 약 알칼리성을 나타낸다. 이러한 환경으로 인해 분리된 균주들은 pH 7~9까지 성장을 하며, 최적 pH는 각 균주별로 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 분리된 균주들의 최적 온도 역시 시료를 채취한 시기와 밀접한 관계가 있는 것으로 추측된다. 특히 nitrate reduction reaction은 HME6007, HME6008, HME6012, HME6024는 positive reaction을 나타내며, 그 외의 Group I은 negative reaction을 나타내었다. 그리고 esculin hydrolysis는 모든 균주가 positive reaction을 arginin dihydrogen, urease는 negative reaction으로 나타났다.

미생물의 분리 동정에 많이 활용되는 cellular fatty acid composition을 이용하여, 분리된 균주에 대한 세포내의 fatty acid 성분을 분석하여 각각의 fatty acid composition을 알아보았다. *Flavobacterium* sp.는 대부분 iso C_{15:0}와

Table 3. Cellular fatty acid composition (%) of 21 isolated strains. All data were obtained from in this study under the same experimental conditions. Only fatty acids amounting to at least 1.0% of the total cellular fatty acids of at least one of the strains are shown. tr, trace (<1.0%); nd, not detected

Peak name	HME 6007	HME 6008	HME 6011	HME 6012	HME 6015	HME 6017	HME 6023	HME 6024	HME 6124	HME 6126	HME 6131	HME 6132	HME 6133	HME 6136	HME 6138	HME 6141	HME 6145	HME 6148	HME 6108	HME 6659	HME 6671
iso C _{12:0}	1.9	nd	nd	1.6	nd	tr	nd	tr	1.5	5.1	nd	nd	nd	nd	2.4	nd	nd	tr	nd	nd	nd
iso C _{13:0}	4.3	nd	3.4	3.5	tr	2.4	tr	2.0	5.7	2.4	nd	nd	nd	nd	9.5	2.0	2.2	2.3	nd	nd	2.0
anteiso C _{13:0}	1.7	nd	nd	tr	tr	nd	nd	tr	tr	tr	nd	tr	nd	nd	2.3	tr	nd	1.3	nd	tr	tr
C _{13:1} at 12-13	tr	nd	nd	tr	nd	nd	tr	tr	tr	nd	1.5	tr	nd	1.3	nd	tr	nd	nd	nd	nd	tr
C _{13:0}	tr	nd	nd	tr	nd	nd	tr	tr	tr	1.3	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	tr	nd	nd	tr
iso C _{14:0}	3.4	tr	2.9	6.7	6.3	2.5	1.5	2.5	5.5	1.9	nd	5.5	5.0	nd	5.1	tr	2.7	7.2	nd	1.2	4.9
C _{14:0}	1.3	3.1	tr	1.3	tr	1.2	tr	1.9	1.8	2.4	2.0	1.3	tr	1.8	tr	4.4	2.1	tr	tr	1.8	1.2
iso C _{15:1} G	15.3	3.2	10.9	8.2	9.7	13.0	12.2	10.0	16.2	8.4	7.1	12.4	12.3	4.1	13.5	8.2	6.7	16.4	15.2	9.5	11.2
anteiso C _{15:1} A	tr	nd	1.3	tr	tr	tr	tr	nd	nd	tr	tr	1.4	tr	nd	1.6	tr	1.1	1.2	1.4	tr	tr
iso C _{15:0}	18.6	16.1	16.3	19.0	13.9	17.0	25.2	29.1	16.1	15.4	20.4	10.0	19.6	18.5	9.4	21.2	11.3	14.7	13.3	16.2	16.5
anteiso C _{15:0}	2.7	15.0	8.4	5.9	4.7	6.1	6.5	5.4	3.0	10.7	9.8	6.3	4.6	16.5	11.6	9.5	5.7	5.9	nd	8.5	4.7
C _{15:1} ω6c	7.4	1.2	5.5	5.3	13.2	7.6	4.9	6.4	9.0	13.3	6.3	13.1	10.2	1.1	8.0	3.1	5.8	6.4	26.8	3.1	7.7
iso C _{16:1} H	3.3	nd	2.6	3.2	5.3	1.2	nd	tr	2.4	1.1	tr	4.8	4.7	tr	4.5	nd	2.3	5.5	1.5	2.5	3.0
iso C _{16:0}	3.1	1.5	5.9	4.5	9.7	2.3	3.3	2.0	3.2	1.0	1.2	4.0	10.9	1.6	4.5	nd	3.8	11.4	1.9	2.8	5.8
C _{16:1} ω5c	tr	nd	nd	nd	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1.0	1.0	1.1	tr	nd	nd	nd	nd
C _{16:0}	1.3	10.4	2.9	1.2	1.6	3.3	1.3	2.7	2.7	1.5	2.5	1.7	1.2	3.4	3.2	2.8	8.2	1.3	1.1	3.4	2.1
iso C _{15:0} 3OH	3.7	6.0	nd	3.9	3.7	5.3	6.7	2.8	3.7	8.7	5.7	5.0	3.4	4.6	nd	13.8	4.1	4.7	5.9	6.7	2.2
C _{15:0} 2OH	tr	tr	5.0	tr	tr	tr	tr	tr	nd	tr	tr	tr	tr	nd	nd	1.3	tr	nd	3.9	tr	tr
C _{15:0} 3OH	nd	nd	nd	nd	1.4	nd	2.0	nd	nd	nd	1.4	1.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
anteiso C _{17:1} ω9c	nd	nd	2.0	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.5	nd	1.5	1.7	1.8	2.3	nd	1.6	1.1
C _{17:1} ω6c	1.3	nd	2.3	nd	2.7	2.8	4.1	1.9	2.5	nd	2.2	3.8	3.7	tr	tr	tr	2.2	nd	7.9	1.6	2.6
iso C _{16:0} 3OH	4.1	1.7	3.9	5.6	6.4	2.6	2.5	2.6	3.6	1.3	1.6	nd	4.1	1.2	nd	tr	2.1	nd	2.3	1.7	2.7
C _{16:0} 3OH	2.1	5.2	nd	1.7	1.1	1.7	1.5	1.9	1.9	1.2	1.8	nd	tr	3.1	nd	2.3	1.5	2.4	tr	1.5	1.3
C _{18:0}	nd	nd	nd	nd	tr	nd	nd	nd	1.5	nd	nd	tr	nd	nd	nd	nd	5.7	nd	nd	nd	nd
iso C _{17:0} 3OH	3.2	7.7	5.1	5.1	2.6	5.6	6.9	3.8	2.3	1.1	2.4	2.2	2.9	3.6	3.4	1.3	2.7	2.7	4.8	4.2	3.4
C _{17:0} 2OH	nd	1.4	tr	tr	nd	tr	tr	tr	nd	nd	nd	nd	tr	nd	nd	nd	tr	nd	tr	tr	nd
C _{17:0} 3OH	nd	nd	tr	tr	nd	tr	tr	tr	tr	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.2	nd	nd
summed feature 2*	nd	2.0	nd	nd	nd	tr	nd	nd	nd	nd	tr	nd	nd	tr	nd	1.6	nd	nd	nd	nd	nd
3	17.2	22.7	13.3	16.4	11.7	14.3	9.6	19.2	10.7	tr	27.9	20.1	6.5	33.7	16.9	20.4	17.1	6.5	4.7	26.3	20.5
5	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	nd	tr	15.3	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.4	nd	nd	nd
9	1.1	1.5	3.6	1.3	1.7	2.8	4.8	1.9	tr	1.1	2.2	2.5	5.6	2.4	nd	tr	2.8	3.8	3.9	4.1	nd

* Summed features represent groups of two or three fatty acids that could not be separated using the MIDI system. Summed Feature 2 comprised C_{14:0} 3OH and/or iso-C_{16:1} L, summed feature 3 comprised C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c, summed feature 5 comprised C_{18:0} ante and/or C_{18:2} ω6,9c, summed Feature 8 comprised C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c and summed feature 9 comprised C_{16:0} 10-methyl and/or C_{17:1} iso ω9c.

summed feature 3 등이 주된 fatty acid의 성분으로 이루어져 있다. 이번 소양호에서 분리된 아변종의 *Flavobacterium* sp.도 역시 주된 성분인 iso C_{15:0}와 iso C_{17:0} 3OH 이외에도 매우 다양한 형태의 fatty acid를 구성성분으로 가지고 있는 것으로 나타났다. Group I에 속하는 *Flavobacterium*의 주요 fatty acid는 iso C_{15:1} G, iso C_{15:0}, summed feature 3 등으로 구성되어 있는 것으로 나타났다. Group I의 14종 모두 minor fatty acid의 composition은 약간의 차이가 존재한다(Table 3). 그리고 5종의 균주가 포함된 Group IV는 anteiso C_{15:0}, iso C_{15:0} 3OH의 비율이 높게 존재하는 것으로 나타났다. 따라서 소양호에서 분리된 균주는 각기 다른 *Flavobacterium*으로 판단할 수 있어 매우 다양한 종이 존재함을 재확인 할 수 있었다.

이와 같이 소양호에서 분리한 아변종 21종을 대상으로 생리 화학적 분석을 수행하였다. 각각의 *Flavobacterium* strain은 서로 다른 유전적 유연관계를 지니며, 이 같은 유연관계와 생리적 특성이 밀접한 연관 관계가 있는 것으로 나타났다. 이들 분리된 균주의 경우 환경에 따라 밀접하여, 소양호내의 많은 미생물 중 *Flavobacterium* sp.가 매우 다양하게 존재하여 보고되지 않은 많은 여러 미기록 신종이 존재하는 것으로 확인되었다. 하지만 호수 내에 존재하는 *Flavobacterium* sp.에 대한 국내 연구는 거의 연구된 바가 없다. 또, 소양호에서 보고되지 않은 고유종의 *Flavobacterium* sp.가 많이 존재한다는 점으로부터 생태학적으로 이들 밝혀지지 않은 *Flavobacterium* sp.들과 생물과의 관계 및 환경에 미치는 영향을 다각적으로 살펴볼 이유가 존재한다.

적 요

우리나라 최대 담수호인 소양호에 존재하는 미생물 중 *Flavobacterium*을 분리하여 그 특징을 조사하였다. 그 중에서 97%와 98% 사이의 상동성을 지니는 *Flavobacterium*을 대상으로 21종을 선택하였으며, 그 균주들의 생리학적, 생태학적 위치를 살펴보았다. 그 결과, 소양호에 존재하는 21종의 분리된 *Flavobacterium*은 4개의 주된 node에 위치하였으며, 그 중에서 대부분이 하나의 group에 속하여 있었다. 각 *Flavobacterium* 21종의 생리적인 특징은 기존의 보고된 *Flavobacterium*들과는 서로 다른 특징을 지니지만, total fatty acid의 분석결과 iso C_{15:0}과 summed feature 3 (comprised C_{16:1} ω7c and/or C_{16:1} ω6c)가 주요 성분으로 전형적인 *Flavobacterium*의 특징을 지닌 것으로 나타났다. 따라서 소양호내에는 유전적 유연관계가 있는 아변종의 *Flavobacterium*이 존재하며, 기존에 알려진 종들

과는 다른 형질을 가지고 있는 것으로 보아 소양호 생태계의 생물 중 다양성이 유지되고 있는 것으로 판단된다.

사 사

이 연구는 환경부 산하 국립생물자원관의 자생생물발굴사업 연구비로 진행되었습니다.

참 고 문 헌

이은주, 김범철, 조규송. 1988. 소양호 지류에서의 (상갈리) 식물플랑크톤 군집구조 (1984~1997). 한국육수학회지. 31: 119-128.

Ahn TS, BC Kim and KS Cho. 1989. Factor analysis of the environmental impact on microbial populations in Soyang Lake. Kor. J. Lim. 19:11-17.

Bernardet JF and JP Bowman. 2006. The Genus *Flavobacterium*. pp.481-531. In The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria, 3rd edn, vol. 7. (Dworkin M, S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer and E Stackebrandt eds.). Springer. New York.

Bernardet JF, Y Nakagawa, B Holmes and Subcommittee on the taxonomy of *Flavobacterium* and *Cytophaga*-like bacteria of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. 2002. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1049-1070.

Choi SI, HW Park and TS Ahn. 1993. The Cellulose degradation and distribution of attached bacteria on cellulose film in lake Soyang. Kor. Jour. Microbiol. 31:355-464.

Choi YK, BC Kim, MS Jun, WM Heo and HS Kim. 2001. Abundance of autotrophic picoplankton and their contribution to phytoplankton biomass in Korean lakes. Kor. J. Limnol. 34: 141-152.

Chun J, JH Lee, Y Jung, M Kim, S Kim, BK Kim and YW Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:2259-2261.

Fu Y, X Tang, Q Lai, C Zhang, H Zhong, W Li, Y Liu, L Chen, F Sun and Z Shao. 2011. *Flavobacterium beibuense* sp. nov., isolated from marine sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:205-209.

Kim MW, C Kang and SJ Kim. 1989. Distribution of bacterial biomass in the water column of Soyang Lake. Kor. Jour. Microbiol. 27:130-138.

Kim SJ, TS Ahn, TY Ahn, KS Joh, NT Kwag, DH Lee and HW

- Park. 1994. Diurnal variation for the bacterial activities affected by the phytoplankton changes in a branch of lake Soyang. *Kor. Jour. Microbiol.* 32:580-585.
- Miyashita M, S Fujimura, Y Nakagawa, M Nishizawa, N Tomizuka, T Nakagawa and J Nakagawa. 2010. *Flavobacterium algicola* sp. nov., isolated from marine algae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:344-348.
- Mudarris M, B Austin, P Segers, M Vancanneyt, B Hoste and JF Bernardet. 1994. *Flavobacterium scophthalmum* sp. nov., a pathogen of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:447-453.
- Pérez-Pascual D, A Menéndez, L Fernández, J Mendéz, P Reimundo, R Navais and J Guijarro. 2009. Spreading versus biomass production by colonies of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*: role of nutrient concentration. *Int. Microbiol.* 12:207-214.
- Pilarski F, AJ Rossini and PS Ceccarelli. 2008. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet *et al.* 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Braz. J. Biol.* 68:409-414.
- Saitou N and M Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Tamura K, J Dudley, M Nei and S Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
- Tirola M, ET Valtonen, P Rintamaki-Kinnunen and MS Kulo-maa. 2002. Diagnosis of flavobacteriosis by direct amplification of rRNA genes. *Dis. Aquat. Organ.* 51:93-100.
- Xu M, Y Xin, J Tian, K Dong, Y Yu, J Zhang, H Liu and Y Zhou. 2011. *Flavobacterium sinopsychrotolerans* sp. nov., isolated from a glacier. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61:20-24.
- Yoon JH, S Park, SJ Kang, SJ Oh, SC Myung and W Kim. 2011. *Flavobacterium ponti* sp. nov., isolated from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61:81-85.

Received: 9 July 2012

Revised: 22 August 2012

Revision accepted: 23 August 2012