

## 호수 생태계에서 세균 생산량 측정 방법의 비교

김명운 · 강찬수 · 김상중  
서울대학교 자연과학대학 미생물학과

### Comparison of Methods for the Measurement of Bacterial Production in a Lake Ecosystem

Kim, Myeong Woon, Chansu Kang and Sang-Jong Kim

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University.  
Seoul 151-742, Korea

**ABSTRACT:** The bacterial secondary production was measured at 6 sites of Lake Soyang in October, 1989 by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation rate. Verification for the method of bacterial secondary production measurement showed that  $^3\text{H}$ -thymidine incorporated into DNA, RNA and protein by average percentage of 38.45, 42.27 and 20.07%, respectively. The more increased incorporated  $^3\text{H}$ -thymidine, the more increase DNA fraction, but protein fraction was generally low. Incorporation of rate of  $^3\text{H}$ -thymidine.  $^3\text{H}$ -leucine into protein correlated with protein fraction of incorporated  $^3\text{H}$ -thymidine. Conversion factors were calculated as follows;  $1.83 \times 10^{20}$  cells/moles of thymidine incorporated/hr and  $1.69 \times 10^{22}$  cells/moles of leucine incorporated/hr.

**KEY WORDS** □ Bacterial production,  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation rate,  $^3\text{H}$ -leucine, Lake Soyang

호수 생태계에서 일차 생산자인 식물성 플랑크톤은 광합성으로 생산한 유기물의 많은 양을 수층으로 방출하게 된다. 이 경우 동물성 플랑크톤에 의해 직접적으로 이용될 수 없기 때문에 전통적인 먹이사슬로부터 상실되게 된다. 세균은 용존 유기물을 이용하여 생물량을 생산하는 이차 생산을 수행하고 이것이 동물성 플랑크톤의 먹이로 작용한다. 종속영양 세균집에 의해 이루어지는 이러한 미생물 순환고리(microbial loop)는 식물성 플랑크톤이 상실한 유기물을 전통적인 먹이사슬로 다시 편입시킨다는 면에서 중요한 의의를 가진다(Azam *et al.*, 1983).

수계 생태계에서 세균에 의한 이차생산은 다양한 변화를 거치면서 발달되어 왔는데, 가장 보편적이고 신뢰성을 가지는 방법으로서 DNA에 대한 tritiated thymidine의 incorporation rate로서 측정하는 방법을 들 수 있으며, 최근에는 tritium으로 label된 leucine을 사용하여 protein에 대한 incorporation rate로서 측정하는 방법이 도입되고 있다.

$^3\text{H}$ -thymidine 방법이 도입된 이래 많은 연구자들이 채택하여 사용되고 있으나, 문제점들 역시 발견되고

있어서 Fuhrman과 Azam(1982)이 최초로 제기한 가정들을 재검토하고, 올바른 방법론을 얻기 위한 시도들이 꾸준히 진행되어 왔다(Moriarty, 1984; Witzel and Graf, 1984; Riemann, 1984; Bell, 1984; Servais *et al.*, 1987; Chin-Leo and Kirchman, 1988; Kirchman and Koch, 1988). 세균의 이차생산을 정확히 측정하기 위해서 고려되어야 할 점으로는 다음과 같은 것을 들 수 있다. 1) 수중에 소량으로 용해되고 존재하는 thymidine을 세균만이 특이적으로 이용하는가? 2) 대상 생태계내의 전체 세균군집 등 thymidine을 이용할 수 있는 세균의 비율은 얼마나 되는가? 3) 방사능 동위원소에 의해 label된 thymidine이 생태계내에서 non-radioactive thymidine에 의해 희석되어지는 specific activity의 비율은 얼마나 되는가? 4)  $^3\text{H}$ -thymidine이 실제로 DNA 이외의 다른 세포 구성성분에 incorporation되는 정도는 얼마인가?

이러한 사항들은 대상 생태계마다 그 값들이 서로 다르며, 그 정확한 검증이 선행되어야 하나 국내의 경우 그 자료가 전무하다. 본 연구에서는 한국의 대

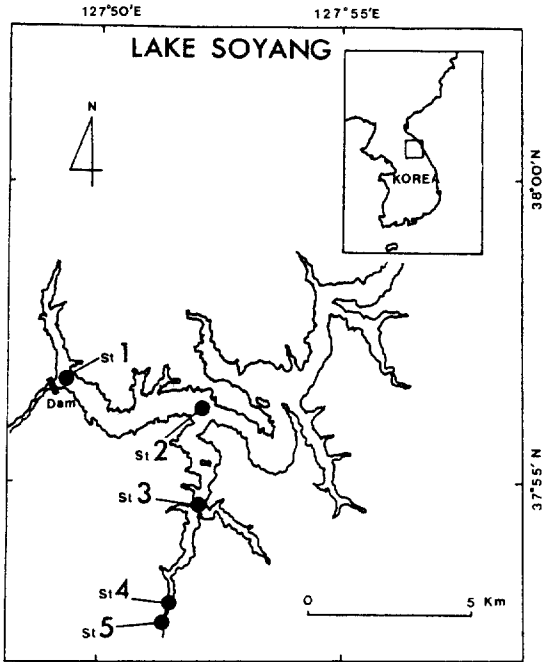


Fig. 1. Map of reaserch area and sampling sites. Red tide occured at St. 4.

표적인 호수 생태계인 소양호에서 세균군집이 물질과 에너지순환에서 차지하는 역할을 알기 위해 적용하는 세균 이차생산 측정의 올바른 방법론의 확립을 위해 실시하였다.

재료 및 방법

<sup>3</sup>H-thymidine을 이용한 세균의 2차 생산량 측정에 대하여, DNA 이외의 부분에 incorporation되는 비율을 정량적으로 알아보기 위하여 화학적인 방법을 사용하였다(Moriaty, 1984 ; Bell, 1984 ; Chin-Leo and Kirchman, 1988).

사전 실험조건의 결정

실험실에서의 사전실험을 통하여 acid와 base의 농도, extraction 시간, 배양시간의 적정조건을 결정하였다. 측정된 각 조건들은 분산분석과 기타 통계적 방법들을 사용하여 비교하였으며, 그 결과 결정된 표준사항들을 시료의 처리에 사용하였다. 항생제인 nalidixic acid의 처리조건과 <sup>3</sup>H-leucine의 농도조건도 함께 결정하였다.

대상지역 및 시료처리

식물성 클랑크톤에 의한 적조가 발생한 시기인 1989년 10월 6일에 적조수역인 상걸리 지역과 오염원의 존재가 예상되는 가두리 양어장 지역을 대상으로

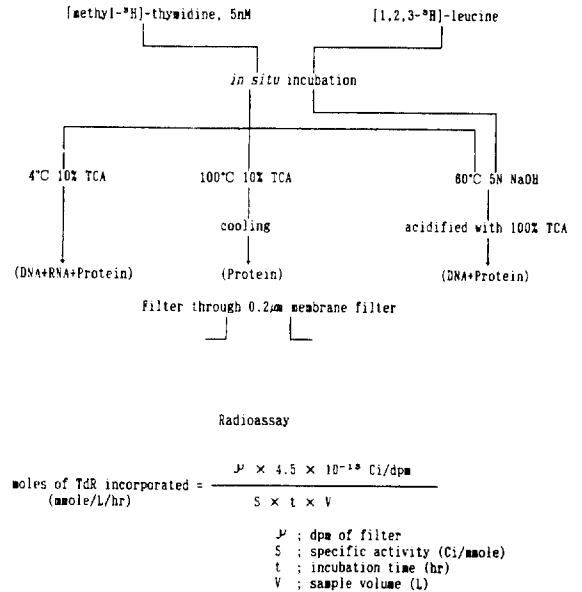


Fig. 2. Flow-chart for the macromolecular fractionation of each cellular components.

시료를 채수하였다(Fig. 1).

정점은 양어장 앞의 2m(정점 3S)와 30m 저층(정점 3B), 상걸리 지역의 표층수(정점 4S)와 2m 깊이의 시료(정점 4B)를 채수하였으며, 두 정점(정점 3과 정점 4)의 중간이 되는 지점의 2m(정점 4'S) 및 30m(정점 4'B)와 control로서 댐 앞 2m(정점 1S) 깊이의 시료를 채수하였다.

채수된 시료는 4°C 상태에서 곧바로 실험실로 운반하여 분석하였다. 시료에 대한 물리화학적 요인은 standard method(APHA, 1985)에 따라 영양염류와 염록소의 양을 spectrophotometer(Shimadzu, UV-160)를 사용하여 측정하였다. 총 세균수의 측정은 acridine orange로 염색하여 형광현미경 하에서 계수하였다(Watson *et al.*, 1977 ; Austin, 1988).

세균 이차생산의 측정

세균의 이차생산을 측정하기 위하여 20 μm의 sieve로 사전 여과한 시료에 [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine(NEN, specific activity 82.2 Ci/mole), 또는 [3,4,5-<sup>3</sup>H]-leucine(NEN, specific activity 153 Ci/mole)이 각각 최종농도가 5 nM과 1 nM이 되도록 첨가한 후, 현장 온도에서 1시간동안 배양하였다. 다른 조(set)의 시료에는 nalidixic acid(Sigma)를 5 μg/ml의 농도로 넣어주어 그 효과를 비교하였다. 배양이 끝난 시료는 다음의 방법으로 처리하였다(Fig. 2).

Ice-cold TCA의 처리

4°C로 냉각된 10% TCA 용액 20 ml를 첨가한 후, 30분간 macromolecule을 추출하였다. 침강된 macro-

molecule을 0.2  $\mu$ m의 membrane filter( $\phi$  25 mm)로 여과하였다.

#### Hot TCA의 처리

10% TCA 20 ml/을 첨가하고 100°C에서 1시간동안 가열하여 nucleic acid가 분해되도록 한 후, 냉각시켜 침강된 물질을 여과하였다.

#### Base의 처리

2N NaOH를 20 ml/를 첨가하고 60°C에서 1시간동안 반응시켜 RNA가 분해되도록 하였으며, 반응이 끝난 뒤 100% TCA 10 ml/을 첨가하여 acidification시킨 후 냉각하여 침강된 물질을 여과하였다.

#### 각 macromolecule로 incorporation된 부분의 계산

여과한 filter를 ethyl acetate(Fluka) 1 ml/로 녹인 후 scintillation cocktail 5 ml/을 첨가 방사능을 측정하였다. Cold TCA에 insoluble한 물질은 DNA, RNA 및 protein으로 이루어져 있으며, Hot TCA 부분은 protein으로, base 처리부분은 DNA와 protein으로 이루어진 것으로 가정하여 DNA, RNA 및 protein 각각의 fraction의 방사능을 계산하였다(Fuhrman and Azam, 1982; Bell, 1984; Rieman, 1984).

#### <sup>3</sup>H-leucine 시료의 처리

<sup>3</sup>H-leucine을 사용한 시료는 <sup>3</sup>H-leucine이 전량 protein으로 incorporation된 것으로 가정하여, Hot TCA 처리와 같은 방법으로 처리하였다(Chin-Leo and Kirchman, 1988; McDonought *et al.*, 1986).

#### Nalidixic acid 처리 효과의 비교분석

Nalidixic acid를 첨가한 시료를 동일한 방법으로 처리한 후 그 결과를 비교하였다. 통계적 분석을 위하여 각 처리방법과 항생제 효과 및 그 상호작용을 대상으로 분산분석을 수행하였으며, Duncan에 의한 다중요인분석을 수행하였다(허, 1988). 통계처리용 package인 SAS(Statistical Analysis System)를 사용하여 분석하였으며, IBM-PC/AT computer를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

세균 생산량 측정에 사용되는 [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine은 세포내의 핵산대사 과정동안에 전량 DNA로 incorporation되는 것으로 생각되어 왔다. 그러나 thymidine의 demethylation 및 이에 간여하는 tetrahydrofolate 등의 cofactor, 효소 및 세포내의 다양한 대사과정의 변이성은 methyl group의 radioactivity가 DNA이외의 다른 세포 구성성분들에서 나타나 초기 가정의 타당성에 대한 재검토가 필요하게 되었다(Moriarty, 1986).

이러한 이유로부터 출발하여 소양호 세균군집의 활성에 따른, 세포내 각 부분에 incorporation되는 변이의 정도를 정량적으로 검정하기 위한 실험을 행하였고, 화학적 방법을 사용하여 각 부분으로 incorporation되는 양을 조사하였다.

세포내 각 구성성분으로의 incorporation되는 비율 화학적인 방법에 의해서 분리된 세포내의 DNA, RNA 및 protein에 대한 <sup>3</sup>H-thymidine의 incorporation 정도와 그 전체 값들은 Table 1에 나타난 바와 같다. 전체적으로 incorporation된 양은 표층이 저층보다 높았으며, 적조발생 지역인 정점 4의 경우는 깊이에 따른 차이를 보이지 않았다. 정점별로는 적조가 발생한 지역과 오염원이 존재하는 양어장 정점에서 높은 값을 보였다.

한편, 각 부분으로 incorporation된 비율을 백분율로 알아본 결과(Table 1), DNA 부분은 평균 38.45% (16.13-70.96%; Standard deviation 18.75)를 차지하였으며, RNA부분은 42.27%(7.11-67.68%; S.D. 15.90)로서, DNA로 incorporation되는 비율이 Rieman(1984)이 보고한 62-87%와 Bell(1984)이 보고한 최고 80%와 비교할 때, 소양호에서 측정된 값은 DNA 부분으로의 incorporation이 적은 편이다. 그러나, incorporation되는 양의 절대값이 증가할수록 DNA로 incorporation되는 비율도 증가하는 경향을 보여, 세균

Table 1. The rate of thymidine incorporation into each cell constituent and its ratio to the total incorporation.

Site	Incorporation rate (p mole/L/hr)				Ratio(%)		
	DNA	RNA	Protein	Total	DNA	RNA	Protein
1S	6.72	8.96	1.28	16.96	39.62	52.83	7.55
3S	32.04	39.04	7.04	78.97	40.57	50.51	8.92
3B	1.99	3.58	0.66	6.23	31.94	57.46	10.59
4'S	13.12	33.97	2.97	50.06	26.21	67.86	5.93
4'B	5.10	11.78	1.60	18.48	27.60	63.74	8.66
4S	58.75	36.07	5.54	100.36	58.54	35.94	5.52
4B	62.72	28.12	8.08	98.92	63.40	28.43	8.17

**Table 2.** Incorporation of thymidine and leucine into protein fraction with and without addition of nalidixic acid (NA, 5 µg/ml concentration).

Site	Incorporation rate (p mole/L/hr)			
	Thymidine incorporation		Leucine incorporation	
	Without NA	With NA	Without NA	With NA
1S	1.28	1.25	0.33	0.50
3S	7.04	6.68	22.33	13.06
3B	0.66	0.47	0.91	0.88
4'S	2.97	2.54	5.38	4.73
4'B	1.60	1.03	8.27	9.20
4S	5.54	5.22	7.18	5.89
4B	8.08	6.36	1.96	2.21

**Table 3.** Effects of nalidixic acid on the incorporation of <sup>3</sup>H-leucine. Decrease in incorporation rate was expressed as percent ratio. Negative values mean the increase in incorporation rate.

Site	Percent decrease of thymidine incorporation			Percent decrease of leucine incorporation in protein fraction
	DNA	RNA	Protein	
3S	26.18	45.14	5.06	41.55
3B	23.33	49.61	28.40	2.47
4'S	-63.60	53.32	14.51	12.21
4'B	37.24	23.99	35.70	-11.32
4S	-1.22	5.35	5.73	18.05
4B	-2.88	-11.07	21.24	-27.44

생산량이 적을수록 RNA로 incorporation되는 비율이 커지는 것으로 보인다. 또한, protein으로 incorporation되는 양은 일정하게 낮은 값을 보여 평균 20.7%였다(5.52-55.18% ; S.D. 16.77).

**<sup>3</sup>H-leucine이 protein으로 incorporation되는 양**

<sup>3</sup>H-thymidine에 의한 protein 내부로의 incorporation 정도가 일정한 비율을 보이므로, <sup>3</sup>H-leucine을 사용하여 세균의 생산량을 측정하므로써 보완할 수 있다(Chin-Leo and Kirchman, 1988 ; Kirchman and Koch, 1988). <sup>3</sup>H-leucine을 사용하여 incorporation rate를 측정하고, 이를 <sup>3</sup>H-thymidine을 이용하여 측정한 protein 부분으로의 incorporation되는 정도와 비교해 본 결과는 Table 2와 같다. <sup>3</sup>H-leucine의 정점별 변화양상은 <sup>3</sup>H-thymidine의 base 처리결과와 일치한다(Spearman correlation coefficient r=0.9874 ; p<0.01). 이러한 결과는 세균 생산량의 측정에 있어서, DNA와 RNA의 생성속도를 동시에 측정할 수 있다는 점에서 Karl과 Winn(1984)이 사용을 주장했던 <sup>3</sup>H-adenine 방법으로 보완한다면, 각각의 생태계가 가지는 생산량을 보다 정확하게 측정할 수 있을 것으로 사료된다.

**Nalidixic acid의 영향에 대한 통계학적 분석**

DNA 합성을 방해하는 항생제인 nalidixic acid가 <sup>3</sup>H-thymidine incorporation에 미치는 영향을 알아 본 결과(Table 3), 항생제 사용으로 인한 DNA 부분으로의 incorporation 감소현상은 관찰되지 않았다. 분산분석을 행한 결과는 Table 4에 나타나 있다. 분산분석의 결과, 화학적 방법에 의한 각각의 처리 방법은 99% 유의수준에서 차이가 있는 것으로 나타났으며, 항생제의 처리효과는 차이가 없는 것으로 나타났다. Duncan에 따른 다중비교도 동일한 결과를 나타내었다.

Nalidixic acid가 효과를 나타내지 못한 것은 일차적으로 5 µg/ml의 낮은 농도와 particle 등에 의한

**Table 4.** Analysis of variance of each treatment

	DF	SSR	F value	Pr.	F
Model	7	1.82 × 10 <sup>11</sup>	4.35	0.0003	
Treatment	3	1.80 × 10 <sup>11</sup>	10.05	0.0001	
Nalidixic acid	1	8.79 × 10 <sup>8</sup>	0.15	0.7022	
Interaction	3	1.04 × 10 <sup>9</sup>	0.06	0.9815	
Error	104	6.21 × 10 <sup>11</sup>			
Corrected	111	8.04 × 10 <sup>11</sup>			

R<sup>2</sup>=0.2267 Coeff. of variation = 158.608

\*Under the 99% signification level, each treatment was stastically different. But nalidixic acid treatment and its interaction with each treatment were not different each other.

흡착 등으로 그 효과가 감소한 결과로 사료되며, 빠른 저항능력의 획득(Singleton and Sainsbury, 1978) 등의 요인도 관련되어 있는 것으로 보인다.

**Conversion factor에 대한 고려**

생태계내의 세균 이차 생산량의 측정에는 incorporation된 thymidine이나 leucine의 mole수로부터 새로 세균의 이차생산에 의해 생성된 세균 개체수로 환산하는 conversion factor에 대한 정보가 필요하며, 이 값은 생태계마다, 세균군집의 생리적 활성도에 따라 차이를 보인다(Bell, 1984 ; Convey and Watzel, 1988).

소양호에서의 conversion factor 결정에는 isotope dilution이나(Riemann, 1984 ; Bell, 1986 ; Chrzanowski, 1988), autoradiography(Fuhrman and Azam, 1982 ; Douglas *et al.*, 1987) 등의 보완적인 실험들과 direct count를 통한 세균수의 변화 등의 사항이 필

요하지만, 세포내의 fractionation 정도에 대한 위의 자료와 1년간의 세균수 측정의 자료들로부터 제한적인 의미의 conversion factor를 산출하였다.

$^3\text{H}$ -thymidine이 DNA로 incorporation된 비율의 평균값인 38.45%로부터 산출한 값은  $1.83 \times 10^{20}$  cells/moles of thymidine incorporated/hr로 나타났으며,  $^3\text{H}$ -leucine의 경우는  $1.69 \times 10^{22}$  cells/moles of leucine incorporated/hr로 계산되었다. 이 값은 직접 비교하기는 어려우나, 소양호에서의 시간당 cell의 생성비율은 다른 곳에서 보고된 값인 0.01/hr과 유

사하다(Fuhrman, 1980; Bell, 1984; Bell, 1986; Servais *et al.*, 1987; Kirchman and Koch, 1988).

수생 생태계에서의 세균군집의 활성도는 다각적으로 변화하여, 세균생산량은 다양한 방법들을 복합적으로 사용할 때에 정확하게 측정할 수 있으며(Riemann and Bell, 1990), 이상의 결과로 미루어  $^3\text{H}$ -thymidine을 사용하여 세균의 DNA production rate를 측정하고,  $^3\text{H}$ -leucine의 사용을 병행할 때, 그 값에 따른 보정 및 검정이 가능할 것으로 사료된다.

## 적 요

1989년 10월 소양호의 6개 정점에서  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation rate로서 세균의 생산량을 측정하였다. 세균 생산량 측정방법을 검토하기 위하여 행한 실험에서  $^3\text{H}$ -thymidine이 DNA, RNA 및 protein에 incorporation되는 비율은 각각 평균 38.45, 42.47 및 20.07%였다. Incorporated된  $^3\text{H}$ -thymidine의 양이 많으면 많을수록 DNA fraction에 incorporation되는 비율은 증가하지만, protein fraction은 낮게 유지되었다.  $^3\text{H}$ -leucine이 protein으로 incorporation되는 속도는  $^3\text{H}$ -thymidine이 protein fraction에 incorporated되는 속도와 높은 상관관계를 보였다. Conversion factor는 다음과 같이 계산되었다. Thymidine의 경우는  $1.83 \times 10^{20}$  cells/moles of thymidine incorporated/hr, leucine의 경우는  $1.69 \times 10^{22}$  cells/moles of leucine incorporated/hr로 계산되었다.

## 사 사

본 연구는 서울대학교 1990년도 대학발전기금 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

## 참고문헌

- 허명희, 1988. SAS 분산분석. 자유 아카데미. 서울.
- APHA-AWWA-WPCE. 1985. Standard method for the examination of water and wastewater, 16th ed. AWWA. Dencer, Co.
- Austin, B., 1988. Methods in aquatic bacteriology. John Wiley & Sons.
- Azam, F., T. Fenchel, J.G. Field, J.S. Gray, L.A. Meyer-Reil, and F. Thingstad, 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.
- Bell, R.T., 1986. Further verification of the isotope dilution approach for estimating the degree of participation of [ $^3\text{H}$ ] thymidine in DNA synthesis in studies of aquatic bacterial production. *Appl. environ. Microbiol.* 52: 1212-1214.
- Bell, R.T., 1984. Thymidine incorporation rates and bacterioplankton dynamics during early spring in Lake Erken. *Arch Hydrobiol. Behi. Ergebn. Limnol.* 19: 81-89.
- Chin-Leo, G. and D.L. Kirchman, 1988. Estimating bacterial production in marine waters from the simultaneous incorporation of thymidine and leucine. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1934-1939.
- Chrzanowski, T.H., 1988. Cnsequences of accounting for isotope dilution in thymidine incorporation assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1868-1870.
- Douglas, D.J., J.A. Novisky, and R.O. Fournier, 1987. Microautoradiography based enumeration of bacteria with estimates of thymidine specific growth and production rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 36: 91-99.
- Fuhrman, J.A. and F. Azam, 1982. Thymidine incorporation as a measure of bacterioplankton production in marine surface waters. *Mar. Biol.* 66: 109-120
- Karl, D.M. and C.D. Winn, 1984. Adenine metabolism and nucleic acid synthesis: Application to microbiological geochemistry. In: Heterotrophic activity in the sea (Hobbie and Williams *ed.*). Plenum Press, New York.
- Kirchman, D.L. and M.P. Koch, 1988. Bacterial production in the Delaway Bay estuary estimated from thymidine and leucine incorporation rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 45: 169-178.
- McDonough, R.J., R.W. Sanders, K.G. Porter, and D.L. Kirchman, 1986. Depth distribution of bacterial production in a stratified lake with and anoxic hypolimnion. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 992-1000.
- Moriarty, D. J.W., 1986. Measurement of bacterial growth rates in aquatic systems from rates of nucleic synthesis. In: Advances in microbial ecology. Vol. 9(K.C. Marshall *ed.*) pp. 245-295. Plenum Pres, New York.
- Moriarty, D.J.W., 1984. Measurement of bacterial growth rates in some marine systems using the incorporation of tritiated thymidine into DNA. In: Heterotrophic activity in the sea (Hobbie and Williams *ed.*). Plenum Press, New York.
- Riemann, B. and R.T. Bell, 1990. Advances in estimating bacterial biomass and growth in aquatic systems. *Arch. Hydrobiol.* 118: 385-402.

17. **Rieman, B.**, 1984. Determining growth rates of natural assemblage of freshwater bacteria by means of  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation into DNA; Comments on methodology. *Arch. Hydrobiol. Behi. Limnol.* **19**: 67-80.
18. **Servais, P., J. Martinez, G. Billen, and J. Vives-Rego**, 1987. Determining [ $^3\text{H}$ ] thymidine incorporation into bacterioplankton DNA: Improvement of the method by DNase treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1977-1979.
19. **Singleton, P., and D. Sainsbury**, 1978. Dictionary of microbiology. John Wiley & Sons, Chichester.
20. **Watson, S.W., J.T. Novitsky, H.L. Quinby, and F.W. Valiso**, 1977. Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 940-946.
21. **Witzel, K.P. and G. Graf**, 1984. On the use of different nucleic acid precursors for the measurement of microbial nucleic acid turn-over. *Arch. Hydrobiol. Behi.* **19**: 59-65.

(Received November 13, 1990)

(Accepted December 7, 1990)