The Korean Journal of Microbiology, Vol. 37, No. 1, March 2001, p. 80-84
Copyright©2001, The Microbiological Society of Korea

소양호에서 활성세균수의 계절적 · 수직적 변화

석정현 · 홍선희 · 김범철 · 안태석*
강원대학교 환경과학과

소양호에서 총세균수와 활성세균수의 계절적·수직적 변화를 측정하였다. 총세균수는 AODC방법을, 활성세균수 측정은 전자전달계를 이용한 호흡활성도 측정인 CTC 방법을 이용하였다. 조사기간 동안 총세균수는 2.1×10^5~3.1×10^6 cells·ml^{-1} 이었으며 활성세균수는 1.8×10^4~8.0×10^5 cells·ml^{-1} 로 나타났고, 총세균수에 대한 활성세균수의 비율은 3.7~44.2 %이였다. 수직 분포를 보면 총세균수는 수온약층에 따라 그 수가 변화하였으나, 활성세균의 수는 큰 변화가 없었다. 총세균수의 값과 β-glucosidase 활성도의 값이 유사한 1999년 8월과 9월의 조사결과에서 β-glucosidase specific activity를 활성세균의 값에서 구한 결과, 9월의 활성이 8월보다 약 6.7배 높았다. 이 활성세균의 측정으로 수중생태계에서 세균의 역할에 대한 새로운 정보를 얻을 수 있다.

Key words □ **active bacteria, CTC, electron transport system, lake soyang**

수중생태계에서 활성세균은 이차 생산, 영양염 회전율(nutrients turnover), 기질의 이용 잠재력과 유기물의 분해 등과 관련된 생태학적 관점에서 총세균수보다는 훨씬 더 유용한 정보를 제공한다(14). 그러나 기존의 Acridine orange(10), DAPI(16), Hoechst dye(15)와 같은 염료를 이용한 방법들은 단지 총세균수만을 측정할 수 있고 그 세균들이 활성을 가지고 있는지는 확인할 수 없었다.

수중생태계에서 활성을 가진 세균을 측정하는 데에는 direct viable count (DVC) 방법이 가장 먼저 개발되었는데, 이 방법은 비교적 간단하고 다양한 환경시료에 적용이 가능하지만 세포분열 억제제로 사용되는 nalidixic acid에 대해 내성을 가진 세균이나 성장이 느린 세균에는 적용되기 어렵고, 사상형 세균이 존재할 때에는 구분이 어려우며, 비교적 긴 배양시간을 필요로 하는 단점이 있다(12).

미생물의 활성도를 측정하기 위한 또 다른 방법은 전자전달계(ETS, electron transport system) 활성을 이용하는 방법이 있다. 세균의 전자전달계 활성도 측정에는 tetrazolium salt가 주로 사용되어 왔는데, 전자전달계 활성을 가진 세균이 수용성 tetrazolium salt를 환원시키게 되면 색을 띤 불용성 formazan이 생성되고, 이들 formazan이 세포 안쪽에 축적되어 현미경으로 식별할 수 있게 된다. 이 때 tetrazolium salt의 환원은 전자전달계에 의해 일어나며, 최종적으로 O_2 대신 tetrazolium salt가 전자수용체로 작용하게 되는 것이다(21). 대표적 tetrazolium salt인 INT(2-(*p*-iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride)를 비롯해 여러 tetrazolium salt들이 수계(19), 지하수(11), 저질층(20)에서 호흡하는 세균을 계수하는데 이용되어 왔다. 그러나 이 방법은 광학현미경으로 관찰하고, 비생물적인 발광이 있어 부적당한 결과가 나올 우려가 있었다. 최근에는 형광물질인 CTC(5-cyano-2,3-di-4-tolyl-tetrazolium chloride)가 호흡하는 세균을 측정하는데 이용되고 있는데, CTC는 용액 상태에서는 무색, 무형광인 반면 환원되어 formazan이 형성되면 620 nm 파장에서 붉은 형광을 나타낸다. CTC는 INT와 구조와 기능상 유사하지만 형광 formazan을 형성한다는 점에서 다르며, 이러한 CTC-formazan의 형광성은 검출 민감도를 증가시켜, CTC 환원력이 작은 세균이나 크기가 작은 세균도 계수가 가능하다(17).

소양호는 수자원으로서의 높은 중요성으로 인해 많은 생태학적, 육수학적 연구가 진행되고 있다. 특히 미생물 생태학적 연구로는 총세균수의 분포(4), 생화학적 분석(3) 등이 있으며 최근에는 분자생물학적 연구(5)가 보고되었다. 그러나 세균의 활성도에 관한 연구는 특정기질에 특이성을 갖는 효소 활성도 측정(2)이 대부분이었고, 직접적인 활성 세균의 측정은 이루어지지 않았다. 따라서 이 연구에서는 소양호에 분포하는 세균중 중요한 역할을 담당하는 활성세균의 분포와 이들의 생태학적 의의를 확인하였다.

재료 및 방법

연구 대상 지역 및 기간

소양호의 댐 앞의 수심 0, 2, 5, 10, 30, 50 m에서 1999년 4월부터 2000년 1월까지 한 달 간격으로 총 10회 조사하였다.

채수 방법

채취시 마다 알코홀로 멸균한 Van Dorn sampler를 사용하여 시료를 채취하였다. 채취된 시료는 멸균된 용기에 담아 냉장 보

*To whom correspondence should be addressed.
Tel : 033-250-8574, Fax : 033-251-3991
E-mail : ahnts@cc.kangwon.ac.kr

관하여 실험실로 운반, 분석하였다.

총세균수

총세균수는 AODC(Acridine Orange Direct Count) 방법(10)으로 측정하였다.

활성세균수

채취한 시료 5 *ml*과 미리 멸균된 R2A broth 4 *ml*, 5mM CTC 용액 1 *ml*을 멸균된 시험관에 넣고, 실온(23°C)의 암실에서 1시간 동안 shaking하면서 배양한 후, 시료 1 *ml*을 black polycarbonate membrane filter(Nuclepore, pore size 0.2 μm, ϕ25 mm)에 여과하여 형광 현미경으로 검경(배율×1000, U excitation, BX-60 Olympus) 하였다(17).

결 과

소양호에서 조사기간동안 총세균수와 활성세균수의 분포는 Fig. 1과 같다. 총세균수는 표층에서 높고 심층으로 갈수록 감소하는 전형적인 분포를 나타내었고, 활성세균수는 수심에 따른 변화가 없었다. 총세균수는 표층의 경우 1999년 4월에서 10월까지 1.6~3.1×10^6 cells · ml^{-1}의 범위를 보이며 지속적으로 증가하다가

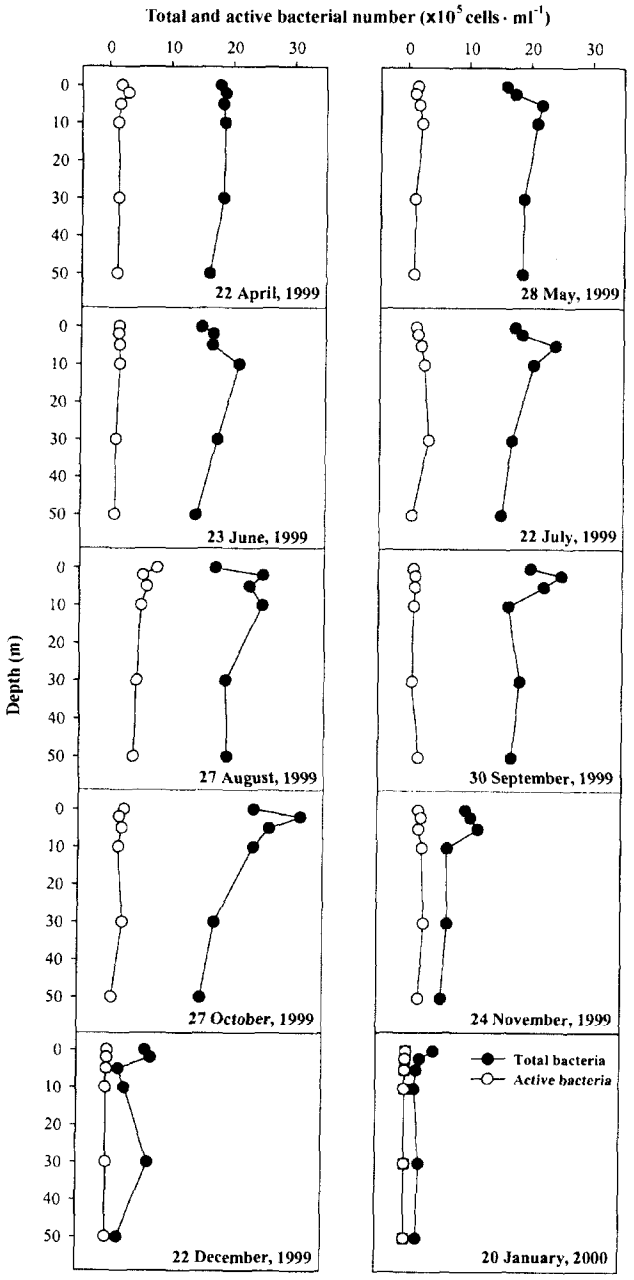

Fig. 1. Vertical profiles of total and active bacteria of Lake Soyang from 22 April 1999 to 20 January 2000.

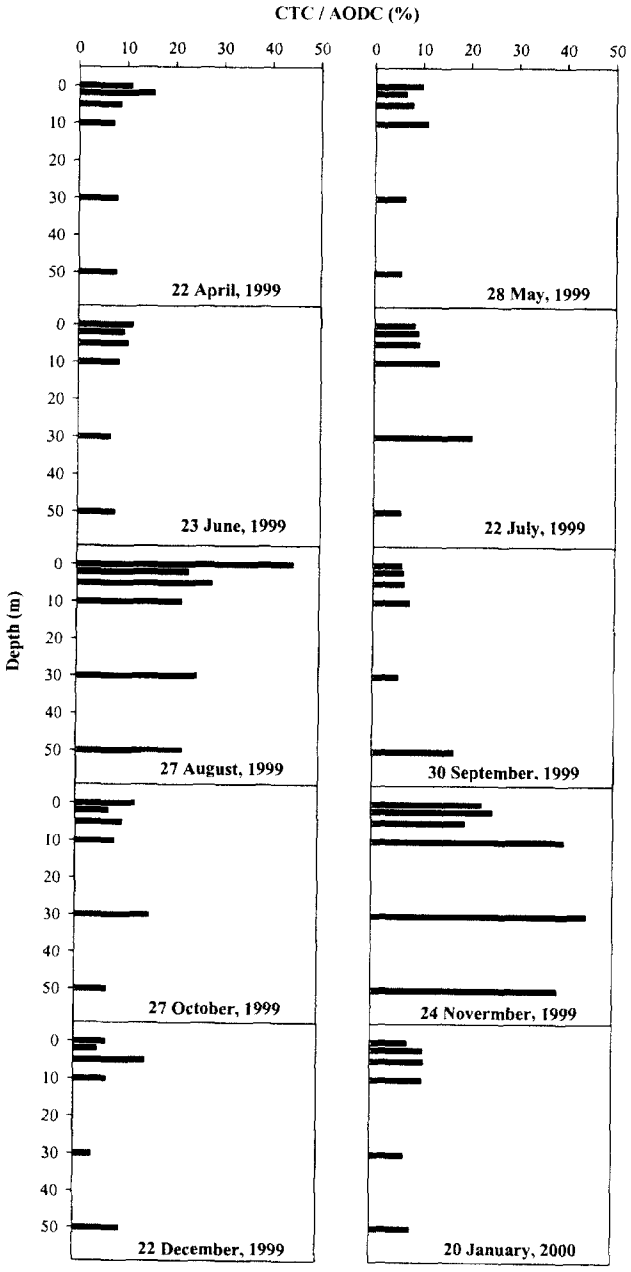

Fig. 2. The ratios of active bacteria to total bacteria of Lake Soyang from 22 April 1999 to 20 January 2000.

10월에 조사기간 중 최대값인 3.1×10^6 cells · ml^{-1}을 보였고 이후 점차 감소하여 11, 12월, 2000년 1월에 2.1×10^5 cells · ml^{-1} ~1.2×10^6 cells · ml^{-1}의 비교적 낮은 범위를 나타내었다. 10 m 이하 수심의 경우, 11, 12, 1월에 표층과 유사한 계절적 변화를 나타내어 $1.8\sim7.0\times10^5$ cells · ml^{-1}의 범위로 점차 감소하여 1월에 가장 낮은 최저값을 보이는 경향을 나타내었지만, 이를 제외한 4월부터 10월까지는 $1.5\sim2.5\times10^6$ cells · ml^{-1}의 범위로 표층과는 달리 월별 변화의 폭이 작았다. 또, 수심별 변화를 보면 4월과 12월을 제외하고는 표층에서 높고 심층으로 갈수록 감소하는 전형적인 분포를 나타내었는데 수체 혼합 직후인 4월은 전 수심에서 1.8×10^6 cells · ml^{-1} 내외의 비교적 고른 분포를 나타내었다. 또, 총세균수는 0 m 수심에서보다 2 m 수심에서 모두 높은 값을 나타내는 경향을 보였다.

활성 세균수는 8월을 제외한 봄, 여름, 가을에 $1.1\sim2.9\times10^5$ cells · ml^{-1}의 비교적 고른 분포를 나타내다가 여름인 8월에 $6.4\sim8.0\times10^5$ cells · ml^{-1}의 높게 나타나 조사기간 중 최고값인 8.0×10^5 cells · ml^{-1}의 값을 나타내었고, 이후 점차 감소하여 겨울인 12, 1월의 경우 $2.3\sim4.2\times10^4$ cells · ml^{-1}의 낮은 값을 나타내었다. 10 m 이하의 수심에서도 4월부터 8월까지 $8.6\times10^4\sim5.4\times10^5$ cells · ml^{-1}의 범위로 점차 증가하다가 8월을 기점으로 점차 감소하여 12, 1월에 $1.8\sim2.6\times10^4$ cells · ml^{-1}의 범위를 나타내었으며 1월에는 조사기간 중 최저값인 1.8×10^4 cells · ml^{-1}을 나타내었다. 수심별 변화는 전 수심에 걸쳐 균일하게 분포하여 수심별 변화폭이 총세균수 보다 비교적 작았고, 표층에서 높고 심층으로 갈수록 감소하는 전형적인 총세균수의 분포와 유사한 경향은 8월에만 나타났다. 8월 표층에서의 활성세균수는 $6.4\sim8.0\times10^5$ cells · ml^{-1}의 범위를 보이며 0 m 수심에서 조사기간동안 최대값을 보였고, 10 m 이하의 수심에서는 $4.3\sim5.4\times10^5$ cells · ml^{-1}로 표층보다 낮은 범위를 나타내었다(Fig. 1).

소양호에서의 총세균수에 대한 활성세균수의 비율은 3.7~44.6%의 범위로 나타났지만, 8월과 11월을 제외하고는 9% 내외의 비교적 일정한 값을 나타내었다. 8월과 11월에는 19.2~44.6%의 비교적 높은 비율을 나타내어 11월 30 m 수심에서 조사기간중 최대값을 보였고, 12월에는 30 m 수심에서 최소값인 3.7%를 나타내었다(Fig. 2).

고 찰

미생물은 영양염의 순환, 유기물의 전환 및 mineralization, 에너지 흐름에 영향을 준다는 점에서 매우 중요하며, 이러한 미생물의 개체수는 수환경의 물리화학적인 조건, 수중의 이용 가능한 유기물 종류와 농도, 미생물의 유기물 이용능력에 따라 변한다. 특히, 활성을 가진 세균의 수가 생태학적으로 매우 중요한 역할을 하는데, 자연 환경에서 대사적으로 활성을 가진 세균을 빠르게 계수할 수 있는 CTC 평가는 영양 결핍 상태에 대한 기질 이용 잠재력의 측정, 독성 평가 등에 이용할 수 있는 유용한 방법이다(18). CTC의 형광성은 0.2 μm이하의 매우 작은 세균이나 낮은 전자전달계 활성으로 인해 적은 양의 formazan을 형성하는 세균까지 계수가 가능하다. 반면에 분홍색이나 검붉은 색을 나타내는 INT-formazan은 무생물 입자나 콜로이드 물질이 있을 경우 구별이 힘들고, 0.4 μm이하의 세균은 계수하기가 힘들다(21). 또한 대부분의 자연수에 존재하는 무생물적 자가형광물질은 일반적으로 청색이나 녹청색을 나타내는 파장대로 방출되는데 반해, CTC 형광은 붉은 색을 나타내는 파장대로 방출되기 때문에 구별이 훨씬 용이하다는 장점이 있고, 불안정성으로 인해 INT-formazan이 immersion oil에 용해되기 쉬운 반면, CTC-formazan은 immersion oil에서도 안정하다고 알려져 있다. 특히, 이러한 장점은 식수나 지하수에서의 활성세균 검출에 있어 INT보다 CTC가 탁월한 결과를 얻을 수 있다 (11).

소양호 표층에서의 활성세균수와 총세균수는 조사가 시작된 4월부터 지속적인 증가를 보이다가 각각 여름과 가을을 기점으로 겨울까지 감소하였다. 일반적으로 수온이 높을수록 미생물의 성장은 빨라지고 수온이 낮아지면 미생물의 활성이 낮아지는데, 소양호에서의 세균 군집 구조에 가장 큰 영향을 미치는 요인도 수온으로 보고된 바 있다(1). 이 연구에서도 수온이 높았던 8월 활성세균수가 최대값을 나타내었고 총세균수에 대한 활성세균의 비율도 21.6~44.6%로 11월과 함께 조사기간 동안 가장 높게 관찰되었다(Fig. 1, 2). 총세균수는 10월에 표층에서 최대값을 나타낸 후 11월에 크게 감소하였고, CTC 활성세균수의 경우 8월에 전 수심에 걸쳐 가장 높은 값을 나타내었지만 총세균수와는 달리 9월에 큰 폭으로 감소하였는데 이는 다음과 같이 고찰해 볼 수 있다.

자연계에 존재하는 세균의 상당부분이 대사적으로 불활성이거나, 일시적 영양상태의 제한 또는 휴면상태일 수 있는데(13), 수중에 존재하는 상당수의 활성세균이 여러 환경 인자들의 영향으로 불활성화 되어 9월에 큰 폭으로 감소되었을 수 있다. 이처럼 활성세균수와 총세균수간에 변화가 상호 영향을 미치지 않을 수 있으며, 이는 소양호에서 총세균수의 증감이 DVC 활성세균수의 증감에 영향을 미치지 않는다는 최(2)의 연구 결과와 유사하다. 또, 8월과 9월의 식물플랑크톤의 구성을 보면 8월에는 *Anabaena spiroides*가 172 cells · ml^{-1}, *Chroococcus dispersus*가 353 cells · ml^{-1} 였으며 9월에는 *Anabaena spiroides*가 538 cells · ml^{-1}였고, *Chroococcus dispersus* 는 발견되지 않았다. 수중생태계에서 세균은 조류와 상조공생 또는 편리공생의 관계에 있기 때문에 활성세균수의 변화가 식물플랑크톤의 천이와 관계가 있을 가능성이 있으며, 이는 앞으로 더 연구할 과제이다.

또한 총세균수의 경우는 표층에서 높고 심층으로 갈수록 감소하는 전형적인 분포를 보이지만 활성세균수는 수심에 따라 변화없이 거의 일정한 수준의 세균값을 나타나는데, 이는 자외선과 연관지어 고찰할 수 있다. 자외선이 수체 표면의 세균 군집과 활성도에 미치는 영향은 크게 성장의 자극과 억제로 나누어 볼 수 있다. 수체 표면에 도달한 자외선은 DOM을 저분자량의 화합물로 쪼개어 세균이 이용하기 쉬운 물질로 바꿔주어 성장을 자극하는 반면, 광분해에 의해 생성된 래디칼이 직접적으로 성장을 억제하기도 하며, DOC를 CO_2로 산화하여 간접적으로 세균의 성장을 억제한다. 해수의 경우, 수표면에서의 대사 활성도와 효소활성도가 자외선에 의해 크게 감소되었다고 보고된 바 있다(9). 또, 호기성 세균이 미세호기성(microaerobic) 세균보다 자외선에 대한 내성이 더 강하다(6)는 연구 결과를 볼 때, O_2를 전자

Table 1. The specific activities of β-glucosidase devided by total bacteria and CTC active bacteria

Month	August, 27, 1999.	September, 30, 1999
β-glucosidase, V_{max} (nmol l^{-1} hr^{-1})	29	23
Specific activity (V_{max}/AODC) (amol $cell^{-1}$ hr^{-1})	1.6×10^5	1.4×10^5
Specific activity (V_{max}/CTC) (amol $cell^{-1}$ hr^{-1})	3.6×10^5	24.0×10^5

수용체로 사용하는 호기성 활성 세균의 경우, 이러한 자외선의 영향을 적게 받아 총세균수에서 관찰되었던 수표면에서의 수적 감소가 나타나지 않은 것이라 사료된다.

본 조사기간 동안 관찰된 소양호에서의 총세균수에 대한 활성세균의 비율은 3.7~44.6%로 나타났는데(Fig. 2), 최(2)의 연구에서 소양호에서의 DVC의 비율이 5.2~66.9%로 조사된바 있다. 활성세균의 비율에 관한 다른 연구들을 보면, CTC를 이용한 연구(17)의 경우, 해수에서 대략 6%, 지하수에서 88%가 활성세균이라는 결과를 얻었고, INT를 이용한 연구에서는 해양 환경에서 4~61% (19), 담수에서 5~36% (21), 호수에서 9~25% (8) 등으로 총세균수에 대한 활성세균수의 비율은 환경에 따라 매우 다양하게 나타나는 것을 알 수 있다.

β-glucosidase 는 수중생태계의 유기물 분해에 매우 중요한 효소이다(7). 소양호에서 8월과 9월 세균의 효소활성도인 β-glucosidase 의 V_{max} 값을 측정해 본 결과 각각 29 nmol · l^{-1} · hr^{-1}, 23 nmol · l^{-1} · hr^{-1} 로 나타 났는데, 이 값을 총세균수(AODC)로 나누어 specific activity 값을 구하여 보면 8월, 9월 각각 1.6×10^5과 1.4×10^5 amol · $cell^{-1}$ · hr^{-1} 로 비슷한 결과를 보이지만 Vmax 값을 활성세균수(CTC active bacteria)로 나누어 보면 각각 3.6×10^5과 24.0×10^5 amol · $cell^{-1}$ · hr^{-1} 로 매우 큰 차이였다(Table 1). 즉 활성세균 세포 하나당 분비하는 효소활성도가 8월보다 9월에 약 6.7배 더 큰 것으로 조사되었다. 이 결과에서 알 수 있듯이 수중생태계에서 DOC의 분해, 순환과정을 좀더 정확하게 이해하기 위해서는 활성세균수의 측정이 중요하다는 것이 확인되었다. 따라서 앞으로 미생물의 분포를 조사할 때 단순히 총세균수만을 측정할것이 아니라 생화학적분석, 활성세균, 기질분해 세균수 등을 세밀하게 측정하여야 하며 이들 결과에서 향후 부영양화 과정에서 일어날 미생물 생태계의 변화를 예측할 수 있다.

이처럼 CTC를 이용한 활성세균의 측정은 간단하지만 매우 유용한 방법이며, 앞으로 소양호에서의 활성세균과 UV를 비롯한 여러 환경요인의 측정을 함께 수행하여 각 요소들의 생태학적 기능과 특성, 변화에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 한다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단의 1997년도 대학 부설 연구소 과제 (0897086-1-3)로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 김동주, 홍선희, 최승익, 안태석. 2000. 소양호 세균군집구조와 그 구조에 영향을 주는 환경요인. 한국미생물학회지. 36, 136-141.
2. 최승익. 1996. 소양호의 세균 개체수와 활성도 변화에 관한 연구. 이학박사학위논문. 강원대학교 대학원.
3. 최승익, 안태석. 1997. 호수 생태계의 생화학적 분석. 한국미생물학회지. 33, 50-54.
4. 최승익, 변명섭, 안태석. 1997. 소양호에서 총세균수의 분포. 한국육수학회지. 30, 377-383.
5. 홍선희, 변명섭, 안태석. 1997. 16S와 23S rRNA에 결합한는 probe를 이용한 겨울철 소양호 세균 군집구조의 분석. 한국미생물학회지. 33, 257-261.
6. Andrew, A. A., T. J. Phelps, R. E. Benoit, and D. C. White. 1993. Survival of subsurface microorganisms exposed to UV radiation and hydrogen peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3545-3550.
7. Chróst, R.J. and J. Overbeck. 1990. Substrate-ectoenzyme interaction : significance of β-glucosidase activity for glucose metabolism by aquatic bacteria. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeb. Limmol.* 34, 93-98.
8. Dutton, R. J., G. Bitton, and B. Koopman. 1983. Malachite green-INT(MINT) method for determining active bacteria in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1263-1267.
9. Helbling, E. W., E. R. Marguet, V. E. Villafane, and O. Holm-Hansen. 1995. Bacterioplankton viability in antarctic waters as affected by solar ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 126, 293-298.
10. 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.
11. King, L. A. and B. C. Parker. 1988. A simple, rapid method for enumerating total viable and metabolically active bacteria in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1630-1631.
12. Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1984. An improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* 102, 117-122.
13. Novitsky, J. A. and R. Y. Morita. 1978. Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions. *Mar. Biol.* 48, 289-295.
14. Packard, T. T. 1985. Measurement of electron transport activity of microplankton. *Adv. Aquat. Microbiol.* 3, 207-261.
15. Paul, J. H. 1982. Use of Hoechst dyes 33258 and 33342 for enumeration of attached and planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 939-944.
16. Porter, K. G. and Y. S. Feig, 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943-948.
17. Rodriguez, G. G., D. Phipps, K. Ishiguro, and H. F. Ridgway. 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1801-1808.
18. Schaule, G., H. C. Flemming, and H. F. Ridgway. 1993. Use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3850-3857.
19. Tabor, P. S. and R. A. Neihof. 1982. Improved method for determination of respiring individual microorganisms in natural waters.

Appl. Environ. Microbol. 43, 1249-1255.
20. Winding, A., S. J. Binnerup, and J. Sørensen. 1994. Viability of indigenous soil bacteria assayed by respiratory activity and growth. *Appl. Envion. Microbiol.* 60, 2869-2875.
21. Zimmermann, R., R. Iturriaga, and J. Becker-Birck. 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number of thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 926-935.

(Received February 22, 2001/Accepted March 5, 2001)

ABSTRACT: The Seasonal Variation of Active Bacterial Abundance in Lake Soyang

Jung-Hyun Suck, Sun-Hee Hong, Bomchul, Kim and Tae-Seok Ahn*(Department of Environmental Science, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea)

Vertical and temporal variations of active and total bacterial abundance were monthly estimated in Lake Soyang from April 1999 to January 2000. The number of total and respiring bacteria was determined directly under microscope by AODC and CTC methods, respectively. The number of total and active bacteria varied from 2.1×10^5 to 3.1×10^6 cells $\cdot ml^{-1}$, and 1.8×10^4 to 8.0×10^5 cells $\cdot ml^{-1}$, respectively. The proportions of respiring bacteria to total cell ranged from 3.7 to 44.2 %: The proportions was the highest in November 1999 and the lowest in December 2000. The specific activity of β-glucosidase divided by total bacteria was 1.6×10^5 amol $\cdot$ cell^{-1} $\cdot$ hr^{-1} in August and 1.4×10^5 amol$\times$cell$^{-1}\times$hr^{-1} in September while the specific activity divided by CTC active bacteria was about 3.6×10^5 amol $\cdot$ cell^{-1} $\cdot$ hr^{-1}, 24.0×10^5 amol $\cdot$ cell^{-1} $\cdot$ hr^{-1}. The specific activity of active bacteria in September was 6.7 times higher than that of August. By these data of active bacteria, the new information of aquatic ecosystem was unveiled.