

## 변형된 DVC법을 이용한 난배양성 토양세균의 검출 및 정량적 평가

황경숙\* · 양희찬 · 染谷 孝<sup>1</sup>

목원대학교 생명과학부 미생물학과, <sup>1</sup>佐賀大學 農學部 應用生物科學科

형광현미경을 이용한 기존의 직접생균수측정(DVC)법을 변형하여 산림토양의 각 층위에 분포하는 난배양성 토양세균의 정량적 평가를 시도하였다. 기존의 방법에서 사용된 DNA 합성저해제(nalidixic acid; 100 µg/ml, pipemidic acid; 50 µg/ml, piromidic acid; 50 µg/ml) 보다 5배 높은 농도를 사용한 결과 토양세균 군집의 세포분열이 배양 24시간까지 충분히 억제되어 기존의 DVC법보다 10배 이상 높은 계수치를 얻었다. 토양시료를 계균수로 원심 세척한 경우 DVC는 전균수(TDC)의 약 1% 미만을 나타내어 첨가된 기질의 이용능을 정확히 관찰할 수 있었다. 형광현미경을 이용하여 DVC법에 의해 검출된 생균수는 전균수의 18~44%를 나타내었고, 평판법(PC)에 의해 계수된 생균수는 전균수의 1% 미만을 나타내어 DVC법이 평판법에 비해 100~2000배 이상 높은 계수치를 나타내었다. 이는 평판법으로는 배양할 수 없는 난배양성(VBNC) 세균이 토양 내에 다수 존재해 있음으로 판단되었고, DVC법에 의해 난배양성 토양세균을 정량적으로 검출할 수 있는 가능성이 확인되었다. 영양기질로써 통상농도의 NB 배지와 NB를 10<sup>-2</sup>로 희석한 DNB배지를 사용하여 DVC법과 평판법에 의한 계수 결과를 비교한 결과 모든 시료에서 DNB 배지에서 생균수는 NB 배지보다 5~10배 이상 높은 값을 나타내어 산림토양의 각 층위에 저영양세균(oligotrophic bacteria)이 다수 분포해 있음으로 추정되었다.

**Key words** □ DNB (diluted nutrient broth), DVC (direct viable count), EB (ethidium bromide), oligotrophic bacteria, VBNC (viable but non-culturable) bacteria

미생물생태계의 구조와 기능을 이해하기 위해서는 무엇보다도 미생물 개체수에 대한 계량적 정보가 필요하다. 희석평판법을 이용하여 토양 세균수(생균수)를 측정할 경우 보통 토양 1 g당 집락수는 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>이며, 현미경 관찰에 의해 직접 계수할 경우 토양 세균수(전세균)는 10<sup>9</sup>~10<sup>11</sup> cells/g로 평판법과 직접계수법에는 수 백 배에서 수천 배 이상의 차이를 나타낸다. 이와 같은 결과는 전균수 측정과 생균수 측정이라는 근본적인 차이 외에 현미경에서는 관찰되나 배양 곤란한 세균(viable but non-culturable, VBNC)이 다수 존재해 있음을 의미한다(3, 5).

이와 같이 배양이 곤란한 난배양성 토양세균 군집의 정량적 평가를 어떻게 할 것인가에 대한 문제가 미생물생태학자들 사이에 집중적으로 논의되면서 직접검정법에 의해 단일세포수준에서 검출·해석하는 연구가 진행되어왔다(9, 13, 14, 15). 토양세균의 정량적 측정법으로 잘 알려진 Jones-Molison법에 사용되고 있는 phenyl alanine blue(PAB)는 단백질에 친화성을 갖고 있어 미생물뿐만 아니라 혼재해 있는 토양유기물 미소입자까지도 염색되어 세균수 측정 결과가 과대평가 되는 등 많은 문제점이 지적되어왔다(13, 14). 그후 AO, DAPI 등 핵산 친화성 형광색소가 개발됨에 따라 특히 수서미생물생태계의 연구가 활발히 진행되어 왔으나 토양생태계에 적용시켜 성공한 예는 극히 드물다. 토양 유기물입자와 토양세균과의 식별이 매우 곤란하여 토양입자와

세균과의 대조를 높이기 위한 노력이 끊임없이 진행되어 왔으나 큰 성과를 올리는 못하였다(6, 13, 14).

한편, Direct viable count(DVC)법은 환경시료에 영양기질과 DNA 합성저해제를 첨가한 후 단시간 배양하면서 세포분열이 억제된 상태 하에서 신장·비대화된 세포(기질을 이용하여 단백질 합성 능력이 있는 생균)를 형광 염색하여 검출하는 방법으로 특히 수천미생물 중 “VBNC 세균”의 검출 및 정량화에 이용되어져 왔으나 토양시료에는 적용되지 못해왔다(4, 10).

본 연구에서는 DVC법을 토양시료에 적용하기 위해 기존의 DVC법을 검토하고, 변형된 방법을 이용하여 토양 중 배양 곤란한 난배양성 세균의 생균수 측정을 시도하였다. 측정된 DVC 계수결과와 평판법(plate count; PC)에 의한 생균수를 비교 검토하였으며 다양한 농도의 기질을 첨가하여 토양세균 군집의 다양성을 평가하였다.

### 재료 및 방법

#### 토양시료

활엽수림(상수리나무)이 밀집해 있는 산림토양으로부터 낙엽층(Litter; L), 낙엽분해층(Fermented; F), 부식층(Humus; H)과 표층으로부터 약 25 cm 아래의 광질층을 이루고 있는 A층으로부터 토양시료를 각각 채취하였다. 토양시료 처리에 사용된 희석수는 0.2 µm membrane filter로 여과시킨 계균수를 사용하였다. Homogenizer (Ace AM-7, Nikon Seiki Co.)로 10,000 × g에서

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 042-829-7593, Fax: 042-829-7590  
E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr

15분간 분산 처리하여 토양현탁액을 제조하였다. 토양에 내재하는 수용성 유기물을 제거하기 위하여 토양현탁액은 10,000 × g에서 10분간 3회 반복하여 원심세척 하였다.

**DVC법에 의한 전균수 및 생균수 측정**

전세균수 측정에는 acridine orange (AO) 색소보다 DNA에 친화성이 높은 ethidium bromide (EB)를 이용하였다. DVC법에 사용된 DNA 합성저해제는 Kogure (9)의 방법에 따라 nalidixic acid (100 µg/ml), pipemidic acid (50 µg/ml), piromidic acid (50 µg/ml)의 3제 혼합액을 사용하였다. 영양기질로는 육즙영양배지 (nutrient broth; NB), 희석육즙배지(diluted nutrient broth; DNB)를 각각 첨가하였다. 토양 현탁액에 상기의 DNA 합성저해제와 영양기질을 혼합하여 25°C에서 24시간 배양한 후에 EB로 염색하고 형광현미경(DMLS, Leica)으로 관찰하면서 신장·비대화된 세포를 생균수로 측정하였다. 세균수는 20개 이상의 화상에서 평균값을 구하였다.

**평판법에 의한 생균수 측정**

Homogenizer (Ace AM-7, Nikon Seiki Co.)로 15,000 × g에서 15분간 분산 처리한 토양현탁액을 순차적으로 희석한 후 각 시료당 5개의 petri dish에 1ml씩 접종하고 육즙영양배지(NB)와 NB배지를 10<sup>-2</sup>로 희석한(diluted nutrient broth; DNB) 배지를 사용하였다. 육즙배지의 조성은 beef extract 10 g, bacto peptone 10 g, NaCl 5 g, distilled water 1,000 ml이며 pH 7.0~7.2로 조정하였다. 모든 시료는 28°C에서 10일 배양한 후 집락수를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**변형된 DVC법: 형광염색제**

DVC법에 사용되는 acridine orange (AO)와 같은 형광색소는 토양입자와 세균을 식별하기가 매우 어려워 DVC법은 토양시료에 적용되지 못해 왔지만, 공동연구자는 각종 형광색소를 비교 검토한 결과 DNA에 친화성이 우수한 ethidium bromide (EB)가 상당히 유효한 형광염색제임을 재발견하고 DVC법이 토양시료에도 적용할 수 있음을 보고한 바 있다(16). EB는 토양미생물을 밝은 오렌지색으로 염색하기에 미생물과 유기물입자를 명확히 식별 할 수 있다(Fig. 2). EB를 형광색소와 비교한 자료를 보면 AO는 EB의 10-85% 정도의 세균수를 나타내었고 DAPI는 EB의 20% 이하로 측정되었다(15). 이와 같이 EB는 우수한 염색 특이성을 갖고, 토양미생물과 토양입자와의 식별도 용이하므로 오랫동안 토양미생물의 정량적 측정의 현안이었던 문제점이 해결되었다고 볼 수 있다.

토양시료를 EB로 염색한 후 전균수(TDC)를 계수하였다. EB는 DNA와 친화력이 높은 특성을 나타내는 형광염료(15)로 생균뿐만 아니라 사균도 염색되기에 EB에 의한 계수 결과는 전균수라 볼 수 있다. 산림토양의 각층위로부터 채취된 시료중 전균수는 L층(39.2±2.4×10<sup>10</sup> cells/g dry soil), F층(26.5±2.1×10<sup>10</sup> cells/g dry soil),

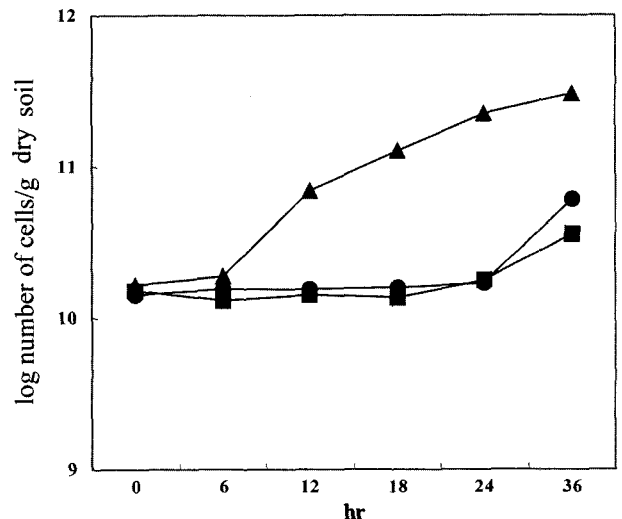
H층(49.3 ± 1.3 × 10<sup>10</sup> cells/g dry soil)이었으며, A층 토양시료 중의 전균수는 19.6 ± 0.8 × 10<sup>10</sup> cells/g dry soil로 계수 되었다.

**변형된 DVC법: DNA합성저해제 농도**

Kogure (9)의 방법에서 사용된 DNA합성저해제(nalidixic acid; 100 µg/ml, pipemidic acid; 50 µg/ml, piromidic acid; 50 µg/ml)를 이용할 경우 배양 6시간 후부터 세포분열이 일어나 세포수가 급증하였다. 본 연구에서는 상기의 DNA 합성저해제 농도를 5~10배 높임으로써 배양 24시간까지 세포분열이 억제되는 효과를 볼 수 있었다(Fig. 1). 즉 전균수(TDC)는 배양 24시간까지 일정한 값을 나타내다 24시간 후부터는 세포가 분열되어 세포수가 점차 증가하는 현상을 나타내었다. 이는 토양세균 군집의 세포분열이 배양 24시간까지 충분히 억제되었음을 시사해 준다. 이상의 결과에 따라 본 실험에서는 모든 토양시료에 대해 기존의 방법에서 사용된 DNA 합성저해제 농도보다 5배 높은 농도의 DNA 합성저해제를 사용하여 24시간 내에 신장·비대화된 세포를 생균으로 측정하였다(Fig. 3).

**변형된 DVC법: 토양시료의 원심세척 효과**

토양시료를 세척하지 않은 대조구 시료와 제균수로 3회 원심세척한 시료의 DVC 값을 비교해 보았다. 대조구 시료의 경우 기질을 첨가하지 않았음에도 불구하고 DVC는 TDC의 27%를 나타내었다. 이는 토양 중에 내재해 있는 유기물을 기질로 이용했음이라고 판단되었다. 한편, 토양 시료를 제균수로 3회 원심세척한 시료의 경우 DVC는 배양 48시간까지 신장·비대화된 세포가 거의 관찰되지 않고 일정한 값을 유지하면서 TDC의 약 1% 미만을 나타내었다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 원심 세척에 의해 토양에 내재하는 수용성 유기물이 제거된 결과라 판단하고, 모든



**Fig. 1.** Growth of bacteria in forest soil sample with various concentrations of DNA synthetic inhibitor. ▲; original method (nalidixic acid; 0.01%, pipemidic acid; 0.005%, piromidic acid; 0.005%), ●; 5-folds of original method, ■; 10-folds of original method.

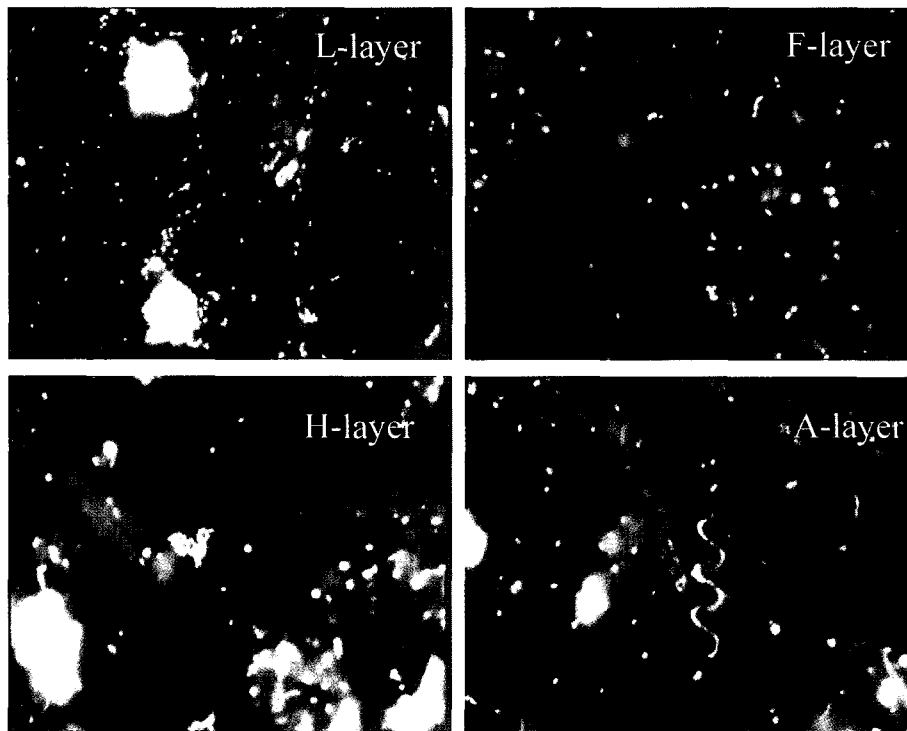


Fig. 2. Photograph of the total direct count (TDC) collected from the forest soil samples (stained with EtBr).

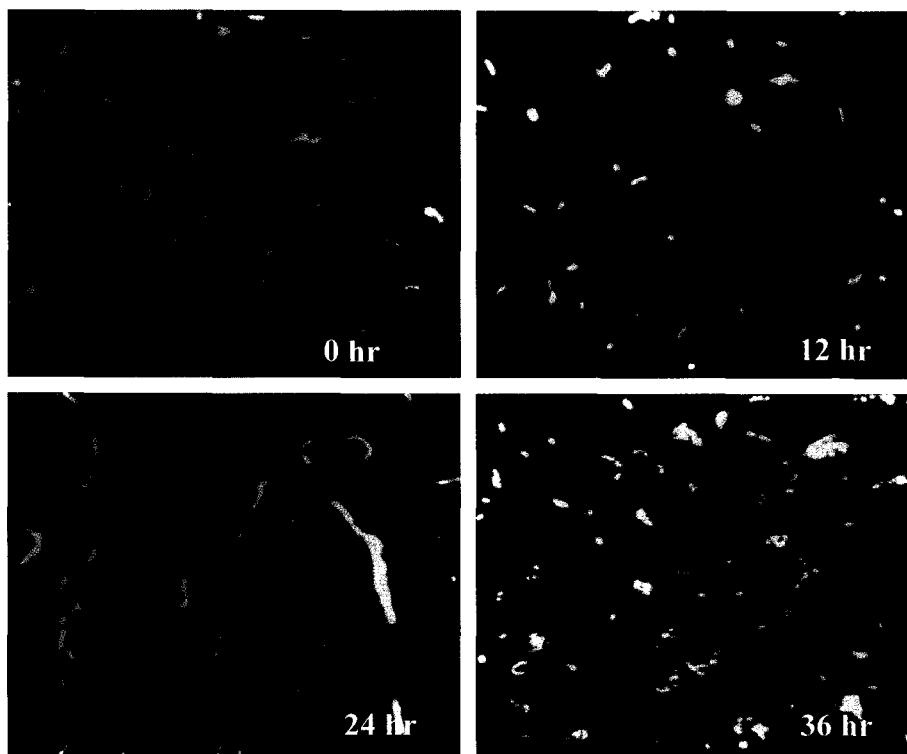


Fig. 3. Changes in cell length during incubation time in DNB medium with nalidixic acid (0.05%), pipemidic acid (0.025%) and piromidic acid (0.025%).

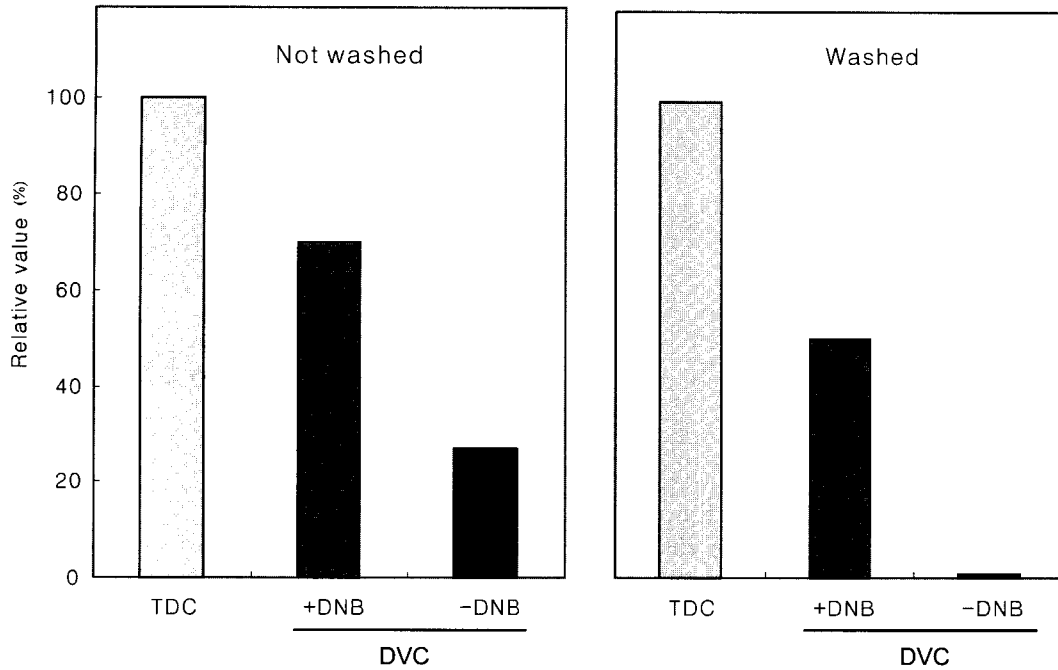


Fig. 4. Effects of washing of soil suspension by centrifugation. TDC=  $2.1 \times 10^{10}$  cells/g dry soil.

Table 1. The ratio of DVC and PC to TDC value collected from a forest soil

Sample	TDC <sup>a</sup>	DVC <sup>b</sup>	PC <sup>c</sup>
L	$39.2 \pm 2.4 \times 10^{10}$	$6.9 \pm 1.7 \times 10^{10}$ (17.7%)	$2.8 \pm 1.2 \times 10^7$ (0.04%)
F	$26.5 \pm 2.1 \times 10^{10}$	$6.7 \pm 2.8 \times 10^{10}$ (23.4%)	$6.0 \pm 0.8 \times 10^8$ (0.9%)
H	$49.3 \pm 1.3 \times 10^{10}$	$17.1 \pm 3.2 \times 10^{10}$ (34.7%)	$6.8 \pm 2.1 \times 10^7$ (0.04%)
A	$19.6 \pm 0.8 \times 10^{10}$	$8.5 \pm 2.1 \times 10^{10}$ (43.5%)	$4.3 \pm 1.7 \times 10^7$ (0.05%)

<sup>a</sup>TDC; total direct count, <sup>b</sup>DVC; direct viable count, <sup>c</sup>PC; plate count

토양 시료는 원심세척 후 DVC법을 수행하였다.

**변형된 DVC법에 의한 생균수**

이상 검토된 변형된 DVC법을 이용하여 산림토양의 각 층위로부터 채취한 토양시료의 생균수를 측정된 결과, L층 시료중의 생균수는  $6.9 \pm 1.7 \times 10^{10}$  cells/g, F층 시료는  $6.7 \pm 2.8 \times 10^{10}$  cells/g, H층 시료에는  $17.1 \pm 3.2 \times 10^{10}$  cells/g이 계수되었고, A층 시료에서는  $8.5 \pm 2.1 \times 10^{10}$  cells/g이 계수되어 전균수(TDC)의 18~44%가 생균수로 측정되었다. 한편 평판법(PC)에 의해 검출된 생균수는 L층 시료는  $2.8 \pm 1.2 \times 10^7$  cfu/g, F층 시료는  $6.0 \pm 0.8 \times 10^8$  cfu/g, H층 시료는  $6.8 \pm 2.1 \times 10^7$  cfu/g 및 A층 시료는  $4.3 \pm 1.7 \times 10^7$  cfu/g 으로, 전균수의 1% 미만을 나타내어 DVC법이 평판법에 비해 100~2000배 이상 높은 계수치를 나타내었다 (Table 1).

이는 평판법으로는 배양할 수 없는 난배양성(VBNC)세균이

토양내에 다수 존재해 있음으로 판단된다. 즉, DVC법과 배양법에 의한 생균수의 큰 차이는 유기물을 대사해서 세포분열까지는 진행되나 집락을 형성하지 못하는 세균이 다수 존재함을 시사해 준다. 본 연구를 통하여 DVC법에 의해 토양내 “VBNC” 세균을 정량적으로 검출할 수 있는 가능성이 확인되었다.

**기질농도에 따른 세균군집의 다양성 평가**

본 연구에서는 통상농도의 NB배지와 NB를  $10^{-2}$ 로 희석한 DNB배지를 사용하여 DVC법과 평판법에 의한 계수 결과를 비교하였다. 통상농도의 NB배지를 첨가한 토양시료의 DVC는 TDC의 2.0~3.4%를 나타내는데 비하여, 저영양배지인 DNB 배지를 첨가한 시료중의 DVC 값은 TDC의 17.7~43.5%를 차지하여 모든 시료에서 높은 계수치를 나타내었다. 또한 토양시료를 평판배지에서 240시간 이상 배양하면서 집락수를 계수한 결과 모든 시료에서 DNB 배지 중의 집락수는 NB배지보다 5~10배 이상 높은 값을 나타내었다(Fig. 5).

이상과 같이 DVC와 PC 모두 통상농도의 NB배지에서보다 DNB배지에서 높은 계수치를 나타낸 결과는 토양 중에는 통상농도의 NB배지에서는 증식할 수 없고 희석한 DNB배지에서만 증식 가능한 저영양세균(oligotrophic bacteria)이 다수 분포해 있음이라 추정되었다(12).

토양미생물의 다양성은 그 증식에 이용되는 물질의 종류 또는 영양요구성의 다양함에 비롯한다고 주장되어 오면서(11) 미생물의 생육과 생육환경 중의 영양분과의 관련성은 미생물학의 중심과제로 미생물이 이용하려는 물질의 범위나 종류 등을 해명함으로써 미생물의 다양성을 파악해 왔다. 그러나 최근에는 영양분의

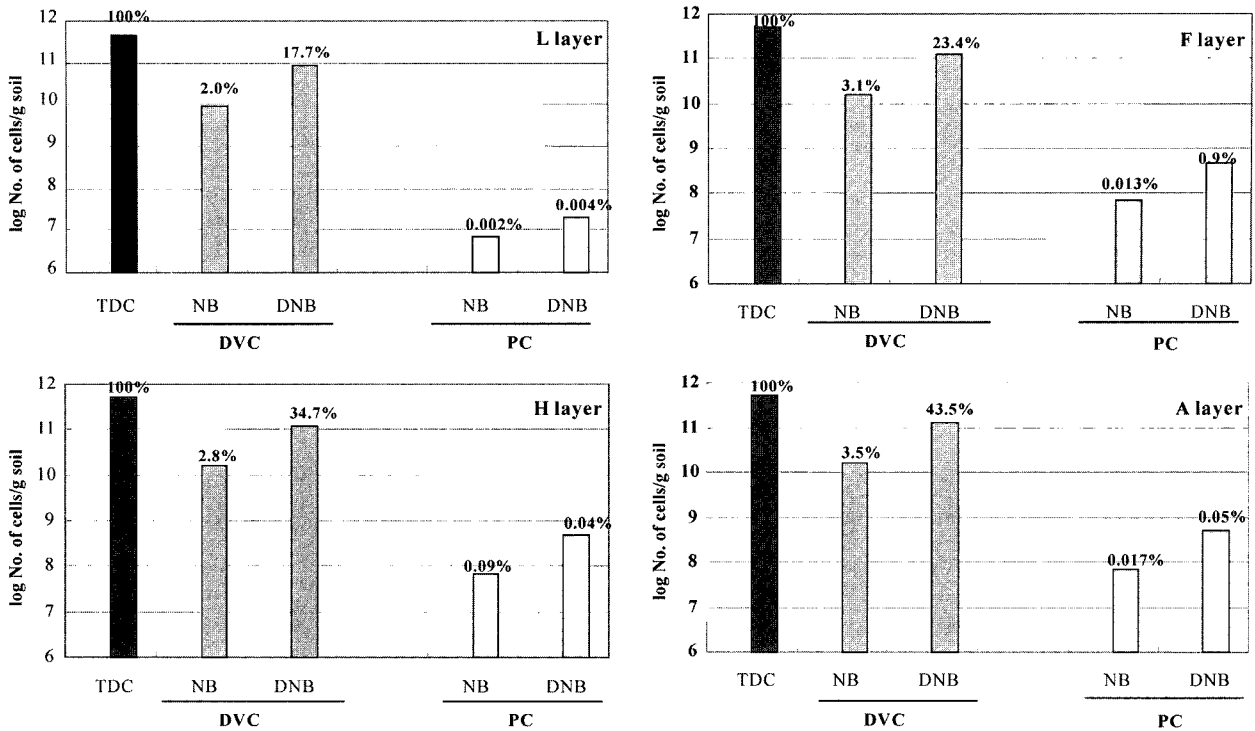


Fig. 5. Comparison of the number of bacteria obtained by direct viable counting (DVC) and plate counting (PC) collected from a forest soil.

농도에 따라서도 그 다양성이 확인되었고(7, 12, 17), 통상농도의 NB배지에서 심한 증식 저해를 받는 세균 중 희석영양배지에서만 증식 가능한 저영양세균이 다수 분리되었다. 이들 새로운 미생물이 자연계에 널리 분포해 있음이 여러 미생물생태학자들에게 의해 밝혀졌다(2, 8). Whang (1) 등은 산림토양의 각 층으로부터 분리된 토양세균의 증식에 요구되는 영양물 농도의 범위를 조사한 결과, 60% 이상이 통상농도의 NB배지에서 증식이 저해되고 희석한 NB배지에서 생육이 가능한 세균군임을 보고하였다. 이들 세균은 통상농도의 NB배지를 10<sup>-4</sup>배 희석한 배지(약 1 mg C/L)에서도 증식 가능하여 저영양세균(oligotrophs)임을 밝혔다.

VBNC 세균이 “viable” 임을 증명하는 방법 중 DVC법이 가장 우수한 것으로 알려져 있다. FDA나 CTC과 같은 형광색소에 의해 생체 염색되어 검출된 토양세균은 세포내의 활성효소가 생 세포임을 증명해 줄 수는 있으나 증식능을 갖는다는 증명은 되지 못한다. 이러한 관점에서 DVC법은 기질을 이용한 균체 합성능을 검출하기 때문에 “viable” 함을 가장 정확히 증명할 수 있는 것이다. Colwell (4) 등의 VBNC세균에 관한 논문에서도 DVC법을 “viable” 이라고 규정하고 이용하였다. 또한 DVC법을 이용해서 토양세균 군집을 정량·검출할 경우, 다양한 기질로 대체함으로써 기질 특이성을 기초로 한 특정 기능을 갖는 토양세균 군집의 정량적 해석도 가능할 것으로 해석된다.

참고문헌

1. 황경숙, 유승현. 1995. 유기영양분 농도에 따른 토양세균

의 증식양상과 통성 및 편성 저영양세균의 분리. 한국미생물학회지 21, 319-324.  
 2. Akagi, Y., N. Taga, and N. Simidu. 1977. Isolation and distribution of oligotrophic marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 23, 981-987.  
 3. Bloomfield, S.F., G.S.A.B. Stewart, C.E.R. Dodd, I.R. Booth, and E.G.M. Power. 1998. The viable but nonculturable phenomenon explained. *Microbiol.* 144, 1-3.  
 4. Byrd J.J., H.S. Xu, and R.R. Colwell. 1991. Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 875-878.  
 5. Colwell, R.R., P.R. Brayton, D.J. Grimes, D.B. Roszak, S.A. Huq, and L.M. Palmer. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholera* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnol.* 3, 817-820.  
 6. Hasebe, J.E., S. Kanazawa, and Y. Takai. 1984. Microbial biomass in paddy soil, I. Microbial biomass calculated from direct count using fluorescent microscope. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30, 175-187.  
 7. Hattori, T. 1976. Plate count of bacteria in soil on a diluted nutrient broth as a culture medium. *Rep. Inst. Agric. Res., Tohoku Univ.* 27, 23-30.  
 8. Ishida, Y. and H. Kadota. 1979. A new method for enumeration of oligotrophic bacteria in lake water. *Arch. Hydrobiol.* 12,77-85.  
 9. Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1984. An improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* 102, 117-122.  
 10. Kogure, K., U. Simidu., N. Taga, and R.R. Colwell. 1987. Correlation of direct viable counts with heterotrophic activity for marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2332-2337.  
 11. Lochhead, A.G. and F.E. Chase. 1943. Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant flora.

- Soil Sci.* 55, 185-189.
12. Ohta, H. and T. Hattori. 1983. Oligotrophic Bacteria on organic debris and plant roots in a paddy field soil. *Soil Biol. Biochem.* 15, 1-8.
  13. Porter, K.G. and Y.S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943-948.
  14. Ramzay, A.J. and A. D. Bawden. 1983. Effects of sterilization and storage on respiration, nitrogen status and direct counts of soil bacteria using acridine orange. *Soil Biol. Biochem.* 15, 263-278.
  15. Roser, D.J. 1980. Ethidium bromide: a general purpose fluorescent stain for nucleic acid in bacteria and eucaryotes and its use in microbial ecology studies. *Soil Biol. Biochem.* 12, 329-336.
  16. Someya, T. 1995. 培養できない土壌細菌の謎に挑む. *化学と生物* 33, 355-356.
  17. Whang, K. and T. Hattori. 1988. Oligotrophic bacteria in rendzina a forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 54, 19-37.

(Received April 1, 2003/Accepted June 19, 2003)

---

**ABSTRACT : The Detection and a Quantitative Evaluation of Viable but Non-Culturable Soil Bacteria Using a Modified Direct Viable Count Method**

**Kyung-Sook Whang\***, **Hee-Chan Yang** and **Takashi Someya\*\*** (\*Department of Microbiology, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea, \*\*Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Saga University, Saga 840-8502, Japan)

This study was performed to analyze quantitatively the number of living bacteria in forest soil samples collected from Mt. Keryong using improved direct viable count (DVC) and plate count (PC) methods. The number of living bacteria by DVC comprised 18~44% of the total direct count (TDC), whereas the number of living bacteria by PC was less than 1% of TDC. These results showed that viable but non-culturable (VBNC) bacteria existed in the soil with high percentages. Besides, DVC was proved to make it possible to make a quantitative detection of the VBNC bacteria. On the other hand, upon measuring the value from the conventional nutrient broth (NB) and  $10^{-2}$  folded diluted nutrient broth (DNB), the values from the DNB showed 5 to 10 times higher than those from the conventional NB medium. These results indicate that oligotrophic bacterial groups, which could multiply in the low nutrient broth, abundantly exist in the soil ecosystem. It would also be possible to apply this kind of method to other substrate to make a quantitative detection of soil bacterial groups.