

대산인근 해역에서 간만조에 따른 종속영양세균의 일일 분포와 세포외 효소 활성력의 변화

이건형 · 최강국 · 백춘봉

군산대학교 자연과학대학 생물학과

Diurnal Fluctuations of Saprophytic Bacterial Distribution and Their Extracellular Enzyme Activities in the Overlying Waters of Sediment of the Yellow Sea near Daesan, Korea

Lee, Geon-Hyoung, Gang-Guk Choi and Chun-Bong Baek

Department of Biology, College of Natural Sciences, Kunsan National University

ABSTRACT

As a part of studying the function and structure of the mudflat environment of the Yellow Sea, seawater samples in the overlying waters of sediment near Daesan were collected every hour on March 29 (spring tides) and on April 5 (neap tides), 1995 to study the diurnal distribution of aerobic saprophytic bacteria and their extracellular enzyme activities. The diurnal distribution of aerobic saprophytic bacteria ranged from 1.0×10^2 to 7.07×10^3 cfu/ml at spring tides and from 1.0×10^2 to 8.3×10^3 cfu/ml at neap tides. The diurnal variations of aerobic saprophytes at the surface waters were greater than those of middle and bottom waters. However, the diurnal fluctuation of saprophyte numbers at spring tides showed no significant difference compared with that at neap tides. The numbers of three physiological groups of aerobic bacteria (proteolytic, lipolytic and amylolytic bacteria) at the surface waters during spring and neap tides were lower than those at the middle and bottom waters. The diurnal variations of five extracellular enzyme activities at the surface waters during the survey period showed lower values than those at the middle and bottom waters. Among the measured extracellular enzyme activities, phosphatase showed the highest. However, the activities of amylase, chitinase and cellulase showed a similar tendency.

Key words: Extracellular enzyme activity, Neap tides, Saprophytic bacteria, Spring tides

서 론

조간대 퇴적토는 상층수의 물리, 화학적 성분과 퇴적토 입자의 크기, 유기물의 함량, 지리적 위치 등 여러 환경 요인에 따라 영향을 받는 복잡한 생태계이다. 특히 연안 생태계는 수심이 낮

이 연구는 1993년도 한국과학재단 특정기초연구비(과제번호 9307005) 지원에 의한 결과임.

음으로 연안 수계에 존재하는 유기물의 순환은 퇴적층에 의해 지대한 영향을 받는다. 연안 퇴적층에는 다양한 경로로 유입된 유기물이 다량 함유되어 있으며 이들 유기물들은 상당 기간 동안 분해되지 않고 남아 있다가 (Meyer-Reil 1984), 수계와 퇴적층에 분포하는 종속영양 세균과 생리적 특성균들이 분비하는 효소들에 의해 분해, 흡수되고(Hoppe 1983), 그 결과 생성된 미생물은 다시 일차 소비자에게 유기물 공급원으로 제공된다. 이 때 미생물들에 의해 이용될 수 있는 유기물들은 수계와 퇴적도에 분포하는 미생물 군집의 특성에 따라 제한되므로 연안 퇴적층 생태계에서의 에너지 흐름을 파악하는 데에는 이러한 미생물 군집의 특성을 밝히는 것이 매우 중요하다.

우리나라 서해안에서 미생물에 관련된 연구로는 해양미생물의 분포(이 등 1990, Lee and Lee 1991, 이 1994, 이 등 1994)와 군집의 특성(이 등 1990) 등이 있으며, 김과 이(1992)에 의한 남해 퇴적도에서 종속영양 세균의 분포 및 세포의 효소 활성력에 관한 연구와 이 등(1994)에 의한 종속영양 세균의 평균 체적에 관한 연구가 있다. 하지만 간만에 따른 종속영양 세균의 일변화와 세포의 효소활성력과 관련된 연구는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 충남 대산 인근 해역을 대상으로 정선 중인 선박에서 간만에 따른 때 시간별 종속영양 세균의 분포와 세포의 효소 활성력을 관찰하였다. 이러한 연구는 퇴적도에 영향을 주는 상층수에서의 미생물의 동태와 퇴적도와 상층수 간의 에너지 흐름을 조사하는데 필요한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 기대한다.

재료 및 방법

연구 대상 해역 및 시료의 채취

퇴적도에 영향을 주는 상층수의 미생물 동태를 파악하기 위하여 충남 대산 인근 해역에서 (Fig. 1의 정점 A) 2회에 걸쳐 정선 중인 선박에서 해수를 때 시간별로 채수하여 간조 및 만조시 변화되는 종속영양 세균 및 생리적 특성균의 분포 동태를 관측하였다. 조사기간 중 대조기(1994년 3월 29일)의 고조는 06시 26분(936 m)과 18시 43분(892 m)에 있었으며, 저조는 00시 07분(-44 m)과 12시 30분(-32 m)에 있었고, 저조기(1994년 4월 5일)의 고조는 12시 56분(668 m) 한 차례 있었으며, 저조는 06시 02분(260 m)과 19시 27분(287 m)에 있었다. 각 시료의 채수시간은 Table 1에서 보는 바와 같다.

해양성 종속영양 세균 및 생리적 특성균의 측정

해양성 종속영양 세균(saprophytic marine bacteria)수의 측정은 bacto marine agar 2216 medium(Difco)에 희석 도말하여 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 14일 간 배양하여 나타난 균체수를 계수하였다. 또한 해수에 존재하는 생리적 특성균(단백질 분해세균, 지방 분해세균, 전분 분해세균)의 측정은 기본배지(Polczar 1957)에 gelatin(0.4%), tween 80(0.1%), soluble starch(0.2%)를 각각의 유일한 탄소원과 에너지원으로 첨가하여 Holding과 Collee(1971)의 방법에 따라 각각의 배지에 희석 도말하여 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 14일 간 배양한 후 계수하였다. 해수에서 계수한 해양성 종속영양 세균과 생리적 특성균의 최종 개체군 밀도(population density)는 각각 colony-forming units(cfu)/ml의 단위로 환산하였다.

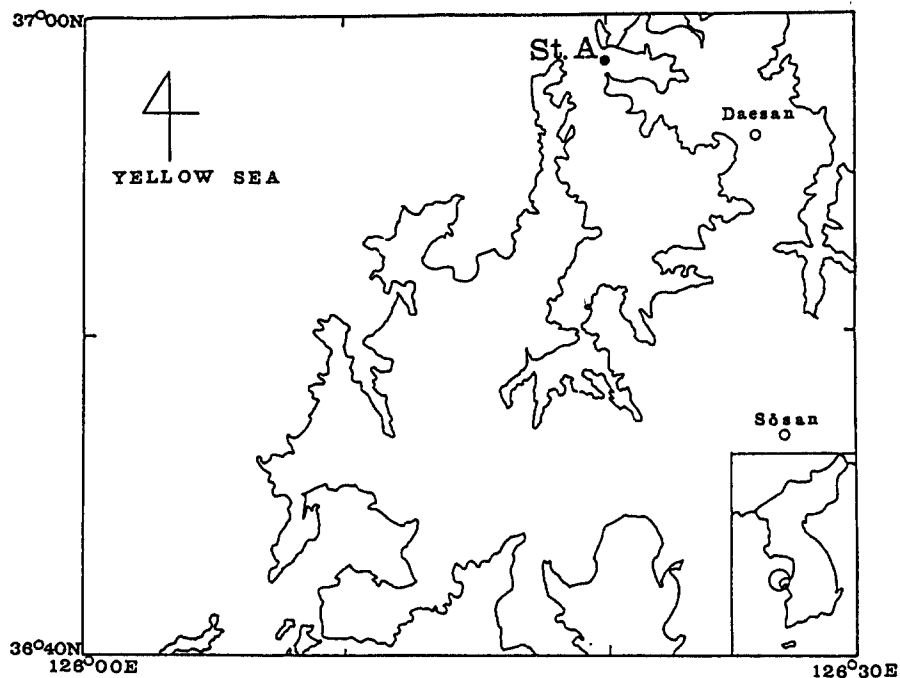


Fig. 1. A map showing the sampling site.

Table 1. Sampling times during spring tides (March 29, 1994) and neap tides (April 5, 1994)

Sample No.	Spring tide	Neap tide
1	09:05	07:45
2	10:10	08:45
3	11:10	09:45
4	12:10	10:45
5	13:10	11:45
6	14:10	12:45
7	16:40	13:45
8	17:40	14:45
9	18:40	15:45
10	19:40	16:45
11	NM*	17:45
12	NM	18:45
13	NM	19:45

* NM: Not measured.

세포의 효소활성도 측정

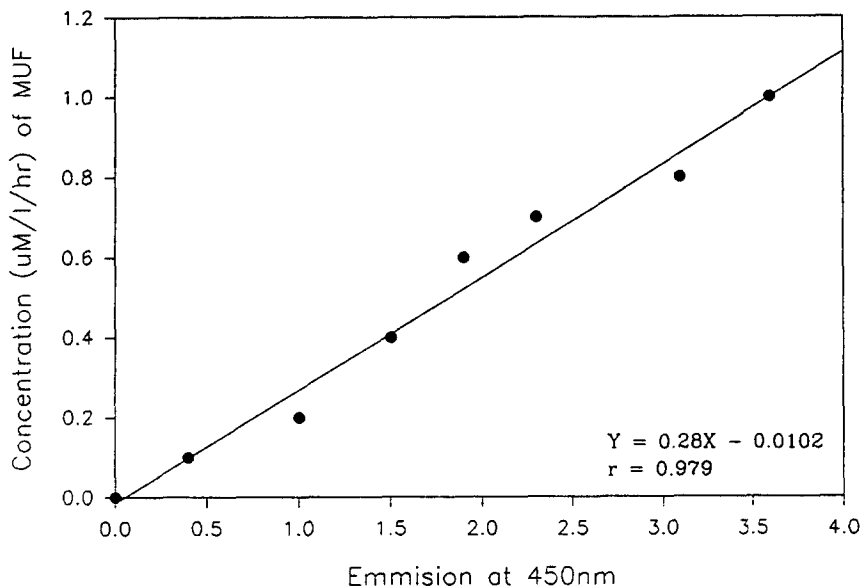
본 실험에서는 생태계에 비교적 널리 분포하여 해양 생태계와 육상 생태계를 비교할 수 있는 5종의 세포의 효소를 선택하여 활성력을 측정하였으며, 이들의 측정은 5종의 형광기질을 사용하였다 (Table 2). 각 반응기질의 stock solution은 5 mM / l 되게 methylcellosolve (ethyleneglycol-monomethylether; C₃H₈O₂)에 녹여 -20°C의 암소에서 보관하였다.

효소 활성 측정시 시료 5 ml에 각 반응 기질 용액을 25 μM 되게 첨가하고, 4시간 동안 암실에서 반응시킨 후 효소 활성에 따른 형광을 spectrofluorometer (Kontron, SFM-25)를 이용하여 다음의 조건 하에서 측정하였다(Hoppe 1983, Kim and Hoppe 1986, Somville 1984); Excitation: 365 nm, Emission: 450 nm, photomultiplier tube voltage: 300, sensitivity: × 100.

Standard curve는 MUF를 methylcello-

Table 2. Fluorogenic substrates used in this study

Substrate	Tested enzyme
4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide	N-acetyl- β -D-glucosaminidase(chitinase)
4-methylumbelliferyl-butyrate	lipase
4-methylumbelliferyl-phosphate	phosphatase
4-methylumbelliferyl- α -D-glucoside	amylase
4-methylumbelliferyl- β -D-cellobiopyranoside	cellulase

**Fig. 2.** A standard curve for the determination of extracellular enzyme activities.

solve에 녹인 후 증류수에 각 농도별로 첨가하여 형광을 측정해 방정식을 구하였으며 (Fig. 2), 각 효소의 활성도는 Fig. 2를 이용하여 환산한 후 반응시간으로 나누어 산출하였다.

결과 및 고찰

퇴적토 상층수에서 해양성 중속영양 세균 및 생리적 특성균의 분포

연안 환경에서 중속영양 세균은 일반적으로 생산성이 높은 유광층에서 가장 높은 분포를 보이나, 연안 퇴적토에서는 상층보다 10 ~ 50 cm 깊이에서 최대 값을 나타낸다. 하지만 본 조사 해역과 같은 조건대에서는 지형적으로 낮은 수계 환경을 이루고, 간조 및 만조에 따라 상, 하층 간의 혼합 현상이 자주 일어나므로 해양성 중속영양 세균의 분포는 조사 시기와 정점에 따라 커다란 차이를 보인다. 따라서, 본 조사 해역에서는 조석 간만의 차에 따라 변화되는 미생물의 동태를 파악하기 위하여 대조기와 소조기로 나누어 미생물의 분포를 관찰하였다.

우선 대조기의 경우, 일일 해양성 중속영양 세균의 분포 동태를 살펴보면, 표층수의 경우 $1.0 \times 10^2 \sim 5.55 \times 10^3$ cfu/ml 의 범주에서 변화하였으며, 중층수는 $1.0 \times 10^2 \sim 1.77 \times 10^4$

cfu/ml의 범주에서, 저층수는 $2.5 \times 10^2 \sim 7.07 \times 10^3$ cfu/ml에서 변화하였다 (Fig. 3A). 표층수의 경우 저조시(4 번 시료)에 비해 고조시(9 번 시료)에 종속영양 세균의 균체수가 비교적 높게 나타났으나 중층수와 저층수에서는 커다란 차이를 발견할 수 없었다. 한편 소조기의 경우, 표층수에서는 $1.0 \times 10^2 \sim 2.05 \times 10^3$ cfu/ml의 범주에서 변화하였으며, 중층수에서는 $2.0 \times 10^2 \sim 2.38 \times 10^3$ cfu/ml의 범주에서, 저층수에서는 $2.25 \times 10^2 \sim 8.3 \times 10^3$ cfu/ml의 범주에서 변화하였다 (Fig. 3B). 대조기에서와 같이 소조기에도 표층수에서는 고조시(6 번 시료) 종속영양 세균의 균체수는 저조시(1, 13 번 시료)에 비해 높게 나타났으나, 중층수와 저층수에서는 커다란 차이를 발견할 수 없었다. 이러한 측정 값은 이 등(1991)이 만경강 하구에서 측정한 값 ($5.0 \times 10^3 \sim 1.3 \times 10^6$ cfu/ml)과 이 등(1990)이 군산 인근해역에서 측정한 값($7.5 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^5$ cfu/ml), 그리고 보령 인근 해역에서 측정한 값 ($1.0 \times 10^2 \sim 6.67 \times 10^5$ cfu/ml) (이 1994)과 비교할 때 상당히 낮은 값을 보였는데, 이러한 낮은 측정 값은 본 조사 정점이 다른

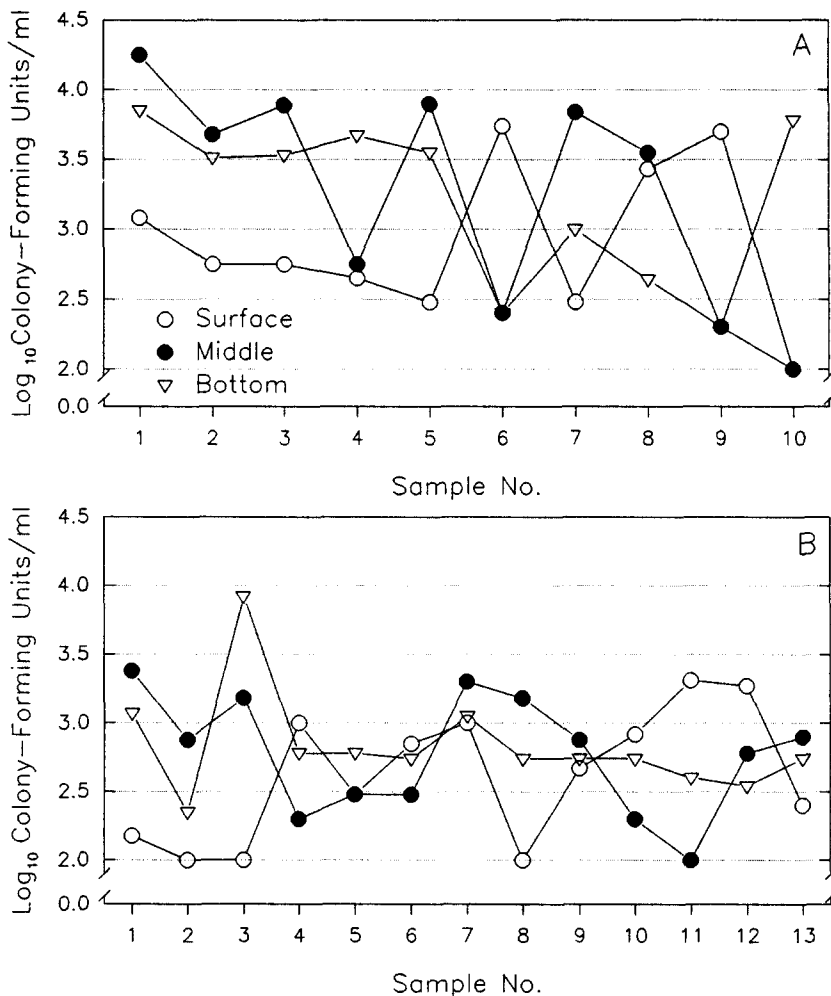


Fig. 3. A diurnal fluctuation of heterotrophic marine bacterial population densities near Daesan of the Yellow Sea. A : the spring tide (March 29, 1995). B : the neap tide (April 5, 1995).

해역에 비해 유기물의 유입이 비교적 적은 청정해역임을 예측할 수 있다. 대조기와 소조기의 일일 해양성 중속영양 세균수의 변화 폭은 유사하였으며, 표층수보다는 중층수와 저층수에서 일일 변화 폭이 측정 시간에 따라 더 커다란 차이를 보였는데, 이는 표층수는 주로 간, 만조시에 퇴적층의 영향을 받지만 중층수와 저층수는 조석의 차이와 관계없이 항상 영향을 받기 때문이라 생각된다.

또한 생리적 특성 군으로 단백질 분해세균과 전분 분해세균 및 지방 분해세균의 분포를 대조기와 소조기로 나누어 일일 변화량을 측정된 결과는 Fig. 4A, 4B, 4C에서 보는 바와 같다. 각 분해세균의 대조기시 변화량을 살펴보면, 단백질 분해세균의 경우, $2.0 \times 10^3 \sim 8.9 \times 10^3$ cfu/ml, 지방 분해세균은 $1.0 \times 10^3 \sim 3.4 \times 10^3$ cfu/ml, 전분 분해세균은 $1.5 \times 10^3 \sim 4.13$

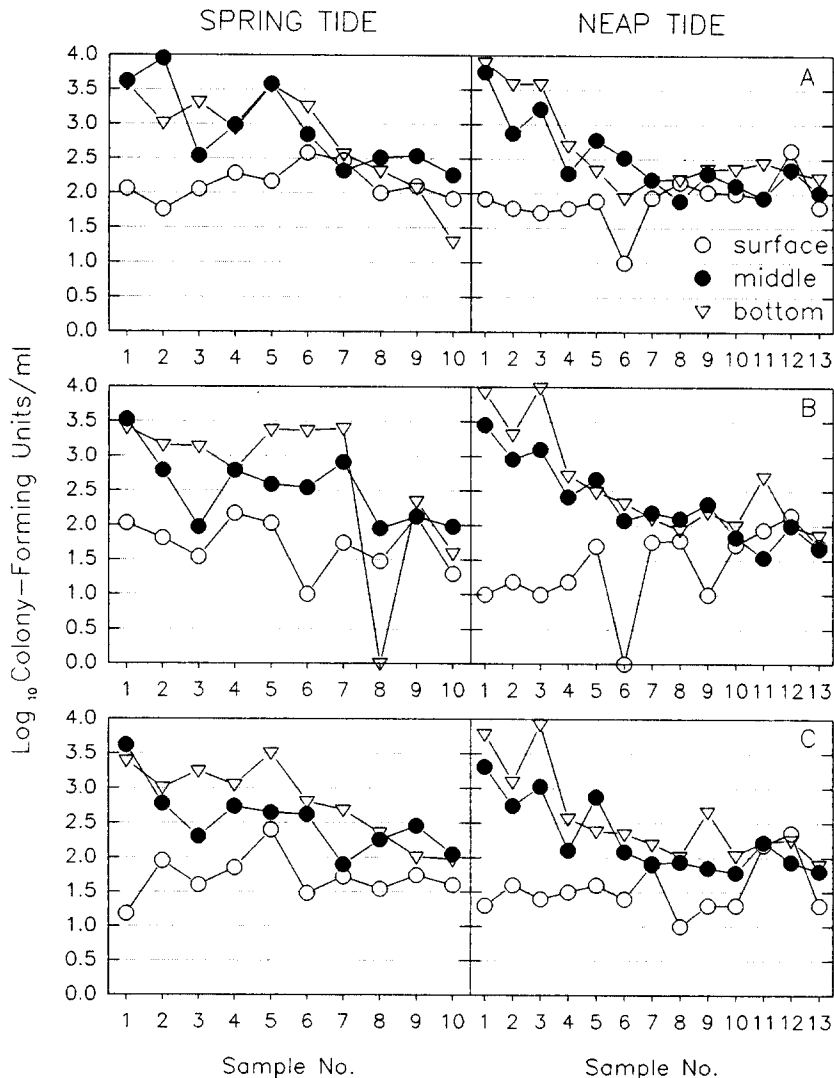


Fig. 4. A diurnal fluctuation of proteolytic (A), lipolytic (B), amylolytic (C) bacterial population densities during spring tide on March and neap tide on April near Daesan of the Yellow Sea.

$\times 10^3$ cfu/ml의 범주에서 변화하였으며, 소조기에는 각각 $5.3 \times 10 \sim 7.95 \times 10^3$ cfu/ml, $0 \sim 9.9 \times 10^3$ cfu/ml, $1.0 \times 10 \sim 8.58 \times 10^3$ cfu/ml의 범주에서 변화하였다. 각 분해 세균의 채수 시간에 따른 균체수의 변화량을 살펴보면, 해양성 종속영양 세균의 분포에서와 마찬가지로 대조기와 소조기 모두 표층수에 비하여 저층수와 중층수에서 균체수의 측정 값이 훨씬 높은 편이었다. 하지만 만경강 하구(이 등 1991)나 군산 인근 해역(이 등 1994), 보령 인근 해역(이 1994)에 비해 전반적으로 균체수가 낮아 다른 해역에 비해 비교적 유기물의 유입이 적은 해역임을 알 수 있다.

퇴적토 상층수에서 세포의 효소 활성력의 측정

Amylase는 육상환경에 비해 수계 환경에서는 아주 낮은 농도로 존재하는데 본 연구에서도 조사 기간 중 측정된 대조기와 소조기의 amylase의 활성은 각각 $0 \sim 0.29 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, $0 \sim 0.14 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 의 범주에서 변화하였으며, 대조기의 저조 때에는 다른 측정시기에 비해 높은 값을 보였지만, 소조기에는 고조 때 약간 높은 값을 보였고 나머지 측정시기에는 거의 측정되지 않았다 (Fig. 5A). 이러한 측정 값은 이 등(1994)에 의해 군산 인근 해역에서 측정된 값보다 훨씬 낮은 값을 나타냈다. 이와 같이 낮은 값을 보인 것은 amylase와 관련된 물질들이 해상보다는 육상에서 기원되었기 때문에 육상으로부터 물질의 유입이 적은 본 조사 정점은 낮은 값을 나타낸 것으로 생각된다.

Chitinase는 주로 갑각류의 껍질이나 균류의 막을 이루는 성분으로 수계 환경보다는 퇴적토에 더 많이 존재한다. 본 조사에서도 대조기와 소조기의 상, 중, 하층수 간의 변화 폭은 각각 $0 \sim 0.13 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, $0 \sim 0.18 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 로 근소한 차이를 나타냈으며 전반적으로 낮은 값을 나타냈다. 주로 대조기에는 조사시간에 따라 비교적 변화 폭이 컸고 소조기에는 측정시간에 따라 거의 차이가 없었다 (Fig. 5B). 이러한 낮은 측정 값은 chitin이 해수 중에는 비교적 적게 존재하고 주로 퇴적층에 많기 때문에 조수의 이동이 많이 나타나는 간, 만조시에만 퇴적층으로부터 유래되는 chitin 성분이 주로 검출되고 그 외의 측정시간에는 거의 측정되지 않는 것으로 생각된다.

Cellulase의 활성도 해양보다는 육상에서 더 높게 나타난다. 본 조사에서도 대조기에는 $0 \sim 0.095 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 의 범주에서, 소조기에는 $0 \sim 0.032 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 의 범주에서 변화하여 대조기와 소조기 간에 커다란 차이가 없었으며, chitinase의 측정에서 본 것과 같이 대조기 측정 시 측정 시간에 따라 측정 값은 다소 차이를 보였으나 소조기에는 측정 시간에 따른 측정 값의 차이가 거의 없었다. 전반적으로 cellulase의 측정 값도 비교적 낮은 편이었다 (Fig. 5C).

Phosphatase는 조사 기간 중 대조기시 표층수에서는 $0 \sim 1.8 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, 중층수에서는 $0 \sim 0.96 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, 저층수에서는 $0.06 \sim 0.93 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 의 범주에서 변화하여 상층수가 중층수나 하층수보다 측정 시간에 따른 변화 폭이 더 컸다. 한편 소조기에는 표층수에서는 $0 \sim 0.66 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, 중층수에서는 $0 \sim 0.82 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, 저층수에서는 $0 \sim 5.8 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 의 범주에서 변화하여, 대조기와는 달리 저층수에 일일 변화 폭이 표층수나 중층수보다 컸다 (Fig. 6A). Phosphatase의 측정 값은 앞에서 언급된 다른 효소들의 측정 값에 비해 다소 높은 편이었지만 이 등(1994)이 조사한 군산 인근 해역보다 낮았다.

Lipase의 활성은 조사 기간 중 대조기시 표층수에서는 $0 \sim 4.14 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, 중층수에서는 $1.01 \sim 5.51 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, 저층수에서는 $0 \sim 5.00 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 의 범주에서 변화하여 상층수에 비해 중층수, 하층수가 측정 시간에 따른 변화 폭이 다소 큰 것을 알 수 있다. 한편 소조기에

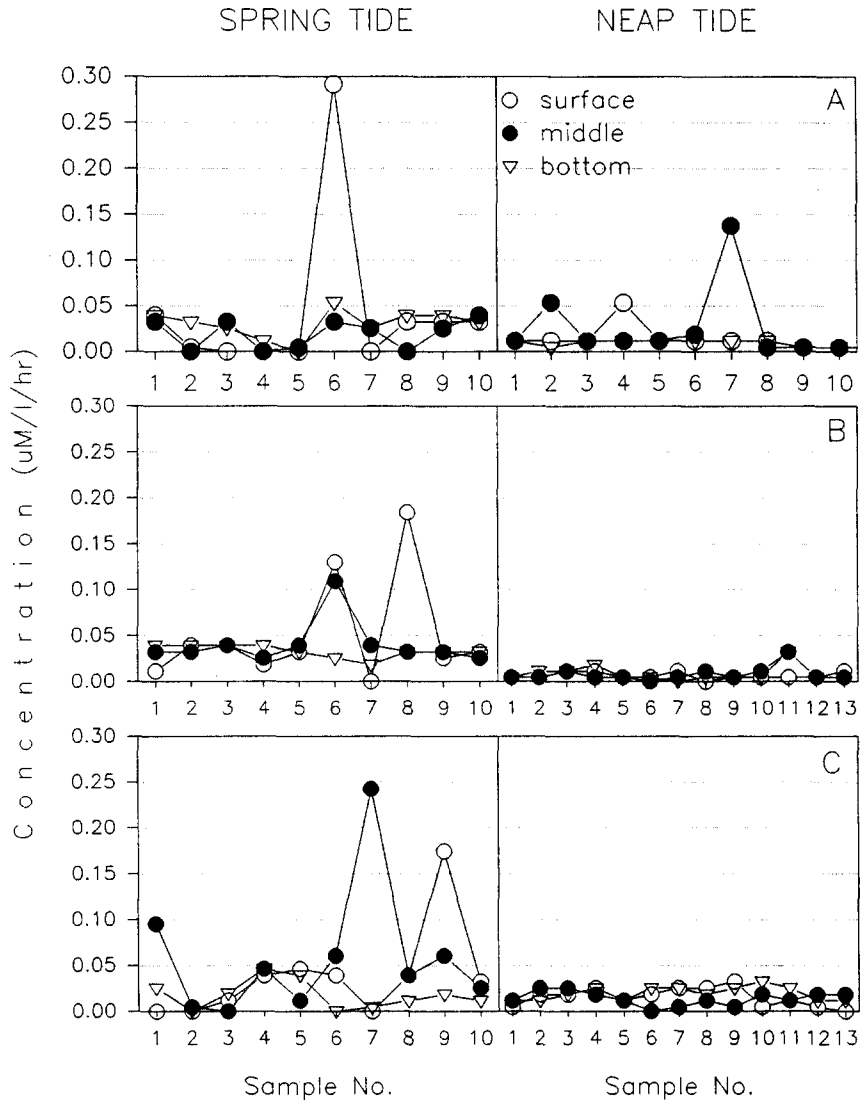


Fig. 5. A diurnal fluctuation of glucosidase (A), chitinase (B), and cellulase (C) during spring tide on March and neap tide on April near Daesan of the Yellow Sea.

도 표층수에서는 $2.80 \sim 6.44 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, 중층수에서는 $3.02 \sim 5.78 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, 저층수에서는 $0 \sim 5.37 \mu\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 의 범주에서 변화하여, 대조기와는 비교하여 변화 폭에는 다소 차이가 있었지만 전반적인 일일 변화 경향은 유사하였다 (Fig. 6B).

대체적으로 본 조사 기간 중 5종의 세포의 효소들의 일일 변화량은 phosphatase가 가장 높은 값을 보였고 다음으로 lipase가 비교적 높은 활성을 나타냈지만, amylase, chitinase, 그리고 cellulase는 낮은 값을 나타냈다. 일반적으로 세포의 효소의 활성은 조사 시기와 장소에 따라서 변화 폭이 크지만(이 등 1994), 본 조사 결과 간의 차이에 의해 일일 조사 시간에 따라서도 측정 값이 달라지는 것을 알 수 있었고, 효소의 특성에 따라 다소 차이는 있지만 대체적으로 퇴적

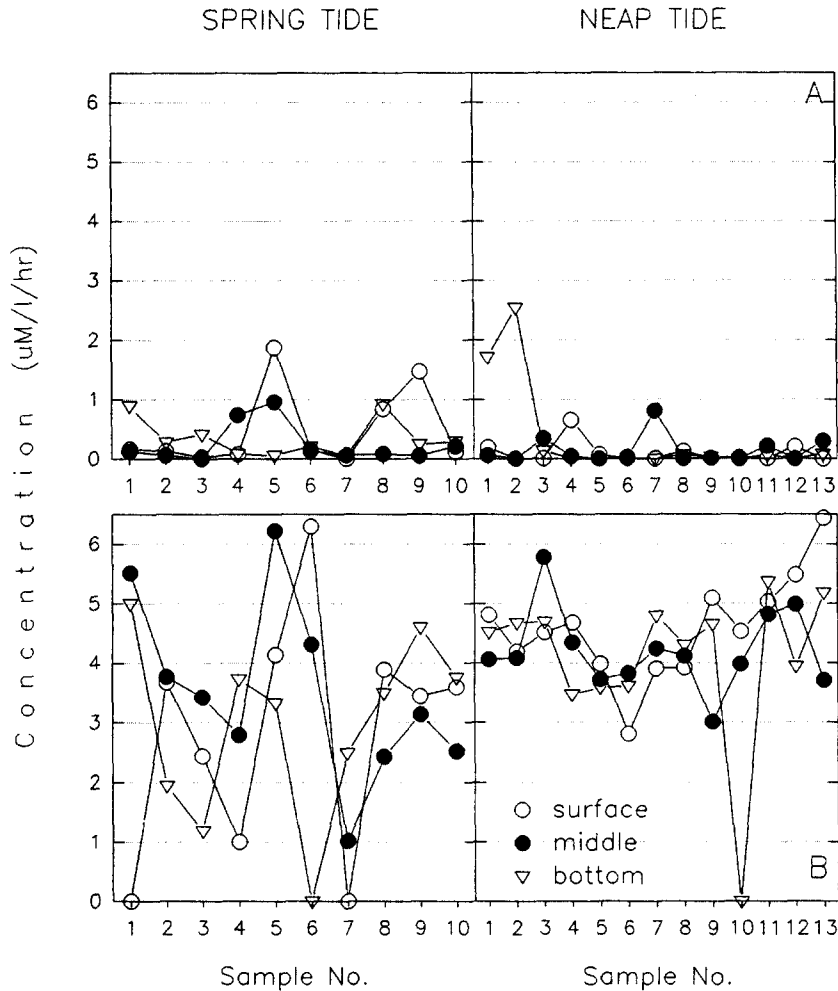


Fig. 6. A diurnal fluctuation of phosphatase (A) and lipase (B) during spring tide on March and neap tide on April near Daesan of the Yellow Sea.

층에 가까운 저층수와 중층수가 표층수에 비해 일일 변화량이 크게 나타났다.

적 요

서해 조간대 퇴적층에서 유기물 분해에 관여하는 종속영양세균의 동태와 세포의 효소활성력에 대한 연구의 일환으로 퇴적층의 상층수에서 대조기(1995년 3월 29일)와 소조기(1995년 4월 5일)에 정선 중인 선박에서 해수를 매 시간별로 채수하여 종속영양세균 및 생리적 특성균의 일일 변화와 세포의 효소의 활성력을 측정하였다. 조사 기간 중 측정 결과는 다음과 같다.

해양성 종속영양 세균의 일분포는 대조기와 소조기에 각각 $1.0 \times 10^2 \sim 7.07 \times 10^3$ cfu/ml, $1.0 \times 10^2 \sim 8.3 \times 10^3$ cfu/ml의 범주에서 변화하였으며, 표층수가 중층수나 저층수에 비해 간만에 따른 일일 변화 폭이 더 크게 나타났다. 하지만 대조기와 소조기의 일일 해양성 종속영양

세균수의 변화 폭은 유사하였다. 한편 생리적 특성군 (단백질 분해세균, 지방 분해세균 및 전분 분해세균)의 일일 변화는 대조기와 소조기 모두 표층수에 비해 중층수와 저층수에서 균체수가 높게 나타났다. 세포의 효소의 활성력은 phosphatase가 전반적으로 높은 값을 보였으나, amylase, chitinase, 그리고 cellulase는 비교적 낮은 값을 나타냈다. 대체적으로 세포의 효소의 활성력은 퇴적층에 가까운 중층수와 저층수가 표층수에 비하여 일일 변화 폭이 크게 나타났다.

인용문헌

- 김상진 · 이건형. 1992. 남해 퇴적도에서 종속영양세균의 분포 및 세포의 효소 활성력. 미생물학회지 30: 383-390.
- 이건형 · 김상진 · 이원호 · 이다미. 1990. 군산 부근 조간대에서의 해양종속영양 세균의 계절적 분포와 특성. 미생물학회지 28: 331-336.
- 이건형 · 이영옥 · 이규춘. 1991. 만경강 하류 생태계에서의 종속영양 세균의 계절적 분포와 이화학적 특성. 한국육수학회지. 24: 27-35.
- 이건형. 1994. 보령화력 온배수 영향 및 해태작황 조사. pp.159-176.
- 이건형 · 김재원 · 김정희. 1994. 군산 인근 해역에서 종속영양 세균의 분포, 평균체적 및 세포의 효소 활성력. 한국생태학회지 17: 79-90.
- Holding, A.J. and J.G. Collee. 1971. Routine biochemical tests. In Norris J.R. and D.W. Ribbons (eds.), *Methods in Microbiology*. Vol. 6A. Academic Press Inc. Ltd, London and N.Y. pp.1-32
- Hoppe, H.G. 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water : Measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11: 299-308.
- Kim, S.J. and H.G. Hoppe, 1986. Microbial extracellular enzyme detection on agar plates by means of fluorogenic methylumbelliferyl substrates. *GERBAM-Deuxieme Colloque International de Bacteriologie Marine. Actes de Colloques. 3. IFREMER. Brest. France.* pp.175-183.
- Lee, G.H. and D.M. Lee. Seasonal distribution and character of heterotrophic marine bacteria in the intertidal zone of the Yellow Sea near Kunsan, Korea. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* 8: 81-85.
- Meyer-Reil, L.A. 1984. Seasonal variations in bacterial biomass and decomposition of particulated organic material in marine sediments. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 19: 201-206
- Polczar, M.J., Jr. 1957. *Manual of Microbiological Methods*. McGraw-Hill Co., New York.
- Somville, M. 1984. Measurement and study of substrate specificity of exoglucosidase activity in eutrophic water. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1181-1185.

(1995년 7월 15일 접수)