Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 28, No. 2, 117–123 (2000)

*Photobacterium phosphoreum*의 생체발광 유지도에 관한 연구

김현숙 · 정성제 · 전억한*
경희대학교 생명과학부 식품가공학과

Studies on the Maintenance of Bioluminescence from Stored *Photobacterium phosphoreum*. Kim, Hyun-Suk, Sung-Je Jung, and Uck-Han Chun*. *Department of Food Technology and Science, Institute of Life Science, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea* – The object of this work is to improve the maintenance of bioluminescence from stored *Photobacterium phosphoreum* in a view of developing continuous monitoring system for pollutants. The long-term experiments were performed to determine the effect of storage temperature and immobilization on the maintenance of bioluminescence and viability of *P. phosphoreum*. A naturally luminescent bacterium, *P. phosphoreum* was starved in 2.5% NaCl solution at 20°C, 4°C, -20°C and -70°C for 30 days. *In vivo* luminescence was measured by luminometry, and total cell concentrations and concentrations of culturable and viable cells were determined by acridine orange staining, dilution plate counting, and direct viable counting, respectively. The bioluminescence emission from cells stored at 4°C was maintained up to 10 days while those with starved cells at other temperature ranges decreased to background level within 3 days. In terms of viability of cells, concentrations of cells stored at 20°C were rapidly decreased as a result of cell lysis, leading to a drop in culturable and viable counts while cells stored at 4°C was shown viable but nonculturable state during starvation. With immobilized cells on strontium alginate, the bioluminescence showed higher maintenance than free cells and decreased with count number of nonculturable cells.

Key words: *P. phosphoreum*, bioluminescence, viable but nonculturable cells, immobilization

최근 수질오염의 심각성이 대두되는 가운데 발광 미생물의 생체발광(bioluminescence)을 이용한 독성물질 측정 시스템 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이는 발광 미생물이 독성물질에 대한 민감성이 뛰어나며, 반응이 신속, 정확할 뿐 아니라 재현성이 좋아 연속 사용이 가능하기 때문이다[11].

대표적인 발광 미생물로서 *Vibrio*, *Photobacterium*, *Alteromonas*와 *Xenorhabdus* 등이 있으며, 이중 *P. phosphoreum*은 다른 발광 미생물과는 달리 4°C의 낮은 온도에서도 생존이 가능해 저온의 수질도 측정할 수 있다는 장점이 있어 많은 연구가 이루어지고 있다. *P. phosphoreum*을 이용한 독성물질 검사의 예로 Microtox 시스템이 있으며, 그 원리는 산업폐수 등에 함유된 화학물질의 독성에 의해 *P. phosphoreum*의 대사 · 생리활동이 저하되어 생체발광이 감소되며, 그 EC_{50} 등을 측정하는 것으로서 이때 감소된 생체발광도는 독성물질에 대한 지시기능(indicator)을 한다[2].

그러나 *P. phosphoreum*의 생체발광은 매우 불안정하여 온도, 산소, 유기물질 등 외부 환경에 의해 쉽게 손상될 뿐 아니라 자연적인 감소속도가 빠르기 때문에 독성물질에 대한 생체발광도의 정확한 감소율을 측정하기 어려우며, 특히 세포의 저장성이 낮아 독성물질 연속 측정 시스템을 개발하기가 용이하지 않다. Microtox 시스템의 경우 동결 건조법이 이용되었으나 동결 건조된 세포를 다시 활성화시키기 위해서는 고가의 세포 활성제가 요구되며, 고농도의 NaCl에 의하여 독성물질에 대한 민감성이 감소될 뿐 아니라 일련의 전처리 작업이 매우 복잡하여 많은 어려움이 따르고 있다[3]. 그러므로 *P. phosphoreum*의 생체발광 유지도를 높여 독성물질에 대한 반응성을 향상시키기 위해서는 운영비용이 보다 저렴하고 전처리 과정이 비교적 간편한 방법이 요구된다.

세포의 고정화는 다공성의 불용성 물질에 세포를 포획하여 세포의 이동성을 제한하는 것으로서 세포의 손상 혹은 유실 등을 방지하여 장시간 세포의 안정성을 유지시켜 준다는 점에서 널리 이용되고 있다. 세포의 고정화에 있어서 중요한 것은 고정화 물질(matrix)의 선택으로서 독성물질 측정을 위한 고정화의 경우 독성물질과 화학반응을 일으키거나 분해되지 않는 물질이어야 하며, 특히 발광 미생물을 위한 고정화의 경우 빛 투과성이 높고 세포의 생체발광을 장시간 유지시켜 줄 수 있는 비독성 물질이어야 한다[7]. 갈조류에서 추출된 sodium alginate는 D-mannuronic acid와 L-guluronic acid의 결합으로 이루어져 있는 천연 다당체로

*Corresponding author
Tel. 0331-201-2626, Fax. 0331-204-8116
E-mail: uhchun@nms.kyunghee.ac.kr

서 고정화 과정이 비교적 간단하고 matrix 내에서의 세포 성장이 가능할 뿐 아니라 생체발광을 해치지 않고 오히려 유지되도록 돕는다는 장점이 있어 널리 이용되고 있다. 점성의 콜로이드성인 sodium alginate는 Ca^{2+} 또는 Sr^{2+}과 같은 양이온과 결합하여 견고한 gel을 형성하는데 그 원리는 양이온이 sodium alginate의 gel 내부로 침투하여 L-guluronic acid와 결합함으로서 단단한 조직을 형성하게 된다. 일반적으로 Ca^{2+}이온이 많이 사용되고 있으나 해양 발광 미생물의 경우 배지 중에 포함된 Na^{2+}이온이 Ca^{2+}이온으로 대치되어 적합하지 않으므로 Sr^{2+}이온의 사용이 제안되고 있다[9].

따라서 본 연구에서는 저장온도에 따른 *P. phosphoreum*의 생존과 생체발광도를 측정하여 세포의 저장성을 향상시킬 수 있는 최적 저장온도를 조사하였으며, 외부 자극에 대한 세포의 생체발광 안정성을 향상시키기 위하여 strontium alginate를 담체로 한 세포 고정화 방법을 시도하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 방법

본 연구에 사용된 발광 미생물은 *Photobacterium phosphoreum* KCTC 2852로서 NaCl이 함유된 배지를 사용하였다. 배지의 pH는 0.1M potassium phosphate buffer를 사용하여 7.0으로 조절하였으며, 조성은 Table 1과 같다. 20°C, 100rpm의 교반기에서 10시간 동안 배양한 균을 접종원(OD_{660}=0.5~0.8)으로 사용하여 이를 10% 접종한 후 위와 동일한 방법으로 계대 배양하였다.

세포의 고정화

2.5%(w/v) NaCl 용액을 용매로 2.4%(w/w) sodium alginate (Hayashi Co., Japan)와 0.31M strontium chloride를 제조하여 냉장 보관 후 고정화 시 두 용액을 혼합 사용하였다[6]. 고정화에 사용된 세포는 OD_{660}=1.3~1.5의 정지기 세포로서 2.5% NaCl 용액으로 10^2배 희석한 후 sodium alginate와 1:9의 비율로 혼합하였으며, 이 혼합액에 동량(0.2 mL)의 strontium chloride 용액을 첨가한 후 백색 불투명한 반구형의 gel이 형성되도록 15분간 실온에 방치해 두었다.

세포의 저장

Table 1. Composition of medium for culture of *P. phosphoreum*

Components	Concentrations
Nutrient broth No. 2*	15g
Sodium chloride	25g
Yeast nitrogen base(without amino acid)	5g
Glycerol	3mL
	distilled water to 1L

*Components of Nutrient broth No. 2
(meat peptone 4.3 g/L, casein peptone 4.3 g/L, sodium chloride 6.4 g/L)

2.5% NaCl 용액에 정지기의 세포 배양액을 10% 접종하여 면전한 후 20°C, 4°C, -20°C, -70°C에 저장하였으며, 3일 간격으로 저장된 시료 일정량을 취하여 측정에 사용하였다. 이때 냉동 저장(-20°C, -70°C)의 경우 NaCl 용액 제조시 동결 보호제인 glycerol을 25%(v/v) 첨가하였다.

생체발광도 측정

Luminometer(Lumat. LB, 9507, Germany)와 luminometer tube(75×12 mm, 5 mL) (DuPont Co., U.S.A)를 사용하여 0.1초간 실온에서 측정하였으며, free cells의 경우 NaCl 용액으로 10^3배 희석한 후 위와 동일한 방법으로 측정하였다. 생체발광도의 측정 단위는 RLU(Relative Light Unit)로서 일정 시간 동안 1.0 mL의 시료에서 발생하는 빛의 양을 mV로 표현한 것이다.

총균수(Total cell count) 측정

2.5% NaCl 용액을 사용하여 적정 농도(OD_{660}=0.1~0.2)로 희석한 시료 2 mL에 5%(v/v) formalin이 함유된 0.1% (w/v) acridine orange(AO, Sigma)를 50 μl 첨가하여 2분 동안 고정 및 염색한 후 polycarbonate(PC) filter(0.2-μm pore size, Sigma)에 여과시켜 Olympus BH2 형광 현미경(360-500 nm blue light excitation, 500nm barrier)을 이용하여 단위 부피(mL) 당 세포수를 측정하였다. 이때 세포 개체수는 10×10의 사각격자 중 10개 특정구역 안의 세포수를 표본 조사하여 그 평균값을 구하였으며, 상용 대수로 표현하였다. 모든 시약은 사용 전 membrane filter(0.45-μm pore size)에 여과시켜 부유물질을 제거하였으며, AO는 냉암소에 보관하여 사용하였다[4].

생균수(Viable cell count) 측정

측정시료 일정량을 원심 분리(4000×g, 3 min)하여 얻은 세포를 멸균수로 세척한 후 총균수 측정과 동일한 세포농도로 희석하였으며, 희석한 시료 1 mL에 0.025%(w/v) yeast nitrogen base(without amino acid) 1 μl와 0.002%(w/v) nali-dixic acid 1 μl를 첨가하여 20°C에서 6시간 동안 배양한 후 총균수와 동일한 방법으로 측정하였다. 모든 시약은 stock 용액으로 제조하였으며, nalidixic acid는 냉장 보관하여 사용하였다[5].

집락수(Culturable cell count) 측정

평판 계수 방법으로서 표면 평판법을 이용하였으며, 적절한 수의 집락을 얻기 위하여 각 시료를 10배 연속 희석하였다. 2.5% NaCl 용액으로 연속 희석한 시료 일정량(< 0.1 mL)을 NaCl이 함유된 한천 평판 배지에 도말하여 20°C에서 48~96시간 배양한 후 형성된 집락을 계수하였다. 측정상의 오차를 줄이기 위하여 한 시료 당 세 개의 샘플을 준비하였으며, 형성된 집락의 평균치를 구하였다. 고정화 세포

의 경우 gel을 분해시키기 위하여 50 mM sodiumhexametaphosphate를 0.4 mL 첨가한 후 20분간 교반(vortex)하였으며, 위와 동일한 방법으로 측정하였다.

Scanning electron microscopy(SEM)

원심 분리(4000×g, 3min)한 세포를 Karnovsky의 방법에 따라 4°C에서 2~4시간 1차 고정한 후 0.1 M sodium cacodylate buffer로 10분간 3회 세척하였으며, 이를 1% osmium tetroxide로 4°C에서 2시간 2차 고정한 후 멸균수를 이용하여 2회 세척하였다. 세척한 세포를 다양한 농도의 ethanol에 순차적으로 10분간 탈수한 후 CO_2 임계점 건조를 위하여 탈수한 세포를 100% hexamethyldisiloxane (HMDS)에 15분간 2회 건조하였으며, 4분간 금속 코팅한 후 주사 전자현미경(JEOL JSM-5410LV, Japan)을 통해 검경하였다.

결과 및 고찰

저장온도에 따른 생체발광 유지도

각 온도에 저장된 세포가 활성화되어 생체발광이 증가하기까지는 일정 시간이 요구된다. 따라서 저장된 세포를 실온에 꺼내어 저장온도에 따른 세포 활성도를 조사한 결과 20°C에 저장한 세포의 경우 일정 시간 이후에도 생체발광도의 증가를 나타내지 않은 반면 4°C에 저장한 세포의 생체발광도는 약 20분 이후 최고 100~120배의 증가율을 나타내 가장 높은 세포 활성도를 나타내었다(Table 2). 냉동 저장된 세포의 경우 탈수 현상을 방지하기 위하여 동결 보호제인 glycerol을 첨가한 결과, 생체발광도는 glycerol 첨가 직후 초기 값의 1/25 수준으로 급격히 감소하여 glycerol에 의한 생체발광 저해 현상을 나타내었을 뿐 아니라 저장된 세포가 활성화되는데 1시간 이상이 소요되었으며, 10~20배의 낮은 생체발광 증가율을 나타내었다(Fig. 1). 장기간 저장함에 따라 세포 활성시간은 연장되어 4°C의 경우 40~50분이 소요되었으며, 냉동 저장한 세포는 2~3시간 이후에도 활성화되지 않았다.

이에 따라 실온에서 충분히 활성화시킨 후 저장온도에 따른 세포의 생체발광 유지도를 측정한 결과, 가장 높은 유지도를 나타낸 것은 4°C에 저장한 세포로서 10일 동안 1×10^4 ~ 10^5RLU 수준을 나타내었으나 20°C의 경우 가장 낮은 생체발광도(7×10^1RLU)를 나타내었으며, 냉동 저장한 세포의 경우 저장기간 동안 10^3RLU의 낮은 생체발광 유지도를 나타낸 것으로 보아 glycerol 첨가로 인한 생체발광도의 감소 현상이 일시적이 아닌 영구적인 손상인 것으로 생각된다 (Fig. 2).

Table 2. The effect of storage temperature on the reactivation of cells

Storage (day)	Reactivation time(min)			Ratio of bioluminescence		
	4°C	-20°C	-70°C	4°C	-20°C	-70°C
1	20	65	75	120	5	4
5	30	85	90	60	3	4
10	45	100	110	25	2	3
15	50	-	-	5	-	-

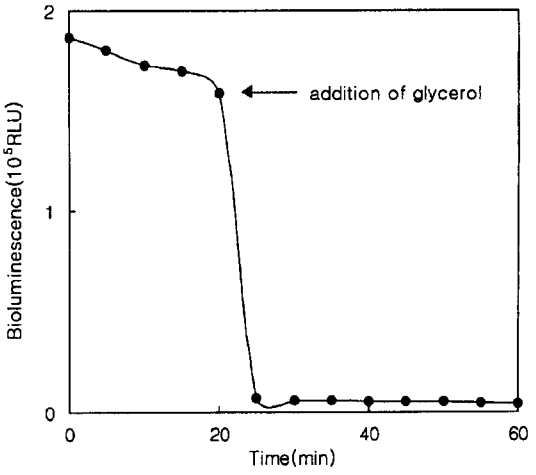

Fig. 1. The effect of glycerol on the bioluminescence intensity of cells at room temperature.

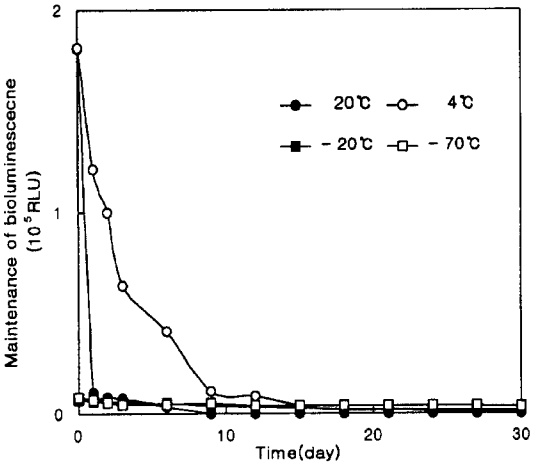

Fig. 2. The effect of storage temperature on the maintenance of bioluminescence of cells.

저장온도에 따른 세포의 생존

온도변화, 유기물질 소진 등 제한된 환경에 장기간 저장된 미생물은 생존에 필요한 세포 내 물질 대사는 지속되지만 세포 분열은 이루어지지 않는 이른바 Viable but nonculturable(VBNC) 상태에 돌입하는 것으로 보고된 바 있다. VBNC 세포는 자세포 형성능력이 상실됨에 따라 plateability의 소실 즉, 총균수와 생균수는 일정한 반면 표면 평판배양 시 집락(colony)을 형성하지 않으며, 세포 크기의 감소

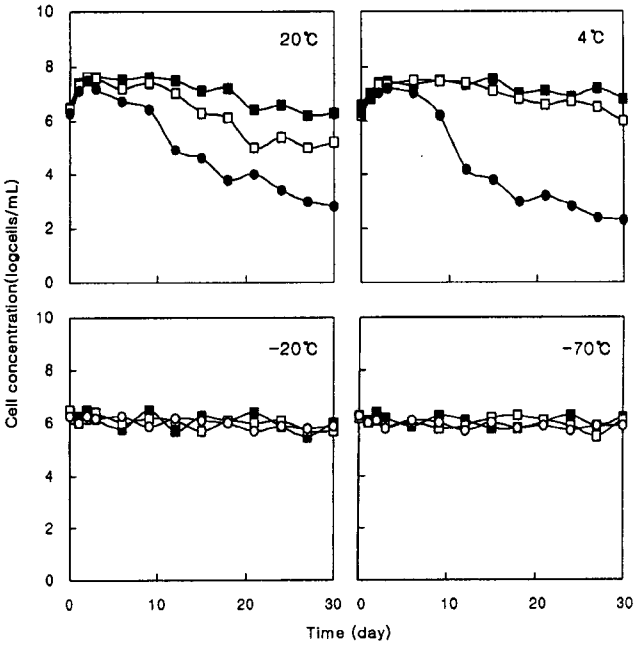

Fig. 3. The effect of storage temperature on the viability of cells.
–■–; total cells , –□–; viable cells, –○–; culturable cells

현상을 나타낸다[10]. 따라서 세포의 plateability와 세포 형태상의 변화를 통하여 저장온도에 따른 세포의 VBNC 상태 여부를 조사하였으며, 이때 세포의 plateability는 세포를 표면 평판 배양하여 얻은 집락수와 Kogure의 직접 생균수 측정법을 통하여 얻은 총균수와 직접 생균수를 비교 분석하였다.

1) 세포의 plateability 측정

Kogure의 직접 생균수 측정법의 원리는 다음과 같다. 생균은 nalidixic acid의 DNA 합성 저해작용으로 인하여 세포 분열이 중단되지만 길이 성장은 계속되어 사상체(filamentous cell)를 형성할 뿐 아니라 AO 염색 시 형광 오렌지색을 나타내어 비활성 세포와 구별되며, 이를 통하여 세포의 생존 여부를 확인할 수 있다[5].

냉동 저장한 세포의 총균수와 생균수는 예상한 바와 같이 저장기간 동안 $1\sim6\times10^6$cells/mL 수준으로 일정하게 유지되었으며, 세포 집락수 또한 동일한 양상을 나타내었다(Fig. 3). 이는 glycerol의 효과로서 세포 안으로 침투된 glycerol이 냉동에 의한 심한 탈수 현상을 방지하여 세포를 보호하며, 냉동에 대한 세포의 감수성에 영향을 주기 때문이다[1]. 최적 생육온도인 20°C의 경우 저장 초기에는 세포 성장에 따른 세포수의 증가를 나타내었으나 시간이 지남에 따라 필수 영양소 소진과 유해물질 축적에 따른 세포 분해 현상으로 인하여 총균수와 생균수는 세포 집락수와 동일한 양상으로 감소하였다[12]. 이와는 대조적으로 4°C에 저장한 세포의 경우 총균수와 생균수는 저장기간 동안 일정한 반면 세포 집락수는 저장 10일 이후 2×10^2cells/mL 수준으로 급격히

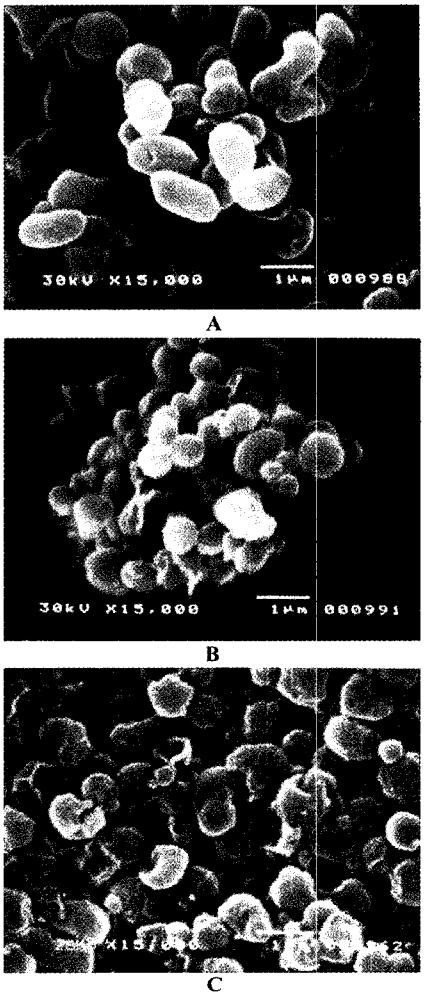

Fig. 4. The effect of storage temperature on the changes of cell morphology.
A, stationary-phase cells; B, cells stored for 20days at 4°C; C, cells stored for 20days at 20°C.

감소하였다.

2) 세포 형태상의 변화

*P. phosphoreum*은 비포자 간균(rod)으로서 정지기 세포의 경우 길이 0.8~2.4 μm, 지름 0.8~1.3μm의 크기를 갖는다(Fig. 4A). 이와는 대조적으로 세포를 4°C에 장기간 저장함에 따라 세포 크기가 점차 감소하여 20일 이후 지름 0.3~1.0 μm 수준의 구균(cocci)으로 형태상의 변화를 나타내었다(Fig. 4B). 세포 크기의 감소 현상은 외부자극에 의한 세포 내 물질 대사의 변화와 관련된 것으로서 RNA의 감소, 세포막 지방산의 변화 등이 이에 속한다. 이러한 현상은 비포자균의 일반적인 특징으로서 제한된 환경에 노출 시 유사포자(sporelike) 상태 즉, 난형체(ovoid)의 세포를 형성하여 생존에 요구되는 물질을 최소화하는데 이는 생존 수단의 일환이기도 하다[12].

세포 원형질막과 관련하여 20°C에 저장한 세포는 유기물질 결핍에 따른 세포 응축 현상과 세포막의 파괴로 인한

세포 분해 현상이 발생하였으나 4°C의 경우 일정한 세포원형을 유지하였다(Fig. 4C). 이는 세포막 성분인 다당체(acidic polysaccharide)와 관련된 것으로서 VBNC 상태의 세포는 세포막 성분의 변화에 따른 세포 크기의 감소를 보이지만 세포막에 다당체 성분을 보유함에 따라 정상적인 세포원형을 유지한 것으로 생각된다[8]. 세포의 plateability 소실과 형태상의 변화를 통하여 4°C에 저장한 세포가 장기간 저온 환경으로 인하여 VBNC 상태에 돌입하였음을 확인하였으며, 이는 세포의 VBNC 상태가 생체발광도와 밀접한 관련이 있는 것으로 추측된다.

3) 세포의 VBNC 상태와 생체발광도의 관련성

세포의 VBNC 상태에 돌입하는 시기는 초기 세포농도에 의해 영향을 받는다. 따라서 세포 저장 시 접종원의 농도를 달리하여 세포의 VBNC 정도를 측정하였으며, 이에 따른 생체발광도를 측정하여 VBNC 상태가 생체발광도에 미치는 영향을 조사하였다. 4~16시간 동안 배양하여 세포농도가 OD_{660}=0.4~1.5인 접종원 2.5% NaCl 용액에 10%를 접종하여 10일 동안 4°C에 저장한 후 생체발광도와 세포 집락수를 측정하였다.

Fig. 5에서 보여주듯이 접종원의 농도가 증가할수록 세포 집락수의 증가 즉, VBNC 상태에 돌입하는 세포수가 감소하였을 뿐 아니라 생체발광도 또한 plateability와 동일한 양상으로 증가하였다. 이러한 결과는 세포의 VBNC 상태가 생체발광도와 밀접한 관련이 있음을 의미하며, 결과적으로 4°C에 저장한 세포가 VBNC 상태에 돌입함에 따라 생체발광도의 감소를 나타낸 것으로 생각된다.

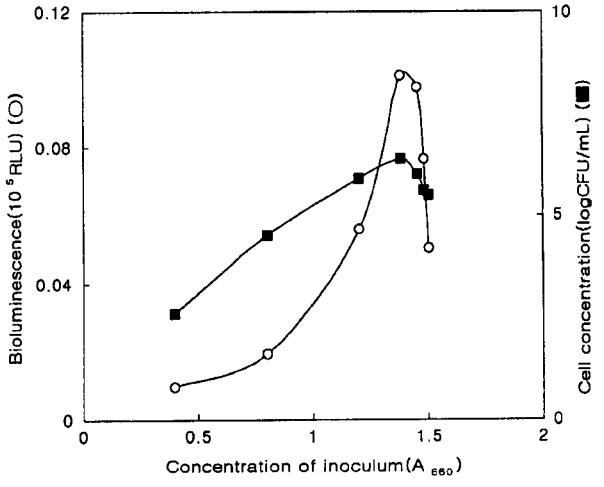

Fig. 5. The effect of concentration of inoculum on the VBNC state and the bioluminescence intensity.

Table 3. The reactivation of immobilized cells during storage

Storage (day)	Reactivation time(min)		Ratio of bioluminescence	
	Free cells	Immobilized cells	Free cells	Immobilized cells
1	20	15	120	200
5	30	25	60	120
10	45	30	25	60
15	50	35	5	10

고정화에 따른 생체발광 유지도

장기간 저장에 따른 고정화 세포의 생체발광 유지도를 조사하기 위하여 세포를 고정한 후 4°C에 저장하였으며, 3일 간격으로 생체발광도를 측정하였다. 이때 세포의 고정화는 백색의 불투명한 gel이 완전히 형성되도록 strontium chloride를 첨가한 직후 15분간 실온에 방치한 후 4°C에 저장하였다.

저장한 세포가 다시 활성화되어 최대 생체발광도를 나타내기까지는 약 15~20분이 소요되었으며, 최고 150~180배의 생체발광 증가율을 나타내었다(Table 3). 고정화에 따른 세포 활성시간 단축 효과는 장기간 저장한 세포일수록 높게 나타나 10일 이상 저장한 세포의 경우 고정화하지 않은 세포에 비해 1.5~2배 높은 세포 활성도를 나타내었다. 세포의 고정화에 따른 효과는 세포 활성도 뿐 아니라 생체발광 유지도를 향상시켜 저장 20일 이후에도 1×10^4RLU 수준의 생체발광도를 나타내었으며, 고정화하지 않은 세포에 비해 2.3배 높은 생체발광 유지도를 나타내었다(Fig. 6). 이러한 결과는 세포를 고정화함으로서 세포가 VBNC 상태로 돌입하는 정도가 감소하였으며, 그 결과 생체발광 유지도가 향상된 것으로 생각된다.

고정화가 세포의 VBNC 정도에 미치는 영향

고정화가 세포의 VBNC 정도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 고정화 세포의 plateability와 형태상의 변화를 측정하였다.

세포를 고정화하여 4°C에 저장한 결과 matrix 내에서의

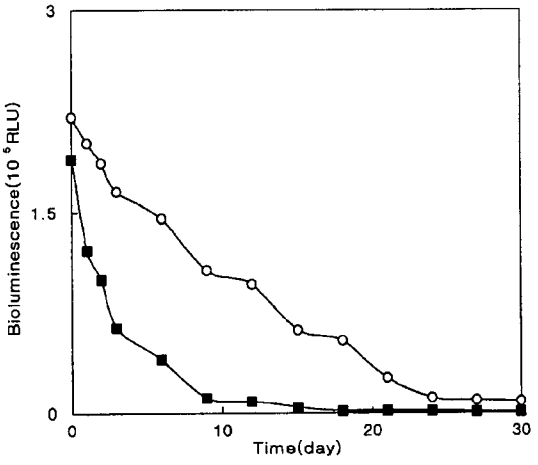

Fig. 6. The maintenance of bioluminescence of immobilized cells during storage at 4°C.
– ■ –; free cells, – ○ –; immobilized cells

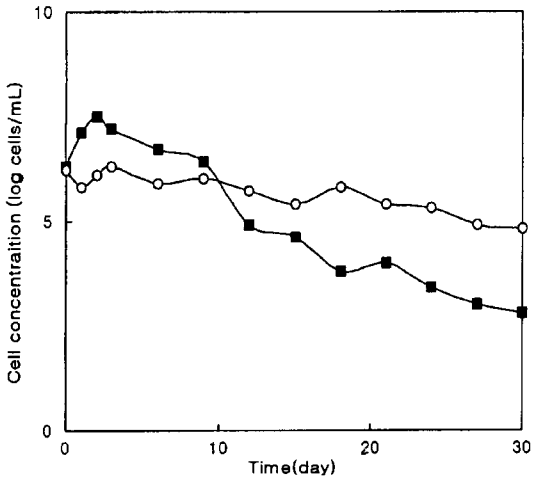

Fig. 7. The plateability of immobilized cells during storage at 4°C.
–■–; free cells, –○–; immobilized cells

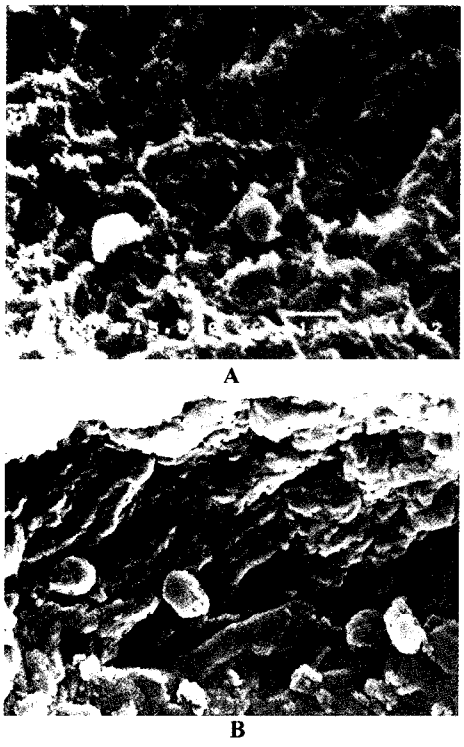

Fig. 8. The growth and morphology of immobilized cells during storage at 4°C.
A, cells immobilized on strontium alginate; B, immobilized cells stored for 20days at 4°C.

세포 성장이 가능하였을 뿐 아니라 저장기간 동안 일정 한 세포 집락수를 유지하여 고정화하지 않은 세포에 비해 높은 plateability를 나타내었다(Fig. 7). 세포의 고정화에 따른 효과는 plateability의 향상 뿐 아니라 세포 형태에 영향을 미쳐 고정화하지 않은 세포와는 달리 4°C의 저온에서도 간균의 형태를 유지하였으며, 이러한 결과는 세포의 고정화가 세포의 VBNC 정도와 밀접한 관련이 있음을 의미한다.

이와 같이 세포의 고정화는 외부 환경인자로부터 세포를 보호하여 실온에서의 생체발광도를 향상시킬 뿐 아니라 장기간 저온저장에 따른 세포의 VBNC 상태를 감소시켜 생체발광 유지도를 향상시키기에 적절한 방법임이 확인되었다.

요 약

*P. phosphoreum*의 생존과 생체발광도는 온도에 의해 많은 영향을 받는다. 냉동 저장한 세포의 경우 glycerol의 보호작용으로 세포농도와 생균수는 측정기간 동안 일정하게 유지된 반면 생체발광도는 glycerol 첨가 직후 급속히 감소하였으며, 저장 이후에도 감소된 생체발광도가 활성화되지 못하였다. 최적 생육온도인 20°C의 경우 저장 초기 세포가 성장함에 따라 세포수의 증가를 보였으나 일정 시간 이후 세포 분해 현상으로 인하여 생균수 및 세포 집락수의 감소를 나타내었으며, 생체발광도는 저장 3일 이후 소멸되었다. 이와는 대조적으로 4°C에 저장한 세포의 생체발광도는 저장 10일 동안 지속되어 가장 높은 생체발광 유지도를 나타내었으나 장기간 저온 저장으로 인하여 세포가 VBNC 상태에 돌입됨에 따라 총균수와 생균수는 일정한 반면 저장 10일 이후 세포 집락수의 급격한 감소를 나타내었으며, 저장 20일 이후 간균에서 구균으로 세포 형태상의 변화를 나타내었다. 이에 따라 세포 저장 시 접종원의 농도를 달리하여 VBNC 상태와 생체발광도의 관련성을 조사한 결과 VBNC 세포가 증가할수록 생체발광도의 감소를 나타내었다.

따라서 VBNC 세포를 감소시키기 위하여 세포를 고정화하여 저장한 결과 별도의 활성제 없이 실온에서 다시 활성화되어 고정화하지 않은 세포에 비해 2.3배 높은 생체발광 유지도를 나타내었으며, 저온저장에 따른 platebility 소실과 세포 응축현상이 나타나지 않았다. 이러한 결과는 세포의 고정화 방법을 이용하여 4°C에서도 세포의 생존 및 생체발광 유지도를 향상시킬 수 있으며, 동결 건조법의 단점을 보완해 줄 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Brock, D. T. and M. T. Madigan. 1994. *Biology of microorganism*, pp. 321-339. 7th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
2. Bulich, A. A. and D. L. Isenberg. 1980. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicology. *Adv. Instrim.* **35**: 35–40.
3. Hinwood, A. L. and M. J. McCormick. 1987. *Toxic. Assess.* **2**: 446–449.
4. Hobbie, J. E., R. J. Daley, and S. Jasper. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1225–1228.
5. Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1979. A tentative direct

microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**: 415–420.
6. Lee, H. J. 1999. Studies on the stability of bioluminescene produced from *Photobacterium phosphoreum* and its linear relationship with toxic substances. Master Thesis.
7. Leenen, J. E., A. P. Vitor, C. F. G. Katja, and T. Johannes. 1996. Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Wat. Res.* **30**: 2985–2996.
8. Linder, K. and J. D. Oliver. 1989. Membrane fatty acid virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2837–2842.
9. Olav, S. and S. Gudmund. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Tibtech-March.* **8**: 71–78.
10. Oliver, J. D. 1993. Formation of viable but nonculturable cells. pp.239-273. *Starvation in bacteria*, Plenum press, New York.
11. Prosser, J. I., K. Killham, L. A. Glover, and E. A. S. Rattray. 1996. Luminescence-based systems for detection of bacteria in the environment, *Critical Rev. Biotechnol.* **16**: 157–183.
12. Roszak, D. B. and R. R. Colwell. 1987. Survival strategies in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**: 365–379.

(Received March 22, 2000)