

군산인근 해역에서 해양세균의 군체수와 Biovolume

이건형 · 이다미 · 김상종*

군산대학교 자연과학대학 생물학과
*서울대학교 자연과학대학 미생물학과

Determination of Marine Bacterial Number and Biovolume in the Intertidal Zone of the Yellow Sea near Kunsan, Korea

Lee, Geon-Hyoung, Da-Mi Lee and *Sang-Jong Kim

Department of Biology, College of Natural Sciences, Kunsan National University, Kunsan City, Jeon-Buk Do, 573-360, Korea

*Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul, 151-743, Korea

ABSTRACT: As a baseline survey to clarify the structure and function of bacterial populations in the intertidal waters of the Yellow Sea near Kunsan in 1987/1988, annual variation of bacterial number and biovolume was estimated by AODC method. Rod-shaped bacteria were more than 74% of all cells during the investigation period. Average biovolume of sampled bacteria ranged from $3.19 \pm 0.59 \times 10^{-2}$ to $6.19 \pm 0.76 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$ for coccoid bacteria, and from $4.57 \pm 0.17 \times 10^{-2}$ to $12.94 \pm 0.21 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$ for rod-shaped ones. It showed that larger biovolume occurred at surface in case of coccoid bacteria, while at bottom in case of rod-shaped ones. There was little correlation between population density and biovolume. Diameters of cells were below $0.5 \mu\text{m}$ among 77-89% of all measured coccoid bacteria, and lengths of cells more than 70% of all measured rod-shaped ones were below $1 \mu\text{m}$. It explains the high percentage of "mini-bacteria" was distributed in the investigation area.

KEY WORDS □ Bacterial size, Biovolume, AODC method, Mini-bacteria

서 론

수계 미생물 생태계의 구조와 기능을 이해하려면 기본 단계로 수계에 존재하는 세균의 수와 생체량을 정확히 측정하는 것이 매우 중요하다. 수계 생태계에서 이러한 측정은 여러가지 방법으로 시도 되었으며 (Van Es and Meyer-Reil, 1982에 게재된 논문 참조), 이러한 방법들 중의 하나로 관심을 끄는 것이 현미경적 방법에 의한 총 세균수와 생체량의 측정이다. 형광 현미경(epifluorescence microscopy)에 의한 직접 측정법은 대부분 세균을 Acridine orange로 염색하여(Acridine Orange Direct Count; AODC

법) 측정하는 방법으로(Hobbie *et al.*, 1977) 수계 생태계 중 특히 해양환경에서 해양미생물의 수를 측정하는데 많이 사용되어 왔고(Dalcy and Hobbie, 1975; Francisco *et al.*, 1973; Zimmermann and Meyer-Reil, 1974). 세균의 크기를 측정하는 데도 역시 이 방법이 사용되어졌다(Bakken and Olsen, 1983; Bell *et al.*, 1983; Ferguson and Rublee, 1976; Hagström *et al.*, 1979; Jordan and Likens, 1980; Van Veen and Paul, 1979). AODC법은 광학현미경의 제한된 해상력에도 불구하고 측정방법이 비교적 간단하고 세균의 크기를 정확히 측정할 수 있는 장점이 있어 수계 생태계에서 채취한 시료를 측정하는데 널리 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 간만의 차가 크며 넓은 간척지를 형성하고 인근에 하구가 발달되어 있는 우리나라의 서해안의 대표적인 조건

이 논문은 1990년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 지방대 육성 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

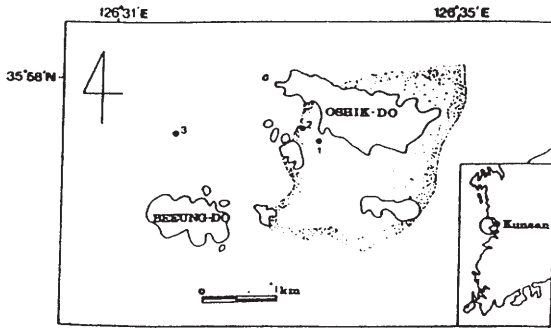


Fig. 1. A map showing the research area and sampling sites near the intertidal zone of Kunsan, Chollabuk-do

대중의 하나인 군산인근해역을 대상으로 이지역 조간대 생태계에서의 세균군집의 특성을 이해하기 위한 기초조사로 세균의 군체수와 생체량의 년중동태와 상호관계를 AODC법을 이용하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 조사정점 및 시료채취

본 조사는 전북 옥구군 옥도면에 위치한 군산항 부근의 오식도와 비응도 사이의 조간대를 대상으로 실시하였으며(Fig. 1), 시료용 해수는 Van Dorn 채수기로 각 정점별 표층과 저층에서 각각 채수하여 현장에서 바로 dark bottle(100 ml)에 담아 formalin (최종농도 0.8-1.2%)으로 고정하여 보관시킨 시료를 대상으로 측정하였다.

2. 세균수 및 체적의 측정

세균수의 직접적인 측정은 Zimmermann(1977)의 방법을 따랐으며 그 방법은 다음과 같다. formalin 으로 고정된 시료를 1 ml/ 취하여 Sudan Black B (Merck)로 미리 염색된 polycarbonated membrane filter (Nuclepore Corp., 25 mm ϕ , 0.2 μ m pore size)에 여과한 후 다시 aqueous fluorochrome solution(Acridine orange, $1:10^4$) 0.5 ml/를 피펫으로 떨어뜨려 filter가 완전히 잠기게 하여 5분간 염색 후 여과하였다. 1 ml/의 iso-propylalcohol을 첨가하여 filter를 탈색시킨 후 진공이 걸려있는 상태에서 filter를 제거하며 공기 중에서 건조시켜 형광 현미경 (Ernst Leitz Wetzlar GMBH, DIAPLAN 2500X) 하에서($\times 1500$) 관찰하였다. 세균수는 다음식에 의해서 계산하였다(Rodina, 1972).

$$X = \frac{SN}{sV}$$

(S:여과된 면적(in μ^2); s:측정된 면적(in μ^2); N:측정된 면적에서의 세균의 평균수; V:여과된 시료의 양)

한편 세균의 체적은 각 시료마다 50-100개의 세균을 무작위로 골라 구형 세균의 경우는 그 모양을 완전한 구형으로 가정하고 간형 세균의 경우는 원통 부분과 양 끝의 두 반구 부분으로 나누어 길이(L)와 넓이(W)를 배율 1,250배의 ocular micrometer로 측정하여 각각의 체적을 계산하였으며(Fuhrman, 1981), 계산한 공식은 다음과 같다. 이때 구균의 경우 $W=L$ 로 하였다.

$$\text{Volume of cell} = (\pi/4)W^2(L - W/3)$$

이상에서 얻은 수치는 통계처리하여 (t-분포, 유의수준 5%) 최종결과를 얻었다.

결과 및 고찰

생태계에 존재하는 세균을 평판 배지법에 의해 군체수를 측정하였을 때 형광 현미경 하에서 계수될 수 있는 세균의 0.1% 이하만이 배양되므로 생태계에서의 군체수를 정확히 파악하기가 어렵다(Kogure *et al.*, 1979; Simidu *et al.*, 1983). 따라서 생태계에 존재하는 군체수를 좀 더 정확히 파악하기 위하여 전자현미경이나 형광 현미경을 이용하여 군체수를 측정하려는 노력이 최근에 시도되고 있다(Zimmermann, 1977; 최, 1987; 강, 1988). 본 연구에서는 그러한 시도의 일환으로 군산 인근해역 조사시(Lee *et al.*, 1990) 채수하여 고정시킨 시료를 중심으로 군체수와 체적을 분석하였다. 우선 정점별 군체수의 분포를 살펴보면 평판배지 법으로 측정된 값은 Lee 등 (1990)에 의해 이미 보고된 바와 같이 $7.5 \times 10^2 - 1.1 \times 10^5$ c.f.u./ml의 범주에서 변화한 반면 같은 기간에 고정시켜 AODC법으로 직접 측정한 값은 $7.9 \times 10^6 - 1.6 \times 10^7$ 범주에서 변화하여 계절에 따라 측정값이 240-17,400 배의 차이를 보였는데 이러한 측정값의 차이는 본 연구결과 만으로서는 예측하기 어려우나 여러사람의 조사에 의하면(Jannasch and Jones, 1959; Kogure *et al.*, 1979; Dahle and Laake, 1982; Simidu *et al.*, 1983; Staley and Konopka, 1985) 휴면상태에 있거나 배양이 잘 안되는 세균, 덩어리를 이루는 세균, 죽은 미생물, 미생물과 유사한 형태의 입자 등이 평판배지법에서는 잘 나타나지 않는 반면 직접측정법에서는 나타나기 때문인 것으로 설명할 수 있다. 한편 정점별 간균과 구균의 분포를 살펴보면 Table 1에서 보는 바와 같이 전 정점에서 간균이 차지하는 비율은 74% 이상이었으며 구균은 26% 이하로 측정되어 모든 조사정점에서 간균이 구균보다 높은 비율로 관찰되었다. 이를 정점별로 살펴보면 간균의 경우 정점 3의 표층과 저층수에서 각각 88%, 83%로 가장 높은 비율로 나타났고 나머지 정점에서는 74-77%의 비율로 간균이 출현하였다. 또한 정점별 세균의 평균 체적을 살펴보면, 구균의 경우 $2.16 \pm 0.29 \times 10^{-2} - 5.40 \pm 0.70 \times 10^{-2} \mu m^3$ 의 범주였으며, 간균의 경우 $1.42 \pm 0.06 \times 10^{-2} - 10.49 \pm 0.25 \times 10^{-2} \mu m^3$ 의 범주에서 변화하였다. 이

Table 1. Estimates of the biovolume of rod-shaped and coccoid bacterial populations in the intertidal surface and bottom waters of the Yellow Sea near Kunsan

Site	COCCUS		ROD	
	Observed number (%)	Average biovolume ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^3$)	Observed number (%)	Average biovolume ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^3$)
S1	2,195(26)	4.40 \pm 0.63	6,344(74)	5.38 \pm 0.20
B1	1,766(23)	4.06 \pm 5.04	5,831(77)	5.79 \pm 0.21
S2	1,581(23)	4.76 \pm 0.71	5,400(77)	5.45 \pm 0.24
B2	1,745(26)	4.12 \pm 0.61	5,054(74)	10.49 \pm 0.25
S3	2,047(12)	5.40 \pm 0.70	14,540(88)	2.28 \pm 0.10
B3	4,020(7)	2.16 \pm 0.29	19,919(83)	1.42 \pm 0.06

Table 2. Monthly variation of the biovolume of the rod-shaped and coccoid bacterial populations for one-year survey in the intertidal waters of the Yellow Sea near Kunsan

Month	COCCUS		ROD	
	Observed number (%)	Average biovolume ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^3$)	Observed number (%)	Average biovolume ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^3$)
Aug. '87	1,316(27)	4.69 \pm 0.74	3,543(73)	5.25 \pm 0.19
Sep.	1,179(27)	5.17 \pm 0.83	3,193(73)	5.27 \pm 0.19
Oct.	1,258(25)	3.60 \pm 0.58	3,730(75)	4.69 \pm 0.18
Nov.	1,400(32)	3.55 \pm 0.42	3,028(68)	5.00 \pm 0.12
Dec.	983(30)	5.33 \pm 0.68	2,277(79)	6.20 \pm 0.18
Feb. '88	876(23)	4.86 \pm 0.68	2,971(77)	7.79 \pm 0.36
Mar.	542(22)	3.19 \pm 0.59	1,943(78)	7.52 \pm 1.44
Apr.	1,213(28)	3.82 \pm 0.44	3,161(72)	12.94 \pm 0.21
May	597(16)	4.80 \pm 0.71	3,058(84)	4.76 \pm 0.18
June	856(19)	6.19 \pm 0.76	3,741(81)	4.57 \pm 0.17
July	1,087(7)	4.67 \pm 1.55	13,603(93)	10.14 \pm 0.22

는 군산인근 해역과 유사한 지형조건을 갖고있는 Kiel Fjord와 Kiel Bight에서 Zimmermann(1977)에 의해서 조사된 세균의 평균 체적과 비교할 때 Zimmermann(1977)에 의해서 조사된 세균의 평균 체적은 $0.06 \mu\text{m}^3$ 을 나타내어 본 조사에서 측정된 값과는 다소 차이를 보였는데 이는 두 지역에서 나타나는 환경요인의 차이때문으로 생각된다. 각 정점별 체적의 변화를 살펴보면, 구균의 경우는 정점 3의 저층수에서 조사정점중 최저값을 보였고 정점 3의 표층수에서 최고값을 보였다. 한편 간균의 경우 정점 3의 저층수에서 최저값을 보였고 정점 2의 저층수에서 최고값을 보여 동일 조사 정점에서 구균의 경우는 대개 표층수에서, 간균의 경우는 주로 저층수에서 세균의 평균 체적이 더 컸다. 또한 정점 1과 정점 2의 표층수와 저층수에서는 거의 비슷한 체적을 갖는 세균들이 분포하고 있는데 반해 정점 3에서는 표층수와 저층수에 분포하는 세균의 체적에 차이를 보였다. 이러한 현상은 정점 1과 2에서는 수심이 비교적 낮아 표층수와 저층수가 비교적 균일한 특성을 나타내는

반면 정점 3은 수심의 차이로 인해 표층수와 저층수의 물리화학적 특성에 차이가 있기 때문인 것으로 생각된다(김과 문, 1984; 오와 고, 1991).

계절별로 살펴보면 Table 2에서 보는 바와 같이 구균의 경우 11월에 32%로 최대의 출현율을, 7월에 7%로 최소의 출현율을 나타냈고, 평균체적은 3월에 $3.19 \pm 0.59 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$ 로 최저값을, 6월에 $6.19 \pm 0.76 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$ 로 최고값을 보였다. 이와같이 출현율이 높을때와 평균체적이 클때와는 반드시 일치하는 것은 아니어서 상관관계가 거의 없음을 알 수 있었다. 간균의 경우 7월에 93%의 출현율을, 12월에 68%의 출현율을 나타냈고 평균체적은 6월에 $4.57 \pm 0.17 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$ 로 최소값을, 4월에 $12.94 \pm 0.21 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$ 로 최대값을 보여 간균의 경우도 구균에서와 마찬가지로 출현빈도와 체적간에는 상관관계가 거의 없음을 알 수 있다. 한편 세균의 크기에 따른 구균과 간균의 평균체적을 살펴보면, 구균의 경우 직경이 $0.5 \mu\text{m}$ 이하인 경우가 정점 3의 저층수(43%)를 제외하고는 전체의 77-89%를 차지하였으며(Table 3) 평균체적은

Table 3. Size distribution of coccoid bacteria and their biovolumes in the intertidal waters of the Yellow Sea near Kunsan

Range	Average diameter	<0.5 μm	Average
Site	($\times 10^{-1} \mu\text{m}$)	Observed number (%)	biovolume ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^3$)
S1	2.82 \pm 0.12	1,958(89)	1.58 \pm 0.11
B1	2.94 \pm 0.07	1,577(89)	1.78 \pm 0.14
S2	2.93 \pm 0.07	1,388(87)	1.84 \pm 0.14
B2	3.10 \pm 0.08	1,359(77)	2.14 \pm 0.17
S3	2.83 \pm 0.06	1,740(85)	1.61 \pm 0.12
B3	2.94 \pm 0.07	1,748(43)	1.84 \pm 0.13

Range	Average diameter	>0.5 μm	Average
Site	($\times 10^{-1} \mu\text{m}$)	Observed number (%)	biovolume ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^3$)
S1	7.76 \pm 0.25	236(11)	27.75 \pm 4.38
B1	7.43 \pm 0.25	189(11)	23.23 \pm 2.42
S2	7.66 \pm 0.25	193(13)	25.77 \pm 2.75
B2	7.63 \pm 0.29	143(23)	25.88 \pm 3.23
S3	7.75 \pm 0.21	307(15)	26.89 \pm 3.92
B3	7.51 \pm 0.24	225(57)	24.38 \pm 2.52

1.58 \pm 0.11 $\times 10^{-2}$ -2.14 \pm 0.17 $\times 10^{-2} \mu\text{m}^3$ 의 범주에서 변화하였고, 직경이 0.5 μm 이상인 경우는 전체의 11-23%를 차지하였으며(정점 3의 저층수 제외) 평균체적은 23.23 \pm 2.42 $\times 10^{-2}$ -27.75 \pm 4.38 $\times 10^{-2} \mu\text{m}^3$ 의 범주에서 변화하여 우리나라 연안 생태계에서도 현미경으로는 관찰이 되나 배지에서는 잘 배양되지 않는 “mini-cell”이 많이 존재하고 있음을 알 수 있었다(Kogure *et al.*, 1979, 1980; Simidu *et al.*, 1983). 이러한 “mini-cell”은 토착적인(autochthonous) 세균(진정한 의미에서의 해양성 세균)들로 풍부한 유기물이 존재하는 데에서도 급속히 성장되지 않으며 오히려 높은 영양상태가 성장에 저해요인으로 작용할 수 있다는 보고가 있다(Carlucci and Shimp, 1974). 본 연구에서 측정된 많은 세균들이 왜 “mini-bacteria”로 나타났는지는 본 연구만으로는 정확히 알 수 없으나 Dawson 등(1981) 과 Kjelleberg 등(1982)에 의하면 해양환경에서 “mini-bacteria”로 존재하는 것은 Starvation시 체적을 적게하므로써 Starvation effect를 최소화 시키기 위한 방법의 하나로 설명하고 있다. 한편 간균의 경우도 평균길이가 1.0 μm 이하인 경우가 전체의 70% 이상을 차지하여(Table 4) 구균의 경우와 마찬가지로 “mini-cell” 형태로 많이 존재하고 있었다. 또한 계절적으로도 구균은 83-94%가 평균직경이 0.5 μm 이하였으며 간균의 경우도 0.5 μm -1.0 μm 사이의 균이 41-78%를 차지하고 있어(자료 미발

Table 4. Size distribution of rod-shaped bacteria and their biovolumes in the intertidal waters of the Yellow Sea near Kunsan

Range	Average diameter	<0.5 μm	Average
Site	($\times 10^{-1} \mu\text{m}$)	Observed number (%)	biovolume ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^3$)
S1	4.96 \pm 0.01	924(14)	1.62 \pm 0.02
B1	4.98 \pm 0.01	720(12)	1.47 \pm 0.03
S2	5.00 \pm 0.00	857(15)	1.42 \pm 0.02
B2	5.00 \pm 0.00	646(12)	1.40 \pm 0.02
S3	5.00 \pm 0.00	761(25)	1.38 \pm 0.01
B3	5.00 \pm 0.00	695(12)	1.40 \pm 0.03

Range	Average diameter	0.5 μm -1.0 μm	Average
Site	($\times 10^{-1} \mu\text{m}$)	Observed number (%)	biovolume ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^3$)
S1	7.27 \pm 0.06	3,595(56)	4.41 \pm 0.13
B1	7.24 \pm 0.06	3,342(57)	4.50 \pm 0.13
S2	7.06 \pm 0.06	3,049(56)	4.61 \pm 0.13
B2	7.15 \pm 0.07	2,884(57)	4.54 \pm 0.13
S3	7.20 \pm 0.06	3,572(58)	4.28 \pm 0.12
B2	7.11 \pm 0.06	3,324(60)	4.30 \pm 0.12

Range	Average diameter	1.0 μm -1.5 μm	Average
Site	($\times 10^{-1} \mu\text{m}$)	Observed number (%)	biovolume ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^3$)
S1	12.54 \pm 0.08	1,239(19)	7.51 \pm 0.36
B1	12.62 \pm 0.08	1,192(20)	7.94 \pm 0.36
S2	12.58 \pm 0.09	959(17)	7.29 \pm 0.37
B2	12.49 \pm 0.08	1,041(20)	7.01 \pm 0.33
S3	12.64 \pm 0.08	1,205(19)	7.36 \pm 0.34
B3	12.50 \pm 0.08	967(17)	7.13 \pm 0.36

Range	Average diameter	>1.5 μm	Average
Site	($\times 10^{-1} \mu\text{m}$)	Observed number (%)	biovolume ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^3$)
S1	18.70 \pm 0.39	586(9)	12.92 \pm 1.20
B1	18.83 \pm 0.43	577(9)	13.33 \pm 1.11
S2	19.38 \pm 0.58	535(9)	13.32 \pm 1.53
B2	19.27 \pm 0.55	458(9)	14.42 \pm 1.60
S3	19.49 \pm 0.50	583(9)	13.69 \pm 1.57
B3	18.44 \pm 0.47	470(9)	13.02 \pm 1.45

표) 해양환경에 존재하는 세균은 전계절을 통해 대부분이 “mini-cell” 형태로 많이 존재하고 있음이 확인되었다. 이상의 결과는 단지 현장에서 채집한 시료를 분석하여 얻은 결과이며 앞으로 실험실 연구를 통하여 해양환경에서 여러 환경요인과 “mini-cell”과의 관계를 밝힐 예정이다.

적 요

조간대 생태계에서의 세균군집의 구조와 기능을 이해하기 위한 기초조사로 군산인근 해역을 대상으로 군체수와 생체량의 년중동태를 AODC 법으로 측정하였으며 그 결과는 다음과 같다: 전 정점에서 간균이 74% 이상으로 측정되어 구균보다 출현빈도가 높았으며, 구균의 평균체적은 $3.19 \pm 0.59 \times 10^{-2}$ – $6.19 \pm 0.76 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$ 의 범주에서, 간균은 $4.57 \pm 0.17 \times 10^{-2}$ – $12.94 \pm 0.2 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$ 의 범주에서 변화하였다. 또한 구균은 표층수에서, 간균은 저층수에서 평균체적이 더 컸으며 구균과 간균 모두 군체수의 증가와 평균체적의 증가와는 상관관계를 보이지 않았다. 크기에 따른 분포는 구균의 경우 직경이 $0.5 \mu\text{m}$ 이하가 77-89%를 차지하였고, 간균은 평균길이가 $1 \mu\text{m}$ 이하가 70% 이상을 차지하여 조사대상 해양환경에서 대부분의 세균은 “mini-cell” 형태로 많이 존재하였다.

참 고 문 헌

1. 강찬수, 1988. 소양호에서의 종속영양 세균 군집의 분포 및 활성의 계절적, 공간적 변화. 석사학위논문. 서울대학교.
2. 김준호, 문형태, 1984. 해양간석지 생태계의 탄소, 질소 및 인의 동태. 서울대학교 자연과학 종합연구소. pp. 47.
3. 오상희, 고철환, 1991. 서해 만경-동진 조간대의 주요 우점 저서 규조류의 분포. 한국해양학회지. **26**, 24-37.
4. 최성찬, 1987. 수동천 수계에서의 세균의 분포와 생리적 활성도. 석사학위논문. 서울대학교.
5. Bakken, L.R. and R.A. Olsen, 1983. Buoyant densities and dry-matter contents of microorganisms: conversion of a measured biovolume into biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1158-1195.
6. Bell, R.T., G.M. Ahlgren and I. Ahlgren, 1983. Estimating bacterioplankton production by measuring [^3H] thymidine incorporation in a eutrophic Swedish lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1709-1721.
7. Carlucci, A.F. and S.L. Shimp, 1974. Isolation and growth of a marine bacterium in low concentrations of substrate. In R. R. Colwell and R.Y. Morita(eds.), Effect of the Ocean Environment of Microbial Activities. pp. 363-367. University Park press: Baltimore.
8. Dahle, A.B. and M. Laake, 1982. Diversity dynamics of marine bacteria studied by immunofluorescent staining on membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* **43s**, 169-176.
9. Daley, R.J. and J.E. Hobbie, 1975. Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique. *Limnol. Oceanogr.* **20**, 875-882.
10. Ferguson, R.L. and P. Rublee, 1976. Contribution of bacteria to standing crop of coastal plankton. *Limnol. Oceanogr.* **22**, 141-145.
11. Francisco, D.E., R.A. Mha and A.C. Rabin, 1973. Acridine orange epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **92**, 416-421.
12. Hagström, A., U. Larsson, P. Hörstedt and S. Normack, 1979. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 805-812.
13. Hobbie, J.E., R.J. Daley and S. Jasper, 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 1225-1228.
14. Jannasch, H.W. and G.E. Jones, 1959. Bacterial populations in seawater as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.* **4s**, 128-130.
15. Jordan, M.J. and G.E. Likens, 1980. Measurement of planktonic bacterial production in an oligotrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* **25**, 719-732.
16. Kjelleberg, S., B.A. Humphrey and K.C. Marshall, 1982. Effect of interfaces on small, starved marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1166-72.
17. Kogure, K., U. Simidu and N. Taga, 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. Microbiol.* **25**, 415-420.
18. Kogure, K., U. Simidu and N. Taga, 1980. Effect of phyto- and zooplankton on the growth of marine bacteria in filtered seawater. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. **46**, 323-326.
19. Lee, G.H., S.J. Kim, W.H. Lee and D.M. Lee, 1990. Seasonal distribution and characteristics of heterotrophic marine bacteria in the intertidal zone near Kunsan of Yellow Sea, Korea. *Kor. Jour. Microbiol.* **28**, 331-336.
20. Rodina, A.G., 1972. Methods in aquatic microbiology. pp. 149-180. University Park Press, Baltimore and Butterworth & Co. Ltd., London.
21. Simidu, U., W.J. Lee and K. Kogure, 1983. Comparison of different techniques for determining plate counts of marine bacteria. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. **49**, 1199-1203.
22. Staley, J.T. and A. Konopka, 1985. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 312-326.
23. Van Es, F.B. and L.A. Meyer-Reil, 1982. Biomass and metabolic activity of heterotrophic marine bacteria. In K. C. Marshall(ed.), Advances in Microbial Ecology, vol. 6. pp. 111-170. Plenum Publishing Corp., New York.
24. Van Veen, J.A. and E.A. Paul, 1979. Conversion of biovolume measurements of soil organisms, grown under various moisture tensions, to biomass and their nutrient content. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 686-692.
25. Zimmermann, R., 1977. Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron micro-

- scopy, In G. Rheinheimer(ed.), Microbial Ecology of a Brackish Water Environment. pp. 103-120. Springer-Verlag. Berlin.
26. **Zimmermann, R. and L.A. Meyer-Reil**, 1974. A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kieler Meeresforschungen*. **30**, 24-27.
- (Received December 2, 1991)**
(Accepted December 17, 1991)