

호수 생태계에서 살아있는 세균을 측정하기 위한 qDVC 방법의 적용

김미리 · 서은영 · 최승익¹ · 안태석*

강원대학교 환경학과, ¹강원대학교 환경연구소

호소수내의 '살아있는 세균'을 측정하기 위하여 quantitative direct viable count (qDVC) 방법을 적용하였다. qDVC방법에 적용되는 최적 glycine 농도는 2%였으며, '살아있는 세균'을 계수하는데 있어서 평판계수법, CTC법 보다는 qDVC 방법이 보다 효과적이라는 것을 확인하였다. qDVC 방법으로 '살아있는 세균'을 측정한 결과 다른 두 방법보다 2.4~6.0배 높은 값이었다. 또한 qDVC 방법은 '살아있는 세균'을 죽은 세포 또는 휴면세포와 쉽게 구별할 수 있었다.

Key word □ active bacteria, CTC, glycine, qDVC, viable cell

대사적으로 활성을 지닌 세균은 생태계에서 생산성, 영양염 회전율(nutrient turnover), 기질 이용 잠재력, 유기물의 분해 등과 관련된 생태학적 관점에서 총세균수보다 훨씬 더 유용한 정보를 제공한다(17). 수생태계에서 '살아있는 상태'의 세균을 계수하는 것은 매우 중요하다. 예로 소양호에서 β -glucosidase 활성도를 측정한 후 specific activity를 구한 결과, 총세균수(AODC)로 나누어 얻은 값은 1999년 8월과 9월에 큰 차이가 없었으나, '살아있는 세균'으로 나누어 specific activity를 얻은 값은 9월에는 8월보다 6.7배 더 높은 것으로 나타났다(1). 즉 '살아있는 세균'만이 β -glucosidase를 분비할 것이므로 1999년 8월과 9월의 경우 수생태계의 유기물 상태가 전혀 다르다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 이렇듯 수생태계에서 '살아있는 세균'을 검출하는 것은 수생태계의 다양한 정보를 얻을 수 있는 방법이다.

수생태계에서 세균을 광학현미경, 위상차 현미경으로 관찰하면 그 세균이 죽은 것인지, 휴지기 상태인지, 살아있는 상태(viable)인지를 확인할 수 없다. 형광현미경이 개발되고 DNA와 RNA에 결합하는 형광염료인 acridine orange로 염색할 경우, 젊은 세포는 주황색으로, 활성이 적은 세포는 녹색으로 보인다는 결과(11)에서 '살아있는 세균'의 비율을 측정할 수 있으나 판정기준이 모호하여 재현성이 매우 낮다.

'살아있는(viable) 세균'의 정의는 다양하다. 분열 중인 것을 살아있는 것으로 보아 분열 중인 세균의 비율(frequency of dividing cell; FDC)을 측정하는 방법이 있다(8). 이 방법은 생식능력이 있는 것을 현미경에서 직접 관찰, 계수하는 방법으로 노동집약적인 방법이었다. 이 방법은 후에 개발된 image analyzer와 결합하여 간편하게 측정값을 얻을 수 있었다. 또 다른 방법은 분열과정을 방해하는 물질인 nalidixic acid를 첨가하여 커진 세포를 활성이

있는 것으로 보는 것이다(13). 이 방법은 nalidixic acid 외에 pipemidic acid, piromidic acid 등 항생물질을 처리하여 '살아있는 세균'의 검출 비율을 높였다(14). 이러한 FDC, DVC 방법의 가장 큰 단점은 판정과 계측 과정에 숙달된 관찰자가 필요하다는 것이다(12).

또 다른 정의는 '전자전달계(ETS)가 활동한다는 것'을 '살아있는 것'으로 보는 것이다. 즉, 세균의 membrane에 존재하는 전자전달계에서 전자를 받아 formazan을 형성하여 색을 띠게 만들거나 형광을 띠게 하는 방법이다. 여기에 사용되는 물질로는 전자를 받으면 붉은색을 띠는 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT)(19), 형광을 띠는 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) 물질(17)을 이용하여 '살아있는 세균'을 확인하는 것이다. 이 방법은 앞의 FDC, DVC 보다는 '살아있는 세균'의 비율이 높게 나타났다. 그러나 이 방법은 기질인 INT와 CTC가 세포를 투과하여야 하므로 세균에 따라 음성으로 나타나는 단점이 있고, 사용하는 물질 자체가 독성이 있으며, 현미경관찰시 fade out 현상 등으로 오류를 유발하기도 한다(17).

이러한 단점들을 보완하기 위해 개발된 방법이 quantitative direct viable count (qDVC)법이다. qDVC법은 DVC법을 변형시킨 것으로 항생물질과 glycine 처리를 통해 spheroplast를 형성한 세균을 선택적으로 용해시키는 방법이다. 배양 시 첨가되는 glycine은 세균이 성장, 분열하는 과정에서 peptidoglycan의 합성을 방해하여 세포벽을 느슨하게 하는 역할을 한다(9). 이러한 glycine의 영향으로 세포벽이 완전하게 형성되지 않은 sphaeroplast는 freeze-thaw 처리법에 의해 용해되어 사라진다. 반면에 휴지기에 있거나 죽은 세균은 이미 형성된 세포벽이 있어, freeze-thaw 과정에서 세포가 용해되지 않는다. 이러한 원리를 응용하여 '살아있는 세균'을 측정하는 것이 바로 qDVC 방법이다(18).

qDVC 방법 중 가장 중요한 것은 세균의 세포벽 형성을 방해하는 glycine의 농도이다. Glycine 농도가 낮으면, peptidoglycan

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-33-250-8574, Fax: 82-33-251-3991
E-mail: ahnts@kangwon.ac.kr

합성을 충분히 방해하지 못하고, glycine 농도가 높으면 휴지기 등에 있는 세균을 용해하여 정확한 측정이 어렵다. 따라서 qDVC 방법을 사용하려면 우선 glycine 농도를 확정하여야 한다.

여기에서는 담수 환경에서 '살아있는 세균'을 정확하게 측정하기 위하여 qDVC 방법을 적용하였고, 최적 glycine 농도를 확인하였다. 그 다음에 영양상태가 다른 호수에서 '살아있는 세균'을 이 방법으로 측정하였고, 기존의 측정 방법인 평판계수법과 CTC 환원법과 비교하였다.

재료 및 방법

공시균주

이 qDVC를 이용하여 분석 할 대상이 주로 호소수이며, 소양호의 경우 세균의 약 80% 이상이 Gram 음성에 속하는 세균이다(2). 따라서 공시균주는 Gram 음성균주를 선택하였고, 서울대학교 미생물 균주센터에서 *Escherichia coli* 10080 균주를 분양받아 사용하였다. '살아있는 세균'은 4시간 배양된 것을 사용하였고, '휴지기 이거나 죽은 세균'은 24시간 배양된 것을 사용하였다. 이들은 acridine orange로 염색하여 형광현미경(Olympus BX60, Exciting filter:B, Lamp:Mercury lamp HBO 100W/2)으로 검정한 결과 각각 주황색과 초록색을 띠고 있어 명확하게 구분이 가능하였다.

qDVC방법에서 최적 glycine 농도 확인

최적 glycine 농도를 결정하기 위해 EC broth에서 4시간 배양한 *E. coli* 와 24 시간 배양한 *E. coli* 배양액 9 ml 를 각각 멸균된 50 ml conical tube에 넣고 여기에 cephalixin (0.01%) 1 ml, nalidixic acid (0.02%) 1 ml, yeast extract (2.5%) 50 µl를 첨가한 후 glycine의 최종 농도를 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0%로 하여 24시간 암실에서 배양하였다. 배양 후 액체질소에 급랭하는 freeze-thaw 처리를 한 뒤(18), acridine orange로 염색한 후 형광현미경으로 검정하였다.

조사 대상 지역 및 기간

소양호, 파로호(구만리, 태산리 2곳 등 총 3곳), 의암호(공지천 합류부) 등 5곳의 호수에서 2003년 9월부터 2003년 10월 중 채수하여 분석하였으며, 모든 시료는 3회 반복하여 실험하였다.

총세균수

총세균수 측정은 Acridine orange direct count (AODC) 방법을 사용하였으며, 형광현미경을 이용하여 계수하였다.

활성세균수

평판도말법

평판도말법은 R2A broth (Difco, USA)에 agar를 첨가한 고체 배지를 사용하였다. 멸균된 고체 배지 상에 시료를 15~20 µl 주입 후 도말하여 25°C의 배양기에 넣어 colony를 형성한 것을 '살아있는 세균'으로 계수하였다. 모든 시료의 분석은 3회 이상

반복 하였으며, 콜로니 숫자가 30~300개 사이의 자료를 사용하였다.

CTC 환원법

멸균된 cap tube에 채취한 시료 5 ml과 미리 멸균된 R2A broth 4 ml, 5 mM 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) stock solution 0.2 ml을 넣고, 현상온도의 암실에서 1시간 동안 shaking 하면서 배양한 후(17), 형광현미경(Olympus BX60, Exciting filter:G)으로 계수하였다. '살아있는 세균'은 형광을 띠는 것으로 하였다.

qDVC법

멸균된 50 ml conical tube에 시료 9 ml과 cephalixin (0.01%) 1 ml, nalidixic acid (0.02%) 1 ml, yeast extract (2.5%) 50 µl, glycine (최종농도: 2%)을 첨가하여 현상온도에서 24시간 동안 암실 배양한 후, 액체질소에 급랭하는 freeze-thaw 처리를 한 뒤 (18) AODC방법으로 계수하였다. '살아있는 세균'의 수는 총세균수 값에서 qDVC법으로 나타난 세균수를 감하여 계산하였다.

결 과

최적 glycine 농도 결정

최종농도가 4% 이상인 glycine을 실험에 사용할 경우, '살아있는 세균'뿐 만 아니라 '휴지기 이거나 죽은 세균'의 세포막에도 glycine이 작용하여 세균수가 감소하는 것을 예비 실험을 통하여 확인하였다. 최적 농도 결정의 정확성을 높이기 위해 glycine 농도를 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3%로 하여 EC broth 에 24시간과 4시간 배양한 *E. coli*에 각각의 농도를 넣어 배양한 결과, '휴지기이거나 죽은 세균'으로 구분되는 24시간 배양한 *E. coli*는 glycine 농도에 거의 영향을 받지 않았지만, glycine 농도가 2.5% 이상일 경우 그 균체수가 glycine을 넣지 않았던 초기에 비해 약 1.3~1.5배 감소하는 것이 관찰되었다. '살아있는 세균'으로 볼 수 있는 4시간 배양된 *E. coli*는 초기 균체수가 0.5% glycine을 넣어 배양하였을 때, glycine 처리하지 않은 것의 약 1/5 수준으로 감소하였고, glycine 농도 증가에 따라 점차적으로 감소하였다(Fig. 1). 이 결과에서 향후 사용하는 qDVC 방법에서 glycine의 농도는 2.0%로 정하여 사용하였다.

qDVC 방법의 정확성 확인

qDVC법에 의하여 '살아있는 세균'만 용해된다는 것을 증명하기 위해 *E. coli* 공시균주에 이 방법을 적용해 보았다. 4시간 배양한 *E. coli*, 즉 살아있는 *E. coli*를 qDVC법으로 처리하고 형광현미경으로 관찰한 결과 매우 적은 수의 세균만 검출되었다. 반대로 24시간 배양한 *E. coli*의 경우 qDVC법으로 처리하고 형광현미경으로 관찰한 결과 많은 수의 세균이 관찰되었다(Fig. 2). 이 실험에서 얻어진 결과는 Table 1과 같다. 즉, 이 qDVC 방법은 glycine 처리과정과 freeze-thaw 과정을 통하여 '죽었거나 휴지기인 상태의 세균'은 용해되지 않는다는 것을 확인하였다. 그

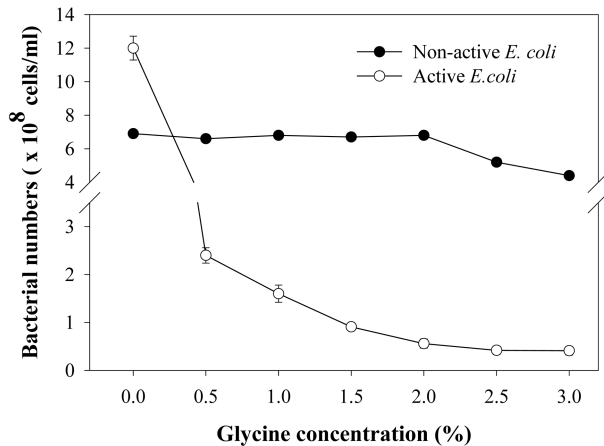


Fig. 1. Proportion of inactive and active *E. coli* according to glycine concentration.

리고 ‘살아있는 세균’은 이 두 과정을 거치면서 완전히 용해되는 것을 확인하였다.

호수 시료에서 평판계수법, CTC 법과 qDVC 방법의 적용

각 호수에서 ‘살아있는 세균’을 검출하기 위하여 평판계수법, CTC법과 qDVC 방법을 적용하여 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 소양호의 총세균수에 대한 ‘살아있는 세균’의 비율은 각각 평판계수법은 6.1~7.9%, CTC 환원법은 13.9~19.9%였다. 그러나 qDVC법을 적용한 경우 평판계수법과 CTC환원법에 비해 각각 6.0배, 2.4배 높은 41.2~45.6%의 비율이었다.

파로호에서도 소양호와 유사한 결과이었다. 파로호의 구만리

선착장에서 채수한 시료에서 총세균수에 대한 ‘살아있는 세균’의 비율은 평판계수법 6.0~8.2%, CTC 환원법 15.4~17.2%, qDVC 법 32.0~44.3%의 비율을 보였다. 또한 파로호에 생태복원용으로 설치된 인공식물섬 주변에서는 총세균수에 대한 ‘살아있는 세균’ 비율이 qDVC방법을 적용하였을 경우 평판계수법의 4.5배, CTC 방법의 2.1배 높은 결과로 호수수와는 큰 차이가 없었다.

의암호의 경우, 총세균수에 대한 ‘살아있는 세균’의 비율이 평판계수법은 9.1~9.9%, CTC환원법은 20.9~24.0%이었다. 그리고 같은 시료에 qDVC법을 적용한 결과, 활성세균의 비율이 32.7~39.0%로 나타났다. 빈-중영양호인 소양호와 파로호와는 다르게 평판계수법과 CTC환원법으로 측정한 ‘살아있는 세균’의 비율이 다른 호수보다 약간 높았다. 그러나 qDVC 방법으로 측정한 ‘살아있는 세균’의 비율은 유사하였다.

고 찰

자연계에 존재하는 살아있는 세균 중 일부는 환경 조건에 따라 일시적으로 휴지기 상태일 수 있고, 이는 세균의 생존 전략이기도 하다(16). 예로 태양광에 의한 radical 생성, 직접적인 자외선의 피해 등 때문에 세균이 휴지기로 변할 수도 있다 (10). 그 외 영양소 부족 등과 같이 환경조건 변화에 따라 ‘살아있는 세균’의 분포가 달라진다.

소양호에서 총세균수와 DVC 방법으로 측정한 ‘살아있는 세균’의 수평 수직적 분포는 서로 상관성이 낮다(3). 또, 식물플랑크톤의 종조성이 바뀔 때에 ‘살아있는 세균’의 변화가 극심한 것도 이 둘의 생태계 구성원 간에 밀접한 관계가 있음을 알려준다(1). 호수 생태계에서는 ‘살아있는 세균’만이 물질 분해, 순환, 먹이

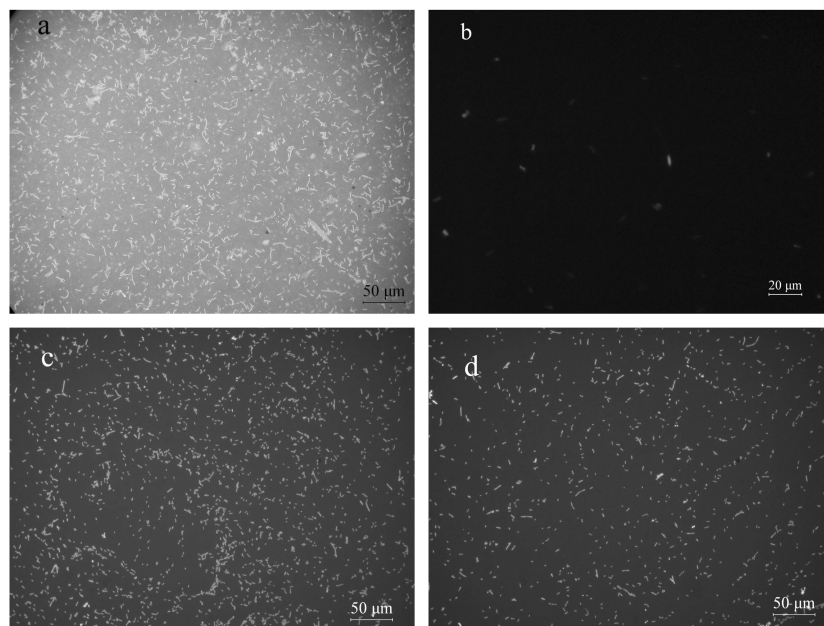


Fig. 2. Microphotograph of typical viable bacteria (up) and dead and/or dormant bacteria(down). (a : viable cells, b : viable cells - after freeze-thaw treatment, c : dead and/or dormant cells, d : dead and/or dormant - after freeze-thaw treatment)

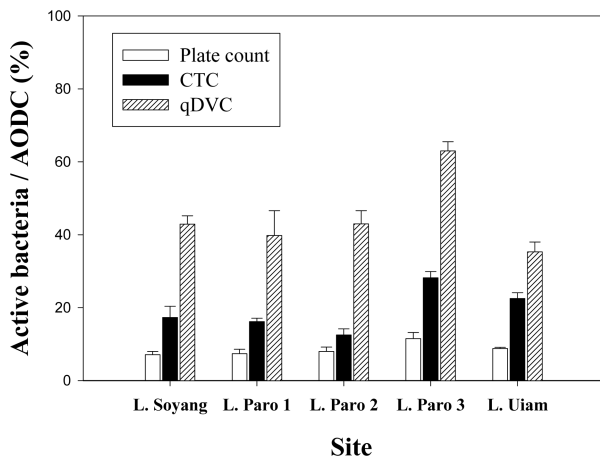


Fig. 3. Proportion of viable bacterial numbers detected by plate count, CTC and qDVC methods in lakes.

연쇄에 직접적으로 관여하므로 ‘살아있는 세균’을 측정하는 것은 미생물 생태학에서 주요한 연구 대상이었다. 기존의 ‘살아있는 세균’을 측정하는 방법들은 생리 대사 과정 산물을 이용하는 방법이었다. 이 방법들은 미약한 생리 대사일 경우에는 확인이 어려운 단점이 있었다. 이 단점을 보완하여 새로이 제안된 qDVC는 세포벽의 형성을 억제하는 glycine을 처리하고 항생제와 급격한 온도의 변화로 세포의 용해를 유도하는 방법이다.

qDVC 방법 중 주요한 과정은 glycine에 의한 sphaeroplast 형성, nalidixic 등 항생제와 freeze-thaw 과정에서 sphaeroplast의 용해과정이다. Glycine은 peptidoglycan 전구물질을 형성할 때에 alanine과 경쟁적인 위치에 있게 되며(15), 다량으로 외부에서 glycine을 넣어줄 경우, 세균의 세포벽이 구성이 바뀌게 된다. 한 예로 methicillin 내성 *S. aureus*의 경우, 다량의 glycine을 넣어준 배지에서 배양한 결과 methicillin 감수성이 증가한 것은 바로 세포벽의 형성이 제대로 이루어지지 않았기 때문이다(7). 즉, 다량으로 넣어 준 glycine은 세균의 세포벽 구성을 변화시켜, 항생제와 freeze-thaw 처리와 같은 과정에서 완전히 용해된다(9). 이러한 glycine의 적정 처리 농도를 확인한 예비실험 결과, glycine의 농도가 4.0% 이상일 경우 ‘죽거나 휴지기인 세균’은 50.0% 정도가 용해되는 것으로 확인되었다. 이 결과에서 다음과 같은 가정이 가능하다. 첫 째는 ‘죽거나 휴지기인 세균’에서도 glycine 농도가 높은 상태에서 24시간 배양되는 동안 일부 세포벽 형성이 일어나고 있고, 이 과정에서 형성된 세포벽이 온도의 급격한 변화에 의하여 용해되는 것으로 사료된다. 또 다른 가정은 세포벽을 구성하고 있는 alanine이 높은 외부의 glycine에 의하여 glycine으로 치환되어 물리적 변화에 의하여 세포벽이 용해된다

는 것이다. 이 연구에서는 glycine 농도가 2%일 경우에 ‘살아있는 세균’은 배양과정에 포함된 항생제와 액체 질소 처리와 같은 물리화학적 처리과정에서 완전하게 용해되었고, ‘죽거나 휴지기인 세균’은 용해 비율이 매우 낮았다. 이러한 결과는 qDVC 방법에서 glycine 처리 농도를 결정하는 것이 선행되어야 한다는 것을 알려준다.

소양호에 존재하는 활성세균의 비율을 측정해 본 결과, qDVC법을 적용하였을 경우 검출된 활성세균 비율이 평판계수법과 CTC 환원법에 의한 것보다 약 2.4~6.0배 높은 45.6%까지 나타나, qDVC법의 활성세균 검출율이 훨씬 높았다. 같은 실험을 공지친, 파로호에 적용한 경우에도 소양호의 경우와 마찬가지로 qDVC법을 통한 활성세균의 검출 비율이 평판계수법이나 CTC 환원법보다 2.1~5.5배 높게 측정되어, qDVC법이 활성세균을 계수하는데 있어서 기존의 방법들에 비해 더 효과적이라는 결론을 내릴 수 있었다. 또한 Yokomaku *et al.*(18)의 연구에서 qDVC법을 하천과 온천에서 적용한 결과, 평판계수법과 CTC 환원법보다 약 2.3~5.5배 높은 63.8%로 검출되어 본 실험과 비슷한 검출율을 나타내었다.

호수의 영양 상태에 따라 각 방법으로 측정된 ‘살아있는 세균’의 검출율의 차이는 나타나지 않았고, 검출 비율은 평판계수법 < CTC 환원법 < qDVC 방법 순으로 높았다. 즉, qDVC 방법이 기존의 방법보다 ‘살아있는 세균’을 검출하는 데에 더 유용함이 확인되었다.

평판계수법이 자연 생태계에서 ‘살아있는 세균’을 검출하는 데에 적절하지 못하다는 것은 이미 잘 알려져 있다. 즉, 모든 세균에게 알맞은 배지 조성이 어렵고, 배양환경이 자연환경을 정확하게 재현하지 못하다는 등의 이유가 있다(5). 또, CTC 환원법은 전자전달계의 활성을 확인하는 과정에서 다음과 같은 문제가 있어 정확한 검출이 어렵다. 즉, CTC는 세균의 세포벽을 통과하여 세포내로 들어 가야하며, 세포내 호흡과정을 완전히 거쳐야 하고, 세균의 대사활성도가 매우 활발하여야 CTC formazan이 형성된다(6). 따라서 CTC 방법의 경우, 전자전달계의 활성이 미약한 경우 전자를 quencher한 CTC formazan이 소량 형성되어 ‘살아있는 세균’이 관찰이 되지 않는 경우가 있다. 또 다른 이유로 세포 안에 들어온 CTC와 환원된 CTC formazan이 세포 물질 대사를 방해하는 물질로 작용할 수 있다는 것이다(17). 이러한 이유로 CTC 환원법에서는 ‘살아있는 세균’을 정확하게 측정할 수 없다.

qDVC 방법은 세균의 peptidoglycan 생성을 방해하는 원리를 이용하여 측정한다. 이번 연구에서는 Gram 음성균이 많은 호수 수에서는 매우 유용한 방법임이 확인되었다. 앞으로 Gram 양성균이 분포하는 토양생태계 등에 적용하기 위하여 반드시 사전에 glycine 농도, lysozyme 처리(4) 등 peptidoglycan 형성을 방해하는 기작과 세포막을 용해하여 물질 투과율을 높이는 방안을 강구하는 등의 방법을 응용하는 새로운 방법을 개발하여야 한다.

Table 1. The numbers of *E. coli* before and after freeze-thaw treatment

Incubation time	Before freeze-thaw treatment	After freeze-thaw treatment
4 hr	12.0±0.1×10 ⁸ cells ml ⁻¹	0.6±0.1×10 ⁸ cells ml ⁻¹
24 hr	6.9±0.02×10 ⁸ cells ml ⁻¹	6.6±0.2×10 ⁸ cells ml ⁻¹

참고문헌

1. 석정현, 홍선희, 김범철, 안태석. 2001. 소양호에서 활성

- 세균수의 계절적·수직적 변화. 한국미생물학회지. 37, 80-84.
2. 이동훈, 안태석, 조규송. 1990. 소양호에서의 종속영양세균의 종 구성 및 alkaline phosphatase 분비 세균에 관한 연구. 한국미생물학회지. 28, 204-219.
 3. 최승익. 1996. 소양호의 세균개체수와 활성도 변화에 관한 연구. 이학박사학위논문, 강원대학교.
 4. 홍선희, 김옥선, 송홍규, 이동훈, 안태석. 2001. Bacillus 속 세균을 검출하기 위한 fluorescent in situ hybridization 방법의 개발. 한국미생물학회지. 37, 204-208.
 5. Amann, R., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1994. Identification of uncultured bacteria: A challenging task for molecular taxonomists. *ASM news*. 60, 360-365.
 6. Creach, V., A.C. Baudoux, G. Bertru, and B.L. Rouzic. 2003. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *J. Microbiol. Methods* 52, 19-28.
 7. De Jonge, B.L., Y.S. Chang, N. Xu, and D. Gage. 1996. Effect of exogenous glycine on peptidoglycan composition and resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *J. Antimicrob. Chemother.* 40, 1498-1503.
 8. Hagstrom, A., U. Larsson, P. Horstedt, and S. Normark. 1979. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 805-812.
 9. Hammes, W., K.H. Schleifer, and O. Kandler. 1973. Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 116, 1029-1053.
 10. 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.
 11. Hobbie, J.E., R.F. Daley, and S. Japer. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1225-1228.
 12. Joux, F. and P. LeBaron. 1997. Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3643-3647.
 13. Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25, 415-420.
 14. Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga. 1984. An improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* 102, 117-122.
 15. Neuhaus, F.C. and W.P. Hammes. 1981. Inhibition of cell wall biosynthesis by analogues of alanine. *Pharm. Ther.* 14, 265-319.
 16. Novitsky, J.A., and R.Y. Morita. 1978. Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions. *Mar. Biol.* 48, 289-295.
 17. Rodriguez, G.G., D. Phipps, K. Ishiguro, and H.F. Ridgway. 1992. Use of a fluorescence redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1801-1808.
 18. Yokomaku, D., N. Yamaguchi, and M. Nasu. 2000. Improved direct viable count procedure for quantitative estimation of bacterial viability in freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5544-5548.
 19. Zimmermann, R., R. Iturriaga, and J. Becker-Birck. 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 926-935.

(Received August 9, 2006/Accepted September 24, 2006)

ABSTRACT: Application of qDVC Method for Measuring Viable Cells in Lakes

Mi Ree Kim, Eun Young Seo, Seung Ik Choi¹, and Tae Seok Ahn* (Dept. of Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea. ¹Institute of Environment Research, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

For measuring the viable cells in lakes, quantitative direct viable count (qDVC) method is applied. In the qDVC process, the final concentration of glycine is fixed as 2%. For confirming the effectiveness of qDVC for enumerating the viable cells, the viable bacterial numbers were measured by plate count, CTC reduction method and qDVC method at 5 different lakes. Among these 3 methods, the bacterial numbers by qDVC is 2.4~6.0 times higher than those by the other 2 methods. And by the qDVC method, the viable cells were easily discriminated from dead or dormant cells.