

## *Paramecium bursaria* 와共生하는 *Chlorella* 의 光合成에 관한 研究

張 楠 基 · 趙 正 一 · 河 權 秀

(서울대학교 師範大學 生物教育科)

### A Study on the Photosynthesis of *Chlorella* Symbiotic with *Paramecium bursaria*

Chang, Nam-Kee, Jung-Il Cho and Kwuen-Soo Ha

(Dept. of Biology, College of Education, Seoul National University)

#### ABSTRACT

The relationship of *Paramecium bursaria* with its symbiotic *Chlorella* was studied in the view-point of photosynthesis and its product movement. The following results were obtained. In 1/10 dilution of bacterized medium green *Paramecium* grew and survived better than colorless *Paramecium*.

*P. bursaria* was competitively related to its symbiotic algae as far as the change of total chlorophyll contents was concerned. Therefore, in continuous darkness total chlorophyll contents of green *Paramecia* decreased proportionally to the time course. Under the condition, on the other hand, that the bacterized medium was not replenished over 10 days, total chlorophyll contents in *P. bursaria* increased by over 2 times as much as those in normal condition.

By means of Oxygen Diometer it was assured that green *Paramecium* was able to utilize the great part of oxygen evolved photosynthetically by its symbiotic algae. Also when light was given many starch grains were found in symbiotic *chlorella* through electron micrography.

These data suggested that *P. bursaria* was photosynthetically given lots of benefit by its symbiotic *chlorella*.

#### 緒 論

*Paramecium bursaria* 와 *Chlorella* 間에는 먹이에 의한 相利共生關係가 있다는 것이 밝혀졌다(Kimball, 1977). *Chlorella* 는 宿主인 *Paramecium* 에게 光合成의 結果 合成된 同化物質을 提供하며 *Chlorella* 는 宿主로부터 同化에 必要한 無機物을 쉽게 얻을 수 있는 利點이 있는 것으로 알려졌다(Margulis, 1981). 이에 對한 間接的 證據로서 첫째 共生하지 않는 *Chlorella* 가 살 수 있는 無機培養液에서 共生하는 *Chlorella* 가 살 수 없다는 點과 둘째 暗處理下에서 共生하는 *Chlorella* 의 呼吸率이 宿主와 比較하였을 때 매우 크다는 點 등을 들 수 있다.

한편  $^{14}\text{CO}_2$  로 標識한 實驗을 통하여 同化物質의 移動을 調査해 본 結果 共生하는 *Chlorella* 는 炭素同化作用에 의해 合成되는 同化物質中 多量을 自身の 細胞 밖으로 放出하는 반면에 共生하지 않는 *Chlorella* 는 同化物質을 거의 외부로 放出하지 않는다는 事實이 밝혀졌다(Muscatine *et al.*, 1967). Brown 과 Nielsen (1974)은 共生하는 *Chlorella* 에서 만들어진 maltose, glucose 등의 同化物質이 數分後에는 宿主인 *Paramecium* 으로 移動해감을 밝혀냄으로써 共生하는 *Chlorella* 가 그 宿主에게 營養을 供給하여 준다는 事實이 確신했다. 또한 Pado(1967)는 *Paramecium* 과 共生하는 *Chlorella* 의 Hill reaction 이 빛의 세기, *Chlorella* 의 個體數 및 光合成色素에 의존함을 보고하였다.

그러므로 本研究에서는 宿主와 그 共生體間의 關係

를 生理生態學的 側面에서 確認하기 위하여 共生하는 *Paramecium*의 生長速度에 미치는 *Chlorella*의 영향, 暗處理下에서 감소하는 *Paramecium*內的 *Chlorella*數, *Chlorella*와의 共生에 의한 *Paramecium*의 크기 變化 그리고 電子顯微鏡과 Hill reaction에 의한 *Paramecium*內에서의 光合成을 調査하여 宿主와 그 共生體間의 物質交換關係를 밝히고자 研究하였다.

## 材料 및 方法

### *Paramecium*의 採取와 培養

實驗에 使用한 *Paramecium bursaria*는 1982年 서울大學校 자하연에서 採取하였으며 그중 한 個體團을 分離하여 growth chamber에서 培養하였다. 培養液은 1,000 ml의 蒸溜水에 10g의 糞을 넣고 15~20分 동안 끓인후 室溫에서 1日間 放置하여 使用하였다. *Paramecium*의 接種時에는 이 培養液을 2培로 희석하여 使用하였다. growth chamber內的 照度는 4개의 FL-20D에 의해 약 2,000 lux를 유지하였으며 10/14 light-dark cycle를 지속시켰다. 溫度는  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 調節하였다. 暗處理는  $25^\circ\text{C}$ 의 恒溫器에서 行하였고 實驗期間中 3日에 한번씩 培養液을 갈아주었다.

*Paramecium bursaria*는 光學顯微鏡下에서 共生하는 *Chlorella*에 의해 綠色으로 보인다. 이러한 상배의 *Paramecium*을 green *Paramecium*이라고 부른다. 그러나 暗處理를 하여 共生하는 *Chlorella*를 모두 除去하였을 때에는 光學顯微鏡下에서 透明하게 보이며 이것을 colorless *Paramecium*이라고 한다.

### *Chlorella*의 分離와 培養

배양한 green *Paramecium*을 1分間 1000 rpm의 速度로 遠心分離하여 수확한 후 Sonicator로 amplitude 9에서 10秒間 처리하고 2000 rpm으로 5分間 遠心分離하여 *Chlorella*를 분리하였다. 이것을 Norris-Calvin 培養液에 0.1% peptone과 2% agar를 섞어 만든 agar plate에 接種한 후 growth chamber에서 培養하였다.

### 生長率의 測定

*Paramecium*의 生長率을 測定하기 위해 처음 5個體(Fig. 1과 2)와 100個體(Fig. 3)씩을 各各  $\phi 35 \times 10$  mm의 disposable tissue culture dish(Falcon)에서 培養하였고 每日 午後 5~6時에 海부현미경( $\times 20$ )으로 그數를 세었다. 5回 반복하여 그 平均値를 data로 택하였다.

### 光合成色素의 定量分析

光合成色素試料 0.2ml에 0.8 ml의 80% acetone을 넣어 光合成色素를 抽出한 후 663과 645nm에서 吸光度를 測定하여 Chang等(1981)의 方法에 依하여 總光合成色素量을 定量하였다.

### Hill reaction의 測定

開放界에서  $\text{N}_2$ 를 使用하여  $\text{O}_2$ 를 充分히 除去한 蒸溜水로 各各 2 ml의 *Chlorella*와 green *Paramecium*을 취하여 Oxygen Diometer(Fisher Scientific Co.)로 酸素의 移入移出量을 定量하여 Hill reaction을 測定하였다(Degn et al., 1973).

### 電子顯微鏡에 의한 同化物質觀察

光을 處理한 green *Paramecium*과 暗處理를 한 green *Paramecium*을 4% glutaraldehyde로 前固定한 후 다시 pH 7.4의 2%  $\text{OsO}_4$ 로 固定하였으며 alcohol 濃度 上昇順으로 脫水하여 Epon 812 混合液으로 包埋하였다(Chung et al., 1974) 이것으로 觀察試料를 만들어 電子顯微鏡으로 檢鏡하였다.

## 結果 및 考察

### 共生 *Chlorella*가 宿主 *Paramecium*의 生長에 미치는 영향

共生하는 *Chlorella*가 宿主인 *Paramecium*의 生長에 미치는 영향을 調査하기 위하여 먹이가 充分한 培養液에서 green *Paramecium*과 colorless *Paramecium*의 個體數의 變化를 調査한 結果는 Figs. 1과 2에서 보는 바와 같다.

Figs. 1과 2의 結果에 의하면 먹이가 充分한 條件에서는 green *Paramecium*이나 colorless *Paramecium*의 生長이 빛의 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 빛과 어두움을 하루에 각각 10, 14時間씩 반복 處理한 條件(LD)과 계속적으로 어두움 속에 放置한 條件(DD)에서 green *Paramecium*과 colorless *Paramecium*의 生長을 比較해 보았을 때 兩條件 모두 colorless *Paramecium*의 個體數가 더욱 增加하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 Karakashian(1975)은 먹이가 充分한 培養液에서 LD와 DD의 경우 모두 green *Paramecium*의 個體數가 더욱 增加하는 것으로 보고하였다. 이 結果를 本實驗結果와 比較하여 볼 때 차이가 있는 것은 使用한 培養液의 種類, 量 및 培養日數 等の 差異에 기인하는 것으로 생각된다(Thiele et al., 1980). 그러므로 먹이가 充分치 못한 培養液에서 green *Para-*

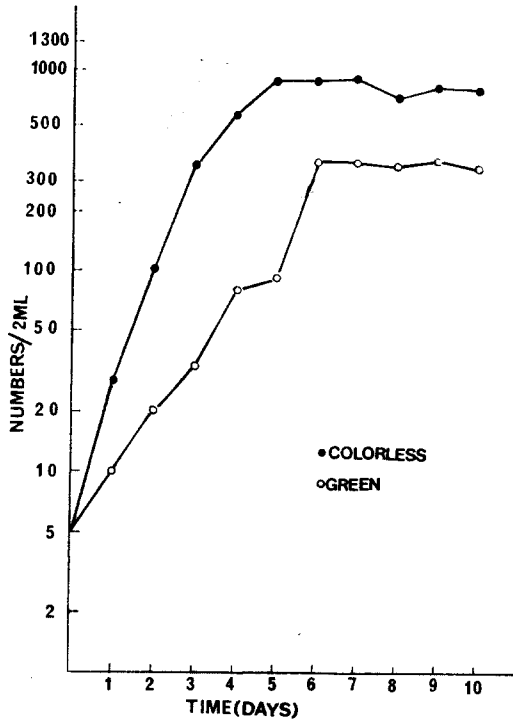


Fig. 1. Growth of green and colorless *Paramecia* in a fully bacterized medium in LD(10h light, 14h dark).

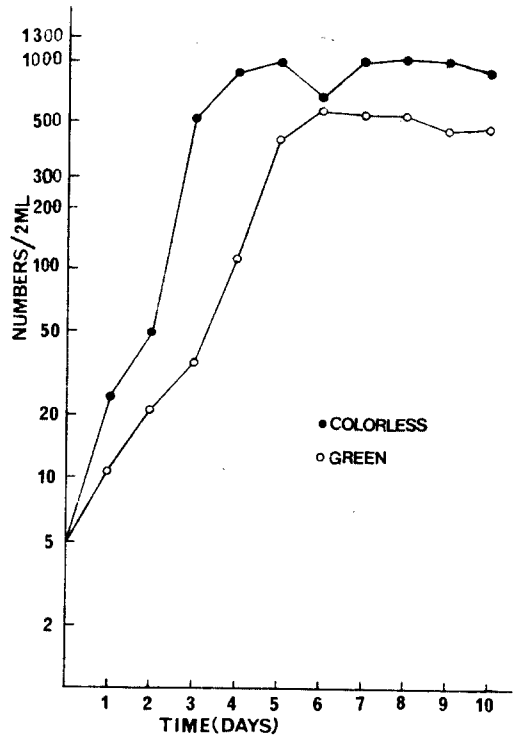


Fig. 2. Growth of green and colorless *Paramecia* in a fully bacterized medium in DD(continuous darkness).

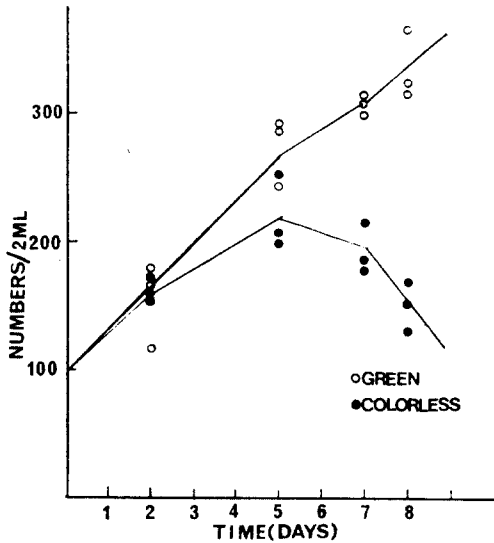


Fig. 3. Effect of diluted bacterized concentration on growth of green and colorless *Paramecia* under diurnal illumination(10h light, 14h darkness).

*mecium*과 colorless *Paramecium*의 生長率을 調査해 볼 필요가 있다.

上記實驗에서 사용한 培養液의 濃度を 10倍로 희석하고 green *Paramecium*과 colorless *Paramecium*을 培養하여 生長率을 調査한 結果는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. Figs. 1과 2에서 얻은 實驗結果와는 달리 이 實驗에서는 green *Paramecium*의 個體數가 colorless *Paramecium*의 個體數의 增加率보다도 높다는 것을 알 수 있었다. colorless *Paramecium*은 5日까지는 점차로 個體數가 增加하여 5日에 最大値를 나타내었고 6日부터는 個體數가 減少하는 것을 관찰할 수 있었다. 이 實驗結果로 推定하여 볼 때 먹이가 充分치 못한 培養液에서 green *Paramecium*은 共生하는 *Chlorella*로부터 光合成에 依해 合成한 營養을 보충받기 때문에 Fig. 3에서 보는 바와 같이 계속하여 個體數가 增加하나 colorless *Paramecium*의 경우는 培養液에 포함되어 있는 먹이의 營養分이 5日까지는 不足하지 않으나 그 以後부터는 점차로 營養分의 不足이 생기기 때문이

라고 생각된다. 自然條件과 같이 먹이가 充分치 못한 境遇에서는 *Chlorella*가 그 宿主에 光合成產物을 提供하며 宿主는 *Chlorella*에게 濃縮된 無機物을 供給하여 據으로써 相互利益을 얻고 있는 것이다(Karakashian, 1975).

또한 個體數의 比較 뿐만 아니라 green *Paramecium*과 colorless *Paramecium*의 크기를 調査하였다. 그 結果는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 크기에 있어서는 green *Paramecium*이 colorless *Paramecium* 보다 3~5倍 程度 크다는 것을 알 수 있었으며 green *Paramecium*의 크기는 共生하고 있는 *Chlorella*의 個體數에 依存되는 것으로 사료된다.

#### 暗處理下에서의 光合成色素分解

Green *Paramecium*을 25°C에서 暗處理하였을 때 總光合成色素量은 暗處理期間에 거의 比例적으로 減少하였으며 時間이 경과함에 따라 그 減少량은 줄어들었다(Fig. 5).

Siegel(1960)에 의하면 *Paramecium bursaria*는 暗處理하였을 때 각 stocks에 따라 光合成色素의 減少

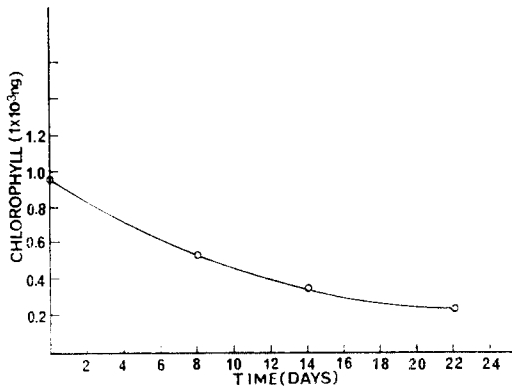


Fig. 5. Total chlorophyll contents (ng/32,200 paramecia) decreasing proportionally to the time course in DD.

率이 각각 다르다고 하였다. 暗處理한 *Paramecium*을 光學顯微鏡으로 觀察하였을 때 暗處理를 하면 할 수록 (Fig. 6, a-1~a-5) 共生하는 *Chlorella*의 크기가 작아지고 그 數가 減少하는 것을 確認하였다. 共生하는 *Chlorella*는 照明下에서는 消失되지 않고 暗處理下에서는 消化 혹은 分解되어 消失되어 버리는 理由에 관하여는 아직 明確하게 알려지지 않았다. 그러나 Karakashian(1975)은 *Chlorella*內에는 *Paramecium*의 消化酵素를 억제하는 物質을 放出하는 機作이나 *Paramecium*의 消化酵素가 자기를 둘러싸고 있는 phago-

some으로 分泌되는 것을 抑制하는 機作이 있을 것이라고 보고한 바 있다. 그 한 例로서 같은 種은 아니지만 *Toxoplasma gondii*의 경우 lysosome內의 酵素가 parasite를 둘러싼 vacuole에 接近하지 못하게 하는 機作을 가지고 있다는 사실이 밝혀졌다(Jones and Hirsch, 1972). 또한 培養液을 갈아주지 않고 10日以上 放置해 두었을 때 32,000個體의 *Paramecium*當 含有되어 있는 總光合成色素量은  $1.98 \times 10^3$ ng으로 正常的인 培養液에서 자란 것보다 2倍以上이나 되며 光學顯微鏡으로 觀察하여 볼 때 매우 조밀하게 *Chlorella*가 들어 있음을 確認할 수 있었다(Fig. 6, b). 이러한 *Paramecium*은 매우 느리게 움직이었다. 이것은 培養條件에 따라 일어나는 宿主와 共生體間의 不均衡에서 오는 結果로 생각된다.

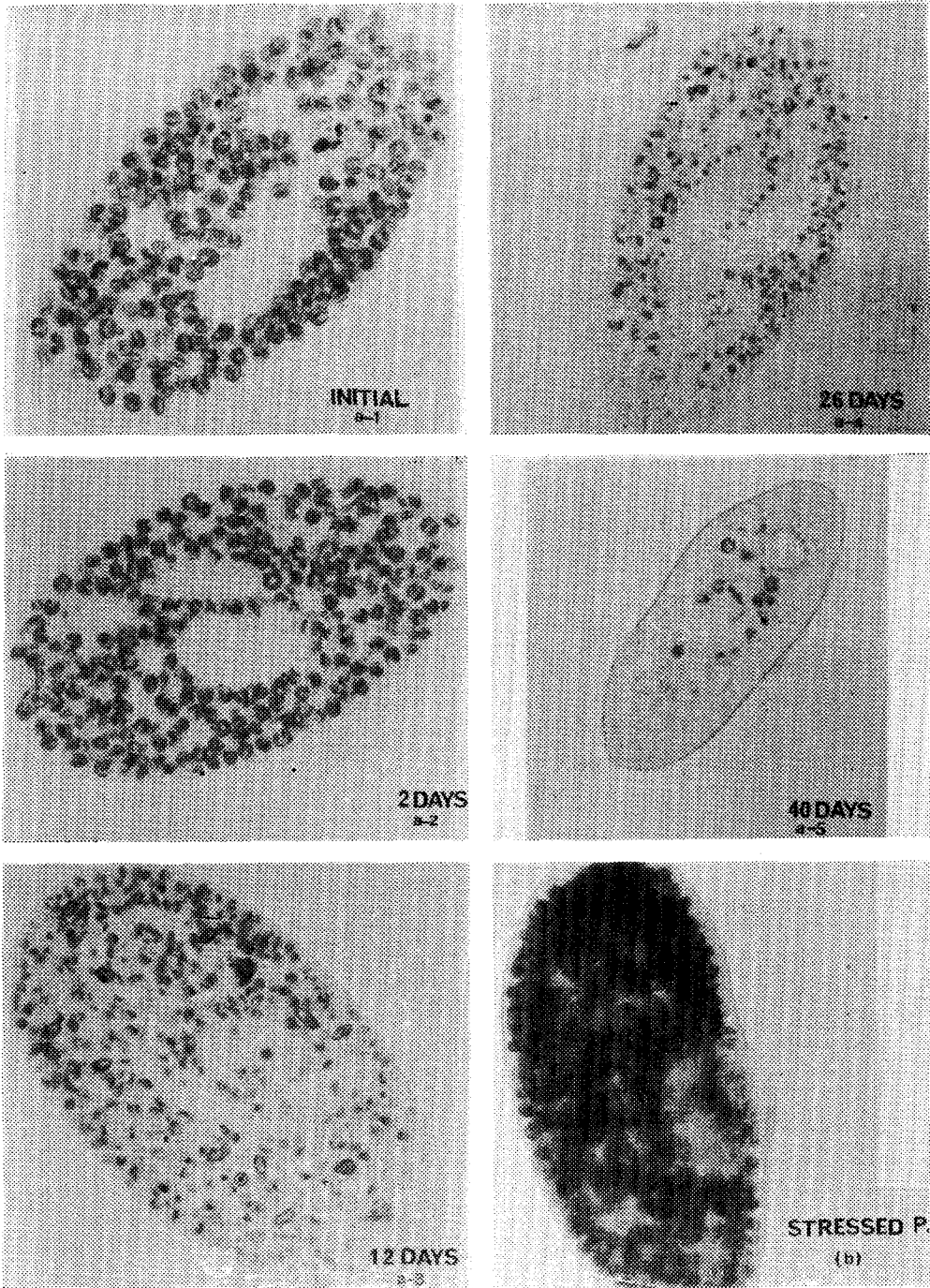
이와 같은 實驗結果로 미루어 볼 때 *Paramecium bursaria*와 *Chlorella*間의 共生關係는 매우 不安定한 狀態이며 빛을 주지 않았을 때는 宿主인 *Paramecium*에 의해서 培養液의 有機物含量을 정상배양액에 비하여 감소시켰을 때에는 *Chlorella*에 의해서 각각 支配당하는 것을 알 수 있었다. 이것과 類似한 結果로 *Tetrahymena pyriformis*의 消化效率이 培養條件과 연관되어 있음이 보고된 바 있다(Ricketts, 1971a, b).

#### Green *Paramecium*의 Hill reaction

Green *Paramecium*에 共生하는 *Chlorella*를 純粹分離한 후 光合成을 調査하기 위하여 酸素의 移出移入量을 分析하였다(Fig. 7). 初期에는 酸素의 放出量이 增加하는 경향을 나타내었으나 점차로 一定한 放出量을 유지하였다. 빛의 세기를 250 lux, 10,000 lux로 增加시켰을 때 酸素의 放出量은 增加傾向을 나타내었다. 實驗溫度가 11°C였기 때문에 光合成率을 나타낼 것으로 豫想되며 이때의 試料의 總光合成色素量은  $9.15 \times 10^3$ ng/ml였다.

한편 *Chlorella*와 共生하는 green *Paramecium*의 光合成結果 放出되는 酸素의 移出移入量을 分析한 比較値는 Fig. 8에서 보는 바와 같다. 初期의 數分 동안은 酸素가 放出되지 않고 오히려 吸收되었다. 이 結果로 볼 때 初期에 빛을 차단하였을 때는 宿主인 *Paramecium*이나 共生하는 *Chlorella*나 呼吸을 하고 있다는 것을 알 수 있었다.

빛의 세기를 250 lux, 10,000 lux로 增加시켰을 때는 酸素의 放出은 서서히 增加하였으며 그 增加하는 물때는 Fig. 7의 경우와 거의 같았다. 이 때는 *Chlorella*의 光合成결과 방출되는 산소량이 *Paramecium*의 呼



**Fig. 6.** (a) Diminution of size of *Paramecium* and numbers of symbiotic *chlorella* during the continuous dark treatment (about  $\times 500$ ).  
 (b) Compact *chlorella* under the condition that the medium was not replenished over 10 days.

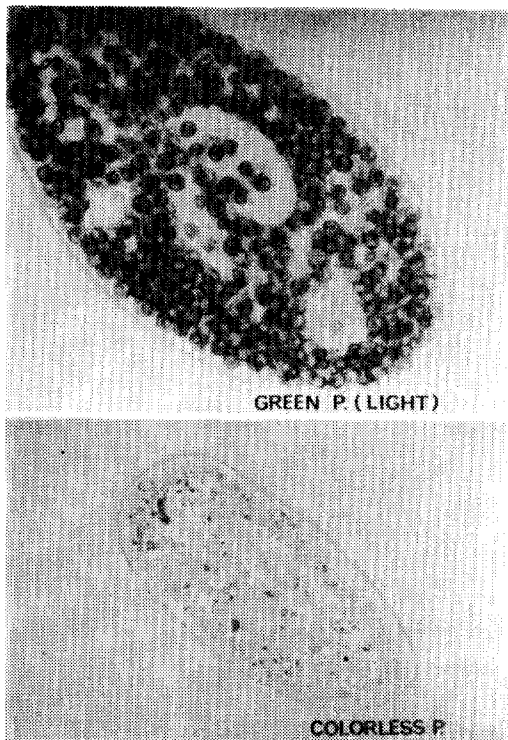


Fig. 4. Comparison of green *Paramecium* with colorless *Paramecium* in size. ( $\times 400$ )



Fig. 9. Electron micrography showing intracellular algae in the region of the macronucleus ( $\times 15,000$ ). Photosynthetic products can be seen in the *chlorella*. (Nu: Nucleus, Chl: Chloroplast, SG: Starch Grain, Mn: Macronucleus)

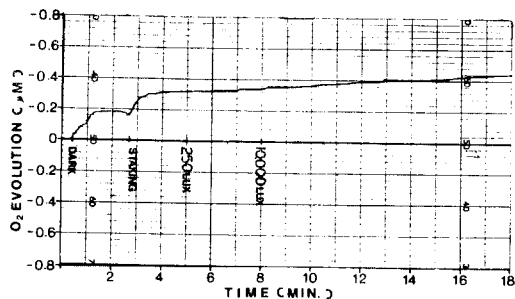


Fig. 7. Analysis of Hill reaction of isolated symbiotic *Chlorella*.

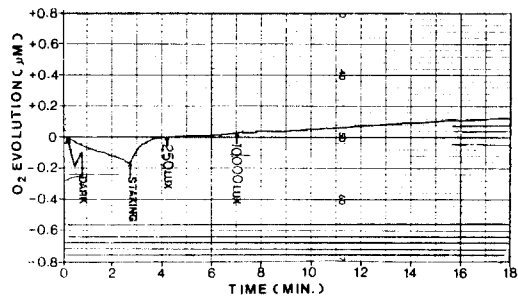


Fig. 8. Analysis of  $O_2$  availability of green *Paramecia* by oxygen diometer. Green *Paramecia* were able to utilize relatively the great part of oxygen which was evolved photosynthetically by symbiotic algae.

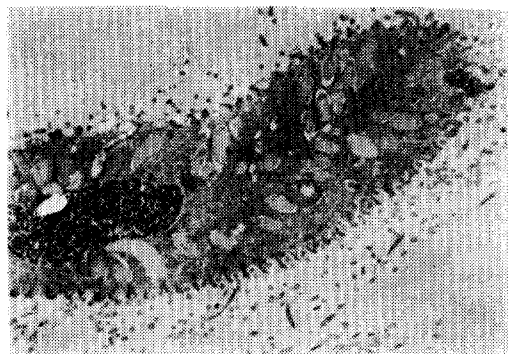


Fig. 10. Removal of *chlorella* by continuous dark treatment ( $\times 5000$ ). (Mn: Macronucleus, Ve: Vesicle)

흡으로 흡수되는 산소량보다 많음을 알 수 있으며 그 결과 *Paramecium*의 體外로 酸素가 放出되기 시작한다는 것을 알 수 있다. 이때의 總光合成色素량은  $6,406 \times 10^9 \text{ng/ml}$ 였다.

Figs 7과 8을 比較하여 보면 共生하는 *Chlorella*의 光合成 結果 放出되는 大部分의 酸素는, 宿主인 *Paramecium*의 呼吸에 利用되며, 남은 여분의 酸素만이 體外로 放出된다는 것을 알 수 있다. 또한 *Paramecium*의 呼吸에 酸素가 利用되고 그 結果 발생되는  $\text{CO}_2$ 는 *Chlorella*의 光合成에 利用된다는 것을 추정할 수 있다. Pado(1967)와 Karakashian(1975)은 共生하는 *Chlorella*가 共生하지 않는 *Chlorella*보다  $\text{CO}_2$  tension에 더 잘 견딜 수 있다고 보고하였으며 Kimball(1977)은 *Chlorella*와 *Paramecium*간의 共生關係의 한 要因으로서  $\text{CO}_2$ 의 交換可能性을 언급하였다.

또한 green *Paramecium*이 가지고 있는 走光性(Henry and Nielsen, 1980)이나 光蓄積性(photoaccumulation)(Saji and Oosawa, 1974) 등의 行動은 同化物質과  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ 의 交換 등 共生體相互間에 利益을 주고 받는 關係에 기인하는 것으로 해석된다.

#### 共生하는 *Chlorella*의 澱粉粒形成

Green *Paramecium*內에 共生하고 있는 *Chlorella*가 빛을 비추어 주었을 때 光合成을 하여 澱粉粒을 형성하는지의 여부를 確認하기 위하여 電子顯微鏡으로 觀察한 結果는 Fig. 9에서 보는 바와 같다. 한편 暗處理를 한 共生 *Chlorella*의 경우는 거의 澱粉粒이 발견되지 않았으며 色素 뿐만 아니라 *Chlorella* 自體가 分解되어 버렸다(Fig. 10). 이 結果를 Fig. 6과 比較하여 볼 때 暗處理한 경우에는 *Chlorella*가 *Paramecium*의 消化酵素에 의해 消化되어 分解되어 버리는 것으로 생각된다.

#### 摘 要

Hill reaction과 電子顯微鏡으로 *Paramecium bursaria*內에서 共生關係를 가지고 있을 때 *Chlorella*의 光合成과 그 產物의 交換關係를 研究한 結果는 다음과 같다.

먹이가 充分치 못한 培養液에서 빛을 비추어 주었을 때 green *Paramecium*은 colorless *Paramecium*보다 個體數의 增加가 빨랐다. green *Paramecium*을 暗處理하였을 때 그안의 *Chlorella*의 總光合成色素량은 暗處理期間에 따라 比例적으로 減少하였다. 10日以上 培

養液을 갈아주지 않은 條件下에서는 *Paramecium*內의 *Chlorella*의 數가 增加하였고 總光合成色素量도 2倍以上으로 增加하였다. *Chlorella*와 green *Paramecium*의 Hill reaction을 調査해본 結果 光合成으로 放出되는 酸素의 大部分을 宿主가 利用하는 것으로 確認되었다. 光을 비추어 주었을 때 green *Paramecium*內의 *Chlorella*에서 많은 澱粉粒이 電子顯微鏡으로 確認되었다. 光이 존재할 때는 *Paramecium*內의 *Chlorella*에서는 活發하게 光合成이 일어나고 있음을 알 수 있었다.

#### 參 考 文 獻

- Brown, J. A. and P. J. Nielsen, 1974. Transfer of photosynthetically produced carbohydrate from endosymbiotic *Chlorella* to *Paramecium bursaria*. J. Protozool., 21: 569~570.
- Chang, N. K., H. M. Vines, and C. C. Black, 1981. Nitrate assimilation and crassulacean acid metabolism in leaves of *Kalanchoe fedtschenkoi* variety Marginata. Plant Physiol., 68: 464~468.
- Chung, P. R., Y. K. Deung, and C. T. Soh, 1974. Studies on fine structure and enzyme activity of *Toxoplasma gondii* in macrophage. Korean J. of Electron Microscopy, 4: 11~24.
- Degn, H., M. Lilleor and J. J. L. Iversen, 1973. The occurrence of a stepwise-decreasing respiration rate during oxidative assimilation of different substrates by resting *Klebsiella aerogenes* in a system open to oxygen. Biochem. J., 136: 1097~1104.
- Henry, A. S. and P. J. Nielsen, 1980. The phototactic action spectrum of *Paramecium bursaria*. J. Protozool., 27: 32 A.
- Jones, J. C. and J. G. Hirsch, 1972. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. J. exp. Med., 136: 1173~1194.
- Karakashian, M. W., 1975. Symbiosis in *P. bursaria*, in Jennings DH, Lee DH, eds., Symbiosis, Cambridge Univ. Press, Cambridge, England: 145~173.
- Kimball, J. W., 1977. Biology, 4ed., Addison-Wesley Pub. Co, 782~793.
- Margulis, 1981. Symbiosis in cell evolution. W.H. Freeman and Company, San Francisco: 315~329.

- Muscatine, I., S. J. Karakashian, M. W. Karakashian, 1967. Soluble extracellular products of algae symbiotic with a ciliate, a sponge and a mutant hydra. *Comp. Biochem. Physiol.*, **20** : 1~12.
- Pado, R., 1967. Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. II. Photosynthesis. *Acta Soc. bot. Pol.*, **36** : 97~108.
- Ricketts, TR., 1971a. Periodicity of endocytosis in *Tetrahymena pyriformis*. *Protoplasma*, **73** : 387~396.
- , 1971b. Endocytosis in *Tetrahymena pyriformis*. Selectivity of uptake of particles and the adaptive increase in cellular acid phosphatase activity. *Expl. Cell Res.*, **66** : 49~58.
- Saji, M. and F. Osawa, 1974. Mechanism of photoaccumulation in *P. bursaria*. *J. Protozool.*, **21** : 556~561.
- Siegel, R. W., 1960. Heredity endosymbiosis in *P. bursaria*. *Expl. Cell Res.*, **19** : 239~252.
- Thiele, J., H. S. Otmar, W. Jurgen, K. Gertrud and S. Joachin, 1980. A new method for axenic mass cultivation of *Paramecium tetraurelia*. *J. Protozool.*, **27** : 118~121.

(1984年1月21日 接受)