

적조와편모조 *Scrippsiella trochoidea* 군증식에 미치는 환경요인과 지방산 조성

임월애 · 김학균* · 이원재 · 이삼석*
부산수산대학교 미생물학과 · *국립수산진흥원 환경과

Composition of Fatty Acid and the Effect of Environmental Factors on the Population Growth of *Scrippsiella trochoidea* a Dinoflagellate Responsible for a Red Tide

Wol-Ae LIM · Hak-Gyoon KIM* · Won-Jae LEE and Sam-Seuk LEE*
Department of Microbiology, National Fisheries University of Pusan,
Pusan 608-737, Korea
National Fisheries Research and Development Agency, Kijang-up Yangsan-gun,
Kyongsangnam-do 626-900, Korea

The cyst of *Scrippsiella trochoidea* from the surface mud in Masan Bay was germinated in the incubator for the culture. This species was one of dinoflagellates responsible for the early spring bloom in the southern coastal water of Korea. The culture experiments were carried out under the various gradients of environmental factors to know their effects on the population growth of this dinoflagellate. With respect to the effects of environmental factors on the growth, it was proved that the maximum cell growth was occurred at 4,000 lux of light intensity, salinity 30‰ and temperature 20°C. When 0.25ml/ml of the filtrates of *Skeletonema costatum* culture medium and the supernatants of soil extracts were added to growth medium as organic growth stimulants, both materials enhanced the population growth. In the fatty acid composition of *S. trochoidea*, C_{16:0} was the major component, and C_{18:0}, C_{18:1}, C_{22:0} and C_{22:1} were a minor components.

서 론

최근 우리나라 연안해역에서 여름철 적조를 일으키는 대부분의 종은 와편모조류이고 이들은 환경이 나쁜 시기인 겨울 동안 휴면포자(cyst)로 저니 중에 존재하다가 봄철이되면 발아한다. 와편모조류는 생활하수와 공장폐수 등의 유입, 오염된 저질로부터 영양염류의 용출 등에 의하여 부영양화된 전수역에서 대량 증식하여 적조를 일으킨다고 보고되고 있다(박 등, 1988; 金, 1990). 이러한 적조발생은 어패류의 질식사과 이들이 가진 독소에 의한 피해 그리고 2차적인 빈산소수괴 형성 등이 해양생태계에 큰 악영향을 미치고 있어 문제가 되

고 있다(Park and Kim, 1991).

*Scrippsiella trochoidea*는 우리나라 진해만에서 이른 봄에 적조를 일으키는 종으로 보고되었고(Park and Kim, 1991), 환경이 나쁠때는 휴면포자를 형성한다(Binder and Anderson, 1987). 金과 岩崎(1987)의 연구에 의하면 *S. trochoidea*의 cyst의 발아는 20°C에서 SW-II 배지를 사용하여 5,000lux에서 발아시킨 결과 40시간이 지나면 발아가 급속히 진행되고, 또한 20°C에서 최대증식을 한다고 보고하였다. 적조생물의 배양에는 이들의 증식과 재생산을 위해 필요한 여러 영양물질 특히 질산염, 인산염, 미량금속원소성분, 비타민류가 주요하게 작용하는데(Lindstrom, 1991), 그 종의 생리적 특성에 따라

영양요구도 달라지므로 그 배지의 조성도 달라지게 된다(Anderson et al., 1991). 증식을 위한 환경적 요인인 온도, 조도, pH, 염분들도 복합적으로 작용한다고 보고되고 있다(飯塚과 奉, 1983; 失特, 1984; Honjo, 1987). 또한 적조생물의 생체 구성 성분 특히 색소, fatty acid., sterols 그리고 독소에 관한 연구가 최근 매우 활발히 진행되고 있다(Hallegraeff et al., 1991).

본 연구에서는 봄철에 와편모조류로서는 가장 먼저 적조를 일으키는 *S. trochoidea*의 균증식에 미치는 환경요인과 유기물의 영향을 조사하였고, 또한 이 종의 지방산을 분석하였다.

재료 및 방법

배양에 필요한 *S. trochoidea*종을 분리하기 위하여 적조가 빈번히 발생하는 마산만의 저니를 core sampling한 후 Matsuoka와 Fukuyo(1986)의 방법으로 처리하였다.

그리고 종의 동정은 山路(1984), 日本水産資源保護協會(1987)와 福代(1990)에 의해 행하였다. Cyst배양은 SW-II 배지에서 그리고 환경요인이 증식에 미치는 영향실험은 F/2배지에서 행하였다. Cyst의 배양실험은 2,000lux, 20°C, light-dark cycle을 12L:12D로 하여 발아시켰고, 균증식 실험 배양 환경 조건은 마산만에서 *S. trochoidea*가 빈번히 출현 했던 봄부터 초여름까지의 환경을 참조하여(국립수산진흥원, 1991) 5단계로 설정, 이중으로 하였다. 균증식 밀도는 매일 1ml씩 분취하여 현미경하에서 계수하였고, 증식율(Relative growth rate: R)과 배가시간(Doubling time: T)을 구하였다(Odum, 1971). 또한 규조류 배양배지 여액은 규조류를 다량 증식 시켜 그 종이 증식한 배양액을 여과필균시켜 첨가하였다. 이 규조류는 *Skeletonema costatum*으로 그 추출액을 F/2배지 1ml당 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25ml 첨가하여 실험을 행하였다.

적조생물의 지방산 분석은 藤野(1983)와 Hallegraeff et al.(1991)의 방법을 개량하여 전처리를 행하여 분석하였다. F/2배지에서 대량배양된 *S. trochoidea*를 약 400ml정도 취하여 0.45µm의 membrane filter로 여과하였다. 멸균해수로 2~3번 행군 후 이 여과한 여과지의 표면이 손상되지 않도록 하여 삼각플라스크에 넣은 후 chloroform: methanol(2:1, V:V)을 약 30ml정도로 처리한 후 냉암소에서 하루밤 방치한 다음, 다시 여과하여 잔여물과 여액을 분리하였다. 지방산의 methyl ether은 Halle-

graeff et al.(1991)의 방법에 준하였다. Methanol: HCl: CH₂Cl₂(10:1:1, V:V:V)혼합용액 약 15ml를 가한 다음 100°C의 수조에서 1시간동안 가열하여 methylation시켰다. 이 반응액을 분액깔대기에 이행하여 증류수와 석유ether를 가한 다음 포화NaHCO₃ 용액 2~3ml를 가하여 methyl ester를 석유ether층으로 이행시키고, 증류수로 수회 세정한 후, 무수 Na₂SO₄로서 탈수하고 용매를 완전히 제거한 다음 분석에 사용하였다. 지방산의 분석은 Gas Chromatography(Varian 3400)에 의해 Table 1의 조건하에서 분석하였으며, 지방산의 동정은 표준지방산 methyl ester의 retention time과의 분석결과를 비교하였다.

Table 1. Operating Condition of Gas Chromatography

Gas Chromatography	Varian 3400
Column	FFAP, 2.5mm×30m
Carrier gas	N ₂
Split ratio	1/20
Column temperature	170~200°C, 1°C/min
Injector temperature	230°C
Detector temperature	250°C
Chart speed	0.5cm/min
Detector	FID

결 과

*S. trochoidea*의 cyst의 특성은 타원형으로 표면에 돌출 가지(Spines)가 있었고, 유영세포는 각을 가지고 윗부분(Epitheca)은 둥근모양인데 뾰족하게 돌출되어 있고, 아래 부분(Hypotheca)은 반구형으로 cingulum은 폭이 넓고 sulcus는 아래부분(Antapex)까지 도달하지 않았고, epitheca에도 들어가 있지 않았다.

동 종의 균증식율은 *S. trochoidea*를 50cells/ml가 되도록 접종, 배양하면서 매일 배양액에서 1ml씩 취하여 증가한 개체수를 계수한 결과 Fig. 1의 곡선과 같았다. 균증식 초기인 유도기는 밀도가 200 cells/ml가 될 때까지였으며, 이후의 대수증식기에서는 급격한 경사를 그리는데 균증식율(R)은 0.53이었고 Doubling time(T)은 1.5일이었다. 대수증식기의 최고 개체수는 3,300cells/ml였다. 적조생물의 증식환경 요인 중 염분의 범위를 10, 15, 20, 25, 30‰로 하여 20°C, 2,000lux에서 배양한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 25와 30‰에서 현저한 균증식

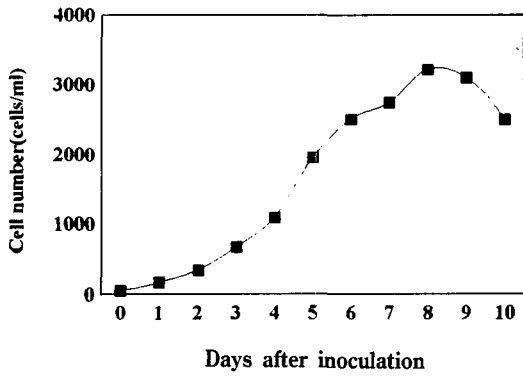


Fig. 1. The growth curve of *S. trochoidea* in F/2 medium at pH 7.0, 2,000lux, 20°C and the photoperiod of 12L : 12D.

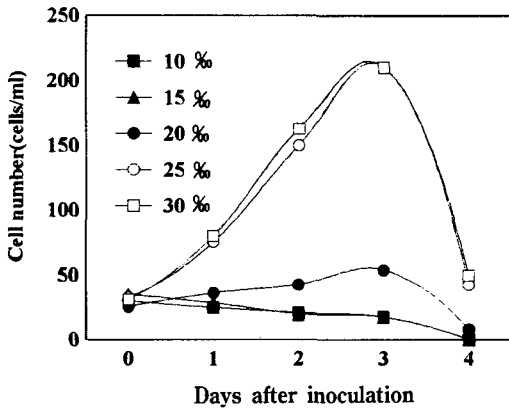


Fig. 2. The growth curve of *S. trochoidea* at different salinity ranges at 10~30‰.

을 보였고, 20‰에서는 낮은 증식을 보였으며, 10, 15‰에서는 증식에 효과가 없었다. 조도의 경우는 500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000lux의 범위를 두고 실험하였는데 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 3,000과 4,000lux의 조도에서는 높은 균증식을 보였고, 2,000와 1,000lux는 저조한 증식을 보이나, 500lux은 전혀 자라지 못하고 사멸하였다. 온도의 영향은 Fig. 4에 나타내었는데 20°C에서 최적 증식을 보였으며, 15°C에서는 균증식율이 저조하였고, 25, 10°C 그리고 5°C는 2일째부터 사멸하였다. 규조류 추출물의 영향은 Fig. 5에 나타내었는데 첨가량이 0.15, 0.2, 0.25ml일때는 균증식율이 좋았으나, 0.1, 0.05 ml일때는 증식이 감소함을 볼 수 있었다. 저니 추출물의 영향은 Fig. 6에 나타내었는데, 0.25ml에서 매우 현저한 증식을 보였으며 세포도 매우 크고

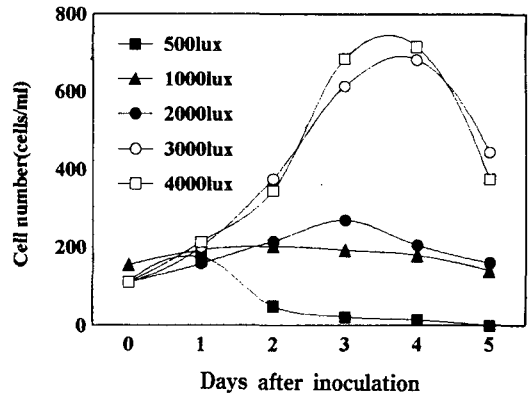


Fig. 3. The growth curve of *S. trochoidea* at different light intensity ranges at 500~4,000lux.

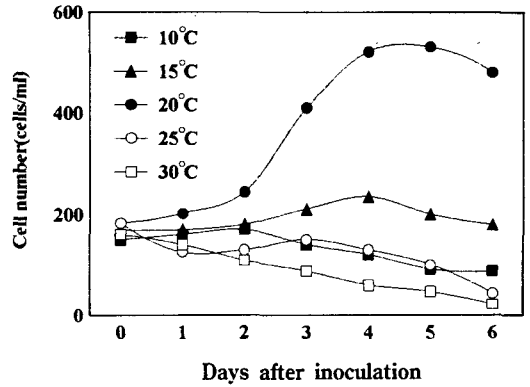


Fig. 4. The growth curve of *S. trochoidea* at different temperature ranges at 10~30°C.

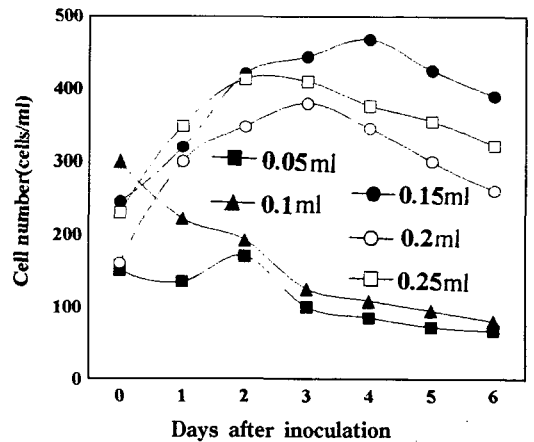


Fig. 5. The growth curve of *S. trochoidea* at different ranges of the filtrates of *Skeletonema costatum* culture medium at 0.05~0.25ml/ml.

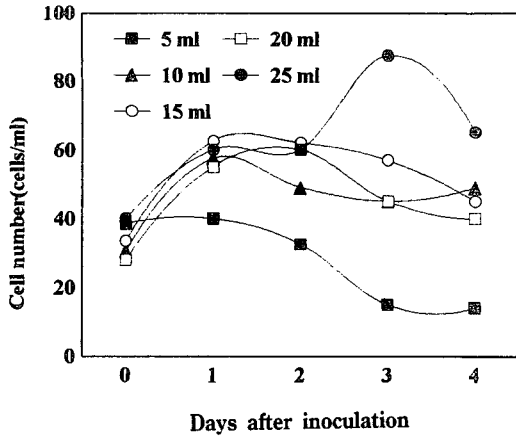


Fig. 6. The growth curve of *S. trochoidea* at different ranges of the supernatants of sea bottom mud extract at 0.05~0.25 ml/ml.

세포의 색깔도 매우 짙은 붉은색을 띄었고 활발히 움직였다. 0.1, 0.15, 0.2ml는 보통의 증식을 보였다. 그러나 0.05ml를 첨가했을 때는 효과가 없었다.

와편모조 *S. trochoidea*의 지방산 조성을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 지방산 구성을 보면 $C_{14:0}$ 에서 $C_{22:6}$ 까지의 포화 및 불포화 지방산이 분석되

Table 2. Fatty acid composition of *Scrippsiella trochoidea*

Fatty acids	Composition rate(%)
14 : 0	11.3
14 : 1	3.2
16 : 0	33.9
16 : 1	3.9
18 : 0	16.3
18 : 1	7.5
18 : 2	3.1
18 : 3	0.8
20 : 0	2.1
20 : 2	1.2
20 : 4	0.6
20 : 5	0.8
22 : 0	5.2
22 : 1	5.2
22 : 2	1.0
22 : 6	3.2
Others	0.7

었는데 $C_{16:0}$ 가 가장 많은 33.9%이고 $C_{18:0}$ 이 16.3%, $C_{14:0}$ 가 11.3%, $C_{18:1}$ 이 7.5%이고, $C_{20:2}$ 가 1.2%, $C_{20:4}$ 가 0.6, $C_{20:5}$ 가 0.8%, $C_{22:1}$ 은 5.2, $C_{22:2}$ 가 1.0%, $C_{22:6}$ 이 3.2%로 분석되었다. 즉 와편모조의 체내에 불포화 지방산이 넓게 분포하고 있음을 알 수 있었다.

고 찰

*S. trochoidea*의 cyst의 발아는 金과 岩崎(1987)의 연구에 의하면 40시간이 지나면 발아가 급속히 진행된다고 하였다. 본 실험에서도 20°C, SW-II배지, 2,000lux에서 마산만 저지 중의 cyst를 분리 발아시킨 결과 60시간 이후부터 발아가 좋았다. 이는 조도가 金과 岩崎(1987)의 실험 때보다 낮았기 때문이라고 생각된다. *S. trochoidea*의 배가 시간 1.5일은 *Prorocentrum minimum*의 2.2일(Kim, 1986)보다는 빠르고 *P. triestinum* 1.2일(김, 1986)보다는 느렸으나 비교적 높은 증식속도를 나타냈다.

*S. trochoidea*의 군증식에 영향을 미치는 환경요인을 실험한 결과 수온이 20°C일때 군증식 속도가 빨랐다. 矢特(1984)의 적조와편모조의 증식에 관계하는 수온의 영향에 관한 연구에서 봄에 적조를 형성하는 식물플랑크톤들은 20°C 전후 범위에서 증식속도가 빠르다고 보고하였다. 또한 金과 岩崎(1987)도 *S. trochoidea*의 연구에서 20°C에서 최대 증식을 한다고 보고하였다. *S. trochoidea*가 20°C에서 최대 군증식속도를 나타낸 본 실험 결과는 위와 일치한다. 염분의 경우는 25~30‰일 경우에 *S. trochoidea*가 최적증식을 하여 마산만의 염분 변화 범위내에 속하고 있다. 조도는 식물플랑크톤의 광합성과 생장에 중요한 역할을 하며 광합성에 의해 배설하는 유기물의 양에도 커다란 역할을 한다. 田中과 大和(1983)에 의하면 식물편모류와 녹조류는 너무 높은 조도에서는 증식에 저해를 받고, Watt(1969)에 의하면 너무 낮은 조도에서도 증식에 저해를 받는다고 보고되었다. 田中과 大和(1983)에 의하면 녹조류의 증식조도는 2,000~5,500lux, 규조류는 1,000~7,000lux, 식물편모류는 1,500~6,000lux에서 잘 자란다고 보고하였다. 본 실험의 결과 *S. trochoidea*는 3,000~4,000lux의 범위에서 잘 성장하여, 위의 범위와 유사함을 알 수 있었다.

해양에서는 많은 식물성 플랑크톤들이 증식하는 과정에서 많은 양의 유기물을 배설 한다고 알려져 있다. Watt(1969)는 규조류는 많은 유기물을 분비한다고 보고하였고 특히 Ignatiades(1973)의 연구에 의하면 규조류인 *S. costatum*은 많은 양의 유기

물을 분비하여 다른 해양생물에 영향을 미치는 요소로 작용한다고 보고하였다. Carlucci와 Bowes(1970)에 의하면 *S. trochoidea*은 증식에 vitamin B₁₂를 요구하지만, thiamin, biotin 등을 분비한다고 보고되었다. 연안의 저니에는 육상에서 유입된 많은 유기물들이 침전되어 있고 vitamins와 회귀금속도 함유되어 있다(Ohwada and Taga, 1972). Lindstrom(1991)의 연구에서 토양추출물을 첨가하였을 때 *Peridinium gatunense*의 증식에 좋은 영향을 미쳤다. 이러한 유기물의 첨가량은 0.25ml/ml로 나타났는데, Guillard(1968)에 연구에 의하면 *S. costatum*의 경우에는 vitamin B₁₂를 4.8×10^5 cells/pg를 요구한다. 또한 배지의 영양요구를 보면 용매 100 ml당 N, P 등은 g범위, 미량금속 등은 µg~mg으로 본다. 이로 추정해 볼 때 본 실험의 결과는 0.25 ml/ml로 매우 합당한 수치로 나타났다.

식물플랑크톤은 불포화지방산을 생성하여 먹이 연쇄에 전달하는 중요한 역할을 할 뿐 아니라, 생리 및 대사에 중요한 물질이라고 이미 잘 알려져 있다. Ackman et al.(1964) 등이 규조류인 *S. costatum*의 지방산을 분석한 결과를 보면 C_{14:0}, C_{16:0}의 구성비가 32.7%, 21.0%로 가장 많았고, C₂₀이상은 C_{20:5}, 13.8%, C_{22:1} 1.76%로 나타났고 와편모조류인 *Amphidinium carterii*의 지방산을 분석한 결과 C_{16:0}이 36.0%로 가장 많은 구성비를 차지하고 있으며, C₂₀이상은 C_{20:5}, C_{22:6}이 7%와 26%로 높게 나타남을 밝혔다. Hallegraef et al.(1991)의 *Gymnodinium catenatum*의 지방산 분석 결과를 보면 Ackman et al.(1964)의 와편모조의 분석과 유사하게 C_{16:0}이 33%로 가장 높게 나타났으며 C_{16:1}도 6.1%였으며, C₂₀이상의 C_{20:5}와 C_{22:6}이 각각 12%와 21.3%로 높게 나타났다. 본 실험종인 *S. trochoidea*의 지방산 조성은 C_{16:0}이 33.9%로 나타났으며, C₂₀이상의 불포화 지방산인 C_{22:0}, C_{22:1}이 각각 5.2%, C_{22:6}이 3.2%로 나타나 위의 식물성플랑크톤의 지방산 분석과 유사함을 알 수 있었다.

요 약

춘계 마산만에서 적조현상을 일으키는 해산 와편모조류인 *S. trochoidea*의 cyst를 저니에서 채취, 분리, 발아시켰다. 환경요인에 대한 증식속도의 실험 결과 수온 20°C, 염분 30‰, 조도 4,000lux에서 증식속도가 빨랐다. 그리고 증식 촉진 유기물질에 대한 실험으로서 규조류(*Skeletonema costatum*) 배양배지 여과액과 저질추출물질에 대한 실험

결과 각각 0.25ml/ml를 첨가하였을 때 각각 증식속도가 빠르게 나타났다. 동종의 지방산을 분석한 결과 C_{16:0}이 가장 많고 C_{18:0}, C_{18:1}, C_{22:0} 그리고 C_{22:1} 등의 순으로 분리되었다.

참 고 문 헌

- Ackman R. G., Jangaard, R. J. Hoyle and H. Brockerhoff. 1964. Origin of marine fatty acid. I. Analysis of the fatty acids produced by diatom *Skeletonema costatum*. J. Fish. Res. Bd. Canada. 21(4): 747~756.
- Anderson R. A., D. M. 1987. Physiological and environmental control of germination in *Scrippsiella trochoidea*(Dinophyceae) resting cysts. J. Phycol. 23: 99~107.
- Carlucci A. F. and P. M. Bowes. 1979. Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed culture. J. Phycol. 6: 351~357.
- Guillard R. R. L. 1968. B₁₂ Specificity of marine centric diatoms. J. Phycol. 4: 59~64.
- Hallegraef G. M., P. D. Nichols, J. K. Volkman, S.I. Blackburn and D. A. Everitt. 1991. Pigments, fatty acids, and sterols of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* J. Phycol. 27: 591~599.
- Honjo T. 1987. Growth potential of *Chattonella marina*(Raphidophyceae) collected in Gokasho Bay, Central Japan. Bull. Plankton Soc. Japan. 34(2): 119~124.
- Ignatiades L. 1973. Studies on the factors affecting the release of organic matter by *Skeletonema costatum*(Greville) cleve in field conditions. J. mar. biol. Ass. U. K. 53: 923~935.
- Kim Hak-Gyoon. 1986. Ecological study of dinoflagellates responsible for red tide. 2. The population growth of *Prorocentrum minimum*(Pav.) Schillar Korean. J. Phycol. 1((1): 103~106.
- Lindstrom Kare. 1991. Nutrient requirement of the dinoflagellate *Peridinium gatunense*. J. Phycol. 27: 207~219.
- Matsuoka K. and Y. Fukuyo. 1986. Cyst and motile morphology of a colonial dinoflagellate *Pheoplykrikos hartmannii*(Zimmermann) comb. nob. Journal of Plankton Research. 8: 811~818.
- Odum E. P. 1971. Fundamentals of ecology. pp.

- 173~183.
- Ohwada K. and N. Taga. 1972. Distribution and seasonal variation of Vitamin B₁₂, thiamine and biotin in the sea. Mar. Chem 1: 61~73.
- Park J. S. and H. G. Kim. 1991. Recent approaches on red tides. Korean and French Seminar on red tide. pp. 159.
- Watt W. D. 1969. Extracellular release of organic mater from two fresh water diatoms Ann. Bot. 33: 427~437.
- 국립수산진흥원, 1991. 수산자원보전지역의 환경평가를 위한 조사보고(내수면). 사업보고 88.
- 金昌勳·岩崎 英雄. 1987. 해산 와편모조 *Scrippsiella trochoidea*의 cyst 형성 및 발아에 대하여, 한국조류학회지, 2(2): 211~221.
- 김학균. 1986. 적조와편모조의 생태학적 연구, 1. *Prorocentrum triestinum* Schiller 증식과 구제, 국립수산진흥원 연구보고 제39호.
- 金鶴均. 1990. 馬山灣의 鞭毛藻赤潮의 發生과 環境特性, 부산수산대학교 해양생물학과 박사학위 논문. pp. 84.
- 藤野安産. 1983. 脂質分析法入門. pp. 42~45.
- 박주석·김학균·이삼근. 1988. 진해만의 적조현상과 원인생물의 천이. 국립수산진흥원 연구보고 제41호. pp. 26.
- 飯塚昭二·奉 邦麿. 1983. 培養條件下で期待される赤潮渦鞭毛藻 *Gymnodinium* sp.(65 年型種)의 最高生長速度, Bull. Plankton Soc. Japan, 2(2): 139~146.
- 福代 康夫. 1990. 日本の赤潮生物. pp. 158~161.
- 山路 勇. 1984. 日本海洋プラクトン圖監. pp. 122~124.
- 矢特 進. 1984. 大阪灣に出現する赤潮鞭毛藻 6種の増殖に及ぼす水溫の影響 Japan, 31(1): 15~22. 大阪灣に出現する赤潮鞭毛藻 *Prorocentrum micans*, *Eutreptiella* sp. および *Chattonella marina*의 増殖制限營養因子について. Plankton Soc. Japan, 31(2) 97~106.
- 日本水産資源保護協會, 赤潮生物研究指針. 1987. pp. 125~131. 94, 188.
- 田中信山·大和田紘一. 1983. 單細胞藻類(珪藻, 鞭毛藻, 綠藻) 54株の 光合成と光照度の關係. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture. 4: 113~120.

1993년 2월 2일 접수

1993년 3월 9일 수리