

Anabaena flos-aquae 에서의 세포사멸계수 (Cell Death Constant)의 측정

오 인 혜
배재대학교 생물학과

Measurement of Cell Death Constant in *Anabaena flos-aquae* (Cyanophyceae) by the Molecular Probe

Oh, In-Hye

Department of Biology, Pai-Chai University, Taejon 302-735, Korea

ABSTRACT

The measurement of cell death constant in *Anabaena flos-aquae* was tested by the Live/Dead BacLight Viability kit(Molecular Probes Co., Seattle, WA). When the Live/Dead BacLight Viability kit was applied to *Anabaena flos-aquae*, the cells with intact cell membranes(live cells) stained fluorescent green, while the cell with damaged membranes(dead cells) stained fluorescent red and the background remained virtually nonfluorescent. The ratios of live : dead cells in the cell suspension were controlled artificially and Live/Dead BacLight Viability kit was applied to them. The ratios of green:red fluorescent cells in the cell suspension were the same as those of live : dead cells controlled artificially. It was also approved by the fluorescence emission. The cell death constant was measured in the P-limited *Anabaena flos-aquae* chemostat culture in the N-fixing and KNO₃-supplied conditions. The culture in N-fixing chemostat had a dead cell proportion of 1.2% at the growth rate of 0.7/day and increased to 2.6% at the growth rate of 0.3/day. The cell death constant of N-fixing culture was 0.008/day. There was a same trend in the KNO₃-supplied chemostat culture. The proportion of dead cell was 1.6% of dead cell proportion at the growth rate of 0.7/day and increased to 4.3% at the growth rate of 0.3/day.

Key words : *Anabaena flos-aquae*, Cell death constant, BacLight Viability Kit, Chemostat.

서 론

정상적인 환경에서 분열하지 않는 원생생물은 죽었거나 휴면 상태에 있는 것이다. 휴면세포란 정상환경으로 다시 돌아가면 성장을 계속할 수 있는 세포이고, 죽은 세포는 정상환경으로 되돌아 가더라도 성장을 할 수 없는 세포를 의미하는데, 일반적으로 휴면세포는 정상세포보다 증식하는데 걸리는 시간이 더

긴 경우를 의미한다. 세균, 곰팡이 세포나 동물세포의 경우 살아있는 세포의 수는 고형배지에서 살아나는 colony 수를 세어서 계산할 수 있다. 그러나 이러한 방법은 엽록소를 가진 조류 세포(algal cell)나 식물세포에서는 적용시킬 수 없었다. 따라서 이러한 세포는 세포 군집에서 어느 정도의 비율로 세포가 죽어가고 있는지도 알 수가 없었을 뿐더러 이에 관한 연구가 이루어질 수 없었다. 따라서 그 동안 생물의 viability에 관한 연구는 주로 세균을 대상으로 하였다. 이에 대한 대부분의 연구

본 연구는 1996년도 기초과학연구소 학술연구 조성비(BSRI-96-4444)의 지원에 의해 수행되었음.

는 *Aerobacter aerogenes*를 재료로 수행되었는데, Sinclair와 Topiwala(1970)는 chemostat culture에서 희석율, 즉 성장률이 감소함에 따라 viability가 감소한다고 하였다. 최근 세포 생물학에서는 세포가 일정한 비율로 죽어가고 있으며, 이러한 과정을 주도하는 유전자가 있음이 보고되었고(Barinaga 1994) 세포가 죽는 것은 자연 현상으로 인식되고 있다.

그동안 direct count-assay는 세균 세포가 살아있는 정도를 알 수는 있으나 시간이 걸리는 단점이 있었다. 최근 Molecular probe 사에서는 살아 있는 세포의 비율을 짧은 시간에 알아낼 수 있는 Live/Dead BacLight Viability kit를 개발하였으며, 현재 많은 종의 세균세포에서 잘 적용됨이 입증되고 있다. 이 BacLight는 핵산염색제가 혼합된 것으로 그 염색제가 세균의 세포막을 투과하는 성질의 차이가 있어 살아있는 세포와 죽은 세포에서 다르게 작용되었다. 이 BacLight를 살아 있는 세균에 적용시킬 경우에 녹색의 형광을, 죽은 세포에서는 적색의 형광이 방출된다. 특히 죽은 세포와 산 세포가 혼합되어 있는 집단에 적용시킨 경우에도 세포가 살아있는지, 죽었는지에 따라 각기 다른 색의 형광을 발하여 구별되었으며 배경은 전혀 형광을 발하지 않았다.

본 논문에서는 이 BacLight를 남조류의 한 종 *Anabaena flos-aquae*에서 죽은 세포와 살아있는 세포를 구별하는데 적용할 수 있는가를 확인하고 적용 가능성이 입증된 후에는 인산염이 제한된 chemostat culture에서 성장율과 질소원의 종류에 따른 세포사멸계수를 계산하였다.

재료 및 방법

Sinclair와 Topiwala(1970)는 chemostat culture에서 희석율, 즉 성장률이 감소함에 따라 viability가 감소한다고 하였는데, 그들은 실험결과로부터 다음과 같은 식을 도출하였다.

Viability (v)는

$$v = \frac{x}{x+x'} = \frac{D}{D+\gamma} \quad (1)$$

x : steady-state에서 viable cells의 농도(g/L)

x' : steady-state에서 non-viable cells의 농도(g/L)

D : 희석율(h^{-1})

γ : 세포 사멸계수(h^{-1})

이 식은 다음과 정리할 수 있다.

$$\frac{1}{v} = 1 + \frac{1}{D} \gamma \quad (2)$$

$1/v$ 의 값을 $1/D$ 에 대하여 plot 하면, 직선이 되고, 그 기울기가 세포사멸계수(cell death constant)로 계산될 수 있음을 보여준다. 이 식에 의하여 Sinclair와 Topiwala(1970)은 *Aerobacter aerogenes*의 glycerol-limited culture에서 세포사멸계수가 0.006 임을 계산하였다. 그러나 이 값은 제한되는 영양염류의 종류, 세포의 밀도 등 여러 가지 요인에 따라 다르다(Postgate 1973).

부균의 *Anabaena flos-aquae*를 변형된 SW 배지(Smith와 Wiedeman 1964, Oh *et al.* 1991)에서 배양하였다. KNO_3 를 250 μM 를 공급하여 배양한 것을 stock으로 하였다. *Anabaena flos-aquae*에서의 적용 가능성을 조사하기 위하여 지수증가기의 조류 세포를 취하여 둘로 나누어 한 부분은 BacLight를 가하여 모두 녹색의 형광을 발하는지를 확인한 후 100% 살아있는 세포(live cell)로 하였다. 다른 부분은 100°C의 물중탕으로 10분간 가열하였다. 물중탕한 표본에 BacLight를 가하니 모두 적색의 형광을 발함을 확인하고 죽은 세포(dead cell) 100%로 하였다. 이 살아있는 세포와 죽은 세포를 적절히 혼합하여 죽은 세포의 비율이 3.1, 6.3, 13.1 그리고 28.8%가 되게 조절하였다. 이렇게 준비된 표본에 BacLight를 0.2 $\mu l/ml$ 되게 가하여 25°C 암소에서 10분간 배양한 후 형광현미경(Nikon PFX, B2 filter 사용)으로 관찰하였다. 형광 현미경 하에서 녹색과 적색의 형광을 발하는 세포의 수를 세어서 죽은 세포의 비율을 계산하였다. 또 이의 fluorescence emission을 spectrofluorometer(SLM-Aminco 8100)으로 확인하였다. spectrofluorometer 사용할 때에는 excitation 파장을 470 nm로 하였으며 470~750 nm에서 fluorescence emission을 측정하였다.

*Anabaena flos-aquae*에서의 BacLight의 적용 가능성을 확인한 후에 인산염 제한 chemostat culture에서 질소원을 달리 공급하면서, 그리고 희석율(D)를 다르게 하여 배양하면서 세포사멸율을 계산하였다. Chemostat 배양은 Rhee와 Gotham(1981)의 방법을 따랐으며, 인산염 제한 배지에서는 인산을 2 μM 을 공급하였으며, 질소원은 질산염의 경우는 KNO_3 250 μM 을 가하고, 암모니아로 공급하는 경우는 NH_4Cl 250 μM 로 공급하였으며, 질소 고정 culture를 위해서는 KNO_3 를 같은 mol 농도의 KCl 로 대체하였다. Chemostat 배양 시에 광도는 70 μM photon $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 로 연속으로 비추고, 온도는 $20 \pm 1^\circ C$ 로 하고, 공기는 300 mL/min로 계속 공급하였다. 연속 배양장치에서 평형상태(steady-state)에 도달하면 표본을 취하여 BacLight를 가하여 형광현미경 하에서 죽은 세포의 비율을 측정하였다. 그리고

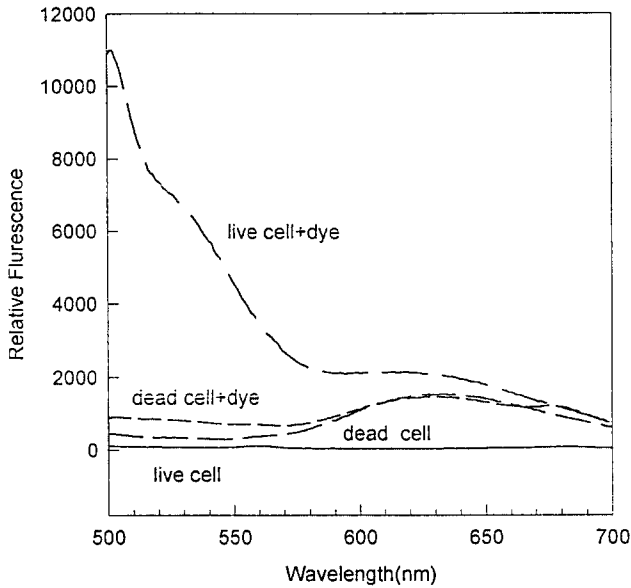


Fig. 1. Fluorescence emission with wavelength of *Anabaena flos-aquae* cell with and without BacLight viability kit. Exicitation is at 470 nm. The spectra were recorded at 1 nm intervals between 500 and 700 nm.

죽은 세포의 비율로부터 식 (2)에 따라 세포사멸계수를 계산하였다. 세포 수는 Burnham 등(1973)에 따라 세었으며, 8 반 복하였다. Live/Dead BacLight Viability kit는 Molecular Probes Inc.(Oregon, USA)에서 구입하였다.

결과 및 고찰

Live/Dead BacLight Viability kit는 핵산염색제의 혼합물로 본 실험재료인 *A. flos-aquae*의 살아있는 세포에서는 녹색 형광을, 죽은 세포에서는 적색 형광을 발하였다. 이는 spectro-flurometer로 fluorescence emission을 측정된 결과에서 뚜렷이 확인되었다(Fig. 1). 살아있는 보통의 세포에서는 500 nm의 형광이 없었으나, BacLight를 가한 후 형광이 크게 증가하였다. 이로 인하여 녹색의 형광이 발하며, dead cell에서는 BacLight를 가하여도 적색 형광의 차이는 크게 없었는데, 이것은 원래 *Anabaena flos-aquae*의 엽록소가 발하는 적색 형광에 의한 것으로 사료된다.

인위적으로 죽은 세포의 비율을 조절된 세포군에 BacLight를 가하고 형광현미경으로 조사된 녹색과 적색 세포의 비율과의 관계는 상관계수가 0.89로 Live/Dead BacLight viability kit가 *Anabaena flos-aquae*에 잘 적용됨을 입증하였다(Fig. 2). Spectroflurometer로 형광을 측정된 경우도 live cell의 비율이 증가함에 따라 비례적으로 500 nm에서의 fluorescence emis-

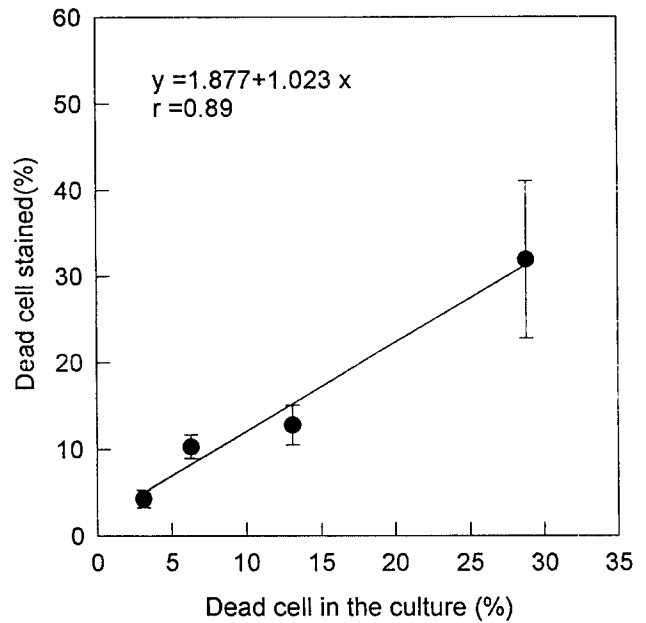


Fig. 2. Relationship between the dead cell proportion controlled artificially and stained dead cell proportion of the total cell number with BacLight in *Anabaena flos-aquae*. The stained dead cell is the cell fluorescent red with BacLight.

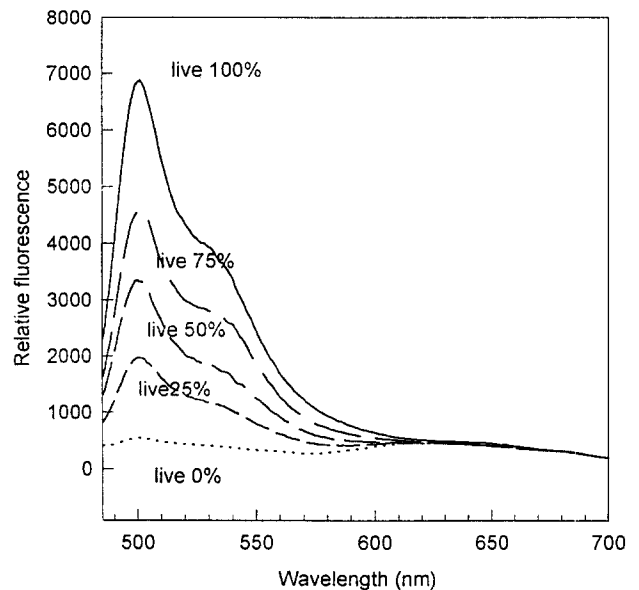


Fig. 3. Fluorescence emission with wavelength of *Anabaena flos-aquae* cell with various live cell proportions. The spectra were recorded at 1 nm intervals between 500 and 700 nm.

sion이 증가함을 보여주었다(Fig. 3).

질소를 전혀 공급하지 않아 질소고정이 일어나는 *Anabaena flos-aquae*에서 각 희석율, 즉 성장율에 따라 죽은 세포 비율이 달랐다. 희석율이 0.3/day에서는 죽은 세포 비율이 2.6%이었으나, 희석율이 0.7/day에서는 1.2%로 희석율이 증가함에 따라 죽은 세포 비율이 감소하였다. 이형세포(heterocyst)의 경우에 영양세포(vegetative cell)와 다르게 반응하는지를 조사하기 위하여, 이형세포를 TTC(Triphenol-tetrazolium chloride)로 염색하여 결정이 나타나는 세포 수를 세어 활성이 있는 이형세포를 구별하였다(Stewart *et al.* 1969). 그러나 이형세포를 고려하여 계산된 죽은 세포 비율은 영양생식세포(vegetative cell)만을 고려하여 계산된 경우와 크게 차이가 없었다. Sinclair와 Topiwala(1970)는 Tempest 등(1967)의 연구를 예로 들어 glycerol-제한 *Aerobacter aerogenes*의 죽은 세포 비율이 희석율이 감소함에 따라 증가하는 경향을 보였으며 이로부터 계산된 세포사멸계수는 0.006이었다. 인산염이 제한된 *Anabaena flos-aquae*가 질소를 고정하는 환경에서는 식(2)에 의하여 계산된 세포사멸계수가 0.008/day로 계산되었다(Fig. 4).

Droop(1983)은 비타민 B₁₂-제한 *Monochrysis*에서 관찰한 기질농도에 따른 고유성장율이 C형을 나타내는 결과를 관찰하고 hook-back model을 제안하였다. 이에 대하여 Goldman(1977)은 희석율이 낮을 때, 죽은 세포 비율이 증가되는 것이라고 제안하였으며, 이에 따라 죽은 세포로부터 나오는 영양염류의 유출속도도 희석율에 반비례적으로 증가할 것이라고 하였다. 여

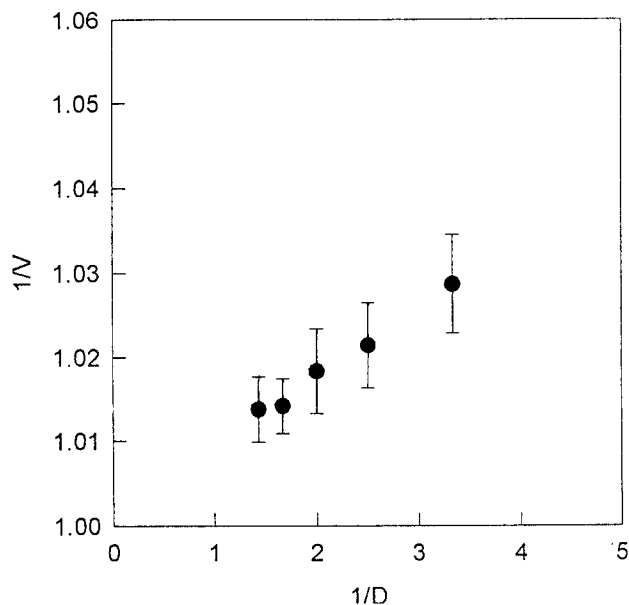


Fig. 4. The plot of $1/V$ and $1/D$ in the P-limited *Anabaena flos-aquae* chemostat under the N-fixing condition.

기에 대하여는 아직 입증할 만한 자료는 충분하지 못한 상태이다. 현재 해양과 담수에서 입자성 유기탄소(POC:Particulate organic carbon)보다 용존 유기탄소(DOC:Dissolved organic carbon)의 비율이 크다는 사실은 밝혀지고 있으나, 용존 유기탄소의 근원에 대하여는 밝혀지지 않고 있다(Smith and Wiebe 1976, Sharp 1977, Fogg 1983, Peterson *et al.* 1994).

질소원으로 질산염이 공급된 경우에도 같은 경향을 보여, 희석율이 0.3/day에서는 죽은 세포 비율이 4.3%이었으나 0.7/day에서는 1.6%이었다. 질산염 공급 chemostat에서는 질소 고정 culture에서와는 달리 $1/D$ 와 $1/v$ 의 관계가 직선적으로 증가하지 않았으므로 식 (2)에 의하여 세포사멸계수를 계산하는 것이 불가능하였다(Fig. 5). 또 암모늄을 이용한 culture에서는 희석율에 따른 죽은 세포 비율이 일정한 경향성을 보이지 않았다. 일반적으로 BacLight를 가하여 죽은 세포 비율을 계산할 경우 죽은 세포 비율이 커질수록 측정치의 표준편차가 커지는 경향이 있었다.

이 BacLight는 *Anabaena flos-aquae* 이외에도 남조인 *Synechocystis*와 *Mycrocystis*에서는 잘 적용이 되었으나 그 이외의 다른 남조류에서도 적용 가능한지는 더욱 검토를 거쳐야 될 것으로 생각된다. 이 실험 방법이 적절히 이용된다면 환경오염물질이 1차 생산자이며 수계의 주요 생산자인 조류의 사멸율에 어느 정도의 영향을 끼치며 또 그 결과 수계의 탄소량의 변화에 어느 정도까지 영향을 미치는가를 밝혀내는데, 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

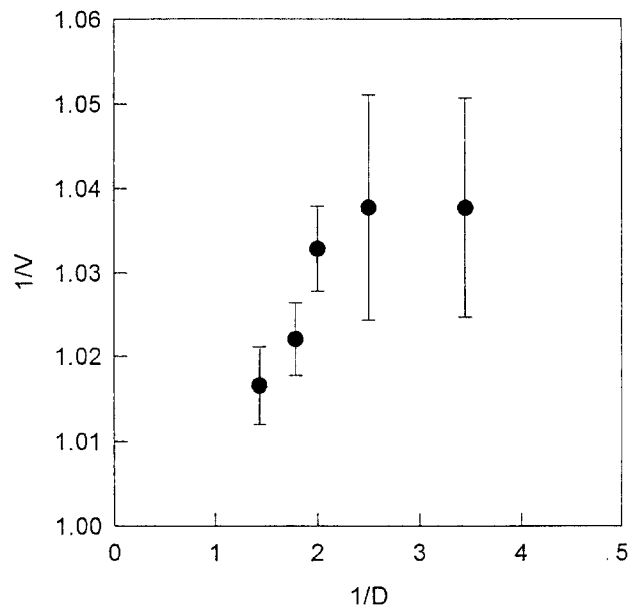


Fig. 5. The plot of $1/V$ and $1/D$ in the P-limited *Anabaena flos-aquae* chemostat when KNO_3 was supplied as nitrogen source.

적 요

남조류의 한 종인 *Anabaena flos-aquae*를 대상으로 Live/Dead BacLight Viability kit(Molecular Probes Co.)를 이용하여 세포사멸계수를 계산하였다. Live/Dead BacLight kit를 *Anabaena flos-aquae*에 가하면 살아있어 세포막이 정상인 세포에서는 녹색의 형광을, 죽어서 세포막이 손상된 세포에서는 적색의 형광이 발하였으며, 배경은 전혀 형광을 발하지 않았다. 인위적으로 죽은 세포와 산 세포의 비율을 조절하여 준비된 표본에 BacLight kit를 가하여 녹색과 적색의 형광을 발하는 세포의 수를 측정할 결과 처음에 준비된 살아있는 세포와 죽은 세포와의 비율과 같았으며 이것은 fluorescence emission 측정으로 확인되었다. 적용 가능성을 확인한 후에 인산염을 제한시킨 *Anabaena flos-aquae*의 chemostat culture에서 질소를 고정하는 경우 성장률이 0.3/일에서는 죽은 세포의 비율이 2.6%이었고, 0.7/일에서는 1.2%로 성장률이 증가함에 따라 죽은 세포의 비율은 감소하였으며, 세포사멸계수는 0.008이었다. 질산염을 이용하는 환경에서는 성장률이 0.3/일에서 4.3%이었고, 0.7/일에서는 1.6%로 같은 경향을 나타내었다.

인 용 문 헌

- Barinaga, M. 1994. Cell suicide: by ice, not fire. *Science* 263: 754-756.
- Burnham, J.C., T. Stetek and J. Boulger. 1973. An improved method of cell enumeration for filamentous algae and bacteria. *J. Phycol.* 9: 346-349.
- Droop, M.R. 1983. 25 Years of algal growth kinetics. *Botanica Marina* 26: 99-112.
- Fogg, G.E. 1983. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Botanica Marina* 26: 3-14.
- Goldman, J.C. 1977. Steady-state growth of phytoplankton in continuous culture: comparison of internal and external nutrient equations. *J. Phycol.* 13: 251-258.
- Oh, H-M., J. Maeng and G-Y Rhee. 1991. Nitrogen and carbon fixation by *Anabaena flos-aquae* sp. isolated from a rice paddy and grown under P and light limitations. *J. Appl. Phycol* 3: 335-343.
- Peterson, B., B. Fry, M. Hullar and S. Saupe. 1994. The distribution and stable carbon isotopic composition of dissolved organic carbon in estuaries. *Estuaries* 17: 111-121.
- Postgate, J.R. 1973. Modern methods in the study of microbial ecology(Ed. T. Rosswall). *Bull. Ecol. Res. Comm. (Stockholm)* 17: 287.
- Rhee, G-Yull and I.J. Gotham. 1981. The effects of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limno. Oceanogr.* 26: 635-48.
- Sharp, J.H. 1977. Excretion of organic matter by marine phytoplankton: Do healthy cells do it? *Limnology and Oceanography* 22: 381-399.
- Sinclair, C.G. and H.H. Topiwala. 1970. *Biotechnol. Bioeng.* 12:1069. In Veldkamp, H. *Continuous culture in microbial physiology and ecology*, Meadowfield Press, Durham, England.
- Smith, D.F. and W.J. Wiebe. 1976. Constant Release of photosynthate from marine phytoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 75-79.
- Smith, R.L. and V. EWiedeman. 1964. A new alkaline growth medium for algae, *Can. J. Bot.* 42: 1582-6.
- Stewart, W.D., A. Haystead and H.W. Pearson. 1969. Nitrogenase Activity in Heterocysts of Blue-Green Algae. *Nature* 224: 226-228.

(1997년 3월 15일 접수)