

연속배양에서 *Microcystis aeruginosa*의 질소 인 흡수와 성장 특성

이 옥 희 · 조 경 제^{1,*}

(인제대학교 낙동강환경연구센터, ¹인제대학교 환경공학부)

Nitrogen and Phosphorus Uptake and Growth Kinetics of *Microcystis aeruginosa* Cultured under Chemostats. Lee, Ok-Hee and Kyung-Je Cho^{1,*} (Environmental Research Center for Nakdong River, Inje University, Gimhae 621-749, South Korea; ¹School of Environmental Science and Engineering, Inje University, Gimhae 621-749, South Korea)

As unialgal cultures to examine the growth kinetics of an algal species, *Microcystis aeruginosa* was grown in chemostats with nitrogen and phosphorus limitation. The nutrient concentrations of NH_4^+ and PO_4^{3-} to limit the growth of *M. aeruginosa* were approximately 200 μM and 7 μM , respectively. Cell size of the algae decreased towards the NH_4 -nitrogen limitation under a constant dilution rate, while it increased in the PO_4 -limitation. The cell quota of nitrogen under nitrogen-limited conditions was 6.1 $\mu\text{mol mg C}^{-1}$ and, under nitrogen sufficient conditions, ranged from 9.5 $\mu\text{mol mg C}^{-1}$ to 12.4 $\mu\text{mol mg C}^{-1}$. In addition to the cell quota, the half-saturation constants for nitrogen uptake (K_s) and the growth rate (μ_m) was 36~61 μM and 0.28~0.35 $\mu\text{mol cell}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ to show high values in comparison with other algal species. As the limiting concentration, cell quota and uptake rate of *M. aeruginosa* were higher than those of any other species, the its nitrogen requirement would be great. In the other side, as the half saturation constant (K_s) for nitrogen uptake was higher, and the ratios of maximum uptake rate (V_m) and K_s was relatively low, the species would have the low competitive ability in the low nitrogen concentration in the ambient water. However, the low concentration of nitrogen in the Nakdong River during the *Microcystis* outbreak would be the inevitable results of the algal blooms. In the lower parts of the Nakdong River, the nutrient status was coupled with the growth kinetics of the blooming algae to have clear seasonal variations through a year.

Key words : chemostat, growth kinetics, *Microcystis aeruginosa*, N and P limitation

서 론

미세조류(식물플랑크톤)의 생장은 여러 가지 영양염에 의해 조절되며 자연 수계에서는 비타민 등 미량으로 존재하는 영양염의 영향도 크다(Droop, 1973). 담수에서 미세조류의 생장을 제한하는 것은 주로 질소(N)와 인(P)이

며 이들의 양과 그 상대적 비율은 미세조류의 성장 뿐 아니라 종조성을 변화시키기도 한다(Kilham, 1986). 이 같은 변화는 일련의 실내 배양실험을 통해서도 증명되고 있다. 담수조류의 변동은 영양염에 대한 미세조류의 종간 경쟁력의 결과로 볼 수 있으며, 경쟁관계에서는 저농도에서 영양염 흡수력이 중요한 요소가 된다(van Donk and Kilham, 1990; Watanabe and Miyazaki, 1996).

*Corresponding author: Tel: 055) 320-3216, Fax: 055) 334-7092, E-mail: kjcho@inje.ac.kr

담수에서는 인이 질소보다 미세조류의 성장에 더 큰 영향을 미치는 경우가 많다. 호수의 부영양화 평가에서 90% 호수가 질소보다 인이 상대적으로 결핍되는 것으로 나타났다(OECD, 1982). 그러나 미세조류 성장에 있어서 인보다 질소가 부족하여 질소의 영향이 더 큰 경우가 있으며 인이 제한적인 담수에서도 일시적으로 질소의 영향이 강하게 나타날 수 있다. 일본 Kasumigaura 호수에서 *Microcystis* 남조류 번무시에 질소가 상대적으로 결핍되고 있는 점이 보고되었다(Sakamoto, 1989; Takamura *et al.*, 1992).

서구에서는 미세조류의 성장과 영양염에 관한 연구는 1960년 후반 이후 호수의 수질오염과 함께 매우 활발하였다. 미세조류의 성장과 중간 경쟁, 나아가 미세조류에 대한 질소나 인의 영향은 현재까지 여전히 중요한 과제가 되고 있다. 한편, 국내 하천과 호수에서는 담수조류가 지나치게 발생하여 수질이 악화되는 부영양화 현상이 일반화 되었고, 특히 여름에는 *Microcystis* 남조류가 수화(일명 녹조현상)를 일으켜 사회 문제로 대두되고 있다. 남조류의 대발생에는 여러 가지 부영양화 요인과 기후 요소 등이 작용하는 것으로 추정되고 있으나 질소와 인과 같은 영양염이 일차적인 원인으로 평가된다(Paerl, 1988). *Microcystis*는 거대한 군체를 이루고 부유력이 커 수표면에 조류막을 형성하거나 거품현상(scum)을 이룬다(Zohary and Breen, 1989). *Microcystis* 남조류는 부유력 이외에 높은 광조건에서도 저해가 일어나지 않는 광합성 특성, 수직 이동이 활발한 속성과 동물플랑크톤과 관계 등에서도 대발생 요인을 가지고 있다(Reynolds *et al.*, 1981).

미세조류의 성장과 영양염의 관계를 규명하는 일련의 실험에서는 연속배양이 효과적이다. 연속배양법은 특정 제한영양염을 낮은 농도로 공급하여 정상상태에 도달할 수가 있고 회분식배양과는 달리 자연상태의 영양염과 유사한 조건을 만들 수 있는 잇점이 있기 때문이다. 본 연구는 국내 호수와 하천에서 흔히 수화를 일으키는 *Microcystis aeruginosa*를 재료로 하여 연속배양의 정상상태 조건에서 성장과 영양염(질소와 인)의 관계를 분석함으로써 그 성장 특성을 규명하고자 하였다. 한편, 낙동강에서 미세조류와 무기영양염의 변동을 계절 별로 상호 관련성을 분석하였다.

연속배양과 조류성장 모델

연속배양은 배양액 탱크로부터 배양액이 연속적으로

공급되고 배양액과 미세조류 일부가 자연 유출되면서 배양용기 내 부피, 미세조류의 생물량, 배양액과 조체 내의 영양염 함량이 일정하게 유지되는 정상상태(steady state)를 장기간 유지할 수 있다(Rhee, 1980). 정상상태에 효과적으로 도달하려면 한가지 영양염이 미세조류 성장을 조절하는 제한요소가 되어야 한다. 배양액의 공급율(즉 희석률)을 변화시켜 용기 내 미세조류의 생물량과 조체 내의 영양염 함량을 변화시킬 수 있으며 정상상태에서 미세조류가 증식된 만큼 새로 유입된 배양액에 의하여 희석되기 때문에 희석률(D)이 곧 미세조류의 성장률(μ)에 해당된다. 즉, $D=\mu$ 이다(약어는 Table 1 참조). 연속배양은 생리상태 또는 생화학적 조성이 동일한 미세조류를 생산할 수 있는 점에서 회분식배양과 구별된다. 연속배양법은 D. Herbert가 1956년에 미생물의 생리특성을 규명하기 위하여 생화학적 조성이 동일한 세균체를 얻기 위하여 고안하였으며(Droop, 1968), Carperon(1968)과 Droop(1968)는 미세조류의 성장 kinetics를 규명하는데 연속배양법을 도입하였다. 연속배양은 매뉴얼 방식의 연속배양(semicontinuous culture)과 자동연속배양(chemostat)으로 구별된다.

질소와 인에 대한 미세조류 성장을 분석하는데 주로 3가지 모델이 이용된다. 제한영양염의 농도(S)에 대한 미세조류 성장률의 관계는 (1)식과 같은 포물선 형태의 Monod 식(Tilman and Kilham, 1976)에 따른다. 한편, 미세조류 성장률은 조체 내 제한영양염의 농도(cell quota, Q)와 직접적인 관계가 있으며 연속배양의 정상상태에서 μ 와 Q는 "C"자 형태의 Droop 식(Droop, 1973)으로 나타낼 수 있다(2식). (2)식에서 μ'_m 은 영양염 농도가 충분히 클 때 갖는 미세조류의 최대성장률로서 (1)식의 μ_m 보다 큰 값을 갖는다. Monod 식은 배지 내 영양염의 농도에 대한 미세조류의 성장을, Droop 식은 세포내 영양염의 함량과 미세조류 성장의 관계를 표시한다. 미세조류의 영양염 흡수율(V)과 제한영양염의 관계를 나타내는 Michaelis-Menten 식은 (3)식과 같다(Dugdale, 1967). 일반적으로 영양염의 흡수율은 연속배양의 정상상태 조건에서 배양한 미세조류를 재료로 하여 측정할 수 있다.

$$\mu = \mu_m [S / (K_s + S)] \quad (1)$$

$$\mu = \mu'_m (1 - Q_0 / Q) \quad (2)$$

$$V = V_m [S / (K_s + S)] \quad (3)$$

질소와 인은 미세조류 성장의 필수 영양염으로서 미세조류의 성장과 N, P 요구도는 위의 세가지 역학적인 관계가 성립한다. 제한영양염에 대한 미세조류의 요구도는

Table 1. Abbreviations and parameters used in the chemostat culture and nutrient-uptake experiments.

Symbol	Definition	Unit
μ	Growth rate	day^{-1}
μ_m	Maximum growth rate	day^{-1}
μ'_m	Maximum growth rate when Q is infinite	day^{-1}
D	Medium dilution rate in the chemostat culture	day^{-1}
Q	Cell quota	pmol cell^{-1}
Q_C, Q_N, Q_P	Cellular quota of carbon, nitrogen and phosphorus	pmol cell^{-1}
Q_{chl}	Cellular quota of chlorophyll- <i>a</i>	pg cell^{-1}
Q_0	Minimum cellular quota	pmol cell^{-1}
$R_{NH_4}, R_{NO_3}, R_{PO_4}$	Residual nutrient of the chemostat medium	μM
V	Nutrient uptake rate	$\text{pmol cell} \cdot \text{hr}^{-1}$
V_m	Maximum nutrient uptake rate	$\text{pmol cell} \cdot \text{hr}^{-1}$
S	Nutrient concentration in medium	μM
K_s	Half-saturation constant for nutrient uptake	$\text{pmol cell} \cdot \text{hr}^{-1}$
K_μ	Half-saturation constant for growth rate	μM
X	Algal numbers or abundance	cells mL^{-1}

최대생장을 (μ_m)과 성장률에 대한 반포화계수 (K_μ), 최대 흡수율 (V_m)과 반포화계수 (K_s)로 요약할 수 있다. 미세조류의 μ_m 과 K_μ , V_m 과 K_s 는 종에 따라 고유한 값을 가지며 다른 종과 경쟁력을 평가하는데 활용된다 (Healey and Hendzel, 1980; Tilman, 1981; van Donk and Kilham, 1990).

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 재료는 남조류 *Microcystis aeruginosa*로서 1995년 8월 낙동강 하류에서 분리 배양하여 사용하였다. *M. aeruginosa* 1개 균체를 분리하여 일차 배양시킨 다음 다시 하나의 세포를 micropipette으로 분리하여 배양시켰다. NO_3^- 또는 NH_4^+ 질소가 결핍된 chemostat 조건에서 남조류를 배양시켜 성장 특성을 분석하였으며, 배양시킨 조체를 수확하여 세포 내 질소 함량 등을 분석하였다. 본 실험에 사용된 조체는 무균상태는 아니었으며 (nonaxenic strain) 그 성장률은 약 1.2 day^{-1} 로서 접종 후 최대 생물량에 이르는 기간이 5일 정도 소요되었다.

2. 연속배양

연속배양기 (chemostat)는 Fig. 1과 같이 설치하였다. 미세조류 배양기의 용량은 1,000 mL였고 실제 조류 배양액은 650 mL를 유지시켰다. WC 배양액 (Guillard and Lorenzen, 1972) 또는 BG-11 배양액 (Rippka et al., 1979)

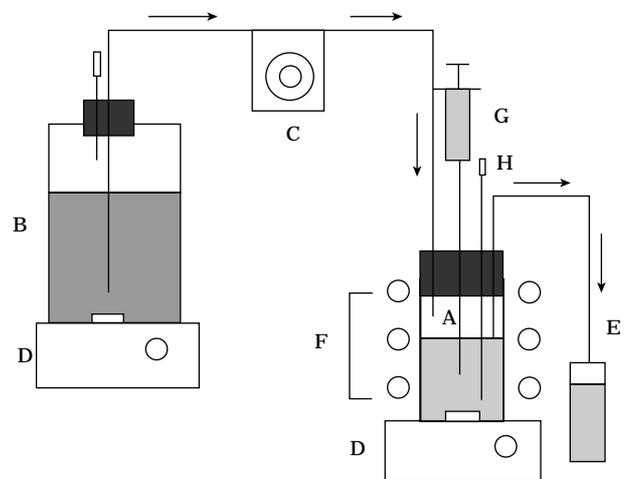


Fig. 1. Chemostat culture system for the growth kinetics of *Microcystis aeruginosa*. A: Culture vessel (1.0 L), B: PE tank (8 L) for culture medium supply, C: Peristaltic pump, D: Magnetic stirrer, E: Effluent of chemostat, F: Circular fluorescent lamp, G: Algal harvest for analysis, H: Gas injector if necessary.

이 든 용기 (8 L)에서 peristaltic pump (model MP3)로 배양액을 조류배양기로 일정 속도로 유입시키고 같은 양이 자연 배출되도록 하였다. 희석률은 최소 0.20 day^{-1} , 최대 1.10 day^{-1} 였고, 실험목적에 따라 최소와 최대 희석률 ($0.21 \sim 1.10$) 범위 내에서 조절하였다. 유입시킨 배양액의 질소 농도는 $30 \mu\text{M}$ 로서 질소 제한 또는 결핍 조건을 유지하였으며, 질소원으로는 NO_3^- (NaNO_3 또는 KNO_3)와 NH_4^+ (NH_4Cl) 두 가지를 사용하였다. 미세조류 배양상태를 관찰하기 위하여 매일 분광광도계로 흡광도를 측정하

였고 세포밀도를 계수하였다. 배양기내 제한 영양염이 검출 한계농도로 감소하고 세포 밀도가 최소 3~5일간 일정하게 유지될 때 정상상태 (steady state)로 보고 조체를 채집하였다. 희석률이 높을 때에는 정상상태에 도달하는 데는 약 2주, 희석률이 낮을 때에는 3주 정도 소요되었다. 연속배양 결과 미세조류의 성장률 (μ)과 세포내 제한 영양염의 함량 (Q)은 Droop 식에 적용하여 분석하였다. 연속배양은 25°C로 유지하였고, 광원으로는 직경 30 cm의 40W 써크라인 형광등 3개를 사용하였으며, 배양시 광의 주기는 14L : 10D였으며 광의 세기는 약 150 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 였다.

3. 성분분석

시료를 채취하여 세포 밀도를 측정하였고, GF/C 여과 조체에 대하여 엽록소 *a* (chl-*a*), 세포당 탄소 (Q_C), 질소 (Q_N) 및 인 (Q_P)의 함량과 배양액 내 NH_4^+ , NO_3^- 및 PO_4^{3-} 농도 (S)를 정량하였다. 미세조류는 Lugol 용액과 formalin 용액으로 고정하여 보관하였다. 미세조류의 탄소 및 질소의 함량을 측정하기 위하여 450°C 전기로에서 2시간 태운 GF/C 여과지 (ϕ 25 mm)로 여과하고, 여과지를 tin plate로 싸서 CHN analyzer (Perkin Elmer, model 2400, 국립수산과학원)로 탄소와 질소를 분석하였다. 세포 밀도를 이용하여 세포당 탄소, 질소 및 인의 함량을 계산하였다. 일부 시료의 세포 당 질소 함량은 고압 멸균 시킨 후 Szechrom법으로 발색 정량하였다 (Wynne and Rhee, 1986). 시료를 여과한 GF/C 여과지를 90% ethanol에서 2분간 비등 추출하여 분광광도계로 chl-*a*의 농도를 정량하였다 (Nusch, 1980).

4. 미세조류의 질소흡수

연속배양에서 평형 정상상태에 이르렀을 때 *M. aeru-*

*ginosa*의 질소 흡수율을 측정하였다. 시료 58 mL 씩을 각각 5개의 100 mL 삼각플라스크에 분주하고 여기에 농도가 서로 다른 2 mL의 NaNO_3 용액을 가하여 최종 NO_3^- 농도가 각각 10, 25, 50, 75, 100 μM 되게 하였다. 플라스크에 NaNO_3 용액을 첨가한 순간부터 0, 2, 4, 10, 20, 30, 40, 60분마다 시료 2 mL를 채취하여 용액 속의 NO_3^- 의 농도를 측정하였다. 단 $t=0$ 의 경우에는 NaNO_3 를 첨가하지 않은 시료를 GF/C로 여과한 여과액에 NaNO_3 용액을 첨가하였다 (Harrison *et al.*, 1989). 각 NO_3^- 농도 별 실험구는 3개씩 처리하였으며, 온도는 25°C 광조건은 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 에서 측정하였다.

분석용 시료 2 mL는 채취 즉시 GF/C 여과지 (ϕ 25 mm)로 여과하여 분석하였다. 자동수질분석기 (Braun Luebbe, model TRAACS-2000, Germany)로 $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ 농도와 NO_2^- 농도를 각각 정량하여 순수 NO_3^- 농도를 구하였다. 질소 흡수율은 연속배양에서 희석률 $D=0.25 \text{ day}^{-1}$, 0.75 day^{-1} 두 조건에서 측정하였다. 실험 결과 질소 농도 (S)에 대한 흡수율 (V)은 Michaelis-Menten 식에 적용하였다.

결과 및 고찰

1. N과 P의 제한상태에서 *M. aeruginosa*의 성장

연속배양 조건에서 *Microcystis* 성장에 대한 영양염의 영향을 알아보기 위하여 희석률 (D)을 0.75 day^{-1} 로 고정된 상태에서 공급 배양액의 NH_4^+ 와 PO_4^{3-} 의 농도를 변화시켰다. 실험 결과, 주어진 NH_4^+ 농도에서 세포내 chl 함량 (Q_{chl}), 탄소 함량 (Q_C), 질소 함량 (Q_N), C/N 비율, 배양기 내 영양염 농도 및 세포의 직경은 Table 2와 같다. 각 NH_4^+ 농도 조건의 연속배양에서 세포밀도는 장기간 일정한 상태 (정상상태)를 유지하였다. NH_4^+ 농도를 증가시켰을 때 세포밀도와 Q_N 은 증가하였으며, Q_C 는 완만한

Table 2. Cell density, cell quota (Q) for chl-*a*, carbon and nitrogen, residual nutrient concentration (R), cell size at the different ammonium supply as nitrogen source in the chemostat. Dilution rate is constantly kept as 0.75 day^{-1} and BG-11 media are used.

NH_4^+ (μM)	Cell density ($\times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$)	Q_{chl} (pg cell^{-1})	Q_C (pmol cell^{-1})	Q_N (pmol cell^{-1})	C/N (atom)	R_{NH_4} (μM)	R_{NO_3} (μM)	R_{PO_4} (μM)	Cell size (μm)
30	0.403	0.017	0.48	0.029	16.6	6.0	0.2	-	2.98
40	0.399	0.041	0.66	0.035	18.9	4.3	2.0	-	2.90
60	0.740	0.117	0.51	0.040	12.8	4.5	1.9	-	2.83
80	1.664	0.140	0.55	0.061	9.0	3.1	0.8	90.3	2.95
100	1.794	0.180	0.56	0.071	7.9	6.4	2.3	77.4	3.20
120	1.798	0.140	0.61	0.080	7.6	21.9	1.2	77.4	3.17
500	1.400	0.220	0.93	0.107	8.7	-	-	-	-
3,500	0.995	0.200	0.81	0.093	8.7	-	-	-	-

Table 3. Cell density, cell quota (Q) for chl-*a*, carbon, nitrogen and phosphorus, cell size at the different phosphate supply as phosphorus source in the chemostat. Dilution rate is constantly kept as 0.75 day⁻¹. WC and BG-11 medium are used in the culture, their nitrogen source are different as KNO₃ in WC medium and NaNO₃ in BG-11 medium.

Medium	PO ₄ ³⁻ (μM)	Cell density (× 10 ⁶ cells mL ⁻¹)	Q _{chl} (pg cell ⁻¹)	Q _P (pmol cell ⁻¹)	Q _C (pmol cell ⁻¹)	Q _N (pmol cell ⁻¹)	C/N (atom)	Cell size (μm)
WC	1	0.403	0.149	0.001	1.00	0.075	13.3	3.60
WC	3	0.758	0.134	0.004	0.77	0.088	8.8	3.30
WC	4	0.340	0.211	0.007	0.74	0.084	8.8	3.50
WC	5	0.656	0.163	0.006	0.87	0.093	9.4	2.70
WC	10	0.462	0.244	0.013	0.88	0.112	7.9	2.80
WC	30	0.702	0.261	0.014	0.66	0.093	7.1	2.90
BG-11	2	0.114	0.077	0.002	6.44	0.402	16.0	4.94
BG-11	8	1.130	0.319	0.008	4.21	0.323	13.0	2.56
BG-11	20	1.000	0.306	0.013	2.30	0.239	9.6	3.12

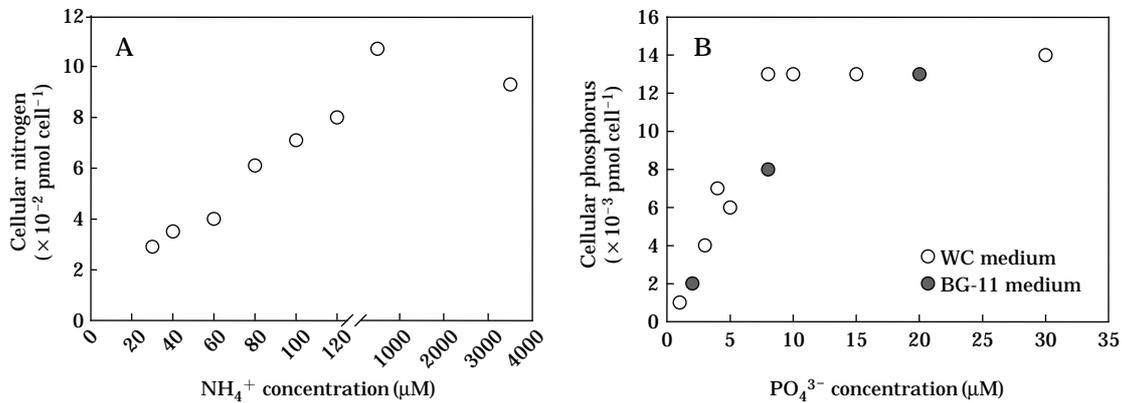


Fig. 2. Relationship between the cell quota and both NH₄⁺ (A) and PO₄³⁻ (B) concentration under chemostat culture of *Microcystis aeruginosa*, in which a dilution rate was kept to be 0.75 day⁻¹.

증가를 하므로서 Q_C/Q_N 비율은 점차 감소하였다. 그러나 세포내 chl-*a* 함량 (Q_{chl})은 크게 증가하였으며 세포의 직경도 증가하는 경향이 있었다.

한편, PO₄ 농도 이외 다른 조건은 일정한 상태에서 PO₄ 농도를 증가시켰을 때 세포밀도, Q_{chl}, Q_P, Q_N은 증가한 반면, Q_C, Q_C/Q_P, Q_C/Q_N 및 세포 직경은 감소하는 경향을 띠었다 (Table 3). PO₄³⁻의 경우 WC와 BG-11 배지를 사용하였을 때 그 경향성은 동일하였다. 그러나 NH₄⁺ 제한조건에서 세포밀도는 크게 증가한 반면 PO₄³⁻ 조건에서 증가는 미미하였다. PO₄³⁻ 농도가 증가함에 따라 세포의 직경은 점진적으로 감소하였으나 NH₄⁺의 경우에는 세포 직경이 증가하여 그 결과는 서로 상반되었다 (Fig. 4).

연속배양 조건에서 공급 배양액 내 NH₄⁺ 및 PO₄³⁻ 농도 증가에 따른 Q_N 및 Q_P를 그래프로 표시하면 Fig. 2와 같다. *M. aeruginosa*의 성장을 제한하는 NH₄⁺의 농도는 약 120 μM, PO₄³⁻는 약 7 μM 이하로 추정되었다. 이후

M. aeruginosa 연속배양에서 질소 제한결핍 상태를 유지하기 위하여 질소는 30 μM을 공급하였으며 인은 5 μM을 주었다.

2. 세포내 질소함량과 *M. aeruginosa*의 성장률

연속배양에서 정상상태에 이르게 되면 배양액 내에서 제한영양염인 질소는 검출 한계 농도로 감소하게 된다. 이 상태에서는 질소 공급량의 부족으로 미세조류의 생장은 제한을 받게 된다. 연속배양에서 질소의 농도를 30 μM로 공급하고 희석률 (D)을 0.20 ~ 1.10 day⁻¹ 범위에서 변화시켰을 때 세포의 밀도 및 세포의 C, N, P, chl-*a* 함량은 Table 4와 같다. 희석률 (D) 증가로 질소공급량을 증가시켰을 때 세포밀도와 Q_N은 완만한 증가를 보였으나 Q_{chl}, Q_P는 크게 증가한 반면, Q_C는 일정 범위값을 유지하였다. 이에 따라 미세조류의 성장률이 증가함에 따라

Table 4. Cell density, cell quota (Q) for chl-*a*, carbon, nitrogen and phosphorus, cell size at the different dilution rate under chemostat steady-state condition, in which nitrogen is limited as 30 μM nitrate supply. WC medium is used.

D (day ⁻¹)	Cell density ($\times 10^6$ cells mL ⁻¹)	Q _{chl} (pg cell ⁻¹)	Q _C (pmol cell ⁻¹)	Q _N (pmol cell ⁻¹)	Q _P (pmol cell ⁻¹)	C/N ratio (atom)	Cell size (μm)
0.20	0.563	0.046	0.55	0.040	0.003	13.8	3.12
0.25	0.430	0.067	0.53	0.044	0.005	12.1	3.20
0.30	0.533	0.070	0.50	0.043	0.005	11.7	3.15
0.35	0.833	0.079	0.49	0.044	0.008	11.2	3.01
0.65	0.833	0.081	0.51	0.050	0.017	10.1	2.96
0.75	0.866	0.091	0.47	0.059	0.021	7.9	3.01
0.90	0.995	0.095	0.36	0.067	0.026	5.3	2.90
1.00	0.776	0.112	0.56	0.076	0.030	7.4	2.83
1.10	0.762	0.126	0.65	0.069	0.029	9.3	2.92

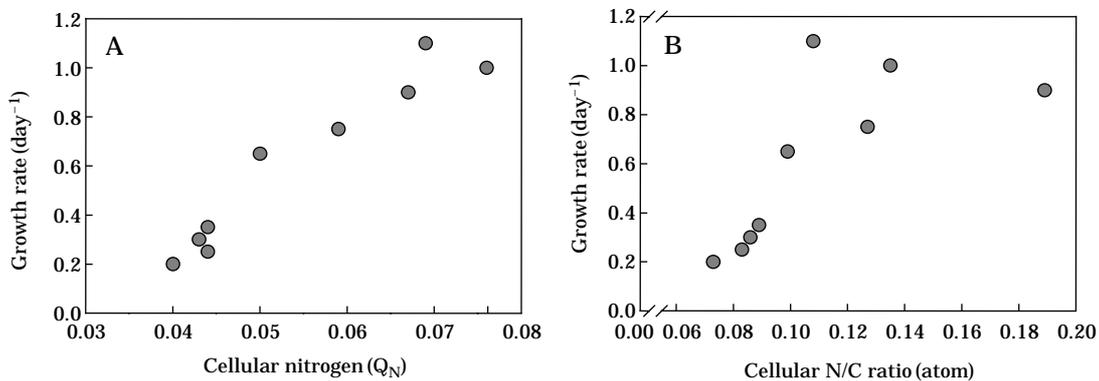


Fig. 3. The growth rate and cell quota of nitrogen in the N-limited chemostat culture of *Microcystis aeruginosa*, in which NO_3^- supply is constantly kept as 30 μM . A line is fitted to the Droop equation (A). The relationship between algal growth rate and cellular N/C ratios (B).

Q_C/Q_N 의 비율은 감소하였다. *M. aeruginosa*의 성장 특성은 희석률을 일정하게 유지하고 질소(NH_4^+) 농도를 증가시켰을 경우와 동일한 경향성을 띠었다.

정상상태에서 *M. aeruginosa*의 성장률($\mu=D$)과 Q_N 의 관계는 Fig. 3A와 같이 포물선으로 나타났다. 이를 Droop 식(Droop, 1973)에 적용하였다.

$$\mu = \mu'_m (1 - Q_0/Q_N) \quad (4)$$

여기에서 Q_0 는 세포내 질소 함량의 최소값으로 조류생장에 대한 최소 조건이고 μ'_m 은 최대성장률이다. Droop 식에서 미세조류의 성장과 영양염의 관계는 Q_0 와 μ'_m 두 가지 항목에 의하여 결정되고 종에 따라 고유한 값을 가진다. *M. aeruginosa*의 Q_0 는 0.04 pmol cell⁻¹였고, μ'_m 은 1.1 day⁻¹였다. 일부 미세조류의 Q_0 와 μ'_m 값을 요약하면 Table 5와 같다. *M. aeruginosa*의 세포내 질소의 최저함량(Q_{0N})은 매우 낮았으나 최대성장률은 높았다. 세포 당 질소함량은 세포가 클수록 증가하므로 중간 비교를 하기

위하여 세포내 탄소를 기준으로 환산하였다. 질소가 결핍되어 성장을 제한하는 조건에서 *M. aeruginosa*의 Q_{0N} 과 질소 충분조건에서 Q_N 은 각각 6.1 $\mu\text{mol mg C}^{-1}$ 및 9.5~12.4 $\mu\text{mol mg C}^{-1}$ 였다. *Ankistrodesmus convolutus* 등 담수조류의 Q_{0N} 이 2.8 $\mu\text{mol mg C}^{-1}$ 이하였고, *M. aeruginosa*는 3.4 $\mu\text{mol mg C}^{-1}$ 인 것(Oh and Rhee, 1991)을 고려하면 낙동강에서 분리 배양한 *M. aeruginosa*의 세포당 질소 함량은 매우 높았다. *M. aeruginosa*는 질소 충분상태에서도 세포내 질소 함량이 다른 미세조류 보다 높았다(Oh and Rhee, 1991). 따라서 연속배양의 질소 제한조건에서 동일한 미세조류 성장률에 대하여 *Microcystis* 남조류의 Q_N/Q_C 비는 다른 미세조류와 비교하면 높을 것으로 추정된다. Watanabe and Miyazaki (1996)의 실험 결과에서도 녹조 *Scenedesmus quadricauda*와 남조 *Microcystis novacekii*의 chemostat 배양 결과에서 *M. novacekii*의 Q_N/Q_C 비가 *S. quadricauda* 보다 매우 컸다. 한편, Rhee and Gotham (1980)와 Oh and Rhee (1991)이 조

Table 5. Q_0 and μ'_m growth parameters under the nitrate-limited culture. F: freshwater algae, M: marine algae. Q_0 : $\mu\text{mol N cell}^{-1}$, μ'_m : day^{-1}

Division		Species	Q_0	μ'_m	Condition	Reference
NO_3^-	F	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0.04	1.10	Chemostat	This study
	M	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	0.19	1.23	Chemostat	Sciandra and Raman (1994)
	M	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	0.09	1.33	Chemostat	Goldman and Peavey (1979)
	M	<i>Chattonella antiqua</i>	7.70	0.74	Semicontinuous	Nakamura (1985a)
NH_4^+	F	<i>Microcystis novacekii</i>	-	0.70	Chemostat	Watanabe and Miyazaki (1996)
	F	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0.08	1.40	Chemostat	Watanabe and Miyazaki (1996)
NO_2^-	F	<i>Chlamydomoans reinhardii</i>	0.12	7.20	Pulsed chemostat	Cunningham (1984)

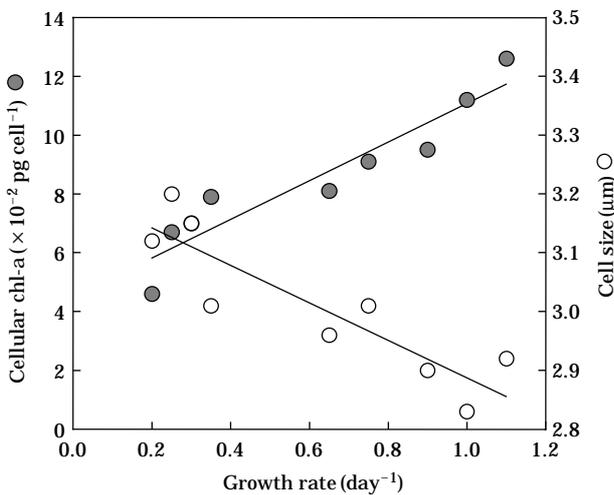


Fig. 4. The relationship between the growth rate and cellular chl-a, and the growth rate and cell size in the N-limited chemostat culture of *Microcystis aeruginosa*, in which NO_3^- supply is constantly kept as $30 \mu\text{M}$.

사한 바에 따르면 *Microcystis* 남조류의 성장에 대한 최적 N/P 비는 9~11로서 다른 담수조류에 비하여 가장 낮았다. *M. aeruginosa*의 최적 N/P와 Q_N 을 비교할 때 세포내 인의 함량(Q_P)은 질소보다 상대적으로 더 많을 것으로 추정된다.

Q_N 의 또다른 지표로서 Q_N/Q_C 비를 μ 와 비교하였다 (Fig. 3B). Q_N/Q_C 비가 증가함에 따라 μ 가 증가하여 직선적 관계가 있는 것은 *M. aeruginosa*의 성장이 질소 제한적임을 의미한다. Fig. 5B 그림에서 *M. aeruginosa*의 기울기는 12.2로서 μ 와 Q_N/Q_C 좌표 관계에서 기울기가 클수록 질소의 이용 효율이 높은 것으로 평가 될 수 있을 것이다.

정상상태의 연속배양에서 미세조류의 성장률 μ 와 제한 영양염의 세포함량 Q 의 포물선 관계는 vitamin B₁₂에 대한 *Monochrysis lutherii* 성장에서 처음 밝혀졌다 (Droop,

1968). 그 후 담수 및 해양 미세조류의 성장과 영양염의 생리특성을 규명하는데 연속배양이 많이 이용되었고, NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} 의 결핍조건에서 세포내 영양염 함량과 성장률은 Droop식으로 분석하였다 (Caperon and Meyer, 1972; Fuhs et al., 1972).

3. *M. aeruginosa*의 질소 흡수력

질소제한 (N-limited 또는 N-starved 상태)에서 연속배양시킨 *M. aeruginosa*의 질소 흡수율을 60분간 NO_3^- 의 흡수율로 측정하였다. NO_3^- 첨가 후 시간에 따른 배양액 내 NO_3^- 농도는 선형이 아닌 완만한 포물선을 그렸다 (Fig. 5A). 즉, 60분 중에서 10분 간격으로 NO_3^- 흡수율을 계산하면 배양시간이 지날수록 흡수율은 점차 감소하였다. 본 실험에서 NO_3^- 의 흡수율 (V)은 0~4분 사이에서 감소율로 산출하였다.

$$V = -dS/dt \cdot 1/X \tag{5}$$

여기서 S는 NO_3^- 의 농도, X는 세포밀도, V의 단위는 $\text{pmol cell} \cdot \text{hr}^{-1}$ 이다. 산출된 NO_3^- 의 V는 아래 Michaelis-Menten 식에 따른다.

$$V = V_m[S/(K_s+S)] \tag{6}$$

여기서 V_m 은 최대흡수율, K_s 는 반포화계수에 해당한다. (6)식을 선형식으로 전환시킨 아래 식에서 K_s 와 V_m 을 구할 수 있다.

$$S = V_m(S/V) - K_s \tag{7}$$

회귀분석으로 V_m 와 K_s 를 구한 결과, 희석률이 0.75 day^{-1} 일 때 K_s 는 $36 \mu\text{M}$ 였고, V_m 은 $0.35 \text{ pmol cell} \cdot \text{hr}^{-1}$ 였다. 희석률이 0.25 day^{-1} 일 때 K_s 는 $61 \mu\text{M}$ 였고, V_m 은 $0.28 \text{ pmol cell} \cdot \text{hr}^{-1}$ 였다. 다른 미세조류와 비교하면 *M. aeruginosa*의 K_s 은 매우 높았고 V_m 도 높은 편이었다 (Table 6). 그러나 Watanabe and Miyazaki (1996)은 *M.*

Table 6. Nitrogen uptake parameters of the chemostat culture. K_s : μM , V_m : $\mu\text{mol cell} \cdot \text{hr}^{-1}$, $^*\mu\text{mol dw mg} \cdot \text{hr}^{-1}$, $^{**}\mu\text{mol} \mu\text{g N} \cdot \text{hr}^{-1}$. F: freshwater algae, M: marine algae.

Division	Species	K_s	V_m	Culture condition	Reference
NO_3^-	F <i>Microcystis aeruginosa</i>	36~61	0.28~0.35	Chemostat	This study
	F <i>Oscillatoria agardhii</i>	28~60	0.60~0.80*	Chemostat	Zevenboom and Mur (1978)
	F <i>Scenedesmus</i> sp.	2.9~8.4	0.01~0.02	Chemostat	Rhee (1978)
	M Oceanic algal species	0.1~0.7	-	Batch	Eppley <i>et al.</i> (1969)
	M <i>Prorocentrum minimum</i>	0.05~0.31	3.37~5.30	Pulsed chemostat	Sciandra (1991)
	M <i>Fragilaria pinnata</i>	0.62	-	Batch	Carpenter and Guillard (1971)
	M <i>Chattonella antiqua</i>	2.81, 3.14	0.91, 0.78	Batch	Nakamura and Watanabe (1983)
NO_2^-	F <i>Chlamydomonas reinhardii</i>	50	0.06	Chemostat	Cunningham (1984)
NH_4^+	F <i>Microcystis novacekii</i>	0.5	$0.09 \pm 0.01^{**}$	Chemostat	Watanabe and Miyazaki (1996)
	F <i>Scenedesmus quadricauda</i>	5.0	$0.42 \pm 0.04^{**}$	Chemostat	Watanabe and Miyazaki (1996)
	M <i>Chattonella antiqua</i>	2.19 ± 0.57	2.02 ± 0.20	Batch	Nakamura (1985b)

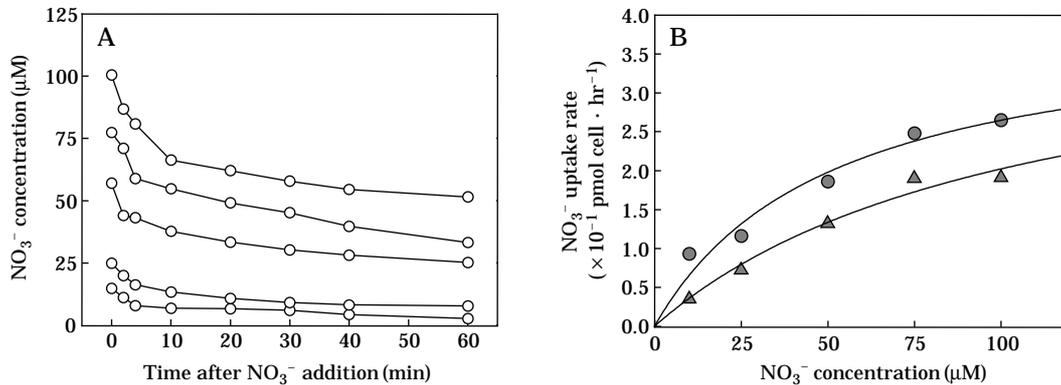


Fig. 5. Continuous NO_3^- disappearance in the short-term nitrogen uptake experiment (A). Uptake rate of chemostat-cultured *Microcystis aeruginosa* against NO_3^- concentration. Two lines represent uptake curves of cells at steady state growth rate 0.25 day^{-1} (●-●) and 0.75 day^{-1} (▲-▲), respectively (B).

*novacekii*의 V_m 이 *Scenedesmus* 등 다른 조류보다 낮았으나 낮은 V_m 에도 불구하고 심수층으로 수직이동을 하므로써 영양염을 효율적으로 흡수하는 것으로 보았다.

K_s 는 배양액내 영양염의 성장액에 대한 반포화계수이다 (Droop, 1968). K_s 는 V_m 과 반비례 관계에 있고, (7)식 세포내 질소의 함량 (Q_N)과는 역수 관계에 있다 (Rhee, 1973). V_m 은 (7)식에서 y 축 절편에서 구할 수 있으며, μ 와 세포밀도 관계에서도 구할 수 있다. 반포화계수 K_s 값은 세포가 클수록 높은 경향이 있으며, 일반적으로 성장률이 큰 조류의 영양염 흡수가 빠르고 클 것이기 때문에 성장률이 빠른 종의 K_s 가 높고, NO_3^- 에 대한 K_s 값이 높으면 대체로 NH_4^+ 의 K_s 값도 높다 (Eppley *et al.*, 1969). K_s 는 온도의 영향이 큰 반면, 광조건의 영향은 크지 않다. K_s 값은 미세조류가 낮은 농도에서 영양염을 이용할 수 있는 정도를 나타내며 (Eppley *et al.*, 1969), 이러한 기질 친화

성은 V_m/K_s 비율로 표시할 수 있다 (Suttle and Harrison, 1988). 저농도 영양염 조건에 대한 미세조류의 중간경쟁력을 평가하는데 있어서는 K_s 보다 V_m/K_s 가 더 유용하다 (Harrison *et al.*, 1989). *M. aeruginosa*의 V_m/K_s 는 다른 미세조류에 비하여 작으므로 낮은 질소농도에 대한 경쟁력이 약하며 질소의 농도가 높을 때 효과적일 수 있다.

영양염의 흡수율은 종간 특이성이 있긴 하지만 세포내 영양염의 함량이나 결핍의 강도와 관련이 있을 것이다 (Nakamura and Watanabe, 1983; Harrison *et al.*, 1989). *Microcystis*의 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 및 K^{15}NO_3 흡수실험에서도 질소의 흡수는 수층의 하층에서도 활발하여 질소흡수율은 광조건보다는 세포내 광합성 산물의 양과 그 대사율의 영향을 주로 받는 것으로 추정되었다 (Takamura *et al.*, 1987).

세포내 영양염의 함량 (Q)과 Q_N/Q_P 의 비율 등은 영양염의 공급량, 광조건 또는 온도 조건에 따라서 변화하게

된다. 영양염 충분 조건에서 세포내 영양염 함량과 최저 함량의 비율 Q/Q_0 는 영양염의 특성에 따라 다르게 나타난다 (Harrison *et al.*, 1990).

정상상태에서 영양염의 흡수율 (V)은 아래 (8)식과 같다.

$$V = \mu \cdot Q \quad (8)$$

P-starved 세포의 V_m 은 μ_m 보다 보통 3~64배에 이르며, Si의 경우 가장 낮고, 질소의 V_m 은 μ_m 의 1~6배 범위이다 (Conway *et al.*, 1976; Parslow *et al.*, 1984). Dortsch *et al.* (1982)은 미세조류의 성장과 영양염과 관계에서 재순환되는 NH_4^+ 와 PO_4^{3-} , 재순환되지 않는 NO_3^- 와 SiO_2 두 그룹으로 분류하였다. 전자는 영양염 첨가시 즉시 흡수되나 후자에 있어서는 세포가 영양염 starved 상태라면 흡수가 지연될 것이다 (Suttle and Harrison, 1988).

미세조류의 영양염 흡수 실험에서 흡수율이 초기에 높은 점 때문에 첨자를 사용하여 측정시간대 별로 구별하기도 하였다 (Goldman and Gilbert, 1982). 흡수율은 주로 NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} 를 대상으로 측정되어 왔으며 초기 30분간 흡수율이 중요하게 인식되고 있다 (Conway *et al.*, 1976). 그러나 영양염 흡수실험에서 제한영양염의 감소 경향이 본 실험결과와 같이 포물선으로 나타나는가 하면 직선적으로 감소하기도 하였다 (Caperon and Meyer, 1972; Nakamura, 1985a; Harrison *et al.*, 1989).

4. 낙동강에서 Microcystis 발생과 영양염의 변동

낙동강 하류지역에서 *M. aeruginosa*가 대발생하는 시기에 수질, 특히 질소와 인의 농도 및 변동은 *M. aeruginosa*의 영양생리 kinetics 특성과 부합하는 것으로 나타나 이를 중심으로 살펴보았다. 낙동강 하류(구포교)와 서낙동강(김해교)에서 1991년부터 1998년까지 *Microcystis*의 발생 변동을 보면 Fig. 6과 같다. 주로 *Microcystis aeruginosa*로서 5월 또는 6월 경에 나타나기 시작하여 9월까지 지속되었으며 늦은 경우에는 11월까지 잔류하였다. 낙동강에서는 1987년 하구둑 건설 직후에는 *Microcystis* 대발생하는 수화현상이 없었으며 1992년의 7월 말경에는 1회성으로 수화를 일으켰다가 곧 소멸하였다. 그러나 1994년 여름부터는 매년 지속적으로 수화현상이 나타났다. 특히 강수량이 적었던 1995~1997년에는 *Microcystis* 수화 빈도가 높았고 발생 지속기간도 매우 길었다. 연도 별로 보면 *Microcystis*의 발생 및 소멸 시기가 불규칙하였으며 변무현상은 변동이 심하였다. *Microcystis* 발생과 그 지속 기간은 유량과 같은 수문요

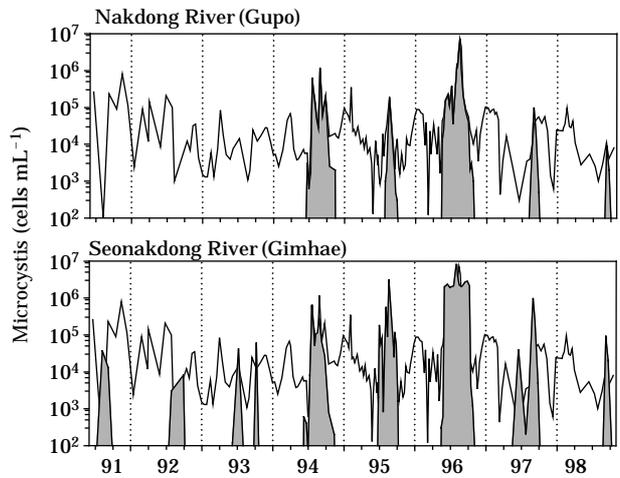


Fig. 6. Long-term variation of abundance of total phytoplankton (solid lines) and cyanobacteria *Microcystis* species (gray-shade areas) in the lower parts of the Nakdong River (Gupo Bridge) and the Seonakdong River (Gimhae Bridge).

인, 영양염류, 기후요인 (강수량, 일사량, 수온 등) 등에 따라 변동이 심한 것으로 추정된다.

낙동강 하류와 서낙동강에서 중요 미세조류와 영양염의 상호관련성을 파악하기 위하여 1995년부터 1997년까지 계절에 따른 영양염의 농도 범위를 좌표로 요약하며 Fig. 7과 같다. 여름 (Sm)에는 *Microcystis* 남조가, 겨울 (Wn)에는 *Stephanodiscus* 규조류가, 봄 (Sp)과 가을 (At)에 녹조와 규조가 대발생한 시기의 영양염 농도의 범위를 표시하였다. 계절에 따른 NH_4^+ , PO_4^{3-} 및 SiO_2 영양염의 농도 범위는 큰 차이가 있었다. NH_4^+ 농도는 7월부터 급격히 감소하였으며, *Microcystis* 대발생 시기에는 비교적 낮은 농도를 유지하였다. 반면, PO_4^{3-} 농도는 여름에 크게 증가하고 겨울에 가장 감소하여 NH_4^+ 와 대비를 이루었다. NO_3^- 의 연중 변동은 NH_4^+ 만큼 뚜렷하지 않았으나 *Microcystis* 발생시기에는 감소하였다. 결과적으로 여름에는 무기질소 영양염 (DIN, dissolved inorganic nitrogen)과 무기인 (SRP, soluble reactive phosphorus)의 비율 (DIN/SRP)이 연중 가장 낮았고 겨울 갈수기에는 매우 높았다 (Cho and Shin, 1997). 이러한 환경은 오염물질의 부하와 유량 등과 1차적 관련이 있지만 미세조류의 대발생으로 특정 영양염이 감소하는 경우가 관찰되었다 (Cho and Shin, 1998). 낙동강에서 *Microcystis* 남조 (여름)와 *Stephanodiscus* 규조 (겨울)의 대발생으로 겨울에는 PO_4^{3-} 와 SiO_2 농도가 매우 낮아진 반면 여름에는 NH_4^+ 농도가 연중 가장 낮아지는 등, 특정 무기 영양염

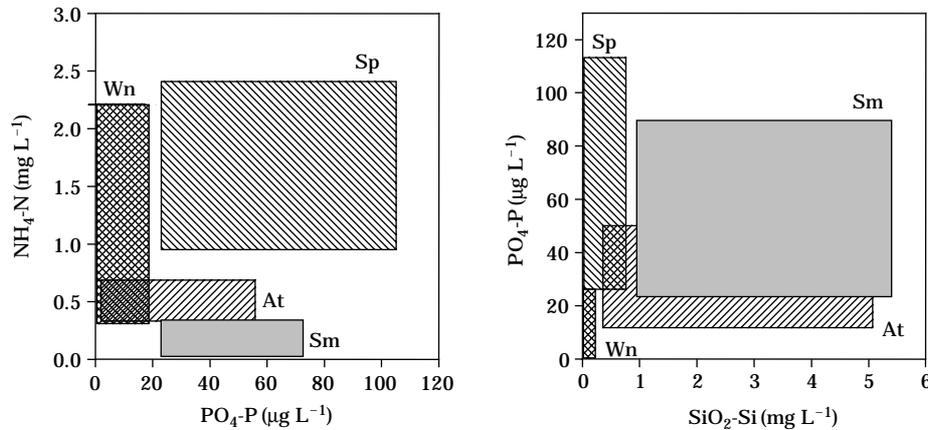


Fig. 7. Coordinate summary to show the seasonal variations of inorganic nutrient concentration - NH_4^+ , PO_4^{3-} , SiO_2 - in the lower parts of the Nakdong River. Sp: Spring, Sm: Summer, At: Autumn, Wn: Winter.

의 변동이 컸다. 이 같은 현상은 수화조류의 영양생리 특성과 부합되는 것으로 추정된다.

수질 분석의 결과로 볼 때 *Microcystis* 성장에는 NH_4^+ , 겨울과 봄에 주로 발생하는 *Stephanodiscus* 규조류는 PO_4^{3-} 또는 SiO_2 가 제한요인으로 작용하거나 미세조류의 성장에 영향을 미치는 인자로 평가되었다. 특히, *Microcystis*는 질소원으로서 NO_3^- 보다는 NH_4^+ 를 선택적으로 흡수하는 점으로 볼 때 (Takamura *et al.*, 1987), NO_3^- 보다 NH_4^+ 의 영향이 더 클 것으로 추정된다. 여름철 NH_4^+ 감소 현상과 겨울철 PO_4^{3-} 및 SiO_2 의 결핍 현상은 하류 지역 뿐 아니라 합천 적포교까지 관찰되어 영양염 결핍은 하류 전지역에서 일어났다 (Cho and Shin, 1997). 낙동강 하류에서 계절에 따른 N, P 및 Si 영양염의 변동은 미세조류 발생량이나 종 구성과 관련이 있으며 특정 미세조류의 대발생에 대한 요인이 될 수 있다. 특히 *Microcystis*의 수화 현상은 N/P 비율이 상대적으로 낮거나 무기 영양염 농도가 낮은 수질에서 주로 발생하는 것으로 보고되고 있으나 (Reynolds and Walsby, 1975; Smith, 1983; Xie *et al.*, 2003), *Microcystis* 발생시 N/P 비율과 영양염의 농도가 낮은 것은 남조류의 발생 원인이라기 보다는 남조류의 대발생 결과 생긴 현상으로 보고되고 있다 (Xie *et al.*, 2003). 한편, 낙동강에서 *Microcystis* 남조류와 *Stephanodiscus* 규조류가 대발생하는 것은 영양염 요구와 미세조류의 성장 등 두 조류의 영양 생리적 특성이 다른 미세조류와 비교하여 경쟁력이 큰 결과로 추정된다. 하천과 호수의 부영양화로 식물플랑크톤 발생량이 증가하는 과정에서 소수 특정 종이 폭발적으로 증가하는 경우가 많다. 낙동강을 비롯 국내 담수에서는 여름에는 *Microcystis* 남조류가 대발생하고, 겨울과 봄 갈수기에는

Stephanodiscus 규조류 단일종에 의한 수화 현상이 일반화되고 있다. 오염지표성 조류를 감소시키거나 부영양화 경감을 위해서는 미세조류의 발생요인을 규명하고 그에 따른 요인 분석이 중요하다.

적 요

연속배양의 평형 정상상태 조건에서 담수조류 *Microcystis aeruginosa*의 최대성장률 (μ_m)과 세포내 영양염의 농도 (Q)의 관계, 질소 결핍 상태에서 액체배지에서 영양염 농도 (S)와 흡수율 (V)의 관계를 각각 조사하였다. 질소 제한조건에서 *M. aeruginosa*의 세포 당 Q_{0N} 은 $0.04 \text{ pmol cell}^{-1}$, μ_m 은 1.1 day^{-1} 였고, 제한조건에서 최저값 Q_{0N} 과 충분조건에서 Q_N 을 탄소기준하여 각각 $6.1 \text{ } \mu\text{mol mg C}^{-1}$ 및 $9.5 \sim 12.4 \text{ } \mu\text{mol mg C}^{-1}$ 였다. 다른 미세조류와 비교하면 세포의 질소 함량이 매우 높았고 질소 결핍시에도 그 함량이 높게 유지되어 질소 요구도가 높은 종이였다. 질소 제한조건에서 영양염 흡수 측정 결과에서 반포화계수 (K_s)와 최대흡수율 (V_m)은 각각 $36 \sim 61 \text{ } \mu\text{M}$ 및 $0.28 \sim 0.35 \text{ } \mu\text{mol cell} \cdot \text{hr}^{-1}$ 범위였다. *M. aeruginosa*의 K_s 값은 매우 높았고 V_m 도 높은 편이었다. K_s 와 흡수력 V_m 은 미세조류의 영양상태 즉 영양염의 세포내 함량 (Q)이나 제한영양염의 결핍의 강도의 영향을 받고 미세조류 성장률과도 관련이 있다. *M. aeruginosa*는 다른 미세조류에 비하여 세포내 질소 함량과 성장률이 높기 때문에 질소와 인에 대한 흡수율이 높을 것이다. 그러나 질소 흡수력의 반포화계수 K_s 값이 높고 V_m/K_s 비율은 낮아 수계에서 질소가 저농도 일 때에는 다른 미세조류와 비교하면 경쟁력이 떨어지고 질소에 대한 기질 친화력은 약한 것으로 나타

났다. 낙동강 하류지역에서 *M. aeruginosa*가 대발생하는 시기에 수중 영양염의 농도 변동은 *M. aeruginosa*의 영양생리 kinetics 특성과 잘 부합하는 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 1999년도 (사)한국물환경학술단체연합회의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다. 미세조류의 세포내 탄소 (C)와 질소 (N) 함량은 국립수산과학원에 분석 (Perkin Elmer CHN analyzer, model 2400)을 의뢰하였습니다. 연구비 지원과 기기분석에 대하여 감사 드립니다.

인 용 문 헌

- Caperon, J. 1968. Population growth response of *Isochrysis galbana* to nitrate variation at limiting concentrations. *Ecology* **49**: 866-872.
- Caperon, J. and J. Meyer. 1972. Nitrogen limited growth of marine phytoplankton. I. Changes in population characteristics with steady state growth rate. *Deep-Sea Res.* **19**: 601-618.
- Carpenter, E.J. and R.R.L. Guillard. 1971. Intraspecific differences in nitrate half-saturation constants for three species of marine phytoplankton. *Ecology* **52**: 183-185.
- Cho, K.J. and J.G. Shin. 1997. Dynamics of inorganic N · P nutrient from midstream to downstream of the Nakdong River. *Korean J. Limnol.* **30**: 85-95.
- Cho, K.J. and J.K. Shin. 1998. Dynamics of inorganic N · P nutrient and planktonic algae during summer and winter in downstream of the Nakdong River. *Korean J. Limnol.* **31**: 67-75.
- Conway, H.L., P.J. Harrison and C.O. Davis. 1976. Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. II. Transient response of *Skeletonema costatum* to a single addition of the limiting nutrient. *Mar. Biol.* **35**: 187-199.
- Cunningham, A. 1984. The impulse response of *Chlamydomonas reinhardtii* in nitrite-limited chemostat culture. *Biotech. Bioeng.* **26**: 1430-1435.
- Dortch, Q., J.R. Clayton, S.S. Thoresen, S.L. Bressler and S.I. Ahmed. 1982. Response of marine phytoplankton to nitrogen deficiency : decreased nitrate uptake vs. enhanced ammonium uptake. *Mar. Biol.*, **70**: 13-19.
- Droop, M.R. 1968. Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition of *Mono-chrysis lutherii*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **48**: 689-733.
- Droop, M.R. 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J. Phycol.* **9**: 264-272.
- Dugdale, R.C. 1967. Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification and significance. *Limnol. Oceanogr.* **12**: 685-695.
- Eppley, R.W., J.N. Rogers and J.J. McCarthy. 1969. Half-saturation constant for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **14**: 912-920.
- Fuhs, G.W., S.D. Demmerle, E. Canelli and M. Chen. 1972. Characterization of phosphorus-limited algae (with reflections on the limiting-nutrient concept). In: Proceedings of the Special Symposium on Nutrients and Eutrophication. *Am. Soc. Limnol. Oceanogr. Spec. Sym.* **1**: 113-132.
- Goldman J.C and P.M. Gilbert. 1982. Comparative rapid ammonium uptake by four species of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **27**: 814-827.
- Goldman, J.C. and D.G. Peavey. 1979. Steady-state growth and chemical composition of the marine chlorophyte *dunaliella tertiolecta* in nitrogen-limited continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 894-901.
- Guillard, R.R.L. and C.J. Lorenzen. 1972. Yellow green algae with chlorophyllide c. *J. Phycol.* **8**: 10-14.
- Harrison, P.J., J.S. Parslow and H.L. Conway. 1989. Determination of nutrient uptake kinetic parameters: a comparison of methods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **52**: 301-312.
- Harrison, P.J., P.A. Thompson and G.S. Calderwood. 1990. Effectes of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *J. Appl. Phycol.* **2**: 45-56.
- Healey F.P. and L.L. Hendzel. 1980. Physiology indicators of nitrogen deficiency in lake phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **37**: 442-453.
- Kilham, S.S. 1986. Dynamics of Lake Michigan natural phytoplankton communities in continuous cultures along a Si:P loading gradient. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* **43**: 351-360.
- Nakamura, Y. 1985a. Ammonium uptake kinetics and interactions between nitrate and ammonium uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Japan* **38**: 33-38.
- Nakamura, Y. 1985b. Kinetics of nitrogen or phosphorus limited growth and effects of growth conditions on nutrient uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Japan* **41**: 381-387.
- Nakamura, Y. and M.M. Watanabe. 1983. Nitrate and phosphate uptake kinetics of *Chattonella antiqua* grown in light/dark cycles. *J. Oceanogr. Soc. Japan* **39**:

- 167-170.
- Nusch E.A. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih. (Ergebn. Limnol.)* **14**: 14-36
- OECD. 1982. Eutrophication of Waters; Monitoring, Assessment and Control. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris. 154pp.
- Oh, H.M. and G.Y. Rhee. 1991. A comparative study of microalgae isolated from flooded rice paddies: light-limited growth, C fixation, growth efficiency and relative N and P requirement. *J. Appl. Phycol.* **3**: 211-220.
- Paerl, H.W. 1988. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine and inland waters. *Limnol. Oceanogr.* **33**: 823-847.
- Parslow, J.S., P.J. Harrison and P.A. Thompson. 1984. Development of rapid ammonium uptake during starvation of batch and chemostat cultures of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Mar. Biol.* **83**: 43-50.
- Reynolds, C.S. and A.E. Walsby. 1975. Water blooms. *Biol. Rev.* **50**: 437-481.
- Reynolds, C.S., G.H.M. Jaworski, H.A. Cmiech and G.F. Leedale. 1981. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **293**: 419-476.
- Rhee, G.-Y. 1973. A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. *J. Phycol.* **9**: 495-506.
- Rhee, G.-Y. 1978. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limnol. Oceanogr.* **23**: 10-25.
- Rhee, G.-Y. 1980. Continuous culture in phytoplankton ecology. In: Advances in Aquatic Microbiology (M.R. Droop and H.W. Jannasch, eds.). Academic Press Inc. Ltd., London. pp. 151-203.
- Rhee, G.-Y. and I.J. Gotham. 1980. Optimum N:P ratios and coexistence of phytoplankton algae. *J. Phycol.* **16**: 486-489.
- Rippka, R., J. Duruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman and R.Y. Stanier. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 1-61.
- Sakamoto, M. 1989. Inorganic carbon and ammonium uptake by phytoplankton nitrogen depleted waters in Lake Suwa. *Japanese J. Limnol.* **50**: 45-51.
- Sciandra, A. 1991. Coupling and uncoupling between nitrate uptake and growth rate in *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) under different frequencies of pulsed nitrate supply. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **72**: 261-269.
- Sciandra, A. and P. Ramani. 1994. The steady states of continuous cultures with low rates of medium renewal per cell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **178**: 1-15.
- Smith V.H. 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science* **221**: 669-671.
- Suttle, C.A. and P.J. Harrison. 1988. Ammonium and phosphate uptake rates, N : P supply ratios, and evidence for N and P limitation in some oligotrophic lakes. *Limnol. Oceanogr.* **33**: 186-202.
- Takamura, N., A. Otsuki, M. Aizaki and Y. Nojiri. 1992. Phytoplankton species shift accompanied by transition from nitrogen dependence to phosphorus dependence of primary production in Lake Kasumigaura, Japan. *Arch. Hydrobiol.* **124**: 129-148.
- Takamura, N., T. Iwakuma and M. Yasuno. 1987. Uptake of C and N (ammonium, nitrate and urea) by *Microcystis* in Lake Kasumigaura. *J. Plank. Res.* **9**: 151-165.
- Tilman, D. 1981. Tests of resource competition theory using from species of Lake Michigan algae. *Ecology* **62**: 802-815.
- Tilman, D. and S.S. Kilham. 1976. Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the diatom *Asterionella formosa* and *Cyclotella meneghiniana* in batch and semicontinuous culture. *J. Phycol.* **12**: 375-383.
- van Donk, E. and S.S. Kilham. 1990. Temperature effects on silicon- and phosphorus-limited growth and competitive interactions among three diatoms. *J. Phycol.* **26**: 40-50.
- Watanabe, T. and T. Miyazaki. 1996. Maximum ammonium uptake rates of *Scenedesmus quadricauda* and *Microcystis navacekii* grown under nitrogen limitation and implications for competition. *J. Phycol.* **32**: 243-249.
- Wynne, D. and G.-Y. Rhee. 1986. Effect of light intensity and quality on the relative N and P requirement (the optimum N : P ratio) of marine planktonic algae. *J. Plank. Res.* **8**: 91-103.
- Xie, L., P. Xie, S. Li, H. Tang and H. Liu. 2003. The low TN:TP ratio, a cause or a result of *Microcystis* blooms? *Wat. Res.* **37**: 2073-2080.
- Zevenboom, W. and L. Mur. 1978. N-uptake and pigmentation of N-limited chemostat cultures and natural populations of *Oscillatoria agardhii*. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* **21**: 261-274.
- Zohary, T. and C.M. Breen. 1989. Environmental factors favouring the formation of *Microcystis aeruginosa* hyperaccumulators in a hypertrophic lake. *Hydrobiologia* **178**: 179-192.

(Manuscript received 10 February 2006,
Revision accepted 15 March 2006)