

진해만에서 분리한 기생성 와편모류  
*Amoebophrya* sp. ex *Heterocapsa triquetra*의 생태특성

박종규<sup>1\*</sup> · 허현정<sup>2</sup> · D. Wayne Coats<sup>3</sup> · 이원호<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>군산대학교 해양학과, <sup>2</sup>김해시청 경제환경국, <sup>3</sup>스미스소니언 환경연구센터)

Ecological Characteristics of the Endoparasitic Dinoflagellate,  
*Amoebophrya* sp. ex *Heterocapsa triquetra* Isolated from Jinhae Bay, Korea

Jong-Gyu Park<sup>1\*</sup>, Hyun-Jung Hur<sup>2</sup>, D. Wayne Coats<sup>3</sup> and Wonho Yih<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of oceanography, Kunsan National University, Kunsan, 573-701, Korea

<sup>2</sup>Welfare and Environment Bureau, Gimhae City Hall, Geoje, 650-800, Korea

<sup>3</sup>Smithsonian Environmental Research Center, Edgewater, Maryland 21037-0028, USA

Infection of free-living dinoflagellates by endoparasitic dinoflagellates of the genus *Amoebophrya* are thought to have significant impacts on host population dynamics and have long been proposed to be a potential biological agent for controlling harmful algal bloom (HAB). To understand the impact of *Amoebophrya* on particular host species, however, it is necessary to quantify aspects the parasites life cycle. Here we used cultures of *Amoebophrya*-host systems from Jinhae Bay, Korea to determine, parasite generation time, and dinospore survival and infectivity. The proportion of host cells infected by *Amoebophrya* sp. changed sharply from 5% to 87% with increasing dinospore:host inoculation ratios. In the absence of *H. triquetra*, most free-living dinospores died within 72 hours and their ability to infect host cells decreased remarkably in a day. The relatively short free-living phase of *Amoebophrya* suggests that the spread of infections is most likely to occur during seasons of high host abundance, as that is when dinospores have the greatest chance of encountering host cells. Infection of host cells inoculated with dinospores during the day was higher than when inoculated during the night, suggesting that infection rates might be related to environmental light conditions and/or diurnal biological rhythm of host species. Total generation times of parasite strains from a thecate dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* were nearly the same regardless of dinospore:host inoculation ratios, representing  $54 \pm 0.5$  h in a 1:1 ratio and  $55 \pm 1.2$  h in a 20:1 ratio. Dinospore production of *Amoebophrya* sp. infecting *Heterocapsa triquetra* was estimated to be 125 dinospores per a strain of *Amoebophrya* sp. There is a growing need to maintain a variety of host-parasite systems in culture and to examine their autecology under various environmental conditions. Such studies would be very helpful in understanding ecological role of these parasites, their overlooked importance in the flow of material and energy in marine ecosystem, and their practical use as biological control agents applied directly to areas affected by HAB.

**Key Words:** *Amoebophrya*, dinospore, Harmful algal bloom, *Heterocapsa triquetra*, Jinhae Bay, Parasitic dinoflagellate

서 론

기생성 와편모류 *Amoebophrya*에 대한 관심은 약 40여 년에 이르는 짧지 않은 역사를 가지고 있다(박 2002). 그 동안 많은 연구자들이 *Amoebophrya*의 세포생물학적 특성이나 미세구조, 생활사 등에 대하여 연구하였고, 일부 정리하기도

하였다(Cachon and Cachon 1987; Drebes 1984; Coats 1999; 박 2002; Park et al. 2004). 최근에는 *Amoebophrya*의 숙주특이성, 분자생물학적 특성 등에 대한 연구결과들을 많이 발표하고 있다(Gunderson et al. 2000; Kim et al. 2004; Kim 2006; Salomon et al. 2003). 이런 연구 결과는 미국 Smithsonian 환경연구센터의 숙주-기생생물 배양시스템 확립에 기인하는 바가 크다(Coats et al. 1996; Yih and Coats 2000; Coats and Park 2002). 그 동안 숙주-기생생물 배양체를 보유하지 못하여 이 생물 시스템의 생태와 생물학적 특성에 관한 연구를

\*Corresponding author (rtjgpark@kunsan.ac.kr)

전혀 수행하지 못했기 때문이다. 국내에서도 이들에 이어 몇 차례 배양시스템 성공 사례(허 2003; 김 등 2002a; 박 등 2007)가 발표되었고 아울러 학술적으로 의미있는 연구결과도 발표되고 있다(Kim *et al.* 2004; Kim 2006).

*Amoebophrya*에 대한 관심이 증가하는 이유 중 하나는 생물학적으로 적조를 제어하려는 실용적 의도와 관련이 있다. *Amoebophrya*는 숙주생물에 기생하여 이들을 수 일 내로 괴멸시키므로 숙주의 개체군 동태에 막대한 영향을 미친다(Coats *et al.* 1996). 이런 특성 때문에 이미 오래 전부터 적조를 생물학적으로 제어하는 데 이용할 수 있을 것으로 판단하고 있었다(Taylor 1968). 하지만 오래 전에 숙주 특이성에 의문이 제기되었고(Nishitani *et al.* 1985), 최근 일부 유각 와편모류에 기생하는 *Amoebophrya spp.* 중에서 숙주 특이성이 미약하거나 불확실한 종들이 존재하는 것으로 밝혀져(Sengco *et al.* 2003; Kim 2006) 현장적용에 문제점으로 대두하였다.

*Amoebophrya*의 숙주 특이성 이외에 적조와 관련이 있는 또 다른 관심분야는 이들의 숙주 감염능력, 총 세대기간, *Amoebophrya*가 어린 개체인 와편모포자(dinospore)를 생산하는 능력, 해수 중에서 생존능력 등에 관한 것이다. 이와 같은 *Amoebophrya*의 생물학적 특성은 숙주생물의 개체군 동태와 크게 관련이 있다. *Amoebophrya*는 일단 숙주를 감염시키면 감염된 숙주를 반드시 죽이고 빠져 나온다. 따라서 기생생물이 숙주를 감염시킬 수 있는 능력과 숙주생물 체내에서 한 세대를 마치는 데 소요되는 기간, 숙주에서 빠져 나와 새로운 숙주를 찾는 dinospore의 수와 이들이 해수 중에서 숙주 없이 생존할 수 있는 기간 등은 숙주생물의 개체군 동태와 밀접한 관계가 있다. 하지만 이런 중요성에도 불구하고 이들의 생물학적 특성에 대한 연구는 크게 미흡하여 아직 소수의 *Amoebophrya sp.*에 대한 연구결과만 발표되었다(Yih and Coats 2000; Coats and Park 2002; 김 2002b; Kim *et al.* 2004). 앞으로 현장에서 생물학적 적조 제어에 기생생물을 실제로 적용하려면 독성 적조종을 포함한 다양한 숙주와 여기에 기생하는 *Amoebophrya* 배양체를 확립하고 이들의 생물학적 특성을 사전에 반드시 인지하여야 할 것이다.

연구에 앞서 사전연구를 통하여 진해만에서 *Akashiwo sanguinea*와 *Heterocapsa triquetra* 2종에 대한 숙주-기생생물 배양체를 확립하였다. 본 연구에서는 새로 확립한 숙주-기생생물 배양체를 이용하여 숙주세포에 기생하는 *Amoebophrya sp.*의 숙주 감염능력과 총 세대기간, *Amoebophrya sp.*의 dinospore 생산능력, 해수 중에서 생존능력 등을 알아보고자 하였다. *H. triquetra*에 기생하는 *Amoebophrya sp.*의 생물학적 특성은 전 세계적으로 아직 보고된 적이 없어 이번에 최초로 제시한다.

## 재료 및 방법

### 기생생물 분리 및 배양

기생생물 배양을 시도하기 이전에 먼저 1여년간 사전 연구를 수행하여 *Amoebophrya*가 기생하는 숙주를 탐색하고 이들을 배양하였다. 시료 분리를 위해 진해만에서 해수를 채집하여 형광현미경(Olympus BH2, excitation filter BP-490, barrier filter L-435,  $\times 100$ ,  $\times 200$ )하에서 관찰한 다음 *Amoebophrya sp.*에 감염되어 특징적인 녹색형광을 띠는 세포를 Pasteur-pipette으로 분리하였다(박 등 2007 참조). 분리한 세포는 여과해수로 3-4회 세척하여 숙주가 있는 5 mL vial에서 1차 배양하였고, 1차 배양에 성공한 시료는 큰 유리 용기에서 2차, 3차 배양하였다. 배양에 완전히 성공하면 약 2일 간격으로 멸균한 125 mL Narrow-Mouth Square Bottle(PC)에 숙주를 75 mL씩 채운 후 *Amoebophrya sp.*에 감염된 숙주를 약 25 mL 접종하여 유지하였다. 실험에 이용한 배양체는 수온 20°C, 빛의 세기 100  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 광주기 14L:10D 환경에서 배양하였다. 조류 배양 시 Si가 첨가되지 않은 f/2 배지(Gullard and Ryther 1962)를 사용하였고, 배양 용기는 125 mL Narrow-Mouth Square Bottle(PC)를 이용하였으며, 실험에 필요한 모든 실험 기구는 Autoclave로 멸균(121°C, 15 lb, 20분)하였다. 위의 방법으로 유각 와편모류 *Heterocapsa triquetra*에 기생하는 *Amoebophrya spp.*의 숙주-기생생물 시스템 배양에 성공하여 숙주 감염능력과 총 세대기간, *Amoebophrya*의 dinospore 생산능력, 해수 중에서 생존능력 등을 측정하는 데 이용하였다.

### *Amoebophrya sp. ex Heterocapsa triquetra*의 생물학적 특성

*Amoebophrya sp. ex H. triquetra*의 생물학적 특성을 알아보기 위해 아래에 기술한 모든 실험은 지수성장기의 숙주세포와 동일 세대의 기생성 와편모류를 대상으로 하였다. 동일 세대의 dinospore를 얻기 위하여 먼저, 압력을 주지 않은 상태에서 일차적으로 공극 12  $\mu\text{m}$  Nucleopore 여과지로 숙주-기생생물의 배양체를 걸러 내어 숙주세포와 dinospore를 분리하였다. 여기에서 수확한 여과배양수 내 다양한 나이의 dinospore를 지수성장기의 새로운 숙주생물에 충분한 비율로 접종하였으며, 1 세대기간이 지난 후 다시 위에서 기술한 방법으로 숙주세포에서 동일세대의 신선한 dinospore를 수확하여 모든 실험에 이용하였다(Coats and Park 2002). 이렇게 수확한 dinospore는 최대 6시간 이내의 나이를 가진다.

### *Amoebophrya sp. ex Heterocapsa triquetra*의 숙주 감염능력

기생생물과 숙주의 비율에 따라 숙주생물의 감염능력이 어떻게 변화하는지 알아보기 위하여 *Amoebophrya sp. ex H.*

*triquetra*의 dinospore와 숙주생물 *H. triquetra*를 20 mL scintillation vial에 각각 1:1, 2.5:1, 5:1, 10:1, 20:1 비율로 접종하였다. 실험에 접종할 dinospore 수를 결정하기 위하여 12  $\mu\text{m}$  Nucleopore 여과지로 dinospore를 수확하여 포르말린으로 고정된 다음, 그 즉시 hemocytometer에 옮겨 형광현미경(Olympus BH2,  $\times 200$ )하에서 계수하였다. 실험은 각 접종비율 마다 3배수로 하였다. 숙주생물의 초기농도는 1,000 cells mL<sup>-1</sup>가 유지되도록 조절하였으며, 기생생물을 접종한 다음 24시간, 36시간, 42시간, 48시간 후에 숙주 감염 정도를 파악하였다. 시료는 포르말린으로 고정하였으며 고정 시료는 즉시 Sedgwick-Rafter Counting Chamber에 옮긴 다음, *Amoebophrya* sp.에 감염되어 녹색 형광을 띠는 감염 숙주를 형광현미경(Olympus BH2, excitation filter BP-490, barrier filter L-435,  $\times 100$ )으로 계수하였다(Combs and Park 2002). 매 시료마다 100 개체를 관찰하였으며 이 중 감염된 숙주세포의 비율을 dinospore의 숙주감염능력으로 보았다. 실험결과는 아래의 2매개변수 단일 지수함수식(a single two-parameter exponential rise to maximum)에 적용하였다.

$$y = a(1 - e^{-bx})$$

a: 최대감염능력( $I_{\text{max}}$ )

$$b: \frac{\alpha}{I_{\text{max}}}$$

$\alpha$ : 초기 직선부분의 경사 즉, dinospore의 초기감염능력

*Amoebophrya* sp. ex *H. triquetra*의 숙주 감염능력이 기생생물의 일주기 생체리듬이나 광주조건에 따라 달라지는지 알아보기 위하여 낮 시간(light cycle)과 밤 시간(dark cycle)에 dinospore를 수확하여 숙주생물에 접종하였다. 밤 시간에 대한 실험은 dinospore 수확 시간을 달리하여 2회 수행하였다. 첫 번째는 밤 시간을 시작한 지 1시간 후, 두 번째는 2시간 후에 dinospore를 수확하였다. 실험방법은 위와 동일하며, 감염능력 파악을 위한 시료는 42시간 후에 부채집하였다.

*Amoebophrya* sp. ex *Heterocapsa triquetra* dinospore의 생존능력과 감염능력

숙주에서 빠져나온 *Amoebophrya*의 dinospore가 해수내에서 생존하는 능력을 알아보기 위해서 숙주-기생생물의 배양체를 공극 12  $\mu\text{m}$ 인 Nucleopore 여과지로 걸러 낸 다음 숙주생물 없이 dinospore만을 원배양체와 같은 배양조건(수온 20°C, 빛의 세기 100  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 광주기 14L:10D)에서 3배수로 배양하였으며 6-12시간 간격으로 시료를 채취하여 dinospore의 생존능력과 감염능력을 측정하였다.

Dinospore의 생존은 녹색형광의 유지 여부를 지표로 삼았다. Dinospore의 생존능력은 각 시기별로 dinospore를 포르말린으로 고정하여 hemocytometer에 옮긴 다음 형광현미경(Olympus BH2,  $\times 200$ )하에서 계수하여 측정하였다. 숙주 체내에서 빠져 나온 dinospore가 해수 중에서 생존하는 기간에 따라 감염능력이 어떻게 변화하는지 측정하기 위하여 20 mL scintillation vial에 각 시간 간격별로 초기농도 1,000 cells mL<sup>-1</sup>의 숙주생물에 1:5 비율의 dinospore를 접종하였다. 시료는 36시간 후에 포르말린으로 고정하였으며, 고정 즉시 Sedgwick-Rafter Counting Chamber에 옮겨 형광현미경(Olympus BH2,  $\times 100$ )하에서 관찰하였다. 매 시료마다 100개체의 숙주를 관찰하였으며 이 중 감염된 세포와 감염되지 않은 세포를 구분하였다.

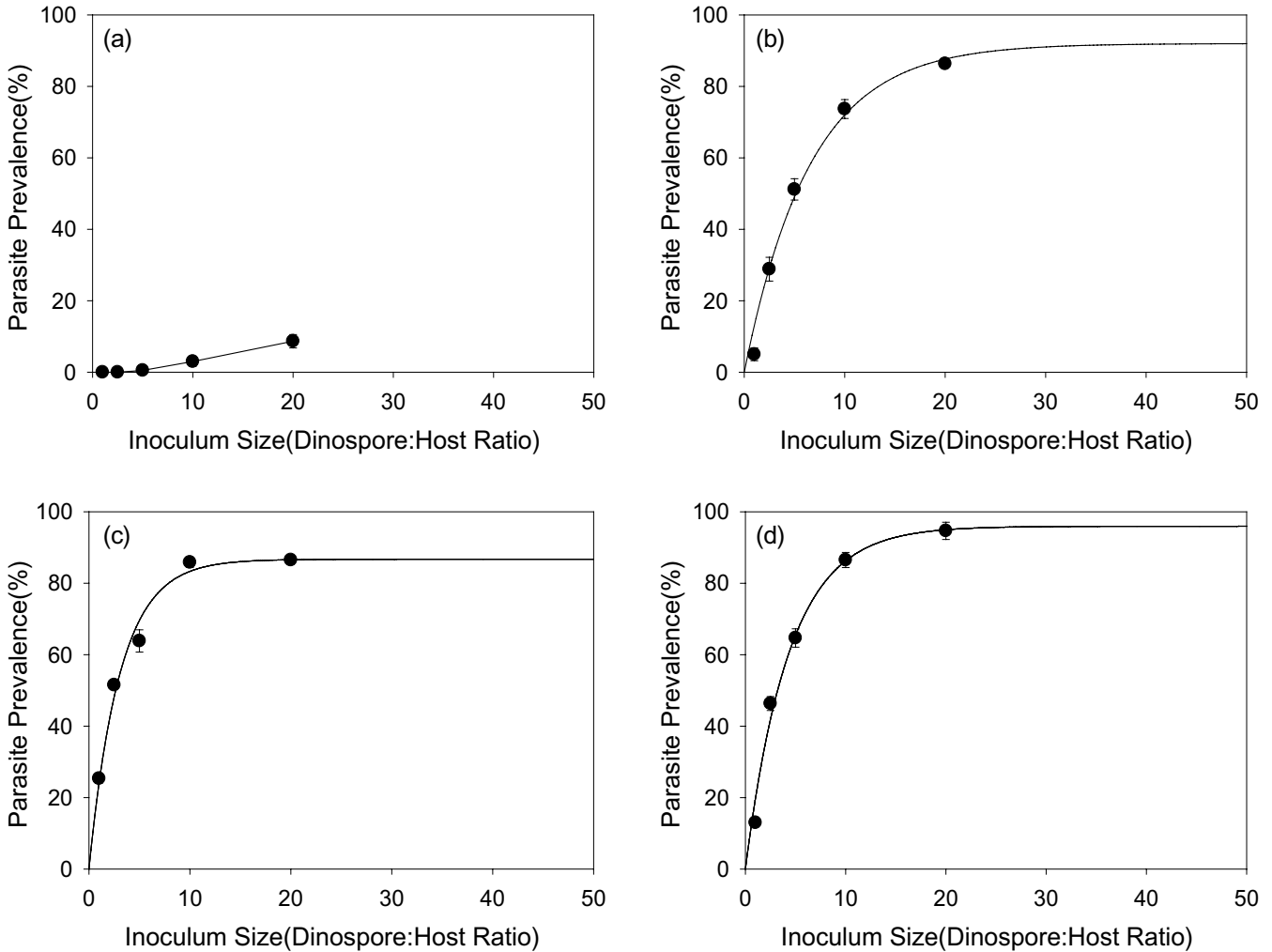
*Amoebophrya* sp. ex *Heterocapsa triquetra*의 세대기간

숙주생물 *H. triquetra*를 감염시킨 *Amoebophrya*가 숙주생물 세포내에서 성장한 후 숙주에서 빠져나올 때까지 세대기간을 측정하기 위하여 처음 32시간까지 8시간 간격, 이후부터 72시간까지 8시간 간격으로 시료를 채취하여 숙주 개체수와 dinospore 수를 계수하였다. 먼저, 앞서 기술한 것과 동일한 방법으로 숙주-기생생물 배양체를 공극 12  $\mu\text{m}$  Nucleopore 여과지로 걸러 동일세대 dinospore를 수확한 다음 dinospore와 숙주생물의 비율을 1:1, 20:1로 각각 2배수 접종하였다. Dinospore 부시료는 포르말린으로 고정하였으며 고정 즉시 hemocytometer에 옮겨 형광현미경(Olympus BH2,  $\times 200$ )하에서 관찰하였다. 숙주 개체수는 Sedgwick-Rafter Counting Chamber에 옮긴 다음 광학현미경(Olympus AX 70,  $\times 100$ )하에서 계수하였다. 총 세대기간은 dinospore를 접종한 시간부터 신생 dinospore의 평균 출현 시간까지 소요된 시간으로 정의하였다. 신생 dinospore의 평균 출현시간은 새로운 dinospore가 최초로 출현한 시각부터 dinospore가 최고 농도를 보인 시각까지 출현 개체수의 누적 총량을 계산하고 그 값의 반에 해당하는 시각을 산출하여 알아냈다(Combs and Park 2002).

## 결 과

*Amoebophrya* sp. ex *Heterocapsa triquetra*의 숙주 감염능력

숙주생물 *Heterocapsa triquetra*를 감염시키기 위하여 dinospores를 접종하였을 때, 감염률은 접종비율에 따라 5-87%로 변화하며 최대값까지 지수적으로 증가하였으며 시간이 지날수록 숙주 감염률은 크게 증가하였다(Fig. 1). 대상 기생생물의 총 세대기간을 고려하여(아래 세대기간 결과 참조) dinospores 접종 후 42시간에 수확한 시료를 기준으로 할 때, dinospore:숙주의 비율을 1:1로 할 경우 25.3% 정도



**Fig. 1.** Parasite prevalence as a function of inoculum size for strains of *Amoebophrya* sp. infecting *Heterocapsa triquetra*. Inoculations of *H. triquetra* with dinospore were conducted at day time. Host cells were counted (a) 24 h, (b) 36 h, (c) 42 h, and (d) 48 h later after dinospore inoculation. In this case ruptured dead host cells were estimated as infected cells. Error bars indicate SE.

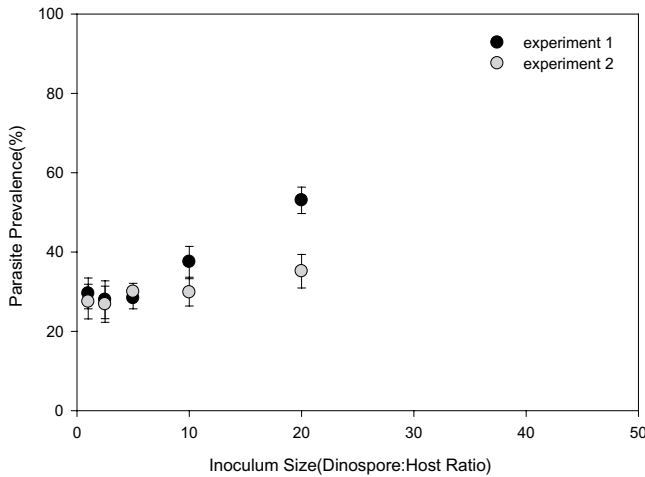
의 감염률을 보였고, 10:1 접종에서는 85.8%의 감염률을 보였다(Fig. 1c). 20:1의 경우에는 숙주생물의 86.5%가 감염되어 10:1 접종과 비교할 때 불과 0.7% 증가하는 데 그쳤다. 이처럼 접종비율이 증가함에 따라 숙주 감염률이 지수적으로 증가하다가 최대에 이르는 경향은 배양 후 24시간 후에 부시료를 채취한 경우를 제외하면 모든 실험에서 동일하게 나타났다. 42시간 경과 후 자료를 single two parameter maximum rise to maximum 함수에 적용해 보았다. 그 결과 최대감염능력  $I_{max}$ 는  $86.69 \pm 1.76$ 이었으며, 곡선회귀 그래프의 초기 기울기  $\alpha$ 는  $28.11 \pm 0.04$  ( $r^2 = 0.95$ ;  $P < 0.0001$ )인 것으로 나타나 숙주:dinospore 비율이 증가하여도 숙주 감염률은 100%에 도달하지 않는 것으로 나타났다.

하루 중 dinospore를 접종하는 시기를 달리하여 *Heterocapsa triquetra*를 감염시켰을 때 숙주 감염률은 그 접종 시간에 따라 뚜렷하게 차이가 났다. 낮 시간에 접종하였을 때에는 숙주:dinospore가 증가할수록 숙주 감염률이 급격하

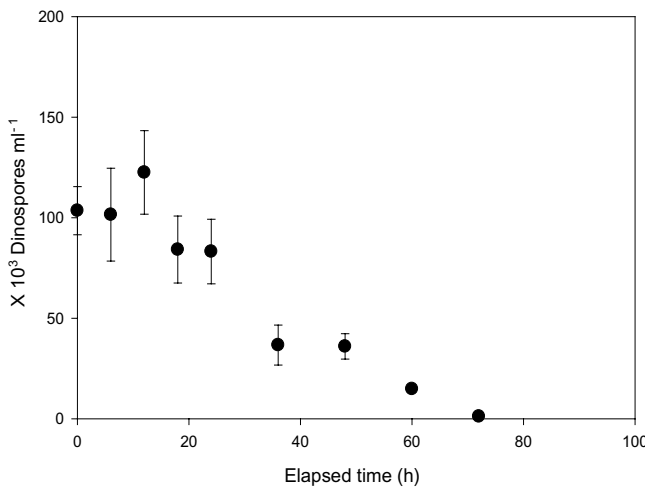
게 증가하여 1:20일 때 최대 86%의 감염률을 보였으나(Fig. 1c), 밤 시간에 접종하였을 때에는 숙주:dinospore가 증가하여도 숙주 감염률이 크게 증가하지 않았으며 최대 감염율도 높지 않았다. 밤 시간(dark cycle)을 시작한 지 1시간 후에 dinospore를 수확하고 접종한 실험 1에서는 1:20에서 53%의 숙주감염률을 보였고, 밤 시간(dark cycle) 시작 2시간 후에 dinospore를 접종한 실험 2에서는 최대 35%의 감염률에 불과하였다(Fig. 2).

***Amoebophrya* sp. ex *Heterocapsa. triquetra* dinospore의 생존능력과 감염능력**

*Heterocapsa triquetra* 체내에서 빠져 나온 지 6시간 이내의 dinospore를 숙주가 없는 상태에서 초기 농도 약  $100 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup>로 배양하였을 때, 살아있는 dinospore 수는 시간이 경과함에 따라 급격히 감소하였다. 처음 12시간 동안에는 초기 접종농도보다 약 20% 정도 증가하는 추세를 보이기도



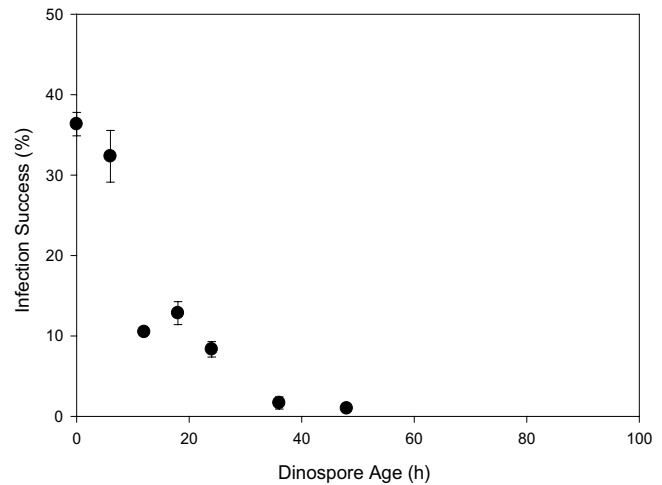
**Fig. 2.** Parasite prevalence as a function of inoculum size for strains of *Amoebophrya* sp. infecting *Heterocapsa triquetra*. Dinospore was inoculated at night time and was counted 42 hours later after inoculation. Ruptured dead cells were accounted to be infected cells.



**Fig. 3.** Survival of dinospores from *Amoebophrya* sp. infecting *Heterocapsa triquetra*. Initial density of dinospore was  $100 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . Error bars indicate SE.

하였지만 그 이후부터 기하급수적으로 감소하여 72시간이 경과한 후에는 대부분의 dinospore가 사멸하여 검출한계 이하로 떨어졌다(Fig. 3). 형광현미경으로 관찰하였을 때 형광의 세기도 초기의 건강한 상태에는 매우 밝고 강하였지만 시간이 지날수록 차츰 약해졌다.

숙주 세포를 빠져나온 dinospore는 해수 중에서 생존한 기간에 따라 새로운 숙주를 감염시키는 능력에 큰 차이를 보였다(Fig. 4). 체내에서 나온 지 6시간 이내의 초기에는 숙주 생물 *H. triquetra*의 약 37%를 감염시킬 수 있었지만, 24시간(+ 6 h 이하) 정도 경과한 후에는 10% 내외의 숙주만 감염시킬 수 있었고, 48시간(+ 6 h 이하)이 경과하면 dinospore가 생존해 있음에도 불구하고 새로운 숙주를 감염시키는 능력



**Fig. 4.** Capability of different aged dinospores to infect *Heterocapsa triquetra* displayed by percentage of harvested dinospores that successfully established host infections. Error bars indicate SE.

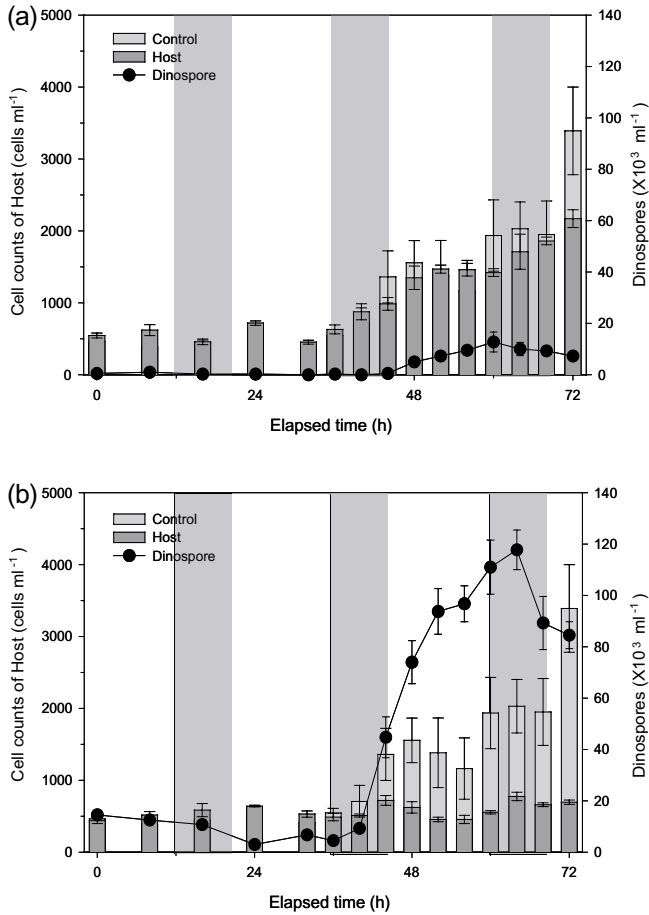
을 거의 상실하였다.

#### *Amoebophrya* sp. ex *Heterocapsa triquetra*의 세대기간

기생생물의 세대기간을 측정하기 위하여 숙주 세포에 dinospore를 접종한 결과, 접종 후 약 2일이 경과한 다음부터 숙주 세포의 체내에서 새로운 dinospore가 출현하기 시작하였다. 숙주와 dinospore 비를 1:1로 접종한 경우에는 약 44시간이 지난 다음에 새로운 dinospore가 나타나기 시작하였다. 그 후 dinospore 수가 점차 증가하다가 약 60시간이 지났을 때  $15.3 \pm 2.7 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ 로 최대에 이르렀다. 1:20의 경우에는 이보다 조금 빠른 40시간 후에 미약하게나마 dinospore가 출현하기 시작하여 그 이후 급격하게 개체수를 늘렸으며 약 64시간이 경과한 후에는  $118.2 \pm 5.3 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ 로 최대에 도달했다. Dinospore를 접종한 시간부터 신생 dinospore의 평균 출현시간까지 소요된 시간을 총 세대기간으로 정의한다면, *H. triquetra*에 기생하는 *Amoebophrya* sp.의 총 세대기간은 숙주와 dinospore 비가 1:1일 때 약  $54 \pm 0.5$  시간이고(Fig. 5a), 20:1일 때 약  $55 \pm 1.2$ 시간 정도 되는 것으로 추정되었다(Fig. 5b).

#### 고 찰

Dinospore가 숙주생물체 내부에 침입하여 생활사를 새로 시작할 때 체내에서 이들의 성장이 충분하지 않은 단계이거나, 심지어 성장이 충분한 경우에도, 특징적인 녹색 형광을 발현하지 못하는 경우가 있다. *Alexandrium affine*(Kim et al. 2004)이나 *Ceratium fusus*(Park et al. 2004)에 기생하는 *Amoebophrya*가 여기에 해당하는데 이 경우 감염된 지 오래



**Fig. 5.** Temporal variation of *Amoebophrya* sp. infecting *Heterocapsa triquetra* inoculated at (a) low (1:1) and (b) high (20:1) dinospore:host ratios. Bars with gray regions represent host abundance and those with black ones control. Closed circles are dinospore abundance. ■ : night. Error bars indicate SE.

되지 않은 개체는 형광현미경으로 그 감염 여부를 판별하기가 매우 어렵다. *Amoebophrya* sp. ex *Heterocapsa triquetra*의 숙주 감염능력은 시간에 따라 점차 증가하여, dinospore를 접종하고 42시간이 지난 후 관찰한 숙주 감염률은 24시간과 36시간이 지난 후 관찰한 숙주생물 감염률 보다 더 높게 나타났다(Fig. 1). Fig. 3, 4에서 볼 수 있듯이, 숙주를 빠져 나온 dinospore가 숙주가 없는 상태에서 해수 중에서 생존하는 능력은 접종 후 24시간이 지나면 급격히 떨어지고, 숙주를 감염시키는 능력도 12시간이 지나면 급격히 낮아진다. 이런 점을 감안하면, 36시간 이후 감염률이 크게 증가한 것은 실제로 숙주 감염률이 점차 증가하였기 때문이 아니라 감염 초기에 숙주가 형광을 발현하지 못하였거나 크게 미약하다가 감염 중기 이후에 형광이 발현되었기 때문인 것으로 판단된다.

Dinospore와 숙주의 비율에 따른 숙주 감염률은 최종적으로 총 세대기간(50-52시간)에 조금 모자란 42시간을 기준으

로 하였다. Dinospore 접종 후 42시간과 48시간이 경과하면 *Amoebophrya* sp. 중 일부는 “vermiform”의 형태로 숙주 밖으로 빠져나가며 숙주 세포를 파괴하기 때문이다(Fig. 5b). 특히, dinospore와 숙주의 비율이 10:1과 20:1로 높을 때에는 숙주 세포를 파괴하고 빠져 나온 vermiform이 더 많을 것이다. 따라서 숙주 감염률을 계산하려면 이렇게 파괴된 숙주의 개체수를 감염 숙주에 포함하여야 한다. Fig. 1c, 1d는 이런 점들을 고려한 것인데, 이 경우 파괴된 숙주의 세포수는 접종 후 36시간 이후의 숙주 개체수와 42시간 또는 48시간 이후 숙주 개체수의 차이로 구하였다. 하지만, 자연적으로 사멸하는 개체도 있을 것이고 감염되지 않은 숙주는 계속 성장할 것이므로 계산상의 오차는 시간이 지날수록 더 커지게 된다. 접종 후 48시간 이후에 나타난 최대 94.7%의 숙주 감염률(Fig. 1d)은 이런 점에서 다소 과대평가된 것일 수 있다. 따라서 접종 후 42시간은 파괴된 숙주 세포도 적고 형광을 내기에도 충분한 시간이므로 최종 숙주 감염률 함수를 결정하는 가장 적절한 시간으로 판단된다. 결국, 형광현미경으로 감염된 숙주의 녹색형광을 관찰하여 숙주 감염률을 측정할 때 무엇보다 중요한 것은 dinospore 접종 후 감염 숙주세포를 계수하는 시간을 결정하는 것이며, 그것은 형광을 내기에 충분하지만 총 세대기간과는 다소 거리가 있는 시간이 가장 적당하다.

*Amoebophrya* sp. ex *Heterocapsa triquetra*의 숙주 감염률은 숙주에 대한 dinospore의 접종비율이 높을수록 급격히 증가하였다. 하지만 그 비율이 높아져도 숙주를 100% 감염시키지는 못하였다(Fig. 1c). 물론, dinospore 접종 비율을 계속 증가시키면 100%에 이를 수도 있겠지만, 자연 생태계에서는 그렇게 높은 비율이 거의 존재하지 않을 것이다. 이와 비슷한 예를 *Karlodinium veneticum*에서 찾아 볼 수 있다. *Amoebophrya* sp. ex *K. veneticum*도 dinospore 접종비율이 20:1 이상에서 약 91.3% 수준까지 자기 숙주를 감염시켰지만 100%에 이르지 못하는 못하였다(Coats and Park 2002). 심지어 100:1에서도 100% 감염에는 실패하였다. 단일 지수함수식의 회귀곡선에 나타난 초기경사( $\alpha$ )에서는 두 종에서 다소 차이를 보였다. *H. triquetra* 숙주의 *Amoebophrya* sp.는 28.1로서, 19.6의 값을 보인 *K. veneticum* 숙주의 *Amoebophrya* sp.보다 약 10 정도 더 높았으며, 이는 *Amoebophrya* sp. ex *H. triquetra*의 dinospore가 *K. veneticum*에서 나온 dinospore보다 초기 감염능력이 1.5배 정도 더 크다는 것을 의미한다. 위의 2종 외에도 국내에서 배양한 *Amoebophrya* sp. ex *Prorocentrum minimum*의 경우에도 20:1 이상에서 숙주 감염률이 더 이상 증가하지 않았으며(김 등 2002b), 유각 와편모류 *Alexandrium affine*과 *Gonyaulax polygramma*도 1차 숙주와 2차 숙주 모두 100% 감염에는 성공하지 못했다(Kim 2006). 반면, *Amoebophrya* sp. ex *Akashiwo sanguinea*의 경우는 10:1

이상의 비에서도 자기 숙주를 100% 감염시켰으며, *Amoebophrya* sp. ex *Gymnodinium instriatum*도, 비록 120:1에 이르러서야 가능했지만, 자기 숙주를 100% 감염시킬 수 있었다(Coats and Park 2002). 이상의 결과로 볼 때, 일반적으로 유각 외편모류를 숙주로 하는 *Amoebophrya* sp.는 무각 외편모류 숙주의 *Amoebophrya* sp.보다 숙주 감염률이 떨어지며, 그 최대값은 대부분 90% 이하인 것으로 판단된다. 유각 외편모류 숙주의 *Amoebophrya* sp.가 이런 특성을 보이는 것은 그들의 비교적 낮은 숙주 특이성과 관련이 있을 것이다(Kim 2006). 유각/무각 외편모류 숙주 세포와 기생생물 사이의 감염률 차이와 숙주 특이성과 관련된 생물학적 특징은 앞으로 외편모류의 진화 과정을 이해하는 데에도 많은 정보를 줄 수 있을 것으로 보인다.

일반적으로 유각 외편모류의 세대기간은 무각 외편모류보다 짧고, dinospore의 감염 성공률도 두 외편모류에서 크게 차이 나지 않아서 유각 외편모류의 외각이 기생생물 침투의 장벽으로 작용하지 않는 것으로 알려져 있다(Kim et al. 2004). 하지만 외각을 뚫고 숙주 세포 내부로 침투하는 데 소요되는 시간에 대해서는 아직 알려진 바가 없다. 사실, 무각 외편모류는 표면에 외각이 없어서 *Amoebophrya* dinospore의 침투에 쉽게 노출되어 있지만, 유각 외편모류는 단단한 외각이 있어서 dinospore가 숙주 생물의 세포 내부로 침투하는 데 어려움을 겪을 수 있다. 따라서 dinospore가 *H. triquetra*의 세포 내부로 침투하기에 가장 좋은 때는 *H. triquetra*가 분열하기 위해 외각을 깨뜨리는 순간이다. *H. triquetra*는 주로 새벽 시간대에 분열하기 때문에(저자의 관찰 경험), dinospore의 침투도 이 시간대에 가장 많이 일어날 것으로 예상할 수 있다. 하지만 실험결과는 예상을 크게 벗어났다. 물론, *Amoebophrya* sp. ex *H. triquetra*의 숙주 감염률은 밤과 낮에 뚜렷한 차이를 보였다. 하지만 낮 시간에 집중하였을 때에 최대 87%의 감염률을 보였고, 밤 시간에는 실험 1의 경우 최대 53%, 실험 2의 경우 최대 35%에 불과한 감염률을 보여 정반대의 결과가 나왔다(Figs 1, 2). 이러한 실험결과는 dinospore의 활동력과 숙주 침투 시기가 숙주생물의 광합성 활동과 관련된 일주기 생체리듬에 결합되어 있을 가능성이 있음을 시사한다. Dinospore가 숙주생물의 광합성 활동에 의한 부산물이나 이와 연관된 세포의 분비물 등을 화학적 추적자로 이용하여 물질을 배출하는 지점을 목표로 숙주 침투를 감행할 가능성이 있다. 생태학적으로는 일주기 수직운동을 통해 낮에 표층에 고밀도로 모이는 외편모류의 일반적인 생태 특징을 잘 이용하는 것으로 볼 수 있다. *Akashiwo sanguinea*처럼 감염된 후 16시간 이내에 빠른 속도로 광합성 능력을 상실하고(Park et al. 2002b), 감염말기에 일주기 수직 이동 능력을 잃고 밀도약층으로 가라앉는 특징(Coats and Bockstahler 1994, Fig. 2; Park et al. 2002a)을 보이는 경우에

는, 숙주생물을 빠져나온 dinospore가 생존능력을 오히려 하루 이상 증진시켜(Coats and Park 2002, Fig. 1) 표층에 있던 숙주생물이 일주기 수직운동으로 저층에 내려 올 때까지 기다리거나 dinospore가 직접 표층으로 이동하는 전략을 취할 수 있다. *Amoebophrya* sp. ex *H. triquetra*의 dinospore가 숙주 체내에서 나온 후 약 12시간 이후에 나타나는 유사한 형태의 생존능력 향상(Fig. 3)도 이런 측면의 생존 전략일 수 있다.

숙주 체내에서 빠져 나온 dinospore의 생존능력은 *Amoebophrya* sp.의 종류에 따라 조금씩 다르다. Coats and Park(2002)은 *Gymnodinium instriatum*, *Akashiwo sanguinea*, *Karlodinium veneficum*에 기생하는 *Amoebophrya* spp.의 dinospores가 각각 3, 5, 13일의 생존능력을 가진다고 보고하였으며, 김 등(2002)도 국내 연안에 출현한 *Prorocentrum minimum* 숙주의 *Amoebophrya* sp.가 약 7일의 생존능력이 있는 dinospores를 생산한다고 보고하였다. 본 연구의 숙주생물인 *H. triquetra*에 기생하는 *Amoebophrya* sp.의 dinospore는 숙주생물을 빠져 나온 후 새로운 숙주를 찾지 못하면 3일 이내에 대부분 사멸하였다. 이런 생존 능력은 *G. instriatum*을 감염시키는 *Amoebophrya* sp.의 dinospore와 비슷한 생존능력으로 지금까지 발표된 값 중에서 가장 낮은 값이다. 해수 중의 dinospore는 그 생존기간에 따라 숙주를 감염시키는 능력에도 큰 변화가 생긴다. 대개 시간이 지날수록 급격히 감소하는데, *Amoebophrya* sp. ex *H. triquetra*의 dinospore는 이런 종류의 연구가 수행된 외편모류 중에서도 변화속도가 빠른 편에 속하였다. *H. triquetra*를 빠져 나온 dinospore는 약 10시간까지 30-40%의 비교적 높은 감염 능력을 보였으나 그 이후부터는 급격히 감염능력을 잃어버렸고 2일 이후로는 dinospore가 있더라도 숙주 감염능력을 모두 상실하였다. Coats and Park(2002)은 *G. instriatum*과 *A. sanguinea*를 감염시키는 *Amoebophrya* sp.의 dinospores가 각각 2일과 5일 만에 감염능력을 모두 잃어버린다고 보고하였다. *K. veneficum*에 기생하는 *Amoebophrya* sp.의 dinospores는 이들과 달리 첫날 보다 그 다음 약 3일 동안 감염능력이 2배 가량 오히려 더 증가하며 11일이 지나도 죽지 않고 미약하게나마 숙주를 감염시킬 수 있는 능력을 갖는다(Coats and Park 2002). *Prorocentrum minimum*은 3일 이후부터 dinospore의 숙주에 대한 감염 성공률이 급격히 낮아진다(김 등 2002). 이러한 결과들은 숙주생물을 감염시키는 데에 dinospore의 상태와 시기가 매우 중요함을 시사한다. 특히, *H. triquetra*가 숙주인 *Amoebophrya* sp.처럼 해수 내 생존기간이 2-3일 이내로 매우 짧고 그 사이 숙주 감염능력도 급격히 떨어지는 경우에는, 이들의 생존을 위해 숙주생물의 집적이 대단히 중요하다. 그러므로 숙주중이 적조를 일으킨 시기는 *Amoebophrya* sp.가 확산을 집중할 수 있는 가장 좋은 순간이며 또한 숙주중에



가장 영향을 많이 끼치는 시기가 될 것이다.

*Amoebophrya* sp.의 총 세대기간(total generation time)은 *Amoebophrya* sp.가 숙주 세포를 감염시킨 후 숙주 세포내에서 발달시간(intracellular development time)을 포함하여 vermiform 형성 및 성숙 등 새로운 dinospore를 생성하기 전까지 걸리는 시간을 의미한다. *Amoebophrya* sp.의 세포내 발달단계와 총 세대기간에 대한 자료는 지금까지 3종의 무각 와편모류(*A. sanguinea*, *G. instriatum*, *K. veneficum*)와 2종의 유각 와편모류(*Alexandrium affine*, *Gonyaulax polygramma*) 그리고 1종의 정단와편모류(*Prorocentrum minimum*)에 기생하는 *Amoebophrya* sp.에 대해서만 보고되었다(김 등 2002b; Coats and Park 2002; Kim et al. 2004). *H. triquetra*를 감염시키는 *Amoebophrya* sp.의 총 세대기간은 숙주에 대한 dinospore의 비를 1:1로 했을 때  $54 \pm 0.5$ 시간이고(Fig. 5a), 20:1로 했을 경우에는  $55 \pm 1.2$ 시간으로 나타났다(Fig. 5b). 하지만 Coats and Park(2002)의 계산법에 따라 총 세대기간을 구한 경우에는 *H. triquetra*와 *A. sanguinea*를 숙주로 하는 *Amoebophrya* sp.는 계산치보다 조금 더 짧은 세대기간을 가질 것으로 판단된다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 이들의 dinospore는 숙주세포를 빠져나온 후 12시간에서 16시간 정도 경과하면 20(*Amoebophrya* sp. ex *H. triquetra*) - 25(*Amoebophrya* sp. ex *A. sanguinea*)% 가량 생존 세포수가 증가한다. 이는 한 세대기간을 마치고 숙주세포를 빠져나왔을 당시, 즉 총 세대기간 경과 직후의 dinospore 수보다 10여 시간 더 지난 후의 dinospore 수가 더 많다는 것을 의미하는 것으로서, Fig. 5의 dinospore 출현량 그래프를 총 세대기간 직후의 실제 dinospore 출현 그래프보다 오른쪽으로 약간 편향되게 하는 결과를 낳는다. 이런 점을 고려하여 총 세대기간을 산출하면, 숙주에 대한 dinospore의 비를 1:1로 했을 때  $53 \pm 0.2$ 시간이고, 20:1로 했을 경우에는  $52 \pm 1.0$ 시간으로 나타났다. 한편, 숙주에 대한 dinospore의 비를 1:1로 하여 무각 와편모류 *A. sanguinea*, *K. veneficum*, *G. instriatum*을 감염시켰을 때 총 세대시간은 각각 67, 71, 59시간이었고, 115:1의 비율로 *G. instriatum*를 감염시켰을 때 총 세대시간은 55시간이었다(Coats and Park 2002). 반면, 유각 와편모류 *A. affine*와 *G. polygramma*를 1:1로 감염시켰을 때 총 세대기간은 각각 55, 53시간이었다(Kim et al. 2004). *P. minimum*은 20-30시간 수준이라고 추정하였다(김 등 2002). *H. triquetra*와 *A. affine* 등의 결과를 보면 대체적으로 유각 와편모류가 무각 와편모류보다 총 세대기간이 더 짧게 나타났다. Kim et al.(2004)은 이러한 기생생물의 세대기간에 영향을 미치는 요인으로 기생생물의 부하량, 숙주의 세포 크기와 부피, 성장환경 그리고 본질적인 숙주 특이적 차이 등을 지적한 바 있다.

*Amoebophrya* sp. ex *H. triquetra*의 세대기간에 대한 실험에

서 몇 가지 가정을 전제하면 *Amoebophrya* 1 개체가 생산하는 총 dinospore 세포수를 대략적으로 계산할 수 있다. 첫 번째 가정은 dinospore의 숙주 감염능력이 Fig. 1c의 곡선회귀 그래프를 따른다는 것이고, 두 번째는 숙주 세포에서 빠져나온 dinospore가 적어도 24시간은 죽지 않는다는 것이며, 마지막으로 숙주와 dinospore의 접촉비율을 1:1로 했을 때 숙주 세포 1 개체에는 dinospore 1 세포만 기생할 수 있다는 것이다. 첫 번째 가정에서 숙주:dinospore 접촉비가 1:1일 때 dinospore에 감염된 총 숙주 세포를 구할 수 있다. 즉, Fig. 1c의 회귀식으로부터 접촉비 1:1일 때  $24.0 \pm 0.04\%$ 의 숙주가 감염됨을 알 수 있다. 따라서 실험 시작할 때 초기 숙주 농도가  $511 \text{ cells mL}^{-1}$ 이었으므로 dinospore 접촉 후 감염된 숙주는 약  $123 \text{ cells mL}^{-1}$ 이다. 감염 숙주의 세포내부에서 생활하던 *Amoebophrya*는 생활사를 마친 후 숙주 세포를 빠져나와 dinospore를 생성하는데, 이 때 배양액에 출현하는 dinospore 개체수는 1:1 접촉을 하였을 때 최대  $15,300 \text{ cells mL}^{-1}$ 에 이른다(Fig. 5a). 결국,  $123 \text{ cells mL}^{-1}$ 의 감염숙주가 dinospore  $15,300 \text{ cells mL}^{-1}$ 를 생산하므로 감염숙주 1 cell은 dinospore 약 125 cells을 생산하는 것을 알 수 있다. 세 번째 가정에서 감염숙주 1 cell에는 *Amoebophrya* 1 cell만 기생하므로, *Amoebophrya* 1 cell이 생산하는 총 dinospore 수는 약 125 cells이다. 이와 같은 dinospore 생산성은 약 500-600개체의 dinospore를 생성하는 *A. sanguinea*와 *Gymnodinium instriatum*보다는 3-4배 정도 적고 약 50여 개체의 dinospore를 생성하는 *Karlodinium veneficum*보다는 2-3배 정도 많은 것이다.

기생성 와편모류 *Amoebophrya*에 대한 연구는 앞으로도 지속적으로 이루어져 많은 숙주생물에 대한 숙주-기생생물 배양체를 확보하고, 다양한 환경조건 하에서 숙주생물과 기생생물간의 생태적 특성을 살필 필요가 있다. 이는 적조발생해역 현장에 직접 적용하는 생물학적 적조제어 연구에 기초가 되고, 그 동안 간과하였던 기생생물의 생태적 중요성과 해양 생태계에서 물질과 에너지 흐름에 대한 그들의 역할을 판단하는 데 도움을 줄 것이다.

## 사 사

본 연구는 한국과학재단 지역대학우수과학자 지원사업(과제번호: R05-2003-000-11755-0)의 지원을 받아 수행하였습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

김영길, 박명길, 이원호. 2002a. 적조생물 *Prorocentrum minimum*의 숙주-기생자 배양체: (1) 기생성 와편모류 *Amoebophrya* sp.의



- 생활사 단계. 한국해양학회지 바다 7: 221-225.
- 김영길, 박명길, 박종규, 이원호. 2002b. 적조생물 *Prorocentrum minimum* (Paillard) Schiller의 숙주-기생생물 시스템: (1) 생활사 및 감염능력. 한국 해양학회 2002년도 추계 학술발표대회 요약집, p. 116.
- 박명길. 2002. 기생성 와편모류 *Amoebophrya*의 생리 생태적 특성과 적조. 한국해양학회지 바다 7: 181-194.
- 박종규, 허현정, Coats D.W., 이원호, 하나. 2007. 진해만에 출현하는 기생성 와편모류 *Amoebophrya* spp.와 숙주 와편모류. 한국 해양학회지 바다 12: 359-369.
- 허현정. 2003. 진해만의 기생성 와편모류 *Amoebophrya*의 출현양상과 생태특성. 인제대학교 석사학위논문.
- Cachon J. and Cachon M. 1987. Parasitic dinoflagellates. In: Taylor F.J.R. (ed.), *The biology of dinoflagellates*. Blackwell Sci. Publ., Oxford, pp. 571-610.
- Coats D.W. and Bockstahler K.R. 1994. Occurrence of the parasitic dinoflagellate *Amoebophrya ceratii* in Chesapeake Bay populations of *Gymnodinium sanguineum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41: 586-593.
- Coats D.W., Adam E.J., Gallegos C.L. and Hedrick S. 1996. Parasitism of photosynthetic dinoflagellates in a shallow subestuary of Chesapeake Bay, USA. *Aquat. Microb. Ecol.* 11: 1-9.
- Coats D.W. 1999. Parasitic life styles of marine dinoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 402-409.
- Coats D.W. and Park M.G. 2002. Parasitism of photosynthetic dinoflagellates by three strains of *Amoebophrya* (DINOPHYTA): parasite survival, infectivity, generation time, and host specificity. *J. phycol.* 38: 520-528.
- Drebes G. 1984. Life cycle and host specificity of marine parasitic dinophytes. *Helgoländer Meeresunters* 37: 603-622.
- Gullard R.R.L. and Ryther J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detontula Confervaceae* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- Gunderson J.H., Goss S.H. and Coats D.W. 2000. rRNA sequence differences among *Amoebophrya* stains infecting dinoflagellates in Chesapeake Bay. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47: 4A.
- Kim S. 2006. Patterns in host range for two strains of *Amoebophrya* (Dinophyta) infecting thecate dinoflagellates: *Amoebophrya* spp. ex *Alexandrium* affine and ex *Gonyaulax polygramma*. *J. phycol.* 42: 1170-1173.
- Kim S., Park M.G., Yih W. and Coats D.W. 2004. Infection of the bloom-forming thecate dinoflagellates *Alexandrium affine* and *Gonyaulax spinifera* by two strains of *Amoebophrya* (Dinophyta). *J. phycol.* 40: 815-822.
- Montagnes D.J.S. and Lynn D.H. 1993. A quantitative protargol stain (QPS) for ciliates and other protists. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B. and Cole J.J. (eds), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publ. Boca Raton, pp. 229-240.
- Nishitani L., Erickson G. and Chew K.K. 1985. Role of the parasitic dinoflagellate *Amoebophrya cetatii* in control of *Gonyaulax catenella* populations. In: Anderson, D.M., White A.W. and Baden D.G. (eds), *Toxic Dinoflagellates*, Elsevier Sci. Pub. Co. Inc., New York, pp. 225-230.
- Park M.G., Cooney S.K., Kim J.S. and Coats D.W. 2002a. Effects of parasitism on diel vertical migration, phototaxis/geotaxis, and swimming speed of the bloom-forming dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *Aquat. Microb. Ecol.* 29: 11-18.
- Park M.G., Cooney S.K., Yih W.H. and Coats D.W. 2002b. Effects of two strains of the parasitic dinoflagellate *Amoebophrya* on growth, photosynthesis, light absorption, and quantum yield of bloom-forming dinoflagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 227: 281-292.
- Park M.G., Yih W.H. and Coats D.W. 2004. Parasites and Phytoplankton, with Special Emphasis on Dinoflagellate Infections. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51: 145-155.
- Salomon P.S., Janson S. and Gran li E. 2003. Multiple species of the dinophagous dinoflagellate genus *Amoebophrya* infect the same host species. *Environ. Microbiol.* 51: 1046-1052.
- Sengco M.R., Coats D.W., Pendorf K.J., Erdner D.L., Gribble K.E. and Anderson D.M. 2003. Biological and phylogenetic characterization of *Amoebophrya* sp. ex *Alexandrium tamarense*. Abstract. Second Symposium on Harmful Marine Algae in the U.S., p. 57.
- Taylor F.J.R. 1968. Parasitism of the toxin-producing dinoflagellate *Gonyaulax catenella* by the endoparasitic dinoflagellate *Amoebophrya ceratii*. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 25: 2241-2245.
- Yih W. and Coats D.W. 2000. Infection of *Gymnodinium sanguineum* by the dinoflagellate *Amoebophrya* sp.: Effect of nutrient environment on parasite generation time, reproduction and infectivity. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47: 504-510.

---

Received 10 October 2007

Accepted 3 December 2007

