

<단보>

저질 환경 개선을 위한 *Nitzschia* sp.의 영양염 흡수 동력학

오 석 진

부경대학교 해양과학공동연구소

Nutrient Uptake Kinetics of *Nitzschia* sp. for Bioremediation of the Benthic Layer

Seok Jin OH

Korea Inter-University Institute of Ocean Science, Pukyong National University, Namgu, Busan 608-737, Korea

For bioremediation of the benthic layer uptake kinetics of phosphate by microphytobenthos *Nitzschia* sp. (JFH200406) were investigated. A short-term phosphate uptake revealed that the maximum uptake rate (ρ_{\max}) and half-saturation constant (K_s) were 0.132 pmol/cell/hr and 502.6 μM , respectively. The maximum specific uptake rate calculated between ρ_{\max} and the phosphorus cell quota (Q_p), calculated from Strathmann equation, was 14.4/day. The values of these parameters indicate that *Nitzschia* sp. accommodates well to surroundings of high phosphate, and can uptake over 14-times more than the phosphorus cell quota. Thus, microphytobenthos *Nitzschia* sp. may be a useful species for bioremediation of the benthic layer.

Key word: Bioremediation, Microphytobenthos, *Nitzschia* sp., Phosphate, Uptake kinetics

서 론

폐쇄성 연안역의 경우 대부분 부영양영화가 진행되어 플랑크톤의 대발생에 따라 막대한 어업피해가 발생하고 있으며, 하계를 중심으로 저층에 빈산소가 발생하여 저서생물이 큰 영향을 받고 있다. 이와 같은 부영양화된 저서환경을 개선하는 것은 중요한 문제로 지금까지 준설, 복사와 같은 토목적인 방법이 동원되었다. 하지만, 이러한 방법은 단시간에 환경개선이 이루어지는 것 같이 보이나, 근본적인 오염유입 공급원의 저감 없이는 원래의 상태로 되돌아가기 때문에 일시적인 개선효과뿐 장기적인 복원효과는 없다. 그래서 자연의 생태계가 가지고 있는 자정효과를 최대한 발굴할 수 있고, 생태계에 보다 친환경적인 저질환경개선 방안이 필요하다. 최근 Oh et al. (2007)은 친환경적 복원방안으로 부영양화된 저층에 발광 다이오드 (light emitting diode; LED)를 부설하여 원래 서식하고 있던 저서성 미세조류의 성장을 촉진시켜 그들의 영양염 흡수능력에 따라 저질정화 가능성을 제시하였다. 이 연구에 따르면 청색파장의 LED에서 저서성 미세조류의 성장이 복수파장의 성장보다 빠르게 나타났으며, 유해·유독 외편모조류에 성장이 제한되는 황색파장에서도 성장이 우수한 것으로 나타났다 (Oh et al., 2008). 하지만, 반드시 성장이 빠르게 촉진된다고 해서 그들의 영양염 흡수 능력이 높아지는 것이 아니며, 만약 영양염 흡수능력이 낮다면 부영양화된 저

질을 개선하는데 한계점이 있다. 따라서 본 연구는 저서성 미세조류 중 연안역에서 주로 우점하고 있는 *Nitzschia* sp.를 이용하여 인산염 흡수 동력학 실험을 통하여 부영양화된 저질의 영양염 제거 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

저서미세조류 *Nitzschia* sp.의 분리 및 보존배양

저서미세조류 중 연안해역에서 쉽게 관찰되는 저서미세조류 *Nitzschia* sp. (JFH200406)를 일본 Fukuoka현의 Hakozaki만 입구에서 채취한 저층퇴적물(수심 3 m)에서 pasteur pipette (ca. ϕ 50-100 μm)를 이용하여 분리하였다. 분리된 세포는 여과해수 (0.22 μm pore size, Millipore GSWP)에 4-5회 세척한 후 배양튜브 (TB-2800, Japan)에 이식하였다. 이들 세포들은 항생물질 혼합액 AM 9 (Table 1)를 이용하여 무균화 작업을 수행하였으며 (Provasoli et al., 1959), DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 검사를 통하여 검증하였다. 배지는 남해 육지도 부근 해수를 바탕으로 한 f/2+Si (Guillard and Ryther, 1962)로 selenium (H_2SeO_3)을 최종농도가 0.001 μM 되게 첨가하였다. 배양조건은 현장수온과 염분에 상응하는 조건 (17°C, 30 psu)이었으며, 광량은 Oh et al. (2007)에 보고한 최대성장속도가 보인 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (12L:12D; cool-white fluorescent lamp)에서 실시하였다. 더욱이 Suzuki and Yamamoto (2005)에 따르면 저서미세조류 배양시 부착기질의 첨가 유무에 따라 성장속도가 크게 달라지면, 특히 입경이 작은 부착기질 일수록 성장

*Corresponding author: sjoh1972@pknu.ac.kr

Table 1. Composition of modified antibiotic mixture AM9 solution based on 1 mL of f/2+Si medium

Dihydrostreptomycin sulfate	5 mg
Potassium penicillin G	5,000 units (1,596 U/mg)
Polymyxin B sulfate	1,500 units (8,050 U/mg)
Tetracycline	0.5 mg
Chloramphenicol	0.05 mg
Neomycin sulfate	0.25 mg

속도가 빠르다는 결과가 도출되어 있다. 따라서 본 배양실험에서도 부착기질로 glass bed (평균직경 0.115 mm)를 소량 첨가하였다. 2차 생물학적 오염을 막기 위해 모든 실험기구는 autoclave (202 kpa, 20 min) 또는 건조멸균 (185 °C, 1 hr)하여 사용하였으며, 모든 실험은 clean bench내에서 작업을 수행하였다.

정치배양

식물플랑크톤에 따른 영양염의 흡수속도는 기본적으로 환경수 중의 영양염 농도에 의존하지만, 세포내에 영양염 pool을 가지는 경우 그 pool의 크기에 따라 달라진다 (Eppley et al., 1969). 따라서 흡수속도의 농도 의존성을 평가할 때는 영양염 첨가 후 그 흡수속도가 일정한 시간, 즉 정속흡수 (surge uptake)를 보이며 세포내의 영양염의 변화가 없는 시간 내에 실험을 할 필요가 있다 (Harrison et al., 1989). 그래서 영양염 흡수 실험을 수행하기 전에 영양염 흡수의 정시간적 변화를 살펴보았다. 세포내의 인을 고갈시키기 위해 *Nitzschia* sp.를 인 (phosphate) 원이 포함되어 있지 않은 인공해수 (AK)를 바탕으로 한 L1배지에서 전배양을 하였다 (Keller et al., 1987; Guillard and Hargraves, 1993). 세포성장이 정지할 때까지 배양을 수행하고 (<0.02 μM), 인산염 (PO₄-P)이 10 μM로 들어 있는 500 mL 배지에 인 고갈 *Nitzschia* sp.를 접종하였다. 배양개시 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240분에 각각 배양액을 여과하여, 인산염을 측정하였다. 여기에서 흡수속도가 일정한 시간을 다음의 영양염 흡수실험의 측정시간으로 정하였다. 인산염의 흡수속도는 250 mL 배양용기 (Nalgen Nunc. International Co., USA)에 각각 1, 5, 10, 20, 40, 80, 150, 500, 1,000 μM을 조제한 L1 배지 90 mL를 분주하였다. 인 고갈 *Nitzschia* sp.이 포함된 배양액 20 mL (약 1,000 cells/mL)을 첨가하여 일정시간 배양 후, 배양액의 인산염의 농도를 몰리브덴 청법 (molybdenum blue method)에 따라 측정하였다 (Strickland and Parsons, 1972). 배양시간은 상기에 서술한 실험의 결과를 이용하여 60분으로 하였다 (결과 및 고찰 참고). 또한 *Nitzschia* sp. 세포를 포함한 영양염 고갈세포를 첨가할 시 인산염 농도가 낮아지기 때문에 전배양의 배양액 및 각 농도로 조제한 배지의 농도를 측정하여 실제 농도를 계산하였다. 이 실험 모두 오전 10시에 수행하였다. 흡수속도는 실험 전후의 영양염의 농도 차로부터 구하였으며, 이들 농도를 Michaelis-Menten 식에 대입하여 농도 의존성을 정량적으로 파악하였다 (Dugdale, 1967).

$$\rho = \rho_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

여기에서 ρ_{max}는 영양염 최대 흡수속도 (pmol/cell/hr), K_s는 반포화상수 (μM), S는 영양염 농도 (μM)이며, 변수값 (ρ_{max}, K_s)은 구하여진 실험값을 위 식에 대입하여 비선형최소자승법으로 계산하였다 (Abe, 1985).

결과 및 고찰

Nitzschia sp.에 따른 인산염 흡수속도는 배양개시전후 약 60분간 거의 일정하였으나 (0.047-0.0058 pmol/cell/hr), 90-240분은 흡수속도가 감소하여 (0.0010-0.0014 pmol/cell/hr; Fig. 1), 두 시간구배에 흡수속도는 뚜렷한 차이가 보였다 (t-test, p<0.005). 따라서 영양염 흡수속도 실험의 시간을 60분으로 설정하여 수행하였다. 인을 고갈 시킨 *Nitzschia* sp.세포를 60분간 인산염 흡수속도를 수행한 결과, 환경수중의 인산염농도(S)가 높아질수록 흡수속도는 증가하였으며, 본 연구에서 설정한 최고농도 조건에서 (1,000 μM) 조차 포화되지 않고, 더 높은 농도에서도 흡수속도가 증가할 가능성이 있다. 이 실험값을 Michaelis-Menten 식에 대입하여 보면, 최대흡수속도 (ρ_{max})는 0.132 pmol/cell/hr, 반포화상수 (K_s)는 502.6 μM이 얻어졌다 (r=0.915; Fig. 2). 폐쇄성 연안역은 해수교환이 낮기 때문에 인간 활동에 따라 육지로부터 유입되는 과잉영양염이 식물플랑크톤을 과대 성장시키고, 생산되어진 입자성 유기물은 저층에 침강하여 축적된다. 박테리아의 활동은 침강된 유기물을 분해하고 산화환경을 환원환경으로 변화시켜 빈산소 수괴가 출현하게 된다. 또한 환원상태는 저질 입자에 흡착되어 있는 무기인을 용출 시킨다. 저서성 미세조류 *Nitzschia* sp.의 인산염의 동력학 실험을 수행한 결과, K_s는 통상 부유성 미세조류보다 100배 높은 농도로 나타났다. 이는 *Nitzschia*

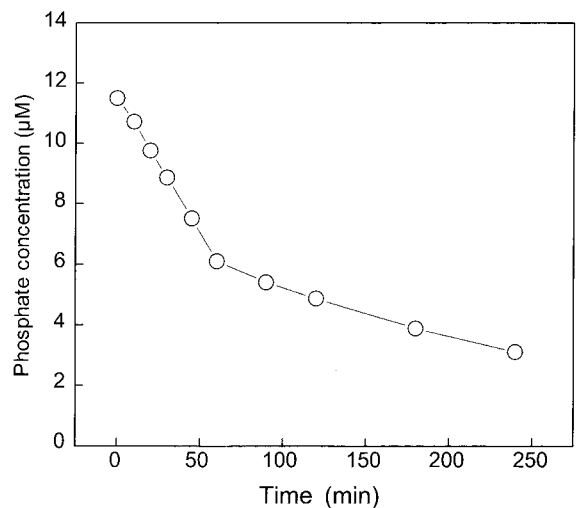


Fig. 1. Change of phosphate concentrations by *Nitzschia* sp. after perturbing phosphate-starved cultivation with 10 μM phosphate. Experimental conditions: 17 °C, 30 psu and 20 μmol/m²/s (cool-white fluorescent lamps, 12:12 h LD cycle).

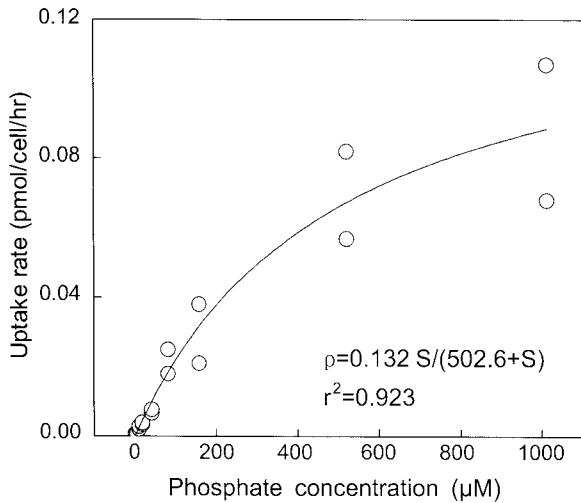


Fig. 2. Phosphate uptake of *Nitzschia* sp. in the range of ambient phosphate concentration. See Fig. 1 for incubation conditions.

sp.가 극도로 높은 인산염의 환경에 적응되어 있다는 것을 알 수 있다. 만약 세포내 인 함유량을 세포체적 ($6,220 \mu\text{m}^3$; 폭을 $10 \mu\text{m}$, 높이를 $22 \mu\text{m}$, 길이를 $150 \mu\text{m}$ 의 oblong 형태로 계산)을 Strathmann (1967)의 식 ($\log C = 0.758 \log V - 0.422$)에 넣어 탄소함유량을 구하면 280 pg/cell 로, 이것을 Redfield 식 (Redfield, 1934)을 이용하여 P 함유량 (Q_p)을 계산하면 0.22 pmol/cell 이 된다. ρ_{max} 를 이용하여 하루당 최대 인산염 비흡수속도 (maximum specific uptake rate; ρ_{max}/Q_p)는 $14.4/\text{day}$ 로 계산된다. 이 수치는 단시간에 구해진 ρ_{max} 로부터 계산되어진 것이기에 실측값과 차이가 있을 수 있으나, 하루에 세포내에 함유되어진 인 함유량의 약 14배의 인산염을 흡수한다는 의미이다. 부영양화가 진행되어진 공극수중의 인산염의 농도는 약 $102 \mu\text{M}$ 로 가정한다면 (경기만 남동부 반월지역 조간대; Lee and Kim, 1990), Michaelis-Menten식을 사용하여 흡수속도는 $0.021 \text{ pmol/cell/hr}$ 로 얻을 수 있다. 이를 세포내인 함유량 0.22 pmol/cell 로 나누면 비흡수속도는 $2.29/\text{day}$ 가 된다. 실험적으로 얻어진 최대 비흡수속도는 $0.38/\text{day}$ 이기에 (Oh et al., 2007), 정상상태로 가정하였을 경우, *Nitzschia* sp.의 성장에 필요한 양의 약 6배의 인산염을 흡수한다고 계산할 수 있다. 이렇게 여분의 영양염을 흡수하는 것은 성장 이외에 다른 생리적인 요소에 사용된다는 것을 유추할 수 있다. 첫 번째는 세포내의 축적으로 대부분 미세조류에서 흡수한 DIP를 polyphosphate 형태로 축적을 하며, 세포내 인이 고갈되면 polyphosphatase를 이용하여 가수분해 후, 그들의 성장에 이용하게 된다. 따라서 세포내 축적이 높은 식물플랑크톤은 환경수 중의 영양염 변동에 크게 영향을 받지 않고 성장할 수 있어, DIP가 고갈된 해역에서도 성장할 수 있다 (Eppley et al., 1969; Cembella et al., 1984). 두 번째는 세포외로 배출로 Yamamoto et al. (1999)과 Oh et al. (2006)에 따르면 성장속도가 높을수록 배출량이 높아진다고 하였으며, 세포가 대수증

식기보다 퇴조기에 가장 많은 배출량을 보인다고 하였다. 하지만, 아직까지 배출성분은 불명확하나, 대부분 용존태 유기물질로 cyclic-AMP와 같은 형태로 배출된다고 알려져 있다 (Cembella et al., 1984). *Nitzschia* sp.는 이들 두 가지 전략 중에 어디에 해당되는지는 금후 연구과제로 남아 있으나, 많은 양의 영양염을 흡수하는 것은 틀림이 없는 것으로 보인다. 따라서 이들 저서성 미세조류를 이용할 경우 부영양화 된 저질의 영양염을 효과적으로 제거할 수 있기 때문에 생물적 환경정화에 유용한 대상 종으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2006년도 교육인적자원부의 재원으로 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구 (KRF-2006-353-C00060)로 지원기관에 감사를 표한다.

참 고 문 헌

- Abe, H. 1985. Ouyo Sugaku Nyumon. Baifu Kan, Tokyo, Japan, 1-215.
- Cembella, A.D., N.J. Antia and P.J. Harrison. 1984. The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: A multidisciplinary perspective. *CRC Critic. Rev. Microbiol.*, 11, 13-81.
- Dugdale, R.C. 1967. Nutrient limitation in the sea: dynamic, identification, and significance. *Limnol. Oceanogr.*, 12, 685-695.
- Eppley, R.W., J.N. Rogers and J.J. McCarthy. 1969. Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 14, 912-920.
- Guillard, R.R.L. and P.E. Hargraves. 1993. *Strichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia*, 32, 234-236.
- 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.
- Keller, M.D., R.C. Selvin, W. Claus and R.R.L. Guillard. 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.*, 23, 633-638.
- Lee, C.B. and D.S. Kim. 1990. Pore water chemistry of intertidal mudflat sediment. 1. Seasonal variability of nutrient profiles (S, N, P). *J. Oceanol. Soc. Kor.*, 25, 8-20.
- Oh, S.J., T. Yamamoto and H.Y. Yoon. 2006. Uptake and excretion of dissolved organic phosphorus by two dinoflagellates, *Alexandrium tamarense* Lebour (Balech) and *Gymnodinium catenatum* Graham. J.

- Fish. Sci. Technol., 9, 30-37.
- Oh, S.J., D.S. Park, H.S. Yang, Y.H. Yoon, T. Honjo. 2007. Bioremediation on the benthic layer in polluted inner bay by promotion of microphytobenthos growth using light emitting diode (LED). J. Kor. Soc. Mar. Environ. Eng., 10, 93-101.
- Oh, S.J., D.I. Kim, T. Sajima, Y. Shimasaki, Y. Matsuyama, Y. Oshima, T. Honjo and H.S. Yang. 2008. Effects of irradiance of various wavelengths from light-emitting diodes on the growth of the harmful dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and the diatom *Skeletonema costatum*. Fish. Sci., 74, 137-145.
- Provasoli, L., K. Shiraishi and J.R. Lance. 1959. Nutritional idiosyncrasies of *Artemia* and *Tigriopus* in monoxenic culture. Ann. N.Y. Sci., 77, 250-261.
- Redfield, A.C. 1934. On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. In: James Johnstone Memorial Volume. Daniel R.J., ed. University Press of Liverpool, U.K., 177-192.
- Strathmann, R.R. 1967. Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume, Limnol. Oceanogr., 12, 411-418.
- Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis, 2nd ed. Bulletin of Fisheries Research Board of Canada, Canada, 1-310.
- Suzuki, M. and T. Yamamoto. 2005. Effects of grain size of substrate on the growth of a benthic microalgae *Nitzschia* sp. J. Grad. Sch. Biosp. Sci., Hiroshima Univ., 44, 31-38.
- Yamamoto, T., K. Tarutani, M. Kawahara and S.J. Oh. 1999. Utilization and excretion of dissolved organic phosphorus by *Alexandrium tamarense* (Hiroshima Bay strain). J. Fac. Appl. Biol. Sci., Hiroshima Univ., 38, 151-159.

2008년 5월 1일 접수

2008년 8월 11일 수리