

<단보>

와편모조류 시스트 분리를 위한 Panning 방법과 SPT 용액방법의 비교

강윤자\* · 문창호 · 조현진<sup>1</sup>  
 부경대학교 해양학과, <sup>1</sup>해양경찰청

Comparison of Panning and Sodium Polytungstate Methods for Separating Dinoflagellate Cysts

Yoon-Ja KANG\*, Chang-Ho MOON and Hyun-Jin CHO<sup>1</sup>  
 Department of Oceanography, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea  
<sup>1</sup>Korea Coast Guard, Incheon 400-707, Korea

Two methods for separating dinoflagellate cysts from marine sediments were compared: panning and sodium polytungstate (SPT). After pretreatment with the SPT solution, *Protoperidinium* species had a high germination rate and cell growth rate. The germinated cells grew continuously, even in a low nutrient environment. *Alexandrium* cysts did not germinate, because their germination is usually active in winter. Using SPT solution, the separation process was easier, quicker, and caused much less eye fatigue than the panning method. Therefore, SPT solution offers a convenient way of pretreating dinoflagellate cysts for separation and analysis.

Key words: Dinoflagellate cysts, Germination, SPT solution method, Panning method

서 론

현재까지 우리나라에서 와편모조류 시스트 발아실험에 사용되는 세포 분리 방법은 초음파처리와 여과를 거쳐서 마이크로피펫으로 세포를 하나씩 분리하는 panning 방법 (Matsuoka et al., 1989)을 따르고 있다 (Kim et al., 2002; Park et al., 2004). 그러나 이 방법은 시스트 주변에 붙어있는 먼지뿐만 아니라 저질 속의 이매패류 파편과 유기물이 충분히 제거되지 않아 세포를 분리하는데 많은 어려움이 따르며, 시스트를 동정하기도 힘들다. 무엇보다 panning 방법은 세포의 유실이 많으며, 연구자의 고도의 집중력과 분리하는데 많은 시간을 필요로 하며, 계속되는 반복 작업과 장시간에 걸친 현미경 작업으로 연구자의 눈에 피로를 유발한다. 그러나 sodium polytungstate (SPT:  $3Na_2WO_4 \cdot 9WO_3 \cdot H_2O$ ) 용액을 이용한 방법은 앞서 언급한 어려움들을 해결할 수 있을 것으로 사료된다. 와편모조류 시스트의 비중은 약  $1.3 \text{ g/cm}^3$ 인 것으로 알려져 있으며 (Anderson and Lively, 1985), Bolch (1997)는 이를 적용하여 와편모조류 시스트를 분리하는 방법을 제안하였다. 여과된 해수와 퇴적물이 혼합된 현탁액에 비중  $1.3 \text{ g/cm}^3$ 으로 희석시킨 SPT 용액을 주입시켜, 물질 고유의 비중차에 의해 퇴적물과 여과된 해수 (Filtered sea water: FSW) 사이에 SPT 용액과 시스트가 뜨게 되고, 이를 분리하여 저질로부터 시스트를 손쉽게 분리할 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 저질속의 와편모조류 시스트를 더

정확하게 동정하고, 간편하게 분리하는 방법으로 SPT 용액을 이용한 방법을 소개하고, 일반적으로 사용되고 있는 panning 방법과 비교 분석하였다. 또한, SPT 용액을 이용하여 분리한 와편모조류 시스트를 발아시켜 발아율을 살펴봄으로써, SPT 용액을 사용하는 방법의 효율성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

Sodium polytungstate 용액

SPT 용액은 무독, 무취로 작업하는 사람의 건강뿐만 아니라 분리하고자 하는 목적 종에도 영향을 미치지 않기 때문에 다루는데 있어 많은 주의를 필요로 하지 않고, pH 2-14의 넓은 범위에서도 안정적이다. SPT 용액은 가격이 비싸다는 단점이 있지만, 여과와 증류 작업을 거치면 다시 사용이 가능하므로 상대적으로 경제적이라고 볼 수 있다 (Savage, 1988; Six et al., 1999). 흔히 비중차를 이용하여 실험대상을 분리하는데 염화아연이나 브로모포름을 사용하는 것과는 달리, SPT 용액은 점성이 낮고, 희석정도에 따라 넓은 범위의 밀도 ( $1.0\text{-}3.1 \text{ g/cm}^3$ )를 맞춰줄 수 있기 때문에 고생대 해성퇴적암에서 발견되는 코노돈트 (conodont)를 분리하거나 (Gregory and Johnston, 1987; Savage, 1988), 퇴적물로부터 저서 무척추 동물을 분리하는데도 사용되었다 (Robinson and Chandler, 1993).

퇴적물 시료 채취 및 보관

본 연구를 위한 시료 채취는 경상남도 통영시 산양읍 인근

\*Corresponding author: gjkang0521@gmail.com

해역에서 2006년 9월 14일에 수행하였다. 길이 30 cm, 지름 1.1 cm의 아크릴 튜브가 들어있는 중력 채니기를 이용하여 5개 정점에서 표층 퇴적물 시료를 채취하여 분리 및 배양하는데 사용하였다. 퇴적물 시료는 아크릴 튜브 내 해수와 같이 밀봉하여, 실험실로 운반한 뒤, 전처리하기 전까지 냉장보관하였다.

**외편모조류 시스트 분류 및 배양**

SPT는 하얀색 가루 상태로서, SPT 75 g에 증류수 25 mL를 첨가하여 비중 2.4 g/cm<sup>3</sup>의 저장액을 만들고, 이를 증류수와 5:1 (증류수:비중 2.4 g/cm<sup>3</sup>의 SPT 용액)로 혼합해 비중 1.3 g/cm<sup>3</sup>의 SPT 용액을 만들었다. 이 혼합액을 이용하여 퇴적물로부터 외편모조류 시스트를 분리하는데, 먼저 퇴적물 시료 중 10 g을 덜어서 FSW와 혼합하여 현탁액을 만들고, 약 10-20 초간 초음파처리를 거친 뒤, 공경 125 μm와 20 μm 크기의 체에 각각 거르고, 10 mL 폴리에틸렌 튜브에 담아 침전시켰다. 그 후, 상등액을 제거하고, 마이크로 피펫을 이용하여 비중이 1.3 g/cm<sup>3</sup>인 SPT 용액 3 mL를 현탁액 아래에 주입하였다. 이를 10분간 원심분리시켜 퇴적물 (비중 1.3 g/cm<sup>3</sup> 이상), SPT 용액 (비중 1.3 g/cm<sup>3</sup> 이하), FSW (비중 1.3 g/cm<sup>3</sup> 이하) 각각 세 개의 층으로 분리시켰다. 여기서, FSW와 SPT 용액 사이에 부유하고 있는 외편모조류 시스트 (비중 1.3 g/cm<sup>3</sup>)를 새로운 테스트 튜브로 옮겨 FSW를 넣고 원심분리하여 상등액을 제거하고 5-6회 반복 세척하였다. 퇴적물에서 분리된 시스트는 마이크로 피펫으로 한 세포씩 분리하여 SW II 배지 (Iwasaki, 1961)가 든 96-well 배양용기에 넣고, 15일 동안 20°C에서 배양 (12:12 LD cycle)하면서 발아유무를 매일 관찰하였다. 세포는 발아공의 유무에 따라 생시스트 (living cysts)와 공시스트 (empty cysts)를 판단하였으며, 생시스트만을 실험에 사용하였다. 시스트의 발아상태는 영양세포가 출현하거나, 발아한 뒤 남은 공시스트가 관찰되면 발아한 것으로 하였다.

**결과 및 고찰**

**Panning 방법과 SPT 용액을 이용한 발아실험 방법 비교**

외편모조류 시스트를 저질에서 분리하기 위한 방법으로 일반적으로는 저질시료를 여과해수에 현탁시킨 후 초음파처리를 하고, 200 μm와 20 μm의 체에 걸러 분리하는 방법을 사용한다 (Matsuoka et al., 1989). 그러나 이 방법은 Fig. 1A에서 보는바와 같이, 미세 입자들이 제거되지 않아 시스트를 발견하기 힘들고, 세포 분리 시 주변의 불순물들을 제거하기 위하여 여러 번의 세척작업을 거쳐야 하며, 분리하는데 시간이 오래 걸린다. 또한, 마이크로피펫을 이용한 세척작업의 반복으로 세포에 스트레스를 가할 수 있으므로 연구자의 숙달된 기술이 필요하다. 반면, SPT 용액을 이용하여 퇴적물의 전처리 과정을 거치면, 손쉽게 분리가 가능하다. 비중차로 인해 비중이 약 1.3 g/cm<sup>3</sup> 인 외편모조류 시스트가 1.3 g/cm<sup>3</sup> 이상인 퇴적물과 1.3 g/cm<sup>3</sup> 이하인 SPT 용액 사이에 떠있기 때문에 가운데 집약된 외편모조류 시스트만을 추출하면 된다. 또한, panning 방법을 사용할 때 보다 시스트 주변에 붙어있는 이물질이 적어서 이들이 발아하고 남은 공시스트와 발아 가능성이 있는 생시스트를 구분 하는데 용이하다 (Fig. 1B). Panning 방법만으로는 쉽게 발견되지 않았던 *Cochlodinium* sp.와 *Protopteridinium reticulatum* 등의 발견율도 SPT 용액을 이용할 때 더 높은 것으로 알려져 있다 (Bolch, 1997). 이 방법도 마이크로피펫을 이용한 분리과정을 거치기는 하지만 여러 번의 세척작업을 거치는 불편함이 없어 분리하는데 시간이 절약되고, 시스트의 세포벽 손상을 월등히 낮출 수 있을 것으로 예상된다. 일반적으로 외편모조류 시스트의 발아는 빛과 온도에도 영향을 받는 것으로 알려져 있어 (Kremp and Anderson, 2000), 대부분의 현장 조사에서도 시료를 전처리하기 전까지 빛을 최대한 차단하여 옮기며, 전처리 과정도 신속히 하도록 한다. 발아실험에서도 배양기에 넣기 전까지는 최

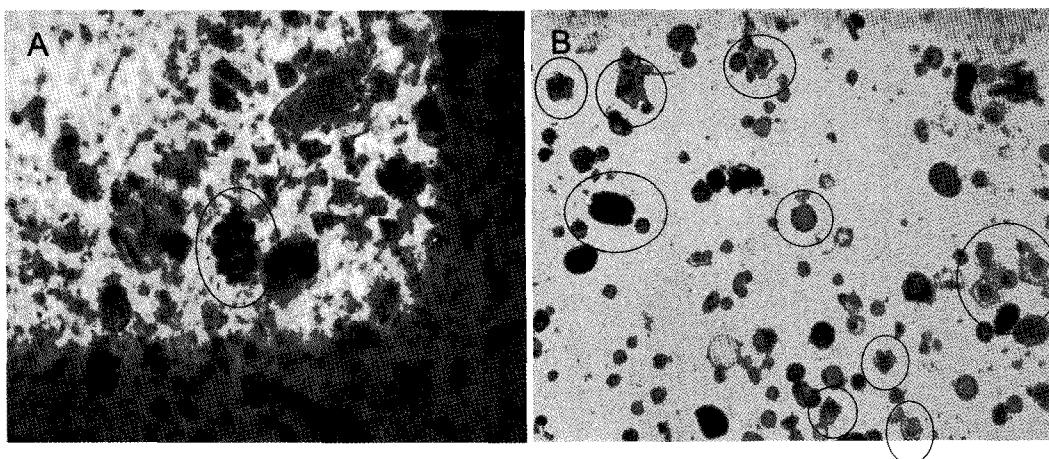


Fig. 1. Comparison of panning (A) and SPT solution method (B) to separate cysts. Circles indicate separated cysts from the surface of marine sediments.

Table 1. List of dinoflagellate cysts conducted germination experiment and their related motile species in parenthesis. Cyst name marked with asterisk means the same name as that of the motile species

Name of cysts species (Name of motile species)	The number of tested cells	The number of germinated cells
Goniaulacoid group		
<i>Alexandrium affine</i> *	18	none
<i>Alexandrium catenella/tamarense</i> *	18	none
Protopteridinioid group		
<i>Brigantedinium cariacense</i> ( <i>Protopteridinium avellana</i> )	15	15
<i>Brigantedinium simplex</i> ( <i>Protopteridinium conicoides</i> )	7	7
<i>Brigantedinium</i> sp.	8	none
<i>Quinquecuspis concretum</i> ( <i>Protopteridinium leonis</i> )	10	10
<i>Protopteridinium americanum</i> *	5	4
<i>Scrippsiella trochoidea</i> *	5	3
<i>Selenopempix alticintum</i> ( <i>Protopteridinium subinerme</i> )	2	none
<i>Votadinium carvum</i> ( <i>Protopteridinium oblongum</i> )	10	10
<i>Votadinium spinosum</i> ( <i>Protopteridinium claudicans</i> )	10	10
Tuberculodinioid group		
<i>Tuberculodinium vacampoe</i> ( <i>Pyrophacus steinii</i> )	5	none

대한 빛을 차단하고, 시료 채집시의 온도를 유지하도록 하는 것이 필요하다. 그러므로 SPT 용액을 사용하면 세포 분리시 걸리는 시간을 단축시켜 발아에 미치는 빛의 영향도 panning 방법을 이용하였을 때 보다 낮출 수 있을 것으로 판단된다.

#### 외편모조류 시스트 발아 및 SPT 용액의 효율성

실험이 진행된 15일 동안 타가영양종인 Protopteridinioid group에 속하는 종들의 발아율이 높았고, 대부분 2-4일이면 발아하였고, 꾸준한 성장을 보였다. *Brigantedinium* 속은 생시스트로는 정확한 종 (species)까지 구분하기 힘들므로, 생시스트 중 발아한 것들을 그 유영세포와 비교 후, 시스트 종별 발아정도를 파악하였다. 30 cells의 *Brigantedinium* sp.를 배양시킨 결과, 그 중 *Brigantedinium cariacense* 15 cells, *Brigantedinium simplex* 7 cells이 발아하여 *Brigantedinium* sp. 30 cells 중 22 cells이 발아하였다. 그 외에도 *Quinquecuspis concretum*, *Protopteridinium americanum*, *Scrippsiella trochoidea*, *Votadinium carvum*, *Votadinium spinosum*이 발아하였다. 이 중 *Quinquecuspis concretum*, *Votadinium carvum*, *Votadinium spinosum*은 10 cells을 배양 시켰고, 모두 발아하였다. 그러나 Protopteridinioid group의 *Selenopempix alticintum*, Goniaulacoid group의 *Alexandrium affine*, *Alexandrium catenella*, *Alexandrium tamarense*, Tuberculodinioid group의 *Tuberculodinium vacampoe*는 발아하지 않았다 (Table 1). Kim et al. (2002)이 춘계 대번식에 있어 *Alexandrium tamarense*가 미치는 영향을 조사하기 위해 실시한 발아실험의 결과에 따르면, 12월경 즉, 수온이 낮아지는 시기와 일치하여 *Alexandrium*의 발아율이 최대값을 나타냈다. 또한, *Alexandrium*의 월별 발아율을 보면, 1월과 2월에 가장 높은 발아율을 보였고, 온도가 10-20°C 사이에서 발아를 하였지만, 약 15°C에서 가장 많이 발아한 것으로 나타났다 (Park, 2000; Shin, 2002). 이들의 발아에 온도의 영향도 무시할 수 없겠지만, 다른 연구의 *Alexandrium* 발아실험의 결과들에 비추어 보아, 낮은 발아율을 보이기는 하나 20°C에서도 발아가 가능하다. 그러나 이들 휴면시스트는 조사지역의

수환경에 따라 일정한 휴면기간을 거치는 것으로 알려져 있다 (Anderson 1980; Anderson and Keafer 1987). 본 연구에서는 10월에 총 36 cells의 *Alexandrium* 휴면포자를 분리 배양하였으나 *Alexandrium*의 발아가 거의 일어나지 않았던 것은 충분한 휴면기간을 지난 후인 1월과 2월이 발아가 가장 활발히 일어나기 때문인 것으로 판단된다. SPT 용액을 이용하여 외편모조류 시스트를 저질로부터 분리 및 배양한 결과, 시스트의 발아율에도 큰 변화가 없었고, Fig. 1에서 한눈에 보아도 비교 가능하듯이 동일한 시료를 전처리했을 때, panning 방법을 이용하였을 때 보다 눈에 띄게 많은 외편모조류 시스트 수가 분리되었다. 무엇보다도 SPT 용액을 사용하면 panning 방법에 비해 상대적으로 세포 손실률이 적고, 세포벽 손상율도 낮아 외편모조류 시스트 연구시 실험의 오차를 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

#### 참고 문헌

- Anderson, D.M. 1980. Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) hypnozygotes. *J. Phycol.*, 16, 166-172.
- Anderson, D.M. and B.A. Keafer. 1987. An endogenous annual clock in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *Nature*, 325, 616-617.
- Anderson, D.M. and J.J. Lively. 1985. Sinking characteristics of dinoflagellate cysts. *Limnol. Oceanogr.*, 30, 1000-1009.
- Bolch, C.J.S. 1997. The use of sodium polytungstate for the separation and concentration of living dinoflagellate cysts from marine sediments. *Phycologia*, 36, 472-478.
- Gregory, M.R. and K.A. Johnston. 1987. A non-toxic substitute for hazardous heavy liquids- aqueous sodium polytungstate ( $3\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) solu-

- tion. N.Z. J. Geol. Geophys., 30, 317-320.
- Iwakaki, H. 1961. The life cycle of *Porphyra tenera* in vitro. Biol. Bull., 121, 173-187.
- Kim, Y.O., M.H. Park and M.S. Han. 2002. Role of cyst germination on the bloom initiation of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Masan Bay, Korea. Aquat. Microb. Ecol., 29, 279-286.
- Kremp A. and D.M. Anderson. 2000. Factors regulating germination of resting cysts of the spring bloom dinoflagellate *Scrippsiella hangoei* from the northern Baltic Sea. J. Plank. Res., 22, 1311-1327.
- Matsuoka, K., Y. Fukuyo and D.M. Anderson. 1989. Methods for modern dinoflagellate cyts studies. In: Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology. Elsevier Science Publishing, Tokyo, Japan, 461-479.
- Park, C.M. 2000. Distribution and germination characteristics of the resting cysts of toxic dinoflagellate genus *Alexandrium* in Korean coastal waters. Master thesis, Pukyong National University, Korea, 1-98.
- Park, M.H, Y.O. Kim, S.Y. Cho, M.S. Han. 2004. Effect of environmental conditions on germination of *Alexandrium tamarense* cysts from Masan Bay, Korea. Kor. J. Environ. Biol., 22, 200-205.
- Robinson, S.M.C. and R.A. Chandler. 1993. An effective and safe method for sorting small molluscs from sediment. Limnol. Oceanogr., 38, 1088-1091.
- Savage, N.M. 1988. The use of sodium polytungstate for conodont separations. J. Micropalaeon., 7, 39-40.
- Shin, J.B. 2002. Distribution and germinability of *Alexandrium tamarense/catenella* resting cysts for the prediction of toxic algal blooms. Master thesis, Pukyong National University, Korea, 1-46.
- Six, J., P.A. Schultz, J.D. Jastrow and R. Merckx. 1999. Recycling of sodium polytungstate used in soil organic matter studies. Soil Biol. Biochem., 31, 1193-1196.

---

2007년 8월 31일 접수  
2008년 6월 9일 수리