

# 구리독성이 *Anabaena flos-aquae*의 생리적 변화에 미치는 영향

류 지원, 최 은 주, 이 기 태\*

경희대학교 생물학과, 경희대학교 지구환경연구소

## Toxicity Effects of Copper on the Physiological Responses of *Anabaena flos-aquae* (Cyanophyceae)

Jiwon Ryu, Eun joo Choi and Kitae Rhie\*

Department of Biology, KyungHee University, Institute of Global Environment,  
Kyung-Hee University

### ABSTRACT

Effects of various concentrations of copper on growth change of blue-greenalgae *Anabaena flos-aquae* were studied. There was significant differences among cultures treated with various concentrations of copper in growth of algae with parameters of cell numbers, specific growth rate (SGR) and chlorophyll contents. Algal growth and SGR were inhibited on by effect of various concentrations of copper more than without copper (ANOVA,  $F=34.69$   $p<0.001$ ,  $F=114.89$ ,  $p<0.001$ ). The SGRs of various concentrations of copper in media were higher than without copper on 8 days after copper treated. The mean of chlorophyll contents was  $1.978 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $1.648 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively, while those of algae in culture without copper was  $3.179 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (ANOVA,  $F=153.74$ ,  $p<0.001$ ). The cellular morphology was different between media of which copper treated and without copper. The colony of algae in media which copper treated was shorter than without copper. Effects of various concentrations of copper on growth change of blue-green-algae *Anabaena flos-aquae* occurred variety changes of parameters of cell numbers, specific growth rate (SGR), chlorophyll contents and cellular morphology on growth of algae.

**Key words** : copper toxicity, blue-green algae, *Anabaena flos-aquae*

### 서 론

무분별한 산업개발과 자원의 이용으로 불균등한 자원의 분배뿐 아니라 자연생태계 혼란이 초래되고 있으며 특히 생활에 필수적인 수자원의 오염과 고갈은 직접적인 생존의 위협으로 다가서고 있다.

더불어 현대사회의 산업개발로 각종 중금속의 유입은 직접적으로는 수중생태계에 영향을 미치고 있으며 간접적으로는 먹이사슬을 통해 각종 생태계 및 최종적으로 인간에게까지 영향을 주고 있다. 이러한 중금속은 조류의 생리적인 변화뿐만 아니라, 생체 조직내의 필수 기능에 대해 영향을 미쳐 단백질을 변화시키므로 효소의 생화학적인 활성이나 물질의 수송체계에 영향을 미친다. 이 중에서도 구리의 경우는 Cyanobacteria뿐 아니라 다양한 생

\* To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-2-961-0603, E-mail: rhiekt@khu.ac.kr

물의 성장, 물질대사와 효소의 활성화에 관여하는 필수적인 요소임에 불구하고 환경의 조건에 따라 그 농도가 과도할 경우 조류의 성장에 있어 물질대사의 교란과 성장억제를 야기하는 것으로 알려지고 있다(Fernandes and Henriques, 1991; Lidon and Henriques, 1991; Lidon *et al.*, 1993; Ouzounidou, 1994). 또한 구리는 광합성에 있어 전자전달계를 교란시켜 전자의 수송을 방해하며, chlorophyll의 분해를 야기시키는 것은 물론 총 물질 대사량의 감소를 야기시키는 것으로 알려져 있다(Sandmann and Böger, 1980; Arduini *et al.*, 1995; Quartacci *et al.*, 2001; Päsikkä, 2002). 본 연구의 재료가 되고 있는 *Anabaena flos-aquae* 종이 속해 있는 cyanobacteria는 수생생태계 내에서 특이적으로 중금속과의 결합능력에 잠재하고 있는 독립영양생물 중의 하나이다(Xiomara *et al.*, 2002). 지금까지 구리의 독성에 대한 생리적 변화 및 내성에 관한 연구는 많은 분야에서 밝혀져 있지만, 구리뿐 아니라 여타 중금속 및 오염물질에 대한 biomonitoring을 위해 미세조류 및 cyanobacteria에 대한 폭넓은 연구가 요구되고 있다(Rai *et al.*, 1981; Genter, 1996). 이러한 생물학적인 분석은 대부분 비연속배양(batch culture) 상황에서 이루어지며(De Filippis and Pallaghy, 1994), 이러한 비연속배양 조건 하에서의 조류는 실험초기에 독성금속에 대한 단순한 경향을 보여준다(Hall *et al.*, 1989). 따라서, 본 연구에서는 중금속에 대한 결합능을 지니고 있는 cyanobacteria의 일종인 *Anabaena flos-aquae*를 비연속배양 조건 하에서 구리를 처리하여 세포수, 엽록소함량, total protein 및 세포형태 등의 생리적 요인의 변화를 측정, 분석함으로써 구리의 영향에 관한 연구를 수행하며, 실제 수계환경에서 구리의 독성에 대한 생리적 지표로 삼고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 조류의 배양

실험재료인 *Anabaena flos-aquae* (UTEX 1440, USA., 1994)는 담수에서 서식하는 남조류의 일종으로 CB (Watanabe *et al.*, 2000)용액을 사용하여 배양하였다. *Anabaena flos-aquae*를 3일간 명조건 12시간, 암조건 12시간으로 비연속배양을 한 후 본

실험의 초기 접종을 하였다. 삼각플라스크 (6 L)에 CB배양액 2 L를 채워 멸균기를 이용하여 121°C, 1.1 kg/cm<sup>2</sup> 조건에서 30분간 멸균시키고 세포수가 5 × 10<sup>5</sup>/mL가 되도록 무균대에서 접종하였다. 배양조건은 온도 25°C, 광도 45 μM photon/m<sup>2</sup>·sec로 유지시키며 80 rpm의 진탕기에서 중금속 처리 전 6일과 중금속 처리 후 측정일 10일을 포함하여 총 16일간 진탕 배양하였다.

### 2. 조류의 성장 조건

배지 내 구리의 농도를 달리한 조류의 성장을 조사하기 위해 조류 접종 후 6일째 각 실험구별로 50 μM 또는 100 μM의 농도가 되도록 염화구리(CuCl<sub>2</sub>; SIGMA Co., USA)를 증류수에 용해하여 배지 내의 구리 농도조건을 조성하였다.

### 3. 조류의 성장 측정

접종일을 포함하여 2일 간격으로 총 6회에 걸쳐서 세포수, Chlorophyll 함량, SGR을 측정하였으며 측정 시마다 각 처리군의 현미경 세포사진을 digital camera를 이용하여 촬영하였다.

#### 1) 세포분열

광학현미경(Optical Microscope)과 Haemocytometer를 이용하여 각 실험구 당 1회에 3차례씩 세포수를 측정하여 1 mL에 들어 있는 조류의 수를 계산하였다.

#### 2) Specific Growth Rate (SGR)

구리의 농도에 따른 조류 성장을 분석하기 위하여 다음 식을 이용하여 Specific Growth Rate (SGR)를 계산하였다.

$$SGR = (\ln N_2 - \ln N_1) / (T_2 - T_1),$$

(N: 세포수, T: 시간, ln: 자연대수)

#### 3) Chlorophyll 함량

대조구와 처리구의 배지를 잘 흔든 후 각각 10 mL씩을 취하여 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 후, 가라앉은 세포만을 취하였다. 모아진 세포는 95% 에탄올을 첨가하여 10 mL로 적정한 뒤, 바닥에 뭉쳐진 세포를 풀어주기 위해 vortexing 하였다. 충분히 세포가 풀어지면 Heating Block을 이용하여 80°C에서 30분간 중탕시켰

다. 30분 중탕 후, 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리시켜 엽록소가 추출된 상층액만을 모은 후 얼음에 넣어 식혔다. 추출된 상층액을 분광광도계를 이용해 648 nm 및 664 nm에서 흡광도를 측정하고 아래의 식에 따라 엽록소의 함량을 계산하여 총 엽록소량을 산출하였다.

$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/mL}) = 13.36 A_{664} - 5.19 A_{648}$$

$$\text{Chlorophyll b } (\mu\text{g/mL}) = 27.43 A_{648} - 8.12 A_{664}$$

$$\begin{aligned} \text{Total chlorophyll content} \\ = \text{Chlorophyll a} + \text{Chlorophyll b} \end{aligned}$$

#### 4) 세포형태관찰

세포의 형태적인 분석은 Digital Camera을 이용하여 최초 접종일부터 2일 간격으로 대조구, 처리구1와 처리구 2의 세포사진을 광학현미경상으로 촬영하였다.

#### 5) 자료분석

구리가 첨가되지 않은 대조구와 50, 100  $\mu\text{M}$ 이 첨가된 각 처리구간의 세포수, Specific Growth Rate (SGR), Chlorophyll 함량의 측정량은 SAS (Statistical Analysis System) 컴퓨터 프로그램 (SAS system ver. 6.12)을 이용하여 각 실험값의 평균을  $\alpha = 0.05$  수준에서 분산분석 (ANOVA test)한 후 Duncan의 다중 범위 검정 방법 (Duncan's multiple range test)으로 사후 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 세포분열

세포의 수는 전 생육기간에서 각 측정일별로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (ANOVA,  $F = 34.69$   $p < 0.001$ ). 각 측정일별 세포수의 평균값을 비교하면 구리 처리일인 0일째  $4.854 \times 10^6$  cell/mL와 2일째  $6.079 \times 10^6$  cell/mL, 4일째  $8.161 \times 10^6$  cell/mL간에는 각각 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (Duncan's Multiple Range Test,  $\alpha = 0.05$ ). 하지만 4일째  $8.161 \times 10^6$  cell/mL와 6일째  $8.192 \times 10^6$  cell/mL간 세포수의 평균은 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 초기 구리 처리일로부터 지속적인 세포분열을 통해 세포수가 증가하다 측정 4일째와 6일째에서 세포의 최대성장

을 이룬 것으로 판단된다. 실제로는 최초 접종일이 구리 처리일의 6일전이므로 세포 접종 후 10일째와 12일째가 된다. 측정 6일째  $8.192 \times 10^6$  cell/mL와 8일째  $10.596 \times 10^6$  cell/mL간에는 세포수의 평균이 증가하였으면 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 하지만, 측정 10일째 세포수의 평균은  $8.896 \times 10^6$  cell/mL으로 8일째 세포수의 평균에 비해 감소되었으며 세포수의 평균 비교에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 10일째 세포수의 평균은 측정 4일째와, 6일째의 세포수의 평균과 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 측정 6일째에서 8일째로 세포분열을 통해 세포수의 평균이 증가하여 세포성장이 회복되다가 8일째를 정점으로 10일째 세포수의 평균이 측정 4일째와 6일째의 평균과 비교하여 유의한 차이가 없을 정도로 감소된 것으로 나타났다.

구리가 처리되기 전인 측정 0일째에는 세포수의 평균이 대조구와 각 처리구에서  $4.815 \times 10^6$ ,  $4.815 \times 10^6$ ,  $4.933 \times 10^6$  cell/mL으로써 모두 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (ANOVA,  $F = 0.02$ ,  $p = 0.976$ ). 구리 처리 후 측정 2일째에는 세포수의 평균을 비교해보면, 구리가 0  $\mu\text{M}$ 일 때,  $7.675 \times 10^6$  cell/mL, 구리가 50  $\mu\text{M}$ 일 때,  $5.158 \times 10^6$  cell/mL, 구리가 100  $\mu\text{M}$ 일 때,  $5.403 \times 10^6$  cell/mL로 50, 100  $\mu\text{M}$ 의 구리가 처리된 배지에서 자라는 조류가 대조구와 비교했을 때 억제효과가 있는 것으로 나타났다 (ANOVA,  $F = 15.65$ ,  $p < 0.001$ ). 하지만 각 처리구인 50  $\mu\text{M}$ 과 100  $\mu\text{M}$ 에서 세포수의 평균에는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (Duncan's Multiple Range Test,  $\alpha = 0.05$ ). 오히려 세포수의 평균에서 구리가 100  $\mu\text{M}$ 일 때보다 구리가 50  $\mu\text{M}$ 일 때 낮은 것으로 나타났다. 측정 4일째 세포수의 평균을 비교해보면, 구리가 0  $\mu\text{M}$ 일 때,  $9.727 \times 10^6$  cell/mL, 구리가 50  $\mu\text{M}$ 일 때,  $7.920 \times 10^6$  cell/mL, 구리가 100  $\mu\text{M}$ 일 때,  $6.837 \times 10^6$  cell/mL로, 대조구와 50, 100  $\mu\text{M}$ 의 구리가 처리된 각각 처리구에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (ANOVA,  $F = 16.73$ ,  $p < 0.001$ ). 측정 2일째에서 구리가 50  $\mu\text{M}$ 일 때와, 100  $\mu\text{M}$ 일 때 세포수의 평균에 있어 유의한 차이가 없었던 점에 비해, 측정 4일째에서는 구리가 50  $\mu\text{M}$ 일 때보다 100  $\mu\text{M}$ 일 때 세포수의 평균에 있어 억제효과가 더 큰 것으로 판단되며 유의한 차이가 있는 것으로 나타난 점에서 구리처리

농도에 따라 세포 성장에 있어서 억제 효과에 차이가 있는 것으로 판단된다.

측정 6일째에는 세포수의 평균을 비교해보면, 구리가 0  $\mu\text{M}$ 일 때,  $9.717 \times 10^6$  cell/mL, 구리가 50  $\mu\text{M}$ 일 때,  $7.355 \times 10^6$  cell/mL, 구리가 100  $\mu\text{M}$ 일 때,  $7.503 \times 10^6$  cell/mL로 50, 100  $\mu\text{M}$ 의 구리가 처리된 배지에서 자라는 조류가 대조구와 비교했을 때 억제 효과가 있는 것으로 나타났다 (ANOVA,  $F=15.70$ ,  $p<0.001$ ). 하지만 측정 2일째에서의 결과와 마찬가지로 각 처리구인 50  $\mu\text{M}$ 과 100  $\mu\text{M}$ 에서 세포수의 평균에는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (Duncan's Multiple Range Test,  $\alpha=0.05$ ). 오히려 세포수의 평균에서 구리가 100  $\mu\text{M}$ 일 때보다 구리가 50  $\mu\text{M}$ 일 때 낮은 것으로 나타났다. 이 결과는 측정 4일째에서 보듯이, 구리가 100  $\mu\text{M}$ 일 때 억제 효과가 컸던 것에 비해 반대의 경향을 나타냈다.

측정 8일째에는 세포수의 평균을 비교해보면, 구리가 0  $\mu\text{M}$ 일 때,  $11.742 \times 10^6$  cell/mL, 구리가 50  $\mu\text{M}$ 일 때,  $10.285 \times 10^6$  cell/mL, 구리가 100  $\mu\text{M}$ 일 때,  $9.762 \times 10^6$  cell/mL로 대조구와 각 처리구간의 유의한 차가 없는 것으로 나타났다 (ANOVA,  $F=3.06$ ,  $p=0.08$ ). 구리가 0  $\mu\text{M}$ 인 대조구와 구리가 50  $\mu\text{M}$ 인 처리구 1 간에 유의한 차가 없는 것으로 나타났으며, 구리가 50  $\mu\text{M}$ 인 처리구 1과 구리가 100  $\mu\text{M}$ 인 처리구 2 간에도 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 하지만 대조구와 구리가 100  $\mu\text{M}$ 인 처리구 2 간의 세포수 평균에서는 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (Duncan's Multiple Range Test,  $\alpha=0.05$ ). 이는 측정 2, 4, 6일째를 거치는 생육기간 동안 나타났던 구리의 억제 효과로 대조구에 비해 각 처리구에서 낮았던 세포수 평균이 대조구와 유의한 차이가 없을 정도로 비슷한 성장을 보임으로써 구리의 억제 효과가 상쇄되어 어느 정도 조류의 성장에 회복이 일어난 것으로 판단된다.

측정 10일째에서는 세포수의 평균을 비교해보면, 구리가 0  $\mu\text{M}$ 일 때,  $10.590 \times 10^6$  cell/mL, 구리가 50  $\mu\text{M}$ 일 때,  $9.048 \times 10^6$  cell/mL, 구리가 100  $\mu\text{M}$ 일 때,  $7.048 \times 10^6$  cell/mL로, 대조구와 50, 100  $\mu\text{M}$ 의 구리가 처리된 각각의 처리구에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (ANOVA,  $F=13.97$ ,  $p<0.001$ ). 측정 8일째까지 계속 증가하던 세포수가 8일째와 10일째에서 대조구 및 각 처리구 모두 감소하는 것으로 나타났다. 또한 측정 8일째, 각 처리구의 세포수

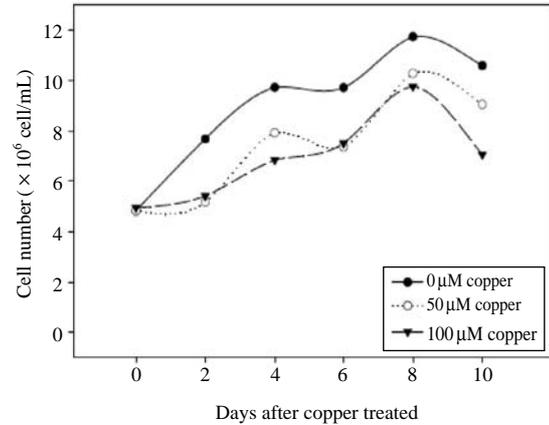


Fig. 1. Changes in cell number of *Anabaena flos-aquae* treated with Cu.

평균이 대조구와 유의한 차이가 없었던 점에 비교하여 10일째 세포수의 평균을 비교해보면, 대조구에 비해 구리가 50  $\mu\text{M}$ 일 때 더욱 감소되었으며, 이에 비해 구리가 50  $\mu\text{M}$ 일 때보다 구리가 100  $\mu\text{M}$ 일 때 더 감소된 것으로 나타났다. 즉, 측정 8일째 구리의 억제 효과가 상쇄되면서 회복세를 보이며 최대 성장을 나타냈던 처리구는 이후, 10일째 세포수가 감소하는 것으로 나타났으며, 구리가 50  $\mu\text{M}$ 일 때보다 구리가 100  $\mu\text{M}$ 일 때 처리된 구리농도에 따른 감소비율은 더욱 커진 것으로 판단된다.

## 2. Specific Growth Rate (SGR)

Specific Growth Rate (SGR)는 전 생육기간 동안 측정일별로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (ANOVA,  $F=114.89$ ,  $p<0.001$ ). 접종일로부터 구리 처리전인 최초 측정일까지 6일간의 SGR은 0.377으로써 측정 2일째의 0.108과는 유의한 차이가 있는 것으로 나타났으나, 측정 4일째의 SGR 0.150은 측정 2일째의 SGR과 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (Duncan's Multiple Range Test,  $\alpha=0.05$ ). 이에 비해 측정 6일째에는 0.004의 SGR을 나타내며 측정 4일째에 비해 낮은 상대성장률을 나타내며 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 이는 6일째 대조구 및 각 처리구에서 세포가 최대 성장에 도달한 것으로 판단되며, 따라서 세포의 상대성장률이 낮게 나타난 것으로 사료된다. 측정일 8일째의 상대성장률은 0.131으로써 측정 6일째의

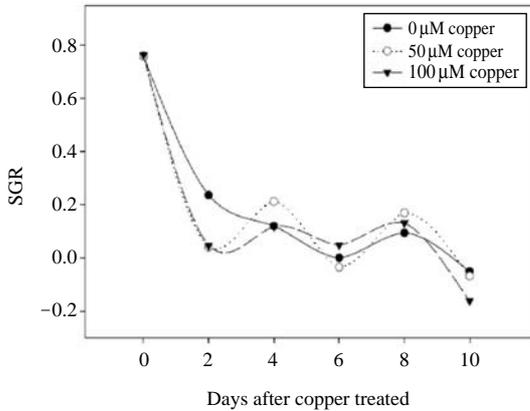


Fig. 2. Changes in specific growth rate of *Anabaena flos-aquae* treated with Cu.

상대성장률에 비해 다시 높아지며 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 세포수의 측정에서 나타난 결과를 비교해보면 구리가 첨가된 처리구에서 구리의 억제효과가 상쇄되면서 어느 정도의 세포 성장이 회복되어 나타난 결과라고 사료된다. 측정 10일째는 SGR이 -0.094로써 측정 8일째의 SGR에 비해 상대적으로 급격히 낮아진 결과를 나타냈다. 이는 측정 8일째를 기점으로 대조구 및 각 처리구에서 전반적으로 세포성장률에 급격한 감소를 가져오면서 나타난 결과로 사료된다. 전반적으로 초기에 높았던 상대성장률은 생육기간이 지날수록 그 값이 작아지면 세포의 성장률이 저하되는 것을 볼 수 있었으나, 구리가 처리된 처리구에 있어 대조구에 비해 상대성장률이 더욱 낮아지기도 구리에 적응이 일어나는 시점을 지나면 대조구에 비해 상대적으로 높은 SGR값을 나타내며 구리의 억제효과가 상쇄되는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만, 처리구의 세포가 가지는 구리의 내성한계를 넘어서면서 그 농도에 따라 급격한 감소를 나타내며 낮은 SGR 값을 나타내는 결과를 관찰할 수 있었다.

### 3. Chlorophyll 함량

엽록소 함량은 전 생육기간에 걸쳐 측정일별로 유의한 차가 있는 것으로 나타났다(ANOVA, F=88.44, p<0.001). 우선 측정일별 엽록소 함량의 평균을 비교해보면, 구리가 처리되기 전인 측정 0일째에는 0.554 μg/mL, 구리 처리 후 측정 2일째는

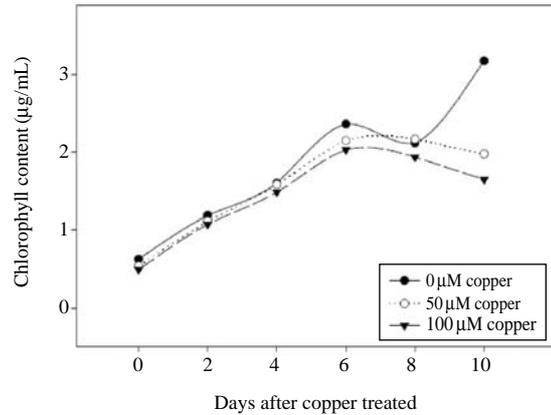


Fig. 3. Changes in chlorophyll content of *Anabaena flos-aquae* treated with Cu.

1.127 μg/mL, 측정 4일째는 1.558 μg/mL, 측정 6일째는 2.268 μg/mL로써 각각 유의한 차이가 있는 것으로 나타났으며 계속적으로 증가하는 것으로 나타났다(Duncan's Multiple Range Test, α=0.05). 하지만, 측정 8일째 엽록소 함량의 평균은 2.076 μg/mL로써 측정 6일의 엽록소 함량 평균보다 낮은 것으로 나타났다. 이 결과는 세포수의 평균 측정에서 측정 8일째 구리의 억제효과가 상쇄로 세포성장률이 회복되면서 세포수의 평균이 측정 6일째에 비해 다시 증가된 것으로 나타난 결과와는 다른 결과를 보여주고 있다. 실제 광학현미경상에서 유관으로 관찰되어지는 구리 처리구의 세포는 대조구에 비해 많은 세포분열을 행하므로써 세포 각각의 크기는 작아지는 반면, 세포수에 있어서는 증가하는 결과를 나타낸 것으로 판단된다. 이는 구리의 처리를 통해 보여지는 억제효과로 인해 세포 각각의 성장보다는 많은 세포분열을 통해서 개체의 증식을 우선 목적으로 하기 때문에 나타나는 결과라고 사료된다.

측정 10일째의 엽록소 함량의 평균은 2.268 μg/mL로써 측정 8일의 엽록소 함량 평균보다 증가한 것으로 나타났다. 이는 구리가 처리된 처리구의 엽록소 함량 평균이 감소하는 것에 비해 구리가 처리되지 않은 대조구의 엽록소 함량 평균이 상대적으로 크게 증가함으로써 나타난 결과로 사료된다. 이제 각 측정일별로 구리에 의한 영향을 엽록소 함량의 평균으로 비교해보면, 우선 구리가 처리되기 전인 측정 0일째에는 0.628, 0.541, 0.492 μg/

mL로써 대조구와 각 처리구에서 엽록소 함량의 평균에 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (ANOVA,  $F=57.19$ ,  $p<0.001$ ). 세포수의 평균비교에서 측정 0일째 유의한 차가 없다는 결과와는 서로 다른 결과를 보여주고 있다. 측정 2일째에는 엽록소 함량의 평균을 살펴보면, 구리가 처리되지 않은 0  $\mu\text{M}$ 에는 1.189  $\mu\text{g/mL}$ , 구리가 50  $\mu\text{M}$  처리된

처리구 1에서는 1.114  $\mu\text{g/mL}$ , 구리가 100  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 2에서는 1.077  $\mu\text{g/mL}$ 로써 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (ANOVA,  $F=8.74$ ,  $p=0.003$ ). 구리가 처리되지 않은 대조구와 구리가 50  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 1과는 유의한 차이가 있는 것으로 나타났으나, 구리가 50  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 1과 구리가 100  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 2 간에는 유의한

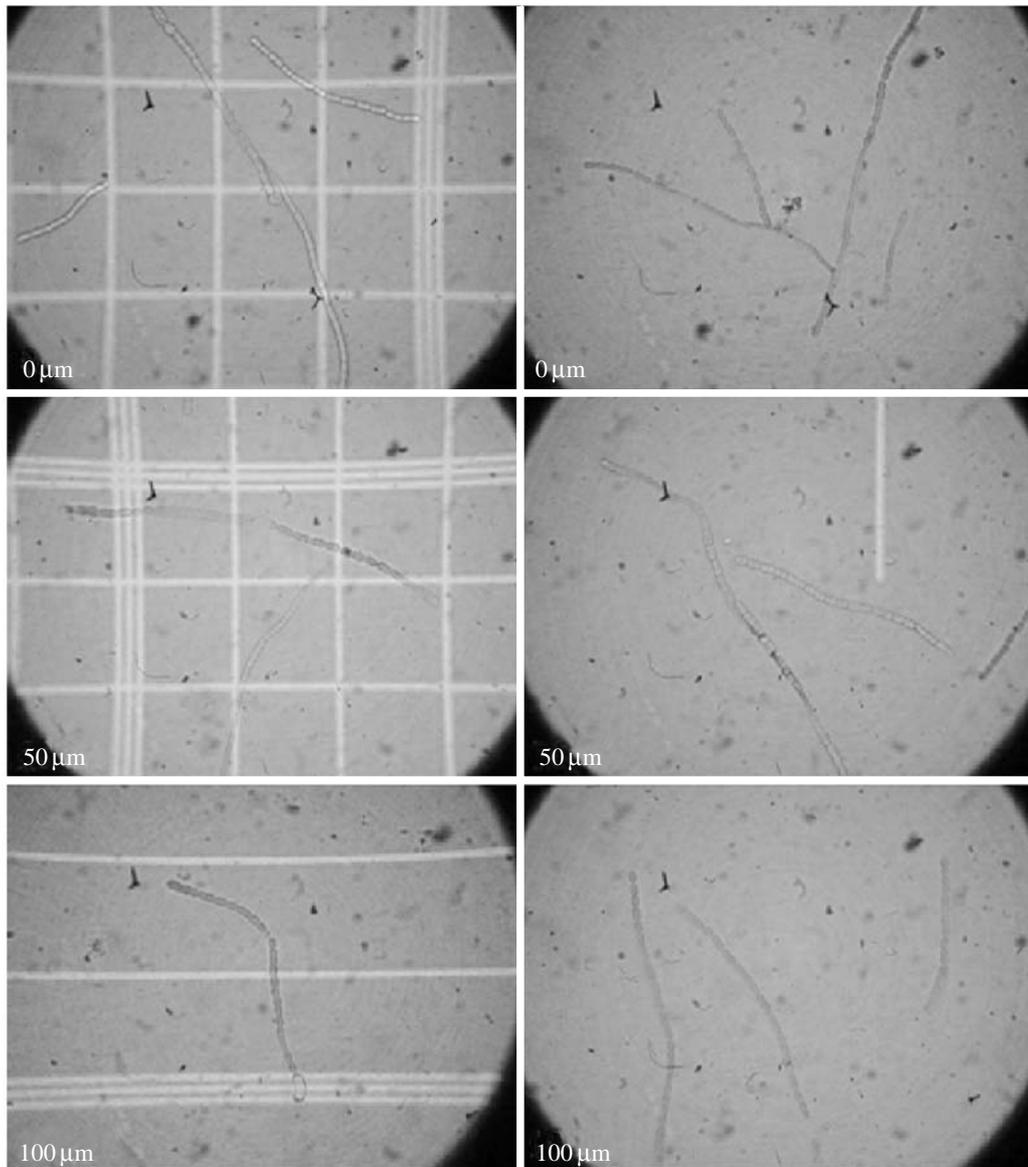


Fig. 4. Shape pattern of *Anabaena flos-aquae* on 2 days after copper treated.

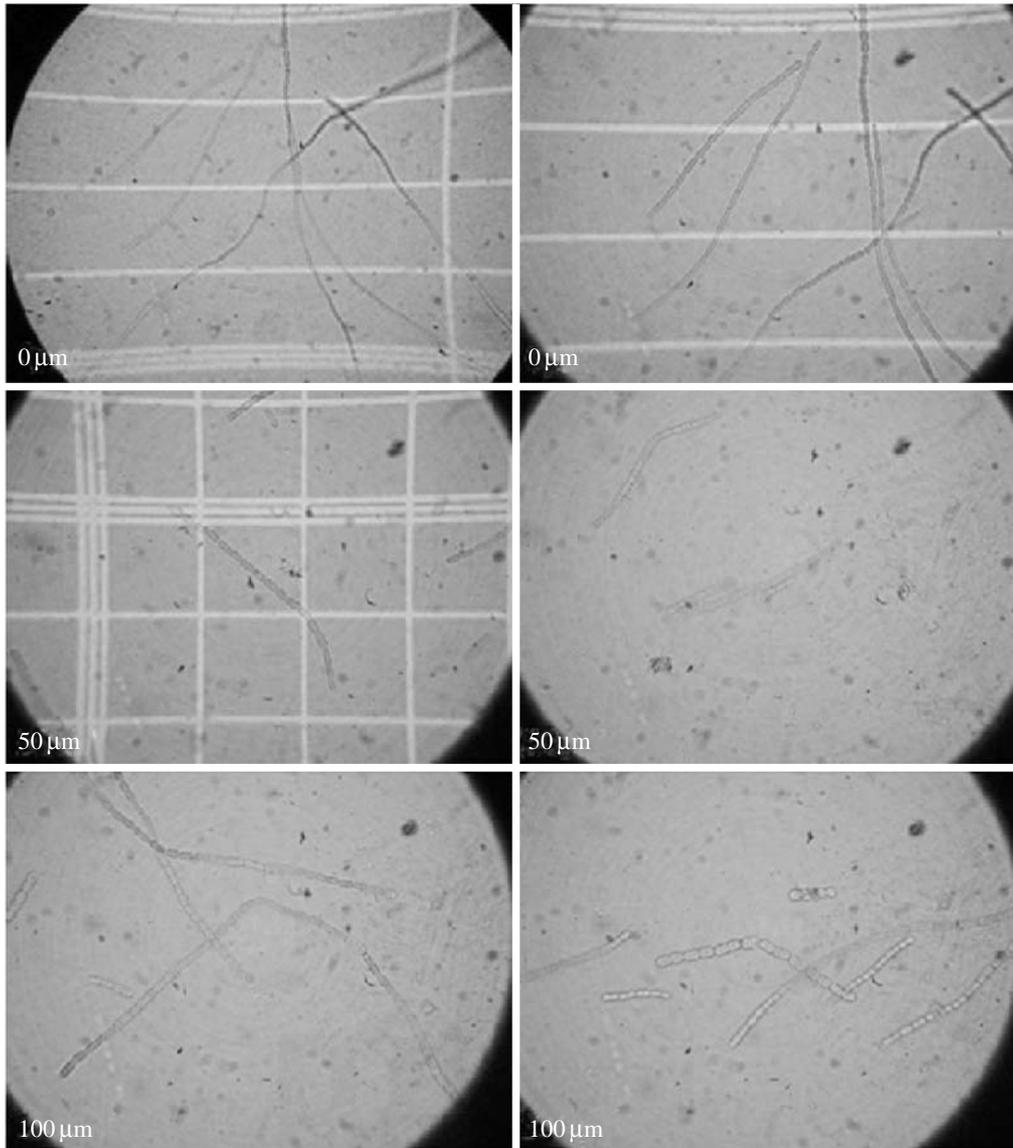


Fig. 5. Shape pattern of *Anabaena flos-aquae* on 4 days after copper treated.

차이가 없는 것으로 나타났다(Duncan's Multiple Range Test,  $\alpha=0.05$ ). 이 결과는 세포수 측정에서 구리가 50  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 1과 구리가 100  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 2 간에 유의한 차이가 없다는 결과와 유사한 결과를 나타냈다. 전반적으로 구리처리가 이루어진 생육기간 초기에는 처리된 구리의 농도에 따른 억제효과보다는 대조구와의 차이만을 나타내는 결과를 보여주고 있다.

측정 4일째에 엽록소 함량의 평균을 보면, 구리가 처리되지 않은 0  $\mu\text{M}$ 에는 1.604  $\mu\text{g/mL}$ , 구리가 50  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 1에서는 1.583  $\mu\text{g/mL}$ , 구리가 100  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 2에서는 1.486  $\mu\text{g/mL}$ 로써 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(ANOVA,  $F=5.81$ ,  $p=0.014$ ). 구리가 처리되지 않은 대조구와 구리가 50  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 1 간에는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으나, 구리가 50  $\mu\text{M}$  처리

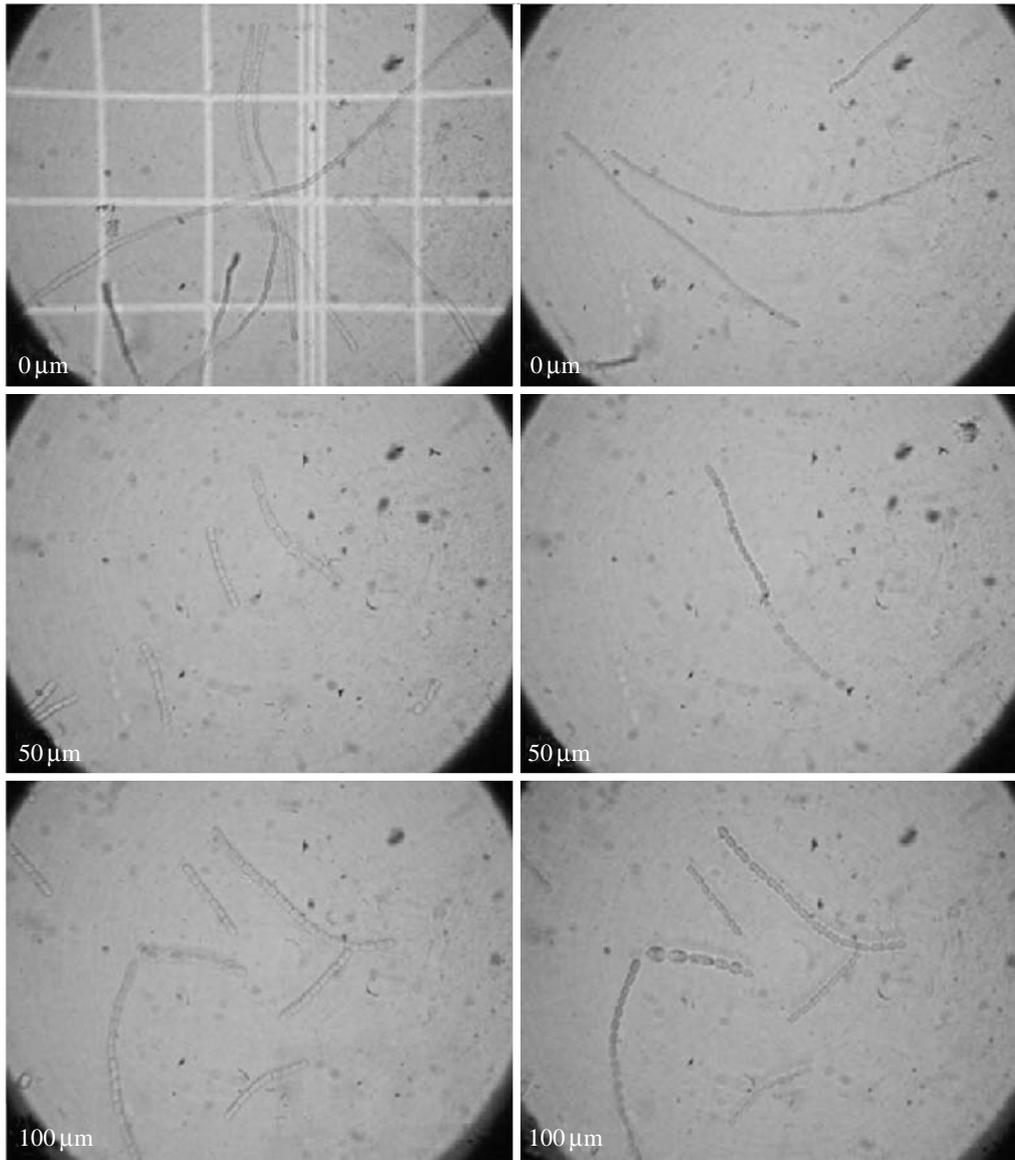
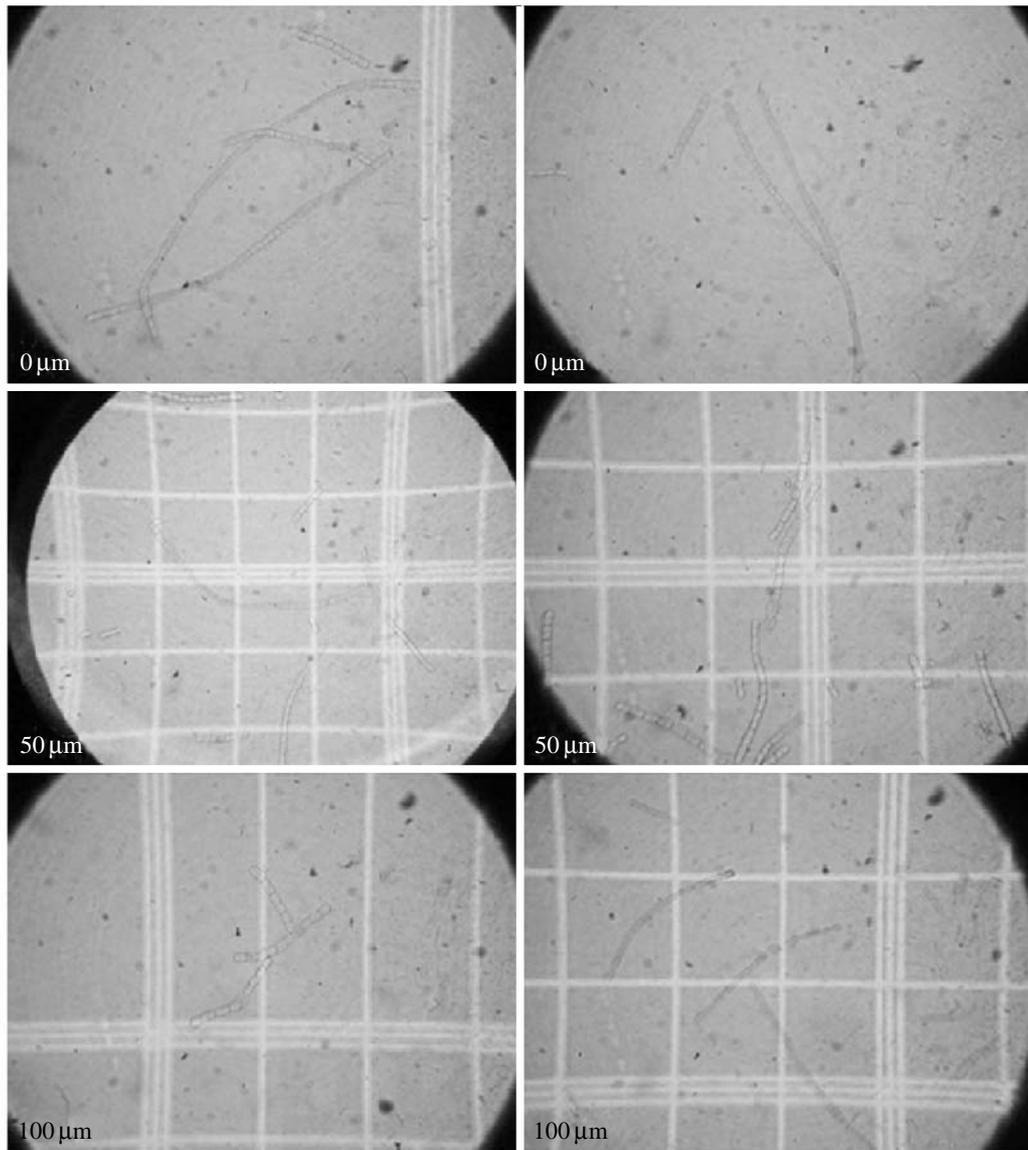


Fig. 6. Shape pattern of *Anabaena flos-aquae* on 6 days after copper treated.

된 처리구 1과 구리가 100  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 2 간에는 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Duncan's Multiple Range Test,  $\alpha=0.05$ ). 측정 2일째 보여준 결과와는 다르게 구리가 50  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 1이 대조구와 유의한 차가 없을 정도로 엽록소의 함량이 증가한 것으로 나타났다.

측정 6일째 엽록소 함량의 평균을 보면, 구리가 처리되지 않은 0  $\mu\text{M}$ 에는 2.354  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 구리가 50

$\mu\text{M}$  처리된 처리구 1에서는 2.150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 구리가 100  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 2에서는 2.032  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로써 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(ANOVA,  $F=44.21$ ,  $p<0.001$ ). 구리가 처리되지 않은 대조구와 구리가 처리된 처리구 1, 처리구 2 간에 각각 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Duncan's Multiple Range Test,  $\alpha=0.05$ ). 측정 6일째의 세포수 측정결과를 살펴보면, 구리를 100  $\mu\text{M}$  처리된 처리구



**Fig. 7.** Shape pattern of *Anabaena flos-aquae* on 8 days after copper treated.

2의 세포수가 구리를 50  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 1과 유의한 차이는 없는 것으로 나타났지만, 세포수의 평균에 있어 처리구 1보다 높은 것으로 나타났다. 엽록소 함량의 결과와는 달리 세포수의 평균이 오히려 높은 결과는, 구리의 억제 효과에 있어 처리농도가 높은 처리구 2에서 더욱 왕성한 세포분열을 통해 세포의 수적인 양을 높인 것으로 사료된다. 측정 8일째 엽록소 함량의 평균을 보면, 구리가 처

리되지 않은 0  $\mu\text{M}$ 에는 2.168  $\mu\text{g/mL}$ , 구리가 50  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 1에서는 2.121  $\mu\text{g/mL}$ , 구리가 100  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 2에서는 1.937  $\mu\text{g/mL}$ 로써 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (ANOVA,  $F=1.99$ ,  $p=0.171$ ). 구리가 처리되지 않은 대조구와 구리가 처리된 처리구 1, 처리구 2 간에 각각 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (Duncan's Multiple Range Test,  $\alpha=0.05$ ). 측정 8일째의 세포수 측정결

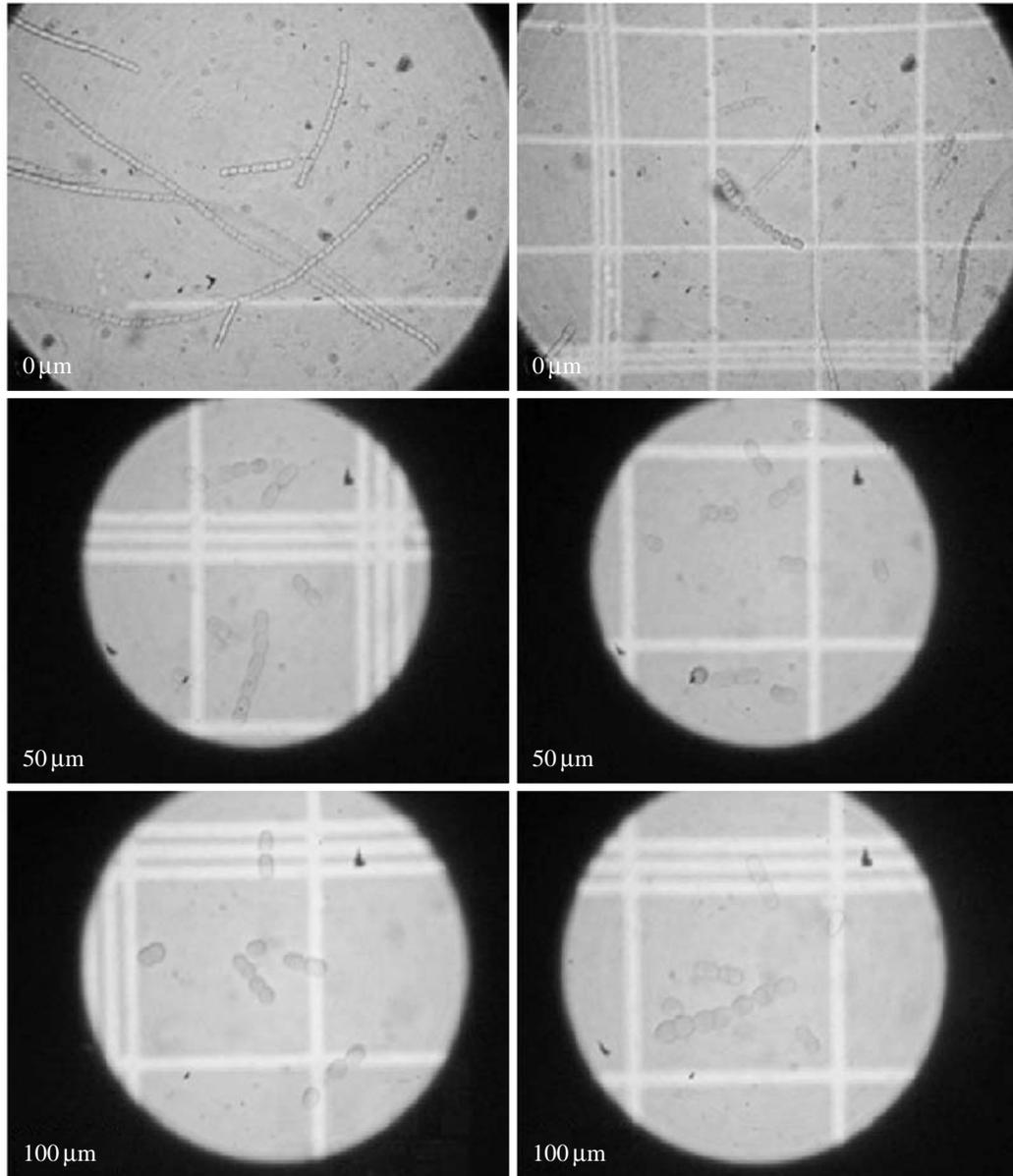


Fig. 8. Shape pattern of *Anabaena flos-aquae* on 10 days after copper treated.

과 세포수의 평균에 유의한 차이가 없다는 결과와 동일한 결과를 나타냈다. 오히려 구리가 50  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 1에서 대조구에 비해 엽록소의 함량 평균이 높게 나타났다. 이는 세포수 측정에서 나타난 결과와 마찬가지로 구리가 처리된 처리구 1과 처리구 2에서 측정 6일째까지 나타냈던 구리의 역

제효과가 어느 정도 상쇄되면서 세포의 성장에 회복이 일어난 것으로 사료된다. 측정 10일째 엽록소 함량의 평균을 살펴보면, 구리가 처리되지 않은 0  $\mu\text{M}$ 에는 3179  $\mu\text{g/mL}$ , 구리가 50  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 1에서는 1.978  $\mu\text{g/mL}$ , 구리가 100  $\mu\text{M}$  처리된 처리구 2에서는 1.648  $\mu\text{g/mL}$ 로써 고도로 유의한 차이

가 있는 것으로 나타났다(ANOVA,  $F=153.74$ ,  $p<0.001$ ). 구리가 처리되지 않은 대조구와 구리가 처리된 처리구 1, 처리구 2 간에 각각 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Duncan's Multiple Range Test,  $\alpha=0.05$ ). 이는 측정 10일째의 세포수 측정 결과 세포수의 평균에 유의한 차이가 있다는 결과와 일치한다. 하지만 세포수의 평균 측정에서 대조구가 측정 8일째에 비해 낮아지는 결과에 비해 엽록소의 함량은 오히려 급격히 증가하는 특징을 나타냈다. 또한 측정 8일째 대조구에 비해 엽록소 함량의 평균이 높았던 처리구 1의 평균이 급격히 낮아졌으며, 이보다 구리가  $100 \mu\text{M}$  처리된 처리구 2의 엽록소 함량 또한 급격히 낮아진 결과를 나타냈다.

#### 4. 세포형태분석

*Anabaena flos-aquae*의 일반형태학적 외형을 살펴보면, 다른 남조류들에서 관찰되어지는 연결생활체(coenobe)의 형태를 보여주고 있으며, 세포 형태에 있어 중요하게 구분되는 이형세포(heterocyst)가 관찰된다. 보통 정상적인 사상체가 타원형 또는 구형이고 직경  $4\sim 8 \mu\text{m}$ , 길이는  $6\sim 8 \mu\text{m}$ 의 형태를 보이는 반면, 이형세포(heterocyst)는 타원형이고 직경은  $4\sim 9 \mu\text{m}$ , 길이는  $6\sim 10 \mu\text{m}$ 이며, 색소가 없는 밝은색의 내용물이 있고, 이웃하는 세포와 접촉면이 두꺼운 세포벽의 구멍 혹은 원형질연락사로 물질 수송이 일어나며, 두꺼운 내부벽을 가지는 것이 특징이다.

전 생육기간 중 광학현미경을 이용하여 촬영한 세포의 형태를 살펴보면, 구리가 처리되기 전 대조구 및 처리구에서 세포의 형태가 유사하게 관찰되었다. 하지만, 구리가 처리되고 측정 2일째, 대조구와는 달리 이형세포(heterocyst)가 많이 나타난 것으로 관찰되었으며, 연결생활체의 형태를 보이는 세포군집의 길이가 줄어드는 것으로 관찰되었다. 또한 측정 4일째에는 구리가 처리된 처리구에서 세포군집의 길이가 대조구에 비해 확연히 짧아진 것을 관찰할 수 있었으며, 각 세포의 크기는 대조구의 정상적인 세포형태에 비해 비정상적으로 커진 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 대조구와 각 처리구간의 서로 다른 세포의 형태는 측정이 이루어진 전 생육기간 동안 관찰되었으며, 세포군집의 길이는 측정일이 지날수록 더욱 짧아지는 것을 볼 수 있었다. 또한 이형세포의 관찰도 대조구에 비해

많은 빈도로 관찰되었다. 측정 10일째에는 이전 생육기간 동안 보이던 연결생활체의 모습은 찾을 수 없을 정도로 각 군집은 2~10개 정도의 세포로 이루어져 있는 것을 관찰할 수 있었으며, 단세포의 형태를 이루는 세포 또한 관찰할 수 있었다. 각 세포의 외형은 대조구와는 다른 형태를 나타내고 있다. 전 생육기간에서 유사한 세포형태를 보여주는 대조구와는 달리 구리가 처리된 각 처리구에서는 차츰 세포군집의 길이가 짧아지며, 각 세포의 형태에 있어 차이를 보이는 결과를 나타냈다.

## 적 요

수용성 구리( $\text{CuCl}_2$ )를 사용하여 각 농도에서 나타나는 영향을 남조류인 *Anabaena flos-aquae*의 세포분열, 상대성장률, 엽록소 함량 및 세포형태 등의 생리적 변화를 측정하여 분석하였다. 세포의 수는 전 생육기간에서 각 측정일별로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(ANOVA,  $F=34.69$ ,  $p<0.001$ ). 구리가  $50, 100 \mu\text{M}$ 로 처리된 배지에서 성장후기 세포수의 평균은 각각  $9.048 \times 10^6 \text{cell/mL}$ ,  $7.048 \times 10^6 \text{cell/mL}$ 로 구리가 처리되지 않은 배지의  $10.590 \times 10^6 \text{cell/mL}$ 보다 적은 수치를 나타내어 구리에 의한 억제효과가 있는 것으로 나타났다.

Specific Growth Rate (SGR)는 전 생육기간 동안 측정일별로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(ANOVA,  $F=114.89$ ,  $p<0.001$ ). 구리가 처리되지 않은 대조구에서는 일반적인 상대성장률을 보여주는 반면, 구리가 처리된 각 처리구에서는 구리가 처리된 초기에는 억제효과를 보이며 세포분열이 저하되며 낮은 SGR값을 나타내다 측정 8일째 대조구에 비해 오히려 높은 SGR값을 보이며 구리의 억제효과로부터 어느 정도 회복되는 결과를 나타냈다.

엽록소 함량 또한, 전 생육기간에 걸쳐 측정일별로 유의한 차가 있는 것으로 나타났다(ANOVA,  $F=88.44$ ,  $p<0.001$ ). 성장후기의 엽록소 함량의 평균을 살펴보면, 구리가  $50, 100 \mu\text{M}$  첨가된 각 처리구에서  $1.978, 1.648 \mu\text{g/mL}$ 로써 대조구의  $3.179 \mu\text{g/mL}$ 에 비해 적은 수치를 나타내어 구리에 의한 억제효과가 있는 것으로 나타났다(ANOVA,  $F=153.74$ ,  $p<0.001$ ).

세포형태에 있어서는 전 생육기간에서 유사한 세포형태를 보여주는 대조구와는 달리 구리가 첨가된 각 처리구에서는 차츰 세포군집의 길이가 짧아지며, 각 세포의 형태에 있어 차이를 보이는 것으로 나타났다.

본 연구에서 구리의 첨가가 조류 전 생육기간에 있어 세포수, 엽록소 함량 등의 생리적 변화측정에서 세포성장장애에 있어 억제효과가 있는 것으로 나타났다. 이후 연구에서는 정확한 세포의 형태적인 분석을 위해서는 과학적 근거를 마련할 수 있는 다양한 접근 방법의 모색이 필요하다고 사료된다.

### 참 고 문 헌

- Arduini I, Godbold DL and Onnis A. Influence of copper on root growth and morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Ait. Seedlings, *Tree Physiology* 1995; 15: 411-415.
- De Filippis LF and Pallaghy CK. Heavy metals: sources and biological effects. In: Rai, L.C., Gaur, J.P., Soeder, C.J. (Eds.), *Algae and Water Pollution*, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart 1994; 31-77.
- Fernandes JC and Henriques FS. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants, *Botany Rev* 1991; 57: 246-273.
- Genter RB. Ecotoxicology of inorganic stresses. In: Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L. (Eds.), *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*, Academic Press, San Diego 1996; 403-468.
- Hall J, Healey FP and Robinson GG. The interaction of chronic copper toxicity with nutrient limitation in chemostat cultures of *Chlorella*. *Aquat, Toxicology* 1989; 14: 15-26.
- Lidon FC and Henriques FS. Limiting step on photo-synthesis of rice plants treated with varying copper levels, *J Plant Physiology* 1991; 138: 115-118.
- Lidon FC, Ramalho J and Henriques FS. Copper inhibition of rice photosynthesis, *J. Plant Physiology* 1993; 142: 12-17.
- Ouzounidou G. Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic functions of *Alyssum montanum* L. plants. *Environmental and Experimental Botany* 1994; 34: 165-172.
- Pätsikkä. Excess copper predisposes photosystem II to photo-inhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll, *Plant Physiology* 2002; 129: 1359-1367.
- Quartacci MF, Cosi E and Navari-Izzo F. Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess, *Environmental and Experimental Botany* 2001; 52: 77-84.
- Rai LC, Gaur JP and Kumar HD. Phycology and heavy-metal pollution, *Biology Reviews* 1981; 56: 99-151.
- Sandmann G and Boger P. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes, *Plant Physiology* 1980; 66: 797-800.
- Watanabe MM, Kawachi M, Hiroki M and Kasai F. NIES-Collection List of Strains 6th edition 2000 Microalgae and Protozoa. Nissei Eblo Co. Tsukuba, Japan. 2000.
- Xiomara C, Jorge GT, Russell C and Robert W. Determination of copper binding in *Anabaena flos-aquae* purified cell walls and whole cells by X-ray absorption spectroscopy, *Microchemical Journal* 2002; 71: 295-304.