

## 한국 연안역에서 분리한 식물플랑크톤의 alkaline phosphatase 활성과 용존태 유기인의 이용

오석진<sup>1</sup> · 권형규<sup>2</sup> · 양한섭<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부경대학교 해양과학공동연구소

<sup>2</sup>부경대학교 해양학과

## Alkaline Phosphatase Activity and Utilization of Dissolved Organic Phosphorus by Phytoplankton Isolated from Korean Coastal Waters

SEOK JIN OH<sup>1</sup>, HYEONG KYU KWON<sup>2</sup> AND HAN-SOEB YANG<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Korea Inter-University Institute of Ocean Science, Pukyong National University, Daeyeon-dong, Nam-gu, Busan 608-737, Korea

<sup>2</sup>Department of Oceanography, Pukyong National University, Daeyeon-dong, Nam-gu, Busan 608-737, Korea

*Skeletonema costatum*, *Chaetoceros didymus*, *Alexandrium tamarense* 그리고 *Heterosigma akashiwo*의 인 제한에 따른 용존태 유기인(dissolved organic phosphorus; DOP)의 이용성과 alkaline phosphatase(APase)의 활성을 살펴보기 위해 실내실험을 실시하였다. *S. costatum*, *C. didymus*, *A. tamarense* 그리고 *H. akashiwo*는 인 공급원으로써 용존태 무기인(dissolved inorganic phosphorus; DIP) 이외에 phosphomonoester와 nucleotide 화합물을 이용하여 성장을 유지할 수 있었다. *S. costatum*, *C. didymus*, *A. tamarense* 그리고 *H. akashiwo*의 APase 활성은 배양액내의 DIP가 각각 0.30  $\mu\text{M}$ , 0.33  $\mu\text{M}$ , 2.04  $\mu\text{M}$ 과 0.63  $\mu\text{M}$ 에서 최초로 활성을 보였으며, 최대활성은 각각 0.01  $\text{pmol cell}^{-1} \text{hr}^{-1}$ , 0.11  $\text{pmol cell}^{-1} \text{hr}^{-1}$ , 1.63  $\text{pmol cell}^{-1} \text{hr}^{-1}$ 와 0.19  $\text{pmol cell}^{-1} \text{hr}^{-1}$ 였다. APase 활성은 종에 따라 다르게 나타났지만, 최대 활성은 DIP의 흡수속도보다도 높아 인이 제한된 환경에서 효과적으로 DOP를 가수분해하여 성장을 유지할 수 있을 것으로 보인다. 따라서 DOP의 이용능력은 적조 플랑크톤의 성장뿐만 아니라 종간경쟁에도 기여할 것으로 생각된다.

Utilization of dissolved organic phosphorus (DOP) and alkaline phosphatase (APase) activity by *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros didymus*, *Alexandrium tamarense* and *Heterosigma akashiwo* under the phosphorus deficient condition were examined in the laboratory. *S. costatum*, *C. didymus*, *A. tamarense* and *H. akashiwo* could make use of phosphomonoester and nucleotide compounds for the growth of them as a phosphorus source. APase activity of *S. costatum*, *C. didymus*, *A. tamarense* and *H. akashiwo* began to be activated at dissolved inorganic phosphorus (DIP) concentrations less than 0.30  $\mu\text{M}$ , 0.33  $\mu\text{M}$ , 2.04  $\mu\text{M}$  and 0.63  $\mu\text{M}$  respectively, and their maximum APase activity were 0.01  $\text{pmol cell}^{-1} \text{hr}^{-1}$ , 0.11  $\text{pmol cell}^{-1} \text{hr}^{-1}$ , 1.63  $\text{pmol cell}^{-1} \text{hr}^{-1}$  and 0.19  $\text{pmol cell}^{-1} \text{hr}^{-1}$ , respectively. Although each phytoplankton species displayed different APase activity for DOP utilization, their maximum APase activities were higher than maximum phosphorus uptake rates, inferring that these species might be able to keep growing under DIP-limited conditions through utilizing effectively the hydrolyzed product of DOP. This result also implies that utilization of DOP might contribute to not only the growth of red tide forming phytoplankton but also the interspecific competition among phytoplankton species in coastal environments.

**Keywords:** dissolved organic phosphorus (DOP), alkaline phosphatase(APase), dissolved inorganic phosphorus (DIP), *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros didymus*, *Alexandrium tamarense*, *Heterosigma akashiwo*

### 서론

인(phosphorus)은 지구상에 서식하는 모든 생물의 생존에 필수적인 원소로 핵산, 지질 또는 골격조직에 많이 포함되어 있으며

생물체내에 약 2~4% 정도의 비율로 존재한다(Karl 2000). 해수 중에 용존 하는 인은 인산염과 같은 무기태 인(dissolved inorganic phosphorus; DIP)과 유기태 인(dissolved organic phosphorus; DOP)으로 구성되어 있다. 이 중 DOP는 미세조류나 박테리아의 대사작용에 의한 배출(excretion), 동물플랑크톤의 섭식작용(Pomeroy *et al.*, 1963; Kuenzler, 1970; Sharp, 1997) 및 육상으로부터 공급

\*Corresponding author: hsyang@pknu.ac.kr

(Beusekom and Brockmann, 1998) 등의 경로를 거쳐 해양으로 들어오며, 그 조성은 매우 복잡하고 다양하다(Shan *et al.*, 1994; Monaghan and Ruttenberg, 1999).

한편 식물플랑크톤은 DIP가 제한된 환경에서 DOP를 이용함으로써 성장을 유지하는 것으로 알려져 있다(Cembella *et al.*, 1984; Yamaguchi and Itakura, 1999; Oh *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2004a, 2004b). DOP를 이용하기 위해서는 가수분해 효소가 필요하며 orthophosphate(Ortho-P)를 유리시켜 성장에 이용한다( $\text{RO-PO}_3\text{H}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_3\text{PO}_4$ ; Kuenzler and Perras, 1965). 이러한 가수분해 효소는 인산화합물질의 종류에 따라 다양하지만, 통상 ester 결합을 가지는 인 화합물을 가수분해하는 효소를 phosphatase라 부른다. Phosphatase는 알칼리성에서 최적 활성도를 가지는 alkaline phosphatase(APase)와 산성에서 최적 활성도를 가지는 acid phosphatase로 나뉜다(Cembella *et al.* 1984; Hernández *et al.* 1994). 이 중 APase는 sugar phosphate, nucleotide phosphate, phospholipid (glycerophosphate)와 같은 phosphomonoester의 가수분해에 기여하며(Price and Morel, 1990), 식물플랑크톤의 세포표면에 불안정한 상태로 결합되어 있어 세포의 용해나 상위포식자의 섭식작용과 같은 물리적 작용에 의해 주변해수로 분리되기도 한다(Kuenzler and Perras, 1965; Cembella *et al.* 1984; Wetzel, 1991). APase는 현장실험 및 배양실험을 통하여 DIP의 감소에 따라 활성이 증가하는 것으로 알려져 있어 자연군집과 식물플랑크톤의 배양실험에서 인 제한의 지표로 유용하게 이용되고 있다(Kobori and Taga 1979; Hirayama *et al.*, 1989; Ammerman 1991; Nausch, 1998; Yamaguchi *et al.*, 2004b).

적조가 빈번히 일어나는 해역은 대부분이 부영양화가 진행되어 있는 해역으로 알려져 있지만 일부 해역에서 DIN: DIP 비율이 Redfield ratio(16:1)보다 높아 인 제한 현상이 나타나고 있다(이 외, 2000; 김, 2001; 이 외, 2004; 조 외, 2006; Lee and Kim, 2007). 이러한 해역은 통상 DIP가 제한되어 있을지라도 DOP의 농도가 DIP 농도와 유사하거나, 높은 농도로 존재하기도 한다(Ketchum *et al.*, 1955; Suzumura *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 2004b; Lee and Kim; 2007). 따라서 DOP의 이용성은 식물플랑크톤의 종 경쟁 및 특정 종의 우점화에 밀접하게 관여할 가능성이 있다(Oh *et al.* 2002; Yamaguchi *et al.* 2004a; Oh *et al.* 2005). 본 연구는 매년 우리나라 연안에서 양식장에 피해를 주는 유독 와편모조류 *Alexandrium tamarense*, 침편모조류 *Heterosigma akashiwo* 그리고 우리나라 연안에서 연중 우점하는 규조류 *Skeletonema costatum* 과 *Chaetoceros didymus*의 인 제한에 따른 APase 활성을 살펴보고, 용존태 유기인의 이용성을 평가하는데 그 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 실험조류의 분리와 배양

본 연구의 실험 중인 *S. costatum*의 세포는 2007년 7월 진해만 서쪽 연안(35°6'9.43N, 128°47'24.93E) 그리고 *C. didymus*와 *A. tamarense*의 세포는 2008년 8월 남해 육지도 인근해역(34°15'009N, 128°35'120E)에서 채집된 표층 해수로부터 pasteur pipette(ca.  $\phi$  50~100  $\mu\text{m}$ )을 이용하여 분리하였으며, *H. akashiwo*는 한국미세조류은행(Korea Marine Microalgae Culture Center; D-075)에

서 순수 분리한 종을 이용하였다. 분리된 세포는 여과해수(0.22  $\mu\text{m}$  pore size, Millipore GSWP)에 4~5회 세척 후 배양튜브(TB-2800, KIZAI, Japan)에 이식하였으며, 실험용 배지는 남해 육지도 해역의 해수를 바탕으로 한 f/2-Si(Guillard and Ryther, 1962)배지로 selenium( $\text{H}_2\text{SeO}_3$ )의 최종농도가 0.001  $\mu\text{M}$ 이 되게 첨가하였다(Doblin *et al.*, 1999). 배양 온도와 염분 조건은 현장 수온과 염분에 상응하는 조건(20 °C, 30 psu)을 주었으며, 광량은 약 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12L: 12D; cool-white fluorescent lamp)을 주었다. 분리한 *S. costatum*, *C. didymus*, *A. tamarense*, *H. akashiwo*은 AM9(Provasoil *et al.*, 1959) 및 피펫 세척법으로 무균처리하였으며, 2차적인 오염을 막기 위하여 모든 실험은 clean bench에서 수행하였다. 실험 기구는 고압멸균(202 kpa, 20 min) 또는 건조멸균(185 °C, 1 h)하여 사용하였다.

### 식물플랑크톤의 alkaline phosphatase activity

인산염 농도의 감소에 따른 식물플랑크톤의 APase 활성을 모니터링하기 위해서 정지배양(batch culture)을 실시하였다. 배양은 AK 인공해수를 바탕으로 한 L1 배지(Keller *et al.*, 1987; Guillard and Hargraves, 1993)를 이용하여 대수증식기(log-phase) 후기의 세포를 2 L의 배양용기에 최종 세포밀도가 약 100 cells  $\text{mL}^{-1}$ 이 되게 접종하였으며, 인산염의 초기농도는 약 5  $\mu\text{M}$ 이 되게 하였다. 배양 온도와 염분은 수온 20 °C와 염분 30 psu, 광량은 약 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12L: 12D; cool-white fluorescent lamp)에서 실시하였다. 이틀에 한번 배양액 중 일부를 취해서 세포밀도, 인산염 그리고 APase 활성도를 측정하였으며, 세포밀도는 도립현미경(TE2000-S, Nikon)하에서 계수하였고, 인산염은 해양환경공정시험법(해양수산부, 2005)에 따라 비색 정량하였다. APase 활성도는 disodium phenylphosphate를 기질로 이용하여 비색 정량하였다. 즉, 시료에 최종농도가 200  $\mu\text{M}$ 인 기질용액과 0.6 M의 Tris(hydroxymethyl) amino methane-HCl solution(pH 9)을 첨가하여 20 °C에서 24시간 배양을 실시한 후 2 mM의 aminoantipyrine 및 5 mM의 ferricyanide를 첨가하고 disodium phenylphosphate의 가수분해로 축적된 phenol 농도를 spectrophotometer(DU-730, Beckman Coulter)를 이용하여 파장 510 nm에서 비색정량하였고, 활성의 단위는  $\text{pmol cell}^{-1} \text{hr}^{-1}$ 로 평가하였다(Yamaguchi *et al.*, 2004a, 2004b). 그리고 단위 면적 당 APase를 평가하기 위해서 각각의 세포의 길이를 현미경으로 측정하여 평균하였으며, 면적은 *A. tamarense*와 *H. akashiwo*는 타원형(Ellipsoid)으로, *S. costatum*과 *C. didymus*는 원기둥(Cylinder)으로 가정하고 계산하였다.

### 식물플랑크톤의 용존태 유기인 이용성

용존태 유기인에 따른 식물플랑크톤 성장속도는 현미경을 이용한 직접 검정이 아닌, *in vivo* chlorophyll 형광값과 세포수의 관계로 평가하였다. 이는 형광광도계에서 직접 측정이 가능한 배양 튜브를 이용하기에 세포밀도의 확인을 위한 배양튜브의 개폐가 없어 초기 배양상태를 계속 유지 할 수 있으며, 대량의 표본을 신속히 처리할 수 있는 장점을 가진다(Brand *et al.*, 1981).

각각의 세포를 현장 수온과 염분에 상응하는 조건(20 °C, 30 psu)으로 광량은 약 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12L: 12D; cool-white fluorescent lamp)에서 대수증식기가 될 때까지 배양한 후 농축과 희석을 통

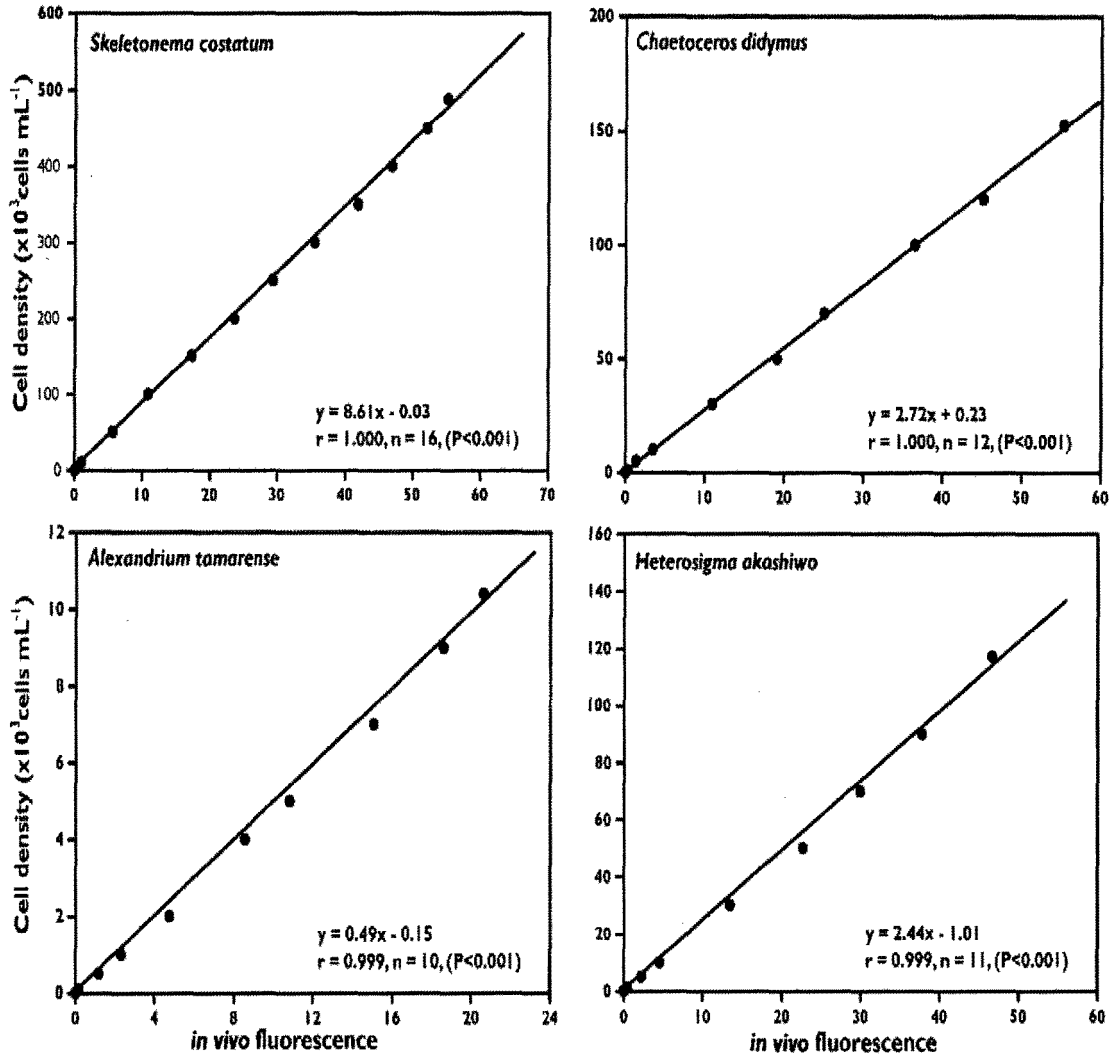


Fig. 1. Relationship between cell density and *in vivo* chlorophyll fluorescence of *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros didymus*, *Alexandrium tamarense* and *Heterosigma akashiwo* isolated from Korean coastal waters.

해 여러가지 세포밀도로 조제한 후 형광광도계(Model 10-AU-005, Turner Designs, USA)로 *in vivo* chlorophyll 형광값을 측정하였다. 측정은 안정적인 형광값을 얻기 위해서 약 5분 동안 암조건에서 방치한 후 측정하였다(Brand *et al.* 1981). 그리고 현미경을 통해서 측정된 세포수를 이용하여 세포밀도와 형광값의 상관관계를 알아보았다. 그 결과 세포밀도와 형광값 사이에는 Fig. 1과 같은 관계식이 성립되었다.

용존태 인 이용성 실험을 위해 DIP인 orthophosphate(Orth-P) 1종, phosphomonoester(PME) 8종 그리고 아데닐산 3종을 인(phosphorus)원으로 이용하였다(Table 1). 먼저 인이 첨가되지 않은 AK 인공해수를 바탕으로 한 L1 배지(Keller *et al.*, 1987; Guillard and Hargraves, 1993)를 9 mL 배양튜브( $10 \times 100$  mm)에 5 mL를 주입하여, 인이 고갈된 세포를 약 100 cells  $\text{mL}^{-1}$ 가 되도록 접종하였으며, 각각 배양액의 용존태 인의 초기농도를 약 25  $\mu\text{M}$ 이 되게 하였다. 그리고 이를 간격으로 오전 10시에 *in vivo* chlorophyll 형광 값을 측정하였다. 성장속도는 대수성장(exponential growth)을 보이는 기간 동안의 형광 값을 이용하여 식 (1)에 의해

Table 1. Phosphorus compounds used in the this study

Phosphorus sources	Abbreviation
Adenosine 5-monophosphate	AMP
Adenosine 5-diphosphate	ADP
Adenosine 5-triphosphate	ATP
Cytidine 5-monophosphate	CMP
Fructose 6-phosphate	F6P
Glucose 1-phosphate	G1P
Glucose 6-phosphate	G6P
Glycerophosphate	Glycero-P
Ribose 5-phosphate	R5P
Uridine 5-monophosphate	UMP
Phenyl phosphate	Phenyl-P
Orthophosphate	Ortho-P

계산하였다.

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{N_t}{N_0} \quad (1)$$

$N_0, N_t$ : 대수성장기에서 초기와  $t$ 시간(day)후의 세포수(cells ml<sup>-1</sup>)  
 $\Delta t$ : 대수성장기의 배양시간(day)

각각의 실험은 triplicate로 수행하였으며, 성장속도는 이들의 평균값으로 나타냈다. 단, triplicate 중 명백히 오류로 판명된 값은 평균치 제외하였다.

### 3. 결 과

#### 식물플랑크톤의 alkaline phosphatase 활성

*S. costatum*, *C. didymus*, *A. tamarensis* 그리고 *H. akashiwo*는 세포 성장이 진행될수록 배양액내의 DIP 농도는 점차 감소하며, APase 활성은 점차 증가하는 경향을 보였다. 실험중 모두 APase 활성은 검출되었으며, 세포의 성장이 정지기(stationary phase)에서 최대 APase 활성이 검출되었다(Fig. 2). *S. costatum*은 배양액내의 DIP 농도가 0.30  $\mu\text{M}$  일 때(13일후), APase 활성이 최초로 검출되었으며(0.001 pmol cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>), 0.01 pmol cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>의 최대 활성을 보였다. *C. didymus*는 *S. costatum*과 유사하게 DIP 농도가 0.33  $\mu\text{M}$ 일 때(9일 후), APase 활성이 최초로 검출되었지만(0.002 pmol cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>), 최대활성은 0.11 pmol cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>로 높게 나타났다. *A. tamarensis*는 규조류보다 높은 DIP 농도에서(9일 후; 2.04  $\mu\text{M}$ ) APase가 최초로 검출되었으며(0.07 pmol cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>), 최대활성은 1.63 pmol cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>였다. *H. akashiwo*는 DIP 농도가 0.63  $\mu\text{M}$ 일 때(7일 후), APase 활성이 최초로 검출되었으며(0.01 pmol cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>), 최대활성은 0.19 pmol cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>로 나타났다(Fig. 2).

APase는 세포표면에서 활성을 보이는 관계로 세포표면적이 증가할수록 APase의 활성이 증가하는 경향을 나타낸다(Cembella *et al.* 1984). 따라서 APase의 최대 활성도를 한 세포당 활성도로 비교 평가하는 것은 적당하지 않을 것으로 생각되어 단위면적당 APase 활성(specific APase; S-APase)으로 비교하였다. 실험중 중에 *A. tamarensis*가 가장 높은 S-APase 활성을 보였고, 규조류는 외편모조류보다 낮은 S-APase 활성을 보였다(Table 2).

#### 식물플랑크톤의 용존태 유기인 이용성

본 연구의 실험중은 인 공급원으로써 Ortho-P만큼 다양한 DOP 화합물을 이용하여 성장을 유지하였다(Fig. 3; Fig. 4). *S. costatum*은 PME에서 0.89~1.02 day<sup>-1</sup>의 성장속도를 보여 Ortho-P에 비교하여 약 91.97±0.05%에 해당하였으며, *C. didymus*는 PME에서 0.67~0.86 day<sup>-1</sup>의 성장속도를 보여 Ortho-P(1.01 day<sup>-1</sup>)에 비교하여 약 77.37±0.06%, *A. tamarensis*는 PME에서 0.22~0.30 day<sup>-1</sup>의 성장속도를 보여 Ortho-P(0.31 day<sup>-1</sup>)에 비교하여 약 82.95±0.09%, *H. akashiwo*는 PME 화합물에서 0.39~0.80 day<sup>-1</sup>의 성장속도를 보여 Ortho-P(0.71 day<sup>-1</sup>)와 비교하여 약 82.09±0.19%에 해당하였다(Fig. 4). 특히 AMP, ADP 및 ATP과 같은 nucleotide 계열의 DOP 화합물의 경우 Ortho-P와 유사한 성장속도를 보이거나 혹은 성장에 더 효율적으로 이용하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 한편, 자연 환경에서는 존재하지 않지만 본 연구에서 APase 활성을 측정하기 위해 이용된 DOP 화합물인 phenylphosphate의 경우는 다른 PME와 유사한 성장속도를 보였다.

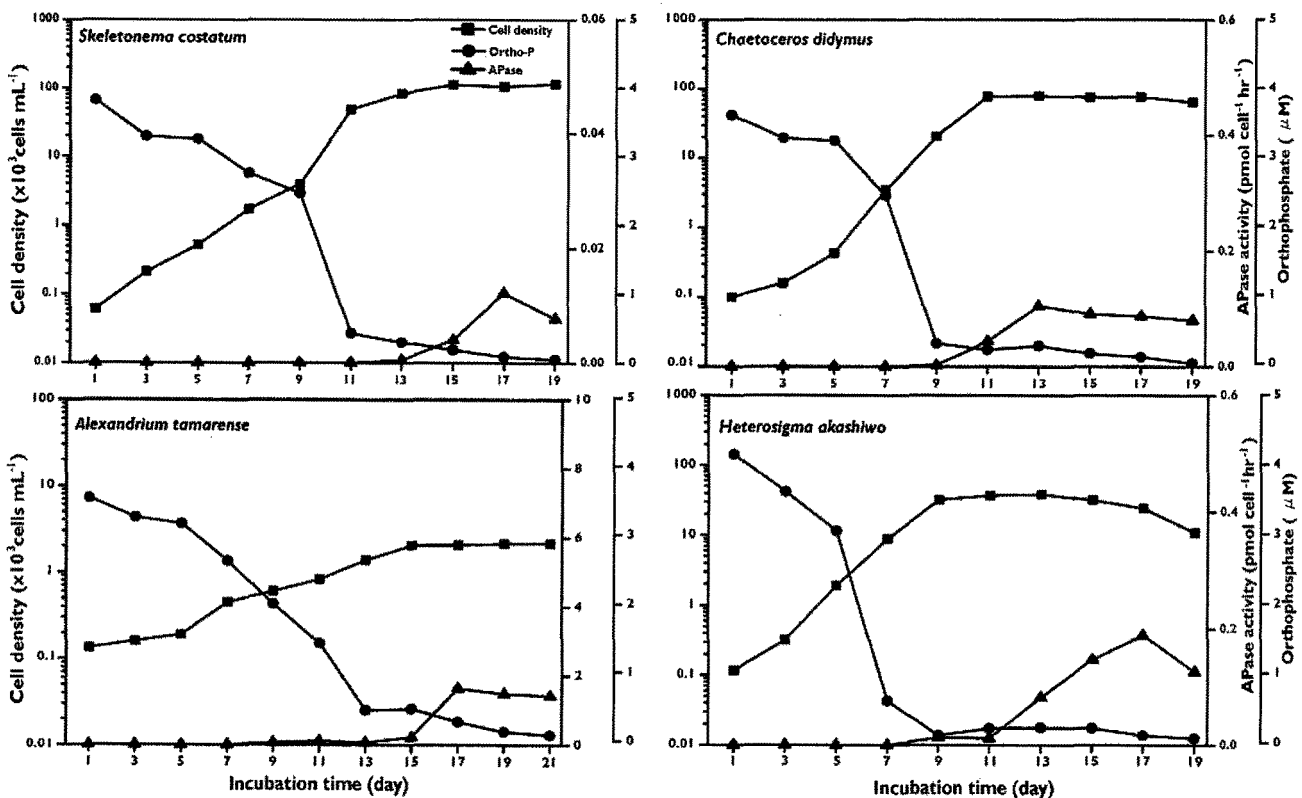


Fig. 2. Change in alkaline phosphatase (APase) activities of *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros didymus*, *Alexandrium tamarensis* and *Heterosigma akashiwo* during the time-course of orthophosphate depletion in batch culture.

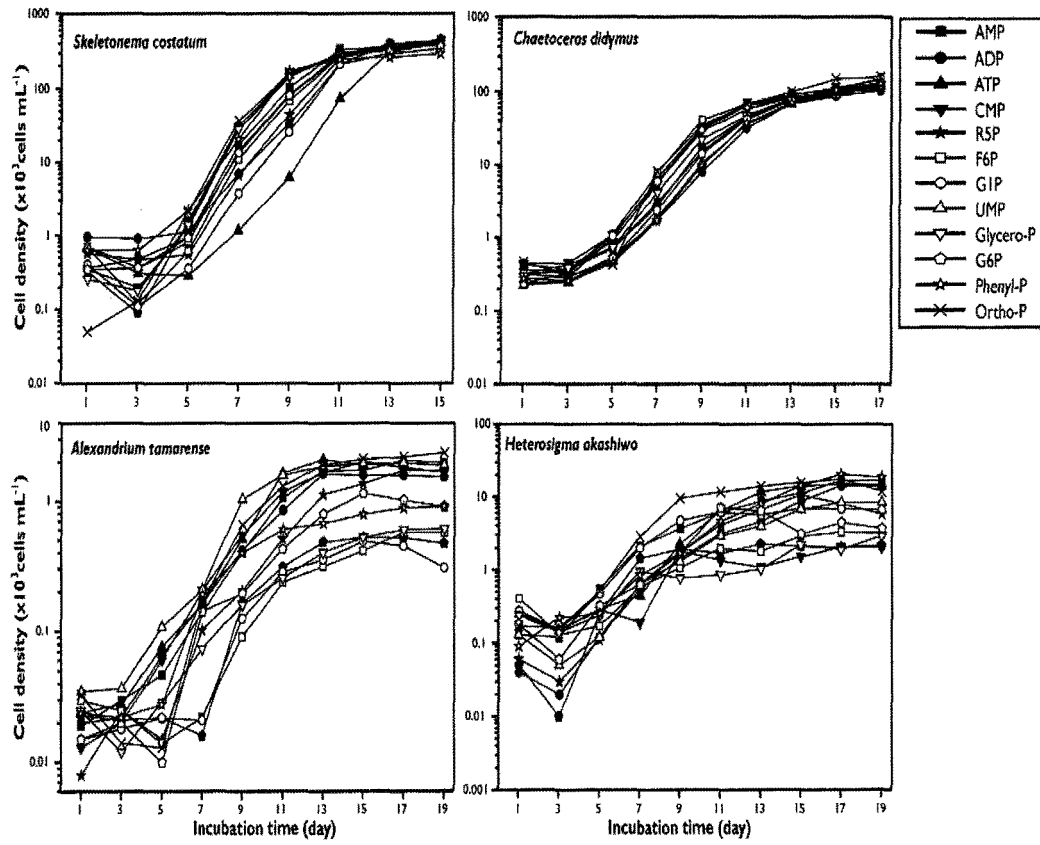


Fig. 3. Growth curves of *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros didymus*, *Alexandrium tamarense* and *Heterosigma akashiwo* grown within various dissolved organic phosphorus concentrations.

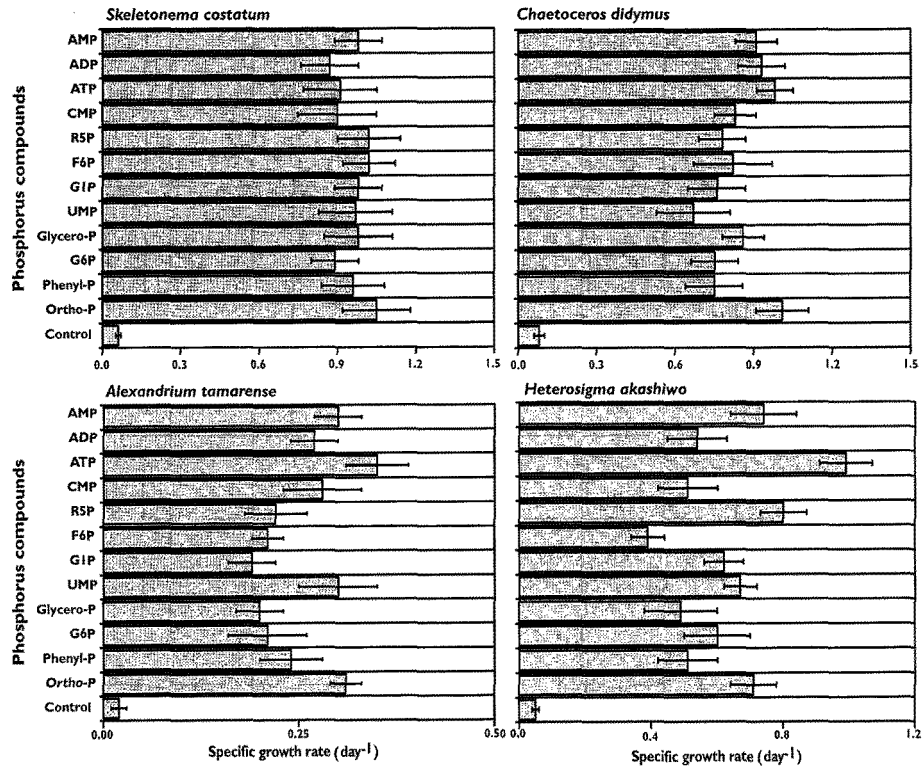


Fig. 4. Specific growth rate of *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros didymus*, *Alexandrium tamarense* and *Heterosigma akashiwo* at various dissolved organic phosphorus concentrations. Each value represents mean  $\pm$ SD of triplicates.

#### 4. 고찰

일반적으로 식물플랑크톤은 무기인의 농도가 저하되면 세포표면에서 APase 활성이 유도되는 것으로 알려져 있다. 하지만 종에 따라 APase가 활성화되는 초기 임계 농도가 얼마인지에 관한 식견은 부족한 실정이다. 적조 종의 경우 APase 활성이 유도되는 DIP의 임계농도를 0.2~0.4 μM로 보고하였다(Dyhrman and Palenik, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2004a). 본 연구의 *S. costatum*과 *C. didymus*는 위의 농도 범위 내에서 APase 활성이 유도되었지만, *A. tamarense*와 *H. akashiwo*는 비교적 높은 농도에서 활성이 유도되었다. Oh *et al.* (2002)는 이와 같은 임계농도가 DIP의 이용성과 밀접한 관련이 있음을 제시하였다. 식물플랑크톤의 특정 영양염류에 대한 친화도(affinity)는 영양염 흡수 및 성장동력학 실험에서 도출된 반포화상수( $K_s$ )로 나타낼 수 있으며, 본 실험 종들의 성장동력학 실험에서 도출된 DIP에 대한  $K_s$ 를 살펴보면 *S. costatum*은 0.30 μM, *C. didymus*는 0.33 μM, *A. tamarense*는 1.97 μM 그리고 *H. akashiwo*는 0.61 μM로 APase가 활성화되기 시작하는 임계 농도와 유사함을 알 수 있다(Oh *et al.* unpublished data). 따라서 초기 APase 활성은 영양염 흡수 및 성장동력학 실험에서 도출된  $K_s$  이하의 농도부터 유도되는 것을 알 수 있기 때문에  $K_s$ 는 초기 APase의 활성에 대한 중간경쟁을 평가하는데 좋은 지표로 활용할 수 있을 것이다.

Oh *et al.*(2002)에 따르면 *p*-nitrophenyl phosphate로부터 측정된 *A. tamarense*(일본 Hiroshima Bay 종주), *Gymnodinium catenatum*(일본 Hiroshima Bay 종주) 그리고 *Proocentrum minimum*(미국 Great South Bay 종주)의 APase 활성도는 세포의 표면적과 좋은 상관성을 가져, 단위면적당 APase는 유사하게 분포한다. 즉, 표면적에 비례해서 APase 활성도가 증가한다는 의미로 *G. catenatum*의 표면적은 *A. tamarense*보다 약 2배 정도이며, 최대 APase 활성도 또한 *G. catenatum*이 *A. tamarense* 보다 약 2배 높게 나타났다. *P. minimum* 또한 표면적에 비례하여 *A. tamarense*와 *G. catenatum*보다 APase 활성도가 낮아, S-APase는 3종이 유사하였다. 하지만 Yamaguchi *et al.* (2004a)가 보고한 *Karenia mikimotoi*

(일본 Hiroshima Bay 종주)와 *S. costatum*(일본 Osaka Bay 종주)의 APase를 본 연구대상 종과 같이 비교하면(disodium phenylphosphate를 기질로 사용), *K. mikimotoi*가 가장 높은 S-APase를 나타내었으며, *A. tamarense*는 3배 정도 낮은 S-APase 활성을 보였고, 규조류는 외편모조류보다 더욱 낮은 S-APase 활성을 보였다(Table 2). 따라서 Oh *et al.*(2002)의 보고와 다르게 인 제한 상태에서 활성화되는 APase 활성은 종 특이성(species-specific)을 가지며, 분류군별로도 큰 차이가 있는 것으로 보인다.

한편, 식물플랑크톤의 DOP의 분해 및 흡수에 직접적으로 기여하는 것은 APase이기 때문에 DOP 흡수와 분해에 대한 APase 활성의 기여를 평가하기 위해서는 세포로부터 활성화되는 APase와 성장에 필요한 인의 양을 고려할 필요가 있다. Droop(1973)는 식물플랑크톤의 성장은 해수 중의 영양염 농도에 의존하지 않고, 세포내의 영양염 축적에 의존한다고 보고하였다. 따라서 이와 같은 흡수 전략을 반연속배양(semi-continuous culture) 실험으로 구현할 수 있으며, 정상상태일 경우  $\mu = \mu_{max}(1 - Q_0/Q)$ 로 나타낼 수 있다. 여기에서  $\mu$ 는 성장속도,  $Q$ 는 제한영양염의 세포내 함유량,  $Q_0$ 는 최소 세포내 제한 영양염 함유량,  $\mu_{max}$ 는 최대성장속도이다. 식물플랑크톤이 제한영양염에 대하여 정상상태일 경우(시간 변화에 따라  $Q$ 의 변화가 없는 상태)  $\mu$ 와  $Q$ 의 곱(multiplication)은 성장속도를 유지하기 위해 필요한 제한영양염의 흡수속도로 가정할 수 있다. 종주는 다르지만 현재까지 반연속실험에 따라 보고된  $Q$ 와  $\mu$ 는 *S. costatum*과 *A. tamarense*으로 한정되어 있기 때문에(Tarutani and Yamamoto 1994; Yamamoto and Tarutani 1999), 이 두 종을 이용하여 성장속도를 유지하는데 필요한 인 흡수속도와 본 실험에서 도출한 플랑크톤의 APase 활성을 평가하였다(Table 3). 인 제한상태에서 *S. costatum*과 *A. tamarense*가 정상상태에서 최대 성장속도의 95%에 상당하는 속도에서 성장속도가 거의 포화된다고 가정한다면 *S. costatum*은 0.003 pmol cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>, *A. tamarense*는 0.248 pmol cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>로 흡수속도가 계산되며, 최대 APase 활성도는 이보다 각각 6.57와 3.33배 높게 나타났다(Table 3). 따라서 *A. tamarense*가 *S. costatum*보다 약 2배 높은 수치로 계산되어, 상기

**Table 2.** Surface area, alkaline phosphatase activity and threshold DIP of phytoplankton

Species	Surface area (×10 <sup>3</sup> μm <sup>2</sup> )	Maximum APase activity (pmol cell <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> )	Threshold DIP conc. (μM)	Specific APase activity (APase surface area <sup>-1</sup> )	References
<b>Dinophyceae</b>					
<i>Gymnodinium mikimotoi</i>	3.8	6.90	0.20	1.82	Yamaguchi <i>et al.</i> (2004a)
<i>Alexandrium tamarense</i>	3.1	1.63	2.04	0.53	This study
<b>Raphidophyceae</b>					
<i>Heterosigma akashiwo</i>	0.7	0.19	0.63	0.27	This study
<b>Bacillariophyceae</b>					
<i>Chaetoceros didymus</i>	1.2	0.11	0.33	0.09	This study
<i>Skeletonema costatum</i>	0.8	0.01	0.30	0.01	This study
<i>Skeletonema costatum</i>	0.8	0.02	0.25	0.03	Yamaguchi <i>et al.</i> (2004a)

**Table 3.** Alkaline phosphatase activity of phytoplankton

Species	Maximum growth rate (day <sup>-1</sup> )	Minimum cell quota for phosphorus (pmol cell <sup>-1</sup> )	Phosphorus uptake rate for saturated growth rate (pmol cell <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> ) (A)	Maximum APase activity (pmol cell <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> ) (B)	B/A
<i>Alexandrium tamarense</i>	0.56 <sup>a</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.248	1.63	6.57
<i>Skeletonema costatum</i>	1.25 <sup>b</sup>	0.0028 <sup>b</sup>	0.003	0.01	3.33

<sup>a</sup>Yamamoto and Tarutani(1999); <sup>b</sup>Tarutani and Yamamoto(1994)

의 단위 면적 당 APase 활성과 유사하게 외편모조류가 규조류보다 높은 활성을 보였다. 하지만 두 종 모두 DIP 흡수속도보다 높은 APase 활성을 유지하고 있어 효과적으로 DOP를 가수분해할 수 있을 것으로 보인다.

Yamaguchi *et al.*(2004a)에 따르면 *K. mikimotoi*, *S. costatum*, *H. akashiwo*는 성장을 위해서 orthophosphate, pyrophosphate, tripolyphosphate, metaphosphate와 같은 DIP 이외에 ADP, ATP와 같은 nucleotide 계열의 DOP를 잘 이용한다고 보고하였고, Oh *et al.*(2002)도 *G. catenatum*과 *A. tamarense*가 성장을 유지하기 위한 인 공급원으로써 ADP, ATP와 같은 DOP를 이용한다고 보고하였다. 이외에도 외편모조류 *A. catenella*(Matsuda *et al.*, 1999), *C. polykrikoides*(Kim *et al.*, 2007), *Chattonella ovata*(Yamaguchi *et al.*, 2008), 규조류 *Coscinodiscus wailesii*(Nishikawa and Hori, 2004a), *Eucampia zodiacus*(Nishikawa and Hori, 2004b) 등이 동일한 결과를 보고하였으며, 본 연구에서도 모든 종이 AMP, ADP, ATP를 DIP만큼 성장에 효율적으로 이용하였다(Fig. 4). 따라서 adenosine 계열 화합물의 가수분해 효소인 nucleotidase는 대부분 식물플랑크톤들이 공통적으로 가지고 있는 것으로 보이며, 자연환경에서 ng L<sup>-1</sup> 단위로 존재하는 것으로 알려져 있지만(Hodson *et al.* 1981), DOP 중 유일하게 대부분의 식물플랑크톤이 이용 가능할 것으로 생각된다.

본 연구의 *A. tamarense*와 같이 유해-유독 외편모조류의 경우 PME를 이용하여 성장을 한다는 다수의 보고가 있다(Matsuda *et al.*, 1999; Yamaguchi and Itakura 1999; Yamaguchi *et al.* 2001; Oh *et al.* 2002; Kim *et al.* 2007). 또한 유해-유독 외편모조류는 아니지만, 우리나라 연안역에서도 자주 적조를 형성하는 *Prorocentrum triestinum*도 PME를 이용하여 성장한다(Nishijima *et al.*, 1989). 그리고 AGP(Algal growth potential) 실험을 통해서도 *K. mikimotoi*의 성장에 DOP의 평균 기여율이 47.9%로 DIP 뿐만 아니라 DOP도 상당히 중요한 인 공급원임을 증명하였다(Nishijima *et al.* 1998). 규조류 중에서는 *C. wailesii*, *Chaetoceros ceratosporum*과 *Eucampia zodiacus*에서 PME를 이용하여 성장한다는 보고가 있다(Nishikawa and Hori 2004a; Nishikawa and Hori 2004b; Yamaguchi *et al.*, 2005). 하지만 일부 규조류와 침편모조류에서 APase의 활성이 보이지 않아 PME 이용이 불가능하다는 보고도 있다. 예를 들면 Hiroshima 만에서 분리한 *S. costatum*에서는 APase 활성뿐만 아니라 PME를 이용하지 않는다고 하였으며(Oh *et al.*, 2005), 침편모조류 *Fibrocapsa japonica*와 *C. ovata* 그리고 *H. akashiwo*(Gokasho Bay 종주)도 PME를 이용하지 않는다고 보고하였다(Yamaguchi *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2008). 본 연구에서는 *S. costatum*과 *H. akashiwo*가 PME를 이용하여 성장하였으며, Osaka 만에서 분리한 *S. costatum*도 PME를 이용하였다(Yamaguchi *et al.*, 2004a). 이와 같이 같은 종이면서 분리해역에 따라 DOP의 이용능력이 왜 차이가 나타나는지 현재로서는 설명이 불가능하다. 그러나 Gallagher(1982)와 이와 심(1995)은 *S. costatum*의 경우 분리한 해역에 따라 다른 생리-생태적 특성을 가진다는 보고가 있어, 모든 식물플랑크톤에서 APase 및 DOP의 이용성을 가지고 있지만, 환경에 따라 활성의 유무가 변화할 가능성이 있다. 따라서 단일 종주에 따른 생리실험의 결과로 그 종의 생리특성을 대표하는 것은 중대한 오류를 유발할 가능성이 있다.

결과적으로 적조를 유발하는 식물플랑크톤은 DOP를 성장에 이용 가능한 종이 있으며, 그 이용에는 APase 활성도에 의존하고 해수 중의 DIP농도가 그들의 Ks보다 낮아질 때 활성이 유발되는 것으로 밝혀졌다. 또한 그 활성의 정도는 종에 따라 다르게 나타났지만, 최대 활성은 영양염 흡수속도보다도 상당히 높게 나타나는 것으로 밝혀졌다. 따라서 인 제한 상태에서 DOP는 적조 플랑크톤의 성장에 큰 역할을 할 뿐만 아니라 종의 우점과정 및 종 경쟁에서도 중요한 영향을 줄 것으로 보인다. 앞으로 국내 적조생물에 대한 DOP의 기여를 세부적으로 밝히기 위해 다수의 국내 종주에 대한 DOP 이용성 및 APase 활성 실험, 현장에서 환경변수와 APase 활성 관계 그리고 적조생물의 DIP 및 DOP 흡수 동력학 실험 등이 필요할 것으로 보이며, 이렇게 축적된 자료는 최근 유해-유독 외편모조류의 적조 발생기작을 설명하는데 유용하게 이용될 것으로 생각된다.

## 사 사

본 논문은 부경대학교 해양과학공동연구소의 지원에 따라 수행된 연구로 지원기관에 감사를 포함한다.

## 참고문헌

- 김광수, 2001. 목포항 수질오염과 부영양도의 계절변화. 한국해양환경공학회지, 4: 3-15.
- 이영식, 2004. 광양만에서 식물플랑크톤중식 제한영양염의 시-공간적 변동특성. 대한환경공학회지, 26: 890-895.
- 이원호, 심재형, 1995. 한국연안 산 규조 *Skeletonema costatum*의 조도에 대한 생태적 지위 성분의 종내 변이. 한국해양학회지, 35: 534-541.
- 이찬원, 권영택, 부민호, 권혁보, 양기섭, 2000. 남해연안 패류양식장의 부영양화 특성. 한국해양환경공학회지, 3: 24-33.
- 조현서, 조천래, 강조해, 이규형, 2006. 2004-2005년 광양만의 해양수질 및 저질의 계절적 변동에 관한 연구. 해양환경안전학회 춘계학술발표대회 논문집, pp. 129-135.
- 해양수산부, 2005. 해양환경공정시험방법.
- Ammerman, J.W., 1991. Role of ecto-phosphohydrolases in phosphorus regeneration estuarine and coastal ecosystems. In: Microbial Enzymes in Aquatic Environments, edited by Chrost, R.J., Springer-Verlag, New York, pp. 165-186.
- Brand, L.E., R.R.L. Guillard and L.S. Murphy, 1981. A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. J. Plankton Res., 3: 193-201.
- Beusekom, J.E.E. and U.H. Brockmann, 1998. Transformation of phosphorus in the Elbe estuary. Estuaries., 21: 518-526.
- 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: Part 1. CRC Critic. Rev. Microbiol., 10: 317-391.
- Doblin, M.A., S.I. Blackburn and G.M. Hallegraeff, 1999. Growth and biomass stimulation of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Graham) by dissolved organic substances. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 236: 33-47.
- Droop, M.R., 1973. Some thoughts of nutrient limitation in algae. J.

- Phycol., **9**: 264–272.
- Dyhrman, S.T. and B. Palenik, 1999. Phosphate stress in cultures and field populations of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* detected by a single-cell alkaline phosphatase assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 3205–3212.
- Gallagher, J.C., 1982. Physiological variation and electrophoretic banding patterns of genetically different seasonal populations of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. phycol.*, **18**: 148–162.
- Guillard, R.R.L. and D. Ryther, 1962. Studies of marine planktonic diatom I: *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, **8**: 229–239.
- Guillard, R.R.L. and P.E. Hargraves, 1993. *Strichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *phycologia.*, **32**: 234–236.
- Hodson, R.E., A.E. Maccubbin and L.R. Pomeroy, 1981. Dissolved adenosine triphosphate utilization by free living and attached bacterioplankton. *Mar. Biol.*, **64**: 43–51.
- Hernandez, I., F.X. Niell and J.A. Fernandez, 1994. Alkaline phosphatase activity in marine macrophytes: Histochemical localization in some widespread species in southern Spain. *Mar. Biol.*, **120**: 501–509.
- Hirayama, K., T. Doma, N. Hamamura and T. Muramatsu, 1989. Role of alkaline phosphatase activity in the growth red tide organisms. In: *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*, edited by Okaichi, T., D.M. Anderson and T. Nemoto, Elsevier, New York, pp. 317–320.
- Karl, D.M., 2000. Phosphorus the staff of life. *Nature*, **406**: 31–33.
- 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.
- Ketchum, B.H., N. Corwin and D.J. Keen, 1955. The significance of organic phosphorus determinations in ocean water. *Deep-Sea Res.*, **2**: 172–181.
- KIM, D.I., T. Matsubara, S.J. Oh, Y. Shimasaki, Y. Oshima and T. Honjo, 2007. Effects of nitrogen and phosphorus sources on the utilization and growth kinetics of the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* isolated from Yatsushiro Sea, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **73**: 711–717.
- Kobori, H. and N. Taga, 1979. Phosphatase activity and its role in the mineralization of organic phosphorus in coastal sea water. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, **36**: 23–39.
- Kuenzler, E.J. and J.P. Perras, 1965. Phosphatase of marine algae. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole.*, **128**: 271–284.
- Kuenzler, E.J., 1970. Dissolved organic phosphorus excretion by marine phytoplankton. *J. Phycol.*, **6**: 7–13.
- Lee, Y.W. and G.B. Kim, 2007. Linking groundwater-borne nutrients and dinoflagellate red-tide outbreaks in the southern sea Korea using a Ra tracer. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **71**: 309–317.
- Matsuda, A., T. Nishijima and K. Fukami, 1999. Effects of nitrogenous and phosphorus nutrients on the growth of toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **65**: 847–855.
- Monaghan, E.J. and K.C. Ruttenberg, 1999. Dissolved organic phosphorus in the coastal ocean: Reassessment of available methods and seasonal phosphorus profiles from the Eel River Shelf. *Limnol. Oceanogr.*, **44**: 1702–1714.
- Nausch, M., 1998. Alkaline phosphatase activities and the relationship to inorganic phosphate in the Pomeranian Bight (southern Baltic Sea). *Aquat. Microb. Ecol.*, **16**: 87–94.
- Nishijima, T., Y. Hata and S. Yamauchi, 1989. Physiological ecology of *Prorocentrum triestinum*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **55**: 2009–2014.
- Nishikawa, T. and Y. Hori, 2004a. Effects of nitrogen, phosphorus and silicon on a growth of a diatom *Eucampia zodiacus* caused bleaching of seaweed *Porphyra* isolated from Harima-Nada, Seto Inland Sea, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **70**: 31–38.
- Nishikawa, T. and Y. Hori, 2004b. Effects of nitrogen, phosphorus and silicon on a growth of a diatom *Coscinodiscus wailesii* causing *Porphyra* bleaching isolated from Harima-Nada, Seto Inland Sea, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **70**: 872–878.
- Oh, S.J., T. Yamamoto, Y. Kataoka, O. Matsuda, Y. Matsuyama and Y. Kotani, 2002. Utilization of dissolved organic phosphorus by the two toxic dinoflagellates, *Alexandrium tamarense* and *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Fish. Sci.*, **68**: 416–424.
- Oh, S.J., Y. Matsuyama, T. Yamamoto, M. Nakajima, H. Takatsuzi, and K. Hujisawa, 2005. Recent developments and causes of harmful dinoflagellate blooms in the Seto Inland Sea-Ecological importance of dissolved organic phosphorus (DOP). *Bull. Coast. Oceanogr.*, **43**: 85–95.
- Pomeroy, L.R., H.M. Mathews and H.S. Min, 1963. Excretion of phosphate and soluble organic phosphorus compounds by zooplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **8**: 50–55.
- Price, N. and F. Morel, 1990. Role of extracellular enzymatic reactions in natural waters. In: *Aquatic Chemical Kinetics: Reaction Rates of processes in Natural Waters*, edited by Stumm, W. Wiley-Interscience, New York, pp. 235–258.
- Provasoil, L., K. Shiraishi and J.R. Lance, 1959. Nutritional idiosyncrasies of *Artemia* and *Tigriopus* in monoxenic culture. *Ann. N. Y. Sci.*, **77**: 250–261.
- Shan, Y., I.D. Mckelvie and B.T. Hart, 1994. Determination of alkaline phosphatase-hydrolyzable phosphorus in nature water systems by enzymatic flow injection. *Limnol. Oceanogr.*, **39**: 1993–2000.
- Sharp, J.H., 1977. Excretion of organic matter by marine phytoplankton: Do healthy cells do it. *Limnol. Oceanogr.*, **22**: 381–399.
- Suzumura, M., K. Ishikawa, H. Ogawa, 1998. Characterization of dissolved organic phosphorus in coastal seawater using ultrafiltration and phosphohydrolytic enzymes. *Limnol. oceanogr.*, **43**: 1553–1564.
- Tarutani, K. and T. Yamamoto, 1994. Phosphate uptake and growth kinetics of *Skeletonema costatum* isolated from Hiroshima Bay. *J. Fac. Appl. Biol. Sci.*, **33**: 59–64.
- Yamaguchi, M. and S. Itakura, 1999. Nutrition and growth Kinetics in nitrogen- or phosphorus -limited cultures of the noxious red tide dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi*. *Fish. Sci.*, **65**: 367–373.
- Yamaguchi, M., S. Itakura and T. Uchida, 2001. Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of novel red tidedinoflagellate *Heptero capsa circularisquama* (Dinophyceae). *Phycologia.*, **40**: 313–318.
- Yamaguchi, H., T. Nishijima, H. Nishitani, K. Fukami and M. Adachi, 2004a. Organic phosphorus utilization and alkaline phosphatase production of 3 red tide phytoplankton. *Nippon Suisan*



- Gakkaishi., **70**: 123–130.
- Yamaguchi, H., T. Nishijima, A. Oda, K. Fukami, M. Adachi, 2004b. Distribution and variation of alkaline phosphatase activity and phosphatase hydrolyzable phosphorus in coastal seawater. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **70**: 333–342.
- Yamaguchi, H., H. Sakou, K. Fukami, M. Adachi, M. Yamaguchi and N. Nishijima, 2005. Utilization of organic phosphorus and production of alkaline phosphatase by the phytoplankton, *Heterocapsa circularisquama*, *Fibrocapsa japonica* and *Chaetoceros ceratosporum*. *Plankton Biol. Ecol.*, **52**: 65–75.
- Yamaguchi, H., S. Sakamoto and M. Yamaguchi, 2008. Nutrition and growth kinetics in nitrogen- and phosphorus-limited cultures of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). *Harmful Algae.*, **7**: 26–32.
- Yamamoto, T., K. Tarutani, 1999. Growth and phosphate uptake kinetics of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from Hiroshima Bay in the Seto Inland Sea, Japan. *Phycol. Res.*, **47**: 27–32.
- Wetzel, R.G., 1991. Extracellular enzymatic interaction: storage, redistribution and interspecific communication. In; *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*, edited by Chrost, R.J., Springer-Verlag, New York, pp. 6–28.

---

2009년 12월 15일 원고접수

2010년 2월 27일 수정본 채택

담당편집위원: 박명길