

Note

퇴적층 남조류 휴면세포의 생리적-분자생물학적 연구를 위한 Ludox 처리법

김건희 · 유경은¹ · 호혜인¹ · 박채홍 · 김현진² · 황순진^{1,*}

건국대학교 휴먼엔에코케어센터, ¹건국대학교 상허생명과학대학 환경보건과학과, ²주식회사 평화엔지니어링

A Protocol of Ludox Treatment for Physiological and Molecular Biological Research of Freshwater Cyanobacteria. Keonhee Kim (0000-0002-5725-1447), Kyeong-eun Yoo¹ (0000-0002-2659-5466), Hye-in Ho¹ (0000-0003-0749-531X), Chaehong Park (0000-0003-1080-0733), Hyunjin Kim² (0000-0001-5600-3655) and Soon-Jin Hwang^{1,*} (0000-0001-7083-5036) (Human and Ecocare center, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea; ¹Environmental Health Science, Sanghuh Life Science College, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea; ²Pyunghwa Engineering Consultants, Gwangyang Doosan Venture Digm, Anyang-si, Gyeonggi-do 14056, Republic of Korea)

Abstract Cyanobacterial resting cells, such as akinetes, are important seed cells for cyanobacteria's early development and bloom. Due to their importance, various methods have been attempted to isolate resting cells present in the sediment. Ludox is a solution mainly used for cell separation in marine sediments, but finding an accurate method for use in freshwater is difficult. This study compared the two most commonly used Ludox methods (direct sediment treatment and sediment distilled water suspension treatment). Furthermore, we proposed a highly efficient method for isolating cyanobacterial resting cells and eDNA amplification from freshwater sediments. Most of the resting cells found in the sediment were akinete to the Nostocales and were similar to those of *Dolichospermum*, *Cylindrospermum*, and *Aphanizomenon*. Twenty times more akinetes were found in the conical tube column using the sediment that had no treatment than in the sample treated by suspending the sediment in distilled water. Akinete separated through Ludox were mainly spread over the upper and lower layers in the column rather than concentrated at a specific depth in the column layer. The *mibC*, *Geo*, and 16S rDNA genes were successfully amplified using the sediment directly in the sample. However, the amplification products of all genes were not found in the sample in which the sediment was suspended in distilled water. Therefore, 5 g to 10 g of sediment is used without pretreatment when isolating cyanobacterial resting cells from freshwater sediment. Cell isolation and gene amplification efficiency are high when four times the volume of Ludox is added. The Ludox treatment method presented in this study isolates cyanobacterial resting cells in freshwater sediment, and the same efficiency may not appear in other biotas. Therefore, to apply Ludox to the separation of other biotas, it is necessary to conduct a pre-experiment to determine the sediment pretreatment method and the water layer where the target organism exists.

Key words: cyanobacteria, sediment, akinete, Ludox, eDNA

Manuscript received 13 March 2023, revised 21 March 2023,
revision accepted 21 March 2023

* Corresponding author: Tel: +82-2-450-3748, Fax: +82-2-456-5062
E-mail: sjhwang@konkuk.ac.kr

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

서론

염주말목 남조류를 포함하는 일부 남조류는 휴면상태의 세포를 형성하여 겨울철과 같은 성장이 불리한 조건에서도 퇴적층에서 생존할 수 있다(Baker and Bellifemine, 2000; Kaplan-Levy *et al.*, 2010). 대표적으로 염주말목은 휴면포자(akinete)라고 불리는 포자를 형성하며 이를 통해 퇴적층과 수층이 연결된 생활사를 보여준다(Yamamoto and Nakahara, 2009; Suikkanen *et al.*, 2010; Sukenik *et al.*, 2019). 이러한 휴면포자는 연중 남조류의 초기 발생에 중요한 씨앗개체로 작용하여 남조류 대발생 기원으로 알려져 있다(Sukenik *et al.*, 2019). 이러한 이유로 남조류의 발생 기원은 대부분 퇴적물을 대상으로 연구가 수행되고 있으며, 퇴적층에 존재하는 남조류의 휴면세포 분포와 밀도를 파악하는 것은 남조류 발생 우심지역(hotspot) 및 남조류의 생활사를 파악하는 데 중요한 정보를 제공하고 있다(Ståhl-Delbanco and Hansson, 2002).

남조류의 휴면세포는 분류군에 따라서 다양한 형태와 크기를 나타내며 이를 퇴적물로부터 분리하기 위해서는 다양한 방법들을 활용하고 있다(Thiel and Wolk, 1983; Sukenik *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2021). 담수환경에서 휴면포자를 분리하는 대표적인 방법으로써 panning method(Matsuoka and Fukuyo, 2000)가 많은 연구에서 사용되고 있다(Kang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2014). Panning method는 퇴적물을 증류수에 현탁한 뒤, 물의 원운동에서 발생하는 원심력으로 휴면포자를 분리하는 방법으로써 적용이 간편하고 방법이 어렵지 않기 때문에 휴면포자 초기 연구에 많이 활용되었다. 하지만 panning method의 특성상 연구자의 숙련도에 따라 휴면포자 분리수율(yield)이 크게 차이이며, 처리시간이 오래 걸리기 때문에 분석 과정에서 많은 어려움이 존재한다(Kang *et al.*, 2008). 특히 입자가 작은 실트(silt)로 구성된 퇴적물의 경우에는 panning method 적용 과정에서 퇴적물 입자와 휴면포자를 명확히 분리하기 매우 어렵다. 이는 mesh를 이용한 휴면포자 여과·농축 과정의 소요시간을 급격하게 증가시키는 원인으로 작용하여 온도 및 빛으로 인한 휴면포자의 발아에 영향 미칠 가능성이 높다. Panning method의 한계점을 해결하고자 해양 연구분야에서 SPT(sodium polytungstate) 시약을 사용한 휴면포자 분리가 수행되었으나 이 또한 많은 한계점이 존재하였다(Kang *et al.*, 2008). 매번 사용할 때마다 분말 형태의 시약을 증류수에 녹여 비중을 맞춰야 하는점, sodium 성분으로 인해 담수에서 적용시 비중문제가 존재하는점, 매우 고가의 시약으로써 경제적인 문제점 등 여전히 많은 한계점이 존재하였다.

해양생태 분야에서는 이러한 panning method의 문제점을 해결하고자 미세규산질입자(nano silica particle) 성분의 Ludox 용액을 이용하여 와편모조류의 휴면포자를 분리하는 연구가 진행되었다(De Jonge and Bouwman, 1977; Bolch, 1997). Ludox 용액은 나노(nano) 크기의 규소입자(silica particle)가 콜로이드(colloid) 형태로 존재하는 용액으로써 해양플랑크톤 세포와 함께 존재할 때 플랑크톤 세포 외벽에 부착되어 비중 차이를 유발한다(Burgess, 2001). 이러한 비중 차이는 퇴적물에 존재하는 휴면포자 세포와 퇴적물 입자를 효과적으로 분리시킬 수 있으며 이를 통해 mesh를 이용한 여과·농축 과정에 소요되는 시간이 크게 감소할 수 있다. Ludox 용액을 이용한 플랑크톤 분리 방법은 정확하게 규정된 전처리 과정이 존재하지 않으며 퇴적물을 그대로 사용하는 방식과 퇴적물을 증류수 및 고정용액에 현탁하여 사용하는 두 가지 방법으로 크게 구분된다(De Jonge and Bouwman, 1977; Zhao *et al.*, 2012; Legrand *et al.*, 2017). 이러한 두 가지 방법 안에서 대상 생물 및 퇴적물 환경조건에 따라서 고정용액을 첨가하거나 원심분리를 2회 이상 진행하는 것과 같은 다양한 과정이 추가된다(Xu *et al.*, 2010; Briski *et al.*, 2013). 이처럼 담수환경의 퇴적물에서 염주말목 남조류의 휴면포자를 분리하기 위해 Ludox 용액을 활용한 연구 사례는 매우 미비하며, 단편적으로 식물플랑크톤 세포를 분리하는 경우에 Ludox 용액을 처리한 사례가 있다. 더욱이 기존의 해양환경에서 적용한 Ludox 용액 처리법은 염도 및 해양환경을 고려한 방법이거나 휴면포자 이외에 규조류 및 와편모조류 세포를 분리하기 위한 방법이 대부분이다(Schwinghamer, 1981; Ichinomiya *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2009). 이로 인해 담수환경 퇴적물에 존재하는 염주말목 남조류의 휴면포자 분리에 직접 적용하기는 어려우며, 이와 같은 방법으로는 높은 효과를 확신할 수 없다.

따라서 본 연구는 가장 많이 활용되는 두 가지 Ludox 용액 처리 방법(증류수 현탁 또는 직접처리)을 비교하고, 이를 기반으로 퇴적물의 남조류 발생 기원 및 잠재성 연구를 수행하고자 할 때, 휴면포자 분리 및 유전자 증폭효율이 높은 Ludox 적용법을 제시하였다.

재료 및 방법

1. 퇴적물 채집

퇴적물은 금강 수계의 대청호 수역(36°22'20"N, 127°29'18"E)에서 core sampler(Uwitec, Austria)를 이용하여 주상 퇴적물(sediment core)을 수직으로 채집하였다. Core

sampler로 채집한 퇴적물은 냉암소(약 4°C) 조건을 유지하며 실험실로 운반하였고 실험실에서 5 cm 간격으로 깊이 에 따라 분리하였다. 분리된 퇴적물은 100 mL 폴리에틸렌 시료병에 담아 분석 전까지 빛을 차단한 환경에서 냉장보관하였다. 채집된 퇴적물 중에서 휴면포자 세포가 가장 많이($1,964 \text{ cells g}^{-1}$) 발견된 시료를 선정하여 본 실험에 사용하였다.

2. Ludox 처리방법 A (직접처리)

현장에서 채집된 퇴적물은 잘 혼합한 뒤 5 g 정량하였으 50 mL conical tube에 옮겨 담고 Ludox HS-40 (Sigmaaldrich, USA)을 20 mL 첨가하였다. 퇴적물을 담은 conical tube를 vortex에서 5분 동안 가장 강한 강도로 혼합한 뒤 2,000 rpm 속도로 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리된 conical tube를 조심스럽게 꺼낸 뒤 표층 4 mL의 상등액과 하층 10 mL를 피펫으로 분리하였으며 휴면포자의 분리 효율을 파악하기 위해 conical tube 하단의 퇴적물 표층을 spatular를 이용하여 긁어내었다. 이들을 각각 10 μm 공극의 sieve로 남조류 세포를 분리하였다(Fig. 1a). 세포에 묻어있는 Ludox를 완전히 제거하기 위해 3차 증류수로 3회 이상 세척하였다. Sieve로 분리한 남조류 세포를 회수하기 위해 3차 증류수 10 mL로 정용한 뒤 갈색 표본병(amber vial)에 보관하였다. 남조류 세포의 유전자 추출은 Ludox로 전처리된 10 mL를 GF/F 여과지(Whatman, UK)로 여과하였으며 남아있을 수 있는 Ludox를 완전히 제거하기 위해 3차 증류수 5 mL를 3회 이상 주입하여 세척하였다.

3. Ludox 처리방법 B (증류수 현탁)

현장에서 채집된 퇴적물을 잘 혼합 후, 5 g을 정량하여 conical tube에 옮겨 담았다. 퇴적물양의 2배 부피(10 mL)가 되도록 3차 증류수로 채워 넣고 가장 강한 강도로 짧게 vortex하여 퇴적물을 현탁하였다. 현탁된 퇴적물에 40 mL의 Ludox를 첨가하고 A 처리방법과 동일한 방법으로 vortex와 원심분리 과정을 거친 후, conical tube의 표층 4 mL를 피펫으로 분리하였다. 나머지 하층의 30 mL를 10 mL씩 3개로 나누어 피펫으로 분리하였다(Fig. 1b). 또한 휴면포자의 분리 효율을 파악하기 위해 conical tube 하단의 퇴적물 표층을 긁어내었다. 이를 10 μm 공극(pore size)의 sieve로 걸러내어 남조류 세포를 분리하였다. A 처리방법과 동일하게 sieve와 세포에 묻어있는 Ludox를 3차 증류수로 세척하였으며 sieve에 남아있는 남조류 세포는 3차 증류수로 정용한 뒤 갈색 표본병(amber vial)에서 보관

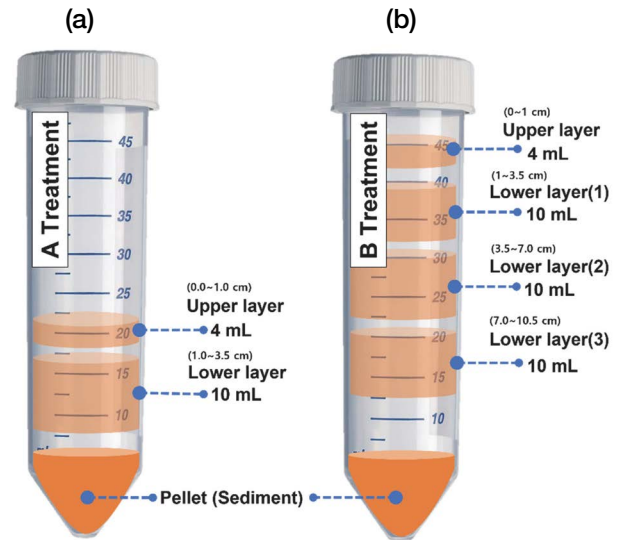


Fig. 1. Sampling layer of the conical tube water column in each Ludox treatments. (a) Sediment directly mixed with Ludox (A treatment), (b) Sediment diluted by distilled water before mixed with Ludox (B treatment).

하였다. 남조류 세포의 유전자 추출을 위한 여과 과정도 A 처리방법과 동일한 방법으로 수행하였다.

4. 남조류 세포계수

Ludox를 통해 분리된 남조류 세포는 현미경 200X~400X 배율에서 계수하였다. 휴면포자 세포는 피각이 온전하고 내부가 모두 채워져 있는 정상세포, 피각이 온전하지만 세포의 일부만 채워져 있는 세포, 피각이 온전하지만 속이 비어있는 세포, 피각이 열려서 세포가 발아된 비어있는 세포, 세포 중간부위의 피각이 불규칙하게 파손된 세포를 모두 계수하였다(Fig. 2). 휴면포자 이외에도 남조류 세포가 존재한다면 포함하여 계수하였다. 남조류 휴면포자 세포는 문헌(Park, 2018)에서 제시한 휴면포자 세포의 크기(가로-세로 길이 비율)에 따라서 속 수준에서 동정하였으며, 휴면포자 이외의 세포는 도감을 기반으로 종 수준에서 동정하였다(Jun, 1993; Park, 2012a, b).

5. DNA 추출 및 증폭

두 가지 Ludox 처리 과정을 통해 $\phi 47 \text{ mm}$ GF/F 여과지(Whatman, UK)에 여과·농축된 남조류 세포의 DNA는 일본 eDNA 학회에서 제시한 DNA 추출방법에 따라서 추출하였다(Minamoto *et al.*, 2021). 추출이 완료된 시료는 분석하기 전까지 초저온 냉동고(deep freezer, -80°C)에서 냉동보관하였다. Ludox 처리 방법에 따른 남조류 16S

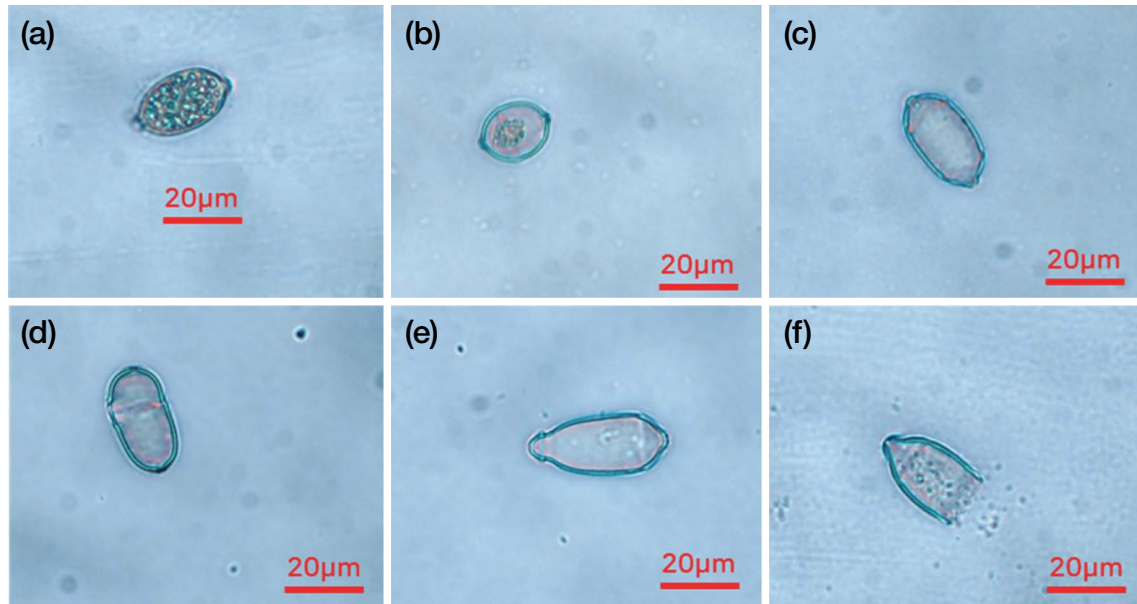


Fig. 2. Cyanobacterial akinete cells to be counted in this study (a) Normal cells. (b) The shell is intact, but the inside is partially empty. (c) The shell is intact, but completely empty inside. (d) The shell is open and the inside is empty. (e) The inside of the cell is empty and the shell is transformed. (f) The inside of the cell is empty and part of the shell is missing.

Table 1. Primers sequences and amplification information for target gene in this study

Primer	Sequences (5'-3')	Melting temp	Cycle	Amplicon (bp)	Target gene	Reference
3139F 3708R	CTAGACCMATGCGGGTTTAA CCATTCTTTRGAATGMTT	53°C	40	569	Geosmin synthase gene (<i>geo</i>)	Tsao <i>et al.</i> , 2014
mibC300F mibC300R	TGTTACGCCACCTTCTCTATGTT CAATCTGTAGCACCATGTTGA	62°C	35	300	2-MIB cyclase gene (<i>mic</i>)	Kim <i>et al.</i> , 2020
Cya359F cya781R(a)	GGGGAATYTTCCGCAATGGG GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT	60°C	30	446	16s ribosomal DNA	Nelian <i>et al.</i> , 1999 Nübel <i>et al.</i> , 1997

rDNA 탐색을 비교하기 위해 PCR 증폭을 수행하였다. 실험에 사용된 Primer 종류와 활성 조건은 Table 1과 같다 (Nübel *et al.*, 1997; Neilan *et al.*, 1999; Tsao *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2020). PCR 증폭은 Thermal cycler (A300, LongGene, China)를 이용하여 수행하였으며, 증폭된 PCR (Polymerase Chain Reaction) 산물은 E-gel™ Power Snap electrophoresis system (Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하여 2% agarose gel에서 전기영동을 시행한 후 E-gel™ Power Snap Camera (Thermo Fisher Scientific, USA)로 유전자 증폭 여부 및 증폭산물의 크기를 확인하였다. 전기영동 결과는 Image J (ver. 1.53t, NIH, USA) 프로그램 이용하여 전기영동 사진으로부터 amplicon band의

색정보(color information)를 분석하였으며, 이를 기반으로 두 가지 Ludox 처리 방법에 따른 유전자의 증폭률을 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 퇴적층에서 분리된 남조류 세포 형태

두 가지 Ludox 처리방법에 따라 분리된 남조류 세포는 모두 염주말목의 휴면포자로서 이외의 다른 남조류 분류군 세포는 발견되지 않았다. 발견된 휴면포자는 대부분 속이 비어있어 피각만 남아있는 세포이거나 내부

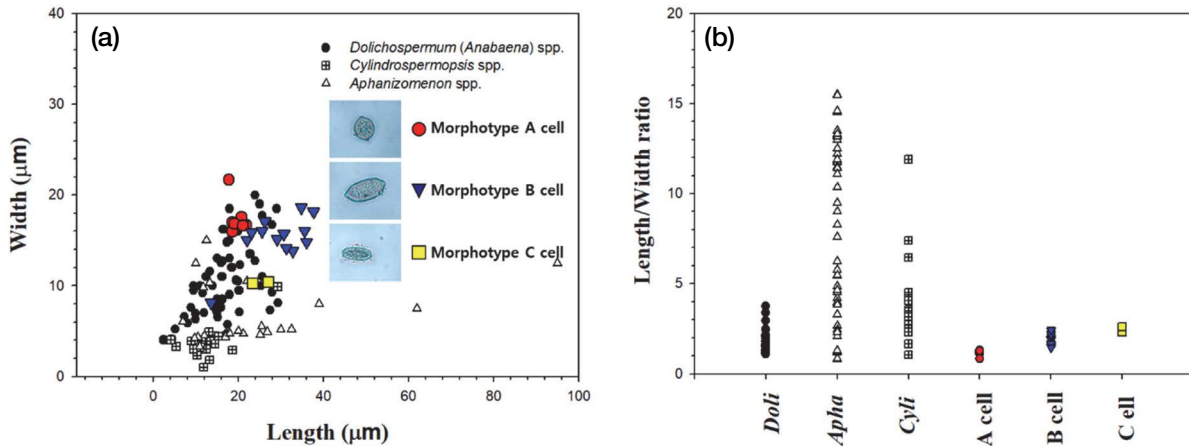


Fig. 3. The morphotype of akinete observed in this study. Classified into 3 morphotypes. Only 2 cells of morphotype C cells were found in all samples. ‘Doli’ means *Dolichospermum* spp., ‘Aph’ means *Aphanizomenon* spp., ‘Cyli’ means *Cylindrospermopsis* spp.

의 영양세포가 발아되어 열려있는 피각세포로써 크게 3개 Morphotype (형태)으로 분류할 수 있었다 (Fig. 3a). Morphotype A의 세포 길이는 17.8~21.9 µm이며, 폭은 15.9~21.6 µm로 구형에 가까운 형태를 나타내었다. Morphotype B와 C 세포는 타원에 가까운 형태로써 길이와 폭의 비율은 각각 1.9와 2.5로 길이가 폭보다 길었다. Morphotype B 세포의 길이와 폭은 13.5~37.6 µm와 8.1~18.6 µm이었으며 Morphotype C 세포의 길이와 폭은 23.4~27.1 µm와 10.2~10.4 µm로 Morphotype B 세포와 Morphotype C 세포는 형태적으로 세포 길이가 유사하였으나 세포의 폭은 Morphotype B 세포가 C 세포보다 2배 가까이 길었다. 또한 Morphotype A와 B는 세포의 양 끝단에 영양세포 연결부가 현미경으로 분명하게 관찰되는 반면에 Morphotype C는 양 끝단이 매끄러운 둥근 형태를 나타내었다.

Ludox를 이용하여 분리된 휴면포자 세포의 형태는 crumble (찌그러지거나 훼손된) 현상이 없었다. 두 개의 처리군 모두에서 동일한 종류의 세포들이 발견되었으며 다양한 문헌을 통해 알려진 염주말목 남조류 휴면포자 세포 크기 범위에 포함되었다 (Park, 2018; Li *et al.*, 2000) (Fig. 3a, b). Morphotype A와 B 세포는 모두 *Dolichospermum*속의 휴면포자 크기 범위에 포함되었으며, 길이와 폭 비율 (L/W ratio) 또한 *Dolichospermum*의 휴면포자 세포의 범위에 포함되었다. Morphotype C 세포는 *Dolichospermum* 뿐만 아니라 *Cylindrospermopsis*와 *Aphanizomenon*의 휴면포자 세포 크기 및 L/W ratio 범위에 포함되었다. 수층에서 발견된 피각세포 중에서 세포의 한 쪽 끝단부가 끊겨있거나 존재하지 않는 세포가 다수 존재하였다. 이는 처리 과정에

서 세포가 훼손되었다기보다는 휴면포자가 발아하는 과정에서 피각세포가 탈각되었으며 원심분리 및 vortex 과정의 물리적 영향으로 인해 세포 끝단부가 분리된 것으로 판단된다 (Goldberg, 2008; Dong *et al.*, 2023).

2. Ludox 사용방법에 따른 퇴적물 남조류세포 분리 효율 비교

Ludox를 직접 처리한 (A 처리방법) 처리군에서는 3가지 Morphotype의 휴면포자 세포가 모두 발견되었으며, 평균 1,695 cells g⁻¹으로 추동지역 퇴적물의 사전조사 (1,964 ± 804 cells g⁻¹)와 유사한 세포밀도를 확인할 수 있었다 (Fig. 4a). A 처리군의 상층 4 mL에서 약 869 cells mL⁻¹의 휴면포자가 존재하였으며, 하층의 10 mL에서도 이와 유사한 861 cells g⁻¹의 휴면포자가 존재하였다. 하지만 하층의 퇴적층 표면에서는 휴면포자 세포가 발견되지 않았다. 이와 다르게 현탁된 퇴적물에 Ludox를 처리한 (B 처리방법) 처리군에서는 2개 Morphotype 세포만 발견되었으며 평균 1,033 cells g⁻¹으로 처리방법 A보다 세포밀도가 낮았다 (Fig. 4b). 상층액 4 mL에서 휴면포자 세포는 단지 5 cells g⁻¹만 발견되었으며, 하층의 10 mL에서 약 147 cells g⁻¹으로 A 처리방법과 비교하였을 때 세포밀도가 약 7배 낮았다. 하지만 tube 바닥의 pellet으로 존재하는 퇴적물 표층에서 평균 880 cells g⁻¹의 휴면포자 세포가 존재하였으며 이는 B 처리방법에서 발견된 휴면포자의 약 85%로 대부분이 수층으로 분리되지 않고 퇴적층에 남아있어 분리가 되지 않았음을 의미한다. B 처리방법을 적용하였을 때 수층에서 발견된 휴면포자는 대부분 하층 (Low layer (1)) 10

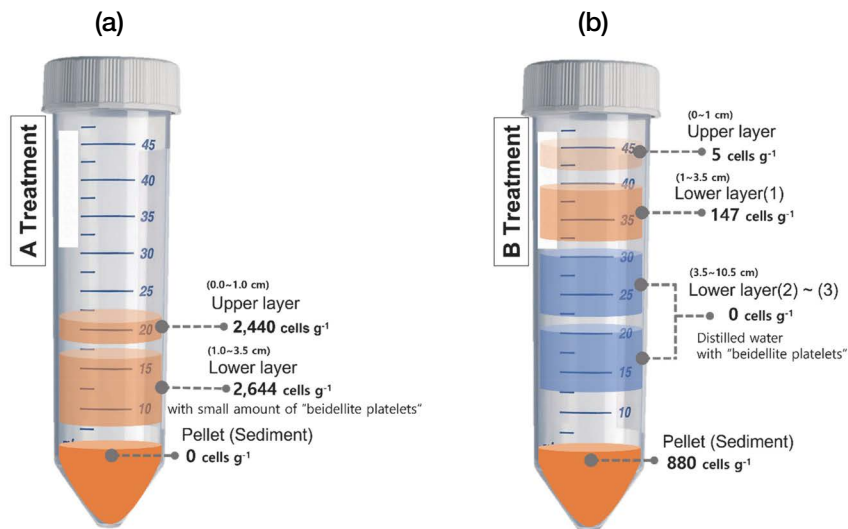


Fig. 4. Distribution of akinete cells in the water column layer and the sediment pellet surface layer according to the Ludox treatment method. (a) Sediment directly mixed with Ludox (A treatment), (b) Sediment diluted by distilled water before mixed with Ludox (B treatment).

mL에 존재하였으며 이외의 수층에서 휴면포자 세포는 발견되지 않았다. 또한 B 처리방법에서 수층으로 부유한 휴면포자 세포는 대부분이 영양세포가 발아하였거나 내부의 영양세포가 사멸하여 비어있는 피각세포였으며, 내부에 영양세포가 존재하는 휴면포자 세포는 대부분 퇴적물 pellet에서 발견되었다. 하층(Low layer (1), (2))의 20 mL에서 휴면포자 세포가 발견되지 않았으나 얇은 판(Platelets) 형태의 토양입자가 다수 존재하였다. 이러한 토양입자는 작게는 50 μm, 크게는 350 μm까지 매우 다양한 크기로 존재하였으며 3.5 cm보다 상층에서는 발견되지 않았다.

Ludox를 이용한 다양한 문헌들 중에서 해양 섬모충류 분리에 Ludox를 적용한 문헌에서는 상층 1~2 mL에 대부분의 섬모충류 세포가 존재하는 것으로 확인되었다(Xu *et al.*, 2010). 해양퇴적층의 선충(nematod)을 분리하기 위해 Ludox를 처음 사용한 문헌에서도 상층부 2.5 cm에서 농축되어 있는 것을 확인하였다(De Jonge and Bouwman, 1977). 하지만 본 실험에서 A 처리군의 휴면포자 세포는 상등액뿐만 아니라 하층에서도 발견되었으며 상등액에 존재하는 밀도만큼 하층에서도 존재하였다. B 처리군에서도 상층 4 mL와 바로 밑 하층 10 mL에서만 휴면포자가 발견되었다. 이를 50 mL conical tube 기준으로 깊이로 환산하면 상층의 1 cm에 존재하는 세포밀도와 그 밑의 2.5 cm에 분포하는 세포밀도가 유사한 것으로써 휴면포자가 존재하는 수층의 깊이는 총 3.5 cm이다. 즉, Ludox를 20 mL 첨가한 A 처리군에서 이는 pellet 퇴적물을 제외한 수층 대부분을 의미한다. 상등액의 사전적 의미에서도 상등액은 수층

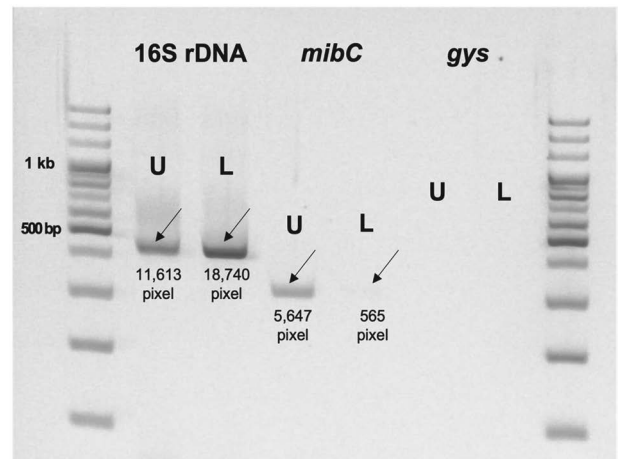


Fig. 5. Comparison of gene amplification rate according to Ludox treatment method (A treatment method). Amplicon of all genes was not found in samples using B treatment method. 'U' means upper layer, and 'L' means lower layer. The pixel numbers under the electrophoresis bands are Image J analysis values.

의 상층부를 의미하기보다는 하부의 pellet과 구분되는 수층 전체를 의미한다(Oxford, 1989). 퇴적층의 동물플랑크톤 휴면아(dormant stage)를 분리하는 과정에서도 상등액을 사용하였으며 상등액 전부를 따라내어(decanted) 사용하였다(Briski *et al.*, 2013). B 처리군에서는 상층 3.5 cm보다 아래의 수층(3.5~10.5 cm)에서는 휴면포자 세포가 전혀 발견되지 않았으며 하단에 베이드라이트판(Beidellite platelets)으로 추정되는 토양입자들이 밀집되어 있었다

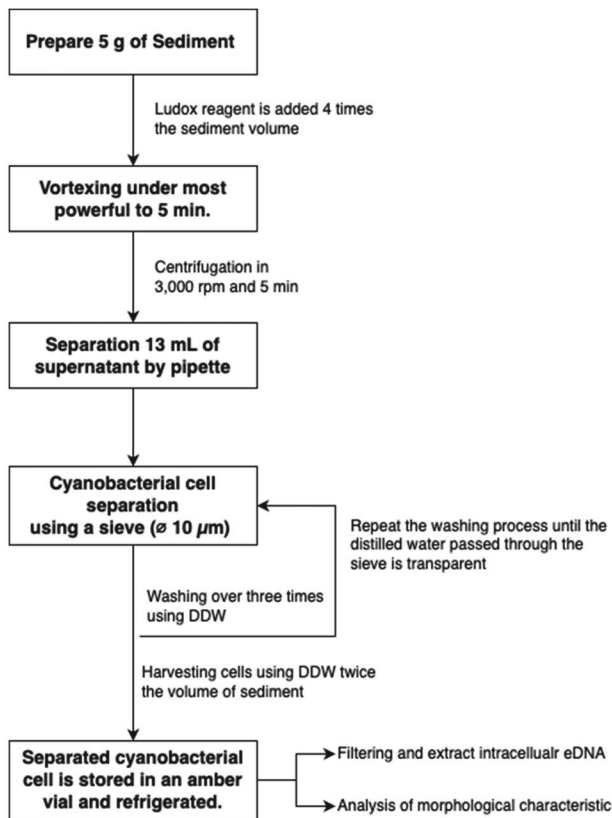


Fig. 6. Protocol of ludox treatments for cyanobacterial resting cells (or akinete) in freshwater sediment.

(Bergaya and Lagaly, 2013; Landman *et al.*, 2014). 따라서 Ludox를 통해 퇴적물에서 분리된 세포들은 conical tube 상층의 특정 깊이에서 고밀도로 존재하기 보다는 상층 0.0~3.5 cm 구간과 같이 넓게 분포하는 것으로 판단된다.

3. 유전자 증폭 비교

두 가지 처리방법을 통해 퇴적물로부터 분리된 intracellular eDNA의 증폭 효율을 비교하기 위해 PCR 증폭하였다. A 처리방법을 통해 분리된 시료에서만 종 특이적인 16S rDNA 유전자와 2-MIB 생합성 유전자(*mibC*)의 증폭 산물이 발견되었으며 B 처리방법을 통해 분리된 시료에서는 유전자 증폭산물이 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 5). 두 처리군 모두에서 Geosmin 생합성 유전자는 증폭되지 않았다. Ludox를 직접 처리한 A 처리방법은 상층과 하층 모두에서 남조류의 16S rDNA 유전자 증폭산물이 관찰되었으며 상층액과 하층의 유전자 증폭량 차이는 1.6배로 하층부에서 더 높았다. 반면에 *mibC* 유전자는 주로 4 mL의 상층액에서 증폭율이 월등히 더 높았으며 하층 시료의 유전자 증폭량과 비교하였을 때 약 10배의 큰 차이를 나타내었다.

이러한 처리방법에 따른 유전자 증폭 차이는 수층으로 부유한 휴면포자 세포의 밀도 차이가 주요한 원인으로 판단된다. 또한 B 처리방법으로 분리된 휴면포자 세포의 대부분이 내부가 비어있는 피각세포로써 내부의 영양세포가 존재하는 휴면포자와 비교하였을 때 intracellular eDNA는 거의 존재하지 않는다. 이러한 차이는 세포 사이의 무게 차이가 원인으로 판단된다. 정상적인 휴면포자 세포를 부유시키기 위해서는 Ludox의 비중(1.31)이 필요하지만 퇴적물을 현탁하면서 첨가된 증류수로 인해 Ludox가 희석되었으며 이는 비중의 감소를 유발한 것으로 판단된다. 퇴적물로부터 분리된 수층에서 남조류의 16S rDNA는 수층 전체에 분포한 반면에 남조류의 2-MIB 합성 유전자는 4 mL 상층액에서 대부분이 발견되었다. 이를 통해 퇴적층에 존재하는 2-MIB 합성 남조류는 휴면포자 세포와 다르게 상층 4 mL에 대부분이 존재하는 것으로 판단할 수 있다. 또한 B 처리군에 존재하는 다량의 베이드라이트판(Beidellite platelets)은 자연상태에서 토양에 nano 크기로 존재하지만, Ludox의 구소입자가 작은 베이드라이트판들과 결합하여 작게는 50 µm부터 크게는 350 µm 이상으로 크기가 증가하게 된다(Landman *et al.*, 2014). 이로 인해 GF/F를 이용한 eDNA 여과 과정에서 여과지의 폐쇄현상을 유발할 수 있을 뿐만 아니라 주변에 존재하는 DNA를 흡착하는 성질을 가지고 있기 때문에 eDNA 추출 수율(Yield)을 감소시키는 원인으로 작용할 수 있다(Burgess, 2001). A 처리군에서도 수층에서 베이드라이트판이 발견되었으나 B 처리군과 비교하였을 때 크기가 작고 발견되는 판의 갯수가 적어서 여과농축 및 eDNA 추출 과정에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다.

결 론

본 연구는 퇴적물에 존재하는 남조류 세포의 생리적-분자생물학적 연구를 위한 정확한 Ludox 활용법을 확인하고자, 실험을 진행하였다. 본 실험결과를 기반으로 분리효율이 가장 좋은 Ludox 사용법은 다음과 같다. ① 증류수로 현탁하지 않은 퇴적물 5~10 g을 50 mL conical tube에 담는다. ② Ludox를 20~40 mL 첨가한다. 이때 퇴적물량과 Ludox 첨가량의 비율은 1:4 비율을 유지한다. ③ Ludox와 퇴적물을 vortex로 5 min 동안 혼합한다. 이 과정에서 크기가 큰 퇴적물 입자가 작게 분해되고 퇴적물에 부착되어 있는 휴면포자 세포가 떨어져 나오게 된다. ④ 혼합된 퇴적물을 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한다. 이 과정에서 비중 차이에 따른 층(layer)이 형성되고, 휴면포자는 수층

으로 부유하게 된다. ⑤ 원심분리가 완료된 50 mL conical tube를 조심스럽게 꺼낸 뒤, 피펫을 이용하여 상등액 13 mL를 분리한다. 상등액은 절대로 따라내어(decanting) 분리하지 말고, 가능한 피펫을 이용하여 퇴적물 Pellet을 건드리지 않고 조심스럽게 분리한다. 만약 2-MIB 합성 남조류를 대상으로 한다면 수층 전체보다는 상층의 4 mL만을 사용해도 무방하다. ⑥ 피펫으로 분리한 수층은 sieve (pore size: 10 µm)로 휴면포자를 걸러내고, 3차 증류수를 사용하여 세포에 묻어있는 Ludox를 3회 이상 세척한다. Sieve의 휴면포자 세포를 세척하면서 sieve를 통과하는 증류수가 투명할 때까지 세척한다. ⑦ 세척을 완료한 뒤 10~20 mL로 정용하여 갈색시료병(amber vial)에 담는다. 정용량은 퇴적물량의 2배를 기준으로 정한다.

Ludox는 많은 문헌들에서 퇴적물에 존재하는 다양한 생물들을 분리하기 위해 사용하고 있으며 생물군별로 처리방법이 다를 뿐만 아니라 동일한 생물군 안에서도 처리방법에 차이가 존재한다. 또한 Ludox 사용 목적에 따라서 처리 과정의 미세한 차이가 존재할 수 있으며 이는 실험결과에 영향을 미칠 수 있다. 대표적으로 동물플랑크톤 휴면아 분리 과정에서는 상등액을 따라내어(decanting) 분리하였으며 이는 세포관찰 중에는 전혀 문제가 되지 않는다. 하지만 환경유전자(eDNA)를 분석하는 과정에서는 퇴적물 Pellet 또는 수층의 하단에 존재하는 베이드라이트판(Beidellite platelets)이 유입될 경우 환경유전자 추출 수율(yield)을 감소시킬 수 있기 때문에 매우 주의해야 한다. 본 연구에서 제시하는 Ludox 처리방법은 담수퇴적층에 존재하는 남조류 세포들을 분리하고, 이들의 유전자를 분석하기 위한 방법으로써 동물플랑크톤이나 섬모충류와 같이 다른 생물군에서는 동일한 분리효율이 나타나지 않을 수 있다. 따라서 다른 생물군의 분리를 위해 Ludox를 적용하기 위해서는 사전에 퇴적물 전처리 방법 및 대상생물이 존재하는 수층을 파악하는 사전실험이 반드시 필요하다.

적 요

휴면포자와 같은 남조류의 휴면세포는 남조류의 초기발생 및 대발생의 중요한 씨앗세포이다. 이러한 중요성으로 인해 퇴적층에 존재하는 휴면세포를 분리하기 위해서 다양한 방법들이 시도되었다. Ludox는 해양퇴적물의 세포분리에 주로 활용되는 용액이지만 담수에서는 정확한 사용법을 찾기 어렵다. 본 연구에서는 가장 많이 사용되는 두 가지 Ludox방법(퇴적물 직접처리, 퇴적물 증류수 현탁처리)을 비교하고, 담수 퇴적물에서 남조류 휴면세포의 분리 및 유전자 증폭 효율이 높은 방법을 제안하였다. 퇴적

물에서 발견된 휴면세포는 대부분 염주말목의 휴면포자로서 *Dolichospermum*, *Cylindrospermum*, *Aphanizomenon*의 휴면포자 형태와 유사하였다. 퇴적물을 증류수에 현탁하여 처리한 시료보다 퇴적물 그대로 사용한 시료에서 20배 더 많은 휴면포자가 발견되었으며 증류수로 현탁된 퇴적물에서는 분리되지 않은 세포가 대부분 pellet 퇴적물 표층에서 발견되었다. Ludox를 통해 층 분리된 휴면포자는 수층의 특정 깊이에서 밀집하기보다는 주로 상층과 하층에 넓게 퍼져있었다. 퇴적물을 그대로 사용한 시료에서 *mibC*, *Geo*, *16S rDNA* 유전자 모두 증폭산물이 확인되었으나 퇴적물을 증류수로 현탁한 시료에서는 모든 유전자의 증폭산물이 발견되지 않았다. 따라서 담수 퇴적물에서 남조류의 휴면세포를 분리하는 경우에는 5~10 g의 퇴적물을 전처리 없이 그대로 사용하며, 퇴적물량 4배 부피의 Ludox를 첨가할 때 세포 분리 및 유전자 증폭 효율이 높았다. 본 연구에서 제시하는 Ludox 처리방법은 담수퇴적층에 존재하는 남조류 휴면세포를 분리하기 위한 방법으로써 다른 생물군에서는 동일한 효율이 나타나지 않을 수 있다. 따라서 다른 생물군의 분리에 Ludox를 적용하기 위해서는 퇴적물 전처리 방법 및 대상생물이 존재하는 수층을 파악하는 사전실험이 반드시 필요하다.

저자정보 김건희(건국대학교 상허생명과학대학 휴먼앤에코케어센터 학술연구교수), 유경은(건국대학교 상허생명과학대학 환경보건과학과 석사과정), 호혜인(건국대학교 상허생명과학대학 환경보건과학과 석사과정), 박채홍(건국대학교 상허생명과학대학 휴먼앤에코케어센터 학술연구교수), 김현진(주식회사 평화엔지니어링 수석연구원), 황순진(건국대학교 상허생명과학대학 환경보건과학과 교수)

저자기여도 개념설정: 김건희, 황순진, 방법론: 김건희, 유경은, 호혜인, 자료제공: 박채홍, 유경은, 호혜인, 원고초안 작성: 김건희, 원고검토: 박채홍, 황순진, 과제관리: 황순진, 김현진, 연구비 수주: 황순진, 김현진

이해관계 이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

연구비 본 연구는 한국환경산업기술원의 '수생태계 건강성 확보 기술개발사업'인 '최첨단 위치기반 USBL ROV 로봇을 탑재한 휴면포자 함유 퇴적물 준설 기술 개발' 과제에 의해 수행되었습니다(2022003040003).

REFERENCES

Baker, P.D. and D. Bellifemine. 2000. Environmental influences on akinete germination of *Anabaena circinalis* and implications for management of cyanobacterial blooms. *Hydrobio-*

- logia* **427**: 65-73.
- Bergaya, F. and G. Lagaly. 2013. Handbook of clay science, Newnes.
- Bolch, C. 1997. The use of sodium polytungstate for the separation and concentration of living dinoflagellate cysts from marine sediments. *Phycologia* **36**(6): 472-478.
- Briski, E., S.A. Bailey and H.J. MacIsaac. 2013. Separation strategies for invertebrate dormant stages contained in sediment. *Aquatic Biology* **18**(3): 209-215.
- Burgess, R. 2001. An improved protocol for separating meiofauna from sediments using colloidal silica sols. *Marine Ecology Progress Series* **214**: 161-165.
- De Jonge, V. and L. Bouwman. 1977. A simple density separation technique for quantitative isolation of meiobenthos using the colloidal silica Ludox-TM. *Marine Biology* **42**: 143-148.
- Dong, L., T. Zhao, Y. Cui, Z. Li, L. Chen, C. Pang and Y. Wang. 2023. Investigation of sludge disintegration using vortex cavitation circulating fluidised grinding technology. *Journal of Environmental Management* **331**: 117290.
- Du, Y., K. Xu and Y. Lei. 2009. Simultaneous enumeration of diatom, protozoa and meiobenthos from marine sediments using Ludox-QPS method. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* **27**(4): 775.
- Goldberg, S. 2008. Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization, 2D PAGE: Sample preparation and fractionation, 3-22.
- Ichinomiya, M., M. Nakamachi and A. Taniguchi. 2004. A practical method for enumerating cysts of ciliates in natural marine sediments. *Aquatic Microbial Ecology* **37**(3): 305-310.
- Jun, J. 1993. Illustration of Korea freshwater phytoplankton, Academy.
- Kang, Y.-J., C.-H. Moon and H.-J. Cho. 2008. Comparison of panning and sodium polytungstate methods for separating dinoflagellate cysts. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **41**(3): 228-231.
- Kaplan-Levy, R.N., O. Hadas, M.L. Summers, J. Rucker and A. Sukenik. 2010. Akinetes: dormant cells of cyanobacteria. Dormancy and Resistance in Harsh Environments 5-27.
- Kim, K., Y. Yoon, H. Cho and S.-J. Hwang. 2020. Molecular probes to evaluate the synthesis and production potential of an odorous compound (2-methylisoborneol) in cyanobacteria. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**(6): 1933.
- Kim, Y.-J., S.-J. Youn, H.-N. Kim, E.-R. Park, M.-Y. Hwang, J.-R. Park, B.-C. Lee and J.-K. Lee. 2014. Formation of Phytoplankton Community and Occurrences of Odorous Compounds by Sediment Incubation. *Journal of Korean Society on Water Environment* **30**(6): 658-664.
- Landman, J., E. Paineau, P. Davidson, I. Bihannic, L.J. Michot, A.-M. Philippe, A.V. Petukhov and H.N. Lekkerkerker. 2014. Effects of added silica nanoparticles on the nematic liquid crystal phase formation in beidellite suspensions. *The Journal of Physical Chemistry B* **118**(18): 4913-4919.
- Legrand, B., A. Lamarque, M. Sabart and D. Latour. 2017. Benthic archives reveal recurrence and dominance of toxigenic cyanobacteria in a eutrophic lake over the last 220 years. *Toxins* **9**(9): 271.
- Li, R., M. Watanabe and M.M. Watanabe. 2000. Taxonomic studies of planktic species of *Anabaena* based on morphological characteristics in cultured strains. *Hydrobiologia* **438**: 117-138.
- Matsuoka, K. and Y. Fukuyo. 2000. Technical guide for modern dinoflagellate cyst study, WESTPAC-HAB. Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan, 47.
- Minamoto, T., M. Miya, T. Sado, S. Seino, H. Doi, M. Kondoh, K. Nakamura, T. Takahara, S. Yamamoto and H. Yamanaka. 2021. An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA* **3**(1): 8-13.
- Nübel, U., F. Garcia-Pichel and G. Muyzer. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8): 3327-3332.
- Neilan, B.A., E. Dittmann, L. Rouhiainen, R.A. Bass, V. Schaub, K. Sivonen and T. Börner. 1999. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* **181**(13): 4089-4097.
- Oxford, E.-D. 1989. Oxford english dictionary, Simpson, Ja & Weiner, Esc, 3.
- Park, C. 2018. Study on the Akinete Life Cycle and Vegetative Cell Dynamics in a Harmful Cyanobacterium, *Dolichospermum circinale* (Nostocales), Konkuk University, Konkuk University.
- Park, J.-G. 2012a. Algal Flora of Korea-Freshwater cyanobacteria (I), Ministry of Environment, National Institute of Biological Resource.
- Park, J.-G. 2012b. Algal Flora of Korea-Freshwater cyanobacteria (II), Ministry of Environment, National Institute of Biological Resource.
- Schwinghamer, P. 1981. Extraction of living meiofauna from marine sediments by centrifugation in a silica sol-Sorbitol mixture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **38**(4): 476-478.
- Ståhl-Delbanco, A. and L.-A. Hansson. 2002. Effects of bioturbation on recruitment of algal cells from the "seed bank" of lake sediments. *Limnology and Oceanography* **47**(6): 1836-1843.
- Suikkanen, S., H. Kaartokallio, S. Hällfors, M. Huttunen and M. Laamanen. 2010. Life cycle strategies of bloom-forming, filamentous cyanobacteria in the Baltic Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **57**(3-4): 199-209.
- Sukenik, A., J. Beardall and O. Hadas. 2007. Photosynthetic characterization of developing and mature akinetes of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanoprokaryota) I. *Journal of*

- Phycology* **43**(4): 780-788.
- Sukenik, A., J. Rücker and I. Maldener. 2019. Dormant cells (akinetes) of filamentous cyanobacteria demonstrate a great variability in morphology, physiology, and ecological function, Academic Press.
- Thiel, T. and C.P. Wolk. 1983. Metabolic activities of isolated akinetes of the cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme*. *Journal of Bacteriology* **156**(1): 369-374.
- Tsao, H.-W., A. Michinaka, H.-K. Yen, S. Giglio, P. Hobson, P. Monis and T.-F. Lin. 2014. Monitoring of geosmin producing *Anabaena circinalis* using quantitative PCR. *Water Research* **49**: 416-425.
- Wood, S.M., A. Kremp, H. Savela, S. Akter, V.-P. Varti, S. Saarni and S. Suikkanen. 2021. Cyanobacterial Akinete Distribution, Viability, and Cyanotoxin Records in Sediment Archives From the Northern Baltic Sea. *Frontiers in Microbiology* **12**: 681881.
- Xu, K., Y. Du, Y. Lei and R. Dai. 2010. A practical method of Ludox density gradient centrifugation combined with protargol staining for extracting and estimating ciliates in marine sediments. *European Journal of Protistology* **46**(4): 263-270.
- Yamamoto, Y. and H. Nakahara. 2009. Life cycle of cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Taiwania* **54**(2): 113-117.
- Zhao, F., K. Xu and Y. He. 2012. Application of the Ludox-QPS method for estimating ciliate diversity in soil and comparison with direct count and DNA fingerprinting. *European Journal of Soil Biology* **49**: 112-118.