

유기농업 생태계로부터 담수 녹조류 분리 및 형태적 동정*

김민정*** · 심창기*** · 김용기** · 홍성준*** · 박종호*** ·
한은정*** · 지형진*** · 윤종철**** · 김석철***

Isolation and Morphological Identification of Fresh Water Green Algae from Organic Farming Habitats in Korea

Kim, Min-Jeong · Shim, Chang-Ki · Kim, Yong-Ki · Hong, Sung-Jun · Park, Jong-Ho ·
Han, Eun-Jung · Jee, Hyeong-Jin · Yun, Jong-Chul · Kim, Suk-Chul

This study aimed to isolate and identify freshwater algae from the organic agricultural ecosystems and investigate its biological characteristics to study the possibility of utilizing a biomass freshwater algae in organic farming. In the survey area, average water temperature was 12.4~28.2°C and the pH ranges were from 6.1 to 8.5. The solid culture method is more suitable than liquid culture method for isolation of freshwater algae with lower contamination level and higher isolation frequency. A total of 115 strains were isolated from six freshwater algae habitats in nine regions in Korea. BGMM (BG11 Modified Medium) amended with NaNO₃ and KNO₃ as a nitrogen, and Na₂CO₃ as carbon source was designed to isolate and culture freshwater algae. Absorbance of freshwater algae culture has increased dramatically to four days and decreased after eight days after inoculation. CHK008 of the seven isolates showed the highest absorbance in seven days after culturing in BGMM. The optimal pH of BGMM for culturing freshwater algae was pH 6-7. As light intensity increased, growth of freshwater algae increased. Among the five kinds of carbon sources, glucose and galactose promoted good growth of freshwater algae in BGMM. The colony color of purified 16 green algae isolates showed a separation of green, dark and light green, and of them, eleven algae strains showed a strong fluorescent light under fluorescence microscopy. Cell size of the green algae showed a wide range of variation depending on the species.

* 본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ00912701)의 연구비지원에 의해 수행되었다.

** Corresponding author, 농촌진흥청 국립농업과학원 유기농업과(yongki@korea.kr)

*** 농촌진흥청 국립농업과학원 유기농업과

**** 농촌진흥청 국립농업과학원 기획조정과

General morphology of the green algae strains was spherical. *Chlamydomonas* sp. was elliptical, and *Chlorella sorokiniana* was ellipsoidal and cylindrical. All strains of the green algae except for *Chlamydomonas* sp. did not have flagella. One isolate of *Chlamydomonas* sp. and five isolates of *C. sorokiniana* secreted mucus. Sixteen isolates of 16 green algae were identified as two family and six species, *Chlorella vulgaris*, *C. sorokiniana*, *C. pyrenoidosa*, *C. kessleri*, *C. emersonii*, and *Chlamydomonas* sp. based on their morphological characteristics.

Key words : freshwater, green algae, culture, organic farming habitats

I. 서 론

클로렐라(*Chlorella*)는 담수, 해수, 공기, 토양 등 다양한 생태계에서 생존하며, 엽록소(Chlorophyll)가 있어 햇빛으로부터 광합성에 필요한 에너지를 얻고 이산화탄소와 같은 무기물로부터 탄소원을 얻어 독립적으로 생장이 가능한 생물이다(Gabriel, 1996; Ichimi et al., 2003).

녹조류인 클로렐라는 형태적으로 직경 10 μm 이하의 구형의 단세포 조류로 현미경을 통해 관찰할 수 있다. 클로렐라 세포내에 엽록 색소인 Chlorophyll a, b를 다량 함유하고 있어 광합성을 통해 독립적으로 생활할 수 있으며, 무성생식을 하기 때문에 증식속도가 빨라 체내에 2개 이상의 낭세포(daughter cell)를 생성하고 매 10~30시간에 1회씩 4개의 낭세포로 분열할 수 있어 1일 4~16배로 증식할 수 있다(Takeda, 1991; Benson, 2002).

클로렐라는 오래전부터 가장 많이 연구된 녹조류중의 하나이며(Lee and Lee, 1970; Huss et al., 1999), Warburg(1919)에 의해 클로렐라의 대량배양기술이 소개된 이후로 광합성이나 질산염환원과 같은 식물의 생리적, 생화학적 연구를 위한 모델생물로서 다루어졌다(Green, 2011; Höxteman, 2007; Kärin, 2009; Zallen, 1993). 제1차 세계대전 때 독일에서 시작된 클로렐라의 대량배양 연구는 전후 미국 카네기연구소를 거쳐, 1951년 일본 도쿠가와 생물학연구소의 Tamiya et al.(1953)에 의해 클로렐라의 대량배양법이 더 발전되었다.

대부분의 클로렐라 종(species)은 생태계에서 광합성에 의해 독립적으로 생활할 수 있으나, 반독립영양, 종속영양 등 다양한 방식으로 생육이 가능하다. *C. variabilis* NC64A 균주(strain)는 단세포 원생동물(protozoa)인 *Paramecium bursaria*와 광합성에 의한 내생공생균(photosynthetic endosymbiont)으로 알려져 있으며(Karakashian and Kaekashian, 1965), 질소고정능력과 식물생육촉진능력을 가진 *Bacillus pumilus*에 의해서 *C. vulgaris*의 생육이 촉진된다는 보고도 있다(Hernandez et al., 2009). 또한, 클로렐라(*C. vulgaris*)와 길항미생물인 *Serratia proteamaculans*나 *Stenotrophomonas maltophilia*와 혼합하고 캡슐화하여 토양개량제로 레드클로버의 근권에 처리하였을 때 식물근권 미생물과 상호작용하여 뿌리와 지상부 신장을 증

진한다고 보고하였다(Raposo and De. Morais, 2011).

클로렐라 균체나 세포추출물(*Chlorella growth factor*)의 농업적 활용사례(Faheed and Abd-El Fattah, 2008; Hiroto et al., 1996; Ördög et al., 2004)는 적으나, 다른 식물에 비해 증식속도가 빠르고 조단백질 함량이 50% 이상으로 완전식품에 가까워 미래의 단백질 식량원으로서 그 가치를 인정받아 건강보조식품으로 이용되어졌다(DOE, 2010; Geoghegan, 1951; Kang et al., 2004; Krauss, 1962; Mahmoud, 2001).

본 실험은 클로렐라 추출물이 유기농 허용자재로 등록되어 있어 클로렐라도 작물생육 및 식물병 관리용 생물자원으로서 담수 클로렐라의 활용 가능성을 연구하고자 유기농 재배 논, 농수로, 하천 및 연못 등으로부터 분리하여 생물학적인 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 분리 및 배양배지

본 연구에 사용된 미세조류는 2011년부터 5월부터 2012년 8월까지 경남 하동군, 충남 서산시, 경남 산청군, 경기도 수원시 등 전국 9개 지역의 유기농 벼재배 논, 농수로, 연못, 등의 서식처로부터 수집하여 분리하였다(Table 1). 또한 담수 녹조류의 생태적 특성을 파악하고자 수집 장소의 수온(°C)과 pH를 조사하였다.

담수 녹조류 균주 배양에 적합한 배지조성을 찾고자 Table 2와 같이 기본적인 녹조류 배양 배지 중 질소원과 탄소원의 비율과 미량원소의 함량을 고려하여 Bold's Basal배지(Tompson et al., 1988)와 BG11배지(Andersen, 2005; Stanier et al., 1971)의 조성을 변형한 BGMM배지(BG11 Modified Medium)를 고안하여 배지종류별 담수 녹조류의 생육을 비교하였다.

수집한 담수 녹조류는 Cha et al.(2008)의 방법을 변형하여 다음과 같은 순서에 의해 순수 분리하였다. 전국 9개 지역의 수집지에서 25 mesh 망이 장착된 수집 병으로 200 mL의 물을 채취한 다음 휴대용 냉장고에 저온 저장하여 실험실로 운반하였다. 채집한 물을 50 mL 원심분리튜브에 옮겨, 냉동원심분리기로 4°C, 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 담수 녹조류 농축 후, 950 µl의 BGMM 액체배지(Ampicillin 50 µg/l, Chloramphenicol 100 µg/l)를 넣은 24-well cell culture plate에 50 µl의 담수 녹조류 침전물을 접종하였다. 그 후 진탕배양기(VS-8480SRN, Vision Scientific Co., Korea)에서 1,500 Lux 밝기의 빛을 조사하여 28°C에서 7일간 150 rpm 속도로 진탕배양 하였다. 또한 BGMM고체배지(Ampicillin 50 µg/l, Chloramphenicol 100 µg/l)에는 세균접종용 loop에 담수 녹조류를 농축액을 묻혀 각 채집 장소마다 5 plates씩 삼분도말(Streak plate method)하여 접종 후, Illuminated incubator(FLI-2000T, EYELA, Japan)에서 2,500 Lux 밝기의 빛을 조사하여 28°C에서 7일간 배양하여 녹색의 균총

이 형성되는 정도와 배양 중 다른 미생물에 의한 오염정도를 조사하였다.

Table 1. Isolation of micro algae isolated from the six habitats in 9 regions in Korea

Habitat	Region	Water temperature(°C)	pH	No. of isolates
Irrigation water	Seosan, Suwon, Jeonju, Nonsan, Gongju	19.5~21.7	6.1~7.9	15
Organic rice paddy water	Seosan, Suwon, Gurye, Nonsan, Gongju	22.2~25.4	6.8~8.2	25
Reservoir	Seosan, Suwon, Hwaseong	20.6~26.2	6.4~8.5	30
Pond	Seosan, Akang, Suwon	25.2~28.2	6.9~8.1	35
River	Seosan, Akyang, Jeonju, Gurye, Nonsan, Gongju	18.9~22.5	6.7~8.1	10
Underground water	Gurye, Danyang, Akyang	12.4~13.5	6.2~8.5	0
Total	9	12.4~28.2	6.1~8.5	115

Table 2. Composition of different culture media used for the growth of freshwater microalgae

Reagent	BGMM ^a (This study)	BG11 medium (Rippka et al., 1979)	Bold's basal medium (Thompson et al., 1988)
Macro media (g/1000 mL)			
NaNO ₃	10.00	15.00	25.00
KNO ₃	15.00	-	-
NaCl	-	-	2.50
K ₂ HPO ₄	-	4.00	7.50
KH ₂ PO ₄	12.00	-	17.50
Na ₂ HPO ₄	5.50	-	-
Na ₂ CO ₃	2.00	2.00	-
Trace metal solution (g/100 mL)			
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	6.38	2.22	0.882
MnCl ₂ · 4H ₂ O	-	1.81	0.044
MnSO ₄ · H ₂ O	1.44	-	-
MoO ₃	-	-	0.071
(NH ₄) ₆ Mo ₇ · 7H ₂ O	0.71	3.00	-
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57	0.79	0.157
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.85	0.49	0.94
H ₃ BO ₃	10.00	2.86	1.142

Reagent	BGMM ^a (This study)	BG11 medium (Rippka et al., 1979)	Bold's basal medium (Thompson et al., 1988)
Fe solution (g/100 mL)			
FeSO ₄ · 7H ₂ O	50.00	-	0.498
Conc. H ₂ SO ₄	1 mL	-	0.1 mL
Citric acid	-	6.00	-
EDTA solution (g/100 mL)			
EDTA-Na ₂	5.00	0.10	5.00
KOH	3.50	-	3.10
Magnesium solution (g/100 mL)			
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.50	7.50	7.50
MgCl ₂	-	-	-
Calcium solution (g/100 mL)			
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.75	-	2.50
Vitamin Solution (g/100 mL)			
Thiamine	0.15	-	-
Vitamin B ₁₂	0.15	-	-
Working Solution (mL/1000 mL)			
Macro media	10 ml	Vitamin Solution	1 ml
Trace metal Solution	1 ml	Mg solution	10 ml
Fe Solution	1 ml	Ca solution	10 ml
EDTA Solution	1 ml	Distilled water	966 ml

^a BGMM : BG11 modified media

2. 담수 녹조류 최적 배양조건 구명

순수 분리한 담수 녹조류 균주의 최적 배양조건을 찾고자, 전국에서 채집하여 분리한 115균주 중 순수하게 단일 세포로 분리된 7개 균주를 선발하여 70 ml T-플라스크에 30 mL의 액상 BGMM배지(50 µg/l Ampicillin, 100 µg/l Chloramphenicol)를 기본 배지로 하여 여기에 5종류의 당류(Glucose, Galactose, Fructose, Maltose, Sucrose)를 탄소원으로 1%씩 첨가한 배지에 담수 녹조류의 균주를 접종하고 7일간 배양하면서 조사하는 빛의 세기(암조건, 2,500 Lux, 5,000 Lux)에 따른 담수 녹조류의 생육 정도를 비교하였다. 또한 BGMM배지의 pH변화에 따른 담수 녹조류의 생육변화를 조사하고자 BGMM배지의 pH를 0.1N NaOH와 0.1N HCl을 이용하여 pH 4~8로 조정된 배지에 접종하여 배양한 후, UV-VIS 분광광도계

(UV-VIS Spectrophotometer 1201, Shimadzu, Japan)를 이용하여 600 nm 파장에서 흡광도 (Optical Density, OD)를 측정하였다. 또한 광학현미경에서 혈구계(Hemocytometer, Hausser Scientific CO. Ltd., U.S.A.)를 이용하여 실측한 클로렐라의 세포수와 분광광도계를 이용하여 측정한 클로렐라의 흡광도를 비교하여 1 OD값에 대한 클로렐라의 세포수로 환산하여 클로렐라의 농도로 추정하였다.

3. 클로렐라 균주의 형태적 동정

전국에서 분리한 115개의 분리 균주 중 순수 배양 한 분리균주 16 균주의 단일 클론을 BGMM고체배지에 재접종하여 7일간 배양 후, 균총(colony)의 색깔을 조사하였다. 또한 형광-광학현미경(Eclipse Ci-S, Nikon, Japan)과 이미지분석 프로그램(i-Solution, Image & Microscope Technology, Korea)을 이용하여 순수 분리한 균주들의 세포의 크기, autofluorescence 발현 정도(-, 없음; +, 약함; ++, 보통; +++, 강함; +++++, 아주 강함), 세포의 편모 (Flagella)와 점질물(Mucilage) 형성 유무를 조사하였다. 광학현미경에서 형광모드를 사용할 경우 510 nm의 형광 filter를 사용하였다.

4. 통계 처리

수집된 자료의 정리와 통계처리는 MS-EXCEL 2010과 SAS (version 8.0)를 이용하였으며, 처리평균간 비교는 DUNCAN 다중검정을 하여 유의확률 $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 인정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 미세조류 균주의 분리

클로렐라의 농업적 활용연구를 위하여 조류를 채취한 전국 9개 유기농 재배지역에서 사용되고 있는 논물, 관개수, 자연 웅덩이와 연못의 물, 강물, 지하수의 수온과 pH를 각각 조사하였더니, 수온은 12.4°C에서 28.2°C, pH는 pH 6.1에서 pH 8.5까지 분포하는 것으로 나타났다(Table 1).

수집한 샘플을 실험실에서 원심 분리하여 농축 후, 미세조류를 항생제를 첨가한 BGMM 액체배양배지와 고체배양배지에서 각각 분리한 결과, Fig. 1과 같이 액체배지를 사용하여 분리하였을 때 다른 세균이나 곰팡이에 의해 오염되어 미세조류만을 분리하는 것이 어려

웠으나 고체배지를 이용하여 일반 세균분리법과 같이 삼분 도말하여 미세조류를 분리할 경우 동일하게 항생제를 첨가하였지만 다른 미생물에 의한 오염정도가 낮았으며, 초록색의 미세조류 균총의 분리정도가 높았다.

본 연구에서는 전국 9개 지역, 6개 담수 녹조류 서식처로부터 총 115개 균주를 분리하여 보관균주를 만들었다(Fig. 1, C). 서식처별로 미세조류 분리 균주수를 비교해보면 연못(35개), 웅덩(30개), 논물(25개), 관개수(15개), 강물(10개) 순으로 많이 분리되었으나 구레, 담양, 악양에서 채집한 지하수에서는 전혀 분리되지 않았다(Table 1).

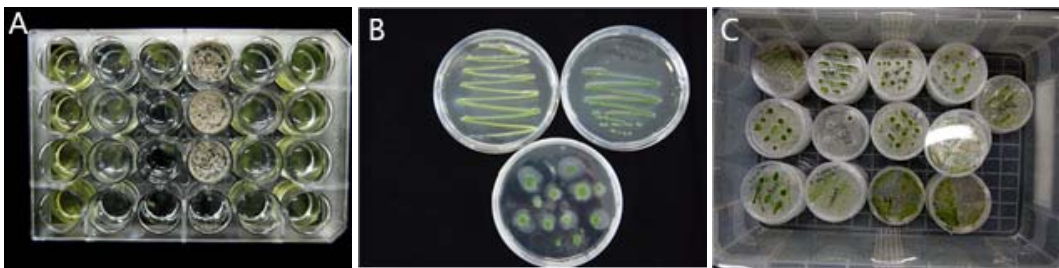


Fig. 1. Isolation (A, B) and conservation (C) of freshwater algae from the six habitats in 9 regions of Korea

Fresh algae were cultured in liquid media(A) and diluted-cultured on agar plate (B) with BGMM medium at 2,500 Lux, 28°C for 7 days in Shaking illuminated incubator with 200rpm or Illuminated incubator.

2. 미세조류 배양조건 탐색

담수 녹조류의 분리 및 배양을 위해 기존에 미세조류 배양용 배지로 많이 사용되고 있는 BG11배지와 Bold's Basal배지의 조성물을 참고하여 질소원으로는 NaNO_3 와 KNO_3 , 탄소원으로는 Na_2CO_3 를 사용하여 BGMM배지를 조제하여 사용하였다. 질소원과 탄소원의 비율은 C/N비율이 1:12.5가 되게 하였으며 기존에 macro media의 구성 성분으로 사용되어오던 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 과 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 macro media에 혼합하여 제조할 경우 배지 내 침전물이 형성되어 담수 녹조류의 배양에 어려움이 있어 macro media 구성 성분으로 부터 각각 분리, 배지를 제조하여 실험에 사용하였다(Table 2).

순수 분리한 담수 녹조류 균주의 최적 배양조건을 찾고자, 전국에서 채집하여 분리한 115균주 중 순수하게 단일 세포만을 보이는 7개 균주를 대상으로 배양일 수에 따른 생육 정도를 조사한 결과 배양 4일째(OD 0.25~0.4)부터 급격히 흡광도가 증가하여 배양 7일에 가장 높은 생장을 보였으며(OD 0.84~1.25), 배양 8일 후에는 흡광도가 감소하는 것으로 나타났다. 또한 실험에 사용한 7개의 담수 녹조류 균주 중 CHK008균주가 배양 7일을 기준으

로 조사하였을 때 가장 높은 흡광도를 보였으며 나머지 6개 균주는 비슷한 흡광도를 나타내었다(Fig. 2).

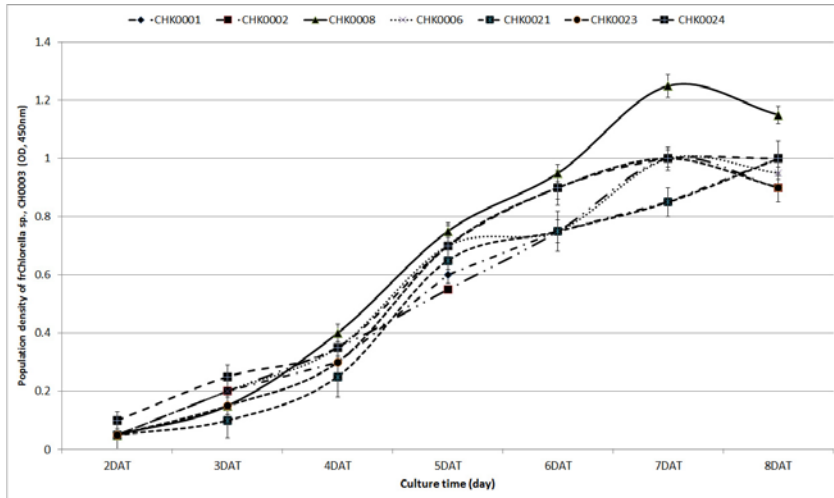


Fig. 2. Growth curve of seven isolates of freshwater algae measured optical density at 600 nm for 8 days after inoculation in BGMM

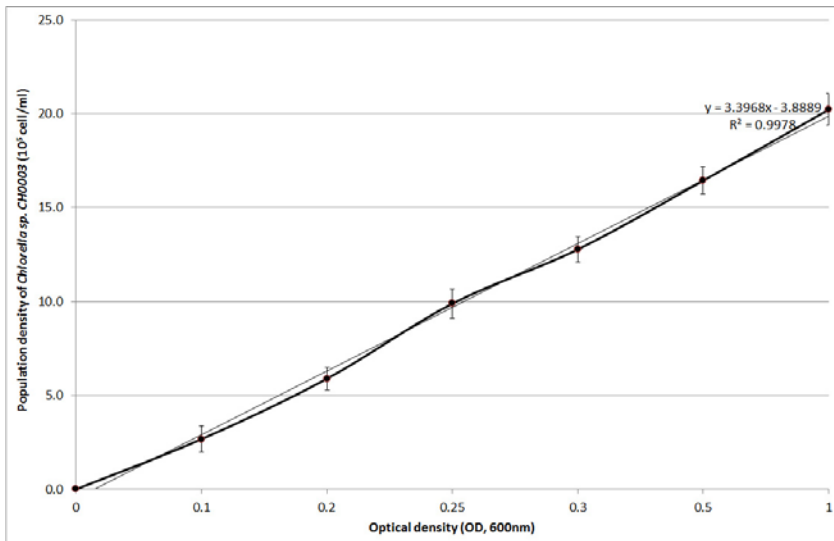


Fig. 3. Estimation of population density of cultured *Chlorella* sp., CH0003 with optical density (OD, 600nm) and cell numbers counted with a hemocytometer

실험에서 사용한 담수 녹조류의 밀도와 생육상태를 파악하고자 UV-VIS 분광광도계(UV-

VIS Spectrophotometer)를 이용하여 600 nm 파장에서 조사하는 흡광도(OD)를 조사하는 한편 광학현미경하에서 혈구계를 이용하여 담수 녹조류의 밀도를 실측하여 흡광도와 실측치 간의 상관계수를 구하고 회귀식을 산출한 결과, 상관계수($R^2 > 0.05$)는 0.9978이었고 산출식은 $y = 3.3968x - 3.8889$ 로 높은 상관성을 보였으며, 담수 녹조류 1단위 OD값은 2.0×10^6 cell/ml 인 것으로 계산되었다(Fig. 3).

BGMM 배지의 pH 변화에 따른 담수 녹조류 균주의 생육변화를 흡광도로 조사하여 비교한 결과, 실험에 사용한 균주(CH0003)는 pH 6(OD 2.75)과 pH 7(2.32)에서 생육이 가장 우수 하였으나 pH 4(OD 0.32)와 pH 8(OD 1.3)에서는 50% 이하의 흡광도를 보이는 것으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Effect of pH levels on the growth of a freshwater algae isolate, CH0003 cultured in BGMM liquid media for 7 days at 28°C under 2,500 Lux

Isolate	pH	Population density of CH0003 isolate (OD, 600nm)						
		1 Day	2 Days	3 Days	4 Days	5 Days	6 Days	7 Days
CH0003	pH4.0	0.40 a	0.40 c	0.50 d	0.51 e	0.52 e	0.51 e	0.32 e
	pH5.0	0.51 a	0.62 b	0.73 c	0.85 d	1.45 c	1.68 c	2.09 c
	pH6.0	0.51 a	0.77 a	1.09 a	1.38 a	2.18 a	2.35 a	2.75 a
	pH7.0	0.52 a	0.78 a	0.88 b	1.29 a	1.85 b	2.07 b	2.32 b
	pH8.0	0.53 a	0.63 b	0.76 c	0.98 c	1.05 d	1.23 d	1.35 d

* Means followed by the same letter within same column are not significantly different ($p < 0.05$).

Table 4. Assessment of the light intensity and carbon sources for the growth of freshwater algae, CH0003 measuring optical density at 600 nm for 7 days after inoculation

Carbon source (1%, w/v)	Optical density (600nm)		
	Darkness	2,500 Lux	5,000 Lux
None	0.00 c	0.02 c	0.18 c
Glucose	0.45 a	0.55 a	0.66 a
Galactose	0.25 b	0.27 b	0.33 b
Fructose	0.00 c	0.04 c	0.14 d
Maltose	0.00 c	0.03 c	0.14 d
Sucrose	0.00 c	0.03 c	0.12 d

* Means followed by the same letter within same column are not significantly different ($p < 0.05$).

당 종류와 빛의 세기(암조건, 2,500 Lux, 5,000 Lux)가 담수 녹조류의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과, 빛의 세기가 강할수록 담수 녹조류의 흡광도가 증가하였으며 5종류 당류 중에서 1% Glucose와 Galactose를 첨가했을 때 담수 녹조류의 생육이 좋은 것으로 나타났다. 암상태에서는 5종류 당류 중에서 1% Glucose와 Galactose에서만 자랐으며 Fructose, Maltose, Sucrose가 첨가된 배지에서는 담수 녹조류가 자라지 않는 것으로 나타났다(Table 4).

3. 미세조류의 형태적 동정

형태적 분류에 사용한 담수 녹조류 16개 균주의 균총 색은 7개는 녹색(green), 5개는 진한 녹색(dark green), 4는 연한녹색(light green)을 나타내었다(Table 5). 또한 형광현미경(510 nm 형광 filter)을 이용하여 각 균주가 나타내는 형광 빛의 강도를 조사한 결과, 16개의 균주 중 11개의 균주가 강한 형광 빛을 나타내었으며 CH001균주가 가장 약한 형광 빛을 나타내었다(Table 5, Fig. 4). 전국에서 분리한 115개의 분리 균주 중 형태적으로 동일한 세포의 형태를 가지는 순수 배양 한 분리균주 16개의 단클론을 형태적인 특징에 의해 동정한 결과 *Chlorella vulgaris*(6균주), *Chlorella sorokiniana*(4균주), *Chlorella pyrenoidosa*(2균주), *Chlorella kessleri*(2균주), *Chlorella emersonii*(1균주), *Chlamydomonas* sp.(1균주)로 2개 속 6개 종으로 구분되었다(Table 5, Fig. 4).

담수 녹조류 16개 균주의 세포 크기는 조사한 균주마다 다양한 변이를 보였으며, *C. vulgaris*의 세포 크기는 4.0~4.6 μm , *Chlamydomonas* sp.(CH0059)와 *C. emersonii*(CH0004)의 세포 크기는 각각 11.5~21.4 μm , 12.4~14.3 μm 이었다. *C. sorokiniana*의 세포 크기는 3.3~4.3 μm , *C. pyrenoidosa*과 *C. kessleri*는 각각 4.0~4.4 μm 과 2.4~8.7 μm 이었다(Table 5). 또한 세포의 외형적인 형태는 대부분 구형(Spherical)이었으나 타원형(ellipsoidal)을 나타내는 균주도 있었다. *Chlamydomonas* sp. CH0059 균주는 타원형이었으며 *C. sorokiniana* CH0018균주는 구형과 타원형이 섞여 있었다.

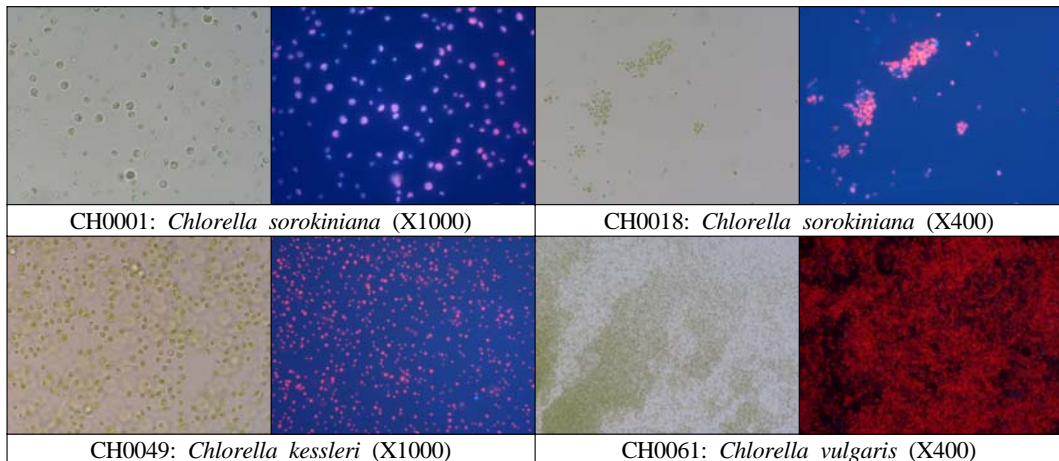
담수 녹조류 16개 균주의 편모 부착 유무와 점질물 형성을 조사하였더니 *Chlamydomonas* sp. CH0059 균주를 제외하고 모든 *Chlorella* 균주는 편모를 가지지 않는 것으로 관찰되었다. 또한 16개 균주 중 대부분의 균주가 점질물을 분비하지 않는 것으로 관찰되었으나 *Chlamydomonas* sp. CH0059와 *C. sorokiniana* CH0001, CH0018, CH0063, CH0002 5개 균주가 세포로부터 점질물을 분비하는 것으로 관찰되었다(Table 5, Fig. 3).

Table 5. Morphological characteristics of 16 strains of freshwater algae isolated from six habitats in nine regions in Korea

Isolate	Species	Colony color	Auto fluorescence ^a	Cell		Flagella ^b	Musilage ^c
				Radius(μm)	Shape		
CH0001	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Green	+	3.4~3.6	Spherical	-	+
CH0002	<i>Chlorella vulgaris</i>	Green	++++	4.3~4.6	Spherical	-	-
CH0004	<i>Chlorella emersonii</i>	Green	++++	12.4~14.3	Spherical	-	-
CH0016	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Green	++	4.1~4.4	Spherical	-	-
CH0018	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Green	++	4.2~4.3	Ellipsoidal / cylindrical	-	+
CH0019	<i>Chlorella vulgaris</i>	Dark geen	++++	4.2~4.5	Spherical	-	-
CH0040	<i>Chlorella kessleri</i>	Light green	++++	2.4~8.7	Spherical	-	-
CH0045	<i>Chlorella vulgaris</i>	Light green	++++	4.0~4.1	Spherical	-	-
CH0049	<i>Chlorella kessleri</i>	Light green	++++	2.4~8.6	Spherical	-	-
CH0050	<i>Chlorella vulgaris</i>	Dark geen	++++	4.2~4.5	Spherical	-	-
CH0053	<i>Chlorella vulgaris</i>	Dark geen	++++	5.2~5.4	Spherical	-	-
CH0059	<i>Chlamydomonas</i> sp.	Green	++	11.5~21.4	Ellipsoidal	+	+
CH0061	<i>Chlorella vulgaris</i>	Dark geen	++++	4.0~4.1	Spherical	-	-
CH0063	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Green	++	4.3~4.5	Spherical	-	+
CHK002	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Light green	++++	3.3~3.5	Spherical	-	+
CHK006	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Dark geen	++++	4.0~4.4	Spherical	-	-

^a autofluorescence intensity : -, none; +, weak; ++normal; +++, strong; +++++, very strong.

^b Flagella: -, none flagella; +, flagella. ^c Musilage : -, none musilage; +, musilage.



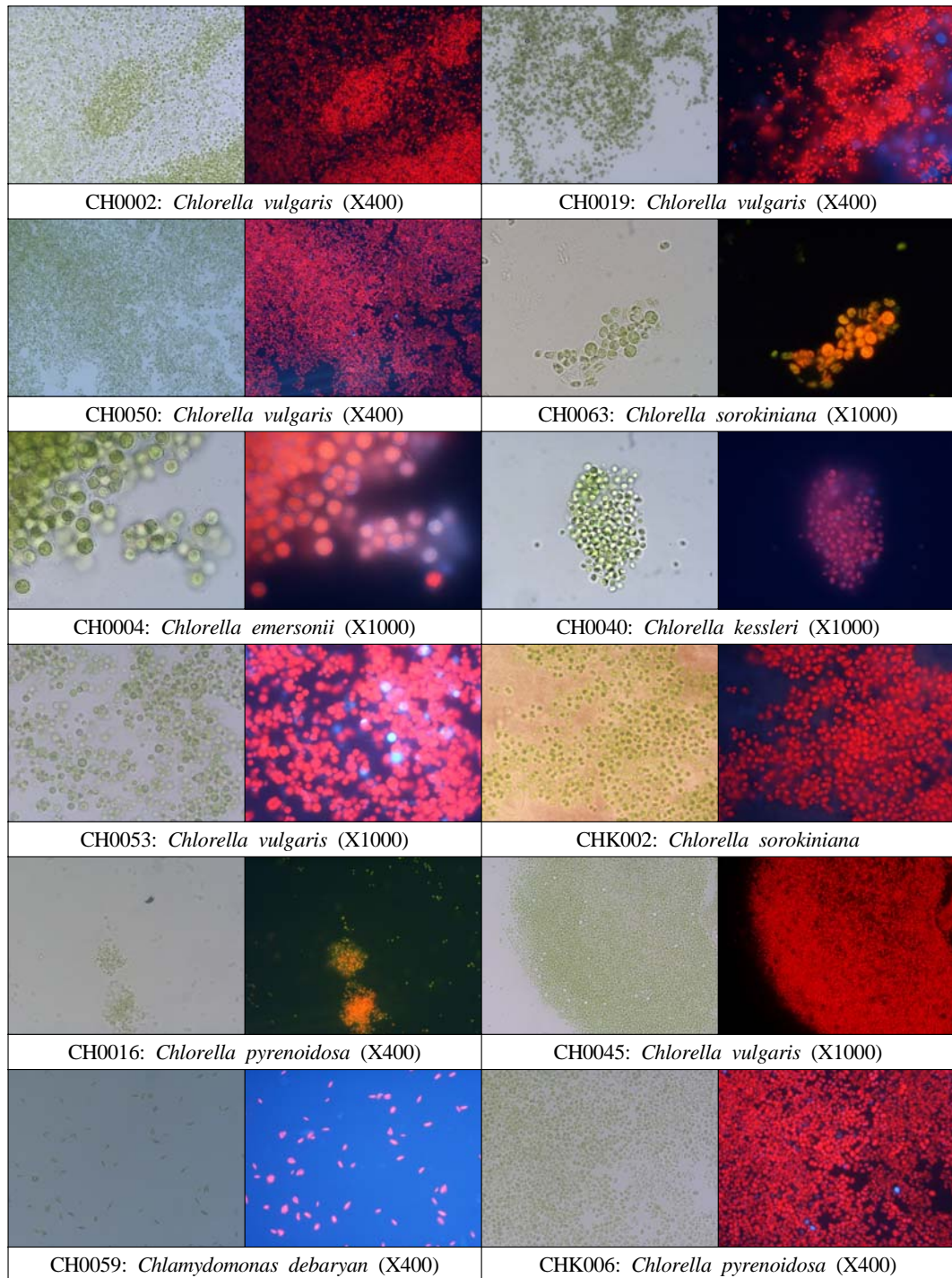


Fig. 4. Comparison of transmission and autofluorescence images of unstained cells (left) of 16 freshwater algae isolates in bright-field and fluorescence modes (right) with 510 nm long-pass filter

IV. 고 찰

미세조류는 고부가가치 소재로 건강식품, 사료, 비료, 연료 등의 생물 공학적 연구개발 소재로서 상업용으로 다양하게 활용하고 있다(Choi, 2004). 최근에는 생물학적 환경정화를 위해 미세조류를 이용한 친환경적인 수질 및 대기오염원 제거기술을 개발하고 있다(Jeon et al., 2008). 국내외적으로 클로렐라의 농업적 활용에 관한 연구는 매우 드물지만, Stirk et al. (2002)은 클로렐라를 포함한 미세조류에는 남조식물에 흔히 존재하는 사이토키닌(Cytokinin) 이나 옥옥신(auxin)과 같은 식물생장촉진호르몬과 유사한 역할을 하는 물질이 있음을 보고하여 클로렐라의 농업적 활용 가능성을 제시하였다.

Vonshak(1986)는 담수 녹조류의 배지 조성은 해당 조류가 분리된 서식지의 환경을 응용하여 화학적인 분석을 통하여 결정하는 것이 일반적이라 보고한 바 있다.

미세조류를 연구하기 시작한 초창기에 Allen(1966)은 녹조류인 *Anacystis nidulans*를 표준 도말법(standard plating method)을 이용하여 성공적으로 단세포 균주를 분리하는 기술을 소개하였다. 국내에서는 Cha et al.(2008)이 클로렐라의 영양학적인 기초자료를 얻고자 경남 김해시의 (주)클만상의 클로렐라 옥외 배양장으로부터 1.5% agar를 첨가한 고체배지에 클로렐라 배양액을 도말하여 colony가 육안으로 보일 때까지 배양하여 형태가 우수하고 생육이 빠른 colony만을 순수 분리할 수 있다고 보고하였다. 또한

선진 외국의 많은 그룹에서는 녹조류 중 산업적으로 이용가치가 높은 클로렐라에 대한 효율적인 배양을 위해 배지성분에 대한 많은 연구를 진행하였다. 기본적으로 질소원의 종류와 질소원과 인산의 비율이 클로렐라의 생체중(biomass)과 클로로필(a, b) 함량을 결정짓는 주요 요인으로 보고하였다(Jeanfils et al., 1993; Huang et al., 1994).

본 연구에서는 원활한 담수 녹조류의 분리 및 배양을 위해 질소원으로는 NaNO_3 와 KNO_3 를 사용하고 탄소원으로는 Na_2CO_3 를 사용하며 기존의 macro media의 구성 성분으로부터 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 과 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 분리한 BGMM배지를 개발하였다.

녹조류의 생장에 필요한 주요 인자로 탄소원과 질소원을 들 수 있으며 그 외에 P, K, Mg, Ca, S, Fe, Cu, Mn, Zn 등의 무기염류도 필요한 것으로 보고되었다(Oh-Hama and Miyachi, 1998). 또한 클로렐라의 배양조건 중에서 개방형 배양기를 이용할 경우 태양광이 가장 일반적인 광원이며 밀폐형 배양기를 이용할 경우 형광등이 광원으로 가장 많이 이용되고 있는 것으로 보고되었다(Mata et al., 2010). 또한 빛의 파장에 따른 *Chlorella* sp. FC-21의 배양특성을 연구한 결과 적색파장이 가장 적합한 것으로 보고하였다(Lee et al., 2011).

조류는 해양에서 생육하는 해양조류와 담수에서 생육하는 담수조류로 나뉘며 형태학적으로 크기에 따라 육안으로 관찰이 가능한 미역, 김 등의 거대조류와 현미경으로 관찰되는 *Chlorella*, *Spirulina* 등의 미세조류로 구분하고 있다(Kanetsuna, 2002). 또한 담수녹조류 중 클로렐라의 크기는 직경 2~10 μm 정도이며 형태적으로 단세포의 구형인 것으로 보고되었

다(Takeda, 1991; Cho, 2004). 본 연구에서 분리한 16개의 담수 녹조류의 세포 크기는 균주마다 다양한 변이를 보였는데, *C. emersonii* CH0004(12.4~14.3 μm)를 제외한 대부분의 *Chlorella* 종의 세포 크기는 2.4~8.7 μm 이었으며 *Chlamydomonas* sp.(CH0059) 종의 세포 크기는 11.5~21.4 μm 로 큰 편이었다.

Shihira and Krauss(1965)는 클로렐라 분리균주에 대한 생리적 특성과 형태적인 특성에 따라 41개로 분류하여 보고하였다. 그러나 클로렐라는 형태적으로 매우 유사하며 자라는 환경이나 이용하는 양분에 따라 형태적인 변이가 심하기 때문에 전통적인 분류방법이나 분자생물학적인 분류방법으로 동정하기가 어렵다(Fott and Novakova, 1969; Wu et al., 2001). 클로렐라를 포함한 녹조류는 약 8,000종 이상인 것으로 보고되고 있으며 미세조류는 클로로필(Chlorophyll)의 종류에 따라 6개의 강으로 나누어진다고 보고되었다(Sheehan et al., 1998; Jin et al., 2008).

본 연구에서 전국에서 분리한 115개의 담수 녹조류 균주 중 형태적으로 동일한 16개 분리균주의 형태적인 특징을 조사하였을 때, *C. vulgaris*(6균주), *C. sorokiniana*(4균주), *C. pyrenoidosa*(2균주), *C. kessleri*(2균주), *C. emersonii*(1균주), *Chlamydomonas* sp.(1균주)로 2개 속, 6개종으로 동정할 수 있었다.

Stanier et al.(1971)는 녹조류인 *Chroococcales*의 단세포 균주가 가지는 세포의 형태학적인 분류법을 정립하여 크게 3개의 그룹으로 분류할 수 있다고 보고하였다. 또한 Lin et al. (2013)은 중부대만의 농경지로부터 토양에 존재하는 조류를 분리하여 광학현미경과 전자현미경을 통한 형태학적인 분류법과 rDNA 분석을 통해 64개 균주가 33개 속에 속한다고 보고하였다. 본 연구에서는 담수 녹조류의 형태적인 특징만으로 동정하였지만, 추후에 보다 정확한 균주 동정을 위해서는 16S rDNA나 18S rDNA 염기서열분석과 같은 분자생물학적인 기법을 활용할 필요가 있을 것으로 사료된다.

V. 적 요

본 연구는 유기농업에서 생물자원으로서 담수 클로렐라의 활용 가능성을 연구하고자 유기농 생태계로부터 담수 녹조류를 분리, 동정하고, 생물학적인 특성을 조사하였다. 조사 지역의 수온은 12.4~28.2°C, pH는 6.1~8.5이었다. 담수 녹조류를 분리할 때 고체배양법이 액체 배양법보다 오염도가 낮고 분리 빈도가 높았다. 전국 9개 지역, 6개 담수 녹조류 서식처로부터 총 115개의 균주를 분리하였다. 담수 녹조류의 분리 및 배양을 위해 질소원으로는 NaNO_3 과 KNO_3 , 탄소원으로 Na_2CO_3 를 사용하였고, macro media의 구성 성분 중 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 과 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 분리하여 제조한 BGMM(BG11 Modified Medium)배지를 고안하였다. 담수 녹조류는 배양 후 4일째부터 급격히 흡광도가 증가하였고 8일째부터 흡광도가 감소하

였다. 공시한 7개의 균주 중 CHK008 균주가 배양 7일째에 가장 높은 흡광도를 보였다. 담수 녹조류 배양에 적합한 BGMM 배지의 pH는 6~7이었고 조사되는 빛이 강할수록 생육이 증가하였으며 5종류 당류 중에서 Glucose와 Galactose를 첨가하였을 때 클로랄라의 생육이 좋았다. 순수 분리한 16개 녹조류 균주의 균총색은 녹색, 진녹색, 연녹색을 나타내었고, 11개의 균주가 형광현미경하에서 강한 형광 빛을 나타내었다. 녹조류 16개 균주의 형태적인 특징을 조사한 결과 *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *C. pyrenoidosa*, *C. kessleri*, *C. emersonii*, and *Chlamydomonas* sp.의 2개 속 6개종으로 동정되었다. 담수 녹조류의 세포 크기는 종마다 다양한 변이를 보였다. 대부분의 담수 녹조류의 세포형태는 구형이었다. *Chlamydomonas* sp.는 타원형이었고 *Chlorella sorokiniana*는 구형과 타원형이 섞여 있었다. 6개 녹조류 종류 중 *Chlamydomonas* sp.를 제외한 모든 균주는 편모가 없었다. *Chlamydomonas* sp. 1개 균주와 *C. sorokiniana* 5개 균주는 세포에서 점질물을 분비하였다.

검색어 : 담수, 녹조류, 동정, 배양, 유기농 생태계

[논문접수일 : 2014. 11. 7. 논문수정일 : 2014. 11. 17. 최종논문접수일 : 2014. 11. 17.]

Reference

1. Aksu, Z., U. Acikel, and T. Kutsal. 1999. Investigation of simultaneous biosorption of copper (II) and chromum (VI) on dried *Chlorella vulgaris* from binary metal mixtures: Application of multicomponent adsorption isotherms. Sep. Sci. Technol. 34: 501-524.
2. Allen, M. B. 1966. Studies on the properties of some blue-green algae. Ph. D. Dissertation, University of California, Berkeley.
3. Anderson, R. A. 2005. Algal Culturing Techniques. Burlington: Elsevier Academic Press. p. 578.
4. Benson A. A. 2002. Following the path of carbon in photosynthesis: A personal story. Photosynth. Res. 73: 29-49.
5. Cha, J. Y., J. W. Kim, B. K. Park, H. J. Jin, S. Y. Kim, and Y. S. Cho. 2008. Isolation and identification of *Chlorella* sp. CMS-1 and the chemical composition of its hot water extract. J. of Life Science 18: 1723-1727.
6. Cho, I. S. 2004. Industrial applications and production of *Chlorella*. Kor. J. Microbiol. 30: 42-49.

7. Faheed, F. A. and Z. Abd-El Fattah. 2008. Effect of *Chlorella vulgaris* as bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. J. of Agri. & Soc. Sci. 4: 165-169.
8. Fott, B. and M. Novakova, 1969. A Monograph of the Genus *Chlorella*. In: The Freshwater Species, Studies in Phycology, Fott, B. (Ed.). Academia, Praha, pp. 10-74.
9. Gabriel, B. 1996. Wastewater Microbiology, John Wiley & Son, N.Y. pp. 68-75.
10. Geoghegan, M. J. 1951. Unicellular algae as a source of food. Nature 168: 426-427.
11. Green, B. R. 2011. After the primary endosymbiosis: an update on the chromalveolate hypothesis and the origins of algae with *chl* c. Photosynth. Res. 107: 103-115.
12. Guiry, M. D. and Guiry, G. M. 2014. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 2014.
13. Hernandez, J. P., L. E. De-Bashan, D. J. Rodriguez, Y. Rodriguez, and Y. Bashan. 2009. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. European J. Soil Biol., 45: 88-93
14. Hiroto, N., M. Tadahiko, and K. Shozo. 1996. Effects of the hot water extract and its residues of *Chlorella* cells on the growth of radish seedlings and changes in soil microflora. Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr. 67: 17-23.
15. Höxteman, E. 2007. A comment on Werburg's early understanding of biocatalysis. Photosynth. Res. 92: 121-127.
16. Huang, B., H. Hong, and L. Chen. 1994. The physiological effects of different N-P ratios on algae in semicontinuous culture. Asian Mar. Biol. 11: 137-142.
17. Huss, V. R., C. Frank, E. C. Hartmann, M. Hirmer, A. Kloboucek, B. M. Seidel, P. Wenzeler, and E. Kessler. 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* Sensu Lato (*Chlorophyta*). J. Phycol. 35: 587-598.
18. Ichimi, K., S. Meksumpum, and S. Montani. 2003. Effects of light intensity on the cyst germination of *Chattonella* sp. (*Raphidophyceae*), Plankton Biology and Ecology 50: 22-24.
19. Jeanfils, J., M. F. Canisius, and N. Burlion. 1993. Effect of nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. J. Appl. Phycol. 5: 369-374.
20. Jeon, S. M., I. H. Kim, J. M. Ha, and J. H. Lee. 2008. Overview of technology for fixation of carbon dioxide using microalgae. J. Korean Ind. Eng. Chem. 19: 145-150.
21. Jin, H. J. 2008. Optimization of media composition and culture conditions for the growth of *Chlorella* sp. CMS-1. Master degree thesis of Dong-A University, Busan, Korea.
22. Kanetsuna, Y. 2002. New and interesting desmids (*Zygnematales*, *Chlorophyceae*) collected

- from asia. *Phyco. Res.* 50: 101-103.
23. Kang, M. S., S. J. Sim, and H. J. Chae. 2004. *Chlorella* as a functional biomaterial. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 19: 1-11.
 24. Karakashian, S. J. and Karakashian M. W. 1965. Evolution and symbiosis in the genus *Chlorella* and related algae. *Evolution* 19: 368-377.
 25. Kärin, N. 2009. The construction of a scientific model: Otto Warburg and the building block strategy. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Science* 40: 73-86.
 26. Kazumasa, H., Y. Sayaka, D. Susilangsih, I. Osamu, M. Aparat, P. Jirapatch, and Y. Kazuhisa. 2003. Bioactivities of nostocine a produced by a freshwater cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme* TISTR 8169. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 512-517.
 27. Krauss, R. W. 1962. Mass culture of algae for food and other organic compounds. *American J. Botany* 49: 425-435.
 28. Lee, T. Y., B. R. Choi, J. K. Lee, and J. H. Lim. 2011. Cultivation of *Chlorella* sp. using light emitting diode. *Kor. J. Envi. Eng.* 33: 591-597.
 29. Lee, Y. N. and C. S. Lee. 1970. Studies on nucleic acid and protein biosynthesis of *Chlorella* cells during the course of the chloroplast development. *Korean J. Microbiol.* 8: 1-12.
 30. Lin C. S., T. L. Chou, and J. T. Wu. 2013. Biodiversity of soil algae in the farmlands of mid-Taiwan. *Botanical Studies* 54: 1-12.
 31. Mahmoud, M. S. 2001. Nutritional status and growth of maize plants as affected by green microalgae as soil additives. *J. Biol. Sci.*, 1: 475-479.
 32. Mata, T. M., A. A. Martins, and N. S. Caetano. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable Sustainable Energy* 14: 217-232.
 33. Metting, B. and J. W. Pyne. 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microbial Technol.* 8: 386-394.
 34. Oh-Hama T. and S. Miyachi. 1998. *Chlorella*, pp. 3-26. In: Borowitzka M. A. and L. J. Borowitzka (eds). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge.
 35. Ördög, V., W. A. Stirk, J. Van Staden, O. Novák, and M. Strand. 2004. Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from *Chlorophyta*. *J. Phycol.*, 40: 88-95
 36. Raposo, M. F. D. J. and R. M. S. C. De. Morais. 2011. *Chlorella vulgaris* as soil amendment: influence of encapsulation and enrichment with rhizobacteria. *Int. J. Agric. Biol.*, 13: 719-724.
 37. Rhichmond, A. 1990. Large scale microalgal culture and applications, In: *Phycology Research for 1990. Proc. Phycology Research Conference 1990*, pp.1-62.

38. Rippka, R., J. B. Deruells, M. Herdman, and R. Y. Stanier. 1979. Assignments strain history and properties of pure culture of Cyanobacteria. *J. General. Micro.* 111: 1-61.
39. Sheehan, J., V. Camobreco, J. Duffield, M. Graboski, and H. Shapouri. 1998. Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus, Final report NREL/SR-580-24089, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.
(www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24089.pdf)
40. Shihira, I. and R. W. Krauss, 1965. *Chlorella* Physiology and Taxonomy of Forty-one Isolates. University of Maryland, College Park, Maryland, pp. 1-92.
41. Stanier R. Y., R. Kunisawa, M. Mandel, and G. Cohen-Bazire. 1971. Purification and properties of multi-cellular blue-green algae (order *Chlorococcales*). *Bacteriol. Rev.* 35: 171-205.
42. Stirk, W. A., V. Ördög, J. Van Staden, and K. Jäger. 2002. Cytokinin-and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J. Appl. Phycol.*, 14: 215-221.
43. Takeda, H. 1991. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (*Chlorophyceae*). *J. Phycol.* 27: 224-232.
44. Tamiya, H., T. Iwamura, K. Shibata, E. Hase, and T. Nihei. 1953. Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of *Chlorella*. *Biochem. Biophys. Acta.* 12: 23-40.
45. Thompson, A. S., J. C. Rhodes, and I. Pettman. 1988. National environmental Research Council. Culture and Collection of Algae and Protozoa. Titus Wilson and Sons LTD. Kendal, UK, pp. 13-35.
46. US DOE(Department of Energy). 2010. National Algal Biofuels Technology Roadmap. http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/algal_biofuels_roadmap.pdf.
47. Vonshak. A. 1986. Laboratory techniques for the culturing of microalgae. In: Richmond, A. (ed). *Handbook of Microalgal Mass Culture*, p. 117. CRC Press, Boca Raton, Florida.
48. Warburg, O. 1919. Über die geschwindigkeit der kohlendioxidzersetzung in lebenden Zellen. *Biochem. Z.* 100: 230-270.
49. Wu, H. L., R. S. Hseu, and L. P. Lin. 2001. Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42: 115-121.
50. Zallen, D. T. 1993. Redrawing the boundaries of molecular biology: The case of photosynthesis. *J. of the History of Biology* 26: 65-87.