

북한강 수역에서 분리한 남조류 *Anabaena circinalis* 휴면포자 발아에 대한 환경요인의 영향

박채홍 · 임병진¹ · 유경아¹ · 박명환 · 황순진*

건국대학교 보건환경과학과, ¹국립환경과학원 한강물환경연구소

Effects of Environmental Factors on Akinete Germination of *Anabaena circinalis* (Cyanobacteriaceae) Isolated from the North Han River, Korea. Park, Chae-Hong, Byung-Jin Lim, Kyoung-A You¹, Myung-Hwan Park and Soon-Jin Hwang* (Department of Environmental Health Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea, ¹Han River Environment Research Center, National Institute of Environmental Research, Yangpyung, Gyeonggi 476-823, Korea)

Abstract Akinete germination may be a starting point of some akinete-producing cyanobacterial blooms in eutrophic freshwater systems. This study examined germinability of akinete of a cyanobacterium *Anabaena circinalis* isolated from the sediment of the North Han River (Cheongpyung Dam), Korea, under several environmental factors such as temperature (5~25°C), light (0~100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), nutrients (nitrogen and phosphorus) and pH (5~12). The high germination rate appeared at high temperature: >55% at 25°C, followed by 15% at 15°C, 10°C and 10% at 5°C. Low light intensity was favorable for akinete germination. Over 45% of germination occurred at low light intensities (5, 15 and 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), while less than 10% of germination occurred at both 50 and 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No germination occurred in the dark condition. Akinete germination rate increased with nutrient (phosphorus and nitrogen) enrichment, and nitrogen addition showed greater effect on the germination compared to phosphorus addition. Akinetes germinated well at neutral or slightly alkaline pH condition (pH 7 and pH 8: >55%), but no germination was observed at pH 11~12. The present study demonstrates some favorable ambient conditions of *Anabaena circinalis* germination, which could provide useful information to study the germination conditions of other *Anabaena* species or akinete-forming algae and predict its bloom in eutrophic freshwaters.

Key words: akinete, germination rate, *Anabaena circinalis*, environmental factors, eutrophic freshwaters

서 론

남조류 *Anabaena*는 불리한 성장환경에서 무성생식 과정을 통해 휴면 기능을 갖는 세포인 휴면포자(akinete)를 형성한다. 휴면포자는 일시적으로 휴면상태를 나타

내며 (Dale, 1983), 다시 성장환경이 좋아지면 발아하여 영양세포로 발전하는 생활사를 가지고 있다. 수체 내에서 휴면포자를 가지는 남조류의 성장은 바닥(퇴적층)에 존재하는 휴면포자의 발아에 의해 시작되며, 휴면포자 발아의 정도는 수체 내의 환경조건, 예를 들면 빛, 온도, 영양염, pH 등과 같은 요인들과 관계가 있는 것으로 알려져 있다 (Van Dok and Hart, 1997; Stáhl-Delbanco *et al.*, 2003). 이러한 환경요인들과 더불어 이화학적 또는 생물학적 작용으로 퇴적물로부터 영양염류의 용출 및 영

Manuscript received 12 November 2014, revised 18 December 2014, revision accepted 22 December 2014

* 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.

양염 비율 변화, 용존산소 농도, 염분 농도, 일시적인 퇴적물의 재현탁(resuspension events), 무척추동물에 의한 생물교란(bioturbation) 등이 영향을 미칠 수 있다(Baker and Bellifemine, 2000; Stáhl-Delbanco and Hansson, 2002; Faithfull and Burns, 2006).

남조류 휴면포자는 발아에 요구되는 최적의 온도범위를 가지고 있으며, 이는 대체로 세포의 성장에 필요한 최적 온도범위와 일치한다(Huber, 1985; Fay, 1988). 빛은 남조류 휴면포자 발아를 제어하는 가장 중요한 매개변수 중 하나이다. *Nodularia spumigena* (Huber, 1985)와 *Anabaena circinalis* Rabenhorst (Van Dok and Hart, 1997)의 휴면포자는 $15 \sim 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 광도 조건을 선호하며, 광이 없는 암 조건에서는 발아가 일어나지 않는다. 한편, 휴면포자 발아를 위한 영양염 요구조건에 관해서는 온도와 빛에 비해 상대적으로 연구가 미비하나, 발아와 성장에 한 종류의 영양염만이 관여하지는 않을 것이므로 그 반응도 다양한 것으로 판단된다. 예를 들면, 인(P)과 질소(N)의 결핍 또는 첨가 조건 하에서 실험한 선행연구들에서 *Anabaena fertilissim*, *Anabaena variabilis*, *Nostoc linckia*, *Anabaena circinalis* 등 서로 다른 종의 휴면포자는 각기 다른 발아율을 보였다(Reddy, 1983, 1984a; Fay, 1988). 또한 수중의 pH도 휴면포자 발아의 중요한 요인 중 하나로 평가되고 있다(Huber, 1985; Fay, 1988). 또한 동일종의 휴면포자라 할지라도 서로 다른 수체에서 다양한 환경조건의 조합으로 인하여 발아의 개시나 최적 발아에 미치는 영향이 다를 수 있다(Baker and Bellifemine, 2000).

본 연구는 남조류 대발생이 일어났던 북한강 수역의 퇴적층에서 분리한 *Anabaena circinalis* 휴면포자의 발아에 미치는 환경요인들의 영향을 분석하였으며, 이를 통해 현장에서 휴면포자의 발아가 남조류 대발생에 미치는 영향을 고찰하였다.

재료 및 방법

1. 휴면포자의 채집 및 분리

남조류 *Anabaena circinalis* 휴면포자는 북한강수계 중 남조류가 대발생했던(2012년 7~9월) 청평호의 퇴적층에서 분리하였다. 퇴적물은 Van veen grab sampler(Q.T. Technology, Korea)를 이용하여 퇴적물 표층(1 cm)을 채취한 후, 100 mL 폴리에틸렌 채집병에 담아 냉장보관($4 \sim 5^\circ\text{C}$)하여 실험실로 운반하였으며, 모든 시료는 분석

전까지 냉장소에 보관하였다. 저층의 퇴적물에서 휴면포자 분리를 위해 100 mL 채집병에 담긴 퇴적물을 잘 섞은 후, 습중량 1 g(W/W)을 취한 후, 냉장 보관한 여과($0.2 \mu\text{m}$) 멸균수(퇴적물을 채취한 곳의 현장수)로 현탁시킨 뒤, 초음파기(JAC 4020 type, 60 Hz, 620 w, Ultrasonic, Korea)로 20초간 2회 초음파 처리하여 현탁액을 분쇄하였다. 분쇄한 현탁액은 $100 \mu\text{m}$ Nylon mesh와 $60 \mu\text{m}$ Nylon mesh에 여과한 뒤, 최종적으로 $10 \mu\text{m}$ Nylon mesh를 이용하여 여과하였다. 여과된 시료는 Panning method(Matsuoka and Fukuyo, 2000)에 따라, 여과수와 함께 총 10 mL로 농축하여 암갈색 유리병에 옮겨 담아 냉장보관(4°C)하였다. 암갈색 유리병에 처리된 퇴적물 시료 중 1 mL을 Sedgwick-Rafter chamber에 취하여 독립현미경(Axiovert A1, ZEISS, Germany) 하에서 Microcapillary를 이용하여 휴면포자를 분리하였다. 분리한 휴면포자는 냉장 보관한 현장수 여과($0.2 \mu\text{m}$) 멸균수가 담긴 microtube에 모아 보관하였다.

2. 휴면포자 형태, 발아 및 성장과정 관찰

현미경(Axiovert A1, ZEISS, Germany) 200x 배율 하에서 농축된 시료로부터 포자를 분리하여 현장여과수로 2~3회 세척하였다. 96 well plate에 여과 멸균수를 0.2 mL 주입한 후 분리한 휴면포자 세포를 접종하여 온도 25°C 및 광도 $30 \sim 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (14L : 10D) 조건의 배양기에서 배양하였다. 휴면포자 형태는 400x 배율 하에서 관찰하였으며 포자의 크기를 측정하였다. 포자가 발아한 후 영양세포로의 발달과정을 확인하기 위해 접종 후 하루 2회씩(오전, 오후) 일정한 시간에 세포의 길이와 폭을 측정하였다.

휴면포자를 발아시켜 배양한 *Anabaena* 영양세포를 이용하여 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과, 본 연구에서 이용한 휴면포자는 *A. circinalis* 종으로 동정되었다(Han River Watershed and Environment Management District, 2013). 본 연구와 동일한 수역에서 현장시료(영양세포)를 채취하여 분석한 선행연구(Li et al., 2013)에서는 *A. crassa*로 동정된 바 있다. 그러나 분자계통학적 분석에서 이 두 종은 같은 그룹에 속하였으며 유전적 차이가 뚜렷하지는 않았다.

3. 휴면포자 발아율 분석

여과 멸균수 0.2 mL를 96 well plate의 각 hole마다 채우고 hole당 1개체씩 접종하였다. 30개체씩을 이용하여 모든 환경조건에 3반복(총 90개체)으로 총 14일간 배양

하였다. 휴면포자의 발아율은 24시간 간격으로 독립현미경 하에서 휴면포자가 발아하고 난 후의 빈포자의 형성을 확인하여 조사하였다. 발아율은 각 실험군에 접종한 휴면포자의 총수에 대한 발아된 휴면포자 비율(%)로 계산하였으며, 14일간의 누적발아율의 변화를 평가하였다.

4. 환경조건에 따른 발아율 실험

온도조건에 따른 휴면포자 발아율 분석을 위해 광도는 $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 일정하게 유지하고 광주기 14L:10D를 가진 배양기에서 온도 5, 10, 15, 20, 25°C의 다섯 가지 단계에서 배양을 실시하였다. 광조건에 따른 휴면포자의 발아율 분석을 위한 배양은 온도 25°C, 14L:10D의 광주기를 가진 배양기에서 0, 5, 15, 30, 50, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 여섯 단계 광도조건 하에서 실시하였다. 영양염 조건에 따른 휴면포자의 발아율 분석을 위해 CB배지(N: 75 mg L⁻¹, P: 7 mg L⁻¹ 포함)를 이용하여 질소와 인을 모두 첨가한 조건(+N, +P in CB medium), 질소와 인이 모두 결핍된 조건(-N, -P in CB medium), 질소는 결핍, 인은 첨가한 조건(-N, +P in CB medium), 질소는 첨가, 인은 결핍된 조건(+N, -P in CB medium)과 증류수 등 다섯 가지 조건하에서 실시하였다. 배양은 온도 25°C, 광도 $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (14L:10D)에서 실시하였다. pH 조건에 따른 휴면포자의 발아율 분석을 위해 CB 배지를 이용하여 pH 5부터 pH 12까지 여덟 가지 조건에서 실시하였다. pH 조절은 초기 CB배지(pH 9)에서 HCl(pH 5~8)과 NaNO₃(pH 10~12)을 이용하여 조절하였다. 배양은 온도 25°C, 광도 $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (14L:10D)에서 실시하였다.

5. 자료분석

각 실험의 조건별로 *A. circinalis* 휴면포자 발아율 차이를 비교하기 위하여 SPSS package (ver. 18.0. SPSS Inc., USA)를 이용하여, 각 조건의 시간별 반복 실험군의 평균 발아율을 이용하여 One-Way ANOVA (Duncan's multiple-range test)를 실시하였다. 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 이다.

결 과

1. 휴면포자 발아 및 성장에 따른 형태적 변화

휴면포자의 형태와 발아 및 성장과정은 Fig. 1에서 제

시하였다. 휴면포자의 외형은 타원형이고 세포벽은 한 층으로 두껍게 형성되어 있다. 광학현미경으로 관찰한 휴면포자는 초록색이고 녹색 과립을 포함하고 있다. 길이는 15~18 μm , 폭 13~16 μm 이며, 휴면포자 양쪽 끝에 길이 0.1~0.2 μm 의 짧은 돌기가 나 있다(Fig. 1-a). 휴면포자의 운동성은 없었다.

배양 1일째 휴면포자가 발아를 시작하면서 세포벽을 뚫고 나오는 탈각 현상을 보였으며, 포자를 둘러싸고 있는 cyst의 모습을 확인할 수 있었다(Fig. 1-b). 2일째에 세포벽 내의 휴면포자가 완전히 탈각하여 발아하였다. 세포가 발아한 뒤 비어 있는 시스트가 관찰되었다. 발아된 세포의 크기는 길이 21~23 μm , 폭 15~16 μm 이었다(Fig. 1-c). 휴면포자가 시스트로부터 빠져나올 때의 크기가 발아되지 않은 상태의 휴면포자 크기에 비해 약간 큰 것으로 판단할 때, 휴면포자는 발아과정에서 이미 세포성장이 시작된 것으로 판단되었다. 배양 3일 이후부터 포자가 영양세포로 발달하면서 길이 성장을 보였으며, 배양 6일째에는 길이 53~55 μm , 폭 10~11 μm 로 길이는 증가하지만 폭은 감소하였다. 이 시기 동안 증식한 세포들이 연결된 세포사(trichome)를 형성하였으며, 이후 세포사의 길이 성장은 계속되었으나 세포의 폭은 10~12 μm 정도로 유지되었다(Fig. 1-d~g). 배양 7일째로 접어들면서 세포사가 구부러지며 타원형으로 세포가 길게 연결되어 보다 명확한 사상체의 모습을 갖추었다. 세포사의 외형을 살펴보면, 다른 남조류들에서 관찰되는 연결생활(coenobe)의 형태를 보여주고 있다(Fig. 1-h). 배양 8일째 세포사의 길이 성장과 함께 폭은 더욱 감소하였다(10 μm → 7~8 μm). 이러한 결과는 휴면포자가 발아한 후 세포들이 연결된 세포사가 성장하는 과정에서, 초기에는 폭이 증가하지만 점차로 폭의 성장이 길이성장으로 전환됨을 의미한다. 또한 이 시기 동안 세포 형태에 있어 중요하게 구분되는 이형세포(heterocyst)가 관찰되었는데, 이는 배지 내 질소원의 감소와 관련이 있는 것으로 판단되었다. 이형세포의 외형은 원형이고 직경은 6~8 μm 이다(Fig. 1-i). 배양 9~10일째 이형세포 상하부의 영양세포들이 증식하였으며 이에 따라 세포사의 길이는 더욱 증가하였다(Fig. 1-j, k). 배양 11일째 이형세포 윗부분의 세포들이 탈리되었으며 아랫부분은 길이 126 μm 이상 성장하였다(Fig. 1-l).

2. 휴면포자의 온도별 발아 특성

온도조건에 따른 휴면포자 누적발아율 변화는 Fig. 2와 같다. 휴면포자 발아율은 25°C > 20°C > 15°C > 10°C > 5°C 순으로 높았으며, 저수온 조건인 5, 10, 15°C와

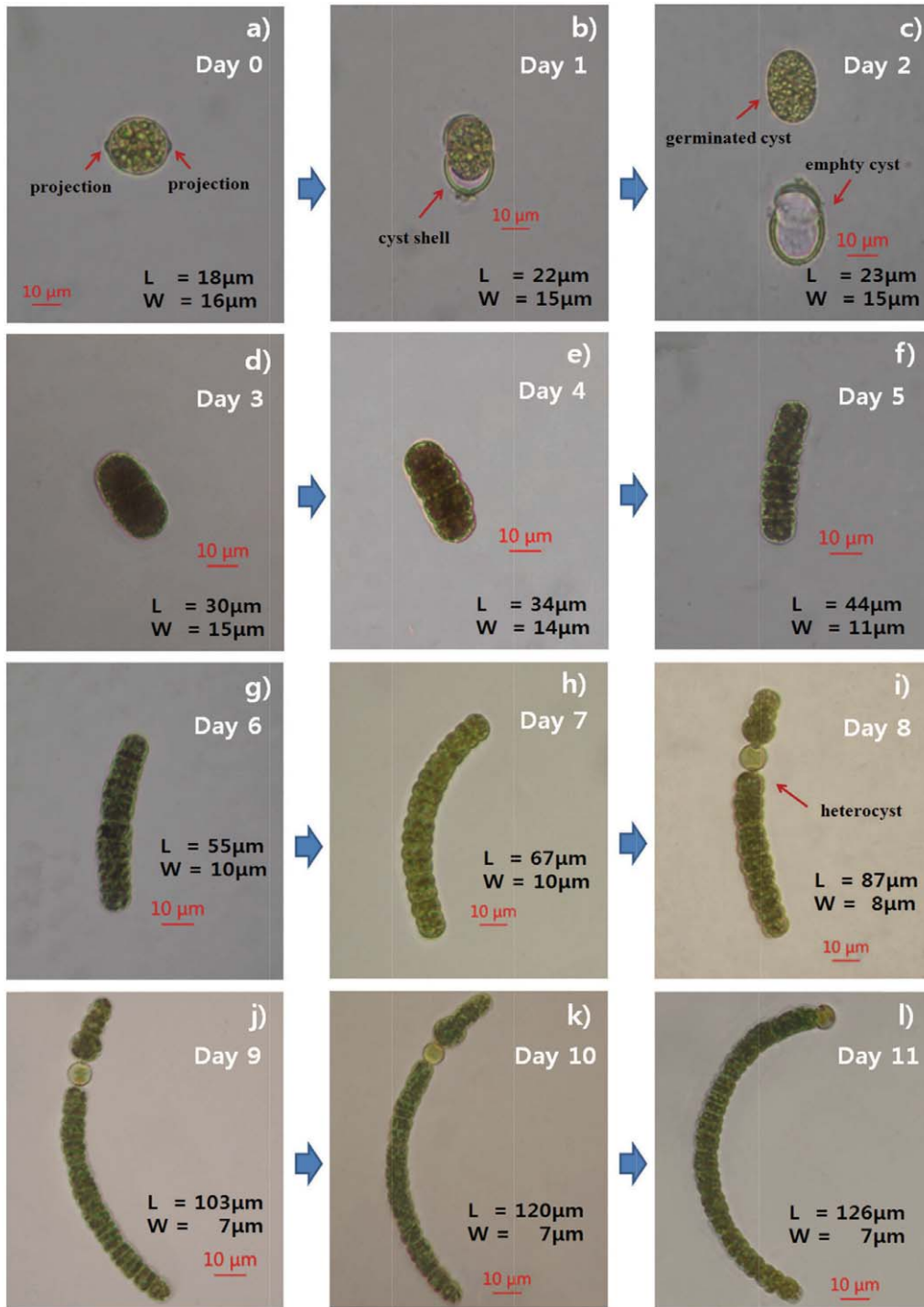


Fig. 1. Serial photos of akinete germination and vegetative cell development of *Anabaena circinalis*. a) Before germination. Akinete size ranges from 16~18 μm. b) Day 1 on which akinete began to germinate with breaking the cyst shell and germinated akinete was elongated (18 μm → 22 μm). c) Day 2 on which akinete came completely out of the shell. d) Day 3 on which germinated akinete began to develop to vegetative cell. Cell is considerably elongated (23 μm → 30 μm). e) Day 4 on which the vegetative cells grew and formed trichome. f, g) Day 5~6 on which trichome continuously grew by about 10 μm a day, but trichome width decreased since day 5 (14 μm → 10 μm). h) Day 7 on which elongated trichome bent. i) Day 8 on which trichome continuously grew but its width further decreased since then (10 μm → 7~8 μm), and a heterocyst appeared, indicating nitrogen source might be depleted in the medium. j, k) Day 9~10 on which vegetative cells grew on both parts above and below the heterocyst. l) Day 11 on which the vegetative cells were detached from the heterocyst.

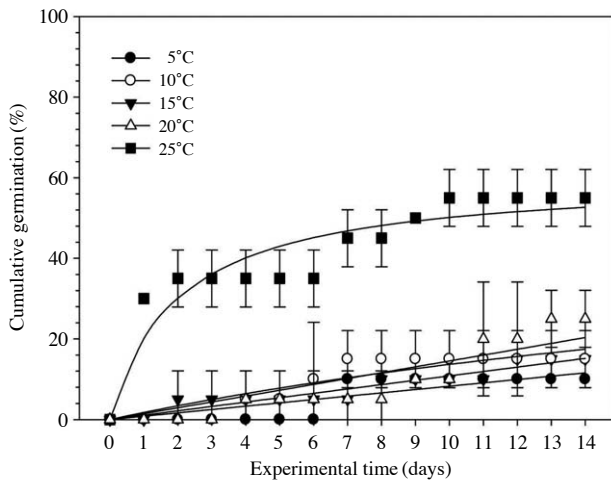


Fig. 2. Cumulative germination rates of *Anabana circinalis* akinete under different temperatures. Light intensity was kept at $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

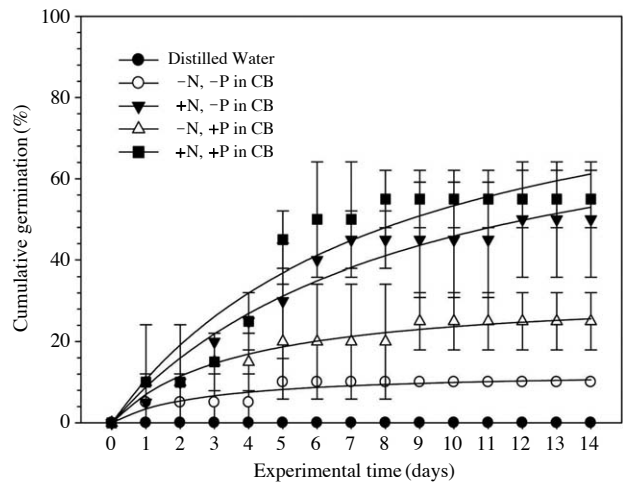


Fig. 4. Cumulative germination rates of *Anabana circinalis* akinete under different concentrations of nitrogen and phosphorus and their combination. Light intensity and temperature were kept at $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 25°C , respectively.

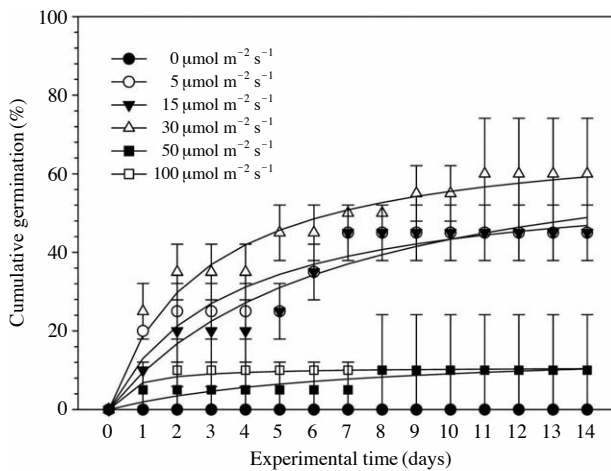


Fig. 3. Cumulative germination rates of *Anabana circinalis* akinete under different light intensities. Temperature was kept at 25°C .

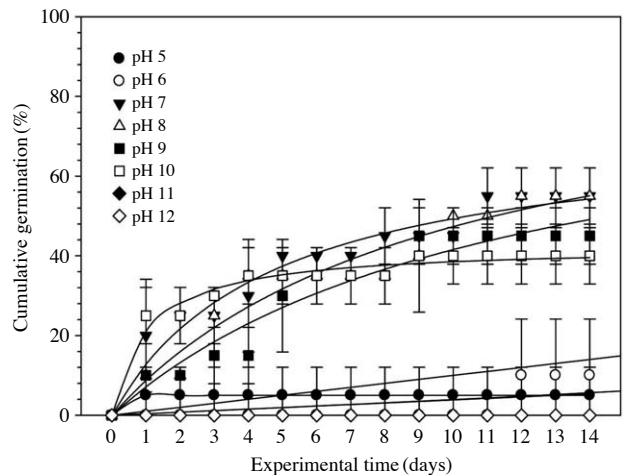


Fig. 5. Cumulative germination rate of *Anabana circinalis* akinete under different pH. Light intensity and temperature were kept at $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 25°C , respectively.

고수온 조건인 25°C 에서 뚜렷한 발아율의 차이를 보였다 ($p < 0.05$, Fig. 6). 저수온 조건인 5°C , 15°C 에서 각각 약 10%, 15% 정도의 낮은 발아율을 나타낸 반면, 고수온 조건인 25°C 에서는 55%의 높은 발아율을 나타냈다. 또한, 20°C 에서는 약 20%의 발아율을 보여, 보다 활발한 휴면포자 발아를 위해서는 20°C 이상의 높은 수온이 요구되는 것으로 나타났다. 특히 25°C 에서의 발아는 1일째부터 급격히 진행되어 약 6일간은 비슷하게 35% 정도의 발아율을 유지하였으며, 7~9일째 동안 45% 정도로 증가하였고 10일째 이후에는 55%로 유지되었다.

3. 휴면포자의 광도별 발아 특성

서로 다른 광조건에서 휴면포자의 누적발아율 변화는 Fig. 3과 같다. 광도 5, 15, $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 조건에서 발아율은 각각 45, 45, 60%로 나타난 반면, 50, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 은 10% 정도의 발아율을 나타내었다. 높은 광도에서는 오히려 발아율이 낮았으며, 반대로 낮은 광도에서 높은 발아율을 나타내었다 ($p < 0.05$, Fig. 3). 반면 암조건에서는 발아가 전혀 일어나지 않았다.

4. 휴면포자의 영양염 농도별 발아 특성

서로 다른 영양염 조건에 따른 휴면포자 누적발아율을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 질소와 인 모두 첨가한 경우(+N+P)와 질소는 첨가하고 인은 결핍시킨 조건(+N-P)에서 발아율은 각각 55%, 50%를 나타내었으며 이 결과는 통계적으로 차이가 없었다($p > 0.05$, Fig. 6). 반면, 질소와 인을 모두 결핍시킨 조건(-N-P)과 인은 첨가하였으나 질소를 결핍시킨 조건(-N+P)에서의 발아율은 각각 10%, 25%를 나타냈다. 즉, 질소가 첨가된 모든 조건에서는 55% 이상의 높은 발아율을 나타낸 반면, 질소가 없는 조건에서는 20% 이하의 낮은 발아율을 나타내었다. 질소와 인이 모두 첨가된 조건에서 가장 높은 발아율을 나타냄에 따라, 충분한 질소와 인, 특히 질소는 *A. circinalis* 휴면포자 발아에 중요한 인자로 나타났다. 증류수 조건(control)에서 발아가 전혀 일어나지

않았다.

5. 휴면포자의 pH별 발아특성

서로 다른 pH조건에 따른 휴면포자 누적발아율은 변화는 Fig. 5와 같다. pH 7, pH 8 조건에서 발아율은 모두 55% 이상으로 가장 높았다. pH 9와 pH 10의 조건에서는 각각 45%, 40% 이상의 발아율을 나타내었으며, 이는 pH 7~8 조건에 비해 10% 이상 낮았으나 통계적인 유의성은 없었다($p > 0.05$, Fig. 6). 반면, pH 5~6의 조건에서는 실험 1일째 이후 대부분의 휴면포자가 파괴되었으며, 이때 발아율은 10% 정도를 보였다. pH 11~12 조건에서는 실험 1일째 이후 모든 휴면포자 세포벽이 파괴되고 실험 2일째 이후에는 모든 세포가 파괴되며 휴면포자의 발아가 전혀 일어나지 않았다.

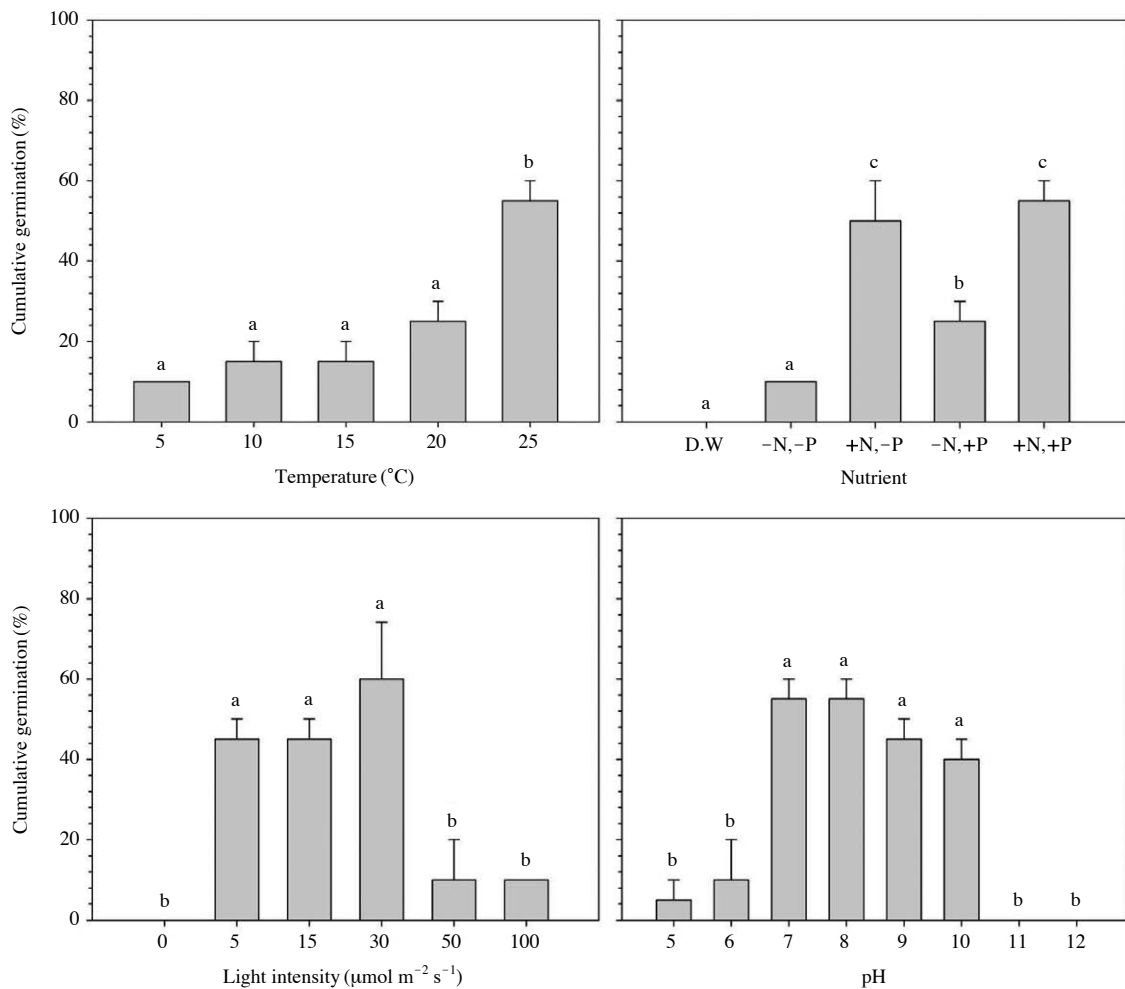


Fig. 6. Statistical comparisons of cumulative germination rates of *Anabaena circinalis* akinete under different environmental factors after 14-day incubation. The different alphabets on the error bar indicate the statistical difference ($p < 0.05$).

고 찰

본 연구는 북한강수역에서 남조류 *Anabaena circinalis* 대발생의 1차적 원인을 제공하는 휴면포자의 발아가 수온, 광도, 영양염, pH 등 이화학적 요인에 의해 영향을 받으며 발아율의 정도는 각 요인의 범위에 따라 차이가 있음을 보여주었다.

수온은 남조류 대발생을 유도하는 주요한 환경요인 중 하나이며 대부분의 남조류는 낮은 수온보다 높은 수온을 선호한다. 예를 들면, *Anabaena spiroides*, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Padisak, 2003; Hong *et al.*, 2006), *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* (Kanoshina *et al.*, 2003)는 주로 여름철 높은 수온에서 크게 발생한다. 현장에서의 휴면포자 역시 월동시기를 거쳐 수온이 높아지는 봄이나 초 여름에 발아하는 현상을 보인다 (Baker, 1999; Karlsson-Elfgren, 2003). 봄과 초여름 동안 수체 및 퇴적층의 온도증가는 휴면포자의 발아를 유발하는 한편 (Paerl, 1988), 발아세포의 대사활동을 촉진하여 대수성장을 유도하게 되며, 따라서 수온은 발아 유도기간 (lag phase)을 결정하는 요인으로 작용한다 (Probert, 2000). 본 연구에서는 낮은 온도보다 높은 온도조건에서 높은 발아율을 나타냈는데 (Fig. 2) 이와 같은 결과는 다른 선행연구 결과와도 일치하였다. *A. circinalis* (Baker and Bellifemine, 2000), *A. flos-aquae* (Kravchuk *et al.*, 2002), *N. spumigena* Mert. (Huber, 1985), *C. raciborski* (Saker *et al.*, 1999)의 휴면포자 발아율은 20~25°C에서 가장 높았으며 (>40%), 10°C 이하의 저수온 상태에서는 발아가 저해되었다 (<15%). 또한 *A. solitaria* 휴면포자는 17°C에서 광에 노출되었을 때 즉시 발아하였으며 (Rengefors *et al.*, 2004), *A. ucrainica* 휴면포자의 경우, 저수온 (5~8°C)에서는 10% 이하로 발아율이 저해된 반면, 상대적으로 고수온 (14~23°C)에서 높은 발아율 (60% 이상)을 나타냈다 (Tsujiura and Okubo, 2003). 따라서 북한강수역에서 여름철 25°C 이상으로 수온의 증가는 *A. circinalis* 휴면포자 발아를 크게 유도하여 영양세포 증식에 직접적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다 (Li *et al.*, 2013). 하지만 일부 남조류, 예를 들면 *Anabaena cylindrica*와 *Aphanizomenon flos-aquae*는 저수온에서도 성장할 수 있으며 (Li *et al.*, 1997; Tsujiura *et al.*, 2001), *Anabaena flos-aquae* 휴면포자는 10°C 이하의 저수온에서 높은 발아율을 나타냈다는 결과도 보고되었다 (Kim *et al.*, 2005). 본 연구에서도 *A. circinalis* 휴면포자는 10°C 내외의 저수온 조건에

서도 10% 내외의 누적발아율을 보임으로써 상대적인 발아율이 낮지만 10°C 내외의 저층의 수온에서도 발아를 통한 수중의 영양세포 증식에 기여할 가능성은 있는 것으로 파악되었다. 요약하면, 광도는 *Anabaena* 포자의 상승에서부터 발아까지 일련의 recruitment 과정에 있어 방아쇠 (trigger) 역할을 하며, 수온상승은 휴면포자의 생리활성을 증가시켜 triggering부터 발아까지의 반응시간에 영향을 주는 것으로 판단된다 (Roelofs and Oglesby, 1970; Kang *et al.*, 2014).

많은 생물들에게 일주기 현상 혹은 계절적 주기를 유도하는 빛은 휴면포자 발아를 위한 전제조건이라는 것은 잘 알려져 있으며 (Baker and Bellifemine, 2000), 휴면포자 발아에 방아쇠 역할을 하는 주 요인이다 (Roelofs and Oglesby, 1970). 또한, 빛은 휴면포자 발아를 위한 에너지를 공급 (광합성)하는 과정으로도 제기되었다 (Kezhi *et al.*, 1985). 휴면포자 발아에는 빛이 절대적으로 필요하며, 낮은 광도라도 휴면포자가 발아하기에 충분할 수 있다 (Van Dok and Hart, 1997). 일부 휴면포자는 광이 없는 조건에서도 발아 할 수 있다고 알려져 있으나 (Neely-Fisher *et al.*, 1989), 대부분의 남조류 휴면포자는 발아에 광을 필요로 한다 (Agrawal, 2009). 본 연구에서 제공한 광도의 범위 중에서 가장 낮은 광도인 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서도 발아가 유도되었는데 이는 다른 연구와도 비슷한 결과를 나타냈다. *Nodularia spumigena* 휴면포자는 최소 0.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 광조건에서도 발아가 되며 (Huber, 1985), *Anabaena iyengarii*, *Westiellopsis prolifica*, 그리고 *Nostochopsis lobatus*의 휴면포자는 최소 6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 (Agrawal and Singh, 2000), *Anabaena circinalis* 휴면포자는 최소 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광조건에서도 발아가 유도된다 (Van Dok and Hart, 1997). 또한 적정 수준 광도의 증가는 휴면포자의 발아시간을 단축시키며 발아율을 증가시킬 수 있다 (Yamamoto, 1976). 본 연구에서도 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 부터 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 까지 발아율이 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 3). 이는 다른 연구의 결과와도 일치하는데, *Anabaena cylindrica* 휴면포자가 2~60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 범위에서 광도가 증가함에 따라 발아율이 증가하였으며 (Yamamoto, 1976), *Stigeoclonium pascheri* 휴면포자는 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로, *Pithophora oedogonia* 휴면포자는 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 증가함에 따라 발아율이 증가하였다 (Agrawal, 1986). 이러한 결과로 판단할 때 남조류의 휴면포자는 수심이 깊은 수역보다는 3 m 이하의 얕은 수역에서 발아가능성이 높다. 이 경우 바람의 작용으로 인해 휴면포자를 포함하는 퇴적물이 유

광대로 떠오를 수 있으며, 또한 퇴적층에 빛이 직접 도달함으로써 휴면포자 발아에 충분한 광을 제공할 수 있다(Karlsson-Elfgren, 2003). 본 연구 결과, 광이 없는 조건에서 휴면포자 발아가 일어나지 않음으로써 *A. circinalis* 휴면포자는 발아를 위해 광을 필요로 함을 확인하였다. 한편, 수심이 깊은 지역이라 할지라도 빛이 투과할 수 있는 수역에서는 휴면포자가 발아할 가능성이 있을 것이다(Baker, 1999). 또한 빛이 없는 퇴적물층 휴면포자가 난류로 인해 빛이 있는 공간으로 이동함에 따라 빛의 가용성의 증가되어 발아를 유도 할 수도 있을 것이다(Baker, 1999).

일반적으로 영양염인 질소와 인은 남조류의 휴면포자 발아에 영향을 준다고 알려져 있다(Agrawal and Misra, 2002). 본 연구에서는 질소와 인이 결핍된 조건에서 낮은 발아율을 보였으나, 질소와 인 모두 충족된 조건에서는 가장 높은 발아율을 나타냈다(Fig. 4). *Westiellopsis prolifica* 휴면포자는 질소나 인이 결핍된 조건과 비교할 때 질소나 인이 충족된 조건에서 5배 이상의 발아율을 보였으며(Agrawal and Sharma, 1994), *Nodularia spumigena* 휴면포자는 인농도의 증가(>0.9 μM)에 따라 발아율도 증가하였다(>68%) (Huber, 1985). *Anabaena vaginicola* 휴면포자는 질소 농도 0.2 mg L⁻¹ 이상에서 96% 이상의 높은 발아율을 보였으며, 인 결핍시에는 발아율이 50% 이하로 감소하였다(Rai and Pandey, 1981). *Nodularia spumigena* 휴면포자도 질소 결핍시 낮은 발아율을 보였으나(<5%), 질소농도 3 mg L⁻¹ 이상에서는 발아율이 증가하였다(>20%) (Myers et al., 2010). 이 밖에도 *Anabaena circinalis*, *Anabaena variabilis*, *Nostoc linckia*, *Anabaena fertilissima* 등의 휴면포자는 질소와 인을 첨가하였을 때 발아율이 현저히 증가하였다(Reddy, 1983, 1984a; Fay, 1988). 하지만 일부 남조류의 휴면포자는 질소와 인에 대해 서로 다른 발아 반응을 나타내는 것으로 보인다. *Anabaena cylindrica*와 *Nostoc* sp. 휴면포자에 대한 질소의 첨가와 결핍은 발아에 큰 영향이 없었으며(Yamamoto, 1976; Sutherland et al., 1985), *Anabaena doliolum*, *Fischerella muscicola* 휴면포자 발아에 인은 영향이 없는 것으로 조사되었다(Kaushik et al., 1971). Huber(1985)는 *Nodularia spumigena*의 휴면포자는 인산염 첨가시 발아가 미비하였으나 질소 첨가시 70~80% 발아율을 나타냈다고 보고하였으며, Van Dok and Hart(1997)는 *Anabaena circinalis*의 휴면포자가 낮은 인산염 농도에서도 높은 발아율을 보임에 따라 인산염이 발아에 중요한 인자가 아니라고 보고하였다. 본 연구에서는 인보다는 질소의 첨가가

Anabaena circinalis 휴면포자 발아에 더 큰 영향을 나타내었다(Fig. 6). 이러한 결과는 종래의 담수생태계 조류관리에 있어 인제한(P-limitation)의 일반도의 패러다임에 대하여 질소의 생태학적 역할에 대한 관심을 환기시킨다.

남조류의 성장 및 휴면포자 발아에 pH는 중요한 환경요인 중 하나로 알려져 있다(Agrawal and Misra, 2002; Lopez-Archilla et al., 2004). 본 연구결과, 산성(pH 5~6)과 알칼리성(pH 11~12) 조건에서는 매우 낮거나(10% 이하) 제로 수준의 발아율을 보인 반면, pH 7~10까지의 중성 및 약알칼리성 조건에서는 40~60%의 높은 발아율을 보였다. 이와 같은 결과는 선행 연구들의 결과와도 일치하였다. *Anabaena vaginicola*, *Anabaena cylindrica*, *Westiellopsis prolifica*, *Anabaenopsis arnoldii*, *Nostochopsis lobatus* 등의 휴면포자는 중성 또는 약알칼리성 pH(7~8)에서 최고의 발아율을 나타냈다(Reddy, 1984b; Agrawal and Sharma, 1994; Agrawal and Misra, 2002). 이러한 결과로 판단할 때, 일반적으로 남조류가 잘 성장하는 pH와 같은 조건에서 최적의 발아가 일어난다고 볼 수 있다(Agrawal and Misra, 2002; Agrawal, 2009). 산성조건에서는 phaeophytin이 분해되며(Brock, 1973), 세포활성이 저해되거나 휴면포자 세포벽의 피해를 줄 수 있다(Agrawal, 2009). 한편, 높은 pH는 세포막의 투과성을 변화시키며(Holm-Hansen, 1963), pH 11 이상에서는 음이온 흡수억제로 인한 휴면포자 세포의 생리활성 저해 및 이산화탄소의 불가용성으로 인한 광합성 억제를 유발시킬 수 있다(Rai and Pandey, 1981).

결론적으로, 다양한 이화학적 요인 및 생물학적 작용들이 *Anabaena* 휴면포자의 발아에 영향을 미치며 개별 요인 내에서도 발아율은 조건의 변화에 따라 다르게 나타난다. 더욱이 현장에서의 휴면포자 발아에 대해서는 어느 한가지만 작용하는 것이 아니므로 본 연구에서 분석한 환경요인들 이외의 다른 요인들까지를 포함하여 복합적인 영향을 받을 것이다(Tsujimura, 2004; Kang et al., 2014). 본 연구 결과를 중심으로 북한강 수역에서의 휴면포자 및 영양세포 발달은 다음과 같이 가설을 설정할 수 있다. 즉, 늦은 봄 이후 여름철로 가면서 높은 수온(20°C 이상)과 저층의 낮은 광도(발아에 필요한 최소한의 광도), 퇴적층 내의 질소와 인의 이용성 증가, 중성 및 약알칼리성 pH 등의 복합적인 환경요인이 잘 조합되었을 때 *A. circinalis* 휴면포자 발아에 trigger로 작용하여 *Anabaena*의 대발생으로 이어질 가능성이 크다.

특히, 휴면포자 발아를 통한 *Anabaena* 대발생을 관리하는 측면에서는 대부분의 영향요인(특히 수온, 빛, pH

등)들을 제어할 수 있는 것이 아니므로 해당 수역에서 휴면포자 발아조건 및 생활사에 대한 보다 심도 있는 이해를 통해 조류번성을 예측 대비하고 그에 맞는 대책을 마련하는 쪽으로 초점을 맞추어야 할 것이다. 다만 영양염 증가는 인위적인 활동에 기인하는 경우가 대부분이므로 하천으로의 하수처리방류수나 지천으로부터의 유입되는 오염수의 관리가 필요하고 특히 오염수의 유입이 있는 수역에 초점을 맞추어 휴면포자의 분포와 발달에 대한 이해와 그에 맞는 관리대책을 고려함이 바람직하다고 사료된다.

사 사

이 논문은 2013년도 건국대학교 연구년교원 지원에 의해 연구되었음.

REFERENCES

- Agrawal, S.C. 1986. Effects of different factors on the akinete germination in *Pithophora oedogonia* (MONT.) WIT TROCK. *Journal of Basic Microbiology* **24**: 175-179.
- Agrawal, S.C. 2009. Factors affecting spore germination in algae-review. *Folia Microbiologica* **54**: 273-302.
- Agrawal, S.C. and V. Singh. 2000. Vegetative survival, akinete formation and germination in three blue-green algae and one green alga in relation to light intensity, temperature, heat shock and UV exposure. *Folia Microbiologica* **45**: 439-446.
- Agrawal, S.C. and U. Misra. 2002. Vegetative survival, akinete and zoosporangium formation and germination in some selected algae as affected by nutrients, pH, metals, and pesticides. *Folia Microbiologica* **47**: 527-534.
- Agrawal, S.C. and U.K. Sharma. 1994. Sporulation and spore germination in *Westiellopsis prolifica* JANET in various culture conditions. *Phykos* **33**: 31-38.
- Baker, P.D. 1999. Role of akinetes in the development of cyanobacterial populations in the lower Murray River, Australia. *Marine and Freshwater Research* **50**: 265-279.
- Baker, P.D. and D. Bellifemine. 2000. Environmental influences on akinete germination of *Anabaena circinalis* and implications for management of cyanobacterial blooms. *Hydrobiologia* **427**: 65-73.
- Brock, T.D. 1973. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: Evolution and ecological implications. *Science*, N.Y **179**: 480-483.
- Dale, B. 1983. Dinoflagellate resting cysts: "benthic plankton" p. 69-136. *In*: Survival Strategies of the Algae (Fryxell, G.A., ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Faithfull, C.L. and C.W. Burns. 2006. Effects of salinity and source of inocula on germination of *Anabaena* akinetes from a tidally influenced lake. *Freshwater Biology* **51**: 705-716.
- Fay, P. 1988. Viability of akinetes of the planktonic cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Proceedings of the Royal Society of London*, series B **234**: 283-301.
- Han River Watershed and Environment Management District. 2013. Distribution and Eco-physiological Characteristics of Harmful Algae in the North Han River. Final report.
- Holm-Hansen, O. 1963. Viability of blue-green and green algae after freezing, *Physiologia PI* **16**: 530-540.
- Hong, Y., A. Steinman, B. Biddanda, R. Rediske and G. Fannestiel. 2006. Occurrence of the toxin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Mona and Muskegon Lakes, Michigan. *Journal of Great Lakes Research* **32**: 645-652.
- Huber, A.L. 1985. Factors affecting the germination of akinetes of *Nodularia spumigena* (Cyanobacteriaceae). *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 73-78.
- Kang, P.G., S.J. Lee, M.S. Byeon, S.A. Yoon, H.N. Kim, J.K. Lee and S.J. Hwang. 2014. Current status and perspectives in the akinete study of the blue-green algal genus *Anabaena*. *Korean Journal of Ecology and Environment* **47**: 1-12.
- Kanoshina, I., U. Lips and J.M. Leppnen. 2003. The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic sea). *Science Direct* **2**: 29-41.
- Karlsson-Elfgren, I. 2003. Studies on the life cycles of akinete forming cyanobacteria. PhD Thesis. Uppsala University. (Sweden)
- Kaushik, M., H.D. Kumar and H.N. Singh. 1971. Studies on growth and development of two nitrogen fixing blue-green algae. I. Carbon and phosphorus nutrition. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* **65**: 435-442.
- Kezhi, B., W. Guoliang and C. Cheng. 1985. Studies on the mechanism of light-dependent germination of akinetes of blue-green algae. *Hydrobiologia* **123**: 89-91.
- Kim, B.H., W.S. Lee., Y.O. Kim, H.O. Lee and M.S. Han. 2005. Relationship between akinete germination and vegetative population of *Anabaena flos-aquae* (Nostocales, Cyanobacteria) in Seokchon reservoir (Seoul, Korea). *Archiv für Hydrobiologie* **163**: 49-64.
- Kravchuk, E.S., E.A. Ivanova and M.I. Gladyshev. 2002. Seasonal dynamics of the numbers of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Breb. akinetes in the surface layer of bottom sediments and bulk water. *Doklady Biological Sciences* **384**: 233-234.
- Li, Z., M.S. Han, S.O. Hwang, M.S. Byeon, S.J. Hwang and B.H. Kim. 2013. Molecular identification of the bloom-forming cyanobacterium *Anabaena* from North Han River system

- in summer 2012. *Korean Journal of Ecology and Environment* **46**: 301-309.
- Li, R., M. Watanabe and M.M. Watanabe. 1997. Akinete formation in planktonic *Anabaena* spp. (cyanobacteria) by treatment with low temperature. *Journal of Phycology* **33**: 576-584.
- Lopez-Archilla, A.I., D. Moreira, P. Lopez-Garcia and C. Guerrero. 2004. Phytoplankton diversity and cyanobacterial dominance in a hypereutrophic shallow lake with biologically produced alkaline pH. *Extremophiles* **8**: 109-115.
- Matsuoka, K. and Y. Fukuyo. 2000. Technical guide for modern Dinoflagellate cyst study. WESTPAC-HAB 6-9.
- Myers, J.H., J. Beardall, G. Allinson, S. Salzman and L. Gunthorpe. 2010. Environmental influences on akinete germination and development in *Nodularia spumigena* (Cyanobacteriaceae), isolated from the Gippsland Lakes, Victoria, Australia. *Hydrobiologia* **649**: 239-247.
- Neely-Fisher, D.L., W.B. White and R.W. Fisher. 1989. Fructose-induced dark germination of *Anabaena* akinetes. *Current Microbiology* **19**: 139-142.
- Padisak, J. 2003. Estimation of minimum sedimentary inoculum (akinete) pool of *Cylindrospermopsis raciborskii*: a morphology and life cycle based method. *Hydrobiologia* **502**: 389-394.
- Paerl, H.W. 1988. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. *Limnology and Oceanography* **33**: 823-847.
- Probert, R.J. 2000. The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. p. 261-292. *In*: Seeds: the ecology of regeneration in plant communities (Fenner, M. ed.). Wallingford, UK: CAB International.
- Rai, A.K. and G.P. Pandey. 1981. Influence of environmental stress on the germination of *Anabaena vaginicola* akinetes. *Annals of Botany* **48**: 361-370.
- Reddy, P.M. 1983. Effects of temperature pre-treatment, desiccation and aging on the viability of spores of halophilic blue-green algae. *Hydrobiologia* **106**: 235-240.
- Reddy, P.M. 1984a. Effect of distilled water pre-treatment, nitrate and phosphate on germination of spores of two blue-green algae. *Hydrobiologia* **100**: 261-265.
- Reddy, P.M. 1984b. Influence of pH on sporulation, spore germination and germling survival in blue-green algae. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* **12**: 411-417.
- Rengefors, K., S. Gustafsson and A. Ståhl-Delbanco. 2004. Factors regulating the recruitment of cyanobacterial and eukaryotic phytoplankton from littoral and profundal sediments. *Aquatic Microbial Ecology* **36**: 213-226.
- Roelofs, T.D. and R.T. Oglesby. 1970. Ecological observations on the planktonic cyanophyte *Gloeotrichia echinulata*. *Limnology and Oceanography* **15**: 224-229.
- Saker, M.L., B.A. Neilan and D.J. Griffiths. 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm island, Queensland. *Journal of Phycology* **35**: 599-606.
- 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**: 1836-1843.
- Ståhl-Delbanco, A., L.A. Hansson and M. Gyllstrom. 2003. Recruitment of resting stages may induce blooms of *Microcystis* at low N:P ratios. *Journal of Plankton Research* **25**: 1099-1106.
- Sutherland, J.M., W.D.P. Stewart and M. Herdman. 1985. Akinete of the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7524: morphological changes during synchronous germination. *Archives of Microbiology* **142**: 269-274.
- Tsujimura, S., K. Ishikawa and H. Tsukada. 2001. Effect of temperature on growth of the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* in lake Biwa and lake Yogo. *Phycology Research* **49**: 275-280.
- Tsujimura, S. and T. Okubo. 2003. Development of *Anabaena* blooms in a small reservoir with dense sediment akinete population, with special reference to temperature and irradiance. *Journal of Plankton Research* **25**: 1059-1067.
- Tsujimura, S. 2004. Reduction of germination frequency of *Anabaena* akinetes by sediment drying: a possible method by which to inhibit bloom formation. *Water Research* **38**: 4361-4366.
- Van Dok, W. and B.T. Hart. 1997. Akinete germination in *Anabaena circinalis* (Cyanophyta). *Journal of Phycology* **33**: 12-17.
- Yamamoto, Y. 1976. Effect of some physical and chemical factors on the germination of akinetes of *Anabaena cylindrica*. *Journal of Genetics and Applied Microbiology* **22**: 311-323.