

Note

FDA와 Calcein-AM 방법을 이용한 해양플랑크톤 생사판별기법

백승호 · 신경순*

한국해양연구원 남해연구소
(656-830) 경상남도 거제시 장목면 장목리 391

Applicability of Fluorescein Diacetate (FDA) and Calcein-AM to Determine the Viability of Marine Plankton

Seung Ho Baek and Kyoungsoon Shin*

South Sea Research Institute, KORDI
Geoje 656-830, Korea

Abstract : Ballast water is widely recognized as a serious environmental problem due to the risk of introducing non-indigenous aquatic species. In this study we aimed to investigate measures which can minimize the transfer of aquatic organisms from ballast water. Securing more reliable technologies to determine the viability of aquatic organisms is an important initiative in ballast water management systems. To evaluate the viability of marine phytoplankton, we designed the staining methods of fluorescein diacetate (FDA) and Calcein-AM assay on each target species belonging to different groups, such as bacillariophyceae, dinophyceae, raphidophyceae, chrysophyceae, haptophyceae and chlorophyceae. The FDA method, which is based on measurements of cell esterase activity using a fluorimetric stain, was the best dye for determining live cells of almost all phytoplankton species, except several diatoms tested in this study. On the other hand, although fluorescence of Calcein-AM was very clear for a comparatively longer time, green fluorescence per cell volume was lacking in most of the tested species. According to the Flow CAM method, which is a continuous imaging technique designed to characterize particles, green fluorescence values of stained cells by FDA were significantly higher than those of Calcein-AM treatments and control, implying that the Flow CAM using FDA assay could be adapted as an important tool for distinguishing living cells from dead cells. Our results suggest that the FDA and Calcein-AM methods can be adapted for use on phytoplankton, though species-specific characters are greatly different from one organism to another.

Key words : fluorescein diacetate (FDA) assay, Calcein-AM, Flow CAM techniques, phytoplankton cell viability, ballast water management systems

1. 서 론

발라스트수(Ballast water; 선박평형수)는 화물을 적재하지 않은 공선 선박의 안전성을 유지하기 위해서 실는 물이며, 전 세계적으로 연간 100억톤 규모로 옮겨지고 있

다(IMO 2001; Gollasch et al. 2007). 이들 평형수에 의해 수송된 다양한 생물들은 새로운 환경에 적응하지 못하고 대부분 사멸하지만, 살아남은 일부 종은 강한 생존력과 번식력으로 항만 고유의 수서 생태계를 교란시키거나 파괴할 수 있는 잠재력을 지니게 된다(Hallegraeff and Bolch 1991; Hallegraeff 1998; Smayda 2007). 국제해사기구(IMO: International Maritime Organization)에서는 선박평

*Corresponding author. E-mail : ksshin@kordi.re.kr

형수에 포함되어 있는 외래종이 다른 지역으로 유입과 유출을 사전에 방지하기 위해서 처리장치를 통하여 사멸 또는 제거시킨 후 배출하여야 하는 국제선박평형수관리협약을 2004년 2월에 채택하였고, 2010년부터 협약이 발효하여 단계적으로 시행되며, 오는 2016년에는 모든 선박에 설치가 의무화된다(IMO 2001). 또한 선박평형수 처리(관리) 장치의 적합성을 확인하는 처리기준에 있어서 박테리아는 *Escherichia coli*이 250 cfu 100 m⁻¹로, Intestinal *Enterococci*는 100 cfu 100 m⁻¹로, *Vibrio cholerae* (serotypes O1 and O139); 1 cfu 100 m⁻¹ 이하로 각각 정하였고, 수중유기물의 최소크기가 10-50 µm 사이의 것은 10 inds m⁻¹로, 최소크기 50 µm보다 더 큰 것은 10 inds m⁻³ 이하의 기준을 이행하여야만 한다(IMO 2001; Gollasch et al. 2007).

선박 평형수 처리기술 개발 과정에서 처리구와 대조구의 생물생사유무를 판별하는 기법은 매우 중요하며, 이것을 신속 정확하게 판별할 수 있는 생물학적 판별기법은 아직 미해결점으로 남아 있다. 또한, 선박의 처리장치를 통과한 생물이 일정기간 항해후 상대국에 배출될 경우 각각의 생물군이 IMO 규정에 맞게 배출되고 있는가를 확인하는 과정에서 생사판별 유무는 매우 중요하다(Waite et al. 2003). 기존의 보고된 생사판별법으로는 크기가 10-50 µm 사이의 생물군은 형광측정기(Turner-designs 10-AU)를 이용한 형광측정방법, 운동성 유무, 형광현미경을 이용한 엽록소 형광색의 차이 등으로 판별하고 있고, 50 µm보다 큰 생물군에 관해서는 부속지(appendage)의 운동성 여부와 뾰족한 침으로 자극하여 그들의 반응성 여부로 평가하고 있다. 이들 방법은 생사 판별자의 주관성이 관여함으로써 보다 객관적인 평가 방법이 요구된다.

일부 선행된 연구에 의하면, Fluorescein diacetate(3', 6'-diacetylfluorescein: FDA) 시약으로 박테리아(Söderström 1977), 균류(Brunius 1980; Lundgren 1981), 조류를 비롯한 원생생물(Medzon and Brady 1969)을 대상생물로 생물활성도를 검토한 사례가 있다(Schnürer and Rosswall 1982). FDA 염색시약은 살아 있는 자가성영양생물의 세포체내에 흡수되어, lipase(지방분해효소), protease(단백질분해효소), esterase(에스테르의 가수분해를 촉매역활하는 효소)등의 효소와 반응하여 형광현미경(650 nm 파장)으로 관찰할 경우 녹색형광을 발하게 되어 생사판별이 가능하다. 또 다른 방법으로는 Calcein-AM 방법이 있고, 이 방법은 형광색소 Calcein의 4개의 칼복시기를 아세토키시메칠화함으로써 지용성(脂溶性)을 높게 하면 세포내 쉽게 침투되어 각종 효소와 가수분해 반응을 일으켜 형광현미경 하에서 황녹색을 발하게 된다(Kaneshiro et al. 1993; Porter et al. 1995; IMO 2008). 세계 각국에서는 선박평형수의 처리장치개발과정에서 FDA 방법, CFDA(Carboxy

fluorescein diacetate) 방법, Calcein-AM 방법으로 생사판별을 하고 있으나, 각 생물군의 종특이성에 따라서 염색 특성이 각각 다르게 나타남으로 보다 세심한 검토가 필요하다.

상기에 언급한 방법들은 현미경검경하에서 연구자가 직접 생사판별을 수행하여야 하기 때문에 많은 시간과 인적 자원이 필요하다. 이러한 점을 보완하게 위해서 보다 정확하고 신속한 장비개발이 중요하다고 판단된다.

Flow CAM(Fluid Imaging Technologies)은 연속적으로 액상 시료를 흘려보내면서 시료에 포함된 부유물(particles)을 고속 디지털 이미징화 하는 장비로써, 직경 2 µm-3 mm 크기의 부유성 입자의 영상을 기록할 수 있다(Sieracki et al. 1998). 본 장비는 실시간으로 수중생물을 모니터링하여 세포의 크기와 더불어 전체의 개체수를 산출할 수 있고, 형광장치가 장착되어 생물의 생사판별기법으로 활용가능하다. 그러나 본 장비의 신뢰성이 검증되지 않아 생사판별장치로 이용될 수 있는지 그 여부를 검토하는 것이 시급하다.

본 연구는 생세포 염색용 형광색소 FDA와 Calcein-AM의 용액을 이용하여 형광평미경에서 발하는 각각의 생물군의 종특이성을 평가하는 것과 더불어 Flow CAM을 이용하여 실시간으로 처리되는 고속디지털 영상과 동시에 발하는 형광값의 차이가 신속 정확한 생사판별기법으로 이용될 수 있는지 그 여부를 검토하는 것을 목적으로 한다.

2. 재료 및 방법

FDA 방법에 의한 생사판별법

FDA 방법은 Dorsey et al.(1989), Jochem(1999)와 Garvey et al.(2007)가 보고한 내용을 바탕으로 아래와 같이 요약하였다. 먼저 생세포 염색용 형광색소 FDA(3',6'-diacetylfluorescein) 시약 100 mg을 25 ml의 갈색암병에 20 ml의 Dimethylsulfoxide(DMSO)와 혼합하였다. DMSO와 섞은 working solution을 여과해수에 400배로 희석하였다. 그 후 1.7 ml의 microtube에 대상생물이 들어 있는 해수 1 ml을 넣고 여과해수에 400로 희석한 용액 25 µl을 넣어 염색 농도 비율을 1:40으로 맞춰 15분 정도 반응시킨 후 형광현미경으로 관찰 및 사진촬영을 행하였다. 여기서 DMSO와 섞은 working solution은 제조후 냉장조건에서 장기간 보존가능하다. 하지만 working solution을 여과해수에 희석하는 순간 FDA 시약이 반응하기 때문에 냉장조건을 유지하고 1시간내 반드시 사용하여야 한다.

Calcein-AM 방법에 의한 생사판별법

상기 방법은 일본이 IMO의 지침서 G2(Guideline for the approval of ballast water management systems;

Information related to the guidelines for ballast water sampling)에 제출한 방법이다(IMO 2008). 먼저 20 μM 의 Calcein-AM 용액을 준비한 후 2 ml 원심용 튜브에 1 ml 넣었다. 그 후 5%의 Pluronic 용액을 추가로 0.3 ml 넣어 working solution을 만들었다. 대상생물이 들어 있는 시험 수 2 ml와 working solution을 혼합한 후 20°C에서 30분 반응시킨 후 형광현미경의 파란색 필터(blue filter)로 관찰 및 사진촬영을 하였다.

FDA와 Calcein-AM 방법의 실험에서 사용한 대상생물은 현장시료에서 채집된 시료 15종과 더불어 배양주 18종을 선택하여 종 특이성에 따른 형광염색 양상을 검토하였다. 모든 배양주는 F/2 배지로 수온 20°C, 염분 34 PSU, 광량 80-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 광주기는 명:암=14:10 조건에서 배양하였다. 구체적으로 현장에서 채집한 식물플랑크톤은 규조류 *Actinocyclus* sp., *Coscinodiscus gigas*, *Leptocylindrus danicus*, *Navicula* sp., *Pleurosigma normanii*, *Skeletonema costatum* 와편모조류 *Ceratium furca*, *Ceratium fusus*, *Akashiwo sanguinea*, *Scrippsiella trochoidea*, *Gymnodinium* sp., *Prorocentrum micans*, *Protoperidinium conicum* 규질 편모조류 *Dictyocha fibula*, *Dictyocha speculum* 등과 함께 단일 종으로 계대 배양된 조류로는 와편모조류 *Akashiwo sanguinea*, *Alexandrium catenella*, *Alexandrium tamarense*, *Gymnodinium impudicum*, *Heterocapsa triquetra*, *Karlodinium micrum*, *Prorocentrum dentatum*, *Prorocentrum minimum*, *Prorocentrum triestinum*, *Scrippsiella trochoidea*, 침편모조류 *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*, *Chattonella* sp. 착편모조류 *Emiliania huxleyi*, *Isochysis galbana*, 유글레나조류 *Eutreptiella gymnastica*, 녹조류 *Chlorella ellipsoidea*, *Chlamydomonas* sp., *Dunaliella* sp. 등을 검토하였다.

Flow CAM 원리 및 방법

Flow CAM(Fluid Imaging Technologies, Inc.)은 peristaltic pump로 당기는 힘에 의해 대상생물이 포함되어 있는 샘플이 flow chamber로 흘러가게 되고, flow chamber를 통하여 흘러가는 도중 장착되어 있는 현미경 렌즈와 고속 디지털 이미징 시스템에 의해서 자동적으로 대상 생물(부유물질)을 감지(7 particule sec^{-1})하여 사진촬영과 함께 세 포전체개체수를 산출하는 장비이다. 아울러 실시간 촬영된 대상생물의 세포크기와 형광값은 자동적으로 산출이 가능하여 생물생사관별법으로 이용될 수 있다. 앞에서 언급한 FDA와 Calcein-AM 염색방법을 이용하여 Flow CAM에 흘러 보내 실시간으로 기록되는 형광값(525 \pm 15 nm)으로 생사관별을 검토하였다. Flow CAM의 시료를 흘러보내는 유리관의 크기가 각각 다르기 때문에 현장 시료를 20 μm 의 넛트로 채집한 후 그 시료를 100 μm 의 sieve

로 사이즈 분급후 20-100 μm 크기의 식물플랑크톤을 대상으로 FDA시약으로 염색하였다. 배양주는 와편모조류 *Akashiwo sanguinea*, *Gymnodinium impudicum*, *Heterocapsa triquetra*, *Karlodinium micrum*, *Prorocentrum minimum*, *Prorocentrum triestinum*, *Scrippsiella trochoidea* 침편모조류 *Chattonella* sp., *Heterosigma akashiwo*, 유글레나조류 *Eutreptiella gymnastica* 등을 FDA 시약에 염색하였고, *Prorocentrum minimum*, *Heterosigma akashiwo* 2종에 관해서 Calcein-AM 염색법으로 검토하여 비교하였다. 또한 *P. triestinum*을 제외한 모든 시료는 염색을 하지 않은 대조구에 대한 형광값도 산출하여 염색된 형광값과 비교 검토하였다.

3. 결과 및 고찰

식물플랑크톤의 생사관별은 염록소에 의해 발하는 자가형광의 변화를 형광현미경으로 관찰하는 방법(Cangelosi et al. 2007; 강 등 2007), 형광측정기(Turner-Designs 10-AU)의 형광값으로 검토하는 방법(Perrins et al. 2006), ATP를 근간으로 하는 분자생물학적 기법등이 있다(Waite et al. 2003). 이와 같은 방법은 식물플랑크톤의 생사관별을 간접적으로 할 수 있으나, 선박평형수에서 배출되는 생물의 생사를 확인하거나 처리장비를 개발하여 그 성능을 검증하는 단계에서는 실용적으로 사용되지 않고 있다. 세계 각국에서는 FDA와 CFDA(Carboxy fluorescein diacetate) 염색 방법을 주로 사용하고 있으나, 생물의 종 특이성에 따라 염색이 되지 않는 종이 존재하기 때문에 가능한 많은 종을 대상으로 염색특성을 검토하는 것이 중요하다(Garvey et al. 2007). 아울러 일본측이 IMO에 제출한 문건에 의하면(IMO 2008), Calcein-AM 방법은 식물플랑크톤뿐만 아니라 동물플랑크톤의 생사관별이 가능하다고 하지만, 이것 또한 종 특이성에 따라 염색이 되는 종과 그렇지 않은 종이 있어 재검토가 요구된다. 본 실험에서 FDA와 Calcein-AM 방법을 검토하여 녹색형광으로 뚜렷하게 구분이 되는 종은 강한 긍정(++), 세포내에서 녹색형광을 부분적 발하는 종은 긍정(+), 전혀 반응이 없는 종은 부정(-)으로 나누어 평가하였다(Table 1).

FDA와 Calcein-AM 방법으로 염색한 규조류중 *Actinocyclus* sp., *Leptocylindrus danicus*, *Navicula* sp., *Skeletonema costatum*에 관해서는 부정적(-)으로, *Coscinodiscus gigas* 와 *Pleurosigma normanii*은 긍정적(+)으로 나타났다(Table 1; Fig. 1E, F; Fig. 2B). 이 중 *L. danicus*, *S. costatum*는 체인을 형성하는 종이다. *S. costatum*는 체인중 몇 개의 세포에서는 녹색형광을 발하는 개체가 관찰되었으나, *L. danicus*는 형광을 발하는 개체를 전혀 관찰할 수 없었다. Gravey et al.(2007)와 Bently-

Table 1. Summary in fluorescein diacetate (FDA) and Calcein-AM assay of marine phytoplankton. ++: excellent work, +: positive, -: does not work for FDA and Calcein-AM

Species	Family	FDA	Calcein-AM	References
<i>Actinocyclus</i> sp.	Bacillariophyceae	-	-	This study
<i>Cerataulina bergonii</i>	Bacillariophyceae	+		Bently-Mowat (1982)
<i>Chaetoceros decipiens</i>	Bacillariophyceae	+		Garvey et al. (2007)
<i>Chaetoceros danicus</i>	Bacillariophyceae	+		Garvey et al. (2007)
<i>Chaetoceros</i> spp.	Bacillariophyceae	+		Bently-Mowat (1982)
<i>Coscinodiscus</i> spp.	Bacillariophyceae	+, +	-	This study, Bently-Mowat (1982)
<i>Ditylum brightwellii</i>	Bacillariophyceae	+		Bently-Mowat (1982)
<i>Leptocylindrus danicus</i>	Bacillariophyceae	-		This study
<i>Melosira</i> spp.	Bacillariophyceae	+	-	Bently-Mowat (1982)
<i>Navicula</i> spp.	Bacillariophyceae	-		This study
<i>Odontella</i> spp.	Bacillariophyceae	+	-	Bently-Mowat (1982)
<i>Pleurosigma</i> spp.	Bacillariophyceae	+		This study
<i>Skeletonema costatum</i>	Bacillariophyceae	+,-	-	This study, Bently-Mowat (1982)
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Bacillariophyceae	+,	+,-	Garvey et al. (2007)
<i>Akashiwo sanguinea</i>	Dinophyceae	++		This study
<i>Alexandrium catenella</i>	Dinophyceae	++	++	This study
<i>Alexandrium tamarense</i>	Dinophyceae	++		This study Onji et al. (2000)
<i>Ceratium furca</i>	Dinophyceae	++	++	This study
<i>Ceratium fusus</i>	Dinophyceae	++	++	This study
<i>Gymnodinium impudicum</i>	Dinophyceae	++	++	This study
<i>Heterocapsa triquetra</i>	Dinophyceae	++		This study
<i>Karlodinium micrum</i>	Dinophyceae	++	++	This study
<i>Prorocentrum dentatum</i>	Dinophyceae	++	++	This study
<i>Prorocentrum mican</i>	Dinophyceae	++,+	++	This study, Onji et al. (2000)
<i>Prorocentrum triestium</i>	Dinophyceae	++	++	This study
<i>Prorocentrum minimum</i>	Dinophyceae	++,+	++	This study, Onji et al. (2000)
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	Dinophyceae	++	++	This study
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Raphidophyceae	++,+	++	This study, Onji et al. (2000)
<i>Chattonella marina</i>	Raphidophyceae	+	++	Onji et al. (2000)
<i>Chattonella</i> sp.	Raphidophyceae	++	++	This study
<i>Dictyocha fibula</i>	Chrysophyceae	+		This study
<i>Dictyocha speculum</i>	Chrysophyceae	+	++	This study
<i>Emiliania huxleyi</i>	Haptophyceae	++	+	This study
<i>Isochysis galbana</i>	Haptophyceae	++,+	+	This study, Bently-Mowat (1982)
<i>Eutreptiella gymnastica</i>	Euglenophyceae	++	++	This study
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Chlorophyceae	++	-	This study
<i>Chlamydomonas</i> sp.	Chlorophyceae	++	-	This study
<i>Dunaliella</i> sp.	Chlorophyceae	++,+	++	This study
<i>Tetraselmis</i> spp.	Prasinophyceae	+,+	+	Bently-Mowat (1982), Onji et al. (2000)

Mowat(1982)은 체인을 형성하는 규조류 *S. costatum*, *Chaetoceros* spp.와 *Odontella* spp.을 FDA로 염색하여 긍정적인 결과를 도출하였고, 체인을 형성하지 않는 일부 종 (*Cerataulina*, *Ditylum*, *Thalassiosira* 속)에 관해서도 긍정적인 결과를 보고하였다. 그들의 연구에서도 세포내의 녹색형광을 방해하는 적색형광이 너무 강하여 부분적으로 녹색형광이 발현에도 불구하고 녹색형광이 무시되는 공통된 문제점을 지적하였고, 이와 같은 경향은 본 연구에서도 뚜렷하게 나타났다. Gravey et al.(2007)은 *Coscinodiscus granii* 세포의 상각(epivalve)과 하각(hypovalve)을 관찰했을 경우 FAD 염색의 녹색형광이 거의 관찰되지 않았으

나, 세포의 환각면(girdle)에서 녹색형광을 뚜렷하게 관찰하였다. 규조류는 하각에 상각의 두껍기 덮여 있는 형태학적 특성을 지니고 있고, 그 부분은 규산질의 단단한 각으로 형성되어 있어 염색액이 세포내에 침투되는 것이 쉽지 않았을 것이지만, 체인을 형성하는 종은 체인 사이로 연결되는 틈새로, 단일 세포에서는 환각면의 틈새로 염색액이 침투되어 각각의 효소와 반응하여 부분적으로 염색되었을 것으로 생각된다. 결과적으로 규조류에 관해서는 세포의 형태학적 특성과 종 특이성에 따라 세포내 FDA와 Calcein-AM의 반응 기작에 따른 차이가 관찰되었고, 특히 현상시료에서 이와 같은 현상이 분명하였으며, 같은 종임

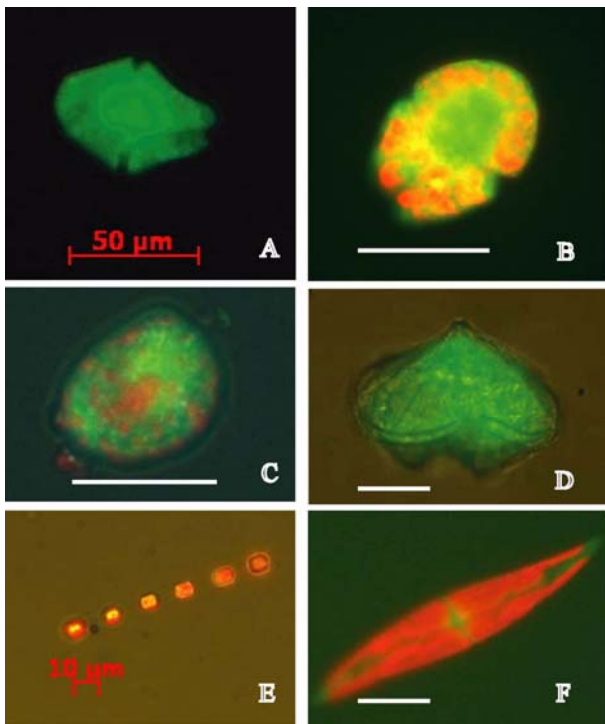


Fig. 1. List of test phytoplankton stained by FDA (Fluorescein diacetate). Dinoflagellate (A-D) and diatom species (E-F). A, B: *Akashiwo sanguinea*, C: *Prorocentrum mican*, D: *Protoperidinium conicum*, E: *Skeletonema costatum*, F: *Pleurosigma normanii*. Scale bar: 50 μm.

에도 불구하고 녹색형광을 발하는 개체와 그렇지 않는 개체로 구분되었다. 이것은 구조류의 폭 넓은 변이성과 더불어 현장에서 사멸해 가는 세포(moribund cell)는 쉽게 염색이 되지 않는다는 Bentley-Mowat(1982)의 보고와 일치한다.

유각와편모조류 *Alexandrium catenella*, *Alexandrium tamarense*, *Ceratium furca*, *Ceratium fusus*, *Heterocapsa*

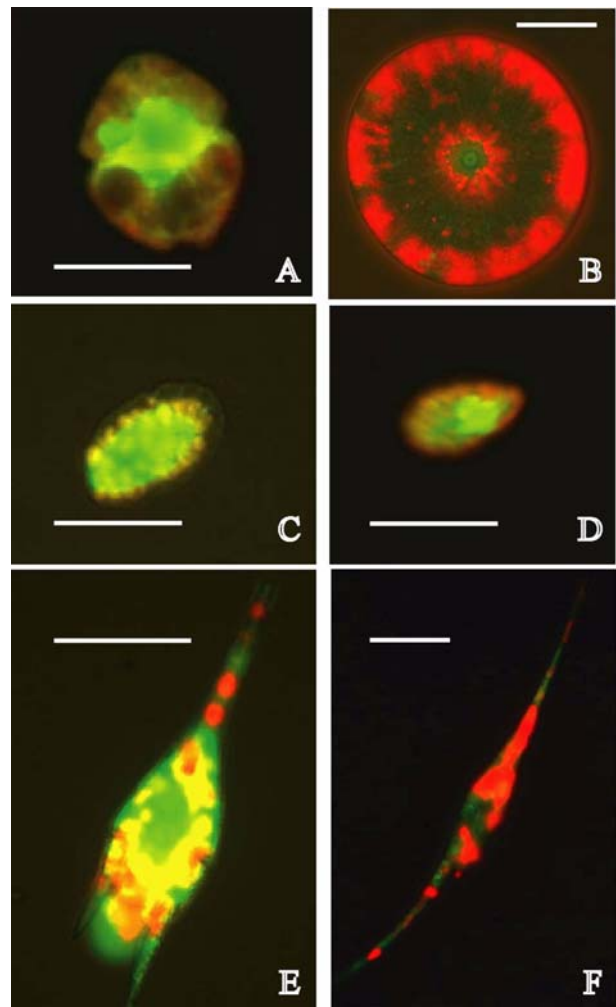


Fig. 2. List of test phytoplankton stained by Calcein-AM. Dinoflagellate (A, D, E and F), diatom (B) and Raphidophyte (C) species; A: *Akashiwo sanguinea*, B: *Coscinodiscus gigas*, C: *Chattonella* sp., D: *Prorocentrum triestinum*, E: *Ceratium furca*, F: *Ceratium fusus*. Scale bar: 50 μm.

Table 2. The differences of chlorophyll fluorescence values (Chl-2 channel; 525 nm) between fluorescein diacetate (FDA), Calcein-AM and control were assessed by *t*-test

Target species	FDA (ave. Chl-2)	Calcein-AM (ave. Chl-2)	Control (ave. Chl-2)	<i>t</i> -test	<i>p</i> -value
<i>Akashiwo sanguinea</i>	1227	-	537	9.112	< 0.001
<i>Gymnodinium impudicum</i>	1384	-	494	19.344	< 0.001
<i>Heterocapsa triquetra</i>	1653	-	547	27.616	< 0.001
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	764	-	545	8.466	< 0.001
<i>Chattonella</i> sp.	1524	-	695	24.152	< 0.001
<i>Eutreptiella gymnastica</i>	1016	-	558	35.527	< 0.001
<i>Prorocentrum minimum</i>	1024	-	633	27.007	< 0.001
	-	569	633	-8.241	< 0.001
<i>Heterosigma akashiwo</i>	1211	-	511	92.501	< 0.001
	-	835	511	21.389	< 0.001

triquetra, *Prorocentrum dentatum*, *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum minimum*, *Scrippsiella trochoidea*와 무각와편모조류 *Akashiwo sanguinea*, *Gymnodinium* sp., *Gymnodinium impudicum*, *Karlodinium micrum*는 FDA와 Calcein-AM 염색에서 아주 긍정적(++)인 반응을 보였다 (Table 1; Fig. 1A-D; Fig. 2A, C-F). 규질편모조류 *Dictyocha fibula*, *Dictyocha speculum* 침편모조류 *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*, *Chattonella* sp. 착편모조류 *Emiliania huxleyi*, *Isochysis galbana*, 유글레나조류 *Eutreptilla gymnastica*, 녹조류 *Chlorella ellipsoidea*, *Chlamydomonas* sp., *Dunaliella* sp.은 FDA 방법에서는 긍정적인(+) 결과가 도출되었으나, Calcein-AM 염색에서 녹조류 *C. ellipsoidea*, *Chlamydomonas* sp.은 부정적(-)이

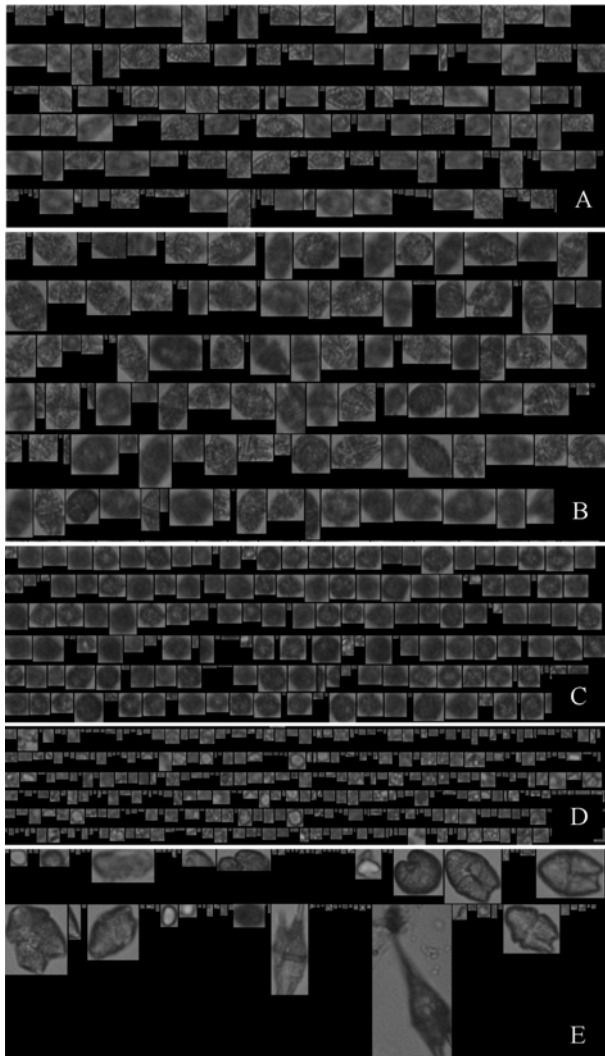


Fig. 3. List of test organism using the Flow CAM, which is a continuous imaging techniques designed to characterize particles. A: *Chattonella* sp., B: *Akashiwo sanguinea*, C: *Scrippsiella trochoidea*, D: *Prorocentrum minimum*, E: field sampe.

였다. Onji et al.(2000)와 Agustí and Sánchez(2002)은 무각과 유각의 와편모조류 7종을 대상으로 FDA 염색을 하여 모든 중에서 긍정적인 결과를 얻었다. 아울러 하프토조류 *E. huxleyi*, *Phaeocystis* sp., *Isochysis galbana* 녹조류 *Dunaliella primolecta*, *Dunaliella* spp.은 긍정적이었으나 (Bently-Mowat 1982; Agustí and Sánchez 2002), 하프토조류 *Phaeocystis globosa*는 부정적이였다(Garvey et al. 2007). 본 조사에서도 FDA 방법은 운동성을 가진 모든 세포에 대해서 긍정적인 반응을 보였으나, Calcein-AM 방법은 녹조류 2종 *Chlororella ellipsoidea*, *Chamydomonas* sp.에 한하여 부정적으로 나타났다. 이와 같은 결과는 종의 특이성에 따라 변이성의 차이는 있었으나, 편모를 가지고 운동할 수 있는 대부분의 식물플랑크톤은 FDA염색이 가능하다고 판단된다.

Flow CAM으로 실시간 촬영된 대상생물을 Fig. 3에 나타내었다. 아울러 FDA과 Calcein-AM 염색방법을 이용하여 Flow CAM에 흘려 보낸 대상생물의 세포직경(ESD; Equivalent Spherical Diameter), 엽록소의 형광값(Chlorophyll fluorescence: Chl-1), 염색된 세포의 형광값(dye cell fluorescence: Chl-2)을 자동적으로 산출하였다. 대상생물

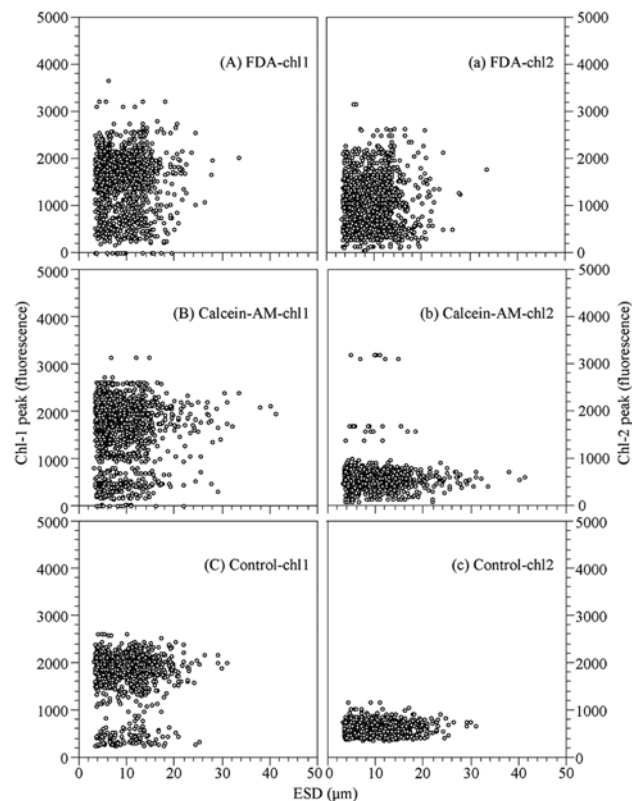


Fig. 4. Comparison of the fluorescence values (Chl-1 and Chl-2 peak) of the FDA (A, a), Calcein-AM (B, b) and control (C, c) on the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* counted by Flow CAM.

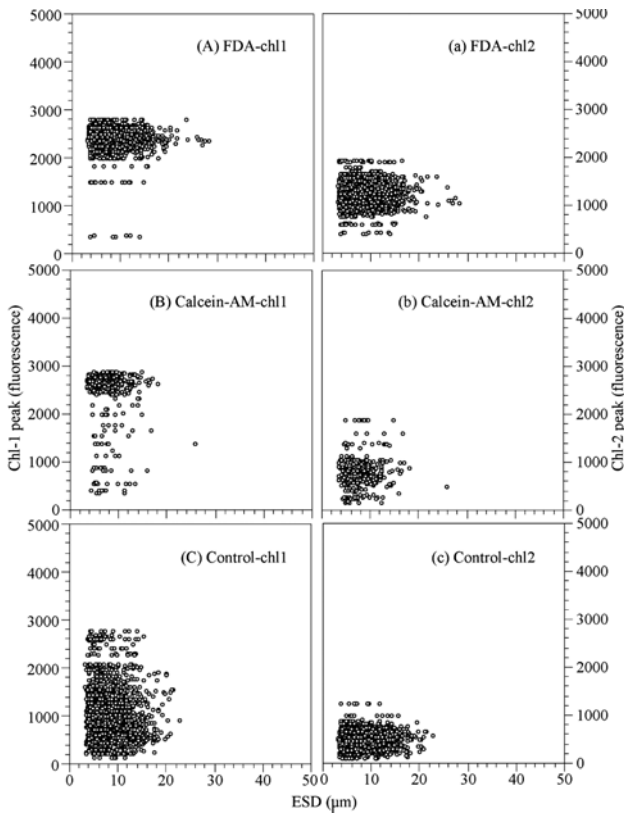


Fig. 5. Comparison of the fluorescence values (Chl-1 and Chl-2 peak) of the FDA (A, a), Calcein-AM (B, b) and control (C, c) on the raphidophyta *Heterosigma akashiwo* counted by Flow CAM.

*P. minimum*에 대한 FDA 염색의 녹색형광은 대조구와 비교하였을 때 유의하게 높게 나타났으나(t -value=27.0, p <0.001), Calcein-AM 염색방법은 낮게 나타났다(t -value=-8.24, p <0.001) (Fig. 4). *H. akashiwo*은 FDA(t -value=92.50, p <0.001)와 Calcein-AM(t -value=21.39, p <0.001) 염색방법 모두 대조구에 비하여 높게 나타났다(Fig. 5). 추가적으로 대조구와 FDA시약에 염색한 외편모조류 *A. sanguinea*(t -value=9.11, p <0.001), *G. impudicum*(t -value=19.34, p <0.001), *H. triquetra*(t -value=27.62, p <0.001), *S. trochoidea*(t -value=8.47, p <0.001), 침편모조류 *Chattonella* sp.(t -value=24.15, p <0.001), 유글레나조류 *E. gymnastica* (t -value=35.53, p <0.001) 등과 비교하였을 때 대상생물 모두 유의하게 높은 녹색형광값(Chl-2)이 관찰되었다(Fig. 6; Table 2). 현장시료와 *Prorocentrum triestium*에 관해서는 대조구는 검토하지 않았으나, FDA로 염색하여 Flow CAM의 Chl-2의 형광값은 다른 대상생물의 대조구에서 관찰된 Chl-2의 형광값(대부분 1000이하로 관찰됨)보다 높게 나타났다(Fig. 6). 결과적으로 Flow CAM에서 FDA로 염색한 생물은 세포내 엽록소를 감지하는 파장(>650nm)의 형광값(Chl-1)이 대조구(control)와 유사한 경

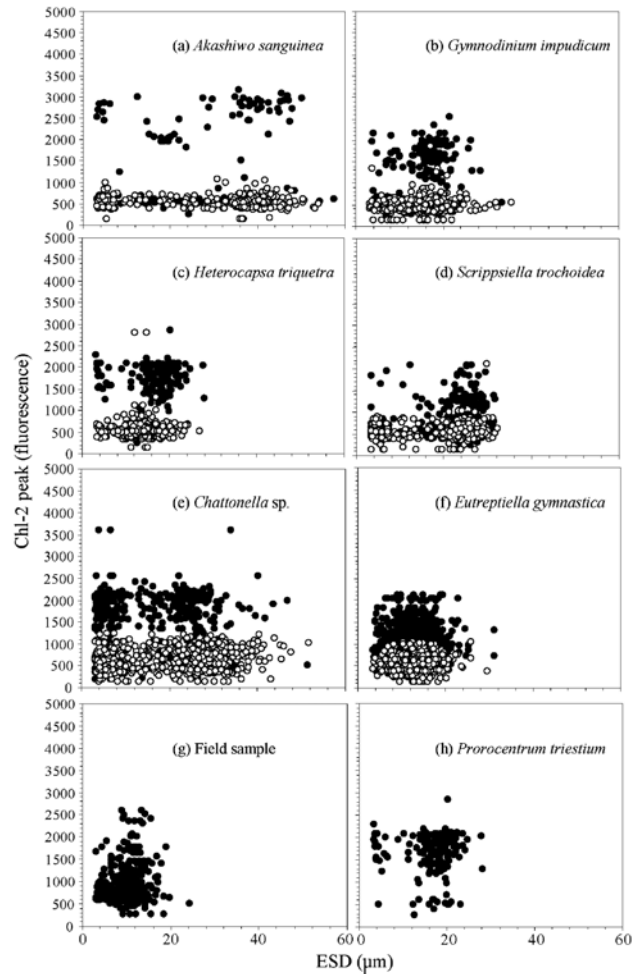


Fig. 6. Comparison of the green fluorescence values (Chl-2 peak) of the FDA and control on marine phytoplankton counted by Flow CAM. White and black circles indicate control and treatment, respectively. a: *Akashiwo sanguinea*, b: *Gymnodinium impudicum*, c: *Heterocapsa triquetra*, d: *Scrippsiella trochoidea*, e: *Chattonella* sp., f: *Eutreptiella gymnastica* g: field sample, h: *Prorocentrum triestium*. Field sample and *P. triestium* did not compare to control.

향을 보였으나, 녹색파장(525 nm)을 감지하는 녹색형광값(Chl-2)은 대조구에 비하여 유의하게 높은 값을 나타내었다. 이것은 FDA시약으로 염색한 생물 형광값이 염색을 하지 않은 생물과 확연히 구분되어 있다는 것을 의미한다. Calcein-AM 방법으로 염색한 외편모조류 *P. minimum*의 형광값이 부분적으로 높은 값을 나타낸 것을 제외하면 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다. 침편모조류 *H. akashiwo*에 관해서도 대조구에 비하여 상대적으로 Chl-2의 값이 조금 높게 나타나는 경향은 있었으나, FDA 방법에서 관찰한 것과 같은 확연한 차이는 나타나지 않았

다. Calcein-AM으로 염색한 대상생물은 형광현미경의 검경하에서도 핵을 중심으로 어떤 특정 부분만 녹색형광을 발하는 경향이 뚜렷하게 관찰되었고, 이것은 Flow CAM의 형광값(Chl-2)을 떨어뜨리게 한 원인으로 생각된다. 반면, FDA 방법은 형광현미경하에서도 대상생물의 특이성에 따라 조금 다르게 나타났으나, 보편적으로 세포전체를 감싸는 녹색형광이 강하게 발하였고, 이와 같은 염색특성은 Flow CAM의 형광값을 높게 감지하게 하는 잇점이 있어 생물의 생사를 보다 효율적으로 판단할 수 있었을 것으로 생각된다.

결과적으로 자연형광법으로 관찰할 수 없는 생물군(10-50 μm 사이의 섬모충류와 중속영양편모조류)과 비교적 활성이 약한 세포에 관해서는 FDA로 염색하여 생물의 생사판별을 구별하는 것이 보다 정확한 생물량을 평가하는데 도움이 될 것으로 판단되었다.

4. 요약

생세포 염색용 형광색소 FDA와 Calcein-AM의 용액을 이용하여 형광현미경으로 관찰한 형광특성과 Flow CAM을 이용하여 발하는 형광값으로 식물플랑크톤의 생사판별을 검토한 결과, 규조류는 종 특이성에 따라 FDA와 Calcein-AM의 염색되는 경향이 다르게 나타났으나, 운동성을 가진 대부분의 식물플랑크톤은 FDA 염색방법으로 생사판별이 가능할 것으로 판단되었다. Flow CAM 결과에서 FDA 염색은 대조구와 비교하였을 때 유의하게 높은 형광값이 관찰되었으나, Calcein-AM 방법은 대조구와 유사하거나 조금 높게 관찰되었다. 결론적으로 검토한 두 방법 모두 종 특이성에 따른 장단점이 있었으나, FDA 방법이 Calcein-AM 방법보다 식물플랑크톤 생사판별에 보다 유리하다는 것을 알 수 있었다. 특히 FDA 방법은 Flow CAM 장비를 이용하면 실시간 생사판별이 가능할 것으로 판단되었다.

사 사

본 연구는 한국해양연구원 연구과제 “항만 환경 위해도 평가기술 개발(PP00731)”과 “유해 수중생물 확인장치 개발(PMs181b)”의 지원으로 수행되었습니다. Flow CAM의 기기 사용과 FDA 염색 방법을 어드바이스한 손동현 박사님께 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

강정훈, 신경순, 현봉길, 장민철, 김은찬, 장만 (2007) 해양 플랑크톤 군집의 전기분해 염소소독 효과. 한국해양환경공

학회지 10:127-137

- Agustí S, Sánchez MC (2002) Cell viability in natural phytoplankton communities quantified by a membrane permeability probe. *Limnol Oceanogr* 47:818-828
- Bentley-Mowat J (1982) Application of fluorescence microscopy to pollution studies on marine phytoplankton. *Bot Mar* 25:203-204
- Brunius G (1980) Technical aspects of the use of 3', 6'-diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria. *Curr Microbiol* 4:321-323.
- Cangelosi AA, Mays NL, Balcer MD, Reavie ED, Reid DM, Strurtevant R, Gao X (2007) The response of zooplankton and phytoplankton from the North American Great Lakes to filtration. *Harmful Algae* 6:547-566
- Dorsey J, Yentsch CM, Mayo S, McKenna C (1989) Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. *Cytometry* 10:622-228
- Garvey M, Moriceau B, Passow U (2007) Applicability of the FDA assay to determine the viability of marine phytoplankton under different environmental conditions. *Mar Ecol Prog Ser* 352:17-26
- Gollasch S, David M, Voigt M, Dragsund E, Hewitt C, Fukuyo Y (2007) Critical review of the IMO international convention on the management of ship's ballast water and sediments. *Harmful Algae* 6:587-600
- Hallegraeff GM, Bolch CJ (1991) Transport of toxic dinoflagellate cysts via ship's ballast water. *Mar Pollut Bull* 22:27-30
- Hallegraeff GM (1998) Transport of toxic dinoflagellates via ship's ballast water: Bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Mar Ecol Prog Ser* 168:297-309
- IMO (2008) Harmful aquatic organisms in ballast water. Marine environment protection committee 58th session agenda item 2
- IMO (2001) Report on the ballast water treatment standards workshop. In: 1st International ballast water treatment standards workshop, IMO London, 28-30 March 2001. <http://globallast.Imo.org/workshopreport.htm>
- Jochem F (1999) Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate. *Mar Biol* 135:721-728
- Kaneshiro ES, Wyder MA, Wu YP, Cushion MT (1993) Reliability of calcein acetoxy methyl ester and ethidium homodimer or propidium iodide for viability assessment of microbes. *J Microb Methods* 17:1-16
- Lundgren B (1981) Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil. *Oikos* 36:17-22

- Medzon EL, Brady ML (1969) Direct measurement of acetylcholinesterase in living protist cells. *J Bacteriol* **97**:402-415
- Onji M, Sawabe T, Ezura Y (2000) An evaluation of viable staining dyes suitable for marine phytoplankton. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* **51**:151-158
- Perrins JC, Cordell JR, Ferm NC, Grocock JL, Herwing RP (2006) Mesocosm experiments for evaluating the biological efficacy of ozone treatment of marine ballast water. *Mar Pollut Bull* **52**:1756-1767
- Porter J, Diaper J, Edwards C, Pickup R (1995) Direct measurements of natural planktonic bacterial community viability by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **61**:2783-2786
- Schnürer J, Rosswall T (1982) Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl Environ Microbiol* **43**:1256-1261
- Sieracki C, Sieracki ME, Yentsch CS (1998) An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Mar Ecol Prog Ser* **168**:285-296
- Smayda TJ (2007) Reflections on the ballast water dispersal-harmful algal bloom paradigm. *Harmful Algae* **6**:601-622
- Söderström BE (1977) Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biol Biochem* **9**:59-63
- Waite TD, Kazumi J, Lane PVZ, Farmer LL, Smith SG, Smith SL, Hitchcock G, Capo TR (2003) Removal of natural populations of marine plankton by a large-scale ballast water treatment system. *Mar Ecol Prog Ser* **258**:51-63

Received Aug. 31, 2009

Revised Nov. 27, 2009

Accepted Dec. 4, 2009