

식물성플랑크톤-현미경계수법
(Phytoplankton-Microscopic Counting Method)

2023

1.0 개요

1.1 목적

이 시험기준은 물 속 부유생물인 식물성플랑크톤의 개체수를 현미경계수법을 이용하여 조사하는 것을 목적으로 하는 정량분석 방법이다.

1.2 적용범위

이 시험기준은 지표수에 적용할 수 있다.

1.3 “내용 없음”

2.0 용어정의

2.1 식물성플랑크톤

식물성플랑크톤은 운동력이 없거나 극히 적어 수체의 유동에 따라 수체 내에 부유하면서 생활하는 단일 개체, 집락성, 선상형태 광합성 생물을 총칭한다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 광학현미경 혹은 위상차현미경

1 000 배율까지 확대할 수 있는 현미경을 사용한다.

3.2 대물마이크로미터(stage micrometer)

눈금이 새겨져 있는 평평한 판이며, 현미경으로 물체의 길이를 측정할 때 쓰는 도구로서 접안마이크로미터 한 눈금의 길이를 계산하는 데 사용한다.

3.3 세즈윅-라프터(Sedgwick-Rafter) 챔버

길이 50 mm, 폭 20 mm, 깊이 1 mm, 부피 1 mL인 챔버를 사용한다.

3.4 접안마이크로미터(ocular micrometer)

동근 유리에 새겨진 눈금이며 접안렌즈에 부착하여 사용한다. 현미경으로 물체의 길이를 측정할 때 사용한다.

3.5 커버글라스

길이 55 mm, 폭 24 mm 또는 길이 21 mm, 폭 21 mm를 사용한다.

3.6 팔머-말로니(Phalmer-Maloney) 챔버

지름 17 mm, 깊이 0.4 mm이며 부피 0.1 mL인 챔버를 사용한다.

3.7 혈구계수기

슬라이드글라스의 중앙에 격자 모양 계수 구역이 상하 2개로 구분되어 있으며, 계수 구역은 격자 모양으로 구분되어 있어 각 격자 구역 내 침전된 조류를 계수한 후 mL당 총 세포 수를 환산한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 루골 용액

요오드화칼륨(potassium iodide, KI, 분자량: 166.00) 20 g을 정제수 200 mL ~ 300 mL에 녹이고 여기에 요오드(iodine, I, 분자량: 126.90) 10 g을 넣어 녹인 다음 정제수를 1 L로 한다. 이 용액을 사용하기 수일 전에 아세트산(acetic acid, CH₃COOH, 분자량: 60.05) 20 mL를 넣어 갈색 시약병에 보존한다.

4.2 포르말린 용액

포름알데히드(formaldehyde, H₂CO, 분자량: 30.03, 35.0 % ~ 38.0 % 함유)에 탄산수소나트륨(sodium hydrogen carbonate, NaHCO₃, 분자량: 84.01)을 넣어 pH를 7로 조정하여 사용하거나 포름알데히드 함량이 8 %인 중성완충포름알데히드용액(조직고정용)을 사용한다.

4.3 글루타르알데하이드[glutaraldehyde, CH₂(CH₂CHO)₂, 분자량: 100.12]

5.0 시료채취 및 관리

ES 04130.1 시료의 채취 및 보존 방법에 따른다.

6.0 “내용 없음”

7.0 분석절차

7.1 일반사항

시료 개체수는 계수면적당 10 ~ 40 정도가 되도록 희석 또는 농축한다.

[주 1] 계수면적: 현미경 시야에서 계수하도록 계수 챔버 내부 혹은 접안마이크로미터로 설정한 스트립 혹은 격자 크기로 한다.

7.2 시료 희석

시료가 육안으로 녹색이나 갈색으로 보이면 정제수로 적절한 농도로 희석한다.

7.3 시료 농축

7.3.1 원심분리방법

7.3.1.1 일정량 시료를 원심침전관에 넣고 $1\,000 \times g$ 으로 20분 정도 원심분리하여 일정배율로 농축한다.

7.3.1.2 미세조류는 $1\,500 \times g$ 에서 30분 정도 원심분리를 행한다. 침강성이 좋지 않은 남조류가 많은 시료는 루골용액으로 고정한 후 농축하거나 일정량을 플랑크톤 넷트 또는 핸드 넷트로 걸러 일정배율로 농축한다.

7.3.2 자연침전법

7.3.2.1 일정시료에 포르말린용액을 1 % 또는 루골용액을 (1 ~ 2) % 가하여 플랑크톤을 고정해 실린더 용기에 넣고 일정시간 정치 후 (0.5 h/mm) 싸이폰을 사용하여 상층액을 따라 내어 일정량으로 농축한다.

[주 2] 침전 용기는 얇고 투명한 유리 실린더를 사용한다.

7.3.2.2 지름이 작은 실린더로 옮겨 2회 ~ 3회 반복한다.

7.4 정성시험

정성시험의 목적은 식물성 플랑크톤의 종류를 조사하는 것이며, 검경배율 100배 ~ 1000배 시야에서 세포의 형태와 내부구조 등 미세한 사항을 관찰하면서 종 분류표에 따라 식물성플랑크톤 종을 확인하여 계수일지에 기재한다(부록 담수조류 분류표와 그림 참조).

7.5 정량시험

식물성플랑크톤의 계수는 정확성과 편리성을 위하여 일정 부피가 있는 계수용 챔버를 사용한다. 식물성플랑크톤의 동정에는 고배율을 많이 사용하지만 계수에는 저 ~ 중배율을 많이 사용된다. 계수 시 식물성플랑크톤의 종류에 따라 필요한 배율이 달라지므

로 아래 방법 중 하나를 이용한다.

7.5.1 저배율 방법(200배율 이하)

7.5.1.1 스트립 이용 계수

세즈윅-라프터 챔버에 커버글라스를 비스듬히 걸쳐 놓고 챔버 내 모서리에 기포가 생성되지 않도록 하면서 잘 혼합된 시료를 조심스럽게 피펫으로 채운다. 계수하기 전에 플랑크톤이 침전하도록 15분 정도 방치한다. 세즈윅-라프터 챔버 내부를 일정한 길이와 넓이(strip)로 구획하여 10스트립 이상 반복 계수하고 다음 계산식으로 1 mL 세포 수를 산출한다.

$$\text{세포 수} / \text{mL} = \frac{C}{L \times D \times W \times N} \times 1000 \quad (\text{식 1})$$

여기서 C = 계수된 세포 수의 합

L = 검경구획의 길이(mm)

W = 검경구획의 폭(mm)

D = 검경구획의 깊이(세즈윅-라프터 챔버 깊이, 1 mm)

N = 검정한 시야의 횟수

7.5.1.2 격자 이용 계수

세즈윅-라프터 챔버에서 격자를 사용할 경우 계수챔버 내에서 일정한 크기 격자를 무작위로 10회 이상 반복 계수하며 다음 계산식으로 1 mL 세포 수를 산출한다.

$$\text{세포 수} / \text{mL} = \frac{C}{A \times D \times N} \times 1000 \quad (\text{식 2})$$

여기서 C = 계수된 세포 수의 합

A = 격자의 면적(mm²)

D = 검정한 격자의 깊이(세즈윅-라프터 챔버 깊이, 1 mm)

N = 검정한 시야의 횟수

[주 3] 세즈윅-라프터 챔버는 조작이 편리하고 재현성이 높은 반면 중배율 이상에서는 관찰하기 어렵기 때문에 미소플랑크톤(nano plankton)의 검경에는 적절하지 않다.

[주 4] 시료를 챔버에 채울 때 피펫은 입구가 넓은 것을 사용하는 것이 좋다.

[주 5] 정체시간이 짧으면 충분히 침전되지 않은 개체가 계수 시 제외되어 오차 유발 요인이 된다.

[주 6] 검경시야의 크기 설정은 세즈윅-라프터 챔버 내부를 구획하거나 격자 혹은 스트립상 접안마이크로미터를 사용한다. 이때 접안마이크로미터의 크기는 현미경상 계수 배율에 따라 변동되므로 대물 마이크로미터를 사용하여 각 계수배율에서 스트립 혹은 격자 크기를 측정해야 한다.

[주 7] 계수 시 스트립을 이용하면 양쪽 경계면에 걸린 개체는 하나의 경계면만 계수한다.

[주 8] 계수 시 격자의 경우 격자의 경계면 4면 중 2면에 걸린 개체는 계수하고 나머지 2면에 들어온 개체는 계수하지 않는다.

[주 9] 시료가 희석되거나 농축되었을 때 개체수 계산 시 보정계수를 산출하여 적용한다.

7.5.2 중배율 방법(200배율 ~ 500배율 이하)

7.5.2.1 팔머-말로니 챔버 이용 계수

팔머-말로니 챔버에 커버글라스를 덮고 조심스럽게 시료를 피펫으로 채우고 15분 정도 정치한 다음 계수한다. 계수는 팔머-말로니 챔버 내에서 일정 격자 크기를 무작위로 10회 이상 반복하여 계수하고 1 mL 내 세포 수는 다음 식으로 계산한다.

$$\text{세포 수} / \text{mL} = \frac{C}{A \times D \times N} \times 1000 \quad (\text{식 3})$$

여기서 C = 계수된 세포 수의 합

A = 격자의 면적(mm^2)

D = 검정한 격자의 깊이(팔머-말로니 챔버의 깊이 0.4 mm)

N = 검정한 시야의 횟수

7.5.2.2 혈구계수기 이용 계수

혈구계수기에 커버글라스를 덮고 조심스럽게 시료용액을 주입한다. 5분 정도 정치한 다음 혈구계수기 격자상 개체수를 계수한다. 이때 혈구계수기는 5회 이상 반복한다. 1

mL 내 세포 수는 다음 식으로 계산한다.

$$\text{세포 수} / \text{mL} = \frac{C}{A \times D \times N} \times 1000 \quad (\text{식 4})$$

여기서 C = 계수된 세포 수의 합
 A = 혈구계수기 면적(mm²)
 D = 혈구계수기 깊이(mm)
 N = 검정한 시야의 횟수

[주 10] 팔머-말로니 챔버는 마이크로시스티스 같은 미소플랑크톤(nano plankton) 계수에 적절하다.

[주 11] 집락을 형성하는 조류는 필요에 따라 단일세포로 분리한 후 고르게 현탁하여 시료로 사용한다.

[주 12] 시료를 챔버에 채울 때 입구가 넓은 피펫을 사용하는 것이 좋다.

[주 13] 검경시야 설정은 팔머-말로니 챔버 내부를 구획하거나, 격자상 접안마이크로미터를 사용한다. 이때 접안마이크로미터의 크기는 현미경상 계수배율에 따라 변동되므로 대물 마이크로미터를 이용하여 각 계수배율하에서 스트립 혹은 격자 크기를 측정해야 한다.

[주 14] 혈구계수기는 가장 큰 격자 크기가 1 mm × 1 mm인 것을 사용한다.

[주 15] 정체시간이 짧으면 충분히 침전되지 않은 개체가 계수 시 제외되어 오차 유발 요인이 될 수 있다.

[주 16] 계수 시 격자의 경우 격자의 경계면 4면 중 2면에 걸린 개체는 계수하고 나머지 2면에 들어온 개체는 계수하지 않는다.

[주 17] 시료가 희석되거나 농축되었다면 개체수 계산 시 보정계수를 산출하여 적용한다.

8.0 결과보고

측정결과는 ‘식물성플랑크톤 계수일지’에 기입하여 보고한다.

[주 18] 담수조류 분류표 및 식물성플랑크톤 계수일지: 부록 참조

9.0 참고자료

9.1 American Public Health Association(APHA), American Water Works

Association, and Water Environment Federation, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. “10200–Plankton. Azide Modification”, Washington, DC., (2005).

9.2 한국담수조류도감, 아카데미서적, (1993).

10.0 부록

<별지 1>

식물성플랑크톤 계수일지

시료채취일시			지점명			기상						
수온(℃)		pH		투명도(m)		Chl.a(mg/m ³)						
농축방법			계수방법			계수배율						
플랑크톤	계수시야										합계	세포수/mL
합계(세포수/mL)												
기타참고사항												