

최 종
연구보고서

양어장 주변의 수질·저질 환경변화와
적조 및 패혈증의 발생 및 방지대책

Changes in water quality and sediment
quality around the mariculture farm and
occurrences of and countermeasures for the
red-tide and septicaemia

2002. 12

광주대학교 주관
연세대학교 협동연구

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “양어장 주변의 수질 · 저질환경 변화와 적조 및 패혈증의 발생 및 방지대책” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 12월 일

주관연구기관명 : 광주대학교

총괄연구책임자 : 양 성 렬

연 구 원 : 조 정 식

연 구 원 : 유 태 종

연 구 원 : 이 창 주

연 구 보 조 원 : 송 환 석

연 구 보 조 원 : 김 종 기

협동연구기관명 : 연세대학교

협동연구책임자 : 박 순 정

연 구 원 : 이 규 호

요 약 문

I. 제 목

양어장 주변의 수질·저질환경 변화와 적조 및 패혈증의 발생 및 방지대책

II. 연구개발의 목적 및 중요성

연안환경은 다른 해역에 비해 인구의 증가 및 왕성한 산업 활동의 결과와, 양식 어장에 따른 자가오염 및 육상 기원 오염물질의 유입 등으로 인해 연안오염의 악화 속도가 빨라지고 있다. 특히 조류의 흐름이 완만하고 태풍 및 자연재해 현상에서 영향을 받지 않는 대부분 폐쇄성 해역에서는 양식어장이 광대하게 분포하고 있다. 양식장 주변 해역의 수질 및 저질 환경의 악화와 계절적으로 유사한 시기에 발생하는 적조와 패혈증은 경제적 큰 손실로 작용하고 있다. 그러므로 장기적이고 체계적으로 양어장 주변의 수질 및 저질 환경의 변화에 따른 이들의 발생기작을 규명하고 효과적인 방지대책을 세우는 것이 중대한 현안 과제라 할 수 있을 것이다.

적조 발생기작에 관한 연구는 미국, 일본 그리고 국내에서 활발히 행하여지고 있다(Smayda, 1997; Honjo, 1993; Yamoci, 1984; Bae *et al.*, 1998). 우리나라에서의 적조연구 경향을 살펴보면 박과 김(1967)에 의해 '진해만의 적조현상에 관한 연구'가 처음으로 보고 된 이후 주로 국립수산진흥원을 중심으로 많은 연구가 진행되어 왔다. 1970년대까지의 적조 연구는 진해만, 통영연안을 중심으로 적조생물의 종분류 및 종조성을 규명하는데 집중되어 왔고, 80년대에는 적조생물의 증식 생리측면과 포자에 대한 기초 연구 및 독성에 대한 연구가 이루어지기 시작하였고, 90년대 이후에는 지금까지의 연구내용에 더불어 field mesocosm 설치에 의한 현장 생태연구, 포식압(grazing pressure) 그리고 적조의 이동과 확산 예측에 대한 연구들이

진행되고 있는 실정이다(김, 1999).

일본에서의 적조 연구는 1950년대부터 활발히 실시되어 왔으며, 일본에서 적조를 빈번히 일으키는 종들에 대한 생물생리 및 생태학적 연구와 적조예보 및 방제를 위한 기법 탐색에 괄목할 만한 연구결과들을 얻었다. 중국에서는 남부의 광둥성에서 북쪽의 산둥성 연안까지 적조가 발생하여 국가해양국과 수산연구원을 중심으로 연구를 하고 있으나, 대개 적조의 분포 및 변동상황을 파악하는데 주력하고 있는 실정이다(APEC, 1995). 미국과 캐나다는 이미 오래전부터 적조에 대한 연구를 수행해 왔으며, 세계 어패류 식중독에 관한 연구를 주도적으로 수행하고 있다. 특히 1997년부터는 우즈홀(Woods Hole) 해양연구소를 주축으로 여러 연구기관이 공동으로 5년간의 장기연구를 수행하고 있는데, 이 프로그램에서는 메인만(Gulf of Maine)에서 자주 출현하는 유독 적조종의 분포와 수송, 휴면포자, 영양염류 환경과 증식 생리 연구, 포식압과 독소의 전달 및 원격탐사 등 다방면의 연구를 수행하고 있는 실정이다.

패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)은 여러 독성미생물들 중에서도 단순히 장염 등을 유발하는 *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. alginoticus*와는 달리 치명적인 패혈증(septicemia)을 일으킨다는 측면에서 특히 주의가 요구되는 병원성 균이다(Stelma et al., 1992). 그러나 외국에서 이 세균에 대한 연구는 매우 활발하게 진행되고 있지는 않다. 그 이유는 외국의 경우 우리와 식생활 문화가 달라서 대부분의 경우 어패류를 날것으로 섭취하지 않음으로, 이 균에 의한 발병이 우리처럼 많이 발생되지 않고 있기 때문이다. 미국의 경우 남부의 플로리다 지방의 굴(oyster)에서 이 병원균이 검출되고 있으며, 이 균의 생태학적인 측면에서나 식품안전성 측면에서의 연구가 이루어지고 있다(DePaola et al., 1990; Oliver et al., 1992; O'Neal et al., 1992; Reddy et al., 1992; Wright et al., 1990). 하지만 미국 갯벌의 생태적, 물리·화학적인 환경이 우리와 다르다는 점과 우리국민은 굴뿐만 아니라 낙지(small octopus), 피조개(arkshell), 바지락(thinshell_surf clam) 등 다른 어패류를 섭취함으로써 패혈증에 쉽게 노출되고 자주 감염된다는 측면에서 그들의 연구결과를 그대로 국내에 응용할 수는 없는 현실이다. 따라서 한국 해안지대에 특이한 자연 환경요인에 대한 이 세균의 반응에 관한 이해가 절실하다고 할 수 있다.

그러나 대부분의 연구가 생리화학적 관점에서의 접근에 국한되어 있고, 지역적

인 해양 물리화학적 특성의 차이에 따른 적조 발생기작에 관한 연구는 많지 않은 실정이다. 양식어장이 잘 발달되어 있고 심지어는 과밀한 상태의 특성과 수질 및 저질 환경의 해양물리, 화학, 생물, 그리고 지질학적 특성이 매우 복잡 다양한 우리나라 연안해역의 특성상 특정한 해역의 환경조건하에서 적조의 발생원인에 대한 연구는 의미가 있다고 판단된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

구 분	목 표	내용 및 범위
1차년도 (1999년)	1) 연안 양식장 부근 해양 환경의 연속 모니터링 2) 적조 원인 생물의 질소계 영양염 이용 능력 파악 3) 패혈증 비브리오균의 생태적 특성 조사	0. 기존 관련 자료 수집 및 보완 0. 양식장 부근 해역에서 연중 수온, 염분 측정 0. 적조생물의 질산염 환원효소 활성도 측정 0. 양식장 수질, 저질 환경에서 영양염 측정 0. 어패류에 존재하는 패혈증 비브리오균의 생태학적인 특성 연구 0. 패혈증 비브리오균의 시기별 그리고 어패류별 분포 조사
2차년도 (2000년)	1) 수질 및 저질 환경악화를 초래하는 주된 오염원 파악 2) 적조생물의 성장을 trigger하는 원인 파악 3) 패혈증 비브리오균의 환경 스트레스에 대한 내성 탐색	0. 1차년도 자료 문제점 등 보완사항 파악 0. 년중 수질환경 특성 및 변화 0. 양식장 부근해역의 수온, 염분 측정 지속 및 적조생물 분포와 계절변화 0. 년중 저질 환경 특성 및 변화 양상 파악 0. 적조생물의 질산염 환원효소 활성도 측정 (지속) 및 ^{15}N 흡수실험 0. 적조생물의 빛 흡수특성 조사 0. 패혈증 비브리오균의 분리 0. 패혈증 비브리오균의 자연계에서의 stress 내성 조사 0. 비브리오균의 내성 극복 및 생존 특성 파악
3차년도 (2001년)	1) 조절 가능한 주요 오염물질의 경제적인 저감 방안 탐색 2) 적조생물의 친환경적인 제어방법 강구 3) 바다/갯벌-microcosm내에서의 패혈증 비브리오균의 생존조사 및 제어방법 개발	0. 2차년도 자료 문제점 등 보완사항 파악 0. 수질 및 저질 환경의 영양염 측정 지속 0. 적조생물의 빛 흡수특성 조사(지속) 0. 남해지역의 바다와 갯벌을 모방한 microcosm을 설치 0. microcosm에 패혈증 비브리오균 접종 및 생존도 탐색 0. 자연환경 하에서 이 균의 생태적 특징을 결정짓는 요인 분석 0. 적조생물 및 패혈증 비브리오균 대발생 및 기작에 대한 종합적 연구 및 토의 0. 적조생물 및 패혈증 비브리오균의 효과적이고 환경친화적 제어방법에 대한 종합적 연구 및 토의

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 앞으로 전망

해양환경의 악화는 저감을 위한 노력에도 불구하고 계속 심화되리라 예견된다. 이에 따라 적절한 대비책이 수립되지 않을 시 적조 및 병원성 세균의 발생빈도도 증가하리라 예상된다. 연안 양식어장이 밀집되어 있는 남해 연안 해역에서 적조 및 패혈증의 발생의 직접적인 원인은 여러 가지가 있지만 확실한 원인파악은 되고 있지 않다. 더욱이 발생원인과 관련한 환경 요인들을 연중 지속적으로 모니터링하고 획득한 연구결과들이 매우 부족한 상태이다. 본 연구에서는 적조 및 패혈증의 발생 기작을 이해하고 우리나라 연안역의 특성에 적합한 방지 대책을 세우는데 기초 자료를 제공할 것이다. 또한, 적조 및 패혈증의 발생과 밀접하게 관련된 수질 및 저질 환경변화와 관련하여 획득된 연속적인 연구결과와, 분자생물학적인 관점에서 비브리오팀 발생 및 제어기작에 관한 연구는 학술적인 면에서뿐만 아니라 수산물의 증식 및 원활한 공급, 안전성과 같은 경제적, 산업적 측면에서도 크게 기여 할 것으로 전망된다.

2. 기술도입의 타당성

국제적으로도 확립된 기술이 없는 상황이므로 자문 등을 통한 최소한의 기술도입이 필요하다고 판단된다. 특히 연안 양식장 주변의 수질 및 저질 환경의 악화와 관련하여 시기적으로 유사하게 발생하는 적조와 패혈증의 동시적, 체계적인 연구는 없으며, 이러한 연구과제는 지역적 특징이 상이하게 다를 수 있고 주변 해양환경 악화의 원인이 또한 서로 같지 않기 때문에 자체 개발하는 것이 바람직한 것으로 여겨진다. 본 연구과제의 성격상 특정 한 분야의 원리 적용뿐 아니라 다양한 분야에 걸친 조사와 그 해석 또한 훌륭한 기술이 될 것으로 판단된다. 본 연구팀이 활용하려고 하는 해양환경, 수산자원, 적조생물 및 생리활성 분야들의 국내외 전문가들의 자문은 본 연구과제의 종합적인 해석과 그 결과들의 응용에 또한 도움을 줄 것으로 기대된다.

S U M M A R Y

I. Title

Changes in water quality and sediment quality around the mariculture farm and occurrences of and countermeasures for the red-tide and septicaemia.

II. Purposes and the Importance of Research

Coastal environments are degrading in a faster rate due to increases in population and industrial activities, self-pollution from mariculture farms and the input of terrigenous pollutants. Especially, in most of the semi-enclosed coastal areas where the current speed is slow and not affected by typhoons and other catastrophic natural disasters, mariculture farms are present in large scales. The degradation of the water quality and benthic environments in the vicinity of the mariculture farms and co-occurring red-tides and septicaemia cause tremendous economical losses in fisheries industry. Therefore, it is imperative to investigate the processes of their development with environmental changes around the mariculture farms, and devise effective countermeasures in the long-term and systematic way.

Researches on the mechanism of red-tide development are being actively conducted in the Unites States, Japan and Korea(Smayda, 1997; Honjo, 1993; Yamoci, 1984; Bae *et al.*, 1998).

The scientific research in Korea has initiated with the article by Park and Kim(1967), and the group at NFRDI exerted the most effort. The researches until 1970's have been mostly on the species identification and composition around Jinhae and Tongyoung areas, in 1980's the physiological aspects of the growth of red-tide organisms, basic research on spores, and toxicological

studies has started, and since 1990's ecological studies using field mesocosm, grazing pressure, and the prediction on the transport and spreading of red tide organism are underway in addition to the continued study of previous programs (Kim, 1999).

The red-tide researches in Japan have been actively conducted since 1950's, and significant achievements were made on techniques of the red-tide prediction and prevention, in addition to the physiological and ecological studies on the red-tide organisms. In China, the red-tide occurs from Guangdong Province in south to Shandong Province in north, and State Oceanic Administration and Chinese Academy of Fishery Sciences are conducting researches, but mostly on the distribution and variability of red-tides. The United States and Canada have been conducting the red-tide research for a long time, and are leading the shell-fish poisoning research. Since 1997, Woods Hole Oceanographic Institution has been conducting the five-year project with other institutions, and the program includes the distribution and transport of frequent harmful red-tide species, resting spores, nutrient and physiological studies, grazing pressure, transfer of toxins, and remote sensing.

Septicaemia causing *Vibrio vulnificus* heeds special caution among simple enteritis causing *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. alginoticus* because *V. vulnificus* causes septicaemia which is fatal to human (Stelma *et al.*, 1992).

However, the research on this species is not active in other countries. Because, they usually do not consume the raw shell fish and the occurrence septicaemia is not common as in Korea. In the United States, this species is detected in oysters from south Florida, and researches on ecological and food safety aspects of this species are being conducted (DePaola *et al.*, 1990; Oliver *et al.*, 1992; O'Neal *et al.*, 1992, Reddy *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 1990). However, their research results cannot be applied directly in Korea because tidal mudflats in the United States are different from Korea, and Koreans consume not only oysters but also other species such as small

octopuses, arkshells, and thihshell-surf clams and easily exposed to and infected by septicaemia. Accordingly, it is urgent to understand the response of this species to specific coastal environments of Korea.

However, most researches are limited to the approaches on the physiological aspects, but the researches on the mechanisms of the red-tide or septicaemia occurrence due to the differences in marine physico-chemical characteristics are not common. Therefore, it is meaningful to study the mechanism of the occurrences of the red-tide and septicaemia under the overcrowded mariculture farms and complicated coastal environments of Korea in terms of physical, chemical, biological, and geological characteristics.

III. Research Purposes, Contents and Scopes

Year	Purposes	Contents and Scopes
1st Yr. (1999)	<ol style="list-style-type: none"> 1) Continuous monitoring of marine environments 2) Nitrogenous nutrient utilizing capacity 3) Ecology of septicaemia causing <i>V. vulnificus</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 0. Collection of relevant existing data 0. Temperature and salinity measurements 0. NRase activity of red-tide organisms 0. Nutrients from water-column and sediments 0. Ecology of septicaemia causing <i>Vibrio vulnificus</i> in fish and shellfish 0. Temporal and host-specific distribution of septicaemia causing <i>V. vulnificus</i>
2nd Yr. (2000)	<ol style="list-style-type: none"> 1) Major Sources of water column and sediment pollution 2) Triggers of the growth of red-tide organisms 3) Tolerance of the septicaemia causing <i>V. vulnificus</i> to the environmental stress 	<ol style="list-style-type: none"> 0. Amendments of the 1st year data 0. Water quality characteristics/variability 0. T-S measurements, distribution and seasonal changes of the red-tide organisms 0. Sediment characteristics and variability 0. NRase activity (cont.) and ¹⁵N uptake experiments by red-tide organisms 0. Light absorption characteristics of red-tide organisms 0. Isolation of septicaemia causing <i>Vibrio</i> 0. Tolerance of <i>V. vulnificus</i> in nature 0. Tolerance and survivability of <i>Vibrio</i>
3rd Yr. (2001)	<ol style="list-style-type: none"> 1) Economical measures of the reduction of major controllable pollutants 2) Environment-friendly measures of red-tide organism control 3) Survival and control of <i>V. vulnificus</i> in the sea/mudflat microcosm 	<ol style="list-style-type: none"> 0. Amendments of the 2nd year data 0. Nutrients in water-column and sediment 0. Light absorption characteristics of red-tide organisms (cont.) 0. Microcosm simulating the sea/mudflat of the south sea of Korea 0. Inoculation of <i>V. vulnificus</i> on microcosm and investigate the survivability 0. Factors controlling the ecology of <i>V. sp.</i> under natural conditions 0. Mechanisms of the breakout of red-tide and septicaemia causing organisms 0. Effective and environment friendly countermeasures against the red-tide and septicaemia causing organisms

IV. Results and Suggestions for Application

1. Future Prospects

The quality of marine environments is expected to deteriorate despite the efforts to reduce the pollution. Accordingly, the frequencies of the occurrence of the red-tide and pathogenic organisms will increase unless proper countermeasures are devised and implemented. It appears that there are several reasons for the occurrence of the red-tide and septicaemia in the coastal areas of the South Sea of Korea, where coastal mariculture farms are concentrated, the most evident cause has not been confirmed yet. Furthermore, the data on continuous monitoring of environmental parameters relevant to the development of these phenomena are still scarce.

In this research, fundamental data to understand the development of the red-tide and septicaemia, and to establish proper countermeasures which can be applied to the coastal areas of Korea, can be provided. Also, continuous monitoring results of the water quality and sediment environments related to the occurrence of the red-tide and septicaemia, and the molecular biological studies on the occurrence and control measures of the *Vibrio* are expected to contribute not only in academic aspects, but also economical and industrial aspects such as the proliferation, constant supply and safety of fisheries products.

2. Adequacy of the Introduction of Techniques

The minimal introduction of techniques through consulting seems inevitable because there is no universally established techniques available. Because there is no simultaneous and systematic research, in relation to the deterioration of water quality and benthic environments, on the red-tide and

septicaemia which occur during the similar periods, and because this type of research can be quite different in regional characteristics and in the causes of the deterioration of surrounding marine environments, it is desirable to develop the techniques by ourselves. Due to the characteristics of this research, not only the application of the theory but also the interdisciplinary investigation and its interpretation could be a worthy technique by itself. The consulting from the experts on marine environments, fisheries resources, physiology of red-tide organisms are expected to be beneficial in overall interpretation of the results and the application of this research.

CONTENTS

Chapter 1 Overview of the research project	22
Chapter 2 Status of the research and development	25
Chapter 3 Research topics conducted and results	27
Chapter 4 Achievements and the contribution to related fields	198
Chapter 5 Application plan for the research results	205
Chapter 6 Foreign informations accumulated during the research	207
Chapter 7 References	209

표 차 례

표 1. The composition of f/2 media.	39
표 2. 철이온과 chelator, red soil이 적조생물 생체형광에 미치는 영향.	130
표 3. 저해제인 Glucosamine, DTPA, 황토가 적조생물 생체형광에 미치는 영향.	131
표 4. 2000년도 전남 강진 지역에서의 총 세균 수 및 패혈증 비브리오균 수.	147
표 5. LBS 배지에서 <i>V. vulnificus</i> 성장에 대한 원액 피틴산 (협신양행 제품)의 MIC.	171
표 6. 발광세균을 이용한 원액 피틴산 (협신양행 제품)의 Toxicity test.	171
표 7. LBS 배지에서 <i>V. vulnificus</i> 성장에 대한 pH 7-피틴산 (협신양행 제품)의 MIC.	172
표 8. LBS 배지에서 <i>V. vulnificus</i> 성장에 대한 피틴산 (Sigma 제품)의 MIC.	173
표 9. EDTA의 발광세균 YH9에 대한 독성정도 검사 결과.	179
표 10. EDTA 농도에 따른 패혈증 비브리오균 성장 저해효과.	179
표 11. 8시간 동안 감염시킨 조개 내 <i>V. vulnificus</i> 의 수 및 7일간 -20℃에 보관 중인 조개 내 <i>V. vulnificus</i> 의 수.	190
표 12. 27시간 동안 감염시킨 조개 내 <i>V. vulnificus</i> 의 수 및 7일간 -20℃에 보관 중인 조개 내 <i>V. vulnificus</i> 의 수.	191

그림 차례

그림 1. 강진 마량항 주변의 양식장과 주변 연구지역	32
그림 2. 완도 사후도 주변의 양식장과 주변 연구지역.	33
그림 3. 2000년 2월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a[$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.	43
그림 4. 2000년 3월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a[$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.	44
그림 5. 2000년 4월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a[$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.	45
그림 6. 2000년 5월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a[$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.	46
그림 7. 2000년 6월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a[$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.	47
그림 8. 2000년 7월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a[$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.	48
그림 9. 2000년 8월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a[$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.	49
그림 10. 2000년 9월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a[$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.	50
그림 11. 2000년 6월 16일 ~ 23일 기간동안 CTD 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a[$\mu\text{g}/\ell$],	

	pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.	51
그림 12.	2000년 6월 25일 ~ 7월 4일 기간동안 CTD 강진 마량항 주변 가두리양식 장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a[$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.	52
그림 13.	2000년 7월 5일 ~ 7월 19일 기간동안 CTD 강진 마량항 주변 가두리양식 장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a[$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.	53
그림 14.	2000년 2월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	55
그림 15.	2000년 3월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	55
그림 16.	2000년 4월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	56
그림 17.	2000년 5월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	56
그림 18.	2000년 6월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	57
그림 19.	2000년 7월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	57
그림 20.	2000년 8월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	58
그림 21.	2000년 9월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	58
그림 22.	2001년 2월 25시간 관측한 가두리양식장의 수온, 염분, 용존산소, pH 그리고 엽록소 a의 수직분포의 변화.	61
그림 23.	2001년 4월 25시간 관측한 가두리양식장의 수온, 염분, 용존산소, pH 그리고 엽록소 a의 수직분포의 변화.	62
그림 24.	2001년 6월 25시간 관측한 가두리양식장의 수온, 염분, 용존산소, pH 그리고 엽록소 a의 수직분포의 변화.	63
그림 25.	2001년 8월 25시간 관측한 가두리양식장의 수온, 염분, 용존산소, pH 그리고 엽록소 a의 수직분포의 변화.	64
그림 26.	2001년 월별 가두리양식장의 수온, 염분, 용존산소, pH 그리고 엽록소 a의 수직분포의 변화.	65
그림 27.	2000년 2월 완도 사후도 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	66
그림 28.	2000년 4월 완도 사후도 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	67
그림 29.	2000년 6월 완도 사후도 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	67
그림 30.	2000년 8월 완도 사후도 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	68
그림 31.	2000년 10월 완도 사후도 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.	68

그림 32. 연구해역의 육상양식장 모식도.	70
그림 33. 양식장의 배출수의 혼합률을 달리한 시료의 형광변화.	71
그림 34. 양식장의 배출수의 혼합률을 달리한 시료의 영양염 변화1.	72
그림 35. 양식장의 배출수의 혼합률을 달리한 시료의 영양염 변화2.	73
그림 36. 2000년 전남 탐진강 측정소의 관측한 월평균 수온[°C], pH, 용존산소[mg/ℓ], COD[mg/ℓ], BOD[mg/ℓ], SS[mg/ℓ] 수질변화.	77
그림 37. 2001년 전남 탐진강 측정소의 관측한 월평균 수온[°C], pH, 용존산소[mg/ℓ], COD[mg/ℓ], BOD[mg/ℓ], SS[mg/ℓ] 수질변화.	77
그림 38. 2002년 전남 탐진강 측정소의 관측한 월평균 수온[°C], pH, 용존산소[mg/ℓ], COD[mg/ℓ], BOD[mg/ℓ], SS[mg/ℓ] 수질변화.	78
그림 39. 2000년 2월 강진 마량항 주변의 시간별 질산염 환원효소 자료.	80
그림 40. 2000년 3월 강진 마량항 주변의 시간별 질산염 환원효소 자료.	80
그림 41. 2000년 4월 강진 마량항 주변의 시간별 질산염 환원효소 자료.	81
그림 42. 2000년 5월 강진 마량항 주변의 시간별 질산염 환원효소 자료.	81
그림 43. 2000년 6월 강진 마량항 주변의 시간별 질산염 환원효소 자료.	82
그림 44. 2000년 7월 강진 마량항 주변의 시간별 질산염 환원효소 자료.	82
그림 45. 2000년 8월 강진 마량항 주변의 시간별 질산염 환원효소 자료.	83
그림 46. 2000년 9월 강진 마량항 주변의 시간별 질산염 환원효소 자료.	83
그림 47. 2000년 2월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	86
그림 48. 2000년 3월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	86
그림 49. 2000년 4월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	87
그림 50. 2000년 5월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	87
그림 51. 2000년 6월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	88
그림 52. 2000년 7월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	88
그림 53. 2000년 8월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	89
그림 54. 2000년 9월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	89
그림 55. 2000년 2월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	93
그림 56. 2000년 3월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	94
그림 57. 2000년 4월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	95
그림 58. 2000년 5월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	96

그림 59.	2000년 6월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	97
그림 60.	2000년 7월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	98
그림 61.	2000년 8월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	99
그림 62.	2000년 9월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	100
그림 63.	2001년 6월 철과 착화합물질의 다른 농도로 주입후 3일 배양한 <i>In vivo</i> fluorescence (A)와 DCMU 첨가후(B)의 형광.	103
그림 64.	(1) 2001년 7월 강진 마량의 가두리양식장에서 채취한 시료를 8일 동안 배양한 초기형광(■; F), DCMU추가 후의 형광(▣; Fd), 그리고 생체형광지수(-◇-; FRI).	104
그림 65.	(2) 2001년 7월 강진 마량의 가두리양식장에서 채취한 시료를 8일 동안 배양한 초기형광(■; F), DCMU추가 후의 형광(▣; Fd), 그리고 생체형광지수(-◇-; FRI).	104
그림 66.	(3) 2001년 7월 강진 마량의 가두리양식장에서 채취한 시료를 8일 동안 배양한 초기형광(■; F), DCMU추가 후의 형광(▣; Fd), 그리고 생체형광지수(-◇-; FRI).	105
그림 67.	2001년 2월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화.	106
그림 68.	2001년 4월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화.	107
그림 69.	2001년 6월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화.	107
그림 70.	2001년 8월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화.	108
그림 71.	2001년 10월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화.	108
그림 72.	2001년 2월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	109
그림 73.	2001년 4월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	110
그림 74.	2001년 6월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	110
그림 75.	2001년 8월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	111
그림 76.	2001년 10월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	111
그림 77.	2001년 2월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한 빛 흡수계수의 변화.	113
그림 78.	2001년 4월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한	

	빛 흡수계수의 변화.	113
그림 79.	2001년 6월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한 빛 흡수계수의 변화.	114
그림 80.	2001년 8월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한 빛 흡수계수의 변화.	114
그림 81.	2001년 10월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한 빛 흡수계수의 변화.	115
그림 82.	2001년 2월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	117
그림 83.	2001년 4월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	118
그림 84.	2001년 6월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	119
그림 85.	2001년 8월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	120
그림 86.	2001년 10월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	121
그림 87.	촉진제를 첨가한 경우 [A] 퇴적물, [B] 철 이온과 착화합물질.	123
그림 88.	저해제를 주입한 경우, [A] DTPA 1 ml 첨가한 경우, [B] 황토 1 g 첨가한 경우	124
그림 89.	촉진제를 첨가한 경우 [A] 퇴적물, [B] FeCl_3 1 ml, 5 ml 주입한 경우 [C] EDTA 1 ml, 5 ml 주입한 경우, [D] FeEDTA 1 ml, 5 ml 주입한 경우.	126
그림 90.	저해제를 주입한 경우, [A] 황토 1 g, 5 g 첨가한 경우, [B] DTPA 1ml 첨가한 경우.	127
그림 91.	저해제를 주입한 경우, [A] 조류저해제 (글루코사민-D ; GL) 10 ml, 5ml 첨가 , [B] 조류저해제 (글루코사민-D ; GL) 1 ml, 0.5 ml, 0.1 ml 첨가, [C] DTPA 1 ml, 0.5 ml 첨가한 경우, [D] 황토 10 g, 5 g, 1 g 첨가한 경우.	132
그림 92.	과산화수소 주입량에 따른 FRI 값.	133
그림 93.	과산화수소 주입량에 따른 FRI의 전체값.	134
그림 94.	2002년 3월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	136
그림 95.	2002년 5월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료.	136
그림 96.	2002년 3월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한 빛 흡수계수의 변화.	137
그림 97.	2002년 5월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한	

빛 흡수계수의 변화.	137
그림 98. 2002년 3월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화.	138
그림 99. 2002년 5월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화.	139
그림 100. 2002년 3월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	141
그림 101. 2002년 5월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].	142
그림 102. selective medium (TCBS) 및 colony hybridization 방법에 의한 패혈증 비브리오균수의 측정 결과.	148
그림 103. <i>vhA</i> gene (coding for hemolysin) 의 염기서열 및 nested PCR용 primer의 위치 및 방향.	150
그림 104. 패혈증 비브리오균의 농도(CFU/ml)와 그 서식처의 물리적 (수온), 화학적 (용존산소), 생물학적 (chlorophyll 농도, nitrite reductase 활 성도) 요인들과의 상관성.	152
그림 105. 저온에서의 CFU 감소 (non-culturable 상태로의 진입) 및 고온처리 시 CFU의 재출현 (resuscitation)현상.	153
그림 106. 2000년 가두리 양식장 해수의 종속영양세균 분포.	155
그림 107. 2001년 가두리 양식장 해수의 종속영양세균 분포.	155
그림 108. 2000년 가두리 양식장 저질토 및 어패류의 종속영양세균 분포.	156
그림 109. 2001년 가두리 양식장 저질토 및 어패류의 종속영양세균 분포.	156
그림 110. 2000년 가두리 양식장의 해수의 vibrio 분포.	158
그림 111. 2001년 가두리 양식장의 해수의 vibrio 분포.	158
그림 112. 2000년 가두리 양식장의 어패류 및 저질토의 vibrio 분포.	159
그림 113. 2001년 가두리 양식장의 어패류 및 저질토의 vibrio 분포.	159
그림 114. 패혈증 비브리오균의 생존에 미치는 저온의 영향.	163
그림 115. 패혈증 비브리오균의 생존에 미치는 고온의 영향.	164
그림 116. 패혈증 비브리오균의 생존에 미치는 산성도의 영향.	166
그림 117. 패혈증 비브리오균의 생존에 미치는 산화적 충격 물질 (과산화수소수)의 영향.	167
그림 118. 피틴산 (phytic acid)의 구조식.	170
그림 119. 피틴산 존재 하에서 패혈증 비브리오균의 생존.	174
그림 120. EDTA (pH 4) 존재 하에서 패혈증 비브리오균의 생존.	175
그림 121. pH 4 조건에서 피틴산의 패혈증 비브리오균(정체기 세포) 사멸효과.	176
그림 122. pH 7.5 조건 하에서 피틴산의 패혈증 비브리오균 사멸효과.	177
그림 123. 피틴산 첨가에 따른 해수 내 침전물 (시험관 1부터 9에는 최종농도 0,	

0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM의 피틴산이 첨가됨).	177
그림 124. pH 4 조건 하에서 EDTA와 피틴산의 패혈증 비브리오균 사멸효과 비교.	180
그림 125. pH 8.0 조건 하에서 EDTA의 패혈증 비브리오균의 사멸효과	181
그림 126. Microcosm의 설치 예.	182
그림 127. 천연해수 조건 하에서 EDTA의 패혈증 비브리오균의 사멸효과.	183
그림 128. 조개 내부에 존재하는 패혈증 비브리오균에 대한 EDTA의 사멸효과.	184
그림 129. 감염된 조개로부터 배출되는 패혈증 비브리오균.	185
그림 130. EDTA 미노출- 또는 노출- <i>V. vulnificus</i> 감염 조개로부터 배출되는 패혈증 비브리오균.	186
그림 131. 조개 내부에서 배출된 패혈증 비브리오균의 사멸률.	187
그림 132. 바다-갯벌-microcosm.	187
그림 133. 바다-갯벌-microcosm 내에서의 패혈증 비브리오균의 생존도.	189
그림 134. Citrate에 의한 비브리오 패혈증 균의 억제효과.	191
그림 135. EDTA에 의한 비브리오 패혈증 균의 억제효과.	192
그림 136. 냉장 및 냉동에 의한 비브리오 패혈증 균의 억제 효과.	193
그림 137. 광촉매에 의한 비브리오 패혈증 균의 억제효과.	194
그림 138. 여러 재질에 코팅된 광촉매에 의한 비브리오 패혈증 균의 억제효과.	195
그림 139. Glass bead의 코팅 재질과 유속에 따른 대장균 사멸효과.	196
그림 140. Glass bead의 코팅 재질과 유속에 따른 패혈증 비브리오균 사멸효과.	196
그림 141. 처리회수에 따른 패혈증 비브리오균 사멸효과.	197
그림 142. 광촉매 처리에 의한 패혈증 비브리오균 사멸효과 (좌: 처리전; 우: 처리 후).	197

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	22
제 2 장 국내외 기술개발 현황	25
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	27
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	198
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	205
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보	207
제 7 장 참고문헌	209

제 1 장 연구개발과제의 개요

가. 연구개발의 필요성

연안해역은 육상기원의 풍부한 영양염의 공급과 조석작용에 따른 활발한 수층 혼합에 의하여 높은 생물 생산성을 보이고, 다양한 생물들의 산란, 생육 및 서식지로서 생태학적으로 매우 중요한 위치를 차지하며, 또한 양질의 단백질질을 포함하고 있는 식량자원의 공급원으로서 경제적으로도 중요한 역할을 한다(Nixon, 1995). 최근 들어 경제수역의 설정으로 인한 어장의 상실에 따라 상당수의 수산업 종사 기구는 현재까지의 잡는 어업에서 기르는 어업으로의 전환이 불가피한 실정이다. 이에 따라 연안 양식장 및 양어장의 수산업에서 차지하는 비중의 증가가 예견된다. 그러나 연안 양식장의 생산성은 지자체 실시 후 어장 허가면적의 남발에 따른 과밀양식에 따른 자가오염과, 육상기원의 오염원에 의한 연안환경의 악화와 적조의 빈번한 발생으로 인하여 급격히 감소되고 있는 실정이다(Park, 1991; Hahn, 1998). 또한 갯벌이 발달된 전남 지역에서는 패혈증과 같이 인체에 치명적인 병을 일으키는 패혈증 비브리오균의 발생은 수산물의 소비를 감소시켜, 매년 하절기에 어민 및 수산물 판매업자에게 막대한 경제적인 손실을 초래하고 있다(Chowdhury *et al.*, 1989; West *et al.*, 1983).

이러한 연안양식장의 지속 가능한 생산을 유지하고 어민의 소득을 증대시키기 위해서는, 연안역의 환경용량을 산정하고 연안 양식장 부근의 해양환경을 개선하는 것이 선결조건이다. 따라서 본 연구에서는 전남 강진 마량항과 완도 사후도에 위치한 연안 가두리 양식장과 그 인근 해역에서 연중 연속적인 수온의 모니터링과 환경변수의 측정을 통하여 연안역의 환경변화와 이에 따른 적조 및 패혈증 비브리오균의 발생 기작을 이해하려고 한다. 이러한 조사 결과를 토대로 패혈증 비브리오균의 자연 및 수산물 내의 농도 및 활성도에 영향을 미치는 요인을 분석하고, 양식장의 지속 가능한 생산성을 추정하고, 적조 및 패혈증 피해 저감과 실현 가능한 방지책을 수립하는데 본 연구의 궁극적인 목적이 있다.

(1) 기술적 측면

육지와 해양의 추이대(ecotone)라 할 수 있는 연안환경은 인구 및 산업활동의 증가에 따라 필연적으로 악화되게 된다. 이에 따라 적조의 빈번한 발생 및

패혈증을 비롯한 여러 가지 병원성 세균이 번식하여 생태계를 교란시키고 양식업을 포함한 수산업에 막대한 피해를 끼친다. 적조와 패혈증 비브리오균은 동일하게 여름철에 주로 나타나며, 수질환경과 함께 저질 환경의 악화와도 매우 밀접한 관계를 가진다. 따라서 이들의 발생기작을 파악하고 대비책을 수립하기 위해서는 수질 및 저질 환경의 파악이 선결조건이다. 적조 및 패혈증 비브리오균 발생기작의 공통점을 찾아서 대비책 수립에 따른 기초 자료로 이용하려는데 본 연구의 목적이 있다고 할 수 있다.

적조는 80년대에서 90년대로 들어오면서 광역화, 장기화, 독성화의 특성을 뚜렷이 보이고 있으며, 이에 따른 피해액도 년 간 변화가 크기는 하지만 점진적으로 증가추세에 있다. 적조 발생기작에 대한 연구는 국립수산진흥원을 비롯한 여러 연구기관에서 수행되었고 현재도 활발히 수행되고 있다. 그러나 대부분의 연구결과는 주로 육상기원의 질산염 등 제어하기 힘든 다량의 영양염 제거가 유력한 대책으로 제시하고 있다. 그러나 해양환경에서 다량의 영양염을 저감시키기 위해서는 하수의 고도처리를 위한 막대한 시설비와 운영비가 소요되며 그 효과도 확실하지 않다. 또한 현재 적용되고 있는 실질적인 피해저감 대책이 근본적인 원인의 제거보다는 황토살포 등 사후대책(end-of-pipe)적인 차원이 대부분이다. 그러나 황토살포에 따른 저서생태계의 파괴는 피할 수 없는 현실이다. 따라서 적조 발생을 유도하는 미량원소(e.g., 미량금속 및 금속의 가용도를 조절하는 착화합물; Yang *et al.*, 1999)를 조절하는 방안을 본 과제에서는 접근하고자 한다.

국내의 패혈증 비브리오균에 대한 연구는 1980년대 초반 전남지방에 괴질이 출현했다는 보도 후, 1990년대에 들어와서 분자생물학적인 기법을 이용한 이 병원균의 신속한 검출법, molecular typing법 등의 개발이 시도되었다. 그러나 아직도 이 균의 국내 갯벌에서의 시기별 지역별 분포나, 어패류별 농도, 국내 갯벌 환경에서의 생존방법, 병원성 인자들에 대한 이해는 미미한 상태이다. 따라서 국내 갯벌 및 바닷물에 존재하는 패혈증 비브리오균의 생태적인 그리고 생리화적인 특성에 대한 이해를 통하여 방지대책 수립을 위한 연구를 종합적이고 체계적으로 수행하고자 한다. 이러한 연구는 갯벌에서 생산되는 유용자원의 하나인 어패류의 안전성을 증진시키고 경제적인 가치를 증진시킬 수 있는 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대되는 매우 필요하고 중요한 연구라 할 수 있겠다. 또한 이 연구과제의

결과로 얻어질 갯벌 내 어패류와 이 병원성 세균과의 상관관계, 갯벌의 물리 화학적인 환경이 이 균의 분포에 미치는 영향 등에 대한 이해는 매우 가치 있는 정보를 제공할 수 있을 것이다.

(2) 경제·산업적 측면

적조와 패혈증의 발생으로 인한 수산업의 피해는 언급하지 않아도 될 만큼 매우 크다. 또한 연안역 및 갯벌에서 생산되는 생물자원 중 어패류의 경제적인 가치는 매우 크다. 따라서 이를 효과적으로 제어하는 방법의 개발은 시급하며 새로운 각도에서의 접근이 필요하다. 그러나 적조 생물과 갯벌 및 해양퇴적층에 존재하는 *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. alginoticus* 등의 독성미생물들은 이러한 어패류를 오염시켜 인간의 건강을 위협하고 결과적으로 어패류의 경제적인 가치를 크게 감소시키고 있다 (Colwell *et al.*, 1985; Depaola *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1992). 이러한 어패류의 독성 미생물에 의한 오염은 어패류를 주로 낚것으로 섭취하는 식문화를 갖는 우리 국민에게는 더 더욱 심각한 문제이다. 따라서 이러한 독성미생물의 생태학적 그리고 생리학적인 특성의 이해는 우리 국민의 보건 향상 측면에서나 연안환경 및 갯벌자원의 경제적인 가치향상을 위해서 필수적으로 요구되고 있다.

(3) 사회·문화적 측면

적조 및 패혈증이 주로 발생하는 여름철은 휴가기간이어서 해수욕장에 많은 인파가 몰리고 해안 휴양지에서 해산물을 섭취하는 기회가 많다. 그러나 적조 및 패혈증이 발생하게 되면 인간의 여가활동을 위축시키고 수산물의 소비를 감소시키는 요인이 된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

연안환경은 다른 해역에 비해 인구 및 산업활동의 왕성한 결과와, 양식어장에 따른 자가오염 및 육상 기원 오염물질의 빈번한 유입 등으로 인해 점차적으로 악화 속도가 빨라지고 있는 실정이다. 이러한 양어장 주변 해역의 수질 및 저질 환경의 악화와 함께, 계절적으로 유사한 시기에 발생하는 적조와 수산물에 의한 패혈증은 경제적으로나 환경학적으로도 큰 손실로 작용하고 있다. 그러므로 장기적이고 체계적인 방법으로 양어장 주변의 수질 및 저질 환경의 변화에 따른 이들의 발생기작을 규명하고 효과적인 방지대책을 세우는 것은 당면하고 있는 중대한 현안 과제라 할 수 있을 것이다.

적조 발생기작에 관한 연구는 미국, 일본 그리고 국내에서 활발히 행하여지고 있다(Smayda, 1997; Honjo, 1993; Yamoci, 1984; Bae *et al.*, 1998). 우리나라에서의 적조연구 경향을 살펴보면, 우리나라에서는 박과 김(1967)에 의해 '진해만의 적조현상에 관한 연구'가 처음으로 보고된 이후 주로 국립수산진흥원을 중심으로 많은 연구가 진행되어 왔다. 1970년대까지의 적조 연구는 진해만, 통영연안을 중심으로 적조생물의 종분류 및 종조성을 규명하는데 집중되어 왔고, 80년대에는 적조생물의 증식 생리측면과 포자에 대한 기초 연구 및 독성에 대한 연구가 이루어지기 시작하였고, 90년대 이후에는 지금까지의 연구내용에 더불어 field mesocosm 설치에 의한 현장 생태연구, 포식압(grazing pressure) 그리고 적조의 이동과 확산 예측에 대한 연구들이 진행되고 있는 실정이다(김, 1999).

일본에서의 적조 연구는 1950년대부터 활발히 실시되어 왔으며, 일본에서 적조를 빈번히 일으키는 종들에 대한 생물, 생리, 생태학적 연구와 적조예보 및 방제를 위한 기법 탐색에 괄목할 만한 연구결과들을 얻었다. 중국에서는 남부의 광둥성에서 북쪽의 산둥성 연안까지 적조가 발생하여 국가해양국과 수산연구원을 중심으로 연구를 하고 있으나, 대개 적조의 분포 및 변동 상황을 파악하는데 주력하고 있는 실정이다(APEC, 1995). 미국과 캐나다는 이미 오래전부터 적조에 대한 연구를 수행해 왔으며, 세계 어패류 식중독에 관한 연구를 주도적으로 수행하고 있다. 특히 1997년부터는 우즈홀(Woods Hole) 해양연구소를 주축으로 여러 연구기관이 공동으로 5년간의 장기연구를 수행하고 있는데, 이 프로그램에서는 메인만(Gulf of Maine)에서 자주 출현하는 유독 적조종의 분포와 수송, 휴면포자, 영양염류 환경과

증식 생리 연구, 포식압과 독소의 전달 및 원격탐사 등 다방면의 연구를 수행하고 있는 실정이다.

패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)은 여러 독성미생물들 중에서도 단순히 장염 등을 유발하는 *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. alginoticus*와는 달리 치명적인 패혈증 (septicemia)을 일으킨다는 측면에서 특히 주의가 요구되는 병원성 균이다 (Stelma et al., 1992). 그러나 외국에서 이 세균에 대한 연구는 매우 활발하게 진행되고 있지는 않다. 그 이유는 외국의 경우 우리와 식생활 문화가 달라서 대부분의 경우 어패류를 날것으로 섭취하지 않음으로, 이 균에 의한 발병이 우리처럼 많이 발생되지 않고 있기 때문이다. 미국의 경우 남부의 플로리다 지방의 굴(oyster)에서 이 병원균이 검출되고 있으며, 이 균의 생태학적인 측면에서나 식품안전성 측면에서의 연구가 이루어지고 있다 (DePaola et al., 1990; Oliver et al., 1992; O'Neal et al., 1992, Reddy et al., 1992; Wright et al., 1990). 하지만 미국 갯벌의 생태적, 물리·화학적 환경이 우리와 다르다는 점과, 우리나라는 굴뿐만 아니라 낙지(small octopus), 피조개(arkshell), 반지락(thinshell-surf clam) 등 다른 어패류를 섭취함으로써 패혈증에 쉽게 노출되고 자주 감염된다는 측면에서 그들의 연구결과를 그대로 국내에 응용할 수는 없는 현실이다. 따라서 한국 해안지대에 특이한 자연 환경요인에 대한 이 세균의 반응에 관한 이해가 절실하다고 할 수 있다.

그러나 대부분의 연구가 생리학적인 관점에서의 접근에 국한되어 있고, 지역적인 해양 물리화학적 특성의 차이에 따른 적조 발생기작에 관한 연구는 많지 않은 실정이다. 양식어장이 잘 발달되어 있고 심지어는 과밀한 상태의 특성과 수질 및 저질 환경의 해양물리, 화학, 생물, 그리고 지질학적 특성이 매우 복잡 다양한 우리나라 연안해역의 특성상 특정한 해역의 환경조건하에서 적조의 발생원인에 대한 연구는 의미가 있다고 판단된다.

아울러 패혈증 비브리오균에 관한 국내에서의 연구는 전남대의 최 상호 교수 팀의 분자생물학적인 연구와 국립보건원 연구팀 및 전남대 의대 정 선식, 이 준행 교수 팀이 병리학적 및 의학적인 차원에서 연구가 매우 활발히 진행 중이므로, 해수 및 갯벌 등의 자연생태계에서 환경변화에 따른 패혈증 비브리오균의 생태·생리학적 연구 결과의 분자 수준에서의 이해에 있어서 학문적인 상호교류가 기대된다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 이론적, 실험적 접근방법

1. 1차년도

1-1. 연안양식장 부근 해양환경의 연속 모니터링

수온의 연속 모니터링은 PAR (photosynthetically available radiation: 광합성에 가용한 광량) sensor와 D.O. sensor가 장착된 EMP-2000 CTD (conductivity, temperature, depth: 수온 염분 측정장치) 1대와 수심, 수온 염분을 기록할 수 있는 Seamons CTD와 3대의 Temperature logger (Seamons)를 양어장에 계류하여 표층에서 저층까지 3개 수심에서 15분 간격으로 연속적으로 측정하였다. 또한 수질 및 저질의 영양염과 중금속 등의 환경 변수들을 매월 현장조사하였다. 기초생산력의 측정은 안정동위원소인 ^{15}N uptake 방법을 이용하여 측정하였다.

1-2. 적조원인 생물의 질소계 영양염 이용 능력 파악

질산염 환원효소(Nitrate reductase: NRase)의 활성도는 적조원인 생물을 포함한 식물플랑크톤의 질소계 영양염 이용능력을 파악하는데 필요한 변수이다(Berges and Harrison, 1995; Berges *et al.*, 1995; Syrett, 1981; Solomonson and Barber, 1990). 이의 측정은 해수시료를 GF/C filter에 여과 후 냉동 운반하여, 실험실에서 포화 질산염(10 mM KNO_3) 하에서 n-propanol을 첨가하여 환원된 아질산염의 농도를 spectrophotometer(Unicam, UV-400)를 이용하여 측정하였다(Davidson and Stewart, 1984; Hochman *et al.*, 1986).

1-3. 패혈증 비브리오균의 생태적 특성

국내 해안 및 갯벌에서 생산되고 있는 대표적인 유용자원인 어패류를 오염시킴으로서 그들의 안전성을 저하시키는 패혈증 비브리오의 생태적인 특성을 연구하고, 패혈증 비브리오균의 환경 스트레스에 대한 내성/생존에 대하여 이해하여, 궁극적

으로 자연적 및 인공적인 환경 하에서 이 세균의 생존 특징을 결정짓는 요인을 해독하고자 수행되고 있다. 이런 지식을 기반으로 패혈증 비브리오균의 병원성인자를 감소시킬 수 있는 방법을 개발하였다.

우선 제 1차년도 연구에서는 전남해안의 바닷물, 갯벌 및 이 지역에서 생산되는 어패류에 존재하는 패혈증 비브리오균의 생태학적인 특성을 이해하였다. 이 세균의 정확한 정량법을 확립하기 위하여 (1) 전통적인 패혈증 비브리오균 계수방법과 (2) 현대적인 분자생물학적인 방법 (colony hybridization)으로 계수된 패혈증 비브리오균 수를 비교 분석하였다. 아울러 (3) 배양이 되지 않지만 감염성을 갖는 (non-culturable but viable; Colwell et al., 1985) 패혈증 비브리오균의 정량을 위하여 또 다른 분자생물학적인 방법 (PCR)을 사용하여 이 방법의 응용성 여부를 판단하고 (Hill et al., 1991), 그 결과를 (1), (2)의 것과 비교하였다. 이러한 세 가지 방법으로부터 도출된 결과를 자연계의 여러 환경인자들의 변화와 비교하여 패혈증 비브리오균의 생태를 결정짓는 주된 환경 인자를 밝혀냈다. 즉, 패혈증 비브리오균의 시기별 그리고 어패류별 분포를 조사하고, 자연계의 여러 환경인자들이 병원균의 분포에 주는 영향을 규명한다. 이로부터 서남해안의 갯벌 또는 갯벌에서 생산되는 어패류에 존재하는 패혈증 비브리오균의 생태학적인 그리고 생리학적인 특성을 이해한다.

이를 위하여, 남해안의 갯벌 그리고 그곳에서 생산 또는 채취되는 어패류에 존재하는 패혈증 비브리오균의 분포를 지역별, 시기별, 그리고 어패류별로 조사하였다. 남해안의 특정지역 (전남 강진 해역)을 시료채취 장소로 정하고 계절별로 1년에 10번 이상 다양한 시료를 채취하여 패혈증 비브리오균의 농도를 측정하였다. 이 세균의 농도 측정은 기존의 선택배지를 사용하여 CFU (colony forming unit)를 결정함으로써 정량하는 방법보다 특이성과 plating efficiency 측면에서 개선된 DNA probe를 사용한 colony hybridization 방법을 이용하였다. 이때 선택할 수 있는 DNA probe는 전남대 최 상호 교수 연구팀이 이미 확보하고 있는 hemolysin 유전자인 *vhA* 유전자를 사용하였다 (Lee et al., 2001). 보다 정확한 패혈증 비브리오균의 정량을 위하여 colony hybridization 결과로 유추된 패혈증 비브리오균은 *vhA* 유전자를 증폭시키는 polymerase chain reaction 방법으로 확인하였다 (Hill et al.,

1991).

2. 2차년도

2-1. 수질 및 저질 환경악화를 초래하는 주된 오염원 파악

1차년도 연속 관측된 환경자료로부터 적조 및 패혈병을 일으키는데 주된 역할을 하는 오염물질을 파악하는데 초점을 맞추었다. 또한 1차년도의 해양환경 연속 모니터링은 계속 수행하였다.

2-2. 적조생물의 성장을 trigger하는 원인파악

적조생물의 성장을 촉진시키는 결정적인 미량원소의 정량적인 분석과 식물플랑크톤에의 가용도를 측정하였다.

2-3. 패혈증 비브리오균의 환경 스트레스에 대한 내성 탐색

국내 해안 및 갯벌에서 생산되고 있는 대표적인 유용자원인 어패류를 오염시킴으로써 그들의 안전성을 저하시키는 패혈증 비브리오균의 생태적인 특성을 연구하고, 패혈증 비브리오균의 환경 스트레스에 대한 내성/생존에 대하여 이해하여 궁극적으로 자연적 및 인공적인 환경 하에서 이 세균의 생존 특징을 결정짓는 요인을 해독한다. 이런 지식을 기초로 앞으로 패혈증 비브리오균을 제어할 수 있는 방법을 개발할 수 있는 기반을 마련하였다. 패혈증 비브리오균은 자연계 또는 숙주라는 두 가지의 매우 상이한 환경에 존재하는데 각 환경이 부여하는 스트레스에 성공적으로 대처하는 능력은 이 병원균이 살아남는데 있어서 필수적인 요소라 할 수 있다 (Roszak and Colwell, 1987). 따라서 본 과제에서는 각 환경이 주는 스트레스가 이 병원균의 생장에 어떠한 영향을 주는가를 조사하였다.

특히 제 1차년도 연구결과에서 보여지듯이, 패혈증 비브리오균의 생태적인 분포가 주로 수온과 밀접한 관련을 보였으므로 다양한 온도변화가 이 세균의 생존 또는 배양성에 끼치는 영향을 조사하였다. 예를 들면, 냉동, 냉장 등의 cold shock, 40°C 이상의 heat shock, 그리고 주변 온도의 변동 등이 이 균의 사멸에 미치는 영

향에 대하여 집중적으로 조사하였다. 이 외에도 다른 종류의 stress인 산성도, 산화적 충격에 대한 영향도 조사하며, 이 결과를 추후 타 세부과제의 조사로부터 나온 갯벌의 물리화학적인 특성이 이 병원균의 분포에 미치는 영향과 연결시켜 그 생태·생리학적인 의미를 파악하는데 사용한다. 이러한 제어 요인이 어패류 생존/성장기간 및 어패류의 저장기간 동안 이에 존재하는 패혈증 비브리오균의 사멸 용도에 적당한지를 판단하고, 제 3차년도 연구를 위한 기초적인 조사도 병행하여 이 병원균 사멸에 영향을 줄 수 있는 하지만 인체에 무해한 화합물, 예를 들면, 식품첨가 가능한 chelator에 대한 조사도 수행하였다. 이러한 연구 결과는 추후 (제 3차년도 연구) 이 세균의 방제 및 인위적인 사멸방법의 개발에 있어서 중요한 기본 자료로서 활용 가능할 것이다.

3. 3차년도

3-1. 조절 가능한 주요 오염물질의 경제적인 저감 방안 탐색

제어하기 힘들고 고비용을 초래하는 다량 영양염보다는 trigger로 작용할 수 있는 미량영양염의 가용도를 제어할 수 있는 경제적인 방법을 실험실과 현장에서 소규모 실험을 통하여 추구하였다.

3-2. 적조생물의 친환경적인 제어방법 강구

적조발생의 trigger 역할을 하는 결정적인 미량원소를 찾아내어서 이를 효율적으로 조절할 수 있는 방안을 모색하였다. 이에 따라서 황토살포 등 2차 오염물질을 유발할 수 있는 현재의 적조피해 저감 방안을 대체할 수 있는 친환경적인 방법을 찾아내는데 목적이 있다.

3-3. 바다/갯벌-microcosm내에서의 패혈증 비브리오균의 생존 조사 및 제어방법 탐구

패혈증 비브리오균의 출현이 자주 보고되는 지역 (갯벌이 발달된 남해 또는 서해 지역)의 바다를 모방한 여러 종류의 microcosms를 설치하였다. 다음 이곳에 배양된 패혈증 비브리오균을 접종한 후 이의 생존도를 탐색하여, 실제 자연환경조건, 어패류와의 공존 조건 또는 어패류의 저장 조건 하에서 이 세균의 성장, 생존 그리고

번식에 영향을 미치는 주요 환경인자를 규명하여 효과적인 제어방법을 탐구하였다. 패혈증 비브리오균의 생존이 실제 환경에서는 어떠한 양상으로 나타나지는가를 이해하기 위하여, 복잡한 자연환경 in situ 실험은 거의 불가능하므로, 자연환경을 모사한, 그렇지만 환경변수를 적절히 조절할 수 있는 실험실 조건 하에서 조사된 결과는 해양 양식장, 전시/보관용 수족관, 그리고 운송/보관용 저장소 등에서 이 병원성세균을 효과적으로 제어함에 있어서 매우 중요한 자료를 제공하리라 생각된다. 따라서 본 연구에서는 실제 환경을 비교적 충실히 모사한 microcosm 환경 내에서 이 세균의 생존도를 측정하였다. 아울러 본 연구팀의 제 2차년도 연구 결과 적당한 조건 하에서 피틴산 (phytic acid) 및 EDTA는 패혈증 비브리오균의 사멸에 매우 효과적임을 알 수 있었으므로 (제 2차년도 결과), 제어책의 한 방법으로서 이의 사용가능성을 타진하였다. 즉, 이를 첨가한 다양한 microcosm 조건 (바다 microcosm, 바다-조개 microcosm, 바다-갯벌 microcosm, 어패류저장 microcosm 등) 하에서 패혈증 비브리오균의 생존을 조사하였다.

제 2 절 연구내용 및 결과

1. 1차년도

1-1. 연안양식장 부근 해양환경의 연속 모니터링

가. 연구해역 및 시기

양어장 주변의 수질·저질 환경변화와 적조 및 패혈증의 발생 및 방지대책에 대한 연구를 위해 남해안의 서부에 위치한 강진의 마량항 부근에 위치한 가두리 양식장에서 1년 동안 연구를 하였다. 본 지역은 담수 유입이 많은 하계에는 인근 지역인 탐진강 유입수의 영향을 받아 담수 유입이 있으며, 또한 상류에서의 다량의 부유물질이 유입되는 곳이기도 하다. 또한 강진군과 완도군이 근접하여 자연적으로 병목형태가 이루어져 해류의 유속이 1.6 knot로 매우 빠른 곳이기도 하다. 그리고 근접한 탐진강에서의 오염원 유입과 인근에 근접한 마량항과 인접한 소규모의 조선소로부터의 오염원 유입 등 여러 가지 오염물질 유입원이 산재하여 있는 곳이기도 하다. 강진군과 완도군의 연륙교 공사로 인하여 부득이

하계 2-3년차에는 전남 완도의 사후도에 위치한 곳에서 본 연구 과제를 수행하였다. 2, 3차년도에 연구를 수행한 사후도는 완도와 고금도 사이에 위치한 조그만 섬으로 인근 수심이 비교적 얇고 조류의 흐름이 비교적 완만한 곳이다.

1차년도에 시행한 강진 마량항 부근의 양식장은 37개의 양식조를 가진 중규모의 양식장이며 주로 참돔과 송어 그리고 농어 및 우럭을 주 양식대상어종으로 양식을 하고 있는 곳이며, 인근에는 김 양식장이 있다. 조사는 초기 1월과 2월에 가두리 양식장에서 양식장 중앙, 중앙으로부터 서쪽으로 50 m, 그리고 동쪽으로 50 m 거리의 지점에서 예비 실험을 하였고, 3월부터는 가두리 양식장과(정점 M, N:34°26' 850", E:126°49' 442") 양식장으로부터 서쪽으로 1 Km 정도 떨어진 완도군과 인접한 곳에 대조구(Ref)를(정점 Ref., N:34°26' 535", E:126°48' 560") 선정하여 조사하였다(그림. 1).

가두리 양식장에서 조석과 일주기에 따른 해수 수질변화 및 플랑크톤의 생물량 및 종조성 등 일주기에 따른 환경 변화를 모니터링하기 위해 매 조사시에 25시간 연속관측을 수행하였다.

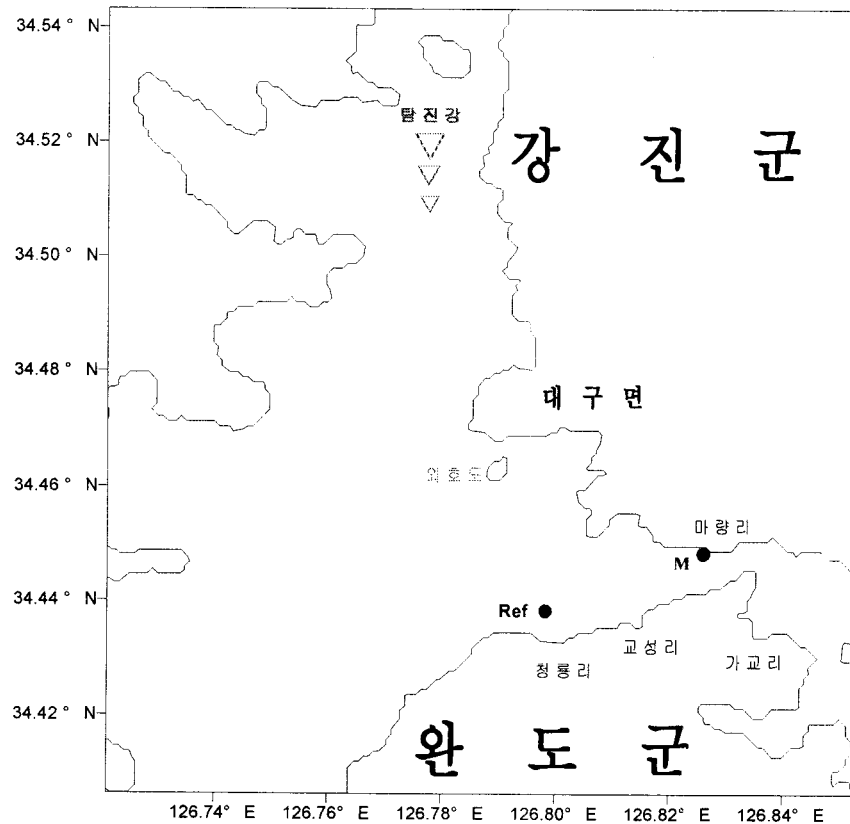


그림 1. 강진 마량항 주변의 양식장과 주변 연구지역.

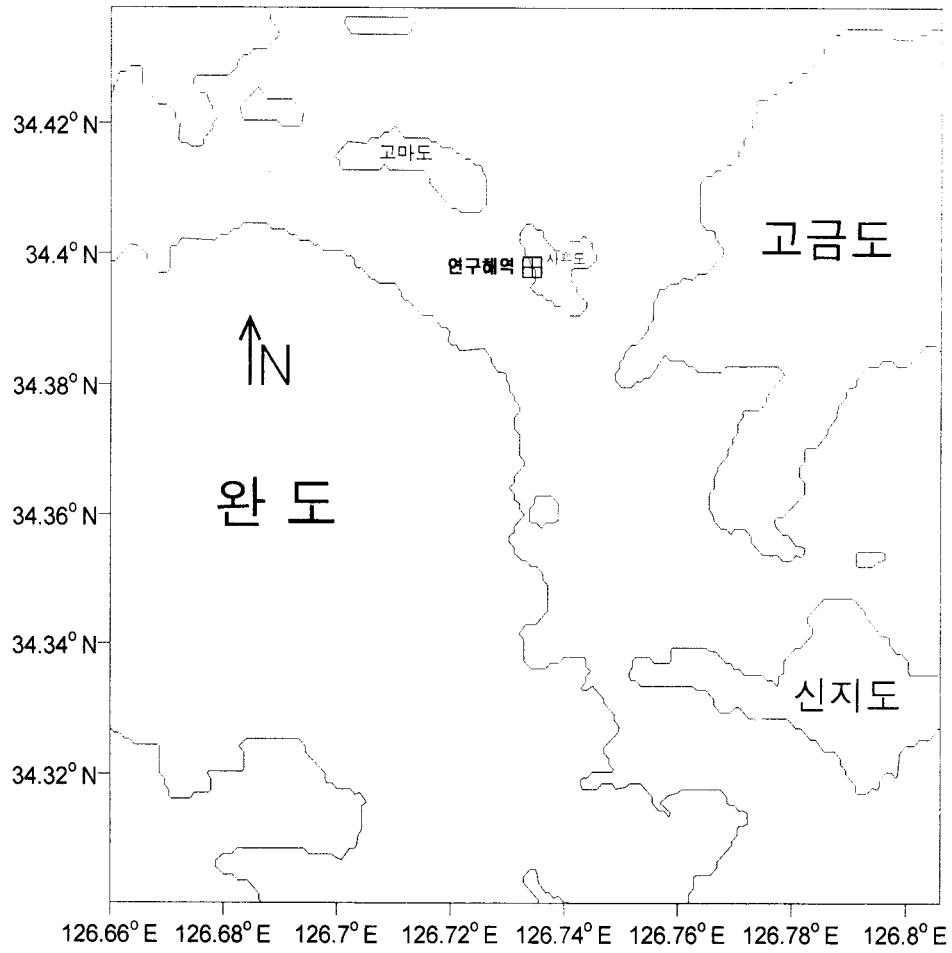


그림 2. 완도 사후도 주변의 양식장과 주변 연구지역.

나. 재료 및 방법

1). 시료채취 및 보존 방법

시료의 채수는 두 정점에서 표층, 수심 5 m, 그리고 저층에서 약 1 m 위의 위치에서 5 ℓ 용량의 Niskin sampler를 사용하여 채수하였다. 채수한 해수를 엽록소 *a*를 측정하기 위해 polyethylene 병에 0.5 ℓ를 옮겨 담은 후 현장에서 GF/C filter로 여과하고, 여과된 여지는 20 ml의 glass vial에 담고, 여과된 해수는 영양염을 측정하기 위해 20 ml plastic vial에 넣은 후 dry ice에 냉동 보관하여 실험실로 옮겨 분석하였다. 또한 실험실에서의 적조생물의 성장을 trigger하는 원인 파악을 하기 위한 배양 실험을 위해 2 ℓ polyethylene carbon 약 30개에 표층수를 채수하여 실험실에서 배양 실험을 하였다.

2). 시료분석 방법

(가) 수온, 염분

현장의 수온 및 염분도는 CTD(SBE 19-03, EMP 2000 또는 YSI 6600)를 이용하여 매월 11회 1시간 간격으로 수심별로 측정하였고, 1 ~ 7월까지 약 3 m 가량에서 수심, 수온, 염분을 기록할 수 있는 Seamons CTD로 연속 모니터링하고, 3대의 Temperature logger (Seamons)를 양어장에 계류하여 표층에서 저층까지 3개 수심에서 15분 간격으로 연속적으로 측정하였다. 광량은 Li - S305A quantum sensor를 이용하여 측정된 광량을 Li - 1000 Datalogger(Li - Cor)을 사용하여 하루의 광량을 15분 단위로 월별 기록하였다.

(나) 엽록소 *a*

엽록소 *a*의 분석은 Parsons et al.(1984)의 방법에 의해 시료를 GF/C 여과지에 여과하여 90% 아세톤 10 ml을 넣은 후 24시간동안 냉암소에서 추출한 후 UV-Vis spectrophotometer(Unicam 4-100)를 이용하여 750 nm, 665 nm, 664 nm, 647 nm, 630 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 엽록소 *a*를 구하였다.

추출된 시료의 엽록소 *a*의 농도는 다음 식으로 계산하였다.

$$C[\text{chlorophyll } a] = 11.85E_{664} - 1.54E_{647} - 0.08E_{630} \quad (\text{식 III-1})$$

$$\text{Chl. } a[\text{mg m}^{-3}] = \frac{C * v}{V} \quad (\text{식 III-2})$$

$$\text{phaeopigments}[\text{mg m}^{-3}] = \frac{26.7[1.7(665_a) - 665_0] * v}{V} \quad (\text{식 III-3})$$

v : 추출에 사용된 아세톤의 부피[mℓ]

V : 여과된 시료의 부피[ℓ]

665₀ : 산을 더하기전의 665 nm에서의 흡광도,

665_a : 산을 더한 후의 665 nm에서의 흡광도.

위에서 Ex는 부유물질에 의한 흡광도를 보정하기 750 nm에서의 흡광도 값을 뺀 값이며, 흡광도를 측정하기 위해 pathlength가 1 cm인 cuvette을 사용하였다.

(다) 영양염 (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , SiO_2)

영양염 분석은 엽록소 a를 분석하기 위해 여과지(GF/C filter, 직경 25 mm, Whatman)로 여과한 해수를 20 ml plastic vial에 넣어 분석 할 때까지 -20℃ 냉동보관 후 TRAACS 2000을 이용하여 분석하였으며 그 분석 방법은 다음과 같다.

㉞ 아질산염(NO_2^-): 시료에 sulfanilamide 용액과 N-(1-naphtyl)-ethylenediamine dihydrochloride를 가하여 발색 시켰다.

㉟ 질산염(NO_3^-): 시료를 Cd-column에 통과시켜서 아질산염으로 환원시킨 후 아질산염 분석방법과 같은 방법으로 발색시켰다.

㉔ 인산염 (PO_4^{3-}): 시료에 ammonium molybdate, potassium antimonyltartrate와 황산의 혼합시약을 가하고 ascorbic acid 로 환원시켜 발색하였다.

㉕ 규산염($Si(OH)_4$) : 시료에 ammonium molybdate를 가하여 silicomolybdate complex를 만든 후 oxalic acid 와 ascorbic acid를 가하여 발색시켰다.

㉖ 암모늄 이온(NH_4^+): 시료에 phenol, sodium nitroprusside (= sodium nitroferricyanide) 용액을 가한 후 alkaline reagent와 sodium hydrochloride solution의 혼합 시료로 산화시킨 후 발색시켜 파장 640nm에서 흡광도를 측정하였다.

(라) 식물 플랑크톤에 의한 광흡수계수 측정(a^*_{ph})

식물 플랑크톤에 의한 광흡수계수 측정(a^*_{ph})은 Kishino *et al.* (1985)의 방법에 따라 실험하였다. 0.5 l 또는 1 l 의 해수를 GF/F, 또는 GF/C(직경 25 mm)에 여과하여 분광 광도계(Unicam 4-10)를 이용하여 400 nm에서 750 nm까지 총 입자(A_p)에 의한 흡광도를 조사(照射; scan)하였다. A_p 의 blank는 GF/F filter를 여과한 해수에 적셔서 이용하였다. 입자상 물질에 의한 흡광도(a_p, m^{-1})는 다음 식에 의해 총 부유입자의 실제 광흡수로 전환된다.

$$a_p(\lambda) = 2.3 \times A_p(\lambda) \times S / (V \times \beta(\lambda)) \quad (\text{식 III-4})$$

여기서, 2.3은 상용대수로부터 자연대수로 전환하기 위한 인수이고, S는 여과된 여지의 면적이며 V는 여과한 해수량 이다. 측정된 여지에 차염소산나트륨($NaClO$) 두 세 방울을 가하여 표백하고, A_p 와 같은 방법으로 색소가 없는 상태에서 입자에 의한 빛의 흡광도 (a_d)를 측정하였다. 색소가 없는 상태에서 입자에 의한 빛 흡수(a_d, m^{-1})는 다음 식에 의해 전환된다.

$$a_d(\lambda) = 2.3 \times A_d(\lambda) \times S / (V \times \beta(\lambda)) \quad (\text{식 III-5})$$

여기서 두 식의 차이 값을 식물플랑크톤에 의한 빛 흡수라고 생각할 수 있다.

$$a_{ph}(\lambda) = a_p(\lambda) - a_d(\lambda) \quad (\text{식 III-6})$$

식물플랑크톤의 [$a^*_{ph}, (m^2 \text{ mg Chl } a^{-1})$] 분광 흡수계수는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$a^*_{ph} = \int_{400}^{750} \frac{aph(d\lambda)}{(750 - 400) Chl - a} \quad (\text{식 III-7})$$

a_{ph} 는 Tassan & Ferrari(1995)에 의해 pathlength amplification factor (β)로 보정한 부유물내의 식물플랑크톤에 의한 빛 흡수이다.

(마) 생체 형광 측정

가두리 양식장 내의 정점 M에서 시료를 표층에서 채수하여 실험 하였다. 표층에서 채수한 시료는, 2 ℓ의 polycarbonate병 에 각각 분배하여 담아 곧바로 초기 생체 형광(F_0 : 현장에서 측정한 생체형광(F))과 DCMU을 추가 후 생체 형광(F_{d0})을 측정하였다.

적조발생을 촉진 시키는 물질로 $FeCl_3$, EDTA (Ethylene- diaminetetraacetic acid), DTPA (Diethylenetriaminepentaacetic acid), FeEDTA를 10 mM 로 만들어 실험하였으며, 퇴적물은 일정량을 덜어내어 첨가하였다. 또, 적조발생을 저해하는 물질로는 DTPA (Diethylenetriaminepentaacetic acid : 393.34 g/mol), 조류저해제(글루코사민-D : GL), 황토의 적조저해능을 생체형광으로 측정하면서 나타냈다. DTPA의 경우도 10 mM로 하여 사용하였으며, 황토의 경우 적조생물 구제효율이 가장 좋은 상태로 만들어 사용하였다. 황토의 입자크기는 50 μm 이하로 되도록 하여 황토 입경을 68 μm 로 만들어 첨가하였다. 생체형광 측정은 fluorometer (Tuner Designs Inc., Sunnyvale, CA)를 이용하였다. 생체형광(*in vivo* fluorescence)은 식물성플랑크톤의 광합성 용량과 성장을 측정하기 위한 방법으로 초기의 생체형광 값을 측정하고, 광합성계 II (Photosystem II; PSII)에서 광합성계 I (PS I)으로의 전자전달계의 저해제인 DCMU [3-(3,4-dichlorophenyl)- 1,1-dimethylurea; diuron]를 첨가한 후 생체 형광을 측정하여 (식 3 - 4)로 FRI를 구한다. Rueter and Ades (1987)는 DCMU을 추가하여 얻어진 생체 형광의 증가를 이용하여, 식물성플랑크톤에 대한 철 이온의 결핍 등 생리학적인 스트레스를 측정하기 위한 지시자로 사용 할 수 있다고 보고하였다. 초기 생체 형광측정 후 시료는 옥외 자연광하에 일주일 이상 배양하면서, 12시간 간격으로 측정하였다.

DCMU를 가하기 전(*in vivo*: F)과 후 (F_d)의 형광차이를 비교하여 식물플랑크톤의 광합성능력을 평가하였고(Samuelsson and Öquist, 1977), 형광반응지수

(fluorescence response index, FRI)를 구하였다(Cullen and Renger, 1979).

$$FRI = \frac{F_d - F}{F_d} \quad (\text{식 III-8})$$

F는 DCMU를 첨가하기 전의 형광 값이고, F_d 는 DCMU를 가한 후의 형광 값이다. FRI는 stress에 의한 식물플랑크톤 광합성기작의 생리적인 활성화 또는 억제 정도를 반영한다(Domotor *et al.*, 1982).

Scrippsiella trochoidea 배양과 형광측정

적조 생물에서의 철이온, 착화합물 그리고 조류저해제에 대한 반응을 살펴보기 위해 다양한 적조 원인종 중 와편모조류 *Scrippsiella trochoidea*를 배양하여 실험하였다. 이를 군산대학교 적조 연구단에서 분양 받아 *S. trochoidea*를 f/2배지에 50 cells/1 ml를 접종하여 항온수욕조에서 일주일 이상 배양하였다. f/2배지란, 해수를 GF/F로 여과한 후 다시 한번 0.45 μm membrane filter로 여과하여 polycarbonate bottle에 담아, 121 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 멸균해준다. 그리고 오염되지 않게 clean bench에서 식힌 다음, 멸균해수 250 ml당 f/2 media stock(Table 1)을 첨가하였다(Guillard and Ryther, 1962).

*S. trochoidea*을 접종한 후 金과 岩崎(1987)의 연구에 의하여 최대증식을 하는 조건으로, 대기온도 20 $^{\circ}\text{C}$, 염분 30 psu, 조도 200 $\mu\text{Ein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 하에서 14:10 L:D의 광주기 조건하에서 배양하였다(임 등, 1993; Qin *et al.*, 1996). 배양시작 3일 후 적조생물을 제어하는 착화합물질 DTPA와 조류저해제(글루코사민-D; GL)의 농도를 변화시켜 첨가하고, 정수장 슬러지를 주입하여 FP-920 Intelligent fluorescence detector로 12시간 간격으로 매일 생체형광을 측정하였다 (Falkowski and Kiefer, 1985).

Table 1. The composition of f/2 media.

compound		f/2	
		mg ℓ^{-1}	μM
Major Nutrients			
Sodium nitrate	NaNO_3	75.0	883
Sodium hydrophosphate	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5.0	36.3
Trace metals			
Ferric chloride	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15	11.7
EDTA	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.36	11.7
Cupric sulfate	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0098	
Sodium molybdate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0063	
Zinc sulfate	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.022	0.08
Cobalt chloride	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.010	0.05
Manganese chloride	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.18	0.9
	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01	
Vitamins			
Vitamin B12(Cyanobalamin)		0.5 μg	0.0037
Biotin		0.5 μg	0.002
Thiamine HCl		0.1	0.296

Kokinos and Anderson (1995)

다. 연구내용 및 결과

1-1) 연안양식장 부근 해양환경의 연속모니터링(1차년도)

(가) 수온, 염분, 광량

연구대상해역인 강진 마량항에 위치한 가두리 양식장의 환경특성을 파악하기 위해 2000년 동계(1월, 2월), 춘계(3월, 4월, 5월), 하계(6월, 7월, 8월), 추계(9월)의 표층에서 저층까지의 시간에 따른 온도, 염분, 조석변화, 엽록소 *a*와 pH 분포를 나타내었다. 조사기간 중 1월의 예비 실험의 수온변화는 정점 M의 표층 수온은 8.05 ~ 8.10°C의 변화를 보였으며, 저층의 수온은 8.01 ~ 8.05°C를 나타내었다. 이 때 염분의 분포의 수온은 6.26 ~ 6.64°C를 나타냈다. 동계의 수위 변화에 따른 수온, 염분의 변동을 보면, 먼저 염분은 31.59 ~ 33.69 psu의 고농도의 염분을 나타냈고, 수위가 상승하는 창조 시 증가하고, 낙조 시 감소하였다. 염분의 변동 폭은 2.1 psu 정도로 매우 큰 차이를 보였다. 이는 6:00경에 바다물이 빠지면서, 육지로부터의 담수 유입이 있던 걸로 보인다. 수온도 마찬가지로 창조 시 상승하고, 낙조 시 하강하였다. 수온의 수평 변동 폭은 0.5°C 정도를 보였다. 저조와 고조사이의 단시간에 염분이 평균화되어 33.5 psu를 나타냈고, 수온이 상승하였다. 저층에서는 7:00시경에 온도가 낮고, 염분이 낮은 물이 유입되고 있었다. 표층과 저층 사이에서 온도변화는 크게 나타나지 않았다(그림 3).

춘계인 3월부터는 25시간동안 2시간 간격으로 관측하였다. 수온은 표층에서 저층에 이르기까지 7.03~7.34°C 범위였고, 염분의 경우는 32.95~33.4 psu를 보였다. 시간에 따른 온도차는 0.3°C, 염분차는 0.45 psu 였다. 표층과 저층의 온도와 염분의 차이는 거의 없었으나, 시간에 따른 변화를 볼 수 있었다. 동계 2월과 같이 염분과 수온이 조석에 의해 주로 영향을 받음을 알 수 있다(그림.1-1). 창조일 때 찬 바다물이 들어와 온도가 0.3°C의 차이로 낮아지며, 염분은 약간 증가함을 보였다. 전체적으로 2월과 같은 형태를 보이고 있다(그림 4).

4월의 표층 수온은 가두리양식장을 비롯한 대조구에서 13.19 ~ 15.09°C의 변화를 보였으며, 저층의 수온은 13.22 ~ 13.36°C를 나타내었다. 4월 수온은 고조일 때 표층에서 낮게 나타나 바람에 의한 표층 냉각이 수온역전을 가져온 것으로 판단된다(그림 5).

5월의 표층 수온은 17.35 ~ 17.64°C의 변화를 보였고, 저층의 수온은 17.26 ~

17.54°C를 나타내었다. 염분은 34.89~35.79 psu로 매우 높게 나타났으며, 비가 내린 후 전반적으로 변화가 없고, 저층으로 갈수록 온도가 조금씩 낮아지고 있었으며, 조석에 따른 온도와 염분의 변화는 다른 달과 비슷한 양상을 보였다(그림 6).

6월의 현장조사기간(23 ~ 24일)과 장마기간(22 ~ 27일)이 겹쳐 강우에 의한 영향이 크게 나타났다. 흐린 날씨로 인해 광량은 낮 시간에 $870 \mu\text{Ein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 비교적 낮은 값을 나타냈으며, 빛에 의한 영향보다 주로 조석과 비에 의해 온도, 염분, 엽록소 *a*와 pH가 변하고 있음을 보여 주고 있다(그림. 7). 현장 조사 시 거의 동일한 수온과 염분을 보이다 19:00 부근에 많은 강우로 인하여 수온이 상승하였고, 염분이 감소하였다. 그 후 밀물로 염분이 높아지고 온도도 점점 하강하였으며, 저층에서 엽록소 *a*가 증가함을 관찰 할 수 있었다. 대조구에서는 표층의 온도가 19.31°C이고 저층은 18.85°C로 0.28°C의 차이를 보였으며, 같은 시간대 양식장에 비교하여 낮은 온도를 보이면서 염분은 0.4 psu 정도 더 높게 나타났다. 영양염을 제외하고 엽록소 *a*와 용존산소는 대조구에서 양식장 보다 낮은 값을 보였다(그림 7).

또 6월에 연속 모니터링한 자료의 경우 그림 7에서 보여주듯이 시간에 따른 염분의 변화는 32.57 ~ 33.45 psu로 0.88 psu의 차이를 나타냈으며, 장마기간으로 인하여 염분이 표층에서 낮게 나타났으며, 그 외의 날에는 염분의 변화가 크지 않음을 알 수 있다. 온도도 낮 최고기온이 장마로 인하여 감소함을 볼 수 있었다. 용존산소와 pH도 같이 감소했다. 그림 12.은 6월의 현장 조사기간 후 25일부터 7월 3일 까지의 연속모니터링 자료이다. 이 기간에 양식장에서 단 한번의 적조가 생겨 염분, 온도, 용존산소와 pH의 변화를 관찰 할 수 있었다. 적조 발생일은 6월 30일 16:45에서 일어났으며, 용존산소 8.45 mg l^{-1} 로 높게 나타났고(그림1-11), 이 때 수온은 22.25°C, 염분은 25.78 psu 그리고 pH는 8.03으로 갑자기 높게 나타났다.

7월의 현장조사는 22일과 23일에 걸쳐서 행하여 졌으며, 둘째 날(23일)은 많은 비가 내려 표층의 염분, 용존산소, pH가 낮아졌고, 광량도 6월보다 훨씬 낮은 $253.7 \mu\text{Ein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 을 보였다(그림 8). 수온은 22일과 23일 모두 6월에 비해 약 3°C 증가하였다. 첫날은 그림 8의 광량에서 나타나듯 맑아, 14:00경에 표층과 저층의 수온차가 최대 1.6°C 정도를 나타내어 성층화 현상을 보였다. 또, 2 m 부분의 유광층에서 6.92 ml l^{-1} 의 높은 용존산소농도를 보여 주었다. 염분은 전체적으로 6월보다 1~1.5 psu의 차이로 감소하였고, 표층과 저층의 염분차도 1 psu 이상으로 나타났다.

그림 8은 여름의 성층화현상이 현저하게 나타났다. 6, 7, 8월 중 8월에 조사한 자료로 수온과 염분이 조석에 따른 변화는 하계와 같은 유형을 보였으며, 특히 8월의 경우 수층의 성층화가 뚜렷하게 진행되었고, 수온과 염분의 표층과 저층사이의 변화가 6월과 7월에 비해 매우 컸다. 수온은 6월에 비해 약 5 ~ 6°C가 더 증가하였고, 7월에 비해선 수온이 4°C정도 더 증가한 24.1 ~ 27°C를 보였다. 염분은 28 ~ 32 psu의 범위로 6월보다는 낮고, 7월보다는 높게 나타났다. 오후에는 조석에 의한 영향이 큰 것으로 보이며, 표층과 저층과의 온도 변화는 25일 14:00에 가장 큰 2.25°C의 차이를 나타내 성층화 현상을 가장 강하게 보여주었다.

9월의 자료는 그림 10에서 보여주는 바와 같이 하계의 자료와 달리 성층이 소멸하였고, 표층과 저층간의 온도변화 보다 시간에 따른 변화가 크게 나타났다. 수온은 21.45 ~ 21.64°C으로 표층과 저층의 차이는 0.17°C로 작게 나타났으며, 하계인 8월에 비하여 5°C 이상 수온이 하강하였다. 염분은 30.8 ~ 31.02 psu로 나타났고, 수직 분포 차는 최대치가 0.31 psu 였고, 평균 0.08 psu의 차이의 작은 값을 보였다. 온도와 염분이 같은 형태로, 수온이 높을 때 염분도 높았으며, 수온이 낮을 때 염분이 낮았다.

2월은 표층과 저층에서 염분이 낮은 물이 유입됨을 볼 수 있었고, 온도는 더 높았던 것으로 보인다. 이는 저조때 물이 빠지면서, 탐진강 유역으로부터 담수의 유입이 있었던 것으로 보인다. 3, 4, 5월인 춘계에는 3월에만 봄철의 계절적인 변화를 보이고 있었으며, 4월에는 표층에서 썰물 때 수온이 낮고 염분이 높은 물이 유입되고 있었다. 5, 6과 7월은 강한 비바람으로 인해, 염분이 표층에서 모든 시간대에 낮게 나타났으며, 염분의 표층과 저층의 시간에 따른 염분분포는 거의 같아졌다. 6, 7, 8월은 수온과 염분의 연직분포가 유사한 형태로 저조에서 수온이 높고, 염분이 낮았고, 고조에서 이와 반대로 나타났고, 9월의 경우는 7:00을 제외하고 이와 같았다. 여름철에 성층화가 나타나도 짧은 시간 안에 성층이 사라짐을 관찰 할 수 있었다. 이는 빠른 유속으로 인한 수직혼합에 기인하는 것으로 판단되며, 또한 조석에 의해 육수나 해수의 유입도 그 원인이 된다고 판단된다.

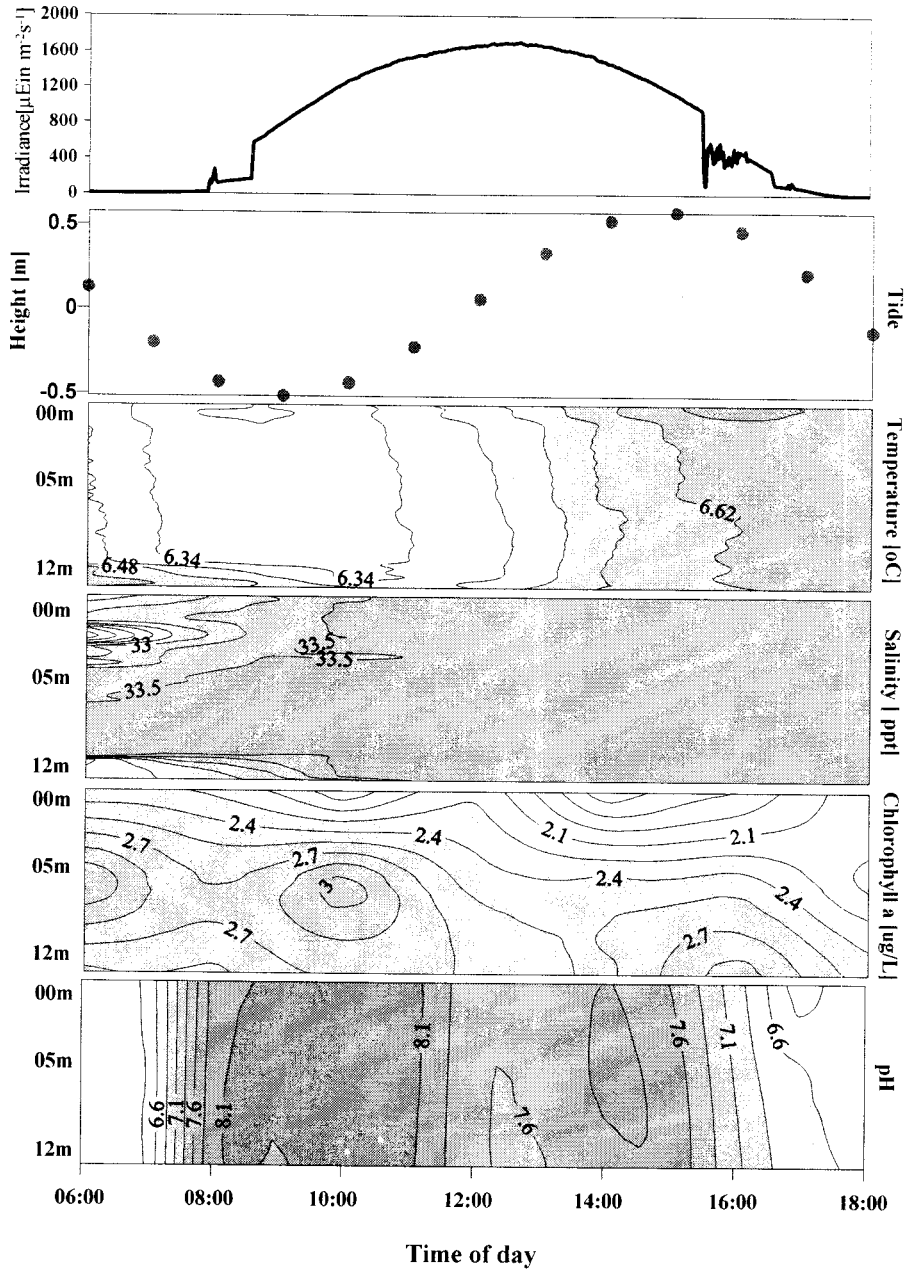


그림 3. 2000년 2월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a [$\mu\text{g/l}$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포

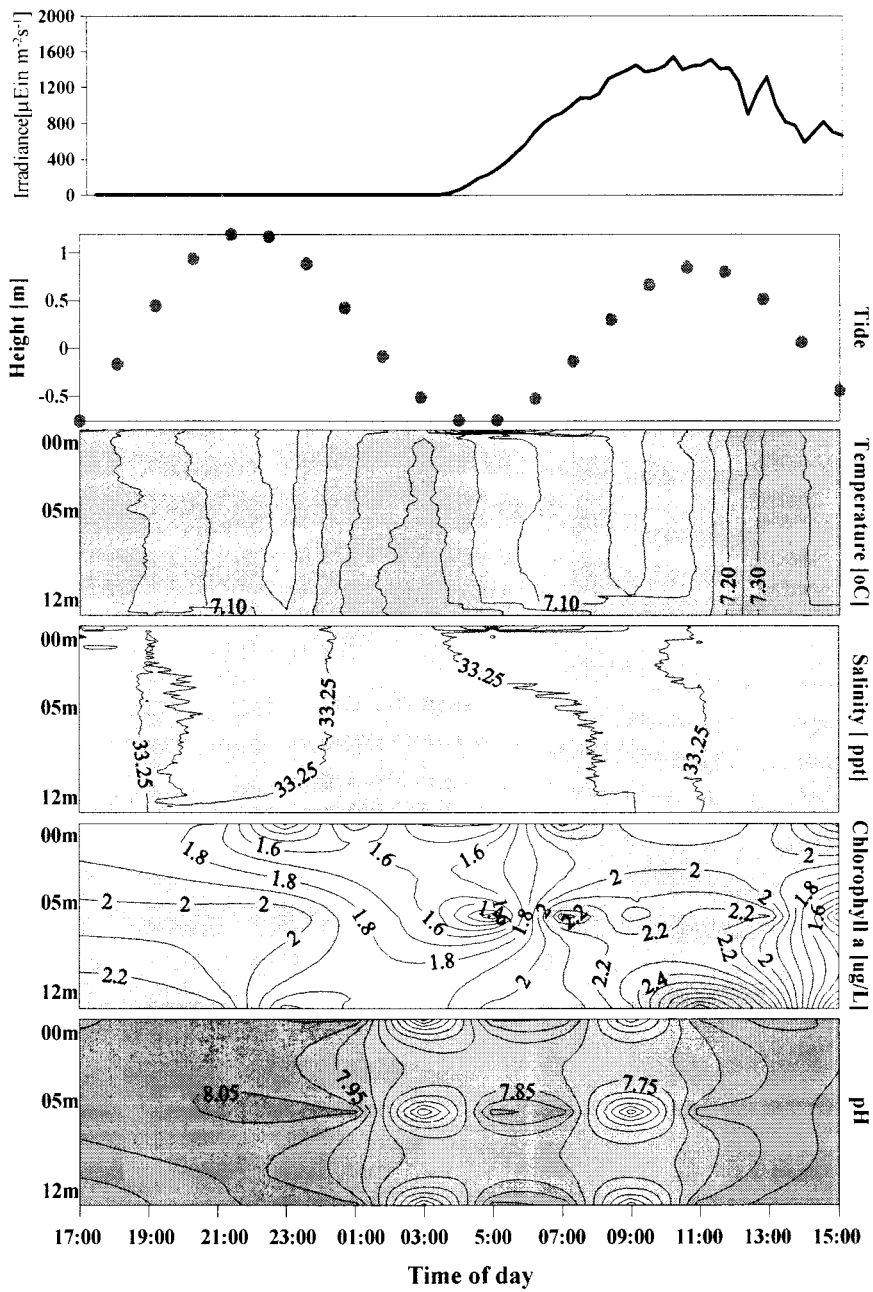


그림 4. 2000년 3월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[$^{\circ}\text{C}$], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a [$\mu\text{g/l}$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포

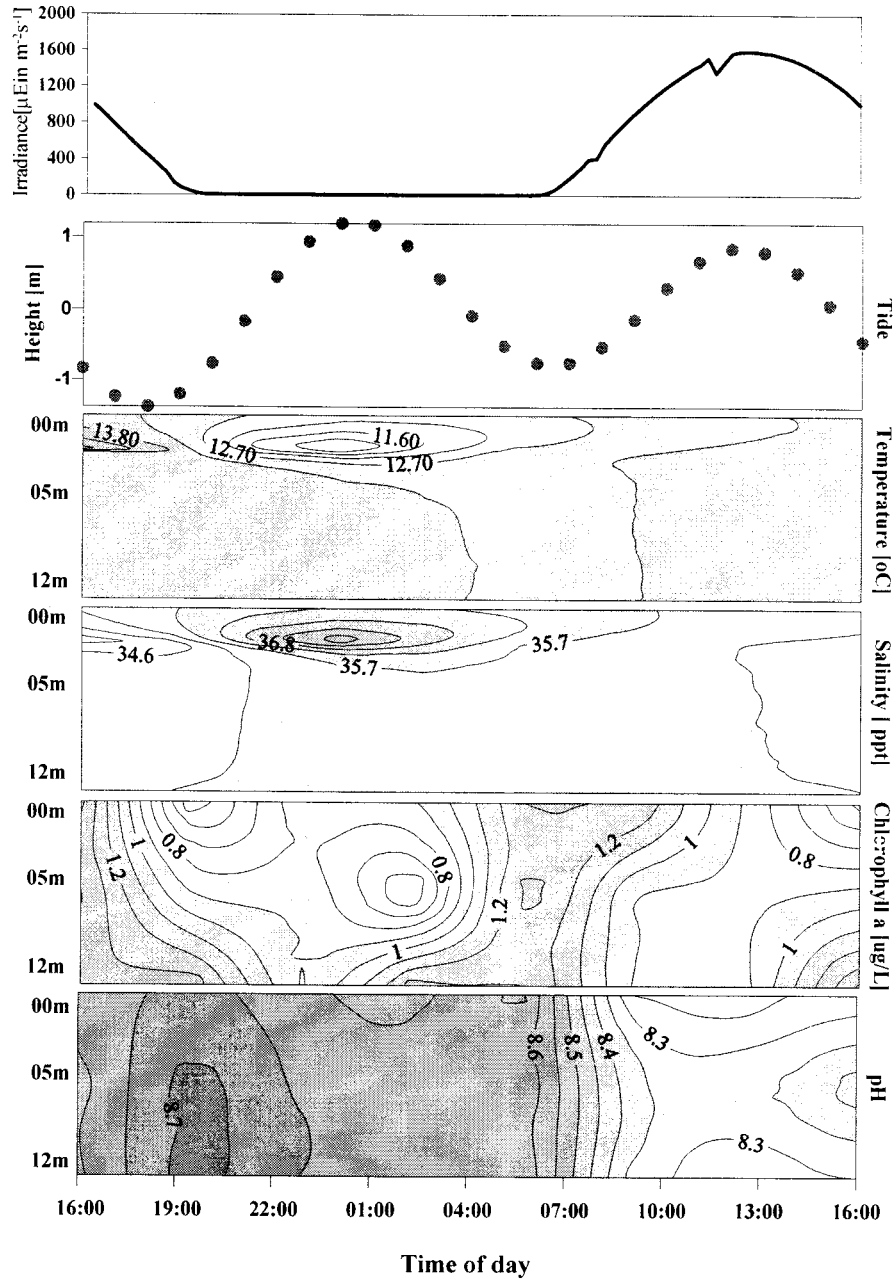


그림 5. 2000년 4월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a [$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포

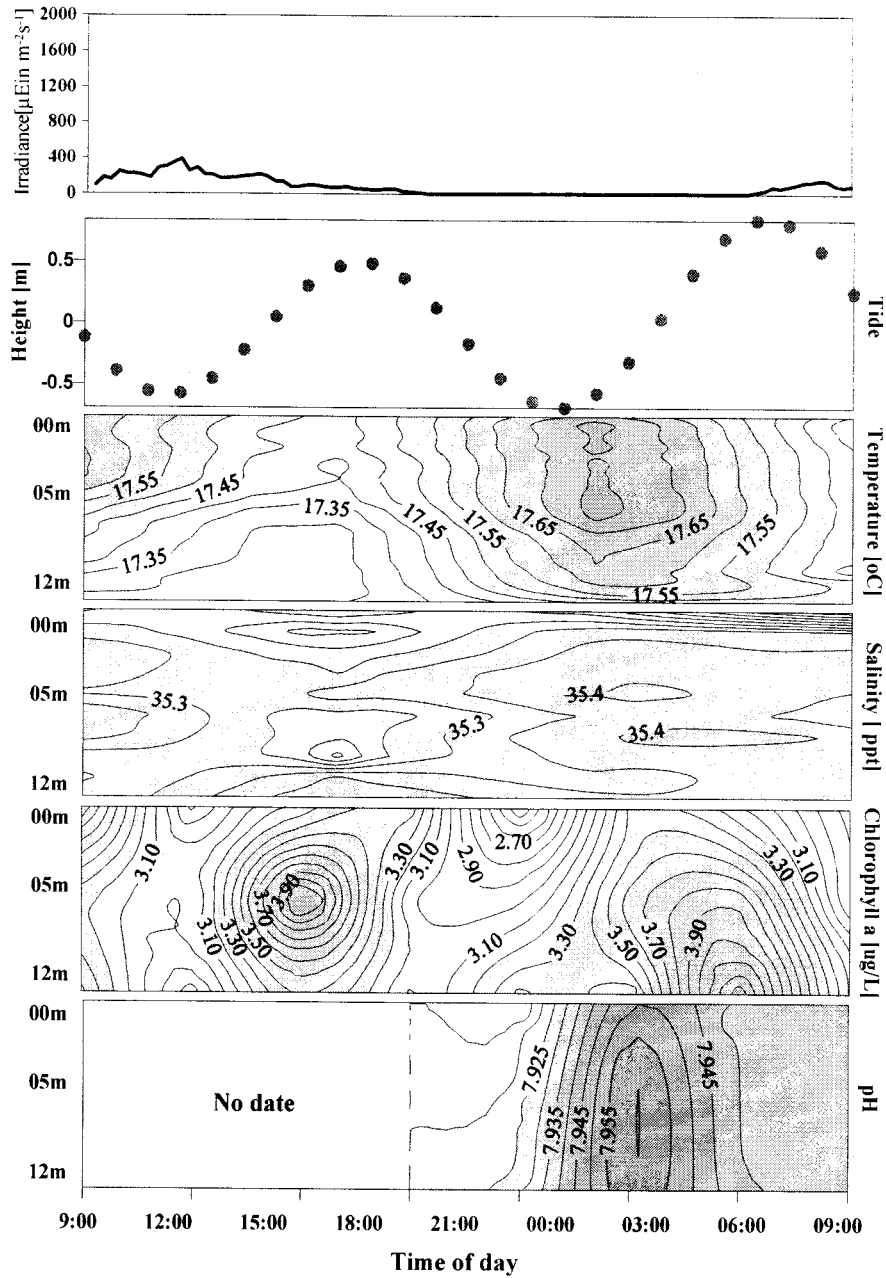


그림 6. 2000년 5월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a [$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포

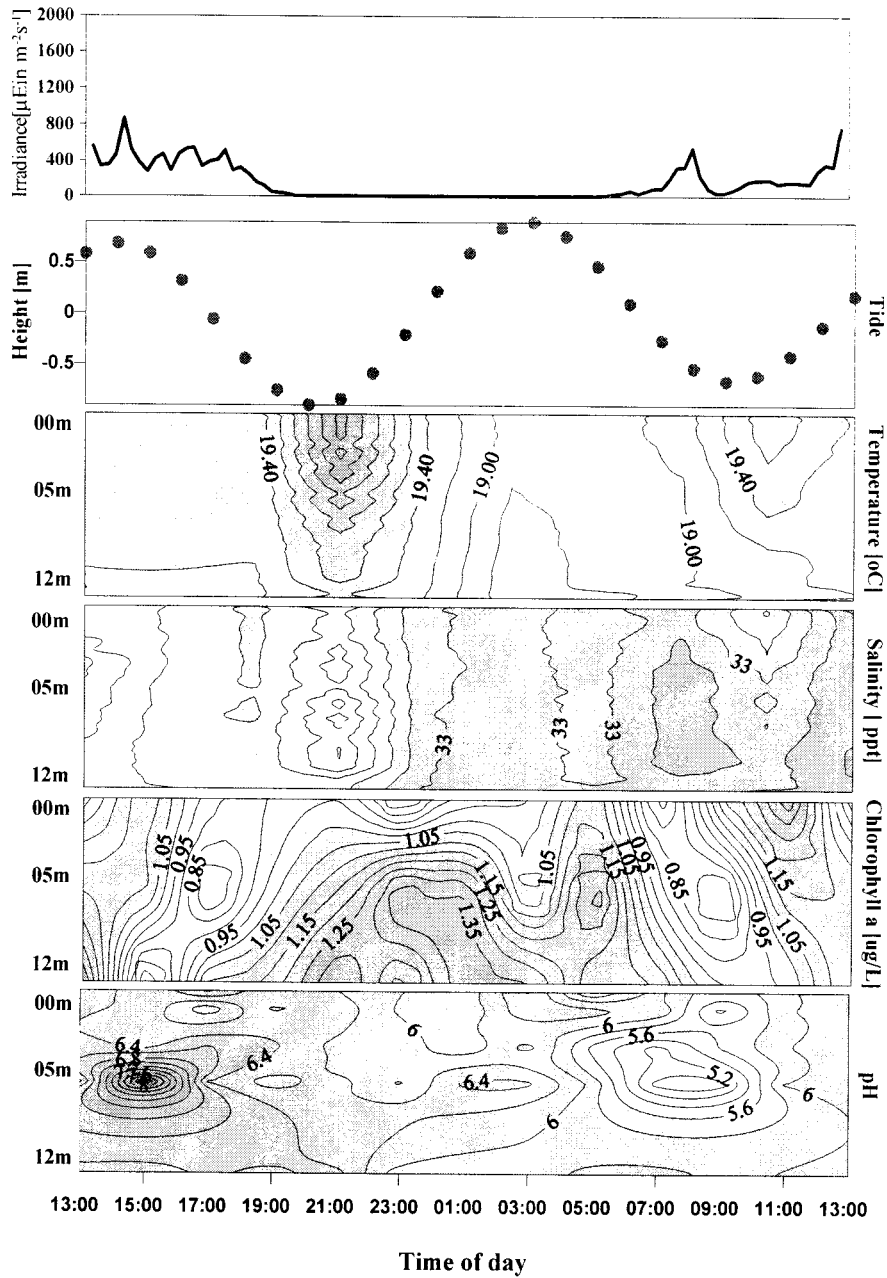


그림 7. 2000년 6월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a [$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포

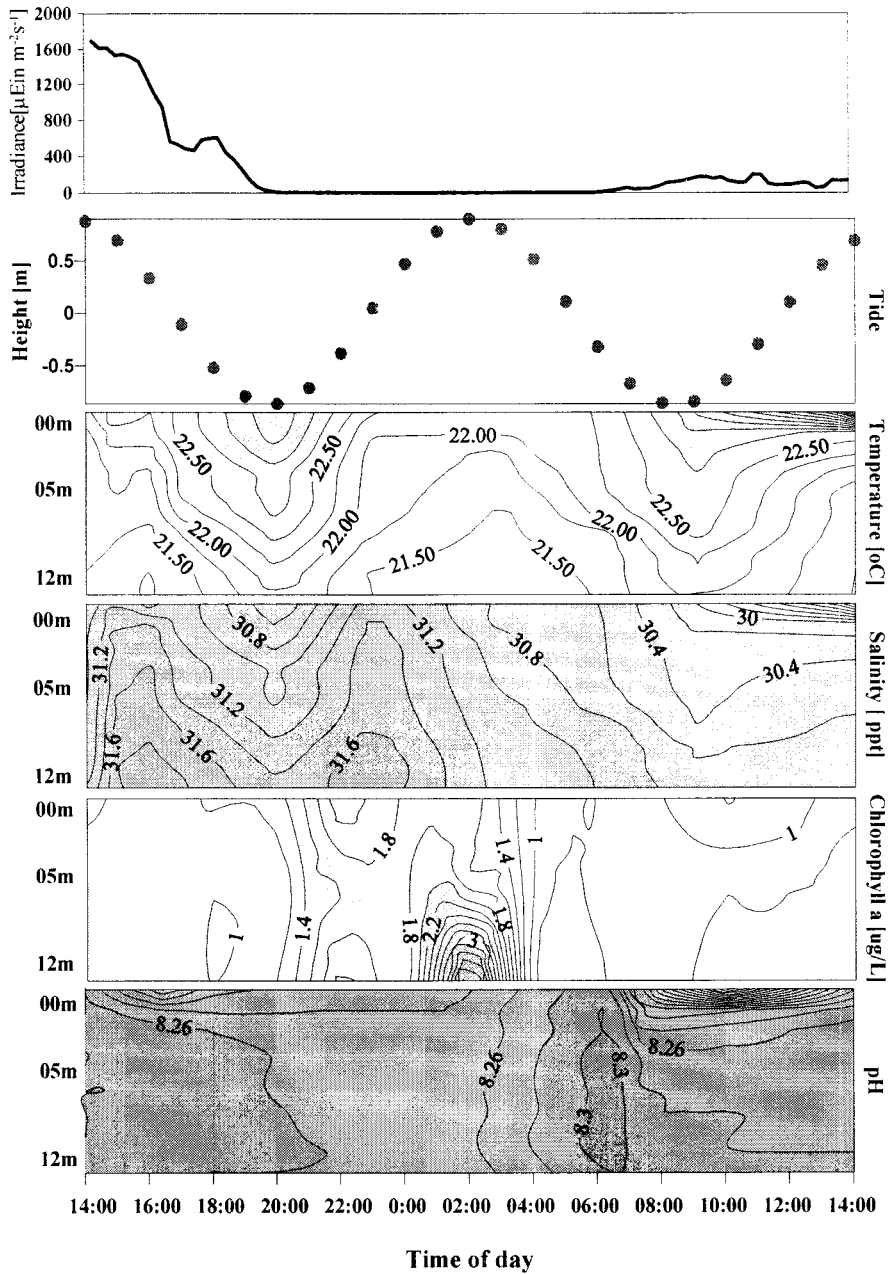


그림 8. 2000년 7월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a [$\mu\text{g/l}$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포

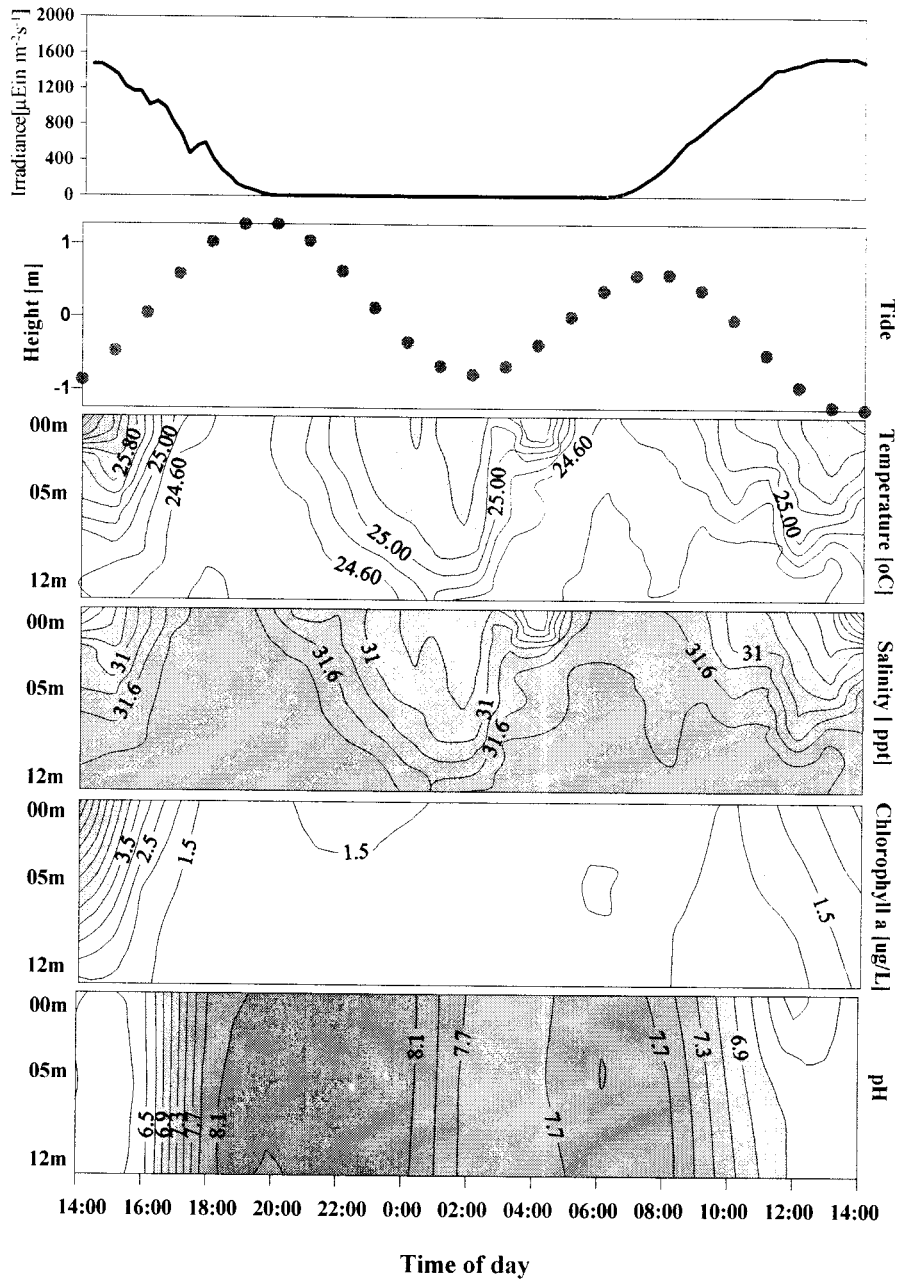


그림 9. 2000년 8월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a [$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포

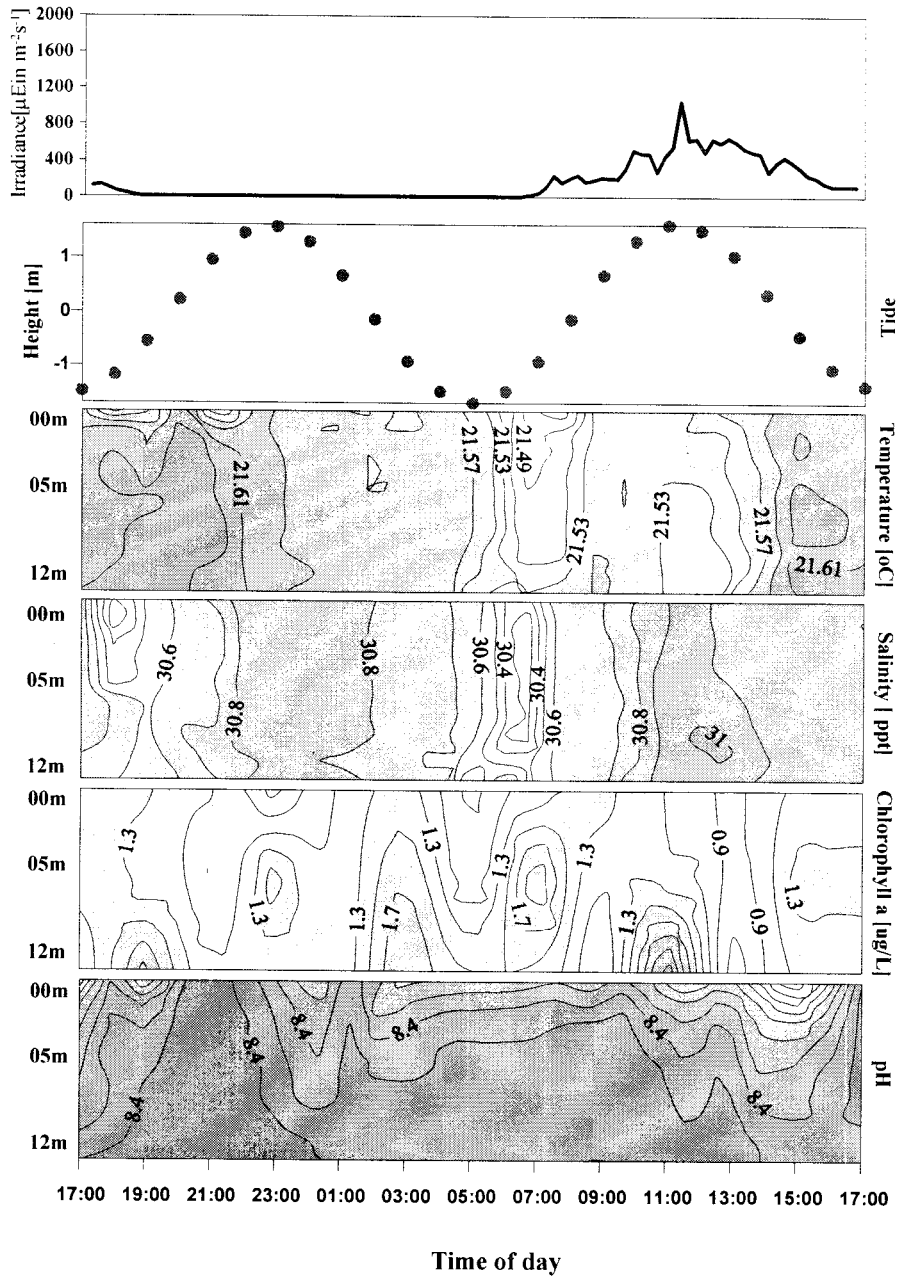


그림 10. 2000년 9월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[$^{\circ}\text{C}$], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a [$\mu\text{g/l}$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포

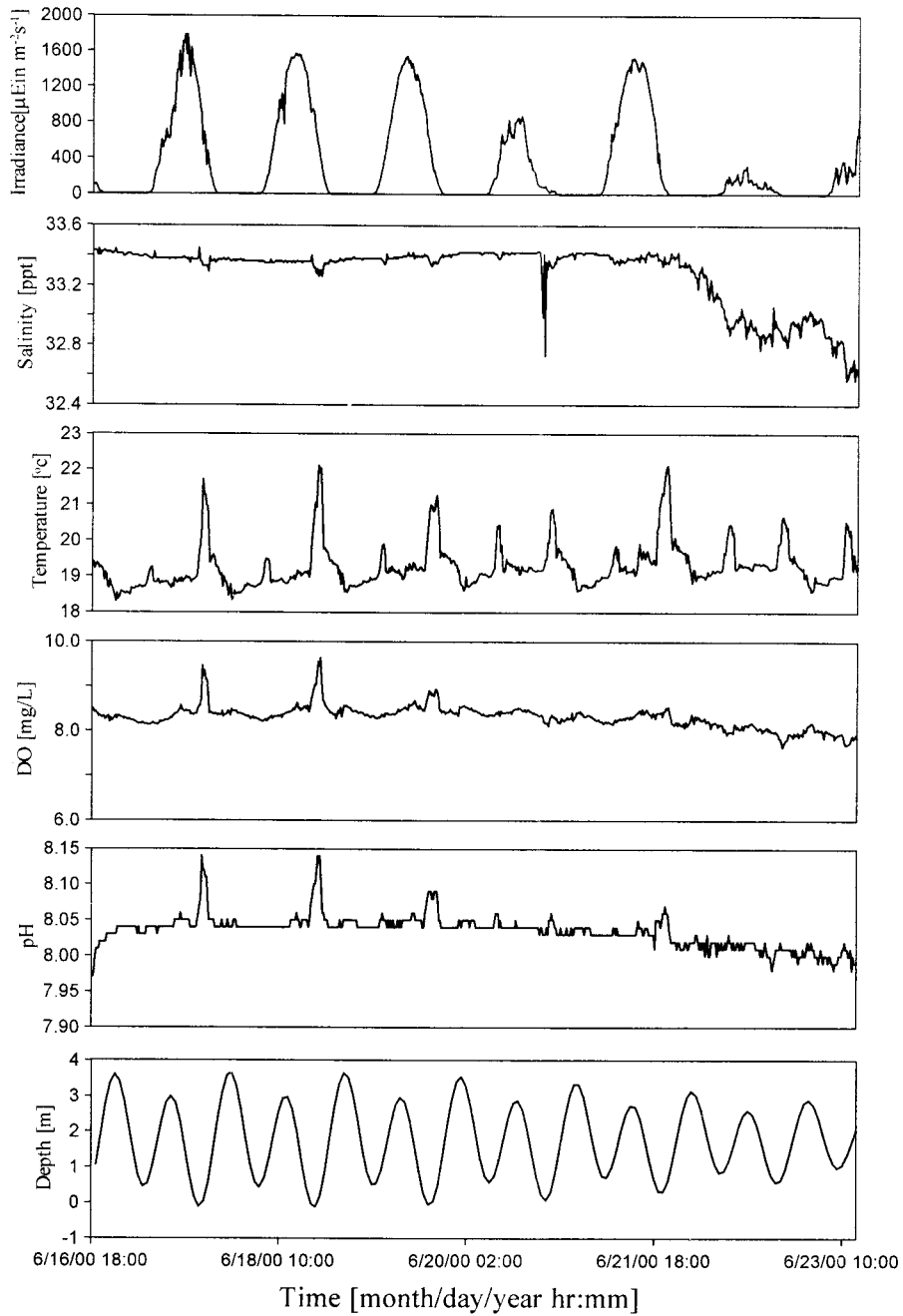


그림 11. 2000년 6월16일 ~ 23일 기간동안 CTD 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[$^{\circ}\text{C}$], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a [$\mu\text{g/l}$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.

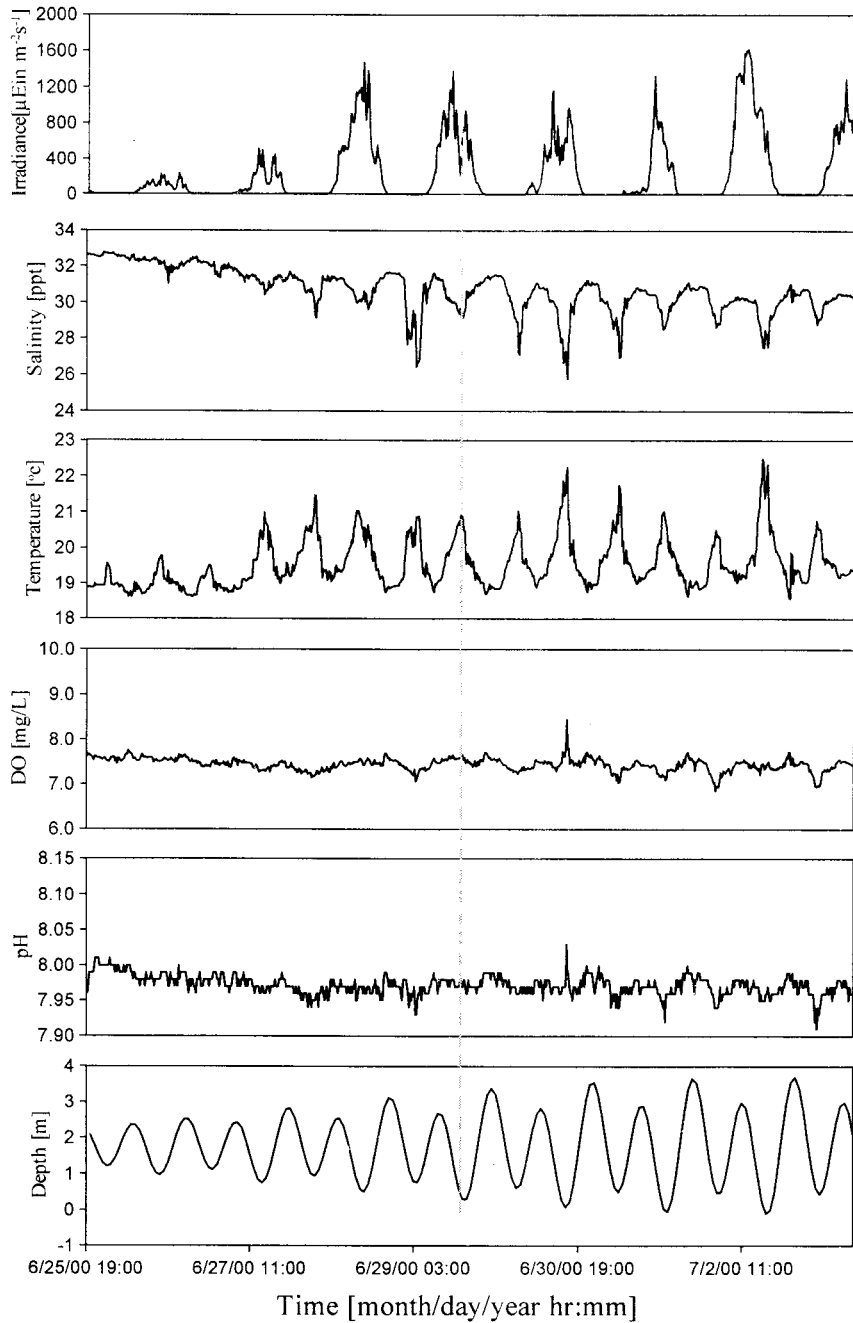


그림 12. 2000년 6월 25일 ~ 7월 4일 기간동안 CTD 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[$^{\circ}\text{C}$], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a[$\mu\text{g/l}$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.

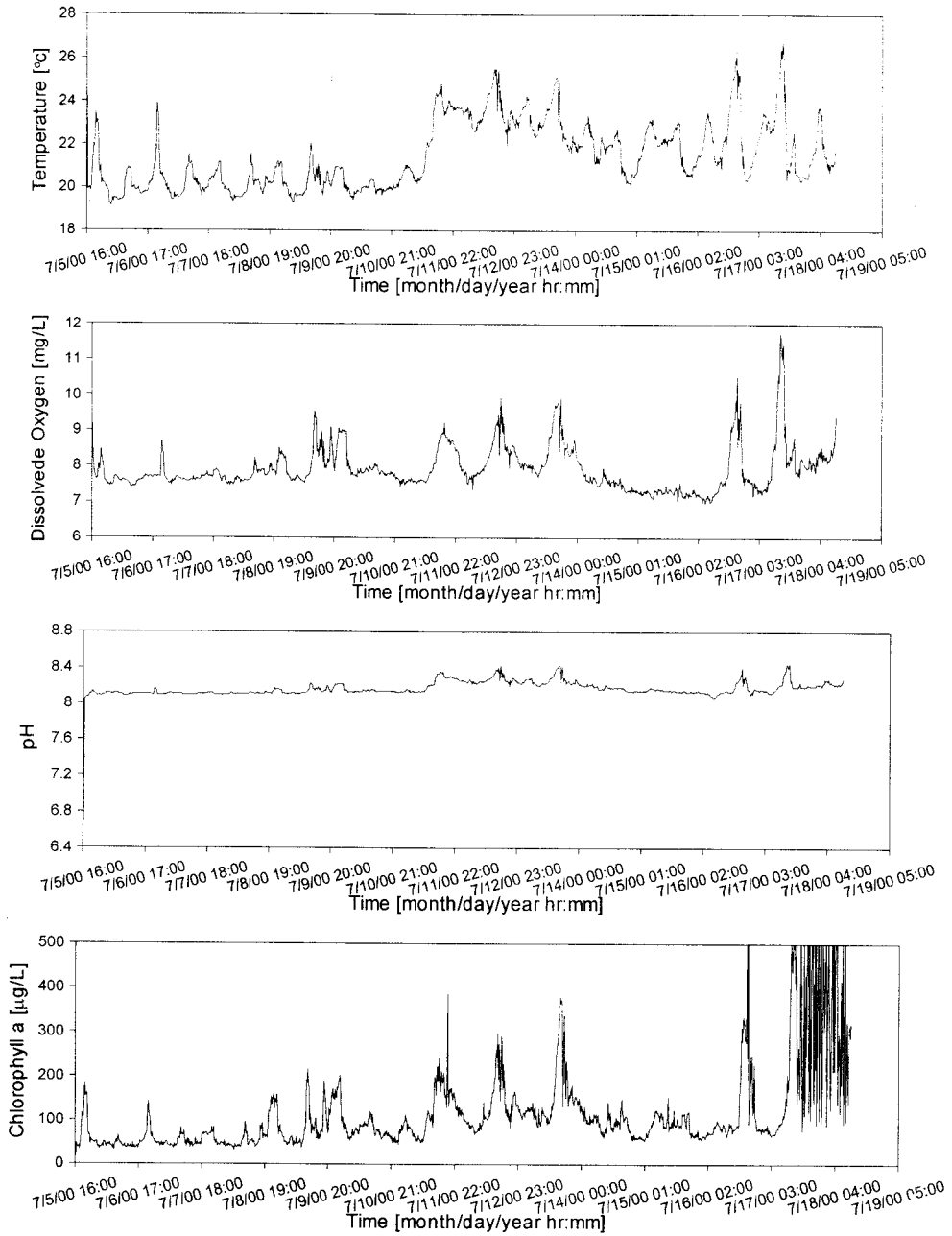


그림 13. 2000년 7월 5일 ~ 7월 19일 기간동안 CTD 강진 마량항 주변 가두리양식장의 온도[°C], 광량[$\mu\text{Ein m}^{-2}\text{s}^{-1}$], 염분도[psu], 엽록소 a [$\mu\text{g}/\ell$], pH 시간 관측에 위한 수심[m] 수직분포.

(나) 용존산소

해양에서 용존 산소는 유기물의 생성과 분해와도 관련이 있으나, 주로 수온과 염분의 해수 물리적 특성에 의해 조절된다. 양식장에서 조사 기간 중 8월에 $3.04 \text{ ml } \ell^{-1}$ 로 최소값을 보였고, 1월에 $11.10 \text{ ml } \ell^{-1}$ 로 최대값을 보였다. 용존산소의 계절적인 변화는 하계에서 동계로 갈수록 증가하는 경향을 보이는데, 이는 동계에는 낮은 수온과 바람에 의해 용존산소의 증가가 일어나고, 하계에는 유기물이 다른 계절에 비해 많이 산화되고, 생물체에 의해 용존산소 소비가 증가되기 때문인 것으로 사료된다. 용존산소 포화도는 파도에 의한 공기의 포집(entrainment)으로 인해 과포화 상태를 보인다. 또한 표층에서의 용존산소 함량은 바람의 세기, 바람이 부는 시간 그리고 기초 생산력등에 의하여 공급되는 산소량과 해수중이나 해저면에서의 유기물의 산화 시에 소모되는 양의 차이로서 결정된다.

1월 예비실험에서 용존산소 결과는 가두리 양식장 내의 정점 1과 정점 2에 표층과 저층의 농도의 현저한 차이를 보이지 않았으나, 가두리 양식장의 가장자리인 정점 3에서는 표층 $11.10 \text{ ml } \ell^{-1}$ 와 수심 2 m에서 $9.14 \text{ ml } \ell^{-1}$ 로 감소하였다. 2월에는 그림. 14 에서 보는 바와 같이 가두리 양식장의 용존산소 수직 분포는 표층에서 $7.43 \text{ ml } \ell^{-1}$, 수심 5 m에서 $8.19 \text{ ml } \ell^{-1}$ 로 증가한 후 다시 저층에서 감소하였다. 3월 수층별 용존산소는 9시에 저층의 용존산소 농도가 표층에 비해 약 $2.5 \text{ ml } \ell^{-1}$ 정도 높은 결과를 보였다(그림. 15). 4월의 용존산소 수직 분포는 표층에서 $6.44 \text{ ml } \ell^{-1}$, 저층에서는 $7.02 \text{ ml } \ell^{-1}$ 를 보였다. 11시와 13시에 측정된 용존산소의 수직구조를 살펴보면 대기 및 밀접한 표층에서 용해가 높았고, 생물량이 많은 수심에서 감소하였다가 다시 저층에서 증가하는 구조를 보였다(그림. 16). 5월 오전 9시의 용존산소 수직 분포는 표층에서 $6.52 \text{ ml } \ell^{-1}$, 수심 5 m에서 $4.07 \text{ ml } \ell^{-1}$ 감소하고, 저층에서 $7.12 \text{ ml } \ell^{-1}$ 로 다시 증가하였다. 오후 18시의 용존산소 수직 분포는 표층에서 $6.57 \text{ ml } \ell^{-1}$ 에서 저층으로 갈수록 증가하여 저층에서는 $10.96 \text{ ml } \ell^{-1}$ 를 보였다. 그 외의 시간대의 용존산소는 수층별로 차이를 보이지 않았다(그림 17). 6월은 표층에서 $5.59 \sim 6.60 \text{ ml } \ell^{-1}$ 의 농도의 변화를 보였으며, 낮 시간에 낮은 농도로 나타났다. 평균 $6.08 \text{ ml } \ell^{-1}$ 로 위의 동계 춘계에 비해 용존산소가 낮아졌다(그림 18, 19). 7월과 8월의 경우도 그러하였으며, 8월은 특히 $3.04 \sim 5.72 \text{ ml } \ell^{-1}$ 로 특히 낮은 농도를 보였고, 평균 $4.65 \text{ ml } \ell^{-1}$ 였다(그림 20). 추계인 9월의 용존산소 평균이 $5.93 \text{ ml } \ell^{-1}$ 로 다시 증가하였다(그림 21).

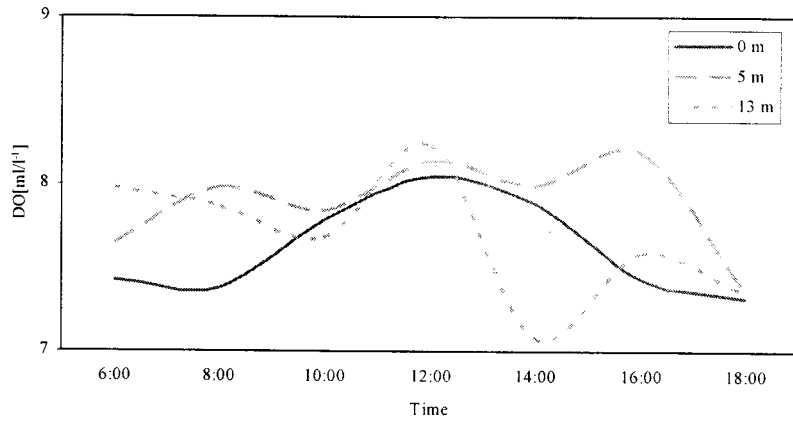


그림 14. 2000년 2월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소

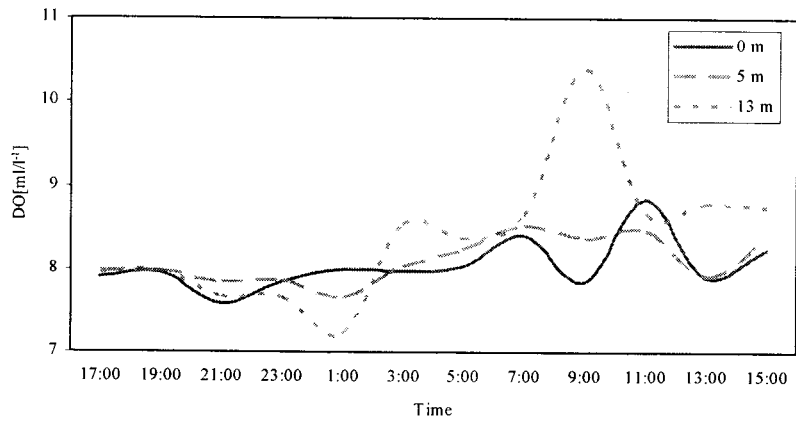


그림 15. 2000년 3월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.

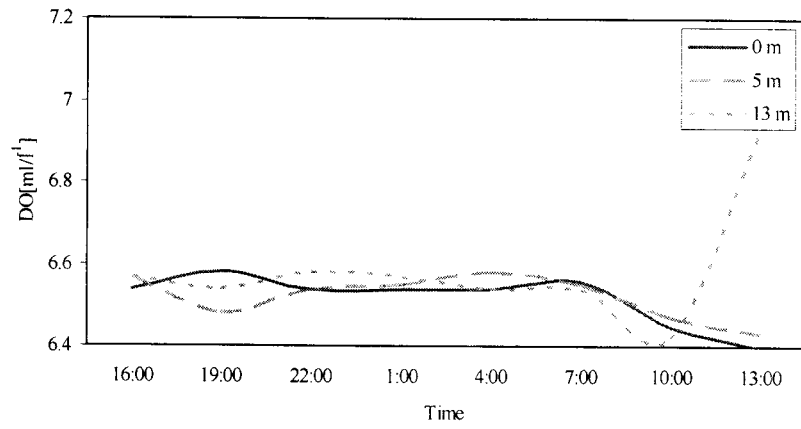


그림 16. 2000년 4월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.

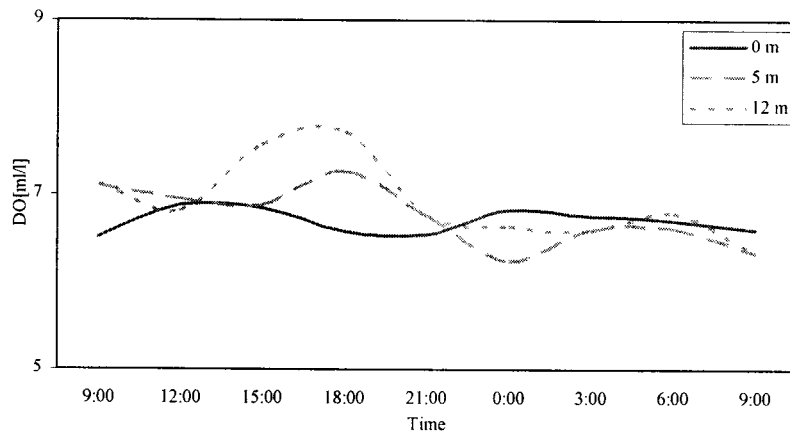


그림 17. 2000년 5월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.

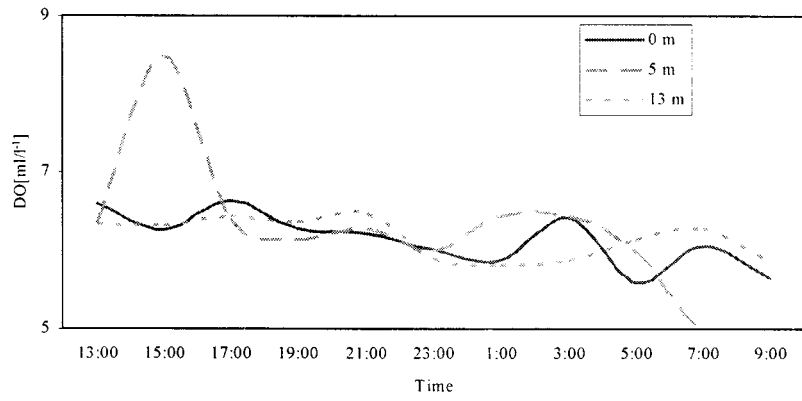


그림 18. 2000년 6월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.

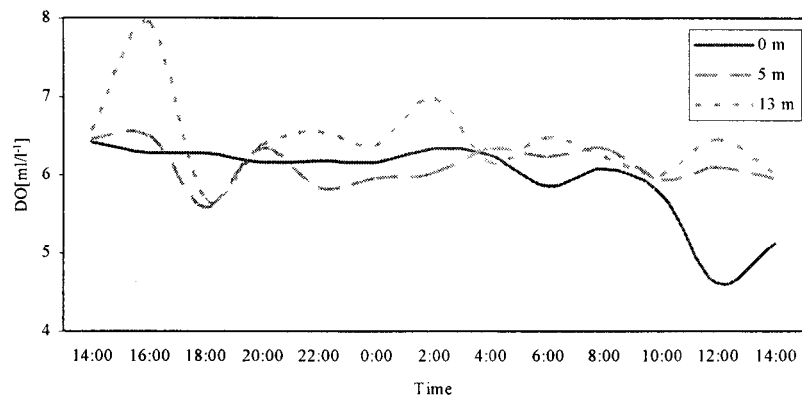


그림 19. 2000년 7월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.

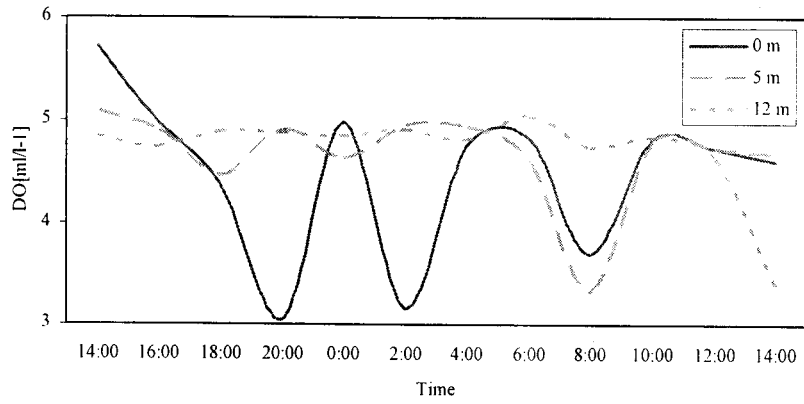


그림 20. 2000년 8월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.

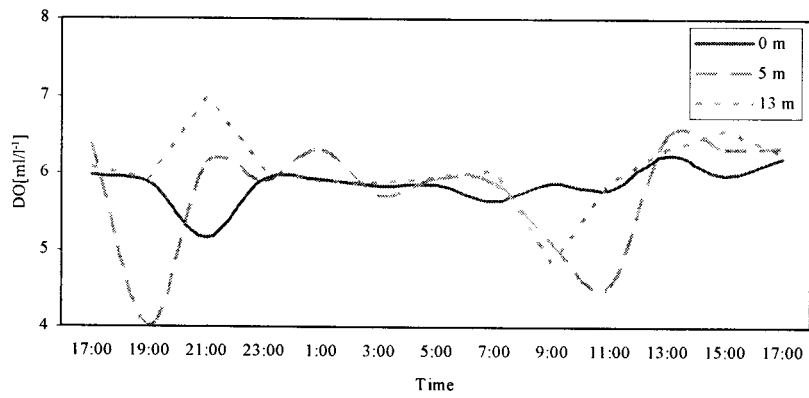


그림 21. 2000년 9월 강진 마량항 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.

1-2) 수질 및 저질 환경악화를 초래하는 주된 오염원 파악 (2차년도)

(가) 수온, 염분, pH

연구대상 해역인 완도 사후도에 위치한 가두리 양식장의 환경특성을 파악하기 위해 2001년 동계 2월과 춘계 4월 하계 6월과 8월 그리고 추계 10월에 해수의 시간에 따른 온도, 염분과 pH 분포를 측정하였다. 2월의 경우 수온변화는 정점을 통해 표층 수온은 5.8 ~ 6.6°C의 변화를 보였으며, 저층의 수온은 6.0 ~ 6.6°C를 나타냈다. 염분의 표층분포는 33.45 ~ 33.55 psu 범위로 나타났으며, 저층의 염분은 33.46 ~ 33.56 psu 의 비교적 높은 값을 나타내었고, 창조 시에 증가하고 낙조 시에 감소했다. 염록소 *a*의 경우 시간대 별로 큰 차이를 보이지 않았지만 낙조 시에 창조시보다 미약하게 감소하였다(그림 22). 4월에 연속 관측한 자료의 결과는 수온의 경우 낙조 시에 감소하는 경향을 보였으며 창조 시에 0.5°C 정도 감소하는 양상을 보였다. 표층 수온은 10.53 ~ 11.27°C 범위로 보였으며, 저층의 경우는 10.46 ~ 10.97°C 범위로 나타났다. 염분의 경우 표층에서 33.60 ~ 33.65 psu 범위를 보였다. 저층의 경우 33.61 ~ 33.67 psu 범위로 나타났다. 연속 관측 시의 염분의 변화는 창조 시와 낙조 시에 미약한 변화를 보이며 낙조 시에 감소하는 경향을 나타냈다. pH의 경우 4월에는 8.60 ~ 8.69 평균이 8.64로 나타났다. 염록소 *a*는 썰물 시에 창조 시보다 증가하는 경향을 나타냈으며 특히 표층보다는 5 m 수심의 중층에서 높은 농도로 존재하였다. 동계인 2월보다는 약 2배가량 증가하는 분포를 보였다. 봄철 대번성에 따르는 현상이라 생각된다. 점차적으로 하계로 접어들수록 수온은 급격히 증가하는 경향을 나타냈다(그림. 23). 6월은 수온이 표층에서 19.73 ~ 20.78°C 범위를 나타냈고, 저층의 경우 18.63 ~ 19.92°C 범위를 보였다. 연속 25시간 관측 자료에서 수온은 조석에 따라 급격한 변화를 보이는 경향을 나타냈다. 낙조 시에 창조시보다 0.8°C 정도 증가하는 양상을 보였다. 특히 낙조 시에는 표저간의 온도 차이도 명확하게 차이가 났다. 염분은 표층에서 31.33 ~ 34.05 psu 저층의 염분은 33.55 ~ 34.07 psu으로 나타났다. 염분의 경우 조석에 따른 큰 차이가 보이지 않았으며, 오히려 주야 시간에 따른 변화폭이 컸다. 아침과 점심 식사 시간을 전후로 염분이 급격히 감소하였는데, 그 정확한 원인은 파악하지 못하였다. pH는 7.37 ~ 8.57 범위를 보였다. 염록소 *a* 농도 분포는 시간별로 큰 차이를 보였는데 특히 자정을 전후로 한 시간에 급격히 감소하였으며 낙조 시에는 오히려 조금씩 증가하는 양상을 나타냈다. 하계인 8월의 수온은 24.30 ~ 23.37°C의 범위였으며, 6월의 수온에 비해 4 ~ 6°C가 더 증가하였다. 수심의 얕음에도 불구하고 표층과

저층수 사이에 뚜렷한 수온약층이 형성되었으며, 낙조 시 표층에서는 급격한 수온의 증가가 관측되기도 하였다. 염분의 경우 32.54 ~ 33.98 psu 범위로 나타났으며, pH는 8.26 ~ 8.81 범위를 보였다.

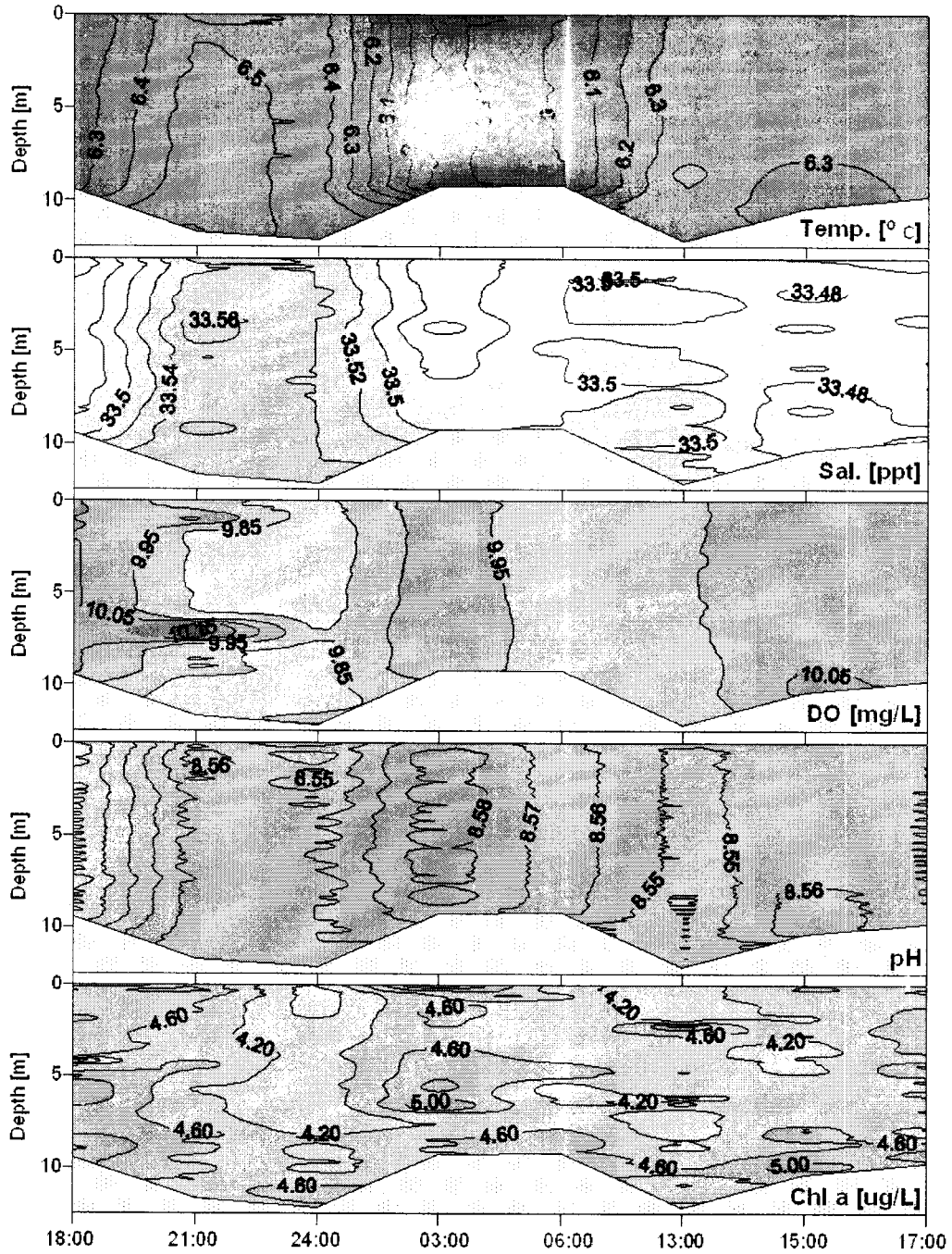


그림 22. 2001년 2월 25시간 관측한 가두리양식장의 수온, 염분, 용존산소, pH 그리고 엽록소 a의 수직분포의 변화.

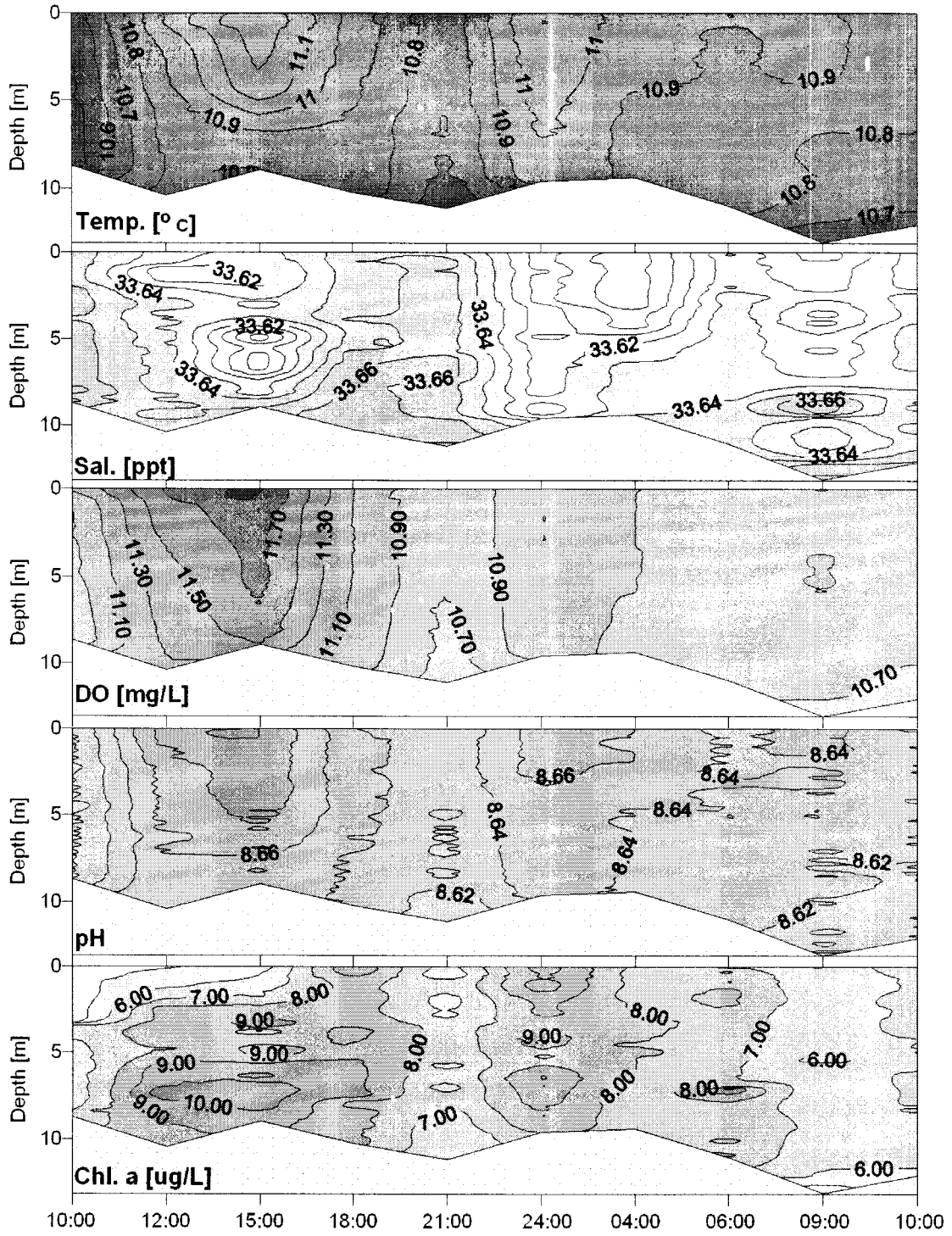


그림 23. 2001년 4월 25시간 관측한 가두리양식장의 수온, 염분, 용존산소, pH 그리고 엽록소 a의 수직분포의 변화.

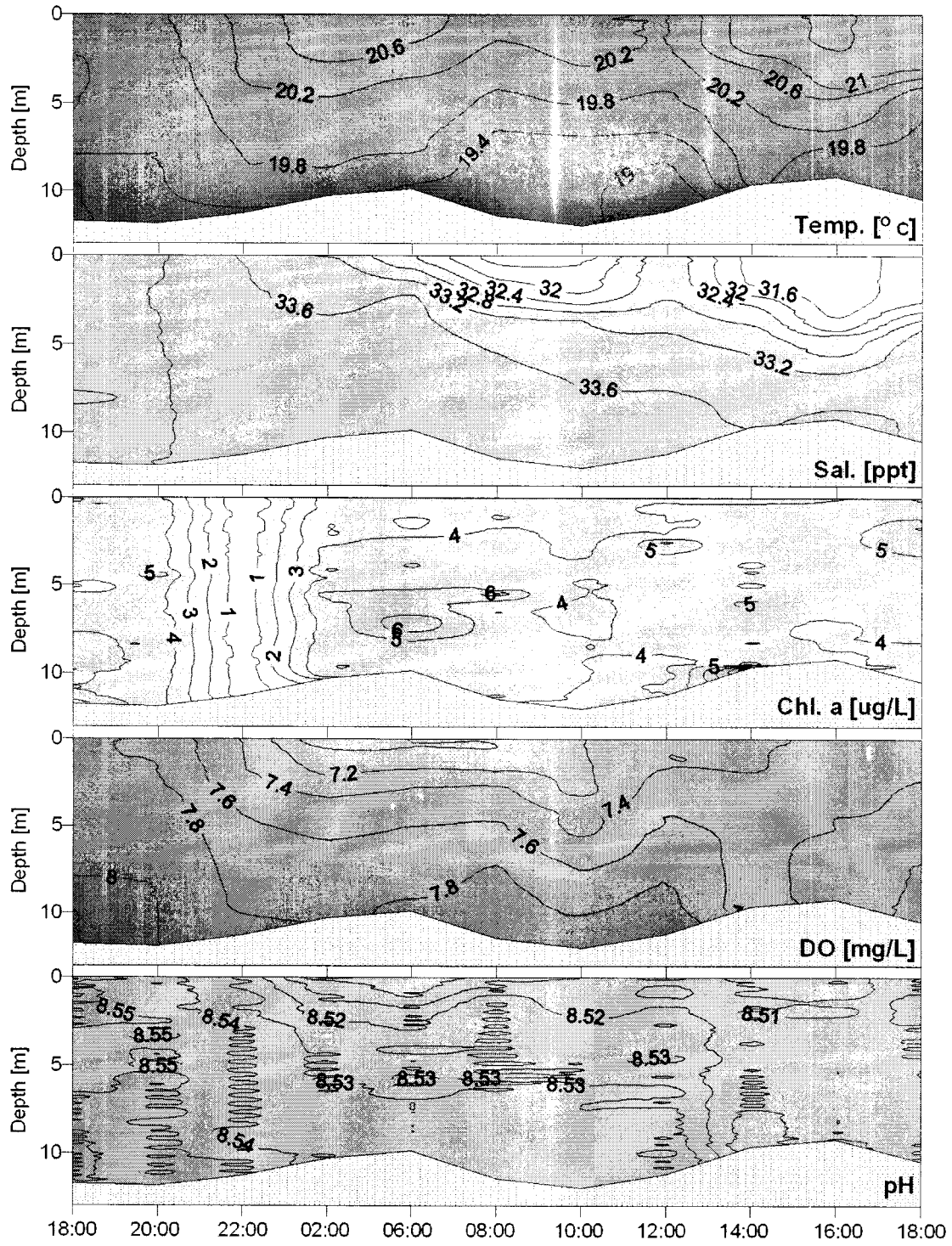


그림 24. 2001년 6월 25시간 관측한 가두리양식장의 수온, 염분, 용존산소, pH 그리고 엽록소 a의 수직분포의 변화.

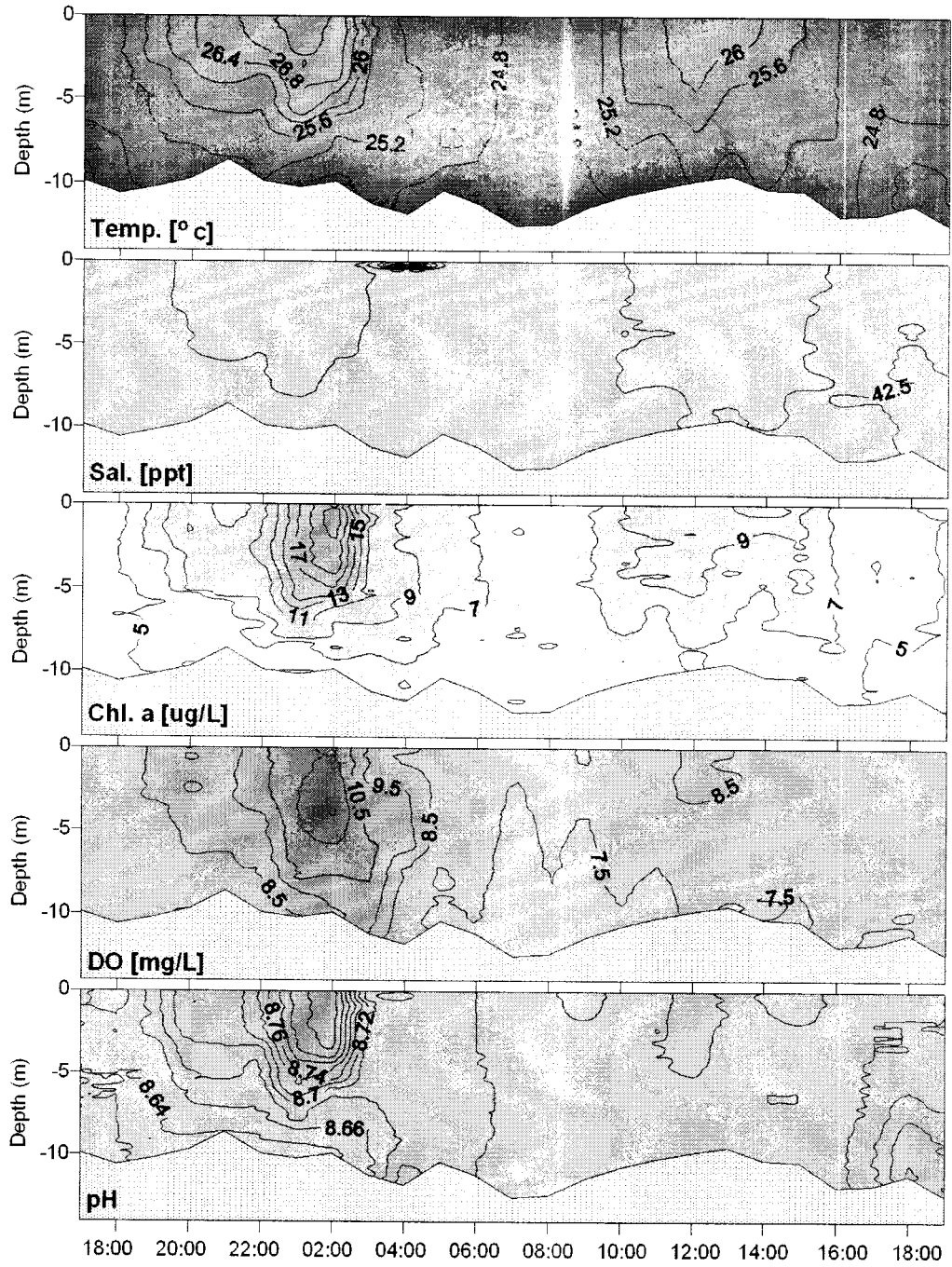


그림 25. 2001년 8월 25시간 관측한 가두리양식장의 수온, 염분, 용존산소, pH 그리고 엽록소 a의 수직분포의 변화.

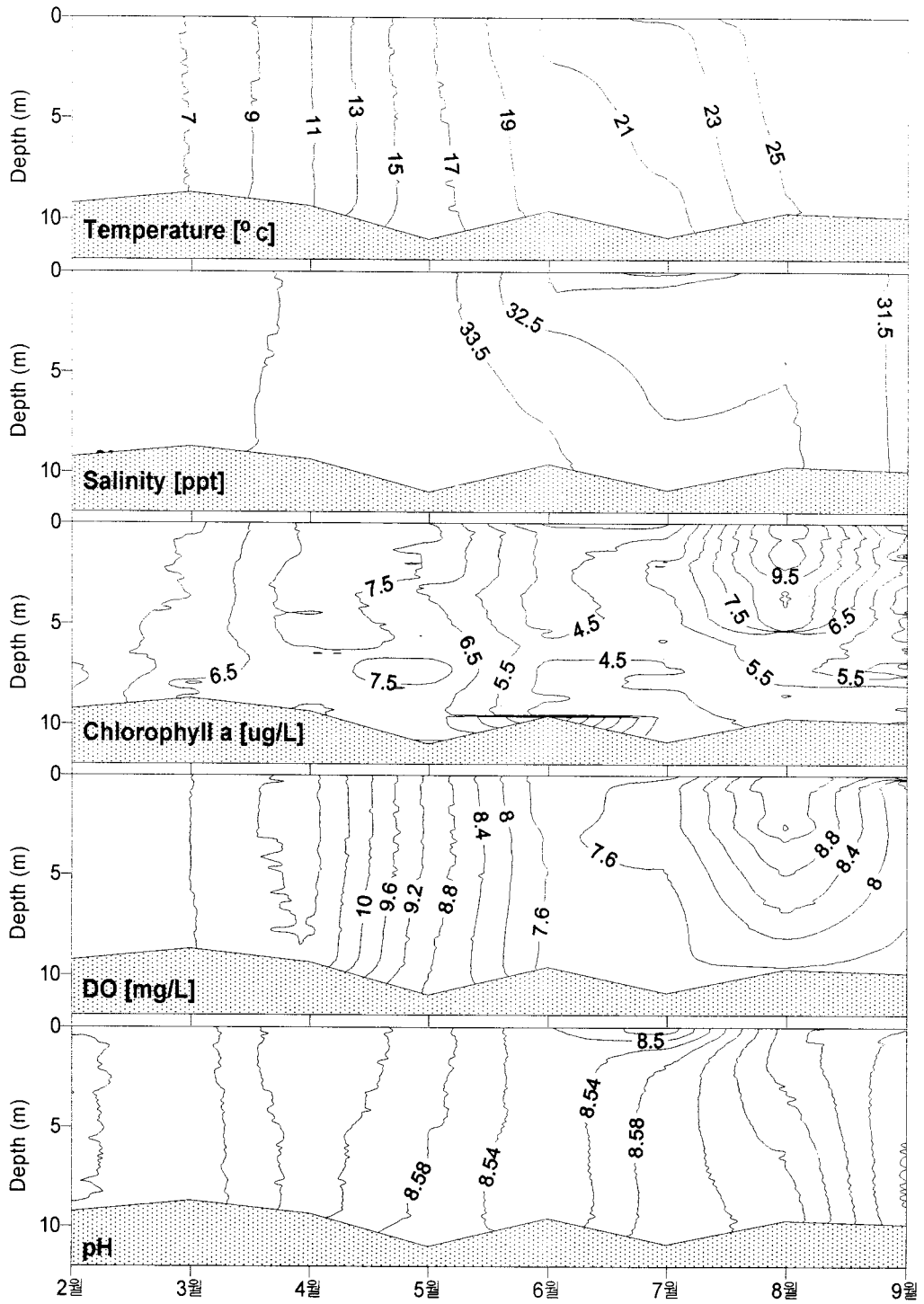


그림 26. 2001년 월별 가두리양식장의 수온, 염분, 용존산소, pH 그리고 엽록소 a의 수직분포의 변화.

(나) 용존산소

일반적인 해양 환경에서 용존산소는 유기물의 생성과 분해와도 관련이 있으나, 주로 수온과 염분의 해수 물리적 특성에 의해 조절된다. 또한 표층에서의 용존산소 함량은 바람의 세기, 바람이 부는 시간 그리고 기초 생산력 등에 의하여 공급되는 산소량과 해수중이나 해저 면에서의 유기물의 산화시 소모되는 양의 차이로서 결정된다.

양식장에서 조사 기간 중 2월에 $7.4 \sim 10.7 \text{ ml } \ell^{-1}$ 로 평균 $8.3 \text{ ml } \ell^{-1}$ 를 보였고, 4월에 $10.0 \sim 11.5 \text{ ml } \ell^{-1}$ 로 평균 $10.6 \text{ ml } \ell^{-1}$ 였다. 6월 용존산소의 하루 동안의 변화는 $7.01 \sim 8.22 \text{ ml } \ell^{-1}$ 의 범위였고, 8월의 경우는 $6.72 \sim 11.24 \text{ ml } \ell^{-1}$ 의 범위로 변하였다. 용존산소의 일변화를 살펴보면 광합성을 하는 일조시간에 높고 빛이 없는 밤에 낮은 농도를 보였다. 그리고 용존산소의 계절적인 변화는 겨울에서 여름으로 진행하면서 감소하는 경향을 보이는데, 이는 동계에는 낮은 수온과 바람에 의한 표층수의 혼합에 의해 산소의 용해도 증가하여 용존산소가 증가하고, 여름에는 표층의 높은 온도에 의한 수층의 안정으로 인한 산소용해도가 감소하여 용존산소가 감소하게 되는 경우가 일반적이다.

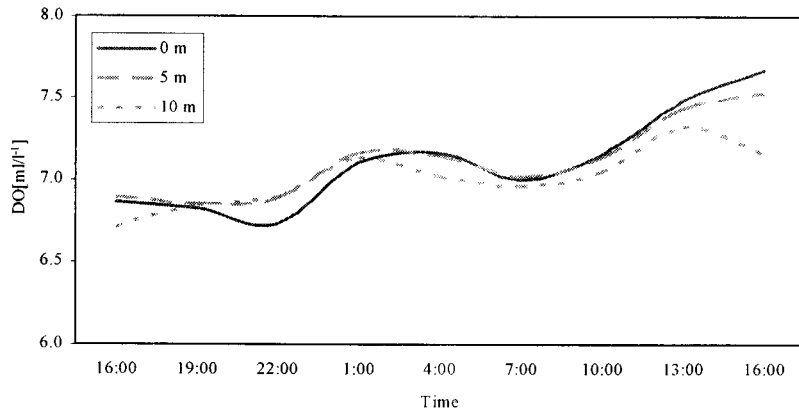


그림 27. 2000년 2월 완도 사후도 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.

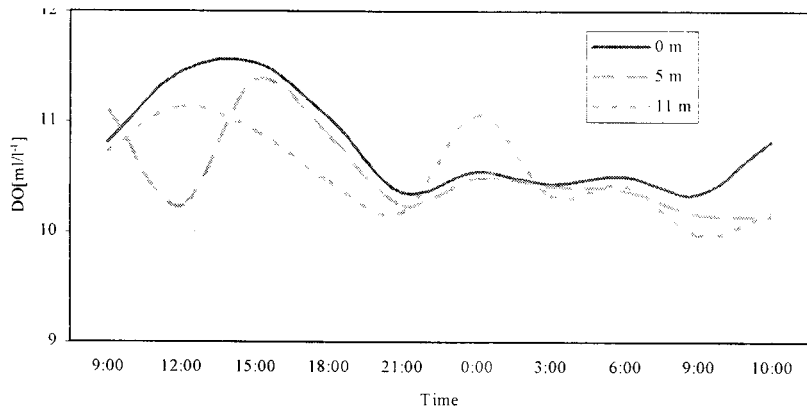


그림 28. 2000년 4월 완도 사후도 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소

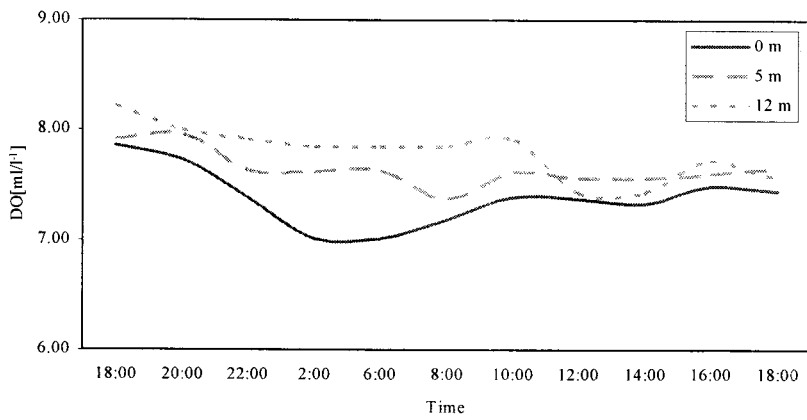


그림 29. 2000년 6월 완도 사후도 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소

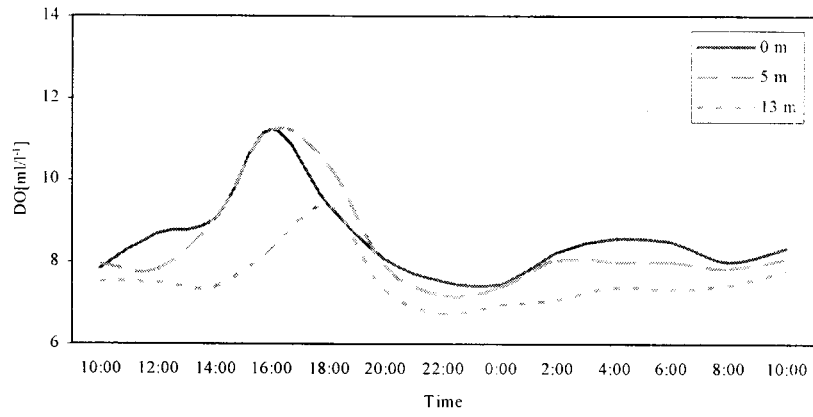


그림 30. 2000년 8월 완도 사후도 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소.

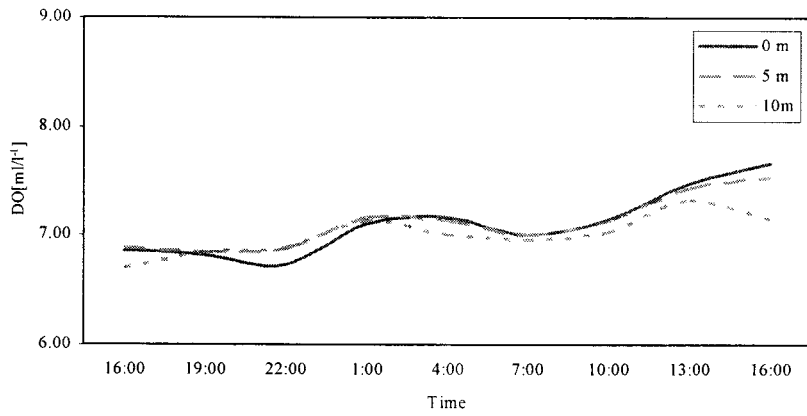


그림 31. 2000년 10월 완도 사후도 주변 가두리양식장의 수층별 용존산소

(다) 육상양식장 배출수의 영향

양식장은 바다에서 그물을 설치하여 기르는 가두리양식장과 저층 해수를 육상으로 pumping 하여 기르는 육상양식으로 두 가지 형태가 있다. 이러한 양식장은 제한된 공간에서 고밀도로 어류를 사육하는 특성 때문에 사료 및 어류의 배설물에 의한 수질과 저질의 오염문제가 필연적으로 수반되고, 이로 인하여 초래되는 연안역의 부영양화는 적조를 일으키는 원인 중 하나로 인식되고 있다. 따라서 본 연구는 양식장의 배출수(Discharge, D)가 식물플랑크톤에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 하였다.

양식장 배출수의 영향이 미치지 않은 지역의 표층수와 배출수를 동물 플랑크톤의 영향을 배제하기 위해 125 μm 의 망으로 먼저 여과한 후 표층에 도달하는 광량의 50%가 투과하도록 nickel 스크린이 씌워진 2 ℓ 병(PC)에 각각 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 0%(배출수 기준)로 혼합하였다. 그리고 3시간 이내 실험실로 운반하여 초기 시료를 취한 후 옥외에서 자연광 하에 1주일 이상 배양하였다. 매일 플랑크톤의 엽록소 a 를 관찰하기 위해 100 ml 를 GF/F여지에 여과하여 아세톤(90%) 10 ml 를 첨가 후 냉암소에서 24시간 추출하여 FP-920 intelligent fluorescence detector로(EX: 435 nm, EM: 638 nm) 형광을 측정하였다. 또한 배양을 하면서 영양염의 변화양상을 추적하기 위하여 매일 형광측정 시에 영양염 시료도 함께 채취하였다. 배양 후 다음 날부터 모든 시료의 형광이 증가하였다. 특히 배출수 100%는 해수(SW) 100%에 비해 5배 이상의 높은 형광을 나타내었다. 혼합비율이 50%인 실험군에서도 배출수 100%에 배양한 양상과 비슷하게 나타났다. 하지만 형광차이는 크게 나타났다. 전반적으로 3일째까지는 급격한 증가 양상을 나타냈으며, 4일 후부터는 서서히 감소하는 경향을 나타냈다. 6일이 지나면서 이차적인 형광증가가 나타났다. 혼합비율 25%이상 모든 시료는 표층해수에 비해 높은 형광을 나타내었다. 대체적으로 특별히 약 일주일 이상 지난 후에 배출수 100%를 비롯한 25%이상의 시료에서 다시 한번 형광이 증가하였다. 배양기간 동안 영양염의 변화 양상의 경우 규산염의 초기농도는 모든 시료에서 약 20.0 μM 를 보였고, 혼합비율 5%와 10%를 제외한 모든 시료에서 배양시간이 경과함에 따라 급격히 감소하는 경향을 보였다. 규산염은 규조류의 구조와 신진대사에 연관되어 대양의 주요지역, 연안의 용승지역 그리고 남극해(Sakahaug *et al.*, 1991)에서 식물플랑크톤의 processes를 조절한다(Dugdale, 1972, 1983). (Conley and malone, 1992)에 의하면 규산염이 식물플랑크톤의 blooming 발생에 주요한 역할을 한다고 하였다. 규산염은 배양기간 동안 시간이 경과함에 따라 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 인산염과

규산염은 질소계 영양염처럼 상황에 따라 증감이 되지 않았다. 질소계 영양염류인 질산염과 아질산염은 배양 일주일의 경과 후 약간씩 증가하는 양상을 나타냈다. 인산염은 혼합 배출수의 농도와 무관하게 보였으며 큰 차이를 나타내지 않았다. 약간의 실험적인 오차로 인하여 5%와 25%에서 급격히 증가하는 양상을 나타내기도 하였다. 표층해수의 초기 영양염 농도는 NO_2+NO_3 , PO_4 , SiO_2 의 농도가 각각 $4.51 \mu\text{M}$, $0.45 \mu\text{M}$, 그리고 $20.12 \mu\text{M}$ 를 나타내었고, 배출수(100%)의 경우는 각각 $5.93 \mu\text{M}$, $0.68 \mu\text{M}$, 그리고 $17.77 \mu\text{M}$ 를 나타내었다. 일주일 경과 후 표층해수(100%)에서 NO_2+NO_3 , PO_4 , SiO_2 의 농도는 $1.16 \mu\text{M}$, $0.09 \mu\text{M}$, 그리고 $3.72 \mu\text{M}$ 를 나타내었고, 배출수(100%)의 경우는 각각 $2.25 \mu\text{M}$, $0.28 \mu\text{M}$, 그리고 $2.0 \mu\text{M}$ 를 나타내어 배출수의 무기염이 표층해수에 비해 다시 높은 농도를 나타냄을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 무기염이 풍부한 저층수가 pumping된 후 어류가 먹다 남은 사료와 어류의 배설물이 첨가되어 배출이 일어나게 된다. 특히 영양염을 상대적으로 이용하는 플랑크톤의 농도가 타 계절에 비해 높아 영양염의 소모가 많았던 해수에 사료와 배설물에서의 영양염 용출은 단시간에 급격히 플랑크톤의 증가를 유발시켜 형광을 증가시킬 수 있다. 그러한 이유로 적응기간이 끝난 3일 경과 후 형광증가의 원인은 이렇게 영양염이 풍부한 저층수가 적당한 광조건하의 상태에서 식물플랑크톤의 bloom이 일어났을 것으로 판단된다. 그리고, 배출수에 혼합되어있던 유기물(사료, 어류 배설물)이 일주일 동안에 무기물로 분해되어 2차 영양염으로 작용하여 일주일 뒤(6일)에 또 한번의 식물플랑크톤 증식이 있던 것으로 생각된다.

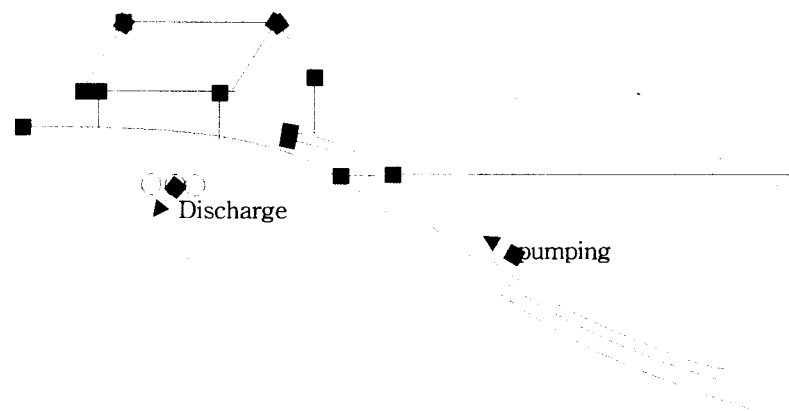


그림 32. 연구해역의 육상양식장 모식도.

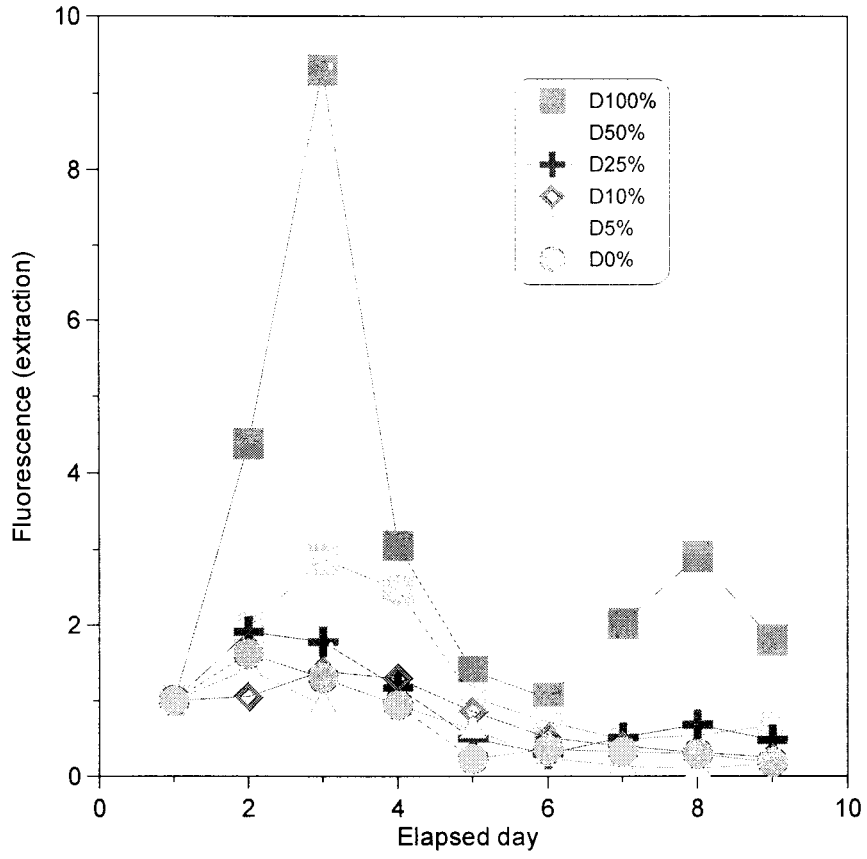


그림 33. 양식장의 배출수의 혼합률을 달리한 시료의 형광변화.

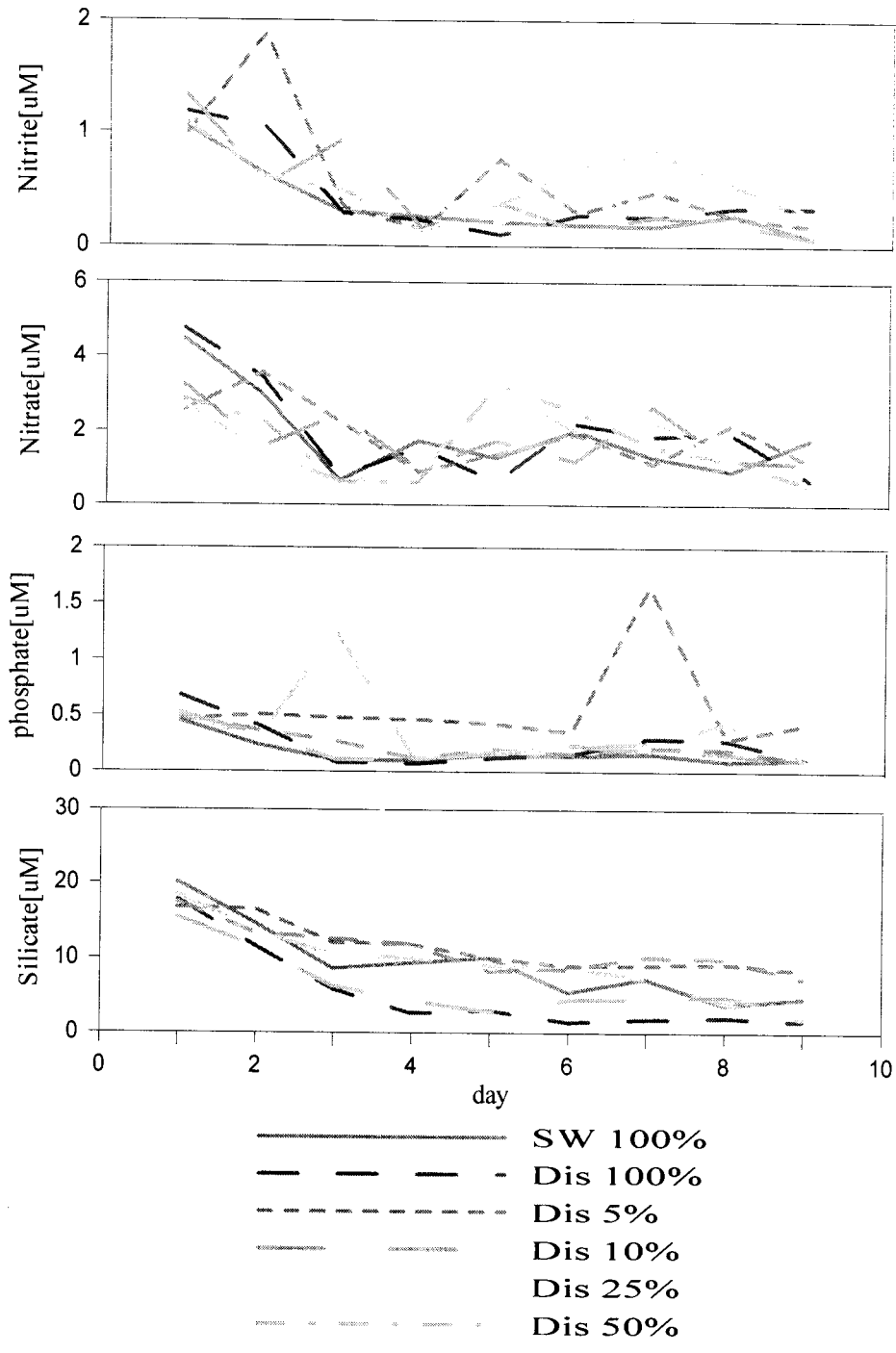


그림 34. 양식장의 배출수의 혼합률을 달리한 시료의 영양염 변화(1).

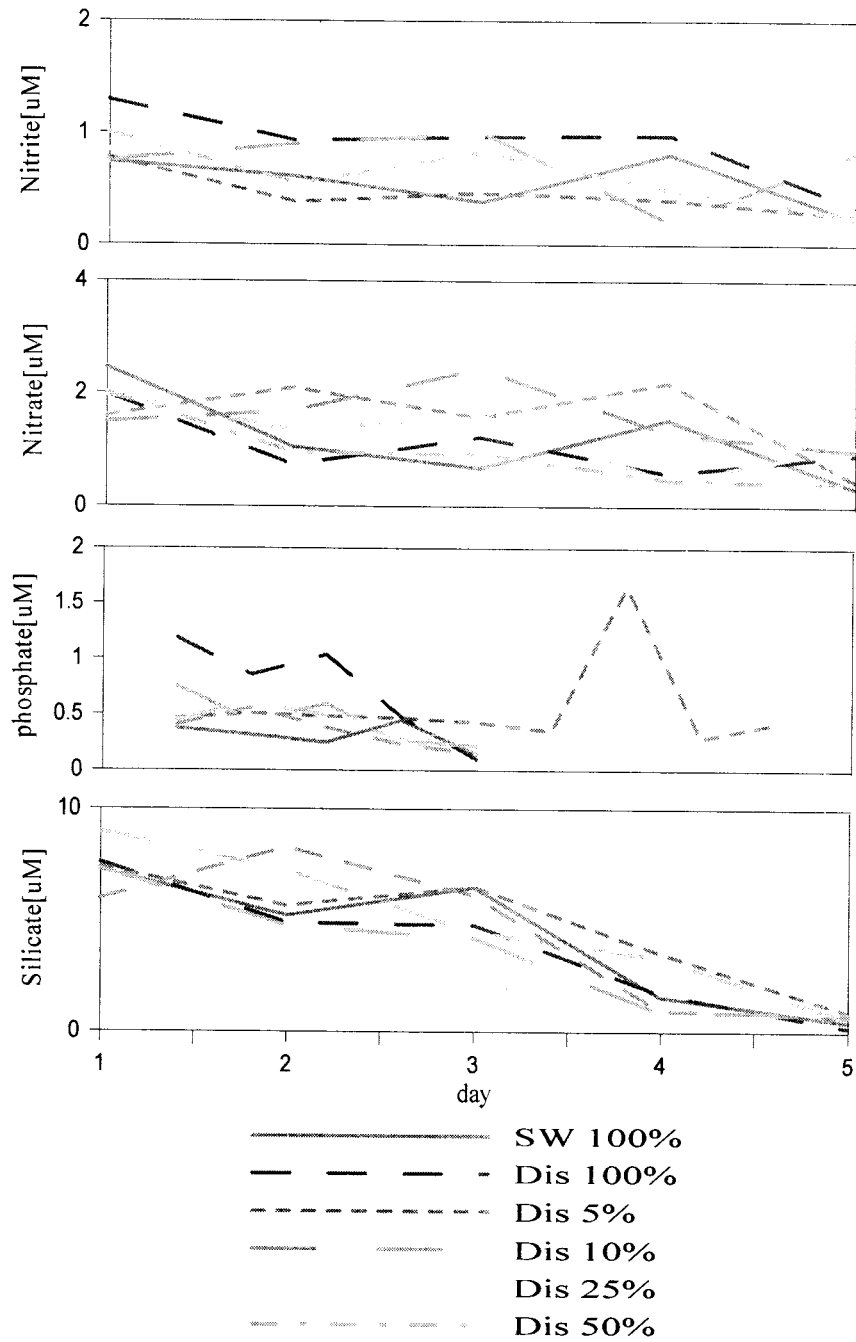


그림 35. 양식장의 배출수의 혼합률을 달리한 시료의 영양염 변화(2)

1-3) 조절 가능한 주요 오염물질의 경제적인 저감 방안 탐색(3차년도)

(가) 수온, 염분, pH

2002년 조절 가능한 주요 오염물질의 경제적인 저감 방안 탐색의 일환으로 가두리 양식장 현장 조사를 2회에 걸쳐 수행을 하였다. 춘계인 3월과 이른 하계인 5월 말 2회에 걸쳐 수행한 연구 결과 중, 수온의 경우 3월에는 11.3°C에서 12.2°C의 분포를 보였으며 표·저 간에도 큰 온도차를 보이지 않았으며, 평균 11.67°C로 큰 변화 폭을 나타내지 않았다. 또한 25시간 연속 관측한 자료에서도 수온차는 크게 나타나지 않았으며 대략 $\pm 1^\circ\text{C}$ 정도의 차이가 났다. 염분농도 또한 안정된 수괴 덕분에 표·저간 및 주간 및 야간에도 큰 차이를 나타내지 않았다. 25시간 연속 관측한 염분 농도 변화는 평균 33.48(± 0.03) psu의 차이가 있었다. 봄철이면서 수직 혼합이 활발하며 안정된 수괴를 보이고 있었던 것으로 생각된다. 수소이온 농도인 pH의 변화도 수온 및 염분농도처럼 미약한 변화만 보였다. 평균 8.41(± 0.09)의 pH차이를 보였다. 5월 31일인 이른 하계 조사에서는 수온이 7°C 정도 상승하였으며 표·간의 온도 차이 또한 2 - 3°C정도 차이를 보였다. 수온분포는 17.0°C에서 19.8°C의 분포를 보였으며 평균 18.2°C를 나타냈다. 염분은 강우 영향으로 인한 담수 유입원의 증가로 인하여 평균 0.5 psu 정도 감소하였다. 32.8 - 33.5 psu 분포를 나타냈으며, 평균 33.1(± 0.2) psu의 분포를 나타냈다. 수소이온농도는 거의 차이가 나지 않았으며 평균 8.6을 나타냈고 시간 및 조석차이 그리고 수심에 따른 변화는 전무했다.

수층의 용존산소의 경우 3월에는 6.6 - 13.7 $\text{ml } \ell^{-1}$ 의 분포를 나타냈으며, 표·저 간에 높은 농도차이를 보였으며 평균 10.9 $\text{ml } \ell^{-1}$ 로 관측되었다. 25시간 연속 관측에서도 시간 및 조석에 따라 많은 차이를 보였다. 5월에는 9.1 - 10.4 $\text{ml } \ell^{-1}$ 로 관측되었으며, 3월에 비해 수심에 따른 변화 폭이 적었고 시간별로도 큰 차이를 나타내지 않았다. 다만 야간에 다소 증가하는 경향을 보였다.

탐진강 수질측정망

수온은 수층 및 저층 유기물의 산화반응 속도, 생물학적 변화의 진행도를 지배하는 인자로서 미생물의 성장 및 용존산소량과 밀접한 관계가 있다. 수온의 상승은 세균 등의 발육을 촉진시키며, 수층의 용존산소 농도를 감소시켜 심한 경우 혐기성

(anoxic) 상태를 만든다. 하천수의 수온은 기온에 의하여 좌우되어지고, 하천의 유속이나 유량, 바람, 생활계 배출수의 유입 등에 따라 영향을 받을 수 있다. 2000년 수온은 최저 6.0℃를 보였고, 최고 30.0℃을 나타내었고, 평균값은 17.0℃ 이었다. 2001년의 경우 8월에 수온이 28.0℃으로 가장 높다. 최저 수온은 2월에 3℃로 나타낸다. 2002년에 6월에 28℃로 최대였다. 월별 변화는 비슷한 경향을 보였다.

수소이온농도는 물의 산성 또는 알칼리성의 강도를 나타내는 값으로 자연수계의 화학적, 생물적으로 중요한 요소이며, 자연 수계에서 저층 침전물에 포함되어 있는 중금속류나 부유물중의 금속류의 용해도 또한 pH의 영향을 받는다. pH를 수질기준에 넣어 관리하는 목적은 산성이나 알칼리성이 강한 물은 생물체에 해롭고 콘크리트나 동을 부식하므로 용수목적에 따라 pH의 허용범위가 정해져 있다. 일반적으로 담수어의 적합한 생존과 저서 무척추 어류의 먹이 생태계를 보전하기 위해서 pH 6.5~9.0 의 범위가 유지되어야 하며, 이 범위 밖에서는 어류에 치명적인 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 2000년 pH는 최소 6.4 수치를 보였으며, pH 최대 7.4로 나타났고, pH의 평균은 7.1이었다. 2001년 pH는 7월에 최소 6.7 수치로 보였으며, pH최대가 7.7 수치로 보였다. 그리고 2002년의 경우 1월과 7월에 최소로 보이고 pH 최대가 8월에 나타났다.

용존산소량이란 수중에 녹아있는 유리산소량을 말한다. 일반적으로 하천수가 오염될 경우 유기물에 의한 부패와 수중 미생물에 의해 용존산소가 소비된다. 용존산소가 부족하게 되면 혐기성 상태가 되어 H₂S, NH₃, CH₄ 등을 발생시키며 어패류를 비롯한 저서생물의 생존을 어렵게 만든다. 용존산소가 많고 적음은 오염정도를 간접적으로 말해주며 일반적으로 오염되지 않은 물의 용존산소농도는 높고, 대부분의 경우 용존산소가 포화되어 있다. 수중의 산소는 조류에 의해 공급되거나 대기 중의 산소가 수면을 통해 물 속으로 분산 흡수되기도 한다. 생물학적 산화 반응 속도는 온도에 비례하여 증가하고 그에 따라 산소요구량도 증가하므로 용존산소량이 적어지는 고온상태 즉 열수의 배출이라든가 여름철 등의 수질관리가 매우 중요하다. 2000년 용존산소의 최소치는 8.5 mg/l, 최대는 13.8 mg/l로 관측되었으며, 평균은 10.5 mg/l로 나타났다. 2001년의 용존산소는 최대가 2월에 13.2 mg/l로 가장 크게 보였고, 최소가 8월에 7.4 mg/l로 가장 낮게 나타난다. 2002년의 경우 용존산소 최대가 12.2 mg/l이고 최소가 8.7 mg/l로 나타낸다.

BOD(생화학적 산소요구량)는 수중에 함유된 생물학적 분해 가능한 유기물질의 함

량 정도를 파악하기 위한 자료로서 수중에서 서식하고 있는 호기성 박테리아를 비롯한 일련의 생물군에 의해 유기물이 산화 분해되는 과정에서 요구되어지는 산소요구량이다. BOD 값이 높다는 것은 수중에 생물학적 분해 가능한 유기물질이 다량 함유되어 호기성 미생물이 이를 분해, 안정화하는데 많은 양의 용존산소를 소모하게 된다는 것을 의미한다. BOD 값이 지나치게 높으면 수중 용존산소는 완전히 소비되어 혐기성 상태가 되어 물의 자정작용이 정지되고 H_2S , H_2 , NH_3 , CH_4 등을 발생시켜 악취가 나게되며 호기성 생물에 치명적이다. 반대로 BOD 값이 낮은 경우는 수중의 유기물 함량이 적어 세균이 이를 안정화하는 데 산소를 적게 소모한다는 것을 의미한다. 2000년 생화학적 산소요구량은 최소 0.4 mg/l 로 가장 낮은 값을 보였으며, 최대치는 1.8 mg/l 를 보였고, 평균값은 0.9 mg/l 로 나타났다. 그리고 2001년 최대가 2.1 mg/l , 최소가 0.4 mg/l 를 보였다. 그리고 2002년의 경우 최대치가 2.8 mg/l , 최소치가 1.3 mg/l 로 나타났다.

화학적 산소요구량은 수중의 유기물을 화학적으로 산화시킬 때 소요되는 산화제를 산소의 양으로 환산한 값이다. 수중에 포함된 화학적 분해 가능한 유기물질 함량의 간접적 척도이다. 2000년 화학적 산소요구량의 최소는 1.2 mg/l 로 나타났고, 최대는 8.0 mg/l 를 보였으며, 평균값은 8.0 mg/l 으로 나타났다. 그리고 2001년의 최대가 6.1 mg/l 로 최소가 0.3 mg/l 으로 보였다. 2002년의 경우 최대가 1.8 mg/l 에서 최소가 0.3 mg/l 으로 보였다.

부유입자성 물질은 배출수역의 바닥으로 침전하여 자연 저서생물군집의 서식지를 변화시키는 피해를 줄 수 있으며, 담수중의 용존 착색물질이나 현탁 입자는 물의 투명도를 저하시킴으로써 수중의 광합성생물에 의한 기초생산력을 저하시키는 원인으로 작용 할 수 있다. 2000년 부유물질 연평균 수질현황을 보면, 최저치가 0.5 mg/l 를 나타내었으며, 최대가 16.0 mg/l 를 보이고, 부유물질 연평균은 4.6 mg/l 로 나타났다. 2001년의 경우 최대치가 13.6 mg/l 이고, 최소치가 10월에 1.2 mg/l 를 보였다. 2002년에 부유물질의 연평균 수질현황을 보면, 최대치가 7월에 16.8 mg/l , 최저치가 1.6 mg/l 을 나타냈다.

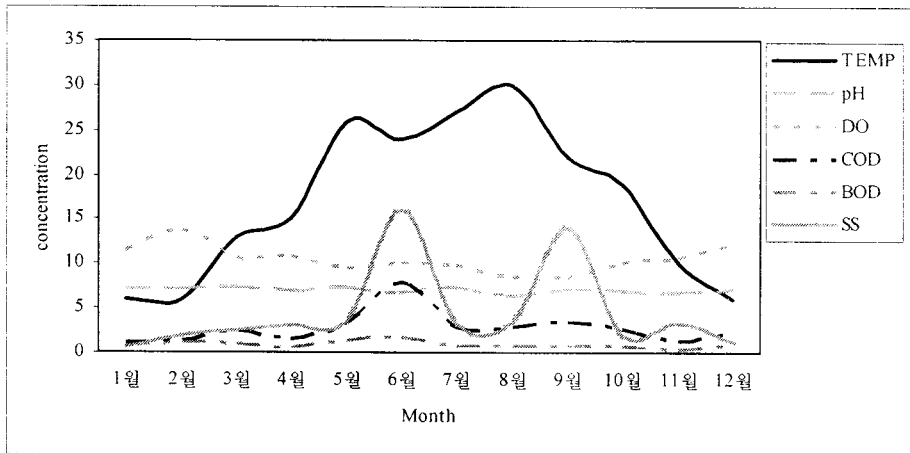


그림 36. 2000년 전남 탐진강 측정소의 관측한 월평균 수온[°C], pH, 용존산소[mg/l], COD[mg/l], BOD[mg/l], SS[mg/l] 수질변화.

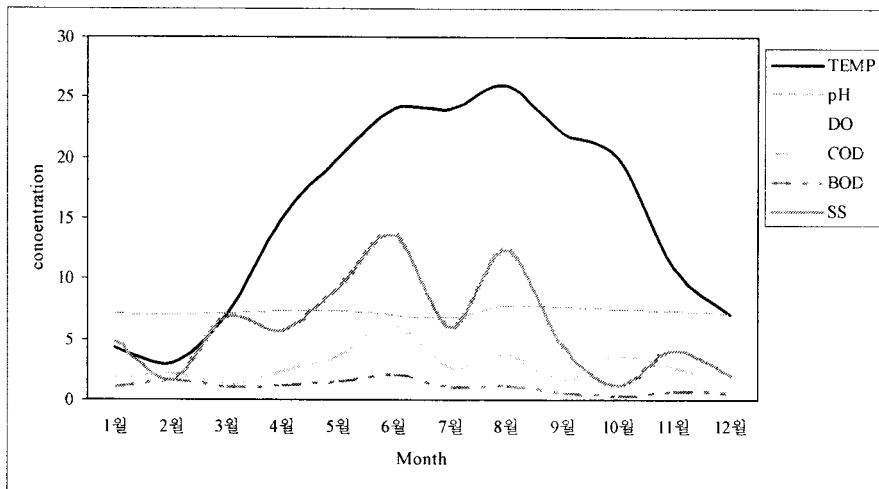


그림 37. 2001년 전남 탐진강 측정소의 관측한 월평균 수온[°C], pH, 용존산소[mg/l], COD[mg/l], BOD[mg/l], SS[mg/l] 수질변화.

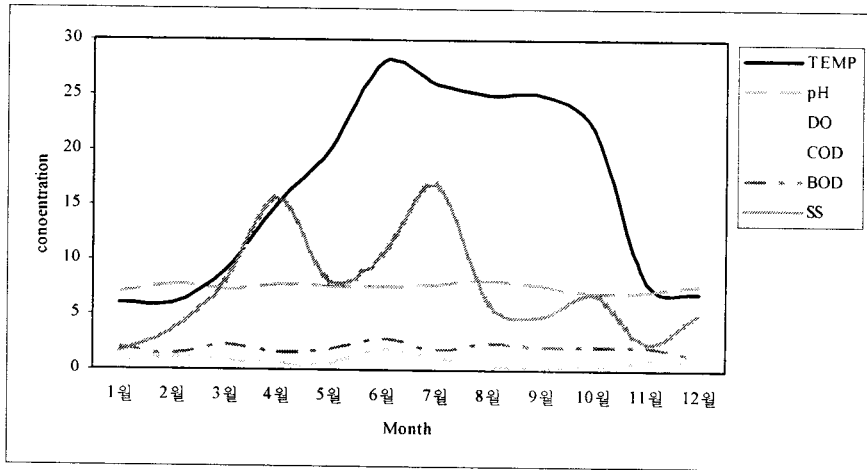


그림 38. 2002년 전남 탐진강 측정소의 관측한 월평균 수온[$^{\circ}\text{C}$], pH, 용존산소[mg/ℓ], COD[mg/ℓ], BOD[mg/ℓ], SS[mg/ℓ] 수질변화.

2-1) 적조원인 생물의 질소계 영양염 이용 능력 파악(1차년도)

(가) 질산환원효소의 활성도(Nitrate Reductase Activity)

1월에 질산염 환원 효소의 활성도를 알아보기 위해 모든 정점에서 수직변화와 표층분포를 조사하였다. 표층에서 질산염 환원효소의 활성도는 $35.1 \sim 233.9 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$, 저층에서는 $70.2 \sim 175.4 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$ 의 범위로 나타났다. 2월에 2시간간격으로 13시간의 결과를 살펴보면 표층에서 질산염 환원효소의 활성도는 $69.5 \sim 190.0 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$, 저층에서는 $59.6 \sim 161.5 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$ 의 범위로 나타났다(그림 39). 3월에 2시간 간격으로 25시간 실험한 결과의 질산염 환원효소의 활성도는 표층에서 $56.6 \sim 94.3 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$, 저층에서는 $56.6 \sim 103.8 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$ 의 범위로 나타났다(그림 40). 4월에 질산염 환원 효소의 활성도는 표층에서 $22.4 \sim 35.1 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$, 저층에서는 $13.4 \sim 46.8 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$ 의 범위로 나타났다(그림 41). 5월에 질산염 환원효소의 활성도는 표층에서 $69.7 \sim 249.0 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$, 저층에서는 $59.8 \sim 169.3 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$ 의 범위로 나타났다(그림 42). 6월에는 장마 기간으로 인하여 표층에서 질산염 환원효소의 활성도가 높게 나타나기도 하였으며, 이를 제외한 대부분의 질산염 환원효소의 활성도가 표층과 중층에서 높았다. 질산염 환원효소의 활성도는 표층에서 $6.5 \sim 45.3 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$, 중층에서는 $6.5 \sim 25.9 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$ 의 범위로 나타났다. 그리고 저층에서 $6.5 \sim 90.6 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$ 범위로 나타났다(그림 43). 7월의 경우 25시간 관측하였다. 질산염 환원효소의 활성도는 표층에서 $11.4 \sim 44.2 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$, 저층에서는 $5.2 \sim 38.2 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$ 의 범위로 보였다. 7월의 경우 저층에서 조금 높은 값으로 관측되었다(그림 44). 8월에 질산염 환원 효소의 활성도를 알아보기 위해 모든 정점에서 수직변화와 표층 분포를 조사하였다. 표층에서 질산염 환원효소의 활성도는 $18.3 \sim 51.2 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$, 저층에서는 $15.4 \sim 48.7 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$ 의 범위로 나타났고, 대조구에서 적은 양으로 측정 되었다(그림 45). 추계인 9월의 질산염 환원 효소의 활성도는 표층에서 $8.8 \sim 38.5 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$, 저층에서는 $14.3 \sim 35.7 \text{ NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$ 의 범위로 중층과 저층에서 높은 농도를 보였고 pH는 표층에서 낮은 값을 나타내며 수심에 따라 변화하였다. 그리고 대조구 경우 표층과 저층이 비슷한 범위로 나타난다(그림 46).

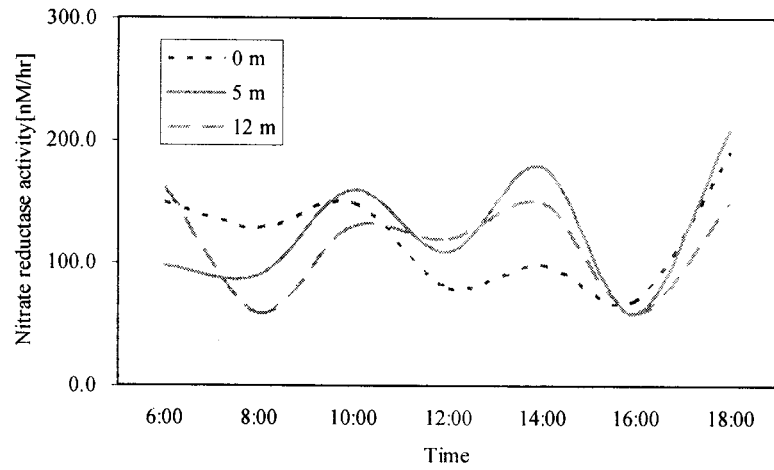


그림 39. 2000년 2월 강진 마량항 주변 해수 중의 시간별 질산염 환원효소 활성도.

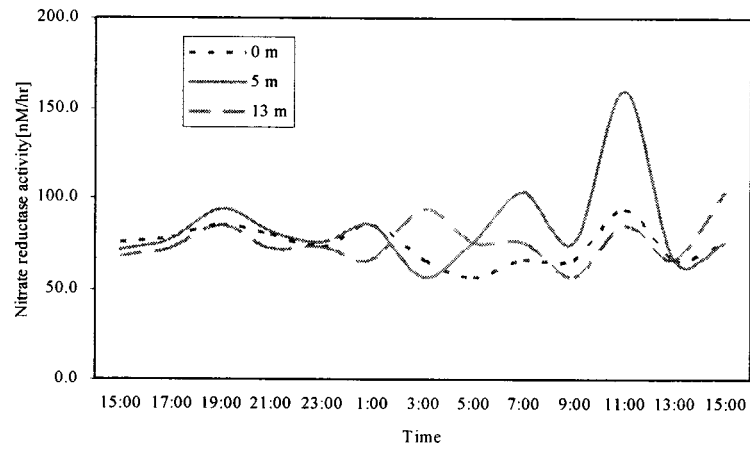


그림 40. 2000년 3월 강진 마량항 주변 해수 중의 시간별 질산염 환원효소 활성도.

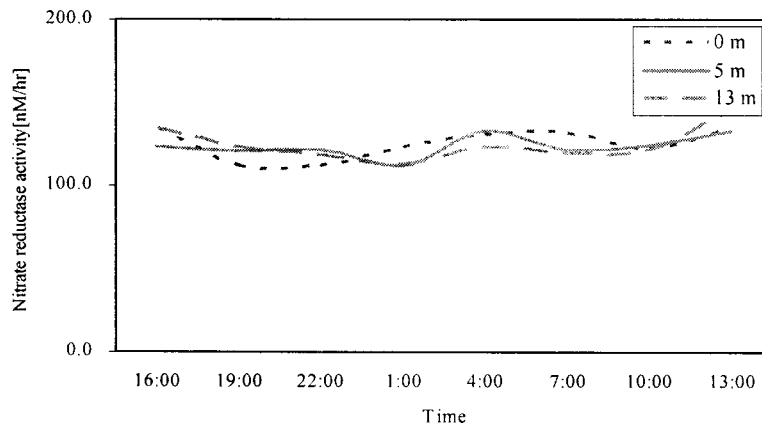


그림 41. 2000년 4월 강진 마량항 주변 해수 중의 시간별 질산염 환원효소 활성도.

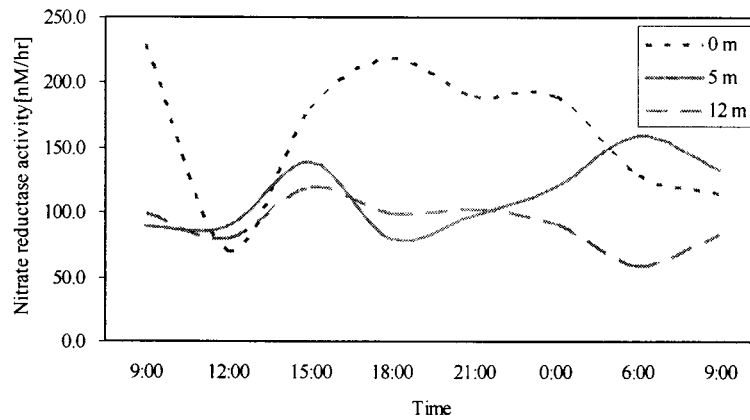


그림 42. 2000년 5월 강진 마량항 주변 해수 중의 시간별 질산염 환원효소 활성도.

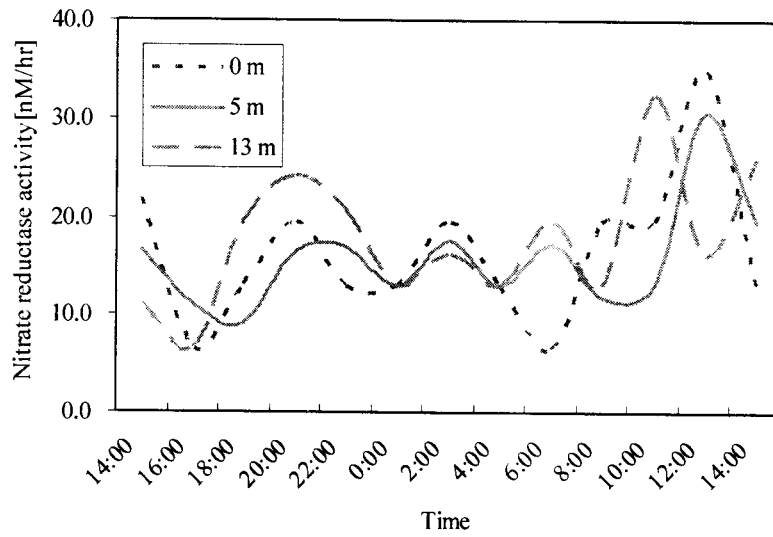


그림 43. 2000년 6월 강진 마량항 주변 해수 중의 시간별 질산염 환원효소 활성도.

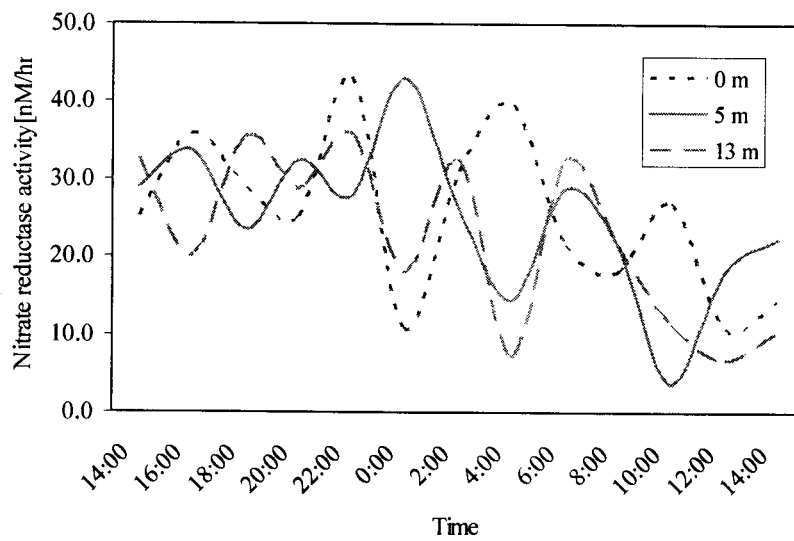


그림 44. 2000년 7월 강진 마량항 주변 해수 중의 시간별 질산염 환원효소 활성도.

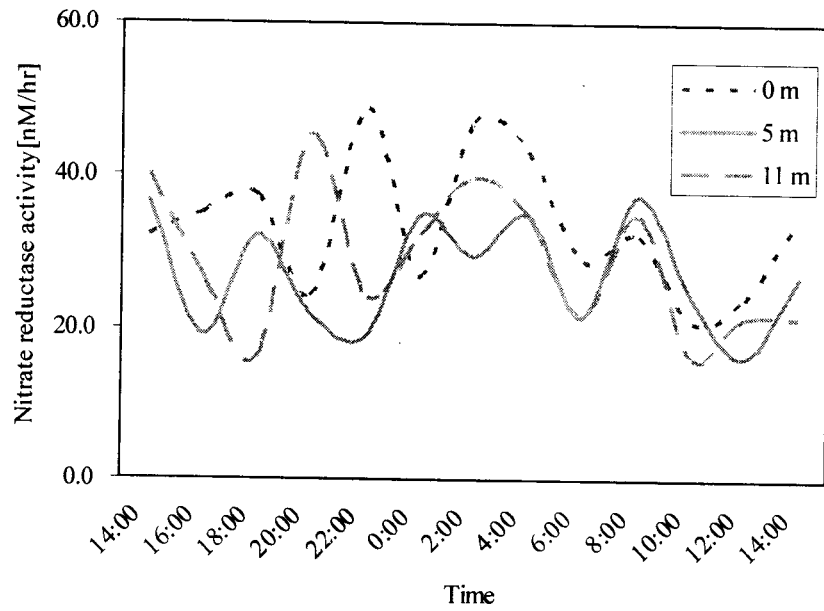


그림 45. 2000년 8월 강진 마랑항 주변 해수 중의 시간별 질산염 환원효소 활성도.

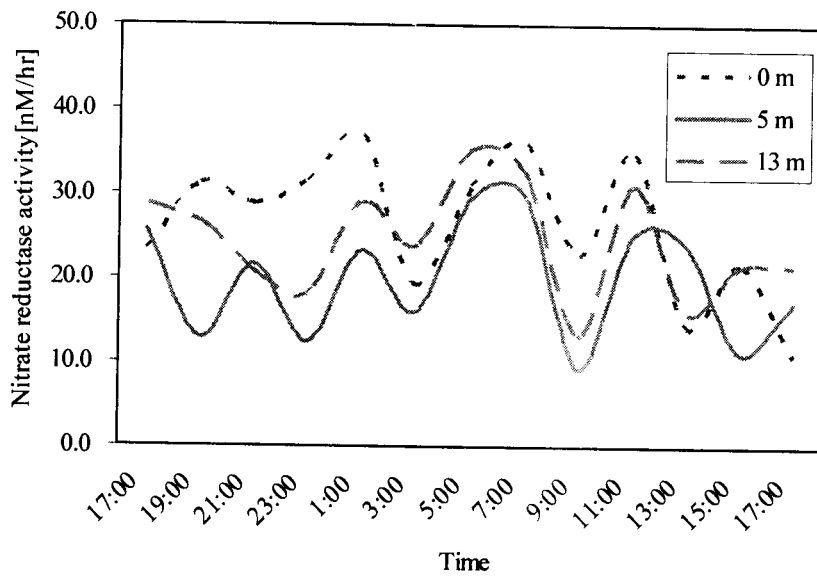


그림 46. 2000년 9월 강진 마랑항 주변 해수 중의 시간별 질산염 환원효소 활성도.

(나) 엽록소 *a*

1월 예비 실험한 결과 엽록소 *a*의 농도는 1월에 표층에서 $0.62 \sim 0.66 \text{ mg m}^{-3}$ 이고 저층의 엽록소 *a*의 농도는 $0.66 \sim 1.80 \text{ mg m}^{-3}$ 의 농도 범위를 보였으며, 수직구조의 경우 저층에서 엽록소 *a*가 증가하는 구조를 보여준다. 2월에 표층에서 엽록소 *a*의 농도는 $1.53 \sim 2.27 \text{ mg m}^{-3}$, 저층의 엽록소 *a*의 농도는 $2.48 \sim 2.72 \text{ mg m}^{-3}$ 의 농도 범위를 보였다. 12시간 관측에서 수층별 엽록소 *a*는 중층과 저층에서 높았으며, 시간이 지나면서 표층의 엽록소 *a*가 더욱 감소하고 중층에서 저층으로 이동이 있음을 관찰 할 수 있다(그림 47). 3월에 표층에서 엽록소 *a*의 농도는 $1.18 \sim 2.24 \text{ mg m}^{-3}$, 저층의 엽록소 *a*의 농도는 $1.09 \sim 3.09 \text{ mg m}^{-3}$ 농도 범위를 보였다. 동계에 비하여 다소 증가한 양으로 낮에 저층에서 가장 높은 농도의 엽록소 *a*가 나타났다(그림 48). 춘계인 4월에는 낮은 농도와 높은 농도의 엽록소 *a*의 차가 1.34 mg m^{-3} 이었으며 4:00 ~ 7:00경을 제외하고 표층과 저층에서 엽록소 *a*가 낮았다. 4월에 표층에서 엽록소 *a*의 농도는 $0.47 \sim 1.43 \text{ mg m}^{-3}$, 저층의 엽록소 *a*의 농도는 $0.89 \sim 1.77 \text{ mg m}^{-3}$ 의 농도 범위이다. 5월에는 전체적으로 높은 농도를 보였으며, 시간이 지날수록 표층에서 중층 그리고 저층으로 엽록소 *a*의 농도가 증가함을 볼 수 있다. 5월에 표층에서 엽록소 *a*의 농도는 $2.77 \sim 3.42 \text{ mg m}^{-3}$, 저층의 엽록소 *a*의 농도는 $2.51 \sim 4.37 \text{ mg m}^{-3}$ 의 농도 범위를 보였다(그림 49).

6월에는 장마 기간으로 인하여 표층에서 엽록소 *a*가 높게 나타나기도 하였으며, 이를 제외한 대부분의 엽록소 *a*의 농도가 중층과 저층에서 높았다. 그러나 5월의 엽록소 *a* 농도에 비해 50% 정도 낮게 나타났다. 6월의 수직 엽록소 *a* 분포는, 표층에서 $0.71 \sim 1.39 \text{ mg m}^{-3}$, 저층에서 $0.68 \sim 1.39 \text{ mg m}^{-3}$ 로 나타났다(그림 51). 7월 표층에서의 엽록소 *a* 농도는 $0.58 \sim 4.51 \text{ mg m}^{-3}$ 으로 6월에 비해 좀 더 높은 농도를 보였고, 표층과 저층의 엽록소 *a*의 농도차는 크지 않았다. 그러나 새벽 2:00에 만조에서 최고 값인 4.51 mg m^{-3} 농도가 저층에서 나타났으며, 2시간 후 엽록소 *a*의 농도가 매우 낮아졌다(그림 52). 8월에는 엽록소 *a*의 농도가 하계 중 가장 높게 나타났으며, 하계 중 가장 심한 수온 약층이 형성된 14:00에는 표층, 중층 그리고 저층에서 가장 높은 농도의 엽록소 *a*가 7.67 mg m^{-3} , 4.55 mg m^{-3} , 1.83 mg m^{-3} 으로 검출되었다. 2시간 후 엽록소 *a*의 농도는 57%, 60% 그리고, 13%로 감소하여 3.28 mg m^{-3} , 1.82 mg m^{-3} , 1.6 mg m^{-3} 나타났고, 4시간 후에는 84%, 75% 그리고 26%가 감소되었다. 이는 성층화 현상으로 인하여 안정된 수괴가 형성되어 저층으로부터의 영양염류의 공급이 제한되어 엽록소 *a* 농도가 급격하게 감소했고, 또한

간조 때로 물살이 약하였다. 엽록소 a 는 8월의 경우 표층에서 주로 높게 나타났고 평균적으로 1.62 mg m^{-3} 의 높은 농도를 보였다. 용존산소와 pH도 14:00에 엽록소 a 와 같이 가장 높은 값을 가졌다. 대조구에서는 15:00에서 조사하였으며, 표층과 저층의 수온은 26.17 과 24.67 $^{\circ}\text{C}$ 을 나타내 1.5°C 의 차이를 나타냈으며 염분도 표층과 저층의 차가 3.68 psu로 매우 높은 차이로 변함을 알 수 있었다. 표층에서 엽록소 a 는 2.27 mg m^{-3} , 저층에서 0.92 mg m^{-3} 로 감소하였다(그림 53).

추계인 9월의 엽록소 a 는 $0.55 \sim 2.55$ 이며 평균 1.23 mg m^{-3} 으로 나타났다. 저층과 중층에서 높은 농도를 보였고 pH는 표층에서 낮은 값을 나타내며 수심에 따라 변하였다. (그림 54).

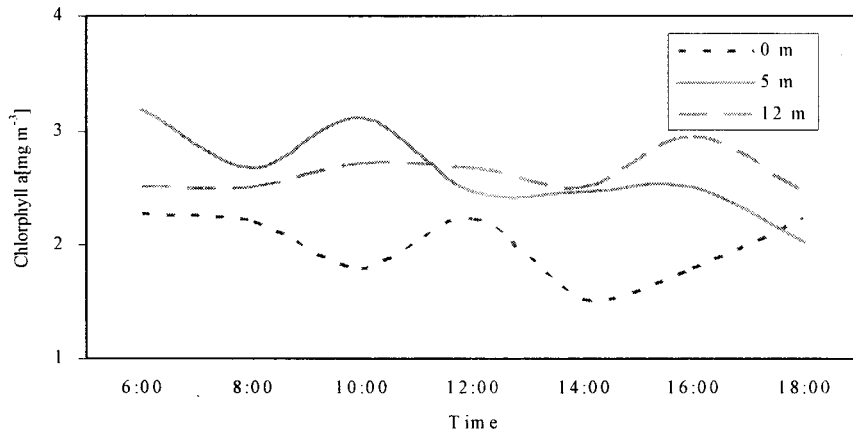


그림 47. 2000년 2월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료

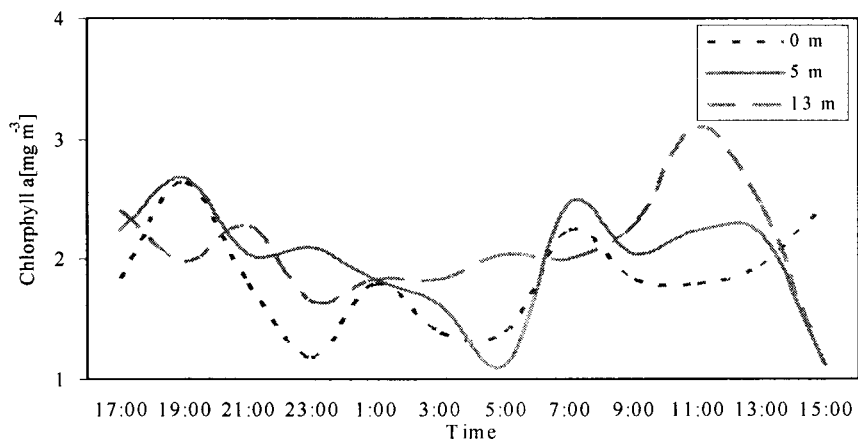


그림 48. 2000년 3월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료

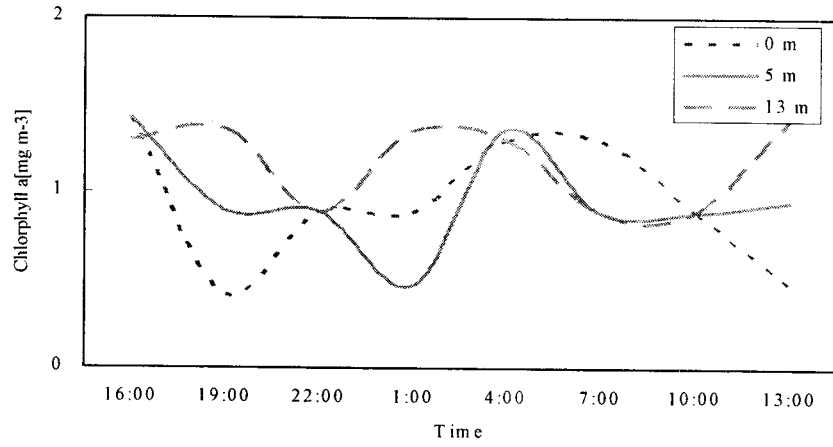


그림 49. 2000년 4월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll *a* 자료

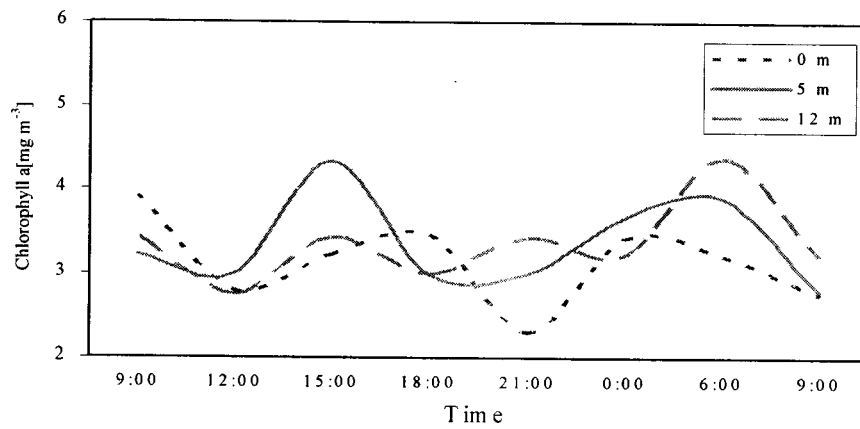


그림 50. 2000년 5월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll *a* 자료.

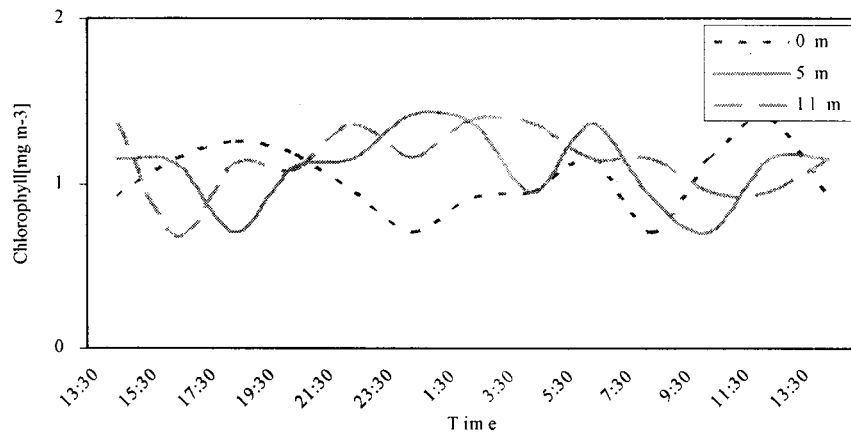


그림 51. 2000년 6월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료

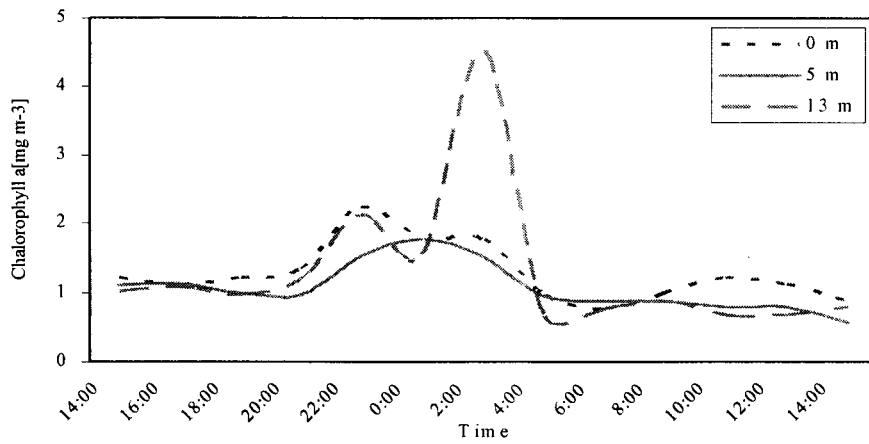


그림 52. 2000년 7월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료

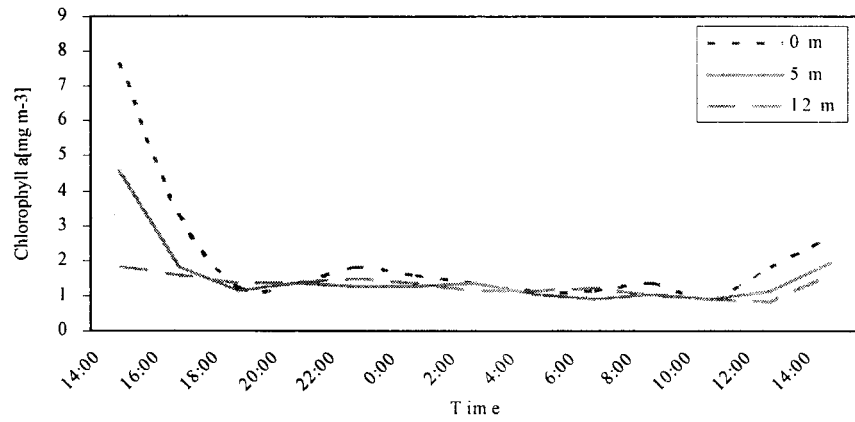


그림 53. 2000년 8월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료

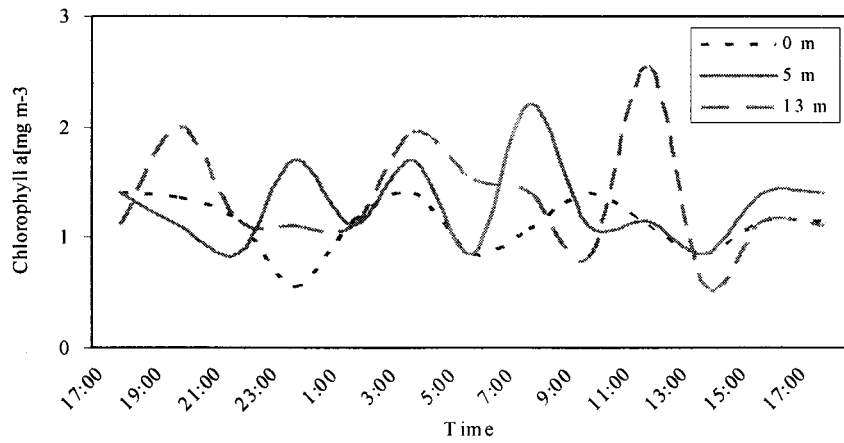


그림 54. 2000년 9월 강진 마량항 주변의 시간별 Chlorophyll a 자료

(다) 영양염

해수 중의 영양염류는 정상적인 해양의 경우 해양 식물의 성장에 매우 중요하고, 대부분의 경우 춘 하계에는 왕성한 흡수, 이용으로 인하여 매우 낮은 농도로 존재한다. 일반적으로 해양의 표층에서 영양염류는 생물체에 흡수되어 유기물을 형성하면, 생물체의 사체(detritus)나 분립(fecal pellets)과 같은 크기가 큰 유기물은 중력 작용을 받아 아래층으로 침강한다. 이 유기물은 침강하는 도중에 미생물에 의해 해수중의 용존 산소를 소비하면서 분해 되고, 이때 유기물 중 질소, 인, 규산염 등 영양염류는 해수 중으로 재생된다. 침강하는 유기물질의 무기화속도는 수온약층 바로 아래 수층에서 가장 크기 때문에 대체적으로 이 수층에서 영양염류의 극대층이 나타난다. 이를테면, 영양염류의 농도는 생물체로의 흡수에 의해 유광층에서 가장 낮고, 유기물의 분해로 영양염이 재생되어 중·저층으로 갈수록 높다. 그러나, 본 연구에서는 표층에서도 최대의 농도를 나타내기도 하였다.

정점 M에서 시간과 깊이에 따른 영양염인 NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} 과 SiO_2 의 분포를 달별로 나타냈으며 위와 같이 영양염도 동계(1월, 2월), 춘계(3월, 4월, 5월), 하계(6월, 7월, 8월) 그리고 추계(9월)로 나누어 해석하였다.

첫 번째로 해수 중의 암모니아는 질소계 유기물의 분해시 가장 먼저 분해되어 나오는 무기 영양염류로서 해수 중의 질산화 박테리아에 의해 순차적으로 산화되어 아질산염 그리고 질산염으로 산화되어 존재하게 된다. 정상적인 해양 환경에 질소계 무기 염류는 암모니아의 경우 해양 식물의 선호도에 따라 매우 낮은 농도로 존재하거나, 충분한 산화 과정을 통해 대부분 질산염으로 존재한다(전, 1994). 암모니아는 해양의 식물 플랑크톤의 성장에 필수적인 nitrogen source이다. 암모니아의 유입원은 산업 폐수나 가정오수 또는 대기로부터의 유입(rain, aerial fallout), 해수 내에서 동물플랑크톤 등에 의한 분비(animal excretion), 유광층에서의 미생물에 의한 분해작용(microbial decomposition), 퇴적물에서의 광물화 작용(mineralization)에 의한 해수로의 transport 등이 있다. 암모니아는 식물성 플랑크톤에 의해 직접적으로 흡수되기도 한다. 암모니아는 해수 내 또는 퇴적물의 유기물의 분해와 플랑크톤과 미생물에 의한 재생산 과정을 통해 생성되는 암모니아는 식물 플랑크톤에 의해 아질산염이나 질산염보다 선택적으로 먼저 흡수된다.

강진 마량항에 위치한 가두리 양식장의 동계의 영양염 분포를 살펴본 결과, 용존 영양염 중 질산염의 농도범위는 오전 12시경에 예비 실험한 결과 아질산과 규산염은 중층에서 0.53, 4.79 μM 가장 높았고 암모니아, 질산과 인산은 저층에서 4.16 μM , 0.23 μM , 0.08 μM 로 높게 관측되었다. N/P ratio는 정점 M의 표층에서 5.57, 저층에서 3.00로 나타났다.

2월에는 전반적으로 영양염이 낮게 나타났고, 6:00경에 저층에서 아질산, 약간의 암모니아 인들이 높았으며, 그 후 표층에서 인이 높아짐을 관찰 할 수 있었다. 또한, silicate는 4시경에 중층에서 2.81 μM 의 낮은 값을 보였다. 겨울철에는 여름철보다 광합성작용이 활발하지 못하고, 해수면 냉각으로 인하여 수직혼합이 활발하게 이루어져서 심층수로부터 영양염류가 공급되기 때문에 표층수 중의 농도가 약간 증가한 것으로 보인다 (그림 55).

춘계인 3, 4, 5월의 영양염 분포를 보면, 이른 봄인 3월과 4월에 질산이 매우 높은 값을 보였다. 이는 수직혼합으로 인해 그 농도가 증가하였음을 나타낸다. 3월의 경우 21:00 저층에서 암모니아의 농도가 높아지고 시간이 지나면서 중층에 아질산이 높게 나타나고, 표층에 질산이 높아졌다. 인이 많이 함유했던, 23:00경에 클로로필도 약간 높았고, 영양염이 풍부했던 11시경의 저층에서 암모니아, 아질산, 질산과 규산염등의 농도가 높았고, 그때의 엽록소 *a*의 농도도 가장 높았다. 4월의 그래프도 질산성 질소의 농도가 3월에 비해선 약간 낮아졌지만, 매우 높은 값을 나타내었다(그림 57). 또한 낮 시간에 표층에서의 영양염 농도가 매우 높았다. 현장실험 전날 강한 바람과 비로 인하여 질산과 규산염을 제외한 아질산과 인산염의 농도가 2 ~ 3배 높아짐을 관찰 할 수 있었다. 이 때 중층에서의 영양염이 높게 나타났다. 그러나 질산염의 농도는 3 ~ 5배 가량 낮아졌다. 춘계인 3, 4, 5월에는 영양염이 중층과 저층에서 조석에 의한 영향으로 표층에서도 높은 농도로 질산이 나타났으며 전반적으로 물의 혼합이 잘되어 지고 있어 영양염이 표층, 저층으로의 이동이 매우 빨랐으며, 몇몇 경우를 제외하고 대부분 균일하게 퍼져 있었다.

하계인 6, 7, 8월에는 수온의 성층화가 낙조일 때만 약간 나타나는 6월과, 전반적으로 성층화가 관찰되어지는 7월과 8월을 나타내었다. 6월에는 장마기간에 조사가 이루어졌다. 이때 저층에서 아질산염이 13:30분에 2.47 μM 농도로 가장 높았으며 나머지 시간에는 0.4 μM 이하의 값을 나타냈다. 질산은 2시간 후에 저층에서 2.16 μM 로 최대값에 가졌고, 오전 9:00부터 중층에서 0.8 μM 로 약간 높아졌다. 그림. 1-40에 나타난 영양염 분포는 만조

시 바닷물이 들어오면서 점점 낮아졌으며 인산염과 규산염은 $R^2 = 0.9057$ 로 상관관계를 보였다. 대조구에서는 같이 N/P값은 1~5정도의 낮은 값을 보여주었다. 이는 질산염이 6월에는 제한 요소로 존재하였음을 말해 주고 있다. 인산염인, 규산염 모두 유사한 양상을 보여 주었다(그림. 59). 7월과 8월은 서로 큰 연관성이 나타나지 않았지만, 각 달마다 영양염의 분포가 거의 비슷하게 나타났다. 인산염의 경우에는 보는 바와 같이 비가 내리면서 인산염이 표층과 저층에서 증가함이 관찰되었다. 8월에는 깊이가 깊어질수록 용존 산소는 매우 낮아 졌으며, 영양염은 14:00에 규산염을 제외한 모든 영양염이 낮게 나타났고, 규산염은 하계의 조사 기간 중 가장 높은 농도로 나타났다. 질산염, 아질산염은 높은 값을 나타내 N/P값은 최소 4.57에서 최대 15.23으로 나타났다.

영양염은 동계, 춘계, 추계에 비해 규산염을 제외하고, 나머지 영양염의 농도는 낮았다. 이 때 8월은 인산염이 저층과 중층에서 높게 나타났고, 7월에 비해 조금씩 영양염의 농도가 높은 값을 가졌다. 여름철의 영양염 분포의 특성을 보면 광합성이 활발하고, 해면이 가열로 인해 성층이 형성되어 심층수로부터 영양염류의 공급을 제한하기 때문에 표층수 중 영양염류의 농도는 극히 낮다. 그러나, 강진 마량의 영양염 분포를 보면, 즈석에 의하여도 많은 영향을 받고 있음을 볼 수 있었고, 지형적 특성에 의한 유속에 의해서도 그 영향을 받아 표층에서도 높은 농도의 영양염 분포를 볼 수 있었다.

추계(9월)에 영양염 분포는 시간에 따라 표층과 저층의 농도 변화가 크게 있지 않았으며 고르게 퍼져있었고, 8월에 비해 전체적으로 2배 가량이 증가하였고, 규산염만이 2배로 감소하였다. N/P값은 대조구의 2 m에서 1.07로 가장 낮았으며, 최대값은 7:00 표층에서 14.46의 값이 나왔고, 평균 7.36을 가진다(그림 62).

온대지방인 우리나라에서는 겨울에 수직혼합이 이루어지는 관계로 가을, 겨울, 이른 봄에는 질산염농도가 높았고, 5월과 9월에는 하계에 비하여 약간 높은 정도였다.

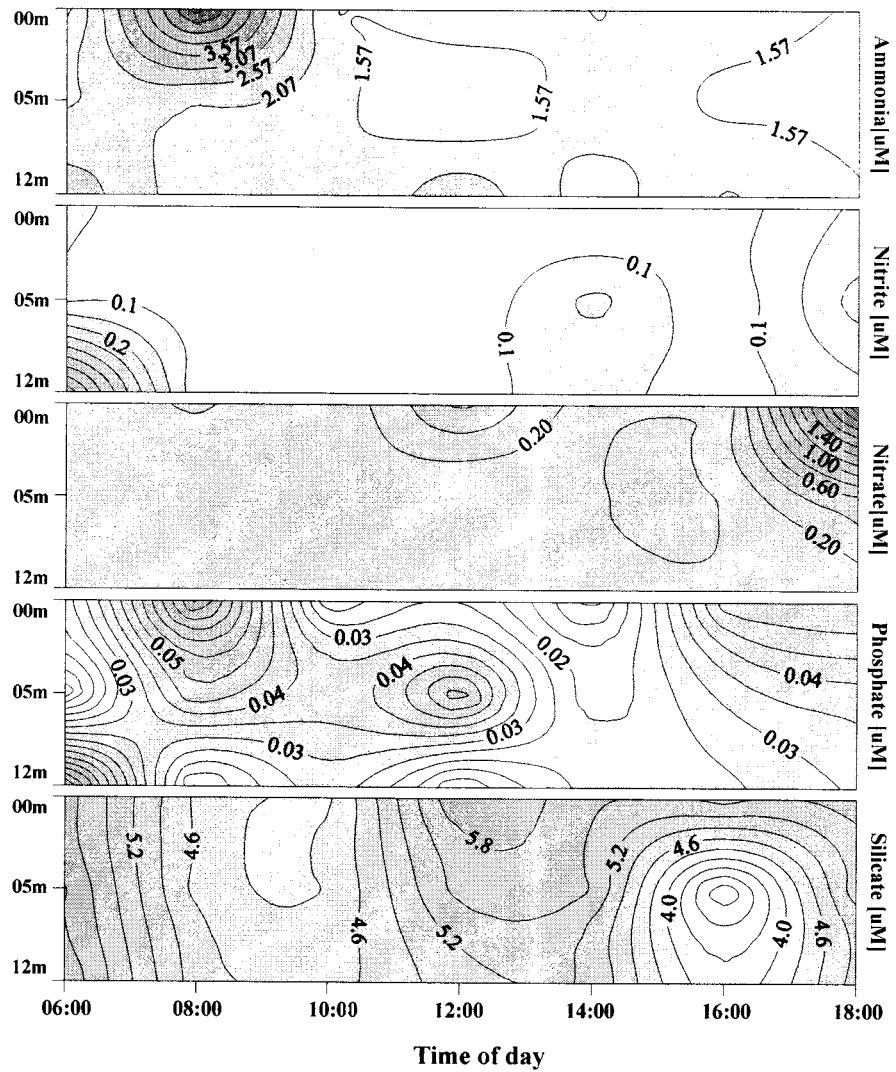


그림 55. 2000년 2월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

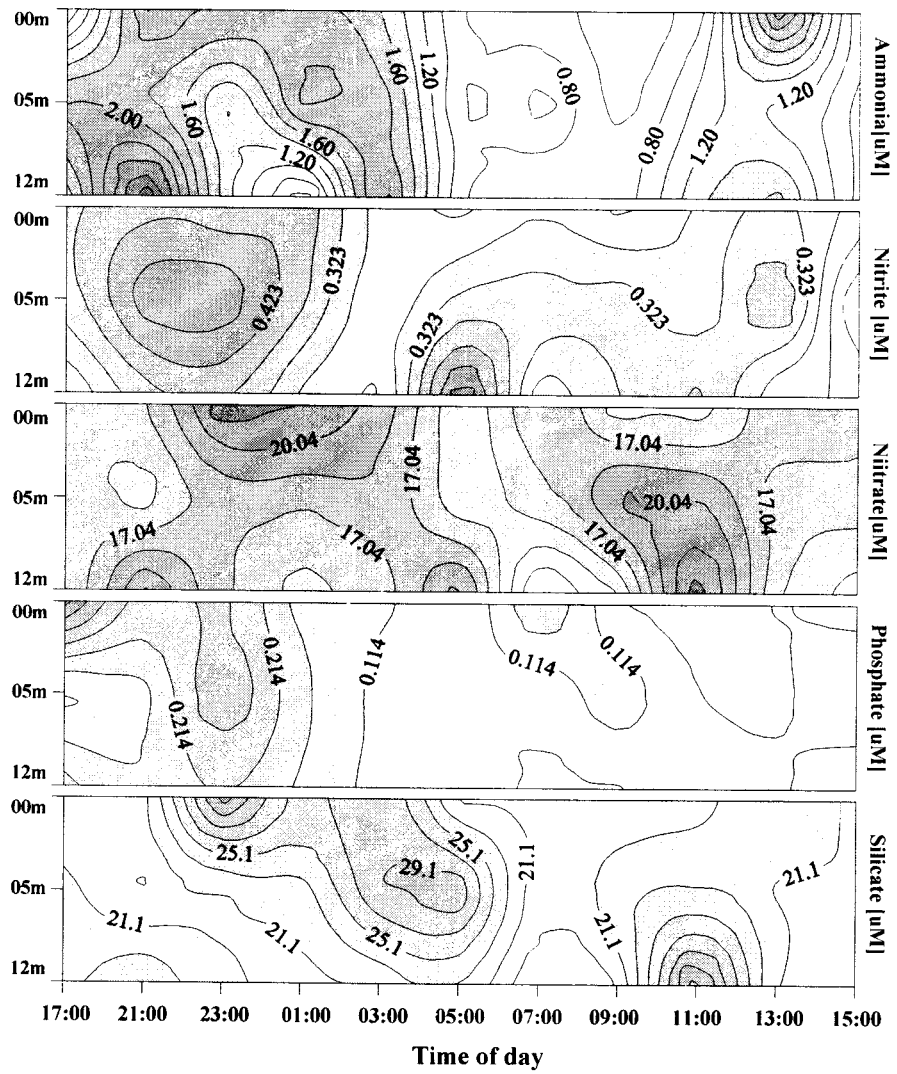


그림 56. 2000년 3월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM] 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

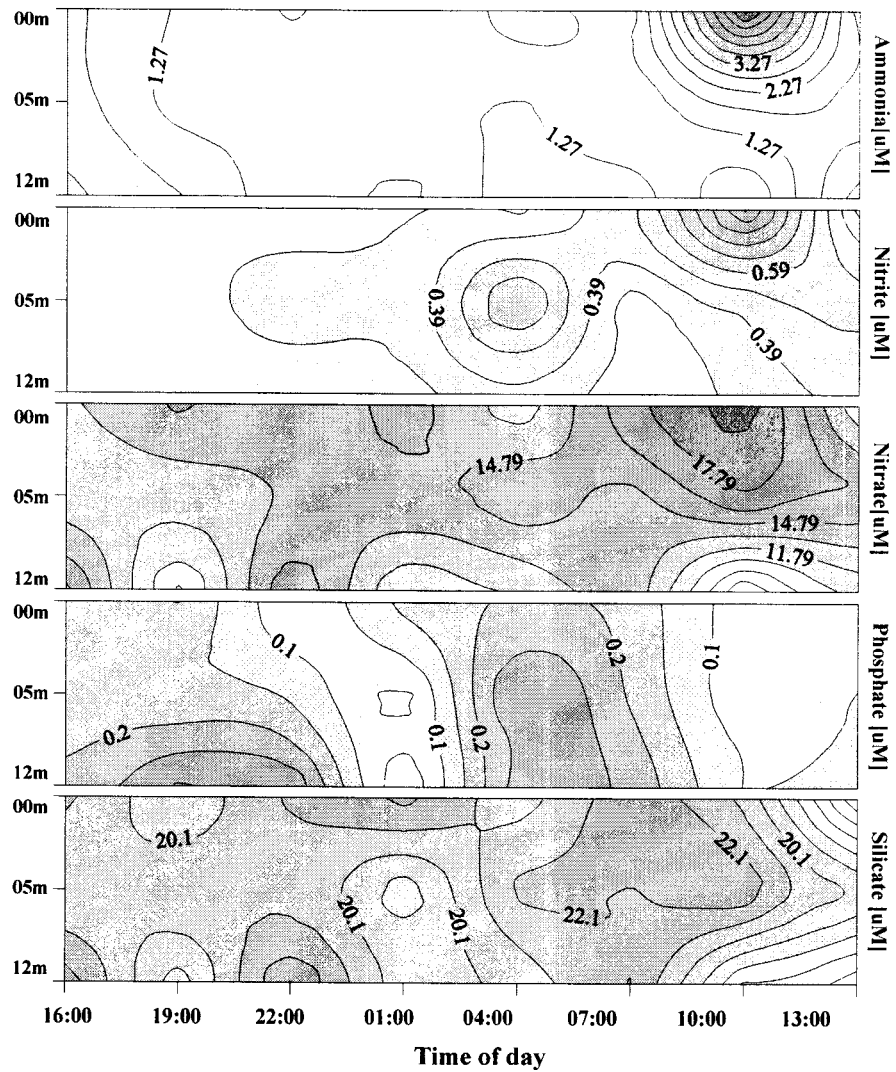


그림 57. 2000년 4월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

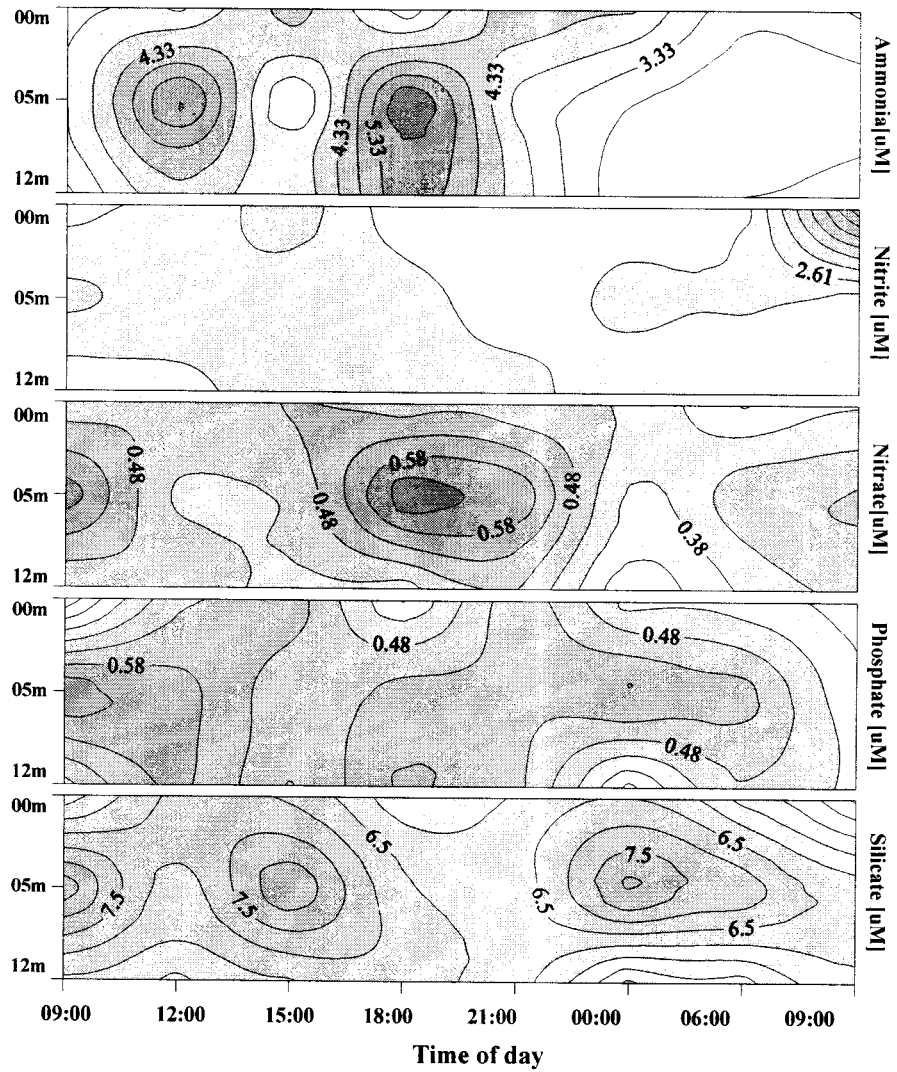


그림 58. 2000년 5월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

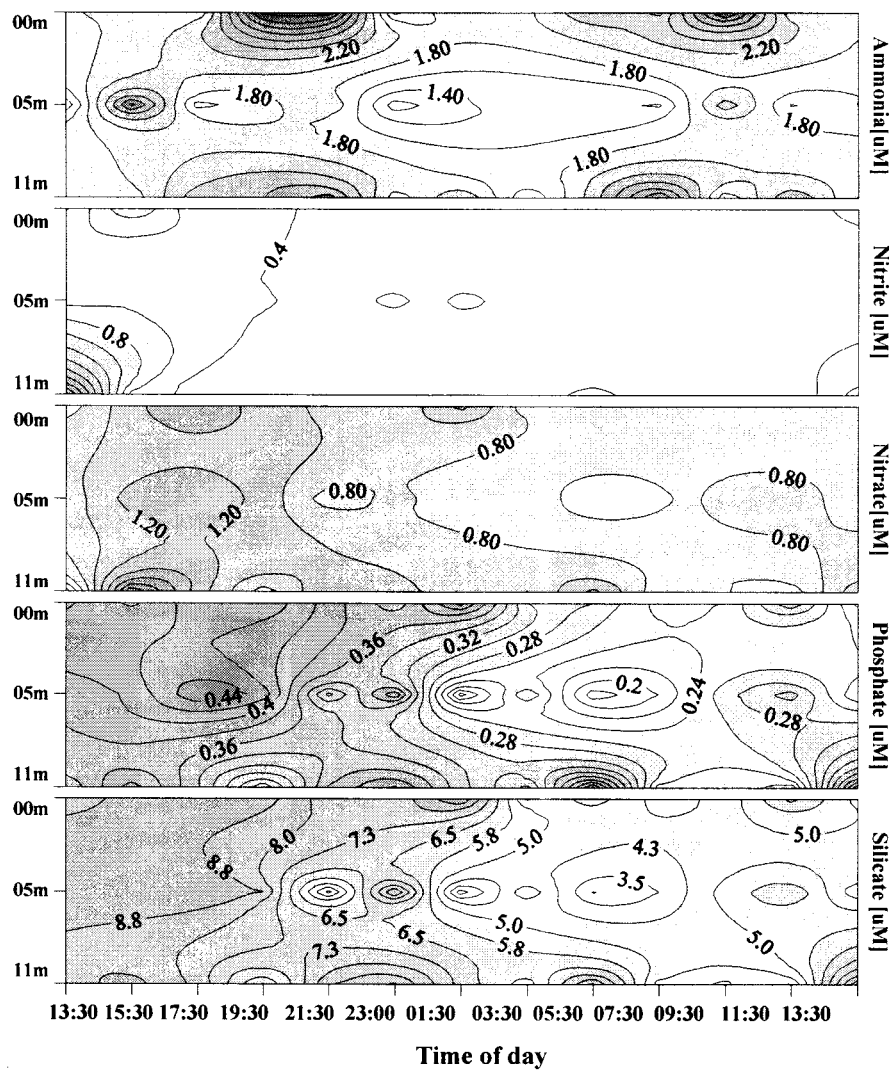


그림 59. 2000년 6월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM]
아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

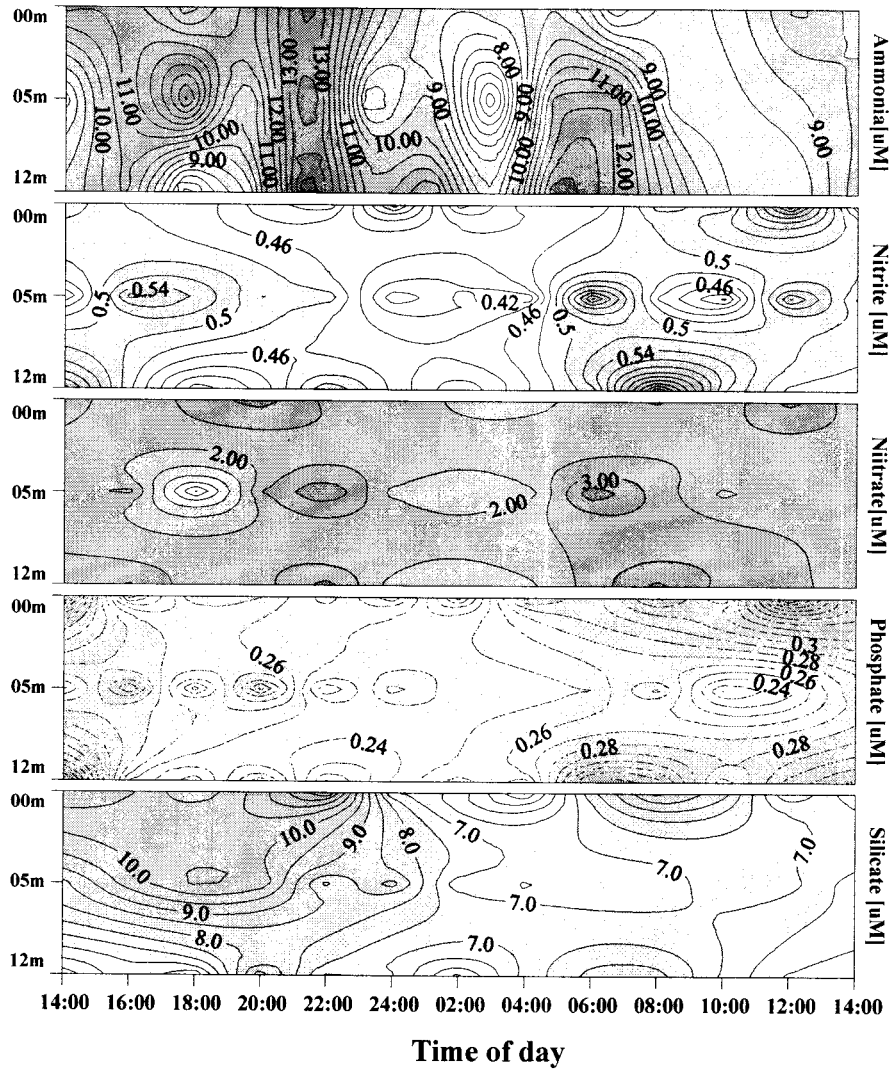


그림 60. 2000년 7월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM] 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

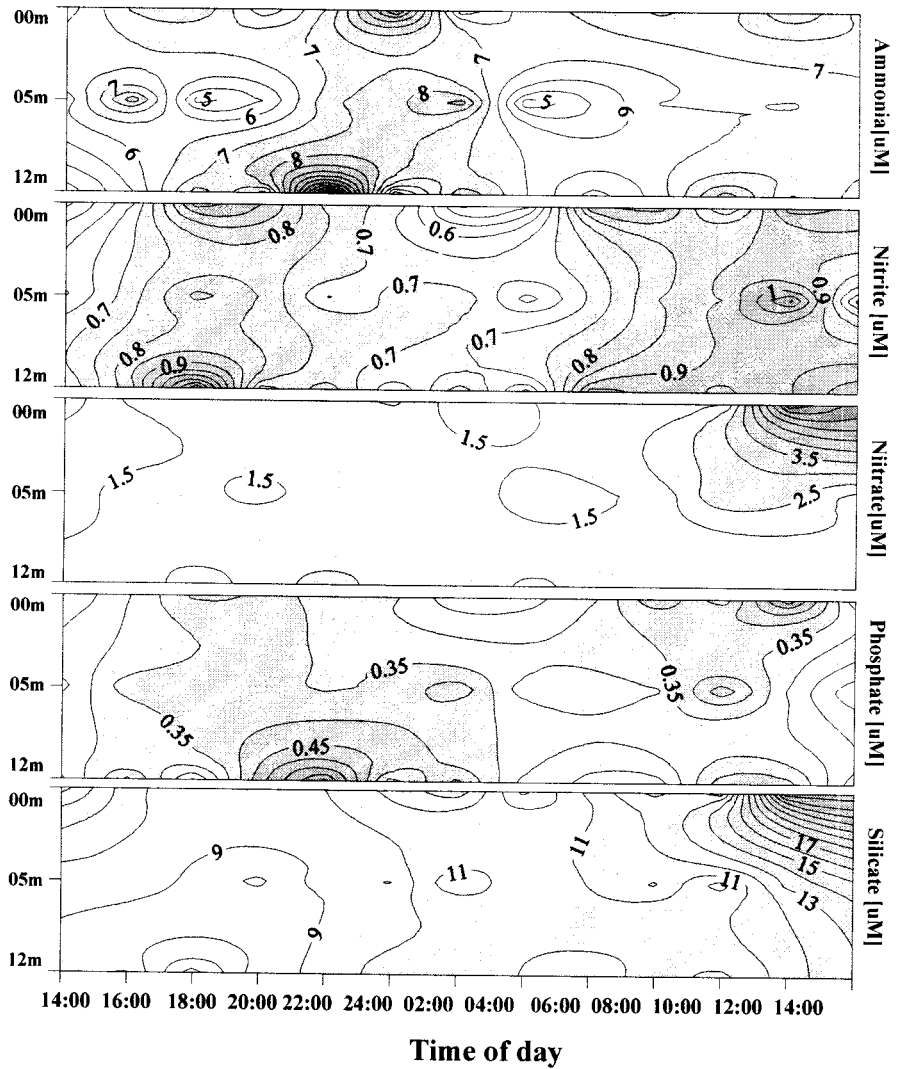


그림 61. 2000년 8월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

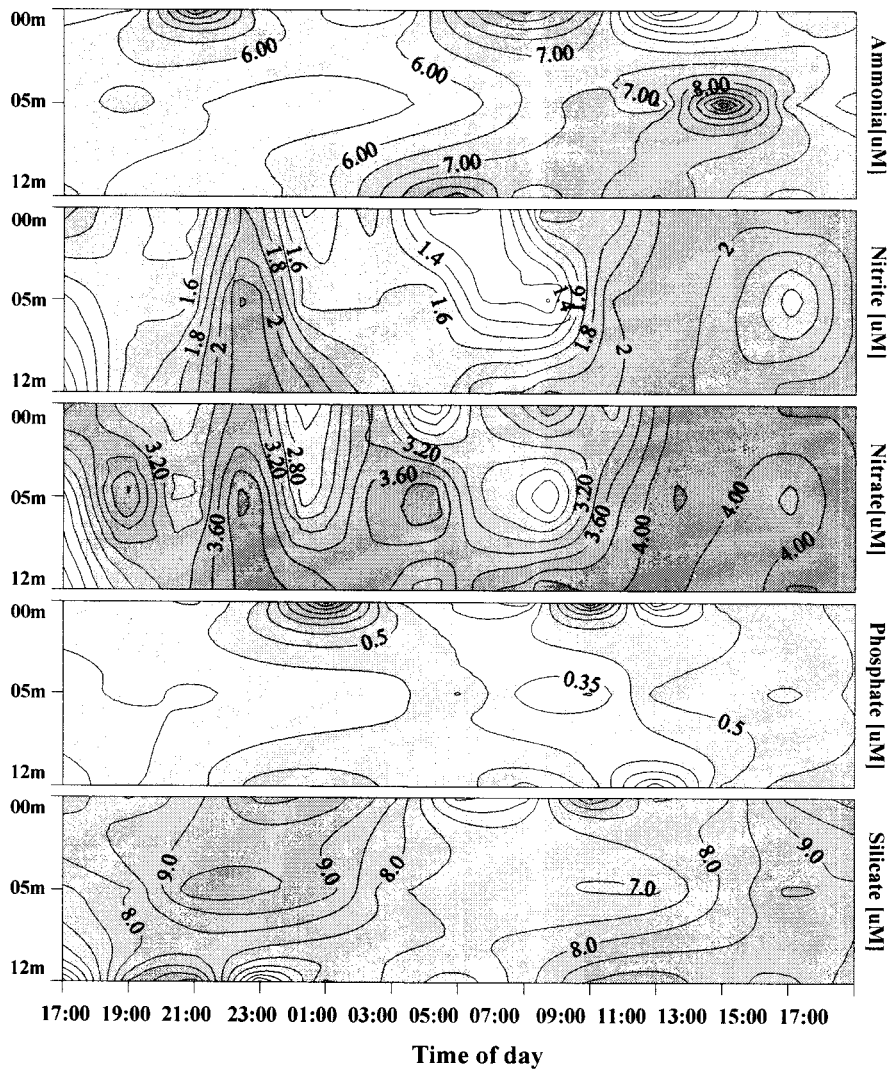


그림 62. 2000년 9월 강진 마량항 주변 양식장의 암모니아 [μM], 질산염 [μM]
아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

2-2) 적조원인 생물의 성장을 trigger하는 원인파악(2차년도)

(가) 환경변화와 적조 발생관계 파악

적조 제어 방안으로 착화합물을 첨가하여 미량으로 존재하는 철 이온을 제어하고자, 조류저해제(글루코사민-D; GL)를 사용하여 그 가능성을 관찰하였다. 철 이온을 제어하기 위한 방법으로, 철과 착화합물질(chelator; EDTA, DTPA)들을 첨가하여 식물성 플랑크톤 성장에 미치는 영향을 살펴보고, 조류저해제의 경우 다양한 농도로 이를 주입하여 최적의 제어효과를 나타내는 농도를 찾고자 하였다.

본 연구에서는 DCMU추가 후의 생체형광 증가를 나타내었고, DCMU를 가하기 전과 후를 계산한 생체 형광의 비(생체형광지수; Fluorescence Response Index, FRI)로 식물플랑크톤의 광합성 잠재능(photosynthetic potential), 상대적인 성장 가능성을 나타내어 해석하였다(Cullen and Renger, 1979).

그림 63-(A)에서 보는 바와 같이 control과 비교하여 철을 주입한 경우만 Fd가 증가하고, 착화합물 DTPA 10 mM - 1 ml 첨가 시에는 감소하였으며 나머지는 control과 비슷한 생체 형광 값과 형태를 가졌다(그림 63). 철을 최종농도 5 μ M로 넣어주었을 때보다 25 μ M로 넣어주었을 때 Fd가 증가하였고, FeEDTA도 마찬가지로 더 높은 농도로 주입한 경우 생체 형광이 증가하였다. 이는 철 이온이 매우 부족한 상태였음을 알 수 있었다(그림. 63). 그러나, 착화합물 EDTA 10mM - 5 ml/2 l 주입하였을 때 철을 주입한 것과는 다른 양상을 보이며 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 4일 후 가장 높은 Fd값을 나타낼 때의 FRI는 0.36~0.6의 높은 값을 띄었고 DTPA를 제외한 모든 경우에서 FRI는 식물성플랑크톤이 생리적으로 심하게 억제되는 0.25이하보다 큰 0.35이상을 나타내었다. 조류저해제를 각각 5 μ l/2 l (1:400), 0.1 μ l/2 l (1:20,000)로 주입하여 실험한 결과 F 값은 0.18~0.23, Fd 0.27~0.37, FRI 0.148~0.432를 나타냈다(그림 65 & 66). GL을 1:400로 주입하였을 때 FRI 값이 3일 이후 완전히 0을 나타내어 조류저해제 GL이 식물성 플랑크톤 성장을 완전히 억제시킴을 알 수 있었으며 F와 Fd 값이 일정한 값을 유지하는 것을 통해 GL이 0.025~0.036의 자체 형광을 가지고 있음을 알 수 있었다(그림 65). 또한 그림 2-29에서 소량의 GL (1:20,000)을 주입한 경우 Fd 값은 3일 후 2.5배 더 증가하였으며 FRI는 0.6으로 나타내 오히려 성장을 촉진시키는 결과를 보였다. 위 실험에서 대부분의 FRI는 초기 적응기에서 감소하고 3일까지 증가 4일 이후 점점 감소하는 양상을 나타내었다. 이

는 시료 안에서 활발한 성장 후 영양염의 고갈로 인한이라고 생각되어진다.

Cullen and Renger(1979)는 FRI가 0.6 이상이면 생리적으로 활발한 성장 상태이고, FRI가 0.25 이하이면 생리적으로 매우 심하게 억제되어 있는 상태라 정의함에 따라 DTPA는 FRI가 0.25 ~ 0.3의 값으로 낮아짐을 보여 식물성 플랑크톤의 적지 않은 스트레스를 주었고, control에 비해 생체형광이 항상 낮게 나타났다. 그러므로 철을 제어하는 킬레이터 DTPA가 적조를 제어 할 수 있다는 가능성을 보여주었다. 조류저해제인 글루코사민-D(GL)는 FRI의 변화가 글루코사민 D의 양에 따라 엄청난 차이를 보였다. 이는 글루코사민-D가 높은 농도로 주입 시 그 효과가 탁월하였으나, 오히려 낮은 농도에서는 식물성 플랑크톤이 성장하는데 영양분으로 쓰임을 알 수 있었다. 이는 시간이 지나면서 이 GL성분이 식물성 플랑크톤에 의해 분해 될 수 있음을 뜻하고 다시 말해 조류저해제 글루코사민-D가 2차적 오염을 주지 않음을 알 수 있었다.

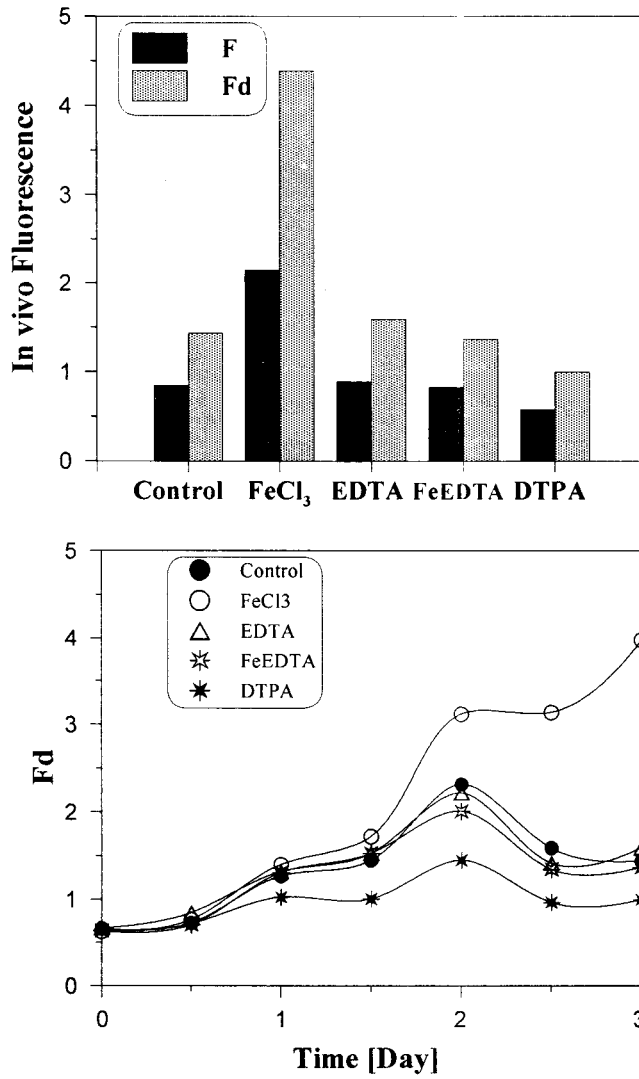


그림 63. 2001년 6월 철과 착화합물질의 다른 농도로 주입후 3일 배양한 *In vivo* fluorescence (A)와 DCMU 첨가후(B)의 형광.

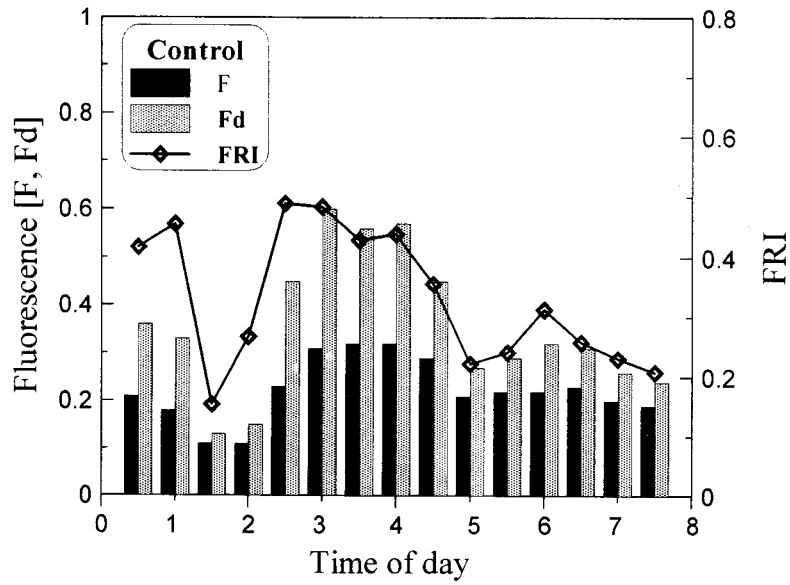


그림 64. (1) 2001년 7월 강진 마량의 가두리양식장에서 채취한 시료를 8일 동안 배양한 초기형광(■; F), DCMU추가 후의 형광(▨; Fd), 그리고 생체형광지수(-◇-; FRI).

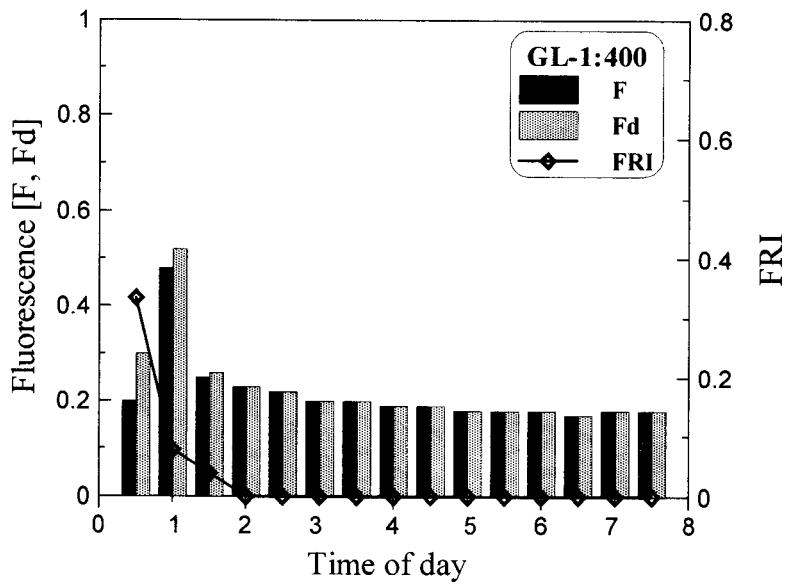


그림 65. (2) 2001년 7월 강진 마량의 가두리양식장에서 채취한 시료를 8일 동안 배양한 초기형광(■; F), DCMU추가 후의 형광(▨; Fd), 그리고 생체형광지수(-◇-; FRI).

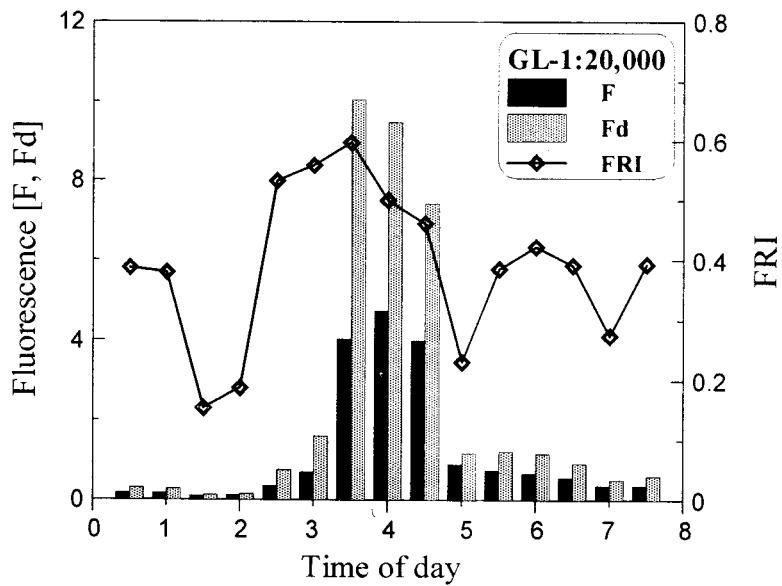


그림 66. (3) 2001년 7월 강진 마량의 가두리양식장에서 채취한 시료를 8일 동안 배양한 초기형광(■; F), DCMU추가 후의 형광(▨; Fd), 그리고 생체형광지수(-◇-; FRI).

(나) 질산환원효소의 활성도(Nitrate Reductase Activity)

2월에 질산염 환원효소의 활성도는 2.7 ~ 6.7 NO₂ nM hr⁻¹로 평균 4.1 NO₂ nM hr⁻¹를 나타내었다. 표층과 5m 그리고 저층에서 시간의 경과에 따른 질산염 환원효소의 활성도는 표·중·저 각층간의 변화 양상은 비슷하게 나타났으나 시간의 경과에 따라 효소활성도의 차이가 나타났다. 자정을 전후로 한 시간에 오히려 생산력이 활발한 낮 시간보다 2배가량 높게 관측되었다(그림. 67). 4월 질산염 환원효소의 활성도는 2.8 ~ 5.2 NO₂ nM hr⁻¹로 평균 3.5 NO₂ nM hr⁻¹의 범위를 나타냈다. 6월의 질산염 환원효소의 활성도는 1.8 ~ 0.7 NO₂ nM hr⁻¹를 나타냈으며 표층의 경우 자정을 전후로 한 시간에 활성도가 급격히 증가하였으나, 5m 수심과 저층에서는 활성도는 이와는 다른 양상을 나타냈다. 중층에서는 아침을 전후로 한 시간에 큰 활성도를 나타냈으며 저층에서는 큰 변화는 나타나지 않았다. 하계인 8월의 경우는 0.4 ~ 2.6 NO₂ nM hr⁻¹ 질산염 환원효소의 활성도를 나타내었고, 시간에 따라 모든 층에서 급격히 차이가 나게 변화 하였다. 약 5시간을 주기로 하여 급격한 증감을 반복하였다. 특히 일출과 일몰시간에 급격히 증가하는 양상을 나타냈다. 질산염 환원효소의 활성도는 2월에 빛이 없는 밤 시간에 전 수층에서 활성도가 높았고,

빛이 있는 시간대에는 일정한 활성도를 보여주었다. 4월에는 빛과 상관없이 일정한 활성도를 보여주었다. 6월의 질산염 환원효소의 활성도는 빛이 약한 오전시간에 높은 활성도를 나타내었다(그림. 69). 8월의 질산염 환원효소의 활성도는 16시를 제외하면 6월과 비슷한 오전에 높은 활성도를 나타냄을 볼 수 있었다(그림. 70). 10월에 25시간 연속 관측한 질산염 환원효소 활성도는 큰 차이를 나타내지 않았다. 평균농도 또한 표층 증층 저층간에 변화 폭이 적었다(그림. 71).

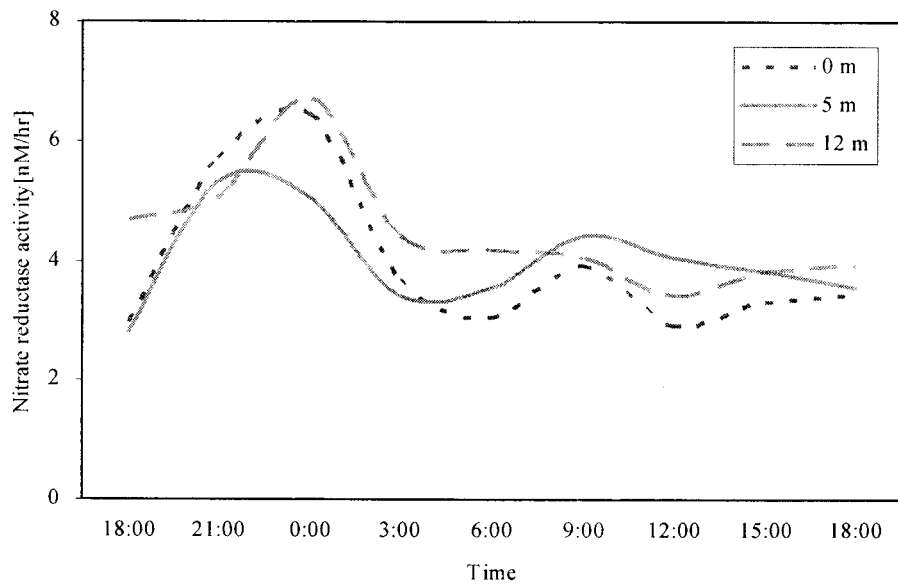


그림 67. 2001년 2월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화.

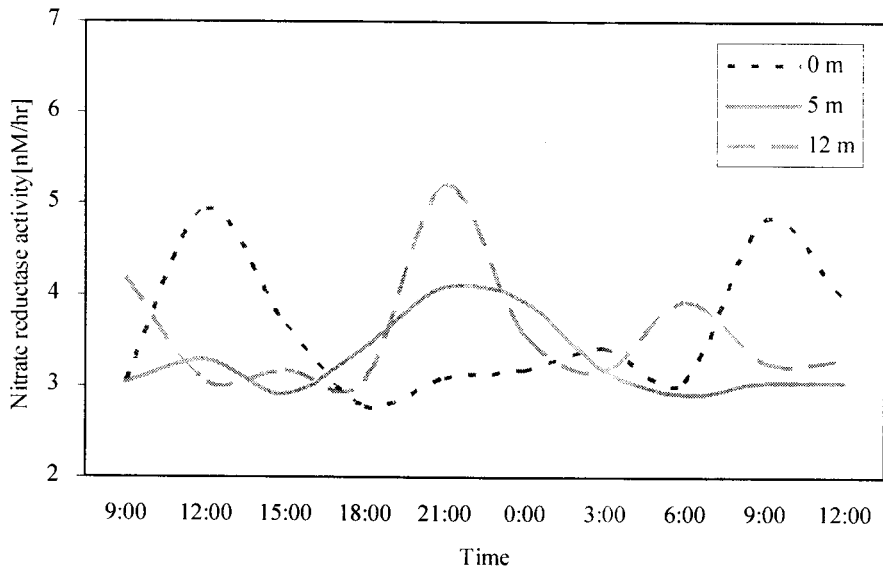


그림 68. 2001년 4월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화

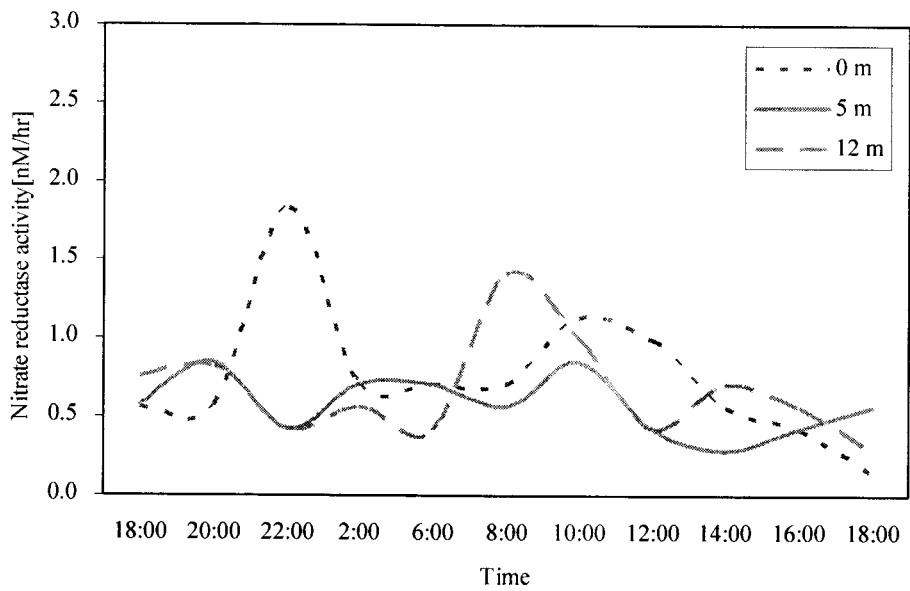


그림 69. 2001년 6월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화

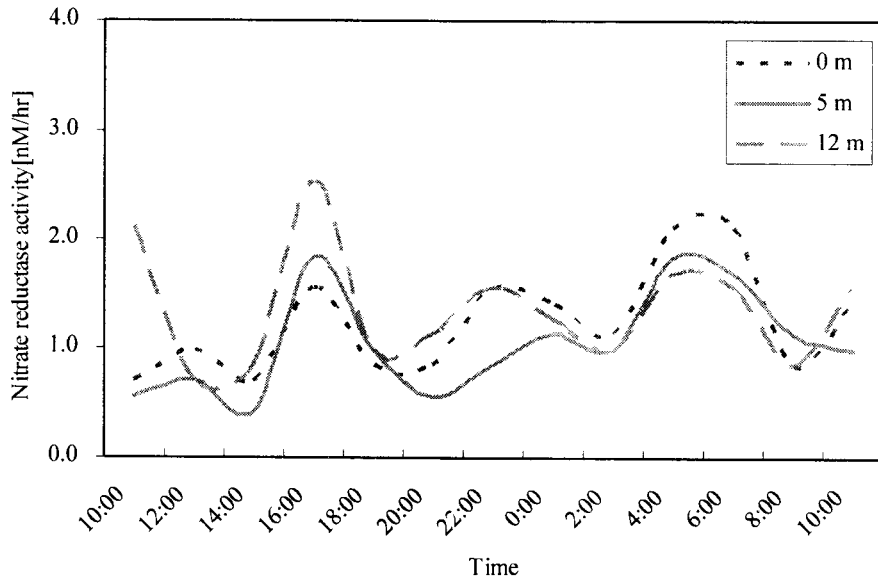


그림 70. 2001년 8월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화

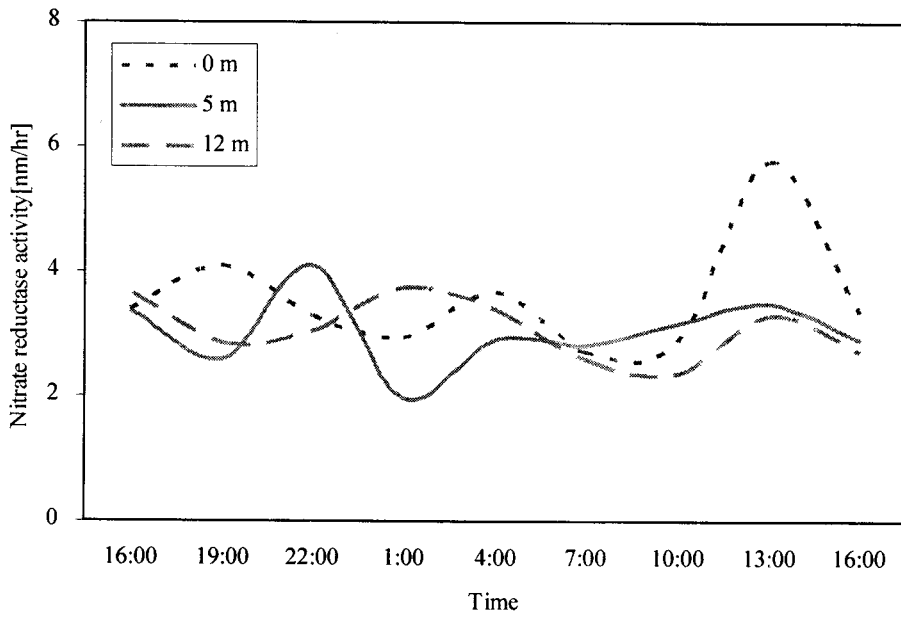


그림 71. 2001년 10월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화

(다) 엽록소 *a*

엽록소 *a*의 농도는 2월에 표층에서 0.9 ~ 3.9 mg m⁻³로 평균 1.7 mg m⁻³를 나타냈다. 4월 엽록소 *a*의 농도는 2.2 ~ 5.4 mg m⁻³로 평균 4.1 mg m⁻³를 나타내었다. 4월에는 수심별 차이는 보이질 않으나 일조시간 때에 높은 엽록소 *a*를 나타내었다(그림 73). 6월 25시간 관측한 엽록소 *a*의 변화는 수심별 차이를 볼 수 없었으나 자정을 전후한 시간에서 급격히 감소하는 경향을 나타냈다(그림 74). 8월 엽록소 *a*는 낙조시 자정시간에 급격히 증가하는 양상을 보였다(그림 75). 또한 이 시간에 용존산소 농도가 급격히 증가하였으며 pH도 급격히 증가하는 양상을 나타냈다. 자정 시간임에도 불구하고 온도가 급격히 증가하였고 약간의 염분변화 그리고 용존 산소등의 변화는 이 시간 이 지역에 갑작스런 외부 유입수가 있었으리라 생각될 만큼 많은 변화를 보였었다. 엽록소 *a*의 월별변화는 동계에서 여름으로 갈수록 증가하였고, 수심에 따라 농도차이를 나타내었다.

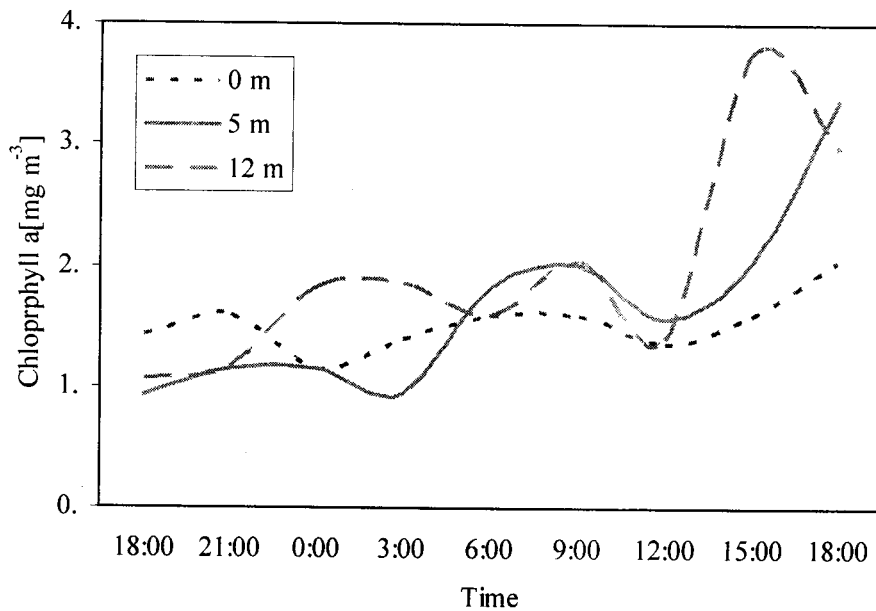


그림 72. 2001년 2월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll *a* 자료.

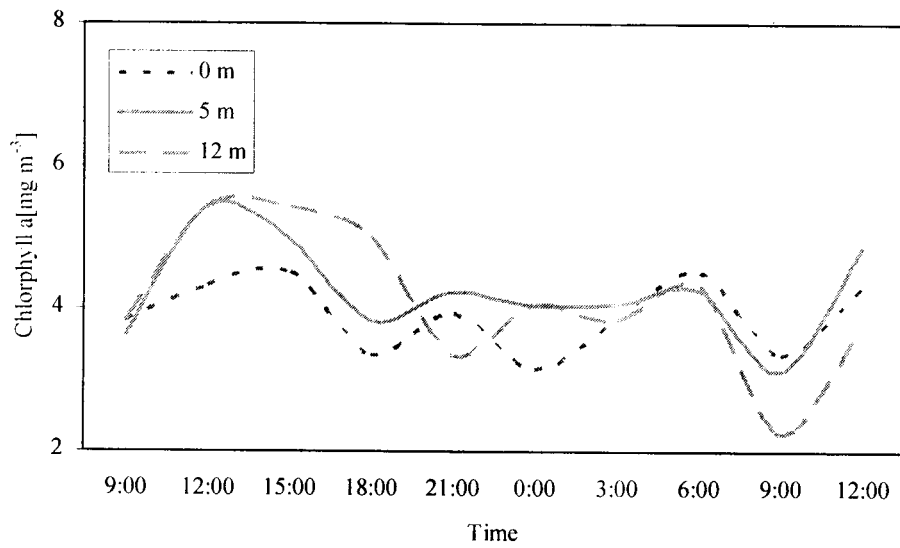


그림 73. 2001년 4월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll *a* 자료

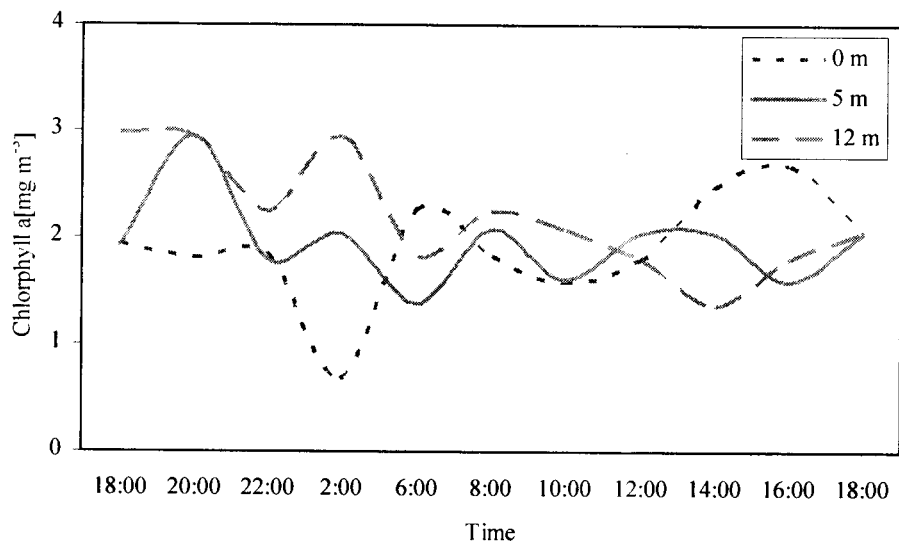


그림 74. 2001년 6월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll *a* 자료.

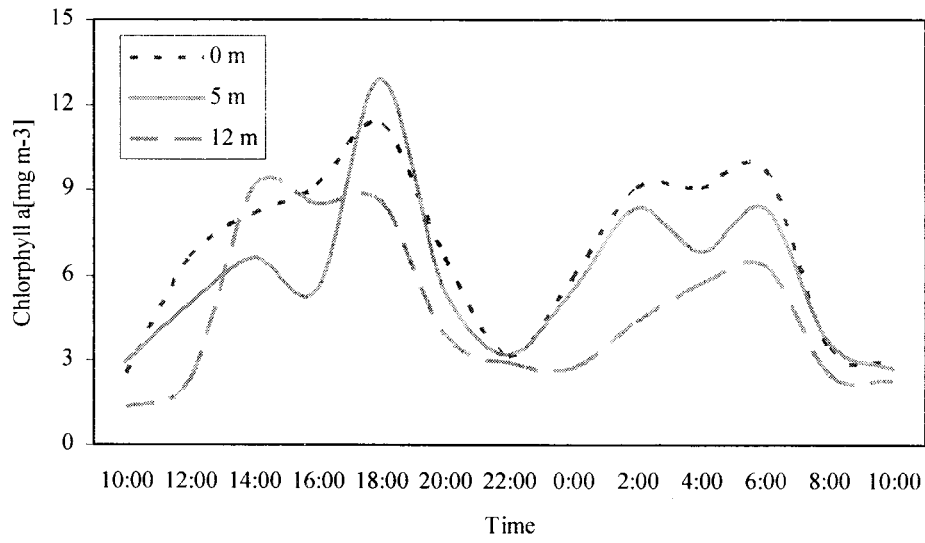


그림 75. 2001년 8월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll *a* 자료.

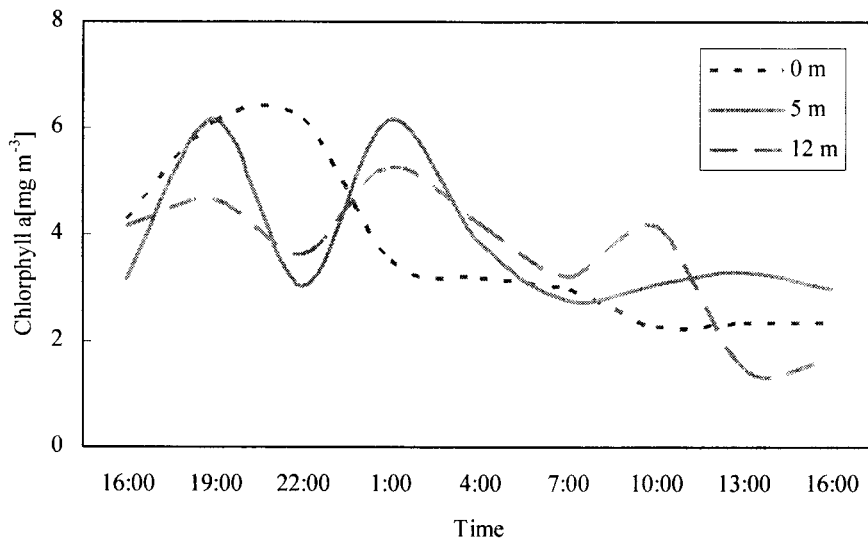


그림 76 . 2001년 10월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll *a* 자료

(라) 식물플랑크톤에 의한 빛 흡수계수(a^*_{ph})

식물플랑크톤에 의한 빛 흡수계수를 측정하여 엽록소 a 를 기준으로 하여 환산한 결과 2월에 $0.0054 \sim 0.0285 \text{ m}^2 \text{ mg chl a}^{-1}$ 로 평균 $0.0169 \text{ m}^2 \text{ mg chl a}^{-1}$ 를 나타내었다(그림 77). 4월에는 $0.0036 \sim 0.0592 \text{ m}^2 \text{ mg chl a}^{-1}$ 로 평균 $0.0089 \text{ m}^2 \text{ mg chl a}^{-1}$ 를 나타내었다(그림 78). 6월의 흡수계수는 $0.0068 \sim 0.07 \text{ m}^2 \text{ mg chl a}^{-1}$ 의 범위였고 평균 $0.0237 \text{ m}^2 \text{ mg chl a}^{-1}$ 를 나타내었다(그림 79). 8월에는 $0.0027 \sim 0.0281 \text{ m}^2 \text{ mg chl a}^{-1}$ 의 범위로 변화하였고, 평균 $0.0141 \text{ m}^2 \text{ mg chl a}^{-1}$ 를 나타내었다. 25시간 연속관측을 통한 식물플랑크톤의 빛 흡수계수를 조사기간 동안 측정하였다(그림 80). 2월 표층에서 시간에 따른 분포 양상은 큰 변화를 보이지 않았으며, 중층에서는 자정을 전후로 한 시간에 2배 이상 높은 빛 흡수계수를 보이며 급격히 증가하였다. 일출이 시작되면서 급격히 감소하는 경향을 나타냈다. 저층에서의 a^*_{ph} 는 중층과 반대되는 경향을 나타냈다. 수심이 낮고 표저간의 혼합이 빠른 곳이지만 빛에 대한 적응이 전혀 다름을 나타내는 것이라 보인다. 4월에는 수층과 시간에 관계없이 식물플랑크톤에 의한 빛 흡수가 일정한 경향을 보이지 않으며 변화폭이 다양하고 특별한 양상을 나타내지 않았다. 6월에는 전반적으로 광량이 풍부한 시간에 전 수층에 걸쳐 증가하는 양상을 나타냈다. 특히 자정을 전후로 한 시간에 표층에서 급격히 2배 이상 높은 값을 나타내는데 더 연구해봐야 할 과제라 여겨진다. 8월의 경우 식물플랑크톤에 의한 빛 흡수계수는 표층과 저층 모든 수괴에 걸쳐 일몰과 아울러 급격히 증가하는 경향을 나타냈다. 그 변화 폭 또한 2배 이상 높게 나타냈다. 하지만 일출이 되는 시간에는 급격히 빛 흡수계수가 감소하였고, 광량이 풍부한 시간인 하오를 기준으로 다시 증가하는 경향을 나타냈다. 10월에는 8월과 반대의 경향을 나타냈다. 특히 자정시간 이후에는 급격히 감소하였다(그림 81).

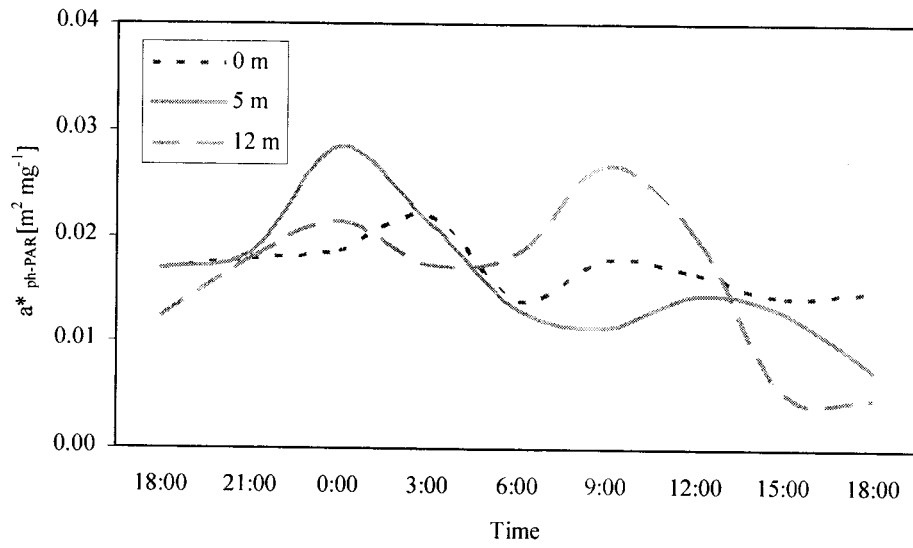


그림 77. 2001년 2월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한 흡수계수의 변화.

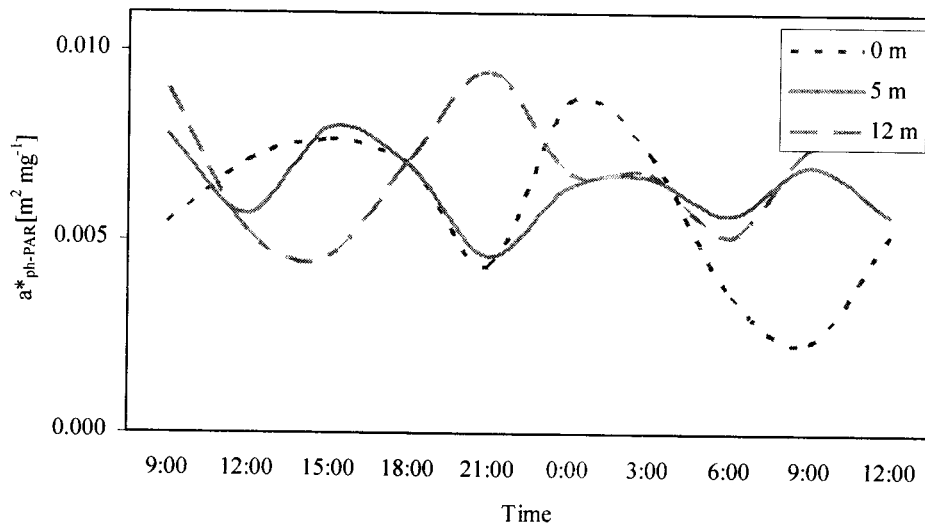


그림 78. 2001년 4월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한 흡수계수의 변화.

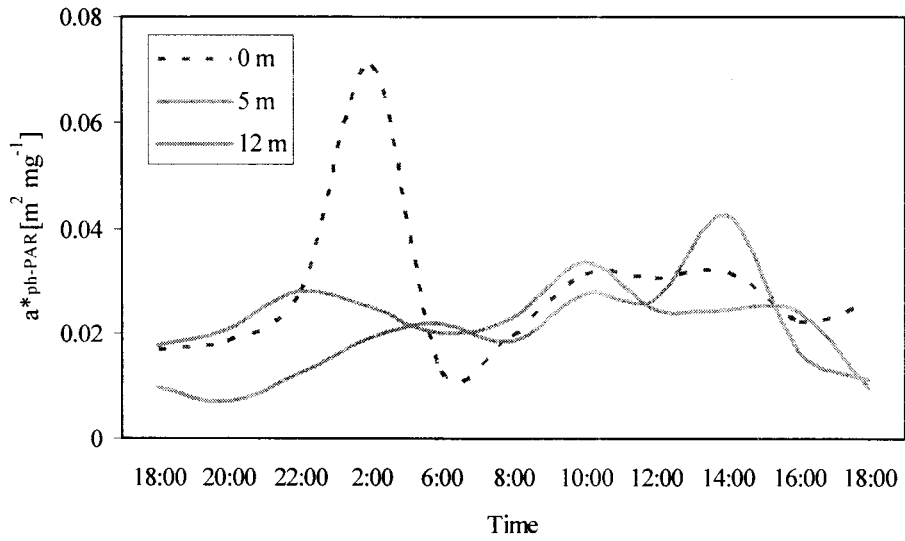


그림 79. 2001년 6월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한 흡수계수의 변화.

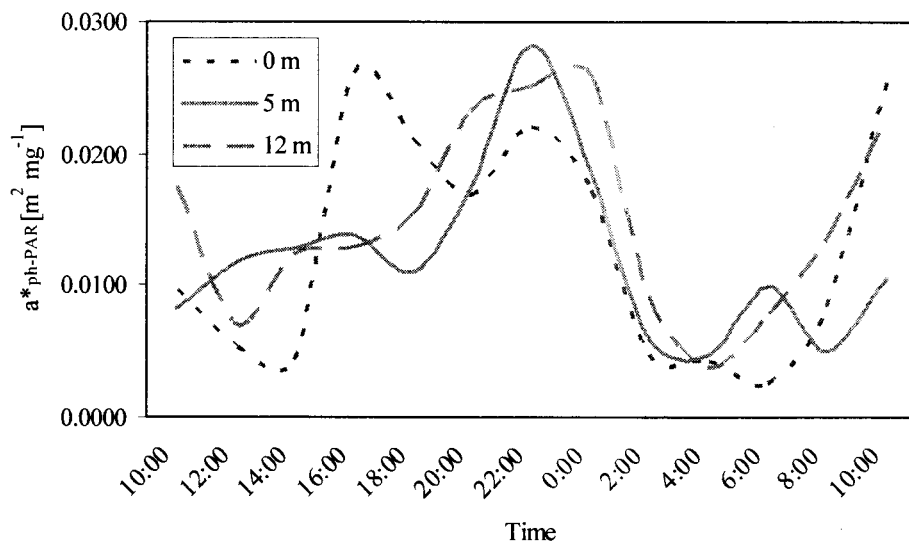


그림 80. 2001년 8월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한 흡수계수의 변화.

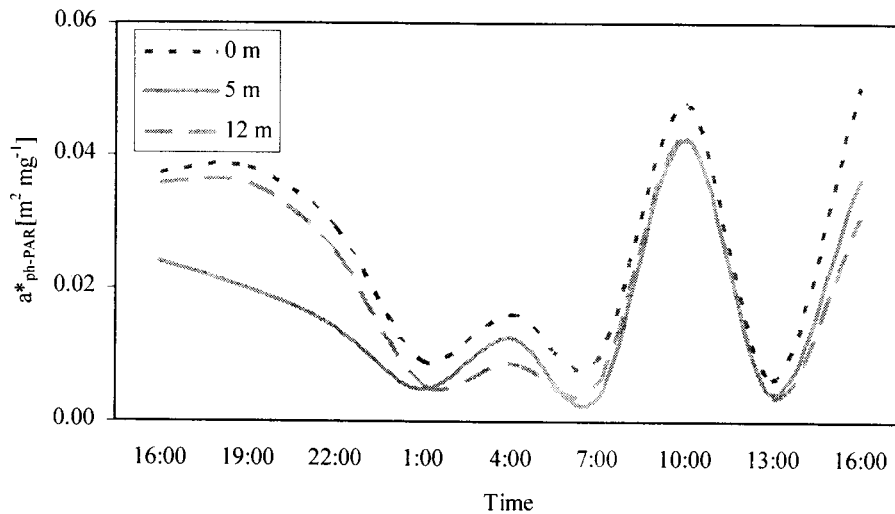


그림 81. 2001년 10월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한 흡수계수의 변화.

(마) 영양염

2월 가두리 양식장에서 아질산의 농도는 0.15 ~ 0.79 μM 로 평균 0.28 μM , 질산염의 농도는 1.78 ~ 15.59 μM 로 평균 3.79 μM , 규산염은 3.99 ~ 34.99 μM 로 평균 8.25 μM , 그리고 인산염인의 농도는 0.28 ~ 2.19 μM 로 평균 0.63 μM 를 나타냈다(그림 82). 4월 가두리 양식장에서 아질산의 농도는 0.02 ~ 0.63 μM 로 평균 0.165 μM , 질산염의 농도는 0.58 ~ 3.42 μM 로 평균 2.07 μM , 규산염은 1.83 ~ 6.77 μM 로 평균 3.94 μM , 그리고 인산염인의 농도는 0.18 ~ 0.46 μM 로 평균 0.29 μM 를 나타냈다(그림 83). 6월 가두리 양식장에서 아질산의 농도는 0.27 ~ 0.95 μM 로 평균 0.59 μM , 질산염의 농도는 0.89 ~ 4.62 μM 로 평균 2.08 μM , 규산염은 2.67 ~ 8.47 μM 로 평균 4.71 μM , 그리고 인산염인의 농도는 0.27 ~ 0.81 μM 로 평균 0.44 μM 를 나타냈다(그림 84). 8월 가두리 양식장에서 아질산의 농도는 0.53 ~ 1.29 μM 로 평균 0.95 μM , 질산염의 농도는 1.73 ~ 9.45 μM 로 평균 3.74 μM , 규산염은 8.41 ~ 22.04 μM 로 평균 14.83 μM , 그리고 인산염의 농도는 0.16 ~ 0.71 μM 로 평균 0.45 μM 를 나타냈다(그림 85). 25시간 연속 관측한 영양염의 변동 추이는 동계인 2월 아질산염의 변화는 일몰 후 서서히 농도가 감소하다가 광량이 풍

부한 점심을 전후로 하여 급격히 증가하는 경향을 나타냈다. 그러나 하오인 3시가 넘어서는 농도가 급격히 감소하는 경향을 나타냈다. 질산염과 인산염 그리고 규산염도 같은 경향을 나타냈다. 규산염의 경우 증감의 주기 패턴이 광량의 유무와 비슷한 패턴을 보여 광량의 증가에 따라 영향이 있는 것으로 보인다. 4월의 연속 관측한 영양염류의 분포의 경우 아질산은 수심에 따르는 특별한 양상은 보이지 않았으나 외부 유입원이 있음을 시사해 주며 시간이 경과함에 따라 미약하게 증가를 하였다. 4월의 경우 25시간 연속하여 수심에 따라 영양염 농도를 측정하였으나 특별하게 다양한 패턴을 보이지 않고 일률적으로 미세하게 증감을 반복하였다. 6월에는 일출 후 오전에는 전반적으로 높은 농도를 보이다가 시간이 경과함에 따라 서서히 감소하는 경향을 나타냈다. 인산염, 규산염 및 질산염의 경우 아침과 자정 그리고 새벽녘에 높은 농도를 보였다. 아질산염과는 전혀 다른 양상을 보였다. 아질산염은 초기 연속 관측을 실행한 9시 경에 높은 농도를 보였으나 타 영양염류는 3번의 증감 곡선을 보였다. 8월의 경우 6월과 같은 양상을 보였다. 추계로 접어들어 온도가 강하하고 수온 약층이 파괴되면서 하계와는 전혀 다른 영양염류의 변동 경향이 나타났다. 아질산염의 경우 시간과 수심에 따라 큰 차이를 보이지 않았고, 질산염과 인산염은 실험 초기에는 급격히 높은 농도를 보이다가 서서히 감소하는 경향을 나타냈으며 조석이 창조기로 변하면서 다시 증가하는 경향을 보였다. 주로 10월에는 영양염류의 변화가 조석의 차이에 있는 것으로 보인다. 규산염은 농도의 변화가 4월과 비슷한 경향을 나타냈다. 하지만 변동 변화 폭이 매우 컸으며 광량의 유무에 따라 각 수심 층에서 변화도 다양하게 나타났다(그림 86).

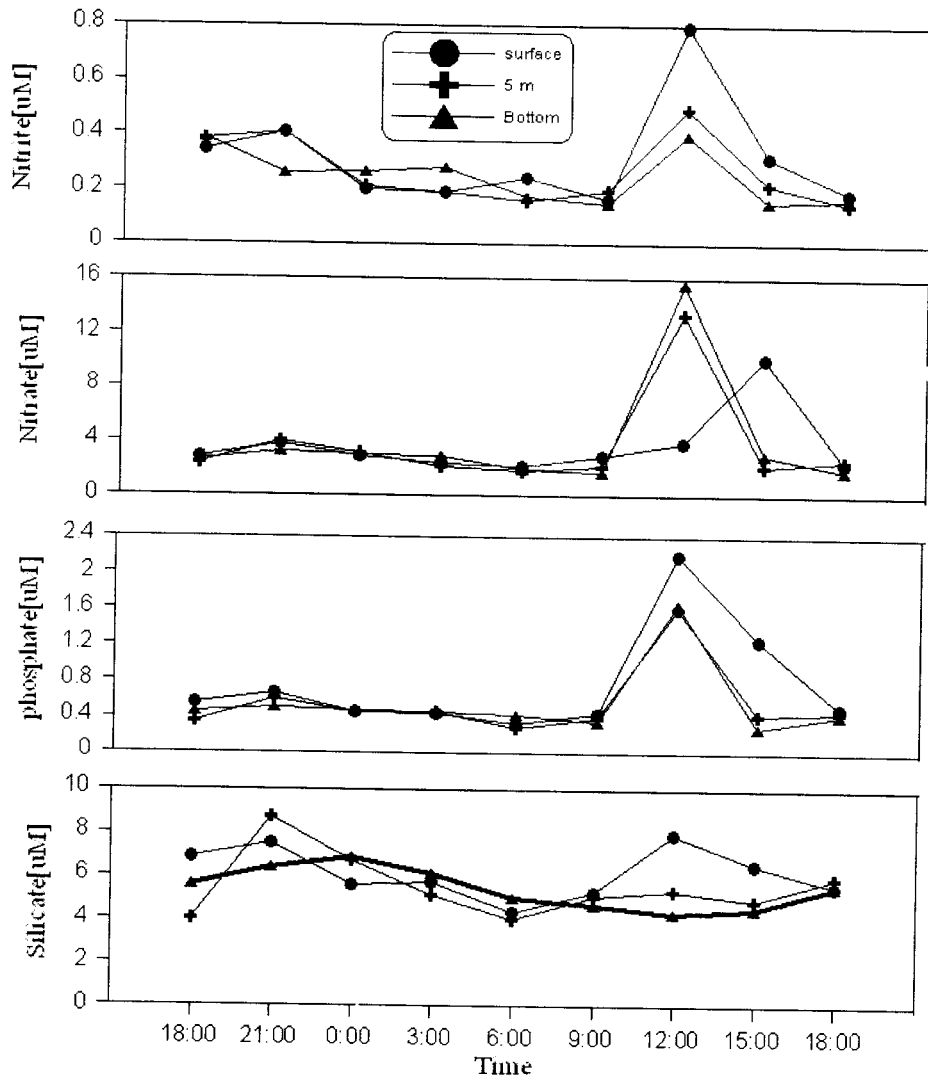


그림 82. 2001년 2월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM] 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

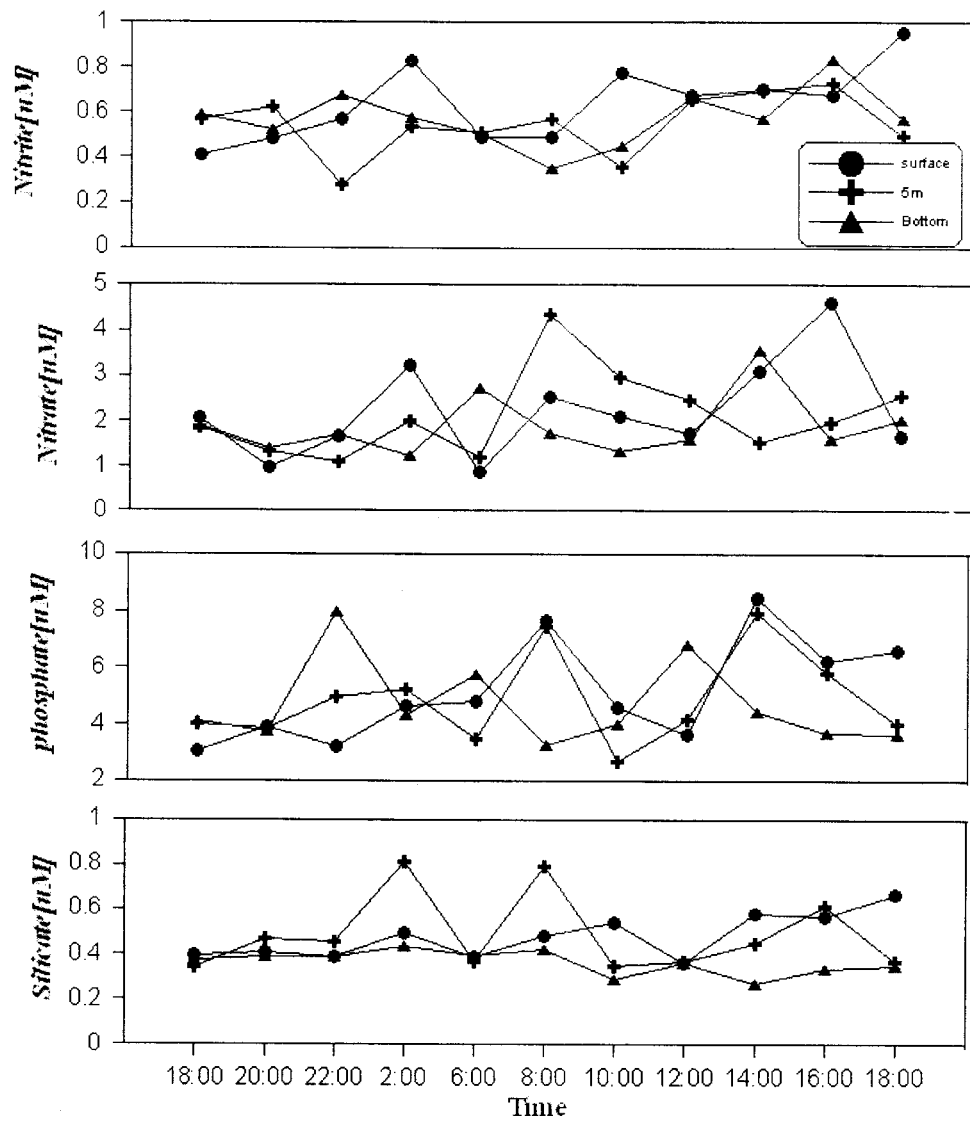


그림 83. 2001년 4월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM] 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

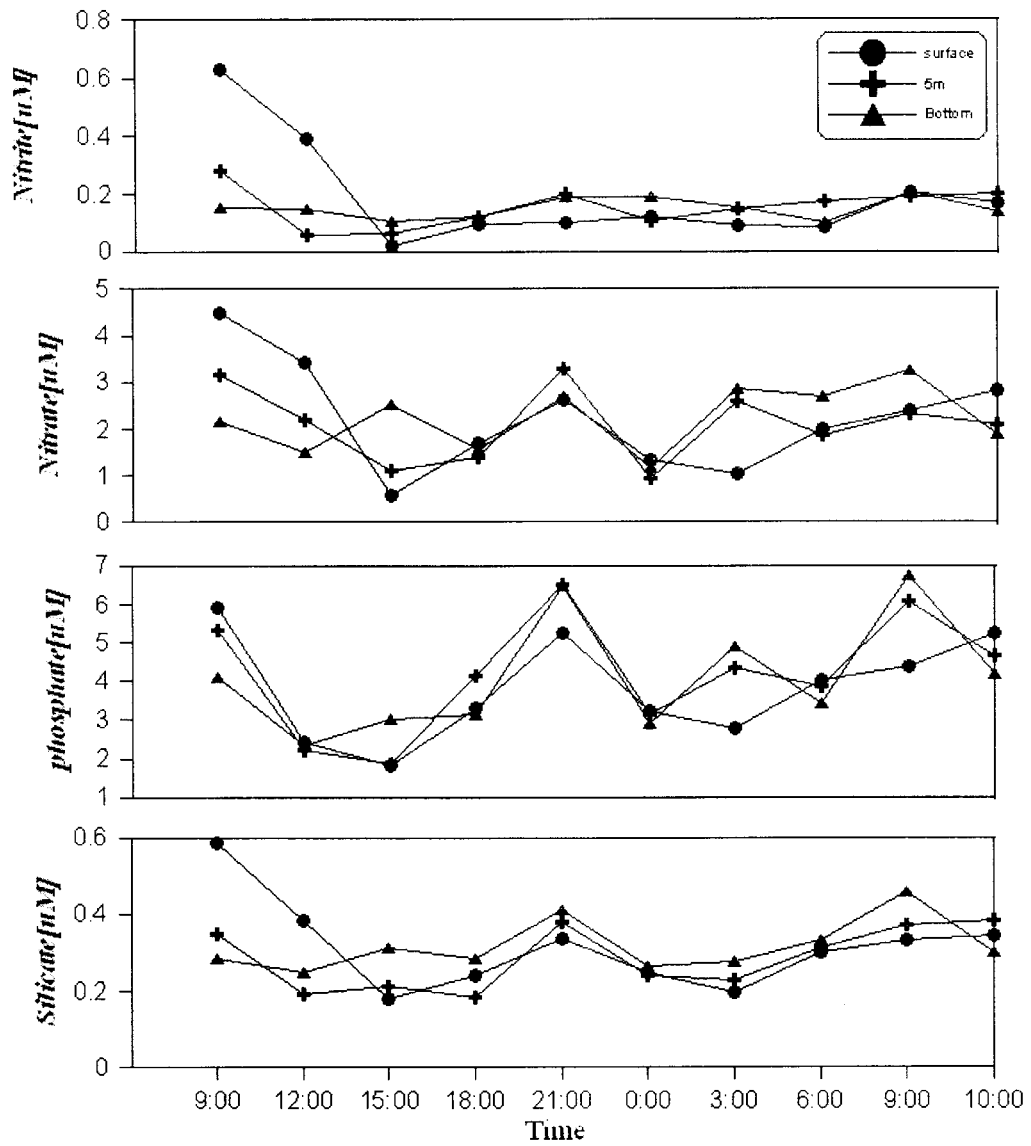


그림 84. 2001년 6월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

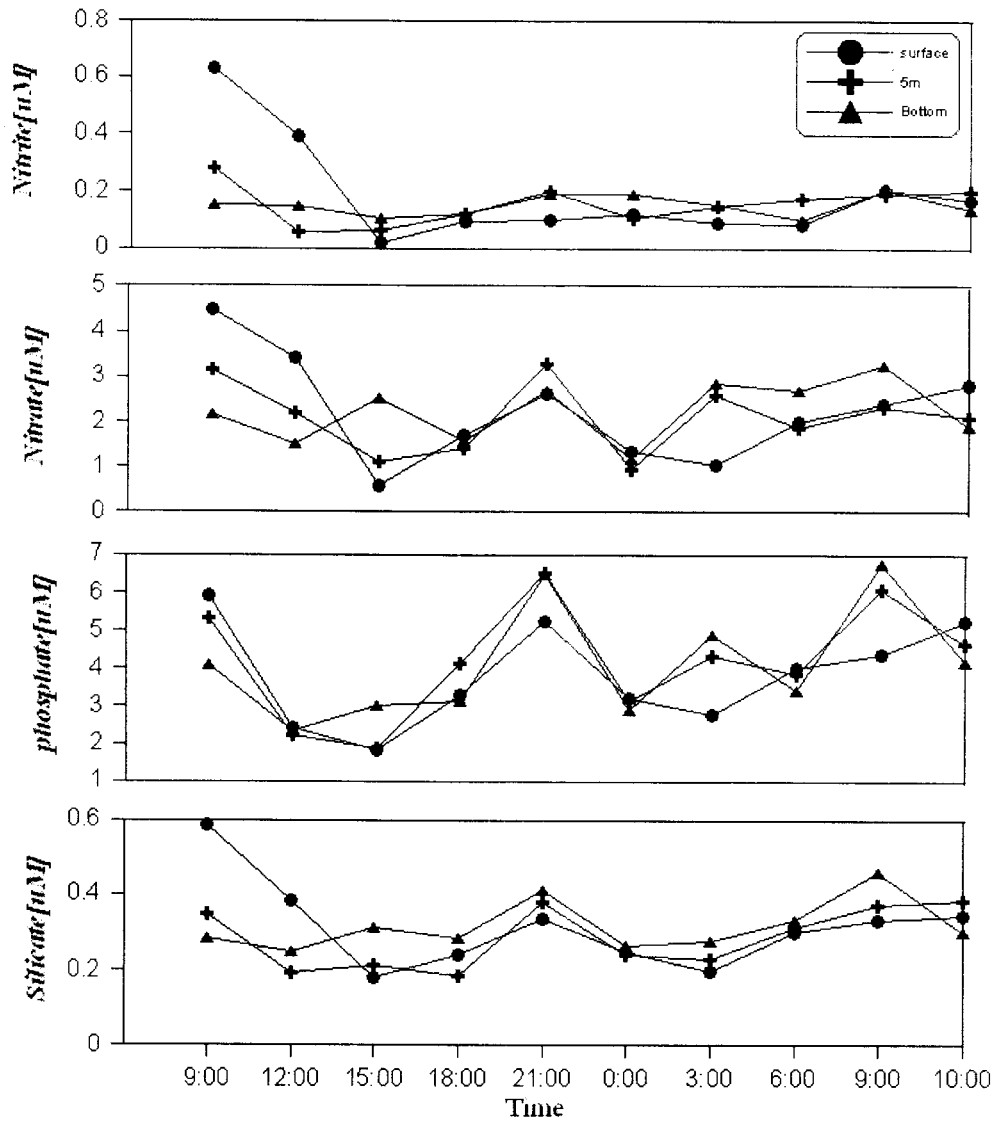


그림 85. 2001년 8월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

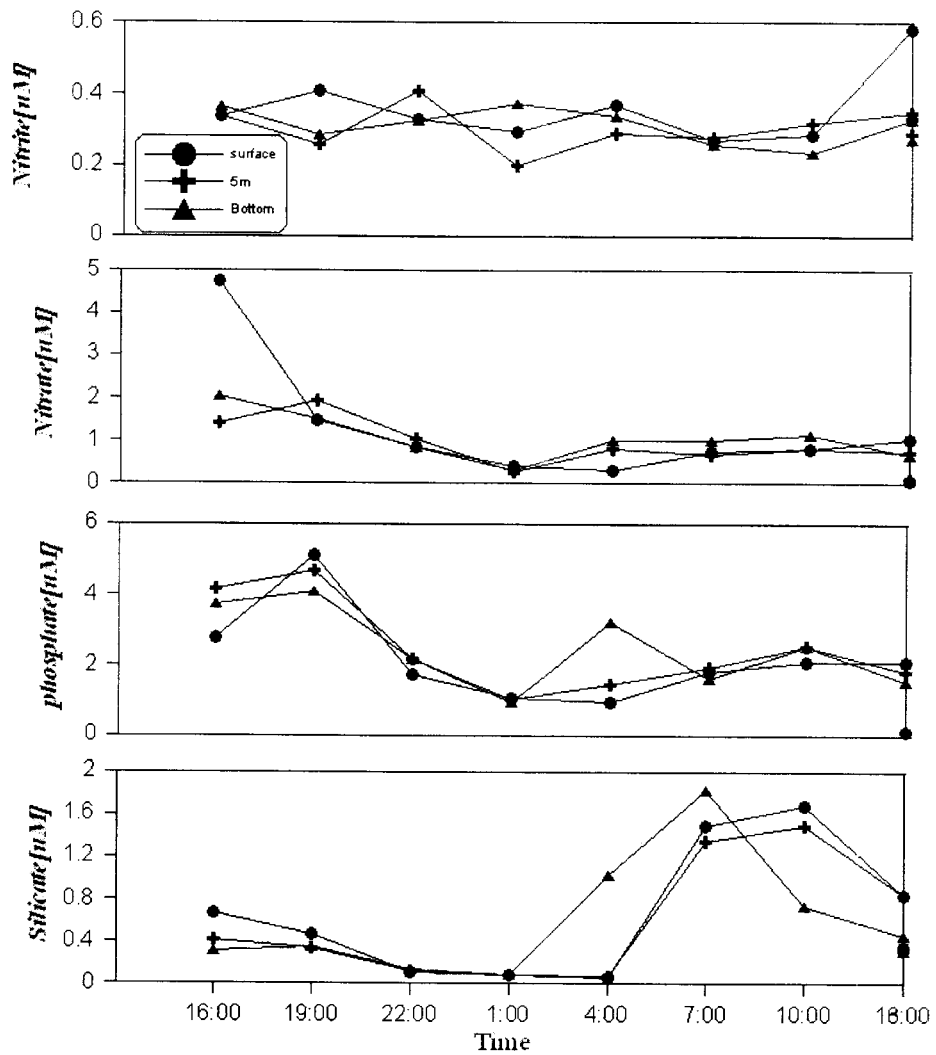


그림 86. 2001년 10월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM], 인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

2-3) 적조생물의 친환경적인 제어방법 강구(3년차)

(가) 자연 식물플랑크톤 군집의 생체 형광변화

생체형광(in vivo fluorescence)은 식물성플랑크톤의 광합성 용량과 성장을 측정하기 위한 방법으로 초기의 생체형광 값을 측정하고, 광합성계II (Photosystem II; PSII)에서 광합성계 I(PSI)으로의 전자전달계의 저해제인 DCMU [3-(3, 4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; diuron]를 첨가한 후 생체 형광을 측정하여 (식 3 - 4)로 FRI를 구한다. Rueter and Ades (1987)는 DCMU를 추가하여 얻어진 생체 형광의 증가를 이용하여, 식물성플랑크톤에 대한 철 이온의 결핍 등 생리화학적 스트레스를 측정하기 위한 지시자로 사용 할 수 있다고 보고하였다. 초기 생체 형광측정 후 시료는 옥외 자연광하에 일주일 이상 배양하면서, 12시간 간격으로 측정하였다.

DCMU를 가하기 전(in vivo; F)과 후 (Fd)의 형광차이를 비교하여 식물플랑크톤의 광합성능력을 평가하였고(Samuelsson and Öquist, 1977), 형광반응지수(fluorescence response index, FRI)를 구하였다(Cullen and Renger, 1979).

$$FRI = \frac{F_d - F}{F_d} \quad (\text{식 3 - 4})$$

F는 DCMU를 첨가하기 전의 형광 값이고, Fd는 DCMU를 가한 후의 형광 값이다. FRI는 stress에 의한 식물플랑크톤 광합성 기작의 생리적인 활성화도 또는 억제 정도를 반영한다 (Domotor *et al.*, 1982).

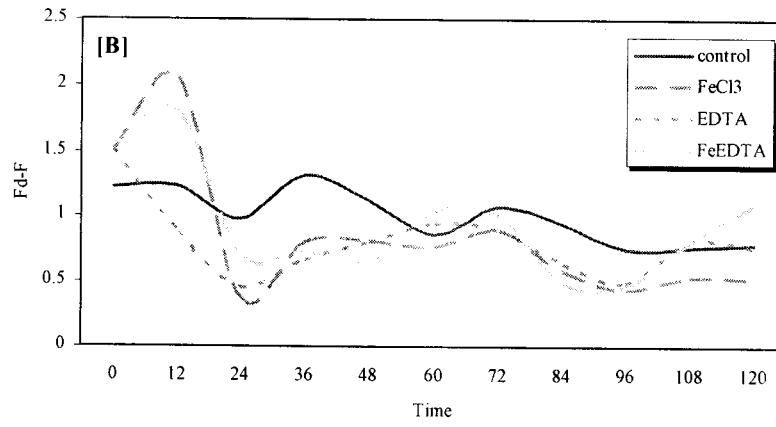
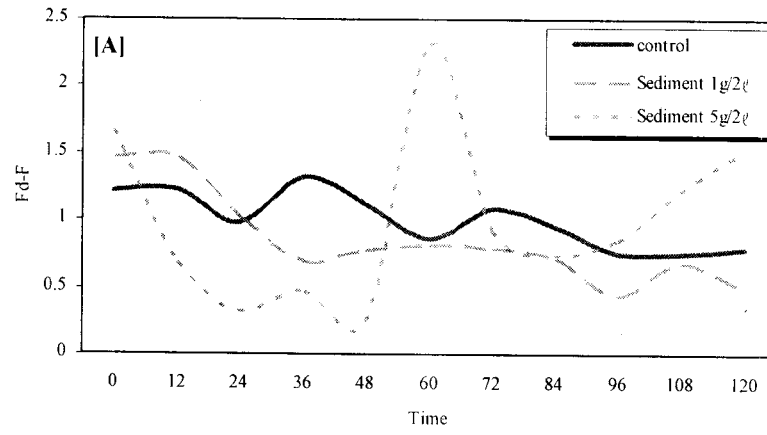


그림 87. 촉진제를 첨가한 경우 [A] 퇴적물, [B] 철 이온과 착화합물질

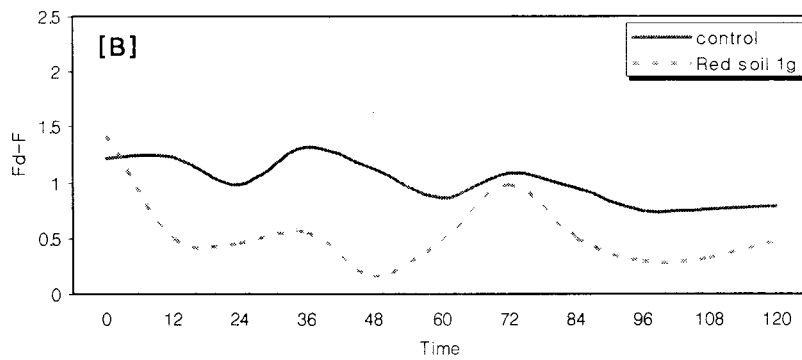
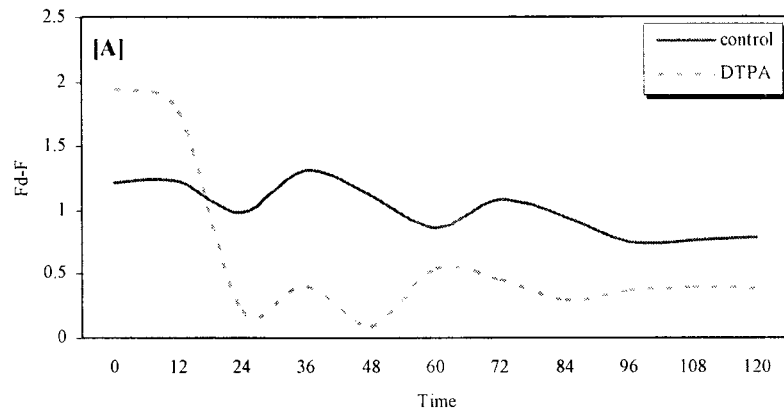


그림 88. 저해제를 주입한 경우, [A] DTPA 1 ml 첨가한 경우, [B] 황토 1 g 첨가한 경우.

가두리 양식장에서 채수한 해수에 촉진제들을 첨가한 경우를 그림. 87에 나타내었다. 그림. 2-50 -[A]는 양식장내의 퇴적물을 첨가한 것으로 주입 양에 따른 연관성은 보기 힘들었으나, 둘 다 control보다 높은 형광 차를 보여 주었다. 1 g/2 l 의 농도로 첨가 하였을 때 Fd-F 값이 control과 비교하여 크게 증가하지 않았으나, 일정한 형광 값을 유지하였다. 5 g/2 l 첨가시에는 초기에는 0.24까지 감소하여 다시 크게 증가하였다. 이는 퇴적물이 일정한 성분으로 구성된 것이 아니며, 임의로 소량을 덜어내어 첨가해 이러한 차이를 보인 것으로 사료된다. 착화합물을 첨가하였을 때는 control보다 높은 형광값을 보였으나 퇴적물 5 g/2 l 보다는 작았다. 철이온과 착화합물의 경우 초기에는 control 보다 더 작은 형광을 가지나, 이를 후 형광이 차츰 증가하고, FeEDTA를 제외하고, 4일 후 형광차가 감소했다. 착화합물에 의한 형광차가 증가한 순서는 FeEDTA, EDTA 그리고 철이

온이었다. 이같이, 철이온과 착화합물을 소량 주입하였을 경우에도 반응이 나타난 것으로 미루어 보아 철이온을 제어하여 적조를 제어하는 방법도 가능하다고 예측할 수 있다.

저해효과가 있는 물질 중 흔히 사용하는 황토 그리고 철이온을 제어하는 착화합물 DTPA 을 첨가하여 나타내었다. 보는 바와 같이 황토를 주입하였을 때 가장 높은 효율을 보였으며, 하루가 지나며 거의 제어됨을 볼 수 있다. 그러나, DTPA의 경우 이틀까지는 매우 낮은 형광차를 나타냈으나, 그 후 control과 유사한 값을 가졌다. 위의 그림 87-[B]의 철 착화합물이 촉진제로 쓰이는 경우도, 크게 반응을 하지 않은 결과와 마찬가지로, 약간의 저해 효과만을 가지고 왔다. 이는 철이온을 제어하는 DTPA의 주입량이 적었기 때문으로 보인다.

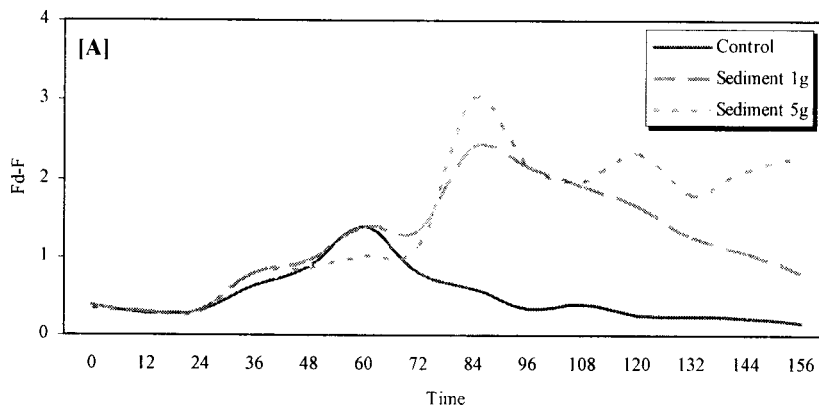


그림 89. 촉진제를 첨가한 경우 [A] 퇴적물, [B] FeCl_3 1 ml, 5 ml 주입한 경우 [C] EDTA 1 ml, 5 ml 주입한 경우, [D] FeEDTA 1 ml, 5 ml 주입한 경우.

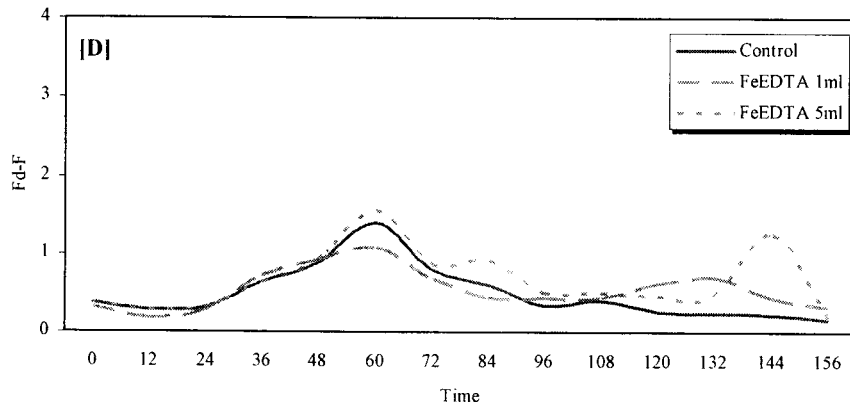
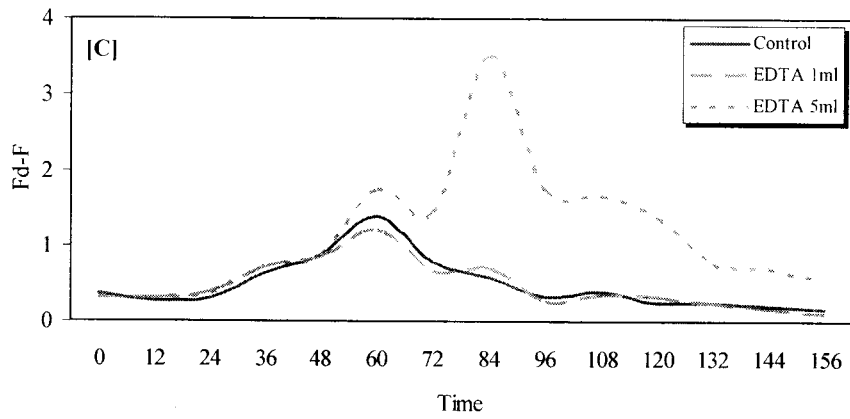
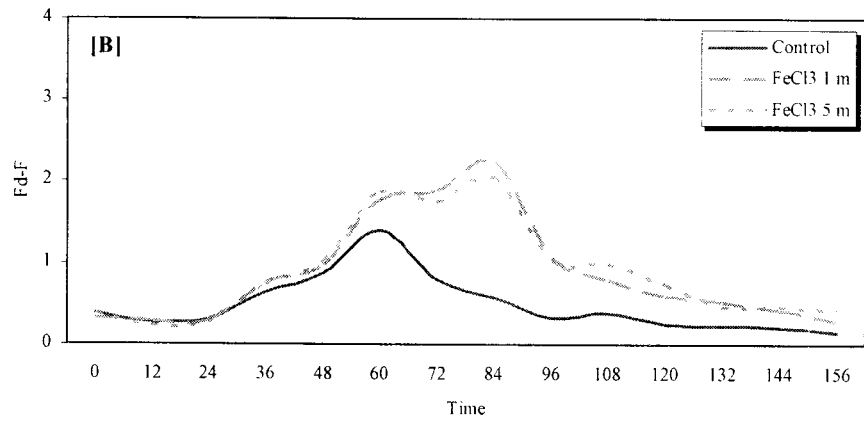


그림 89-계속. 촉진제를 첨가한 경우 [A] 퇴적물, [B] FeCl₃ 1 ml, 5 ml 주입한 경우
 [C] EDTA 1 ml, 5 ml 주입한 경우, [D] FeEDTA 1 ml, 5 ml 주입한 경우.

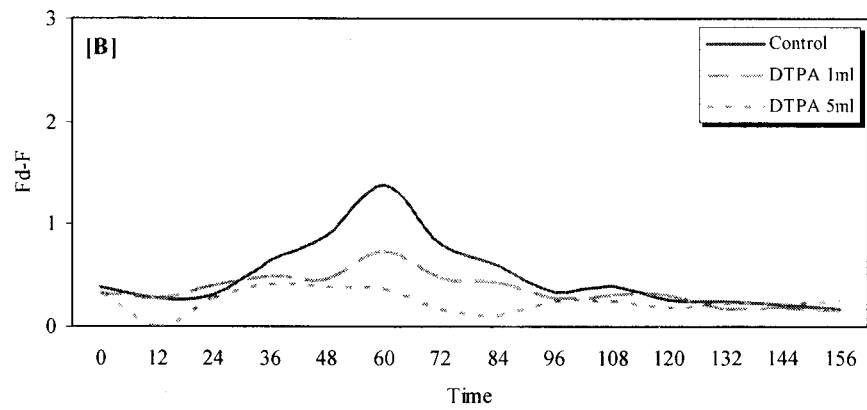
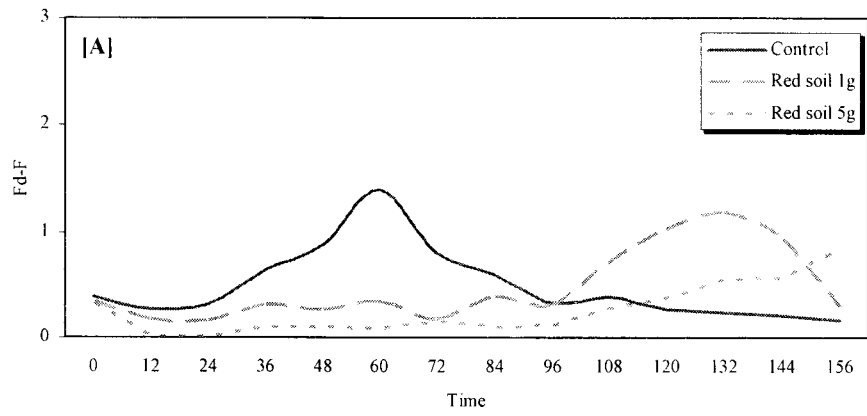


그림 90. 저해제를 주입한 경우, [A] 황토 1 g, 5 g 첨가한 경우, [B] DTPA 1ml 첨가한 경우.

[A]는 4월달에 채취한 퇴적물을 주입한 것이다. 3일까지는 control과 같은 반응을 보이며, 4일 후 4~5배가량이 증가하였다(그림. 90). 1 g 첨가했을 때는 그 후 계속 감소하였으나, control에 비해 매우 높은 형광을 나타냈다. 그러나 5 g의 많은 양을 투입하였을 때는 Fd-F의 변화가 1.79 ~ 2.32사이에서 변하며, 약간씩 감소하였다. 이는 양식장내 퇴적물에 영양염이 충분히 존재한 탓으로 여겨지며 퇴적물내 영양염이 용출되어 나오는데 시간이 걸려 초기에는 크게 증가하지 않은 것으로 사료된다. [B]에 철이온을 주입하였을 경우 이틀째부터 조금씩 형광이 증가하였으며 오후부터는 크게 증가하였다. 또, 첨가량을 1 ml, 5 ml로 하였으나 동일한 형태로 증가함을 관찰 할 수 있었다. 이 것은 1 ml 이상 첨가시 더 많은 양의 철이온을 첨가하여도, 반응하지 않고 일정량만이 반응함을 알 수 있으며, 철이온이 어느 정도 존재하고 있어 최대 1 ml 만이 반응하였다고, 사료되어 진다. 그러나 같이 EDTA를 첨가한 경우, 1 ml 첨가 시에는 control과 같은 형태를 보여 아무런 영향을 주지 못하고, 5 ml 투입 시 가장 높은 Fd-F를 나타내었다. 이는 위에서와 같이 해수에 존재하는 철이온을 식물성플랑크톤이 이용하기 쉽게 하여 성장을 촉진 시켜 주었음을 알 수 있다. 그러나, 또다른 착화합물 FeEDTA는 control과 큰 차이를 찾을 수 없었으며, 3일부터 5ml 첨가하였을 때는 Fd-F가 control보다 증가하였으며, 1ml 첨가하였을 경우는 5일부터 증가하고 6일 후에는 둘다 control과 같아짐을 볼 수 있었다. FeEDTA는 생물이 거의 이용하지 않았으며, 후반에 생체 형광이 높아지는 것으로 보아, 이용되는 시간이 오래 걸리는 것으로 판단된다.

저해제로 황토와 DTPA를 사용한 경우, 5 g의 황토를 첨가하였을 때 12시간 안에 Fd-F를 0.02로 만들어 식물성플랑크톤의 성장을 제어시켰다. 그러나, 4일 후에는 형광차가 급격히 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 이는 배양이 오래될수록, 채수한 해수량이 줄어들어, 병안에 분말로 된 황토와 함께 가라앉은 유기물등이 형광측정 시 함께 유입되어 증가되었다고 판단된다.

또 황토 1 g을 추가하였을 때는 형광을 0으로 하지 못하였으나, 식물성 플랑크톤의 성장이 최적일 때에 영향을 줌으로써 Fd-F가 최대의 값을 나타내지 못하도록 억제 작용을 함을 볼 수 있다. 그러나 황토 1 g일 때도 마찬가지로 4일 이후부터 형광이 증가함을 볼 수 있었다.

착화합물 DTPA 첨가의 경우도 마찬가지로 초기의 형광을 유지하며 Fd-F가 최대 값을 나타내는 것을 억제하는 것을 볼 수 있었으며, 오래 배양하여도 초기의 형광을 유지함을 그

림. 90-[B]에서 볼수 있었다. DTPA의 첨가량에 따른 변화를 보면 Fd-F가 상승하는 부분을 얼마만큼 더 감소시키는가 이다. DTPA 5 ml를 주입했을 경우에는 1ml의 소량으로 주입했을 경우보다 Fd-F가 낮아지는 것을 보면 알 수 있다.

즉, 그림. 90 에서 보는 바와 같이 DTPA는 초기의 형광을 계속적으로 유지하며 Fd-F가 최대로 증가하는 크기를 감소시켜 저해 효과를 보여 주고 있으며, 황토를 첨가한 경우에는 초기의 형광값보다 매우 낮은 값을 보여 주는 형태를 관찰 할 수 있었다.

광합성과 식물성플랑크톤의 성장이 가장 활발할 때를 서로 비교하기 위해 control이 가장 높은 지점의 형광을 표 2로 표시하였다. 이를 오후시간에 가장 높은 형광을 나타냈으며, 제어효과가 가장 좋은 순서는 황토 5 g > 황토 1 g > DTPA 5 ml > DTPA 1 ml 였다.

표 2. 철이온과 chelator, red soil이 적조생물 생체형광에 미치는 영향.

	cont.	Sediment		FeCl ₃		FeEDTA		EDTA		Red soil		DTPA	
		1g	5g	1ml	5 ml	1ml	5 ml	1ml	5ml	1g	5g	1ml	5 ml
F	0.93	1.7	2.64	1.36	1.35	1.35	1.06	1.02	1.15	0.85	1.05	0.72	0.4
Fd	2.32	3.09	3.66	3.12	3.21	3.21	2.62	2.22	2.89	1.19	1.14	1.45	0.76
Fd-F	1.39	1.39	1.02	1.76	1.86	1.86	1.56	1.2	1.74	0.34	0.09	0.73	0.36
FRI	0.6	0.45	0.28	0.56	0.58	0.58	0.6	0.54	0.6	0.29	0.08	0.503	0.474

7월 24일의 양식장 내 해수에서는 조류저해제 (글루코사민-D ; GL)를 추가하여 실험하였다. 글루코사민-D는 천연물질만으로 만들어진 저해제로서, 적조 제어 가능성과 효율을 보고자 실험하였다. 그림. 71 에서 보는 바와 같이 [A], [C], [D]는 모두 control보다 낮은 형광차를 보여 플랑크톤의 성장을 저해시켜주었다. 글루코사민-D는 5ml이상의 양을 주입할 때, 높은 저해 효과를 가져왔으며, 24시간 안에 완전히 저해됨을 볼 수 있었다. 또한 10 ml를 첨가한 경우와 5 ml를 첨가한 반응이 동일하였다. 그러나 [B]에서 글루코사민-D의 양이 적어질수록 형광차가 조금씩 증가함을 관찰 할 수 있었으며, 0.1ml/2l의 매우 낮은 농도로 주입시에는 control의 Fd-F가 0.16~0.25 일 때, GL은 1~1.27로 5배 이상 증가함을 볼 수 있다. 즉, 오히려 성장을 촉진시키는 결과를 나타낸다. 이것은 GL이 분해 가능한 물질로 2차적 오염을 시키지 않음을 시사한다. 여기서 GL의 최적의 제

어 농도는 5ml/2ℓ 임을 알 수 있으며, 첨가량에 따라 변화가 크므로, 적량을 사용하는 것이 중요하겠다.

[C]는 황토를 첨가하였을 때 3가지 경우 모두 control보다 낮은 형광차를 보였다. 10g/2ℓ, 5g/2ℓ로 첨가 시 12시간 후 생체 형광차가 0을 나타내 좋은 효율을 보여 주었다. 그러나 5g/2ℓ의 경우 이틀째부터 Fd-F가 0.1이하에서 변함을 볼 수 있고, 더 낮은 농도 1g/2ℓ로 주입했을 경우, control의 Fd-F값과 어느 정도 차이를 보이며 감소하였으며, 최대 0.2까지 올라갔었다. [C]에서는 황토 10g/2ℓ가 최적의 제어 농도임을 알 수 있으며, 첨가량이 적어질수록 그 효율이 떨어졌다. [D]의 DTPA의 경우 낮은 농도로 첨가하였을 때, 앞에 실험과 유사한 결과를 얻었다. 0.5 ml의 낮은 농도로 첨가하였을 경우 1 ml로 주입했을 때보다 Fd-F가 약간 더 증가했으며, 감소할 때까지 시간이 12시간 더 걸림을 알 수 있었다. 그리고 둘 다 3일 오후부터는 유사하게 감소함을 볼 수 있었다. 위와 같이 가장 높은 형광을 나타내어 서로 비교한 결과, 조류저해제 10 ml, 5 ml > 황토 10 g > DTPA 1 ml > 황토 5g > GL 1 ml, 0.5 ml > DTPA 0.5 ml > 황토 1 g > control > GL 0.1 ml 순으로 나타났으며, 조류저해제의 경우 100%의 저해 효과를 가져왔으며 이 때 F와 Fd는 다소 높은 값으로 생체형광이 일정하게 나타났다. 이것은 자체적으로 형광을 가지고 있으며, 이때 자체 형광은 0.025~0.036임을 구할 수 있었다. 또한 FRI는 생물의 스트레스정도를 나타내는 것으로 0.6이상은 매우 높은 활성도를 말하며, 0.25 이하는 심하게 스트레스를 받음을 뜻한다. 조류저해제 GL을 낮은 농도로 첨가하여 주었을 때 FRI가 0.559를 나타내어 생리적으로 안정되어 있음을 알 수 있다. DTPA는 Fd-F의 제해 능력에 비해 FRI가 0.25보다 높게 나옴을 볼 수 있었다.

표 3. 저해제인 Glucosamine, DTPA, 황토가 적조생물 생체형광에 미치는 영향.

	contro l	Inhibitor (Glucosamin-D; GL)					DTPA		황 토		
		10ml	5ml	1ml	0.5ml	0.1ml	1ml	0.5ml	10g	5g	1g
F	0.31	0.29	0.2	0.17	0.14	0.71	0.13	0.16	0.43	0.39	0.51
Fd	0.60	0.29	0.20	0.24	0.21	1.61	0.18	0.24	0.44	0.45	0.70
Fd-F	0.29	0.00	0.00	0.07	0.07	0.90	0.05	0.08	0.01	0.06	0.19
FRI	0.483	0.000	0.000	0.292	0.333	0.559	0.278	0.333	0.023	0.133	0.271

자연해수에서 여러 저해제를 첨가하여 실험한 결과, 황토는 1일안에 저해 효과가 크게 나타났으며, 주입양이 많아질수록 저해 효과가 높게 나타났다. 그러나 배양한 해수의 양

이 줄어들수록, 형광이 높게 나타남을 볼 수 있었다. 또, 실험시 사용한 황토는 위에서 설명한 것과 같이 68 μm 로 분쇄하여 사용한 것으로 경제성 측면에서 문제가 있다.

미량의 철이온을 저해하고자 한 착화합물 DTPA도 높은 저해효과를 보여주었으나, 초기의 형광 이하로는 감소하지 않거나, control과 같은 형태이나 크기가 축소된 그래프로 나타남을 볼 수 있었다. 즉 완전제어는 아니지만, 식물성플랑크톤이 발생하는 것을 크게 감소시키는 것을 관찰 할 수 있었다.

조류저해제(글루코사민-D)는 자연 조건에서 5ml/2 ℓ 로 주입하였을 때 저해효과가 탁월하였으며, 황토보다 12시간 후에 Fd-F가 0으로 나타났으며 완전히 제어됨을 알수 있었다. 그러나 이보다 낮은 농도에서 control과 유사하였으며, 가장 낮은 농도 0.1ml / 2 ℓ 로 첨가하였을 경우 오히려 크게 성장함을 보여 주었다. 이것으로 황토와 같이 2차적인 오염은 없을 것으로 보이며, 적당량을 주입하였을 경우 가장 큰 저해 효과를 가져옴을 관찰 할 수 있었다.

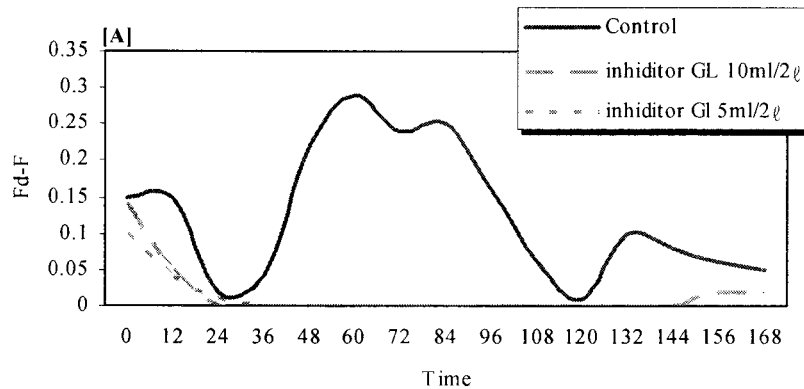


그림 91. 저해제를 주입한 경우, [A] 조류저해제 (글루코사민-D ; GL) 10 ml, 5ml 첨가, [B] 조류저해제 (글루코사민-D ; GL) 1 ml, 0.5 ml, 0.1 ml 첨가, [C] DTPA 1 ml, 0.5 ml 첨가한 경우[D] 황토 10 g, 5 g, 1 g 첨가한 경우.

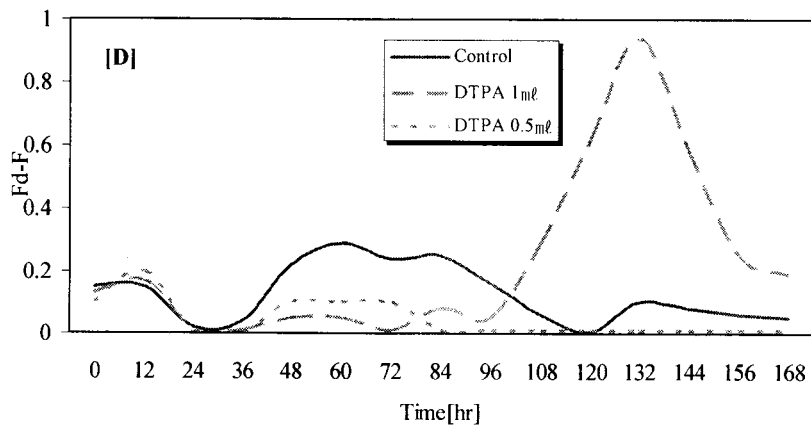
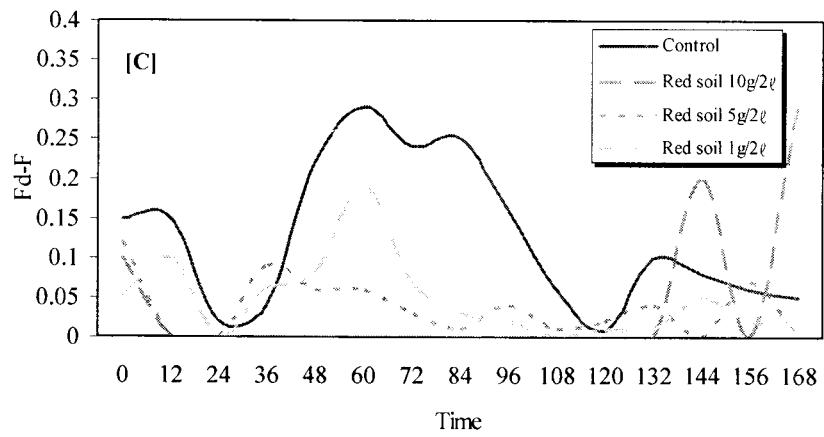
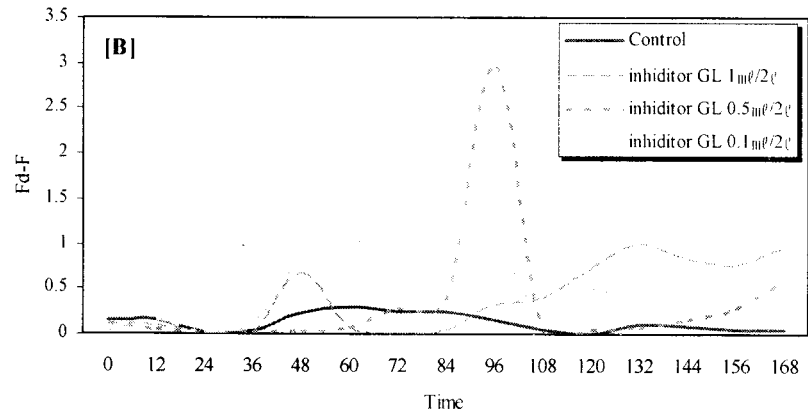


그림 91-계속. 저해제를 주입한 경우, [A] 조류저해제 (글루코사민-D ; GL) 10 ml, 5ml 첨가, [B] 조류저해제 (글루코사민-D ; GL) 1 ml, 0.5 ml, 0.1 ml 첨가, [C] DTPA 1 ml, 0.5 ml 첨가한 경우 [D] 황토 10 g, 5 g, 1 g 첨가한 경우.

(나) 생체형광(*In vivo* fluorescence)

적조구제에는 화학적, 생물학적, 물리적인 방법이 있으나 사용상의 어려움과 문제점이 있어 현재 황토살포에 의한 적조생물구제가 널리 사용되지만 황토 역시 2차 오염을 유발하므로 장기적으로 이상적인 적조제어대책이라고 보기는 힘들다. 본 실험에서는 적조제어제로 과산화수소(H_2O_2)를 사용하였다. 250 ml 시료에 과산화수소 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 ml를 주입하여 0분, 5분, 15분, 30분, 45분, 60분에 일정량의 시료를 취하여 생체형광을 측정하였다. 60분후 위의 주입량에 따른 적조 제어율은 각각 -30%, 37%, 48%, 41%, 97%, 86%, 98%로 대체로 주입량을 증가할수록 제어율이 높은 것으로 나타났다.

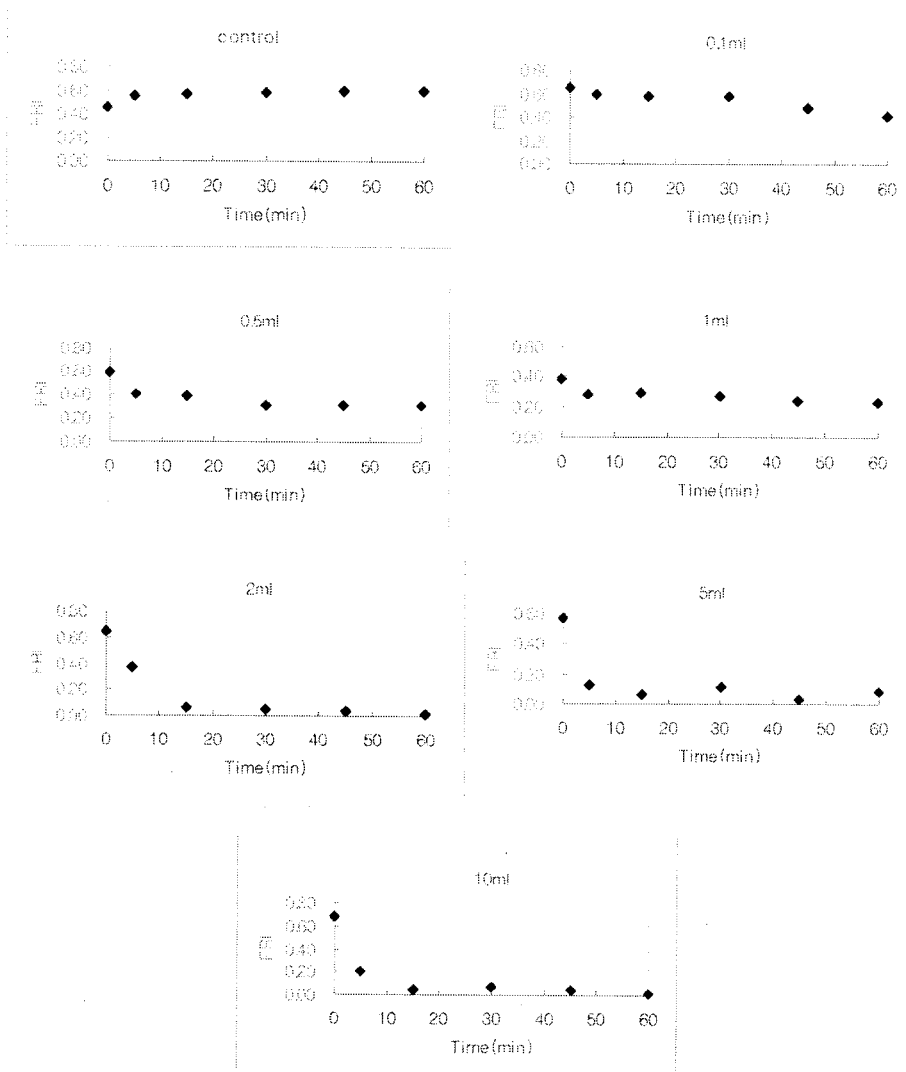


그림 92. 과산화수소 주입량에 따른 FRI 값.

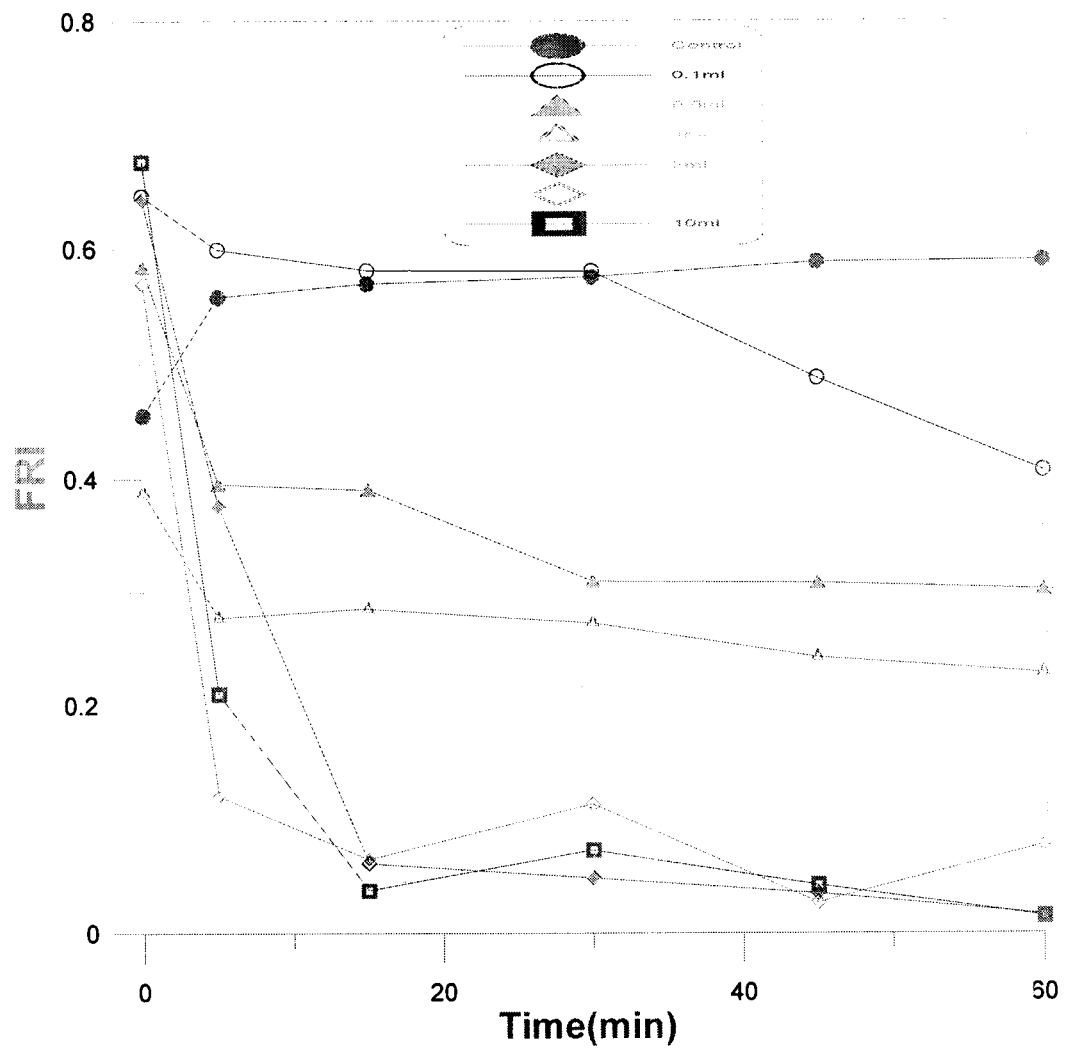


그림 93. 과산화수소 주입량에 따른 FRI의 전체값.

(다) 엽록소 a 및 식물플랑크톤에 의한 광 흡수계수($a \cdot ph$)

해수중의 입자상 물질은 파장에 따라 독특한 광 흡수특성을 지니고 있다. 400 ~ 750 nm 사이의 가시광선 영역에서 식물플랑크톤에 의한 빛 흡수는 440 과 674 nm에서 최대 흡수치를 나타내고, detritus에 의한 빛 흡수는 청색 계열인 400 nm 근처에서 증가한다. 수심별로 입자에 의한 흡수 스펙트럼(a_p)을 측정한 결과 440 nm와 673 nm에서 최대흡수를 보였다. 대개의 경우 표층에서 높은 흡수계수를 보이고 수심이 깊어질수록 감소하는 경향을 나타냈다. 가두리 양식장 주위에서 식물플랑크톤 생물량인 엽록소 a 의 양을 측정하였다. 1.33 - 5.66 $mg\ m^{-3}$ 의 농도 분포를 보였다. 3월 평균 엽록소 a 의 농도는 $2.6(\pm 1.1)\ mg\ m^{-3}$ 이었다. 25시간 연속 관측한 결과 미약하나마 광량이 풍부한 낮 시간에는 생물량이 증가하였으며 표층에서 중층과 저층보다 높은 농도를 보였다. 또한 엽록소 a 와 아울러 플랑크톤의 빛 이용률을 알 수 있는 흡수계수인 $a \cdot ph$ 의 경우 수심에 따라 큰 차이를 보였으며, 주로 표층에서 높은 빛 흡수 이용률을 보였다. 시간에 따른 변화도 빛 즉, 광량이 풍부한 낮 시간에 흡수계수가 높았으며 밤이 되면서 감소하는 경향을 나타냈다. 빛 흡수계수는 3월에 평균 $0.019(\pm 0.018)\ m^2\ mg^{-1}$ 의 분포를 보였고, 5월에는 $0.005(\pm 0.004)\ m^2\ mg^{-1}$ 의 분포를 보였다. 3월과 같은 경향을 나타냈으나, 표층에서만 강한 흡수계수 값이 나타났다. 하지만 수괴 중층과 저층에서는 빛 흡수 이용률이 급격히 감소함을 알 수 있었다. 오히려 광량이 풍부하였지만 5월에 더 낮은 값을 나타냈다.

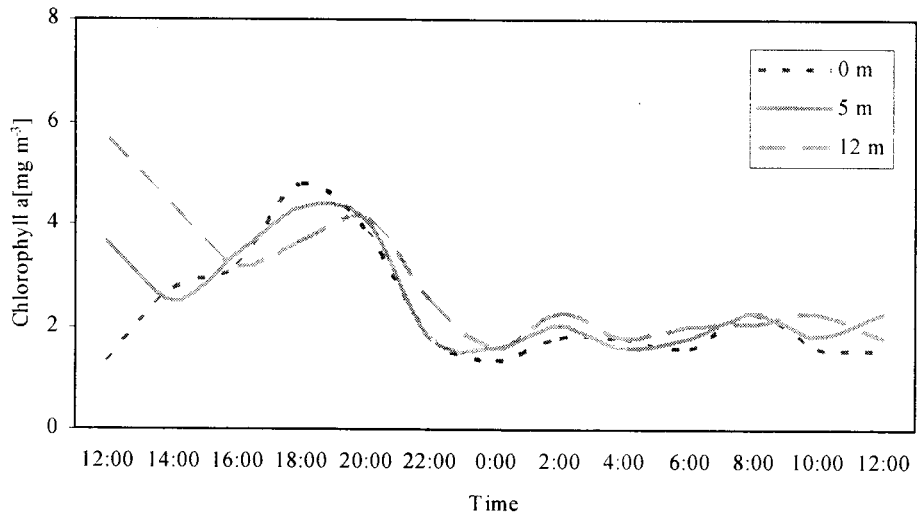


그림 94. 2002년 3월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll *a* 자료

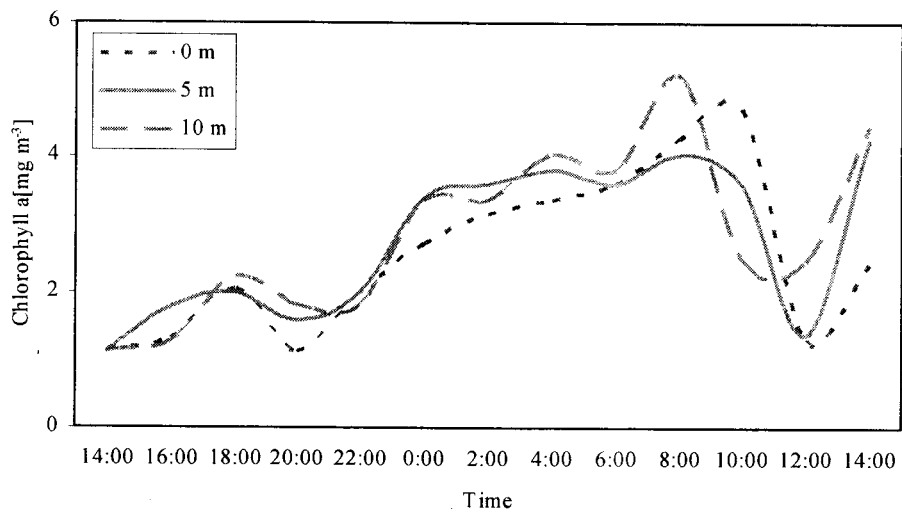


그림 95. 2002년 5월 가두리양식장 주변의 시간별 Chlorophyll *a* 자료.

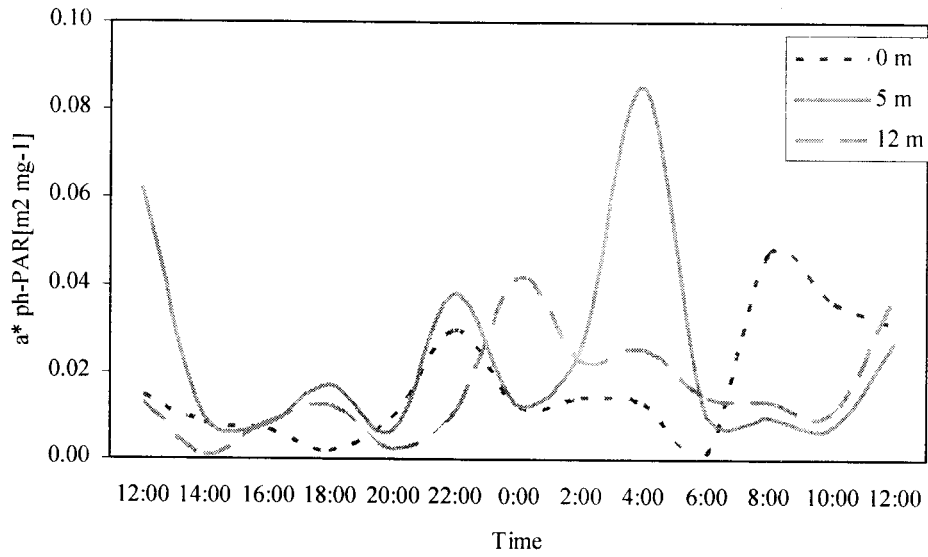


그림 96. 2002년 3월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한 흡수계수의 변화.

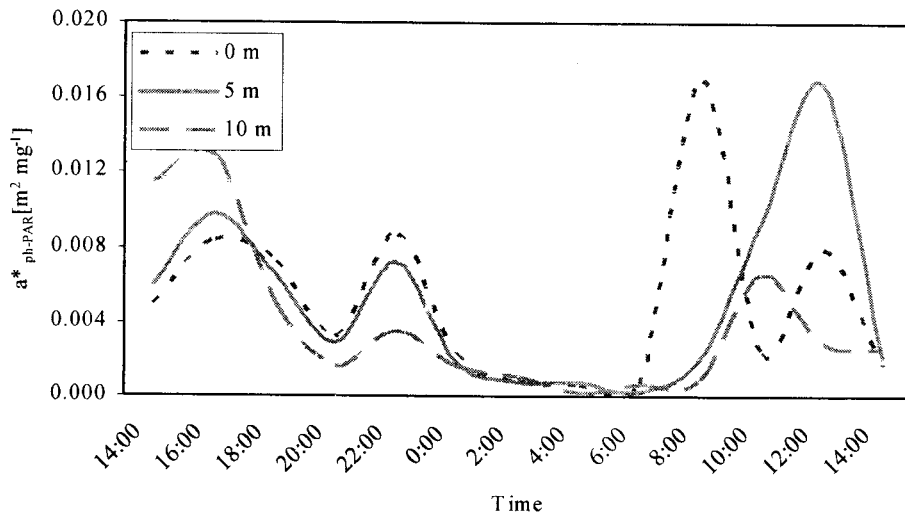


그림 97. 2002년 5월에 관측한 가두리양식장의 식물플랑크톤에 의한 흡수계수의 변화.

(라) 질산환원효소의 활성도(Nitrate Reductase Activity).

질산염환원효소 활성도는 질산염 환원효소(nitrate reductase; NR)는 질스계 영양염의 이용기작과 C:N 생산성비에 영향을 미친다. 특히 해양환경에서 주로 일차생산을 제한하는 주된 영양염은 무기질소원이다. 질스계 영양염은 탄소원에 비교하여 해양환경에서 그 기원에 따라 구분이 가능하다는 장점이 있다. 일차생산 중 용승, 질소고정, 강우 등에 의하여 유광층 외부로부터 유입된 질소원에 의한 생산을 신생산(new production)이라고 하며, 시스템을 고갈시키지 않고 수확(harvest) 또는 수출(export)이 가능한 생산이다. 이러한 신생산을 유추할 수 있는 것이 질산염 환원효소의 활성도이다. 3월과 5월 두 차례에 걸쳐 측정된 질산염 환원 효소 농도는 각각 $0.65(\pm 0.32)$, $5.33(\pm 0.27)$ $\text{NO}_2 \text{ nM hr}^{-1}$ 로 나타났다. 효소 활성도가 하계에 높게 나타났다. 25시간 연속 관측 자료에서 효소 활성도는 시간에 따라 큰 차이를 보이지 않았으며 주야에 따른 빛 이용률에도 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 표·저의 수심에 따른 효소 활성도도 크게 나타나지 않았다. 단지 봄과 여름의 온도 차이에 따른 활성도의 차이가 있을 따름이다.

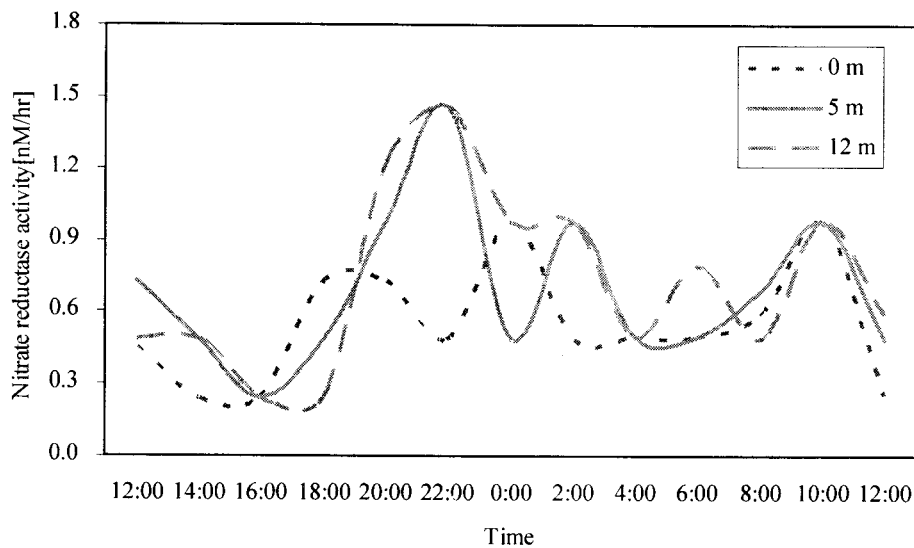


그림 98. 2002년 3월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화.

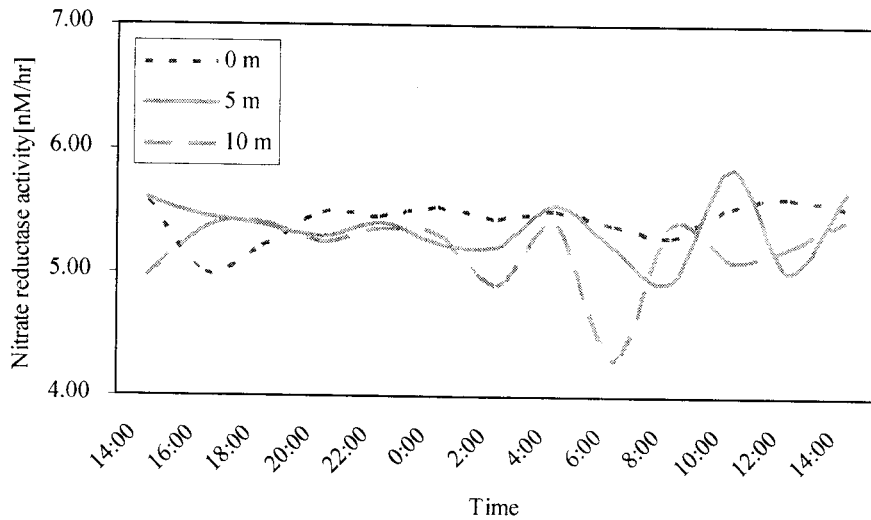


그림 99. 2002년 5월에 관측한 가두리양식장의 질산 환원효소의 활성도의 변화.

(마) 영양염

가두리 양식장에서의 주요 해양환경에 영향을 미치는 오염인자는 사료와 양식대상어류의 배설물이다. 특히 하계 수온이 증가 할 때에는 저층이 혐기성화 되어 용존 산소가 부족하여 저층에 사는 어패류가 폐사하기도 한다. 그러나 유속이 어느 정도 존재하고 활발한 혼합이 있을 경우에는 오히려 적당한 양의 영양염류가 수층에 투입되어 식물플랑크톤의 먹이원이 되기도 한다. 또한 이러한 식물플랑크톤 증가는 동물플랑크톤과 원생동물의 증가를 촉발하게 되어 대상 양식어류의 먹이원이 증가할 수 있다. 춘계인 3월에 아질산염의 농도는 $0.224(\pm 0.167) \mu\text{M}$ 의 분포를 나타냈으며, 25시간 연속 관측한 자료에서의 변화는 $0.01 - 0.74 \mu\text{M}$ 의 분포를 보였다. 대개의 경우 중층인 5 m 범위에서 가장 높은 분포를 보였으나 시간의 경과와 조석의 차이에 따르는 농도 변화 차이는 나타나지 않았다. 하계인 6월의 경우 시간에 따른 약간의 차이는 있으나 대개의 경우 표층에서 저층과 중층에서보다 높게 관측되었다. 25시간 연속 관측한 아질산염의 농도는 시간별 큰 차이는 나타나지 않았다. 암모니아성 질소는 수심에 따라 보였다. 특히 하계인 6월에 강한 수온 약층이 형성되어 표저간의 차이가 5배가량 차이가 나는 것도 있었다. 시간의 경과에 따른 암모니아 농도의 변화폭은 극히 미약하였으며 조석에 따른 차이도 또한 나타나지 않았다. 그러나 특이한 사항은 여름철인 하계에 오히려 수온증가와 수온약층에 의한 결과로 저층 암모니아 농도의 경우 하계에 춘계인 3월이 더 높을 것이라 예측되었으나 오히려 평균 농도 분포

는 $8.24(\pm 5.30) \mu\text{M}$ 로 관측되었으며, 그 범위 또한 2.26 - 25.28 μM 사이를 보였다.

규산염의 경우 식물플랑크톤 특히 규조류의 피각을 이루는 중요한 영양염이며, 연안역의 경우 규산염이 식물플랑크톤의 성장에 제한 요인으로 작용한다는 보고가 있다. 본 연구에서 3월인 춘계와 하계인 6월의 수층의 규산염 농도의 변화를 25시간 연속하여 관측하였다. 연구기간 중 수심에 따른 분포의 경우 표층에서 높은 농도를 보여줬으며 중층, 저층으로 진행할수록 농도가 감소하였다. 이는 표층에 존재하는 대량의 식물플랑크톤의 성장 제한요인으로 규산염이 작용하지 않는다는 것을 반증하는 것으로서 본 연구해역에서 규산염은 생물량 증가의 제한 요인이 되지 않았다. 3월의 규산염 농도는 $3.60 - 13.78(7.33 \pm 2.52) \mu\text{M}$, 하계인 6월에는 평균 $8.98 \pm 2.25 \mu\text{M}$ 의 범위로 관측되었다. 평균 농도 또한 하계에 높게 나타났다. 우리나라 연안역 특히 수괴가 안정되고 조류의 흐름이 완만한 곳에서는 봄철 대번성이 크게 나타나는데 주로 규조류에 의한 번성이다. 본 연구해역에서는 대개의 경우 4월말과 5월에 대번성이 일어나는데, 이러한 경우 수층에 규산염 농도가 급격히 감소하나 본 연구에서는 오히려 대번성이 일어난 후에 규산염도가 증가함을 나타냈다. 해양에서는 식물플랑크톤 성장의 제한요인으로 흔히 질소계 영양염이 제한요인이 되며, 담수성 수괴와 강의 하구에서는 인산염이 주된 제한요인이 된다. 본 연구에서는 3월의 경우 N/P ratio가 평균 25이상 높게 관측되었다. 하지만 6월에는 3.5 이하로 질소계 영양염이 해역의 제한성 영양염으로 나타났다.

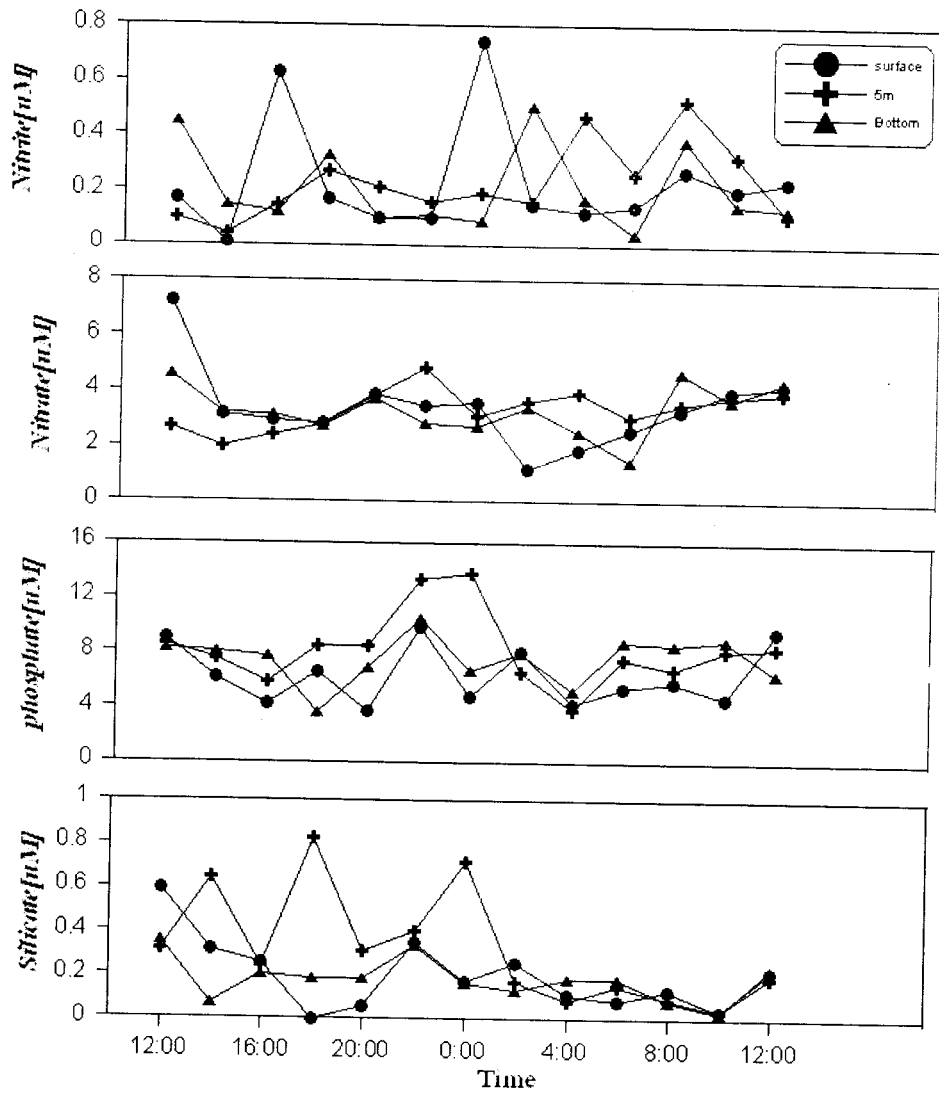


그림 100. 2002년 3월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM]
인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

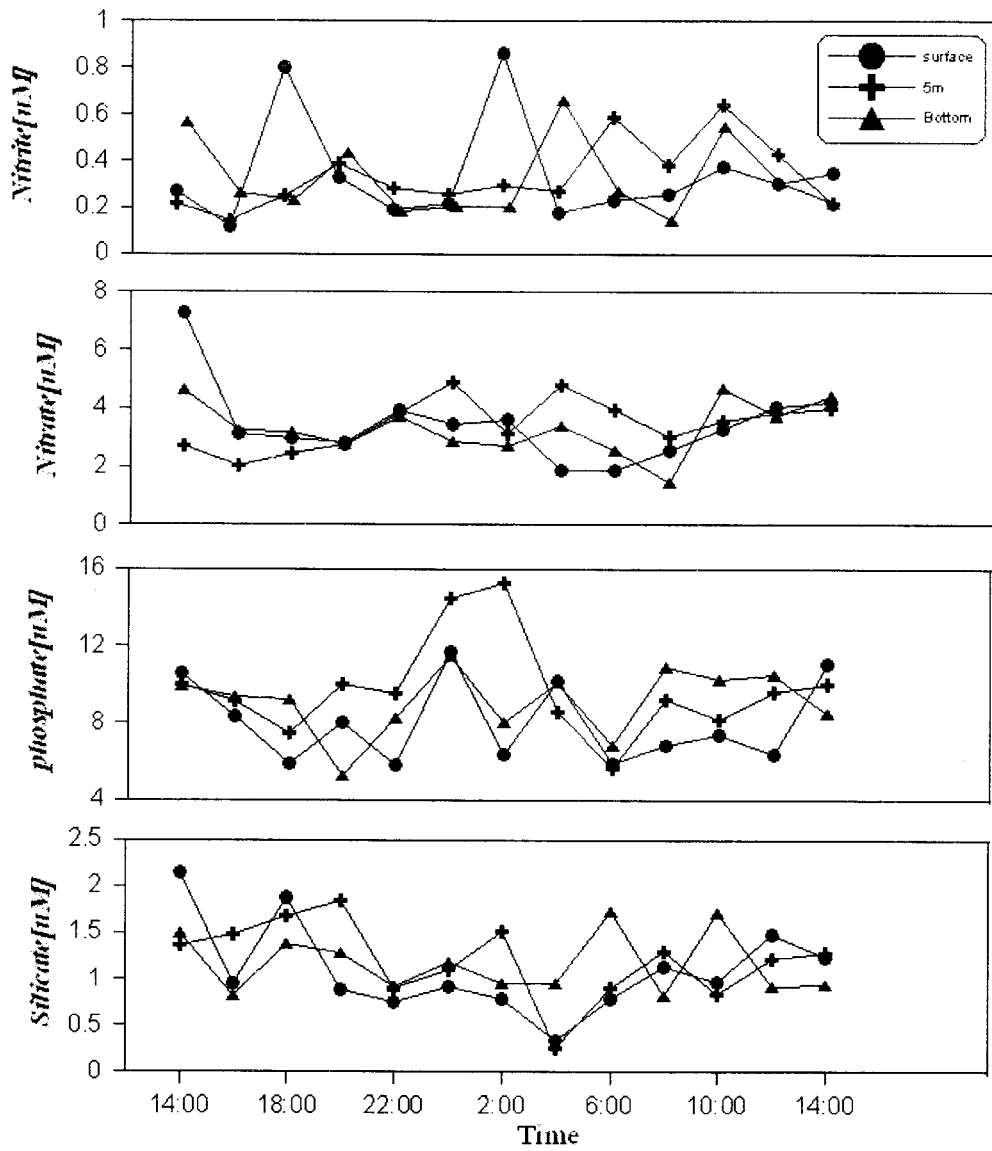


그림 101. 2002년 5월 완도 사후도 주변 양식장의 질산염 [μM], 아질산염 [μM]
인산염 [μM] 그리고 규산염 [μM].

3-1) 패혈증 비브리오균의 생태적 특성 조사(1차년도)

(가) 전통적인 방법인 비브리오-선택배지 (TCBS plate)를 사용한 패혈증 비브리오균의 정량

남해안에 존재하는 패혈증 비브리오균의 생태학적인 특성을 이해하기 위하여, 패혈증 비브리오균의 분포 및 그 양을 조사하고, 자연계의 여러 환경인자들이 병원균의 분포에 주는 영향을 규명하기 위한 연구를 수행하였다. 본 연구진은 2000년도 2월부터 매월 마지막 주에 전남 강진의 한 어장을 중심으로 바다물, sediment, 그리고 이 지역에 생산되는 해양생물 (홍합)을 채취하였다. 채취된 시료를 적당히 희석하여 비브리오 선택배지라고 알려진 TCBS plate (Sloan et al., 1992)에 도말하여 배양한 후, 이 선택배지에서 초록색 colony morphology를 보이는 패혈증 비브리오균을 동정, 그 수를 측정하였다.

전남 강진군 마량포구에서 2월부터 12월까지 다음과 같은 시료를 채취하였다. 가두리 양식장 내외 각 2곳을 선정하여, site1 (가두리 내 양식장)과 site2 (가두리 외부)에서 seawater와 sediment를 채취하였으며, 양식장내 살고 있는 홍합(mussel)을 대표적인 해양생물체 시료로 사용하였다. 그러므로 각 sample을 W1 (water in site1; 표층수), S1 (sediment in site1; 수심 13 m)과 W2 (water in site2; 표층수), S2 (sediment in site2; 수심 25 m)로 명명하였다 (표 1 참조). Sediment 내에 존재하는 bacterial cell을 조사하기 위하여 1:1 (시료 1 g/인공바다물 1 ml) 비율로 5분간 mixing한 후 5분 동안 정지한 후 그 supernatant를 사용하였다. 생물체 내에 존재하는 bacterial cell을 조사하기 위하여 우선 홍합 (mussel)의 내장을 끄집어낸 후 1:1 (시료 1 g/인공해수 1 ml) 비율로 섞은 다음, homogenizer를 이용하여 grinding한 후 5분간 mixing한 후 5분 동안 정지한 후 그 supernatant를 사용하였다.

패혈증 비브리오균을 동정 계수하기 위하여 사용되어진 선택배지로는 TCBS (Bacto yeast extract, Bacto proteose peptone, sodium citrate, sodium thiosulfate, Bacto Oxgall, Bacto saccharose, sodium chloride, ferric citrate,

Bacto brom thymol blue, thymol blue, Bacto agar)를 사용하였다. 각각의 sample 은 인공바다물 (ASW: artificial seawater)로 희석하였으며 도달한 후 하루 배양 후 각각의 colony를 계수하였다. 그 연구 결과를 아래의 표 1 및 그림 1에 정리하였다.

(나) 전통적인 방법보다 민감한 분자생물학적인 방법 (colony hybridization)으로 패혈증 비브리오균의 정량

배양가능한 패혈증 비브리오균의 농도 측정은 기존의 선택배지를 사용하여 CFU (colony forming unit)을 결정함으로써 정량하는 방법보다 특이성과 agar plating efficiency 측면에서 개선된 DNA probe를 사용한 colony hybridization 방법을 이용하였다. 같은 시기에 채취된 각 시료를 희석한 후, membrane filter 상에 걸러진 세포들을 비선택배지 (LBS plate)에서 배양하였다. 세균의 colony가 적당한 크기로 성장한 다음 membrane filter를 처리하여 패혈증 비브리오균에 특이한 DNA probe를 사용한 colony hybridization을 수행하였다. 이를 위하여 선택한 DNA probe는 본 연구팀이 이미 확보하고 있는 hemolysin 유전자인 *vvhA* 유전자 (Lee and Choi, 1995; Lee et al., 2001; Yamamoto et al., 1990)를 사용하였는데, 그 이유는 *vvhA* 유전자가 패혈증 비브리오균과 진화적으로 매우 유사한 비브리오종을 구분할 수 있기 때문이다.

불리한 환경인자에 의하여 스트레스를 받은 패혈증 비브리오균 (damaged *V. vulnificus* cell)이 TCBS plate에서 성장이 어려울 수 있으므로, 보다 정확한 배양 가능한 패혈증 비브리오균의 정량을 위하여 본 방법을 채택하였다. 그 결과 수온이 높아지는 계절 (4월 및 10월 이후 시료)에 본 방법의 우수성이 증명되었으며, 또한 전 계절적으로 본 방법이 선택배지를 사용한 방법보다 보다 높은 패혈증 비브리오균의 계수할 수 있었다.

Colony hybridization을 하기 위하여 filter는 pore-size 0.22 μm 인 membrane filter를 사용하였다. 703 bp 길이의 probe DNA (hemolysin을 코딩하는 유전자)를 다음과 같은 방법으로 PCR을 통하여 얻었다. 즉 hemolysin 유전자에 특이한 두

primer를 forward primer (5'GACTATCGCATCAACAACCG3')와 reverse primer (3'GGCAGTAATACTCGCTACCT5')로 사용하여 *V. vulnificus*-specific probe를 얻어 정제하였고, 그 DNA를 DIG-labeling kit (hexanucleotide mixture, dNTP labeling mixture, Klenow enzyme)를 사용하여 37°C에서 labeling 하였다.

위의 labeling된 *V. vulnificus*-specific DNA probe를 사용하여 colony hybridization을 수행하였다. 바다 세균의 colony가 성장된 filter는 colony hybridization을 하기 위하여 다음의 네 가지 단계로 처리하였다: 즉 (1) 10% SDS, (2) denaturation solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl), (3) neutralization solution (Tris-HCl, NaCl), 그리고 (4) SSPE solution에서 순차적으로 처리되었으며, 최종적으로 UV-cross linker에서 bacterial DNA를 filter 상에 고정하였다. 처리된 filter를 prehybridization solution에 47°C에서 4시간 혼합한 후, boiling시킨 DNA probe와 함께 넣어 47°C에서 18시간 혼성화 하였다. 세척은 20X, 0.5X, 0.1X washing solution (20X SSC, Maleic acid buffer, 10% SDS)에 68°C에서 각각 15분씩 2회 수행하였다. 다음, filter를 10% blocking solution (maleic acid buffer, 10% blocking stock reagent)에 넣어 1시간 동안 상온에서 shaking하면서 incubation하였고, 그 후 anti-digoxigenin-AP를 10% blocking solution에 1:5000의 비율로 희석하여 넣었다. 이 조건하에 상온에서 1시간 동안 shaking하면서 incubation하고, 마지막으로 hybridization 결과를 발색반응으로 보기 위하여 NBT와 BCIP를 첨가하여 관찰하였다. 이러한 결과, 본 colony-hybridization은 수백 개의 다양한 bacterial colony (pre-hybridization) 중에서 매우 정확하고 민감하게 *V. vulnificus* colony만을 탐지할 수 있었다.

표 4 및 그림 102에 정리한 바와 같이 패혈증 비브리오균은 해수의 경우 5월부터 9월까지 탐지되었으며, sediment 나 조개의 경우에는 4월부터 12월까지 계속적으로 관찰되었다. 또한 그 수에 있어서는 8월 시료에 있어서 최대값 (해수: $8 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^4$ /ml, sediment: $2.9 \times 10^5 \sim 5.3 \times 10^4$ /gr, 조개: 4.2×10^4 /gr)이었는데, 이러한 수 및 분포는 기존의 보고 (Lee *et al.*, 2001)와 비슷한 범위라 할 수 있다.

표 4. 2000년도 전남 강진 지역에서의 총 세균 수 및 패혈증 비브리오균 수
(selective medium (TCBS), non-selective medium (LBS), colony hybridization)

sampling time	temp of site (°C)	sampling site	CFU/ml on TCBS		CFU/ml on Filter/LBS	
			total	<i>V. vulnificus</i> (green CFU)	total	<i>V. vulnificus</i> (probe-positive CFU)
2/10	6.5°C	W1 ^a	1×10 ²	nd ^c	9.8×10	nd
		W2 ^b	1×10 ²	nd	2.3×10	nd
		S1 ^c	5.97×10 ³	nd	6.9×10 ¹	nd
		S2 ^d	1.4×10 ¹	nd	4.8×10 ³	nd
		mussel	3.32×10 ³	nd	1×10 ¹	nd
3/10	9.9°C	W1	1×10	nd	1.3×10 ²	nd
		W2	4×10	nd	6×10 ¹	nd
		S1	9.9×10 ⁴	nd	2.7×10 ¹	nd
		S2	7.3×10 ⁴	nd	5.2×10 ⁵	nd
		mussel	1.15×10 ³	nd	1.8×10 ⁶	nd
4/24	13.4°C	W1	5×10	nd	7.8×10	nd
		W2	7×10	nd	1.5×10	nd
		S1	6.5×10 ¹	nd	1.9×10 ³	2×10 ¹
		S2	2.8×10 ⁴	nd	1.1×10 ³	1×10 ¹
		mussel	9.8×10 ²	nd	5.6×10 ¹	nd
5/26	18.7°C	W1	nd	nd	1.1×10 ²	1×10
		W2	nd	nd	1.4×10 ²	1.5×10
		S1	1.35×10 ¹	1×10 ³	5.6×10 ¹	1×10 ³
		S2	9.5×10 ³	nd	2.0×10 ³	1×10 ³
		mussel	2.95×10 ³	2×10 ²	2.9×10 ¹	1×10 ¹
6/23	19.7°C	W1	4×10	2×10	3×10 ³	2×10 ²
		W2	1×10	1×10	1.6×10 ³	1.6×10 ²
		S1	8.97×10 ³	1.95×10 ³	1.32×10 ⁵	6×10 ³
		S2	2.76×10 ⁵	3.8×10 ³	2.76×10 ⁵	1.2×10 ¹
		mussel	2.28×10 ³	1.5×10 ²	2.85×10 ⁵	1.2×10 ¹
7/25	22°C	W1	4.34×10 ²	3.2×10	5.4×10 ²	1.1×10 ²
		W2	3	nd	4.5×10	1×10
		S1	3.9×10 ³	3.23×10 ²	9.9×10 ¹	5.7×10 ³
		S2	1.75×10 ³	9.75×10	1.26×10 ⁷	5.3×10 ³
		mussel	7.7×10 ²	1.07×10 ²	6.48×10 ¹	4.5×10 ³
8/26	26°C	W1	4.3×10 ²	1×10 ²	3.2×10 ³	8×10 ²
		W2	1.5×10 ¹	1.75×10 ¹	1.01×10 ⁵	1.2×10 ¹
		S1	2.9×10 ³	1.03×10 ³	3.4×10 ⁵	2.9×10 ³
		S2	3.3×10 ¹	2.8×10 ³	2.53×10 ⁵	5.3×10 ¹
		mussel	9.8×10 ¹	7.1×10 ¹	3.53×10 ⁵	4.2×10 ¹
9/28	23°C	W1	3.5×10	1×10	1.2×10 ³	7.5×10
		W2	4.5×10	nd	9×10 ²	6×10
		S1	2.7×10 ⁴	6.4×10 ³	1.03×10 ⁵	5.8×10 ³
		S2	3.89×10 ³	7.1×10 ²	3.23×10 ⁴	1×10 ³
		mussel	4×10 ¹	2.07×10 ³	4.6×10 ¹	8.5×10 ³
10/29	18°C	W1	nd	nd	nd	nd
		W2	nd	nd	nd	nd
		S1	2.38×10 ⁴	5.75×10 ²	9.6×10 ¹	3×10 ³
		S2	2.07×10 ³	8×10	2.23×10 ⁴	1.2×10 ³
		mussel	3.55×10 ³	9.75×10	5.5×10 ³	5.6×10 ²
12/1	11.5°C	W1	nd	nd	6×10	nd
		W2	nd	nd	2×10	nd
		S1	1×10 ¹	1.2×10 ³	1.12×10 ⁵	2.5×10 ³
		S2	1.19×10 ⁴	9×10 ²	5.1×10 ⁴	1.5×10 ³
		mussel	1.58×10 ²	5.5×10	1.04×10 ⁴	6.3×10 ²

^a W1: Seawater sampled at the aquaculture farm

^b W2: Seawater sampled at the area distant from aquaculture farm

^c S1: Sediment sampled at the aquaculture farm (11.5m-depth)

^d S2: Sediment sampled at the area distant from aquaculture farm (13m-depth)

^e nd: Not detectable

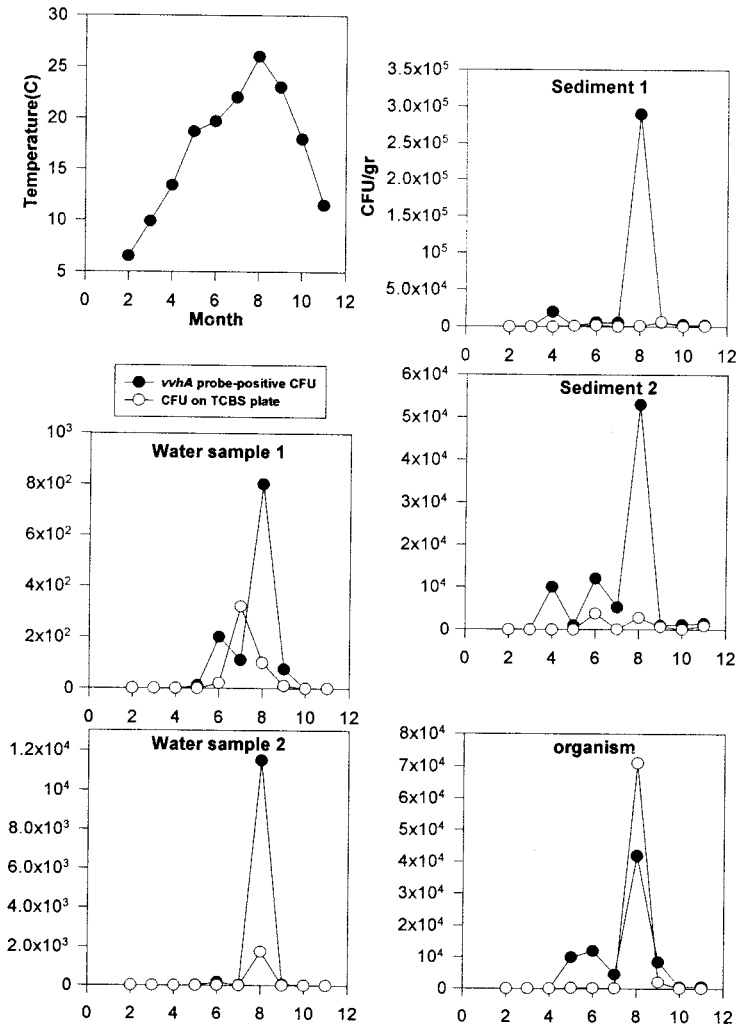


그림 102. selective medium (TCBS) 및 colony hybridization 방법에 의한 패혈증 비브리오균수의 측정 결과.

(다) 패혈증 비브리오균에 특이한 PCR 방법으로 배양이 되지 않지만 생존하고 있는(non-culturable but viable) 패혈증 비브리오균 존재의 파악 및 정량

환경 스트레스에 의하여 damage를 입은 비브리오균의 배양가능성의 급감소에 대하여 많은 연구진들이 동감하고 있다 (Ruby and Lee, 1998). 따라서 심한 상처를 입은 (그러나 아직도 감염 잠재성을 갖는) 패혈증 비브리오균이 선택배지는 물론

비선택배지 (LBS plate)에서도 성장하지 않는 경우가 있을 것이다. 이 경우 위의 1) 및 2) 방법으로는 그 수를 정량할 수 없으므로, 배양이 필요하지 않는 계수방법을 이용하였다. 즉, 패혈증 비브리오균에만 특이한 양성반응을 보이는 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 패혈증 비브리오균의 존재를 우선적으로 알아보고 most probable number (MPN) 통계방법으로 그 수를 짐작하는 방법론 (Lee and Ruby, 1995)을 본 연구에서 응용하였다.

이를 위하여, 패혈증 비브리오균의 *vvhA* 유전자에만 특이한 두 가지 set의 primers를 이용한 polymerase chain reaction (nested PCR)을 사용하였다. 본 방법의 장점은 첫 번째 set를 사용한 PCR 후, nested primer set으로 두 번째의 PCR을 수행하므로, 시료 내 template의 copy number가 낮더라도 이를 탐지하는데 있어서 그 민감도를 매우 증진시킬 수 있다는 것이다 (Lee et al., 1998).

위의 연구목적을 달성하기 위하여, 패혈증 비브리오균의 *vvhA* 유전자에만 특이한 두 가지 set의 primers를 이용한 polymerase chain reaction (nested PCR) 방법을 사용하였다 (전남대 최 상호교수의 도움). 이 방법은 간략하게 첫 번째 한 set (primer 1, 2; 그림 103)를 사용한 PCR의 결과 생성된 DNA 조각 내에 상보적인 염기서열을 갖는 nested primer set (primer 3, 4; 그림 103)으로 두 번째의 PCR을 수행하여 진행되기 때문에 (Yamamoto et al., 1990), 시료 내 template의 copy number가 낮더라도 이를 탐지하는데 있어서 그 민감도를 매우 증진시킬 수 있다는 장점을 갖고 있다. Nested-PCR을 하기 위한 해수 시료 5L를 filtering 및 centrifugation하여 농축시킨 것을 준비하였다. 농축된 cell pellet을 10 μ l ASW (또는 증류수)에 재부유한 후, 다음의 방법으로 bacterial cell lysate를 준비하였다. 즉 5회의 반복적인 freezing (-84 $^{\circ}$ C에서 1 분씩) 그리고 thawing (상온에서 30 초씩)을 실시하여 nested-PCR 반응을 위한 template로 사용하였다.

atgaaa aaaatgactc tgttaccct ttctctttaa
 cgtaaccgcg tacagggttg cgcacaagaa tatgtgccga ttgttgagaa acctatttac
 atcaccagct caaagattaa gtgtgtgttg cacacaagcg gtgatttcaa cgccacacga
 gactggtgta atgcggtgac ttccatcgat gttcgcgta atgtggcaca aatgcgctcg
 gtacaatcgg caacgtcaga tggttttact cctgacgcca aaattgtccg tttcaccgct
 gatgccgaca agcctggcac gggatttcat ttggttaacg agctacagca agatcacagc
 tggttccaga gttgggcaaa ccgccgact tacattggtc cattcgccag cagttacgac
 ctttgggtga aaccggttcc tggttacaca ccgaaaaaag cccgtgacct accgcagaat
 gagaacaaaa actaccaaca ccgcgatact tacggttact ccacggtat taacggcaaa
 gtaggtgctg aagtgaacaa agacggcccg aaagtgggtg gcgaagtcag tggctcattt
 acctacaact actcgaagac cttgggtgtt gatacaaaaag actatcgcat caacaaccgt
primer1-->
 tcatcattga gtgatttga tatttcattc gagcgtgaat ttggggaatg tgatgaactg
 cgccgccaag agcttggatg ctatttcacc gccgctcact ggggcagtgg ctgggtattt
primer3-->
 gataagacga agttcaacc tatctcttat tccaacttca aaccgaacta tgacgttttg
 tacgaagcgc ccgtgtctga aactggcgtg acggattttg agatgggctg gaaactcaac
 tatcgtgcac gcttgggtac cgttcttctc tcagcgtgt ttcgggtta cggctctgca
<--primer4
 ggctcgtcaa ccaacagcag tactgtgaaa caacgtattc gcacgactg gaatcaccca
 ctgtttgaa cgaacgaca cgttacctg cagtcactga gcaacaacga tctctgcctg
 gatgtttatg gtgagaacgg tgacaaaacg gttcgggtg gttcgggtta cggctggagc
 tgcacggca gttggaacca agttggggc ctagataaag aagaacgtta tcgtagccga
 gtggcatccg atcgttgttt gaccgtaaac gcagacaaaa cgctcacagt cgaacagtgt
 ggtgcgaact tagcacagaa atggtattgg gaaggcgata agctcattag ccgctatggt
 gatggcagta atactcgcta ccttctaaac attgttgggt gtcgtaatgt tcaagtaacc
<--primer2
 cctgaaaatg aagcaaatca ggcgcggttg aaaccacat tacaacaagt caaactctag

그림 103. *vvhA* gene (coding for hemolysin) 의 염기서열 및 nested PCR용 primer의 위치 및 방향.

첫 번째 PCR 반응에는 *V. vulnificus*의 chromosome 상의 *vvhA* 유전자에 특이한 forward primer (5'-GACTATCGCATCAACAACCG-3')와 reverse primer (5'-CCGTCATTATGAGCGATGGA-3')를 각각 1 μ 씩 사용하여 MgCl₂ (final conc. 2 mM), 10 \times buffer, 10 \times dNTP, *Taq* DNA polymerase를 첨가한 후 진행시켰다. 조건은 96 $^{\circ}$ C 에서 7분간 boiling한 후, 94 $^{\circ}$ C 1분, 55 $^{\circ}$ C 1분, 그리고 72 $^{\circ}$ C 1분씩 30 cycle을 실행하였다. 두 번째의 nested-PCR은 first-PCR을 통해 얻은 PCR 산물 (704 bp)을 template로 사용하여, 이에 특이한 두 primer를 forward primer (5'-GCTATTTACCGCCGCTCAC-3')과 reverse primer (5'-AAGCCAAATGCCGAGACGCC-3')로

각각 1 μ 씩 첨가하여 진행되었다. 두 번째 PCR 반응은 MgCl₂ 농도를 1mM로 조정하는 것 외에는 첫 번째 PCR과 동일한 조건에서 수행되었으며 그 결과, 222 bp 크기의 product가 얻어졌다.

자연 시료를 사용하기 전, 우선 optimal condition을 확립하기 위하여, 여러 농도 (10⁴ 10³ 10² 10¹ 1 0)의 *V. vulnificus* cell을 사용하여 PCR를 하였는데, 그 결과 첫 번째 PCR은 10³ cell까지 그리고 nested-PCR은 10¹ cell이 존재한다면 이들을 탐지할 수 있는 탐지한계로 확인되었다.

그러나 자연 시료를 사용한 PCR 결과, 위의 그림에서 보인 바와 같은 양성 반응을 얻을 수 없었다. 이는 바닷물의 농축 시, bacterial cell 이외의 것들 (예를 들면, 함께 농축된 조류 [algae] 및 부유물질)에 의한 PCR 반응의 효소인 *Taq* DNA polymerase의 방해의 원인이라 사료되었다. 따라서 이러한 영향을 알아보기 위하여 약 10⁵의 *V. vulnificus* cell을 농축시료에 더한 다음 첫 번째 PCR 및 nested-PCR 수행하여 그 결과를 살펴보았는데, 그 결과는 부정적이었다. 그러므로, non-culturable 상태의 패혈증 비브리오균의 존재를 알아보기 위한 시도는 성공적이지 않았다.

(라) 패혈증 비브리오균의 생태와 환경인자들간의 관계의 조사

환경 인자에 대한 연구 결과 중, 수온에 대한 영향을 알아보았는데, 배양 가능한 패혈증 비브리오균의 출현 (4월부터) 및 감소 (9월부터)는 수온과 매우 밀접한 관계가 있음을 밝혔다. 이러한 결과는 미국 동부 Chesapeake bay에서 수행된 실험 결과 (Wright et al. 1996)와도 매우 유사한 것이라 할 수 있다. 즉, *V. vulnificus*는 수온이 8 $^{\circ}$ C 미만일 때인 2월과 3월에는 발견되지 않았고, 수온이 8 $^{\circ}$ C 이상일 때인 5월, 7월, 9월에는 3.0 \times 10에서 2.1 \times 10² CFU/ml의 범위로 발견되었다. 제 1차년도 보고서에서와 같이 *V. vulnificus*의 수는 하절기에 집중적으로 발견되는데, 이와 같은 blooming에 대한 이유를 알아보기 위하여, *V. vulnificus*, 특히 DNA probe 및 선택배지를 사용하여 밝힌 패혈증 비브리오균의 농도(CFU/ml)와 그 서식처의 물리적 (수온), 화학적 (용존산소), 생물학적 (chlorophyll 농도, nitrate reductase 활성도) 요인들과의 상관성을 조사하였다 (그림 104).

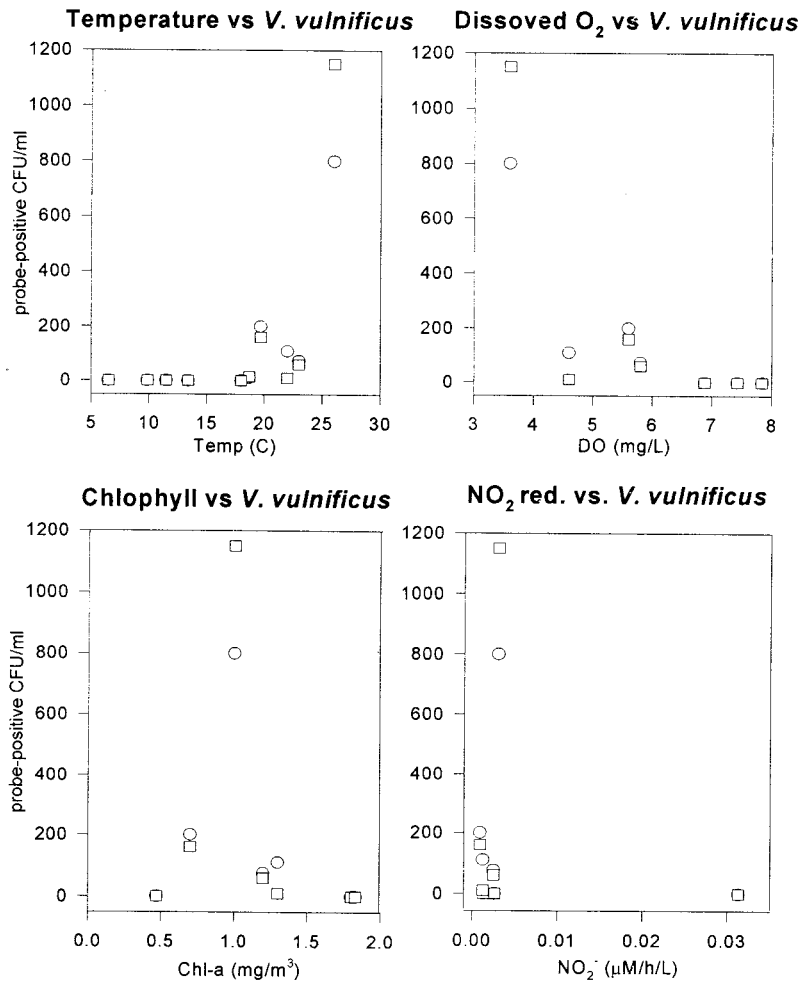


그림 104. 패혈증 비브리오균의 농도(CFU/ml)와 그 서식처의 물리적 (수온), 화학적 (용존산소), 생물학적 (chlorophyll 농도, nitrite reductase 활성도) 요인들과의 상관성.

이 결과, 패혈증 비브리오균의 농도 수온에 대하여 양의 관계 그리고 용존산소량에 대하여 음의 관계를 보이나, 다른 생물학적인 요인과의 상관성은 나타나지 않았다. 아울러 '온도의 생존에 대한 영향' 결과를 살펴보면 (제2차년도 보고서 참조), 특히 저온상태 ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) 에서 *V. vulnificus* 수의 급격한 감소, 그리고 다시 배양 온도를 높였을 시 *V. vulnificus* 수의 원상회복 (소생 과정) 함을 알 수 있었다 (그림 105).

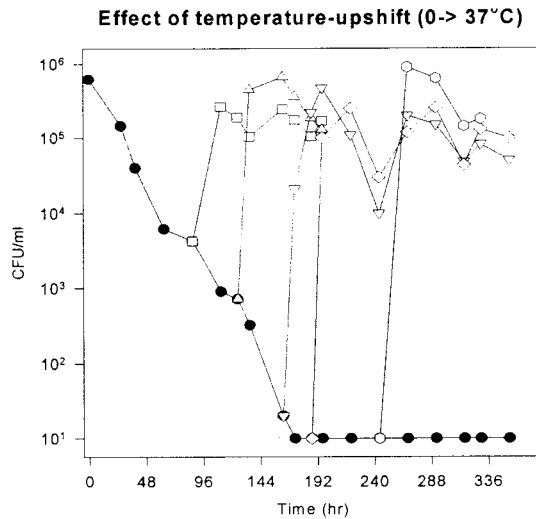


그림 105. 저온에서의 CFU 감소 (non-culturable 상태로의 진입) 및 고온처리 시 CFU의 재출현 (resuscitation)현상.

따라서 자연계에서 보이는 하절기 패혈증 비브리오균의 다량 발생 기작은 다음과 같이 추론할 수 있을 것이다. 동절기 낮은 수온에서 non-culturable 상태로 생존한 (극히) 일부 *V. vulnificus* 개체군이 수온의 증가에 따라 그 배양성이 회복되므로서 고체배지 상에 colony를 보일 수 있으며, 또한 전형적인 타가영양생물체 (heterotroph)인 culturable *V. vulnificus*는 소생 과정 후, 주변 해수 내의 영양분의 증가 (이는 감소된 DO로서 추론 가능함: 그림 104 참조)에 의하여 빠른 증식을 수행하므로서 결과적으로 7-8월 사이에 blooming을 보이는 것이며, 그 이후에는 다시 수온의 감소에 따라서 배양방법으로는 탐지할 수 없는 수준으로 점진적으로 감소하는 것이라 판단한다.

가두리 양식장 내에서 colony-hybridization방법으로 얻은 배양 가능한 패혈증 비브리오균의 계절에 따른 분포 (표 1 참조)를 살펴보면, 수온이 낮은 2-3월에는 패혈증 비브리오균이 보이지 않다가 4월 수온이 오르면서 그 개체수가 탐지되었다. 그 이후 8월까지 계속적으로 증가하는 수온과 함께 패혈증 비브리오균의 증가가 보였다. 그 이후 9월부터는 수온 및 패혈증 비브리오균의 수의 점진적인 감소가 보였다. 이러한 수온과의 상관관계는 해수 뿐 아니라 sediment 및 해양생물 내에 존재하는 패혈증 비브리오균의 경우에도 해당되는 일반적인 현상이라 판단된다.

(마) 패혈증 비브리오균의 시기별 그리고 어패류별 분포조사

① 시료 채취

㉠ 해수

2000년에는 강진 마량면 호남수산 가두리 양식장을, 그리고 2001년에는 완도 해역의 가두리 양식장의 해수를 표층과 심층에서 저질토를 채취하였으며, 대조구로 양식장으로부터 1km 떨어진 해수를 채취하여 균 분리원으로 사용하였다.

㉡ 어패류

가두리 양식장에 양식되고 있는 어류와 부착되어있는 홍합을 채집하여 우럭은 아가미를 그리고 패류는 전체를 시료로 이용하였다.

② 세균 분포 조사

㉠ 종속영양세균 분포

Zobell 배지에 시료의 희석액을 spread plate 방법으로 접종한 후 25°C에서 5일간 배양하여 나타난 colony 를 계수하였다.

양식장 해수에 존재하는 종속영양세균의 2000년 조사 결과는 $1.3 \times 10^3 \sim 6.8 \times 10^4$ CFU/ml로(대조구: $1.3 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^4$ CFU/ml)이었으며, 2001년에는 표층에 $2.6 \times 10^3 \sim 2.6 \times 10^4$ CFU/ml, 그리고 심층에 $2.1 \times 10^3 \sim 2.0 \times 10^4$ CFU/ml의 범위로 층간 차이는 거의 없었다. 그리고 외해인 대조구의 $1.3 \times 10^3 \sim 3.9 \times 10^4$ CFU/ml 와 큰 차이를 나타내지 않았다.

저질토에 분포하는 종속영양세균은 2000년에는 해수의 1000 배정도 높은 $6.6 \times 10^5 \sim 1.4 \times 10^7$ CFU/g dry soil 이 분포하고 있었다. 2001년도의 경우 $1.9 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^7$ CFU/g · dry soil 분포하고 있었다. 따라서 두 양식장 간에 큰 차이는 나타나지 않았다.

어패류의 경우 종에 관계없이 2000년에는 $0.1 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^5$ CFU/g dry weight 의 분포를 보였으나, 5월에 홍합에서는 1.0×10^6 CFU/g dry weight의 분포를 보였다. 시기별로는 큰 변화를 보여주지 않고 있다. 2001년에는 2월부터 8월까지 지속적으로 분포가 늘어났으며 10월부터 분포량이 감소하였다 (그림 106 ~ 109).

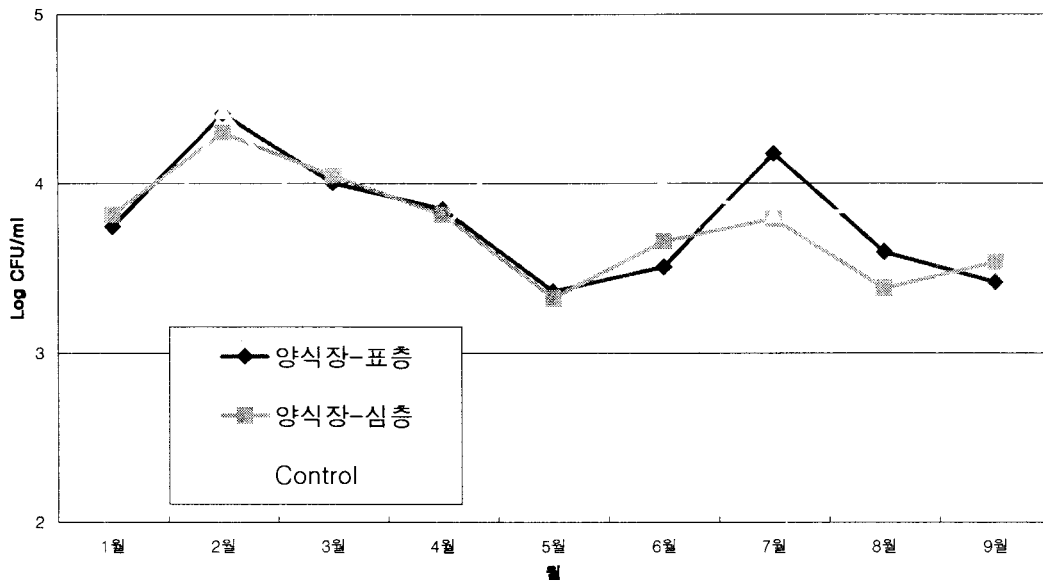


그림 106. 2000년 가두리 양식장 해수의 종속영양세균 분포.

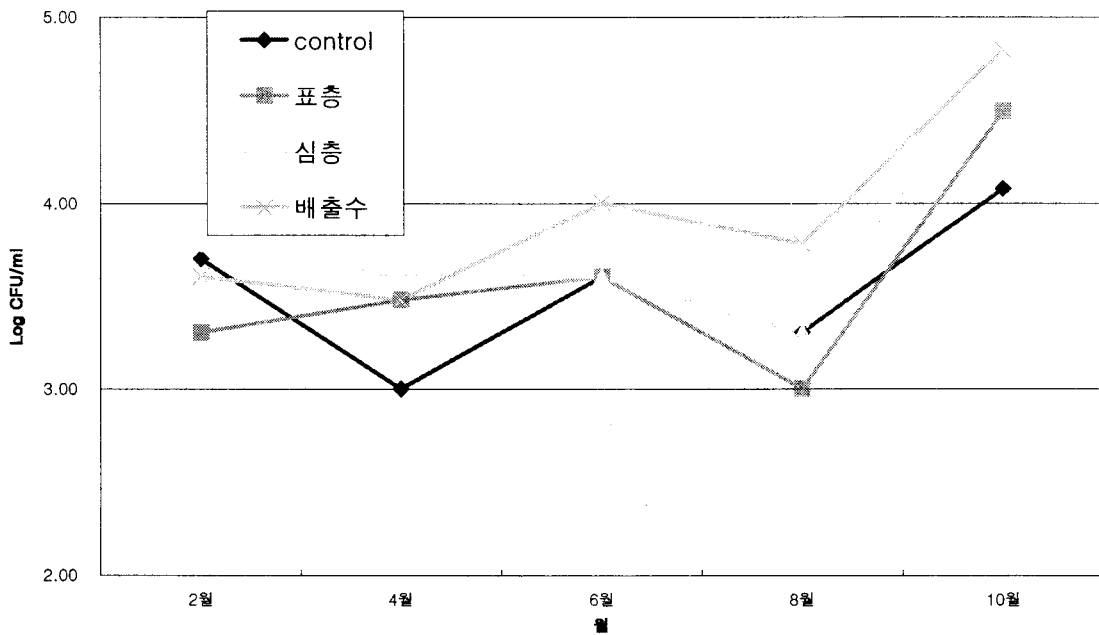


그림 107. 2001년 가두리 양식장 해수의 종속영양세균 분포.

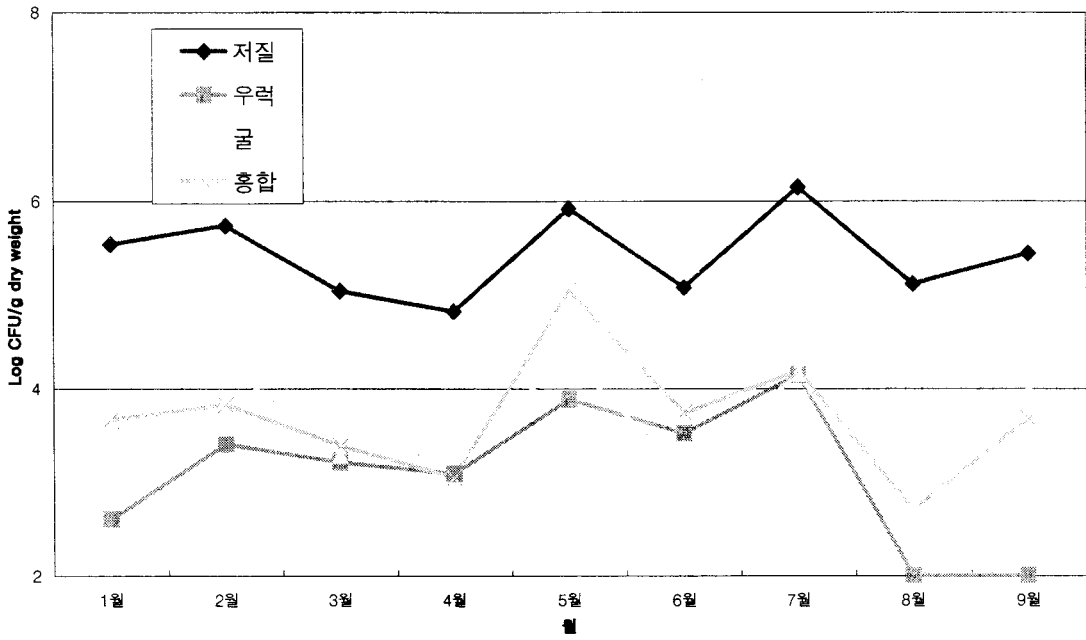


그림 108. 2000년 가두리 양식장 저질토 및 어패류의 종속영양세균 분포.

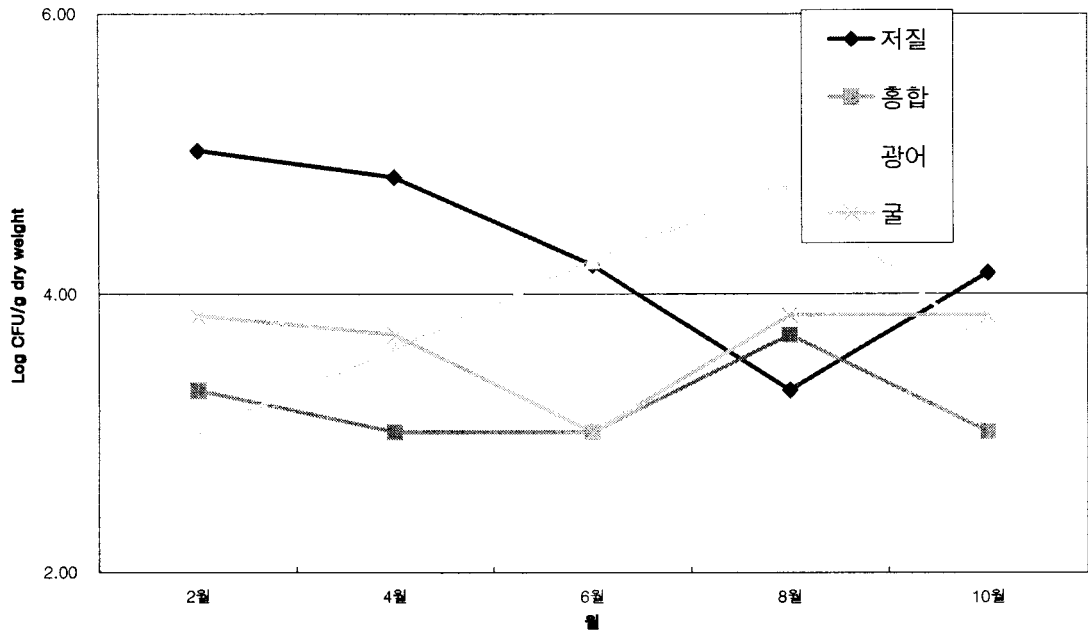


그림 109. 2001년 가두리 양식장 저질토 및 어패류의 종속영양세균 분포.

㉔ 비브리오 균 분포

Vibrio 속의 세균 분포는 thiosulfate-citrate-bile-sucrose (TCBS; Difco) 배지에 나타난 군락수를 계수하여 측정하였다. 이때 노란색을 띤 군락은 *Vibrio vulnificus* 형 vibrio로 계수하였다. 해수는 1 ~ 100 ml를 membrane filter(0.45 μ m pore size)로 여과하였으며, 어류의 아가미와 홍합은 2 ~ 3 g을 mixer로 갈아서 멸균 해수와 혼합하였고, 저질토는 2g 정도를 멸균해수와 혼합하여 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. TCBS 배지를 이용하여 시료의 희석액을 spread plate 방법으로 접종한 후 37°C에서 1일간 배양하여 나타난 colony를 계수하였다.

이결과, 해수에 분포하는 비브리오균은 2000년에는 4월까지의 거의 출현하지 않다가 온도가 상승하는 5월부터 출현하여 9월에 145 CFU/ml 까지 출현하였다. 동일한 시기에 대조구에서는 168 CFU/ml 까지 출현하였다. 양식장과 대조구 사이의 차이는 뚜렷하지 않았다. 2001년에는 ND ~ 2.0 × 10² CFU/ml 의 분포를 보였으며 종속 영양세균의 분포와 유사하게 10월을 제외한 나머지 계절에는 낮은 분포를 보였다. 양식장 저질토에는 2000년의 경우 전 시기에 걸쳐 출현하고 있으며 최고 3.0 × 10³ CFU/ g dry soil 의 분포를 보였다. 대조구에 비해 양식장의 수층에 분포도가 낮은 것은 항생제의 투여에 의한 것이라고 사료된다. 어류나 패류에는 5월부터 출현하기 시작하며 1 g당 0 ~ 3.4 × 10³ CFU 정도 분포하고 있었다.

2001년에는 저질토에 1.5 × 10¹ ~ 5.3 × 10³ CFU/g · dry soil 정도 분포하고 있었으며 6월부터 10월까지의 높은 분포를 보였다. 어패류에는 수온의 상승에 따라 2월부터 8월까지 지속적으로 분포가 늘어났으며 10월부터 분포가 감소하였다. 이러한 분포 양상은 종속영양세균의 분포와 유사하였다. 따라서 동계와 춘계에는 해수나 어패류에서는 vibrio의 증식이 일어나지 않음을 알 수 있었다 (그림 110~113).

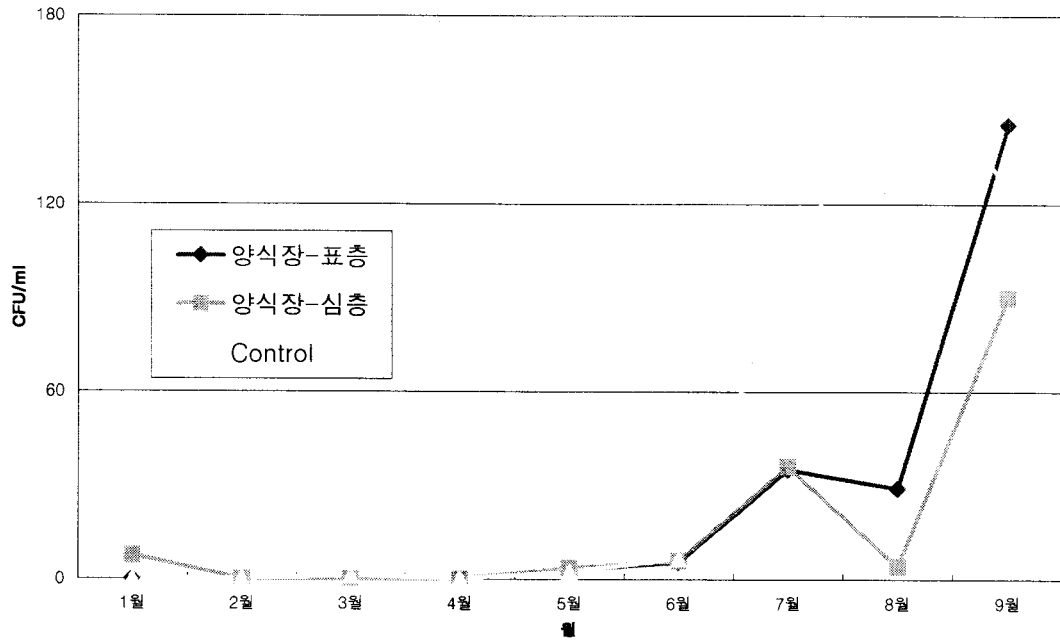


그림 110. 2000년 가두리 양식장의 해수의 vibrio 분포.

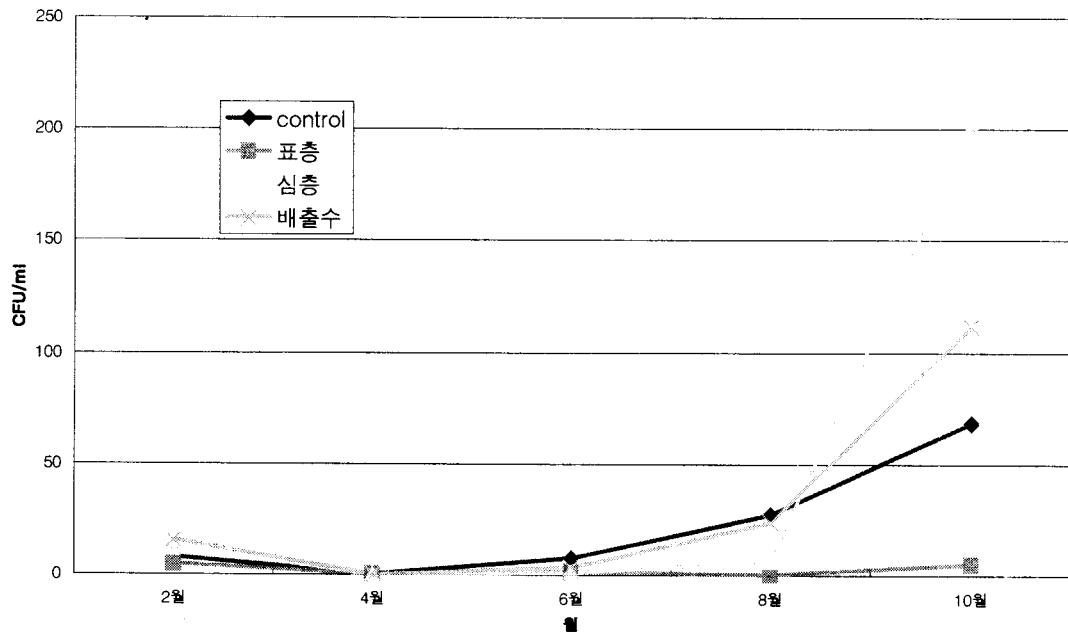


그림 111. 2001년 가두리 양식장의 해수의 vibrio 분포.

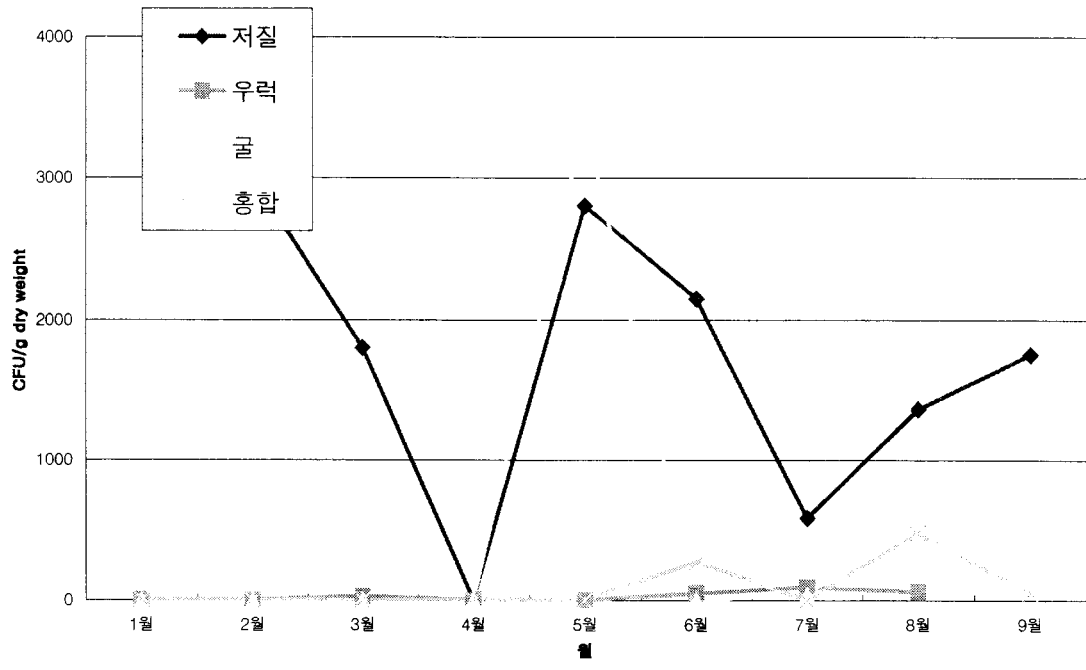


그림 112. 2000년 가두리 양식장의 어패류 및 저질토의 vibrio 분포.

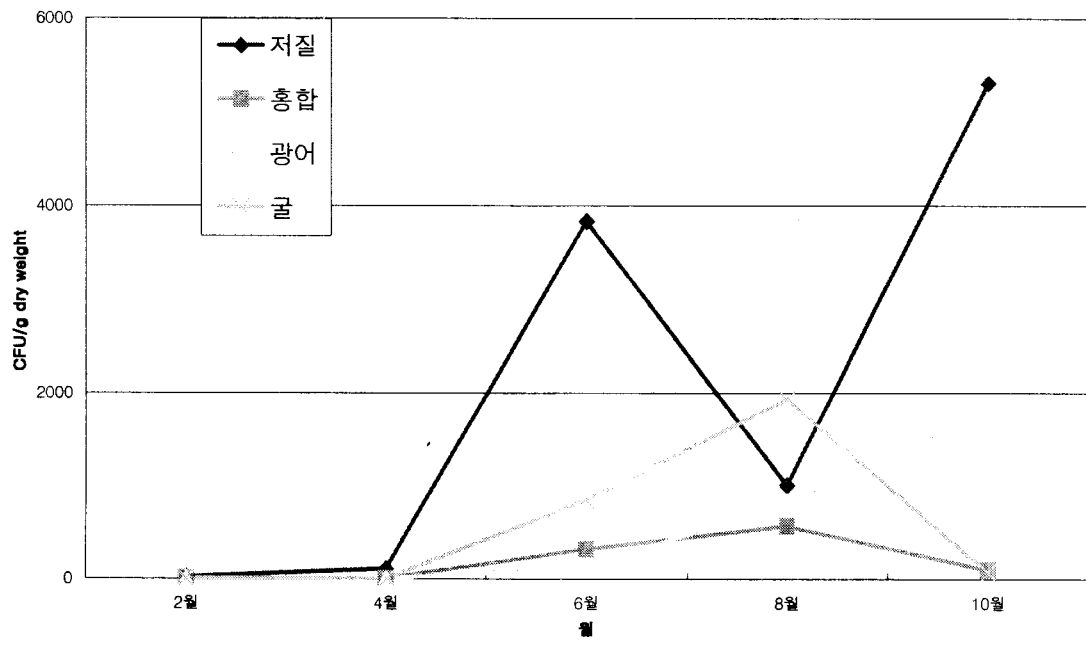


그림 113. 2001년 가두리 양식장의 어패류 및 저질토의 vibrio 분포.

㉔ 비브리오패혈증 균 분포

*V. vulnificus*를 검출하기 위해서는 동일한 방법으로 준비한 시료를 증균 배지인 2% NaCl이 첨가된 alkaline peptone water (APW, pH 8.4)에 넣고 18 ~ 24시간 증균 배양하였다. 증균된 배양액을 백금이로 취하여 TCBS 한천배지에 도말하여 37°C에서 18 ~ 24시간 배양한 후 노란색의 sucrose 음성 집락을 선별하여 Kligler's iron agar (KIA; BBL) 배지에 침지하고 37°C에서 18 ~ 24시간 배양한 후 lactose 분해능을 가지며 가스 생성능과 H₂S 생성능이 없는 균락을 선택하여 o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG, Sigma) 시험을 행하여 양성반응을 보인 균만을 Vitek 32로 최종적인 생화학적 동정을 행하였다.

증균배지에서 노란색 집락을 TCBS와 LBS 배지를 이용하여 순수분리한 후 Viotek kit 과 nested-PCR을 사용하여 동정하였다. 순수 분리된 비브리오균을 Viotek kit를 사용하여 동정한 결과 *Vibrio alginolyticus*, *V. damsela*와 *V. parahaemolyticus* 가 대부분이었으며, 패혈증을 유발하는 *V. vulnificus*는 저질토에서는 2000년 5월부터, 그리고 해수와 패류에서는 2001년 6월부터 9월까지 확인되었다. 2001년에는 6월과 8월에 저질에서만 검출되었다 (표 1). 즉, *V. vulnificus*는 수온에 영향을 받으며 해수나 어패류보다는 저질토에 분포하고 있음을 알 수 있었다.

㉕ 중합효소 연쇄 반응에 의한 *V. vulnificus*의 확인

Vitek 32에 의해 *V. vulnificus*로 동정된 균이 *vvhA* 유전자를 가지고 있는지 여부를 nested PCR로 확인하였다. DNA 추출은 Ausbel *et al.* (10)의 방법을 변형하여 수행하였고, nested PCR 조건은 Lee *et al.* (15)의 방법을 따랐으며 증폭된 222-bp의 DNA 절편은 1.5% agarose 전기영동을 실시하여 확인하였다.

3-2) 패혈증 비브리오균의 환경 스트레스에 대한 내성 탐색(2차년도)

본 연구의 대상 세균으로서 *Vibrio vulnificus* ATCC29307을 사용하였으며, 생존률 조사를 위한 배지로는 LBS (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 2.5% sodium chloride, 1.5% agar) plate를 사용하였다. 접종 후 배양은 30°C에서 수행하였고, 액체배지의 경우는 30°C, 200rpm에서 진탕 배양하였다. Exponential 상태의 세균은 18시간 culture를 계대 배양한 후 optical density (OD₆₀₀)가 0.2 - 0.3 정도인 배양액, 그리고 stationary 상태의 세균은 OD₆₀₀ 2.0 - 3.0 이상인 배양액으로부터 적정 부피를 채취한 후, 20°C에서 약 5분간 7,000 rpm으로 원심 분리하여 얻은 cell pellet을 얻었다. 다음 인공해수 (ASW; 0.1 M MgSO₄, 0.02 M CaCl₂, 0.6 M NaCl, 0.02 M KCl; pH 8.3)로 두 번 세척한 후, 세균 농도가 약 10⁶ CFU/ml이 되도록 부유액을 만들고, 다음과 같은 다양한 조건의 스트레스 조건에 노출시켰다. 아래와 같은 스트레스-microcosm 내에서 세균의 생존 능력의 변화를 측정하기 위하여, 일정한 시간 간격으로 일부분의 병원균을 채집하여 ASW를 사용 적당히 희석한 후, LBS agar plate에 도말하였다. 이 plate들을 30°C에서 배양하여 성장된 colony 수를 정량함으로써 그 생존도를 조사하였다.

(1). 온도

- 적정 온도(30-37 °C)
- 저온 (4, 10, 15, 20 °C)
- 고온 (40-42 °C)
- 온도의 변동 (0-->37 °C로의 배양 온도 상승)

(2). 산성도

- 적정 pH (pH 7-8)
- 산성 pH (pH 4)

(3). 산화적 충격

- 다양한 농도의 H₂O₂

이외에도 인체에 무해한 자연 산물 중 패혈증 비브리오균의 생존을 감소시키는 물질의 탐색하였는데, 이 중에서 chelator 기능을 갖는 phytic acid 및 EDTA의 병원균 생존에 대한 영향을 조사하였다.

(가) 온도가 패혈증 비브리오균의 생존에 미치는 영향 조사

① cold-shock의 영향

LBS 배지에서 exponential phase 상태로 성장하고 있는 *V. vulnificus* cell을 모아 ASW에 resuspension하여 나눈 후, 각각을 낮은 배양온도 즉, 4, 10, 20 °C에서 배양시키면서 그들의 생존 능력의 변화를 적정온도인 30°C 및 37°C의 것과 비교 조사하였다 (그림 114). 10°C 미만의 온도 조건 하에서 패혈증 비브리오균이 급격한 CFU/ml의 감소를 나타냈으므로 그 생존능력이 크게 떨어짐을 알 수 있었다. 그러나 이 경우 실제 세균이 사멸한 것인지 아니면 LBS agar plate 상에서의 배양성 감소인지에 대한 조사가 필요할 것이다 (1-3항 참조).

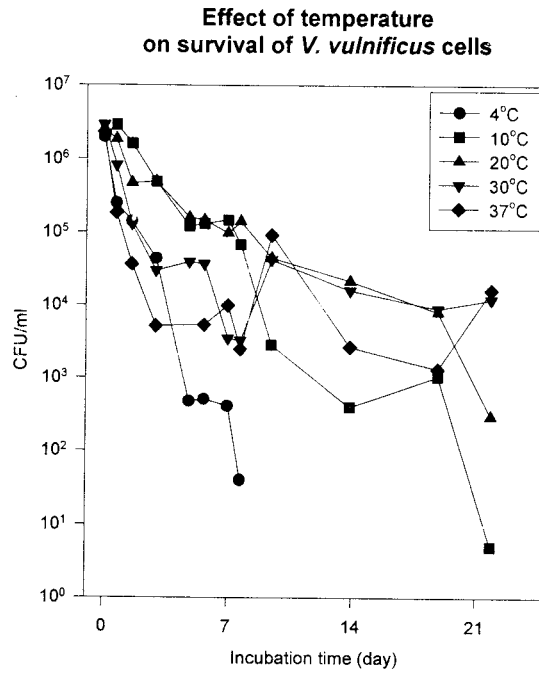


그림 114. 패혈증 비브리오균의 생존에 미치는 저온의 영향.

② heat-shock의 영향

LBS 배지에서 exponential phase 상태로 성장하고 있는 *V. vulnificus* cell을 모아 40°C의 ASW 또는 42°C의 LBS에 resuspension한 후, 그들의 생존 능력의 변화 및 성장능력을 조사하였다. 이 결과 40°C의 ASW에서의 생존은 약 2일 간의 감소 후 다시 회복하였으며, 42°C의 LBS에서의 성장은 30°C에 비해 그 성장률은 느리지만 4일간 지속적인 개체수의 증가를 보여주었다 (그림 115). 그러므로 약 40°C ~ 42°C 정도의 고온에서 패혈증 비브리오균은 그 생존 및 성장이 계속 유지됨을 알 수 있었다.

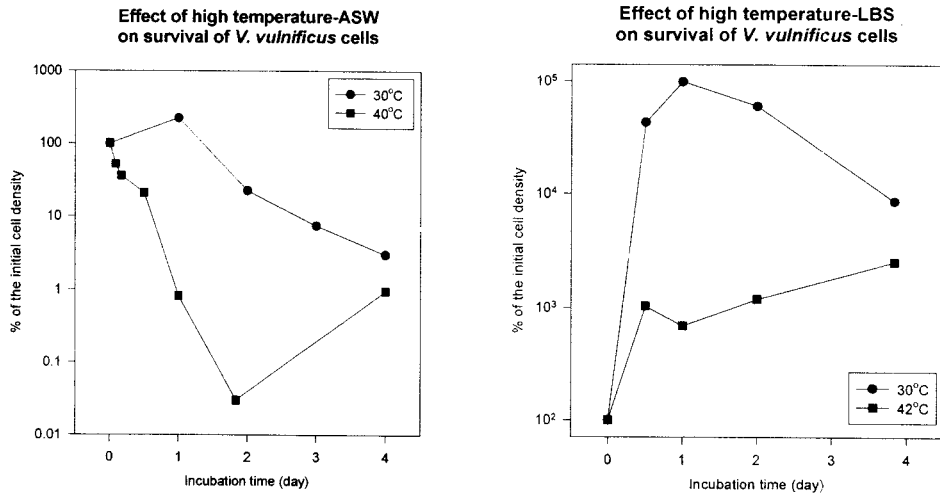


그림 115. 패혈증 비브리오균의 생존에 미치는 고온의 영향.

③ 온도의 변동 (0-->37도로의 온도 상승)

위의 결과로부터 10°C 미만의 낮은 온도에 노출되는 경우, 패혈증 비브리오균의 생존이 크게 영향을 받는다는 사실이 관찰되었다. 이러한 저온 처리가 이 세균을 완전히 사멸시킨 것인지, 아니면 배양성 (culturability)만을 감소시킨 것인지에 대한 조사가 매우 중요한 문제이기에, 낮은 온도 하에 존재하던 패혈증 비브리오균의 배양온도를 상승시키는 경우, 이 세균의 resuscitation (소생) 여부를 조사하는 실험을 수행하였다. 0°C 조건의 ASW-microcosm 내 *V. vulnificus*의 CFU/ml 수가 일정 수준 이하로 감소시킨 후, 온도 조건만을 37°C로 변화시키면서 CFU/ml 수 변화를 보았다. 아래의 그림에서와 같이 온도를 upshift시켰을 때, 감소되었던 CFU/ml 이 초기의 값만큼 다시 회복되는 것을 보였다 (제 1차년도 결과 부분의 그림 117 참조).

이 때 사용된 배양액이 아무런 영양분도 포함되지 않은 ASW이므로, 이 회복은 몇몇 살아있던 세균들의 증식 때문이라기보다는 패혈증 비브리오균이 낮은 온도에서

있었던 배양성 (culturability)을 회복 (resuscitation)한 것이라 판단된다. 따라서 고온에서와 마찬가지로, 저온처리 시에도 패혈증 비브리오균의 완전한 사멸은 기대하기 어렵다고 판단된다. 그러나 Biosca et al. (1996)에 의하면 장어에 병원성인 *V. vulnificus* biotype 2의 25℃와 5℃ 하에서의 생존을 패혈증비브리오 biotype 1과 비교하였는데, 그 결과 온도가 25℃일 때는 최소한 50일이 되도록 비브리오의 free-living form을 잃지 않은 반면, 낮은 온도 (5℃)에서는 활성도가 줄어들었고, 크기와 형태의 변화를 보여주며, non-culturable state로 전환됨을 보였다. 그럼에도 불구하고 배양 가능한 패혈증 비브리오균이 장어와 쥐 (mice)에 감염되는 것에 비해 non-culturable cell은 그들의 virulence를 잃는 것으로 보고되었다 (아래 제 4항의 내용 참조).

(나) 산성도가 패혈증 비브리오균의 생존에 미치는 영향을 조사

Exponential phase 상태의 *V. vulnificus* cell을 모아, 산성인 LBS (pH 4)와 ASW (pH 4)에 노출시키면서 그들의 생존 정도를 중성의 ASW (pH 7)에서의 생존도와 비교하였다 (그림 116). 이러한 비교 결과, 산성 LBS 배지에 노출된 패혈증 비브리오균의 생존이 산성 (pH 4)에 의해 큰 영향을 받는 반면, 48시간 이상 산성 ASW에 노출된 패혈증 비브리오균의 생존은 중성의 것과 많은 차이를 보이지 않으므로, 패혈증 비브리오균이 주위 배지 조건에 따라서 산성에 대한 어느 정도의 적응성을 갖을 수도 있다는 것을 암시하고 있다. 다시 말하자면, 산성이라는 스트레스가 영양 고갈상태 (즉, ASW 배지)와 함께 가해질 때, cross-protection 현상을 보이므로, 이 경우 산성이라는 스트레스의 패혈증 비브리오균의 사멸에는 그다지 큰 역할을 기대하기 어려움을 알 수 있었다.

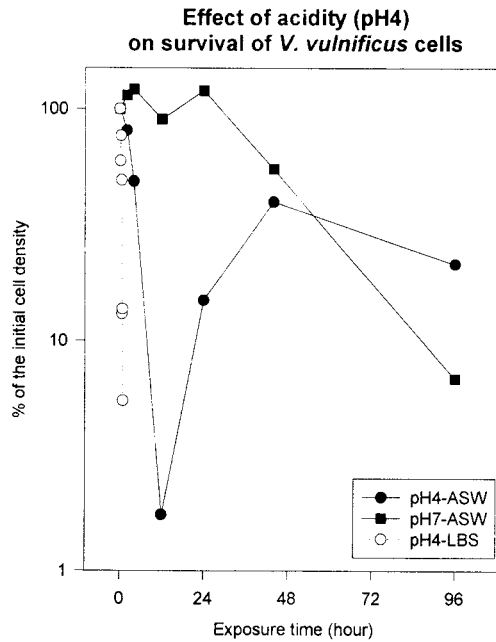


그림 116. 패혈증 비브리오균의 생존에 미치는 산성도의 영향.

(다) 산화적 충격이 패혈증 비브리오균의 생존에 미치는 영향을 조사

① 다양한 농도의 H₂O₂를 처리

Exponential phase 상태의 패혈증 비브리오균을 다양한 농도의 H₂O₂ (0.0003, 0.001, 0.003, 0.005, 그리고 0.01%)에 노출시키면서 약 3시간 동안 이 병원균의 생존을 관찰하였다. 산화적 충격에 대한 많은 연구가 진행되어온 대장균 (*E. coli*) 등과 비교하여 실험을 수행하였는데, 그 결과 패혈증 비브리오균의 경우 0.001%라는 매우 낮은 농도의 H₂O₂에도 민감하여 빠른 시간 (예를 들면, 60분 이내) 내에 그 수가 매우 급격히 감소함을 보였다 (그림 117). 따라서 낮은 농도의 H₂O₂가 보이는 인체 유해성 여부가 조사된 후, 이 물질의 억제제 사용 여부가 판단될 수 있을 것이다. 아울러 이러한 패혈증 비브리오균의 산화적 충격에 대한 민감한 반응을 이해하기 위하여, 보다 심도 있는 분자유전학적인 연구가 필수적으로 수행되어야 한다고 생각한다.

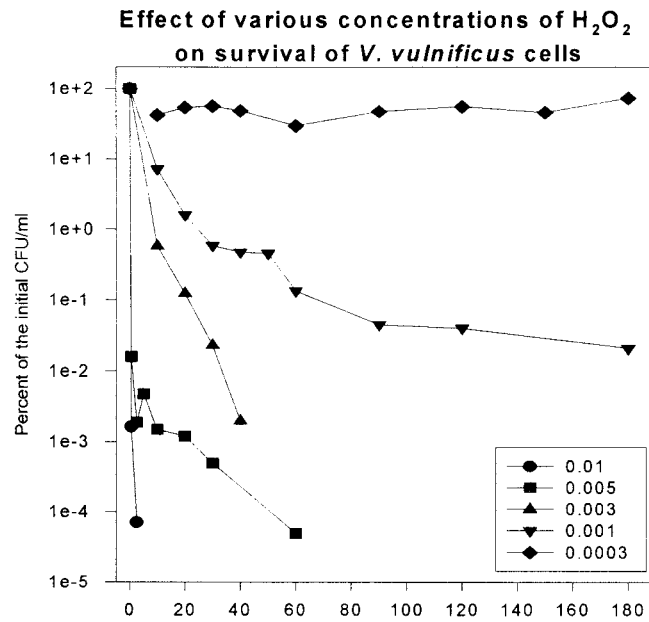


그림 117. 패혈증 비브리오균의 생존에 미치는 산화적 충격 물질 (과산화수소수)의 영향.

(라) 현장평가 지적사항에 대한 보완실험 - 패혈증 비브리오균의 환경탐색 스트레스에 대한 내성탐색에서 viable but non-culturable 상태 및 소생 (resuscitation) 가능성

*V. vulnificus*의 특이한 생리적인 특징인 non-culturable but viable state와 culturable state 사이의 전환 가능성은 이 세균의 생존 조사에 있어서 반드시 고려해야 할 사항이라 판단한다. 본 연구진이 수행한 연구에는 모두 3가지의 환경 스트레스를 조사하였다. 첫째, 온도의 경우에는 위에서 설명한 바와 같이 그 가능성을 구체적으로 증명할 수 있었다 (1항 참조). 그러나 다른 두 가지의 환경요인, 즉, 산성도 및 산화적 충격에 대한 내성 조사의 경우 resuscitation을 조사하기에는 다음과 같은 실험적인 문제점으로 인하여 소생가능성에 대한 정확한 연구가 어려웠다.

① *V. vulnificus* cell을 pH 4인 LBS (영양배지) 및 pH4인 ASW (인공해수 - no carbon/nitrogen source)에 노출시키면서 그들의 생존 정도를 중성의 ASW에서의 생존도와 비교한 결과, 산성 LBS 배지에 노출된 패혈증 비브리오균의 생존이 큰 영향을 받는 반면, 48시간 이상 산성 ASW에 노출된 패혈증 비브리오균의 생존은 중성의 것과 많은 차이를 보이지 않았다. 이는 산성도라는 stress가 영양고갈상태 (즉, ASW 하에서의 starvation)와 함께 가해질 때, cross-protection 현상을 보이므로, 이 경우 산성 stress의 패혈증 비브리오균의 사멸 조사를 정확히 수행할 수 없다는 문제점이 있었다.

② 영양배지 조건하에서 산성도 및 산화적 충격 후, resuscitation 과정을 조사하기 위하여 주어진 스트레스를 제거 (즉 배지의 중성화 및 H₂O₂의 제거)하면, 일부 살아남은 culturable *V. vulnificus* (이 시기 *V. vulnificus* population의 대부분은 non-culturable 상태임)가 영양배지 내에서 급격하게 성장 (regrowth)함에 따라, 증가된 CFU 중 어느 정도가 resuscitation에 의한 것인지를 알 수 없었다.

그러므로, 다양한 stress 하에서 이 세균의 non-culturable but viable 상태로의 존재 및 resuscitation 과정의 가능성의 중요성은 인식하나, 이를 정확히 조사하기에는 현재로서는 불가능하다고 판단한다. 그러나 평가위원의 의견에 따라 cross-protection이 존재하는 조건 하에서라도 비슷한 실험을 수행하여 (즉, 산성-ASW 및 H₂O₂-ASW하에서의 non-culturable but viable 상태로의 존재 가능성 및 산성 및 H₂O₂ 제거 시 resuscitation의 가능성) 그 결과를 본 보고서에 기재하면 다음과 같다.

③ 산성도 스트레스

Exponential phase 상태의 *V. vulnificus* cell을 산성 (pH 4) ASW에 2시간 노출시킨 후 세균만을 모아 중성 (pH 7) ASW에 재부유한 다음 총 4시간 동안 *V. vulnificus* 세균 수를 조사하였다. 그 결과 초기 2시간동안 감소하였던 CFU/ml (초기 2.0×10^6 cell/ml \rightarrow 1.5×10^5 cell/ml) 가 중성 pH에서 초기 세포수의 약 61% 까지 (1.2×10^6 cell/ml)다시 증가했음을 보였다. 따라서 산성도 (+ 영양결핍 조건)에 의한 세균수의 감소는 실제 세균의 사멸이라기보다는, 감소된 CFU/ml의 약

60% 정도는 non-culturable but viable 상태로 진입한 상태이며, 이러한 세균은 증성의 조건에서 다시 소생할 수 있음을 보여주는 것이라 판단된다.

④ 산화적 충격 스트레스

Exponential phase 상태의 패혈증 비브리오균을 H₂O₂ (0.0003%)가 함유된 ASW에 노출시키면서 약 4시간 동안 이 병원균의 생존을 관찰한 결과, 2.5시간 이상 노출시킨 경우 어떠한 CFU도 얻을 수 없었다. 4시간째 되는 배양액 (즉 *V. vulnificus* CFU가 2.5×10^7 cell/ml → 0 CFU/ml가 되어 탐지되지 않는 배양)으로부터 세균만을 모아 H₂O₂가 함유되지 않은 ASW로 재부유한 결과, 어떠한 *V. vulnificus* CFU도 출현하지 않았다. 이러한 결과는 적어도 4시간 동안 H₂O₂에 노출된 *V. vulnificus*가 배양 불가능하지만 생존된(non-culturable but viable) 상태로 진입한 것이라기 보다는 사멸된(dead) 상태로 진입하여 사멸한 결과라고 짐작할 수 있다.

(마) 인체에 무해한 자연 산물 중 패혈증 비브리오균의 생존을 감소시키는 물질의 탐색

일본 보건복지부에 의해 자연물로 승인된 바 있는 피틴산 (phytic acid)은 거의 모든 식물체에 존재하는 organic phosphoric acid의 ester인 myo-hexaphosphoric로서 (그림 118), 물을 비롯한 polar solvent에 잘 용해되며, pH 5 ~ 10 조건 하에서는 열에 대한 내성이 있어서 100°C 이상에서도 거의 분해되지 않는 특성을 지닌 물질이다. 이 물질은 EDTA와 같이 강력한 chelation 능력을 보이는데, 다른 chelating agent와는 다르게 산성과 알칼리성에 이르기까지 광범위한 pH 범위에서도 강력한 chelation 능력을 나타내는 특징이 있다 (그러나 이 부분에는 의문의 여지가 있음: 5-2-2항 참조). 이 물질을 pH 3 ~ 10사이의 solution으로 쥐에게 오랜 기간 투여한 실험 결과, 전혀 독성을 나타내지 않았다고 보고되어 인체에는 무해하다고 여겨지고 있다.

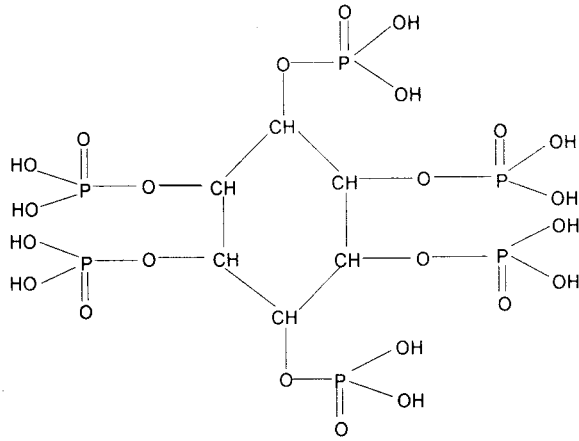


그림 118. 피틴산 (phytic acid)의 구조식.

패혈증 비브리오균은 그들의 생존 및 병원성의 유지를 위하여 철을 비롯한 금속류의 존재를 필수적으로 요구하고 있다. 따라서 본 연구에서는 phytic acid (Sigma Co. 및 협신양행 제품)를 패혈증 비브리오균에 처리한 후, 이 세균의 생존에 대한 효과를 조사하였다. 정량적인 비교를 위하여 EDTA가 패혈증 비브리오균의 생존에 미치는 영향을 함께 수행하였다.

①협신양행의 제품의 phytic acid

㉠ pH 조정 없이 (50% 원액의 pH는 1.5 이하) 사용한 경우:

Phytic acid가 다양한 농도로 패혈증 비브리오균에 처리되었을 때, 패혈증 비브리오균의 LBS에서의 성장 여부를 비교하면서 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)을 결정하였다. 그 결과, 아래의 표 5와 같이 약 0.27%의 농도의 phytic acid가 MIC로 나타났다.

표 5. LBS 배지에서 *V. vulnificus* 성장에 대한 원액 피틴산 (협신양행 제품)의 MIC.

dilution factor (%)	OD at 600nm (after 24 hr incubation in LBS)
0.31	0.054
0.27*	0.059
0.25	0.376
0.22	7.13
0.19	6.83
0.16	6.88
0.078	5.78
0.039	6.04
0.02	5.97
0	5.09

아울러 사용한 phytic acid의 독성 여부 및 그 정도를 정확히 판단하기 위하여, 본 연구진이 개발한 발광세균을 이용한 독성검사 시스템에 이를 적용시켜 보았다 (김 등, 2000; Lee *et al.*, 2001). 그 결과, 발광의 정도를 50% 감소시키는 phytic acid의 effective concentration (EC₅₀; 표 6)는 0.09 - 0.23%로 나타나 이 경우 (예상과는 다르게) 매우 독성이 있음을 보였다.

표 6. 발광세균을 이용한 원액 피틴산 (협신양행 제품)의 Toxicity test.

Exposure tome (min)	EC ₅₀ (%)
5	0.234
15	0.114
30	0.094

㉞ pH를 7-8로 titration한 경우:

이렇듯 협신양행의 phytic acid가 높은 독성을 보이는 이유가 협신양행에서 제조한 phytic acid 용액의 낮은 산성도에서 기인한다고 판단되어, 그 용액의 pH를 7-8

로 조정하여 유사한 실험을 수행하였다. 그 결과 pH를 7-8로 titration한 경우, 1.25%의 phytic acid를 사용한 경우에도 패혈증비 브리오균에 대한 아무런 inhibition을 보이지 않아 독성의 정도가 나타나지 않았다 (표 7). 그러나 1.25% phytic acid에 해당되는 농도의 EDTA (즉, 17.5 mM)의 경우에는 67.3%의 growth inhibition을 보였다. 이러한 결과는 위의 제품이 chelation 역할에 의한 패혈증 비브리오균의 사멸이 아닌 강산성에 의한 사멸임을 알 수 있었으며, 이 세균의 억제제로서의 사용이 어려움을 보여준 결과라 할 수 있다.

표 7. LBS 배지에서 *V. vulnificus* 성장에 대한 pH7-피틴산 (협신양행 제품)의 MIC.

dilution factor (%)	OD at 600nm (after 16-18 hr incubation in LBS)
1.25	3.69
0.63	3.71
0.31	3.62
0.16	4.11
0	3.73

① Sigma사로부터 구입한 phytic acid (pH 7.5)

가 협신양행제품의 phytic acid 사용의 의미가 희석되었으므로, 보다 정제되어 있는 Sigma사의 phytic acid를 사용하였다. 이 경우, 다양한 농도의 phytic acid가 패혈증 비브리오균의 성장에 미치는 inhibition 정도를 조사한 결과, 매우 높은 농도의 phytic acid의 경우만, 즉, 100 mM의 농도에 노출된 경우에 성장이 약 27% 감소함을 보였다. 아울러 다른 종류의 성장 배지를 사용한 경우에서도, 100 mM의 농도에 접한 경우에만 성장이 약 20% 감소하였다 (표 8).

표 8. LBS 배지에서 *V. vulnificus* 성장에 대한 피틴산 (Sigma 제품)의 MIC.

concentration (mM)	OD at 600nm (after 24 hr incubation in LBS)
100	4.07
90	4.18
70	5.13
50	5.92
40	6.35
30	7.00
20	6.96
10	7.21
5	6.93
1	7.61
0.1	7.53
0	5.59

Ⓛ Chelator 역할을 보이는 적정 pH 하에서의 연구: phytic acid (pH 4)

17.5 mM의 EDTA는 패혈증 비브리오균의 성장을 LBS영양배지에서는 67.3%, 그리고 ASW-glucose 배지에서는 24.8% 억제시키는 효과를 보였다. 이 수치는 Sigma사의 pH 7.5로 조절된 phytic acid가 보이는 억제 정도가 EDTA에 비하여 살균력이 저조함을 제시하고 있다. 이러한 phytic acid의 패혈증 비브리오균에 대한 뚜렷한 억제효과를 보이지 못하는 이유는 phytic acid가 산성 pH 조건하에서만 강력한 chelation 기능을 보이기 때문이라 생각된다. 따라서 pH 4로 적정된 phytic acid를 사용하여 패혈증 비브리오균에 대한 영향을 같은 pH의 EDTA와 비교하여 수행하였다.

이 결과 phytic acid의 사멸효과는 concentration dependency (0 - 50 mM의 phytic acid)를 보였으며 (그림 119), 약 50 mM의 미만의 농도 하에서는 패혈증 비브리오균의 성장 상태 (예를 들면, balanced growth 상태인 exponential phase의 세포 [그림 119-A], 또는 영양고갈상태인 stationary phase의 세포 [그림 119-B])와는 무관하게 효과적인 사멸률을 나타내었다.

(A) 지수기세균

(B) 정체기 세균

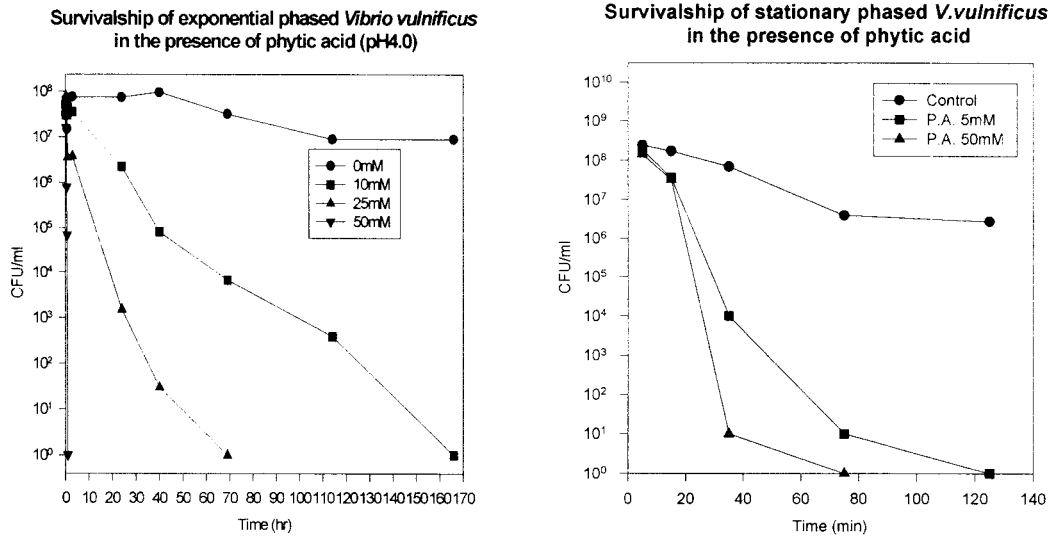


그림 119. 피틴산 존재 하에서 패혈증 비브리오균의 생존.

또한 이 사멸효과는 매우 강력한 chelator로 알려진 EDTA와 비교할 정도의 사멸 또는 억제 효과를 나타내었다 (그림 120). 이러한 결과는 추후 (제 3차년도 연구), 이 물질을 이용한 어패류 내의 패혈증 비브리오균의 억제에 이용가치가 있다는 것을 보여준다 하겠다.

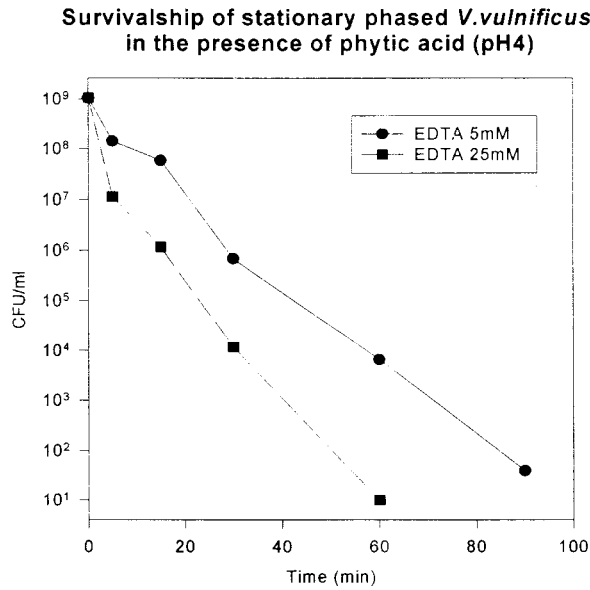


그림 120. EDTA (pH 4) 존재 하에서 패혈증 비브리오균의 생존.

3-3) 바다/갯벌-microcosm내에서의 패혈증 비브리오균의 생존 조사 및 제어방법 탐구(3차년도)

(가) 자연해수 microcosm 실험에 있어서 피틴산의 사용 가능성 타진

패혈증 비브리오균은 그들의 생존 및 병원성의 유지를 위하여 철을 비롯한 금속류의 존재를 필수적으로 요구하고 있다. 따라서 본 연구에서는 인체에 무해하다고 알려져 있는, 모든 식물체에 존재하는 organic phosphoric acid의 ester인 피틴산 (Sigma Co.)을 패혈증 비브리오균에 처리한 후, 이 세균의 생존에 대한 효과를 조사한 바 있다. 이 결과, 최대 chelator 기능을 보이는 조건 (예를 들면, pH 4)에서 피틴산의 사멸효과는 concentration dependency (0 - 50 mM의 phytic acid)를 보였으며, 약 50 mM의 미만의 농도 하에서는 패혈증 비브리오균의 성장 상태 (예를 들면, exponential phase 또는 stationary phase)와 상관없이 효과적인 사멸률을 나타내었다 (그림 121 : 제 2차년도 결과). 이러한 결과는 이 물질을 이용한 어패류 내의 패혈증 비브리오균의 억제에 이용가치가 있다는 것을 보여준다 하겠다.

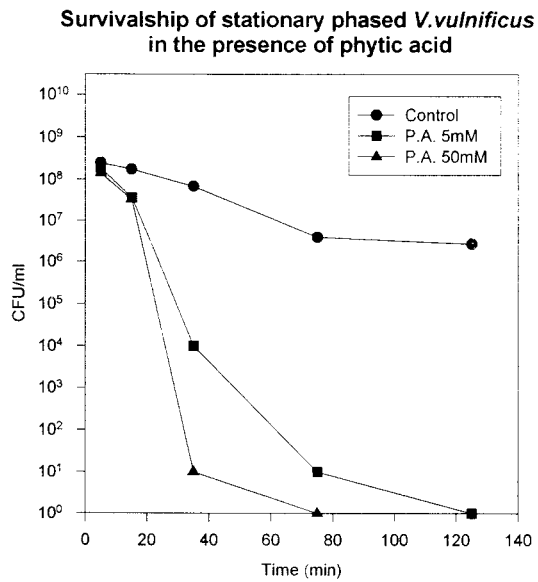


그림 121. pH 4 조건하에서 피틴산의 패혈증 비브리오균 (정체기 세포) 사멸효과.

실제 바닷물의 경우 그 산성도는 평균 8.3으로 알려져 있다 (실제 전남지역의 해수 및 갯벌의 경우도 마찬가지임: 제1차년도 결과 참조). 따라서 중성-약알칼리성 조건하에서 피틴산의 패혈증 비브리오균 사멸효과를 살펴보았다 (그림 122). 그러나 pH 7.5의 인공해수에서 피틴산은 50 mM 농도를 사용한 경우에도 대조군과 비교하여 사멸 효과를 보여주지 않았다.

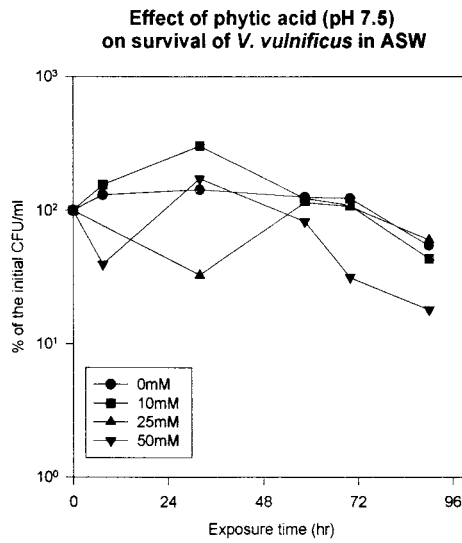


그림 122. pH 7.5 조건하에서 피틴산의 패혈증 비브리오균 사멸효과.

이번에는 인공해수가 아닌 자연해수 (서해 바닷물 채취)에 피틴산을 첨가하여 패혈증 비브리오균 사멸효과를 보고자 하였다. 그러나 그림 123에서 보는 바와 같이 피틴산의 첨가는 해수 내 염분이온들의 침전을 야기 시켰다. 침전물의 양은 첨가된 피틴산의 양과 비례하였다.

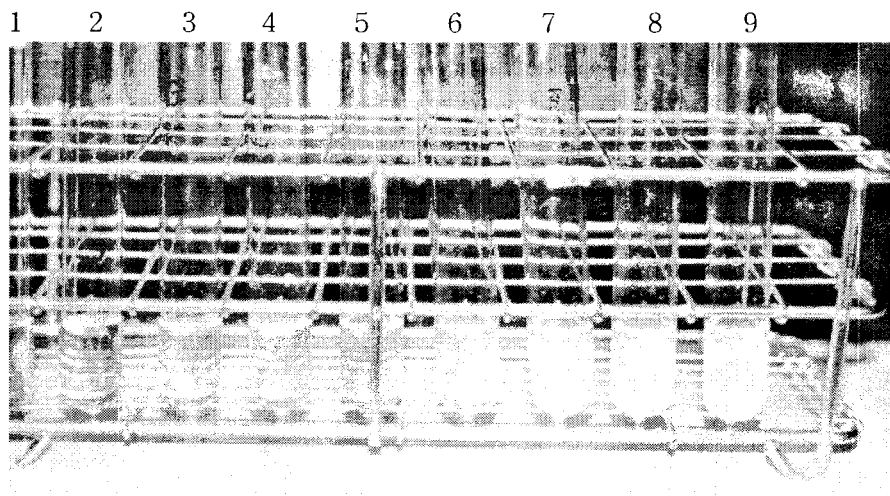


그림 123. 피틴산 첨가에 따른 해수 내 침전물 (시험관 1부터 9에는 최종농도 0, 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mM의 피틴산이 첨가됨).

따라서 자연 해수 내에 피틴산을 첨가하고자 한 실험은 위의 두 가지 이유, 즉, 해수 산성도에서는 chelator 역할을 할 수 없으며 해수에 첨가 시 해수 내 염분들의 침전으로 인하여 그 사용이 불가능하였다. 그러므로 이를 대체할 다른 종류의 chelator들을 탐색하였다.

(나) 피틴산을 대신할 chelator의 선택

인체에 무해한 chelator로서 몇 가지를 자료 탐색한 결과, 강력한 chelator 중 하나인 EDTA는 식품첨가물로 사용되고 있다. 그러므로 본 연구팀은 우선 EDTA로의 대체 가능성을 알아보하고자 다음과 같은 패혈증 비브리오균에 대한 영향을 조사하였다. 그러나 이미 전남대 의대의 정 선식, 양 한모, 이 준행 교수팀에 의하여 자연 상태가 아닌 증류수 내 존재하는 패혈증 비브리오균의 살균에 있어서 EDTA의 첨가 효과에 있어서 그 살균효과가 우수함이 보고가 있었다 (정 등, 1989). 따라서 본 연구에서는 증류수가 아닌 비교적 자연 해수 및 갯벌 상태를 모사한 조건에서 EDTA의 효과를 여러모로 살펴보고자 연구를 수행하였다.

① EDTA의 독성정도 (toxicity) 조사

아울러 사용한 EDTA의 독성 여부 및 그 독성 정도를 정확히 판단하기 위하여, 본 연구진이 개발한 발광세균 (Lee et al., 2001)을 이용한 독성검사 시스템에 이를 적용시켜 보았다(표 9). 그 결과, 대조군 대비 발광의 정도를 50% 감소시키는 EDTA의 5, 15, 30분 노출 시 effective concentration (EC_{50})는 각 19.9, 19.5, 35.2 mM로 나타났다. 그러나 이 독성검사는 세균을 사용한 bioassay이므로 인체에 대한 영향은 다를 수 있다고 본다. 이러한 결과를 기반으로, 아래의 microcosm 실험에서 실제 적용할 수 있는 EDTA의 농도로서 EC_{50} 값의 반 정도인 10 mM을 사용하였다.

표 9. EDTA의 발광세균 YH9에 대한 독성정도 검사 결과.

EDTA conc. (mM)	% (relative light unit)		
	5 min	15min	30min
0	100.0	100.0	100.0
10	70.0	85.7	134.8
25	49.9	42.8	60.9
50	18.6	4.51	38.8

② EDTA의 패혈증 비브리오균에 대한 minimal inhibitory concentration (MIC) 조사

단백질 성분 등이 다량 함유되어 매우 높은 영양상태인 LBS 배지 및 포도당이 첨가된 인공해수 배지 (ASW-0.05% glucose) 내의 패혈증 비브리오균에 다양한 농도의 EDTA를 노출시킨 후, 각각의 성장 정도 (600 nm의 optical density로 측정)에 대한 영향을 비교하면서 MIC를 결정하였다. 그 결과, 아래의 표와 같이 17.5 mM의 EDTA는 *V. vulnificus*의 성장을 LBS 영양배지에서는 67.3% 그리고 ASW-glucose 배지에서는 24.8% 저해시켰다 (표 10). 이 수치는 피틴산의 경우 100 mM의 농도인 경우 *V. vulnificus*의 성장을 약 20 - 27% 감소 시켰음 과 비교할 때, pH 7.5의 피틴산이 보이는 효과보다 우수하였다.

표 10. EDTA 농도에 따른 패혈증 비브리오균 성장 저해효과.

Conc. (mM)	OD _{600nm} (after 18 hr incubation)	
	LBS	ASW-glucose
17.5	1.4	0.550
8.8	2.0	0.687
4.4	3.29	0.545
2.2	3.87	0.654
0	4.28	0.731

③ EDTA의 패혈증 비브리오균에 대한 사멸정도 조사 - pH 4.0의 피틴산과 비교

우선 EDTA의 패혈증 비브리오균에 대한 사멸정도를 pH 4.0에서 조사하면서 피틴산의 것과 비교하였다. 이를 위하여 LBS에서 성장중인 지수기(exponential growth phase) 상태의 *V. vulnificus* cell을 pH 4.0으로 적정된 EDTA 및 피틴산 용액에 접종한 후, 적당한 시간 별로 희석한 후 LBS agar plate에 도말하여 CFU를 측정하여 그 생존도를 조사하였다 (그림 124 및 그림 121 참조). 그 결과 산성 조건 하에서의 피틴산의 영향은 (제2차년도 보고서에서와 같이) 효과적으로 패혈증 비브리오균을 사멸시켰으며, 같은 농도의 EDTA는 이 보다 더 효과적으로 패혈증 비브리오균의 사멸을 유도하였다. 이는 2-2항의 결과와 더불어 피틴산이 보이는 효과보다 우수하였다.

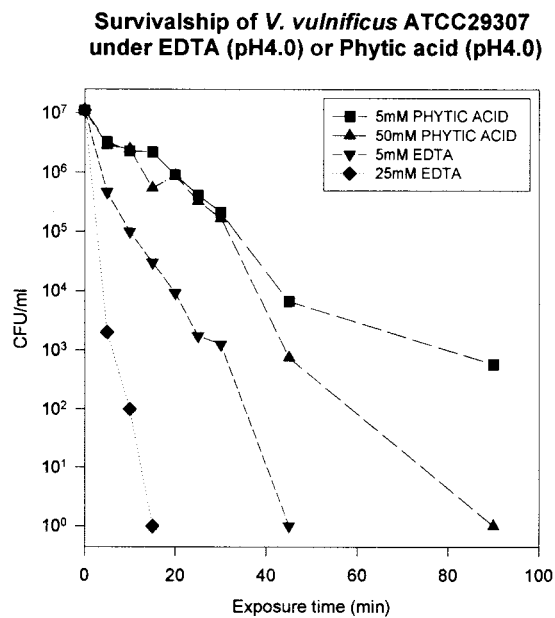


그림 124. pH 4 조건 하에서 EDTA와 피틴산의 패혈증 비브리오균 사멸효과 비교.

④ EDTA의 패혈증 비브리오균에 대한 사멸정도 조사 - pH 8.0

실제 바닷물의 약알칼리성 조건 하에서 EDTA의 패혈증 비브리오균 사멸효과도 살펴보았다 (그림 125). pH 8.0으로 적정된 인공해수에서 EDTA는 pH 4에서와 같이 강력한 chelator 기능을 보이지는 않았으나, 비교적 높은 사멸 효과를 보여주지 않았다. 이러한 효과는 pH 7.5의 피틴산의 경우와 비교할 때 (그림 122 참조), 매우 우수한 효과라 평가된다. 따라서 앞으로의 연구에 있어서 패혈증 비브리오균의 제어 물질로는 EDTA를 사용한 결과만을 제시하였다.

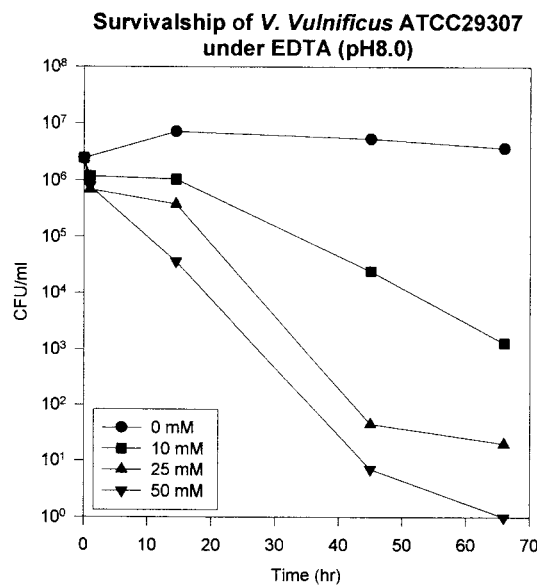


그림 125. pH 8.0 조건 하에서 EDTA의 패혈증 비브리오균의 사멸효과.

(다) 바다-microcosm 내에서의 패혈증 비브리오균의 생존도 조사

① Test tube나 flask 등을 이용한 경우 보이는 “bottle effect” 등을 어느 정도 줄이고, 비교적 실제 자연환경을 모사하는 microcosm 설치를 위하여 아래 그림 126 과 같은 수족관을 설치 운영하였다. 각 수족관은 서해안에서 채취한 해수 약 10 - 20 l로 채웠으며, 경우에 따라 현장에서 얻은 조개 및 갯벌을 적당히 넣어주었다.

모든 microcosm 실험은 duplicate setting으로 수행하였다. 패혈증 비브리오균은 *V. vulnificus* ATCC29307 rif^r (항생제인 rifampicin에 내성을 갖는 spontaneous mutant 균주)를 LBS 배지 내 지수기 상태의 것을 멸균된 해수로 washing 한 후 microcosm에 약 10^6 - 10^7 cell/ml이 되게끔 접종하였다. 온도는 25(\pm 2)°C를 유지하였고 aeration을 위하여 지속적인 공기의 투입을 시켰다. 설치 후 적당 시간에 해수, 조개 및 갯벌을 aliquot를 얻었으며 이를 멸균된 해수로 적당히 희석한 후, 100 µg/ml rifampicin을 함유하는 LBS agar plate에 도말하였다. 30°C에 하루 배양한 후 이 배지에서 성장하는, 즉 rifampicin에 내성을 보이는 패혈증 비브리오균의 수를 정량하였다. 본 실험을 위한 기초 실험 결과, 자연 환경에서 갯 채취된 (즉, 인위적인 패혈증 비브리오균의 접종 이전의) 해수, 조개 및 갯벌에는 rifampicin에 내성을 보이는 패혈증 비브리오균은 탐지되지 않았다.

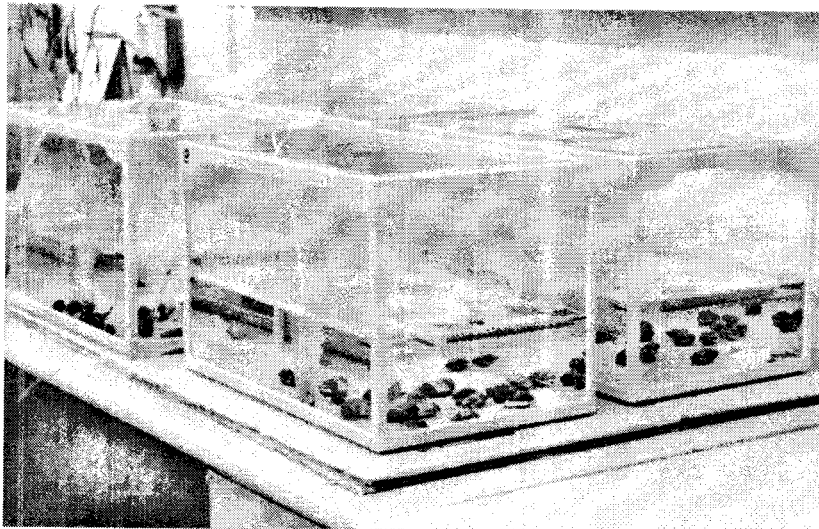


그림 126. Microcosm의 설치 예.

② 우선, 자연 해수 내의 패혈증 비브리오균도 실험실 내 0.8% NaCl 용액 또는 인공해수에서 보였던 EDTA의 사멸효과가 있는지를 해수만을 포함하는 microcosm 설치하여 조사하였다. 30분 그리고 20시간 동안 EDTA 노출된 후, 패혈증비브리오균수의 변화를 측정하였다 (그림 127). 그 결과 EDTA를 첨가하지 않은 자연해수의 경우

초기 농도인 2.8×10^6 cell/ml로부터 $1 \sim 3 \times 10^7$ cell/ml까지 그 수가 증가하였다. 그러나 10 mM EDTA에 노출된 경우, 30분에는 이미 $3 \sim 12 \times 10^4$ CFU/ml로 감소하며, 20시간에는 그 수가 detection limit (10 CFU/ml)이하로 급격히 감소하였다. 따라서 천연해수에서도 EDTA의 패혈증비브리오균의 사멸 효과는 대단히 우수한 것으로 나타났다.

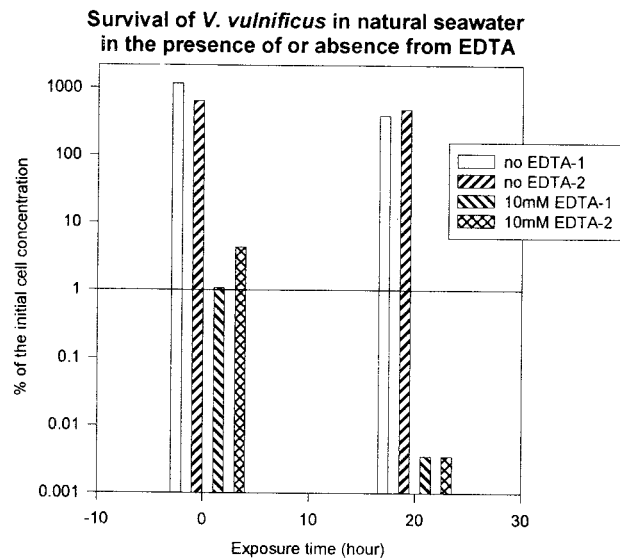


그림 127. 천연해수 조건하에서 EDTA의 패혈증 비브리오균의 사멸효과.

(라) 바다-조개-microcosm 내에서의 패혈증 비브리오균의 생존도 조사

① 이번에는 조개를 첨가한 해수 microcosm (그림 126 참조) 내에서의 EDTA의 영향을 알아보았다. 10L의 해수 (EDTA가 첨가되지 않은 수족관 2개 그리고 EDTA가 10mM로 첨가된 수족관 2개) 내에 각각 20마리의 조개 (바지락)를 넣은 후, 약 $2 \sim 3 \times 10^7$ cell/ml의 패혈증 비브리오균을 접종한 후 3 그리고 7 시간째에 바지락 내부에 존재하는 패혈증 비브리오균수를 조사하였다 (그림 128). 이 결과 EDTA처리한 경우, 각 28.5배 그리고 1.9배의 차이를 나타내었다. 그러나 시간이 흐를수록 EDTA의 영향을 점점 없어짐을 보였다. 그 이유는 다음의 실험결과로서 설명 가능할 것이다.

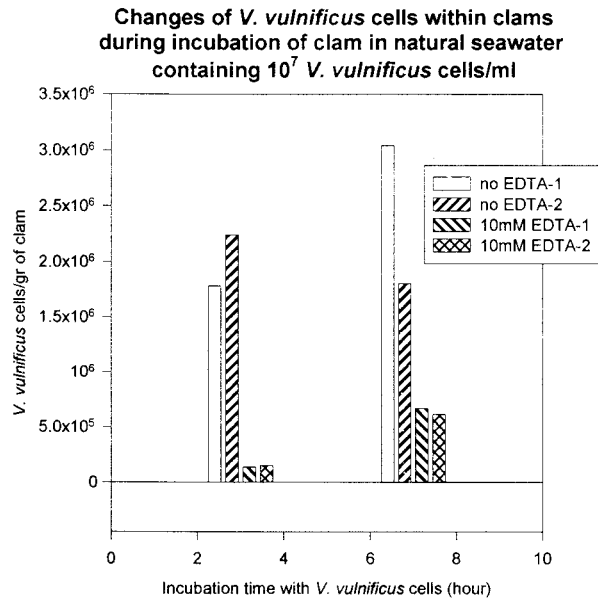


그림 128. 조개 내부에 존재하는 패혈증 비브리오균에 대한 EDTA의 사멸효과.

② 이번에는 패혈증 비브리오균에 감염된 조개를 새로운 자연해수에 넣은 후, 이로부터 배출되는 패혈증 비브리오균을 조사하였다 (그림 129). 본 실험에 사용된 조개는 $1.65 \sim 2.74 \times 10^7$ cell/ml의 패혈증 비브리오균이 존재하는 해수에서 44시간 배양된 것으로서, fresh seawater로 옮길 시 조개 내부의 패혈증 비브리오균 수는 $2.54 \sim 3.35 \times 10^4$ cell/gr이었다. 그림 129에서 보는 바와 같이 1시간 이후부터 패혈증 비브리오균이 조개로부터 배출됨이 관찰되었으며, 14시간 쯤 그 수가 최대에 ($4 \sim 5 \times 10^3$ cell/ml) 도달함을 보였다. 이는 패혈증 비브리오균에 감염된 조개는 이 세균의 continuous culture-incubator 역할을 하면서 계속적으로 주변 바닷물의 패혈증비브리오균수에 큰 영향을 보여준다 하겠다.

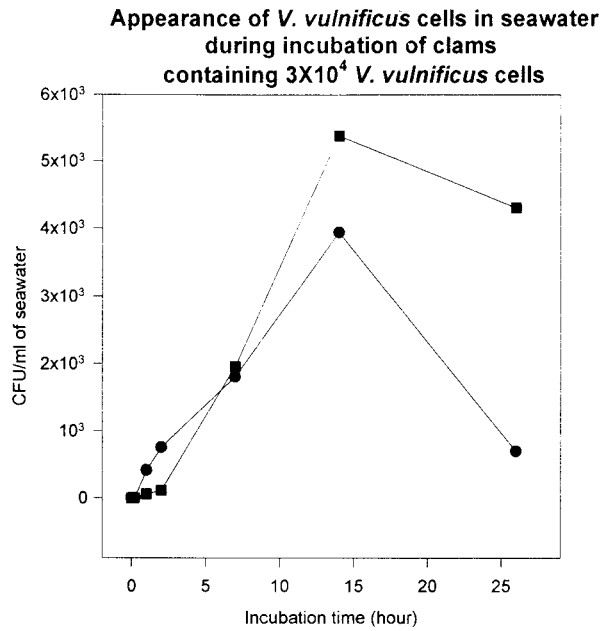


그림 129. 감염된 조개로부터 배출되는 패혈증 비브리오균.

③ 두 가지의 패혈증 비브리오균 (한 세트는 EDTA 처리된 *V. vulnificus* cell 그리고 다른 세트는 EDTA에 노출되지 않은 control *V. vulnificus* cell)에 의하여 41 시간 동안 감염된 조개를 새로운 자연해수에 넣은 후, 이로부터 배출되는 각 패혈증 비브리오균수를 비교하였다 (그림 130). 본 실험에 사용된 바지락은 EDTA 처리 *V. vulnificus* 감염 조개는 $3.7 \sim 4.8 \times 10^6$ cell/gr, 그리고 EDTA 미처리 *V. vulnificus* 감염 조개는 $4.2 \sim 5.4 \times 10^6$ cell/gr의 패혈증 비브리오균이 fresh seawater로 옮길 시 존재하였다. 그림 10에서 보는 바와 같이 초기 조개 내 패혈증 비브리오균수는 큰 차이가 없었으나, 해수로 배출되는 패혈증 비브리오균수는 6시간 부터 약 2배 정도의 차이를 보이고 있다. 이는 그림 8에서와 같이 조개 내 패혈증 비브리오균은 EDTA의 영향을 받으며, 아울러 이러한 세균들이 주위 바닷물에 배출 되는 양 또한 EDTA의 영향을 받음을 보여주는 결과라 할 수 있다.

Appearance of *V. vulnificus* cells in natural seawater containing clams pre-infected by either EDTA-treated or control *V. vulnificus*

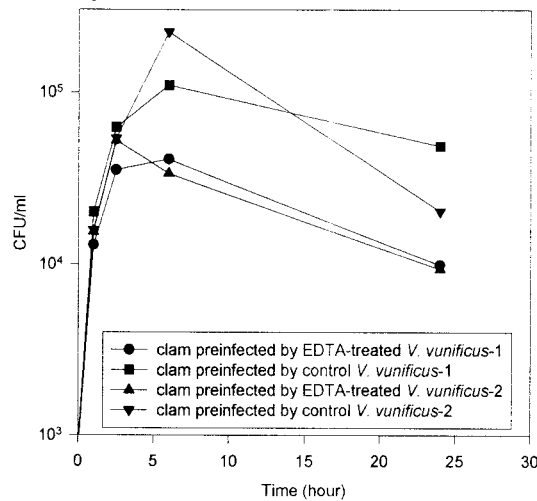


그림 130. EDTA 미노출- 또는 노출-*V. vulnificus* 감염 조개로부터 배출되는 패혈증 비브리오균.

④ 감염된 조개로부터 배출된 패혈증 비브리오균의 EDTA에 대한 반응을 조사하였다. 본 실험의 목적은 실험실 (즉, LBS라는 영양배지) 내에서 배양된 패혈증 비브리오균이 EDTA에 대하여 민감한 반응을 보였는데, 자연계의 실제 생리적 상태로서 존재하는 경우에도 똑같은 사멸효과를 보이는가를 조사하기 위함이었다. 그림 131에 보는 바와 같이 천연해수 내의 조개 내부에서 배출된 패혈증 비브리오균도 주변 바닷물에 첨가된 EDTA에 의하여 빠른 사멸률을 보여주었다.

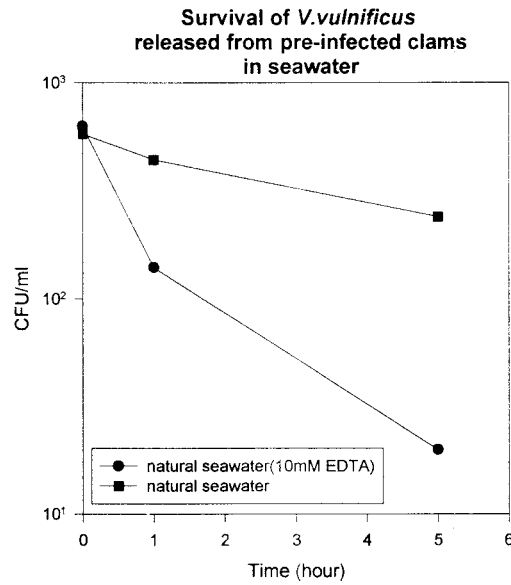


그림 131. 조개 내부에서 배출된 패혈증 비브리오균의 사멸률.

(마) 바다-갯벌-microcosm 내에서의 패혈증 비브리오균의 생존도 조사

해수 10 ℓ에 서해안 갯벌 2.1 kg을 넣은 후, 패혈증 비브리오균을 접종하였다 (그림 132). 위의 microcosm 실험에서와 같이 한 세트(2개의 수족관: $2.8 \sim 4.0 \times 10^7$ /cells)에는 EDTA를 최종농도가 10 mM이 되게끔, 그리고 다른 세트 (2개의 수족관: $3.0 \sim 4.6 \times 10^7$ /cells)에는 EDTA 처리를 하지 않은 상태로 배양하였다.

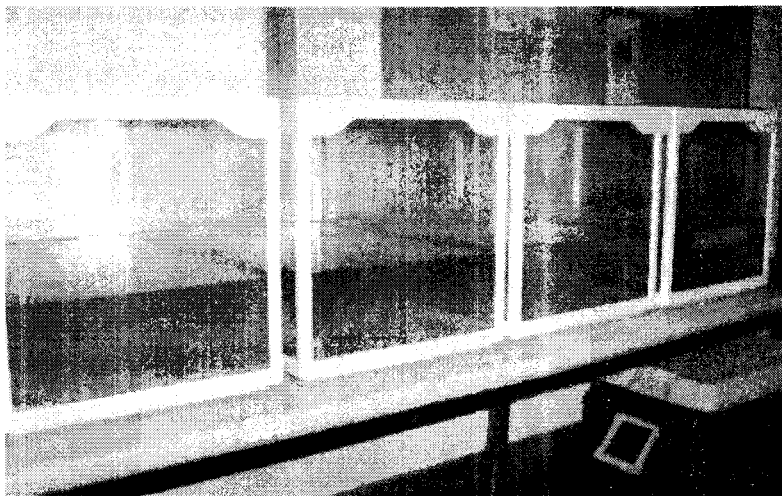
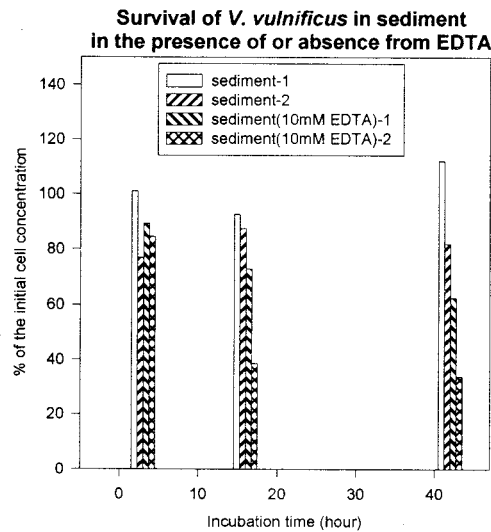


그림 132. 바다-갯벌-microcosm.

시간 별로 바닷물 및 갯벌을 sampling 한 후, 패혈증 비브리오균수의 변화를 측정하였다. 이 결과 EDTA 미처리 microcosm의 경우, 갯벌 내 *V. vulnificus*의 수는 초기 접종 수 대비 82-112%로서 초기 균수를 유지하였다. 그러나 10mM EDTA 처리 microcosm의 경우, 42시간 쯤 갯벌 내 *V. vulnificus*의 수는 초기 접종 수 대비 33.8-62.5%로 약간 감소함을 나타내었다 (그림 133-가). 그러나 바닷물 내 *V. vulnificus*의 수는 EDTA 미처리 및 처리 microcosm의 차이를 보이지 않았다 (그림 133-나).

(가) 갯벌 내 패혈증 비브리오균



(나) 해수 내 패혈증 비브리오균

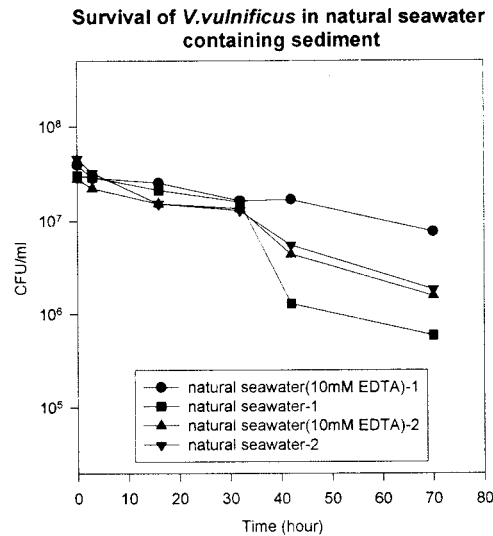


그림 133. 바다 - 갯벌 - microcosm 내에서의 패혈증 비브리오균의 생존도.

이러한 결과는 갯벌을 첨가한 microcosm의 경우, 갯벌의 silt/clay 성분이 (아마도) 다량의 철 및 양이온을 제공하므로 10 mM EDTA로는 충분한 철 및 양이온 제거 효과를 보여주지 않았거나 또는 silt/clay의 직접적인 binding에 의하여 EDTA의 효과가 나타날 수 없었던 것으로 추측된다. 또한 갯벌은 *V. vulnificus*에게 attached 생활 조건을 부여하므로 생존 및 번식에 있어서 해수에서의 planktonic 생활보다는 유리한 듯 하다. 이러한 결과는 4(A)항의 조개-해수 microcosm 실험에서와 같이 시간이 흐를수록 EDTA의 영향을 점점 없어짐을 보인 것과 비슷한 효과라 볼 수 있는데, 즉, 갯벌 및 조개의 존재는 이 세균의 chemostat의 역할을 하면서 계속해서 주위 바닷물에 패혈증 비브리오균을 접종시키는 것과 같은 효과를 보였다.

(바) 어패류저장-microcosm 내에서의 패혈증 비브리오균의 생존도 조사

어패류 저장 조건 (예를 들면, 채취한 조개류의 오랜 시간 동안의 저장을 위한 동결 조건) 하에서의 EDTA의 영향을 살펴보기 위하여 다음과 같은 microcosm 실험을 수행하였다. 서해에서 채취한 자연해수를 두 그룹 (각 그룹 당 2 세트)으로 나누어, 한 그룹은 자연해수 그대로, 다른 그룹은 10 mM EDTA를 포함한 해수 각 20 L

를 담고 있는 수족관을 설치하였다. 다음 각 수족관에 *V. vulnificus* 가 10^6 cells/ml이 되도록 접종한 후, 바지락조개를 각 세트 당 20마리씩 배양하였다. 배양 8시간 및 27시간이 되었을 시, 6 - 7마리의 조개를 꺼내어 그 중 2-3마리는 조개 내 *V. vulnificus*의 수를 정량하는데 사용하고 나머지 조개는 -20°C 냉동고에 보관하였다. 보관 1주일이 되었을 시, 보관중인 조개를 꺼내어 그 내부의 *V. vulnificus*의 수를 정량하였다.

표 3 및 4에 정리된 결과와 같이 -20°C 보관 중 EDTA의 조개 내부의 *V. vulnificus*의 살균효과는 대조군과 비교하였을 때, 절대적인 *V. vulnificus* 균수의 차이는 약 10배를 보였다. 그러나 감소정도를 비교해 보면 별 다른 효과를 보이지 않았다. 즉, 8시간 동안 오염시킨 조개의 경우, EDTA 없을 때에는 7.1×10^6 cell/gr 으로부터 1주일의 냉동저장 후 3.2×10^4 cell/gr으로 초기 농도의 약 1.92%로 감소하였으나, EDTA 처리 시에는 2.1×10^6 cell/gr 으로부터 1주일의 냉동저장 후 3.2×10^4 cell/gr으로 초기 농도의 약 1.51%로 감소하였다 (표 11). 또한 27시간 동안 오염시킨 조개의 경우, EDTA 없을 때에는 1.9×10^5 cell/gr 으로부터 1주일의 냉동저장 후 2.8×10^2 cell/gr으로 초기 농도의 약 0.14%로 감소하였으나, EDTA 처리 시에는 7.3×10^4 cell/gr 으로부터 1주일의 냉동저장 후 8.7×10 cell/gr으로 초기 농도의 약 0.12 %로 감소하였다 (표 12).

표 11. 8시간 동안 감염시킨 조개 내 *V. vulnificus*의 수 및 7일간 -20°C 에 보관 중인 조개 내 *V. vulnificus*의 수.

	CFU/gr of clam	
	0 time	after 1 wk at -20°C storage
no EDTA	$7.12(\pm 0.99) \times 10^6$	$1.37(\pm 0.13) \times 10^5$
10mM EDTA	$2.12(\pm 0.34) \times 10^6$	$3.2(\pm 1.03) \times 10^4$

표 12. 27시간 동안 감염시킨 조개 내 *V. vulnificus*의 수 및 7일간 -20°C에 보관 중인 조개 내 *V. vulnificus*의 수.

	CFU/gr of clam	
	0 time	after 1 wk at -20°C storage
no EDTA	1.94(±0.75)×10 ⁵	2.80(±0.96)×10 ²
10mM EDTA	7.27(±3.4)×10 ⁴	8.68(±1.2)×10 ¹

(사) 패혈증 비브리오균의 억제방법 개발 및 적용

① Chelating agent에 의한 *V. vulnificus*의 억제

배양된 *V. vulnificus* 현탁액을 Chelating agent인 EDTA, Citrate, Glycine가 농도별로 첨가된 해수에 접종한 후 37°C에서 배양하였다. 시간별로 채취된 시료를 TCBS 배지에 접종한 후 37°C에서 1일간 배양하여 나타난 colony를 계수하였다.

Chelating agent인 EDTA, Citrate, Glycine을 해수에 첨가한 결과 EDTA가 효과가 있음을 확인하였다(그림 134, 135). EDTA 500mg/l 의 농도이상으로 1시간 처리할 경우 균의 성장을 억제하였다. Citrate와 Glycine은 영양소로 이용하여 성장을 촉진시키는 효과를 나타냈다.

② 냉동(-20°C) 및 냉장(4°C)에 의한 *V. vulnificus*의 증식억제

여과 멸균된 해수에 균체를 현탁한 후 -20°C와 4°C에서 배양하면서 동일한 방법으로 colony를 형성한 균을 측정하였다.

이결과, *V. vulnificus*를 TCBS평판배지에 자란 상태에서 냉동, 냉장을 시킨 경우에는 48시간 후 새로운 TCBS 평판배지에 계대 배양할 경우 *V. vulnificus*는 성장하지 않았다. 그러나 멸균 해수에 현탁시킨 *V. vulnificus*를 -20°C와 4°C에서 배양할 경우 24시간 이내에 유의할만한 균의 감소는 없었다(그림 136). 이것은 냉장고에 4일간 보관한 굴에서도 이 세균이 발견된다는 점과, 액체배지와 바닷물에 *V. vulnificus*를 접종하여 냉동 및 냉장을 하였을 경우 유의할만한 세균수의 감소를 관찰할 수 없었다고 하는 것과 일치하였다. 즉, *V. vulnificus*는 viable but nonculturable(VBNC)한 상태

의 세균 중의 하나이기 때문이다.

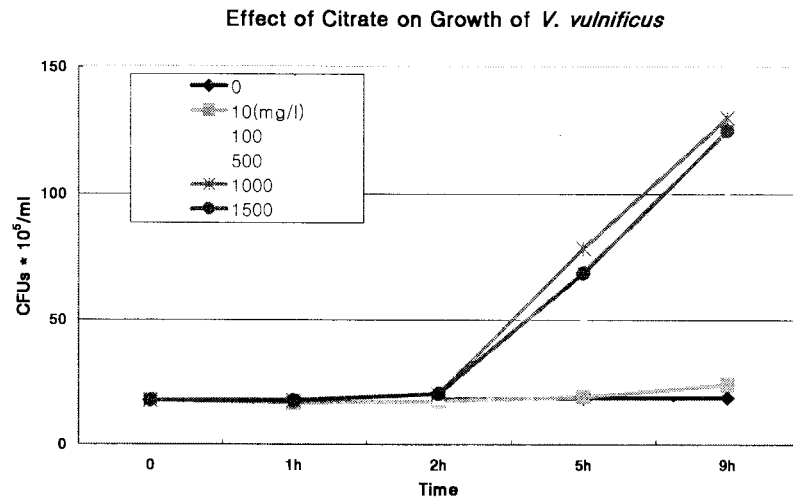


그림 134. Citrate에 의한 패혈증 비브리오균의 억제효과

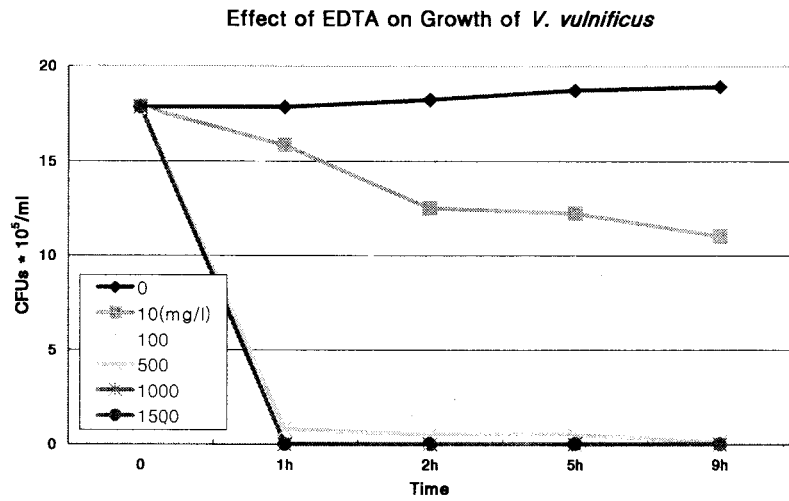


그림 135. EDTA에 의한 패혈증 비브리오균의 억제효과.

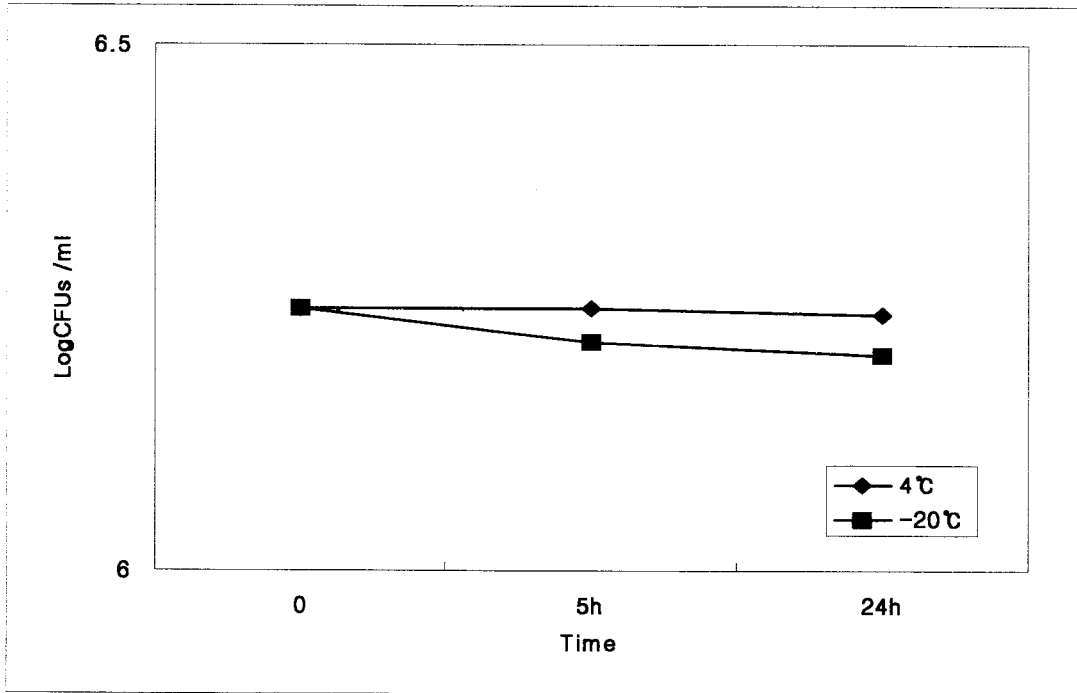


그림 136. 냉장 및 냉동에 의한 패혈증 비브리오균의 억제 효과.

③ 광촉매에 의한 *V. vulnificus*의 억제

배양된 *V. vulnificus* 현탁액을 광촉매인 TiO_2 (50mg/ml)와 혼합한 후 가시광선 500Lux와 400nm의 자외선 15Lux을 조사한 후 위와 동일한 방법으로 사멸효과를 측정하였다. 광촉매인 TiO_2 에 의한 균의 사멸효과를 측정한 결과 가시광선 500Lux와 400nm의 자외선 15Lux을 조사한 결과 촉매가 없어도 사멸효과는 나타났으나 광촉매를 50mg/ml의 농도로 빛과 함께 처리한 결과 15분 이내에 완전히 사멸되는 효과를 나타냈다(그림 137).

④ 광촉매로 피복된 재질에 따른 *V. vulnificus*의 억제

Activated carbon fiber(ACF)와 Glasswool fiber(GF)를 TiO_2 로 피복시킨 후 위와 동일한 방법으로 사멸효과를 측정하였다.

Activated carbon fiber(ACF)와 Glasswool fiber(GF)를 TiO_2 로 피복시킨 경우에도 사멸효과가 확인되었다(그림 138). 특히 ACF의 경우에는 TiO_2 에 피복하지 않아도 억제효과가 나타났다.

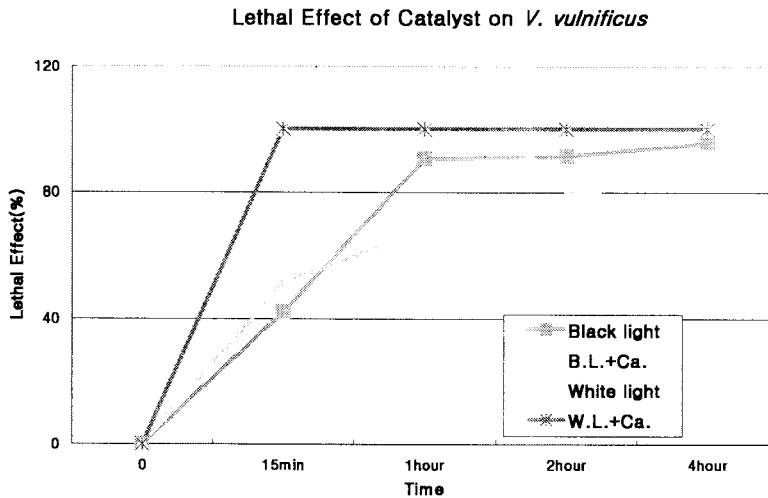


그림 137. 광촉매에 의한 패혈증 비브리오균의 억제효과.

⑤ 광촉매 정화시스템 구성 요건

컬럼용 광촉매 시스템에 적합한 bead를 선택하기 위해 Si/Al 과 glass bead에 TiO_2 를 도포(coating)하여 이들의 살균력을 비교하였다. 컬럼 내부의 공극 부피는 80 ml 이며 peristaltic pump로 처리수를 컬럼에 유입시켰다. 대장균과 비브리오 패혈증 균 배양 시료를 생리식염수에 혼탁한 후 유속을 달리하여 통과시키면서 살균능을 측정하였다.

컬럼용 광촉매 시스템에 적합한 모델을 찾기 위해 Si/Al 과 glass bead에 TiO_2 를 도포(coating)하여 이들의 살균력을 비교한 결과는 그림 133과 같다. 대장균을 대상으로 실험한 결과 두 가지 재질을 이용한 촉매가 모두 우수한 살균효과를 나타냈으나 특히 Si/Al에 도포한 경우 살균력이 뛰어났다. 그리고 유속이 느릴수록 (촉매와 접촉시간이 길수록) 살균효과가 컸다. 대장균의 경우에는 유속에 따른 효과가 나타났으나 비브리오 패혈증 균은 생존력이 낮기 때문에 유속이 28 ml/min 이하에서는 완벽한 사멸효과를 나타냈다 (그림 139).

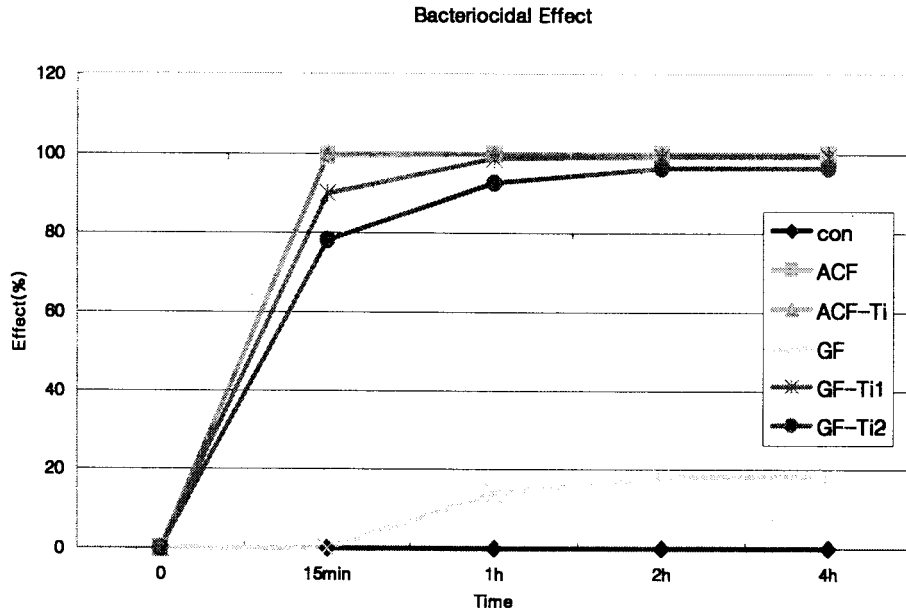


그림 138. 여러 재질에 코팅된 광촉매에 의한 패혈증 비브리오균의 억제효과

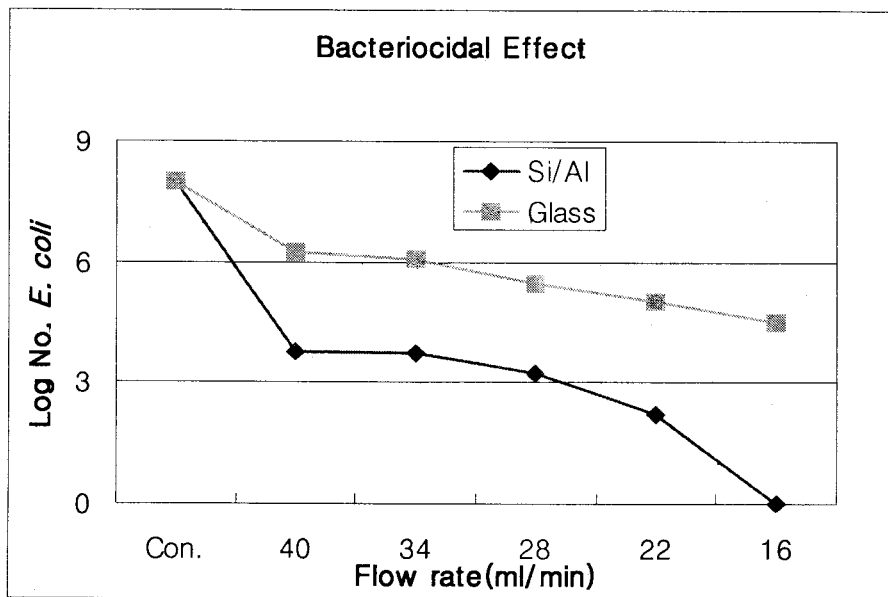


그림 139. Glass bead의 코팅 재질과 유속에 따른 대장균 사멸효과.

⑥ 광촉매 정화시스템에 의한 *Vibrio vulnificus* 억제 효과

컬럼에 주입되는 대상수의 유입 빈도에 따른 효과를 측정하였다. 패혈증 비브리오균을 해수에 혼탁 시킨 후 1과 동일한 방법으로 실시하였다.

패혈증 비브리오균의 사멸을 위해 컬럼에 주입되는 대상수의 유입 빈도에 따른 효과를 측정한 결과 패혈증 비브리오균의 억제에는 해수를 사용할 경우에도 식염수에서와 동일한 효과를 나타냈다. 즉, 유속 28 ml/min의 속도로 1회를 통과시켜도 완벽한 사멸효과를 나타냈다 (그림 140 ~ 142).

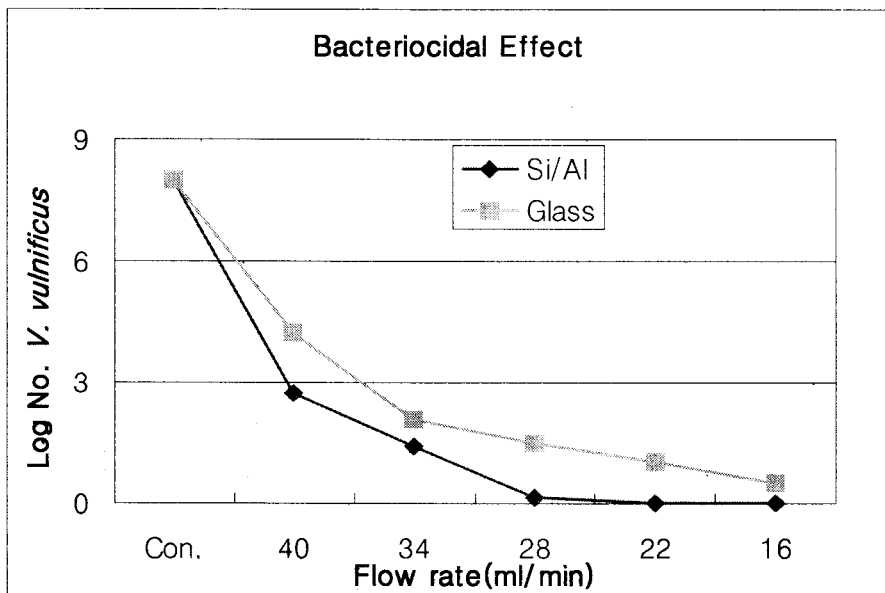


그림 140. Glass bead의 코팅 재질과 유속에 따른 패혈증 비브리오균 사멸효과.

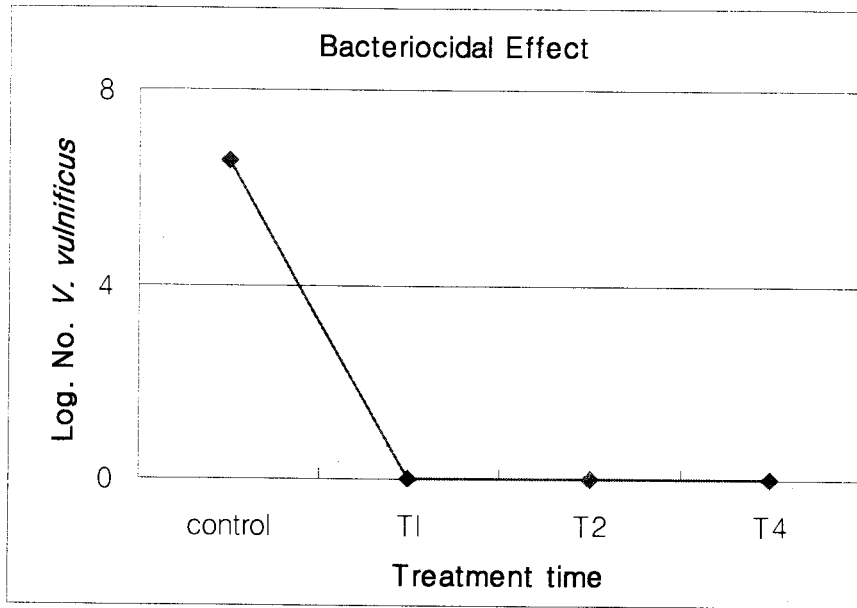


그림 141. 처리회수에 따른 패혈증 비브리오균 사멸효과.

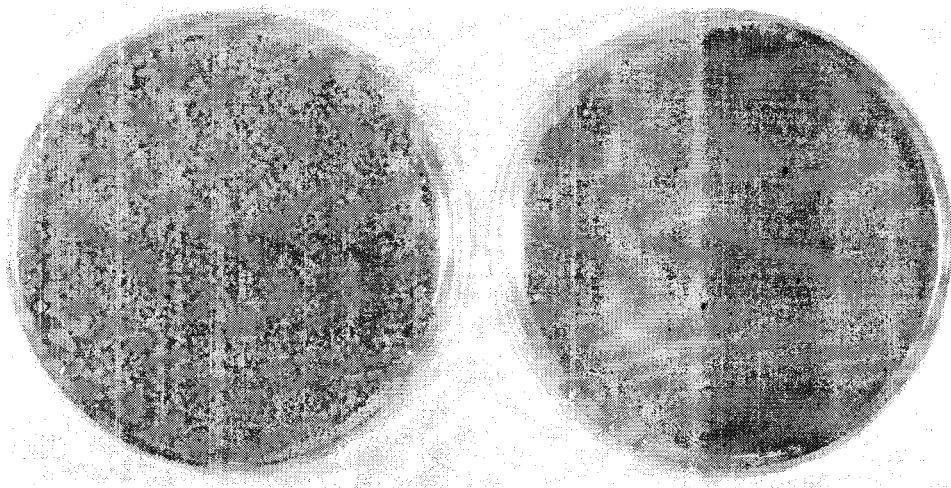


그림 142. 광촉매 처리에 의한 패혈증 비브리오균 사멸효과
(좌: 처리전; 우: 처리후).

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

적조생물의 성장을 trigger하는 원인 파악

1. 글루코사민-D(GL)를 이용한 적조생물의 적해

조류저해제인 글루코사민-D(GL)는 FRI의 변화가 글루코사민 D의 양에 따라 많은 차이를 보였다. 글루코사민-D가 높은 농도로 주입 시 그 효과가 탁월하였으나, 오히려 낮은 농도에서는 식물성 플랑크톤이 성장하는데 영양분으로 쓰임을 알 수 있었다. 이는 시간이 지나면서 이 GL성분이 식물성 플랑크톤에 의해 분해 될 수 있음을 뜻하며, 조류저해제 글루코사민-D가 2차적 오염을 주지 않음을 알 수 있었다.

2. 착화합물을 이용한 존재하는 철 이온을 제어

철이온과 착화합물을 이용한 적조 생물의 배양시 초기에는 대조군보다 더 작은 생체형광 값이 나타났으나, 이틀 후 형광이 차츰 증가하고, FeEDTA를 제외하고 배양 4일 후부터 형광차이가 감소했다. 착화합물에 의한 생체형광 차이가 증가한 순서는 FeEDTA, EDTA 그리고 철이온이었다. 철이온과 착화합물을 소량 주입하였을 경우에도 반응이 나타난 것으로 미루어 보아 철이온을 제어하여 적조를 제어하는 방법도 가능하다고 판단된다. DTPA를 주입했을 경우 생체형광이 0.25 ~ 0.3으로 낮아 식물성 플랑크톤의 적지 않은 스트레스를 주었고, 대조군에 비해 생체형광이 항상 낮게 나타났다. 그러므로 철을 제어하는 킬레이터 DTPA가 적조를 제어 할 수 있다는 가능성을 보여주었다.

3. 과산화수소(H₂O₂)를 이용한 적조 구제

적조구제에는 화학적, 생물학적, 물리적인 방법이 있으나 사용상의 어려움과 문제점이 있어 현재 황토살포에 의한 적조생물구제가 널리 사용되지만 황토 역시 2차 오염을 유발하므로 장기적으로 이상적인 적조제어대책이라고 보기는 힘들다. 적당량의 적조 생물에 과산화수소 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 ml를 주입하여 0분, 5분, 15분, 30분, 45분, 60분에 일정량의 시료를 취하여 생체형광을 측정하였다. 60분후 위의 주입량에 따른 적조 제어율은 각각 -30%, 37%, 48%, 41%, 97%, 86%, 98%로 대체로 주입량을 증가할수록 제어율이 높은 것으로 나타났다.

4. 자연상태에서 질산환원효소 활성도

질산염환원효소 활성도는 질산염 환원효소(nitrate reductase; NR)는 질소계 영양염의 이용기작과 C:N 생산성비에 영향을 미친다. 특히 해양환경에서 주도 일차생산을 제한하는 주된 영양염은 무기질소원이다. 질소계 영양염은 탄소원에 비교하여 해양환경에서 그 기원에 따라 구분이 가능하다는 장점이 있다. 질산염 환원효소 활성도는 대체적으로 하계에 높게 나타났다. 25시간 연속 관측 자료에서 효소 활성도는 시간에 따라 큰 차이를 보이지 않았으며 주야에 따른 빛 이용률에도 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 표·저의 수심에 따른 효소 활성도도 크게 나타나지 않았다. 단지 계절적인 온도 차이에 따른 활성도의 차이가 났다.

5. 저층퇴적물을 이용한 식물플랑크톤 배양

가두리 양식장에서의 주요 해양환경에 영향을 미치는 오염인자는 사료와 양식 대상어류의 배설물이다. 특히 하계 수온이 증가 할 때에는 저층이 혐기성화 되어 용존 산소가 부족하여 저층에 사는 어패류가 폐사하기도 한다. 그러나 유속이 어느 정도 존재하고 활발한 혼합이 있을 경우에는 오히려 적당한 양의 영양염류가 수층에 투입되어 식물플랑크톤의 먹이원이 되기도 한다. 저층 퇴적물의 양을 달리하여 식물플랑크톤을 배양 한 결과 퇴적물양이 많을수록 시간이 경과함에 플랑크톤 증식률이 높아졌다.

1차년도 패혈증 비브리오균의 생태적 특성

1. 배양 가능한 패혈증 비브리오균의 정량

-전통적인 선택배지의 사용 결과

2000년 2월부터 12월까지 비브리오-선택배지 (TCBS plate)를 사용하여 1년간 패혈증 비브리오균을 생태적으로 정량하였다.

-현대적인 분자생물학적 방법 결과

같은 기간 동일 시료를 사용하여 전통적인 방법보다 민감한 분자생물학적인 방법 (colony hybridization)으로 패혈증 비브리오균을 정량하였으며, 그 결과 계절적으로 본 colony hybridization방법이 선택배지를 사용한 방법보다 보다 탁월한

패혈증 비브리오균 정량법을 확립했다고 판단한다.

2. 총 패혈증 비브리오균의 정량

패혈증 비브리오균에 특이한 PCR 방법으로 배양이 되지 않지만 감염성을 갖을 수 있는 (non-culturable but viable) 패혈증 비브리오균의 존재를 파악하고자 하였으나, 시료의 농축과정 중 PCR 반응의 방해 물질로 인하여 양성 결과를 얻지 못했다. 그러나 pure culture로서 존재 또는 다양한 세균과 공존하는 패혈증 비브리오균을 정확히 탐지할 수 있는 최적의 조건은 확립하였다.

3. 환경 요인 중, 온도와 밀접한 연관성 규명

자연계에서 보이는 하절기 패혈증비브리오의 다량 발생 기작은 동절기 낮은 수온에서 non-culturable 상태로 생존한 일부 *V. vulnificus* 개체군이 수온의 증가에 따라 그 배양성이 회복됨으로서 고체배지 상에 colony를 보일 수 있으며, 또한 전형적인 타가영양생물체인 culturable *V. vulnificus*는 소생 과정 후, 주변 해수 내의 영양분의 증가 (이는 감소된 DO로서 추론 가능)에 의하여 빠른 증식을 수행함으로써 결과적으로 7-8월 사이에 bloom을 보이는 것이며, 이 이후에는 다시 수온의 감소에 따라서 배양방법으로는 탐지할 수 없는 수준으로 점진적으로 감소하는 것이라 판단한다.

2차년도 패혈증 비브리오균의 환경 스트레스에 대한 내성 탐색

1. 온도의 영향

V. vulnificus cell을 낮은 배양온도 즉, 4, 10, 20도에서 배양시키면서 생존능력의 변화를 적정온도인 30 및 37°C의 것과 비교 조사한 결과, 10도 미만의 온도 조건하에서 패혈증 비브리오균이 급격한 CFU/ml의 감소를 나타냈으므로 그 생존능력이 크게 떨어짐을 알 수 있었다. 그러나 낮은 온도 하에 존재하던 패혈증 비브리오균의 배양온도를 상승시키는 경우, 이 세균의 resuscitation (소생)함을 보였다. 따라서 저온처리 시, 패혈증 비브리오균의 완전한 사멸은 기대하기 어렵다고 판단된다. 또한 40°C의 ASW에서의 생존은 약 2일 간의 감소 후 다시 회복하였으며, 42°C의 LBS에서의 성장은 30°C에 비해 그 성장률은 느리지만 4일간 지속적인 개체수

의 증가를 보여주었다. 그러므로 고온에서 패혈증비브리오는 그 생존 및 성장이 계속 유지되어 사멸 조건으로는 적당하지 않음을 알 수 있었다.

2. 산성도의 영향

V. vulnificus cell을 산성인 LBS (pH4)와 ASW (pH4)에 노출시키면서 그들의 생존 정도를 조사하였다. 산성 LBS 배지에 노출된 패혈증 비브리오균의 생존이 산성 (pH4)에 의해 큰 영향을 받는 반면, 48시간 이상 산성 ASW에 노출된 패혈증 비브리오균의 생존은 중성의 것과 많은 차이를 보이지 않으므로, 패혈증 비브리오균이 주위 조건에 따라서 산성에 대한 어느 정도의 내성을 갖을 수도 있다는 것을 암시하므로, 산성도 stress의 패혈증 비브리오균의 사멸에는 그다지 큰 역할을 기대하기 어려움을 알 수 있었다.

3. 산화적 충격의 영향

V. vulnificus cell을 여러 농도의 H₂O₂에 노출시키면서 생존을 관찰하였는데, 그 결과 패혈증 비브리오균의 경우 0.001%라는 매우 낮은 농도의 H₂O₂에도 민감하여 60분 이내에 그 수가 매우 급격히 감소함을 보였다. 따라서 H₂O₂가 보이는 인체 유해성 여부가 조사된 후, 이 물질의 억제제 사용 여부가 판단될 수 있을 것이다.

4. 패혈증비브리오균 제어/사멸 화학물질의 탐색

일본 보건복지부 등에 의해 자연물로 승인된 바 있는 피틴산 (phytic acid)은 강력한 chelation 능력을 보이는데, 이 물질을 쥐에게 오랜 기간 투여한 실험 결과 전혀 독성을 나타내지 않았다고 보고되어 인체에는 무해하다고 여겨지고 있는 물질이다. 패혈증 비브리오균은 그들의 생존 및 병원성의 유지를 위하여 철을 비롯한 metal류의 존재를 필수적으로 요구하고 있다. 따라서 phytic acid를 패혈증 비브리오균에 처리한 후 생존에 대한 효과를 조사하였는데, 이 결과 효율적인 패혈증 비브리오균의 사멸을 보여주었다. 이러한 결과를 바탕으로 제 3차년도 연구에서는 이 부분의 집중적인 연구가 필요하리라 사료된다.

3차년도 Microcosm내에서의 패혈증 비브리오균의 생존 조사 및 제어방법 탐구

1. 자연해수 microcosm 실험에 있어서 피틴산의 사용 가능성 타진

자연 해수 내에 피틴산을 첨가하고자 한 실험은 위의 두 가지 이유, 즉, 해수 산성도에서는 chelator 역할을 할 수 없으며 해수에 첨가 시 해수 내 염분들의 침전으로 인하여 그 사용이 불가능하였다. 그러므로 이를 대체할 다른 종류의 chelators를 탐색하였다.

2. 피틴산을 대신할 chelator의 선택

인체에 무해한 chelator로서 몇 가지를 자료 탐색한 결과, 강력한 chelator 중 하나인 EDTA는 식품첨가물로 사용되고 있다. 그러므로 본 연구팀은 우선 EDTA로의 대체 가능성을 알아보하고자 다음과 같은 패혈증 비브리오균에 대한 영향을 조사하였다. 그러나 이미 전남대 의대팀에 의하여 자연상태가 아닌 증류수 내 존재하는 패혈증 비브리오균의 살균에 있어서 EDTA의 첨가 효과에 있어서 그 살균효과의 우수함이 보고가 있었다. 따라서 본 연구에서는 증류수가 아닌 비교적 자연 해수 및 갯벌 상태를 모사한 조건에서 EDTA의 효과를 여러모로 살펴보고자 연구를 수행하였다. 그 결과 pH8.0으로 적정된 인공해수에서 EDTA는 pH4에서와 같이 강력한 chelator 기능을 보이지는 않았으나, 비교적 높은 사멸 효과를 보여주지 않았다. 이러한 효과는 pH 7.5의 피틴산의 경우와 비교할 때, 매우 우수한 효과라 평가된다. 따라서 앞으로의 연구에 있어서 패혈증 비브리오균의 제어물질로서 EDTA를 연구하였다.

3. 바다-microcosm 내에서의 패혈증 비브리오균의 EDTA에 대한 생존도 조사

자연 해수 내의 패혈증 비브리오균도 실험실 내 0.8% NaCl 용액 또는 인공해수에서 보였던 EDTA의 사멸효과가 있는지를 해수만을 포함하는 microcosm 설치하여 조사한 결과, EDTA를 첨가하지 않은 자연해수의 경우 초기 농도인 2.8×10^6 cell/ml로부터 $1 \sim 3 \times 10^7$ cell/ml까지 그 수가 증가하였다. 그러나 10mM EDTA에 노출된 경우, 30분에는 이미 $3 \sim 12 \times 10^4$ CFU/ml로 감소하며, 20시간에는 그 수가 detection limit (10 CFU/ml)이하로 급격히 감소하였다. 따라서 천연해수에서도 EDTA의 패혈증 비브리오균의 사멸 효과는 대단히 우수한 것으로 나타났다.

4. 바다-조개-microcosm 내에서의 패혈증 비브리오균의 EDTA에 대한 생존도 조사

EDTA처리한 경우, 각 28.5배 그리고 1.9배의 차이를 나타내었다. 또한 조개 내 패혈증 비브리오균은 EDTA의 영향을 받으며, 아울러 이러한 세균들이 주위 바닷물에 배출되는 양 또한 EDTA의 영향을 받음을 보여주는 결과라 할 수 있다. 그리고 천연해수 내의 조개 내부에서 배출된 패혈증 비브리오균도 주변 바닷물에 첨가된 EDTA에 의하여 빠른 사멸률을 보여주었다.

5. 바다-갯벌-microcosm 내에서의 패혈증 비브리오균의 EDTA에 대한 생존도 조사

10mM EDTA 처리 microcosm의 경우, 42시간 짜 갯벌 내 *V. vulnificus*의 수는 초기 접종 수와 비교 시 약간 감소함을 나타내었다.

6. 어패류저장-microcosm 내에서의 패혈증비브리오균의 EDTA에 대한 생존도 조사

-20 °C 보관 중 EDTA의 조개 내부의 *V. vulnificus*의 살균효과는 대조군과 비교하였을 때, 절대적인 *V. vulnificus* 군수의 차이는 약 10배를 보였으나, 감소정도를 비교해 보면 별 다른 효과를 보이지 않았다.

7. 제어제의 현장에서의 적용방법에 대한 방법론 (제 5 장 연구개발결과의 활용계획 참조)

자연 상태에서 EDTA를 패혈증 비브리오균의 제어제로서의 적용은 크게 두 가지 방향으로 사용할 수 있을 것이다. EDTA의 경우, 수족관 내 자연해수(pH8.3)에 최종농도가 5 - 10mM 정도로서 직접적인 투여가 가능할 것이며, phytic acid의 경우, 최종농도가 5mM 정도인 pH4의 용액을 세척과정 중 또는 저장과정 전에 도입하면 제어효과가 우수하리라 판단한다. 이 때 사용된 EDTA의 최종농도는 본 연구진이 제시한 5 - 10mM인데 이 농도는 타생물체에 대하여 독성을 조이지 않을 듯하다고 판단된다. (그러나 이 독성검사는 발광세균을 사용한 bioassay이므로 인체에 대한 영향은 다를 수도 있다).

8. 광촉매 정화시스템에 의한 기대

Si/Al - TiO₂의 광촉매 장치를 이용한 억제 방법을 찾아냈으므로 육상 양식장 및 회집 수조에서의 여과 장치 개발의 실효성을 입증하였고, 광촉매 column을 소형 수족관에 설치할 경우 소비자에게는 패혈증 비브리오균으로부터 보호와 상인들의 소

특 증대에 기여할 수 있다.

제 5장 연구개발 결과의 활용계획

제어제의 현장에서의 적용방법

*V. vulnificus*를 효과적으로 제어할 수 있는 방법에 대한 연구 결과, 본 연구진은 chelator의 사용 가능성을 타진하였다. 제2차년도 및 제3차년도 보고서에서와 같이 두 가지 종류의 chelator로서 천연물로부터 생산되는 phytic acid와 EDTA에 대한 실험실 연구 결과를 현장에 적용할 수 있는 방법을 고려하였다.

(1) 예를 들면, open system이라 할 수 있는 가두리 양식장에 직접적으로 투여하는가, 아니면 보관장소 (예를 들면, 수족관) 또는 처리과정 (예를 들면 세척/저장 과정) 등 closed system에 적용하는가 등을 고려하였다. 본 연구진의 실험 결과는 closed system에의 적용이 보다 환경안정적이며 경제적인 선택이라 판단한다. 또한 적용 시 사용하는 적정농도의 결정은 두 가지 화합물에 대한 minimum inhibitory concentration 실험 및 생존실험 결과에 기초하였다.

(2) 제어제의 적용은 크게 두 가지 방향으로 사용할 수 있을 것이다. EDTA의 경우, 수족관 내 자연해수(pH8.3)에 최종농도가 5 - 10mM 정도로서 직접적인 투여가 가능할 것이며, phytic acid의 경우, 최종농도가 5mM 정도인 pH4의 용액 (제3차년도 진도보고서 참조)을 세척과정 중 또는 저장과정 전에 도입하면 제어효과가 우수하리라 판단한다 (특히 출처: 비브리오 불니피쿠스의 살균 조성물 및 그 사용방법).

(3) 아울러 사용한 농도 하에서 *V. vulnificus* 이외의 타생물체에 대한 위해성/독성 정도를 판단하기 위하여, 발광세균을 이용한 독성검사 시스템을 이용하여 조사하였다 (제3차년도 진도보고서 참조). 예를 들면, EDTA의 경우, 대조군 대비 발광의 정도를 50% 감소시키는 EDTA의 5, 15, 30분 노출 시 effective concentration (EC₅₀)는 각 19.9, 19.5, 35.2mM로 나타났다 (아래 표 참조).

EDTA conc. (mM)	% (relative light unit)		
	5 min	15 min	30 min
0	100.0	100.0	100.0
10	70.0	85.7	134.8
25	49.9	42.8	60.9
50	18.6	4.51	38.8

따라서 본 연구진이 제시한 5 - 10mM 농도는 타생물체에 대하여 독성을 보이지 않을 듯하다고 판단된다 (그러나 이 독성검사는 발광세균을 사용한 bioassay이므로 인체에 대한 영향은 다를 수도 있다). 제 3차년도 연구에서 수행한 다양한 microcosm 실험에서는 실제 적용할 수 있는 EDTA의 농도로서 EC₅₀값의 반 정도인 10mM을 사용하였다.

제 6장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보

비브리오 불니피쿠스의 생태/생리조사 보고

1. Hoi, L., J. L. Larsen, I. Dalsgaard, and A. Dalsgaard. 1998. Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotype in Danish marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 7-13.

6월부터 9월 중순까지 0.8 - 19 CFU/liter의 낮은 density비율로 *V. vulnificus*가 발견되었고, 7월부터 11월 중순까지는 0.04 - 11 CFU/liter의 비율로 발견되었다. 패혈증 비브리오균의 존재유무는 수온의 온도에 직접적으로 많은 영향을 끼치는 것으로 밝혀졌다. 그렇지만, 우리는 mussel farm에 있는 물에서 온도가 7°C 미만일 때도 유럽의 shellfish에서 패혈증비브리오를 발견할 수 있었다. 패혈증비브리오의 아가미와 장내 물질 (intestinal contents), 점액질 (mucus)에서도 발견되었고, 99.6%가 패혈증 비브리오 type1으로 우점종을 나타내었다.

2. Motes, M. L., A. Depaola, D. W. Cook, J. E. Veazey, J. C. Hunsucker, W. E. Garthright, R. J. Blodgett, and S. J. Chirtel. 1998. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in northern Gulf and Atlantic coast oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1459-1465.

비브리오를 1994년 7월부터 1995년 9월까지 세 군데의 northern Gulf지역과 두 군데의 Atlantic coast site에서 채취하였다. 3월말과 4월부터 시작하여 늦은 여름에 걸치는 온도가 26°C일 때는 패혈증 비브리오의 수가 <1000/gr으로 증가하였고, 10월과 11월 12월에 걸치는 겨울에는 그 수가 감소하여 <10/gr으로 발견되었다. 또한 north and south Carolina site에서는 1년 내내 패혈증 비브리오를 발견할 수 없었다.

3. Marco-Noales, E., E. G. Biosca, and C. Amaro. 1999. Effects of salinity

and temperature on long-term survival of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1117-1126.

염분의 농도를 0.3 - 3.8%로 그리고 수온을 12°C, 25°C, 30°C로 맞춰주고 비브리오의 최상의 culture condition을 잡았다. 최상의 염분도는 1.5%였고, 낮은 염분도는 비브리오의 생존능력을 떨어뜨렸다. Opaque type이 translucent 보다 생존능력이 뛰어났고, long-term starved cell은 capsule은 유지되었으나, cell size가 줄어들었고, rod shape이 coccus 모양으로 변했다.

제 7장 참고문헌

- 金昌勳·岩崎 英雄. 1987. 해산 와편모조 *Scrippsiella trochoidea*의 cyst 형성 및 발아에 대하여. *한국조류학회지*, 2(2), 211-221.
- 임월애·김학균·박주석·이원재(1), 1993, 적조와편모조 *Scrippsiella trochoidea*와 해양세균 *Pseudomonas spp.*의 동시 배양시 지방산 조성의 변화, *J. Oceanol. Soc. Korea*, 28(3), 186-191.
- 전형주·박용철·정경호, 1994, 인천 연안 환경의 영양염과 미량 금속의 분포에 관한 연구, *Yellow Sea Research*, 6:41~71.
- 김 상중, 조 장천, 이 규호, 이 동훈, 장 덕진, 박 한오. 2000. 자동수질측정장치 개발 - 발광미생물을 이용한 수질오염조기경보장치 및 정보전송네트워크 개발. 환경기술연구개발 성과 세미나 발표집. pp. 144-151. 국립환경연구원/국립환경과학기술협회.
- 김학균, 1999. 국내외의 적조연구 현황. 인제대학교 적조연구단 특별심포지움 발표 논문집, p1-12.
- 박주석, 김종두, 1967. 진해만의 적조현상에 관한 연구. 국립수산진흥원 연구보고, 1:66-79
- 정선식, 양한모, 이준행. 1989. *Vibrio vulnificus* 패혈증의 예방을 위한 효과적인 살균방법의 모색에 관한 연구 - 1. 살균적 osmotic shock 및 이에 대한 chelating agent의 강화효과. *Journal of Korean Medical Association*, 32: 272-282.
- APEC, 1995. Red tides and harmful algal blooms in the Asia-Pacific region. Final report of the red tide/toxic algae project. APEC/MRC/WG. 109pp.
- Aznar, R., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1993. Ribotyping and randomly

- amplified polymorphic DNA analysis of *Vibrio vulnificus* biotypes. *System. Appl. Microbiol.*, **16**:303-309.
- Bae, H. M., H. G. Choi, W. C. Lee and S. J. Yoon, 1998. Control of the red tide by yellow loess dispersion. In: *Harmful Algal Blooms in Korea and China*, edited by Kim, H.G., S.G. Lee and C.K. Lee, National Fisheries Research and Development Institute, Republic of Korea, pp. 53-60.
- Berges, J. A. and P. J. Harrison, 1995. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: A revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 82-93.
- Berges, J. A., W. P. Cochlan and P. J. Harrison, 1995. Laboratory and field responses of algal nitrate reductase to diel periodicity in irradiance, nitrate exhaustion, and the presence of ammonium. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **124**: 259-269.
- Biosca, E. G., C. Amaro, E. Marco-Noales and J. D. Oliver. 1996. Effect of low temperature on Starvation-survival of the Eel pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 450-455.
- Cullen, J.J. and E.H. Renger. 1979. Continuous measurement of the DCMU-induced fluorescence response of natural phytoplankton populations. *Mar. Biol.*, **53**, 1-29.
- Conley D. J. and T. C. Malone (1992) Annual cycle of dissolved silicate in Chesapeake Bay: implication for the production and fate of phytoplankton biomass. *Marine Ecology Progress Series*. **81** 121-128.
- Chowdhury, M. A. R., H. Yamanaka, S. Miyoshi, K. M. S. Aziz, and S. Shinoda. 1989. Ecology of *Vibrio mimicus* in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**:2073-2078.

- Colwell, R. R., P. R. Brayton, D. J. Grimes, D. B. Roszak, S. A. Huq, and L. M. Palmer. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology.*, **3**:817-820.
- Domotor, S.L., K. Mountford and C.F. D' Elia, 1982, Autoradiographic detection of species-specific thermal stress effects on natural phytoplankton assemblages. *Mar. Environ. Res.*, **6**, 27-35.
- Dugdale R. C. (1972) Chemical oceanography and primary productivity in upwelling regions. *Geoforum*, **11**, 47-61
- Dugdale R. C. (1983) Effect of source nutrient concentrations and nutrient regeneration on production of organic matter in coastal upwelling center. In Coastal Upwelling, Pt. A, E. Suess and J. Thiede, editors, Plenum Press, pp. 175-182.
- Davidson, I. R. and W. D. P. Stewart, 1984. Studies on nitrate reductase activity in *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour. I. Longitudinal and transverse profiles of nitrate reductase activity within the thallus. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **74**: 201-210.
- DePaola, A., G. M. Capers, and D. Alexander. 1994. Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the U.S. Gulf coast. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**:984-988.
- DePaola, A., L. H. Hopkins, J. T. Peeler, B. Wentz, and R. M. McPhearson. 1990. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**:2299-2302.
- Falkowski P. and D.A. Kiefer, 1985, Chlorophyll *a* fluorescence in phytoplankton: relationship to photosynthesis and biomass, *J. Plankton Res.*, **7**(5), 715-731.

- Guillard, R. R. L., and Ryther, J. H., 1962. Studies of marine planktonic diatom. I. *Cyclotella nana* H. and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Phycol.*, 17: 309-314
- Hahn, S. D., 1998. History of algal bloom records in Korean coastal waters. In: *Harmful Algal Blooms in Korea and China*, edited by Kim, H.G., S.G. Lee and C.K. Lee, National Fisheries Research and Development Institute, Republic of Korea, pp. 34-43.
- Hill, W. E., S. P. Keasler, M. W. Trucksess, P. Feng, C. A. Kaysner, and K. A. Lampel. 1991. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:707-711.
- Hochman, A., A. Nissany, D. Wynne, B. Kaplan and T. Berman, 1986. Nitrate reductase: an improved assay method for phytoplankton. *J. Plank. Res.*, 8: 385-392.
- Honjo, T., 1993. Overview on bloom dynamics and physiological ecology of *Heterosigma akashiwo*. In: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, edited by Smayda, T.J. and Y. Shimizu, Elsevier, Amsterdam, pp. 33-41.
- Jeong, H. J. 1999. The ecological role of heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic community. *J. Eukaryotic Microbiol.*, 46(4):300-306.
- Kishino M., M. Takahashi, N. Okami and S. Ichimura, 1985. Estimation of the spectral absorption coefficients of phytoplankton in the sea. *Bull. Mar.*, 22, 233-240.
- Kokinos, J. and D. Anderson, 1995, Morphological development of resting cysts in cultures of the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyderum* (=L. *Machaerophorum*). *Palynology* 19, 143-166.
- Lee, C., L.-H Chen, M.-L. Liu, and Y.-C. Su. 1992. Use of an oligonucleotide

- probe to detect *Vibrio parahaemolyticus* in artificially contaminated oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:3419-3422.
- Lee, J. H., K.-H. Lee, and S. H. Choi. 2001. Enumeration of *Vibrio vulnificus* in natural samples by colony blot hybridization. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**:302-309.
- Lee, K.-H. K.-J. Park, S.-J. Kim, D.-H. Lee, D. Jahng, and J.-C. Cho. 2001. Bioluminescent organism for detecting toxic substances. US Patent & Trademark Office. Serial No. 09/791,479
- Murphy, S. K., and J. D. Oliver. 1992. Effects of temperature abuse on survival of *Vibrio vulnificus* in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:2771-2775.
- Nixon, S. W., 1995. Coastal eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia*, **41**: 199-220.
- O'Neal, K. R., S. H. Jones, and D. J. Grimes. 1992. Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:3257-3262.
- Oliver, J. D., K. Guthrie, J. Preyer, A. Wright, L. M. Simpson, R. Siebeling, and J. G. Morris Jr. 1992. Use of colistin-polymixin B-cellobiose agar for isolation of *Vibrio vulnificus* from the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:737-739.
- Oliver, J. D., L. Nilsson, and S. Kjelleberg. 1991. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**:2640-2644.
- Parsons T. R., Y. Maita, and C. M. Lalli, 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press 489pp.

- Park, J. S., 1991. Red tide occurrence and countermeasure in Korea. In: *Recent Approaches of Red Tides*, Proceedings of 1990 Korean-French Seminar on Red Tides, edited by Park, J.S. and H.G. Kim, National Fisheries Research and Development Agency, Republic of Korea, pp. 1-24.
- Qin, X.-M., J.-Z. Zhou, P.-Y. Qian, 1997, Effects of Fe and Mn on the growth of a red tide dinoflagellate *scrippsiella trochoidea* (Stein) Loeblich III, *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 15(2), 173-180.
- Rueter, J. G. and D.R. Ades. 1987. The role of iron nutrition in photosynthesis and nitrogen assimilation in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 23, 452-457.
- Reddy, G. P., U. Hayat, C. Abeygunawardana, C. Fox, A. C. Wright, D. R. Maneval Jr., C. A. Bush, and J. G. Morris Jr. 1992. Purification and determination of the structure of capsular polysaccharide of *Vibrio vulnificus* M06-24. *J. Bacteriol.*, 174:2620-2630.
- Roszak, D. B., and R. R. Colwell. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, 51:365-379.
- Ruby, E. G. 1996. Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.*
- Samuelson, G. and G. Öquist. 1976. A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on *in vivo* chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant.*, 40, 315-319.
- Sakshaug E., D. Slagstad and O. Holm-Hansen (1991) Factors controlling the development of phytoplankton blooms in the Antarctic Ocean-a mathematical model. *Marine Chemistry*, 35, 259-271.

- Smayda, T. J., 1997. What is a bloom? A commentary. *Limnol. Oceanogr.*, **42**: 1132-1136.
- Solomonson, L. P. and M. J. Barber, 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulations. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, **41**: 225-253.
- Stelma, G. N., A. L. Reyes, J. T. Peeler, C. H. Johnson, and P. L. Spaulding. 1992. Virulence characteristics of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:2776-2782.
- Syrett, P. J., 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*, **210**: 182-210.
- Tamplin, M. L., A. L. Martin, A. D. Ruple, D. W. Cook, and C. W. Kaspar. 1991. Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediment, and oyster. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**:1235-1240.
- Tassan S. and G.M. Ferrari, 1995. An alternative approach to absorption measurement of aquatic particles retained on the filters. *Limnol. Oceanogr.*, **40**, 1358-1368.
- Tassan S. and G.M. Ferrari, 1995. An alternative approach to absorption measurement of aquatic particles retained on the filters. *Limnol. Oceanogr.*, **40**, 1358-1368.
- West, P. A., J. V. Lee, and T. N. Bryant. 1983. A numerical taxonomic study of species of *Vibrio* isolated from the aquatic environment and birds in Kent, England. *J. Appl. Bacteriol.*, **55**:263-282.
- Wright, A. C., L. M. Simpson, J. D. Oliver, and G. Morris Jr. 1990. Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.*, **58**:1769-1773.

- Wright, A. C., R. T. Hill, J. A. Janson, M-C. Roghman, R. R. Colwell, and J. G. Morris, Jr. 1996. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 717- 724.
- Yamochi, S., 1984. Nutrient factors involved in controlling the growth of red tide flagellates *Prorocentrum micans*, *Eutreptiella* sp. and *Chattonella marina* in Osaka Bay. *Bull. Plank. Soc. Japan*, **31**: 97-106.
- Yang, S. R., H. S. Song, S. J. Pae and S-H. Huh, 1999. Effects of iron, chelators and nitrate concentration on *in vivo* fluorescence and nitrate reductase of the red tide organism *Amphidinium carterae*. *J. Korean Soc. Oceanogr.*, **34**: 49-57.

Appendices

Appendix 1. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients in the study area in February, 2000

Time	Depth [m]	Temp. [°C]	Salinity	DO [ml l ⁻¹]	Chl <i>a</i> [mg m ⁻³]	NO ₂ [μM]	NO ₃ +NO ₂ [μM]	PO ₄ [μM]	SiO ₂ [μM]	NH ₄ μM	N/P
6:00	0	6.37	32.59	-	2.27	0.12	0.20	0.02	5.94	1.42	3.63
	5	6.40	32.96	-	3.19	0.09	0.20	0.00	6.12	2.01	-
	12	6.57	32.16	-	2.51	0.54	0.65	0.08	6.34	2.94	1.41
8:00	0	6.22	33.08	-	2.21	0.06	0.29	0.08	4.54	5.86	2.81
	5	6.27	33.50	-	2.69	0.07	0.12	0.05	4.51	2.09	0.96
	12	6.27	33.57	-	2.51	0.06	0.06	0.01	4.76	1.71	0.68
10:00	0	6.30	33.48	-	1.80	0.09	0.10	0.02	4.21	1.54	0.89
	5	6.32	33.56	-	3.13	0.09	0.19	0.04	4.32	1.72	2.73
	12	6.32	33.58	-	2.72	0.08	0.18	0.03	4.46	1.57	3.43
12:00	0	6.46	33.70	-	2.24	0.05	0.71	0.03	6.09	2.00	26.26
	5	6.37	33.62	-	2.48	0.07	0.07	0.06	5.60	1.01	0.01
	13	6.36	33.57	-	2.68	0.09	0.18	0.00	5.05	2.50	22.55
14:00	0	6.62	33.64	-	1.53	0.05	0.12	0.00	5.55	1.54	28.56
	5	6.57	33.58	-	2.48	0.17	0.19	0.02	5.52	1.85	1.19
	13	6.56	33.58	-	2.51	0.11	0.19	0.02	5.18	1.28	3.55
16:00	0	6.73	33.58	7.43	1.80	0.08	0.14	0.05	5.62	1.80	1.10
	1	6.73	33.58	7.32	-	-	-	-	-	-	-
	2	6.70	33.60	7.53	-	-	-	-	-	-	-
	3	6.69	33.60	7.41	-	-	-	-	-	-	-
	5	6.66	33.58	8.19	2.51	0.07	0.08	-	2.81	1.47	-
	13	6.63	33.58	7.59	2.95	0.08	0.10	0.02	3.74	2.13	0.97
18:00	0	6.63	33.58	-	2.24	0.16	2.71	0.05	5.65	1.53	46.53
	5	6.64	33.58	-	2.04	0.22	0.78	0.04	5.35	1.40	15.04
	13	6.64	33.58	-	2.48	0.14	0.20	0.03	5.03	1.59	1.96
Min.		6.22	32.16	7.32	1.53	0.05	0.06	0.00	2.81	1.01	0.01
Max.		6.73	33.70	8.19	3.19	0.54	2.71	0.08	6.34	5.86	46.53
Average		6.50	33.44	7.58	2.43	0.12	0.36	0.03	5.07	1.95	8.65

Appendix 2. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients
in the study area in March, 2000

Time	Depth	Temp.	Salinity	DO	Chl α	NO ₂	NO ₃ +NO ₂	PO ₄	SiO ₂	NH ₄	N/P
	[m]	[°C]	[ppt]	[ml l ⁻¹]	[mg m ⁻³]	[µM]	[µM]	[µM]	[µM]	µM	
17:00	0	7.33	32.97	7.91	1.83	0.36	15.72	0.44	20.46	0.77	35.26
	1	-	-	8.34	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	8.14	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	7.79	-	-	-	-	-	-	-
	5	7.17	33.22	7.98	2.24	0.35	16.32	0.09	21.77	2.08	171.14
	11	7.18	33.23	7.96	2.41	0.22	15.48	0.24	22.65	1.50	63.99
19:00	0	7.13	33.25	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	7.15	33.25	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	7.15	33.25	-	-	-	-	-	-	-	-
21:00	0	-	-	-	1.80	0.40	16.94	0.24	20.37	2.22	69.78
	5	-	-	-	2.04	0.51	14.68	0.15	18.64	1.80	96.93
	11.5	-	-	-	2.27	0.35	21.77	0.17	25.28	2.98	127.81
23:00	0	7.17	33.29	-	1.18	0.38	22.59	0.27	34.50	1.98	81.30
	5	7.21	33.26	-	2.10	0.51	17.62	0.32	20.88	1.14	53.26
	13	7.24	33.27	-	1.66	0.38	17.37	0.22	21.85	1.28	76.87
1:00	0	7.14	33.26	-	1.80	0.41	21.57	0.14	26.07	1.85	152.39
	5	7.15	33.26	-	1.83	0.38	17.30	0.18	22.10	2.09	95.25
	13	7.17	33.26	-	1.83	0.26	14.93	0.15	20.41	0.43	94.98
3:00	0	7.17	33.29	-	1.39	0.25	19.49	0.13	29.38	1.59	151.92
	5	7.21	33.26	-	1.63	0.22	18.35	0.10	29.05	1.91	177.35
	12	7.24	33.27	-	1.83	0.21	16.26	0.10	21.24	2.11	132.58
5:00	0	6.72	33.57	-	1.39	0.21	14.22	0.06	20.50	0.78	240.70
	5	7.13	33.25	-	1.12	0.34	14.29	0.10	31.03	0.75	136.14
	11.5	7.13	33.26	-	2.04	0.57	20.86	0.11	23.23	0.81	189.41
7:00	0	-	-	-	2.24	0.27	18.85	0.22	20.43	0.71	83.60
	5	-	-	-	2.48	0.35	16.55	0.07	19.76	1.12	246.16
	10	-	-	-	2.01	0.23	10.47	0.05	16.93	0.61	203.09
9:00	0	7.03	33.25	7.84	1.83	0.21	14.63	0.06	19.68	0.42	223.58
	1	-	-	8.04	-	0.35	20.65	0.15	22.65	0.52	131.10
	2	-	-	8.41	-	0.32	13.97	0.06	19.00	0.68	228.57
	3	-	-	7.99	-	-	-	-	-	-	-
	5	7.03	33.25	8.37	2.04	-	-	-	-	-	-
	11.5	7.04	33.25	-	2.27	-	-	-	-	-	-
11:00	0	7.12	33.25	-	1.80	0.28	14.81	0.04	20.43	0.70	413.94
	5	7.11	33.25	-	2.24	0.28	20.15	0.06	23.29	1.08	307.60
	13	7.11	33.25	-	3.09	0.38	24.08	0.08	34.46	1.38	287.26
13:00	0	7.32	33.26	7.91	1.94	0.34	18.20	0.07	23.10	2.57	268.53
	1	-	-	8.45	-	0.44	16.15	0.05	20.90	1.12	302.73
	2	-	-	8.50	-	0.23	15.67	0.07	21.11	1.66	209.54
	3	-	-	8.27	-	-	-	-	-	-	-
	5	7.34	33.27	7.92	2.21	-	-	-	-	-	-
	13	7.34	33.27	8.79	2.45	-	-	-	-	-	-
15:00	0	7.28	33.26	-	2.45	0.25	17.55	0.05	20.74	0.81	383.51
	5	7.27	33.26	-	1.12	0.10	16.54	0.12	21.07	0.71	138.01
	13	7.26	33.26	-	1.09	0.21	13.31	0.01	20.12	0.73	962.71
Min.		6.72	32.97	7.79	1.09	0.10	10.47	0.01	16.93	0.42	35.26
Max.		7.34	33.57	8.79	3.09	0.57	24.08	0.44	34.50	2.98	962.71
Average		7.17	33.26	8.15	1.93	0.32	17.19	0.13	22.82	1.30	199.00

Appendix 3. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients
in the study area in April, 2000

Time	Depth [m]	Temp. [°C]	Salinity [ppt]	DO [ml l ⁻¹]	Chl <i>a</i> [mg m ⁻³]	NO ₂ [μM]	NO ₃ +NO ₂ [μM]	PO ₄ [μM]	SiO ₂ [μM]	NH ₄ [μM]	N/P
16:00	0	15.10	33.64	-	1.43	0.28	13.39	0.20	21.37	1.90	66.15
	5	13.57	34.74	-	1.42	0.24	12.58	0.16	20.02	1.98	77.63
	12	13.41	34.92	-	1.30	0.21	16.86	0.21	22.74	2.40	78.10
19:00	0	13.58	34.70	-	0.42	0.26	15.36	0.20	19.21	1.22	75.04
	5	13.56	34.76	-	0.89	0.24	12.67	0.15	20.79	1.03	81.26
	11.5	13.42	34.92	-	1.36	0.20	8.79	0.30	18.56	1.79	28.15
22:00	0	9.86	38.70	-	0.89	0.21	13.57	0.06	21.26	0.70	239.11
	5	13.31	35.50	-	0.89	0.39	13.79	0.14	20.87	1.27	93.70
	10	13.36	35.49	-	0.89	0.19	16.42	0.30	23.16	0.94	54.61
1:00	0	-	-	-	0.89	0.28	15.71	0.17	22.41	1.18	92.90
	5	-	-	-	0.47	0.30	14.78	0.03	18.40	1.18	464.01
	11.5	-	-	-	1.35	0.24	10.52	0.01	19.59	0.64	-
4:00	0	13.20	35.56	-	1.30	0.27	12.57	0.21	20.54	0.55	58.86
	5	13.21	35.58	-	1.36	0.74	16.73	0.31	22.37	1.35	51.17
	13	13.23	35.56	-	1.30	0.37	12.30	0.27	20.38	1.55	43.70
7:00	0	13.20	35.32	-	1.30	0.47	17.87	0.18	22.74	1.12	96.65
	5	13.24	35.50	-	0.88	0.23	14.34	0.19	21.97	0.75	73.67
	13	13.25	35.48	-	0.88	0.22	14.64	0.24	22.14	1.54	60.17
10:00	0	13.45	35.11	6.44	0.88	1.11	21.26	0.07	20.84	6.42	273.04
	1	-	-	6.47	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	6.42	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	6.40	-	-	-	-	-	-	-
	5	13.38	35.13	6.43	0.88	0.42	18.24	0.06	22.94	1.83	282.86
	13	13.30	35.20	6.93	0.88	0.32	6.12	0.10	16.97	0.28	58.95
13:00	0	13.36	35.22	6.88	0.47	0.25	12.20	0.08	14.14	1.51	152.72
	1	13.36	35.22	6.81	-	-	-	-	-	-	-
	3	13.36	35.16	6.69	-	-	-	-	-	-	-
	5	13.405	35.12	6.75	0.94	0.53	16.91	0.10	20.19	1.46	157.93
	13	13.355	35.22	7.02	1.42	0.42	11.27	0.12	15.39	2.54	89.04
ref	0	13.47	-	6.44	1.77	0.83	1.17	0.20	30.33	5.71	1.77
11:00	1	13.46	-	6.31	-	-	-	-	-	-	-
	2	13.45	-	6.28	-	-	-	-	-	-	-
	3	13.44	-	6.24	-	-	-	-	-	-	-
	5	13.35	-	6.49	1.83	0.29	1.75	0.20	31.19	3.06	7.49
	13	13.3	-	6.43	0.94	0.35	2.39	0.18	36.56	2.42	11.28
Min.		13.30	33.64	6.24	0.47	0.25	1.17	0.08	14.14	0.28	1.77
Max.		13.47	38.70	7.02	1.83	0.83	16.91	0.20	36.56	5.71	157.93
Average		13.39	35.29	6.61	1.18	0.43	7.40	0.14	23.54	2.43	68.45

Appendix 4. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients
in the study area in May, 2000

Time	Depth	Temp.	Salinity	DO	Chl <i>a</i>	NO ₂	NO ₃ +NO ₂	PO ₄	SiO ₂	NH ₄	N/P
	[m]	[°C]	[ppt]	[ml l ⁻¹]	[mg m ⁻³]	[μM]	[μM]	[μM]	[μM]	[μM]	
9:00	0	-	-	6.52	3.90	0.45	5.60	0.28	3.13	3.1276	18.22
	1	-	-	6.86	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	6.76	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	3.22	0.61	8.93	0.68	3.28	3.2754	12.16
	12	-	-	7.12	3.43	0.44	6.40	0.46	2.73	2.7276	12.98
12:00	0	-	-	6.87	2.78	0.48	7.19	0.52	3.25	3.2485	12.96
	1	-	-	6.89	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	6.82	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	6.95	2.99	0.41	6.63	0.60	6.23	6.2286	10.36
	12	-	-	6.80	2.75	0.47	5.88	0.60	4.20	4.2005	9.08
15:00	0	-	-	6.84	3.22	0.48	6.91	0.56	4.61	4.6111	11.43
	1	-	-	6.87	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	6.89	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	6.89	4.34	0.43	8.61	0.49	2.54	2.5361	16.72
	12	-	-	7.75	3.43	0.42	6.45	0.48	3.35	3.3545	12.68
18:00	0	17.64	35.19	6.57	3.46	0.45	5.59	0.38	3.02	3.0244	13.67
	1	17.63	35.39	7.01	-	-	-	-	-	-	-
	3	17.66	35.47	6.95	-	-	-	-	-	-	-
	5	17.6	35.66	7.27	2.98	0.68	6.59	0.55	6.53	6.5301	10.68
	12	17.26	35.79	-	2.99	0.40	6.86	0.59	5.77	5.7715	10.92
21:00	0	17.35	34.89	6.54	2.31	0.43	6.05	0.57	4.71	4.7124	9.84
	1	17.37	35.33	6.82	-	-	-	-	-	-	-
	3	17.41	35.3	6.68	-	-	-	-	-	-	-
	5	17.41	35.28	6.76	2.98	0.63	6.19	0.53	3.54	3.5398	10.46
	11.7	17.38	35.46	6.75	3.43	0.48	6.26	0.55	4.07	4.069	10.58
0:00	0	17.76	35.19	6.82	3.43	0.43	6.53	0.41	4.38	4.3817	14.95
	1	17.76	35.37	6.49	-	-	-	-	-	-	-
	3	17.76	35.29	6.83	-	-	-	-	-	-	-
	5	17.77	35.27	6.24	3.67	0.36	8.28	0.60	2.81	2.8141	13.30
	11	17.59	35.07	6.64	3.22	0.28	4.38	0.31	2.38	2.3794	13.04
6:00	0	17.43	35.31	6.75	3.22	0.33	5.35	0.40	2.92	2.9182	12.46
	1	17.42	35.05	6.83	-	-	-	-	-	-	-
	3	17.39	35.31	6.61	-	-	-	-	-	-	-
	5	17.38	35.3	6.60	3.90	0.48	7.42	0.56	2.30	2.3026	12.38
	10	17.27	35.29	6.58	4.38	0.39	4.75	0.48	2.83	2.829	9.15
9:00	0	-	-	6.71	2.75	0.38	3.92	0.35	3.41	3.4088	10.06
	1	-	-	6.60	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	6.69	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	6.61	2.78	0.49	6.40	0.39	2.47	2.4709	15.20
	12	-	-	6.79	3.19	0.44	5.90	0.42	3.17	3.171	13.10
ref.	0	-	-	7.51	3.66	-	-	-	-	-	-
11:00	1	-	-	6.97	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	6.84	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	6.82	2.78	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	6.75	2.51	-	-	-	-	-	-
Min.		17.26	34.89	6.24	2.31	0.28	3.92	0.28	2.30	2.30	9.08
Max.		17.77	35.79	7.75	4.38	0.68	8.93	0.68	6.53	6.53	18.22
Average		17.51	35.31	6.81	3.25	0.45	6.38	0.49	3.65	3.65	12.35

Appendix 5. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients
in the study area in June, 2000

Time	Depth	Temp.	Salinity	DO	Chl <i>a</i>	NO ₂	NO ₂ +NO	PO ₄	SiO ₂	NH ₄	N:P
	[m]	[°C]	[ppt]	[ml l ⁻¹]	[mg m ⁻³]	[µM]	[µM]	[µM]	[µM]	[µM]	
13:30	0	19.38	32.72	6.60	0.92	0.37	1.06	0.42	8.55	1.77	1.62
	1	19.38	32.71	6.44	-	-	-	-	-	-	-
	3	19.33	32.68	6.49	-	-	-	-	-	-	-
	5	19.25	32.62	6.34	1.15	0.52	1.39	0.38	8.81	1.24	2.29
	11	19.2	32.7	6.33	1.36	2.47	2.57	0.34	8.45	1.67	0.28
15:30	0	19.31	32.77	6.25	1.15	1.01	2.16	0.40	8.86	1.88	2.90
	1	19.31	32.78	6.35	-	-	-	-	-	-	-
	3	19.26	32.77	6.28	-	-	-	-	-	-	-
	5	19.24	32.79	8.47	1.12	0.59	1.88	0.40	9.13	2.86	3.19
	10	19.2	32.81	6.31	0.68	0.52	2.68	0.41	9.03	1.69	5.27
17:30	0	19.29	32.8	6.64	-	0.42	1.82	0.43	9.36	1.80	3.23
	1	19.29	32.8	5.87	-	-	-	-	-	-	-
	3	19.28	32.8	6.61	-	-	-	-	-	-	-
	5	19.25	32.79	6.39	0.71	0.43	1.80	0.46	9.37	1.53	3.01
	10	19.22	32.85	6.43	1.12	0.33	1.64	0.34	7.81	2.33	3.81
19:30	0	19.22	32.91	6.27	-	0.54	1.63	0.44	9.12	3.47	2.49
	1	19.23	32.89	6.42	-	0.45	1.57	0.43	8.76	1.72	2.59
	3	19.21	32.9	6.44	-	0.22	0.93	0.24	4.91	2.39	2.90
	5	19.21	32.89	6.13	-	-	-	-	-	-	-
	10	19.19	32.83	6.35	-	-	-	-	-	-	-
21:30	0	20.45	32.7	6.21	0.95	0.27	1.21	0.39	7.57	3.50	2.43
	1	20.48	32.76	6.34	-	-	-	-	-	-	-
	3	20.47	32.7	6.15	-	-	-	-	-	-	-
	5	20.25	32.67	6.28	1.15	0.23	0.92	0.29	3.27	1.99	2.35
	10	19.72	32.62	6.48	1.36	0.38	1.57	0.36	8.67	2.67	3.30
23:30	0	19.49	32.98	6.02	0.71	0.31	1.14	0.35	7.47	1.55	2.39
	1	19.49	32.97	5.97	-	-	-	-	-	-	-
	3	19.49	32.98	6.13	-	-	-	-	-	-	-
	5	19.44	32.97	5.98	1.42	0.48	1.33	0.39	9.53	1.09	2.16
	10	19.31	32.98	5.89	1.16	0.37	1.41	0.40	9.61	1.69	2.57
1:30	0	19.24	33.01	5.87	0.92	0.40	1.66	0.43	9.49	2.00	2.94
	1	19.24	33.01	5.83	-	-	-	-	-	-	-
	3	19.23	33.02	5.83	-	-	-	-	-	-	-
	5	19.2	33.01	6.43	1.36	0.13	0.81	0.17	2.38	1.38	3.95
	13	19.14	33.01	5.81	1.39	0.34	1.29	0.33	6.95	2.20	2.89
3:30	0	18.73	33.03	6.41	0.95	0.20	0.90	0.30	4.18	1.96	2.32
	1	18.76	33.03	6.34	-	-	-	-	-	-	-
	3	18.74	33.03	6.26	-	-	-	-	-	-	-
	5	18.64	33.03	6.43	0.95	0.34	1.08	0.28	5.59	1.46	2.63
	11	18.44	33.07	5.86	1.36	0.31	1.11	0.27	5.38	1.43	2.90
5:30	0	18.88	32.97	5.59	1.15	0.32	1.09	0.28	5.37	2.40	2.76
	1	18.88	32.97	6.26	-	-	-	-	-	-	-
	3	18.88	32.96	5.56	-	-	-	-	-	-	-
	5	18.87	32.97	5.96	1.36	0.21	0.68	0.17	2.71	1.43	2.78
	11	18.87	32.97	6.13	1.15	0.45	1.71	0.44	8.97	2.11	2.82
7:30	0	19.01	33.12	6.06	0.71	0.24	0.87	0.23	3.95	2.16	2.69
	1	19.01	33.11	6.21	-	-	-	-	-	-	-
	3	19	33.11	5.14	-	-	-	-	-	-	-
	5	18.96	33.13	4.95	0.92	0.27	0.78	0.20	3.51	1.38	2.53
	11	18.93	33.12	6.27	1.15	0.29	0.95	0.23	3.92	3.03	2.88
9:30	0	19.3	32.87	5.64	1.15	0.32	1.05	0.24	4.45	3.44	3.02
	1	19.32	32.85	5.34	-	-	-	-	-	-	-
	3	19.15	33.03	5.61	-	-	-	-	-	-	-
	5	19.05	33.12	4.89	0.71	0.32	1.30	0.27	5.32	2.32	3.56
	11	19.04	33.12	5.84	0.95	0.32	0.93	0.24	4.34	1.66	2.54
11:30	0	19.88	32.86	-	1.39	0.34	1.10	0.32	6.71	2.05	2.41
	5	19.71	32.93	-	1.15	0.33	1.28	0.31	6.41	1.58	3.08
	11	19.24	33	-	0.95	0.23	0.72	0.21	3.41	2.39	2.36
13:30	0	19.34	33.2	-	0.92	0.44	1.06	0.21	4.76	2.02	2.90
	5	19.38	33.14	-	1.15	0.28	0.91	0.22	3.76	1.80	2.85
	11	19.38	33.13	-	1.15	0.69	1.84	0.46	10.13	1.78	2.53
ref.	0	19.13	33.18	5.51	0.92	0.49	2.29	0.40	9.05	2.16	4.51
17:00	1	19.13	33.18	5.37	-	-	-	-	-	-	-
	3	19.13	33.17	5.72	-	-	-	-	-	-	-
	5	19.11	33.17	5.81	0.92	0.51	2.22	0.46	8.42	1.79	3.73
	18	18.85	33.19	5.69	0.71	0.47	2.08	0.41	8.69	1.30	3.88
Min.		18.44	32.62	4.89	0.68	0.13	0.68	0.21	2.38	1.09	0.28
Max.		20.48	33.20	8.47	1.42	2.47	2.68	0.46	10.13	3.50	5.27
Average		19.25	32.95	6.08	1.07	0.43	1.40	0.31	6.77	2.01	2.89

Appendix 6. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients
in the study area in July, 2000

Time	Depth [m]	Temp [°C]	Salinity [ppt]	DO [ml l ⁻¹]	Chl <i>a</i> [mg m ⁻³]	NO ₂ [μM]	NO ₃ +NO [μM]	PO ₄ [μM]	SiO ₂ [μM]	NH ₄ [μM]	N/P
14:00	0	23.15	29.9	6.42	1.24	0.51	2.88	0.38	10.84	11.18	6.23
	1	22.86	30.06	6.35	-	-	-	-	-	-	-
	2	22.57	30.13	6.92	-	-	-	-	-	-	-
	3	22.33	30.25	6.40	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.79	30.47	6.46	1.11	0.42	2.29	0.25	8.38	7.78	7.58
	15	21.51	30.66	6.56	1.02	0.61	2.62	0.38	5.20	9.13	5.30
16:00	0	22.21	30.91	6.29	1.12	0.48	1.99	0.22	10.58	11.18	6.80
	1	22.17	31.4	6.30	-	-	-	-	-	-	-
	3	21.94	31.49	6.43	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.69	31.61	6.50	1.14	0.57	2.59	0.31	9.75	11.13	6.54
	13	21.26	31.85	7.94	1.10	0.48	3.03	0.25	6.45	10.65	10.21
18:00	0	22.61	31.12	6.29	1.24	0.47	2.76	0.28	9.53	9.63	8.16
	1	22.56	31.14	6.50	-	-	-	-	-	-	-
	3	22.46	31.2	6.29	-	-	-	-	-	-	-
	5	22.34	31.29	5.58	1.00	0.54	-	0.23	10.58	14.25	-
	11	21.42	31.76	5.70	0.99	0.39	2.21	0.22	5.58	6.10	8.12
20:00	0	23.39	30.55	6.17	1.34	0.43	3.21	0.27	10.75	11.18	10.26
	1	23.48	30.49	6.98	-	-	-	-	-	-	-
	3	23.23	30.71	6.18	-	-	-	-	-	-	-
	5	22.88	30.95	6.19	0.99	0.48	2.49	0.30	10.36	9.93	6.64
	11	22.27	31.31	6.34	1.21	0.43	2.32	0.28	9.29	8.59	6.84
22:00	0	22.23	31.37	6.39	2.24	0.41	2.36	0.25	12.50	13.78	7.94
	1	22.25	31.32	6.18	-	-	-	-	-	-	-
	3	21.91	31.51	6.01	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.89	31.52	5.84	1.53	0.49	3.46	0.22	7.90	14.13	13.49
	12	21.48	31.76	6.57	2.12	0.52	3.18	0.21	6.96	14.56	12.73
0:00	0	22.23	31.37	6.17	1.77	0.55	2.37	0.28	7.08	10.67	6.57
	1	22.25	31.32	6.23	-	-	-	-	-	-	-
	3	21.91	31.51	6.22	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.89	31.52	5.96	1.77	0.39	1.85	0.26	9.19	7.96	5.53
	12	21.46	31.77	6.38	1.56	0.45	1.77	0.24	7.05	10.74	5.45
2:00	0	20.08	30.72	6.35	1.77	0.39	1.88	0.20	6.32	8.76	7.27
	1	20.08	30.72	6.27	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	6.36	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	6.02	1.53	0.42	1.85	0.24	6.68	9.68	5.88
	13	-	-	6.99	4.51	0.40	1.79	0.26	5.39	12.16	5.26
4:00	0	22.1	30.81	6.27	0.99	0.45	1.93	0.30	4.46	8.88	4.89
	5	21.82	30.85	6.35	0.97	0.40	1.68	0.25	7.02	4.97	5.18
	13	21.36	31.11	6.17	0.66	0.46	1.84	0.25	7.16	8.51	5.65
6:00	0	22.26	30.61	5.87	0.78	0.44	2.07	0.28	7.82	9.49	5.77
	5	22.21	30.65	6.23	0.88	0.62	3.88	0.25	6.86	12.11	13.02
	12	21.59	30.97	6.48	0.78	0.51	2.71	0.34	8.15	13.81	6.46
8:00	0	23.17	30.06	6.09	1.00	0.53	1.98	0.32	9.61	7.07	4.48
	5	22.75	30.32	6.35	0.90	0.46	2.77	0.28	6.58	12.42	8.20
	11	22.27	30.58	6.25	0.88	0.72	3.63	0.33	8.24	-	8.91
10:00	0	22.11	30.73	5.77	1.24	0.51	2.21	0.29	8.74	8.29	5.80
	5	21.97	30.78	5.94	0.80	0.40	1.89	0.22	7.37	8.14	6.83
	11	21.83	30.86	6.01	0.68	0.54	2.81	0.26	6.92	8.40	8.61
12:00	0	23.4	29.96	4.62	1.14	0.67	3.16	0.40	6.02	10.15	6.16
	5	23.07	30.17	6.10	0.80	0.58	2.45	0.24	7.18	8.90	7.89
	11	22.07	30.7	6.46	0.68	0.47	2.69	0.30	5.93	8.04	7.28
14:00	0	21.9	30.85	5.12	0.90	0.47	2.17	0.33	7.35	9.28	5.11
	5	21.63	30.98	5.97	0.58	0.48	2.37	0.28	6.22	9.62	6.81
	13	21.5	31.05	6.01	0.80	0.47	2.16	0.32	5.70	9.80	5.23
Min.		20.08	29.90	4.62	0.58	0.39	1.68	0.20	4.46	4.97	4.48
Max.		23.48	31.85	7.94	4.51	0.72	3.88	0.40	12.50	14.56	13.49
Average		22.13	30.94	6.24	1.22	0.49	2.46	0.28	7.79	10.03	7.24

Appendix 7. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients
in the study area in August, 2000

Time	Depth (m)	Temp. (°C)	Salinity (ppt)	DO (ml l ⁻¹)	Chl <i>a</i> (mg m ⁻³)	NO ₂ [μM]	NO ₃ +NO [μM]	PO ₄ [μM]	SiO ₂ [μM]	NH ₄ [μM]	N/P
14:00	0	27.08	29.56	5.72	7.67	0.48	1.19	0.20	13.48	5.76	3.52
	2	26.23	30.53	4.05	-	-	-	-	-	-	-
	5	25.44	31.3	5.10	4.55	0.60	1.79	0.23	9.46	5.71	5.11
	7	25.39	31.34	4.96	-	-	-	-	-	-	-
	11	24.83	31.89	4.85	1.83	0.66	2.32	0.24	8.72	4.26	6.88
16:00	0	25.52	31.23	4.98	3.28	0.64	2.27	0.30	10.41	7.10	5.48
	2	25.52	31.26	4.93	-	-	-	-	-	-	-
	5	24.98	31.73	4.91	1.82	0.73	2.48	0.38	9.82	8.30	4.55
	7	24.82	31.86	4.85	-	-	-	-	-	-	-
	12	24.74	31.92	4.74	1.6	0.84	2.69	0.41	9.06	5.49	4.53
18:00	0	24.57	32.03	4.37	1.24	0.98	2.69	0.41	9.12	7.47	4.19
	2	24.56	32.05	4.85	-	-	-	-	-	-	-
	5	24.44	32.12	4.46	1.14	0.87	2.48	0.35	8.77	4.79	4.56
	7	24.41	32.14	4.95	-	-	-	-	-	-	-
	13	24.36	32.17	4.89	1.36	1.19	2.41	0.19	5.55	7.76	6.32
20:00	0	24.48	32.12	3.04	1.36	0.90	2.53	0.40	9.50	5.59	4.12
	2	24.46	32.12	4.79	-	-	-	-	-	-	-
	5	24.47	32.12	4.91	1.36	0.79	2.14	0.37	7.79	5.52	3.68
	7	24.46	32.12	4.85	-	-	-	-	-	-	-
	12	24.44	32.13	4.88	1.36	0.67	2.39	0.48	8.61	6.37	3.58
22:00	0	25.13	31.35	4.99	1.82	0.73	2.40	0.31	10.00	7.12	5.34
	2	25.13	31.35	4.81	-	-	-	-	-	-	-
	5	24.95	31.56	4.63	1.26	0.65	2.40	0.34	9.51	7.38	5.09
	7	24.87	31.68	4.89	-	-	-	-	-	-	-
	12	24.53	32.08	4.85	1.48	0.78	3.02	0.66	9.22	13.18	3.39
0:00	0	25.42	30.62	3.16	1.58	0.68	2.79	0.31	11.24	10.57	6.78
	2	25.41	30.67	3.66	-	-	-	-	-	-	-
	5	25.39	30.71	4.96	1.26	0.72	2.56	0.36	8.95	7.86	5.17
	7	25.23	31.02	4.46	-	-	-	-	-	-	-
	11	24.82	31.65	4.91	1.36	0.60	2.36	0.33	10.60	5.12	5.32
2:00	0	25.65	30.26	4.76	1.37	0.44	1.63	0.21	12.73	5.70	5.58
	2	25.61	30.38	4.86	-	-	-	-	-	-	-
	5	25.5	30.54	4.94	1.37	0.74	2.56	0.44	11.95	8.67	4.15
	7	25.47	30.61	4.94	-	-	-	-	-	-	-
	11	25.08	31.25	4.81	1.14	0.78	2.67	0.46	10.60	7.94	4.09
4:00	0	25.03	31.11	4.83	1.14	0.49	1.93	0.23	8.76	6.79	6.22
	2	24.84	31.44	5.31	-	-	-	-	-	-	-
	5	24.82	31.46	4.62	1.03	0.58	1.87	0.27	10.20	4.62	4.76
	7	24.81	31.49	4.78	-	-	-	-	-	-	-
	10	24.45	32.02	5.04	1.14	0.59	2.00	0.28	9.96	6.47	4.98
6:00	0	24.5	31.82	4.64	1.14	0.94	2.87	0.28	11.24	-	6.77
	5	24.36	32.01	0.92	0.92	0.98	2.58	0.24	9.36	5.28	6.73
	10	24.31	32.06	4.86	1.24	-	-	-	-	-	-
	0	24.62	31.7	3.69	1.37	0.97	2.69	0.44	13.29	7.58	3.88
	2	24.63	31.69	3.43	-	-	-	-	-	-	-
8:00	5	24.56	31.77	3.32	1.03	0.85	2.48	0.29	12.10	6.52	5.60
	7	24.55	31.78	4.88	-	-	-	-	-	-	-
	10	24.44	31.93	4.74	1.02	0.92	2.52	0.22	10.49	6.25	7.44
	0	25.17	30.91	4.81	0.92	0.75	2.75	0.32	11.64	7.26	6.26
	2	25.18	30.89	4.29	-	-	-	-	-	-	-
10:00	5	24.88	31.42	4.78	0.92	0.90	3.89	0.49	9.56	-	6.16
	10	24.25	32.09	4.83	0.9	0.89	2.47	0.43	9.69	8.33	3.67
	0	25.59	30.23	4.73	1.82	1.03	7.83	0.58	24.45	8.50	11.72
	2	25.52	30.43	4.63	-	-	-	-	-	-	-
	5	25.36	30.66	4.72	1.14	1.11	3.77	0.30	13.18	6.47	9.02
12:00	7	25.15	30.95	4.63	-	-	-	-	-	-	-
	10	24.37	31.97	-	0.81	0.95	2.68	0.42	11.44	6.44	4.11
	0	25.86	27.96	-	2.65	0.98	6.77	0.27	24.48	7.34	21.77
	5	24.91	31.42	4.67	1.96	0.69	2.44	0.16	14.61	6.84	10.96
	11	24.62	31.71	3.38	1.59	1.05	2.97	0.22	13.01	7.20	8.72
ref. 15:00	0	26.14	28.07	4.46	2.27	-	-	-	-	-	-
	2	25.96	29.36	4.95	-	-	-	-	-	-	-
	5	25.42	30.46	4.73	1.03	-	-	-	-	-	-
	7	25.18	31.2	4.85	-	-	-	-	-	-	-
	13	24.67	31.75	4.86	0.92	-	-	-	-	-	-
Min.		24.25	27.96	3.04	0.81	0.44	1.19	0.16	5.55	4.26	3.39
Max.		27.08	32.17	5.72	7.67	1.19	7.83	0.66	24.48	13.18	21.77
Average		25.01	31.28	4.65	1.62	0.79	2.74	0.34	11.12	6.93	6.06

Appendix 8. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients in the study area in September, 2000

Time	Depth [m]	Temp [°C]	Salinity [ppt]	DO [ml l ⁻¹]	Chl <i>a</i> [mg m ⁻³]	NO ₂ [μM]	NO ₃ +NO [μM]	PO ₄ [μM]	SiO ₃ [μM]	NH ₄ [μM]	N/P
17:00	0	-	-	5.97	1.40	1.88	5.59	0.41	8.88	5.36	9.04
	2	-	-	6.12	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	6.38	1.40	1.37	3.83	0.31	7.41	5.69	8.03
	11	-	-	6.08	1.10	1.07	3.11	0.22	4.20	6.29	9.06
19:00	0	21.54	30.25	5.87	1.36	1.59	4.64	0.38	7.94	5.39	8.11
	2	21.63	30.21	5.95	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.64	30.39	4.00	1.10	1.60	5.81	0.38	7.96	6.26	11.16
	11	21.63	30.56	5.91	1.99	1.66	4.55	0.34	9.03	5.00	8.41
21:00	0	21.64	30.63	5.16	1.14	1.37	4.20	0.34	8.78	9.14	8.36
	2	21.64	30.63	6.00	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.65	30.66	6.12	0.85	1.54	4.33	0.33	9.90	5.53	8.54
	12	21.64	30.71	6.97	1.14	1.82	5.18	0.39	10.27	5.40	8.51
23:00	0	21.6	30.87	5.91	0.55	1.94	5.47	0.50	10.19	6.06	7.06
	2	21.6	30.88	6.00	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.6	30.87	5.90	1.70	2.26	6.46	-	9.57	-	-
	7	21.6	30.87	6.12	-	-	-	-	-	-	-
	13	21.6	30.87	6.05	1.10	2.19	6.08	0.54	4.84	5.36	7.22
1:00	0	21.57	30.84	5.91	1.14	1.35	3.71	1.06	9.87	5.45	2.23
	2	21.57	30.84	5.83	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.58	30.83	6.31	1.10	1.54	4.13	0.36	9.28	5.06	7.13
	7	21.58	30.83	6.34	-	-	-	-	-	-	-
	12	21.58	30.87	5.90	1.10	2.04	5.84	0.53	8.11	5.84	7.14
3:00	0	21.57	30.76	5.84	1.40	1.68	5.17	0.43	8.73	5.04	8.08
	2	21.57	30.76	5.90	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.57	30.76	5.71	1.70	1.58	5.24	0.39	7.60	-	9.31
	7	21.57	30.76	5.93	-	-	-	-	-	-	-
	13	21.57	30.77	5.88	1.95	-	-	-	-	-	-
5:00	0	21.58	30.7	5.86	0.85	1.16	3.24	0.34	5.88	7.70	6.12
	2	21.58	30.72	5.90	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.58	30.71	5.94	0.85	1.71	5.85	0.51	7.23	5.66	8.17
	7	21.58	30.72	5.93	-	-	-	-	-	-	-
	10	21.58	30.72	5.95	1.53	1.59	4.59	0.46	6.64	8.84	6.55
7:00	0	21.49	30.2	5.86	1.08	1.21	4.59	0.23	6.28	9.17	14.46
	2	21.48	30.19	6.05	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.48	30.18	5.88	2.21	1.26	4.12	0.32	-	-	8.88
	7	21.5	30.23	6.15	-	-	-	-	-	-	-
	12	21.51	30.24	6.04	1.40	1.93	5.75	0.60	7.77	6.50	6.33
9:00	0	21.53	30.65	5.87	1.40	1.94	5.98	0.94	9.61	7.74	4.28
	2	21.53	30.65	5.77	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.54	30.64	5.08	1.10	1.17	3.45	0.27	6.99	7.32	8.49
	7	21.54	30.64	5.86	-	-	-	-	-	-	-
	12	21.55	30.65	4.84	0.81	2.03	6.27	0.48	9.07	7.40	8.73
11:00	0	21.53	30.88	5.80	1.10	1.72	4.78	0.13	7.41	3.44	23.25
	2	21.53	30.89	5.83	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.53	30.91	4.53	1.14	2.00	5.71	0.53	6.93	6.40	7.01
	7	21.53	30.93	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	21.53	30.91	5.87	2.55	1.99	5.97	0.06	9.37	8.07	63.21
13:00	0	21.58	30.86	6.24	0.85	2.06	6.14	0.56	7.81	5.10	7.32
	2	21.55	30.86	6.17	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.55	30.86	6.48	0.85	2.07	6.32	0.56	8.06	10.87	7.61
	7	21.54	30.91	6.48	-	-	-	-	-	-	-
	12	21.52	31.02	6.32	0.55	1.93	5.71	0.51	8.66	7.04	7.36
15:00	0	21.61	30.8	5.98	1.14	2.13	6.40	0.55	9.62	6.82	7.75
	2	21.61	30.8	6.22	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.61	30.83	6.32	1.40	1.61	5.32	0.47	9.10	6.58	7.84
	7	21.62	30.84	6.39	-	-	-	-	-	-	-
	13	21.61	30.84	6.58	1.14	2.07	6.34	0.60	8.29	6.18	7.08
17:00	0	21.6	11.85	6.20	1.14	2.08	6.32	0.60	10.18	6.49	7.10
	2	21.6	30.8	6.35	-	-	-	-	-	-	-
	5	21.6	30.8	6.27	1.40	2.03	6.23	0.60	8.84	5.74	7.01
	9	21.6	30.8	6.53	1.11	2.07	6.21	0.58	9.34	7.01	7.09
ref	0	-	-	5.79	0.85	2.13	5.97	0.50	4.73	3.98	7.68
12:00	2	-	-	5.81	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	5.19	1.40	1.85	5.16	0.35	5.61	8.88	9.46
	7	-	-	6.01	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	5.56	0.55	1.25	3.46	0.31	3.71	6.93	7.13
Min.		21.48	11.85	4.00	0.55	1.07	3.11	0.06	3.71	3.44	2.23
Max.		21.65	31.02	6.97	2.55	2.26	6.46	1.06	10.27	10.87	63.21
Average		21.57	30.36	5.93	1.23	1.74	5.20	0.45	7.99	6.49	9.58

Appendix 9. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients in the study area in February, 2001

Time	Depth	Temp.	Salinity	DO	Chl <i>a</i>	NO ₂	NO ₃	SiO ₂	PO ₄	N:P
	[m]	[°C]	[psu]	[ml l ⁻¹]	[mg m ⁻³]	[µM]	[µM]	[µM]	[µM]	
18:00	0	6.20	33.45	8.09	1.42	0.34	2.390	6.83	0.55	4.9
	5	6.25	33.46	8.15	0.93	0.38	1.984	3.99	0.35	6.8
	9	6.28	33.49	8.14	1.06	0.39	2.224	5.60	0.46	5.7
21:00	0	6.53	33.55	10.63	1.60	0.41	3.321	7.55	0.67	5.6
	5	6.56	33.56	7.65	1.15	0.41	3.536	8.74	0.60	6.6
	11	6.61	33.56	7.73	1.15	0.26	2.931	6.38	0.51	6.3
0:00	0	6.45	33.54	7.86	1.15	0.20	2.676	5.59	0.47	6.2
	5	6.47	33.54	7.97	1.15	0.21	2.918	6.72	0.46	6.8
	12	6.46	33.54	7.90	1.83	0.26	2.750	6.88	0.48	6.3
3:00	0	5.87	33.47	8.10	1.39	0.19	2.161	5.70	0.45	5.3
	5	5.84	33.47	8.20	0.95	0.19	1.970	5.15	0.45	4.8
	9	5.86	33.5	7.95	1.86	0.28	2.560	6.12	0.47	6.1
6:00	0	6.01	33.5	7.81	1.60	0.24	1.906	4.32	0.33	6.6
	5	6.02	33.5	7.82	1.83	0.16	1.695	4.01	0.28	6.6
	9	6.00	33.5	7.44	1.60	0.17	1.777	5.01	0.43	4.6
9:00	0	6.25	33.5	7.81	1.60	0.16	2.716	5.26	0.44	6.6
	5	6.26	33.49	8.05	2.01	0.19	1.935	5.07	0.39	5.4
	12	6.24	33.49	8.14	2.04	0.15	1.630	4.64	0.35	5.1
12:00	0	6.34	33.5	7.78	1.36	0.79	3.024	7.91	2.19	1.7
	5	6.35	33.5	7.78	1.57	0.49	12.871	5.34	1.61	8.3
	10	6.40	33.52	7.82	1.39	0.40	15.194	4.27	1.65	9.5
15:00	0	6.35	33.49	10.71	1.60	0.32	9.754	6.54	1.25	8.1
	5	6.34	33.48	9.14	2.04	0.22	1.892	4.88	0.43	4.9
	9	6.23	33.46	8.61	3.76	0.15	2.886	4.50	0.28	10.7
18:00	0	6.33	33.49	10.13	2.04	0.18	2.131	5.51	0.50	4.6
	5	6.36	33.49	9.62	3.36	0.15	2.454	5.95	0.47	5.6
	9	6.33	33.49	8.23	2.95	0.16	1.637	5.51	0.42	4.3
Min.		5.84	33.45	7.44	0.92	0.14	1.63	3.98	0.28	1.7
Max.		6.61	33.56	10.70	3.76	0.79	15.1	8.73	2.18	10.7
Average		6.26	33.50	8.34	1.71	0.27	3.51	5.70	0.62	6.1

Appendix 10. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients
in the study area in April, 2001

Time	Depth	Temp.	Salinity	DO	Chl <i>a</i>	NO ₂	NO ₃	SiO ₂	PO ₄	N/P
	[m]	[°C]	[psu]	[ml l ⁻¹]	[mg m ⁻³]	[µM]	[µM]	[µM]	[µM]	
9:00	0	10.53	33.65	10.81	3.83	0.63	3.846	5.91	0.59	7.6
	5	10.48	33.66	11.10	3.63	0.28	2.892	5.32	0.35	9.1
	8	10.46	33.67	10.73	3.84	0.15	2.011	4.11	0.28	7.6
12:00	0	11.01	33.63	11.44	4.31	0.39	3.023	2.42	0.38	8.9
	5	10.86	33.64	10.24	5.43	0.06	2.139	2.22	0.19	11.5
	10	10.82	33.65	11.13	5.43	0.15	1.353	2.33	0.25	6.0
15:00	0	11.27	33.62	11.53	4.52	0.02	0.558	1.83	0.18	3.2
	5	11.09	33.58	11.37	4.96	0.06	1.043	1.87	0.21	5.2
	8	10.84	33.62	10.90	5.43	0.11	2.419	3.01	0.31	8.1
18:00	0	10.96	33.64	11.04	3.36	0.09	1.602	3.30	0.24	7.0
	5	10.91	33.64	10.86	3.84	0.12	1.282	4.12	0.19	7.6
	10	10.88	33.66	10.47	4.99	0.12	1.437	3.14	0.28	5.5
21:00	0	10.74	33.64	10.36	3.95	0.10	2.543	5.23	0.34	7.9
	5	10.72	33.65	10.25	4.24	0.20	3.077	6.50	0.38	8.6
	11	10.65	33.67	10.18	3.36	0.19	2.502	6.48	0.41	6.5
0:00	0	11.10	33.6	10.55	3.16	0.12	1.226	3.22	0.25	5.4
	5	11.08	33.61	10.49	4.04	0.11	0.847	3.13	0.24	4.0
	9	10.97	33.61	11.06	4.07	0.19	0.966	2.89	0.27	4.4
3:00	0	10.94	33.58	10.44	3.84	0.09	0.948	2.78	0.19	5.3
	5	10.88	33.61	10.43	4.07	0.15	2.445	4.33	0.23	11.4
	9	10.88	33.63	10.34	3.83	0.15	2.705	4.90	0.28	10.3
6:00	0	10.90	33.63	10.50	4.51	0.09	1.899	4.01	0.30	6.6
	5	10.89	33.63	10.38	4.28	0.17	1.683	3.84	0.31	5.9
	11	10.87	33.64	10.42	4.31	0.10	2.578	3.43	0.33	8.1
9:00	0	10.91	33.6	10.35	3.36	0.21	2.197	4.38	0.33	7.2
	5	10.88	33.62	10.16	3.13	0.19	2.127	6.06	0.37	6.3
	13	10.66	33.67	9.97	2.25	0.21	3.066	6.77	0.46	7.1
10:00	0	10.84	33.63	10.82	4.28	0.17	2.654	5.23	0.34	8.2
	5	10.81	33.64	10.15	4.85	0.20	1.887	4.67	0.38	5.5
	12	10.63	33.65	10.18	3.76	0.14	1.746	4.19	0.30	6.3
Min.		10.460	33.580	9.974	2.249	0.023	0.558	1.827	0.18	3.2
Max.		11.270	33.670	11.527	5.432	0.629	3.846	6.770	0.58	11.5
Average		10.849	33.632	10.622	4.096	0.165	2.023	4.054	0.30	7.1

Appendix 11. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients
in the study area in June, 2001

Time	Depth	Temp.	Salinity	DO	Chl <i>a</i>	NO2	NO3	SiO2	PO4	N/P
	[m]	[°C]	[psu]	[ml l ⁻¹]	[mg m ⁻³]	[µM]	[µM]	[µM]	[µM]	
18:00	0	19.7	34.0	7.9	1.9	0.4	1.7	3.0	0.4	5.2
	5	19.8	34.1	7.9	1.9	0.6	1.3	4.0	0.3	5.4
	11	19.0	34.1	8.2	3.0	0.6	1.3	4.1	0.4	5.1
20:00	0	19.7	34.1	7.7	1.8	0.5	0.5	3.9	0.4	2.4
	5	19.4	34.0	8.0	3.0	0.6	0.7	–	0.5	2.9
	12	19.3	34.0	8.0	3.0	0.5	0.9	3.7	0.4	3.6
22:00	0	20.3	33.6	7.4	1.8	0.6	1.1	3.2	0.4	4.3
	5	20.1	33.8	7.6	1.8	0.3	0.8	4.9	0.5	2.4
	11	19.4	33.9	7.9	2.2	0.7	1.0	8.0	0.4	4.4
2:00	0	20.8	32.5	7.0	0.7	0.8	2.4	4.6	0.5	6.6
	5	20.0	33.8	7.6	2.0	0.5	1.5	5.2	0.8	2.5
	10	19.3	34.0	7.8	3.0	0.6	0.7	4.3	0.4	2.8
6:00	0	20.4	31.4	7.0	2.3	0.5	0.4	4.8	0.4	2.3
	5	19.7	33.6	7.6	1.4	0.5	0.7	3.5	0.4	3.3
	10	19.2	33.9	7.8	1.8	0.5	2.2	5.8	0.4	6.9
8:00	0	20.3	31.3	7.2	1.8	0.5	2.0	7.7	0.5	5.2
	5	19.7	33.3	7.4	2.1	0.6	3.8	–	0.8	5.5
	11	19.1	33.8	7.9	2.2	0.3	1.4	3.3	0.4	4.1
10:00	0	20.2	32.7	7.4	1.6	0.8	1.3	4.6	0.5	3.8
	5	19.7	33.3	7.6	1.6	0.4	2.6	2.7	0.3	8.5
	12	18.6	33.7	7.9	2.1	0.4	0.9	4.0	0.3	4.6
12:00	0	21.3	31.5	7.4	1.8	0.7	1.1	3.6	0.4	4.8
	5	20.2	33.1	7.6	2.0	0.7	1.8	4.2	0.4	6.7
	11	19.8	33.6	7.4	1.8	0.7	0.9	6.8	0.4	4.4
14:00	0	21.3	31.5	7.3	2.5	0.7	2.4	8.5	0.6	5.3
	5	20.2	33.1	7.6	2.0	0.7	0.8	–	0.4	3.4
	10	19.9	33.6	7.4	1.4	0.6	3.0	4.4	0.3	13.3
16:00	0	21.4	33.6	7.5	2.7	0.7	3.9	–	0.6	8.1
	5	20.6	31.3	7.6	1.6	0.7	1.2	5.8	0.6	3.2
	9	19.4	32.6	7.7	1.8	0.8	0.8	3.7	0.3	4.8
18:00	0	21.2	31.9	7.4	2.0	1.0	0.7	6.6	0.7	2.5
	5	19.9	33.4	7.7	2.0	0.5	2.1	4.0	0.4	6.9
	10	19.7	33.6	7.6	2.0	0.6	1.4	3.7	0.3	5.8
Min.		18.6	31.3	7.0	0.7	0.3	0.4	2.7	0.3	2.3
Max.		21.4	34.1	8.2	3.0	1.0	3.9	8.5	0.8	13.3
Aver.		20.0	33.2	7.6	2.0	0.6	1.5	4.7	0.4	4.9

Appendix 12. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients in the study area in August, 2001

Time	Depth	Temp.	Salinity	pH	DO	Chl <i>a</i>	NO ₂	NO ₃	SiO ₂	PO ₄	N/P
	[m]	[°C]	[psu]		[ml l ⁻¹]	[mg m ⁻³]	[µM]	[µM]	[µM]	[µM]	
10:00	0	25.15	32.92	8.65	7.85	2.48	1.17	3.5992	21.66	0.62	7.6
	5	24.91	33.24	8.64	7.95	2.92	0.90	2.6962	14.60	0.44	8.2
	10	24.30	33.98	8.65	7.54	1.36	1.02	4.3103	15.27	0.61	8.8
12:00	0	25.82	32.54	8.67	8.71	6.58	1.22	2.8873	17.26	0.53	7.7
	5	25.27	32.58	8.64	7.81	4.99	1.20	2.7003	22.39	0.56	7.0
	10	25.06	33.25	8.64	7.51	2.27	1.24	3.5992	19.10	0.67	7.2
14:00	0	26.68	32.56	8.7	9.04	8.15	0.83	2.6962	17.03	0.35	10.0
	5	25.84	32.65	8.69	9.03	6.58	0.97	4.3103	16.23	0.44	12.0
	9	24.93	33.41	8.63	7.37	9.08	0.96	2.8873	10.18	0.57	6.7
16:00	0	27.37	33.15	8.81	11.24	9.15	0.60	2.7003	14.30	0.25	13.0
	5	26.74	33.42	8.77	11.23	5.46	1.03	3.0884	19.79	0.44	9.3
	10	24.89	33.45	8.26	8.26	8.54	1.06	1.4256	15.42	0.44	5.7
18:00	0	25.58	33.42	8.69	9.37	11.34	1.25	2.4581	18.53	0.47	7.9
	5	25.41	33.56	8.68	10.29	12.96	1.28	2.6659	22.04	0.61	6.5
	11	24.97	33.98	8.65	9.35	8.62	1.29	1.1333	16.99	0.58	4.2
20:00	0	25.01	33.65	8.69	8.08	6.58	1.07	1.7040	16.53	0.54	5.2
	5	24.94	33.68	8.69	7.90	5.43	0.89	2.1414	12.82	0.44	6.9
	10	24.66	33.78	8.68	7.30	3.84	0.97	2.3990	13.09	0.53	6.4
22:00	0	24.68	33.24	8.67	7.53	3.16	0.74	2.4281	8.90	0.33	9.6
	5	24.62	33.45	8.68	7.21	3.19	0.88	4.8495	12.09	0.46	12.4
	13	24.62	33.88	8.67	6.72	2.95	1.07	2.3836	14.82	0.54	6.4
0:00	0	24.96	33.62	8.64	7.45	5.91	1.23	1.1430	17.15	0.56	4.2
	5	24.96	33.65	8.66	7.39	5.46	1.13	2.9526	18.83	0.60	6.8
	11	24.66	33.78	8.67	6.97	2.72	1.25	1.3225	13.05	0.63	4.1
2:00	0	25.95	33.5	8.67	8.24	9.09	0.66	2.3903	12.67	0.31	9.8
	5	25.68	33.58	8.67	8.02	8.42	0.93	2.5722	11.90	0.39	9.0
	10	24.88	33.97	8.66	7.06	4.31	1.12	2.5161	12.79	0.56	6.5
4:00	0	26.33	33.24	8.67	8.57	9.09	0.77	2.5724	11.55	0.42	7.9
	5	25.46	33.48	8.67	8.01	6.79	0.53	2.7586	8.41	0.37	8.8
	10	25.02	33.68	8.67	7.39	5.67	1.10	2.3848	21.88	0.66	5.3
6:00	0	25.6	33.43	8.64	8.50	9.77	1.01	2.0205	14.64	0.71	4.3
	5	25.38	33.56	8.66	8.00	8.42	0.78	2.1819	13.49	0.39	7.6
	10	24.84	33.85	8.67	7.36	6.35	0.96	1.6421	15.01	0.56	4.6
8:00	0	24.85	33.32	8.68	7.99	3.39	0.68	1.4771	18.50	0.37	5.8
	5	24.79	33.48	8.68	7.83	3.66	0.72	1.6777	12.68	0.34	7.1
	12	24.57	33.79	8.69	7.42	2.48	0.82	2.9981	20.17	0.37	10.3
10:00	0	24.847	33.42	8.68	8.36	2.92	0.91	1.5296	13.10	0.30	8.1
	5	24.83	33.65	8.68	8.08	2.72	0.92	3.7468	12.96	0.27	17.4
	12	24.39	33.75	8.72	7.77	2.24	0.90	4.9041	11.92	0.16	36.2
Min		24.300	32.540	8.260	6.720	1.360	0.528	1.133	8.405	0.161	4.1
Max.		27.370	33.980	8.810	11.240	12.960	1.293	4.904	22.387	0.707	36.2
Aver.		25.217	33.450	8.665	8.146	5.770	0.976	2.612	15.378	0.471	8.5

Appendix 13. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients in the study area in October, 2001

Time	Depth	Temp.	Salinity	DO	Chl <i>a</i>	NO2	NO3	SiO2	PO4	N/P
	[m]	[°C]	[psu]	[ml l ⁻¹]	[mg m ⁻³]	[µM]	[µM]	[µM]	[µM]	
16:00	0	20.5	32.3	6.9	4.3	0.3	4.8	2.8	0.7	7.6
	5	20.5	32.3	6.9	3.2	0.3	1.4	4.2	0.4	4.1
	9	20.4	32.3	6.7	4.1	0.4	2.0	3.7	0.3	7.7
19:00	0	20.8	32.6	6.8	6.1	0.4	1.5	5.1	0.5	4.0
	5	20.8	32.6	6.9	6.2	0.3	1.9	4.7	0.3	6.4
	10	20.8	32.6	6.8	4.6	0.3	1.5	4.1	0.4	5.1
22:00	0	20.7	32.5	6.7	6.2	0.3	0.8	1.7	0.1	10.5
	5	20.7	32.5	6.9	3.0	0.4	1.0	2.2	0.1	11.3
	10	20.7	32.6	6.9	3.6	0.3	0.8	2.2	0.1	8.4
1:00	0	20.1	32.1	7.1	3.5	0.3	0.4	1.1	0.1	8.4
	5	20.2	32.1	7.2	6.2	0.2	0.3	1.0	0.1	6.0
	8	20.3	32.2	7.1	5.3	0.4	0.3	1.0	0.1	7.9
4:00	0	20.3	32.2	7.2	3.2	0.4	0.3	0.9	0.1	10.6
	5	20.3	32.2	7.1	3.9	0.3	0.8	1.4	0.1	14.5
	8	20.5	32.4	7.0	4.2	0.3	1.0	3.2	1.0	1.3
7:00	0	20.4	32.3	7.0	3.0	0.3	0.7	1.8	1.5	0.7
	5	20.5	32.3	7.0	2.8	0.3	0.7	2.0	1.3	0.7
	8	20.5	32.1	7.0	3.2	0.3	1.0	1.6	1.8	0.7
10:00	0	20.5	32.4	7.2	2.3	0.3	0.8	2.1	1.7	0.7
	5	20.5	32.5	7.1	3.1	0.3	0.8	2.5	1.5	0.8
	10	20.6	32.6	7.0	4.2	0.2	1.1	2.5	0.7	1.9
13:00	0	20.4	32.0	7.5	2.3	0.6	1.0	2.1	0.8	1.9
	5	20.3	32.1	7.4	3.3	0.3	0.7	1.8	0.8	1.3
	8	20.4	32.3	7.3	1.5	0.3	0.7	1.5	0.5	2.2
16:00	0	21.0	32.2	7.7	2.3	0.3	0.1	0.1	0.3	1.1
	5	20.8	32.3	7.5	3.0	0.3	0.1	0.1	0.3	1.3
	10	20.5	32.5	7.2	1.7	0.3	0.1	0.1	0.3	1.3
Min.		20.1	32.0	6.7	1.5	0.2	0.1	0.1	0.1	0.7
Max.		21.0	32.6	7.7	6.2	0.6	4.8	5.1	1.8	14.5
Average		20.5	32.3	7.1	3.7	0.3	1.0	2.1	0.6	4.8

Appendix 14. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients
in the study area in March, 2002

Time	Depth [m]	Temp. [°C]	Salinity [psu]	pH	DO [ml l ⁻¹]	Chl <i>a</i> [mg m ⁻³]	NO2 [µM]	NO3 [µM]	SiO2 [µM]	PO4 [µM]	NH4 [µM]	N/P
12:00	0	12.2	33.4	8.7	11.7	1.3	0.17	7.23	8.95	0.59	4.69	20.4
	6	11.4	33.4	8.6	12.1	3.6	0.10	2.69	8.58	0.31	6.24	28.8
	12	11.3	33.6	8.7	12.4	5.7	0.45	4.59	8.22	0.35	12.11	48.5
14:00	0	12.2	33.4	8.4	11.0	2.7	0.01	3.13	6.17	0.31	7.63	34.5
	5	12.0	33.5	8.4	11.6	2.5	0.04	1.99	7.54	0.65	8.17	15.8
	10	11.4	33.5	8.4	11.6	4.3	0.15	3.20	7.99	0.07	4.47	114.4
16:00	0	12.2	33.4	8.4	12.4	3.2	0.63	2.95	4.23	0.25	25.28	113.2
	5	12.1	33.4	8.4	11.1	3.4	0.15	2.41	5.77	0.24	2.52	21.2
	8	11.9	33.4	8.4	11.2	3.2	0.12	3.14	7.72	0.20	13.36	83.3
18:00	0	12.0	33.5	8.4	11.3	4.8	0.17	2.80	6.50	0.00	7.20	50.8
	5	11.9	33.5	8.4	10.8	4.3	0.27	2.76	8.46	0.83	9.44	15.1
	8	11.9	33.5	8.4	10.7	3.6	0.33	2.73	3.60	0.18	3.32	34.8
20:00	0	11.8	33.5	8.6	11.1	3.8	0.10	3.88	3.72	0.06	9.77	246.1
	5	11.8	33.5	8.8	11.4	4.1	0.21	3.84	8.41	0.31	14.11	59.0
	11	11.8	33.5	8.8	10.7	4.1	0.10	3.72	6.90	0.18	14.92	103.2
22:00	0	11.5	33.5	8.4	11.6	1.8	0.10	3.44	9.86	0.35	5.55	26.0
	5	11.5	33.5	8.4	11.1	1.8	0.16	4.85	13.30	0.40	2.26	18.2
	13	11.5	33.5	8.4	11.1	2.5	0.11	2.84	10.51	0.33	2.37	15.9
0:00	0	11.5	33.5	8.4	10.1	1.4	0.74	3.57	4.75	0.17	4.43	51.6
	5	11.5	33.5	8.5	11.1	1.6	0.19	3.10	13.78	0.72	9.27	17.5
	13	11.5	33.5	8.5	11.1	1.6	0.09	2.70	6.64	0.16	7.32	62.3
2:00	0	11.6	33.5	8.5	9.5	1.8	0.15	1.19	8.00	0.25	8.46	38.5
	5	11.6	33.5	8.5	10.4	2.0	0.16	3.62	6.55	0.17	7.56	66.3
	11	11.6	33.5	8.5	9.7	2.3	0.51	3.40	7.89	0.13	14.13	140.9
4:00	0	11.7	33.5	8.5	11.0	1.8	0.12	1.89	4.26	0.11	6.70	80.1
	5	11.7	33.5	8.5	6.6	1.6	0.47	3.92	3.82	0.08	12.36	202.7
	9.7	11.6	33.5	8.5	11.2	1.8	0.17	2.53	5.18	0.18	23.66	146.1
6:00	0	11.7	33.5	8.5	11.9	1.6	0.14	2.55	5.35	0.09	5.51	95.4
	5	11.7	33.5	8.5	11.3	1.8	0.26	3.03	7.47	0.15	3.50	44.8
	10	11.5	33.5	8.5	10.1	2.0	0.04	1.44	8.77	0.18	2.90	23.8
8:00	0	11.6	33.5	8.5	7.5	2.3	0.27	3.28	5.77	0.13	6.65	78.3
	5	11.6	33.5	8.5	13.7	2.3	0.53	3.54	6.79	0.09	10.92	171.3
	11	11.6	33.5	8.5	8.4	2.1	0.38	4.66	8.57	0.08	14.43	241.3
10:00	0	11.4	33.5	8.5	11.1	1.6	0.20	3.99	4.62	0.04	6.18	276.1
	5	11.4	33.5	8.5	11.4	1.8	0.32	3.78	8.14	0.04	6.28	264.4
	11	11.4	33.5	8.5	12.3	2.2	0.15	3.69	8.92	0.03	6.95	362.5
12:00	0	11.4	33.5	8.5	11.3	1.6	0.23	4.19	9.50	0.21	3.99	39.6
	5	11.4	33.5	8.5	10.1	2.3	0.11	3.94	8.40	0.19	3.74	42.1
	12	11.4	33.5	8.5	10.7	1.8	0.13	4.36	6.44	0.23	3.09	33.2
Min.		11.3	33.4	8.4	6.5	1.3	0.0	1.1	3.5	0.13	2.26	15.1
Max.		12.2	33.5	8.8	13.6	5.6	0.7	7.2	13.7	0.82	25.28	362.5
Aver.		11.6	33.4	8.4	10.9	2.5	0.2	3.3	7.3	0.23	8.24	90.5

Appendix 15. Spatial and seasonal variation of hydrographic properties and nutrients
in the study area in May, 2002

Time	Depth [m]	Temp. [°C]	Salinity [psu]	pH	DO [$\text{m}^3 \ell^{-1}$]	Chl <i>a</i> [mg m^{-3}]	NO2 [μM]	NO3 [μM]	SiO2 [μM]	PO4 [μM]	NH4 [μM]	N/P
14:00	0.0	19.6	32.9	8.5	9.4	1.1	0.3	7.3	10.6	2.1	22.2	13.8
	5.0	19.0	32.8	8.6	9.7	1.1	0.2	2.7	10.0	1.4	24.0	19.8
	10.0	17.5	33.1	8.5	10.3	1.1	0.6	4.6	10.0	1.5	30.1	23.4
16:00	0.0	19.7	32.9	8.5	10.0	1.3	0.1	3.1	8.3	0.9	25.9	30.8
	5.0	19.1	32.8	8.5	9.8	1.8	0.1	2.0	9.2	1.5	26.7	19.4
	10.0	17.8	33.1	8.5	10.0	1.3	0.3	3.2	9.4	0.8	23.2	32.4
18:00	0.0	19.8	33.5	8.5	9.4	2.0	0.8	3.0	5.9	1.9	44.3	25.5
	5.0	19.4	33.4	8.6	9.7	2.0	0.3	2.5	7.5	1.7	21.8	14.5
	10.0	17.9	33.3	8.5	10.1	2.2	0.2	3.2	9.2	1.4	32.9	26.3
20:00	0.0	18.0	33.1	8.5	9.4	1.1	0.3	2.8	8.1	0.9	26.9	34.2
	5.0	17.5	33.1	8.5	9.3	1.6	0.4	2.8	10.0	1.8	29.4	17.7
	10.0	17.4	33.4	8.5	10.2	1.8	0.4	2.8	5.2	1.3	23.6	20.9
22:00	0.0	18.0	33.1	8.5	10.4	2.0	0.2	3.9	5.8	0.8	30.3	45.3
	5.0	18.6	33.0	8.5	9.2	2.0	0.3	3.8	9.5	0.9	34.9	43.2
	10.0	17.5	33.2	8.5	9.3	1.8	0.2	3.7	8.2	0.9	35.9	43.7
0:00	0.0	18.2	33.1	8.6	10.2	2.7	0.2	3.5	11.7	0.9	26.8	33.0
	5.0	17.6	33.1	8.6	10.1	3.4	0.3	4.9	14.5	1.1	23.8	26.1
	10.0	17.2	33.2	8.6	9.8	3.4	0.2	2.9	11.5	1.2	24.1	22.9
2:00	0.0	18.0	33.1	8.6	9.8	3.2	0.9	3.6	6.3	0.8	26.4	39.2
	5.0	17.8	33.1	8.6	9.5	3.6	0.3	3.1	15.3	1.5	31.5	23.2
	10.0	17.1	33.3	8.6	9.4	3.4	0.2	2.7	8.0	0.9	23.1	27.5
4:00	0.0	17.9	33.1	8.6	10.0	3.4	0.2	1.9	10.1	0.3	10.0	36.2
	5.0	17.8	33.1	8.6	9.6	3.8	0.3	4.8	8.6	0.3	10.6	60.2
	10.0	17.0	33.3	8.6	9.5	4.0	0.7	3.4	10.1	0.9	30.1	36.1
6:00	0.0	18.2	33.1	8.6	9.7	3.6	0.2	1.9	5.9	0.8	22.9	31.7
	5.0	18.2	33.0	8.6	9.4	3.6	0.6	3.9	5.6	0.9	29.6	38.1
	10.0	17.2	33.2	8.6	9.4	3.8	0.3	2.6	6.8	1.7	41.2	25.3
8:00	0.0	18.4	33.1	8.6	9.6	4.3	0.3	2.6	6.8	1.1	23.3	23.0
	5.0	18.1	33.1	8.6	9.4	4.0	0.4	3.0	9.2	1.3	21.5	19.1
	10.0	17.7	33.1	8.6	9.2	5.2	0.1	1.5	10.9	0.8	21.2	27.8
10:00	0.0	18.7	33.1	8.6	10.3	4.7	0.4	3.3	7.4	1.0	25.2	29.7
	5.0	18.1	33.0	8.6	10.1	3.6	0.6	3.6	8.2	0.8	29.7	40.2
	10.0	17.5	33.1	8.6	10.0	2.5	0.5	4.7	10.2	1.7	33.4	22.6
12:00	0.0	19.0	33.2	8.6	9.5	1.3	0.3	4.0	6.3	1.5	25.4	20.1
	5.0	18.8	33.0	8.6	9.2	1.4	0.4	3.8	9.7	1.2	25.8	24.7
	10.0	17.9	33.1	8.6	9.1	2.5	0.3	3.7	10.5	0.9	26.7	33.6
14:00	0.0	19.4	33.4	8.6	9.4	2.4	0.4	4.2	11.1	1.2	24.0	23.2
	5.0	18.7	33.3	8.5	9.3	4.3	0.2	4.0	10.0	1.3	24.0	22.0
	10.0	17.6	33.1	8.4	9.2	4.5	0.2	4.4	8.5	0.9	23.6	30.3
min.		17.0	32.8	8.4	9.1	1.1	0.1	1.5	5.2	0.3	10.0	13.8
max.		19.8	33.5	8.6	10.4	5.2	0.9	7.3	15.3	2.1	44.3	60.2
Average		18.2	33.1	8.6	9.7	2.7	0.3	3.4	9.0	1.2	26.6	28.9

Appendix 16. 2000년 탐진강 하천수의 수질현황

Month	TEMP.	pH	DO	COD	BOD	SS
	℃		(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
1월	6	7.1	11.5	1.2	0.8	0.5
2월	6	7.2	13.8	1.4	1.2	2
3월	13	7.3	10.7	2.6	0.9	2.5
4월	15	7	10.9	1.6	0.5	3
5월	26	7.4	9.4	3.2	1.3	3.5
6월	24	6.8	10.1	8	1.8	16
7월	27	7.4	9.8	2.9	0.7	3.2
8월	30	6.4	8.6	2.9	0.7	3.5
9월	22	7.2	8.5	3.4	0.8	14
10월	19	6.9	10	2.8	0.8	2
11월	10	6.7	10.6	1.4	0.4	3.2
12월	6	7.2	12.1	2.3	1	1.2
MIN.	6.0	6.4	8.5	1.2	0.4	0.5
MAX.	30.0	7.4	13.8	8.0	1.8	16.0
Average	17.0	7.1	10.5	2.8	0.9	4.6

Appendix 17. 2001년 탐진강 하천수의 수질현황

Month	TEMP.	pH	DO	COD	BOD	SS
	℃		(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
1월	4.3	7	12.4	1.8	1	4.8
2월	3	6.9	13.2	2.2	1.6	1.6
3월	7	7	11.8	1.3	1	6.8
4월	15	7.3	11.3	2.3	1.1	5.6
5월	20	7.3	10.6	3.6	1.5	9.2
6월	24	6.9	9.3	6.1	2.1	13.6
7월	24	6.7	8.9	2.7	1	6
8월	26	7.7	7.4	3.7	1.2	12.4
9월	22	7.6	8.8	1.6	0.6	4.4
10월	20	7.4	10.9	3.6	0.4	1.2
11월	11	7.3	12.1	2.6	0.7	4
12월	7	7	10.5	1.4	0.6	2
MIN.	3.0	6.7	7.4	1.3	0.4	1.2
MAX.	26.0	7.7	13.2	6.1	2.1	13.6
Average	15.3	7.2	10.6	2.7	1.1	6.0

Appendix 18. 2002년 탐진강 하천수의 수질현황

Month	TEMP. ℃	pH	DO (mg/l)	COD (mg/l)	BOD (mg/l)	SS (mg/l)	T-N (mg/l)	T-P (mg/l)
1월	6	7	12.2	0.6	2	1.6	3.31	0.01
2월	6	7.7	10.8	1.2	1.5	3.6	1.98	0.02
3월	9	7.3	11.3	0.8	2.3	8	3.43	0.01
4월	15	7.7	10.8	0.6	1.6	15.6	3.47	0.01
5월	20	7.6	9.4	0.6	1.8	8	2.06	0.03
6월	28	7.6	11	1.8	2.8	10.4	2.78	0.03
7월	26	7.7	8.7	1.1	1.9	16.8	2.71	0.05
8월	25	8.1	9.4	0.5	2.4	6	2.37	0.03
9월	25	7.7	8.9	0.3	2.2	4.8	0.80	0.02
10월	22	7	10.8	0.5	2.1	6.8	1.52	0.04
11월	8	7.2	9.1	0.8	2.2	2.4	0.89	0.07
12월	7	7.7	12	1.1	1.3	5.2	4.77	0.03
MIN.	6.0	7.0	8.7	0.3	1.3	1.6	0.80	0.01
MAX.	28.0	8.1	12.2	1.8	2.8	16.8	4.77	0.07
Average	16.4	7.5	10.4	0.8	2.0	7.4	2.51	0.03