

**생활사 해명을 통한  
코클로디니움 유해 적조의 제어기술개발**

(Development of Bloom Control Techniques  
through Life Cycle Elucidation of the Harmful  
Dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*)

부경대학교

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생활사 해명을 통한 코클로디니움 유해 적조의 제어기술개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 1월 일

주관연구기관명 : 부경대학교  
주관연구책임자 : 김 창 훈  
연 구 원 : 김 동 선  
연 구 원 : 오 석 진  
연 구 원 : 김 충 재  
연 구 보 조 원 : 배상완, 김진주  
이종선, 김성현  
김경훈, 허철희  
최아방, 한 란  
이보람, 송지효  
허정수 外  
협동연구기관명 : 국립수산과학원  
협동연구책임자 : 배 현 민  
연 구 원 : 박영태, 임월애  
조은섭, 박태규 外

# 요 약 문

## I. 연구 과제명

생활사 해명을 통한 코클로디니움 유해 적조의 제어기술개발  
(Development of Bloom Control Techniques through Life Cycle Elucidation of the Harmful Dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*)

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

*Cochlodinium polykrikoides*는 어류치사성 적조생물로서, 과거에는 생활사의 해명이 되어있지 않아 외래유입설이 주장되어 왔으나 최근 휴면포자 식별로 내부 적조발생 잠재력 존재 가능성이 제시되어, 그 휴면포자의 신속하고 정확한 식별법과 지역별 잠재력 조사가 필요하게 되었다. 그리하여 본 종의 월동생리/생태와 관련된 환경요인을 파악하고, 적조 증식촉진요인의 규명과 적조 유동확산 모델을 확립하려 하였다. 나아가 생활사 단계를 활용한 구제물질살포 효율성을 검증하여 휴면포자 밀집지역에 대한 발생 억제 가능성과 발아초기 구제물질 살포 효율성을 조사하였으며, 구제물질 살포에 의한 적조 잠재력 제어능을 확인하고 물리적 적조예방 및 피해대책 가능성을 검증하고자 하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. *Cochlodinium polykrikoides* 생활사 해명

가. *C. polykrikoides* 휴면포자(cyst)의 최초 발견 및 발아 확인

나. Hyaline cyst 형성 및 발아 특성

다. *C. polykrikoides* 발생 지표종으로서 *Nematodinium* sp.의 발생과 계통해석

### 2. *Cochlodinium polykrikoides* 발생 잠재력(휴면포자) 고감도 식별법 개발 및 적용

가. 휴면포자 정량법 확립 :

Direct counting법(SPT법) 및 Real-time PCR법

나. Direct counting법에 의한 휴면포자 분포조사의 의의

다. Real-time PCR을 이용한 지역별 잠재력 파악 :

모델해역(자란만) 정기조사 및 적조 상습해역의 휴면포자 분포

3. *Cochlodinium polykrikoides* 지역개체군의 발생/생태 환경 해석
  - 가. 정기 정점(자란만, 육지도, 사량도, 미조) 조사
  - 나. 자란만 고정 정점 집중조사
  - 다. *C. polykrikoides*와 *Nematodinium* sp. 발아체 출현의 상관관계
4. 적조생물 성장 환경 및 증식 촉진/억제 요인 탐색
  - 가. *C. polykrikoides*의 성장환경 및 생리특성 파악
  - 나. 살조 바이러스의 분리 및 생리·생태 특성
5. 적조 발생 확산 예찰을 위한 모델 구축
  - 가. 해양물리조사
  - 나. 해수 유동모델 구축
  - 다. 입자 추적자 모델
6. 적조 잠재력 제어 현장 평가 및 발아 초기개체군 구제 가능성 검토
  - 가. 실내 마이크로코즘 실험을 통한 황토살포 효과 조사
  - 나. 황토살포에 따른 *C. polykrikoides* 영양세포 구제 및 휴면포자 형성 저해 평가

#### IV. 연구개발 결과

##### 1. *Cochlodinium polykrikoides* 생활사 해명

###### 가. *Cochlodinium polykrikoides* 휴면포자(cyst)의 최초 발견 및 발아 확인

*C. polykrikoides*의 휴면포자 실체 확인을 위하여 매년 정기적으로 적조 형성 또는 영양세포의 초기 발생이 확인되고 있는 사량도 및 자란만의 저질을 채집하여 여과해수에 부니질을 sieving한 후 배양 및 현미경 관찰을 실시하였다. 또한 영양세포의 출현 시기에 net sampling (20 um)을 실시하여 부유하는 휴면포자를 동시에 관찰하였다. 그러나 현재까지 저질 시료를 처리한 경우는 *C. polykrikoides*의 휴면포자가 발아하는 과정을 직접 확인할 수는 없었으나, 발아체(germinant)인 영양세포의 출현을 확인하였다. 한편 2009년 5월 말-6월 초에 걸쳐 자란만 정기조사 정점 4에서 net 채집한 시료에서 *C. polykrikoides*의 휴면포자를 최초로 발견하였으며, 이의 발아하는 과정을 현미경 하에서 확인하였다.

발아 직전의 휴면포자는 작은 spine을 형성하고 있는 것과 가지고 있지 않은

형태도 관찰되었으며, 모두 뚜렷한 red body를 가지고 있었다. 크기는 35~43  $\mu\text{m}$ 였으며, 배양과정에서 형성되는 hyaline cyst와는 다른 것으로 판단되었다. 초기 발아체는 체장 35~45  $\mu\text{m}$ , 체폭 20~30  $\mu\text{m}$  정도였으며, 영양세포는 최대 8 chains까지 형성되었다.

#### 나. Hyaline cyst 형성 및 발아 특성

*C. polykrikoides* 종에 의해 형성된 hyaline 세포는 영양세포와 비교해 세포 크기는 비슷하고 투명한 색상, Chloroplast가 결여된 비운동성의 형태적 특징을 가지고 있었다. 세포의 표면에 sulcus와 cingulum의 희미한 흔적이 남아 있고 투과성의 얇은 막으로 둘러싸여 있었다. 영양/영양 조건 실험에서 영양세포와 형태적으로 구별되는 다수의 hyaline 세포의 형성과 hyaline 세포에서 다시 영양세포로 가입되는 것을 확인하였다. Hyaline 세포는 단일세포에서부터 8개 세포가 연결된 연쇄체까지 다양하게 형성되었고, 각 세포는 red body를 갖고 있으며 각 연쇄체는 세포들을 둘러싸는 투명한 막(hyaline)을 형성하였다. 저질에 있는 경우도 염색법을 통하여 확인할 수 있었고, 형광현미경 하에서 붉게 발광하는 엽록체로 살아있는 세포인 것이 판단되었다.

이상의 결과는 4개 이상의 세포로 이어진 연쇄체의 영양세포 대부분은 연쇄체 수에 변화 없이 hyaline 세포로 전환될 수 있음을 의미하고, hyaline 세포가 영양세포의 사멸단계에 해당되는 것이 아닌 일시적으로 형성되는 일시포자(temporary cyst)일 수 있고 호적한 조건에서 다시 영양세포로 가입될 수 있음을 제시하며, 영양세포로부터 형성된 hyaline 세포는 호적한 환경에 의해 영양세포로 재출현함을 보여 hyaline 세포는 *C. polykrikoides*의 생활사의 한 단계로서 역할을 하는 것으로 판단된다.

#### 다. *Cochlodinium polykrikoides* 발생 지표종으로서 *Nematodinium* sp.의 출현과 계통해석

*C. polykrikoides*의 생활사 연구 중 *C. polykrikoides*와 *Nematodinium* sp.의 발생 시기와 발아체의 형태적 유사성이 관찰되었다. *Nematodinium* sp.의 휴면포자는 남해 해역 모든 조사 정점에 존재하였으며, *C. polykrikoides*와 현장에서 거의 동시에 발생이 시작되는 것이 확인됨으로써, 모니터링 과정에서 두 종을 초기발생의 지표종으로 설정할 수 있을 것으로 추정되었다. 따라서 *Nematodinium* sp.의 정확한 계통관계를 파악하기 위해 분자계통 해석을 수행하였다. 본 연구에서의 *Nematodinium* sp.(실험군)는 *Prorocentrum*, *Lepidodinium* 등의 그룹과 하나의

clade에서 분화한 것으로 해석되었다. 계통해석에 이용된 종 중 실험군과 100% 일치하는 종은 없었으나, 그 중 가장 근연관계에 있는 종은 *Warnowia* sp.와 *Nematodinium* sp.이었으며 그 다음으로 *Cochlodinium* cf. *geminatum*과 *Dissodinium pseudolunula*인 것으로 나타났다. 이들 종은 형태적으로는 매우 유사하나 본 연구의 결과에서 유전적으로 일부 차이를 보임에 따라 향후 상세한 형태적, 분자생물학적 연구를 통한 명확한 종의 분류가 필요하다.

## 2. *Cochlodinium polykrikoides* 발생 잠재력 고감도 식별법 개발 및 적용

### 가. 휴면포자 정량법 확립

**Direct counting법(SPT법)** : 저질 중 휴면포자의 직접계수를 위하여 SPT 방법을 도입하였다. 일반적으로 와편모조류의 휴면포자의 비중은 약  $1.3 \text{ g/cm}^3$ 인 것으로 보고되어 있으며(Anderson and Lively, 1985; Bolch, 1997), 본 연구에서도 밀도가 1.2 와 1.5인 실험구에서 보다 1.3인 실험구에서 가장 많은 와편모조류 휴면포자를 분리할 수 있었다. 이후 *Nematodinium* sp.의 휴면포자의 정량조사에서 SPT 용액의 밀도를 1.3에 맞추어 실시하였다.

**Real-time PCR법** : 미세조류의 세포를 동정하는데 있어서 기본적으로 형태학적인 특징을 관찰하는 것은 광학현미경이나 주사전자현미경(SEM)으로 가능하나, 비슷한 형태를 가지는 와편모조류 휴면포자의 경우 형태학적인 특징을 통해 종 동정을 하기 위해서는 배양을 통한 발아체의 관찰이 필요하다. 이런 방법은 시간과 비용 측면에서 아주 비효율적으로 이런 문제를 극복하기 위해 Real-time PCR 기법을 이용하였다. Real-time PCR법은 PCR 증폭산물의 형광감도 증가를 실시간으로 모니터링하여 해석하는 기술이며, 종 특이적인 primer와 probe을 이용하여 좀 더 정확한 동정과 검출, 정량이 이루어졌다.

### 나. Direct counting법에 의한 휴면포자 분포조사의 의의

많은 유해적조 초기발생은 휴면포자가 밀집된 "Seed beds"로부터 기인하는 것으로 추정되고 있다. 보통 연안지역에 휴면포자가 광범위하게 분포한다는 사실을 고려했을 때, 그 지역 휴면포자의 일시적인 발아에 의해 적조가 시작된다는 시나리오가 가능하다. 따라서 2007년 *C. polykrikoides* 적조 발생이 만연했던 고성 지역의 자란만과 완도 등지의 연안지역을 대상으로 휴면포자 분포조사를 실시하였다. 분포 조사 결과 *Nematodinium* sp.의 휴면포자가 높은 밀도로 발견되었고, 적조가 일어났던 연안지역( $10\text{-}15 \text{ cysts}/10 \text{ g sediments in wet weight}$ ), 휴면포자의 물리적인 축적이 가능한 지역( $98 \text{ cysts}/10 \text{ g sediments}$ )과 그렇지 않은 다

른 지역(0-2 cysts/10 g sediments)에서 뚜렷한 차이를 나타냈다. 따라서 호적 조건 하에서 휴면포자의 발아가 촉진되는 특성을 고려한다면, 수심이 얇은 연안 지역에서는 휴면포자 개체군 밀도가 높은 곳은 상습 적조의 진원지 역할을 하는 것으로 볼 수 있을 것이다.

#### 다. Real-time PCR을 이용한 지역별 잠재력 파악

*C. polykrikoides*의 주요 적조 발생지인 자란만, 사랑도, 미조, 육지도, 통영, 여수 및 완도지역을 대상으로 휴면포자의 분포 및 발생 잠재력을 조사하고자 하였다. *C. polykrikoides*의 ITS rDNA영역을 통해 만들어진 primer와 probe를 이용하였다. 그 결과, 모델 해역인 자란만의 경우 2009년은 정점 4, 7, 8, 10에서 6월부터 9월까지 0~3.3 copies/g, 2010년에는 2009년과 동일 정점에서 4월부터 6월까지 최대 10 copies/g(정점 8)까지 검출되어, 적조발생 상습 지역임이 확인되었다. 미조에서는 2009년 5월 정점 1, 2, 6, 10, 13, 15에서 1~2 copies/g의 범위로 검출되었고, 2010년 8월에는 정점 1과 2에서 각각 1과 3 copies/g가 검출되었다.

이를 근거로 각 정점 수괴의 *C. polykrikoides* 영양세포의 현존량을 조사하였는데, 자란만 정점 4, 7, 8, 10에서 2011년 5월부터 8월까지 표층 해수에서 최대 212 cells/L, 저층 해수에서 최대 1,052 cells/L로 검출되었고, 미조 연안에서는 표층 해수에서 최대 320 cells/L, 저층 해수에서 최대 40 cells/L로 검출되었다.

이 결과로, 저질 시료의 real-time PCR을 이용한 *C. polykrikoides* 휴면포자 검출에 따른 적조발생 잠재력 파악과 실제 수괴의 *C. polykrikoides* 영양세포 출현 예측이 가능한 것으로 판단되며, 적조 발생 가능지역 파악과 그에 따른 적조 피해 최소화 방안 구축에 활용이 가능할 것으로 사료된다.

### 3. *Cochlodinium polykrikoides* 지역개체군의 발생/생태 환경 해석

#### 가. 정기 정점(자란만, 육지도, 사랑도, 미조) 조사

2009년~2011년 *C. polykrikoides*의 주요 적조 발생지인 자란만, 사랑도, 미조, 육지도 지역을 대상으로 해수 및 저질시료에 대하여 이화학적 (physico-chemical) 및 생물학적 요인을 조사하였다.

○ 자란만 일대의 5~9월 수온은 표층 16.88~31.05℃, 저층 14.65~25.90℃이었으며, 염분은 표층 20.35~34.94 psu, 저층 30.10~35.02 psu, 용존산소는 표층 4.00~10.76 mg/L, 저층 0.79~8.10 mg/L 범위로 나타났다. DIN은 표층 0.08~2.68 μM의 범위, 저층 0.03~7.84 μM의 범위였으며, DON은 표층 0.21~2.80 μM,

저층 0.05~1.64  $\mu\text{M}$ 의 범위였다. DTN중 표층에서는 50%가 DIN과 DON의 비율이었지만, 저층의 경우 DIN의 비율이 65%로 다소 높았다. DIP는 0.09~1.62  $\mu\text{M}$  at, 저층에서 0.02~1.81  $\mu\text{M}$  였으며 DOP는 표층 0.03~0.56  $\mu\text{M}$  범위, 저층 0.03~0.52  $\mu\text{M}$ 의 범위였다. DTP 중 DIP의 비율은 표층에서 약 70%, 저층에서 65% 정도를 나타내었다. DSi는 표층 0.13~13.51  $\mu\text{M}$ , 저층 1.15~12.98  $\mu\text{M}$ 의 범위로 나타났다.

식물플랑크톤 중 조성 및 현존량의 경우 총 71종의 식물플랑크톤 중 와편모조류 35종 (300~27,000 cells/L), 규조류 36종 (2,100~2,000,000 cells/L)이 관찰되었으며 현존량은 춘계에서 하계로 갈수록 증가하는 경향을 보였다. 우점종은 조사 기간 중 규조류인 *Chaetoceros* sp.였으나, *C. polykrikoides*는 관측 초기에 규조류의 증가와 함께 증가하는 경향이였지만, 규조류의 우점 영향으로 대발생까지는 도달하지 못하였다.

○ 사랑도 2010~2011년 7~8월의 수온은 표층에서 23.56~25.24 $^{\circ}\text{C}$ , 저층에서 18.85~20.51 $^{\circ}\text{C}$ 이었으며, 염분은 표층 31.58~34.23 psu, 저층 32.21~34.34 psu, 용존산소(DO)는 표층 6.73~7.49 mg/L, 저층 4.18~6.51 mg/L 범위로 나타났다. 식물플랑크톤 종조성 및 현존량의 경우, 총 42종의 식물플랑크톤 중 와편모조류 14종 (400~3,400 cells/L), 규조류 28종 (8,000~459,350 cells/L)이 관찰되었다. 규조류 *Pseudonitzschia pungens*가 우점하였고 7월 21일 조사에서 *C. polykrikoides*의 발아체가 소량 (45~155 cells/L) 관찰되었으나, 대량발생으로는 연결되지 않았다.

○ 미조 2011년 7~8월의 수온은 표층에서 22.73~25.80 $^{\circ}\text{C}$ , 저층에서 17.29~24.41 $^{\circ}\text{C}$ 이었으며, 염분은 표층 27.79~33.44 psu, 저층 32.38~34.93 psu, 용존산소는 표층 4.52~6.86 mg/L, 저층 1.45~5.16 mg/L 범위로 나타났다. DIN는 표층 0.87~1.97  $\mu\text{M}$ , 저층 0.85~1.95  $\mu\text{M}$  범위였으며, DON은 표층 0.04~0.66  $\mu\text{M}$ , 저층 0.12~1.59  $\mu\text{M}$  범위로 나타났다. DTN중 DON은 표층에서 약 20%, 저층에서 30% 내외였다. DIP는 표층 0.01~0.53  $\mu\text{M}$ , 저층 0.06~0.69  $\mu\text{M}$  범위이었으며, DOP는 표층 0.03~0.38  $\mu\text{M}$  저층 0.08~0.38  $\mu\text{M}$  범위였다. DTP 중 DOP 비율은 표층과 저층에서 약 50%였다. DSi는 표층 0.54~10.63  $\mu\text{M}$ , 저층 1.35~9.24  $\mu\text{M}$ 이었다.

총 52종의 식물플랑크톤 중 와편모조류는 22종으로 310~6,500 cells/L의 현존량의 변화를 보였으며, 규조류는 30종으로 67,050~100,400 cells/L의 현존량이 관찰되었다. 우점종으로 규조류 *Asterionella glacialis*가 우점한 후 *Chaetoceros pseudocurvisetus*, *Skeletonema costatum*으로 종 천이가 보였다. *C. polykrikoides*의 발



아체는 7월 26일, 8월 24일 20~200 cells/L, 5~42cells/L 로 발견되었으나, 다른 해역과 마찬가지로 대량발생은 보이지 않았다.

○ 육지도 2011년 7~8월의 수온은 표층에서 22.73~25.80℃, 저층에서 17.29~24.41℃이었다. 염분은 표층 27.79~33.44 psu, 저층 32.38~34.93 psu, 용존산소는 표층 4.52~6.86 mg/L, 저층 1.45~5.16 mg/L로 나타났다. DIN은 표층 0.31~1.98 μM, 저층 0.824~1.97 μM이었으며, DON은 표층 0.04~0.66 μM과 저층 0.12~0.74 μM의 범위로, DTN 중 각각 30%, 35% 비율을 보였다. DIP는 표층 0.00~0.32 μM, 저층 0.01~0.38 μM 범위이며, DOP는 표층 0.03~0.44 μM, 저층 0.03~0.38 μM 범위로, DTP 중 DOP의 비율은 각각 50%와 40%로 나타났다.

39종의 식물플랑크톤 중 와편모조류는 12종 (1,500~10,000 cells/L), 규조류는 27종 (21,900~613,200 cells/L)으로 관찰되었으며, 우점종은 미조와 같이 *A. glacialis*의 우점 후 *C. pseudocurvisetus*, *S. costatum*가 우점하였다. *C. polykrikoides*의 발아체는 7월 26일, 8월 24일 소량 발견되었으나 적조 발생까지는 이어지지 않았다.

#### 나. 자란만 고정 정점 집중조사

집중조사 기간 동안 2010년, 2011년 모두 6월을 시작으로 발아체가 검출 되는 것을 볼 수 있으며, 저층과 표층의 해수에 고루 분포하는 양상을 볼 수 있다. 대부분의 발생 추이는 저층에서 먼저 발생해서 표층의 발아체 수치가 많아지는 양상을 볼 수 있으며, 이는 수온의 변화와 같은 다양한 환경조건의 변화에 따라 발아체가 반응하는 것이라 판단할 수 있다. 2011년의 경우 저질에서 휴면포자의 검출은 없었지만 해수에서 발아체가 검출됨으로써 자란만 지역이 *C. polykrikoides* 상습 출현 지역임을 알 수 있었다.

#### 다. *Cochlodinium polykrikoides*와 *Nematodinium* sp. 발아체 출현의 상관관계

자란만의 정기조사와 집중조사 과정을 통하여 *C. polykrikoides*와 *Nematodinium* sp.의 발아체가 거의 동일 시기에 출현하고 있는 것으로 나타나 이에 대한 조사를 실시하였다.

2010년 5월 29일부터 8월 17일까지 *C. polykrikoides*와 *Nematodinium* sp.의 발아체의 출현을 조사한 결과, 6월 13일 *Nematodinium* sp.가 정점 4와 7에서 각각 14 cells/L, 7 cells/L로 먼저 발생하였으며, 6월 16일에는 *C. polykrikoides*가 뒤이어 출현하였다. 이때, *Nematodinium* sp.는 45 cells/L(정점 4)와 54 cells/L(정

점 7)로 높은 밀도를 보였다.

2011년 5월 14일에서 8월 3일까지의 조사에서도 *C. polykrikoides*와 *Nematodinium* sp.의 발아체 출현은 2010년 결과와 비슷한 경향을 나타내었으며, *Nematodinium* sp.의 발아체가 발견된 후 2-3일 후에 *C. polykrikoides*의 발아체가 발견되기 시작하였다. 이상의 결과는 *Nematodinium* sp.와 *C. polykrikoides*가 현장에서 거의 동시에 발생하기 시작하고 이후에도 유사한 출현양상을 보임으로써, 두 종은 출현생태에 있어서 상호 초기발생 지표종으로 고려할 수 있으며, 이를 바탕으로 특정 해역에서 *C. polykrikoides* 초기발생의 모니터링에 활용이 가능할 것으로 판단된다.

#### 4. 적조생물 성장 환경 및 증식 촉진/억제 요인 탐색

##### 가. *Cochlodinium polykrikoides*의 성장환경 및 생리특성 파악

우리나라 연안해역에 출현하는 유해성 와편모조류 *C. polykrikoides*의 생리특성을 파악하기 위하여 수온, 염분, 빛 그리고 영양염의 변화에 따른 성장 특성을 살펴보았다.

*C. polykrikoides*의 성장에 영향을 미치는 수온과 염분을 보면, 수온 15°C 중 염분 15 psu와 20 psu에서는 성장하지 않았지만, 그 외의 실험구는 성장하였다. 최대성장속도는 수온 25°C, 염분 30 psu에서 0.35 day<sup>-1</sup>로 나타났다. 그리고 *C. polykrikoides*는 염분의 증·감에 따라 성장속도가 급격히 변화하는 것으로 나타났으며, 최대성장속도를 보이는 염분은 다른 종들에 비해서 다소 높았다. 광조건 실험으로부터 *C. polykrikoides*는 10 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>에서 성장하지 않았으며, 25 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>이상에서는 관찰되었다. 광 조건에 의해 유도된 성장식은  $\mu = 0.30 (I-15.27)/(I+27.22)$ , ( $r=0.99$ )로, 최대성장속도는 0.30 day<sup>-1</sup>, 보상광량은 15.27 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>로 나타났다. 따라서 *C. polykrikoides*는 하계에 성장이 우호적이라는 것을 알 수 있으며, 이와 같은 자료를 활용할 경우 현장에서 적조 형성에 대한 예보 기술을 설립하는데 있어 중요할 것으로 판단된다.

*C. polykrikoides*의 영양염의 친화성을 살펴보기 위해서 대표적인 제한영양염 중 하나인 인에 대해서 흡수 동력학 실험을 수행하였다. DIP는 10 μM까지는 농도가 증가함에 따라 흡수속도가 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 유사하였다. 이를 Michaelis-Menten식에 대입하여 본 결과 요인간의 상관관계수( $r$ )는 0.90으로 높은 인과관계를 보였다. 이 때 최대성장속도 ( $p_{max}$ )는 0.80 pmol cell<sup>-1</sup>hr<sup>-1</sup>, 반포화상수( $K_s$ )는 1.87 μM이었다. *C. polykrikoides*의  $K_s$ 값은 유독 와편모조류 *Gymnodinium catenatum*과 *Alexandrium tamarense*보다는 낮은 값이었으나, 규조류

*Skeletonema costatum*의  $K_s$ 값보다는 높았다. 이와 같은 결과는 대표적인 연안역 우점종인 *S. costatum*보다는 무기영양염류에 대한 친화성이 낮다는 것을 의미한다. 영양염에 대한 친화성이 낮더라도 최대흡수속도 ( $\rho_{max}$ )가 크면 영양염이 높은 농도로 존재할 경우, 공급되어지는 영양염을 흡수하여 세포내에 축적할 수 있다. 최대 흡수속도  $V_{max}$  ( $\rho_{max}/Q_0$ )를 계산하여 보면 본 종은 51.9 /day로 다른 외편모조류에서 보고되어진  $V_{max}$ 값에 비교하면 높았다. 또한,  $V_{max}/K_s$ 비는 27.7로서 *A. tamarense*와 유사하였다. 이와 같은 결과로부터 *C. polykrikoides*는 우리나라 대표적인 규조류에 비하여 무기태 영양염에 대하여 상대적으로 불리한 생리적 조건을 가지고 있는 것으로 판단된다.

한편 *C. polykrikoides*는 인 공급원으로써 DIP만큼 다양한 DOP화합물을 이용하여 성장을 유지하였다. *C. polykrikoides*는 PME에서  $0.13 \sim 0.19 \text{ day}^{-1}$ 의 성장속도를 보여 Ortho-P (orthophosphate)에 비교하여 약  $92 \pm 12\%$ 에 해당하였다. AMP (Adenosine 5-monophosphate), ADP (Adenosine 5-diphosphate) 및 ATP (Adenosine 5-triphosphate)와 같은 nucleotide 계열의 DOP 화합물의 경우 Ortho-P의 성장속도와 유사하게 나타났다. 따라서 *C. polykrikoides*는 DIP가 제한된 환경에서는 DOP를 이용하여 성장할 가능성이 클 것으로 보이며, DIP 제한은 *C. polykrikoides*과 같은 종의 성장에 우호적일 것으로 보인다. 또 다른 용존태 유기물의 이용성을 평가할 수 있는 DOP 가수분해 효소인 Alkaline phosphatase 활성 (APase)도를 시험하였다. *C. polykrikoides*는 세포 성장이 진행될수록 배양액 내의 DIP 농도는 점차 감소하며, APase 활성은 점차 증가하는 경향을 보였으며, 세포의 성장이 정지기에서 최대 APase 활성이 검출되었다. *C. polykrikoides*는 배양액 내의 DIP 농도가  $0.83 \mu\text{M}$  일 때 (11일후), APase 활성이 최초로 검출되었으며,  $0.70 \text{ pmol cell}^{-1}\text{hr}^{-1}$ 의 최대 활성을 보였다. APase가 처음으로 유도된 DIP 농도는 자란만의 현장농도보다 상당히 높은 농도로 생존, 분열 및 종 경쟁을 위해서는 DOP와 같은 유기 영양염이 필요할 것으로 보인다.

#### 나. 살조 바이러스의 분리 및 생리·생태 특성

해양 바이러스의 대부분은 해양 세균에 감염하는 bacteriophage이지만 다양한 조류에서도 바이러스들이 존재하는 것이 밝혀졌다. 따라서 해양의 조류 바이러스에 관한 연구는 지구환경에 관한 생태학적 혹은 적조 방제와 같은 측면의 연구 이외에도, 바이러스의 기초생물학적인 연구에 있어서 중요한 의의를 가지고 있다.

본 연구에서는  $0.22 \mu\text{m}$  filter로 여과한 해수를 이용한 Virus screening이 수행

되었으며, 그 결과 와편모조류 중 적조 원인 종인 *C. polykrikoides*와 관련 있는 *Prorocentrum minimum*과 *Heterocapsa pygmaea*를 감염하는 바이러스를 발견하였다. 이러한 바이러스들의 형태적, 분자생물학적 특징 규명과 숙주세포를 사멸시키는 생리, 생태학적인 관계가 명확히 입증되었다. 마찬가지로 *C. polykrikoides*를 포함한 그 외 유해조류를 감염하는 바이러스가 발견된다면, 이러한 연구를 기초로 하여 유해적조의 제어에 도입이 가능할 것으로 판단된다. 이러한 바이러스들의 형태적, 분자생물학적 특징 규명과 숙주세포를 사멸시키는 생리, 생태학적인 관계가 명확히 입증되었다. 마찬가지로 *C. polykrikoides*를 포함한 그 외 유해조류를 감염하는 바이러스가 발견된다면, 이러한 연구를 기초로 하여 유해적조의 제어에 도입이 가능할 것으로 판단된다.

## 5. 적조 발생 확산 예측을 위한 모델 구축

### 가. 해양물리조사 및 해수 유동모델 구축

대조기 최대 창조시의 조류는 북서향하고 대조기 최대 낙조시에는 남동향하는 흐름을 보였다. 소조기 조류는 최대 창조시와 낙조시의 유향은 각각 대조기와 동일한 분포를 보였고, 유속이 대조기에 비하여 작게 나타났다. 조석간차류의 분포를 보면 남동향 하는 흐름이 전반적으로 우세하게 나타난다.

### 나. 입자 추적자 모델

해수 유동모델과 Lagrangian 방법을 이용한 입자 추적자 모델(particle tracking model)을 이용하여 유해적조의 거동을 파악하였다. 통영-남해 주변해역에서 4대분조(M2, S2, K1, O1)의 조류를 POM (Princeton Ocean Model)을 이용하여 계산하였다. 이러한 유동 환경을 기반으로 하여 자란만, 미조앞바다, 옥지도 서측 해역 그리고 세 지점에서 동시에 유해적조 생물이 발생하였을 경우 시간에 따른 공간적 분포를 알기 위해 입자 추적자 모델을 이용하였다.

자란만에서 유해 적조가 발생할 경우 2일이 경과하기까지 자란만 근해에서 발생한 유해 적조 입자의 78%가 분포하고, 4일 경과 후, 남해도 남쪽 해역과 옥지도 남쪽까지 확산된다. 6일 경과 후, 옥지도 남측 먼 바다로 확산되고, 서서히 동향하는 것으로 나타났다.

미조 앞바다에서 유해 적조가 발생할 경우 4일 경과 까지 남해도 남·서측으로 많이 분포하고, 5일 경과 후, 외해역으로 다수 분포하는 것으로 나타났다. 8일 경과 후 다시 남해도 남측 해역에 다수 분포하고, 남해도 서측 수로를 통해 북향한다. 10일 경과 후, 남해도 서측 수로를 통해 북향하던 유해 적조 입자들이 광

양만 내만으로 유입된다.

육지도 서측에서 유해 적조가 발생할 경우 2일이 경과하면 남해도 남측해역과 사량도 남측 해역 및 거제도 남서쪽 연안에 확산되어 나간다. 6일 경과 후 거제도 남서측 해역에 약 20%의 유해 적조입자가 고밀도로 분포하다가 7일 경과 후, 통영과 거제도 사이 수로를 통하여 진해만으로 유입된다.

## 6. 적조 잠재력 제어 현장 평가 및 발아 초기개체군 구제 가능성 검토

### 가. 실내 마이크로코즘 실험을 통한 황토살포 효과 조사

연구 기간 동안 현장에서 *C. polykrikoides* 적조가 일어나지 않은 관계로, 실내 실험을 통하여 황토 살포에 의한 적조 구제 효과를 조사하였다. *C. polykrikoides* 영양세포를 1,000, 2,000, 5,000 cells/mL로 하고, 황토는 0~10,000 ppm의 범위로 구간을 설정하여 황토 살포 1일 경과 후 chlorophyll a 값을 측정하여 대조구와 비교하여 조사하였다.

그 결과, *C. polykrikoides* 영양세포 농도가 2,000 cells/mL 이상에서 황토 농도가 10,000 ppm인 경우 황토에 의한 구제 효과가 높은 것으로 나타났다. 이를 바탕으로 메조코즘(mesocosm) 설치를 통한 대량 배양 상태에서의 황토 살포 효과를 파악하여야 할 것으로 판단된다.

### 나. 황토살포에 따른 *Cochlodinium polykrikoides* 영양세포 구제 및 휴면포자 형성저해 평가

휴면포자 형성 저해 능력을 조사하기 위해 멸균된 저질과 f/2 배지를 Cell culture flask에 담아 마이크로코즘 실험을 수행하였다. 배양된 *C. polykrikoides* (5,000 cells/mL)에 황토(10,000 ppm)를 살포하였으며, 영양세포 및 휴면포자를 검출하기 위하여 고감도 식별법인 real-time PCR법을 이용하였다. 그 결과, 황토 살포전의 저질에서는 *C. polykrikoides*가 검출되지 않았고, 황토 살포 후 1시간이 경과하였을 때 표층과 저층의 *C. polykrikoides* 검출 값이 비슷한 것을 볼 수 있었다. 그러나 24시간 경과 후에는 수층의 *C. polykrikoides* 검출값이 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 저질에서의 검출값은 낮아지는 경향을 보였다.

이것으로 보아, 황토 살포에 의해 물리적으로 응집된 영양세포가 저층으로 가라앉기는 하지만, 세포가 파괴되지 않고 아직 유영 능력이 있는 *C. polykrikoides*가 저층에서 표층으로 다시 올라 오는 것으로 볼 수 있다. 10일 정도 경과 후에 저질에서 검출되는 *C. polykrikoides*의 경우는 일시 휴면포자(temporary cyst)일 가능성이 높은 것으로 판단되며, Real-time PCR법을 이용한 보다 장기적인 적조

잠재력 현장조사에 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 유해적조 *C. polykrikoides*의 휴면포자를 적조 상습 해역에서 최초로 발견하여 생활사 해명  
: 적조 발생 원인규명, 지역별 적조 잠재력 및 모니터링에 활용
2. *C. polykrikoides*의 일시 휴면포자(temporary cyst)를 실내 및 현장조사를 통하여 확인하였고, 영양세포의 증식과정에서 단성생식(parthenogenesis)에 의해 형성됨을 확인  
: 적조 증식 및 확산, 지역별 적조 잠재력 예측에 활용
3. *Nematodinium* sp.의 휴면포자와 발아 특이성을 최초로 발견함
4. 저질 중의 휴면포자의 정량법 확립
  - 해수/휴면포자/Sodium polytungstate (SPT)의 비중차를 이용한 밀도구배원심법(SPT-density gradient centrifugation method)과 Primuline 형광 염색법(Primuline-staining method)을 조합한 외편모조류 휴면포자 정량법 확립
  - 종 특이적인 primer와 probe을 이용하여 PCR 증폭산물의 형광감도 증가를 실시간으로 모니터링하여 해석하는 Real-time PCR법을 개발하여 적용함  
: 적조 발생 잠재력 조사 및 현장 모니터링에 활용
5. 지역별 휴면포자 잠재력 파악
  - 직접법을 통한 *Nematodinium* sp.의 휴면포자의 지리적 분포 및 지도 작성
  - 적조발생의 잠재력인 "seed bed"로서 가능성을 입증
  - Real-time PCR을 이용한 저질 중의 *C. polykrikoides* 발생 잠재력을 확인하여 지역별 분포 양상을 지도화
  - 2007년 이후 *C. polykrikoides* 발생 잠재력의 급격한 감소와 영양세포의 출현 양상이 일치하는 것을 확인(자란만의 집중조사 및 상습지역의 정기조사 결과)  
: 지역별 적조 발생 예측 및 조기 방제에 활용
6. *C. polykrikoides* 지역개체군의 발생/생태환경 해석
  - *C. polykrikoides*의 초기 발생은 지역별 차이를 나타내는 것을 확인함  
: 자란만(6월 초-중순; 수심 6-10 m; 저층수온 19-22℃),  
미조(7월 상순; 수심 16-24 m; 저층수온 20-22℃),  
육지도(8월 상순; 수심 28-35 m; 저층수온 22-23℃)
  - 지역별 초기 발생의 차이는 수심에 따른 물리적 환경요인(저층 수온변화 등)의 변화와 관련되는 것으로 해석됨

- 외해쪽(육지, 미조)보다는 자란만에서 현존량과 영양염(무기 및 유기태 질소 /인)의 농도가 높았으나, 강우 등의 물리적 환경변화에 따라 *C. polykrikoides* 개체군 증식이 저하됨
  - *C. polykrikoides*과 *Nematodinium* sp.이 거의 동시에 발생하는 특성을 확인하여 상호 초기발생 지표종으로 판단함  
: 특정 해역에서 *Nematodinium* sp.의 발생을 *C. polykrikoides* 초기발생의 모니터링에 활용
7. *C. polykrikoides*의 성장환경 및 생리특성 파악
- *C. polykrikoides*의 최대성장속도는 수온 25°C, 염분 30 psu에서 0.35 day<sup>-1</sup>로서 염분의 증·감에 따라 성장속도가 급격히 변화하는 것을 확인  
: 현장의 관측(자란만 집중조사) 결과와 잘 일치
  - *C. polykrikoides*는 DIP가 제한된 환경에서는 DOP를 이용할 가능성이 큰 것으로 확인됨  
: 유기물 유입이 많은 양식장 인근의 유해적조발생 모니터링 및 방제에 활용
8. 유해 와편모조류인 *Prorocentrum minimum*과 *Heterocapsa pygmaea*에 종특이적 살조 바이러스를 발견하고, 숙주세포를 사멸시키는 특성을 입증(특허 출원)  
: *C. polykrikoides*을 포함한 유해적조생물 제어에 활용 가능성
9. 적조 발생 확산 예찰을 위한 모델 구축
- 남해 동부해역(자란만-육지도 라인)을 중심으로 해양물리조사를 통한 유동 모델 구축
  - 해수 유동모델과 Lagrangian 방법을 이용한 입자추적자모델을 확립  
: 유해적조의 거동을 파악, 적조예찰 및 방제에 활용
10. 적조 잠재력 제어 현장 평가 및 초기 발아개체군 구제 가능성 검토
- 황토살포에 따른 *C. polykrikoides* 영양세포의 구제 효율 확인(실내실험)
  - 실내 마이크로코즘(microcosm) 실험을 통한 황토살포 효과 조사  
: Real-time PCR을 이용한 침적 세포의 존재를 확인  
: 적조 구제물질 살포에 대한 효과 및 잠재력 제어 효율성 검증에 활용이 기대됨

# SUMMARY

## I. Title

Development of Bloom Control Techniques through Life Cycle Elucidation of the Harmful Dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*

## II. Introduction

The dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* is a fish-killing species of harmful algae, and its outbreak had been known to be caused by inflows from outside as its life cycle was not identified. However, as a recent identification of its resting cysts suggested a possibility of its potential for internal outbreak, rapid and precise methods of identifying resting cysts and researches on regional resting cyst potential were required.

This study was to find environmental factors related to its physiological ecology of dormancy, to identify growth promoting factors of harmful algal blooms, and to establish their hydrodynamic model. It also examined the efficiency of applying mitigation substance, and carried out a research on the possibility of controlling their outbreak in regions populated densely with resting cysts and on the efficiency of spreading mitigation substance at the early stage of their germination. It also tried to judge its ability of controlling the potential of the red tide outbreak, and to verify its physical prevention and its damage control against harmful algal blooms.

## III. Research Subjects and Contents

### 1. Life cycle elucidation of *Cochlodinium polykrikoides*

- (1) The first findings of resting cysts of *Cochlodinium polykrikoides* and *Nematodinium* sp. and the identification of their germination
- (2) The formation of hyaline cysts and characteristics of their germination
- (3) The occurrence and systematic interpretation of *Nematodinium* sp. as an indicator species of *C. polykrikoides*



2. **The Development and application of conventional method for the discrimination of resting cyst potentials of *C. polykrikoides***
  - (1) The establishment of the counting method of resting cysts
  - (2) The meaning of the distribution investigation of resting cysts by the direct counting method
  - (3) An investigation of regional cyst potential by using real-time PCR method
3. **An Interpretation on the occurrence and the ecological environment of a regional population of *C. polykrikoides***
  - (1) An periodic investigation on strains of Jaran Bay, Yokji-do, Saryang-do and Mijo-myeon
  - (2) A concentrative investigation on fixed stations in Jaran Bay
  - (3) A correlation in the occurrences of germinants of *Cochlodinium polykrikoides* and *Nematodinium* sp.
4. **A detection of growth conditions, and growth promoting or inhibition components for harmful algae**
  - (1) An Identification of growth environment and physiological characteristics of *Cochlodinium polykrikoides*
  - (2) Separation and physiology and ecological characteristics of algicidal viruses
5. **The establishment of a model for mitigation and prediction of harmful algal blooms**
  - (1) An physical investigation and the establishment of a hydrodynamic model
  - (2) Particle Tracking Model
6. **An evaluation of field restraint on HABs seed potential and examination about the possibility of mitigating the initial germinant population**
  - (1) An investigation of the mitigation efficiency of loess spreading on vegetative cells of *Cochlodinium polykrikoides*
  - (2) An investigation of the effect of loess spreading in microcosm experiments

#### IV. Results

1. **Life cycle elucidation of *Cochlodinium polykrikoides***
  - (1) **The first findings of resting cysts of *Cochlodinium polykrikoides***

### **and *Nematodinium* sp. and the identification of their germination**

To identify the reality of resting cysts of *C. polykrikoides*, we conducted a cultivation and microscope examination on suspended materials sieved in filtered seawater after sampling sediments from Saryang-do and Jaran Bay, where there were annually reported periodic formations of harmful algal blooms and early outbreaks of vegetative cells. We conducted a net sampling (20  $\mu\text{m}$ ) of vegetative cells, and observed floating cysts at the same time. Even though no germination was traced directly in cysts of *C. polykrikoides* from the sediment under the sampling process, the occurrence of its vegetative cells, germinants, was verified. On the other hand, the resting cysts of *C. polykrikoides* were first found in the net sampling at the periodic examination on the station 4 in Jaran Bay from the end of May through early June, 2009 and their germination process was verified under the microscope. Just before germination, resting cysts were observed to be with a small spine and without one, and all of them had a conspicuous red body. Their size was 35~43 $\mu\text{m}$  long, and they were distinguished from hyaline cysts being formed in the process of germination. The early germinants were 35~45  $\mu\text{m}$  long and 20~30  $\mu\text{m}$  wide, and their vegetative cells developed into 8 chains at the maximum.

### **(2) The formation of hyaline cysts and characteristics of their germination**

Hyaline cysts formed from *C. polykrikoides* were similar to vegetative cells in size, pale in color, immobile without chloroplasts. Their size was similar to that of motile cells. Only faint traces of the sulcus and cingulum remained on the surface; all hyaline cysts were surrounded by a transparent, thin hyaline membrane. After being preserved for 6 months at 4°C in darkness, cells of *C. polykrikoides* regenerated successfully from the hyaline cysts when moved to the light and a higher temperature. Hyaline cells developed diversely into single cells or cell clusters being chained with eight cells. Each cell had a red body, and cell clusters formed a hyaline membrane surrounding cells. Even in the sediment, cells could be detected having primuline staining. Thanks to their chloroplasts emitting red light, they were

determined to be alive under the fluorescence microscope. The result meant that most vegetative cells of cell clusters chained with more than four cells could be transformed into hyaline cells without changing the number of cell clusters. It also suggested that hyaline cells could be considered a kind of temporary cysts, not to be at the dying stage of vegetative cells. As *C. polykrikoides* cells regenerated vegetative cells successfully from the hyaline cysts in the favorable condition, hyaline cells were determined to be in one stage of the life cycle of *C. polykrikoides*.

### **(3) The occurrence and systematic interpretation of *Nematodinium* sp. as an indicator species of *C. polykrikoides***

*C. polykrikoides* and *Nematodinium* sp. were observed to share some similarity in the outbreaking period and in the morphology of germinants. Resting cysts of *Nematodinium* sp. were present all over the area of the South Sea, Korea. As *C. polykrikoides* and *Nematodinium* sp. began to occur on the spot at the same time and showed a similar aspect of occurrence, the two species were estimated to play as a indicator species to each other in the mode of ecological occurrence. In order to grasp an accurate systematic relationship of *Nematodinium* sp., an interpretation of molecular system was conducted by using the information of genome sequence of dinoflagellates registered in NCBI. *Nematodinium* sp. in the experimental group was interpreted to be divided from groups of *Prorocentrum* and *Lepidodinium* and from one clade. There was no species being perfectly coincident with *Nematodinium* sp. in the system analysis. The most related species were *Warnowia* sp. and *Nematodinium* sp., being followed by *Cochlodinium* cf. *geminatum* and *Dissodinium*. They were much similar in morphology, but as they showed a partial genetic difference in the result of this study, further detailed morphological and molecular biological researches were required for a definite classification of species.

## **2. The development and application of conventional method for the discrimination of resting cyst potentials of *C. polykrikoides***

### **(1) The establishment of the counting method of resting cysts**

The method of SPT was introduced to count resting cysts directly in the sediment. The resting cysts of dinoflagellates were reported to have a specific gravity of about 1.3 g/cm<sup>3</sup> (Anderson and Lively, 1985; Bolch, 1997). The most dinoflagellates could be separated from an experimental group with a concentration of 1.3 g/cm<sup>3</sup>, and they were more than from experimental groups with a concentration of 1.2 g/cm<sup>3</sup> and 1.5 g/cm<sup>3</sup>. Afterwards, the concentration of SPT solution was set at 1.3 g/cm<sup>3</sup> for resting cysts of *Nematodinium* sp. in the quantitative analysis.

Vegetative cells of *C. polykrikoides* were morphologically defined by their distinct characteristics of the cingulum, and were identified by light microscopy and/or scanning electron microscopy (SEM) on cultured strains (Matsuoka et al. 2008). For identification of dinoflagellate cysts, light microscopy and SEM observations were also required, and the field-derived cysts were commonly incubated in culture media over a period of several weeks for growth, and then the germinated cells were re-examined by microscopy for species verification. These conventional methods required considerable time and expertise for species identification. To overcome this difficulty, molecular identification methods such as real-time PCR assay, fluorescent in situ hybridization and sandwich hybridization have been used for detection of harmful dinoflagellates. The rapid and accurate identification and enumeration of the target species of interest were prerequisites for HABs monitoring programs. Real-time PCR assay has been used for rapid detection and enumeration of harmful dinoflagellates in waters and sediments. The method used a cloned fragment of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) rDNA gene as a standard for cyst quantification.

## **(2) The meaning of the distribution investigation of resting cysts by the direct counting method**

A common assumption was that cyst 'seed beds' provided the inoculum for many harmful blooms. Given the widespread cyst distribution typical of coastal areas, one important scenario was that the blooms were initiated by the synchronized germination of cysts throughout the region. Therefore, we investigated the cyst distribution along the coastal areas such as

Gosung-Jaran Bay and Wando, where *Cochlodinium* blooms were prevalent in 2007. As expected, a high distribution of *Nematodinium* cysts was shown only in some stations of the coastal areas where blooms occurred last year (10-15 cysts/10 g sediments in wet weight) and in stations where a physical accumulation was possible (98 cysts/10 g sediments), while the other stations showed just a trace of their distribution (0-2 cysts/10 g sediments). On the other hand, from their feature that the cyst population germinates under favorable environmental conditions, it was estimated that their densely-populated regions took the role of point sources of recurrent bloom initiation in the shallow coastal areas.

### **(3) An investigation of regional cyst potential by using real-time PCR method**

*C. polykrikoides* was detected in sediment samples from the coast of Southern Sea. Of total sediment samples, Jaran Bay samples were positive for *C. polykrikoides* continually (~2010), other location samples were detected. The abundances of these species in the coast of Jaran Bay were relatively higher than other location (100 rDNA copies for *C. polykrikoides* per cm<sup>3</sup> of wet sediment obtained from top layer of centrifuged 30 g of sediment). *C. polykrikoides* was detected from the coasts of Saryangdo, Yeosu, Wando, Mijo-myeon, Tongyeong, Yokji-do from 10 to 30 rDNA copies per cm<sup>3</sup> of wet sediment. As a result, the detection of resting cysts of *C. polykrikoides* from samples in the sediment by real-time PCR can be used to clarify the potential of red tide breakout and to predict the occurrence of resting cysts of *C. polykrikoides* in the water mass. It can be used in locating regions liable to the red tide outbreak and in establishing a device to minimize the harm of the red tide.

## **3. An Interpretation on the occurrence and the ecological environment of a regional population of *C. polykrikoides***

### **(1) An periodic investigation on strains of Jaran Bay, Yokji-do, Saryang-do and Mijo-myeon**

Physico-chemical and biological factors were investigated on seawater and

sediment samples in the areas of Jaran Bay, Yokji-do, Mijo-myeon, and Saryang-do, that is, major regions where *C. polykrikoides* occurred from 2009 through 2011.

Around **Jaran Bay** from May through September, water temperature was 16.88~31.05°C at the surface and 14.65~25.90°C at the bottom, salinity was 20.35~34.94 psu at the surface and 30.10~35.02 psu at the bottom, and dissolved oxygen was 4.00~10.76 mg/L at the surface and 0.79~8.10 mg/L at the bottom. DIN (dissolved inorganic nitrogen) was in the range of 0.08~2.68  $\mu\text{M}$  at the surface and 0.03~7.84  $\mu\text{M}$  at the bottom, and DON (dissolved organic nitrogen) was 0.21~2.80  $\mu\text{M}$  at the surface and 0.05~1.64  $\mu\text{M}$  at the bottom. DIN and DON accounted for fifty percent of DTN (dissolved total nitrogen) at the surface, respectively and DIN accounted for sixty five percent of DTN at the bottom. DIP (dissolved inorganic phosphorus) was 0.09~1.62  $\mu\text{M}$  at surface and 0.02~1.81  $\mu\text{M}$  at the bottom, and DOP (dissolved organic phosphorus) was in the range of 0.03~0.56  $\mu\text{M}$  at the surface and in the range of 0.03~0.52  $\mu\text{M}$  at the bottom. DIP accounted for seventy percent of DTP (dissolved total phosphorus) at the surface and for sixty five percent at the bottom. DSi (dissolved silicon) was in the range of 0.13~13.51  $\mu\text{M}$  at the surface and in the range of 1.15~12.98  $\mu\text{M}$  at the bottom.

As for the species composition and standing crops of phytoplankton, 35 species of dinoflagellates (300~27,000 cells/L) and 36 species (2,100~2,000,000 cells/L) were observed among 71 species of phytoplankton, and their standing crops increased with the lapse of time from spring to summer. The diatom *Chaetoceros* sp. was a dominant species in the period of investigation. *C. polykrikoides* tended to increase correspondingly with the increase of diatoms at the early observation, but did not develop to the point of blooms under the influence of dominant diatoms.

In **Saryang-do** from July through August of 2010 and 2011, water temperature was in the range of 23.56~25.24°C at the surface and 18.85~20.51°C at the bottom. Salinity was 31.58~34.23 psu at the surface and 32.21~34.34 psu at the bottom. DO was in the range of 6.73~7.49 mg/L at the surface and in the range of 4.18~6.51 mg/L. As for the species composition

and standing crops, 14 species of dinoflagellates (400~3,400 cells/L) and 28 species of diatoms (8,000~459,350 cells/L) were observed among 42 species of phytoplankton. The diatom *Pseudo-nitzschia pungens* was dominant species. Germinants of *C. polykrikoides* were observed to be with a concentration of 45~155 cells/L at the investigation on July 21, and did not develop into a mass occurrence.

In **Mijo-myeon** in July and August, 2011, water temperature was 22.73~25.80°C at the surface and 17.29~24.41°C at the bottom, salinity was 27.79~33.44 psu at the surface and 32.38~34.93 psu at the bottom, and dissolved oxygen was 4.52~6.86 mg/L at the surface and 1.45~5.16 mg/L at the bottom. DIN was in the range of 0.87~1.97  $\mu\text{M}$  at the surface and in the range of 0.85~1.95  $\mu\text{M}$  at the bottom. DON was in the range of 0.04~0.66  $\mu\text{M}$  at the surface and in the range of 0.12~1.59  $\mu\text{M}$  at the bottom. DON accounted for twenty percent of DTN at the surface and for about 30 percent of DTN. DIP was in the range of 0.01~0.53  $\mu\text{M}$  at the surface and in the range of 0.06~0.69  $\mu\text{M}$  at the bottom, and DOP was 0.03~0.38  $\mu\text{M}$  at the surface and 0.08~0.38  $\mu\text{M}$  at the bottom. DOP accounted for fifty percent of DTP. DSi was in the range of 0.54~10.63  $\mu\text{M}$  at the surface and in the range of 1.35~9.24  $\mu\text{M}$  at the bottom.

Among 52 species of phytoplankton, 22 species of dinoflagellates marked a difference in standing crops of 310~6,500 cells/L, and 30 species of diatoms were observed in standing crops of 67,050~100,400 cells/L. After the diatom *Asterionella glacialis* became dominant, there was species succession into *Chaetoceros pseudocurvisetus* and *Skeletonema costatum*. Germinants of *C. polykrikoides* were found to be at 20~200 cells/L on July 26, and at 5~42 cells/L on August 24.

In **Yokji-do** from July through August, 2011, water temperature was 22.73~25.80°C at the surface and 17.29~24.41°C at the bottom. Salinity was 27.79~33.44 psu at the surface and 32.38~34.93 psu at the bottom, and dissolved oxygen was 4.52~6.86 mg/L at the surface and 1.45~5.16 mg/L at the bottom. DIN was 0.31~1.98  $\mu\text{M}$  at the surface and 0.824~1.97  $\mu\text{M}$  at the bottom, and DON was 0.04~0.66  $\mu\text{M}$  at the surface and 0.12~0.74  $\mu\text{M}$  at the bottom, accounting for thirty percent and thirty five percent of DTN,

respectively. DIP was in the range of 0.00~0.32  $\mu\text{M}$  at the surface and in the range of 0.01~0.38  $\mu\text{M}$  at the bottom, and DOP was 0.03~0.44  $\mu\text{M}$  at the surface and 0.03~0.38  $\mu\text{M}$  at the bottom, accounting for fifty percent and forty percent of DTP, respectively.

12 species of dinoflagellates (1,500~10,000 cells/L) and 27 species of diatoms (21,900~613,200 cells/L) were observed among 39 species of phytoplankton. Just like in Mijo-myeon, *A. glacialis* was dominant, being followed by *C. pseudocurvisetus* and *S. costatum*. Some germinants of *C. polykrikoides* were traced on July 26 and August 24, but did not develop into a red tide outbreak.

## **(2) A concentrative investigation on fixed stations in Jaran Bay**

During the concentrative investigation, germinants started to be detected in June, 2010 and 2011, distributing evenly in the seawater on the surface and at the bottom. Mostly, they occurred first at the bottom, and later the number of germinants tended to increase at the surface. This change can be understood as a response of germinants to the change of conditions in diverse environments such as water temperature. In 2011, there was no detection of resting cysts at the bottom, but Jaran Bay could be determined to be a habitual region of *C. polykrikoides* occurrence, as its germinants were detected in the seawater.

## **(3) A correlation in the occurrences of germinants of *Cochlodinium polykrikoides* and *Nematodinium* sp.**

Through periodic and concentrative investigation, germinants of *C. polykrikoides* and *Nematodinium* sp. were found to appear almost at the same time. In the investigation of the occurrence of germinants of *C. polykrikoides* and *Nematodinium* sp. from May 29 through August 17, 2010, *Nematodinium* sp. appeared to be with a concentration of 14 cells/L and 7 cells/L at the station 4 and 7 on June 13, respectively, and was followed by the occurrence of *C. polykrikoides* on June 16. At that time, *Nematodinium* sp. showed a high concentration of 45 cells/L at the station 4 and of 54 cells/L at the station 7. In the investigation from May 14 through August 3, 2011, the occurrence



of germinants of *C. polykrikoides* and *Nematodinium* sp. was found to show a tendency similar to that in 2010, and germinants of *C. polykrikoides* were detected two or three days after the discovery of germinants of *Nematodinium* sp. As *Nematodinium* sp. and *C. polykrikoides* occurred on the spot almost at the same time, showing a tendency of occurrence similar to each other, they can be considered to play a role of an indicator species of initial development to each other, and they can be used in monitoring the initial development of *C. polykrikoides* in some specific sea area on the basis of the consideration.

#### **4. A detection of growth conditions, and growth promoting or inhibition components for harmful algae**

##### **(1) An Identification of growth environment and physiological characteristics of *Cochlodinium polykrikoides***

To understand the physiological characteristics of harmful dinoflagellate *C. polykrikoides*, we investigated the effects of water temperature, salinity, light and nutrients on its growth, using strains isolated from the coastal area of Korea.

As for the effect of water temperature and salinity on the growth of *C. polykrikoides*, the cell growth was not observed at a salinity of 15 psu and 20 psu at a temperature of 15°C, but other experimental groups grew. The maximum growth rate (0.35 day<sup>-1</sup>) was obtained at 25°C and at a salinity of 30 psu. The growth rate of *C. polykrikoides* depended conspicuously on the change of salinity rather than on that of water temperature, and the optimum salinity of *C. polykrikoides* was a little higher than that of other red tide species in Korea. In the light experiment, *C. polykrikoides* did not grow at 10  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and its cell growth was observed at irradiance values of 25  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and above. The irradiance-growth curve was described as  $\mu = 0.30 (I - 15.27) / (I + 27.22)$ , ( $r = 0.99$ ). This suggests a compensation PFD of 15.27  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and a maximum growth rate of 0.30 day<sup>-1</sup>. In conclusion, *C. polykrikoides* preferred a high salinity, temperature and irradiance in the summer of Korea. This result provided important information for understanding the mechanism of *C. polykrikoides* blooms and for developing

the technology to predict the blooms of this organism in the field.

To understand the affinity of *C. polykrikoides* to nutrients, we experimented on its uptake kinetics of DIP (dissolved inorganic phosphorus), one of typical limiting nutrients in the coastal area. Its uptake rate increased correspondingly on the increase in the concentration of DIP up to 10  $\mu\text{M}$ , but showed no more difference at a higher concentration than 10  $\mu\text{M}$ . The Michaelis-Menten's equation showed a high determination coefficient,  $r = 0.90$ . At that time, the maximum uptake rate ( $\rho_{\text{max}}$ ) was 0.80  $\text{pmol cell}^{-1}\text{hr}^{-1}$  and half-saturation concentration ( $K_s$ ) for DIP was 1.87  $\mu\text{M}$ . In the present study, the  $K_s$  value of *C. polykrikoides* was lower than that of *Gymnodinium catenatum* and *Alexandrium tamarense*, but it was higher than that of the diatom *Skeletonema costatum*. This result suggested that *C. polykrikoides* was disadvantaged in competition with the diatom *Skeletonema costatum* in an environment of inorganic nutrients. Phytoplankton with a high  $\rho_{\text{max}}$  could survive by storing nutrients in the cell even though the high  $K_s$  was quite disadvantaged in competition. The maximum specific uptake rate ( $V_{\text{max}}$ ;  $\rho_{\text{max}}/Q_0$ ) of *C. polykrikoides* was estimated to be 51.9  $\text{day}^{-1}$ . This value was high, compared to those reported on other species. The  $V_{\text{max}}/K_s$  was calculated to be 27.7, which was similar to that of *A. tamarense*. This indicated that *C. polykrikoides* was a poor competitor in terms of utilizing inorganic nutrients, compared to the dominant diatom in the coastal area of Korea.

*C. polykrikoides* maintained its growth utilizing DOP (dissolved inorganic phosphorus) compounds, which had as various molecular weights and structures as DIP. The growth rate of PME (phosphomonoester) was observed to be 0.13~0.19  $\text{day}^{-1}$ , which was correspondent to 92 $\pm$ 12% in comparison with that of Ortho-P (orthophosphate). As for DOP compounds in the nucleotide such as AMP (adenosine 5-monophosphate), ADP (adenosine 5-diphosphate) and ATP (adenosine 5-triphosphate), their growth rate was similar to that of Ortho-P. Thus, *C. polykrikoides* might grow, utilizing DOP compounds under DIP-limited conditions. In other word, the DIP-limited condition would give a favorable influence on the growth of *C. polykrikoides*. In Alkaline phosphatase (APase) activity, which hydrolyzes

phosphomonoesters in the surrounding water, the APase of *C. polykrikoides* increased with its cell growth, while DIP concentration decreased in the culture fluid. Its APase reached a maximum of activity at the stationary phase of cell growth. The APase activity of *C. polykrikoides* was first detected when the DIP concentration decreased to 0.83  $\mu\text{M}$  (day 11). The APase reached a maximum of 0.70  $\text{pmol cell}^{-1}\text{hr}^{-1}$  in the stationary phase. DIP concentration with the first induction of the APase activity was considerably higher than that in Jaran Bay. Therefore, organic nutrients such as DOP may be useful for the survival, cell division and species competition of *C. polykrikoides*.

## **(2) Separation and physiology and ecological characteristics of algicidal viruses**

Most of viral particles were presumably bacteriophages infecting marine germs, but viruses infecting algae have also been reported. In this study, a virus screening was done by the microplate MPN (The Most Probable Number) method on 0.22  $\mu\text{m}$  filtered seawater samples from each sampling site. As a result, *Heterocapsa pygmaea* infecting virus (HpygDNAV01) was detected to infect and lyse the dinoflagellate *Heterocapsa pygmaea* and *Prorocentrum minimum*. A further discovery of viruses infecting other harmful algae including *C. polykrikoides* would make it possible to restrain harmful algal blooms on the basis of this study.

## **5. The establishment of a model for mitigation and prediction of harmful algal blooms**

### **(1) An physical investigation and the establishment of a hydrodynamic model**

Tidal currents flowed to northwest at the maximum flood in the spring tide, and to southeast at the maximum ebb in the spring tide. Neap tidal currents showed a similar distribution in the maximum flood and the maximum ebb to that in the spring tide, but the speed decreased compared to that in the spring tide. As for the distribution of the tide-induced residual current, the flow to southeast was found to be mostly prevalent.

## **(2) Particle Tracking Model**

The movement of harmful algal blooms was detected with the particle tracking model using a hydrodynamic model and Lagrangian method. Currents with four tidal components, that is, M2, S2, K1, O1, were calculated with the help of POM (Princeton Ocean Model) in the coastal area of Tongyeong and Namhae. A particle tracking model was utilized to understand the spatial distribution of harmful algal blooms with the lapse of time in the case of their occurring in Jaran Bay, the sea off Mijo-myeon and the west of Yokji-do, and also in the case of the simultaneous occurrence at the three areas.

Harmful algal blooms in Jaran Bay could distribute 78 percent of harmful algal particles two days after their occurrence, and spread to the southern water of Namhae and Yokji-do with the lapse of four days. With the lapse of six days, they spread to a faraway sea of Yokji-do and turned to east slowly. In the case of harmful algal blooms in the sea off Mijo-myeon, they distributed mostly in the south and the west of Namhae-do until the lapse of four days, but they spread to the outer waters largely five days later. Eight days later, they distributed largely in the south water of Namhae-do again and proceeded to north through the west channel of Namhae-do. Ten days later, harmful bloom particles flew into Jinhae Bay after proceeding to north through the west channel of Namhae-do.

## **6. An evaluation of field restraint on HABs seed potential and examination about the possibility of mitigating the initial germinant population**

### **(1) An investigation of the mitigation efficiency of loess spreading on vegetative cells of *Cochlodinium polykrikoides***

As there was no outbreak of *C. polykrikoides* blooms on the spot during the research, the mitigation efficiency of loess spreading was investigated in the indoor experiment. With the vegetative cells of *C. polykrikoides* being with a concentration of 1,000 cells/mL, 2,000 cells/mL and 5,000 cells/mL, and loess being spread in the range of 0~10,000 ppm, the chlorophyll a of experimental

groups were measured one day after the spread of loess, being compared to that of control groups. As a result, the mitigation efficiency was the highest on vegetative cells of *C. polykrikoides* with a concentration of 2,000 cells/mL and 10,000 ppm of loess. The efficiency should be identified in mass culture condition with the installation of mesocosm on the basis of this experiment.

## **(2) An investigation of the effect of loess spreading in microcosm experiments**

Microcosm experiments were done on sterilized sediment and f/2 culture medium in cell culture flask in order to investigate the ability of restraining the formation of resting cysts. Loess was spread with a concentration of 10,000 ppm over *C. polykrikoides* cultured at 5,000 cells/mL, and real-time PCR was adopted to detect vegetative cells and resting cysts. As a result, *C. polykrikoides* was not detected in the sediment before the spread of loess. One hour after the spread of loess, the value of *C. polykrikoides* were similar at the surface and bottom. However, the value of *C. polykrikoides* was found to increase in the middle of water, and to tend to decrease at the bottom. It was found that the cells did not undergo a cell destruction and *C. polykrikoides* having the ability of swimming rose from the bottom to the surface, while the spread of loess was settling a physical coagulation of vegetative cells at the bottom. *C. polykrikoides* being detected in the sediment ten days later were determined to be temporary cysts. Therefore, a long-term field investigation was expected to be adopted on the field of the red tide potential using real-time PCR.

# CONTENTS

SUMMARY .....	xv
---------------	----

CONTENTS .....	xxix
----------------	------

Figure Contents .....	xxxv
-----------------------	------

Table Contents .....	xliii
----------------------	-------

## Chapter 1 Overview of Research Project

1. Purpose of Research .....	1
2. Necessity of Research .....	1
3. Contents and scope of Research .....	5

## Chapter 2 Domestic and Foreign Technical Developments

1. Status of domestic technology development .....	6
2. International technology developments .....	7
3. A position of the outputs from this research compared to the domestic and overseas .....	8

## Chapter 3 Subjects and Contents and of the Research Development

1. Life cycle elucidation of <i>Cochlodinium polykrikoides</i> .....	9
A. The first findings of resting cysts of <i>Cochlodinium polykrikoides</i> and <i>Nematodinium</i> sp. and the identification of their germination .....	9
B. The formation of hyaline cysts and characteristics of their germination .....	10
C. The occurrence and systematic interpretation of <i>Nematodinium</i> sp. as an indicator species of <i>C. polykrikoides</i> .....	16

(1) Germination process of <i>Nematodinium</i> sp. resting cyst .....	17
(2) The molecular phylogenetic study of <i>Nematodinium</i> sp. as an indicator species of <i>C. polykrikoides</i> .....	20
2. The Development and application of conventional method of resting cysts with potentials for the occurrence of <i>C. polykrikoides</i> .....	23
A. The establishment of the counting method of resting cysts .....	23
(1) Direct counting(SPT method) & Real-time PCR .....	23
B. The meaning of the distribution investigation of resting cysts by the direct counting method .....	38
C. An Identification of regional potential utilizing real-time PCR .....	48
(1) High sensitivity identification and quantification in sediments .....	48
(2) High sensitivity identification and quantification in germinate .....	50
(3) Periodic investigation in model(Jaran Bay) and Distribution of resting cysts in frequent occur red tides of the sea .....	52
3. An Interpretation on the occurrence and the ecological environment of a regional population of <i>C. polykrikoides</i> .....	64
A. An periodic investigation on strains of Jaran Bay, Yokji-do, Saryang-do and Mijo-myeon .....	64
B. A concentrative investigation on fixed stations in Jaran Bay .....	106
C. Analysis of field survey .....	115
D. A correlation in the occurrences of germinants of <i>Cochlodinium polykrikoides</i> and <i>Nematodinium</i> sp. ....	118
4. A detection of growth conditions, and growth promoting or inhibition components for harmful algae .....	120
A. An Identification of growth environment and physiological characteristics of <i>Cochlodinium polykrikoides</i> .....	120
B. Separation and physiology and ecological characteristics of Algicidal viruses .....	139

5. The establishment of a model for mitigation and prediction of harmful algal blooms .....	152
A. An physical investigation .....	152
B. The establishment of a hydrodynamic model .....	173
C. Particle Tracking Model .....	184
D. Summary and Conclusions .....	195
6. An evaluation of field restraint on HABs seed potential and examination about the possibility of mitigating the initial germinant population .....	197
A. An investigation of the mitigation efficiency of loess on vegetative cells of <i>Cochlodinium polykrikoides</i> .....	197
B. An investigation of the effect of loess spreading in microcosm experiments .....	201
<b>Chapter 4 Proportion of achievement on object and contribution to the related fields</b>	
1. Achievement of the goals of research and development .....	205
2. Contribution to the development of the technology-related fields .....	208
<b>Chapter 5 Research accomplishments and the application plan for the results</b>	
1. Research accomplishments .....	209
2. The application plan for the research accomplishments .....	211
<b>Chapter 6 Foreign scientific and technical information gathering from the Research</b>	
1. Scientific and technical information exchange through research exchange .....	213
<b>Chapter 7 References</b>	
References .....	219
<b>Appendix 1. Physicochemical Research the marine environment .....</b>	<b>228</b>
<b>Appendix 2. Marine environment and occurs of <i>C. polykrikoides</i>, <i>Nematodinium</i> sp. ....</b>	<b>236</b>
<b>Appendix 3. Real-time PCR Data .....</b>	<b>247</b>



# - 목 차 -

요약문 .....	ii
SUMMARY .....	xv
CONTENTS .....	xxix
목차 .....	xxxii
그림목차 .....	xxxv
표목차 .....	xlili
<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b>	
1. 연구개발의 목적 .....	1
2. 연구개발의 필요성 .....	1
3. 연구개발의 내용 및 범위 .....	5
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b>	
1. 국내 기술개발 현황 .....	6
2. 국외 기술개발 동향 .....	7
3. 연구결과가 국내·외 기술개발 현황에서 차지하는 위치 .....	8
<b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과</b>	
1. <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 의 생활사 해명 .....	9
가. <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 의 휴면포자(cyst)의 최초 발견 및 발아 확인 .....	9
나. Hyaline cyst 형성 및 발아 특성 .....	10
다. <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 발생 발생지표종으로써 <i>Nematodinium</i> sp.의 발생과 계	

통 해석 .....	16
(1) <i>Nematodinium</i> sp. 휴면포자의 발아 과정 .....	17
(2) <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 의 출현 지표종 <i>Nematodinium</i> sp.의 분자계통학 적 연구 .....	20
2. <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 발생 잠재력(휴면포자) 고감도 식별법 개발 및 적용 .....	23
가. 휴면포자 정량법 확립 : .....	23
(1) Direct counting법(SPT법) 및 Real-time PCR법 .....	23
나. Direct counting법에 의한 휴면포자 분포조사의 의의 .....	38
다. Real-time PCR을 이용한 지역별 잠재력 파악: .....	48
(1) 저질내 고감도 식별 및 정량화 .....	48
(2) 발아체 고감도 식별 및 정량화 .....	50
(3) 모델해역(자란만) 정기조사 및 적조상습 해역의 휴면포자 분포 .....	52
3. <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 지역개체군의 발생/생태 환경 해석 .....	64
가. 정기 정점(자란만, 육지도, 사랑도, 미조) 조사 .....	64
나. 자란만 고정 정점 집중조사 .....	106
다. 현장 조사 결과 분석 .....	115
라. <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 와 <i>Nematodinium</i> sp. 발아체 출현의 상관관계 .....	118
4. 적조생물 성장 환경 및 증식 촉진/억제 요인 탐색 .....	120
가. <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 의 성장환경 및 생리특성 파악 .....	120
나. 살조 바이러스의 분리 및 생리·생태 특성 .....	139
5. 적조 발생 확산 예찰을 위한 모델 구축 .....	152
가. 해양물리조사 .....	152
나. 해수 유동 모델 구축 .....	173
다. 입자 추적자 모델 .....	184
라. 요약 및 결론 .....	195

6. 적조 잠재력 제어 현장 평가 및 발아 초기개체군 구제 가능성 검토 .....	197
가. 황토살포에 따른 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 영양세포 구제효과 조사 .....	197
나. 실내 마이크로코즘 실험을 통한 황토살포 효과 조사 .....	201
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b>	
1. 연구개발목표의 달성도 .....	205
2. 관련분야의 기술발전에 기여도 .....	208
<b>제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획</b>	
1. 연구개발 성과 .....	209
2. 연구개발 성과활용 계획 .....	211
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b>	
1. 연구교류를 통한 과학 기술정보 교환 .....	213
<b>제 7 장 참고문헌</b>	
참고 문헌 .....	219
<b>부록 1. 이화학적 해양환경 조사</b> .....	228
<b>부록 2. 해양환경 및 <i>C. polykrikoides</i>, <i>Nematodinium</i> sp.의 발생</b> .....	236
<b>부록 3. Real-time PCR Data</b> .....	247

# 그림 목 차

그림 1. 한국 연안에서 코클로디니움 유해적조의 발생 추이 .....	2
그림 2. 한국 연안에서 유해적조의 발생과 어패류 양식생산 추이 .....	2
그림 3. 자란만 현장에서 관찰된 <i>C. polykrikoides</i> 의 발달 단계별 사진 .....	9
그림 4. <i>C. polykrikoides</i> 의 영양세포 및 hyaline 세포의 광학현미경 사진 .....	12
그림 5. 해수 샘플에서 형성된 <i>C. polykrikoides</i> 의 hyaline 세포와 이들 세포의 DAPI 염색 및 엽록체 형광 사진(C) .....	12
그림 6. <i>C. polykrikoides</i> 배양실험을 통하여 관찰된 1-4 cells 형태를 가진 hyaline cysts의 광학현미경 사진(a, c) 및 형광현미경 하에서 관찰된 chloroplast 색소 반응(b, d) .....	13
그림 7. 온도 및 배지에 따른 시간대별 hyaline 세포의 형성 .....	14
그림 8. 온도 및 배지에 따른 시간대별 hyaline 세포의 형성과 단독세포를 포함한 연쇄체의 출현 양상 .....	15
그림 9. 영양세포로부터 형성된 hyaline 세포의 영양세포로 재출현하는 과정 .....	16
그림 10. 실험실에서의 휴면포자 발아모습. <i>Nematodinium sp.</i> 의 휴면포자 .....	17
그림 11. 현장시료에서 관찰된 휴면포자 모습 .....	18
그림 12. 얇은 막에 둘러 싸여 있는 발아체 .....	18
그림 13. 발아체의 변화 과정 .....	18
그림 14. <i>Nematodinium sp.</i> 휴면포자와 발아체의 SEM 사진 .....	19
그림 15. 발아 후의 독특한 발아공(archeopyle)과 포자벽 .....	19
그림 16. 28S rDNA D1-D3의 염기서열을 이용한 분자계통도 .....	22
그림 17. 저질 전처리 과정 .....	24
그림 18. SPT (Sodium Polytungstate) Solution을 이용한 <i>Cochlodinium polikrikoides</i> 휴면포 자의 밀도구배 원심분리법 .....	24
그림 19. SPT법을 이용하여 저질시료에서 분리한 휴면포자를 포함한 입자체 광학현 미경 사진(각 그림의 왼쪽면)과 형광현미경에서 반응한 포자의 양상 .....	25
그림 20. Real-time PCR의 원리 .....	27
그림 21. Taq-man probe의 원리 .....	27

그림 22. 현장 표층 sample 채집 정점 지도, 2009 Gaedo .....	28
그림 23. Real-time PCR 유전자 probe 개발에 이용한 유전자 범위 모식도 .....	29
그림 24. 현장 시료 SSU rDNA Melting curve .....	33
그림 25. Taq-man probe 종 특이성 검증 .....	34
그림 26. Real-time PCR에 적용할 Standard 정량선 .....	34
그림 27. 퇴적물 내 휴면포자의 정량화를 위한 Standard curve .....	37
그림 28. 한국 광역 sample의 Real-time PCR을 통한 <i>C. polykrikoides</i> 와 <i>G. impudicum</i> 휴 면포자 분포 현황 .....	38
그림 29. 남해 연안 해역별 휴면포자 분포 조사 정점 .....	39
그림 30. 해역별 휴면포자 조사 정점도 .....	40
그림 31. 남해 서부 연안해역의 <i>Nematodinium sp.</i> 휴면포자 분포도 .....	44
그림 32. 남해 중부 연안해역의 <i>Nematodinium sp.</i> 휴면포자 분포도 .....	45
그림 33. 남해 동부 연안해역의 <i>Nematodinium sp.</i> 휴면포자 분포도 .....	46
그림 34. 2008년과 2009년 조사된 자란만 일원의 <i>Nematodinium sp.</i> 휴면포자 분포 및 변동특성 .....	47
그림 35. 퇴적물 내 휴면포자의 정량화를 위한 검량선 .....	50
그림 36. 해수 내의 발아체 정량화를 위한 검량선 .....	51
그림 37. 남해 해역별 휴면포자 조사 정점도. 남해 서부 연안해역 .....	53
그림 38. Real-time PCR을 이용한 여수 인근 해역에서 검출된 <i>C. polykrikoides</i> 휴면 포자 검출량 .....	56
그림 39. Real-time PCR을 이용한 완도 인근 해역에서 검출된 <i>C. polykrikoides</i> 휴면 포자 검출량 .....	57
그림 40. Real-time PCR을 이용한 2009년, 2010년 자란만 인근 해역에서 검출된 <i>C.</i> <i>polykrikoides</i> 휴면포자 검출량 .....	58
그림 41. Real-time PCR을 이용한 2009년 ~ 2011년 자란만 인근 해역에서 검출된 <i>C. polykrikoides</i> 휴면포자 검출량 .....	59
그림 42. 2009년 ~ 2011년 자란만 정점 4, 7, 8, 10에서 검출된 <i>C. polykrikoides</i> 휴면 포자 변동량 비교 .....	59
그림 43. Real-time PCR을 이용한 사량도 인근 해역에서 검출된 <i>C. polykrikoides</i> 휴 면포자 검출량 .....	60
그림 44. Real-time PCR을 이용한 미조면 인근 해역에서 검출한 <i>C. polykrikoides</i> 휴면 포자 검출량 .....	61

그림 45. Real-time PCR를 이용한 통영 인근 해역에서 검출한 <i>C. polykrikoides</i> 휴면 포자 검출량 .....	62
그림 46. Real-time PCR를 이용한 옥지도 인근 해역에서 검출한 <i>C. polykrikoides</i> 휴면 포자 검출량 .....	63
그림 47. 자란만 정기 관측조사 정점도 .....	64
그림 48. 사랑도 정기조사 관측 정점 .....	66
그림 49. 미조면 정기조사 관측 정점 .....	67
그림 50. 옥지도 정기조사 관측 정점 .....	68
그림 51. 자란만 표층 및 저층의 수온 수평분포도(°C) .....	70
그림 52. 2009~2011년 정기조사에 따른 자란만의 수온 변화 .....	72
그림 53. 자란만 표층 및 저층의 염분 수평분포도(psu) .....	74
그림 54. 2009년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 염분 변화 .....	76
그림 55. 자란만 표층 및 저층의 용존산소 수평분포도(mg/L) .....	78
그림 56. 2010년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 용존산소 변화 .....	80
그림 57. 2010년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 용존태 무기 질소 (DIN)의 변화 .....	81
그림 58. 2010년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 용존태 유기 질소 (DON)의 변화 .....	82
그림 59. 2010년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 용존태 무기 인 (DIP)의 변화 .....	83
그림 60. 2010년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 용존태 유기 인 (DOP)의 변화 .....	83
그림 61. 2010년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 용존태 규산염 (DSi)의 변화 .....	84
그림 62. 2010~2011년 자란만 해역의 월별 식물플랑크톤과 <i>C. polykrikoides</i> 현존량 변화 .....	87
그림 63. 2009년 ~ 2011년 정기조사에 따른 자란만 <i>C. polykrikoides</i> 의 휴면포자 및 현장 발아체 정량 .....	89
그림 64. 2010~2011년 사랑도 식물플랑크톤 및 <i>C. polykrikoides</i> 의 현존량 .....	92
그림 65. Real-time PCR을 이용한 2010년 사랑도 <i>C. polykrikoides</i> 의 발아체 정량 .....	93
그림 66. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 수온 변화 .....	94

그림 67. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 염분 변화 .....	94
그림 68. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 용존산소 변화 .....	95
그림 69. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 용존태 무기 질소 (DIN)의 변화 .....	95
그림 70. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 용존태 유기 질소 (DON)의 변화 .....	96
그림 71. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 용존태 무기 인 (DIP)의 변화 .....	96
그림 72. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 용존태 유기 인 (DOP)의 변화 .....	97
그림 73. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 용존태 규산염 (DSi)의 변화 .....	97
그림 74. 2011년 미조면 식물플랑크톤 및 <i>C. polykrikoides</i> 의 현존량 .....	99
그림 75. 2009년~2011년 정기조사에 따른 미조 <i>C. polykrikoides</i> 의 휴면포자 및 현장 발아체 정량 .....	100
그림 76. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 수온 변화 .....	101
그림 77. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 염분 변화 .....	101
그림 78. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 용존산소 변화 .....	102
그림 79. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 용존태 무기 질소 (DIN)의 변화 .....	102
그림 80. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 용존태 유기 질소 (DON)의 변화 .....	103
그림 81. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 용존태 무기 인 (DIP)의 변화 .....	103
그림 82. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 용존태 유기 인 (DOP)의 변화 .....	104
그림 83. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 용존태 규산염 (DSi)의 변화 .....	104
그림 84. 2010년~2011년 육지도 표층 해수 중 식물플랑크톤 현존량 .....	106
그림 85. 자란만 집중조사 관측 정점 .....	107
그림 86. 2010년~2011년 자란만 집중조사기간 동안 수온 변화 .....	109
그림 87. 2010년~2011년 자란만 집중조사기간 동안 염분 변화 .....	110

그림 88. 2010년~2011년 자란만 집중조사기간 동안 용존산소 변화 .....	111
그림 89. 자란만 정점 4에서 식물플랑크톤과 <i>C. polykrikoides</i> 의 현존량 그래프 .....	112
그림 90. 자란만 정점 7에서 식물플랑크톤과 <i>C. polykrikoides</i> 의 현존량 그래프 .....	112
그림 91. 2010년~2011년 자란만 집중조사 해역 <i>C. polykrikoides</i> 의 현장 발아체 정량 .....	114
그림 92. 수온, 염분, 용존산소의 변화와 <i>C. polykrikoides</i> 의 발생량 변화 .....	115
그림 93. 질산염, 인산염, 규산염의 변화와 <i>C. polykrikoides</i> 의 발생량 변화 .....	116
그림 94. 자란만에서의 <i>C. polykrikoides</i> 와 <i>Nematodinium</i> sp.의 발아체 출현 .....	119
그림 95. 각각의 수온과 염분에 대한 <i>C. polykrikoides</i> 의 성장곡선 .....	128
그림 96. 각각의 수온과 염분에 대한 <i>C. polykrikoides</i> 성장곡선의 contour plot .....	129
그림 97. <i>C. polykrikoides</i> 의 이론적 성장속도와 실측된 성장속도 사이의 관계 .....	130
그림 98. 여러 가지 광조건(12L: 12D)에서 성장한 <i>C. polykrikoides</i> 의 <i>in vivo</i> chlorophyll fluorescence 값 .....	131
그림 99. 여러 가지 광조건에서 <i>C. polykrikoides</i> 의 성장속도 .....	131
그림 100. Lambert-beer식을 이용하여 자란만에서 <i>C. polykrikoides</i> 의 $I_c$ 에 해당하는 수 심을 계산한 모식도 .....	132
그림 101. <i>C. polykrikoides</i> 의 인(phosphorus)이 제한된 정치배양에서 시간에 따른 배 양액 중 인산염 농도 변화 .....	133
그림 102. 용존태 무기인의 첨가량에 따른 <i>C. polykrikoides</i> 인의 흡수속도 .....	134
그림 103. 여러 가지 용존태 인(유기태와 무기태)의 첨가에 따른 <i>C. polykrikoides</i> (남 해 자란만 strain)의 성장속도 .....	136
그림 104. 인(phosphorus)가 제한된 배치배양에서 <i>C. polykrikoides</i> 의 세포수와 alkaline phosphatase (APase) 활성의 변화 .....	138
그림 105. Host Isolation Procedures .....	141
그림 106. Location of the sampling station in Namhae area .....	142
그림 107. Virus Isolation Procedures .....	142
그림 108. <i>Heterocapsa pygmaea</i> NF-F-GYM-SP-1 .....	144



그림 109. <i>Heterocapsa pygmaea</i> NF-F-GYM-SP-1 전자현미경으로 관찰한 결과 .....	145
그림 110. <i>Heterocapsa pygmaea</i> 의 성장실험 (A) 바이러스를 접종하지 않은 <i>H. pygmaea</i> NF-F-GYM-SP-1 배양주(●)와 바이러스를 접종한 배양주(○)의 성장곡선, (B) MPN방법을 통해 virus titer를 확인한 결과 .....	146
그림 111. <i>Prorocentrum minimum</i> NF-F-PMI-1d. (A) pictures of both healthy culture (Left) and PminDNAV01 inoculated culture (Right) (B) optical microscopic observation of intact cells; (C) optical microscopic observation of PminDNAV01-infected cells at 120 hpi .....	148
그림 112. <i>P. minimum</i> NF-F-PMI-1d. (A) Transmission electron microscopic observations of an intact cell.; (B) Transmission electron microscopic observations of PminDNAV01-infected cells at 120 hpi.; (C) Higher magnification of square site of (B) .....	149
그림 113. Growth Experiment. Change in the abundance of <i>Prorocentrum minimum</i> NF-F-PMI-1d cells with(○) or without(●) viral inoculation. PminDNAV01 was inoculated to exponentially growing host culture. Algal cell numbers were measured by direct counting. The assays were performed at least three times. The number of virus starts to increase 80 hours postinoculation. Virus titer was checked by MPN method	150
그림 114. 연구해역도 및 유동관측 정점 .....	152
그림 115. 자란도와 사량도 검조소의 조위도 .....	153
그림 116. 조석자료 위치도 .....	155
그림 117. 자란만 주변지역의 대조기 최강창조류도(단위 : 노트, 해양조 사원. 1982) .....	156
그림 118. 자란만 주변지역의 대조기 최강낙조류도(단위 : 노트, 해양조 사원. 1982) .....	157
그림 119. 2009년 5월 16일 ~ 6월 2일 자란만 외측(St. 1)에서 관측한 수층에 따른 해류의 수평유동성분 .....	162
그림 120. 2010년 7월 29일 ~ 8월 17일 자란도 주변(St. 2)에서 관측한 수층에 따른 해류의 수평유동성분 .....	163
그림 121. 2011년 9월 7일 ~ 23일 옥지도 주변(St. 3)에서 관측한 수층에 따른 해류의 수평유동성분 .....	164
그림 122. 2009년 자란만 외측(St. 1)의 수층에 따른 rose graph(좌)와 scatter(우)	

.....	165
그림 123. 2010년 자란도 주변(St. 2)의 수층에 따른 rose graph(좌)와 scatter(우) .....	166
그림 124. 2011년 욕지도 주변(St. 3)의 수층에 따른 rose graph(좌)와 scatter(우) .....	167
그림 125. 2009년 자란만 외측(St. 1)의 수층에 따른 누적유속분포도(progressive vector) .....	168
그림 126. 2010년 자란도 주변(St. 2)의 수층에 따른 누적유속분포도(progressive vector) .....	168
그림 127. 2011년 욕지도 주변(St. 3)의 수층에 따른 누적유속분포도(progressive vector) .....	169
그림 128. 2009년 자란만 외측(St. 1)의 4대분조 조류타원도 (단위:cm/sec) .....	171
그림 129. 2010년 자란도 주변(St. 2)의 4대분조 조류타원도 (단위:cm/sec) .....	171
그림 130. 2011년 욕지도 주변(St. 3)의 4대분조 조류타원도 (단위:cm/sec) .....	172
그림 131. 모델 영역 .....	173
그림 132. 대조기 최강창조시 조류 .....	181
그림 133. 대조기 최강낙조시 조류 .....	181
그림 134. 소조기 최강창조시 조류 .....	182
그림 135. 소조기 최강낙조시 조류 .....	182
그림 136. 15일 주기의 유속을 평균한 조석잔차류 .....	183
그림 137. 유해 적조 발생 지점 .....	186
그림 138. 유해 적조 확산 구역 .....	186
그림 139. 자란만에서 유해 적조가 발생할 경우(Case 1) .....	191
그림 140. 미조 앞바다에서 유해 적조가 발생할 경우(Case 2) .....	192
그림 141. 욕지도 서측에서 유해 적조가 발생할 경우(Case 3) .....	193
그림 142. 세 지점에서 동시에 유해 적조가 발생할 경우(Case 4) .....	194
그림 143. 황토에 대한 <i>C. polykrikoides</i> 의 구제효과 실험 장면 .....	197
그림 144. <i>C. polykrikoides</i> 의 배양(왼쪽, 약 20-L 규모의 생수통; 오른쪽, 200-L 규모 의 배양 수조의 모습) .....	198
그림 145. 황토에 대한 <i>C. polykrikoides</i> 영양세포 구제 및 휴면포자 형성 제어에 관 한 연구를 수행하기 위한 구조물의 예시(적조 발생시 현장에 설치할 예정 임) .....	200
그림 146. 황토에 대한 <i>C. polykrikoides</i> 의 구제효과 마이크로코즘 실험 장면	

.....	201
그림 147. 황토에 대한 <i>C. polykrikoides</i> 의 구제효과 마이크로코즘 실험의 표층 현미 경 관찰 사진 .....	203
그림 148. 황토(좌), 세프레마(중앙), 신물질(우) 살포(최종농도 200 ppm) 후 메조코 즘 내 변화. a, 살포 직후; b, 살포 1분 후; c, 살포 10분 후 .....	204

# 표 목 차

<표 1> <i>Nematodinium</i> sp.의 single cell PCR에 이용한 DNA primer .....	20
<표 2> 밀도별 SPT Solution 구배 실험(Triplicate) .....	25
<표 3> Real-time PCR을 위한 종 특이적 Primer와 probe .....	30
<표 4> 와편모조류의 SSU, ITS1, 5.8S, and ITS2 rDNA 염기서열 증폭에 이용된 primer .....	31
<표 5> 와편모조류 DNA와 Chimera 염기서열의 melting temperature .....	32
<표 6> <i>C. polykrikoides</i> 의 Plasmid DNA Standard curve 제작에 이용한 primer .....	36
<표 7> 조사정점 위치 .....	41
<표 8> <i>C. polykrikoides</i> 의 ITS 영역 증폭에 이용된 primer .....	49
<표 9> Real-time PCR에 사용된 primer와 TaqMan probe .....	49
<표 10> 조사정점 좌표 .....	55
<표 11> 자란만 채집 날짜 .....	65
<표 12> 자란만 조사 방법 .....	65
<표 13> 사량도 채집 날짜 .....	66
<표 14> 미조 채집 날짜 .....	67
<표 15> 육지도 채집 날짜 .....	68
<표 16> 사량도 정기조사 관측 결과 .....	90
<표 17> 자란만 집중조사 채집 날짜 .....	107
<표 18> 자란만 집중조사 조사 방법 .....	108
<표 19> 배양실험에 사용한 인(phosphorus) 공급원 .....	125
<표 20> 배양실험에 사용한 인(phosphorus) 공급원 .....	126
<표 21> <i>C. polykrikoides</i> 의 배양실험으로 얻어진 성장속도에 따른 수온과 염분의 조건을 이용한 이원 배치 분산분석(two-factor ANOVA) 결과 .....	129
<표 22> <i>C. polykrikoides</i> 와 다른 식물플랑크톤의 인(phosphorus)의 흡수 동력학 실험에 의해 도출된 변수 비교 .....	135
<표 23> HpDNAV의 숙주특이성 확인 .....	147
<표 24> Infection specificities of <i>Prorocentrum minimum</i> infecting DNA virus (PminDNAV) against 28 strains of marine phytoplanktons .....	151
<표 25> 조사정점 위치 .....	153

<표 26> 연구해역 인근의 조석 조화상수 및 비조화상수 .....	154
<표 27> 자란만과 육지도의 조류조화분해를 사용하여 나타낸 4대분조 결과 .....	170
<표 28> 시간에 따른 각 구역별 유해 적조 입자 개수 .....	190
<표 29> 황토에 대한 <i>C. polykrikoides</i> 의 구제 효과(chlorophyll <i>a</i> 값) .....	199
<표 30> 황토에 대한 <i>C. polykrikoides</i> 의 구제 효과(Direct counting, Real-time PCR 값) .....	204

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 연구개발의 목적

매년 대규모 적조 발생과 피해를 유발하는 *Cochlodinium polykrikoides*의 생활사를 해명하여 지역적 잠재력(휴면포자)을 파악하고, 이들의 생활사 단계(휴면, 발아 및 형성)를 고려한 적조발생 예측과 확산모델을 개발함으로써 실효적인 적조 발생예측 및 제어시스템을 구축하고자 함.

## 2. 연구개발의 필요성

### ▶ *Cochlodinium polykrikoides* 적조 초기발생과 변천 및 대규모 피해 확산

국내 연안에서 *C. polykrikoides* 적조는 1982년 낙동강 하구에서 최초로 발생하였으며, 이후 진해만, 통영, 거제, 남해, 여수 등의 남해안 중부 해역으로 발생이 확대되었다. '94년까지는 여수, 남해, 통영, 마산 등 연안의 어류양식장에서 발생하였으나, '95년 대규모 적조가 동해안 해역으로 확대된 이후 '98년부터는 서해 연안에서도 발생하고 있다(김 등, 2001). 국내에서 거의 매년 발생하는 *C. polykrikoides* 적조는 최근에는 8월 경에 나로도 주변 해역(북돌바다)에서 최초로 발생하는 것으로 보고되고 있으며, 부영양화된 연안수가 외측의 전선역에서 대마난류와 만나면서 고밀도로 증식, 확산되어 광역화 및 장기화하는 것으로 보고되었다(김 등, 1999). 그동안 *C. polykrikoides*의 적조발생에 관한 많은 연구(Park et al., 1988; Kim, 1997, 1998; Kim et al., 1999; Lee et al., 1999, 2001; Jung et al., 1999; 김, 1995; 김과 신, 1997; 국립수산진흥원, 1994, 1997; 국립수산과학원, 2006, 2007, 2008)가 수행되었으나 생활사에 관한 해명이 되지 않아 대부분이 영양세포의 출현과 적조 발생의 진행상황의 해석(그림 1)에 그치고 있다. 현재까지 한국 연안에서 대규모 적조발생에 대한 피해가 예상 외로 심각한 상황이고, 또한 명확한 발생규모의 지역적 확산에 대한 해명이 되어 있지 않은 실정이다. 그러나 90년대 이후 대규모 유해적조의 출현과 2000년대 이후 다소 소강 상태에 접어드는 과정에는 연안의 양식생산(그림 2) 및 무분별한 연안 이용을 통한 자가오염의 진척 등에 대한 결과라는 지적(Hallegraeff, 1992)이 되어 왔다. 따라서 적조 상습지역을 중심으로 생태환경적인 조사와 원인 해명이 절실한 상황이다.

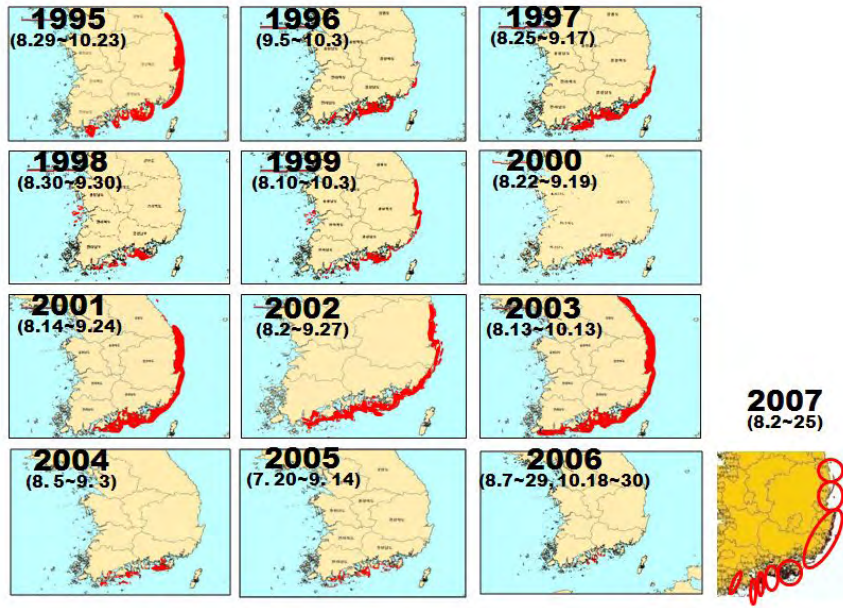


그림 1. 한국 연안에서 코클로디니움 유해적조의 발생 추이.

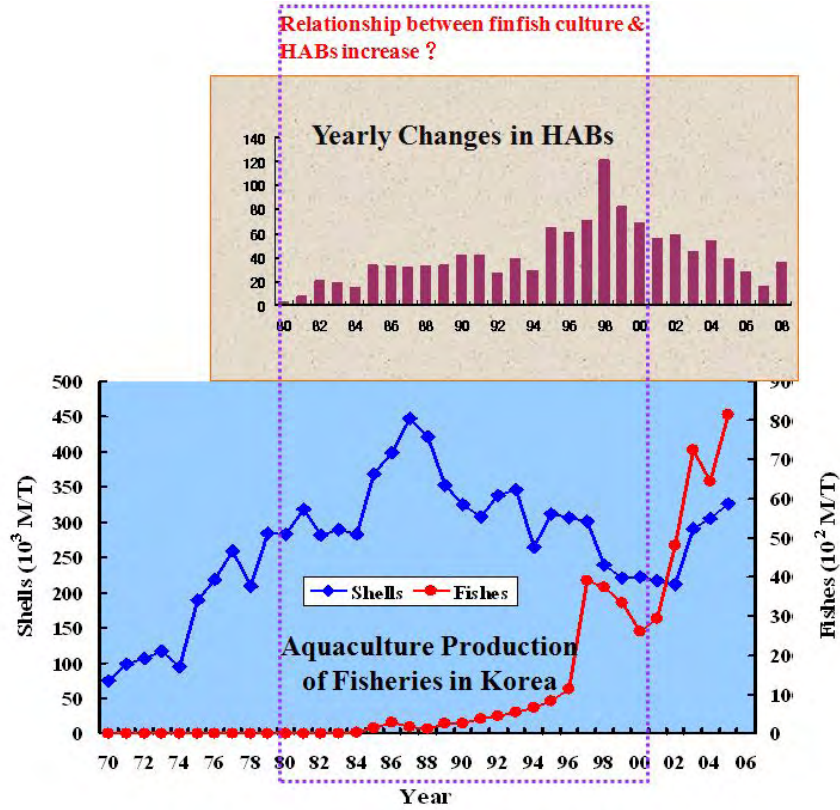


그림 2. 한국 연안에서 유해적조의 발생과 어패류 양식생산 추이.

### ▶ 유해 적조생물 *C. polykrikoides*의 생활사 해명

*C. polykrikoides*와 같은 대부분의 와편모조류는 유성 생활사의 한 부분으로 운동성이 없고 내구성이 강한 휴면포자를 형성하고 해저에 침적하여 일정기간을 보낸 후 어느 시기에 집단으로 발아하여 수계에 영양세포로 유입되는 것으로 알려져 있다(Anderson et al., 1983). 와편모조류의 휴면포자는 종의 분산 및 적조의 시작과 소멸, 그리고 불리한 외부 환경조건에서의 생존에 있어 중요한 생태학적 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Anderson, 1980; Bolch & Salas, 2007). 또한 특정 해역에 존재하는 휴면포자 개체군의 경우, 적조 발생의 씨앗 개체군(seed population) 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에 현장 휴면포자의 식별, 지역적 분포와 현존량을 파악하는 것은 *C. polykrikoides* 적조 발생의 원인을 이해하고 예측하는데 가장 먼저 해명해야 할 사안으로 판단되고 있다. 한편, 적조 발생기작 해명을 위해 최근 증식촉진요인과 물리해양학적 측면의 연구(양 등, 2000; Lee et al., 2001)에 관심이 모아지고 있으나 초기 발생 개체의 가입이 시작된 이후의 영양증식단계에서 관찰이 이루어지고 있기 때문에 아직까지 발생 기작을 설명하기에는 충분하지 않다. 오히려 외래 유입 가능성에 대한 지적이 늘어나고 있는 실정이다. 따라서 생활사 해명을 통한 적조 확산 방지 및 제어 등의 대책 마련을 위하여 이를 활용한 집중적인 신속한 연구 착수 및 현장 적용의 필요성을 강조하지 않을 수 없다.

### ▶ 생활사 해명을 통한 적조 확산방지 및 제어의 필요성

적조 발생과 확산의 과정에서 영양세포의 유성생식(sexual reproduction)에 의한 휴면포자의 형성, 발아, 증식, 물리적 이동 등의 과정을 거치기 때문에 이들과 각 과정을 조절하여 주는 것이 곧 적조 제어의 근본적인 대책이라고 할 수 있다. 휴면포자가 확인되고 지역적 잠재력의 파악이 가능하게 됨에 따라, ① 휴면포자의 잠재력을 신속, 정확하게 파악하는 방법, ② 휴면포자로 진행되는 과정을 막거나 방해하는 방법, ③ 현장의 휴면포자를 구제하거나 발아를 억제시키는 방법, ④ 발아 초기 단계에서 발아체를 구제하는 방법, ⑤ 발아 개체의 영양 증식을 조절(증식 촉진 요인-주로 화학적 인자-을 제어)하는 방법, 등의 각 단계별 조절이 가능하게 된다면 가장 효과적인 적조 예방책이 될 수 있을 것이다. 여기에 ⑥ 적조 확산을 예측할 수 있는 물리학적 측면의 유동모델의 적용, ⑦ 인간 활동의 증대에 따른 지역 개체군의 이송과 해류에 의한 유입 확인, 등의 해명이 뒤따라야 할 것이다. 향후 지구환경변화에 따른 새로운 적조생물의 출현과 지속적인 적조 발생이 예고되고 있어서 연안 환경변화에 연동하는 적조생물의 생활사 과정을



과약하여 대처하는 것이 무엇보다 우선되어야 할 것이다.

▶ 분자식별 기술을 적용한 신속·정확한 개체군 식별과 확산 해석

유해·유독 외편모조류에 대한 분류학적 연구는 최근 분자생물학적 식별법을 도입하여 현장 모니터링에도 적극적으로 활용되고 있다. 특히 적조 발생 현장에서도 형태적으로 아주 유사한 종이 동시에 출현하고 있어서 분류 전문가일지라도 현미경으로 구별하기 어려운 경우가 많다.

○ 종 특이적인 DNA probe를 이용한 분자생물학적 분석(Real-time PCR법)

특히 이와 같은 무각 외편모조류는 현장에서 시료를 고정할 경우, 터지거나 형태적인 특성을 알 수 없게 변형되기 때문에 정확한 조사가 불가능하다. 따라서 현장에서 바로 해수시료를 농축·고정 보관하여 종 특이적인 DNA probe를 이용한 분자생물학적 분석(Real-time PCR법)을 실시함으로써 정확한 종의 식별과 정량화까지 가능하게 되었으며, 영양세포 및 씨앗개체군 연구에 응용된 사례가 있다(Zhang and Lin, 2005; Park et al., 2007a, 2007b). 본 연구에서는 이전의 연구 사례(Park et al., 2007a, 2007b)를 바탕으로 *C. polykrikoides*의 초기 발생과 확산(적조 확산 모델에도 적용)에 걸친 광범위한 연구에 적용함으로써 정확한 적조 발생 예측과 모니터링이 가능할 것으로 기대된다. 또한 저질 중의 휴면포자개체군의 정확한 동정과 지역적 잠재력을 파악하는 데에도 이용 가능한 수준이어서 생활사 단계별 형태학적 식별법과 접목할 필요가 있다.

▶ 유해 적조생물의 발생과 증식과정을 고려한 적조확산모델개발

현재 남해안과 서해안 등지의 외해역에 거의 매년 하계에 출현하고 있는 *C. polykrikoides* 적조가 인접한 내만에서 발생한 것인지 또는 전라도 여수 앞바다 나로도 해역에서 발생하여 이동한 것인지에 대해서도 명확하지 않다. 적조의 이동에 크게 작용하는 바람의 영향을 고려한 연안역의 해수유동 재현은 어려움이 따르고 물리해양학적 측면에서 조류와 해류만 고려한 연구만으로도 부족한 실정이다. 적조발생의 1차적인 원인인 적조생물의 초기발생(휴면포자 발아)과 증식과정뿐만 아니라 해양에서의 조류, 해류 및 바람 등의 2차적인 외부요소를 동시에 고려해야 할 것이다. 이를 위해서 조석강제력과 개방경계를 통한 해수의 유출입 및 바람을 동시에 고려한 3차원 POM(Princeton Ocean Model)을 이용하여 해수유동을 재현하며, 해수유동모델의 결과를 적조생물의 초기 발생과 증식, 이동 및 확산과정을 고려한 유체 내 입자운동을 추적할 수 있는 3차원 PTM(Particle tracking model)을 가동시켜 적조의 거동을 밝힐 수 있을 것으로 기대된다.

### □ 경제·산업적 측면

*C. polykrikoides*는 어류 폐사를 일으키는 와편모종으로써 매년 남해안을 중심으로 대규모 수산피해를 일으키는 유해 적조종으로 분류된다. 유해 플랑크톤의 적조 발생빈도의 증가, 발생해역의 광역화, 발생기간의 장기화 등의 양상을 보이면서 수산피해가 급격히 확산되어 사회·경제적인 문제로 대두되고 있다. 국외의 경우 미국, 필리핀, 중국, 일본, 중동 등지에서도 위종에 의한 경제적인 피해가 꾸준히 보고되고 있다(Imai et al., 2006; Azanza et al., 2008; Gobler et al., 2008). 위 적조 원인종에 의한 양식 산업, 경제적, 산업적 피해를 줄이고 적조 제어 방법을 확보하는 문제는 시급히 해결해야 할 과제로 판단된다.

### 3. 연구개발의 내용 및 범위

연구개발의 목표	연구개발 내용	연구 범위
<b>■ <i>C. polykrikoides</i> 적조 발생 잠재력 파악 및 생활사 해명</b>	○휴면포자 정량법 확립	- direct counting법 - real-time PCR법
	○지역별 잠재력 파악	- 남해안 휴면포자 분포 - 휴면포자 분포지도화 - 분자식별법을 이용한 개체군 탐색
	○월동 생리/생태 특성 규명	- 현장 발생(발아) 생리 - 휴면포자 발아 특성 - 휴면포자 형성 특성
<b>■ 적조 증식과정을 고려한 적조 확산 및 예측모델개발</b>	○적조생물 성장 환경요인 파악 및 증식촉진요인 탐색	- 성장에 미치는 수온, 염분, 광조건 영양염 분포 파악 - 증식촉진/억제요인 탐색 - 무기태 및 용존태 영양염 흡수 및 성장동력학 파악
	○이류-확산모델을 이용한 물질의 거동파악 ○증식과정을 고려한 적조확산모델의 개발	- 대상해역의 유동, 수온, 염분 관측 - 조류모델 및 입자의 이동, 확산 수식화 - 적조생물의 이류-확산 모델화
<b>■ 생활사 단계에 따른 적조 제어 기술 평가 및 방안 수립</b>	○적조 잠재력 제어 효율성 평가 ○생활사 단계별 제어 가능성 및 현장제어 기술 평가	- 적조 구제물질(황토) 살포 시 휴면포자 억제 효율성 평가 - 저질 중 휴면포자 및 발아 개체군 구제 가능성 검토

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국내 기술개발 현황

#### 가. 생활사 해명에 관한 연구 및 기술개발

최근 세계 최초로 *C. polykrikoides*의 휴면포자를 발견하여 이를 현장 잠재력 조사 및 적조 초기 발생의 생리, 생태학적 측면에 해명가능하게 됨.

#### 나. 휴면포자 분포 및 월동 생리·생태

현재까지 주요 적조 원인생물인 와편모조류에 대한 많은 연구 보고가 이루어져 있다. 특히 마비성패독 원인종인 *Alexandrium*을 포함한 일부종에 집중되어 있으며, 발아 특성 및 휴면 기간에 관한 연구를 *C. polykrikoides*의 발생 생태에 적용할 수 있는 수준이다.

다. 분자생물학적 기술을 도입한 *C. polykrikoides* 영양세포 및 휴면포자의 빠른 식별법이 개발되어 유해 적조생물에 대한 적용(Real-time PCR법)은 외국의 수준에 앞서가고 있다.

#### 라. 적조생물의 증식촉진 요인에 대한 연구의 부족

양식장 주변의 화학적 환경요인 등에 대한 연구가 전무하고, 주요 무기 영양염의 현장 분석과 실내 실험 결과에 그치고 있다.

#### 마. 적조피해 방제를 위한 제어기술

황토를 포함한 적조구제물질은 세계적으로 가장 많은 개발과 현장 살포를 통한 적용이 진행되어 왔다(나 등, 1996; 최 등, 1998; 김, 2000; 배 등, 2002). *C. polykrikoides* 적조현장에 살포하는 과정에서 생태계에 미치는 영향조사가 실시되고 있으나 조사 대상이 제한적이고 결과 해석이 애매하여 보다 구체적인 조사가 요구되고 있다.

바. 적조를 유발하는 원인종에 따라 폐쇄적인 연안역에서 상습적으로 발생하는 종이 있는가 하면, 외해역과 같이 영양염 농도가 낮은 곳에서도 매년 발생하는 종이 보고되고 있다(Lee et al., 1999; Jung et al., 1999; Kim et al., 1999). 기존의 남해안을 대상으로 하여 수행된 수치모델(최 등, 1994)은 조석 강제력

만을 고려하여 조석 재현에 중점을 두었고, 남해 일부 내만에 국한된 연구모델 역시 조석 및 조류의 재현에 초점을 두었다. 한국 연안역에서 생활사 과정을 고려한 적조확산모델의 기술개발은 아직 전무한 상태이다.

## 2. 국외 기술개발 동향

### 가. 휴면포자 식별 및 생활사 연구

국외에서도 *C. polykrikoides*의 휴면포자에 대한 연구는 일본(Matsuoka & Fukuyo, 2000) 등에서 오래전부터 진행되어 왔으나 아직까지 정확한 실체를 확인한 보고는 없고, 이를 빠르게 식별할 수 있는 기술을 개발한 사례는 전무한 실정이다. 다만 *C. polykrikoides*이 아닌 다른 유해/유독 종의 경우 휴면포자 및 검출기법이 개발된 사례가 있다. 예를 들면 휴면포자 생리/생태 연구의 경우 마비성 패독 종인 *Alexandrium*을 대상으로 발아 특성 및 휴면 기간에 관한 연구가 미국 및 일본 등지에서 보고되어 있다(Anderson et al., 1995). 또한 분자생물학적 식별법의 경우 미국 동부 연안에서 주로 문제가 되는 유독 적조종인 *Pfiesteria*의 빠른 검출을 위한 DNA probe가 개발되었고 위 방법이 영양세포 및 씨앗개체군 연구에 응용된 사례가 있다(Zhang and Lin, 2005; Park et al. 2007a, 2007b).

### 나. 유해 적조발생 원인과 이동, 확산 해석

휴면포자의 발아를 통한 유독 적조종인 *Alexandrium*의 유입(미국 Gulf of Maine; Anderson and Keafer, 1987), 북서 스페인에서 *Gymnodinium catenatum*의 이동(Fraga et al., 1988), 이상 기후와 환경 조건에 의하여 인도 서부 태평양에서 *Pyrodinium bahamense*의 적조 발생(Maclean, 1989), 등과 같은 다양한 적조발생의 원인이 제시되고 있다. 물리적 조건에 따라 장거리 이동(Frank and Anderson, 1992), 적조생물종에 따라서는 해류의 흐름에 따른 집적 현상(Kamykowski, 1974; Cullen and Horrigan, 1981), 수온, 염분, 광선, 영양염류 등 최적 환경조건이 지속되는 경우(Whitledge, 1993), 등 많은 연구에서 적조발생의 원인과 확산에 대한 모니터링 결과가 발표되어 왔다. 특히 연안역의 활용도가 높은 일본에서는 막대한 수산피해를 일으키는 적조의 발생기구 구명과 방제기술을 개발하기 위한 활발한 모델개발과 현장 적용 연구가 진행되어 왔다(Yanagi et al., 2001).

### 3. 연구결과가 국내·외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

가. 국외보다는 국내에서 가장 크게 문제가 되고 있는 *C. polykrikoides* 적조의 발생원인과 향후 이에 대처할 수 있는 내용을 확보하게 됨에 따라 독자적인 관련 연구를 수행하여 적조문제 해결에 접근이 가능할 것으로 예상된다.

나. *C. polykrikoides*의 휴면포자에 대한 연구는 일본(Fukuyo & Matsuoka, 2000) 등에서 오래전부터 진행되어 왔으나 아직까지 정확한 실체를 확인한 보고는 없고, 이를 빠르게 식별할 수 있는 기술을 개발한 사례는 전무한 실정이다. 본 연구에서 도입한 휴면포자에 관한 연구 및 검출 기법 개발은 유해 적조종의 발생기작을 이해하고 적조 조기 경보에 유용한 정보를 제공할 것으로 기대된다.

다. 특히 생활사 해명을 통한 적조의 초기 발생과 이동·확산에 관한 연구를 현장 조사의 과정에서 분자생물학적 식별법을 적용하여 고감도의 빠르고 정확한 적용이 가능하며, 더욱이 이를 이동·확산 모델에 도입하여 적조 발생의 원인 해명과 중장기적인 예보 시스템을 확립할 수 있을 것으로 기대된다.

라. 또한 국내에서 적조피해방지 및 제어를 위해 황토살포를 실시한 결과도 현재까지 생물학적으로 명확한 구제효과를 입증하기 어려웠으나, 적조생물의 생활사의 각 과정에서 이에 대한 확인이 가능할 것으로 예상되고 있어서 실질적인 적조방제 효과와 황토살포의 효율적이고 경제적인 지침 마련이 가능할 것으로 예상된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. *Cochlodinium polykrikoides*의 생활사 해명

#### 가. *Cochlodinium polykrikoides*의 휴면포자(cyst)의 최초 발견 및 발아 확인

현장에서 나타나는 *C. polykrikoides*의 초기 발아체 및 발달 단계별 모습을 관찰하였다.

##### (1) 재료 및 방법

- 조사 시기 : 2010년 5월~2010년 9월
- 2010년 자란만 정점 4와 7에서 플랑크톤네트( $\varnothing$  20 $\mu$ m)를 이용하여 농축한 후 형광도립현미경(Olympus IX70)으로 직접 관찰하였다.

##### (2) 관찰 결과

자란만 현장에서 직접 검경한 *C. polykrikoides* 초기 발아체의 형태적 특징은 그림 3과 같다. 체장은 35~45  $\mu$ m였고, 체폭은 20~30  $\mu$ m 정도였다. 조사기간 내에 *C. polykrikoides*는 최대 8 chains 까지 확인되었다. 휴면포자에서 발아한 초기 발아체의 모습은 대부분의 와편모조류의 영양세포처럼 보였고, 휴면포자에서 발아해 나온 발아체는 뚜렷한 red body가 존재하였다. 그리고 1~2 chains 의 경우는 이미 보고된 대로 횡구가 세포면을 약 2회 정도 회전하고 있어 타 종과는 뚜렷이 구분할 수 있었다.

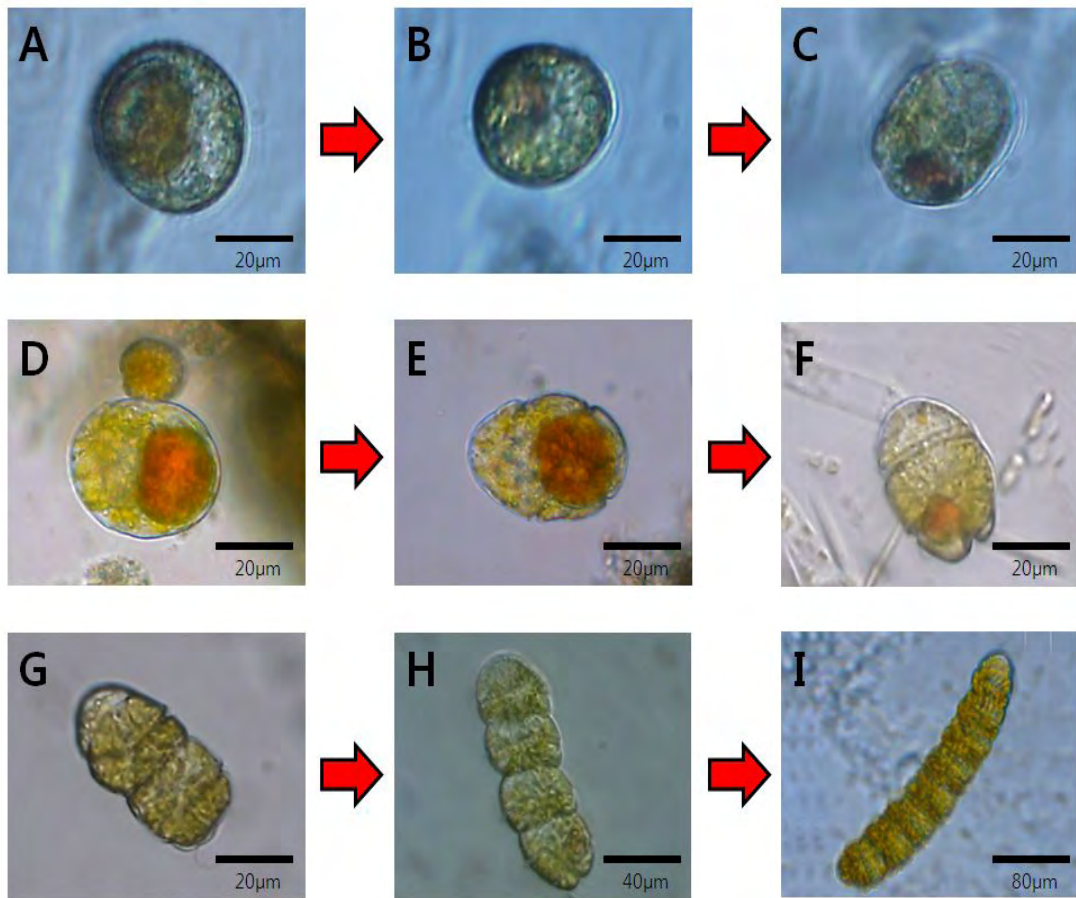


그림 3. 자란만 현장에서 관찰된 *C. polykrikoides*의 발달 단계별 사진. (A, 휴면포자; B, 단세포형태의 초기발아체, 단세포형태; C와 D와E: 황구 뚜렷해짐 F: 단일 영양세포G: 2 chains 형성; H: 4 chains 형성; I: 8 chains 형성).

#### 나. Hyaline cyst 형성 및 발아 특성

*C. polykrikoides*의 생활사 중 영양세포로 출현한 후 환경조건 등의 영향으로 일시적으로 형성되는 것으로 판단되는 hyaline 세포와 영양세포로 현장에 재가입 여부를 조사하였다.

##### (1) 재료 및 방법

##### (가) Hyaline 세포의 관찰

○ *C. polykrikoides*가 출현한 해수를 샘플링하여 48 well plate에 분주하여 20℃의 암소에 1개월간 보관 후 실온에서 관찰하면서 hyaline 세포의 형성여부를 확인하였다.

○ 20℃의 암소에 1개월간 보관한 샘플은 DAPI 염색처리를 통하여 염색의 여부를 조사하였고 세포의 생존 여부를 확인하기 위하여 형광현미경으로 엽록체

의 형광 여부를 조사하였다.

(나) 배양조건에 따른 hyaline 세포의 형성

온도별, 배지별 조건을 달리하여 영양세포가 hyaline 세포로 형성되는 정도를 확인하였다.

- 온도: 17, 20, 23℃의 3개 구간
- 배지: SWII, SW(seawater)의 2개 구간
- 빛: 12L: 12D

이상의 조건에서 hyaline 세포는 단세포, 2개, 4개 및 8개 세포가 이어진 연쇄체를 각각 계수하였다.

(다) Hyaline 세포의 생활사의 일부분으로서의 특성

*C. polykrikoides*가 출현한 해수를 샘플링하여 10℃의 암소에 1개월간 보관 후 실온에서 hyaline 세포의 변동양상을 조사하였다.

(2) 결과 및 고찰

(가) Hyaline 세포의 관찰

○ *C. polykrikoides* 영양세포를 20℃의 암소에 1개월간 보관 후 현미경으로 관찰한 결과, 그림 4와 같이 영양세포와는 형태적으로 구별되는 다수의 hyaline 세포가 형성된 것을 확인할 수 있었다.

○ *C. polykrikoides*의 hyaline 세포는 단일 세포에서부터 8개 세포가 연결된 연쇄체까지 다양하게 형성되었다. 이들의 각 세포는 red body를 갖고 있었고, 각각의 연쇄체는 세포들을 둘러싸는 막(hyaline)을 형성하고 있었다. 8개가 연결된 연쇄체의 경우에는 위쪽 4세포와 아래쪽 4세포는 각각의 hyaline으로 둘러싸여 있었고 8개 이하로 연결된 연쇄체는 대부분 하나의 hyaline으로 둘러싸여 있는 점에서 이들은 서로 구별되는 특징으로 나타났다.

○ 본 연구에서 20℃ 수온 조건에서 다량의 hyaline 세포가 형성됨으로써, *C. polykrikoides*의 영양세포는 현장에서 hyaline 세포를 형성할 수 있을 것으로 판단된다.

○ 이들 hyaline 세포를 DAPI 염색한 결과 그림 5와 같이 염색됨으로써 hyaline 세포는 저질로 싸여있어도 DAPI 염색으로 확인할 수 있었고, 엽록체는 형광현미경 하에서 붉게 발광함으로써 살아있는 세포인 것으로 판단되는 결과였다.



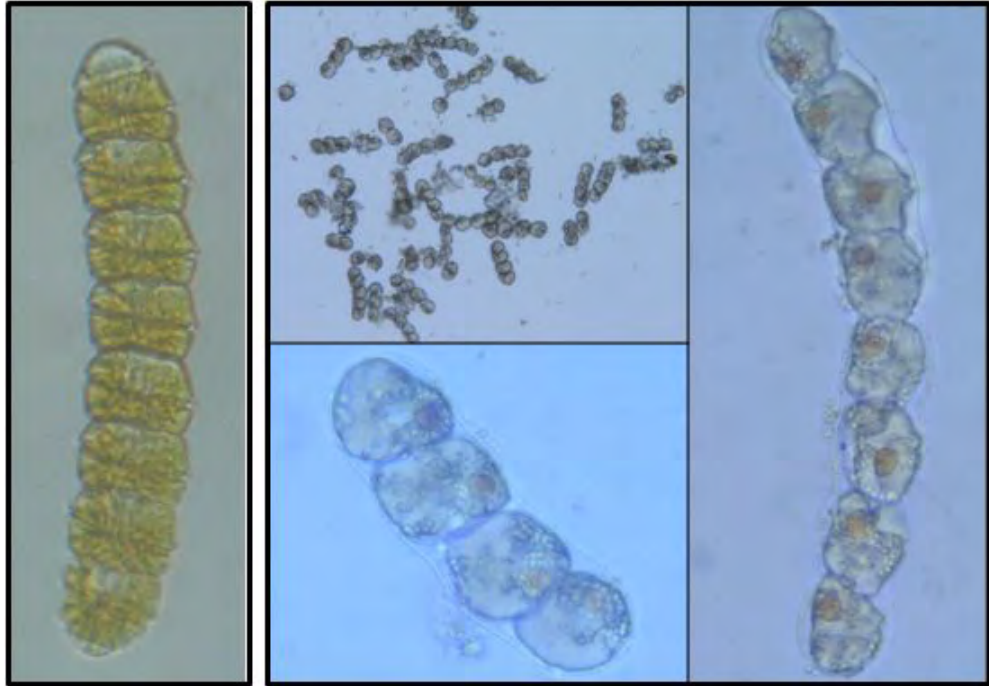


그림 4. *C. polykrikoides*의 영양세포(왼쪽) 및 hyaline 세포(오른쪽)의 광학현미경 사진.

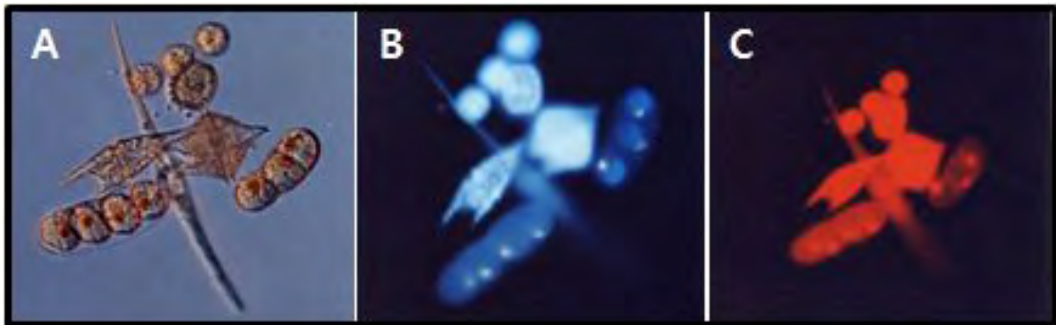


그림 5. 해수 샘플에서 형성된 *C. polykrikoides*의 hyaline 세포(A)와 이들 세포의 DAPI 염색(B) 및 엽록체 형광 사진(C).

#### (나) hyaline 세포의 형성

○ *C. polykrikoides*이 출현한 해수를 온도 및 배지별로 조건을 달리하여 hyaline 세포의 형성 정도를 확인한 결과는 그림 7과 같다. 온도별 결과는 배지에 관계없이 23°C 구간에서 가장 많은 hyaline 세포가 형성되었고, 배지별로는 해수(SW) 구간이 영양염이 추가된 SWII 구간에 비해 23°C의 조건에서 최대 1.5배 이상의 hyaline 세포가 형성되었다. Hyaline 세포의 형성은 일별로는 두드러진 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다.

○ 이상의 결과는 hyaline 세포의 형성은 영양염이 풍부한 조건보다는 부족한 조건에서 활발하게 진행됨을 보였다. 17℃, 20℃보다는 23℃의 조건에서 다량의 hyaline 세포가 형성되는 것은 *C. polykrikoides*의 영양세포가 현장에서 적조를 형성하는 시기임에도 조건에 따라서는 다량의 hyaline 세포를 형성할 수 있음을 제시하였다.

○ 배양실험을 통해 1-4 cells 형태를 가진 hyaline cyst를 광학현미경상에서 관찰할 수 있었다. 그림 6에서는 (a)와 (b)에서 화살 표시된 부분은 아직 hyaline cyst로 충분히 이행되지 않은 3 cells 세포는 chloroplast가 아직 남아 있는 상태로 형광현미경 하에서 붉은색의 여기반응을 나타내고 있다. 그 외의 red body에 해당하는 부분만이 반응하는 경우는 포자상태로 진행된 것이며, 대부분이 투명한 외막을 형성하고 있는 것을 관찰할 수 있었다.

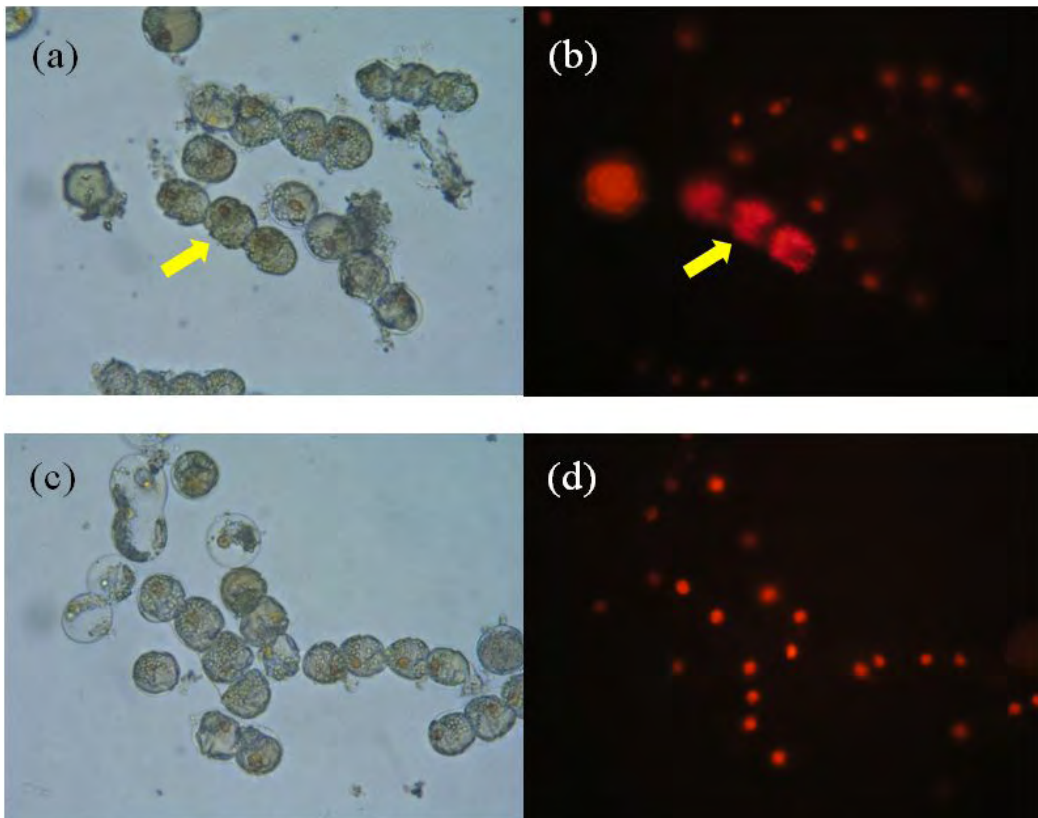


그림 6. *C. polykrikoides* 배양실험을 통하여 관찰된 1-4 cells 형태를 가진 hyaline cysts의 광학현미경 사진(a, c) 및 형광현미경 하에서 관찰된 chloroplast색소 반응(b, d).

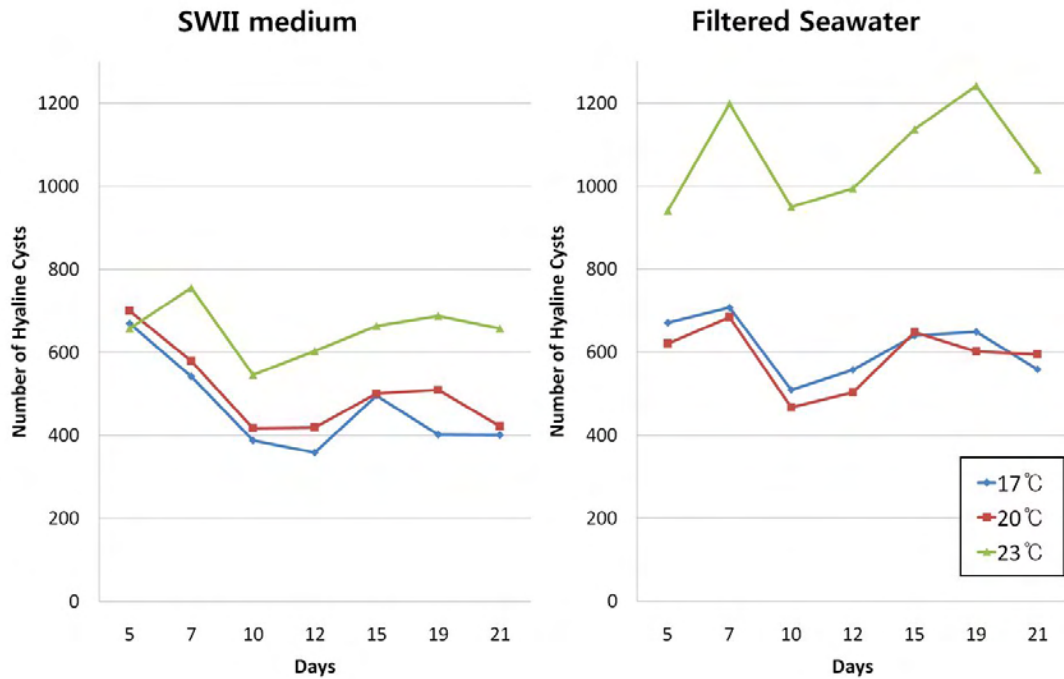


그림 7. 온도 및 배지에 따른 시간대별 hyaline 세포의 형성(좌, SWII 배지; 우, SW).

- *C. polykrikoides*가 출현한 해수를 온도 및 배지별 조건에서 형성된 hyaline 세포를 단독세포를 포함하여 2, 4, 8 세포의 연쇄체별로 계수한 결과는 그림 8 과 같다.
- 일부 구간을 제외하고 모든 조건에서 4개 세포로 이어진 연쇄체가 가장 많이 형성되었고 8개 세포의 연쇄체도 높게 나타났다. 단독세포는 거의 모든 구간에서 가장 낮은 계수값을 보였다.
- 이상의 결과는 4개 이상의 세포로 이어진 연쇄체의 영양세포 대부분은 연쇄체 수에 변화 없이 hyaline 세포로 전환될 수 있음을 의미하고, 이는 hyaline 세포가 영양세포의 사멸단계에 해당되는 것이 아닌 일시적으로 형성되는 일시 포자(temporary cyst)일 수 있고 호적한 조건에서 다시 영양세포로 가입될 수 있음을 제시한다.

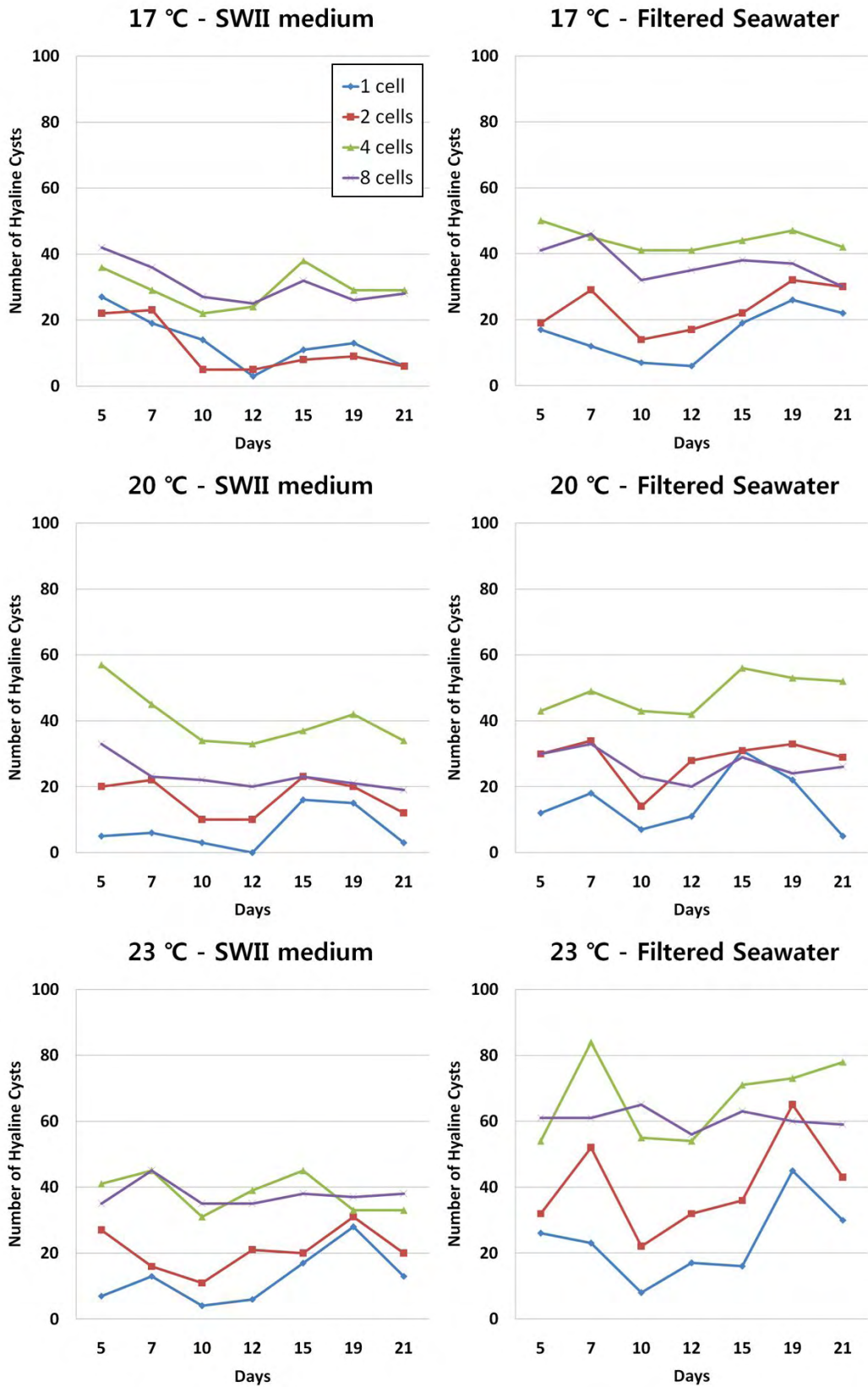


그림 8. 온도 및 배지에 따른 시간대별 hyaline 세포의 형성과 단독세포를 포함한 연쇄체의 출현 양상.

(다) 생활사의 일부분으로서 Hyaline 세포의 특성

○ Hyaline 세포는 그림 9에서와 같이 영양세포로 재출현하는 것이 확인되었다. 그림 9에서는 2개의 세포로 이어진 연쇄체의 경우에는 단독세포와 같이 hyaline 세포에서 영양세포로 재출현하는 것은 확인되지 않았으나 그림 9의 B에서는 4개의 세포로 이어진 연쇄체가 각각의 세포로 분리됨을 보이면서 영양세포로 재출현했을 것으로 판단된다.

○ 이상의 결과는 영양세포로부터 형성된 hyaline 세포는 호적한 환경에 의해 영양세포로 재출현함을 보였고, hyaline 세포는 *C. polykrikoides*의 생활사의 한 과정으로 판단된다.

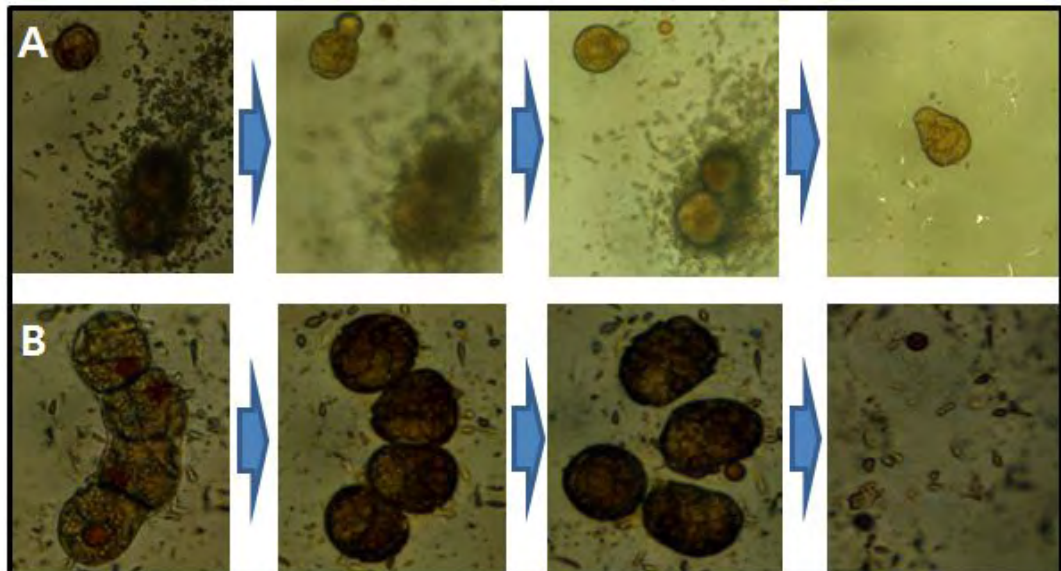


그림 9. 영양세포로부터 형성된 hyaline 세포의 영양세포로 재출현하는 과정(A, hyaline 세포의 영양세포로의 재출현 과정; B, hyaline 세포가 각각의 세포로 분리되는 과정).

#### 다. *Cochlodinium polykrikoides* 발생 지표종으로써 *Nematodinium* sp.의 발생과 계통 해석

*C. polykrikoides*의 생활사 연구 중 1차 년도에 보고된 *C. polykrikoides*의 분포 조사는 분자생물학적 분석에 따라 *C. polykrikoides*의 휴면 포자가 아닌, *Nematodinium* sp.의 휴면 포자인 것으로 밝혀졌다. 그러나 *C. polykrikoides*와 *Nematodinium* sp.의 형태적 유사성과 발생 패턴의 유사성이 밝혀져 후속 연구를 수행하였으며, *C. polykrikoides*에 의한 유해적조 발생 지표종으로서의 가능성을 연구하였다.

(1) *Nematodinium* sp. 휴면포자의 발아 과정

*Nematodinium* sp. 휴면포자의 발아와 영양세포로의 전환을 이해하기 위해 발아 과정을 관찰하였다.

(가) 재료 및 방법

- 조사 시기: 2009년 5월 ~ 2009년 7월
- 2009년 정점 7과 11에서 채집한 저질시료에서 휴면포자를 분리 후 발아
- 현장에서 플랑크톤네트( $\varnothing$  20 $\mu$ m)를 이용하여 농축한 후에 곧바로 형광도립현미경(Olympus IX70)과 SEM을 이용하여 관찰하였다.



그림 10. 실험실에서의 휴면포자 발아모습. (A) *Nematodinium* sp. 의 휴면포자. (B) 단단한 껍질로 싸여 있던 *Nematodinium* sp.가 껍질을 터뜨리고 밖으로 노출되었다. (C) 얇은 막이 몸을 둘러싸고 있다. 어느 순간 이 막에서 미끄러지듯이 빠져나와 유영을 한다.

(나) 관찰 결과

실험실에서 관찰 했던 휴면포자의 발아 모습이 현장에서도 발견되었다. 조사 기간 동안 관찰된 휴면포자의 형태적 모습은 그림 11과 같다. 발아체는 평균 20~30  $\mu$ m의 크기였다. 막으로 둘러싸인 여러 발아체들(그림 12)은 현미경 관찰 시 약 2시간 안에 모두 막을 뚫고 나와 유영을 하기 시작하였다. 발아체는 조사기간 동안 빈번하게 발견할 수 있었으나(그림 13), 영양세포 단계의 *Nematodinium* sp.는 7월 이후에 아주 드물게 한번씩 관찰되었다. 휴면포자와 발아체를 더 자세히 관찰하기 위해 SEM을 이용하였다. 그 결과 그림 14와 같이 관찰되었으며, 포자벽이 갈라지면서 발아체가 나오는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 휴면포자에서 발아체가 나간 후 풍선이 터진 듯한 모양으로 남아 있는 발아공(archeopyle)도 그림 15와 같이 관찰할 수 있었다.

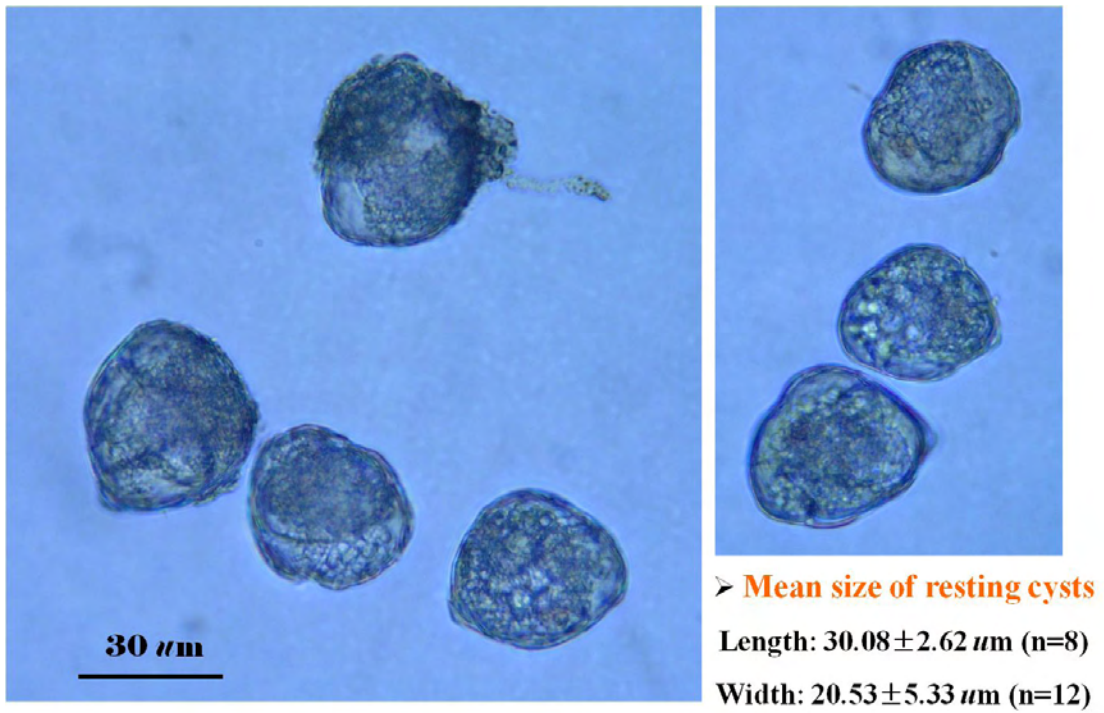


그림 11. 현장시료에서 관찰된 휴면포자 모습.



그림 12. 얇은 막에 둘러 싸여 있는 발아체.

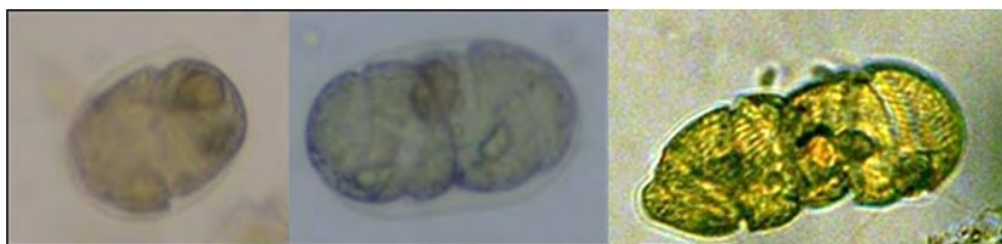


그림 13. 발아체의 변화 과정.

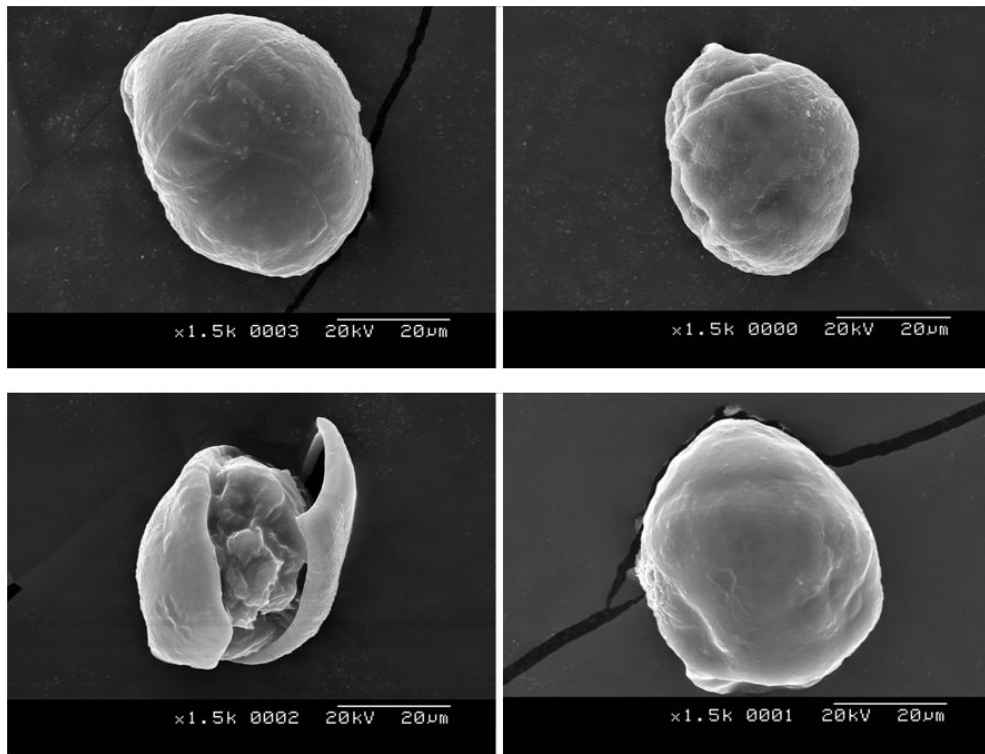


그림 14. *Nematodinium* sp. 휴면포자와 발아체의 SEM 사진.



그림 15. 발아 후의 독특한 발아공(archeopyle)과 포자벽.



(2) *Cochlodinium polykrikoides*의 출현 지표종 *Nematodinium* sp.의 분자계통학적 연구

본 연구결과 자란만에서 *Nematodinium* sp.의 휴면포자를 확인하였고, 이를 토대로 휴면포자의 분포, 영양세포의 형태 및 출현에 관한 연구를 수행한 바 있다. 본 연구에서는 *Nematodinium* sp.의 정확한 계통관계를 파악하기 위해 분자계통해석을 수행하였다.

(가) 재료 및 방법

○ *Nematodinium* sp.는 타가영양성(heterotrophic)으로 알려져 있고, 영양세포의 배양법은 확립되지 않은 상황에 있다. 따라서 분자계통학적 연구를 수행하기 위하여 본 연구팀은 저질에 존재하는 휴면포자를 분리하여 single cell PCR을 통해 증폭된 rDNA로부터 염기서열 정보를 조사하여 분자계통해석을 수행하였다.

○ *Nematodinium* sp.의 single cell PCR을 수행하기 위하여 경남 고성 자란만 일대에서 2~3월에 저질을 채집하였다. 채집한 저질시료를 해수/*Sodium polytungstate*(SPT)의 비중차를 이용한 밀도구배원심법(SPT-density gradient centrifugation method)을 이용하여 와편모조류의 휴면포자를 분리하였다. 이렇게 분리한 다양한 와편모조류의 휴면포자들 중에서 capillary pipette을 이용하여 *Nematodinium* sp.의 휴면포자 7 세포를 분리하였고 분리한 각각의 휴면포자로부터 염기서열을 조사하였다.

○ *Nematodinium* sp.의 휴면포자는 마이크로튜브에 넣은 후 증류수 5  $\mu$ l를 채우고 100°C에서 5분간 끓인 후 PCR에 이용하였다. PCR은 28S rDNA D1, D3영역을 타겟으로 하는 primer(표 1)를 제작하여 수행하였다. PCR 조건은 초기 94°C 5분, 25회 반복 반응(94°C 30 secs, 55°C 1min, 72°C 1min)후, 최종 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 direct sequencing하여 염기서열을 조사하였다.

표 1. *Nematodinium* sp.의 single cell PCR에 이용한 DNA primer

Primer	5'→3'
D1R	ACCCGCTGAATTTAAGCATA
D3B	TCGGAGGGAACCAGCTACTA

○ *Nematodinium* sp.의 분자계통해석을 위하여, 인터넷 데이터베이스(NCBI)에 등재된 와편모조류의 염기서열 정보를 활용하여 분자계통을 수행하였다. 분자계통의 해석은 ClustalX 2.0.12를 이용하여 NJ(neighbor joining) 방법으로 하였다.

(나) 결과 및 고찰

○ 분자계통해석의 결과는 그림 16과 같이 나타났다. 본 연구에서 조사한 *Nematodinium* sp.(그림 16에서 화살표로 표시된 부분)는 계통해석에 이용된 종 중 100% 일치하는 종은 없었고 가장 근연의 관계에 있는 종은 *Warnowia* sp.와 *Nematodinium* sp.인 것으로 나타났다. *Warnowia* sp., *Nematodinium* sp.와 근연의 관계에 있는 종은 *Cochlodinium* cf. *geminatum*과 *Dissodinium pseudolunula*였다. 이들 그룹은 *Gymnodinium nolleri*와 함께 동일한 clade에서 진화했고, *Prorocentrum*, *Lepidodinium* 등의 그룹과 하나의 clade에서 분화한 것으로 나타났다.

○ 본 연구에서 조사한 *Nematodinium* sp.의 28S rDNA D1-D3 영역의 염기서열을 기 보고된 *Warnowia* sp.와 *Nematodinium* sp.의 염기서열과 비교한 결과, *Nematodinium* sp. 보다 *Warnowia* sp.와 상동성이 높은 것으로 조사되었다. 이들 종은 형태적으로는 매우 유사하나 본 연구의 결과에서와 같이 유전적으로 일부 차이를 보임에 따라 향후 상세한 형태적, 분자생물학적 연구를 통한 명확한 종의 분류가 필요할 것으로 판단된다.

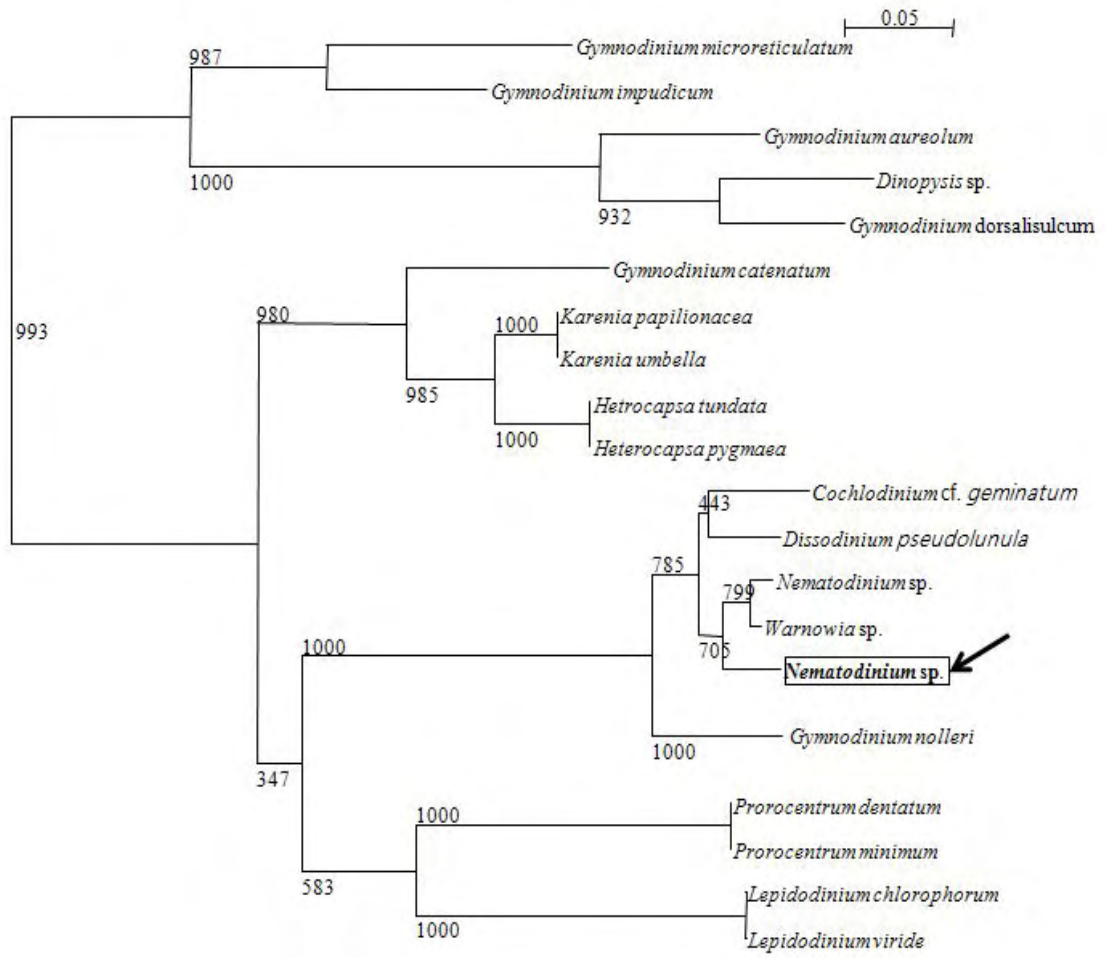


그림 16. 28S rDNA D1-D3의 염기서열을 이용한 분자계통도.

## 2. *Cochlodinium polykrikoides* 발생 잠재력(휴면포자) 고감도 식별법 개발 및 적용

### 가. 휴면포자 정량법 확립

#### (1) Direct counting법(SPT법) 및 Real-time PCR법

##### (가) Direct counting법

###### ① 재료 및 방법

○ 본 연구에서는 2009년 5월부터 7월까지 적조 상습발생지인 남해안 중부의 고성 인근 해역(자란만, 사랑도)을 중심으로 예비 조사를 실시하여 *C. polykrikoides*의 휴면포자 잠재력이 높았던 정점을 저질시료 채취장소로 선정하였다. 채취한 시료는 현장에서 저온 (약 10℃)보관하여 실험실로 운반하였다.

○ 해수/휴면포자/Sodium polytungstate (SPT)의 비중차를 이용한 밀도구배 원심법 (SPT-density gradient centrifugation method; Bolch, 1997)을 이용하여 *C. polykrikoides* 휴면포자의 계수법을 확립하였다.

○ 휴면포자 분리에 적합한 밀도를 알아내기 위해 SPT Solution의 밀도를 1.2, 1.3, 1.5의 세 개의 실험군으로 나누어 휴면포자를 분리하였다.

###### ○ SPT Solution treatment (그림 18)

(㉠) 저질 전처리 (Sediment sieving)(그림 17)

(㉡) SPT 처리

(㉢) 원심분리 (1,600g x 10 min)

(㉣) 휴면포자 수확

(㉤) 광학 현미경으로 직접 계수 (Direct counting)

○ Primuline 형광 염색법 (Primuline-staining method; Yamaguchi et al., 1995)

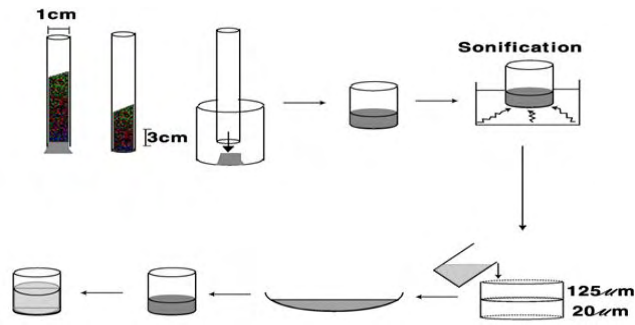


그림 17. 저질 전처리 과정.

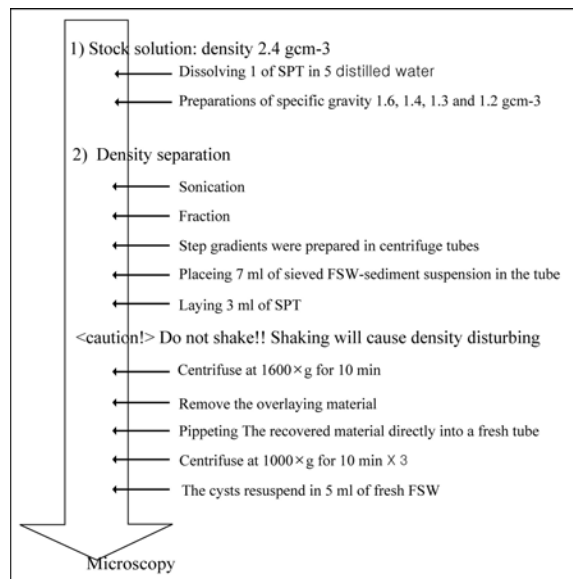


그림 18. SPT (Sodium Polytungstate) Solution을 이용한 *C. polikrikoides* 휴면포자의 밀도구배 원심분리법.

## ② 결과 및 고찰

○ 본 연구에서는 2009년 3월 자란 만정점 JR D1과 6월 JR 7에 분포하는 *C. polikrikoides*의 휴면포자의 현존량을 SPT 밀도를 다르게 적용해 조사하였다. 일반적인 와편모조류의 휴면포자의 비중은 약  $1.3 \text{ g/cm}^3$  인 것으로 보고되어 있다(Anderson and Lively, 1985; Bolch, 1997). 와편모조류의 휴면포자를 분리한 결과 밀도가 1.2 와 1.5인 실험구에서 보다 1.3인 실험구에서 *C. polikrikoides* 휴면포자를 분리하는데 가장 적절한 밀도로 나타났다(표 2). 이후 조사에서도 SPT 용액의 밀도를 1.3에 맞추어 실시하였다.

표 2. 밀도별 SPT Solution 구배 실험(Triplicate)

St. no	Density	Direct counting no.
2009년 03월 11일 JR D1	1.2	0
	1.3	25±2
	1.5	18±1
2009년 06월 25일 JR 7	1.2	0
	1.3	14±1.5
	1.5	6±0.5

○ SPT법을 이용하여 모은 휴면포자들과 현장시료를 관찰하였을 때 관찰할 수 있는 휴면포자들을 그림 19에 나타내었다. (a)는 저질 시료를 SPT처리 후 원심분리 하여 모은 것이다. (b),(c)는 1997년 9월 사랑도 인근에서 발생한 적조 소멸 후의 저질 시료에서 분리한 휴면포자 모양의 세포로 실내에서 형성된 *C. polikrikoides*의 2 cells (b), 3 cells (c) hyaline cyst의 형태와 유사한 것을 볼 수 있다. (d)는 2009년 7월 자란만의 저질 시료에서 발견된 3 cells 형태로 반응하여 *C. polykrikoides*의 hyaline cyst로 추정되는 형태를 관찰할 수 있었다.

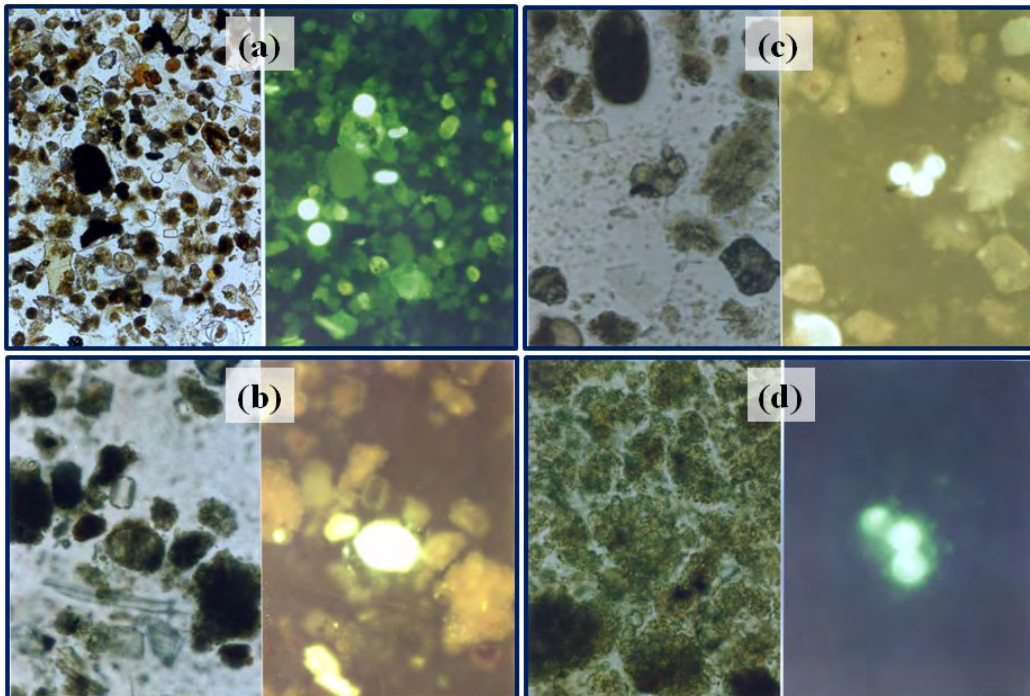


그림 19. SPT법을 이용하여 저질시료에서 분리한 휴면포자를 포함한 입자체 광학현미경 사진(각 그림의 왼쪽면)과 형광현미경에서 반응한 포자의 양상.

## (나) Real-time PCR법

### ① 재료 및 방법

#### ㉠ 영양세포 정량법

○ 본 연구에서 대상종으로 하고 있는 무각 와편모조류인 *C. polykrikoides*는 현장에서 시료를 고정할 경우, 세포막의 손상으로 형태적인 특성을 알 수 없는 형태로 변형된다. 때문에 현미경적 계수에 의한 정확한 정량이 불가능한 점을 개선하기 위해서 현장에서 바로 해수시료를 농축·고정 보관하여 종 특이적인 DNA probe를 이용한 분자생물학적 분석(real-time PCR법)을 실시함으로써 정확한 종의 식별과 정량화에 중점을 두었다. 본 연구에 이용된 real-time PCR법은 매 PCR 주기가 반복될수록 증폭되는 DNA의 양이 많아지는 것을 실시간으로 확인할 수 있다(그림 20). DNA의 양과 형광물질의 세기가 비례하도록 probe와 형광물질을 적용하는 원리를 이용하였다. real-time PCR의 연구 방법에는 여러 가지가 있는데 본 연구는 Taq-man probe를 기초로 하는 방법을 택해 연구를 진행하였다. Taq-man probe는 5' 말단은 형광물질 (FAM)로 3'말단은 quencher 물질 (TAMRA) 로 이루어져 있다. TaqMan probe(그림 21)는 annealing step에서 template DNA에 특이적으로 hybridize 하지만 probe상에 quencher에 의해 형광발색이 억제된다. Extension 반응시에 Taq DNA polymerase에 갖는 5'→3' exonuclease 활성으로 template에 hybridize한 TaqMan probe가 분해되어 형광색소가 probe에서 유리되면서 quencher에 의한 억제가 해제되어 형광을 나타내는 원리를 이용하여 real-time PCR법에 적용하였다.

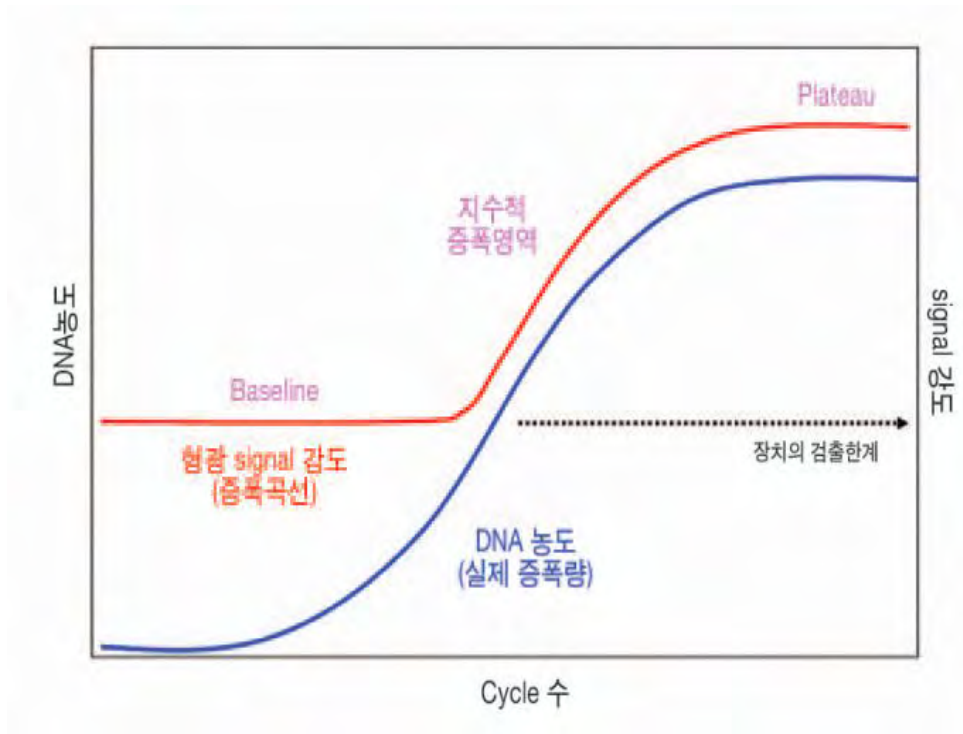


그림 20. Real-time PCR의 원리.

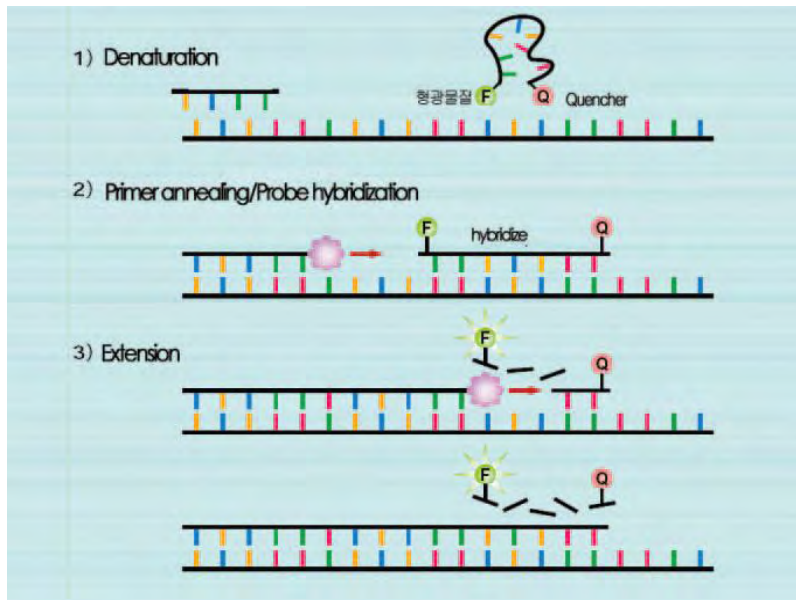


그림 21. Taq-man probe의 원리.



○ *C. polykrikoides*의 유전자 특징을 분석하여 위 유전자중 종 특이성을 보이는 영역에 종 특이적인 DNA probe(유전자 탐침자)를 디자인하였다. 디자인된 probe는 유사종(*Gymnodinium impudicum*)과의 테스트를 거쳐 종 특이적으로 반응하는지를 검증하고 검출 감도 및 정확도를 실험실 내에서 테스트하였다. 실험실 테스트가 끝난 probe는 현장 시료에 직접 테스트하여 적합성을 확인한 후 한국연안의 여러 정점에서 채집된 해수 표층시료를 probe를 이용하여 분석하였다.

(ㄱ) 배양주 확보

배양주는 CCMP(Provsoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton), NFRDI(국립수산과학원)에서 제공받거나 분리하였다.

(ㄴ) 현장 시료 채집

Real-time PCR 분석을 위한 현장 시료를 아래의 지도와 같은 6개의 정점을 대상으로 시료를 채취하였다(그림 22).

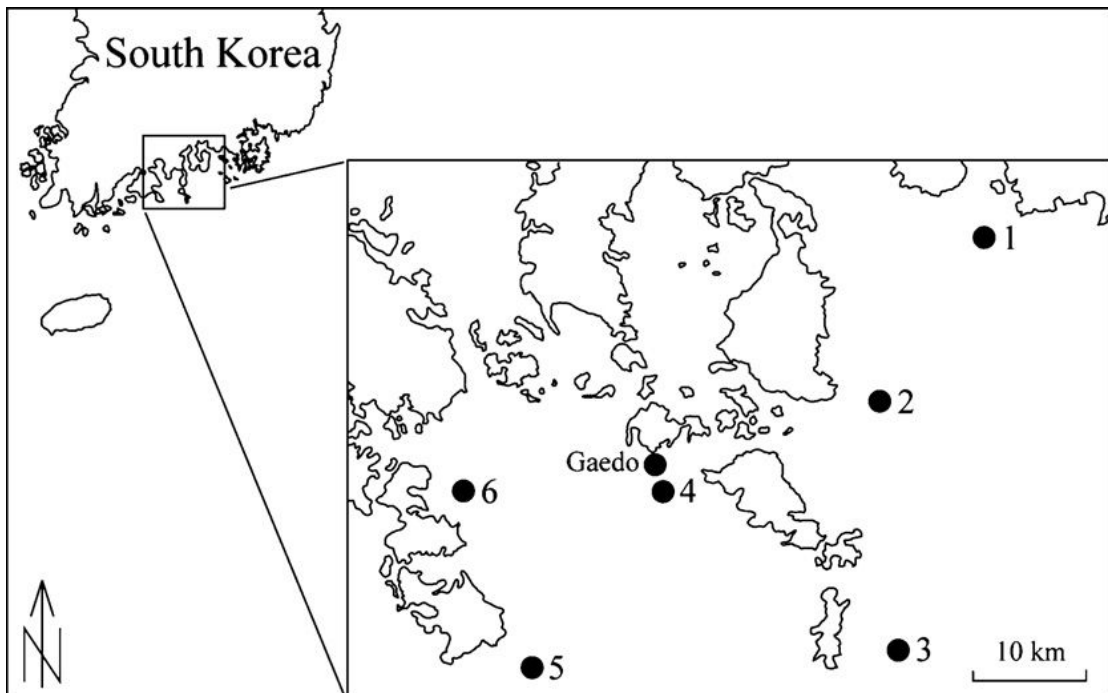


그림 22. 현장 표층 sample 채집 정점 지도, 2009 Gaedo.

(ㄷ) DNA 추출

현장 시료의 DNA를 추출하기 위해 PCI법을 이용하였고, 추출된 DNA는 -20℃에 보관하여 real-time PCR 분석에 이용되었다.

(㉔) ITS2 region rDNA Taq-man probe 디자인

본 연구에 이용된 주요 목표 gene region을 기초로 하여 *C. polykrikoides*에 특이적으로 반응하는 형광물질 유전자 probe (Taq-man probe)를 디자인하여 *C. polykrikoides*에 대한 종 특이성을 확립하였다.

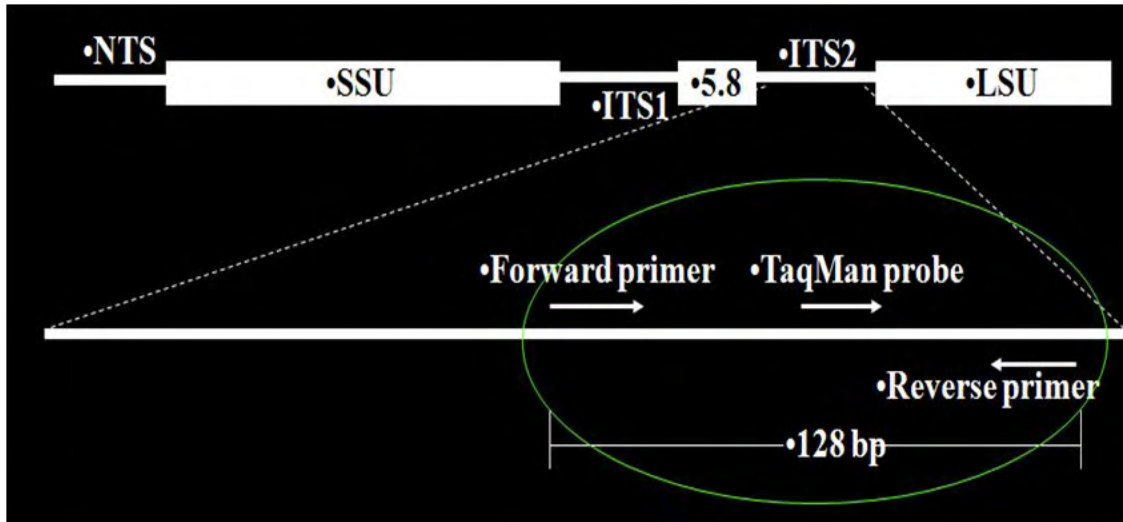


그림 23. Real-time PCR 유전자 probe 개발에 이용한 유전자 범위 모식도.

(㉕) Real-time PCR

Real-time PCR은 1 mL of template DNA, primers 와 probe 0.2 and 0.15  $\mu$ M, 5  $\mu$ L of platinum quantitative PCR supermix-UDG (Invitrogen, Eugene, OR, USA) and PCR grade water 로 final volume을 10 $\mu$ L로 하여 수행하였다.

PCR 조건은 2분에서 50 $^{\circ}$ C, 2분에서 95 $^{\circ}$ C, 그리고 45 cycle 의 10초에서 95 $^{\circ}$ C, 45초에서 60 $^{\circ}$ C였다. 분석은 Rotor-Gene 6000 instrument (Corbett Research, Sydney, Australia)을 사용하였다.

표 3. Real-time PCR을 위한 종 특이적 Primer와 probe

Dinoflagellate	Forward / Reverse / Probe	Code	Sequence(5'→3')	Reference
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	Forward	CPITSF	CGGCAACCTTTGTCAAACA	This study
	Reverse	CPITSR2	GGTTTGCTGATCTAACTTCATG TCT	
	Probe	CPITSP	FAM-CAACCGTGATACCCGCTA GCTTTGC-TAMRA	
<i>Gymnodinium impudicum</i>	Forward	GIITSF	GAGTGCTTGTGCCTCAGGAT	This study
	Reverse	GIITSR	CGCTTAGCCAGTTGGTTGAC	
	Probe	GIITSP	FAM-CCTCAGGAGCGCCTCGAG AACA-TAMRA	
<i>Cryptoperidiniopsis brodyi</i>	Forward	CBITSF	TTGACACGTTGAAGTGAWGGA	Park et al., 2007
	Reverse	CBITSR	ACAGCCAATGAAAGAGTKATG ACAA	
	Probe	CBITSP	FAM-CATCTCATCGCTCGCCGT CGAT-TAMRA	

(H) Standard curve 제작

영양세포의 정량을 위해 Standard curve를 제작하였다. PCR을 통해 *C. polykrikoides*의 rDNA영역을 증폭한 후 산물을 이용하여 cloning을 실시하여 colony를 분리한 후 plasmid를 배양하였고, 배양된 plasmid는 purification kit를 사용하여 DNA를 분리한 후 정제하여 얻어진 plasmid DNA는 정량하였다. 이를 이용하여 standard curve를 제작하였고 standard curve는 현미경으로 검정된 영양세포 개수와 비교분석하였다.

표 4. 와편모조류의 SSU, ITS1, 5.8S, and ITS2 rDNA 염기서열 증폭에 이용된 primer

Primer	Forward/ reverse	Amplification/ sequence	Sequence (5'→3')	Reference
DINO18SF1	Forward	Amplification	AAGGGTTGTGTTYATTAGNTACARAAC	Lin et al. (2006a,b)
18ScomR1	Reverse	Amplification	CACCTACGGAAACCTTGTTACGAC	Lin et al. (2006a,b)
DINO1706F	Forward	Amplification	CCGATTGAGTGNTHCGGTGAA	This study
G17F	Forward	Sequence	ATACCGTCCTAGTCTTAACC	Litaker et al. (2003)
G23R	Reverse	Sequence	TTCAGCCTTGCGACCATAC	Litaker et al. (2003)
ITSF	Forward	Amplification	GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	This study
ITSR	Reverse	Amplification	CCCTGTTTCATTCGCCATTAC	This study
ITSCPF1	Forward	Sequence	ACTTGCAGCGACGGATGTC	This study
ITSCPR2	Reverse	Sequence	AGACATCCGTCGCTGCAAG	This study
ITSGIF	Forward	Sequence	CGGTTTCGATCAACGATGAAG	This study
ITSGIR	Reverse	Sequence	GCGTGCTTTCAGGGATGTC	This study

② 결과 및 고찰

○ Melting curve 분석(그림 24)을 통하여 DINO18SF1 and 18ScomR1 primer 에서 280 clones이 분석되었고, 3종과 알려지지 않은 외편모조류 종의 동정이 가능하게 되었다. DINO18SF1 and 18ScomR1은 117 bp를 증폭하기 디자인되어 Melting curve는 총 280 clones에서 79.91℃와 81.73℃에서 peak를 보였다 (표 5).

○ Taq-man probe를 이용하여 real-time PCR 중 특이성을 검증한 결과(그림 25), 목표 종에 대한 염기서열에 primer와 probe가 cross-reactivity 테스트 결과 primer set는 목표 종에 대해서 각각의 염기서열에 해당되는 증폭산물 (amplicon)이 일치하였다. Real-time PCR 정량을 위한 Standard curve의 제작은 *C. polykrikoides*와 *G. impudicum* 세포의 genomic DNA의 Standard curve는 연속적인 10배 희석으로 작성하여, Ct값은 초기 세포수의 log값으로부터 계산되었으며, 모든 경우에서 검출 한계값은 반응의 목표 종의 세포수보다 낮게 나타났다. Standard curve의 검증에 대한 정확도는 Standard curve와 비교한 *C. polykrikoides*와 *G. impudicum* 세포의 알려진 값의 DNA 추출의 희석과 관계가 있음을 보였다(그림 24). 따라서 영양세포를 기초로 하는 real-time PCR법을 확립하여 나아가 휴면포자에도 적용할 수 있는 효율적인 정량방법으로 사료된다.

표 5. 외편모조류 DNA와 Chimera 염기서열의 melting temperature

Dinoflagellate (clone code)	Number of reaction	Melting temperature <sup>a</sup>	
		T <sub>m1</sub>	T <sub>m2</sub>
<i>C. polykrikoides</i> (GD1589bp46)	4	83.75±0.02	81.73±0.02
<i>Polykrikos</i> sp. (GD1590bp2)	4	84.01±0.02	81.40±0.00
<i>G. impudicum</i> (GD1591bp4)	4	83.65±0.00	81.30±0.00
<i>G. catenatum</i> (GD1591bp1)	4	83.27±0.02	
<i>Gymnodinium</i> sp. (GD1580bp9)	4	83.35±0.00	
<i>Gymnodinium</i> sp. (GD1590bp57)	4	83.20±0.02	
Unknown dinoflagellate (GD1590bp26)	4		80.75±0.02
Unknown dinoflagellate (GD1590bp27)	4		80.80±0.00
<i>Chimera</i> (GD1590bp14)	4	83.86±0.02	80.45±0.02
<i>Alexandrium</i> sp. (GD1590bp7)	4		79.97±0.02

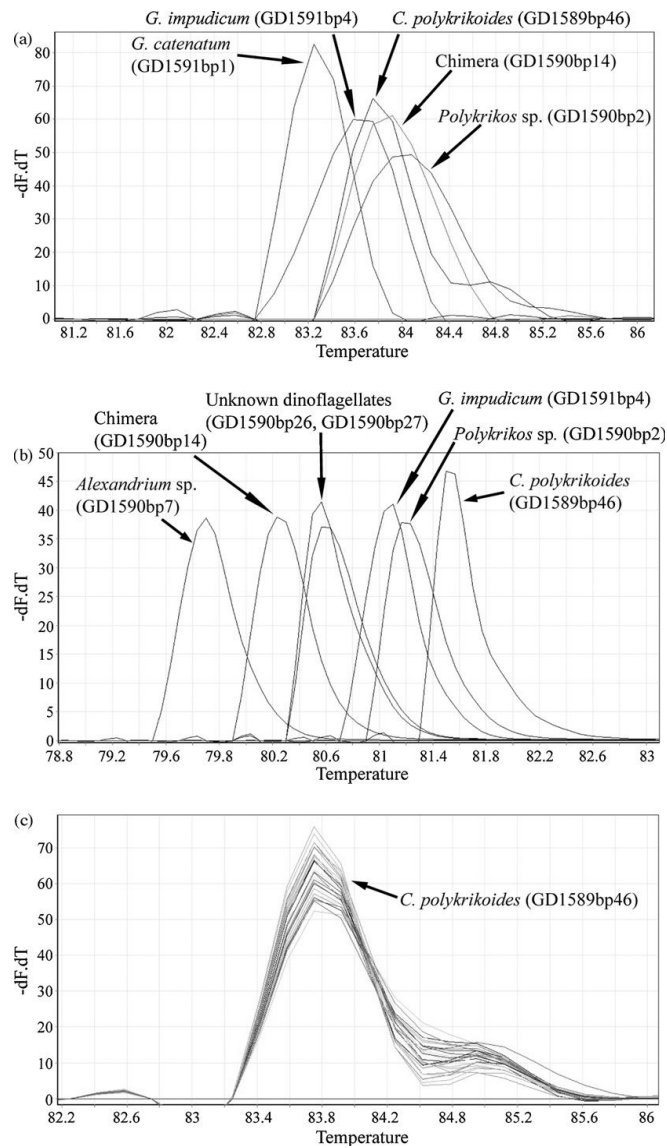
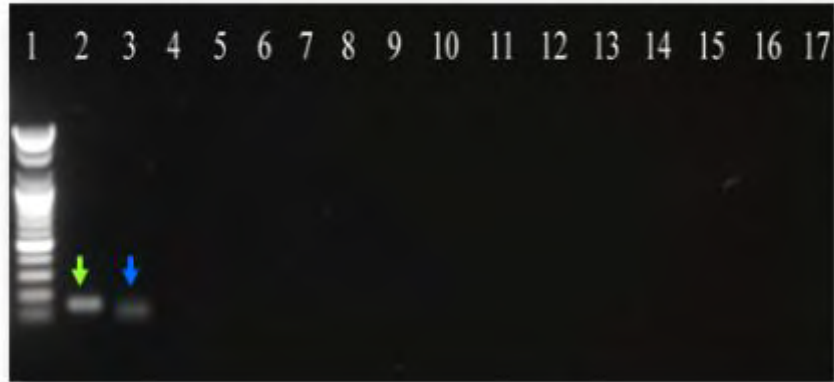


그림 24. 현장 시료 SSU rDNA melting curve.

- (a) 1.6 kb PCR products amplified by DINO18SF1 and 18ScomR1  
 (b) 117 bp PCR products amplified by DINO1706F and 18ScomR1  
 (c) Melting curves from PCR products of *C. polykrikoides* (TM values of mean standard deviation, 83.75 0.02) amplified by DINO18SF1 and 18ScomR1.



↓ *C. Polykrikoides*     
 ↓ *G. impudicum*

그림 25. Taq-man probe 종 특이성 검증.

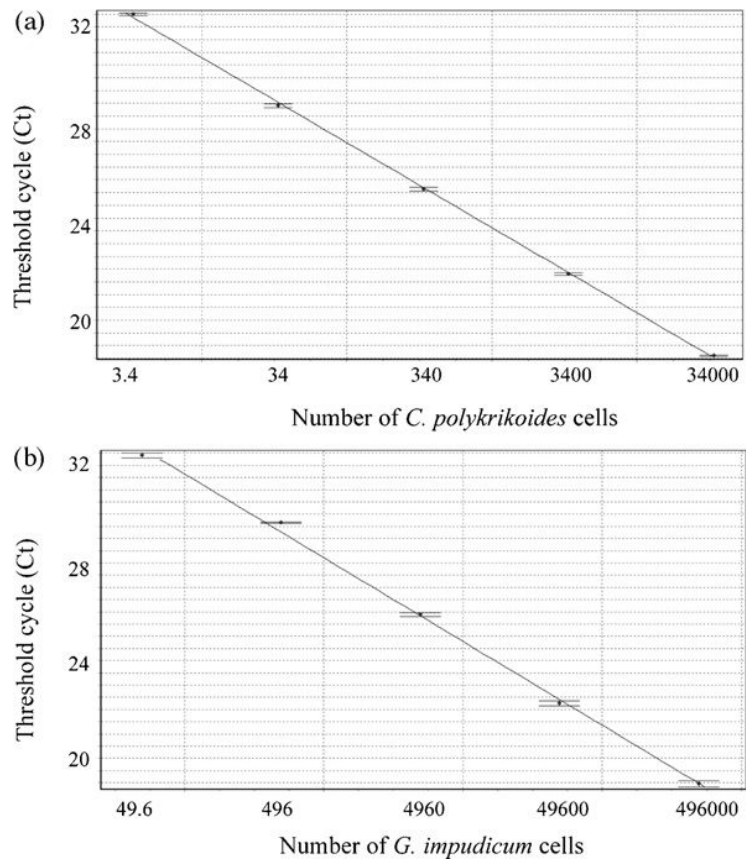


그림 26. Real-time PCR에 적용할 Standard 정량선.

## (다) 휴면포자 정량법

### ① 재료 및 방법

○ *C. polykrikoides*의 유전자 특징을 분석하여 위 유전자중 종 특이성을 보이는 영역에 종 특이적인 DNA probe(유전자 탐침자)를 디자인 하였다. 디자인된 probe는 유사종(*Gymnodinium impudicum*)과의 테스트를 거쳐 종 특이적으로 반응하는지를 검증하고 검출 감도 및 정확도를 실험실 내에서 테스트하였다. 실험실 테스트가 끝난 probe는 현장 퇴적물에 직접 테스트하여 적합성을 확인한 후 한국연안의 여러 정점에서 채집된 퇴적물을 probe를 이용하여 분석하여 휴면포자 분포와 변동량을 분석하여 휴면포자 지도화에 이용하였다.

### ㉠ 배양주 확보

*C. polykrikoides*의 배양주는 국내산 5 배양주를 분리하거나 분양받아서 real-time PCR의 control로 이용하였다. 종 분류는 현미경을 통한 형태분류와 염기서열 분석을 통한 유전자 동정을 통해 확인하였다.

### ㉡ 퇴적물 채집

남해안에서 *C. polykrikoides*의 주요 적조 발생지(79개 정점)를 중심으로 퇴적물을 채집하였다. 퇴적물은 Lafont grab을 이용하여 채집하며 500 mL 통에 담아 4°C의 온도조건에서 다음 분석까지 보관하였다.

### ㉢ 퇴적물로부터 외편모조류 DNA 추출

퇴적물로부터 외편모조류의 DNA 추출을 위해 PCI 추출법을 사용하여 추출하였다.

### ㉣ Real-time PCR 수행

1  $\mu$ L template DNA, primers 와 probe (0.2와 0.15  $\mu$ M), 5  $\mu$ L platinum quantitative PCR supermix-UDG (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), PCR grade water로 총 volume 10  $\mu$ L를 맞추었다. PCR 조건은 2분에서 50°C, 2분에서 95°C, 그리고 45 cycle 의 10초에서 95°C, 45초에서 60°C. 분석은 Rotor-Gene 6000 instrument (Corbett Research, Sydney, Australia)을 사용하였다.

### ㉤ Standard curve 제작

휴면포자 정량을 위해 Standard curve를 제작하였다. PCR을 통해 *C. polykrikoides*의 rDNA영역을 증폭한 후 산물을 이용하여 cloning을 실시하여 5개의 colony를 분리한 후 plasmid를 배양하였다. 배양된 plasmid는



purification kit를 사용하여 DNA를 분리한 후 정제하여 얻어진 plasmid DNA는 정량 하고 이를 이용하여 standard curve를 제작하였고 standard curve는 현미경으로 검정된 휴면포자 개수와 비교분석하였다.

표 6. *C. polykrikoides*의 Plasmid DNA Standard curve 제작에 이용한 primer

Primer name	Forward/ reverse	Sequence( 5'→ 3')	Reference
ITSF2	Forward	TACGTCCCTGCCCTTTGTAC	Litaker et al.(2003)
ITSR2	Reverse	TCCCTGTTTCATTCGCCATTAC	

㉞ 퇴적물로부터 PCR inhibitor 제거

퇴적물로부터 PCR inhibitor 제거를 위해 *Cryptoperidiniopsis brodyi*의 DNA를 control로 하여 제거여부를 확인하였고, 정량은 real-time PCR을 사용하여 최적의 희석 농도를 계산하였다.

㉟ 염기서열 분석을 통한 real-time PCR 특이성 검증

양성반응을 보인 PCR산물은 증폭한 후 cloning을 통해 염기서열 분석을 실시하였고 얻어진 염기서열은 Bayesian 방법을 이용하여 계통유연을 분석하여 real-time PCR의 특이성을 검증하였다.

② 결과 및 고찰

○ 본 연구에서는 *C. polykrikoides* 휴면포자량을 정량하기 위하여 Standard curve를 제작하였다. 제작된 Standard curve (그림 27)는 Plasmid DNA copy 수와 Ct 값의 선형 상관관계를 나타냈다. 이는 Standard curve 검량선의 역학 범위 안에서 반응 당 100 plasmid DNA copy 수를 검출 할 수 있음을 보였다. 저질 시료를 분석함에 있어, 희석되지 않은 DNA 추출물에서 PCR inhibition (PCR 저해현상)이 일어나 DNA 연속적 희석이 반드시 수반되어야 한다고 생각된다.

○ Real-time PCR 법을 통한 우리나라 해역의 *C. polykrikoides* 와 *G. impudicum*의 저질에서의 휴면포자 분포 현황을 조사한 결과(그림 28), *C. polykrikoides* 는 진해만과 여수해역에서만 출현한 반면 *G. impudicum* 은 인천 지역을 제외하고 다양한 지역에서 출현한 것으로 나타났다. 79개의 저질 시료 중 17~20개의 시료에서 *C. polykrikoides* 와 *G. impudicum* 에 양성반응을 보였다. 여수에서는 field sample에서의 39%가 *C. polykrikoides* 와 *G. impudicum*

에 양성 반응을 보였다. 여수 지역의 이 두 종의 평균 분포량은 *C. polykrikoides* 와 *G. impudicum* 은 진해만에서 여수지역 보다 적은 분포를 보였다. *G. impudicum*은 포항, 목포, 군산 지역에서 240~1560 범위의 rDNA copies 수를 나타냈다. *C. polykrikoides* 는 여수의 43개 정점에서 564,960 rDNA copies 수로 나타나 가장 높은 분포를 보였고, *G. impudicum* 은 여수의 36개 정점에서 8112 rDNA copies로 나타나 가장 높은 분포를 보였다.

○ Real-time PCR 분석 결과로 *C. polykrikoides*는 남해의 저질에 일반적으로 분포하고 있으며, 과거에 서해나 동해의 수층에서 검출된 것과는 달리 남해의 저질에서만 분포하고 있음을 보였고, 이는 *C. polykrikoides*의 분포와 과거 수층에 *C. polykrikoides*의 출현은 *C. polykrikoides* bloom의 초기 발생을 위한 씨앗 개체군인 휴면포자 출현과 밀접한 관련이 있다. 따라서 휴면포자가 적조 발생과 확산에 기인할 가능성이 제시됨으로써, 생활사 해명을 통한 적조발생 예측, 휴면포자의 지역적 잠재력 제어, 발생 단계에서 이를 제어할 수 있는 기술을 확립하는 데 중요한 역할을 할 것으로 보여진다.

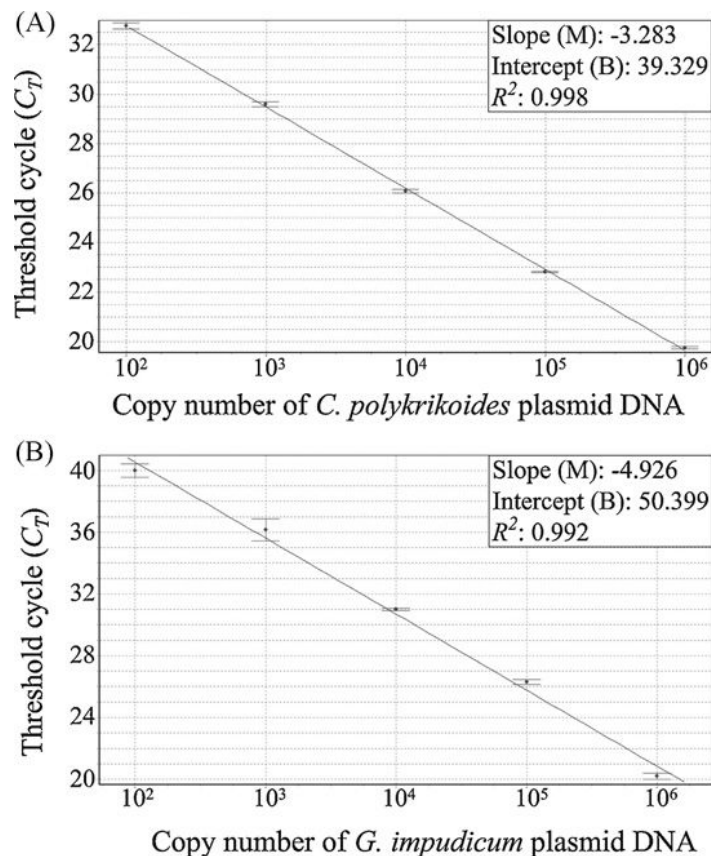


그림 27. 퇴적물 내 휴면포자의 정량화를 위한 Standard curve.

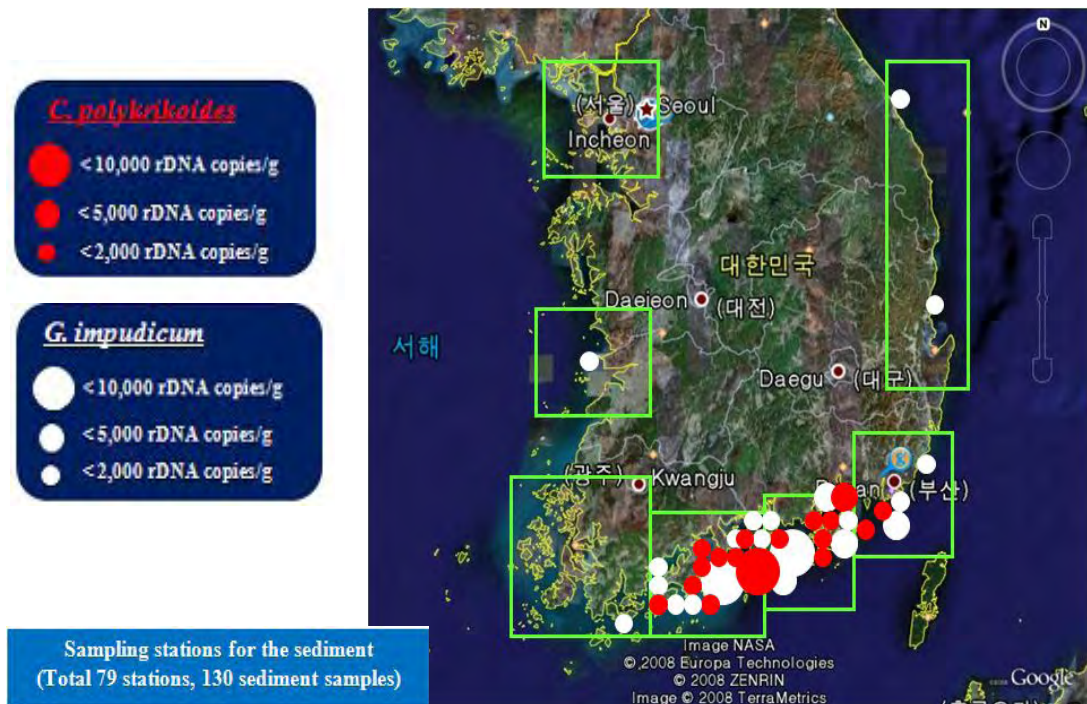


그림 28. 한국 광역 sample의 Real-time PCR을 통한 *C. polykrikoides* 와 *G. impudicum* 휴면포자 분포 현황.

#### 나. Direct counting법에 의한 휴면포자 분포조사의 의의

##### (1) 남해 해역별 휴면포자의 분포 조사

*Nematodinium* sp.의 휴면포자(Cyst)의 분포 조사를 direct counting 방법을 이용하여 적조발생 잠재력을 예측하였다.

##### ① 재료 및 방법

○ 조사 시기: 2009년 1월 ~ 2009년 9월

○ 조사 해역: 남해 서부 연안역(완도(A), 여수(B)), 남해 중부 연안역(남해 미조(C-1), 고성 자란만, 사랑도(C-2)), 남해 동부 연안역(통영, 거제, 진해(D-1), 욕지도(D-2))(그림 29; 그림 30).

○ 조사 방법: 각 정점에서 Box-corer 또는 Wildcorers를 이용해 저질 채취. 2장에서 소개한 SPT(Sodium Polytungstate)Solution 법을 이용하여 처리한 후 휴면포자 분리 후 형광도립현미경(Olympus IX70)으로 관찰하며 직접 계수.

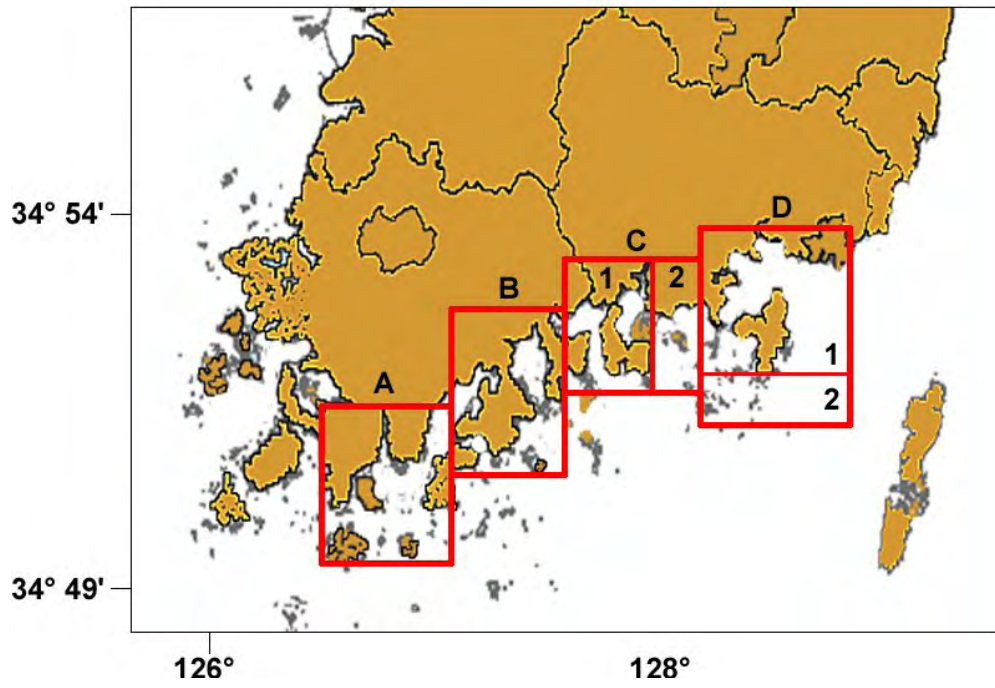


그림 29. 남해 연안 해역별 휴면포자 분포 조사 정점.

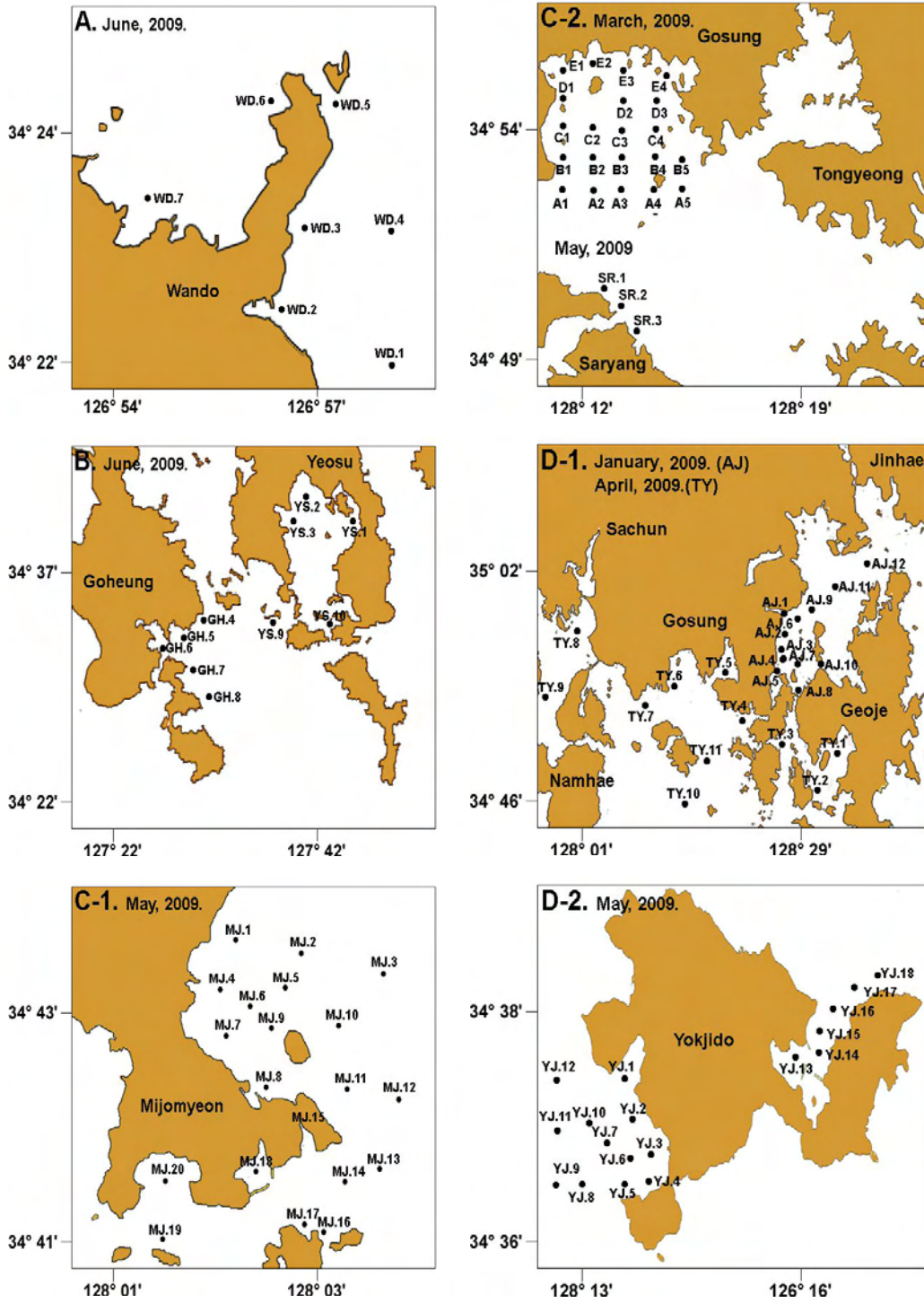


그림 30. 해역별 휴면포자 조사 정점도. 남해 서부 연안해역:(A: 완도, B: 여수), 남해 중부 연안해역:(C-1: 미조, C-2: 자란만, 사랑도), 남해 동부 연안해역(D-1: 통영, 거제, 진해, D-2: 옥지도).

표 7. 조사정점 위치

해역	정점 번호	경도	위도	비고
A	WD. 01	E 126° 57' 27"	N 34° 22' 26"	2009.06.09
	WD. 02	E 126° 56' 31"	N 34° 23' 02"	완도
	WD. 03	E 126° 56' 48"	N 34° 23' 34"	
	WD. 04	E 126° 57' 27"	N 34° 23' 35"	
	WD. 05	E 126° 57' 02"	N 34° 24' 31"	
	WD. 06	E 126° 56' 30"	N 34° 24' 31"	
	WD. 07	E 126° 54' 59"	N 34° 23' 41"	
B	YS. 01	E 127° 44' 12"	N 34° 42' 04"	2009.06.02
	YS. 02	E 127° 39' 41"	N 34° 43' 38"	여수
	YS. 03	E 127° 38' 12"	N 34° 41' 51"	
	GH. 04	E 127° 30' 46"	N 34° 35' 17"	고흥
	GH. 05	E 127° 29' 21"	N 34° 34' 03"	
	GH. 06	E 127° 26' 38"	N 34° 33' 37"	
	GH. 07	E 127° 29' 29"	N 34° 32' 09"	
	GH. 08	E 127° 30' 35"	N 34° 29' 53"	
	YS. 09	E 127° 37' 28"	N 34° 34' 56"	
	YS. 10	E 127° 42' 17"	N 34° 34' 56"	
C-1	MJ. 01	E 128° 02' 36"	N 34° 43' 58"	2009.05.02
	MJ. 02	E 128° 03' 04"	N 34° 43' 54"	미조
	MJ. 03	E 128° 03' 45"	N 34° 43' 41"	
	MJ. 04	E 128° 02' 24"	N 34° 43' 37"	
	MJ. 05	E 128° 03' 02"	N 34° 43' 35"	
	MJ. 06	E 128° 02' 38"	N 34° 43' 27"	
	MJ. 07	E 128° 02' 31"	N 34° 43' 17"	
	MJ. 08	E 128° 02' 92"	N 34° 42' 56"	
	MJ. 09	E 128° 02' 58"	N 34° 43' 20"	
	MJ. 10	E 128° 03' 29"	N 34° 43' 20"	
	MJ. 11	E 128° 03' 40"	N 34° 42' 54"	
	MJ. 12	E 128° 04' 05"	N 34° 42' 35"	
	MJ. 13	E 128° 03' 57"	N 34° 42' 29"	
	MJ. 14	E 128° 03' 39"	N 34° 42' 22"	
	MJ. 15	E 128° 03' 16"	N 34° 42' 36"	
	MJ. 16	E 128° 03' 24"	N 34° 41' 59"	
	MJ. 17	E 128° 03' 13"	N 34° 41' 59"	
	MJ. 18	E 128° 02' 46"	N 34° 42' 24"	
	MJ. 19	E 128° 01' 51"	N 34° 42' 18"	
	MJ. 20	E 128° 01' 51"	N 34° 41' 58"	

표 7. 계속

해역	정점 번호	경도	위도	비고
C-2	A1	E 128° 12' 30"	N 34° 53' 08"	2009.03.11
	A2	E 128° 13' 19"	N 34° 53' 20"	자란만
	A3	E 128° 14' 09"	N 34° 53' 09"	
	A4	E 128° 15' 07"	N 34° 53' 20"	
	A5	E 128° 15' 52"	N 34° 53' 11"	
	B1	E 128° 12' 24"	N 34° 53' 56"	
	B2	E 128° 13' 19"	N 34° 53' 56"	
	B3	E 128° 14' 15"	N 34° 53' 56"	
	B4	E 128° 15' 07"	N 34° 53' 56"	
	B5	E 128° 15' 55"	N 34° 53' 56"	
	C1	E 128° 12' 34"	N 34° 54' 26"	
	C2	E 128° 13' 19"	N 34° 54' 42"	
	C3	E 128° 14' 08"	N 34° 54' 25"	
	C4	E 128° 15' 07"	N 34° 54' 42"	
	D1	E 128° 12' 32"	N 34° 55' 26"	
	D2	E 128° 14' 15"	N 34° 55' 26"	
	D3	E 128° 15' 07"	N 34° 55' 26"	
	E1	E 128° 12' 33"	N 34° 55' 37"	
	E2	E 128° 13' 19"	N 34° 56' 15"	
	E3	E 128° 14' 11"	N 34° 55' 42"	
E4	E 128° 12' 33"	N 34° 55' 37"		
SR. 01	E 128° 13' 52"	N 34° 51' 00"		
SR. 02	E 128° 14' 11"	N 34° 50' 34"		
SR. 03	E 128° 14' 28"	N 34° 50' 21"		
D-1	AJ. 01	E 128° 27' 00"	N 35° 59' 04"	2009.01.20
	AJ. 02	E 128° 27' 35"	N 35° 58' 34"	진해만
	AJ. 03	E 128° 26' 27"	N 35° 57' 39"	
	AJ. 04	E 128° 27' 33"	N 35° 56' 59"	
	AJ. 05	E 128° 26' 05"	N 35° 55' 50"	
	AJ. 06	E 128° 29' 33"	N 35° 59' 41"	
	AJ. 07	E 128° 29' 36"	N 35° 57' 42"	
	AJ. 08	E 128° 29' 43"	N 35° 54' 30"	
	AJ. 09	E 129° 30' 22"	N 35° 59' 26"	
	AJ. 10	E 129° 32' 38"	N 35° 56' 32"	
	AJ. 11	E 129° 33' 17"	N 35° 01' 47"	
	AJ. 12	E 129° 37' 10"	N 35° 02' 04"	

표 7. 계속

해역	정점 번호	경도	위도	비고
D-1	TY. 01	E 128° 33 ' 29 "	N 34° 48 ' 48 "	2009.04.10
	TY. 02	E 128° 31 ' 12 "	N 34° 46 ' 51 "	통영
	TY. 03	E 128° 26 ' 47 "	N 34° 49 ' 59 "	
	TY. 04	E 128° 21 ' 13 "	N 34° 51 ' 28 "	2009.04.09
	TY. 05	E 128° 18 ' 53 "	N 34° 55 ' 39 "	
	TY. 06	E 128° 13 ' 24 "	N 34° 54 ' 34 "	
	TY. 07	E 128° 07 ' 30 "	N 34° 52 ' 28 "	
	TY. 08	E 128° 00 ' 00 "	N 34° 57 ' 14 "	
	TY. 09	E 127° 56 ' 12 "	N 34° 52 ' 39 "	
	TY. 10	E 128° 15 ' 00 "	N 34° 43 ' 03 "	
	TY. 11	E 128° 17 ' 41 "	N 34° 48 ' 35 "	
	TY. 12	E 128° 26 ' 35 "	N 34° 45 ' 59 "	2009.04.10
D-2	YJ. 01	E 128° 14 ' 03 "	N 34° 37 ' 57 "	2009.05.05
	YJ. 02	E 128° 14 ' 03 "	N 34° 37 ' 39 "	육지도
	YJ. 03	E 128° 14 ' 22 "	N 34° 37 ' 25 "	
	YJ. 04	E 128° 14 ' 20 "	N 34° 37 ' 13 "	
	YJ. 05	E 128° 14 ' 00 "	N 34° 37 ' 07 "	
	YJ. 06	E 128° 15 ' 05 "	N 34° 37 ' 21 "	
	YJ. 07	E 128° 13 ' 50 "	N 34° 37 ' 27 "	
	YJ. 08	E 128° 13 ' 37 "	N 34° 37 ' 01 "	
	YJ. 09	E 128° 13 ' 25 "	N 34° 37 ' 03 "	
	YJ. 10	E 128° 13 ' 33 "	N 34° 37 ' 25 "	
	YJ. 11	E 128° 13 ' 09 "	N 34° 37 ' 28 "	
	YJ. 12	E 128° 13 ' 08 "	N 34° 37 ' 53 "	
	YJ. 13	E 128° 16 ' 15 "	N 34° 37 ' 57 "	
	YJ. 14	E 128° 16 ' 36 "	N 34° 37 ' 56 "	
	YJ. 15	E 128° 16 ' 39 "	N 34° 38 ' 06 "	
	YJ. 16	E 128° 16 ' 49 "	N 34° 38 ' 17 "	
	YJ. 17	E 128° 17 ' 03 "	N 34° 38 ' 26 "	
	YJ. 18	E 128° 17 ' 15 "	N 34° 38 ' 33 "	



② 결과 및 고찰

㉠ 남해 서부 연안역

완도(A)는 7개의 정점 중 2개 정점(WD. 2, 3)에서 1 cysts/10g으로 나타났다. 여수와 고흥의 정점(B)에서는 5개의 정점에서 평균 1.4 cysts/10g가 존재하였다.

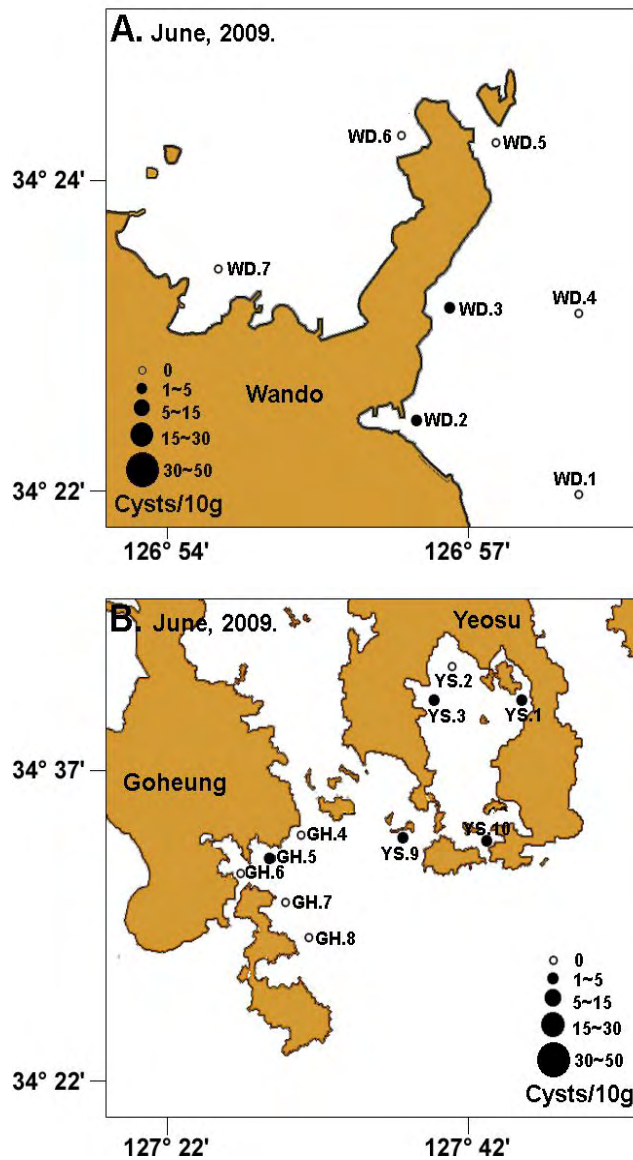


그림 31. 남해 서부 연안해역의 *Nematodinium* sp. 휴면 포자 분포도. A: 완도, B: 여수와 고흥.

㉔ 남해 중부 연안역

자란만의 평균은 5 cysts/10g으로 나타났으며 특히 D1 정점에서는 49 cysts/10g 의 휴면포자가 존재하였다. 사랑도에서는 3개의 정점 모두 휴면포자가 발견되지 않았다. 미조 조사에서는 20개의 정점 중 5개의 정점에서 평균 2 cysts/10g의 휴면포자가 존재하였다.

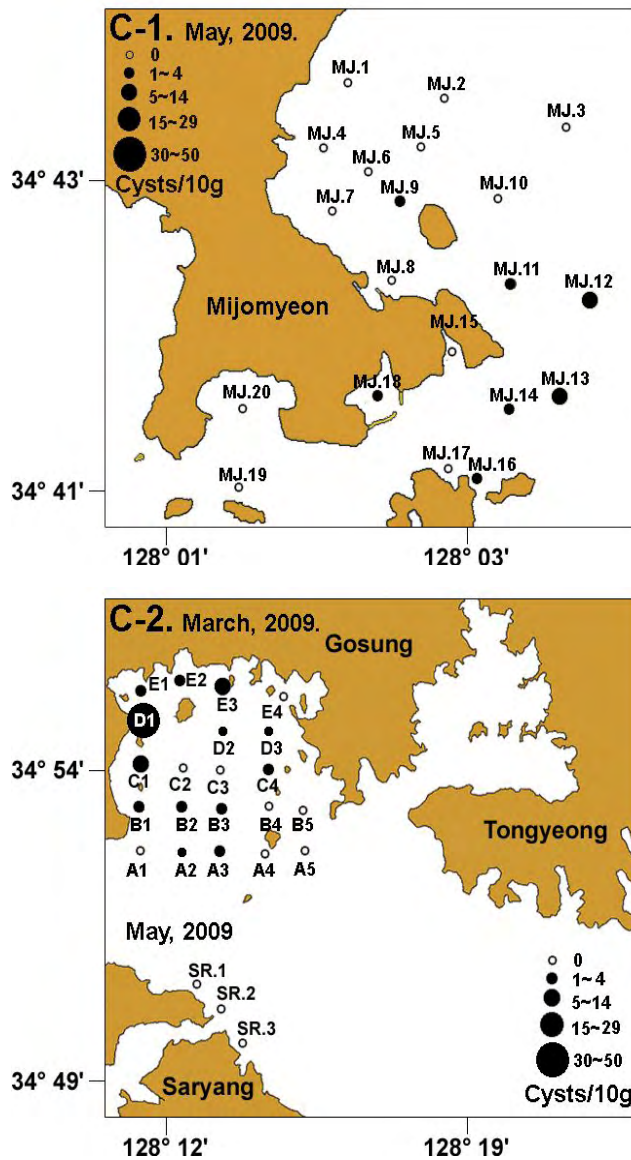


그림 32. 남해 중부 연안해역의 *Nematodinium* sp. 휴면포자 분포도. C-1: 2009. 5. 2 미조, C-2: 2009. 3. 11 자란만, 2009. 5. 16 사랑도.

㉔ 남해 동부 연안역

거제도 안정 정점 3에서 3 cysts/10g의 휴면포자가 발견된 것 외에는 거의 나타나지 않았다. 통영정점에서는 간헐적으로 나타났으나 1 cysts/10g이하로 나왔다. 옥지도에서는 7개의 정점에서 평균 1 cysts/10g로 발견되었다.

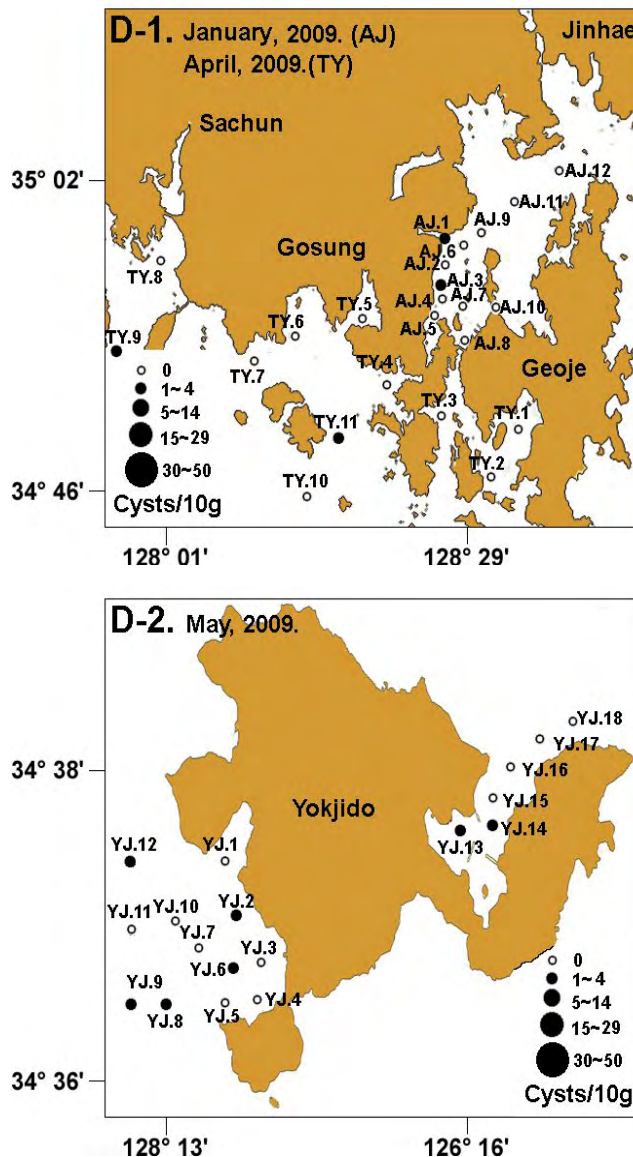


그림 33. 남해 동부 연안해역의 *Nematodinium* sp. 휴면포자 분포도. D-1: 2009. 1. 20 안정 2009. 4. 9 ~ 4. 10 통영, 거제, 진해, D-2: 2009. 5. 5 옥지도.

(2) 자란만 일원의 *Nematodinium* sp. 휴면포자 분포 및 변동

○ 본 연구 기간 중 자란만 일원에서 나타난 *Nematodinium* sp. 휴면포자의 변동 특성을 볼 수 있었다.

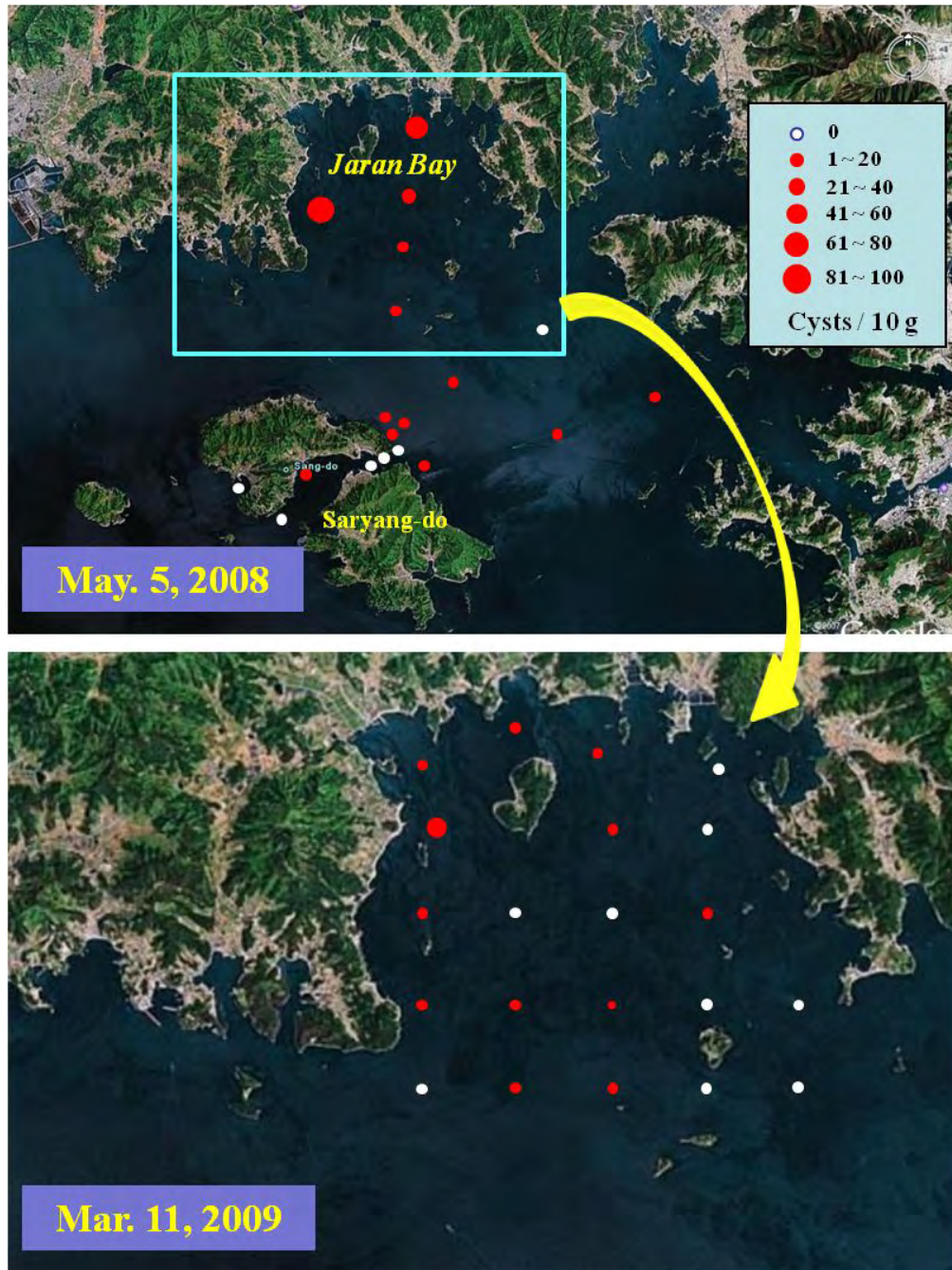


그림 34. 2008년과 2009년 조사된 자란만 일원의 *Nematodinium* sp. 휴면포자 분포 및 변동특성.

○ 그림 34에서 보는 바와 같이 2008년도에 자란만 안 쪽에 높은 밀도로

보이던 휴면포자의 분포가 2009년도에는 고루 퍼지는 경향을 볼 수 있고, 전체적으로 밀도가 줄어든 것을 볼 수 있다. 이 결과는 해수의 유동에 따라 휴면포자의 이동이 있는 것으로 보인다. 또한, 해수 유동에 의해 휴면포자의 분포가 넓어지게 되는 경우도 생각할 수 있으나, 한 장소에 집중된 지역이라도 발아 후 다음 해에 분포밀도가 다르게 나타나는 것으로 판단된다. 따라서 휴면포자의 발생 전 시기에 매년 지역적 분포상황을 파악 할 필요가 있을 것이다.

#### 다. Real-time PCR을 이용한 지역별 잠재력 파악

○ Real-time PCR은 실시간으로 유전자의 양을 모니터링 할 수 있으며, PCR 후 전기영동방법으로 확인하는 시간을 절약할 수 있어서 보다 빠르고 쉽게 분석할 수 있다. 그리고 standard curve를 통하여 유전자의 양을 기반으로 휴면포자 및 발아체를 정량화 할 수 있는 장점이 있다.

○ 본 연구에서는 real-time PCR을 도입하여 한국연안에 분포하고 있는 *C. polykrikoides*의 휴면포자를 검출하고 정량화하여 잠재적 적조발생요인을 파악하고자 한다.

#### (1) 저질내 고감도 식별 및 정량화

##### ① 재료 및 방법

○ Positive control: 본 연구에서 사용된 positive control은 국내산 5개 배양주를 분리하거나 분양받아서 f/2 배지에 배양하였다. 배양된 영양세포는 GF/C filter를 이용하여 250 ml를 필터하였고, PCI법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 -70℃에 보관하였으며, 종 분류는 형태분류와 염기서열 분석을 통한 유전자 동정으로 확인하였다.

○ Plasmid DNA 제작: *C. polykrikoides*의 휴면포자를 대량으로 확보하기 어려우므로 plasmid DNA를 제작하고, standard curve를 작성해야 한다. 따라서 real-time PCR에 사용되는 primer와 probe를 포함하는 영역을 대상으로 종 특이적인 primer를 제작하였고, 이 primer를 이용하여 standard PCR를 진행하였다(표 8). PCR 반응은 초기 94℃ 5분간 반응시켰고, 35회 반복반응(94℃ 30초, 55℃ 1분, 72℃ 1분)후, 최종 72℃에서 7분간 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 TAE buffer를 용매로 한 1% Agarose gel에 전기영동하고 EtBr로 염색

한 뒤 자외선을 조사하여 확인하였다. 확인된 산물은 gel extraction kit를 이용하여 정제한 후 pGEM-T Easy Vector System 1(Promega Corporation)을 이용하여 plasmid DNA를 만든 후 competent cell에 삽입하여 LB배지에 배양하였다. 배양된 cell을 Plasmid Purification Mini Kit를 이용하여 plasmid DNA를 확보하였다.

표 8. *C. polykrikoides*의 ITS 영역 증폭에 이용된 primer

primer	Sequence (5'→3')
ITSF	5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3'
ITSR	5'-CCCTGTTTCATTCGCCATTAC-3'

○ Standard Curve 제작을 위한 real-time PCR 수행 : 확보된 plasmid DNA를 이용하여 standard curve를 제작하였다. plasmid DNA template를 이용하여 standard curve를 만들기 전 plasmid DNA의 길이를 이용하여 무게를 정량화 하였으며 이를 copy수에 맞는 농도로 계산하여 plasmid DNA를 단계별로 희석하였다. 희석된 plasmid DNA를 이용하여 real-time PCR을 진행하였다. 0.5  $\mu$ L template DNA, primers 와 probe(0.3와 0.15  $\mu$ M), 5  $\mu$ L Premix Ex Taq(TAKARA BIO INC), PCR grade water로 총 volume 10  $\mu$ L로 조절하였다. 반응에 사용된 primer쌍과 TaqMan probe의 염기서열은 표 9에 나타내었다. Real-time PCR 반응은 초기 50 $^{\circ}$ C 2분간 반응시켰고, 95 $^{\circ}$ C 2분간 반응 후 45회 반복반응(95 $^{\circ}$ C 10초, 60 $^{\circ}$ C 40초)하였다. 분석은 Rotor-Gene 6000 instrument(Corbett Research, Sydney, Australia)을 사용하였다.

표 9. Real-time PCR에 사용된 primer와 TaqMan probe

Primer	Sequence (5'→3')
CPITSF	5'-CGGCAACCTTTGTCAAACA-3'
CPITSR2	5'-GGTTTGCTGATCTAACTTCATGTCT-3'
CPITSP	5'-FAM-CAACCGTGATACCCGCTAGCTTTGC-TAMRA-3'

## ② 결과 및 고찰

○ *C. polykrikoides* 영양세포의 ITS 영역을 Standard PCR 로 제작된 plasmid DNA를 단계별로 희석(10, 100, 1000, 10000, 100000 copies/g)하여 real-time PCR을 진행하였다. 이때 Ct값이 약 20, 23, 25, 27, 29이 나왔으며 이 값을 토

대로 standard curve를 작성하였다.

○ Plasmid DNA copy 수와 Ct 값은 그림 35와 같이 높은 선형 상관관계를 나타내어 standard curve로 사용할 수 있었다. Real-time PCR을 진행할 때 positive control로 사용된 *C. polykrikoides*에서 실시간 반응을 확인할 수 있었고 negative control로 멸균한 초순수를 사용하였을 때 반응이 나오지 않아, 본 실험에 다른 영향이 없었음을 알 수 있었다.

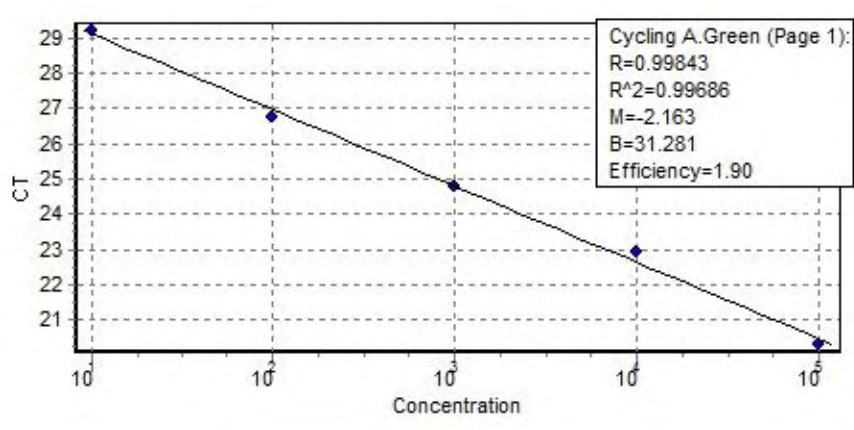


그림 35. 퇴적물 내 휴면포자의 정량화를 위한 검량선.

## (2) 발아체 고감도 식별 및 정량화

○ *C. polykrikoides*의 영양세포를 형태학적인 특징을 이용하여 명확히 분류하기 어렵기 때문에 유전자 특징을 분석하여 Real-time PCR 방법으로 본 종의 동정 및 정량화하는 것이 효과적인 방법이라 생각된다.

○ 휴면포자 정량과 마찬가지로 종 특이적인 DNA probe(유전자 탐침자)를 이용하여 한국남해안의 여러 정점에서 채집된 해수를 분석함에 따라 영양세포의 분포와 변동량을 조사하였다.

○ 휴면포자 정량 때는 plasmid DNA를 이용하였으나, 영양세포 정량 때는 배양된 *C. polykrikoides*의 영양세포를 이용하여 standard curve를 작성하였다.

### ① 재료 및 방법

○ 영양세포로부터 DNA 추출: Positive control로 사용하기 위해 배양된 *C. polykrikoides*를 Sedgwick-rafter Chamber를 이용하여 계수하였다. 계수된 세포 2 mL(4,900 cells/mL)을 tube에 담아 원심분리(14,000 rpm, 10분)후 배지를 제거하고 PCI법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 -70℃에 보관

하였다.

○ Standard curve 제작을 위한 real-time PCR 수행: 추출된 DNA를 이용하여 단계별로 희석한 후 standard curve를 작성하였다. 0.5  $\mu$ L template DNA, primers 와 probe(0.3와 0.15  $\mu$ M), 5  $\mu$ L Premix Ex Taq(TAKARA BIO INC), PCR grade water로 총 volume 10  $\mu$ L로 조절하였다. 반응에 사용된 primer쌍과 TaqMan probe는 표 9를 사용하였다. Real-time PCR 반응은 초기 50 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시켰고, 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응 후 45회 반복반응 하였다(95 $^{\circ}$ C 10초, 60 $^{\circ}$ C 40초). 분석은 Rotor-Gene 6000 instrument(Corbett Research, Sydney, Australia)을 사용하였다.

## ② 결과 및 고찰

○ *C. polykrikoides* 영양세포에서 추출한 DNA를 단계별로 희석(9.8, 98, 980, 9800 cells/mL)하여 Real-time PCR을 진행하였을때 Ct값이 약 23, 27, 30, 33 이 나왔으며 이 값을 토대로 standard curve를 작성하였다. *C. polykrikoides* 영양세포 DNA양과 Ct 값은 그림 36과 같이 높은 선형 상관관계( $R^2>0.99$ )를 나타내어 standard curve로 사용할 수 있었다. Real-time PCR을 진행할 때 positive control로 사용한 *C. polykrikoides*에서 실시간 반응을 확인할 수 있었고 negative control로 멸균한 초순수를 사용하였을 때 반응이 나오지 않아, 본 실험에 다른 영향이 없었음을 알 수 있었다.

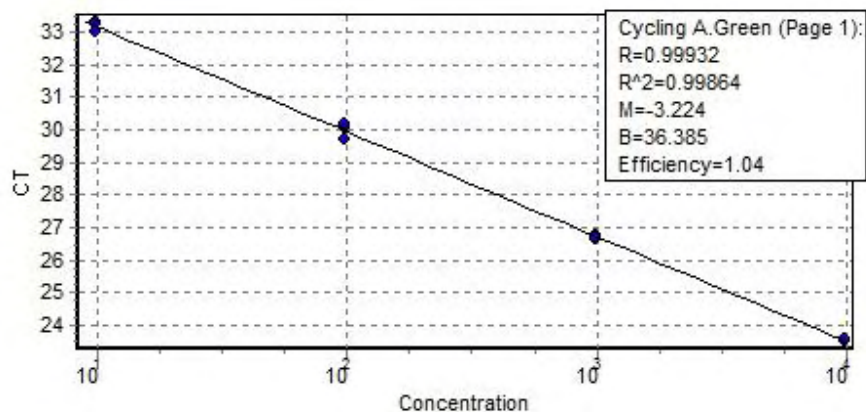


그림 36. 해수 내의 발아체 정량화를 위한 검량선.



(3) 모델해역(자란만) 정기조사 및 적조상습 해역의 휴면포자 분포

○ Plasmid DNA와 배양된 *C. polykrikoides*의 휴면포자로부터 도출된 standard curve를 이용하여 *C. polykrikoides* 적조 상습발생지역인 남해안을 대상으로 휴면포자 및 발아체를 조사하였다.

① 재료 및 방법

○ 조사 해역: 남해 서부 연안역 "A" (완도, 여수), 남해 중부 연안역 "B" (고성 자란만, 남해 미조, 사랑도), 남해 동부 연안역 "C" (통영, 옥지도) (그림 37).

○ 조사 시기: 2009년 5월 ~ 2010년 4월 (남해 중부 자란만 해역)  
2010년 3월 ~ 2010년 9월 (남해 서부, 중부, 동부 연안역)  
2011년 3월 ~ 2011년 9월 (남해 중부, 동부 연안역)

○ 조사 방법: 남해안에서 *C. polykrikoides*의 주요 적조 발생지(그림 37, 표 10)에서 Box-corer 또는 Wildcocorers를 이용해 저질을 채집하였다. 500 mL 통에 담아 4°C, 암소에 다음 분석까지 보관하였다.

- 저질로부터 DNA 추출 : 채집한 저질 30 g을 tube에 담은 후 원심분리(2000 rpm, 5분)하여 해수를 제거하였다. 그 후 0.3M NaCl 5 mL넣고 원심분리(2000 rpm, 20분)하여 상등액을 제거 후 DNA를 추출하였다. DNA 추출은 Soil DNA Isolation Kit(MO BIO)을 이용하였다.

- Real-time PCR 수행 : 0.5  $\mu$ L template DNA, primers와 probe(0.3과 0.15  $\mu$ M), 5  $\mu$ L Premix Ex Taq(TAKARA BIO INC) 그리고 PCR grade water로 총 volume 10  $\mu$ L로 조절하였다. PCR 조건은 2분에서 50°C, 2분에서 95°C, 그리고 45회 반복반응(95°C 10초, 60°C 45초)하였다. 분석은 Rotor-Gene 6000 instrument(Corbett Research, Sydney, Australia)을 사용하였다.

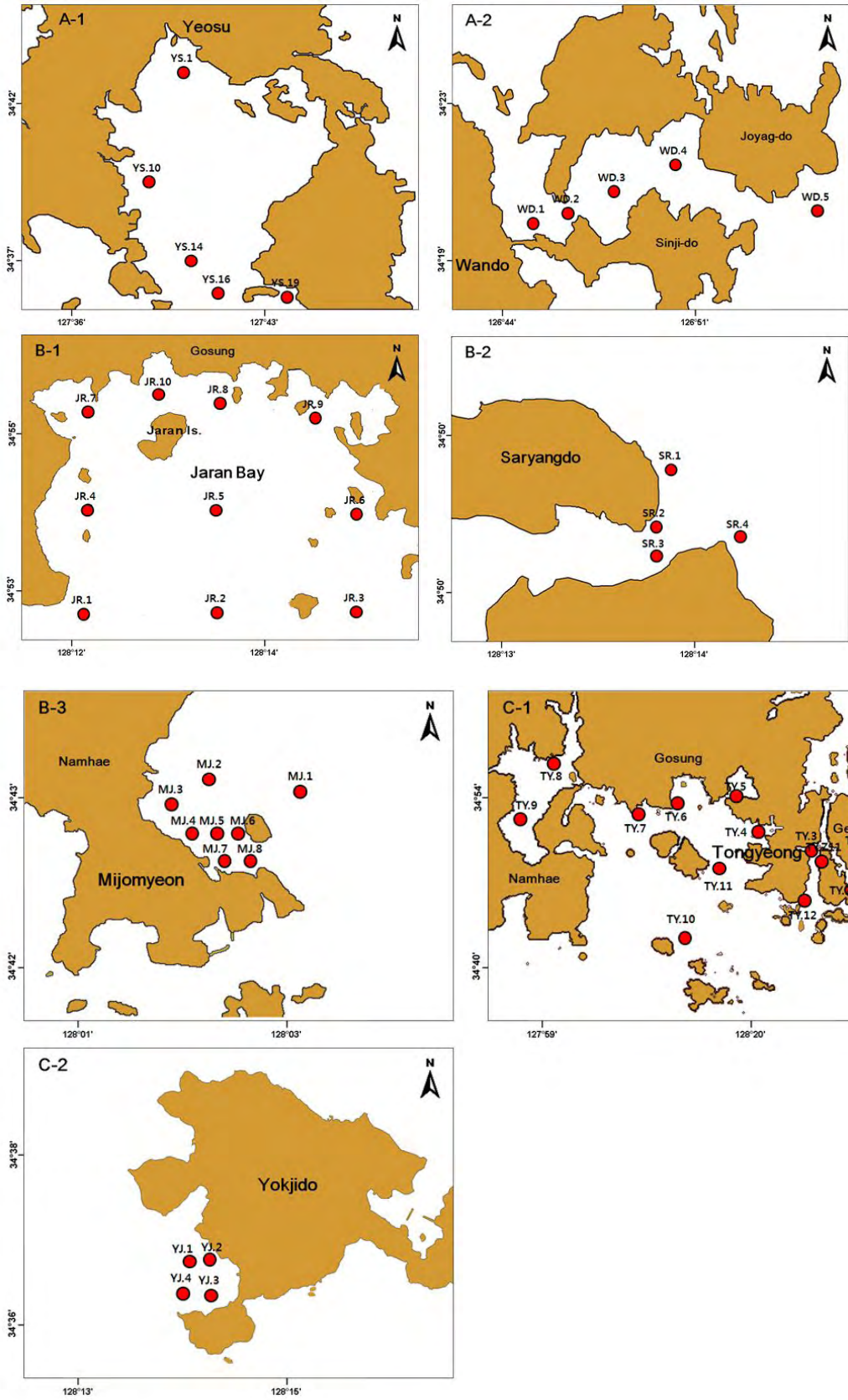


그림 37. 남해 해역별 휴면포자 조사 정점도 남해 서부 연안해역(A-1, 여수 A-2, 완포, 남해 중부 연안해역 (B-1, 자란만 ; B-2, 사랑도 ; B-3, 미조), 남해 동부 연안해역(C-1, 통영 C-2, 욕지도).

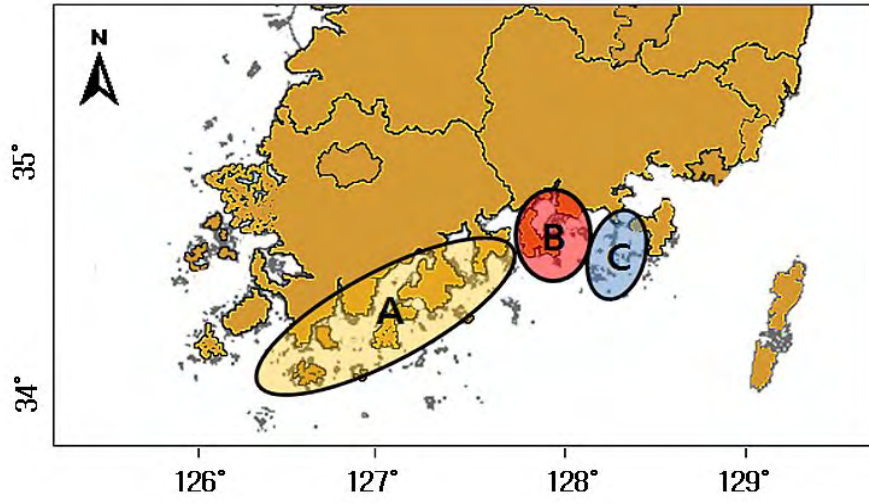


그림 37. 계속.

표 10. 조사정점 좌표

해역	정점 번호	경도	위도	비고
A	1	YS. 01	E 127° 40 ' 04 "	N 34° 43 ' 38 "
		YS. 02	E 127° 39 ' 09 "	N 34° 39 ' 41 "
		YS. 03	E 127° 40 ' 52 "	N 34° 37 ' 32 "
		YS. 04	E 127° 40 ' 58 "	N 34° 36 ' 23 "
		YS. 05	E 127° 44 ' 09 "	N 34° 36 ' 06 "
	2	WD. 01	E 126° 45 ' 33 "	N 34° 20 ' 28 "
		WD. 02	E 126° 46 ' 53 "	N 34° 20 ' 44 "
		WD. 03	E 126° 48 ' 40 "	N 34° 21 ' 28 "
		WD. 04	E 126° 50 ' 46 "	N 34° 22 ' 11 "
		WD. 05	E 126° 56 ' 19 "	N 34° 20 ' 55 "
B	1	JR. 01	E 128° 12 ' 30 "	N 34° 53 ' 08 "
		JR. 02	E 128° 14 ' 09 "	N 34° 53 ' 09 "
		JR. 03	E 128° 15 ' 52 "	N 34° 53 ' 11 "
		JR. 04	E 128° 12 ' 34 "	N 34° 54 ' 26 "
		JR. 05	E 128° 14 ' 08 "	N 34° 54 ' 25 "
		JR. 06	E 128° 15 ' 07 "	N 34° 54 ' 42 "
		JR. 07	E 128° 12 ' 33 "	N 34° 55 ' 37 "
		JR. 08	E 128° 14 ' 11 "	N 34° 55 ' 42 "
		JR. 09	E 128° 12 ' 33 "	N 34° 55 ' 37 "
		JR. 10	E 128° 13 ' 19 "	N 34° 56 ' 15 "
2	SR. 01	E 128° 13 ' 58 "	N 34° 50 ' 46 "	
	SR. 02	E 128° 13 ' 51 "	N 34° 50 ' 32 "	
	SR. 03	E 128° 13 ' 48 "	N 34° 50 ' 23 "	
	SR. 04	E 128° 14 ' 19 "	N 34° 50 ' 23 "	
	3	MJ. 01	E 128° 03 ' 28 "	N 34° 43 ' 27 "
		MJ. 02	E 128° 02 ' 39 "	N 34° 43 ' 31 "
		MJ. 03	E 128° 02 ' 14 "	N 34° 43 ' 22 "
		MJ. 04	E 128° 02 ' 24 "	N 34° 43 ' 10 "
MJ. 05		E 128° 02 ' 42 "	N 34° 43 ' 11 "	
MJ. 06		E 128° 02 ' 57 "	N 34° 43 ' 10 "	
MJ. 07		E 128° 02 ' 50 "	N 34° 42 ' 57 "	
MJ. 08		E 128° 03 ' 03 "	N 34° 42 ' 56 "	
C	1	TY. 01	E 128° 33 ' 29 "	N 34° 48 ' 48 "
		TY. 02	E 128° 31 ' 12 "	N 34° 46 ' 51 "
		TY. 03	E 128° 26 ' 47 "	N 34° 49 ' 59 "
		TY. 04	E 128° 21 ' 13 "	N 34° 51 ' 28 "
		TY. 05	E 128° 18 ' 53 "	N 34° 55 ' 39 "
		TY. 06	E 128° 13 ' 24 "	N 34° 54 ' 34 "
		TY. 07	E 128° 07 ' 30 "	N 34° 52 ' 28 "
		TY. 08	E 128° 00 ' 00 "	N 34° 57 ' 14 "
		TY. 09	E 127° 56 ' 12 "	N 34° 52 ' 39 "
		TY. 10	E 128° 15 ' 00 "	N 34° 43 ' 03 "
		TY. 11	E 128° 17 ' 41 "	N 34° 48 ' 35 "
		TY. 12	E 128° 26 ' 35 "	N 34° 45 ' 59 "
	TY. Z07	E 128° 31 ' 28 "	N 34° 49 ' 13 "	
	TY. Z11	E 128° 26 ' 35 "	N 34° 45 ' 59 "	
	2	YJ. 01	E 128° 14 ' 06 "	N 34° 37 ' 22 "
		YJ. 02	E 128° 14 ' 22 "	N 34° 37 ' 24 "
YJ. 03		E 128° 14 ' 23 "	N 34° 37 ' 14 "	
YJ. 04		E 128° 13 ' 53 "	N 34° 37 ' 12 "	

② 결과 및 고찰

㉠ 남해 서부 연안역

○ 2010년 4월 12일 여수 인근 해역에서 채집한 저질 DNA를 이용하여 Real-time PCR 분석 결과를 그림 38에 나타내었다. 정점 3을 제외한 나머지 정점에서는 1~2 copies/g이 검출되었다.

○ 정점 1에서는 3 copies/g이 검출되어 내만에는 *C. polykrikoides*의 휴면포자가 누락되어 있을 가능성을 제시하고 있다.

○ 본 해역의 초기조사를 통하여 적조 잠재력을 조사하였으나, *C. polykrikoides* 적조 발생 확률이 낮을 것으로 예상된다.

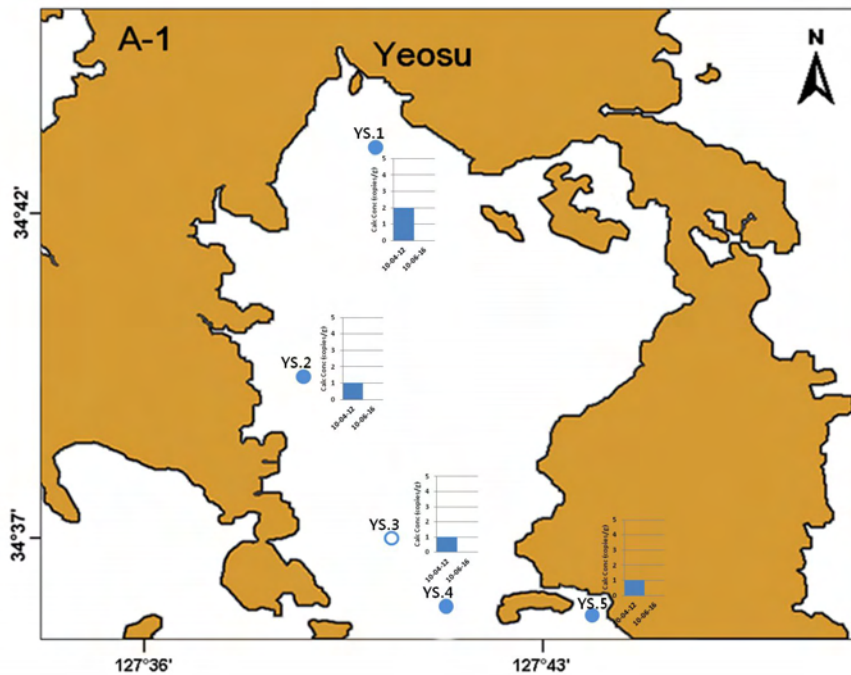


그림 38. Real-time PCR을 이용한 여수 인근 해역에서 검출된 *C. polykrikoides* 휴면포자 검출량(○, 불검출 정점; ●, 검출된 정점).

○ 2010년 4월 22일 완도 인근 해역에서 채집한 저질을 이용하여 real-time PCR 분석 결과를 그림 39에 나타내었다. 정점 5에서 1 copies/g이 검출되었으며 나머지 정점에서는 검출되지 않았다.

○ 적조가 발생하는 7월 보다 초기에 조사하여 적조 발생 잠재력을 파악하고자 하였으나 휴면포자 검출량이 낮게 나왔기 때문에 본 해역에서는 *C. polykrikoides* 적조 발생 확률이 낮을 것으로 생각된다.

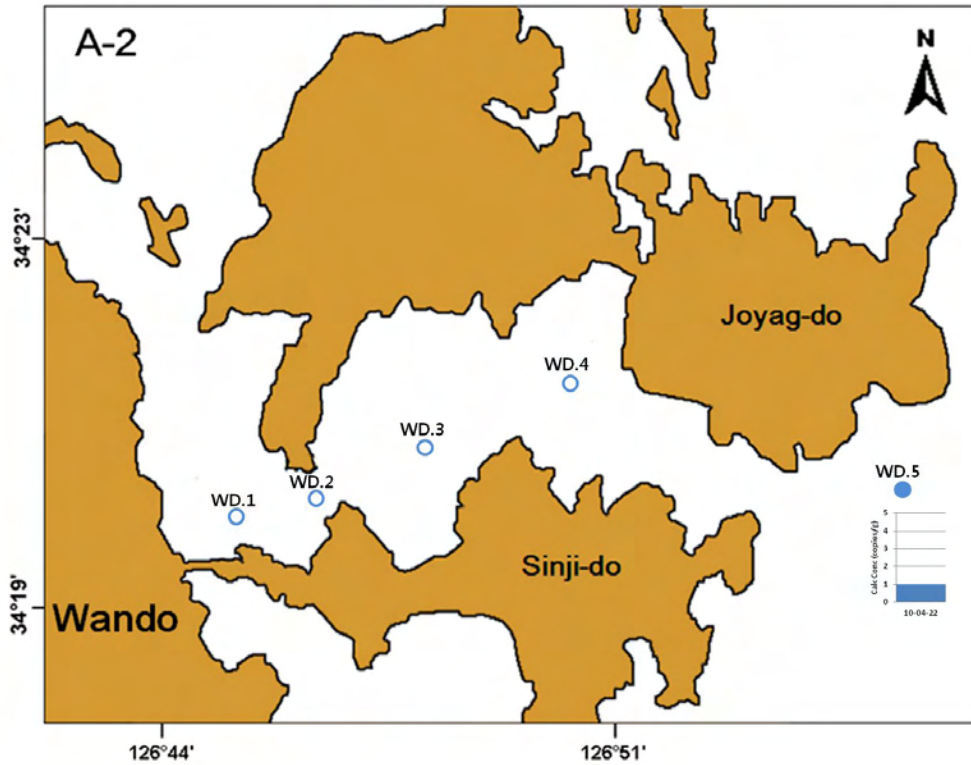


그림 39. Real-time PCR을 이용한 완도 인근 해역에서 검출된 *C. polykrikoides* 휴면포자 검출량(○, 불검출 정점; ●, 검출된 정점).

㉔ 남해 중부 연안역

○ 2009년 자란만 인근 해역을 조사하였을 때, 다른 정점에 비해 정점 4, 7, 8, 10에서 휴면포자가 검출되었고 더욱이 2010년 3월과 4월에서도 이들 정점에서 2 copies/g이 검출되어 2010년 5월~9월, 2011년 4월~7월에 이 해역을 집중적으로 조사하였다.

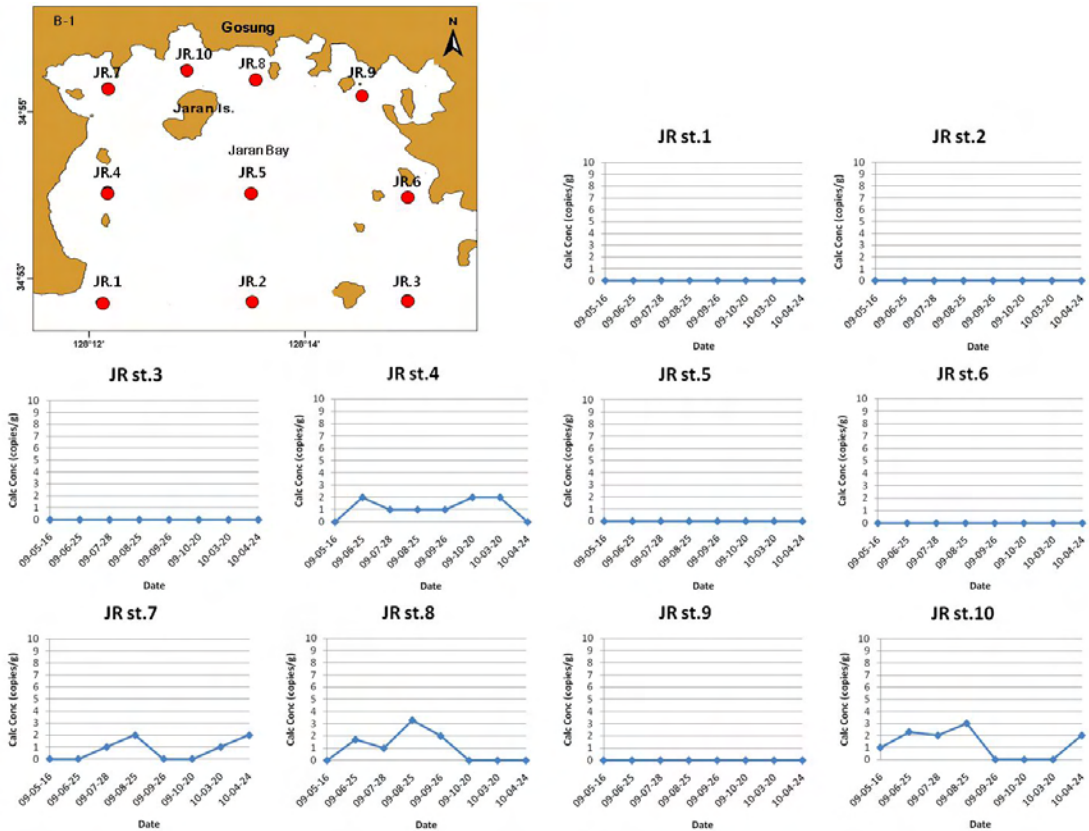


그림 40. Real-time PCR을 이용한 2009년, 2010년 자란만 인근 해역에서 검출된 *C. polykrikoides* 휴면포자 검출량.

○ 2010년 4월~5월에는 4개의 정점 모두 휴면포자가 증가하였다가 7월 이후에는 감소하는 추세를 보였다(그림 41). 특히 6월 정점 8에서 최대치(10 copies/g)를 보였으며 다른 정점에서 3~8 copies/g의 검출량을 보였다. 그러나 2011년에는 각 정점에서 휴면포자가 검출 되지 않았다.

○ 2009년~2011년 자란만 정점 4, 7, 8, 10의 휴면포자 변동량을 살펴보면 2009년보다 2010년에서 휴면포자 검출량이 높게 나타났다(그림 41). 따라서 2010년 7~8월에는 *C. polykrikoides*의 적조발생이 예상되었으나, 잦은 장마와 태풍과 같은 외부교란에 따라 *C. polykrikoides*의 대량발생은 나타나지 않았다. 또한, 2011년에는 각 정점에서 휴면포자가 나타나지 않아 적조발생이 일어나지 않을 것으로 예상되었으며, 실제 영양세포의 출현은 확인 하였으나 적조라고 할 규모의 대량발생은 일어나지 않은 것을 확인 할 수 있었다.

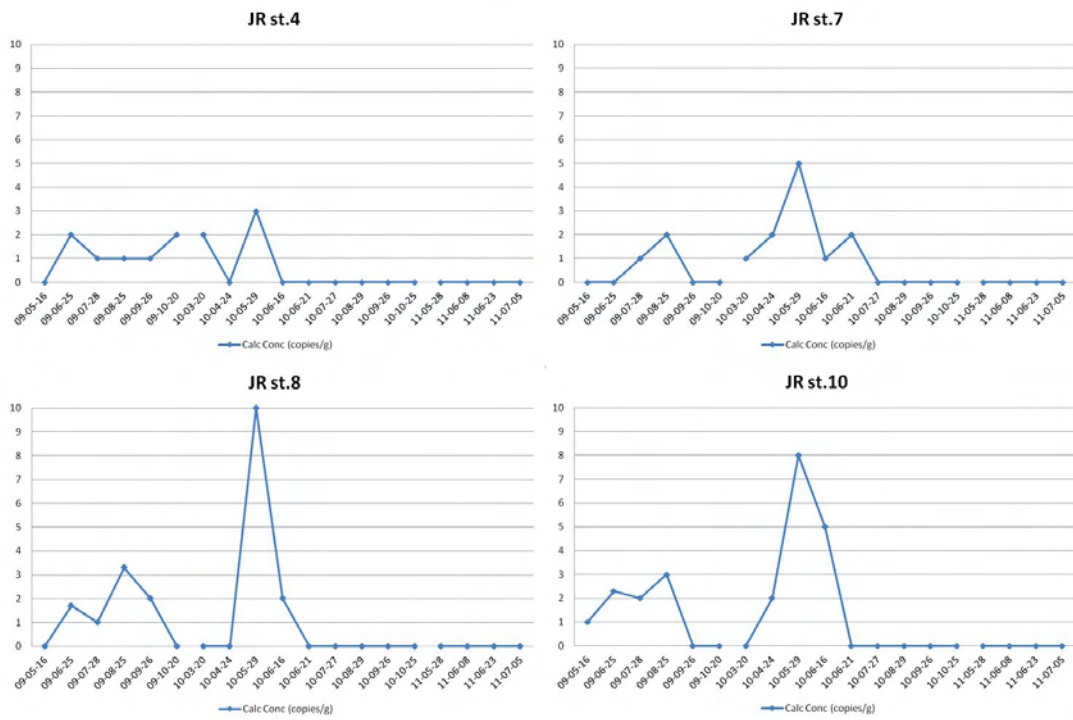


그림 41. Real-time PCR를 이용한 2009년 ~ 2011년 자란만 인근 해역에서 검출된 *C. polykrikoides* 휴면포자 검출량.

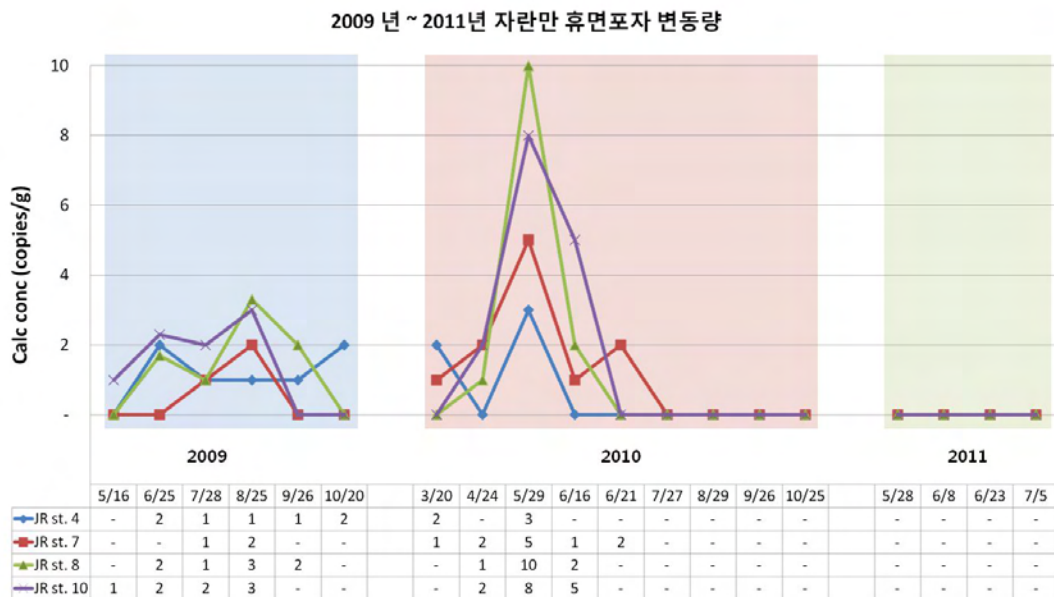


그림 42. 2009년~2011년 자란만 정점 4, 7, 8, 10에서 검출된 *C. polykrikoides* 휴면포자 변동량 비교.



○ 사랑도 인근 해역에서도 자란만 해역과 비슷하게 2010년 4월 조사 때 1~3 copies/g이 확인되었으나, 이후에는 검출되지 않았다(그림 43). 이 또한 잦은 장마와 태풍 등의 환경적 영향을 받아 해수 중의 발아체가 휴면포자가 되기 전에 확산된 것으로 생각된다. 2011년 조사의 경우 7월과 8월 조사 시 휴면 포자가 검출되지 않았다.

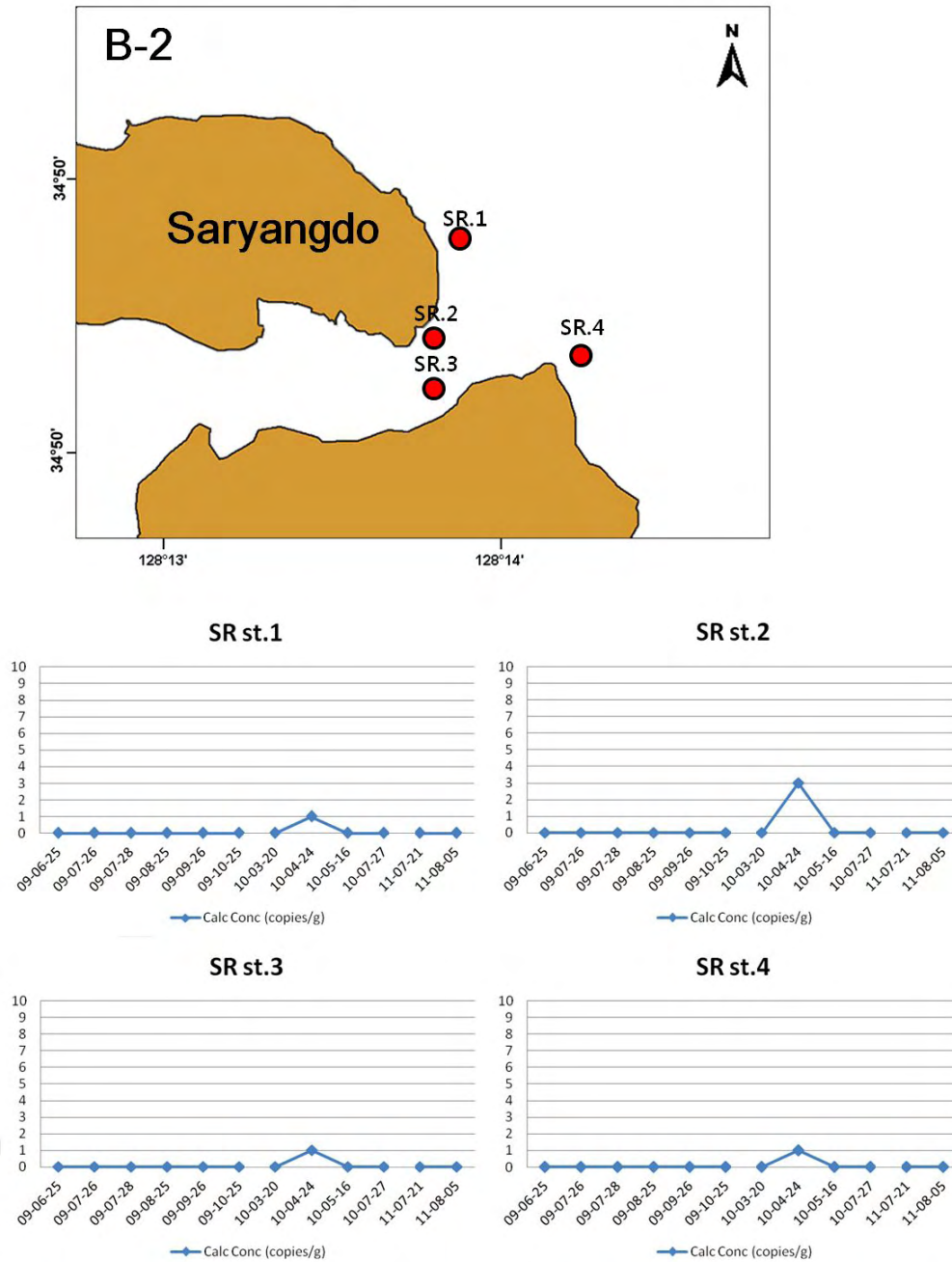


그림 43. Real-time PCR를 이용한 사랑도 인근 해역에서 검출된 *C. polykrikoides* 휴면포자 검출량.

○ 미조 인근 해역에서는 2010년 5월 조사 때 정점 1, 2, 6, 10, 13, 15에서 1~2 copies/g이 확인되었으며, 8월 조사 때에는 정점 1, 2에서만 1~3 copies/g이 확인되었으나 이후의 조사와 2011년 조사에서는 확인이 되지 않았다(그림 44).

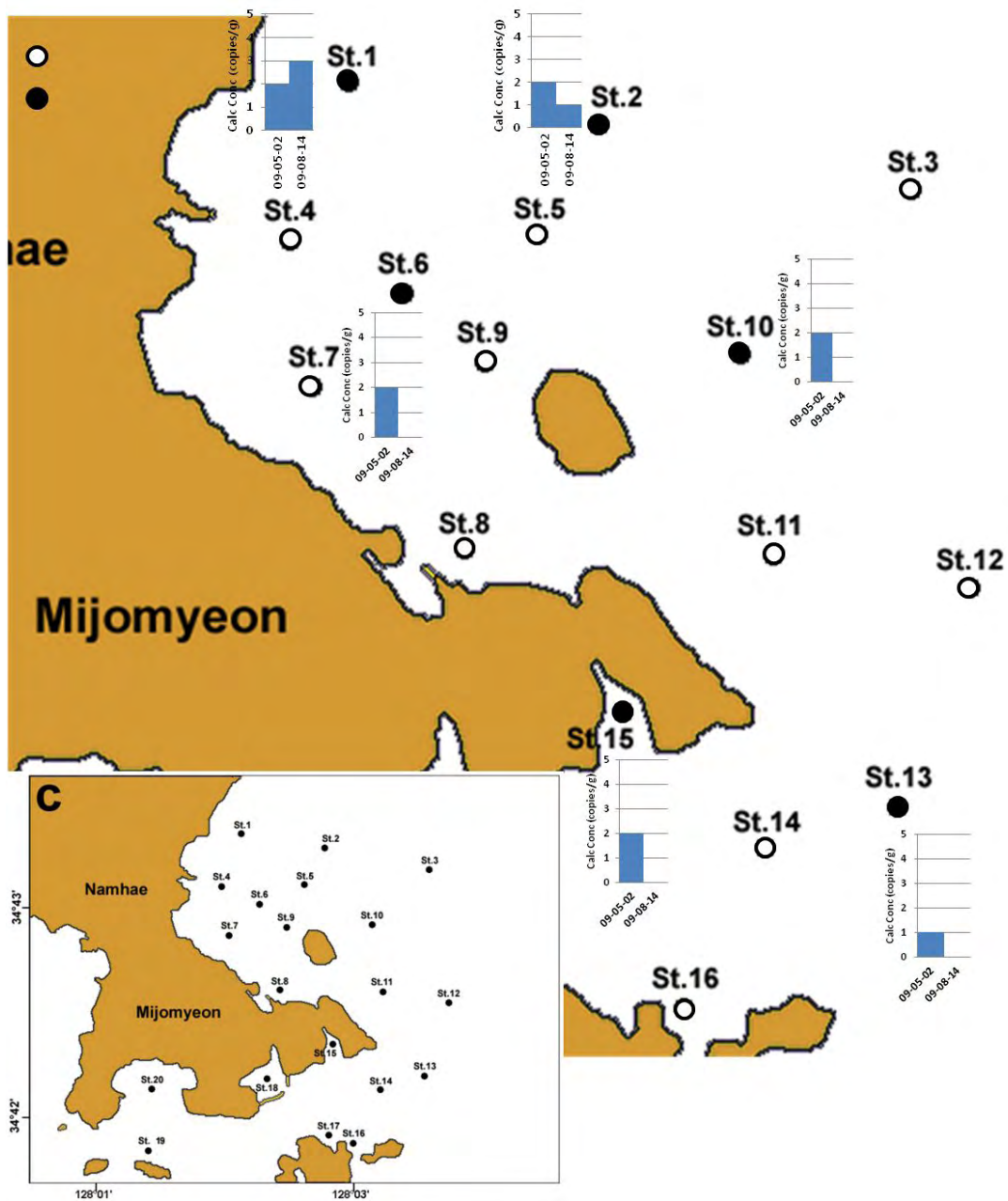


그림 44. Real-time PCR을 이용한 미조면 인근 해역에서 검출한 *C. polykrikoides* 휴면포자 검출량(○, 불검출 정점; ●, 검출된 정점).

㉔ 남해 동부 연안역

○ 2010년 4월 12일 통영 인근 해역은 정점 1에서 3 copies/g이 확인되었으며 정점 9에서 1 copies/g이 확인되었다. 하지만 나머지 정점에서는 휴면포자가 검출되지 않았다. 7월 1일~3일에는 모든 정점에서 휴면포자가 검출되지 않아 이 해역에서는 *C. polykrikoides* 적조 발생확률이 낮을 것으로 판단되었다. 2011년 3월 초기 발아체 검출을 위한 조사 시에도 휴면포자는 검출되지 않았으며 적조 발생 확률은 낮을 것으로 판단되었다.

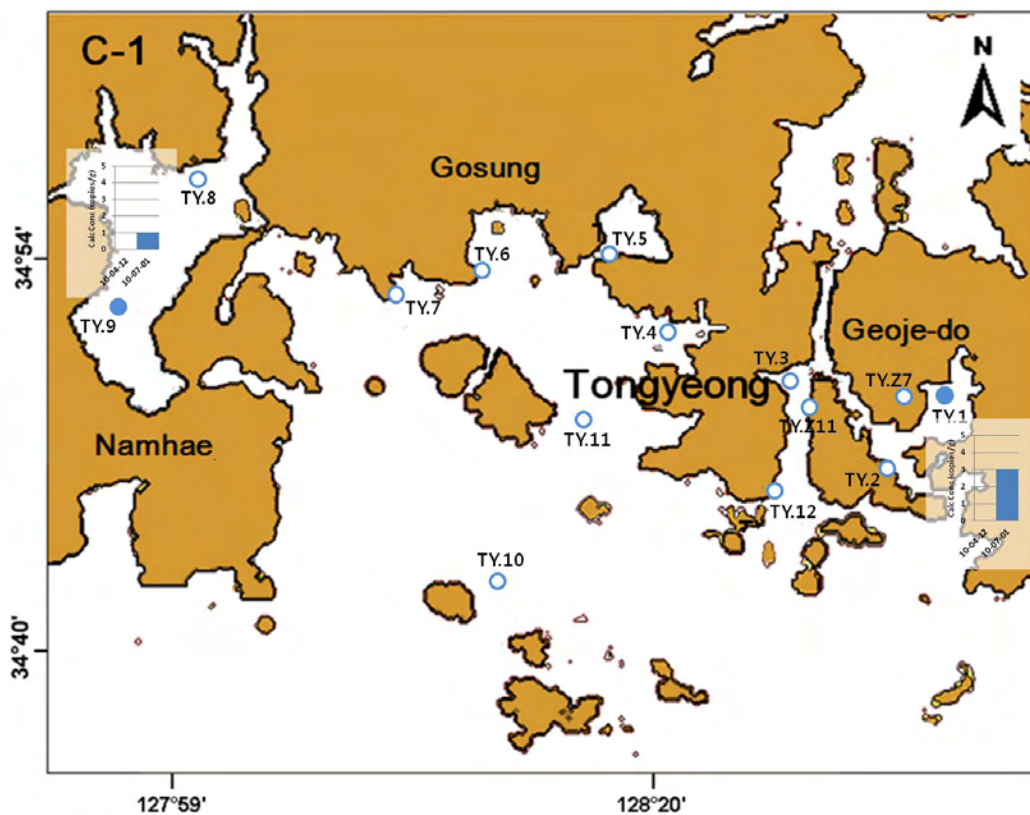


그림 45. Real-time PCR를 이용한 통영 인근 해역에서 검출한 *C. polykrikoides* 휴면포자 검출량(○, 불검출 정점; ●, 검출된 정점).

○ 2010년 8월 23일 조사한 육지도 인근 해역의 모든 정점에서는 휴면포자가 검출되지 않았었고, 2011년 8월, 9월의 조사 시에도 휴면포자는 검출 되지 않아 *C. polykrikoides*에 의한 적조 발생 가능성은 낮은 것으로 판단된다.

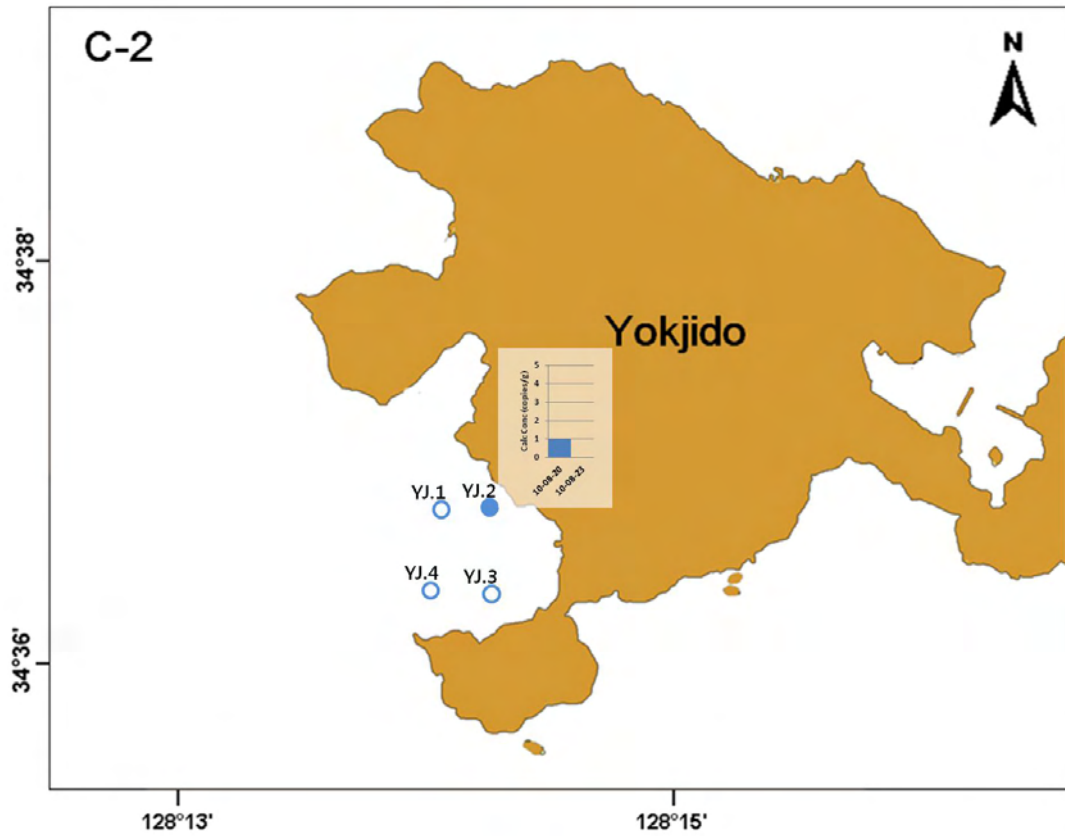


그림 46. Real-time PCR를 이용한 육지도 인근 해역에서 검출한 *C. polykrikoides* 휴면포자 검출량(○, 불검출 정점; ●, 검출된 정점).

### 3. *Cochlodinium polykrikoides* 지역개체군의 발생/생태 환경 해석

#### 가. 정기 정점(자란만, 옥지도, 사랑도, 미조) 조사

*C. polykrikoides* 발아체의 발생/생태 환경 특성을 밝히기 위해 남해 일대 해역을 선정하여 물리적, 화학적, 생물학적인 요인을 정기적으로 관측하였다.

#### (1) 재료 및 방법

##### (가) 자란만

○ 2009년 자란만에서 5월부터 9월까지 한 달 한번 조사를 원칙으로 수행하였으며, 관측점은 총 9개 정점을 선정하여 표층(0 m)과 저층(b-1 m; 저층에서 상부 1 m 수층)을 대상으로 하였다(그림 47).

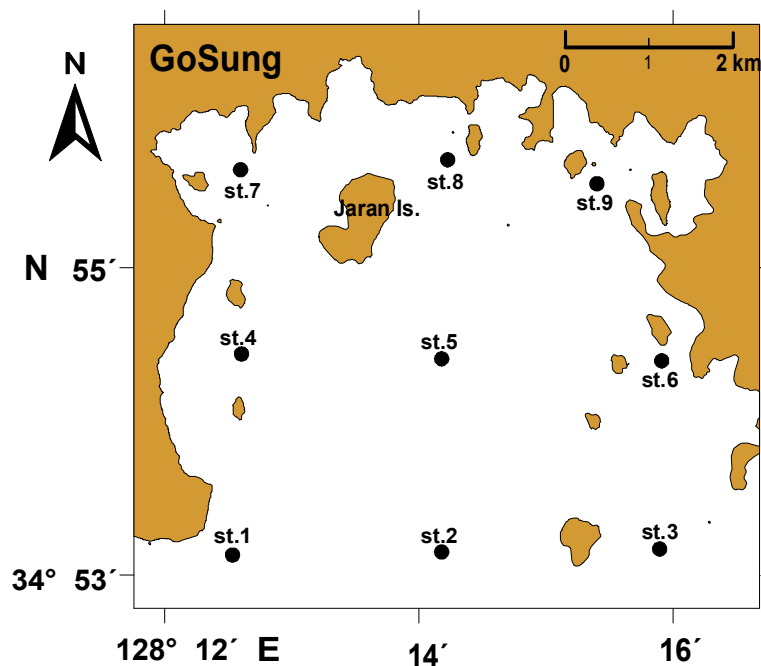


그림 47. 자란만 정기 관측조사 정점도.

○ 2010년 5월부터 7월까지 6회, 2011년 5월부터 8월까지 4회 조사를 수행하였으며, 관측점은 정점 4, 7, 8, 10번의 표층(0 m)과 저층(b-1 m; 저층에서 상부 1 m 수층)에서 실시하였다(표 11, 표 12, 그림 47).

표 11. 자란만 채집일시

차수	일시		
1	2009-05-16	2010-04-28	2011-05-28
2	2009-06-25	2010-05-29	2011-06-08
3	2009-07-28	2010-06-16	2011-06-23
4	2009-08-25	2010-06-21	2011-07-05
5	2010-06-28		
6	2010-07-29		

표 12. 자란만 조사방법

조사 방법	항목
물리적 해양환경	수심, 수온, 염분, 용존산소(Dissolved Oxygen; DO)
이화학적 해양환경	암모니아성 질소(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N), 아질산성 질소(NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N), 질산성 질소(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N), 인산 인(PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P; Dissolved Inorganic Phosphorus: DIP), 규산 규소(Si(OH) <sub>4</sub> -Si), 용존태 총인(Total Dissolved Phosphorus; DTP), 용존태 총질소 (Total Dissolved Nitrogen; TDN)
생물학적 해양환경	식물플랑크톤 종 조성 및 <i>C. polykrikoides</i> 현존량

○ 수심, 수온, 염분, 용존산소(Dissolved Oxygen; DO)의 경우 수질 다항목 측정기 (MS5, Hach Hydrolab)를 사용하여 측정하였고, 물리 및 이화학적 해양환경의 경우 Van dorn 채수기를 사용하여 표층(0m)과 저층(b-1m)을 채수하였으며, 분석은 해양환경공정시험방법에 의거하여 수행하였다(해양수산부, 2002).

○ 식물플랑크톤의 종 조성 및 현존량은 표층 해수 1L를 현장 농축(50 μm, 10 μm Nylon mesh)을 하여 형광도립현미경을 사용하여 고배율(×200, ×400)로 검경하였다.

○ 또한 *C. polykrikoides*의 발아체는 직접검경으로 파악하는 방법과 real-time PCR 방법을 이용하여 정량하였다.

○ 해수 시료에서의 DNA 추출은 표층 해수 20L 현장 농축한 시료를 GF/C filter로 여과한 후 PCI 법으로 수행하였고, 저질 시료에서의 DNA추출은 Soil DNA Isolation Kit(MO BIO)을 이용하였다. DNA 추출 후 휴면포자 및 발아체 정량을 위하여 real-time PCR을 수행하였다.

(나) 사랑도

- 사랑도에서 2010년 3회, 2011년 2회 수행하였다. 관측점은 정점 1, 2, 3, 4 번의 표층(0 m)과 저층(b-1 m)에서 실시하였다(표 13, 그림 48).
- 조사항목은 수온, 염분, 용존산소 그리고 식물플랑크톤 중 조성 등이며 조사방법은 자란만 정기조사와 같이 실시하였다(표 12).

표 13. 사랑도 채집 일시

차수	일시
1	2010-07-27
2	2010-08-27
3	2010-09-17
5	2011-07-21
6	2011-08-05

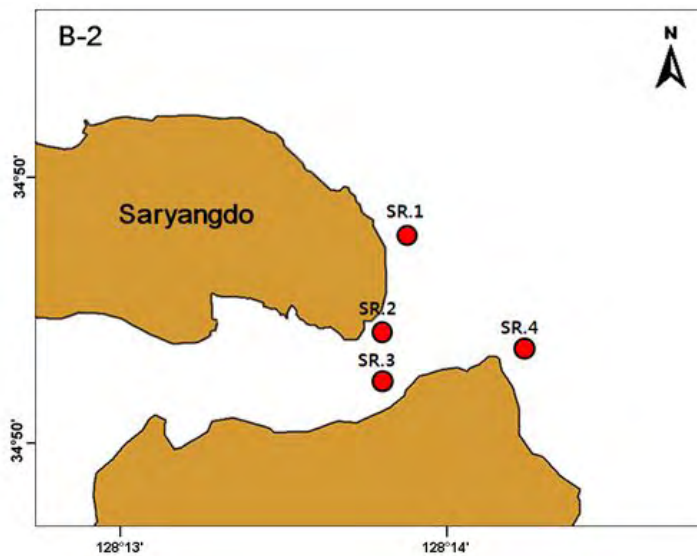


그림 48. 사랑도 정기조사 관측 정점.

(다) 미조

- 미조에서 2011년 5회 정기조사를 수행하였다. 관측점은 지도 상 정점 1, 2, 6, 10번의 표층(0 m)과 저층(b-1 m)에서 실시하였다(표 4.1-4, 그림 49).
- 조사항목은 수심, 수온, 염분, 용존산소 그리고 식물플랑크톤 중 조성 및 현존량으로 하였고 조사방법은 자란만 정기조사와 같은 방법으로 실시하였다(표 12).

표 14. 미조 채집 일시

차수	일시
1	2011-07-26
2	2011-08-11
3	2011-08-18
4	2011-08-24
5	2011-09-29

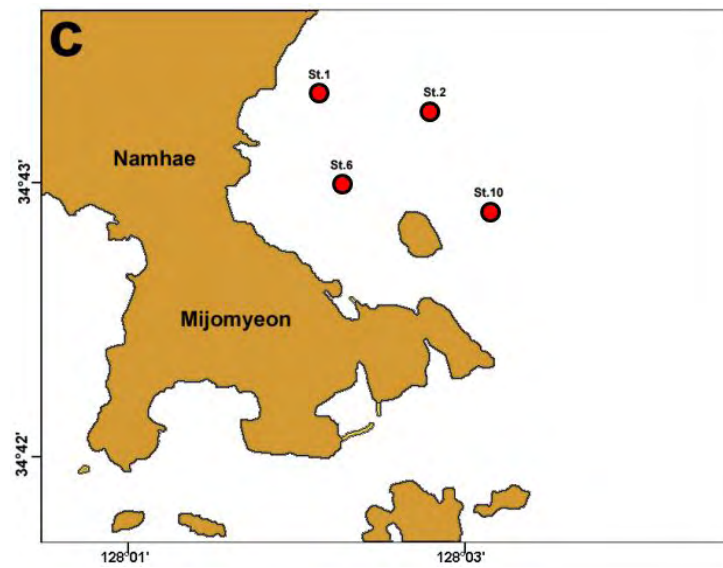


그림 49. 미조면 정기조사 관측 정점.

(라) 육지도

○ 육지도에서 2011년 5회 조사를 수행하였다. 관측점은 정점 1, 2, 3, 4번의 표층(0 m)과 저층(b-1 m; 저층에서 상부 1 m 수층)에서 실시하였다(표 15, 그림 50).

○ 조사항목은 수심, 수온, 염분, 용존산소 그리고 식물플랑크톤 종 조성 및 현존량으로 하였고 조사방법은 자란만 정기조사와 같은 방법으로 실시하였다(표 12).



표 15. 육지도 채집 일시

차수	일시
1	2011-08-04
2	2011-08-17
3	2011-08-30
4	2011-09-07
5	2011-09-25

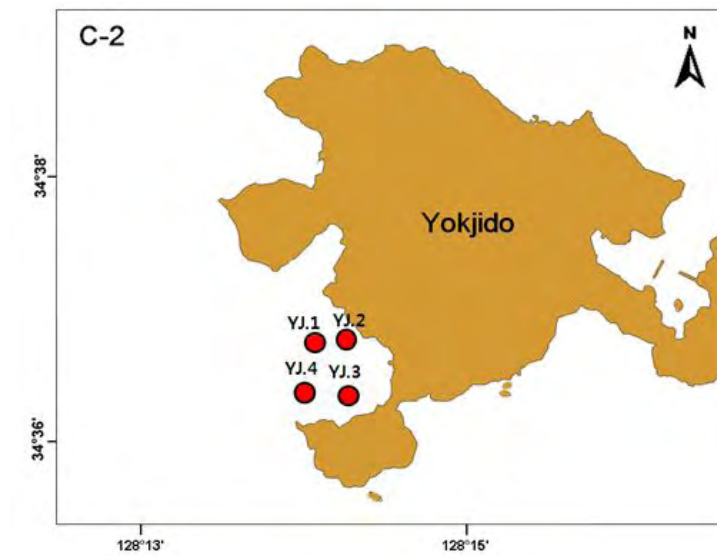


그림 50. 육지도 정기조사 관측 정점.

(2) 결과 및 고찰

(가) 자란만

① 수심, 수온 염분 및 용존산소

㉠ 수심

○ 자란만은 내륙과 인접한 4, 6, 7, 8, 9 정점의 수심은 6~10m 이내의 범위에 있으며 만의 바깥쪽 정점인 1, 2, 3, 5 정점은 그 보다 더 깊은 10~15m의 수심으로 측정되었으며 전체적으로 평균 수심 10m 이내의 천해역이었다.

㉡ 수온

○ 2009년 5월의 표층 및 저층 수온수평분포는 계절적으로 수온이 상승하는 시기로 내만의 외측인 자란도 안쪽이 19.4℃ 만 입구는 18.4℃로 나타나 내측 수온이 약 1℃ 높게 나타났다. 저층을 보면 만 입구는 16.4℃ 내측은 18.6℃로 외측보다 약 2.2℃ 높은 것을 볼 수 있다. 표층과 저층의 수온 차이가 약 1℃ ~2℃가 차이가 나며 이는 수온약층이 서서히 형성되어 가는 것을 나타낸다(그림 51).

○ 6월의 표층 분포를 보면 내측은 26.0℃을 보이며 외측은 23.0℃로 나타나 3℃의 차이를 보이고 있다. 저층 또한 내측은 24.5℃이고 외측은 이보다 4.5℃ 낮은 20℃를 보이고 있다. 5월 보다 태양 복사열에 의한 표층의 가열로 만내의 수온이 증가하였고 이에 수온약층이 5월보다 강하게 형성되는 것으로 판단된다(그림 51).

○ 7월의 표층 분포를 보면 내측과 외측 모두 6월보다 약 1~2℃ 낮게 형성되었다. 7월의 경우 바람이 많았고, 흐린 날도 많아 표층수온이 6월보다 낮게 형성되었다. 저층의 수온분포를 보면 내측은 21.8℃를 외측은 20.8℃를 보이며 내만과 입구의 수온이 약 1℃ 차가 나타났다(그림 51).

○ 8월의 표층 분포를 보면 내측은 25.4℃를 보이고 외측은 26.2℃로 외측이 내측보다 약 1.0℃ 높게 나타났다. 또한 저층의 수온분포도 내측은 24.4℃를 외측은 25.0℃를 보여 외측이 내측보다 약 1.0℃ 높게 나타난 것을 확인 할 수 있다. 이는 외부로부터 고온수가 자란만으로 유입되어 내측보다 외측의 수온이 더 높게 나타났다고 판단된다. 표층과 저층의 수온차가 약 1.0℃로 8월에 수온약층이 서서히 약화되어 가는 것처럼 보인다. 8월의 기상상태는 7월과 유사하여, 내만측의 수온이 낮게 나타난 것으로 보인다(그림 51). 9월의 표층 분포를 보면 내측과 외측의 수온이 24.0℃ 근처로 만내의 수온이 거의 동일하게 형성되었고 특이하게 만의 중심에서 24.2℃의 링(ring)이 존재하였다. 저층의 수온 분포 또한 내측인 자란도 근처와 외측인 만 입구 근처의 수온이 23.0℃ 근처로 균일하게 형성된 것을 볼 수 있다. 그리고 표층 및 저층의 수온 차이가 약 1.0℃로 수온약층이 파괴되었다고 판단된다. 이는 추계로 접어들면서 태양복사열이 약해져 표층수가 냉각되었고 수심이 낮은 내만의 특성상 만내의 수온의 혼합이 쉽게 이뤄진 결과라 판단된다(그림 51).

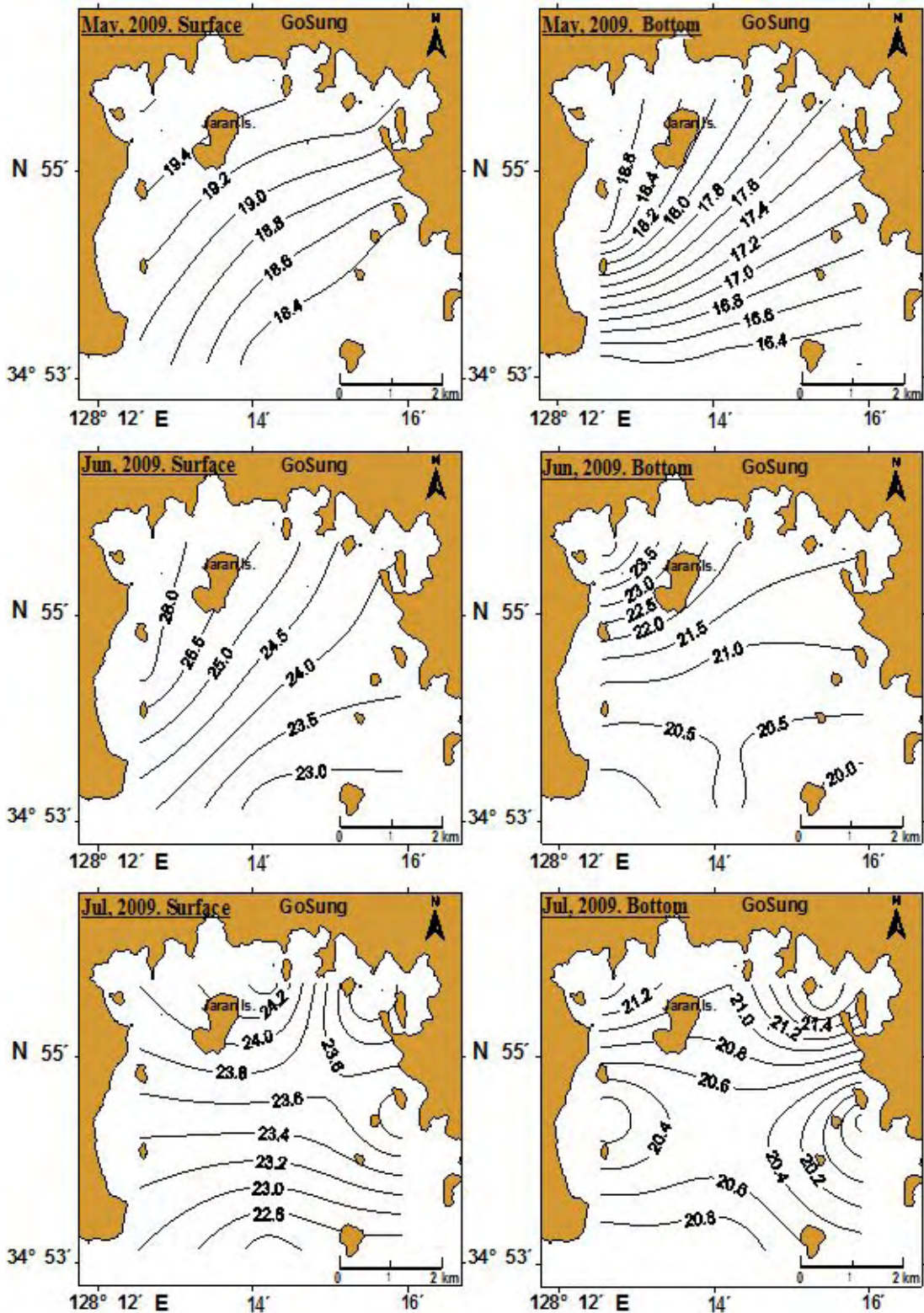


그림 51. 자란만 표층 및 저층의 수온 수평분포도(°C).

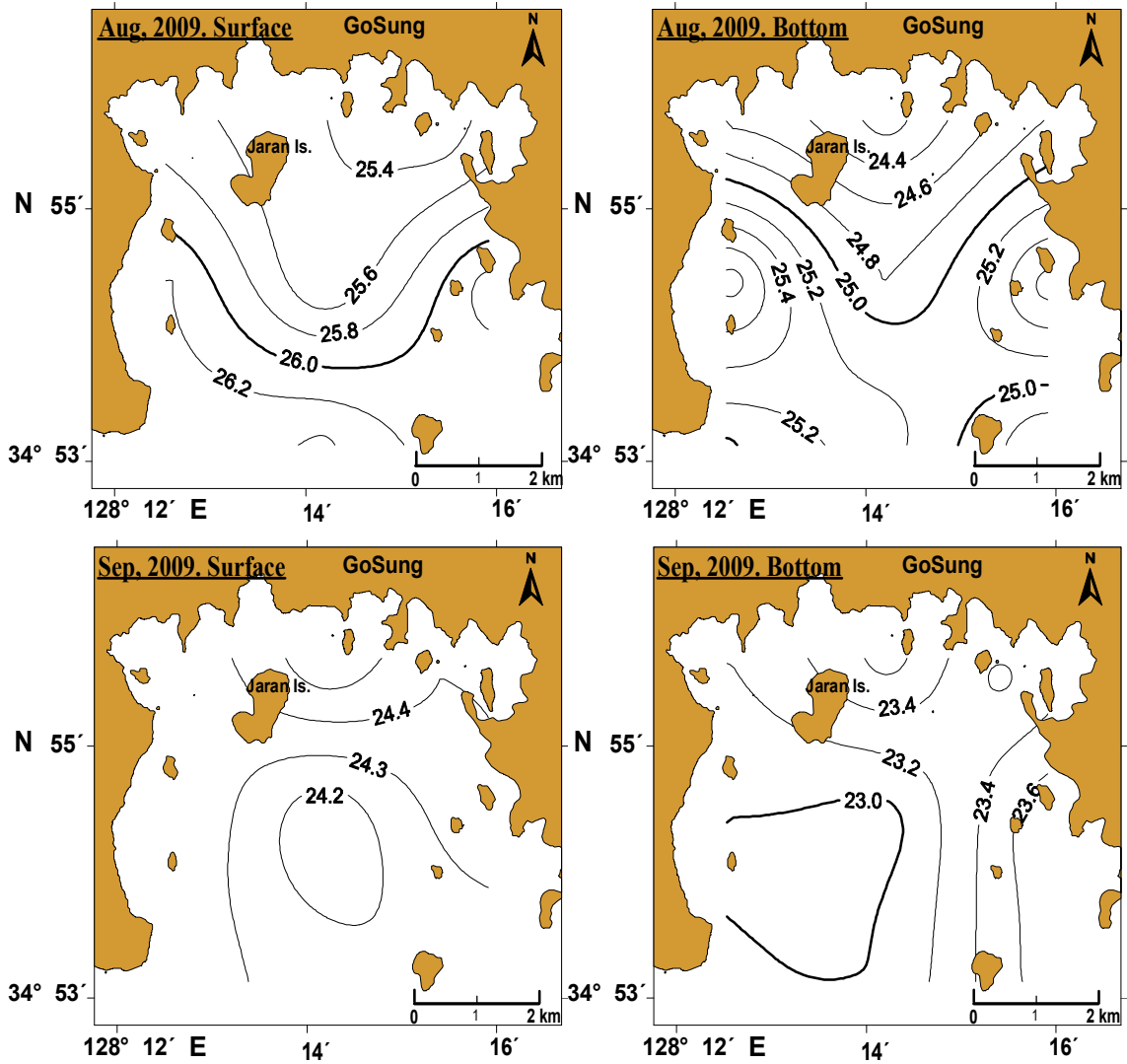


그림 51. 계속

○ 2010년 표층에서는 관측 정점 간에 수온 차이는 크지 않았으며, 춘계에서 하계로 갈수록 수온이 상승하는 온대역의 일반적인 양상을 보였다. 저층은 5월에 하계로 갈수록 정점간의 차이가 나타났으며, 7월 우기에 비교적 수심이 낮은 정점 4에서 25.5℃로 낮은 수온을 보였다(그림 52).

○ 2011년 표층에서도 각 정점 간 수온차이는 크지 않았고, 시간이 춘계에서 하계로 갈수록 수온이 점차 상승하였다. 저층은 표층보다 온도의 변화폭이 작았으며, 6월 이후의 수온변화 차도 작았다.

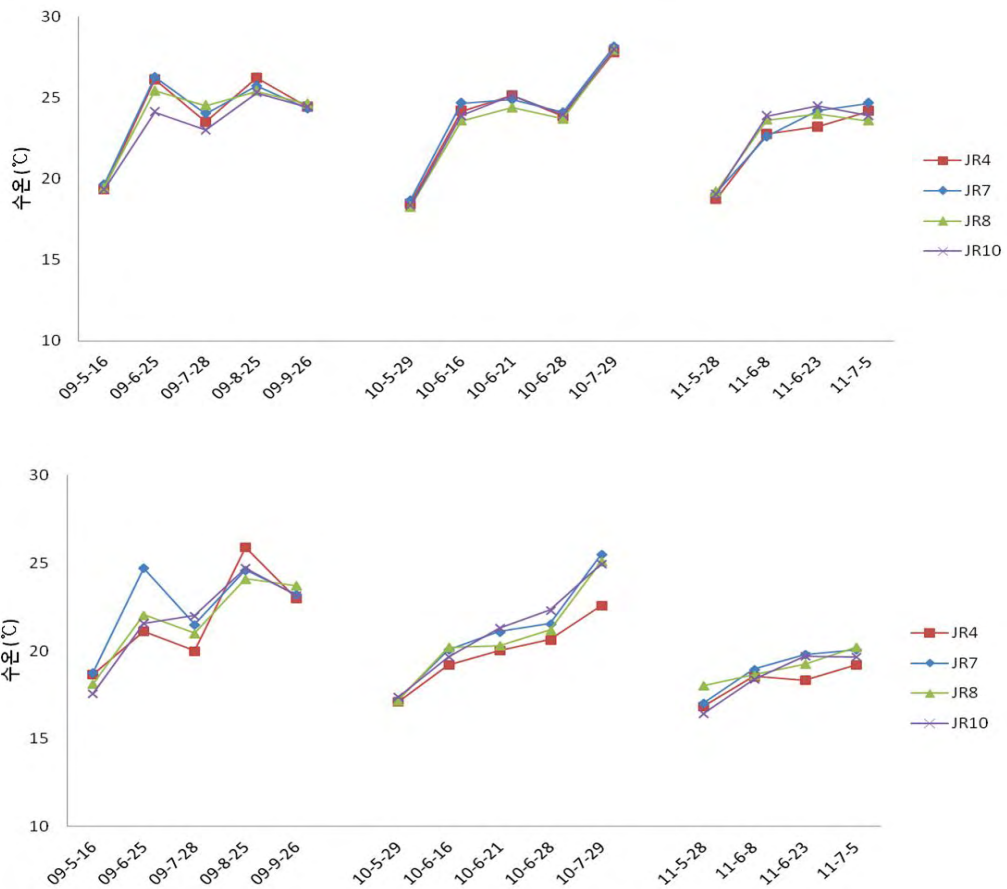


그림 52. 2009~2011년 정기조사에 따른 자란만의 수온 변화  
(상: 표층수온변화, 하: 저층수온변화).

㉔ 염분

○ 2009년 6월 표층의 분포를 보면 자란도 안쪽의 좌측에서 33.4 psu를 보이며 외측인 만 입구 방향으로 등염분선이 일정한 간격으로 증가 되어 나가는 것을 볼 수 있다. 이는 자란도 좌측의 하천에서 담수 유입으로 판단된다. 저층의 분포를 보면 자란도 우측에서만 34.4 psu 보다 높게 나타났고 자란만내의 염분은 균일하게 나타났다(그림 53).

○ 7월의 표층 분포를 보면 내측인 자란도의 좌측에서 31.2 psu를 시작으로 외측으로 등염분선이 32.6 psu까지 증가하는 형태로 나타났다. 7월의 염분은 6월보다 약 2 psu ~ 3 psu 정도 작게 보였다. 이는 7월의 강수 증가에 의해 자란만으로 담수 유입이 증가하여 염분 값이 감소한 것으로 판단된다. 저층의 염분분포를 보면 자란만의 좌측이 우측보다 낮으며 외측에서 자란도 쪽으로 혀 모양의 33.0 psu의 등염분선이 발견되었다. 이는 외측으로부터 고염의 저층 해수가 유입된 것으로 판단된다(그림 53).

○ 8월의 표층 분포를 보면 내만의 중심역에 32.0 psu의 상대적으로 고염의 링(ring)이 존재하고 이를 기준으로 등염분선이 감소하는 독특한 구조가 나타났다. 저층의 염분분포를 보면 자란만 외측 남서 해역에서 31.8 psu인 등염분선이 존재하고 자란도 근처에서 30.4 psu로 등염분선이 낮게 나타났다. 이는 상대적으로 고염인 외측의 저층 해수가 자란만으로 유입된 것으로 판단된다(그림 53).

○ 9월의 표층 분포를 보면 외측인 만 입구의 좌측에서 상대적으로 고염인 32.8 psu의 값을 보이며 내측으로 갈수록 감소하는 형태로 나타났다. 이는 만의 외측으로부터 해수가 유입된 것으로 판단된다. 저층의 염분분포를 보면 표층수와 유사하게 완도의 좌측에 33.0 psu의 상대적으로 고염이 존재하여 만의 중앙부로 진행하나 만 내측에 33.4 psu ~ 34 psu의 고염이 존재하고 있다. 이는 자란만으로 유입된 고염의 해수가 외측으로 빠져나가지 못하고 만의 내측에 쌓여 고염이 나타난 것으로 판단된다(그림 53).

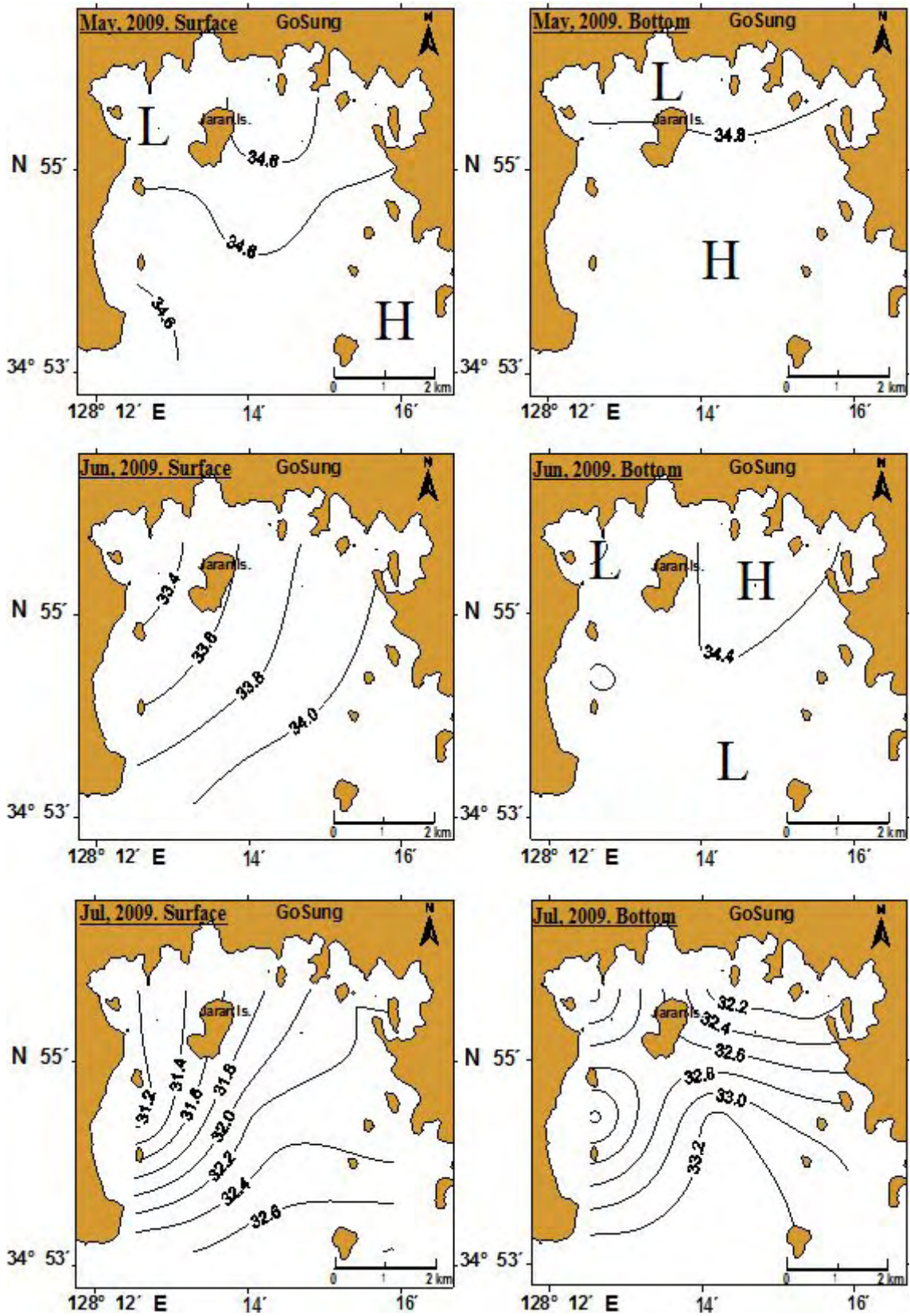


그림 53. 자란만 표층 및 저층의 염분 수평분포도(psu).

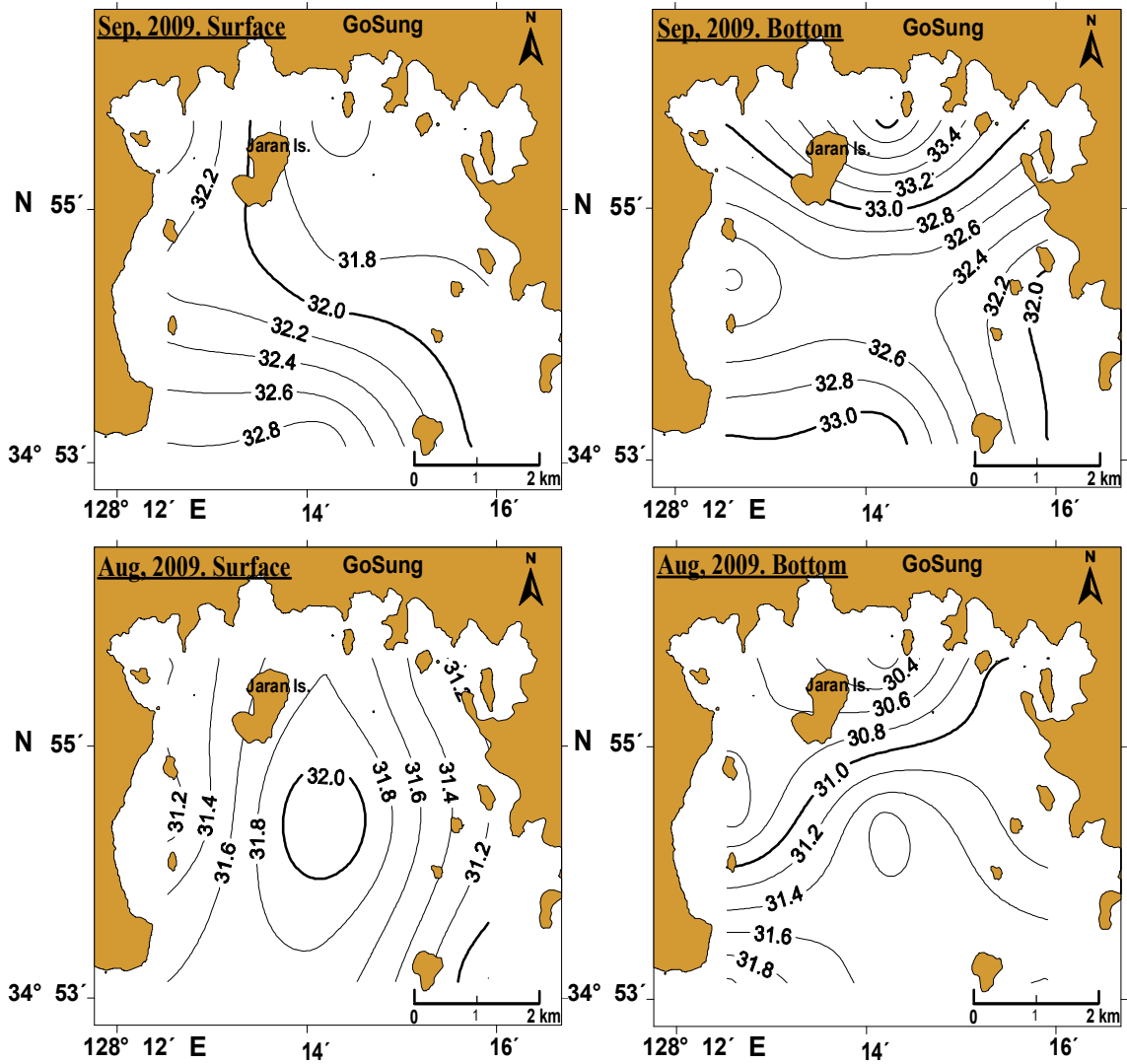


그림 53. 계속.

○ 2010년 표층에서 염분은 5월부터 6월까지 정점간의 변화는 거의 없었으며 7월 우기로 갈수록 점차 감소하는 경향을 보였다. 그리고 7월에 정점 4가 31.58 psu로 가장 낮은 염분을 나타내었다. 저층은 비교적 강우 영향을 적게 받기 때문에 6월까지 정점 그리고 시기별로 큰 차이가 없었다. 7월은 표층과 같이 정점간의 차이가 나타났으며, 수온과 양상이 다르게 정점 7에서 가장 낮은 염분 농도를 보였다(그림 54).

○ 2011년 표층은 6월 25일을 제외한 모든 기간에 염분의 농도가 비슷했으며 저층은 모든 조사기간 동안 일정한 염분농도를 나타내었다. 2010년의 결과와 같이 강우영향을 받지 않는 저층 수괴의 특성을 보였다.



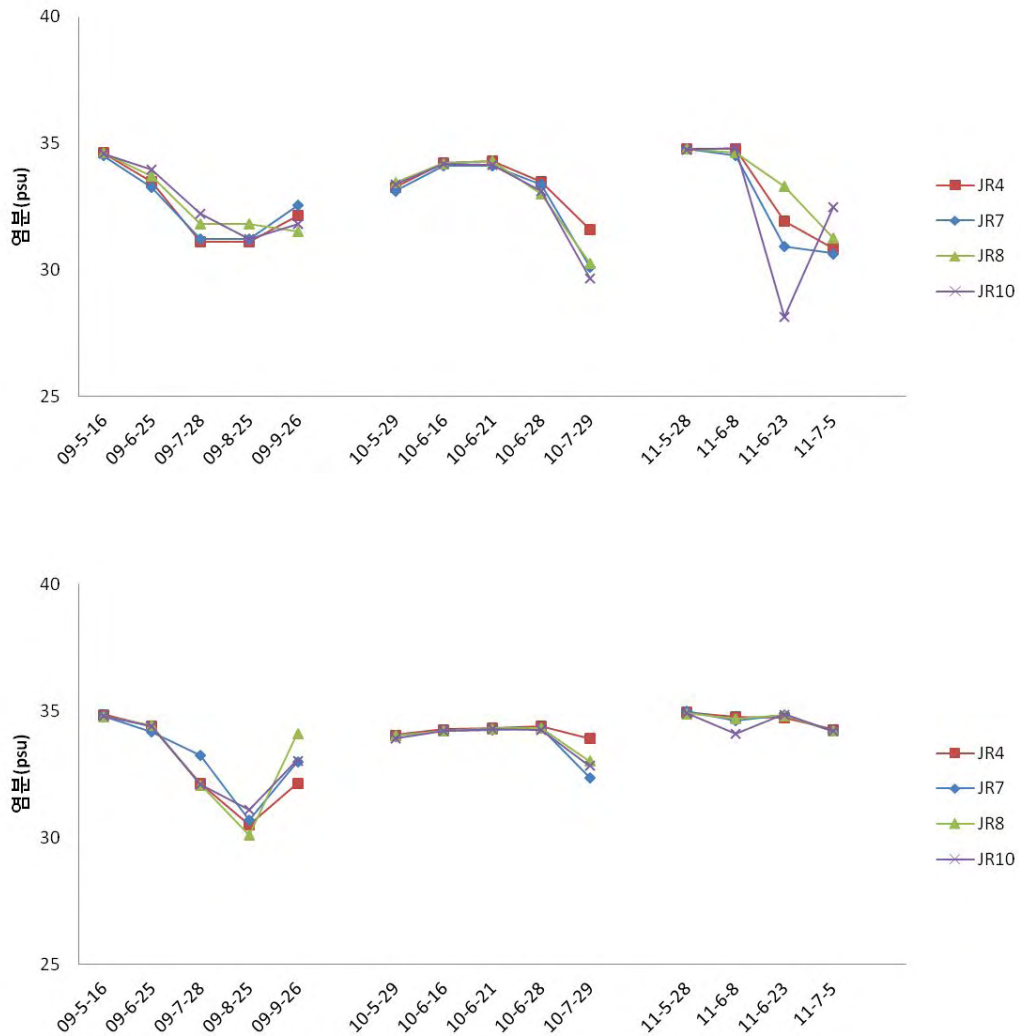


그림 54. 2009년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 염분 변화  
(상: 표층염분변화, 하: 저층염분변화).

㉠ 용존산소

○ 2009년 5월 표층 분포를 보면 자란만 전 해역에서 약 7.8 mg/L~8.0 mg/L로 용존산소가 풍부하게 분포하였다. 저층을 보면 외측에서 7.6 mg/L의 값을 보이며 자란도 우측에서 7.0 mg/L로 가장 낮게 나타났다(그림 55).

○ 6월의 표층 분포를 보면 자란도 좌측에서 8.0 mg/L 이상의 높은 용존산소 값을 보이며 외측인 입구 부근에서 7.2 mg/L로 나타났다. 저층의 분포를 보면 표층에서 상대적으로 높게 나타난 자란도 좌측의 해안선 부근에서 가장 낮은 4.0 mg/L의 빈산소 값을 보였으며 자란도 안쪽의 우측에서 7.6 mg/L로 가장 높게 나타났다(그림 55).

○ 7월의 표층 분포를 보면 자란도 좌측에서 7.2 mg/L 용존산소 값을 보이며 자란도 우측으로 갈수록 감소하여 6.8 mg/L 의 값을 보였다. 저층의 분포를 보면 전체적으로 6월보다 약 2.0 mg/L 가 낮아졌다. 자란도의 좌측에서 상대적으로 높은 5.2 mg/L 이상의 값을 보였으며 자란도의 우측에서 2.6 mg/L 이하의 빈산소 수피가 나타났다(그림 55).

○ 8월의 표층 분포를 보면 내측인 자란도 부근에서 상대적으로 높은 7.2 mg/L 용존산소 값을 보이며 외측인 입구 부근으로 가면서 감소하여 6.4 mg/L 의 값을 보였다. 저층의 분포를 보면 자란도의 좌측에서 6.0 mg/L 이상의 값이 나타났고 자란도의 우측에서 4.0 mg/L 이하의 낮은 값이 나타났다(그림 55).

○ 9월의 표층 분포를 보면 자란만의 중심역에서 최소값인 4.3 mg/L의 링(ring)을 기준으로 원을 그리며 내측 및 외측으로 점점 증가하여 7.0 mg/L 이상의 값이 해안선 부근에서 나타났다. 이는 저층의 낮은 용존산소가 표층으로 올라와 나타난 결과라 생각한다. 저층을 보면 외측의 동부해안선 부근에서 7.0 mg/L 이상의 높은 값을 보였으며 자란도의 우측 해안선 부근에서 가장 낮은 5.0 mg/L가 나타났다(그림 55).

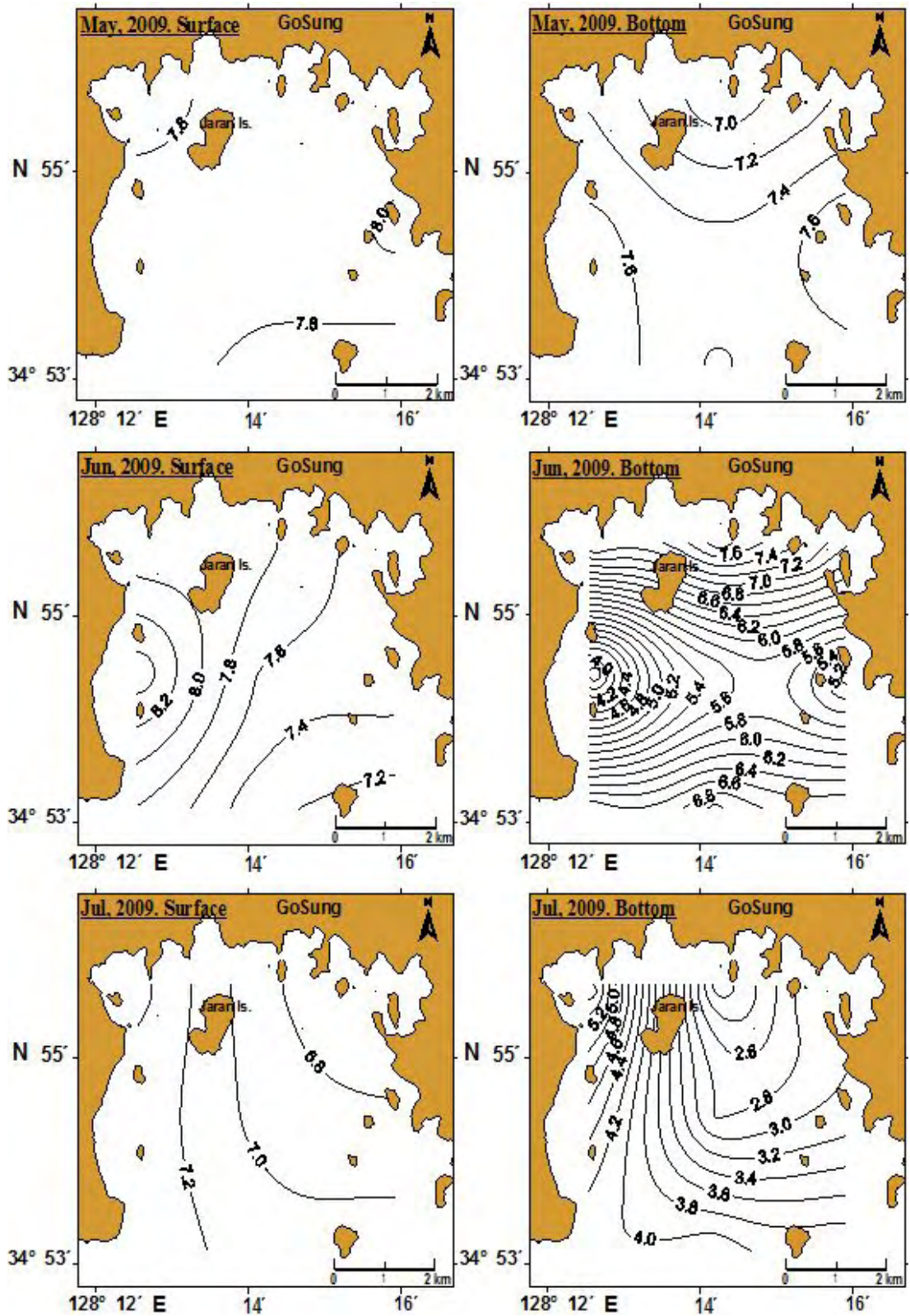


그림 55. 자란만 표층 및 저층의 용존산소 수평분포도(mg/L).

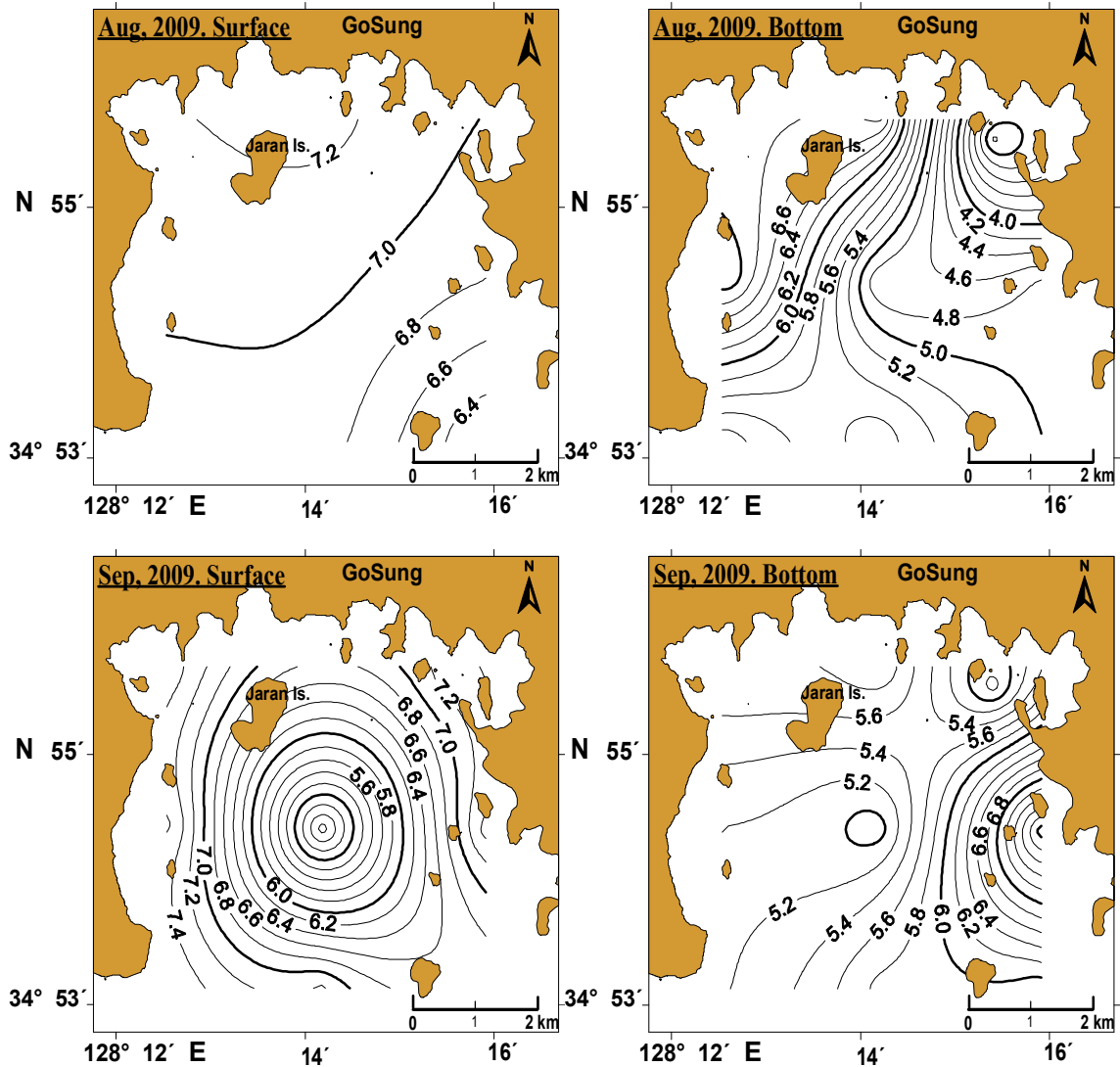


그림 55. 계속.

○ 2010년 자란만의 용존산소는 표층에서 5월부터 6월까지 정점간의 변화가 거의 없었으나, 7월에는 만 안쪽에 위치하는 정점 7과 10에서 6.18 mg/L와 6.75 mg/L로 낮은 농도를 보였다. 저층은 준계에서 하계로 갈수록 크게 낮아지는 경향으로 6월과 7월에는 대부분 정점에서 저산소화가 뚜렷이 나타났다. (그림 56).

○ 2011년 표층의 용존산소는 6.95~7.37 mg/L 범위로 전 조사기간 동안 일정하였으며 7월 조사기간 중 저층은 각 정점간의 용존산소 차이가 3.16~6.92 mg/L 범위로 큰 차이를 보였다.

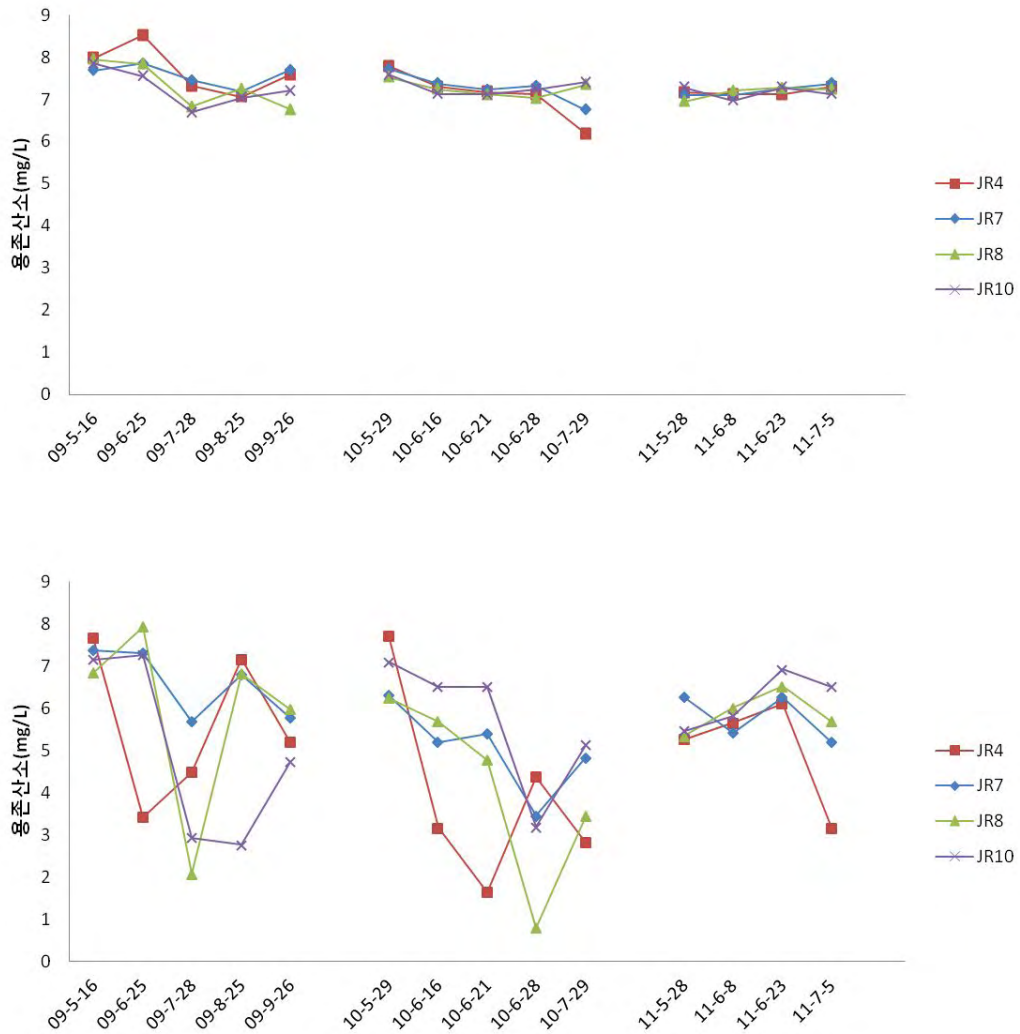


그림 56. 2010년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 용존산소 변화  
(상: 표층, 하: 저층).

② 영양염류 (Raw data 부록 참조)

○ 정기조사에 따른 용존태 무기 질소(DIN)는 전 조사 기간 동안 표층은 0.08 ~2.68  $\mu\text{M}$  의 범위, 저층은 0.03~7.84  $\mu\text{M}$ 의 범위였다. 평균은 2010년의 경우 표층과 저층의 평균값이 1.17  $\mu\text{M}$ , 1.38  $\mu\text{M}$  이었고, 2011년의 경우 표층과 저층의 평균값은 0.76  $\mu\text{M}$ , 1.33  $\mu\text{M}$  이었다. 2011년에 비해서 2010년의 값이 좀 더 높은 경향을 보였다(그림 57).

○ 정기조사에 따른 용존태 유기 질소(DON)는 전 조사 기간 동안 표층은 0.21~2.80  $\mu\text{M}$  의 범위, 저층은 0.05~1.64  $\mu\text{M}$ 의 범위였다. 평균은 2010년의 경우 표층과 저층의 평균값이 0.60  $\mu\text{M}$ , 0.34  $\mu\text{M}$  이었고, 2011년의 경우 표층과 저층의 평균값은 0.99  $\mu\text{M}$ , 0.89  $\mu\text{M}$  이었다. 2010년에 비해서 2011년의 값

이 좀 더 높은 경향을 보였다(그림 57).

○ 용존태 총질소(DTN)의 경우 전체 분포의 DIN : DON의 비가 표층에서 약 7 : 93 에서 88 : 12 까지 다양한 분포를 나타 내었고, 평균은 55 : 45 의 비율을 보였다. 저층에서는 약 3 : 97 에서 97 : 3 까지 분포를 보였고, 평균 은 65 : 35 였다. 2010년은 DIN의 평균 비가 표층, 저층에서 약 66%, 80 % 로 DON보다 DIN이 높은 경향을 나타냈고, 2011년은 DIN의 비가 표층, 저층 에서 약 43%, 47% 로 DON이 DIN 보다 높은 경향을 보였다.

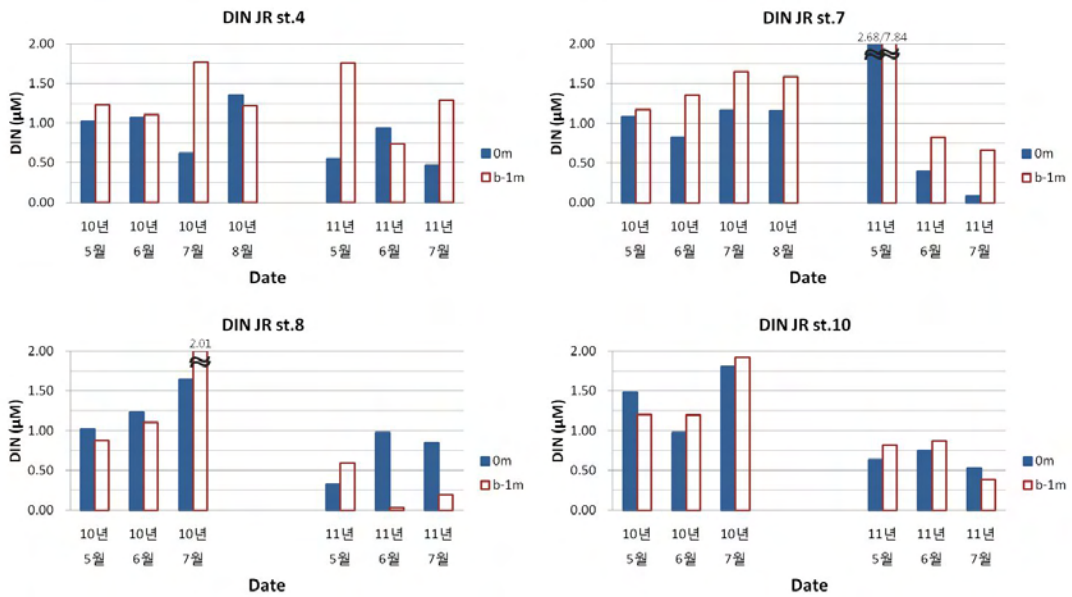


그림 57. 2010년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 용존태 무기 질소(DIN)의 변화.

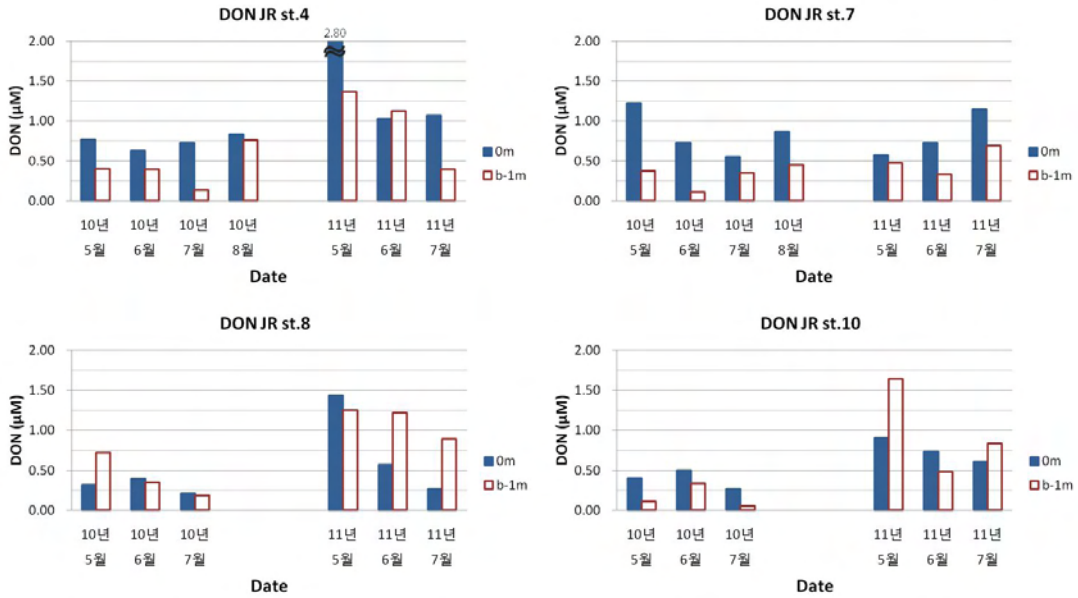


그림 58. 2010년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 용존태 유기 질소(DON)의 변화.

○ 정기조사에 따른 용존태 무기 인(DIP)은 전 조사 기간 동안 표층은 0.09~1.62  $\mu\text{M}$  의 범위, 저층은 0.02~1.81  $\mu\text{M}$ 의 범위였다. 평균은 2010년의 경우 표층과 저층의 평균값이 0.90  $\mu\text{M}$ , 0.82  $\mu\text{M}$  이었고, 2011년의 경우 표층과 저층의 평균값은 0.47  $\mu\text{M}$ , 0.48  $\mu\text{M}$  이었다. 2011년에 비해서 2010년의 값이 좀 더 높은 경향을 보였다. (그림 59).

○ 정기조사에 따른 용존태 유기 인(DOP)은 전 조사 기간 동안 표층은 0.03~0.56  $\mu\text{M}$  의 범위, 저층은 0.03~0.52  $\mu\text{M}$ 의 범위였다. 평균은 2010년의 경우 표층과 저층의 평균값이 0.21  $\mu\text{M}$ , 0.27  $\mu\text{M}$  이었고, 2011년의 경우 표층과 저층의 평균값은 0.23  $\mu\text{M}$ , 0.20  $\mu\text{M}$  이었다. 2010년과 2011년의 값이 비슷한 경향을 보였다. (그림 60).

○ 용존태 총인(DTP)의 경우 전체 분포의 DIP : DOP의 비가 표층에서 약 20 : 80 에서 95 : 5 까지 다양한 분포를 나타 내었고, 평균은 69 : 31 의 비율을 보였다. 저층에서는 약 11 : 89 에서 93 : 7 까지 분포를 보였고, 평균은 65 : 35 였다. 2010년은 DIP의 평균 비가 표층, 저층에서 약 74%, 63 % 로 DOP보다 DIP가 높은 경향을 나타냈고, 2011년은 DIP의 비가 표층, 저층에서 약 63%, 66% 로 2010년과 동일하게 DIP가 높은 경향을 보였다.

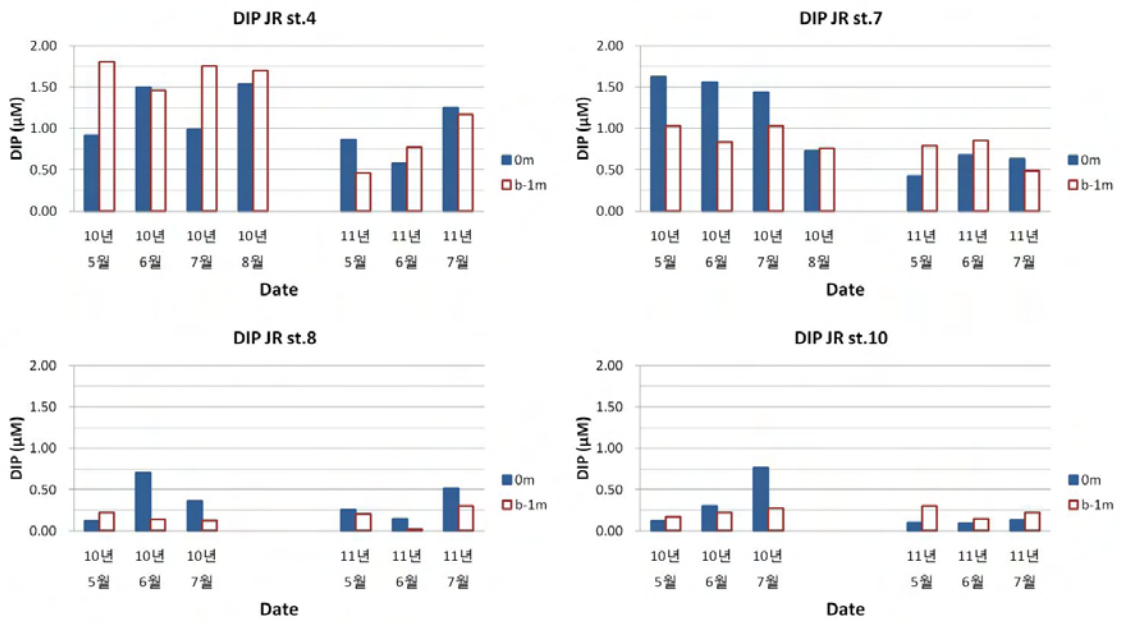


그림 59. 2010년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 용존태 무기 인(DIP)의 변화.

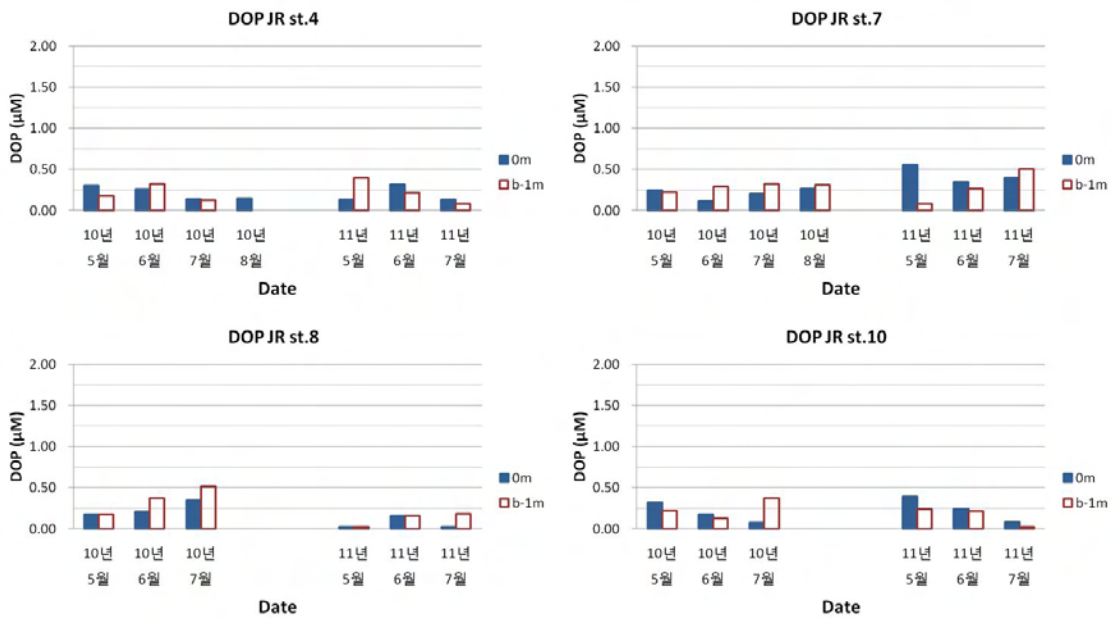


그림 60. 2010년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 용존태 유기 인(DOP)의 변화.



○ 정기조사에 따른 용존태 규산염(DSi)은 전 조사 기간 동안 표층은 0.13~13.51  $\mu\text{M}$  의 범위, 저층은 1.15~12.98  $\mu\text{M}$ 의 범위였다. 평균은 2010년의 경우 표층과 저층의 평균값이 6.39  $\mu\text{M}$ , 7.77  $\mu\text{M}$  이었고, 2011년의 경우 표층과 저층의 평균값은 4.40  $\mu\text{M}$ , 7.36  $\mu\text{M}$  이었다. 2010년과 비해서 2011년의 값이 비슷하였지만, 2011년의 표층의 평균이 낮은 경향을 보였으며, 하계로 갈수록 증가하는 경향을 나타내었다(그림 61).

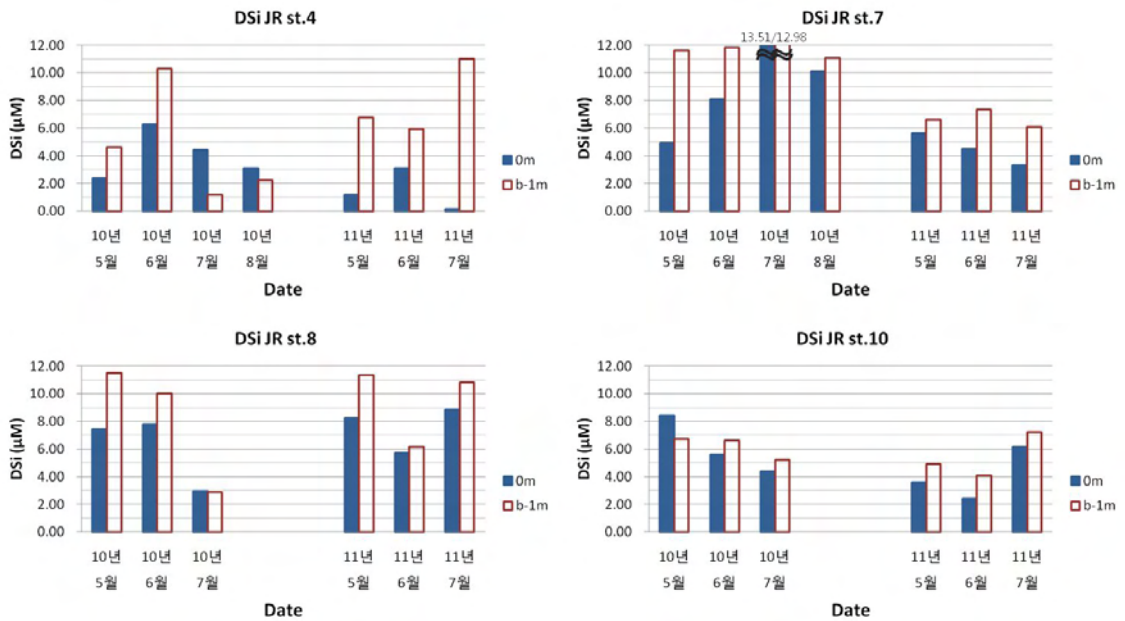


그림 61. 2010년~2011년 정기조사에 따른 자란만의 용존태 규산염(DSi)의 변화.

### ③ 식물플랑크톤

○ 2010년 5월 식물플랑크톤을 동정한 결과 총 46종 중 와편모조류는 16종, 규조류는 30종이 출현하였다. 와편모조류의 세포밀도는 300~800 cells/L였고, 규조류는 2,150~5,000s cell/L로 나타났다. 정점별로는 와편모조류의 경우 정점 4에서, 규조류는 정점 7과 10에서 다른 정점에 비하여 낮은 세포밀도를 보였다. 우점종으로는 규조류 *Leptocylindrus adriaticus*가 약 1,000 cells/L로 전체 21.39%를 차지하여 최우점종으로 나타났다. 다음으로 *Rhizosolenia fragilissima*는 640 cells/L로 14.17%에 해당하여 차우점종으로 나타났다. 그 외 *Skeletonema costatum*, *Alexandrium* spp, *Chaetoceros costatus*, *Chaetoceros lorenzianus*, *Leptocylindrus danicus*, *Lauderia borealis* 등이 빈번하게 출현하였다. 하지만 *C. polykrikoides*의 영양세포는 발견되지 않았다.

○ 6월의 식물플랑크톤을 동정한 결과 35종 중 와편모조류는 17종, 규조류는 18종이 출현하였다. 와편모조류의 세포밀도는 930~2,700 cells/L였고, 규조류는 약 50,000~190,000 cells/L로 나타나, 5월에 비해 증가하였다. 정점별로는 5월과 같이 와편모조류의 경우 큰 변화가 없었으나, 규조류는 정점 7과 8에서 다른 정점에 비하여 비교적 낮은 세포밀도를 보였으며, 정점 4에서 최대 세포밀도를 보였다. 6월 우점종으로는 *Chaetoceros dydimus*가 출현종 중 41.56%에 해당하는 42,450 cells/L가 출현하여 최우점종으로, *Chaetoceros pseudocrinitus*가 11.52%로 차우점종으로 나타났다. 그 외 *Pseudonitzschia pungens*, *Chaetoceros difficilis*, *C. costatus*, *Leptocylindrus danicus*, *Thalassionema nitzschioides* 등이 출현하였다.

○ 7월 식물플랑크톤을 동정한 결과 총 42종이 출현하였는데, 그 중 와편모식물문 23종, 황갈조식물문은 19종이 출현하였다. 와편모조류의 세포밀도는 700~6,200 cells/L이며, 규조류는 약 600,000~2,000,000 cells/L로 나타나, 5월과 6월에 비해 증가하였다. 정점별로는 와편모조류의 경우 정점 7과 8에서, 규조류는 와편모조류가 적었던 정점 10에서 높았다. 7월의 우점종은 6월의 차우점종인 *C. pseudocrinitus*가 307,750 cells/L로 28.67%에 해당하여 최우점종이었다. 그리고 *C. costatus*는 158,937 cells/L로 25.05%에 해당하여 차우점종이었다. 그리고 출현 빈도가 높은 종들은 다른 시기와 다르게 대부분 *Chaetoceros* 속으로 나타났다. *C. polykrikoides*의 영양세포는 정점 4, 7, 8, 10에서 226, 34, 132와 110 cells/L의 밀도로 6월보다 세포밀도가 증가하였다.

○ 2011년 5월에는 총 42종의 식물플랑크톤이 동정되었고, 이 중 규조류가 31종, 와편모조류는 11종이었다. *Chaetoceros paradoxum*이 33.24%로 우점종으로 나타났으며 *Chaetoceros affinis*가 차우점종이었으며, *Leptocylindrus danicus*도 다수 관찰되었다. 수층별 현존 밀도는 표층의 밀도가 저층의 밀도보다 높았지만 정점 7에서는 저층의 밀도가 더 높았고 정점 10의 경우는 표층과 저층의 현존 밀도가 비슷하게 관찰되었다. 현존량은 정점 8에서 표층 405,800cells/L, 저층 289,500cells/L로 가장 높았으며, 정점 10에서 표층 229,450cells/L와 저층 242,450cells/L로 가장 낮았다. 전체적으로 정점 8을 제외한 모든 정점에서 비슷한 종조성과 현존량을 보여주었으며, 규조류의 비율이 99.58%로 높았고 와편모조류는 0.41%의 낮은 비율로 나타났다.

○ 6월에는 총 46종의 식물플랑크톤이 동정되었고, 이 중 규조류가 26종, 와편모조류가 20종으로 관찰되었다. *Chaetoceros didymus*가 우점종으로 나타났으며 *Chaetoceros danicus*가 차우점종이었으며, *Chaetoceros costatus*도 다수 관찰되었

다. 전체적으로 *Chaetoceros*속의 생물이 우점하는 경향을 보였으며, *Asterionella glacialis*도 다수 관찰되었다. 수층별로는 표층의 밀도가 저층의 밀도보다 높았으며, 현존량은 정점 4에서 표층 609,675cells/L, 저층 523,800cells/L로 가장 높았으며, 정점 10에서 표층 552,500cells/L과 저층 432,900cells/L로 낮았지만 각 정점 당 큰 차이를 보이지는 않았다. 전체적으로 모든 정점에서 비슷한 종 구성과 현존량을 보여주었으며, 특히 규조의 비율이 99.77%로 높았고 와편모조는 0.22%의 낮은 비율로 나타났다.

○ 7월에는 44종의 식물플랑크톤이 관찰되었으며, 그 중 와편모조류가 15종, 29종이 규조류였다. *Chaetoceros pseudocurvisetus*가 우점종으로 나타났으며, *Pseudonitzschia pungens*가 차우점종 이었다. 표층과 저층의 현존밀도는 한 정점 안에서 큰 차이를 보여주지 않았으며, 정점 10을 제외한 나머지 정점들은 비슷한 현존밀도를 보여주었다. 현존량은 정점 4에서 표층 372,800cells/L, 저층 367,350cells/L 로 가장 높게 나타났으며 정점 10에서 257,600cells/L, 저층 264,750cells/L로 낮게 관찰되었다. 와편모조류의 비율이 0.51%로 낮게, 규조류의 비율이 99.48%로 높게 나타났으며 *Chaetoceros*속의 다양한 종들이 식물플랑크톤 조성의 대부분을 차지하였다. 7월 들어서 5, 6월에서 관찰되지 않던 *C. polykrikoides* 발아체가 관찰되기 시작하였다.

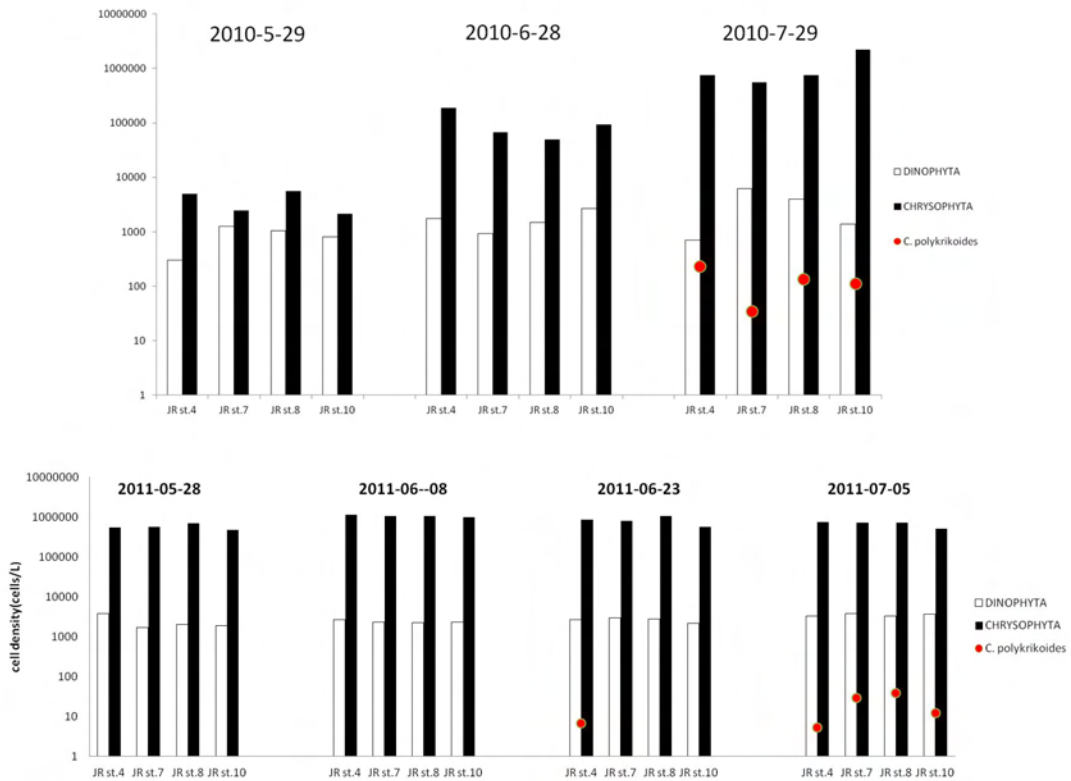


그림 62. 2010~2011년 자란만 해역의 월별 식물플랑크톤과 *C. polykrikoides* 현존량 변화.

④ Real-time PCR을 이용한 *C. polykrikoides*의 휴면포자 분포 및 발아체 조사  
 ○ 자란만 정점에서 *C. polykrikoides* 발아체의 출현과 휴면포자 현존량의 변동을 조사한 결과, *C. polykrikoides* 휴면포자는 정점 7에서 6월~8월까지 증가추세를 보이다가 9월 이후에는 감소하였다(그림 63). 2009년에서 2011년까지의 전체적인 추이를 살펴보면 2009년에는 6월 ~ 8월로 가면서 저질층의 휴면포자가 증가하는 것을 볼 수 있고, 2010년 5월 ~ 7월로 가면서 휴면포자의 양이 감소하는 것을 볼 수 있다. 2011년에는 전체 정점에서 휴면포자가 검출되지 않았다.

○ *C. polykrikoides* 발아체는 2010년의 경우 저질상의 휴면포자가 줄어들면서 수층의 발아체량이 증가하는 것을 볼 수 있다(그림 63). 또한, 직접 계수했을 때와 real-time PCR을 이용하여 관찰한 결과가 수치상의 차이는 존재하지만 전체적인 추이는 비슷한 것을 볼 수 있다.

○ 2010년에는 6월 25일부터 시작된 장마가 7월 중순에 그치고 정상 날씨로 되돌아오자 7월 29일에 표층 및 저층에서 최대농도(226.8 cells/L, 66 cells/L)를 나타내었고, DNA 분석에서도 7월 29일에 최대농도(100 cells/L, 47 cells/L)를 나타내었다. 2011년에는 6월 ~ 7월로 넘어가는 시기에 저층에서

발아체가 검출되다가 시간이 경과함에 따라 표층에서 발아체가 검출되는 양상을 볼 수 있었다.

○ 2009년 ~ 2011년 사이의 휴면포자와 발아체의 출현은 휴면포자량이 줄어들면서 영양세포가 늘어나는 관계를 보였고, 그 교차 시기는 대체로 6월 중인 것을 나타냈다.

○ 현미경을 통해 계수한 값과 real-time PCR 방법으로 정량 값을 비교하면, 두 방법에 의해 검출된 발아체의 증가와 감소의 패턴이 유사하기 때문에 두 방법 모두 *C. polykrikoides*의 발아체를 탐색하는데 유용한 수단임을 알 수 있다. 그리하여 자란만보다 발아체의 발생시기가 1~2개월 늦은 사량도 및 남해미조면 일대, 육지도 해역을 대상으로 조사정점을 이동하여 계속 관측을 실시하였다.

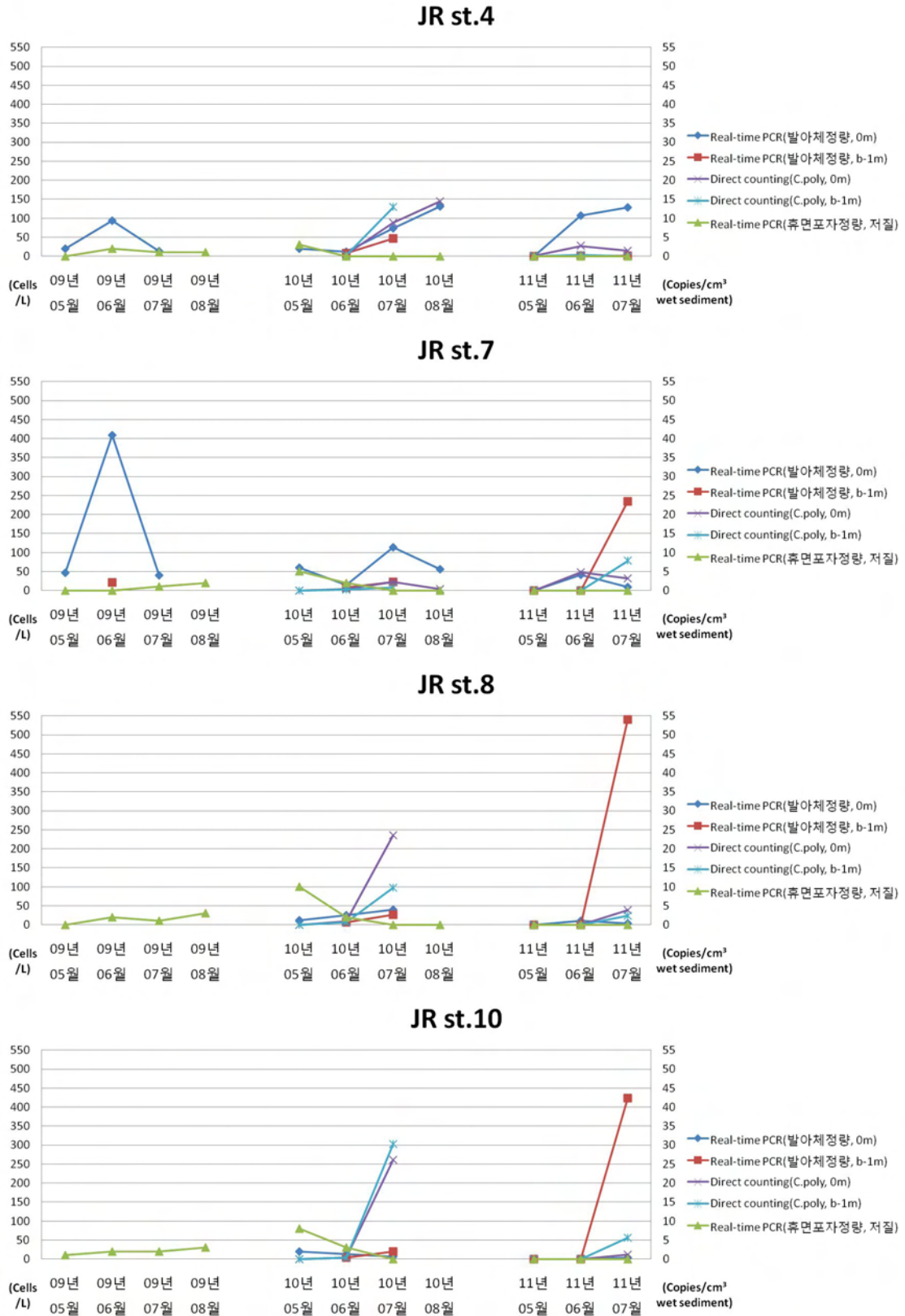


그림 63. 2009년 ~ 2011년 정기조사에 따른 자란만 *C. polykrikoides*의 휴면포자 및 현장 발아체 정량.

(나) 사랑도

① 수심, 수온, 염분 및 용존산소

○ 사랑도의 수심은 조사 정점 간 큰 차이가 없었으며, 평균 깊이 14.45m 인 수괴로 나타났다.

○ 2010년 사랑도의 표층수온은 25℃, 저층수온은 19℃로 모든 정점이 거의 일정하였으며, 표층과 저층의 사이에 약 6℃ 차이가 나타났다(표 16). 같은 시기 2011년의 측정결과는 2010년과 비교했을 때 전체적으로 큰 변화가 없었다. 염분 또한 2010년과 2011년 양년 간 조사에서 표층에서 32 psu, 저층에서 34 psu로 공간적인 차이는 없었다(표 16).

○ 표층 용존산소는 7.20~7.49 mg/L, 저층은 4.18~5.81 mg/L의 범위를 보였다. 표층이 저층보다 용존산소가 높게 나타났지만, 그 차이는 7월보다 8월의 경우가 뚜렷하였다(표 16).

표 16. 사랑도 정기조사 관측 결과

날짜	정점(st.)	수온 (℃)		염분(‰)		pH		DO		투명도
		표층	저층	표층	저층	표층	저층	표층	저층	
2010	SR st.1	24.86	19.06	32.24	34.34	8.34	8.04	7.33	5.06	5
/7/2	SR st.4	24.67	19.80	32.47	34.23	8.36	8.09	7.49	5.02	5
7	SR st.2	24.35	19.08	32.77	34.34	8.33	8.13	7.35	5.81	5
2010	SR st.1	25.42	18.88	31.58	34.15	8.33	7.99	7.30	4.18	8
/8/2	SR st.2	25.22	18.92	31.68	34.24	8.30	7.98	7.20	4.49	9
7	SR st.3	25.18	19.00	31.69	34.07	8.31	7.99	7.26	4.19	8
	SR st.4	24.91	18.85	31.83	34.24	8.30	7.98	7.20	4.49	8
2011	SR st.1	24.16	19.22	34.23	34.27	8.34	8.31	7.30	3.16	6
/7/2	SR st.2	24.66	20.08	34.20	34.21	8.32	8.33	7.37	5.20	5.5
1	SR st.3	23.56	20.21	34.11	34.21	8.44	8.48	7.24	5.69	5
	SR st.4	23.87	19.66	34.17	34.22	8.42	8.38	7.13	6.51	6
2011	SR st.1	24.51	20.51	33.51	32.87	8.09	7.36	6.73	6.31	5.5
/8/0	SR st.2	24.64	20.21	33.23	32.52	8.04	7.94	6.92	5.98	6
5	SR st.3	24.31	19.89	33.17	32.21	8.01	7.91	6.98	5.89	5
	SR st.4	24.41	20.02	33.31	32.29	8.04	7.95	7.02	6.03	5

② 식물플랑크톤 중 조성 및 현존량

○ 2010년 8월 27일 사랑도의 식물플랑크톤을 동정한 결과, 38종의 식물플랑크톤이 출현하였다. 그 중 10종이 와편모조류이었고, 28종이 규조류이었다. 현존량은 정점 4를 제외하고는 큰 차이가 없었다. 와편모조류와 규조류의 현존량은 각각 400~3,400 cells/L, 8,000~15,000 cells/L의 범위로 나타났다(그림 64). 우점종으로는 *Chaetoceros costatus*가 1,700 cells/L로 전체 식물플랑크톤 중 14.57%를 차지하여 최우점종으로 나타났다. *Leptocylindrus danicus*는 10.71%(1,250 cells/L)로 차우점종이었다. 그 외에 *Chaetoceros* 속의 *C. brevis*와 *C. mitra*가 다수 관찰되었다. *C. polykrikoides*의 영양세포는 관찰되지 않았다.

○ 2011년 7월에 사랑도에서는 총 32종의 식물플랑크톤이 동정되었고, 이중 규조류는 18종, 와편모조류는 14종이었다. 우점종은 *Pseudo-nitzschia pungens*이었고 차우점종은 *Chaetoceros curvisetus*이었으며 다양한 *Chaetoceros*속들이 다수 관찰되었다. 수층별 현존 밀도는 표층이 저층보다 높은 경향을 보였으며, 정점 간 현존량 변화는 표층과 저층이 유사하였다. 현존량은 정점 3에서 표층 459,350 cells/L, 저층 307,050 cells/L로 가장 높았으며, 정점 1에서 표층 415,150 cells/L, 저층 295,650 cells/L로 가장 낮았다. 전체적으로 조사해역 내 현존량의 정점 간 차이는 크지 않았다. 분류군 별로 규조류가 99.35%를 차지하였으며 와편모조류가 0.64%를 차지하였다.

○ 8월에는 총 43종이 동정되었고 이중 규조류는 19종이었으며 와편모조류는 24종이었다. 이중 우점종은 *Chaetoceros pseudocurvisetus* 였으며 차우점종은 *Chaetoceros pseudocrinitus* 였으며, 이외에도 다양한 *Chaetoceros* 속이 다수 관찰되었다. 수층별 현존밀도는 표층의 밀도가 저층보다 높았으나, 정점 3의 경우 저층의 밀도가 표층보다 높았다. 가장 높은 현존량을 보인 곳은 정점 3으로 표층은 651,600 cells/L, 저층은 666,500 cells/L의 현존량을 보여주었으며, 정점 4에서 표층 417,500 cells/L, 저층 380,500 cells/L 의 현존량으로 가장 낮은 수치로 관찰되었다. 분류군별 종조성비는 규조류가 98.66%를 차지하였으며 와편모조류는 1.43%를 차지하였다.



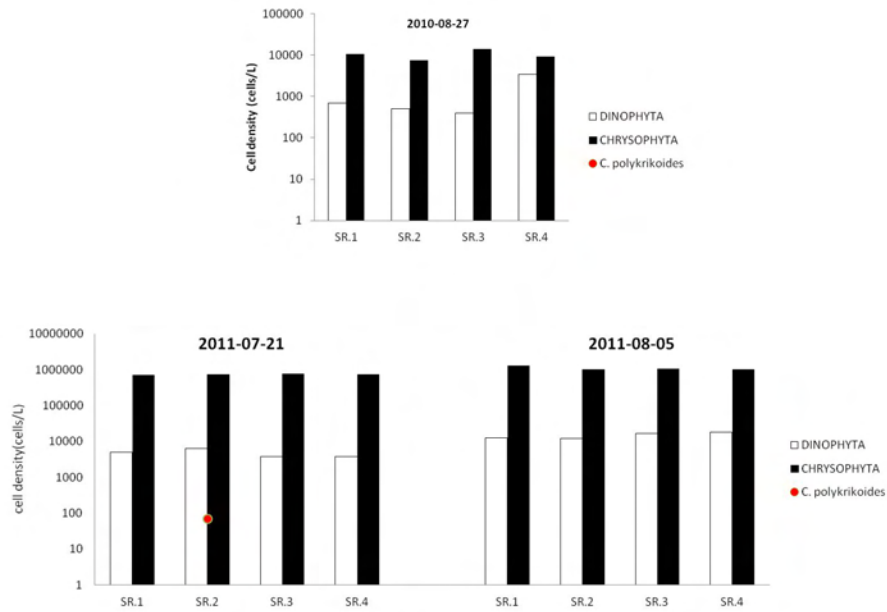


그림 64. 2010~2011년 사랑도 식물플랑크톤 및 *C. polykrikoides*의 현존량.

### ③ Real-time PCR을 이용한 *C. polykrikoides* 발아체 조사

○ *C. polykrikoides* 발아체의 출현을 직접 계수를 통해 조사한 결과, 약 11 cells/L의 세포밀도를 보였으며, real-time PCR 방법으로 정량할 경우 약 16 cells/L이 검출되었다(그림 66.). 2010년의 8월 29일 조사에서는 real-time PCR 방법으로만 정량하였으며, 정점 2에서 최대값(22 cells/L)을 나타내었다. 2011년의 조사에서는 저질과 해수 모두에서 휴면포자 및 발아체의 검출은 없었다.

○ 직접 계수한 것과 real-time PCR 방법으로 정량값을 비교하면 발아체가 증가와 감소의 패턴은 두 방법이 유사하기 때문에 두 방법 모두 *C. polykrikoides*의 발아체를 탐색하는데 유용한 수단임을 알 수 있다.

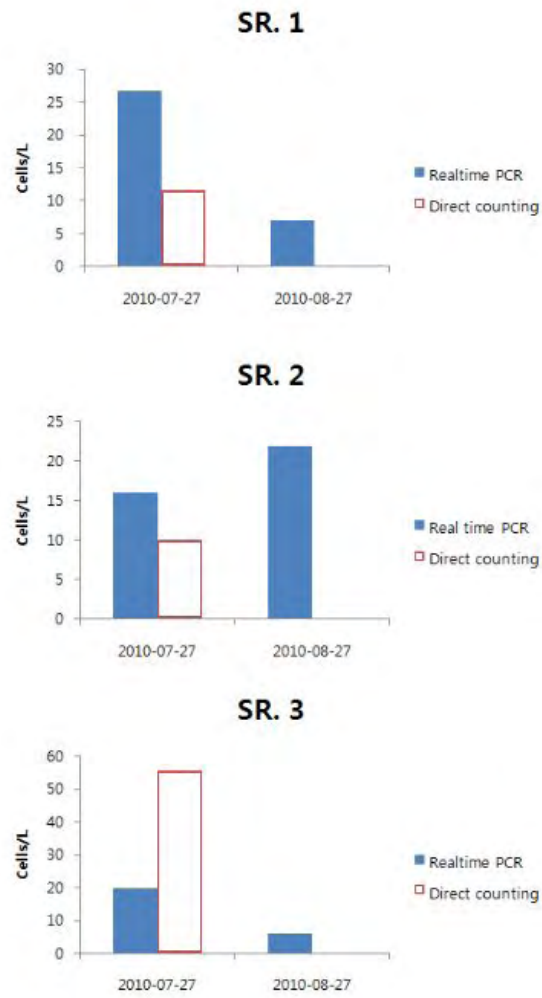


그림 65. Real-time PCR을 이용한 2010년 사랑도 *C. polykrikoides*의 발아체 정량.

(다) 미조

① 수심, 수온, 염분 및 용존산소

○ 미조면은 수심 16~24m 깊이의 정점이었으며, 앞서의 자란만과 사랑도에 비해 조금 더 깊은 지역이었다.

○ 미조면의 표층수온은 22.73~25.80℃, 저층수온은 17.29~24.41℃로 표층수온이 저층수온보다 낮게 나타났다. 8월 11일 저층 수온을 제외한 모든 관측 시 정점간 큰 차이를 보이지 않았다(그림 66).

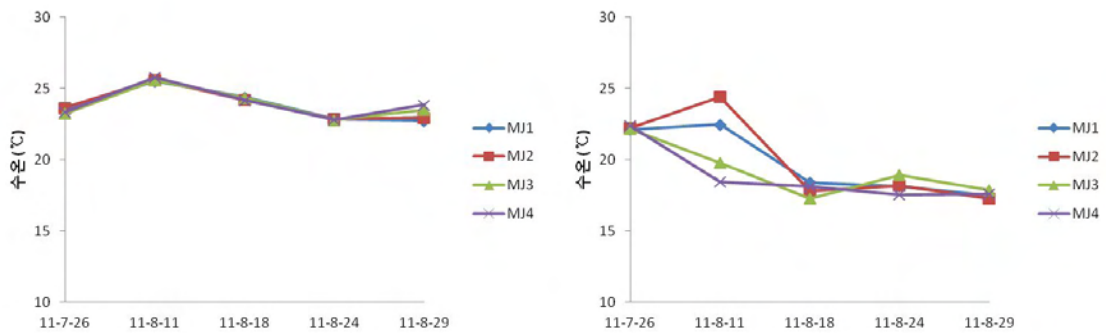


그림 66. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 수온 변화(좌: 표층, 우: 저층).

○ 미조면의 염분은 표층이 27.79~33.44 psu 범위로 측정되었으며 저층은 32.38~34.93 psu로 저층이 표층보다 안정적인 경향을 보였다.(그림 67)

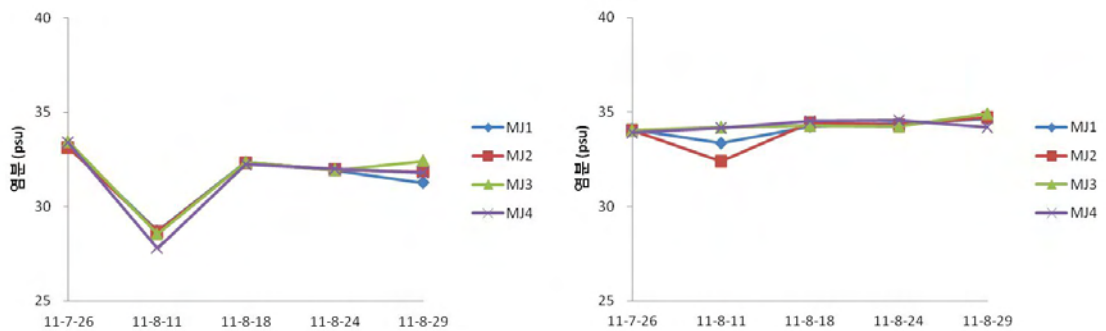


그림 67. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 염분 변화(좌: 표층, 우: 저층).

○ 표층 용존산소는 4.52~6.86 mg/L, 저층은 1.45~5.16 mg/L로 나타났다. 표층과 저층의 용존산소는 3 mg/L 정도 차이가 났으며 저층에 비해 표층의 용존산소 농도가 높았다(그림 68).

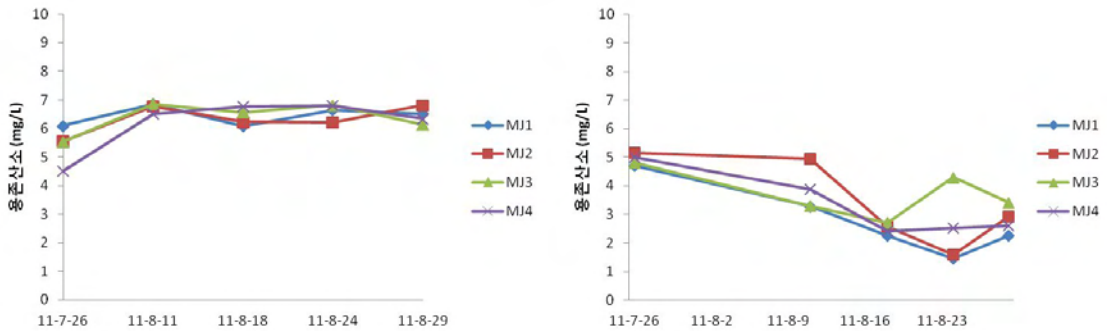


그림 68. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 용존산소 변화(좌: 표층, 우: 저층).

② 영양염류

○ 조사기간 중 미조 정점의 용존태 무기 질소(DIN)는 전 조사 기간 동안 표층 0.87~1.97  $\mu\text{M}$ , 저층 0.85~1.95  $\mu\text{M}$  범위로 나타났으며, 표층 DIN의 평균값은 1.67  $\mu\text{M}$ , 저층의 평균값은 1.31  $\mu\text{M}$ 이었다. 저층은 조사 초기부터 증가하여 조사 중 감소하다 증가하였고 표층은 두 번째 조사 시 최솟값 (1.98  $\mu\text{M}$ )을 나타낸 후 안정된 값을 나타내었다(그림 69).

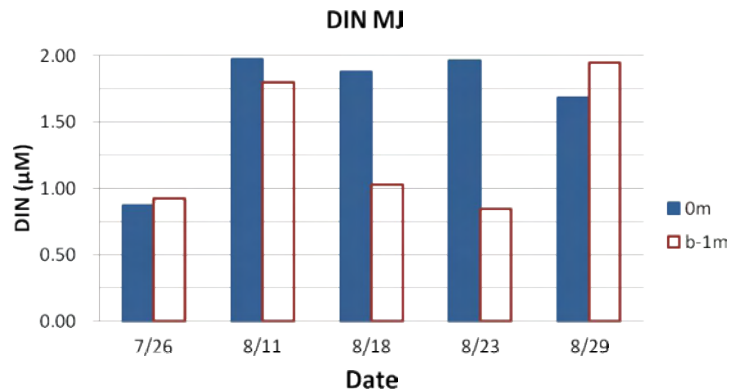


그림 69. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 용존태 무기 질소 (DIN)의 변화.

○ 용존태 유기 질소(DON)는 표층 0.04~0.66  $\mu\text{M}$ (평균 0.31  $\mu\text{M}$ ), 저층 0.12~1.59  $\mu\text{M}$ (평균 0.71  $\mu\text{M}$ ) 사이로 나타났다. 표층에서의 DON값은 감소하다가 증가하는 경향을 보였으며 저층에서의 DON값은 급격히 증가 후 점차 낮아졌다(그림 70).

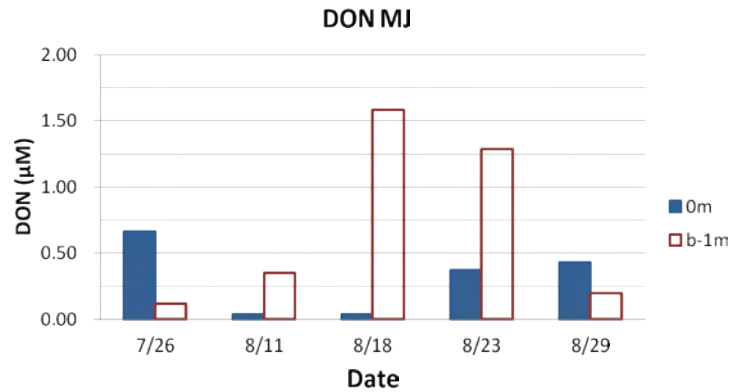


그림 70. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 용존태 유기 질소 (DON)의 변화.

○ 용존태 총질소(DTN)의 경우 전체 분포의 DIN : DON의 비가 표층에서 약 56 : 44 에서 98 : 2 까지 다양한 분포를 나타 내었고, 평균적으로 83 : 17 의 비율을 보였다. 저층에서는 약 39 : 61 에서 90 : 10 까지 분포를 보였고, 68 : 32 의 비율의 평균값을 보였다.

○ 용존태 무기 인(DIP)은 조사기간 동안 표층 0.01~0.53  $\mu\text{M}$ , 저층 0.06~0.69  $\mu\text{M}$  범위로 나타났다. 조사기간 중 표층의 DIP 의 평균값은 0.21  $\mu\text{M}$ 이었 으며 저층에서 DIP의 평균값은 0.31  $\mu\text{M}$  이었다.

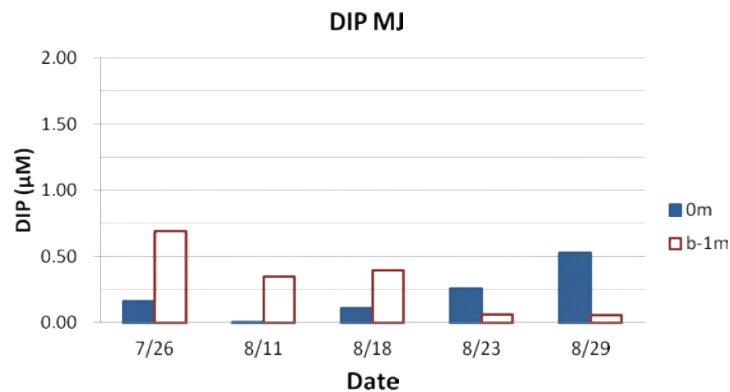


그림 71. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 용존태 무기 인 (DIP)의 변화.

○ 용존태 무기 인(DIP)은 표층 0.03~0.38  $\mu\text{M}$ , 저층 0.08~0.38  $\mu\text{M}$  범위로 나타났다. 조사기간 중의 표층의 평균값은 0.15  $\mu\text{M}$ 이었으며 저층의 평균값 은 0.19  $\mu\text{M}$  였다. 전 조사기간 중 대체적으로 낮은 값을 보여주었다.

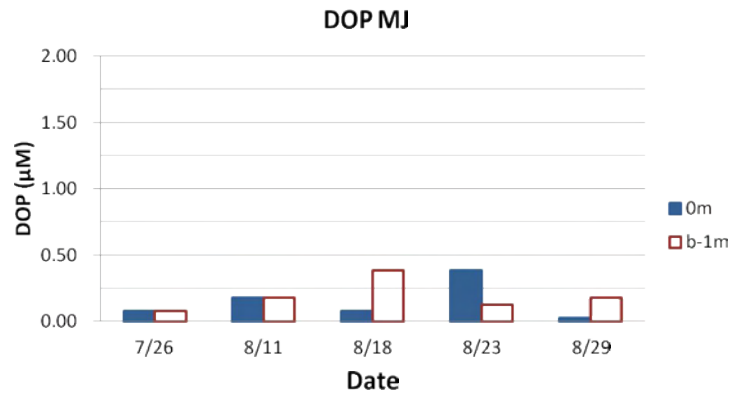


그림 72. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 용존태 유기 인 (DOP)의 변화.

○ 용존태 총인(DTP)의 경우 전체 분포의 DIP : DOP의 비가 표층에서 약 3 : 97 에서 95 : 5 까지 다양한 분포를 나타 내었고, 평균은 53 : 47 의 비율을 보였다.

저층에서는 약 24 : 67 에서 89 : 11 까지의 DIP : DOP 비 분포를 보였고, 값의 평균적인 비는 52 : 48 였다.

○ 용존태 규산염(DSi)은 표층 0.54~10.63  $\mu\text{M}$  의 넓은 범위로 나타났는데 8월 11일 측정결과에서 10.63  $\mu\text{M}$  의 높은 값이 검출됐고, 저층은 1.35~9.24  $\mu\text{M}$  사이의 값이 나타났으며 조사기간 중 8월 11일 측정결과에서 9.24  $\mu\text{M}$  의 최댓값을 나타낸 후 점차 낮아지는 경향이 나타났다.

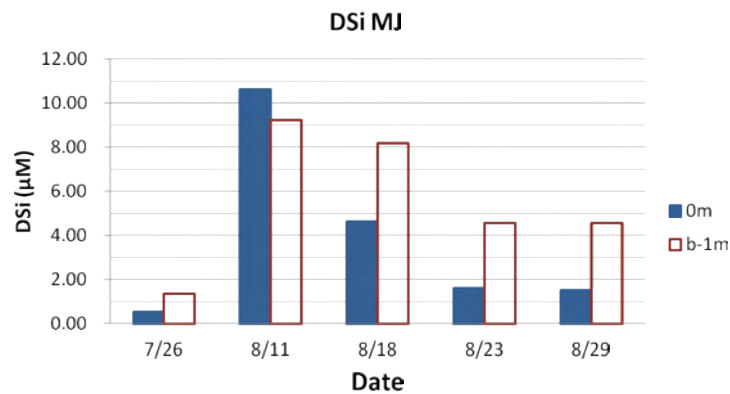


그림 73. 2011년 정기조사에 따른 미조면의 용존태 규산염 (DSi)의 변화.

③ 식물플랑크톤 종 조성 및 현존량

○ 2011년 7월 26일에는 모든 정점에서 총 41종이 동정되었고 이중 와편모조류는 16종, 규조류는 25종이었다. 우점종은 *Asterionella glacialis* (5,100~71,500 cells/L, 17.69%), 차우점종은 *Rhizosolenia fragilissima* (1,000~62,500 cells/L, 10.19%)이었다. 그 외에 *Chaetoceros* 속의 생물들이 다수 관찰되었으며, 현존량은 많지 않으나 다양한 와편모조류가 동정되었다. *C. polykrikoides*의 영양세포가 소량 관찰되었으며 수층별로는 표층보다 저층의 밀도가 높았다. 정점별로는 정점 1에서 표층 199,350 cells/L, 저층 268,350 cells/L 로 가장 높은 현존량을 보여주었으나 반면 정점 2에서 표층 67,050 cells/L, 저층 100,400 cells/L 의 현존량으로 가장 낮았다. 분류군별로는 규조류가 93.95%를 차지하였으며, 와편모조류가 6.14%의 종조성비를 차지하였다.

○ 8월 11일 총 41종의 식물플랑크톤이 동정되었고, 22종의 와편모조류가 동정되었고, 규조류는 19종이었다. 우점종은 *Chaetoceros pseudocurvisetus*였으며 차우점종은 *Skeletonema costatum*이었다. *Rhizosolenia fragilissima*, *Chaetoceros* 속의 다양한 종들도 다수 관찰되었다. 수층별 현존밀도는 표층이 저층보다 높은 경향을 보였으며, 정점별 조성형태는 표층과 저층이 유사하였다. 가장 높은 현존량을 보인 곳은 정점 3으로, 표층 1,002,650 cells/L, 저층 771,050 cells/L 이었다. 반면, 정점 4에서는 표층 671,950 cells/L, 저층 560,400 cells/L로 가장 낮았다. 분류별로는 규조류가 98.96%의 조성비를 차지하였으며, 와편모조류가 1.1%를 차지하였다.

○ 8월 18일 미조에서는 38종의 식물플랑크톤이 동정되었고 이중 와편모조류는 8종, 규조류는 30종이었다. *Skeletonema costatum*이 우점종으로 나타났으며 *Chaetoceros pseudocurvisetus*가 차우점종으로 나타났다. 수층별로는 저층보다 표층의 밀도가 높았으며 정점별로는 유사한 경향을 나타내었다. 정점 3이 표층 477,250 cells/L, 저층 381,000 cells/L로 가장 높은 현존량을 나타내었다. 각 정점사이에 큰 차이는 없었으나 정점 2에서 표층 430,450 cells/L, 저층 353,550 cells/L로 비교적 적은 현존량을 보였다. 전체 식물플랑크톤 중 와편모조류의 종조성비는 0.31% 였으며 99.68%의 대부분을 규조류가 차지하였다.

○ 8월 24일 총 41종의 식물플랑크톤이 동정되었고 이중 와편모조류는 17종, 규조류는 26종이었다. 우점종은 *Chaetoceros pseudocurvisetus*, *Chaetoceros radicans*, *Chaetoceros pseudocrinitus*이었으며, 와편모조류 중 *Dinophysis* 속들의 여러 종들이 관찰되었지만 현존량이 크지는 않았다. *C. polykrikoides*의 영양세포가 소량 관찰되었으며 수층별로는 표층보다 저층의 밀도가 높았다. 조사기

간 중 수층별로 표층과 저층의 현존량차이는 표층이 저층보다 높은 밀도를 보였으며 정점별로는 큰 차이를 보이지 않았다. 가장 높은 현존량을 보인 곳은 정점 4로, 표층 225,850 cells/L, 저층 144,800 cells/L이었다. 큰 차이는 나지 않지만 정점 2에서 표층 176,825 cells/L, 저층 147,100 cells/L로 비교적 낮은 현존량을 보였다. 전체적으로 규조류가 전체 종조성비 중 98.13%를 차지하였으며 와편모조류가 1.86%를 차지하였다.

○ 8월 29일 미조 정점에서는 총 37 종이 동정되었고 이 중 10종의 와편모조류가 동정되었으며 나머지 27종은 규조류였다. 우점종은 *Pseudonitzschia pungens*였으며 차우점종은 *Chaetoceros pseudocrinitus*였고 *Chaetoceros pseudocrinitus* 외의 다른 *Chaetoceros* 속이 다수 관찰되었다. 수층별로는 표층과 저층의 생물량 밀도차이가 낮으며 표층이 저층보다 높은 밀도를 보였다. 정점 4에서 표층 241,400 cells/L, 저층 144,200 cells/L로 가장 높은 현존량을 보였으며 정점 1에서 표층 212,850 cells/L, 저층 123,250 cells/L로 낮은 현존량을 보여주었다. 98.40%의 비율을 규조류가 차지하였으며 1.59%만이 와편모조류이었다.

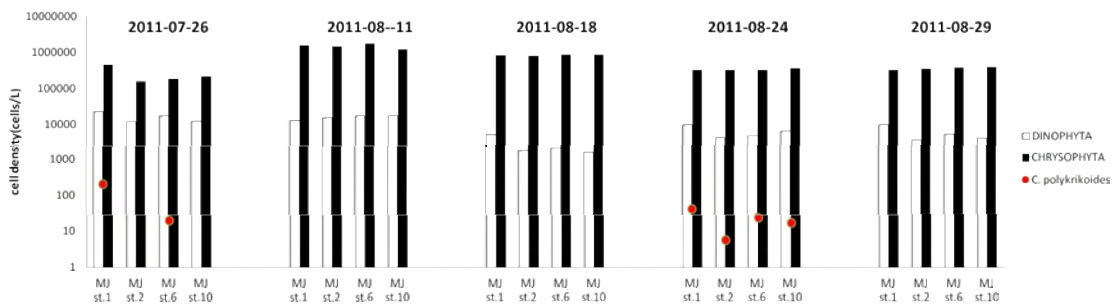


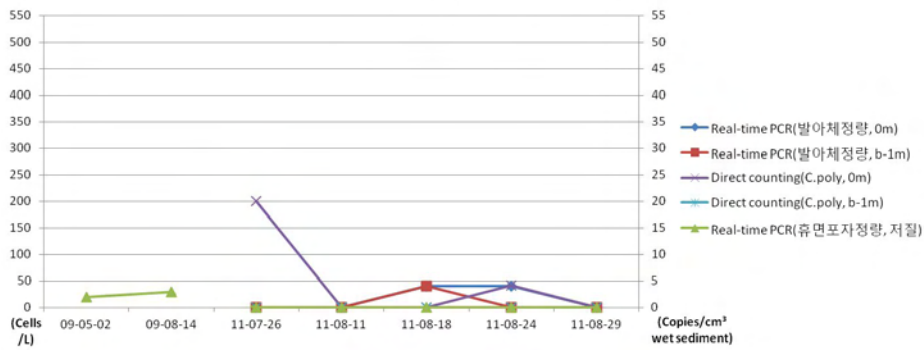
그림 74. 2011년 미조면 식물플랑크톤 및 *C. polykrikoides*의 현존량.

#### ④ Real-time PCR을 이용한 *C. polykrikoides* 발아체 조사

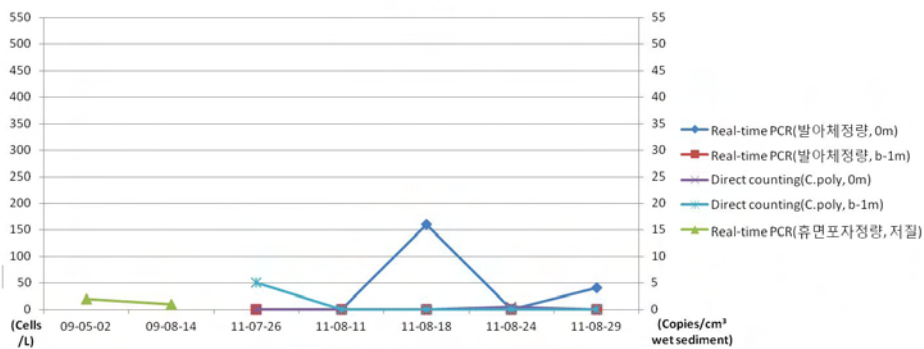
○ *C. polykrikoides* 발아체의 출현을 직접 계수를 통해 조사한 결과, 2009년에 일부 저질에서 휴면포자가 검출 되었으며, 2011년에 휴면포자는 검출 되지 않았으나 해수 중에 발아체는 검출이 되는 것을 확인하였다. 2011년 8월 11일 ~ 29일 사이에 발아체가 출현 하였던 것을 볼 수 있고, 직접 계수와 real-time PCR의 검출 추이가 비슷함을 볼 수 있다. 그러나 직접 계수보다는 real-time PCR을 통한 발아체의 검출 감도가 더 높은 것을 볼 수 있다.



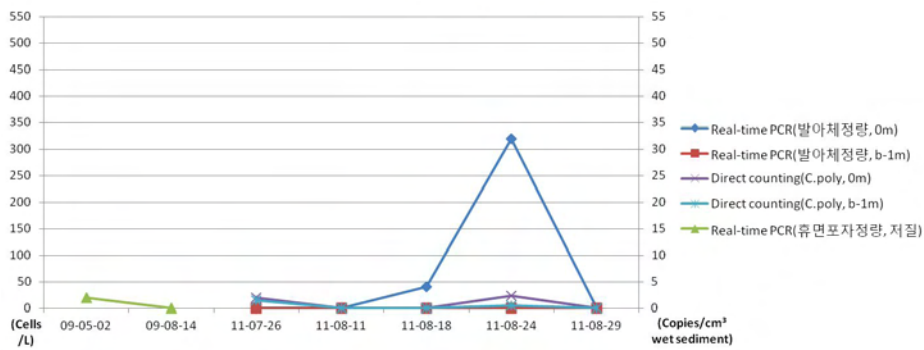
### MJ st.1



### MJ st.2



### MJ st.6



### MJ st.10

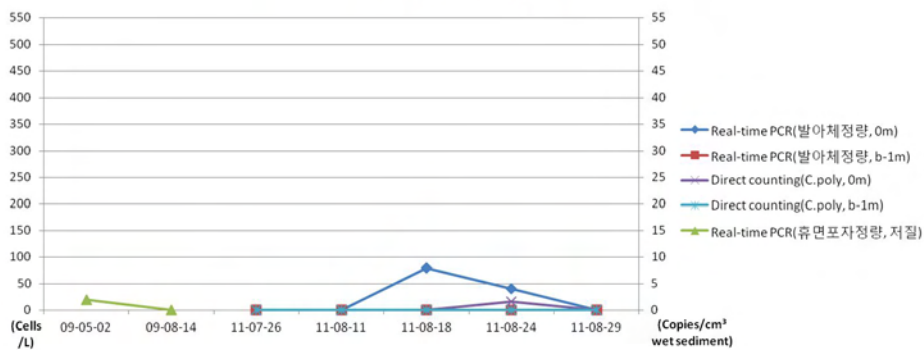


그림 75. 2009년~2011년 정기조사에 따른 미조 *C. polykrikoides*의 휴면포자 및 현장 발아체 정량.

(라) 육지도

① 수심, 수온, 염분 및 용존산소

○ 육지도의 수심은 28~35m로 측정되었으며 각 정점 간 수심차가 큰 편이었다.

○ 육지도의 8월 표층수온은 모든 정점에서 26℃로 일정하였다. 하지만 저층수온은 정점 1, 4에서 15.17~16.1℃로 정점 2, 3의 16.86~17.42℃보다 1~2℃ 낮게 나타났다(그림 76).

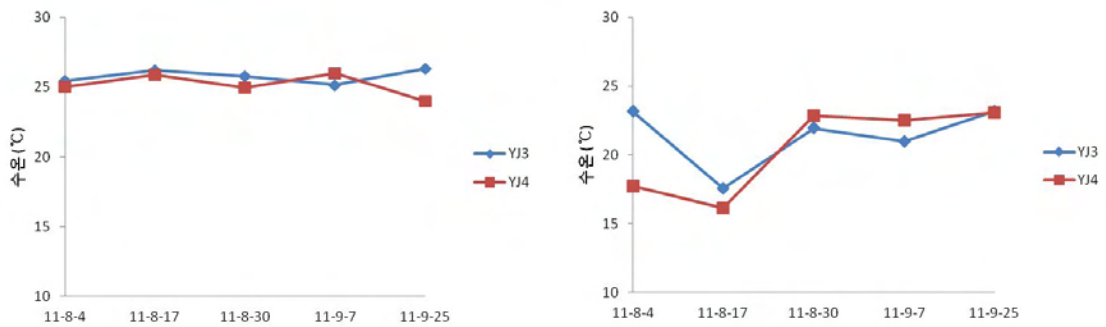


그림 76. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 수온 변화. (좌 : 표층, 우 : 저층)

○ 8월 육지도의 염분은 표층은 32 psu 로 유사하였으며, 저층은 34 psu로 모든 정점에서 일정하게 나타났다(그림 77).

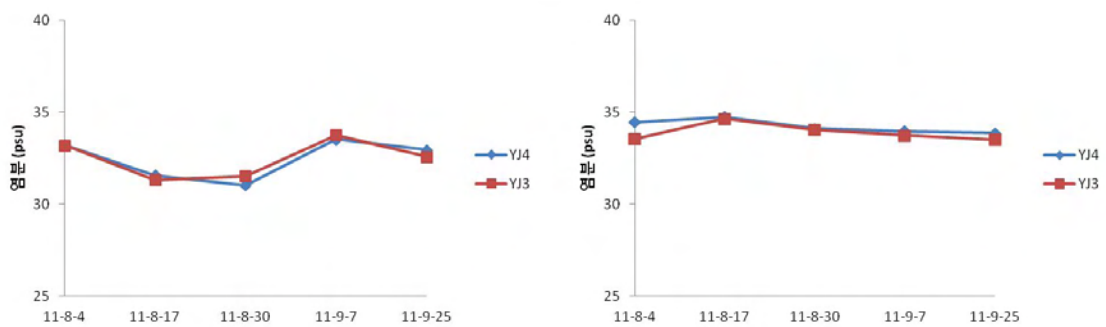


그림 77. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 염분 변화. (좌 : 표층, 우 : 저층).

○ 표층 용존산소는 7.28~7.56 mg/L, 저층은 4.25~4.71 mg/L로 나타났다. 표층과 저층의 용존산소는 3 mg/L 정도 차이가 났으며 사랑도와 유사한 경향을 나타냈다(그림 78).

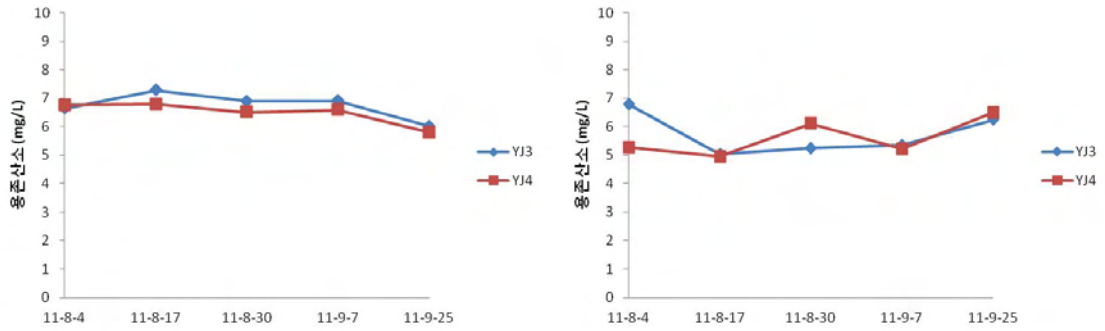


그림 78. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 용존산소 변화(좌 : 표층, 우 : 저층).

② 영양염류

○ 조사기간 중 육지도 정점의 용존태 무기 질소(DIN)는 전 조사 기간 동안 표층 0.31~1.98  $\mu\text{M}$ , 저층 0.824~1.97  $\mu\text{M}$  범위로 나타났으며, 표층 DIN의 평균값은 1.29  $\mu\text{M}$ , 저층의 평균값은 1.06  $\mu\text{M}$ 이었다. 표층과 저층 모두에서 8월 17일 조사 시 급격히 증가하는 경향을 나타냈으며 8월 30일 조사에서는 급격히 떨어지는 경향을 보였다. 그 후 조사기간에서는 다시 증가하였다(그림 79).

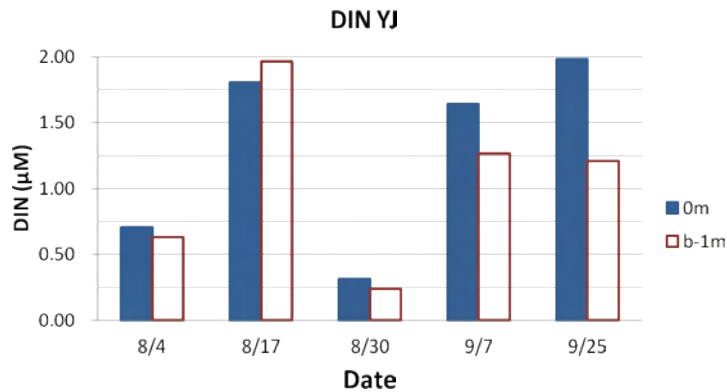


그림 79. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 용존태 무기 질소(DIN)의 변화.

○ 용존태 유기 질소(DON)는 표층 0.04~0.66  $\mu\text{M}$ 과 저층 0.12~0.74  $\mu\text{M}$ 의 범위로 나타났다. 표층의 DON의 평균값은 0.31  $\mu\text{M}$  이었으며 저층 DON의 평균값은 0.49  $\mu\text{M}$  로 나타났다(그림 80).

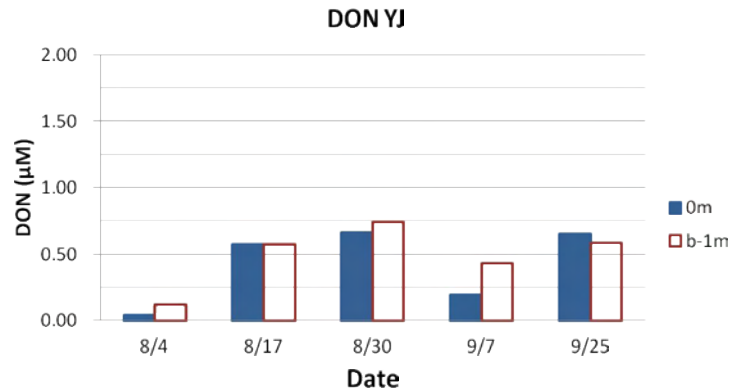


그림 80. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 용존태 유기 질소 (DON)의 변화.

○ 용존태 총질소(DTN)의 경우 전체 분포의 DIN : DON의 비가 표층에서 약 31 : 69 에서 94 : 6 까지 다양한 분포를 나타 내었고, 평균적으로 73 : 27 의 비율을 보였다. 저층에서는 약 24 : 76 에서 84 :16 까지 분포를 보였고, 평균은 65 : 35 였다. 표층, 저층 모두 DIN의 값이 DON보다 높은 경향을 나타내었다.

○ 용존태 무기 인(DIP)은 조사기간 동안 표층 0.00~0.32  $\mu\text{M}$ , 저층 0.01~0.38  $\mu\text{M}$  범위로 나타났다. 조사기간 중 표층의 DIP 의 평균값은 0.21  $\mu\text{M}$ 이었 으며 저층의 DIP 평균값은 0.31  $\mu\text{M}$  이었다.

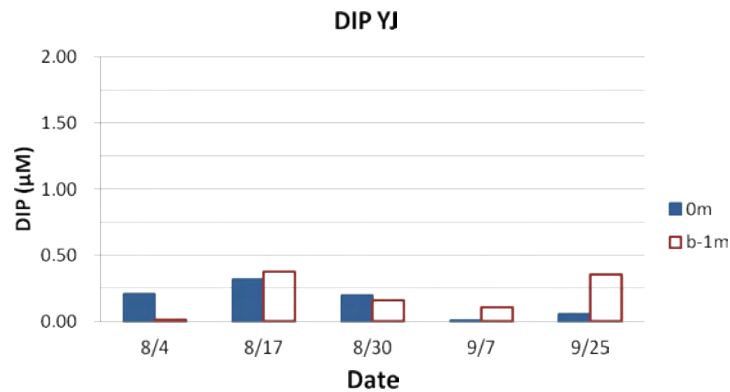


그림 81. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 용존태 무기 인 (DIP)의 변화.

○ 용존태 무기 인(DOP)은 표층 0.03~0.44  $\mu\text{M}$ , 저층 0.03~0.38  $\mu\text{M}$  범위로 나타났다. 조사기간 중의 표층의 평균값은 0.16  $\mu\text{M}$  이었으며 저층의 평균값

은 0.17  $\mu\text{M}$  였다. 전 조사기간 중 대체적으로 낮은 값을 보여주었다.

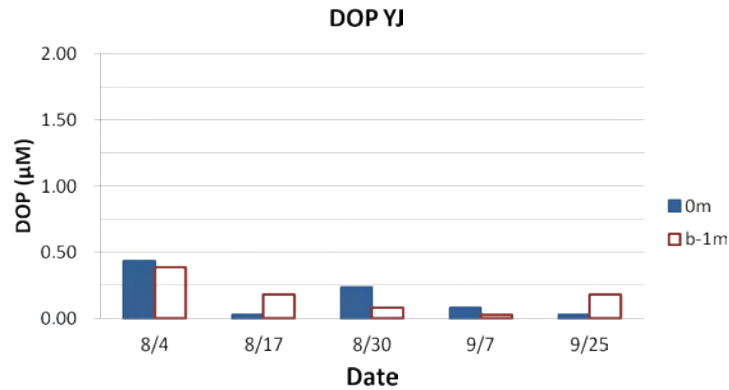


그림 82. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 용존태 유기 인 (DOP)의 변화.

○ 용존태 총인(DTP)의 경우 전체 분포의 DIP : DOP의 비가 표층에서 약 3 : 97 에서 92 : 8 까지 다양한 분포를 나타 내었고, 평균은 48 : 52 의 비율을 보였다. 저층에서는 약 3 : 97 에서 80 : 20 까지 분포를 보였고, 평균값의 비는 57 : 43 이었다.

○ 용존태 규산염(DSi)은 표층 0.43~6.76  $\mu\text{M}$  의 넓은 범위로 나타났는데 표층 측정 결과에서 8월 17일 조사 시 0.43  $\mu\text{M}$  의 낮은 값을 나타냈으며 평균 값은 5.85  $\mu\text{M}$ 였다. 저층은 4.36~7.17  $\mu\text{M}$  사이의 값이 나타났으며 표층보다 안정된 경향을 보여주었다.

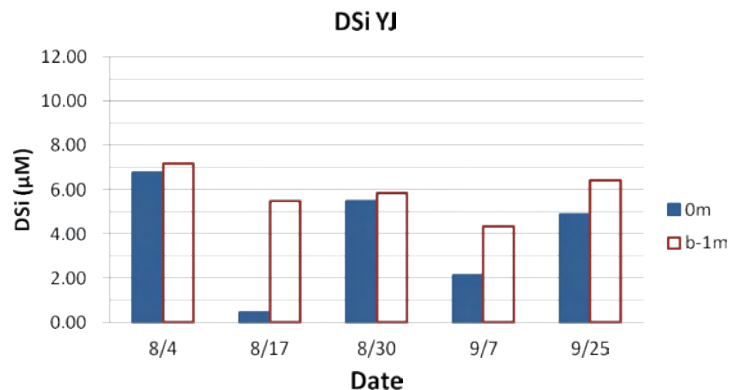


그림 83. 2011년 정기조사에 따른 육지도의 용존태 규산염 (DSi)의 변화.

③ 식물플랑크톤 종 조성 및 현존량

○ 2011년 8월 4일 육지도 표층과 저층의 식물플랑크톤 현존량을 동정한 결과, 와편모조류는 7종, 규조류는 16종으로 총 23종의 식물플랑크톤이 관찰되었다. 와편모조류의 현존량은 1,500~10,000 cells/L, 규조류는 21,900~29,666 cells/L의 범위로 출현하였다. 우점종은 *Chaetoceros pseudocrinitus*가 최우점종이었으며, *Chaetoceros costatus*는 차우점종이었다. 그 외에 *Chaetoceros*속의 다양한 종들과 *Pseudonitzschia pungens*가 관찰되었다. 표층보다 저층의 현존량 밀도가 높았으며 정점 4에서 표층 28,333 cells/L, 저층 39,667 cells/L로 가장 많았다. 규조류가 전체의 85.42%를 차지하였으며 와편모조류의 비율은 14.5%였다.

○ 17일에는 총 35 종이 동정되었고 이 중 12종의 와편모조류가 동정되었으며 나머지 23종은 규조류였다. 우점종은 *Chaetoceros pseudocurvisetus*였으며 차우점종은 *Chaetoceros curvisetus*였다. 그리고 *Chaetoceros* 속의 다른 종들이 다수 관찰되었다. 수층별로는 표층과 저층의 큰 생물량 밀도차이가 낮으며 저층이 표층보다 높은 밀도를 보였다. 정점 4에서 표층 286,000 cells/L, 저층 613,200 cells/L로 가장 높은 현존량을 보였으며 정점 3에서 표층 384,500 cells/L, 저층 421,550 cells/L로 낮은 현존량을 보여주었다. 99.05%의 비율을 규조류가 차지하였으며 0.94%만이 와편모조류였다.

○ 30일에는 총 28 종이 동정되었고 이 중 16종의 와편모조류가 동정되었으며 나머지 22종은 규조류였다. 우점종은 *Dictyocha speculum*였으며 차우점종은 *Pseudonitzschia pungens*였다. 다른 관찰시기와 다르게 *Chaetoceros*속의 수가 적었으며 전체적인 생물밀도가 낮았다. 수층별로는 표층과 저층 간 밀도차이가 크지 않았으며 정점 3에서 표층 3,850 cells/L, 저층 3,800 cells/L로, 정점 4에서 표층 2,500 cells/L, 저층 2,950 cells/L로 나타났다. 71.37%의 비율을 규조류가 차지하였으며 28.62%가 와편모조류이었다.

○ 9월 7일 육지도 정점에서는 총 33종의 식물플랑크톤이 동정되었으며 그 중 5종이 와편모조류였으며 규조류가 27종이었다. 우점종은 *Chaetoceros pseudocurvisetus*와 *Chaetoceros didymus*였으며 *Pseudonitzschia pungens*도 다수 관찰되었다. 표층과 저층의 밀도차가 크지 않은 경향을 보였으며 정점 3에서 표층 261,500 cells/L, 저층 254,530 cells/L로 현존량이 가장 높았으며 정점 4는 215,975 cells/L, 197,050 cells/L의 현존량을 나타내었다. 98.88%가 규조류에 속한 식물플랑크톤이었으며 1.11%의 비율을 와편모조류가 차지하였다.

○ 25일 육지도에서는 3종의 와편모조류, 20종의 규조류로 총 23종의 식물플

랑크톤이 관찰되었다. 그중 우점종은 *Chaetoceros didymus*와 *Chaetoceros pseudocurvisetus*이었으며 차우점종은 *Pseudonitzschia pungens*이었다. 표층과 저층의 현존량 밀도차이가 컸으며 표층의 현존량 밀도가 저층보다 높았다. 정점 4에서 표층 127,150 cells/L, 저층 70,740 cells/L의 현존량이 조사되었고 정점 3은 표층 106,000 cells/L, 저층 56,100 cells/L 였다. 규조류가 99.62%로 대부분을 차지했으며 와편모조류는 0.37%로 나타났다.

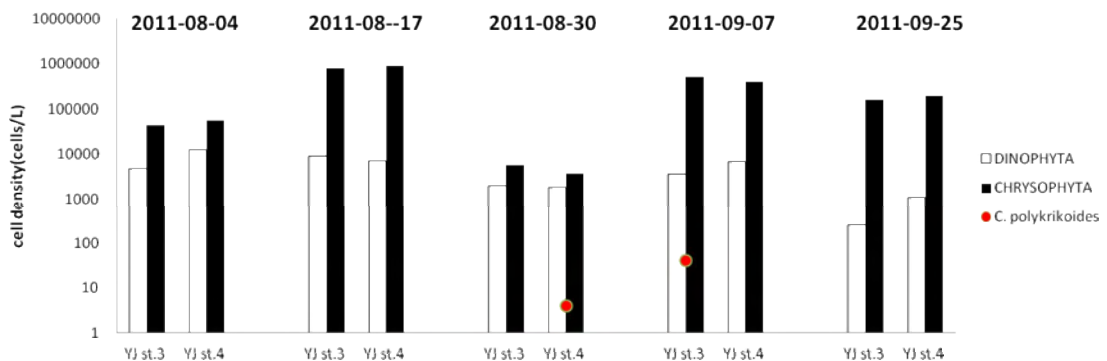


그림 84. 2011년 욕지도 표층 해수 중 식물플랑크톤 현존량.

#### ④ Real-time PCR을 이용한 *C. polykrikoides* 발아체 조사

○ *C. polykrikoides* 발아체의 출현을 직접 계수를 통해 조사한 결과, 2011년 8월 30일, 9월 7일에 저층 해수에서 약 4~41 cells/L의 세포밀도를 보였으며, Real-time PCR 방법으로 정량했을 때는 4번 정점의 저층 해수에서 9월 7일, 9월 25일에 약 40 cells/L이 검출되었다. 2009년 ~ 2011년 기간의 조사 중 욕지도의 해수에서 유일하게 2011년 8월 말 ~ 9월 초에만 *C. polykrikoides* 발아체가 검출되었다.

#### 나. 자란만 고정 정점 집중조사

○ *C. polykrikoides* 발아체의 발생/생태 환경 특성을 밝히기 위해 자란만 해역을 short-term 스케일로 집중 조사하였다.

##### (1) 재료 및 방법

○ 자란만에서 2010년 6월 05일부터 8월 17일까지 17회, 2011년 5월 14일부터 8월 3일까지 19회로 총 36회 조사를 수행하였다. 관측점은 정점 4, 7번의 표층(0m)을 대상으로 실시하였다(그림 85, 표 17., 표 18.)

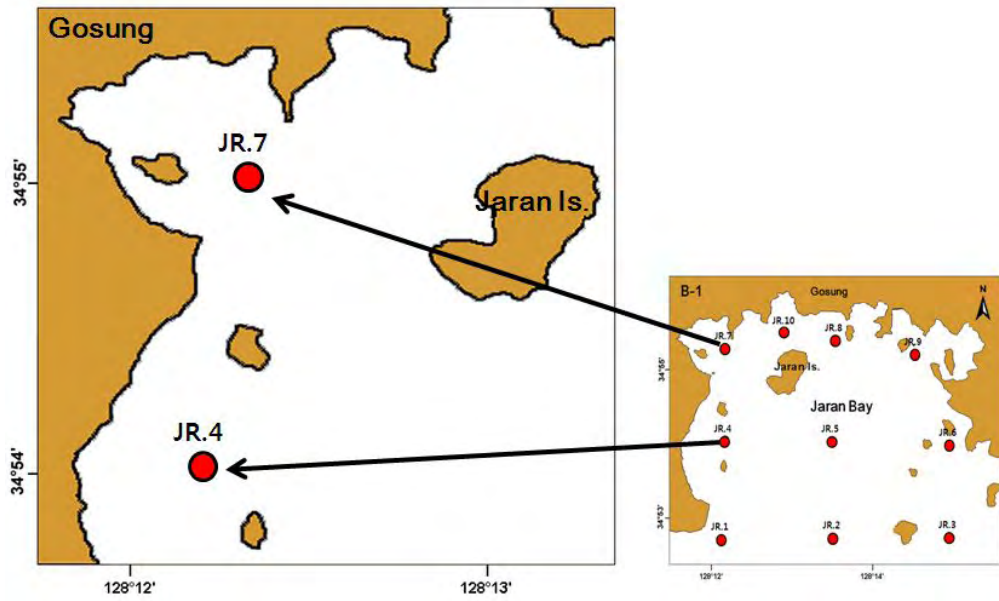


그림 85. 자란만 집중조사 관측 정점.

표 17. 자란만 집중조사 채집 일시

차수	일시	차수	일시
1	2010-06-05	1	2011-05-14
2	2010-06-08	2	2011-05-16
3	2010-06-13	3	2011-05-18
4	2010-06-19	4	2011-05-22
5	2010-06-25	5	2011-05-25
6	2010-07-06	6	2011-05-28
7	2010-07-09	7	2011-06-02
8	2010-07-14	8	2011-06-08
9	2010-07-17	9	2011-06-11
10	2010-07-20	10	2011-06-14
11	2010-07-25	11	2011-06-19
12	2010-08-02	12	2011-06-23
13	2010-08-06	13	2011-07-05
14	2010-08-12	14	2011-07-11
15	2010-08-17	15	2011-07-17
		16	2011-07-19
		17	2011-07-24
		18	2011-08-03



표 18. 자란만 집중조사 방법

조사 방법	항목
물리적 해양환경	수온, 염분, 용존산소(Dissolved Oxygen; DO), 투명도
생물학적 해양환경	<i>C. polykrikoides</i> 의 현장 발아체 및 영양세포 관찰, 식물플랑크톤 종 조성 및 현존량
분자생물학적 검출	Real-time PCR 수행

○ 채수기를 사용하여 표층(0m) 을 채수 하였으며, *C. polykrikoides*의 발아체를 정량하기위해 식물플랑크톤 네트( $\varnothing 20\mu\text{m}$ )를 이용하여 20L 농축 채집하였다.

○ 발아체는 직접검경으로 파악하는 방법과 real-time PCR 방법을 이용하여 정량하였다.

○ 표층 해수 20L 현장 농축한 시료를 GF/C filter로 여과 후 PCI 법으로 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였으며, 발아체 정량을 위한 real-time PCR을 수행하였다.

## (2) 결과 및 고찰

### (가) 수온, 염분 및 용존산소

○ 2010년 정점 4의 수온은  $22.24\sim 29.52$ , 정점 7은  $22.36\sim 31.05^{\circ}\text{C}$ 의 변화를 보였다. 두 정점 모두 춘계에서 하계로 갈수록 상승하였지만, 7월 14일부터 내린 강우로 인해 17일에 정점 4는  $23.15^{\circ}\text{C}$ , 정점 7은  $24.86^{\circ}\text{C}$ 까지 낮아졌다. 또한 8월 12일에 태풍의 영향으로 두 정점 모두 다소 낮아 졌다(그림 86). 2011년의 수온은  $18.72\sim 27.76^{\circ}\text{C}$ 의 변화를 보였으며, 춘계에서 하계로 시간이 지남에 따라 점차 상승하였다. 같은 시기의 전년도의 수온과 비교해 보았을 때 전체적인 평균 수온은 약  $2.64^{\circ}\text{C}$  낮은 편이었다.

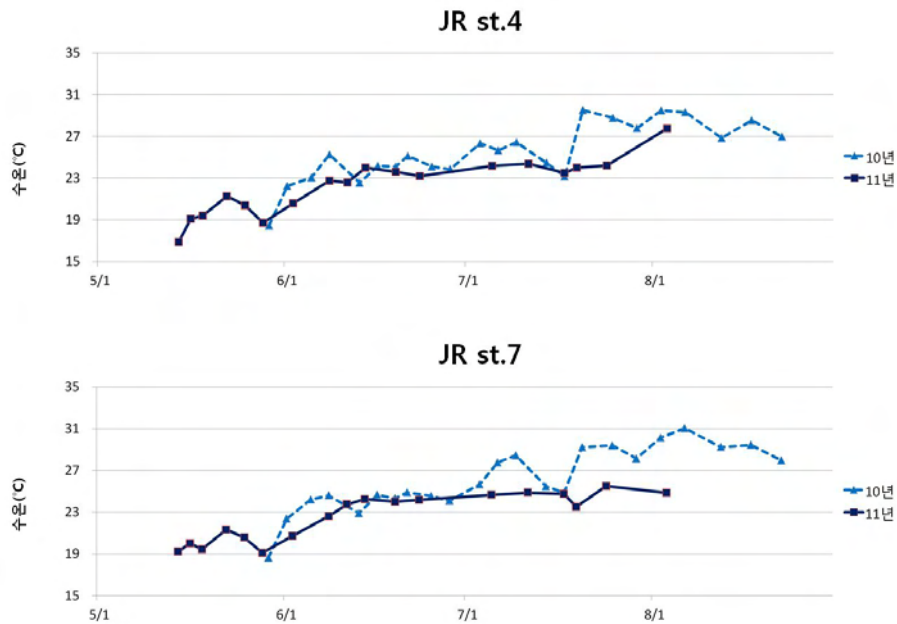


그림 86. 2010년~2011년 자란만 집중조사기간 동안의 수온 변화.

○ 2010년 정점 4의 염분은 28.13~34.32 psu, 정점 7은 20.35~33.42 psu의 변화를 보였다. 정점 4와 정점 7의 염분차이는 크지 않았지만, 7월 14일 전후 하여 장마로 인한 많은 강우로 두 정점의 염분이 크게 낮아졌다. 특히 정점 7의 경우 7월 17일 및 8월 12일에 염분이 매우 낮게 나타났는데(그림 87) 이는 강한 호우로 인해 하천에서 많은 양의 담수가 유입되었기 때문으로 생각된다. 이러한 결과는 발아체의 형성에 있어서 6월 초기 좋은 환경을 유지하였으나, 7월과 8월의 장마와 태풍으로 인해 형성되었던 발아체가 소멸 되었을 가능성이 높다. 2011년에는 6월 중순까지 염분의 변화가 거의 없었지만, 그 이후로 시작된 장마와 태풍으로 인해 염분농도의 급감이 관찰되었다. 정점 7의 염분이 정점 4보다 더 낮아지는 경향은 2010년과 동일하였다.

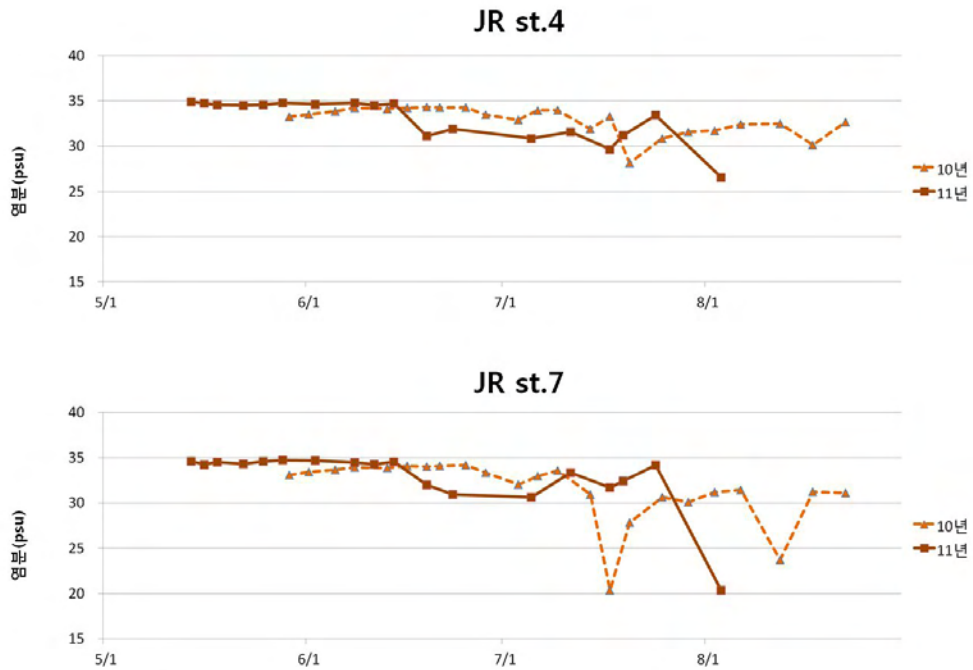


그림 87. 2010년~2011년 자란만 집중조사기간 동안의 염분 변화.

○ 정점 4의 용존산소는 5.79~10.76 mg/L, 정점 7은 5.76~8.80 mg/L의 변화를 보였다. 대체적으로 준계에서 하계로 갈수록 낮아지는 경향을 보였으며, 2010년 7월 14일 전후의 많은 강우와 8월 12일의 태풍으로 인해 표층과 저층 수괴의 혼합으로 용존산소가 낮아지는 경향을 나타내었다(그림 88). 2011년 7월 중순에 자란만 전체적으로 용존산소가 급감하고 다시 상승하는 형태가 관찰되었다.

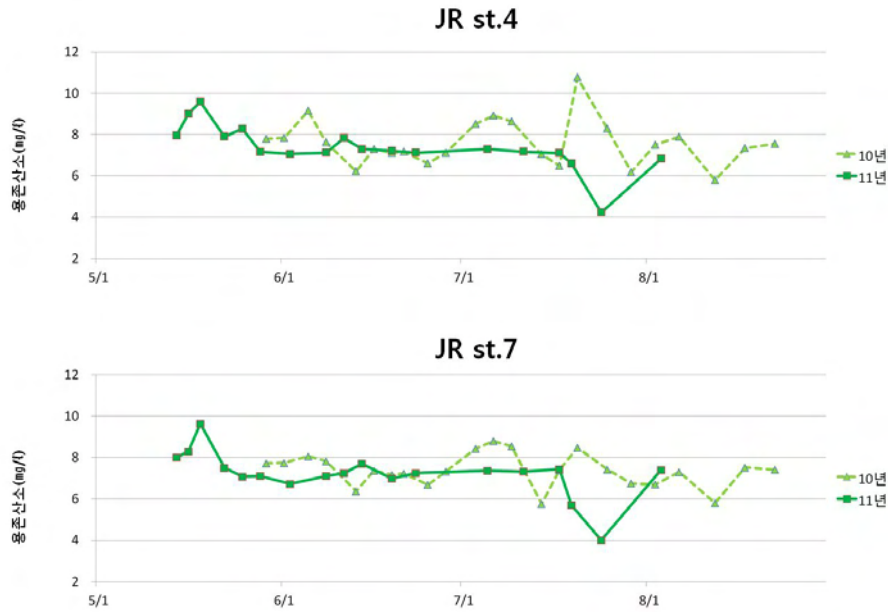


그림 88. 2010년~2011년 자란만 집중조사기간 동안 용존산소 변화.

(나) 식물플랑크톤 종 조성 및 현존량

- 2010년 6월 5일에서 8월 17일까지 규조류와 와편모조류의 현존량은 염분의 증감에 따라 변화되는 양상을 보였다(그림 87).
- 6월초의 우점종은 *L. minimus*이었으며, 6월 말 이후부터는 *Chaetoceros* 속의 다양한 종들에 의해 우점종의 천이가 발생하였다. 하지만 8월 중순에는 *P. pungens* 종으로 우점종이 변화하였으며, 두 정점간의 우점종의 차이는 없었다.
- 정점 4에서 *C. polykrikoides* 출현 변동을 조사한 결과, 6월 16일(정기조사결과) 이후 출현과 동시에 서서히 증가하여 6월 19일 58 cells/L를 나타내었고, 6월 25일 강우로 인해 발아체의 양이 급격히 감소하였다. 하지만 7월 14일 133 cell/L에서 8월 2일에 최대농도 278 cells/L까지 도달하였다. 8월 6일까지 169 cells/L정도의 밀도를 유지하다가 8월 11일 태풍의 영향으로 완전히 소멸하였다.
- 정점 7에서 *C. polykrikoides*는 정점 4와 마찬가지로 6월 16일부터 출현하기 시작하였으나, 그 수가 현저히 낮은 값을 보였다. 강우기가 끝난 7월 17일 최대농도인 24 cells/L를 나타내었으나 크게 증가하지 않고 태풍의 영향 이후 소멸하였다.
- 2011년 5월 14일부터 8월 3일까지 자란만의 식물상은 관찰 기간 중 규조류 *Chaetoceros* 속이 우점종이었다. 와편모조류의 현존량은 규조에 비해 극히 낮은 양상을 보였으며, 우점종인 *Chaetoceros* 속 외의 다른 속에 의한 우점종

천이는 일어나지 않았다.

○ *C. polykrikoides*는 2010년 6월 16일, 2011년 6월 2일에 12~157 cells/L 범위로 처음 나타났으며 8월 이후 소멸하였다.

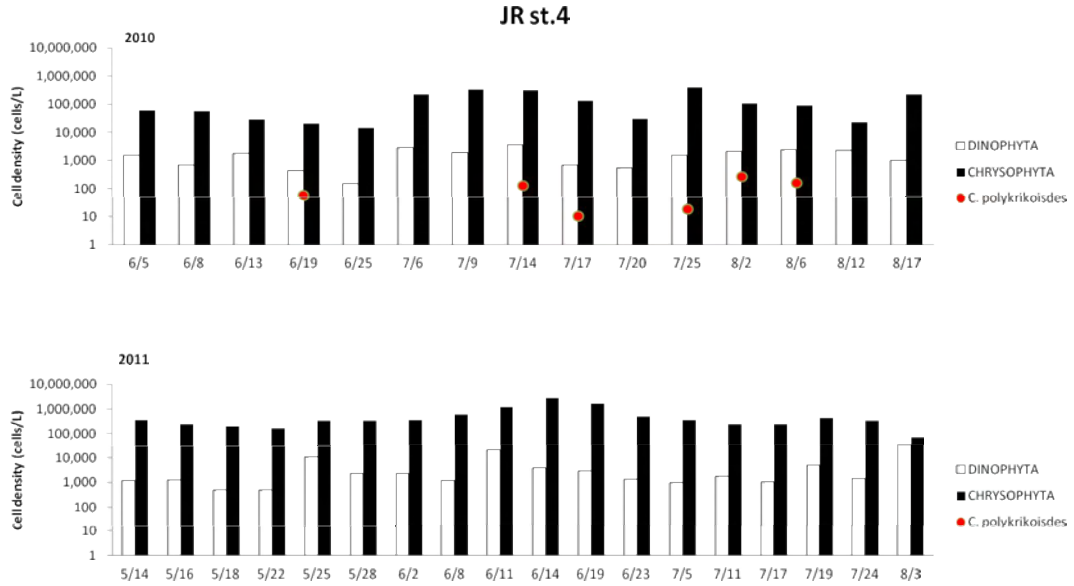


그림 89. 자란만 정점 4에서 식물플랑크톤과 *C. polykrikoides*의 현존량 그래프.

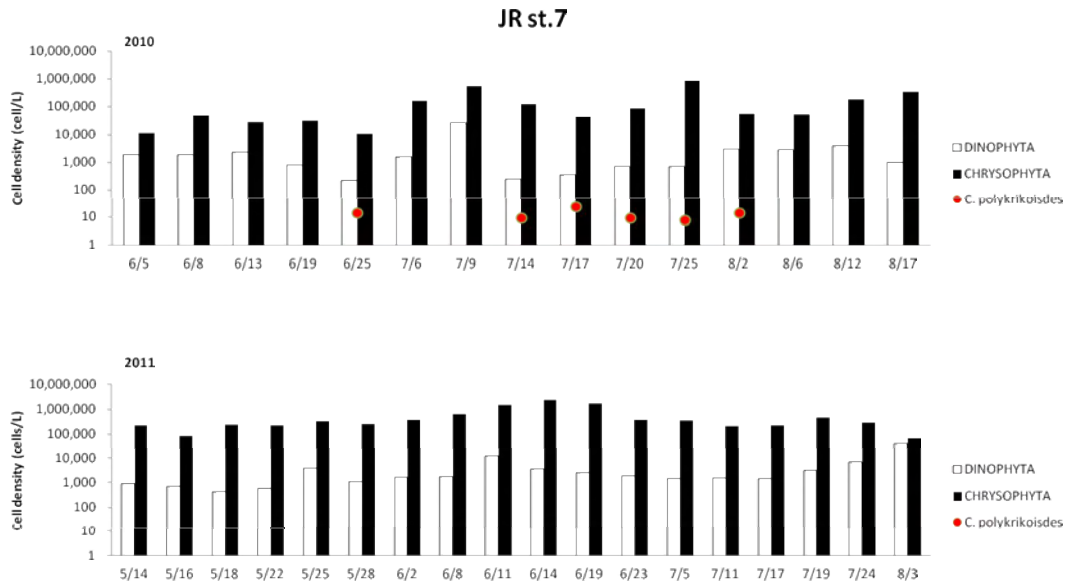
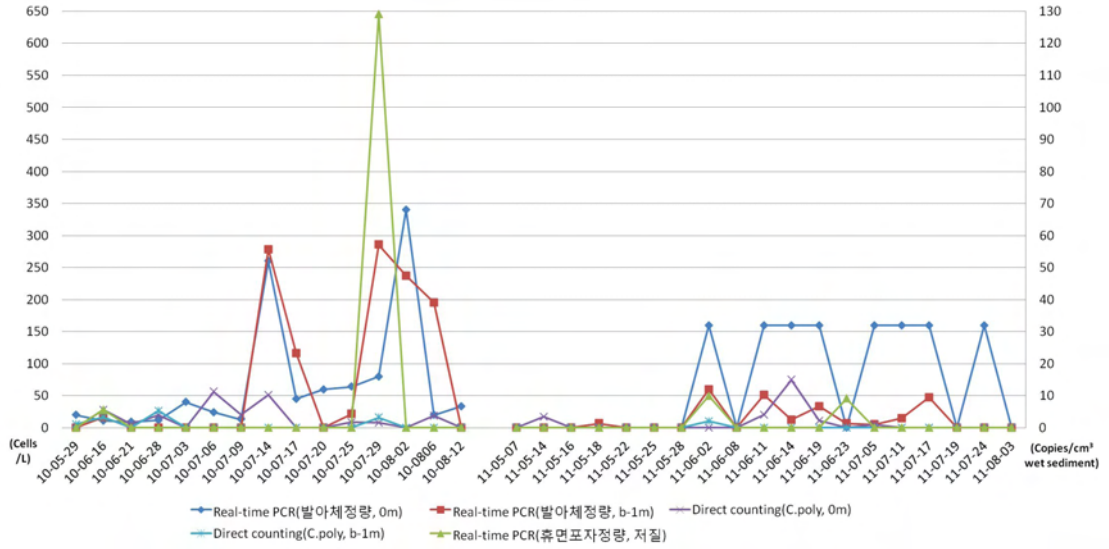


그림 90. 자란만 정점 7에서 식물플랑크톤과 *C. polykrikoides*의 현존량 그래프.

(다) Real-time PCR을 이용한 *C. polykrikoides* 발아체 조사

○ 2010년 5월~8월 조사 때 *C. polykrikoides* 발아체가 최대치(580 cells/L)를 보였으며 2010년 6월에 최소치(9 cells/L)을 보였다. 집중조사 기간 동안 2010년, 2011년 모두 6월을 시작으로 발아체가 검출 되는 것을 볼 수 있으며, 저층과 표층의 해수에 고루 분포하는 양상을 볼 수 있다. 대부분의 추이가 상대적인 양에 따라 달라지지만 저층에서 먼저 발생해서 표층의 발아체 수치가 많아지는 일부 양상을 볼 수 있으며, 이는 수온의 변화와 같은 다양한 환경조건의 변화에 따라 발아체가 이동하는 것이라 판단할 수 있다. 2011년의 경우 저질에서 휴면포자의 검출은 없었지만 해수에서 발아체가 검출됨으로써 자란만 지역이 *C. polykrikoides* 상승 출현 지역임을 알 수 있었다. 전체적인 추이를 보았을 때 자란만 정점 4에서는 직접 계수한 것과 Real-time PCR 방법으로 정량한 값을 비교하면 발아체 증가와 감소의 패턴은 두 방법이 유사하나, 정점 7에서는 2010년 7월 17일 시료에서 큰 차이점을 보였다. 이는 직접 점경의 검출 제한성에 따라 발생하는 차이로 생각되므로, 두 방법 모두 *C. polykrikoides*의 발아체를 탐색하는데 유용한 수단임을 알 수 있다.

### JR st.4 (집중조사)



### JR st.7 (집중조사)

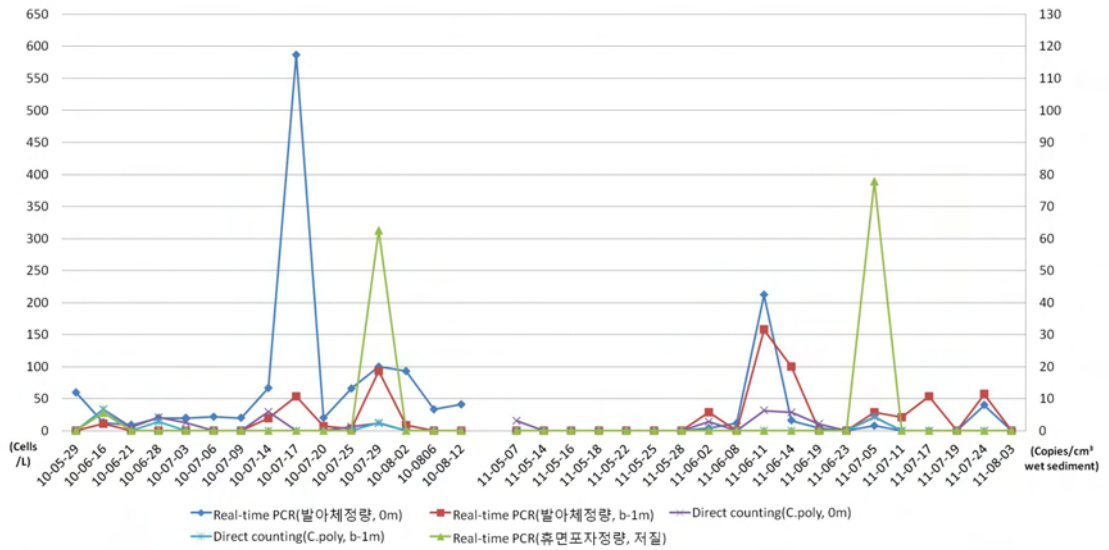


그림 91. 2010년~2011년 자란만 집중조사 해역 *C. polykrikoides*의 현장 발아체 정량.

## 다. 현장 조사 결과 분석

앞의 현장 조사 결과에서 나온 데이터를 바탕으로 *C. polykrikoides*의 발생과 각 항목간의 관계성을 파악하고자 하였다. (RAW data 부록 첨부)

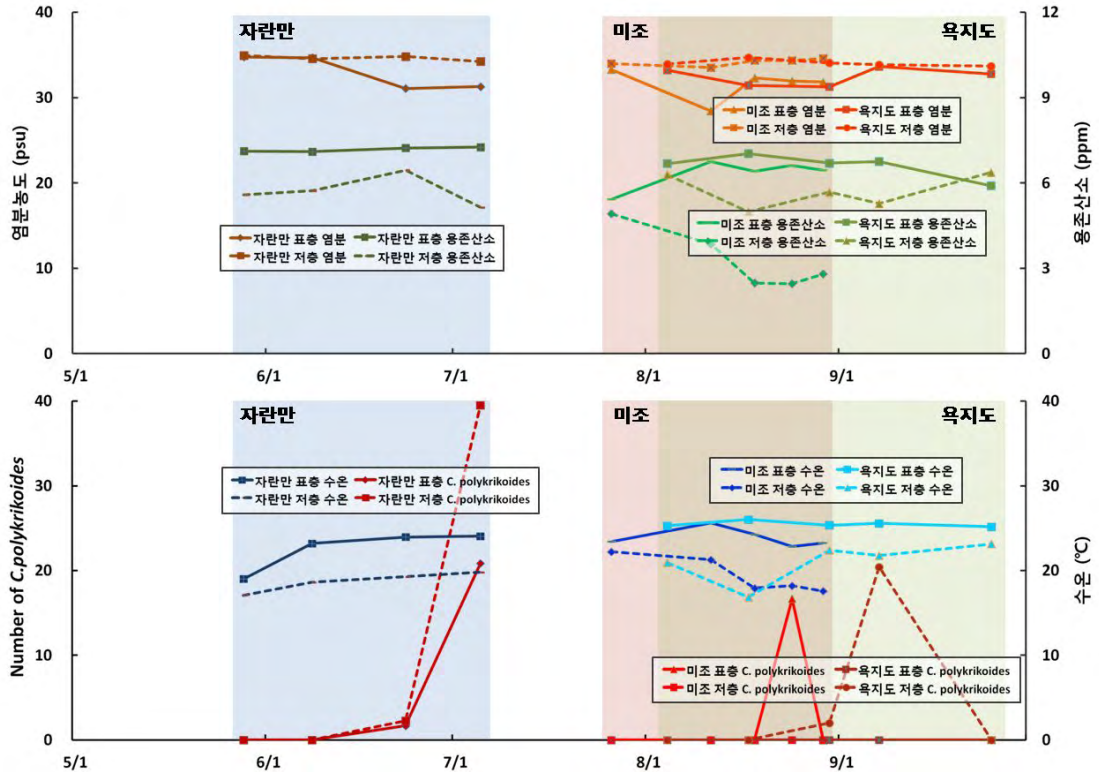


그림 92. 수온, 염분, 용존산소의 변화와 *C. polykrikoides*의 발생량 변화.

### (1) 수온

수온의 경우, 자란만의 저층 수온이 19~21°C 정도 되는 시기에 *C. polykrikoides*의 발아체가 관찰되기 시작하였다. 그 시기는 자란만 보다 비교적 외해인 미조와 욕지도에서 최초 발생 시기의 수온도 19~22°C 정도로 측정되는 것으로 서로 비슷한 수치가 측정되었다. 그러므로 *C. polykrikoides*의 최초 발생에 적절한 수온은 19~22°C으로 보여진다. 지리적 위치에 따른 수심의 차이, 즉 외해로 나갈수록 수심이 깊어지는 물리적 차이가 수온의 차이를 가져오는 것으로 판단되며, 넓은 지역에 분포하는 휴면포자가 비교적 낮은 수심의 내만에서 최초로 발생하고 뒤이어 휴면포자의 발생에 적절한 수온으로 도달하는 시기가 비교적 늦은 외해에서도 발생하여 나온다고 판단할 수 있었다.

### (2) 염분

전체 조사기간 중 강우가 있는 경우 표층의 염분수치가 일시적으로 감소하였



으며, 저층의 경우는 다른 요인에 의한 염분수치의 변화가 적은 편이었다. 자란만 집중조사에서 *C. polykrikoides*의 초기발생 이후 큰 강우량을 동반한 태풍과 잦은 강우에 의한 표층수 염분의 하강은 *C. polykrikoides* 세포 수의 감소를 가져왔으며, 염분수치의 변화가 적은 저층의 경우 *C. polykrikoides* 세포수의 변화가 표층보다는 적은 결과를 보였다. 이는 표층에서의 큰 염분변화는 *C. polykrikoides*의 성장에 영향을 주었으나 전체적으로 적은 염분변화를 가지는 저층에서는 영향을 덜 준 것으로 볼 수 있다.

### (3) 용존산소

자란만과 육지도의 관측 결과에서 측정된 용존산소가 낮아지는 시기에 *C. polykrikoides*의 영양세포가 증가하고 용존산소가 증가하는 시기에 *C. polykrikoides*의 영양세포가 감소하는 경향을 보여주었다. 자란만과 육지도의 저층 관찰에서 *C. polykrikoides* 영양세포의 개체수가 많게 관찰된 경우는 용존산소가 표층보다 비교적 낮게 측정되었다.

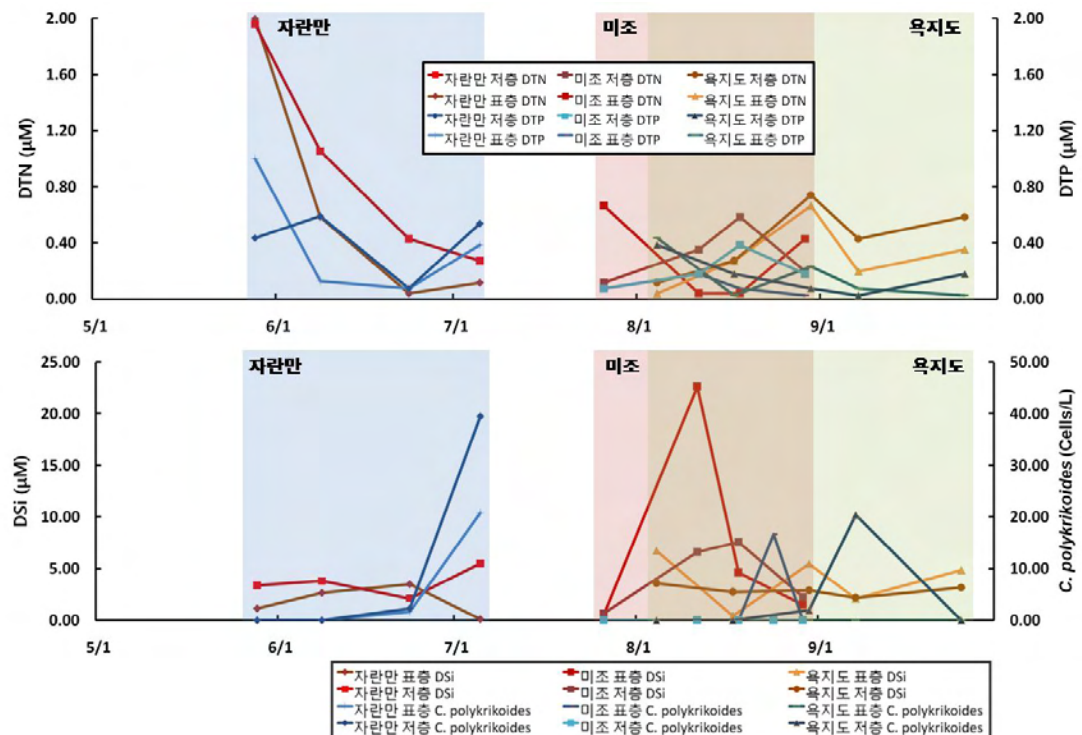


그림 93. 질산염, 인산염, 규산염의 변화와 *C. polykrikoides*의 발생량 변화.

### (4) 질산염

자란만 저층의 DTN이 감소함에 이어 *C. polykrikoides*의 발아체가 관찰되기 시작하였으나, 미조와 육지도의 경우에는 DTN의 증감경향과 *C. polykrikoides* 영양

세포 개체수의 증감경향은 비슷한 결과를 보였다. 전 조사 기간 동안 유해 적조는 발생하지 않았으며 용존무기질소는 적조 발생 가능농도인  $7.14 \mu\text{g-at/L}$ (일본수산자원보호협회, 1972)보다 낮은 값을 보여주었다.

#### (5) 인산염

현장 조사에서 질산염에서의 결과와는 대조적으로 인산염의 농도증가와 *C. polykrikoides* 개체수의 증가가 함께 관찰되었다. 자란만 저층에서의 경우, 인산염의 증가시기와 *C. polykrikoides* 영양세포의 증가시기는 유사한 경향을 보였으며, 미조와 육지도의 조사에서도 인산염의 농도가 증가하면 *C. polykrikoides* 영양세포의 개체수도 증가하는 경향을 보여주었다.

#### (6) 규산염

규조류가 아닌 와편모조류인 *C. polykrikoides*의 종 특성상, 규산염의 변화는 *C. polykrikoides*의 발생과 성장에 큰 영향을 주지 않을 것으로 판단되었으며, 실제 조사 결과 그래프 상의 *C. polykrikoides*의 개체수 변화와 규산염의 변화양상은 큰 상관관계를 읽을 수 없었다.

## 라. *Cochlodinium polykrikoides*의 발아체와 *Nematodinium* sp. 발아체 출현의 상관관계

현장에 출현하는 *C. polykrikoides*의 발아체와 *Nematodinium* sp.의 발아체의 세포밀도를 비교하여 이들 두 종간의 상관관계를 조사하였다.

### (1) 재료 및 방법

○ 조사 시기: 2010년 5월 29일~8월 17일

2011년 5월 14일~8월 3일

(정기조사 및 집중조사 기간에 병행하여 실시)

○ 조사 해역: 남해 중부 연안역의 고성 자란만(그림 47)

○ 조사 방법: 각 정점에서 표층 해수 20 L를 식물플랑크톤 네트(20  $\mu$ m)를 이용하여 농축한 뒤 세포의 밀도를 형광도립현미경을 사용하여 고배율( $\times 200$ ,  $\times 400$ )로 직접 검경하여 조사하였다.

### (2) 결과 및 고찰

○ 2010년 자란만에서 5월 29일부터 8월 17일까지 *C. polykrikoides*와 *Nematodinium* sp.의 발아체의 출현을 조사한 결과, 두 종은 비슷한 시기에 발생하고 출현하는 경향이였다. 6월 13일 *Nematodinium* sp.가 정점 4와 7에서 각각 14 cells/L, 7 cells/L로 먼저 발생하였으며, 6월 16일에는 *C. polykrikoides*가 뒤이어 출현하였다(그림 94). 이 때, *Nematodinium* sp.는 45 cells/L(정점 4)와 54 cells/L(정점 7)로 높은 밀도를 보였다. 이후에는 간헐적으로 출현하였고 장마와 태풍으로 인해 점점 감소하는 경향을 보이다가 8월 11일 태풍 이후로 관찰되지 않았다.

○ 세포밀도 측면에서는 정점 4의 경우, 조사기간 후반에 *C. polykrikoides*가 *Nematodinium* sp.에 비해 상대적으로 높은 출현밀도를 보였지만, 그 이외에는 유사한 밀도를 보였다.

○ 2011년 5월 14일에서 8월 3일까지의 *C. polykrikoides*와 *Nematodinium* sp.의 발아체 출현 조사에서도 2010년 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 정점 4에서 5월 16일 조사 시 *Nematodinium* sp.의 발아체가 발견된 후 6월 2일 조사에서 *C. polykrikoides*의 발아체가 발견되기 시작하였다. 정점 7의 경우 5월 14일 조사 시 *Nematodinium* sp.의 발아체가 먼저 관찰 된 후 6월 2일 조사에서 뒤 이어 *C. polykrikoides*의 발아체가 관찰되었다. 최초 발견 이후 밀도의 증감을 반복하다가 8월 3일 조사 이후에 자란만 정점에서는 *C. polykrikoides*와

*Nematodinium* sp.의 발아체가 관찰되지 않았다.

○ 2011년에도 세포밀도 측면에서 2010년도의 결과와 유사한 출현 밀도를 보였다.

○ 이상의 결과는 *C. polykrikoides*와 *Nematodinium* sp.가 현장에서 동시에 출현하기 시작하고 이후에도 유사한 출현양상을 보임으로써, 두 종은 출현생태에 있어서 서로 지표종의 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다.

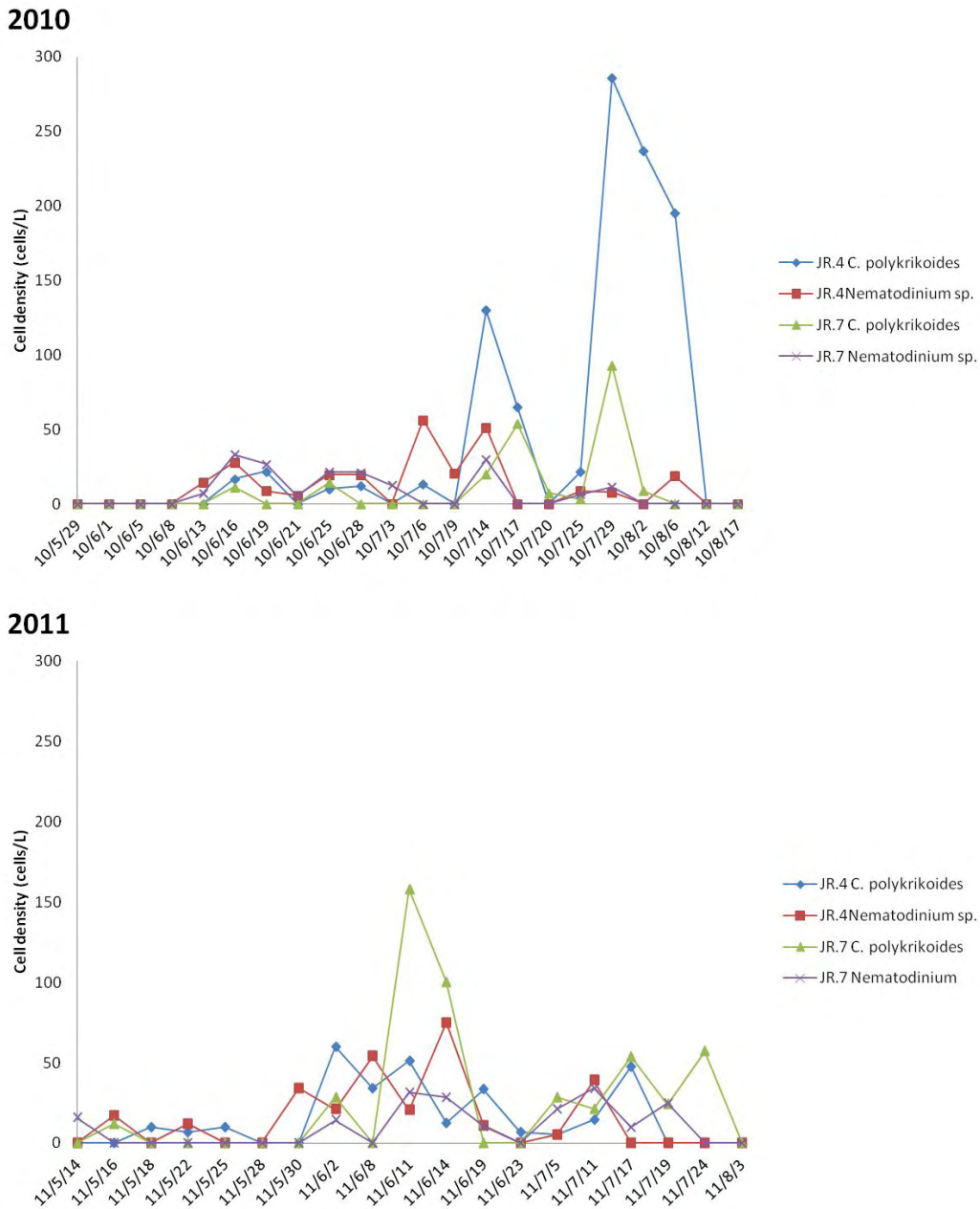


그림 94. 자란만에서의 *C. polykrikoides*와 *Nematodinium* sp.의 발아체 출현.

#### 4. 적조생물 성장 환경 및 증식 촉진/억제 요인 탐색

*C. polykrikoides*의 무기 및 유기 영양염의 이용성을 파악하고, 이들 종의 확대에 영향을 미치는 영향을 파악하고자 하였다. 또한 자란만에서 식물플랑크톤의 성장억제 요인으로 작용하는 조류 바이러스의 유무를 파악하여 차기년도의 *C. polykrikoides*의 살조 바이러스의 유무를 파악하는데 기초자료를 제공하고자 하였다.

##### 가. *Cochlodinium polykrikoides*의 성장환경 및 생리특성 파악

○ 유해 와편모조류 *C. polykrikoides* MARGALEF는 Puerto Rico 연안에서 처음으로 발견되었으며(Margalef, 1961), 미국, 캐나다, 중남미, 호주 인도양 등에서 적조를 일으키고 있다(Hallaegraeff, 1992; Garate Lizarraga et al., 2000). 1990년대 이후에는 매년 우리나라, 일본 및 중국에서도 하계에 적조를 일으켜 수산업 등에 큰 피해를 일으키고 있다(Kim et al., 2001). 이와 같이 연안역에서 식물플랑크톤의 이상 성장에 영향을 주는 대표적인 환경요인은 수온, 염분, 조도, 영양염 그리고 미량금속과 같은 물리·화학적인 요인과 포식자의 포식압 등과 같은 생물학적 요인을 들 수 있다.

○ 수온은 식물플랑크톤의 효소활성에 영향을 주기 때문에 종 특이성에 따라 성장이 가능한 최적 수온이 종에 따라 다르다(Eppley, 1972; Goldman and Carpenter, 1974). 더욱이 휴면포자 형성을 포함하는 월동양식과 발아에 직접적으로 영향을 미치기 때문에 종천이 및 생존전략에 있어 중요한 요인 중에 하나이다(Yamaguchi, 1994).

○ 염분은 세포의 삼투압과 관련이 있어 급격한 염분 변화는 원형질 분리나 세포 자체를 파열시키지만(Boney, 1979), 종에 따라 내성의 범위가 틀리기 때문에 광염성과 협염성 종으로 나뉘며, 대부분 연안에서 적조를 유발하는 종은 광염성으로, 통상 와편모조류는 12-30 psu 그리고 침편모조류는 8-30 psu에서 잘 성장하는 것으로 알려져 있다(Iwasaki, 1979).

○ 해양의 기초생산자인 식물플랑크톤은 태양에너지를 이용하여, 무기물로부터 유기물을 합성한다. 식물플랑크톤의 광합성과 성장은 빛의 성질에 따라 크게 좌우하며, 특히 빛의 조성은 광합성 생물 및 비광합성 생물의 신진대사에까지 영향을 준다(Sánchez-Saavedra and Voltina, 1994). 특히 편모조류는 운동능력을 보유하고 있어, 광학적으로 성장할 수 있는 심도까지 유포를 하여 저층에 풍부한 영양염을 섭취할 수 있다. 따라서 보다 낮은 광 조건에서도 성

장할 수 있는 종은 유영심도가 보다 깊어져 다른 종보다 유리한 생존 전략을 가질 수 있다.

○ 영양염은 식물플랑크톤의 성장에 필요하며 경쟁·공존 등의 종 천이에까지 영향을 미친다(Tilman, 1982). 더욱이 식물플랑크톤은 자기 증식을 유지하기 위해서 용존태 무기 영양염이 제한되어진 환경에서도 용존태 유기영양염을 가수분해하여 영양물질로 이용할 수 있다. 해수중의 무기영양염은 종종 기초생산에 제한을 주기 때문에 유기영양염이 식물플랑크톤의 성장에 중요한 영양염 공급원일 가능성이 있다.

○ 1차년도에는 기본적인 생리적인 식견을 파악하기 위해서 *C. polykrikoides*의 성장에 영향을 미치는 수온, 염분 그리고 광조건 실험을 수행하였으며, 2차년도는 우리나라 연안역에서 대표적인 제한원소인 인(phosphorus)에 대해서 *C. polykrikoides*의 무기 및 유기 영양염의 이용성 및 인 제한에 따른 Alkaline phosphatase(APase) 활성을 파악하고, 인의 흡수 능력을 정량적으로 파악하였다.

## (1) 재료 및 방법

### (가) 실험조류의 분리와 배양

○ 본 연구의 실험 종인 *C. polykrikoides*는 남해에서 채집된 표층 해수로부터 pasteur pipette(ca.  $\phi$  50 ~ 100  $\mu$ m)을 이용하여 분리하였다.

○ 분리된 세포는 여과해수(0.22  $\mu$ m pore size, Millipore GSWP)에 4~5회 세척 후 배양튜브(TB-2800, Japan)에 이식하였으며, 실험용 배지는 남해 육지도 해역의 해수를 바탕으로 한 f/2(Guillard and Ryther, 1962)배지로 selenium( $H_2SeO_3$ )의 최종농도가 0.001  $\mu$ M이 되게 첨가하였다.

○ 유지배양온도와 염분조건은 현장수온과 염분에 상응하는 조건(20°C, 30psu)으로, 광량은 약 300  $\mu$ mol  $m^{-2} s^{-1}$ (12L : 12D; cool-white fluorescent lamp)에서 실시하였다.

○ 영양염의 이용성 실험을 위해 *C. polykrikoides*는 피펫 세척법으로 무균화 처리를 수행 하였으며, 2차적인 오염을 막기 위하여 모든 실험은 clean bench에서 수행하였으며, 실험기구는 고압멸균(202 kpa, 20 min) 또는 건조멸균(185°C, 1h)하여 사용하였다.

○ 영양염의 이용성 실험을 위해 *C. polykrikoides*를 AM9 및 피펫 세척법으로 무균화 처리를 수행하였으며, 2차적인 오염을 막기 위하여 모든 실험은 clean bench에서 수행하였으며, 실험기구는 고압멸균(202 kpa, 20 min) 또

는 건조멸균(185°C, 1h)하여 사용하였다.

(나) 수온과 염분의 변동에 따른 성장속도의 변화

○ 배양 온도는 15, 20, 25, 30°C의 4단계, 염분은 15, 20, 25, 30, 35 psu의 5단계를 조합한 총 20 단계의 조건에서 증식속도 변화를 관찰하였다.

○ 염분 조절은 배지에 사용한 해수의 염분농도가 30 psu로 저염분인 15~25 psu는 초순수이온수를 첨가하여 조절하였으며, 35 psu는 자연 증발시켜 조절하였다.

○ 수온, 염분의 급속한 변화는 세포 성장에 나쁜 영향을 주기에 세포의 이식을 다음과 같이 실시하였다. 우선 수온 20°C, 염분 30 psu, 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에 전 배양을 실시하여 대수성장기의 세포를 염분 20, 25, 30, 35 psu의 배지에 이식하여 배양하였다. 그리고 20 psu의 배지의 세포가 대수성장기에 있을 때 다시 15 psu로 이식하여 염분변화에 따른 영향을 최소화 하였다. 수온은 20°C의 배양된 세포를 하루에 1°C씩 온도를 증가 또는 감소 시켜 각각의 온도단계에 도달하게 하였으며, 18°C부터 15°C까지는 2일에 1°C씩 감소 시켰다.

○ 각각의 수온과 염분 단계에 적용된 세포를 300 ml의 f/2배지에 최종 세포수가 50-100 cell  $\text{ml}^{-1}$ 되도록 첨가하였다. 그 후, 하루에 한 번씩 도립현미경을 이용하여 세포 성장여부를 관찰하였다. 모든 실험은 triplicate로 실시하였다.

○ 성장속도는 다음 식을 이용하여, 대수성장(exponential growth)을 보이는 기간 동안의 세포수를 이용하여 계산하였다.

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{N_t}{N_0} \quad (1)$$

$N_0, N_t$ : 대수성장기에서 초기와 t시간 (day) 후의 세포수(cells  $\text{ml}^{-1}$ )

$\Delta t$ : 대수성장기의 배양시간(day)

○ 한편, *C. polykrikoides*가 언제 어디서 고밀도로 증식을 하는지 예측이 필요하다. 그래서 이들 종의 성장과 생존을 지배하는 물리, 화학, 생물학적인 영향을 수량적으로 파악하는 것이 필요하다. 본 실험에서 설정되어진 각각의 수온과 염분 단계는 등간격으로 설정되어 있기 때문에 성장속도에 영향을 주는 수온과 염분의 관계를 다음과 같이 다항식으로 나타내었다.

$$\mu = \beta_{00} + \beta_{10} \cdot T + \beta_{20} \cdot T^2 + \beta_{30} \cdot T^3 + \beta_{01} \cdot S + \beta_{02} \cdot S^2 + \beta_{03} \cdot S^3 + \beta_{11} \cdot T \cdot S + \beta_{12} \cdot T \cdot S^2 + \beta_{21} \cdot T^2 \cdot S + \dots + \beta_{nm} \cdot T^n \cdot S^n + \varepsilon$$

$\mu$ : 비증식속도(specific growth rate; day<sup>-1</sup>)

T: 수온(temperature; °C)

S: 염분(salinity; psu)

$\beta_{nm}$ : 편회귀계수(regression coefficient)

○ 여기에서는 3차항까지 변수증감법(forward-backward stepwise selection)에 따른 중회귀분석법(multiple linear regression analysis)으로 편회귀계수(partial regression coefficient)를 구하였다.

(다) 광 조건에 따른 성장속도 변화

○ 광 조건에 따른 성장속도는 현미경에 이용한 직접 검경이 아닌, *in vivo* chlorophyll 형광값과 세포수의 관계로 평가하였다.

○ *C. polykrikoides*을 수온 20°C, 염분 30 psu 그리고 조도 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12L: 12D; cool-white fluorescent lamp)의 조건에서 세포밀도 약  $3.0 \times 10^3 \text{ cell ml}^{-1}$ 까지 증식시킨 후 농축과 희석을 통해 여러 가지 세포밀도를 조제, 형광광도계(Turner Designs; Model 10)로 *in vivo* chlorophyll 형광값을 측정하였다.

○ 광 조건은 10, 25, 50, 70, 100, 150, 250, 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (QSL-2100 Series Laboratory Radiometer, Biospherical Instrument Inc.)의 6 단계로 조절하였으며, 매일 1회 오전 10시에 형광광도계로 측정하였다. 성장속도와 조도의 관계는 Lederman and Tett (1981)의 모델을 개량한 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\mu = \mu_m \frac{I - I_0}{(K_s - I_0) + (I - I_0)} \quad (2)$$

$\mu$  : 성장속도 (specific growth rate; day-1)

I : 광량 (Irradiance;  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

$I_c$  : 광량의 역치 (compensation PFD;  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )



$\mu_m$  : 최대 성장속도 (maximum specific growth rate;  $\text{day}^{-1}$ )

$K_s$  : 반포화상수 (half-saturation light intensity;  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

(라) *C. polykrikoides*의 인산염 흡수속도

○ 흡수속도의 농도 의존성을 평가할 때는 영양염 첨가 후 그 흡수속도가 일정한 시간, 즉, 정속흡수(surge uptake)를 보이며 세포내의 영양염의 변화가 없는 시간 내에 실험을 할 필요가 있다(Harrison et al., 1989; Yamamoto and Tarutani, 1999). 그래서 영양염 흡수 실험을 수행하기 전에 영양염 흡수의 경시간적 변화를 살펴보았다.

○ 인이 고갈된 *C. polykrikoides*를 인산염이  $5 \mu\text{M}$ 로 들어 있는 500 ml 배지에 접종하였다. 배양개시 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240분에 각각 배양액을 채수하여, 인산염을 측정하였다. 여기에서 흡수속도가 일정한 시간을 영양염 흡수실험의 측정시간으로 정하였다.

○ 인산염의 흡수속도는 250 mL 배양용기(Nalgen Nunc. International Co., USA)에 각각 1, 2, 5, 10, 12, 15, 20  $\mu\text{M}$ 을 조제한 L1 배지 90 mL를 분주하였다. 인 고갈 *C. polykrikoides*가 포함된 배양액 10 mL(약 2,500 cells/mL)을 첨가하여 일정시간 배양 후, 배양액의 인산염의 농도를 몰리브덴 청법(molybdenum blue method)에 따라 측정하였다(Strickland and Parsons, 1972). 배양시간은 상기에 서술한 실험의 결과를 이용하여 45분으로 하였다. 흡수속도는 실험 전후의 영양염의 농도 차로 부터 구하였으며, 이들 농도를 Michaelis-Menten 식에 대입하여 농도 의존성을 정량적으로 파악하였다(Dugdale, 1967).

$$\rho = \rho_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

여기에서

$\rho_{\max}$  : 영양염 최대 흡수속도( $\text{pmol cell}^{-1}\text{hr}^{-1}$ )

$K_s$  : 반포화상수( $\mu\text{M}$ )

S : 영양염 농도( $\mu\text{M}$ )

변수값( $\rho_{\max}$ ,  $K_s$ )는 실험값을 식(1)에 대입하여 비선형최소자승법으로 계산하였다(Abe, 1985).

표 19. 배양실험에 사용한 인(phosphorus) 공급원

Phosphorus sources	Abbreviation
Adenosine 5-monophosphate	AMP
Adenosine 5-diphosphate	ADP
Adenosine 5-triphosphate	ATP
Cytidine 5-monophosphate	CMP
Fructose 6-phosphate	F6P
Glucose 1-phosphate	G1P
Glucose 6-phosphate	G6P
Glycerophosphate	Glycero-P
Ribose 5-phosphate	R5P
Uridine 5-monophosphate	UMP
<i>p</i> -phenyl phosphate	Phenyl-P
Fructose 1, 6-diphosphate	FDP
Metaphosphate	Meta-P
Pyrophosphate	Pyro-P
Tripolyphosphate	Tripoly-P
Orthophosphate	Ortho-P

(마) 식물플랑크톤의 용존태 유기 및 무기인 이용성

- 용존태 유기 및 무기물의 이용성을 파악하기 위해 최근 여러 해역에서 자주 제한 요소로 작용하는 인을 중심으로 살펴보았다.
- 본 실험은 dissolved inorganic phosphorus(DIP) 4 종, phosphomonester(PME) 8종, phosphodiester(PDE) 1종 그리고 아데닐산 3종을 인(phosphorus) 공급원으로 이용하였다(표 20).
- 인이 고갈된 세포를 약 100 cells ml<sup>-1</sup>가 되도록 접종하였으며, 각각 배양액의 용존태 인의 초기농도를 약 5 μM이 되게 하였다. 그리고 이를 간격으로 오전 10시에 *in vivo* chlorophyll 형광 값을 측정하였다. 성장속도는 대수 성장(exponential growth)을 보이는 기간 동안의 형광 값을 이용하여 (1)식에 의해 계산하였다.

표 20. 배양실험에 사용한 인(phosphorus) 공급원

Phosphorus sources	Abbreviation
Adenosine 5-monophosphate	AMP
Adenosine 5-diphosphate	ADP
Adenosine 5-triphosphate	ATP
Cytidine 5-monophosphate	CMP
Fructose 6-phosphate	F6P
Glucose 1-phosphate	G1P
Glucose 6-phosphate	G6P
Glycerophosphate	Glycero-P
Ribose 5-phosphate	R5P
Uridine 5-monophosphate	UMP
<i>p</i> -phenyl phosphate	Phenyl-P
Fructose 1, 6-diphosphate	FDP
Metaphosphate	Meta-P
Pyrophosphate	Pyro-P
Triphosphate	Triphospho-P
Orthophosphate	Ortho-P

(바) *C. polykrikoides*의 alkaline phosphatase activity

○ 배양은 AK 인공해수를 바탕으로 한 L1 배지를 이용하여 대수성장기 (log-phase) 후기의 세포를 2 L의 배양용기에 최종세포밀도가 약  $100 \text{ cells ml}^{-1}$  이 되게 접종하였으며, 인산염의 초기농도는 약  $5 \mu\text{M}$ 이 되게 하였다. 배양온도와 염분은 수온  $20^\circ\text{C}$ 와 염분 30 psu, 광량은 약  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (12L : 12D; cool-white fluorescent lamp)에서 실시하였다.

○ 이틀에 한번 배양액 중 일부를 취해서 세포밀도, 인산염 그리고 APase 활성도를 측정하였으며, 세포밀도는 도립현미경(TE2000-S, Nikon)하에서 계수하였고, 인산염은 Strickland and Parsons (1972)에 따라 비색 정량하였다. APase 활성도는 disodium phenylphosphate를 기질로 이용하여 비색 정량하였다.

## (2) 결과 및 고찰

(가) 수온과 염분의 변동에 따른 성장속도의 변화

○ 본 연구에서 수행되어진 수온과 염분 단계에 대한 성장속도 그래프를 그림 95에 나타내었다. *C. polykrikoides*는 15 psu의  $15^\circ\text{C}$ 를 제외하고는 모든 수온과 염분 범위에서 성장을 하였다. 15 psu에 수온에 대한 성장속도의 범위는  $0.10\text{-}0.12 \text{ day}^{-1}$ 이며, 20 psu에서는  $0.10\text{-}0.21 \text{ day}^{-1}$ , 25 psu에서는  $0.13\text{-}0.29 \text{ day}^{-1}$ , 30 psu에서는  $0.16\text{-}0.35 \text{ day}^{-1}$  그리고 35 psu에서는  $0.20\text{-}0.32 \text{ day}^{-1}$ 이었다. 이들 성장속도를 각각의 수온과 염분에 대한 contour plotting을 작성하면, 최대성장속도는  $25^\circ\text{C}$ 와 30 psu에서  $0.35 \text{ day}^{-1}$ 의 성장속도를 보였다(그림 96). 또한 최대 성장속도의 85%를 차지하는  $0.30 \text{ day}^{-1}$ 이상의 성장속도는  $25^\circ\text{C}$ 에서 25-35 psu의 수온과 염분 구배로 고온, 고염에서 높은 성장속도를 나타내는 특성을 보였다.

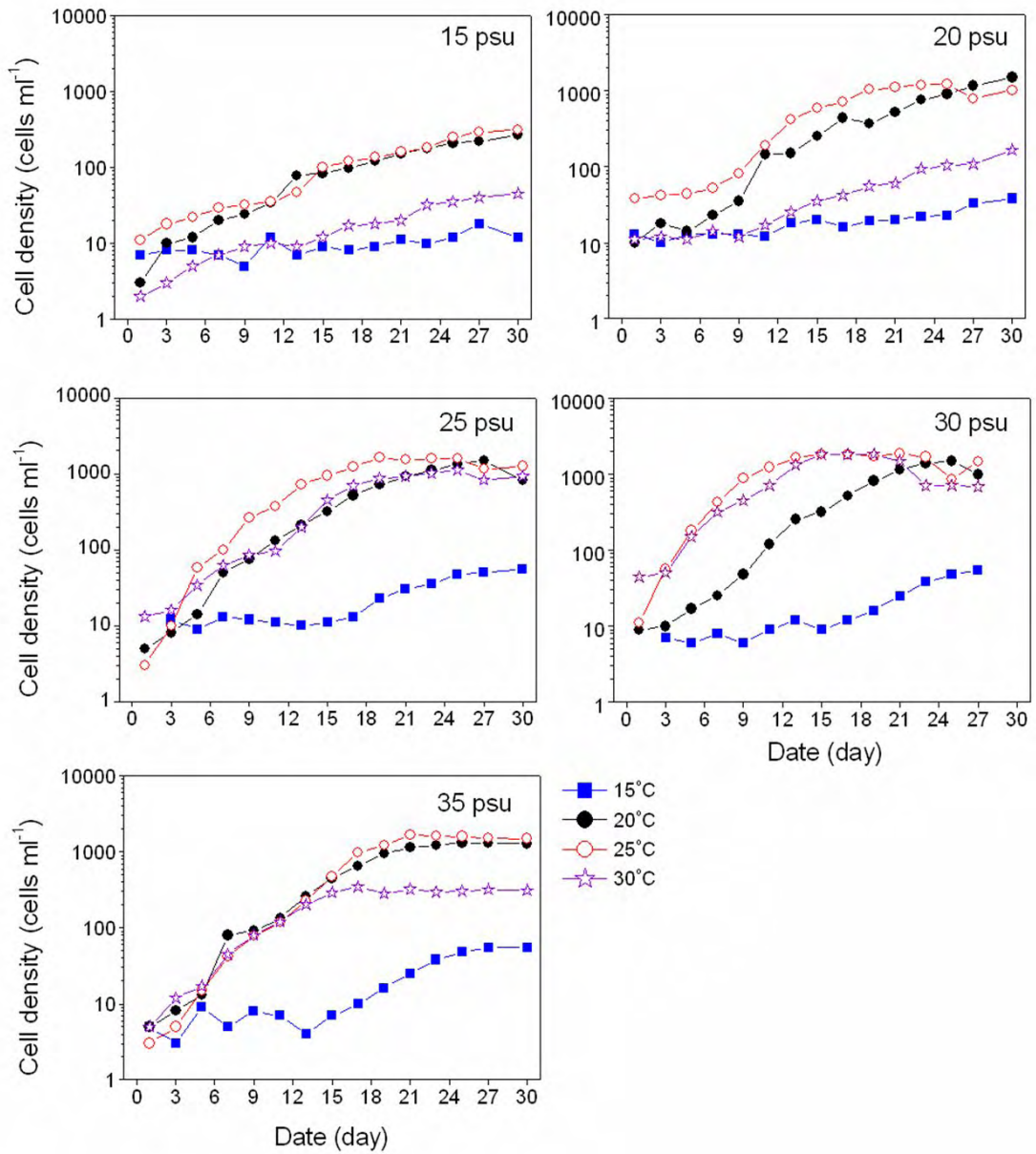


그림 95. 각각의 수온과 염분에 대한 *C. polykrikoides*의 성장곡선. 각각의 값은 triplicate data의 평균으로 나타내었다.

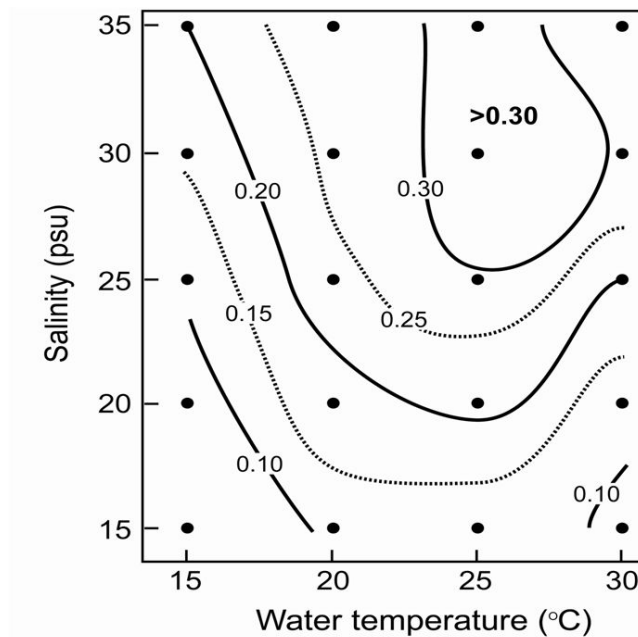


그림 96. 각각의 수온과 염분에 대한 *C. polykrikoides* 성장곡선의 contour plot.

○ *C. polykrikoides*의 배양실험으로 얻어진 성장속도에 따른 수온과 염분의 조건을 이용한 이원 배치 분산분석(two-factor ANOVA) 결과, 0.05% 수준 내에서 본 종의 성장속도에 대한 수온과 염분의 유의한 영향을 나타내었다. 수온과 염분 및 그들의 교호작용의 제곱 합(sum of squares)은 총 제곱 합(total sum of squares)에서 각각 30.5%, 65.8% 그리고 96.3%를 설명하고 있기 때문에 *C. polykrikoides*의 성장속도는 염분이 수온보다 영향을 미친다고 할 수 있지만, 그 보다 두 함수의 교호작용이 성장에 있어 더 큰 영향을 주는 것을 알 수 있다(표 21).

표 21. *C. polykrikoides*의 배양실험으로 얻어진 성장속도에 따른 수온과 염분의 조건을 이용한 이원 배치 분산분석(two-factor ANOVA) 결과

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Mean square	F value	P value
Temperature	3	0.058	0.019	33.258	4.279E-6
Salinity	4	0.124	0.031	53.866	1.441E-7
Interaction	7	0.182	0.026	45.034	1.119E-7
Error	12	0.007	5.58E-4	-	-
Corrected total	19	0.189	-	-	-

○ 또한, 얻어진 결과를 수온과 염분의 2인자 요인으로 해석한 결과, *C. polykrikoides*은 수온 또는 염분의 각각의 주효과와 그것들의 상호작용이 1%수준

에 유의하였다. 변수는 3차항까지 하였으며, 변수증가법에 따른 중회귀분석에 따라 편회귀계수를 구하였다. 따라서 얻어진 회귀식은 다음과 같다.

$$\mu = -0.050 \cdot S + 0.002 \cdot T^2 + 0.003 \cdot S^2 - 0.00007597 \cdot T^3 - 0.000035 \cdot S^3 + 0.0000457 \cdot T^2 S - 0.00003529 \cdot T S^2 \quad (2)$$

○ 여기서 중회귀계수는 0.995(F=159.819; <0.0001)로 광조건, 영양염 그리고 포식과 피식과 같은 환경요소를 제외한 수온과 염분 함수만을 이용하여 *C. polykrikoides*의 성장속도를 추정할 수 있다(그림 97).

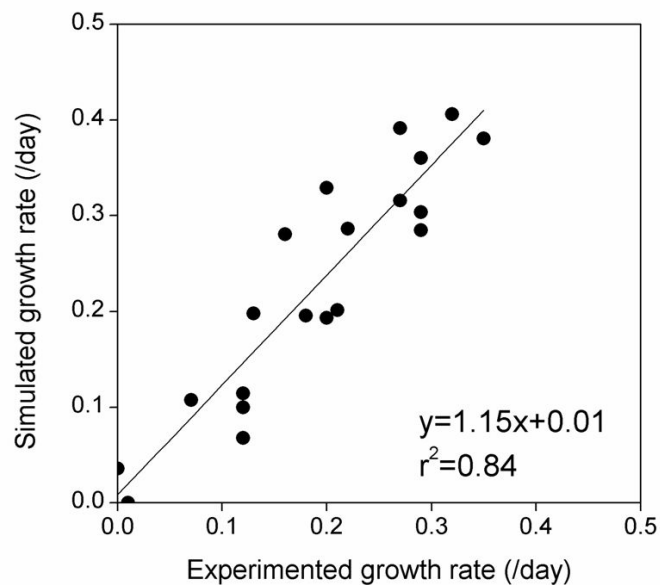


그림 97. *C. polykrikoides*의 이론적 성장속도와 실측된 성장속도 사이의 관계.

(나) 광 조건에 따른 성장속도 변화

○ 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 조도에서는 *C. polykrikoides*이 성장하지 않았지만, 25-100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서는 조도의 증가와 함께 성장속도도 증가하였다(0.08-0.20  $\text{day}^{-1}$ ). 150-300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 성장속도는 0.24-0.26  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이며, 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  이상의 성장속도는 거의 유사하였다(그림 98).

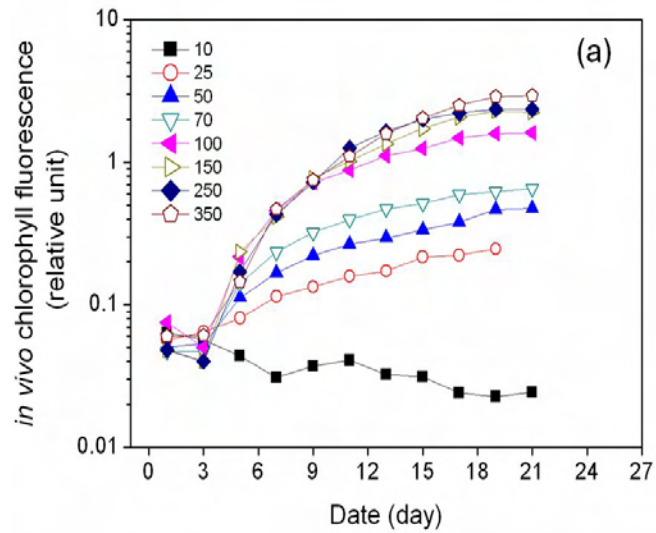


그림 98. 여러 가지 광조건(12L: 12D)에서 성장한 *C. polykrikoides*의 *in vivo* chlorophyll fluorescence 값.

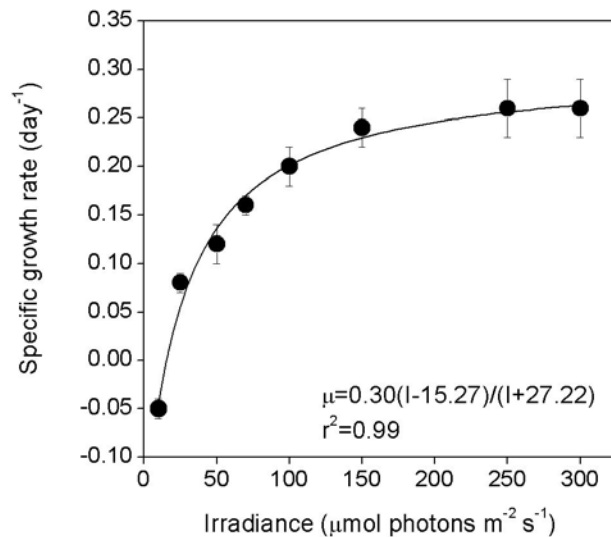


그림 99. 여러 가지 광조건에서 *C. polykrikoides*의 성장 속도.

○ 비선형최소자승법에 따라 유도된 식은  $\mu = 0.30 \cdot (I - 15.27) / (I + 27.22)$ , ( $r = 0.99$ )로,  $\mu_m$ 은  $0.30 \text{ day}^{-1}$ ,  $I_0$ 는  $15.27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $K_s$ 는  $53.18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 로 나타났다(그림 99).

○ *C. polykrikoides*는 배양에 사용된 최대광량인  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 에서 일부 식물 플랑크톤에서 보고되는 광 저해현상(photoinhibition)은 나타나지 않았다(그림 99).



○ 자란만에서  $I_c$ 에 해당하는 수심을 Lambert-beer식( $I_z = I_0 e^{-kz}$ ;  $I_z$ 은 수심  $z$ 에서의 광량,  $I_0$ 는 해면에서 광량,  $z$ 은 수심,  $k$ 는 빛의 소산계수)에 대입하여 간접적으로 계산할 수 있다. 이때 소산계수는 2009년도 자란만에서 조사한 평균 투명도를 이용하여 계산하였다,  $I_0$ 는 하계의 평균 광량인  $2,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 해수면으로 입사할 때 50%가 감소한다고 고려하여  $1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 을 대입하였다. 계산 결과, *C. polykrikoides*의 생장에 필요한  $I_c$ 에 해당하는 수심은 약 11 m로 계산되었다(그림 100).

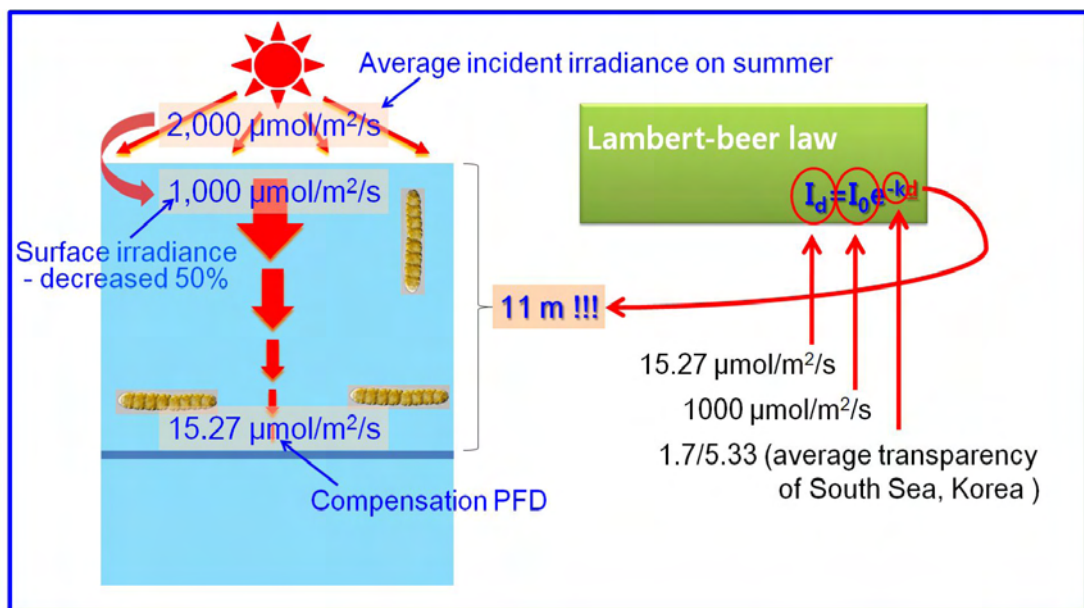


그림 100. Lambert-beer식을 이용하여 자란만에서 *C. polykrikoides*의  $I_c$ 에 해당하는 수심을 계산한 모식도.

○ 이 수심은 자란만의 경우 저층까지 해당되며(평균 7.7 m), 남해안 외양양의 경우 수온약층보다 깊은 수심으로 *C. polykrikoides*의 광 이용만을 고려하면 남해 연안해역 어디에서도 이종의 유영세포가 발견될 수 있다. 따라서 *C. polykrikoides*는 표층에 영양염류가 고갈되어 있을 경우 이 종의 비교적 빠른 유형 능력과 낮은  $I_c$ 에 기인해 저층에 풍부한 영양염을 섭취할 수 있을 것이다.

○ *C. polykrikoides*는 이분열에 따라 체인을 형성하여 비교적 빠른 속도로 유영한다. Fraga et al. (1989)에 따르면 체인을 형성하는 종은 그렇지 않는 종보다 빠른 유영속도를 가진다고 하였으며, *C. polykrikoides*의 경우, 약  $3-4 \text{ m hr}^{-1}$ 의 수직이동속도로(Park et al., 2001), *G. catenatum*와 같이 긴 체인을 형성하는 종( $1.2 \text{ m hr}^{-1}$ ; Baba et al., 2001)보다도 높은 수직이동속도를 보인다. 이는 표층보다 풍부한 영

양염을 섭취하기 위해 저층으로 하강한 후 필요한 영양염을 흡수하고, 일출에 광합성을 위해 표층으로 상승할 수 있다는 것을 의미한다.

○ Lee and Kim (2007)의 보고에 따르면 저층의 지하수 유출에 따라 용존태 유기물의 공급은 무기영양염이 제한된 해역에 식물플랑크톤의 적조를 유발시키는 주요 원인으로 제공한다고 언급하였다. 따라서 *C. polykrikoides*의 경우 수심 13 m 내외에 영양염 공급원이 있는 경우 저층까지 빠른 속도로 유영하여 그들의 성장에 이용할 수 있을 것으로 생각된다. 와편모조류 중 *K. mikimotoi*와 *Heterocapsa circularisquama*의 경우도 저층의 부영양화가 적조 형성의 원인 중의 하나로 취급되어지고 있으며, 저층의 정화 작용 없이 이들 bloom을 제어할 수 없을 것이라고 보고하고 있어(Yamaguchi and Honjo, 1989; Oh et al., 2004), I<sub>0</sub>에 따른 유형능력제한은 종경쟁에서 중요한 요인이 될 수 있다.

(다) *C. polykrikoides*의 인산염 흡수속도

○ *C. polykrikoides*에 따른 인산염 흡수는 배양초기부터 45분까지 거의 비슷한 흡수속도를 보였지만(0.53~0.65 pmol cell<sup>-1</sup>hr<sup>-1</sup>), 60분에서 240분은 앞의 시간대보다 흡수속도가 현저히 낮아졌다(0.20-0.27 pmol cell<sup>-1</sup>hr<sup>-1</sup>; t-test, p<0.05). 따라서 *C. polykrikoides*의 흡수속도 실험을 위한 시간설정을 45분으로 하였다(그림 101).

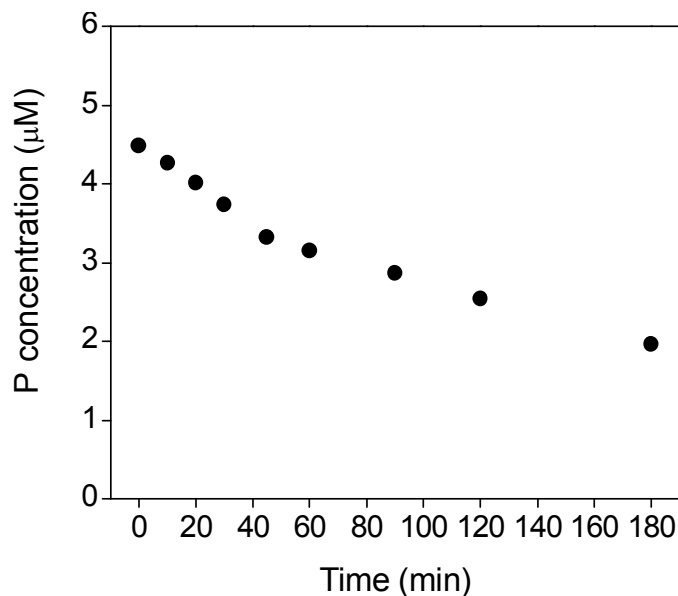


그림 101. *C. polykrikoides*의 인(phosphorus)이 제한된 정치 배양에서 시간에 따른 배양액 중 인산염 농도 변화.

○ *C. polykrikoides*의 흡수실험은 10  $\mu\text{M}$ 까지는 농도가 증가함에 흡수속도가 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 유사하였다. 이를 Michaelis-Menten식에 대입하여 본 결과 요인간의 상관계수( $r$ )는 0.90으로 높은 인과관계를 보였다. 이때  $\rho_{\text{max}}$ 는  $0.80 \text{ pmol cell}^{-1}\text{hr}^{-1}$ ,  $K_s$ 는  $1.87 \mu\text{M}$ 이었다(그림 102).

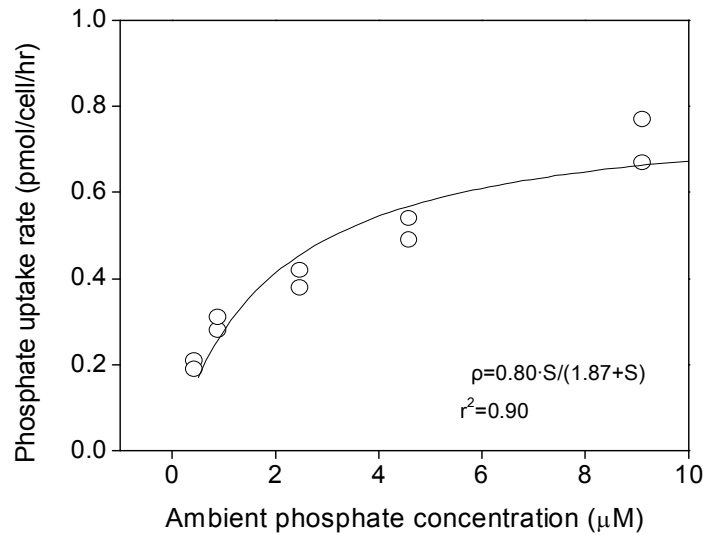


그림 102. 용존태 무기인의 첨가량에 따른 *C. polykrikoides* 인의 흡수속도.

○ 일반적으로 반포화상수( $K_s$ )는 제한 영양염에 대한 친화성(affinity)을 나타내는 기준으로(Dugdale, 1967), 이 값이 높을수록 영양염에 대한 친화성이 낮으며, 세포 크기가 큰 종이 대략 높은  $K_s$  값을 보인다. 본 연구에서 얻어진 *C. polykrikoides*의  $K_s$  값( $1.87 \mu\text{M}$ )은 *G. catenatum*과 *A. tamarense*보다는 낮은 값이었으나, 규조류 *Skeletonema costatum*의  $K_s$ 값보다는 높았다. 이와 같은 결과는 본 종이 대표적인 연안역 우점종인 *S. costatum*보다는 무기영양염류에 대한 친화성이 낮다는 것을 의미한다(표 22).

표 22. *C. polykrikoides*와 다른 식물플랑크톤의 인 (phosphorus)의 흡수 동력학 실험에 의해 도출된 변수 비교

Species	Constants					References
	$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )	$P_{\text{max}}$ ( $\text{pmol}/\text{cell}/\text{hr}$ )	$Q_0$ ( $\text{pmol}/\text{cell}$ )	$V_{\text{max}}$ (/day)	$V_{\text{max}}/K_s$	
<i>Alexandrium tamarense</i>	2.60	1.40	0.56	60.0	23.1	MacIsaac et al. (1979)
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	1.87	0.80	0.37***	51.9	27.7	This study
<i>Gymnodinium catenatum</i>	3.40	1.42	1.83	18.6	5.48	Yamamoto et al. (2004)
<i>Gymnodinium catenatum**</i>	2.65	1.39	1.27	26.2	9.87	Oh et al. (2007)
<i>Gymnodinium mikimotoi</i>	-	-	0.25	-	-	Yamaguchi and Itakura (1999)
<i>Chattonella antiqua</i>	1.90	0.14	0.60	5.60	2.95	Nakamura (1985)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	-	-	0.095	-	-	Watanabe et al. (1982)
<i>Skeletonema costatum</i>	0.68	0.0384	0.0033	279	411	Eppley et al. (1969)

\* Hiroshima strain

\*\* South Sea strain

\*\*\* Kim et al. (2007)로부터 인용

○ 자란만에서 용존태 무기인(dissolved inorganic phosphorus; DIP)의 농도는 춘·하계에 평균  $0.21 \mu\text{M}$ 로 본 실험에서 밝혀진  $K_s$ 보다 상당히 낮은 농도를 나타내었다. 이는 본 해역에서 DIP가 성장을 제어하는 중요한 요소로 작용할 수 있을 것으로 보이며, 성장을 위해서는 유기 영양염이 필요할 것으로 생각된다.

(라) *C. polykrikoides*의 용존태 유기인 및 무기인 이용성

○ *C. polykrikoides*는 인 공급원으로써 Ortho-P만큼 다양한 용존태 유기인(dissolved organic phosphorus; DOP) 화합물을 이용하여 성장을 유지하였다. *C. polykrikoides*는 PME에서  $0.13 \sim 0.19 \text{ day}^{-1}$ 의 성장속도를 보여 Ortho-P의 성장속도에 약  $92 \pm 12\%$ 에 해당하였다. AMP, ADP 및 ATP와 같은 nucleotide 계열의 DOP 화합물의 경우 Ortho-P의 성장속도와 유사하게 나타났다. 따라서 *C. polykrikoides*는 DIP가 제한된 환경에서는 DOP를 이용하여 성장 할 가능성이 클 것으로 보인다(그림 103).

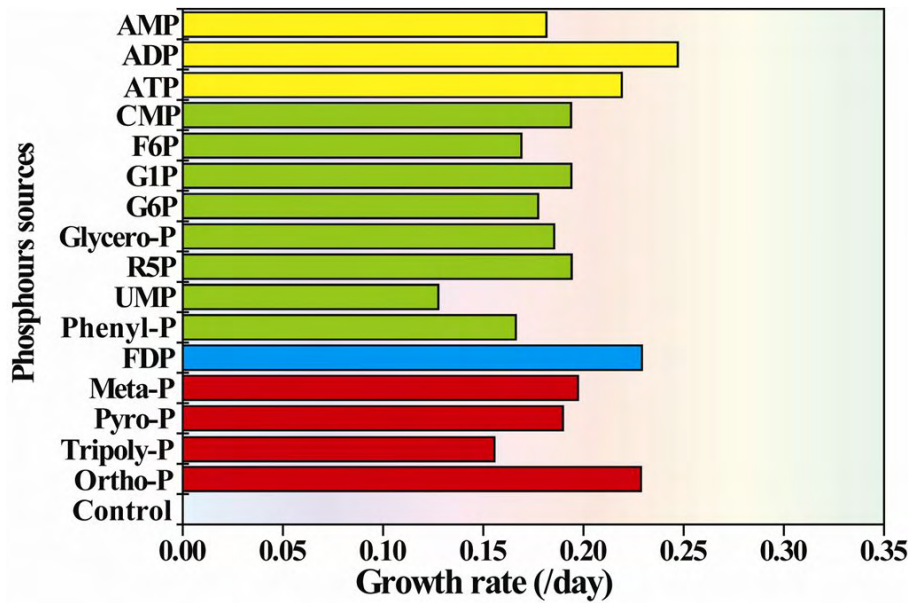


그림 103. 여러 가지 용존태 인(유기태와 무기태)의 첨가에 따른 *C. polykrikoides*(남해 자란만 strain)의 성장속도. 황색, 녹색, 적색 bars는 각각 nucleotide, PME, 그리고 DIP를 의미한다.

○ Yamaguchi et al.(2004)는 *Karenia mikimotoi*, *Skeletonema costatum*, *Heterosigma akashiwo*는 성장을 위해서 orthophosphate, pyrophosphate, tripolyphosphate, metaphosphate와 같은 DIP이외에 ADP, ATP와 같은 nucleotide 계열의 DOP를 잘 이용한다고 보고하였고, Oh et al. (2002)도 *G. catenatum*와 *A. tamarense*가 성장을 유지하기 위한 인 공급원으로써 ADP, ATP와 같은 DOP를 이용한다고 보고하였다. 이외에도 와편모조류 *Alexandrium catenella*(Matsuda, 1999), *Chattonella ovata*(Yamaguchi et al., 2008), 규조류 *Coscinodiscus wailesii*(Nishikawa and Hori, 2004a), *Eucampia zodiacce*(Nishikawa and Hori, 2004b) 등이 동일한 결과를 보고하였으며, 본 연구의 *C. polykrikoides* 역시 AMP, ADP, ATP는 DIP만큼 성장에 효율적으로 이용하였다. 따라서 adenosine 계열의 화합물의 가수분해 효소인 nucleotidase은 대부분 식물플랑크톤에서 공통적으로 가지고 있는 것으로 보이며, 자연환경에서  $\text{ng L}^{-1}$  단위로 존재하는 것으로 알려져 있지만 (Hodson et al., 1981), DOP 중 유일하게 대부분의 식물플랑크톤이 이용 가능할 것으로 생각된다. 따라서 *C. polykrikoides*는 DIP가 제한된 환경에서는 DOP를 이용하여 성장할 가능성이 클 것으로 보인다.

(마) *C. polykrikoides*의 alkaline phosphatase 활성

○ 식물플랑크톤이 DOP를 이용하기 위해서는 가수분해 효소가 필요하며 orthophosphate(Ortho-P)를 유리시켜 생장에 이용한다( $\text{RO-PO}_3\text{H}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_3\text{PO}_4$ ; Kuenzler and Perras, 1965). 이러한 가수분해 효소는 인산 화합물질의 종류에 따라 다양하지만, 통상 ester결합을 가지는 인 화합물을 가수분해하는 효소를 phosphatase라 부르며, 알칼리성에서 최적 활성도를 가지는 alkaline phosphatase(APase)와 산성에서 최적 활성도를 가지는 acid phosphatase로 나뉜다(Cembella et al., 1984; Hernández et al., 1994). 이 중 APase는 sugar phosphate, nucleotide phosphate, phospholipid (glycerophosphate)와 같은 phosphomonoester의 가수분해에 기여하며(Price and Morel, 1990), 식물플랑크톤의 세포표면에 불안정한 상태로 결합되어 있어 세포의 용해나 상위포식자의 섭식작용과 같은 물리적 작용에 의해 주변해수로 분리되기도 한다(Kuenzler and Perras, 1965; Cembella et al., 1984; Wetzel, 1991). 더욱이 APase는 현장실험 및 배양실험을 통하여 DIP의 감소에 따라 활성이 증가하는 것으로 알려져 자연군집과 식물플랑크톤의 배양실험에서 인 제한의 지표로 유용하게 이용되고 있다.

○ *C. polykrikoides*는 세포 성장

이 진행될수록 배양액내의 DIP 농도는 점차 감소하며, APase 활성은 점차 증가하는 경향을 보였으며, 세포의 생장이 정지기(stationary phase)에서 최대 APase 활성이 검출되었다(그림 104). *C. polykrikoides*는 배양액내의 DIP 농도가  $0.83 \mu\text{M}$  일 때(11일후), APase 활성이 최초로 검출되었으며,  $0.70 \text{ pmol cell}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ 의 최대 활성을 보였다.

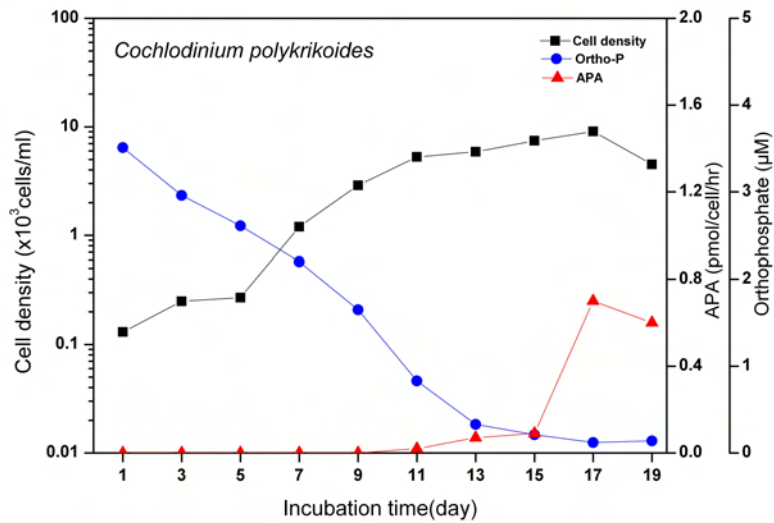


그림 104. 인(phosphorus)이 제한된 배지배양에서 *C. polykrikoides*의 세포수와 alkaline phosphatase (APase) 활성의 변화.

○ 일반적으로 일부 식물플랑크톤은 무기인의 농도가 저하되면 세포표면에서 APase 활성이 유도되는 것으로 알려져 있다. 하지만 종에 따라 APase가 활성화되는 초기 임계 농도가 얼마인지에 관한 식견은 부족한 실정이다. Oh et al. (2002)는 이와 같은 임계농도가 DIP의 이용성과 밀접한 관련이 있어, 흡수 동력학 실험에서 도출되는  $K_s$ 와 유사함을 제시하였다.

○ 식물플랑크톤의 특정 영양염류에 대한 친화도(affinity)는 영양염 흡수 및 성장동력학 실험에서 도출된 반포화상수( $K_s$ )로 나타낼 수 있다. 하지만, 흡수 동력학 실험에서 도출된  $K_s$ 는  $1.87 \mu\text{M}$ 로 APase가 활성화되기 시작하는 임계 농도보다 약 2배 높았다. 금후에도  $K_s$ 와 APase 임계농도 사이의 관계는 검토할 필요성이 있을 것으로 판단된다. 그렇지만, 자란만의 DIP의 농도를 고려하였을 때 이 해역에서 *C. polykrikoides*이 성장하기 위해서는 APase 활성을 보여 DOP를 이용할 것으로 생각된다.

## 나. 살조 바이러스의 분리 및 생리·생태 특성

### (1) 연구배경 및 중요성

○ 약 20 여 년 전 처음으로 해양에 바이러스 혹은 바이러스입자와 같은 것들의 존재가 보고된 이후, 여러 연구를 통하여 해양에 존재하는 바이러스의 양이 처음 생각했던 것 보다는 훨씬 더 많은 농도로 존재하고 있는 것으로 추정되어져 왔다 (Van Etten et al., 1991). 또한 해양 바이러스의 양을 여러 가지 간접적인 방법들을 통하여 추정한 결과, 해수 1 ml 당  $10^6$ - $10^9$  의 바이러스입자가 존재하는 것으로 보고되고 있다.

○ 해양 바이러스의 대부분은 해양 세균에 감염하는 bacteriophage이지만 해양의 다양한 조류(algae)에서도 바이러스들이 존재하고 있는 것이 밝혀져 왔다. 따라서 해양의 조류 바이러스에 관한 연구는 지구환경에 관한 생태학적 혹은 적조방제와 같은 측면의 연구이외에도, 바이러스의 기초생물학적인 연구에 있어서도 중요한 의의를 가지고 있다.

○ 조류 바이러스는 특성상 살아 있는 적절한 숙주 생물이 필요하므로 이러한 점을 이용하여 현재 일본에서 적조방제와 관련된 연구가 수행되어지고 있다. 예를 들면, 일본 세토내해구수산연구소의 Nagasaki 연구그룹은 바이러스가 적조를 일으키는 조류인 *Heterosigma akashiwo*의 사멸에 관여하고 있고, 바이러스와 조류가 상호간 집단 역동성(Dynamics)에 영향을 미치고 있는 것으로 보고하고 있다 (Nagasaki and Yamaguchi, 1997). 또한 최근에는 계속적인 연구를 통하여 다양한 조류를 사멸시킬 수 있는 새로운 바이러스를 해마다 분리하고 있다 (Nagasaki et al., 2004; 2005).

○ 현재까지 연구되고 잘 알려진 조류 바이러스는 대부분 double-stranded (ds) DNA 형태를 가지고 있으며, 유전자의 크기 또한 다른 육상 생물에서 발견되어 온 일반적인 바이러스의 크기에 비해 엄청난 크기의 게놈을 가지고 있다. 그 바이러스의 입자 크기 또한 보통 >100 nm 보다 커서, 흔히 “거대 바이러스(Giant virus)”로 불린다 (Van Etten et al., 1991; Van Etten et al., 2002). 이 조류 바이러스들의 게놈의 분석결과 이들 거대바이러스는 대부분 *Phycodnaviridae* 로 분류되어져 있으나 보다 정확한 바이러스의 분류를 위하여서는 좀 더 많은 면밀한 연구가 필요하다 (Van Etten and Ghabrial, 1991).

○ 현재 조류 바이러스에 대한 연구는 미국, 캐나다, 일본을 중심으로 이루어지고 있으며, 그 역사가 짧고 그 중요성에 비하여 비교적 잘 알려지지 않은 분야이어서 세계적으로 소수의 연구인력들이 이 분야의 연구에 종사하고 있다. 조



류 바이러스는 해양 생태계에서 광합성 생물의 사멸, 영양분의 순환, 적조 및 녹조 생물의 제거 등 다양한 역할을 하고 있으므로 장래 이들에 대한 연구가 확대될 것으로 기대되고 있다.

## (2) 선행연구 분석

### (가) 조류 바이러스 연구 현황

○ 수생 생태계에 다양한 조류 (algae)에서도 바이러스들이 존재하고 있는 것이 밝혀져 왔으며, 이들은 현재 양식업에 막대한 피해를 입히고 있는 적조 (red tide) 를 제어하기 위한 하나의 방법으로써 기대되고 있다(Hallegraeff, 1993; Nagasaki et al., 2004; 2005).

○ 일본의 Nagasaki연구팀에 의하면 바이러스가 적조를 일으키는 조류인 *Heterosigma akashiwo*의 사멸에 관여하고 있으며 바이러스와 조류가 서로 서로의 집단의 역동성에 영향을 미침 (Nagasaki and Yamaguchi, 1997). 또한 일본에서는 지속적인 연구를 통해 적조를 일으키는 다양한 조류를 사멸시킬 수 있는 새로운 바이러스를 해마다 분리 (Nagasaki et al., 2004; 2005; 2007; 2008)하고 있다.

### (나) 조류 바이러스의 일반적인 특징

현재까지 연구되고 잘 알려진 조류 바이러스는 대부분 double-stranded (ds) DNA 형태를 가지고 있다. 유전자의 크기도 다른 육상 생물의 바이러스에 비하여 엄청난 크기의 게놈을 가지고 있다. 바이러스의 입자 크기 또한 보통 >100 nm 보다 커서, 흔히 “거대 바이러스”로 불린다 (Van Etten et al., 1991; Van Etten and Meints, 1999). 이들 바이러스의 게놈의 분석결과 대부분 *Phycodnaviridae* 로 분류하고 있다 (Van Etten and Ghabrial, 1991). *Phycodnaviridae*는 핵산으로 dsDNA (160~560 kb)를 가지고 있으며, 감염 숙주의 종류에 따라 Chlorovirus, Prasinovirus, Prymnesiovirus, Phaeovirus, Coccolithovirus, Rapidovirus 등으로 구분한다.

## (3) 재료 및 방법

### (가) 조류 바이러스 탐색을 위한 숙주 확보

국내의 바이러스 분리를 위해서는 숙주의 확보가 필수적이며 필요한 숙주 확보를 위해 이 중 일부는 국립수산과학원(NFRDI)에서 분양받은 규조류를 포함한 편모조류, 와편모조류 총 35개의 strain을 분양받았다. 또한 연구

개시 후 국내의 연안으로부터 해수를 채수하여 125um filter와 20um filter를 이용하여 동물플랑크톤을 제거한 후, 농축을 하여, Direct Isolation을 통하여 1 cell씩 분리한 후, 광학현미경을 이용하여 증식 정도를 확인한 후, 성장이 좋은 clone을 중심으로 bacteria-free 조건을 만들기 위하여 dilution end point method 또는 capillary method를 이용하여 오염된 세균을 제거하여 필요한 strain을 확보하였다(그림 105).

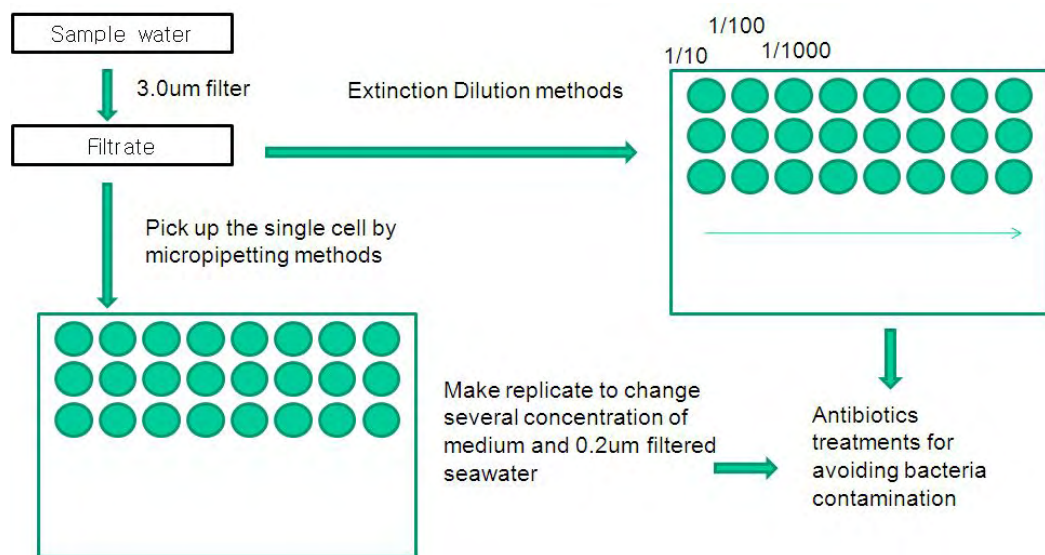


그림 105. Host Isolation Procedures.

(나) 국내 연안에서 새로운 조류 바이러스 탐색

○ 2009년 2월 말부터 시작하여 2010년 9월 초까지 남해안의 총 4개 조사정점을 선택하여 표층수와 5m부근, 바닥에서 1m 위의 지점에서 해수 1L씩을 채수하였으며, corring 방법을 통하여 침전물을 확보하였다. 각 조사정점은 지도로 표시하였다(그림 106).

○ 순수 배양된 숙주에 0.8um filter로 여과한 해수 또는 침전물을 접종하여 광학현미경을 통해 2주간 숙주세포의 lysis여부를 관찰한다. 만약 lysis가 일어났으면 이를 다시 바이러스에 의한 감염인지 확인을 하기 위하여 박테리아와 바이러스의 크기 구분을 위해 lysate를 0.22um filter로 여과한 후 다시 접종하여 lysis의 발생유무에 의하여 바이러스의 존재 여부를 확인하였으며, 바이러스의 존재 여부가 확인되면 dilution end point method를 이용하여 순수한 바이러스 strain을 확보하였다.

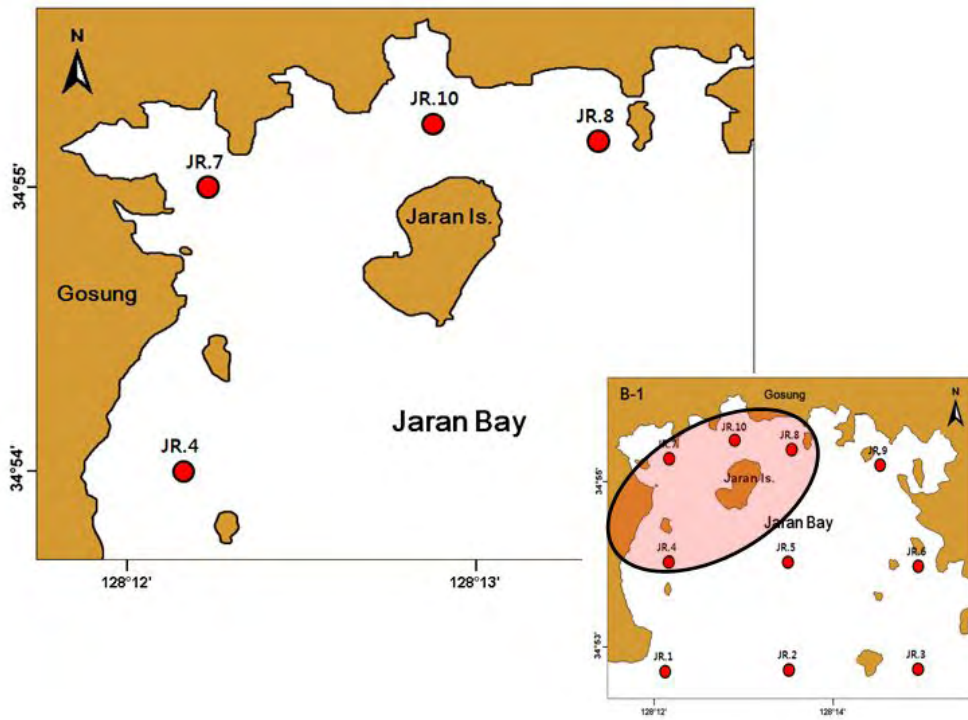


그림 106. Location of the sampling station in Namhae area.

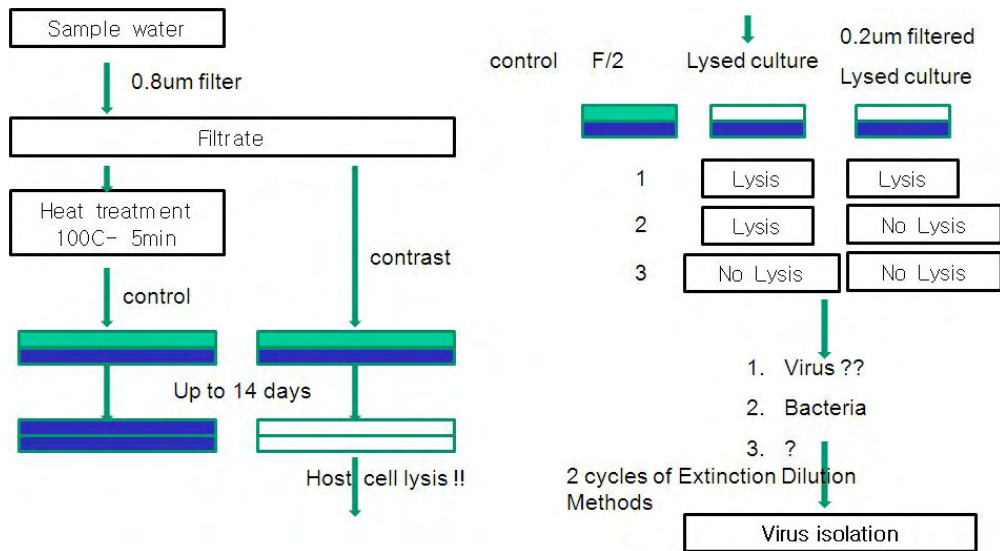


그림 107. Virus Isolation Procedures.

(다) 조류 바이러스의 생리·생태적 특성 연구

○ 확보된 조류바이러스의 생리·생태적 특성연구를 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

① 투과전자현미경(TEM)을 이용한 내부구조 관찰

Negative straining법을 통해 바이러스의 존재여부를 관찰하였으며, 바이러스에 감염된 숙주세포의 내부구조를 보고 바이러스 감염 여부를 확인하였다. Lysis가 일어나기 시작한 숙주세포를 6시간 단위로 2mL씩 sampling하여 1% Glutaraldehyde와 2% OsO<sub>4</sub>로 4℃, 암소에서 1시간동안 동시고정을 한다. 후에 2% OsO<sub>4</sub>로 2차 고정을 한다. Dehydration (10, 30, 50, 75, 80, 90, 100%(3회)) 단계와 Infiltration(20, 50, 70, 80, 90, 95%, 100%)단계를 거쳐 Block을 만든다. (Poly/Bed812<sup>®</sup> Embedding Kit, Polyscience, Inc) Block을 Trimming 한 후, 70nm 두께로 Thin-section한 후 Uranyl Acetate로 염색, 투과전자현미경으로 관찰하였다. 이 후, 완전히 lysis가 일어난 숙주세포를 Lead Citrate와 Uranyl Acetate로 염색을 하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

② 숙주 및 바이러스의 성장실험

분리된 조류바이러스의 그 숙주세포의 감염실험을 통해 감염 후 바이러스가 터져 나올 때까지의 시간 및 virus titer를 확인하였다. 실험구와 대조구 용으로 두 개의 F/2배지를 준비한 후에 각각 숙주세포의 cell/mL양이 비슷한 수준을 유지하도록 정량을 하여 접종을 하여 대수증식기가 될 때까지 1일 (24시간)단위로, 대수증식기가 시작되는 시점에 바이러스 접종을 하여 초기에는 4시간(0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40hrs) 단위로 샘플링을 하였다. Direct counting법을 이용하여 광학현미경 하에서 숙주세포를 오차를 줄이기 위하여 각각 3회씩 counting하였으며, 단계적으로 Virus양을 희석하여 숙주의 감염정도를 보는 MPN방법을 이용하여 Virus titer checking을 하였다.

③ 분리된 바이러스의 숙주특이성 실험

다양한 속(Genus)의 34개의 Host strain에 새로 분리한 *Prorocentrum minimum* Virus strain을 감염시켜서 2주간 확인하여 바이러스의 숙주특이성을 갖는지 여부를 확인하였다.

(라) 결과 및 고찰

① *Heterocapsa pygmaea* infecting virus (HpDNAV)

○ 2009년 7월 28일 자란만 정점 1과 4의 표층해수 시료에서 *Heterocapsa pygmaea*를 감염시키는 바이러스가 분리되었다. 이는 가설 1. 특정 질병에 걸린 모든 숙주에는 동일한 병원균이 존재하여야 하고, 2. 질병에 걸린 숙주로부터 병원균을 분리하여 배양할 수 있어야 하며, 3. 순수 배양한 병원균을 건강한 숙주에 접종했을 때, 그 숙주는 질병에 걸려야 한다. 4. 새로이 질병에 걸린 숙주로부터 분리된 병원균은 최초의 병원균이어야 한다. 라는 코흐의 가설에 의거 위의 조건을 만족시키기 때문에 이 숙주를 감염시킨 원인은 바이러스 혹은 박테리아이나, 초기 실험조건에서 0.22  $\mu\text{m}$ 에서 위의 가능성을 제거하였기 때문에 바이러스라 할 수 있다.

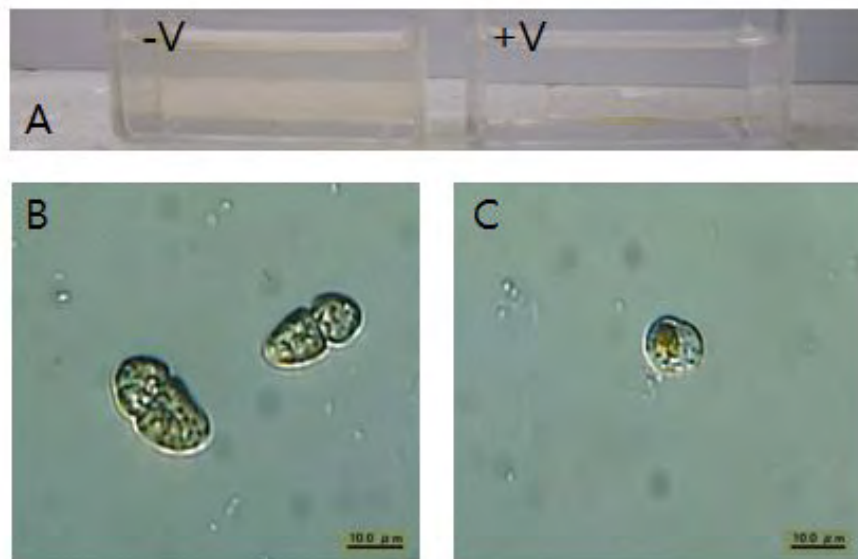


그림 108. *Heterocapsa pygmaea* NF-F-GYM-SP-1. (A) 배양주 (-V) 및 HpDNAV 접종한 배양주(+V), (B) HpDNAV 접종하지 않는 배양주 (C) HpDNAV 접종 후 96시간이 지난 배양주.

○ 분리된 바이러스는 접종 5일이 지나면 완전히 lysis가 일어나는 것을 광학현미경 상에서 관찰할 수 있었으며, 접종한 Host를 negative staining 후 투과전자현미경으로 관찰하였을 때 Host의 조직에서 약 160-170 nm정도의 바이러스 유사체가 발견 되었다(그림 108).

○ *H. pygmaea* infecting Virus (HpV)의 형태적 특징을 보면 Family Phycodnaviridae나 Iridoviridae와 같은 흔히 바이러스라고 생각되는 정 20

면체인 Icosahedral 형태를 띄고 있었다(그림 109).

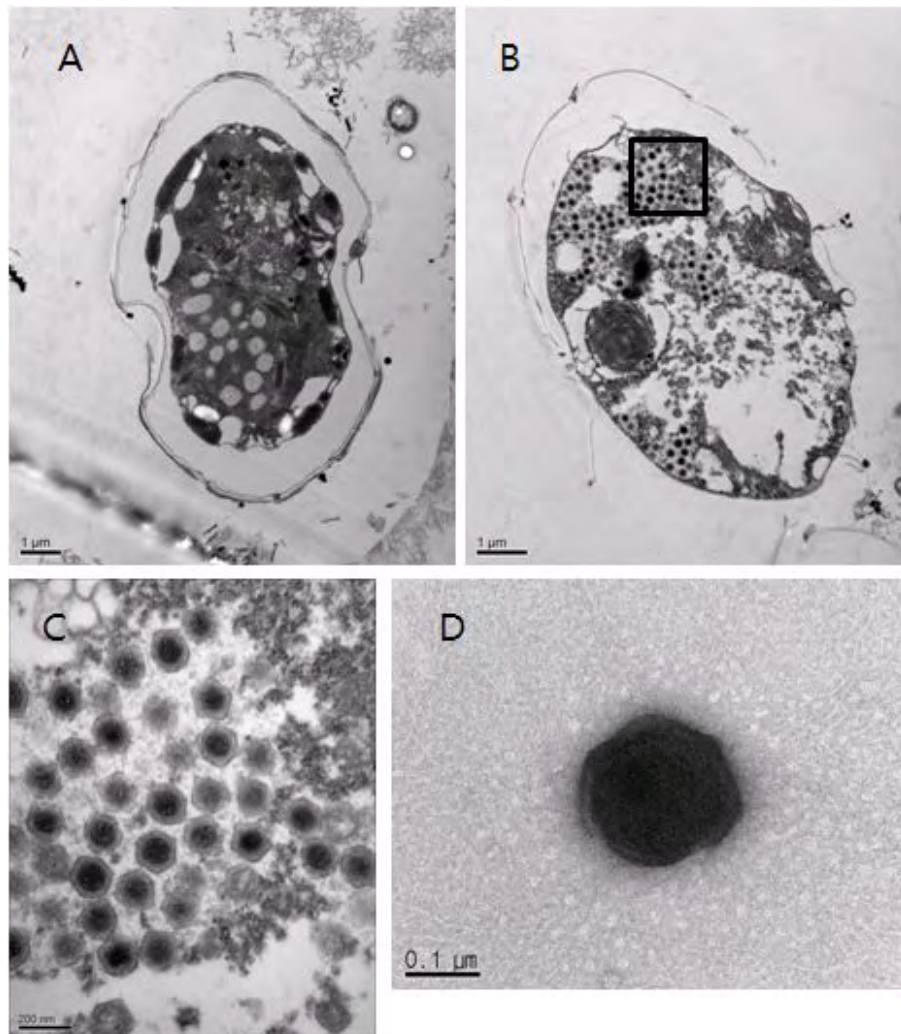


그림 109. *Heterocapsa pygmaea* NF-F-GYM-SP-1. (A) *H. pygmaea* 배양주의 전자현미경 사진, (B) HpDNAV 접종 후 96시간이 지난 배양주의 전자현미경 사진, (C) (B)의 배양주 세포내의 □부분을 고배율로 관찰한 결과 (D) HpDNAV를 Positively staining하여 전자현미경으로 관찰한 결과.

○ Host의 성장곡선을 통한 바이러스 감염 후 사멸되는 시간을 관찰한 결과, 바이러스를 감염시킨 경우 접종 80시간 이후부터 Host의 급격한 사멸이 관찰되었으며, 약 5일 후 완전한 lysis를 확인할 수 있었다(그림 110).

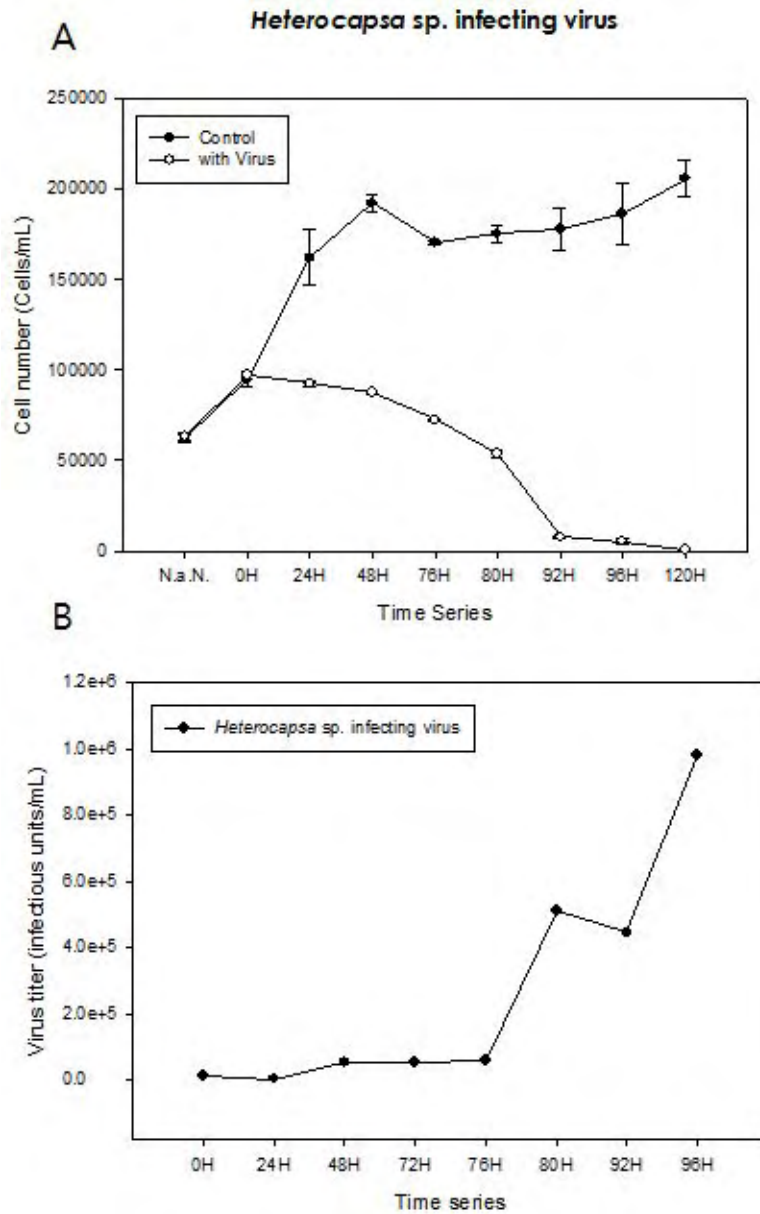


그림 110. *Heterocapsa pygmaea*의 성장실험 (A) 바이러스를 접종하지 않은 *H. pygmaea* NF-F-GYM-SP-1 배양주(●)와 바이러스를 접종한 배양주(○)의 성장곡선, (B) MPN방법을 통해 virus titer를 확인한 결과.

○ 바이러스의 일반적인 특징인 숙주특이성에 대한 확인을 하기 위해서, 34개의 host strain과 새로 분리한 바이러스를 접종하여 host 사멸 여부를 관찰하였다(표 23). 이 실험에 사용된 host는 규조류, 편모조류, 와편모조류, 침편모조류 등 다양한 조류가 사용되었다. 하지만 *Heterocapsa pygmaea* 이외의 종에서는 전혀 lysis가 발생하지 않은 것으로 보아 숙주특이성을 가지고 있는 것으로 보인다.

표 23. HpDNAV의 숙주특이성 확인

Class	Genus and Species	Strains	Sensitivity to HpDNAV
Bacillariophyceae	<i>Asterionella glacialis</i>	NF-F-Asa-1	-
	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	ME-CCS-1	-
	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	NF-F-CCS-2	-
	<i>Skeletonema palmeriana</i>	NF-D-SPA-1	-
	<i>Skeletonema costatum</i>	ME-SCM-1	-
Chlorophyceae	<i>Dunaliella</i> sp.	PK-F-DUN-SP-1	-
Cryptomonadaceae	<i>Rhodomonas</i> sp.	PK-F-RHO-SP-1	-
	<i>Rhodomonas</i> sp.	PK-F-RHO-SP-2	-
	<i>Rhodomonas</i> sp.	PK-F-RHO-SP-3	-
Dinophyceae	<i>Akashiwo sanguinea</i>	NF-F-AKA-1	-
	<i>Alexandrium</i> sp.	NF-F-ALE-SP-1	-
	<i>Alexandrium</i> sp.	NF-F-ALE-SP-2	-
	<i>Alexandrium catenella</i>	NF-F-ACA-1	-
	<i>Alexandrium catenella</i>	NF-F-ACA-3	-
	<i>Amphidinium carterae</i>	PK-F-ACA-1	-
	<i>C. polykrikoides</i>	NF-F-CPO-3(old)	-
	<i>Gymnodinium impudicum</i>	NF-F-GIM-1	-
	<i>Gymnodinium</i> sp.	NF-F-GYM-SP-1	+
	<i>Prorocentrum minimum</i>	NF-F-PMI-1d	-
	<i>Prorocentrum minimum</i>	NF-F-PMI-2	-
	<i>Prorocentrum micans</i>	NF-F-PMC-1	-
<i>Prorocentrum micans</i>	NF-F-PMC-2	-	
Euglenophyceae	<i>Eutreptia</i> sp.	NF-F-EUT-SP-1	-
Prymnesiophyceae	<i>Prymnessium parvum</i>	PK-F-Pry-SP-1	-
Raphidophyceae	<i>Heterosigma akashiwo</i>	NF-F-HAK-1	-
	<i>Heterosigma akashiwo</i>	PK-F-HAK-1	-
	<i>Heterosigma akashiwo</i>	PK-F-HAK-2	-
	<i>Chattonella antiqua</i>	NF-F-CAN-1	-

+: lysed; -: not lysed.



② *Prorocentrum minimum* 의 infecting virus (PminDNAV01)

○ 2009년에 실시한 조류 바이러스 탐색 결과 2009년 7/28 자란만 St.1(0m), St.4(0m)에서 *Gymnodinium* sp. 와 2009년 7/28 동일 정점에서 *Prorocentrum minimum*의 두 종에서 살조성이 나타나는 것을 확인하였다. 또한 0.22um filter로 여과한 후 다시 접종한 결과에서도 위와 동일한 살조성이 확인되었다(그림 111).

○ 이는 1. 특정 질병에 걸린 모든 숙주에는 동일한 병원균이 존재하여야 하고, 2. 질병에 걸린 숙주로부터 병원균을 분리하여 배양할 수 있어야 하며, 3. 순수 배양한 병원균을 건강한 숙주에 접종했을 때, 그 숙주는 질병에 걸려야 한다. 4. 새로이 질병에 걸린 숙주로부터 분리된 병원균은 최초의 병원균이어야 한다, 는 코흐의 가설에 의거 위의 조건을 만족시키기 때문에 이 숙주를 감염시킨 원인은 바이러스 혹은 박테리아이나, 초기 실험조건에서 0.22um 필터에서 위의 가능성을 제거하였기 때문에 바이러스라 할 수 있다.

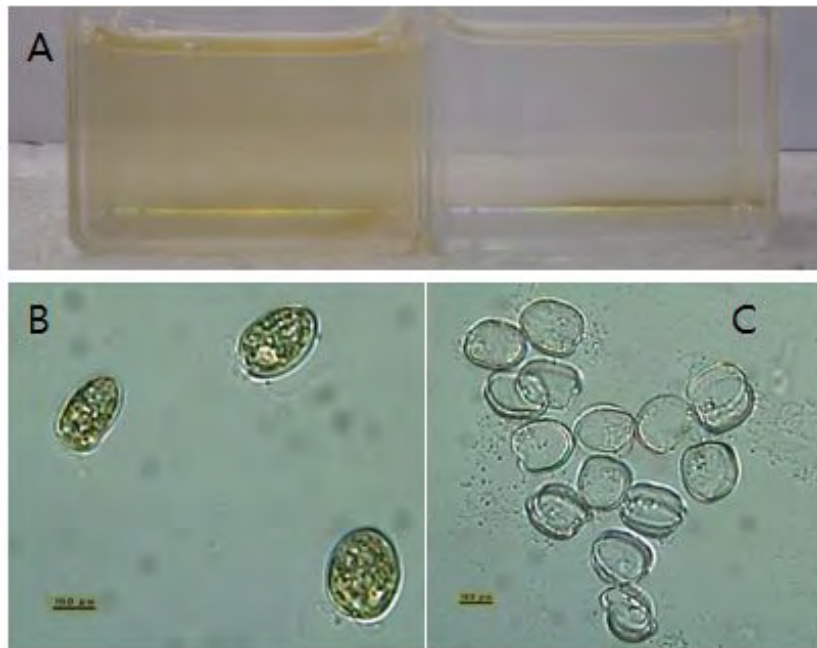


그림 111. *Prorocentrum minimum* NF-F-PMI-1d. (A) Pictures of both healthy culture (Left) and PminDNAV01 inoculated culture (Right) (B) Optical microscopic observation of intact cells; (C) Optical microscopic observation of PminDNAV01-infected cells at 120 hpi.

㉞ 투과전자현미경(TEM)을 이용한 Negative staining 및 내부구조 관찰

○ 분리된 바이러스는 접종 5일이 지나면 완전히 lysis가 일어나는 것을 광학현미경 상에서 관찰할 수 있었으며, 접종한 Host를 negative staining 후 투과전자현미경으로 관찰하였을 때 Host의 조직에서 약 175-185nm정도의 바이러스 유사체가 발견 되었다(그림 112).

○ *Prorocentrum minimum* infecting Virus (PminDNAV01)의 형태적 특징을 보면 Family Phycodnaviridae나 Iridoviridae와 같은 흔히 바이러스라면 상상이 되는 정20면체인 Icosahedral형태를 띠고 있음을 알 수 있다.

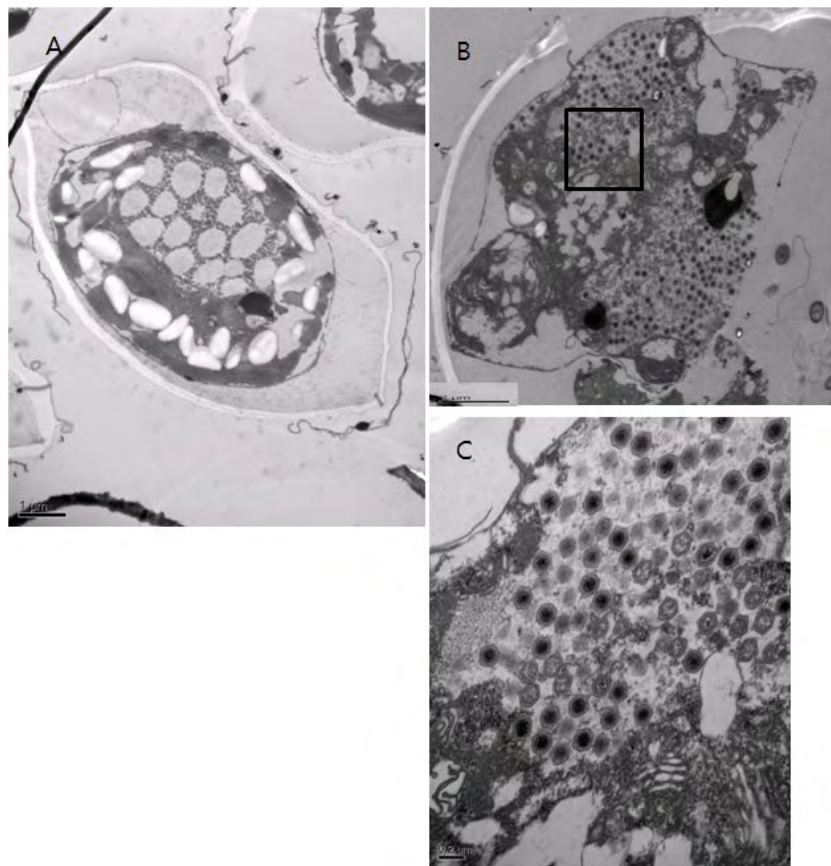


그림 112. *P. minimum* NF-F-PMI-1d. (A) Transmission electron microscopic observations of an intact cell.; (B) Transmission electron microscopic observations of PminDNAV01-infected cells at 120 hpi.; (C) Higher magnification of square site of (B).

○ Test tube에서 바이러스를 접종한 경우와 접종하지 않은 경우 그 성장에 있어 P 확인한 차이를 보이기 때문에, Host의 성장곡선을 통한 바이러스 감염 후 사멸되는 시간을 관찰한 결과, 바이러스를 감염시킨 경우 접종 80시간

이후부터 Host의 급격한 사멸이 관찰되었으며, 약 5일 후 완전한 Lysis를 확인할 수 있었다(그림 113).

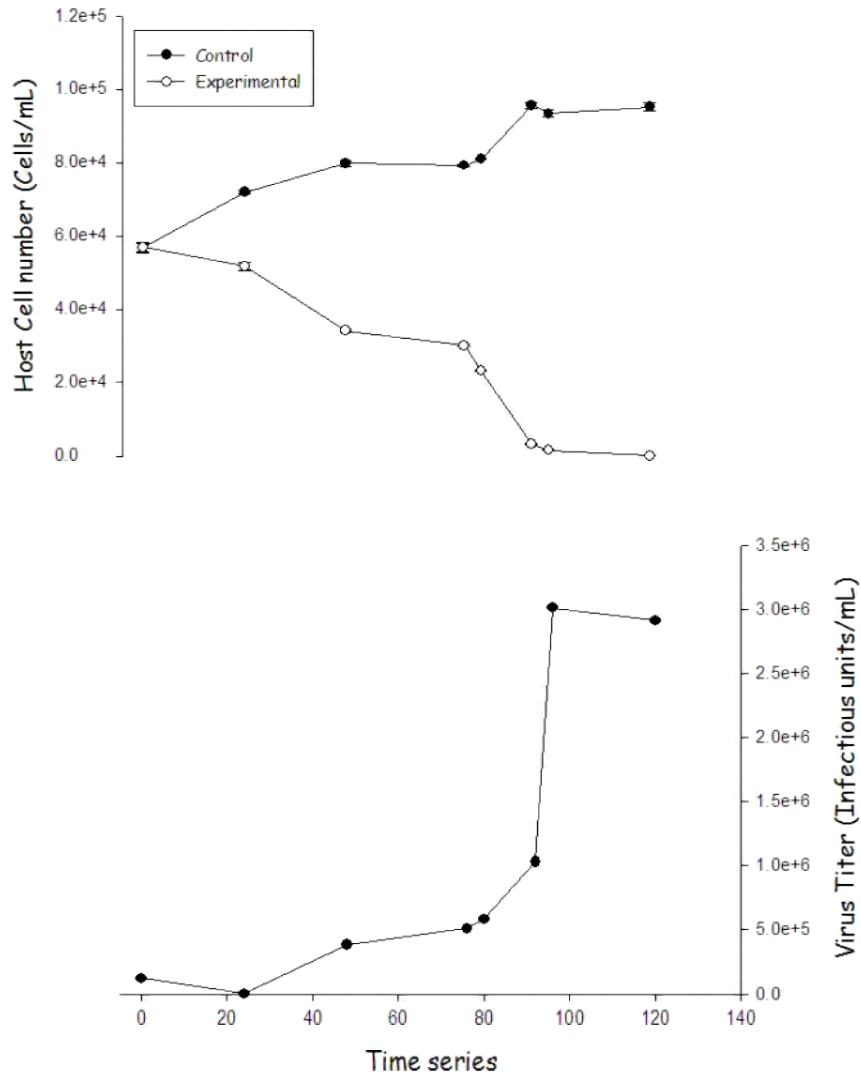


그림 113. Growth Experiment. Change in the abundance of *Prorocentrum minimum* NF-F-PMI-1d cells with(○) or without(●) viral inoculation. PminDNAV01 was inoculated to exponentially growing host culture. Algal cell numbers were measured by direct counting. The assays were performed at least three times. The number of virus starts to increase 80 hours postinoculation. Virus titer was checked by MPN method.

○ 분리된 바이러스의 숙주특이성 실험

바이러스의 일반적인 특징인 숙주특이성에 대한 확인을 하기 위해서, 34개의 Host strain과 새로 분리한 바이러스를 접종하여 Host 사멸 여부를 관찰하였다(Table 6). 이 실험에 사용된 Host는 규조류, 편모조류, 와편모조류, 침편모조류 등 다양한 조류가 사용되었다. 하지만 *Prorocentrum minimum* 이외의 종에서는 전혀 Lysis가 발생하지 않은 것으로 보아 숙주특이성을 가지고 있음을 알 수 있다.

표 24. Infection specificities of *Prorocentrum minimum* infecting DNA virus (PminDNAV) against 28 strains of marine phytoplanktons

Class	Genus and Species	Strains	Sensitivity to PminDNAV
Bacillariophyceae	<i>Asterionella glacialis</i>	NF-F-Asa-1	-
	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	ME-CCS-1	-
	<i>Chaetoceros curvisetus</i>	NF-F-CCS-2	-
	<i>Skeletonema palmeriana</i>	NF-D-SPA-1	-
	<i>Skeletonema costatum</i>	ME-SCM-1	-
Chlorophyceae	<i>Dunaliella</i> sp.	PK-F-DUN-SP-1	-
Cryptomonadaceae	<i>Rhodomonas</i> sp.	PK-F-RHO-SP-1	-
	<i>Rhodomonas</i> sp.	PK-F-RHO-SP-2	-
	<i>Rhodomonas</i> sp.	PK-F-RHO-SP-3	-
Dinophyceae	<i>Akashiwo sanguinea</i>	NF-F-AKA-1	-
	<i>Alexandrium</i> sp.	NF-F-ALE-SP-1	-
	<i>Alexandrium</i> sp.	NF-F-ALE-SP-2	-
	<i>Alexandrium catenella</i>	NF-F-ACA-1	-
	<i>Alexandrium catenella</i>	NF-F-ACA-3	-
	<i>Amphidinium carterae</i>	PK-F-ACA-1	-
	<i>C. polykrikoides</i>	NF-F-CPO-3(old)	-
	<i>Gymnodinium impudicum</i>	NF-F-GIM-1	-
	<i>Gymnodinium</i> sp.	NF-F-GYM-SP-1	-
	<i>Prorocentrum minimum</i>	NF-F-PMI-1d	+
	<i>Prorocentrum minimum</i>	NF-F-PMI-2	-
	<i>Prorocentrum micans</i>	NF-F-PMC-1	-
	<i>Prorocentrum micans</i>	NF-F-PMC-2	-
Euglenophyceae	<i>Eutreptia</i> sp.	NF-F-EUT-SP-1	-
Prymnesiophyceae	<i>Prymnessium parvum</i>	PK-F-Pry-SP-1	-
Raphidophyceae	<i>Heterosigma akashiwo</i>	NF-F-HAK-1	-
	<i>Heterosigma akashiwo</i>	PK-F-HAK-1	-
	<i>Heterosigma akashiwo</i>	PK-F-HAK-2	-
	<i>Chattonella antiqua</i>	NF-F-CAN-1	-

+: lysed; -: not lysed.

## 5. 적조 발생 확산 예찰을 위한 모델 구축

### 가. 해양물리조사

#### (1) 조사방법

○ 자란만 주변의 조석자료는 국립해양조사원에서 제공하는 조석 조화/비조화 함수를 참고하였고, 해수유동자료는 RDCP600(Recording Doppler Current Profiler, AADI)을 이용하여 2009년에는 자란만의 입구인 St. 2에 5월 16일 12:05부터 2009년 6월 2일 13:00까지(약 15일간), 2010년에는 자란도 주변에서 7월 29일 16:06분부터 2010년 8월 17일 14:06분까지(약 20일간), 2011년에는 옥지도 주변에서 9월 7일 13:13부터 23일 14:43까지(약 15일간) 부표 mooring하여 유속 및 유향을 파악하였다(그림 114, 표 25).

○ 자료 분석 방법은 연구해역의 유동분포를 파악하기 위하여 층별수평유동성분(u, v-component)를 이용하여 시계열 분포(stick vector diagram)와 3-D 수평 유속을 표현하였다. 관측된 자료를 이용하여 Pawlowicz et. al, (2002)이 개발한MATLAB의 T\_tide를 이용하여 조류조화분해를 실행하였고, 4대분조( $M_2$ ,  $S_2$ ,  $K_1$ ,  $O_1$ )를 조류타원도로 표현하였다.

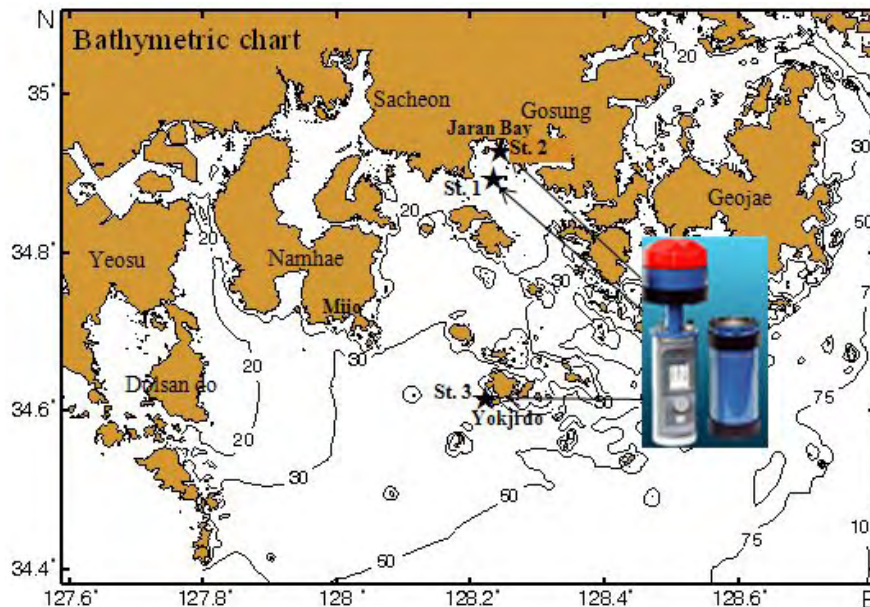


그림 114. 연구해역도 및 유동관측 정점.

표 25. 조사정점 위치

조사시기	위도	경도	비고
2009년 5월 16일 ~ 6월 2일	N 34° 53' 9.90"	E 128° 14' 9.60"	자란만 입구
2010년 7월 29일 ~ 8월 17일	N 34° 55' 35.02"	E 128° 14' 29.83"	자란도 주변
2011년 9월 7일 ~ 23일	N 34° 53' 9.9"	E 128° 14' 9.6"	육지 앞바다

(2) 연구결과

(가) 조석

○ 본 연구해역 인근의 조석을 파악하기 위하여 조석에 대한 기존 자료(문헌자료)를 수집, 조사하였다. 자란만 주변의 조석 특성을 살펴보면, 조석형태수( $\frac{K1+O1}{M2+S2}$ )가 0.21~0.24로 0.25보다 작은 반일주조형으로 매일 거의 같은 2회의 고조와 2회의 저조가 나타난다. 자란도에서 대조차 및 소조차는 각각 238cm 및 82cm의 크기를 가진다(그림 115, 표 26 참조).

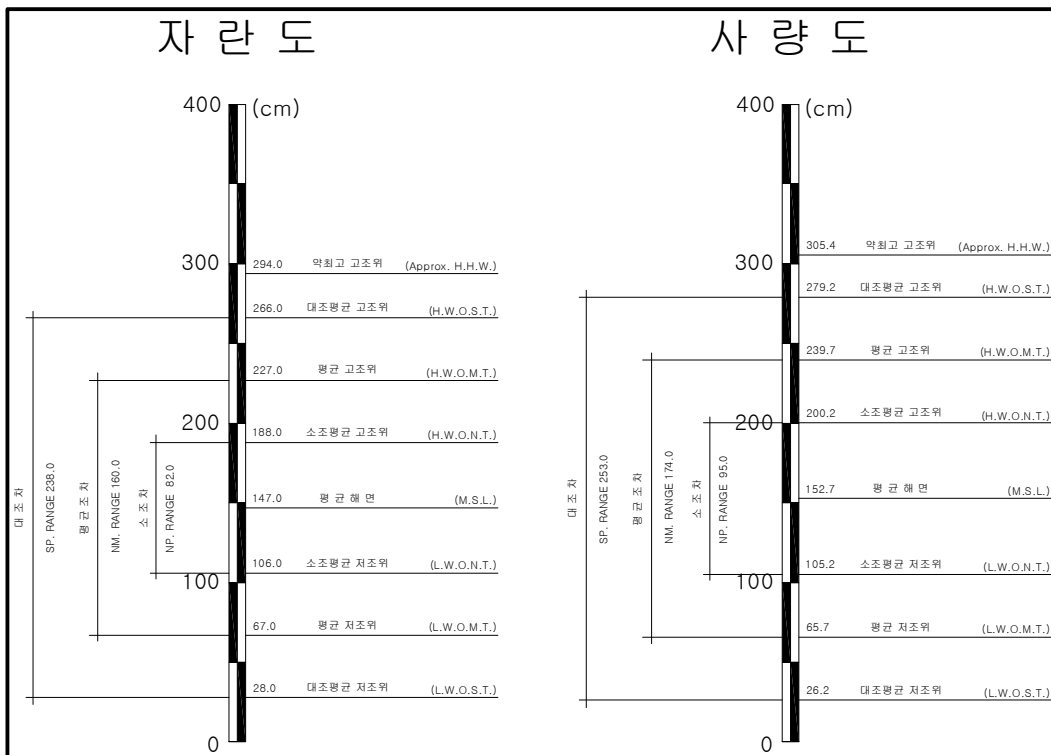


그림 115. 자란도와 사량도 검조소의 조위도.

표 26. 연구해역 인근의 조석 조화상수 및 비조화상수

		삼천포		자란도		사량도	
관 측 위 치		34° 55' 27"N		34° 55' 13"N		34° 50' 26"N	
		128° 04' 08"E		128° 13' 18"E		128° 13' 36"E	
관 측 기 간		1967/09/28		1983/08/20		1990/03/14	
		~1967/10/27		~1983/09/03		~1990/05/19	
조 화 상 수	분조	반조차 (cm)	지각 (°)	반조차 (cm)	지각 (°)	반조차 (cm)	지각 (°)
	M <sub>2</sub>	94.3	250.9	80.0	245.7	87.0	249.7
	S <sub>2</sub>	41.7	272.6	39.0	279.0	39.5	279.6
	K <sub>1</sub>	16.6	169.0	16.6	190.6	15.9	173.8
	O <sub>1</sub>	12.2	152.7	11.4	144.4	10.3	147.2
비 조 화 상 수	평균고조간격	8시간 39분		8시간 28분		8시간 37분	
	평균저조간격	14시간 51분		14시간 40분		14시간 48분	
	약최고고조위	329.6		294.0		305.4	
	대조평균고조위	300.8		266.0		279.2	
	평균고조위	259.1		227.0		239.7	
	소조평균고조위	217.4		188.0		200.2	
	평균해면	164.8		147.0		152.7	
	소조평균저조위	112.2		106.0		105.2	
	평균저조위	70.5		67.0		65.7	
	대조평균저조위	28.8		28.0		26.2	
약최저저조위	0.0		0.0		0.0		
대 조 차	272.0		238.0		253.0		
소 조 차	105.2		82.0		95.0		
평균조차	188.6		160.0		174.0		
조석형태수	0.21		0.24		0.21		

자료 : 국립해양조사원.

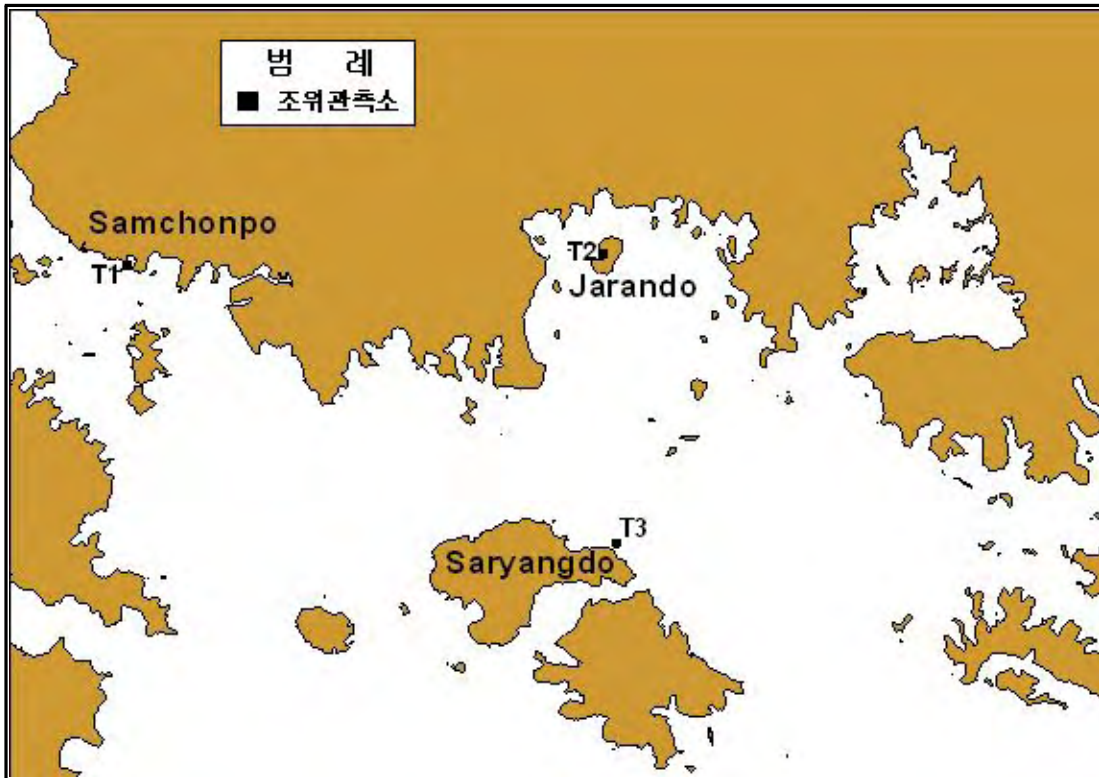


그림 116. 조석자료 위치도.

(나) 조류

- 기존 자료(해양조사원, 1982) 수집·조사과 현장관측을 통하여 자란만의 주변해역의 해수유동 특징을 살펴보면 다음과 같다.
- 기존자료에 의하면, 자란만 일대의 최강창조류도 및 최강낙조류도를 그림 117, 118 에 각각 나타내었다. 자란만의 해수유동은 조석에 의해 주로 이루어지므로 반일주조가 우세하고 왕복성이 강하다. 자란만과 사랑도 사이 수로에서 대조기 표층 최강유속은 창조 시와 낙조 시 모두 0.7노트 정도이고, 사랑도와 미륵도 사이의 수로에서는 창조 시 0.8노트, 낙조 시 1노트로 낙조류가 창조류보다 강하다.



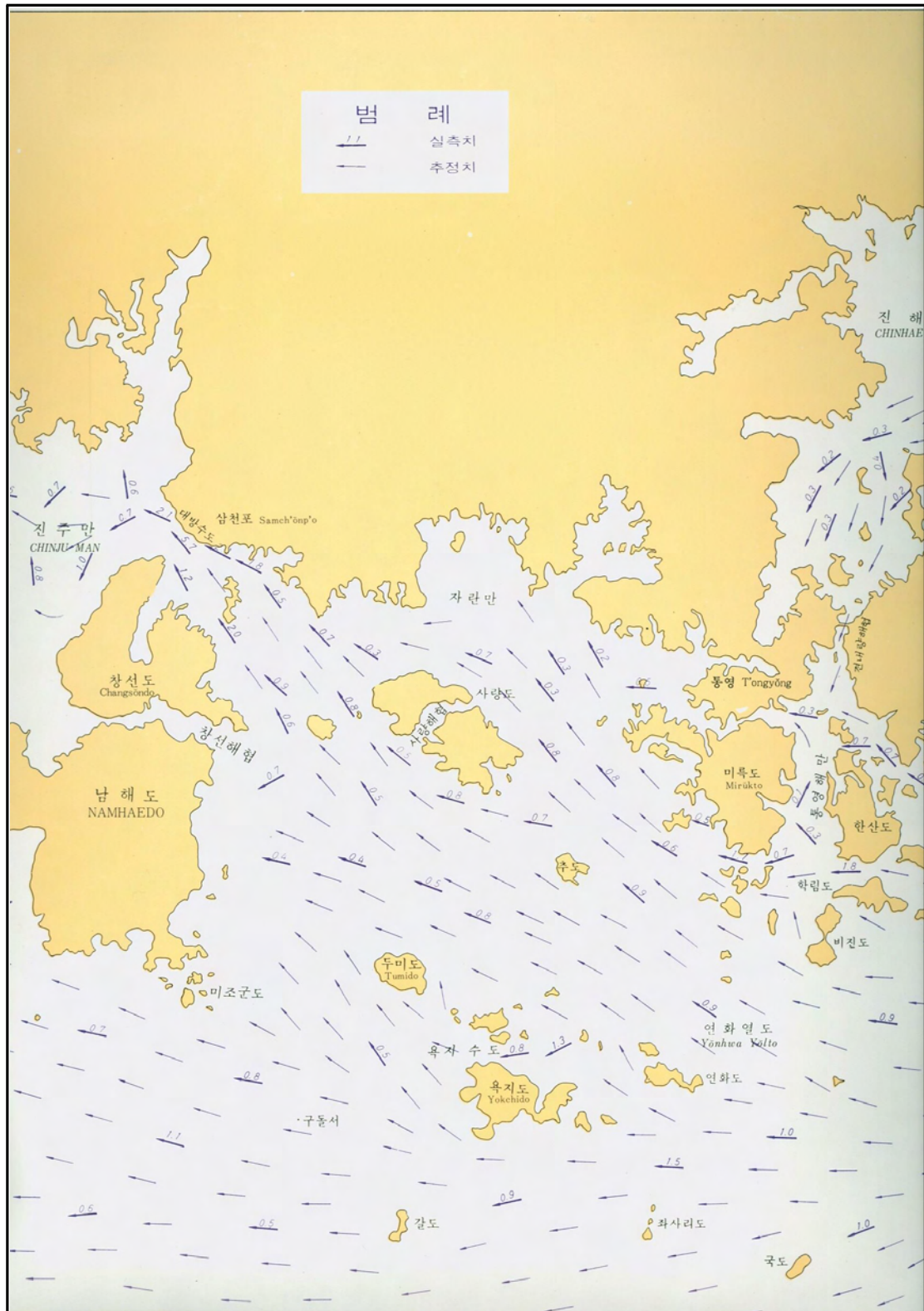


그림 117. 자란만 주변지역의 대조기 최강창조류도 (단위 : 노트, 해양조사원. 1982).

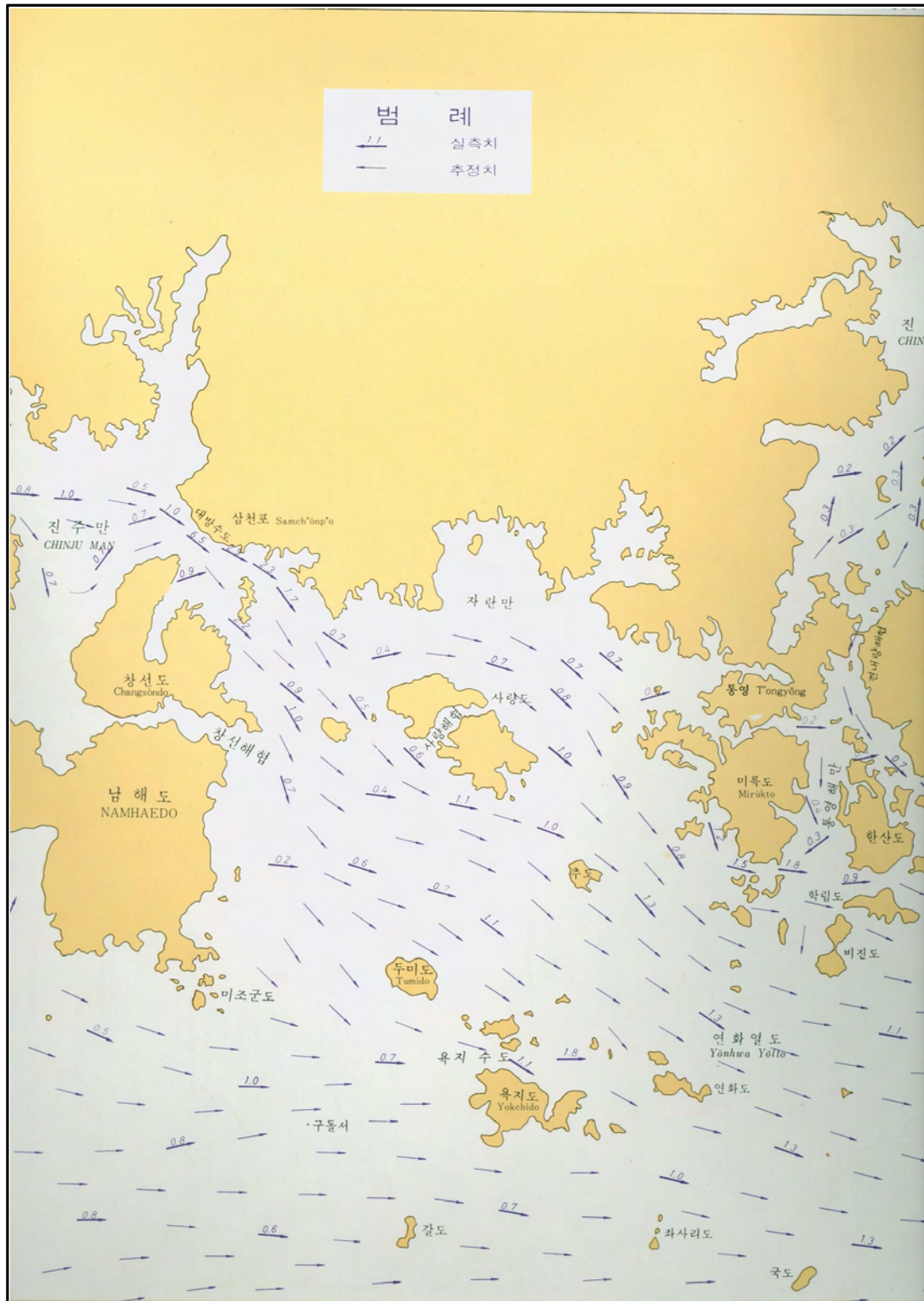


그림 118. 자란만 주변지역의 대조기 최강낙조류도 (단위 : 노트, 해양조사원, 1982).

○ 연구해역의 해수 유동 분포 변화를 파악하기 위하여 RDGP600을 이용하여 자란만의 외측(St. 1)과 자란도 주변(St. 2) 그리고 육지도 서측(St. 3)에서 15일간 및 20일간 현장 mooring 관측을 실시하였다.

○ 그림 117, 118은 2009년과 2010년의 자란만 입구와 자란도 주변의 관측 지점, 2011년 육지도 서측 관측지점의 수평유동성분(u, v-component)을 이용하여 stick vector diagram을 시계열로 나타낸 것이다. 각 그림의 x축은 관측 일을 y축은 speed(cm/s)을 나타내고 위에서 첫 번째 그림은 표·중·저층의 평균, 두 번째는 표층, 세 번째는 중층을 네 번째는 저층을 나타내고 있다. 먼저 2009년(그림 119) 표층의 수평유속을 보면 2009년 5월 17일부터 5월 23일 까지 남향류 및 북향류가 번갈아 나타나다가 5월 24일부터 5월 26일 까지 북향류가 강하게 나타나고 그 후에 다시 남향류 및 북향류가 번갈아 나타나고 있다. 중층의 수평유속을 보면 표층과 유사하게 남향류 및 북향류가 번갈아 나타나다가 5월 26일부터 5월 29일까지 남향류가 우세하게 나타났다. 저층의 수평유속을 보면 표·저층 보다 약하게 약 10 cm/s 이하로 남향류 및 북향류가 번갈아 나타났다. 평균적인 흐름을 보면 약 10 cm/s 이하로 남향류 및 북향류가 우세하게 번갈아 나타나고 있다. 2010년(그림 120) 표·중·저층의 수평유속을 보면 남향류와 북향류가 번갈아 나타났다. 표층 및 저층의 유속은 10 cm/s 이하이고, 중층은 20 cm/s 이상으로 상대적으로 중층의 흐름이 가장 강한 것을 알 수 있다. 평균적인 흐름을 보면 약 10 cm/s 이하로 남향류 및 북향류가 우세하게 번갈아 나타나고 있다. 2011년(그림 121) 표·중·저층의 수평유속을 보면 남향류와 북향류가 번갈아 나타났다. 이 지역은 전체적으로 남향류가 우세하게 나타나고 있다. 평균적으로 북향하는 흐름은 약 10 cm/s 로 나타나고 남향하는 흐름은 20cm/s 로 나타났다. 큰 차이는 보이지 않지만 표층에서 중·저층에 비하여 유속이 강하게 나타난다.

○ 2009년 2010년 및 2011년의 좌측은 rose 그래프를 우측은 scatter 그래프를 나타낸 것으로 정북방향( $0^\circ$ )을 기준으로 시계방향으로 각도가 변화한다. Rose 그래프는 관측된 수평유속(u,v) 성분 중에서 어떤 방향으로 가장 많이 분포하는 가를 정량적으로 보여주는 것으로 단위는 전체 데이터 중 분포하는 percentage(%)를 나타낸다. Scatter 그래프는 관측한 수평유속 성분 중에서 유속과 유향의 분포를 점으로 표현한 것으로 단위는 cm/s로 나타낸다. 2009년 rose 그래프의 표층을 보면 약  $30^\circ \sim 60^\circ$  방향으로 16%로 가장 크게 나타나 표층에서는 북동향류가 우세하게 나타난 것을 알 수 있다. 중층

은 모든 방향에서 거의 동일하게 나타났고, 저층은 남향류 성분이 우세하게 나타났다. 우측의 scatter 그래프를 보면 표·중·저층에서 모두 원의 형태로 어떠한 우세한 방향이 없다는 것을 알 수 있다. 그리고 중층에서 원의 반경이 약 20cm/s 이상으로 가장 크게 나타났다(그림 122). 2010년 좌측의 rose 그래프의 표층을 보면 약 180°~360° 방향으로 우세하며, 0°~90° 방향의 분포가 가장 작으며, 이는 표층에서는 서향류 또는 남서향류가 우세하게 나타난다고 판단할 수 있다. 중층은 북서향류와 남서향류가 우세하며, 저층은 모든 방향으로 고르게 분포하는 것을 알 수 있다. 우측의 scatter 그래프를 보면 표·중·저층에서 모두 원형으로 나타났으며, 이는 연구해역의 수평유속이 특정한 방향성은 없는 것으로 판단된다. 그리고 표·저층에서 원의 반경은 10 ~ 20 cm/s 범위를 나타내며, 중층은 20 cm/s 이상으로 상대적으로 가장 크게 나타났다(그림 123). 2011년 좌측의 rose 그래프의 표층을 보면 약 120°~180° 방향으로 우세하며, 270°~360° 방향의 분포가 가장 작으며, 이는 표층에서는 남향류 또는 남동향류가 우세하게 나타난다고 판단할 수 있다. 중층에서는 표층보다 120°~180° 방향으로 더 우세하게 나타나고 있다. 오른쪽의 scatter 그래프를 보면 표층과 중층에서 150° 방향으로 우세하게 나타났다. 중층에서 최대 35cm/s 유속을 보이는데 비하여 표층에서 40cm/s 로 표층에서 중층보다 더 강하게 나타나고 있다. 저층에서는 거의 원형으로 나타나 수평유속이 특정한 방향성은 없는 것으로 판단된다(그림 124).

○ 조류자료 표현에 있어서 시간에 따른 조류 유속 값의 각각 끝을 다시 시작점으로 하여 다음 time step을 연속적으로 이어 만든 누적유속분포도(progressive vector)를 그림 125(2009년), 124(2010년) 및 125(2011년)에 표·중·저층을 나타냈다. 누적유속분포도는 조류의 왕복성이나 회전성을 쉽게 파악할 수 있으며 또한 잔차류(향류)에 대해서도 시각적으로 알아보기 쉽다. 그림에서 각도는 정북을 기준각도(0°)로 하고 시계방향으로 증가하는 형태이다. 여기서 관측 자료의 u성분과 v성분은 cm/sec이고 취득 자료의 interval은 5분으로 5분(1step)당 실제 이동거리는  $\text{speed cm / sec} \times 300 \text{ sec} / 100,000$ 로 하여 계산하면 실제 이동거리는 km로 계산되어 x 및 y 축을 km 단위로 표현하였다. 먼저, 2009년의 표층은 초기에는 남진하다가 시간이 이 경과할수록 북동진 하는 형태를 보이고 있다. 중층은 초기에는 북서진하여 이동하다가 동진하여 다시 이동하고 다시 남동진으로 이동하고 있다. 저층은 처음부터 남동진하여 향하고 있다(그림 125). 한편, 2010년의

표층은 초기에는 서진하다가 시간이 이 경과할수록 남서진 하는 형태를 보이고 있다. 중층은 남서진과 북서진을 왕복하며 나타나지만 전반적으로 서진하여 이동하고 있다. 저층은 남진하여 이동하고 있다(그림 126). 이 해석은 천해역으로 바람 및 담수 유입 등에 의한 취송류와 밀도류의 영향을 많이 받을 것으로 예상되며, 표층 및 저층의 진행 방향이 상이한 것은 밀도류와 취송류 영향이 크다고 판단된다. 2011년의 수층에 따른 누적유속분포도에서는 표·중·저층에서 모두 남동진 하는 형태를 보이고 있다(그림 127).

○ 표 27은 2009년, 2010년 과 2011년 관측한 자료를 Pawlowicz et. al, (2002)에 의하여 개발한 T\_tide Toolbox를 이용하여 조류 조화분해한 결과 중 4대분조만 정리하여 이를 조류타원도로 표현한 것이다. 먼저 2009년의 주태음반일주조( $M_2$ )를 보면 장축(Major)은 2.594 cm/s 이고 단축(Minor)은 0.206 cm/s이며 세로축(y축)과 타원의 주축(semi-major)과의 각도인 INC는  $17.73^\circ$  이며 Phase 값은  $167.84^\circ$ 로 북동동류 및 남서서류가 우세한 것을 의미하고 그 값은 3 cm/s 이하이다. 주태양반일주조( $S_2$ )를 보면 장축은 1.1 cm/s 이며, 단축은 0.495 cm/s이고 INC는  $38.74^\circ$ 이고 Phase는  $218.48^\circ$ 로 북동류 및 남서류가 우세하나 그 값은 2 cm/s 이하이다. 일월합성일주조( $K_1$ )을 보면 주축은 2.612 cm/s이고 단축은 1.057 cm/s이고 INC는  $1.71^\circ$ 이며 Phase는  $52.56^\circ$ 로 동향류 및 서향류가 우세하게 나타나고 그 값은 3 cm/s 이하이다. 주태음일주조( $O_1$ )을 보면 장축은 1.133 cm/s이고 단축은 0.650 cm/s이고 INC는  $50.35^\circ$ 이며 Phase는  $88.72^\circ$ 로 주방향은 북동류 및 남서류가 우세하나 그 값은 2 cm/s 이하로 나타났다. 조류조화분해 결과 연구해역에서 조류의 크기는 5 cm/s 이하로 미약한 흐름을 나타냈다(그림 128). 한편, 2010년은 주태음반일주조( $M_2$ )를 보면 장축(Major)은 1.432 cm/s 이고 단축(Minor)은 0.524 cm/s이며 세로축(y축)과 타원의 주축(semi-major)과의 각도인 INC는  $166.29^\circ$  이며 Phase 값은  $153.32^\circ$ 로 서향류 및 동향류가 우세한 것을 의미하고 그 값은 3 cm/s 이하이다. 주태양반일주조( $S_2$ )를 보면 장축은 0.297 cm/s 이며, 단축은 0.333 cm/s이고 INC는  $137.85^\circ$ 이고 Phase는  $204.50^\circ$ 로 북서류 및 남동류가 우세하나 그 값은 1 cm/s 이하이다. 일월합성일주조( $K_1$ )을 보면 주축은 0.252 cm/s이고 단축은 0.345 cm/s이고 INC는  $157.71^\circ$ 이며 Phase는  $45.96^\circ$ 로 남서류 및 북동류가 우세하게 나타나고 그 값은 1 cm/s 이하이다. 주태음일주조( $O_1$ )을 보면 장축은 0.511 cm/s 이고 단축은 0.375 cm/s이고 INC는  $170.45^\circ$ 이며 Phase는  $261.37^\circ$ 로 주방향은 북서류 및 남동류가 우세하나 그 값은 1 cm/s 이하로 나타났다. 이상의

조류조화분해 결과 연구해역에서 조류의 크기는 5 cm/s 이하로 미약한 흐름을 나타내는 것으로 판단된다(그림 129). 2011년은 주태음반일주조(M<sub>2</sub>)를 보면 장축(Major)은 2.81 cm/s 이고 단축(Minor)은 0.184 cm/s이며 세로축(y축)과 타원의 주축(semi-major)과의 각도인 INC는 85.31° 이며 Phase 값은 111.79°로 남향류 및 남향류가 우세한 것을 의미하고 그 값은 3 cm/s 이하이다. 주태양반일주조(S<sub>2</sub>)를 보면 장축은 2.053 cm/s 이며, 단축은 0.745 cm/s이고 INC는 97.76°이고 Phase는 159.19°로 북류 및 남류가 우세하나 그 값은 2.5 cm/s 이하이다. 일월합성일주조(K<sub>1</sub>)을 보면 주축은 1.323 cm/s 이고 단축은 0.481 cm/s이고 INC는 65.25°이며 Phase는 7.55°로 남서류 및 북동류가 우세하게 나타나고 그 값은 2 cm/s 이하이다. 주태음일주조(O<sub>1</sub>)을 보면 장축은 1.789 cm/s이고 단축은 0.487 cm/s이고 INC는 138.33°이며 Phase는 289.50°로 주방향은 북서류 및 남동류가 우세하나 그 값은 2 cm/s 이하로 나타났다. 이상의 조류조화분해 결과 연구해역에서 조류의 크기는 5 cm/s 이하로 미약한 흐름을 나타내는 것으로 판단된다(그림 130).

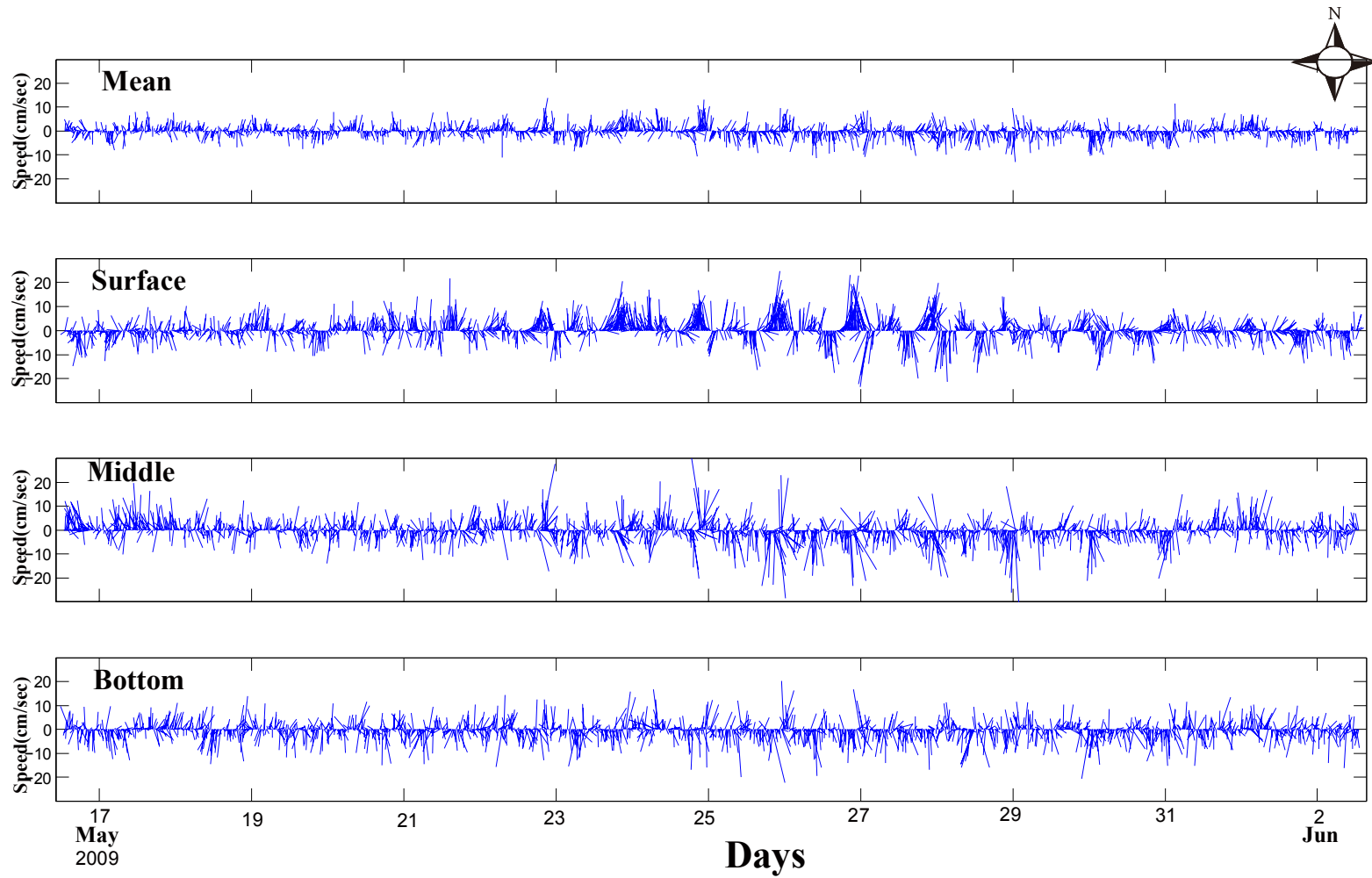


그림 119. 2009년 5월 16일 ~ 6월 2일 자란만 외측(St. 1)에서 관측한 수층에 따른 해류의 수평유동성분.

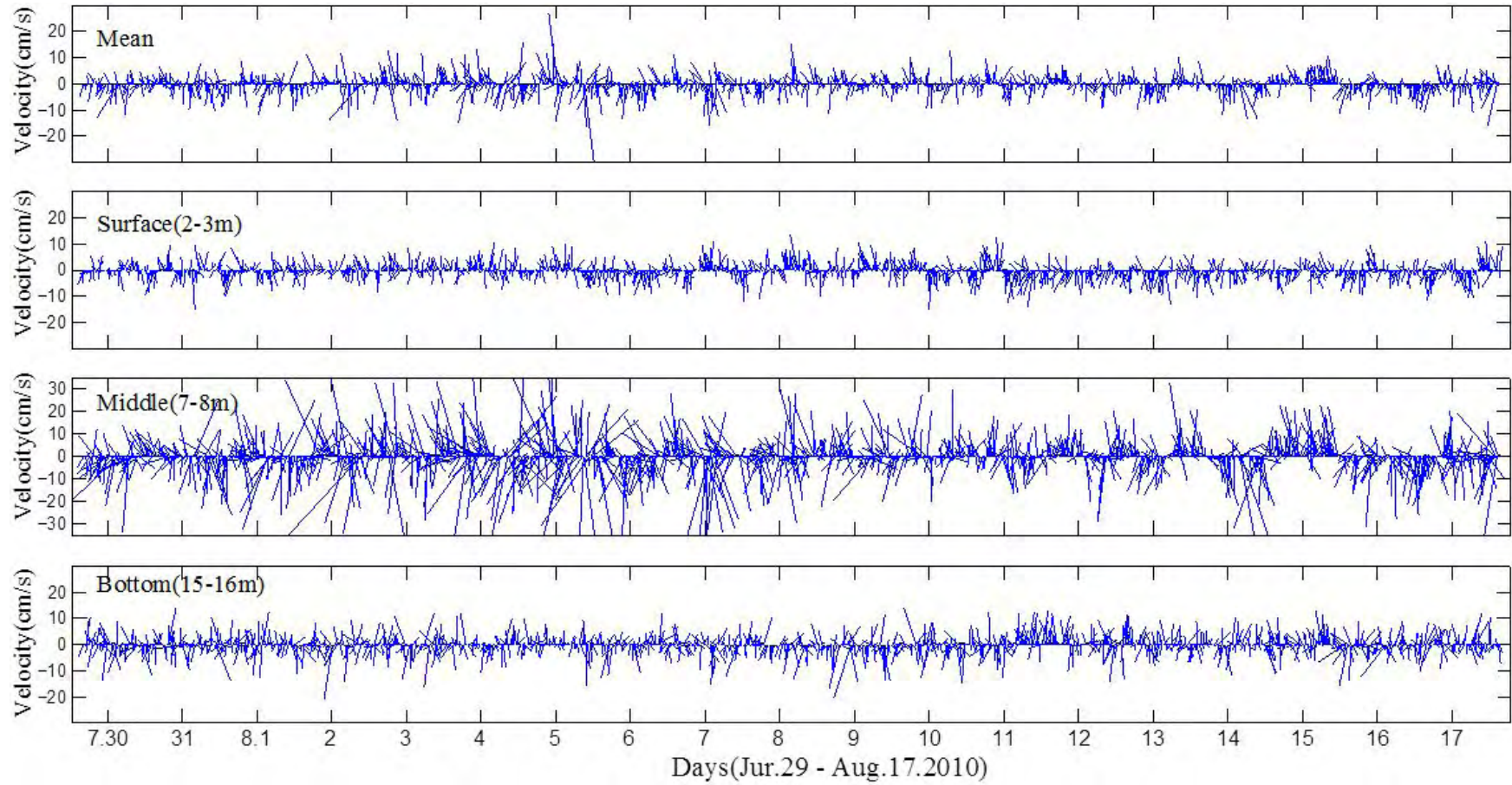


그림 120. 2010년 7월 29일 ~ 8월 17일 자란도 주변(St. 2)에서 관측한 수층에 따른 해류의 수평유동성분.



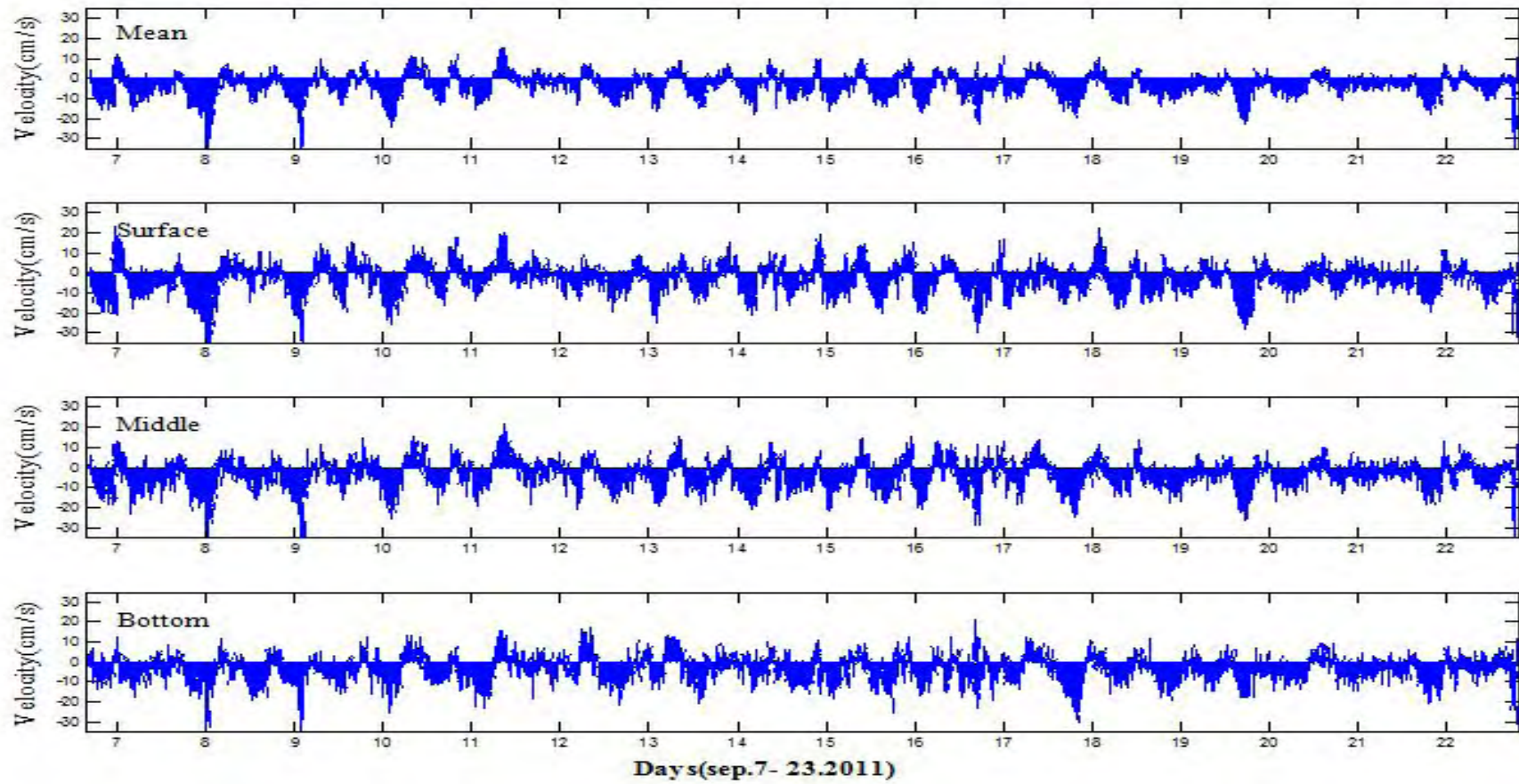


그림 121. 2011년 9월 7일 ~ 23일 욱지도 주변(St. 3)에서 관측한 수층에 따른 해류의 수평유동성분.

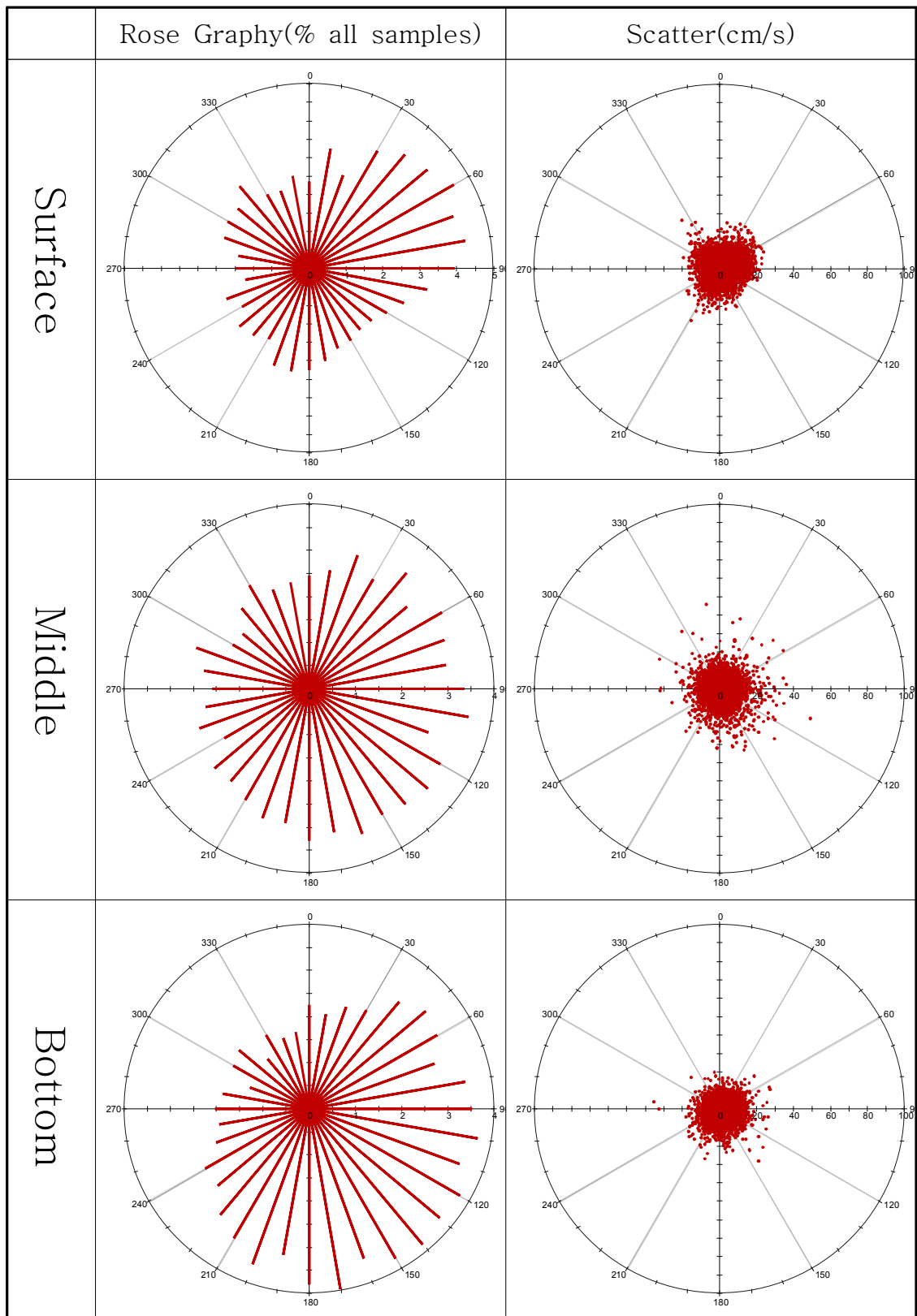


그림 122. 2009년 자란만 외측(St. 1)의 수층에 따른 rose graph(좌)와 scatter(우).

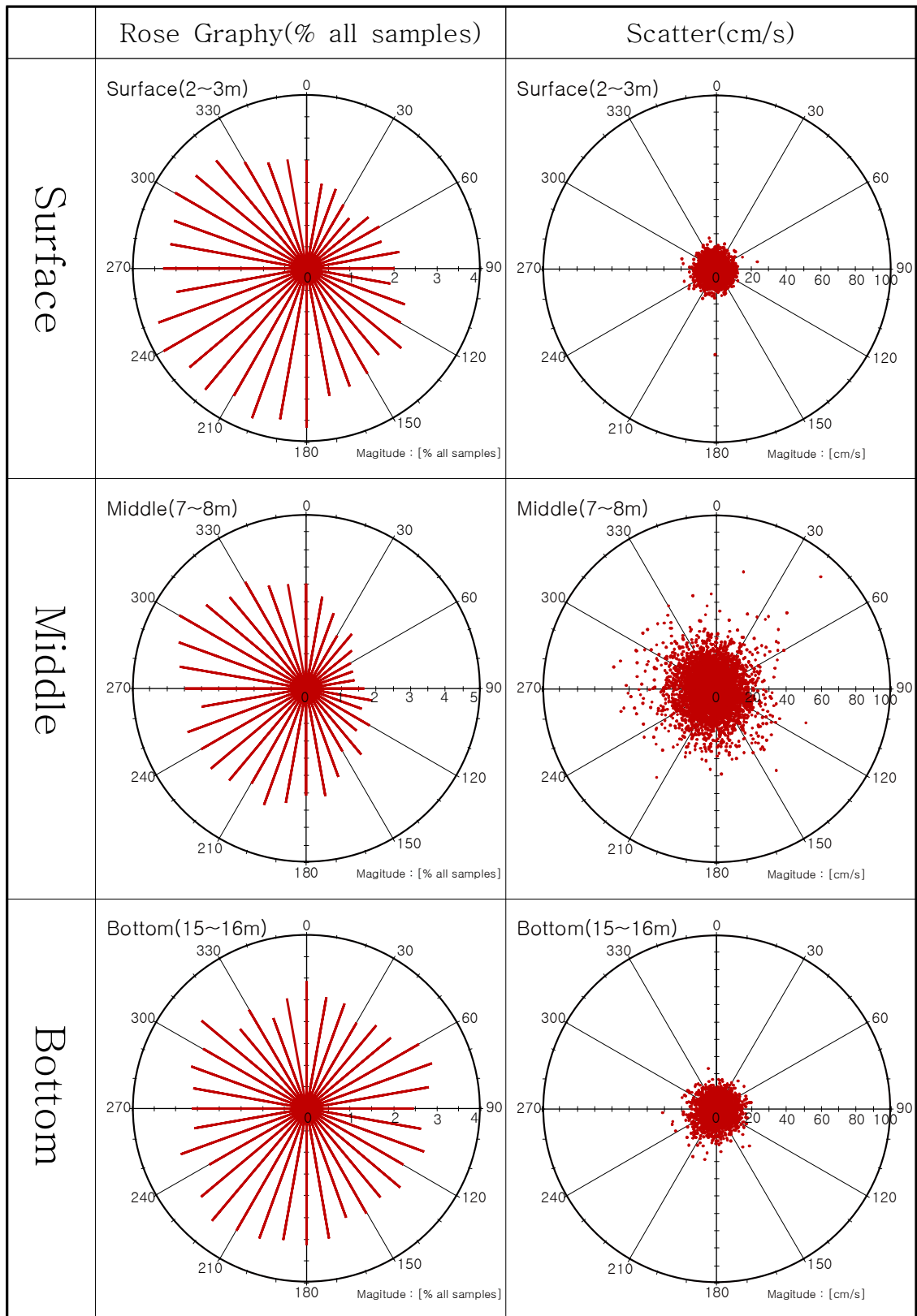


그림 123. 2010년 자란도 주변(St. 2)의 수층에 따른 rose graph(좌)와 scatter(우).

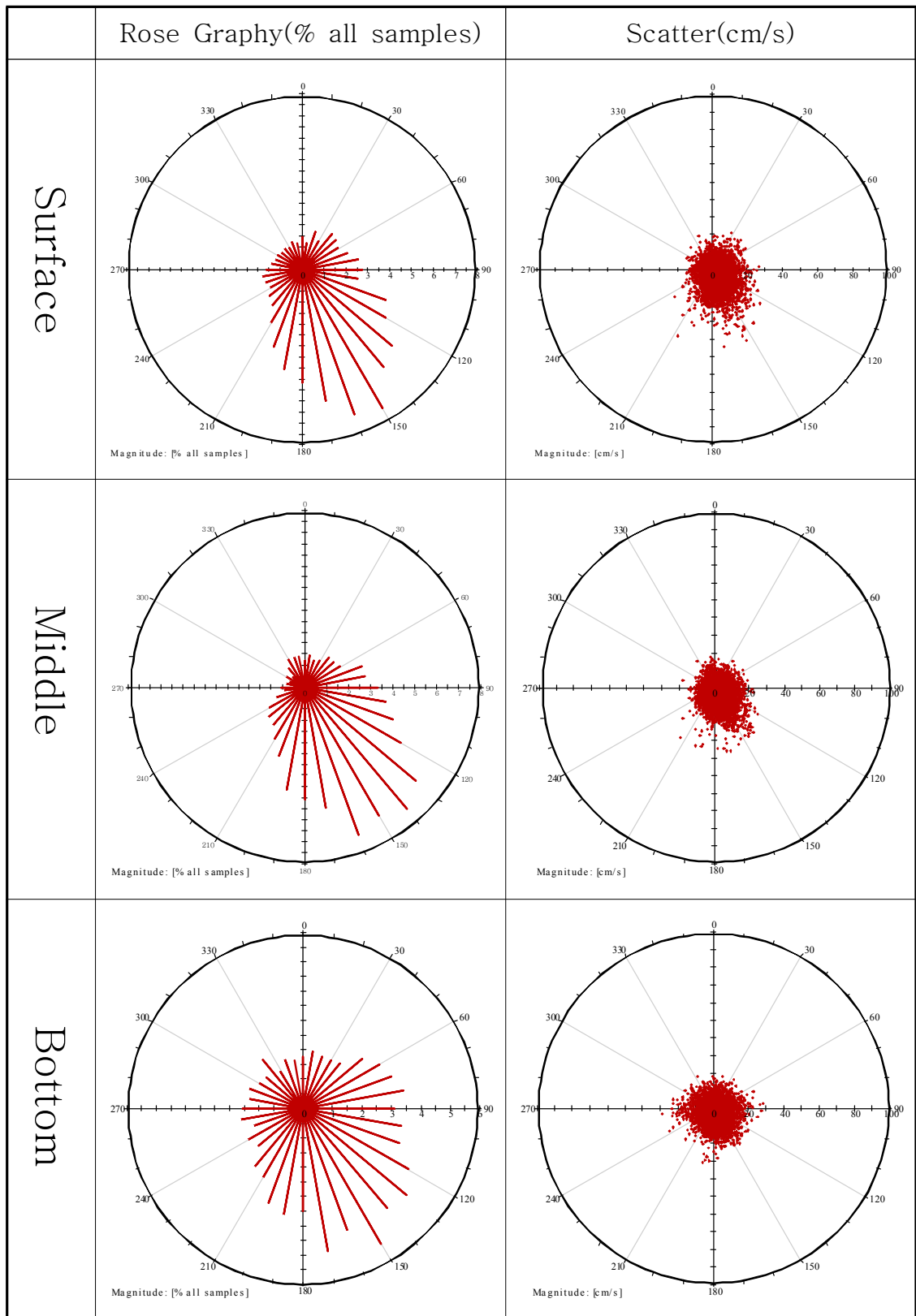


그림 124. 2011년 육지도 주변(St. 3)의 수층에 따른 rose graph(좌)와 scatter(우).

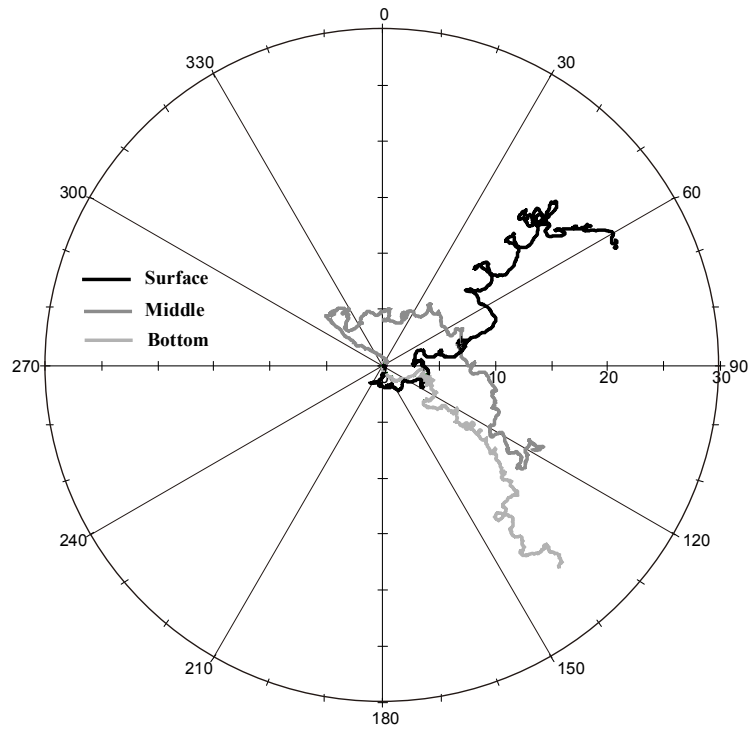


그림 125. 2009년 자란만 외측 (St. 1) 수층에 따른 누적유속분포도(progressive vector).

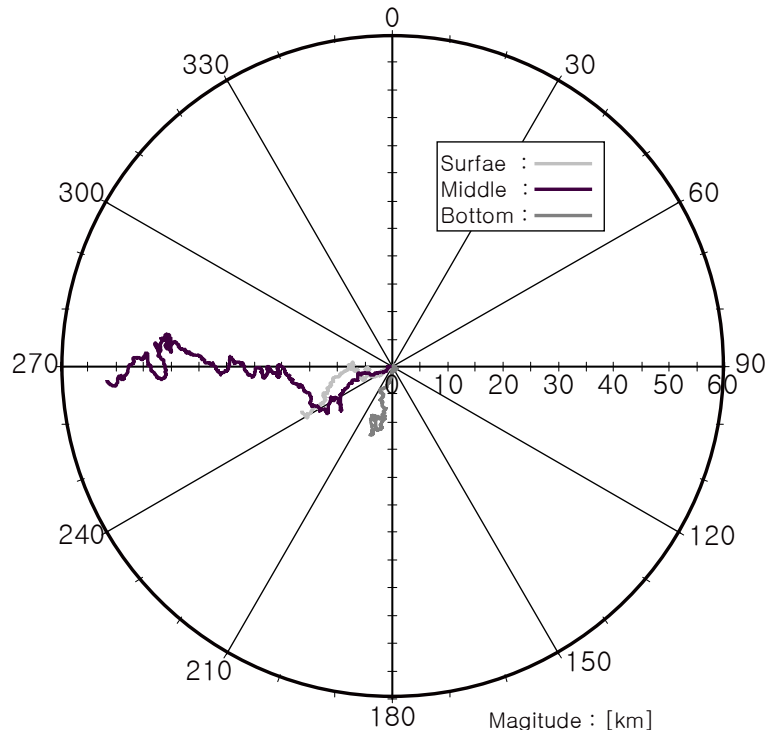


그림 126. 2010년 자란도 주변 (St. 2) 수층에 따른 누적유속분포도(progressive vector).

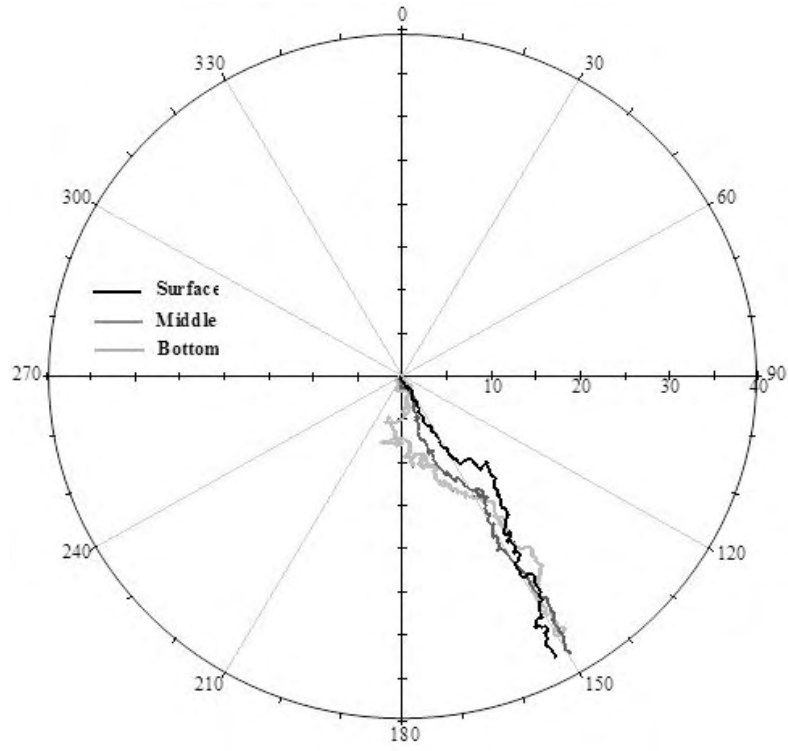


그림 127. 2011년 욕지도 주변 (St. 3)의 수층에 따른 누적유속분포도 (progressive vector).

표 27. 자란만과 육지도의 조류조화분해를 사용하여 나타낸 4대분조 결과

Station	Constituent	Major(cm/s)	Minor(cm/s)	INC(angle)	G(Phase)
St. 1	M <sub>2</sub>	2.594	0.206	17.73	167.84
	S <sub>2</sub>	1.100	0.495	38.74	218.48
	K <sub>1</sub>	2.612	1.057	1.71	52.56
	O <sub>1</sub>	1.133	0.650	50.35	88.72
St. 2	M <sub>2</sub>	1.432	0.524	166.29	153.32
	S <sub>2</sub>	0.297	0.333	137.85	204.50
	K <sub>1</sub>	0.252	0.345	157.71	45.96
	O <sub>1</sub>	0.511	0.375	170.45	261.37
St. 3	M <sub>2</sub>	2.810	0.184	85.31	111.79
	S <sub>2</sub>	2.053	0.745	97.76	159.19
	K <sub>1</sub>	1.323	0.481	65.25	7.55
	O <sub>1</sub>	1.789	0.487	138.33	289.50

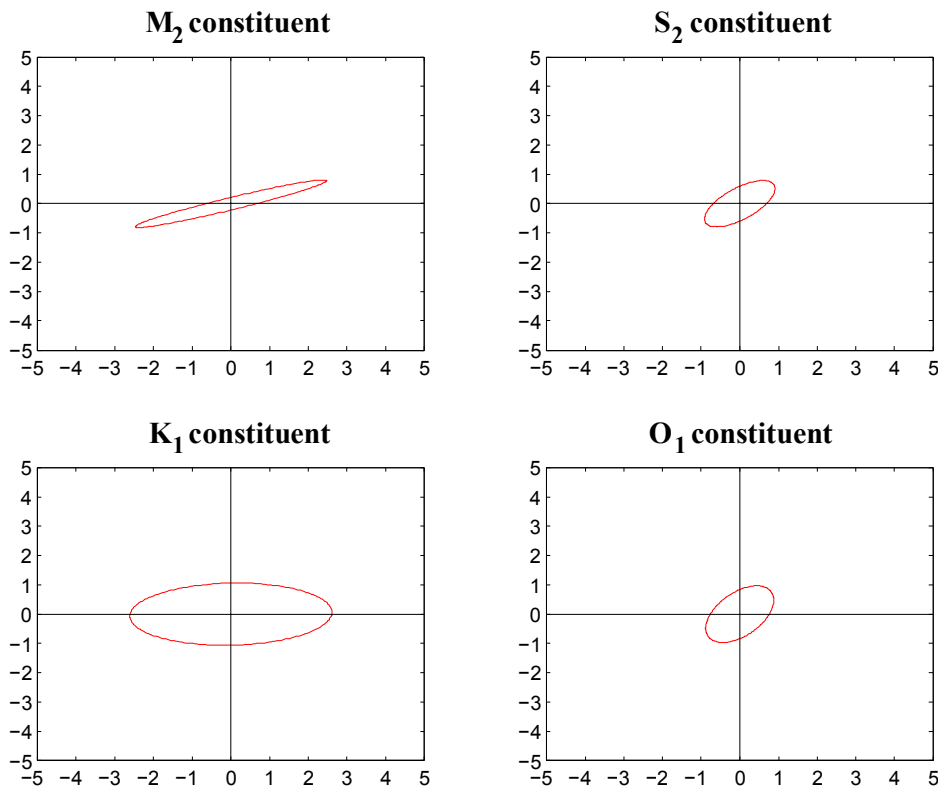


그림 128. 2009년 자란만 외측(St. 1)의 4대분조 조류타원도(단위 : cm/sec).

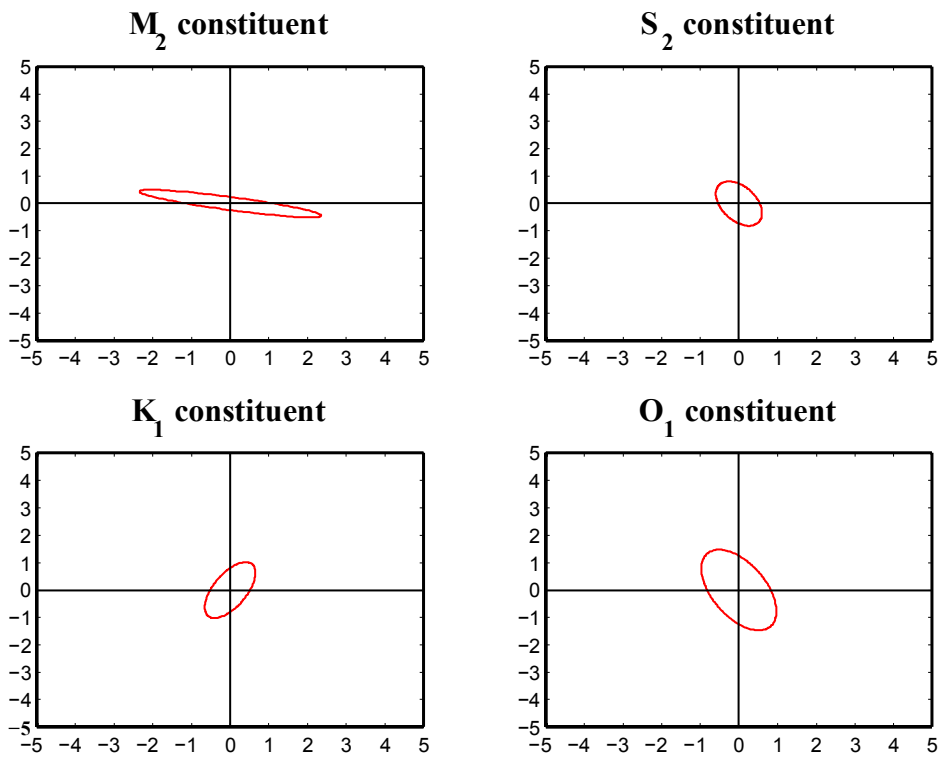


그림 129. 2010년 자란도 주변(St. 2)의 4대분조 조류타원도(단위 : cm/sec).



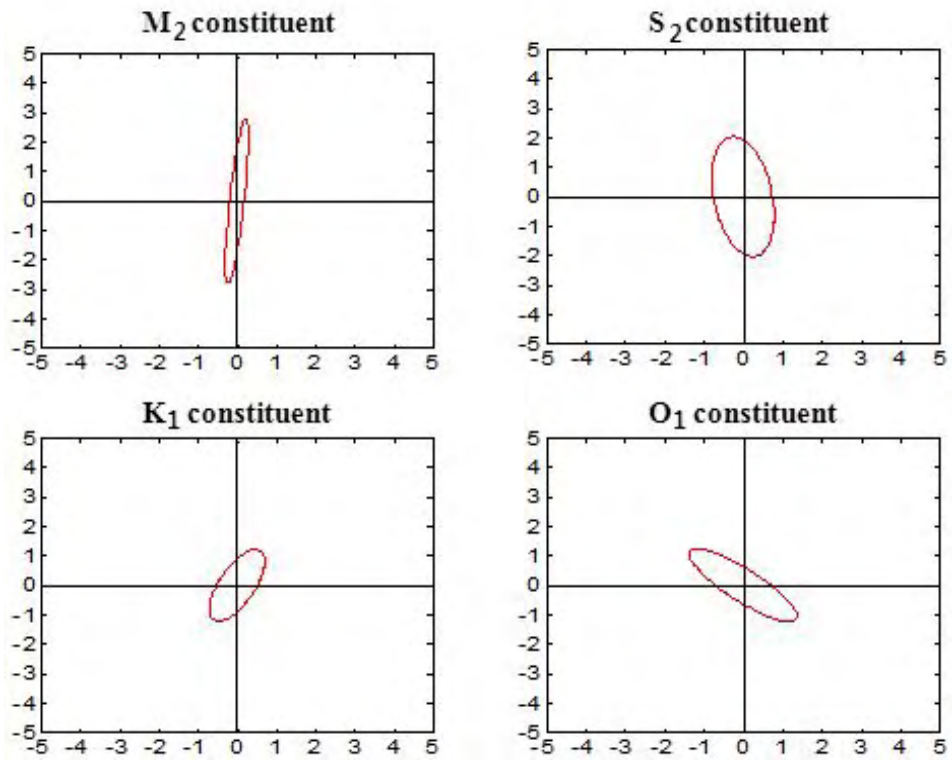


그림 130. 2011년 욱지도 서측(St. 3)의 4대분조 조류타원도(단위 : cm/sec).

## 나. 해수 유동 모델 구축

### (1) 모델 수립

○ 본 연구해역인 자란만 주변의 해수유동에 따라 확산되는 적조포자의 거동을 파악하기 위해 먼저 조석에 의한 해수유동을 수치 실험하였다.

○ 본 수치모델링에서는 국립해양조사원 검조소의 4대 분조( $M_2$ ,  $S_2$ ,  $K_1$  및  $O_1$ )와 NOAA에서 제공하는 외양역의 조화상수를 이용하여 수치모델의 개방경계를 설정하였다.

○ 모델 영역 크기는 가로(동-서) 방향 116km, 세로(남-북) 방향 80km, 격자는 가로·세로 400m의 격자를 사용하여 모델 영역내의 주요 지형과 수심을 잘 반영할 수 있도록 하였다. 수심은 국립해양조사원 발행 최신 229해도에 근거하였다.

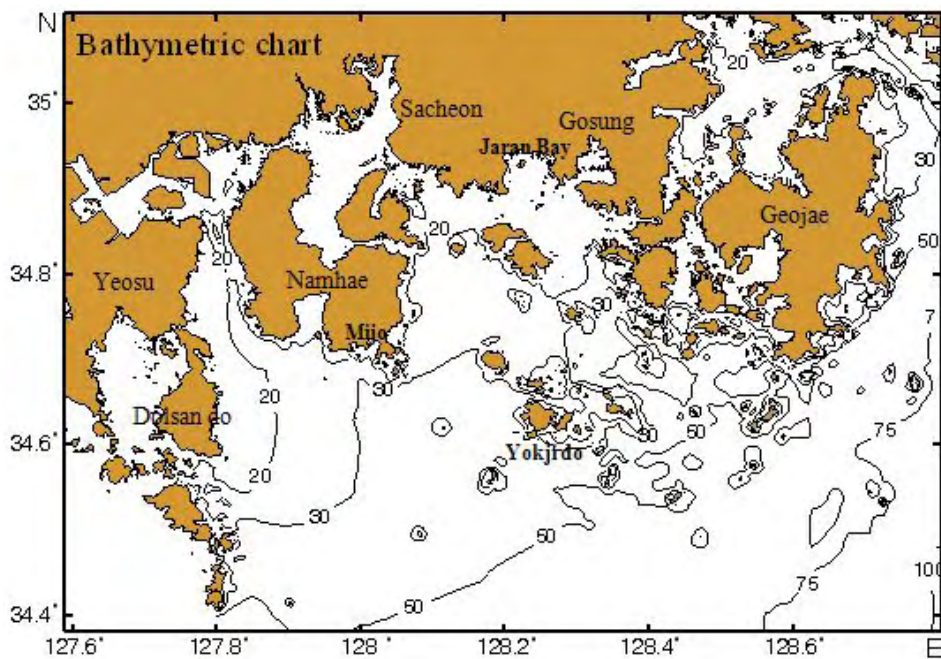


그림 131. 모델 영역.

(2) 사용모델 설명

○ 본 수치실험에 사용된 해수유동모델은 Blumberg and Mellor(1987)에 의해 개발된 POM(Princeton Ocean Model)으로 외양뿐만 아니라 하구, 대륙붕 등 연안역에 주로 적용되어 왔으며(Ezer et al., 2002) 이미 국내에서도 여러 해역에 성공적으로 적용된 바가 있다.

○ POM은 연직좌표계로  $\sigma$ -좌표계를 사용함으로써 z-좌표계의 단점인 해저지형 경사에 따른 저층흐름 재현의 문제점(Gerdes, 1993; Winton et al., 1998; Pacanowski and Gnanadesikan, 1998)을 해결하였다.  $\sigma$ -좌표계는 해저지형을 따라 저층경계가 형성되므로 계단모양의 저층경계를 계산하는 z-좌표계와는 달리 해저면의 물리적 과정을 보다 현실에 가깝게 재현할 수 있기 때문이다. 또 연직방향의 시간차분으로 음해법을 사용하고, time step은 외부모드(2D) 및 내부모드(3D)를 분리하여 계산하는 split time method를 사용하여 계산 시간 면에서 효율성 및 경제성이 높다는 점도 장점이라 할 수 있다.

○ 본 수치모델링에 사용된 모델은 수심에 대해 적분된 수평 방향 3차원 조류모델로서 물질 보존 방정식을 첨부한 것이다. 사용된 모델은 연속 방정식, 운동 방정식 및 물질 보존 방정식으로 구성되어 있다. 연속 방정식과 운동 방정식은 조위와 유속장의 시·공간적인 변화를 묘사하고, 물질 보존 방정식은 특정 물질(본 모델링에서는 적조포자)의 시·공간적인 분포를 묘사한다. 경압경도력을 무시하고, 유체정역학적 근사와 Boussinesq 근사를 사용할 때, 수심 적분된 연속 방정식, 운동 방정식, 물질 보존 방정식은 각각 다음과 같다.

$$\frac{\partial \eta}{\partial t} + \frac{\partial UD}{\partial x} + \frac{\partial VD}{\partial y} + \frac{\partial \omega}{\partial \sigma} = 0 \quad (1)$$

$$W = \omega + U \left[ \sigma \frac{\partial D}{\partial x} + \frac{\partial \eta}{\partial x} \right] + V \left[ \sigma \frac{\partial D}{\partial y} + \frac{\partial \eta}{\partial y} \right] + \sigma \frac{\partial D}{\partial t} + \frac{\partial \eta}{\partial t} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} & \frac{\partial UD}{\partial t} + \frac{\partial UUD}{\partial x} + \frac{\partial VUD}{\partial y} + \frac{\partial U\omega}{\partial \sigma} - fVD + gD \frac{\partial \eta}{\partial x} + \frac{gD^2}{\rho_0} \int_{\sigma}^0 \left[ \frac{\partial \rho'}{\partial x} - \frac{\sigma'}{D} \frac{\partial D}{\partial x} \frac{\partial \rho'}{\partial \sigma'} \right] d\sigma' \\ & = \frac{\partial}{\partial \sigma} \left[ \frac{K_M}{D} \frac{\partial U}{\partial \sigma} \right] + F_x \end{aligned} \quad (3)$$

$$\frac{\partial VD}{\partial t} + \frac{\partial UVD}{\partial x} + \frac{\partial VVD}{\partial y} + \frac{\partial V\omega}{\partial \sigma} + fUD + gD \frac{\partial \eta}{\partial y} + \frac{gD^2}{\rho_0} \int_{\sigma}^0 \left[ \frac{\partial \rho'}{\partial y} - \frac{\sigma'}{D} \frac{\partial D}{\partial y} \frac{\partial \rho'}{\partial \sigma'} \right] d\sigma'$$

$$= \frac{\partial}{\partial \sigma} \left[ \frac{K_M}{D} \frac{\partial V}{\partial \sigma} \right] + F_y \quad (4)$$

$$\frac{\partial TD}{\partial t} + \frac{\partial UTD}{\partial x} + \frac{\partial VTD}{\partial y} + \frac{\partial T\omega}{\partial \sigma} = \frac{\partial}{\partial \sigma} \left[ \frac{K_H}{D} \frac{\partial T}{\partial \sigma} \right] + F_T - \frac{\partial R}{\partial z} \quad (5)$$

$$\frac{\partial SD}{\partial t} + \frac{\partial USD}{\partial x} + \frac{\partial VSD}{\partial y} + \frac{\partial S\omega}{\partial \sigma} = \frac{\partial}{\partial \sigma} \left[ \frac{K_H}{D} \frac{\partial S}{\partial \sigma} \right] + F_S \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial q^2 D}{\partial t} + \frac{\partial Uq^2 D}{\partial x} + \frac{\partial Vq^2 D}{\partial y} + \frac{\partial \omega q^2}{\partial \sigma} &= \frac{\partial}{\partial \sigma} \left[ \frac{K_q}{D} \frac{\partial q^2}{\partial \sigma} \right] \\ &+ \frac{2K_M}{D} \left[ \left( \frac{\partial U}{\partial \sigma} \right)^2 + \left( \frac{\partial V}{\partial \sigma} \right)^2 \right] + \frac{2g}{\rho_0} K_H \frac{\partial \tilde{\rho}}{\partial \sigma} - \frac{2Dq^3}{B_1 \ell} + F_q \end{aligned} \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial q^2 \ell D}{\partial t} + \frac{\partial Uq^2 \ell D}{\partial x} + \frac{\partial Vq^2 \ell D}{\partial y} + \frac{\partial \omega q^2 \ell}{\partial \sigma} &= \frac{\partial}{\partial \sigma} \left[ \frac{K_q}{D} \frac{\partial q^2 \ell}{\partial \sigma} \right] \\ &+ E_1 \ell \left( \frac{K_M}{D} \left[ \left( \frac{\partial U}{\partial \sigma} \right)^2 + \left( \frac{\partial V}{\partial \sigma} \right)^2 \right] + E_3 \frac{g}{\rho_0} K_H \frac{\partial \tilde{\rho}}{\partial \sigma} \right) - \frac{Dq^3}{B_1} \tilde{W} + F_\ell \end{aligned} \quad (8)$$

여기서,

t : 시간

x, y, z : 직교좌표상의 거리

D : 총수심(D=H+n)

$$\sigma = \frac{z - \eta}{H + \eta}$$

H : 평균해면으로부터의 수심

n : 평균해면으로부터의 해면변위

U, V, W : x,y,z방향의 유속성분

$\omega$  : sigma 면을 통과하는 연직유속성분

f : Coriolis parameter ( $f=2\Omega \sin \psi$ ,  $\psi=36^\circ N$ )

g : 중력 가속도

$\rho_0$  : 평균 해수 밀도

KM ,KH : 수평 와동점성, 와동확산항

Fx, Fy : x방향과 y방향의 수평와점성항

T, S : 수온과 염분 농도

FT, Fs : 수온 염분의 수평난류확산항

○ 지배 방정식들은 x축이 동, y축은 북, 그리고 z축은 해수면으로부터 위가 양인 (x,y,z,t) 오른손 좌표계에서의 식들이다. 수평 와동 점성항  $F_x$ 와  $F_y$  및 수평 난류 확산항  $F_s$ 는 모델 격자로는 직접적으로 다룰 수 없는 sub-grid scale 현상에 의해 야기된 것이며 다음과 같이 표현될 수 있다.

$$F_x = \frac{\partial}{\partial x} \left[ 2DA_M \frac{\partial U}{\partial x} \right] + \frac{\partial}{\partial y} \left[ DA_M \left( \frac{\partial U}{\partial y} + \frac{\partial V}{\partial x} \right) \right]$$

$$F_y = \frac{\partial}{\partial x} \left[ DA_M \left( \frac{\partial U}{\partial y} + \frac{\partial V}{\partial x} \right) \right] + \frac{\partial}{\partial y} \left[ 2DA_M \frac{\partial V}{\partial y} \right]$$

$$F_s = \frac{\partial}{\partial x} \left[ DA_H \frac{\partial C}{\partial x} \right] + \frac{\partial}{\partial y} \left[ DA_H \frac{\partial C}{\partial y} \right]$$

(9)

여기서,

AM : 수평 와동 점성 계수

AH : 수평 난류 확산 계수

$$A_M = A_H = \epsilon \cdot (\Delta X)^{4/3}$$

○ 본 수치모델링에서는 수평 와동 점성 계수는 Richardson의 4/3승 법칙에 기초하여  $\epsilon$ 는 0.02(C.G.S)를 적용하였고, 수평 난류 확산 계수는 수평 와동 점성 계수와 같은 값을 사용하였다.

○ 과거 상수로 사용되던 수평와동 점성계수는 POM에서 격자 크기 및 수평 전단속도에 비례하도록 하는 Smagorinsky type diffusivity (Smagorinsky, 1963)가 사용되며 그 식은 다음과 같다.

$$A_M = C \Delta x \Delta y \sqrt{\left( \frac{\partial U}{\partial x} \right)^2 + \frac{1}{2} \left( \frac{\partial U}{\partial y} + \frac{\partial V}{\partial x} \right)^2 + \left( \frac{\partial V}{\partial y} \right)^2}$$

(10)

여기서

C : 무차원 상수

$\Delta x, \Delta y$  : x방향과 y방향의 격자 크기

○ 격자구성은 엇갈림 격자(staggered grid)에 속하는 Arakawa C-grid를 이용하였다. 기본 방정식은 flux-conservative form으로 표현하여서 방정식을

차분화할 때 질량과 에너지의 보존에 유의하였고, 차분화 방법으로는 유한 체적법(Finite Volume Method)을 사용함으로써 질량과 부피 보존이 잘 되게 하였다. 수면 경사를 반음해법으로, 수평 확산항을 CS(Centered Space) 법으로 해석하였고, 시간에 대하여는 leapfrog scheme을 사용하였다. 운동 방정식의 이류항은 CS법으로 해석하였고, 물질 보존 방정식의 이류항은 upwind scheme으로 해석하였다. 또 각 time step(N)마다 수치해는 아래의 식(Asselin, 1972)에 따라 평활화(smooth)되었다.

$$T_s^n = T^n + \frac{\alpha}{2}(T^{n+1} - 2T^n + T_s^{n-1})$$

(11)

여기서,

$\alpha=0.05$

T : unsmoothed numerical solution

Ts : smoothed solution

수심 적분된 기본 방정식에서 Courant-Friedrichs-Lewy(CFL) 수치 안정 조건은 다음과 같다.

$$\Delta t \leq \frac{\Delta x}{\sqrt{2gH_{\max}}}$$

여기서,

$\Delta x$  : 격자 간격

g : 중력 가속도

Hmax : 최대 수심

○ 본 모델링에서의  $\Delta t$ 는 CFL 수치 안정 조건을 만족시키는 1초를 사용하였다. 총 계산시간은 45일(90조석주기)을 수행하였으며, 예측값으로는 대조기인 마지막 90번째 조석주기의 창조시와 낙조시의 유향유속성분을 사용하였다.

(3) 초기조건 및 경계조건

○ 수치실험 조건 가운데 유동장에 대한 초기조건으로는 계산 시작 단계에서 해수유동이 없는 것(cold start)으로 설정하여 계산을 시작하였고, 유동의 폐경계 조건으로는 육지 경계면을 가로지르는 유량은 없는 조건을, 그리고 해저마찰은 다음의 식과 같이 Manning의 마찰계수를 이용한 quadratic stress law를 사용하였다.

$$\text{quadratic stress law} = \vec{\tau} = C_D \sqrt{U^2 + V^2} \vec{U}$$

$$C_D = gn^2 \Delta z^{-1/3} \quad (12)$$

n : manning의 마찰계수

$\Delta z$  : bottom layer thickness (수심 적분된 경우는 전체 수심)

○ 개방경계에서의 조위 조건은 주요 4대 분조(M2, S2, K1, O1)에 의한 조화상수를 고려하여 관측자료 및 Odamaki(1989)의 차트를 참고하여 시·공간의 함수로 주었고, 해면에서 바람은 없는 것으로 하였다.

○ 조류의 개방 경계조건은 개방경계에 수직(normal)한 속도 성분은 모델 영역 외부의 속도 성분을 필요로 하는 이류항(advective term)과 수평 와동항(horizontal eddy viscosity term)을 무시하고 운동방정식을 풀어 구하였다. 개방경계에 평행한(tangential) 속도 성분은 흐름이 모델 영역 외부로부터 내부를 향할 때는 내부 값과 같은 값으로 처리하였고, 흐름이 모델 영역 내부로부터 외부로 향할 때는 다음의 식에 의해 구하였다.

$$\frac{\partial U_t}{\partial t} + U_n \frac{\partial U_t}{\partial x_n} = 0$$

$U_t$  : 개방경계에 평행한(tangential) 속도성분

$U_n$  : 개방경계에 수직(normal)한 속도성분

$x_n$  : 개방경계에 수직(normal)한 좌표(coordinate)

#### (4) 수치실험 결과

○ 본 연구해역 주변의 해수 유동 변화를 수치실험 하였다. 모델의 결과는 다음과 같이 대조기의 창조시와 낙조시, 소조기의 창조시와 낙조시의 유속 변화를 수치 실험하여 보았다(그림 132~133.). 계산 시는 400m 간격으로 계산하였으나, 시각적 도움을 주기위해 그림으로 표현한 것은 1600m 간격으로 표현하였다.

○ 대조기 창조시 자란만의 동측입구에서는 최대 36cm/sec 정도의 북서류가 나타났고, 만의 중앙부에서는 북향류가 나타났으며, 자란만 서측부근에서는 최대 17cm/sec의 북향류가 나타났다. 자란도와 사랑도 사이의 유속은 해양조사원의 자료는 0.7노트(1 knot = 51.44cm/sec : 약 36cm/sec)의 북서류로 조사되었으며, 모델링 결과는 34.3cm/sec의 북서류로 나와 문헌의 실측유속과 유사한 결과를 나타내었다. 사랑도와 옥지도 사이에서는 최대 64cm/sec로 북서향 하는 흐름이 나타났고, 외양 쪽에서는 60cm/sec로 서향 하는 흐름이 우세하게 나타났으며, 내만으로 향하는 흐름은 비교적 약하게 나타난다(그림 132). 낙조시에는 자란만 동측입구에서 최대 33cm/sec의 남동류가 나타났고, 만의 중앙부에서는 남향하고 만의 서측입구에서는 33cm/sec 미만의 남향류가 나타났다. 자란도와 사랑도 사이 해양조사원의 자료는 0.7노트(약 36cm/sec)의 남동류로 조사되었으며, 모델링 결과는 32.7cm/sec의 남동류로 나와 문헌의 실측유속과 유사한 결과를 나타내었다. 사랑도와 옥지도 사이에서는 57cm/sec로 남동향하는 흐름이 나타났고, 외양 쪽에서는 61cm/sec로 동향하는 흐름이 강하게 나타났다(그림 133).

○ 소조기 창조시의 경우는 자란만의 동측입구에서는 최대 8.1cm/sec 정도의 북서향류가 나타났고, 만의 중앙부에서는 북향류가 나타났으며, 자란만 서측부근에서는 최대 3.7cm/sec의 북향류가 나타났다. 사랑도와 옥지도 사이 수로에서 28cm/sec로 북서향 하는 흐름이 나타나고 외양쪽에서는 33cm/sec로 북서향 하는 흐름이 우세하게 나타난다(그림 134). 낙조시에는 자란만의 동측입구에서는 최대 4.3cm/sec 정도의 남동류가 나타났고, 만의 중앙부에서는 남향류가 나타났으며, 자란만 서측부근에서는 최대 4.1cm/sec의 남향류가 나타났다. 사랑도와 옥지도 사이 수로에서 29cm/sec의 남동향 하는 흐름이 나타나고, 외양 쪽에서는 27cm/sec의 남동향 하는 흐름이 강하게 나타난다. 내만 해역에서는 3cm/sec 이하로 유속이 미약하게 나타난다(그림 135).



○ 15일 주기의 유속을 평균한 조석 잔차류의 경우는 자란만의 입구에서 3.1cm/s 정도의 북서향류가 나타났고, 만의 중앙부에서는 2.3cm/s의 북남향류가 나타났다. 사랑도와 육지도 사이 수로에서 5.5cm/s로 서향하는 흐름이 나타나고 외양 쪽에서는 8.1cm/s로 서향하는 흐름이 우세하게 나타난다 (그림 136).

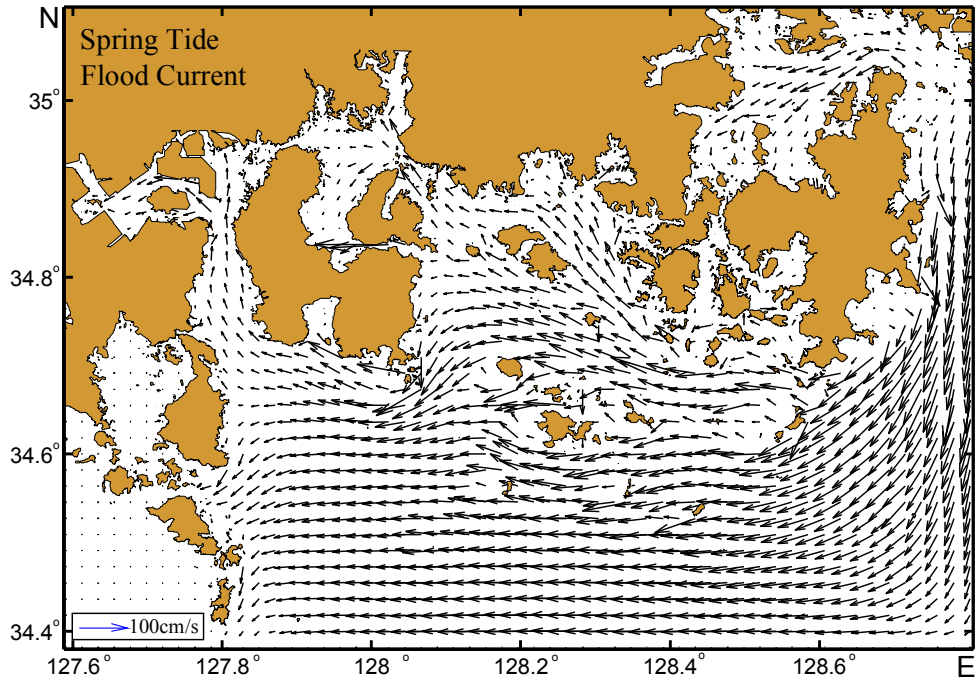


그림 132. 대조기 최강창조시 조류.

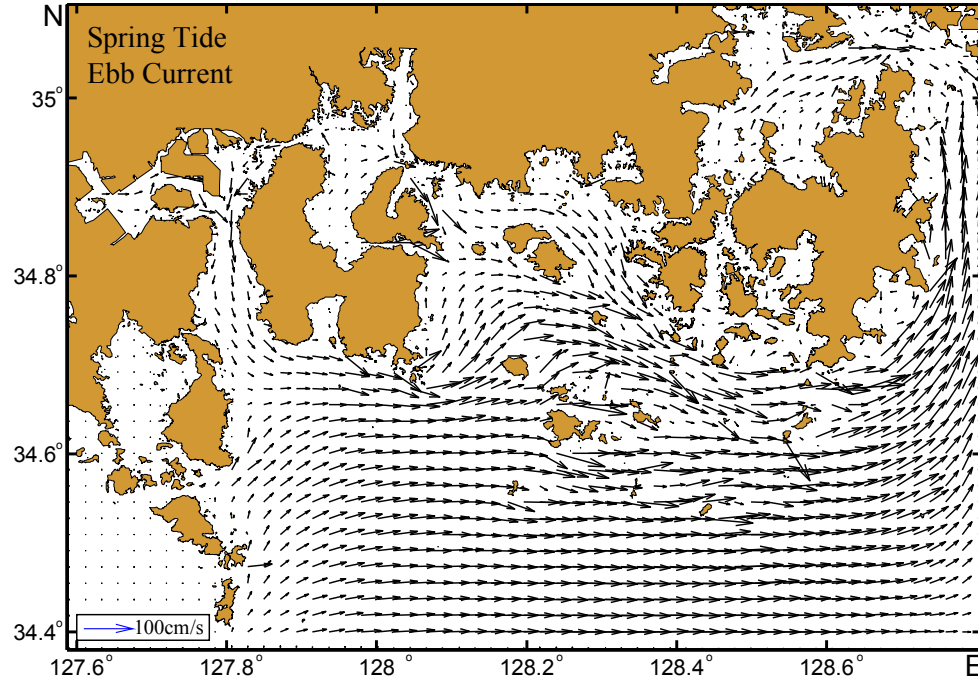


그림 133. 대조기 최강낙조시 조류.

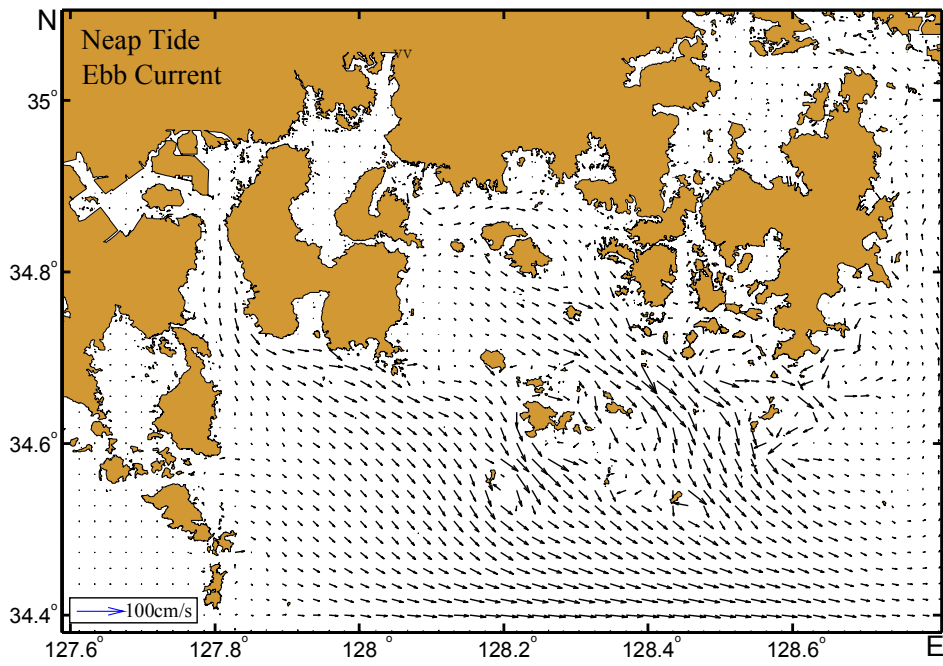


그림 134. 소조기 최강창조시 조류.

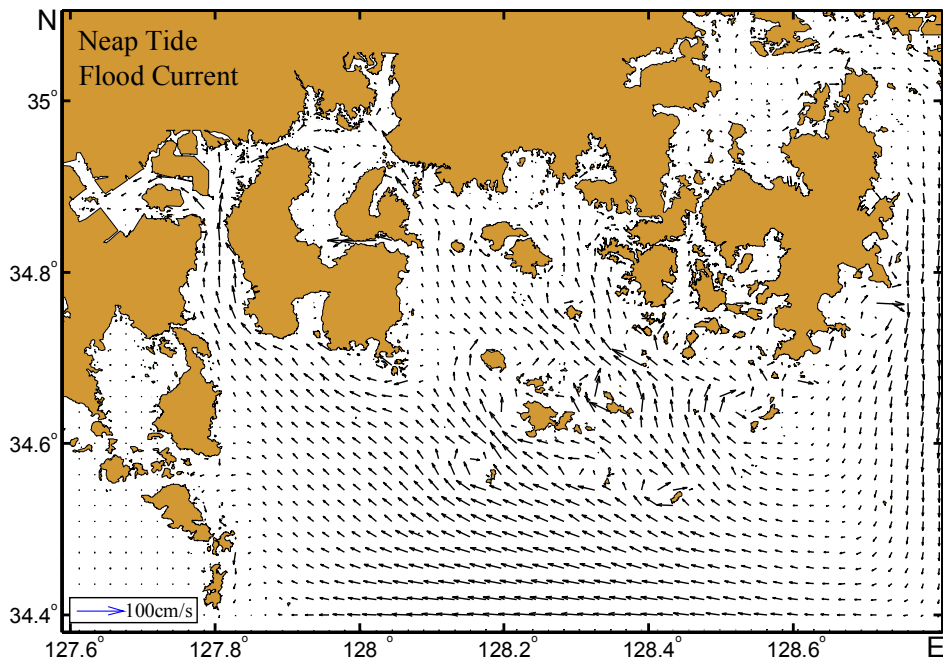


그림 135. 소조기 최강낙조시 조류.

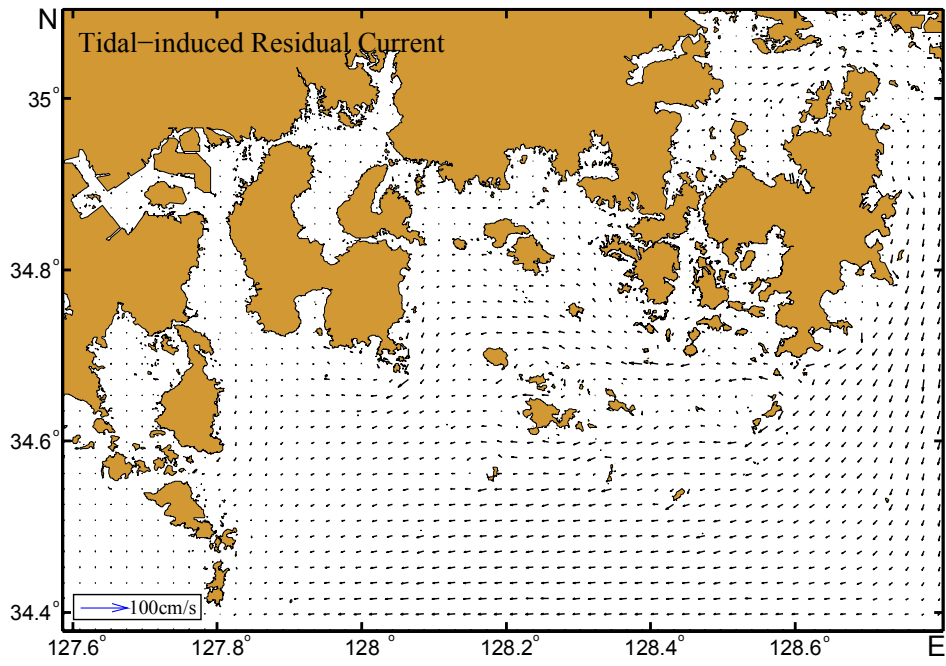


그림 136. 15일 주기의 유속을 평균한 조석잔차류.

## 다. 입자 추적자 모델

### (1) 모델 개요

- 적조 발생 시 적조생물은 수영능력이 없는 것으로 가정하여 해수유동에 의해 이동·확산되어 시공간적 분포 변화를 실험한다.
- 해양에서 물질의 이류·확산을 나타내는 방법에는 Eulerian와 Lagrangian 방법이 있다. Lagrangian 방법은 해양의 부유물질을 입자들의 모임이라 보고 일정한 부피를 가진 입자들이 서로 독립적으로 움직인다는 가정 하에서 이류와 확산에 의해 시간에 따라 이동한 위치를 구하는 방법이다. 본 논문에서는 Lagrangian 방법에 의한 추적방법을 이용한다.
- 물질확산에 관한 문제는 일반적으로 확산 방정식을 수치적으로 풀이하여 근사해를 구하는 방법 외에 입자의 움직임이 임의행보(random walk)한다는 가정하에 수립된 Monte Carlo방법이 있다. 이러한 입자추적법은 현상을 손쉽게 재현할 수 있다는 장점이 있고, 결과의 분석이 용이하기에 본 연구에서는 Monte Carlo방법을 이용하여 발생한 적조입자의 추적에 이용한다.

$$\begin{aligned} X_{i+1} &= X_i + U \Delta t + R \\ R &= \gamma \sqrt{6 k_x \Delta t} \end{aligned} \quad (14)$$

여기서, U : 그 time step에 계산된 유속, R : 임의행보(random walk),  
 $\gamma$  : uniform random number(평균=0, 표준편차=1)이다.

### (2) 적조 확산 예측

- 유해 적조가 어떠한 지점에서 발생하였다고 가정하였을 때 유해 적조 입자의 확산 경로와 범위를 예측하기 위하여 입자 추적자 모델을 수행하였다. 유해 적조가 발생 할 것으로 가정한 지점을 그림 135에 나타내었고 입자 추적자 모델에 의해 유해적조가 시간에 따라 어느 장소에서 발견되는지 알아보기 위하여 남해도 북쪽 내만을 포함한 사랑도 서측 해역을 A zone, 자란만을 포함한 사랑도 동측 해역을 B zone, 광양만, 남해 남·서측 해역을 C zone, 육지도 주변 및 남측해역을 D zone, 거제도 남서부 해역을 E zone, 그리고 진해만을 F zone 으로 구역을 나누어 그림 136에 나타내었다. 각 지점별로 같은 양의 적조(총 650개)가 발생하는 것으로 하여 모델에

적용하였으며, 유해 적조가 자란만(Case1), 미조 앞바다(Case2), 육지도 앞바다(Case3)에서 각각 발생하는 경우와 세 지점에서 동시에 발생하는 경우(Case4)에 대하여 각 구역별 유해 적조 확산을 모의해 보았다(그림 139~139). 또한 시간에 따른 각 구역별 유해 적조 입자 개수를 파악하여 표 28에 나타내었다.

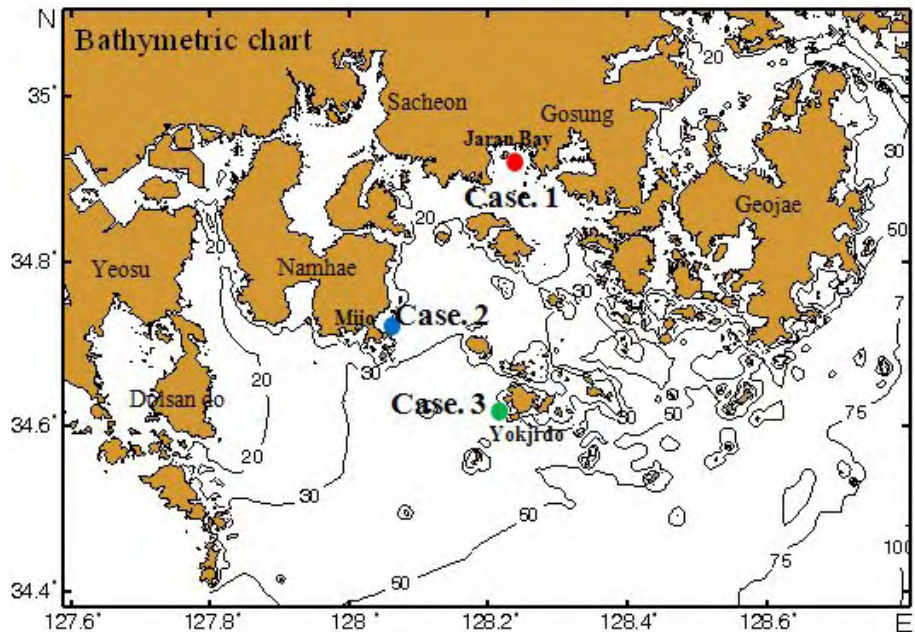


그림 137. 유해 적조 발생 지점.

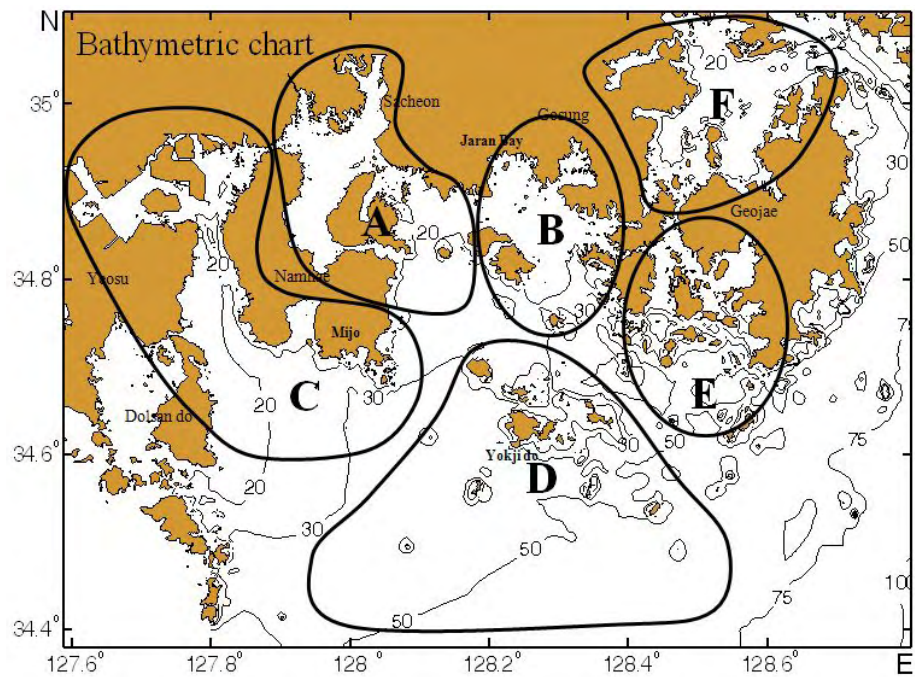


그림 138. 유해 적조 확산 구역.

(가) 자란만에서 유해 적조가 발생 할 경우(Case 1)

○ 자란만에서 유해 적조가 발생 할 때 시간에 따른 적조 입자의 분포를 그림 137에 나타내었다. 유해 적조가 발생한 시점으로 2일 경과 후, 육지도 까지 확산되어 나가는 것으로 나타났다. 사량도 서측 해역인 A zone에 위치한 유해 적조 입자 218개(38%), 사량도 동측 해역인 B zone에 위치한 유해 적조 입자 256개(40%)로 자란만 주변 해역을 벗어나지 못한 것으로 나타났다. 4일 경과 후, 남해도 남쪽 해역과 육지도 남쪽까지 확산되어 나가는 것으로 나타났다. 6일 경과 후와 8일 경과 후를 보면 남쪽으로 더 넓은 범위로 확산되어 육지도 남측 먼 바다에서 유해 적조 입자들이 모이는 경향을 보인다. 10일 경과 후, 남해도와 육지도 남측으로 이동한 유해 적조 입자들이 동향 하는 것으로 나타났다. 상당량의 적조 입자가 육지도 남쪽으로 확산되는 반면 사량도 주변 해역인 A zone 과 B zone에 위치한 유해 적조 입자 개수가 4일 경과 이후 약 180개로 일정량 유지 되는 것으로 나타났다. 자란만에서 유해 적조가 발생 후, 10일이 경과하기 까지 남해도 주변과 거제도 남동측 해역까지 확산되나, 광양만과 진해만으로 유입되지 않는다.

(나) 미조 앞바다에서 유해 적조가 발생 할 경우(Case 2)

○ 미조 앞바다에서 유해 적조가 발생 할 때 시간에 따른 적조 입자의 분포를 그림 138에 나타내었다. 유해 적조가 발생한 시점으로 2일 경과 후, 남해도 남측 해역과 사량도 남서측 해역 그리고 육지도 주변으로 확산되어 나가는 것으로 나타났다. 4일 경과 후, 남해도 남측, 서측 해역과 광양만을 포함하는 C zone의 유해 적조 입자 개수는 226개로 총 개수의 약 34%이고 C zone 남쪽으로 상당수 분포한 것으로 나타났다. 사량도 주변 해역인 A zone 과 B zone의 유해 적조 입자 개수는 총 96개로 나타났고 일부는 광양만 입구와 거제도 남측에서 나타난다. 6일 경과 후, 광양만 입구에 위치하던 유해 적조 입자들이 남향하여 남해도 남측 해역의 무리와 합쳐져 C zone의 유해 적조 입자개수는 202개(30%), D zone의 유해 적조 입자개수는 257개(39%)로 약 70%의 적조 입자가 분포하고 있다. 사량도 주변 해역에 위치한 유해 적조 입자들은 B zone 으로 동쪽으로 이동하는 경향을 보인다. 8일 경과 후, 남해도 남측인 C zone 에 있던 유해 적조 입자들이 광양만 입구까지 북향하고 사량도 동측 B zone 에 있던 유해 적조 입자들은 사량도와 육지도 사이 해역으로 남향한다. 10일 경과 후, 남해도 남측 해역인



C zone에 280개(42%)의 유해 적조 입자들이 고밀도로 분포하고 광양만 입구까지 북향하던 유해 적조 입자들은 광양만 내만으로 유입된다.

(다) 옥지도 서측에서 유해 적조가 발생 할 경우(Case 3)

○ 옥지도 서측에서 유해 적조가 발생 할 때 시간에 따른 적조 입자의 분포를 그림 139에 나타내었다. 유해 적조가 발생한 시점으로 2일 경과 후, 옥지도 주변 해역인 D zone 의 유해적조 입자 개수는 459개(70%)로 가장 많이 나타났고 남해도 남측 해역과 사랑도 남측해역 그리고 거제도 남서쪽 연안으로 확산되어 나가는 것으로 나타났다. 4일 경과 후, 사랑도 북측 자란만 까지 확산되고 옥지도 남측 외해까지 고루 확산된다. 6일 경과 후, 거제도 남서측 해역인 E zone에 유해 적조 입자 개수는 123개로 총 개수의 20%가 분포하는 것으로 나타났다. 7일 경과 후, 거제도 남서측 해역에 분포 하던 유해 적조 입자가 F zone 인 진해만으로 유입되고 자란만 내에 일 평균 45개의 유해 적조 입자가 분포한다. 10일 경과 후, 사랑도와 옥지도 사이, 삼천포 앞바다, 거제도와 통영 사이의 수로에서 고밀도로 나타난다. 옥지도 서측에서 유해 적조가 발생 할 경우인 Case 3은 Case 1, Case 2 와 비교해 보았을 때 거제도 남서측 해안인 E zone 에 유해 적조 입자가 다수 분포하여 통영과 거제 사이의 수로를 통해 진해만 까지 유입되는 특징을 보인다.

(라) 세 지점에서 동시에 유해적조가 발생 할 경우(Case 4)

○ 자란만, 미조 앞바다, 옥지도 서측에서 동시에 유해 적조가 발생 할 때 시간에 따른 적조 입자의 분포를 그림 140에 나타내었다. 세 지점에서 동시에 유해 적조가 발생할 시 전체적으로 고루 확산되는 것으로 나타난다. 사랑도 서측 해역인 A zone에서는 자란만에서 발생한 유해 적조 입자가 주로 나타나고 사랑도 동측 해역인 B zone에서는 세 지점에서 발생한 유해 적조 입자가 고루 나타난다. 남해도 남측 해역인 C zone에서는 미조에서 발생한 유해 적조 입자가 주로 나타나고, 옥지도 주변 해역인 D zone에서는 자란만과 옥지도 서측에서 발생한 유해 적조 입자가 우세하게 나타나며, 거제도 남서측 해역인 E zone 에서는 옥지도 서측에서 발생한 유해 적조 입자가 주로 분포한다. 각 지점에서 발생한 유해 적조 입자가 가장 고르게 분포하는 지역은 사랑도 주변 해역인 B zone이고, 가장 많은 유해적조 입자들이 분포하는 곳은 남해도 남측 해역인 C zone으로 나타났다. 광양만으로 유입

되는 유해 적조 입자는 미조에서 발생한 입자로 조류에 의해 여수와 남해도 사이의 수로나 남해도 북측 수로를 통해 유입되는 것으로 판단되고, 진해만으로 유입되는 유해 적조 입자는 육지도 서측에서 발생한 입자로 거제도과 통영 사이의 수로를 통해 유입되는 것으로 판단된다.

표 28. 시간에 따른 각 구역별 유해 적조 입자 개수

Case	Time(Day)	A zone	B zone	C zone	D zone	E zone	F zone
Jaran (Case 1)	1	106	359	17	6	0	0
	2	218	256	65	92	12	0
	3	233	106	126	135	0	0
	4	215	60	125	210	13	0
	5	187	16	147	248	48	0
	6	180	50	115	205	81	0
	7	171	81	67	291	16	0
	8	125	96	31	347	23	0
	9	176	40	30	296	36	0
	10	96	87	25	309	6	0
Mijo (Case 2)	1	78	7	282	66	0	0
	2	73	31	222	186	2	0
	3	48	38	276	203	0	0
	4	31	65	226	189	8	0
	5	21	75	168	281	0	0
	6	2	88	202	257	1	0
	7	0	68	243	283	2	0
	8	0	44	217	262	0	0
	9	0	28	295	229	0	0
	10	32	61	280	167	9	0
Yokji (Case 3)	1	0	0	17	459	0	0
	2	19	33	79	421	47	0
	3	45	94	102	259	88	0
	4	5	122	126	135	39	0
	5	13	67	36	370	82	0
	6	1	67	82	349	123	0
	7	8	67	73	187	119	41
	8	2	74	96	275	94	45
	9	21	111	109	227	48	48
	10	135	58	113	150	82	48

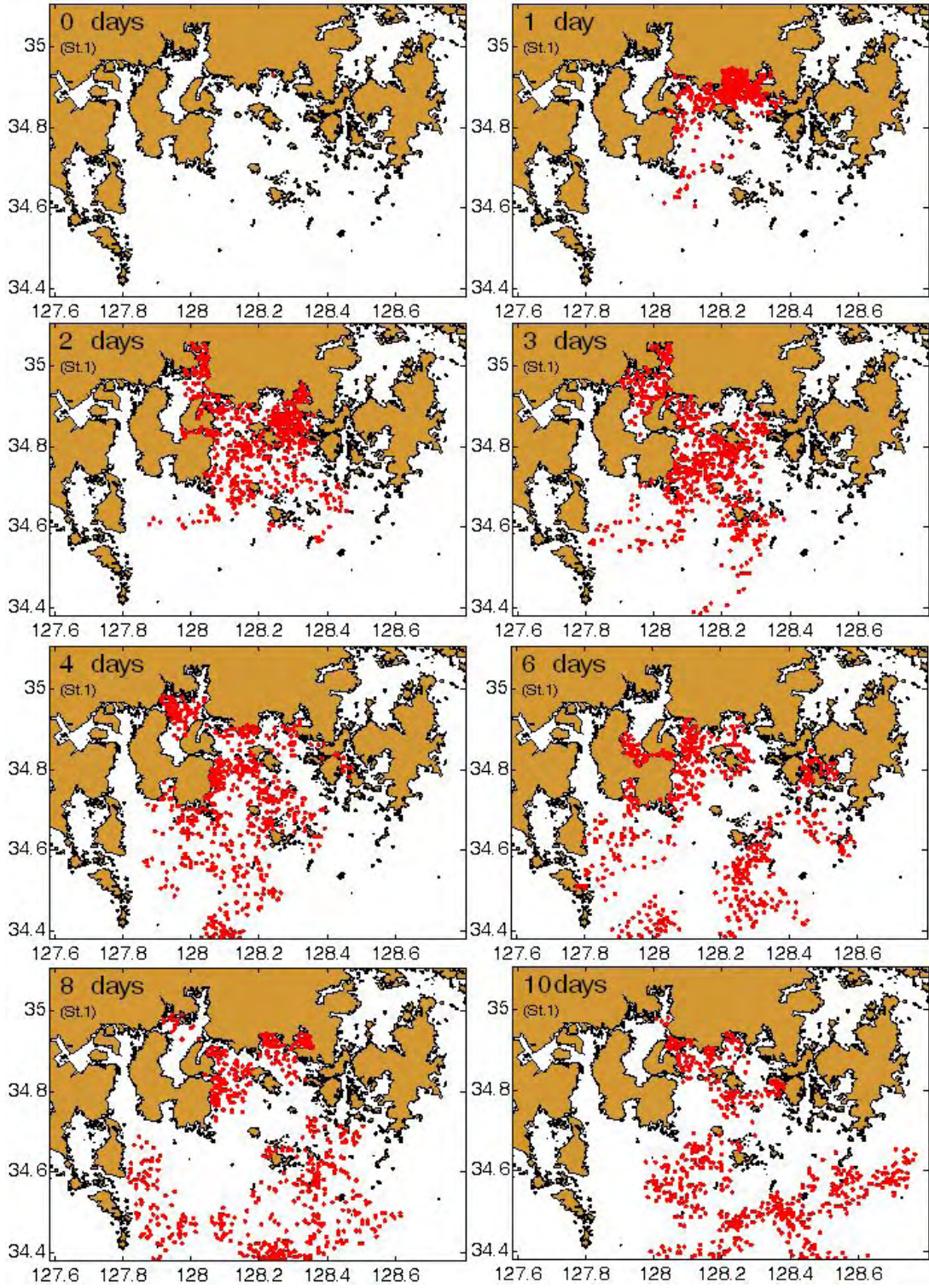


그림 139. 자란만에서 유해 적조가 발생할 경우(Case 1).

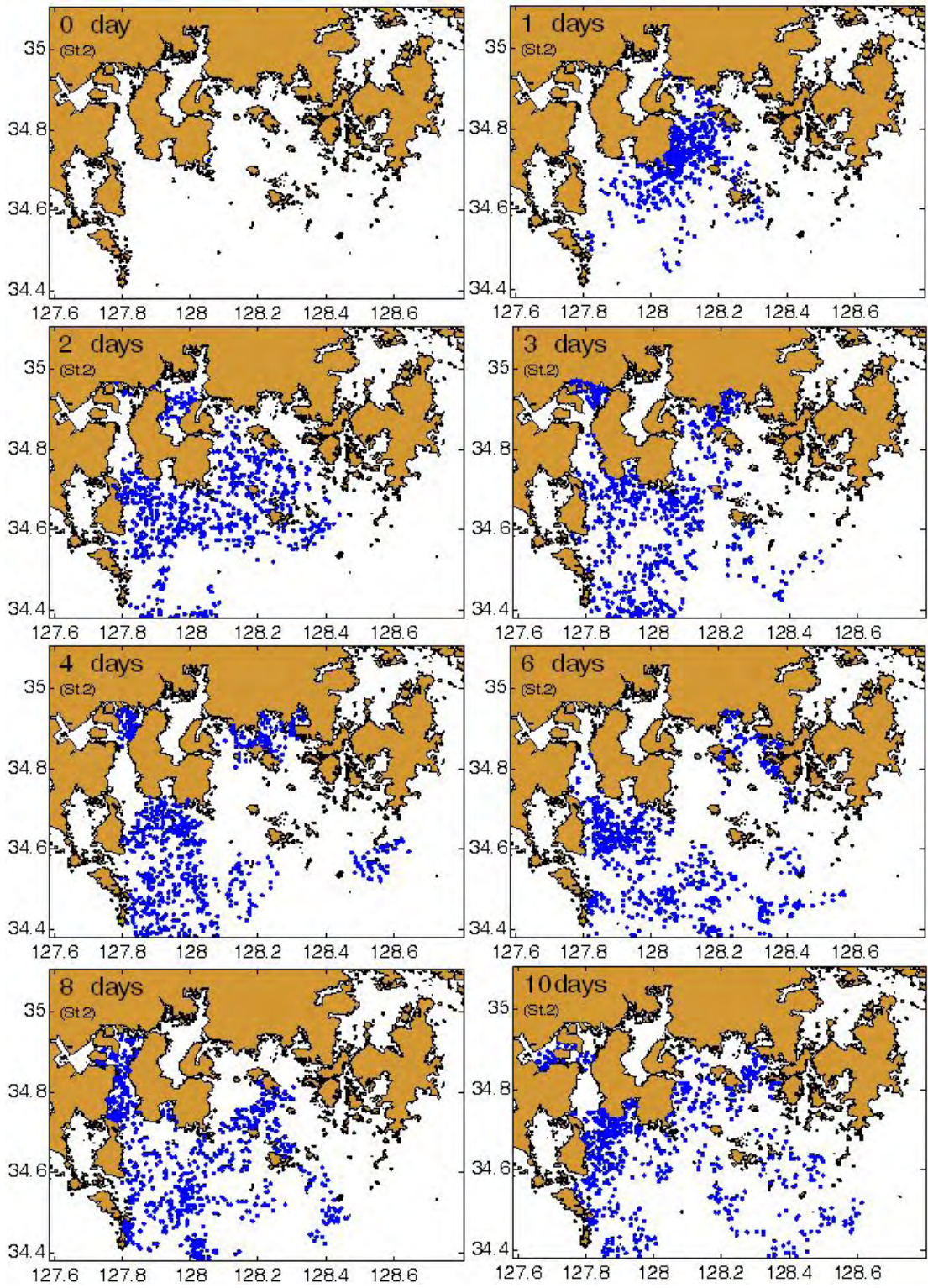


그림 140. 미조 앞바다에서 유해 적조가 발생할 경우(Case 2).

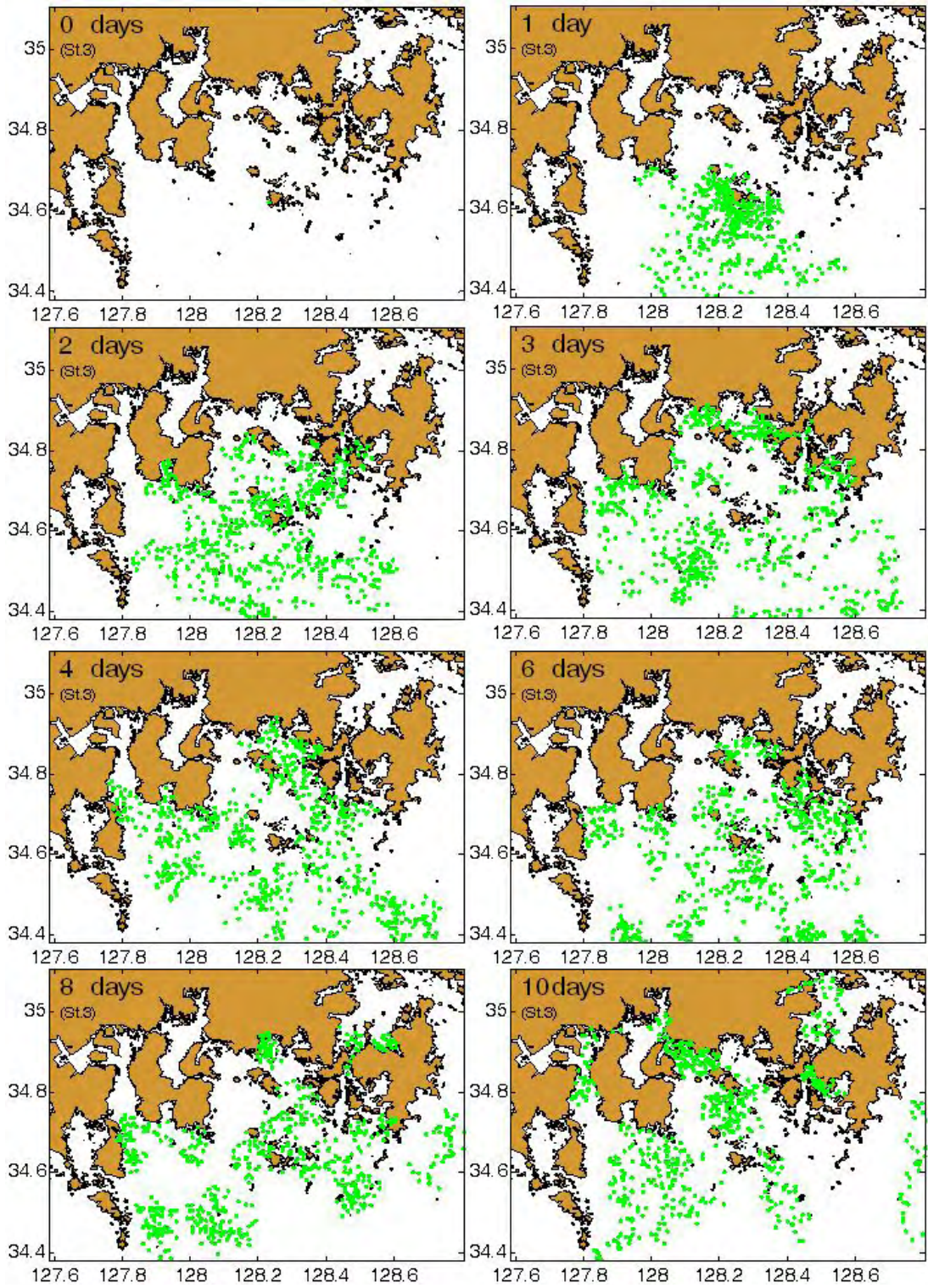


그림 141. 옥지도 서측에서 유해 적조가 발생할 경우(Case 3).

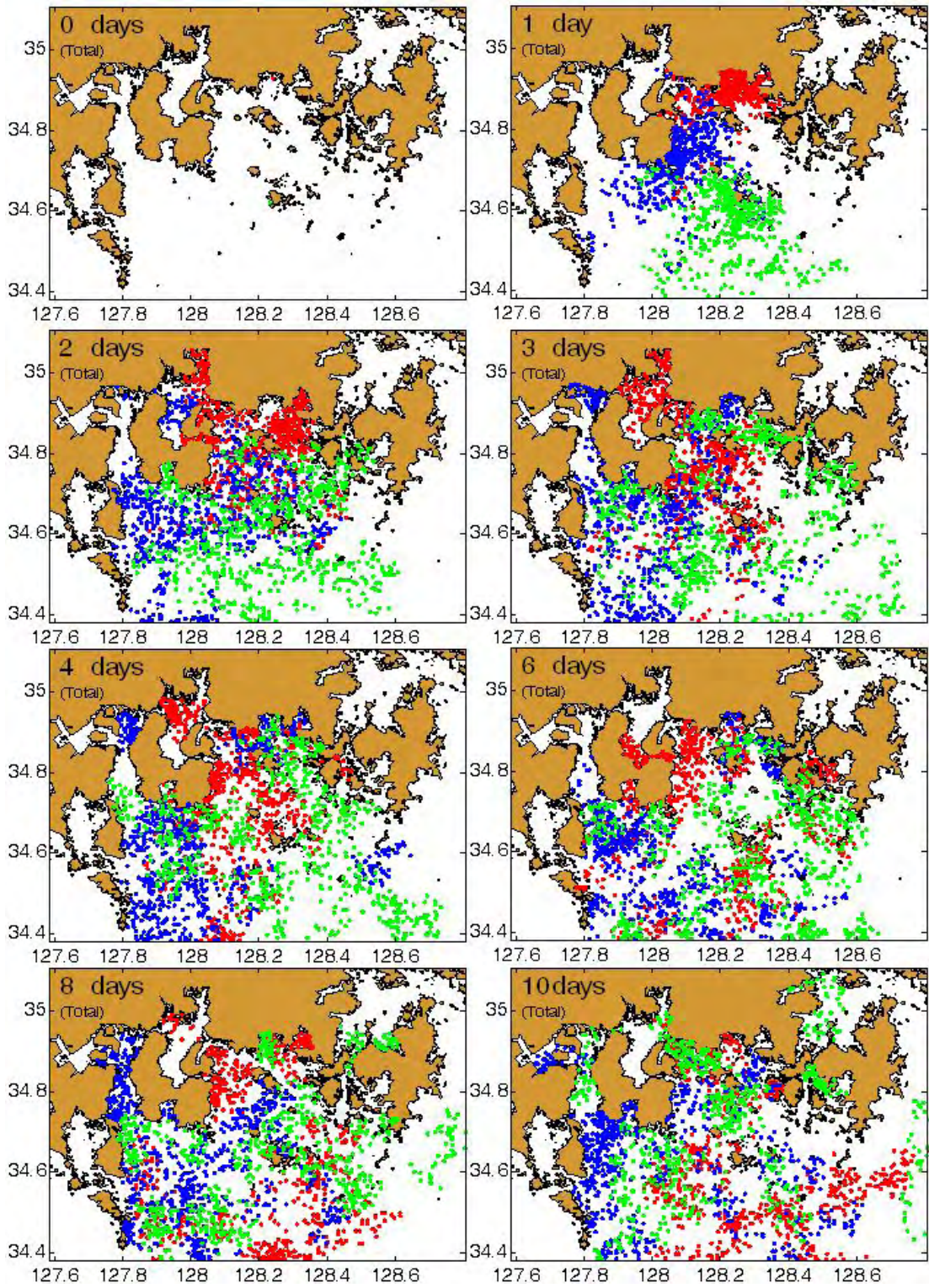


그림 142. 세 지점에서 동시에 유해 적조가 발생할 경우(Case 4).

## 라. 요약 및 결론

### (1) 유동 분포

○ 대조기 창조시 자란만의 동측입구에서는 최대 36cm/sec 정도의 북서류, 만의 중앙부에서는 북향류가 나타났으며, 자란만 서측부근에서는 최대 17cm/sec의 북향류가 나타났다. 사랑도와 육지도 사이에서는 최대 64cm/sec로 북서향 하는 흐름이, 외양쪽에서는 60cm/sec로 서향하는 흐름이 우세하게 나타났다. 대조기 낙조시에는 자란만 동측입구에서 최대 33cm/sec의 남동류, 만의 중앙부에서는 남향하고 만의 서측입구에서는 33cm/sec 미만의 남향류가 나타났다. 사랑도와 육지도 사이에서는 57cm/sec로 남동향, 외양쪽에서는 61cm/sec로 동향하는 흐름이 나타났다. 소조기 창조시의 경우는 자란만의 동측입구에서는 최대 8.1cm/sec 정도의 북서향류, 만의 중앙부에서는 북향류가 나타났으며, 자란만 서측부근에서는 최대 3.7cm/sec의 북향류가 나타났다. 사랑도와 육지도 사이 수로에서 28cm/sec로 북서향 하는 흐름, 외양쪽에서는 33cm/sec로 북서향 하는 흐름이 나타난다. 낙조시에는 자란만의 동측입구에서는 최대 4.3cm/sec 정도의 남동류, 만의 중앙부에서는 남향류가 나타났으며, 자란만 서측부근에서는 최대 4.1cm/sec의 남향류가 나타났다. 사랑도와 육지도 사이 수로에서 29cm/sec의 남동향 하는 흐름이 나타나고, 외양쪽에서는 27cm/sec의 남동향 하는 흐름이 나타난다. 내만 해역에서는 3cm/sec 이하로 나타난다. 조석 잔차류의 경우는 자란만의 입구에서 3.1cm/s 정도의 북서향류, 만의 중앙부에서는 2.3cm/s의 북남향류가 나타났다. 사랑도와 육지도 사이 수로에서 5.5cm/s로 서향, 외양쪽에서는 8.1cm/s로 서향하는 흐름이 나타난다.



## (2) 적조 입자 확산 분포

○ 자란만에서 유해 적조가 발생 할 경우 2일이 경과하기 까지 자란만 근해에서 발생한 유해 적조 입자의 78%가 분포하고, 4일 경과 후, 남해도 남쪽 해역과 옥지도 남쪽까지 확산 된다. 6일 경과 후, 옥지도 남측 먼 바다로 확산되고, 서서히 동향하는 것으로 나타났다. 미조 앞바다에서 유해 적조가 발생 할 때, 4일 경과 까지 남해도 남·서측으로 많이 분포하고, 5일 경과 후, 외해역으로 다수 분포한다. 8일 경과 후 다시 남해도 남측 해역에 다수 분포하고, 남해도 서측 수로를 통해 북향한다. 10일 경과 후, 남해도 서측 수로를 통해 북향하던 유해 적조 입자들이 광양만 내만으로 유입된다. 옥지도 서측에서 유해 적조가 발생 할 경우 2일이 경과하면 남해도 남측해역과 사랑도 남측 해역 및 거제도 남서쪽 연안에 확산되어 나간다. 6일 경과 후 거제도 남서측 해역에 약 20%의 유해 적조입자가 고밀도로 분포하다가 7일 경과 후, 통영과 거제도 사이 수로를 통하여 진해만으로 유입된다.

## 6. 적조 잠재력 제어 현장 평가 및 발아 초기개체군 구제 가능성 검토

### 가. 황토살포에 따른 *Cochlodinium polykrikoides* 영양세포 구제효과 조사

본 연구에서는 *C. polykrikoides*의 구제물질로써 황토를 살포하고, 이에 대한 영향 및 효과를 다음과 같은 주요 관점에서 조사하고자 하였다.

- 황토에 대한 *C. polykrikoides* 영양세포의 사멸 과정 모니터링(황토에 의한 hyaline 세포의 형성 여부 포함)
- 황토에 의한 *C. polykrikoides*의 휴면포자 형성 저해능 조사

#### (1) 재료 및 방법

##### ○ 예비실험

- 황토에 대한 *C. polykrikoides*의 구제 효과를 조사하기 위하여 시험관 수준의 실험을 진행하였다(그림 141).
- *C. polykrikoides* 영양세포의 농도는 1,000, 2,000, 5,000 cells/ml로 하였고, 황토는 0~10,000 ppm의 범위로 구간을 설정하였다.
- 황토에 대한 구제 효율은 황토를 살포하고 1일 경과 후 chlorophyll *a* 값을 측정하여 대조구와 비교하여 조사하였다.



그림 143. 황토에 대한 *C. polykrikoides*의 구제효과 실험 장면.

##### ○ *C. polykrikoides*의 대량배양

- *C. polykrikoides*의 분리주는 자체 보유 5종을 대상으로 시험관 수준에서부터 단계적으로 규모를 확대하여 대량배양을 실시하고 있다(그림 142).
- 배양 조건은 L:D 주기는 12:12. 에어레이션은 1 VVM, 배지는 f/2로 하였

다.

- 본 종의 대량배양은 자연환경에서 소멸되기 시작하는 10월부터 200-L 규모의 수조에서 배양하기 시작하여 11월에 황토를 살포하여 실험을 진행하였다.



그림 144. *C. polykrikoides*의 배양(왼쪽, 약 20-L 규모의 생수통 ;오른쪽, 200-L규모의 배양 수조의 모습).

○ 황토에 대한 *C. polykrikoides*의 영양세포 구제 및 휴면포자 생성 저해 효과 분석

- *C. polykrikoides* 영양세포에 대한 황토의 효과 및 영향 조사는 황토 살포 후 수층별 및 시간대별로 채수하여 영양세포 확인, hyaline 세포의 형성 여부 확인 등의 연구를 수행할 예정이다.

- 휴면포자 생성 저해 효과 분석은 황토 살포 후 1개월 간격으로 저면에 침강한 황토를 샘플링하여 휴면포자의 형성 유무, 휴면포자의 발생량 등을 직접계수 및 realtime PCR 방법으로 정량한다.

(2) 결과 및 고찰

○ 실험의 결과는 표 29에 제시하였다.

- 1,000 cells/mL의 적조생물 실험구에서 chlorophyll *a* 값은 황토 농도별 (100~2,000)로 0.35~0.47의 범위로 큰 차이가 없고, 대조구(황토 0 ppm)에서의 값 0.50와 비교하여도 황토에 대한 효과는 미미한 것으로 나타났다. 황토 농도가 10,000 ppm으로 증가된 경우에는 chlorophyll *a* 값이 0.05로 황토에 대한 구제 효과(구제효율 90%)가 높은 것으로 나타났다.

- 2,000 cells/mL의 적조생물 실험구에서 chlorophyll *a* 값은 황토 농도별 (100~2,000)로 0.85~0.97의 범위로 대조구의 1.1보다 낮았지만 황토에 의한 구제 효과는 미미한 것으로 나타났다. 황토 농도가 10,000 ppm으로 증가된 경우에는 chlorophyll *a* 값이 0.15로 황토에 대한 구제 효과(구제효율 86%)가 높은 것으로 나타났다.
- 5,000 cells/mL의 적조생물 실험구에서 chlorophyll *a* 값은 황토 농도별로 0.90~2.14의 범위로 대조구의 2.72 보다 낮게 나타났고 구제효율은 18~65%의 범위로 세포수의 증가로 황토에 대한 구제효율은 떨어지는 것으로 나타났다.
- *C. polykrikoides*을 80% 이상 구제하기 위한 황토의 적정 농도는 세포수 2,000 cells/mL 기준시 10,000 ppm 이상이 적절한 것으로 판단되고 이상의 결과는 향후 실험의 기초자료로 활용될 것이다.

표 29. 황토에 대한 *C. polykrikoides*의 구제 효과(chlorophyll *a* 값)

황토농도(ppm)	세포농도		
	1,000 cells/mL	2,000 cells/mL	5,000 cells/mL
0	0.5	1.1	2.72
100	0.46	0.97	2.14
200	0.46	0.89	1.87
500	0.47	0.89	1.60
1,000	0.47	0.86	1.44
2,000	0.35	0.85	1.68
10,000	0.05	0.15	0.90

○ 이러한 결과는 본 연구진과 국립수산과학원에 의해 실시한 실내실험 결과(김과 배, 2006)와 유사한 양상을 보이고 있으나, 황토의 농도가 1,000~2,000 ppm 농도일 때 대략 50% 전후의 효과를 보인 것에 비하면 훨씬 효과가 낮은 것으로 나타났다. 이는 황토 살포 후 30분이 지나 바로 측정된 것이므로 코클로디니움의 높은 비율로 제거되는 것처럼 생각되나, 일정 시간 후에 살아있는 세포가 재부상하는 결과로 해석된다. 따라서, 2006년의 실험결과에서 제시하고 있는 것처럼 보다 더 코클로디니움 세포에 많은 손상 또는 파열을 가져올 수 있는 물질을 적용하는 것이 바람직하다 할 수 있을 것이다.

○ 향후 실험 계획

- 2009년 9월 대량배양을 시작으로 실내 마이크로코즘 실험을 진행하여 황토에 의한 영양세포의 구제 효과 및 영양세포의 동태를 모니터링한 바 있다. 향후 실험은 예비실험의 결과를 토대로 적조현장에서 영양세포의 동태를 포함한 세포의 사멸 및 hyaline 세포의 생성 유무 등을 조사할 계획이었으며, 휴면포자에 대한 황토의 영향 조사는 현장에서 황토를 살포하고 월별로 휴면포자의 생성 제어에 대한 연구를 진행할 계획이었다.

- 2010년, 2011년에도 코클로디니움 적조가 발생하지 않은 관계로 실내 마이크로코즘 실험을 진행하였으며, 현장에서 대규모 적조가 발생할 경우에는 현장에 그림143과 같은 메조코즘을 설치하여 실험을 진행할 계획으로 준비한 바 있다.



그림 145. 황토에 대한 *C. polykrikoides* 영양세포 구제 및 휴면포자 형성 제어에 관한 연구를 수행하기 위한 구조물의 예시(적조 발생 시 현장에 설치할 예정임).

## 나. 실내 마이크로코즘 실험을 통한 황토살포 효과 조사

○ 본 연구에서는 연구기간 동안 현장에서 *C. polykrikoides*에 의한 유해 적조 현상이 나타나지 않아서, 구제물질로써 황토를 살포하고, 이에 대한 영향 및 효과를 실내 마이크로코즘 실험을 통해 연구하였다.

- 황토에 대한 *C. polykrikoides* 영양세포의 사멸 과정 모니터링
- 황토에 의한 *C. polykrikoides*의 휴면포자 형성 저해능 조사

### (1) 재료 및 방법

#### ○ 실험 방법

- 황토에 대한 *C. polykrikoides*의 구제 효과를 조사하기 위하여 cell culture flask(250ml, SPL)를 이용한 마이크로코즘 실험을 진행하였다(그림 144).

- *C. polykrikoides* 영양 세포의 농도는 5,000 cells/mL로 하였고, 황토는 10,000 ppm으로 설정하였다.

- 황토에 대한 구제 효율은 영양 세포의 농도가 5,000 cells/mL 일 때를 기준으로 황토 살포 1일 경과 후 현미경을 이용한 직접 검경과 real-time PCR을 이용하여 조사하였다.



그림 146. 황토에 대한 *C. polykrikoides*의 구제효과 마이크로코즘 실험 장면 (좌 : 대조군, 중 : 황토 살포 1시간 후, 우 : 황토 살포 24시간 후).

○ *C. polykrikoides*의 배양

- *C. polykrikoides*의 분리주는 자체 보유 4종을 대상으로 실시하였다.
- 배양 조건은 L:D 주기는 12:12. 에어레이션은 1 VVM, 배지는 f/2로 하였다.
- 본 종의 배양에서 일정 농도 이상의 영양 세포 농도를 얻기 위해서 분리 균주를 원심분리를 통해 농축하였다.

○ 황토에 대한 *C. polykrikoides*의 영양세포 구제 및 휴면포자 생성 저해 효과 분석

- *C. polykrikoides* 영양세포에 대한 황토의 효과 및 영향 조사는 황토 살포 후 시간대별로 채수하여 영양세포 확인 연구를 수행하였다.
- 휴면포자 생성 저해 효과 분석은 황토 살포 후 1개월 간격으로 저면에 침강한 황토를 샘플링하여 휴면포자의 형성 유무, 휴면포자의 발생량 등을 직접계수 및 real-time PCR 방법으로 정량하였다.

(2) 결과 및 고찰

○ 실험 결과는 다음과 같다.

- 황토 살포 전, 황토 살포 1시간 후, 황토 살포 24시간 후의 각 cell culture flask의 실험값은 표 30에 제시하였고, 각 과정의 표층 현미경 사진은 그림 145에 제시하였다. 그림 145에서 보는 바와 같이 황토 살포 전에는 영양세포들이 유평하는 것을 볼 수 있고, 황토 살포 후 1시간이 경과한 것은 황토 입자와 섞인 *C. polykrikoides* 영양세포를 간간히 볼 수 있었다. 황토 살포 후 24시간이 경과한 것은 *C. polykrikoides*의 영양세포는 황토 살포 전보다 농도가 낮아진 것으로 보였으나, 영양세포들이 존재하는 것을 볼 수 있었다.

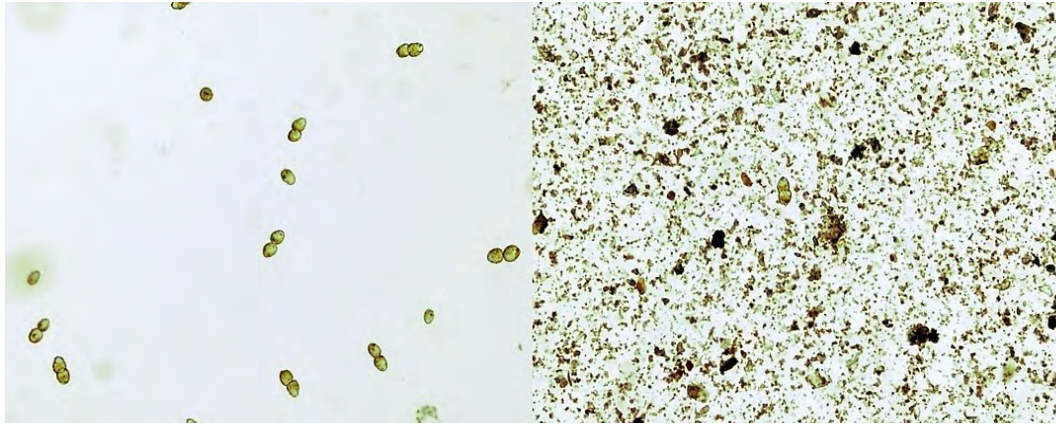


그림 147. 황토에 대한 *C. polykrikoides*의 구제효과 마이크로코즘 실험의 표층 현미경 관찰 사진(좌 : 대조군, 우 : 황토 살포 1시간 후).

- 각 단계의 표층은 영양 세포를 direct counting이 가능하므로 direct counting 값과 real-time PCR 값을 함께 나타내었고, 저층의 저질 샘플의 경우는 direct counting이 불가능하므로 real-time PCR 값을 표시하였다.

- 표층은 황토 살포 초기보다 황토 살포 24시간 경과 후에 영양세포의 수가 늘어난 것을 볼 수 있으며, 저층은 황토 살포 초기가 황토 살포 24시간 후 보다 값이 높은 것을 볼 수 있다. 이로 보아, 황토 살포에 의해 일시적으로 영양세포가 저층으로 떨어지기는 하지만, 유영 능력이 있는 *C. polykrikoides*가 저층에서 표층으로 다시 올라오는 것으로 볼 수 있다. 또한, 저층의 결과 값에서 볼 때 황토 살포 초기에는 전부 영양세포라고 볼 수 있지만, 24시간 경과 후에 검출된 결과 값은 영양세포인지, 생성된 휴면포자인지 판단할 수 없었다. 추후 황토 살포로 생성된 저층 저질에서의 휴면포자 발아에 대한 추가 실험이 필요할 것으로 보인다.



표 30. 황토에 대한 *C. polykrikoides*의 구제 효과(Direct counting, Real-time PCR 값)

황토농도 (ppm)	세포농도 (cells/mL)					
	황토 살포 전		황토 살포 1시간 후		황토 살포 24시간 후	
	Direct counting	Real-time PCR	Direct counting	Real-time PCR	Direct counting	Real-time PCR
10,000 ppm (표층)	4,900	4,680	2,200	2,440	3,300	3,120
10,000 ppm (저층)		40		2,020		840

○ 메조코즘을 이용한 구제물질 살포실험 장면 (김과 배, 2006)

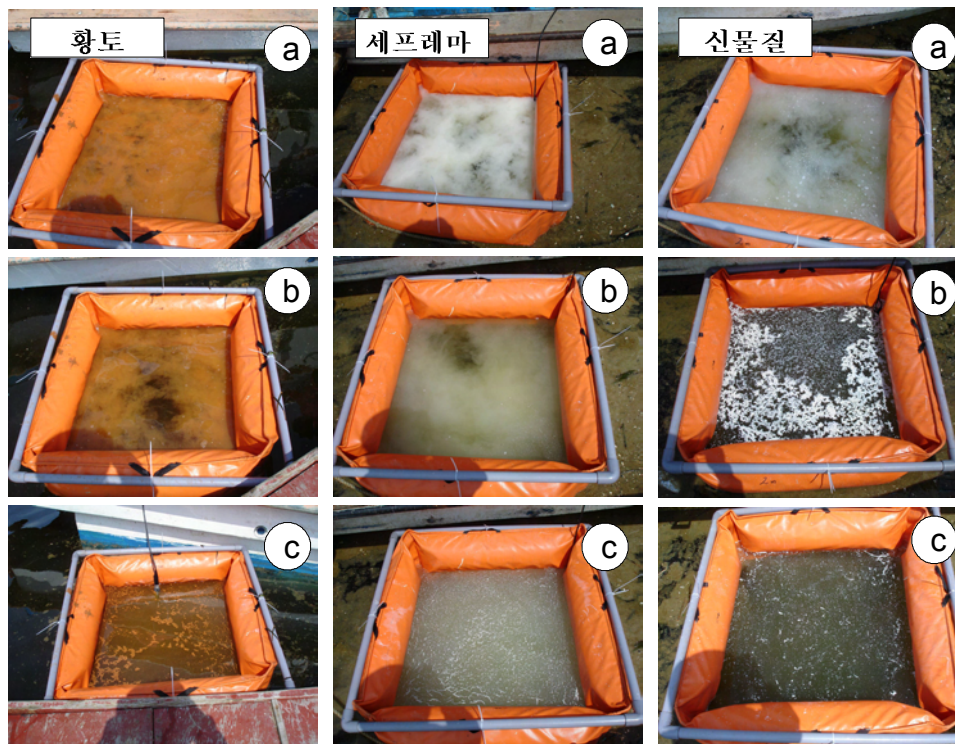


그림 148. 황토(좌), 세프레마(중앙), 신물질(우) 살포(최종농도 200 ppm) 후 메조코즘 내 변화. a, 살포 직후; b, 살포 1분 후; c, 살포 10분 후.

○ 향후 실험 계획

- 향후 실험은 마이크로코즘 실험 결과를 토대로 현장에 메조코즘 설치를 통한 대량 배양 상태에서의 황토 살포 효과를 파악하여야 할 것으로 판단된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연구개발목표의 달성도

#### 가. 연차별 연구개발 목표에 대한 평가의 착안점 및 기준

구분	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 년도 (2008)	휴면포자 정량법 확립	30%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 현미경 검경에 의한 정량화 방법</li> <li>• 분자식별법의 개발 및 신속 정확한 적용 가능성</li> </ul>
	지역별 적조 잠재력 파악	20%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 초기 발생과 확산 지역을 조사 범위에 포함 여부</li> </ul>
	지역 분리주 확보 및 개체군 식별법 탐색	10%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 적조발생 해역의 개체군 분리주 확보, 순수 배양의 가능성</li> </ul>
	<i>C. polykrikoides</i> 성장요인 및 거동파악	20%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 현장 및 실내의 모델구축자료의 확보가 충실한가?</li> </ul>
	월동 생리/생태 파악	20%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 정기 조사에 의한 잠재력의 발생 가능성 조사</li> <li>• 휴면포자 형성과 발아에 대한 조건 탐색을 파악할 수 있는가?</li> </ul>
2차 년도 (2009)	발생·성장 단계별 고감도 식별법 개발, 적용	40%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 영양세포에 대한 분자식별법 (DNA probe)의 적용 수준은?</li> <li>• real-time PCR 방법을 적용한 휴면포자 등의 계수가 가능한가?</li> </ul>
	개체군 이동·확산모델 개발	40%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 모델 개발을 위한 적절한 현장관측 여부</li> <li>• 성장 환경요인을 모델에 적용 여부</li> <li>• 대상모델의 적조 이동·확산 예측 적합성</li> </ul>
	적조 잠재력 제어 평가	20%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 적조현장에서 구제물질 살포 시 휴면포자의 제어 평가방법의 정확성</li> <li>• 휴면포자의 제어방법 개발 가능성</li> </ul>
3차 년도 (2010)	연안역 적조 이동·확산 모델에 의한 적조발생 예측 시스템 확립	40%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 적조 이동·확산 모델의 적합성</li> <li>• 모델에 의한 현장 예측의 정확성</li> </ul>
	연안역 적조 잠재력 규명 및 활용	30%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 휴면포자 분포지도화의 범위</li> <li>• 휴면포자 지역잠재력 조사가 적조발생 예측에 활용 정도</li> </ul>
	생활사 단계에 따른 적조 잠재력 현장 제어기술 평가	30%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생활사 단계 중 효과적인 제어능</li> <li>• 적조 발생 시의 잠재력 제어효율 평가를 통하여 실효적인 제어방안 수립 가능성</li> </ul>
최종 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <i>C. polykrikoides</i> 적조 발생 잠재력 파악 및 생활사 해명</li> </ul>	40%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 적조 잠재력 조사가 적조발생 예측 및 제어에 실효성의 정도</li> <li>• 휴면포자 잠재력의 제어 효율성</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 생활사 해명을 통한 지역개체군 발생예측 및 확산모델 개발</li> </ul>	30%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지역 적조발생 예측모델의 실현성</li> <li>• 생활사 단계별 적조생물 발생과 확산 예측 결과의 재현성</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 적조발생 예측 및 제어 평가의 실용화 가능성</li> </ul>	30%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 지역개체군 발생예측의 실현성</li> <li>• 생활사 단계별 제어기술의 현장 적용의 효율성 및 활용방안</li> </ul>

나. 연차별 연구개발 목표 달성도 및 주요 성과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도(%)	연구개발 수행내용 및 성과
1차 연도 (2009)	C. polykrikoides 적조 발생 잠 재력 파악 및 생활사 해명	○휴면포자 정량법 확립	100	■ direct counting법(SPT법) 확립 ■ real-time PCR법 확립 : 종특이적 DNA probe 디자인
		○휴면포자 지역별 잠재력 파악	100	■ 적조 상습지역, 서해안 지역 확인 ■ 정기 집중조사 지역(자란만 일원)
		○지역 분리주 확보 및 개체군 식별법 탐색	90	■ 영양세포 및 휴면포자 분자식별법 개발: 적조 상습지역에 적용
	C. polykrikoides 성장요인 및 거동파악	○월동 생리/생태 특성	100	■ 정기 집중조사를 통한 조기발생 확인: 휴면포자-발아체-영양세포 (5월말-6월) ■ 발생(발아) 특성 현장조사 : 물리 화학 생물학적 요인 조사
		○C. polykrikoides 성장 환경요인 탐색	120	■ 분리 배양주의 실내 배양실험 : 물리 요인(수온, 염분, 조도) 실험 : 화학적 요인(무기 및 일부 유기태)
		○모텔해역의 해수유동 모델 구축	100	■ motel해역의 정기 조사 : 해양물리조사(조석, 조위, 조류 등) ■ 해수유동모델 구축 : POM에 의한 수치실험
2차 연도 (2010)	생활사 해명을 통한 지역개체 군 발생 및 확 산 모델 개발	○발생-성장 단계별 고감도 식별법 개발, 적용	100	■ 현장 휴면포자 및 발아체 고감도 식별 및 정량화 : motel 해역(자란만 내) 조사 : 적조 상습지역 조사
		○지역개체군의 발생/ 생태 환경 해석	100	■ 휴면포자 분포 조사 : 남해안 휴면포자와 발아체 출현량 조사 ■ 발생 환경 해석을 위한 집중조사 : 물리·화학적 요인(영양염류 포함) : 생물학적인 요인(분자정량 조사) ■ C. polykrikoides와 지표종과의 비교 : 발아체 출현 상관관계 : 분자계통해석
		○증식촉진요인 파악	120	■ 살조 바이러스 : 조류 바이러스 분리 및 특성 파악 ■ 분리 배양주의 실내 배양실험 : 무기태 영양염의 흡수 동력학 실험 : 유기·무기 영양염의 성장 동력학 실험 : 조류 성장잠재력 실험
		○개체군 이동·확산모 델 개발	100	■ 발아 개체군~증식 개체군의 이동· 확산 모델 개발 및 적용 : motel 해역에서 생물발생 및 이화 학적 분석요소 적용
	적조 잠재력 제어 평가	○적조 잠재력 제어 현장 평가	80	■ 적조 발생대비 구제물질(황토) 평가 : 구제물질 살포 시 영양세포 구제 및 휴면포자 생성 효과 실내분석 ■ 발아 초기개체군 구제 가능성 검토

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도(%)	연구개발 수행내용 및 주요 성과
3차 년도 (2010)	○적조 발생 잠재력 규명 및 적조확산 모델개발	C. polykrikoides 생활사 해명 및 적조 잠재력 규명	110	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ C. polykrikoides 생활사 단계별 형태 및 분자식별을 통한 해명               <ul style="list-style-type: none"> <li>: 휴면포자 및 Hyaline 포자 특성구분</li> <li>: 초기발생 지표종 발견 및 특성 확인</li> </ul> </li> <li>■ 고감도 분자식별에 의한 휴면포자 분포지도화               <ul style="list-style-type: none"> <li>: 적조 상승 지역 및 모델해역 잠재력 파악 및 변동 상황</li> <li>: 내재적 잠재력에 의한 지역적조발생의 원인 규명</li> <li>: 지역별 적조발생 예측 및 모니터링 활용</li> </ul> </li> </ul>
		지역개체군의 발생 생 태환경 해석	110	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ C. polykrikoides 초기 발생환경 규명               <ul style="list-style-type: none"> <li>: 생태환경과 지역적 발생차이 규명</li> <li>: 이화학적 요인의 영향 해석</li> </ul> </li> <li>■ 발생 지표종을 통한 모니터링 활용               <ul style="list-style-type: none"> <li>: 지역 잠재력과 연계 모니터링 기대</li> </ul> </li> <li>■ 개체군 발생 및 증식촉진/억제 요인 규명               <ul style="list-style-type: none"> <li>: 실내 증식 촉진요인 확인</li> <li>: 신규 살조 바이러스 특성 규명 및 증식저해효과 확립</li> </ul> </li> </ul>
		적조발생 확산 예찰을 위한 모델 확립	80	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 남해 동부해역(적조상승지역) 외 모델 적용               <ul style="list-style-type: none"> <li>: 이동확산 모델을 적용한 적조확산 모델 활용</li> <li>: 입자추적자 모델확립을 통한 적조 거동 시현</li> </ul> </li> </ul>
	○적조 제어 기술 평가 및 방안수립	생활사 단계에 따른 적조잠재력 제어기술 평가	50	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 구제물질에 대한 제어 평가 (실내)               <ul style="list-style-type: none"> <li>: 유해적조생물에 대한 영양세포 및 발아체의 황토 구제효과 (실내 예비)</li> </ul> </li> <li>■ 발아기 및 소멸기 제어평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>: 현장 저질에 대한 실내실험</li> <li>: 메조코즘 및 현장조사(실현 불가)</li> </ul> </li> </ul>

## 2. 관련분야의 기술발전에 기여도

### 가. 기술적 측면

- (1) *C. polykrikoides* 휴면포자를 최초로 발견하고 생리 생태적 특징 연구를 통한 적조 발생 원인 규명
- (2) *C. polykrikoides* 휴면포자의 빠른 식별을 위한 현미경검경법 및 분자생물학적 식별법 기술 확보
- (3) *C. polykrikoides* 휴면포자의 분포를 지도화 함으로써 적조 발생을 예측하는데 활용
- (4) 적조생물 증감을 수식화에 따른 정량화된 모델구축
- (5) 적조방제 대책에 대한 기초자료 제공

### 나. 경제·산업적 측면

- (1) 적조에 의한 수산물 피해 최소화
- (2) 분포지도를 이용 *C. polykrikoides* 휴면포자의 제어 및 퇴치에 활용
- (3) 이 연구에서 개발된 기술을 다른 유해/유독 미생물 검출 및 예보에 응용
- (4) 적조생물의 이동-확산을 예측하여 연안 어장 피해저감 대책에 기여
- (5) 적조예찰(감시선이나 헬리콥터 이용 등)을 위해 발생되고 있는 경비 절감 효과

### 다. 사회·문화적 측면

- (1) 적조의 발생과 확산을 제어하게 됨으로써 해양 생태계 및 수계환경을 보호하는데 일조
- (2) 수계산업 종사자, 해양 이용객에게 환경 제어의 심미적 효과 제공
- (3) 개발된 적조제어 기술은 유관기관 및 국외로 전수, 협력 관계를 형성하여 국가 과학역량 이미지 향상

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구개발 성과 및 현장 활용 계획

#### 가. *C. polykrikoides* 생활사 해명

- (1) 유해적조 *C. polykrikoides*의 휴면포자를 적조 상습 해역에서 최초로 발견하여 생활사 해명  
: 적조 발생 원인규명, 지역별 적조 잠재력 및 모니터링에 활용
- (2) *C. polykrikoides*의 일시포자(temporary cyst)를 실내 및 현장조사에서 확인하였고, 영양세포의 증식과정에서 단성생식(parthenogenesis)에 의한 형성을 확인  
: 적조 증식 및 확산, 지역별 적조 잠재력 예측에 활용
- (3) *Nematodinium* sp.의 휴면포자와 발아 특이성을 최초로 발견함

#### 나. 적조발생 잠재력 파악

- (1) 저질 중의 휴면포자의 정량법 확립
  - 해수/휴면포자/Sodium polytungstate (SPT)의 비중차를 이용한 밀도 구배원심법(SPT-density gradient centrifugation method)과 Primuline 형광염색법(Primuline-staining method)을 조합한 와편모조류 휴면포자 정량법 확립
  - 종 특이적인 primer와 probe를 이용하여 PCR 증폭산물의 형광감도 증가를 실시간으로 모니터링하여 해석하는 Real-time PCR법을 개발하여 적용함  
: 적조 발생 잠재력 조사 및 현장 모니터링에 활용
- (2) 지역별 휴면포자 잠재력 파악
  - 직접법을 통한 *Nematodinium* sp.의 휴면포자의 지리적 분포 및 지도 작성
  - 적조발생의 잠재력인 "seed bed"로서 가능성을 입증
  - Real-time PCR을 이용한 저질 중의 *C. polykrikoides* 발생 잠재력을 확인하여 지역별 분포 양상을 지도화
  - 2007년 이후 *C. polykrikoides* 발생 잠재력의 급격한 감소와 영양세포의 출현 양상이 일치하는 것을 확인(자란만의 집중조사와, 상습지역의 정기조사)  
: 지역별 적조 발생 예측 및 조기 방제에 활용

다. *C. polykrikoides* 지역개체군의 발생/생태환경 해석

- (1) *C. polykrikoides*의 초기 발생은 지역별 차이를 나타내는 것을 확인함
  - 자란만(6월 초-중순; 수심 6-10 m; 저층수온 19-22℃),
  - 미조(7월 상순; 수심 16-24 m; 저층수온 20-22℃),
  - 육지도(8월 상순; 수심 28-35 m; 저층수온 22-23℃)
- (2) 지역별 초기 발생의 차이는 수심에 따른 물리적 환경요인(저층 수온변화 등)의 변화와 관련되는 것으로 해석됨
  - 외해쪽(육지, 미조)보다는 자란만에서 현존량과 영양염(무기 및 유기태 질소/인)의 농도가 높았으나, 강우 등의 물리적 환경변화에 따라 코클로디니움 개체군 증식이 저하됨
- (3) *C. polykrikoides*과 *Nematodinium*이 거의 동시에 발생하는 특성을 확인하여 상호 초기발생 지표종(indicator species of initial development)으로 판단함
  - : 특정 해역에서 *Nematodinium*의 발생을 *C. polykrikoides* 초기발생의 모니터링에 활용

라. 적조생물 성장환경 및 생리특성 파악

- (1) *C. polykrikoides*의 최대성장속도는 수온 25℃, 염분 30 psu에서 0.35 day<sup>-1</sup>로서 염분의 증·감에 따라 성장속도가 급격히 변화하는 것을 확인
  - : 현장의 관측(자란만 집중조사)결과와 잘 일치
- (2) *C. polykrikoides*는 DIP가 제한된 환경에서는 DOP를 이용할 가능성이 큰 것으로 확인됨
  - : 유기물 유입이 많은 양식장 인근의 유해적조발생 모니터링 및 방제에 활용
- (3) 유해 와편모조류인 *Prorocentrum minimum*과 *Heterocapsa pygmaea*에 종특이적 살조 바이러스를 발견, 숙주세포를 사멸시키는 특성을 입증(특허 출원)
  - : *C. polykrikoides*을 포함한 유해적조생물 제어에 활용 가능성

마. 적조 발생 확산 및 예측모델 개발

- (1) 남해 동부해역(자란만-육지도 라인)에서 해양물리조사를 통한 유동 모델 구축
- (2) 해수 유동모델(hydrodynamic model)과 Lagrangian 방법을 이용한 입자 추적자 모델(particle tracking model)을 확립
  - : 유해적조(HABs; harmful algal blooms)의 거동 파악, 적조예찰 및 방제에 활용

바. 생활사 단계에 따른 적조 제어기술 개발

(1) 적조 잠재력(HABs seed potential) 제어 현장 평가 및 초기 발아개체군 (initial germinant population) 구제 가능성 검토

- 황토살포에 따른 *C. polykrikoides* 영양세포의 구제 효율 확인(실내실험)
- 실내 마이크로코스름(microcosm) 실험을 통한 황토살포 효과 조사
  - : Real-time PCR을 이용한 침적 세포의 존재를 확인
  - : 적조 구제물질 살포에 대한 효과 및 잠재력 제어 효율성 검증에 활용 기대됨

## 2. 성과활용 계획

가. 연구 성과 활용 계획

(단위 : 건수)

구분		특허	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	논문
활용건수	목표	2		2	5	2	SCI(E) : 5편 기타 : 5편
	달성	2			2		SCI(E) : 2편 기타 : 2편

나. 연구개발 성과의 활용방안

□ 기술적 활용방안

- ① *C. polykrikoides* 휴면포자를 최초로 발견하고 생리 생태적 특징 연구를 통한 적조 발생 원인 규명
  - : 적조 발생 원인규명, 지역별 적조 잠재력 및 모니터링에 활용
- ② *C. polykrikoides* 휴면포자의 빠른 식별을 위한 현미경 검경법 및 분자 생물학적 식별법 기술확보 및 활용
  - : 적조 발생 잠재력 조사 및 현장 모니터링에 활용
- ③ *C. polykrikoides* 휴면포자의 분포를 지도화함으로써 적조 발생을 예측하는데 활용
- ④ *C. polykrikoides*과 상호 초기발생 지표종을 확인함으로써 특정 해역에서 이를 이용한 *C. polykrikoides* 조기발생 예측 및 모니터링에 활용
- ⑤ *C. polykrikoides* 성장환경 및 생리특성 파악을 통하여 유기물 유입이



많은 양식장 인근의 유해적조발생 모니터링 및 방제에 활용

- ⑥ 종특이적 살조 바이러스 발견과 숙주세포를 사멸시키는 특성을 입증  
: *C. polykrikoides*을 포함한 유해적조생물 제어에 활용 가능성
- ⑦ 입자 추적자 모델(particle tracking model)을 확립  
: 유해적조(HABs; harmful algal blooms)의 거동 파악, 적조예찰 및 방제에 활용
- ④ 적조생물 증감을 수식화에 의한 정량화된 모델구축 및 활용
- ⑧ 적조 구제물질 살포에 대한 *C. polykrikoides* 영양세포의 구제 효율(실내) 실험을 통하여 간편하고 정확한 잠재력 제어 효율성 검증에 활용이 기대 됨

□ 기타 활용 방안

- ① 어류 및 패류 양식업자들이 손쉽게 활용할 수 있는 검출 kit 개발의 원천기술 제공
- ② 적조 종의 관리방안 마련을 위한 중요한 자료로 활용
- ③ *C. polykrikoides* 이외에도 다른 유해 미생물에의 검출에도 본 연구에서 개발된 기술을 활용
- ④ 연안 양식장의 유해적조 피해 저감 효과에 이용
- ⑤ 적조확산모델 구축에 따른 적조 이동경로의 예측으로 적조예찰도 가능

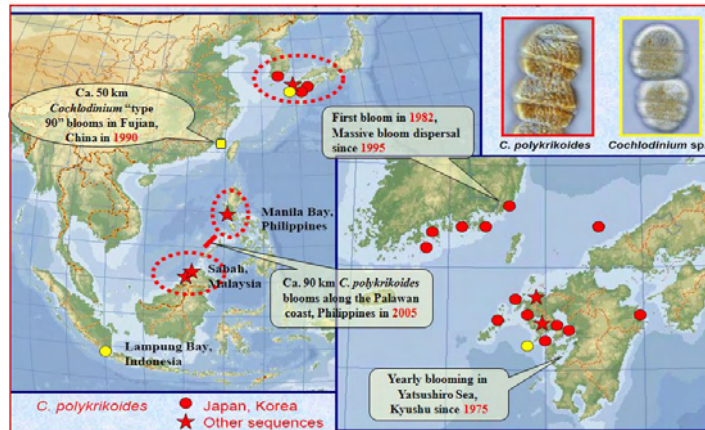
## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

### 1. 연구교류를 통한 과학기술정보 교환

가. *Cochlodinium polykrikoides* 유해적조의 발생과 피해 확산과 연구교류 요청

최근까지 급격한 *C. polykrikoides* 적조 확산에 따른 피해가 동남아시아(일본, 한국, 중국, 필리핀, 말레이시아, 인도네시아 등)에서 발생하고 있으며(아래 참고 1), 또한 2009년에는 이란 및 오만의 남부 해역에 대규모로 발생(참고 2)하여 양식새우 및 어류의 대량폐사가 발생하고 있다. 아직까지 적조발생의 구체적인 원인 규명이 되지 않아 연구와 대책이 앞선 국내 연구진에 대한 도움을 요청한 바 있으며, 양국에서 실무진이 직접 상호 방문하여 대책을 협의하고 있다. 국제적인 전문가를 초청하여 심포지움 등을 개최하고 원인규명을 요구하고 있다.

⇒ 유조선 등의 선박 평형수(Ballast water)에 의한 외래종의 전파가 강조되고 있어서 무엇보다 국내 *C. polykrikoides* 연구진과의 교류의 필요성 급증.



참고 1. 동남 아시아의 *C. polykrikoides* 발생 상황.

Dear Prof. Kim chang hoon  
 I am Dr Mortazavi Director of Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute, located south of Iran. About 3 months ago HAB events in the coastal waters of the our waters observed. the studies showed Cocliodinium polykrikoides species have case massive fish mortality, So we are planing a workshop about environmental effects and methods of HABs control in Coastal waters specially in shrimp farms. Please send your conditions about participation in workshop as a Guest lecturer. I am sure your help will be useful.

참고 2. 2009년 *C. polykrikoides* 적조발생 관련 긴급 메일.

나. 국제학술회의 참석을 통한 과학기술정보 교류



① 필리핀조류학회 초청강연 참석 정보교류(2009. 4. 13)

- 2005년 파라완 연안에서 대규모 코클로디니움 적조발생과 피해
- 한·필리핀 조류학회를 통한 유해조류 발생원인 규명 공동연구교류 협의
- 담수 유해적조 발생에 대한 분자식별 및 워크샵 교류
- 황토살포에 대한 국내 연구진과 기술교류

② 제 14차 국제유해조류연구발표회(ISSHA; 그리스, 2010. 11.1~5) 발표참가 정보 수집

2년에 한번 씩 개최되는 국제 유해조류 연구발표회는 세계 각국의 유해조류 전문가가 참석하여 학술발표 및 정보교류를 하는 가장 대표적인 국제학술대회이다. 2010년 11월에 열린 제 14차 그리스 회의에서는 초청연설 5편, 구두발표 150편, 포스터 383편 등 538편의 연구논문이 발표되었다. 주제별 발표 논문수를 보면 유해적조의 군집 동태에 관한 논문이 94편으로 가장 많았고, 다음으로 독소, 화학적 구조와 합성, 탐색과 분석방법에 관한 연구 순이었다. 2012년에는 한국 창원에서 제 15차 대회 개최 예정.

참고 3. 제 14차 그리스 회의 주제별 연구 논문 발표 수

주 제	구두	포스터	계
1. 유해적조 군집 동태	20	74	94
2. 적조시계열발생: 기후 변화와 오염이 야기한 영향	16	20	36
3. 유해적조가 해양생태계 구조 및 기능과 먹이망에 미치는 피해	10	18	28
4. 생물학적 상호관계, 간섭, 혼합식성, 기생, 공생, 세균과 바이러스	21	26	47
5. 새로운 지역 적조발생	10	33	43
6. 담수적조	-	5	5
7. 외래종 유입과 적조	4	3	7
8. 남조류, 생태, 생리, 생리활성물질	8	25	33
9. 적조생물의 계통과 유전적 다양성	16	33	49
10. 독소, 화학적 구조와 합성, 탐색과 분석방법	13	49	62
11. 독성의 기작	11	22	33
12. 적조예찰 연구의 생물 감지에 응용하기 위한 새로운 센서기술	10	29	39
13. 유해조류의 채집과 배양	-	10	10
14. 적조관리, 방제기술 및 공공관심	6	30	36
15. 유해적조와 건강 과학실험	5	6	11
16. 초청연설	5		5
계	155	383	538

③ 제 6차 아시아-태평양 국제조류학회(6th APPF, 여수, 2011. 10. 9~14) 학술정보 교류

3년에 한번 개최되는 APPF 국제학술대회가 2011년 10월 여수에서 개최되어 조류학 전반에 걸친 발표 및 정보교류를 하였다.



㉠ 참가국

참가국	참가자(인)	참가국	참가자(인)
Australia	9	Philippines	2
Brazil	1	Russian Federation	5
China	19	South Africa	1
Hong Kong	2	Spain	1
India	10	Sri Lanka	1
Indonesia	2	Taiwan	2
Japan	47	Thailand	23
Malaysia	14	United Kingdom	2
Netherlands	1	United States	15
New Zealand	5	Viet Nam	2
Pakistan	7	Korea	299
합계	117	합계	353
총계		470	

㉡ 학술적 가치와 기대효과

- 해조생산과 해양산업의 중심지인 전남도와 여수시에서 국내외 600여명의 조류(藻類)학계 석학 및 관련 산업체 관계자가 참석하여 총 300여 편의 연구 논문을 발표하고, 기초 및 응용연구의 토론의 장을 마련함.
- 학술발표대회에서 발표된 논문은 분류, 생태, 생리, 유전 등의 기초연구 뿐만 아니라, 조류의 실용화 확대를 위한 다양한 분야의 심포지움이 준비됨.

㉢ 유해 및 유용 미세조류 관련정보

(ㄱ) 미세조류 유래 바이오에너지 및 바이오매스

- 전 세계는 미세조류 유래의 바이오에너지 생산에 매우 많은 연구비를 경쟁적으로 투자하고 있으나, 미세조류 바이오디젤이 상업화에 성공하기 위한 경제성 있는 기술 개발이 미비한 상태.
- 이번 심포지움에서 상업화를 위한 (i) 알맞은 미세조류 종의 선정 및 개량, (ii) 적당한 광생물 반응기의 개발, (iii) 환경 친화적이고 유지 가능한 영양분 및 배양조건, (iv) 경제적인 미세조류 수확기술 개발, (v) 미세조류 바이오디젤의 생산과 정제, (vi) 바이오디젤을 만들고 남은 바이오매스의 활용 등에 대한 기술 개발에 대한 논의로, 국가 녹색성장 방향 제시.
- 특히, 동 산업분야로 많은 인력과 연구비가 투자되면서 그 발전 속도가 점점 가속되고 있는 전 세계 연구 및 산업 추세를 확인함으로써, 에너지 사용량

의 무려 97%를 수입하는 우리나라는 더 많은 인력과 노력의 투자가 시급함을 정부차원에서 검토 필요성이 제기됨.

(L) 아시아 태평양 블루 카본

주요발표자) 호주 모나쉬대학교 John Beardall 교수 /

말레이시아 말라야 대학 Siew-Moi Phang 교수

○ 인간 활동에 의한 탄소 배출량의 저장고로서 해양 식물의 잠재력에 대한 관심이 높아지고 있음.

○ 해양과 연안생태계의 탄소 포집과 저장은 육상생태계와 유사한 Blue REDD 크레딧 메커니즘으로 보상하는 방안 제시.

○ Blue Carbon과 관련한 미래의 다양한 연구, 지역 프로젝트, 협동에 관한 관심과 함께 해양의 무한한 가능성을 제시하고, 연안역 관리 및 해양 연안환경의 중요성 제고함.

○ 특히, 해양 1차생산자의 대부분을 차지하는 해조류와 해산식물(맹그로브와 해초류)의 중요성 제고.

○ 추가 활동 예정 사항: 2012여수세계박람회 조직위원회는 2012년 여수세계박람회 기간 중 해양관련 국제기관인 PICES, ICES, 및 IOC 3개 기관 공동으로 국제기후변화심포지엄을 유치하였고, 부대 행사로 관련 주제로 워크숍을 신청하였음.

(L) 외편모류 혼합영양성과 다양성

주요발표자) 일본 도쿄대학교 Takuo Omura 교수 /

일본 류큐대학 Danang Ambar Prabowo 교수

○ 다양한 원생생물 그룹 중 외편모류는 현재 다양성, 독소 생성으로 인한 수산 및 양식업에의 영향, 먹이망 내에서 다양한 역할 등으로 인해 크게 주목받고 있는 생물군중의 하나임.

○ 이번 심포지엄에서는 특히 (i) 일본 주변에서 시가테라 어류독을 일으키는 종들에 대한 고찰, (ii) *Gyrodinium*속에 속하는 한 종의 분류와 계통, (iii) 설사성 패류독을 생성하는 *Dinophysis*종의 고유 색소체 존재유무, (iv) *Prorocentrum*을 포함한 저서성 외편모류의 다양성 및 혼합영양, (v) 해양 먹이망 내에서 혼합 영양성 외편모류의 생태학적 역할 등에 관한 결과가 발표됨.

○ 해양 생태계 내에서 외편모류가 차지하는 중요성과 다양한 역할에도 불구하고

하고 현재 국내에서는 소수의 연구자만이 관심을 갖고 연구하고 있는 상황에서 본 학회의 개최를 통해 더 많은 인력과 노력의 투자가 시급함이 제기됨.

(ㄷ) 해양 바이오생리활성 물질

주요발표자) 말레이시아 사바대학 Charles Santhanaraju Vairappan 박사 /  
일본 홋카이도 대학 Tatsufumi Okino 박사

○ 바이오생리활성물질 또는 천연물 즉 생물체내의 대사 작용에 의하여 생성되는 유기화합물은 독특한 구조와 강력한 생리활성을 가지고 있어 산업적 기술적 개발가치가 매우 높음.

○ 선진국에서조차 해양 및 수산생물의 천연물 또는 생리활성물질에 대한 연구가 불과 40여년의 역사를 지니고 있어 이와 관련된 육상천연물에 비하면 매우 역사가 짧다고 할 수 있음.

○ 이번 심포지엄에서는 해조류 및 미세조류에서 확보될 수 있는 생리활성물질에 대하여 소개하고 이들의 산업적 응용 가능성을 제시함.

○ 특히, 해조류 및 미세조류에서 분리된 천연물이 면역 활성을 증진하고 당뇨병치료효과를 보이는 연구결과는 신약개발의 가능성을 제시하였고, 친환경 방오제와 같은 천연소재 등의 연구개발 가능성 등이 심도 있게 토론됨.

○ 그러나 이 분야의 연구는 생물학 및 생태학, 생물공학, 정밀화학 등의 융복합적 연구를 통해 기술수준을 향상시키게 되므로 관련분야의 인프라 구축과 융복합적 연구시스템 도입의 국가적 검토와 지원의 필요성이 제기됨.

## 제 7 장 참고문헌

- 국립수산진흥원. 1997-2003. 어패류 위생에 관한 연구, 우리나라 남해안에서의 패류독소 (마비성, 설사성, 기억상실성)의 발생 및 변동에 관한 연구, 국립수산진흥원 사업보고서.
- 국립수산진흥원, 1997. 한국연안의 적조 -최근 적조의 발생원인과 대책-, 국립수산진흥원, pp. 280.
- 국립수산과학원, 2006-2008. 한국연안의 적조발생 상황. 국립수산과학원.
- 국립해양조사원, 1982. 조류도(부산에서 여수). 서지 제 620호, pp. 6-7.
- 김창훈·김영수. 2006. 유용 미세조류의 배양과 응용. 라이프사이언스. pp. 149-170.
- 김창훈, 배헌민. 2006. 친환경적 적조구제 및 제어기술의 현장 실용성 평가. 해양수산부. pp. 424.
- 김창훈, 신재범. 1997. 한국 연안의 유해·유독 적조조류의 발생과 독성생산. *Algae*, 12: 269-276.
- 김학균. 1995. 부영양화 및 적조현상 규명에 관한 연구. 환경부, 과학기술처. pp. 179-185.
- 김학균. 2000. 국내의 적조피해 방제 대책 기술 연구 동향. *Proceedings of the Inter-State Symposium on Harmful Algal Blooms & Clays*. pp. 11-27.
- 김학균, 정창수, 임월애, 이창규, 김숙양, 윤성화, 조용철, 이삼근, 2001. 한국연안의 *Cochlodinium polykrikoides* 적조발생과 변천. *한국수산학회지*, 34: 691-696.
- 나기환, 최우정, 전영렬. 1996. 부유황토에 대한 적조방제 연구. *한국양식학회지* 9: 239-245.
- 배헌민, 김창숙, 김필근, 황진욱. 2002. 황토의 적조구제효율 증진 기술 및 생태계 영향 연구. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Harmful Algal Blooms & Control*. pp. 66-84.
- 양재삼, 최현용, 정해진, 정주영, 박종규. 2000. 전남 고흥 해역의 유해성 적조의 발생연구: 1. 물리·화학적인 특성. *한국해양학회지* 5: 16-26.
- 이삼근, 박주석, 김학균. 1993. 한국 남해연안해역에서 출현하는 유독 편모조류의 분류. *수진연구보고*, 48: 1-8.
- AANDERA Data instruments, 2006. TD 220b RDCP STUDIO a post-procissing suite. pp. 5-28.
- Anderson, D.M. 1980. Effects of temperature conditioning on developments and



- germination of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) hypnozygotes. J. Phycol., 16: 166-172.
- Anderson, D.M., S.W. Chisholm, C.J. Watras. 1983. The importance of life cycle events in the population dynamics of *Gonyaulax tamarensis*. Mar. Biol., 76: 179-190.
- Anderson, D.M., Y. Fukuyo and K. Matsuoka. 1995. Cyst Methodologies. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson, A. E. Cembella, eds., UNESCO, Paris, pp. 229-249.
- Anderson, D.M., B.A. Keafer. 1987. An endogenous annual clock in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. Nature 325: 616-617.
- Anderson, D.M., J.J. Lively, E.M. Reardon and C.A. Price. 1985. Sinking characteristics of dinoflagellate cysts. Limnol. Oceanogr. 30: 1000-1009.
- Abe, H. 1985. Ouyo Sugaku Nyumon. Baifu Kan, Tokyo, 1-215.
- Azanza, R.V., David, L.T., Borja, R.T., Baula, I.U., Fukuyo, Y. 2008. An extensive *Cochlodinium* bloom along the western coast of Palawan, Philippines. Harmful Algae 7: 324 - 330.
- Baba, T., Hiyama, S. and Tainaka, T. 2001. Vertical migration of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* and toxicity of cultures oyster in Senzaki Bay, Yamaguchi Prefecture. Bull Plankton Soc Jpn 48: 95-99.
- Blumberg, A.F. and G.L. Mellor. 1987. A description of a three-dimensional coastal ocean circulation model. In : Three dimensional Coastal Models (N.S. Heaps, ed.), American Geophysical Union, Washington, D.C., pp. 1-16.
- Bolch, C.J.S. 1997. The use of sodium polytungstate for the separation and concentration of living dinoflagellate cysts from marine sediments. Phycologia 36: 472-478
- Bolch, C.J.S., de Salas, M.F. 2007. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium* "tamarensis complex" to Australasia. Harmful Algae 6: 465 - 485.
- Boney, A.D. 1979. Phytoplankton. Camelot Press, Southampton, 1-116.
- Cembella, A.D., Antia, N.J. and Harrison, P.J. 1984. The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a

- multidisciplinary perspective: Part 1. *CRC Critic. Rev. Microbiol.* 10: 317-391.
- Dugdale, R.C. 1967. Nutrient limitation in the sea: dynamic, identification, and significance. *Limnol. Oceanogr.* 12: 685-695.
- Eppley, R.W., Rogers, J.N. and McCarthy, J.J. 1969. Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 14: 912-920.
- Ezer, T., H. Arango and A.F. Shchepetkin. 2002. Developments in terrain-following ocean models: intercomparison of numerical aspects, *Ocean Modelling* 4: 249-267.
- Fraga, S., Gallagher, S. and Anderson, D.M. 1989. Chain-forming dinoflagellates: an adaptation to red tides. In: *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Okaichi T, Anderson DM and Nemoto T, eds. Elsevier, New York, pp. 281-284.
- Frank, P.J.S., D.M. Anderson. 1992. Toxic phytoplankton blooms in the southwestern Gulf of Maine: testing hypotheses of physical control using historical data. *Mar. Biol.* 112: 165-174.
- Garate-Lizarraga, I., Bustillos-Guzman, J., Morquecho, J. and Lechuga-Deveze, C. 2000. First outbreak of *Cochlodinium polykrikoides* in the Gulf of California. *Harmful Algae News*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 21, pp 7.
- Gerdes, R. 1993. A primitive equation ocean circulation model using a general vertical coordinate transformation. 1. Description and testing of the model. *Journal of geophysical Research* 98, 14, 683-14701.
- Gobler, C.J., Berry, D.L., Anderson, O.R., Burson, A., Koch, F., Rodgers, B.S., Moore, L.K., Galeski, J.A., Allam, B., Bowser, P., Tang, Y., Nuzzi, P., 2008. Characterization, dynamics, and ecological impacts of harmful *Cochlodinium polykrikoides* blooms on eastern Long Island, NY, USA. *Harmful Algae* 7: 293 - 307.
- Goldman, J.C. and Carpenter, E.J. 1974. A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth. *Limnol. Oceanogr.* 19: 756-766.
- Guillard, R.R.L. and Ryther, D. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.

- Hallegraeff, G.M. 1992. On the global spreading of toxic dinoflagellates. *Ciguatera Inf Bull* 2: 2-4.
- Harrison, P.J., Parslow, J.S. and Conway, H.L. 1989. Determination of nutrient uptake kinetic parameters: a comparison of methods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 52: 301-312.
- Hernández, I., Niell, F.X. and Fernandez, J.A. 1994. Alkaline phosphatase activity in marine macrophytes: Histochemical localization in some widespread species in southern Spain. *Mar. Biol.* 120: 501-509.
- Hodson, R.E., Maccubbin, A.E. and Pomeroy, L.R. 1981. Dissolved adenosine triphosphate utilization by free living and attached bacterioplankton. *Mar. Biol.* 64: 43-51.
- Imai, I., Yamaguchi, M., Hori, Y. 2006. Eutrophication and occurrences of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea. *Plankton Benthos Res.* 1: 71 - 84.
- Iwasaki, H. 1979. Physiological ecology of red tide flagellates. In: *Biochemistry and physiology of protozoa*. Levandowsky, M. and Hutner, S.H., eds. Academic Press, New York, pp. 357-393.
- Jung, C.S., Choi, W.J., Kim, H.G., Jung, Y.G., Kim, J.B. and Lim, W.A. 1999. Interrelation between *Cochlodinium polykrikoides* blooms and community structure of zooplankton in the coastal waters around Namhaedo in the south sea of Korea, 1988. *Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korean*, 57: 153-161.
- Kamykouwski, D. 1974. Possible interactions between phytoplankton and semidiurnal internal tides. *J. Mar. Res.* 32: 65-87.
- Kim, C.J., Kim, H.G., Kim, C.H. and Oh, H.M. 2007. Life cycle of the ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* in Korean coastal waters. *Harmful Algae* 6: 104-111.
- Kim, C.H. 1995. Paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Alexandrium* species isolated from benthic cysts in Chinhae Bay, Korea. *J. Kor. Fish. Soc.* 28: 364-372.
- Kim, C.H., Cho, H.J., Shin, J.B., Moon, C.H., Matsuoka, K. 2002. Regeneration from hyaline cysts of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, dinophyceae). A red tide organism along the Korean coast. *Phycologia* 41:

667 - 669.

- Kim, C.H. and J.S. Lee. 1996. Occurrence of toxic dinoflagellates and PSP toxin profiles in *Alexandrium* spp. from Chinhae Bay, Korea. In [Eds.] T. Yasumoto, Y. Oshima and Y. Fukuyo. *Harmful and Toxic Algal Blooms*, IOC of UNESCO 1996, pp. 61-64.
- Kim, C.H., Y. Sako and Y. Ishida. 1993a. Variation of toxin production and composition in axenic cultures of *Alexandrium catenella* and *A. tamarense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59: 633-639.
- Kim, C.H., Y. Sako and Y. Ishida. 1993b. Comparison of toxin composition between populations of *Alexandrium* spp. from geographically distant areas. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 641-646.
- Kim, H.G. 1997. Recent harmful algal blooms and mitigation strategies in Korea. *Ocean Res.* 19: 185-192.
- Kim, H.G. 1998. Harmful algal blooms in Korean coastal waters focused on three fish killing dinoflagellates. In: Kim, H.G., Lee, S.G., Lee, C.K. eds. *Harmful Algal Blooms in Korea and China*. Pusan: National Fisheries Research and Development Institute. p. 1-20.
- Kim, H.G., Choi, W.J., Jung, Y.G., Jung, C.S., Park, J.S., An, K.H. and Baek, C.I. 1999. Initiation of *Cochlodinium polykrikoides* blooms and its environmental characteristics around the Narodo island in the western part of South Sea of Korea. *Bull Nat'l Fish Res Dev Inst Korea* 57: 119-129.
- Kuenzler, E.J. and Perras, J.P. 1965. Phosphatase of marine algae. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*. 128: 271-284.
- Lee, C.K., Lee, S.G. and Kim, H.G. 1999. Occurrence and abundance of three morphologically similar dinoflagellates, *Cochlodinium polykrikoides*, *Gyrodinium impudicum* and *Gymnodinium catenatum* in the southern coast of Korea. *Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Inst. Korean* 57: 131-139.
- Lee, Y.S., Park, Y.T., Kim, Y.S., Kim, K.Y., Park, J.S., Go, W.J., Jo, Y.J. and Park, S.Y. 2001. Countermeasure and outbreak mechanism of *Cochlodinium polykrikoides* red tide 1. Environmental characteristics on outbreak and disappearance of *C. polykrikoides* bloom. *J. Korean Soc. Oceanog.* 6(4): 259-264.

- Lee, Y.W. and Kim, G.B. 2007. Linking groundwater-born nutrients and dinoflagellate red-tide outbreaks in the southern sea of Korea using a Ra tracer. *Estuarine Coastal and Shelf Sci.* 71: 309-317.
- Lin, S., Zhang, H., Hou, Y., Miranda, L., Bhattacharya, D. 2006a. Development of a dinoflagellate-oriented PCR primer set leads to detection of picoplanktonic dinoflagellates from Long Island Sound. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5626 - 5630.
- Lin, S., Zhang, H., Dubois, A., 2006b. Low abundance distribution of *Pfiesteria piscicida* in Pacific and Western Atlantic as detected by mtDNA-18S rDNA real-time polymerase chain reaction. *J. Plankton Res.* 28: 667 - 681.
- Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Kibler, S.R., Reece, K.S., Stokes, N.A., Steidinger, K.A., Millie, D.F., Bendis, B.J., Pigg, R.J., Tester, P.A. 2003. Identification of *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) and *Pfiesteria*-like organisms using internal transcribed spacer-specific PCR assays. *J. Phycol.* 39: 754 - 761.
- MacIsaac, J.J., Grunseich, G.S., Glover, H.E. and Yentsch, C.M. 1979. Light and nutrient limitation in *Gonyaulax excavata*: nitrogen and carbon trace results. In: Toxic Dinoflagellate Blooms. Taylor, D.L. and Seliger, H.H. eds. Elsevier, New York, 107-110.
- Maclean, J.L. 1989. An overview of *Pyrodinium* red tides in the western Pacific. G.M. Hallegraeff & J.L. Maclean (Eds.), *Biology, Epidemiology and Management of Pyrodinium Red Tides*. ICLARM Conference Proceedings 21, Manila, Philippines, pp. 1-8.
- Margalef R. 1961. Hidrografia y fitoplancton de um rea marina de la costa meridional de Puerto Rico. *Invest Pesq* 18: 33-96.
- Matsuoka, K. and Fukuyo, Y. 2000. Technical Guide for Modern Dinoflagellate Cyst Study. WESTPAC-HAB/WESTPAC/IOC.
- Matsuda, A., Nishijima, T. and Fukami, K. 1999. Effects of nitrogenous and phosphorus nutrients on the growth of toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 65: 847-855.
- Nagasaki, K., Yamaguchi, M. 1999. Cryopreservation of a virus(HaV) infecting a harmful bloom causing microalga, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Fish. Sci.* 65: 319-320.

- Nakamura, Y. 1985. Ammonium uptake kinetics and interactions between nitrate and ammonium uptake in *Chattonella antiqua*. J. Oceanogr. Soc. Japan 41: 33-38.
- Nishikawa, T. and Hori, Y. 2004a. Effects of nitrogen, phosphorus and silicon on a growth of a diatom *Eucampia zodiacus* caused bleaching of seaweed *Porphyra* isolated from Harima-Nada, Seto Inland Sea, Japan. Nippon Suisan Gakkaishi. 70: 31-38.
- Nishikawa, T and Hori, Y. 2004b. Effects of nitrogen, phosphorus and silicon on a growth of a diatom *Coscinodiscus wailesii* causing *Porphyra* bleaching isolated from Harima-Nada, Seto Inland Sea, Japan. Nippon Suisan Gakkaishi. 70: 872-878.
- Oh, S.J., Yamamoto, T., Kataoka, Y., Matsuda, O., Matsuyama, Y. and Kotani, Y. 2002. Utilization of dissolved organic phosphorus by the two toxic dinoflagellates, *Alexandrium tamarense* and *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). Fish. Sci., 68: 416-424.
- Oh, S.J. and Yoon, Y.H. 2004. Effects of water temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* (Graham) isolated from Yeosuhae Bay, Korea. Algae 14: 293-301.
- Pacanowski, R.C., Gnanadesikan, A., 1998. Transient response in a z-level ocean model that resolves topography with partial cells. Monthly Weather Review, 126: 3248-3270.
- Park, J.S., Kim, H.G. and Lee, S.G. 1988. Red tide occurrence and succession of its causative organisms in Jinhae Bay. Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Agency 41: 1-26 (in Korean).
- Park, J., Jeong, M., Lee, J., Cho, K.J. and Kwon, O.S. 2001. Diurnal vertical migration of a harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae) during a red tide in coastal waters of Namhae Island, Korea. Phycologia 40: 292-297.
- Park, T.G., DE Salas, M.F., Bolch, C.J.S., Hallegraeff, G.M. 2007a. Development of a real-time PCR probe for quantification of the heterotrophic dinoflagellate *Cryptoperidiniopsis brodyi* (Dinophyceae) in environmental samples. Appl Environ Microbiol 73: 2552-2560.

- Park, T.G., Bell, E.M., Pearce, I., Rublee, P.A., Bolch, C.J.S., Hallegraeff, G.M. 2007b. Detection of a novel ecotype of *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) in an Antarctic saline lake by real-time PCR. *Polar Biol.* 30: 843-848.
- Pawlowicz, R., Beardsley, B. and Lentz, S. 2002. Harmonic Analysis Including Error Estimates in MATLAB using T\_TIDE", *Computers and Geosciences*, 28: 929-937.
- Sánchez-Saavedra, M.P. and Voltina, D. 1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light condition. *Comp Biochem Physiol* 107B: 39-44.
- Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R. 1972. A practical handbook of seawater analysis, 2nd ed. Bulletin of Fisheries Research Board of Canada, 1-310.
- Tilman, D. 1982. Resource competition and community Structure, Princeton University Press, Princeton, 1-269.
- Watanabe, M.M., Nakamura, Y., Mori, S. and Yamochi, S. 1982. Effect of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada from Osaka Bay, Japan. *Jpn. J. Phycol.* 30: 279-288.
- Wetzel, R.G. 1991. Extracellular enzymatic interaction: storage, redistribution and interspecific communication. In; *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*, edited by Chrost, R.J., Springer-Verlag, New York, pp. 6-28.
- Yamaguchi, M. 1994. Physiological ecology of the red tide flagellate *Gymnodinium nagasakiensis* (Dinophyceae) - Mechanism of the red tide occurrence and its prediction. *Bull Nansei Natl Fish Res Inst* 27: 251-394 (in Japanese with English abstract).
- Yamaguchi, M. and Honjo, T. 1989. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the noxious red tide flagellate *Gymnodinium nagasakiense* (Dinophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 2029-2036 (in Japanese with English abstract).
- Yamaguchi, M. and I. Imai. 1995. A rapid and precise technique for enumeration of resting cysts of *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) in natural sediments. *Phycologia*, 34(3): 207-214.
- Yamaguchi, M. and Itakura S. 1999. Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of the noxious red tide dinoflagellate *Gymnodinium*

- mikimotoi*. Fish. Sci., 65, 367-373.
- Yamaguchi, H., Nishijima, T., Nishitani, H., Fukami, K. and Adachi, M. 2004. Organic phosphorus utilization and alkaline phosphatase production of 3 red tide phytoplankton. Nippon Suisan Gakkaishi 70: 123-130.
- Yamaguchi, H., Sakamoto, S. and Yamaguchi, M. 2008. Nutrition and growth kinetics in nitrogen- and phosphorus-limited cultures of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). Harmful Algae 7: 26-32.
- Yamamoto, T. and Tarutani, K. 1999. Growth and phosphate uptake kinetics of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from Hiroshima Bay in the Seto Inland Sea, Japan. Phycol. Res. 47: 27-32.
- Yamamoto, T., Oh, S.J. and Kataoka, Y. 2004. Growth and uptake kinetics for nitrate, ammonium and phosphate by the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Hiroshima Bay, Japan. Fish. Sci. 70: 108-115.
- Yanagi, T., G. Onitsuka, N. Hirose and J.-H. Yoon. 2001. A numerical simulation on mesoscale dynamics of the spring bloom in the Sea of Japan. J. Oceanogr. 57: 617 - -630.
- Zhang, H., and S. Lin. 2005. Development of a cob-18S rDNA gene real-time PCR assay for quantifying *Pfiesteria shumwayae* in the natural environment. Appl. Environ. Microbiol. 71: 7053-7063.



Appendix 1. 이화학적 해양환경 조사 (단위 :  $\mu\text{M}$ , JR : 자란만)

조사 정점	수층	일시	DTN	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N	NH <sub>4</sub> -N	DTP	PO <sub>4</sub> -P	DSi	
JR. 1	표층	2009-05-16			0.13	5.79	0.22	0.15		
		2009-06-25		5.51	0.30	2.07	0.57	0.40		
		2009-07-28		12.90	0.01	1.57	0.72			
		2009-08-25		2.74	0.01	0.79	0.92	0.15		
		2009-09-26		3.67	0.09	1.14	0.87	0.45		
		2009-10-25		12.90	0.48	1.57	1.11	0.05		
		2010-10-21				0.16			1.26	
	저층	2009-05-16				0.32	3.64	0.27	0.20	
		2009-06-25		10.13	0.09	1.71	0.52	0.45		
		2009-07-28		10.13	1.16	0.21	0.77			
		2009-08-25		3.67	0.07	1.50	0.92	0.15		
		2009-09-26		2.28	0.65	0.79	1.06	0.40		
		2009-10-25		6.44	0.98	0.79	0.97	0.50		
JR. 2	표층	2009-05-16			0.07	3.21	0.27	0.20		
		2009-06-25		3.67	0.65	11.36	0.72	0.05		
		2009-07-28		2.47	0.03	5.00	0.67			
		2009-08-25		12.90	0.05	0.36	0.77	0.20		
		2009-09-26		10.13	0.42	1.07	0.87	0.25		
		2009-10-25		9.21	0.73	0.36	0.87	0.54		
		2010-10-21				0.08			1.16	
	저층	2009-05-16				0.15	9.50	0.22	0.15	
		2009-06-25		3.67	0.20	7.00	0.67	0.30		
		2009-07-28		1.82	1.88	1.07	0.77			
		2009-08-25		11.06	0.01	0.79	0.92	0.25		
		2009-09-26		4.59	0.65	2.00	0.82	0.54		
		2009-10-25		7.36	0.98	2.07	0.87	0.54		
JR. 3	표층	2009-05-16			0.92	7.36	0.32	0.25		
		2009-06-25		0.90	0.09	2.14	0.92	0.15		
		2009-07-28		10.13	0.01	0.64	0.72			
		2009-08-25		2.74	0.07	0.21	0.87	0.20		
		2009-09-26		8.28	0.69	1.57	0.92	0.54		
		2009-10-25		9.21	1.12	1.57	0.82	0.54		
		2010-10-21				0.04			1.81	
	저층	2009-05-16				0.48	8.29	0.27	0.20	
		2009-06-25		10.13	0.40	4.21	0.77	0.05		
		2009-07-28		0.90	1.47	0.43	0.77			
		2009-08-25		10.13	0.25	0.86	1.06	0.74		
		2009-09-26		0.90	0.98	1.71	0.77	0.30		
		2009-10-25		8.28	1.04	0.43	1.11	0.74		
IR. 1	표층	2009-05-16			0.48	12.86	0.87	0.79		

JR. 4 표층 2009-05-30 1.82 0.03 1.64 0.87 0.79

Appendix 1. 계 속 (JR : 자란만)

조사 정점	수층	일시	DTN	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N	NH <sub>4</sub> -N	DTP	PO <sub>4</sub> -P	DSi
		2009-05-30		1.82	0.03	1.64	0.87	0.79	
		2009-06-25		8.28	0.13	4.79	1.51	0.20	
		2009-07-28		5.51	0.03	1.36	0.77		
		2009-08-25		7.36	0.07	5.36	0.82	0.50	
		2009-09-26		3.67	0.20	3.36	2.05	1.49	
		2009-10-25		7.36	0.92	2.79	1.01	0.69	
		2010-04-28			0.12	0.63	0.40	0.27	0.07
		2010-05-24	1.943	1.013	0.08	0.76	0.89	0.12	0.10
		2010-05-26	1.924	0.080	0.50	0.14	1.29	0.22	0.66
		2010-05-29	1.499	1.200	0.10	0.97	0.79	0.57	6.40
		2010-06-01	1.932	0.027	0.02	1.18	0.69	0.17	4.39
		2010-06-05	1.900	0.400	0.00	1.25	0.74	0.07	4.71
		2010-06-08	1.893	2.320	0.22	0.35	0.99	0.17	8.89
		2010-06-13	1.514	0.320	0.12	0.90	0.25	0.22	4.49
		2010-06-16	1.597	0.747	0.12	1.04	9.95	0.17	5.87
		2010-06-19	1.466	1.307	0.00	1.11	0.50	0.32	6.19
		2010-06-21	1.903	0.187	0.26	0.14	3.91	0.62	5.77
	표층	2010-06-25	1.529	0.293	0.02	0.83	0.74	0.32	7.15
		2010-06-28	1.437	0.027	0.00	2.78	0.64	0.22	9.16
		2010-07-03	1.695	0.293	0.02	0.28	0.99	0.42	7.46
JR. 4		2010-07-06	1.462	0.427	0.04	0.49	0.50	0.02	4.81
		2010-07-09	1.348	0.453	0.00	1.18	0.69	0.12	6.93
		2010-07-14	1.971	3.707	0.14	1.46	0.64	0.17	7.15
		2010-07-17	2.092	0.107	0.10	2.57	0.40	0.12	3.12
		2010-07-20	1.921	0.213	0.64	1.04	0.50	0.07	5.66
		2010-07-24	2.114	0.160	0.00	0.35	4.16	0.07	0.15
		2010-07-29	2.137	0.480	0.02	0.49	1.09	0.07	0.05
		2010-08-02	2.102	0.347	0.00	2.64	0.74	0.12	0.68
		2010-08-06	2.174	0.213	0.02	2.71	0.69	0.12	0.78
		2010-08-12	2.398	3.387	0.10	2.71	7.03	0.22	9.27
		2010-08-17	2.131	0.027	0.14	0.49	0.84	0.22	2.68
		2010-08-22	2.071	0.160	0.08	0.35	1.93	0.02	2.02
		2011-05-28	8.320	0.07	0.23	0.741	1.000	0.132	1.15
		2011-06-08	0.586	0.31	0.19	1.464	0.128	0.556	2.68
		2011-06-23	0.039	0.27	0.35	1.825	0.077	0.079	3.49
		2011-07-05	0.117	0.40	0.27	0.982	0.385	0.132	0.13
		2009-05-16			0.22	11.71	0.57	0.50	
		2009-05-30		0.90	0.01	0.93	0.92	0.40	
	저층	2009-05-30		0.90	0.01	0.93	0.92	0.40	

2009-06-25	3.67	0.05	8.50	1.91	0.74
2009-07-28	6.44	0.40	1.71	0.72	

Appendix 1. 계 속 (JR : 자란만)

조사 정점	수층	일시	DTN	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N	NH <sub>4</sub> -N	DTP	PO <sub>4</sub> -P	DSi
JR. 4	저층	2009-08-25		0.90	0.07	0.29	0.92	0.40	
		2009-09-26		7.36	0.73	0.71	0.97	0.54	
		2009-10-25		6.44	0.65	2.07	1.21	0.59	
		2010-04-28			0.12	0.83	0.25	0.27	3.12
		2010-05-29	1.633	0.400	0.10	0.76	12.08	0.17	4.60
		2010-06-16	1.492	0.960	0.12	0.07	7.23	0.17	9.06
		2010-06-21	1.408	0.027	0.18	0.07	0.40	0.37	11.18
		2010-06-28	1.585	0.187	0.02	3.06	1.53	0.42	10.65
		2010-07-29	1.903	0.133	0.04	0.00	1.88	0.12	0.05
		2011-05-28	7.305	0.15	0.15	1.102	0.436	0.397	6.76
		2011-06-08	1.055	0.48	0.31	0.982	0.590	0.026	7.63
		2011-06-23	0.430	0.35	0.27	0.922	0.077	0.397	4.26
2011-07-05	0.273	1.05	0.64	1.886	0.538	0.079	10.99		
JR. 5	표층	2009-05-16			0.24	6.36	0.77	0.69	
		2009-06-25		2.74	0.34	4.43	1.01	0.15	
		2009-07-28		0.90	0.01	0.00	0.82		
		2009-08-25		2.74	0.03	1.86	0.87	2.52	
		2009-09-26		8.28	0.03	0.43	1.46	0.84	
		2009-10-25		11.98	1.04	0.79	0.97	0.74	
	저층	2009-05-16			0.17	3.07	0.32	0.25	
		2009-06-25		2.74	0.26	0.64	1.01	0.25	
		2009-07-28		8.28	2.05	4.36	0.77		
		2009-08-25		8.28	0.38	0.29	1.11	0.40	
		2009-09-26		11.06	1.43	1.21	1.86	0.69	
		2009-10-25		4.59	1.12	1.86	1.11	0.74	
JR. 6	표층	2009-05-16			0.28	4.36	0.57	0.50	
		2009-06-25		2.74	0.11	4.07	0.72	0.05	
		2009-07-28		0.90	0.01	1.21	0.82		
		2009-08-25		7.36	0.01	6.86	0.77	0.40	
		2009-09-26		5.51	0.05	1.79	5.82	0.45	
		2009-10-25		8.28	0.65	1.36	0.87	0.50	
	저층	2009-05-16			0.03	4.36	0.32	0.25	
		2009-06-25		3.67	0.03	1.64	0.87	0.40	
		2009-07-28		9.21	2.15	6.21	0.77		
		2009-08-25		9.21	0.48	0.93	1.06	1.58	
		2009-09-26		11.06	1.00	1.86	1.81	1.88	
		2009-10-25		5.51	0.59	2.64	0.92	0.59	
		2009-05-16			0.20	5.00	0.32	0.25	

JR. 7	표층	2009-05-30	3.67	0.01	12.57	0.97	0.50
		2009-05-30	3.67	0.01	12.57	0.97	0.50
		2009-06-01	3.67	0.01	4.14	0.97	0.50

Appendix 1. 계 속 (JR : 자란만)

조사 정점	수층	일시	DTN	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N	NH <sub>4</sub> -N	DTP	PO <sub>4</sub> -P	DSi
		2009-06-03		4.59	0.01	1.57	1.01	0.40	
		2009-06-05		4.59	0.01	5.86	0.97	0.45	
		2009-06-07		11.98	0.73	15.21	1.06	0.45	
		2009-06-10		7.36	0.13	8.86	1.06	0.40	
		2009-06-13		2.74	0.26	4.57	1.16	0.40	
		2009-06-17		6.44	0.13	1.57	1.06	0.40	
		2009-06-20		6.44	0.05	0.36	0.77	0.40	
		2009-06-25		5.51	0.07	4.86	0.82	0.10	
		2009-07-28		2.74	0.01	5.14	0.82		
		2009-08-25		3.67	0.03	15.71	0.97	0.30	
		2009-09-26		7.36	0.01	0.07	1.16	2.23	
		2009-10-25		1.82	0.20	5.50	0.87	0.35	
		2010-04-28			0.10	1.18	0.25	0.22	1.31
		2010-05-24	2.481	19.949	0.14	1.74	1.09	0.27	2.27
		2010-05-26	2.509	38.885					
		2010-05-29	1.917	0.160	0.06	0.42	25.20	0.22	7.57
		2010-06-01	1.676	0.773	0.00	1.25	0.64	0.02	9.59
		2010-06-05	1.730	0.347	0.00	1.32	0.74	0.07	9.27
		2010-06-08	1.971	0.320	0.04	0.35	1.24	0.17	6.92
		2010-06-13	1.394	1.707	0.12	1.04	2.62	0.02	5.96
JR. 7	표층	2010-06-16	1.293	0.240	0.28	0.14	7.33	0.02	6.40
		2010-06-19	1.469	2.027	0.00	0.56	0.64	0.12	7.36
		2010-06-21	1.449	0.427	0.18	0.14	0.40	0.12	7.46
		2010-06-25	1.565	0.293	0.08	1.32	0.45	0.17	9.69
		2010-06-28	1.411	0.427	0.04	6.11	0.99	0.17	10.33
		2010-07-03	1.863	14.695	0.14	2.71	24.46	0.12	16.69
		2010-07-06	1.415	2.160	0.02	1.67	0.69	0.17	7.04
		2010-07-09	1.666	0.187	0.02	1.25	9.41	0.42	6.51
		2010-07-14	1.383	21.256	0.06	5.00	4.06	0.37	17.01
		2010-07-17	1.297	50.166	0.10	2.29	9.06	0.22	44.48
		2010-07-20	1.542	6.668	1.48	3.96	0.59	0.02	9.27
		2010-07-24	2.237	2.560	0.04	0.35	0.84	0.07	3.54
		2010-07-29	2.319	1.013	0.04	0.00	1.04	0.22	3.54
		2010-08-02	2.060	0.533	0.00	0.56	0.54	0.22	2.48
		2010-08-06	2.215	1.974	0.04	4.38	1.04	0.27	2.06
		2010-08-12	1.493	32.351	0.12	8.47	0.89	0.32	32.49
		2010-08-17	2.102	2.694	0.1	0.49	1.49	0.17	5.25

2010-08-22	2.276	7.254	0.24	2.15	0.99	0.32	8.28
2011-05-28	3.242	0.11	0.07	1.343	0.231	0.556	5.64
2011-06-08	0.664	0.15	0.40	1.645	0.077	0.291	3.39
2011-06-23	0.195	0.27	0.48	2.066	0.077	0.397	5.64

Appendix 1. 계 속 (JR : 자란만)

조사 정점	수층	일시	DTN	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N	NH <sub>4</sub> -N	DTP	PO <sub>4</sub> -P	DSi
	표층	2011-07-05	0.195	0.23	0.19	0.922	0.026	0.397	0.23
		2009-05-16			0.15	4.64	0.37	0.30	
		2009-05-30		1.82	0.03	1.43	0.97	1.04	
		2009-05-30		1.82	0.03	1.43	0.97	1.04	
		2009-06-01		2.74	0.48	8.43	0.87	0.40	
		2009-06-03		11.06	0.07	4.00	1.01	0.54	
		2009-06-05		7.36	0.15	5.36	1.01	0.45	
		2009-06-07		11.98	0.92	10.21	0.97	0.59	
		2009-06-10		7.36	0.11	11.79	1.01	0.35	
		2009-06-13		5.51	0.34	4.71	0.97	0.40	
		2009-06-17		8.28	0.01	2.14	0.82	0.54	
		2009-06-20		6.44	0.07	0.71	3.44	1.14	
		2009-06-25		1.82	0.15	3.21	0.82	0.20	
JR. 7	저층	2009-07-28		3.67	0.01	1.21	0.82		
		2009-08-25		2.74	0.01	0.86	1.16	0.45	
		2009-09-26		9.21	0.11	0.50	1.51	1.19	
		2009-10-25		1.82	0.17	6.21	0.92	0.40	
		2010-04-28			0.16	0.14	16.14	0.27	2.16
		2010-05-29	1.542	0.373	0.12	3.06	0.54	0.22	11.60
		2010-06-16	1.538	0.133	0.16	1.60	0.25		9.37
		2010-06-21	1.538	0.160	0.22	0.97	0.25	0.47	12.03
		2010-06-28	1.306	0.027	0.04	4.79	0.99	0.37	14.15
		2010-07-29	1.996	0.347	0.22	0.28	0.59	0.32	2.98
		2011-05-28	8.320	0.11	0.15	1.283	0.282	0.079	6.61
		2011-06-08	0.195	0.31	0.23	1.042	0.231	0.185	9.11
		2011-06-23	0.273	0.56	0.56	0.982	0.231	0.344	5.59
		2011-07-05	0.117	0.19	0.40	1.223	0.231	0.503	6.10
		2009-05-16			0.20	2.43	0.47	0.40	
		2009-06-25		2.74	0.13	12.07	0.77	0.40	
		2009-07-28		1.82	0.01	14.21	0.87		
		2009-08-25		3.67	0.01	7.29	0.82	0.30	
		2009-09-26		4.59	0.13	0.64	0.97	0.54	
		2009-10-25		3.67	0.09	1.57	0.87	0.00	
JR. 8	표층	2010-04-28			0.10	0.28	0.50	0.27	0.25
		2010-05-29	1.341	0.320	0.12	0.69	0.30	0.17	7.46
		2010-06-16	1.606	0.373	0.16	0.21	0.35	0.02	9.48

2010-06-21	1.738	0.133	0.18	1.39	0.40	0.07	5.24
2010-06-28	1.526	0.667	0.00	4.93	1.98	0.52	8.63
2010-07-29	1.860	0.213	0.02	0.69	0.35		2.93
2011-03-19	4.023	0.00	0.14	1.223	0.026	0.291	4.26
2011-04-19	14.805	0.10	0.02	1.223	0.846	0.079	7.53

Appendix 1. 계 속 (JR : 자란만)

조사 정점	수층	일시	DTN	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N	NH <sub>4</sub> -N	DTP	PO <sub>4</sub> -P	DSi		
		2011-05-28	5.039	0.23	0.27	1.163	0.282	0.026	3.75		
	표층	2011-06-08	0.586	0.40	0.15	1.102	0.282	0.291	1.20		
		2011-06-23	0.352	0.48	0.60	1.223	0.333	0.026	4.21		
		2011-07-05	0.430	0.27	0.23	1.283	0.538	0.026	0.13		
		2009-05-16			0.07	21.57	0.27	0.20			
		2009-06-25		2.74	0.09	23.21	0.92	1.53			
		2009-07-28		5.51	2.56	1.14	1.21				
		2009-08-25		9.21	0.03	2.93	1.01	0.20			
		2009-09-26		3.67	0.26	1.36	1.41	0.89			
		2009-10-25		1.82	0.09	0.57	0.82	0.25			
JR. 8		2010-04-28			0.18	0.63	0.69	0.22	2.69		
		저층	2010-05-29	1.593	0.720	0.18	5.42	0.40	0.17	11.49	
			2010-06-16	1.686	0.267	0.12	0.56	0.30	0.02	8.74	
			2010-06-21	1.353	0.320	0.18	1.46	0.25	0.17	9.16	
			2010-06-28	1.299	0.453	0.04	2.36	0.99	0.92	12.24	
			2010-07-29	2.194	0.187				0.52		
			2011-03-19	5.742	0.02	0.00	1.102	0.538	0.132	2.63	
			2011-04-19	11.055	0.02	0.02	1.283	0.385	0.026	7.07	
			2011-05-28	4.727	0.15	0.07	1.283	0.231	0.026	11.35	
			2011-06-08	0.117	0.23	0.27	1.163	0.282	0.132	8.55	
			2011-06-23	0.352	0.60	0.35	1.404	0.077	0.185	3.80	
			2011-07-05	0.430	0.64	0.40	1.163	0.487	0.185	10.84	
				2009-05-16			0.22	3.43	0.27	0.20	
				2009-06-25		1.82	0.11	21.14	0.52	0.25	
			표층	2009-07-28		0.90	0.03	0.79	0.82		
				2009-08-25		2.74	0.01	1.50	1.26	0.35	
	2009-09-26			5.51	0.01	1.00	0.87	0.64			
	2009-10-25			2.74	0.28	1.71	0.82	0.30			
		2009-05-16				0.28	3.93	0.47	0.40		
		2009-06-25			1.82	0.34	7.43	2.00	1.49		
JR. 9		저층	2009-07-28		5.51	2.71	3.29	0.87			
			2009-08-25		1.82	0.22	5.14	2.40	1.24		
			2009-09-26		4.59	1.02	1.71	1.06	0.59		
			2009-10-25		3.67	0.15	5.79	1.16	0.10		
				2010-05-29	1.883	0.400	0.12	0.42	0.45	0.32	8.42

		2010-06-16	1.504	0.160	0.10	0.14	0.25	0.02	5.98
		2010-06-21	1.510	0.640	0.18	1.67	0.35	0.07	6.51
JR. 10	표층	2010-06-28	1.405	0.693	0.04	2.57	0.84	0.42	4.28
		2010-07-29	2.066	0.267	0.06	1.60	0.84	0.07	4.39
		2011-03-19	36.680	0.08	0.08	0.922	0.026	0.238	4.26
		2011-04-19	10.273	0.06	0.10	1.102	0.077	0.026	8.85

Appendix 1. 계 속 (JR : 자란만, MJ : 미조)

조사 정점	수층	일시	DTN	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N	NH <sub>4</sub> -N	DTP	PO <sub>4</sub> -P	DSi
		2011-05-28	0.898	0.27	0.11	1.524	0.077	0.926	3.60
	표층	2011-06-08	0.273	0.27	0.31	1.223	0.487	0.608	2.83
		2011-06-23	0.508	0.15	0.27	1.102	0.179	0.079	2.02
		2011-07-05	0.273	0.07	1.05	1.223	0.026	0.079	6.15
		2010-05-29	1.310	0.107	0.16	0.07	0.40	0.22	6.72
		2010-06-16	1.398	0.293	0.16	6.18	0.25	0.02	5.03
		2010-06-21	1.575	0.133	0.22	2.36	0.45	0.12	7.36
JR. 10		2010-06-28	1.627	0.587	0.02	3.47	0.35	0.22	7.46
		2010-07-29	1.975	0.053	0.02	2.01	0.64	0.37	5.20
	저층	2011-03-19	5.195	0.14	0.02	1.464	0.128	0.344	2.63
		2011-04-19	8.555	0.02	0.06	1.343	0.179	0.026	8.34
		2011-05-28	2.461	0.07	0.11	1.584	0.282	0.238	4.92
		2011-06-08	0.195	0.19	0.48	1.404	0.538	0.397	4.82
		2011-06-23	1.211	0.35	0.15	1.223	0.179	0.026	3.34
		2011-07-05	0.586	0.40	0.07	0.681	0.026	0.026	7.22
		2009-05-30		1.82	0.01	1.21	0.92	0.45	
		2009-05-30		1.82	0.01	1.21	0.62	0.45	
		2009-06-01		2.74	0.11	9.86	1.06	1.09	
		2009-06-03		7.36	0.03	2.50	1.06	0.54	
	표층	2009-06-05		6.44	0.05	3.86	1.11	0.40	
		2009-06-07		13.83	0.20	10.86	0.92	0.40	
		2009-06-10		8.28	0.01	9.79	0.97	0.40	
		2009-06-13		-0.95	0.05	7.50	0.92	0.35	
		2009-06-17		10.13	0.09	0.50	0.87	0.35	
		2009-06-20		5.51	0.01	0.36	0.82	0.50	
JR. 11		2009-05-30		2.74	0.03	9.50	0.62	0.40	
		2009-05-30		2.74	0.03	9.50	0.92	0.40	
		2009-06-01		2.74	0.05	7.93	1.01	0.54	
		2009-06-03		8.28	0.03	0.93	0.97	0.45	
	저층	2009-06-05		7.36	0.13	6.79	0.87	0.50	
		2009-06-07		7.36	0.11	8.57	1.91	1.49	
		2009-06-10		8.28	0.17	8.64	0.92	0.35	
		2009-06-13		2.74	0.34	3.57	1.01	0.40	
		2009-06-17		5.51	0.01	3.21	0.87	0.69	

		2009-06-20		11.06	0.09	0.79	1.01	0.50	
JR. 13	표층	2010-10-21			0.12			0.92	
JR. 16	표층	2010-10-21			0.06			0.57	
JR. 17	표층	2010-10-21			0.06			0.62	
		2011-07-26	0.664	0.19	0.19	1.524	0.077	0.238	0.54
MJ. 1	표층	2011-08-11	0.039	1.92	1.92	1.404	0.179	0.185	22.63
		2011-08-18	0.039	0.22	0.22	1.464	0.077	0.185	4.62

Appendix 1. 계 속 (MJ : 미조, SR : 사랑도, YJ : 옥지도)

조사 정점	수층	일시	DTN	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N	NH <sub>4</sub> -N	DTP	PO <sub>4</sub> -P	DSi
	표층	2011-08-23	0.273	0.14	0.14	1.765	0.385	0.344	1.61
		2011-08-29	0.430	0.18	0.18	1.163	0.026	0.556	1.51
MJ. 1		2011-07-26	0.117	0.27	0.27	0.801	0.077	0.767	1.35
		2011-08-11	0.352	0.77	0.77	1.042	0.179	0.026	13.24
	저층	2011-08-18	0.586	0.52	0.52	1.404	0.385	0.079	15.18
		2011-08-23	1.289	0.02	0.02	1.645	0.128	0.132	4.57
		2011-08-29	0.195	0.18	0.18	1.404	0.179	0.238	4.57
	SR. 1	표층	2011-07-21	0.117	0.31	0.31	0.982	0.128	0.450
2011-08-05			0.273	0.31	0.27	0.922	0.128	0.132	4.31
저층		2011-07-21	0.195	0.52	0.52	0.620	0.128	0.450	2.83
		2011-08-05	0.742	0.27	0.31	0.741	0.282	0.132	4.31
YJ. 3		2011-08-04	0.039	0.27	0.31	0.922	0.436	0.344	6.76
		2011-08-17	0.273	0.10	0.10	1.404	0.026	0.344	0.43
	표층	2011-08-30	0.664	0.10	0.10	1.163	0.231	0.026	5.48
		2011-09-07	0.195	0.10	0.10	1.946	0.077	0.079	2.12
		2011-09-25	0.352	0.07	0.07	0.982	0.026	0.079	4.87
	저층	2011-08-04	0.117	0.31	0.27	1.042	0.385	0.397	7.17
		2011-08-17	0.273	0.30	0.30	0.861	0.179	0.556	5.48
		2011-08-30	0.742	0.02	0.02	0.982	0.077	0.238	5.84
		2011-09-07	0.430	0.35	0.35	2.127	0.026	0.132	4.36
		2011-09-25	0.586	0.31	0.31	1.343	0.179	0.132	6.40



Appendix 2. 해양 환경 및 *C. polykrikoides*, *Nematodinium* sp. 의 발생 (JR : 자란만)

조사정점	수층	일시	수온(°C)	염분(‰)	DO(mg/l)	<i>C. polykrikoides</i> (Cells/L)	<i>Nematodinium</i> sp. (Cells/L)
JR. 1	표층	2009-05-16	18.96	34.56	7.85		
		2009-06-25	24.14	33.92	7.79		
		2009-07-28	23.00	32.60	7.37		
		2009-08-25	26.34	31.60	6.86		
		2009-09-26	24.39	32.81	7.60		
		2011-05-28	18.42	34.66	7.68	0	0
	저층	2009-05-16	16.26	34.83	7.75		
		2009-06-25	19.54	34.33	6.77		
		2009-07-28	21.00	33.31	4.02		
		2009-08-25	24.96	32.04	5.05		
		2009-09-26	23.05	33.04	5.18		
2011-05-28	15.28	34.79	6.62	0	0		
JR. 2	표층	2009-05-16	18.24	34.68	7.76		
		2009-06-25	22.66	34.16	7.23		
		2009-07-28	22.50	32.74	7.08		
		2009-08-25	26.44	31.74	6.89		
		2009-09-26	24.24	32.96	7.21		
		2011-05-28	18.00	34.73	7.65	0	0
	저층	2009-05-16	16.28	34.83	7.37		
		2009-06-25	20.62	34.29	7.04		
		2009-07-28	21.00	33.37	4.14		
		2009-08-25	25.30	31.50	5.74		
		2009-09-26	23.02	33.20	5.85		
2011-05-28	14.79	34.94	5.50	0	0		
JR. 3	표층	2009-05-16	18.30	34.67	7.70		
		2009-06-25	22.82	34.14	7.11		
		2009-07-28	22.70	32.80	7.12		
		2009-08-25	26.00	30.80	6.23		
		2009-09-26	24.20	31.90	6.63		
		2011-05-28	17.83	34.86	7.32	0	0
	저층	2009-05-16	16.21	34.83	7.54		
		2009-06-25	19.58	34.36	6.74		
		2009-07-28	20.50	33.06	3.97		
		2009-08-25	24.60	31.60	5.01		
		2009-09-26	23.70	32.00	5.91		
2011-05-28	14.65	35.02	5.37	0	0		
JR. 4	표층	2009-05-16	19.33	34.63	7.97		
		2009-06-25	26.12	33.47	8.52		
		2009-07-28	23.50	31.10	7.31		
		2009-08-25	26.20	31.10	7.06		

2009-09-26	24.40	32.13	7.58		
2010-05-29	18.46	33.25	7.79	0	0

Appendix 2. 계 속 (JR : 자란만)

조사정점	수층	일시	수온(°C)	염분(‰)	DO(mg/l)	<i>C. polykrikoides</i> (Cells/L)	<i>Nematodinium</i> sp. (Cells/L)
		2010-06-01	22.24	33.51	7.84	0	0
		2010-06-05	23.04	33.87	9.15	0	0
		2010-06-08	25.26	34.24	7.63	0	0
		2010-06-13	22.54	34.13	6.22	0	14
		2010-06-16	24.16	34.23	7.30	17	28
		2010-06-19	24.11	34.32	7.11	22	9
		2010-06-21	25.12	34.28	7.17	0	6
		2010-06-25	24.09	34.29	6.60	0	19
		2010-06-28	23.85	33.46	7.11	0	20
		2010-07-03	26.33	32.91	8.52	0	0
		2010-07-06	25.67	33.96	8.91	0	56
		2010-07-09	26.44	33.99	8.63	0	20
		2010-07-14	24.46	31.92	7.05	278	51
		2010-07-17	23.15	33.29	6.49	116	0
		2010-07-20	29.52	28.13	10.76	0	0
		2010-07-25	28.77	30.83	8.30	21	9
		2010-07-29	27.79	31.58	6.18	286	8
		2010-08-02	29.48	31.72	7.50	237	0
		2010-08-06	29.32	32.42	7.89	195	19
JR. 4	표층	2010-08-12	26.84	32.49	5.79	0	0
		2010-08-17	28.53	30.15	7.34		
		2010-08-22	26.97	32.66	7.55		
		2011-05-14	16.88	34.91	7.96	0	0
		2011-05-16	19.10	34.74	9.01	-	-
		2011-05-18	19.41	34.57	9.59	0	0
		2011-05-22	21.27	34.51	7.90	7	0
		2011-05-25	20.39	34.57	8.28	0	0
		2011-05-28	18.72	34.79	7.16	0	0
		2011-06-02	20.57	34.64	7.06	60	0
		2011-06-08	22.74	34.78	7.12	0	0
		2011-06-11	22.57	34.51	7.83	51	20
		2011-06-14	24.01	34.70	7.30	13	75
		2011-06-19	23.60	31.10	7.21	33	11
		2011-06-23	23.20	31.92	7.12	7	0
		2011-07-05	24.16	30.83	7.30	5	5
		2011-07-11	24.38	31.58	7.17	15	0
		2011-07-17	23.50	29.65	7.10	48	0
		2011-07-19	24.01	31.20	6.60	0	0

2011-07-24	24.20	34.31	4.23	0	0
2011-08-03	27.76	26.56	6.83	0	0

---

Appendix 2. 계 속 (JR : 자란만)

조사정점	수층	일시	수온(°C)	염분(‰)	DO(mg/ℓ)	<i>C. polykrikoides</i> (Cells/L)	<i>Nematodinium</i> sp. (Cells/L)
		2009-05-16	18.64	34.86	7.67		
		2009-06-25	21.12	34.41	3.41		
		2009-07-28	20.00	32.14	4.49		
		2009-08-25	25.90	30.50	7.16		
		2009-09-26	23.00	32.14	5.20		
		2010-05-29	17.12	34.05	7.71	0	5
		2010-06-01	-	-	-	-	-
		2010-06-05	-	-	-	-	-
		2010-06-08	-	-	-	-	-
		2010-06-13	-	-	-	-	-
		2010-06-16	19.22	34.27	3.16	6	17
		2010-06-19	-	-	-	-	-
		2010-06-21	20.01	34.33	1.64	0	0
		2010-06-25	-	-	-	-	-
		2010-06-28	20.64	34.39	4.37	0	27
		2010-07-03	-	-	-	-	-
		2010-07-06	-	-	-	-	-
		2010-07-09	-	-	-	-	-
		2010-07-14	-	-	-	-	-
JR. 4	저층	2010-07-17	-	-	-	-	-
		2010-07-20	-	-	-	-	-
		2010-07-25	-	-	-	-	-
		2010-07-29	22.58	33.92	2.82	129	16
		2010-08-02	-	-	-	-	-
		2010-08-06	-	-	-	-	-
		2010-08-12	-	-	-	-	-
		2010-08-17	-	-	-	-	-
		2010-08-22	-	-	-	-	-
		2011-05-14	-	-	-	-	-
		2011-05-16	-	-	-	0	17
		2011-05-18	-	-	-	-	-
		2011-05-22	-	-	-	-	-
		2011-05-25	-	-	-	-	-
		2011-05-28	16.85	34.95	5.27	0	0
		2011-06-02	17.12	34.76	4.45	10	10
		2011-06-08	18.54	34.78	5.65	0	0
		2011-06-11	-	-	-	-	-
		2011-06-14	-	-	-	-	-
		2011-06-19	-	-	-	-	-
		2011-06-23	18.34	34.73	6.10	9	0

Appendix 2. 계 속 (JR : 자란만)

조사정점	수층	일시	수온(°C)	염분(‰)	DO(mg/l)	<i>C. polykrikoides</i> (Cells/L)	<i>Nematodinium</i> sp. (Cells/L)
JR. 4	저층	2011-07-05	19.22	34.27	3.16	0	0
		2011-07-11	-	-	-	-	-
		2011-07-17	-	-	-	-	-
		2011-07-19	-	-	-	-	-
		2011-07-24	-	-	-	-	-
		2011-08-03	-	-	-	-	-
JR. 5	표층	2009-05-16	18.77	34.58	7.86		
		2009-06-25	24.21	33.80	7.56		
		2009-07-28	23.50	32.30	6.93		
		2009-08-25	25.40	32.30	7.06		
		2009-09-26	24.10	31.85	4.30		
	2011-05-28	18.70	34.79	7.31	0	0	
	저층	2009-05-16	17.42	34.82	7.43		
		2009-06-25	20.66	34.40	5.43		
		2009-07-28	20.50	33.30	2.80		
		2009-08-25	24.80	31.70	4.64		
		2009-09-26	22.90	32.40	4.88		
2011-05-28		15.78	35.00	4.50	0	0	
JR. 6	표층	2009-05-16	18.32	34.62	8.05		
		2009-06-25	23.63	34.07	7.53		
		2009-07-28	24.00	32.20	6.83		
		2009-08-25	26.30	31.20	6.79		
		2009-09-26	24.40	31.80	7.48		
	2011-05-28	18.60	34.94	7.11	0	0	
	저층	2009-05-16	16.89	34.82	7.80		
		2009-06-25	20.88	34.35	4.92		
		2009-07-28	19.50	32.90	3.11		
		2009-08-25	25.70	31.00	4.85		
		2009-09-26	23.80	31.90	8.10		
2011-05-28		15.34	34.97	4.99	0	0	
JR. 7	표층	2009-05-16	19.61	34.53	7.68		
		2009-06-25	26.25	33.26	7.86		
		2009-07-28	24.00	31.20	7.45		
		2009-08-25	25.70	31.20	7.18		
		2009-09-26	24.30	32.55	7.69		
		2010-05-29	18.63	33.10	7.72	0	0
		2010-06-01	22.36	33.42	7.74	0	0
		2010-06-05	24.20	33.69	8.06	0	0
		2010-06-08	24.59	33.93	7.82	0	0
		2010-06-13	22.88	33.91	6.37	0	6

Appendix 2. 계 속 (JR : 자란만)

조사정점	수층	일시	수온(°C)	염분(‰)	DO(mg/l)	<i>C. polykrikoides</i> (Cells/L)	<i>Nematodinium</i> sp. (Cells/L)
		2010-06-16	24.66	34.11	7.37	11	33
		2010-06-19	24.32	34.04	7.16	0	27
		2010-06-21	24.88	34.12	7.23	0	5
		2010-06-25	24.54	34.21	6.68	14	21
		2010-06-28	24.09	33.35	7.32	0	21
		2010-07-03	25.66	32.05	8.43	0	13
		2010-07-06	27.76	32.96	8.80	0	0
		2010-07-09	28.44	33.59	8.54	0	0
		2010-07-14	25.46	30.93	5.76	20	30
		2010-07-17	24.86	20.35	7.40	54	0
		2010-07-20	29.21	27.85	8.47	7	0
		2010-07-25	29.38	30.64	7.42	3	6
		2010-07-29	28.14	30.09	6.75	93	12
		2010-08-02	30.12	31.20	6.70	9	0
		2010-08-06	31.05	31.44	7.30	0	0
		2010-08-12	29.23	23.71	5.79	0	0
		2010-08-17	29.43	31.25	7.52		
		2010-08-22	27.96	31.09	7.41		
	표층	2011-05-14	19.21	34.62	8.00	0	16
JR. 7		2011-05-16	20.01	34.26	8.30	-	-
		2011-05-18	19.44	34.55	9.63	0	0
		2011-05-22	21.33	34.34	7.50	0	0
		2011-05-25	20.57	34.62	7.08	0	0
		2011-05-28	19.10	34.76	7.10	0	0
		2011-06-02	20.72	34.69	6.72	29	14
		2011-06-08	22.61	34.51	7.10	0	0
		2011-06-11	23.75	34.27	7.25	158	32
		2011-06-14	24.24	34.57	7.70	100	29
		2011-06-19	24.01	32.01	6.99	0	11
		2011-06-23	24.17	30.93	7.25	0	0
		2011-07-05	24.66	30.64	7.37	29	21
		2011-07-11	24.87	33.35	7.32	21	0
		2011-07-17	24.75	31.72	7.43	54	0
		2011-07-19	23.50	32.42	5.70	0	0
		2011-07-24	25.50	34.21	4.00	57	0
		2011-08-03	24.86	20.35	7.40	0	0
		2009-05-16	18.76	34.79	7.38		
	저층	2009-06-25	24.73	34.17	7.30		
		2009-07-28	21.50	33.25	5.69		
		2009-08-25	24.60	30.70	6.81		

Appendix 2. 계 속 (JR : 자란만)

조사정점	수층	일시	수온(°C)	염분(‰)	DO(mg/l)	<i>C. polykrikoides</i> (Cells/L)	<i>Nematodinium</i> sp. (Cells/L)
		2009-09-26	23.20	33.00	5.77		
		2010-05-29	17.17	34.03	6.24	0	0
		2010-06-01	-	-	-	-	-
		2010-06-05	-	-	-	-	-
		2010-06-08	-	-	-	-	-
		2010-06-13	-	-	-	-	-
		2010-06-16	20.21	34.21	5.69	6	33
		2010-06-19	-	-	-	-	-
		2010-06-21	20.31	34.31	4.78	0	0
		2010-06-25	-	-	-	-	-
		2010-06-28	21.18	34.34	0.79	0	14
		2010-07-03	-	-	-	-	-
		2010-07-06	-	-	-	-	-
		2010-07-09	-	-	-	-	-
		2010-07-14	-	-	-	-	-
		2010-07-17	-	-	-	-	-
		2010-07-20	-	-	-	-	-
		2010-07-25	-	-	-	-	-
		2010-07-29	25.07	33.04	3.44	63	13
		2010-08-02	-	-	-	-	-
JR. 7	저층	2010-08-06	-	-	-	-	-
		2010-08-12	-	-	-	-	-
		2010-08-17	-	-	-	-	-
		2010-08-22	-	-	-	-	-
		2011-05-14	-	-	-	-	-
		2011-05-16	-	-	-	0	0
		2011-05-18	-	-	-	-	-
		2011-05-22	-	-	-	-	-
		2011-05-25	-	-	-	-	-
		2011-05-28	17.03	34.99	6.26	0	0
		2011-06-02	19.25	34.78	5.69	0	0
		2011-06-08	18.95	34.62	5.42	0	0
		2011-06-11	-	-	-	-	-
		2011-06-14	-	-	-	-	-
		2011-06-19	-	-	-	-	-
		2011-06-23	19.78	34.85	6.26	0	0
		2011-07-05	20.08	34.21	5.20	78	22
		2011-07-11	-	-	-	-	-
		2011-07-17	-	-	-	-	-
		2011-07-19	-	-	-	-	-
		2011-07-24	24.60	34.10	3.53	-	-

Appendix 2. 계 속 (JR : 자란만)

조사정점	수층	일시	수온(°C)	염분(‰)	DO(mg/l)	<i>C. polykrikoides</i> (Cells/L)	<i>Nematodinium</i> sp. (Cells/L)
JR. 7	저층	2011-08-03	-	-	-	-	-
		2009-05-16	19.42	34.63	7.95		
		2009-06-25	25.42	33.70	7.84		
		2009-07-28	24.50	31.80	6.83		
		2009-08-25	25.40	31.80	7.25		
		2009-09-26	24.60	31.50	6.76		
		2010-05-29	18.24	33.44	7.53	0	5
	표층	2010-06-16	23.56	34.20	7.24	28	28
		2010-06-21	24.37	34.28	7.12	0	0
		2010-06-28	23.69	33.00	7.03	0	44
		2010-07-29	27.95	30.26	7.35	236	0
		2011-05-28	19.17	34.79	6.95	0	0
		2011-06-08	23.61	34.62	7.21	0	0
		2011-06-23	23.97	33.29	7.27	0	0
JR. 8		2011-07-05	23.56	31.24	7.24	38	0
		2009-05-16	18.11	34.79	6.85		
		2009-06-25	22.05	34.44	7.93		
		2009-07-28	21.00	32.08	2.07		
		2009-08-25	24.10	30.10	6.82		
		2009-09-26	23.70	34.10	5.97		
		2010-05-29	17.38	33.92	7.10	0	0
	저층	2010-06-16	19.66	34.22	6.51	17	0
		2010-06-21	21.31	34.29	6.50	0	0
		2010-06-28	22.32	34.25	3.18	0	17
		2010-07-29	24.93	32.83	5.13	98	0
		2011-05-28	18.02	34.90	5.34	0	0
		2011-06-08	18.63	34.71	6.01	0	0
		2011-06-23	19.24	34.83	6.52	0	0
		2011-07-05	20.21	34.21	5.69	24	0
		2009-05-16	19.32	34.58	7.85		
		2009-06-25	24.11	33.97	7.55		
	표층	2009-07-28	23.00	32.20	6.69		
		2009-08-25	25.30	31.20	7.04		
		2009-09-26	24.40	31.80	7.20		
JR. 9		2011-05-28	19.26	34.73	6.86	0	0
		2009-05-16	17.57	34.80	7.16		
		2009-06-25	21.56	34.41	7.26		
	저층	2009-07-28	22.00	32.10	2.93		
		2009-08-25	24.70	31.10	2.76		
		2009-09-26	23.15	33.05	4.72		
		2011-05-28	18.06	34.84	7.06	0	0



Appendix 2. 계 속 (JR : 자란만, MJ : 미조)

조사정점	수층	일시	수온(°C)	염분(‰)	DO(mg/l)	<i>C. polykrikoides</i> (Cells/L)	<i>Nematodinium</i> sp. (Cells/L)
JR. 10		2010-05-29	18.33	33.37	7.59	0	0
		2010-06-16	23.87	34.17	7.13	11	11
		2010-06-21	25.11	34.15	7.11	0	6
		2010-06-28	23.93	33.11	7.24	0	14
	표층	2010-07-29	27.97	29.65	7.41	261	0
		2011-05-28	19.02	34.74	7.28	0	9
		2011-06-08	23.86	34.82	6.97	0	0
		2011-06-23	24.47	28.13	7.28	0	0
		2011-07-05	23.87	32.47	7.13	12	8
		2010-05-29	17.22	34.01	6.31	0	5
		2010-06-16	20.08	34.21	5.20	11	17
		2010-06-21	21.09	34.24	5.40	0	16
		2010-06-28	21.55	34.32	3.45	0	14
	저층	2010-07-29	25.50	32.38	4.83	303	0
		2011-05-28	16.41	34.93	5.46	0	0
	2011-06-08	18.37	34.11	5.82	0	0	
	2011-06-23	19.69	34.86	6.92	0	0	
	2011-07-05	19.66	34.22	6.51	56	6	
JR. 11	표층	2011-07-05	24.71	32.77	7.21		
	저층	2011-07-05	19.87	34.21	6.34		
MJ. 1		2011-07-26	23.46	33.25	6.10	200	0
		2011-08-11	25.51	28.70	6.86	0	0
	표층	2011-08-18	24.39	32.35	6.08	0	0
		2011-08-24	22.83	31.93	6.64	42	0
		2011-08-29	22.73	31.25	6.51	0	0
		2011-07-26	22.12	34.05	4.71	0	24
		2011-08-11	22.47	33.33	3.28	0	5
	저층	2011-08-18	18.40	34.23	2.25	0	0
		2011-08-24	18.13	34.39	1.45	0	0
		2011-08-29	17.52	34.62	2.25	0	0
MJ. 2		2011-07-26	23.63	33.10	5.55	0	0
		2011-08-11	25.61	28.67	6.77	0	0
	표층	2011-08-18	24.19	32.31	6.23	0	0
		2011-08-24	22.85	31.94	6.22	6	0
		2011-08-29	22.94	31.85	6.82	0	0
		2011-07-26	22.22	34.01	5.16	50	0
		2011-08-11	24.41	32.38	4.95	0	10
	저층	2011-08-18	17.79	34.44	2.57	0	0
		2011-08-24	18.17	34.30	1.59	0	10
		2011-08-29	17.29	34.70	2.91	0	0
MJ. 3	표층	2011-08-24	22.79	31.93	6.82	24	5

Appendix 2. 계 속 (MJ : 미조, SR : 사량도)

조사정점	수층	일시	수온(°C)	염분(‰)	DO(mg/l)	<i>C. polykrikoides</i> (Cells/L)	<i>Nematodinium</i> sp. (Cells/L)
MJ. 3	저층	2011-08-24	18.95	34.21	4.29	6	6
MJ. 4	표층	2011-08-24	22.82	31.98	6.81	17	8
	저층	2011-08-24	17.56	34.54	2.52	0	0
MJ. 6	표층	2011-07-26	23.24	33.44	5.54	20	0
		2011-08-11	25.58	28.53	6.86	0	0
		2011-08-18	24.32	32.34	6.56	0	0
		2011-08-29	23.51	32.41	6.14	0	0
	저층	2011-07-26	22.17	34.03	4.81	15	0
		2011-08-11	19.78	34.20	3.30	0	0
		2011-08-18	17.30	34.26	2.71	0	0
MJ. 10	표층	2011-08-29	17.85	34.93	3.41	0	0
		2011-07-26	23.33	33.37	4.52	0	0
		2011-08-11	25.80	27.79	6.51	0	6
		2011-08-18	24.16	32.24	6.77	0	0
	저층	2011-08-29	23.86	31.78	6.34	0	0
		2011-07-26	22.38	33.92	4.99	0	0
		2011-08-11	18.44	34.16	3.88	0	0
MJ. 10	저층	2011-08-18	18.15	34.52	2.41	0	0
		2011-08-29	17.59	34.17	2.61	0	0
SR. 1	표층	2010-07-27	24.86	32.24	7.33	69	0
		2010-08-27	25.42	31.58	7.30		
		2010-09-16	25.07	30.01	10.13		
		2011-07-21	24.16	34.23	7.30	0	0
		2011-08-05	24.51	33.51	6.73	0	0
	저층	2010-07-27	19.06	34.34	5.06	8	0
		2010-08-27	18.88	34.15	4.18		
SR. 2	표층	2010-09-16	20.99	32.65	4.37		
		2011-07-21	19.22	34.27	3.16	0	0
		2011-08-05	20.51	32.87	6.31	0	0
		2010-08-27	25.22	31.68	7.20		
	저층	2010-09-16	25.06	29.95	8.99		
		2011-07-21	24.66	34.20	7.37	69	0
		2011-08-05	24.64	33.23	6.92	0	0
SR. 3	표층	2010-08-27	18.92	34.24	4.49		
		2010-09-16	21.70	32.30	4.55		
		2011-07-21	20.08	34.21	5.20	500	0
		2011-08-05	20.21	32.52	5.98	0	0
SR. 3	표층	2010-08-27	25.18	31.69	7.26		
		2010-09-16	25.38	30.00	9.38		
		2011-07-21	23.56	34.11	7.24	0	0
		2011-08-05	24.31	33.17	6.98	0	0

Appendix 2. 계 속 (SR : 사랑도, YJ : 옥지도)

조사정점	수층	일시	수온(°C)	염분(‰)	DO(mg/l)	<i>C. polykrikoides</i> (Cells/L)	<i>Nematodinium</i> sp. (Cells/L)
SR. 3	저층	2010-08-27	19.00	34.07	4.19		
		2010-09-16	20.98	32.25	4.17		
		2011-07-21	20.21	34.21	5.69	0	0
		2011-08-05	19.89	32.21	5.89	0	0
SR. 4	표층	2010-07-27	24.67	32.47	7.49	45	0
		2010-08-27	24.91	31.83	7.20		
		2010-09-16	25.92	30.05	8.75		
		2011-07-21	23.87	34.17	7.13	0	0
	2011-08-05	24.41	33.31	7.02	0	0	
	2010-07-27	19.80	34.23	5.02	155	0	
	2010-08-27	18.85	34.24	4.49			
	2010-09-16	20.13	32.85	3.93			
SR. 5	표층	2010-07-27	24.35	32.77	7.35	58	0
	저층	2010-07-27	19.08	34.34	5.81	202	0
YJ. 1	표층	2010-08-23	26.50	32.47	7.28		
	저층	2010-08-23	15.17	34.74	4.31		
YJ. 2	표층	2010-08-23	26.66	32.56	7.42		
YJ. 2	저층	2010-08-23	17.42	34.00	4.71		
YJ. 3	표층	2010-08-23	26.36	32.55	7.50		
		2011-08-04	25.47	33.20	6.64	0	0
		2011-08-17	26.19	31.33	7.28	0	0
		2011-08-30	25.76	31.52	6.89	0	6
		2011-09-07	25.15	33.76	6.91	0	0
	2011-09-25	26.31	32.57	6.01	0	0	
	저층	2010-08-23	16.86	34.12	4.40		
		2011-08-04	23.16	33.56	6.79	0	0
2011-08-17		17.58	34.65	5.02	0	0	
YJ. 4	표층	2011-08-30	21.94	34.05	5.24	0	8
		2011-09-07	21.00	33.74	5.34	41	0
		2011-09-25	23.17	33.52	6.24	0	0
		2010-08-23	25.74	32.73	7.56		
		2011-08-04	25.03	33.22	6.76	0	7
	2011-08-17	25.87	31.56	6.79	0	0	
저층	2011-08-30	24.95	31.03	6.51	0	0	
	2011-09-07	25.98	33.53	6.59	0	0	
	2011-09-25	24.01	32.96	5.80	0	0	
YJ. 4	저층	2010-08-23	16.10	34.27	4.25		
		2011-08-04	21.90	33.77	6.83	0	0
		2011-08-17	16.13	34.75	4.95	0	0

Appendix 2. 계 속 (YJ : 육지도)

조사정점	수층	일시	수온(°C)	염분(‰)	DO(mg/l)	<i>C. polykrikoides</i> (Cells/L)	<i>Nematodinium</i> sp. (Cells/L)
		2011-08-30	22.85	34.11	6.11	4	4
YJ. 4	저층	2011-09-07	22.53	33.96	5.21	0	0
		2011-09-25	23.09	33.86	6.50	0	0

Appendix 3-1. Real-time PCR Data - Seawater Sample, 0m (2009~2011, JR : 자란만)

조사정점	일시	Ct	Calc Conc (Cells/L)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
JR. 1	2011-5-28	-	-	-	
JR. 2	2011-5-28	-	-	-	
JR. 3	2011-5-28	-	-	-	
	2009-05-31	-	20	-	
	2009-06-01		non-sample		
	2009-06-02	-	20	-	
	2009-06-03		non-sample		
	2009-06-04	-	320	-	
	2009-06-05		non-sample		
	2009-06-06	-	220	-	
	2009-06-07		non-sample		
	2009-06-08	-	367	-	
	2009-06-09	-	40	-	
	2009-06-10		non-sample		
	2009-06-16	-	40	-	
	2009-06-17		non-sample		
	2009-06-18	-	160	-	
	2009-06-19	-	433	-	
	2009-06-20		non-sample		
	2009-07-08	-	13	-	
JR. 4	2010-05-29	-	20	-	
	2010-06-16	-	11	-	
	2010-06-21	-	9	-	
	2010-06-28	-	12	-	
	2010-07-03	-	40	-	
	2010-07-06	-	24	-	
	2010-07-09	-	13	-	
	2010-07-14	-	260	-	
	2010-07-17	-	45	-	
	2010-07-20	-	60	-	
	2010-07-25	-	64	-	
	2010-07-29	-	80	-	
	2010-08-02	-	340	-	
	2010-08-06	-	20	-	
	2010-08-12	-	33	-	
	2011-5-7	-	-	-	
	2011-5-14	-	-	-	
	2011-5-16	-	-	-	
	2011-5-18	-	-	-	

Appendix 3-1. 계 속 (JR : 자란만)

조사정점	일시	Ct	Calc Conc (Cells/L)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
	2011-5-22	-	-	-	
	2011-5-25	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
	2011-6-2	37.28	20	0.5	
	2011-6-8	-	-	-	
	2011-6-11	37.17	24	0.6	
	2011-6-14	38.53	8	0.2	
JR. 4	2011-6-19	36.48	36	0.9	
	2011-6-23	-	-	-	
	2011-7-5	38.53	8	0.2	
	2011-7-11	37.79	16	0.4	
	2011-7-17	38.49	8	0.2	
	2011-7-19	-	-	-	
	2011-7-24	30.62	80	2	
	2011-8-3	-	-	-	
JR. 5	2011-5-28	-	-	-	
JR. 6	2011-5-28	-	-	-	
	2009-05-31	-	47	-	
	2009-06-01	-	100	-	
	2009-06-02	-	260	-	
	2009-06-03	-	40	-	
	2009-06-04	-	140	-	
	2009-06-05	-	180	-	
	2009-06-06	-	3713	-	
	2009-06-07	-	40	-	
	2009-06-08	-	1193	-	
	2009-06-09	-	220	-	
	2009-06-10	-	-	-	
JR. 7	2009-06-16	-	53	-	
	2009-06-17	-	20	-	
	2009-06-18	-	140	-	
	2009-06-19	-	20	-	
	2009-06-20	-	20	-	
	2009-07-08	-	40	-	
	2010-05-29	-	60	-	
	2010-06-16	-	13	-	
	2010-06-21	-	9	-	
	2010-06-28	-	20	-	
	2010-07-03	-	20	-	
	2010-07-06	-	22	-	



Appendix 3-1. 계 속 (JR : 자란만)

조사정점	일시	Ct	Calc Conc (Cells/L)	Calc Conc (copies/reaction)	비고	
JR. 7	2010-07-14	-	67	-		
	2010-07-17	-	587	-		
	2010-07-20	-	20	-		
	2010-07-25	-	66	-		
	2010-07-29	-	100	-		
	2010-08-02	-	93	-		
	2010-08-06	-	33	-		
	2010-08-12	-	41	-		
	2011-3-19	-	-	-		
	2011-5-7	-	-	-		
	2011-5-14	-	-	-		
	2011-5-16	-	-	-		
	2011-5-18	-	-	-		
	2011-5-22	-	-	-		
	2011-5-25	-	-	-		
	2011-5-28	-	-	-		
	2011-6-2	39.61	4	0.1		
	2011-6-8	37.95	12	0.3		
	2011-6-11	34.06	212	5.3		
	2011-6-14	37.65	16	0.4		
	2011-6-19	39.42	4	0.1		
	2011-6-23	-	-	-		
	2011-7-5	38.79	8	0.2		
	2011-7-11	41.4	-	-		
	2011-7-17	41.52	-	-		
	2011-7-19	-	-	-		
	2011-7-24	31.74	40	1		
	2011-8-3	-	-	-		
	JR. 8	2010-05-29	-	11	-	
		2010-06-16	-	10	-	
2010-06-21		-	7	-		
2010-06-28		-	60	-		
2010-07-29		-	40	-		
2011-4-19		-	-	-		
2011-5-28		-	-	-		
2011-6-8		37.28	20	0.5		
2011-6-23		-	-	-		
2011-7-5		40.31	4	0.1		
JR. 9	2011-4-19	-	-	-		
	2011-5-28	-	-	-		



JR. 10    2010-05-29    -                    20                    -

Appendix 3-1. 계 속 (JR : 자란만, MJ : 미조)

조사정점	일시	Ct	Calc Conc (Cells/L)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
	2010-06-16	-	20	-	
	2010-06-21	-	14	-	
	2010-06-28	-	6	-	
	2010-07-29	-	6	-	
JR. 10	2011-4-19	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
	2011-6-8	-	-	-	
	2011-6-23	-	-	-	
	2011-7-5	39.85	4	0.1	
	2009-05-31		non-sample		
	2009-06-01	-	40	-	
	2009-06-02		non-sample		
	2009-06-03	-	32	-	
	2009-06-04		non-sample		
	2009-06-05	-	40	-	
	2009-06-06		non-sample		
	2009-06-07	-	40	-	
JR. 11	2009-06-08		non-sample		
	2009-06-09		non-sample		
	2009-06-10		non-sample		
	2009-06-16		non-sample		
	2009-06-17	-	20	-	
	2009-06-18		non-sample		
	2009-06-19		non-sample		
	2009-06-20	-	14	-	
	2009-07-08		non-sample		
	2011-7-26	-	-	-	
	2011-8-11	-	-	-	
MJ. 1	2011-8-18	31.61	40	1	
	2011-8-24	29.45	320	8	
	2011-8-29	-	-	-	
	2011-7-26	-	-	-	
	2011-8-11	-	-	-	
MJ. 2	2011-8-18	31.36	40	1	
	2011-8-24	31.26	40	1	
	2011-8-29	-	-	-	
	2011-7-26	-	-	-	
	2011-8-11	-	-	-	
MJ. 6	2011-8-18	30.09	160	4	

2011-8-24	38.67	-	-
2011-8-29	31.16	40	1

Appendix 3-1. 계 속 (MJ : 미조, SR : 사랑도, YJ : 옥지도)

조사정점	일시	Ct	Calc Conc (Cells/L)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
MJ. 10	2011-7-26	-	-	-	
	2011-8-11	-	-	-	
	2011-8-18	30.57	80	2	
	2011-8-24	31.04	40	1	
	2011-8-29	-	-	-	
SR. 1	2011-7-21	-	-	-	
	2011-8-5	-	-	-	
SR. 2	2011-7-21	-	-	-	
	2011-8-5	-	-	-	
SR. 3	2011-7-21	-	-	-	
	2011-8-5	-	-	-	
SR. 4	2011-7-21	-	-	-	
	2011-8-5	-	-	-	
YJ. 3	2011-8-4	-	-	-	
	2011-8-17	-	-	-	
	2011-8-30	-	-	-	
	2011-9-7	-	-	-	
	2011-9-25	-	-	-	
YJ. 4	2011-8-4	-	-	-	
	2011-8-17	-	-	-	
	2011-8-30	-	-	-	
	2011-9-7	-	-	-	
	2011-9-25	-	-	-	

Appendix 3-2. Real-time PCR Data - Seawater Sample, b-1m (2009~2011, JR : 자란만)

조사 정점	일시	Ct	Calc Conc (Cells/L)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
JR. 1	2011-5-28	-	-	-	
JR. 2	2011-5-28	-	-	-	
JR. 3	2011-5-28	-	-	-	
	2010-06-16	-	8	-	
	2010-06-21	-	12	-	
	2010-06-28	-	-	-	
	2010-07-29	-	47	-	
	2011-5-7	-	-	-	
	2011-5-14	-	-	-	
	2011-5-16	-	-	-	
	2011-5-18	-	-	-	
	2011-5-22	-	-	-	
	2011-5-25	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
JR. 4	2011-6-2	40.28	4	0.1	
	2011-6-8	-	-	-	
	2011-6-11	-	-	-	
	2011-6-14	-	-	-	
	2011-6-19	-	-	-	
	2011-6-23	-	-	-	
	2011-7-5	39.42	4	0.1	
	2011-7-11	-	-	-	
	2011-7-17	-	-	-	
	2011-7-19	-	-	-	
	2011-7-24	39.85	0	0	
	2011-8-3	-	-	-	
JR. 5	2011-5-28	-	-	-	
JR. 6	2011-5-28	-	-	-	
	2009-05-31		non-sample		
	2009-06-01	-	30	-	
	2009-06-02		non-sample		
	2009-06-03	-	13	-	
	2009-06-04		non-sample		
JR. 7	2009-06-05	-	32	-	
	2009-06-06		non-sample		
	2009-06-07	-	7	-	
	2009-06-08		non-sample		
	2009-06-09		non-sample		
	2009-06-10		non-sample		

Appendix 3-2. 계 속 (JR : 자란만)

조사 정점	일시	Ct	Calc Conc (Cells/L)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
	2009-06-16		non-sample		
	2009-06-17		non-sample		
	2009-06-18		non-sample		
	2009-06-19		non-sample		
	2009-06-20		non-sample		
	2009-07-08		non-sample		
	2010-06-16	-	9	-	
	2010-06-21	-	12	-	
	2010-06-28	-	-	-	
	2010-07-29	-	22	-	
	2011-3-19	-	-	-	
	2011-5-7	-	-	-	
	2011-5-14	-	-	-	
	2011-5-16	-	-	-	
JR. 7	2011-5-18	-	-	-	
	2011-5-22	-	-	-	
	2011-5-25	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
	2011-6-2	-	-	-	
	2011-6-8	-	-	-	
	2011-6-11	-	-	-	
	2011-6-14	-	-	-	
	2011-6-19	-	-	-	
	2011-6-23	-	-	-	
	2011-7-5	31.8	1052	26.3	
	2011-7-11	-	-	-	
	2011-7-17	-	-	-	
	2011-7-19	-	-	-	
	2011-7-24	30.27	120	3	
	2011-8-3	-	-	-	
	2010-06-16	-	9	-	
	2010-06-21	-	7	-	
	2010-06-28	-	-	-	
	2010-07-29	-	26	-	
JR. 8	2011-4-19	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
	2011-6-8	-	-	-	
	2011-6-23	-	-	-	
	2011-7-5	32.74	540	13.5	
IR. a	2011-4-19	-	-	-	



Appendix 3-2. 계 속 (JR : 자란만, MJ : 미조)

조사 정점	일시	Ct	Calc Conc (Cells/L)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
JR. 10	2010-06-16	-	6	-	
	2010-06-21	-	5	-	
	2010-06-28	-	-	-	
	2010-07-29	-	20	-	
	2011-4-19	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
	2011-6-8	-	-	-	
	2011-6-23	-	-	-	
	2011-7-5	33.09	424	10.6	
JR. 11	2009-05-31		non-sample		
	2009-06-01	-	12	-	
	2009-06-02		non-sample		
	2009-06-03	-	7	-	
	2009-06-04		non-sample		
	2009-06-05	-	9	-	
	2009-06-06		non-sample		
	2009-06-07	-	6	-	
	2009-06-08		non-sample		
	2009-06-09		non-sample		
	2009-06-10		non-sample		
	2009-06-16		non-sample		
	2009-06-17		non-sample		
	2009-06-18		non-sample		
	2009-06-19		non-sample		
2009-06-20		non-sample			
2009-07-08		non-sample			
MJ. 1	2011-7-26	-	-	-	
	2011-8-11	-	-	-	
	2011-8-18	-	-	-	
	2011-8-24	-	-	-	
	2011-8-29	-	-	-	
MJ. 2	2011-7-26	-	-	-	
	2011-8-11	-	-	-	
	2011-8-18	31.95	40	1	
	2011-8-24	-	-	-	
	2011-8-29	-	-	-	
MJ. 6	2011-7-26	-	-	-	
	2011-8-11	-	-	-	
	2011-8-18	-	-	-	
	2011-8-24	-	-	-	



Appendix 3-2. 계 속 (MJ : 미조, SR : 사랑도, YJ : 욱지도)

조사 정점	일시	Ct	Calc Conc (Cells/L)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
MJ. 10	2011-7-26	-	-	-	
	2011-8-11	-	-	-	
	2011-8-18	-	-	-	
	2011-8-24	-	-	-	
	2011-8-29	-	-	-	
SR. 1	2011-7-21	-	-	-	
	2011-8-5	-	-	-	
SR. 2	2011-7-21	-	-	-	
	2011-8-5	-	-	-	
SR. 3	2011-7-21	-	-	-	
	2011-8-5	-	-	-	
SR. 4	2011-7-21	-	-	-	
	2011-8-5	-	-	-	
YJ. 3	2011-8-4	-	-	-	
	2011-8-17	-	-	-	
	2011-8-30	-	-	-	
	2011-9-7	-	-	-	
	2011-9-25	-	-	-	
YJ. 4	2011-8-4	-	-	-	
	2011-8-17	-	-	-	
	2011-8-30	-	-	-	
	2011-9-7	31.08	40	1	
	2011-9-25	32.02	40	1	



Appendix 3-3. Real-time PCR Data - Sediment (2009~2011, JR : 자란만)

조사 정점	일시	Ct	Calc Conc (copies/g)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
JR. 1	2009-05-16	-	-	-	
	2009-06-25	-	-	-	
	2009-07-28	-	-	-	
	2009-08-25	-	-	-	
	2009-09-26	-	-	-	
	2009-10-20	-	-	-	
	2010-03-20	-	-	-	
	2010-04-24	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
JR. 2	2009-05-16	-	-	-	
	2009-06-25	-	-	-	
	2009-07-28	-	-	-	
	2009-08-25	-	-	-	
	2009-09-26	-	-	-	
	2009-10-20	-	-	-	
	2010-03-20	-	-	-	
	2010-04-24	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
JR. 3	2009-05-16	-	-	-	
	2009-06-25	-	-	-	
	2009-07-28	-	-	-	
	2009-08-25	-	-	-	
	2009-09-26	-	-	-	
	2009-10-20	-	-	-	
	2010-03-20	-	-	-	
	2010-04-24	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
JR. 4	2009-05-16	-	-	-	
	2009-06-25	-	2	-	
	2009-07-28	-	1	-	
	2009-08-25	-	1	-	
	2009-09-26	-	1	-	
	2009-10-20	-	2	-	
	2010-03-20	-	2	-	
	2010-04-24	-	-	-	
	2010-05-29	-	3	-	
	2010-06-16	-	-	-	
	2010-06-21	-	-	-	
	2010-07-27	-	-	-	

Appendix 3-3. 계 속 (JR : 자란만)

조사 정점	일시	Ct	Calc Conc (copies/g)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
JR. 4	2010-08-29	-	-	-	
	2010-09-26	-	-	-	
	2010-10-25	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
	2011-6-8	-	-	-	
	2011-6-23	-	-	-	
	2011-7-5	-	-	-	
JR. 5	2009-05-16	-	-	-	
	2009-06-25	-	-	-	
	2009-07-28	-	-	-	
	2009-08-25	-	-	-	
	2009-09-26	-	-	-	
	2009-10-20	-	-	-	
	2010-03-20	-	-	-	
	2010-04-24	-	-	-	
2011-5-28	-	-	-		
JR. 6	2009-05-16	-	-	-	
	2009-06-25	-	-	-	
	2009-07-28	-	-	-	
	2009-08-25	-	-	-	
	2009-09-26	-	-	-	
	2009-10-20	-	-	-	
	2010-03-20	-	-	-	
	2010-04-24	-	-	-	
2011-5-28	-	-	-		
JR. 7	2009-05-16	-	-	-	
	2009-06-25	-	-	-	
	2009-07-28	-	1	-	
	2009-08-25	-	2	-	
	2009-09-26	-	-	-	
	2009-10-20	-	-	-	
	2010-03-20	-	1	-	
	2010-04-24	-	2	-	
	2010-05-29	-	5	-	
	2010-06-16	-	1	-	
	2010-06-21	-	2	-	
	2010-07-27	-	-	-	
	2010-08-29	-	-	-	
	2010-09-26	-	-	-	
2010-10-25	-	-	-		

2011-5-28 - - -

Appendix 3-3. 계 속 (JR : 자란만)

조사 정점	일시	Ct	Calc Conc (copies/g)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
JR. 7	2011-6-8	-	-	-	
	2011-6-23	-	-	-	
	2011-7-5	-	-	-	
JR. 8	2009-05-16	-	-	-	
	2009-06-25	-	1.7	-	
	2009-07-28	-	1	-	
	2009-08-25	-	3.3	-	
	2009-09-26	-	2	-	
	2009-10-20	-	-	-	
	2010-03-20	-	-	-	
	2010-04-24	-	-	-	
	2010-05-29	-	10	-	
	2010-06-16	-	2	-	
	2010-06-21	-	-	-	
	2010-07-27	-	-	-	
	2010-08-29	-	-	-	
	2010-09-26	-	-	-	
	2010-10-25	-	-	-	
	2011-4-19	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
	2011-6-8	-	-	-	
2011-6-23	-	-	-		
2011-7-5	-	-	-		
JR. 9	2009-05-16	-	-	-	
	2009-06-25	-	-	-	
	2009-07-28	-	-	-	
	2009-08-25	-	-	-	
	2009-09-26	-	-	-	
	2009-10-20	-	-	-	
	2010-03-20	-	-	-	
	2010-04-24	-	-	-	
	2011-4-19	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
JR. 10	2009-05-16	-	1	-	
	2009-06-25	-	2.3	-	
	2009-07-28	-	2	-	
	2009-08-25	-	3	-	
	2009-09-26	-	-	-	
	2009-10-20	-	-	-	
	2010-03-20	-	-	-	

2010-04-24 - 2 -

Appendix 3-3. 계 속 (JR : 자란만, MJ : 미조)

조사 정점	일시	Ct	Calc Conc (copies/g)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
JR. 10	2010-05-29	-	8	-	
	2010-06-16	-	5	-	
	2010-06-21	-	-	-	
	2010-07-27	-	-	-	
	2010-08-29	-	-	-	
	2010-09-26	-	-	-	
	2010-10-25	-	-	-	
	2011-4-19	-	-	-	
	2011-5-28	-	-	-	
	2011-6-8	-	-	-	
	2011-6-23	-	-	-	
	2011-7-5	-	-	-	
	MJ. 1	2009-05-02	-	2	-
2009-08-14		-	3	-	
2011-7-26		-	-	-	
2011-8-11		-	-	-	
2011-8-18		-	-	-	
2011-8-24		-	-	-	
2011-8-29		-	-	-	
MJ. 2	2009-05-02	-	2	-	
	2009-08-14	-	1	-	
	2011-7-26	-	-	-	
	2011-8-11	-	-	-	
	2011-8-18	-	-	-	
	2011-8-24	-	-	-	
	2011-8-29	-	-	-	
MJ. 3	2009-05-02	-	-	-	
	2009-08-14	-	-	-	
MJ. 4	2009-05-02	-	-	-	
	2009-08-14	-	-	-	
MJ. 5	2009-05-02	-	-	-	
	2009-08-14	-	-	-	
MJ. 6	2009-05-02	-	2	-	
	2009-08-14	-	-	-	
	2011-7-26	-	-	-	
	2011-8-11	-	-	-	
	2011-8-18	-	-	-	
	2011-8-24	-	-	-	
	2011-8-29	-	-	-	

MJ. 7	2009-05-02	-	-	-
	2009-08-14	-	-	-

Appendix 3-3. 계 속 (MJ : 미조, SR : 사랑도)

조사 정점	일시	Ct	Calc Conc (copies/g)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
MJ. 8	2009-05-02	-	-	-	
	2009-08-14	-	-	-	
MJ. 9	2009-05-02	-	-	-	
	2009-08-14	-	-	-	
MJ. 10	2009-05-02	-	2	-	
	2009-08-14	-	-	-	
	2011-7-26	-	-	-	
	2011-8-11	-	-	-	
	2011-8-18	-	-	-	
	2011-8-24	-	-	-	
	2011-8-29	-	-	-	
MJ. 11	2009-05-02	-	-	-	
	2009-08-14	-	-	-	
MJ. 12	2009-05-02	-	-	-	
	2009-08-14	-	-	-	
MJ. 13	2009-05-02	-	1	-	
	2009-08-14	-	-	-	
MJ. 14	2009-05-02	-	-	-	
	2009-08-14	-	-	-	
MJ. 15	2009-05-02	-	2	-	
	2009-08-14	-	-	-	
MJ. 16	2009-05-02	-	-	-	
	2009-08-14	-	-	-	
SR. 1	2009-06-25	-	-	-	
	2009-07-26	-	-	-	
	2009-07-28	-	-	-	
	2009-08-25	-	-	-	
	2009-09-26	-	-	-	
	2009-10-25	-	-	-	
	2010-03-20	-	-	-	
	2010-04-24	-	1	-	
	2010-05-16	-	-	-	
2010-07-27	-	-	-		
2011-7-21	-	-	-		
2011-8-5	-	-	-		
SR. 2	2009-06-25	-	-	-	
	2009-07-26	-	-	-	
	2009-07-28	-	-	-	

SR. 2	2009-08-25	-	-	-
	2009-09-26	-	-	-
	2009-10-25	-	-	-

Appendix 3-3. 계 속 (SR : 사랑도, TY : 통영)

조사 정점	일시	Ct	Calc Conc (copies/g)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
SR. 2	2010-03-20	-	-	-	
	2010-04-24	-	3	-	
	2010-05-16	-	-	-	
	2010-07-27	-	-	-	
	2011-7-21	-	-	-	
	2011-8-5	-	-	-	
SR. 3	2009-06-25	-	-	-	
	2009-07-26	-	-	-	
	2009-07-28	-	-	-	
	2009-08-25	-	-	-	
	2009-09-26	-	-	-	
	2009-10-25	-	-	-	
	2010-03-20	-	-	-	
	2010-04-24	-	1	-	
	2010-05-16	-	-	-	
	2010-07-27	-	-	-	
	2011-7-21	-	-	-	
2011-8-5	-	-	-		
SR. 4	2009-06-25	-	-	-	
	2009-07-26	-	-	-	
	2009-07-28	-	-	-	
	2009-08-25	-	-	-	
	2009-09-26	-	-	-	
	2009-10-25	-	-	-	
	2010-03-20	-	-	-	
	2010-04-24	-	1	-	
	2010-05-16	-	-	-	
	2010-07-27	-	-	-	
	2011-7-21	-	-	-	
2011-8-5	-	-	-		
TY. 1	2010-04-12	-	-	-	
	2010-07-01	-	3	-	
TY. 2	2010-04-12	-	-	-	
	2010-07-01	-	-	-	
TY. 3	2010-04-12	-	-	-	
	2010-07-01	-	-	-	
TY. 4	2010-04-12	-	-	-	

	2010-07-01	-	-	-
TY. 5	2010-04-12	-	-	-
	2010-07-01	-	-	-
TY. 6	2010-04-12	-	-	-

Appendix 3-3. 계 속 (TY : 통영, WD : 완도, YJ : 옥지도)

조사 정점	일시	Ct	Calc Conc (copies/g)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
TY. 6	2010-07-01	-	-	-	
TY. 7	2010-04-12	-	-	-	
	2010-07-01	-	-	-	
TY. 8	2010-04-12	-	-	-	
	2010-07-01	-	-	-	
TY. 9	2010-04-12	-	-	-	
	2010-07-01	-	1	-	
TY. 10	2010-04-12	-	-	-	
	2010-07-01	-	-	-	
TY. 11	2010-04-12	-	-	-	
	2010-07-01	-	-	-	
TY. 12	2010-04-12	-	-	-	
	2010-07-01	-	-	-	
TY. 13	2010-04-12	-	-	-	
	2010-07-01	-	-	-	
TY.	A	2011-3-26	-	-	
	B	2011-3-26	-	-	
	C	2011-3-26	-	-	
	D	2011-3-26	-	-	
	G	2011-3-26	-	-	
	G2	2011-3-26	-	-	
	H	2011-3-26	-	-	
	I	2011-3-26	-	-	
	L	2011-3-26	-	-	
	M	2011-3-26	-	-	
WD. 3	1	2010-04-22	-	-	
	2	2010-04-22	-	-	
	4	2010-04-22	-	-	
	5	2010-04-22	-	1	
	YJ. 1	2009-08-20	-	-	-
2010-08-23		-	-	-	
YJ. 2	2009-08-20	-	1	-	
	2010-08-23	-	-	-	
	2009-08-20	-	-	-	
	2010-08-23	-	-	-	



	2011-8-4	-	-	-
YJ. 3	2011-8-17	-	-	-
	2011-8-30	-	-	-
	2011-9-7	-	-	-
	2011-9-25	-	-	-

Appendix 3-3. 계 속 (YJ : 육지도, YS : 여수)

조사 정점	일시	Ct	Calc Conc (copies/g)	Calc Conc (copies/reaction)	비고
	2009-08-20	-	-	-	
	2010-08-23	-	-	-	
	2011-8-4	-	-	-	
YJ. 4	2011-8-17	-	-	-	
	2011-8-30	-	-	-	
	2011-9-7	-	-	-	
	2011-9-25	-	-	-	
YS. 1	2010-04-12	-	2	-	
	2010-06-16	-	-	-	
YS. 2	2010-04-12	-	1	-	
	2010-06-16	-	-	-	
YS. 3	2010-04-12	-	-	-	
	2010-06-16	-	-	-	
YS. 4	2010-04-12	-	1	-	
	2010-06-16	-	-	-	
YS. 5	2010-04-12	-	1	-	
	2010-06-16	-	-	-	