

염분 구배가 *Cochlodinium polykrikoides* Margalef의 수직이동 및 DNA/RNA 비율에 미치는 영향

조은섭* · 이영식

국립수산과학원 남해수산연구소

Received January 14, 2005 / Accepted June 8, 2005

Effect of Salinity-stratified Waters on Upward Migration and Ratio of Extracted DNA/RNA in *Cochlodinium polykrikoides* Margalef Based on the Ratio of Absorbance at 260 and 280 nm. Eun Seob Cho* and Young Sik Lee. South Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Yeosu 556-823, South Korea – The coastal regions of Yeosu, the South Sea of Korea, has occurred annually the red tide which is caused by potentially ichthyotoxic dinoflagellate *C. polykrikoides*, with a wide avenue for exchange with oceanic waters and freshwater runoff from Sumjin river. We attempted to examine the variability in response to vertical migration and concentration of extracted DNA/RNA of *C. polykrikoides* exposed to salinity-stratified waters. The experimental aquarium of the 60 liter was employed to culture *C. polykrikoides*. One aquarium was supplied with only sea water, the other was consisted of sea water and freshwater. Experiment was conducted for 5 days. In experimental column (mixture of freshwater and sea water), salinity was maintained to 20 at upper and approximately 30 at bottom during the period of this study. The fluctuation with related to dissolved oxygen and pH was similar pattern to both columns. Chlorophyll *a* was significantly higher value at upper than bottom. During 24 h, chlorophyll *a* on experimental column was extremely high on the top as soon as lighting, compared with control. With elapsed time, the gap between experimental and control columns was a little. In darkness, chlorophyll *a* was not significantly different between upper and bottom, most cells appeared to randomly distribute on column regardless of water layer. Fluctuation with related to concentration of extracted DNA and RNA based on ratio of absorbance of 260 and 280 nm in experimental column was higher at final day or diel migration than control. These results implied that a large volume of freshwater could be associated with influence of concentration of DNA and RNA, in particular, rapid upward movement caused massive fish kills as soon as sunset.

Key words – *C. polykrikoides*, DNA, fish kills, freshwater, red tide, RNA, salinity, vertical migration

여수연안 해역은 외해로부터 대마난류, 한국연안 고유수 등과 같은 다양한 수괴의 영향을 받을 수 있을 뿐만 아니라 섬진강으로부터 담수의 영향을 많이 받고 있는 것이 큰 특징인 관계로 오래 전부터 해양수산자원의 산란 및 육성장으로 광범위하게 이용되고 있다[16,22]. 또한 매년 여름철에 유해성 *Cochlodinium polykrikoides* Margalef 적조 발생 및 형성 지역으로 잘 알려져 있다[27]. *C. polykrikoides* 대규모로 적조가 형성되면 세포자체내의 점액질 성분이 많아지고 바다의 점성 또한 높아져서 어류의 아가미를 막아 질식을 유발시킨다 [3]. 따라서 *C. polykrikoides* 적조가 수면위로 부상되어 가두리 양식장에 들어오면 전량 폐사시킬 수 있다. 실질적으로 남해도를 대상으로 시간별 *C. polykrikoides*의 수직이동을 측정 한 결과 일출되는 시간에 수면으로 부상되어 오전 11:00 경에 대부분의 세포가 밀집되며, 일몰 경에는 대부분의 세포가 하층으로 신속하게 이동한다고 한다[21]. 이처럼 상·하층으로 이동하는 속도가 다른 적조생물에 비해서 빠르다고

하였다[21]. 빠른 수직이동으로 인해 *C. polykrikoides* 적조로 인한 어류 폐사는 예상보다 훨씬 클 것으로 생각된다. 그러나 여기에 대한 연구는 다소 미흡한 것이 사실이다.

여수연안 중 돌산은 섬진강의 영향을 가장 많이 받는 해역으로 염분이 상당히 낮은 관계로 어떤 연구자에 의하면 *C. polykrikoides* 적조를 일으킬 수 있는 요인으로 설명하는 경우도 있다. 또한 돌산해역에는 가두리 어류양식장이 많아서 *C. polykrikoides*의 빠른 수직상승에 의한 적조피해는 매우 높을 수 있기 때문에 적조로 인한 피해를 최소화 시키는데 *C. polykrikoides*의 생리적 리듬인 수직이동에 관한 연구는 중요하다고 할 수 있다. 와편모조류의 수직이동 기작을 빛[7,26], 영양염[5,18], 광합성[15], 포식압[9,24] 등으로 설명하고 있으나, 염분의 영향에 의한 *C. polykrikoides*의 수직이동에 미치는 연구보고는 거의 미진한 실정이다. 염분변화에 따른 해양생물 및 동물성플랑크톤에 미치는 영향은 많은 연구가 된 바 있으나[1,2,15,19,20,23], 식물성플랑크톤 뿐만 아니라 *C. polykrikoides*가 염분농도가 다른 상·하층을 얼마만큼 수직이동 할 것인가에 대해서는 더욱 연구가 되어 있지 않다.

따라서 이 연구는 일반해수와 담수와 해수를 혼합시켜 염

*Corresponding author

Tel : +82-61-690-8959, Fax : +82-61-686-1588

E-mail : eun-5657@hanmail.net

분이 구배된 모형수조를 만들어서 *C. polykrikoides*가 상·하층으로 움직이는 변화를 비교하였다. 또한 세포내의 생리활성 성분 중 DNA와 RNA는 생체량 및 단백질과 효소활성에 대한 대사활성의 indicator로서 작용될 수 있어서[4,10,11,12], *C. polykrikoides*의 수직이동시 DNA/RNA 변화가 있는 지를 조사하였다.

재료 및 방법

시험용 적조생물인 *C. polykrikoides*는 국립수산물학원에서 분양 받아 계대 배양하여 사용했다. 배지는 f/2-Si[8], 조도는 $50 \mu\text{mol}^2 \text{S}^{-1}$, 조도 주기(L:D)는 12:12로 유지시켰다. 시험기간은 2004년 3월 27일부터 4월 1일까지 5일 동안 하였으며, 그 이후로는 급격한 세포수 감소로 시험이 진행되기 어려웠다. 24시간 수직이동 실험을 위해 4월 1일 오전 9시부터 다음날 오전 10시까지 3시간 간격으로 시료를 채취했다. 시험용 수조는 60 l들이 아크릴 수조(Φ: 190 mm, h: 1.95 m) 2개를 설치하여(Fig. 1), 하나는 여수연안에서 채수한 일반해수와 다른 시험구는 섬진강에서 채수한 담수와 일반해수와 혼합시켜 염분농도를 조절하였다. 현장에서 채수한 일반해수와 섬진강 담수는 고압 멸균하였으며, 멸균 후 f/2-Si 배지를 첨가하여 시험수조에 넣었다. 각 수조에는 간격 20 cm 범위로 8개의 PVC 밸브를 장착시켰고, 최상층에는 뚜껑을 개폐한 후 직접 시료를 채수했고, 동일하게 $100 \mu\text{mol}^2 \text{S}^{-1}$ 을 조사(lighting) 시켰다. 실험은 남해수산연구소 적조배양실에서 계대 배양과 동일한 조건에서 하였다. 실험 개시로부터 종료시 5일째 수조내의 염분, 용존산소, pH, chlorophyll *a* 측정은 YSI 650MDS (YSI incorporated, U.S.A)로 하였다. *C. polykrikoides*는 4번 밸브의 위치에 첨가하였으며, 첨가 후 농도는 $100 \text{ cells ml}^{-1}$ 로 하였다. 세포내의 DNA/RNA 조사를 위하여 genomic DNA는 AccuPrep Genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Korea), RNA는 TRI Reagent kit (Molecular Research Center)로 추출하였다. 분리된 DNA와 RNA 양을 측정하기 위하여 UV spectrophotometer (GeneQuant pro, Pharmacia)로 260 nm와 280 nm에서 정량하였다.

결과 및 고찰

실험기간 동안 시험구의 염분구배를 알아보기 위하여 실험이 종료되는 5일째 염분, 용존산소, pH, chlorophyll *a*을 각 수심별로 조사한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 시험수조의 상층부위는 염분이 20 정도 나타났고, 밸브 4번부터 8번까지 30을 보여 염분구배가 되었다. 그러나 대조구는 뚜렷한 염분구배가 보이지 않고, 30 정도로 유지되었다. 용존산소는 대조구나 시험구 모두 실험개시보다 종료시에 10 mg l^{-1} 이하로 보여 약 50% 정도 떨어지는 경향을 보인 반면, pH는 실험개

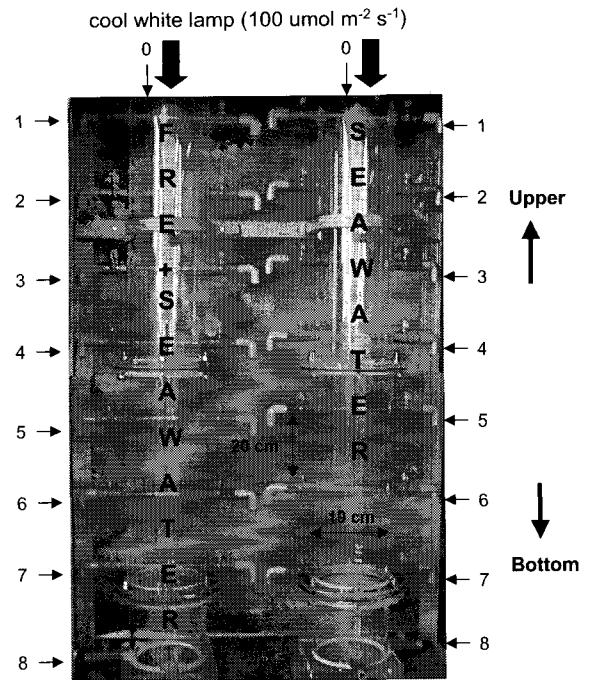


Fig. 1. Apparatus of the 60 liter for culturing *C. polykrikoides* used in tests of effects of salinity-stratified waters on vertical migration. The experimental aquarium was made from acrylic glass and joined together by two columns (Φ: 190 mm, h: 1.95 m). The vessel has 8 valves on the side and one port on the top. This port could be sealed with plastic cap. Test was conducted at the Harmful Algal Bank, South Sea Fisheries Research Institute, at 20°C on 12:12 h L:D cycle for 5 days. Experimental column was consisted of the mixture of freshwater collected from Sumjin river and sea water provided Yeosu coastal waters. FRE: freshwater.

시 때나 종료시에도 약 8 정도의 범위로 모두 동일하게 보였다. 채수 시기는 빛이 있는 동안에(오전 11:00) 실시되는 관계로 chlorophyll *a* 수치는 상·하층에 따라 큰 차이를 보였다. 최상층에서 밸브 2번까지와 그 이후의 밸브와는 약 5배 이상의 차가 나타났다. 이 그림에서 알 수 있듯이 비록 담수와 해수를 혼합된 해수라도 *C. polykrikoides*는 충분히 상층까지 이동할 수 있다는 것을 알 수 있다.

Fig. 3은 24시간 동안 chlorophyll *a* 변화를 본 것으로, 형광등의 점등시기에는 상층과 하층간의 chlorophyll *a* 차이는 6배 이상으로 보여 빛에 대한 수직상승은 높은 것을 알 수 있다. 특히 시험구와 대조구를 비교해 보면 점등이 시작되는 오전 09:00의 경우 대조구보다 훨씬 높은 값을 보였으나 시간이 경과함에 따라 그 차이는 소폭으로 떨어졌다. 이러한 결과는 점등이 시작되는 시기에 일반해수보다 오히려 담수와 해수가 혼합된 해수에 더욱 급속히 상승되는 것을 알 수 있으나, 일반해수는 점등으로부터 시간이 경과함에 따라 수직이동이 높은 것으로 보인다. 이렇게 표층에 밀집된 세포는

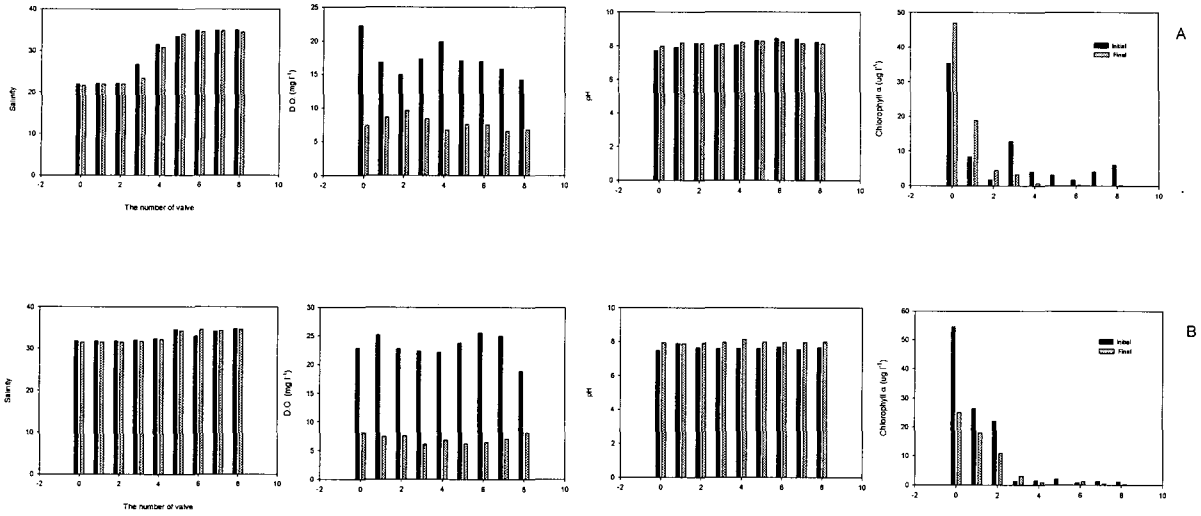


Fig. 2. Variability in salinity, dissolved oxygen, pH, and chlorophyll *a* for 5 days. 0: water collected from the top, 1: water from the number of valve 1 on the side of column, 2: water from the number of valve 2 on the side of column, 3: water from the number of valve 3 on the side of column, 4: water from the number of valve 4 on the side of column, 5: water from the number of valve 5 on the side of column, 6: water from the number of valve 6 on the side of column, 7: water from the number of valve 7 on the side of column, 8: water from the number of valve 8 on the side of column. The lower number of valve on the side of column, the upper collected water is toward to upper. A: column contained with mixture of sea water and freshwater, B: column contained with sea water.

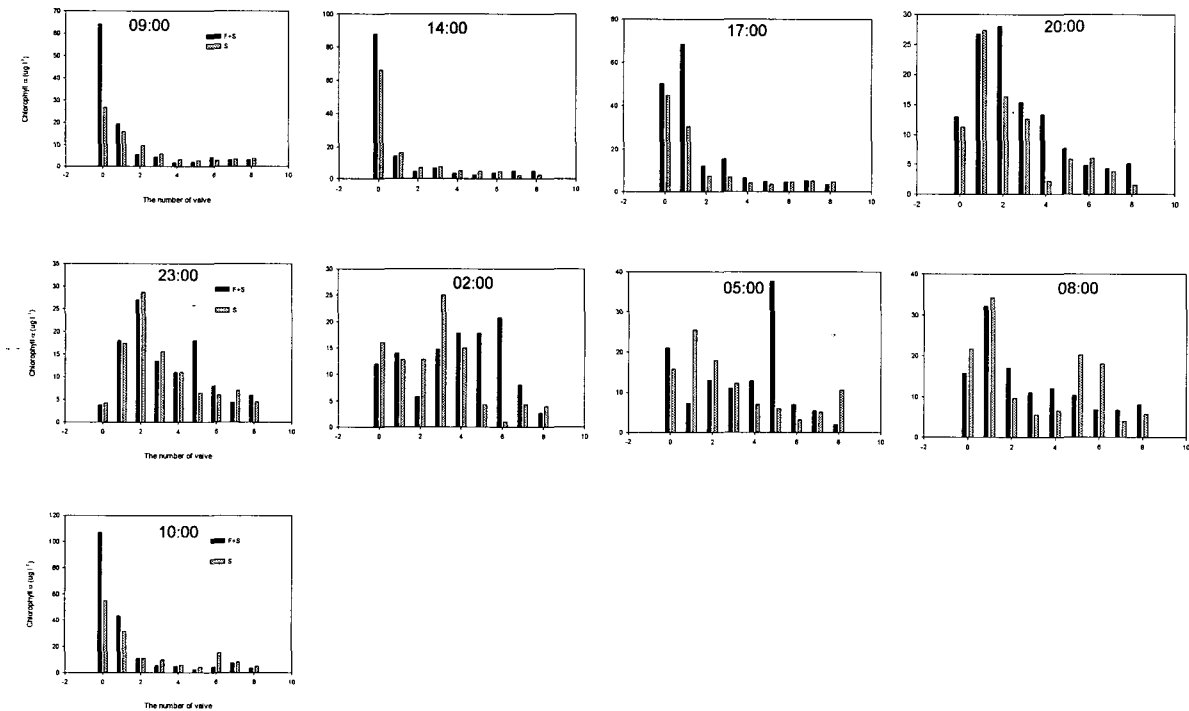


Fig. 3. Fluctuation with related to chlorophyll at the final day for 24 h. Analysis was determined to the interval of 3 h. 0: water collected from the top, 1: water from the number of valve 1 on the side of column, 2: water from the number of valve 2 on the side of column, 3: water from the number of valve 3 on the side of column, 4: water from the number of valve 4 on the side of column, 5: water from the number of valve 5 on the side of column, 6: water from the number of valve 6 on the side of column, 7: water from the number of valve 7 on the side of column, 8: water from the number of valve 8 on the side of column. The lower number of valve on the side of column, the upper collected water is toward to upper. F: freshwater. S: sea water.

소등이 되어도 신속하게 저층으로 이동하는 것이 아니라 대부분 중층에 많이 분포하고 있다. 특히 소등은 점등과 달리 일반해수와 혼합해수와와의 *C. polykrikoides*의 이동에 뚜렷한 차이를 볼 수 없었다. Kamykowski[12]에 의하면 동일한 환경 하에서 저층으로 이동되는 현상을 중력에 의한 것이라고 설명하고 있다. 또한 박 등[21]에 따르면 *C. polykrikoides*는 수면으로 부상하는 속도보다 바닥으로 침강되는 것이 훨씬 더 신속하게 움직인다고 하였다.

그러나 본 실험에서는 저층으로 이동되는 속도보다 상층으로 부상되는 것이 급속히 이루어진 것은 시험용으로 사용된 수조와 현장과의 중력차이로 생각된다. 만약 수조의 높이를 지금보다 훨씬 더 높게 만들면 중력에 의해서 저층으로 움직이는 속도가 빨리 진행될 것으로 보인다. 혼합해수에서 점등과 동시에 부상속도가 급속한 것은 아마 일반해수에 비하여 광합성 활성[16,17]을 최대화하기 위한 생리적인 리듬으로 생각된다. 박 등[21]도 빛이 *C. polykrikoides*의 수직상승에 현저한 역할을 하지 않는다고 보고했다. 이미 여러 연구자들도 암흑상태에서도 생리적인 리듬에 의해서 수면으로 부상될 수 있다고 하였다[6,25]. 본 실험의 일반해수도 수면 부상속도가 혼합해수에 비하여 떨어지는 이유가 *C. polykrikoides* 세포자체의 생체적 리듬도 많이 작용된 것으로 보인다 반면, 혼합해수의 경우는 염분구배에 따른 생체적 쇼크로 인하여 생리적 리듬보다 빛에 대한 광합성 작용이 더 영향을 미친 것으로 생각된다.

Fig. 4는 *C. polykrikoides*의 DNA 및 RNA를 나타낸 것으로 일반해수의 경우 상·하층 및 실험 전후에 관계없이 0.90~0.95 범위로 나타난 반면, 혼합해수에서는 DNA의 변화폭이

매우 컸다. 또한 RNA의 경우도 혼합해수에서 현저한 변화를 보였다. 이러한 변화는 24시간 주·야간 수직이동에서도 일반해수에 비해 혼합해수에서 세포내의 RNA 변화가 큰 것으로 보였다(Fig. 5). 이러한 결과를 보아서 *C. polykrikoides* 수면으로 부상하거나 저층으로 이동할 경우 세포내의 DNA/RNA 함량에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보이지만, 담

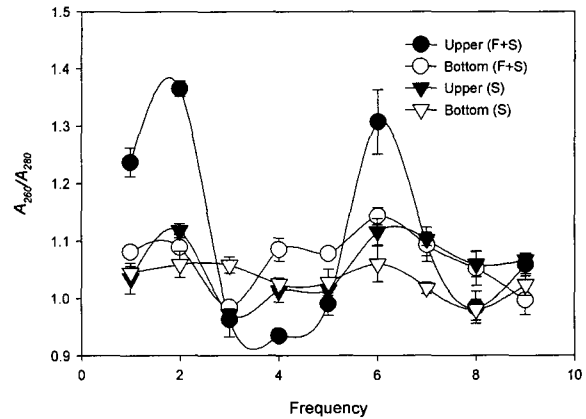


Fig. 5. Variation of concentration of extracted RNA in *C. polykrikoides* based on the ratio of absorbance at 260 and 280 nm for 24 h. Analysis was determined to final day and the interval of 3 h from to waters collected from upper and bottom. 1: water collected at 09:00 a.m., 2: water collected at 14:00 p.m., 3: water collected at 17:00 p.m., 4: water collected at 20:00 p.m., 5: water collected at 23:00 p.m., 6: water collected at 02:00 a.m., 7: water collected at 05:00 a.m., 8: water collected at 08:00 a.m., 9: water collected at 10:00 a.m. F: freshwater, S: sea water. The values are expressed as mean±S.E. (n=3).

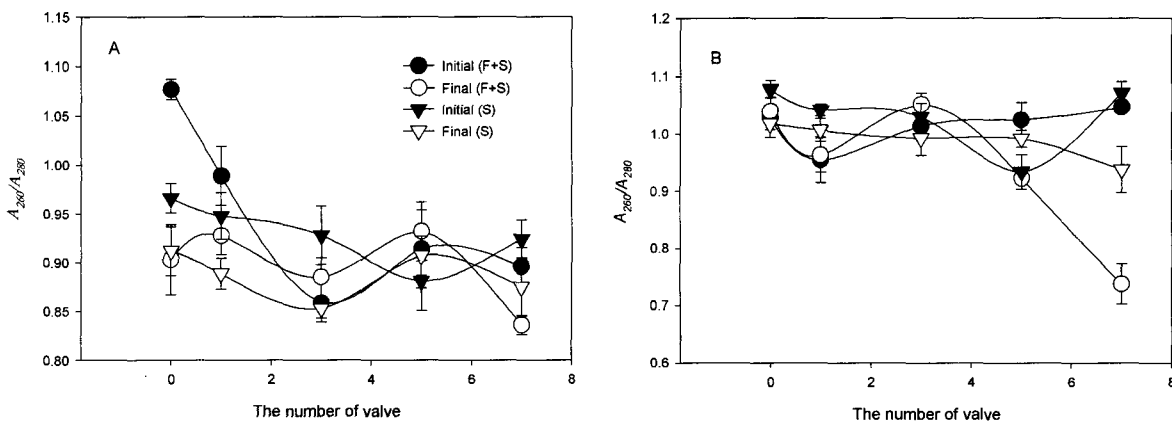


Fig. 4. Effect of *C. polykrikoides* exposed to sea water and mixed sea water on concentration of extracted DNA (A) and RNA (B) based on the ratio of absorbance at 260 and 280 nm. Analysis was determined in initial and final days. 0: water collected from the top, 1: water from the number of valve 1 on the side of column, 2: water from the number of valve 2 on the side of column, 3: water from the number of valve 3 on the side of column, 4: water from the number of valve 4 on the side of column, 5: water from the number of valve 5 on the side of column, 6: water from the number of valve 6 on the side of column, 7: water from the number of valve 7 on the side of column, 8: water from the number of valve 8 on the side of column. The lower number of valve on the side of column, the upper collected water is toward to upper. F: freshwater, S: sea water. The values are expressed as mean±S.E. (n=3)

수유입이 높은 해역에서의 *C. polykrikoides* 수직상승이나 DNA/RNA 뚜렷한 변화를 주는 것을 알 수 있다. 실질적으로 *C. polykrikoides*에 의한 대량폐사 시기는 일출 때라고 설명을 많이 하지만, 본 실험을 통하여 확실히 담수유입이 많은 해역에서는 신속한 수직이동으로 인하여 매우 높은 치사율을 가져올 것으로 보인다. 따라서 저층에 집적된 적조가 일출과 동시에 순간적으로 부상될 수 있어서, 지금까지 양식업자의 피해 설명이 어느 정도 과학적으로 증명되어, 여기에 대한 모니터링이 절실히 요구되는 바이다.

요 약

여수연안은 어류 치사성 유해적조생물인 *C. polykrikoides* 적조가 매년 발생하는 해역일 뿐만 아니라 섬진강으로부터 담수유입이 돌산을 중심으로 많은 영향을 받고 있다. 담수유입에 따른 염분도 변화가 *C. polykrikoides*의 수직이동에 영향을 미칠 수 있는 지를 조사했다. 실험장치는 60 l들이 아크릴 수조에 일반해수와 담수와 해수를 혼합시킨 시험구를 설정하여 *C. polykrikoides*의 수직부상 속도와 DNA/RNA 함량 비교를 하였다. 실험은 5일 동안 시행했다. 실험개시로부터 종료시까지 시험구의 경우 상층부위에서는 염분이 20으로 나타난 반면에, 하층은 30 정도로 유지되었다. 그러나 용존산소와 pH 변화는 시험구와 대조구 모두 비슷한 양상을 보였다. 또한 chlorophyll a도 수조의 하층보다 상층에 높은 수치를 보였다. 24시간동안 *C. polykrikoides* 상·하층 이동을 조사한 결과 점등이 되는 순간 시험구는 대조구에 비하여 월등히 높은 상승을 보였으나, 시간이 경과함에 따라 그 차이는 적었다. 소등이 되는 동안은 점등에 비하여 상·하층 현저한 차이를 볼 수 없고 대부분 균일하게 분포하는 양상을 보였다. 또한 실험 종료시나 24시간 주·야간 수직이동 시 대조구에 비하여 시험구에 분포하고 있는 *C. polykrikoides*의 DNA 및 RNA 변화폭이 높았다. 이 실험을 통하여 담수유입은 *C. polykrikoides* 세포에 많은 영향을 미칠 수 있을 것으로 보이며, 특히 신속한 수직상승으로 인하여 여기에 대한 *C. polykrikoides*의 모니터링이 절실히 요구되는 바이다.

감사의 글

이 연구는 국립수산과학원(남해해양환경조사, RP-05-ME-11)에 의해 운영되었습니다. 실험이 잘 수행될 수 있도록 열심히 조사해 준 조민희, 심규성 연구원에게 고마움을 전합니다. DNA/RNA 측정을 도와주신 전남대학교 임채광 선생님에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Ambler, J. W., J. E. Cloern and A. Hutchinson. 1985. Seasonal

cycles of zooplankton from San Francisco Bay. *Hydrobiol.* **129**, 177-197.

2. Bell, K. N. I. and J. A. Brown. 1995. Active salinity choice and enhanced swimming endurance in 0 to 8-d-old larvae of *diadromous gobies*, including *Sicydium punctatum* (Pisces), in Dominica, West Indies. *Mar. Biol.* **121**, 409-417.

3. Cho, E. S., C. S. Kim, S. G. Lee and Y. K. Chung. 1999. Binding of alcian blue applied to harmful microalgae from Korean coastal waters. *Bull. Nat'l Fish. Res. Dev. Inst.* **55**, 133-138.

4. Dortch, Q. and T. T. Packard. 1989. Differences in biomass structure between oligotrophic and eutrophic marine ecosystems. *Deep Sea Res.* **36**, 223-240.

5. Eggersdorfer, B. and D. P. Hader. 1991. Phototaxis, gravitaxis and vertical migration in the marine dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *FEMS Micro. Ecol.* **85**, 319-326.

6. Eppley, R. W., O. Holm-Hansen and D. H. Strickland. 1968. Some observations on the vertical migration of dinoflagellates. *J. Phycol.* **4**, 333-340.

7. Figueroa, F. L., F. X. Niell and F. G. Figueiras. 1998. Diel migration of phytoplankton and spectral light field in the Ria de Vigo (NW Spain). *Mar. Biol.* **130**, 491-499.

8. Guillard, R. R. L. and J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms 1. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* **8**, 229-239.

9. Hays, G. C. 1995. Ontogenetic and seasonal variation in the diel vertical migration of the copepods *Metridia lucens* and *Metridia longa*. *Limnol. Oceanogr.* **40**, 1461-1465.

10. Holm-Hansen, O., W. H. Sutcliffe and J. Sharp. 1968. Measurement of deoxyribonucleic acid in the ocean and its ecological significance. *Limnol. Oceanogr.* **13**, 507-514.

11. Iwamura, T., K. Kanazawa, Y. Shibata, S. Morimura, S. Ichimura, O. Maeda and H. Tamiya. 1967. Preliminary studies on the feasibility of microanalytic measurement of planktonic populations. *J. Oceanog. Soc. Jpn.* **23**, 247-251.

12. Kamykowski, D. 1995. Trajectories of autotrophic marine dinoflagellates. *J. Phycol.* **31**, 200-208.

13. Kamykowski, D., S. A. McCollum and G. J. Kirkpatrick. 1988. Observations and a model concerning the translational velocity of a photosynthetic marine dinoflagellate under variable environmental conditions. *Limnol. Oceanogr.* **33**, 66-78.

14. Karl, D. M., C. D. Winn and D. C. L. Wong. 1981. RNA synthesis as a measure of the microbial growth in aquatic environments. I. Evaluation, verification and optimization of methods. *Mar. Biol.* **64**, 1-12.

15. Kinne, O. 1966. Physiological aspects of animal life in estuaries with special reference to salinity. *Neth. J. Sea Res.* **3**, 222-244.

16. Lee, S. W. 1996. An outline of oceanophysics, Jipmundang Press, Seoul. 225 pp.

17. Lieberman, O. S., M. Shilo and J. van Rijn. 1994. The physiological ecology of a freshwater dinoflagellate bloom population; vertical migration, nitrogen limitation, and nutrient uptake kinetics. *J. Phycol.* **30**, 964-971.

18. MacIntyre, J. G., J. J. Cullen and A. D. Cembella. 1997.

- Vertical migration, nutrition and toxicity in the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **148**, 201-216.
19. Mann, R., B. M. Campos and M. W. Luckenbach. 1991. Swimming rate and responses of larvae of three mactrid bivalves to salinity discontinuities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **68**, 257-269.
 20. Morgan, C. A., J. R. Cordell and C. A. Simenstad. 1997. Sink or swim? Copepod population maintenance in the Columbia River estuarine turbidity-maxima region. *Mar. Biol.* **129**, 309-317.
 21. Park, J. G., M. K. Jeong, J. A. Lee, K. J. Cho and O. S. Kwon. 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.
 22. Seung, Y. H. 1992. Water masses and circulations around Korean peninsula, *J. Oceanogr. Soc. Korea.* **27**, 324-331.
 23. Vazquez, E. and C. M. Young. 1996. Responses of compound ascidean larvae to haloclines. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **133**, 179-190.
 24. Watanabe, M., K. Kohata and T. Kimura. 1995. Generation of a *Chattonella antiqua* bloom by imposing a shallow nutrient gradient in a mesocosm. *Limnol. Oceanogr.* **40**, 1447-1460.
 25. Weiler, C. S. and D. M. Karl. 1979. Diel changes in phased-dividing cultures of *Ceratium furca* (Dinophyceae): nucleotide triphosphate, adenylate energy charge, cell carbon, and patterns of vertical migration. *J. Phycol.* **15**, 384-391.
 26. Yamazaki, A. K. and D. Kamykowski. 2000. A dinoflagellate adaptive behavior model: response to internal biochemical cues. *Ecol. Model.* **134**, 59-72.
 27. 국립수산진흥원. 2000. 1999년도 한국연안의 적조발생상황. 206 pp.