

## 적조·와편모조류, *Cochlodinium polykrikoides* 의 순수분리 및 성장

서필수·이상준·김 윤·이정호·김학균\*·이재동\*\*  
국립수산진흥원 생물공학과, \*국립수산진흥원 적조연구부, \*\*부산대학교 미생물학과

### Axenic Culture Production and Growth of a Dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*

Pil-Soo SEO, Sang-Jun LEE, Yoon KIM, Jeong-Ho LEE, Hak-Gyoon KIM\* and Jae-Dong LEE\*\*

Division of Biotechnology and \*Harmful Algal Blooms Research Department,  
National Fisheries Research & Development Institute, Pusan 619-900, Korea

\*\*Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

To know the antibiotic specificity of a dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*, we investigated the survival time of *C. polykrikoides* against several concentrations of antibiotics and judged the selective specificity of antibiotics based on the  $LT_{50}$  (50% of lethal time). The result showed that *C. polykrikoides* was sensitive to tetracycline and chloramphenicol, and resistant to polymixin-B, ampicillin, penicillin-G, dihydrostreptomycin, and neomycin. In the case of sensitive antibiotics to *C. polykrikoides*, tetracycline and chloramphenicol, the safety concentrations of both antibiotics were determined and the antibiotic specificity based on the plotted survival curve was analyzed.

Before antibiotic treatment, we tested the antibiotic susceptibility of the contaminated bacterial population in the culture of *C. polykrikoides*, and decided the proper kinds of antibiotics and concentrations before percoll-centrifugation. By percoll-centrifugation, we reduced bacteria, removed fungi, collected the algal pellet, and made axenic culture by antibiotic cascade procedure based on the result of antibiotic susceptibility test.

We observed that axenic *C. polykrikoides* culture entered the logarithmic phase of growth when cell density was over 740 cells/ml and propagated to 5,800 cells/ml maximally. Divisions per day, k value of *C. polykrikoides* represented a good index for growth at the low density of cells. There was a highest k value shift before reaching to the logarithmic phase.

We suggested that the preceding highest k value shift stage is a good indicator for accurate broadcasting for red tide blooming in the field, and the stage is also a good time for controlling red tide blooming in the field, either.

**Key words :** *Cochlodinium polykrikoides*, antibiotic survival test, axenic culture, growth curve, k (divisions/day) value

### 서 론

한국 연안에 출현하는 적조 생물은 34종이 보고되어 있으며, 이중 편모조류가 22종, 규조류가 11종, 섬모충류가 1종으로 구성되어 있다 (Park, 1991). 이 중 와편모조류에 속한 *Cochlodinium polykrikoides*은 1982년 적조를 일으킨 후, 1989, 1990, 1991, 1992년에 계속 적조를 일으켰고, 1992년도와 1995년에는 장기간 10,000 cells/ml 이상의 고밀도 적조가 넓은 해역에서 발생하여 막대한 수산 피해를 일으켰다 (김 등, 1996).

*C. polykrikoides*는 현재 *Gymnodiniacea*의 한 속 이다 (Schütt, 1896). 형태적 특징은 세포주위에 줄무늬 형태가 깊게 파여져 상단에서부터 하단에 이르기까지 나타난다.

연쇄조체를 형성하지 않는 단세포의 경우 크기는 40~50  $\mu$ m이고 폭은 20~25  $\mu$ m로서 상단은 뾰족하며 하단은 둥근 형태를 하고 있다 (이 등, 1993). 그리고 연쇄군체의 경우 2, 4, 8개 세포의 연쇄조체 등 다양하며 홀수개로 연쇄형을 형성한 것들도 존재한다 (Fig. 1).

독성학적인 면에서 *C. polykrikoides*의 출현이 어류폐사에 직접적인 영향을 줌으로써 독성을 가지고 있다고 추정되는 보고도 있다 (Onoue and Nozawa, 1989; Yuki and Yoshimatsu, 1989). 그러나, 국내출현 *C. polykrikoides* 자체가 어떤 독성을 가지고 있는 지는 명확히 밝혀지지 않고 있다. 현재 고려되는 어류폐사에 작용하는 요인은 몇 가지로 추측되는데, 그 첫번째 독성은 고도불포화지방산 EPA 및 DHA에 의한 용혈작용 (이, 1995)과 유사하리라

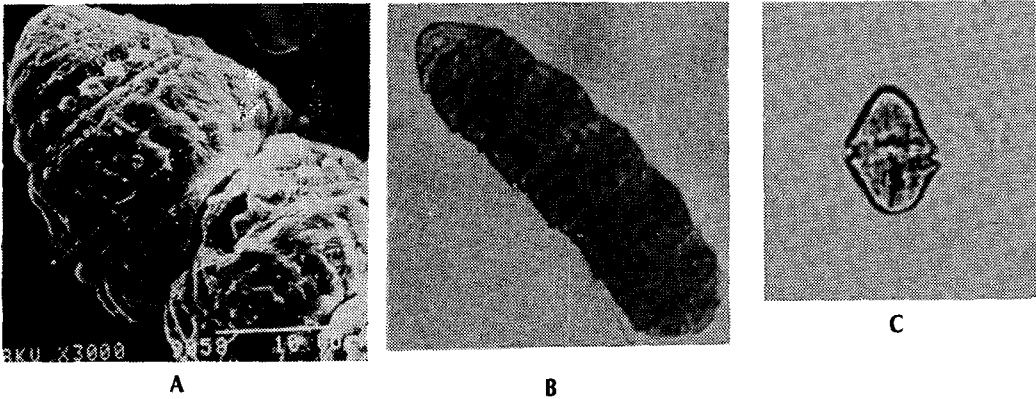


Fig. 1. General forms of *C. polykrikoides*.

A: fused cell, SEM ( $\times 3000$ ), B: fused cells, LM ( $\times 400$ ), C: single cell, LM ( $\times 100$ )

추측되며, 두번째는 세포의 바깥 막을 둘러 싸고 있는 점질물질 (Jenkinson, 1993)로 추측된다. Fig. 1B에서 보는 바와 같이 여러 개의 세포가 연결된 *C. polykrikoides*이 분비하는 점질물질이 어류의 아가미를 폐쇄시켜 호흡장애를 일으켜 결국 어류를 폐사시키는 것이 아닌가 추측된다. 그리고 다른 요인으로는 *C. polykrikoides*이 대량증식하면 낮에는 고산소 밤에는 저산소 수괴가 형성되어 해수의 용존산소를 결핍시켜 어류를 폐사시킬 것이라고 추측되며, 최근 코클로디늄의 산소소비와 넘치의 폐사는 밀접한 관련이 있는 것으로 보고가 되었다 (김 등, 1995; 류 등, 1996).

따라서 *C. polykrikoides*의 독성학적 특성을 연구하기 위해서는 무엇보다도 *C. polykrikoides*의 순수분리에 의한 배양방법의 확립에 대한 필요성이 절실히 요구된다. 지금까지 알려진 편모조류를 분리하는 방법들은 micropipetting (or washing) 방법 (Droop, 1954; Iwasaki, 1967; Pringshiem, 1946), phototactic behavior를 이용한 방법 (Imai and Yamaguchi, 1994; Paasche, 1971) 등이 있으며, 최근 Connell과 Cattolico (1996)는 간단한 순수분리법에 대해서 보고하였다. 본 연구에서는 이제까지 알려진 이러한 방법들을 토대로 하여 *C. polykrikoides*로부터 제거할 박테리아 군집에 대한 항생제의 감수성을 조사한 후 percoll 원심분리를 통해 박테리아를 감소시키고, 곰팡이를 제거한 후 *C. polykrikoides*에 해가 적고 박테리아에 감수성이 큰 항생제를 연속적으로 처리하여 순수분리를 행하였다. 순수분리된 *C. polykrikoides*는 실험실 조건에서 배양되었고, 하루당 분열횟수를 기준으로한 성장형태도 조사되었다.

## 재료 및 방법

### 시약, 항생제 및 배지조성

percoll, f/2 배지 (Guillard and Ryther, 1962)에 필요한 시약 및 항생제는 Sigma 제품을 사용하였고, 항생제 tetracycline과 chloramphenicol은 ethanol에 녹였고, polymixin-B, ampicillin, penicillin-G, dihydrostreptomycin, neomycin대해서는 증류수에 녹여  $0.22\mu\text{m}$  여과지 (Millipore)로 여과하였다. 박테리아와 곰팡이의 성장배지의 구성시약은 Difco Co.로 부터 구입하였다.

### 균주

*C. polykrikoides*는 1996년 국립수산진흥원 적조생물과로부터 분양받았고, f/2 배지에  $20^{\circ}\text{C}$ , 1,000 Lux에서 생육시켰으며, 매 3주마다 계대배양되었다.

### 생존시험

대수증식기중반에 접어든 *C. polykrikoides* 배양액을  $100\mu\text{l}$  (cell numbers  $\approx 50\sim 70$ )씩 취하여 96 well plate (Corning, Cat. No. 25860-96)에 접종하고 각 농도별로 항생제를 처리한 후, 2시간 또는 3시간 간격으로 광학현미경하에서 파괴되지 않은 세포 수를 관찰하였다.

### 세포수집

Reith & Cattolico의 방법 (1985)을 변형하여 세포를 회수했다. percoll (Sigma, P1644) 3ml를 50ml tube (Falcon)에 넣고 대수증식기 중반에 접어든 세포 (30ml)의 배양액을 넣어 3000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 회수된 조체는 다시 새로운 f/2 배지 30ml에 현탁시켜 2회 더 반복하여 원심분리하고 난 뒤, 얻은 조체를 항생제 처리에 사용하였다.

항생제 연속처리

수집한 세포를 집중하고 30ml 배지에 항생제를 첨가한 후 24시간 또는 48시간 배양 후에 상등액을 100 µl씩 취하여 Luria Broth (LB) agar plate (Sambrook et al., 1989)에 도말하여 박테리아의 오염여부를 각각 측정하였으며, 나머지 배양액은 percoll 원심분리에 의해서 먼저 처리한 항생제를 제거하고, 새로운 f/2 배지에 접종시켜 다음 항생제 테스트를 진행시키는 방법으로, 박테리아가 배지에 나타나지 않을 때까지 항생제 연속처리 (antibiotic cascade)를 하였다.

최종적으로 박테리아가 제거되었음이 확인된 *C. polykrikoides*를 percoll 원심분리로 모으고 새로운 배지에 옮겼다.

성장측정

순수분리된 *C. polykrikoides*를 f/2 배지에 접종하여 20 °C에서 1000 Lux 조도하에서 생육시켰고 3~5일 간격으로 생육을 측정하였다. 배양액을 1ml 취하여 10% 포르말린을 이용하여 고정시킨 후 광학현미경하에서 세포수를 측정하였다.

통계

모든 실험은 3회 반복하여 얻은 평균값을 취했다.

결과 및 고찰

항생제 생존실험 (antibiotic survival test)

본 연구에서는 아직 *C. polykrikoides*의 고체배지에 대한 배양법이 확립되지 못했기 때문에 액체배지에서 각 항생제별 *C. polykrikoides*의 생존여부를 조사하였다 (Table 1). 그 결과 *C. polykrikoides*는 tetracycline과 chloramphenicol에 특히 민감하였다. 즉, tetracycline농도별 처리에 의한 50%사멸하는 시간 (LT<sub>50</sub>)이 50µg/ml 농도에서 22시간 전후, 125µg/ml 에서는 13시간 전후, 250µg/ml 에서는 11시간 전후, 500µg/ml 에서는 8시간 전후, 1000µg/ml 에서는 6시간 전후로 조사되었다. 여러 농도의 tetracycline에 대한 *C. polykrikoides*의 사멸곡선을 조사한 결과는 Fig. 2 A에 보는 바와 같이, 가장 낮은 50µg/ml 농도에서도 12시간 경과 후 세포들이 서서히 파괴됨을 볼 수 있었다. 일반적으로 항생제의 농도가 증가할수록 사멸율도 컸음을 나타내어 형태적으로 완전한 세포를 기준으로 한 생존율은 항생제 농도와 잘 일치됨을 알 수 있다.

chloramphenicol 처리의 경우 tetracycline 처리때 보다는 다소 저항성이 높음을 알 수 있었으며, *C. polykrikoides*의 LT<sub>50</sub>이 125µg/ml 농도에서는 48시간 전후, 250µg/ml

Table 1. LT<sub>50</sub> of *C. polykrikoides* by antibiotic treatment

Concentration (µg/ml) Antibiotics	50	125	250	500	1000
Tetracycline	22h	13h	11h	8h	6h
Chloramphenicol	—	48h	46h	12h	10h
Polymixin-B	—	—	—	—	48h
Ampicillin	—	—	—	—	72h
Penicillin-G	—	—	—	—	72h
Dihydrostreptomycin	—	—	—	—	72h
Neomycin	—	—	—	—	—

— : not reach to 50% death

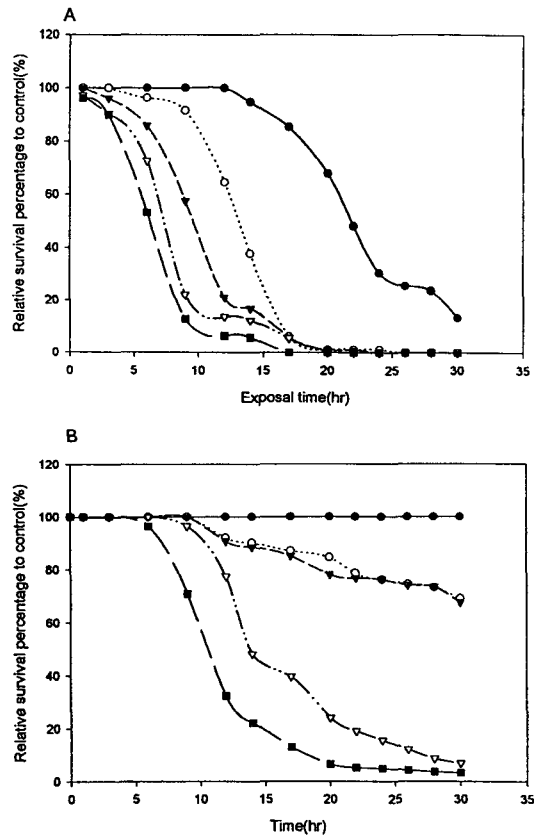


Fig. 2. Relative survival percentages of *C. polykrikoides* to antibiotics. The survival percentage was corrected on the basis of control as 100%.

A: tetracycline, B: chloramphenicol  
Concentrations: ●, 50µg/ml; ○, 125µg/ml; ▲, 250µg/ml; 500µg/ml; ■, 1000µg/ml

에서는 46시간 전후, 500µg/ml 에서는 12시간 전후, 그리고 1000µg/ml에서는 10시간을 전후로 나타났다 (Table 1). *C. polykrikoides*의 사멸 형태를 상세히 분석한 결과는 Fig. 2B와 같다. 50µg/ml 농도에서는 *C. polykrikoides*의

사멸에 영향을 주지 않았으며, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도와 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 사멸곡선이 유사하고, 또, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도와 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  항생제 농도에서 다소 급격히 사멸되었음을 나타낸다. chloramphenicol 경우는 tetracycline의 일관성 있는 사멸율과는 다르게 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~250 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도와 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 사이에 chloramphenicol에 대한 *C. polykrikoides*의 감수성에는 다른 2차적인 요인이 있는 것처럼 보인다.

다른 항생제인 polymixin-B, ampicillin, penicillin-G, dihydrostreptomycin, neomycin은 높은 농도에서도 *C. polykrikoides*의 생존에 거의 영향을 미치지 않았다.

결과적으로 *C. polykrikoides*는 항생제 tetracycline과 chloramphenicol에 대해서는 민감하였고, polymixin-B, ampicillin, penicillin-G, dihydrostreptomycin, neomycin에 대해서는 저항성이 컸다

#### 순수분리 (axenic culture production)

*C. polykrikoides* 배양액내에 존재하는 박테리아의 항생제에 대한 감수성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. *C. polykrikoides*는 비교적 민감한 항생제 (Table 1)인 chloramphenicol 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 24시간 액체배양하고 LB plate에 도말한 다음 7일후 균집을 확인한 결과 비교적 적은 수의 균집들이 나타났다. *C. polykrikoides*에 저항성이 큰 항생제에 48시간 액체배양한 오염된 균집들의 감수성을 실험한 결과는 ampicillin과 neomycin 125, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 비교적 적은 수의 균집이 나타났다. 따라서 본 실험에서 순수 분리할 *C. polykrikoides* 배양액에 존재하는 박테리아 균집에 대해서 chloramphenicol, ampicillin, neomycin이 유효한 것으로 나타났다. *C. polykrikoides* 배양액내의 박테리아를 제거하기 위하여 percoll 원심분리를 이용해서 조체를 회수했다. 매 원심분리 후 *C. polykrikoides*의 조체를 f/2 배지에 현탁시킨 후 원심분리시마다 감소되는 박테리아의 수를 LB plate에 도말하여 측정 한 결과는 Table 3과 같다. 1차, 2차, 3차 percoll 원심분리 후 박테리아 수는 대조군에 비해서 각각 1/4로 감소되어 최종적으로 1/64로 감소되었다. 또한, 곰팡이 오염은 PDA (potato dextrose agar) 배지 (Difco, 1985)에 도말하여 조사한 결과 대부분의 경우 곰팡이는 1차 percoll 원심분리 후에 제거되었다.

본 연구에서는 침가한 percoll이 전체적으로 f/2 배지를 사용한 배양액 내에서 밀도와 점성을 높여 박테리아와 곰팡이를 제거하는 데 효과적이었고 또한 원심분리시 *C. polykrikoides*가 파괴되지 않음이 현미경적 관찰을 통해 확인되었다.

최종적으로 얻어진 조체회수군에 오염된 박테리아에

**Table 2. Antibiotic susceptibility test for contaminated bacteria\***

Antibiotics	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Exposed time (hr)	No. of bacteria
Chloramphenicol	50	24	+
	125		+++
Polymixin-B	250	48	+++
	125		++
Ampicillin	250	48	++
	125		++++
Penicillin-G	250	48	++++
	125		++++
Dihydrostreptomycin	250	48	++++
	125		+
Neomycin	250	48	+

\* 100  $\mu\text{l}$  of sample was spreaded on LB plates and colonies were counted after 7 days of incubation at 20 $^{\circ}\text{C}$ .  
 + + + + :  $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$  colonies  
 + + + :  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$  colonies  
 + + :  $1 \times 10^2 - 1 \times 10^4$  colonies  
 + :  $1 - 1 \times 10^2$  colonies

**Table 3. Changes in numbers of bacterial and fungal colonies after each percoll-centrifugation**

Centrifugation Contaminant	Colony numbers			
	Control	1st.	2nd.	3rd.
Bacteria	$1.2 \times 10^4$	$3.2 \times 10^3$	$8 \times 10^2$	$2 \times 10^2$
Fungi	3	0	-	-

- : not tested

감수성이 큰 항생제 (Table 2)인 chloramphenicol (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ampicillin (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), neomycin (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 사용하여 재료 및 방법에서와 같이 항생제 연속처리를 통해서 순수분리를 행하였다.

percoll 원심분리 전에 오염된 박테리아의 항생제에 대한 감수성을 미리 파악하여 항생제 연속처리를 실시하는 방법은 오염된 실험실의 *C. polykrikoides*의 순수분리뿐만 아니라 해수에서 채집한 다른 조류의 순수분리에도 적용될 수 있는 유용한 방법이라 사료된다.

#### *C. polykrikoides*의 성장 (growth of *C. polykrikoides*)

순수 분리한 *C. polykrikoides*의 성장곡선을 측정하기 위하여 초기에 f/2 배지 100 $\mu\text{l}$ 에 *C. polykrikoides*를 약 7 cells/ml의 밀도로 접종하여 배양하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 접종후 13일까지 성장에 큰 변화는 나타나지 않았으며 접종후 17일을 전후하여 ml당 세포수가 150~170 cells/ml에 도달한 후, 급격한 대수증식기에 접어들었고, 접종 32~45일 사이에는 정지기로 접어들었으며 그 후부터 급격한 사멸기에 접어들었다. 이 성장곡선에서 보는 바와 같이 세포 수가 일정 밀도 이상 (약 740 cells/ml)

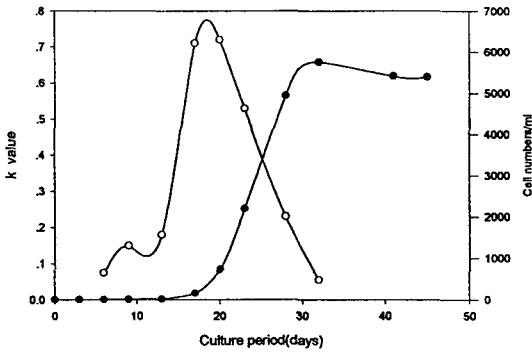


Fig. 3. Growth pattern of *C. polykrikoides* in f/2 medium.

●—● : growth curve  
○—○ : k value curve

에 도달해야 대수증식기에 접어든다는 것을 알 수 있다. 또한 대수증식기 직전의 세포 농도인 160~740 cells/ml가 단 시간에 대수증식기를 유도할 수 있는 잠재적인 밀도 임을 알 수 있으며, 계대배양을 위한 접종시 아주 효과적인 세포 밀도라고 사료된다.

특정기간 중 *C. polykrikoides*의 분열속도를 측정하기 위하여 본 연구에서는 Fig. 3의 성장곡선을 하루당 분열 단위(k)로 분석한 결과는 Table 4와 같고 k-value curve는 Fig. 3에 도식되었으며, k 값은 다음 등식에 의하여 얻어졌다 (Guillard, 1973).

$$k = (3.322/t) \log (N_1/N_0)$$

k : 하루당 분열횟수

N<sub>0</sub> : 초기 세포수

N<sub>1</sub> : 특정 시기의 세포수

t : 배양일수

k 값의 장점은 Fig. 3의 경우 0~17일 까지의 성장곡선이 명확하지 않지만, k 값은 정확한 증식지표를 제시한다. 얻어진 9~13일 사이의 k 값은 0.1810이고 13~17일 사이의 k 값은 0.7175로, 이 두 연속된 기간 사이에 엄청난 k 값의 변화 (k-value shift)가 있었으며, 대수증식기 직전의 13~17일 사이와 17~20일 사이에서 각각 0.7175와 0.7274로 가장 높았고, 대수증식기인 20~23일

Table 4. Calculated k (division/day) values from the growth curve of Fig. 3

Interval days	0~6	6~9	9~13	13~17	17~20	20~23*	23~28*	28~32
N <sub>2</sub> /N <sub>1</sub>	98/72	135/98	223/135	1630/223	7398/1630	2205.6/7398	4945.0/2205.6	5760.0/4945.3
k	0.0755	0.1539	0.1810	0.7175	0.7274	0.5253	0.2329	0.0550

\*logarithmic phase of growth

및 23~28일 사이의 k값은 0.5253 및 0.2329로 오히려 떨어졌다.

본 실험에서 아주 적은 세포의 밀도를 접종하므로써 여러 다양한 k 값을 가진 증식곡선을 얻었고, k 값의 상승에 의한 대수증식기의 유도현상을 정확히 파악할 수 있었다. 즉, 대수증식기를 유도하기 전에는 반드시 높은 k 값 변화를 가진 유도기가 존재하였다. 이러한 분열 형태가 현장에서 적용될 수 있다고 사료되므로, 현장에서 가장 높은 k 값 변화를 가진 세포 밀도를 조사하여 *C. polykrikoides*의 정확한 적조예보와 제어를 연구할 수 있는 하나의 모델로서 제시할 수 있었다

## 요 약

*C. polykrikoides*의 항생제에 대한 특이성을 알아보기 위해 *C. polykrikoides*의 항생제에 대한 50% 생존시간을 조사하였다. *C. polykrikoides*는 tetracycline과 chloramphenicol에 대해서는 아주 민감하였고, polymixin-B, ampicillin, penicillin-G, dihydrostreptomycin, neomycin에 대해서는 저항성이 큰 선택적 특이성을 가졌다. *C. polykrikoides*에 민감한 항생제인 tetracycline과 chloramphenicol의 경우는 사멸곡선을 분석하여 사멸에 영향을 주지 않는 농도를 확인했으며, 또한, 농도에 따른 *C. polykrikoides*에 대한 항생제의 작용특성을 분석하였다.

박테리아에 오염된 *C. polykrikoides* 배양액을 percoll 원심분리로 박테리아를 제거 하기 전에 *C. polykrikoides*에 저항성이 큰 항생제에 대한 박테리아 군집의 감수성 시험을 행하여 박테리아 제거를 위한 적당한 항생제와 농도를 결정한 뒤, percoll 원심분리로 박테리아와 곰팡이를 제거하고, 조체를 회수한 후, 남아있는 소량의 박테리아를 감수성이 큰 항생제를 연속적으로 처리 (antibiotic cascade)하여 *C. polykrikoides*의 순수배양 (axenic culture)이 가능하게 되었다.

순수배양한 *C. polykrikoides*은 밀도가 약 740 cells/ml 이상에서 대수증식기에 접어들었고 최대 5,800 cells/ml까지 증식하였다. *C. polykrikoides*의 하루당 분열을 k 값은 저밀도 세포 상태에서 아주 정확한 증식지표를 제시하였고, 대수증식기 전에 반드시 최대의 k 값 변화를 가진 세포의 밀도가 존재하였으며, 우리는 이 최대 k 값 변화를 가진 밀도를 정확한 적조 예보와 초기에 적조제어를 위한 모델로서 사용될 수 있음을 제시한다.

결론적으로 본 연구에서 확립된 *C. polykrikoides*의 순수분리에 의한 배양방법은 *C. polykrikoides* 뿐만 아니라 다른 적조 생물의 독성학적, 면역학적, 생화학적, 생태

학적, 분자생물학적 연구를 위해 편리하게 이용할 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

- Connell, L. and R.A. Cattolico. 1996. Fragile algae: axenic culture of field-collected samples of *Heterosigma carterae*. Mar. Biol., 125, 421~426.
- Difco. 1984. Difco Manual, Difco Laboratories, Detroit, USA, 689pp.
- Diven, C.L. and H.K. Schones. 1982. Production of axenic *Gonyaulax* cultures by treatment with antibiotics. Appl. Envir. Microbiol., 44, 250~254.
- Droop, M.R. 1967. A procedure for routin purification of algal cultures with antibiotics. Br. Phycol. Bull., 3, 295~297.
- Droop, M.R. 1954. A note on the isolation of small marine algae and flagellates for pure cultures. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 33, 511~514.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates, In *Handbook of Phyco-logical Methods, Culture Methods and Growth Measurements*, J.R. Stein, ed., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 290~311.
- Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervaceae* (Cleve). Can. J. Microbiol. 8, 229~239.
- Imai, I. and M. Yamaguchi. 1994. A simple technique for establishing axenic cultures of phytoflagellates. Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology, 9, 15~17.
- Iwasaki, H. 1967. The isolation and culture of unicellular algae. Japan Fisheries Resource Conservation Association, Tokyo, 55pp (in Japanese).
- Jenkinson, I.R. 1993. Viscosity and elasticity of *Gyrodinium* cf. *aureolum* and *Noctiluca scintillans* exudates, in relation to mortality of fish and damping of turbulence. In *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, T.J. Smayda and Y. Shimizu, eds., Elsevier, Amsterdam, pp. 757~762.
- Onoue, Y. and K. Nozawa. 1989. Separation of toxins from harmful red tides occurring along the coast of Kagoshima prefecture. In *Red Tides: Biology, Environmental Science and Technology*, T. Okaichi, D.M. Anderson, and T. Nemeto, eds., Elsevier, New York, pp. 371~374.
- Paasche, E. 1971. A simple method for establishing bacteria-free cultures of phototatic flagellates. J. Cons. Int. Explor. Mer., 33, 509~511.
- Park, J.S. 1991. Red tide occurrence and countermeasure in Korea. In *Recent approaches on red tides*, J.S. Park and H.G. Kim, eds. Department of Oceanography and Marine Resources, National Fisheries Research & Development Agency, Korea, pp. 1~24.
- Pringshiem, E.G. 1946. Pure culture of Algae. Cambridge University Press, Cambridge, 119pp.
- Reith, M.E. and R.A. Cattolico. 1985. In vitro chloroplast protein synthesis by the chromophytic alga *Oligsthodiscus luteus*. P1. *Physiol.*, 24, 2550~2556.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. A1.
- Schütt, F. 1896. Peridinales, in ENGLER, *Naturl. Pflanzenfam.*, Teil I, Apt. 1B, 1~30, Leipzig.
- Yuki, K. and S. Yoshimatsu. 1989. Two fish-killing species of *Cochlodinium* from Harima Nada, Seto Inland Sea, Japan. In *Red Tides: Biology, Environmental Science and Technology*, T. Okaichi, D.M. Anderson, and T. Nemeto, eds., Elsevier, New York, pp. 451~454.
- 김창훈. 1995. 유해·유독 적조생물 발생과 독성생산에 관한 연구. 1995 국내학술 발표회 초록집. 부산수산대학교 해양산업개발연구소, pp. 86~88.
- 김학균, 이삼근, 안경호, 윤성화. 1996. 한국연안의 유독성 *Cochlodinium* 적조 발생과 변천, 제 2회 연구발표 및 귀국보고, 국립수산진흥원, pp. 23~24.
- 류호영, 방종덕, 이주, 심정민. 1996. 적조생물, *Cochlodinium polykrikoides* 및 양식넙치의 산소소비, 제 2회 연구발표 및 귀국보고, 국립수산진흥원, pp. 89~90.
- 윤양호, 노홍길, 김영기. 1992. 제주부방, 함덕연안해역에 있어서 식물 플랑크톤 군집의 계절변동 특성. Bull. Mar. Res. Inst., Cheju Nat. Univ., 16, 27~42.
- 이삼근, 박주석, 김학균. 1993. 한국 남해연안해역에서 출현하는 유독 편모조류의 분류. 국립수산진흥원, 48, 1~22.
- 이종수. 1995. *Cochlodinium polykrikoides* 적조 조체의 생리활성 성분. 1995 국내 학술발표회 초록집. 부산수산대학교 해양산업개발연구소, pp. 89~90.

1997년 2월 13일 접수

1997년 12월 27일 수리