「The Sea」 Journal of the Korean Society of Oceanography
Vol. 16, No. 3, pp. 117 — 124, August 2011

HPLC를 이용한 광합성색소 분석과 CHEMTAX 프로그램을 이용한 식물플랑크톤 군집조성 연구

이용우[1,*] · 박미옥[2] · 김윤숙[3] · 김성수[1] · 강창근[3]
[1]해양환경관리공단 기후수질팀
[2]부경대학교 해양학과
[3]포항공과대학교 해양대학원

Application of Photosynthetic Pigment Analysis Using a HPLC and CHEMTAX Program to Studies of Phytoplankton Community Composition

YONG-WOO LEE[1,*], MI OK PARK[2], YOON-SUK KIM[3], SEONG-SU KIM[1] AND CHANG-KEUN KANG[3]
[1]*Climate & Marine Environment Team, Korea Marine Environment Management Corporation, Seoul 135-870, Korea*
[2]*Department of Oceanography, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea*
[3]*Ocean Science and Technology Institute, Pohang University Science and Technology, Gyeongbuk 790-784, Korea*

High-Performance Liquid Chromatograph(HPLC)를 이용하여 식물플랑크톤의 광합성색소를 분석한 결과를 토대로 CHEMTAX 프로그램을 이용하여 식물플랑크톤 군집조성을 추정하는 방법이 많이 이용되고 있다. CHEMTAX 프로그램은 식물플랑크톤 군집별(class level)로 체내에 존재하는 주요색소의 chlorophyll *a*에 대한 상대적인 비 값을 기초로 분석을 한다. 본 연구는 국내 해역에서 분리한 식물플랑크톤 군집별 주요 종들이 가지는 광합성색소의 상대적인 비 값을 파악하고 이 자료를 기초로 남해안에 위치한 여자만과 가막만에서 측정한 광합성색소 분석결과에 대해서 CHEMTAX 프로그램을 이용하여 식물플랑크톤의 군집조성을 파악하였다. 국내해역에 존재하는 같은 군집 종들 사이에서도 주요색소의 상대적인 비 값은 차이를 보였으며, 국외의 다른 해역에서 제시된 상대적인 비 값과도 상당한 차이를 보였다. 본 연구에서 얻은 비 값을 기초로 식물플랑크톤 군집조성을 분석한 결과, 다른 해역에서 제시된 비 값을 이용하여 분석한 결과와 유의한 차이를 보였다. 우점하는 군집(bacillariophyceae와 dinophytes)에 대해서는 5% 이내에서 차이를 보였으며, 비록 chlorophyll *a*에 대해서 낮은 기여도를 보이지만 pico와 nano 크기의 군집들(cyanophytes와 prasinophytes)에서는 상당한 차이(2배 이상)를 보였다. 비록 HPLC-CHEMTAX 분석방법은 식물플랑크톤 군집조성 연구에 유용하게 이용되고 있지만, 보다 정확한 결과와 식물플랑크톤의 생리, 생태를 이해하기 위해서는 연구해역에 존재하는 식물플랑크톤 종들에 대한 주요색소의 상대적인 비 값에 대한 연구가 계속적으로 진행되어야 할 것으로 판단된다.

Many studies of the phytoplankton community structure have been conducted using the CHEMTAX program on the basis of the photosynthetic pigment concentrations measured by a HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) technique. The CHEMTAX program determines the contribution of each phytoplankton class to total phytoplankton biomass (chlorophyll *a*) based on the ratios of marker pigment to chlorophyll *a* of phytoplankton group. In this study, the marker pigment/chlorophyll *a* ratios were investigated in phytoplankton species isolated from marine waters around the Korean peninsula. These results were used as the input pigment ratios of the CHEMTAX program to investigate phytoplankton community structure in Korean coastal waters (Yeoja and Gamak Bay). There were significant differences in the ratios of marker pigment to chlorophyll *a* among the different species within the same algal class. There was a significant difference between the values of our ratios and the previously used ratios in other regions of the world. When phytoplankton community composition was calculated using our initial ratios in Yeoja and Gamak Bay, our results were significantly different from the results calculated on the basis of initial ratios of marker pigment in phytoplankton suggested in other marine waters. The estimates of the contributions of the major algal groups (bacillariophyceae and dinophytes) to total chlorophyll *a* varied within 5% depending on the initial ratios chosen. The variations of estimates for the pico- and nanoplankton (cyanophytes and prasinophytes), which have relatively low contributions to total chlorophyll *a*, were higher than those for major algal group. Although the HPLC-pigment measurements com-

*Corresponding author: wbluesea@koem.or.kr

bined with CHEMTAX analysis are useful for identifying and qualifying phytoplankton community structure, further researches for the pigment ratios of the dominant phytoplankton species presenting in a given area are also needed.

Keywords: HPLC, CHEMTAX, Phytoplankton community structure, Photosynthetic pigment, Yeoja Bay, Gamak Bay

서 론

식물플랑크톤은 해양의 먹이망(food web)에서 기초 생산자로서 중요한 위치를 차지하고 있을 뿐만 아니라 전 지구적인 규모의 이산화탄소 순환에 있어서 대기의 이산화탄소 양을 조절하는 중요한 역할을 하고 있어 이들의 생체량(biomass)과 군집구조(community structure)에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Azam *et al.*, 1983; Karl, 1999; Sabine *et al.*, 2004).

전통적으로 식물플랑크톤의 생체량과 군집조성에 대한 연구는 흡광광도계나 형광분석기를 이용하여 chlorophyll *a*의 농도를 측정하고(Holm-Hansen *et al.*, 1965; Strickland and Parsons, 1972) 현미경 관찰을 통하여 식물플랑크톤 종조성 분석을 실시해 왔으나, 이들 방법은 chlorophyll *a* 측정의 경우 chlorophyll *a* 이외의 다른 광합성색소(특히, chlorophyll *b*와 *c*)와 chlorophylls의 분해산물과의 광 흡수 밴드의 중복으로 인하여 과소 또는 과대 평가될 수 있다(Gieskes and Kraay, 1983; Mantoura and Llewellyn, 1983). 또한 현미경 관찰을 통한 종조성 분석은 정확한 분류학적 지식과 많은 시간과 노력을 필요로 한다는 문제점을 가지고 있다. 이를 보완하기 위해서 HPLC를 이용하여 식물플랑크톤의 광합성색소를 분석하는 방법이 도입되었다.

HPLC를 이용한 방법은 각각의 색소를 분리한 상태에서 측정하므로 정확한 chlorophyll *a* 농도를 측정할 수 있으며, 보조색소(carotenoid 계열)들의 분석을 통하여 식물플랑크톤의 군집조성(class level)에 대한 정보를 제공한다(Wright *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1996). 특히, 일반적인 현미경 관찰을 통하여 구별하기 힘든 pico 또는 nano 크기의 식물플랑크톤 군집구조에 대한 유용한 정보를 제공해 준다(Mackey *et al.*, 1998). 또한 chlorophyll의 분해산물인 chlorophyllide와 phaeopigment의 분석을 통하여 식물플랑크톤의 생리적인 상태와 상위소비자에 의한 섭이 강도(grazing intensity) 정도를 파악할 수 있으며(Bidigare *et al.*, 1986; Burkill *et al.*, 1987), 광보호 색소(diadinoxanthin, diatoxanthin)의 상대적인 비 값을 이용하여 수괴의 수직 혼합속도 등을 추적하는데 이용하여 왔다(Welschmeyer and Hoepffner, 1986).

그러나 이들 식물플랑크톤이 가지는 광합성색소의 농도 분포만으로는 식물플랑크톤의 군집구조와 분포를 이해하는데 한계가 있어서 HPLC를 이용한 광합성색소 분석결과를 토대로 식물플랑크톤 생체량(chlorophyll *a*)에 대한 식물플랑크톤 각 군집별 기여도를 평가하기 위한 노력이 시작되었다(Gieskes and Kraay, 1983; Everitt *et al.*, 1990; Leterlier *et al.*, 1993). 그러나 대부분의 방법들은 식물플랑크톤의 주요색소를 이용한 군집별 기여도를 평가하기 위한 관계식을 유도하기 어렵고 여러 군집에 함께 존재하는 주요색소들에 대해서 보정 하는데 어려움이 있었다. Mackey *et al.*(1996)은 이러한 단점을 보완하기 위해서 최근에 보다 정확하고 쉽게 사용할 수 있는 Excel 기반의 CHEMTAX 프로그램을 개발하였다.

국내에서 HPLC와 CHEMTAX를 이용한 식물플랑크톤 군집조성에 대한 연구는 제주도 연안에서 수괴의 특성 차이에 따른 식물플랑크톤 군집조성 변화(Lee *et al.*, 2009b), 남해안에 위치한 가막만 내에서 계절별 군집조성의 변화(Oh *et al.*, 2008), 그리고 해저 지하수 유출과 적조발생 또는 식물플랑크톤 군집조성과의 관계를 파악하기 위한 연구에 이용되었다(Lee and Kim, 2007; Lee *et al.*, 2009a; Lee *et al.*, 2010).

CHEMTAX 프로그램은 연구해역에 존재하는 식물플랑크톤 각 군집별로 가지는 주요색소의 chlorophyll *a*에 대한 상대적인 비를 기초로 분석한다. 그러나 식물플랑크톤 내에 존재하는 주요색소의 상대적인 비는 서식환경, 특히 영양염류와 광조건에 따라서 달라지게 되므로 연구해역에 맞는 상대적인 비 값을 이용하여 분석해야 한다(Latasa and Berdalet, 1994; Goericke and Montaya, 1998; Mackey *et al.*, 1998; Schlüter *et al.*, 2000). 그러나 아직까지 국내 해역에서 분리한 식물플랑크톤 내에 존재하는 주요색소들의 상대적인 비에 대한 연구 결과는 전무하다.

본 연구는 국내 해역에서 분리한 식물플랑크톤 군집별 주요 종들에 대해서 HPLC를 이용하여 광합성색소를 분석하고 이들의 상대적인 비를 알아보고자 한다. 또한 남해안에 위치한 여자만과 가막만 내에서 현장조사를 통해 얻은 광합성색소 분석 결과를 CHEMTAX 프로그램을 이용하여 식물플랑크톤의 군집조성 분석을 실시하고 다른 해역에서 제시한 상대적인 비 값을 이용하여 분석한 결과와 비교하였다.

재료 및 방법

식물플랑크톤 군집별 주요 종과 현장시료 채취

국내 연안과 외양에서 분리하여 배양한 식물플랑크톤의 각 군집별 주요 종은 한국해양미세조류은행(KMMCC: Korea Marine Microalgae Culture Center), 부경대학교 미생물학과, 그리고 한국해양연구원으로부터 분양 받았으며, 이들 각각의 종들에 대한 정보는 Table 1에 나타내었다. HPLC-CHEMTAX 분석방법을 이용한 식물플랑크톤 군집조성 추정결과에 대한 고찰을 위하여 2009년 8월에 남해안에 위치한 여자만과 가막만 내의 각각 4개 정점에서 해수시료를 채취하여 광합성색소 분석을 실시하였다.

식물플랑크톤의 광합성색소 분석

HPLC를 이용한 식물플랑크톤의 광합성색소 분석을 위해서 채수기를 이용하여 해수를 채수하고 해수 1 L를 GF/F 여과지(47 mm)로 여과하였다. 여과지는 알루미늄 호일에 싸서 드라이아이스에 보관하여 실험실로 운반하였고, HPLC 분석 전까지 초저온냉동고(-80 °C)에 보관하였다. 식물플랑크톤의 광합성색소는 95% 메탄올 5 mL로 암냉소에서 24시간 이내에 추출하였으며, 색소 추출 및 분쇄시 발생할 수 있는 시료의 손실을 보정하기 위해서 내부 표준물질로써 canthaxanthin 50 μL를 첨가하였다(Wright *et al.*,

Table 1. Culture list donated from KMMCC, PKNU, and KORDI

Species	Culture origin	Medium	Temp. (°C)	Sail.	Irradiance	Main marker pigments
Dinophyceae						Peridinin
Scrippsiella trochoidea	PKNU	f/2	20	30	120 μE m^{-2} s^{-1}	
Alexandrium catenella	PKNU	f/2	20	30	120 μE m^{-2} s^{-1}	
Akashiwo sanguinea	PKNU	f/2	20	30	120 μE m^{-2} s^{-1}	
Fabriocapca japonica	PKNU	f/2	20	30	120 μE m^{-2} s^{-1}	
Gyrodinium impudicum	PKNU	f/2	20	30	120 μE m^{-2} s^{-1}	
Prorocentrum micans	PKNU	f/2	20	30	120 μE m^{-2} s^{-1}	
Bacillariophyceae						Fucoxanthin
Navicula elegans	PKNU	f/2	20	30	30 μE m^{-2} s^{-1}	
Skeletonema costatum	PKNU	f/2	20	30	30 μE m^{-2} s^{-1}	
Skeletonema costatum	KMMCC (B-285)	f/2	20	33	2700 Lux	
Chlorophyceae						Lutein, Chlorophyll *b*
Chlorella ellipsoidea	PKNU	f/2	20	30	30 μE m^{-2} s^{-1}	
Chlorella vulgaris	PKNU	f/2	20	30	30 μE m^{-2} s^{-1}	
Dunaliella tertiolecta	KMMCC (C-9)	f/2	20	33	2700 Lux	
Nannochloris osulata	PKNU	f/2	20	30	30 μE m^{-2} s^{-1}	
Cyanophyceae						Zeaxanthin
Oscillatoria angustrissima	PKNU	f/2	20	30	30 μE m^{-2} s^{-1}	
Oscillatoria angustrissima	KMMCC (CY-3)	f/2	20	33	300 Lux	
Synechococcus sp.	KORDI	f/2	20	30	-	

[1]KMMCC, Korea Marine Microalgae Culture Center; PKNU, Pukyong National University; KORDI, Korea Ocean Research and Development Institute

1991; Jeffrey, 1997). 추출 후 분석 직전에 cell의 파쇄를 위하여 초음파 분쇄를 5분간 실시한 후 2500 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액 1 mL를 취하여 300 μL의 이온교환수와 잘 섞은 후, 100 μL의 loop에 주입하여 분석하였다.

표준색소의 농도는 기존에 알려진 흡광계수를 이용하고 흡광도는 최대흡수파장과 750 nm에서 각각 측정하여 흡광도 값을 보정하여 계산하였다(Park and Park, 1997). Standard response factor(Rf)는 표준물질을 HPLC(Shimadzu systems, Japan)에 주입하여 피크 면적을 계산하고, 이 면적으로 표준물질의 농도를 나누어 계산하였다. 현장시료의 색소 정량식은 다음과 같다.

$$C = \text{Area} \times Rf \times (Ve/Vs) \quad (1)$$

C = concentration [μg L^{-1}]

Area = area of the peak in sample [area]

Rf = standard response factor [μg L^{-1} $area^{-1}$]

$$Ve = \frac{AIS}{(\text{peak area of IS added to sample}) \times (\text{volume of IS added to sample}) \text{ [L]}}$$

AIS: peak area of the internal standard (IS) when 1 mL IS is mixed with 300 μL of H_2O

Vs = volume of filtered water sample [L]

색소 분석을 위한 HPLC와 용매 system 그리고 각 색소의 추출용매와 흡광계수(E)는 각각 Table 2와 3에 나타내었다. 색소분리를 위한 용매 구배와 flow rate는 Zapata *et al.*(2000)에 의해서 제시된 방법을 이용하였다.

HPLC 분석을 통하여 얻은 chromatogram의 피크에 대한 동정은 표준색소의 retention time과 KMMCC로부터 분양 받은 단일종으로 배양된 미세조류로부터 얻은 추출 색소의 retention time과 비교하여 결정하였다. 표준색소는 chlorophyll *a*(Sigma Co.)와 chlorophyll *b*, fucoxanthin, peridinin, zeaxanthin, lutein, 19'-hexanoyloxy-fucoxanthin, 19'-butanoyloxy-fucoxanthin, neoxanthin, prasinoxanthin, alloxanthin, violaxanthin(DHI, Denmark)을 구입하여 이용하였다. 모든 색소는 UV-VIS 검출기 자료를 사용하여 정성, 정량 하였으며, 형광자료는 chlorophyll 계열의 색소를 정성하는데 보조자료로 활용하였다.

Table 2. HPLC and solvent system

HPLC : Shimadzu HPLC system (Shimadzu Co., Japan)
Detector : absorbance (Shimadzu SIL-20A, Japan) at 440 nm
fluorescence (Shimadzu RF-10AXL, Japan) at Ex : 440 nm Em : 650 nm
Column : Waters Symmetry C_8 column (150×4.6 mm, particle size : 3.5 μm, 100 Å pore size)
Sample loop : 100 μL
Solvent A : MeOH: ACN: aqueous pyridine solution (0.25 M) (50:25:25 v:v:v)
Solvent B : MeOH: ACN: Acetone (20:60:20 v:v:v)

*MeOH: Methanol; ACN: Acetonitrile

CHEMTAX 프로그램

CHEMTAX 프로그램은 Mackey *et al.*(1996)에 의해서 해수 시료 중 광합성색소 분석 결과와 식물플랑크톤 군집별로 가지는 주요색소의 상대적인 비 값을 기초로 인자분석(factor analysis)과 최대경사 알고리즘(steepest descent algorithm)을 이용하여 식물플랑크톤의 생체량(chlorophyll *a*)에 대한 식물플랑크톤 각 군집(class level)별 상대적인 기여도를 추정하기 위해서 만들어진 프로그램

Table 3. Elution order of the photosynthetic pigments used to calculate the phytoplankton community structure using the CHEMTAX program and their extinction coefficients (E)

Peak no.	Pigment	Wavelength	Solvent	E (L g^{-1} cm^{-1})
1	Peridinin	472	Ethanol	132.5
2	19'-butanoyloxy-fucoxanthin	446	Ethanol	160
3	Fucoxanthin	449	Ethanol	160
4	19'-hexanoyloxy-fucoxanthin	447	Ethanol	160
5	Neoxanthin	439	Ethanol	224.3
6	Prasinoxanthin	454	Ethanol	160
7	Violaxanthin	443	Ethanol	255
8	Alloxanthin	453	Ethanol	262
9	Lutein	445	Ethanol	255
10	Zeaxanthin	450	Ethanol	254
11	Chlorophyll *b*	646.8	90% acetone	51.36
12	Chlorophyll *a*	662.7	90% acetone	88.15

이다. CHEMTAX 분석을 통해서 얻은 결과는 초기값으로 이용되는 식물플랑크톤 군집별 주요색소의 상대적인 비 값에 영향을 받게 된다. 이들 비 값은 영양염류와 광조건 등에 의해서 달라질 수 있으므로(Latasa and Berdalet, 1994; Goericke and Montaya, 1998; Mackey *et al.*, 1998; Schlüter *et al.*, 2000), 연구해역에 따라 적절한 식물플랑크톤 군집별 광합성색소의 상대적인 비 값을 적용하여 분석한다(Lohrenz *et al.*, 2003).

결과 및 고찰

국내 주요 식물플랑크톤 광합성색소 분석

국내 해역에서 분리하여 배양중인 주요 종들을 분양 받아(Table 1) 측정한 식물플랑크톤 군집별 chlorophyll *a*에 대한 주요 광합성색소의 상대적인 비는 Table 4와 5에 나타내었다. Mackey *et al.*(1996)에 의해서 적도태평양과 남빙양에서 분리한 식물플랑크톤 중 광합성색소의 상대적인 비는 Table 5에 나타내었다. 식물플랑크톤 군집은 크게 9개의 군집으로 구분되는데(bacillariophyceae, chlorophytes, dinophytes, cyanophytes, prymnesiophytes, pelagophytes, cryptophytes, prasinophytes, prochlorophytes) (Anderson *et al.*, 1996), 본 연구에서는 크기가 작은 식물플랑크톤의 경우 분리 및 배양의 어려움 때문에 국내 해역에서 분리되어 배양된 4개 군집(bacillariophyceae, dinophytes, chlorophytes, cyanophytes)의 주요 종들을 분양 받아 분석을 실시하였다.

Dinophytes의 주요색소인 peridinin의 경우 chlorophyll *a*에 대

Table 4. The ratios of maker pigments to the chlorophyll *a* in the culture species donated from KMMCC, PKNU, and KORDI

Taxa/species	Perid	But-fuco	Fuco	Hex-fuco	Neo	Pras	Viola	Allo	Lut	Zea	Chl *b*	Chl *a*
Dinophyceae												
Scrippsiella trochoidea	1.2426											1
Alexandrium catenella	0.6939											1
Akashiwo sanguinea	0.8780											1
Fabriocapca japonica	0.6988											1
Gyrodinium impudicum	0.4487											1
Prorocentrum micans	0.5543											1
Bacillariophyceae												
Navicula elegans			0.5946									1
Skeletonema costatum			0.5322									1
Skeletonema costatum			0.5122									1
Chlorophyceae												
Chlorella ellipsoidea					0.0668		0.0386		0.2590	0.0088	0.3456	1
Chlorella vulgaris					0.0591		0.0279		0.2108	0.0040	0.3241	1
Dunaliella tertiolecta					0.1103		0.0864		0.1875	0.0025	0.6935	1
Nannochloris osulata					0.0661		0.0297		0.2440	0.0099	0.3386	1
Cyanophyceae												
Oscillatoria angustissima										0.0839		1
Oscillatoria angustissima										0.0608		1
Synechococcus sp.										0.2808		1

[1]Abbreviations: Perid, Peridinin; But-fuco, 19'-butanoyloxy-fucoxanthin; Fuco, Fucoxanthin; Hex-fuco, 19'-hexanoyloxy-fucoxanthin; Neo, Neoxanthin; Pras, Prasinoxanthin; Viola, Violaxanthin; Allo, Alloxanthin; Lut, Lutein; Zea, Zeaxanthin; Chl *b*, Chlorophyll *b*; Chl *a*, Chlorophyll *a*.

Table 5. The initial pigment ratios used for the CHEMTAX program. *Pigment ratios from our cultures

	Taxa	Perid	But-fuco	Fuco	Hex-fuco	Neo	Pras	Viola	Allo	Lut	Zea	Chl *b*
Initial ratio (from our cultures)	Prasino	0	0	0	0	0.3768	0.1413	0.2165	0	0.0843	0	0.2807
	Dino*	0.7527	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Crypto	0	0	0	0	0	0	0	0.1927	0	0	0
	Prymne	0	0	0	1.7139	0	0	0	0	0	0	0
	Pelago	0	0.5076	0.8354	0.2225	0	0	0	0	0	0	0
	Chloro*	0	0	0	0	0.0756	0	0.0457	0	0.2253	0.0063	0.4255
	Cyano*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1418	0
	Bacilla*	0	0	0.5464	0	0	0	0	0	0	0	0
Initial ratio (Mackey *et al.*, 1996)	Prasino	0	0	0	0	0.3768	0.1413	0.2165	0	0.0843	0	0.2807
	Dino	0.7471	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Crypto	0	0	0	0	0	0	0	0.1927	0	0	0
	Prymne	0	0	0	1.7139	0	0	0	0	0	0	0
	Pelago	0	0.5076	0.8354	0.2225	0	0	0	0	0	0	0
	Chloro	0	0	0	0	0.0495	0	0.1185	0	0.1294	0.3262	0.0168
	Cyano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6795	0
	Bacilla	0	0	1.0198	0	0	0	0	0	0	0	0

[1]Abbreviations: Prasino, Prasinophytes; Dino, Dinophytes; Crypto, Cryptophytes; Prymne, Prymnesiophytes; Pelago, Pelagophytes; Chloro, Chlorophytes; Cyano, Cyanophytes; Bacilla, Bacillariophyceae.
[2]See Table 4 for marker pigment abbreviations.

한 상대적인 비가 0.4487-1.2426(평균 0.7257±0.2807, n=6)의 범위였으며, 동해 남부와 경남 연안에서 주로 무해성 적조를 일으키는 *Scrippsiella trochoidea*가 가장 높은 비 값(peridinin: chlorophyll *a*=1.2426)을 보였다(Table 4). Bacillariophyceae의 경우 주요색소인 fucoxanthin은 0.5123-0.5946(평균 0.5464±0.0430, n=3)의 범위였으며, 종 사이에 큰 차이를 보이진 않았다. 녹조류(green algae) 계열인 chlorophytes의 경우 주요색소로써 lutein과 chlorophyll *b*를 가지고 있으며 chlorophyll *a*에 대한 상대적인 비는 각각 평균 0.2250±0.0323(n=3)와 0.4255±0.1789로 나타났다. Cyanophytes의 주요색소인 zeaxanthin은 평균 0.1418±0.1209(n=3)로 높은 변이 값을 보였는데 한국해양연구원으로부터 분양 받은 *Synechococcus* sp. 중에 존재하는 zeaxanthin의 상대적인 비(0.2808)가 가장 높게 나타났다(Table 4). 크기가 큰 bacillariophyceae와 dinophytes 중에 존재하는 주요색소의 상대적인 비는 종간 큰 차이는 보이지 않는데 반해서 작은 크기의 식물플랑크톤 그룹에서 종에 따라서 상당한 차이를 보였다.

본 연구를 통해서 얻은 군집별 주요색소의 상대적인 비와 Mackey *et al.*(1996)에 의해서 제시된 비 값과 비교했을 때 dinophytes의 경우 유사한 범위에 있었으며(peridinin:chlorophyll *a*=0.7471), bacillariophyceae는 약 2배 정도 낮은 값(fucoxanthin:chlorophyll *a*=1.0198)을 보였다. Bacillariophyceae의 주요색소의 상대적인 비 값은 국내 해역과 인접한 동중국해에서 군집구조를 이해하는데 사용한 비 값과 유사하게 나타났다(0.47-0.86)(Furuya *et al.*, 2003). 국내 해역에서 분리한 cyanophytes의 주요색소인 zeaxanthin의 chlorophyll *a*에 대한 비 값(0.1418±0.1209(n=3))은 Mackey *et al.*(1996)와 Furuya *et al.*(2003)에 의해서 제시된 비 값(각각 0.6795와 0.35-2.06) 보다 상대적으로 높게 나타났다. Chlorophytes의 경우 군집조성을 추정하는데 이용되는 주요색소로 chlorophyll *b*, lutein, neoxanthin, 그리고 violaxanthin을 가지고 있는데 색소별로 상대적인 비 값이 Mackey *et al.*(1996)에 의해서 제시된 값과 상당한 차이를 보였다. 국내 해역 종들에 존재하는 lutein의 상대적인 비 값이 2배 정도 높게 나타났으며, chlorophyll *b*의 경우는 10배 이상 차이를 보였다(Table 5). 국내 해역 종에서 측정한 비 값은 동중국해에서 사용한 chlorophyll *b*/chlorophyll *a*에 대한 비 값(0.29-0.46)과 유사하였다(Furuya *et al.*, 2003). 이러한 식물플랑크톤이 가지는 광합성색소의 상대적인 비는 식물플랑크톤의 서식환경(영양염류와 광량)의 변화에 따라 달라지므로(Latasa and Berdalet, 1994; Mackey *et al.*, 1996; Goericke and Montaya, 1998; Schlüter *et al.*, 2000), 앞으로 국내 해역에 존재하는 주요 식물플랑크톤 종들에 대해서 광합성색소의 상대적인 비 값의 변화에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

여자만, 가막만 내 광합성색소 분석결과

식물플랑크톤 각 군집별 주요색소의 상대적인 비(초기값) 값의 변화에 따라 CHEMTAX 프로그램을 이용한 군집조성 분석결과의 차이를 비교하기 위해서 남해안의 인접한 두 내만(여자만, 가막만)에서 식물플랑크톤의 광합성색소 분석을 실시하였다(Table 6). Chlorophyll *a* 농도는 여자만에서는 5.2-14.4(10.3±4.6) μg L^{-1} 범위였으며, 가막만에서는 1.56-7.45(3.36±2.76) μg L^{-1}로 여자만에서 상대적으로 높은 생산량을 보였다. 두 해역 모두 bacillariophyceae의 주요색소인 fucoxanthin이 가장 높은 농도를 보였으며, 여자만과 가막만에서 각각 평균 6.49±2.18, 1.28±1.27 μg L^{-1}로 나타났다. 나머지 주요색소들의 농도는 0.5 μg L^{-1} 이하로 낮은 농도를 보였다(Table 6).

CHEMTAX 프로그램을 이용한 군집조성 분석

다양한 광합성색소를 빠르고 정확하게 분석 가능한 HPLC의 발달과 식물플랑크톤 생체량에 대한 각 군집별 기여도를 추정할 수

Table 6. The concentrations (μg L^{-1}) of maker pigments analyzed in (A) Yeoja and (B) Gamak Bay in August 2009

	St.	Perid	But-fuco	Fuco	Hex-fuco	Neo	Pras	Viola	Allo	Lut	Zea	Chl *b*	Chl *a*
(A) Yeoja Bay	1	0.16	0.03	4.37	0.01	0.02	0.05	0.02	0.02	0.00	0.02	0.24	7.67
	2	0.16	0.10	6.99	0.06	0.03	0.13	0.01	0.08	0.00	0.07	0.15	5.24
	3	0.05	0.08	9.32	0.04	0.05	0.19	0.03	0.06	0.01	0.08	0.38	14.38
	4	0.09	0.07	5.27	0.03	0.01	0.05	0.02	0.03	0.00	0.03	0.35	13.93
(B) Gamak Bay	1	0.03	0.11	3.17	0.02	0.01	0.05	0.02	0.02	0.00	0.01	0.24	7.45
	2	0.15	0.02	0.77	0.03	0.02	0.04	0.01	0.10	0.00	0.02	0.29	2.51
	3	0.03	0.01	0.68	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.10	1.90
	4	0.06	0.01	0.48	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.06	0.11	1.56

[1]See Table 4 for marker pigment abbreviations.

있는 CHEMTAX 프로그램(Mackey *et al.*, 1996)이 개발되면서 이들 방법을 이용한 식물플랑크톤 군집조성에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. CHEMTAX 프로그램은 식물플랑크톤의 각 군집별 chlorophyll *a*에 대한 주요색소들의 상대적인 비 값을 기초로 식물플랑크톤의 군집구조를 추정할 수 있다. CHEMTAX 프로그램에는 적도태평양과 남빙양에서 분리한 식물플랑크톤 군집별로 가지는 주요색소들의 상대적인 비 값(평균값)을 초기값으로 제시하고 있으며, 광량에 따른 광합성색소의 상대적인 비의 변화에 의한 분석 오류를 줄이기 위해서(Mackey *et al.*, 1996; Schlüter *et al.*, 2000; Hassen *et al.*, 2008) 수심 50 m 이내와 이심으로 구분하여 초기값이 다르게 설정되어있다.

Mackey *et al.*(1998)은 서부 적도 태평양 해역에서 관측한 광합성색소 분석 결과들을 수심별로 서로 구간이 겹치게 하여 3개의 구간(0-75, 70-105, 100-150 m)으로 나누어 CHEMTAX 프로그램 분석한 결과, 같은 수심의 자료라도 포함되는 데이터 집합(data set)에 따라 다른 결과값이 나오는 것을 확인하였다. CHEMTAX 프로그램은 식물플랑크톤의 상대적인 광합성색소 비의 초기값과 실제 해양에서 측정한 값들 사이의 인자분석(factor analysis)과 최대경사 알고리즘(steepest descent algorithm)을 이용하여 residue가 가장 적게 발생하는 최종 비 값(final ratio)을 다시 구하고 이 값을 이용해서 식물플랑크톤의 각 군집별 기여도를 평가한다. 따라서 초기값으로 들어가는 식물플랑크톤 중 특정 군집의 주요색소 비 값의 변화는 데이터 집합 내에 존재하는 전체 군집에 영향을 미치게 된다. 따라서 외양역에서 또는 계절변화, 해역별 식물플랑크톤의 군집변화를 비교할 때 환경변화(광량, 영양염류)에 대한 요인들을 고려하여 데이터 집합을 따로 구성하여 분석을 해야 한다(Wright and van den Enden, 2000; Hassen *et al.*, 2008).

최근에 Lee *et al.*(2009b)은 제주도 연안에서 관측한 광합성색소 분석 결과를 Mackey *et al.*(1996)과 Lohrenz *et al.*(2003)에 의해서 제시된 각각의 초기값을 이용하여 CHEMTAX 프로그램으로 식물플랑크톤의 군집구조 분석을 실시하였다. 그 결과 제주도 연안에서 우점하는 그룹이었던 prasinophytes, bacillariophyceae, cryptophytes, 그리고 dinophytes의 경우 약 15%이내에서 chlorophyll *a*에 대한 기여도가 차이를 보이는 것으로 나타났으며, 크기가 작은 pico나 nano 플랑크톤의 경우 오차 범위가 더 크게 나는 것으로 보고하였다.

여자만과 가막만에서 식물플랑크톤의 군집조성을 살펴보기 위해서 현장 관측한 광합성색소 분석결과를 각각의 만별로 데이터 집합을 만들어 CHEMTAX 프로그램을 이용하여 분석하였다. CHEMTAX 분석을 위한 각 식물플랑크톤 군집별 광합성색소의 상대적인 비(초기값)는 4개 군집(bacillariophyceae, dinophytes, chlorophytes, cyanophytes)에 대해서는 국내 해역에서 분리하여 분석한 값을 이용하고 이외의 식물플랑크톤 군집에 대해서는 Mackey *et al.*(1996)에 의해서 제시된 값을 사용하였다(Table 5).

여자만 내에서 분석한 식물플랑크톤 군집은 chlorophyll *a*의 80% 이상 bacillariophyceae가 차지하였으며, 이외에 chlorophytes, cryptophytes, dinophytes, cyanophytes가 각각 5% 이내로 기여하였다. 반면 가막만 내에서는 정점 1과 3에서는 80% 이상 bacillariophyceae가 우점하였으며, 정점 2와 4에서는 bacillariophyceae가 각각 64, 78%를 차지하였다. 정점에 따라 cyanophytes(약 26%), cryptophytes(약 19%), dinophytes(약 8%), chlorophytes(약 11%) 등이 상대적으로 높은 기여도를 보였다(Table 7).

본 연구결과를 Mackey *et al.*(1996)에 의해서 제시된 식물플랑크톤 각 군집별 주요색소의 상대적인 비 값을 이용한 CHEMTAX 분석결과와 비교하였다. 그 결과 여자만에서 chlorophyll *a*에 대한 bacillariophyceae의 기여도는 약 5% 이내에서 차이를 보였으며, 비록 chlorophyll *a*에 대한 기여도는 낮지만 cyanophytes(5% 이하)의 경우 2-6배 정도 차이를 보였다. 또한, prasinophytes의 경우 2배 정도 차이를 보였다. 가막만 정점 4에서는 본 연구에서 측정한 초기값을 이용해서 측정한 결과 cyanophytes의 기여도가 약 26% 정도 차지하였으나, Mackey *et al.*(1996)에 의해서 제시된 값을 이용하여 분석하였을 경우 약 6%를 차지하였다. Bacillariophyceae에 대해서는 각각 57, 81%를 차지하는 것으로 나타났다. 대체로 우점종에 대해서는 chlorophyll *a*에 대한 상대적인 기여도에서 큰 차이를 보이지 않았지만 크기가 작고 기여도가 낮은 식물플랑크톤 군집에서는 상당한 차이를 보여, CHEMTAX 프로그램을 이용하여 분석한 결과를 토대로 낮은 기여도를 보이는 식물플랑크톤 군집에 대한 고찰을 할 경우 주의해야 할 것으로 판단된다.

같은 주요색소를 가지고 있는 군집의 식물플랑크톤 간의 주요색소 비 값 또한 상당한 차이를 보였다. 국내의 동해 남부와 경남 연안에서 적조를 일으키는 *S. trochoidea*의 주요색소의 비 값(peridinin:chlorophyll *a*=1.2426)은 같은 군집의 다른 종들에 비해서 2배 정도 높은 값을 보였다. 따라서 *S. trochoidea*의 번성이 일어 났을 때 일반적인 상대적인 비 값을 이용하여 CHEMTAX 프로그램을 이용하여 군집조성 분석을 실시한다면 예기치 않은 오류를 범할 수 있을 것이다.

Table 7. The community composition of phytoplankton (%) calculated using the CHEMTAX program (a) based on the initial ratios obtained from Korean phytoplankton species (b) the initial ratios suggested by Mackey *et al.* (1996)

		St.	Prasino	Dino	Crypto	Prymne	Pelago	Chloro	Cyano	Bacilla
(a)	Yeoja Bay	1	0.5	2.9	1.6	0.0	0.8	5.6	2.0	87
		2	2.4	2.8	4.5	0.1	2.7	2.0	4.1	82
		3	1.9	0.5	2.4	0.0	1.1	3.7	4.1	86
		4	0.1	1.1	2.4	0.0	1.2	5.4	3.3	86
	Gamak Bay	1	0.7	0.5	1.3	0.0	2.8	3.0	1.1	91
		2	1.5	7.8	18.9	0.4	1.6	10.7	5.7	53
		3	0.9	1.9	1.1	0.3	0.8	5.1	5.5	84
		4	1.2	5.0	1.5	1.1	1.2	6.6	26.0	57
(b)	Yeoja Bay	1	5.9	2.9	1.6	0.0	0.8	0.0	0.4	88
		2	4.2	2.8	4.5	0.1	2.7	0.0	1.3	85
		3	5.2	0.5	2.4	0.0	1.1	0.0	0.9	90
		4	5.4	1.1	2.4	0.0	1.2	0.0	0.4	89
	Gamak Bay	1	3.1	0.5	0.8	0.0	3.0	0.0	0.2	92
		2	11.2	8.1	12.9	0.5	1.6	0.0	1.4	64
		3	5.3	1.9	0.6	0.4	0.8	0.0	1.1	90
		4	7.1	5.4	1.2	1.2	1.2	0.0	5.9	78

[1]See Table 5 for taxon abbreviations.

Irigoien *et al.*(2004)은 English Channel에서 식물플랑크톤의 군집조성 분석을 위하여 HPLC-CHEMTAX 분석과 현미경 관찰방법을 함께 실시하였다. 그 결과, 다른 식물플랑크톤의 군집임에도 불구하고 bacillariophyceae의 주요색소를 가지는 식물플랑크톤(예, dinophytes *Karenia mikimotoi*, haptophytes *Phaeocystis pouchetii*) 들의 번식이 일어났을 때 bacillariophyceae에 의한 bloom이 형성되는 것으로 오인할 수 있음을 제시하였다. 따라서 HPLC-CHEMTAX를 이용한 군집조성에 대한 결과 해석의 오류를 막기 위해서는 현미경 관찰의 병행과 식물플랑크톤 각각 종들에 대한 주요색소의 구성과 비에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

본 연구결과, 식물플랑크톤의 군집조성에 대한 연구를 수행하기 위해 HPLC-CHEMTAX 프로그램을 사용하는데 있어서 연구해역의 특성을 충분히 고려해야 하고, 이를 이용하여 얻은 결과의 해석은 현미경 관찰을 병행하여 우점종들에 대한 정보를 파악하고 이들의 주요색소들에 대한 상대적인 비 값에 대한 고찰이 있어야 할 것으로 판단된다. 또한, HPLC-CHEMTAX 분석과 flow cytometry를 이용하여 picoplankton의 분포에 대한 연구도 병행한다면 식물플랑크톤의 군집조성에 대한 연구에 있어서 더욱 유용한 정보를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2009-351-C00175).

참고문헌

Anderson, R.A., R.R. Bidigare, M.D. Keller and M. Latasa, 1996. A comparison of HPLC pigment signatures and electron microscopic observations for oligotrophic waters of the North Atlantic and Pacific Oceans. Deep-Sea Res. II, **43**: 517–537.

Azam, F., T. Fenchel, J.G. Field, J.S. Gray, L.A. Meyer-Reil and F. Thingstad, 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. Mar. Ecol. Prog. Ser., **10**: 257–263.

Bidigare, R.P., T.J. Frank, C. Zastrow and J.M. Brooks, 1986. The distribution of algal chlorophylls and their degradation products in the Southern Ocean. Deep-Sea Res., **33**: 923–937.

Burkill, P.H., R.F.C. Mantoura, C.A. Llewellyn and N.J.P. Owens, 1987. Microzooplankton grazing and selectivity of phytoplankton in coastal waters. Mar. Biol., **93**: 581–590.

Everitt, D.A., S.W. Wright, J.K. Volkman, D.P. Thomas and E.J. Lindstrom, 1990. Phytoplankton community compositions in the Southern Western equatorial Pacific determined from chlorophyll and carotenoid pigment distributions. Deep-Sea Res., **37**: 975–997.

Furuya, K., M. Hayashi, Y. Yabushita and A. Ishikawa, 2003. Phytoplankton dynamics in the East China Sea in spring and summer as revealed by HPLC-derived pigment signatures. Deep-Sea Res. II, **50**: 367–387.

Gieskes, W.W. and G.W. Kraay, 1983. Unknown chlorophyll *a* derivatives in the North Sea and the tropical Atlantic Ocean revealed by HPLC analysis. Limnol. Oceanogr., **28**: 757–766.

Goericke, R. and J.P. Montaya, 1998. Estimating the contribution of microalgal taxa to chlorophyll *a* in the field-variations of pigment ratios under nutrient- and light-limited growth. Mar. Ecol. Prog. Ser., **169**: 97–112.

Hassen, M.B., Z. Drira, A. Hamza, H. Ayadi, F. Akrout and H. Issaoui, 2008. Summer phytoplankton pigments and community composition related to water mass properties in the Gulf of Gabes. Estuar. Coast. Shelf Sci., **77**: 645–656.

Holm-Hansen, O., C.J. Lorenzen, R.W. Holmes and J.D.H. Strickland, 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. J. Cons. int. Explor. Mer., **30**: 3–15.

Irigoien, X., B. Meyer, R. Harris and D. Harbour, 2004. Using HPLC pigment analysis to investigate phytoplankton taxonomy: the importance of knowing your species. Helgol. Mar. Res., **58**: 77–82.

Jeffrey, S.W., 1997. Application of pigment methods to oceanography. In: Jeffery, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W. (eds) Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods, UNESCO Publishing, Paris.

Karl, D.M., 1999. A sea of change: Biogeochemical variability in the North Pacific subtropical gyre. Ecosystems, **2**: 181–214.

Latasa, M. and E. Berdalet, 1994. Effect of nitrogen or phosphorus starvation on pigment composition of cultured *Heterocapsa* sp. J. Plankton Res., **16**: 83–94.

Lee, Y.W., D.W. Hwang, G. Kim, W.C. Lee and H.T. Oh, 2009a. Nutrient inputs from submarine groundwater discharge (SGD) in Masan Bay, an embayment surrounded by heavily industrialized cities, Korea. Sci. Total Environ., **407**: 3181–3188.

Lee, Y.W. and G. Kim, 2007. Linking groundwater-borne nutrients and dinoflagellate red-tide outbreaks in the southern sea of Korea using a Ra tracer. Estuar. Coast. Shelf Sci., **71**: 309–317.

Lee, Y.W., G. Kim, W.A. Lim and D.W. Hwang, 2010. A relationship between submarine groundwater-borne nutrients traced by Ra isotopes and the intensity of dinoflagellate red-tides occurring in the southern sea of Korea. Limnol. Oceanogr., **55**: 1–10.

Lee, Y.W., J.M. Lee and G. Kim, 2009b. Identifying sharp hydrographical changes in phytoplankton community structure using HPLC pigment signatures in coastal waters along Jeju Island, Korea. Ocean Sci. J., **44**: 1–10.

Leterlier, R.M., R.R. Bidigare, D.V. Hebel, M. Ondrusek, C.D. Winn and D.M. Karl, 1993. Temporal variability of phytoplankton community structure based on pigment analysis. Limnol. Oceanogr., **38**: 1420–1437.

Lohrenz, S.E., C.L. Carroll, A.D. Weidemann and M. Tuel, 2003. Variations in phytoplankton pigments, size structure and community composition related to wind forcing and water mass properties on the North Carolina inner shelf. Cont. Shelf Res., **23**: 1447–1464.

Mackey, D.J., H.W. Higgins, M.D. Mackey and D. Holdsworth, 1998. Algal class abundances in the western equatorial Pacific: Estimation from HPLC measurements of chloroplast pigments using CHEMTAX. Deep-Sea Res. I, **45**: 1441–1468.

Mackey, M.D., D.J. Mackey, H.W. Higgins and S.W. Wright, 1996. CHEMTAX - a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser., **144**: 265–283.

Mantoura, R.F.C. and C.A. Llewellyn, 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. Anal. Chim. Acta, **151**: 297–314.

Oh, H.T., D.J. Kim, W.C. Lee, R.H. Jung, S.J. Hong, Y.S. Kang, Y.W. Lee and C. Tilburg, 2008. Composition of phytoplankton in Gamak Bay by CHEMTAX analyses. J. Environ. Sci., **17**: 1155–1167.

Park, M.O. and J.S. Park, 1997. HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. J. Korean Soc. Oceanogr., **32**: 46–55.

Sabine, C.L., R.A. Feely, N. Gruber, R.M. Key, K. Lee, J.L. Bullister, R. Wanninkhof, C.S. Wong, D.W.R. Wallace, B. Tilbrook, F.J. Millero, T.H. Peng, A. Kozyr, T. Ono and A.F. Rios, 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO_2. Science, **305**: 367–371.

Schlüter, L., F. Møhlenberg, H. Havskum and S. Larsen, 2000. The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll *a* ratios. Mar. Ecol. Prog. Ser., **192**: 49–63.

Strickland, J.D. and T.R. Parsons, 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2nd ed. Bull. Fish. Res. Bd. Can., pp. 167.

Welschmeyer, N.A. and N. Hoepffner, 1986. Rapid xanthophyll cycling: an in situ tracer for mixing in the upper ocean. EOS (Trans. Am. Geophys. Un.), **67**: 969.

Wright, S.W. and R.L. van den Enden, 2000. Phytoplankton community structure and stocks in the East Antarctic marginal ice zone (BROKE survey, January-March 1996) determined by CHEMTAX analysis of HPLC pigment signatures. Deep-Sea Res. II, **47**: 2363–2400.

Wright, S.W., S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, C.A. Llewellyn, T. Bjørnland, D. Repeta and N. Welschmeyer, 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser., **77**: 183–196.

Zapata, M., F. Rodríguez and J.L. Garrido, 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C_8 column and pyridine-containing mobile phases. Mar. Ecol. Prog. Ser., **195**: 29–45.

2011년 2월 28일 원고접수
2011년 8월 3일 수정본 채택
담당편집위원: 박명길