

Original article

식물플랑크톤 군집구성 파악을 위한 현미경관찰법과 지표색소분석법 비교 연구: CHEMTAX 프로그램 활용

김도균 · 최지수 · 오혜지¹ · 장광현¹ · 최광순² · 신경훈*

한양대학교 해양융합공학과, ¹경희대학교 환경학및환경공학과, ²한국수자원공사 K-water연구원

Comparison of Microscopy and Pigment Analysis for Determination of Phytoplankton Community Composition: Application of CHEMTAX Program. Dokyun Kim (0000-0002-5369-569X), Jisoo Choi (0000-0001-8316-7276), Hye-Ji Oh¹ (0000-0003-2098-8485), Kwang-Hyeon Chang¹ (0000-0002-7952-4047), Kwangsoon Choi² (0000-0002-9358-0627) and Kyung-Hoon Shin* (0000-0002-3169-4274) (Department of Marine Sciences and Convergent Technology, Hanyang University, Ansan 15588, Republic of Korea; ¹Department of Environmental Science and Engineering, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea; ²K-water Research Institute, Daejeon 34045, Republic of Korea)

Abstract To understand how to efficiently observe the biomass and community of phytoplankton, phytoplankton sampling was carried out from June to October 2019 at the Yeongju dam sediment control reservoir (YJ) and Bohyeonsan dam reservoir (BH1 and BH2). The results derived from microscopic observation, such as the conventional phytoplankton qualitative/quantitative analysis, and from the CHEMTAX method based on the pigments, were compared. The relative contribution of phytoplankton, calculated by the microscopy and CHEMTAX methods, showed a significant difference in all four classes: cryptophyta, chlorophyta, cyanobacteria, and diatoms. In addition, the correlation between the two observation methods was poor. This might be caused by methodological differences in microscopy that do not consider the varying cell sizes among phytoplankton species. In this study, by converting the cells into carbon, the slope between both carbon biomasses based on microscopy and CHEMTAX was improved close to the 1 : 1 line, and the y-intercept was closer to 0 for cryptophyta and diatoms. For cyanobacteria, the slope increased, the y-intercept decreased, and the plot approached 1 : 1 although the correlation coefficients were not improved in all classes. The present study suggests that application of CHEMTAX based on pigment analysis could be a possible approach to efficiently determine the relative carbon proportions of individual classes of phytoplankton community composition.

Key words: phytoplankton, biomass, microscopy, pigment, CHEMTAX, carbon contents

서 론

Manuscript received 6 December 2021, revised 17 December 2021, revision accepted 20 December 2021

* Corresponding author: Tel: +82-31-400-4158
E-mail: shinkh@hanyang.ac.kr

수 생태계에서 식물플랑크톤은 무기물로부터 유기물을 생성하는 일차생산자로서 (Odum, 1993) 동물플랑크톤과 고차소비자에게 에너지를 공급할 뿐만 아니라 전 지

구적인 규모의 탄소순환을 조절하는 역할을 하고 있으며 (Sabine *et al.*, 2004), 생태계 오염도 및 건강성 평가에 유용하게 활용될 수 있기 때문에 생체량과 군집 구조에 대한 연구가 지속적으로 이루어져 왔다 (Azam *et al.*, 1983; Karl, 1999).

식물플랑크톤의 생체량 (biomass)과 군집에 대한 연구는 전통적으로 분광광도법 (spectrophotometry)과 형광법 (fluorometry)을 이용하여 엽록소 *a* (chlorophyll *a*, Chl.*a*)의 농도 측정 (Holm-hansen *et al.*, 1965; Lorenzen, 1967; Bowles *et al.*, 1985) 및 현미경을 이용한 종 조성 직접 분석 등을 통해 진행되어 왔다. 그러나 Chl.*a* 농도 측정은 chlorophyll *b* 또는 chlorophyll *c*와 같은 분해산물에 의한 Chl.*a* 측정의 과소 또는 과대평가를 야기할 수 있으며 (Gieskes and Kraay, 1983; Welschmeyer, 1994), 현미경관찰법의 경우에는 크기가 작거나 분해되기 쉬운 세포를 과소 평가하기 쉽고 분류학적 지식과 많은 분석 시간이 요구된다는 어려움이 있다 (Roy *et al.*, 2006). 이러한 문제를 보완하기 위해 고성능 액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, HPLC)를 이용한 식물플랑크톤의 색소 (pigment) 분석법이 제안되었다 (Wright *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1996). 이 방법은 식물플랑크톤의 광합성 색소 (chlorophylls)와 보조 색소 (carotenoids)의 정성 및 정량 분석을 통해 식물플랑크톤의 생체량과 군집 조성을 비교적 신속하게 분석할 수 있는 장점이 있으며, 현미경관찰법으로 과소평가하기 쉬운 미소플랑크톤의 군집 구조 해석에 용이하여 국내외적으로 활용되어 왔다 (Jeffrey, 1997; Jeffrey *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997, 2001, 2008; Zapata *et al.*, 2000; Schlüter *et al.*, 2000; Gibb *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2004; Ha *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2011, 2012). 하지만, 식물플랑크톤의 주요 색소는 여러 군집에 공통적으로 존재하기도 하며, 서식 환경에 따라 존재하는 색소의 구성비 또한 변화하기 때문에, 정확한 군집 분류를 하는데 있어 오차를 유발할 수 있다.

Mackey *et al.* (1996)은 이러한 단점을 보완하기 위해 pigment의 상대비 (pigment/Chl.*a*)를 산정하여 Chl.*a* 농도에 대한 군집별 기여율을 보다 정확하게 파악할 수 있는 CHEMTAX 프로그램을 개발하였다. 국내에서 HPLC와 CHEMTAX를 활용하여 식물플랑크톤의 군집조성을 연구한 사례는 대부분 해양에서 이루어져 왔지만 (Noh *et al.*, 2005; Lee and Kim *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009, 2010; Lee *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2018), 최근 국내 담수에서도 낙동강에서 첫 적용사례가 있었다 (Choi *et al.*, 2019). 하지만, 아직까지 연구자가 직접 관찰해야 하는 현미경관찰법과, 색소 조성비 분석결과에 의존하는 HPLC-

CHEMTAX법에서 도출한 결과가 상이하여 군집조성을 해석하는 데에 어려움이 있다 (Choi *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2020). 따라서 본 연구에서는 낙동강 상류에 위치한 영주댐과 보현산댐 저수지에서 서식하는 식물플랑크톤의 군집 조성 파악을 위해 현미경관찰법과 HPLC-CHEMTAX법으로 산출한 결과를 비교 분석하여 향후 담수 식물플랑크톤 군집 조성을 정량적으로 평가하기 위한 방법론을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 식물플랑크톤 채집 및 전처리

본 연구는 낙동강 상류에 위치한 영주댐 유사조절지 1개 정점 (YJ)과 보현산댐 저수지 2개 정점 (BH1 and BH2)에서 2019년 6월부터 10월까지 총 9회 조사하였다. Van Dorn sampler (10 L)로 표층수 (0.5~1 m depth)를 채수한 후, 현미경 관찰을 위해 500 mL를 분취하여 루골 용액이 시료량의 0.5~1%가 되도록 고정하였고 색소 분석을 위한 시료는 미리 태운 (450°C, 4 h) 47 mm 유리섬유여과지 (0.7 µm glass fiber filter, GF/F)로 400~500 mL 여과 후 -80°C로 즉시 동결시켰다.

2. 식물플랑크톤 현미경 관찰

채집된 식물플랑크톤의 종 동정과 생체량 측정을 위해 2주 동안 암실에서 방치하여, 고정된 식물플랑크톤을 침전시켰다. 2주 후에 상등액을 제거한 후 시료 1 mL를 표본으로 하여 현미경 (Nicon E-600)으로 동정하고, Sedgwick Rafter cell counting chamber로 계수하였다. 현미경의 렌즈는 plan FLUORE 400배와 600배를 사용하였다.

3. 식물플랑크톤 지표색소 분석

식물플랑크톤 pigment 농도 분석을 위해 동결 건조된 여과지가 담긴 15 mL conical tube에 5 mL의 100% 아세톤을 주입하였고, 내부표준물질로 100 µL의 cantaxanthin (internal standard, IS)을 첨가하였다. 그 후 ultra sonicator로 초음파 분쇄 (30 sec, 50 W)하여 4°C의 냉암소에서 24 시간 동안 추출하였다. 추출을 마친 시료는 상등액 1 mL를 syringe filter (PTFE, 0.2 µm, hydrophobic)로 취한 후 300 µL의 3차 증류수로 water packing하여 Zapata *et al.* (2000)에 의해 제안된 HPLC (Agilent HPLC, 1200) 분석방법에 따라 측정되었다. 지표색소의 정성은 standard pigments (DHI water & Environment, Hørsholm, Denmark)

Table 1. Pigment ratio matrix for the CHEMTAX analysis (Paerl *et al.*, 2015).

	Fuco	Neo	Viol	Diad	Anth	Myx	Allo	Lut	Zea	Chl <i>b</i>	β -Car	Ech
Cryptophyta	0	0	0	0	0	0	0.37	0	0	0	0.004	0
Chlorophyta	0	0.038	0.026	0	0.016	0	0	0.15	0	0.36	0.003	0
Cyanobacteria	0	0	0	0	0	0.14	0	0	0.26	0	0.097	0.076
Diatom	0.51	0	0	0.074	0	0	0	0	0	0	0.003	0

Fuco: Fucoxanthin, Neo: Neoxanthin, Viol: Violaxanthin, Diad: Diadinoxanthin, Anth: Antheraxanthin, Allo: Alloxanthin, Lut: Lutein, Zea: Zeaxanthin, Chl. *b*: Chlorophyll *b*, β -Car: β -carotene, Ech: Echinenone

Table 2. Average cell size and geometric shape of phytoplankton.

Class	Species	Geometric shape	Diameter (μ m)	Height (μ m)	Length (μ m)	Reference
Cyanobacteria	<i>Microcystis novacekii</i>	Sphere	3			El Herry <i>et al.</i> , 2009
Diatom	<i>Aulacoseira granulata</i>	Cylinder	7	20		Simonsen, 1979
Chlorophyta	<i>Actinastrum hantzschii</i>	Double cone	4	17		Lagerheim, 1882
Cryptophyta	<i>Chroomonas coerulea</i>	Cone + Half sphere	6	4	5	Skuja, 1948
	<i>Chroomonas marssonii</i>		10	16	6	

의 spectrum과 retention time (R.T)을 대조하여 결정하였고, 각 지표색소는 Jeffrey (1997)에 의해 알려진 흡광계수 (extinction coefficient)를 이용하여 Park *et al.* (1997)에 의한 계산식에 따라 정량하였다.

4. CHEMTAX program

Schlüter *et al.* (2006)에 의해 알려진 담수성 식물플랑크톤 군집의 각 지표색소 (cryptophyta: alloxanthin (Allo); chlorophyta: chlorophyll *b* (Chl.*b*); cyanobacteria: zeaxanthin (Zea); diatoms: fucoxanthin (Fuco))는 Mackey *et al.* (1996)에 의해 제안된 CHEMTAX 프로그램을 이용하여 식물플랑크톤 생체량에 대한 군집별 기여율을 평가하였다. 이는 식물플랑크톤 군집 간 주요 색소의 상대적인 비의 값을 인자 분석 (factor analysis)을 통한 최대 경사 알고리즘 (steepest descent algorithm)을 이용하여 식물플랑크톤의 생체량에 대한 각 군집별 상대기여율을 추정하는 원리로, 초기 개발은 해양 식물플랑크톤 군집 연구를 위해 이용되었으나, 최근 담수환경에서도 활용되고 있다 (Paerl *et al.*, 2015; Tamm *et al.*, 2015; Schlüter *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2020). CHEMTAX 분석을 통해 산출된 결과는 초기 입력 값으로 이용되는 식물플랑크톤 군집별 지표 색소의 상대적 비 (pigment/Chl.*a* ratio)에 의해 결정된다. 이 비는 영양염류 농도와 광, 수온 등 여러 환경조건에 따라 달라질 수 있다 (Latasa and Berdalet *et al.*, 1994; Schlüter *et al.*,

2000). 따라서 정확성과 재현성이 높은 결과를 얻기 위해서 대상 수 환경에 서식하는 식물플랑크톤 군집에 맞는 최적화된 상대비를 적용하여 분석해야 하지만 (Lohrenz *et al.*, 2003), 현재까지 국내에 알려진 담수 식물플랑크톤의 군집별 지표 색소의 상대적 비는 제시된 바 없다. 따라서 본 연구 수역과 유사한 부영양화 수역에서 연구된 Paerl *et al.* (2015)에 의해 알려진 색소 비를 CHEMTAX 프로그램의 초기 입력 값으로 사용하여 분석하였다 (Table 1).

5. 탄소함량 기반 생체량 산출 (biomass, μ gC L⁻¹)

식물플랑크톤은 군집별 세포 크기의 차이 때문에, 한 세포당 가지고 있는 색소의 양은 상이하다. 본 연구에서는 세포 크기를 기반으로 생체량을 비교하기 위해, 군집별 우점종 또는 우점종과 형태학적으로 매우 유사한 종의 평균 직경, 높이, 길이 등의 정보와 기하학적 형태를 기존문헌에서 참고하여 (Table 2), Eq. 1과 같이 각 형태에 따라 군집별 세포 부피를 구하였다 (Hillebrand *et al.*, 1999; Sun and Liu, 2003; Vadrucci *et al.*, 2007). 그 후 Menden-Deuer (2000)에 의해 제안된 식물플랑크톤 세포부피-탄소함량식 (Eq. 2)을 이용하여 군집별 세포부피에 따른 탄소 함량을 도출하였다. 따라서, 현미경관찰법으로 계수한 세포 수에 세포당 탄소 함량을 곱하여 식물플랑크톤 생체량 (μ gC L⁻¹)을 산출하였다. D는 직경 (diameter, μ m), H는 높이 (height, μ m), L은 길이 (length, μ m)이다.

$$\begin{aligned} \text{Unit species biovolume } (\mu\text{m}^3) & \\ &= D^3 \times \pi/6 \quad (\text{for sphere shape}) \\ &= D^2 \times H \times \pi/4 \quad (\text{for cylinder shape}) \\ &= D^2 \times H \times \pi/6 \quad (\text{for double corn shape}) \\ &= D^2 \times (D+L) \times \pi/12 \quad (\text{for corn + half sphere shape}) \end{aligned} \quad (1)$$

$$\text{Carbon content } (\text{pg cell}^{-1}) = \text{biovolume}^{0.939} \times 0.216 \quad (2)$$

6. 통계분석

세 정점의 식물플랑크톤 생체량과 군집 조성 간 유의차

검증을 위해 IBM SPSS Statistics 23 (2015 SPSS Inc., IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하여 일원 배치 분산분석(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)을 실시하였다. 또한, 관찰 방법에 따른 군집 조성 차이를 분석하기 위해 현미경관찰법과 CHEMTAX법으로 산출한 식물플랑크톤 군집별 기여율의 유의 차이를 0.05 수준에서 Tukey 정직유의차(honestly significant difference, HSD) 검정과 Dunnett의 분산 동질성 및 이분산성 검정하여 사후 분석하였으며, 그들의 회귀 관계(regression relationship)는 피어슨 상관분석(pearson correlation analysis)을 통해 파악하였다.

Table 3. Microscopy based cells and relative contribution of phytoplankton.

Date	Station	Microscopy based cells (cell mL ⁻¹)					Microscopy based cells contribution (%)			
		Cryptophyta	Chlorophyta	Cyanobacteria	Diatom	Total	Cryptophyta	Chlorophyta	Cyanobacteria	Diatom
24 Jun	YJ	20330	163	692203	1129	713825	3	0	97	0
	BH 1	605	6019	16381	336	23341	3	26	70	1
	BH 2	135	1126	74522	909	76692	0	1	97	1
15 Jul	YJ	241	1390	47381	206	49218	0	3	96	0
	BH 1	86	456	792550	10454	803546	0	0	99	1
	BH 2	8	503	114909	3140	118560	0	0	97	3
24 Jul	YJ	400	220	1946350	124	1947094	0	0	100	0
	BH 1	30	60	250283	27481	277854	0	0	90	10
	BH 2	23	99	800685	11496	812303	0	0	99	1
12 Aug	YJ	236	558	201781	1179	203754	0	0	99	1
	BH 1	95	112	776945	0	777152	0	0	100	0
	BH 2	24	8	1013808	0	1013840	0	0	100	0
29 Aug	YJ	31	175	1884905	104	1885215	0	0	100	0
	BH 1	286	719	239966	92	241063	0	0	100	0
	BH 2	406	298	231694	367	232765	0	0	100	0
10 Sep	YJ	25	286	328089	295	328695	0	0	100	0
	BH 1	13	63	330574	25	330675	0	0	100	0
	BH 2	56	459	444503	25	445043	0	0	100	0
24 Sep	YJ	725	110	183650	765	185250	0	0	99	0
	BH 1	97	77	27852	66	28092	0	0	99	0
	BH 2	250	214	213056	397	213917	0	0	100	0
07 Oct	YJ	448	778	132	146	1504	30	52	9	10
	BH 1	448	1064	5305	2228	9045	5	12	59	25
	BH 2	24	661	1122	7087	8894	0	7	13	80
22 Oct	YJ	1003	3944	96	1290	6333	16	62	2	20
	BH 1	1003	417	21021	1703	24144	4	2	87	7
	BH 2	365	524	3862	4691	9442	4	6	41	50

결 과

1. 식물플랑크톤 군집 구조

조사기간 동안 식물플랑크톤 총 세포 수는 YJ에서 1,584~1,947,000 cell mL⁻¹ (평균: 612,000±788,000 cell mL⁻¹), BH1에서 11,900~803,500 cell mL⁻¹ (평균: 280,300±314,200 cell mL⁻¹), BH2에서 8,904~1,014,000 cell mL⁻¹ (평균: 325,700±362,500 cell mL⁻¹)으로 나타났다. YJ에서 7월 24일(1,947,000 cell mL⁻¹)과 8월 29일(1,885,000 cell mL⁻¹)에 발생한 식물플랑크톤 대 발생을 제외하면 세 정점에서 비슷한 수준을 나타냈다($p > 0.05$, one-way ANOVA). 또한, 세 정점 모두 7월 15일부터 8월 12일까지 가장 높은 세포 수를 기록했으며, 이는 9월부터 점차 감소하다가 10월에 최소값을 나타냈다(Table 3). 여름철인 7~9월 조사기간 동안 전체 식물플랑크톤 중 남조류의 기여율은 YJ에서 96~100% (평균: 99±1%), BH1에서 90~100% (평균: 98±4%), YJ에서 97~100% (평균: 99±1%)로 세 정점 모두에서 우점하였다. 10월부터는 총 식물플랑크톤 세포 수와 남조류의 기여율이 급격히 감소하며 군집 구성에 천이가 관찰되었는데, 이때 YJ에서는 녹조류가 56±9%를 차지하며 우점하였고, 은편모조류가 22±9%, 규조류가 15±8%로 뒤를 따랐다. BH1에서도 남조류의 기여율이 59±20%까지 감소하였으며, BH2에서는 규조류가 65±21%로 가장 우점하였다(Fig. 1).

2. 식물플랑크톤 지표색소 및 군집 기여율 분석(HPLC-CHEMTAX)

Chl.*a*의 농도는 YJ에서 6.5~78.1 µg L⁻¹ (평균: 29.6±

28.2 µg L⁻¹), BH1에서 2.7~34.5 µg L⁻¹ (평균: 15.1±12.1 µg L⁻¹), BH2에서 3.0~57.1 µg L⁻¹ (평균: 21.1±21.2 µg L⁻¹)로 나타났다. 세 정점 모두 8월에 가장 높은 농도를 기록했으며, 이는 9월 말부터 점차 감소하였다. 세 정점에서, 남조류 우점도가 가장 높았던 7~8월에 남조류 지표색소인 zeaxanthin 농도가 증가하였고, 8월 12일 YJ에서 최대 7.3 µg L⁻¹을 기록하였다. 이는 가을로 접어들면서 10월에 규조류 지표색소인 fucoxanthin 농도가 YJ에서 2.3±2.4 µg L⁻¹, BH1에서 8.3±4.1 µg L⁻¹, BH2에서 4.8±3.4 µg L⁻¹로 증가하면서 전체 색소 중 기여율은 각각 51±11%, 71±2%, 그리고 71±3%를 차지하였다(Fig. 2). CHEMTAX 프로그램에 식물플랑크톤의 지표 색소 농도와 Chl.*a* 농도를 입력함으로써 얻어진 총 색소 농도에 대한 각 색소의 기여율을 계산하여 식물플랑크톤 군집 조성 비율을 산출하였다. 그 결과, 세 정점에서 은편모조류의 군집 기여율은 1~34% (평균: 7±6%), 녹조류는 3~54% (평균: 24±16%), 남조류는 0~95% (평균: 44±24%), 규조류는 0~94% (평균: 25±25%)의 범위로 나타났다(Table 4).

3. 식물플랑크톤 현미경관찰법과 HPLC-CHEMTAX법 비교

관찰 방법에 따른 식물플랑크톤 군집 조성의 차이를 비교하기 위해 현미경으로 관찰한 세포 수와 탄소량으로 환산한 생체량, 그리고 CHEMTAX 기반 Chl.*a* 기여율을 군집별로 각각 비교하였다(Fig. 3). 남조류를 제외한 세 군집(은편모조류, 녹조류, 규조류)에서 식물플랑크톤 기여율이 현미경관찰법에 비해 CHEMTAX 결과에서 유의하게 증가하였다(은편모조류: $p < 0.05$, 녹조류: $p < 0.01$, 규

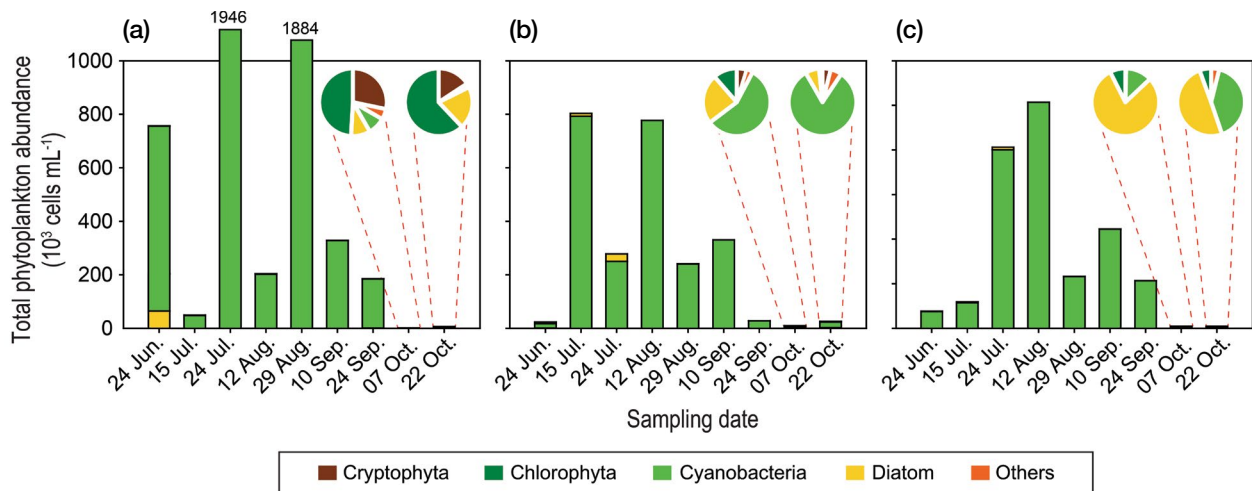


Fig. 1. Phytoplankton abundance and community counted by microscopy in (a) YJ, (b) BH1, and (c) BH2.

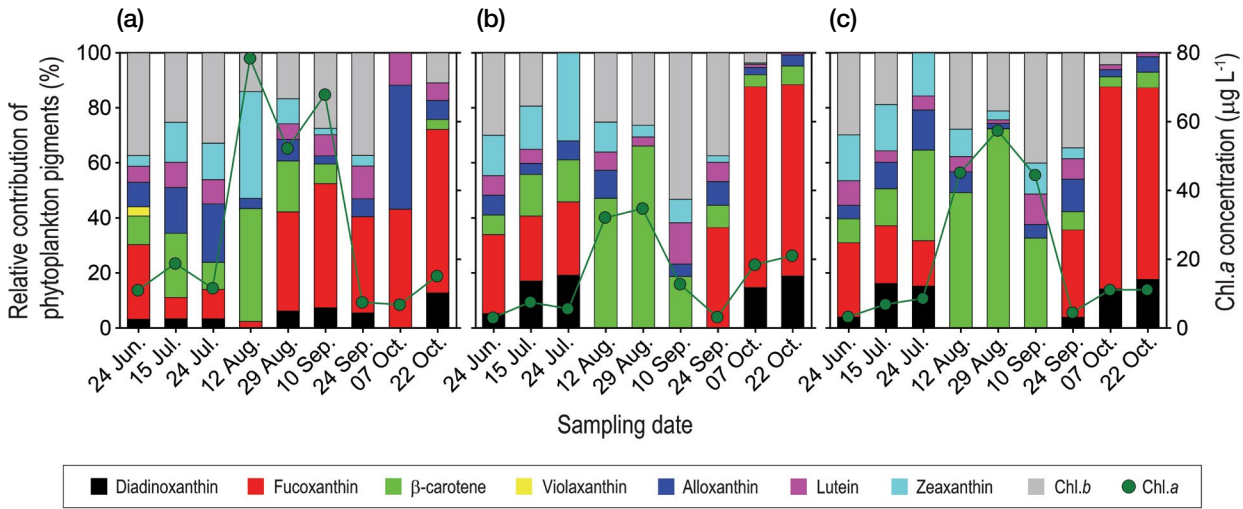


Fig. 2. Relative contribution of phytoplankton pigments and Chl.a concentration in (a) YJ, (b) BH1, and (c) BH2.

조류: $p < 0.05$). 반면에, 현미경관찰을 통한 기여율이 정점과 전 기간 동안 $83 \pm 31\%$ 로 가장 우점한 것으로 나타난 남조류의 세포 수 기여율은 CHEMTAX로 계산되었을 때 $44 \pm 24\%$ 로 감소하였다($p < 0.01$). 특히 남조류 세포 수가 95% 이상의 상대 기여율(평균: $99 \pm 1\%$)을 보일 때, CHEMTAX로 계산된 기여율은 17~94%(평균: $51 \pm 21\%$)의 범위를 보이며 상대적으로 과소평가되었다($p < 0.01$). 한편, 탄소 기반 생체량과 CHEMTAX 결과는 녹조류($p < 0.01$)를 제외하고는 세 군집 모두에서 차이가 없었다. 규조류의 경우, 현미경관찰법보다 탄소 기반 생체량 결과에서 유의한 증가가 관찰되었다($p < 0.05$).

CHEMTAX로 계산된 식물플랑크톤의 군집 기여율과 현미경관찰법으로 계수된 군집기여율을 회귀분석을 통해 비교한 결과, 은편모조류의 관계식은 $y = 0.82x - 0.04$ ($R^2 = 0.63$, $p < 0.01$)였고, 남조류는 $y = 0.72x - 0.52$ ($R^2 = 0.31$, $p < 0.01$), 규조류는 $y = 0.57x - 0.06$ ($R^2 = 0.63$, $p < 0.01$)였지만, 녹조류는 $y = -0.11x - 0.09$ ($R^2 = 0.01$, $p > 0.05$)로 유의한 상관관계를 보이지 않았다. 지금까지 현미경관찰법과 CHEMTAX법으로 계산한 식물플랑크톤 군집 조성을 비교하고자 하는 시도가 있었다. 하지만 그 상관관계는 비교적 낮아, 두 가지 관찰법을 서로 설명하기에 충분하지 않았다(Havskum *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2018; Choi *et al.*, 2019). CHEMTAX 결과는 식물플랑크톤의 Chl.a 당 군집별 지표색소의 상대비를 기반으로 계산된 것이기 때문에 각 군집별 세포의 크기가 고려되지 않는다는 한계가 있다. 이를 보완하기 위해, 현미경으로 관찰한 각 군집을 세포당 탄소 함량으로 변환시켜서 두 가지 방법 모두 세포 크기가 고려된 생체량으로 상관관계를 살펴보았다(Table

5). 네 군집 모두에서 탄소를 환산하였을 때 두 방법 간 결정계수(R^2)는 감소하였지만 은편모조류는 $y = 1.01x - 0.02$ ($R^2 = 0.49$, $p < 0.01$), 규조류는 $y = 0.97x - 0.04$ ($R^2 = 0.58$, $p < 0.01$)로 기울기가 약 1로 1:1 line에 상당히 가까운 수준을 보였으며, y 절편은 0에 더욱 가까워졌다. 남조류 역시 $y = 0.73x - 0.28$ ($R^2 = 0.21$, $p < 0.05$)로 기울기가 증가하였고, y 절편은 감소하였으며, raw data 중 1:1 line에 가까운 plot이 증가하였다. 녹조류는 $y = 0.03x - 0.06$ ($R^2 = 0.001$, $p > 0.05$)으로 상관관계식이 호전되지는 않았지만, 음의 상관관계였던 전자와 비교하였을 때, 기울기가 양의 값으로 변화하였다(Fig. 4).

고찰

규조류의 경우 현미경관찰법에 비해 탄소 기반 생체량과 CHEMTAX법에서 식물플랑크톤 기여율이 각각 증가하였는데, 이는 상대적으로 세포 크기가 큰 규조류의 탄소와 색소 함량 때문으로 보여진다(Finkel *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2017). 또한, 현미경관찰법과 CHEMTAX법의 상관관계가 가장 높았는데, 기존 문헌에서도 규조류의 양호한 상관관계가 보고된 적 있다(Choi *et al.*, 2019). 이는 상대적으로 현미경관찰법으로 식별이 용이하고, 규조류의 지표색소인 fucoxanthin의 Chl.a 상대비(Fuco/Chl.a ratio)가 높아 CHEMTAX 계산에서도 높은 재현성으로 분석이 되었기 때문으로 보여진다(Paerl *et al.*, 2015). 남조류의 경우 CHEMTAX법으로 계산된 기여율이 현미경관찰법에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.01$). 남조류는 다른 군집

Table 4. CHEMTAX based Chl.*a* concentration and relative contribution of phytoplankton.

Date	Station	CHEMTAX based Chl. <i>a</i> ($\mu\text{g Chl.}a \text{ L}^{-1}$)					CHEMTAX based Chl. <i>a</i> contribution (%)			
		Cryptophyta	Chlorophyta	Cyanobacteria	Diatom	Total	Cryptophyta	Chlorophyta	Cyanobacteria	Diatom
24 Jun	YJ	1.1	5.5	2.3	1.9	10.7	10	51	21	17
	BH 1	0.2	1.0	1.1	0.4	2.7	7	37	42	15
	BH 2	0.1	1.1	1.5	0.3	3.0	3	37	49	11
15 Jul	YJ	2.0	4.2	11.0	1.4	18.5	11	22	59	8
	BH 1	0.2	1.4	4.2	1.4	7.2	3	19	58	19
	BH 2	0.5	1.2	3.8	1.1	6.6	8	18	58	17
24 Jul	YJ	1.5	3.1	5.6	1.1	11.3	14	28	49	9
	BH 1	0.2	0.2	4.1	0.9	5.4	4	3	76	17
	BH 2	0.7	0.6	5.7	1.3	8.3	9	8	68	16
12 Aug	YJ	0.7	3.3	74.1	0.0	78.1	1	4	95	0
	BH 1	2.0	6.3	21.5	2.1	31.8	6	20	68	6
	BH 2	2.3	9.0	30.1	3.6	44.9	5	20	67	8
29 Aug	YJ	3.5	9.9	27.6	11.0	51.9	7	19	53	21
	BH 1	1.1	6.1	22.8	4.4	34.5	3	18	66	13
	BH 2	2.1	9.2	38.3	7.4	57.1	4	16	67	13
10 Sep	YJ	2.5	25.7	16.8	22.6	67.6	4	38	25	33
	BH 1	0.5	6.7	5.3	0.0	12.5	4	54	43	0
	BH 2	1.7	15.4	26.6	0.6	44.2	4	35	60	1
24 Sep	YJ	0.5	3.7	1.2	1.8	7.2	7	51	17	25
	BH 1	0.3	1.3	0.7	0.6	2.9	9	44	25	21
	BH 2	0.5	1.7	1.1	0.9	4.2	12	41	26	21
07 Oct	YJ	2.2	0.9	1.8	1.6	6.5	34	14	28	25
	BH 1	0.7	0.6	0.0	16.9	18.1	4	3	0	93
	BH 2	0.3	0.4	0.0	10.1	10.8	3	3	0	94
22 Oct	YJ	1.4	3.5	2.0	8.0	14.8	10	23	13	54
	BH 1	1.2	1.2	5.9	12.5	20.7	6	6	28	60
	BH 2	0.8	0.8	3.4	5.8	10.9	7	8	32	54

에 비하여 작은 세포 크기로 인해 현미경 관측 시 과소평가 될 수 있으며 (El Herry *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2018), 여름철 대 발생으로 인해 큰 군체를 형성하면 서로 응집되어 과대평가될 가능성이 있다 (Son *et al.*, 2005). 반면에 녹조류의 경우에는 남조류의 양상과는 대조적으로, 현미경관찰법에 비해 CHEMTAX법으로 계산된 기여율이 과대평가되었다 ($p < 0.01$). 본 연구에서는 pigment 분석을 Zapata *et al.* (2000)에 의해 제안된 HPLC 분석법을 따라 정성 정량하였다. 녹조류의 지표색소인 lutein은 남조류 지표색소인 zeaxanthin과 peak RT가 매우 유사하여 (Vidussi *et al.*,

1996; Zapata *et al.*, 2000), peak 간섭으로 인해 정량에서 과대/과소평가될 가능성이 있다. 은편모조류의 경우 현미경 관찰을 위한 식물플랑크톤 고정 시 식물플랑크톤 편모의 탈락과 같은 세포의 손상이 유발될 수 있다 (Park *et al.*, 2001; Wong and Wong, 2003). 이는 HPLC로 분석된 색소 결과에서 은편모조류의 지표색소인 alloxanthin은 검출된 반면, 현미경 관찰로는 검출이 어렵게 하는 요인 중 하나이다 (Min *et al.*, 2011).

현미경 법에서 과대평가된 은편모조류와 규조류 중 일부가 1 : 1 line으로 더 가깝게 이동하였고, 남조류도 마찬가지로

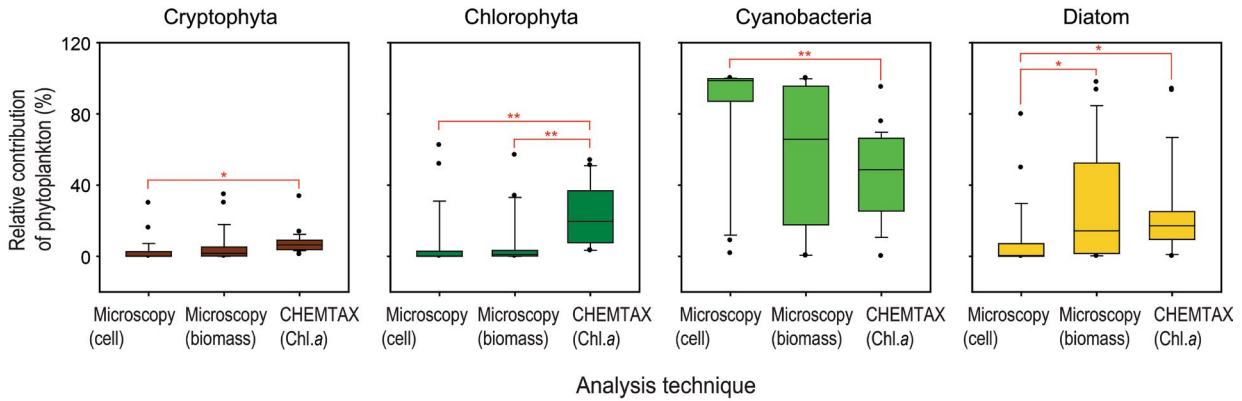


Fig. 3. Comparison of relative contribution of phytoplankton according to microscopy (cell), microscopy (biomass), and CHEMTAX (Chl.a) analysis technique.

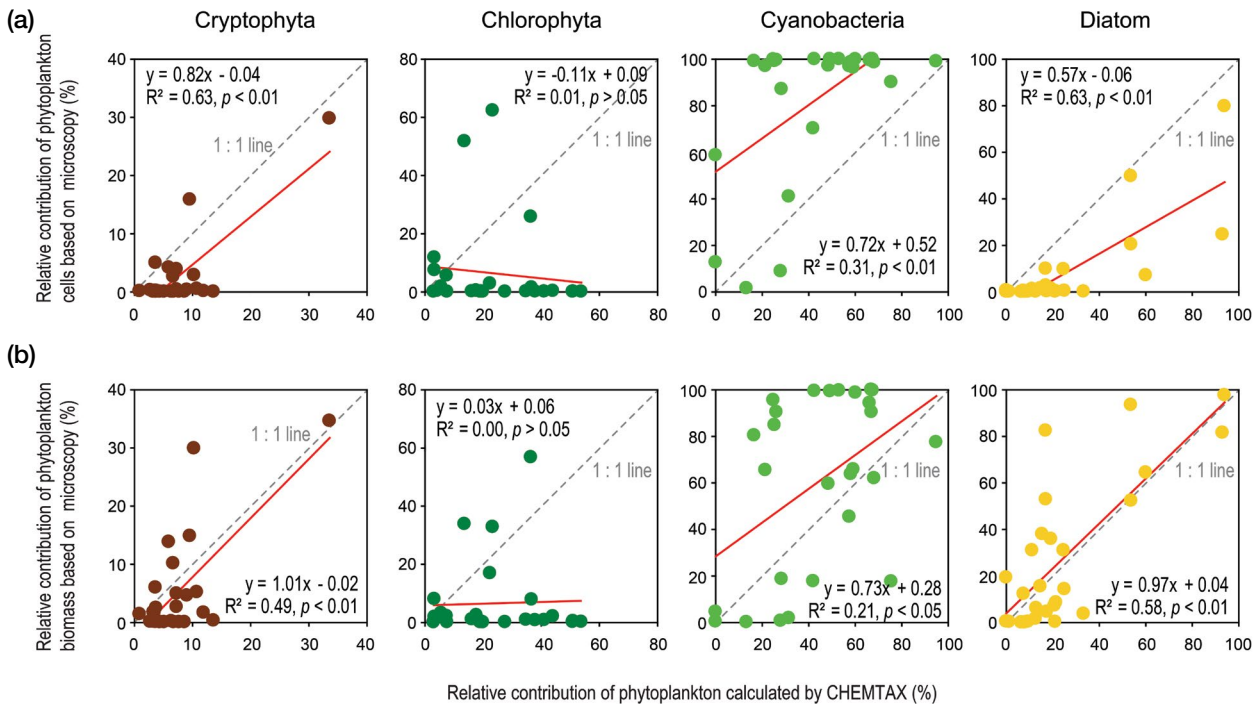


Fig. 4. Relationship of relative contribution of phytoplankton between (a) cells and Chl.a based on CHEMTAX, and between (b) biomass and Chl.a based on CHEMTAX.

가지로 현미경 관찰에서 100%에 가까운 기여율을 보이는 plots 중 일부가 탄소 환산 후 감소하였다. 녹조류를 제외 하면 세 군집 모두에서 탄소 환산법과 CHEMTAX법 사이의 회귀 직선의 기울기가 1:1 line에 더욱 가까워져 두 방법이 서로 일치하는 빈도가 높아졌지만 R²은 오히려 감소하였다(Fig. 4). 본 연구에서는 식물플랑크톤을 탄소 함량으로 변환하기 위해, 현미경으로 관찰된 식물플랑크톤의 군집별 우점종 한 종 또는 두 종의 평균 직경, 높이, 길이

를 참고문헌에서 얻어 생체량을 측정하고 이를 탄소량으로 환산하였기 때문에(Table 2), 각 군집의 종 조성에 따라 탄소 환산이 전체 생체량을 설명하는 정도가 달라질 수 있다. 따라서 현미경 기반 탄소환산법과 CHEMTAX법의 상관관계를 높이기 위해서는 각 군집의 종별 세포 크기를 측정하여 세부적인 탄소 환산이 이루어져야 할 것이다.

한편, HPLC-CHEMTAX법은 식물플랑크톤의 Chl.a에 대한 지표색소의 상대 비를 기반으로 계산되기 때문

Table 5. Microscopy based biomass and relative contribution of phytoplankton.

Date	Station	Microscopy based biomass ($\mu\text{gC L}^{-1}$)					Microscopy based biomass contribution (%)			
		Cryptophyta	Chlorophyta	Cyanobacteria	Diatom	Total	Cryptophyta	Chlorophyta	Cyanobacteria	Diatom
24 Jun	YJ	822	4	1798	125	2750	30	0	65	5
	BH 1	24	137	43	37	241	10	57	18	15
	BH 2	5	26	194	101	325	2	8	59	31
15 Jul	YJ	10	32	123	23	187	5	17	66	12
	BH 1	3	10	2059	1159	3232	0	0	64	36
	BH 2	0	11	299	348	658	0	2	45	53
24 Jul	YJ	16	5	5057	14	5092	0	0	99	0
	BH 1	1	1	650	3046	3699	0	0	18	82
	BH 2	1	2	2080	1274	3358	0	0	62	38
12 Aug	YJ	10	13	524	131	677	1	2	77	19
	BH 1	4	3	2019	0	2025	0	0	100	0
	BH 2	1	0	2634	0	2635	0	0	100	0
29 Aug	YJ	1	4	4897	12	4914	0	0	100	0
	BH 1	12	16	623	10	662	2	2	94	2
	BH 2	16	7	602	41	666	2	1	90	6
10 Sep	YJ	1	7	852	33	893	0	1	95	4
	BH 1	1	1	859	3	864	0	0	99	0
	BH 2	2	10	1155	3	1170	0	1	99	0
24 Sep	YJ	29	3	477	85	594	5	0	80	14
	BH 1	4	2	72	7	85	5	2	85	9
	BH 2	10	5	554	44	613	2	1	90	7
07 Oct	YJ	18	18	0	16	52	35	34	1	31
	BH 1	18	24	14	247	303	6	8	5	81
	BH 2	1	15	3	786	804	0	2	0	98
22 Oct	YJ	41	90	0	143	273	15	33	0	52
	BH 1	41	9	55	189	293	14	3	19	64
	BH 2	15	12	10	520	557	3	2	2	93

에, 설정된 초기 상대 비 값에 따라 군집 조성이 크게 바뀌게 된다. 이 상대 비는 식물플랑크톤 중 조성 차이뿐만 아니라, 광 조건(Goericke and Montoya, 1998; Nicklisch and Woltke, 1999), 영양염류(Latasa and Berdalet, 1995) 등 여러 환경조건에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 지표색소를 분석하여 식물플랑크톤의 생체량과 군집 조성을 파악하기 위해서는 해당 수역의 물리 및 화학적 특성을 함께 조사하여야 한다. 또한 여러 환경 조건(빛, 영양염 등) 변화에 따른 주요 식물플랑크톤 중별 색소 비에 대한 자료 축적이 선행된다면, 향후 보다 정확하게 식물플랑크톤 군집 조성을 파악할 수 있을 것이다. 본 연구에서 제시한 식물플

랑크톤 생체량과 군집 조성을 효율적으로 신속하게 파악하는 시도는 추후 수질 및 수생태 모니터링에 있어 유용한 분석 방법으로 검토될 필요성이 있다.

적 요

본 연구는 여름철 식물플랑크톤의 생체량 및 군집 조성 변화를 파악하기 위해 2019년 6월부터 10월까지 총 9회에 걸쳐 영주댐 유사조절지(YJ)와 보현산 댐저수지(BH1 and BH2)에서 식물플랑크톤 채집을 수행하였다. 또한, 전

통적인 식물플랑크톤 정성/정량 방법인 현미경관찰법과 식물플랑크톤의 지표색소 기반인 CHEMTAX법으로 도출된 결과를 비교 분석하였다. 분석된 네 강(class) 수준의 은편모조류, 녹조류, 남조류, 규조류는 두 관찰법으로 산출한 결과에서 모두 유의한 차이를 나타내었으며, 서로간의 상관관계 또한 좋지 않았다. 이는 세포 크기가 고려되지 않은 현미경관찰법과 지표색소의 Chl.*a* 상대비를 기반으로 하는 CHEMTAX법의 방법론 차이에서 유발되었을 가능성이 있다. 따라서 탄소 함량으로 생체량을 변환하여 CHEMTAX법과 비교한 결과 은편모조류와 규조류는 회귀선의 기울기가 약 1로 1:1 line에 상당히 가까운 수준을 보였으며, y 절편은 0에 더욱 가까워졌다. 남조류 역시 기울기가 증가하였고, y 절편은 감소하였으며, raw data 중 1:1 line에 가까운 plot이 증가하였다. 녹조류는 음의 상관관계였던 전자와 비교하였을 때, 기울기가 양의 값으로 변하였다. 하지만, 모든 군집에서 결정계수가 감소한 것은 각 군집의 우점종의 전체 셀 수를 탄소량으로 환산하는 과정에서 군집별 종 구성에 따라 기여율 분포의 분산이 커진 것이 주요 원인 중 하나로 보인다. 따라서 두 방법의 상관관계를 높이기 위해서는 각 군집의 종별 세포 크기를 측정하여 더욱 세부적인 탄소 환산이 이루어져야 할 것이다. 지금까지 현미경관찰법과 CHEMTAX법의 결과를 비교하여 두 방법의 단점은 보완하고, 효율성을 극대화시키기 위한 노력이 진행되어 왔으나 서로의 차이를 설명하기에는 한계가 있었다. 본 연구에서는 색소 분석에 기반한 CHEMTAX 프로그램을 활용함으로써 식물플랑크톤 군집의 상대 탄소 비율을 효율적이고 신속하게 파악하는 방법을 제안하였다.

저자정보 김도균 (한양대학교 대학원생 박사 수료), 최지수 (한양대학교 연구원 석사), 오혜지 (경희대학교 대학원생 박사 수료), 장광현 (경희대학교 교수), 최광순 (K-water 연구원 수석연구원), 신경훈 (한양대학교 교수)

저자기여도 개념설정: D. Kim & K.H. Shin, 자료제공: D. Kim, J.S. Choi, H.J. Oh, K.H. Chang, K. Choi & K.H. Shin, 자료관리: D. Kim & K.H. Shin, 원고 초안작성: D. Kim & K.H. Shin, 원고 교정: D. Kim, J.S. Choi, H.J. Oh, K.H. Chang, K. Choi & K.H. Shin, 원고 편집: D. Kim & K.H. Shin, 과제관리: K.H. Shin, 연구비 수주: K.H. Shin

이해관계 이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없습니다.

연구비 본 결과물은 수자원공사 용역과제 [댐저수지에서 조류의 1차생산력 및 영양염류 이용을 분석 연구 (2019)]의 지원을 받아 연구되었습니다.

REFERENCES

- Andersen, 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 Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **43**(2-3): 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. *Marine Ecology Progress Series* **10**: 257-263.
- Bowles, N.D., H.W. Paerl and J. Tucker. 1985. Effective solvents and extraction periods employed in phytoplankton carotenoid and chlorophyll determinations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **42**(6): 1127-1131.
- Choi, J., J.O. Min, B. Choi, D. Kim, J.J. Kang, S.H. Lee and K.H. Shin. 2020. Key Factors Controlling Primary Production and Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (cHABs) in a Continuous Weir System in the Nakdong River, Korea. *Sustainability* **12**(15): 6224.
- Choi, J., J.O. Min, B. Choi, J.J. Kang, K. Choi, S.H. Lee and K.H. Shin. 2019. Variation of primary productivity and phytoplankton community in the weirs of mid and downstream of the Nakdong River during fall and Early winter: Application of phytoplankton pigments and CHEMTAX. *Korean Journal of Ecology and Environment* **52**(2): 81-93.
- El Herry, S., H. Nasri and N. Bouaicha. 2009. Morphological characteristics and phylogenetic analyses of unusual morphospecies of *Microcystis novacekii* forming bloom in the Cheffia Dam (Algeria). *Journal of Limnology* **68**(2): 242.
- Finkel, Z.V., J. Beardall, K.J. Flynn, A. Quigg, T.A. V. Rees and J.A. Raven. 2010. Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research* **32**(1): 119-137.
- 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 1. *Limnology and Oceanography* **28**(4): 757-766.
- Goericke, R. and J.P. Montoya. 1998. Estimating the contribution of microalgal taxa to chlorophyll *a* in the field--variations of pigment ratios under nutrient-and light-limited growth. *Marine Ecology Progress Series* **169**: 97-112.
- Ha, S.Y., S.W. Kang, M.O. Park, Y.N. Kim, S.H. Kang, K.H. Shin. 2010. Photoinduction of UV-absorbing compounds and photo-protective pigment in *Phaeocystis pouchetii* and *Porosira glacialis* by UV exposure. *Ocean and Polar Research* **32**(4): 397-409.
- Havskum, H., L. Schlüter, R. Scharek, E. Berdalet, S. Jacquet. 2004. Routine quantification of phytoplankton groups microscopy or pigment analyses?. *Marine Ecology Progress Series* **273**: 31-42.
- Hillebrand, H., C.D. Dürselen, D. Kirschtel, U. Pollingher and

- T. Zohary. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* **35**(2): 403-424.
- Holm-Hansen, O., C.J. Lorenzen, R.W. Holmes and J. D. Strickland. 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *ICES Journal of Marine Science* **30**(1): 3-15.
- Jeffrey, S.W. 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. Phytoplankton pigment in oceanography, p. 37-84. In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods* (Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura and S.W. Wright, eds.). UNESCO, Paris.
- Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura and S.W. Wright. 1997. *Phytoplankton Pigments in Oceanography* (Jeffrey, S.W. et al., eds.). UNESCO Publishing, Paris.
- Karl, D.M. 1999. A sea of change: biogeochemical variability in the North Pacific Subtropical Gyre. *Ecosystems* **2**(3): 181-214.
- Lagerheim, G. 1882. Bidrag till k nneheten om stockholmstrakterns Pediastrer, Protococceer och Palmellaceer. * fversigt af Kongl. Vetenskaps-Akademiens F rhandlingar Arg* **39**(2): 47-81.
- Latasa, M. and E. Berdalet. 1994. Effect of nitrogen or phosphorus starvation on pigment composition of cultured *Heterocapsa* sp. *Journal of Plankton Research* **16**(1): 83-94.
- Lee, E., M. Son, J.B. Kim, W.C. Lee, G.E. Jeon and S.H. Lee. 2018. A study of variation characteristics of the phytoplankton community by UPLC located in the Jinju Bay, Korea. *Korean Journal of Environmental Biology* **36**(1): 62-72.
- 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. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **71**(1-2): 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. *Limnology and Oceanography* **55**(1): 1-10.
- Lee, Y.W., J.M. Lee and G. Kim. 2009. Identifying sharp hydrographical changes in phytoplankton community structure using HPLC pigment signatures in coastal waters along Jeju Island, Korea. *Ocean Science Journal* **44**(1): 1-10.
- Lee, Y.W., M.O. Park, Y.S. Kim, S.S. Kim and C.K. Kang. 2011. Application of photosynthetic pigment analysis using a HPLC and CHEMTAX program to studies of phytoplankton community composition. *The Sea* **16**(3): 117-124.
- 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. *Continental Shelf Research* **23**(14-15): 1447-1464.
- Lorenzen, C.J. 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations 1. *Limnology and Oceanography* **12**(2): 343-346.
- 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. *Marine Ecology Progress Series* **144**: 265-283.
- Mantoura, R.F.C. and S.W. Wright. 1997. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. *Oceanographic Literature Review* **10**(44): 1110.
- Menden-Deuer, S. and E.J. Lessard. 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology and Oceanography* **45**(3): 569-579.
- Min, J.O., S.Y. Ha, B.H. Choi, M.H. Chung, W.D. Yoon, J.S. Lee and K.H. Shin. 2011. Primary productivity and pigments variation of phytoplankton in the Seomjin River estuary during rainy season in summer. *Korean Journal of Ecology and Environment* **44**(3): 303-313.
- Min, J.O., S.Y. Ha, M.H. Chung, B.H. Choi, Y.J. Lee, S.H. Youn, W.D. Yoon, J.S. Lee and K.H. Shin. 2012. Seasonal variation of primary productivity and pigment of phytoplankton community structure in the Seomjin Estuary. *Korean Journal of Ecology and Environment* **45**(2): 139-149.
- Nicklisch, A. and P. Woitke. 1999. Pigment content of selected planktonic algae in response to simulated natural light fluctuations and a short photoperiod. *International Review of Hydrobiology* **84**(5): 479-495.
- Noh, J.H., S.J. Yoo, J.A. Lee, H.C. Kim and J.H. Lee. 2005. Phytoplankton in the waters of the Jeodo Ocean Research Station determined by microscopy, flow cytometry, HPLC pigment data and remote sensing. *Ocean and Polar Research* **27**(4): 397-417.
- Odum, E.P. 1993. *Ecology and Our Endangered Life-Support Systems*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 301.
- 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. *Journal of Environmental Science International* **17**(10): 1155-1167.
- Oh, S.J., C.H. Moon and M.O. Park. 2004. HPLC analysis of biomass and community composition of microphytobenthos in the Saemankeum tidal flat, west coast of Korea. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **37**(3): 215-225.
- Paerl, H.W., H. Xu, N.S. Hall, K.L. Rossignol, A.R. Joyner, G. Zhu and B. Qin. 2015. Nutrient limitation dynamics examined on a multi-annual scale in Lake Taihu, China: implications for controlling eutrophication and harmful algal blooms. *Journal of Freshwater Ecology* **30**(1): 5-24.
- Pan, H., A. Li, Z. Cui, D. Ding, K. Qu, Y. Zheng, L. Liu, T. Jiang and T. Jiang. 2020. A comparative study of phytoplankton community structure and biomass determined by HPLC-CHEMTAX and microscopic methods during

- summer and autumn in the central Bohai Sea, China. *Marine Pollution Bulletin* **155**: 111172.
- Park, J.W., S.H. Yu, S.Y. Kim, J.E. Lee and E.W. Seo. 2008. Effect of turbid water on the phytoplankton community in Imha Reservoir. *Journal of Life Science* **18**(12): 1671-1678.
- Park, M.O. and J.S. Park. 1997. HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Journal of the Korean Society of Oceanography* **32**(1): 46-55.
- Park, M.O., C.H. Moon, S.Y. Kim, S.R. Yang, K.Y. Kwon and Y.W. Lee. 2001. The Species Composition of Phytoplankton along the Salinity Gradients in the Seomjim River Estuary in Autumn, 2000: Comparison of HPLC Analysis and Microscopic Observations. *Algae* **16**(2): 179-188.
- Roy, R., A. Pratihary, G. Mangesh and S.W.A. Naqvi. 2006. Spatial variation of phytoplankton pigments along the southwest coast of India. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **69**(1-2): 189-195.
- 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 Rios, A.F. 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science* **305**(5682): 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. *Marine Ecology Progress Series* **192**: 49-63.
- Schlüter, L., S. Behl, M. Striebel and H. Stibor. 2016. Comparing microscopic counts and pigment analyses in 46 phytoplankton communities from lakes of different trophic state. *Freshwater Biology* **61**(10): 1627-1639.
- Schlüter, L., T.L. Lauridsen, G. Krogh and T. Jørgensen. 2006. Identification and quantification of phytoplankton groups in lakes using new pigment ratios—a comparison between pigment analysis by HPLC and microscopy. *Freshwater Biology* **51**(8): 1474-1485.
- Simonsen, R. 1979. The diatom system: ideas on phylogeny. *Bacillaria* **2**: 9-71.
- Skuja, H. 1948. Taxonomie des phytoplanktons einiger seen in Uppland, Schweden. *Symbolae Botanicae Upsalienses* **9**: 1-399.
- Son, M.H., I.S. Zulfugarov, O. Kwon, B.Y. Moon, I.K. Chung, C.H. Lee, J. Lee. 2005. The study on the fluorescence characteristics of several freshwater bloom forming algal species and its application. *Algae* **20**(2): 113-120.
- Sun, J. and D. Liu. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* **25**(11): 1331-1346.
- Tamm, M., R. Freiberg, I. Tönno, P. Nöges and T. Nöges. 2015. Pigment-based chemotaxonomy—a quick alternative to determine algal assemblages in large shallow eutrophic lake? *PloS one* **10**(3): e0122526.
- Vadrucci, M.R., M. Cabrini and A. Basset. 2007. Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystems of Mediterranean Ecoregion. *Transitional Waters Bulletin* **1**(2): 83-102.
- Vidussi, F., H. Claustre, J. Bustillos-Guzmán, C. Cailliau, J.C. Marty. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll *a* from divinylchlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research* **18**(12): 2377-2382.
- Wang, L., L. Ou, K. Huang, C. Chai, Z. Wang, X. Wang and T. Jiang. 2018. Determination of the spatial and temporal variability of phytoplankton community structure in Daya Bay via HPLC-CHEMTAX pigment analysis. *Journal of Oceanology and Limnology* **36**(3): 750-760.
- Welschmeyer, N.A. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and pheopigments. *Limnology and Oceanography* **39**(8): 1985-1992.
- Wong, C.K. and C.K. Wong. 2003. HPLC pigment analysis of marine phytoplankton during a red tide occurrence in Tolo Harbour, Hong Kong. *Chemosphere* **52**(9): 1633-1640.
- 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. *Marine Ecology Progress Series* **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 C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series* **195**: 29-45.
- Zhou, W., G. Wang, C. Li, Z. Xu, W. Cao, F. Shen. 2017. Retrieval of phytoplankton cell size from chlorophyll *a* specific absorption and scattering spectra of phytoplankton. *Applied Optics* **56**(30): 8362-8371.