

장목만에서 분리한 유독 와편모조류 *Alexandrium pacificum* (Group IV): 형태, 계통 분류와 온도, 염분 및 영양염 농도 차이에 따른 성장 변화

한경하^{1,2}, 윤주연¹, 광경윤¹, Li Zhun³, 이원철², 신현호^{1,*}

¹한국해양과학기술원 해양시료도서관, ²한양대학교 환경과학과, ³한국생명공학연구원 생물자원센터

Alexandrium pacificum (Group IV) isolated from Jangmok Bay, Korea: Morphology, phylogeny, and effects of temperature, salinity, and nutrient levels on growth

Kyong Ha Han^{1,2}, Joo Yeon Youn¹, Kyeong Yoon Kwak¹, Zhun Li³, Wonchoel Lee² and Hyeon Ho Shin^{1,*}

¹Library of Marine Samples, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Geoje 53201, Republic of Korea

²Department of Environmental Science, Hanyang University, Seoul 04763, Republic of Korea

³Biological Resource Center/Korean Collection for Type Cultures (KCTC), Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeonbuk 56212, Republic of Korea

*Corresponding author

Hyeon Ho Shin
Tel. 055-639-8440
E-mail. shh961121@kiost.ac.kr

Received: 2 September 2022

Revised: 15 September 2022

Revision accepted: 15 September 2022

Abstract: A strain of *Alexandrium* species was established by isolating cells from Jangmok Bay, Korea. Its morphology and molecular phylogeny based on LSU rRNA gene sequences were examined. In addition, growth responses of this *Alexandrium* species to changes in temperature, salinity, and nutrient concentrations were investigated. This *Alexandrium* species from Jangmok Bay had a ventral pore on the 1', which was morphologically consistent with previously described *Alexandrium tamarense* and *A. catenella*. Phylogenetic analyses revealed that this isolate was assigned to *A. pacificum* (Group IV) within *A. tamarense* species complex. In growth experiments, relatively high growth rates and cell densities of *A. pacificum* (Group IV) were observed at 15°C and 20°C. This species also grew under a wide range of salinity. This indicates that this Korean isolate of *A. pacificum* (Group IV) is a stenothermic and euryhaline species. In growth responses to changes in nutrient levels, enhanced growth rates and cell densities of *A. pacificum* (Group IV) were observed with additions of nitrate and phosphate. In particular, rapid uptakes of phosphate by *A. pacificum* (Group IV) were observed in experimental treatments, indicating that the increase in phosphate concentration could stimulate the growth of *A. pacificum* (Group IV).

Keywords: *Alexandrium*, morphology, phylogeny, nutrient, growth

서 론

마비성 패류 독소 (paralytic shellfish toxin)는 해양 식물 플랑크톤 중 *Gymnodinium catenatum* Graham, *Pyrodinium bahamense* Plate, *Centrodinium punctatum* Cleve, *Alexandrium* 종과 같은 와편모조류 (dinoflagellate)에 의해 생산된다 (Harada et al. 1982; Oshima et al. 1987; Anderson et al. 1994; John et al. 2014; Murray et al. 2015; Shin et al. 2020). 특히, *Alexandrium* 종에 의한 마비성 패류 중독 (paralytic shellfish poisoning; PSP) 발생이 전 세계 연안에서 빈번하게 보고 되어 왔다 (Anderson et al. 1994; Hallegraeff 2003; Taylor et al. 2003). Anderson et al. (2012)의 연구 결과에 따르면, *Alexandrium* 속 (genus)에서 약 30종 이상이 유해하거나 유독한 종으로 알려져 있으며, 이 중 *Alexandrium tamarense* species complex와 *Alexandrium minutum* Halim이 PSP 발생의 주요 원인 종으로 동정되고 있다.

Alexandrium 종의 형태적 동정은 유영세포의 크기와 형태, 유영세포 표면의 구조 (ornamentation), first apical plate (1')와 sixth precingular plate의 형태와 크기, apical pore complex의 형태, sulcal plate의 형태와 크기, apical pore plate와 1' plate의 접촉 유무, ventral pore의 관찰 유무 등에 따라 결정된다 (Balech 1995). 하지만, 해수 시료와 배양주 (strain)에서 나타나는 *Alexandrium* 종은 기존에 알려진 형태적 특징을 기반으로 동정에 어려움이 있다는 것이 밝혀지면서 (e.g. Anderson et al. 2012), 현재는 분자계통학적 위치 (molecular phylogeny), 독소 구성 (toxin analogue), 독성 유전자 (toxin gene)의 유무 등에 의해 *Alexandrium* 종의 동정이 이루어지고 있다 (John et al. 2014). 최근에는 Lilly et al. (2007)과 John et al. (2014)이 분자계통도와 지리적 분포를 바탕으로 *A. tamarense* species complex를 5개의 분기군 (clade)으로 구분하였다. 이후 Prud'homme van Reine (2017)은 *A. fundyense* (Group I)과 다른 분기군에 속하는 종들의 형태적 차이를 바탕으로 *A. fundyense*는 *A. catenella*로 동정해야 한다고 하였고, 현재 *A. fundyense* (Group I)은 *A. catenella* (Group I)로 명명되고 있다. 그리고, 이 계통도와 명명법을 바탕으로 한국 연안에서 나타나는 *Alexandrium* 종 중에서 *A. tamarense* species complex에 속하는 종은 *A. catenella* (Group I)와 *A. pacificum* (Group IV)으로 알려져 있다 (Shin et al. 2017). 하지만, 2017년 이전에 수행된 *Alexandrium* 종의 생리, 생태 연구는 대상종의 명확한 동정을 바탕으로 이루어져 있지 않다.

한국 연안에서 *Alexandrium* 종의 출현은 봄에서 초여름까지 관찰되고 (Lee and Han 2003; Oh et al. 2012), 5월과 6월에 주로 우점하거나 대증식을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Shin et al. 2017; Kim et al. 2020). 그리고, 이 시기에 대증식은 수온과 밀접한 연관이 있다 (Wang and Hsieh 2002; Oh et al. 2012; Shin et al. 2017). 하지만, 과거에 수행된 *Alexandrium* 종의 성장과 환경 요인과의 연관성 연구는 대상 종들에 대한 형태적 동정을 기반으로 진행되어 왔기 때문에 (Han et al. 1992; Oh et al. 2012; Kwon et al. 2013), 종을 특정하여 성장 반응 결과를 이해하기에는 어려움이 있다.

수온, 염분, 영양염은 식물플랑크톤의 성장과 분포에 영향을 미치는 중요한 해양 환경 요인이다 (Tilman 1982; Juhl et al. 2000; Elmgren and Larsson 2001). 특히, *Alexandrium* 종과 같은 유해 와편모조류 (harmful dinoflagellate)의 대증식과 환경 요인과의 관계에 관한 연구는 향후 유해조류 대발생 (harmful algal bloom)과 PSP 발생 예측 연구에 도움을 줄 수 있다 (e.g. Anderson 2009). 이런 이유에서, 전 세계 많은 해역에서 *Alexandrium* 종의 발생과 환경 요인과의 상관성을 규명하기 위해 연구가 진행되어 왔지만 (e.g. Anderson et al. 2012), 한국 연안에서 분리한 *Alexandrium* 종의 성장에 영향을 미치는 환경 요인에 관한 연구는 미비하다. 따라서, 본 연구에서는 거제도 장목만에서 *Alexandrium* 종을 분리한 후, 형태적 특징과 LSU rRNA gene sequence 분석을 통한 분자계통도를 작성하여 종을 명확히 하고, 온도, 염분, 영양염 농도 차이에 따른 성장 반응을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

1. *Alexandrium* 종의 분리과 배양

2017년 5월 거제도 장목만 (34°59'36.71"N, 128°40'27.73"E)에서 플랑크톤네트 (20 µm mesh)를 이용하여 검정용 시료를 채집하였다 (Fig. 1). 채집된 시료에서 *Alexandrium* 종은 광학현미경하에서 Pasteur pipette를 이용하여 단일의 유영세포로 분리, 세척하여, f/2-Si 배지가 채워진 48-well culture plate (SPL, Seoul, South Korea)에 접종하였다.

성장 유도를 위한 *Alexandrium* 종의 배양은 온도 20°C, 광량 80 µmol photons m⁻² s⁻¹의 환경으로 설정된 배양기에서 진행하였고, 격일 간격으로 종의 성장을 확인하였다. 그리고, 안정된 성장을 보이는 Culture plate의 *Alexandrium* 종을 대상으로 pipette을 이용하여 유영세포들을 확보하여

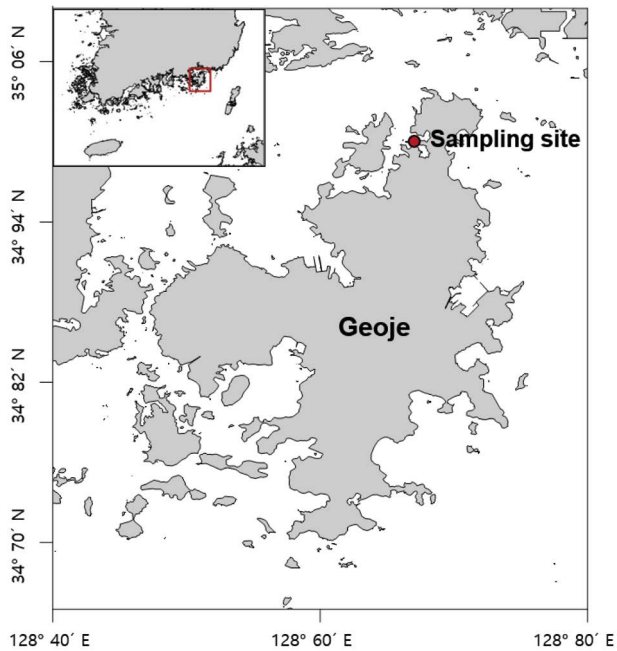


Fig. 1. Location of the sampling site in the Jangmok Bay of Geoje Island, Korea.

Culture flask (SPL, Seoul, South Korea)에 재접종한 후, 유지 배양을 통해 배양주로 확보하였다. 확보된 배양주는 해양식물플랑크톤 기탁등록보존기관에 등록하였다(LIMS-PS-2607).

2. *Alexandrium* 종의 형태 관찰

장목만에서 분리한 *Alexandrium* 종의 형태는 광학현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)과 주사전자현미경 (JOEL Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 주사전자현미경을 이용한 관찰에서 시료 제작은 지수성장기의 배양주를 Lugol's solution (최종농도 2.5%)으로 실내에서 2시간 동안 고정하여 초순수 (deionized water)로 세척하였다. 그리고 농도가 다른 에탄올 시리즈 (10, 30, 50, 70, 90, 99.9%)에서 각각 15분씩 탈수를 진행하였고, 임계점건조법 (SPI-DRY REGULAR CPD, USA)을 통하여 건조시켰다. 건조된 시료는 Aluminum stub에 고정시켜 백금코팅을 한 후, 유영세포의 형태를 관찰하였다.

3. Genomic DNA 추출, PCR 증폭 및 염기서열 분석

본 연구에서 *Alexandrium* 종의 분자계통학적 위치는 LSU rRNA gene sequence의 분석을 바탕으로 결정되었다.

확보한 *Alexandrium* 종의 분자계통학적 위치를 파악하기 위해, 지수성장기의 배양주를 1.5 mL 튜브에 1 mL 분취하였고, 원심분리기 (3,000 × g, 20분)를 이용하여 유영세포를 농축하였다. 이후 튜브에서 상등액을 제거하여 펠렛 (pellet)을 확보한 후, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 Genomic DNA를 추출하였다. LSU rRNA gene sequence 증폭을 위한 primer pair는 forward primer, D1R와 reverse primer, R2를 이용하였다 (Takano and Horiguchi 2006). PCR은 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 pre-denature 95°C에서 2분, denature는 95°C에서 20초, annealing은 55°C에서 1분, elongation은 72°C에서 1분, post-elongation은 72°C에서 5분으로 하여 30회로 증폭 반응을 설정하여 진행하였고, Final elongation은 72°C에서 5분으로 하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전개하여 Midori Green Advance (Nippon Genetics, Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 염색하여 전기영동을 수행하였고, DNA 밴드를 UV하에서 확인하였다. 정제된 PCR product에 대한 DNA sequencing의 경우 QIAquick PCR purification kit (Qiagen)를 이용하였고, Cycle-sequencing reaction은 ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하였다.

4. 계통 분석

확보된 염기서열 (sequence) 비교는 NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 얻은 염기서열을 추가하여 총 60개의 염기서열을 MEGA v. 7.0.26 프로그램을 이용하여 정렬, 편집하였고, Genbank에 Accession No. OP355285로 등록하였다. 그 결과 1402 bp의 정렬된 염기서열로 자료를 정리할 수 있었고, out group은 *Fragilidium subglobosum* (AF033868)로 설정하여, jModelTest v. 2.1.4 프로그램으로 분석하였다 (Darriba et al. 2012). 계통 분석은 GTR + G model (A : C : G : T = 0.2734 : 0.1705 : 0.2666 : 0.2896; p-inv = 0; gamma shape = 0.4570)을 사용하였다. 계통학적 유연관계 분석에서 베이지 추론 (Bayesian Inference; BI)은 MrBayes 3.1.2로 하였고, 최대우사분석 (Maximum-likelihood analysis; ML)은 PhyML (Guindon and Gascuel 2003; Ronquist and Huelsenbeck 2003)을 이용하였다. 계통수에서 각 branch에 대한 신뢰도는 1,000회의 bootstrap으로 하였다. 이후 분석 결과를 바탕으로 분자계통도를 작성하였고, 분자계통도의 확인은 Tree-View 4.5 프로그램을 이용하였다.

5. 온도, 염분 구배와 영양염 첨가에 따른 *Alexandrium* 종의 성장 반응 실험

온도와 염분, 영양염 첨가에 따른 *Alexandrium* 종의 성장 반응을 파악하기 위하여, 분리한 유영세포들을 2 L bottle (SPL, Seoul, South Korea)에서 3주간 선배양(subculture) 하였다. 모든 성장 실험은 1달 이상 순치된 동중국해(위경도; 32°00'N, 127°00'E) 해수를 이용하여 진행하였다. 순치된 해수에서 용존무기질소(DIN; NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺)와 인산염(DIP; PO₄³⁻) 농도는 각각 6.27, 0.21 μM였다. 그리고, 배양기 내 광량은 80 μmol m⁻² s⁻¹, 명암주기는 12L : 12D로 하여 성장 실험을 수행하였다.

성장 반응 실험을 위해 지수성장기의 배양주에서 30 mL를 취하여 f/2-Si 배지를 포함하고 있는 55 mL 크기의 배양 튜브에 접종하여 최종유영세포밀도가 약 2.0 × 10² cells mL⁻¹이 되도록 하였다.

온도와 염분의 변화에 대한 성장실험에서 온도는 염분 30 psu하에서 6단계의 조건(5, 10, 15, 20, 25, 30°C), 염분은 최적 온도조건하에서 5단계의 조건(15, 20, 25, 30, 35 psu)으로 하였다. 이 실험에서 염분은 3차 증류수를 이용하여 조절하였다.

영양염 첨가실험은 유영세포의 최대 성장을 나타내는 온도와 염분 조건에서 수행되었다. *Alexandrium* 배양주의 선배양은 영양염을 첨가하지 않은 멸균 해수에 2L 규모로 3주간 배양하여, 유영세포 내 영양염을 고갈시켰다. 이후 각각의 실험구에 농도가 다른 질산염(nitrate) 또는 인산염(phosphate)을 첨가하여 실험을 진행하였다(Table 1).

유영세포 밀도의 변화는 이틀에 한 번 형광광도계(10-AU Fluorometer, Turner Designs, USA)를 이용하여 *in vivo* fluorescence 형광값을 측정하여 관찰하였다. 이 실험에서 유영세포 밀도는 형광값과의 상관관계를 통해 계산된 수치를 환산하여 구하였다(*r*²=0.99). 그리고 성장 속도는 지수성장을 보인 기간 동안의 유영세포 밀도를 다음의 식에 대입하여 계산하였다(Eq. 1, Guillard 1973).

$$\mu = \frac{\log_2 (N_t - N_0)}{\Delta t} \tag{Eq. 1}$$

μ: 성장 속도(divs day⁻¹)

N₀, N_t: 지수성장기의 초기와 t시간(day) 후의 유영세포 밀도

Δt: 지수성장기간(day)

결과 및 고찰

1. *Alexandrium pacificum* (Group IV)의 형태와 계통 분류

거제도 장목만에서 분리한 *Alexandrium* 종의 유영세포는 진한 노란색을 띠고 있으며, 상각(epitheca)은 원뿔형이고 하각(hypotheca)은 반 구형이었다(Fig. 2A-D). 광학현미경을 이용한 관찰에서 Cingulum과 핵(nucleus)이 뚜렷하게 보이고, 핵은 유영세포의 중심에 위치해 있었다(Fig. 2A-C). 유영세포의 길이(length)는 22.17~42.85 μm (평균=29.79 ± 3.78, n=50)였고, 폭(width)은 19.4~28.72 μm (평균=23.74 ± 2.57 μm, n=50)였다. 상각과 하각의 크기는 큰 차이를 보이지 않았다. 주사전자현미경을 이용한 관찰에서, 판 배열은 Po (apical pore plate), 4', 6'', 5''', 2''''', posterior sulcal plate였다(Fig. 2E-J). 유영세포 표면에는 작은 구멍(pore)들이 불규칙하게 분포하고 있었다(Fig. 2K). Ventral pore는 판 1'와 4' 사이에 존재하였고(Fig. 2G), cingulum plate의 경계는 명확하게 구분되지 않았다. Po에는 십표 모양의 판이 관찰되었고, 유영세포 표면에서 나타난 구멍과는 구별되는 조금 큰 크기의 작은 구멍들이 관찰되거나 이보다 더 큰 크기의 구멍 한 개가 관찰되기도 하였다(Fig. 2L, M).

Balech (1995)이 제시한 *Alexandrium* 종에 관한 형태 기록에 따르면, *Alexandrium tamarense*와 *A. catenella*는 판배열이 같고, ventral pore의 유무에 따라 종이 구분될 수 있다. 즉, *A. tamarense*는 ventral pore를 가지고 있지만, *A. catenella*는 ventral pore를 가지고 있지 않다. 이 형태적 기록을 바탕으로 과거 한국 연안에서 출현하는 PSP 발생의 원인종은 *A. tamarense*로 동정되어 왔다. 본 연구에서도 장목만에서 분리한 *Alexandrium* 종은 *A. tamarense*로 동정될 수 있는 것처럼 보인다. 하지만, Lilly *et al.* (2007)과 John *et al.* (2014)은 *A. tamarense*와 *A. catenella*의 형태적 특징은 과거 기록과

Table 1. Nutrient concentrations (μM) used in the experimental design

Treatment	Control	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6
Nitrate	None added	1	5	10	20	50	100
Phosphate	None added	0.1	0.5	1	2	5	10

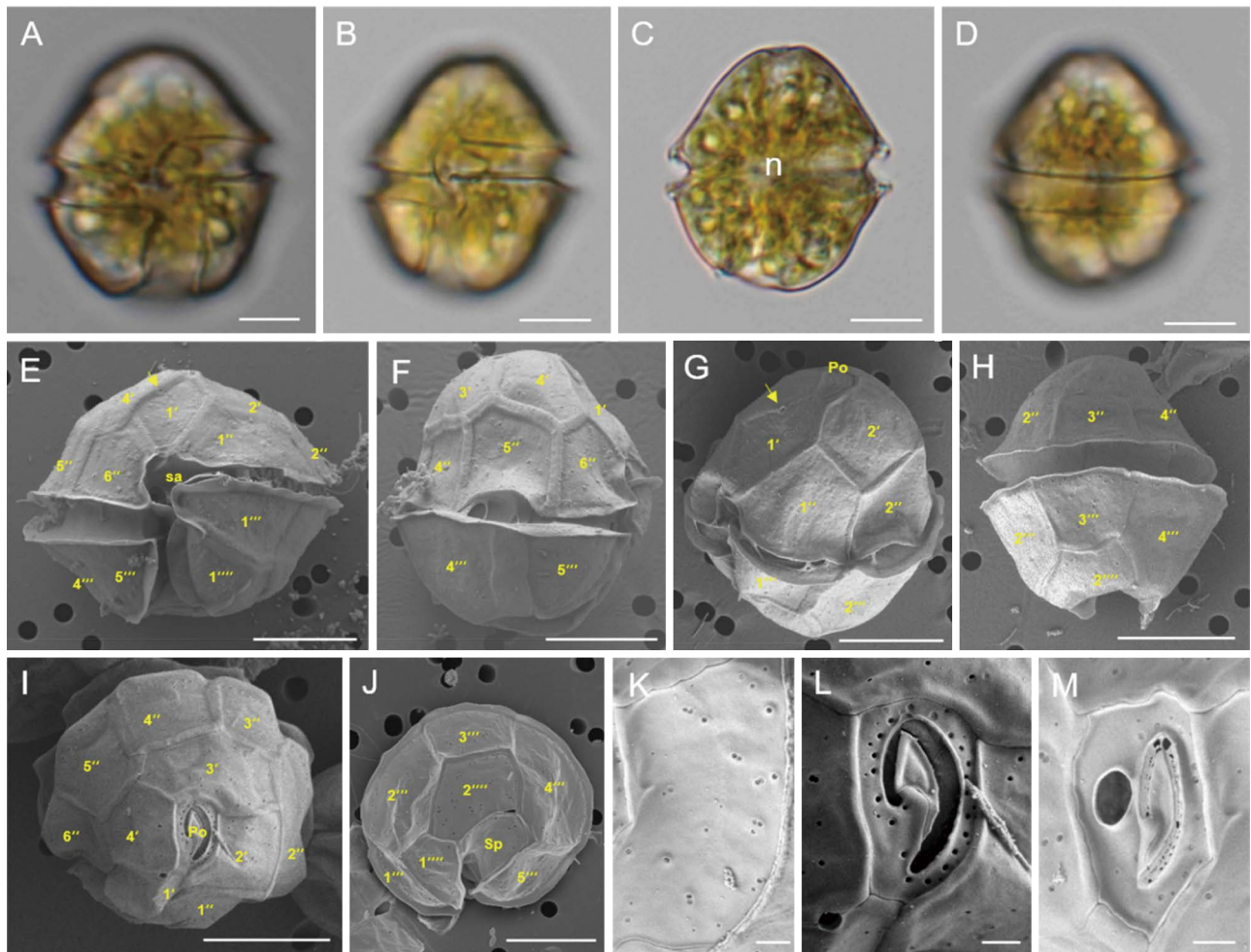


Fig. 2. Light and scanning electron micrographs (SEM) of *Alexandrium pacificum* (Group IV) (culture strain LIMS-PS-2607). (A, B) Ventral view. (C) Deeper focus of ventral view showing the nucleus (n). (D) Dorsal view. (E) SEM image of ventral view showing ventral pore (arrow). (F) SEM image of right lateral view. (G) SEM image of left-lateral to apical view showing ventral pore (arrow). (H) SEM image of dorsal view. (I) Apical view showing apical pore plate (Po). (J) Antapical view showing the sulcal plate (Sp). (K) Details of cell surface showing small pores. (L, M) Details of apical pore complex. Scale bars: 10 μ m in A-J and 1 μ m in K-M.

일치하지 않고 구분이 되지 않는다고 하였다. 따라서, 종 수준에서 동정은 분자계통 분석에 따른 결과에 의해 구분되어야 한다.

확보된 *Alexandrium* 배양주의 염기서열 분석을 통해 계통 관계를 확인한 결과, 장목만에서 분리한 종은 일본, 호주, 홍콩 및 뉴질랜드 해역의 분리주(isolate)와 함께 *A. tamarense* species complex 내 *A. pacificum* (Group IV)으로 구분되었다(Fig. 3). *A. pacificum* (Group IV)의 출현은 장목만과 인접한 진해-마산만, 거제도 동쪽 해역에서 기록되어 있다(Shin *et al.* 2017, 2021; Kim *et al.* 2020). Shin *et al.* (2017, 2021)의 연구 결과에 의하면, 한국 연안에서 출현하는 *A. pacificum* (Group IV)는 *A. catenella* (Group I)와 형태

적으로 큰 차이가 없다. 본 연구에서도 장목만에서 분리한 *A. pacificum* (Group IV)은 *A. catenella* (Group I)와 형태적으로 구분이 되지 않았다. 하지만, *A. pacificum* (Group IV)과 *A. catenella* (Group I)는 수온에 따라 출현 시기가 구분이 되는 것으로 알려져 있기 때문에(Shin *et al.* 2017), 한국 연안에서 *A. tamarense* species complex 내 종의 동정에 성장 반응 연구 결과는 매우 중요할 것으로 판단된다.

2. 온도 차이에 따른 *A. pacificum* (Group IV)의 성장 반응

온도 차이에 따른 *Alexandrium pacificum* (Group IV)의 성장 곡선과 성장 속도를 Fig. 4에 나타냈다. *A. pacificum*

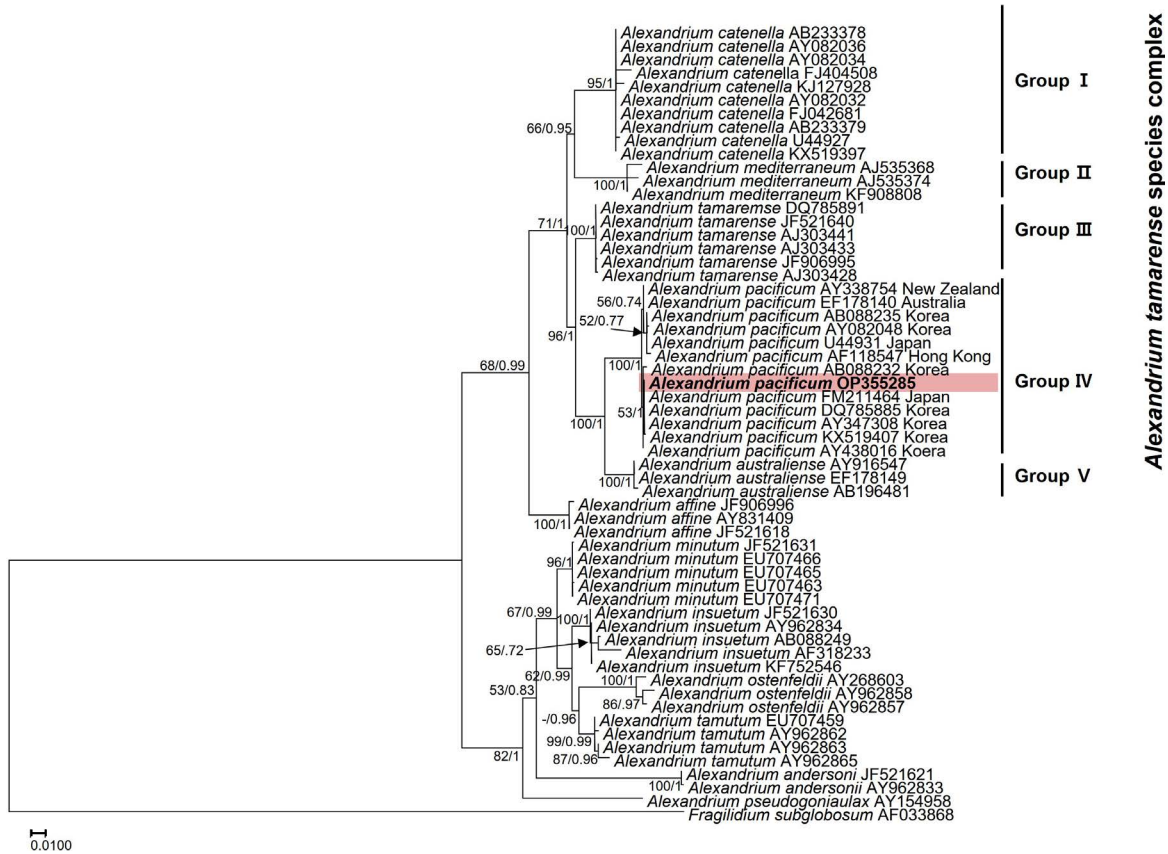


Fig. 3. Maximum-likelihood tree showing the phylogenetic position of *Alexandrium pacificum* (Group IV) based on partial nuclear-encoded LSU rDNA sequences. A newly acquired sequence is shown in bold. *Fragilidium subglobosum* was selected as an outgroup. Scale bar = number of nucleotide substitutions per site.

(Group IV)의 뚜렷한 성장은 15°C와 20°C에서 관찰되었고, 5°C와 10°C에서 *A. pacificum* (Group IV)은 성장하지 않았다. 성장 속도는 0.12 divs day⁻¹에서 0.28 divs day⁻¹로 나타났다. 최고 성장은 20°C 온도 조건에서 나타났고, 최저 성장 속도는 25°C의 온도 조건에서 나타났다. 30일간의 배양 기간 동안, 25°C와 30°C의 유영세포 농도는 초기 접종 농도에서 큰 차이를 보이지 않았지만, 15°C와 20°C에서 유영세포는 배양 28일까지 지속적으로 성장하였다. 본 연구에서 기록된 *A. pacificum* (Group IV)의 최적 성장 온도와 성장 속도는 한국의 진해-마산만에서 분리한 *Alexandrium* 종의 배양주에서 실험 결과 (Lee et al. 2006; Oh et al. 2012)와 일본의 Hiroshima 만과 Mikawa 만에서 보고된 *Alexandrium* 종의 성장 반응과 유사하다 (Yamamoto et al. 1995; Yamamoto and Tarutani 1997).

Alexandrium 종의 출현 시기에 관한 Shin et al. (2017)의

연구 결과에 따르면, 진해-마산만에서 *A. pacificum* (Group IV)의 증식은 수온이 약 19°C인 11월에 나타난다. 이 결과는 본 연구에서 나타난 *A. pacificum* (Group IV)의 온도에 대한 최대 성장 반응과 유사하다. Shin et al. (2021)은 진해-마산만에서 *A. pacificum* (Group IV)이 4월과 12월에 나타난다고 하였다. 이 시기에 수온은 약 10°C에서 24°C이며 (Shin et al. 2017), 본 연구에서 나타난 *A. pacificum* (Group IV)이 성장할 수 있는 온도 범위를 포함하고 있다. 최근에 Nam and Oh (2021)는 종에 대한 분류학적 정보를 제시하지 않고 온도에 대한 *A. catenella* (Group I)의 성장 반응 실험을 하였고, 이 종이 20°C와 25°C의 높은 온도에서 높은 성장을 보인다는 것을 확인하였다. 하지만, Shin et al. (2021)과 Kim et al. (2020)은 *A. catenella* (Group I)의 출현은 비교적 수온이 낮은 시기에 관찰되며 (1월과 4월), *A. pacificum* (Group IV)의 출현 시기와는 구분이 된다고 하였

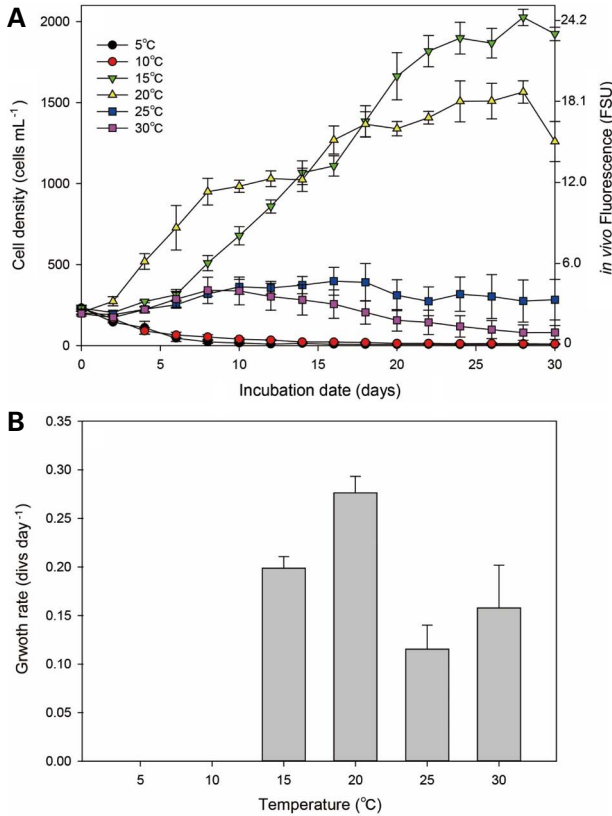


Fig. 4. Growth curves (A) and rates (B) of *Alexandrium pacificum* (Group IV) exposed to different temperature levels.

다. 즉, Nam and Oh (2021)의 성장 실험에서 대상 종은 *A. catenella* (Group I)보다는 *A. pacificum* (Group IV)일 가능성이 있다.

3. 염분 차이에 따른 *A. pacificum* (Group IV)의 성장 반응

염분 차이에 따른 *Alexandrium pacificum* (Group IV)의 성장 곡선과 성장 속도를 Fig. 5에 나타냈다. *A. pacificum* (Group IV)의 성장은 염분 15 psu를 제외한, 모든 염분 구간(20, 25, 30, 35 psu)에서 관찰되었다. 성장을 보이는 모든 염분 구간에서 유영세포는 배양 20일까지 성장을 하였고 이후 안정기(stationary phase)에 들어갔다. 배양 마지막 날에 유영세포 농도는 염분 30 psu에서 가장 높았고, 다음으로 염분 25, 35 psu 순이었으며, 염분 20 psu에서 유영세포 농도가 가장 낮았다. 성장이 관찰된 염분 범위 내에서 지수 성장기 기간으로 계산된 성장 속도는 0.14 divs day⁻¹와 0.18 divs day⁻¹ 범위로 나타났으며, 염분 구간 25 psu와 30 psu에

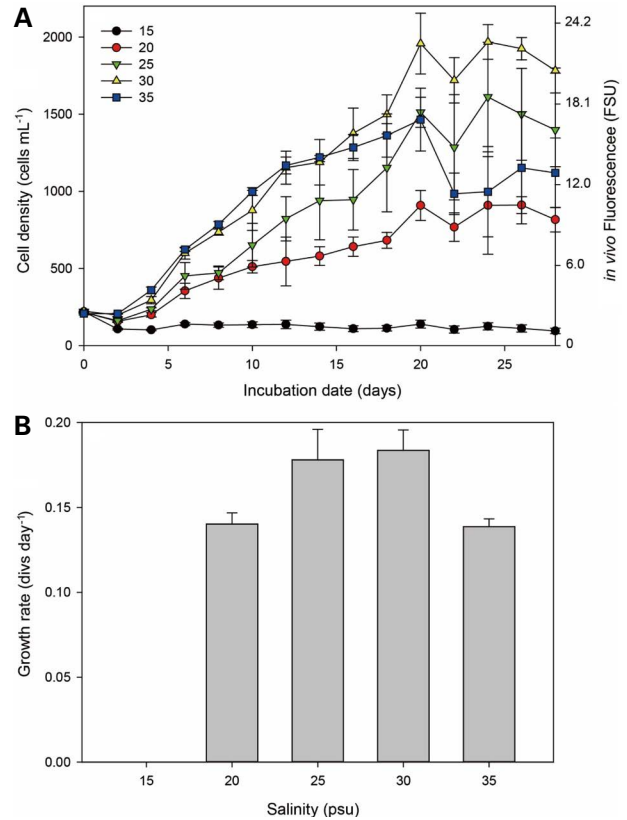


Fig. 5. Growth curves (A) and rates (B) of *Alexandrium pacificum* (Group IV) exposed to different salinity levels.

서 높았고, 염분 20 psu와 35 psu에서는 낮았다.

장목만에서 염분은 연중 18.0~28.9 psu 범위로 나타난다 (Lee et al. 2005a). 이 염분 범위는 본 연구 결과에 보인 *A. pacificum* (Group IV)의 염분에 대한 성장 범위를 포함한다. 즉, 장목만에서 *A. pacificum* (Group IV)의 출현에 염분의 변화는 크게 영향을 주지 않을 것으로 판단된다. 하지만 극도로 낮은 염분에서 *Alexandrium* 종의 성장이 저해된다는 연구 결과가 있고 (Lee et al. 2005b; Lee et al. 2006), 본 연구에서도 *A. pacificum* (Group IV)은 염분 15 psu에서 유영세포 농도는 초기 접종 농도에서 차이를 보이지 않았기 때문에, *A. pacificum* (Group IV)은 담수 유입이 강한 해역 혹은 강수가 집중되는 시기에 성장은 어려울 것으로 판단된다. Oh et al. (2012)과 Bui et al. (2021)에 따르면, 한국 연안에서 나타나는 *Alexandrium* 종의 염분에 대한 최적 성장은 대부분 염분 30 psu 범위에서 나타나고, 일본 연안에서도 염분 30~32 psu 범위에서 최적 성장을 보인다 (Yamamoto et al. 1995; Yamamoto and Tarutani 1997). 이 결과는 본 연

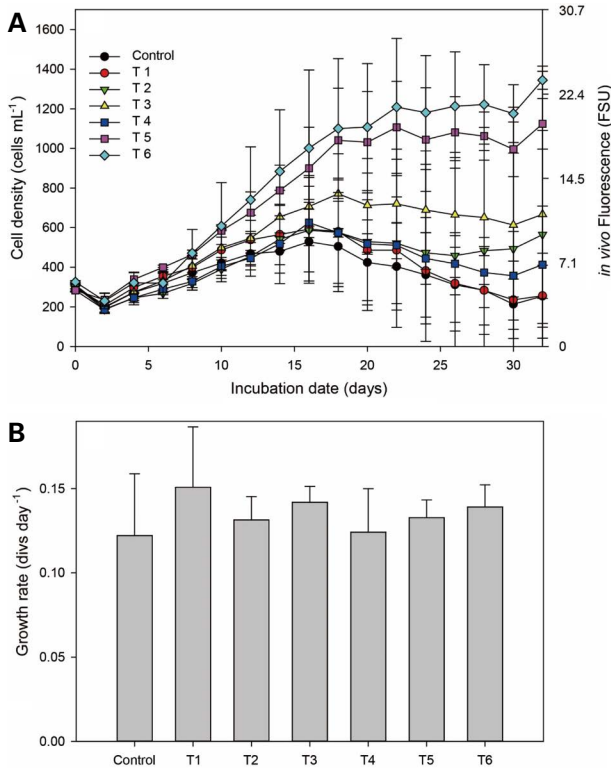


Fig. 6. Growth curves (A) and rates (B) of *Alexandrium pacificum* (Group IV) exposed to different nitrate concentrations.

구에서 보여지는 염분에 대한 *A. pacificum* (Group IV)의 최적 성장 결과와 유사하다. 따라서, *A. pacificum* (Group IV)은 넓은 염분 범위에서 성장이 가능하지만, 특정 염분(염분 25 psu 이상, 35 psu 이하)에서는 성장이 촉진될 수 있다는 것을 나타낸다.

4. 질산염과 인산염 첨가에 따른 *A. pacificum* (Group IV)의 성장 반응

질산염과 인산염 첨가에 따른 *Alexandrium pacificum* (Group IV)의 성장 곡선과 성장 속도를 Figs. 6과 7에 나타냈다. 질산염 첨가 실험에서 *A. pacificum* (Group IV)은 대조구(control)와 모든 실험구(treatments)에서 배양 16일 혹은 18일(지수성장기)까지 성장한 후 안정기에 들어갔다(Fig. 6A). 하지만, 지수성장기 이후, 실험구 T5, T6를 제외한 대조구와 실험구(T1, T2, T3, T4)에서 *A. pacificum* (Group IV) 유영세포 농도는 서서히 감소하는 경향을 보였다. 그리고 지수성장기에서 보이는 대조구와 실험구에서 성장 속도는 0.12 divs day⁻¹에서 0.15 divs day⁻¹의 범위로 유

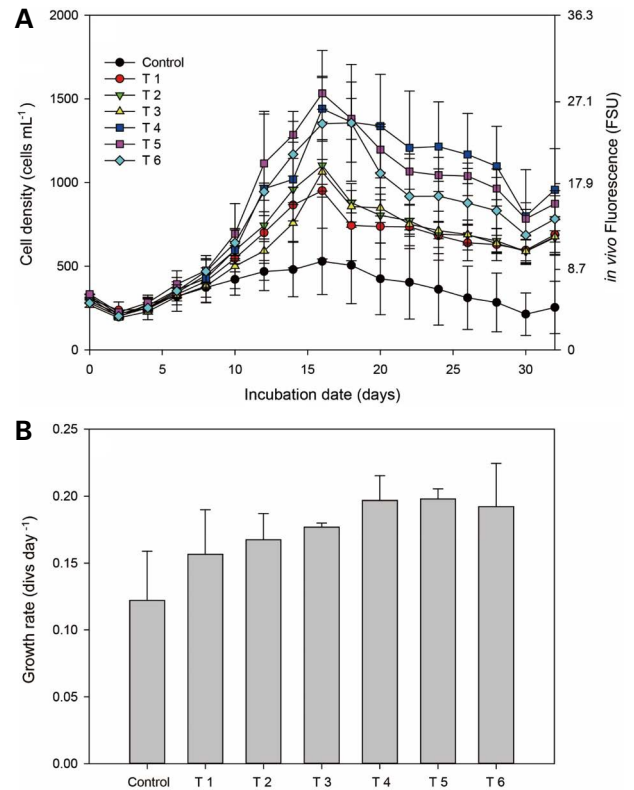


Fig. 7. Growth curves (A) and rates (B) of *Alexandrium pacificum* (Group IV) exposed to different phosphate concentrations.

사하였지만(Fig. 6B), 배양 마지막날 최종 유영세포 농도는 T5 (1,124 cells mL⁻¹)와 T6 (1,344 cells mL⁻¹)의 유영세포 농도가 대조구와 다른 실험구(529~779 cells mL⁻¹)보다 약 두 배 정도 높았다.

인산염 첨가 실험에서 *A. pacificum* (Group IV)는 대조구와 모든 실험구에서 16일(지수성장기)까지 성장한 후, 유영세포 농도는 감소하였다(Fig. 7A). 질산염 첨가 실험에서 나타난 안정기는 관찰되지 않았다. 유영세포 농도는 지수성장기와 배양 마지막날까지 실험구에서 대조구보다 높았고, 실험구에서도 인산염 첨가 농도가 높은 T4, T5, T6에서 T1, T2, T3보다 높았다. 성장 속도 또한 모든 실험구에서 대조구보다 높았으며, 인산염 농도가 높아질수록 성장 속도는 증가하는 경향을 보였지만, 실험구 T4 (0.20 divs day⁻¹), T5 (0.20 divs day⁻¹), T6 (0.19 divs day⁻¹)에서 성장 속도는 유사하였다(Fig. 7B).

해양생태계에서 영양염은 와편모조류의 성장과 분포에 영향을 미치는 중요한 환경 요인이고, 수주에서 영양염의 증가는 와편모조류의 대발생과 밀접한 관련이 있다

(Smayda 1997, 2000). 본 연구에서도 질산염과 인산염과 같은 영양염 농도 증가가 *A. pacificum* (Group IV)의 성장을 증진시키는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, 질산염을 첨가한 실험군에서 *A. pacificum* (Group IV)는 안정기를 가지는 반면, 인산염을 첨가한 실험군에서 *A. pacificum* (Group IV)는 안정기를 가지지 않았기 때문에, 질산염과 인산염 농도의 증가는 *A. pacificum* (Group IV)의 성장에 다르게 작용하는 것처럼 보인다. Sommer (1989)의 연구 결과에 따르면 식물플랑크톤은 성장을 위해 영양염을 이용하는 두 가지 전략을 가진다. 첫 번째는 흡수한 영양염을 성장에 바로 이용하는 성장 전략(growth strategy), 두 번째는 흡수한 영양염을 유영세포 내에 축적하여 성장하는 저장 전략(storage strategy)이다. 이 전략 중에 *A. pacificum* (Group IV)은 인산염에 대해서는 성장 전략을 가지고, 질산염에 대해서는 저장 전략을 가지는 것으로 판단된다. 즉, 수주에서 인산염의 농도 증가는 *A. pacificum* (Group IV)의 성장을 촉진시킬 수 있는 중요한 요인이 될 것으로 판단된다.

Li et al. (2011)과 Leong et al. (2010)은 질산염에 대해서 *Alexandrium* 종의 성장은 저장전략을 이용한다고 하였고, Paredes-Mella et al. (2020)은 *A. catenella* (Group I)가 빈영양상태에서 다른 종들과의 경쟁에서 우위를 차지할 수 있는 저장 전략을 가진다고 하였다. 이 결과는 *A. pacificum* (Group IV)과 *A. catenella* (Group I)가 성장을 위해 영양염에 대해 같은 전략을 가질 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서, Shin et al. (2017)의 연구 결과에서 기록된 두 종의 출현 시기 차이는 영양염 농도에서 변화보다 시기에 따른 수온 변화가 주요 원인으로 판단된다.

적 요

장목만에서 분리한 *Alexandrium* 종의 배양주를 확보하여 형태와 계통분류를 통해 종을 명확히 하고 온도, 염분 및 영양염 농도 차이에 따른 성장 반응을 파악하였다. 확보한 *Alexandrium* 종은 형태적으로 *Alexandrium catenella*, *A. tamarense*와 구분이 되지 않았다. 하지만, 분자계통도 작성을 통해 장목만에서 분리한 *Alexandrium* 종은 *A. tamarense* species complex 내의 *A. pacificum* (Group IV)에 속하는 것을 확인할 수 있었다. 온도에 대한 성장 반응 실험에서 *A. pacificum* (Group IV)는 15°C와 20°C에서 높은 성장 속도

와 유영세포 농도를 보였고, 염분에 대한 성장 반응 실험에서 *A. pacificum* (Group IV)은 염분 20~35 psu의 넓은 염분 범위에서 성장하였다. 즉, *A. pacificum* (Group IV)은 협온성, 광염성의 특징을 가진다. 그리고 영양염 첨가에 따른 성장 반응 실험에서, *A. pacificum* (Group IV)은 질산염과 인산염의 농도 증가와 함께 성장을 하였지만, 질산염과 인산염에 대해 다른 소비 전략을 가지는 것으로 나타났다.

CRedit authorship contribution statement

KH Han: Formal analysis, data curation, writing-original draft and writing-review & editing. HH Shin: Formal analysis, data curation, writing-original draft and writing-review & editing. JY Youn: Investigation and data curation. KY Kwak: Investigation and data curation. Z Li: Investigation and data curation. W Lee: Writing-review & editing.

사 사

본 연구는 해양수산과학기술진흥원 해양생물 마이크로바이옴 분석과 적용 연구를 통한 마린바이오텍스 개발사업(20210469)과 한국해양과학기술원(PEA0021), 한국연구재단(NRF-2022M3H9A1083416)의 지원을 받아 수행되었음.

REFERENCES

- Anderson DM, DM Kulis, GJ Doucette, JC Gallagher and E Balech. 1994. Biogeography of toxic dinoflagellates in the genus *Alexandrium* from the northeastern United States and Canada. Mar. Biol. 120:467-478. <https://doi.org/10.1007/BF00680222>
- Anderson DM, TA Alpermann, AD Cembella, Y Collos, E Masseret and M Montresor. 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*, Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. Harmful Algae 12:10-35. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.012>
- Anderson DM. 2009. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). Ocean Coastal Manage. 52:342-347. <https://doi.org/10.1016/ocecoaman.2009.04.006>
- Balech E. 1995. The Genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station. Cork, Ireland.

- Bui QTN, H Kim, H Park and JS Ki. 2021. Salinity affects saxitoxins (STXs) toxicity in the dinoflagellate *Alexandrium pacificum*, with low transcription of SXT-biosynthesis genes *sxtA4* and *sxtG*. *Toxins* 13:733. <https://doi.org/10.3390/toxins13100733>
- Darriba D, GL Taboada, R Doallo and D Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9:772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Elmgren R and U Larsson. 2001. Nitrogen and the Baltic Sea: managing nitrogen in relation to phosphorus. *Sci. World* 1:371–377. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.291>
- Guillard RRL. 1973. Division rates. In: *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements* (Stein JR ed.). Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Guindon S and O Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52:696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Hallegraeff GM. 2003. Harmful algal blooms: a global overview. pp. 25–50. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing. <https://doi.org/10.25607/OBP-1370>
- Han MS, JK Jeon and YO Kim. 1992. Occurrence of dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, a causative organism of paralytic shellfish poisoning in Chinhae Bay, Korea. *J. Plankton Res.* 14:1581–1592. <https://doi.org/10.1093/plankt/14.11.1581>
- Harada T, Y Oshima, H Kamiya and T Yasumoto. 1982. Confirmation of paralytic shellfish toxins in the dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* and bivalves in Palau. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48:821–825. <https://doi.org/10.2331/suisan.48.821>
- John U, RW Litaker, M Montresor, S Murray, ML Brosnahan and DM Anderson. 2014. Formal revision of the *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) taxonomy: The introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification. *Protist* 165:779–804. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.10.001>
- Juhl AR, V Velazquez and MI Latz. 2000. Effect of growth conditions on flow-induced inhibition of population growth of a red-tide dinoflagellate. *Limnol. Oceanogr.* 45:905–915. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.4.0905>
- Kim YO, J Choi, SH Baek, M Lee and HM Oh. 2020. Tracking *Alexandrium catenella* from seed-bed to bloom on the southern coast of Korea. *Harmful Algae* 99:101922. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101922>
- Kwon HK, JA Park, HS Yang and SJ Oh. 2013. Dominance and survival strategy of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* under dissolved inorganic nitrogen-limited conditions. *J. Korean Soc. Mar. Environ. Energy* 16:25–35. <https://doi.org/10.7846/JKOSMEE.2013.16.1.25>
- Lee CK, OH Lee and SG Lee. 2005a. Impacts of temperature, salinity, and irradiance on the growth of ten harmful algal bloom-forming microalgae isolated in Korean Coastal waters. *The Sea* 10:79–91.
- Lee HO and MS Han. 2003. Spring bloom of *Alexandrium tamarense* in Chinhae Bay, Korea. *Aquat. Microb. Ecol.* 33:271–278. <https://doi.org/10.3354/ame033271>
- Lee HO, NW Lee, T Katano and MS Han. 2006. Growth characteristics for toxic marine dinoflagellate *Alexandrium catenella* isolated from Jinhae Bay, Korea. *Korean J. Environ. Biol.* 24:147–154.
- Lee WJ, K Shin, PG Jang, MC Jang and NJ Park. 2005b. Summer pattern of phytoplankton distribution at a station in Jangmok bay. *Ocean Sci. J.* 40:109–117. <https://doi.org/10.1007/BF03022605>
- Leong SCY, M Maekawa and S Taguchi. 2010. Carbon and nitrogen acquisition by the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in response to different nitrogen sources and supply modes. *Harmful Algae* 9:48–58. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.07.003>
- Li TS, RC Yu and MJ Zhou. 2011. Short-term effects of different nitrogen substances on growth and toxin production of dinoflagellate *Alexandrium catenella* Balech (strain ACDH). *Harmful Algae* 12:46–54. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.08.011>
- Lilly EL, KM Halaných and DM Anderson. 2007. Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae) 1. *J. Phycol.* 43:1329–1338. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00420.x>
- Murray SA, R Diwan, RJ Orr, GS Kohli and U John. 2015. Gene duplication, loss and selection in the evolution of saxitoxin biosynthesis in alveolates. *Mol. Phylogenet. Evol.* 92:165–180. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.06.017>
- Nam KT and SJ Oh. 2021. Influence of water temperature and salinity on the production of paralytic shellfish poisoning by toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Group I). *Korean Soc. Mar. Environ. Saf.* 27:119–126. <https://doi.org/10.7837/kosomes.2021.27.1.119>
- Oh SJ, JA Park, HK Kwon, HS Yang and WA Lim. 2012. Ecophysiological studies on the population dynamics of two toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* isolated from the Southern coast of Korea I. Effects of temperature and salinity on the growth. *J. Korean Soc. Mar. Environ. Energy* 15:133–141. <https://doi.org/10.7846/JKOSMEE.2012.15.2.133>
- Oshima Y, M Hasegawa, T Yasumoto, G Hallegraeff and S Blackburn. 1987. Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. *Toxicon* 25:1105–1111. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90267-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90267-4)

- Paredes-mella J, D Verela, P Fernández and O Espinoza-González. 2020. Growth performance of *Alexandrium catenella* from the Chilean fjords under different environmental drivers: plasticity as a response to a highly variable environment. *J. Plankton Res.* 42:119–134. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbaa011>
- Prud'homme van Reine WF. 2017. Report of the nomenclature committee for algae: 15. *Taxon* 66:191–192. <https://doi.org/10.12705/661.16>
- Ronquist F and JP Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Shin HH, Z Li, D Réveillon, GA Rovillon, KN Mertens, P Hess, HJ Kim, JH Lee, KW Lee, DK Kim, BS Park, J Hwang, MH Seo and WA Lim. 2020. *Centrodinium punctatum* (Dinophyceae) produces significant levels of saxitoxin and related analogs. *Harmful Algae* 100:101923 <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101923>
- Shin HH, Z Li, ES Kim, JW Park and WA Lim. 2017. Which species, *Alexandrium catenella* (Group I) or *A. pacificum* (Group IV), is really responsible for past paralytic shellfish poisoning outbreaks in Jinhae-Masan Bay, Korea? *Harmful Algae* 68:31–39. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.07.006>
- Shin HH, Z Li, HJ Kim, BS Park, J Lee, AY Shin, TG Park, KW Lee, KH Han, JY Youn, KY Kwak, MH Seo, D Kim, MH Son, DJ Kim, K Shin and WA Lim. 2021. *Alexandrium catenella* (Group I) and *A. pacificum* (Group IV) cyst germination, distribution, and toxicity in Jinhae-Masan Bay, Korea. *Harmful Algae* 110:102122. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102122>
- Smayda TJ. 1997. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton bloom in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 42:1137–1153. https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.5_part_2.1137
- Smayda TJ. 2000. Ecological features of harmful algal blooms in coastal upwelling ecosystems. *Afr. J. Mar. Sci.* 22:219–253. <https://doi.org/10.2989/025776100784125816>
- Sommer U. 1989. The role of competition for resources in phytoplankton succession. pp. 57–106. In: *Plankton Ecology: Succession in Plankton Communities*. Springer. Berlin. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74890-5_3
- Takano Y and T Horiguchi. 2006. Acquiring scanning electron microscopical, light microscopical and multiple gene sequence data from a single dinoflagellate cell 1. *J. Phycol.* 42:251–256. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00177.x>
- Taylor FJR, Y Fukuyo, J Larsen and GM Hallegrae. 2003. Taxonomy of harmful dinoflagellates. pp. 389–432. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae* (Hallegrae GM, DM Anderson and AD Cembella eds.). IOC-UNESCO. Paris.
- Tilman D. 1982. *Resource Competition and Community Structure*. Princeton University Press. Princeton, NJ.
- Wang DZ and DP Hsieh. 2002. Effects of nitrate and phosphate on growth and C2 toxin productivity of *Alexandrium tamarense* CI01 in culture. *Mar. Pollut. Bull.* 45:286–289. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00183-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00183-2)
- Yamamoto T and K Tarutani. 1997. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Jpn. J. Phycol.* 45:95–101.
- Yamamoto T, Y Yoshizu and K Tarutani. 1995. Effect of temperature, salinity and irradiance on the growth of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* isolated from Mikawa Bay, Japan. *Jpn. J. Phycol.* 43:91–98. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2004.19.4.293>