



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

경산호, *Montipora digitata* 에 대한 LED
(Light Emitting Diode)의 성장 효과



2017년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

유 상 준

이 학 석 사 학 위 논 문

경산호, *Montipora digitata* 에 대한 LED
(Light Emitting Diode)의 성장 효과

지도교수 김 도 형

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2017 년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

유 상 준

유상준의 이학석사 학위논문을 인준함

2017년 2월 26일



주 심 이학박사 박 원 규 (인)

위 원 이학박사 강 주 찬 (인)

위 원 이학박사 김 도 형 (인)

목 차

목차	i
Abstract	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 시험 산호 및 순치	4
1.1. 연구에서 사용한 산호	4
1.1.1. <i>Montipora digitata</i>	4
1.1.2. <i>Caulastrea furcata</i>	4
1.2. 시험 산호의 순치	5
2. 공생조류의 분리 및 동정	7
2.1. <i>Montipora digitata</i> 로부터 공생조류 분리	7
2.2. <i>Montipora digitata</i> 로부터 분리한 공생조류의 유전학적 동정	8
3. Symbiodinium clade C15의 시험관 배양	10
3.1. F/2 배양액을 이용한 Symbiodinium clade C15 시험관 배양 시험	10
3.2. <i>Symbiodinium sp. C15</i> 의 LED 파장 별 시험관 배양 시험	11
4. <i>Montipora digitata</i> 의 LED 파장별 성장 시험	12
4.1. 시험 수조 설계 및 제작	12
4.2. <i>Montipora digitata</i> 최적 성장을 위한 LED 파장 도출 시험	14
5. <i>Montipora digitata</i> 성장 적정 광량 도출 시험	16
5.1. 시험 수조 설계 및 제작	16
5.2. <i>Montipora digitata</i> 최적 성장을 위한 LED 광량 도출 시험	18
6. Chlorophyll 정량 시험	19
7. 통계분석	19

III . 결과	20
1. 공생조류의 분리 및 동정	20
1.1. <i>Montipora digitata</i> 로부터 공생조류의 분리	20
1.2. <i>Montipora digitata</i> 로부터 분리한 공생조류의 유전학적 동정	21
1.3. <i>Montipora digitata</i> 로부터 분리한 공생조류의 계통발생학적 분석	21
2. <i>Montipora digitata</i> 로부터 분리한 공생조류의 시험관 배양 시험	23
2.1. F/2 배지에서 공생조류의 시험관 배양 시험	23
2.2. <i>Montipora digitata</i> 분리 공생조류의 LED 파장 별 시험관 배양 시험	25
3. <i>Montipora digitata</i> 의 LED 파장별 성장 시험	26
3.1. LED 에 조사된 <i>Montipora digitata</i> 의 공생조류 밀도 변화	26
3.2. LED 파장 별 <i>Montipora digitata</i> 의 성장 시험	28
4. <i>Montipora digitata</i> 성장의 LED 적정 광량 도출 시험	30
5. Chlorophyll 정량 시험	32
5.1. LED 파장별 공생조류 인공배양 시험에서 chlorophyll 정량	32
5.1.1. Chlorophyll α	32
5.1.2. Chlorophyll c_2	34
5.1.3. Chlorophyll 조성비와 총량	36
5.2. LED 파장별 <i>Montipora digitata</i> 성장 시험에서 Chlorophyll 정량	38
5.2.1. Chlorophyll α	38
5.2.2. Chlorophyll c_2	40
5.2.3. Chlorophyll 조성비와 총량	42
5.3. LED 광량 별 <i>Montipora digitata</i> 성장 시험에서 Chlorophyll 정량	44
5.3.1. Chlorophyll α	44
5.3.2. Chlorophyll c_2	46
5.3.3. Chlorophyll 조성비와 총량	47
IV . 고찰	49
V . 요약	57
VI . 감사의 글	58
VII . 참고문헌	59

Effect of LED (light emitting diode) light on coral, *Montipora digitata* (Cnidaria:
Anthozoa: Scleractinia)

Yoo Sang Joon

*Department of Aquatic life medicine,
The Graduate School, Pukyong National University*

Abstract

Montipora digitata is a major species that forms a reef builder as well as having high ornamental value due to its wide variety of colors, its ecological value is very high. Recently, the number of natural populations is decreasing due to climate change, and the need for more efficient artificial production system is increasing. In this study, we tried to derive the light condition that induces the optimum growth of *M. digitata* using LED light. A control group irradiated with white composite LED light using *M. digitata* fragment (average weight of $n = 30$, $22.63 \text{ g} \pm 0.87$) and 4 groups of 4 wavelengths (405, 465, 520 and 640 nm) growth test was carried out by dividing into experimental groups. *M. digitata* had the highest growth rate of 3.1% ($p < 0.001$ compared to white LED irradiation) at 465 nm wavelength, The density of the symbiotic algae isolated from *M. digitata* and the total amount of chlorophyll (Chlorophyll a + Chlorophyll c2) also showed the highest increase at 465 nm. In order to determine the optimum light intensity required for the growth of *M. digitata*, we have experimented with LEDs with a wavelength of 465 nm with four kinds of light intensities (60, 125, 250, 400 $\mu \text{ mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Growth was proportional to the amount of light, and the highest growth rate (4.16 %, $p < 0.001$) was induced at 400 $\mu \text{ mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The density of isolated *Symbiodinium* sp C15 and the total amount of chlorophyll after light intensity experiment also showed the greatest increase at 465 nm, indicating a very high correlation with growth.

In conclusion, 465nm was the most effective wavelength for the growth of *M. digitata*, and the higher the light intensity, the higher the growth rate. This seems to be related to the characteristics of heat resistance and light resistance of *Symbiodinium* sp C15 symbiotic to *M. digitata*. The light condition of LED derived from this study can be used not only for display of coral, but also for growth, and it is expected to contribute to the increase of coral productivity by utilizing it in mass production system in the future.



I. 서론

백화현상은 적도지방에서 국지적 현상으로 시작 되었으나 최근 전세계적으로 이상 고 수온 현상이 지속됨에 따라 범 지구적 문제로 확대 및 인식 되었다. 2015년 발생한 El Niño로 인해 현재, 약 93%에 달하는 산호초 지역에서 백화현상이 발생 하였고 산호의 대량 폐사와 산호초 소실의 대 위기를 맞이하고 있다. 산호초의 위기는 단순한 의미에서 자연 자원의 소실이나 산호 멸종의 의미 이상으로, 전세계 해양생물의 25%에 이르는 서식지 유실과 그에 따른 생태계 파괴, 그리고 수산자원의 감소로 이어져, 자연과 인간 양쪽에 위협이 되고 있다(Climatc council, 2015). 대규모 백화현상을 유발하는 기상이변 (고온 현상)은 매해 발생빈도가 높아 질 것으로 예상되며 과거 수십 년에 한번 간헐적으로 발생했던 것이, 단 기간 내 2년에 1번 이상으로 빈도를 높일 것으로 예측하고 있다(Emanuel 2005; CSIRO and BoM 2015). 그럼에도 불구하고 기온 이상에 대한 인류의 근본적 대처 방안 마련과 단기간 내의 위기 해결은 불가능 하므로 백화 현상으로부터 산호 및 산호초 보호에 대한 대처 마련이 매우 시급 하다.

현재 인도네시아는 세계 최대 산호 수출국으로 약 71%의 시장 점유율을 갖고 있다(Timotius et al. 2009). 인도네시아 정부는 늘어나는 수출량과 수온에 의한 백화현상 또는 환경 오염 등의 문제로 줄어가는 산호의 개체 수를 유지 하기 위하여 산호 농장에 매년 생산되는 livestock 중 10%의 의무적 방생을 권고 하고 있다 (James et al. 2011). 자원 확보의 방안으로, 인공적으로 높은 생산량을 유지하는 것은 곧 방류 량의 증가로 이어지며, 산호의 인공 생산 방법의 개발과 그에 따른 생산량 증대는 결과적으로 백화현상에 대한 자구책이 될 수 있다.

산호의 인공 생산에서 산호의 성장이나 번식 등의 생리 기능을 이해 함에 있어 산호와 상리 공생 관계를 유지하며 광합성을 하는 조류 (Symbiodinium) 를 이해 하는 것은 가장 주요한 요소임에 틀림이 없다.

과거 산호와 광조건의 관계 연구는 광원의 개발과 함께 시작 되었으며, 초기 Metal halide를 이용한 태양광의 단순한 재현 및 광량 시험으로부터 시작하여 형광등을 이용한 광원의 색상에 따른 산호 성장 및 공생조류의 밀도 증감을 도출했던 과정을 거쳐 최근에는 정확한 광 파장을 구현 할 수 있는 단파장 LED 광원을 활용하여 산호종의 성장에 적정 광조건을 도출하거나 *Symbiodinium* sp. B의 독립 유영체 (ex hospite)의 성장에 청색 광 (465 nm)의 유효성이나, 적색 광 (640 nm)에 의한 산호 유영체 (*Symbiodinium* motile cell type)의 유사분열 억제를 다룬 연구(Wang et al. 2008)같이 특정 광조건에서 산호와 공생조류의 성장 및 생리적 변화를 이해하려는 다양한 연구가 진행 되고 있다. 그러나 산호종의 성장을 위한 적정 광조건 연구의 경우, 제한 적인 산호종에서 성장 효과를 시험 하는데 그쳤으며, 465 nm 파장에서 산호의 성장이 잘 일어난다는 기존 연구 결과와 다르게 성장 효과가 복합파장보다 낮은 성장률을 보이는 등 균일화 된 광조건을 도출하기 어려웠다 (Wijgerde et al. 2013).

반면 국내 산호 연구는 2014년부터 거품돌산호(*Alveopora japonica*; Rodriguez et al. 2014)를 시작으로 단풍돌산호(*Montipora trabeculata*; Choi et al. 2014) 같은 열대 경산호종의 보고를 시작으로 매해 신종의 보고 및 열대 종의 복상이 보고 됨에 따라, 신종의 동정 및 보고와 서식 생태 조사에 머물러 있다 (해양수산부. 2016). 또한 국립수산물과학원 산하, 미래양식연구센터 (김성호 et al. 2011) 와 제주 한화 아쿠아플라넷 (해양수산부. 2016) 에서 조각산호를 이용한 수온, 염분, 광조건에 의한 활착 조건 시험 및 자연 이식 시험 등을 통해 관상용 산호의 적정 사육 환경을 도출 함으로 산호 인공 번식 에 대한 연구도 시도 되었다. 하지만 조각산호를 만드는 기술은 무성생식을 통해 다양한 조건에서 쉽게 번식이 가능 하므로 취미가 들에게도 기초적인 산호 육성 기술의 하나이며 이미 상업적으로 널리 적용 되어 활용 되고 있는 방법이다. 또한 다양한 조건 시험에 대한 산호의 생리적 연구 보다는 현상 연구에 그쳐 있는 수준으로 판단된다. 산호에 대한 연구가 아직 기초적 단계에 머물러 있음에도 우리 해역은 이미 갯녹음 현상이 발생하여 저서 생물의 소실이 발생 하였으며

(권혜옥 et al. 2007), 2017년에는 NOAA에서 백화 현상의 피해 발생 확률이 매우 높은 지역으로 예측 되고 있다(NOAA. 2016). 국내 해역은 인도네시아를 중심으로 서쪽으로 스리랑카, 동쪽으로는 호주의 GRB (Great barrier reef)와 함께 Coral Triangle로 지칭되는 아시아 산호 생태 고리의 상단 끝점에 위치하여, 백화 현상의 피해로부터 Coral Triangle의 마지막 보루로 높은 생태적 가치를 지니고 있다(WWF. 2016).

본 연구에서는 백화현상에 대비한 산호의 자연적 방류량 확보 및 관광 사업 그리고 의료재나 보석가공 같이 최근 각광 받고 있는 고부가 가치 재료써의 안정적이고 효과적인 산호 인공 생산을 위해 산호 생장에 유효한 광조건을 도출하고자 했다. 특히, 높은 에너지 효율과 원하는 파장의 구현이 가능한 LED(light emitting diode)를 이용하여 다양한 파장 및 광량에서 산호의 성장 효과에 대해 시험 하였으며, 인도양에서 백화현상의 주 피해종이며 생태적 가치 및 관광 가치가 높은 *M. digitata*를 평가 산호종으로 채택하여 경산호의 성장에 필요한 최적의 광조건을 도출 함으로 산호의 실내 양식시스템 개발의 발판을 마련하고자 하였다.

II . 재료 및 방법

1. 시험 산호 및 순치

1.1. 연구에서 사용한 산호

Montipora digitata

Montipora digitata(Fig 1. a)는 경산호목(Scleractinia), Acropora과 산호로 인도네시아의 얕은 해안(수심 1 m)에서 양식에 의해 생산되어(Dinar farm, CV, Indonesia) 수입된 것을 구입하여 사용하였다. *M. digitata* 5점 (한 점의 평균 무게 $116.6 \text{ g} \pm 29.20$) 을 7일간 순치하여 안정 시킨 뒤 산호를 조각화 (fragmentation) 하는 작업을 진행 하였다. 산호 조각은 $1 \text{ g} \pm 1.07$ 으로 니퍼(nipper)를 이용하여 절단 한 뒤에 cyanoacrylate 접착제를 뼈대에 도포하여 산호석 타일(3 X 3 cm, 무작위 20개 측정 평균 무게 $22.01 \text{ g} \pm 0.63$, 증류수 세척)에 접착 하였다(Fig 1. c). 이후 7일 동안 순치 수조 (Fig 1. e) 에서 fragment의 접착 상태 확인 및 안정화 상태를 확인 후에 시험에 사용 하였다.

Caulastrea furcata

여러 LED 광원의 조사에 의한 *M. digitata*의 성장효과의 비교를 위해 *Caulastrea furcata* (Fig 1. b)를 사용 하였다. *C. furcata*는 인도양에서 서식하는 경산호목(Scleractinia), Merulinidae 과의 산호로 깊은 수심 대 (5-18 m)에 서식함에 따라 *M. digitata*와의 적정 광 조건의 비교를 위해 사용하였다. 인도네시아 (Dinar farm, CV, Indonesia) 에서 자연 양식(수심 8 m)을 통해 육성된 개체를 3점(한 점 평균 무게 $82 \text{ g} \pm 4.58$)을 수입하였다. 수입 이후 7일간 순치 수조에서 안정 시킨 뒤 산호 조각(fragment)을 만들었다. 산호석 타일(3 X 3 cm, 무작위 20개 측정 무게 $19.36 \text{ g} \pm 0.46$, 증류수 세척)을 사용 하였으며 절단 한 산호 조각은

(무작위 20개 측정 평균 무게 $2.2 \text{ g} \pm 1.10$) cyanoacrylate 접착제를 뼈대에 도포하여 산호석 타일에 접착하였다(Fig 1. d). 이후 7일 동안 순치 수조에서 fragment의 접착 상태 확인 및 안정화 상태를 확인 후에 시험에 사용 하였다.

1.2. 시험 산호의 순치

순치수조는 (110 L; 유리수조 Leglass 600, 가로 60 x 세로 35 x 높이 38 cm + 여과조 가로 20 x 세로 35 x 높이 40 cm)(Fig 1. e)의 수질 상태는 Table 1에 나타내었다. 지속적인 수질의 상태를 확인하기 위해 일주일에 2회 측정하였으며, 이 때 사용한 조명은 중국 HY사의 165 W 복합과장 LED 로 12시간/1일 조사 해주었다(Fig 1. e).

Table 1. water condition of acclimation tank

Salinity	35	%	Artificial salt, Kent, USA
Temperature	26 ± 0.5	°C	온도조절기, 한국테크원, 대한민국
Hydrogen ion	8.2	pH	pH test, Tetra, Germany
Total Ammonia	0	mg·l ⁻¹	NH ₃ /NH ₄ test kit, Tetra, Germany
Nitrate	0	mg·l ⁻¹	Nitrate test, Tetra, Germany
Phosphate	0.015	mg·l ⁻¹	Phosphate test, Nyos, Germany
Potassium(K)	450	mg·l ⁻¹	Potassium test, Nyos, Germany
Magnesium(Mg)	1400	mg·l ⁻¹	Magnesium test, Nyos, Germany
Alkalinity	9.0	dH	Alkalinity test, Tetra, Germany

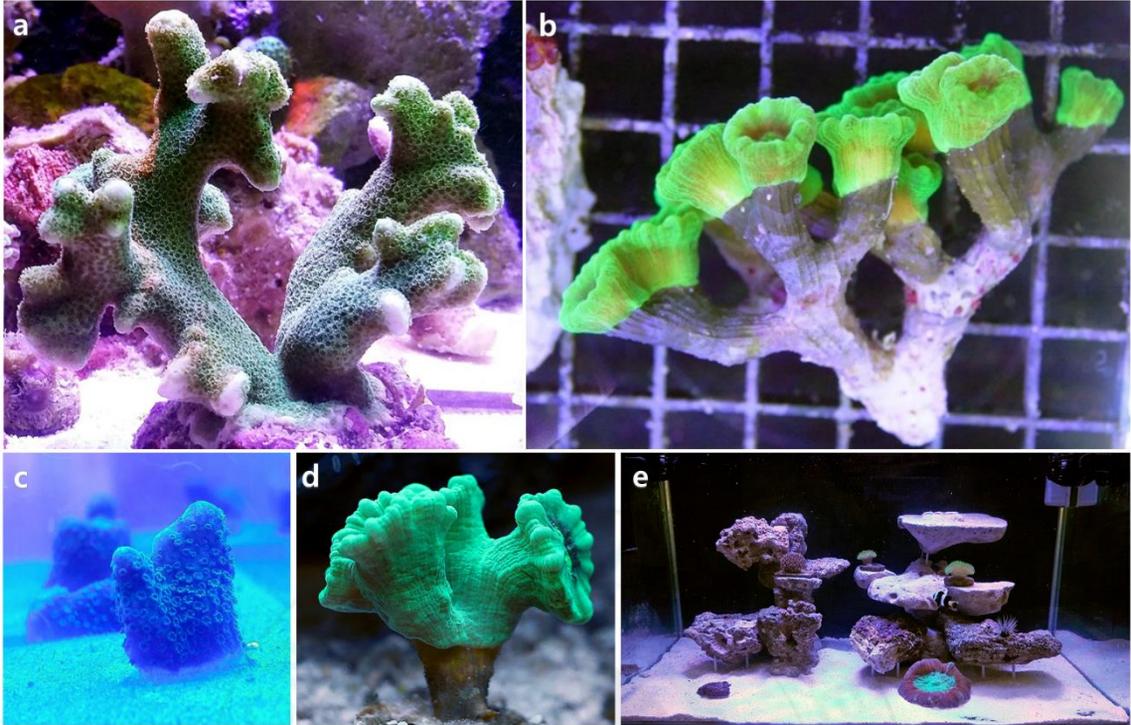


Figure 1. Coral used in this study (a) *Montipora digitata* colony branch. (b) *Caulastrea furcata* colony branch. (c) *Montipora digitata* fragment. (d) *Caulastrea furcata* fragment. (e) Coral acclimation tank.

2. 공생조류의 분리 및 동정

2.1. *M. digitata*로부터 공생조류 분리

산호로부터의 공생조류 분리는 NaOH 분리 방법을 (Zamoum et al. 2012) 이용하였다. *M. digitata*를 평균 $1.67 \text{ g} \pm 0.28$ 의 무게로 절단하여 멸균 해수(자연해수를 $0.2 \mu\text{m}$ 필터링 한 후 autoclave)로 세척 한 뒤에 1.5 mL 튜브에 넣고 NaOH, 2 mol L^{-1} 을 1 mL 첨가하여 heat-block($37 \text{ }^\circ\text{C}$)에서 1시간 반응시켰다. 반응시간 중, 매 15분마다 1분씩 vortex 하였으며, 반응 후 $70 \mu\text{m}$ nylon mesh(Falcon, USA)로 걸러 뼈대를 제거 한 뒤에 3000 g에서 5분 간 원심 분리하여 NaOH를 제거 하였다. 이 후 extraction buffer(0.05 mol L^{-1} phosphate buffer pH 7.8, 0.4 mol L^{-1} sorbitol)를 $50 \mu\text{L/g}$ 첨가 하여 vortex로 현탁 시켜 다시 3000 g에서 5분 원심분리 하여 상청액을 제거 하는 방법으로 NaOH를 2회 세척 하였다. 최종적으로 12000 g 에서 3분간 원심 분리한 뒤 상청액을 제거하고 다시 extraction buffer 1 mL을 첨가 후 현탁시켜 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 에 보관 하였다. 분리한 공생조류는 광학 현미경(Olympus BX41, USA)으로 관찰과 촬영(Leica DMC 2900, Watzlar, Germany)을 하였다

2.2. *M. digitata*로부터 분리한 공생조류의 유전학적 동정

공생조류의 동정을 위해 NaOH 방법에 의해 *M. digitata*로부터 공생조류를 분리 하였다. 분리된 공생조류는 2×10^5 cell/ml 농도로 extraction buffer 1ml과 함께 원심분리 튜브에 넣어 4 °C에 보관 하던 것을 3000g에서 5분 원심 분리하여 extraction buffer를 제거 하였다. Ep-tube에 남겨진 공생조류 펠릿으로부터 DNA 추출을 실시 하였으며, DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen Corporation, Santa Clarita, CA)를 사용하였다. Geller et al. (2001) 와 Rodriguez et al. (2010, 2014) 의 연구를 참고 하여 lysis 반응을 1 시간으로 늘려주는 것을 제외 하고 제조사의 방법과 동일하게 수행하였다.

공생조류의 clade 및 sub clade 분석을 위해 nuclear ribosomal RNA 유전자와 chloroplast에 있는 일부 유전자를 증폭하여 분석하고자 하였다. Nuclear 5.8S 부터 Internal Transcribed Spacer region2 (ITS2) 그리고 28S의 일부(LSU of domain V)부위 까지를 primer set 1(Pochon et al. 2001; Its-DINO, L_O)과 primer set 2(Pochon et al. 2010; ITS I, LSU I rev)을 이용하여 PCR하였다. 또한 Chloroplast rDNA의 23S large subunit의 Domain V를 primer set 3(Pochon et al. 2010; 23S I, 23S I rev)를 이용하여 증폭 하였다. 각 PCR 조건은 Table 2에 나타내었으며, Thermal cycler system(Bio-rad, Hercules, CA)을 사용하여 PCR을 수행 하였다. 증폭시킨 공생조류의 DNA 시료는 각 1 μ l씩 아가로스겔 1%에 로딩하여 Mpid-2 plus(Takara, Japan)에서 25분 전기영동 하여 band를 확인 했다. 시료의 maker 사이즈와 밴드 크기가 일치하는 시료들을 sequencing 하였으며 결과로 나온 염기서열을 NCBI/BLAST를 통해 clade 및 sub clade의 동정을 시도 하였다. 이때 1과 2번 세트의 primer marker를 이용한 염기서열을 MEGA6 (ver.6.06)에서 정렬하여 겹치는 부분(ITS2 region)을 제거하고 결합하여 분석에 사용하였다.

또한, 동정에 사용 된 공생조류 샘플의 두 염기서열, Nuclear rDNA 5.8S-28S (set 1+2) 1080 bp와, Chloroplast rDNA 23S, 528 bp 을 사용하여 clade 및 sub clade의 계통발생학적 분석을 실시하였다(Pochon et al. 2006).

NCBI에 등재된 공생조류의 A-I clade와 각 clade에 해당하는 sub clade 염기서열 중 Nuclear rDNA 5.8S-28S 와, Chloroplast rDNA 23S 부위에 해당하는 염기서열을 수집하였다. *M. digitata* 공생조류 샘플의 염기서열과 수집된 각 공생조류 clade 및 sub clade들의 두 유전부위의 염기서열을 각각 MEGA(Ver.6.06)를 사용하여 정렬(alignment) 한 뒤에 앞('5-) 뒤(-3') 겹치지 않는 염기서열을 절삭하여 수집된 염기서열의 길이를 일치 시켰으며 clade 및 sub clade의 Nuclear rDNA 5.8S-28S 유전 부위와 Chloroplast rDNA 23S의 유전부위를 비교 할 수 있는 계통도를 MEGA6를 사용하여 제작 하였다. 계통도는 Neighbor-Joining method로 Kimura 2-parameter model(ML bootstrap 1000)을 base로 제작 되었다.

Table 2. Primer sets and PCR conditions used in this study

Set No	Target	Sequence	Cycling Profile	Reference
1	Nuclear LSU/SSU rDNA (600-bp, 5.8S+ITS2)	GTGAATTGCAGCAGAACTTC	(95°C for 2 min) (94°C for 30 sec)(50°C for 30 sec) (72°C for 120 sec) x 40 (72°C for 5 min)	
		GCTATCCTGAG(AG)GAAACTTCG		
2	Nuclear 28S rDNA (973-bp, ITS-2 ~ nr28S D1-D3 Regions)	GTCATTGCACCCTTGG	(95°C for 2 min) [(95°C for 30 sec)(46°C for 45sec)(72°C for 1 min)] x 30 (72°C for 5 min)	Pochon et al.,2001, 2010
		ACACCTTCAGGCTTCCCA		
3	Chloroplast 23S rDNA (464-bp, Domain V)	GCTCAAATGATATGCTGTAGAAG	(95°C for 4 min) [(94°C for 30 s)(50°C for 1 min)(72°C for 2 min)] x 4 [(94°C for 30 s)(55°C for 1 min)(72°C for 2 min)] x 30 (72°C for 5 min)	
		GAGACTCCTATCTGGACACTA		

3. *Symbiodinium* clade C15의 시험관 배양

3.1. F/2 배양액을 이용한 *Symbiodinium* clade C15의 시험관 배양 시험

산호로부터 분리한 공생조류(*Symbiodinium* sp. C15)의 배양을 위해 f/2 액상 배지(AlgaBoost™ f/2 2000 x, AusAqua, Australia)를 사용 하였다. 제조사의 설명서를 참고 하여 인공 해수(인공 해수염; Kent, USA, 35 g/distilled water 1 L) 1 L 당 AlgaBoost™ f/2 2000x를 500 μ L 사용하였다. 만들어진 배양액을 세포 배양용 T25 플라스크(Corning, NY USA)에 20 mL씩 분주 하였으며, KAS antibiotic cocktail (Soffer et al. 2008): 50 μ g \cdot mL⁻¹ kanamycin, 100 μ g \cdot mL⁻¹ ampicillin and 50 μ g \cdot mL⁻¹ streptomycin 또는, KA antibiotic cocktail (Yuyama et al., 2014): 20 μ g \cdot mL⁻¹ kanamycin, 50 μ g \cdot mL⁻¹ ampicillin)을 50 μ L \cdot mL⁻¹ 을 첨가 한 후 각 플라스크에 *Symbiodinium* sp. C15를 각 시험 농도 별로 접종 한 뒤에 배양 하였다.

배양기(Forma Series11 incubator, Thermo, USA) 에서 온도는 26 $^{\circ}$ C \pm 2으로, 광원은 백색 LED(SMD 5050 LED, 6 chip/bar, 2 bar, Samsung, Korea)를 162 μ mol photons \cdot m⁻² \cdot s⁻¹ 광량으로 12L: 12D 조사하여 *Symbiodinium* sp. C15를 배양하였다.

배양된 *Symbiodinium* sp. C15는 충분히 pipetting 한 뒤 플라스크에서 1 ml을 분주한 뒤 10 μ L씩 Neubauer haemocytometer를 사용, 주 1회 샘플당 3회 반복하여 밀도 변화를 측정 하였다.

3.2. *Symbiodinium* sp. C15의 LED 파장 별 시험관 배양 시험

준비된 f/2 배지 플라스크에 *Symbiodinium* sp. C15를 각 플라스크당 2.0×10^5 cell/ml로 접종 하였다. 배양기(Forma Series11 incubator, Thermo, USA) 에서 온도는 $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ 으로, 백색광(SMD 5050 LED 6 chip/bar, 3 bar, Samsung, Korea)을 광량 $243 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 과 각 405 nm, 465 nm, 520 nm, 640 nm 파장을 해양생물 시험용 조명 장치(적분구시스템, LMCC-A01, 부경대학교 LED 센터)를 약 $250 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 으로 조사하여 49일간 배양 하였다.

배양 *Symbiodinium* sp. C15는 3일에 한번 광학 현미경(Olympus BX41, USA) 상에서 오염 및 배양 등을 확인하였으며 1주일에 한번, 플라스크를 충분히 pipetting 하여 모여있는 *Symbiodinium* sp. C15를 현탁 시킨 뒤 1.5 mL Ep-tube에 1mL 을 옮겨 다시 vortex 한 뒤 10 μL 씩 Neubauer haemocytometer로 3회 반복하여 밀도를 측정 한 뒤 chlorophyll을 정량 하였다

4. *Montipora digitata*의 LED 파장별 성장 시험

4.1. 시험 수조 설계 및 제작

가로 60 X 세로 45 X 높이 45 cm 유리 어항 (121.5 L)을 기초로 시험 수조를 제작 하였다. 발포 압출 PVC 판 (5T formax board, Dong-jin profile, Korea)을 이용하여 격벽과 여과조를 제작 하였으며 각 격실은 가로 30 X 세로 45 X 높이 45 cm (60.75 L)로 제작 되었다. 각 격실 마다 수류모터(10w wave-maker 7500 L · h⁻¹, Sobo, China)를 이용하여 인공 수류를 조성 하였으며, LED 기판은 수조 10cm 높이에 설치 하였다. 여과조는 가로 90 X 세로 20 X 높이 55 cm (99 L)로 제작 되었으며 return section에는 수중모터(UT-100 water pump, 10w, hyopsihin, Korea)를 이용하여 각 섹션의 해수를 순환 시켰으며 중앙 칸에는 Protein skimmer (DT-2520 20 w 1400 L · h⁻¹, JAD, China)와 여과제 3 L(Siporax 15mm, Sera, Germany), 그리고 활성탄 0.5 L 을 설치 하였다.

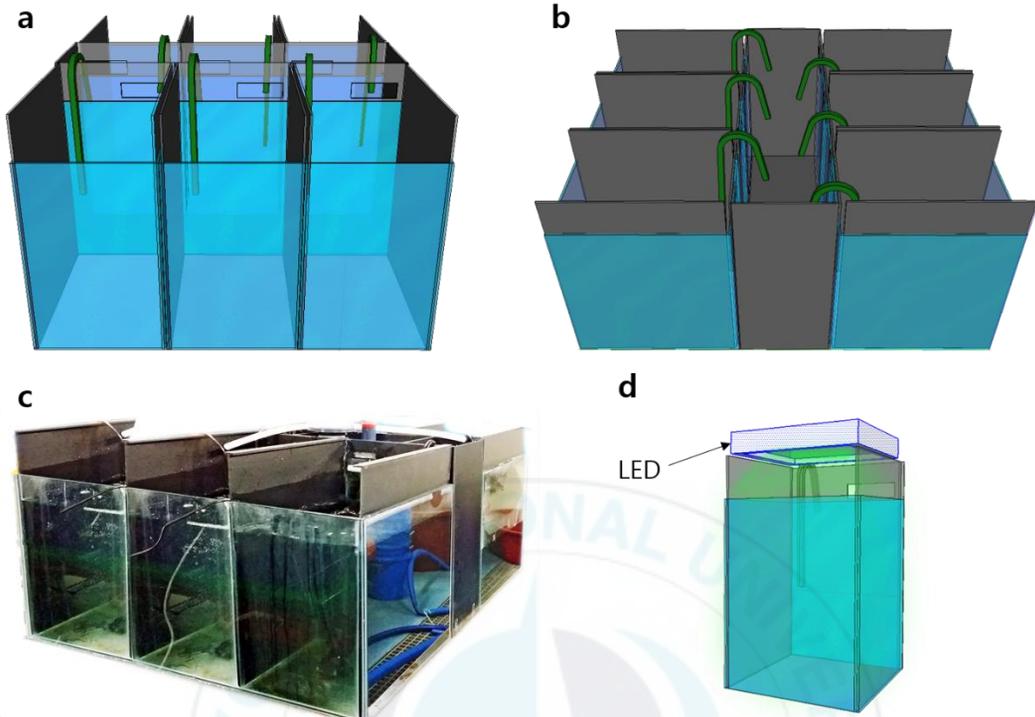


Figure 4. Diagrams and picture of a six-compartmented water tank designed and used in this study. (a) Each compartment shared sea water through the 1 circulation tank that contained a skimmer and filter materials. (b) The plane figure (c) Actual picture of the tank used in this study. (d) Each compartment was irradiated by one wavelength LED light.

4.2. *Montipora digitata* 최적 성장을 위한 LED 파장 도출 시험

M. digitata (Fig 1. A) fragment는 산호석 타일(3 X 3cm, 무작위 20개 측정 무게 $22.01 \text{ g} \pm 0.63$, 증류수 세척)에 산호 조각, $1 \text{ g} \pm 1.07$ 으로 니퍼(nipper)를 이용하여 절단 한 뒤 순간접착제를 뼈대에 도포하여 접착하였다 (Fig 1. D). 이후 7일 동안 순치 수조 (Fig 1. F)에서 fragment의 접착 상태 확인 및 안정화 상태를 확인 후에 무게 측정 후(fragment 수 총 30개, $22.63 \text{ g} \pm 0.87$) 시험에 사용 하였다.

DPE(Day post exposure) 0에, 준비된 30개의 fragment 중 5개를 무작위로 선별 하여 공생조류(*Symbiodinium* sp. C15) 분리를 위해 타일을 제거한 뒤 무게를 측정 한 *M. digitata* 조각을 ($2.07 \text{ g} \pm 0.22$) 멸균 해수 세척하여 5 mL Ep-tube에 넣고 NaOH, 2 mol L^{-1} 을 2 mL 첨가하여 heat-block, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응 하였다. 반응시간 중에는 매 15분마다 1분씩 vortex 하였다. 반응 후 $70 \mu\text{m}$ nylon mesh(Falcon, USA)로 걸러준 뒤에 3000 g에서 5분 원심 분리하여 NaOH를 제거 하였다. extraction buffer를 $50 \mu\text{L/g}$ 첨가 하여 vortex로 현탁 시켜 세척 한 뒤 다시 3000 g에서 5분 원심분리 하여 상청액을 제거 하는 방법으로 2회 세척 하였다. 12000 g 에서 3분간 원심 분리한 뒤 상청액을 제거하고 다시 extraction buffer 1 mL을 첨가하여 현탁 시켰다.

각 시료는 1 mL에서 $10 \mu\text{L}$ 를 떠서 Neubauer haemocytometer에서 3회 밀도 측정을 후에 평균 밀도를 각 시료 산호 조각 무게로 나누어, g당 공생조류(*Symbiodinium* sp. C15)의 밀도를 측정 한 뒤에는 chlorophyll 정량을 실시 하였다. DPE 42와 84에서 각 파장 별 fragment를 무게 측정 후에 DPE 0 과 같은 방법으로 g당 공생조류(*Symbiodinium* sp. C15)의 밀도를 구하였고 chlorophyll 정량 시험을 실시 하였다.

나머지 25개의 산호 fragment는 DPE 0에 시험수조 각 격실에 fragment를 5개씩 넣어 준 뒤 격실 별로 백색광(SMD 5050 LED 6 chip/bar, 3 bar, Samsung, Korea)을 광량 $243 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 과 각 405 nm, 465 nm, 520 nm, 640 nm 파장을 해양생물 시험용 조명 장치(적분구시스템, LMCC-A01, 부경대학교 LED 센터)를 이용하여 약 $250 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}$

$2 \cdot s^{-1}$, 12L: 12D 로 조사 하였다. 이때 수조의 수질 조건은 Table 3. 과 같이 유지 하였으며, 1주에 2회 측정 하였으며 1일 30L 환수 하였다.

시험 중 영양공급을 위한 먹이 생물은 *Anemia nauplii*(Sep art, INVE, USA)를 인공 부화 하여 급이 하였다. 인공 부화는 비커(3 L)에 인공해수 1 L를 넣고 건조란을 20 g 넣어 28 °C 에서 에어레이션하여 24 시간 후부터 *A. nauplii* 을 수확 하였으며, 1 주일 동안 나누어, 조명이 꺼지는 시간에 스포이트로 Target feeding 하였다.

산호 Fragment의 무게는 매주 측정 및 기록 하였다. 격실 별로 basket에 담아 물기를 털어내고 와이프올로 산호석 타일의 해수를 흡습하여 닦아낸 뒤에 저울에 올려 측정 및 기록 하였으며 일별 specific growth rates (SGR)를 다음의 식을 사용하여 구하였다(Wijgerde et al. 2014; W_t 는 샘플링 날의 개체 별 무게, W_{t-1} 는 DPE 0에서의 무게, Δt 는 샘플링 포인트의 일수).

$$SGR \text{ (day}^{-1}\text{)} = (W_t - W_{t-1})/\Delta t$$

Table 3. water condition of experiment tank

Salinity	35 ± 2.0	‰	Artificial salt, Kent, USA
Temperature	26 ± 0.5	°C	온도조절기, 한국테크윈, 대한민국
Hydrogen ion	8.2	pH	pH test, Tetra, Germany
Total Ammonia	0	mg·l ⁻¹	NH ₃ /NH ₄ test kit, Tetra, Germany
Nitrate	0	mg·l ⁻¹	Nitrate test, Tetra, Germany
Phosphate	0.015	mg·l ⁻¹	Phosphate test, Nyos, Germany
Potassium(K)	450	mg·l ⁻¹	Potassium test, Nyos, Germany
Magnesium(Mg)	1400	mg·l ⁻¹	Magnesium test, Nyos, Germany
Alkalinity	9.0	dH	Alkalinity test, Tetra, Germany

5. *Montipora digitata* 성장 적정 광량 도출 시험

M. digitata (Fig 1. a) fragment는 산호석 타일 (3 X 3cm, 무작위 20개 측정 무게 $20.05 \text{ g} \pm 0.37$, 증류수 세척)에 산호 조각, $2 \text{ g} \pm 0.66$ 으로 니퍼(nipper)를 이용하여 절단 한 뒤 순간접착제를 뼈대에 도포하여 접착하였다 (Fig 1. c). 이후 7일 동안 순치 수조 (Fig 1. e) 에서 fragment의 접착 상태 확인 및 안정화 상태를 확인 후에 무게 측정 후 (fragment 수 총 30개, $21.98 \text{ g} \pm 1.78$) 시험에 사용 하였다.

5.1. 시험 수조 설계 및 제작

시험 수조는 가로 60 X 세로 45 X 높이 45 cm 유리 어항 (121.5 L)을 기초로 시험 수조를 제작 하였다. 발포 압출 PVC 판 (5T formax board, Dong-jin profile, Korea)을 이용하여 수조 내에 격벽을 제작 하였으며 각 격실은 가로 45 X 세로 22.5 X 높이 45 cm (60.75 L)로 제작 되었다. 각 격실 마다 수류모터(10w wave-maker $7500 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, Sobo, China)를 이용하여 인공 수류 및 격실간 순환을 조성 하였으며, 여과조는 가로 60 X 세로 20 X 높이 55 cm (45.6 L)로 제작 되었으며 중앙 칸에는 Protein skimmer (DT-2520 20 w $1400 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, JAD, China)와 여과제 3 L (Siporax 15 mm, Sera, Germany), 그리고 활성탄 0.5 L 을 설치 하였으며(Fig 5.) 수질 조건은 Table 3과 같이 하였다.

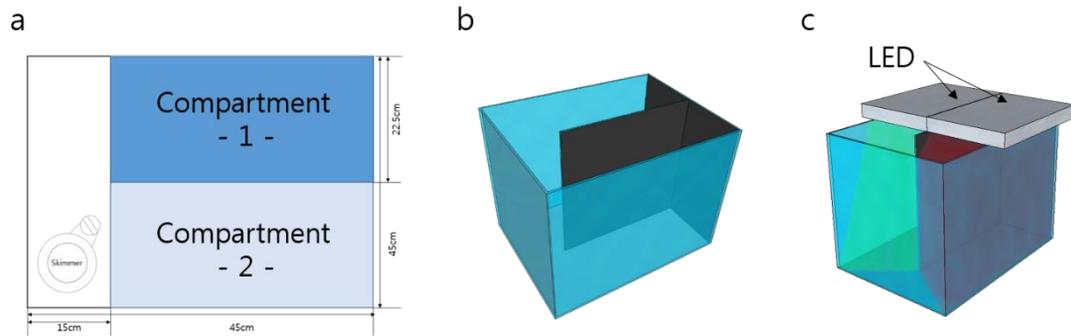
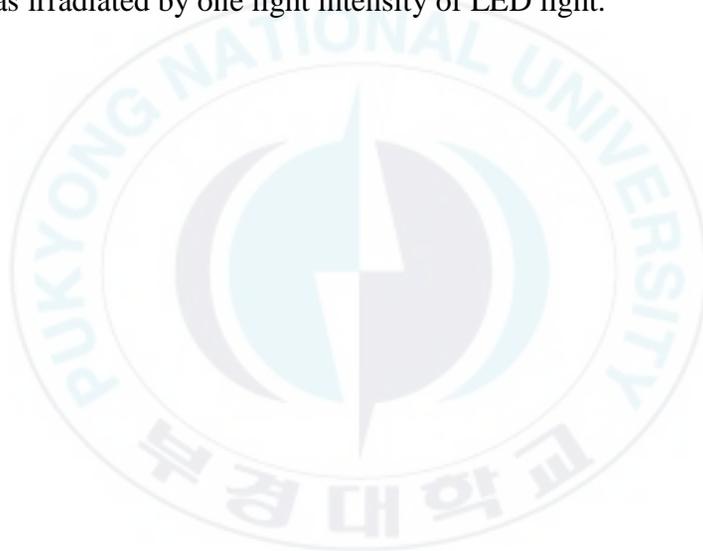


Figure 5. Diagrams and picture of a two-compartmented water tank designed and used in this study. (a) The plane figure (b) Two compartment shared sea water through the 1 circulation section that contained a skimmer and filter materials. (c) Each compartment was irradiated by one light intensity of LED light.



5.2. *Montipora digitata* 최적 성장을 위한 LED 광량 도출 시험

DPE 0에 준비된 fragment 30개중 5개를 무작위로 선별하여 공생조류 밀도 측정 및 chlorophyll 정량을 실시 하였다. 나머지 fragment 25개는 시험수조 각 격실에 5개씩 넣어 준 뒤 section별로 백색 LED(3chip/bar, 10 bar, Samsung, Korea) 405 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 그리고 465 nm LED를 250 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 광량을 기준으로 1/4 (60 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 1/2 (125 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 1 (250 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 1.5 (400 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)배로 설정하여, 12L: 12D 로 조사 하였다. 이때 수질은 염도 35 % \pm 2, 수온 26 $^{\circ}\text{C}$ \pm 0.5, pH 8.2, 총 암모니아 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 질산염 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 인산염 0.015 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, K 450 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Mg 1400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Alkalinity 9.0 dH를 유지 하였으며, 매일 30 L 환수 하였다. 시험 중 영양공급을 위한 먹이 생물은 *Anemia nauplii*(Sep art, INVE, USA)를 인공 부화 하여 급이 하였다. 인공 부화는 비커(3L)에 인공해수 1 L를 넣고 건조란을 20g 넣어 28 $^{\circ}\text{C}$ 에서 에어레이션하여 24시간 후부터 *A. nauplii* 을 수확 하였으며, 1주일 동안 나누어, 조명이 꺼지는 시간에 스포이트로 Target feeding 하였다.

산호 Fragment의 무게는 매주 측정 및 기록 하였다. 격실 별로 basket에 담아 물기를 털어내고 와이프올로 산호석 타일의 해수를 흡수하여 닦아낸 뒤에 저울에 올려 측정 및 기록 하였다. 일별 specific growth rates (SGR)은 다음의 식을 사용하여 구하였다 (Wijgerde et al. 2014; W_{tx} 는 샘플링 날의 개체 별 무게, W_{t0} 는 DPE 0에서의 무게, Δt 는 샘플링 포인트의 일수)

$$\text{SGR (day}^{-1}\text{)} = (W_{tx} / W_{t0}) / \Delta t$$

DPE 70에 무게를 측정한 뒤, 공생조류(*Symbiodinium* sp. C15)를 분리하여 밀도 측정 및 chlorophyll 정량을 실시 하였다.

6. Chlorophyll 정량 시험

공생조류 인공배양 및 *M. digitata* 성장시험에서 분리된 공생조류의 밀도를 측정 한 뒤 Chlorophyll의 정량을 실시 했다. 12000 g에서 3분간 원심 분리하여 멸균해수 또는 f/2 배지를 제거 했다. Ep-tube에 담긴 공생조류 pellet에 90 % acetone 1 mL을 넣고 충분히 vortex하여 뭉친 pellet을 부유 시켰다. 이후 sonication(level 4-5, 1분, 3회)하여 cell을 부수었다. Ep-tube를 호일에 싸서 빛을 완전히 차단 한 뒤에 4 °C 에서 24 시간 암처리 후에 분광도계에 로딩하여 흡광도를 측정했다.

흡광도 측정은 Spectrophotometer(Ultrospec[®]3000, Pharmacia Biotech, USA)에서 암처리 된 시료를 cubit(Styroform rack-Art No.2712120, Ratiolab, Germany)에 1 mL 옮겨 630 nm와 664 nm 파장을 측정 하여 Chlorophyll a와 c₂ 를 도출하였다(Jeffrey et al. 1975).

$$\text{Chlorophyll a} = 11.43 E_{664} - 0.64 E_{630}$$

$$\text{Chlorophyll c}_2 = 27.09 E_{630} - 3.63 E_{664}$$

7. 통계분석

LED 파장 및 광량 시험에서 공생조류(*Symbiodinium* sp. C15) 밀도 변화와 *M. digitata* 성장 시험에서 도출된 성장률, 그리고 chlorophyll의 정량 시험에서 각 대조구와 시험구 간의 유의성 관계 비교를 위해 IBM SPSS Statics Version 20 (IBM, USA)을 이용하여 ANOVA(Tukey HSD^a/Duncan^a)분석 하였으며, 각 시험의 대조구와 시험구 또는 각 파장별 시험구와 광량 시험구 간의 P value의 도출은 Excel (MS office 2016, Microsoft, USA)의 T-검정 (등분산 가정 두집단) 분석을 사용하여 개별 유의성 비교를 실시 하였다.

III . 결과

1. 공생조류의 분리 및 동정

1.1. *Montipora digitata*로부터 공생조류의 분리

평균 무게 $1.67 \text{ g} \pm 0.28$ 의 *M. digitata*로부터 NaOH , 2 mol L^{-1} 로 1 시간 반응하여 분리한 공생조류의 밀도는 $5.56 \pm 2.94 \times 10^4 \text{ cell/g}$ 이었다.

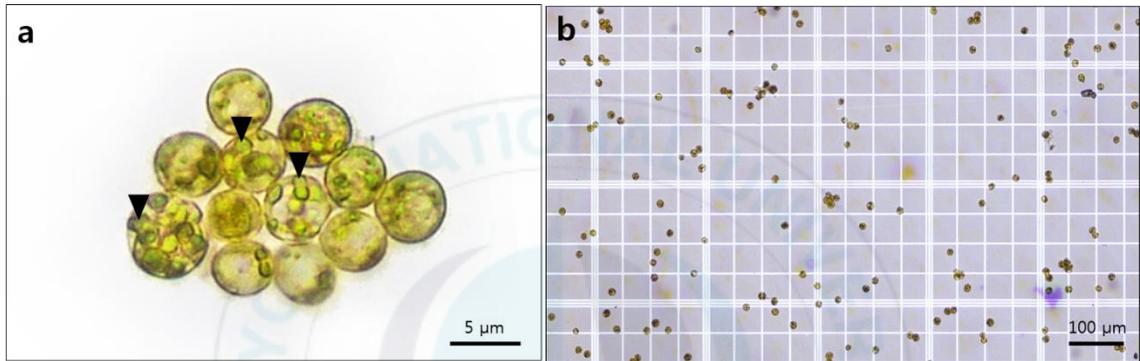


Figure 6. Symbiodinium isolated from *Montipora digitata* used in this study. (a) Symbiodinium under magnification of 400 x. (b) Isolated symbiodinium on hemocytometer under magnification of 100 x. Arrowheads indicate chloroplasts in the zoothanthellae.

1.2. *Montipora digitata*로부터 분리한 공생조류의 유전학적 동정

M. digitata 분리 공생조류의 핵(nuclear)의 5.8-28S rDNA, 1080 bp와 엽록체(chloroplast)의 23S-rDNA, 528 bp의 염기서열을 각각 BLAST 한 결과 *Symbiodinium* sp. C15와 100 %의 상동성을 보였다.

1.3. *Montipora digitata*로부터 분리한 공생조류의 계통발생학적 분석

NCBI로부터 수집한 nr28S DNA와 cp23S rDNA 유전 부위의 *Symbiodinium* sp. A-I clade 염기서열을 이번 연구에서 분리한 *Symbiodinium* 샘플 염기서열과 계통학적 분석한 결과 *Symbiodinium* sp. C15와(clade C, sub clade 15) 가장 가까운 계통적 위치를 보였다 (Fig 7.).



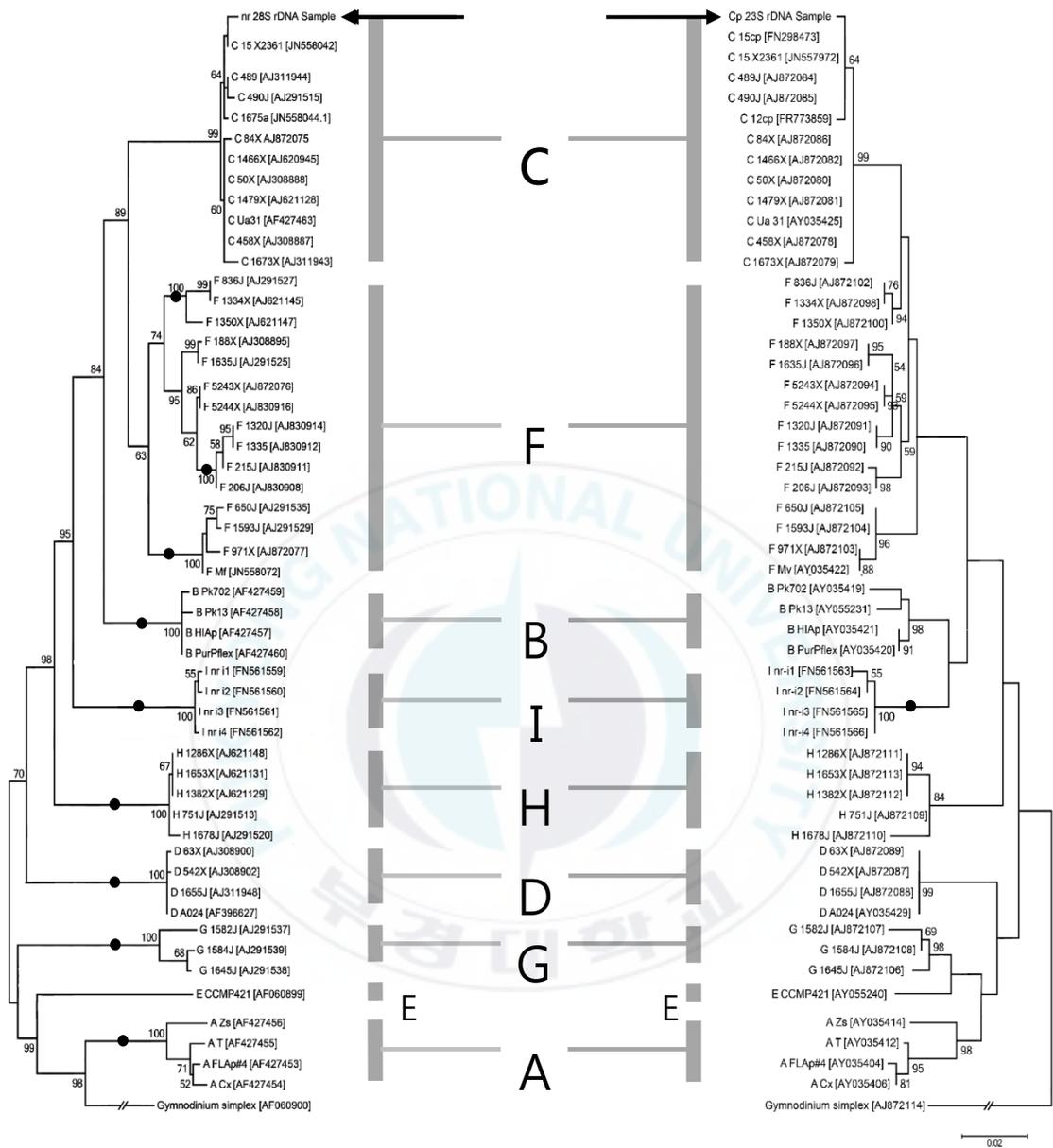


Figure 7. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method of the genus *Symbiodinium* showing the position of clade C based on the previously published (A) nr28S and (B) cp23S datasets. Black dots represent values of 100% bootstrap support, Alphabets, located in middle of figure are indicating *Symbiodinium* Clade A-I. Each cord names and accession numbers (small texts) are meaning of sub clade.

2. *Montipora digitata*로부터 분리한 공생조류의 시험관 배양 시험

2.1. F/2 배지에서 공생조류의 시험관 배양 시험

*M. digitata*의 공생조류를 배양하기 위한 f/2 배지의 최적 농도는 제조사 (AusAqua) 의 권장 농도보다 높은 농도로 하였을 때 효과적이었다. 배지의 농도를 2-8 배로 높여 배양한 결과, 28일차(DPC, Day post culture)에서 공생조류의 밀도가 DPC 0 대비 각각 2.2-2.3 배까지 증가, 배양기간 중 최대 밀도를 기록하였다. DPC 28에서 각 배지농도에서 배양된 최대밀도는 1 배(제조사 권장농도)와 비교 할 때 농도가 높을수록 유의적이었다(배지 농도 2 배; $p < 0.05$, 배지농도 4 배; $p < 0.0001$, 배지농도 8 배; $p < 0.0001$). 그러나 배지농도 4 배와 8 배 간의 공생조류 밀도는 유의적 차이가 없었다.

반면 배지 농도 1/2 에서는 DPC 28에 공생조류 밀도가 1.6 배 증가함으로 배지농도 1 배에 비해 유의적으로 적은 증가를 보였다($p < 0.0001$). 시험 결과 배지의 농도를 2배로 사용할 때 가장 효과적인 것을 확인하였다.

DPC 28에 가장 높은 공생조류 밀도증가를 보인 뒤 DPC 49까지 지속적인 감소를 보였다. 시험 최고 농도인 f/2 배양액 8 배는 DPC 49에서 공생조류의 밀도가 DPC 28 대비 15.73 % 감소 하였으며, f/2 배양액 4배 농도에서는 DPC 28 대비, 15.06 % 감소, 2배 농도는 19.76 % 감소, 그리고 1배 농도는 27.39 % 감소 하였다. 시험 최저 농도인 1/2 농도의 f/2 배양액에서는 34.50 %의 밀도 감소를 보임으로 증식 최고 밀도에 도달 이후 3주간, 사용 f/2 배양액 농도에 반비례하여 공생조류 밀도의 감소량이 증가하는 추세를 보였다. DPC 28 이후, 공생조류의 감소는 f/2배지의 교환 또는 성분의 첨가를 4주 이내에 하는 것이 효과적임을 확인 하였다(Fig 8.).

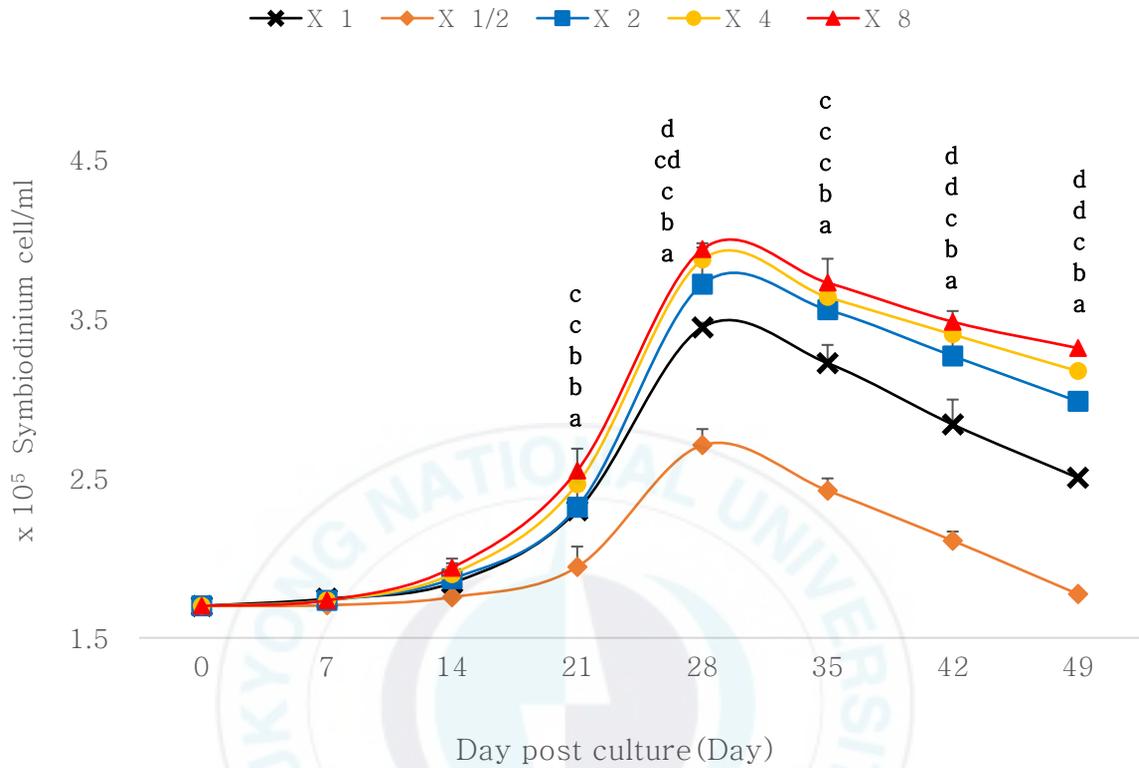


Figure 8. Optimal concentration of f/2 medium to culture *symbiodinium* sp. C15 isolated from *Montipora digitata* used in this study. The alphabet above each spot of day (a, b, c, d) are showing the significance level with ANOVA analysis, the lowest concentration group was indicated 'a', and another group, like 'b-d' have significant difference.

2.2. *Montipora digitata* 분리 공생조류의 LED 파장 별 시험관 배양 시험

465 nm LED 조사 구에 6 주간 배양 된 *M. digitata*의 분리 공생조류는 평균 3.8×10^5 cell/ml 로 1.91 배 밀도가 증가하였으며 백색 LED 조사 구(1.7배)와 비교 했을 때 유의적으로($p < 0.01$) 성장을 촉진시키는 것으로 나타났다. 그러나 640 nm LED 조사 구에서는 약 1.4 배 밀도가 증가했으며, 백색 LED 조사구와 비교하여 밀도 증가가 매우 적었다 ($p < 0.001$). 405 nm LED 조사 구에서 평균 밀도는 3.2×10^5 cell/ml, 520 nm LED 조사 구에서 3.15×10^5 cell/ml로 각각, 405 nm LED 1.6 배와 520 nm LED 1.58 배 밀도가 증가 했으나 백색 LED 조사 구와 비교할 때 유의적 차이는 없었다(Fig 9.).

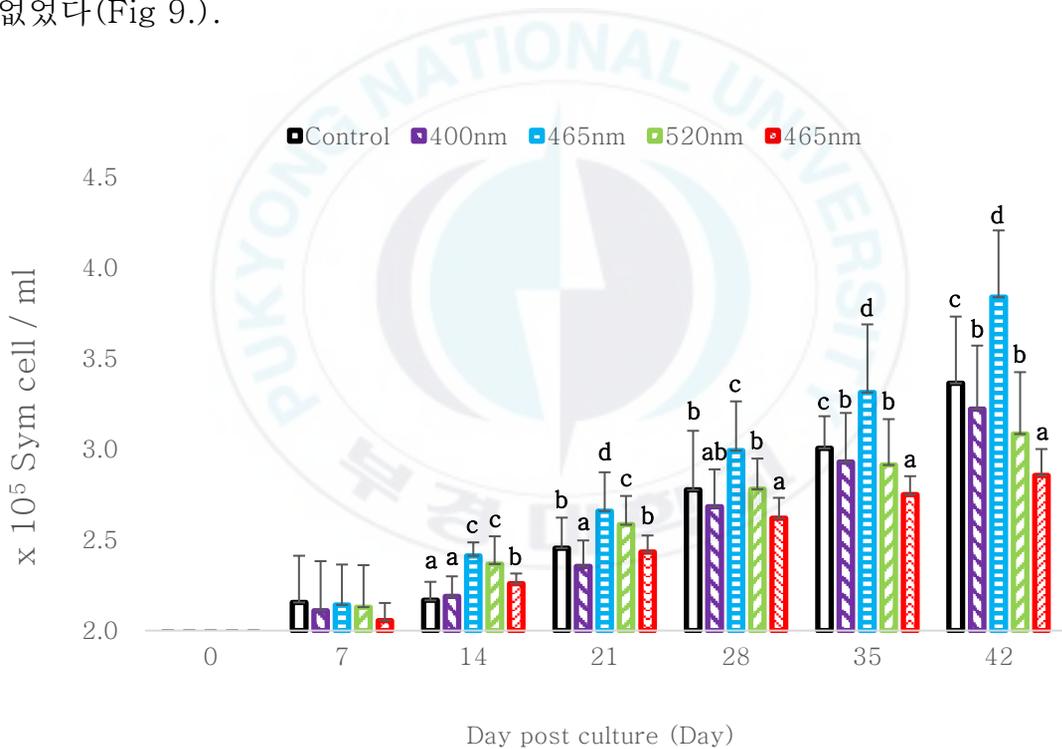


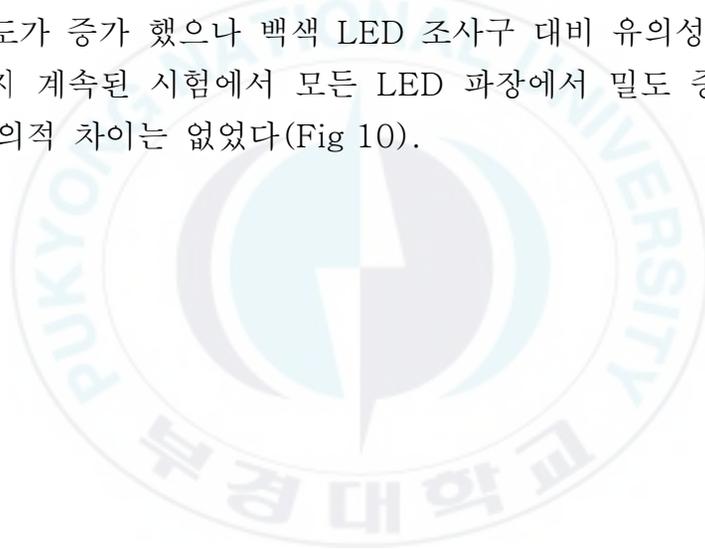
Figure 9. Growth of symbiodinium isolated from *Montipora digitata* for 6 weeks. The alphabet above each spot of day (a, b, c) are showing the significance level with ANOVA analysis.

3. *Montipora digitata*의 LED 파장별 성장 시험

3.1. LED 에 조사된 *Montipora digitata*의 공생조류 밀도 변화

최초(DPE 0)에 *M. digitata* fragment ($2.07 \text{ g} \pm 0.22$)에서 분리된 공생조류의 밀도는 조각 산호 1g당 $2.02 \pm 0.11 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ 였으며 백색 LED 조사 구에서 DPE 42 에 $5.44 \pm 0.35 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ 로 2.69 배 밀도가 증가 하였다. 465 nm LED 조 사 구는 $6.41 \pm 0.30 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ 로 3.17 배의 밀도가 증가 함으로 백색 LED 조사구 대비 매우 높은 밀도 증가를 보였다 ($p < 0.0001$). 반면 DPC 42에서 640 nm LED 조사구는 DPC 0과 비교하여 $4.30 \pm 0.16 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ 로 2.13 배 밀도가 증가 하였으나 백색 LED 조사 구에 비하여 밀도 증가는 낮았다($p < 0.01$). 405 nm, 520 nm LED 조사 구는 밀도가 증가 했으나 백색 LED 조사구 대비 유의성은 없었다.

DPE 84까지 계속된 시험에서 모든 LED 파장에서 밀도 증가를 보였으나 DPE 42와 유의적 차이는 없었다(Fig 10).



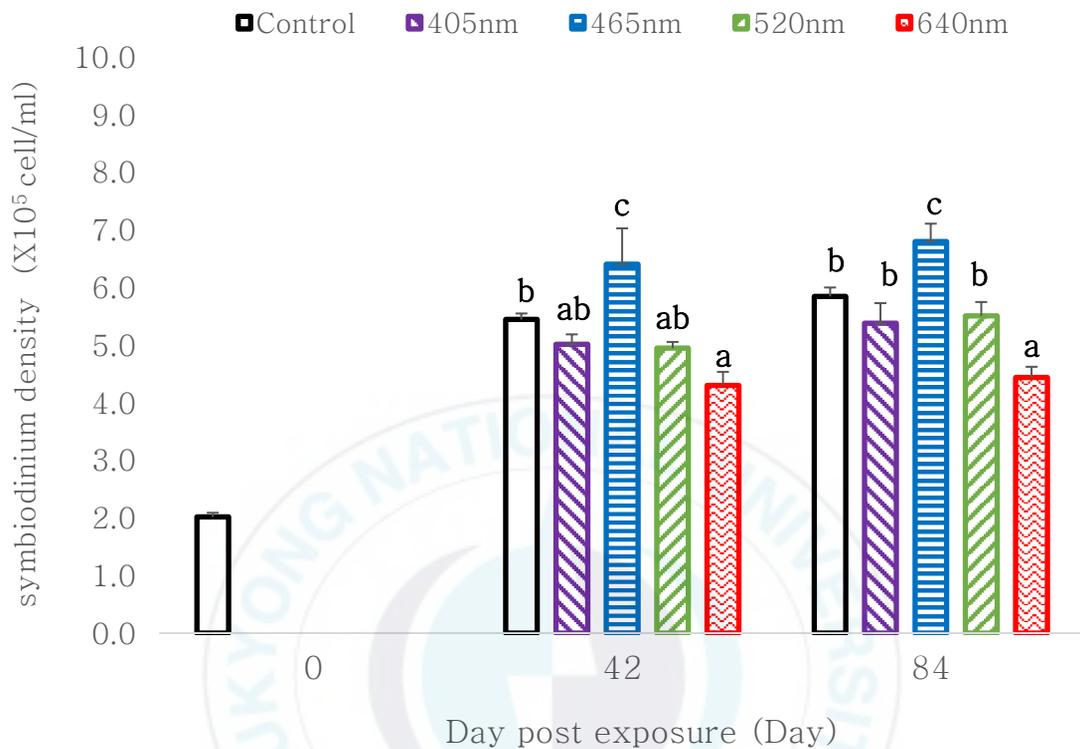


Figure 10. Increase of symbiodinium density for in vivo experiment 42 days and 84 days. During 42 days symbiodinium density increase seems like in vitro experiment result, which 465 nm was the most effect to growth and 645 nm had rather growth effect. At the DPE84 was no significant change of symbiodinium density and there were a little increase except 640 nm. It had induced result that low growths were limited saltation pattern like fore 42 days by overcrowd of symbiodinium in coral tissue. The alphabet above each spot of day (a, b, c) are showing the significance level with ANOVA analysis.

3.2. LED 파장 별 *Montipora digitata*의 성장 시험

백색 LED(Control light) 조사 구에서 *M. digitata*의 평균 무게는 fragment 타일($22.01 \text{ g} \pm 0.63$) 포함 DPE 0에 $23.184 \text{ g} \pm 1.11$ 이었으나 6 주 후 (DPE 42)에 평균 $23.93 \text{ g} \pm 1.41$ 으로 2.07 % 성장 하였으며 일별 성장률은 $0.049 \pm 0.007 \text{ %/day}$ 이었다. 465 nm, LED 조사 구에서 *M. digitata* fragment의 성장은 최초 DPE 0, 평균무게 $22.55 \text{ g} \pm 0.59$ 에서 DPE 42에 $23.24 \text{ g} \pm 0.64$ 으로 3.08 % 성장률을 보였으며 일별 성장률은 $0.073 \pm 0.007 \text{ %/day}$ 증가 하여 백색 LED 대비 매우 유효 하였다 ($p < 0.001$). 405 nm, 520 nm 파장 조사구는 백색 LED 조사구 대비 유의적 차이를 보이지 않았다.

반면 DPE 42에서 640 nm 조사구는, $1.44 \pm 0.16\%$ ($0.034 \pm 0.004 \text{ %/day}$)의 성장률로 백색 LED 조사구 대비 가장 낮은 ($p < 0.001$) 성장 효과를 보였다(Fig 11. a).

이후 DPE 84까지 계속된 시험의 모든 LED 파장에서 *M. digitata*의 성장이 지속되었으며 465 nm 조사구에서 $5.9 \pm 0.65\%$ 로 가장 높은 성장효과를 보였다. 그러나, 일별 성장률을 보면 DPE 42 이후 성장률의 증가는 멈추었다(Fig 11. b).

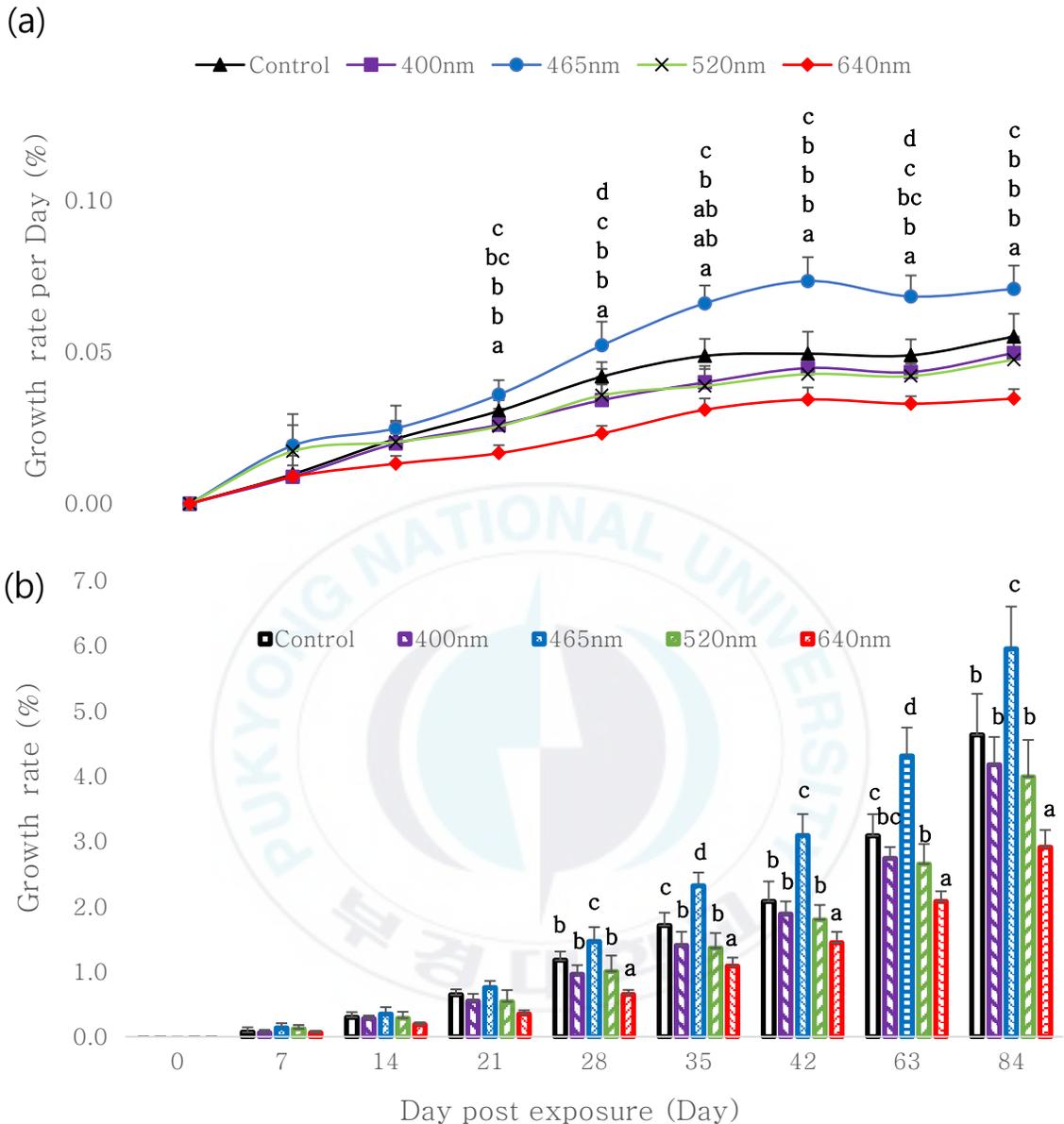


Figure 11. In vivo experiment, LED growth effect of *M. digitata* for 12 weeks. All of LED sources shown the effect of growth, *M. digitata* was the most increased under 465 nm, blue light LED wavelength. At the DPE42, daily growth rate stopped increased and kept staying in same level. The alphabet above each spot of day (a, b, c, d) are showing the significance level with ANOVA analysis.

4. *Montipora digitata* 성장의 LED 적정 광량 도출 시험

백색 LED 조사 구에서 *M. digitata*의 평균 무게는 fragment 타일(20.054 g \pm 0.38) 포함 DPE 0에 21.686 g \pm 1.20 이었으나 6주후 (DPE 42)에 평균 23.118 g \pm 1.41으로 3.05 \pm 0.12 % 성장 하였으며 일별 성장률은 0.0728 \pm 0.003 %/day 이었다. *M. digitata*의 파장별 성장 시험에서 전체 광량으로 설정 되었던 250 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (1배)광량에서 10주간 매일 0.0860 \pm 0.014 %/day 성장률로 3.61 \pm 0.577 % 성장 하였으며 백색 LED 조사구 대비 유의적인 차이를 보였다(p<0.05). 1.5배 광량인 400 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 광량에서는 6주간 (DPE 42) 일별 0.0955 \pm 0.014 %/day의 성장률로 4.16 \pm 0.595% 성장 하여 가장 높은 성장률을 보였다(p<0.001). 반면 1/2(125 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)광량과 1/4(60 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)광량의 LED 조사 구에서 *M. digitata* 의 성장은 DPE 42에 각각 1/2 광량에서 2.75 \pm 0.220%(0.065 \pm 0.054 %/day)와 1/4 광량에서 2.36 \pm 0.208 % (0.056 \pm 0.004 %/day)로 성장하여 백색 LED 대비 낮은 성장률을 기록하였다(con: 1/2 광량, p<0.01, con: 1/4 광량, p<0.0001).

이후 DPE 70까지 계속된 시험에서 모든 조건에서 *M. digitata*의 성장이 지속되었으며 1.5배 조사구에서 성장률이 7.06 \pm 0.57 % (0.100 \pm 0.008 %/day)로 가장 높은 성장(p<0.0001)을 보였다. 또한 DPE 70에서 1.5배 광량은 5.95 \pm 0.382 %의 성장률을 기록한 1 배 광량과도 성장률에서 유의적 차이를 보였다(p>0.01). 그리고 1/2 광량에서 DPE 49부터 백색 조사구와 성장률 차이가 좁혀졌으며 최종적으로 DPE 70에서 5.22 \pm 0.279 % 성장함으로 백색 LED 조사구의 5.14 \pm 0.167% 성장률과 유의적 차이가 없었다. 그러나 1/4 광량은 DPE 70까지 4.52 \pm 0.236% 성장함으로 백색 LED조사구와 비교하여 지속적으로 낮은 성장률을 기록하였다(p<0.0001). (Fig 12.).

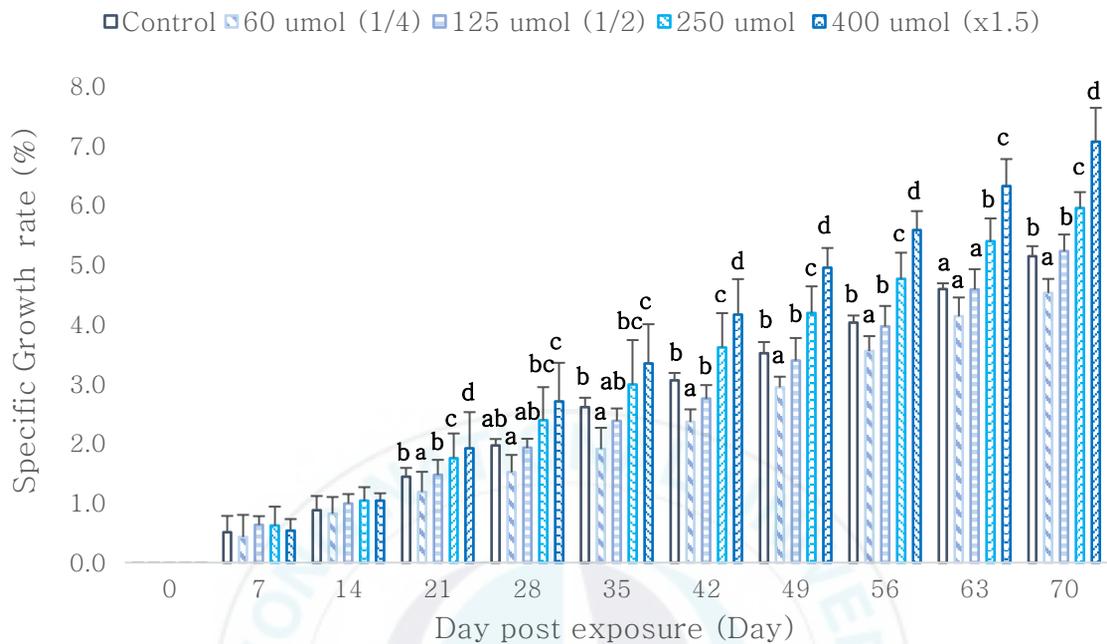


Figure 12. In vivo experiment, LED growth effect of *M. digitata* for 10 weeks. All of LED light intensity shown the effect of growth, *M. digitata* was the most increased under the strongest intensity, $400 \mu\cdot\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. As stronger 465 nm LED light had better growth effect on *M. digitata*. The alphabet above each spot of day (a, b, c, d) are showing the significance level with ANOVA analysis.

5. chlorophyll 정량 시험

5.1. LED 파장별 공생조류 인공배양 시험에서 chlorophyll 정량

결과 2.2. *M. digitata* 분리 공생조류의 LED 파장 별 시험관 배양 시험에서 공생조류의 밀도 측정 후, chlorophyll의 정량 시험을 실시한 결과

5.1.1. Chlorophyll α

최초, DPE(Day post exposure)0 에서 *M. digitata*으로부터 추출한 공생조류의 Chlorophyll α 의 양은 평균 $3.27 \pm 0.007 \mu\text{g}/10^5$ 였으며, 6 주간 (DPE 42) 백색 LED 조사 구(control light)에서 평균 $3.53 \pm 0.132 \mu\text{g}/10^5$ 으로 1.1배 증가하였다. DPE 42에 가장 많은 증가량을 보인 파장은 640nm로 평균 $3.84 \pm 0.007 \mu\text{g}/10^5$ 로 1.18배의 증가를 보였으며 백색 LED 조사구와 비교하여 유의적 증가($p < 0.01$)를 보였다. 반면, DPE 42에 465 nm에서 Chlorophyll α 는 증감에 유의성이 없었으며 (1.01배 증가, $3.333 \pm 0.006 \mu\text{g}/10^5$), 405, 520 nm LED 조사 구 역시 Chlorophyll α 의 양의 유의적 차이는 없었으나, 미세한 감소(405 nm, 0.98 배 증가, $3.228 \pm 0.013 \mu\text{g}/10^5$, 520 nm, 0.99 배 증가를 ($3.225 \pm 0.017 \mu\text{g}/10^5$) 보였다(Fig 13.).

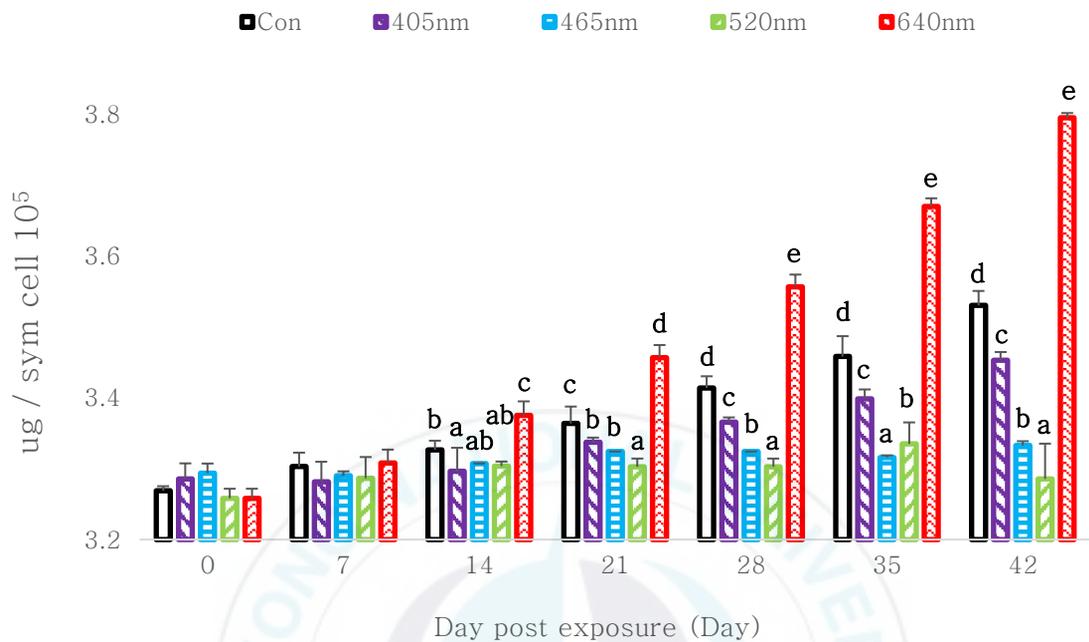
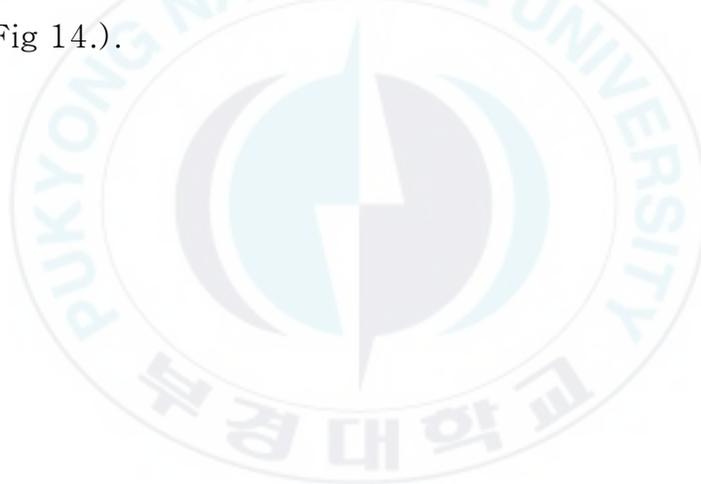


Figure 13. In vitro experiment, chlorophyll a determination for 6 weeks. Chlorophyll a quantity from symbiodinium of *M. digitata* was the most increased under 640nm, red light LED wavelength. The alphabet above each spot of day (a, b, c, d, and e) are showing the significance level with ANOVA analysis.

5.1.2. Chlorophyll c₂

Chlorophyll c₂ 는 최초, DPE(Day post exposure)0 에서 symbiodinium 밀도 10⁵ cell 당 평균 7.46 ± 0.027 µg였으며, 6 주간(DPE 42) 백색 LED 조사구 에서 평균 10.48 ± 0.027 µg/10⁵으로 1.4 배 증가하였다. DPE 42에 가장 많은 증가량을 보인 파장은 465 nm로 평균 11.8 ± 0.046 µg/10⁵로 1.6 배의 증가를 보였으며 백색 LED 조사구 대비 높은 유의적 증가량(p<0.0001)를 보였다. 405 nm, 520 nm는 두 파장간 유의적 차이는 없었으나 백색 LED 대비 증가량이 적었다(405 nm, 1.3배 증가, 9.49 ± 0.004 µg/10⁵, 520 nm, 1.26 배 증가, 9.33 ± 0.006 µg/10⁵) 반면, 640 nm에서 Chlorophyll c₂ 는 증감에 유의성이 없었으며 (1.09 배 증가, 8.07 ± 0.013 g/10⁵), 백색 LED 대비 가장 적은 증가량을 보였다 (p<0.0001) (Fig 14.).



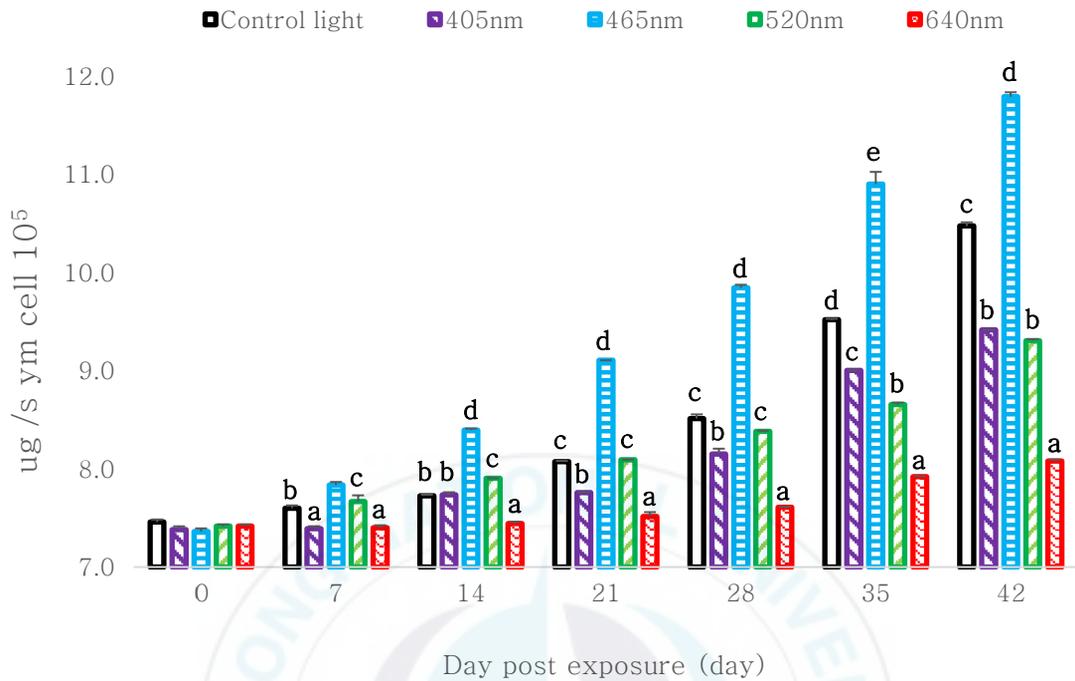


Figure 14. In vitro experiment, Chlorophyll c₂ determination for 6 weeks. Chlorophyll c₂ quantity from symbiodinium of *M. digitata* was the most increased under 465 nm, blue light LED wavelength. The alphabet above each spot of day (a, b, c, d, and e) are showing the significance level with ANOVA analysis.

5.1.3. Chlorophyll 조성비와 총량

Chlorophyll a와 Chlorophyll c₂의 조성비와 총량의 변화를 보기 위해 Chlorophyll a/c₂ 및 Chlorophyll a+c₂를 구하였다. DPE 0에서 평균(n=3) 44.191 ± 0.237 a /c₂ 값이 DPE 42에서 640 nm 파장이 46.97 ± 0.164 a/c₂로 Chlorophyll a 의 총량이 증가 함에 따라 Chlorophyll a 의 높은 조성비를 보였다. 반면 DPE 42에서 465 nm 파장의 Chlorophyll a/c₂ 는 28.26 ± 0.106로 Chlorophyll c₂의 양이 증가 하고 Chlorophyll a 이 감소 함에 따라 가장 낮은 Chlorophyll a /c₂ 값을 보였다. 백색 LED, 405 그리고 520nm는 Chlorophyll a 감소 추세를 보였다 (백색 33.70 ± 0.232; 405 nm 36.67 ± 0.136; 520 nm 40.4 ± 0.359) (Fig 15. a).

Chlorophyll a+c₂, Chlorophyll의 총량은 465 nm 파장에서 DPE 0, 최초 평균 Symbiodinium 밀도 10⁵ cell 당 10.68 ± 0.027μg 에서 DPE 42에 15.12 ± 0.039 μg/10⁵으로 가장 높은 증가를 보였으며 640 nm 파장에서 11.87 ± 0.014 μg/10⁵으로 가장 낮은 증가를 기록하였다(Fig 15. b).

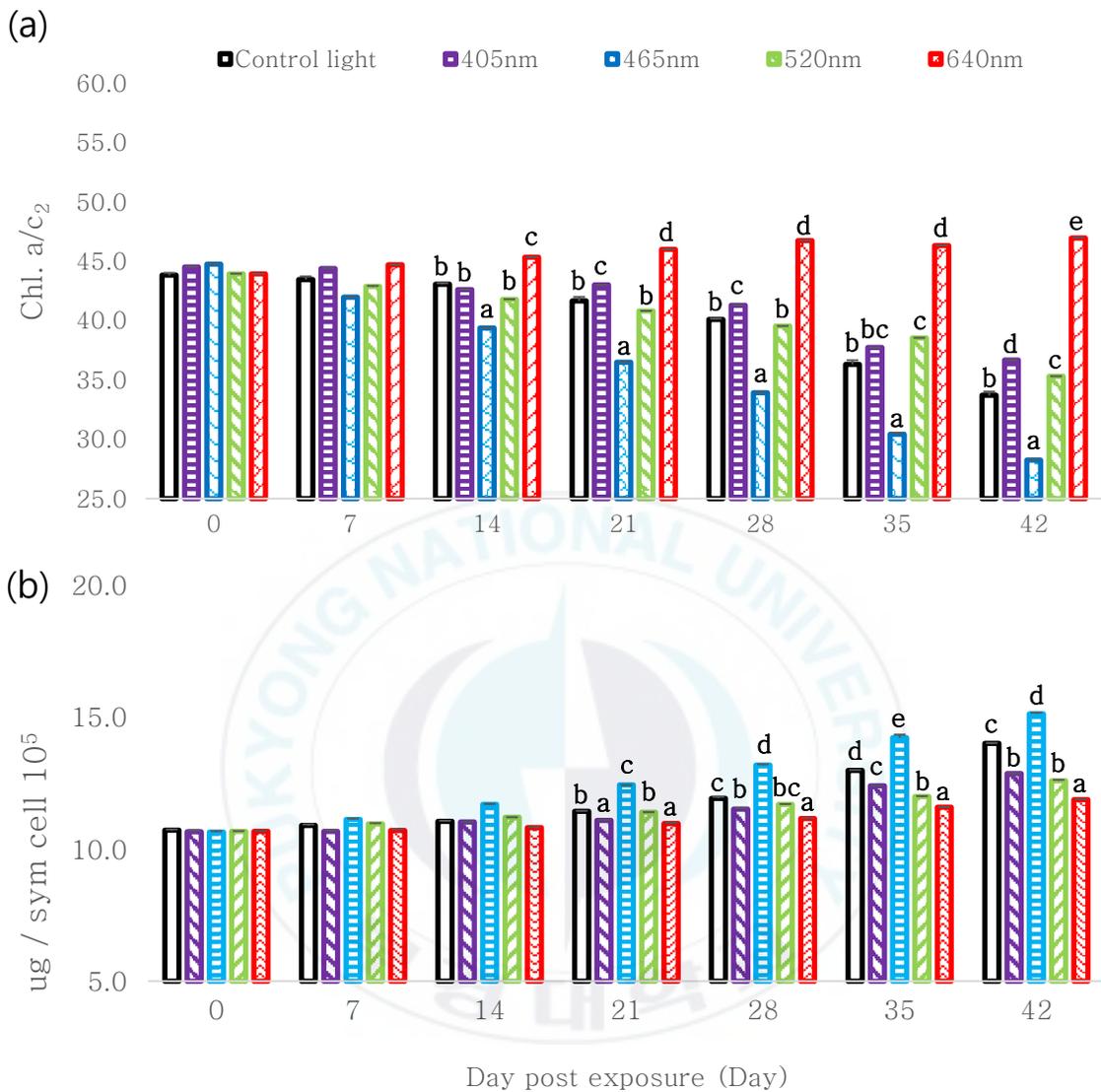


Figure 15. In vitro experiment, Chlorophyll a/c₂ composition ratio and Chlorophyll a +c₂ total quantities for 6 weeks. (a) is chlorophyll a/c₂ quantity from symbiodinium of *M. digitata* was shown composition of chlorophyll a, the most increased under 465nm, blue light LED wavelength and 640 nm was increased of chlorophyll a. (b) is chlorophyll a+c₂, shown to indicate total amount of chlorophyll. The alphabet above each spot of day (a, b, c, d, and e) are showing the significance level with ANOVA analysis.

5.2. LED 파장별 *Montipora digitata* 성장 시험에서 Chlorophyll 정량

결과 3. *Montipora digitata*의 LED 파장별 성장 시험에서 분리 공생조류의 밀도 측정 후, Chlorophyll의 정량 시험 결과

5.2.1. Chlorophyll α

최초, DPE(Day post exposure)0, 무작위로 선별한 *M. digitata*, Fragment (n=5)으로부터 분리한 공생조류의 Chlorophyll α 의 평균 밀도는 $3.36 \pm 0.011 \mu\text{g}/10^5$ 였으며, 6 주간(DPE 42) 백색 LED 조사 구(control light)에서 평균 $3.45 \pm 0.065 \mu\text{g}/10^5$ 으로 1.02 배 증가하였다. 백색 LED 조사구에 비해 640nm파장이 DPE 42에 평균 $3.72 \pm 0.333 \mu\text{g}/10^5$, 1.1 배로 유의적(p<0.05) 증가를 보였다. 반면, 465 nm 파장은 최초 DPE 0과 DPE 42 간의 Chlorophyll α 증감에 유의성이 없었으며 ($3.288 \pm 0.063 \mu\text{g}/10^5$), 520 nm LED 조사 구 역시 42 일 동안 Chlorophyll α 의 양의 유의적 차이는 없었다(520 nm, $3.22 \pm 0.05 \mu\text{g}/10^5$). 다만 405 nm파장에서는 DPE 0 대비 DPE 42에 405 nm, $3.411 \pm 0.031 \mu\text{g}/10^5$ 로 Chlorophyll α 의 유의적 증가(p<0.05)를 보였으나 백색 LED 조사구와 유의적 차이는 없었다(Fig 16.).

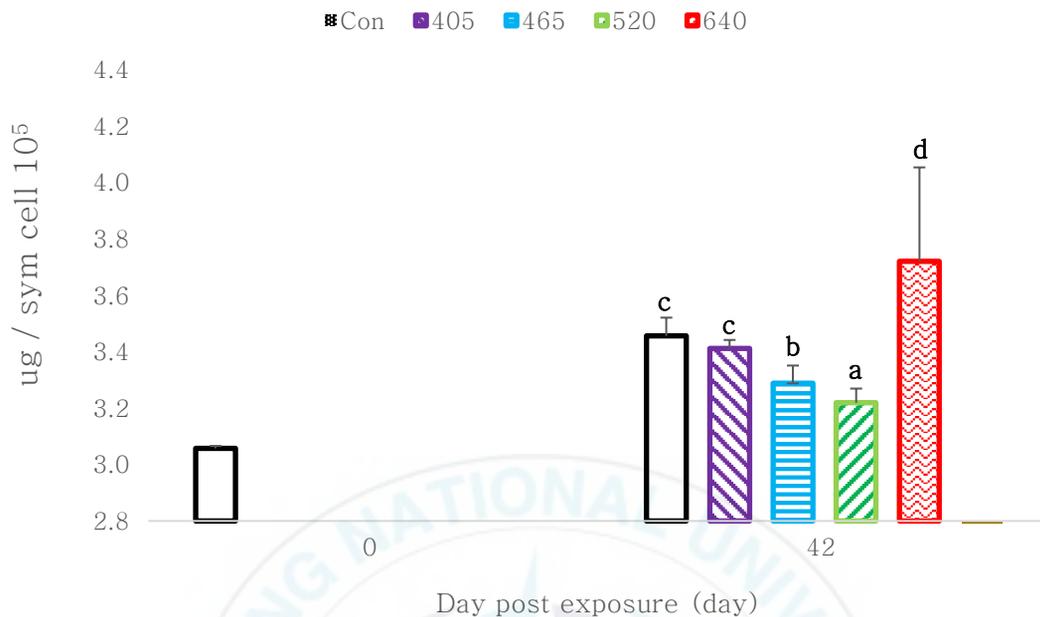


Figure 16. In vitro experiment, chlorophyll a determination for 6 weeks. Chlorophyll a quantity from symbiodinium of *M. digitata* was the most increased under 640 nm, red light LED wavelength. The alphabet above each spot of day (a, b, c, d) are showing the significance level with ANOVA analysis.

5.2.2. Chlorophyll c₂

Chlorophyll c₂ 는 최초, DPE(Day post exposure)0 에서 symbiodinium 밀도 10⁵ cell 당 평균 7.87 ± 0.069 µg였으며, 6 주간(DPE 42) 백색 LED 조사구 에서 평균 9.19 ± 0.186 µg/10⁵으로 1.1배 증가하였다. DPE42에 가장 많은 증가량을 보인 파장은 465 nm로 평균 10.03 ± 0.254 µg/10⁵로 1.3 배의 증가를 보였으며 백색 LED 조사구 대비 높은 유의적 증가량(p<0.001)를 보였다. 405 nm, 520 nm는 두 파장간 유의적 차이는 없었으나 백색 LED 대비 증가량이 적었다(405 nm, 1.1배 증가, 8.6 ± 0.193 µg/10⁵, 520 nm, 1.1배 증가, 8.4 ± 0.266 µg/10⁵) 반면, 640 nm에서 Chlorophyll c₂ 는 8.07 ±0.013 µg/10⁵로 42일간 증감에 유의성이 없었으며 백색 LED 대비 가장 적은 증가량을 보였다(p<0.0001)(Fig 17.).



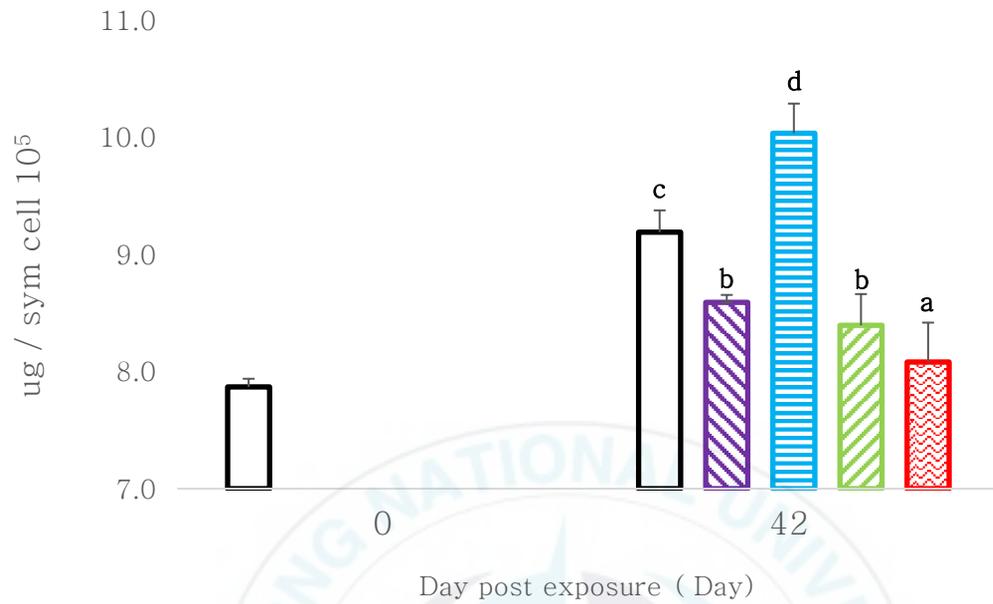


Figure 17. In vitro experiment, Chlorophyll c₂ determination for 6 weeks. Chlorophyll c₂ quantity from symbiodinium of *M. digitata* was the most increased under 465nm, blue light LED wavelength. The alphabet above each spot of day (a, b, c, d) are showing the significance level with ANOVA analysis.

5.2.3. Chlorophyll 조성비와 총량

Chlorophyll의 조성비와 총량의 변화를 보기 위해 chlorophyll α/c_2 및 chlorophyll $\alpha+c_2$ 를 구하였다. DPE 0에서 평균($n=5$) 38.92 ± 0.677 chlorophyll α/c_2 값이 DPE 42, 640nm 파장에서 46.97 ± 0.164 chlorophyll α/c_2 로 가장 높은($p<0.01$) chlorophyll α 의 조성비를 보였다. 반면 DPE 42에서 465 nm 파장의 Chlorophyll α/c_2 는 32.82 ± 1.131 로 Chlorophyll c_2 의 양이 증가 하고 chlorophyll α 이 감소 함에 따라 가장 낮은 chlorophyll α/c_2 값을 보였다. 백색 LED 조사구와 405 nm 조사구는 chlorophyll α/c_2 감소 추세를 보였다 (백색 37.67 ± 0.758 ; 520nm 39.68 ± 1.126). 405 nm 파장 조사구에서는 백색 LED 대비 높은 chlorophyll α/c_2 증가 값을 보였다($p<0.01$) (Fig 18. a).

Chlorophyll $\alpha+c_2$ 으로 나타낸 Chlorophyll의 총량은 465 nm 파장 조사구에서 DPE 0, 최초 평균 symbiodinium 밀도 10^5 cell 당 Chlorophyll 총량 $10.92 \pm 0.065 \mu\text{g}/10^5$ 에서 DPE 42에 $13.32 \pm 0.248 \mu\text{g}/10^5$ 으로 가장 높은($p<0.001$) 증가를 보였으며 640 nm 파장에서 $11.78 \pm 0.281 \mu\text{g}/10^5$ 으로 가장 낮은($p<0.01$) 증가를 기록 하였다 (Fig 18. b).

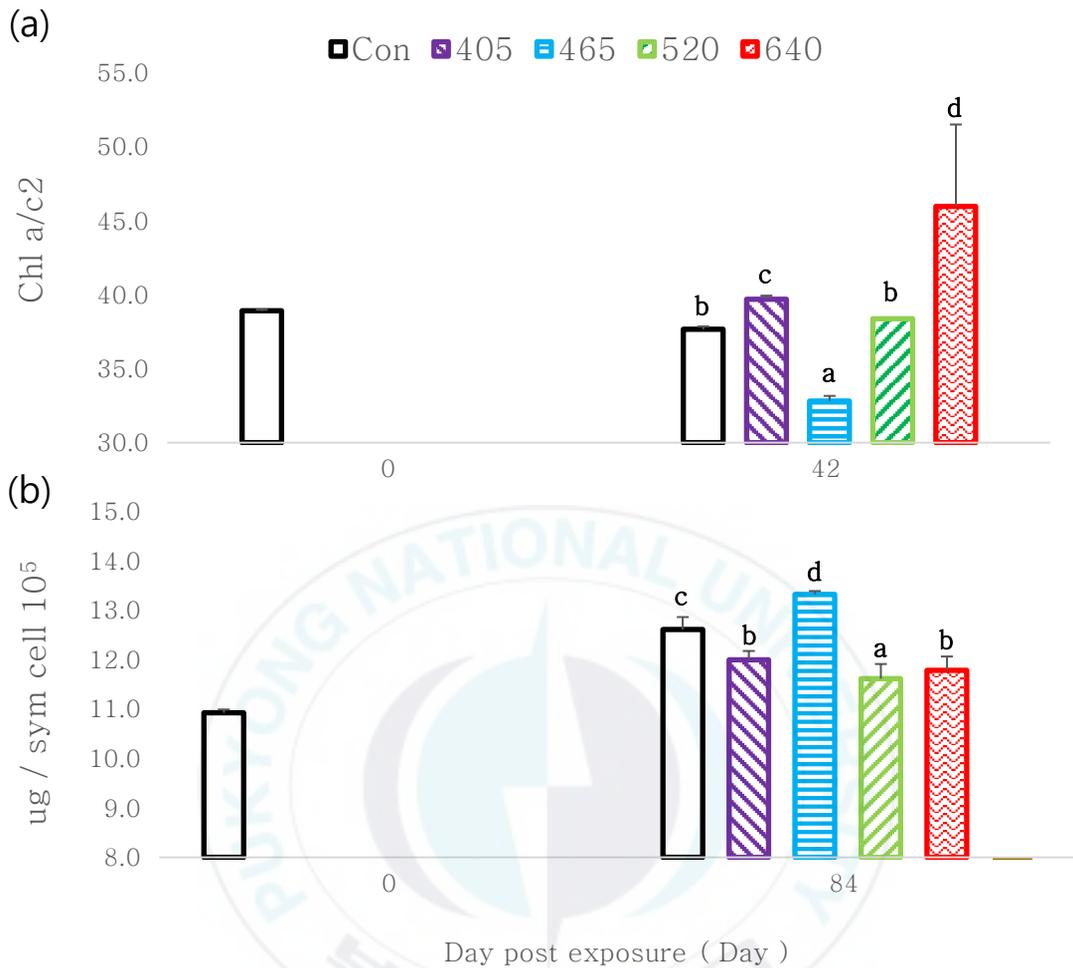


Figure 18. In vitro experiment, chlorophyll a/c₂ composition ratio and chlorophyll a+c₂ total quantities for 6 weeks. (a) is chlorophyll a/c₂ quantity from symbiodinium of *M. digitata* was the most increased under 465 nm, blue light LED wavelength and 640 nm was increased of chlorophyll a. (b) is total amount of chlorophyll a+c₂. The alphabet above each spot of day (a, b, c and d) are showing the significance level with ANOVA analysis.

5.3. LED 광량 별 *Montipora digitata* 성장 시험에서 Chlorophyll 정량

결과 4. *Montipora digitata* 성장의 LED 적정 광량 도출 시험에서 분리 공생조류의 밀도 측정 후, chlorophyll의 정량 결과

5.3.1. Chlorophyll α

최초, DPE(Day post exposure)0, 무작위로 선별한 *M. digitata* fragment (n=5)으로부터 분리한 공생조류에서 Chlorophyll α 의 양은 symbiodinium 밀도 10^5 당 평균 $2.55 \pm 0.014 \mu\text{g}$ 였으며, 10 주간(DPE 70) 백색 LED 조사 구(control light)에서 평균 $2.746 \pm 0.056 \mu\text{g}/10^5$ 으로 1.08 배 증가하였다. 반면 465 nm 파장의 $60 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서는 최초 DPE0과 종료 시점인 DPE 70 간의 Chlorophyll α 증감에 유의성이 없었으며($2.59 \pm 0.085 \mu\text{g}/10^5$), $125 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 광량 조사구부터 광량에 대비하여 유의적 증가를 보였다($125 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $p < 0.0001$). 그러나 $400 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 이 DPE 42에 평균 $2.8 \pm 0.045 \mu\text{g}/10^5$, 1.1배로 백색 LED 조사구보다 매우 높은 ($p < 0.0001$) 증가를 보였다(Fig 19.).

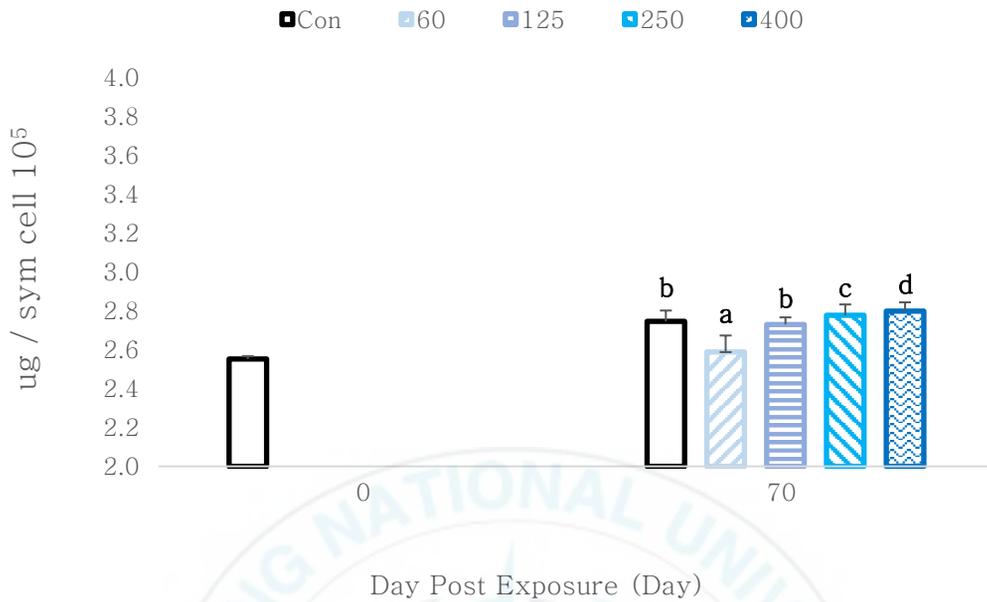


Figure 19. In vitro experiment, chlorophyll a determination for 10 weeks. Chlorophyll a quantity from symbiodinium of *M. digitata* was the most increased under 400 $\mu\cdot\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light intensity. The alphabet above each spot of day (a, b, c, d) are showing the significance level with ANOVA analysis.

5.3.2. Chlorophyll c₂

Chlorophyll c₂ 는 최초, DPE(Day post exposure)0 에서 symbiodinium 밀도 10⁵ cell 당 평균 6.01 ± 0.039 µg였으며, 10 주간(DPE 42) 백색 LED 조사구 에서 평균 8.34 ± 0.266 µg/10⁵으로 1.38배 증가하였다. DPE 70에 서 465 nm 파장의 60 µ·mol photons·m⁻²·s⁻¹ 에서는 평균 7.63 ± 0.08 µg/10⁵로 가장 적은 chlorophyll c₂ 증가량을 보였으며, 최대 조사 광량인 400 µ·mol photons·m⁻²·s⁻¹ 에서 평균 10.50 ± 0.26 µg/10⁵로 1.74배 증가를 보이며 광량 대비 chlorophyll c₂의 양이 증가 하였다. 250 µ·mol photons·m⁻²·s⁻¹ 광량 조사구(250, 400 µ·mol photons·m⁻²·s⁻¹)부터 백색 LED 조사군과 비교하여 증가량이 컸다(p<0.0001) (Fig 20.).

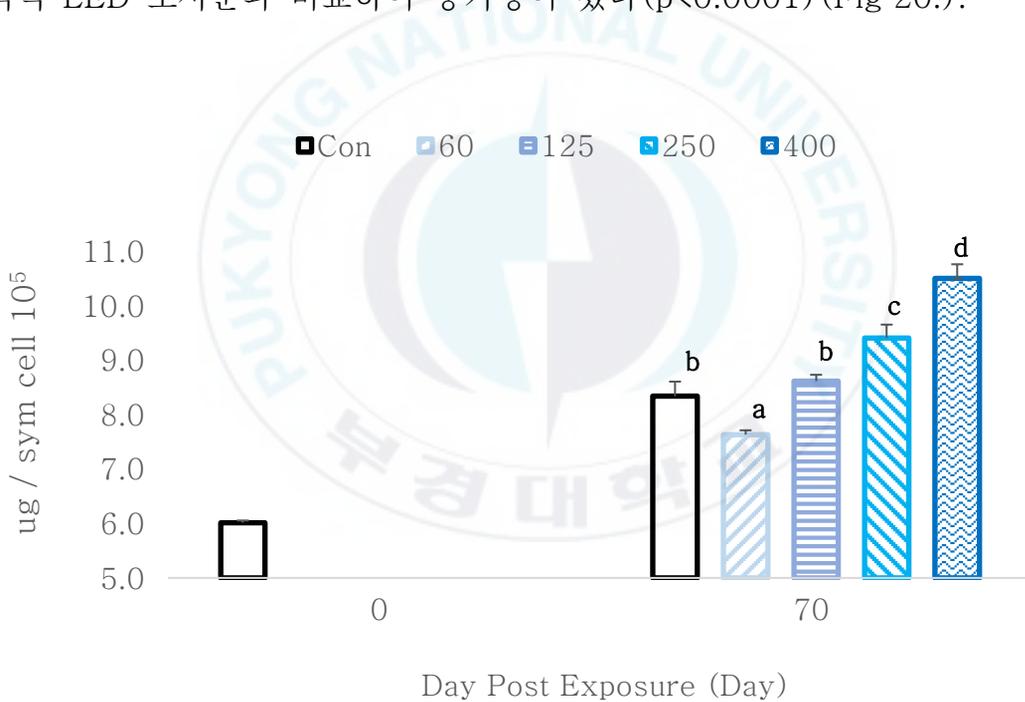


Figure 20. In vitro experiment, Chlorophyll c₂ determination for 10 weeks. Chlorophyll c₂ quantity from symbiodinium of *M. digitata* was the most increased under 400 µ·mol photons·m⁻²·s⁻¹ light intensity. The alphabet above each spot of day (a, b, c, d, and e) are showing the significance level with ANOVA analysis.

5.3.3. Chlorophyll 조성비와 총량

Chlorophyll의 조성비와 총량의 변화를 보기 위해 chlorophyll a/c_2 및 chlorophyll $a+c_2$ 를 구하였다. DPE 0에서 평균($n=5$) 42.22 ± 0.35 의 chlorophyll a/c_2 값이 DPE 70에, 백색 LED 조사구에서 32.95 ± 1.33 chlorophyll a/c_2 로 chlorophyll a 의 조성비를 감소를 보였다. DEP 70까지 465 nm 파장의 각 광량 조사구는 광량의 증가에 대비하여 chlorophyll c_2 의 조성비 증가로 Chlorophyll a/c_2 값은 광량증가에 반비례한 결과를 보였다(fig 21. a)

Chlorophyll $a+c_2$, Chlorophyll의 총량은 백색 LED 조사구에서 DPE 0, 최초 평균 symbiodinium 밀도 10^5 cell 당 $8.57 \pm 0.045 \mu\text{g}$ 에서 DPE 70에 $11.09 \pm 0.248 \mu\text{g}/10^5$ 으로 증가 했으며, 광량에 비례하여 총량이 증가 하였다. $250 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 광량에서부터 백색 LED 조사에 대비하여 유의적 차이를 보였다($p<0.0001$) (Fig 21. b).

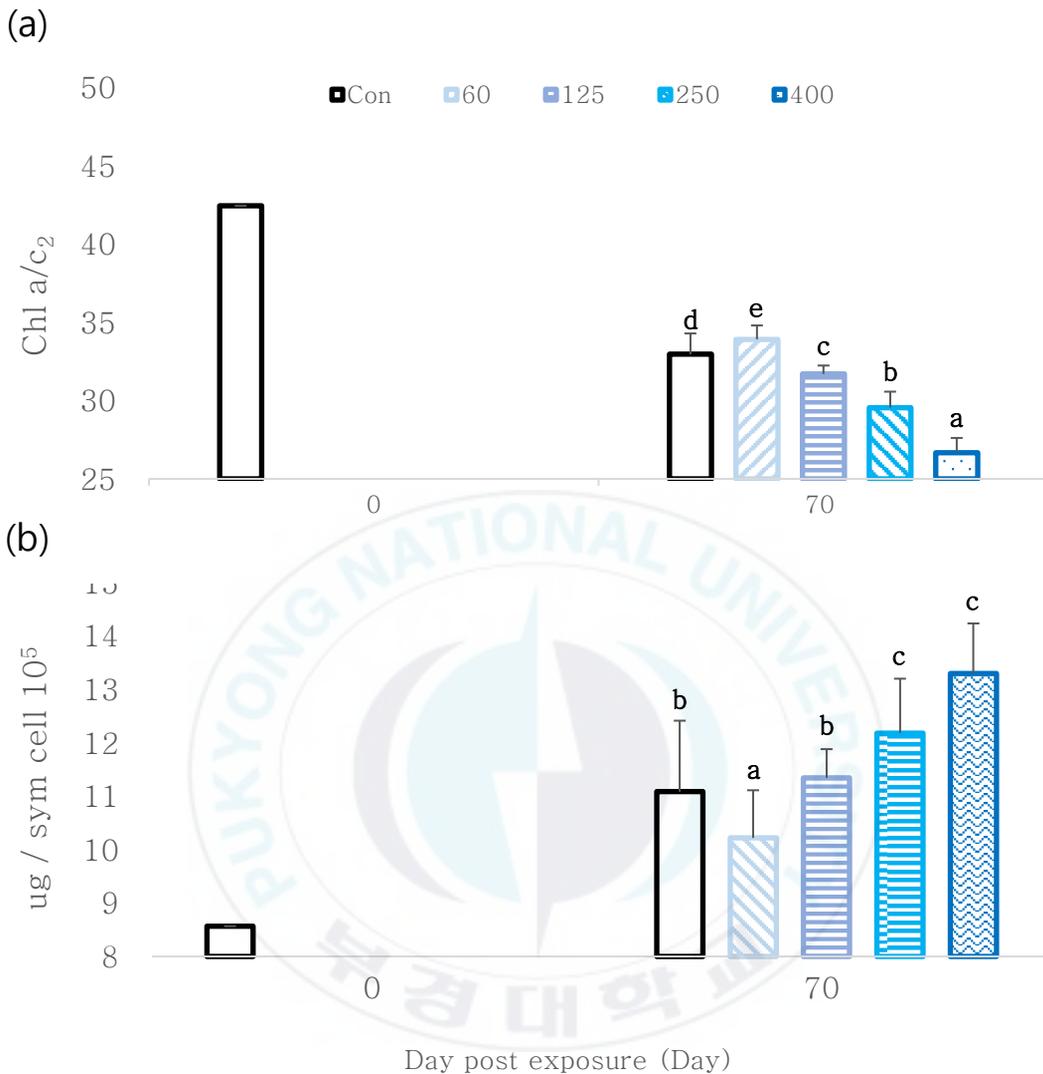


Figure 21. In vitro experiment, chlorophyll a/c₂ composition ratio and chlorophyll a+c₂ total quantities for 10 weeks. (a) is chlorophyll a/c₂ from symbiodinium of *M. digitata* was shown that composition if chlorophyll a was decreased, (b) is chlorophyll a+c₂ was indicated total quantity increased. The alphabet above each spot of day (a, b, c, d, and e) are showing the significance level with ANOVA analysis.

IV . 고찰

LED (Light Emitting Diode)는 단파장을 재현 할 수 있는 특징 때문에 의학에서 상처치료와 같은 light therapy의 도구로 많이 활용하고 있다(Russel et al. 2005, Adamskaya et al. 2011). 또한 어류에서는 어류의 스트레스 감소나 성장 효과 (Migaud et al. 2007, Villamizar et al. 2009, Shin et al. 2012) 와 특정 파장을 이용한 미생물의 배양까지 점차 다양한 분야에 확대 되는 경향이 뚜렷해지고 있으며 (Villamizar et al. 2011, et al. 2013, Paschoal Zhao et al. 2013), 높은 에너지 효율과 전시효과로 가정의 소형 어항에서부터 아쿠아리움 같은 대형 상업 전시수조 까지 관상 산업에서 사용도 점차 늘고 있다. 특히 산호 전시 및 사육에서의 LED의 활용 가치가 매우 높는데, 산호는 미국에서만 매해 140여종, 500,000 개체 이상이 수입되는 등, 세계적 수요는 높아지는 (Rhyne et al. 2012) 반면, 지구온난화로 인해 자연의 개체 수와 함께 실외 양식 생산량도 감소하고 있어, 실내 양식의 필요성이 나날이 높아지고 있다. 실내 산호 양식 기술의 여러 핵심중의 하나가 바로 빛의 공급이며, 에너지 효율과 원하는 파장의 구현이 가능한 LED의 활용이 매우 중요하다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 이 LED 빛을 이용하여 산호와 공생조류의 성장과 공생관계의 특성을 연구하고자 하였다.

기존의 여러 연구(e.g., Kinzie et al. 1984, 1987, D'Angelo et al. 2008)에서 다양한 광원 및 LED 광원의 다양한 파장에 의한 산호의 성장과 생리학적 변화에 관한 연구가 진행되었다. 산호의 성장에 메탈등이나 형광등의 청색광, 그리고 LED의 465 nm 파장광 조사로 인해 해양의 광합성 생물이 주로 활용하는 chlorophyll c_2 가 증가하는 것을 확인하였다(Kinzie et al. 1984, 1987, D' Angelo et al. 2008). 이를 근거로 최대 광합성 효율을 내는 청색광 또는 465 nm 광원이 산호 성장에 유효한 파장으로 알려져 있으며, 청색광 및 465 nm 광원이 주로 광조건 시험에 사용되고 있다 (Kinzie et al. 1984, Wang et al. 2008). 그러나 465 nm의 LED 파장을

이용하여 여러 종류의 산호 (Pocilloporidae 3종, Acroporidae 3종 Faviidae, Mussidae, Merulinidae, Poritidae 각 1종으로 총 6과 10종)의 생장을 관찰한 결과 산호종마다 성장률에 차이가 났다(Wijgerde et al. 2013). 이는 산호종에 따라 파장에 대한 감수성에 차이가 나며, 이는 본래 서식하던 수심에 따라 진화한 결과와 연관성이 있을 것으로 보인다. 무엇보다 계통발생학적으로 유사한 동일 과에 속한 종이라도 동일한 광조건에 상이한 성장률을 나타낸 결과로 볼 때(Wijgerde et al. 2013), 유사종이라 할지라도 공생하는 공생조류의 종이나 산호의 서식 환경 등 여러 요인에 의해 파장 및 광조건에 대한 성장률의 차이가 있는 것으로 판단된다.

시험에 사용 된 경산호목 (Scleractinia), *M. digitata*는 전세계적으로 널리 분포하며 산호초를 형성(reef builder)하는 Acroporidae에 속하는 종으로 주로 얕은 수심(shallow)에서 서식하는 산호이다. 타 Acroporidae 종에 비해 성장이 빨라 비교적 쉬운 사육 난이도를 가지면서도 진한 녹색의 형광 또는 붉은색의 polyp 등, 다양한 체색의 아름다움을 특징으로 갖는 관상 및 부가가치가 매우 높은 종 이다. 타 산호에 비해 높은 광 적응성과, 온도 적응성의 특징을 갖고 있음에도, 수온에 의한 백화 현상으로부터 많은 피해를 받고 있는 종 이기도 하다(Riddle et al. 2008). 현재 보고된 *M. digitata*로부터 분리 된 내재 공생조류 (symbiodinium) 는 3종의 sub clade로 각 공생조류의 광 적응력이나 온도 저항력 등의 차이로 인해 공생 산호의 광 적응성이나 내열성이 결정 되는 것으로 알려져 있다 (LaJeunesse et al. 2005). 3종의 내재 공생조류 중 가장 많은 지역에서 분리 되는 종은 *Symbiodinium* sp. C1으로 태평양과 대서양의 다양한 수심대에서 서식하는 *M. digitata*에서 발견되며 넓은 서식 분포를 보임에 따라 다양한 광조건에 적응 할 수 있어, 다른 clade의 공생조류에 비해 높은 내광성이 있는 것으로 알려져 있다. *Symbiodinium* sp. C73 형의 공생조류는 동태평양의 0.5m 이내의 낮은 수심대의 서식 산호에게서 제한적으로 분리 되는 종인 만큼, 가장 높은 내열, 내광성을 특징으로 갖는다 (LaJeunesse et al. 2004). 세 번째 종은 본 시험에서 분리한 *Symbiodinium* sp. C15 형으로 인도양 서식 산호들에 주로 내재하며, 앞의 두 종과 비교 할 때 중간 정도의

내열, 내광성을 특징으로 갖는다. C3의 변형 형(variation)으로 알려져 있으며 *M. digitata*는 1-3 m의 수심 대에 서식하는 중에 공생하며, 5-20m에서 서식하는 산호(*Porties lutea*)에서 분리 되기도 한다(LaJeunesse et al. 2001; 2003).

Symbiodinium sp. C15의 동정을 위해서 Nuclear rDNA 5.8S, ITS (Internal Transcribed Spacer) 2, 그리고 Nuclear rDNA partial 28S를 사용 했다. *Symbiodinium* sp. C15가 속한 C clade는 cnidarian에 가장 우점적으로 공생하는 조류로 (Baker et al. 2003, LaJeunesse et al. 2005) 약 100개 이상의 sub clade가 보고 되었으며, 각 sub clade의 type 또는 haplotypes는 염기서열 비교로 구분 및 동정 하고 있다(Pochon et al. 2004). 과거 symbiodinium clade 및 sub clade의 구분 및 동정에는 주로 Nuclear rDNA SSU 부위나 Nuclear rDNA 18S를 사용 되었으나 해당 유전 부위의 *Symbiodinium* 종간 변이가 크지 않아 정확한 동정이 어려웠다. 하지만 최근에는 종간 변이가 큰 ITS2 와 Nuclear rDNA 28S를 유전부위를 사용 함에 따라 정확한 clade 및 sub clade를 동정 할 수 있게 되었다. 또한 symbiodinium의 chloroplast 의 domain V 는 공생조류만 갖고 있는 광합성 기관을 이용하여 직접적으로 동정 할 수 있으므로 공생조류 동정에 널리 이용되고 있다(Pochon et al. 2004, 2010).

본 연구에서는 LED(light emitting diode)의 단파장에 대한 *M. digitata*의 성장 효과를 알아 보기 위해, 가시광선 내의 여러 단파장(405-645 nm)과 특정 파장의 여러 광량의 LED 광을 조사하여 *M. digitata*의 성장에 따른 산호 무게의 증감, 공생조류 (symbiodinium)의 밀도 변화, chlorophyll의 정량 변화를 통해 각 파장과 광량이 *M. digitata*의 성장에 주는 영향을 알고자 하였다.

LED 파장별 성장 시험에서 *M. digitata*는 465nm 파장 조사구에서 가장 높은 성장률($5.9 \pm 0.65\%$)을 보였다. 성장률과 동일하게 465 nm 조사구에서 공생조류의 밀도가 84일간 3.2배로 가장 많이 증가 하였으며, Chlorophyll의 총량(chlorophyll $\alpha+c_2$) 역시 42일간 1.22 배 증가, 465 nm 조사구에서 증가량이 가장 높았다. 산호 체내의 공생조류 밀도 및

chlorophyll 의 증가는 따라 공생조류의 광합성에 의한 공여물의 증가로 연결되며 이는 자연스레 산호 성장과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다(Wijgerde et al. 2013). 이는 앞서 언급한 465 nm 파장이 산호 성장에 유효하다 라는 것 과는 일치하는 결과이며 465 nm 파장에서 광합성률이 증가 한다는 보고와 (Mass et al. 2010), blue(465 nm) light가 산호 체내에서 공생조류 밀도를 조절 (regulator) 하는 것을 촉진 (stimulatory) 하며 반대로 red (640 nm) light는 조절을 억제 (inhibitory) 한다는 Wijgerde(2014)의 연구 결과와도 일치한다. 465 nm 파장에서의 유효한 성장효과와 640 nm 에서 상대적으로 낮았던 *M. digitata*의 성장률로 볼 때 이는 LED가 조사하는 단 파장이 산호 성장에 영향을 준다는 것이 확인 되었다.

LED 노출 시험 42 일(DPE 42) 이후 84 일까지의 일별성장률의 상승이 멈춘 것을 볼 수 있는데(Fig 22. a), 이는 공생조류의 밀도 포화의 결과에 따른 것으로 보인다. 공생조류의 밀도를 포화 상태 이상으로 증가 시켰을 때 공여물의 양도 계속 증가 하겠지만, 공여물의 성분이 주로 Lipid 로 구성되어 있으므로 산호는 Amino acid 등의 타 성분을 얻기 위해 공생조류를 소화 (heterotrophic feeding) 하거나 다른 산호와 공생조류 공유를 위해 체외로 다수의 공생조류를 배출 하는 것으로 알려져 있다(Osinga et al. 2011). 465 nm 에서 42일과 84일간의 공생조류 밀도의 증가에 유의적 차이가 없음은 DPE 42를 기점으로 공생조류의 밀도가 포화를 이루었으며 *M. digitata*의 일별 성장률의 상승이 멈추었음에도 일별성장률을 유지하며 성장이 지속된 것으로 볼 때 DPE 42 이후 증가한 공생조류는 산호에 소화 또는 체외 배출된 것으로 보여진다.

또한 일별 성장률에서 다른 파장에 비해 낮은 성장률을 보인 640 nm 에서 84 일간 성장률의 상승이 지속됨에 따라(Fig 22. c) 적색광 또는 640 nm 파장이 산호의 성장을 억제 한다는 이전의 Wijgerde et al. (2014)의 연구나 Wang et al. (2008)의 연구와는 다른 양상의 결과를 보였다. Wijgerde et al. 에서는 640 nm에서 공생조류의 밀도조절이 억제 됨에 따라 6 주 간의 640 nm 광원 노출 시험에서 백화현상과 함께 시험산호의 폐사가 다수 발생 했다.

Wang et al. 에서 역시, 640 nm 가 공생조류의 유사분열을 억제 함으로 생활환의 진행을 막아 공생조류의 수를 줄임으로 인해 산호의 영양결핍이 초래되어 백화 현상이 발생 했다. 본 시험 과정 중, 비교를 위해 70일간, *M. digitata*와 동일한 조건에서 파장별 광원 노출 시험 한 *Caulastrea furcata* 역시, 465nm 조사구에서 가장 성장률이 높은 것은 동일하였으나, 640 nm 에서는 일별 성장률의 감소를 보였으며, 성장률 및 산호의 무게, 그리고 공생조류의 밀도 역시 640 nm 노출 군에서는 감소함으로(Fig 22. b), 640 nm 에서 성장이 억제 된다는 Wijgerde나 Wang의 연구 결과와 일치하였다. Mass et al. (2010) 에 따르면 저수심에 사는 산호는 필연적으로 적색광 (640 nm) 파장에 노출 되기 때문에 적색광 파장 역시 성장에 관련이 있으며, 성장 억제 파장에서의 성장 능력은 공생조류의 sub clade의 내열성과 내광성에 특성에 의해 주어지는 것으로 알려져 있다. 시험에 사용한 *M. digitata*는 낮은 수심에 사는 산호이며 내열성과 내광성을 특징으로 갖는 *Symbiodinium* sp. C15와의 공생관계 이었다. 반면, *C.furcata*의 경우 비교적 깊은 수심(5-15 m)에 서식하는 종으로 465 nm 에서 가장 높은 성장률을 보였으며 640 nm 조사구에서는 성장 하지 못하였다. *C.furcata*에서 분리한 공생조류는 *Symbiodinium* sp. C3으로 공생산호의 수심 분포가 0-90 m으로 내염성을 우선적 특징으로 하므로(Riddle et al. 2016) C15의 내열성과는 다른 특성을 갖고 있다. 또한, 두 종의 파장별 산호 성장 시험의 640 nm 노출군에서 chlorophyll a의 정량의 차이가 났으며, *M. digitata*의 경우 chlorophyll a 의 양이 상승하였다(Fig 22. c, d), 단순히 *M. digitata*의 결과로만 봤을 때 chlorophyll a 가 *M. digitata*의 성장에 영향을 주지 못했다고 생각 했으나 Wijgerde et al. (2014) 나 Mass et al. (2010)의 연구에서 chlorophyll a 역시 산호의 성장 인자로 언급되어 있으며 실제 650 nm 을 최대 흡수 파장으로 하는 chlorophyll a의 특성상 640 nm 조사구에서 chlorophyll a의 양의 증가와 함께 성장률과 공생조류의 밀도 상승이 지속 된 것으로 보여진다.

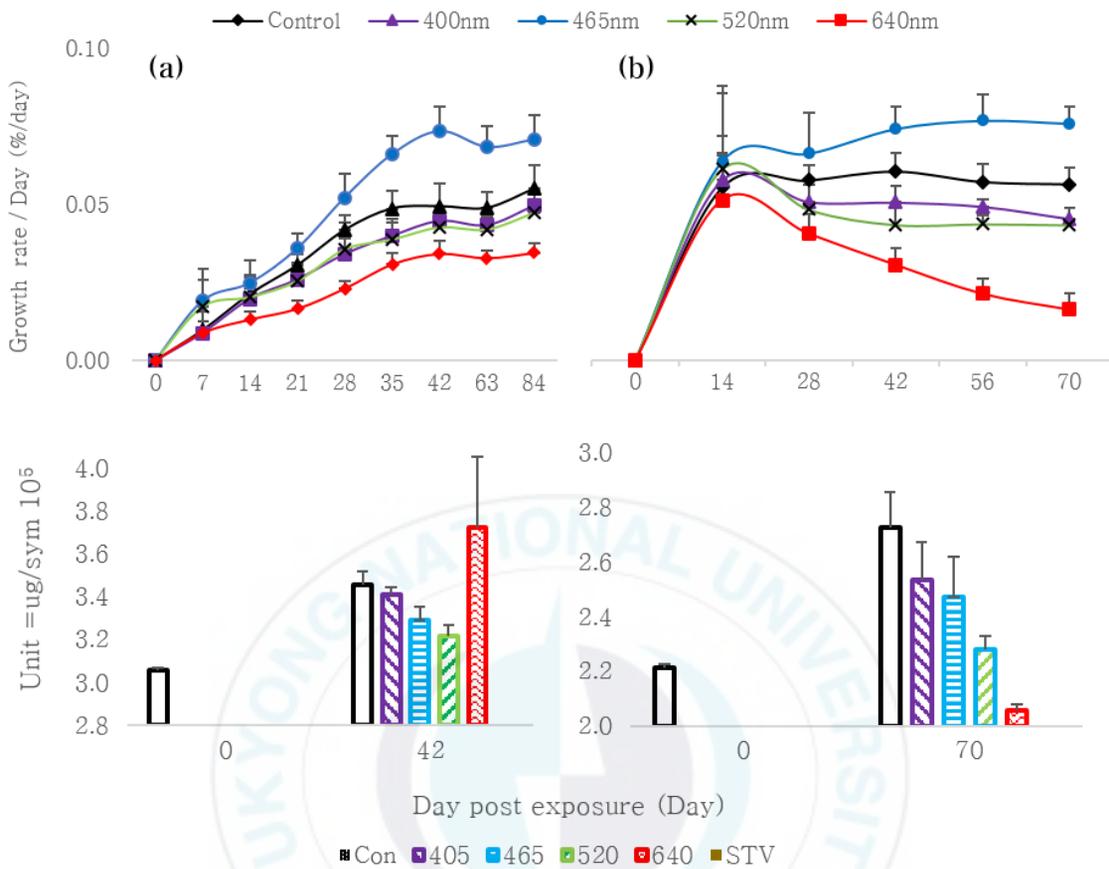
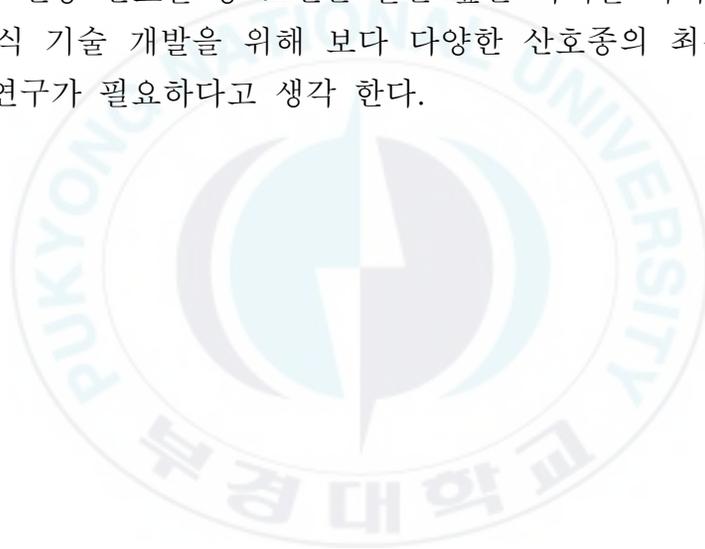


Figure 22. Graphs of daily growth rate and chlorophyll a concentration. (a) is daily growth rate of *M. digitata* under 5 LED wavelengths. (b) is daily growth rate of *C. furcata* under 5 LED wavelengths. (c) is the increase of chlorophyll a symbiodinium that extracted from *M. digitata*, cultured under 5 LED wavelengths. (d) is the increase of chlorophyll a symbiodinium that extracted from *C. furcata*, cultured under 5 LED wavelengths

파장별 산호의 성장 시험에서 가장 효과가 좋은 465 nm로 실시한 최적 광량 도출 시험에서는 광량 상승에 비례하여 *M. digitata*의 성장이 좋았다. 백색 LED 광과의 직접적 비교는 백색광의 광량이 465 nm의 최대 광량인 $400 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 과 근접하게 설정 되어 시험이 실시됨에 따라 백색광과 그 이하 광량의 465 nm 조사구의 성장률 직접적 비교는 하기 어려웠다. 그러나 465 nm의 $400 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 과 백색광을 비교했을 때 465 nm 파장이 유의 적으로 성장률이 높았으며 465nm 시험구들의 경우 광량에 비례하여 성장률이 도출 되었다. Kinzie et al. (1984) 에서 공생조류 내재 산호가 수심이 깊을수록 성장을 잘한다고 보고 하였다. 이유는 자연에서 수심이 깊을수록 도달하는 465 nm 파장대의 빛의 양이 상대적으로 많기 때문이라고 언급하였다. 본 연구에서는 수직 서심을 고정 조건으로 두고 광량을 차등적으로 조사 하였다. Wijgerde et al. (2014) 에서는 산호에 의한 공생조류 밀도 조절 (regulation) 이 광량이 셀수록 더 강하게 작용하며 이는 공생조류의 밀도 증가 및 산호 성장에 더 효과적이라고 하였다. 두 연구 결과와 맞물려 465 nm 파장의 광량이 강할수록 *M. digitata*의 성장이 잘 일어 났으며 이는 무게 증가와 함께 공생조류의 밀도 또한 동일하게 광량이 늘어날수록 증가하는 것도 관찰이 되어 *M. digitata*의 성장과 공생조류 증가는 광량에 비례한다는 결론을 도출 하였다. 그러나 자연에서 *M. digitata*의 광합성 기관이 기능 할 수 있는 광량의 한계가 $700 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Riddle et al. 2008)으로 알려져 있는 만큼 더 높은 광량의 시험이 요구 된다.

*M. digitata*의 최적 성장을 위한 광조건은 본 시험을 통해 465 nm 파장에서 $400 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 으로 산호 성장 시험에서 밝혀 졌다. 적정 파장과 광량에서 산호의 무게와 공생조류의 밀도 그리고 chlorophyll의 양이 증가 하였다. 또한 공생조류를 분리하여 실시한 인공 배양 시험에서도 465 nm 파장대에서 가장 높은 밀도 증가를 확인 하였다. 다양한 광조건에서 직접적인 광합성 양을 도출하거나 광주기별로 시험한다면 더욱 정확한 광조건을 도출 할 수 있으리라 보며, 도출된 광조건은 개인의 아쿠아리움 운용에서부터 상업적 대형아쿠아리움에 바로 적용할 수 있을 뿐 아니라

산호의 인공생산량을 증대 함에 있어 바로 적용이 가능할 것이다. 또한, 기존에 산호 성장을 억제 하는 것으로 알려진 적색광 (640 nm)에서 *M. digitata* 의 성장 및 공생조류 그리고 chlorophyll a의 양이 증가 한 결론을 도출함에 따라, 저수심 서식 산호의 장과장을 활용한 chlorophyll a의 전환 에 따른 증가율 또는 해양 생물의 chlorophyll a 광합성 기작에 대한 추가적 연구가 이루어진다면 백화현상을 이해하는데 도움이 되리라고 본다. 미국 기상청(NOAA)의 기후 예상에 따르면 남해 및 서해 해역도 2017년부터 백화 현상의 피해 지역에 포함 될 것으로 예상 된다. 백화 현상의 피해에 대한 자구책의 마련이 시급 한 상황이며 국내 자생 산호 및 매해 보고되는 신종 산호들 중 보전은 물론 높은 가치를 지니는 산호종 들에 대한 인공 양식 기술 개발을 위해 보다 다양한 산호종의 최적 성장 도출을 위한 광조건 연구가 필요하다고 생각 한다.



V . 요약

*Montipora digitata*는 채색이 매우 다양하여 높은 관상적 가치를 지닐 뿐만 아니라, 조초산호(Reef builder)를 이루는 주요 종으로 생태학적 가치가 매우 높다. 최근 기후 변화로 자연 개체수가 줄어 보다 효율적인 인공 생산 시스템의 개발 필요성이 날로 증대되고 있다. 본 연구에서는 LED 빛을 이용하여 *M. digitata*의 최적 성장을 유도하는 광조건을 도출하고자 하였다. *M. digitata* 조각 (n=30 평균 무게, 22.63 g ± 0.87) 을 이용하여 백색 복합 LED광을 조사한 대조군과 4개 파장 (405, 465, 520 및 640 nm) 을 각 수조에 조사한 4개의 실험구로 나눠 성장 시험을 실시 하였다. *M. digitata*은 465 nm 파장에서 3.1 % (백색 LED 조사구 대비 p<0.001) 의 가장 높은 성장률을 기록하였으며, 이 산호에서 분리한 공생조류의 밀도와 chlorophyll (Chlorophyll α, Chlorophyll c2) 의 양 역시 465 nm에서 가장 많이 증가 하였다. 또한 *M. digitata*의 성장에 필요한 최적 광량을 알아보기 위해 465nm 파장의 LED를 다음과 같이 4가지(60, 125, 250 및 400 μ·mol photons·m⁻²·s⁻¹) 광량으로 실험한 결과, 성장은 광량과 비례하였으며 400 μ·mol photons·m⁻²·s⁻¹ 에서 유의적으로 가장 높은 성장률(4.16%; p<0.001) 유도하였다. 광량 실험 후 분리된 *Symbiodinium* sp. C15의 밀도와 chlorophyll의 총량 또한 465 nm 에서 가장 많이 증가하여 성장과 매우 높은 연관성을 나타내는 것으로 나타났다. 결론적으로 465nm가 *M. digitata*의 성장에 가장 효과적인 파장이었으며 광량이 높을수록 성장률도 높아졌다. 이는 *M. digitata*에 공생하는 *Symbiodinium* sp. C15의 내열성과 내광성의 특징과 연관된 것으로 보인다. 본 연구에서 도출된 LED의 광조건은 산호의 전시에 사용해도 무방할 뿐만 아니라 성장에도 도움이 되므로 향후 대량 생산시스템에 활용되어 산호 생산성 증대에 크게 기여할 것으로 기대된다.

VI . 감사의 글

항상 부족한, 늦깎이 제자에게 언제나 변함 없이 깊은 배려와 따뜻함이 담긴 가르치심으로 연구를 마무리 할 수 있게 해주신 스승님, 김도형 지도 교수님께 진심을 담은 존경과 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 부족한 제 논문에 세세한 지도와 편달을 주신 박원규 교수님과 강주찬 교수님께 깊은 감사 드립니다. 또한 많은 지도와 가르침을 주신 정준기 교수님, 정현도 교수님, 김기홍 교수님, 허민도 교수님께도 감사 드립니다.

늘 따뜻함으로 항상 관심 가져주시고 격려해 주신 전남대학교 김위식 교수님과 김종오 박사님 부경대학교 이무근 박사님과 우승호 박사님께 감사 드리며, 지난 2년 반 동안 모자란 오빠, 형임에도 가족과도 같이 모든 순간을 함께 해준 어병예방학 실험실 식구들 Luan, 아란, 남은, 윤진, Ebrahim, 히혜홍, 윤향, 선경, 정은, 현아, 민진에게도 고마운 마음을 전합니다.

또한 산호 연구의 시작부터 끝까지 많은 조언을 주신 준영 형님, 늘 좋은 산호 구해주느라 고생하신 MS aqua 민수 형님, 산호 관련 늘 좋은 source를 제공해주신 부산 아쿠아리움 은섭이, 많은 시간 수다에 힘을 쏟아준 혁진이 그리고 여수 팸 동생들, 틈틈이 전화로, 출장 방문으로 친구의 떨어지는 사기를 북돋워 준 호상 이에게도 고마운 마음을 전합니다.

끝으로 언제나 힘이 되어 주는 사랑하는 아내 선경, 멀리서 공부하는 아빠를 항상 이해 해주는 아빠의 보물 지온이와 소율이 늘 보고 싶고 사랑해, 부족한 아들 항상 뒷바라지 해주시고 도움 주시는 아버지, 어머니, 장인어른, 장모님과 고모 노릇 해주느라 바쁜 여동생들, 하늘이 은혜에게도 사랑과 감사 그리고 미안한 마음을 전합니다.

VII . 참고문헌

- Adamskaya, N., Dungal, P., Mittermayr, R., Hartinger, J., Feichtinger, G., Wassermann, K., ... & van Griensven, M. (2011). Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats. *Injury*, 42(9), 917–921.
- Baker, A. C., & Rowan, R. (1997, June). Diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) in scleractinian corals of the Caribbean and eastern Pacific. In *Proc 8th Int Coral Reef Symp* (Vol. 2, pp. 1301–1306).
- Baker, A. C. (2003). Flexibility and specificity in coral–algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of Symbiodinium. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 661–689.
- Baker, A. C., Starger, C. J., McClanahan, T. R., & Glynn, P. W. (2004). Coral reefs: corals' adaptive response to climate change. *Nature*, 430(7001), 741–741.
- Baker, A. C., Glynn, P. W., & Riegl, B. (2008). Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long–term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuarine, coastal and shelf science*, 80(4), 435–471.
- Chang, S. S., Prezelin, B. B., & Trench, R. K. (1983). Mechanisms of photoadaptation in three strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*. *Marine Biology*, 76(3), 219–229.

- Carlos, A. A., Baillie, B. K., Kawachi, M., & Maruyama, T. (1999). Phylogenetic position of Symbiodinium (Dinophyceae) isolates from tridacnids (Bivalvia), cardiids (Bivalvia), a sponge (Porifera), a soft coral (Anthozoa), and a free-living strain. *Journal of Phycology*, 35(5), 1054–1062.
- Cha Ha–Rim. (2001). Taxonomy of two subtribes, Mesomyaria and Acontiarina (Anthozoa, Actiniaria) in Korea. *Animal Systematics, Evolution and Diversity*, 17(1), 91–113.
- Cho, I. Y., Kang, D. W., Kang, J., Hwang, H., Won, J. H., Paek, W. K., & Seo, S. Y. (2014). A study on the biodiversity of benthic invertebrates in the waters of Seogwipo, Jeju Island, Korea. *Journal of Asia–Pacific Biodiversity*, 7(1), e11–e18.
- CLIMATE COUNCIL, (2015). AUSTRALIA’S CORAL REEFS UNDER THREAT FROM CLIMATE CHANGE.
<http://www.climatecouncil.org.au/> . Released PDF booklet
- CSIRO and BoM (2015) Climate change in Australia: Projections for Australia’s NRM regions. Technical Report, 216pp.
- Dana riddle (2008) Feature Article: Montipora digitata: A Stony Coral for All Hobbyists. *Advancedaquarist* Accessed at:
<http://www.advancedaquarist.com/2008/1/aafeature2>
- Dana riddle (2016) An Update on Symbiodinium Species and Their Hosts. *Advancedaquarist* Accessed at:
<http://www.advancedaquarist.com/2016/2/aafeature>

D'Angelo, C., Denzel, A., Vogt, A., Matz, M. V., Oswald, F., Salih, A., ... & Wiedenmann, J. (2008). Blue light regulation of host pigment in reef-building corals. *Marine Ecology Progress Series*, 364, 97–106.

Emanuel K (2005) Increasing destructiveness of tropical cyclones over the past 30 years. *Nature* 436, 686–688

Forcioli, D., Merle, P.–L., Caligara, C., Ciosi, M., Muti, C., Francour, P., Cerrano, C. and Allemand, D. (2011). Symbiont diversity is not involved in depth acclimation in the Mediterranean sea whip *Eunicella singularis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 439, 57–71.

Gattuso JP, Magnan A and Billé A (2015) Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO₂ emissions scenarios. *Science*, 349:45

GBRMPA (Great Barrier Reef Marine Park Authority) (2016a) Coral bleaching. Updated: 15 April 2016. Accessed <http://www.gbrmpa.gov.au/media-room/coral-bleaching>.

GBRMPA (2016b) Map of observed bleaching as at 15 April 2016. Accessed at http://www.gbrmpa.gov.au/__data/assets/pdf_file/0009/246384/GD-2016-0040-BleachingStatus-AsAt15-April-2016.pdf.

GBRMPA (2016c) Managing the Reef: Coral bleaching. Accessed at <http://www.gbrmpa.gov.au/managing-thereef/threats-to-the-reef/climate-change/what-does-this-mean-for-species/corals/what-is-coral-bleaching>.

Glynn, P. W., Maté, J. L., Baker, A. C., & Calderón, M. O. (2001). Coral bleaching and mortality in Panama and Ecuador during the 1997–1998 El Niño–Southern Oscillation event: spatial/temporal patterns and comparisons with the 1982–1983 event. *Bulletin of Marine Science*, 69(1), 79–109.

Gorbunov MY, Kolber ZS, Lesser MP, Falkowaski PG (2001) Photosynthesis and photoprotection in symbiotic corals. *Limnol Oceanogr* 46:75–85

Hoegh–Guldberg O et al. (2014) The Ocean. In: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Barros VR et al. (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1655–1731.

James W. Fatherree et al. (2011) Aquarium Invertebrates: A Trip to an Indonesian Coral and Clam Farm. *Advancedaquarist* Accessed at: <http://www.advancedaquarist.com/2011/9/inverts>

Jeffrey, S. T., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanz BPP*.

Kinzie III, R. A., Jokiel, P. L., & York, R. (1984). Effects of light of altered spectral composition on coral zooxanthellae associations and on zooxanthellae in vitro. *Marine Biology*, 78(3), 239–248.

- LaJeunesse, T. C. (2001). Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a “species” level marker. *Journal of Phycology*, 37(5), 866–880.
- LaJeunesse, T., W. Loh, R. vanWoesik, O. Hoegh–Guldberg, G. Schmidt and W. Fitt, (2003). Low symbionts diversity in southern Great Barrier Reef corals, relative to those in the Caribbean. *Limnol. Oceanogr.*, 48(5):2046–2054.
- LaJeunesse, T., R. Bhagooli, M. Hidaka, L. de Vantier, T. Done, G. Schmidt, W. Fitt and O. Hoegh–Guldberg, (2004). Closely related *Symbiodinium* species differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental latitudinal and biogeographical gradients. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 284: 147–161.
- LaJeunesse, T. C. (2005). “Species” radiations of symbiotic dinoflagellates in the Atlantic and Indo–Pacific since the Miocene–Pliocene transition. *Molecular Biology and Evolution*, 22(3), 570–581.
- Lobban, C., Schefter, M., Simpson, A., Pochon, X., Pawlowski, J., & Foissner, W. (2002). *Maristentor dinoferus* n. gen., n. sp., a giant heterotrich ciliate (Spirotrichea: Heterotrichida) with zooxanthellae, from coral reefs on Guam, Mariana Islands. *Marine Biology*, 140(2), 411–423.
- Mass, T., Genin, A., Shavit, U., Grinstein, M., & Tchernov, D. (2010a). Flow enhances photosynthesis in marine benthic autotrophs by increasing the efflux of oxygen from the organism to the water.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(6), 2527–2531.

Mass, T., Kline, D. I., Roopin, M., Veal, C. J., Cohen, S., Iluz, D., & Levy, O. (2010b). The spectral quality of light is a key driver of photosynthesis and photoadaptation in *Stylophora pistillata* colonies from different depths in the Red Sea. *Journal of Experimental Biology*, 213(23), 4084–4091.

McClanahan, T. R., Maina, J., Moothien–Pillay, R., & Baker, A. C. (2005). Effects of geography, taxa, water flow, and temperature variation on coral bleaching intensity in Mauritius. *Marine Ecology Progress Series*, 298, 131–142.

Migaud, H., Cowan, M., Taylor, J., & Ferguson, H. W. (2007). The effect of spectral composition and light intensity on melatonin, stress and retinal damage in post–smolt Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 270(1), 390–404.

Moon, H. W., & Song, J. I. (2008). Taxonomy of the black coral family Antipathidae (Anthozoa: Antipatharia) from Korea. *Animal Systematics, Evolution and Diversity*, 24(2), 209–214.

NASA (National Aeronautics and Space Administration) (2015) 2014 warmest year in modern record. Accessed at <http://climate.nasa.gov/news/2221/>.

NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) (2015a) NOAA declares third ever global coral bleaching event: Bleaching

intensifies in Hawaii, high ocean temperatures threaten Caribbean corals. October 8, 2015. Accessed at <http://www.noaanews.noaa.gov/stories2015/100815-noaa-declares-third-ever-global-coralbleaching-event.html>.

NOAA. (2015c). Coral Reef Watch: Four-Month Coral Bleaching Thermal Stress Outlook. NOAA Coral Reef Watch – 6 Oct 2015 – 60% Probability Coral Bleaching Thermal Stress for Feb–May 2016. Accessed at: http://www.orbit.nesdis.noaa.gov/star/news2015_201510_WorldCoralBleaching.php.

NOAA (2016) NOAA Optimum Interpolation Sea Surface Temperature Analysis. Latest Plots and Plot Archives: Tropical Pacific Weekly Mean and Anomaly Plot Archive. Observed sea surface temperature anomaly (7-day average centred on 2 March 2016) relative to 1971–2000. Accessed at: http://www.emc.ncep.noaa.gov/research/cmb/sst_analysis/images/archive/weekly_TPAC/tpacv2_20160302.png.

Omata, T., Suzuki, A., Sato, T., Minoshima, K., Nomaru, E., Murakami, A., ... & Maruyama, T. (2008). Effect of photosynthetic light dosage on carbon isotope composition in the coral skeleton: Long-term culture of *Porites* spp. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 113(G2).

Osinga, R., Schutter, M., Griffioen, B., Wijffels, R., Verreth, J.J., Shafir, S., Henard, S., Taruffi, M., Gili, C., Lavorano, S., 2011. The biology and economics of coral growth. *Marine Biotechnology* 13, 658–671.

- Paschoal, M. A., Tonon, C. C., Spolidório, D. M., Bagnato, V. S., Giusti, J. S., & Santos–Pinto, L. (2013). Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 10(3), 313–319.
- Pawlowski, J. A. N., HOLZMANN, M., FAHRNI, J. F., POCHON, X., & LEE, J. J. (2001). Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid foraminifera: 2. Dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(3), 368–373.
- Pochon, X., Pawlowski, J., Zaninetti, L., & Rowan, R. (2001). High genetic diversity and relative specificity among *Symbiodinium*–like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans. *Marine Biology*, 139(6), 1069–1078.
- Pochon, Xavier, T. C. LaJeunesse, and J. Pawlowski. "Biogeographic partitioning and host specialization among foraminiferan dinoflagellate symbionts (*Symbiodinium*; Dinophyta)." *Marine Biology* 146.1 (2004): 17–27.
- Pochon, X., Montoya–Burgos, J. I., Stadelmann, B., & Pawlowski, J. (2006). Molecular phylogeny, evolutionary rates, and divergence timing of the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 38(1), 20–30.
- Pochon, X., & Gates, R. D. (2010). A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Molecular phylogenetics and evolution*, 56(1), 492–497.
- Reimer, J. D., Kim, S., Arai, S., Keshavmurthy, S., & Choi, K. S. (2016).

First records of zooxanthellate *Zoanthus* (Anthozoa: Hexacorallia: Zoantharia) from Korea and Japan (East) Sea. *Marine Biodiversity*, 1–5.

Rhyne, A.L., Tlusty, M.F., Kaufman, L., 2012. Long-term trends of coral imports into the United States indicate future opportunities for ecosystem and societal benefits. *Conservation Letters* 5, 478–485.

Richier, S., Merle, P. L., Furla, P., Pigozzi, D., Sola, F., & Allemand, D. (2003). Characterization of superoxide dismutases in anoxia- and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1621 (1), 84–91.

Rodriguez-Lanetty, M., Cha, H. R., & Song, J. I. (2002). Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates associated with anthozoans from Korean waters. *Order*, 100(3).

Rodriguez-Lanetty, M., Krupp, D. A., & Weis, V. M. (2004). Distinct ITS types of *Symbiodinium* in Clade C correlate with cnidarian/dinoflagellate specificity during onset of symbiosis. *Marine Ecology Progress Series*, 275, 97–102.

Rodriguez-Lanetty, M., Cha, H. R., & Song, J. I. (2002). Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates associated with anthozoans from Korean waters. *Order*, 100(3).

Rowan, R. O. B., & Powers, D. A. (1991). A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science*, 251(4999), 1348–1351.

Rowan, R., & Knowlton, N. (1995). Intraspecific diversity and ecological

zonation in coral–algal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 2850–2853.

Rowan, R., Knowlton, N., Baker, A., & Jara, J. (1997). Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature*, 388(6639), 265–269.

Rowan, R. (2004). Coral bleaching: thermal adaptation in reef coral symbionts. *Nature*, 430(7001), 742–742.

Russell, B. A., Kellett, N., & Reilly, L. R. (2005). A study to determine the efficacy of combination LED light therapy (633 nm and 830 nm) in facial skin rejuvenation. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 7(3–4), 196–200.

Shin, H. S., Lee, J., & Choi, C. Y. (2012). Effects of LED light spectra on the growth of the yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii*. *Fisheries science*, 78(3), 549–556.

Song, J. I. (1982). A Study on the Classification of the Korean Anthozoa: 7. Scleractinia (Hexacorallia). *The Korean Journal of Zoology*, 25(3), 131–148.

Timotius Silvanita. (2009). A Review on Ornamental Coral Farming Effort in Indonesia. *The International Ocean Science, Technology and Policy Symposium 2009 World Ocean Conference 2009 Manado*, 12–14 May 2009

Van Oppen, M. J., Palstra, F. P., Piquet, A. M. T., & Miller, D. J. (2001).

Patterns of coral–dinoflagellate associations in *Acropora*: significance of local availability and physiology of Symbiodinium strains and host–symbiont selectivity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1478), 1759–1767.

Van Oppen, M. J. (2004). Mode of zooxanthella transmission does not affect zooxanthella diversity in acroporid corals. *Marine Biology*, 144(1), 1–7.

Vieira, C., Keshavmurthy, S., Ju, S. J., Hyeong, K., Seo, I., Kang, C. K., ... & Choi, K. S. (2016). Population dynamics of a high–latitude coral *Alveopora japonica* Eguchi from Jeju Island, off the southern coast of Korea. *Marine and Freshwater Research*, 67(5), 594–604.

Villamizar, N., García–Alcazar, A., & Sánchez–Vázquez, F. J. (2009). Effect of light and photoperiod on the growth, development and survival of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 292(1), 80–86.

Villamizar, N., García–Mateos, G., & Sánchez–Vázquez, F. J. (2011). Behavioral responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and *Artemia* sp. exposed to constant light or darkness vs. light/dark cycles of white, red or blue wavelengths. *Aquaculture*, 317(1), 197–202.

Wang L–H, Liu Y–H, Ju Y–M, Hsiao Y–Y, Fang L–S, et al. (2008) Cell cycle propagation is driven by light–dark stimulation in a cultured symbiotic dinoflagellate isolated from corals. *Coral Reefs* 27:823–835.

Wijgerde, T., Houlbrèque, F., & Ferrier–Pagès, C. (2009). What do corals feed on?. Coral Science (www. coralscience. org).

Wijgerde, T., Diantari, R., Lewaru, M. W., Verreth, J. A., & Osinga, R. (2011). Extracoelenteric zooplankton feeding is a key mechanism of nutrient acquisition for the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*. *Journal of Experimental Biology*, 214(20), 3351–3357.

Wijgerde, T., Henkemans, P., & Osinga, R. (2012). Effects of irradiance and light spectrum on growth of the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*—Applicability of LEP and LED lighting to coral aquaculture. *Aquaculture*, 344, 188–193.

Wijgerde, T., Michaël Laterveer (2013) Feature Article: Coral growth under Light Emitting Diode and Light Emitting Plasma: a cross–family comparison *Advancedaquarist* Accessed at: <http://www.advancedaquarist.com/2013/2/aafeature>

Wijgerde, T., van Melis, A., Silva, C. I., Leal, M. C., Vogels, L., Mutter, C., & Osinga, R. (2014). Red light represses the photophysiology of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *PLoS one*, 9(3), e92781.

XL Catlin Seaview Survey. (2015). Scientists Confirm Global Coral Bleaching Event for 2015 – Bleaching reports in the Caribbean lead to announcement for only the third time in recorded history. XL Catlin Seaview Survey. October 8, 2015

Yentsch, C. S. (1962). Measurement of visible light absorption by particulate matter in the ocean. *Limnology and Oceanography*, 7(2), 207–217

Zamoum, T., & Furla, P. (2012). Symbiodinium isolation by NaOH treatment. *Journal of Experimental Biology*, 215(22), 3875–3880.

Zhao, Y., Wang, J., Zhang, H., Yan, C., & Zhang, Y. (2013). Effects of various LED light wavelengths and intensities on microalgae-based simultaneous biogas upgrading and digestate nutrient reduction process. *Bioresource technology*, 136, 461–468.

권혜옥, 김진만, & 이식모. (2007). 갯녹음 해역의 해조장 복원 모듈. 한국해양환경공학회 창립 10주년 기념행사 및 2007년도 춘계학술대회 논문집, 71–76..

김성호, 양문호, 정민민, 김삼연, 김홍수, 김재우, & 한석중. (2011). [P-9] 수온, 염분, 파장별 해수관상생물 연산호 핑거레더 (*Sinularia* sp.) 의 성장과 생존. 2011년도 한국수산과학회 양식분과 학술대회, 64–64. 최임호, 김종식, 곽석남, 김성수, & 한명일. (2013). 갯녹음 발생 분포특성 및 효과조사 기법 고찰. 해양환경안전학회 2013년 춘계학술발표회, 308–311.

해양수산부. (2016). 2015년 해양생태계 서식처 기능 개선 및 복원사업 - 보호종 중 증식 복원 및 관리등 -. 분야의 2015년도 최종보고서. 발간등록번호 11-1192000-000611-10, 190–194.