



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

해양의 플랑크톤과 viral haemorrhagic
septicemia virus와의 상호작용에 관한
연구



윤 동 빈

이 학 석 사 학 위 논 문

해양의 플랑크톤과 viral haemorrhagic
septicemia virus와의 상호작용에 관한
연구

지도교수 김 도 형

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2020년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

윤 동 빈

윤동빈의 이학석사 학위논문을 인준함.

2020년 8월 28일



위원장 이학박사 김기홍 (인)

위원 이학박사 김광일 (인)

위원 이학박사 김도형 (인)

목 차

목차	i
Abstract	iii
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	4
2.1. 사용된 식물, 동물플랑크톤 및 배양조건	4
2.1.1. 식물플랑크톤 (<i>Chlorella</i> sp., <i>Skeletonema coastatum</i>)	4
2.1.2. 동물플랑크톤 (Rotifer, <i>Brachionus rotundiformis</i>)	4
2.2. 바이러스의 배양 및 정량법	5
2.2.1. 사용된 바이러스 및 배양조건	5
2.2.2. RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR	5
2.2.3. TCID ₅₀ 을 이용한 virus titer 분석	6
2.3. 식물플랑크톤과 VHSV의 상호작용 분석	7
2.3.1. 식물플랑크톤에 존재하는 VHSV의 정량	7
2.3.2. 식물플랑크톤에 존재하는 VHSV의 활성 분석	7
2.3.3. <i>Chlorella</i> sp.에 부착 혹은 내재화된 VHSV의 확인	8
2.4. Rotifer와 VHSV의 상호작용 분석	9
2.4.1. Rotifer와 VHSV의 co-culture	9
2.4.2. Rotifer에 VHSV가 부착 혹은 내재화된 <i>Chlorella</i> sp. 급이	10
2.5. 통계분석	10

3. 결과	11
3.1. 식물플랑크톤과 VHSV의 상호작용 분석	11
3.1.1. <i>Chlorella</i> sp.와 <i>Skeletonema costatum</i> 에 부착 또는 내재화된 VHSV의 정량	11
3.1.2. <i>Chlorella</i> sp.와 <i>Skeletonema costatum</i> 에 부착 또는 내재화된 VHSV의 활성 분석	14
3.1.3. VHSV의 <i>Chlorella</i> sp.에 부착 또는 내재화 가능성 분석	17
3.1.4. <i>Chlorella</i> sp.에 내재화된 VHSV의 활성 분석	23
3.2. Rotifer와 VHSV의 상호작용 분석	25
3.2.1. Rotifer에 부착 또는 내재화된 VHSV의 정량	25
3.2.2. Rotifer에 부착 또는 내재화된 VHSV의 활성 분석	29
4. 고찰	32
5. 결론	39
6. 참고문헌	42

Studies on interactions between marine plankton and viral haemorrhagic septicemia virus

Dong-Bin Yun

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Planktons and viruses are the important biotic components in the marine and freshwater ecosystems, but there are only a few studies reported on the effects of co-existence of them. Some studies have reported that plankton might serve as a transmission vector for viral diseases. Therefore, this study aimed to investigate the interaction between some types of plankton and viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV). In this study, two types of phytoplankton including *Skeletonema costatum* and *Chlorella* sp, and one type of zooplankton, Rotifer (*Branchionus plicatilis*) commonly used for feed in the laval stage of farmed fish. The phytoplankton and zooplankton were cultivated in F/2 medium at 20 °C and sterilized seawater at 25 °C, respectively. Each phytoplankton at two different concentrations (10^5 , 10^6 cells mL^{-1}) were co-cultured with VHSV (10^5 , 10^6 copies mL^{-1}) at 20 °C for up to 16 days. Rotifer (50 ind. mL^{-1}) was fed with *Chlorella* sp. (3.1×10^7 cells mL^{-1}) co-cultured with VHSV (10^6 copies mL^{-1}) and co-cultured with VHSV (10^5 copies mL^{-1}) without plankton harbored at 20 °C for 3 days. The mixture of each plankton and VHSV was separated into supernatant and pellet after centrifugation (4000xg 5min at 20 °C). From each subsample set, VHSV was quantified by

real-time PCR, and also viral activity was analyzed using TCID₅₀ method. Approximately 6.2×10^3 , 5.2×10^3 copies of VHSV were measured in the pellet containing phytoplankton up to 4 days and the virus was active as each phytoplankton pellet showed 3.5×10^3 , 5.2×10^3 TCID₅₀ pellet⁻¹, respectively. In *Chlorella* sp. co-cultured with VHSV, VHSV concentration in the pellet was decreased from 10^5 to 10^4 pellet⁻¹ for 16 days. The virus concentration in rotifer that has been fed with co-culture of VHSV plus *Chlorella* sp. for 3 days were 10^1 and 10^3 copies rotifer⁻¹ on day 1 and day 3, respectively. VHSV concentration in rotifer that has been co-cultured with VHSV without plankton harbored 10^4 and 10^5 rotifer⁻¹ at day 1 and 3, respectively. Based on the results of this study, it seems that VHSV could internalized into *Chlorella* sp. although it is unable to proliferate inside the plankton. This study shows that plankton can act as a transmission vector for VHS, and virus in the marine environment could be accumulated in the upper trophic level and may be involved in disease transmission.

1. 서론

식물플랑크톤은 기초생산자로 빛 에너지를 합성을 통해 해양생태계 물질순환의 기반이 되는 생물군이며(Yoon, 2015), 동물플랑크톤의 주요 먹이 공급원으로서 상위 영양단계로 에너지를 전달하는 bottom up controller로서의 역할을 한다(Lo et al., 2004). 또한 전 지구적인 탄소순환에 있어 중요한 역할을 한다. 일부 동·식물플랑크톤은 어류의 자치어와 갑각류의 초기 먹이 생물로 이용되는 중요한 먹이생물이다. 그 중 *Chlorella* 종은 지질을 통하여 바이오에너지를 생산하고자 하는 다양한 연구가 이루어지고 있고(Cho et al., 2011; Lee et al., 2012; Singh et al., 2013), 특히 넙치 자어 육성에 필요한 Rotifer와 같은 먹이생물 배양에 주로 이용되고 있다(국립수산과학원 넙치양식표준지침서, 2006). 우리나라 연안에 분포하는 식물플랑크톤의 군집에는 *Skeletonema costatum* 종과 같은 규조류들이 우점하여 분포하고 있다(Yoon, 2016; Kim et al., 2016). 또한 제주 바다목장 해역의 군집은 마찬가지로 규조류종이 높게 우점하여 나타나고 다음으로 편모조류종이 분포하고 있는 것으로 보고되었다(Yoon, 2015).

일차생산자의 상위포식자인 동물플랑크톤은 해양생태계 내에서 일차생산자와 상위 영양단계인 수산 및 어류 자원을 연결하는 중요한 중간고리 역할을 담당하고 있다(Raymont 1983; Runge 1988). 이 중 Rotifer (*Branchionus plicatilis*)와 *Artemia* (brine shrimp)는 여러 양식 수산생물종의 종묘 생산용 초기 먹이로 널리 이용되고 있다. 이러한 동물플랑크톤은 해양에서 일어나는 물리, 화학, 생물학적 요인에 민감하게 반응하기 때문에 환경 변화의 지시자로 인식되어 해양생태계 연구에 널리 이용된다(Mackas et al., 2001).

우리나라 수산생물질병관리법에서 전염병으로 정하고 있는 바이러스성출혈성패혈증(viral haemorrhagic septicaemia virus, VHS)은 Family *Rhabdoviridae*, Genus *Novirhabdovirus*에 속하는 RNA 바이러스인 바이러스성출혈성패혈증바이러스(viral haemorrhagic septicaemia virus, VHSV)에 의한 질병으로 OIE에서도 보고성 질병으로 지정하고 있다(OIE, 2019). VHSV는 1963년 덴마크에서 담수양식을 하던 무지개송어에서 처음 보고된 이후로(Jensen, 1963), 유럽 뿐만 아니라 1980년대 후반 이후 북미와 아시아지역을 비롯하여 전 세계 각지에 담수와 해산 어류에 피해를 입히는 질병이다(Jensen et al., 1979; Brunson et al., 1989; Winton et al., 1989; Meyers & Winton, 1995; Skall et al., 2005; European Food Safety Authority, 2008). 우리나라의 경우 2001년에 최초로 보고된 이후부터 저수온기에 넙치양식장에 지속적으로 경제적 피해를 입히고 있으므로(Kim et al., 2003) 양식장의 질병 발생 빈도를 줄이기 위한 다각적인 노력이 필요한 실정이다.

최근 연구에서는 수계에 존재하는 플랑크톤이 virus의 vector로 작용할 가능성이 확인되고 있다. 예를 들어, 일본의 Biwa호 내에 존재하는 식물플랑크톤과 동물플랑크톤으로부터 Koi herpesvirus; Cyprinid herpesvirus-3 (KHV)가 검출되었고(Minamoto et al., 2011), 새우의 먹이생물로 주로 이용되는 brine shrimp (*Artemia* sp.)와 같은 동물플랑크톤은 white spot syndrome virus (WSSV), infectious myonecrosis virus (IMNV) 같은 바이러스의 vector로 작용할 수 있음을 보고하였다(Sahul Hameed et al., 2002; da Silva SM et al., 2015). Mortensen 등(1993)은 infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)가 검출된 노르웨이의 turbot (*Scophthalmus maximus*) 양식장 주변 환경에 서식하는 *Artemia*에서 바이러스가 검출되었고, *Diporeia* spp. (*Pontoporeiidae*, Amphipoda)에서

활성을 지닌 IVb type의 viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV)가 검출되었다(Faisal et al., 2011). 앞의 여러 연구들을 종합했을 때, 해양의 플랑크톤들은 어류, 갑각류 바이러스성 질병의 vector로 작용할 가능성이 높을 것으로 보이나 현재 우리나라에서 이와 관련된 연구가 부족한 실정이다.

그러므로 본 연구의 목적은 넙치의 먹이생물로 널리 이용되는 Rotifer와 *Chlorella* sp. 그리고 우리나라 연안해역에 많이 존재하는 *Skeletonema costatum*이 VHS의 vector 역할 가능성을 다양한 조건의 co-culture와 활성 분석 실험을 통해 알아보려고 하였다.



2. 재료 및 방법

2.1. 사용된 식물, 동물플랑크톤 및 배양조건

2.1.1 식물플랑크톤 (*Chlorella* sp., *Skeletonema costatum*)

식물플랑크톤 (*Chlorella* sp., *Skeletonema costatum*)은 한국해양과학기술원 (Korea Institute of Ocean Science & Technology, KIOST) 해양시료도서관에서 분양받아 사용하였다. 미세조류의 배양은 Guillard and Ryther 1962, Guillard, 1975의 방법을 따라 artificial seawater (35 psu)에 500 μ l F/2 2000X (AlgaeBoost, Australia)를 첨가하여 F/2 medium을 제조하고 미세조류 배양에 사용하였다. 배양 조건은 20℃의 온도로 설정된 배양기에 광량은 20 μ mol $m^{-2}s^{-1}$, 광주기는 10L:14D, 조건의 백색광을 설치하여 배양하였다. 식물플랑크톤의 cell density는 hemocytometer를 이용하여 실체 현미경 하에서 200X 배율로 측정하였다.

2.1.2 동물플랑크톤 (Rotifer, *Brachionus rotundiformis*)

동물플랑크톤 (Rotifer, *Brachionus rotundiformis*)은 우리나라 경상남도 통영 소재의 청경(Rotifer 배양업체)에서 살아있는 해수산 Rotifer를 구매하였고 자연 해수를 121℃, 10min 간 고압증기 멸균한 해수를 이용하여 25℃에 순치시켜 실험에 사용하였다. 동물플랑크톤의 cell density는 Sedgewick-Rafter Counting Chamber를 이용하여 실체 현미경 하에서 40X 배율로 측정하였다.

2.2. 바이러스의 배양 및 정량법

2.2.1. 사용된 바이러스 및 배양 조건

본 연구에서 사용한 바이러스는 부경대학교 김기홍 교수님 연구실에서 분양받은 viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) KJ2008 strain IVa type)을 이용하였다. 먼저 바이러스 배양을 위해 Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell을 10% 농도의 fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), 1% 농도의 150 IU/mL penicillin G, and 100 µg/mL streptomycin (P/S, Gibco, USA)이 첨가된 L-15 medium (Leibovitz, Sigma-aldrich, United Kingdom)를 이용하여 배양하였고 세포는 온도는 28°C로 설정된 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 3일간 배양된 EPC cell을 도립 현미경을 이용하여 monolayer를 확인하고 old medium을 제거한 다음 2% 농도의 FBS, 1% 농도의 P/S가 첨가된 L-15 medium을 새로 첨가한 후에 200 µl의 바이러스를 접종하였다. 15 °C에 7일간 배양한 후에 90% 정도의 cytopathic effects (CPE)를 확인하였다. VHSV가 포함된 상층액을 4000xg, 10min 그리고 온도는 4 °C의 조건으로 원심분리를 하여 syringe filter (0.45 µm)를 이용하여 여과하였다. 바이러스는 실험에 사용되기 전까지 -80°C에 보관하였다.

2.2.3. RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR

Total RNA는 TRIzol reagent (Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 RNA를 추출 하였다. 5 µL Total RNA에 1 µL DEPC water, 2 µL N gene Forward primer (10 µM), 2 µL N gene Reverse primer (10 µM)를 첨가하여 N gene PCR (58°C for 10min) 실시하였다. 그 후 MMLV reverse transcription kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 10 µL의 PCR산물에

4 μ L의 5 \times reaction buffer, 2 μ L DTT, 2.5 μ L 10mM dNTP, 0.5 μ L Ribonuclease Inhibitor (Takara, Japan), 1 μ L MMLV reverse transcriptase를 첨가하여 역전사 PCR (40 $^{\circ}$ C for 60min, 95 $^{\circ}$ C for 5min)을 통해 20 μ L의 cDNA를 합성하였다. cDNA는 분석에 사용되기 전까지 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다. Real-time 정량 PCR은 AccuPower Plus Dualstar qPCR Master Mix (Bioneer, Korea)를 사용하였고 2 μ L의 cDNA에 12.5 μ L Dualstar Master Mix, 7.5 μ L DEPC water, 1 μ L taqman qPCR Forward primer (8 μ M), 1 μ L taqman qPCR Reverse primer (8 μ M), 1 μ L taqman qPCR probe (4 μ M)를 첨가하여 ExicyclerTM 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea)을 이용하여 실시하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation 처리 후, 94 $^{\circ}$ C에서 5초간 denaturation, 58 $^{\circ}$ C에서 10초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 15초간 extension의 조건으로 40 cycle을 진행하였다. VHSV의 copy number는 Pierce 등(2013)의 방법을 이용하여 분석하였다. Standard curve는 $10^8 \sim 10^1$ 까지 단계희석한 plasmid DNA를 이용하였고 바이러스 정량은 plasmid DNA copy 값(x)에 대한 Ct값(y)의 표준 회귀식은 $y = -3.3273x + 42.406$ 을 이용하였다.

2.2.3. TCID₅₀을 이용한 virus titer 분석

플랑크톤에 존재하는 바이러스의 활성도를 측정하는 방법으로 TCID₅₀를 이용하였다 (Reed and Muench, 1938). 96 well plate의 각 well당 L-15 medium (2% FBS+1% P/S)에 10^6 cells mL⁻¹ 농도의 EPC cell 현탁액 100 μ L를 분주하였다. 샘플은 10^{-7} 까지 희석한 다음 5반복으로 각 well당 100 μ L씩 접종하여 15 $^{\circ}$ C에 5일간 배양하고 나서 각 희석배수별로 접종시킨 well의 세포 단층을 관찰하고 CPE를 유무를 통해 감염된 well의 %를

계산하여 TCID₅₀ mL⁻¹ 단위로 바이러스를 정량하였다.

2.3. 식물플랑크톤과 VHSV의 상호작용 분석

2.3.1 식물플랑크톤에 존재하는 VHSV의 정량

두 종의 식물플랑크톤 (*Chlorella* sp., *Skeletonema costatum*)을 온도는 20 °C에 백색광, 광주기 10L:14D 그리고 광량은 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건으로 T25 flask에 배양하였다. VHSV는 두 종의 미세조류에 (2×10^5 copies mL⁻¹, 9×10^5 copies mL⁻¹)를 각각 접종하고 6, 24, 48 그리고 96시간 동안 배양하였다. 1 mL의 혼합액을 얻어 원심분리(4000xg, 5min at 20°C)를 하고 상층액(Supernatant)와 Pellet 샘플로 나누었고 Pellet 샘플은 phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2 to 7.4)로 2회 세척하고 난 후 TRIzol을 분주하였으며, RNA 추출 전까지 -80°C에 보관하였다.

2.3.2. 식물플랑크톤에 존재하는 VHSV의 활성 분석

두 종의 식물플랑크톤(*C* sp., *Skeletonema costatum*)을 온도는 20 °C에 백색광, 광주기 10L:14D 그리고 광량은 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건으로 T25 flask에 배양하였다. 그리고 두 종의 식물플랑크톤 (10^5 cells mL⁻¹)에 VHSV (1.98×10^6 TCID₅₀ mL⁻¹, 4.42×10^6 TCID₅₀ mL⁻¹)를 각각 접종하였다. 샘플링은 hpi 96에 실시하였고 샘플링 방법은 1 ml의 혼합액을 확보하고 원심분리 (4000xg, 5min)를 상온에서 실시하여 상층액을 제거하고 Pellet 샘플을 얻었다. Pellet 샘플은 1mL의 PBS로 2회 세척을 하고 1 ml의 L-15 medium (+2% FBS+1% P/S)를 분주하였고 분석 전까지 -80 °C에

보관하였다.

2.3.3. *Chlorella* sp.에 부착 혹은 내재화된 VHSV의 확인

Chlorella sp.를 온도는 20 °C에 백색광, 광주기 10L:14D 그리고 광량은 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 조건으로 T25 flask에 배양하였다. 그리고 *Chlorella* sp. (10^6 cells mL^{-1})에 VHSV (2.0×10^5 copies mL^{-1})를 접종하였고 20 °C에 배양하였다. *Chlorella* sp.에 부착 혹은 내재화된 VHSV를 확인하기 위해 샘플링 방법은 1mL의 혼합액을 샘플링하여 상온에서 원심분리(4000×g, 5min)를 실시하여 상층액과 Pellet 샘플로 나누었고 Pellet 샘플은 1mL의 PBS로 2회 세척을 하였다. Pellet 샘플에 TRIzol을 분주하고 10분간 vortex한 한 후에 원심분리(4000×g, 5min at 20 °C)를 하여 상층액(부착된 VHSV)과 Pellet (내재된 VHSV) 샘플로 분리하였다. 그 후 *Chlorella* sp.의 RNA를 추출하기 위해 Poong 등(2017)의 방법을 따라 Pellet (Internalized VHSV) 샘플을 액체질소에 1분간 처리하고 실온에서 녹인 후에 TRIzol을 분주하였고 RNA 추출 전까지 -80 °C에 보관하였다. 활성 분석을 위한 샘플은 Pellet에 L-15 medium (+2% FBS+1% P/S)를 분주하였고 분석 전까지 -80 °C에 보관하였다. 2차 실험(Exp. 2)은 *Chlorella* sp.를 내재화된 VHSV가 증식을 하는지 알아보려고 진행하였다. 샘플링 시간을 제외한 실험 방법은 1차 실험과 동일하게 진행하였다.

2.4 Rotifer와 VHSV의 상호작용 분석

2.4.1 Rotifer와 VHSV의 co-culture

Rotifer에 VHSV (1.4×10^5 copies mL⁻¹)를 접종하였고 25 °C에 배양하였다. 샘플링은 dpi 1 그리고 3 에 실시하였고 샘플링 방법은 5 ml의 혼합액을 50% EtOH로 고정시킨 뒤 원심분리 (4000×g, 5min at 25 °C)를 하고 상청액은 모두 제거하였다. Pellet은 멸균 해수를 이용하여 2회 세척 한 후에 1 ml의 TRIzol을 분주하고 RNA추출 전까지 -80 °C에 보관하였다. 그리고 활성도 분석은 1 그리고 3 dpi sample을 5 ml의 혼합액을 확보하고 원심분리 (4000×g, 5min at 25 °C)를 실시하여 Supernatant를 제거하고 Pellet 샘플을 얻었다. Pellet 샘플은 1 mL의 멸균해수로 2회 세척을 하고 1mL의 L-15 medium (+2% FBS+1% P/S)를 분주하였고 분석 전까지 -80 °C에 보관하였다.

2.4.2 Rotifer에 VHSV가 부착 혹은 내재화된 *Chlorella* sp. 급이

Chlorella sp.에 VHSV를 부착 또는 내재화시키기 위해 *Chlorella* sp. (3.1×10^6 cells mL⁻¹)에 VHSV (6.2×10^6 copies mL⁻¹)를 접종하여 20 °C에서 4일간 배양하였다. 4일간 배양한 후 *Chlorella* sp. + VHSV 혼합액을 확보하여 원심분리 (4000×g, 5min at 20 °C)를 통해 상청액을 모두 제거하고 멸균해수를 이용해서 pellet을 2회 세척하고 난 후 Rotifer에게 급이하였다. 그리고 *Chlorella* sp. + VHSV 혼합액을 이용하여 *Chlorella* sp.에 부착 혹은 내재화된 VHSV를 real-time PCR을 이용하여 검출 및 정량하였다. 샘플링은 dpi 1 그리고 3에 실시하였고 샘플링 방법은 5mL의 혼합액을 50% EtOH로 고정시킨 뒤 원심분리 (4000×g, 5min at 25 °C)를 하고 상청액은 모두 제거하였다. Pellet은 멸균 해수를 이용하여 2회 세척한 후에 1 mL의 TRizol을 분주하여 RNA 추출 전까지 -80 °C에 보관하였다. 그리고 활성도 분석을 위한 샘플은 5 mL의 혼합액을 멸균 해수로 2회 세척하는 과정까지 동일하게 실시한 후 1mL의 L-15 medium (+2% FBS+1% P/S)을 분주하였고 분석 전까지 -80 °C에 보관하였다.

2.5. 통계분석

SPSS v23.0 (IBM, NY, USA)을 통해 일원 분산 분석을 사용하여 통계적으로 데이터에 액세스 한 후 Turkey test를 수행하였고, $p < 0.05$ 일 때 실험 결과 값의 유의성을 보이는 것으로 판단하였고 그룹들 간에 유의한 차이가 다른 문자로 표시되었다.

3. 결과

3.1. 식물플랑크톤과 VHSV의 상호작용 분석

3.1.1. *Chlorella* sp.와 *Skeletonema costatum*에 부착 또는 내재화된 VHSV의 정량

96시간 동안 *Chlorella* sp.와 *Skeletonema costatum*의 농도는 각각 3.3×10^5 cells mL⁻¹과 1.4×10^5 cells mL⁻¹로 나타나 시간이 지나면서 증가하는 것을 확인하였다(Fig 1A, 2A). *Chlorella* sp.와 *S. costatum*에 존재하는 VHSV의 검출 및 정량 실험에 대한 결과는 Fig. 1과 2에 나타내었다. Control (VHSV in F/2 medium)과 VHSV + Phytoplankton (in F/2 medium)을 원심분리하여 얻은 상층액(Supernatant)에서 검출된 바이러스는 시간이 지나면서 약 10배 감소하는 것을 확인할 수 있었으나, Control과 식물플랑크톤 접종구간과 유의적인 차이는 존재하지 않았다 (Fig. 1A, 2A). Control의 Pellet에서는 바이러스가 검출되지 않았지만 VHSV + Phytoplankton의 Pellet에서는 10^3 copies pellet⁻¹의 VHSV가 확인되었다. Pellet 샘플에서 Control과 식물플랑크톤 접종구간과 유의적 차이가 확인되었다(Fig. 1B, 2B).

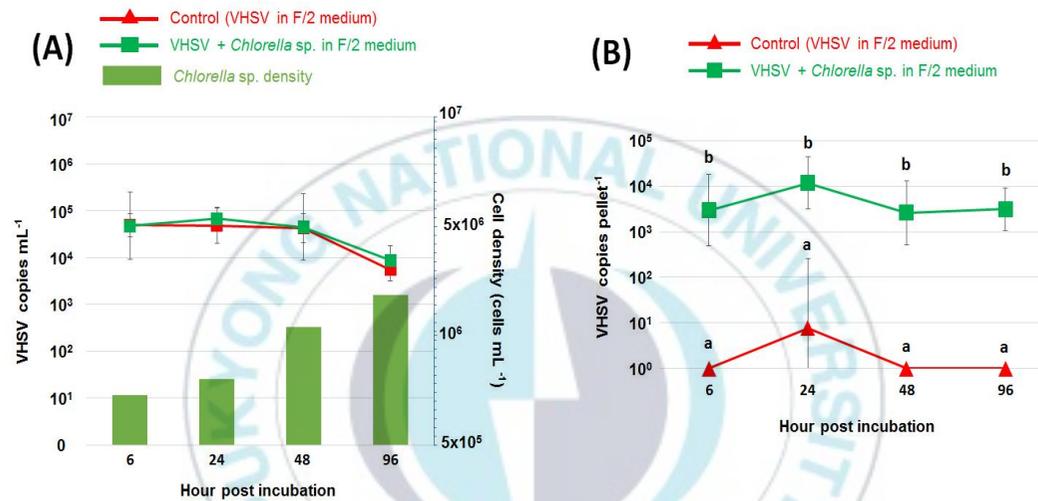


Fig. 1. Real-time PCR results of Plankton and VHSV co-culture experiment in the supernatant and pellet samples. X-axis represents the subsamples at different time intervals of 6, 24, 48 and 96 hours and Y1-axis represents VHSV copies mL⁻¹ and Y2-axis represents *Chlorella* sp. cell density (Cells mL⁻¹). (A) supernatant sample, (B) pellet sample and different letters indicate significant difference at p<0.05.

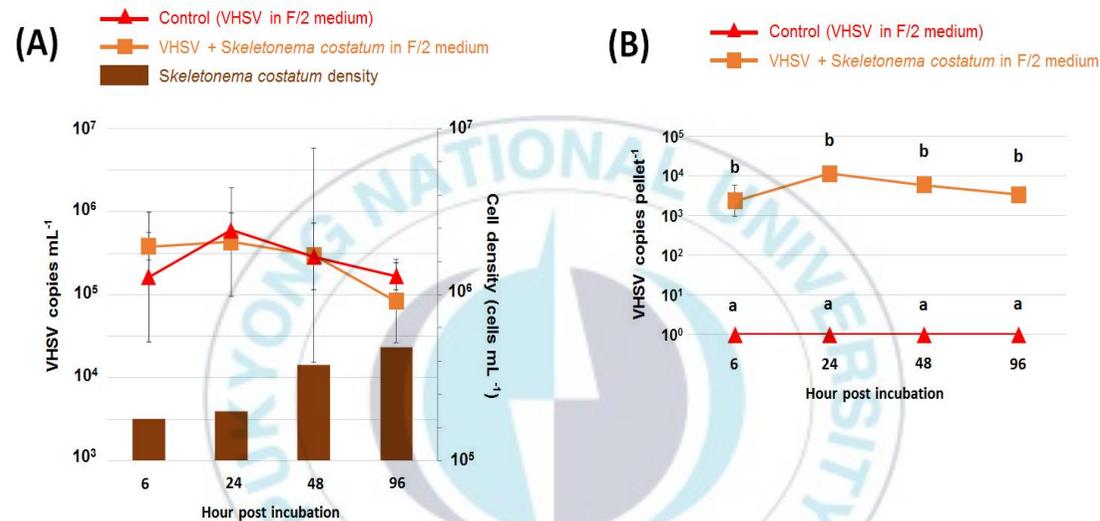
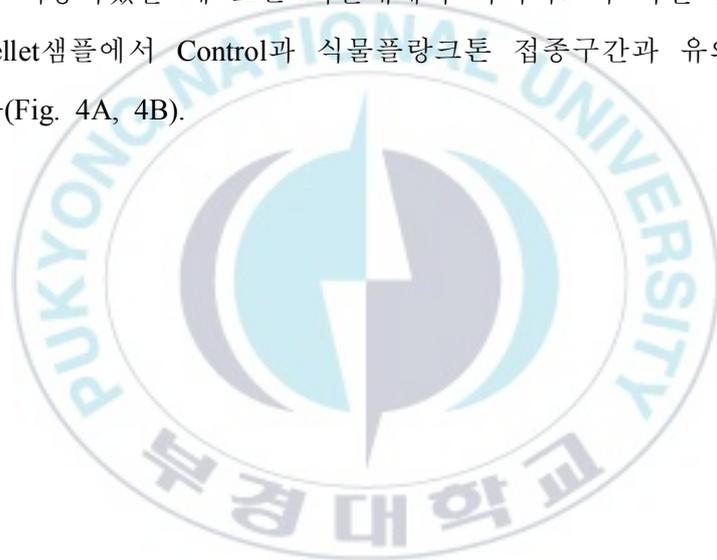


Fig. 2. Real-time PCR results of Plankton and VHSV co-culture experiment in the supernatant and pellet samples. X-axis represents the subsamples at different time intervals of 6, 24, 48 and 96 hours and Y1-axis represents VHSV copies mL⁻¹ and Y2-axis represents *S. costatum* cell density (Cells mL⁻¹). (A) supernatant sample, (B) pellet sample and different letters indicate significant difference at p<0.05.

3.1.2. *Chlorella* sp.와 *Skeletonema costatum*에 부착 또는 내재화된 VHSV의 활성 분석

Chlorella sp.와 *S. costatum*과 VHSV를 96시간동안 co-culture 한 후 얻은 Pellet에서는 모두 CPE가 확인되었고 Control의 Pellet에서는 확인되지 않았다(Fig. 3). 실험 기간 동안 식물플랑크톤 + VHSV의 Pellet에서 10^3 TCID₅₀ pellet¹이상의 바이러스가 확인되었고 real-time PCR 결과와 유사하게 나타났다. 그리고 Control의 Pellet에서는 TCID₅₀과 real-time PCR방법을 이용하였을 때 모든 시간대에서 바이러스가 확인 및 정량되지 않았다. Pellet샘플에서 Control과 식물플랑크톤 접종구간과 유의적 차이가 확인되었다(Fig. 4A, 4B).



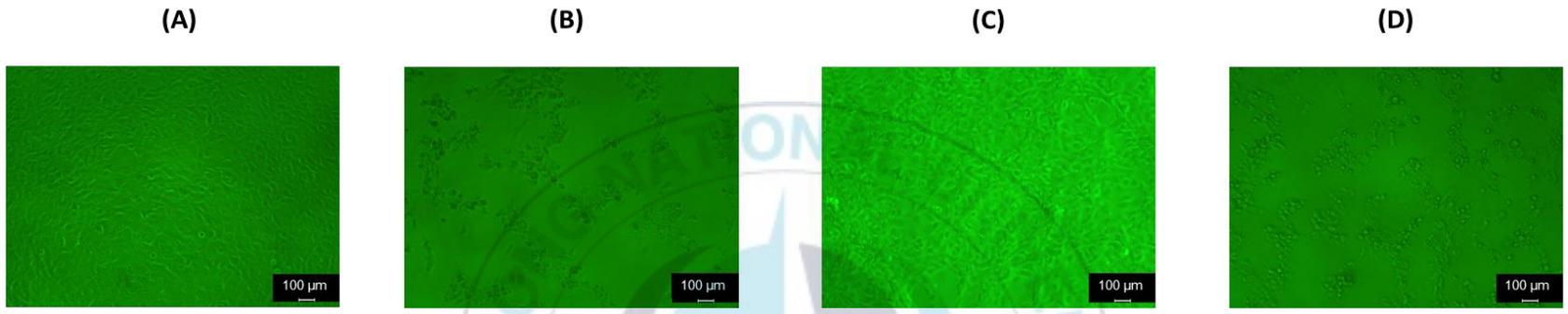


Fig. 3. Showing the Cytopathic effect (CPE) of Plankton and VHSV co-culture experiment in 96 hours pellet sample. (A) and (C) are the control group (B), pellet samples with *Chlorella* sp. co-cultured with VHSV and (D) pellet sample with *S. costatum* co-cultured with VHSV. Bar=100 µm.

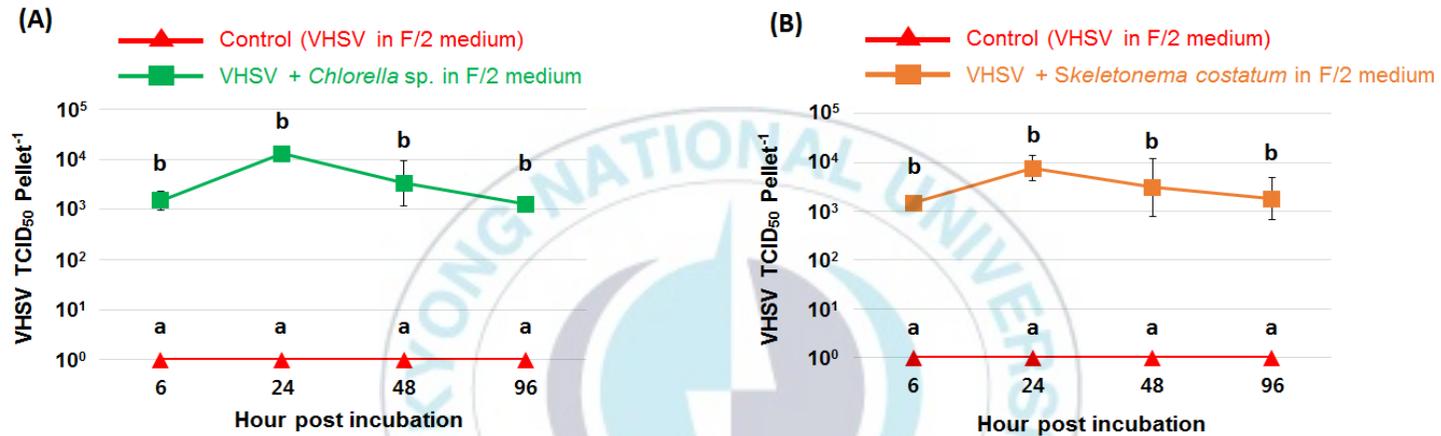
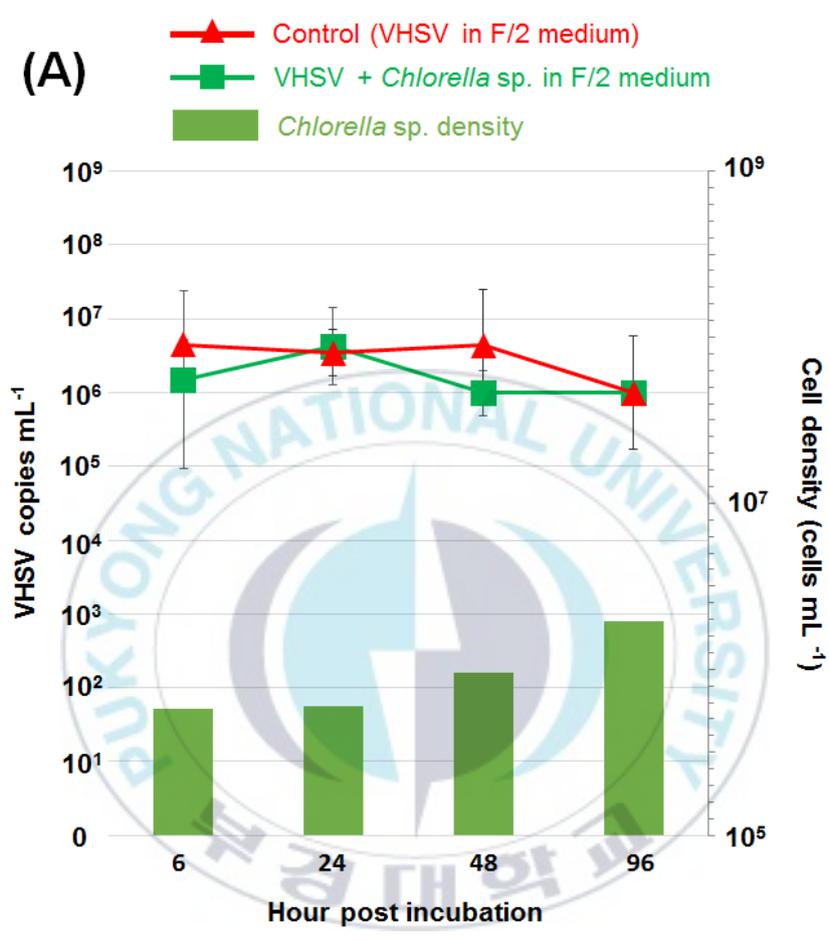


Fig. 4. TCID₅₀ results of Plankton and VHSV co-culture experiment in F/2 medium at different time intervals of 6, 24, 48 and 96 hours (A) pellet samples with control and VHSV + *Chlorella* sp. in F/2 medium groups. (B) pellet samples with control group and *S. costatum* co-cultured with VHSV group. Different letters indicate significant difference at $p < 0.05$.

3.1.3 VHSV의 *Chlorella* sp.에 부착 혹은 내재화 가능성 분석

96시간 동안 *C* sp.는 2×10^5 cells mL⁻¹에서 2×10^6 cells mL⁻¹로 증가하여 배양조건에는 문제가 없음을 확인하였다. Control, VHSV + *Chlorella* sp.의 상층액에서는 모두 VHSV가 검출되었고 이전 결과와 유사하게 시간이 지나면서 VHSV의 농도가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5A). *Chlorella* sp.의 Pellet에서 부착 혹은 내재된 바이러스로 나누었을 때, 대부분 부착된 것으로 보이는 VHSV가 계속 검출되었고 내재된 VHSV는 hour post inoculation (hpi) 96에서 10^3 copies pellet⁻¹의 바이러스가 검출되었다(Fig. 5B). Control의 Pellet에서는 VHSV가 검출되지 않았으며, VHSV + *Chlorella* sp.의 Pellet에서는 10^4 copies pellet⁻¹의 VHSV가 확인되었다(Fig. 5C). VHSV + 마찬가지로 상층액에서는 두 그룹간 유의적 차이는 없었고 Pellet에서는 유의적인 차이가 확인되었다.



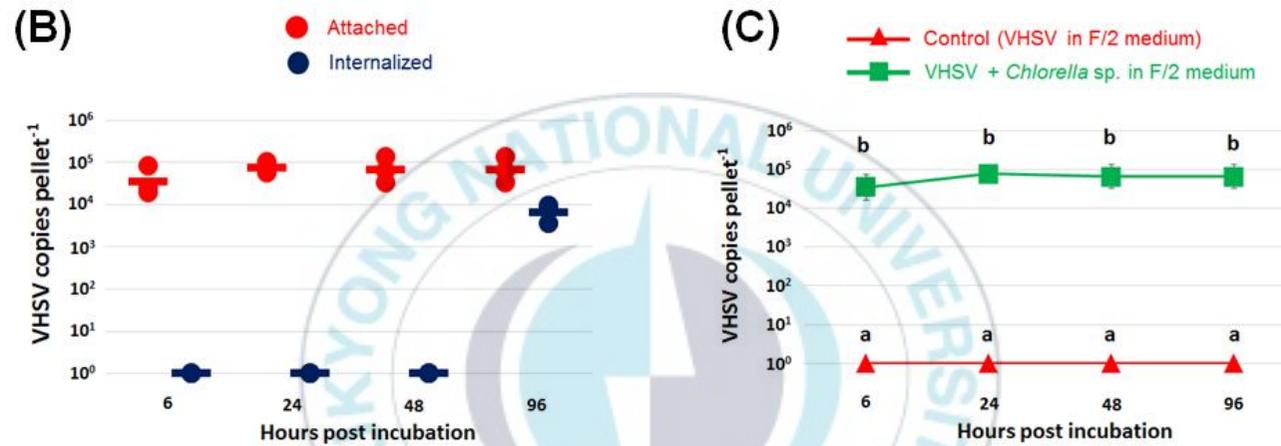
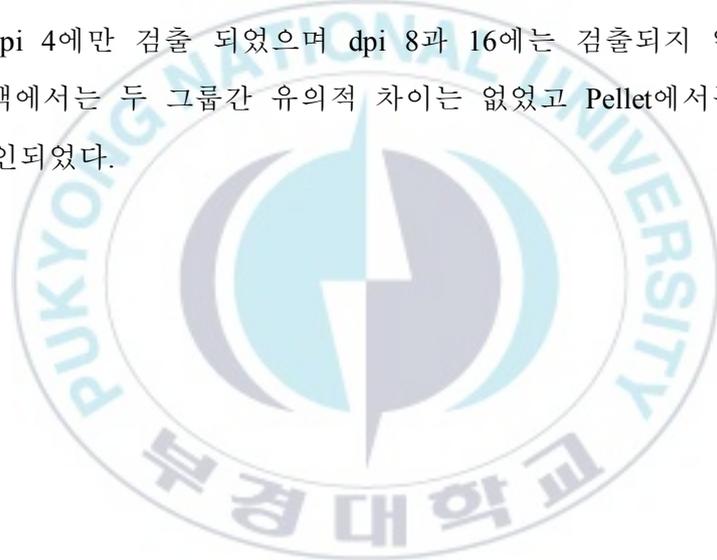
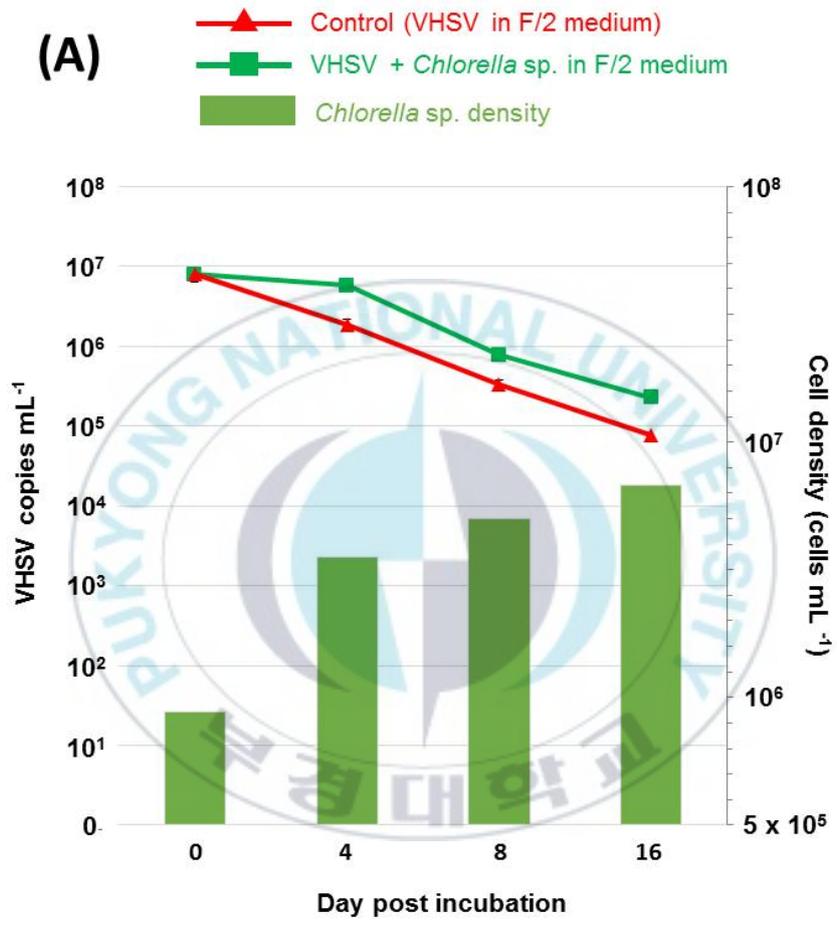


Fig. 5. Real-time PCR results of samples in which Control and VHSV + *Chlorella* sp. groups were cultured for 6, 24, 48 and 96 hours. (A) supernatant samples with Control and VHSV + *Chlorella* sp. groups and the cell density of *Chlorella* sp. (B) *Chlorella* sp. co-cultured with VHSV group in the Pellet samples with which is attached (Blue rectangular) and Internalized (Red rectangular) in *Chlorella* sp respectively. (C) pellet samples with control and VHSV + *Chlorella* sp. groups. The error bar indicate the standard deviation and different letters indicate significant difference at $p < 0.05$.

*C. sp.*에 내재된 VHSV의 증식 여부를 알아보기 위해 진행된 실험(Exp. 2)의 Control과 VHSV + *C. sp.*의 상층액에서는 모두 day post inoculation (dpi) 4부터 dpi 16 까지 VHSV의 농도가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6A). 이전 결과와 동일하게 Control의 Pellet 샘플에서는 VHSV가 검출되지 않았고 VHSV + *C. sp.*의 Pellet에서는 dpi 4부터 dpi 16까지 VHSV가 약 10^5 copies pellet⁻¹ 에서 10^3 copies pellet⁻¹ 농도로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6B). VHSV + *C. sp.*의 Pellet을 부착 혹은 내재된 바이러스로 나누어보았을 때, 부착된 것으로 보이는 VHSV는 dpi 16까지 계속 검출되었고, 내재된 VHSV는 dpi 4에만 검출 되었으며 dpi 8과 16에는 검출되지 않았다 (Fig. 6C). 상층액에서는 두 그룹간 유의적 차이는 없었고 Pellet에서는 유의적인 차이가 확인되었다.





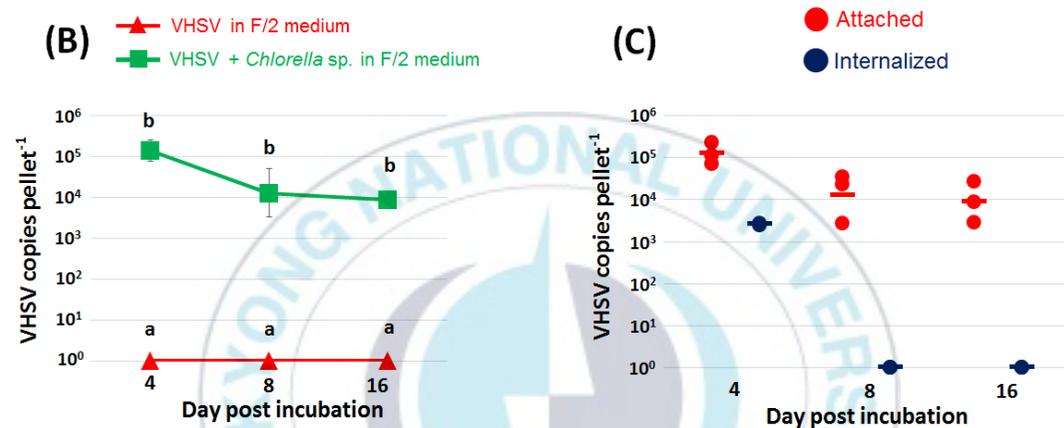
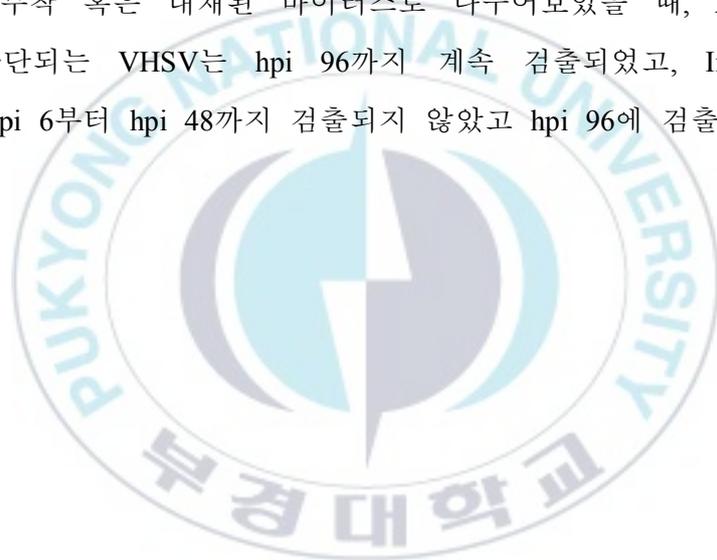


Fig. 6. Real-time PCR results of samples in which *Chlorella* sp. was cultured with VHSV for 0, 4, 8 and 16 days. (A) supernatant samples with control and *Chlorella* sp. co-cultured with VHSV group and the cell density of *Chlorella* sp. (B) pellet samples with control and VHSV + *Chlorella* sp. in F/2 medium groups. (C) The results of VHSV attached (Blue rectangular) and Internalized (Red rectangular) in *Chlorella* sp. The error bar indicate the standard deviation and different letters indicate significant difference at $p < 0.05$.

3.1.4. *Chlorella* sp.에 내재화된 VHSV의 활성 분석

Chlorella sp.에 존재하는 VHSV의 활성도 분석은 Control과 VHSV + *C* sp의 Pellet을 이용하였다. Real-time PCR방법을 이용하여 바이러스가 검출되지 않았던 Control의 Pellet에서는 바이러스의 활성은 없었다. 하지만 VHSV + *Chlorella* sp.의 Pellet 샘플에서는 real-time PCR을 이용하여 10^4 copies pellet⁻¹의 바이러스가 검출된 결과와 유사하게 대략 10^4 TCID₅₀ pellet⁻¹이상의 VHSV가 활성이 있는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 7A). Pellet 샘플에서 부착 혹은 내재된 바이러스로 나누어보았을 때, Attached 된 것으로 판단되는 VHSV는 hpi 96까지 계속 검출되었고, Internalized한 VHSV는 hpi 6부터 hpi 48까지 검출되지 않았고 hpi 96에 검출 되었다(Fig 7B).



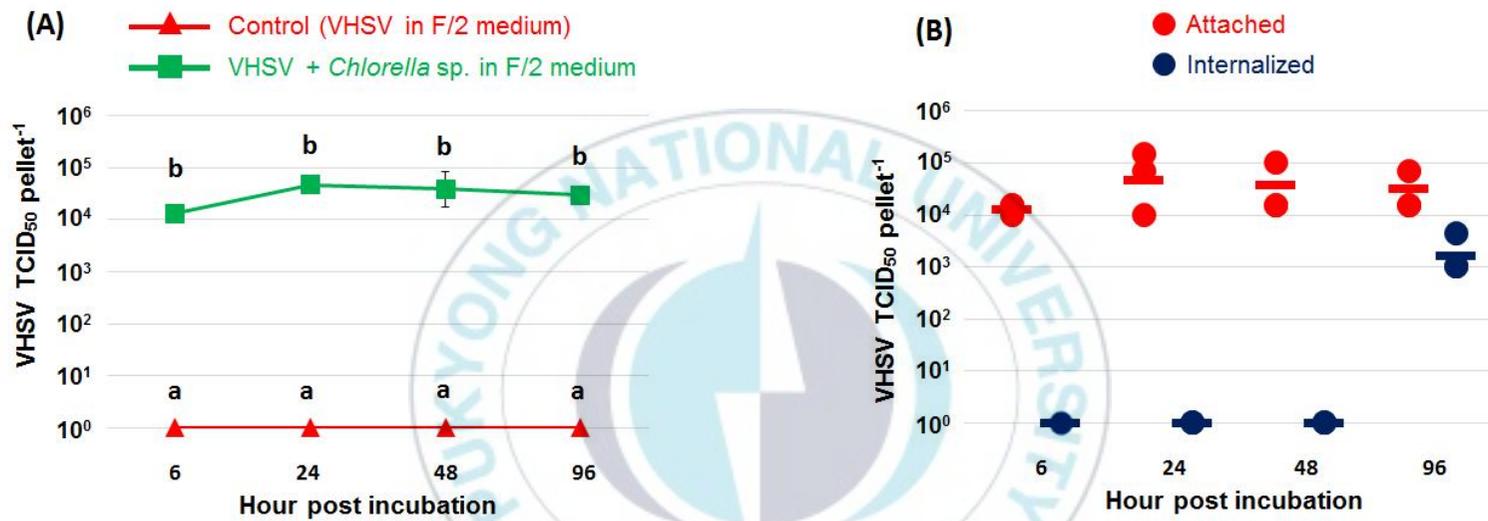


Fig. 7. TCID₅₀ results of samples in which *Chlorella* sp. and VHSV were cultured for 6, 24, 48 and 96 hours. (A) supernatant samples of Control and *C. sp.* co-cultured with VHSV group. (B); The results pellet sample with VHSV attached (Blue rectangular) and Internalized (Red rectangular) in *Chlorella* sp. The error bar indicate the standard deviation and different letters indicate significant difference at $p < 0.05$.

3.2. Rotifer와 VHSV의 상호작용 분석

3.2.1 Rotifer에 부착 또는 내재화된 VHSV의 정량

VHSV는 Control (only VHSV in sterilized seawater)에서 dpi 1, dpi 3 모두 검출되지 않았지만 Rotifer + VHSV 구간의 dpi 1에서는 1.6×10^4 VHSV copies Rotifer⁻¹의 VHSV가 검출되었고, dpi 3에서는 dpi 1보다 증가한 1.5×10^5 VHSV copies Rotifer⁻¹의 VHSV가 검출되었다 (Fig. 8). Rotifer에서 Control과 Rotifer + VHSV간의 유의적인 차이가 확인되었다. Dpi 1과 3에서의 Rotifer 마리수와 Rotifer에서 검출된 VHSV를 비교하였을 때, dpi 1에서는 Rotifer 한 마리당 63.4 ± 15.3 VHSV copies Rotifer⁻¹ 가 검출되었고 dpi 3에서는 dpi 1보다 증가한 977.9 ± 819.2 VHSV copies Rotifer⁻¹ 가 검출되었다(Table 1).

VHSV와 4일간 배양된 *C. sp.*에서는 이전 실험과 유사하게 부착, 내재된 샘플에서 각각 6×10^5 copies pellet⁻¹, 4.3×10^3 copies pellet⁻¹의 VHSV가 확인되었다 (Fig. 9). Control (*Chlorella sp.* + Rotifer)의 Rotifer에서는 바이러스가 모든 시간대에서 검출되지 않았다. 하지만 *Chlorella sp.* with VHSV + Rotifer구간의 Rotifer에서 dpi 1에서는 5.3×10^1 VHSV copies Rotifer⁻¹이상의 VHSV가 검출되었고, dpi 3에서는 2×10^3 VHSV copies Rotifer⁻¹의 VHSV가 검출되었으며(Fig. 10), Rotifer sample에서 Control과 실험구간의 유의적인 차이가 확인되었다. Rotifer 내 축적된 VHSV를 알아보기 위해 dpi 1, 3에 존재하던 Rotifer 마리수와 Rotifer에서 검출된 VHSV를 비교하였을 때 *Chlorella sp.* with VHSV + Rotifer 구간에서 dpi 1와 dpi 3에서는 4.7 ± 0.7 VHSV copies Rotifer⁻¹, 9.7 ± 0.8 VHSV copies Rotifer⁻¹가 각각 검출되었다(Table 2).

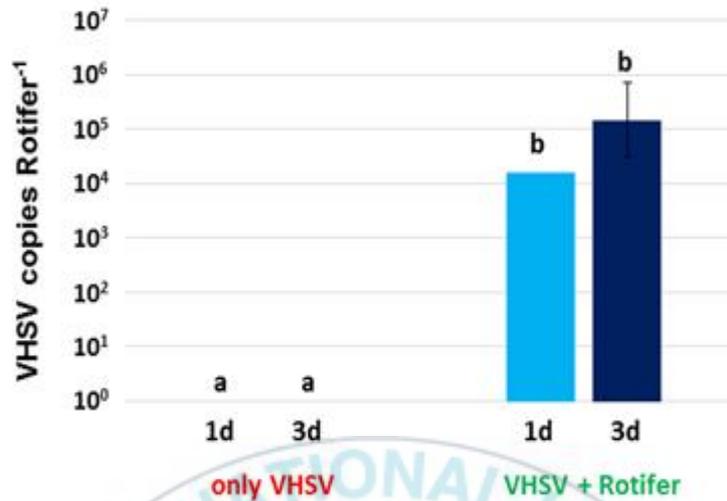


Fig. 8. Real-time PCR results of only VHSV and Rotifer + VHSV group were cultured for 1, 3 days. Blue bar: dpi 1 samples of only VHSV and Rotifer + VHSV group, respectively. Deep Blue bar: dpi 3 samples of only VHSV and Rotifer + VHSV group, respectively. Different letters indicate significant difference at $p < 0.05$.

Table 1. Concentration of VHSV attached or internalized in rotifer.

Time(d)	Viral concentration (VHSV copies Rotifer ⁻¹)		Rotifer mL ⁻¹
	only VHSV	VHSV + Rotifer	
1	N.D.	63.4 ± 15.3	50
3		977.9 ± 819.2	30

N.D., Not detected

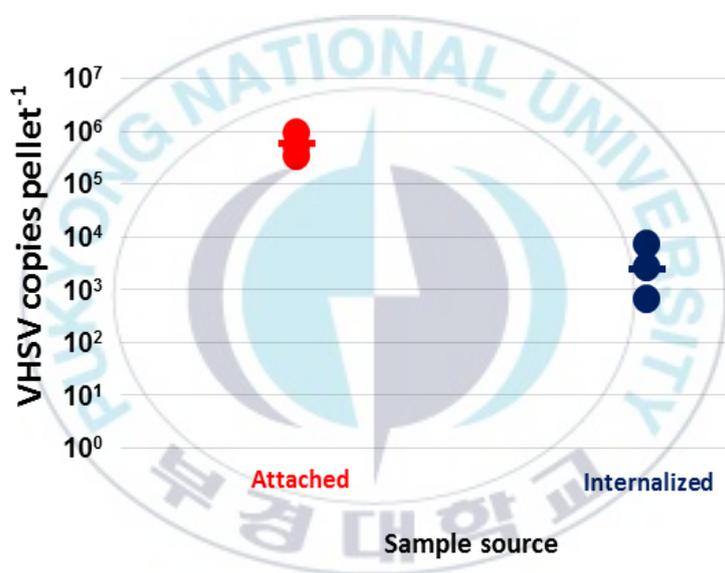


Fig. 9. Real-time PCR results of samples in which *Chlorella* sp. with VHSV attached (Blue rectangular) and Internalized (Red rectangular) was cultured for 96 hours. The error bar indicates the standard deviation, respectively.

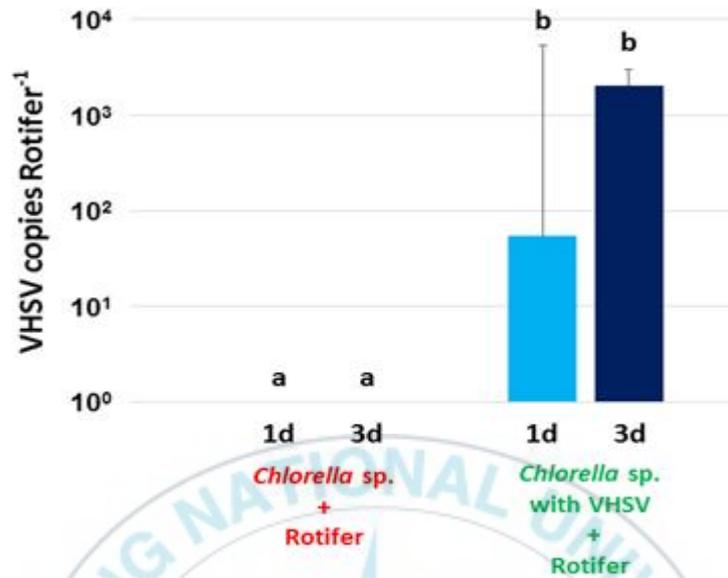


Fig. 10. Real-time PCR result of *Chlorella* sp. + Rotifer and *Chlorella* sp. with VHSV + Rotifer group were cultured for 1, 3 days. Blue bar: dpi 1 samples of *Chlorella* sp. + Rotifer and *Chlorella* sp. with VHSV + Rotifer group, respectively. Deep Blue bar: dpi 3 samples of *Chlorella* sp. + Rotifer and *Chlorella* sp. with VHSV + Rotifer group, respectively. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

Table 2. Concentration of VHSV attached or internalized in rotifer.

Time(d)	Viral concentration (VHSV copies Rotifer ⁻¹)		Rotifer mL ⁻¹
	only VHSV	<i>Chlorella</i> sp. with VHSV + Rotifer	
1	N.D.	4.7 ± 0.7	50
3		9.7 ± 0.8	30

N.D., Not detected

3.2.1 Rotifer에 부착 또는 내재화된 VHSV의 활성 분석

VHSV와 함께 배양된 Rotifer에 존재하는 VHSV의 활성도 분석은 Control (VHSV only in sterilized seawater)과 Rotifer + VHSV의 Rotifer 샘플로 분석하였다. Control 샘플에서 활성을 지닌 VHSV는 확인되지 않았으나, Rotifer + VHSV의 Rotifer 샘플에서는 dpi 1에서 1×10^4 TCID₅₀ Rotifer⁻¹, 그리고 dpi 3에서는 더 증가한 6.8×10^5 TCID₅₀ Rotifer⁻¹의 농도로 활성을 지닌 VHSV가 확인되었다(Fig. 11). Rotifer 샘플에서 Control과 Rotifer + VHSV의 유의적인 차이가 확인되었다.

VHSV와 함께 배양된 *Chlorella* sp.를 섭이한 Rotifer에 존재하는 VHSV의 활성도 분석은 Control(*Chlorella* sp. + Rotifer)과 *Chlorella* sp. with VHSV + Rotifer의 Rotifer로 분석하였다. 마찬가지로 Control 샘플에서 활성을 지닌 VHSV는 확인되지 않았으나, *Chlorella* sp. with VHSV + Rotifer의 Rotifer 샘플에서는 dpi 1에서 10^1 TCID₅₀ Rotifer⁻¹, dpi 3에서는 10^3 TCID₅₀ Rotifer⁻¹의 농도로 활성을 지닌 VHSV가 확인되었다(Fig. 12). Rotifer에서 Control과 *Chlorella* sp. with VHSV + Rotifer의 유의적인 차이가 확인되었다.

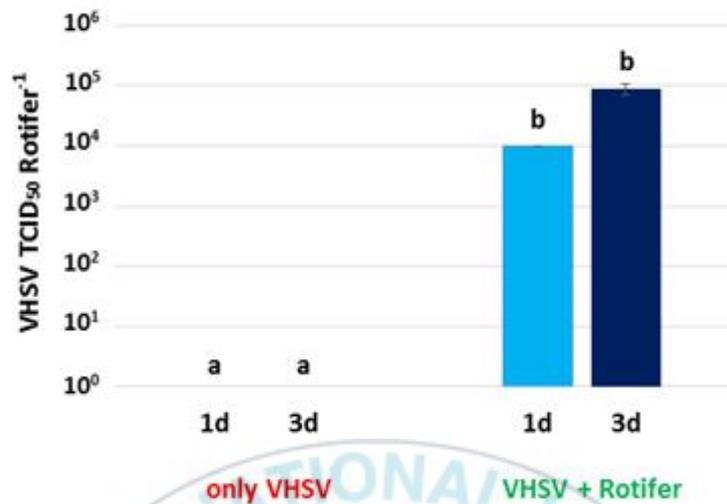


Fig. 11. TCID₅₀ result of samples in which only VHSV and Rotifer + VHSV group were cultured for 1, 3 days. Blue bar: dpi 1 samples of only VHSV and Rotifer + VHSV group, respectively. Deep Blue bar: dpi 3 samples of only VHSV and Rotifer + VHSV group, respectively. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

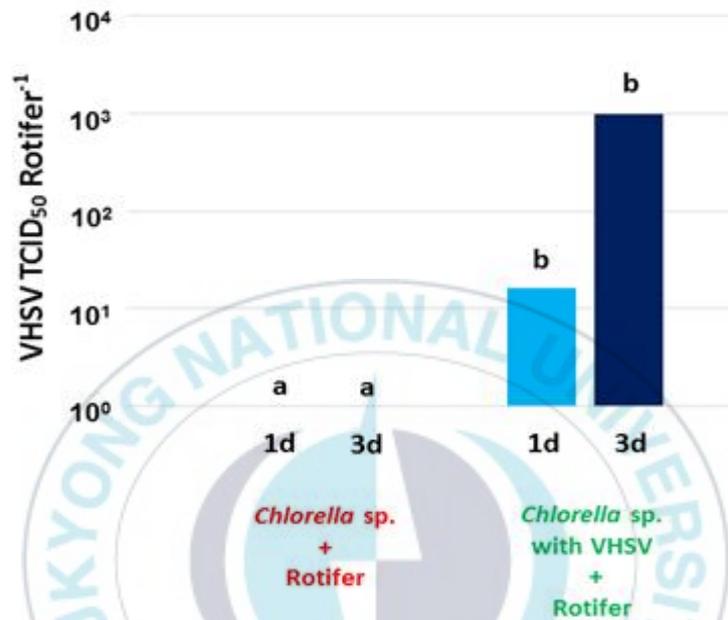


Fig. 12. TCID₅₀ result of samples in which *Chlorella* sp. + Rotifer and *Chlorella* sp. with VHSV + Rotifer were cultured for 1, 3 days. Blue bar: dpi 1 samples of *Chlorella* sp. + Rotifer and *Chlorella* sp. with VHSV + Rotifer group, respectively. Deep Blue bar: dpi 3 samples of *Chlorella* sp. + Rotifer and *Chlorella* sp. with VHSV + Rotifer group, respectively. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

4. 고찰

수계에 존재하는 식물플랑크톤은 일반적으로 이산화탄소를 흡수(고정)하는 광합성을 통해 에너지를 생산하며 동물플랑크톤의 먹이가 되는 일차생산자이다. 수계에 존재하는 식물플랑크톤은 오염물질에 포함되어 있는 질소와 인과 같은 영양염류를 기질로 사용하여 제거하고 중금속을 흡착할 수 있다고 알려져 있다(Hamasaki et al., 1994; Radmer, 1996; Travieso et al., 1999; Park et al., 2008; Park et al., 2010; Nam et al., 2012; Oh et al., 2018). 동물플랑크톤 또한 수중의 중금속과 같은 오염물질을 체내에 축적하는 경향이 있다 (Kadiene et al., 2019). 비교적 최근 연구에 의하면 동·식물플랑크톤은 영양염류나 오염물질뿐만 아니라 다른 생물 질병의 원인이 되는 바이러스성 질병을 매개하는 매개체(vector)의 역할을 할 수 있다고 하였다. 지금까지 여러 연구를 통해 WSSV (Liu et al., 2007), IMNV (da Silva et al., 2015), IPNV (Mortensen et al., 1993), KHV (Minamoto et al., 2011), VHSV (Faisal and Winters, 2011)가 플랑크톤에 의해 매개될 가능성이 있는 것으로 보인다. 특히, VHSV의 경우 미국의 오대호에 존재하는 단각류의 일종인 *Diporeia* spp.에서 활성을 지닌 VHSV type IVb가 확인되었고 오대호에 서식하는 야생어류에서의 VHS 발생(Faisal and Winters, 2011; Faisal et al., 2012)과 상관성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 넙치의 경우 Rotifer의 먹이생물로 널리 이용되는 *Chlorella* sp.와 Rotifer 등을 이용한 연구는 전무하다. 따라서 본 연구는 *Chlorella* sp.와 우리나라 연안에 우점하여 분포하고 있는 *Skeletonema costatum*, 그리고 넙치 자치어기에 초기 먹이생물로 이용되는 Rotifer와 같은 플랑크톤이 VHSV의 vector로 작용할 가능성을 조사하였다.

VHSV를 식물플랑크톤과 함께 배양한 후 real-time PCR을 이용하여

바이러스를 정량하였을 때 플랑크톤이 존재하지 않는 조건에서 시간이 지날수록 보다 빨리 그 농도가 감소하는 경향을 보였다. 이는 바이러스가 플랑크톤과 같은 유기물에 부착한 상태로 존재할 수 있는 환경이 유기물이 없어 free-living 한 상태로 존재할 수 밖에 없는 환경이 더 안정적이라는 것을 보여주는 결과라 판단된다. 식물플랑크톤에 부착 또는 내재화된 바이러스는 hpi 6부터 96 동안 상층액 대비 약 10% 정도가 꾸준히 검출되었고 활성도도 유지한 채로 존재하였다. Jiang (2012)은 식물플랑크톤 (*Alexandrium tamarense*, *Alexandrium minutum*)과 WSSV를 함께 배양 한 후 whole cell fluorescence *in situ* hybridization (WFISH) 방법으로 관찰하였을 때 이전 연구(Liu et al., 2007)에 의하면 다양한 식물플랑크톤 (*Isochrysis galbana*, *Skeletonema costatum*, *Chlorella* sp., *Heterosigma akashiwo*, *Scrippsiella trochoidea*, *Dunaliella salina*)과 WSSV를 함께 배양하였을 때 3일째까지 *I. galbana*, *S. costatum*, *Chlorella* sp.에서 바이러스가 검출되었다. 본 연구결과에서도 사용한 식물플랑크톤에 활성을 지닌 VHSV가 96시간 동안 존재하는 것으로 보아 이들이 VHSV의 mechanical vector로 작용할 가능성이 있는 것으로 보인다.

대부분의 이전 연구에서는 바이러스와 함께 배양된 식물플랑크톤이나 자연환경에서 채집된 식물플랑크톤을 이용하여 conventional PCR에 의해 특정 바이러스의 존재 유무를 보고하였다(Liu et al., 2007; Minamoto et al., 2011; Yanuhar et al., 2018). 그러나 검출된 바이러스가 플랑크톤 표면에 부착되어 있는지 혹은 내재화 되었는지는 확인하지 않았다. 본 연구에서는 VHSV가 *Chlorella* sp.에 내재화될 가능성을 액체질소 처리 방법 (Poong et al., 2017)을 이용하여 확인하였다. 이 방법은 분자생물학적인 측면에서 내재화 여부를 판단할 수 있는 적절한 방법이라 판단된다. 그 결과 활성을 유지한 채로 *Chlorella* sp.에 부착된 바이러스가 대부분이었으나, 4일째에

바이러스가 *Chlorella* sp.에 내재화된 것으로 확인되었으며 활성 또한 나타내었다. 4일째에 *Chlorella* sp. 내부로 들어간 바이러스가 증식하는지에 대한 여부를 16일 동안 관찰하였을 때, 앞선 결과와 유사하게 부착된 바이러스가 대부분이었고, 내재화된 바이러스는 4일 이후에는 검출되지 않았다. Liu 등 (2007)은 WSSV와 10일간 배양된 식물플랑크톤(*Isochrysis galbana*, *Skeletonema costatum*, *Chlorella* sp., *Heterosigma akashiwo*, *Scrippsiella trochoidea*, *Dunaliella salina*)에서 바이러스는 검출되지 않았고 이는 식물플랑크톤이 WSSV의 숙주 생물이 아닐 것 이라고 하였다. 본 연구에서 *Chlorella* sp.는 16일 동안 꾸준히 증식하고 있었지만, 상층액과 원심분리하여 얻은 *Chlorella* sp.에서 검출된 바이러스는 시간이 지날수록 감소하는 것으로 보아 VHSV가 *Chlorella* sp.의 내부에서 증식하지 못하는 것으로 보인다. 이는 *Chlorella* sp.가 VHSV에 감수성을 지니진 아니 하지만 물리적으로 표면에 부착되어 활성을 유지한 채로 존재하는 것으로 생각된다.

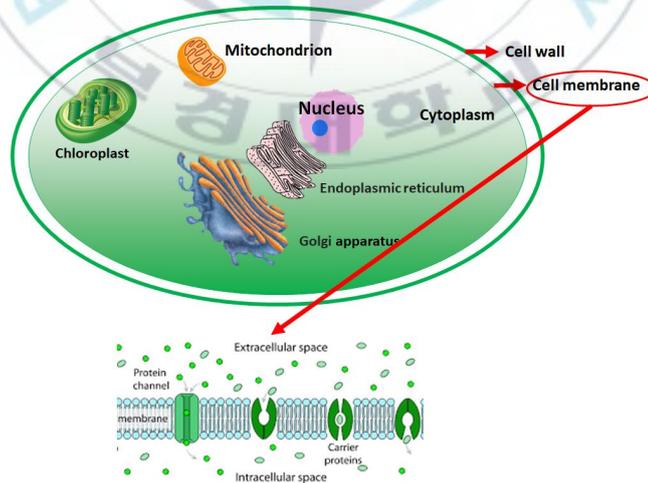


Fig. 13. The cell structure of *Chlorella* species and the pathway of substance transport in the membrane.

Fig. 13.에 나타난 대사과정에서 바이러스가 식물플랑크톤에 부착 혹은 내재화 할 수 있는 경로로 작용하여 식물플랑크톤에서 바이러스가 검출되었을 것으로 생각된다. 하지만 바이러스가 플랑크톤에 부착 혹은 내재화에 대한 정확한 정보를 파악하기 위해서는 Transmission electron microscopy (TEM)와 *in situ* hybridization 방법을 이용한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

Frada 등(2014)에 의하면 북대서양에 서식하는 요각류에서 real-time PCR을 통해 algae virus의 일종인 *Emiliana huxleyi* virus (*EhV*)이 검출되었고 *EhV*에 감염된 *Emiliana huxleyi*를 Copepod가 섭이하였을 때 바이러스는 체내에서 168시간까지 검출되었다. 또한 이전의 연구(Sahul Hameed et al., 2002; Zhang et al., 2006; Jiang, 2012; da Silva et al., 2015)에서 WSSV, IMNV와 함께 배양된 식물플랑크톤을 Rotifer, *Artemia* 그리고 새우까지 이르는 먹이사슬 경로에 따라 먹었을 때 모든 생물에서 바이러스가 검출되어 해양 생태계 내 먹이사슬 경로를 통해 병원체가 감수성생물로 전파할 가능성을 나타내었다. 본 연구에서도 먹이사슬 경로를 이용하여 VHSV와 함께 배양하고 나서 원심분리 후에 얻은 *Chlorella* sp.를 3일 간 섭취한 Rotifer에서 VHSV가 축적되는 것이 확인되었다. 이는 해양생태계의 먹이사슬 경로에 따라 상위포식자가 바이러스성 병원체를 지닌 하위 영양단계 생물들을 포식함으로써 축적된 바이러스를 어류에게 전파할 가능성이 있을 것으로 보인다. 특히 육상 넙치 종묘 배양장에서는 식물플랑크톤, Rotifer 그리고 *Artemia*를 배양하여 난황이 흡수된 넙치 자어의 먹이로 사용하고 있어 자치어 시기에 VHSV는 검출 감도 이하의 낮은 농도로 존재하고 있을 가능성을 배제할 수 없을 것이다.

Kitamura 등 (2003)은 해양에 존재하는 동물플랑크톤이 marine birnavirus

(MABVs)의 vector로 작용할 가능성이 있다고 하였다. Porchas-Cornejo 등 (2017)은 다양하고 풍부한 동물플랑크톤이 WSSV를 전파하는데 관련이 있을 것이라 하였다. 그리고 Sudhakaran 등 (2006)과 Sivakumar 등 (2009)은 어류의 자어, 갑각류의 유생 생물의 초기 먹이 생물로 이용되는 여러 성장단계의 *Artemia* (nauplii, metanaupill, juveniles, sub-adults and adults)가 white tail disease (WTD)의 원인체인 extra small virus (XSV), *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV)의 reservoir 혹은 기계적 운반체로 작용하여 바이러스성 질병을 수평 전파 할 수 있다고 하였다(Sudhakaran et al., 2006; Sivakumar et al., 2009). IHNV에 감염된 대서양연어의 피부에 기생한 요각류의 일종인 *Lepeophtheirus salmonis*로부터 동일한 바이러스가 검출되었고, 건강한 연어를 감염시켜(Jakob et al., 2011) 이 연어 물이도 IHNV의 vector 역할을 할 수 있는 것으로 보인다. 본 연구 결과도 *Chlorella* sp., *S. costatum* 및 Rotifer가 VHS의 vector 역할을 할 가능성을 보여주고 있다. 본 연구에서 *Chlorella* sp.와 Rotifer에 부착 혹은 내재화된 바이러스는 *Chlorella* sp.에서 최대 0.28 copies *Chlorella* sp.⁻¹, 그리고 Rotifer에서는 977.9 ± 819.2 copies Rotifer⁻¹로 확인되었다. 일반적으로 Rotifer의 크기는 180~200 µm이고 *Chlorella* sp.와 *S. costatum*는 2~60 µm로 최대 100배 정도 차이가 난다. 이는 Rotifer에 바이러스가 부착할 수 있는 면적이 *Chlorella* sp.와 *S. costatum*보다 넓어 더 많은 양이 부착하였거나, 여과섭식을 하는 Rotifer 체내로 들어가서 나타난 결과일 수 있다. 종합하면, 수계에 존재하는 바이러스가 다양한 planktonic stage의 동물플랑크톤 뿐만 아니라 기생충성 생물에 부착 혹은 내부로 직접적으로 들어갈 수 있음과 동시에 바이러스의 reservoir 혹은 vector로 작용하여 질병을 전파할 가능성이 있음을 나타낸다.

바이러스는 숙주 세포에 침입할 때, 초기에 숙주 세포막에 존재하는

수용체와 결합하여 바이러스 침투 및 전위가 발생하고 (Schneider-Schaulies, 2000), 이러한 과정은 WSSV 감염에 대한 잠재적 바이러스 숙주의 특성을 규명하는데 사용된다고 한다(Liang, 2005). 이전에 Feng 등(2013)은 *Artemia* 세포막에 새우의 아가미 세포막과 유사한 WSSV의 specific binding 부위가 존재하는 것이 확인되어 *Artemia*가 WSSV의 잠재적인 숙주가 될 수 있다고 하였다. 본 연구에서는 *Artemia*의 하위 영양 단계인 Rotifer를 이용하여 동물플랑크톤과 VHSV의 상호작용에 대해 알아보았지만, 추후에 VHSV와 *Artemia*간의 상호작용에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

현재 해수 내 바이러스를 확인하기 위해서는 John 등 (2015)이 고안한 해수 농축법을 사용하고 있다. 이 방법은 해수 20L를 여과(pore size : 2.7 μ m, 0.22 μ m)하고 FeCl₃ 반응, 0.1M EDTA-0.2M MgCl₂ Buffer, pH 6.0 제조와 같은 복잡한 전처리 과정이 있어 많은 양의 해수를 확인하기에는 시간적, 효율적인 측면에서 한계가 있다. 하지만 본 연구에서 도출된 결과는 이전의 복잡한 농축방법을 생략하고 해양에 존재하는 플랑크톤을 채집함으로써 바이러스를 정량할 수 있는 가능성이 있음을 나타낸다.

본 연구의 결과는 해양에 존재하는 동·식물플랑크톤이 바이러스의 mechanical vector 역할을 하는 것과 먹이사슬 경로를 통해 각 먹이 단계에서 바이러스가 축적되어 질병이 전파될 수 있다는 또 다른 증거를 제시하고 있다. 향후 VHSV 뿐만 아니라 다양한 바이러스성 질병과 플랑크톤의 상호작용에 관한 연구가 필요할 것으로 판단된다. 이러한 연구는 자연 수계 내 질병의 발생원인 파악 그리고 전파경로의 차단을 위한 기초 자료로 제공될 수 있다. 플랑크톤을 채집하여 양식장 근해에 바이러스의 존재를 확인할 수 있는 새로운 모니터링 기법 개발과 기초 자료와 추후 국내 수산생물 법정전염병에 대한 예보체계를 구축하는데

중요한 자료로 제공될 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 국내 육상 넙치 양식장의 유입수로부터 플랑크톤을 여과하는 것만으로도 바이러스의 유입을 감소시켜 질병의 발생을 저감할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 넙치 종묘 배양장인 경우, 사육중인 넙치 종묘의 중점적인 관리도 중요하지만 *Chlorella*, *Rotifer*, *Artemia*와 같은 먹이생물 배양시설에 바이러스성 질병에 대해 철저한 관리가 필요할 것으로 생각된다.



5. 결론

본 연구의 목적은 해양에 존재하는 플랑크톤과 viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV)간의 상호작용에 대해 조사하고, 양식장 내 바이러스 유입의 저감 전략 마련에 대한 기초 정보를 제공하는 것이었다. VHSV는 활성을 지닌 채 플랑크톤에 부착 혹은 내재화되어 존재할 수 있고, 사용한 바이러스의 약 10% 정도가 플랑크톤에 내재화 되는 것으로 보이나 플랑크톤 내에서는 바이러스는 증식하지 못하는 것으로 확인되었다. 그리고 본 연구 결과는 VHSV가 미세 먹이사슬 경로를 통해 상위 영양단계로 추적될 수 있음을 보여주고 있다. 그러므로 해양의 플랑크톤은 VHSV의 mechanical vector로 작용하여 질병을 전파할 가능성이 충분히 있고 VHSV 뿐만 아니라 다른 병원체와 플랑크톤 간의 상호작용에 관한 연구도 향후에 필요할 것으로 판단된다. 또한 향후 양식장의 유입수로부터 플랑크톤을 여과함으로써 줄어드는 바이러스의 양을 파악하고 질병 발생 간의 상관관계를 연구할 필요성도 있을 것이다. 나아가해수 내 플랑크톤의 채집과 바이러스 정량 결과로 실제로 존재하는 바이러스의 양을 추정하고 그 존재 유무를 파악할 수 있는 새로운 유형의 바이러스 모니터링 기법의 개발도 가능할 수 있을 것이다.

국문요약

해양의 플랑크톤과 viral haemorrhagic septicemia virus와의 상호작용에 관한 연구

윤 동 빈

부 경 대 학 교 대 학 원 수 산 생 명 의 학 과

플랑크톤과 바이러스는 해양 및 담수 생태계에서 중요한 생물 구성요소이지만 플랑크톤과 바이러스의 상호 작용에 관한 연구는 거의 없다. 연구에 따르면 플랑크톤은 바이러스를 전파할 수 있는 벡터의 역할을 한다고 보고되었다. 바이러스가 플랑크톤에 부착하여 바이러스 이동 및 전파를 촉진 할 수 있으므로 플랑크톤이 질병 역학에 관여한다고 추측하고 있다. 본 연구에서는 플랑크톤과 낚치의 중요한 질병 유발 바이러스성 패혈증바이러스(VHSV)간의 상호작용을 조사하였다. 실험은 *Skeletonema costatum*, *Chlorella* sp., Rotifer (*Branchionus plicatilis*)와 같은 3종의 주요 플랑크톤을 본 실험에서 사용하였다. 식물플랑크톤은 F/2 medium, 동물플랑크톤은 멸균해수에서 각각 20 °C, 25 °C에서 배양하였다. 식물플랑크톤 (10^5 , 10^6 cell mL⁻¹)들은 VHSV (10^5 , 10^6 copies mL⁻¹)와 20 °C에서 각각 96시간, 16일동안 배양하였다. Rotifer는 20 °C에서 VHSV와 4일간 배양하고 VHSV와 배양된 *Chlorella* sp.를 Rotifer에게 먹였다. 샘플을 주기적으로 얻었고 플랑크톤 VHSV 혼합물을 원심 분리하고 (4000xg, 5min at 20 °C) Supernatant와 Pellet을 얻었다. 각 샘플에서 real-time PCR로 VHSV를 정량하였고, TCID₅₀방법으로 바이러스 활성도를 분석하였다. 식물플랑크톤의 Pellet은 6.2×10^3 , 5.2×10^3 copies의 VHSV가 4일 동안 검출되었고 바이러스의 활성은 3.5×10^3 , 5.2×10^3 TCID₅₀ pellet¹으로 유지하고 있었다. 16일동안 VHSV와 함께 배양된 *Chlorella* sp.에서 Supernatant의 바이러스는 10^6 에서 10^5 copies mL⁻¹ 로 감소하였고 Pellet의 바이러스는 10^5 에서 10^4 copies mL⁻¹로 감소하였다. VHSV+*Chlorella* sp.를 먹은 Rotifer의 바이러스 농도는 1일과 3일에

10¹과 10³ copies rotifer⁻¹이었고 반면에 플랑크톤이 없는 VHSV와 함께 배양한 Rotifer에서는 1일과 3일에 10⁴과 10⁵ copies rotifer⁻¹이었다. 본 연구의 결과를 통해 플랑크톤에 존재하는 VHSV는 감염력은 있으나 증식하지 않는 것으로 보인다. 플랑크톤은 VHSV를 전파할 vector로 작용할 수 있고, 해양 환경에서 VHSV는 상위 영양 단계로 축적될 수 있을 것으로 생각된다. 양식장에서 플랑크톤 여과 방법은 양식장 내로 바이러스성 질병의 유입을 줄일 수 있을 것으로 보인다.



참고문헌

- A.S. Sahul Hameed, B.L.M. Murthi, M. Rasheed, S. Sathish, K. Yoganandhan, V. Murugan, Kunthala Jayaraman., (2002). An investigation of *Artemia* as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. Vet Res Commun. Jan;34(1):25-32.
- Boyd, C.E. and Tucker, C.S. (1998) Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Cho, S. J., Lee, D. H., Luong, T. T., Park, S. R., Oh, Y. K. and Lee, T. H, (2011). Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Fatty Acid Contents and Composition in the Green Microalga, *Chlorella* sp. 227 J. Microbiol. Biotechnol., 21, 1073-1080.
- da Silva SM, Lavander HD, de Santana Luna MM, de Melo Eloi da Silva AO, Gálvez AO, Coimbra MR., (2015). *Artemia franciscana* as a vector for infectious myonecrosis virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. J Invertebr Pathol; 126:1-5.
- European Food Safety Authority, (2008). Aquatic species susceptible to diseases listed in Directive 2006/88/EC, Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). The EFSA Journal, 808, 1-144
- Faisal M and Winters AD., (2011). Detection of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) from *Diporeia* spp. (*Pontoporeiidae*, *Amphipoda*) in the Laurentian Great Lakes, USA. 2011. Parasites & Vectors 4(1):2.
- Faisal M, Shavalier M, Kim RK, Millard E. V, Gunn MR, Winters AD, Schulz CA, Eissa A, Thomas MV, Wolgamood M, Whelan GE, Winton J., (2012). Spread of the emerging viral hemorrhagic septicemia virus strain, genotype IVb, in Michigan, USA. Viruses, 4(5), 734-760.
- Feng, S.Y., Huang, J., Zhang, S.C., (2005). Binding research between cell membrane of copepod and WSSV. J. Fish. Sci. China 12, 458-463.
- Frada MJ, Schatz D, Farstey V, Ossolinski JE, Sabanay H, Ben-Dor S, Koren I, Vardi A, 2014. Zooplankton may serve as transmission vectors for

- viruses infecting algal blooms in the ocean. *Curr Biol.* 2014 Nov 3;24(21):2592-7.
- Guojian Jiang, Can white spot syndrome virus be transmitted through the phytoplankton→rotifer →artemia→shrimp pathway?, (2012). *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(5), pp. 1277-1282
- Hamasaki, A., Shioji, N., Ikuta, Y., Hukuda, Y., Makita, T., Hirayama, K., Matuzaki, H. Tukamoto, T., Sasaki, S., (1994). Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas from a power plant, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45(1), 799-809.
- H F Skall, N J Olesen and S Møllergaard., (2005). Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming – a review. *Journal of Fish Diseases*. *Journal of Fish Diseases* 28(9):509-29.
- Horlyck V, Møllergaard S, Dalsgaard I, Jørgensen PEV., (1984). Occurrence of VHS in Danish maricultured rainbow trout. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 4:11–13.
- Jensen, M.H., (1963). Preparation of fish tissue cultures for virus research. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 59, 131–134.
- Jensen, N., J., Bloch, B. and Larsen, J. L., (1979). The ulcer-syndrome in cod (*Gadus morhua*) III. A preliminary virological report. *Nord. Vet. Med.*, 31 : 436-442.
- Johnm S., Poulos, B., & Schirmer, C. (2015). Iron chloride precipitation of viruses from seawater. *protocols.io*, 1-8.
- JS Zhang, SL Dong, XL Tian, YW Dong, XY Liu, DC Yan., (2006). Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture* Volume 261, Issue 4, Pages 1181-1185.
- JS Zhang, SL Dong, YW Dong, XL Tian, CQ Hou, (2008). Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. *J Invertebr Pathol.* Jan;97(1):33-9.
- Kang, J.H, Kim W.S, Kwon, O.Y, Cho, K.H., (2016). Long-term variation of

- zooplankton around Dokdo in the East Sea. Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society. Vol. 17, No. 9 pp. 422-430.
- Kadiene, Baghdad Ouddane, Jiang-Shiou Hwang & Sami Souissi, (2019). Bioaccumulation of metals in calanoid copepods by oral intake Esther U. Scientific Reports volume 9, Article number: 9492.
- Kim, H.J, Park, J.Y, Son, M. H, Moon, C. H., (2016). Long-term Variations of Phytoplankton Community in Coastal Waters of Kyoungju City Area. Journal of Fisheries and Marine Sciences Education, Volume 28 Issue 5, 1417-1434.
- Kim H.Y, Kim, B.K, Kim, E.K, Kim, C.D, Jeong, J.B, Lee, C.B., (2015). Spatial and Temporal distribution of Mesozooplankton Communities in Hallyeohaesang National Park and South Eastern Sea of Korea in 2014. Journal of National Park Research, Vol. 6, No. 2, pp. 91-102
- Kim, S.M., Lee, J.I., Hong, M.J., Park, H.S., Park, S.I., (2003). Genetic relationship of the VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. J. Fish Pathol. 16, 1–12 (In Korean with English abstract).
- Lee, H. S., Jeon, S. G., Oh, Y. K., Kim, K. H., Chung, S. H., Na, J. G. and Yeo, S. D, (2012). Recovery of Lipid from *Chlorella* sp. KR1 via Pyrolysis and Characteristics Pyrolysis Oil, Korean Chem. Eng. Res., 50(4), 672-677.
- Liang, Y., Huang, J., Song, X.L., Zhang, P.J., Xu, H.S., (2005). Four viral proteins of white spot syndrome virus (WSSV) that attach to shrimp cell membranes. Dis. Aquat.Org. 66, 81–85.
- Liu B, Yu Z, Song X, Guan Y., (2007). Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. J Invertebr Pathol. 95(2):87-92.
- L. J. REED, H. MUENCH., (1938). A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. *American Journal of Epidemiology*, Volume 27, Issue 3, 493–497.
- Lo, W. -T. Hwang, J. -J. Hsu, P. -K. Hsieh, H. -Y. Tu, Y. -Y. Fang, T. -H.

- & Hwang, J. -S., (2004). Seasonal and spatial distribution of phytoplankton in the waters off nuclear power plants, north of Taiwan. *Journal of Marine Science and Technology* 12, 372~379.
- Mackas DM, RE Thomson and M Galbraith. (2001). Changes in the zooplankton community of the British Columbia continental margin, 1985-1999, and their covariations with oceanographic conditions. *Can. J. Fish. Aq. Sci.* 58:685-702.
- Marco Antonio Porchas-Cornejo, Pindaro Alvarez-Ruiz, Francisco Javier Alvarez-Tello, Marcel Martinez-Porchas, Luis Rafael Martinez-Cordova, Juana Lopez-Martinez, Ricardo Garcia-Morales, (2017). Detection of the white spot syndrome virus in zooplankton samples collected off the coast of Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*, vol 49, 48-56.
- Minamoto T, Honjo MN, Yamanaka H, Tanaka N, Itayama T, Kawabata Z., (2011). Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. *Res Vet Sci.* 2011 Jun; 90(3):530-2.
- Mortensen, S., Evensen, O., Rodseth, O., Hjeltnes, B., (1993). The relevance of infection-pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed Norwegian turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 115, 245–252.
- Moon, S.Y, Soh, H.Y, Oh, H.J., (2010). Seasonal Variation of Zooplankton Communities in the Southern Coastal Waters of Korea. *Ocean and Polar Research*. Vol. 32(4):411-426
- Nam, G. S., Song, Y. H., Lee, E. H., Bae, Y. S., Kim, M. O., (2012). Water quality improvement by the microalgae in agricultural regions, *Water for Future*, 45(6), 85-90.
- Oh, E. J., Hwang, I. S., Yoo, J., & Chung, K. Y. (2018). Removal of Nutrients and Heavy Metals from Swine Wastewater using *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Science International*, 27(11), 1059-1072.
- OIE (2019). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Chapter 2.3.10. Viral haemorrhagic septicaemia virus. OIE.
- Park, J. I., Woo, H. C., Lee, J. H., (2008). Production of bio-energy from

- marine algae: status and perspectives, Korean Chemical Engineering Research, 46(5), 833-844.
- Park, H. J., Jin, E. J., Jung, T. M., Joo, H., & Lee, J. H. (2010). Optimal culture conditions for photosynthetic microalgae *Nannochloropsis oculata*. Applied Chemistry for Engineering, 21(6), 659-663.
- Park, H. K., Jun, L. J., Kim, S. M., Park, M. E., Cho, M. Y., Hwang, S. D., Park, S. H., Jeong, H. D., Jeong, J. B. (2016) Monitoring of VHS and RSIVD in Cultured *Paralichthys olivaceus* of Jeju in 2015. Korean J Fish Aquat Sci-49(2), 176-183, 2016.
- Pierce, L. R., Willey, J. C., Palsule, V. V., Yeo, J., Shepherd, B. S., Crawford, E. L., & Stepien, C. A., (2013). Accurate detection and quantification of the fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV) with a two-color fluorometric real-time PCR assay. PloS one, 8(8), e71851.
- Radmer, R. J. Algal diversity and commercial algal products, 1996. Bioscience, 46(4), 263-270.
- Raymont JEG. (1983). Plankton and productivity in the oceans. Vol II Zooplankton, 824p.
- Runge JA. (1988). Should we expect a relationship between primary production and fisheries? The role of copepod dynamics as a filter of trophic variability. Hydrobiologia, 167/168: 67-71.
- Sako, H., Sorimachi, M., 1985. Susceptibility of fish pathogenic viruses, bacteria and fungus to ultraviolet irradiation and the disinfectant effect of U.V.-ozone water sterilizer on the pathogens in water (In Japanese with English summary). Bull. Nat. Res. Inst. Aquaculture. 8: 51-58.
- Schlotfeldt HJ, Ahne W, Jørgensen PEV, Glende W., (1991) Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) a natural outbreak. Bull Eur Assoc Fish Pathol 11:105-107.
- Schneider-Schaulies, J., (2000). Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. J. Gen. Virol. 81, 1413-1429.
- Shin-Ichi Kitamura, Shin-Ichiro Kamata, Shin-Ichi Nakano, Satoru Suzuki

- Detection of Marine Birnavirus Genome in Zooplankton Collected From the Uwa Sea, Japan, (2003). *Dis Aquat Organ.* Mar 17;54(1):69-72
- Shuying Feng, Guangda Li, Wenpo Feng, Jie Huang, (2013). Binding of white spot syndrome virus to *Artemia* sp. cell membranes. *Journal of Virological Methods* Volume 193, Issue 1, Pages 108-111.
- Singh, D., Puri, M., Wilkens, S., Mathur, S. A., Tuli, K. D. and Barrow, J. C, (2013). Characterization of a New Zeaxanthin Producing Strain of *Chlorella saccharophila* Isolated from New Zealand Marine Waters, *Bioresour. Technol.*, 143, 308-314.
- Sivakumar, V.K., Sarathi, M., Venkatesan, C., Sivaraj, A., Hameed, A.S.S., (2009). Experimental exposure of *Artemia* to Hepatopancreatic parvo-like Virus and Subsequent transmission to post-larvae of *Penaeus monodon*. *J. Invertebr. Pathol.* 102, 191–195.
- Soh, H.Y, Soh, M.H, Shin, K.S, Jang, M.C., (2013). Occurrence Patterns of Zooplankton Present in Ports of Korea during Summer. *Korean J. Environ. Biol.* Vol.31 No.4 pp.448-457.
- Sudhakaran, R., Yoganandhan, K., Ahmed, V.P., Hameed, A.S.S., 2006. *Artemia* as a possible vector for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus transmission (XSV) to *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. *Dis. Aquat. Org.* 70, 161–166.
- SW Poong, P-E Lim, Jeannette W.-S. Lai, S-M Phang., (2017). Optimization of high quality total RNA isolation from the microalga, *Chlorella* sp. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) for next-generation sequencing. *Phycological Research* 2017; 65: 146–150.
- T. Meyers, James R. Winton, (1995). Viral hemorrhagic septicemia virus in North America. *Annual Review of Fish Diseases* 5:3-24
- Torgersen, Y., 1998. Physical and chemical inactivation of the infectious salmon anaemia (ISA) virus. In: *Proceedings of the New England Farmed Fish Health Workshop*, Washington County Technical College, Eastport, ME, 2-10.
- Travieso, L., Canizares, R. O., Borja, R., Benitez, F., Dominguez, A. R.,

- Valiente, V., (1999). Heavy metal removal by microalgae, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(2), 144-151.
- Uun Yanuhar, Yuliana, Kusriani, Diana Arfiati., (2018). Opportunity plankton as vector transmission of koi herpes virus infection on carp (*Cyprinus carpio*) *AACL Bioflux*, Volume 11, Issue 6.
- Yang Ho Yoon., (2015). Spatio-temporal Distributions of Phytoplankton Community in the Coastal Waters of Gogunsan Islands(CoWGs), West Sea of Korea. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol. 16, No. 3 pp. 2287-2300.
- Yang Ho Yoon., (2016). Bio-environmental Characteristics of the Uljin Marine Ranching Area (UMRA), East Sea of Korea. 1. Spatio-temporal Distributions of Phytoplankton Community. *Journal of the Korean Society for Marine Environment and Energy*, Vol. 19, No. 1. pp. 37-46.

