

수산화석사 학위논문

진해만의 마비성 패독 발생과 Real-time PCR
기법을 이용한 *Alexandrium*속의 검출



2008년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

박 정 경

수산학석사 학위논문

진해만의 마비성 패독 발생과 Real-time PCR 기법을
이용한 *Alexandrium*속의 검출

지도교수 김 창 훈

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함



2008년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

박 정 경

박정경의 수산학석사 학위논문을 인준함

2007년 12월 20일



주 심 이학박사 김 동 수 (인)

위 원 농학박사 김 창 훈 (인)

위 원 이학박사 김 종 명 (인)

목 차

Abstract	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 조사지역	4
2. 진해만의 마비성 패독 발생 조사	6
2.1. <i>Alexandrium</i> 속의 확보 및 담치 채집	6
2.2. HPLC를 이용한 마비성 패독 분석	7
3. Real-time PCR 기법을 이용한 진해만의 <i>Alexandrium</i> 속 검출	11
3.1. DNA 추출	11
3.2. <i>Alexandrium</i> 속 특이적인 Real-time PCR	12
3.3. PCR inhibitor	13
3.4. Real-time PCR 기법을 이용한 진해만의 <i>Alexandrium</i> 속 검출	13

III. 결과	14
1. 진해만의 마비성 패독 발생 조사	14
1.1. <i>Alexandrium</i> 속의 출현량과 담치의 독화	14
1.2. <i>Alexandrium</i> 속 분리주의 마비성 패독 독성	24
2. Real-time PCR 기법을 이용한 진해만의 <i>Alexandrium</i> 속 검출	27
2.1. <i>Alexandrium</i> 속 특이적인 Real-time PCR	27
2.2. PCR inhibitor	28
2.3. Real-time PCR 기법을 이용한 진해만의 <i>Alexandrium</i> 속 검출	28
IV. 고찰	33
1. 진해만의 마비성 패독 발생 조사	33
2. Real-time PCR 기법을 이용한 진해만의 <i>Alexandrium</i> 속 검출	37
V. 요약	39
VI. 감사의 글	41
VII. 참고문헌	42

Development of Paralytic Shellfish Poisoning Toxification and Detection of the Genus *Alexandrium* by using Real-time PCR Assay in Jinhae Bay, Korea

Jeong-Kyeong Park

**Department of Fisheries Biology, Graduate School,
Pukyong National University
Busan 608-737, Korea**

Abstract

Outbreaks of toxic dinoflagellate *Alexandrium* have gradually increased in Korean coastal waters and caused severe damage to shellfish culture industry. The survey on mussel toxicity in association with toxic dinoflagellate *Alexandrium* was conducted when cultured mussels *Mytilus edulis* were found to accumulate paralytic shellfish toxins from March to May 2007 in Jinhae Bay, Korea. The cell density of *Alexandrium* spp. increased until mid of April, following decreased and disappeared in end of May. The maximum cell densities of *Alexandrium* spp. reached 25,800 cells L⁻¹ on 30 May. The mussel toxicity also increased with increase of the cell density of *Alexandrium* spp. (except 30 March), and decreased gradually in proportion to cell density. The highest PSP toxicity was 4,456.01 µg STXeq. 100 g⁻¹ on 18 April. The predominant toxins detected in mussels were C1+2, GTX1+4, GTX2+3, and trace toxins were dcSTX, neoSTX, STX, GTX5. At the beginning of the survey, the proportion of C1+2 and GTX1+4 in mussels were much higher and lower, respectively. However, the former gradually decrease, while the latter gradually increased thereafter.

In order to rapid detection of the genus *Alexandrium* in environmental

water samples, the real-time PCR assay was adopted. 5.8S-b5' and 5.8S-b3' primers specifically amplified only the genus *Alexandrium*, while amplification products were undetectable in reaction containing the DNA of other dinoflagellates. The 6-month field survey conducted in Jinhae Bay (April-September), and the DNA of the genus *Alexandrium* was detected in April, May and August. It was similar period of occurrence toxic *Alexandrium* sp. in Korean coastal water. Therefore, the real-time PCR assay is available to rapid detection of the genus *Alexandrium* during coastal water monitoring.



I. 서론

유해 적조 발생(Harmful Algal Blooms, HABs)은 세계적으로 인류의 보건과 수산자원, 관광산업 등을 위협하며 연안해역의 산업화와 부영양화로 인해 그 규모가 점차 지속화·광역화 되고 있다(Anderson, 1989; Hallegraeff et al., 1992; Smayda et al., 1990). 유해 적조 발생의 원인이 되는 식물플랑크톤 중 일부는 독소를 생산하고 이것을 섭취한 조개류에 축적되고, 이를 섭취하여 중독된 포유류는 심할 경우 사망에 이르게 된다. 특히 와편모조류 *Alexandrium* (Halim)속은 강력한 신경독소를 생산하여 이들을 섭취한 패류의 마비성 패독(Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)으로 인한 심각한 경제적, 사회적 문제를 일으키고 있다(Anderson, 1997).

마비성 패독 독소는 강한 수용성의 신경독으로 포유동물 체내에서 나트륨채널에 대한 이온수송을 저해하여(Kao, 1993), 감각 이상과 구강주변의 마비 및 떨기와 구토, 졸림 등을 유발하고, 심할 경우 호흡곤란과 순환기 마비로 사망에 이르게 한다(Bricelj and Shumway, 1998). 또한 STX (saxitoxin) 화합물을 총칭하는 헤테로고리형 구아닌으로 주 골격을 이루고 20개 이상의 화합물로 구성되어 있다. 독성이 상대적으로 높은 carbamate계의 독소(STX, NEO, GTX1-4)와 독성이 가장 낮은 *N*-sulfocarbamoyl계 독소(C1-4, B1-2), 그 중간의 독성을 가지는 decarbamoyl계 독소(dcGTX1-4, dcSTX)로 구성된다(Oshima et al., 2003). 마비성 패독을 생산하는 와편모조류는 *Alexandrium acatenella*, *A. catenella*, *A. cochrutricula*, *A. fracterculus*, *A. fundyense*, *A. leei*, *A. minitum*, *A. tamarense*, *A. tamiyavanichii*, *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamanse* var. *compressum* 등이 알려져 있다(Taylor et al., 2003).

*Alexandrium*속은 주로 북미, 유럽 및 일본 등 북반구의 온대지역에서 발생하였으나(Dale and Yentsch, 1978), 최근에는 중국, 베트남, 태국, 브라질에서도 출현하고 있다(Wang et al., 2005; Nguyen-Ngo, 2004; Chou et al., 2004; Persich et al., 2006). 세계 여러지역의 *Alexandrium*속 독양상과 마비성 패독 발생에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다(Hall, 1982; Oshima et al., 1982; Maranda et al., 1985; Yoshida et al., 2001).

국내에서는 1986년과 1996년 독화된 담치를 섭취한 사람이 사망하는 사건이 발생하였고(Chang et al., 1987; Lee et al., 1997), 이러한 독화 발생은 매년 봄철 굴, 담치와 같은 패류의 수확금지가 반복되고 있다. 국내 양식 및 자연산 패류는 매년 진해만과 부산 가덕도, 통영 등에서 3월에서 6월 사이 규제치($80 \mu\text{g STXeq. } 100 \text{ g}^{-1}$) 이상의 독소가 검출되고 있다(NFRDI, 1998-2003). Chang et al. (1988)은 봄철 진해만 해역의 마비성 패독 발생의 원인생물이 *A. tamarensis*임을 확인하였고, Han et al. (1992)과 Lee et al. (1992)에 의해 독소를 생산하는 원인생물과 조개류의 독화에 대한 연구가 수행되었다. 또한 손 (2005)은 진해만의 *Alexandrium*속의 현존량과 담치류의 체내 독함량의 관계를 보고하였다.

따라서 진해만은 마비성 패독의 발생에 대한 지속적인 모니터링이 요구되는 지역이며, 일반적으로 현장 모니터링은 원인종의 마비성 패독 조사와 원인생물의 종 동정으로 이루어진다(Galluzzi et al., 2004). 그러나 마비성 패독 조사는 전처리와 분석에 많은 시간이 소요되며, 환경적인 조건에 따라 독성의 변화가 발생한다. 광학 현미경이나 전자현미경을 이용한 종동정 방법 또한 많은 시간이 소요되고, 정확한 종 동정을 위해 많은 경험이 요구되며 연구자에 따라 주관적인 견해로 결과의 오류를 유발한다(Rehnstam-Holm et al., 2002). 이러한 문제를 해결하기 위해 PCR 기법, Real-time PCR 기법, Fluorescence in situ hybridization (FISH),

Sandwich-hybridization, immunological 기법 등 여러 분자생물학적인 방법들이 개발되어 왔다(Scholin et al., 2003). 이 중 Real-time PCR 기법은 전기영동 없이 신속한 원인생물의 검출과 정량화가 가능하여 현재 *Pfiesteria* sp. (Bowers et al., 2000; Saito et al., 2002), *Karenia* sp. (Gray et al., 2003), *Aureococcus* sp. (Popels et al., 2003), *A. minutum* (Galluzzi et al., 2004) 등과 같은 유해 적조생물을 현장해수 내에서 검출하는데 이용하고 있다.

본 연구에서는 2007년 3월에서 5월까지 진해만을 대상으로 마비성 패독 발생을 모니터링하였고, 이 지역을 포함한 남해안 *Alexandrium*속 분리주의 독양상을 조사하였다. 또한 효율적인 현장 모니터링을 위해 Real-time PCR 기법을 이용하여 진해만 *Alexandrium*속을 신속하게 검출할 수 있는 방법을 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 조사지역

조사지역은 매년 봄 마비성 패독 발생으로 패류의 수확이 금지되는 남해 진해만을 대상으로 하였다. 진해만은 외해와 차단되는 폐쇄적인 형태이며, 내부에는 작은 만들이 곳곳에 형성되어 있어 해안선이 매우 복잡하다. 국내 최대 규모의 패류 양식이 행해지며, 특히 경남 마산시 수정리 해역은 담치 양식장이 밀집되어 있고 매년 *Alexandrium*속이 빈번하게 출현하는 지역이다(Fig. 1).



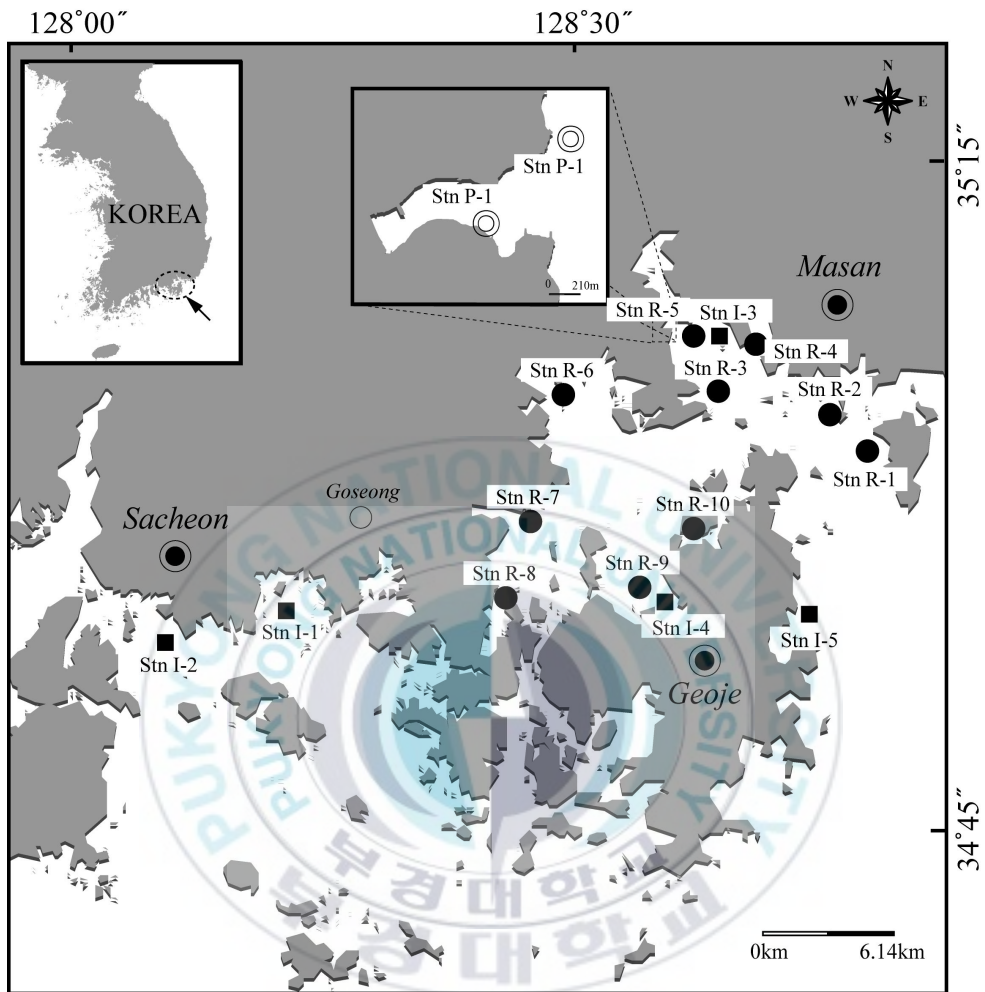


Fig. 1. The study area showing the location of sampling stations.

- : Regional *Alexandrium* isolates.
- : Environmental water sample for Real-time PCR.
- ⊙ : Phytoplankton and mussels.

2. 진해만의 마비성 패독 발생 조사

2.1. *Alexandrium*속의 확보 및 담치 채집

*Alexandrium*속 분리주 확보를 위해 진해만의 고현, 수정리, 지세포와 고성, 삼천포에서 저질시료를 채집하였다. 시료는 Core-sampler (TFO type, $\varnothing$ 1.1 and 4.3 cm)를 이용하여 채집 후 저온(10°C) 보관하여 실험실로 운반하였고 발아 방지하기 위해 4°C 의 냉암소에서 보관하였다. 저질시료의 표층을 털어내어 여과해수에 부유시킨 후 초음파처리하고 nylon mesh로 여과하였다. 밀도구배원심법(SPT-density gradient centrifugation method; Bolch, 1997)을 이용하여 저질시료 내 휴면포자를 분리하였고, 도립현미경(Olympus IX70)하에서 모세관피펫을 이용하여 *Alexandrium tamarense/catenella* complex 휴면포자를 분리하였다. 분리한 휴면포자는 SW II 배지, 17°C , $150\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 조건하에서 발아시켰고, 무균화하여 계대배양하였다(Table 1).

봄철 *Alexandrium*속의 출현량과 담치의 마비성 패독 관계를 조사하기 위해 경상남도 마산시 구산면 수정리 해역의 담치 양식장 2곳(Fig. 1)을 대상으로 2007년 3월에서 5월까지 약 일주일 간격으로 각 정점의 식물플랑크톤과 담치를 채집하였다. 식물플랑크톤 채집은 난센채수기를 이용하여 표층과 저층수를 각각 1 L 정량채수하고, nylon mesh로 여과한 후 50 mL로 농축하였고, 10% glutaraldehyde를 이용하여 최종농도 2%로 고정하였다. 고정된 시료는 Sedgwick-Rafter chamber에 1 mL 분취하여 Fukuyo et al. (1990)와 심(1994)의 방법에 따라 동정 및 계수하였다. 담치는 양식종인 진주담치(*Mytilus edulis*)를 식물플랑크톤 채집정점과 동일한 곳에서 약 20개체 채집한 후 저온(10°C) 상태로 실험실로 운반하였다.

2.2. HPLC를 이용한 마비성 패독 분석

마비성 패독 분석은 Oshima (1995) 방법에 따라 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용하였다. 담치의 독소 분석을 위한 전처리는 담치의 육질부를 동량의 0.1 N HCl로 균질화하고 얼음에 침지하면서 초음파 파쇄기(Daigger Ultrasonic Processor, GE750, Japan)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 조직은 pH 조절(3.5~4.0) 후 중탕(100℃, 5 min)하고 원심분리(3,000×g, 10 min)하여 상등액을 Sep-pak C₁₈ cartridge로 여과하였다. 이 중 1.5 mL을 한외여과기(Ultrafree-MC; M. W. 10,000, Millipore, Japan)에 넣어 원심분리(8,000×g, 10 min)하고 분석 전 까지 -20℃에 보관하였다(Fig. 2).

Alexandrium 분리주는 중기지수성장기에 50 mL 수확하여 원심분리(1,500×g, 5 min)한 후, 0.05N acetic acid를 첨가하고 초음파 파쇄기를 이용하여 얼음을 침지하며 파쇄 하였다. 파쇄 한 시료는 원심분리(10,000×g, 10 min)하여 상등액을 한외여과기(Ultrafree-MC; M. W. 10,000, Millipore, Japan)에 넣어 원심분리(8,000×g, 10 min)하고 분석 전 까지 -20℃에 보관하였다

각 독소의 분석조건은 Table 2에 나타내었다. 분석에 사용된 표준 독소는 일본 도호쿠대학의 Oshima 교수로부터 제공받았으며, 독성은 표준독소에 대한 상대값으로 계산하였다.

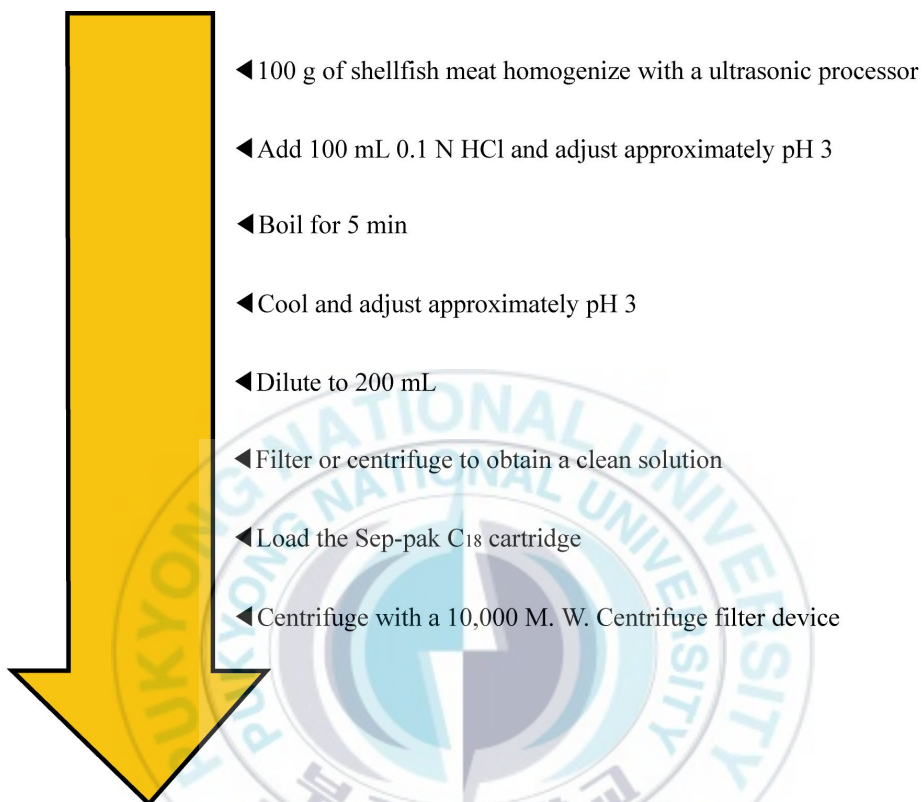
Table 1. Isolation information, strain code and identification of *Alexandrium* regional isolates

Strain code	Sampling			Species
	Site	Date	Origin	
SCPC0603	Samcheonpo	11. Mar. 2006	C	-
GSW0407	Gosung	.Jul. 2004	W	<i>A. catenella</i>
GHC0701-1	Gohyeon	17. Jan. 2007	C	<i>A. tamarense</i>
JSPC0701-4	Jiseopo	17. Jan. 2007	C	<i>A. catenella</i>
JSPC0701-5	Jiseopo	17. Jan. 2007	C	<i>A. catenella</i>
JSPC0701-9	Jiseopo	17. Jan. 2007	C	<i>A. catenella</i>
SJC0611-2	Sujeongri	09. Nov. 2006	C	-
SJC0611-3	Sujeongri	09. Nov. 2006	C	-
SJC0611-7	Sujeongri	09. Nov. 2006	C	-
SJC0609	Sujeongri	11. Sep. 2006	C	<i>A. tamarense</i>

C, cyst germinant; W, isolated from water samples.

Table 2. Operating conditions for HPLC analysis of PSP toxins

Column	Zorbax XDB-C ₈ column (4.6×250 mm; Agilent Technology)
Mobile phases	Flow rate : 0.8 mL/min
(a) Cs	1 mM Tetrabutyl ammonium phosphate , adjust pH 5.8 by actic acid
(b) GTXs	2 mM Sodium 1-heptanesulfonate in 10 mM Ammonium phosphate, adjust pH 7.1
(c) STXs	2 mM Sodium 1-heptanesulfonate in 30 mM Ammonium phosphate, adjust pH 7.1 : acetonitrile = 100: 6
Post column reaction reagent	Flow rate : 0.4 mL/min
Oxidizing reagent	7 mM Periodic acid in 50 mM Potassium phosphate buffer, adjust pH 9.0
Acidifying reagent	0.5 M Acetic acid
Reaction	10 m Teflon tubing (Ø 0.5 mm) at 65°C in water bath
Detection	Excitation : Emission wavelength = 330 : 390



Paralytic shellfish toxin analysis by HPLC

Fig. 2. Sample preparation of mussels for PSP toxins after the slight modification of Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000).

3. Real-time PCR 기법을 이용한 진해만의 *Alexandrium*속 검출

3.1. DNA 추출

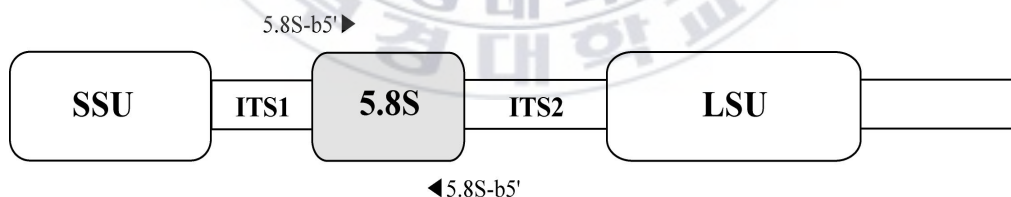
진해만 분리주 *A. catenella* (JSPC0701-5)와 *A. tamarense* (GHC0701-1)를 각각 원심분리 하여 TE buffer를 첨가하고 100℃에서 끓인 후 PCI (Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol, 25:24:1)용액을 첨가하고 원심분리 (14,000 rpm, 10 min)하였다. 99.5% 에탄올과 3 M sodium acetate (pH 5.2)를 첨가한 후 4시간동안 방치하고 DNA 침전을 위해 -20℃에서 30 분간 보관한 후 원심분리(14,000 rpm, 20 min)하였다. 그 후 70% 에탄올에 펠렛을 옮겨 50℃에서 건조하고 TE buffer를 첨가하여 분석 전까지 -70℃에 보관하였다.

현장해수시료의 DNA 추출은 진해만 각 정점의 표층수 250 mL를 GF/C로 여과한 후 위와 동일한 방법으로 추출하였다.

3.2. *Alexandrium*속 특이적인 Real-time PCR

실험에 이용한 primer는 *Alexandrium*속 5.8S rDNA 영역에 특이적으로 반응하는 5.8S-b5' (5'-YGA TGA AGA ATG CAG CAA MAT G-3')와 5.8S-b3' (5'-CAA GCA HAC CTT CAA GMA TAT CC-3') (Galluzzi et al., 2004)를 사용하였다(Fig. 3). PCR 반응액은 Platinum qPCR SuperMIX-UDG (Invitrogen), 50 μ M SYTO9 (Molecular probe), 0.05 μ M primer, 주형 DNA, 3차 증류수를 이용하였다. *Alexandrium*속 특이적인 Real-time PCR 수행을 확인하기 위해 *A. tamarense*, *A. catenella*와 그 외 와편모조류인 *Karlodinium veneficum*, *Cryptoperidiniopsis brodyi*, *Gymnodinium impudicum*을 실험에 이용하였다.

Real-time PCR Cycle은 95℃에서 10분, 95℃에서 15초, 60℃에서 1분 간 50 cycle로 증폭하였다(Rotor-Gene™ 6000, Corbett Research).



5.8S-b5': 5' -YGATGAAGAATGCAGCAAMATG- 3'

5.8S-b3': 5' -CAAGCAHACCTTCAAGMATATCC- 3'

Fig. 3. Organization of *Alexandrium* species rDNA and location of primer for the *Alexandrium* genus-specific PCR.

3.3. PCR inhibitor

진해만을 대상으로 표층해수 250 mL를 채수한 후, GF/C로 여과하여 3.1의 방법으로 DNA를 추출하였다. 현장해수시료 DNA 추출액에 *Karlodinium veneficum* DNA 추출액을 첨가한 후 KVF2a (5' -ACA GGT AGC GTC TCC AAC GA-3)와 KVR2b (5' -TGG AGC AGG CTA CGA GTC AA-3) primer를 이용하여 Real-time PCR을 수행하였다.

3.4. Real-time PCR 기법을 이용한 진해만의 *Alexandrium*속 검출

2007년 4월에서 9월까지 진해만에 출현하는 *Alexandrium*속을 검출하기 위해 매월 10개 정점(Fig. 1)에서 채집한 현장 해수를 대상으로 Real-time PCR을 수행하였다. 시료는 NFRDI에서 제공 받았다.

III. 결과

1. 진해만의 마비성 패독 발생 조사

1.1. *Alexandrium*속의 출현량과 담치의 독화

2007년 3월에서 5월까지 진해만의 *Alexandrium*속의 출현량 조사결과, 3월 30일에 정점1과 2에서 각각 25,800 cells L⁻¹와 19,800 cells L⁻¹로 최대를 나타냈고, 이후 감소한 다음 점차 증가하여 4월 18일에 각각 7,500 cells L⁻¹와 8,050 cells L⁻¹까지 증가한 후 다시 감소하였다(Figs. 5, 6). 담치의 독성은 3월 20일 첫 조사에서 규제치 이하로 검출되었고(4.27 μ g STXeq. 100 g⁻¹), 원인생물이 증가함에 따라 독성도 점차 증가하여 4월 18일 정점1과 2에서 각각 4,456 μ g STXeq. 100 g⁻¹, 2,868 μ g STXeq. 100 g⁻¹으로 가장 높게 검출되었고, 두 정점 모두 5월 19일부터 규제치 이하의 독성이 나타났다(Table 3).

진해만의 양식산 진주담치의 마비성 패류 독소는 두 정점에서 모두 C1, C2, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, neoSTX, dcSTX, STX가 검출되었다. 정점1의 C1+2 독조성 성분비는 평균 44.38 mol%였고 3월 20일경에 가장 높게 검출된 후 전체독성이 증가할수록 그 비율이 점차 감소하여 4월 26일에 35.00 mol%까지 낮아졌다. GTX1+4의 성분비는 평균 30.43 mol%로 첫 조사에서는 14.00 mol%로 낮게 나타났으나 4월 6일 최대 58.00 mol%까지 증가하였고, 이후 5월 23일에 9.00 mol%로 감소하였다. GTX2+3의 성분비는 평균 16.71 mol%였고, 3월 20일 첫 조사에서는 검출되지 않았으나 이후 점차 증가하여 4월 26일에 36.00 mol%를 나타낸 후 점차 감소하였다. 미량성분인 neoSTX는 3월 30일 조사에서

10.00 mol%를 나타낸 후 점차 감소하였고, dcSTX와 STX는 제독되는 시기에 0.00~2.00 mol%로 낮게 검출되었다. neoSTX, dcSTX, STX는 각각 평균 3.23 mol%, 0.09 mol%, 0.76 mol%의 성분비를 나타냈다. 정점2의 C1+2 독조성 성분비는 평균 39.39 mol%로 3월 20일 첫 조사에서 정점1(81.00 mol%)에 비해 낮은 53.00 mol%를 나타냈고, 이 후 점차 감소하다 5월 8일 이 후 증가하였다. GTX1+4의 성분비는 평균 35.09 mol%로 3월 20일부터 4월 20일까지 31.00~64.00 mol%로 증가하였고, 5월 23일 8.00 mol%로 감소하였다. GTX2+3의 성분비는 평균 35.00 mol% 였고, GTX5는 조사기간 동안 산발적으로 검출되었고 성분비는 평균 5.58 mol%로 나타났다. neoSTX, dcSTX, STX는 각각 평균 1.82 mol%, 0.14 mol%, 1.27 mol%의 성분비를 나타냈다.

조사기간 동안 마비성 패류 독소는 독화초기에 C2, GTX3, GTX4의 함량이 C1, GTX1, GTX2 함량보다 높았으나 제독되는 기간에 C2, GTX3, GTX4의 함량이 감소하고 이에 반해 C1, GTX1, GTX2의 함량이 높아지는 변화를 나타냈다.

Table 3. PSP toxicity of mussels *Mytilus edulis* and abundance of the genus *Alexandrium* cells on Jinhae Bay from March to May 2007

	Stn 1		Stn 2	
	Toxicity ($\mu\text{g STXeq. } 100 \text{ g}^{-1}$)	<i>Alexandrium</i> spp. (cells L^{-1})	Toxicity ($\mu\text{g STXeq. } 100 \text{ g}^{-1}$)	<i>Alexandrium</i> spp. (cells L^{-1})
20-Mar	4.27	1,200	14.13	2,900
27-Mar	110.21	850	99.26	800
30-Mar	283.30	25,800	47.77	19,800
06-Apr	1,221.92	1,850	1,411.20	1,600
10-Apr	1,671.06	2,650	1,345.22	1,400
18-Apr	4,456.01	7,500	2,868.57	8,050
26-Apr	1,731.47	500	774.04	300
08-May	358.84	100	178.54	100
19-May	30.45	700	36.65	400
23-May	27.24	350	19.47	200

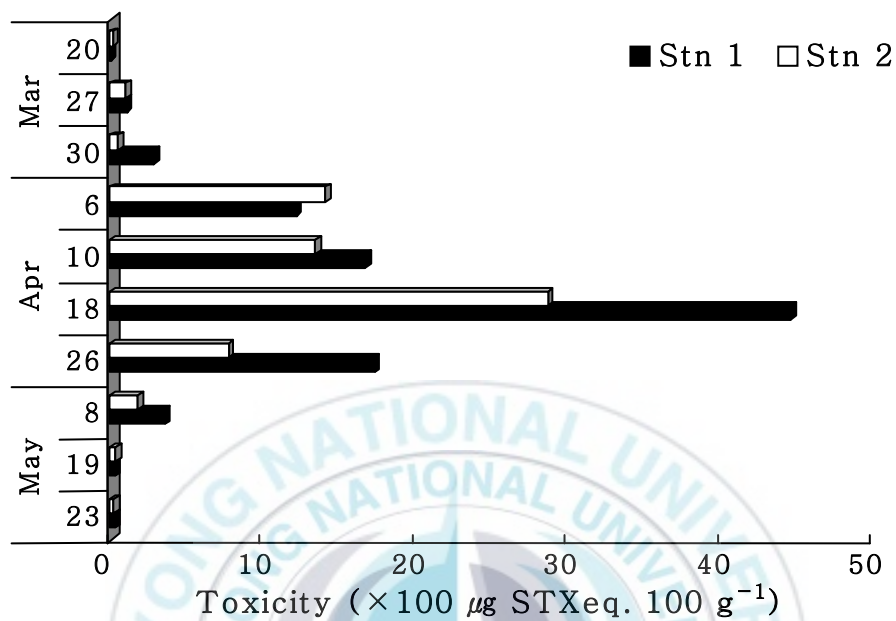


Fig. 4. Comparison of the PSP toxicity of mussel *Mytilus edulis* between the farms in Jinhae Bay from March to May 2007.

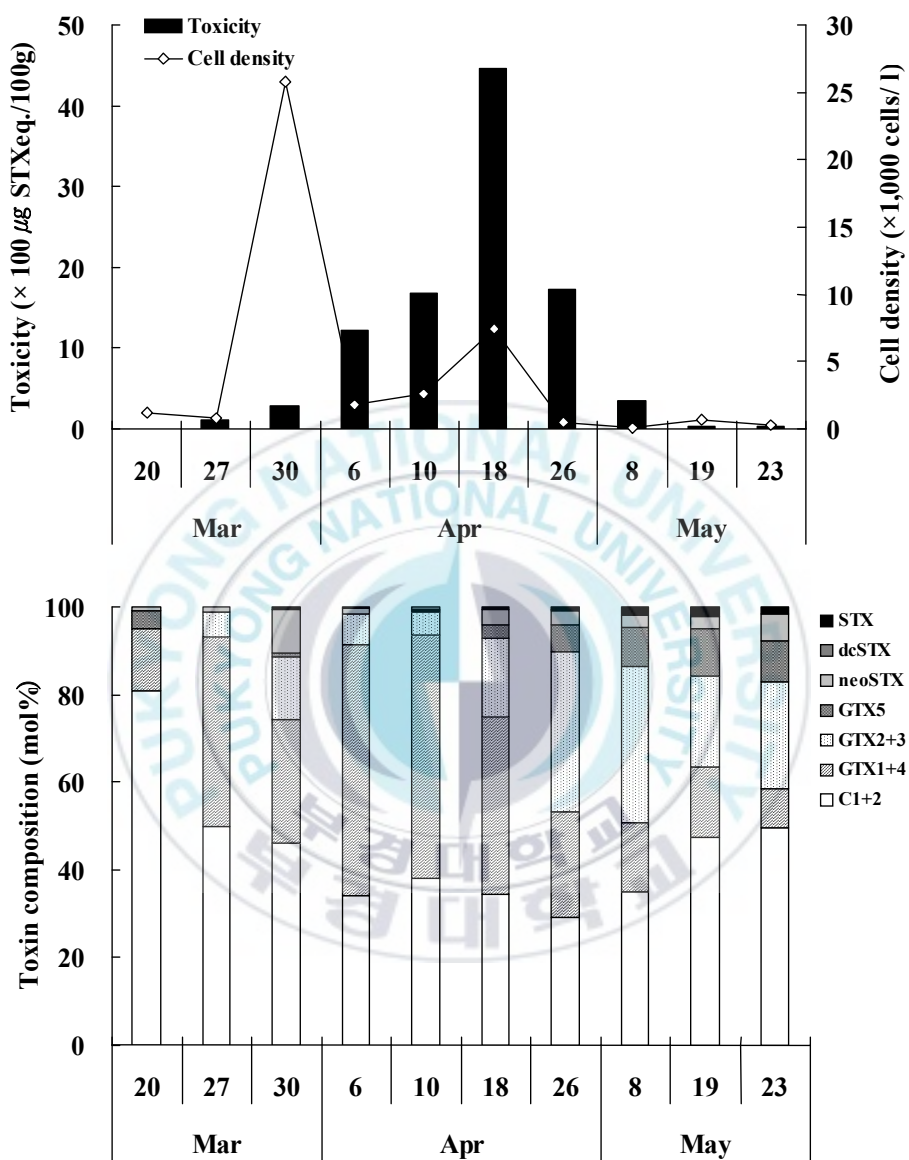


Fig. 5. Temporal change of PSP toxicity of mussel *Mytilus edulis* and *Alexandrium* cell density (a), and PSP toxin composition of mussel (b) at Stn 1. in Jinhae Bay from March to May 2007.

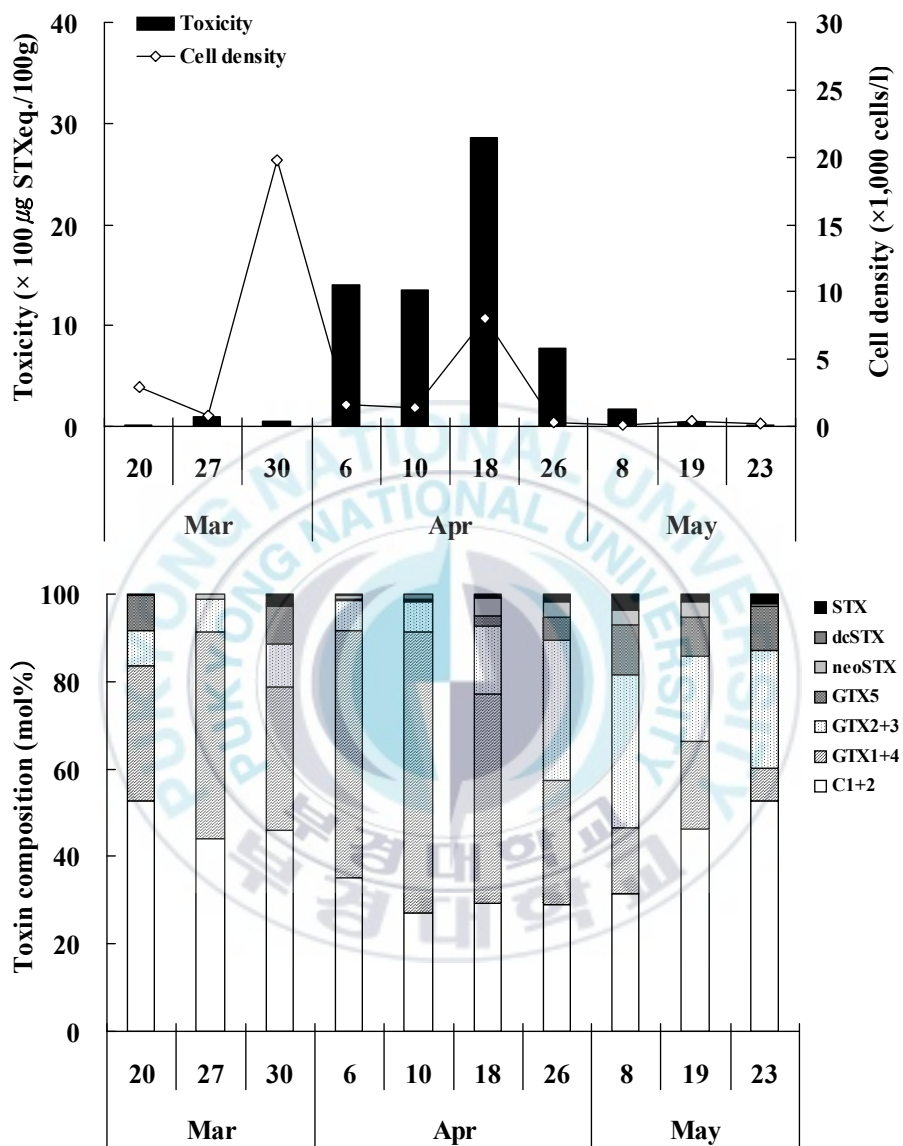


Fig. 6. Temporal change of PSP toxicity of mussel *Mytilus edulis* and *Alexandrium* cell density (a), and PSP toxin composition of mussel (b) at Stn 2. in Jinhae Bay from March to May 2007.

Table 4. PSP toxin content and composition of mussel *Mytilus edulis* at stn 1 in Jinhae Bay from March to May 2007

	Toxin content (nmol g ⁻¹)										
	C1	C2	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	neoSTX	dcSTX	STX	Total
20-Mar	0.20	0.25	0.06	-	-	Tr	Tr	Tr	-	-	0.56
27-Mar	0.37	1.08	0.36	0.06	0.11	0.89	-	Tr	-	-	2.89
30-Mar	0.66	2.64	0.57	0.24	0.79	1.45	0.08	0.72	-	Tr	7.18
06-Apr	2.33	6.20	4.58	0.55	1.23	9.90	-	0.31	-	Tr	25.16
10-Apr	4.87	8.97	7.17	0.70	1.19	13.00	0.15	0.08	0.27	-	36.40
18-Apr	11.12	21.06	32.33	16.12	0.75	5.69	2.75	3.26	Tr	0.56	93.68
26-Apr	7.31	2.46	6.91	11.25	0.92	1.22	2.07	1.13	Tr	0.25	33.54
08-May	2.15	0.58	0.95	2.47	0.28	0.29	0.71	0.21	-	0.14	7.79
19-May	0.38	Tr	0.11	0.17	-	Tr	0.09	Tr	-	Tr	0.84
23-May	0.32	Tr	Tr	0.18	-	Tr	0.07	Tr	-	Tr	0.73

.-, not detected.

Tr, <0.05.

Table. 5 PSP toxin content and composition of mussel *Mytilus edulis* at stn 2 in Jinhae Bay from March to May 2007

	Toxin content (nmol g ⁻¹)										Total
	C1	C2	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	neoSTX	dcSTX	STX	
20-Mar	0.22	0.27	0.19	Tr	-	0.09	0.07	-	-	-	0.92
27-Mar	0.24	0.59	0.28	Tr	0.09	0.61	-	Tr	-	-	1.88
30-Mar	0.17	0.55	0.24	0.11	Tr	0.28	0.14	Tr	-	-	1.53
06-Apr	2.88	7.53	5.35	0.56	1.42	11.41	0.06	0.35	-	-	29.57
10-Apr	2.79	4.00	6.66	0.72	0.96	9.50	0.08	0.12	0.26	-	25.10
18-Apr	4.37	12.19	23.39	8.66	0.13	3.73	1.42	2.16	0.02	0.38	56.47
26-Apr	2.82	1.46	3.64	4.61	0.10	0.61	0.78	0.52	-	0.12	14.66
08-May	1.00	0.21	0.43	1.19	0.14	0.15	0.44	0.13	-	0.10	3.78
19-May	0.39	0.06	0.17	0.19	-	Tr	0.09	Tr	-	0.01	0.98
23-May	0.27	Tr	Tr	0.15	-	Tr	0.06	-	-	0.01	0.57

.-, not detected.

Tr, <0.05.

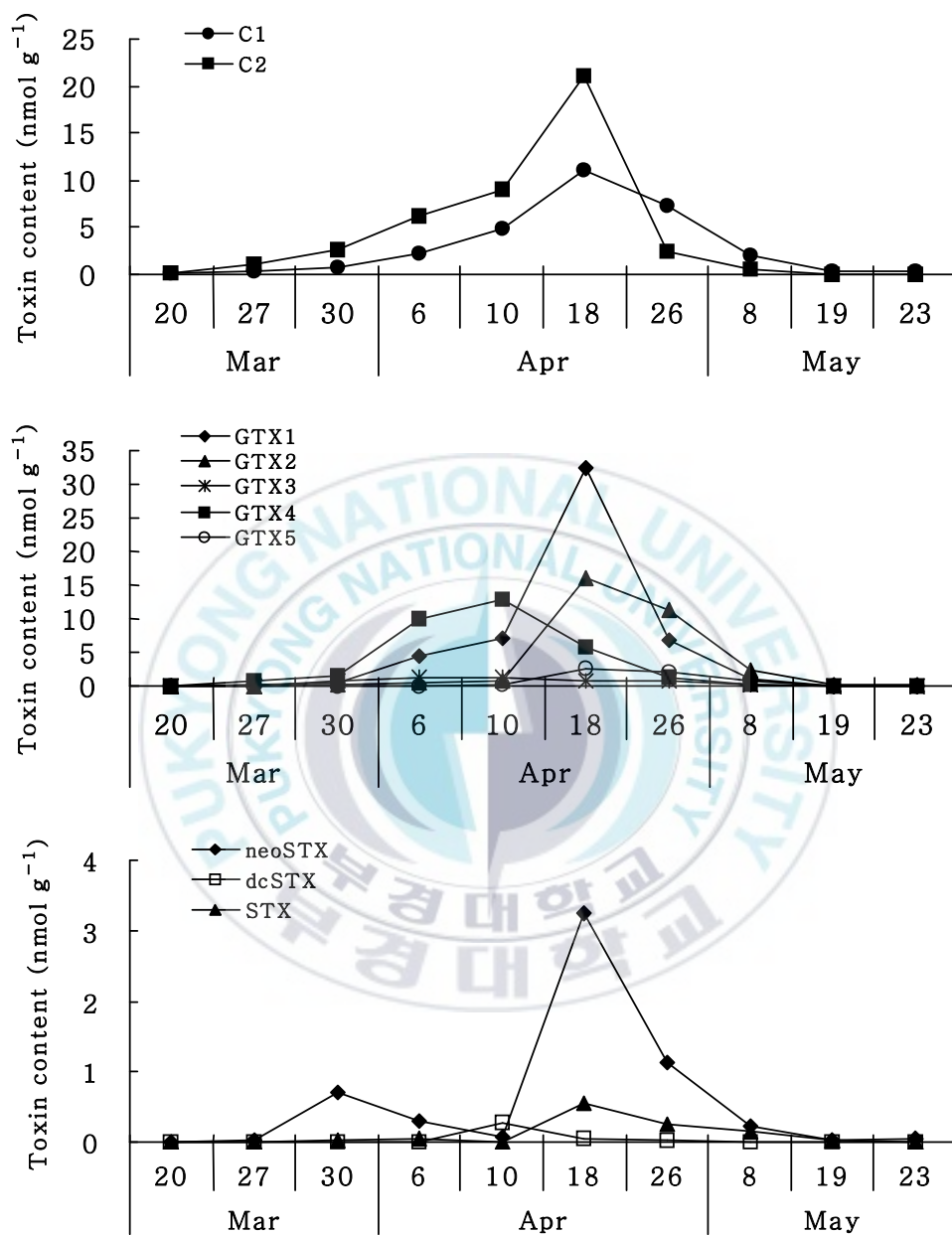


Fig. 7. The change of individual PSP toxin groups of mussel *Mytilus edulis* at Stn 1 in Jinhae Bay from March to May 2007; C toxin (a), GTX (b), STX(c).

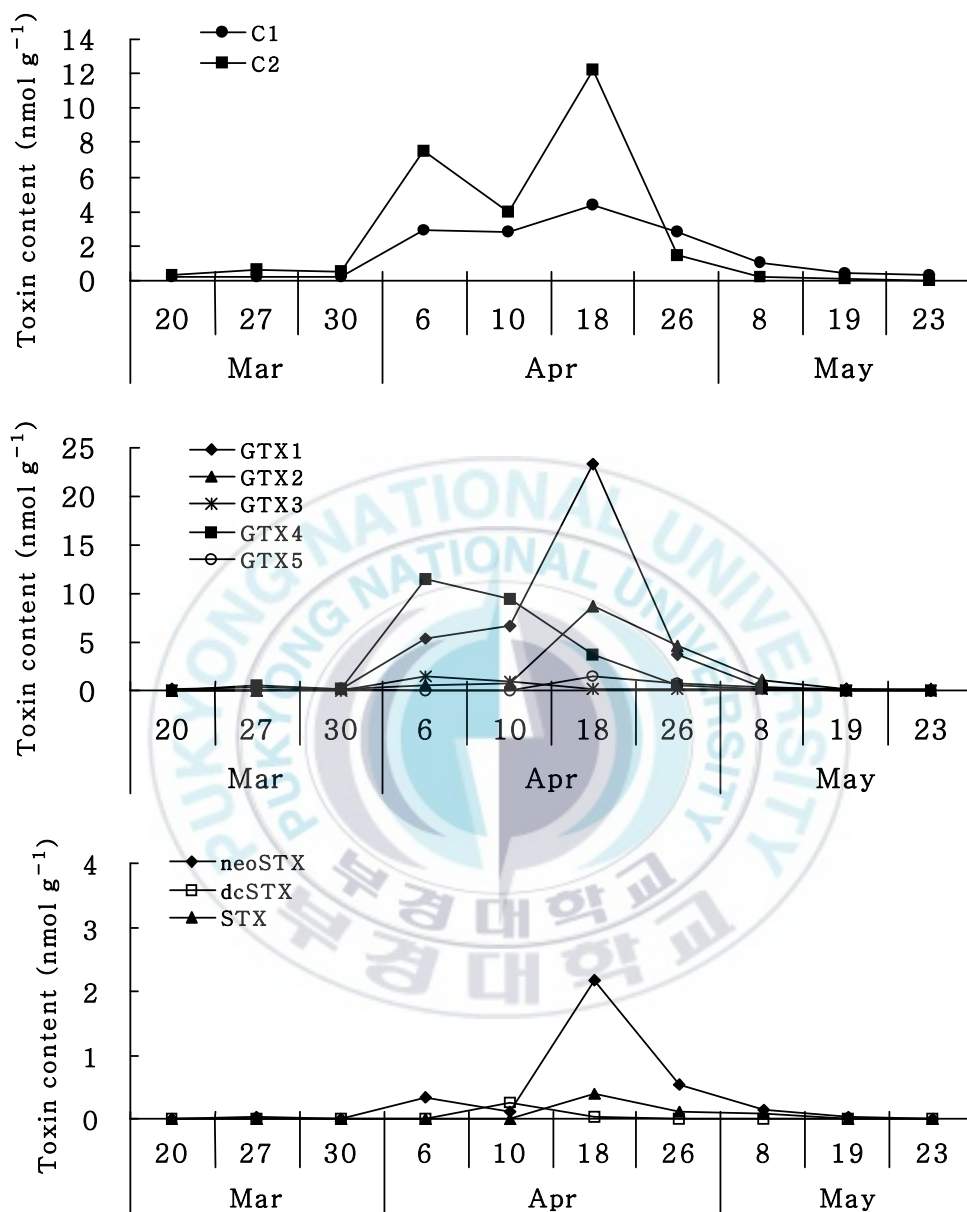


Fig. 8. The change of individual PSP toxin groups of mussel *Mytilus edulis* at Stn 2 in Jinhae Bay from March to May 2007; C toxin (a), GTX (b), STX(c).

1.2. *Alexandrium*속 분리주의 마비성 패독 독성

진해만 3지역과 고성, 삼천포 *Alexandrium*속 분리주의 마비성 패독은 3.95 (JSPC0701-5)~144.20 (SJC0609) fmol cell⁻¹ 이었고, 모든 분리주에서 C1, GTX1, GTX3, GTX4, neoSTX가 검출되었다. 지세포와 수정리 분리주의 주요성분은 C1+2였고, 고현과 삼천포 분리주는 neoSTX, 고성 분리주는 GTX1+4가 주요 성분이었다. 이 외에도 GTX2+3, GTX5, dcSTX, STX 등이 미량성분으로 검출되었다. 지세포 분리주 중 JSPC0701-5는 매우 낮은 독성(3.95 fmol cell⁻¹)을 나타냈고, 주요성분은 C1, 미량성분은 GTX4, GTX5가 검출되었다. 고성과 삼천포의 분리주는 GTX1+4와 neoSTX가 주요성분으로 진해만의 분리주와 독조성비에서 차이를 보였다. 분리주에서 독성이 높은 Carbamate계 독소(GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, neoSTX, STX)는 2.12 (JSPC0701-5)~89.43 (SCP0603) mol%였고, GHC0701-1 (63.98 mol%), GSW0407 (75.95 mol%), SCPC0603 (89.43 mol%)에서는 매우 높은 비율을 나타냈다.

Table. 6 Individual toxin contents of *Alexandrium* regional isolates

Isolates	Toxins, fmol cell ⁻¹										Total
	C1	C2	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	neoSTX	dcSTX	STX	
SCPC0603	9.16	-	3.57	0.40	7.40	32.86	1.63	45.51	-	1.59	102.12
GSW0407	5.84	4.53	1.41	-	Tr	23.79	-	7.54	-	-	43.12
GHC0701-1	2.17	10.96	0.35	Tr	0.28	6.69	-	15.42	0.10	0.74	36.71
JSPC0701-4	18.70	54.72	1.74	Tr	0.92	14.36	-	51.29	-	1.11	142.87
JSPC0701-5	3.75	-	-	-	-	Tr	0.12	-	-	-	3.95
JSPC0701-9	8.94	16.67	0.65	Tr	0.15	4.43	-	9.95	0.45	0.14	41.38
SJC0611-2	32.06	46.89	4.63	0.15	6.55	39.89	Tr	7.06	3.95	Tr	144.20
SJC0611-3	4.52	16.18	0.97	-	0.21	7.44	-	2.85	Tr	-	32.19
SJC0611-7	7.46	19.56	0.68	Tr	0.55	6.50	Tr	0.56	0.22	-	35.59
SJC0609	6.56	44.70	0.32	Tr	1.41	19.02	Tr	14.70	3.02	Tr	90.40

-, not detected.

Tr, <0.05.

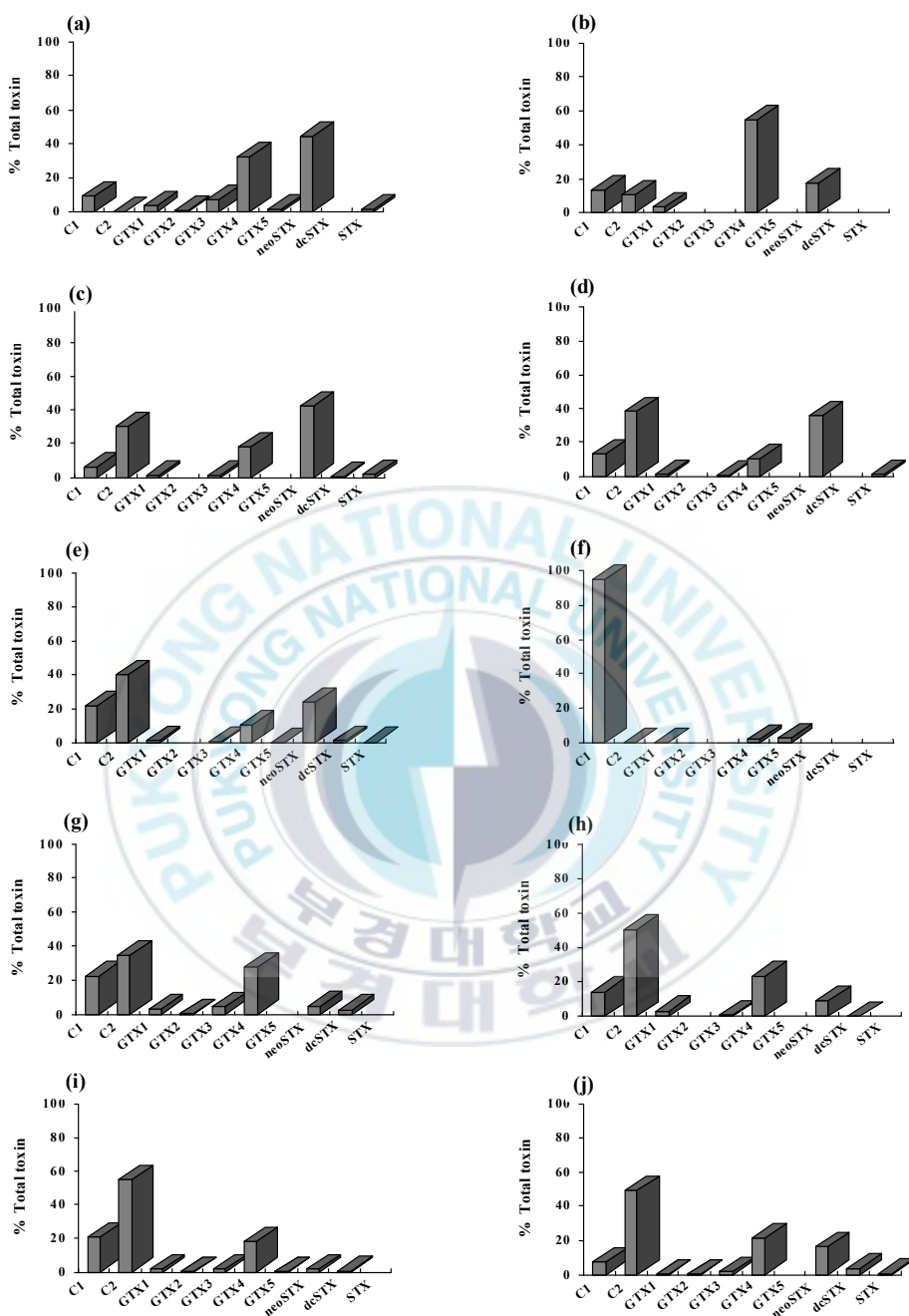


Fig. 9. Toxin composition of the *Alexandrium* regional isolates as a percentage of total toxins. (a) SCPC0603; (b) GSW0407; (c) GHC0701-1; (d) JSPC0701-4; (e) JSPC0701-9; (f) JSPC0701-5; (g) SJC0611-2; (h) SJC0611-3; (i) SJC0611-7; (j) SJC0609.

2. Real-time PCR 기법을 이용한 진해만의 *Alexandrium*속 검출

2.1. *Alexandrium*속 특이적인 Real-time PCR

*Alexandrium*속 중 특이적인 5.8S-b3', 5.8S-b5' primer쌍의 반응 특이성을 검증하기 위해 *A. catenella*, *A. tamarense* 배양주 외에 *Karlodinium veneficum*, *Cryptoperidiniopsis brodyi*, *Gymnodinium impudicum* 배양주를 DNA주형으로 사용하여 Real-time PCR을 실시하였다(Table 7). 반응결과 positive control(*A. catenella*, *A. tamarense*)을 제외한 다른 외편모조류와 반응하지 않아, 5.8S-b3', 5.8S-b5' primer쌍은 *Alexandrium*속에 대해 종 특이성을 나타내고 있음을 확인하였다.

Table. 7 Specificity of Real-time PCR

Species	Phylogenetic association	Amplification
<i>Alexandrium catenella</i>	Dinoflagellate (<i>Gonyaulacaceae</i>)	+
<i>Alexandrium catenella</i>	Dinoflagellate (<i>Gonyaulacaceae</i>)	+
<i>Alexandrium tamarense</i>	Dinoflagellate (<i>Gonyaulacaceae</i>)	+
<i>Alexandrium tamarense</i>	Dinoflagellate (<i>Gonyaulacaceae</i>)	+
<i>Karlodinium veneficum</i>	Dinoflagellate (<i>Gymnodiniaceae</i>)	-
<i>Cryptoperidiopsis brodyi</i>	Dinoflagellate (<i>Gymnodiniaceae</i>)	-
<i>Gymnodinium impudicum</i>	Dinoflagellate (<i>Gymnodiniaceae</i>)	-

-, amplification products not detected;

+, amplification products detected.

2.2. PCR inhibitor

진해만 현장시료 250 mL의 PCR inhibitor를 확인 한 결과 이 지역에 서는 어떠한 inhibitor도 검출되지 않았다(Fig. 12). 따라서 진해만의 현 장해수시료 250 mL는 희석이나 화학물질을 이용하지 않아도 3.1의 DNA추출방법으로 Real-time PCR 수행이 가능하였다.

2.3. Real-time PCR 기법을 이용한 진해만 현장해수시료의 *Alexandrium* 속 검출

진해만 현장해수시료를 대상으로 Real-time PCR을 수행한 결과 2007 년 4월부터 9월 까지 *Alexandrium*속은 4월에는 정점 2, 3, 5번에서 반 응을 나타냈고, 5월에는 정점 5, 8, 10번에서, 8월에는 정점 7, 8, 10번에 서 반응을 나타냈다. 이밖에 6, 7, 9월에는 어느 정점에서도 *Alexandrium*속 이 검출되지 않았다(Fig. 13, Table 9).

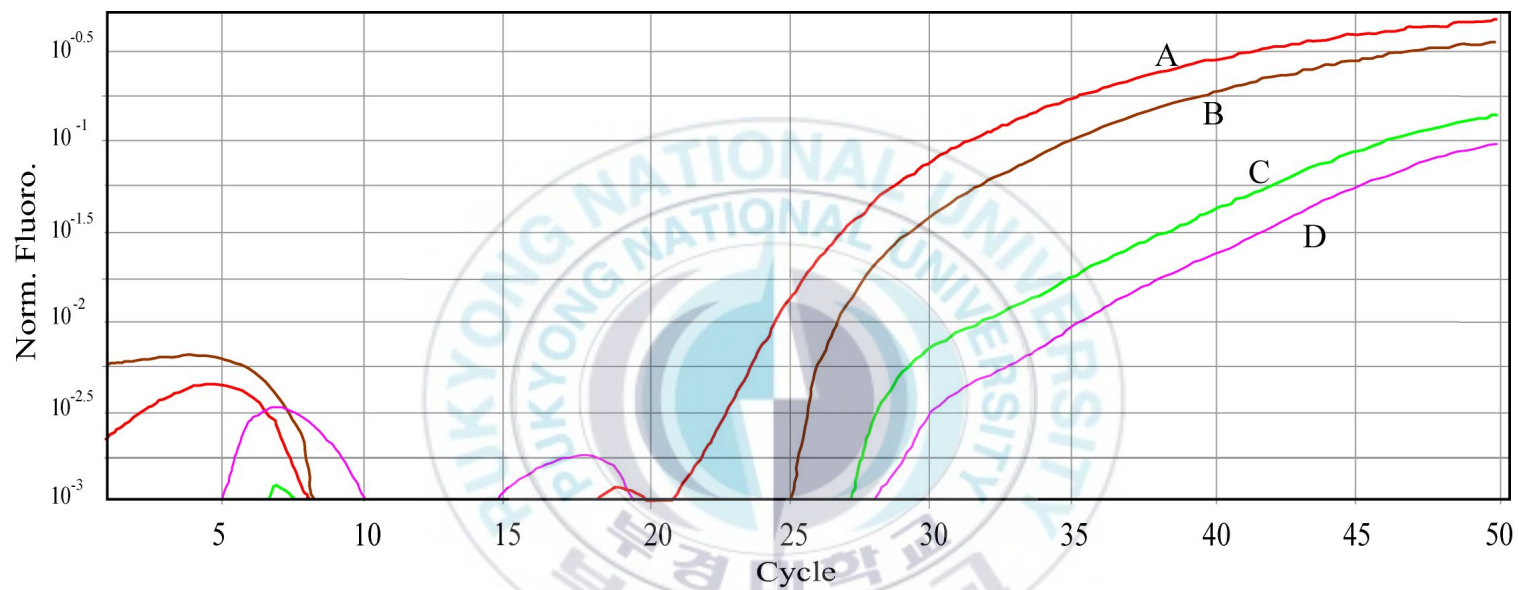


Fig. 10. The specificity test of the genus *Alexandrium* specific primer set, 5.8S-b5',5.8S-b3'.
A, B; *A. catenella*; C, D; *A. tamarense*.

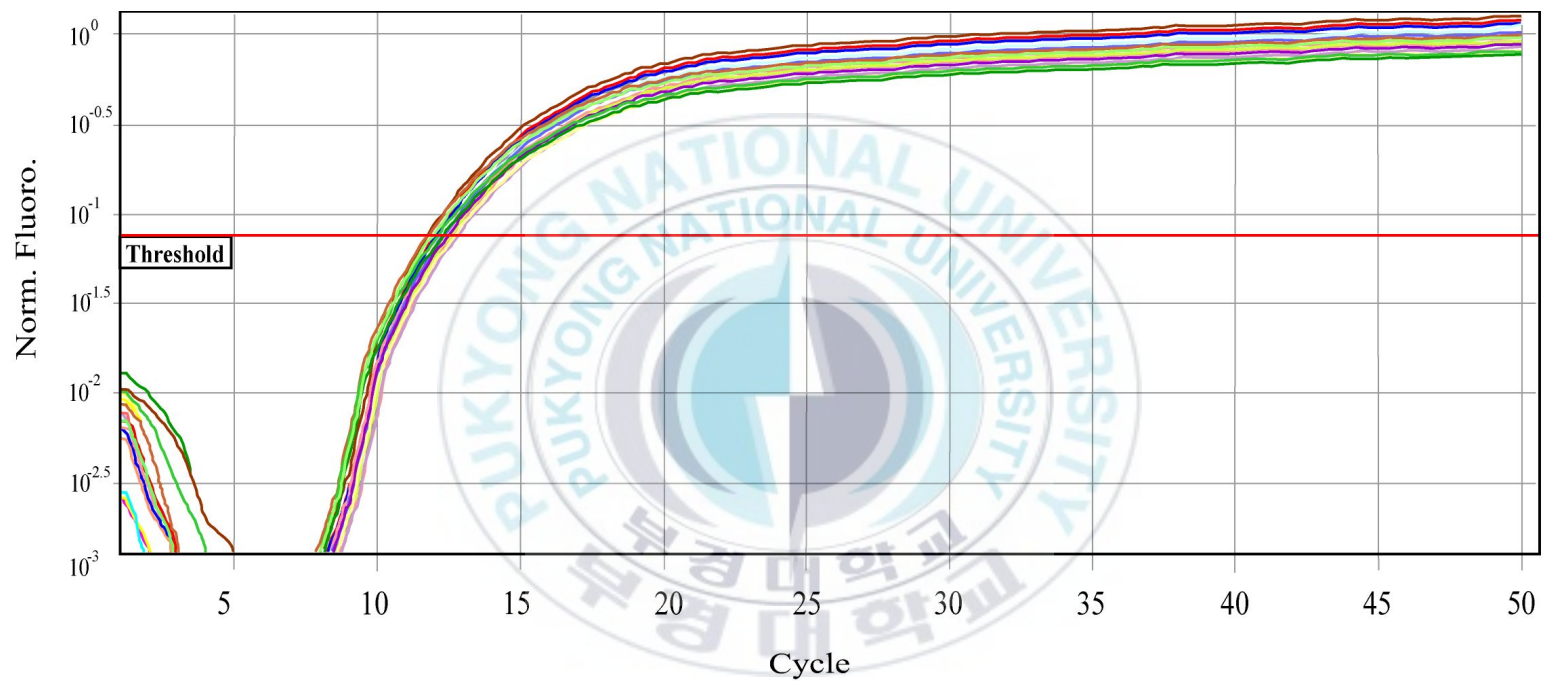


Fig. 12. PCR inhibitor test by *Karlodinium veneficum* in Jinhae Bay.

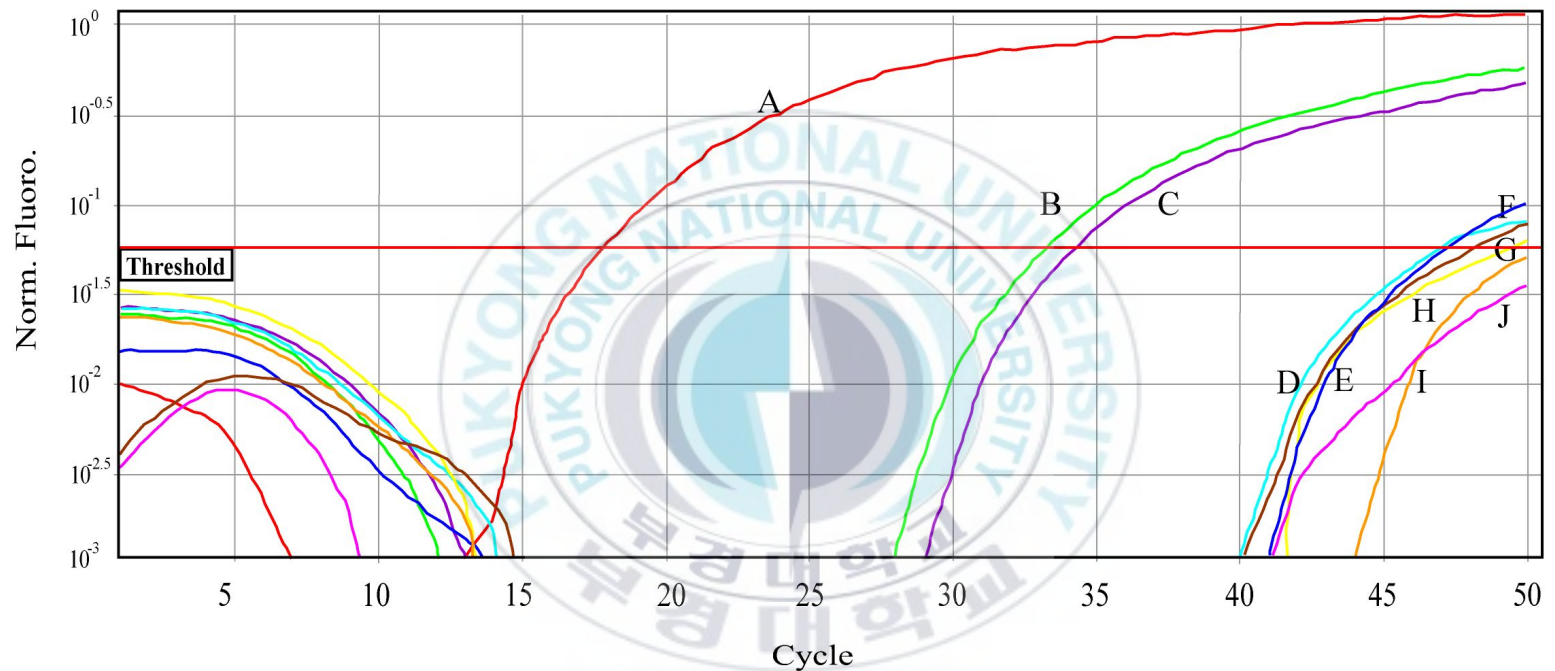


Fig. 13. Real-time PCR assay on environmental water samples in Jinhae Bay for detection of the genus *Alexandrium* from April to September 2007. A, *A. catenella* (nested PCR); B, Aug. Stn R-7; C, Aug. Stn R-8; D, May Stn R-8; E, May Stn R-5; F, Apr. Stn R-2; G, Aug. Stn R-10; H, Apr. Stn R-5; I, May Stn R-10; J, Apr. Stn R-3.

Table 8. Detection of the genus *Alexandrium* by Real-time PCR assay on environmental water samples in Jinhae Bay from April to September 2007

Month	Station									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4	-	+	+	-	-				-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

empty space, not sampling.

+, detected; -, not detected.

IV. 고찰

1. 진해만의 마비성 패독 발생 조사

2007년 3월부터 5월까지 진해만 진주담치의 마비성 패독 발생과 원인생물의 출현량의 상관관계를 조사하였다. 3월부터 발생한 마비성 패독 발생은 5월까지 진행되었고, 4월 중순에 최대치를 기록하였다. 정점 1에서 *Alexandrium*속은 최대 25,800 cells L⁻¹ 출현량을 나타냈고 최대 독성은 4,456.02 µg STXeq. 100 g⁻¹이었다. 정점 2에서는 최대 19,800 cells L⁻¹ 출현량을 나타냈고 최대 독성은 2,868.57 µg STXeq. 100 g⁻¹으로 정점1과 비교하였을 때 출현량과 독성이 모두 낮게 나타났다. 이결과 진해만의 *Alexandrium*속의 출현량이 높을수록 독성도 증가하는 것으로 사료된다. 1990년 진해만 조사에서도 4월 중순 원인생물의 급격한 증가에 따라 담치의 독성이 증가하였고(Lee et al., 1992), 2005년 조사에서도 *Alexandrium* spp.가 출현량이 많아질수록, 담치류의 독성도 증가하였다(Shon, 2005).

하지만, 담치의 마비성 패독 발생은 원인생물인 *Alexandrium*속의 증가와 반드시 그 시기가 동일하지 않는 것으로 사료된다(Figs. 5, 6). *Alexandrium*속의 최대 출현량은(3월 30일) 담치의 최대 독화 시기(4월 18일)보다 약 3주정도 앞서 나타났으며, 이 때 담치의 독성은 규제치(80 µg STXeq. 100 g⁻¹)이하 이거나 점차 증가되는 시기였다. 이후 *Alexandrium*속의 출현량은 재차 증가하였고, 출현량의 증가와 비례하여 담치의 독성도 증가하였다. Chang et al. (1988)은 1987년 마산 지역에서 마비성 패류 독화가 시작된 후 약 7일 후에 *Protogonyaulax catenella* (= *A. catenella*)가 출현하였고 마비성 패류 독화가 검출되지

않은 시점부터 약 5일정도 후에 원인생물이 소멸하였다고 보고하였다. 또한 Nishitani et al. (1984)는 1981년과 1983년 미국의 Quartermaster 항에서 진주담치의 독성과 *A. catenella*의 상관관계를 조사한 결과, 1981년에 진주담치의 독성이 최고에 도달한 후 원인생물인 *A. catenella*의 출현량이 최대에 도달하였으나, 1983년에는 원인생물의 출현량이 최대에 도달한 후 독성이 최고에 도달하여 원인생물의 출현량과 패류의 독화 사이에 항상 일정한 상관관계가 성립되는 것은 아니라고 보고하였다.

한편, 원인생물에 의해 생산되는 11β -epimer 독소(C2, GTX3,4)는 조개류의 체내에서 일반적으로 더 안정된 11α -epimer 독소(C1, GTX1,2)로 전환된다(Oshima, 1995; Bricelj and Sumway, 1998). 또한 조개류 체내에 축적된 독소들 중 이성질체독소의 전환은 실험실에서 수행한 독화 실험보다는 자연환경에서 주로 나타나고, 조개류의 조직 내에서 효소에 의하거나 화학적인 반응에 의해 독소전환이 발생한다고 알려져 있다(Shimizu and Yoshioka, 1981; Sullivan et al., 1983; Anderson et al., 1989; Cembella et al., 1993; Bricelj et al., 1996). 본 조사에서도 두 정점 모두 담치의 독화시간 경과에 따른 이성질체독소의 전환이 관찰되었다. 독화가 시작되면서 11β -epimer 독소가 11α -epimer 독소에 비해 높은 비율로 나타났으나 제독이 진행되면서 11α -epimer 독소의 비율이 11β -epimer 보다 점차 높게 나타났다.

한편, STX는 조개류의 제독이 진행됨에 그 비율이 증가하며, (Oshima et al., 1990; Sekiguchi et al., 2001) 이는 생체내의 산화·환원 반응에 이용되는 glutathione과 같은 티올(thiol) 화합물과 반응하여 마비성패류 독소의 11-O-sulfate 유도체(GTX)로부터 생체전환된다(Asakawa et al., 1987; Sakamoto et al., 2000, Sekiguchi et al., 2001).

본 조사에서 STX는 정점 1에서 3월 30일과 4월 6일 미량으로 나타난 것을 제외하면, 제독되는 시기부터 검출되었으며, 이때 GTX1+4의 비율은 상대적으로 감소하였다. 이는 티올에 의해 11-O-sulfate 유도체인 GTX1+4가 STX로 생체전환된 것으로 사료된다.

진해만을 포함한 남해안 5지역의 *A. catenella* 및 *A. tamarense* 분리주는 3.95~144.20 fmol cell⁻¹의 독함량을 나타냈고, 이는 Kim (1995)과 Kim et al. (2005)에 의해 조사된 진해만의 *Alexandrium*속 분리주의 독함량과 유사하였다.

일반적으로 *Alexandrium*속은 지리적으로 구분된 개체군이라도 독조성은 유전적으로 안정되고, 이것에 의한 지역 간의 개체군 식별이 가능하다(Boyer et al., 1987, Oshima et al., 1987). 본 조사에서 진해만의 3지역의 모든 분리주에서(JSPC0701-5 제외) C1, C2, GTX1, GTX3, GTX4, neoSTX가 동일하게 검출되었고, GTX2, GTX5는 미량이거나 검출되지 않는 특징을 보였다. 반면 STX는 고성과 지세포의 분리주에서만 검출되었고 수정리의 분리주에서는 미량이거나 검출되지 않아 STX에 의한 서로 다른 독조성을 가지는 지역분리주가 확인되었다. 고성 분리주의 독조성은 진해만과 유사하였으나, GTX3이 검출되지 않았고 삼천포의 분리주는 C2가 검출되지 않은 반면 GTX2와 GTX5가 검출되어 진해만의 분리주와 독조성에서 차이를 나타냈다. 김. (2002)은 진해만의 수정리와 진동리 분리주에서 동일종임에도 GTX2 및 STX의 독조성에서 차이를 나타냈고, 남해 외해역 및 황해 지역에서도 GTX5에 의해 서로 다른 독조성을 가진 지역분리주가 존재한다고 보고하였다.

진해만의 모든 분리주 독조성에서 C1+2의 성분비가 가장 높았으며, 지세포의 분리주가 수정리 분리주에 비해 neoSTX의 성분비가 높게 나타났다. 반면 고성과 삼천포의 분리주는 맹독인 carbamate계 독소의 비

율이 진해만 분리주 보다 높게 나타났다. 특히 삼천포 분리주는 진해만의 분리주와 독조성비에 있어 많은 차이를 나타냈다. 이는 삼천포 남동 화력발전소 앞의 퇴적물에서 분리한 휴면포자의 분리주로 화력발전소에서 배출되는 온배수와 같은 환경조건에 따른 차이로 사료되며 이러한 특징을 규명하기위해 앞으로 이 지역의 분리주와 주변 환경요인에 대한 연구가 계속되어야 할 것이다.



2. Real-time PCR 기법을 이용한 진해만의 *Alexandrium*속 검출

본 연구에서는 Real-time PCR 기법을 이용하여 *Alexandrium*속을 현장해수시료에서 특이적이고 신속하게 검출할 수 있는 방법을 시도하였다. *Alexandrium*속 특이적인 5.8S-b5', 5.8S-b3' primer의 특이성을 검증하기 위하여 진해만에서 분리한 *A. catenella*와 *A. tamarense* 배양주와 그 밖의 3종의 와편모조류의 DNA 주형을 사용하여 Real-time PCR을 실시하였고, primer은 진해만의 *Alexandrium*속 배양주를 제외한 다른 와편모조류와 반응하지 않아 그 특이성이 확인되었다. Galluzzi et al. (2004)의 연구에서도 이탈리아산 *A. catenella*, *A. taylori*, *A. tamarense*, *A. minutum*과 그 외 와편모조류, 규조류를 대상으로 동일한 primer의 특이성을 확인 하였다.

한편, 현장해수시료에는 종종 PCR을 방해하는 유기·무기물질을 포함하며 이것은 target DNA와 함께 추출되어 결과의 오류를 유발한다(Lin et al., 2006; Zhang et al., 2005). 특히 표층의 시료는 석탄산(phenolic)과 부식산, 중금속과 같은 PCR 방해인자를 포함하고 있다(Wilaon, 1997). 진해만 현장해수시료에 250 mL에 대한 PCR 방해인자를 확인하기 위해 현장해수시료 DNA추출액에 *Karlodinium veneticum*을 첨가하여 Real-time PCR를 실시한 결과, 이 지역에서는 어떠한 방해인자도 검출되지 않았다(Fig. 12). 따라서 본 연구에서 이용한 DNA 추출 방법은 진해만의 현장해수시료 250 mL내 방해인자의 영향을 받지 않는 것으로 확인되어 Real-time PCR수행에 이용하였고 신속한 현장해수시료내 *Alexandrium*속의 검출이 가능하였다.

2007년 4월부터 9월까지 Real-time PCR 기법을 이용하여 진해만의 *Alexandrium*속의 출현을 조사한 결과, 4월, 5월 그리고 8월의 현장시료

에서 *Alexandrium*속이 검출되었다(Table. 8). 4월과 5월에 검출된 *Alexandrium*은 봄철 진해만의 마비성 패독 발생의 원인 생물로 보고된 종으로 사료되며(Lee et al., 1992), 8월에는 주로 국내에서 고온에 발생하는 종으로 알려진(김 등, 1999) *Alexandrium*이 검출된 것으로 사료된다.

종 특이적인 genetic marker를 이용한 분자적 접근은 형태학적으로 매우 유사하여 현미경으로 정확한 동정을 하기 어려운 종에 대한 정확하고 빠른 검출이 가능하며(Muller et al., 1995; Mauchline et al., 2002; Zhang and Lin., 2002), 최근에는 Real-time PCR을 현장해수내 유해 적조생물을 검출하는데 이용하고 있다. Galluzzi et al. (2004)은 이탈리아 현장해수시료내 *A. minutum*의 신속한 검출을 방법을 연구한 바 있고, 최근 Kamikawa et al. (2007)은 저질내 *Alexandrium* 휴면포자를 검출하고 정량화를 실시한 바 있다. 또한 어류의 피부손상과 대규모의 폐사에 영향을 주는 와편모조류 *Pfiesteria*의 동정과 검출에도 이용하였다(Bowers et al., 2000; Saito et al., 2002; Zhang and Lin, 2005; Lin et al., 2006).

본 연구에서는 국내에서 처음으로 진해만의 현장해수시료에서 마비성 패독 발생의 원인종인 *Alexandrium*속의 Real-time PCR 검출기법을 시도하였다. 그러나 이 기법을 이용한 현장모니터링 기술 확립을 위해서는 정량화와 SYT09에 비해 특이성이 높은 Taq Man probe를 이용한 방법(Bowers, 2000), 저질 내 휴면포자의 검출과 정량화 등이 개발되어야 할 것으로 사료된다.

V. 요약

매년 마비성 패독 발생으로 조개류의 수확이 금지되는 진해만을 대상으로 담치의 마비성 패독 발생과 *Alexandrium* 분리주의 지역개체군 식별, Real-time PCR 기법을 이용한 현장시료해수 내 *Alexandrium*속의 신속한 검출 방법을 시도해 보았다. *Alexandrium*속의 출현량은 3월 30일에 정점1과 2에서 각각 25,800 cells L⁻¹와 19,800 cells L⁻¹로 최대였고, 이후 감소한 다음 점차 증가하여 4월 18일에 각각 7,500 cells L⁻¹와 8,050 cells L⁻¹까지 증가한 후 다시 감소하였다. 한편, 담치의 독성은 3월 20일 첫 조사에서 규제치 이하로 검출되었고(4.27 µg STXeq. 100 g⁻¹), 4월 18일 정점1과 2에서 각각 4,456 µg STXeq. 100 g⁻¹, 2,868 µg STXeq. 100 g⁻¹으로 최대 독함량을 나타냈고, 두 정점 모두 5월 19일 조사부터 규제치 이하의 독성이 검출되었다. 진해만의 양식산 진주담치의 마비성 패독 독소는 두 정점에서 C1, C2, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, neoSTX, dcSTX, STX가 검출되었다. 또한, 본 조사에서는 마비성패류 독소는 이성질체간 독조성비가 변화하였다. 패류 독화가 진행되는 4월 10일까지 11β-epimer가 높은 비율을 나타냈으나 제독이 진행되는 4월 18일부터 11α-epimer의 비율이 점차 증가하였다. 진해만 3지역과 고성, 삼천포 *Alexandrium*속 분리주의 마비성 패독 독함량은 3.95 (JSPC0701-5)~144.20 (SJC0611-2) fmol cell⁻¹ 이었고, 모든 분리주에서 C1, GTX1, GTX3, GTX4, neoSTX가 검출되었다. JSPC0701-5를 제외한 진해만의 분리주는 주요성분에서 유사한 독조성을 보였고, 이는 진해만 지역의 지역개체군으로 판단된다. *Alexandrium*속을 검출하기 위해 진해만 현장해수의 PCR 방해인자를 확인한 결과 이 지역의 250 mL 현장해수에는 검출되지 않았다. 또한 *Alexandrium*속 특이적으로 반응하는

primer을 이용하여 2007년 4~9월까지 진해만의 10개 정점에서 현장해수시료를 대상으로 Real-time PCR을 수행한 결과 *Alexandrium*속은 4월, 5월, 8월에 검출되었다.



VI. 감사의 글

먼저 이 논문이 완성되기까지 진심어린 지도와 끝까지 저를 믿어주시고 용기를 북돋아 주신 김창훈 교수님께 감사드립니다. 또한 따끔한 충고로 논문이 완성되도록 지도해주신 김동수 교수님, 김종명 교수님께 감사드립니다.

바쁘신 일정에도 불구하고 늘 저에게 관심을 가져주신 김영수 박사님께 진심으로 감사드리며, 학문적으로 부족한 저에게 늘 많은 가르침을 주신 박태규 박사님께도 감사드립니다. 학부 때부터 실험실에서 동고동락하며 늦은 시간에도 한걸음에 달려와 저의 고민을 해결해준 황철희 선배님과 격려를 잊지 않으시는 장성욱 선배님, 늘 곁에서 할 수 있다는 자신감과 용기를 주고 학위논문기간동안 배려를 아끼지 않은 손명백 선배님께 진심으로 감사드립니다. 석사과정동안 힘든일과 기쁜일을 늘 함께하며 든든한 버팀목이 되어준 김인주 언니에게 진심으로 감사드립니다. 또한 학부과정의 윤홍석, 김경훈, 김현동 군에게도 감사드립니다. 매번 힘든 고비를 함께 건넜은 김영수 선배님, 송하연 선배님, 이승형 선배님, 이해정양 등 석사 동기들에게 감사드립니다. 늘 옆에서 힘이 되고 고민 상담소가 되어준 최수희양, 늘 저를 배려해주고 따끔한 충고를 아끼지 않은 민문경양, 가끔은 친구처럼 많은 의지가 되는 조소은양, 미래를 위해 열심히 노력하고 있는 강지영양에게 감사드립니다. 또한 바쁘다는 이유로 부족한 친구지만 늘 이해해주고 걱정해주신 오현주, 이보현, 이정현, 홍주연양에게 진심으로 감사드립니다.

마지막으로 늘 부족함 없이 학업에 전념할 수 있도록 해주시고 지금도 저를 위해 고생하고 계신 사랑하는 부모님의 깊은 은혜에 감사드리고 남동생 승범과 이모님께도 진심으로 감사드립니다.

VII. 참고문헌

- Anderson, D. M. 1989. Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. In: T. Okaichi, D. M. Anderson, and T. Nemoto (eds.), Red tides: biology, environmental science and toxicology. Elsevier, New York, pp. 11-16.
- Anderson, D. M. 1997. Turning back the harmful red tide. *Nature*. 388: 513-514.
- AOAC. 2000. Paralytic shellfish poisoning. In: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (17th edition). William, H. (ed.), Association of Official Analytical Chemists, Virginia. pp. 59-60.
- Asakawa, M., Takagi, M., Iida, A. and Oishi, K. 1987. Studies on conversion of paralytic shellfish poison (PSP) components by biochemical agents. *Eisei Kagaku* 33: 50-55.
- Bowers, H. A., Tengs, T., Glasgow, H. B., Jr., Burkholder, J. M., Rublee, P. A. and Oldach, D. W. 2000. Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4641-4648.
- Boyer, G. L., Sullivan, J. J., Andersen, R. J., Harrison, P. J. and Taylor, F. J. R. 1987. Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* 96: 123-128.
- Bricelj, V. M. and Shumway, S. E. 1998. Paralytic Shellfish Toxins in Bivalve Molluscs: Occurrence, Transfer Kinetics, and Biotransformation. *Rev. Fish. Sci.* 6: 315-383.
- Cembella, A. D., Shumway, S. E. and Lewis, N. I. 1993. Anatomical distribution and spatio-temporal variation in paralytic shellfish toxin composition in two bivalve species from the Gulf of Marine. *J. Shellfish. Res.* 12: 389-403.
- Chang, D.-S., Shin, I.-S., Pyeun, J.-H. and Park, Y.-H. 1987. A study on paralytic shellfish poison of sea mussel, *Mytilus edulis*: food poisoning accident in Gamchun Bay, Pusan, Korea, 1986. *Bull. Korean Fish. Soc.* 20: 293-299. (in Korean)
- Chang, D.-S., Shin, I.-S., Cho, H.-R., Kim, J.-H., Pyeun, J.-H. and Park, Y.-H. 1988. Studies on distribution, characterization and detoxification of shellfish in Korea. 1. A study on the distribution of paralytic shellfish poison. *Bull. Korean Fish. Soc.* 21: 113-126. (in Korean)

- Chou, H. N., Chen, Y. M. and Chen, C. Y. 2004. Variety of PSP toxins in four culture strains of *Alexandrium minutum* collected from southern Taiwan. *Toxicon*. 43: 337-340.
- Dale, B. and Yentsch, C. M. 1978. Red tide and paralytic shellfish poisoning. *Oceanus*. pp. 14-19.
- Fukuyo, Y., Takano, H., Chikara, M. and Matsuoka, K. 1990. Red Tide Organisms in Japan - An Illustrated Taxonomic Guide. Uchida Rokakuho, Tokyo, 430 pp.
- Galluzzi, L., Penna, A., Bertozzini, E., Vila, M., Garecés, E and Magnani, M. 2004. Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Alexandrium minutum* (a dinoflagellate). *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1199-1206.
- Gray, M., Wawrik, B., Paul, J. and Casper, E. 2003. Molecular detection and quantification of the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5726-5730.
- Hall, S. 1982. Toxins and toxicity of *Protogonyaulax* from the northeast Pacific. Ph. D. thesis, Univ. Alaska, Fairbanks, AK. 196pp.
- Hallegraeff, G. M. and Bolch, C. J. 1992. Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture. *J. Plankton Res.* 14: 1067-1084.
- Han, M.-S., Jeon, J.-K. and Kim, Y.-O. 1992. Occurrence of dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, a causative organism of paralytic shellfish poisoning in Chinhae Bay, Korea. *J. Plankton Res.* 14: 1581-1592
- Kamikawa, R., Nagai, S., Hosoi-Tanabe, S., Itakura, S., Yamaguchi, M., Uchida, Y., Baba, T. and Sako, Y. 2007. Application of real-time PCR assay for detection and quantification of *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* cysts from marine sediments. *Harmful Algae*. 6: 413-420.
- Kao, C. Y. 1993. Paralytic shellfish poisoning. In: *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Falconer, I. R. (ed.) London, Academic Press. pp. 75-86.
- Kim, C. -J., Kim, C. -H. and Sako, Y. 2005. Paralytic shellfish poisoning toxin analysis of the genus *Alexandrium* (Dinophyceae) occurring in Korean coastal waters. *Fish. Sci.* 71: 1-11.
- Kim, C. H. 1995. Paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Alexandrium* species isolated from benthic cysts in Jinhae Bay, Korea. *J. Korean Fish. Soc.* 28(3): 364-372.

- Lee, J.-S., Jeon, J.-K., Han, M.-S., Oshima, Y. and Yasumoto, T. 1992. Paralytic shellfish toxins in the mussel *Mytilus edulis* and dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from Jinhae Bay, Korea. *Bull. Korean Fish. Soc.* 25: 144-150.
- Lee, J.-S., Shin, I.-S., Kim, Y.-M. and Chang, D.-S. 1997. Paralytic shellfish toxins in the mussel, *Mytilus edulis*, caused the shellfish poisoning accident at Geoje, Korea, in 1996. *J. Korean Fish. Soc.* 30: 158-160. (in Korean)
- Lin, S., Zhang, H. and Dubois, A. 2006. Wide distribution and low abundance of *Pfiesteria piscicida* as detected by mtDNA-18S Rdna real-time PCR. *J. Plankton Res.* 28: 667-681.
- Maranda, L., Anderson, D. M. and Shimizu, Y. 1985. Comparison of toxicity between population of *Gonyaulax tamarensis* of eastern north American waters. *Est. Coast. Shelf Sci.* 21: 401-410.
- Mauchline, T. H., Kerry, B. R., Hirsch, P.R. 2002. Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlaydosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 : 1846-1853.
- Muller, J. R., Janz, S., Goedert, J. J., Potter, M. and Rabkin, C. S. 1995. Persistence of immunoglobulin heavy chain/*cmv* recombination-positive lymphocyte clones in the blood of human immunodeficiency virus-infected homosexual men. *proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92: 6577-6581.
- NFRDI. 1998. 어패류 위생에 관한 연구. 국립수산물진흥원사업보고서. pp. 499-511.
- NFRDI. 1999. 어패류 위생에 관한 연구. 국립수산물진흥원사업보고서. pp. 437-447.
- NFRDI. 2000. 어패류 위생에 관한 연구. 국립수산물진흥원사업보고서. pp. 401-410.
- NFRDI. 2001. 어패류 위생에 관한 연구. 국립수산물진흥원사업보고서. pp. 503-510.
- NFRDI. 2002. 어패류 위생에 관한 연구. 국립수산물진흥원사업보고서. pp. 1047-1054.
- NFRDI. 2003. 어패류 위생에 관한 연구. I. 패류 독소 조사. pp. 61-76.
- Nguyen-Ngoc, L. 2004. An autoecological study of the potentially toxic dinoflagellate *Alexandrium affine* isolated from Vietnamese waters. *Harmful Algae.* 3: 117-129.
- Nishitani, L., Hood, R., Wakeman and Chew, K. K. 1984. Potential importance of an endoparasite of *Gonyaulax* in paralytic shellfish poisoning outbreaks. In: Seafood toxin. E. P. Ragelis (ed),. American Chemical Society, Washington, D. C. pp. 139-149.

- Oshima, Y., Singh, H. T., Fukuyo, Y. and Yasumoto, T. 1982. Identification and toxicity of the resting cysts of *Protogonyaulax* found in Ofunato Bay. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 48: 1303-1305.
- Oshima, Y., Hasegawa, M., Yasumoto, T., Hallegraeff, G. and Blackburn, S. 1987. Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. *Toxicon*. 25: 1105-1111.
- Oshima, Y., Sugino, K., Itakura, H., Hirota, M. and Yasumoto, T. 1990. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In: Toxic Marine Phytoplankton, Graneli, E., Sundstrom, B., Edler, L. and Anderson, D. M. (eds), Elsevier Science Publishers, New York. pp. 391-396.
- Oshima, Y. 1995a. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. In: Harmful Marine Algal Blooms. Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P. and Marcaillou, C. (eds.), Lavoisier, Publishing, Paris. pp. 475-480.
- Oshima, Y. 1995b. Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M. and Cembella, A. D. (eds.), IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO. pp. 81-94.
- Oshima, Y. B., Luckas and Hummert. 2003. Analytical methods for paralytic shellfish poisons. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson and A. D. Cembella (eds.), Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO, France. pp. 191-209.
- Persich, G. R., Kulis, D. M., Lilly, E. L., Anderson, D. M. and Garcia, V. M. T. 2006. Probable origin and toxin profile of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech from southern Brazil. *Harmful Algae*. 5: 36-44.
- Popels, L. C., Cary, S. C., Hutchins, D. A., Forbes, R., Pustizzi, F., Gobler, C. J. and Coyne, K. J. 2003. The use of quantitative polymerase chain reaction for the detection and enumeration of the harmful alga *Aureococcus anophagefferens* in environmental samples along the United States East Coast. *Limnol. Oceanogr.: Methods* 1:92-102.
- Rehnstam-Holm, A. S., Godhe, and Anderson, D. M. 2002. Molecular studies of *Dinophysis* (Dinophyceae) species from Sweden and North America. *Phycologia*. 41:348-357.

- Saito, K., Drgon, T., Robledo, J. A. F., Krupatkina, D. N. and Vasta, G. R. 2002. Characterization of the rRNA locus of *Pfiesteria piscicida* and development of standard and quantitative PCR-based detection assays targeted to the nontranscribed spacer. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5394-5407.
- Sakamoto, S., Sato, S., Ogata, T. and Kodama, M. 2000. Formation of intermediate conjugates in the reductive transformation of gonyautoxins to saxitoxins by thiol compounds. *Fish. Sci.* 66: 136-141.
- Scholin, C. A., Vrieling, E., Peperzak, L., Rhodes, L. and Buble, P. 2003. Detection of HAB species using lectin, antibody and DNA probe. In: Manual on Harmful Marine Microalgae, Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M. and Cembella, A. D. (eds.), Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO, Paris, pp. 131-163.
- Sekiguchi, K., Sato, S., Ogata, T., Kaga, S. and Kodama, M. 2001. Accumulation and depuration kinetics of paralytic shellfish toxins in the scallop *Patinopecten yessoensis* fed *Alexandrium tamarense*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 220: 213-218.
- Sekigushi, K., Sato, S., Kaga, S., Ogata, T. and Kodama, M. 2001. Accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in bivalves and an ascidian fed on *Alexandrium tamarense* cells. *Fish. Sci.* 67: 301-305.
- Shimizu, Y. and Yoshioka, M. 1981. Transformation of paralytic shellfish toxins as demonstrated in scallop homogenates. *Science*. 212: 547-549.
- Smayda, T. J. 1990. Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 42: 1137-1153.
- Sullivan, J. J., Iwaoka, W. T. and Liston, J. 1983. Enzymatic transformation of PSP toxins in the littleneck clam (*Protothaca staminea*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114: 465-472.
- Taylor, F. J. R., Fukuyo, Y., Larsen, J. and Hallegraeff, G. M. 2003. Taxonomy on harmful dinoflagellates. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M. and Cembella, A. D. (eds.), UNESCO, Paris. pp. 389-432.
- Wang, D. Z., Jiang, T. J. and Hsieh, D. P. H. 2005. Toxin composition variations in cultures of *Alexandrium* species isolated from the coastal waters of Southern China. *Harmful Algae*. 4: 109-121.
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3741-3751.

- Yoshida, T., Sako, Y and Uchida, A. 2001. Geographic differences in paralytic shellfish poisoning toxin profiles among Japanese population of *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* (Dinophyceae). *Phycol. Res.* 49: 13-21.
- Zang, H., Lin, S. 2002. Detection and quantification of *Pfiesteria piscicida* by using the mitochondrial cytochrome b gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 989-994.
- Zhang, H., and Lin, S. 2005. Development of a *cob*-18S rRNA gene real-time PCR assay for quantifying *Pfiesteria shumwayae* in the natural environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7053-7063.
- 김영수. 2002. 한국연안 및 외양역에 분포하는 유독 와편모조류 *Alexandrium tamarense/catenella* 복합군의 마비성패독 생산 특성. 이학석사, 부경대학교, 부산. 65 pp.
- 김창훈, 김충재, 박철민. 1999. 한국 연안에 출현하는 마비성 패독 생산조류. 인제대학교 적조연구단 특별 심포지움 발표논문집. pp. 54-69.
- 손명백. 2005. 해양 유독 와편모조류 *Alexandrium tamarense*에 의한 담치류의 마비성 패독 축적. 이학석사, 부경대학교, 부산. 63pp.
- 심재형. 1994. 한국동식물도감, 제34권 식물편(해양식물플랑크톤). 교육부. 487pp.