「The Sea」 Journal of the Korean Society of Oceanography
Vol. 15, No. 1, pp. 36 — 40, February 2010

선박평형 수 내 유해 와편모조류(Dinophyceae)의 분자생물학적 검출

박태규* · 김성연
국립수산과학원 양식환경연구소

Molecular Detection of Harmful Dinoflagellates (Dinophyceae) in Ballast Water

TAE-GYU PARK* AND SUNG-YEON KIM
Aquaculture Environment Institute, National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI), Tongyeong 650-943, Korea

선박평형 수는 유독 와편모조류 및 다양한 미세조류의 국제적인 이동경로로 알려져 있다. 본 연구에서는 선박평형 수에 있는 와편모조류의 다양성을 조사하기 위하여 와편모조류 특이적인 PCR primer와 종 특이적인 real-time PCR 유전자 탐침자를 이용하였다. 선박평형 수 시료에 대한 광학현미경 조사에서는 와편모조류가 매우 낮은 농도로 관찰되었지만, SSU rDNA의 cloning 및 염기서열 분석 결과에서는 기생 와편모조류, 초미세플랑크톤, 어패류 폐사 원인종 등 다양한 종류가 확인되었다. 본 연구 결과는 종 특이적 PCR primer와 같은 분자생물학적 방법이 선박평형 수에 외래 유입종의 신속 정확한 진단에 유용함을 보여주고 있다.

Ballast water has been known as a major vector for global dispersal of toxic dinoflagellates and other microalgae. In this study, biodiversity in ships' ballast water was examined using a dinoflagellate-oriented PCR primer set and species-specific real-time PCR. While motile dinoflagellates could be observed at very low cell densities by light microscopy, a wide range of dinoflagellate taxa including parasitic and phototrophic pico-dinoflagellates as well as harmful species to marine fish/shellfish was detected when techniques for cloning/sequencing of SSU rDNA of sample cells were used. Present result suggests that molecular methods including species-specific PCR primers may offer rapid and accurate detection of invasive species in ballast water.

Keywords: Ballast Water, Biodiversity, Dinoflagellate, Harmful Algae

서 론

선박평형 수는 해양생물 종들의 인위적 이동의 원인이 되고 있으며, 식물플랑크톤 종들의 인위적 이동은 해양생태계의 변화, 종 조성, 공공위생, 지역 경제 등에 영향을 미칠 수 있다(Smayda 2007). 예를 들면, 유독 와편모조류 *Gymnodinium catenatum* Graham은 지난 100년간 호주 및 동남아시아로 선박평형 수를 통해 유입이 되었고, 이는 마비성패독 발생의 원인이 되어 많은 패류양식장에 경제적 피해를 주었다(Bolch and Salas 2007). 선박평형 수 내의 유해 미세조류의 유무는 광학현미경 혹은 전자현미경을 이용한 형태적 분류에 의해 판별이 되어 왔다(Hallegraeff and Bolch 1992; Bolch and Salas 2007). 조사의 한 사례를 보면, 호주의 18개 항구로 들어오는 343개 화물선을 조사한 결과, 규조류와 와편모조류를 포함한 53개 종의 미세조류 휴면포자가 발견 되었고 일부 종은 성공적으로 발아하여 배양 및 전자현미경으로 관찰이 되었다(Hallegraeff and Bolch 1992). 이는 선박평형 수가 주요한 외래종 유입의 통로가 됨을 보여준다.

형태적 구분이 어려운 미세조류의 다양성 조사 및 신속한 검출을 위해, 최근에는 분자생물학적 기법이 사용되고 있다. 특히 cloning과 염기서열 분석기법은 배양하기 어려운 초미세플랑크톤의 다양성 연구에도 널리 응용되고 있다. 위 기법을 이용하여 남극과 같이 극한환경에서도 높은 생물 다양성이 존재함을 밝혀 내었으나 대부분의 생물종들은 배양이 어려워 각각의 생태적 위치가 밝혀져 있지 않은 상태이다(Lopez-Garcia *et al.*, 2001). 미세조류의 신속한 검출 기법으로는 최근 real-time PCR법이 각광을 받고 있으며 유독 미세조류 및 적조 조기 경보를 위해 응용되었다(e.g. Park *et al.*, 2009). Real-time PCR법은 배양이 필요 없고, 다양한 종이 혼합되어 있는 현장 해수로부터 특정 생물을 신속하게 검출할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 cloning/염기서열과 real-time PCR 기법을 이용하여 선박평형 수 내에 와편모조류 다양성 및 독성종(*Karlodinium veneficum*(Ballantine) J. Larsen) 현존 유무를 조사하였다.

재료 및 방법

선박평형 수는 2007년 12월 9일 싱가포르 Brani 항구를 출발하

*Corresponding author: tgpark@nfrdi.go.kr

여 12월 17일 부산항에 도착한 4000-TEU 화물선(1 TEU = 20 feet 화물선)으로부터 얻어졌다(8일간의 항해). 선박평형 수는 공해상에서 교환되지 않았고 배는 싱가포르로부터 바로 부산항에 입항하였다. 선박평형 수 10 L가 채집되었고 10 L polyethylene 용기에 담아 10 ℃ 정도를 유지하며 실험실로 옮겨졌다. DNA 추출은 채집 후 2 시간 이내에 이루어졌다. DNA 추출을 위해 4 L 선박평형수를 0.2 μm(47 mm diameter) polycarbonate membranes(Whatman, Ltd, Maidstone, England)을 이용하여 걸려냈고, 얻어진 세포로부터 DNA를 추출하였다. 또한 4 L 선박평형 수를 10 μm 망구 크기의 망을 이용해 농축했고, 농축된 해수를 광학현미경을 이용해 관찰하였다. Total genomic DNA 추출은 phenol-chloroform 방법을 이용하였다. 간략하게 설명하면, 900 μL TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA, pH 8.0)를 넣은 후 필터지를 이쑤시개를 이용하여 잘게 부수었다. 그 후 100 ℃에 5분간 끓인 후 900 μL phenol: chloroform: isoamyl alcohol(25:24:1)을 넣었다. 원심분리 후 DNA는 3 M sodium acetate(pH 5.2)와 99.5% ethanol을 이용하여 침전시키고, 건조된 DNA는 100 μL TE buffer에 용해되었다.

와편모조류의 SSU rDNA는 와편모조류 특이적인 SSU rDNA primers(Dino18SF1 and 18ScomR1, Table 1)를 이용하여 유전자를 증폭하였다(약 1.6 kb 크기) (Line *et al.,* 2006). PCR에 들어가는 시약은 다음과 같다; 0.5 μL Takara *EXTaq* DNA polymerase (Takara MirusBio, Madison, WI, USA),0.5μL template DNA, primers(최종농도 1.0 μM), dNTP mixture(최종농도 2.5 mM), 10 μL 10 x *EXTaq* buffer, 그리고 PCR 용 증류수를 이용하여 100 μL로 최종농도를 맞추었다. PCR 분석 조건은 94 ℃에서 2분 후 32 반복으로 94 ℃ 1분, 58 ℃ 1.5분, 72 ℃ 2분이었다. PCR 산물은 ethidium bromide로 염색이된 2 % agarose gel에서 확인되었고, QIAquick PCR purification columns(Qiagen, Hildon, Germany)을 이용하여 정제하였다. 정제된 산물은 pGEM-T vector system (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 cloning하였고, 임의적으로 선택된 29개 clones은 plasmid purification kit(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 plasmid를 정제하였다. 염기서열 분석은 primers pUC/M13(Promega, Madison, WI, USA)와 internal primers (Table 1)를 이용하였고, Macrogen(Seoul, Korea)에 분석의뢰 하였다. 분석된 염기서열은 GenBank에 등록되었다(GenBank accession numbers FJ832099~FJ832127).

K. veneficum 검출을 위해 *K. veneficum* 특이적인 real-time PCR 유전자 탐침자를 이용하였다(Table 2). 분석방법은 Park *et al.*(2009)의 방법을 따랐다. 선박평형 수 내의 유해종 검출 감도 확인을 위해 세포수를 알고 있는 *K. veneficum* 배양주와 선박평형 수를 섞어서 실험하였다. 우선 standard curve를 제작하였다. *K. veneficum* 배양주는 광학현미경 아래에서 계수되었고(6,540 세포), 배양주는 0.2 μm membrane filter(MFS, California)로 멸균된 1 L 선박평형수에 첨가되었다. DNA 추출 후 DNA는 10배수로 나누어졌다 (6,540, 654, 65, 6, 0.6세포; n = 3). Real-time PCR을 이용하여 10배수로 나뉜 DNA를 분석하였고(3반복 분석), 이를 이용하여 standard curve를 제작하였다. 광학현미경 계수결과와 real-time PCR로 계수된 세포농도 결과를 비교하기 위해 광학현미경으로 계수된 5,870, 1,174, 2,348 세포를 real-time PCR로(3반복 분석) 분석하였다.

SSU rDNA의 계통유연 분석을 위해 Apicomplexa *Hammondia hammoni* outgroup으로 선정하였다. 각각의 염기서열은 ClustalX (Thompson *et al.,* 1997)를 이용하여 정렬하였고, 수작업을 통해 최종 정렬을 하였다. 근린분석(Neighbor Joining analysis)은 PAUP (Version 4.0, Swofford 1999)을 이용하여 실시하였고, Modeltest3.7 (Posada and Crandall 1998)을 이용하여 최적의 분석모델로 GTR+G+I model of nucleotide substitution을 이용하였다. 각각의 유전자는 independent, unordered, equally weighted characters로 처리하였고 alignment gaps은 missing characters로 하였다.

결 과

광학현미경 조사 결과 규조류가 선박평형 수의 우점종이었고, 와편모조류 유영세포는 매우 드물었으며, 광학현미경으로는 정량이 어려운 정도의 매우 낮은 농도의(모두 2 세포 관찰) *Gyrodinium* 속 세포들이 관찰되었다. 반면, cloning/염기서열 분석 결과로 다양한 와편모조류 종류들이 확인되었다(Fig. 1). 현장 시료 중의 DNA를 이용한 염기서열 분석은 PCR 과정에서 chimeric sequences를 형성할 수 있기 때문에 Bellerophon(Huber *et al.,* 2004)을 이용하여 chimeric sequence 여부를 확인하였다. 선박평형 수에서 얻어진 clone과 관련 와편모조류의 염기서열을 200-nt 및 300-nt window sizes로 분석하였다. 모두 20개가(200-nt window가 15개, 300-nt window가 5개) putative parent 와 chimera의 유사성을 의미하는 1 보다 높은 preference scores를 보였다. 하지만 20개 모

Table 1. Primers used to amplify and to sequence of partial SSU rDNA (1.6 kb) of dinoflagellate species

Primer name	Forward/Reverse	Amplification/Sequence	Sequence (5'→3')	Reference
DINO18SF1	Forward	Amplification	AAGGGTTGTGTTYATTAGNTACARAAC	Lin *et al.*(2006)
18ScomR1	Reverse	Amplification	CACCTACGGAAACCTTGTTACGAC	Lin *et al.*(2006)
G17F	Forward	Sequence	ATACCGTCCTAGTCTTAACC	Litaker *et al.*(2003)
G23R	Reverse	Sequence	TTCAGCCTTGCGACCATAC	Litaker *et al.*(2003)

Table 2. Primers and TaqMan probe for *Karlodinium veneficums* pecific real-time PCR assay

Dinoflagellate	Forward/Reverse/Probe	Code	Sequence (5'→3')	Reference
Karlodinium veneficum	Forward	KVITSF3	CTGTGAACTTCTTTGTGAGCTCTT	Park *et al.*(2009)
	Reverse	KVITSR3	TAGCGATAGCTTCGCAGACA	
	Probe	KVITSP3	FAM-AGGTGAATCCCAATGCTGCTCCACTA-TAMRA	

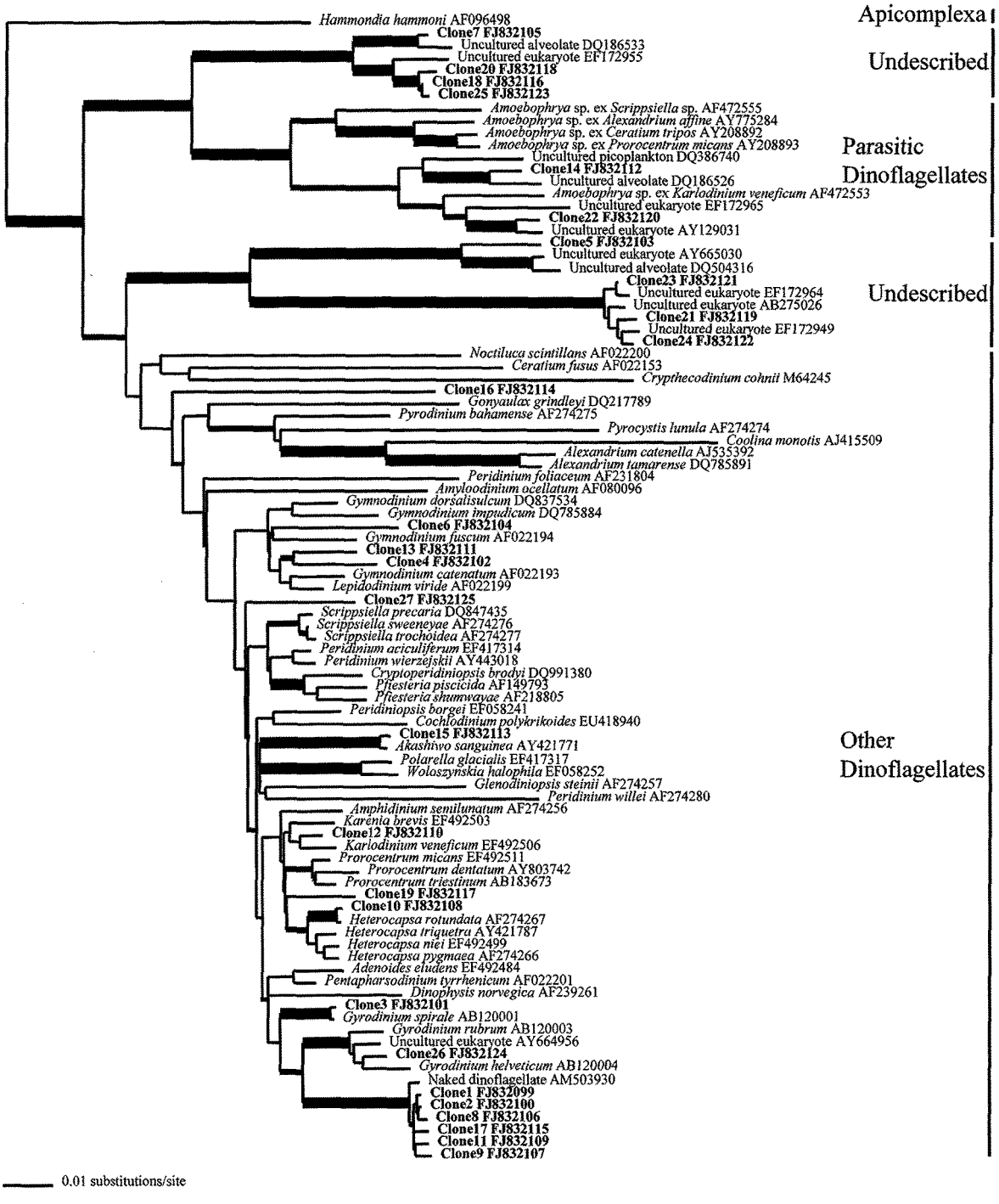

Fig. 1. Phylogram based on minimum evolution (distance) analysis using field (ballast water originating from Singapore) derived partial SSU rDNA sequences(1.6kb) of dinoflagellates and related organisms. The parameters of the GTR+I+G model of nucleotide substitution were estimated as follows: the frequencies of nucleotides were 0.2335 for A, 0.3137 for T, 0.1832 for C, and 0.2697 for G; the rate parameters were 1.4104 for A C, 4.1685 for A↔G, 1.7884 for A↔T, 0.9620 for C↔G, 7.4922 for C↔T, and 1.0(fixed) for G↔T; Proportion of invariable sites was 0.3459; Gamma distribution shape parameter was 0.5815. Numbers of adjacent to each node represent bootstrap values ≥50 % calculated from 1000 replicates. The thickest lines indicate bootstrap values of 100 %, the thick lines indicate bootstrap values of >80 %, and thin lines indicate bootstrap values of ≥50 %. Scale bar = 0.01 substitution per base. Samples sequenced in the present study are shown in bold.

두 이전에 발표된 염기서열과 같거나, parental sequences와 95% 이상 같기 때문에 이들 모두 chimera가 아닐 가능성이 높다. 그러므로 본 연구에서 얻어진 염기서열은(Fig. 1) 인위적인 것이 아닌 자연해수에 존재하는 DNA로 간주될 수 있다.

두 개의 clones이(Fig. 1에 포함되지 않음) parasitioid nanoflagellate *Pirsonia*와 protistan parasite *Perkinsus*종이었던 반면 다른 27

clones은 와편모조류에 속했다. 계통유연 분석결과(Fig. 1) 27개중 7개(clones 7, 18, 20, 21, 23, 24, 25) clones이 undescribed eukaryotes에 속하였고 이전에 보고된 대서양의 picoeukaryotes과 같은 clade를 형성했다. 두 개 clones은(clones 14, 22) 넓은 분포를 보이는 parasitic dinoflagellate *Amoebophrya*와 유연관계를 가졌다(e.g. Lin *et al.*, 2006). Clone10과 15는 패류폐사와 관련이 있는(Botes *etal.*,2002) *Heterocapsa rotundata*(Lohmann) Hansen와 *Akashiwo sanguinea* (Hirasaka) Hansen et Moestrup와 강한 유연관계를 보였다. Clone 12는 전 세계적으로 어류폐사 원인종인 에 속하였다(Place *et al.*, 2008). 나머지 14개 clones은 *Gyrodinium* 및 *Gymnodinium* 과 같은 와편모조류와 유연관계를 보였다. "Karlotoxin(KmTx)"을 생산하는 것으로 알려져 있는 *K. veneficum*은 *Kareniaceae* clade에 속하며 이와 유연관계를 보인 clone 12가 *K. veneficum*인지의 유무 확인을 위해 real-time PCR 유전자 탐침자를 사용하였다. 결과는 음성반응을 보였다. 본 연구에 사용된 선박평형 수에서는 *K. veneficum*이 발견되지는 않았지만, 선박평형 수에 임의로 시료를 섞어 확인한 결과, real-time PCR이 높은 검출감도를 보였다. Standard curve는 correlation coefficients(R^2) 값이 0.999로 세포농도와 C_T 값이 높은 상관관계를 보였다. 또한 real-time PCR의 선박평형 수 내의 유해종 검출감도를 테스트한 결과, 1 세포 미만의 높은 검출감도를 보였고, 정확도 분석결과 광학현미경과 비슷한 세포농도 값을 보여(P>0.05, Student's t test), real-timePCR이 형태구분이 어려운 유해종 검출에 유용할 것으로 보인다. 또한 시료 채취부터 검출 완료까지 대략 3시간 정도로 신속한 외래종 진단에 유용할 것으로 보인다.

결 론

Cloning 및 염기서열 분석법이 수 많은 원핵생물 다양성 연구에 응용되어 왔지만 와편모조류 연구에는 최근에 적용이 되었다(Lin *et al.*, 2006; Burkholder *et al.*, 2007). 전통적인 와편모조류 식별 방법은 광학현미경 및 전자현미경을 이용했지만(Hallegraeff and Bolch 1992), 최근 들어 다양한 분자생물학적 기법이 미세조류 연구에 적용되고 있으며, 선박평형 수 내 생물다양성 연구에도 적용된 사례가 있다(Burkholder *et al.*, 2007). 많은 유해조류들이 선박평형 탱크 내의 퇴적물에 휴면포자를 형성하는데, 많게는 3억개 이상의 *Alexandrium* 휴면포자가 하나의 선박평형 수 내에서 발견되기도 했다(Hallegraeff and Bolch 1992). 휴면포자가 아닌 유영세포 형태로도 미세조류가(e.g. brown tide phytoplankton *Aureococcusano phagefferens*) 선박평형 수 내에서 장기간 생존이 가능하다는 보고도 있다(Doblin *et al.*, 2004). 이렇게 인위적으로 이동된 유해조류는 토착종들과의 접합을 통해 생존력이 뛰어난 생태종으로 출현할 가능성이 있으며, 이러한 종들이 우점하면 적조문제 등을 심화시킬 수도 있다는 주장도 있다(Smayda 2007). 본 연구에서는 분자생물학적 방법을 이용하여 어패류 폐사 원인종을 비롯한 다양한 미세조류가 선박평형 수를 통해 이동되고 있음을 보여주고 있다. 최근 선박평형 수를 통한 외래종 유입을 막기 위해 생물학적 혹은 물리적 처리 방법들이 개발되고 있다. 또한 선박평형 수를 통한 외래 유입종 유입 여부를 확인하기 위해 외국선박을 장기간 항구에 정박시키는 것은 높은 비용 때문에 현실적으로 어려우므로 비용절감을 위해서는 신속한 외래 유입종 진단 방법을 필요로 하고 있다. 선박평형 수 관리 협약 내 G2 지침서에 제시된 분석 완료 시간은 6시간 이내로, 3시간 정도의 분석시간이 걸리는 real-time PCR 유전자 탐침자와 같은 분자생물학적 기법을 이용한 외래 유입종 식별연구가 앞으로 필요하리라 본다.

사 사

분자생물학 실험에 도움을 주신 국립수산과학원의 최진희 양에게 감사드리며, 동 연구기관에 계시는 박영태, 강양순, 정상옥 박사님께도 감사를 드립니다. 본 연구는 국립수산과학원의 지원을 받아 수행된 연구임(RP-2010-ME-011).

참고문헌

Bolch, C.J.S. and de Salas, M.F., 2007. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium "tamarensis*complex" to Australasia. Harmful Algae **6**: 465–485.

Botes, L., Smit, A.J. and Cook, P.A., 2002. The potential threat of algal blooms to the abalone (*Haliotis midae*) mariculture industry situated around the South African coast. Harmful Algae **2**: 247–259.

Burkholder, J.M., Hallegraeff, G.M., Melia, G., Cohen, A., Bowers, H.A., Oldach, D.W., Matthew, W.P., Sullivan, M.J., Zimba, P.V., Aien, E.H., Kinder, C.A. and Mallin, M.A., 2007. Phytoplankton and bacterial assemblages in ballast water of U.S. military ships as a function of port of origin, voyage time, and ocean exchange practices. Harmful Algae **6**: 486–518.

Doblin, M.A., Popels, L.C., Coyne, K.J., Hutchins, D.A., Cary, S.C. and Dobbs, F.C., 2004. Transport of the harmful bloom alga *Aureococcusano phagefferens* by ocean going ships and coastal boasts. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 6495–6500.

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.

Huber, T., Faulkner G. and Hugenholtz P., 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. Bioinformatics **20**: 2317–2319.

Lin, S., Zhang, H., Hou, Y., Miranda, L. and Bhattacharya, D., 2006. Development of a dinoflagellate-oriented PCR primer set leads to detection of picoplanktonic dinoflagellates from Long Island Sound. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 5626–5630.

Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Kibler, S.R., Reece, K.S., Stokes, N.A., Steidinger, K.A., Millie, D.F., Bendis, B.J., Pigg, R.J. and Tester, P.A., 2003. Identification of *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) and *Pfiesteria*-like organisms using internal transcribed spacer-specific PCR assays. J. Phycol. **39**: 754–761.

Lopez-Garcia, P., Rodriguez-Valera, F., Pedros-Allo, C. and Moreira, D., 2001. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plakton. Nature **409**: 603–607.

Park, T.G., Park, Y.T. and Lee, Y., 2009. Development of a SYTO9 based real-time PCR probe for detection and quantification of

toxic dinoflagellate *Karlodinium veneficum*(Dinophyceae) in environmental samples Phycologia **48**: 32–43.

Place, A.R., Saito, K., Deeds, J.R., Robledo, J.A.F. and Vasta, G.R., 2008. A decade of research on *Pfiesteria* spp. and their toxins: unresolved questions and an alternative hypothesis. InBotana, L.M. (Eds) Seafood and freshwater toxins. CRC Press, NewYork, pp. 717–751.

Posada, D. and Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substation. Bioinformatics **14**: 817–818.

Smayda, T.J., 2007. Reflections on the ballast water dispersal - harmful algal bloom paradigm. Harmful Algae **6**: 601–22.

Swofford, D.L., 1999. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewnaik, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. **25**: 4876–4882.

2010년 1월 17일 원고접수
2010년 2월 26일 수정본 채택
담당편집위원: 박명길