

# 와편모조류 *Alexandrium affine*의 생장에 미치는 용존태 무기 및 유기 영양염(질소와 인)의 영향

오석진\* · 김지혜\*\* · 박경우\*\*\* · 김석윤\*\*\*\*

\*, \*\*\*\* 부경대학교 해양학과 교수, \*\* 부경대학교 해양학과 조교, \*\*\* 국립수산과학원 기후변화연구과 연구원

## Effects of Dissolved Inorganic and Organic Nutrient (Nitrogen and Phosphorus) on the Growth of Dinoflagellate *Alexandrium affine*

Seok Jin Oh\* · Ji Hye Kim\*\* · Kyung Woo Park\*\*\* · Seok-Yun Kim\*\*\*\*

\*, \*\*\*\* Professor, Department of Oceanography, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

\*\* Assistant, Department of Oceanography, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

\*\*\* Researcher, Oceanic Climate and Ecology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

**요약** : 본 연구에서는 와편모조류 *Alexandrium affine*(LIMS-PS-2345)의 생장에 미치는 용존태 무기 및 유기 영양염의 영향을 조사하였다. 영양염 흡수 동력학 실험에서 *A. affine*의 최대흡수속도( $\rho_{max}$ )와 반포화상수( $K_s$ )는 질산염에서 77.0 pmol/cell/hr과 17.6  $\mu$ M, 인산염에서 15.5 pmol/cell/hr과 3.88  $\mu$ M로 산출되어, 무기영양염에 대하여 높은 요구량 및 낮은 친화성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 유기 영양염에 따른 *A. affine*의 성장속도를 확인한 결과, 유기 질소 urea, glycine와 유기 인 adenosine triphosphate(ATP), glycerol phosphate(Glycerol-P) 첨가구에서 무기 영양염 첨가구의 70% 이상 성장속도를 보였다. 따라서 낮은 무기 영양염 환경에서 *A. affine*의 우점화와 종간경쟁에서 우위를 위해서는 용존태 유기 영양염의 이용이 필요할 것으로 생각된다.

**핵심용어** : *Alexandrium affine*, 무기영양염, 유기영양염, 최대흡수속도, 반포화상수

**Abstract** : In this study, we investigated the effects of dissolved inorganic and organic nutrient on the growth of dinoflagellate *Alexandrium affine* (LIMS-PS-2345). The maximum uptake rates ( $\rho_{max}$ ) and half saturation constants ( $K_s$ ) calculated from the uptake kinetics experiment were 77.0 pmol/cell/hr, 17.6  $\mu$ M for nitrate and 15.5 pmol/cell/hr, 3.88  $\mu$ M for phosphate, respectively. These results suggested that this species has high inorganic nutrient demand and a low affinity for inorganic nutrients. During the utilization of organic nutrients for *A. affine*, growth rates of experimental groups added by organic nitrogen (urea and glycine) and phosphorus (adenosine triphosphate and glycerol phosphate) were above 70%, compared to the experimental groups added by inorganic nutrients. Thus, *A. affine* may need to utilize organic nutrients to understand the dominant strategy and advantageous position in the interspecific competition within low inorganic nutrient environments.

**Key Words** : *Alexandrium affine*, Inorganic nutrient, Organic nutrient, Maximum uptake rates, Half saturation constants

### 1. 서론

식물플랑크톤 대발생은 단일 또는 복수 종이 해수 1L 당 수천에서 수만 세포까지 급격히 성장하는 현상으로, 원인종도 과거 규조류에서 와편모조류로 종천이가 발생하였다(Lim et al., 2020). 원인종 종천이는 해양환경 요소와 기후변화에

의한 기상의 변화로 발생하는 것으로 알려졌지만(Lim et al., 2020), 아직 원인종과 경쟁종의 생리적 특성 파악과 함께 제한된 자원 및 공간 등에서 종천이의 이해는 매우 부족한 것이 현실이다(Kwon et al., 2014).

한편, 와편모조류 *Alexandrium*은 전 세계적으로 약 30여 종이 분포하고 있으며(Anderson et al., 2012), 해류 흐름 및 선박 평형수 등에 따라 전 세계적으로 확산이 되는 실정이다(Anderson et al., 1983; 2012). 국내에서는 *Alexandrium* 종에 의한 첫 대발생은 진해만이었으며(Cho, 1978), 그 이후로 *A.*

\* First Author : sjoh1972@pknu.ac.kr, 051-629-6576

† Corresponding Author : yunk0411@gmail.com, 051-629-6574

*affine*, *A. catenella*, *A. insuetum*, *A. pacificum* 그리고 *A. miutum* 등 약 6여종이 출현하는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 1990; Park and Kong, 2009; Kwon et al., 2013; Shin et al., 2014).

본 연구의 대상 종인 *A. affine*는 일본에서 최초로 보고되었으며(Fukuyo, 1985), 현재 호주 타즈마니아(Hallegraeff et al., 1991), 포르투갈과 브라질(Balech, 1995), 페루(Vera et al., 1999), 인도네시아(Sidabutar et al., 2000), 베트남(Yoshida et al., 2000), 멕시코(Garate-Lizarraga et al., 2002) 등 많은 국가에서도 보고된 바 있다. 국내에서는 1986년 9월 진동만에서 최초로 보고되었고(Kim et al., 1990), 최근 2017년 8월 통영 인근에서 고밀도의 대발생을 보였다(Kim et al., 2019). 일반적으로 마비성 패독(paralytic shellfish toxin; PST)을 유발시키지 않는 종으로 알려졌지만, 필리핀과 베트남 분리 주에서 carbamoyl toxin (GTX1+2, GTX3+4, NeoSTX 그리고 STX)과 같은 강독이 보고되어(Ngoc, 2004; Subong et al., 2017), 주의가 필요한 종으로 인식되고 있다.

한편, 질소는 식물플랑크톤 생장에 필수적인 요소로 해수 중에서 제한 영양염으로 작용한다. 해수 중에서 질소는 다양한 형태로 존재하고 있으며, 질산염, 아질산염, 암모니아염과 같은 용존태 무기 질소(dissolved inorganic nitrogen; DIN)와 다양한 용존태 유기 질소(dissolved organic nitrogen; DON)의 형태로 존재한다. 유독 *Alexandrium*의 경우, 질소는 PST의 생성에 영향을 미친다고 알려져 있으며, 질소 농도가 증가함에 따라 세포내 독 조성이 변화되거나 강화된다는 보고도 있다(Leong and Taguchi, 2004). 따라서 질소의 이용 능력은 생장과 우점화에 있어 중요하다.

인은 에너지 저장, 세포구조 및 유전물질에 필수적이기 때문에 식물플랑크톤이나 광합성 생물에서도 생장에 매우 중요한 원소이다(White and Dyhrman, 2013). 해수 중 인은 용존태 무기인(dissolved inorganic phosphorus; DIP)과 용존태 유기인(dissolved organic phosphorus; DOP)으로 존재하며, 일부 연안에서 제한 영양염으로 나타나 중간 경쟁을 유도하기도 한다. DOP 화합물은 직접적으로 생장에 이용하기 어려우며, 이를 이용하기 위해서는 alkaline phosphatase(APase)라는 가수분해효소로 분해 후, 유리된 무기인을 이용한다(Kwon et al., 2011). 일반적으로 돌말류는 와편모조류에 비해 DIP의 친화성이 높기 때문에 해수 중 DIP의 결핍이 나타나면 생장에 제한을 받는다(Egge, 1998). 더욱이 종마다 인에 대한 친화성 정도와 이용 능력이 다양하게 나타나기 때문에, 질소원과 함께 중간 경쟁을 유발시키는 중요한 요인이 된다(Yamamoto et al., 2004).

국내에서 *A. affine* 연구의 대부분은 출현과 분포, 현존량 변동, 형태학 그리고 cyst의 분포 연구가 주로 수행 되었고

(Kim et al., 1990; Shin et al., 2007; Shin et al., 2011), Kim(2006)의 *A. affine*와 기생성 와편모류 *Amoebophrya* spp.의 상호 관계 그리고 Kim et al.(2019)의 수온, 염분 및 조도에 따른 생장속도의 변화 연구를 제외하고는 이화학적 변수에 따른 생리 변화 연구는 극히 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 *A. affine*의 무기 영양염의 흡수 속도 및 친화성 평가과 함께, 유기영양염에 대한 이용성을 파악하고, 이들 생존 및 우점화 전략에 대해서 고찰하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 *Alexandrium affine*의 배양 및 무균화

실험 종인 *A. affine* (LIMS-PS-2345)는 한국해양과학기술원 해양 시료도서관에서 분양받아 실험에 이용하였다. 계대배양의 온도와 염분은 분양 당시의 조건으로 20°C 그리고 30 psu였다. 실험용 배지는 남해 외양역의 해수를 바탕으로 한 f/2(Guillard and Ryther, 1962) 배지에 selenium( $H_2SeO_3$ )을 최종 농도 0.001  $\mu M$ 이 되도록 첨가하여 사용하였다. *A. affine*의 무균화를 위해 24 well plate에 AM 9 혼합액(Provasoli et al., 1959)과 배양 중의 세포액을 각각 0.1:1, 0.3:1, 0.5:1, 0.7:1의 비율로 첨가 후, 24시간 동안 배양하였으며, 현미경 하에서 집중 세포의 생존 여부를 확인하였다. 최종적으로 0.1:1의 비율로 항상 처리한 세포를 f2 배지에 접종하였고, 대수성장기 세포를 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole)로 염색하여 형광 현미경 하에서 무균을 확인하였다(Porter and Feig, 1980). 또한 2차적인 오염을 막기 위해 모든 실험은 clean bench에서 수행하였으며, 실험기구는 고압 멸균(121°C, 202 kpa, 20 min)하여 사용하였다.

### 2.2 *Alexandrium affine*의 무기 질소 및 인 농도에 따른 흡수 동력학 실험

식물플랑크톤의 영양염 흡수는 기본적으로 환경 수 중의 영양염 농도에 의존하지만, 세포 내에 영양염 pool을 가지는 경우, 크기에 따라 달라짐으로 흡수 속도의 농도 의존성을 평가할 때는 영양염 첨가 후 흡수 속도가 일정한 시간 즉, 정속 흡수(surge uptake)를 보이며 세포 내 영양염의 변화가 없는 시간 내에 실험해야 한다(Eppley et al., 1969; Harrison et al., 1989). 따라서 영양염 흡수 실험을 수행하기 전에 영양염 흡수의 경시적인 변화를 파악하였다. 먼저, 세포 내 질소와 인을 고갈시키기 위해 질소 또는 인원이 포함되지 않은 AK 인공해수를 기반으로 한 L1 배지에서 *A. affine* 전배양을 하였다. 세포의 생장이 정지할 때까지 배양을 실시하여, 세포 내 질소 또는 인을 고갈시켰다. 그 후,  $NaNO_3$  35  $\mu M$ 과  $PO_4-P$

3 μM로 함유된 L1 배지에 세포 내 질소 또는 인 고갈된 *A. affine*를 접종하였다. 배양 개시(0분), 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240분에 배양액을 채수하여 NO<sub>3</sub>-N과 PO<sub>4</sub>-P를 측정하였다. 수온, 염분 및 광조건은 Kim et al.(2019)이 보고한 최적수온(25°C), 염분(30 psu) 그리고 광조건(150 μmol/m<sup>2</sup>/s)에서 수행하였다.

영양염 흡수 속도는 100 ml 배양용기(Pyrex, USA)에 PO<sub>4</sub>-P가 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 2, 3 μM 7단계, NaNO<sub>3</sub>는 1, 3, 5, 10, 30, 50, 80 μM 7단계로 조제된 L1 배지에 세포 내 질소 또는 인 이 고갈된 *A. affine* (> 1,000 cells/mL)을 접종하였다. 배양시간은 상기에 서술된 실험의 결과를 바탕으로 정속 흡수를 보이는 시간으로 하였다. 특히, 영양염 고갈 세포를 함유한 배양액을 첨가할 시 PO<sub>4</sub>-P와 NaNO<sub>3</sub>의 농도가 낮아지기 때문에 접종 직후 배양액을 채수하여 PO<sub>4</sub>-P와 NaNO<sub>3</sub>를 측정하였으며, 실험 종료 후 재차 측정하였다. 영양염 흡수 속도와 영양염의 관계는 Michaelis-Menten 식에 대입하여 농도 의존성을 파악하였다(Dugdale, 1967). 영양염 흡수에 대한 각각의 변수는 측정된 실험값을 식(1)에 대입하여 비선형 최소자승법으로 계산하였다.

$$\rho = \rho_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

$\rho_{\max}$  : 영양염 최대 흡수속도(pmol/cell/hr)  
 $K_s$  : 반포화 상수(μM)  
 $S$  : 영양염 농도(μM)

### 2.3 *Alexandrium affine*의 유기 영양염의 이용

유기 질소원으로 urea와 glycine(Gly) 그리고 무기 질소원으로 NH<sub>4</sub>-N와 NO<sub>3</sub>-N을 사용하였으며, 인공해수를 바탕으로 한 L1배지에 각각의 영양염이 최종 300 μM이 되도록 조제 하였다. 또한 유기 인원으로는 adenosine triphosphate(ATP)와 glycerol phosphate(Gly-P) 그리고 무기 인원으로는 tripolyphosphate(Tripoly-P)와 PO<sub>4</sub>-P(PO<sub>4</sub>)를 인공해수를 바탕으로 한 L1배지에 각각 25 μM이 되도록 조제하였다. 농도별로 조제된 L1배지에 *A. affine*를 최종 세포 밀도가 100 cells/mL 되도록 접종하였다. 세포의 성장속도는 대수생장을 보이는 동안의 형광값을 이용하여 다음 식(2)에 의해 계산하였다.

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{N_t}{N_o} \quad (2)$$

$N_0$  : 대수성장기에서 초기의 세포 수(cells/mL)  
 $N_t$  : 대수성장기에서 t시간 후의 세포 수(cells/mL)  
 $\Delta t$  : 대수성장기의 기간(day)

한편, 수온, 염분 및 광조건은 *A. affine*의 무기 질소 및 인에 대한 정속흡수 실험과 같이 최적수온, 염분 그리고 광조건에서 수행하였다.

### 2.4 *Alexandrium affine* 대발생 현장에서 DIN과 DIP의 장기 변화

2017년 8월 *A. affine*가 대발생한 해역의 DIN과 DIP 변화 특성을 파악하기 위하여 해양환경공단(Korea Marine Environment Management corporation; KOEM)에서 제공하는 해양 환경측정망자료를 사용하였다(<https://www.meis.go.kr/portal/main.do>). 활용한 측정망 정점은 2017년 8월에 *A. affine*가 대발생한 인근 해역(34° 48' 35" N, 128° 17' 41" E)의 표층 자료이며, 1997년부터 2017년까지의 2월 5일, 8월 그리고 11월의 자료를 사용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 *Alexandrium affine*의 무기 질소 및 인 농도에 따른 흡수 동력학 실험

*A. affine*의 무기 질소에 대한 정속흡수시간을 살펴보면, NaNO<sub>3</sub>의 농도는 시간에 따라 감소하였고, NaNO<sub>3</sub> 흡수 속도는 배양 초기부터 10분 동안 69.8 pmol/cell/hr이었지만, 이후에는 1.20~24.7 pmol/cell/hr로 현저히 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1; t-test, p < 0.05). 따라서 *A. affine*의 NaNO<sub>3</sub> 흡수 실험의 시간을 10분으로 설정하여 수행하였다. 다음으로 *A. affine*의 무기 인에 대한 정속 흡수 시간을 살펴보면, PO<sub>4</sub>-P 농도도 시간에 따라 점차 감소하였다. 흡수 속도는 배양 개시부터 20분 동안은 2.30~4.00 pmol/cell/hr이었으나, 30~240분에는 0.40~1.20 pmol/cell/hr로 감소하였다(Fig. 2; t-test, p < 0.05). 따라서 *A. affine*의 PO<sub>4</sub>-P 흡수 속도 실험 시간은 20분으로 설정하였다.

*A. affine*의 NaNO<sub>3</sub>에 대한 흡수 속도는 약 30 μM까지 농도가 증가에 따라 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 유사하였다(Fig. 1). 이를 Michaelis-Menten 식으로 유도한 결과,  $\rho_{\max}$ 는 77.0 pmol/cell/hr,  $K_s$ 는 17.6 μM로 계산되었다. 인에 대한 흡수 속도는 실험에서 설정한 최대 농도인 3 μM까지 PO<sub>4</sub>-P의 농도가 증가에 따라 증가하였으며(Fig. 2), Michaelis-Menten 식으로 유도한 결과,  $\rho_{\max}$ 는 15.5 pmol/cell/hr,  $K_s$ 는 3.88 μM로 계산되었다.

와편모조류 *Alexandrium affine*의 생장에 미치는 용존태 무기 및 유기 영양염(질소와 인)의 영향

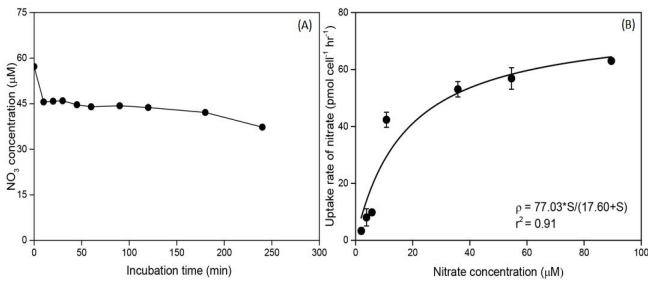


Fig. 1. Changes in (A) nitrate concentrations of nitrogen-starved culture of *Alexandrium affine* after addition of nitrate and (B) uptake rates of *A. affine* as a function of the ambient nitrate concentrations.

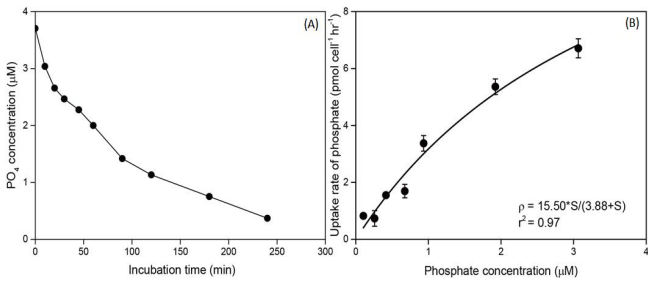


Fig. 2. Changes in (A) phosphate concentrations of phosphorus-starved culture of *Alexandrium affine* after addition of phosphate and (B) uptake rates of *A. affine* as a function of the ambient phosphate concentrations.

$K_s$ 는 기질에 대한 친화성 정도를 나타내는 척도이며,  $K_s$  농도가 낮을수록 낮은 영양염 농도에서도 빠르게 성장하며, 반대로  $K_s$  농도가 높을수록 높은 영양염 환경에서 성장한다는 것을 의미한다(Dugdale, 1967). 더욱이 세포의 크기가 작은 종보다 큰 종일수록, 연안성 종(neritic species)보다 외양성 종(oceanic species)일수록, 성장속도가 낮은 종보다 높을수록 높은  $K_s$ 를 보이는 것으로 알려져 있다(Eppley et al., 1969). *A. affine*의  $\text{NaNO}_3$ 에 대한  $K_s$  농도를 다른 종과 비교하여 보면, 우리나라에서 매년 하계에 대발생하는 유해조류 *Cochlodinium polykrikoides*, 유독 와편모조류 *Gymnodinium catenatum* 그리고 유해조류 *Prorocentrum minimum*보다 높았다(Table 1).  $\text{PO}_4\text{-P}$ 에 대한  $K_s$  농도의 경우 *C. polykrikoides*와 *A. tamarense* 보다 높았으며, 영양염에 대한 높은 요구량과 낮은 친화성을 보이는 *G. catenatum*과 저서성 규조류와 유사하였다(Table 1). 또한 저농도 영양염 조건( $< K_s$ )에서는 식물플랑크톤의 중간 경쟁관계를 평가하는데 있어서,  $K_s$  값보다 친화성 지수  $\alpha$  ( $\rho_{\max}/K_s$ )가 더 유용하게 사용된다(Harrison et al., 1989). 본 종의 경우,  $\text{NaNO}_3$ 와  $\text{PO}_4\text{-P}$ 에 대한  $\alpha$ 는 다른 종에 비하여 매우 낮은 값을 보였으며(Table 1), 낮은 농도의 무기 영양염 하에서

는 다른 종에 비해 낮은 경쟁력을 가지고 있는 것으로 판단되었다.

Table 1. Comparison of uptake kinetics for nitrate and phosphate among various phytoplankton including *Alexandrium affine*

Species	$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )	$\rho_{\max}$ (pmol/cell/hr)	$\alpha^*$ ( $\rho_{\max}/K_s$ )	References
<i>Alexandrium affine</i>	17.6	77.0	0.23	This study
<i>Alexandrium catenella</i>	0.6-28.1	-	-	Collos et al. (2004)
<i>Chattonella antiqua</i>	2.81	0.91	3.09	Nakamura (1985)
<i>Ceratium furca</i>	0.49	-	-	Baek et al. (2008)
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	3.04	1.89	1.61	Kim et al. (2007)
<i>Gonyaulax polyedra</i>	8.6-10.3	-	-	Eppley et al. (1969)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	7.59	6.48	1.17	Yamamoto et al. (2004)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	2.00	-	-	Tomas (1979)
<i>Peridinium cinctum</i>	29.0	-	-	Sherr et al. (1982)
<i>Prorocentrum minimum</i>	5.00	0.10	50.0	Lomas and Gilbert (2000)
<i>Alexandrium affine</i>	3.88	15.5	0.25	This study
<i>Alexandrium tamarense</i>	2.60	1.40	1.86	MacIsaac et al. (1979)
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	1.19	0.35	3.40	Kim (2003)
<i>Chattonella antiqua</i>	1.90	0.14	13.6	Nakamura (1985)
<i>Ceratium furca</i>	0.05	-	-	Baek et al. (2008)
<i>Gymnodinium bogoriense</i>	3.2	-	-	Lieberman et al. (1994)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	3.40	1.42	2.39	Yamamoto et al. (2004)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	1.0	-	-	Tomas (1979)
<i>Achnanthes</i> sp.	3.95	0.17	23.2	Kwon et al. (2013)
<i>Amphora</i> sp.	3.82	0.06	63.7	Kwon et al. (2013)
<i>Navicula</i> sp.	3.02	0.23	13.1	Kwon et al. (2013)
<i>Nitzschia</i> sp.	3.15	0.30	10.5	Kwon et al. (2013)

\*  $\alpha$  is calculated by  $K_s$  and  $\rho_{\max}$  described from each references.

한편, 통영 인근해역의 경우, 무기영양염의 농도는 감소하고 있는 경향을 보였다(Fig. 3; 4). Kim et al.(2019)는 *A. affine*의 최적 성장조건이 수온 20~25°C, 염분 20~35 psu로 하계에 우점할 수 있는 생리 특성을 가진 것으로 보고하였

다. 통영 인근해역의 하계 DIN과 DIP 감소를 계산하면, DIN은 0.25  $\mu\text{M}/\text{year}$ , DIP은 0.02  $\mu\text{M}/\text{year}$ 로 감소하는 경향이였다. 또한 하계 평균 영양염 농도는 DIN이 2.36  $\mu\text{M}$ , DIP가 0.34  $\mu\text{M}$ 로, *A. affine*의 무기 영양염의  $K_s$  농도 보다 매우 낮은 농도를 보였다. 무기영양염의 감소는 하계뿐만 아니라 춘계, 추계, 동계에도 나타나고 있지만, DIN는 하계에 그 감소가 뚜렷하였다. 향후, 지구온난화에 따른 고온, 고염 그리고 빈영양으로 특징 지을 수 있는 대마난류의 영향 강화는 한반도 인근해역의 무기 영양염 감소를 더욱 촉진할 가능성이 있다.

또한 표층수온의 증가는 성층을 더욱 강화시켜, 저층으로부터의 영양염 공급을 더욱 차단시킨다(Hallegraeff, 2010; Gentien et al., 2005). 실제, 2017년 8월 통영 인근에서 *A. affine* 대발생 당시의 DIN 농도는 0.47  $\mu\text{M}$ , DIP 농도는 0.55  $\mu\text{M}$ 로 *A. affine*의  $K_s$  값보다 현저히 낮은 농도를 보였다. 따라서 무기 영양염의 요구량이 높은 *A. affine*의 생리 특성과 서식환경변동을 고려한다면 이 종의 생존과 우점화를 위해서는 무기 영양염 이외의 다른 형태의 영양염이 필요함을 알 수 있다.

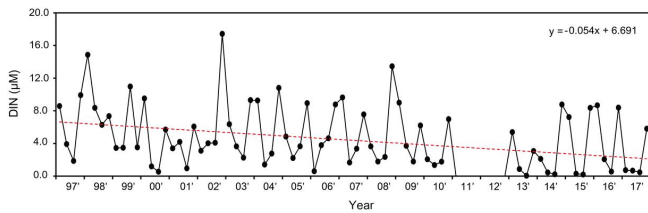


Fig. 3. Long-term changes in DIN in Tongyeong area from 1997 to 2017.

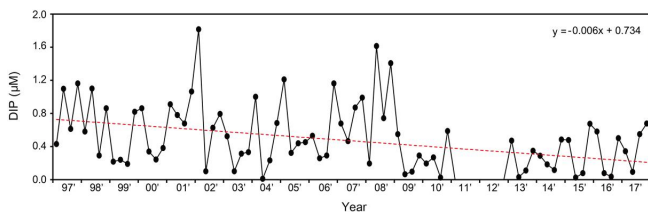


Fig. 4. Long-term changes in DIP in Tongyeong area from 1997 to 2017.

### 3.2 *Alexandrium affine*의 유기 영양염의 이용

*A. affine*는 무기 영양염에 대하여 낮은 친화성을 가지고 있으며, 우점화를 위해서는 필수적으로 다른 형태의 영양염이 필요할 것으로 전술하였다. 최근 유해 와편모조류의 대발생에서 용존태 유기 영양염이 하나의 원인으로 생각되고 있으며, 유기 영양염 이용 능력의 중요성은 점차 증가하고 있다(Bronk, 2002; Park et al., 2013; Kwon et al., 2013). 따라서 유기 영양염의 이용능력이 중요한 요인이 될 것으로 판단되

어, 다양한 DON과 DOP 중 대표적인 2종을 선택하여 정지(batch) 배양을 수행하였다.

질소화합물에 대한 성장속도는 질산염에서 0.59/day, 암모니아염에서 0.27/day 그리고 Gly에서 0.51/day(질산염에 대한 성장속도는 약 88%에 해당), urea에서 0.44/day(질산염에 대한 성장속도는 약 75%에 해당)로 나타났다(Fig. 5). 인 화합물에 대해서는  $\text{PO}_4$ 에서 0.59/day, Tripoly-P에서 0.52/day 그리고 ATP에서 0.53/day( $\text{PO}_4$ 에 대하여 ATP는 91%), Gly-P에서 0.42/day( $\text{PO}_4$ 에 대하여 ATP는 71%)로 나타났다. 질소원에서는  $\text{NH}_4\text{-N}$ 에서 낮은 성장 속도를 보였으며 질산염에서 가장 높은 성장속도를 보였지만, 그 차이는 크지 않았다. 인원에서도 Gly-P에서 비교적 낮은 성장속도, ATP에서 높은 성장속도가 보였기 때문에 *A. affine*는 무기 영양염 뿐만 아니라 용존태 유기 영양염을 생장에 잘 이용하는 특징을 보였다.

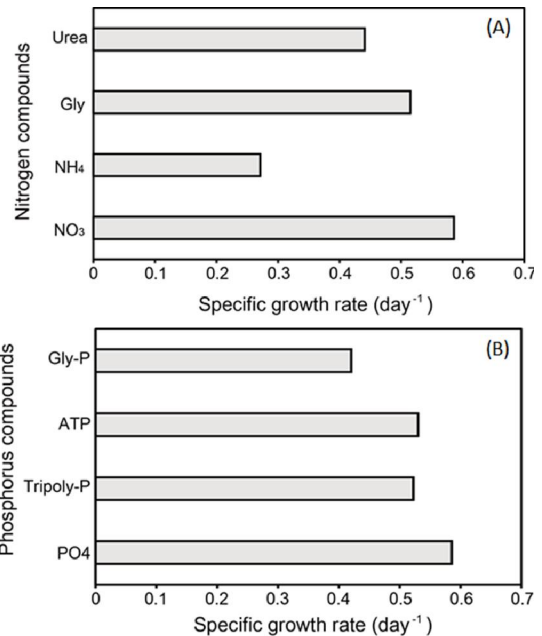


Fig. 5. Specific growth rate (/day) of *Alexandrium affine* incubated with various nitrogen compounds (A) and phosphorus compounds (B).

DON 중 Gly는 용존 유리아미노산(dissolved free amino acid; DAFF)의 일종이며, DAFF는 식물플랑크톤의 질소공급원으로서 매우 중요하며, 종속영양 미생물에 의한 유기물 순환 및 에너지 공급단계에서 중요한 작용을 한다(Cowey and Corner, 1966). 일반적으로 식물플랑크톤의 체내 DAFF 비율은 Arginine 성분이 가장 높으며 Gly를 포함하여 Aspartic acid, Alanine 그리고 Lysine 성분 등이 우점하는 것으로 보고

되었다. 이러한 성분의 아미노산들은 식물플랑크톤 체내에 우점하는 동시에 해수 중에서도 우점하는 것으로 나타나기 때문에(Cowey and Corner, 1966), 본 연구에서도 높은 성장속도를 보인 Gly의 이용은 낮은 무기질소에서 좋은 질소원이 될 수 있다.

urea는 아미노산의 최종 분해 산물로 다양한 식물플랑크톤이 이를 이용하여 생장이 가능하나(Steidinger et al., 1998; Auro and Cochlan, 2013; Kwon et al., 2013; 2014), 일부 종(일부 남조류 *Synechococcus* 종주)에는 urea를 생장에 이용하는데 필요한 urease라는 가수분해효소를 가지지 않기 때문에, urea를 생장에 이용하지 못하는 경우도 있다(Collier et al., 1999; Lartigue et al., 2009; Nagasoe et al., 2010). *A. affine*는 충분히 urea를 이용하였기 때문에, 체내에 urea를 가수분해시킬 수 있는 urease의 활성을 가지고 있을 것으로 생각되며, 무기 질소가 제한 또는 고갈되는 환경일 경우, 활성이 높아져 urease를 가지고 있지 않은 종보다 경쟁의 이점이 있을 것으로 생각된다.

DOP 중 ATP는 아데닐산(adenylic acid) 계열의 화합물로 핵산을 구성하며 대부분의 식물플랑크톤이 이용하는 것으로 보고되었다(Oh et al., 2010; Kwon et al., 2013; 2014). 특히, 해수 중에서 ng/L 농도로 존재하며, 다양한 식물플랑크톤이 이용 가능한 인원으로 알려져 있다(Kwon et al., 2014). 인산모노에스테르(phosphomonoester; PME)의 일종인 Gly-P의 경우도 PME를 가수분해하는 APase 유무에 따라 생장에 이용하는 종과 그렇지 않은 종로 구분되기도 한다(Nishijima et al., 1990; Yamaguchi et al., 2005). 실제 Table 1에 보여준 칠편모조류 *H. akashiwo* (Yamaguchi et al., 2008)는 PME를 생장에 이용하지 않았으며, *Fibriocapsa japonica*(Yamaguchi et al., 2005)와 우리나라 연안역에 우점하는 규조류 *Skeletonema* sp.의 일부 종주도 PME를 이용하지 않았다(Oh et al., 2005). 반면에 *A. tamarense*(Li et al., 2011; Xu et al., 2012; Kwon et al., 2013), *A. catenella*(Xu et al., 2012; Kwon et al., 2013), *A. fundyense* (Dyrman and Anderson, 2003), *C. polykrikoides*(Kwon et al., 2014) 그리고 *G. breve*(Steidinger et al., 1998) 등은 다양한 PME를 이용하여 생장이 가능한 것으로 보고되었다. *A. affine*는 Gly-P를 이용하였기 때문에 APase를 가지고 있을 것으로 생각되며, 이러한 유기 영양염의 이용 능력은 무기 영양염이 제한된 환경에서 중요한 생존 및 우점화 전략으로 고려된다. 따라서 2017년 8월 통영 인근에서 *A. affine* 대발생도 부족한 무기 영양염을 대신하여 유기 영양염을 이용하여 대발생하였을 가능성이 높을 것으로 생각된다.

한편, 유사한 생태적 지위를 가지는 종들은 동일한 자원에 대해 경쟁할 때 오직 한 종만이 생존할 수 있지만, 실제 해양에서 식물플랑크톤 군집은 제한된 자원보다 더 많은 종이 공존하고 있다(Oh et al., 2014). 또한 대발생시에 단일종의

대발생도 있지만, 서로 다른 생태적 지위를 가지는 복수종의 대발생도 발생한다. 실제 해양에서는 다양한 환경 요인들이 주기적, 비주기적으로 공급되고 있어, 본 실험과 같은 실내 배양실험으로 식물플랑크톤의 우점화 및 경쟁관계를 단정 짓기는 어렵다. 따라서 향후 주기적 또는 비주기적인 영양염 공급 조건(pulsed mode)의 실내실험과 그에 따른 수치모형을 구현을 통하여, *A. affine*의 생존전략 및 우점화 기작에 대한 근본적인 이해가 필요할 것으로 생각된다.

## 4. 결론

본 연구는 *A. affine*의 무기 영양염의 흡수 속도 및 친화성 평가와 함께, 유기영양염에 대한 이용성을 파악하였다. 영양염 흡수 동력학 실험에서 *A. affine*는 무기 영양염에 낮은 친화성과 높은 요구량을 가지는 생리적인 특징을 보였다. 최근 한반도 인근 해역의 경우, 지구온난화에 따라 대표적인 서안 경계류인 고온, 고염 그리고 빈영양으로 특징 지을 수 있는 쿠로시오 해류가 강화되고 있으며, 이는 대마난류까지 영향을 미쳐 한반도 인근해역의 무기 영양염은 감소되고 있다. 따라서 본 종의 무기 영양염의 이용성만을 고려하였을 경우, 우리나라 연안역에서 우점화를 위해서는 불리한 생태적 지위를 가지고 있다. 하지만 다양한 무기 및 유기 영양염의 정치배양실험 결과, 무기 영양염뿐만 아니라 유기 영양염에서도 잘 성장하였기 때문에 다양한 형태의 영양염을 이용 가능한 생리적인 특징을 가지고 있는 것으로 생각된다. 2017년 통영 인근 해역에서 *A. affine* 대발생도 해수 중의 낮은 무기 영양염을 대신하여, 다양한 유기 영양염을 이용하여 발생하였을 가능성이 높을 것으로 보인다.

## 사 사

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2019년)에 의하여 연구되었습니다.

## References

- [1] Anderson, D. M., S Chisholm, and C. Watras(1983), Importance of life cycle events in the population dynamics of *Gonyaulax tamarensis*, Marine Biology, Vol. 76, No. 2, pp. 179-189.
- [2] Anderson, D. M., T. J. Alpermann, A. D. Cembella, Y. Collos, E. Masseret, and M. Montresor(2012), The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health, Harmful Algae,

- Vol. 14, pp. 10-35.
- [3] Auro, M. E. and W. P. Cochlan(2013), Nitrogen utilization and toxin production by two diatoms of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* complex: *P. cuspidata* and *P. fryxelliana*, Journal of Phycology, Vol. 49, No. 1, pp. 156-169.
- [4] Baek, S. H., S. Shimode, M. S. Han, and T. Kikuchi(2008), Growth of dinoflagellates, *Ceratium furca* and *Ceratium fusus* in Sagami Bay, Japan: The role of nutrients, Harmful Algae, Vol. 7, pp. 729-739.
- [5] Balech, E.(1995) The Genus *Alexandrium* (Halim) (Dinoflagellata), Sherkin Island Marine Station, p. 151.
- [6] Bronk, D. A.(2002) Dynamics of DON, In: Hansell D. A. and A. C. Craig (eds), Biogeochemistry of marine dissolved organic matter, Academic Press, MA, pp. 153-247.
- [7] Cho, C. H.(1978), On the *Gonyaulax* red tide in Jinhae bay, Bulletin of the Korean Fisheries Society, Vol. 11, No. 2, pp. 111-114.
- [8] Collier, J. L., B. Brahmsha, and B. Palenik(1999), The marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7805 requires urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) to utilize urea as a nitrogen source: molecular-genetic and biochemical analysis of the enzyme, Microbiology, Vol. 145, Vol. 2, pp. 447-459.
- [9] Collos, Y., C. Gagne, M. Laabi, A. Vaquer, P. Cecchi, and P. Souchu(2004), Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, Southern France, Journal of Phycology, Vol. 40, pp. 96-103.
- [10] Cowey, C. B. and E. D. S. Corner(1966), The amino acid composition of certain unicellular algae, and of the faecal pellets produced by *Calanus finmarchicus* when feeding on them, In: Barnes, H. (ed), Some contemporary studies in marine science, George Allen & Unwin Ltd., London, pp. 225-231.
- [11] Dugdale, R. C.(1967), Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification and significance, Limnology and Oceanography, Vol. 12, No. 4, pp. 685-695.
- [12] Dyhrman, S. T. and D. M. Anderson(2003), Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*, Limnology and Oceanography, Vol. 48, No. 2, pp. 647-655.
- [13] Egge, J. K.(1998), Are diatoms poor competitors at low phosphate concentrations? Journal of Marine Systems, Vol. 16, No. 3, pp. 191-198.
- [14] Eppley, R. W., J. N. Rogers, and J. J. McCarthy(1969), Half-saturation constant for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton, Limnology and Oceanography, Vol. 14, No. 6, pp. 912-920.
- [15] Fukuyo, Y.(1985), Morphology of *Protogonyaulax tamarensis* (Lebour) Taylor and *Protogonyaulax catenella* (Whedon and Kofoid) Taylor from Japanese coastal waters, Bulletin of Marine Science-Miami, Vol. 37, No. 2, pp. 529-537.
- [16] Gárate-Lizarraga, I., D. López-Cortés, J. Bustillos-Guzmán, F. Hernández-Sandoval, and I. Murillo-Murillo(2002), Physicochemical characteristics and phytoplankton biomass during El Niño 1997-1998 in Bahía Concepción, Gulf of California, American Society of Limnology and Oceanography, Albuquerque, p. 56.
- [17] Gentien, P., P. Donaghay, H. Yamazaki, R. Raine, B. Reguera, and T. Osborn(2005), Harmful algal blooms in stratified environments, Oceanography, Vol. 18, No. 2, pp. 172-183.
- [18] Guillard, R. R. L. and J. H. Ryther(1962), Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran, Canadian Journal of Microbiology, Vol. 8, No. 2, pp. 229-239.
- [19] Hallegraeff, G. M.(2010), Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge, Journal of Phycology, Vol. 46, pp. 220-235.
- [20] Hallegraeff, G. M., C. J. Bolch, S. I. Blackburn, and Y. Oshima(1991), Species of the toxigenic dinoflagellate genus *Alexandrium* in southeastern Australian waters, Botanica Marina, Vol. 34, pp. 575-587.
- [21] Harrison, P. J., J. S. Parslow, and H. L. Conway(1989), Determination of nutrient uptake kinetic parameters: a comparison of methods, Marine Ecology Progress Series, Vol. 52, pp. 301-312.
- [22] Kim, D. I.(2003), Physiological and ecological studies on harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Margalef). Ph. D. Thesis, Kyushu University, Fukuoka, pp. 154.
- [23] Kim, D. I., T. Matsubara, S. J. Oh, Y. Shimasaki, Y. Oshima and T. Honjo(2007), Effects of nitrogen and phosphate sources on the utilization and growth kinetics of the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* isolated from Yatsushiro Sea, Japan, Nippon Suisan Gakkaishi, Vol. 73, No. 4, pp. 711-717.
- [24] Kim, H. G., J. S. Park, and S. G. Lee(1990), Coastal algal blooms caused by the cyst-forming dinoflagellates, Bulletin of the Korean Fisheries Society, Vol. 23, No. 6, pp. 468-474.
- [25] Kim, J. H., S. J. Oh, and S. -Y. Kim(2019), The effect of

- temperature, salinity and irradiance on the growth of *Alexandrium affine* (Dinophyceae) isolated from Southern Sea of Korea, Journal of the Korean Society of Marine Environment & Safety, Vol. 25, No. 2, pp. 229-236.
- [26] Kim, S.(2006), Patterns in host range for two strains of *Amoebophrya* (Dinophyta) infecting thecate dinoflagellates: *Amoebophrya* spp. ex *Alexandrium affine* ex *Gonyaulax polygramma*, Journal of Phycology, Vol. 42, pp. 1170-1173.
- [27] Kwon, H. G., H. J. Kim, H. -S. Yang, and S. J. Oh(2014), The importance of dissolved organic nutrients on the interspecific competition between the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* and the diatom *Skeletonema* sp., The Sea, Vol. 19, No. 4, pp. 232-242.
- [28] Kwon, H. G., J. A. Park, H. -S. Yang, and S. J. Oh(2013), Dominance and survival strategy of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* under dissolved inorganic nitrogen-limited conditions, Journal of the Korean Society for Marine Environment and Energy, Vol. 16, No. 1, pp. 25-35.
- [29] Kwon, H. K., S. J. Oh, and H. -S. Yang(2011), Ecological significance of alkaline phosphatase activity and phosphatase-hydrolyzed phosphorus in the northern part of Gamak Bay, Korea, Marine Pollution Bulletin, Vol. 62, No. 11, pp. 2476-2482.
- [30] Lartigue, J., E. L. E. Jester, R. W. Dickey, and T. A. Villareal(2009), Nitrogen source effects on the growth and toxicity of two strains of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*, Harmful Algae, Vol. 8, No. 5, pp. 781-791.
- [31] Leong, S. C. Y. and S. Taguchi(2004), Response of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* to a range of nitrogen sources and concentrations: growth rate, chemical carbon and nitrogen, and pigments, Hydrobiologia, Vol. 515, pp. 215-224.
- [32] Li, T., R. Yu, and M. Zhou(2011), Short-term effects of different nitrogen substrates on growth and toxin production of dinoflagellate *Alexandrium catenella* Balech (strain ACDH), Harmful Algae, Vol. 12, pp. 46-54.
- [33] Lieberman, O. S., M. Shilo, and J. van Rijn(1994), The physiological ecology of a freshwater dinoflagellate bloom population: vertical migration, nitrogen limitation and nutrient uptake kinetics, Journal of Phycology, Vol. 30, pp. 964-971.
- [34] Lim, W. A., W. J. Go, K. Y. Kim, and J. W. Park(2020), Variation in harmful algal blooms in Korean coastal water since 1970, Journal of the Korean Society of Marine Environment & Safety, Vol. 26, No. 5, pp. 523-530.
- [35] Lomas, M. W. and P. M. Gilbert(2000), Comparison of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates, Journal of Phycology, Vol. 36, pp. 903-913.
- [36] MacIsaac, J. J., G. S. Grunseich, H. E. Glover, and C. M. Yentsch(1979), Light and nutrient limiting in *Gonyaulax excavata*: Nitrogen and carbon trace results, In: Taylor, D. L. and H. H. Selige (eds.), Toxic Dinoflagellate Blooms, Elsevier, New York, pp. 107-110.
- [37] Nagasoe, S., T. Shikata, Y. Yamasaki, T. Matsubara, Y. Shimasaki, Y. Ohima, and T. Honjo(2010), Effects of nutrients on growth of the red-tide dinoflagellate *Gyrodinium instriatum* Freudenthal et Lee and a possible link to blooms of this species, Hydrobiologia, Vol. 651, pp. 225-238.
- [38] Nakamura, Y.(1985), Ammonium uptake kinetics and interaction between nitrate and ammonium uptake in *Chatonella antiqua*, Journal of the Oceanographical Society of Japan, Vol. 41, pp. 33-38.
- [39] Ngoc, N. L.(2004), An autecological study of the potentially toxic dinoflagellate *Alexandrium affine* isolated from Vietnamese water, Harmful algae, Vol. 3, No. 2, pp. 117-129.
- [40] Nishijima, T., Y. Hata, and S. Yamauchi(1990), Physiological ecology of *Prorocentrum triestinum*, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, Vol. 55, No. 11, pp. 2009-2014.
- [41] Oh, S. J., H. G. Kwon, and H. -S. Yang(2010), Alkaline phosphatase activity and utilization of dissolved organic phosphorus by phytoplankton isolated from Korean coastal waters, The Sea, Vol. 15, No. 1, pp. 16-24.
- [42] Oh, S. J., Y. Matsuyama, T. Yamamoto, M. Nakajima, H. Takatsuzi, and K. Hujisawa(2005), Recent developments and causes of harmful dinoflagellates blooms in the Seto Inland Sea - Ecological importance of dissolved organic phosphorus (DOP). Bulletin on Coastal Oceanography, Vol. 43, pp. 85-95.
- [43] Park, J., H. J. Jeong, Y. D. Yoo, and E. Y. Yoon(2013), Mixotrophic dinoflagellate red tides in Korean waters: distribution and ecophysiology, Harmful Algae, Vol. 30S, pp. S28-S40.
- [44] Park, T. G. and Y. S. Kong(2009), Temporal changes in abundances of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) in Chinhae Bay, Korea, Journal of the Environmental Sciences, Vol. 18, No. 12, pp. 1331-1338.
- [45] Porter, K. G. and Y. S. Feig(1980), The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, Limnology and Oceanography, Vol. 25, No. 5, pp. 943-948.



- [46] Provasoil, L., K. Shiraishi, and J. R. Lance(1959), Nutritional idiosyncrasies of *Artemia* and *Tigriopus* in monoxenic culture, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 77, pp. 250-261.
- [47] Sherr, E. B., B. F. Sherr, T. Berman, and J. M. McCarthy (1982), Differences in nitrate and ammonia uptake among components of a phytoplankton population, *Journal of Plankton Research*, Vol. 4, No. 4, pp. 961-965.
- [48] Shin, H. H., S. H. Baek, L. Zhun, M. S. Han, S. J. Oh, S. H. Youn, Y. S. Kim, D. K. Kim, and W. A. Lim(2014), Resting cysts, and effects of temperature and salinity on the growth of vegetative cells of the potentially harmful species *Alexandrium insuetum* Balech (Dinophyceae), *Harmful Algae*, Vol. 39, pp. 175-184.
- [49] Shin, H. H., Y. H. Yoon, and K. Matsuoka(2007), Modern dinoflagellate cysts distribution off the eastern part of Geoje Island, Korea, *Ocean Science Journal*, Vol. 42, No. 1, pp. 31-39.
- [50] Shin, H. H., Y. H. Yoon, Y. O. Kim, and K. Matsuoka(2011), Dinoflagellate cysts in surface sediments from southern coast of Korea, *Estuaries and Coasts*, Vol. 34, No. 4, pp. 712-725.
- [51] Sidabutar, T., D. P. Praseno, and Y. Fukuyo(2000), Status of harmful algal blooms in Indonesian waters, 9th International Conference on Harmful Algal Blooms, Conference Abstracts, Tasmania, p. 220.
- [52] Steidinger, K. A., G. A. Vargo, P. A. Tester, and C. R. Tomas(1998), Bloom dynamics and physiology of *Gymnodinium breve* with emphasis on Gulf of Mexico, In: Anderson, D. M., A. D. Cembella and G. M. Hallegraeff (eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, Springer, New York, pp. 135-153.
- [53] Subong, B. J. J., G. A. Benico, A. K. L. Sulit, C. O. Mendoza, L. J. Cruz, R. V. Azanza, and E. C. Jimenez(2017), Toxicity and protein expression of *Alexandrium* species collected in the Philippine Water, *Philippine Journal of Science*, Vol. 146, No. 40, pp. 425-436.
- [54] Tomas, C. R.(1979), *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae). III. Uptake and utilization of nitrogen and phosphorus, *Journal of Phycology*, Vol. 15, No. 1, pp. 5-12.
- [55] Vera, G., S. Fraga, J. M. Franco, and G. Sánchez Rivas(1999) Primer registro en el Perú del dinoflagelado *Alexandrium affine* Inoue y Fukuyo, *Informe Progresivo, Instituto del*, No. 105, pp 3-12.
- [56] White, A. and S. Dyhrman(2013), The marine phosphorus cycle, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 4, pp. 1-2.
- [57] Xu, J., A. Y. T. Ho, L. He, K. Yin, C. Hung, N. Choi, P. K. S. Lam, R. S. S. Wu, D. M. Anderson, and P. J. Harrison(2012), Effects of inorganic and organic nitrogen and phosphorus on the growth and toxicity of two *Alexandrium* species from Hong Kong, *Harmful Algae*, Vol. 16, pp. 89-97.
- [58] Yamaguchi, H., H. Sakou, K. Fukami, M. Adachi, M. Yamaguchi, and N. Nishijima(2005), Utilization of organic phosphorus and production of alkaline phosphatase by the marine phytoplankton, *Heterocapsa circularisquama*, *Fibrocapsa japonica* and *Chaetoceros ceratosporum*. *Plankton Biology & Ecology*, Vol. 52, No. 2, pp. 65-75.
- [59] Yamaguchi, H., S. Sakamoto, and M. Yamaguchi(2008), Nutrition and growth kinetics in nitrogen- and phosphorus-limited cultures of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae), *Harmful Algae*, Vol. 7, pp. 26-32.
- [60] Yamamoto, T., S. J. Oh, and Y. Kataoka(2004), Growth and uptake kinetics for nitrate, ammonium and phosphate by the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Hiroshima Bay, Japan, *Fisheries Science*, Vol. 70, No. 1, pp. 108-115.
- [61] Yoshida, M., C. V. Thuoc, K. Matsuoka, T. Ogata, Y. Fukuyo, and N. Chu(2000), The occurrence of PSP and DSP causative dinoflagellates in northern Vietnamese coastal waters, 9th International Conference on Harmful Algal Blooms, Conference Abstracts, Tasmania, p. 248.

---

Received : 2021. 07. 12.

Revised : 2021. 08. 10.

Accepted : 2021. 08. 27.