

# 적조생물의 성장단계에 따른 세포 내·외 Reactive Oxygen Species (ROS) 변화

이민지<sup>1,2</sup> · 방단비<sup>1,2</sup> · 신성수<sup>1,2</sup> · 강윤자<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>국립수산과학원 기후환경자원과, <sup>2</sup>전남대학교 환경해양학과, <sup>3</sup>전남대학교 해양융합과학과

## Internal and External Changes in Reactive Oxygen Species (ROS) During the Growth Stages of Harmful Algal Bloom Species

Minji Lee<sup>1,2</sup>, Danbi Bang<sup>1,2</sup>, Seong-Su Shin<sup>1,2</sup> and Yoonja Kang<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>South Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Yeosu 59780, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Environmental Oceanography, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Ocean Integrated Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea

Reactive oxygen species (ROS) generated by harmful algal blooms (HABs) exert detrimental effects on aquaculture systems. Fish gill cells deteriorate upon exposure to HABs, suggesting that internally generated ROS in HABs influences the external environment. Therefore, we investigated the internal and external changes in ROS concentrations during growth using fluorescence staining of four representative HABs: *Alexandrium affine*, *Chattonella marina*, *Karenia mikimotoi*, and *Margalefidinium polykrikoides*. The concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> produced by *A. affine* were low; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from *M. polykrikoides* was primarily detected internally throughout the experiments, and O<sub>2</sub><sup>-</sup> was not detected. High H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> concentrations were observed in *K. mikimotoi* during the death phase, with weak external O<sub>2</sub><sup>-</sup> concentrations. Regarding *C. marina*, which produces large amounts of ROS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was observed internally during the exponential phase, whereas weak O<sub>2</sub><sup>-</sup> concentrations were measured externally in the stationary phases. Collectively, our results highlight that ROS concentrations and internal/external distributions are functions of HABs and growth stage. These differences indicate the potential allelopathic mechanisms of proliferating HABs and suggest a possible impact of ROS on aquaculture organisms.

Keywords: HABs, ROS, Phytoplankton, Aquaculture organisms, Allelopathy

### 서론

해양생태계에서 유해적조는 수생생물의 성장 및 폐사에 심각한 영향을 주고, 일부 종들은 폐독을 유발하여 인간 및 포유류에게 해를 끼치는 등 다양한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Anderson, 1997). 1990년대부터 세계적으로 유해적조의 발생 빈도, 규모, 강도가 점차 증가하면서 적조는 해양생태 연구의 주요 이슈로 부상하였다. 이에 따라 적조 원인 생물의 생리·생태, 영향, 억제(처리) 등에 관한 연구와 기술 개발이 활발히 이루어지고 있는 실정이다. 적조로 인한 양식어류의 폐사 원인은 아가미 흡착에 의한 질식으로 밝혀졌으나, 그 외 다른 요인이 있

을 수 있다는 주장이 꾸준히 제기되어 왔다. 한국에서 큰 수산 피해를 일으키는 적조생물인 *Margalefidinium polykrikoides* (= *Cochlodinium polykrikoides*) 역시 아가미 흡착에 의한 어류 질식사도 대부분 판명하고 있지만, *M. polykrikoides*가 생성하는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)에 대한 연구의 필요성이 제안되고 있다. 여기서 ROS란 초과산화물라디칼, 과산화수소, 하이드록실 라디칼 등을 포함한다. 적조생물 중 ROS를 많이 생산한다고 알려진 *Chattonella marina*의 경우 생성된 ROS가 어류 폐사와 관련 있다고 연구된 바 있으며(Cho et al., 2022), 다른 다양한 식물플랑크톤 역시 불명확한 이유로 ROS를 생성한다(Diaz and Plummer, 2018). ROS는 비생물학적 및

\*Corresponding author: Tel: +82. 61. 690. 8961 Fax: +82. 61. 686. 1588

E-mail address: yoonjakang@chonnam.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2024.0389>

Korean J Fish Aquat Sci 57(4), 389-396, August 2024

Received 31 May 2024; Revised 10 July 2024; Accepted 25 August 2024

저자 직위: 이민지(연구사), 방단비(연구원), 신성수(연구원), 강윤자(교수)

생물학적으로 유도된 화학반응의 생산물로 환경에서 자연적으로 발생하며, 일반 해양 환경에서는 매우 낮은 농도( $10^{-18}$ – $10^{-6}$  mol/L)로 존재한다(Diaz and Plummer, 2018). 다만 산소가 풍부한 표층수에서의 ROS 생성은 생물학적 요인이 가장 지배적이라고 알려져 있다.

특히 적조와 같이 식물플랑크톤이 대량 증식하면 해수 중 높은 ROS 농도를 야기할 수 있으며, 높은 ROS가 allelopathy로 작용할 수 있어 양식생물에 피해를 줄 가능성이 있다(Hansard et al., 2010; Rusak et al., 2011; Diaz and Plummer, 2018; Yang et al., 2022). 결과적으로 적조 원인생물에 의한 어류의 생리적 변화 및 폐사 메커니즘을 보다 구체적으로 밝히기 위해서는 어류의 생리 및 조직적 변화부터 유전자 수준까지 심도 있는 연구가 필요하며, 그 전에 적조생물의 ROS 생성 정도와 같은 생리적 자료가 바탕이 되어야 한다. 또한, ROS 생성이 식물플랑크톤의 성장 단계와 영양조건에 의해 영향을 받는다고 알려져 있으나(Oda et al., 1995; Kim et al., 2005), 적조생물이 생산하는 잠재적 위해 물질인 ROS가 식물플랑크톤 종간 어떤 차이가 있는지, 성장 단계 중 어느 시기에 많이 발생하는지 등의 세부적인 연구는 아직 부족한 실정이다. 따라서 적조에 의한 어류 폐사 메커니즘을 더욱 구체적으로 규명하기 위해서는 적조생물의 ROS 세포 내·외 분포 및 성장단계별 생성 정도에 대한 연구가 필요하다.

**재료 및 방법**

**적조생물 배양 및 성장 실험**

적조생물 *M. polykrikoides* (NFRDI CP-001, 통영 분리)와 *Alexandrium affine* (NFRDI AA-001, 통영 분리)는 국립수산물품질관리원 남동해수산연구소의 균주를 이용하였다. *Karenia mikimotoi* (KM02 KSS, 일본 세토 내해)와 *C. marina* (LIM-PS-2900, 남해 분리)는 일본 및 한국해양과학기술원에서 분양 받은 균주를 사용하였다(Fig. 1). 배양조건으로는 형광등 및 메탈할라이드램프(200–500  $\mu$ E/m<sup>2</sup>/s, 12 h dark cycle; MasterColour CDM-70W; Philips, Amsterdam, Netherlands)를 광원으로 사용하였고, 수온 20, 25°C, f/2배지(Guillard 1975), 염분 33 pus 조건에서 1L polystyrene (PS) bottle에 배양하였다. 세포 밀도 변화는 이틀에 한번 현미경(DE/AxioScope 5; Carl zeiss, Oberkochen, Germany)으로 검경하였다. 적조생물의 성장속도는 지수성장을 보인 기간 동안의 세포 밀도를 아래의 식에 대입시켜 산출하였다(Guillard, 1975).

$$\mu = \log_2 (N_t - N_0) / t_t - t_0$$

$\mu$ : 성장속도(/day)

$N_0, N_t$ : 지수성장기의 초기와 t시간(일) 후의 세포 밀도

$\Delta t$ : 지수성장기간(일)

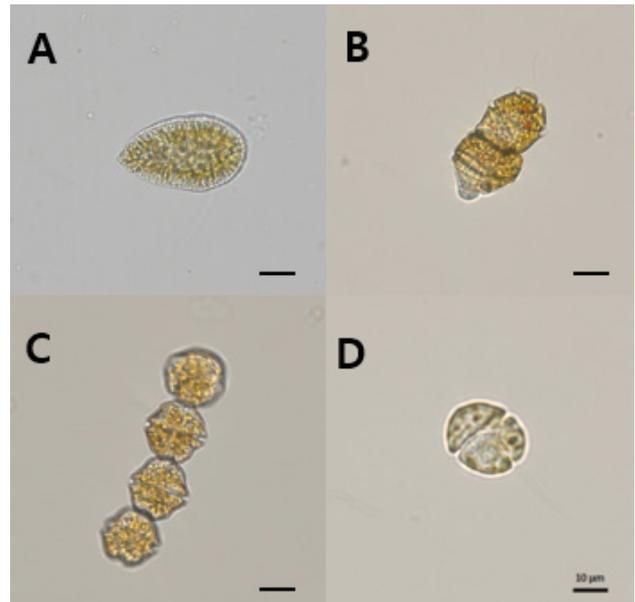


Fig. 1. Microscopic images of phytoplankton used in the experiment. A, *Chattonella marina*; B, *Margalefidinium polykrikoides*; C, *Alexandrium affine*; D, *Karenia mikimotoi*.

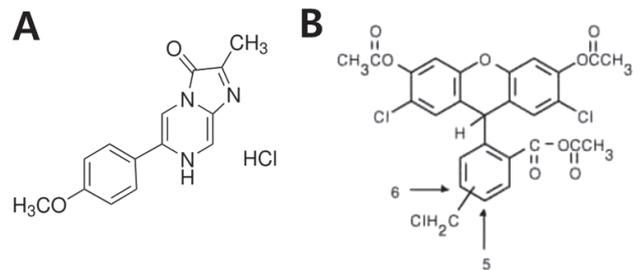


Fig. 2. Chemical structures used in staining methods. A, CM-H<sub>2</sub>DCFDA, 5-carboxy-2,7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyylester; B, MCLA, 6-(4-Methoxyphenyl)-2-methyl-3,7-dihydroimidazo [1,2-a]pyrazin-3(7H)-one hydrochloride.

**적조생물의 체 내·외 ROS 분석**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> assay**

적조생물 세포 내·외부 ROS [과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 초과산화물 라디칼(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)] 분포 파악을 위하여 ROS와 특이적으로 반응하여 초록색 형광을 띄우는 발광시약을 사용하여 실험 수행하였다(Fig. 2). 과산화수소 검출은 염색시약인 5-carboxy-2,7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyylester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA)을 이용(최종농도 10  $\mu$ M)하였고, 초과산화물 라디칼 검출로는 6-(4-Methoxyphenyl)-2-methyl-3,7-dihydroimidazo [1,2-a]pyrazin-3(7H)-one hydrochloride (MCLA)을 이용(최종농도 100  $\mu$ M)하여 암소에서 15분간 반응시킨 후 형광현

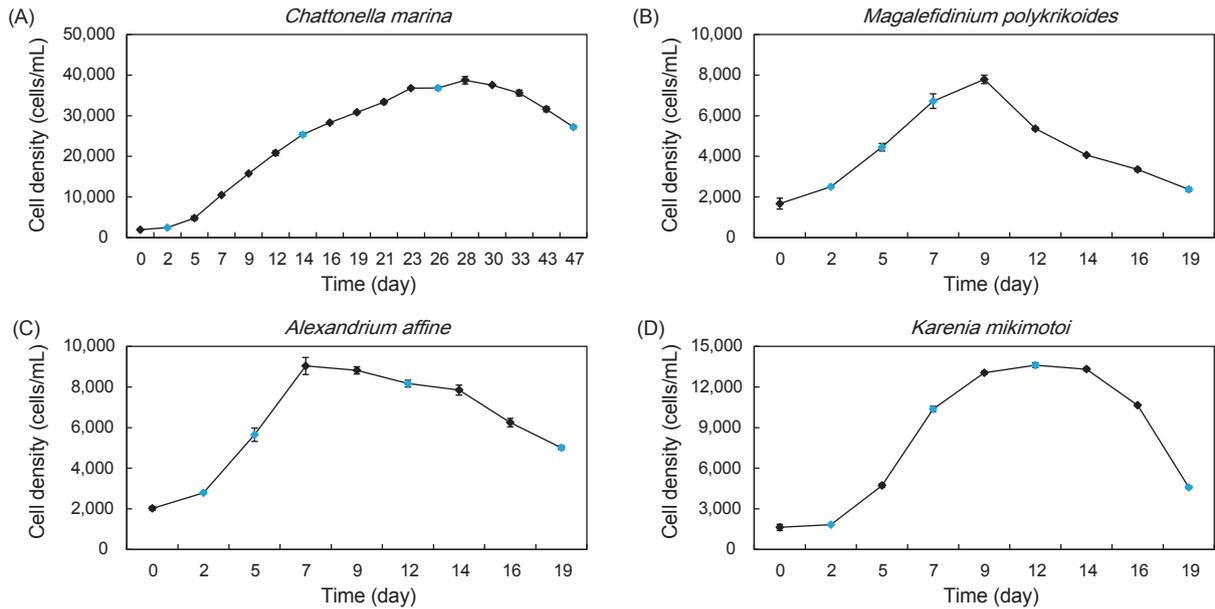


Fig. 3. Changes in the population of each phytoplankton species over time: Sky-blue circle indicate the sample for staining observation.

미경(DE/AxioScope 5; Carl zeiss, Oberkochen, Germany)으로 각 세포의 형광 반응을 관찰하였다. 적조생물 성장단계별 세포 내·외 ROS 파악을 위하여 각 성장단계(초기, 지수성장기, 안정기, 감소기)에 상기 염색법을 통해 ROS 분포 및 강도를 관찰하였다.

#### SIA (Sequential Injection Analysis)

해수 중 저농도(nM) ROS ( $H_2O_2$ )를 분석하기 위한 SIA (sequential injection analysis)의 원리는 다음과 같다. 해수 중 과산화수소가 루미놀 용액과 반응하여 화학발광을 하고, 루미놀은 과산화수소에 의해 쉽게 산화되어 들뜬 상태인 중간체 3-aminophthalate를 만든다. 이것이 바닥상태로 내려가면서 청색(425 nm) 발광을 일으키며 photomultiplier tubes (PMTs)로 광의 세기로 농도를 구한다. 분석 흐름은 가는 튜브로 운반용액(diethylenetriaminepentaacetic acid, DTPA)을 흘려보내고, 펌프로 일정량의 blank·표준용액·해수시료를 DTPA로 옮기고, Ferrozine (철 간섭 최소화) 시약과 루미놀 용액이 시료와 mixing zone에서 혼합하여 일어나는 시료의 화학발광을 PMT로 측정한다. 또한 성장단계별 ROS 농도를 정량화 하기 위하여 앞선 ROS 실험과 동일한 조건으로 적조생물 배양을 수행하였으며, 성장단계별 ROS 농도를 SIA를 이용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 적조생물의 성장률 비교

각 적조생물의 최적 성장률(specific growth rate,  $\mu$ )를 보면 *K. mikimotoi*가 0.40  $d^{-1}$ 으로 가장 높았으며, *A. affine*는 0.34  $d^{-1}$ ,

*M. polykrikoides*는 0.28  $d^{-1}$ , 마지막으로 *C. marina*는 0.21  $d^{-1}$ 으로 가장 낮았다(Fig. 3). 적조생물의 최대밀도는 *C. marina*가 39,700 cells/mL로 최고 높았고, *K. mikimotoi*가 13,700 cells/mL, *A. affine*가 9,500 cells/mL, *M. polykrikoides*는 8,000 cells/mL로 가장 낮았다. 대부분의 적조생물이 지수성장기 혹은 쇠퇴기에 ROS 생성이 많기 때문에 높은 최대 밀도 및 빠른 성장률을 가진 식물플랑크톤은 양식어류에 영향을 미칠 가능성이 더 크고, allelopathy로 작용할 가능성 역시 크다(Diaz and Plummer, 2018).

하지만 본 연구에 의하면 ROS 생성이 가장 많다고 알려져 있으며 형광발색이 가장 강하게 나타난 *C. marina*가 가장 낮은 성장률을 보인 것에 반하여 최대성장기에서 가장 많은 개체수를 보였다. *M. polykrikoides* 역시 다른 종에 비해 성장률은 낮았으나 현미경 관찰 시 두번째로 강한 ROS를 보였다. 따라서 적조생물의 성장률과 ROS는 직접적인 상관성을 보이지 않았으며, 세포당 ROS 생산량이 많고 최대 밀도가 높을 수록 양식어류에 피해를 줄 가능성이 클 것으로 보인다.

### 적조생물의 세포 내외 ROS 생성 비교

#### *Chattonella marina*의 ROS 생성 특성

ROS를 가장 많이 생성하는 식물플랑크톤으로 알려진 *Chattonella* 속은 적조 생물 중에서도 ROS 생성 기작, strain별 생리 특성 차이와 같은 생리학적인 연구가 가장 활발히 수행되었다(Oda et al., 1997; Kim et al., 2007). 그 중 *C. marina*의 경우 1990년대에 주로 서해 내만에서 적조를 일으키는 종으로, 주로 일본과 중국에서 양식어류에 심각한 피해를 주는 주요한 적

조 원인종으로 알려져 있다. 많은 연구에서 *Chattonella*속이 생성하는 ROS가 양식어류 사멸에 주로 관여한다고 보고하였다 (Hiroishi et al., 2005; Kim et al., 2007; Cho et al., 2022). 또한, 몇 연구에서는 *C. ovata*, *C. antiqua*와 같은 다른 침편모조류 (Oda et al., 1997; Marshall et al., 2005; Portune et al., 2010) 및 *Karenia*, *Alexandrium* 등 일부 와편모조류(Kim et al., 1999; Yamasaki et al., 2004; Marshall et al., 2005; Mooney et al., 2011; Griffith and Gobler, 2016)가 ROS를 생성한다는 것을 발견하였다(Table 1). 더 나아가, Marshall et al. (2005)은 화학발광 분석을 통해 dinoflagellates, raphidophytes 등에 속하는 미세조류 37종의 초산화물 생성 능력을 연구하여 다양한 식물플랑크톤이 초산화물을 생성할 수 있다는 것을 밝혀냈다.

본 실험 결과 중 ROS를 많이 생성하는 *C. marina*의  $H_2O_2$  분포는 세포 내 중앙부 혹은 전체에서 강한 녹색 형광을 띄었고,  $O_2^-$ 은 세포 외부에서 강하게 생성되었다. *C. marina*의  $O_2^-$ 은 세포 외부의 경계 부분에서 엷은 녹색 형광을 띄는 것으로 보아 ROS를 세포 외부로 방출함을 알 수 있었고(Fig. 4),  $H_2O_2$ 에 비하여 형광 광도가 아주 약하여 생성이 적음을 알 수 있었다.

성장단계별  $H_2O_2$  생성은 세포 내부에서 초기부터 엷은 녹색 형광을 띄며 비교적 안정기에 가장 강하게 나타났다. 특히  $O_2^-$ 은 세포와 외부경계면에서 지수성장기부터 감소기까지 엷은 초록색으로 발광하여 주로 세포 외부에서 강하게 생성되었다. *C. marina*는 세포표면에 위치한 enzyme system을 통해  $O_2^-$ 를 생성하며 이러한 시스템은 NAD(P)H의 대사과정과 밀접하게 관련되어 있다.

침편모조류의 세포표면에 있는 다당류를 포함한 복잡한 구조인 글루코칼릭스가  $O_2^-$  생성 시스템을 가지고 있기 때문에 주로 세포 표면에서  $O_2^-$ 가 관찰된다(Kim et al., 2000, 2007; Cho et al., 2022).  $H_2O_2$ 의 경우  $O_2^-$ 에서 유래한 것인지 또는 독립적인 경로에 의해서 생성되는지는 밝혀지지 않았지만, Kim et al. (2007)이 수행한 연구 결과  $H_2O_2$ 가 단순히  $O_2^-$ 에서 유래한 것은 아니며 서로 다른 독립적인 생성 기작이 있는 것으로 밝혀졌

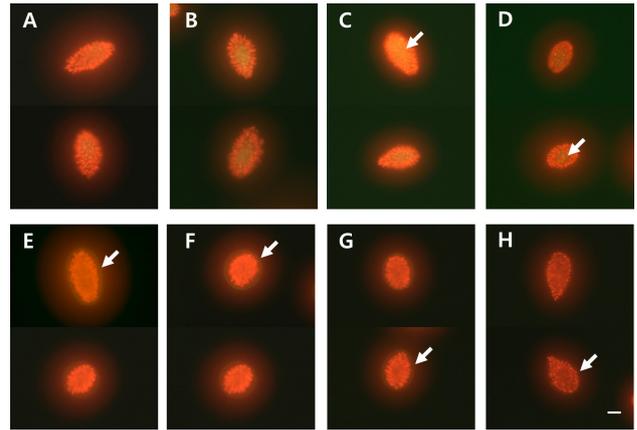


Fig. 4. Staining results of *Chattonella marina*. top,  $H_2O_2$ ; bottom,  $O_2^-$ ; A and E, Lag phase; B and F, Exponential phase; C and G, Stationary phase; D and H, Death phase; White arrow, Green fluorescence.

다.  $H_2O_2$ 는 아직 알려지지 않은 세포 내 시스템에 의하여 생성되고 특히 *C. marina*와 *C. ovata*의 경우 세포 내 구획에 축적되는 것으로 밝혀졌다.

#### *Margalefidinium polykrikoides*의 ROS 생성 특성

*M. polykrikoides*는 국내에서 가장 많은 적조피해를 유발하는 종으로 최근 4년간의 수산피해는 없었지만, 1995년 764억의 최대 피해 이후 거의 매년 적조 발생 경향을 보여왔다. *M. polykrikoides*는 양식어류의 아가미를 막아 질식사를 유발한다고 알려져 있으나 현재까지 그 기작이 명확히 밝혀지지 않았다(Gárate-Lizárraga et al., 2004). Kim et al. (1999)은 한국에서 분리한 *M. polykrikoides*가  $O_2^-$ 와  $H_2O_2$ 를 생성한다고 보고했으며, *M. polykrikoides*가 ROS 생성을 통해 아가미의 조직 손상과 어류 사멸을 유발할 것이라고 제안했다(Kim et al., 2000, 2002; Shin et al., 2019). 본 연구결과  $H_2O_2$ 는 *M.*

Table 1. Toxicity and events for each phytoplankton

Species	Main toxic factors	Event
<i>Karenia mikimotoi</i>	Hemolysin, ROS	Ichthyotoxic, toxic to invertebrates, toxic to zooplankton, antialgal
<i>Margalefidinium polykrikoides</i>	Hemolysin, ROS, sulfated polysaccharides, noxiustoxin	Antiviral, ichthyotoxic, molluscicidal
<i>Alexandrium tamarense</i>	Saxitoxin, neosaxitoxin, gonyautoxin, N-sulfocarbomoyl toxins, tetrodotoxin, hemolysin, ROS	Neurotoxic, paralytic shellfish poisoning, toxic to marine organisms, toxic to zooplankton, cytotoxic
<i>Alexandrium catenella</i>	Saxitoxin, neosaxitoxin, gonyautoxin, N-sulfocarbomoyl toxins, hemolysin, ROS	Neurotoxic, paralytic shellfish poisoning, toxic to marine organisms
<i>Chattonella marina</i>	Brevetoxin-like toxin, ROS, hemolysin, hemagglutinin	Ichthyotoxic, neurotoxic
<i>Chattonella ovata</i>	ROS	Ichthyotoxic
<i>Chattonella antiqua</i>	Brevetoxin-like toxin, ROS	Ichthyotoxic, neurotoxic

ROS, Reactive oxygen species. Cited from Landsbetg et al. (2019), Cho et al. (2022).

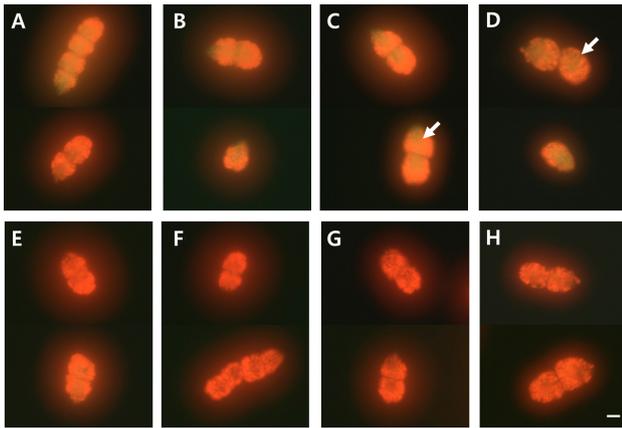


Fig. 5. Staining results of *Margalefidinium polykrikoides*. top, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; bottom, O<sub>2</sub>; A and E, Lag phase; B and F, Exponential phase; C and G, Stationary phase; D and H, Death phase; White arrow, Green fluorescence.

*polykrikoides*의 세포 내부에서 관찰되었고, O<sub>2</sub>은 체 내·외 모두 거의 관찰되지 않았다(Fig. 5). *M. polykrikoides* 성장단계별(초기, 지수기, 안정기, 감소기) ROS 파악 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성은 지수성장기에 가장 강하게 확인되었다. SIA분석 결과에서도 *M. polykrikoides*의 ROS가 지수성장기에 약 40 nM의 농도로 가장 높았다(Fig. 8). 하지만 양식어류가 *M. polykrikoides*에 노출될 때 발생하는 아가미 조직의 산화적 손상 및 DNA분해가 적조생물이 생성하는 ROS의 직접적인 영향인지는 추가적인 연구가 필요하다.

#### *Alexandrium affine*의 ROS 생성 특성

*A. affine*는 하계 국내 연안에 흔히 출현하지만 패독을 일으키는 다른 *Alexandrium* 속과 달리 무해성으로 알려져 있다. 하지만 일부 보고에서는 이 종이 미약한 독성을 가지고 있다고 보고되었고 어류 폐사를 일으키지 않았지만 다른 종에 비해 어류에 높은 ROS 스트레스를 유발하였다(NIFS, 2023). 따라서 무해성임에도 불구하고 본 종의 ROS 발생 특성을 파악할 필요가 있었다. 본 실험을 통해 ROS의 세포 내·외 분포를 파악한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 *A. affine* 세포 내의 중앙부위에 약하게 분포하였고, O<sub>2</sub>은 *A. affine*에서는 검출되지 않았다. *A. affine* 성장단계별(초기, 지수기, 안정기, 감소기) 세포 ROS 측정 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성은 안정기(안정기-감소기)에 세포 내부에서 옅은 녹색 형광을 띄며 저농도로 생성되었고(Fig. 6), O<sub>2</sub>은 성장단계에서 검출되지 않았다. SIA분석 결과 안정기-감소기에 세포 외 ROS가 약 12 nM로 약하게 측정되었다(Fig. 8). 최신 연구결과에 따르면 양식생물을 높은 농도(8,000 cells/mL)의 *A. affine*에 노출하였을 때 양식생물 폐사는 일어나지 않았다(NIFS, 2023). 이와 같이 *A. affine*가 발생하는 ROS의 농도는 매우 낮으며 이 종이 생성하는 ROS의 유해성은 미미하다고 판단된다. 다만 *A. affine*

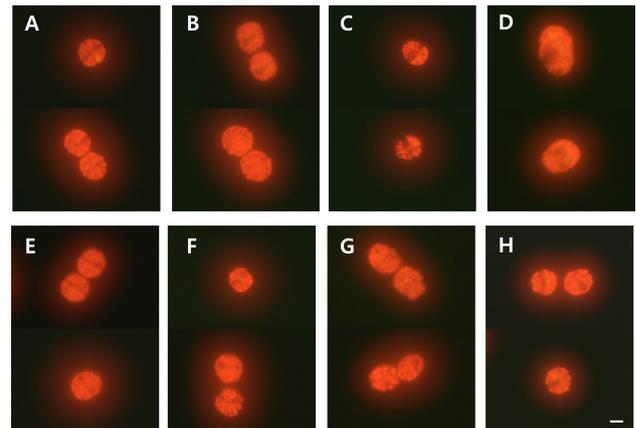


Fig. 6. Staining results of *Alexandrium affine*. top, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; bottom, O<sub>2</sub>; A and E, Lag phase; B and F, Exponential phase; C and G, Stationary phase; D and H, Death phase; White arrow, Green fluorescence.

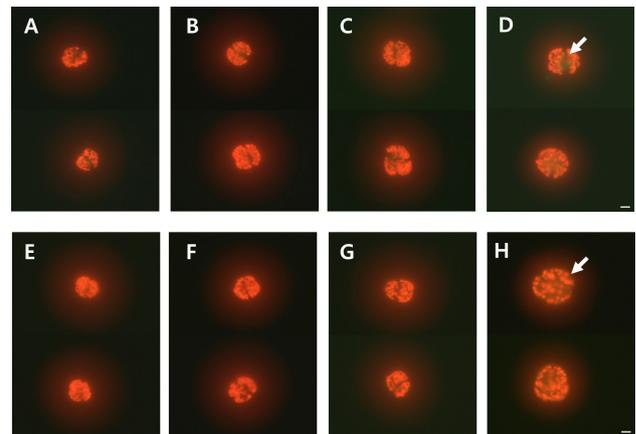


Fig. 7. Staining results of *Karenia mikimotoi*. top, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; bottom, O<sub>2</sub>; A and E, Lag phase; B and F, Exponential phase; C and G, Stationary phase; D and H, Death phase; White arrow, Green fluorescence.

의 경우 균주에 따라 유해성의 차이를 보인다는 보고에 따라 여러 균주를 이용한 추가연구가 필요하다.

#### *Karenia mikimotoi*의 ROS 생성 특성

*K. mikimotoi*는 2016년 완도에서 전복 폐사를 야기한 적이 있으나 국내에서 주로 피해를 발생시키는 적조생물은 아니다. 하지만 일본에서는 매우 큰 수산피해를 자주 유발하는 종으로 어류와 패류 모두에 유해하다(Li et al., 2017). 2023년에도 일본 나가사키현, 구마모토현, 가고시마현(타치바나만, 야쓰시로해)에서 *Chattonella* 적조와 더불어 막대한 수산피해를 일으켰다. 따라서 한국에서도 기후변화에 따른 해양환경의 변화로 향후 수산생물에 피해를 줄 수 있는 종으로 고려된다. *K. mikimotoi*

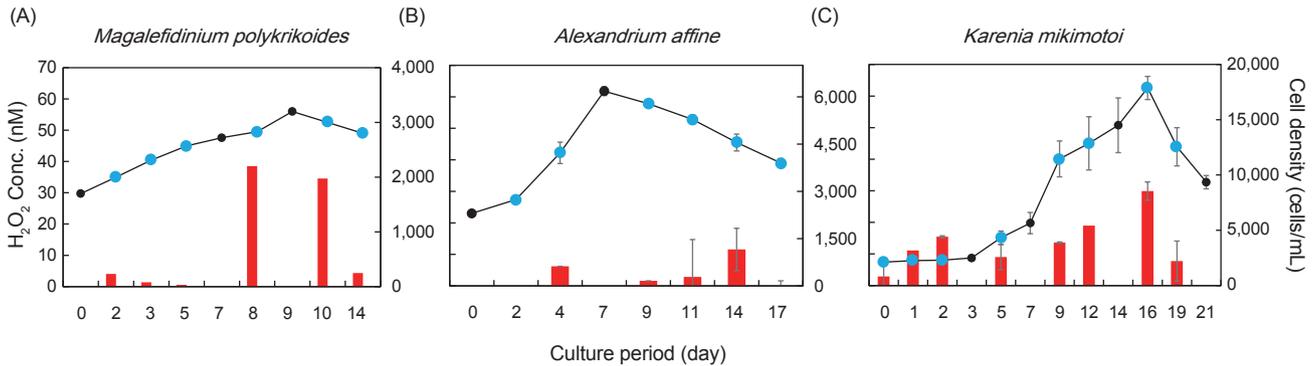


Fig. 8. SIA analysis results. Black line indicate cell density and sky-blue circle indicate the sample for SIA. Red bar indicates  $H_2O_2$  concentration. SIA, Sequential injection analysis.

의 ROS 생성 관찰 결과  $H_2O_2$ 는 세포 내의 중앙부위에 약하게 분포하였고,  $O_2^-$ 의 경우 *K. mikimotoi*는 세포 내·외부의 경계에서 아주 약하게 외부로 방출하는 것을 확인하였다(Fig. 7). 성장 단계별  $H_2O_2$  생성은 감소기(안정기-감소기)에 세포 내부에서 옅은 녹색 형광을 보여 저농도로 생성되었고,  $O_2^-$ 은 감소기로부터 갈수록 세포 내부와 외부경계면에서 옅은 녹색으로 관찰되어 저농도로 생성되는 것을 확인하였다. SIA분석 결과 ROS는 안정기-감소기에 최대 30 nM로 나타났다(Fig. 8). *K. mikimotoi*는 다른 적조생물에 비해 균주별 ROS생성 차이를 많이 보이는 종이며 이들의 유해성 역시 균주별 차이가 큰 종이다(Kim et al., 2019).

Kim et al. (2019)의 연구결과에 따르면, 특정 균주(NGU04)의 경우 *C. marina*와 거의 유사한 농도의 높은 ROS를 생성하였지만 다른 균주들은 그 편차가 매우 컸다. 본 실험에 사용된 *K. mikimotoi*를 이용하여 어류 노출 실험을 진행한 결과 어류에 산화적 스트레스를 유발하였으나, 8,000 cells/mL에 달하는 높은 농도에도 불구하고 어류 폐사가 발생하지 않은 것으로 보아 본 연구에서 사용된 균주는 유해성이 낮은 것으로 판단된다(NIFS, 2023). *K. mikimotoi*의  $H_2O_2$  생성은 광합성과 직접적으로 연결되지 않은 대사 경로를 통해 발생한다고 보고되어 있으며(Kim et al., 2019; Marshall et al., 2003), 이 중에서 생성된 ROS는 세포 분열에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Oda et al., 1995). 또한 동일 식물플랑크톤이라도 균주별 ROS 생성 속도 차이는 균주별 성장속도 차이와 연관이 있다(Kim et al., 2019). 보다 더 정밀한 비교를 위해 앞으로 다양한 균주를 확보하여 추가적인 어류 노출실험과 ROS 생성 실험이 필요하다.

#### 향후 연구 방향

해양에서의 ROS는 빠른 반응속도로 인해 매우 낮거나 검출되지 않기 때문에 해양순환에서 중요한 요인(미생물 신호 전달 경로, 영양염 화학적 상태 변화 등)이나 그에 대한 연구가 어렵다. 그럼에도 불구하고 ROS가 해양에 미치는 영향, 항산화제

가 ROS를 생성하는 적조생물의 유해성을 완화시키는 등의 연구가 진행되었다(Oda et al., 1997; Kim et al., 1999; Tang and Gobler, 2009, 2010; Flores et al., 2012). 하지만 *Alexandrium*, *Karenia*, *Margalefidinium* 등 대표적인 적조생물에서 유래하는 ROS는 수생생물의 성체에 직접적으로 영향을 줄 만큼 농도가 높지 않다(Twiner et al., 2001; Marshall et al., 2003; Tang and Gobler, 2009). 따라서, 단순히 ROS의 절대 농도가 아닌 ROS가 유리지방산과 반응하여 어떤 작용을 일으키는지, 또는 세포의 파괴나 allelopathy, 바이러스 감염과 같은 다른 생물학적 상호작용에서 어떠한 역할을 하는지 파악하는 것이 필요하다(Daiz and Plummer, 2018). 또한 적조생물이 어류에 미치는 영향에 대한 실험 결과 수생생물의 혈액, 간, 특히 적조생물의 영향을 직접 받는 아가미에서 ROS의 양이 급격히 높았다(NIFS, 2023). 따라서, 적조생물이 분비하는 ROS뿐만 아니라 현재 활발히 진행되는 세포 내 ROS의 생성 기작을 구명할 필요가 있다. 이러한 연구들은 수생생물과 적조생물 ROS간의 관계를 파악하게 되므로 궁극적으로 양식 생물을 건강하고 안전하게 관리하는데 중요할 것이다.

요약하면, 적조 원인생물이 생성하는 ROS는 양식생물에 유해한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 ROS는 적조생물의 내부와 외부에서 생성되며, 식물플랑크톤 외부에서 생산되는 ROS는 해양 ROS flux에 크게 기여한다고 알려져 있다. 또한 어류 아가미에서 세포가 파괴되며 식물플랑크톤 내부 ROS가 외부로 영향을 줄 가능성도 있다. 따라서 대표적인 적조 원인생물 4종(*A. affine*, *C. marina*, *K. mikimotoi*, *M. polykrikoides*)을 이용하여 성장 과정 동안 발생하는 ROS의 변화를 형광염색법( $H_2O_2$ : CM- $H_2DCFDA$ ,  $O_2^-$ : MCLA)과 SIA로 분석하였다.

그 결과 *A. affine*가 생산하는  $H_2O_2$ 와  $O_2^-$  농도는 미약하였으며, *M. polykrikoides*의  $H_2O_2$ 는 주로 세포의 내부에서 관찰되었고,  $O_2^-$ 는 관찰되지 않았다. *K. mikimotoi*의  $H_2O_2$ 와  $O_2^-$  모두 초기보다 쇠퇴기에 많이 생성되었으며,  $O_2^-$ 는 주로 세포 외

에서 약하게 관찰되었다. 기존 ROS를 많이 생성한다고 알려진 *C. marina*의 경우 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 세포 내부에서 지수성장기에 가장 많이 생성되었고, O<sub>2</sub>는 초기부터 안정기까지 세포 외부에서 약하게 관찰되었다. 결론적으로 종 및 성장단계에 따른 ROS의 농도 및 내·외부 분포 차이를 확인하였고, 이는 적조 발생 종뿐 만 아니라 발생시기 역시 ROS의 차이를 야기하여 양식생물에 영향을 미칠 것으로 보인다.

## 사 사

이 연구는 2024년 국립수산물연구원 수산과학연구사업 R2024010과 정부 (과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(NRF2022R1C1C1008380)을 받아 수행된 연구입니다.

## References

- Anderson DM. 1997. Turning back the harmful red tide. *Nature* 388, 513-514.
- Cho K, Ueno M, Liang Y, Kim D and Oda T. 2022. Generation of reactive oxygen species (ROS) by harmful algal bloom (HAB)-forming phytoplankton and their potential impact on surrounding living organisms. *Antioxidants* 11, 206. <https://doi.org/10.3390/antiox11020206>.
- Diaz JM and Plummer S. 2018. Production of extracellular reactive oxygen species by phytoplankton: Past and future directions. *J Plankton Res* 40, 655-666. <https://doi.org/10.1093/plankt/fby039>.
- Flores HS, Wikfors GH and Dam HG. 2012. Reactive oxygen species are linked to the toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium* spp. to protists. *Aquat Microb Ecol* 66, 199-209. <https://doi.org/10.3354/ame01570>.
- Gárate-Lizárraga I, López-Cortés DJ, Bustillos-Guzmán JJ and Hernández-Sandoval F. 2004. Blooms of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniaceae) in the Gulf of California, Mexico. *Rev Biol Trop* 52, 51-58.
- Griffith AW and Gobler CJ. 2016. Temperature controls the toxicity of the ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *Mar Ecol Prog Ser* 545, 63-76. <https://doi.org/10.3354/meps11590>.
- Guillard RR. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals*. In: Smith WL and Chanley MH, eds. Springer, Boston, MA, U.S.A. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3).
- Hansard SP, Vermilyea AW and Voelker BM. 2010. Measurements of superoxide radical concentration and decay kinetics in the Gulf of Alaska. *Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* 57, 1111-1119. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2010.05.007>.
- Hiroishi S, Okada H, Imai I and Takashi Y. 2005. High toxicity of the novel bloom-forming species *Chattonella ovata* (Raphidophyceae) to cultured fish. *Harmful Algae* 4, 783-787. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.12.008>.
- Kim CS, Lee SG, Kim HG and Jung J. 1999. Reactive oxygen species as causative agents in the ichthyotoxicity of the red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *J Plankton Res* 21, 2105-2115. <https://doi.org/10.1093/plankt/21.11.2105>.
- Kim CS, Lee SG and Kim HG. 2000. Biochemical responses of fish exposed to a harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *J Exp Mar Biol Ecol* 254, 131-141. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00263-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00263-X).
- Kim D, Nakamura A, Okamoto T, Komatsu N, Oda T, Iida T, Ishimatsu A and Muramatsu T. 2000. Mechanisms of superoxide anion generation in the toxic red tide phytoplankton *Chattonella marina*: Possible involvement of NAD(P)H oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1524, 220-227. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(00)00161-6).
- Kim D, Oda T, Muramatsu T, Kim D, Matsuyama Y and Honjo T. 2002. Possible factors responsible for the toxicity of *Cochlodinium polykrikoides*, a red tide phytoplankton. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 132, 415-423. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00093-5](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00093-5).
- Kim D, Watanabe M, Nakayasu Y and Kohata K. 2005. Changes in O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Chattonella antiqua* during diel vertical migration under nutrient stratification. *Aquat Microb Ecol* 39, 183-191. <https://doi.org/10.3354/ame039183>.
- Kim D, Nakashima T, Matsuyama Y, Niwano Y, Yamaguchi K and Oda T. 2007. Presence of the distinct systems responsible for superoxide anion and hydrogen peroxide generation in red tide phytoplankton *Chattonella marina* and *Chattonella ovata*. *J Plankton Res* 29, 241-247. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbm011>.
- Kim D, Wencheng L, Matsuyama Y, Cho K, Yamasaki Y, Takeshita S and Oda T. 2019. Extremely high level of reactive oxygen species (ROS) production in a newly isolated strain of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *Eur J Phycol* 54, 632-640. <https://doi.org/10.1080/09670262.2019.1632936>.
- Li X, Yan T, Lin J, Yu R and Zhou M. 2017. Detrimental impacts of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* in Fujian coastal waters on typical marine organisms. *Harmful Algae* 61, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.011>.
- Marshall JA, de Salas M, Oda T and Hallegraeff G. 2005. Superoxide production by marine microalgae: I. Survey of 37 species from 6 classes. *Mar Biol* 147, 533-540. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-1596-7>.
- Marshall JA, Nichols PD, Hamilton B, Lewis RJ and Hallegraeff GM. 2003. Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycanthus*): The synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harmful Algae* 2, 273-281. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00046-5).

- Mooney BD, Dorantes-Aranda JJ, Place AR and Hallegraef GM. 2011. Ichthyotoxicity of gymnodinioid dinoflagellates: PUFA and superoxide effects in sheepshead minnow larvae and rainbow trout gill cells. *Mar Ecol Prog Ser* 426, 213-224. <https://doi.org/10.3354/meps09036>.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2023. Study on the Impact of the Harmful Algae on the Physiologic Change and Mortality of Cultured Marine Fish. NIFS, Busan, Korea.
- Oda T, Moritomi J, Kawano I, Hamaguchi S, Ishimatsu A and Muramatsu T. 1995. Catalase-induced and superoxide dismutase-induced morphological changes and growth inhibition in the red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Biosci Biotechnol Biochem* 59, 2044-2048. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.2044>.
- Oda TS, Nakamura A, Shikayama M, Kawano I, Ishimatsu A and Muramatsu T. 1997. Generation of reactive oxygen species by raphidophycean phytoplankton. *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 1658-1662. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1658>.
- Portune KJ, Cary SC and Warner ME. 2010. Antioxidant enzyme response and reactive oxygen species production in marine raphidophytes. *J Phycol* 46, 1161-1171. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00906.x>.
- Rusak SA, Peake BM, Richard LE, Nodder SD and Cooper WJ. 2011. Distributions of hydrogen peroxide and superoxide in seawater east of New Zealand. *Mar Chem* 127, 155-169. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2011.08.005>.
- Shin YK, Nam SE, Kim WJ, Seo DY, Kim YJ and Rhee JS. 2019. Red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* induces significant oxidative stress and DNA damage in the gill tissue of the red seabream *Pagrus major*. *Harmful Algae* 86, 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.04.008>.
- Tang YZ and Gobler CJ. 2009. Characterization of the toxicity of *Cochlodinium polykrikoides* isolates from Northeast US estuaries to finfish and shellfish. *Harmful Algae* 8, 454-462. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.10.001>.
- Tang YZ and Gobler CJ. 2010. Allelopathic effects of *Cochlodinium polykrikoides* isolates and blooms from the estuaries of Long Island, New York, on co-occurring phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 406, 19-31. <https://doi.org/10.3354/meps08537>.
- Twiner MJ, Dixon SJ and Trick CG. 2001. Toxic effects of *Heterosigma akashiwo* do not appear to be mediated by hydrogen peroxide. *Limnol Oceanogr* 46, 1400-1405. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.6.1400>.
- Yang H, Gobler CJ and Tang YZ. 2022. Consistency between the ichthyotoxicity and allelopathy among strains and ribotypes of *Margalefidinium polykrikoides* suggests that its toxins are allelochemicals. *Front Mar Sci* 9, 941205. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.941205>.
- Yamasaki Y, Kim DI, Matsuyama Y, Oda T and Honjo T. 2004. Production of superoxide anion and hydrogen peroxide by the red tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *J Biosci Bioeng* 97, 212-215. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70193-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70193-0).