

보안과제(), 일반과제(O) / 공개(O), 비공개()

BSPN68400-12366-3

황해 주요 갯벌의 저서성 규조류 다양성 분석 기법 개발 및 데이터베이스 구축

2020. 09.

한국해양과학기술원

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “황해 주요 갯벌의 저서성 구조류 다양성 분석 기법 개발 및 데이터베이스 구축” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 09. 28

총괄연구책임자: 안 성 민

참 여 연 구 원: 김지훈 현명진 조성태

보고서 초록

| | | | | | |
|--|-----------------------|---|-------------------------------|-------------|---|
| 과제고유 번호 | N68400 | 해당단계 연구기간 | 2018.06.01 - 2020.08.31 | 단계 구분 | 1/3 |
| 연구사업명 | 중사업명 | 이공학개인지초연구지원사업 | | | |
| | 세부사업명 | 기본연구 | | | |
| 연구과제명 | 중과제명 | | | | |
| | 세부과제명 | 황해 주요 갯벌의 저서성 규조류 다양성 분석 기법 개발 및 데이터 베이스 구축 | | | |
| 연구책임자 | 안성민 | 해당단계 참여연구원수 | 총 : 3 명 내부: 0 명 외부: 3 명 | 해당단계 연구비 | 정부: 50,000 천원 기업: 천원 계 : 50,000 천원 |
| | | 총연구기간 참여연구원수 | 총 : 4 명 내부: 0 명 외부: 4 명 | 총 연구비 | 정부: 150,000 천원 기업: 천원 계 : 150,000 천원 |
| 연구기관명 및 소속부서명 | 한국해양과학기술원 해양생태연구센터 | | 참여기업명 | | |
| 국제공동연구 | | | | | |
| 위탁연구 | | | | | |
| 요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내) | | | | 보고서 면수 | 26 |
| <ul style="list-style-type: none"> ○ 서해 주요 갯벌에서 2018년 7월부터 2020년 5월까지 2년간 격일로 현장조사 수행 ○ 현장 조사 시 이화학적 요인(영양염, 입도, 함수율, 온도, 미세조류 생체량, 미세조류 색소) 분석을 위한 시료 확보 ○ 갯벌 퇴적물 시료에서 저서성 규조류 배양주를 분리하여 341개의 단일 배양주 확보 ○ 속 이하의 수준으로 동정된 319개의 배양주는 8목 16과 24속 77종으로 나뉨 ○ 확보된 배양주들에 대한 867건의 염기서열 정보 획득(18s rDNA: 244개, rbcL: 341개, cob: 282개) ○ 각 분자마커들의 해상력 비교 및 활용가능성 검토 ○ NGS 분석을 위한 reference DB 및 퇴적물 시료를 이용한 sample library 구축 | | | | | |
| 색인어 (각 5개 이상) | 한 글 | 갯벌, 저서성 규조류, 생물다양성, 데이터베이스, 차세대염기서열분석기술 | | | |
| | 영 어 | Tidal flat, Benthic diatom, Biodiversity, Database, NGS | | | |

요 약 문

I. 제 목

황해 주요 갯벌의 저서성 규조류 다양성 분석 기법 개발 및 데이터베이스 구축

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구에서는 황해의 유형별 주요 갯벌에서 저서성 규조류의 데이터베이스 구축 및 다양성 분석 기법의 개발을 통해 저서생태계의 기능 및 구조 변동, 저서성 규조류 생물 다양성 규명 및 모니터링을 위한 기반 마련

2. 연구개발의 필요성

- 우리나라의 갯벌은 세계 5대 갯벌 중의 하나이나, 환경오염과 지속적인 연안개발로 해양 환경의 지속가능성이 현저히 낮아지고 있으며, 이로 인해 생태적 기능의 변화 및 저하와 더불어 해양 가치 저하 및 혜택 감소가 야기됨
- 갯벌 보전에 대한 요구가 높아짐에 따라 국내외적으로 갯벌의 이해, 활용 등을 위한 해양 보호구역의 확대, 지정이 이루어지고 있으며, 이에 갯벌생태계 기능 및 구조에 대한 정확한 현황 파악과 이를 기초로 하는 지속가능성 증대를 위한 연구가 요구됨
- 그러나 갯벌생태계의 기능 및 구조에 대한 우리의 지식은 명확하지 않고, 이러한 급진적인 환경 변화에 대처하기 위한 기초 자료 및 연구는 부족한 실정임
- 갯벌생태계에서 저서미세조류는 주요 일차생산자로 에너지 및 물질 순환과 갯벌 생태계 기능 유지에 매우 중요한 역할을 수행하지만 현장 조사, 시료 획득 및 처리, 분류 및 동정 등 연구 방법의 어려움으로 인해 주요 연구 대상에서 소외되어 왔음
- 그 결과, 저서미세조류의 다양성 및 생태 특성에 대한 이해는 매우 부족한

- 실정이며, 이는 연안생태계의 구조 및 기능 이해와 온난화 및 기후변화에 따른 연안생태계 변동을 예측함에 있어서 불확실성을 증가시킴
- 그 중에서도 최우점하는 저서성 규조류는 현재까지도 형태학에 기반을 둔 전통적인 분류학에 의존하고 있으며, 분자학적 기법을 활용한 거의 전무한 실정임. 복잡하고 광역적인 갯벌생태계의 특성을 감안하면 추후 생물다양성 및 생태 특성 연구 분야에서 NGS 기법의 적용 및 도입은 필연적임
 - NGS 분석 기법의 적용을 위해서는 양질의 데이터베이스의 확충이 필수적으로 요구되지만 기존의 데이터베이스는 매우 부족하고 확충을 위한 노력과 지원은 매우 미흡한 실정임
 - 그러므로 본 연구를 통해 양질의 데이터베이스와 NGS 분석 기법을 확보하여 갯벌 저서성 규조류 생물 다양성 규명 및 광역적 갯벌 생태 모니터링을 위한 기반 마련

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 서해안 다양한 환경의 갯벌에 서식하는 저서성 규조류의 균주 확보
- 저서성 규조류의 데이터베이스 구축
- 저서성 규조류의 다양성 분석을 위한 NGS 기법 개발

IV. 연구개발결과

- 서해 주요 갯벌에서 2018년 7월부터 2020년 5월까지 2년간 격월로 현장조사 수행
- 현장 조사 시 이화학적 요인(영양염, 입도, 함수율, 온도, 미세조류 생체량, 미세조류 색소) 분석을 위한 시료 확보
- 갯벌 퇴적물 시료에서 저서성 규조류 배양주를 분리하여 341개의 단일 배양주 확보
- 속 이하의 수준으로 동정된 319개의 배양주는 8목 16과 24속 77종으로 나뉨
- 확보된 배양주들에 대한 867건의 염기서열 정보 획득(18s rDNA: 244개, *rbcL*: 341개, *cob*: 282개)
- 각 분자마커들의 해상력 비교 및 활용가능성 검토
- NGS 분석을 위한 reference DB 및 퇴적물 시료를 이용한 sample library 구축

V. 연구개발결과의 활용계획

- 분자 기법의 도입으로 기존의 형태 기반 분석법의 한계점을 극복할 수 있으며, 분석자 및 과정에 따른 차이를 줄여 연구결과에 대한 상호 비교를 가능케하여 장기적, 광역적 분석 기반 마련
- 우리나라 서해안의 주요 갯벌에서 서식하는 저서성 규조류에 대한 인벤토리 구축 및 형태 분자학적 기초자료 확보를 통한 데이터베이스 확충을 통해 아직 미개척 분야인 갯벌 저서성 규조류에 대한 연구 선도
- 실제 갯벌에 서식하는 난분류성 저서규조류의 서식환경에 따른 다양성 규명 및 기초적 생태 특성의 연구를 통한 갯벌 생태계 기능적 측면의 이해 재고
- 본 연구를 통해 확보한 결과는 기후 변화에 따른 생물다양성 및 연안 생태계기능 및 생산량 변화 모니터링 연구로 발전시켜 생태계모델링의 기초 자료로 활용 가능
- 본 연구는 갯벌에서 최우점하는 저서규조류를 대상으로 수행되나, 본 연구에서 활용하는 연구 기법은 부유성 규조류뿐만 아니라 적조 생물 및 다양한 미세조류로 확대 적용할 수 있으며, 이들 통해 주요 현안과 관련된 해양생태계 변동 예측 등의 종합 연구로 발전 가능

목 차

| | |
|--------------------------------|----|
| 제 1 장 서 론 | 7 |
| 1. 연구개발의 필요성 | 7 |
| 1. 연구개발의 목적 | 8 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 | 9 |
| 1. 국내외 기술개발 현황 | 9 |
| 2. 현기술 상태의 취약성 | 10 |
| 제 3 장 연구개발 내용 및 결과 | 11 |
| 1. 연구개발 수행 내용 | 11 |
| 2. 연구개발 결과 | 12 |
| 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 | 21 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 | 21 |
| 제 6 장 참고문헌 | 22 |

제 1 장 서 론

1. 연구개발 필요성

우리나라의 갯벌은 세계 5대 갯벌 중의 하나이나, 환경오염과 지속적인 연안개발로 해양 환경의 지속가능성이 현저히 낮아지고 있으며, 이로 인해 생태적 기능의 변화 및 저하와 더불어 해양 가치 저하 및 혜택 감소가 우려되고 있다(김과 강, 2005). 갯벌 보전에 대한 요구가 높아짐에 따라 국내외적으로 갯벌의 이해, 활용 등을 위한 해양 보호구역의 확대, 지정이 이루어지고 있으며, 이에 갯벌생태계 기능 및 구조에 대한 정확한 현황 파악과 이를 기초로 하는 지속가능성 증대를 위한 연구가 요구된다. 그러나 갯벌생태계의 기능 및 구조에 대한 우리의 지식은 명확하지 않고, 이러한 급진적인 환경 변화에 대처하기 위한 기초 자료 및 연구는 부족한 실정이다.

갯벌에 서식하는 저서성 미세조류 중 가장 대표적인 분류군은 규조류로, 이 그룹은 미세조류 중 가장 큰 그룹을 이루고 있으며, 전세계적으로 분포하여 지표생물로서 매우 의미 있는 그룹이다(Yallop et al., 1994; Thornton et al., 1999; Gowda et al., 2001; Mann et al., 2010). 저서성 미세조류는 다양한 연안 생태계에서 중요한 일차생산자로(Hauboisa et al., 2005), 때때로 주된 일차생산자의 역할을 하기도 한다(Underwood and Kromkamp, 1999). 또한 이들은 수층과 퇴적층 사이의 영양염의 교환을 일으키는 역할을 수행한다(Thornton et al., 1999). 이 그룹은 갯벌 내에서 대개 군체 형태로 생육하며, biofilm 또는 mat를 형성한다. Mat와 biofilm의 주요 성분은 polysaccharide로 저서성 미세조류의 안정적인 생장에 도움을 줄 뿐만 아니라 퇴적물의 안정성에도 크게 기여한다(Yallop et al., 1994; Underwood and Barnett, 2006). 저서성 규조류는 부유성 규조류에 비해 종 수가 많은 것으로 알려져 있지만, 부유성 종들에 비해 연구 대상에서 외면 받아왔기에 그에 대한 정보는 부족한 실정이다. 또한 기존의 저서성 규조류에 대한 연구들도 주로 담수역에서 수행되었기 때문에, 오랜 연구 역사에도 불구하고 여전히 많은 부분이 미지의 영역으로 남아있다. 이는 국내에서도 비슷한 실정이다. 국내에서 지금까지 알려진 규조류는 총 1,681 종으로 그 중 해양 규조류는 761종으로 알려져 있지만 대체로 부유성 종들이 보고되어 있다(환경부 2015).

저서성 규조류는 앞서 언급한 바와 같이 연안 저서생태계 내에서 생태학적 기능의 유지를 위해 중요한 역할을 하고 있으며, 연안생태계 평가 및 모니터링을 위한 좋은 지표생물이다. 저서규조류의 생체량과 분포에 영향을 미치는 요인은 영양염과 입도 등 다양하며, 이러한 이화학적 요인의 변화는 갯벌 기능 및 생산량 변화로 이어질 수 있다. 갯벌

간척사업의 결과로 갯벌 생태계의 생산력과 기능이 크게 저하되고 생물다양성이 감소되고 있으며, 기후변화, 해양산성화 등 전지구적인 현안들로 인해 저서규조류의 군집구조를 비롯한 해양미세조류 군집 구조의 변화가 예측되고 있다(Beardall et al., 2009). 따라서 갯벌 저서성 규조류에 대한 모니터링 기법의 개발이 필요하며, 갯벌 서식지별 저서규조류의 생태 특성 파악을 통해 서식환경 변화에 따른 군집구조 및 기능 변화 양상을 판단하고 변동 추이에 대한 추정이 가능할 것으로 기대된다.

저서성 규조류를 대상으로 한 NGS 기법의 적용 연구는 전 세계적으로 아직 시작단계에 머물러 있는 실정이다(Medlin, 2018). 분자계통학적 연구방법은 전통적인 형태학적 분석기법과는 달리 여러 시료를 동시에 분석할 수 있으며, 보다 빠르고 간편하면서도 정확한 연구가 가능하다. 따라서 규조류 동정 및 분류, 다양성 분석 연구에 분자 기법의 적용 기법의 개발을 통해 기존의 규조 연구의 어려움을 해소하는데 기여할 수 있으며, 각기 다른 지역에서의 연구 결과들의 직접적인 비교와 광역적이고 장기적인 연구가 가능하다. 따라서 저서성 규조류 다양성 분석을 위해 분자 기법의 개발과 적용 가능성 검토가 필요하다.

2. 연구개발 목적

본 연구에서는 황해의 유형별 주요 갯벌에서 저서성 규조류의 데이터베이스 구축 및 다양성 분석 기법의 개발을 통해 저서생태계의 기능 및 구조 변동, 저서성 규조류 생물 다양성 규명 및 모니터링을 위한 기반 마련하고 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 기술개발 현황

지금까지 국내에서는 연안 갯벌에서 저서성 미세조류에 대한 다양한 연구들이 있었으며, 현재까지도 이어지고 있다. 심과 조 (1984)는 퇴적물의 입도와 현존량을 분석하여 양의 상관관계를 보임을 밝혔으며, Choi (1988)는 입도에 따라 일부 종의 출현 양상이 달라짐을 보고하였다. 그 외에도 퇴적물의 특성에 따른 규조류의 출현 양상에 대한 연구가 이루어져 왔다(조, 1988; 오와 고; 1991). 유와 최 (2005)는 갯벌 내 미세조류의 분포와 더불어 일차생산력에 대한 연구를 실시하였고, 이 (2002)는 이화학적 요인에 따른 미세조류의 수직 분포에 대한 연구를 실시하였다. 또한 최 등 (2010)은 위성자료를 이용하여 갯벌의 퇴적환경과 저서 미세조류 환경에 대해 분석하고자 하였으며, HPLC 기법을 활용한 갯벌 내 저서미세조류의 생체량 및 군집 조성 분석이 이루어졌다(오 등, 2004; 이 등, 2009; 이 등, 2012). 그 밖에 주로 갯벌이 잘 발달된 서해 및 서남해역에서 갯벌 환경 변화와 저서성 미세조류의 생체량과 군집 구조 변화에 대한 많은 연구가 진행되었다(Kim and Cho, 1985; Lee, 2002; 이, 2003; 나와 이, 2011; 이와 정, 2011; 최 등, 2013). 국외에서는 현미경을 이용하여 갯벌에 서식하는 미세 형태 및 분포 양상에 관한 연구와(Alem, 1950; Hopkins, 1964; Law, 1988; Underwood et al., 1988; Ohtsuka, 2005; Aktan & Aykul, 2005; Trites et al., 2005; Haubois et al. 2005; Ribeiro, 2010), 계절 및 환경요인 변화에 따른 반응에 대한 연구(Admiaeal & Peletier, 1980a, b; Jong & Admiraal, 1984; Peletier, 1996; Watermann et al., 1999; Wachnick et al., 2010; Du et al., 2012) 등 기반 연구가 꾸준히 이루어지고 있다. 이와 더불어, 최근에는 갯벌 저서 규조의 일차생산에 대한 연구 (Hendrarto & Nitisuparjo, 2009; Chevalier et al., 2010)와 세포외 분비 물질의 기능에 대한 연구(Brouwer et al., 2006; Mckew et al., 2011) 등 다양한 분야에 대해 연구가 진행되고 있다.

근래에는 이러한 어려움을 극복하기 위해 규조를 대상으로 DNA 염기서열을 이용한 분자계통학적 연구와 동정을 위한 DNA barcoding 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Evans et al. 2007; Jahn et al. 2007; Moniz and Kaczmarek, 2010). DNA barcoding 및 meta-barcoding 기법의 이용을 통해 형태적으로 유사한 종들과 속들의 나눌 수 있게 되었다(그림 1). 이는 광학현미경에 의한 동정을 기반으로 한 현 분류 체계의 정정으로 이어지고 있으며, 분류체계의 변화에 따른 논란이 지속되고 있다(Medlin, 2018).

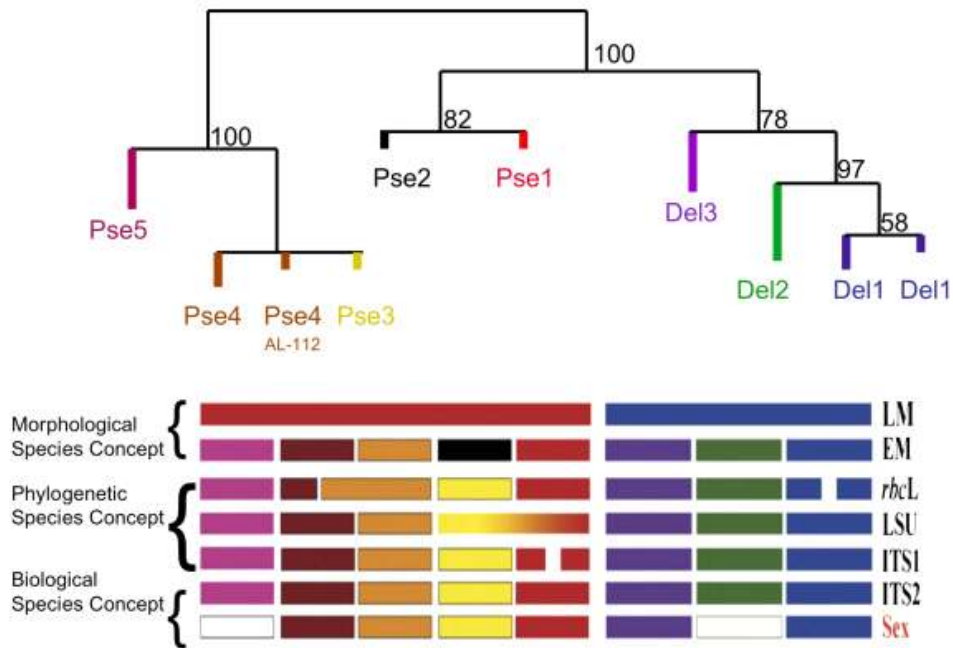


그림 1. Pseudo-nitzschia 속의 종들에 대한 미세 형태 분석 기법 및 분자마커 별 종 동정 해상력 비교(Medlin, 2018).

2. 현기술 상태의 취약성

앞서 언급한 바와 같이 저서성 규조에 대한 연구들은 과거부터 지속적으로 이루어지고 있지만, 각각의 연구들에서 명명법 또는 분류체계에서 차이 또는 저자에 따른 동정의 차이 등에 의해 제대로 정립되어 있지 않으며, 각각의 자료들을 상호비교 하는 것도 또한 어렵다(Underwood and Barnett, 2006). 이는 규조 연구의 어려움에 기인하는데, 규조의 전통적인 형태학적 연구 방법은 각 종들의 모양, 크기, 피각의 미세구조를 이용한 것이었다. 이러한 방법은 종의 동정의 어려움 때문에 숙달되기까지 오랜 기간의 훈련이 필요하다. 또한 갯벌에서 저서성 규조 군집 구조를 연구하는 것은 분류 체계 및 동정의 어려움과 더불어 방법적인 어려움 때문에 연구 수행이 어려웠다(Sullivan and Currin, 2002). 따라서 과거에는 종 수준의 군집 구조에 대한 연구를 피하거나, 색소 분석을 이용한 조사를 수행하기도 하였다(Brotas and Plante-Cuny, 2003). 최근 분자학적 기법을 이용한 연구들이 시도되고 있으나 전세계적으로 아직 시작단계에 머물러 있는 실정이다(Medlin, 2018). 이로 인해 갯벌에서 저서성 규조의 중요성에도 불구하고 군집 구조 및 동태와 같은 분포 및 생태에 대한 연구가 명확하게 이루어지지 않은 실정이다.

제 3 장 연구개발 내용 및 결과

1. 연구개발 수행 내용

가. 연구 기간 및 조사 계획

- 총 연구 기간은 3년으로 격월 조사를 수행(그림 2)
- 서해안에 위치한 국내 주요 갯벌 4곳에 대해 각 조사 지역 별로 상부, 중부, 하부 조간대에 각각 조사 정점을 설정하여 저서성 규조류의 광역 및 국지적 분포 특성 분석 (그림 3)
- 현장 조사 시 서식지 환경 분석을 위한 데이터 및 시료 획득

| 구분 | 세부 단계 | 1차년도 (2018년) | 2차년도 (2019년) | 3차년도 (2020년) | 목표 성과 |
|----------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| 현장조사 | 저서성 규조류 시료 획득 | → | | | 균주별 서식 환경 자료 확보 |
| | 서식 환경 자료 획득 | → | | | |
| 저서성 규조류 균주 확보 | 단일 균주 분리 및 배양 | → | | | 저서성 규조류 균주 확보 |
| 저서성 규조류 데이터베이스 구축 | 형태 및 이미지 정보 획득 | → | | | 저서성 규조류 데이터베이스 확보 |
| | 염기서열 자료 획득 | → | | | |
| 저서성 규조류 NGS 분석 기법 개발 | 마커유전자 해상력 비교 | → | | | NGS 분석 기법 개발 및 적용 가능성 검토 |
| | Primer 디자인 | → | | | |
| | NGS 분석 | → | | | 저서성 규조류 시공간적 분포 특성 규명 |
| | 자료 정리 | → | | | |

그림 2. 연구 개발 로드맵

나. 저서규조류 균주 확보, 관찰 및 동정

- 도립현미경과 pasteur's pipette을 이용하여 단일 균주로 분리. f/2 배지를 이용하여 2-3주 간격으로 계대배양
- 균주의 동정을 위해 광학현미경 및 주사전자현미경을 이용하여 morphometric data 및 이미지 획득

다. 균주의 DNA 추출 및 sequencing

- 각 균주로부터 genomic DNA 추출 및 PCR (18S V4 region, *rbcL*, *cob* gene 등), sequencing 진행하여 sequence 데이터 확보
- 획득 자료 및 GenBank DB를 활용하여 각 마커 유전자 별 데이터베이스 구축

라. NGS 기법을 이용한 저서규조류 다양성 분석

- 조사 시기별 퇴적물 시료에서 DNA를 추출
- MiSeq 기법을 활용하여 NGS 분석 실시 및 Mothur 프로그램을 통한 데이터 처리(그림 3)

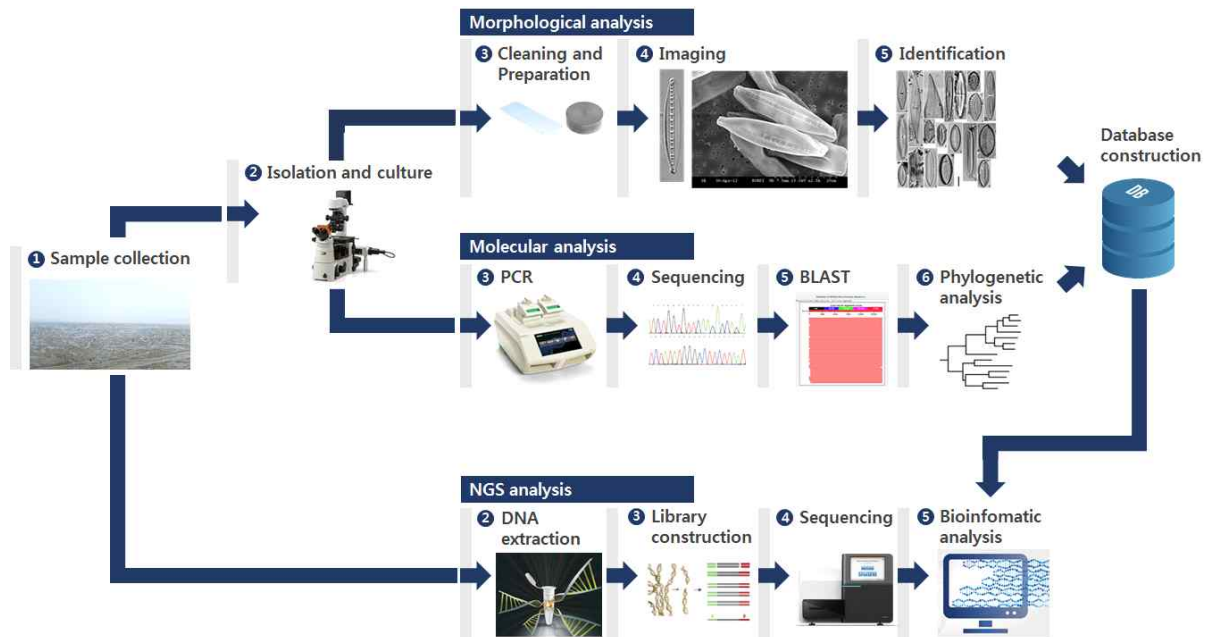


그림 3. 저서성 규조류 데이터베이스 구축 및 NGS 분석기법 개발을 위한 연구 흐름도.

2. 연구개발 결과

가. 서해 주요 갯벌에서의 현장조사 수행

서해 주요 갯벌에서 2018년 7월부터 2020년 5월까지 2년 동안 격월로 현장조사를 수행하였다(그림 4). 현장 조사 시 배양주 분리용 시료 및 퇴적물 DNA 시료, 이화학적 요인 (영양염, 입도, 함수율, 온도, 미세조류 생체량, 미세조류 색소) 분석을 위한 시료를 확보

하였다.

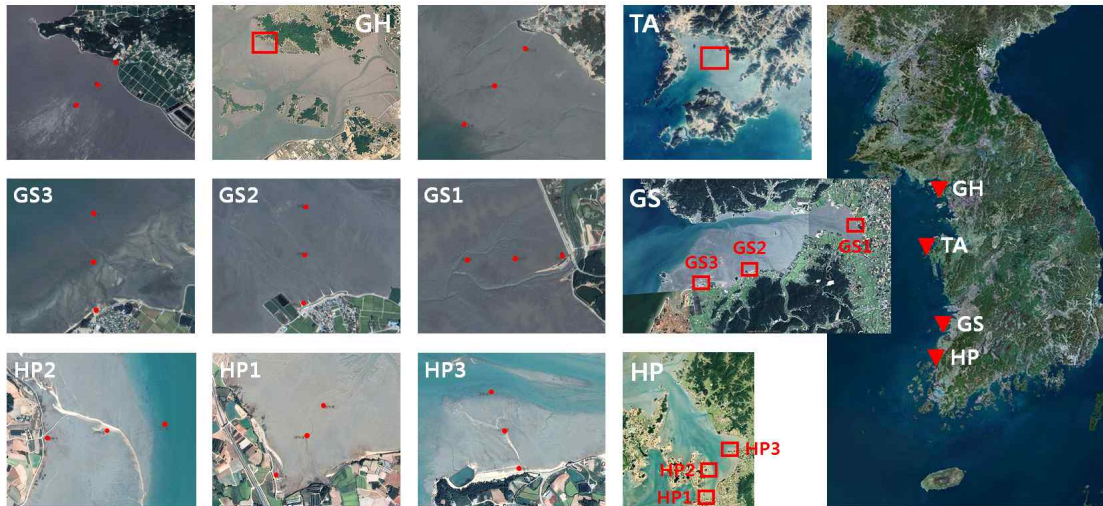


그림 4. 조사 대상 정점. GH: 여차리 갯벌(강화군 화도면 여차리), TA: 근소만 갯벌(태안군 소원면 법산리), GS: 곰소만 갯벌(GS1 - 부안군 줄포면 우포리, GS2 - 고창군 심원면 하전리, GS3 - 고창군 심원면 만돌리), HP: 함평만 갯벌(HP1 - 무안군 현경면 송정리, HP2 - 무안군 현경면 수양리, HP3 - 함평군 함평읍 석성리).

갯벌 내에서 생육하는 저서성 규조는 영양염 농도, 수온, 염분, 조도, 바람, 조위 등 다양한 환경 변화를 겪게 된다. 따라서 저서성 규조는 환경 조건에 대한 내성이 넓은 편인데, 이는 하루 동안에도 조위에 의해 퇴적물의 온도, 염도, 산소함유량, 수분 함량이 달라지기 때문이다. 따라서 부유성 미세조류에 비해 계절에 따른 변화가 상대적으로 적고, 연중 높은 생체량을 보인다(이 등, 2009; Colijn and Dijkema, 1981). 그러나 저서성 규조류의 환경 조건에 대한 내성이 넓다 하더라도 그들의 생태적 지위는 명확하여 계절적 군집 구조 및 풍도의 변화가 나타나며, 이러한 변화는 수온 및 조도 등 기후 인자 변화의 결과로 볼 수 있다(Underwood, 1994; Underwood and Provot, 2000). 따라서 이들의 군집 구조 및 다양성 변동에 영향을 미치는 요인들을 분석하기 위해 현장 조사 시 이화학적 요인 분석을 위한 자료 및 시료 확보를 수행하였다. 이화학적 요인들 중 미세조류 생체량, 지시색소 분포, 함수율, 퇴적물 온도 등은 일부 또는 전체 시료에 대한 분석이 완료되었으며, 이를 그림 5에 나타내었다. 그러나 퇴적물 입도 분석용 시료는 과산화수소 및 염산을 이용한 전처리가 완료된 상태이나 분석은 수행되지 않았으며, 영양염 역시 분석이 진

행되지 않았다. 따라서 저서성 규조류의 군집 동태 및 다양성과 환경요인과의 관계에 대한 고찰은 현재 단계에서는 어렵다.

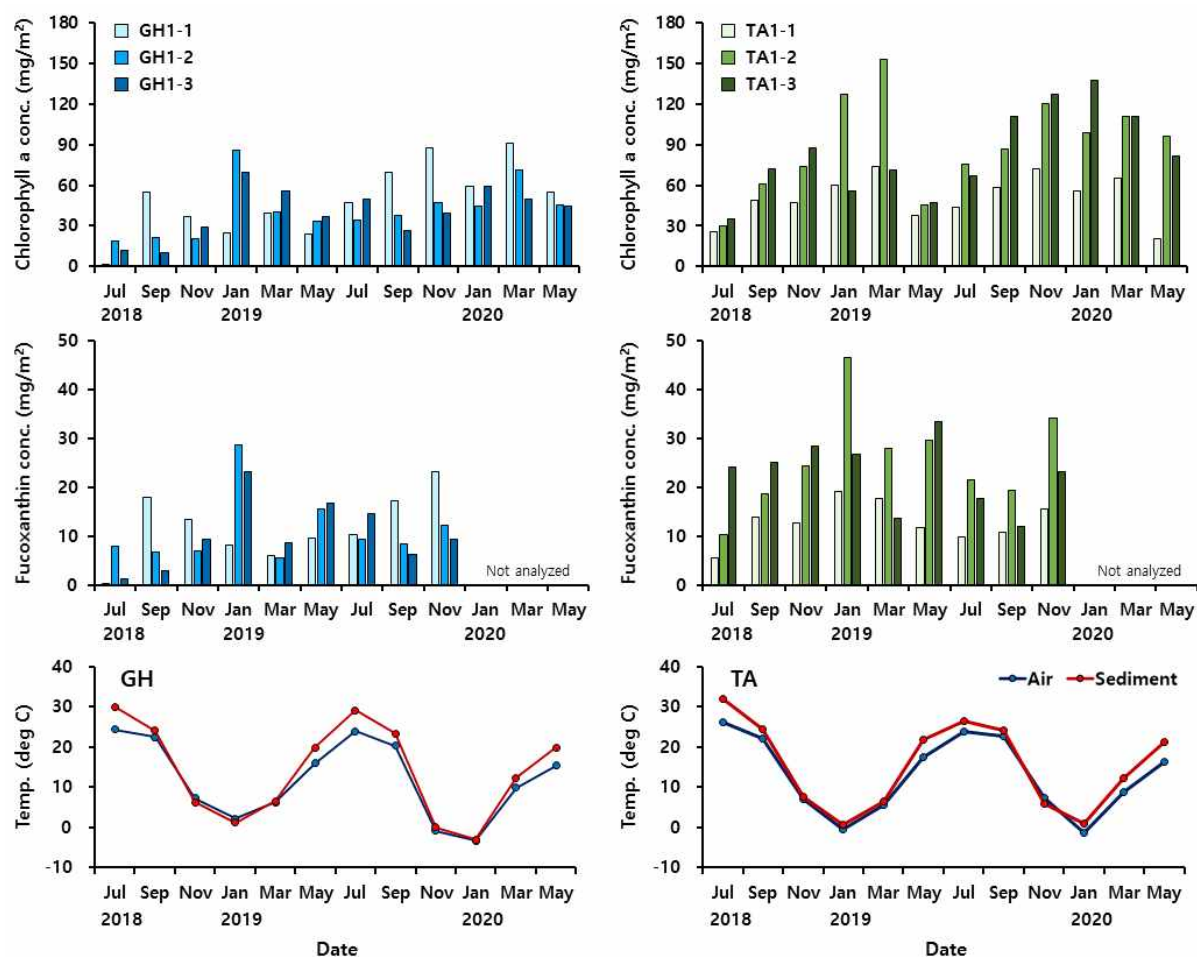


그림 5. 강화 여차리와 태안 근소만 갯벌의 퇴적물 내 미세조류 생체량 및 규조류 지시색소, 기온 및 퇴적물 온도의 변화.

나. 저서성 규조류의 배양주 확보

현장 조사 시 획득한 갯벌 퇴적물 시료에서 저서성 규조류 배양주를 분리하여 341개의 단일 배양주를 확보하였다. 그 중 319개의 배양주에 대해서는 속 이하의 수준으로 동정이 완료되었다. 형태적으로 총 319개의 배양주는 8목 16과 24속 77종으로 나뉘었고, 이중 7종은 중심돌말류(centric diatom)이었으며, 그 외의 종들은 우상돌말류(pennate diatom)로

나타났다(그림 6). *Navicula* 속에 속하는 종들이 34종으로 가장 많았으며, 그 다음은 *Halamphora* (18종), *Nitzschia* (17종), *Entomoneis* (10종) 속 순이었다. 분리된 일부 종들에 대한 광학 및 전자현미경 사진을 그림 7와 8에 나타내었다. *Navicula*는 규조류 중 가장 큰 속이며, 그 다음은 *Nitzschia* 이다 (Mann, 1986). 이들 속의 종들은 대부분의 갯벌 생태계에서 우점하는 것으로 알려져 있다 (Fernandes et al., 1999; Cibic et al., 2012). 이들 속의 우점은 펄조간대의 퇴적환경과 유의한 관계를 가진다. 두 속의 종들은 biraphid diatom이며, 운동능력을 가지고 있어 침전이 계속적으로 진행되고 주기적으로 환경이 변화하는 조간대에서 생육하기 유리할 수 있다 (Sullivan, 1978). 반면 *Halamphora* 및 *Amphora* 속의 종들은 모래 퇴적 환경을 선호하는 것으로 알려져 있으며(Mitbavkar and Anil, 2002), 본 연구에서도 GS2와 GS3 HP3 등 모래 비율에 높은 정점들에서 주로 분리되었다. 더불어 본 연구를 통해 2019년 국가생물종목록(환경부, 2019)을 기준으로 총 14종의 국내 미기록종을 발견하였으며, 종수준으로 동정되지 않은 배양주들에 대해서 추가적인 분석이 이루어지면 미기록종 및 신종의 추가적인 발굴이 가능할 것으로 판단된다.

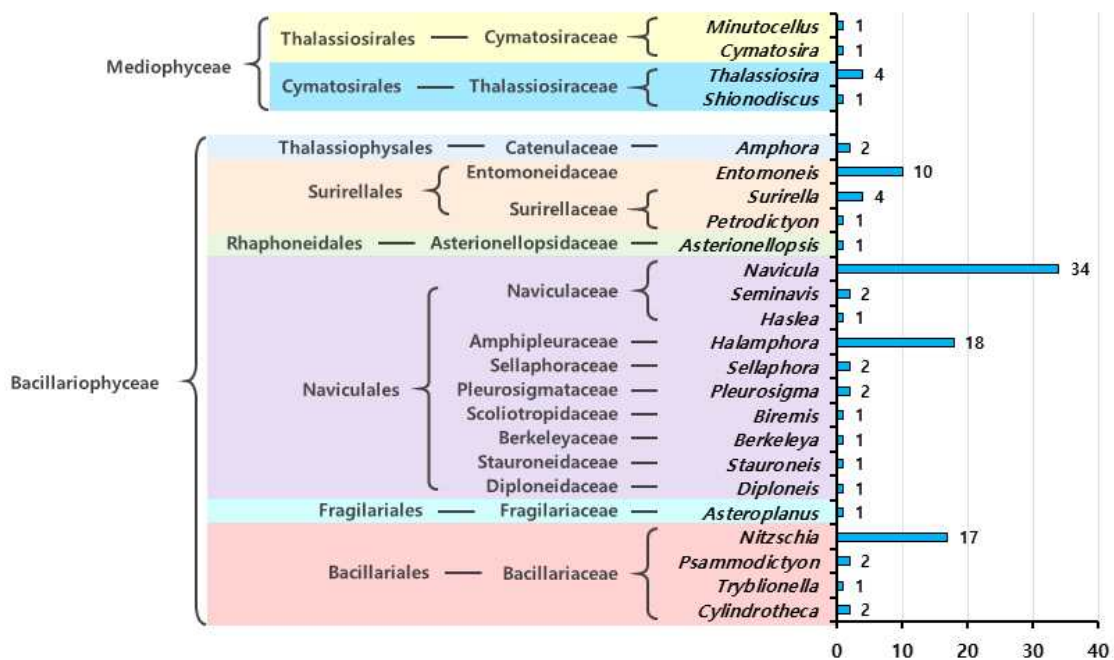


그림 6. 본 연구에서 분리된 저서성 규조류의 분류군별 종 수 현황

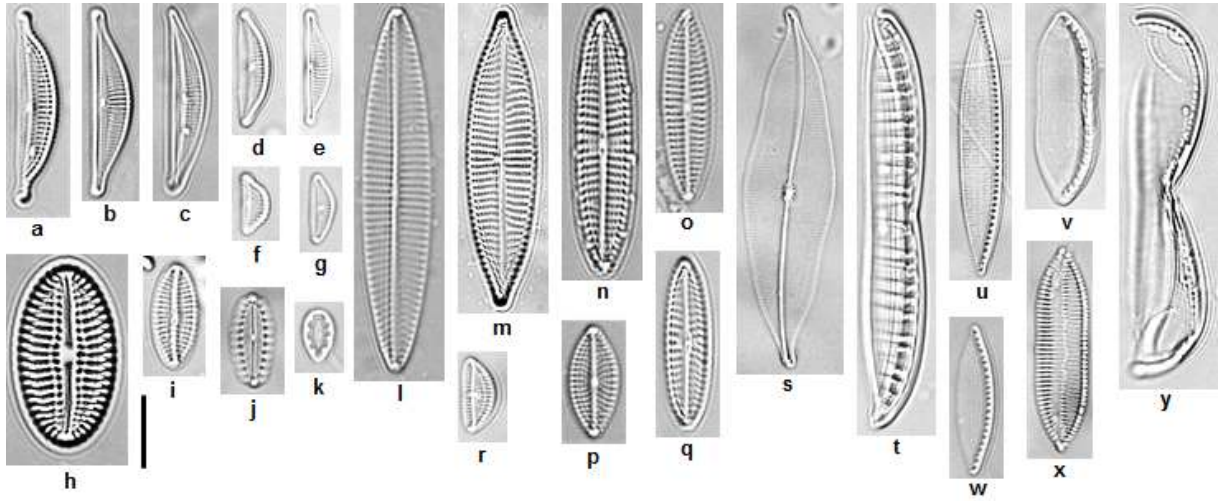


그림 7. 서해 주요 갯벌에서 분리된 저서 규조류의 광학현미경 사진. a. *Halamphora holsatica*; b. *Halaphora tumida*; c. *Amphora* aff. *spartinetensis*; d. *Amphora* sp.3; e. *Amphora* sp.1; f. *Halamphora costata*; g. *Halamphora coffeaeformis*; h. *Diploneis* sp.; i. *Sellaphora* sp.2; j. *Biremis* sp.; k. *Surirella* sp.; l. *Navicula duerrenbergiana*; m. *Navicula* sp.6; n. *Navicula* aff. *mollis*; o. *Navicula ramosissima*; p. *Navicula pseudosalinarioides*; q. *Navicula* sp.6; s. *Pleurosigma* sp.; t. *Nitzschia rhopalodioides*; u. *Nitzschia calcicola*; v. *Pasmmodictyon constrictum*; w. *Nitzschia* sp.3; x. *Tryblionella apiculata*; y. *Entomoneis pseudoduplex*

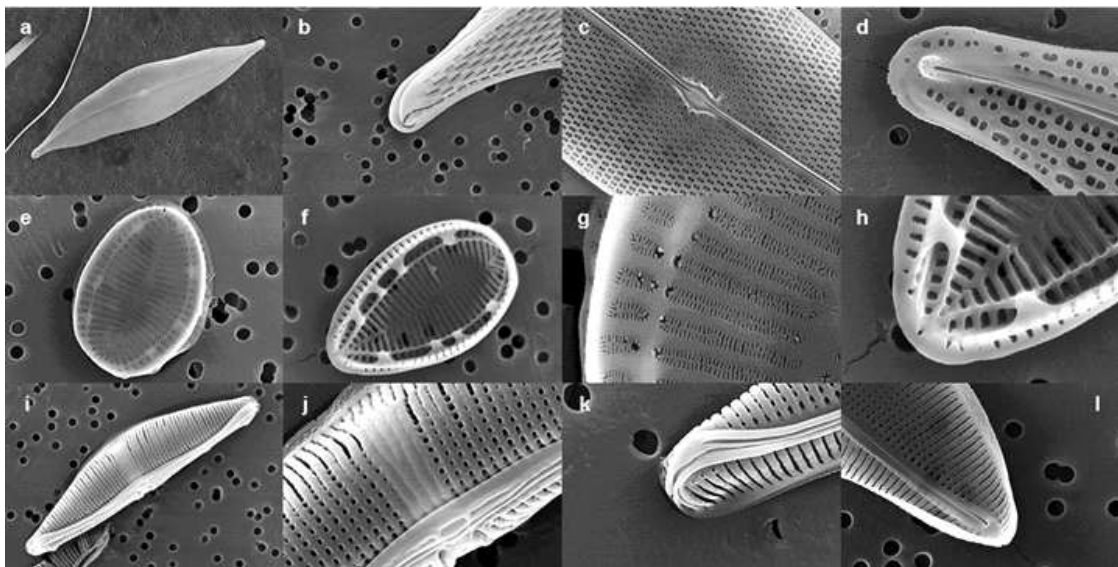


그림 8. 서해 갯벌에서 분리된 저서 규조류의 주사전자현미경 사진. a-d. *Pleurosigma* sp.; e-h. *Surirella* sp.; i-l. *Halamphora staurophora*.

다. 저서성 규조류의 유전자별 염기서열 확보

확보된 배양주들에 대해 18S rDNA (244개, 약 1850 bp) 및 *rbcL* (341개, 약 1450 bp), *cob* (282개, 약 300 bp) 유전자에 대한 염기서열정보를 확보하였다(표 1). 확보된 각 유전자별 염기서열들을 BLASTn 알고리즘을 이용하여 GenBank 데이터베이스와 비교해 본 결과, 대부분의 종들에서 형태 분류와 불일치가 확인되었으며, 특히 18S rDNA의 경우 99.0%의 높은 유사성을 가지는 종들도 형태적으로 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다. *rbcL*과 *cob* 유전자는 전반적으로 각각 97.7%와 82.1%의 낮은 수준의 identity를 보였다.

표 1. 전체 확보 배양주의 3개 유전자에 대한 확보 시퀀스 수와 BLAST 성공 수 및 평균 유사도. BLAST 성공은 형태 동정 결과와 일치한 것을 의미하며, %PI는 parsimony-informative sites의 비율을 의미함.

| Gene | No. of strains | No. of obtained sequences (%) | BLAST match success (%) | Mean similarity | S.D. | %PI |
|-------------|----------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------|-------|------|
| 18S | 341 | 244 (71.6%) | 101 (41.4%) | 0.990 | 0.014 | 30.4 |
| <i>rbcL</i> | | 341 (100%) | 128 (37.5%) | 0.977 | 0.021 | 39.1 |
| <i>cob</i> | | 282 (82.7%) | 17 (6.0%) | 0.821 | 0.130 | 67.8 |

라. 저서성 규조류 분석을 위한 각 분자마커의 적용가능성 비교

본 연구에서는 각 유전자별로 획득한 염기서열을 통해 분자 마커로서의 활용가능성을 평가하였다. 각 유전자의 전체와 각 코돈별 *p*-distance를 비교해 본 결과, 미토콘드리아 DNA의 *cob* 유전자가 매우 높은 변이율(23.6%)을 보였으며, 각 코돈 포지션 별 비교에서도 높은 수치를 보였다(그림 9).

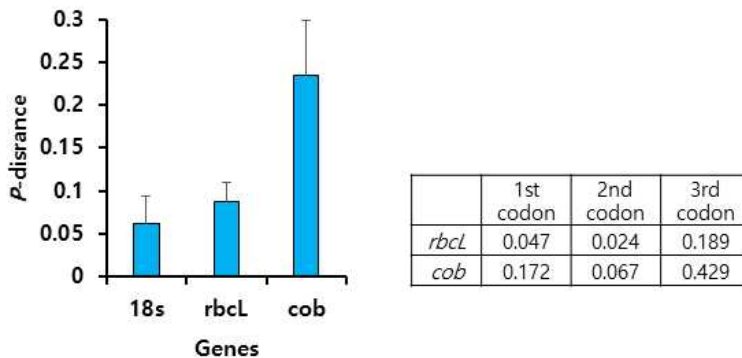


그림 9. 3가지 유전자의 유전체 전체와 각 codon position 별 *p*-distance

특히 3rd codon position의 변이율이 42.9% 이상으로 *rbcL* 및 18S보다 높아 분자마커로서의 높은 활용 가능성을 보여주었다(그림 10). 이러한 결과는 *cob*이 다른 분자마커에 비해 유전적 다양성이 매우 높고 염기서열 조성이 전체 구조류 그룹 내에서 변화가 크다는 것을 의미한다. 반면 18S rRNA는 가장 긴 염기 서열 길이에 불구하고 *p*-distance가 작기 때문에 오인 가능성이 높다는 것을 암시한다.

주요 배양주들에 대한 maximum likelihood 계통수를 작성하여 비교한 결과에서도 각 분자마커의 해상력은 *cob*이 가장 높았으며, 18S의 경우 가장 낮은 수준을 보여준다(그림 11). 지금까지 GenBank에 구축된 구조류 염기서열 정보를 살펴보면 시퀀스 수와 종 수 모두 18S가 가장 많고 *rbcL*이 그 다음으로 나타났다(그림 12). 특히 *rbcL*의 경우 시퀀스 수는 아직 18S에 비해 적은 것으로 나타났으나, 종 수는 거의 유사한 수준을 보였다. 미토콘드리아DNA 중에서는 *cox1*이 가장 많은 수를 보였으며, 본 연구에서 활용된 *cob*의 경우에는 집계가 무의미한 수준이었다. 본 연구에서 *cox1*을 활용하기 위해 시도하였으나 PCR 및 sequencing 성공률이 매우 낮았으며, 이는 아마도 인트론의 존재로 인한 것으로 추측된다. 따라서 현재 데이터베이스 구축 현황과 각 유전자의 분기 수준을 고려할 때 *rbcL*은 현실적인 대안이 될 수 있다. 그러나 앞서 언급한 바와 같이 저서성 구조류에 대한 Blast 검색 성공률은 낮은 수준이며, 이는 저서성 구조류에 대한 데이터베이스가 여전히 부족하다는 것을 시사한다.

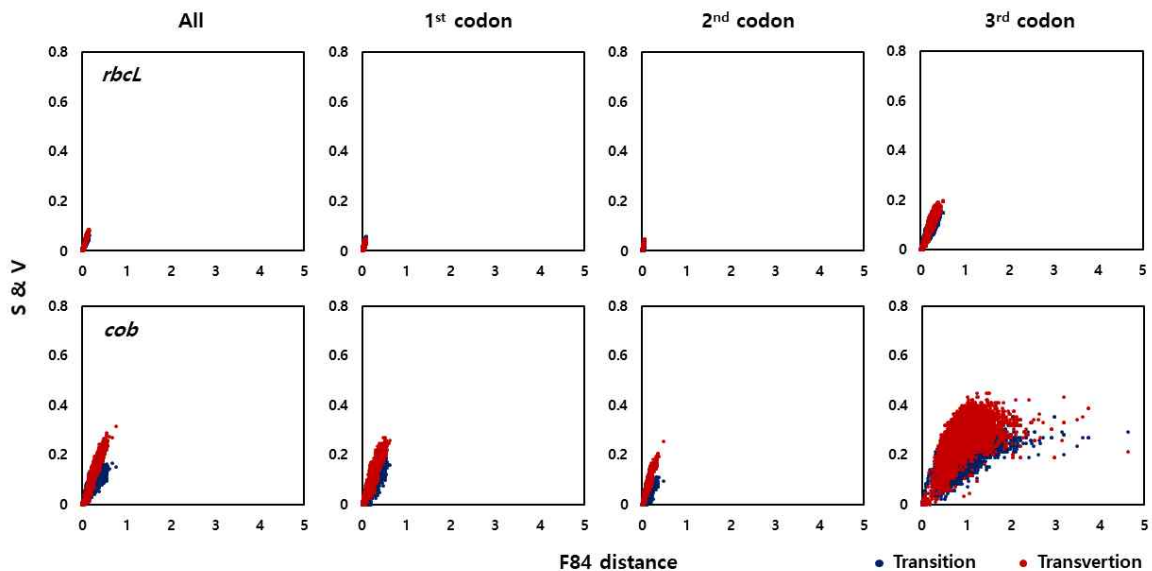


그림 10. *rbcL*과 *cob* 유전자의 saturation test 결과. 각 유전자의 변이율을 유전체 전체와 codon position 별로 비교분석하였음

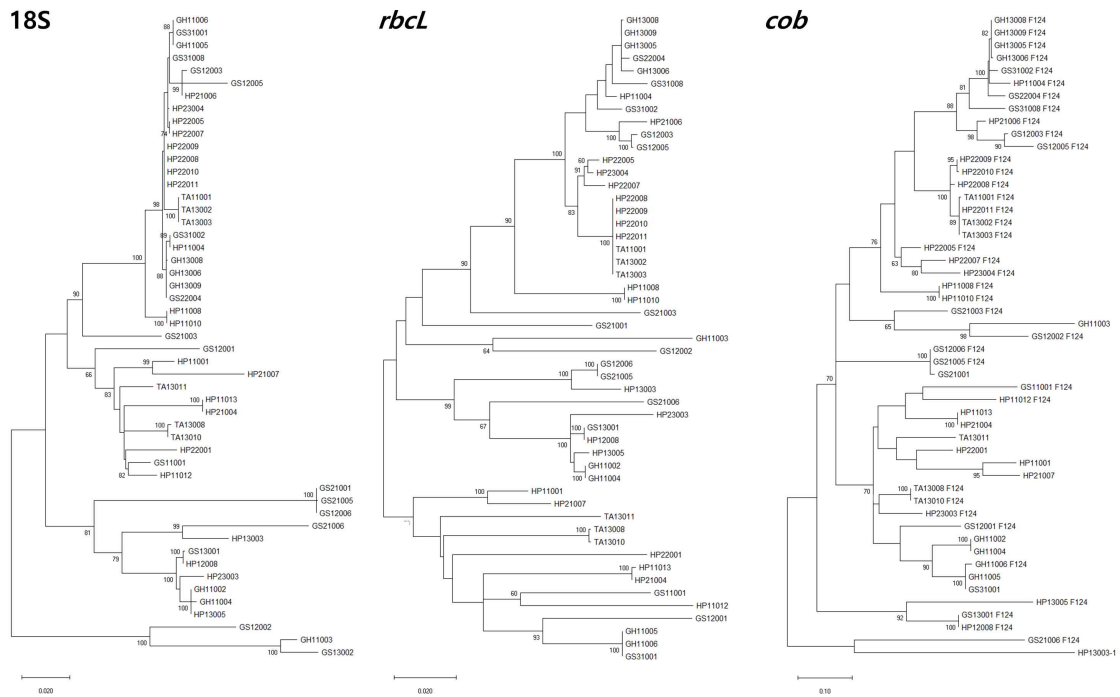


그림 11. 각 분자마커별 주요 배양주들에 대한 maximum likelihood 계통수 비교.

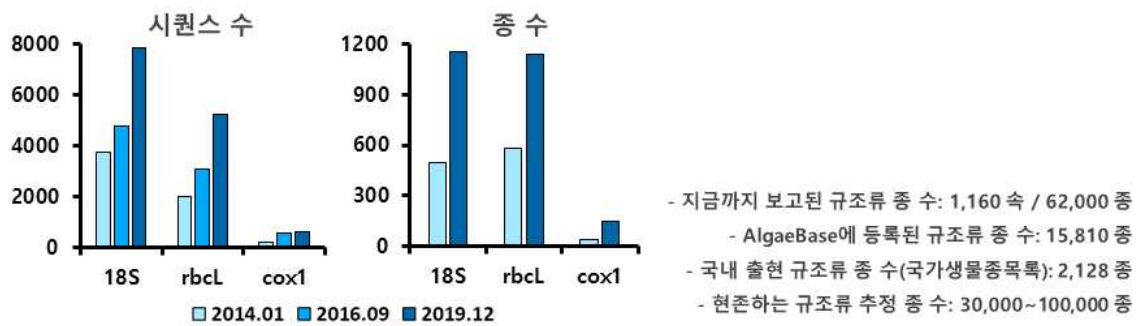


그림 12. 저서성 규조류의 분자마커별 GenBank 내 등록된 시퀀스 수 및 종 수 변화.

마. 저서성 규조류 다양성 규명을 위한 NGS 분석

본 연구에서는 NGS 분석을 위해 현장 조사 시 퇴적물 시료를 확보하여 PowerSoil DNA Isolation Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. NGS 분석을 위한 플랫폼으로는 분석 Illumina사의 MiSeq을 활용하였으며, 이를 위해 각 분자마커별로 활용이 가능

한 primer set을 선정하였다(표 2). 추출된 DNA와 primer set을 이용하여 amplicon PCR을 수행하였으며, PCR 산물과 Nextera XT Index primer kit set A, B를 이용하여 index PCR을 수행하였다. 각 단계의 PCR 결과물은 AMPure XP bead를 이용하여 정제하였다. DNA 정량은 NanoDrop ND-1000을 이용하여 수행하였다. 위의 과정을 통해 NGS 분석을 위한 라이브러리를 준비하였고 현재 18S 및 *rbcL*의 경우에는 라이브러리 준비가 완료된 상태이며, *cob*의 경우에는 amplicon PCR 이후 정제가 완료된 상태이다.

표 2. NGS 분석을 위한 각 유전자별 primer set

| Gene | Primer set | Sequence | Read Length |
|-------------|------------|-------------------------|-------------|
| 18S v4 | DIV4for | GCGGTAATTCAGCTCCAATAG | 337 bp |
| | DIV4rev3 | CTCTGACAATGGAATACGAATA | |
| <i>rbcL</i> | DrbcL265F | TAYCGYGTAGATCCAGTTCCA | 431 bp |
| | DrbcL695R | GCACGRTRATASCTTCCAT | |
| <i>cob</i> | cobF124 | GCTTGGAGTTTTGGDTCTTYDGC | 327 bp |
| | cobR451 | CATGCWAATGGYGCTCHATGTT | |

Reference 데이터베이스는 18S의 경우에는 SILVA (SSU 138)에서, *rbcL*과 *cob*은 GenBank로부터 받은 자료에 본 연구에서 확보한 염기서열들을 추가하여 제작을 완료하였다(표 3). 세 가지 분자마커 모두 outgroup으로는 Ochrophyta에 속하는 *Bolidomonas* 속의 종들을 이용하였다. 각 시퀀스의 taxonomy 정보는 AlageBase의 분류 기준을 따라 작성하였으며, 염기서열의 핸들링은 ARB package를 활용하였다. 그러나 과제 중단으로 인해 NGS 분석 및 Mothur package를 활용한 데이터 분석, 이화학적 요인과의 관계 분석 등 이후 분석 과정은 진행되지 않았다.

표 3. NGS 분석을 reference database 제작 현황

| Genes | Obtained from other DB | | | | | Obtained from this study | Used for DB |
|-------------|------------------------|----------------------------|------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------|
| | Total | Unidentified or Uncultured | Out groups | Mismatch with MiSeq region | Match with MiSeq region | | |
| 18s | 2,874 | 41 | 16 | 2 | 2,815 | 244 | 3,059 |
| <i>rbcL</i> | 5,044 | 89 | 10 | 1,417 | 3,528 | 341 | 3,869 |
| <i>cob</i> | 226 | 2 | 2 | 201 | 21 | 282 | 303 |

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

- 본 연구 사업을 통해 1편의 국제논문 출판, 2편의 국내학회 발표
- 갯벌에 서식하는 저서성 규조류 341개의 배양주 분리 및 확보, 867건의 염기서열 정보 획득(18s rDNA: 244개, *rbcL*: 341개, *cob*: 282개)하였으며, 41개 배양주에 대해 생물자원 연구성과 기탁 및 활용지원(<https://biorp.kribb.re.kr/>)에 기탁 완료

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 분자 기법의 도입으로 기존의 형태 기반 분석법의 한계점을 극복할 수 있으며, 분석자 및 과정에 따른 차이를 줄여 연구결과에 대한 상호 비교를 가능케하여 장기적, 광역적 분석 기반 마련
- 우리나라 서해안의 주요 갯벌에서 서식하는 저서성 규조류에 대한 인벤토리 구축 및 형태 분자학적 기초자료 확보를 통한 데이터베이스 확충을 통해 아직 미개척 분야인 갯벌 저서성 규조류에 대한 연구 선도
- 실제 갯벌에 서식하는 난분류성 저서규조류의 서식환경에 따른 다양성 규명 및 기초적 생태 특성의 연구를 통한 갯벌 생태계 기능적 측면의 이해 재고
- 본 연구를 통해 확보한 결과는 기후 변화에 따른 생물다양성 및 연안 생태계기능 및 생산량 변화 모니터링 연구로 발전시켜 생태계모델링의 기초 자료로 활용 가능
- 본 연구는 갯벌에서 최우점하는 저서규조류를 대상으로 수행되나, 본 연구에서 활용하는 연구 기법은 부유성 규조류뿐만 아니라 적조 생물 및 다양한 미세조류로 확대 적용할 수 있으며, 이들 통해 주요 현안과 관련된 해양생태계 변동 예측 등의 종합 연구로 발전 가능

제 6 장 참고문헌

- 김웅서, 강성현 (2005) 해양개발의 현재와 미래. 한국해양연구원.
- 나정은, 이학영 (2011) 새만금호 갯벌의 부착조류 분포. *Korean J. Environ. Biol.*, 29(1): 46-51.
- 심재형, 조병철 (1984). 인천부근 조간대의 저생규조류 군집. 서울대 자연과학대학 논문집, 9: 135-150.
- 오승진, 문창호, 박미옥 (2004) 한국 서해 새만금 갯벌에서 저서미세조류의 생체량과 군집조성에 대한 HPLC 분석. *J. Kor. Fish. Soc.*, 37(3): 215-225.
- 유만호, 최중기 (2005). 강화도 장화리 갯벌에서 저서미세조류의 계절적 분포 및 일차 생산력. *한국해양학회지*, 10(1): 8-18.
- 이용우, 박미옥, 윤지현, 허성범 (2012) 색소분석을 통한 곰소만 내 해수와 퇴적물 중 미세조류 생체량과 군집구조의 시공간적 변화. *한국해양학회지*, 17(2): 87-94.
- 이용우, 최은정, 김영상, 강창근 (2009) 광합성색소 분석을 통한 광양만 갯벌 퇴적물 중 저서미세조류의 계절변화. *한국해양학회지*, 14(1): 48-55.
- 이학영 (2002) 한국 남서부 갯벌의 저서성 미세조류의 대상분포와 수직분포에 미치는 이화학적 요인의 효과에 관한 비교. *한국환경과학회지*, 11(6): 529-535.
- 이학영 (2003) 가마미 해수욕장(전남 영광) 갯벌의 미세조류의 분포에 관한 연구. *한국환경과학회지*, 12(7): 715-724.
- 이학영, 정명화 (2011) 함평만 갯벌의 저서규조류 분포 특성. *Korean J. Environ. Biol.*, 29(1): 17-22.
- 조경제 (1988) 낙동강 하구 저토의 환경구배에 따른 저서 규조류의 군집구조. 서울대학교 대학원 박사학위 청구논문.
- 최윤석, 박광재, 윤상필, 정상옥, 안경호, 송재희 (2013) 태안 남해포 갯벌 패류양식해역의 환경특성. *Korean J. Malacol.*, 29(1): 51-63.
- 최종국, 유주형, 엄진아, 노승목, 노재훈 (2010) 원격탐사 자료를 이용한 근소만 갯벌 퇴적 환경 및 저서미세조류 환경 분석. *한국습지학회지*, 12(3): 67-78.
- 환경부 (2015) 국가 생물종 목록집 「돌말류」. 국립생물자원관.
- Admiaeal, W. & Peletier, H. (1980a) Distribution of diatom species on an estuarine mud flat and experimental analysis of the selective effect of stress. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 46: 157-175.
- Admiaeal, W. & Peletier, H. (1980b) Influence of Seasonal Variations of Temperature

- and Light on the Growth Rate of Cultures and Natural Populations of Intertidal Diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2: 35-43.
- Aktan, Y. & Aykulu, G. (2005) Colonisation of Epipelagic Diatoms on the Littoral Sediments of Izmit Bay. *Turk. J. Bot.*, 29: 83-94.
- Aleem A.A. (1950) The diatom community inhabiting the mud-flats at Whitstable. *New Phytol.* 49: 174 - 188.
- Beardall, J., Stojkovic, S., & Larsen, S. (2009). Living in a high CO₂ world: impacts of global climate change on marine phytoplankton. *Plant Ecology & Diversity*, 2(2), 191-205.
- Brotas, V. and Plante-Cuny, M.R. (2003) The use of HPLC pigment analysis to study microphytobenthos communities. *Acta Oecol.* 24: 109-115.
- Brouwer, J.D., Neu, T.R. & Stal, L.J. (2006) On the function of secretion of extracellular polymeric substances by benthic diatoms and their role in intertidal mudflats: A review of recent insights and views, in: Kromkamp, J. *et al.* (Ed.) (2006). Functioning of microphytobenthos in estuaries: Proceedings of the Colloquium, Amsterdam, 21-23 August 2003. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Verhandelingen, Afd. Natuurkunde (Tweede Reeks), 103: 45-61.
- Chevalier, E.M., Gévaert, F. & Créach, A. (2010) In situ photosynthetic activity and xanthophylls cycle development of undisturbed microphytobenthos in an intertidal mudflat. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 385: 44-49.
- Choi, J.K. (1988) A floristic study on benthic diatoms in Songdo tidal flat, Gyeonggi Bay, Korea. Doctoral Dissertation, Seoul National University. Korea.
- Cibic, T., Comici, C., Bussani, A., & Del Negro, P. (2012) Benthic diatom response to changing environmental conditions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115: 158-169.
- Colijn, F. and Dijkema, K.S. (1981) Species composition of benthic diatoms and distribution of chlorophyll a on an intertidal flat in the dutch Wadden Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 4: 9-21.
- Du, G.Y., Li, E.T., Li, H. & Chung, I.K. (2012) Migratory Responses of Benthic Diatoms to Light and Temperature Monitored by Chlorophyll Fluorescence. *J. Plant Biol.*, 55: 159 - 164.

- Evans, K.M., Wortley, A.H. and Mann, D.G. (2007) An assessment of Potential Diatom "Barcode" Genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their Effectiveness in Determining Relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist*, 158: 349-364.
- Fernandes, L.F., Brandini, F.P., Gutseit, K.S., Fonseca, A.L.D.O., & Pellizzari, F.M. (1999) Benthic diatoms growing on glass slides in the Paranaguá Bay, Southern Brazil: taxonomic structure and seasonal variation. *INSULA Revista de Botânica*, 28: 53.
- Gowda, G., Gupta, T.R.C., Rajesh, K.M., Gowda, H., Lingadhala, C. and Ramesh, A.M. (2001) Seasonal distribution of phytoplankton in Nethravathi estuary. *J. Mar. Biol. Ass. India*, 43: 31-40.
- Haubois, A.G., Sylvestre, F., Guarini, J.M., Richard, P. & Blanchard, G.F. (2005) Spatio-temporal structure of the epipelagic diatom assemblage from an intertidal mudflat in Marennes-Oléron Bay, France. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 64: 385-394.
- Hendrarto, B.I. & Nitisuparjo, M. (2009) Biodiversity of benthic diatom and primary productivity of benthic micro-flora in mangrove forest on Central Java. *Journal of Coastal Development*, 14(1): 131-140.
- Hopkins J.T. (1964) A study of the diatoms of the Ouse estuary sussex II. The ecology of the mud-flat diatom flora. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 44: 333-341.
- Jahn, R., Zetzsche, H., Reinhardt, R. and Gemeinholzer, B. (2007) Diatoms and DNA barcoding: A pilot study on an environmental sample. In Kusber, H.-W. & Jahn, R. (eds.) in *Proceedings of the 1st Central European Diatom Meeting 2007*. Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem (FU-Berlin). Germany.
- Jong, L.D. & Admiraal W. (1984) Competition between three estuarine benthic diatom species in mixed cultures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 18: 269-275.
- Kim, J.H. and Cho, K.J. (1985) the physico-chemical properties of sediment, the species composition and biomass of benthic diatoms in the intertidal zone of Keum River estuary. *Kor. J. Ecol.* 8: 199-207.
- Law R.A. (1988) Diatoms (bacillariophyceae) from surface sediments in the San Francisco Bay estuary. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 45(9): 133-254.

- Lee, H.Y. (2002) Comparison of the effects of physicochemical factor on the zonation and vertical distribution of benthic microalgal communities in the tidal flat of south-west Korea. *J. Kor. Environ. Soc.*, 11: 529–535.
- Mann, D.G., Sato, S., Trobajo, R., Vanormelingen, P. & Souffreau, C. (2010) DNA barcoding for species identification and discovery in diatoms. *Cryptogamie, Algologie*, 31(4): 557–577.
- McKew, B.A., Taylor, J.D., Mcgenity, T.J. & Underwood, G.J.C. (2011) Resistance and resilience of benthic biofilm communities from a temperate saltmarsh to desiccation and rewetting. *The ISME Journal*, 5: 30–41.
- Medlin, L. K. (2018). Mini review: diatom species as seen through a molecular window. *Brazilian Journal of Botany*, 41(2), 457–469.
- Mitbavkar, S., Anil, A. (2002) Diatoms of the microphytobenthic community: population structure in a tropical intertidal sand flat. *Marine Biology*, 140: 41–57.
- Moniz, M.B.J. and Kaczmarska, I. (2010). Barcoding of diatoms: nuclear encoded ITS revisited. *Protist* 161: 7–34.
- Ohtsuka, T. (2005) Epipellic diatoms blooming in Isahaya Tidal Flat in the Ariake Sea, Japan, before the drainage following the Isahaya-Bay Reclamation Project. *Phycological Research*, 53: 138 - 148.
- Peletier, H. (1996) Long-term changes in intertidal estuarine diatom assemblages related to reduced input of organic waste. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 137: 265–271.
- Ribeiro, L.L.C.S. (2010) Intertidal benthic diatoms of the Tagus estuary: Taxonomic composition and spatial-temporal variation. PhD Thesis, Universidade de Lisboa, Portugal.
- Sullivan, M.J. (1978) Diatom community structure: Taxonomic and statistical analysis of a Mississippi Salt Marsh. *Journal of Phycology*, 14: 468–475.
- Sullivan, M. and Currin, C. (2002) Community structure and functional dynamics of benthic microalgae in salt marshes. In Weinstein, M.P. & Kreeger, D.A. [Eds.] *Concepts and Controversies in Tidal Marsh Ecology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 81–106.
- Thornton, D.C.O., Underwood, G.J.C. and Nedwell, D.B. (1999) Effect of illumination and emersion period on the exchange of ammonium across the estuarine sediment - water interface. *Marine Ecology Progress Series*, 184: 11 - 20.

- Trites, M., Kaczmarek, I., Ehrman, J.M., Hicklin, P.W. & Ollerhead, J. (2005) Diatoms from two macro-tidal mudflats in Chignecto Bay, Upper Bay of Fundy, New Brunswick, Canada. *Hydrobiologia*, 544: 299–319.
- Underwood, G.J.C. and Barnett, M. (2006) What determines species composition in microphytobenthic biofilms? In Kromkamp, J., de Brouwer, J.F.C., Blanchard, G.F., Forster, R.M. & Créach, V. [Eds.] *Functioning of microphytobenthos in estuaries*. Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Amsterdam, pp. 121–138.
- Underwood G.J.C. and Kromkamp, J. (1999) Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. *Advances in Ecological Research*, 29: 93–153.
- Underwood, G.J.C., Phillips, J. & Saunders, K. (1998) Distribution of estuarine benthic diatom species along salinity and nutrient gradients. *Eur. J. Phycol.*, 33: 173–183.
- Underwood, G.J.C. and Provot, L. (2000) Determining the environmental preferences of four estuarine epipelagic diatom taxa: growth across a range of salinity, nitrate and ammonium conditions. *Eur. J. Phycol.*, 35: 173–182.
- Wachnicka, A., Gaiser, E., Collins, L., Frankovich, T. & Boyer, J. (2010) Distribution of Diatoms and Development of Diatom-Based Models for Inferring Salinity and Nutrient Concentrations in Florida Bay and Adjacent Coastal Wetlands of South Florida (USA). *Estuaries and Coasts*, 33: 1080 - 1098.
- Watermann, F., Hillebrand, H., Gerdes, G., Krumbein, W.E. & Sommer, U. (1999) Competition between benthic cyanobacteria and diatoms as influenced by different grain sizes and temperatures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 187: 77–87.
- Yallop, M.L., Winder, B.D., Paterson, D.M. and Stal, L.J. (1994) Comparative structure, primary production and biogenic stabilization of cohesive and non-cohesive marine sediments inhabited by microphytobenthos. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 39: 565–582.

주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.