

BSPN67400-11858-7

선택성이 높은 살조기술 개발 (기술이전)

2019.01.23.

한 국 해 양 과 학 기 술 원

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “선택성이 높은 살조기술 개발(기술이전)” 사업의 최종보고서로 제출합니다.

2019.01.23

연구책임자 : 백승호
참여연구원 : 김영옥
“ : 김진호
“ : 김윤지
“ : 이민지
“ : 임영균
“ : 최정민

보고서 초록

과제고유 번호	PN67400	해당단계 연구기간	2017. 4. 4 ~ 2018. 12. 31	단계 구분	1/1
연구사업명	중사업명	선택성이 높은 살조기술 개발(기술이전)			
	세부사업명	선택성이 높은 살조기술 개발(기술이전)			
연구과제명	대과제명	선택성이 높은 살조기술 개발(기술이전)			
	세부과제명	선택성이 높은 살조기술 개발(기술이전)			
연구책임자	백승호	해당단계 참여연구원수	총 : 7 명 내부: 2 명 외부: 5 명	해당단계 연구비	정부 : 150,000천원 기업 : 천원 계 : 150,000천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 7 명 내부: 2 명 외부: 5 명	총 연구비	정부 : 150,000천원 기업 : 천원 계 : 150,000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 위해성분석연구센터		참여기업명		
국제공동연구 위탁연구					
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	73
<p>- 본 연구 과제는 친환경, 고효율 적조 구제물질의 개발 및 실용화를 위해서 적조구제물질 사용승인 고시를 바탕으로, 실증 생태계 위해성 평가를 수행함.</p> <p>- 적조구제물질(GreenTD)에 대한 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 적조구제효율은 최적 농도 0.2~0.5 ppm으로 파악됨, 특히 GreenTD물질은 유해종에는 높은 살조능력이 있고, 무해종에는 일시적으로 광합성활성에 영향을 주지만, 시간의 경과에 따라 회복되는 것으로 파악됨. 유해생물에 대한 GreenTD물질의 제어효과는 <침편모조류> <와편모조류> <규조류> <녹조류> 순으로 나타남.</p> <p>- GreenTD 물질에 대하여 적조구제물질 사용승인 고시 기준에 근거하여 10 - 30분 경과후 살조효율로 평가하면, 0.5 ppm의 농도수준에서 살조효율이 87.2%로 높게 나타남.</p> <p>- 적조생물을 제어 할 수 있는 GreenTD 최적 농도에서 상위 포식생물에 대한 영향이 크지 않는 것으로 파악되었으나, 일정의 높은 농도(최적 대비 100배)에서는 알테미아가 영향이 관찰됨.</p> <p>- 해양수산부 적조구제물질 사용승인 고시를 기준으로 본 연구에서 활용한 GreenTD의 현장실증 결과, 종합점수 88점으로 평가되어 해양수산부 산하 국립수산과학원 적조구제물질 사용승인 위원회에 추천할 수 있을 것임. 특히, 기존 고시의 평가기준으로도 충분히 '추천'에 해당되는 결과가 나왔지만, 실제 현장을 잘 고려한 평가기준이 정립된다면, GreenTD물질은 적조구제물질로서 더욱 우수한 점수로 평가 될 것으로 판단됨.</p> <p>- 결과적으로 GreenTD물질은 부유생물 생태계에서는 위해성이 상대적으로 낮고, 선택성이 높은 살조물질로 평가되지만, 추후 저서생태계평가를 수행한 후, 적조구제물질 사용승인 절차를 거치는 것이 바람직함.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	유해조류대발생; 살조물질; 생태계위해성평가			
	영 어	Harmful Algal Bloom; Algicides; Ecological Risk assessment			

요 약 문

I. 제 목

선택성이 높은 살조기술 개발(기술이전)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 본 연구 과제는 친환경, 고효율의 적조 구제물질의 개발 및 실용화를 위해서 2016년 개정된 적조구제물질 사용승인 고시를 바탕으로, 기 개발된 구제물질에 대해 생태계 위해성 평가를 수행하여 과학적 데이터를 산출한 후, 현장에 적용 가능한 구제물질을 선정하고자 함

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 적조구제물질(Green TD)에 대한 적조생물(*Cochlodinium polykrikoides*)의 최적 살조농도 파악
- 마이크로코즘(20L)에서 최적 살조물질농도에서 유해적조생물의 살조능 평가
- 메소코즘(>1000L)에서 부유생물 생태계 위해성 평가

IV. 연구개발결과

- 적조구제물질(GreenTD)에 대한 *Cochlodinium polykrikoides* 적조구제효율은 최적 농도 0.2~0.5 ppm으로 파악됨, 특히 GreenTD물질은 유해종에는 높은 살조능력이 있고, 무해종에는 일시적으로 광합성활성에 영향을 주지만, 시간의 경과에 따라 회복되는 것으로 파악됨.
- 유해생물에 대한 GreenTD물질의 제어효과는 침편모조류> 와편모조류> 규조류> 녹조류 순으로 나타남.
- GreenTD 물질에 대하여 적조구제물질 사용승인 고시 기준에 근거하여 10 - 30분 이후

결과의 살조효율로 평가하면, 0.5 ppm의 농도에서 87.2%의 높은 효율을 보였음.

- 적조생물을 제어 할 수 있는 GreenTD 최적 농도에서는 생태계에 미치는 상위 포식생물에 대한 영향이 크지 않는 것으로 파악되었으나, 일정한 높은 농도(최적 대비 100배)에서는 알테미아의 부정적인 영향이 관찰됨.
- 해양수산부 적조구제물질 사용승인 고시를 기준으로 본 연구에서 활용한 GreenTD의 현장 실증 결과, 종합점수 88점으로 평가되어 해양수산부 산하 국립수산과학원 적조구제물질 사용승인 위원회에 추천할 수 있을 것임. 특히, 기존 고시의 평가기준으로도 충분히 '추천'에 해당되는 결과가 나왔지만, 실제 현장을 잘 고려한 평가기준이 정립된다면, GreenTD 물질은 적조구제물질로서 더욱 우수한 점수로 평가 될 것으로 판단됨.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 유해성 미세조류 제어를 위한 선택적이고 고효율 살조물질이 개발된다면, 폐쇄성 혹은 반 폐쇄성 연안 내만 및 양식장 주변해역에서 적조생물 제어 효율을 극대화 할 수 있고, 수산양식생물의 피해 최소화에 활용됨.
- 생태학적인 유용서식지 복원, wet-land 복원 및 하천생태복원, 연안 및 해양의 적조피해 예방 및 제어기술에도 활용됨.

S U M M A R Y

I. Title

- Development of highly selective algicidal technology (Technology Transfer)

II. Purpose and necessity of R & D

- The purpose of this project is to develop and apply the environmental friendly and highly effective algicidal substance based on the notification of “the approval of the use of harmful algae algicidal substances” revised in 2016. Ecosystem risk assessment is performed, and selected as an applicable algicidal substances to natural environment.

III. Contents and scope of R & D

- Determination of optimal concentration (GreenTD) for red tide organisms (*Cochlodinium polykrikoides*)
- Assessment of mortality of harmful tidal organisms using optimal concentration of substances in microcosm (20L).
- Risk assessment using mesocosms (>1000L).

IV. Result of R & D

- The optimum concentration of *Cochlodinium polykrikoides* removal by GreenTD is 0.2 ~ 0.5 ppm.
- GreenTD showed high algicidal activity on harmful species, but temporarily reduced the photosynthetic activity in the other species.

- The algicidal activity of GreenTD on the harmful and nonharmful algae was as follows: raphidophyte > dinoflagellates > diatoms > green alga
- GreenTD showed a high efficiency of 87.2% at a concentration of 0.5 ppm after 10 to 30 minutes of application.
- The GreenTD has no significant effect in higher trophic level organisms (zooplankton species), however, it showed a negative effect on *Altamia* in high concentrations (100 times higher).
- Total score of GreenTD was 88 points based on “the approval of the use of harmful algae algicidal substances”.
- It might be recommended to “the committee for approval of harmful algae algicidal substances”.
- In particular, if new evaluation criteria “the approval of the use of harmful algae algicidal substances” are taken into consideration of actual marine sites, GreenTD will be evaluated as superior materials.

V. Utilization of Study Results

- High selectivity of developed substance can expect high efficiency to control the harmful algal bloom species in closed and semi-closed coastal environment.
- Developed technology is expected to minimize ecological and economic damage to aquatic farm.
- Developed technology can be used for ecological habitat restoration, wet-land restoration and ecological river restoration.

Contents

Chapter 1. Introduction	1
1. The aim, necessity, and range of the research project	1
2. Important and concept of the research project	1
Chapter II. The state-of-art of technical development	2
1. The-state-of-art of technical development in domestic and abroad region	2
2. Domestic and Foreign R & D Status and Problems	9
Chapter III. Research and development contents and results	11
1. Research Scope and Research Methods	11
2. Results of Research and Development	15
Chapter IV. Outcome and plan of utilization	71
1. Utilization of research and development results	71
2. Expected effect of research and development results	71
Chapter V. Reference	73

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
1 절 연구개발의 개요	1
2 절 연구개발의 중요성	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	2
1 절 연구개발 대상의 국내·외 연구현황	2
2 절 국내·외 적조생물 구제 연구개발 현황과 문제점	9
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	11
1 절. 연구개발수행 내용	11
2 절. 연구개발수행 결과	15
제 4 장 연구개발결과의 활용계획	71
1 절 연구개발 결과의 활용방안	71
2 절 연구개발 결과의 기대효과	71
제 5 장 참고문헌	73

제 1 장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발의 개요

○ 적조발생으로 인한 수산피해를 최소화하기 위해, 2014년-2016년에 걸쳐 미생물 발효추출물, 황토혼합물, 도석혼합물, 이암분말혼합물 등 친환경 적조구제물질 4종을 현장 적용성 평가를 수행하였지만, 혼합물의 적조구제효율은 상대적으로 낮아, 추가로 고효율의 적조구제물질의 평가가 필요함.

○ 유해적조에 대해 0.5 ppm 이하의 낮은 농도에서 1시간 이내에 90% 이상의 높은 살조능을 나타낼 뿐만 아니라 환경위해성 및 동물 독성평가에서 낮은 독성을 보이는 친환경 살조물질 GreenTD를 (주)큐얼스에서 개발함. 결과적으로, 기 개발된 GreenTD를 대상으로 적조구제물질 사용승인고시 승인을 위한 해양생태계 현장 적용성 평가체계 및 절차가 필요함.

2절. 연구개발의 중요성

○ 우리나라 연안해역은 다양한 적조 원인생물이 대발생을 일으켜 수산업에 영향을 주고 있음. 특히, 1995년에 남해안에서는 와편모조류 *Cochlodinium polykrikoides*이 대발생하여 764억원의 수산피해를 야기시켰으며, 2013년도에도 남해안에서만 247억의 수산피해가 집계되고 있음. 이러한 이유로, 적조 발생시 적조 생물을 구제하고자 다양한 제어 기술 개발 연구가 진행되어 왔음.

○ 현재 국내에서는 적조생물 구제를 위해 현장에 적용하고 있는 유일한 방법으로는 적조발생 해역에 황토를 살포하여 적조발생 원인생물(*C. polykrikoides*)을 침강시켜 구제를 하고 있음. 하지만, 황토살포에 따른, 저서생태계 위협, 구제효과 효율성, 황토 사용 경제성등이 명확하지 않음. 특히 황토 살포는 *C. polykrikoides*와 같은 특정 종에만 적용가능하며, 그 또한 황토의 산지에 따라서 구제효율이 0-90%로 차이를 보여, 관련 학계에서는 황토사용에 대한 부정적인 인식이 팽배함. 그리고 우리나라 연안에서 발생하는 유해 적조생물의 천이에 관한 데이터를 분석 했을 때, 현재 *C.*

*polykrikoides*와 같은 특정 종에만 적용되는 황토 살포는 향후 문제가 발생 할 수 있기 때문에, 적조생물 천이를 미리 예측하고, 다양한 종에 적용 될 수 있는 적조생물 구제물질 개발이 필요함.

○ 따라서, 본 연구 과제는 친환경, 고효율의 적조 구제물질의 개발 및 실용화를 위해서 2016년 개정된 적조구제물질 사용승인 고시(표 1)를 바탕으로, 기 개발된 구제물질에 대해 생태계 위해성 평가를 수행하여 과학적 데이터를 산출한 후, 현장에 적용 가능한 구제물질을 선정하고자 함(국립수산과학원 2014).

제 2 장. 국내의 기술개발 현황

1절. 연구개발 대상의 국내·외 연구현황

○ 유해미세조류에 의한 수산피해 최소화를 위하여 세계적으로 다양한 물질을 개발하고 있음. 하지만 현재까지 개발되어 사용되고 있는 살조물질은 유해조류 제어 효과가 미미하거나, 또는 생태계의 영향이 높은 물질로 구성되어, 기초연구개발 단계를 벗어나지 못하고 있음. 국내에서도 지금까지 해양/담수 유해미세조류를 제거하기 위한 다양한 물리 화학적 방법을 강구하고 있지만, 친환경적인 이미지로 황토를 지속적으로 활용하고 있음. 하지만, 황토의 살조효과가 미미하여, 적조생물에 의한 양식수산생물의 피해는 지속적으로 관찰되고 있어, 어민들 또한 황토 살포에 대한 부정적인 견해를 보임.

○ 국내사례

- 국내의 인공생태계(mesocosm)관련 연구는 미흡한 실정이나, 한국해양과학기술원에서 “폐쇄생태계를 이용한 유기오염물질의 이동 연구”가 수행되어 자연해수와 인공생태계내의 수환경과의 차이와 동식물플랑크톤의 군집구조를 비교하여 유기오염물질의 이동 및 농축, 피-포식자의 관계를 조사한 선례가 있음(김 등 2001; 강 등 2005; 강과 김, 2006). 이 연구는 해양에서 일어나는 생물학적 과정과 물질 플럭스에 초점을 둔 기초적인 연구라고 할 수 있음.

- 국내의 살조물질과 관련된 인공생태계에서의 연구는 담수권에서 살조세균의 안정성 평가를 위해 수행된바 있으며, 현장적용기술이 과기부 NRL 사업으로 연구(자체생성유기물 오염수역의 생태복원기술개발) 되었고, 국내연구로는 인공생태계를 활용하여 최초로 시도된 살조물질의 생태학적 변화 연구라 할 수 있음(과기부, 2005).

- 적조피해 대책 연구의 일환으로 “천적생물을 이용한 적조방제기술 개발”사업으로 현장에서 부유식 폐쇄생태계를 설치하여 적조생물 제어에 대한 과학적 자료를 확보한 바 있으나(해양수산부 1999), 현장 적용하기 위한 천적생물의 대량배양 및 살포가 용이하지 않아 경제성 및 실용성의 한계를 지니고 있음.

- 이후 교과부 미래유망 융합기술 사업으로 “나노캡시드 살포 및 생태계 위해성 평가 원천기술 개발”이 한국해양과학기술원을 중심으로 수행되었고, 적조구제물질에 대한 소, 중형 폐쇄생태계에서 다양한 자료를 확보하고, 현장실용성 평가 기준(표 1)에 맞춰 현장적용을 위한 준비단계까지 왔으나, 물질의 대량확보를 위한 장비개발이 미비한 실정임(미래부 2014).

표 1. 2016년 개정된 적조구제물질 사용승인에 관한 고시의 현장실용성 평가 기준

평가 항목	조사 • 실험방법	평가기준	
해양 생태계의 영향	제품설명서에 제시된 살포 농도를 주입하고 1, 3, 24시간 경과 후 수질 항목(pH, 화학적 산소 요구량, 영양염(NO ₃ , NH ₄ , PO ₄ , Si ₂), 용존산소, 부유물질, 클로로필a)의 변화율	pH	살포 전후 변동폭 10% 이하: 5점, 11~20%: 4점, 21~30%: 3점, 31~40%: 2점, 41% 이상: 1점
		화학적 산소 요구량(COD)	살포 전후 변동폭 0~20% 이하: 10점, 21~40%: 8점, 41~60%: 6점, 61~80%: 4점, 81% 이상: 2점
		NO ₃	살포 전후 변동폭 0~20%: 3점, 21~40%: 2점, 41% 이상: 1점
		NH ₄	살포 전후 변동폭 0~20%: 3점, 21~40%: 2점, 41% 이상: 1점
		PO ₄	살포 전후 변동폭 0~20%: 3점, 21~40%: 2점, 41% 이상: 1점
		Si ₂	살포 전후 변동폭 0~20%: 3점, 21~40%: 2점, 41% 이상: 1점
		용존산소 (포화도 %)	살포 전후 변동폭 5%이내: 10점, 6~10%: 8점, 11~15%: 6점, 16~20%: 4점, 21%이상: 2점
		부유물질	살포 전후 변동폭 0~20%: 3점, 21~40%: 2점, 41% 이상: 1점
제품설명서에 제시	식물플랑크톤	살포 전후 변동폭	

	된 살포 농도를 주입하고 1, 3, 24시간 경과 후 동·식물플랑크톤 개체수, 다양도 지수 변화율 및 어류 생존율	(4)	10% 이하: 5점, 11~30%: 4점, 31~50%: 3점, 51~70%: 2점, 71% 이상: 1점
		동물플랑크톤 (4)	살포 전후 변동폭 10% 이하: 5점, 11~30%: 4점, 31~50%: 3점, 51~70%: 2점, 71% 이상: 1점
		어류	살포 후 생존율 95%이상: 10점, 94~90%: 9점, 89~85%: 8점, 84~80%: 7점, 79~75%: 6점, 74~70%: 5점, 69~65%: 4점, 64~60%: 3점, 59~55%: 2점, 54%이하 : 1점
구제효율	제품설명서에 제시된 살포 농도를 주입하고 30분 경과 후 <i>C. polykrikoides</i> 구제효율	구제 효율이 95%이상: 10점, 94~90%: 9점, 89~85%: 8점, 84~80%: 7점, 79~75%: 6점, 74~70%: 5점, 69~65%: 4점, 64~60%: 3점, 59~55%: 2점, 54%이하 : 1점	

※ 해양생태계 영향 평가시 각 항목의 변화율은 물질 주입 후 1시간(가중치: 50%), 3시간(가중치: 30%), 24시간(가중치: 20%)의 변화율로 계산함.

※ 평가기관에서 평가 기준에 의한 항목 평가 후 계수하여 70점 이상의 물질에 대해서는 추천함.

○ 국내에서 사용하는 황토살포법은 황토의 콜로이드입자가 수중의 현탁물질(영양물질, 미소플랑크톤 등)을 응집, 흡착하는 성질이 있는 것에 착안하여 살조물질로 이용하는 것임. 그러나 이 방법은 자연 상태의 황토를 단순히 수중에 살포하는 기술로서 유해조류에 특이성이 부족하고 추후 살포된 분체물질의 이차적인 오염문제까지 겹쳐 새로운 환경문제를 발생시킬 위험이 있음. 또한, 필요 이상의 황토를 사용할 경우 어류 아가미 폐쇄로 호흡장애 등을 유발하는 등 그 살조 효과에 대해 많은 논란이 있는 실정임.

○ 2010년 이전에는 황산동과 같은 화학약품살포법, 초음파처리법, 전기분해법, 오전처리법, 개면여과 침강법, 피-포식생물을 활용한 생물학적 제어기술등에 대한 다양한 제어방법이 검토되었으나, 실제 현장적용도가 현저하게 떨어짐(표 2).

표 2. 다양한 살조 기술의 특징 및 문제점

기술	특징	문제점
화학약품 살포법	황산동 및 유기화합물을 이용한 적조생물 치사 및 파괴	지속성이 없고 비경제적
초음파처리법	초음파(160-4000KHz)를 이용한 생물파괴	국부적으로 사용함
전기분해법	차아염소산나트륨용질 이용	해양환경위해성이 큼
오존처리법	오존을 이용한 독성중화 작용에 의한 생물분쇄 및 멸균	해수의 산소량 과다 증가로 생태계 악영향
계면여과 침강법	계면활성제 및 응집제를 이용한 생물 여과 및 응집원리	국부적 활용가능
점토 및 황토 살포법	황토 및 활성점토를 이용한 생물흡착 및 치사	낮은 효율과 황토침전에 따른 악영향
생물학적 제어	천적생물 및 살조세균을 이용한 제어	기술적 한계 극복 필요

◆ 해양수산부는 적조로 인한 양식 어패류 피해를 최소화하기 위해 미생물 발효 추출물과 황토 혼합물, 도석 혼합물, 이암 분말 혼합물 등 친환경 적조구제물질 4종을 올해부터 현장에 적용한다고 밝혔다(뉴스1, 2016. 3. 30.).

○ 국외사례

- 미국 EPA의 Office of Pesticide Programs (OPP)에서는 생태학적 위해성 평가를 위해 인공생태계에서 연구를 수행하고 있음. 특히 살충제의 안정성 입증을 위해 인공생태계 실험을 추진하고 있으며, 부유생물에서 어류와 같이 상위 영양단계에 걸친 다양한 생물을 포함하는 폐쇄인공생태계에서 살충제의 영향을 조사하고 있음. 인공생태계에 의한 안정성 평가는 체계적인 절차를 거친 후, 최종 승인은 전문가의 심의를 거쳐야함(그림 1).

- OPP에서 권장하는 위해성 평가방법은 인공생태계에서의 결과를 통해 체계적으로 수행되고 있음(그림 2). OPP의 전문가들이 인공생태계에서의 실험방법을 검토한 후, 최종 검토함. 전문가들은 실험에 사용되는 인공생태계의 적절성, 살충제의 적용법, 잔류성, 생물영향, 데이터의 정확성, 데이터의 정리, 통계분석의 항목들을 검토 후, 최종적인 결론을 내림(Brassard *et al.*, 1994).

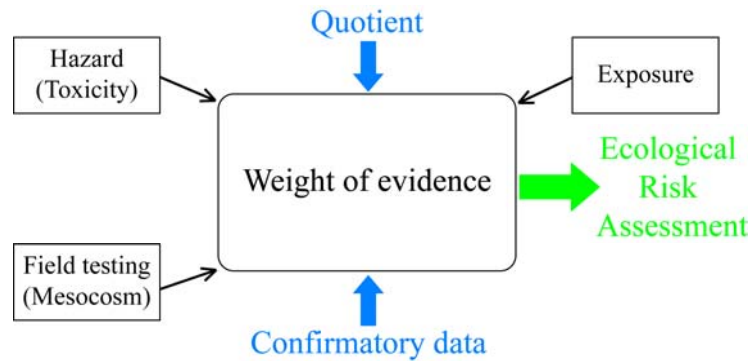


그림 1. 생태계 위해성 평가를 위한 과정과 체계

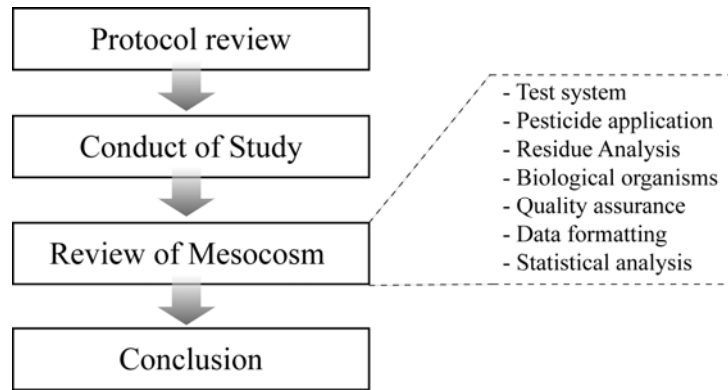


그림 2. 미국 EPA의 인공생태계를 적용한 생태계 위해성 평가를 위한 과정

○ 국내의 시장현황

- 한국 연안의 적조발생으로 인한 양식수산업의 피해액은 1995-2005년 사이에 약 1,200억 원 정도로 집계되고 있음, 아울러 적조발생의 간접적인 피해액까지 고려하면 피해액수는 더욱 큰 것으로 예상됨. 특히 전 세계적으로도 유해조류의 피해범위는 매년 지속적으로 확대되고 있어 본 기술의 적용시장은 국내외적으로 매우 클 것으로 사료됨(표 3).

표 3. 1995-2005년 국내 *C. polykrikoides*의 적조발생 현황

년도	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
피해액(억원)	764	21	15	1.6	3.2	2.6	84	48.4	215	1.2	11
최초발생일	8.28	9.4	8.24	8.30	8.11	8.22	8.14	8.2	8.13	8.5	7.19
소멸일	10.23	10.2	9.20	10.2	10.3	9.19	9.24	9.27	10.13	9.3	9.14
발생지역	완도 삼척	완도 경주	완도 포항	완도 거제	완도 울진	고흥 기장	완도 기장	목포 울진	진도 강릉	완도 거제	완도 거제

- 한국 적조발생은 남해 완도-동해 울진까지 500-1000km까지 광역해역에서 대발생하는 경향이 강함. 적조발생에 따른 피해액은 년도별 차이는 있지만, 일정한 주기를 가지고 있음. 즉 광역해역에서 적조규모가 크게 발생하였다고, 피해액이 큰 것이 아니라, 5-6년마다 빈, 관이 적조조기예보 및 대응에 방심하는 시기에 큰 어업피해의 경향이 강함. 따라서, 관에서는 적조가 발생하지 않은 기간에도 어민들에 대한 적조방제에 대한 관심과 대처방법에 대한 요령에 관한 매뉴얼을 만들고 상시 교육 시스템을 만들어 관리하는 것이 중요함(그림 3).

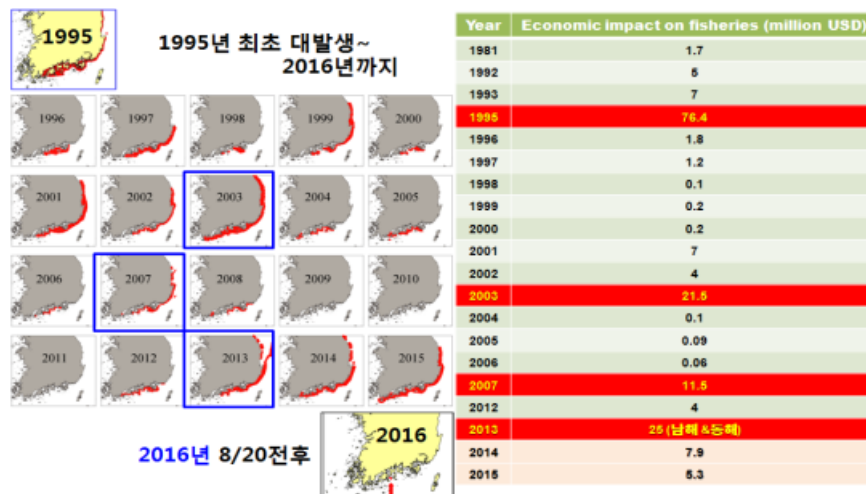


그림 3. 1995-2016년 국내 적조발생현황 및 피해액

- 세계적으로도 적조생물에 관한 연구가 많이 진행되고 있으며, Scopus를 검색한 결과, 적조생물에 관한 연구는 미국, 일본, 중국에 이어 우리나라가 4번째로 연구논문이 많이 도출하고 있다는 것은 적조발생에 관한 관심이 높다는 것을 시사할 수 있고, 또한 적조연구도 활발하게 진행하고 있다는 것을 시사함(그림 4).

SCOPUS 검색: 담수 유해 미세조류 12주 해수 유해 미세조류(*Cochlodinium* 포함)

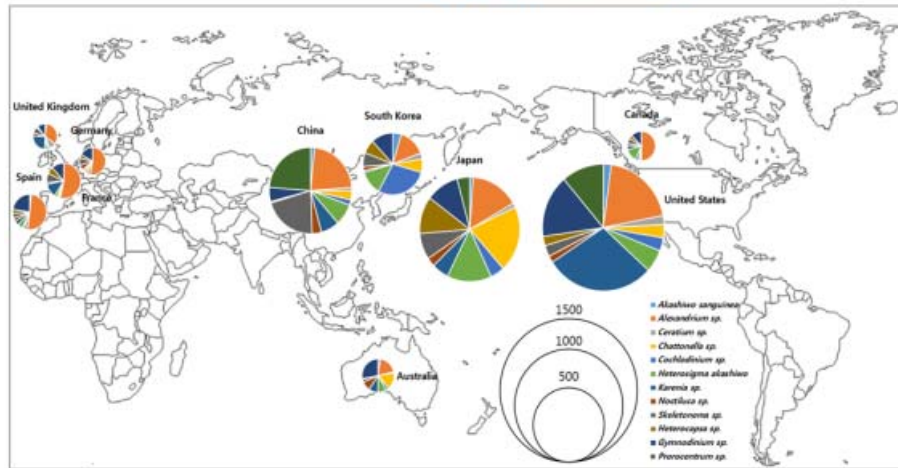


그림 4. 세계적 HABs(유해유독생물 대발생) 연구현황(1970-2016년)

- 세계적으로도 유해조류의 피해범위는 아래 그림에서 보듯이 지속적으로 확대되고 있으며 따라서 본 기술이 적용될 수 있는 시장의 범위는 국내를 넘어 전 세계적으로 확대될 수 있을 것으로 기대됨(그림 5).

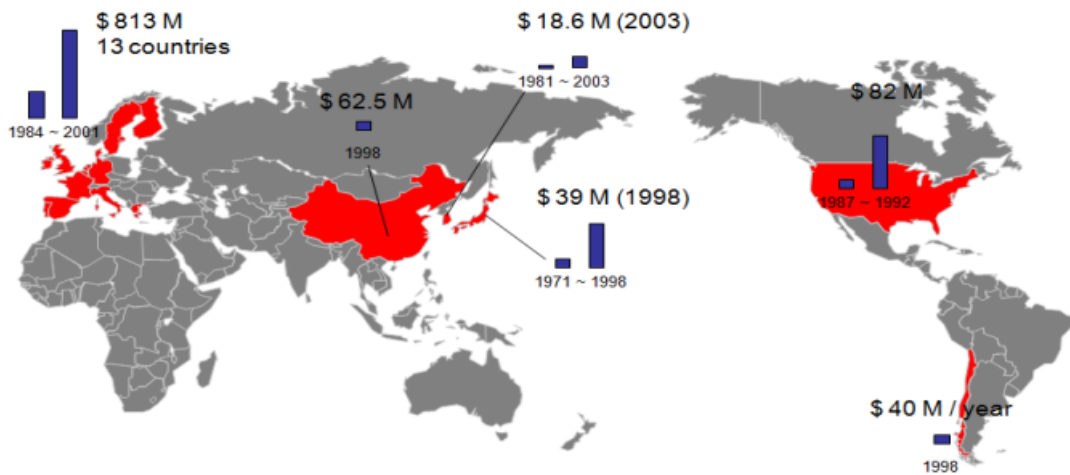


그림 5. HABs발생에 의한 경제적 손실 피해금액 및 발생해역

2절. 국내·외 적조생물 구제 연구개발 현황과 문제점

- 현재 세계적으로 적조생물 구제를 위해 진행되고 있는 방법으로는 화학약품(황산구리 등)을 살포해 적조생물을 직접 죽이거나 파괴, 초음파로 적조생물의 세포를 파괴, 오존으로 적조생물의 독성을 중화, 생물학적 처리를 통한 bio-control 등 다양한 방법이 연구되고 있음. 하지만, 물리(초음파 등) 및 화학적 처리(황산구리 이용) 등의 방법은 아직 경제성이나 환경에 대한 2차 피해유발 등의 이유로 아직 실용화되지 못하고 있음.
- 일본에서는 점토를 이용한 적조구제를 시도하고 있으나, 민간 차원에서 이루어지고 있으며, 현재는 재해보험을 통해 적조로 인한 피해를 보상하는 차원으로 적조 피해에 대응하고 있는 실정임.
- 해외 수산 선진국에서는 적조를 자연현상으로 판단하여, 적조에 대한 직접적인 구제보다는 육상 오염원 차단 및 양식어장 이동 등을 통해 적조피해를 최소화하는 정책을 실시하고 있음.
- 국내에서 개발된 천적생물 및 살조세균 등을 이용한 생물학적 처리방법은 주로 피식자-포식자 관계를 이용해 선택적으로 적조생물만 제어하는 방법이 개발 되고 있으나, 천적생물의 배양 및 현장적용에 있어서 현재까지는 현실적이지 못하다는 것이 중론임.
- 2003년 기 개발된 적조구제물질 및 장비 150여종 중에서 실용성 평가에 참여를 희망한 13종에 대한 현장적용 평가가 실시되었으나 해양환경 및 생태계에 미치는 부정적 영향으로 인해 제트스트리머를 제외한 나머지 적조구제물질은 실용화에 실패하였음.
- 현재 약 180여종의 적조구제물질이 개발되어 있으나 생태계 안정성 및 경제성에 대한 검증이 이루어지지 못하여 아직까지 황토, 전해수황토살포기, 적조제거기 등을 제외하고는 실용화된 물질·장비가 없는 실정임.
- 현재 국내에서는 적조생물 구제를 위해 현장에 적용하고 있는 유일한 방법으로는 적조발생 해역에 황토를 살포하여 적조발생 원인생물(*C. polykrikoides*)과 함께 침강시켜 구제함(그림 6). 하지만, 황토를 이용한 적조생물 구제 후, 저서생태계 위협, 구제효과 효율성, 황토사용 경제성, *C. polykrikoides*와 같은 특정 종에만 적용 등 관련 학계에서는 황토사용에 대한 우려가 있음.



그림 6. 적조발생 해역에서 황토살포 모습(좌)과 원리(우)

○ 따라서 본 연구에서는 기존의 주요 제어기법에 대한 문제점을 개선 및 해결하기 위해 유해조류 대발생에 대한 이해를 바탕으로 보다 선택적이고 효율적으로 대상 유해조류를 제거할 수 있는 친환경적인 물질에 대한 생태계 위해성 평가를 수행하여, 전 세계적인 문제로 부각되고 있는 유해조류로 인한 양식수산생물의 피해를 줄이고자 함(그림 7).

○ 유해 조류에 의한 피해 현황 (국내)



그림 7. 유해조류에 의한 경제적 피해 모식도

제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 연구개발수행 내용

1.1. 당해 연구의 목적

○ 적조구제물질인 GreenTD를 총괄 연구기관인 (주)큐엘스로 부터 제공 받아, 유해 적조생물 *C. polykrikoides*에 대하여 해양수산부 고시인 “적조구제생물질 장비의 사용승인에 관한 고시”의 적조구제효율 항목을 중심으로 현장실용성평가를 수행하였음.

1.2. 연구 기준

○ 모든 실험은 “해양수산부고시 제2016-43호 「적조 구제물질·장비의 사용승인에 관한 고시」(해양수산부 고시 제2015-105호, 2015.7.21.) 개정안을 토대로 진행되었음(그림 8, 9).

<p>1. 실험 및 조사방법</p> <p>가. 적조생물구제효율</p> <p>1) 적조생물(코클로디니움)의 밀도가 1,000 cells/mL 이상인 해수에 구제물질 또는 장비를 사용하여 현장 또는 실내 구제효율을 3회 조사 평가한 자료 제출(야장 및 결과)</p> <p>2) 구제효율은 중형폐쇄생태계(지름 1m, 높이 3m 이상) 또는 실내에서 20L 수조를 이용하여 대조구를 설정하고 3개 이상의 실험구에서 살포 전과 살포 후 10분에서 30분 사이 제거효율을 측정하여 구제효율 조사</p> <p>나. 해양생태계 영향조사</p> <p>구제물질의 해양생태계 영향평가는 중형폐쇄생태계(지름 1m, 높이 3m 이상)를 이용하며, 적조생물(코클로디니움)이 1,000 cells/mL 이상 포함된 적조가 발생한 해역의 해수나 적조생물(코클로디니움)의 농도가 1,000 cells/mL 이상의 대수성장기의 건강한 개체를 이용하며, 이 경우 실험대상 적조생물의 출처가 명확하여야 한다.</p> <p>1) 수질 및 부유생물 : 중형폐쇄생태계에서 수질(pH, COD, 암모니아, 질산, 인산, 규소, 용존산소, 부유물질)과 동·식물플랑크톤의 정성·정량 조사를 살포 전, 살포 직후, 1시간 후, 3시간 후, 6시간 후, 12시간 후, 24시간 후, 48시간 후 조사</p> <p>2) 저서생물 : 살포해역 저서생물의 정성·정량 변화를 해양환경공정 시험기준에 따라 30일간 평가(중형폐쇄생태계 이용, 0.05 m² 이상의 채집면적에서 2시간, 1일, 2일, 5일, 7일, 15일, 30일에 채집)</p>

그림 8. 적조구제물질 고시에 따른 적조구제효율 실험 및 조사방법

가. 구제물질

평가항목	조사.실험 방법	평가기준
구제효율 (5)	수산생물에 영향이 없는 살포 농도	구제효율이 90%이상 : 매우우수(5점), 89-80% : 우수(4점), 79-70% : 보통(3점), 69-60% : 미흡(2점), 59% 이하 : 부적합(1점)
생물영향 (2)	주요 먹이생물인 알레미아 유생을 이용한 생존률 파악	유효구제효율(실내구제효율 70% 이상) 농도의 2배 정도 농도에서 생존율이 대조구의 90%이상: 매우 우수(5점), 80-89%:우수(4점), 70-79%:보통(3점), 60-69%:미흡(2점), 59% 이하: 부적합(1점)
해양생태계영향 (11)	수질: 수온, 화학적산소 요구량, 영양염, 용존산소, 부유물질	- 수질(3): 살포 전후 변동폭 10% 이내: 매우우수 (5점), 변동폭 11-19%이내: 우수(4점), 20-29%: 보통(3점), 30-39%: 미흡(2점), 40%이상: 부적합(1점)
	구제물질 살포 전후의 동식물플랑크톤 종 조성 및 개체수 변동	- 살포 전후 동식물플랑크톤 종 다양성살포 전후의 변동(4) 폭 10% 이내: 매우우수 (5점), 11-30%: 우수(4점), 31-50%: 보통(3점), 51-70%:미흡(2점), 70% 이상: 부적합(1점)
	저서생물 종 조성 및 개체수 변동	살포전후 저서생물 다양성 지수의 변동(4) 폭이 10%이하:매우우수(5점), 11-30%:우수(4점), 31-50%:보통(3점), 50-70%:미흡(2점), 71%이상:부적합(1점)
사용방법 (1)	현장살포장비의 살포간편성(효율) 및 주변기기 운용정도	살포과정 매우 단순 및 간단:매우우수(5점), 단순하지만 주변기기 다소 필요:우수(4점), 다소 복잡: 보통(3점), 과정 및 주변기기 복잡:미흡(2점), 매우 복잡: 부적합(1점)
경제성 (1)	황토대미 유효살포면적당 살포 소요경비	황토 대미 2배:매우우수(5점), 황토대미 5배: 우수(4점), 황토대미 10배: 보통(3점), 황토 대미 20배: 미흡(2점), 황토대미 50배 이상:부적합 (1점)

그림 9. 적조구제물질 고시에 따른 적조구제효율 실험 및 조사방법

1.3. 3단계의 검증 실험 수행

- 적조생물 *C. polykrikoides*을 이용한 GreenTD 구제효율 검증 1(넓은 범위의 GreenTD 농도 스크리닝 / 농도범위: 0.001 ~ 50 ppm)
- 적조생물 *C. polykrikoides*을 이용한 GreenTD 구제효율 검증 2(적조구제효율 고시의 개체수 조건에 근거한 GreenTD 농도 스크리닝 / 농도범위: 0.2 - 5 ppm)
- 적조생물 *C. polykrikoides*을 이용한 GreenTD 구제효율 검증 3(적조구제효율 고시의 개체수 및 규모 조건에 근거한 20 L 마이크로코즘)

1.4. 연구 요약

- 적조구제물질(GreenTD)를 활용하여 다양한 농도에서 *C. polykrikoides* 적조구제효율을 산출한 결과, *C. polykrikoides* 적조 발생시 GreenTD의 최적 농도는 0.2~0.5 ppm으로 파악됨 (적조구제효율과 상위영양단계의 생태계 위해성 등 고려함).

1.5. 평가항목별 분석 방법

1.5.1. 환경요인(DO, pH) 측정

- 적조구제물질에 의한 환경영향평가의 항목은 용존산소(Dissolved oxygen, DO)와 pH이며, DO와 pH는 각각 YSI 6600 data sonde(YSI, USA)와 YSI professional plus(YSI, USA)를 활용하여 현장에서 측정함(그림 10).

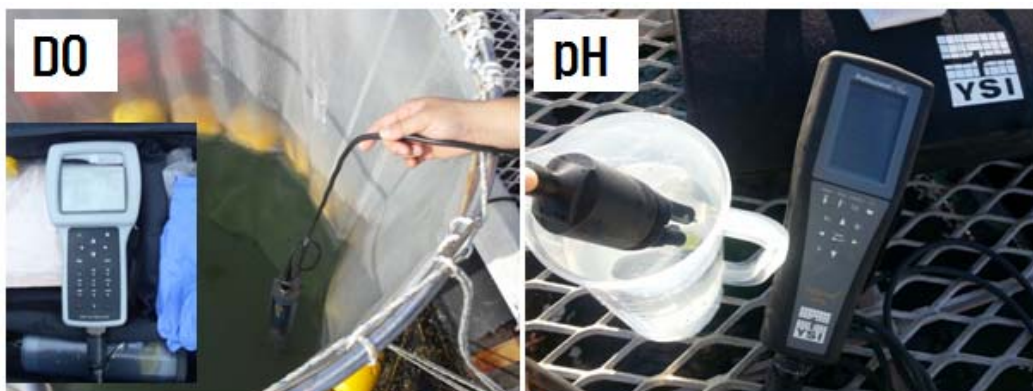


그림 10. 현장에서의 DO(좌), pH(우) 측정

1.5.2. 식물플랑크톤 채집 및 분석

○ 식물플랑크톤의 정량/정성 분석은 소형 폐쇄생태계(처리군) 및 어떠한 구체물질도 넣지 않은 대조군에서 각기 다른 시간대별(0시간, 1시간, 3시간, 6시간, 24시간, 48시간) 변화양상을 관찰하기 위하여, 각 채집시간에 중형 폐쇄생태계 내 수체를 1-2분 동안 gently mixing함. 고정 후 시료는 균일하게 섞은 후 Sedgwick Rafter counting chamber에 넣고 광학현미경(Zeiss, Axioskop 40, Germany)하에서 시료당 400 개체 이상을 3회 반복 계수한 후 부피당 개체수로 환산하였음. 이때, 식물플랑크톤 군집 중 형태가 온전하며, chloroplast가 뚜렷이 관찰될 때 살아 있는 세포로 규정을 하여 계수 및 동정을 하였고, 세포가 파괴되거나 chloroplast가 없을 때 죽어 있는 세포로 규정하여 개체의 계수 및 동정에서 제외함. 식물플랑크톤의 계수 및 동정은 채수 후 2시간 이내에 분석을 완료하여 시료 내 식물플랑크톤의 채수 당시의 현실적인 상태를 반영함. 각각의 세부적인 실험 방법은 아래의 연구결과에서 구체적으로 언급함.

2절. 연구개발수행 결과

2.1. 구제효율평가

2.1.1. 적조생물 *C. polykrikoides*에 대한 GreenTD 구제효율 검증 (1차: GreenTD 농도 스크리닝: 농도범위: 0.001 - 50 ppm)

1) 실험목적

○ 본 실험은 1차적으로 GreenTD에 대한 적조생물의 반응을 파악하기 위해서 다양한 농도의 GreenTD에 대한 *C. polykrikoides*의 살조 적정 농도를 파악하고자 함.

2) 실험방법

○ 배양 분리주 *C. polykrikoides* 50 mL을 70 mL유리 시험관에 넣어 duplicate로 실험을 수행함(그림 11).

○ GreenTD 투여농도: 50, 25, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.01, 0.001 ppm로 선정

○ 적조생물의 살조 유무를 판단하기 위해서 GreenTD 살조물질 투여 후 0h, 1h, 3h 경과 시, Phyto-PAM을 이용하여 생물활성도(Fv/Fm), Active Chlorophyll *a*를 측정함.

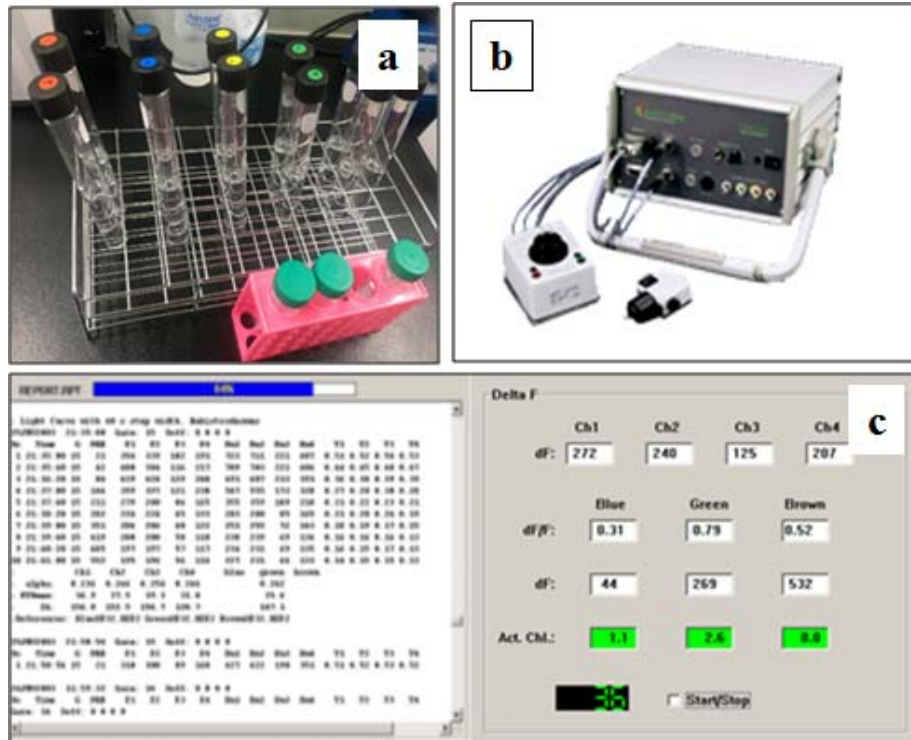


그림 11. GreenTD 농도구배에 *C. polykrikoides* 살조를 위한 평가준비 및 장비

3) 실험결과

- GreenTD 0.1 - 5 ppm의 실험군에서 1 h 후, 모든 실험군에서 Fv/Fm 의 값이 0.1이하로 감소함.
- 살조물질 접촉 3 h 후 10 ppm 이상의 농도에서 Fv/Fm 값이 0에 가까운 수치를 보였음.
- 살조물질 접촉 1 h 이후, 생물의 활성 정도를 파악할 수 있는 Active Chlorophyll *a* 는 1 ppm 이상의 모든 실험군에서 1전후의 값을 기록하였고, 이는 1 ppm GreenTD 농도에서 적조 생물 *C. polykrikoides* 에 치명적인 사멸을 유도한 결과로 판단됨(그림 12).

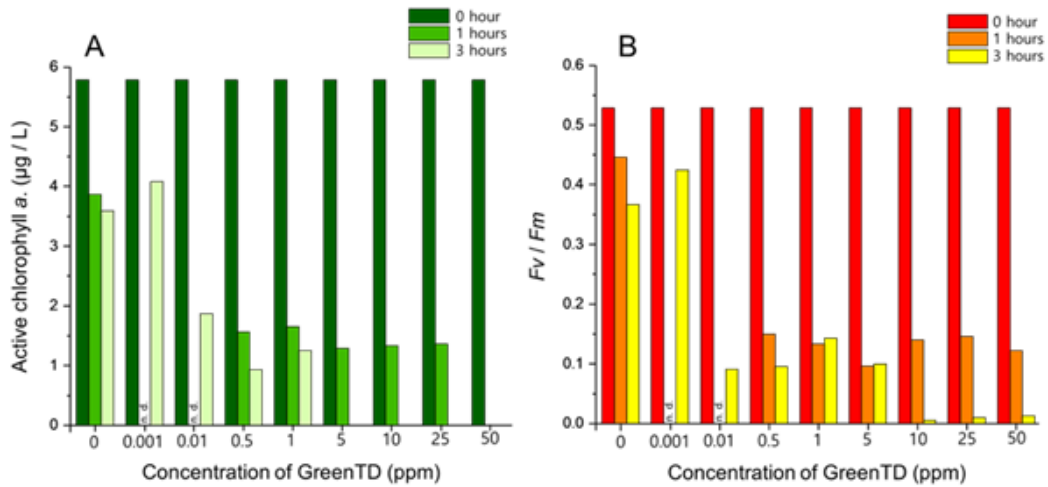


그림 12. 적조구제물질 농도구배에 따른 F_v/F_m 과 Active Chlorophyll a 변동

2.1.2. 적조생물 *C. polykrikoides*을 이용한 GreenTD 구제효율 검증(2차: 적조구제 물질 사용승인에 관한 고시 기준에 근거한 *C. polykrikoides* 개체수 조건에 따른 GreenTD 농도 스크리닝 : 0.2 ~ 5 ppm)

2.1.2.1. 실험목적

○ “적조구제물질 사용승인에 관한 고시“에 근거한 현장실용성평가에 적용하여 적조경 보수준의 *C. polykrikoides*의 개체수를 유지한 후 생물의 살조능을 평가하는 것이 중요함. 따라서 이 기준에 근거한 실험을 수행하기 위해서 적조생물 *C. polykrikoides*의 개체수 밀도를 1,000 cells/mL 로 대량 배양하여 앞서 1차 스크린 한 결과에 근거하여 좁은 범위의 GreenTD 에 대한 농도구배(0.2, 0.5, 1, 2, 5 ppm) 실험을 수행함.

2.1.2.2. 실험방법

○ 적조구제물질 고시에 준하는 *C. polykrikoides*의 세포 밀도 1,000 cells/mL 이상으로 배양된 생물을 이용함. 상기 세포밀도 *C. polykrikoides* 50 mL을 70 mL 유리 시험관을 넣고 3회 반복 실험을 수행함.

○ 살조물질 GreenTD 첨가농도는 생태계에 미치는 영향을 최소화하면서 적조대상생물의 살 조효율을 얻을 수 있는 농도 0.2, 0.5, 1, 2, 5 ppm에서 실험을 수행함(실험 1에 근거하여 평가).

○ 살조물질 첨가 후 0 h, 3 h, 24 h 경과 시, Phyto-PAM을 이용하여 생물활성도(F_v/F_m),

Chlorophyll *a*, Active Chlorophyll *a*을 측정하였음.

○ 적조생물의 사멸유무를 파악하기 위해서 현미경하에서 생물 생사판별(움직임과 세포파괴현상으로 구별함)을 수행함과 동시에 *C. polykrikoides*의 죽은 개체수를 개수. 특히, 여기서 *C. polykrikoides* 개체수는 GreenTD 살조물질 첨가로 인하여 치명적인 손상을 입어 세포가 붕괴된 개체, 살조물질의 영향으로 형태가 크게 변화되어 움직이지 않는 개체는 죽은 것으로 간주함.

2.1.2.3. 실험결과

1) Active Chlorophyll *a*

○ 대조군의 Active Chlorophyll *a*는 Chlorophyll *a*농도와 유사하게 나타남.

○ GreenTD 물질 첨가 3 h 경과 후, 0.2 - 1 ppm의 농도에서는 대조군대비 1/3정도로 감소하는 경향을 보였으나, 2, 5 ppm에서도 약 1.5 $\mu\text{g/L}$ 이하로 유지됨(그림 12). 즉 > 2 ppm의 농도에서는 Active Chlorophyll *a*를 교란시켜 엽록소 활성이 극히 낮게 유지되는 특성을 파악함. 이는 적조생물의 사멸 유무를 판단할 수 있는 정량적인 측도로 활용할 수 있을 것으로 기대됨.

○ GreenTD 물질 첨가 24 h 경과 후, 살조물질 농도가 0.2, 0.5 ppm에서 0 $\mu\text{g/L}$ 에 가까운 값이 검출되었고, 그 이상의 농도에서는 전혀 검출되지 않는 특성을 파악함.

2) F_v/F_m

○ F_v/F_m 는 Phyto-PAM 장비에서 측정한 항목 중 생물반응이 느리게 감지되는 특성이 있음.

○ 살조물질 첨가 3 h 후, 0.2 ppm에서는 대조군과 유사하게 활성이 높게 관찰되었고, 0.5 ppm과 1 ppm에서는 0.3 정도 감소하는 특성을 보였음(그림 12).

○ 살조물질 첨가 24 h 이후, F_v/F_m 값의 감소하는 경향은 3 h 보다 뚜렷하였으나, 감소폭이 다른 측정항목보다 크지 않은 것을 파악함.

3) *C. polykrikoides* 개체수

○ 현미경 검경을 통한 *C. polykrikoides* 개체수 변동을 파악함에 있어, 움직이는 생물을 정확하게 개수 할 수 없는 것과 생사판별을 움직임 여부로 평가해야 하는 단점이 있음. 아울러, 특정 적조생물의 개체수를 파악하는 것은 다른 측정항목보다 주관적이지만, 숙련도가 매우 중요하게 작용됨.

○ *C. polykrikoides* 개체수는 살조물질 첨가로 인하여 치명적인 손상을 입어 세포가 붕괴된 개체, 아울러, 살조물질의 영향으로 형태가 크게 변화되어 움직이지 않은 개체수는 죽은 것으로 간주하였음.

○ 살조물질 첨가 3 h 후, 0.2 ppm과 0.5 ppm에서도 대조군과 비교하여 명확하게 개체수가 감소하는 양상을 확인하였음. 하지만, 일부 개체는 여전히 운동성을 보여 유영하는 것을 관찰할 수 있음. 즉, 3 h 경과에도 살조물질 농도가 낮은 실험군에서는 일부 개체가 생존할 수 있다는 것을 의미함. 하지만, 1 ppm 이상의 농도에서는 생존한 개체수가 존재하지 않았음(그림 13).

○ 실험 24 h 후, 대조군에서는 여전히 높은 개체수를 유지한 반면, 살조물질 첨가군에서는 생존한 개체수가 전혀 관찰되지 않았음. 즉 모든 살조물질 처리군에서 적조생물을 구제할 수 있다는 것을 의미함.

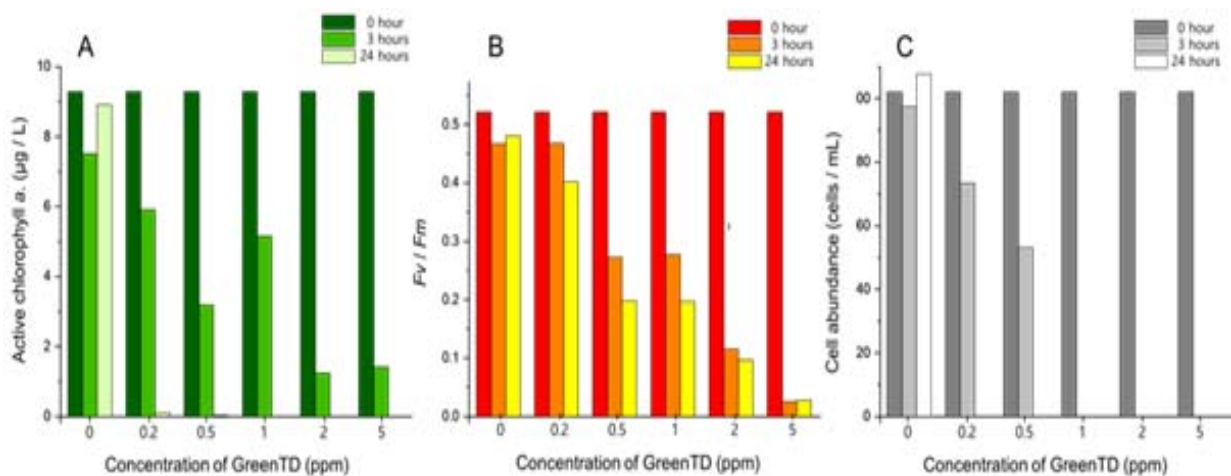


그림 13. GreenTD 농도에 따른 시간 별 Ac. Chl. a, Fv/Fm, Cell abundance의 변화

4) *C. polykrikoides* 형태 변화

○ GreenTD 0.2 ppm에서는 대조군과 유사하게 일정한 운동성을 보였음. 하지만, 생존한 개체수가 극히 감소함.

○ GreenTD 0.5 ppm과 1 ppm의 농도에서는 *C. polykrikoides* 개체의 세포가 붕괴되어 사멸하는 형태학적 특성을 보였음.

○ GreenTD 2 ppm 과 5 ppm와 같은 고농도에서는 *C. polykrikoides* 개체의 붕괴되는 것도 관찰하였으나, 특이적으로 세포가 둥근 형태로 고정됨. 시간의 경과와 더불어 둥근형태의 세포도 점차적으로 붕괴되어 형태를 관찰할 수 없게 됨(그림 14 A: 대조군에서 chain을 형성함, B: 5 ppm 에서 세포가 고정이 된 것으로 사료되는 개체, C: 1 ppm에서 3 h 경과 후 세포가 붕괴된 개체)

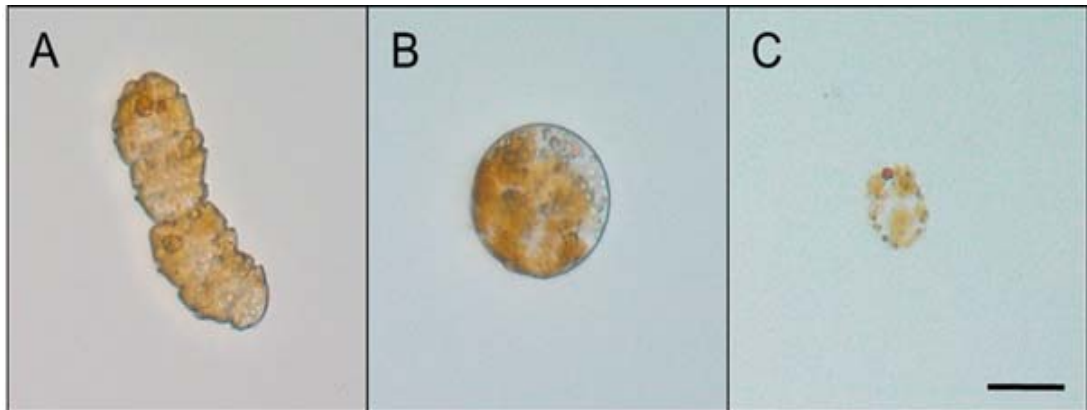


그림 14. GreenTD 첨가에 따른 *C. polykrikoides* 형태 변화

3.1.3. 물질을 이용한 적조 발생 종의 선택적 살조능 평가

3.1.3.1. 실험목적

○ 현재 국내에서는 적조생물 *C. polykrikoides* 구제를 위해 현장에 적용하고 있는 유일한 방법으로는 황토를 살포하여 적조 원인 생물을 침강 및 흡착시켜 구제하고 있음. 하지만, 각 지역에 따른 황토 구성성분의 차이로 인하여 적조생물 구제효율은 0-90%로 크게 차이를 보임. 특히 분리배양된 *C. polykrikoides*의 배양주에서는 황토에 대한 살조효과가 일정하게 나타났지만, 현장에서 발생한 *C. polykrikoides* 대상으로 평가한 결과 살조효과가 미미함. 자연 상태를 모사한(Mesocosm) 실험에서 현장 적조생물 *C. polykrikoides*을 대상으로 황토를 살포하였을 때, 대상생물의 살조효과보다 오히려 증식촉진제 역할을 하는 것으로 파악되었다(Baek *et al.*, 2014a). 아울러, 황토는 살포 후 해저로 침강되면, 저서생물 생태계에 부정적인 영향을 미칠 수 있음(Sengco and Anderson, 2004; Shumway *et al.*, 2003). 특히, 구제효율의 신뢰성, 황토운반 및 살포에 따른 비용등과 관련하여 학계에서는 황토사용에 대한 부정적인 인식이 팽배할 뿐만 아니라, 양식어민들 사이에서도 적조생물 살조효과에 대한 의구심이 증폭되고 있는 실정임. 따라서, 정부에서는 적조발생으로 인한 수산피해를 최소화하기 위해, 국립수산과학원에서 적조구제물질을 발굴하고자 기업체에서 개발된 200여 물질을 공모 및 평가하였다. 1차적으로 공모된 각 물질에 대하여 살포 비용과 원가를 고려하여 경제성이 있는 물질을 선정하였음. 2차적으로 각 물질에 대한 살조구제효율은 실험에서 적조배양생물을 대상으로 평가하였음. 3차적으로 구제효율이 우수하면서 친환경적인 물질을 대상으로 메소코즘에서 현장 적용성 평가를 수행하였음. 결과적으로, 생태계에 미치는 영향등을 고려하여, 최종적으로 미생물발효추출물, 황토혼합물, 도석혼합물, 이암분말혼합물 등 친환경 적조구제물질 4종을 적조구제물질 사용승인고시에 준하는 물질로 등

록하였음. 하지만, 이들 물질 또한 *C. polykrikoides* 의 분리배양주에서는 높은 살조효과를 보였으나, 현장적조생물 *C. polykrikoides* 을 대상으로 메소코즘에서 평가한 결과, 살조효과가 미미한 수준으로 나타났음(미공개 자료). 연구에서는 적조생물 *C. polykrikoides* 을 효과적으로 구제하기 위해서 (주)큐얼스에서 개발한 친환경 살조물질 GreenTD를 대상으로 구제 효율을 평가하였음. 현장 적용성 평가 수행하기 이전, 유해 미세조류와 무해 미세조류를 대상으로 선택성 살조여부를 평가하여, 현장 적용 가능성을 고찰하고자 함.

3.1.3.2. 실험방법

○ Thiazolidinedione 유도체 GreenTD의 물질을 조선대학교 응용화학소재실험실에서 개발하였고, (주)큐얼스에서 대량생산 공정을 거친 물질을 제공받았음. 여기서 GreenTD물질에 대한 화학 구조는 특허등록과 관련된 사항으로 제공할 수 없음. Baek *etal.*(2014a)의 보고에 의하면, Thiazolidinedione 유도체 TD49(MW: 337.8)은 수용성이 낮아 100% 에탄올에 완전히 용해시킨 후 용매를 해수에 첨가하는 방법으로서 현장 적용에 적합하지 않는 단점이 있었음. 이를 보완하기 위해서, 분말형태의 GreenTD를 개발하였고, 대량생산을 가능하게 하여, 현장 적용에 용이하게 활용할 수 있도록 개선하였음. 본 물질은 여과 해수에 직접 녹여, 최종농도 5 g L⁻¹(5000ppm)의 Stock solution을 만들어 아래에서 언급하는 다양한 살조효율 실험에 활용하였음.

○ 연구에서는 유해 및 무해 미세조류 7종을 대상으로 GreenTD에 대한 살조능 평가를 수행하였음. 유해 미세조류는 국내에서 종종 대증식하는 침편모조류 2종, 와편모조류 2종으로 구성되었고(Baek *etal.*,2014b), 무해 미세조류는 국내 연안에서 가장 흔히 출현되는 규조류 2종을 선정하였고, 이와 함께 연안에 자주 출현하는 녹조류 1종을 활용하였음(Baek *etal.*,2014b; Baek *etal.*,2015b).

○ 본 연구에 활용된 미세조류는 한국해양과학기술원 해양시료도서관에서 활용하였음. 분양받은 조류는 살조능 평가에 활용하기 이전 생물활성을 최대한 높이기 위해 f/2 배지가 첨가된 1L배양용기에 2주일간 배양하였음. 배양 조건은 온도 25°C, 광량 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 광주기 12L: 12D로 조절하였음. 생물 농도에 따른 GreenTD의 살조효과 여부를 파악하기 위해서, 고밀도와 저밀도 생물군으로 나누어 실험을 진행하였음. 고밀도 생물군은 높은 생물활성을 위해 동일한 조건에서 2주간 배양한 생물을 그대로 사용하였고, 저밀도 실험군은 고밀도의 생물을 인공해수에 1/2~1/3로 희석하여 활용하였음. 70 mL 시험관(ϕ 22 mm X 200 mm; PYREX[®])에 각각의 배양된 생물을 50 mL 를 접종한 후, GreenTD 최종농도가 0(대조군), 0.05, 0.2, 0.5, 1.0 μg

L^{-1} (=ppm)이 되도록 농도구배를 두었음. 모든 실험은 3반복실험군(triplicate)으로 진행되었음. GreenTD에 대한 최종 살조물질 농도는 사전에 다양한 평가를 거친 후 선정되었음. 유해 미세조류에 대한 효율적인 살조반응과 함께 무해 미세조류에 대한 전반적인 생물활성능을 평가하기 위해서 시간경과(1hr, 3hrs, 24 hrs)에 따라서 PAM g(phytoplankton analyzer; PHYTO-ED, S/N: EDEF0139, Germany)장비로 세포 내 활성을 측정하였음. PAM (pulse-amplitude modulation)장비는 엽록소 내 전자전달 및 에너지 손실 관계를 이용한 생물정량과 더불어 광합성 전자 전달율(electron transport rate: ETR)에 의한 생물활성을 측정할 수 있었음. 따라서 본 장비로 각 파장별(470nm, 520nm, 640nm, 665nm) 엽록소 형광을 산출하여, 엽록소(Chlorophyll *a*), F_v/F_m (광합성 효율), 활성엽록소(Active Chlorophyll *a*)를 다양한 조건에서 파악하였음. 특히 적조구제물질 사용승인에 관한 고시에 준하는 평가는 각 생물군에 대한 살조 후 생물 사멸유무와 함께 생물개체수를 판단해야 함으로, 초기와 24 시간 경과후의 생물 개체수를 Sedgwick-Rafter chamber에 0.1-1 mL(생물 개체수에 근거함)을 분주하여, 광학현미경 하에서 생존 개체를 검경 및 계수하였음. 마지막으로 살조된 유해 미세조류에 대한 재생장유무를 판단하기 위해서 GreenTD 첨가 후 2주동안(model 10-AU, Turner Designs Sunnyvale, CA, USA)를 활용하여 형광값(*invivo*fluorescence)을 측정하여 재생장 가능성을 평가하였음. 실험기간 동안 각 생물군에 대한 최적의 환경조건을 유지하기 위해, 앞선 언급한 사전 배양조건과 동일하게 유지시켜 배양을 수행하였음.

3.1.3.3. 결과 및 토의

1) GreenTD물질의 경제성

○ 적조구제물질의 사용승인을 받는 조건은 양식 수산생물에 피해를 주지 않고, 해양 생태계에도 부정적인 영향을 최소화하면서 대상생물만 선택적으로 살조하는 것임. 따라서 적조구제물질은 해양에 잔류하지 않는 친환경적 소재와 함께, 운반 및 살포가 용이하여 경제성이 높은것이 선정대상에 유리함. 기 수행된 동일 연구 팀의 선행연구에 의하면, Thiazolidinedione 유도체(TD49)는 당뇨병 치료 보조제로 활용되고 있으며, 유해 적조생물을 선택적으로 살조하는 능력이 우수하였음. 따라서 본 물질(GreenTD)에 대한 경제성을 파악하기 위해서, 황토와 TD49물질을 예시로 비교하여 보았음. 2013년 적조생물이 대발생하여 황토를 대규모 살포하였으나, 효과적으로 적조생물을 제어하지 못하여, 270억 규모의 수산양식업 피해를 입혔음. 그 때 적조생물을 제어하기 위해서 살포된 황토의 양은 228,000톤(구매 비용34억)이며, 장비 운용 및 인건비등

살포에 소진된 총 비용은 약 118억 정도로 파악되었음(Baek *et al.*,2014b). 만약 같은 면적에 TD49 물질로 살조효율을 고려하여 4,750 kg을 현장에 적용하였다고 가정하면, 생산단가는 60억으로 추정됨. 하지만, TD49 물질에 대한 용매 추출, 운반 및 살포 비용을 고려하면 황토보다는 경제성이 매우 낮을 것으로 판단되었음. 이와 같은 점을 보완하고자 (주)큐얼스에서는 TD49 물질보다 원가를 1/10로 줄인 GreenTD 물질을 발굴하였고, 특히 용매 추출없이, 현장해수에 희석하여 살포할 수 있는 현장적용 용이성이 강력한 장점이라고 할 수 있음. 따라서, 본 물질을 현장 적용성 평가 전, 다양한 생물군과 함께 생물밀도(고밀도와 저밀도)에 따른 살조물질 구매실험이 실험실 규모에서 선행되어야 함. 결과적으로 본 연구에서 활용한 GreenTD 물질은 황토대비 충분히 경제성이 높을 것으로 판단됨. 특히, 선택적인 살조능을 고려하면, 적조생물을 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 기대됨.

2) 유해성 및 비유해성종의 활성 평가

○ 본 연구에서는 유해종 4종과 함께 무해종 3종을 대상으로, 2가지 생물농도 조건(고밀도, 저밀도)에서 생물활성에 대한 결과를 그림 15에 나타내었음. 유해종과 무해종을 선택한 이유는 살조물질의 선택성 유무를 판단하기 위해서 선별되었음. 살조물질 현장 적용시, 무해종을 선택성 없이 살조하게 되면 생태계에 미치는 부정적인 영향을 클 것이며, 반대로 대상 유해종을 효율적으로 살조하지 못하면 살조처리의 의미를 부여할 수 없게 됨. 먼저, 유해종 침편모조류 *C. marina*의 Active Chl.*a*값은 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도의 고밀도 실험군에서 $13.3 \pm 0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 24시간 후 $25.62.84 \text{ L}^{-1}$ 로 크게 성장하였고(Fig. 1A), 저밀도 실험군에서 초기 $6.76 \pm 0.34 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 24시간 경과후 $1.0 \pm 0.59 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 대부분 사멸하였음(그림 15). 이는 저밀도 실험군에서는 낮은 GreenTD 농도에서 *C. marina* 살조효과를 기대할 수 있지만, 고밀도 실험군에서 효과적으로 살조할 수 없을 것으로 판단됨.

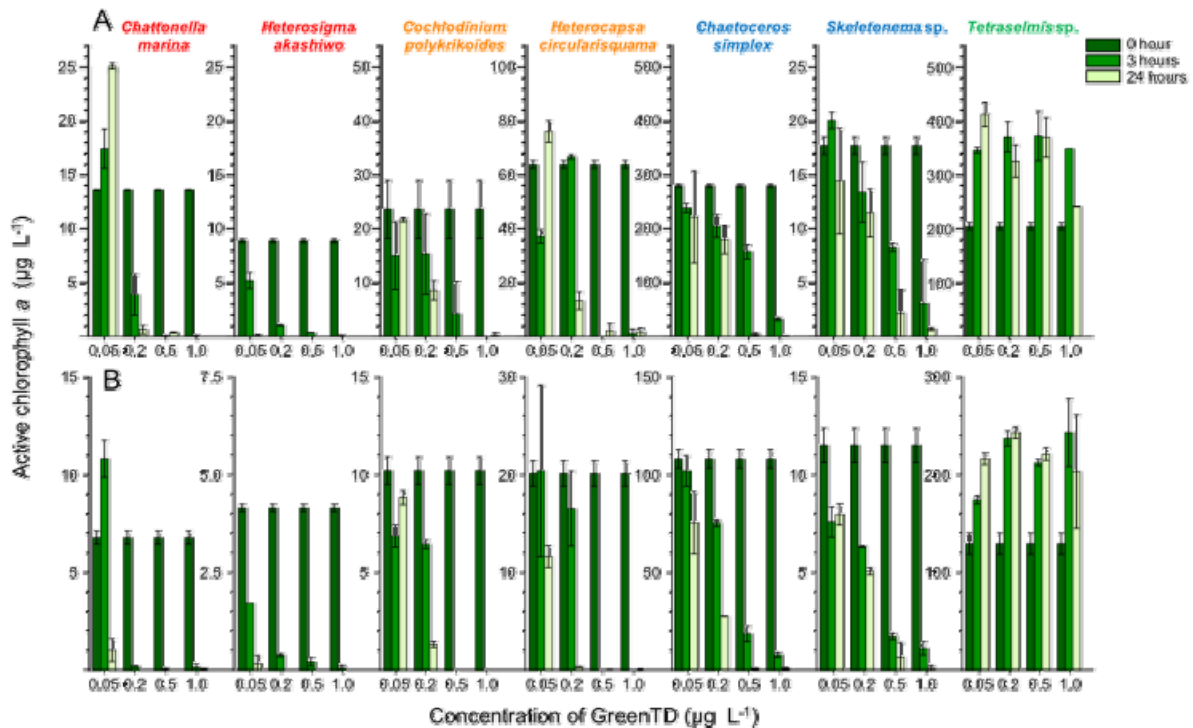


그림 15. 다른 생물농도 조건(고밀도, 저밀도)에서 유해종 4종과 무해종 3종의 생물활성(Active Chl. a)

○ 반면, GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 고밀도 실험군은 3시간 경과후 Active Chl.a값이 $3.82 \pm 1.85 \mu\text{g L}^{-1}$ 로, 24시간 경과후에는 0.64 ± 0.38 로 극히 낮게 나타났음. 특히, 저밀도 실험군에서는 3시간 경과 후 극히 낮은 값을 보였음. GreenTD 0.5와 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 저밀도와 고밀도생물과 관계없어, 유사하게 시간의 경과와 더불어 낮은 Active Chl.a를 보였음. 즉 GreenTD 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도에서는 3시간 이후 대부분의 *C. marina*는 광합성활성을 잃었음. F_v/F_m 값 또한 고밀도 실험군에서 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 24시간 경과후에도 일정이 높은 값(0.60 ± 0.01)으로 초기 값과 유사하였으나, 저밀도에서는 초기 대비 48.1%로 줄어든 값을 기록하였음. GreenTD 살조농도에 따른 *C. marina*의 F_v/F_m 시간경과에 따른 변동폭은 Active Chl.a과 유사한 특성을 보였음. 유해종 침편모조류 *H. akashiwo*에 대한 고밀도와 저밀도 실험군의 Active Chl.a값은 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도 적용 3시간 경과 후 각각 $5.08 \pm 0.73 \mu\text{g L}^{-1}$ 과 $1.07 \pm 0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 나타났음. 이는 *C. marina*에서 나타난 광합성활성 인자와 유사한 경향을 보였음. 특히, *H. akashiwo*는 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서 일정하게 광합성활성이 낮게 나타난 것으로 보아, *C. marina*보다 조금 낮은 농도

에서도 살조효과가 나타날 것으로 판단됨. 결과적으로 침편모조류 *C. marina*와 *H. akashiwo*는 각각 GreenTD 0.5 와 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서 80% 이상의 살조효과를 기대할 수 있을 것이며, 같은 침편조모류 중 세포체적과 생물밀도의 차이에 따라서도 살조효과가 상이한 차이를 보일 것으로 판단됨.

○ 우리나라에서 수산양식생물에 가장 큰 피해를 입히는 적조생물 와편모조류 *C. polykrikoides*에 관해서 살펴보면, 살조물질 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 적용시, 고밀도 실험군의 Active Chl.a값은 초기 23.1 ± 5.27 로 관찰되었으나, 3시간 경과후 $14.7 \pm 6.14 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 일정하게 감소하였고, 24시간 경과이후에는 $21.2 \pm 0.37 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 다시 증가하는 양상을 보였음. 반면, 저밀도 실험군에서도 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 적용시 일정하게 높은 값을 보여, 활성엽록소에 대하여 명확한 영향을 미치지 않았음. GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 *C. polykrikoides*고밀도와 저밀도 실험군에서 24시간 경과후 각각 $8.39 \pm 1.48 \mu\text{g L}^{-1}$ 과 $1.28 \pm 0.15 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 나타나, GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도보다 극히 낮은 생물활성을 보여, 생물사멸에 일정하게 영향을 미치는 것으로 파악되었음.

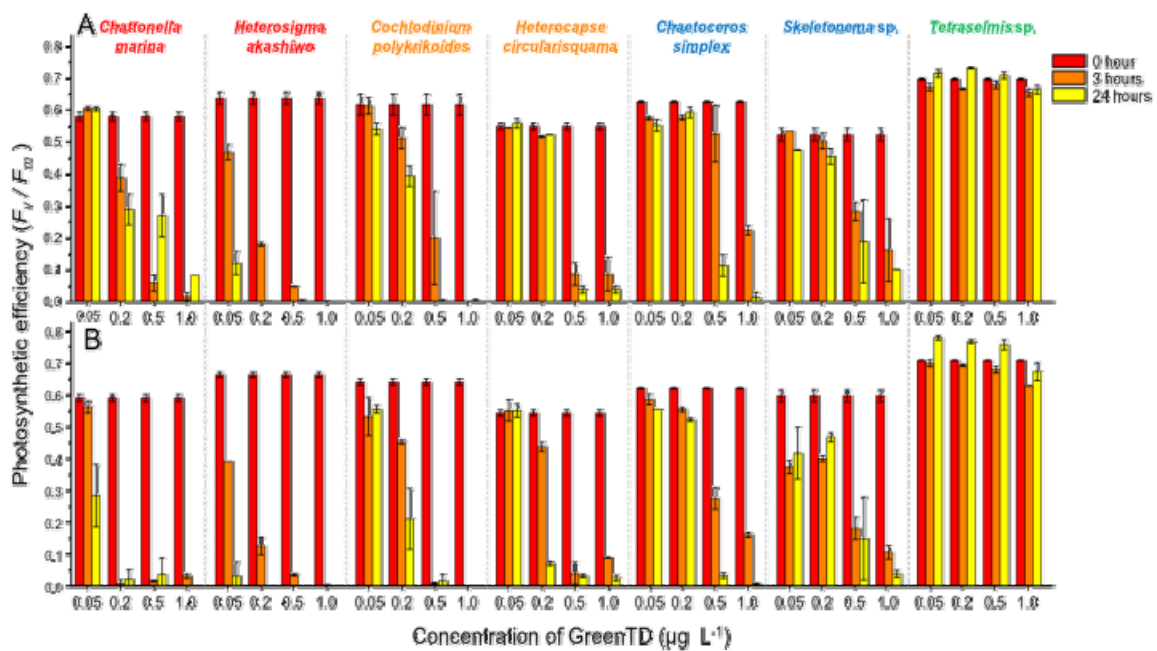


그림 16. 다른 생물농도 조건(고밀도, 저밀도)에서 유해종 4종과 무해종 3종의 생물활성(F_v/F_m)

○ 와편모조류 *H.circularisquama*는 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 적용시, 고밀도 실험군에서 Active Chl.*a*값은 초기 $119 \pm 3.11 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서 3시간 경과 후 $66.1 \pm 3.83 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 감소하였으나, 상기의 *C. polykrikoides* 실험군과 유사하게 24시간 경과후에는 $129 \pm 3.34 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 재차 상승하는 경향을 보였음. GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 생물밀도와 관계 없이, 3시간 경과 후에는 전혀 영향을 미치지 않았지만, 24시간 경과 후에는 극히 낮은 값을 유지하였음. *Heterocapsa* sp.에 대한 F_v/F_m 값의 시간별 영향을 살펴보면, 고밀도 실험군에서 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 0.6전후로 활성이 높게 나타난 반면, GreenTD 0.5와 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 0.1이하의 낮은 값을 유지하였음. 반면 저밀도 실험군에서는 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서부터 일정하게 영향을 받는 것으로 파악되었음. 무해성 규조류는 고밀도와 저밀도 실험군에서 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 적용시 24시간 경과 후에도 값이 초기 대비 *C. simplex*는 각각 64.4%와 25.3%를 유지하였고, *Skeletonema* sp.는 각각 64.7%와 48.8%를 유지하였음. 아울러 저밀도 실험군에서도 F_v/F_m 값이 0.52 ± 0.01 이상으로 초기 대비 10-20% 감소한 것으로 보아, 생물 활성을 지속적으로 유지하고 있다는 것을 시사함. 반면, GreenTD 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도에서는 Active Chl.*a*와 F_v/F_m 이 초기 대비 약 20% 이하로 낮게 유지되었음. 무해성 녹조류 *Tetraselmis* sp.는 앞서 언급된 유해성 규조류, 침편모조류, 와편모조류와는 전혀 다른 양상을 확인하였음. 특히 미세조류의 성장 및 살조 특성에 따라서 Active Chl.*a*은 F_v/F_m 값과 시간 경과에 따른 변화특성이 조금 다른 경향을 보였음(그림 16). 이는 GreenTD 물질첨가 후 F_v/F_m 값은 세포가 사멸할 때 일시적으로 급격히 높아지는 경향이 있고, Active Chl.*a*가 살조물질 처리후 빠르게 반응하여 영향을 미친 실험군에서 급격하게 낮게 나타나는 경향은 미세조류별 세포 분해기작과 연관성이 있을 것으로 사료됨. 즉, 살조물질 접촉 후 세포 내 물질이 침투되면, 특정 세포가 분해 과정에서 세포막을 파괴하면서 세포 내 잔여 엽록소를 수주내 분산되어 엽록소가 일시적으로 높게 나타나는 경향이 있다는 것을 의미함.

3) 유해성 및 비유해성종의 살조효율 평가

○ 고밀도 및 저밀도 실험군과 GreenTD 살조물질농도별 시간에 따른 각 생물군의 생존 개체수의 변화를 그림 17에 나타내었음. 침편모조류 *C. marina*는 초기를 접종한 고밀도 실험군에서 24시간 경과후 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서 살조효율 6.3%로 낮게 관찰되었으나, 그 이상의 농도에서는 100%의 살조효과를 보였음. 반면, $1.0 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$ 로 저밀도 실험군에서는 GreenTD 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서도 96.8% 살조효율을 보였음. 침편모조류 *H. akashiwo*는 고밀도($9.1 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$) 실험군과 저밀도

도($4.6 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$) 실험군에서 GreenTD $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서조차 100%로 살조효과를 보여, 아주 효과적으로 생물을 제어할 수 있는 특성을 확인하였음. 와편모조류 *C. polykrikoides* 는 GreenTD $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ 에서, 고밀도 실험군($1.9 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$)과 저밀도($0.7 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$) 실험군에서 각각 20.5%, 14.8%의 살조효과를 관찰하였음. $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서는 고밀도 실험군에서도 살조효율을 보였고, 그 이상의 GreenTD 농도에서는 100% 살조효과를 기록하였음. 와편모조류 *H. circularisquama* 는 초기 개체수 $3.9 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$ 로 고밀도 실험군에서는 GreenTD $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서 살조효율이 24.7%로 낮았고, 이는 같은 농도를 적용한 와편모조류 *C. polykrikoides*의 초기 개체수 밀도보다 10배 정도 높은 밀도를 접종하였기 때문으로 판단되며, 고밀도 와편모조류 적조를 제어하기 위해서는 단계적으로 높은 농도의 GreenTD 를 적용해야 한다는 것을 시사할 수 있음.

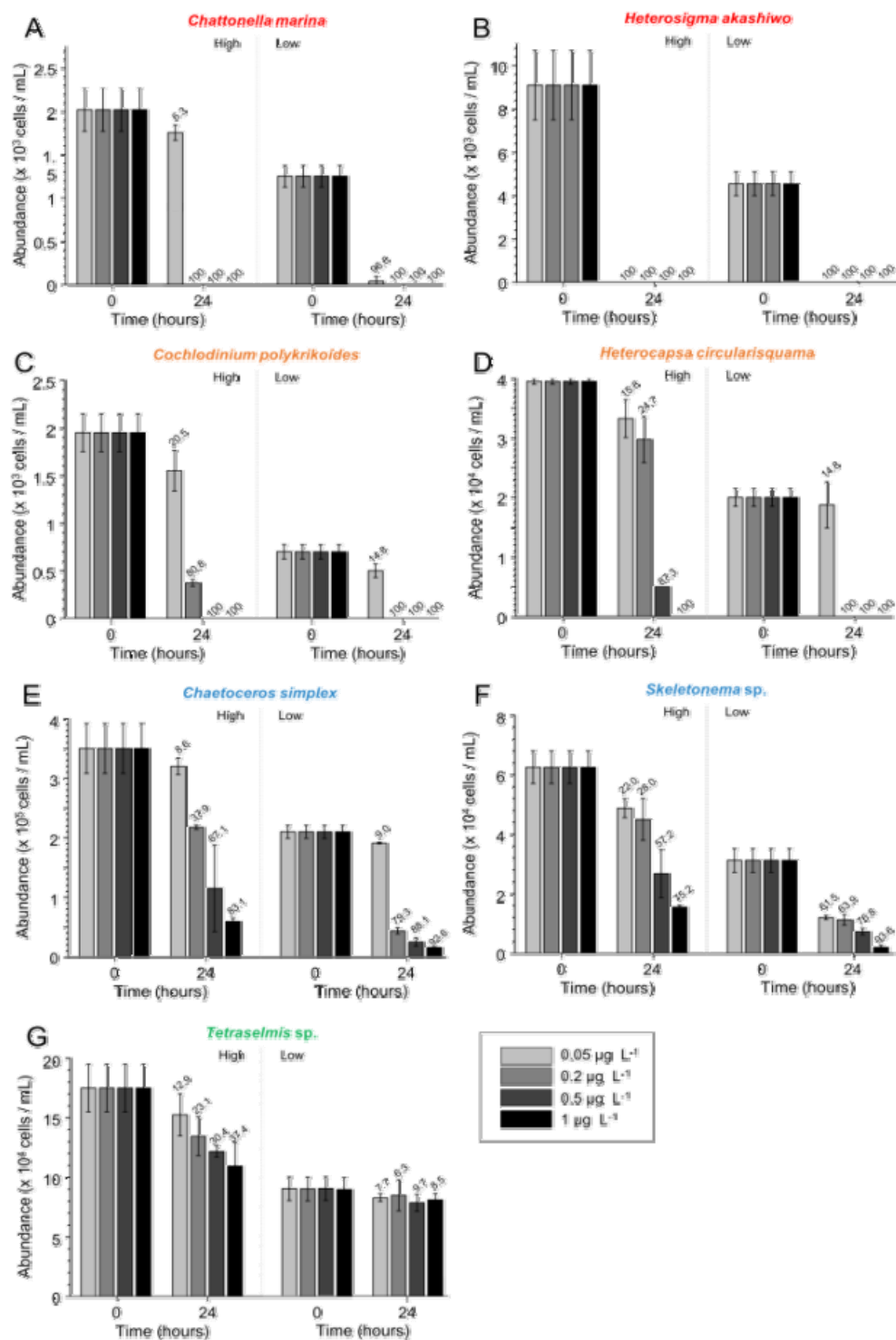


그림 17 다른 생물농도 조건(고밀도, 저밀도)에서 유해종 4종과 무해종 3종의 개체수변화

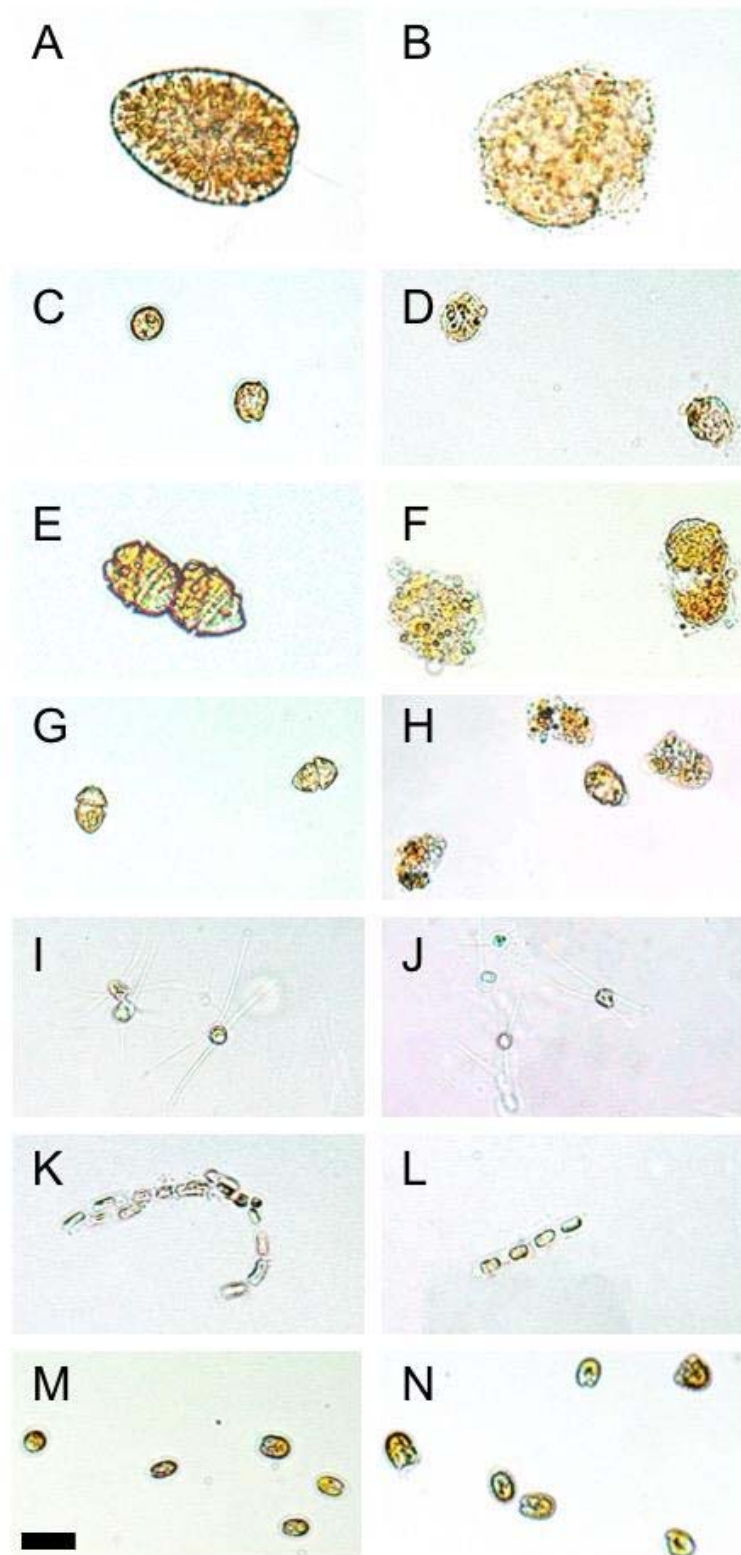


그림 18 . GreenTD 살포 전 후의 유해종 4종과 무해종 3종의 세포사멸

○ 규조류인 *C. simplex*는 고밀도 실험군(3.5×10^5 cells ml⁻¹)과 저밀도(2.1×10^5 cells ml⁻¹)을 다른 유해종보다 10-100배 정도 높은 초기밀도를 접종하였으나, 본 종이 가지는 1세포당 세포 체적은 유해종 *C. polykrikoides*의 1/10수준에 머무는 것을 고려하면, 세포 단위 체적당 초기 개체수 밀도에 대한 값은 합리적으로 접종하였다고 판단됨. 하지만, 무해성 규조류 2종은 GreenTD 0.5 µg L⁻¹농도에서 치명적으로 영향을 받는 것으로 파악되었음. 무해성 녹조류 *Tetraselmis* sp.는 앞서 언급한 광합성활성 결과에서는 전혀 영향을 미치지 않았으나, 개체수는 초기 대비 약간 감소하였다. 즉 본 종은 GreenTD에 영향을 미치지 않을 것으로 판단됨.

○ 살조실험 과정에서 세포 사멸 사진을 그림 18에 나타내었음. 침편모조류 *C. marina*와 *H. akashiwo*는 물질 접종 후 빠르게 세포가 터지 양상을 보였고, 와편모조류 *C. polykrikoides*과 *H. circularisquama*도 유사한 양상을 확인할 수 있었음. 하지만 일부 *H. circularisquama*는 세포 파괴 없이 일정한 형태를 유지하는 것을 볼 수 있었음. 규조류 *C. simplex*와 *Skeletonema* sp.의 경우 규산질 세포벽이 파괴되지 않아 물질접종 후에도 특이적인 형태 변화는 관찰되지 않았음. 특히, 녹조류 *Tetraselmis* sp.는 형태적인 변화는 보이지 않았고, GreenTD 1 µg L⁻¹의 고농도 접종에도 불구하고, 여전히 빠르게 움직이는 개체를 확인하였으며, 이는 앞서 토의한 살조효율과 잘 일치함. 결과적으로 유해 미세조류 침편모조류와 와편모조류는 살조물질의 첨가후 세포가 파괴되어 빠르게 분해되었고, 규조류와 녹조류의 세포파괴는 관찰되지 않았음.

4) 유해성 및 비유해성종의 재성장특성

○ 앞서 언급한 Phyto-PAM장비는 살조물질에 대한 생물의 생사판별을 현미경 검경보다 빠르고 간편하게 적용가능함. 하지만, 살조물질 적용후 생물이 파괴되면서 생성되는 일시적으로 엽록소 형광값을 높게 하는 단점은 있으나, Active Chl.*a*과 F_v/F_m값으로 살조효율을 정확하게 유추할 수 있음. 하지만 24시간 이후에는 파괴된 엽록소 형광값은 안정적으로 관찰할 수 있어, 10-AU 형광장비로 측정이 효율적으로 가능함. 즉 Phyto-PAM 장비보다 시간이 1/10수준으로 장기간 생물의 재성장애 따른 생물활성을 측정 가능함. 따라서 본 연구에서도 미세조류의 재성장 유무를 지속적으로 관찰하기 위해서 10-AU 형광장비로 14일 동안 측정한 결과를 그림 19에 나타내었음. *C.marina*는 GreenTD 0.05 µg L⁻¹농도에서는 일정하게 형광값이 관찰되어 대조군과 유사한 경향을 보였으나, 나머지 농도에서는 재성장하는 특성이 관찰되지 않았음. Baek *et al.*(2014)보고에서 *H. akashiwo*의 성장 단계 별 TD49 물질 접종 실험 결과

에 따르면, 모든 성장 단계에서 $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 높은 TD49 농도에도 불구하고 약 2주 이내에 *H. akashiwo* 재성장이 관찰되었음. 하지만, 본 실험에서는 $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 낮은 농도에서도 재성장이 관찰되지 않은 것으로 보아, GreenTD는 TD49물질보다 살조효능이 더 우수한 것으로 판단됨. *C. polykrikoides*는 대조구가 점진적으로 감소하는 경향이 있지만, Baek *et al.*(2014)의 현장 실험에서도 본 종의 대조군은 고밀도로 유지된 이후 자연적인 사멸단계로 돌입함. 처리군 중 GreenTD $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ 농도의 고밀도 실험군에서 대조구와 유사하게 형광값의 감소를 보였음. 하지만, 시간 경과 후 저농도의 물질 점중에도 *C. polykrikoides*는 대부분 사멸하였고 재성장하는 양상을 관찰할 수 없었음(그림 19).

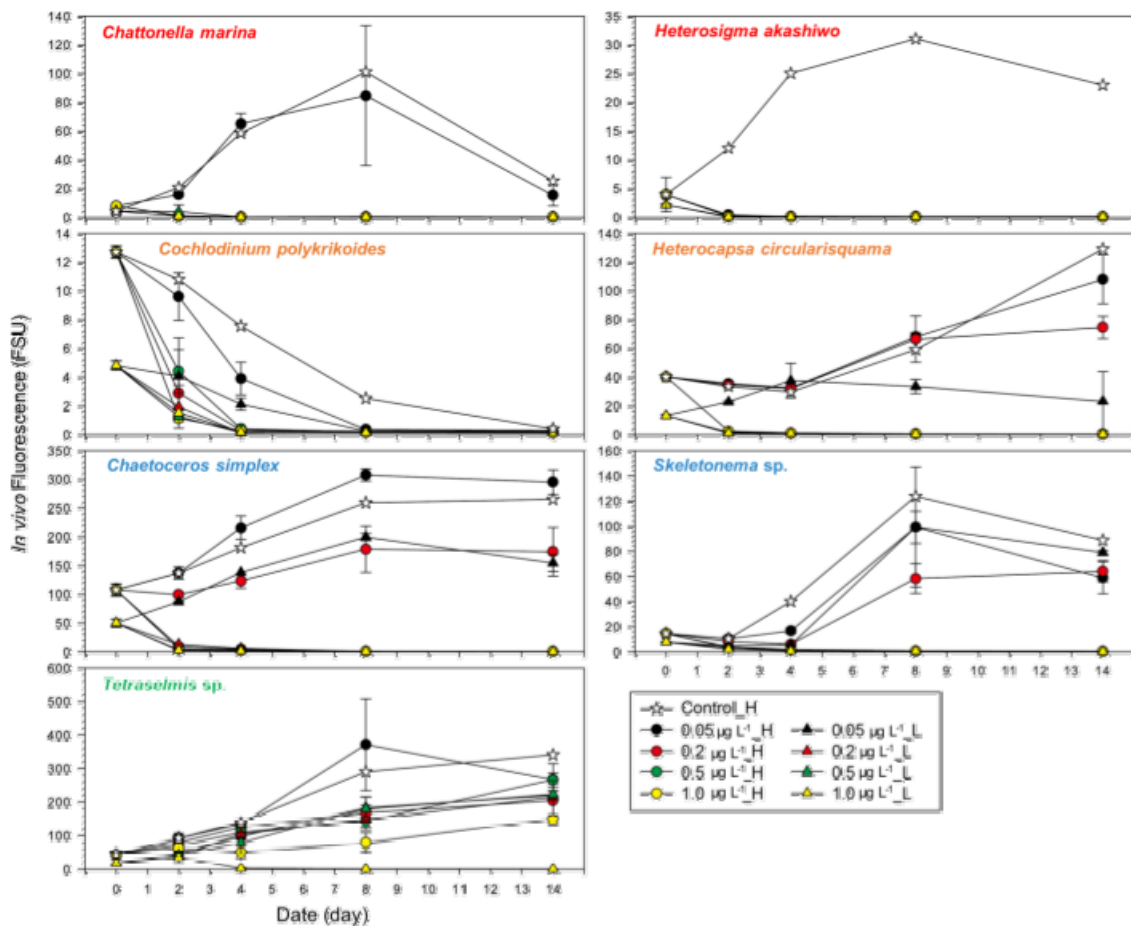


그림 19 GreenTD 물질 접종 후 각 생물군 형광값의 변화에 따른 성장특성

○ 반면, 유해 와편모조류 *H. circularisquama*는 24 이내 80% 이상의 살조효율이 관찰된 실험군에서는 사멸하였지만, 그렇지 않은 실험군에서는 재성장하거나 일정의

개체수를 지속적으로 유지하는 것으로 나타났음. 이와 같은 양상은 Baek *et al.* (2014b)에서 TD49 물질 적용시에도 유사하게 관찰되어, *Heterocapsa*종은 종 특이적으로 살조물질에 대한 내성을 가지고 있는 것으로 파악되었음. 무해성 규조류 *C. simplex*, *Skeletonema* sp.와 더불어 녹조류 *Tetraselmis* sp.는 GreenTD 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도를 제외하면, 물질농도간 차이가 있지만 대부분 실험시작 4일 경과 후부터 재성장을 하였다. 즉, 무해 조류는 일정시간이 경과하면 생물의 재성장이 이루어 질 수 있어, *C. polykrikoides*에 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 을 적용할 경우, 대상생물은 제어할 수 있으면서 무해성 조류에는 크게 영향을 미치지 않을 것으로 판단됨. 지금까지 우리나라에서는 적조생물 *C. polykrikoides*과 일본에서는 *C. marina* 을 방제하기 위해서 다양한 살조물질을 처리하는 실험을 많이 수행되었음. 살조세균 및 천적생물을 이용한 적조생물 구제방식은 주로 피식자-포식자 관계를 이용해 선택적으로 적조생물만 제어하는 친환경적인 방법으로, 선택성이 있으나 현장 적용을 위한 대량배양의 어려움과 희석 및 확산과 같은 현장의 다양한 변수 때문에 실제 현장적용에는 한계가 있음 (Fukami *et al.* 1991; Imai *et al.* 1991; Yoshinaga *et al.* 1995, 1997; Park *et al.* 1998). 본 연구팀이 개발한 GreenTD물질은 다양한 조류에 대한 선택성은 기존의 TD49물질보다 미미하지만, 현장 적용시 편의성과 비용적 측면이 크게 강화되었음. 따라서 우리나라에서 발생하는 *C. polykrikoides*적조와 일본 *C. marina* 적조 방제에 이용하면, 수산양식생물의 피해를 줄일 수 있을 것으로 판단됨.

5) 결론

○ 하계 우리나라 연안내만에서 빈번하게 발생하는 유해적조생물 제어는 수산피해를 최소화하기 위한 중요한 국가적 현안문제임. 본 연구에서는 Thiazolidinedione 유도체 물질인 GreenTD농도 구배별로 유해 미세조류 4종과 무해 미세조류 3종에 대해 생물 고밀도 실험군과 저밀도 실험군에서 살조물질 농도별 살조효율과 선택성을 조사하였음. 유해종에 속하는 침편모조류 *C. marina*와 *H. akashiwo*는 각각 GreenTD 0.5와 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서 단시간에 확실한 효과를 보였으며, 14일 동안의 관찰에서도 재성장을 보이지 않았음. 적조생물 *C. polykrikoides*은 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 이상의 농도에서 광합성 활성이 현저하게 떨어졌고, 살조효율 역시 85%이상으로 나타났음. *H. circularisquama*는 고밀도 실험군에서 GreenTD 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 저밀도 실험군에서는 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 농도에서부터 일정하게 영향을 받는 것으로 파악되었음. 규조류 *C. simplex*와 *Skeletonema* sp.에 대해서는 생물농도가 고밀도일 때 GreenTD 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서는 크게 영향을 받지 않았으며, 초기 일정한 영향을 받은 후 시간 경과와 더

불어 재성장이 이루어졌음. 특히 녹조류 *Tetraselmis* sp.는 최고농도인 GreenTD 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ 에서도 일정하게 높은 값을 유지하였음. GreenTD농도와 생물밀도에 따른 차이가 뚜렷하게 나타났으나, 전반적으로 살조물질의 효과는 침편모조류> 와편모조류> 규조류> 녹조류 순으로 나타났음. 결과적으로 GreenTD물질은 유해종에는 높은 살조능력이 있고, 무해종에는 일시적으로 광합성활성에 영향을 주지만, 시간의 경과에 따라 회복되는 것을 알 수 있음.

2.1.3. 적조생물 *C. polykrikoides*을 이용한 GreenTD 구제효율 검증; 적조구제물질 사용 승인에 관한 고시에 근거한 개체수 밀도($1000 \text{ cell mL}^{-1}$)에서 20L 마이크로코즘 실험

2.1.3.1. 실험배경

1) 적조생물 구제효율(적조 구제효율 고시참조)

○ 적조구제물질 사용승인의 기준에 의하면, 적조생물(*C. polykrikoides*)의 밀도가 $1,000 \text{ cells mL}^{-1}$ 이상인 해수 또는 배양생물조건에서 구제물질 또는 장비를 사용하여 현장 또는 실내 구제효율을 3회(3반복) 실험한 결과 자료 제출이 필요함. 따라서 본 연구에서는 실내에서 20 L 배양용기를 이용하여 대조군과 3개 이상의 반복 처리군을 두어 GreenTD 살포 전과 살포 후 10분, 30분, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h 사이 살조효율을 평가함.

2) 적조생물구제효율검증을 위한 대량 배양 장치 제작

○ 상기 적조 고시에서 언급한 것과 같이 현장에서 적조가 발생하지 않을 경우 실험실에서 적조생물을 배양하여 최소 밀도가 $1,000 \text{ cells mL}^{-1}$ 로 유지시켜 실험을 수행해야 함. 따라서, 본 연구팀은 아래 대량 배양장치를 개발하여, 적조생물을 대량 배양함(그림 20). 현재, 20 L 규모에서 $1,000 - 1500 \text{ cells/mL}$ 를 유지할 수 있는 능력을 보유함. *C. polykrikoides*를 실험실에서 120 L로 배양을 할 수 있어, GreenTD 살조물질 평가를 수행함.



그림 20. 실험실에서 적조생물 *C. polykrokoides*을 120L로 배양하는 과정

2.1.3.2. 실험방법

○ 적조구제물질 고시에 준하는 세포 생물 밀도 $1,000 \text{ cells mL}^{-1}$ 이상으로 배양된 *C. polykrokoides* 120 L를 준비함. 자체 제작한 실내배양기에 20 L씩 대조군과 처리군을 각각 3 반복실험군을 준비하여 *C. polykrokoides* 개체수밀도를 약 $1000\text{--}1100 \text{ cells mL}^{-1}$ 되도록 조절함. 살조물질 농도는 기존 실험결과를 바탕으로 0.5 ppm으로 선정하여 평가함. 살조물질 첨가 후 0 h, 3 h, 24 h, 48 h 경과 시 Phyto-PAM을 이용하여 생물활성도(Fv/Fm), Chlorophyll *a*, Active Chlorophyll *a*를 측정하였음. 적조생물의 사멸유무를 파악하기 위해서 현미경하에서 생물 생사판별(움직임과 세포파괴현상으로 구별함)을 수행함과 각 시간별 *C. polykrokoides*의 개체수를 파악하여, 살조구제효율을 측정함.

2.1.3.3. 실험결과

1) Phyto-PAM 장비에서 측정된 Chlorophyll *a*

○ 대조군 Chlorophyll *a*는 실험 종료시까지 유사한 경향을 파악함. 반면, 처리군 Chlorophyll *a*는 약 3시간 경과 후 일정하게 증가 및 유지 하였으나, 24 h 경과 후 측정되지 않았음(그림 21). 이는 GreenTD 살조물질 접종 후 0.5 h 전후로 세포가 터져, 수계내 엽록소 기원의 물질이 증가하여, 단시간에 일정한 높은 값이 측정된 것으로 파악되었고, 세포가 파괴됨으로 24h 경과 후에는 엽록소가 측정되지 않았음..

2) Phyto-PAM 장비에서 측정된 Active Chlorophyll *a*

○ 대조군의 Active Chlorophyll *a*는 실험 시작에서 종료까지 안정적으로 유지된 것에 됨. 하

지만, 처리군은 3 h 부터 값이 측정되지 않았고, 24h 이후에도 측정되지 않았음(그림 21). 결과적으로 3 h 이후에는 100%사멸된 것으로 판단됨.

3) Phyto-PAM 장비에서 측정된 F_v/F_m

○ 대조군의 큰 변동없이 초기와 유사하게 관찰되었으나, 처리군의 F_v/F_m 값은 Active Chlorophyll a 의 결과와 유사하게 0.5 h경과 후 높은 활성을 보였음. 이후 급격히 감소하여 6 h 경과 후에는 0에 가까운 값을 보였음(그림 21). 결과적으로 3개(Chlorophyll a , Active Chlorophyll a , and F_v/F_m) 측정항목을 종합적으로 검토하면, *C. polykrikoides*의 개체수는 3h 경과 후 치명적인 손상으로 대부분 사멸을 한 것으로 판단됨.

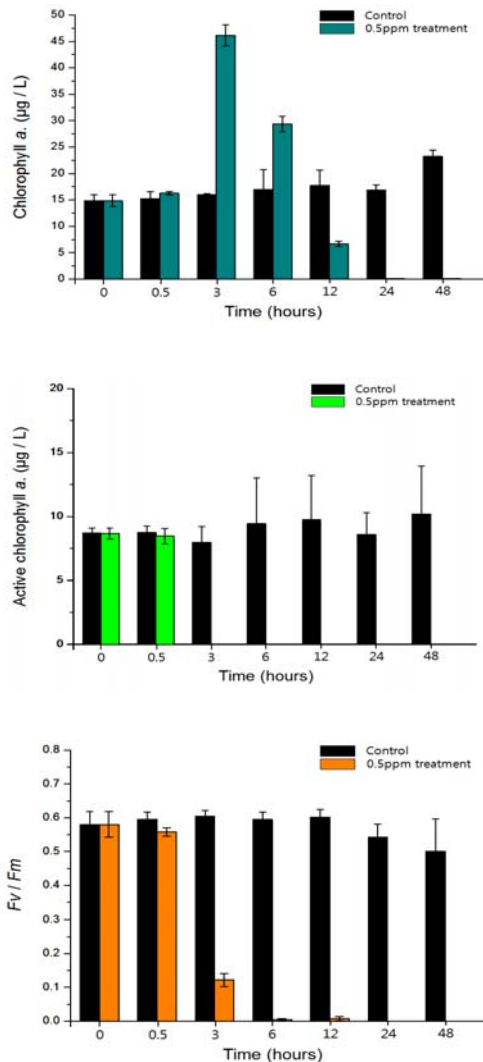


그림 21. GreenTD 0.5 ppm첨가에 따른 시간 별 Chl. a , active Chl. a , F_v/F_m 의 변화

4) *C. polykrikoides* 개체수 밀도의 시계열 변화추세

○ 20 L이상 3 반복구로 적조생물 밀도가 1,000 cells/mL 이상 조건하에 수행한 실험 결과, *C. polykrikoides* 초기 개체수밀도가 1010 cells mL⁻¹ 에서 0.5 h 경과 이후 13 cells mL⁻¹ 로 크게 감소하였음(그림 22). 또한 3 h 경과한 후 *C. polykrikoides* 개체는 전혀 관찰되지 않았고, 앞서 Phyto-PAM장비에서 관찰된 Active-Chl.a결과와 유사한 것을 파악하였음. 따라서 Phyto-PAM장비의 Active-Chl.a은 살조제 처리후 생물의 생사관별을 할 수 있는 과학적인 측정방법으로 합리적인 값을 산출할 수 있는 우수한 장비로 판단됨. 결과적으로 GreenTD 물질에 대하여 적조구제물질 사용승인 고시 기준에 근거하여 10 - 30분 이후 결과의 살조효율로 평가하면, 87.2%의 효율을 보였음. GreenTD는 적조생물 *C. polykrikoides* 을 살조하는데 우수한 물질로 판단됨.

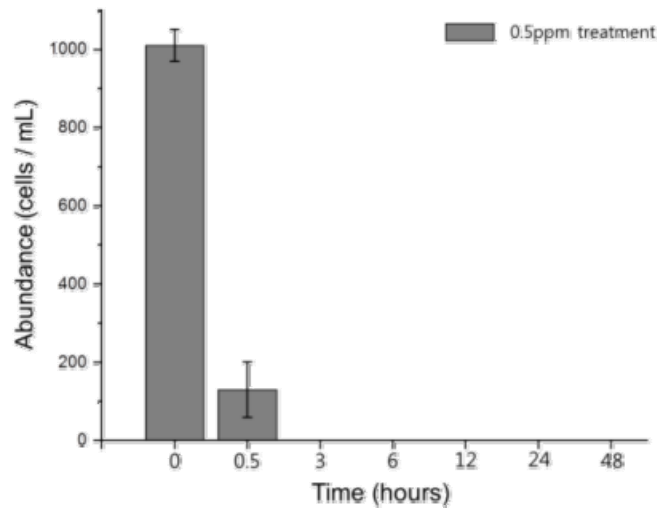


그림 22. GreenTD 0.5ppm첨가에 따른 시간 별 *C. polykrikoides* 생존 개체수의 변화

2.2. 추가 수행 실험

2.2.1. 알테미아와 동물플랑크톤을 이용한 GreenTD 위해성 평가

2.2.1.1. 실험목적

○ 적조대상생물 *C. polykrikoides* 을 제어하기 위하여 특정 물질을 살포하기 전에 생태계 위해성을 평가후, 적조구제물질 사용승인의 고시를 통과할 필요성이 있음. 생태계의 위해성 평가 과정은 적조생물의 살조 유무와 관계없이, 상위 영양단계의 생물군에게 미치는 영향을 파악하는 것이 중요함. 따라서 배양된 알테미아와 현장해수에 존재하는 동물플랑크톤 군집을 이용하여 GreenTD 물질에 대한 생태계에 미치는 위해성 평가를 수행하고자 함.

2.2.1.2. 실험방법

○ 알테미아는 24-48 hrs 부화시켜 움직임이 활발한 생물을 대상으로 평가하였고, 현장 현장 동물플랑크톤군집의 평가는 2017년 하계 8월에 동물플랑크톤 네트를 이용하여 수직 예인한 생물을 채집하여 평가에 이용하였음. GreenTD 첨가농도는 극히 높은 환경에서 적응능이 있는지 평가하기 위해서, 적조생물 살조범위보다 1000-10000배 높은 농도에서 평가함. 즉 GreenTD살조물질 농도는 8000, 4000, 1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0 (ppm)으로 조절하여 평가함. 온도에 따른 차이와 물질의 농도에 따른 차이를 파악하기 위해서 2개의 온도구배(25 ℃, 20 ℃)와 함께 3반복 실험군을 두어 평가함. Green TD 첨가 24 h와 48 h 후, 해부현미경으로 살아있는 알테미아와 자연 동물플랑크톤의 군집의 생사유무를 판별하여, 생태계 미치는 영향을 간접적으로 평가함.

2.2.1.3. 실험결과

○ 실험생물 알테미아와 자연산 동물플랑크톤 군집은 온도 구배에 따른 GreenTD에 대한 영향은 크게 나타나지 않았음(그림 23).

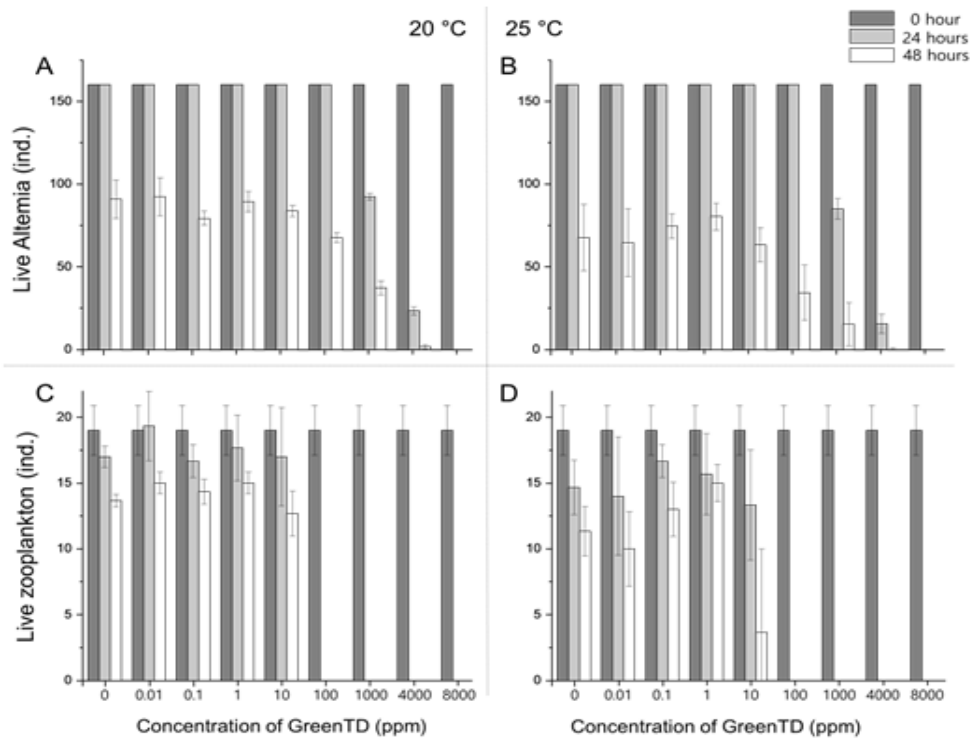


그림 23. GreenTD 첨가에 따른 알테미아 생존개체 및 자연동물플랑크톤의 개체수 변동

○ 특히 알테미아는 24 h 경과 후 100 ppm에서는 영향을 받지 않았고 1000 ppm의 극히 높은 농도에서 약 50%정도 영향을 받는 것으로 나타남. 대조군에서도 48 h 경과후에는 50%의 사망률을 보여서, 48h에 대한 알테미아의 생존율을 평가하는 것은 크게 의미가 없지만, 100 ppm농도에서도 48 h 경과후 대조군과 유사한 사망률을 보인 것으로 보아, GreenTD물질은 알테미아생물에서는 100 ppm 농도이상에서만 일정하게 영향을 받을 것으로 사료됨. 반면, 자연동물플랑크톤군집은 10 ppm부터 영향을 받으며, 100 ppm부터는 모두 사멸하는 특성을 파악함. 즉 자연 동물군집은 대조군에서 시간의 경과와 더불어 사멸하는 특성을 보였지만, 대조군대비 평가하여도 일정히 높은 10 ppm 이상에서는 영향을 받는 것으로 사료됨. 특히 이와 같은 현상은 고수온환경에서 두드러지게 나타나는 것으로 확인됨. 따라서, 해상에 살포하는 GreenTD의 최대 농도가 10 ppm 이하로 설정하는 것이 합리적일 것으로 판단됨. 즉, 적조생물 살조를 위해 고농도의 stock solution을 제조하여 해수 표층에서 1 m 전후로 호수 및 분사기를 이용하여 살포 및 주입하는 최대 농도가 10 ppm이 되지 않게 조율하는 것이 합리적임. 살포 후 선박이 움직이면서 와류를 형성시켜 0m~1m층의 해수 면적을 계산하여(가로1m X 세로1m X 높이 1 m= 1ton 해수에 0.1-0.5 ppm농도로 희석될 수 있게 분사 속도와 선박의 이동속도를 조절함) 살포하면 적조생물을 효과적으로 처리 할 수 있을 것으로 판단됨.

2.2.2. 인공폐쇄생태계를 조성을 위한 메소코즘백 제작

1) 해양생태계 영향조사(적조 고시참조)

○ 적조구체물질 사용승인고시에 근거하여 구체물질의 해양생태계 영향평가는 중형폐쇄생태계(1ton)를 이상의 조건에서 평가하여야 함. 적조생물(*C. polykrikoides*)이 1,000 cells/mL 이상 포함된 적조가 발생한 해역의 해수나 적조생물의 농도가 1,000 cells/mL 이상의 대수성장기의 건강한 개체를 이용하여야 함. 아울러, 이 경우 실험대상 적조생물의 출처가 명확하여야 함.

○ 수질 및 부유생물 : 중형폐쇄생태계에서 수질(pH, COD, 암모니아, 질산, 인산, 규소, 용존 산소, 부유물질)과 동·식물플랑크톤의 정성·정량 조사를 살포 전, 살포 직후 평가

○ 저서생물 : 살포해역 저서생물의 정성·정량 변화를 해양환경공정시험기준에 따라 30일간 평가(중형폐쇄생태계 이용, 0.05 m² 이상의 채집면적에서 2시간, 1일, 2일, 5일, 7일, 15일, 30 일에 채집)

○ 상기와 같은 조건을 충족할 수 있는 실험 디자인이 중요하며, 첫 번째로 구체물질의 해양생태계 영향평가에 대한 중형폐쇄생태계(1ton)의 제작이 필수적임.

2) 해양생태계 영향평가를 위한 폐쇄생태계(메소코즘)을 제작(그림 24)

○ 상기 적조 고시에서 언급한 것과 같이 현장에서 적조가 발생하지 않으면, 적조대상생물을 1톤 이상으로 배양하여, 3회 반복 실험군 구성과 함께 대조군 3개에서 실험하는 것은 불가능에 가까움(총 6톤의 배양생물이 필요함). 따라서 생태계의 위해성 평가는 적조생물이 포함되지 않는 다양한 생물군이 포함되어 있는 자연상태 군집으로 1톤 이상을 실험을 할 수 있도록 적조의 고시를 부분적으로 변경할 필요성이 있음.

○ 현행의 고시를 이행하기 위해서는 적조가 발생한 해역에서 적조생물로 평가하는 방법이 유일한 대안이지만, 적조발생은 년도에 따른 해양환경의 변화의 차이에 따라서 변화특성을 가짐. 따라서, 본 연구팀은 적조가 발생하지 않을 경우에도, 1톤 이상의 실험군을 조성하여 다양한 해양생물에 미치는 영향 평가를 수행하고자 함. 이와 함께, 적조가 발생하였을 경우, 추가로, 적조 발생해역에서도 1톤 이상의 실험군을 조성하여 해양생태계에 미치는 영향을 평가하고자 함(그림 25). 인공생태계에서의 적조구체물질 적용과 생태학적위해성 평가 과정은 그림 26과 같음.



그림 24. 폐쇄생태계(메소코즘)을 수행하기 위해서 백 제작 및 조립과정



그림 25. 실험 진행을 위한 메소코즘 설치 장면(좌: 메소코즘 백 누수점검, 우: 한국해양과학기술원내 메소코즘 pier(과거 자료_앞으로 상기와 같이 실험예정임))

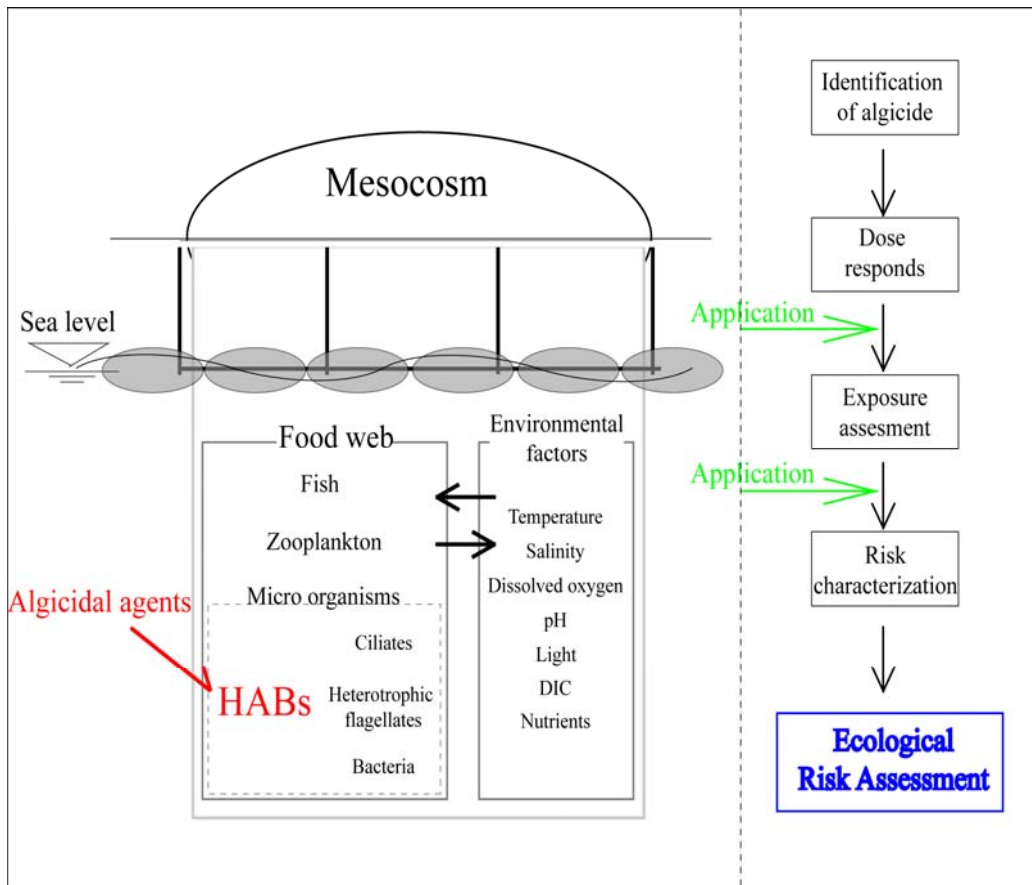


그림26. 인공생태계에서의 적조구제물질 적용과 생태학적위해성 평가 과정

2.2.3. 2018년 8월 통영주변해역 적조탐색조사

○ 2018년 국립수산과학원의 적조속보에 근거하여, 8월 8일에서 8월 10일에 걸쳐 남해도 통영연안 해역에서 *C. polykrikoides* 적조생물의 개체수 동태 및 생태계 위해성 평가를 위한 현장 조사를 수행함. 특히, 적조발생 해역에서 Green TD물질의 살조능 및 적조구제물질 사용 승인을 위한 메소코즘 평가를 수행하기 위하여 조사를 수행함(그림 27). 일반적으로 *C. polykrikoides*의 적조는 DVM (diel vertical migration)을 활발하게 하는 생물로 알려져, 야간에는 영양염류가 풍부한 저층으로 하강하여, 주간에는 다시 표층으로 올라와 광합성을 하는 것으로 알려져 있음. 따라서 *C. polykrikoides*의 적조발생 및 관찰은 PM 14:00이후가 적절하다고 판단하여 3일 동안 오후시간에 적조발생해역을 모니터링하여 적조생물의 개체수 동태를 파악하여, 적절한 개체수가 유지되었을 경우, GreenTD물질에 대한 살조능 평가뿐만 아니라, 생태계에 미치는 영향을 평가하고자 계획함.

○ 8월 8월 PM 14:00 통영 오비도-사랑도 인근해역에서 *C. polykrikoides*의 개체수 밀도를

조사 후, 통영 옥지도 부근으로 대규모 적조가 발생했다는 정보를 바탕으로 PM 14:00~16:00 공간을 이동하여 적조생물을 탐색하였음. 하지만, 옥지도 및 두미도 해역에서는 적조를 발견할 수 없어, 다시 오비도 인근해역으로 장소를 옮겨 지속적으로 조사를 수행함. 통영 사랑도-오비도부근에서 PM 17:00경 *C. polykrikoides*의 적조 띠를 발견하여 개체수밀도를 파악한 결과, 800 cells mL⁻¹로 관찰됨. 따라서, 적조구제물질 사용 승인고시에 준하는 *C. polykrikoides*의 개체수 밀도 1000 cells mL⁻¹이 유지되지 않아, 다음날 추가적으로 모니터링하기 위하여 철수함.

○ 8월 9일 PM 15:00~PM 18:00까지 통영 오비도-미륵도-두미도 해역에서 *C. polykrikoides*의 모니터링을 지속적으로 수행하였으나, 당일에는 적조의 띠조차 발견할 수 없었음.

○ 8월 10일 PM 14:00~PM 17:00 동안, 통영 오비도, 사랑도-두미도-옥지도- 통영항 부근을 조사하였지만, *C. polykrikoides*의 개체수는 극히 낮게 관찰되었고, 규조류 밀도가 기하급수적으로 증가하는 양상을 확인함.

○ 결론적으로, 현장 적조생물을 이용한 생태계 위해성 평가 및 적조구제물질 사용승인 고시에 준하는 실험을 수행할 수 없었음. 따라서, *C. polykrikoides*을 대량 배양하여 실험을 수행함. 아래 2차 실험 참조.



그림 27. 현장 적조생물을 이용한 메소코즘 실험을 위한 사전 모니터링

2.3. 해양생태계 영향평가

2.3.1. 메소코즘을 이용한 GreenTD가 해양생태계에 미치는 영향평가_1차실험(4월)

2.3.1.1. 실험목적

○ GreenTD가 해양생태계에 미치는 영향을 파악하기 위해서 적조생물이 사멸하는 0.2 ppm 농도조건에서 생태계 위해성을 평가함. 상기의 농도는 다양한 소규모 실험의 결과를 바탕으로 낮은 농도에서도 실제 현장에서 적조생물을 사멸시킬 수 있는지 검토하고, 가능하면, 적조구제 물질 사용승인을 받을 수 있는 근거 자료를 확보하기 위해서 수행됨

○ 적조구제물질 사용승인고시에 따르면 수질(수온, 화학적산소요구량, 영양염, 용존산소, 부유물질), 동식물플랑크톤 종 조성 및 개체수 변동, 저서생물 종 조성 및 개체 수 변동이 해양생태계 영향평가항목을 중점적으로 초점을 맞춤

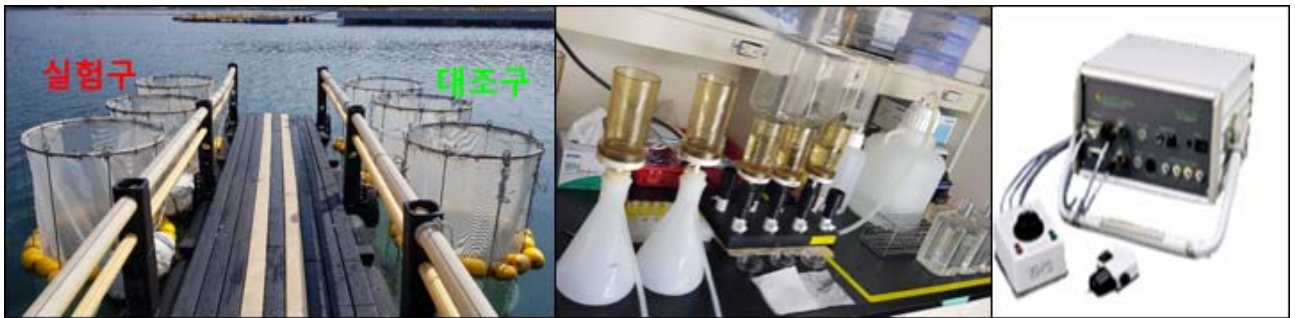


그림 28. 현장 메소코즘실험 모습 및 분석장비

2.3.1.2. 실험방법

○ 실험은 2018년 4월 경남 거제시 장목만에서 1톤 규모의 메소코즘을 제작하여 수행함. 각 대조군(자연해수)와 함께 처리군(자연해수 + 0.2 ppm GreenTD)을 3반복구(triplicate)로 실험을 진행함. 각 실험 시간대별 수온, 염분, pH, DO는 YSI장비로 수행하였고, 이후 메소코즘 백내수계를 잘 혼합한 후, COD, SS 및 영양염등 비생물학적인 요인과 함께 박테리아, 식물플랑크톤, 동물플랑크톤등 생물학적인자를 분석하기 위해서 4L 채수병에 넣어서 실험실로 운반함. 아울러 각 시간별 적조생물의 생사판별을 위한 현미경 검경과 함께, phytoPAM장비를 활용하여 생물활성(chlorophyll *a*, active chlorophyll *a* & *Fv/Fm* 값)을 평가하였음. 해양수산부 적조구제물질사용승인에 관한 고시 기준에 알맞은 분석을 위해 물질 접종후 1, 3, 6, 12 h 후 생태계 반응을 조사하고 이후 15일간 지속적으로 모니터링을 수행함(그림 28).

2.3.1.2. 실험결과

1) 환경요인

○ 실험기간동안 온도는 16.1°C에서 19.8°C까지의 변폭을 나타내었으며 실험구와 대조구 모두 메소코즘 외측의 실제 수온과 유사한 경향을 보였음. 염분은 32 psu 내외를 유지하였으나 실험기간 중 내린 소량의 강우로 인해 실험 종료 12일차에 외측에 비해 1가량 떨어진 값을 기록함. pH는 처리군과 대조군에서 8 전후의 값을 유지하였음. DO는 GreenTD 접종 후 2일차부터 처리군에서 점차적으로 감소하였음. 특히 처리군의 DO는 실험 7일차 8.5 mg/L 근처 값으로 폭 감소하였으나, 9일부터 다시 증가하여 실험종료 13일차에 다시 감소하였음. 대조군의 DO는 식물플랑크톤의 성장으로 인해 10 mg/L 근처까지 증가 후 13일차까지 서서히 감소함(그림 29)

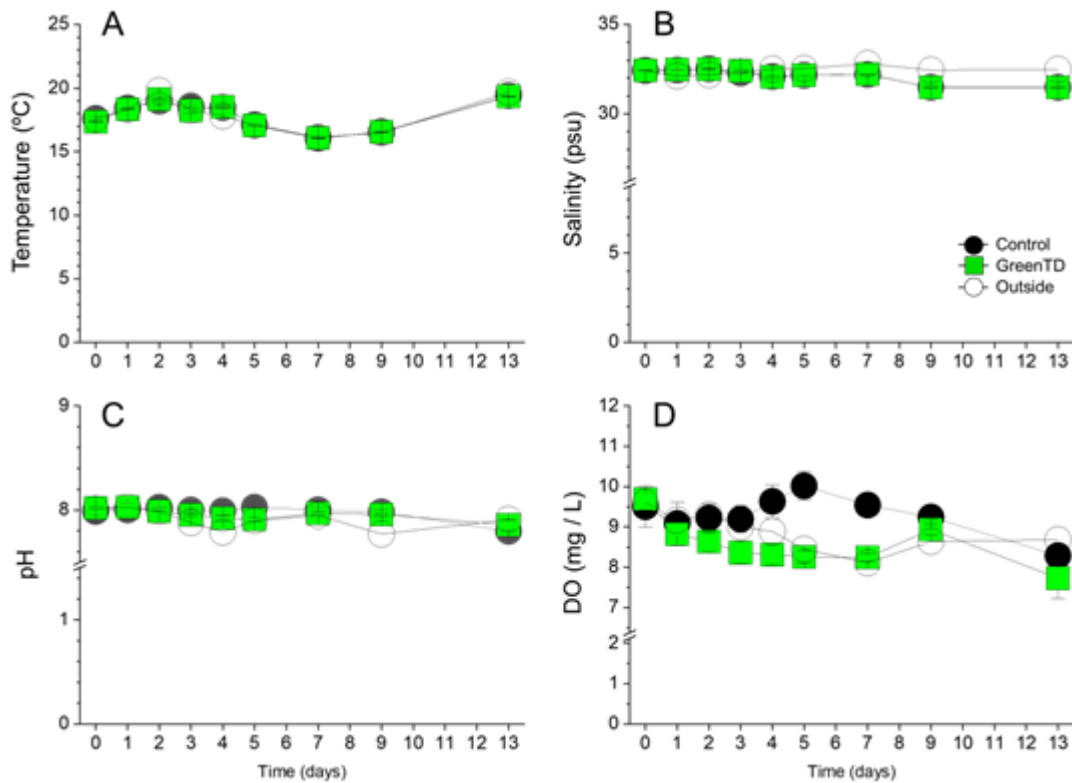


그림 29. 실험기간동안 환경요인의 변화. A: 수온, B: 염분, C: pH 그리고 D: 용존산소

2) 생물요인 _식물플랑크톤

○ GreenTD 접종 후, 처리군에서 2일부터 식물플랑크톤의 개체수가 급격히 감소하여, 5일까지 낮게 유지하였음. 특히, 7일부터 nanoflagellate의 번성으로 식물플랑크톤의 총 개체수가 급

격히 증가하였고 이후 실험종료 13일에는 서서히 감소하는 양상을 보였음.

○ 대조군의 식물플랑크톤의 총 개체수밀도는 실험 시작 후 2일까지 생물적응으로 오히려 감소하였지만, 3일부터 증가하였음. 그 후 5일에 약 4100 cells mL⁻¹로 최고치를 기록한 후 실험 종료 13일에는 감소하는 양상을 보였음. 이는 종료시점에 영양염류의 고갈로 식물플랑크톤의 개체수가 급격하게 감소한 것으로 판단됨.

○ 실험 초기 식물플랑크톤은 규조류가 우점하였으며, 주요 우점종은 *Pseudo-nitzschia* spp. 와 *Chaetoceros* spp.로 나타났음. 특히 대조군에서는 초기 식물플랑크톤 군집이 실험 종료까지 유사한 군집구성 비율을 보였음. 반면, 처리군에서는 규조류의 비율이 4일차부터 급격히 감소하였으며 7일차에는 nanoflagellate로 천이되는 양상을 파악함(그림 30)

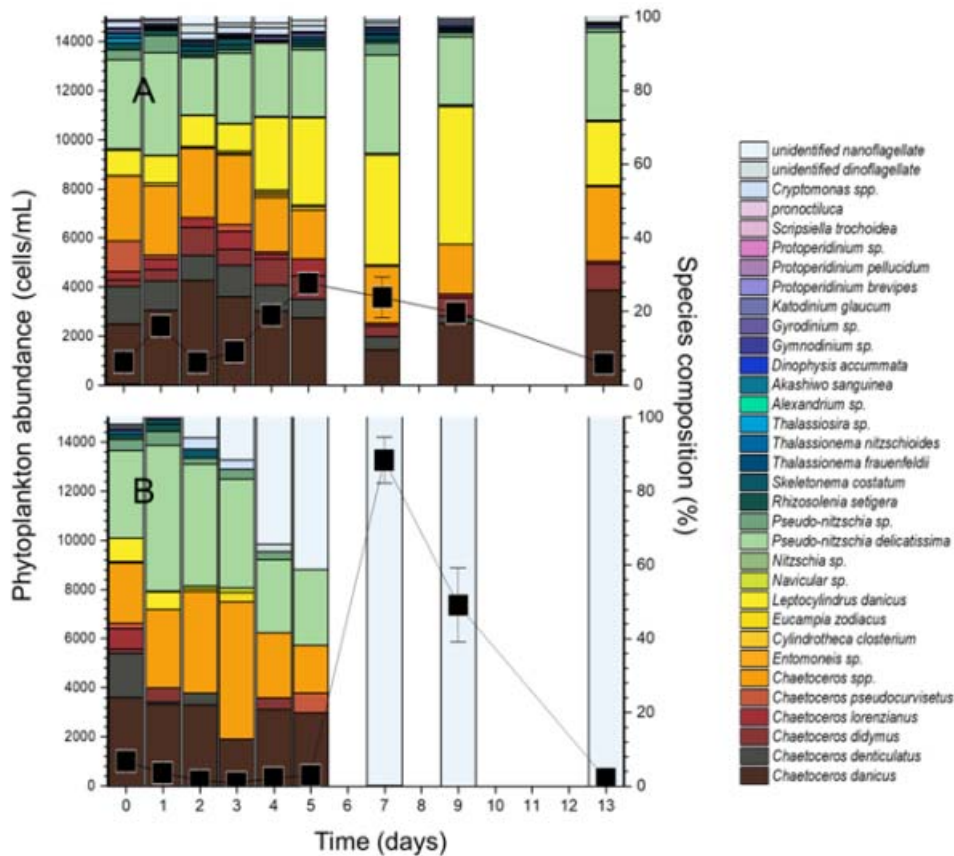


그림 30. 식물플랑크톤의 개체수와 종조성의 변화 A: 대조구, B: 실험구

3) 생물요인 _Active Chlorophyll *a* & *Fv/Fm*

○ 살조물질 GreenTD 처리군에서 Phyto-PAM장비의 Chl.*a* 농도는 이후 2일후 0.25 µg/L까지 감소하였고, 이는 대조군 대비(대조구: 3.48 µg/L) 약 1/15 수준으로 감소하여, 생물에 영향

을 미치는 것으로 파악됨. 특히 active Chl *a*은 거의 제로에 가까운 수준까지 감소하여, 생물의 활성에 일정한 영향을 미치는 것으로 파악됨. 반면, 7일부터 nanoflagellate의 증가로 인하여 일정하게 회복되는 것을 파악하였음. 특히 Fv/Fm 값에서도 1일과 2일에는 0.2 수준 까지 낮게 떨어졌으나 nanoflagellate의 성장과 함께 0.6 근처까지 증가하는 것을 확인함. 즉 5일 이후에는 천이 현상으로 식물플랑크톤의 인공생태계가 거의 회복되는 것을 파악함.(그림 31)

4) 생물요인 _동물플랑크톤

○ 처리군의 동물플랑크톤 개체수는 GreenTD 처리 2일 후, 1 L당 6개체 수준으로 급격히 감소한 후 실험 기간 종료시까지 낮은 개체수를 유지함. 대조군의 동물플랑크톤 개체수는 실험 3일까지 1 L당 200개체 근처의 높은 생물량을 나타냈으나 4일차부터 7일차까지 서서히 감소하였으며 7일차 이후 다시 서서히 증가하는 경향을 보임(그림 32)

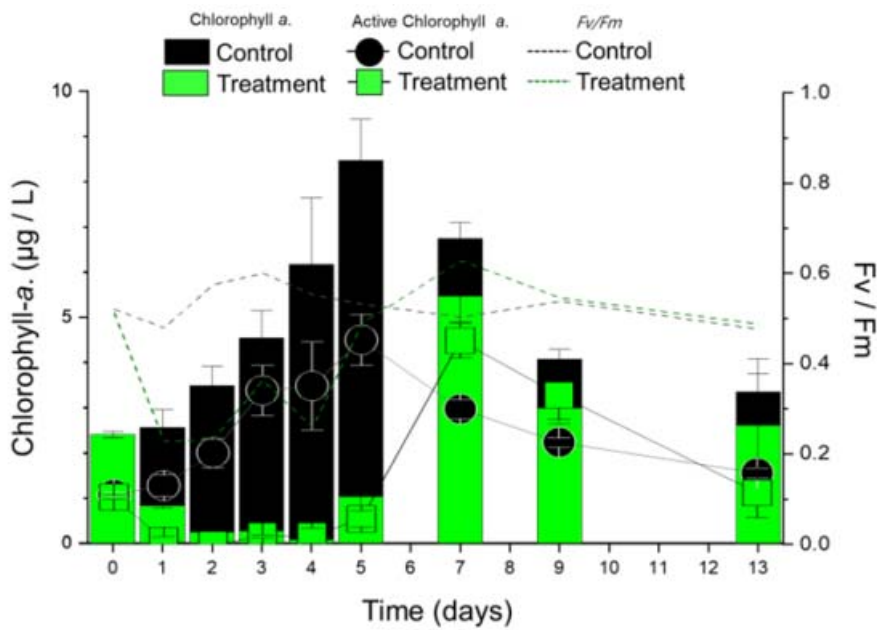


그림 31. 메소코즘 실험기간동안 Chlorophyll *a*, active Chlorophyll *a*, Fv/Fm 값의 변화

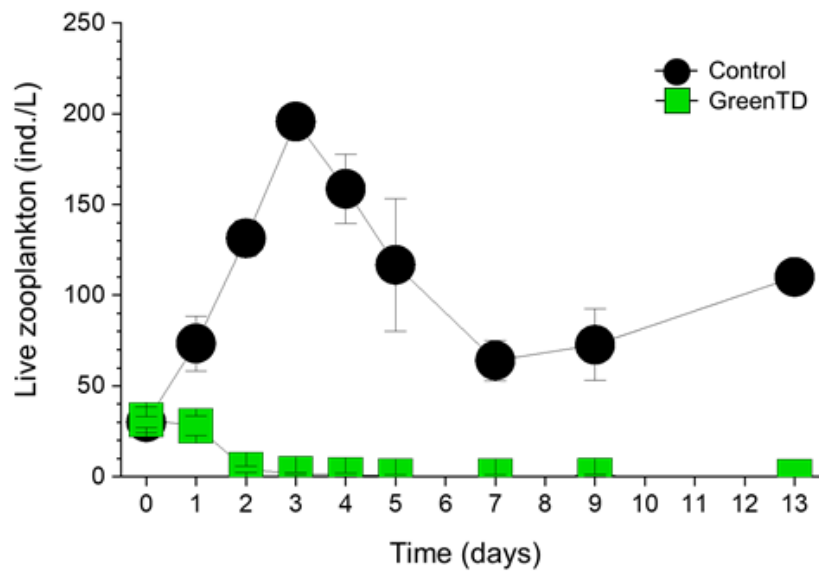


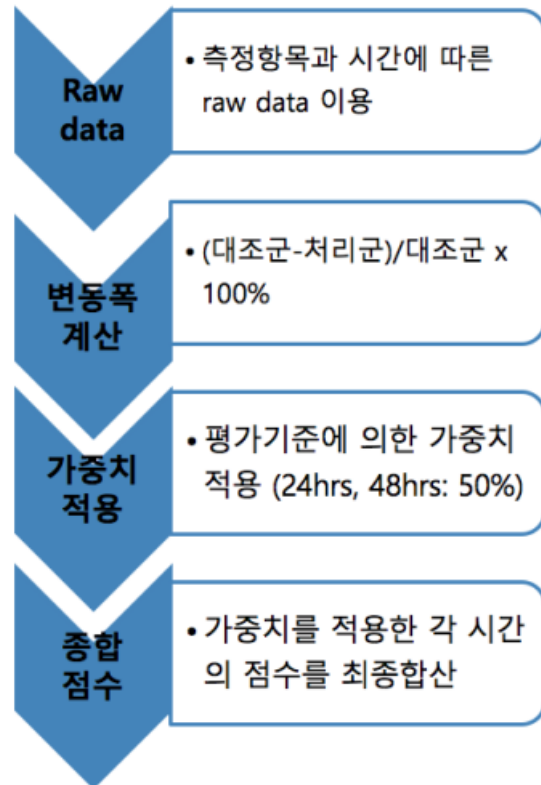
그림 32. Mecrocasm 동안 live zooplankton의 개체수 변화

2) 점수 평가

○ 적조구제물질 사용승인 고시 기준으로 구제물질 GreenTD의 현장실용성평가 결과, 종합점수 83점(추천에 해당됨)으로 평가되었음(표 4, 5). 평가에 대한 각 항목의 점수는 아래의 표와 같음.

○ 적조고시를 기준으로 한 구제물질 GreenTD의 현장실용성평가 결과, 종합점수 83점(추천에 해당됨)으로 평가되었음. 특히 가중치 및 몇가지 평가항목이 누락되었음에도, 전반적으로 높은 평가점수를 받았음. 향후 향상된 재평가가 필요하지만, 본 결과만으로도 충분히 우수한 물질임을 확인하였음.

점수 적용 방법



구제효율	평가항목	0h	0.5h	살조율	평가점수					
		C.p 개체수	1010	130	87.13	4				
생물영향	평가항목	0h	0.5h	생존율	평가점수					
		알테미아 개체수	160	160	100.00	5				
생태계-수질	평가항목	0h	24h	48h	가중치환산	24h	48h	sum	Aver	평가점수
	수온	17.35	18.33	19.12		2.84	5.10	5.25	5.25	5
	pH	8.02	8.03	7.99		0.06	0.19			
	DO (mg/L)	9.69	8.82	8.64		4.47	5.42			
	암모니아	0.00	0.00	0.00						
	질산	0.00	0.00	0.00						
	인산	0.00	0.00	0.00						
	규소	0.00	0.00	0.00						
	부유물질 (mg/L)	0.03	0.04	0.03		5.72	1.81	7.53		
COD (mg/L)	2.64	2.60	2.77		0.15	0.47	0.62			
생태계-부유	평가항목	0h	24h	48h	가중치환산	24h	48h	sum	Aver	평가점수
	식물개체수(cells/L)	1010000	531667	211667		23.68	39.52	63.20	48.88	2
	식물다양성									
	동물개체수(ind./L)	31.3	28	4		5.27	43.61	48.88		
동물다양성										
생태계-저서	N. D									
사용방법	5									
경제성	5									

표 4. 구제물질 점수 평가 과정

	기준치	평가점수(1-5)	기준치적용	최종점수
구제효율	5	4	20	83
생물영향	2	5	10	
생태계-수질	3	5	15	
생태계-부유	4	2	8	
생태계-저서	4	5	20	
사용방법	1	5	5	
경제성	1	5	5	

표 5. 구제물질 점수 평가 결과

2.3.2. 메소코즘을 이용한 GreenTD가 해양생태계에 미치는 영향평가_2차 실험(9월)

2.3.2.1. 실험목적

○ 적조구제물질 사용승인 고시에 의하면, 살조물질 살포후 시계열 수질(수온, 화학적산소요구량, 영양염, 용존산소, 부유물질), 동식물플랑크톤 종 조성 및 개체수 변동, 저서생물 종 조성 및 개체 수 변동이 중요함. 이에 대한 해양생태계 영향평가를 수행하여, 적조구제물질 사용승인 고시에 대응할 수 있는 기본 자료(2일 평가)와 함께, 심위위원회의 전문가들이 평가할 수 있는 중장기적인 자료를 확보하기 위해서 부유생물의 동태 및 수환경요인에 관한 추가적인 자료를 12일(1-2주)까지 확보하기 위함. 아울러, 선행된 실험에서 최적의 농도로 제시된 0.4 ppm 농도의 GreenTD가 현장 생태계에 미치는 영향을 구체적으로 평가하기 위하여 본 실험을 디자인함.

2.3.2.2. 실험방법(전체 과정)

○ 1톤 규모의 메소코즘을 제작하여 한국해양과학기술원 남해연구소가 위치한 장목만에서 실험을 진행함
○ 구조류가 우점한 자연해수를 현장에서 이동식 펌프를 이용하여 메소코즘백 6개에 약 1톤씩 주입함. 대조군과 실험군을 각 3개씩 구성하여 평가하였으나, 실제 적조구제물질 사용승인 고시에서는 살조물질 처리 전과 후를 평가하는 항목에 관해서 3반복군을 두어 평가결과를 제시하도록 권고하고 있어, 일부러, 대조군실험에 대한 결과를 구체적으로 언급할 필요성이 없음. 따라서 대조군 3반복실험군중, 1반복 실험군만 reference로 활용하고, 2반복 실험군에서는 적조개체수밀도의 차이를 두어 실제 현장에서 일어날 수 있는 중천이 양상을 평가하고자 함. 따라서 대조군 2반복 처리군에 관해서는 구체적으로 언급하지 않았고, 본 연구에서는 reference와 함께 GreenTD 처리군에 대하여 구체적으로 언급함(그림 33).

○ 적조생물 *Cochlodinium* 100 L 와 *Alexandrium affine*(80%)+ *Cochlodinium*(20%)를 공기주입식 배양장치(400L)에서 배양하여 1톤의 메소코즘 백에 나누어 접종함(그림 34, 35, 36).

○ 대조군과 함께 3반복 처리군에 대한 환경요인 및 화학-생물학적 요인(수온, 염분, pH, DO, 화학적산소요구량, SS 및 영양염, Chl. *a*, 식물플랑크톤 종조성, 동물플랑크톤 종조성)을 12일 동안 모니터링함

○ 각 메소코즘 백의 수온, 염분, pH, DO의 변동양상은 YSI장비를 이용하여, 현장에서 측정하였고, 메소코즘 백 내 시료의 균일성을 확보하기 위해서 시료를 균일하게 혼합한 후, 4L 무균채수병에 옮겨 담아, 실험실로 운반함.

○ 영양염류는 GF/F필터로 시료를 여과하여, HgCl로 고정 후 냉동 보관하였으며, 이 후 아질산과 질산성 질소, 인산염, 규산염, 암모니아성 질소를 Parsons *et al.* (1984)의 분석법에 따라서 영양염 자동분석기 (Autoanalyzer QuikChem 8000; Lachat Instruments, Loveland, CO, USA)를 이용하여 분석하였고, 각각의 영양염 농도는 표준해수를(RMNS, KANSO Technos Co., Ltd., Japanhemical Industries, Osaka, Japan)을 이용하여 보정하였음.

○ Chl. *a*농도는 각 시간별 채수한 시료를 GF/F여과지에 여과한 후 여과지를 냉동보관한 후 실험 종료후 일괄적으로 90% 아세톤 용액에 24h 냉암조건에서 추출한 후, 형광광도계(10-AU)로 측정하여 값을 산출함.

○ 화학적산소요구량(COD)와 SS는 해양환경공정시험법을 토대로 측정하였으며, 아래의 실험방법에 관해서 구체적으로 언급함.

○ 식물플랑크톤의 종조성과 현존량 분석을 위하여 샘플을 Lugol's solution을 이용하여 최종 농도 1%로 고정하였고, 종 동정 및 계수는 50 ml로 농축된 시료를 Sedgewick-Rafter counting chamber 에 100~300 μ l 분주하여 광학현미경하(100~400배 배율)에서 분석.

○ 동물플랑크톤 종조성과 현존량 분석은 샘플 2 L를 200 μ m mesh에 필터한 후 포르말린으로 고정하였으며, 이를 광학현미경하(50~100배 배율)에서 분석하였고, 0.2-20mm의 Mesozooplankton을 대상으로 동정 및 계수하였음.

○ 해양수산부 고시 기준에 준하는 분석을 위해 물질 접종 후 0h, 0.5h, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h 후 생태계 반응을 조사를 수행하였고, 전문가가 구제물질의 독성을 객관적으로 평가할 수 있도록 12일동안 지속적으로

모니터링함.

○ 실험기간동안 PAM을 이용하여 chlorophyll *a*, active chlorophyll *a* 그리고 F_v/F_m 값을 모니터링하여, 살조구제물질 살포후 1차 생물의 반응을 동시에 평가함.

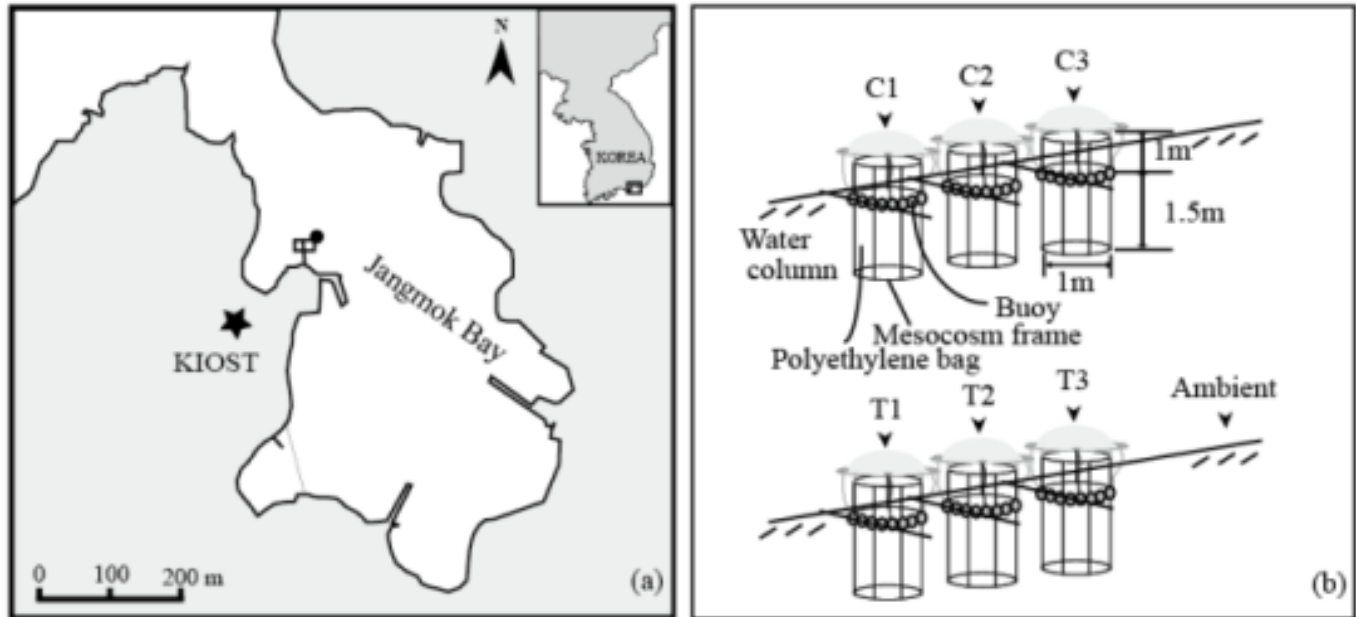


그림 33. 메소코즘의 정점 및 실험 모식도



그림 34. 공기 주입식 대량배양장치에서 적조생물 대량배양

	메소코즘 추가 해수 및 조류	GreenTD 최종농도
Control 1 (C1)	현장수 (1000L)	X
Treatment 1 (T1)	현장수 + 유해조류 (100L)	0.4ppm
Treatment 2 (T2)	현장수 + 유해조류 (100L)	0.4ppm
Treatment 3 (T3)	현장수 + 유해조류 (100L)	0.4ppm

그림 35. 대조군과 처리군의 실험디자인



그림 36. 현장 메소코즘과 실험 모습

- 화학적산소요구량(Cheical Oxygen Demand:COD)측정법

○ 측정원리

해저퇴적물 중 유기물량은 퇴적물의 환경을 평가하는데 중요한 척도 중의 하나로 사용됨 일반적으로 유기물량의 측정은 강열감량법이나 유기탄소량 측정법 등을 이용하여 직접 정량하는 방법이 주로 사용됨. 반면 유기물이 산화될 때 환경에 미치는 영향을 알아내기 위해, 유기물이 산화될 때 소비되는 산소량을 측정하는 방법이 있는데, 이를 화학적 산소요구량(COD: Chemical Oxygen Demand)이라 한다. 화학적 산소요구량은 퇴적물 내 유기물을 강한 산화제로 산화시킬 때, 소모되는 산소량으로 정의함. 산화제로는 과망간산칼륨 혹은 중크롬산칼륨 등을 이용하나, 측정범위가 넓은 과망간산칼륨법을 보다 많이 활용됨. 이 방법은 생물학적 산소요구량, 유기탄소량 혹은 유기물량과 상관관계가 좋은 것으로 알려져 있으며, 퇴적물 오염의 지표로 많이 사용됨.

2. 시험방법

- 50 mL 삼각 플라스크에 시료 25~50mL를 취하고 20% 수산화나트륨용액 1mL를 넣어 알칼리화 시킴.
- 여기에 0.025N 과망산간칼륨용액 10mL를 넣은 다음 플라스크에 냉각관을 붙이고 수욕(water bath)의 수면이 시료의 수면보다 높게 하여 60분간 가열함.
- 냉각관의 끝을 통하여 증류수로 세척한 다음 냉각관을 떼어내고, 냉각시킨 다음 10% 요오드화칼륨용액 1mL를 넣고, 10% 황산용액 5mL를 넣어 유리된 요오드를 지시약으로 녹말지시약 2mL를 넣고 0.025N 티오황산나트륨용액으로 무색이 될 때까지 적정함.
- 따로 시료량과 같은 양의 증류수를 바탕용액으로 하여 같은 조건에서 바탕용액 시료의 시험을 수행한 후 해수시료의 화학적산소요구량은 다음과 같은 식에 대입시켜 화학적 산소요구량(COD)를 산출함(그림 37).

$$\text{COD (mg/L)} = (A - B) \cdot f \cdot 1000 / V \cdot 0.2$$

A : 바탕용액 적정에 소비된 0.025 N 티오황산나트륨용액(mL)

B : 해수시료 적정에 소비된 0.025 N 티오황산나트륨용액(mL)

f : 0.025 N 티오황산나트륨용액의 역가 : 제6항 용존산소 1.7. 티오황산나트륨용액의 검정에 따른다.

V : 시료의 양(mL)

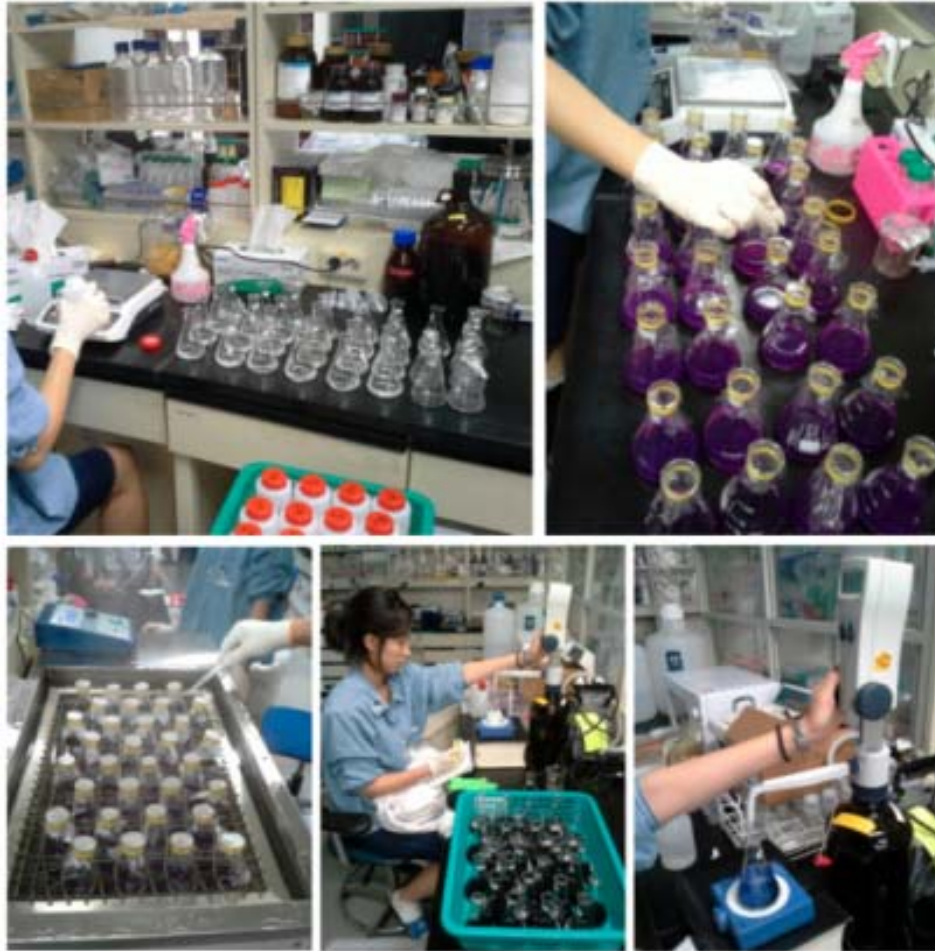


그림 37. COD분석 계산식과 과정

- 실험방법(부유물질; Suspended Solid; SS)

1. 측정원리

현장에서 채수된 시료를 미리 무게를 알고 있는 여과지 Nucleopore, membrane(공경 0.45 μm), GF/F(공경 0.7μm)에 여과한 후 105~110°C에서 일정하게 건조하여 여과지의 무게를 달아 증가한 무게를 부유물질의 양으로 평가함.

2. 시험방법

- GF/F여과지를 진공으로 흡인되는 여과기에서 증류수로 염분이 완전히 제거될 때까지 반복하여 여과 세척함.

- 건조기를 이용 105~110°C에서 2시간 이상 건조시킨 후 데시케이터에 넣어 방냉 한 다음 전자저울로 무게(mg)를 측정함.

- 일정 부피의 잘 혼합된 해수시료를 준비된 5.2항의 여과지에 진공으로 흡인되는 여과기로 여과한 후 여과지의 염분을 제거하기 위하여 약 10 mL의 증류수로 3회 반복하여 여과 세척함. 이때 시료 여과시에는 여과지의 물기가 거의 제거되도록 추가로 3분간 흡인·여과함.

- 건조기를 이용 105~110°C에서 1시간 이상 시료 여과지를 건조시킨 후 데시케이터에 넣어 방냉한 다음 전자저울로 무게(mg)를 측정함

- 부유물질의 양을 여과 전(B)과 후(A)의 무게차이를 여과한 시료의 부피(V)로 나누어 계산함

$$\text{부유물질의 양(mg/L)} = (A-B)/V$$

V : 여과한 시료의 부피(L)

- 실험결과자료에 관한 언급방법
- 실험은 적조구제물질 사용 승인에 관한 고시를 근거하여 48시간까지 고시 조건으로 실험을 수행하였으며, 총 12일간 추가적인 관찰을 수행함
- 실험은 아래와 같은 시간 간격으로 샘플링 하였으나, 이하 그림은 해석의 편의를 위하여 등간격으로 나타냄 (그림 38)

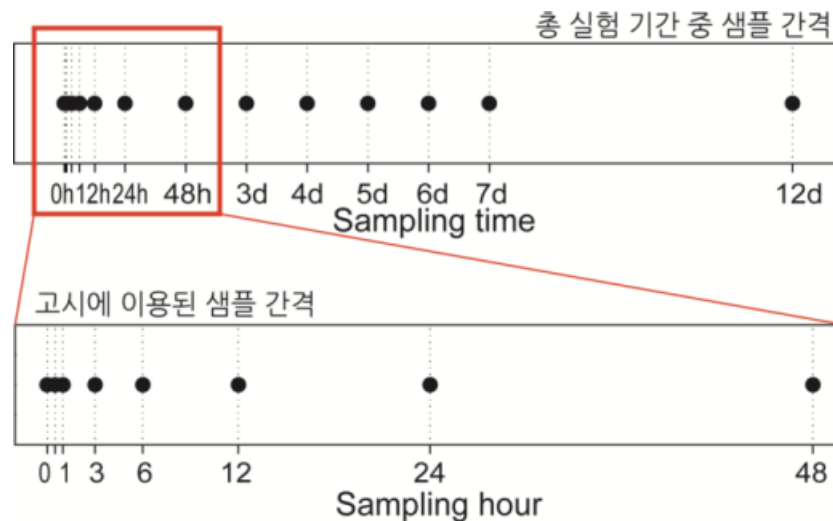


그림 38. 총 실험기간 중 시료 분석 및 적조구제물질 사용승인 고시 기준 분석

2.3.2.3. 실험 결과

1) 환경요인 수온, 염분도, 용존산소, pH

○ 수온은 22℃ ~ 25℃의 범위로 시간 변화에 따라 소폭 변화하였으나, 일반적인 가을철 수온 범위를 보였다. 하지만, 실험 시작 2일 후부터 5일까지 수온이 지속적으로 1.0-1.5℃ 증가하는 양상은 태양 복사열에 의하여 백내 수온이 균일하게 올라간 것이 주된 원인이고, 이후의 감소는 시간경과에 따른 수온 하강의 영향과 함께 강우의 영향으로 백 주변해역의 해수가 점차적으로 하강한 결과로 판단됨(그림 39).

○ 염분의 변화는 12일차에 다소 하락한 것을 제외하면 거의 없었으며, 실험군의 염분이 대조구보다 약간 낮게 관찰됨. 이는 초기부터 실험생물을 넣어 염분이 조금씩 다르게 출발한 것에 기인된 것이며, 현장에서 설치된 메소코즘 백 내 염분의 변동양상은 초기 대비 유사한 변화추이를 보였고, 수온이 증가하는 실험 2일 후부터 점차적으로 미세한 상승 폭을 보였으나, 실험 종료시 염분이 1-2 psu 낮게 관찰됨, 이는 실험 7일 이후, 산발적인 강우의 영향으로 메소코즘 백내 염분을 현저하게 하강시킨 주된 원인으로 파악됨.

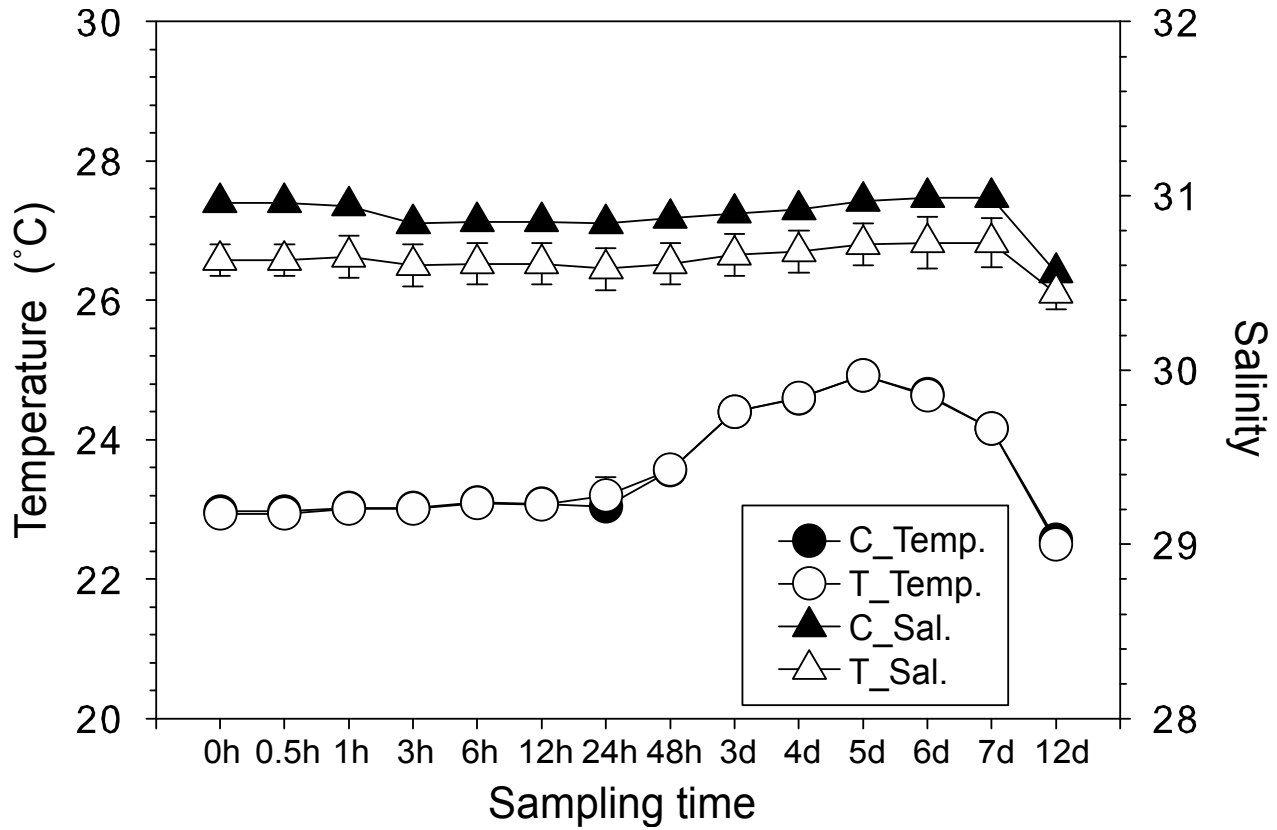


그림 39. 메소코즘에서 대조군과 처리군의 수온과 염분변동

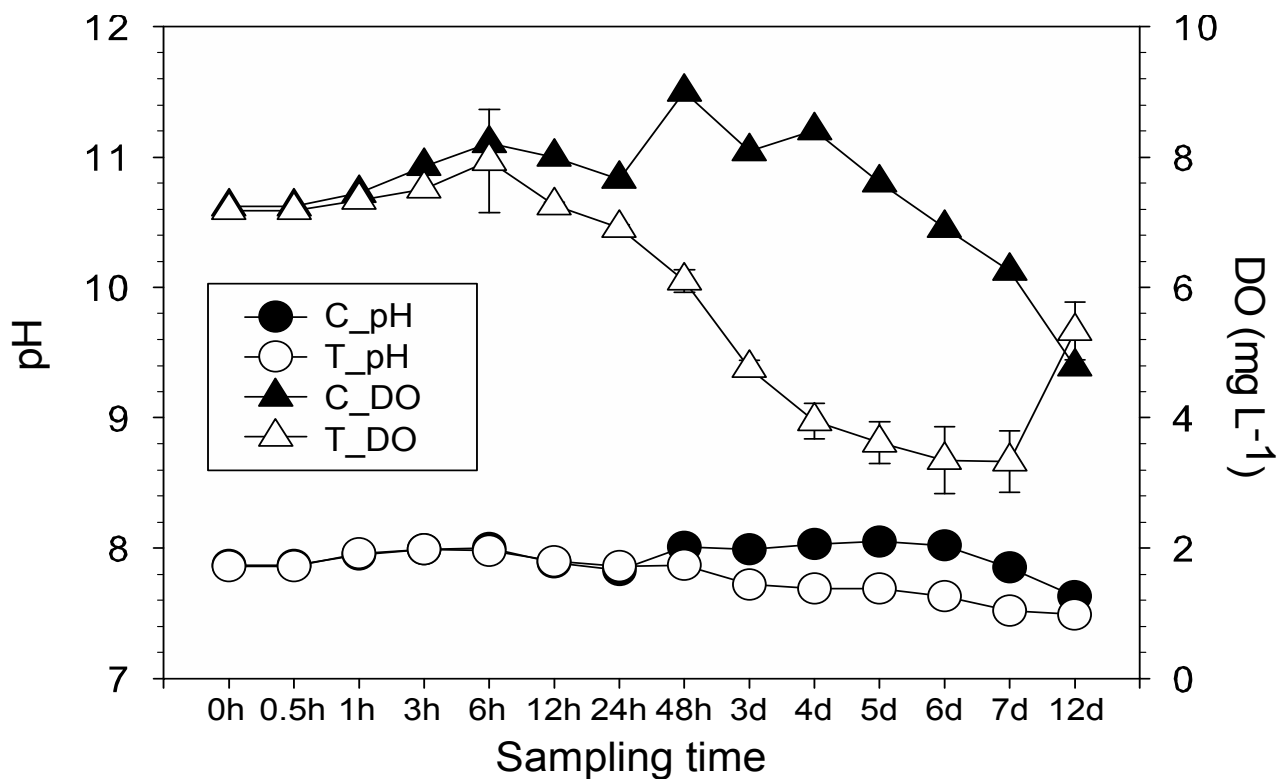


그림 40. 메소코즘에서 대조군과 처리군의 pH와 DO농도 변화

○ Green TD살조물질을 처리한 후 24시간을 기점으로 대조군과 실험구의 pH의 차이가 미미하게 나타나기 시작함. 이 후 실험 6일 경과후 최대 0.4의 차이를 보였으나, 대조군 및 GreenTD 처리군의 초기 대비 pH의 변동폭은 그다지 크지 않을 것으로 판단됨(그림 40).

○ 용존산소(DO)는 실험 시작후 대조군을 포함하여 처리군에서도 약간 증가하는 양상을 보였으나, 6h 경과 후 처리군에서는 점차적으로 감소하는 특성을 보였음. 특히, 처리군에서 실험 6일째 3.50 mg L⁻¹ 전후로, 7일 째는 가장 낮은 3.33 mg L⁻¹으로 관찰됨. 이후 12일째에는 회복되어 5.8 mg L⁻¹으로 관찰되어 대조군보다 최종적으로 조금 높게 관찰됨. 반면, 대조군에서도 실험 2일 후 점차적으로 감소하기 시작하여, 실험 종료일까지 지속적으로 DO가 급격히 감소함.

2) 환경요인 영양염

○ 대조군의 영양염은 규산염을 제외하고 초기 3시간 동안 일정하게 감소하는 양상을 보였음. GreenTD처리 군에서는 암모니아와 규산염의 변동은 거의 관찰되지 않았으나, 질산염+아질산염과 인산염이 소폭 하강하는 특색을 보였음(그림 41).

○ 질산염+아질산염 농도의 변화양상은 대조군에서 초기부터 점차적으로 내려갔으나, 3h 이후부터 24h까지 증가하는 양상을 보였음, 이후 감소와 증가를 반복하였으나, 1 μM 전후의 변동폭으로 식물플랑크톤의 증식에는 크게 기여하지 않았을 것으로 판단됨. 반면, 처리군에서는 48h까지는 현저한 감소를 관찰되지 않았고, 이는 살조제의 영향으로 식물플랑크톤이 증식할 수 없어, 일정하게 지속적으로 영양염류가 소모되지 않은 결과로 판단되며, 이후 점차적인 감소는 살조제 처리 후 일정시간의 경과와 더불어 식물플랑크톤이 아질산+질산염을 일정하게 소비한 결과로 판단됨. 특히 3일경과 이후에는 대조군과 처리군의 질산염+아질산염의 변동양상이 유사하는 것이 특이적임.

○ 암모니아의 농도는 이후 3시간 후부터 처리군에서 일정하게 증가하는 양상을 관찰되었음. 이는 살조제 처리 후 박테리아의 분해과정에서 생성된 암모니아가 재생성된 것으로 판단됨. 아울러, 3h 이후 대조군의 암모니아도 처리군과 비교하여 현저한 증가는 관찰되지 않았지만, 일정하게 증가하고 있는 경향을 파악함. 특히 처리군에서는 24h 경과 후 암모니아의 농도가 점차적으로 감소하는 경향을 관찰하였고, 3일 이후에는 대조군과 처리군에서 암모니아의 변화양상은 명확하지 않았음.

○ 인산염농도의 시계열 변화추이는 대조군과 처리군에서 유사한 경향을 보였고, 특히, 처리군에서도 인산염 농도는 점차적으로 감소하여 3일째는 최저농도(0 μM)로 관찰됨. 이후, 대조군과 처리군에서 0.1 μM 전후의 변화폭을 보였으나, 실험 종료시 대조군에서만 0.25 μM 로 조금 증가한 양상을 확인함.

○ 규산염의 변동양상은 처리군에서 거의 관찰되지 않았으나, 대조군에서는 12h 이후 지속적으로 감소하여, 3일째 규조류 증식에 필요한 최소 농도이하로 떨어짐. 이후 규산염 농도는 조금 증가하는 양상을 보였으나, 이는 식물플랑크톤의 증식에는 크게 기여할 수 없는 농도레벨로 판단됨. 반면, 처리군의 시계열 규산염 농도의 변화는 4.0 μM 전후로 큰 폭으로 변화하지 않은 특색을 보였는데, 이는 규산염을 영양염원으로 하는 규조류의 증식이 현저하게 일어나지 않은 결과로 사료됨.

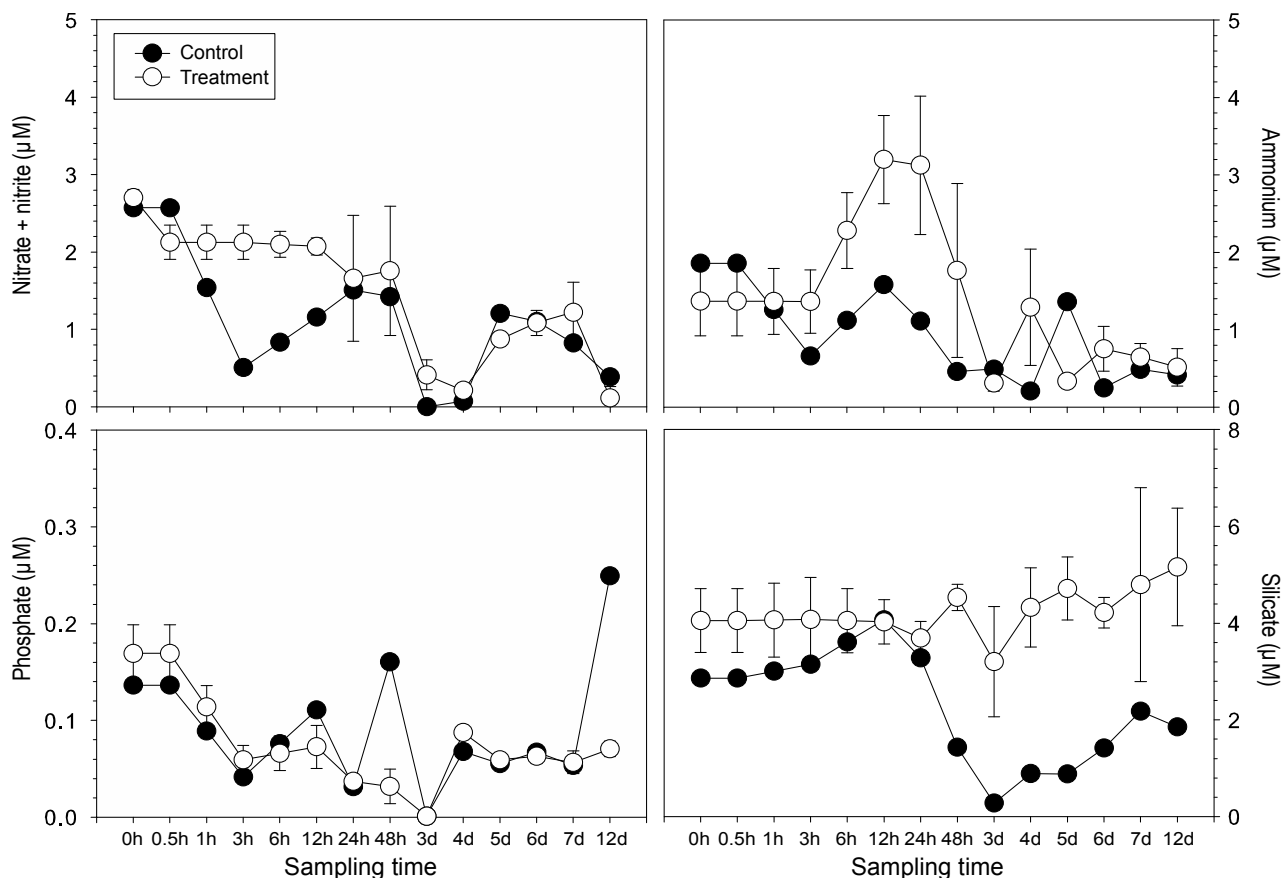


그림 41. 메소코즘에서 대조군과 처리군의 영양염류 농도 변화(질산염+아질산염, 암모늄, 인산염, 규산염)

3) 환경요인_COD

○ 적조구제물질 사용 승인에 관한 고시에 근거하여 48시간까지의 화학적 산소요구량 측정은 필수 항목으로, 12시간까지 대조군과 실험구의 차이가 크지 않았음(그림 42).

○ 특히, COD농도는 12h 까지 대조군과 처리군에서 비슷한 양상으로 평형 및 소폭 감소를 유지하였으나, 12h이후 대조군에서는 급격히 증가하였으며, 처리군에서는 지속적으로 소폭 감소하는 경향을 보였음.

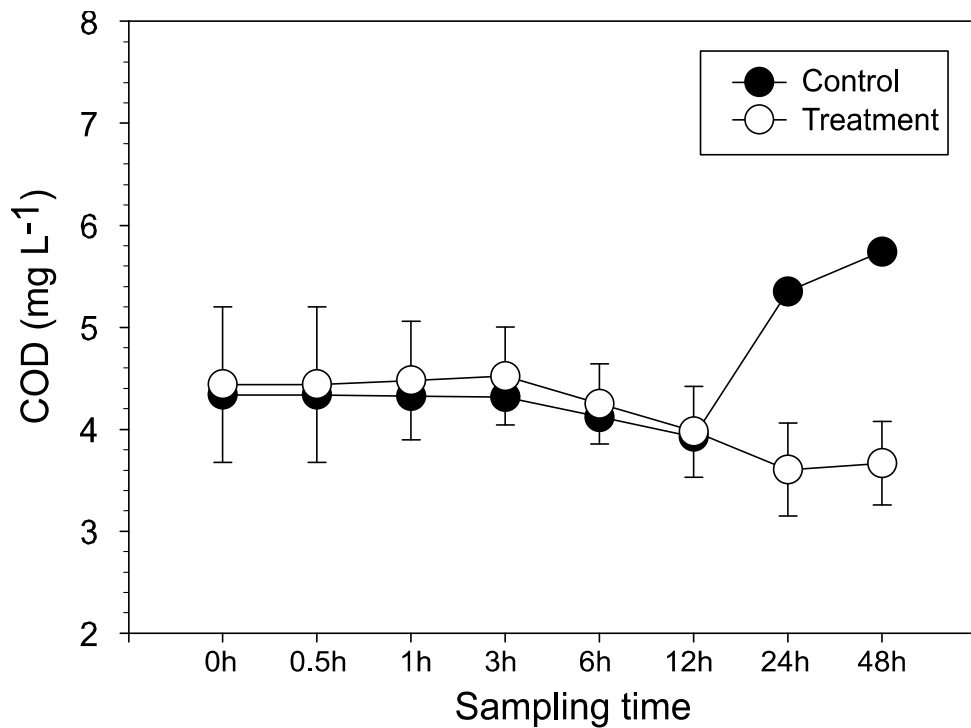


그림 42. 메소코즘에서 대조군과 처리군의 COD 변동

4) 환경요인(48h) _부유물질

○ 부유물질은 대조군에서 12시간까지 소폭 증가하였으며, 이후 48 h에는 큰 폭으로 증가하였으며, 이는 식물플랑크톤의 현저한 증식에 의한 결과로 판단됨. 반면, 처리군에서는 24 h까지 전반적으로 점차적으로 감소하는 양상을 파악함. 특히 대조군과 처리군의 부유물질 변화 폭은 크게 관찰되지 않은 것이 특징임(그림 43).

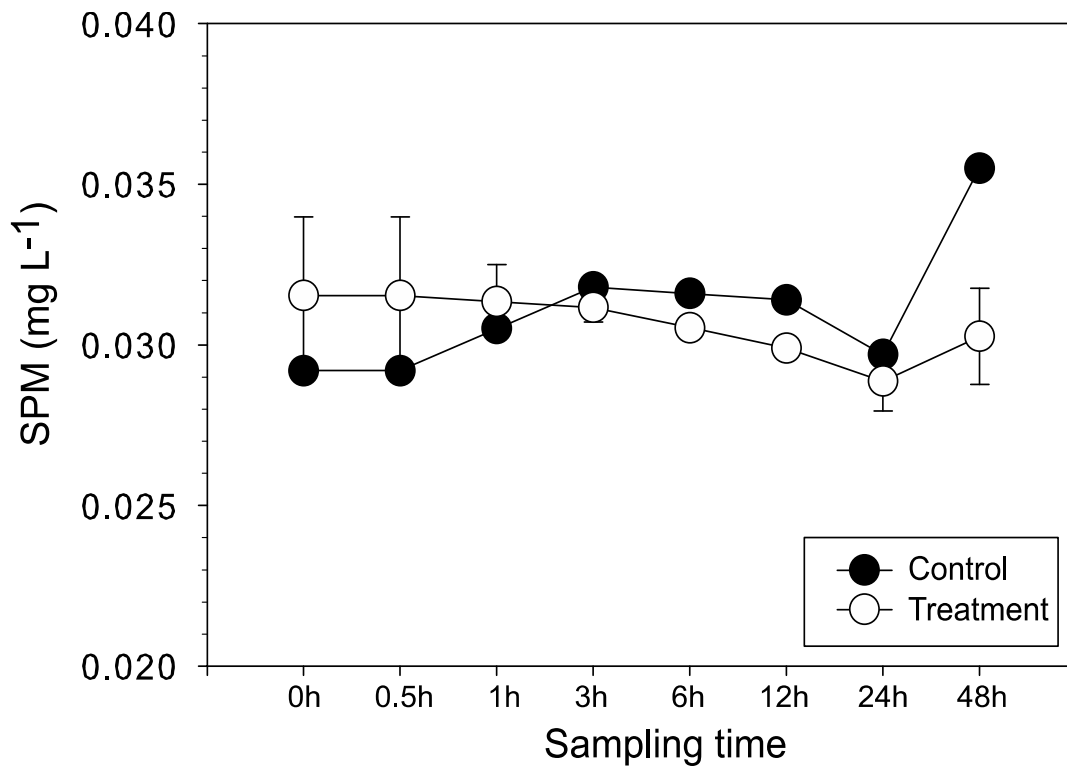


그림 43. 메소코즘에서 대조군과 처리군에서 부유물질 변동

5) 생물요인 Fv/Fm , Chl. *a*, Active Chl. *a*

○ 식물플랑크톤의 활성을 평가할 수 있는 Fv/Fm 값은 초기 0.6이상으로 상대적으로 높게 유지시켜 실험을 진행함. 대조군의 Fv/Fm 값은 7일까지 0.4이상의 활성이 유지되었으며, 12일차에 감소하는 경향을 보였음. 특히 처리군에서는 1h을 기점으로 서서히 감소하기 시작하여 48h에는 0.15로 극히 낮은 값을 보였으나, 이후 점차적으로 회복되는 경향을 관찰함. 만약 Green TD 를 해양에 살포후 3h 이내 적조생물을 빠르게 사멸시킬 수 있으면, 그 후 해수의 회색 효과를 고려하지 않아도, 48 h 경과 후부터 다른 생물의 생리활성에는 크게 영향을 미치지 않을 것으로 판단됨(그림 44).

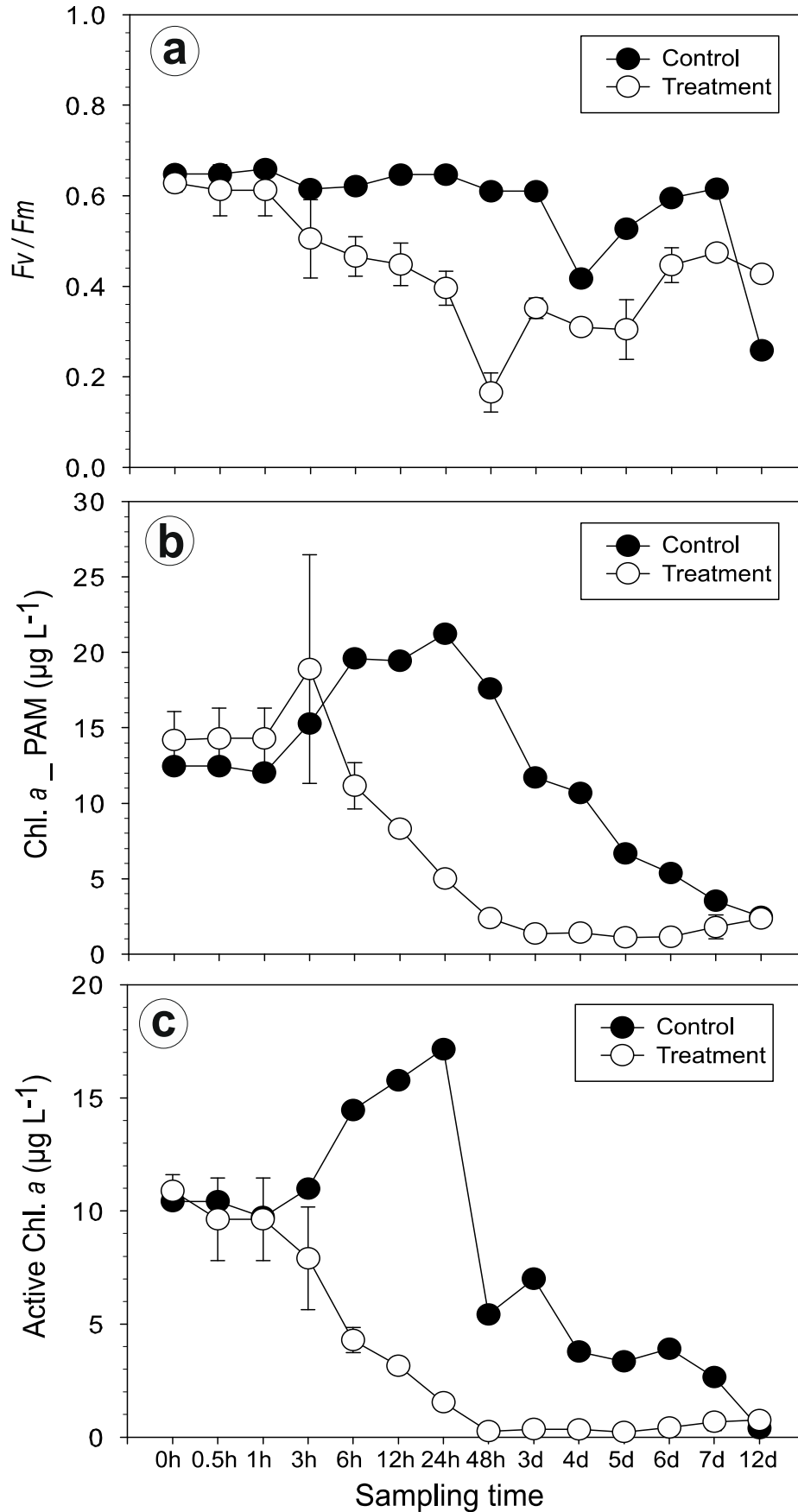


그림 44. 메소코즘에서 대조군과 실험군의 생물의 생리활성(Fv/Fm , Chl. *a*, Active Chl. *a*)

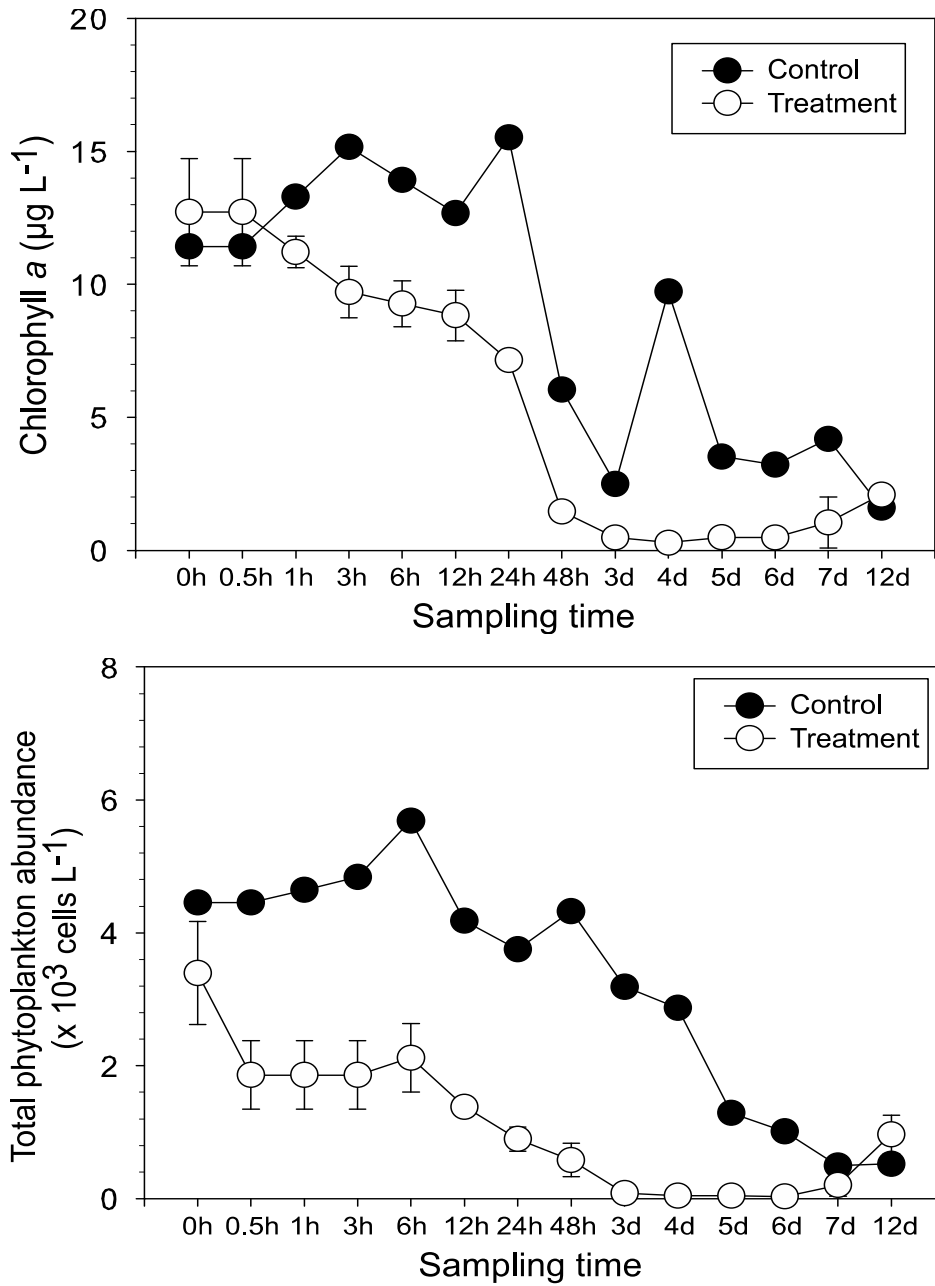


그림 45. 메소코즘에서 대조군과 실험군의 Chl. a 농도와 총 식물플랑크톤 개체수 변동

○ Phyto_PAM을 이용한 Chl. a 값을 살펴보면, 실험 1 h 경과까지는 대조군과 처리군의 Chl. a 값이 유지되었음. 하지만, 대조군의 Chl. a 값은 3h~24h 동안 지속적으로 증가한 후, 48h 이후 천천히 감소하는 경향을 보였음. 처리군에서는 3 h 까지 일시적으로 일정량 증가하였고, 이는 메소코즘내 적조생물이 살조물질에 영향을 받아 세포가 파괴되는 과정에서 세포 팽창과 함께, 세포 내부 엽록소가 수중으로 분산되면서 일시적으로 증가한 양상으로 파악됨. 이전 연구에서도 TD물질을 살포후 일시적으로 3h까지 엽록소가 증가하는 경향을 파악하였고, 이는 TD물질이 세포를 파괴하면서 엽록소에 현저하게 영향을 미칠 수 있다는 것을 간접적으로 시사할 수 있음. 하지만, 3h 이후 Chl. a 값은 급격히 감소하기 시작하며, 48h 부터는 거의 측정되지 않았음.

○ Active Chl. a 값은 광합성 생물의 생리활성을 파악할 수 있는 중요한 측도로 활용 가능함. 따라서 살조제 처리후, 적조생물의 생사유무를 판단하는 중요한 인자로 이용할 수 있음. Active Chl. a 값은 대조군과 처리군에서 실험 1h 경과까지는 변화폭 없이, 일정한 값을 유지함. 이후, 대조군에서는 실험 시작 후 3h ~ 24h 동안 현저한 증가를 보였고, 24h 때 최고치에 도달함. 실험 48h 후에는 대조군에서도 급격하게 감소하여 초기(10 mg m⁻³) 대비 1/2의 수준으로 나타난 후, 지속적으로 Active Chl. a 값이 감소하는 양상을 보였음. 반면, 처리군에서는 Green TD 처리 이후 3h 경과부터 지속적으로 Active Chl. a 값이 감소하여, 실험 48h에는 값이 거의 관찰되지 않았지만, 실험 종료일에는 처리군에서도 일정하게 식물플랑크톤이 재성장하는 것을 파악됨. 아래 단락에서 식물플랑크톤의 천이양상을 구체적으로 언급함.

6) 생물요인 Chl. a, 식물플랑크톤

○ 아세톤으로 추출한 총 Chl. a 농도와 총 식물플랑크톤 개체수의 경향은 유사하게 나타났음(그림 45). GreenTD 살조물질 처리군에서는 Phyto-PAM을 이용한 결과와 유사하게 Chl. a의 농도는 실험 1h 이후부터 급격히 감소하여 48h 에는 1.5 mg m⁻³으로 관찰된 후, 지속적으로 감소하여 실험5일까지는 0.2 mg m⁻³ 이하로 관찰되었음. 이후 총 Chl. a값이 천천히 상승하여, 실험종료시 2.0 mg m⁻³전후를 보여, 대조군보다 약간 증가한 결과를 보였음. 반면, 대조군에서는 전반적으로 실험 48h 까지는 증가하는 양상을 보였고, 그 후 영양염류의 고갈로 식물플랑크톤의 현저하게 감소한 결과, 총 Chl. a값이 점차적으로 감소함.

○ 대조군과 처리군의 식물플랑크톤의 총 개체수의 변화양상은 Chl.a값과 유사한 경향을 파악함. 즉, 처리군에서는 현저하게 식물플랑크톤의 개체수가 감소한 후, 실험 종료시 조금씩 증가하는 양상을 파악하였고, 대조군에서는 일정한 기간동안 총 개체수가 증가한 후 기하급수적으로 감소하는 양상을 파악함. 이는 영양염류의 고갈로 인한 변동 양상으로 파악됨. 즉 영양염류가 고갈은 특정 식물플랑크톤의 개체수 밀도를 현저하게 떨어뜨려, 식물플랑크톤의 천이를 유발하는 중요한 인자로 파악됨.

○ 식물플랑크톤 종조성의 초기 우점종은 규조류로 나타났고, 대조군과 처리군에서 명확한 차이를 보였음. 실험기간동안 대조군에서는 *Chaetoceros* spp.가 극우점하는 양상을 보였고, 다음으로 외편모조류 *Alexandrium affine*이 높은 밀도를 유지하였음(그림 46과 47). 이는 분리 배양된 종을 메소코즘에 접종한 결과가 잘 반영된 것으로 사료됨. 메소코즘 실험 시작후 GreenTD의 영향으로 대조군과 비교하여 처리군에서 식물플랑크톤의 총 개체수가 급격히 감소하는 것을 파악하였고, 식물플랑크톤 군집조성은 48시간(2일) 경과까지는 유사한 경향을 보였음. 하지만 3일차부터 대조군에서 규산염이 고갈되면서, 규산염을 영양염으로 하는 규조류가 천천히 감소하였음. 반면, 상대적으로 규조류의 감소로 인하여 *Alexandrium affine*의 비율이 높게 나타났고, 시간 경과와 더불어 *Alexandrium affine*의 점유율이 높아지고 있었음. 특히, 처리군에서는 실험 3일 경과후 외편모조류가 대부분 사멸되었으며, 초기 우점 종인 *Chaetoceros* spp. 또한 매우 낮은 개체수를 유지하는 특성을 보였음. 즉 처리군에서 외편모조류는 명확하게 제어되는 것을 파악할 수 있었고, 규조류 군집에서도 *Chaetoceros* spp.은 일정한 영향을 받는 것으로 사료됨. 이전 Baek *et al.* (2014)의 보고에 의하면, TD49물질은 선택성이 우수하여, 비유해종에는 영향이 상대적으로 적게 나타났고, 그중 *Chaetoceros* spp.또한 살조물질의 영향을 약하게 받는 것으로 나타났음. 반면, GreenTD 처리군에서는 규조류 *Chaetoceros* spp.은 일정하게 영향을 받는 것으로 파악됨. 살조제 처리후 대상생물을 빨리 처리 및 사멸할 수 있는 능력이 무엇보다 중요하며, 만약, 살조 후 해양에서는 조석간만에 의한 해류의 이동으로 3시간(최대6시간 조석주기의 차이)이내 확산되는 것을 고려하면, 초기 1-2시간에 대상 적조생물을 살조하는 능력이 탁월하면, 다른 생물군에 미칠 영향은 그다지 크지 않을 것으로 사료됨.

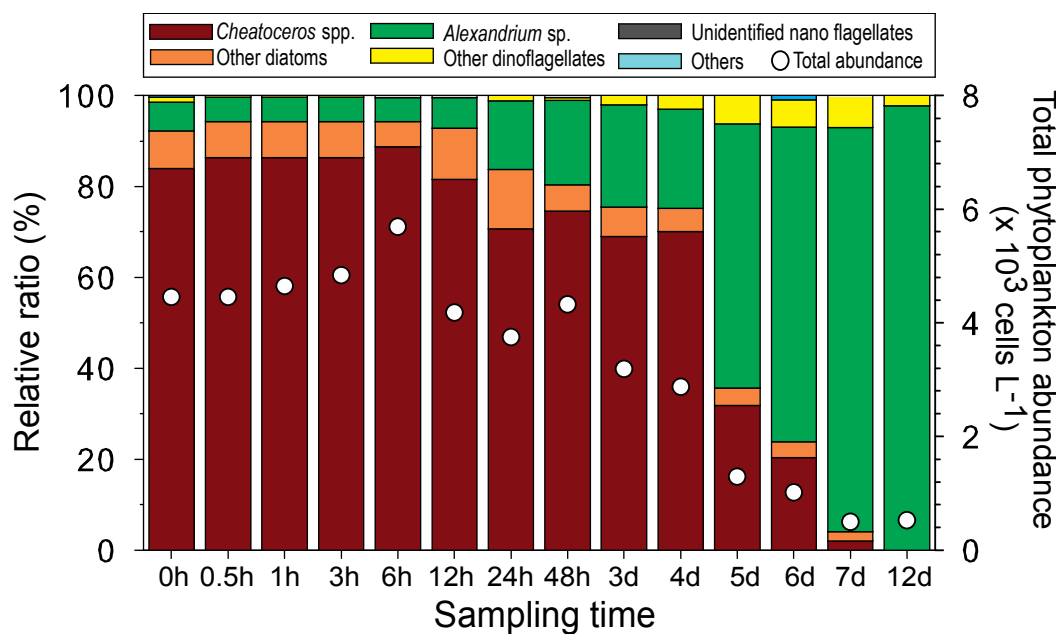


그림 46. 메소코즘에서 대조군의 식물플랑크톤 종조성과 총 개체수

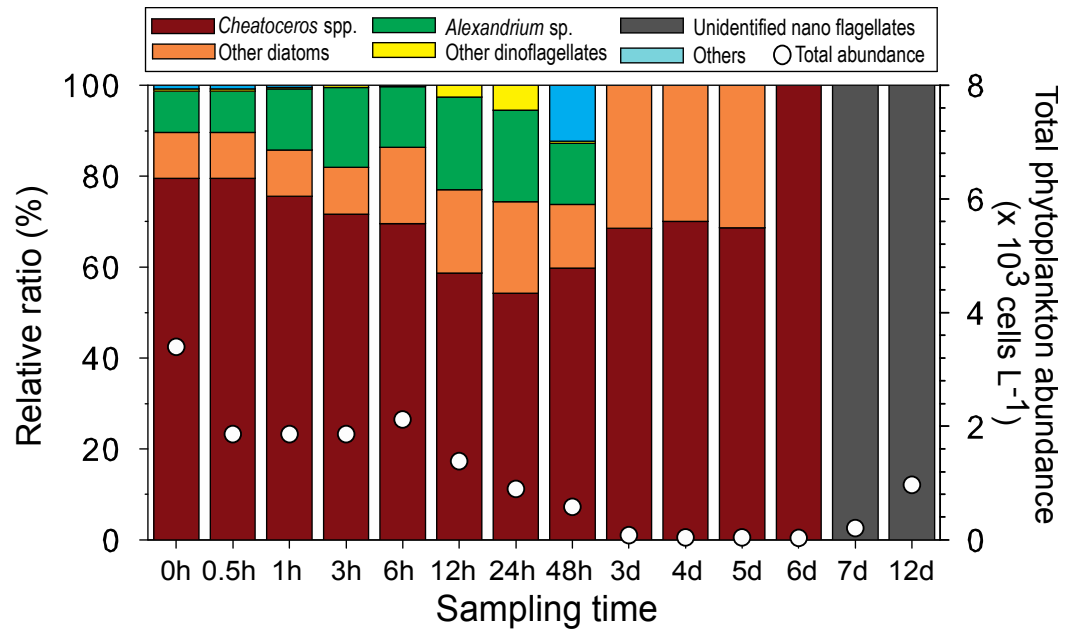


그림 47. 메소코즘에서 처리군의 식물플랑크톤 종조성과 총 개체수

7) 생물요인 - 동물플랑크톤

○ 동물플랑크톤은 대조군에서 초기 3시간까지 감소하는 양상을 보였으나, 이후 4일 경과 후 6일까지는 크게 증가하는 양상을 파악함(그림 48). 즉 초기 해수를 펌프로 메소코즘 백에 넣는 과정에서 일정하게 동물플랑크톤이 영향을 받았으나, 그 후 영향을 받지 않고, 개체수밀도가 늘어나는 것으로 보아 실험이 정상적으로 된 것으로 판단됨. 처리군에서 동물플랑크톤의 개체수는 실험군간의 편차는 있지만, 12시간까지 일정량으로 유지되면서 감소하는 경향을 파악하였고, 특히 1일 경과후부터 급격하게 감소하여, 12일차에는 낮은 개체수를 유지하는 특성을 보였음. 동물플랑크톤의 유영능력은 GreenTD와 같은 살조물질을 회피할 수 있을 것으로 판단됨. 즉, 격리된 메소코즘에서 24시간에는 크게 영향을 받지 않았다는 것은 실제 현장에서도 1일 정도는 영향을 낮게 받을 것으로 사료됨. 이와 같이 GreenTD 처리 후 최대 6시간까지 영향을 받지 않으면, 현장에서는 조류에 의한 수동적 회식 효과와 더불어, 동물플랑크톤이 가지는 유영능력으로 충분하게 회피할 수 있어, 생태계의 부정적인 영향은 크지 않을 것으로 사료됨. 특히, 적조가 발생하면, 90-99% 적조대상생물이 점유함으로 동물플랑크톤과 다른 생물군이 극히 낮은 밀도로 존재하기 함으로 대상생물을 효율적으로 제어하는 것이 중요할 것으로 판단됨.

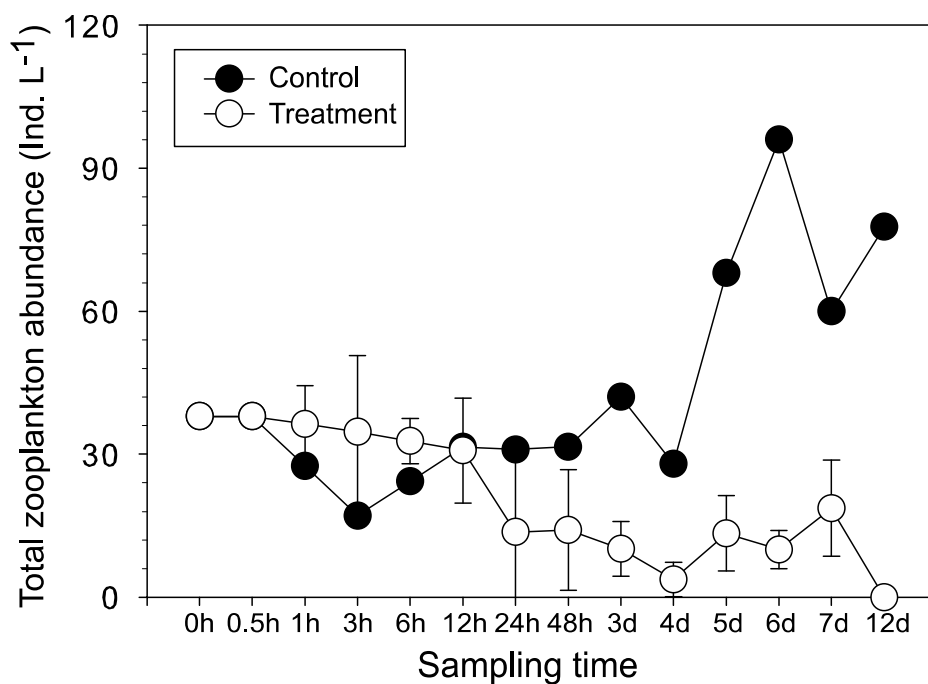


그림 48. 메소코즘 대조군과 처리군의 총 동물플랑크톤 개체수

○ 적조구제물질 사용승인고시의 승인조건으로 생물다양성이 포함되어 있음. 특히, 0- 48h 이내의 생물다양성을 요구함. 이는 급성독성을 평가하는 차원이고, 만성독성을 평가하기 위해서는 보다 장시간의 종의 변화 및 천이 특성에 따른 생물 다양성을 조사하는 것이 중요하다고 판단됨. 추후, 적조구제물질 실질 심사에서 이와 같은 장기간의 생물 다양성 자료를 바탕으로 전문가와 상의 및 평가하는 것이 중요할 것으로 판단됨. 식물플랑크톤의 다양성은 대조군에서 12시간부터 48시간까지 약간 높아졌으나, 이후 5일 경과까지 일정하게 유지된 후 급격히 감소하는 양상을 보였음. 처리군에서는 초기 보다 약간 증가하면서 5일 경과 후부터 대조군과 유사하게 급격하게 감소하는 것을 파악함. 동물플랑크톤의 다양성은 대조군에서 안정적으로 7일까지 유지되었으나, 그 후 12일차에는 약간 감소하는 양상을 파악함. 처리군의 동물플랑크톤 다양성은 12시간까지는 초기와 유사하게 유지하였음. 하지만, 24시간이후부터 급격히 감소함과 더불어 실험구간의 편차가 매우 증가하였고, 12일경과 후에는 동물플랑크톤이 대부분 사멸되어 다양성이 나타나지 않았음(그림 49). 즉, GreenTD 처리후 초기에 영향을 받아, 동물플랑크톤의 다양성에 영향을 미친 것으로 사료됨. 앞서 언급한 것과 같이, 살조제 처리후, 희석 및 확산을 고려하면, 초기에 영향을 받은 동물플랑크톤의 위해성은 크지 않을 것으로 사료됨.

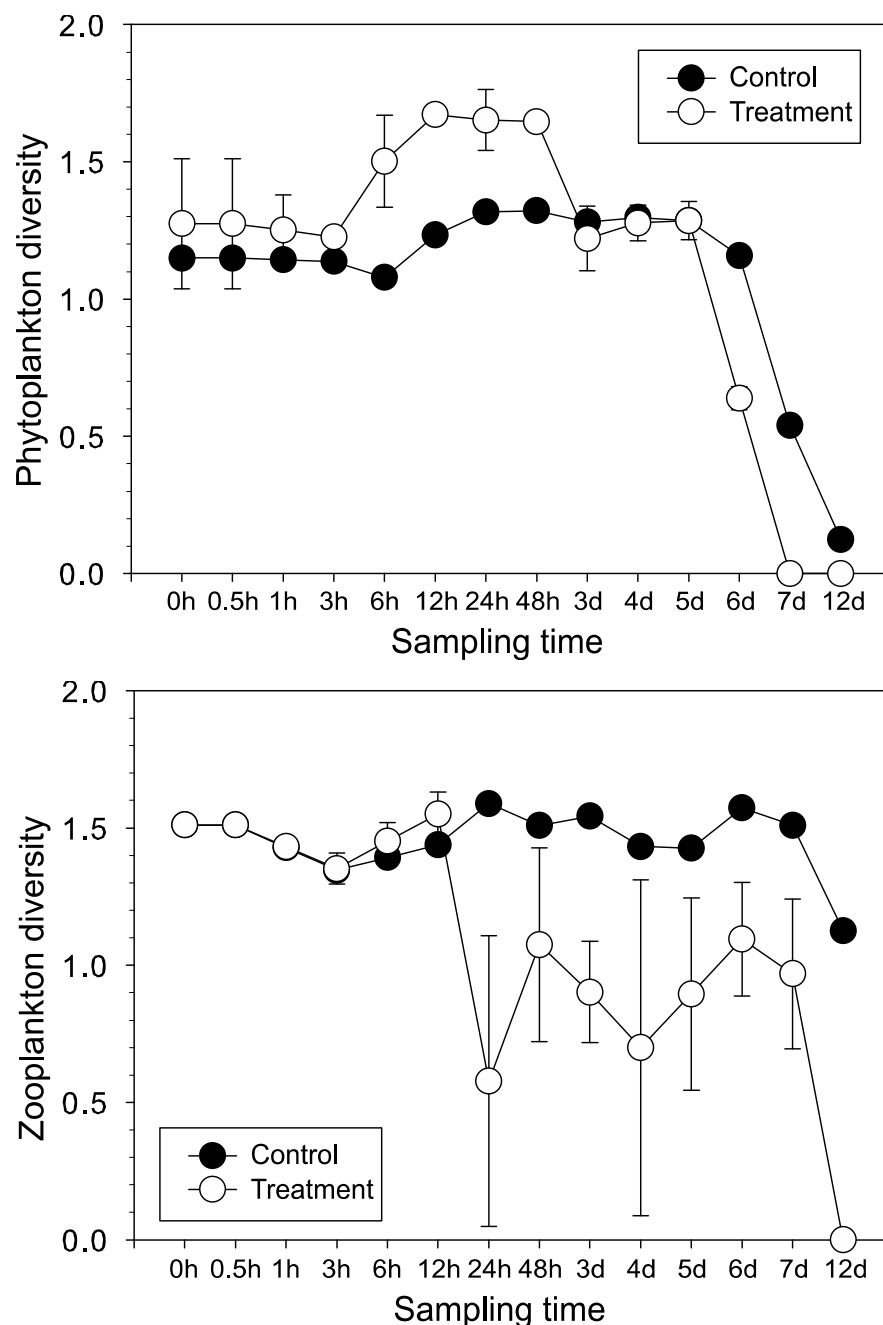
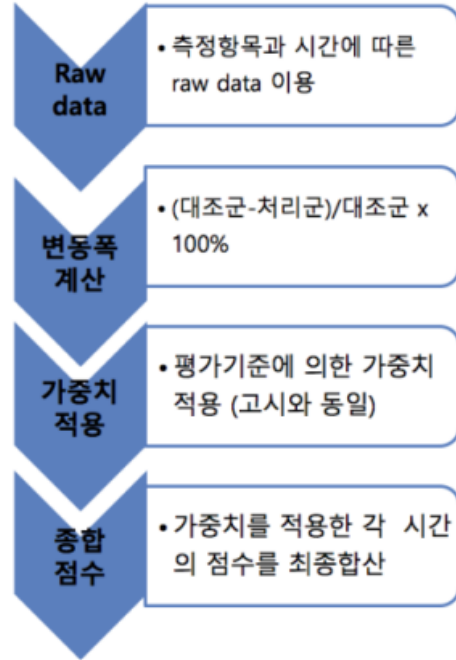


그림 49. 메소코즘 대조구와 실험구의 동물플랑크톤과 식물플랑크톤 다양성

8) 종합평가

○ 적조고시를 기준으로 한 구제물질 GreenTD의 현장실용성평가 결과, 종합점수 88점(추천에 해당됨)으로 평가되었음(표 6, 7). 현행 적조고시에 제시된 평가 기준의 점수화제도는 비과학적인 측면이 다수 존재하고 있음. 예를 들면, 생물의 변동폭이 크면, 점수가 나쁘게 나타나는데, 이와 반대로 작동하는 항목이 다소 존재함에도 불구하고 일괄적으로 변동폭에 초점을 맞추는 것을 생태계의 영향을 평가하는 좋은 방법이 아니라고 판단됨. 즉 특정해역에서 적조대상생물을 제어하면, 초기대비 엽록소(대상적조생물의 엽록소가 대부분)가 급격하게 감소하게 되어야 정상적으로 적조생물을 제어되었다고 간주할 수 있는데, 현행 적조고시에서는 엽록소 변동폭이 커지면 점수가 나쁘게 나타남. 아울러, 적조생물이 사멸하게 되면, 유기물이 분해되는 과정에서 용존산소가 소모되어 일정한 농도로 낮아질 가능성이 높음. 따라서, 적조생물을 사멸시킨후 다른 해양생태계에 미치는 용존산소 허용 범위등을 고려하여 임계농도(빈산소수괴 4 mg/L)이하로 떨어지지 않은 범주에 있으면, 정상적인 현상임으로 평가 점수에 영향을 미치지 않도록 고려하는 것이 합리적이라고 판단됨. 즉 만약 허용한계 범위이하를 설정하여, 그 값 이하로 떨어지지 않으면, 전반적으로 문제되지 않은 것으로 간주하는 것이 바람직함. 이와 같은 항목에 대한 점수화 시스템이 재구축되어야 하며, 구제물질 고시평가 위원들도 이와 같은 조사항목에 대한 불합리성을 직시하고, 충분히 검토 후, 적조생물의 사멸 및 살조에 초점을 맞춰 물질 개발을 권장하는 것이 합리적인 생태계의 영향 평가라고 판단됨. 기존 고시의 평가기준으로도 충분히 '추천'에 해당되는 결과가 나왔지만, 실제 현장을 잘 고려한 평가기준이 정립된다면, GreenTD물질은 적조구제물질로서 더욱 **우수한 점수**로 평가 될 것으로 판단됨. 따라서 이를 뒷받침하기 위해서 본 연구진은 추가적인 다양한 살조구제 실험을 다수 수행하였으며, **그 결과를 부록에 첨부함.**

점수 적용 방법



구제효율	평가항목	0h	0.5h	살조율	평가점수																
	C.polykrikoides 개체수	1010	130	87.13	4																
생물영향	평가항목	0h	0.5h	생존율	평가점수																
	Artemia 개체수	160	160	100.00	5																
생태계-수질	Raw data	0h	0.5h	1h	3h	6h	12h	24h	48h	가중치 환산	0.5h	1h	3h	6h	12h	24h	48h	sum	Aver.	평가점수	
	수온	22.94	22.93	23.01	23.01	23.09	23.07	23.20	23.57		0.00	0.09	0.06	0.07	0.06	0.11	0.27	0.66	14.28		4
	pH	7.86	7.84	7.96	7.99	7.98	7.90	7.86	7.87		0.02	0.41	0.34	0.15	0.06	0.00	0.02	1.01			
	DO	7.18	7.18	7.34	7.51	7.94	7.26	6.91	6.10		0.00	0.64	0.92	1.06	0.10	0.39	1.50	4.61			
	암모니아	1.37	1.35	1.37	1.36	2.28	3.20	3.13	1.77		0.14	0.06	0.07	6.66	13.36	12.82	2.91	36.03			
	질산염+아질산염	2.70	2.13	2.13	2.13	2.10	2.07	1.66	1.76		2.13	6.40	4.26	2.23	2.33	3.85	3.50	24.70			
	인산	0.17	0.16	0.11	0.06	0.07	0.07	0.04	0.03		0.55	9.80	12.98	6.10	5.71	7.81	8.13	51.08			
	규소	4.05	4.05	4.07	4.08	4.05	4.02	3.69	4.53		0.01	0.10	0.13	0.00	0.07	0.89	1.18	2.37			
	부유물질	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03		0.00	0.10	0.19	0.32	0.51	0.83	0.38	2.32			
	COD	4.44	4.45	4.48	4.52	4.25	3.98	3.61	3.67		0.02	0.28	0.37	0.43	1.04	1.88	1.74	5.75			
생태계-부유	Raw data	0h	0.5h	1h	3h	6h	12h	24h	48h	가중치 환산	0.5h	1h	3h	6h	12h	24h	48h	sum	Aver.	평가점수	
	식물플랑크톤 개체수	3395.00	3000.00	2628.33	1861.67	2120.00	1383.33	896.67	580.00		1.16	6.77	9.03	3.76	5.93	7.36	8.29	42.30	21.71		4
	식물플랑크톤 다양성	38.00	37.80	36.36	34.71	32.76	30.80	13.68	14.10		0.05	1.30	1.73	1.38	1.89	6.40	6.29	19.04			
	동물플랑크톤 개체수	1.28	1.28	1.25	1.23	1.50	1.67	1.65	1.65		0.00	0.56	0.77	1.78	3.11	2.96	2.91	12.09			
	동물플랑크톤 다양성	1.51	1.51	1.43	1.35	1.45	1.55	0.58	1.08		0.00	1.57	2.10	0.39	0.26	6.17	2.89	13.39			
생태계-저서	N. D.																				
사용방법	5																				
경제성	5																				

표 6. 구제물질 점수 평가 과정

	기준치	평가점수(1-5)	기준치적용	최종점수
구제효율	5	4	20	88
생물영향	2	5	10	
생태계-수질	3	4	12	
생태계-부유	4	4	16	
생태계-저서	4	5	20	
사용방법	1	5	5	
경제성	1	5	5	

표 7. 구제물질 점수 평가 결과

2.4. 부록

○ 알테미아와 현장 동물플랑크톤의 영향평가

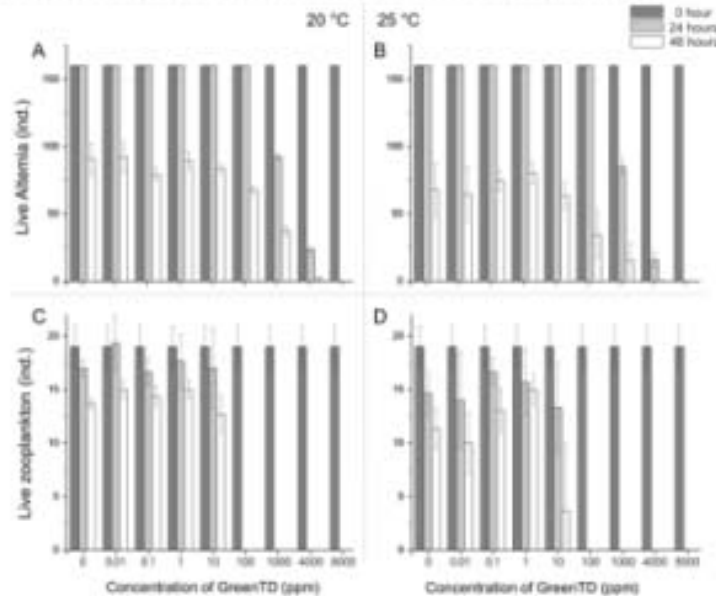
실험 1.3. 배양된 알테미아와 현장수의 동물플랑크톤을 이용한 GreenTD 구제효율 검증

가. 실험목적

- 적조생물을 살조하기 위해서 물질을 살포하기 전에 생태계 위해성을 평가하여야 함. 생태계의 위해성 평가과정은 적조생물의 살조유무와 관계없이, 상위 영양단계의 생물군에게 미치는 영향을 파악하는 것이 중요함.

나. 실험방법

- 알테미아 실험/현장 동물플랑크톤 실험-
- 알테미아는 배양 후 24h경과 후, 현장 동물플랑크톤은 2017년 하계에 네팅하여 채집
- GreenTD투여농도 : 8000, 4000, 1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0 (ppm)로 극히 높은 농도에서의 영향을 구체적으로 파악
- 온도구배(25 °C, 20 °C)와 3개의 반복구로 실험을 진행
- Green TD 첨가 24 hrs와 48 hrs후, 해부 현미경으로 살아있는 알테미아와 자연 동물플랑크톤의 군집을 개수하여 평가



Green TD 첨가에 따른 알테미아(위쪽:녹색 24hrs, 청색 48 hrs) 생존개체 및 자연동물플랑크톤의 개체수 변동

다. 실험결과

- 1) 알테미아는 1000 ppm의 극히 높은 농도에서 영향
- 2) 자연 동물플랑크톤군집은 10 ppm부터 영향을 받으며, 100 ppm부터는 모두 사멸함

○ 비유해성 생물 규조류 군집에 대한 영향평가

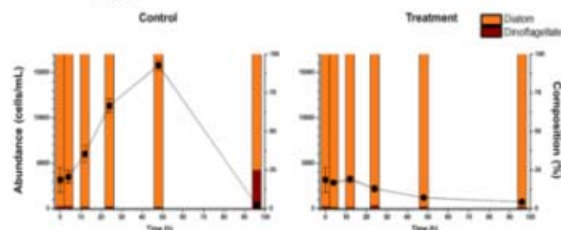
실험 1.4. 비유해성 규조류군집에 GreenTD의 영향

가. 실험목적

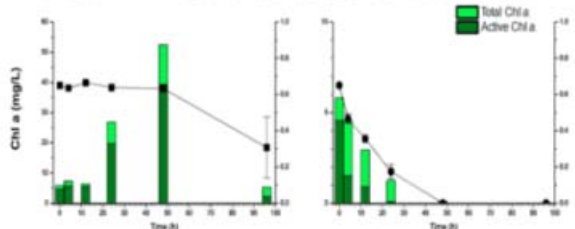
- 폐쇄생태계인 메소코즘(1ton)에서 영향을 평가하기 전 단계에서 소규모 실험(1L)에서, 어떤 군집에 영향을 미치는지 평가
- 따라서 본 실험의 목적은 메소코즘에 적용 할 GreenTD 1 ppm 농도에서 비유해성 미세조류(규조류 및 와편모조류)에 미치는 영향을 소규모 실험을 통하여 평가하고자 하였음.

나. 실험방법

- 1) 2017년 하계 자연 식물플랑크톤을 채집하였음. 대구균과 처리군(Green TD 1 ppm 농도)에서 Phyto-PAM을 이용하여 0h-96h에 측정함과 동시에 현미경을 통하여 규조류와 와편모조류의 비율을 산출. 2) 실험은 1 L 용기로 25 °C에서 실험을 3반복(Triplicate) 수행.



대조군과 GreenTD 첨가에 따른 식물플랑크톤 개체수와 종조성



대조군(좌)과 GreenTD 첨가(우)에 따른 Total Chl.a, Active Chl.a 및 Fv/Fm 변동

다. 실험결과

- 1) 식물플랑크톤 24 hrs 이후 실험구의 개체수가 급격히 감소 대조군은 48 hrs 동안 지속적으로 성장하였으나, 실험구는 그렇지 않았음

- 2) active Chlorophyll a 및 Fv/Fm 3 hrs 경과후, 실험구의 Active Chl. a과 생물활성도(Fv/Fm)가 급격히 감소함 48 hrs이후, 거의 값이 검출되지 않음 대조군은 실험 48 hrs 경과 후, 지속적으로 Chl. a값이 증가하였고, 아울러 Fv/Fm 값도 높게 유지

○ 녹조에 대한 영향 평가 및 구제효율

실험 1.5. 녹조류가 우점한 현장수를 이용한 GreenTD의 구제효율 검증

- ▶ 가. 실험목적
- ▶ **2017년에는 C. polykrikodes의 적조가 발생하지 않아**, 담수 및 기수역에서 대발생하는 녹조 *Microcystis*를 대상으로 생태계 위해성 평가를 수행
- ▶ GreenTD를 투여 하였을 때, *Microcystis*의 사멸정도와 동물플랑크톤, 박테리아, 환경요인 변화를 파악

▶ 나. 실험방법

- ▶ 1) 녹조류 *Microcystis*가 우점한 낙동강하구역에서 현장수 200L를 채수
- ▶ 2) 20 L씩 3반복으로 준비된 실험구에 Green TD 1 ppm으로 실험을 수행함. 대조군에는 자연생물 군집을 3반복 실험구를 두어 평가
- ▶ 3) 광학 현미경을 이용한 식물 및 동물 플랑크톤 정량 및 정성 분석
- ▶ 4) DAPI 염색방법을 이용하여 박테리아 개체수 파악
- ▶ 5) Phyto-PAM을 이용한, 생물활성도(Fv/Fm), active Chlorophyll a 측정
- ▶ 6) 90% 아세톤 추출법을 이용한 Chlorophyll a 측정
- ▶ 7) 수질측정기 (YSI2000) 이용하여 환경요인(수온, pH, DO) 측정



실험 1.5. 녹조류가 우점한 현장수를 이용한 GreenTD의 구제효율 검증

- ▶ 다. 실험결과
- ▶ 1) 환경요인
- ▶ 가) 실험기간 중 수조 내 수온은 약 22-30 °C로 변동하였으나, 각각의 실험구 간 차이는 거의 없었음. 특히, 수온은 태양광량(날씨)에 큰 영향을 받았음
- ▶ 나) pH와 DO는 실험 1일차부터 GreenTD 처리군에서 대조군보다 상대적으로 낮게 측정되었으나, 큰 차이는 보이지 않았음

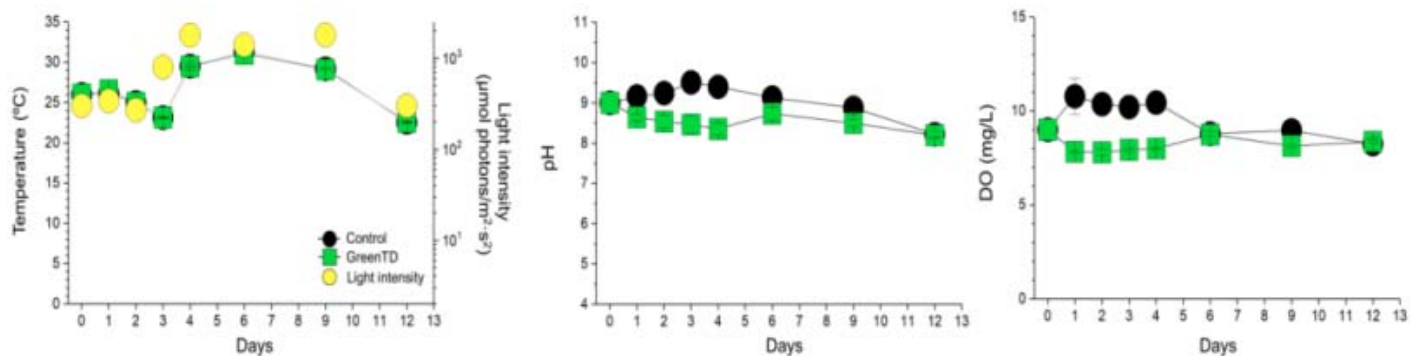
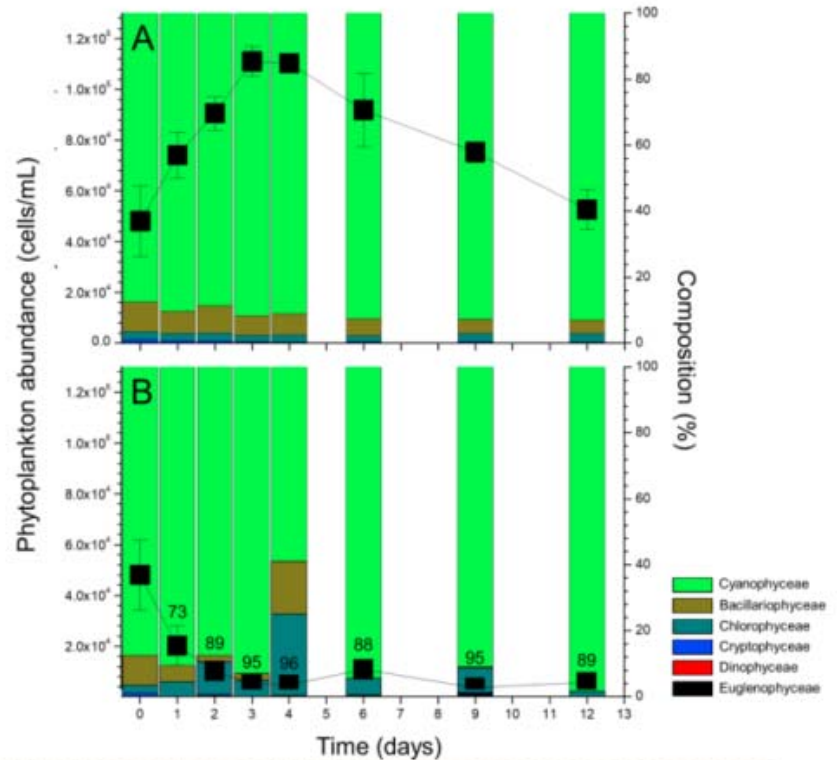


그림 녹조류가 우점한 현장수를 이용한 Green TD49 생태계 위해성평가에서 pH와 DO의 변화 (적색:GreenTD)

실험 1.5. 녹조류가 우점한 현장수를 이용한 GreenTD의 구제효율 검증

▶ 2) 식물플랑크톤

- ▶ 가) GreenTD 처리군에서 1일 경과 후, 식물플랑크톤의 개체수가 급감하였으나, 대조군에서는 크게 감소하지 않았고, 조금씩 증가하는 특색을 보였음. 즉 **GreenTD는 녹조류도 효율적으로 제어할 수 있다는 것을 의미!!**
- ▶ 나) Green TD 접종 4일 후 *Microcystis*가 대부분 사멸하여 극히 낮은 개체수 밀도를 관찰하였으나, 실험 6일 이후부터 *Microcystis*가 극히 낮은 개체수를 유지하였음.



녹조류가 우점한 현장수를 이용한 GreenTD 생태계 위해성평가에서 식물플랑크톤 총 개체수 및 종조성의 변동

○ GreenTD에 대한 종특이성 및 선택성

실험 2.1. Specificity Test of GreenTD

가. 실험 목적

- ▶ 살조물질 GreenTD의 조류 종별 / 농도별 살조능 효율 시험

나. 실험 방법

- ▶ 0.05, 0.2, 0.5 그리고 1 ppm 농도의 GreenTD를 조류 7종 (*Chattonella*, *Heterosigma*, *Cochlodinium*, *Heterocapsa*, *Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Tetraselmis*)의 고농도/저농도의 배양주에 접종하여 24시간 동안 개체수, active chlorophyll *a* 그리고 생물활성도 (Fv/Fm)를 측정

다. 실험 결과

1) 개체수

- ▶ 침편모조류인 *Chattonella*와 *Heterosigma*에서 GreenTD 최저농도인 0.05ppm에서도 비교적 높은 살조율이 나타남
- ▶ 와편모조류인 *Cochlodinium*과 *Heterocapsa*에서 고농도 생물실험군에서는 0.5ppm 저농도 생물실험군에서는 0.2ppm부터 높은 살조율이 나타남
- ▶ 규조와 녹조종에 대해서는 비교적 낮은 살조율

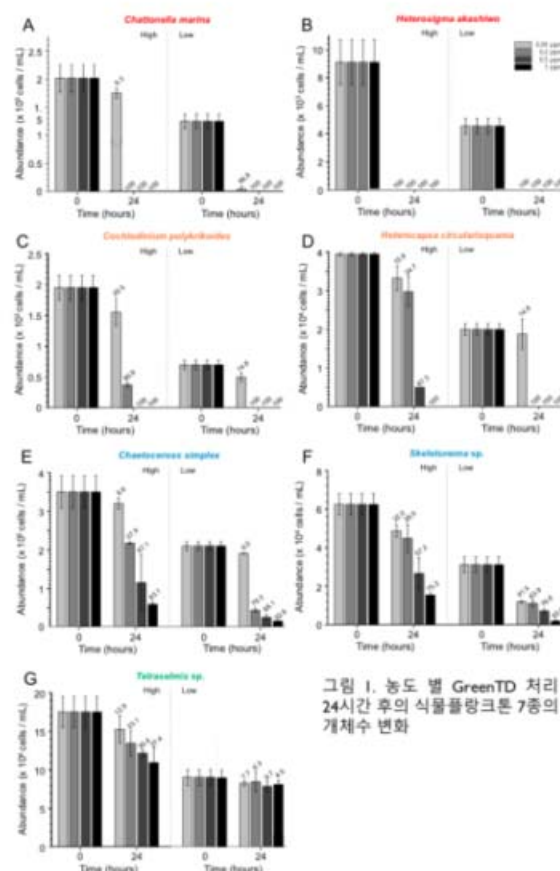


그림 1. 농도 별 GreenTD 처리 24시간 후의 식물플랑크톤 7종의 개체수 변화

실험 2.1. Specificity Test of GreenTD

2) Active chlorophyll *a*

- ▶ *Tetraselmis*를 제외한 모든 식물플랑크톤 종에 대해 0.5ppm의 농도에서 24시간 후 active Chl *a*가 0에 가깝게 감소, 감소 정도는 식물플랑크톤의 초기 개체수가 낮을수록 크게 나타남
- ▶ *Chattonella marina*의 0.05ppm 실험구와 *Tetraselmis*의 모든 실험구에서는 active Chl *a*가 증가함

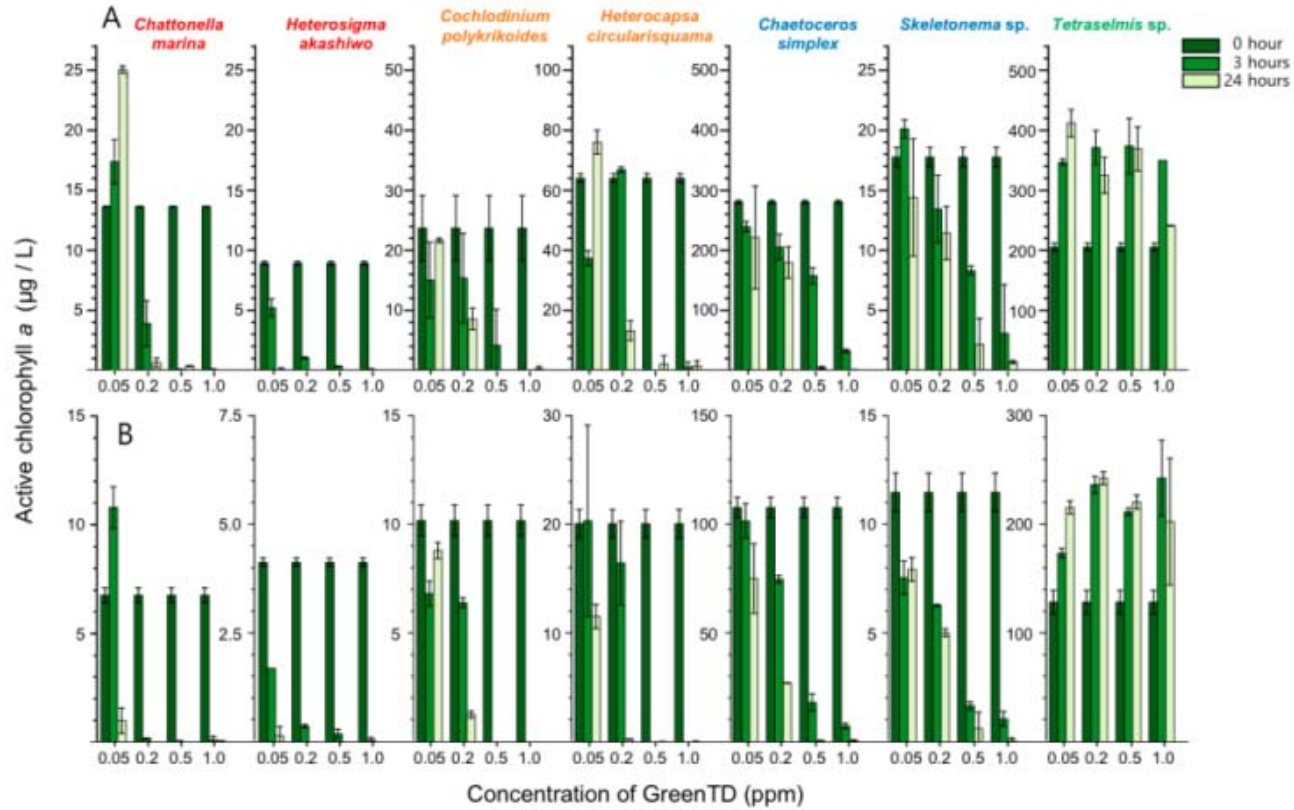


그림 2. 농도 별 GreenTD 처리 24시간 동안의 식물플랑크톤 7종의 active chlorophyll *a* 농도 변화 A: 고농도 실험구, B: 저농도 실험구

실험 2.1. Specificity Test of GreenTD

2) 생물활성도 (F_v/F_m)

- ▶ *Tetraselmis*를 제외한 모든 식물플랑크톤 종에 대해 0.5ppm의 농도에서 24시간 후 F_v/F_m 값이 크게 감소함
감소 정도는 식물플랑크톤의 초기 개체수가 낮을수록 크게 나타남
- ▶ 규조류인 *Chaetoceros*와 *Skeletonema*에서는 F_v/F_m 의 감소폭이 비교적 적었고 녹조인 *Tetraselmis*에서는 감소하지 않음

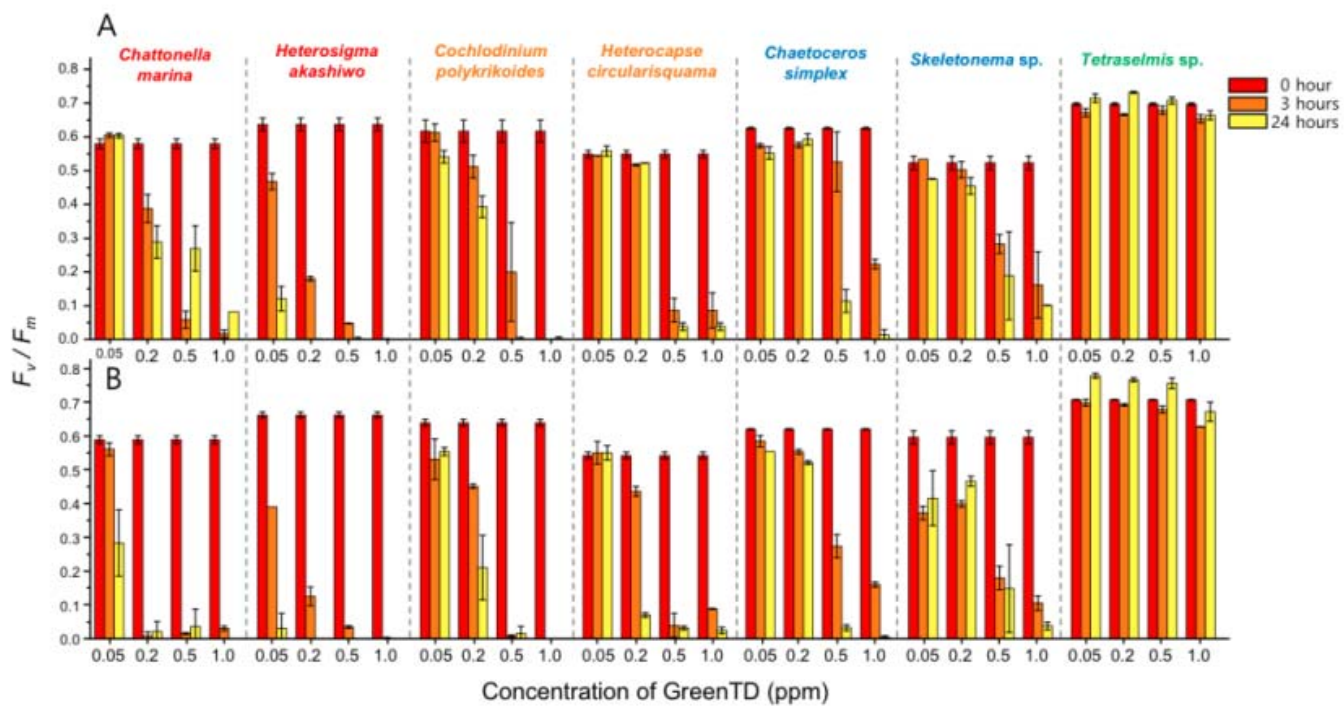


그림 3. 농도 별 GreenTD 처리 24시간 동안의 식물플랑크톤 7종의 생물 활성도 값(F_v/F_m)의 변화 A: 고농도 실험구, B: 저농도 실험구

○ 현장 적조생물 *Akashiwo sanguinea*를 이용한 평가

실험 2.2. Algicidal Screening test of GreenTD for *Akashiwo*

가. 실험 목적

▶ 2018년 봄철 적조를 발생시킨 원인 생물 *Akashiwo sanguinea*에 대한 GreenTD의 살조능 시험

나. 실험 방법

▶ *Akashiwo sanguinea* 1000 cell/mL 의 해수에 0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 그리고 5 ppm 농도의 GreenTD처리 후 PAM을 이용하여 *Akashiwo sanguinea*의 active Chl *a*와 *Fv/Fm* 값을 24시간 동안 추적

다. 실험 결과

▶ GreenTD 0.5 ppm이상의 농도 실험구에서 약 6시간 이후부터 active Chl *a*와 *Fv/Fm*값이 급격히 감소하기 시작하였으며, 12시간 이후부터 0에 가까운 값을 나타냄

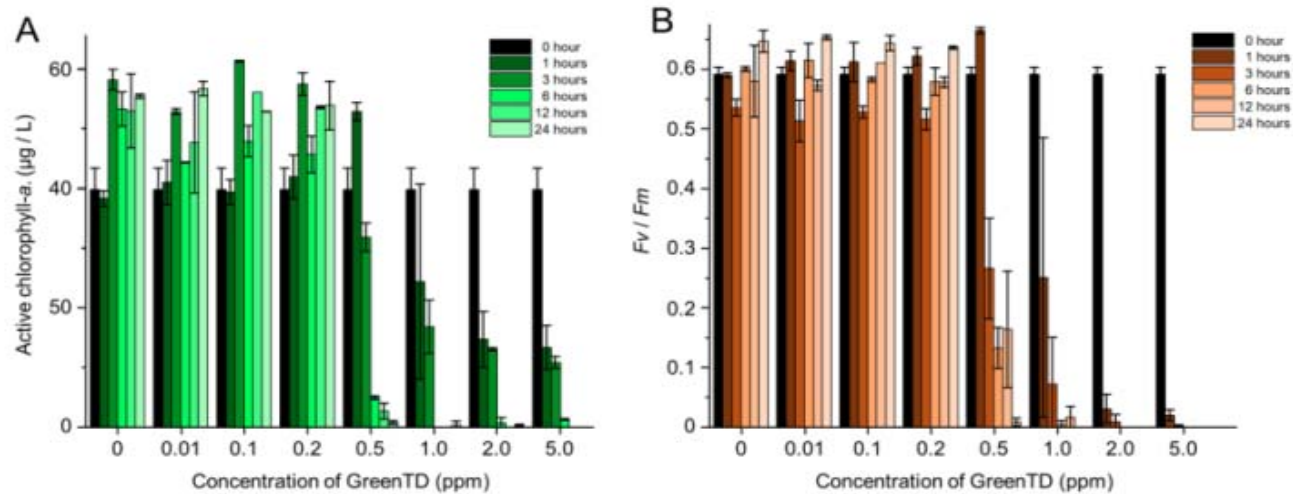


그림 4. 농도 별 GreenTD 처리 24시간 동안의 *Akashiwo sanguinea*의 active chlorophyll *a* (A)와 *Fv/Fm* 값(B)의 변화

○ 현장 적조생물 *Akashiwo sanguinea*에 대한 살조물질 농도 및 세포밀도의 관계

실험 2.3. *Akashiwo sanguinea* 농도별 GreenTD 적용농도 탐색

가. 실험 목적

▶ *Akashiwo sanguinea* 생물 농도 별 맞춤형 최적 GreenTD의 적용농도 탐색

나. 실험 방법

▶ *Akashiwo sanguinea* 생물농도 1,240, 740, 315, 18 cell/mL 당 0.2, 0.5, 1 ppm 농도의 GreenTD처리 후 광학 현미경과 SR chamber를 이용하여 *Akashiwo sanguinea*의 개체수를 48시간 동안 추적

다. 실험 결과

▶ *Akashiwo sanguinea* 740 cells/mL 이상의 농도까지는 GreenTD 0.2 ppm에서 48시간 이후 100%의 살조율이 나타났지만, 최고농도인 1,180에서는 48시간 이후 0.2 ppm에서는 34.5%, 0.5ppm에서는 75.1%의 살조율을 보여주었고, 1.0 ppm의 농도에서만 100%의 살조율을 나타내었다.

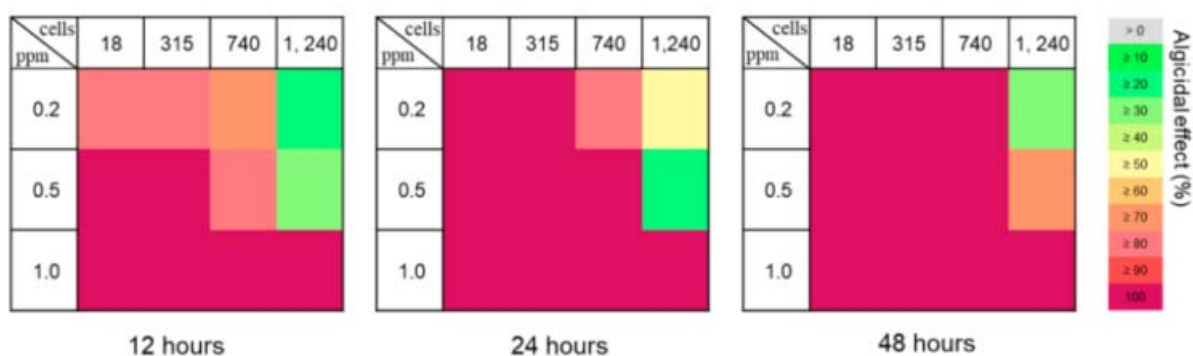


그림 5. 24시간 동안의 *Akashiwo sanguinea* 초기 생물농도에 따른 GreenTD의 별 살조효율

○ 현장 적조생물 *Akashiwo sanguinea*에 대한 마이크로코즘 생태계 위해성 평가

실험 2.4. Microcosm test for *Akashiwo sanguinea* bloom

가. 실험 목적

▶ *Akashiwo sanguinea* 적조가 발생한 현장수를 대상으로 GreenTD의 살조능 시험

나. 실험 방법

▶ 장목만 연안에 발생한 *Akashiwo sanguinea* 적조현장수를 채수, 기존에 스크리닝한 결과를 토대로 현장의 *Akashiwo sanguinea* 생물농도를 파악한 후 적합한 농도(1 ppm)의 GreenTD를 처리한 후 20L 규모의 microcosm을 진행
 ▶ Microcosm은 20도씨 12:12 L:D 조건하에 12일간 진행 ▶ 수온, 염분, pH 및 DO 환경요인 모니터링
 ▶ *Akashiwo sanguinea* 개체수 및 active Chl *a*, *Fv* / *Fm*를 PAM을 이용하여 측정, live zooplankton의 개체수를 모니터링

나. 실험 결과

1) 환경요인

▶ 실험기간동안 온도는 20 도씨, 염분은 32 psu 내외를 유지하였으며 pH는 실험구보다 대조구에서 약간 높게 나타났으나 약 8근처를 유지하였고, DO는 GreenTD 접종 후 2일차 *Akashiwo sanguinea*의 사멸로 인해 대조구에서 약 2.9까지 급격히 떨어진 후 nanoflagellate의 번성으로 인해 실험 종료일 12일차에 7.3으로 대조구보다 높게 측정됨

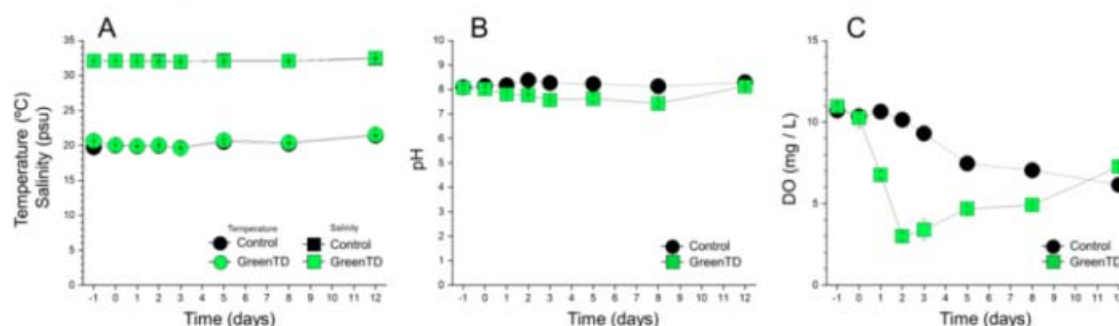


그림 6. 24시간 동안의 *Akashiwo sanguinea* 초기 생물농도에 따른 GreenTD의 별 살조효율

실험 2.4. Microcosm test for *Akashiwo sanguinia* bloom

2) 생물요인

가) *Akashiwo sanguinia* 개체수

- ▶ *Akashiwo sanguinia* 초기 개체수(-1 day)는 약 1,400 cells/mL였으며 GreenTD 접종 당시(0 day) 약 1,500 cells/mL까지 증가
- ▶ GreenTD 1 ppm 접종 이후 하루만에 모든 실험구에서 *Akashiwo sanguinia*가 사멸하였음
- ▶ 접종 1 day 이후부터 해수의 색깔은 점차 투명해 졌으며, 접종 8일차 부터는 실험구에서 녹색 nanoflagellate가 번성하면서 물 빛깔이 녹색으로 변화함 (그림 6)
- ▶ 대조구에서 *Akashiwo sanguinia*는 실험 3일차까지 2,250 cells/mL까지 번성하였다가 차츰 개체수가 감소 하였음

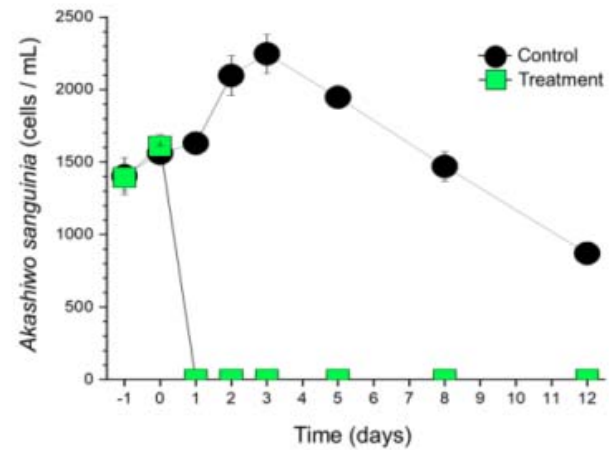
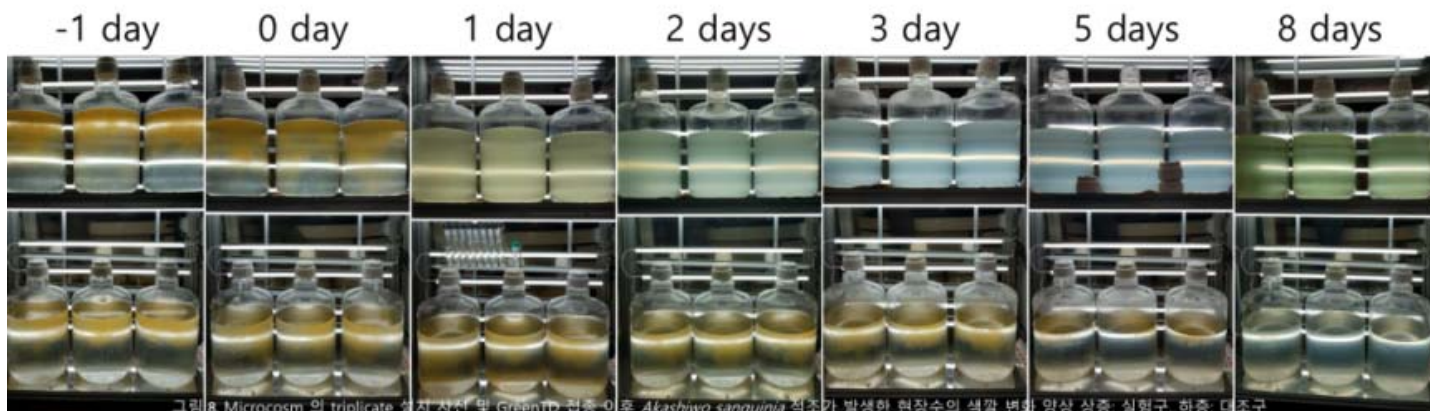


그림 7. Microcosm 내 12일간의 *Akashiwo sanguinia*의 개체수 변화



실험 2.4. Microcosm test for *Akashiwo sanguinia* bloom

2) 생물요인

나) Active chlorophyll *a* & *Fv/Fm*

- ▶ GreenTD 처리 이후 하루만에 클로로필은 20.1 µg/L 까지 대조구대비 약 1/3수준으로 감소하였고 active Chl *a*과 *Fv/Fm*은 거의 0까지 감소함
- ▶ active Chl *a*은 실험 8일차까지 낮은 값을 유지하였으나 *Fv/Fm*은 3일차부터 서서히 증가하여 결국 실험 종료 12일차에 실험구에서 번성한 nanoflagellate로 인해 0.6근처까지 증가하였고 active Chl *a*값도 21.9 µg/L로 대조구 보다 높게 측정됨

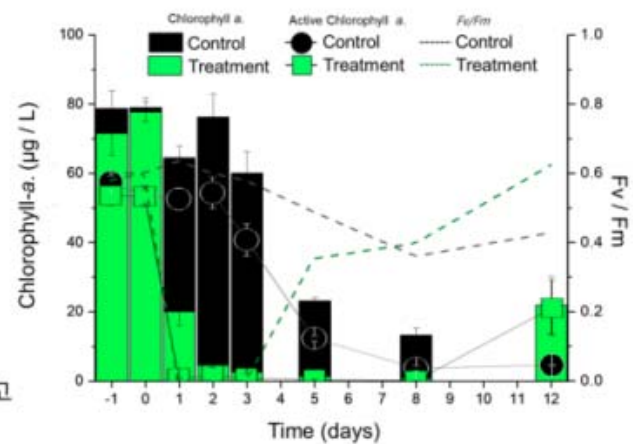


그림 9. Microcosm 내 12일간의 chlorophyll *a*, active chlorophyll *a* 그리고 *Fv/Fm* 값의 변화

다) Live zooplankton

- ▶ GreenTD 처리 이후 하루만에 동물플랑크톤은 1L당 2개체 수준으로 급격히 감소함
- ▶ 대조구의 경우 2일차까지 1L당 70개체 근처의 높은 생물량을 나타냈으나 3일차 부터 급감하였으며 8일차 이후로는 1L당 20개체 근처의 생물량을 유지하였음

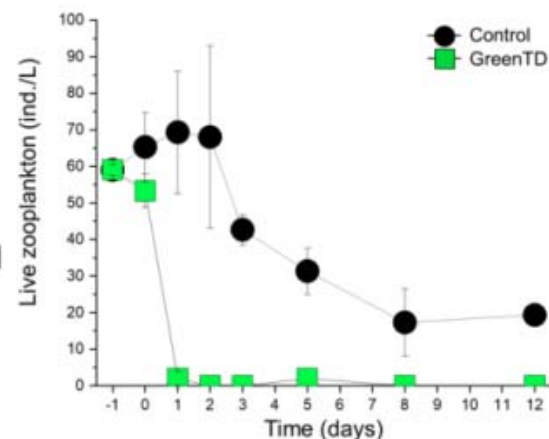


그림 10. Microcosm 내 12일간의 live zooplankton의 변화

제 4 장. 연구개발결과의 활용계획

1 절. 연구개발 결과의 활용방안

○ 현재 우리나라는 호수의 60% 이상이 부영양화 되어있어 음용수의 확보조차 원활하지 않는 물 부족국가로 분류되어 수자원의 확보가 매우 중요한 현안과제로서 대두되어 있음. 현재 국내 주요 호수나 하천생태계에 친환경적 유해생물 제어기술이 도입되어 있지 않고, 적용사례 또한 없기 때문에 본 제안기술이 안정화 단계에 이르면, 첨단 환경기술의 수출은 물론 고부가 가치의 산업기술로서 그 의의가 매우 높을 것임.

○ 유해성 조류 제어를 위한 선택적이고 고효율의 살조물질이 개발된다면, 폐쇄성 혹은 반 폐쇄성 오염수역인 댐 및 저수지, 소규모 수 환경 복원(골프장, 위락시설, 양어장)에 유기오염 제어 기술로 활용될 수 있음. 그 밖에도 생태학적인 유용서식지 복원, wet-land 복원 및 하천생태복원, 연안 및 해양의 적조피해 예방 및 제어기술에도 활용될 수 있음.

○ 수환경 유해조류의 효율적 제어는, 급격한 기후변화로 유해조류가 갑자기 발생할 때에도 체계적으로 대체할 수 있기 때문에 국가의 관광 및 레저 산업/수산업/조선산업의 경쟁력을 획기적으로 높여줄 것임.

2 절. 연구개발 결과의 기대효과

2.1. 매출증대 및 비용 절감 효과

○ 꾸준히 증가하고 있는 인구와 발달하는 산업은 현재의 환경오염을 만들어 왔으며, 낙동강 폐놀 사건 이후에야 비로소 환경에 관심이 집중되고 있음. 그 이후로 많은 환경문제들이 사회적인 이슈가 되면서 현재 우리나라에서도 학계와 정부의 산학협동연구를 통해 많은 전문 인력이 배출되고 있음. 본 기술개발의 경제적인 효과는 다음과 같음.

- ① 수 환경기술의 수출을 통한 고부가가치의 지적 재산권 확보
- ② 수 환경 산업의 활성화로 산업인력 고용확대 효과
- ③ 수 환경 산업기술의 첨단화 유도
- ④ 산학 협력기술 개발의 성공사례에 따른 환경 관련 산업체의 활성화 확산
- ⑤ 자체기술의 개발로 국가 경제 경쟁력강화

○ 현재 부영양화(적조/녹조)가 발생된 지역에 황토를 물과 혼합하여 살포함으로써 문제해결을 시도하고 있지만 살포지역 또한 광범위하여 해마다 오염지역이 확대되고 있는 실정임. 황토살포 후 가라앉은 황토는 황토특유의 마이크로입자 때문에 호흡 시 황토입자가 어류의 아가미에 달라붙어 산소 공급을 차단함으로써 살 수 없는 환경을 제공하기 때문에 오염지역이 늘어나고 있는 실정임. 따라서 본 기술을 적용하면

① 유해조류에 의한 양식장의 피해를 예방하고 유해한 화학물질을 사용하지 않고 유해조류를 제어함으로써 기타 인위적인 환경오염을 발생시키지 않을 수 있고,

② 우리나라 약품을 기반으로 하는 친환경 유해조류 제어물질을 사용하기 때문에 수계의 교란을 최소화하여 생태계 악순환 방지할 수 있으며,

③ 농업용수의 개선 효과로 인해 우수 농산물 생산이 가능하고 식수의 안정화를 통해 국민건강에 이바지하여 개선 효과를 볼 수 있음.

○ 본 과제와 관련된 미래시장을 적조제어를 통한 피해액 저감과 나노수송체의 개발에 따른 신규 시장 창출로 크게 구분하면, 적조피해액 감소가 연간 500억원 이상, 살조물질의 생산 및 나노수송체의 응용에 관련된 시장이 20억불 이상으로 추정됨. 또한 본 기술의 상용화와 관련하여 저비용의 탄소원, 질소원 성분이 미생물배양의 원료로 범용 확대되면, 생산단가가 크게 절감되고, 수율도 향상시

켜 산업발전에 기여하고, 나노수송체의 대량생산으로 인한 생물공학산업의 활성화가 기대됨.

2.2. 수출증대 및 수입대체 효과

○ 적조에 의한 피해는 수산물뿐만 아니라 인명에 막대한 영향을 끼쳐 공중 보건 분야에서 심각한 이슈로 대두되고 있음. 최근의 예를 들어 보면 1987년 캐나다에서 *Nitzschia pungens*의 적조가 발생되어 150여 명이 플랑크톤 독성에 의해서 중독되었고, 3명이 사망하였음. 같은 해에 우리나라의 감천만에서는 플랑크톤 독성에 의해 20여명이 중독되고 2명이 사망하는 사건이 발생하였음. 일본의 경우, 1985년도 적조에 의한 피해액은 600억원 정도임. 따라서 본 연구기술은 유해조류에 의한 경제적 손실뿐만 아니라 인명피해를 예방할 수 있어 사회적 문제점 해결에도 큰 과급효과가 있을 것으로 봄. 또한 인도네시아, 태국, 베트남이 주 생산지인 양세우양장의 폐사원인중의 하나가 유해조류이기 때문에 본 기술은 해외수출이 가능함.

제 5 장. 참고문헌

국립수산과학원. 2014. 적조 구제물질/장비 사용에 대한 심사 기준안. 2014. 8pp.

강정훈, 김웅서 (2006) 인위적인 동물플랑크톤 첨가에 따른 중형폐쇄생태계 내 플랑크톤 변동. J. Kor. Soc. Mar. Environ. Engineer. 9(2): 109-119.

강정훈, 김웅서, 신경순, 장만, 황근춘 (2005) 질산염 첨가에 따른 중형폐쇄생태계 내 플랑크톤 군집의 변화. Ocean and Polar Res. 27(3): 341-349.

김웅서 (2001) 해양생태계 연구를 위한 폐쇄생태계의 활용. 환경생물학회. 19(3): 183-194.

과학기술부 2005. 자체생성 유기물 오염수역의 생태복원 기술개발 2000-N-NL-01-C-290. 491pp.

해양수산부 1999. 해양환경보전 국가기본전략연구 BSPM 99041-00-1200-1073. 853pp.

미래창조과학부 2014. 나노캡시드 생태계 위해성 평가 원천기술 개발 BSPN65650-10370-3 133pp.

Brassard, CA, Buikema AL, Bailey Jr. TA Frankenberry MJ, Lee RM, Stavola AM, Stunkard CL, Touart LW (1994) EPA Aquatic Mesocosm Study Review, pp.17-24, In: R. L. Graney, Miles, J. H. Kennedy, J. H. Rodgers(eds), Aquatic Mesocosm Studies in Ecological Risk Assessment, Lewis publ.

주 의

1. 이 보고서는 연구개발특구진흥재단에서 수행한 “선택성이 높은 살조 기술 개발(기술이전)” 사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 연구개발특구진흥재단에서 수행한 “선택성이 높은 살조기술 개발(기술이전)” 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.