

미래유망 융합기술 파이오니아 사업
바이오나노캡시드 융합기술개발 연구단
(제 2 세부)

나노캡시드 생태계 위해성 평가 원천기술 개발

Development of fundamental technology for ecosystem
risk assessment of viral nano capsid

2014. 2.

한국해양과학기술원

미래창조과학부

제 출 문

미래창조과학부장관 귀하

본 보고서를 “유해조류 제어를 위한 바이오나노 캡시드 제조 및 탑재 융합기술 개발(세부과제 “나노캡시드 생태계 위해성 평가 원천기술 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2014 . 02 .24

주관연구기관명 : 한국해양과학기술원

주관연구책임자 : 백 승 호 (해양과)

연 구 원 : 김 영 옥 (해양과)

” : 장 민 철 (해양과)

” : 손 문 호 (해양과)

” : 주 혜 미 (해양과)

” : 배 시 우 (해양과)

보고서 요약서

과제고유번호	2008-2000127	해 당 단 계 연구 기 간	2011. 03. 15 - 2014. 02. 28	단 계 구 분	2단계
연구사업명	중사업명	첨단융합기술개발사업			
	세부사업명	미래유망 융합기술 파이오니어사업			
연구과제명	총괄과제명	유해조류 제어를 위한 바이오나노 캡시드 제조 및 탑재 융합기술 개발			
	세부과제명	나노캡시드 살포 및 생태계 위해성 평가 원천기술 개발			
연구책임자	백승호	해당단계 참여 연구원수	총 : 3 명 내부 : 1 명 내부 : 2 명	해당단계 연구비	정부 : 140,000 천원 기업 : 천원 계 : 140,000 천원
		총연구기간 참여 연구원수	총 : 5명 내부 : 3 명 외부 : 3 명	총연구비	정부 : 340,000 천원 기업 : 천원 계 : 340,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서면수	141
<p><input type="checkbox"/> 본 연구는 개발된 바이러스 나노 캡시드의 현장적용 시 자연생태계에 미치는 위해성 여부를 진단하기 위해 메소코즘을 적용한 해양생태계 위해성 평가 기술을 정립하고 현장 살포기술을 개발하여 효과적 현장적용을 위한 실용성을 강구하고자 하였음.</p> <p><input type="checkbox"/> 살조물질에 대한 생물농축도 테스트</p> <ul style="list-style-type: none"> - TD49물질에 대한 생물농축도(BCF)조사 - TD49물질에 대한 생물축적도(BAF)조사 - TD49물질의 오탄올/물 분배계수 측정 <p><input type="checkbox"/> 마이크로코즘 및 메소코즘을 적용한 생태계 위해성 평가기술</p> <ul style="list-style-type: none"> - 메소코즘 내 부유생태계의 폐쇄환경 영향 평가 - 메소코즘 내 살조물질의 부유생태계 위해성 평가 - 메소코즘 적용 살조물질의 해양생태계 위해성 평가 가이드라인 구축 - 적조생물에 대한 살조 물질 TD49의 살조 효과 조사 - 적조생물에 대한 황토의 제어 효과 조사 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	유해조류, 바이러스, 캡시드 단백질, 나노 바이오, 탑재, 생태계 안전성			
	영 어	harmful algae, virus, capsid protein, nanobio, embedding, ecological safety			

요 약 문

I. 제 목

나노캡시드 살포 및 생태계 위해성 평가 원천기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 개발된 바이러스 나노 캡시드의 현장적용 시 자연생태계에 미치는 위해성 여부를 진단하기 위해 메소코즘을 적용한 해양생태계 위해성 평가 기술을 정립하고 현장 살포기술을 개발하여 효과적 현장적용을 위한 실용성을 강구하고자 함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

살조물질에 대한 생물농축도 테스트

- TD49물질에 대한 생물농축도(BCF)조사
- TD49물질에 대한 생물축적도(BAF)조사
- TD49물질의 오탄올/물 분배계수 측정

마이크로코즘 및 메소코즘을 적용한 생태계 위해성 평가기술 기반구축

- 폐쇄생태계의 자체 생태학적 특성 규명
- 메소코즘 내 부유생태계의 폐쇄환경 영향 평가
- 메소코즘 내 살조물질의 부유생태계 위해성 평가
- 메소코즘 적용 살조물질의 해양생태계 위해성 평가 가이드라인 구축
- 적조생물에 대한 살조 물질 TD49의 살조 효과 조사
- 적조생물에 대한 황토의 제어 효과 조사

IV. 연구개발결과

1세부와 2세부과제에서 제조한 나노입자(TD49)를 실제 수 환경 (마이크로코즘과 메소코즘)에 살포하여 유해조류에 특이하게 감염시킨 다음 유해조류가 선택적으로 치사하는지와 더불어 수 환경에 어떠한 위해성이 나타나는지를 탐색하는 기술로서 마이크로코즘과 메소코즘를 통한 살조물질의 위해성 검증 시스템을 확립함.

본 연구를 통하여 적조/녹조 방제를 통한 해양환경 보존 및 오염방지, 어민 소득 증가, 국민 건강증대에 기여할 것이며 BT, NT와 ET를 융합한 이 기술은 5-10년 후에는 표적 항암제 DDS, 기능성 화장품, 생물 농약 등에도 응용이 가능할 것으로 판단됨.

V. 연구개발결과의 활용계획

신규 독성물질의 해양 위해성 평가에 대한 체계적인 평가 방법 제시

자연생태계에 직접 적용 시 야기되는 문제점을 사전에 감지/방지함으로써 자연서식생물의 피해를 저감시키는 방안 제시

자연 생태계에 살조물질 적용을 통해 유발되는 위해성을 인공생태계를 통한 일차적 검증을 거칠 수 있는 안전성 기술이 확보됨

인공생태계 상품화를 위한 재현성 연구 및 추가 및 보완을 병행하여 확립된 기술을 노하우 축적

S U M M A R Y

I. Title

Development of fundamental technology for the dispersion and ecosystem risk assessment of viral nano capsid

II. Purpose and necessity

This study is intended to assess ecological risk of in-situ virus nano-capsid application to the natural ecosystem. For effective in-situ application of the algicidal capsid, techniques of marine ecological risk assessment through mesocosm operation will be developed in company with field dispersion techniques.

III. Contents and scope

Technical development for agicidal effects of nao-capsid(TD49)

- Test of bioconcentration for TD49 substance
- Test of bioaccumulation for TD49 substance
- Analysis of octanol/ water division factor of TD49 substance

Establishment of ecological risk assessment techniques using mesocosm and microcosm

- Clarification of ecological characteristics within mesocosm
- Assessment of containment effect on the plankton ecosystem within mesocosm
- Ecological risk assessment of algicidal capsid on the plankton ecosystem
- Set-up of guidelines for marine ecological risk assessment in use of mesocosm by algicidal nano-capsid
- Algicidal effect of the TD49 on the fish-killing flagellates
- Control effect of yellow clay on the fish-killing flagellates

IV. Results

Establishment of ecological risk assessment techniques using mesocosm

- Lab and microcosm techniques have been established.
- Mesocosm (several tons scale) assessment techniques have been established.
- Application of the artificial capsid particles has been tested.

V. Plan of application

Suggestion of systematic assessment method in relation to newly produced toxicant

Suggestion of scheme to reduce insidious effect by direct application of toxicant on the natural living organisms of in-situ ecosystem in advance.

Confirmation of method being able to screen primary risk by direct application of algicidal materials to natural environment using mesocosm

Accumulation of know-how by carrying out reproducible research and additional complement to make mesocosm as a commercial item

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction

1. The aim, necessity, and range of the project
2. Definition and concept of the technology
3. Significance of technical development

Chapter 2. The-state-of-art of technical development

1. The-state-of-art of technical development in domestic and abroad region
2. Distinction and originality of this research project compared to conventional technologies

Chapter 3. The contents and results of this research project

1. Modeling of movement behavior of artificial capsid molecules
2. Ecological assessment of algicidal compounds using mesocosm

Chapter 4. Goal achievement and level of contribution to related disciplines

Chapter 5. Outcome and plan of utilization

1. Outcome
2. Fields of commercial production
3. Analysis of economical efficiency

Chapter 6. International science/technology information concerning this research project

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
I. 연구개발의 목적 및 필요성	1
II. 연구개발 대상 기술의 정의 및 개념	1
1. 살조물질 위해성 평가	1
2. 살조물질 현장 위해성 평가 방안 구축	1
III. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성	3
1. 기술적 측면	3
2. 경제·산업적 측면	4
3. 사회·문화적 측면	5
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	6
I. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황	6
1. 국내연구동향	6
2. 국외연구동향	6
II. 기존기술과의 차별성 및 원천성	8
III. 당해연도 연구개발 목표 및 연구방법	10
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	15
3.1. 생물농축도(BCF) 조사	15
3.2. 생물축적도(BAF) 조사	21
3.3. TD49의 옥탄올/물 분배계수 측정	26
3.4. TD49 물질에 대한 종특이적 살조능 평가	30
3.5. 폐쇄생태계(mesocosm)에서 TD49 농도별 <i>H.circularisquama</i> 제어능 평가	61
3.6. 폐쇄생태계(mesocosm)에서 황토와 TD49 물질에 대한 해양환경위해성 평가	77
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	115
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	127
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	129
제 7 장 참고문헌	132

제 1 장 연구개발과제의 개요

I. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 제 2 세부과제에서는, 개발된 살조물질의 해양생태에 미치는 위해성을 평가하기 위해, 실험실 수준의 다양한 생물종에 대한 노출평가와, 중·소규모의 인공생태계를 조성하여 실제 해양 생태계를 묘사하는 독성평가를 실시한다. 그리고 살조물질(나노입자)의 현장적용을 위해 해수 중 유동특성 분석과 적조때 부근에서 효율적으로 반응할 수 있는 살포기를 개발하여 현장 최적 운전조건을 확립하고자 한다. 본 세부과제는 i) “살조물질의 노출평가를 통한 실험실 규모의 위해성평가” 와 ii) “현장 생태계를 통한 종합 위해성 평가”개발을 중심으로 연구를 수행 한다.

II. 연구개발 대상 기술의 정의 및 개념

1. 살조물질 위해성 평가

- 일반적인 위해성평가의 1단계는 위해성 평가를 위한 모든 자료와 정보를 기반으로 문제점을 도출하는 단계이고, 2단계는 분석단계로 대상 환경이 잠재적인 위해 요소에 노출된 정도를 분석하는 오염노출분석 부분과 각 잠재요소가 대상 생물 또는 생태계에 미치는 영향과 반응을 분석하는 생물영향평가 부분으로 이루어진다. 3단계에서는 위의 두 부분의 분석결과를 종합하여 대상 생물, 환경 또는 생태계에 대한 위해성을 정성적 또는 정량적 방법으로 평가한다.
- 현재 국내의 해양 생태계 위해성 평가체제가 충분히 갖추어 지지 않아 각 연구자의 연구특성에 따라서 평가 대상을 선택하여 독성평가를 하고 있다. 따라서 해양 생태계에 노출된 오염물질에 대한 표준화된 생물영향평가체계를 구축할 필요가 있다. 본 연구에서는 살조물질의 해양 생태계에 대한 다양한 위해성 평가를 통해 체계적인 평가방법을 새롭게 제안하고자 한다. 본 연구의 해양 생태 위해성 평가는 주로 미국 EPA 2002에 고시된 평가방법을 토대로 하여, 다양한 생물종에 대한 개별 노출평가로부터 종합적인 위해성을 예측하는 평가체계를 구축한다.

2. 살조물질 현장 위해성 평가 방안 구축

- 현재는 의무화 되어 있지 않은 현장 적용의 종합적인 위해성평가를 위해 중소 규모의 실제의 인공생태계를 구축하여 실제 위해도를 가장 정확히 분석하는

평가체계를 개발하고자 한다. 인공생태계는 연구자가 다양한 환경 요인을 조사 목적에 맞게 조절하여 생태계의 변화를 모니터링 할 수 있는 장점을 가지고 있어 살조물질의 독성실험 및 환경오염에 대한 생태계의 변화실험 등 응용분야에서 활용도가 높다. 특히 현장에서 해양 폐쇄생태계를 설치하기 때문에 실험실에서의 실험보다 자연에 가까운 조건에서 실험을 할 수 있어 신뢰성 있는 실험결과를 얻을 수 있다 (그림 1-1). 미국 EPA에서는 환경문제 해결을 위해 폐쇄생태계를 이용한 실험결과를 토대로 환경정책에 활용하고 있다.

○ 인공생태계는 규모에 따라 소형 (<math> < 1\text{m}^3 </math>), 중형 ($1-1000\text{m}^3$), 대형 (>1000m^3)으로 구분하며, 중형폐쇄생태계(Mesocosm)는 소형보다 커서 자연현상에 가까운 simulation이 가능하고 대형보다 작아 경제적으로 활용이 가능하여 해양에서 관련 연구의 경우 중형생태계를 가장 많이 사용하고 있다. 따라서 나노캡시드와 같은 살조물질의 현장적용의 효율성과 안정성 확보는 중형폐쇄생태계의 적용이 권장되고 있다.

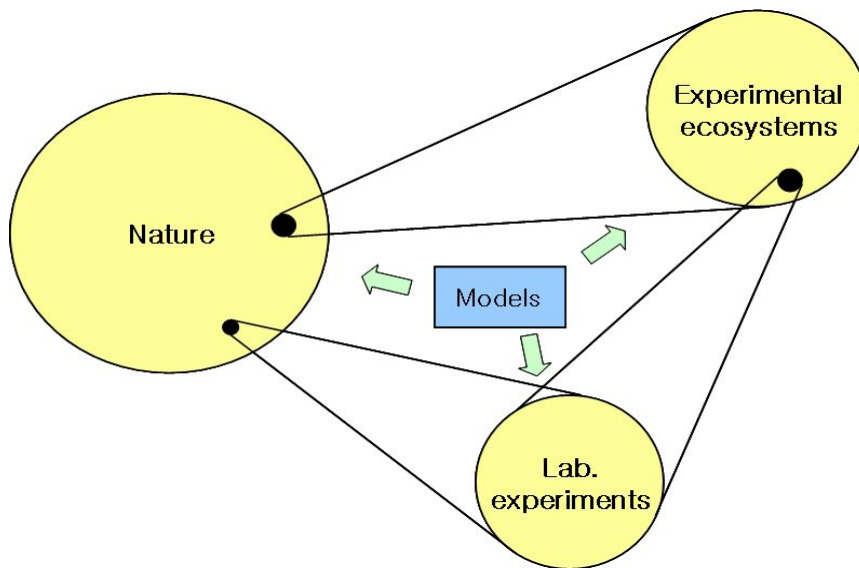


그림1-1. 자연생태계와인공생태계사이의관계 (Lalli,1990)

Ⅲ. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

1. 기술적 측면

- ▶ 살조물질의 해양 독성평가에 대한 체계적인 국내 가이드라인 구축안 제시
- ▶ 다양한 종의 독성테스트를 통한 종합적 독성평가 해석방법 제시
- ▶ 표준화된 해양 독성평가 방법의 구축으로 인한 향후 해양독성평가 시 편리성을 제공하고 평가기술의 제고 가능
- ▶ 살조물질 현장적용 시 복잡한 자연생태계에서 유발되는 현상을 자연 상태에 가깝게 simulation 가능
- ▶ 자연 생태계에 살조물질 적용을 통해 유발되는 위해 영향을 인공생태계를 통한 일차적 검증을 거칠 수 있는 안전성 기술 확보

- 현재 해양 위해성 평가에 대한 국내의 체계적인 기준이 정립되어 있지 않아 연구자에 따라 다양한 자기개발 방식 또는 EPA, OECD 방식에 따라 해양위해성 평가를 실시하고 있다. 본 기술이 개발되면 체계화된 국내 해양 위해성 평가 가이드라인을 제공할 수 있다.
- 해양 생태에서 개별 생물종들의 다양한 독성평가로부터 종합적인 위해성 평가로 확대 해석하는 방법을 제시한다.
- 생물조작법 (biomanipulation)을 이용해 생태계의 기능 변화 즉 생태계의 구조 변화를 파악할 수 있다.
- 개발 물질의 영향과 이동경로를 비롯하여 만성적 영향은 인공생태계 활용 시에만 그 파악이 가능하다.

2. 경제·산업적 측면

- ▶ 신속하고 체계화된 살조물질 독성평가 방법개발은, 환경교란을 최소화하는 살조물질 개발을 용이하게 함으로서 환경복구비용을 최소화하고 연안관광산업을 활성화시킴
- ▶ 자연생태계에 직접 적용 시 야기되는 문제점을 사전에 감지/방지하므로 자연서식생물 또는 양식생물의 피해를 저감시킴으로 수산경제의 미치는 악영향을 차단함

- 신속하고 정확한 살조물질 독성평가 기술은, 살조물질 개발팀으로 신속하고 유기적으로 피드백 되어 환경교란을 최소화하는 효율적인 살조물질 개발이 용이하게 되어, 환경비용이나 적조 및 환경교란으로 인한 관광산업 피해를 줄이는데 기여할 것이다.
- 적조의 피해는 자연서식생물보다 인공양식수산물로부터 파생되므로 인공생태

계를 가두리를 비롯한 양식장의 기능에 맞추어 적용하면 경제적 손실을 최소화할 수 있다.

○ 살조물질의 인공생태계내의 성공적 적용개발 시 수산물의 안정성이 확보되어 어민의 소득증대에 이바지 한다.

3. 사회·문화적 측면

- ▶ 인공생태계의 활용을 통해 유해조류의 효과적 제어로 국민 보건의 사회적 불안감을 해소하고 독화 수산물이라는 불신감/혐오감을 사라지게 함.
- ▶ 해역의 건강성을 회복하여 수산물의 건강성, 안정성을 도모하여 국민과 함께 하는 웰빙 바다의 이미지 부각.
- ▶ 적조현상을 단시간에 효과적으로 제어함으로써 연안지역의 관광산업 타격을 미연방지.

○ 따라서 본 과제와 같은 기술개발이 요구되며, 유해조류의 친환경적 제어를 통한 수산업의 지속적인 경쟁력을 확보함으로써 어민은 물론, 파생산업에 종사하는 사람들의 사회 심리적 안정감에 이바지 할 수 있다.

○ 또한 환경 친화적 항(抗)유해조류 생물소재 및 물질을 유해조류 제어에 활용하면 이차오염의 가능성이 없는 안전한 해양환경 및 어장환경을 유지가 가능할 것이다.

○ 유해조류의 문제는 환경오염의 문제를 넘어 관광과 레저분야로까지 확대되고 있으며 궁극적으로 국민의 공중보건과도 밀접한 관계를 맺고 있는 바, 유해적조의 사회 문화적 파급효과는 실로 크다고 할 수 있다. 구미 각국에서는 이러한 사회 문화적 비용손실에 대한 자료가 정리되고 있으므로 이를 바탕으로 한 국내 통계자료의 확보도 시급하다 할 수 있다.

○ 결론적으로 본 기술의 성공적 개발은 기술적, 경제적 이익에만 머물지 않고 전 국토의 환경적 문제와 관광 레저를 비롯하여 대국민의 공중보건에까지 그 영향을 크게 끼칠 수 있는 매우 중요한 사안이라 할 수 있다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

I. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

1. 국내연구동향

- 국내의 인공생태계 (mesocosm) 관련 연구는 극히 드물다. 한국해양과학기술원에서 “폐쇄생태계를 이용한 유기오염물질의 이동 연구”가 수행되어 자연해수와 인공생태계내의 수환경과의 차이와 동식물플랑크톤의 군집구조를 비교하여 유기오염물질의 이동 및 농축, 피-포식자의 관계를 조사한 선례가 있다 (한국해양연구원, 2000; 강 등. 2005; 강과 김, 2006). 이 연구는 해양에서 일어나는 생물학적 과정과 물질 플럭스에 초점을 두어 기초 학문적인 연구 선례라고 할 수 있다.
- 국내의 담수권에서 살조세균의 안정성 평가를 위해 microcosm과 mesocosm과 같은 모델생태계를 이용한 현장적용기술이 최근 과기부 NRL 사업으로 연구 (자체생성유기물 오염수역의 생태복원기술개발) 되었으며 현재 일부 결과의 미공개로 자세한 결과는 파악할 수 없으나 국내연구로는 유일하게 적조 제어 관련 mesocosm 연구라 할 수 있다 (과기부, 2005).
- 국내의 경우 현재까지 개발된 살조물질은 없으며 개발된 신물질의 현장적용과 관련된 인공 생태계를 이용한 연구사례는 전무하다. 따라서 해양에서의 중형생태계를 이용한 수서생태계 위해성 연구는 본 연구가 선도적이며 최초라 할 수 있다.

2. 국외연구동향

- 미국 EPA의 Office of Pesticide Programs (OPP)에서는 생태학적 위해성 평가를 위해 mesocosm 연구를 수행하고 있다. 특히 살충제의 안정성 입증을 위해 mesocosm test를 추진하고 있으며 부유생물에서 어류와 같이 상위 영양단계에 걸친 다양한 생물을 포함하는 mesocosm pond에서 살충제의 영향을 조사하고 있다. 메소코즘에 의한 안정성 평가는 체계적인 절차를 거치고 결과는 전문가의 심의를 거쳐야만 안정성이 획득된다 (그림 2-1).

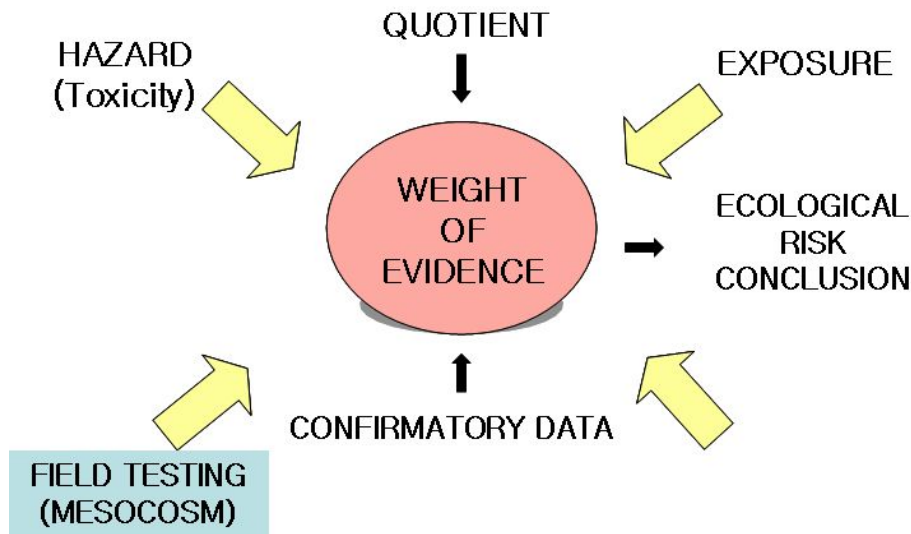


그림 2-1. 생태계 위해성 평가를 위한 과정과 체계

(2) 연구사례 조사·분석 및 시사점

(가) Mesocosm 적용 평가의 체계화

○ 미국 EPA의 OPP에서 권장하는 mesocosm을 이용한 위해성 평가방법은 아래와 같이 체계적인 순서를 밟고 있다 (그림 2-2). OPP의 전문가들이 mesocosm 실험방법을 검토한 후, mesocosm 연구를 유도하고, mesocosm 연구의 최종 검토를 다시 거친다. 이때 실험에 사용되는 메소코즘의 적절성, 살충제의 적용법, 잔류성, 생물영향, 데이터의 정확성, 데이터의 정리, 통계분석의 항목들을 검토한 후, 최종적으로 실험의 결과에 대한 결론을 내리고 있다 (Brassard et al., 1994).

(나) 국내 mesocosm 활용법 정립

○ 국내의 경우 현재까지 유사한 연구사례가 없으므로 참고 및 비교가 불가능한 현실이다. 따라서 살조물질의 개발 시 어느 수준까지 현장적용성을 검증해야 할 것인가는 문제부터 고심해야 할 것이다. 현시점 국내에서 적용가능 범위를 설정하여 연구범위의 틀을 마련해야 하며 아울러 미국 EPA의 방법을 면밀히 검토한 후, 국내 적용법을 모색하고 인공생태계의 적용을 위한 체계적 가이드라인을 마련해야 한다.

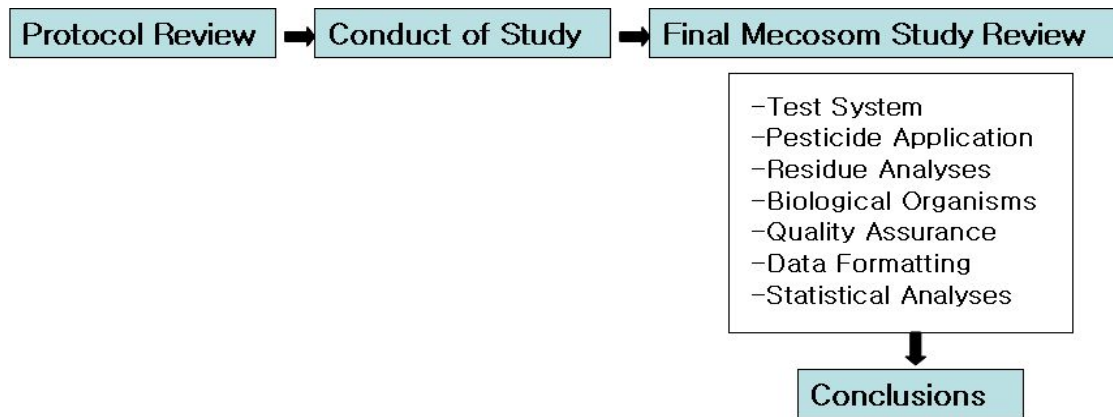


그림 2-2. 미국 EPA의 메소코즘을 적용한 생태계 위해성 평가를 위한 과정

II. 기존기술과의 차별성 및 원천성

- 해양 생태 위해성 평가에 대해 국내의 가이드라인 정립되어 있지 않아 연구자에 따라 평가 방법이 상이하다. 표준화된 체계적인 평가방법을 구축 및 제공한다면 수서 생태독성 평가에 대한 다양한 기술적 제고가 가능해지고 평가의 편리성도 도모할 수 있을 것이다.
- 실험실에서 개발된 나노캡시드는 현장에서 그 효과를 입증해야 한다. 현장의 실험은 자연 상태를 수용하면서 인위적 조작을 유도해야 하므로 인공생태계(microcosm, mesocosm)의 적절한 설계여부는 개발 물질의 효능을 제대로 평가할 수 있는 열쇠라 할 수 있다. 현재 보유하고 있는 인공생태계 기술은 자연생태계와 인공생태계의 차이를 규명하기 위해 고안된 것으로 나노 캡시드와 같은 일종의 독성물질의 효과를 살펴보기 위한 경우 인공생태계의 규모, 재질, 물질의 노출기간 등을 충분히 고려하여야 나노 캡시드 맞춤형 인공생태계로서 그 활용을 기대할 수 있다. 현 시점 관련 또는 참고 가능 선례가 없어 시행착오의 반복을 최소화 하는 효과적 접근법을 심도 있게 강구해야 한다.
- 해양 적조방제에 주로 사용되는 황토살포는 용액상태의 선상투기 나 공중살포 방식을 사용하고 있다. 적조생물체와 효과적으로 반응하는 입자의 크기는 콜로이드성의 나노입자 크기인데 살포되는 황토의 대부분이 반응하지 않고 해저부로 곧바로 침적되어 저서생태계의 교란 및 파괴를 유발하고 있다. 황토의 구성성분 자체가 적조방제에 비효과적이지만 보다 더 분쇄 살포하고 적조때 수심에서 살포한다면 지금 보다 살조효과를 어느 정도 개선할 수 있으리라 사료된다. 그러한 살조 방식에는 본 연구에서 개발하려고 하는 와류형 수평분사기가 아주 효과적일 것이다. 황토입자는 응집반응에 의해 플럭화 되면서 제거되는 기구이기 때문에 응집반

응, 침강에 소요되는 시간이 상당하고 응집반응이 일어나려면 엄청난 속도경사 즉 난류가 필요하다. 하지만 현재의 공중살포방식은 황토의 반응효과를 전혀 개선할 수 없다. 그래서 강력한 와류형성으로 속도경사를 크게 할 수 있는 와류형 수평분사기는 반응특이성을 갖는 다양한 나노입자 살포에 유효하게 이용될 수 있을 것이다.

III. 연구개발 목표 및 연구방법

1. 연구개발 목표

1.1. 2단계 1차년도 연구개발 목표 (2011년)

2011년도 연구개발목표	- 살조물질의 생물 농축도(BCF) 조사 - 살조물질 탐재 나노캡시드의 생물농축도(BCF) 조사	- 신규 살조물질의 해양 주요 먹이사슬 대상종을 이용해 생물 농축도 조사 - 신규 살조물질 탐재 나노캡시드의 해양 생물 주요 어종을 대상으로 생물농축도 조사	실험분석 및 예측모델	20,000
	- 마이크로코즘을 적용한 살조물질의 부유 생태계 위해성 평가	- 선별된 살조후보물질(TD49 화합물)의 부유생태계 위해성 평가	위해성 평가	30,000
	- 적조생물에 대한 살조물질의 살조능 평가	- 마이크로코즘내에서 적조생물에 대한 살조후보물질의 살조능 평가	살조능 평가	30,000
	- 메소코즘 수월성 확보를 위한 마이크로코즘 생태계 사전 평가법 수립	- 메소코즘 적용 위해성 평가를 위한 마이크로코즘 적용의 사전 효율성 검토	살조 효율성 검토	20,000

1. 2. 2단계 2차년도 연구개발 목표 (2012년)

2012년도 연구개발목표	- 폐쇄효과 최소화형 메소코즘의 설계 및 제작	- 메소코즘 적용 위해성 평가를 위한 장비의 단계적 설계 및 제작 및 폐쇄효과 최소화를 위한 효율성 검토	폐쇄효과 검토	10,000
	- 살조후보물질의 국내 우점 유해적조생물의 살조효과 조사	- 선별된 살조후보물질(TD49 화합물)의 국내 우점 미세조류(유해종과 비유해종)의 살조효과 비교분석	위해성 평가	10,000
	- 국내유입 가능 신규 유해적조생물 (<i>Heterocapsa circularisquama</i>)의 균주 확보 및 유지	- 마이크로코즘내에서 적조생물에 대한 살조후보물질의 살조능 평가	균주 유지 확보	10,000
	- <i>H. circularisquama</i> 에 대한 살조후보물질 살조능의 메소코즘 평가	- 메소코즘 적용 위해성 평가를 위한 <i>H. circularisquama</i> 에 대한 살조후보물질(TD49) 살조능평가 및 생태계 위해성 평가	살조 효율성 검토 및 생태계 위해성 평가	70,000

1. 3. 2단계 3차년도 연구개발 목표 (2013년)

2013년도 연구개발목표	-메소코즘에서 적조생물 <i>Hetrosigma akashiwo</i> 살조효과 및 생태계 위해성 평가	- 신규 살조물질(TD49)에 대한 <i>Hetrosigma akashiwo</i> 살조효과 - 황토에 대한 <i>Hetrosigma akashiwo</i> 살조효과 - 살조물질 및 황토가 부유생물생태계에 미치는 영향평가	부유생물생태계 위해성 평가	50,000
	- 메소코즘에서 적조생물 <i>Chattonella marina</i> 살조효과 및 생태계 위해성 평가	-- 신규 살조물질(TD49)에 대한 <i>Chattonella marina</i> 살조효과 - 황토에 대한 <i>Chattonella marina</i> 살조효과 - 살조물질 및 황토가 부유생물생태계에 미치는 영향평가	부유생물생태계 위해성 평가	50,000
	- 마이크로코즘에서 적조생물 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 에 대한 살조물질의 살조능 평가	-- 신규 살조물질(TD49)에 대한 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 살조효과 - 황토에 대한 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 살조효과 - 살조물질(TD49) 및 황토가 부유생물생태계에 미치는 영향평가 - 살조물질(TD49) 및 황토가 어류에 미치는 영향평가	해양생태계 위해성 평가	35,000
	- 다양한 적조생물을 메소코즘규모에서 평가 후 현장 적용을 위한 방안 모색	- 메소코즘 적용 위해성 평가를 위한 마이크로코즘 적용의 사전 효율성 검토	현장 적용검토	5,000

2. 연구수행방법

2.1. 2단계 1차년도 연구수행방법 (2011년)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
TD49의 생물농축도(BCF) 조사	- 해수 중 TD49에 노출시켜 단일 생물농축도 조사 - 대상생물로는 새우와 넙치를 사용 - TD49(해수)에 일정기간 노출 시킨 후 HPLC를 이용하여 농도분석	- 넙치를 10일간 해수를 통해 TD49에 노출 시킨 후 내장, 아가미, 근육을 적출하여 각각 분석함. - 새우는 7일간 TD49에 노출 시킨 후 분석함. - 동결건조 후 homogenizer로 파쇄시켜 초음파처리를 함. - 원심분리 후 상등액을 취하여 회전증발 농축기를 사용하여 농축시킨 후 HPLC로 분석.
TD49의 생물축적도(BAF)	- 해수 중 TD49에 노출시키면서	- TD49에 해수를 통해 노출시킨 후

조사	<p>TD49에 노출된 새우를 넙치의 먹이로 이용하여 생물 축적도 조사</p> <ul style="list-style-type: none"> - TD49의 농도는 HPLC로 분석 	<p>TD49에 노출시킨 새우를 넙치에게 먹이로 공급하고 익일에 넙치의 내장, 아가미, 근육을 적출하여 각각 분석함.</p> <ul style="list-style-type: none"> -TD49의 농도는 HPLC로 생물농축도 조사와 동일한 조건에서 분석함.
TD49의 옥탄올/물 분배계수 및 QSAR값과 BCF의 비교	<ul style="list-style-type: none"> - OECD guideline 123과 Aaron 등의 방법을 이용하여 Slow-stirring method로 분석 - 기 보고된 K_{ow}-BCF간의 QSAR을 이용하여 TD49의 BCF 비교 	<ul style="list-style-type: none"> - Slow-stirring method로 진행함. - 용매의 전처리 단계로서 순수한 1-octanol과 물을 포화용액 제조를 위하여 물로 포화된 옥탄올의 조제는 옥탄올 6 : 물 1의 비율로 혼합하여 24시간 진탕하여 포화시킨 후, 물 층과 분리하여 사용. 옥탄올로 포화된 물의 조제는 물 6 : 옥탄올 1의 비율로 혼합 후, 24 시간 진탕하여 포화시키고 분리하여 사용함. - 포화된 1-octanol 50 ml와 물 950 ml의 비율로 두 상을 형성시켜 TD49 주입 후 교반시킴. - 두 층으로 분리된 TD49는 HPLC로 분석함.
유해조류의 성장단계 및 T49 물질의 농도별 살조능 조사	<ul style="list-style-type: none"> - 유해적조생물의 성장단계별 최적의 살조농도 파악 - 유해조류의 성장단계별 엽록소의 형광값(<i>in vivo</i> fluorescence)과 개체 수밀도를 파악하여 사멸정도 파악 - Photo PAM장비를 이용한 적조생물의 활성정도(active Chl.a) 파악 	<ul style="list-style-type: none"> -적조대상생물을 성장단계별 초기성장기, 대수증식기, 안정기에 각각의 농도가 다른 TD49물질을 접종 후 생물의 사멸정도를 파악함. -TD49물질은 대상생물의 세포벽에 침투하여 세포내부의 구조를 파악하여 세포가 폭발하듯이 사멸함. 이 과정에서 고유 엽록소의 활성을 잃게 되고, 파괴되지 않는 세포는 활성엽록소를 가지게 되는데, 이와 같이 활성엽록소(active Chl.a)를 측정하면 생물의 사멸정도를 기계적으로 쉽게 측정이 가능함. -1일 간격으로 2-3주간 생물의 사멸정도를 모니터링함
TD49물질을 이용한 마이크로코즘에서 부유생물생태계 위해성 검토	<ul style="list-style-type: none"> - 마이크로코즘을 이용하여 TD49물질이 부유생물생태계에 미치는 위해성 평가 및 적조생물 제어능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 마이크로코즘(10L규모)에서 대상유해조류와 자연상태의 생물을 배양한 후 TD 49물질의 살조능 파악 - 1일 간격으로 10동안 생물의 사멸정도 및 환경요인의 변화를 모니터링함

		<ul style="list-style-type: none"> - 1일 간격으로 엽록소의 형광값(<i>in vivo</i> fluorescence), active Chl.a 및 개체수밀도를 파악하여 대상생물의 사멸정도 파악 - 생태계에 미치는 영향은 상위영양동물플랑크톤의 사멸정도로 파악하기 해양생태계 위해성 검토
TD49물질을 이용한 현장적조생물 <i>Akashiwo sanguinea</i> 살조능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 현장에서 자연상태의 유해적조생물 <i>Akashiwo sanguinea</i>의 제어 가능성 검토. - 실험규모(소, 중, 대규모)가 다른 실험구에서 TD49물질의 살조특성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 소규모(50 mL), 중규모(10 L), 대규모(40 L)에서 현장에서 발생한 적조생물을 채수하여 TD49물질의 살조특성 파악. - 3 종류의 실험규모에서 1일 간격으로 엽록소의 형광값(<i>in vivo</i> fluorescence), active Chl.a 및 개체수밀도를 파악하여 대상생물 및 자연상태의 생물의 생존여부 파악. - 해양생태계 위해성 평가는 대상생물과 자연상태의 생물군집에 어떠한 영향을 주는지 평가하여 결정함.

2.2. 2단계 2차년도 연구수행방법 (2012년)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
TD49물질에 대한 연안 우점종(유해종과 비유해종)의 살조제어 특성평가	<ul style="list-style-type: none"> - 연안에서 빈번하게 발생하는 적조생물을 대상으로 종특이적(species-specific)으로 살조여부 검토. 	<ul style="list-style-type: none"> - 연안에서 우점하는 유해종과 비유해종에 대한 대조구대비 TD49물질살조 정도를 파악하기 위해서 물질 접촉 후 24h, 48h동안의 active Chl.a 농도를 파악하여 살조능 여부를 평가함.
국내유입 가능 신규 유해적조생물 (<i>Heterocapsa circularisquama</i>)의 균주 확보 및 유지	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Heterocapsa circularisquama</i>는 일본 세토내해역수산연구소에서 분양받은 균임. - 본 종에서 종특이적으로 출현하는 바이러스를 확보하기 위해서 안정적인 배양 - 살조물질(TD49)에 대한 특이적 살조효과 확인 	<ul style="list-style-type: none"> - 일본에서 균주 분양받음 - 나노캡시드 탑재를 위한 바이러스를 분리하기 위하여 안정적 배양균주 확보 - TD49물질에 대한 균주별 살조효과 확인

<p><i>H. circularisquama</i>에 대한 살조후보물질 살조능의 메소코즘 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>H. circularisquama</i> 배양균주 확보 현장의 적조수준에 준하는 mass-culture를 수행하여, 각 메소코즘에 분주할 수 있는 생물량 확보 (180L 대량배양). -1.3ton 규모의 메소코즘에서 TD49 물질의 농도별 <i>H. circularisquama</i> 의 살조능 평가 - Photo PAM장비를 이용한 적조생물의 활성정도(active Chl.a) 파악 -살조대상생물 이외의 생물군에 대한 생태계 위해성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> -1.3ton 규모의 메소코즘에서 TD49물질의 농도를 control, blank, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0μM로 맞춤. -12시간 간격으로 대상생물 <i>H. circularisquama</i> 살조여부 확인 - 생태계에 미치는 영향은 상위영양 동물플랑크톤의 사멸정도로 파악하기 해양생태계 위해성 검토
--	--	---

2.3. 2단계 3차년도 연구수행방법 (2013년)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>메소코즘에서 적조생물 <i>Hetrosigma akashiwo</i> 살조효과 및 생태계 위해성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> -- 적조생물 <i>Hetrosigma akashiwo</i> 을 현장의 적조 수준에 준하는 mass-culture를 수행하여, 각 메소코즘에 분주할 수 있는 생물량 확보 (300L 대량배양). -1.0ton 규모의 메소코즘에서 TD49 물질의 농도별 <i>Hetrosigma akashiwo</i> 의 살조능 평가 -황토에 대한 영향 평가 - Photo PAM장비를 이용한 적조생물의 활성정도(active Chl.a) 파악 -살조대상생물 이외의 생물군에 대한 생태계 위해성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> -<i>H. akashiwo</i> 실험군의 최종농도는 0, 0.5, 1.0, 1.5μM로 황토는 400g /ton, 1kg/ton 2개의 실험군을 포함한 황토 (400g /ton)+TD49(0.4μM)의 혼합실험군을 둠. -TD49와 황토에 의한 생태계내의 영향을 평가하기 위해 인근 해수에 서식하는 200 μm 이상 크기의 동물플랑크톤을 <i>H. akashiwo</i>의 실험시 600 individual L⁻¹로, <i>C. marina</i>의 실험시 300 individual L⁻¹로 메소코즘에 각각 주입하여 평가함 -TD49와 황토의 영향조사는 물질을 주입 한 후 5일간 매일 06:00, 18:00에 2회 모니터링하였고, 6-10일 사이에는 06:00에 1회 모니터링함. -12시간 간격으로 대상생물 <i>Hetrosigma akashiwo</i> 살조여부 확인 - 생태계에 미치는 영향은 상위영양 동물플랑크톤의 사멸정도로 파악하기 해양생태계 위해성 검토

<p>메소코즘에서 적조생물 <i>Chattonella marina</i> 살조효과 및 생태계 위해성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 적조생물 <i>Chattonella marina</i>의 배양균주 확보 현장의 적조수준에 준하는 mass-culture를 수행하여, 각 메소코즘에 분주할 수 있는 생물량 확보(300L 대량배양). -1.0ton 규모의 메소코즘에서 TD49 물질의 농도별 <i>Chattonella marina</i>의 살조능 평가 -황토에 대한 영향 평가 - Photo PAM장비를 이용한 적조생물의 활성정도(active Chl.a) 파악 -살조대상생물 이외의 생물군에 대한 생태계 위해성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> -<i>C. marina</i> 실험군의 최종농도는 0, 0.2, 0.4, 0.8μM로 황토는 400g /ton, 1kg/ton 2개의 실험군을 포함한 황토 (400g /ton)+TD49(0.4μM)의 혼합 실험군을 둠. -TD49와 황토의 영향조사는 물질을 주입 한 후 5일간 매일 06:00, 18:00에 2회 모니터링하였고, 6-10일 사이에는 06:00에 1회 모니터링함. -12시간 간격으로 대상생물 <i>Chattonella marina</i> 살조여부 확인 - 생태계에 미치는 영향은 상위영양 동물플랑크톤의 사멸정도로 파악하기
<p>마이크로코즘에서 적조생물 <i>Cochlodinium polykrikoides</i>에 대한 살조물질의 살조능 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 신규 살조물질(TD49) 및 황토에 대한 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 살조효과 - 살조물질(TD49) 및 황토가 부유생물 생태계에 미치는 영향평가 - 살조물질(TD49) 및 황토가 어류에 미치는 영향평가 	<ul style="list-style-type: none"> -2013년도 통영인근에서 일어난 적조생물 <i>C. polykrikoides</i>을 제어하기 위하여, 황토와 TD49물질을 이용하여 마이크로코즘 실험을 수행함. -모든 실험은 12 L의 플라스틱 케이 지(30 cm long ´ 20 cm wide ´ 20 cm depth)에 10L의 시료를 넣고, 대조군을 포함하여 TD49처리군(0.4, 0.8 μM), 황토처리군(4g 과 10g per 10L), 황토와 TD49혼합처리군(0.4 μM+4g per 10L)에서 살조능실험 및 생태계에 미치는 영향평가를 수행함. -박테리아의 생물량은 수단블랙(Sudan Black)용액에 0.2 μm membrabe filter (Millipore)를 염색한 후 고정된 시료를 잘 혼합 희석하여 일정량(0.5-2 mL)을 취해 여과후 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 5분간 염색하여 형광현미경 (Axioplane, Zeiss)으로 1000배 하에서 검경 및 계수함 - 생태계에 미치는 영향은 상위영양 동물플랑크톤의 사멸정도로 파악하기 해양생태계 위해성 검토 어류에 대한 살조물질(TD49, 황토)에 대한 독성 평가는 3개월 된 줄돔

		<p>(Striped beakerch fish; <i>Oplegnathus fasciatus</i> 4.8±0.5cm in length)을 이용하였음.</p> <p>-어류독성실험에서 TD49 농도는 0, 0.2, 0.4, 0.8, 2.0, 4.0, 10 μM로 조절하였고, 황토의 농도는 4g L⁻¹ 과 10g L⁻¹.으로 맞춰 48시간 노출실험을 수행하여 평가함.</p>
--	--	---

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

3.1. 생물농축도(BCF)조사

3.1.1. 연구배경

인간들의 활동에 의해 생성된 다양한 화학물질들이 환경으로 유입되어 식물을 포함한 수서 및 육상 생물체는 이런 화학물질에 노출된다. 흡수된 화학물질이 급성독성평가에 의해 낮은 농도에서 문제가 없다고 하더라도, 시간이 흐른 후 흡수된 화학물질이 배설을 통하여 체외로 배출되지만 그 중 일부는 흡수되어 고농도로 생물체내에 축적되는데 이러한 생물 농축현상은 먹이를 포함한 주변 환경보다 해당 생물체내의 화학물질 농도가 더 높아지는 결과를 가져옴. 수서생물의 경우 생물농축(Bioconcentration)은 생체 내 어떤 화학물질 농도가 물에 포함되어 있는 동일 화학물질 농도보다 높아지는 것을 나타낸다.

본 실험에서는 해양생태계에서 TD49의 생물농축도 조사를 하기 위해서 TD49를 처리한 해수에 단일 생물체 2종에 노출평가를 실시하였다.

3.1.2. 실험방법

3.1.2.1. 대상생물 및 배양조건

본 실험에서는 새우(*Fenneropenaeus chinensis*)와 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 이용하였음. 새우(*F. chinensis*)는 G 광역시의 N 시장에서 구매한 양식새우를 실험실에서 3일간 순치시켰다(그림 3-1-1). 새우의 크기는 13 ± 2

cm이고, 중량은 18 ± 3 g이며, 새우의 사육 환경은 온도 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, pH는 8.0 ± 0.1 , 용존산소는 9.4 ± 0.7 mg/L에서, 광주기는 광조건 16 시간, 암조건 8 시간을 유지하였다. 배양에 사용한 먹이로는 열대어사료인 TetraBits와 TetraMin (Tetra-Werke, Melle, Germany)을 공급하였다. 실험에 이용된 넙치(*P. olivaceus*)는 고흥군 소재 육상 수조식 사육장(H수산)으로부터 분양받아 사용하였다(그림 3. 1. 1). 넙치의 크기는 12 ± 0.5 cm고 중량은 13 ± 2 g이며, 넙치의 사육 환경은 온도 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, pH는 7.97 ± 0.1 , 용존산소는 8.8 ± 0.2 mg/L였다. 사료는 어류용 사료(Aller aqua, Christiansfeld, Denmark)를 공급하였고, 사료공급량은 어체중(습중량)의 2%로 1 일 1 회에 걸쳐서 공급하였고, 먹이와 배설물은 사료 공급 1 시간 후에 제거하였다. 실험 기간 동안에는 사료 공급을 중단하였다. 광주기는 광조건 16 시간, 암조건 8 시간을 유지하였음. 실험에 사용된 해수는 해수염(TetraMarine salt pro, United Pet Group. Inc)을 구입하여 증류수 1 L당 33 g을 넣어 제조하여 사용하였다.

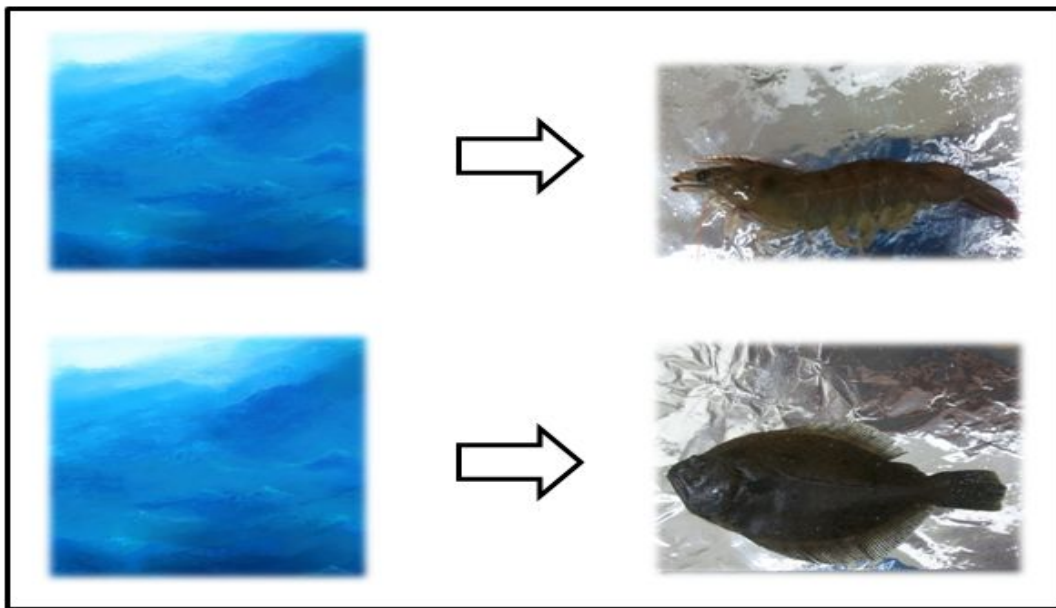


그림 3-1-1. *Fenneropenaeus chinensis* and *Paralichthys olivaceus* samples.

3.1.2.2. 노출실험

새우(*F. chinensis*)는 이전 급성 독성 농도 실험에서 살조물질을 처리한 후 구해진 PNEC 값의 10배 농도(34 nM)에서 TD49의 생물 농축 실험을 진행하였다.

해수염과 증류수를 혼합하여 해수를 제조한 후 수조에 TD49의 농도가 34 nM이 되도록 용해시켰으며 동일한 TD49의 농도로 제조한 해수를 1 일 마다 전량 교체하였다. 0, 1, 2, 4, 7 일째에 수조에서 새우(*F. chinensis*)를 채집하였다. 증류수로 세척한 후, 길이 및 중량을 측정하고, 분석하기 전까지 -80°C 에서 냉동 보관하였다.

넙치(*P. olivaceus*)의 노출 방법 및 실험 조건은 OECD guideline 305와 Munger와 Hare의 방법을 참고로 하였다(OECD 1996; Munger and Hare 1997). 새우(*F. chinensis*)와 마찬가지로 PNEC 값의 10배 농도(34 nM)에서 TD49의 생물 농축 실험을 진행하였음. 해수를 제조한 후 TD49의 농도가 34 nM이 되도록 용해시켜 제조하였으며 해수는 1 일 마다 전량 교체하였음. 먹이를 주지 않고 해수를 통한 흡수를 유도하였다. 10 일이 지난 후, 수조에서 넙치(*P. olivaceus*)를 채집하여 증류수로 세척한 후, 길이 및 중량을 측정하였음. 넙치의 내장(viscera), 아가미(gill), 근육(muscle)을 해부하여 분리한 후, 분석하기 전까지 -80°C 에서 냉동 보관하였다.

3.1.2.3. TD49의 추출 및 분석

모든 샘플은 동결건조기를 이용하여 건조시킨 후 건조중량을 측정하고, DMSO를 넣고 homogenizer로 파쇄한 후, 고속으로 1분 이상 교반시킨 후 20분 동안 초음파 처리를 추가로 실시하였음. 원심분리관에 옮겨 담은 후 4°C , 12000 rpm, 10분 동안 원심분리 하여 상등액을 취함. 이 작업을 3반복하여 회수된 상등액은 회전증발 농축기(Rotary vacuum evaporator, Eyela, Japan)를 이용하여 농축시킨 후, DMSO를 1 mL를 넣어서 재용해 시켰음. 농축시킨 시료는 원심분리하여 상등액만 취한 후 0.2 μm syringe filter로 여과시킨 후 HPLC로 분석하였다. 본 실험에 사용된 분석 장치는 Pump는 Young-lin M930, Autosampler는 Young-lin YL9150 Autosampler, Absorbance Detector는 Young-lin M720이며, 사용된 컬럼은 octadecylsilane column(Waters PAH C18, 5 μm , 4.6×250 mm)을 이용하였다. Mobile Phase는 10 mM phosphate buffer : acetonitrile = 25 : 75(v/v%)로 pH는 4.3, 유속은 1 mL/min로 하였다. 이때 UV 흡광 파장은 350 nm임.

3.1.3. 결과 및 고찰

생물농축에 있어 가장 중요한 인자는 화학물질의 분자크기 및 분자전하, 분자의 존재 형태, 개체의 크기 혹은 연령, 조직형태, 생전환 등을 들 수 있다(Leeuwen and Hermens 2001). 수서생물의 경우에는 물과의 접촉에서 호흡과정이나 피부를

통해 직접 유입이 된다.

3.1.3.1. 새우(*F. chinensis*)에 대한 노출평가

생물농축실험 후 새우에 농축된 TD49의 함량을 측정하였다. TD49에 7일 동안 노출 시킨 새우에서 TD49가 검출되지 않았다. 이는 분쇄 시 발생하는 열에 의하여 생성된 아스타크산틴의 성분에 TD49가 흡착되었거나 새우의 체내에 고농도로 존재하는 콜레스테롤 성분(100g당 130mg)과 같은 방해물질에 의해 측정 시 검출되지 않는 것으로 판단된다. 그러나 먹이사슬을 통하여 넙치에게 먹이로 주었을 때 대조군에 비하여 높은 농축이 일어난 것을 보아(그림 2) 새우의 체내에도 TD49가 농축 되었을 것으로 예상된다. 그러므로 앞으로 TD49에 대한 추출과정의 정제방법 등에 대하여 추가적으로 연구되어야 할 것으로 사료된다.

3.1.3.2. 넙치(*P. olivaceus*)에 대한 노출평가

생물농축실험 후 넙치에 농축된 TD49 함량정도를 측정하기 위해 내장, 아가미, 근육 세 부분으로 나누어 분석하였다. TD49에 10일 동안 노출 시킨 후 측정된 값(그림 3)은 내장 2.30 ± 0.36 nmole/g, 아가미 2.15 ± 0.56 nmole/g, 근육 0.69 ± 0.35 nmole/g 이고 BCF를 계산한 값은 내장 67.70 ± 10.52 , 아가미 63.32 ± 16.54 , 근육 20.25 ± 10.25 로 측정되었다(Table 3.1.1).

내장에서 가장 높은 농도(2.30 ± 0.36 nmole/g)를 보였으며, 아가미(2.15 ± 0.56 nmole/g) - 근육(0.69 ± 0.35 nmole/g) 순으로 높은 농도를 보였다. 이는 내장이 저장과 분해에 중요한 역할을 하는 조직으로 TD49의 축적이 더 크게 일어났기 때문으로 사료된다. 그리고 아가미의 경우 물질의 흡수, 저장, 이동의 중요역할을 담당하면서 외부 오염물질의 직접적인 노출이 되는 부위이기 때문에 높은 농도가 축적되었으며, 근육 부위는 오염물질이 직접적으로 닿는 부위가 아니고 (Palaniappan et al. 2010), 에너지 흡수나 대사과정의 관여가 적기 때문에 낮은 농도가 추출되었을 것이라고 사료된다(Kim et al. 2007).

오염물질은 모든 조직에 일정한 분포를 보이지 않고 내장(특히 간 또는 신장), 아가미 등에 많은 양이 축적된다. 간의 경우 오염물을 저장, 재분배, 형질 변환 등의 중요한 역할을 하기 때문이고, 아가미는 호흡으로 인해 외부 오염물질에 가장 노출이 쉽게 되기 때문이다.

내장에서의 10일째 검출농도가 낮은 이유는 당뇨병과 관련된 질환 치료를 위한 치료제인 Thiazolidinedione(TD)라는 물질을 기본 골격으로 되어 있어 내장에서 신진 대사 활동에 의하여 분해되거나 다른 대사산물로 변하였기 때문으로 사료된

다.

실험 결과 TD49의 수중에서 용해도가 낮아 생물농축계수가 높을 것으로 예상되었지만 어류를 이용한 실험 결과 생물농축계수가 높지 않았다. 이는 중금속 생물농축 연구결과와의 비교에서도 상대적으로 낮은 값에 해당한다(Cho and Kim 2007). 생물농축계수 분석시기에 따른 축적 농도 차이의 원인은 분석상의 오차, 시험어종의 나이, 크기, 종간의 차이, 조직형태, lipid content, 오염 물질의 노출 농도 등 다양한 이유가 있다고 알려져 있다(Leeuwen and Hermens 2001; Kim et al. 2007; Seguchi and Asaka 1981).

표 3.1.1. Bioconcentration factors of TD49 for *F. chinensis* and *P. olivaceus* (n=3)

	<i>F. chinensis</i>	<i>P. olivaceus</i>		
		Viscera	Gill	Muscle
TD49 (nmoles/g)	ND ^{a)}	2.30 ± 0.36	2.15 ± 0.56	0.69 ± 0.35
BCF	ND	67.70 ± 10.52	63.32 ± 16.54	20.25 ± 10.25

a) ND : not-detectable

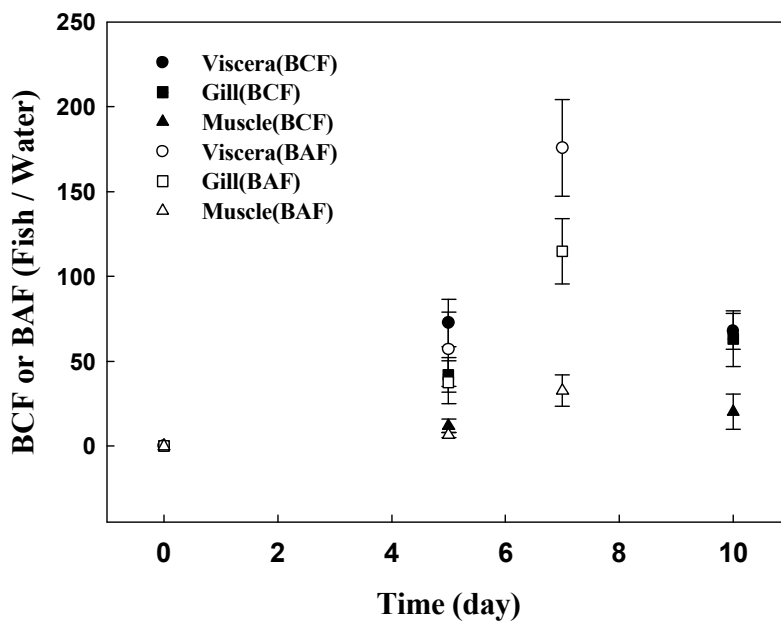


그림 3.1.2. Comparison of bioconcentration factor and bioaccumulation factor of TD49 (n=3).

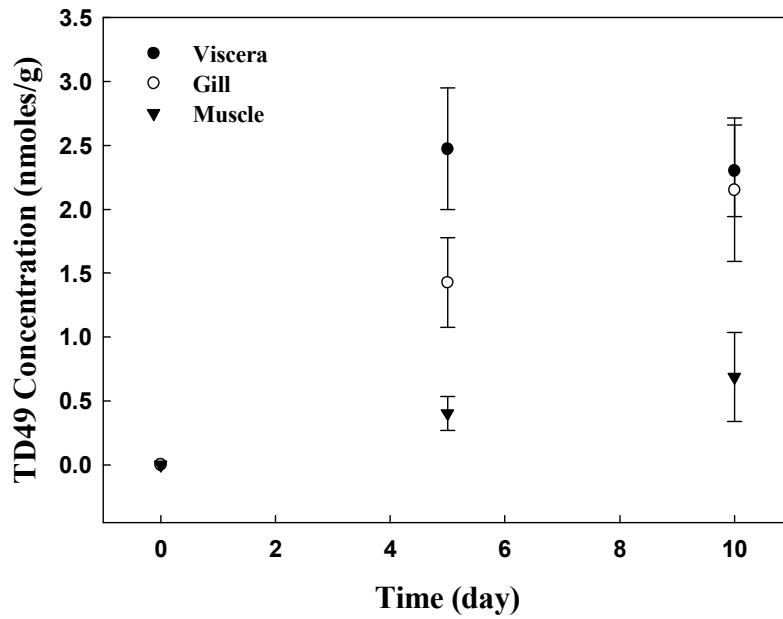


그림 3.1.3. Concentration of TD49 in organ tissues of *P. olivaceus* exposed to 34 nM of TD49 for 10 days(n=3).

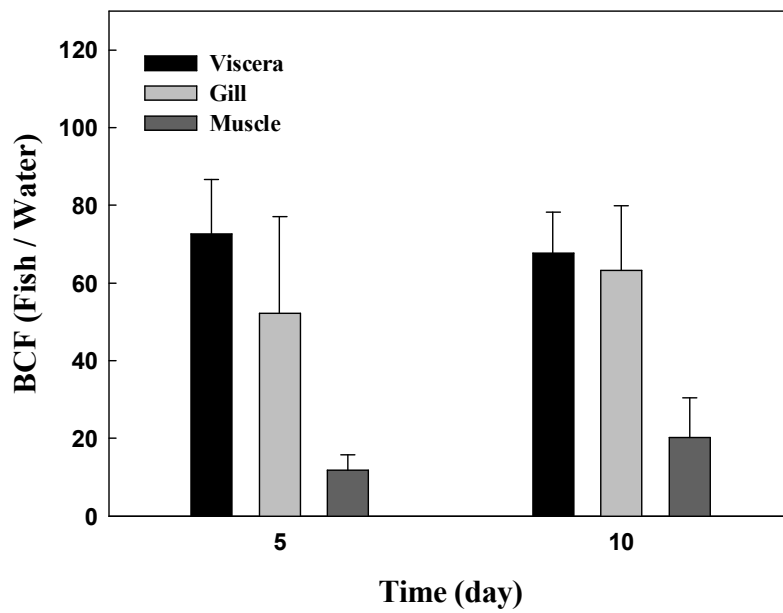


그림 3.1.4. Bioconcentration factor (BCF) of TD49 in organ tissues of *P. olivaceus* exposed to 34 nM of TD49 for 10 days (n=3).

3.2. 생물축적도(BAF)조사

3.2.1. 연구배경

생물축적(Bioaccumulation)은 생체 내 어떤 화학물질 농도가 물에 포함되어 있는 동일 화학물질 농도보다 높아지는 것을 나타내는 생물농축(Bioconcentration)과 수서생물은 물론 보다 상위에 위치한 고등 생물의 경우 생물농축의 주된 경로가 먹이인 경우에 생물확대(Biomagnification)라고 하며(Kelly et al. 2007), 이 두 가지 개념의 종합적인 결과를 생물축적(Bioaccumulation)이라고 한다(Leeuwen and Hermens 2001).

본 실험에서는 해양생태계에서 TD49의 생물축적도 조사를 하기 위해서 TD49를 처리한 해수에 먹이사슬 관계에 있는 새우와 넙치 2종에 대하여 노출평가를 실시하였다(그림 3.2.1).

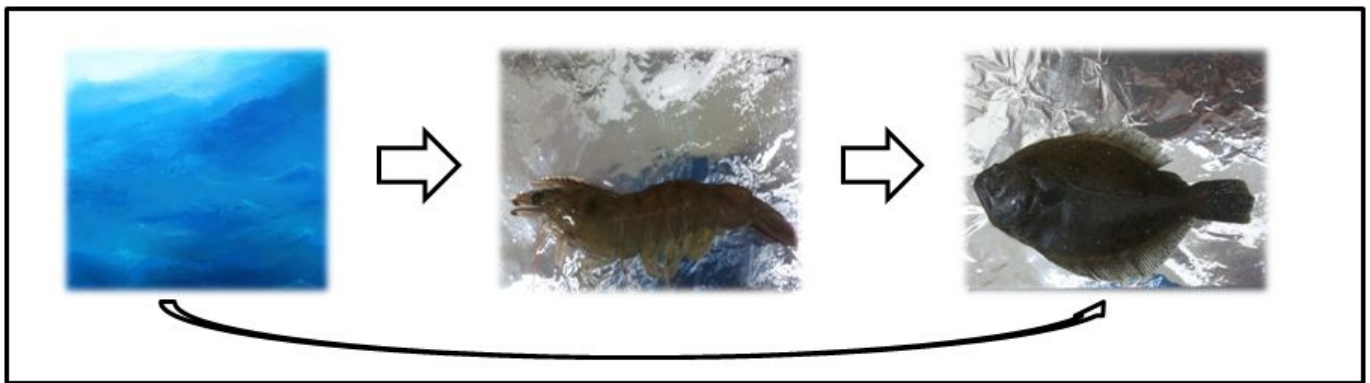


그림 3.2.1. Bioaccumulation using *Fenneropenaeus chinensis* and *Paralichthys olivaceus*

3.2.2. 실험방법

3.2.2.1. 대상생물 및 배양조건

본 실험에서는 새우(*Fenneropenaeus chinensis*)와 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 이용하였고, 배양조건은 생물농축도 실험과 동일한 조건으로 실험을 수행하였다.

3.2.2.2. 노출실험

넙치(*P. olivaceus*)의 노출 방법 및 실험 조건은 OECD guideline 305[3]와

Munger와 Hare의 방법을 참고로 하였다(Munger and Hare 1997). 생물농축도 실험과 마찬가지로 PNEC 값의 10배 농도(34 nM)에서 TD49의 생물축적실험을 진행하였다. 해수를 제조한 후 TD49의 농도가 34 nM이 되도록 용해시켜 제조하였으며 해수는 1 일 마다 전량 교체하였다. 34 nM의 TD49에 노출된 새우(*F. chinensis*)를 조각내어 먹이로 공급하여 해수와 먹이를 통한 흡수를 유도하였다. 7일이 지난 후, 수조에서 넙치(*P. olivaceus*)를 채집하여 증류수로 세척한 후, 길이 및 중량을 측정한다. 넙치의 내장(viscera), 아가미(gill), 근육(muscle)을 해부하여 분리한 후, 분석하기 전까지 -80°C 에서 냉동 보관한다.

3.2.2.3. 배출실험

배출 단계에서는 TD49를 포함하지 않은 순수한 해수에 TD49를 축적시킨 넙치를 넣고 매일 물을 전량 교체해 주었다. 7일째 넙치(*P. olivaceus*)를 채집하여 증류수로 세척한 후, 길이 및 중량을 측정한다. 넙치의 내장(viscera), 아가미(gill), 근육(muscle)을 해부하여 분리한 후, 분석하기 전까지 -80°C 에서 냉동 보관한다.

3.2.2.4. TD49의 추출 및 분석

추출방법은 생물농축도 실험과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

3.2.3 결과 및 고찰

3.2.3.1. 노출실험

생물축적실험에서도 넙치의 부위에 따른 TD49 축적정도를 알아보기 위하여 내장, 아가미, 근육 세 부분으로 나누어 분석하였다. TD49에 7일 동안 노출시킨 후 측정된 값(그림 6)은 내장 5.98 ± 0.97 nmole/g, 아가미 3.91 ± 0.65 nmole/g, 근육 1.11 ± 0.31 nmole/g 이고 BCF를 계산한 값(그림 7)은 내장 175.89 ± 28.45 , 아가미 114.88 ± 19.15 , 근육 32.59 ± 9.22 으로 측정되었다(Table 3.2.1).

생물축적실험에서도 내장(5.98 ± 0.97 nmole/g)에서 가장 높은 농도를 보였으며, 아가미(3.91 ± 0.65 nmole/g) - 근육(1.11 ± 0.31 nmole/g) 순으로 높은 농도를 보였다.

5일째 농도에 비하여 7일째 농도가 증가한 원인으로는 먹이로 준 새우의 체내에

쌓인 TD49의 농도가 증가하였을 가능성과 새우를 소화 시키는데 상당 시간이 소요되어 발생한 현상이라 사료된다.

BCF와 BAF를 비교하였을 때 5일째는 큰 차이를 보이지 않았지만 7일째 분석결과(그림 2)를 토대로 살펴보면 먹이를 통하여 상당량의 축적이 일어났음을 알 수 있었다. 그러나 실제 생태계에는 수많은 종들이 함께 분포하며 다양한 섭취대상이 존재하는바 실험실 내의 제한된 측정값보다 더 높은 양의 축적이 일어날 가능성이 존재한다(Munger and Hare 1997).

표 3.2.1. Bioaccumulation factors of TD49 for *P. olivaceus*

	<i>P. olivaceus</i>		
	Viscera	Gill	Muscle
TD49 (nmoles/g)	5.98 ± 0.97	3.91 ± 0.65	1.11 ± 0.31
BAF	175.89 ± 28.45	114.88 ± 19.15	32.59 ± 9.22

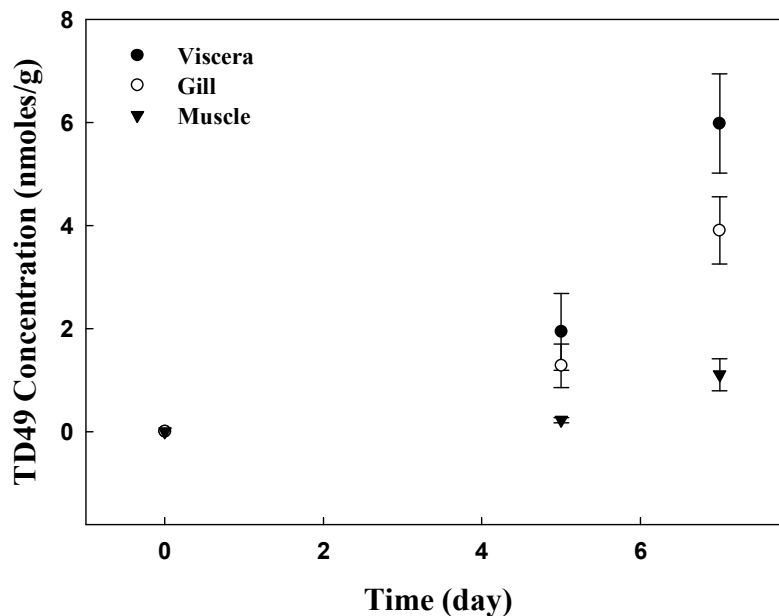


그림 3.2.2. Concentration of TD49 in organ tissues of *P. olivaceus* exposed to 34 nM of TD49 for 7 days (n=3).

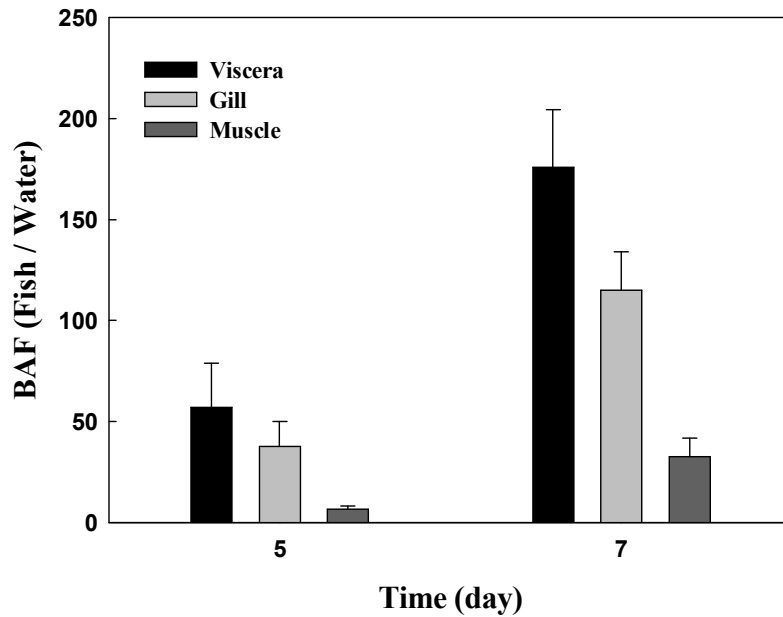


그림 3.2.3. Bioaccumulation factor (BAF) of TD49 in organ tissues of *P. olivaceus* exposed to 34 nM of TD49 for 7 days (n=3).

3.2.3.2. 배출실험

흡수 단계 이후 배출 단계에서는 넙치의 TD49의 잔류량을 알아보기 위하여 내장, 아가미, 근육 세 부분으로 나누어 분석하였다. TD49에 노출된 먹이와 해수를 공급하여 7일간 노출시킨 넙치를 TD49를 투여하지 않은 해수만을 넣어 7일 동안 사육한 후 분석한 결과(그림 8), 내장에서는 2.81 ± 0.76 nmole/g 이 검출되어 약 53%가 감소한 것을 알 수 있었고, 아가미와 근육에서는 검출되지 않았다 (Table 3).

이 결과로 보아 TD49는 해양에 사용되었을 경우 생물체내에 농축될 가능성은 있지만, TD49의 사용이 중단되면 7일 후에는 50% 이상이 배출되고 시간이 흐름에 따라 모두 체내에서 배출되어 제거 될 것으로 생각된다.

표 3.2.2. Residual concentration of TD49 in each part of *P. olivaceus* (n=3) after elimination experiments

	<i>P. olivaceus</i>		
	Viscera	Gill	Muscle
TD49 (nmoles/g)	2.81 ± 0.76	ND ^{a)}	ND

a) ND : non-detectable

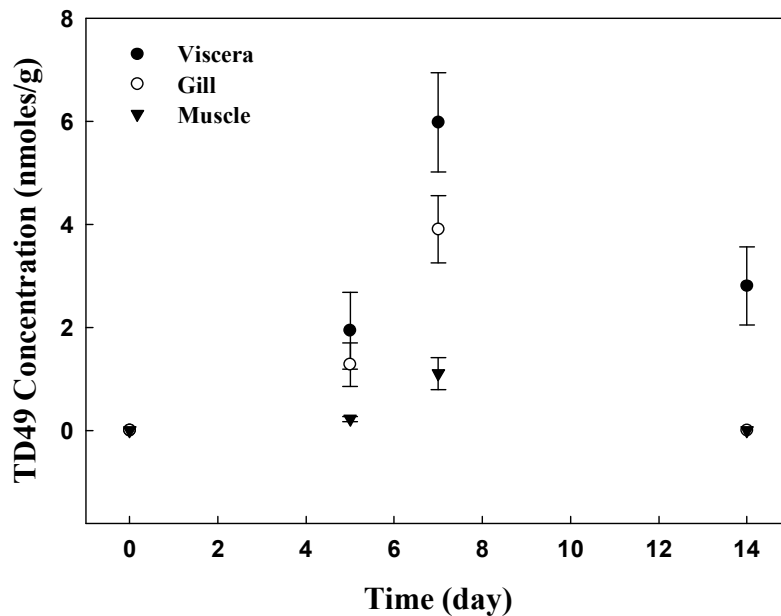


그림 3.2.4. Change of TD49 in *P. olivaceus* during the dietary uptake and elimination experiments.

3.3. TD49의 옥탄올/물 분배계수 측정

3.3.1 연구배경

화학물질의 영향을 평가하고 예측하는데 있어서 화학물질의 물리적·화학적 특성과 물질을 둘러싸고 있는 주변 환경의 특성에 대해서도 알아야 할 필요성이 있다(Porte and Albaiges 1993).

화학물질의 물리적·화학적 특성 중 환경에 영향을 직접적으로 미치는 것들은 분자량, 증기압, 끓는점, 물에 대한 용해도 옥탄올/물 분배계수, 헨리상수, 분해상

수 등을 들 수 있다. 그 중 옥탄올/물 분배계수는 독성, 생물축적, 토양과 침전물의 흡착 정도를 예측하는데 있어서 중요한 특성 중의 하나이고, 옥탄올은 생물체의 경우에는 지방 혹은 토양의 경우에는 유기탄소와 같이 화학물질의 용매를 대표할 수 있는 것으로 간주된다.

$$K_{ow} = C_{octanol} / C_{water}$$

$C_{octanol}$: 옥탄올에서 화학물질의 평형농도

C_{water} : 물에서 화학물질의 평형농도

K_{ow} 는 1-octanol[CH₃(CH₂)₇OH]의 C : H 의 구성비가 생물체의 구성성분인 lipid[CH₃(CH₂)_nCOOH]의 C : H의 구성비율과 유사하기 때문에 lipid를 대체하여 화학물질이 생물체 내에서 미치는 영향을 평가할 수 있다. 또한 1-octanol은 물에 거의 불용성이므로 소수성의 척도가 될 수 있고 화학물질이 생물체에 미치는 영향이나 의약품이 인체에 흡수되는 정도를 예측하거나 추출공정에서 용매를 선택하는데 중요한 정보를 제공한다. 그러므로 옥탄올-물 분배계수는 화학물질이 환경에서의 거동을 연구하는데 중요한 데이터로 이용될 수 있을 것이다.

옥탄올(CH₃(CH₂)₇OH)은 생물체의 지방과 유사한 성질을 가지고 있고 지질의 특성들을 잘 나타내 주고 있기 때문에 옥탄올-물 분배계수는 생물농축 정도를 예측하는 목적으로 오랫동안 사용되어 온 지표이고, 매우 많은 데이터베이스와 화학구조로부터 이를 예측할 수 있는 모형이 개발되어 왔다(Sangster 1989; Meylan and Howard 1995; Chiou et al. 2005).

화학물질의 생물농축을 평가하는 경우, BCF와 K_{ow} 사이에서는 일반적으로 K_{ow} 가 증가함에 따라 BCF가 증가하는 직접적인 상관관계에 있다. 하지만 생물종에 따라 K_{ow} / BCF 상관관계식의 기울기와 절편 값이 다양한 차이를 보이는데 이것은 생물종간 생리적 차이, 즉 지질량의 차이로 해석하고 있다. 따라서 이들의 상관관계에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 판단된다(Leeuwen and Hermens 2001).

본 연구에서는 BCF_{fish}와 K_{ow} 간의 상관관계를 알아보고 방정식(log BCF = a·log K_{ow} + b)을 활용하여 구한 BCF값과 실험을 통해 구한 BCF값을 비교하였다.

3.3.2. 실험방법

분배계수 측정에 사용된 실험방법은 OECD guideline 123과 Aaron 등의 소개된 Slow-stirring method를 참고하여 진행하였다(OECD 2006; Fisk et al. 1999).

Slow-stirring method을 위해 사용한 1-octanol은 Merck(99%), 물은 증류수를 사용하였다. 용매의 전처리 단계로서 순수한 1-octanol과 물을 포화용액 제조를 위하여 충분한 양의 1-octanol과 물을 플라스크에 준비하고 교반시켜 포화가 이루어지게 한다. 물로 포화된 옥탄올의 조제는 옥탄올 6 : 물 1의 비율로 혼합하여 24시간 진탕하여 포화시킨 후, 물 층과 분리하여 사용하였고 옥탄올로 포화된 물의 조제는 물 6 : 옥탄올 1의 비율로 혼합 후, 24 시간 진탕하여 포화시키고 분리하여 사용하였다.

플라스크에 포화된 1-octanol 50 ml와 물 950 ml의 비율로 두 상을 형성시킨다. 그리고 TD49를 포화된 1-octanol층에 주입한 후 평형에 도달하도록 24시간 이상 교반시킨다. 이 때 옥탄올이 휘발되는 것을 막기 위하여 밀봉하고, 두 상의 계면이 유지되고, 동심원이 0.5 ~ 1 cm가 유지되도록 천천히 교반시킨다. 교반시킨 후 두 층이 완전히 분리되도록 충분한 시간동안 정치시킨 다음, 시료를 채취한다. 채취한 시료를 회전증발 농축기(Rotary vacuum evaporator, Eyela, Japan)를 이용하여 농축시킨 후, DMSO를 넣어서 재용해 시킨다. 그리고 용해된 시료는 0.2 μ m syringe filter로 여과시킨 후 HPLC로 분석한다.

구해진 K_{ow} 를 문헌에 나온 옥탄올/물 분배계수와 BCF의 관계식을 적용하여 BCF값을 계산하여 어떤 관계식에 적용가능한지 검토한 후, 실험을 통하여 얻어진 BCF값과 비교하여 상관관계를 분석한다.

3.3.3. 결과 및 고찰

3.3.3.1. TD49의 옥탄올/물 분배계수 측정

TD49는 수중에서 낮은 용해도로 인해 거의 녹지 않고 유기용매를 사용하여 용해된다. 그렇기 때문에 옥탄올/물 분배계수 측정 시 옥탄올 층에 많은 양이 축적될 것으로 예상된다.

옥탄올/물 분배계수 실험결과 Log K_{ow} 값은 3.66 이었고, 기 보고된 옥탄올/물 분배계수의 관계식을 이용한 BCF 계산 결과, 구해진 BCF 값은 실험을 통하여 구해진 결과에 비하여 전체적으로 높은 것을 알 수 있다. 옥탄올/물 분배계수를 이용하여 구해진 BCF 값과 실험을 통하여 구해진 BCF 값을 비교하였을 때 가장 근접한 식은 Neely et al의 식($\log BCF = 0.54K_{ow} + 0.12$)으로 판단되며 본 연구의 K_{ow} 값을 적용하였을 때 124.85라는 BCF 값이 얻어졌다.

실험에 의하여 구해진 log K_{ow} 값에 비하여 생태계에서 낮은 정도로 일어나는 생물농축은 분해/대사과정, 분자크기, 고지용성 등 여러 가지 요인의 복합적인 결과로 볼 수 있다(Kwon 2008; Leeuwen and Hermens 2001). 따라서 이들의 상관

관계에 대해서는 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

요약

본 연구에서는 급성독성평가 데이터를 토대로 하여 독성평가 실험의 최종단계인 생물농축실험과 옥탄올/물 분배계수를 이용한 관계식을 사용한 생물농축계수를 구하여 신규 살조물질이 실제 해양에서 사용되었을 경우 해양생물의 체내에 축적될 가능성을 평가하고자 하였다.

1. TD49+해수에 10일 동안 노출된 후 넙치의 장기별 농도는 내장 2.30, 아가미 2.15, 근육 0.69 nmoles/g로 분석되었다. 근육이 가장 낮고, 내장이 가장 높았다. 각 BCF는 내장 67.70, 아가미 63.32, 근육 20.25로 계산되었다.
2. TD49에 노출된 새우를 먹이로 공급한 넙치를 7일 동안 TD49에 노출 후 장기별로 분석한 결과, 내장 5.98, 아가미 9.93, 근육 1.11 nmoles/g로 분석되었다. 물로만 노출시킨 그룹에 비교하여 상당히 높은 양이 축적된 것을 알 수 있다. 각각의 BAF는 내장 175.89, 아가미 114.88, 근육 32.59로 계산되었다.
3. TD49에 노출된 먹이와 해수를 공급하여 7일간 노출시킨 이후 순수한 해수만을 넣어 배출 실험한 결과, 내장에서 2.81 nmole/g 이 검출되어 약 53%가 감소하였고, 아가미와 근육에서는 검출되지 않았다.
4. 옥탄올/물 분배계수 실험결과 $\log K_{ow}$ 값은 3.66 이었고, 기 보고된 QSAR 관계식에 의해 BCF를 계산한 결과 실험값과 가장 일치한 식은 Neely et al(1974)의 식으로 판단된다.

실험 결과 TD49의 수중에서 용해도가 낮아 생물농축도가 높을 것으로 예상되었지만 어류에 대한 농축도 실험 결과 생물농축계수가 그다지 높지 않았다. 이는 타 보고의 생물농축도 관련 QSAR이나 다른 중금속과 비교하였을 때에도 상대적으로 낮은 수치로 판명되었다.

TD49의 생물농축도는 낮았지만, 개방상태의 현장에서는 해류에 의한 희석효과 등 다양한 저감요인으로 인해 위해도는 더욱 더 감소되리라 사료되며, 연안 환경의 여러 변수를 고려하여 TD49에 대한 지속적인 관찰이 필요할 것이다.

3.4. TD49 물질에 대한 종특이적 살조능 평가 (2단계 1차년도: 2011년)

3.4.1 연구배경

개발된 살조물질이 해양생태계에 미치는 영향을 평가하기 위해서 다양한 생물종과 다양한 규모의 배양장치를 설치하여 해양부유생태계 생물에 대한 독성과 적조생물에 대한 살조능을 확인하고자 하였다. 본 세부과제의 3.4장에서는 I) 적조생물의 4종(*Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*, *Chattonella* sp., *Heterocapsa circularisquama*)에 대한 성장단계별 및 TD49물질 농도별 살조효과, II) 적조생물 *H. akashiwo*와 *C. marina*에 관해서는 소형메소코즘에서 살조능과 해양부유생생물에게 미치는 영향평가, III) 현장적조생물 *Akashiwo sanguinea*의 살조능 테스트, IV) 연안해역에 우점하는 적조생물 20종에 대한 TD49물질의 살조효과등에 관한 실험을 수행하였다.

3.4.2. 실험방법

3.4.2.1. TD49 살조물질

Thiazolidinedione 유도체 TD49의 구조는 Figure 3. 4. 1. 1에 나타내었으며, 조선대학교 조훈교수로부터 신규로 합성한 물질을 제공받았다.

TD49(MW: 337.8)의 용해는 동국대학교 한효경교수가 개발한 방법에 따라 TD49와 분산제 Solutol® RHS15(MW: 960)(BASF, Ludwigshafen, Germany)를 함께 100% 에탄올에 완전히 용해시킨 용매를 상온에서 진공펌프를 이용하여 제거시켰다.

얻어진 고체 분산제는 spatula를 이용해 긁어내고 12시간 동안 진공하에서 완전히 건조시켰고, 이와 같이 얻어진 건조물을 증류수를 넣고 초음파를 이용하여 재용해한 후 stock solution(296)으로 사용하였다. TD49물질은 해수에 잘 녹지 않기 때문에 7% 메탄올에 녹여 TD49 stock solution을 만들어 살조능 실험에 사용하였다.

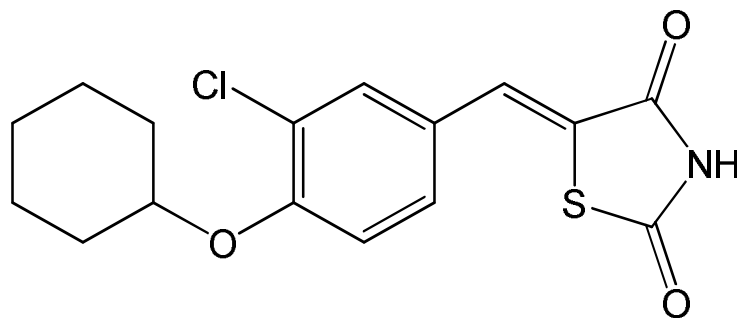


그림 3. 4. 1. Chemical structure of TD49.

3.4.2.2. 적조생물의 4종(*Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*, *Chattonella* sp., *Heterocapsa.circularisquama*)에 대한 성장단계별 및 TD49물질 농도별 살조효과

적조생물의 성장기에 따른 살제제어 특성을 파악하기 위해서 잠재적으로 우리나라 연안

에 피해를 입힐 것으로 생각되는 4종 *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*, *Chattonella* sp., *Heterocapsa circularisquama* (HU9436)으로 평가 하였다.

실험은 두께가 달린 70 mL의 시험관(ø22 mm X 200 mm; PYREX ®)에 50 mL 배양수를 넣고, 각각의 실험구에 농축시킨 적조생물을 일정량(3 FSU) 균일하게 접종 한 후 20°C의 배양조건에서 3배수의 반복구로 수행하였다(그림 3. 4. 2).



그림 3. 4. 2. Photography of Exp.1

대상생물에 대한 TD49물질의 농도별 살조능을 파악하기 위해서 대조구를 포함하여 살조물질 TD49에 대한 농도구배(0.02, 0.2, 2 μM) 실험을 수행하였다.

침편모조류 *H.akashiwo* 와 편모조류 *Heterocapsa circularisquama*에 관해서는 각각의 성장단계에 따른 살조능을 평가하기 위해서 초기(initial growth phase), 대수증식기(lag and logarithmic growth phase), 안정기(stationary growth phase)에서 TD 49물질을 각각 농도별로 주입하였다.

본 실험은 1일 간격으로 22일간 수행하여 살조능을 평가하였다. 한편, *Chattonella marina*와 *Chattonella* sp.에 관해서는 *H. akashiwo* 와 *H.circularisquama*의 실험과 동일한 방법으로 초기, 대수증식기에 관해서 9일간 평가하였다.

배양은 광량 60 μmol m⁻²s⁻¹, 광주기 12L: 12D로 조절하여, 1일 간격으로 Turner Designs 10-AU Fluorometer로 형광값(*in vivo* fluorescence)을 측정하였다 (그림 3. 4. 3).

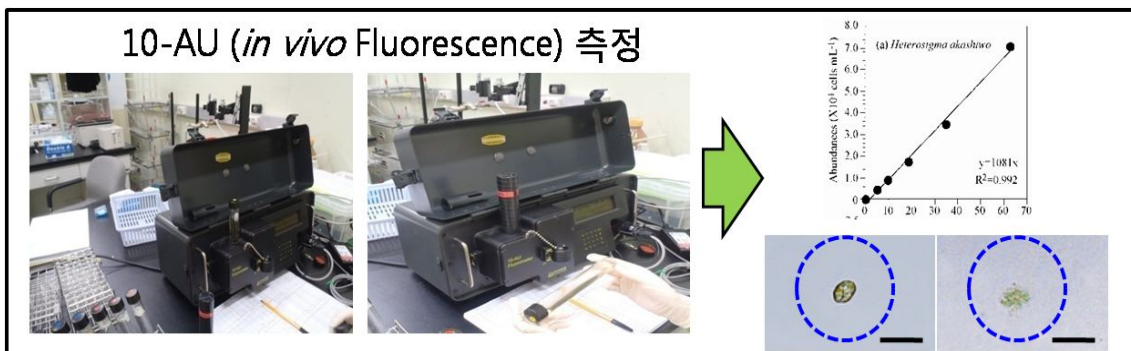


그림 3. 4. 3. Methods of *in vivo* fluorescence measurement.

또한 살조물질에 대한 생물의 활성반응 정도를 파악하기 위해서 모든 실험구에서 TD49 접종 후 곧바로 Phyto PAM (phytoplankton analyzer; PHYTO-ED, S/N: EDEF0139, Germany)장비로 적조생물 활성 엽록소(Activity Chlorophyll)를 측정하였음(그림 3. 4. 4).



그림 3. 4. 4. Methods of active Chl.a measurement using Phyto PAM.
 모든 실험에서 형광광도계로 측정된 값과 각 종의 세포밀도와의 관계식으로 FSU값에 대한 각 종에 대한 개체수밀도를 파악하였음(그림 3. 4. 5 and 그림 3. 4. 6).

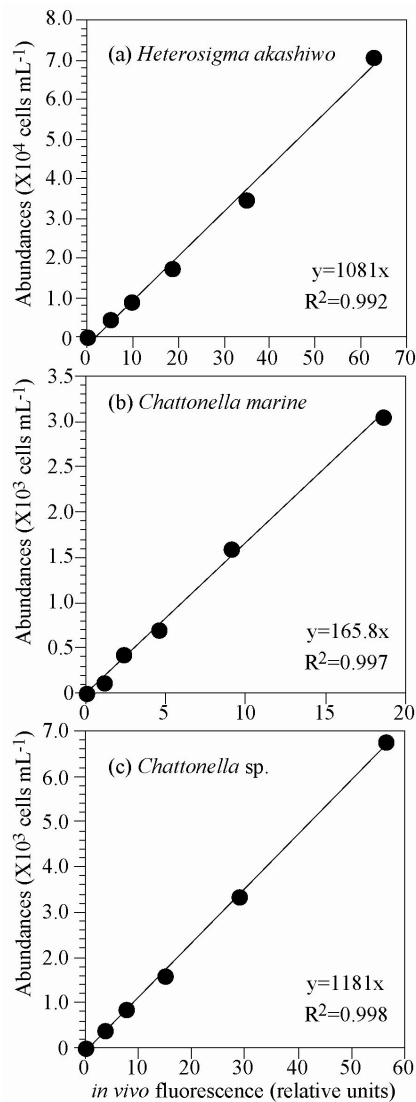


그림 3. 4. 5. Relationship between cell density and *in vivo* chlorophyll fluorescence of *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina* and *Chattonella sp.*.

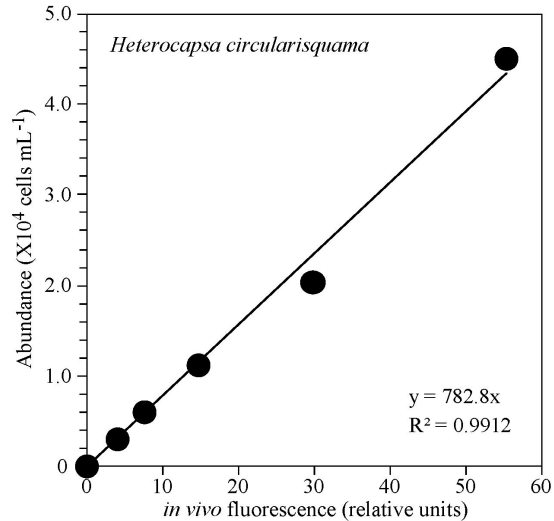


그림 3. 4. 6. Relationship between cell density and *in vivo* chlorophyll fluorescence of *Heterocapsa circularisquama*.

3.4.2.3. 동물플랑크톤 위해성 검토

살조물질 TD49가 적조생물 이외의 상위영양단계생물 생태계에 미치는 영향을 파악하기 위해서 자연상태의 동물플랑크톤 군집과 적조생물을 혼합 배양하여 평가 하였다.

동물플랑크톤 시료는 장목만 (한국해양연구원 남해분원; 34° 59' N, 128° 40' E)에서 원추형 네트(망구 45 cm, 망목 200 μ m)채집하여 실험실로 운반하여 6-well tissue culture test plate에 동물플랑크톤을 20 ind. 10 mL⁻¹넣고, TD49 살조물질을 농도별(0, 2, 5, 10, 20, 40, 100 μ M)로 접종한 후 20°C 암조건하에서 48시간 배양하여 동물플랑크톤의 생존율을 구하였다(그림 3. 4. 7).



그림 3. 4. 7. Test of zooplankton risk assessments

또한 위에서 언급한 *H. akashiwo*의 살조능 평가시 별도의 동물플랑크톤 실험구를 두어 안정적인 성장단계에 도달하였을 때(15일째) TD 49물질 2 μ M과 더불어 동물플랑크톤을 50 ind. 50 mL⁻¹넣고, 연속적으로 배양하여 적조생물(*H. akashiwo*)의 살조능 평가와 더불어 동물플랑크톤의 생존율을 구하였다.

동물플랑크톤의 생존율을 구하기 위한 생사판별은 해부현미경하에서 부속지의 운동성

여부와 뾰족한 침으로 자극하여 그들의 반응성 여부로 평가하였다.

3.4.2.4. 중규모 메스코즘 실험을 통한 *H. akashiwo*와 *Chattonella marina*의 살조능 및 부유생물 생태위해성 평가

*H. akashiwo*와 *Chattonella marina*의 살조능 및 식물, 동물플랑크톤군집에 대한 생태계 위해성평가를 수행하였음(그림 3. 4. 8).

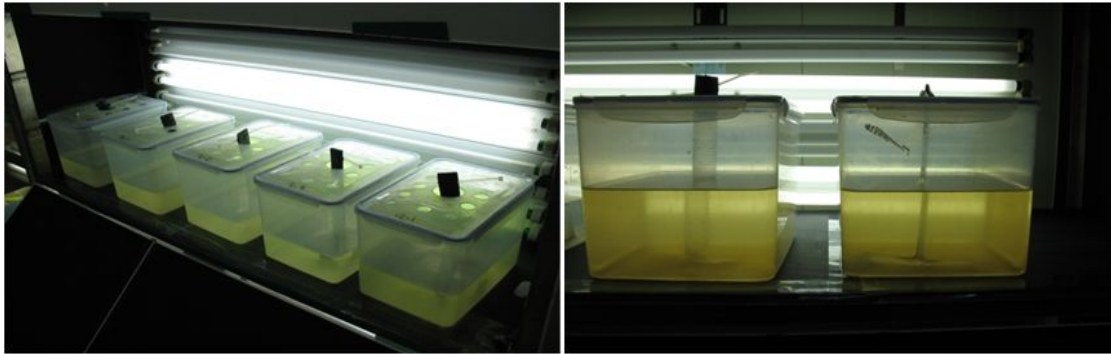


그림 3. 4. 8. photography of meddle scale experiments

실험은 12 L cage에 10 L 배양수를 넣고, 각각의 실험구에 농축시킨 적조생물을 일정량 균일하게 접종 한 후 20°C의 배양조건에서 각 실험구마다 3개 반복구로 수행하였음.

배양은 1일 간격으로 10일간 샘플링하였으며, 수온, 염분, pH, Turner Designs 10-AU Fluorometer로 형광값(*in vivo* fluorescence), Phyto PAM 장비를 이용한 활성 엽록소 (Activity Chlorophyll)등을 측정하였음.

3.4.2.5. 현장적조생물 *Akashiwo sanguinea* 제어

*Akashiwo sanguinea*의 적조를 제어하기 위하여 현장과 실험실에서 다양한 규모(Small scale(SS): 50 mL, Meddle scale(MS): 10 L, Large scale(LS): 40 L)의 실험을 수행하였다.

SS(Small scale)실험은 장목판에서 *A. sanguinea*가 포함된 자연상태의 해수를 1 L 채수병에 채수하여 두께가 달린 70 mL의 시험관(ϕ 22 mm X 200 mm; PYREX ®)에 50 mL 넣었다. 각 실험구(대조군, 용매Methanol처리군, TD49 처리군) 마다 적조생물(50-60 FSU)을 균일하게 접종 한 후 20°C의 배양조건에서 배양하였다. 여기서 TD49 처리군의 물질농도는 최종 2 μ M로 조절하였고, Methanol처리군은 TD49 물질의 제조과정에서 용매제로 이용한 Methanol의 농도가 2 μ M에 준하는 값으로 평가하였다. 또한 본 실험에서는 살조물질에 대한 생물의 활성반응 정도를 파악하기 위해서 TD49 접종 후 Phyto PAM (phytoplankton analyzer; PHYTO-ED, S/N: EDEF0139, Germany)장비로 적조생

물 활성 엽록소(Activity Chlorophyll)를 측정하였다.

MS(meddle scale)실험은 장목만에서 *A. sanguinea*가 포함된 자연상태의 해수 80 L를 채수하여 실험실로 운반한 후 접종 전 잘 흔들어 12 L 플라스틱 cage에 10 L씩 넣고 평가하였다.

LS(large scale)실험은 적조발생해역의 해수를 버킷으로 채수하여 60 L 규모 용기에 40 L 를 넣고 평가하였다. 본 실험에서는 현장에서 보다 낮은 TD49 물질의 농도로 적조생물을 제어 할 수 있는지 평가하기 위해 최종농도가 1 μ M의 처리군과 대조군으로 자연환경조건(수온: 12-16°C 염분: 30-32 psu; 수온은 주·야간에 차이를 보였고, 염분은 배양시간의 경과와 더불어 증가했음)에서 배양하였다(그림 3. 4. 9).

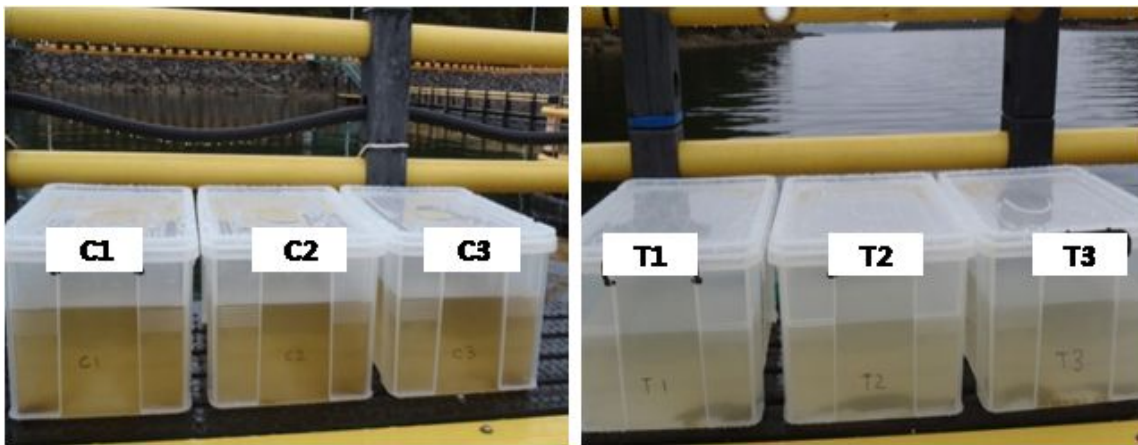


그림 3. 4. 9. Photography of large scale experiments(control and TD49 treatment)

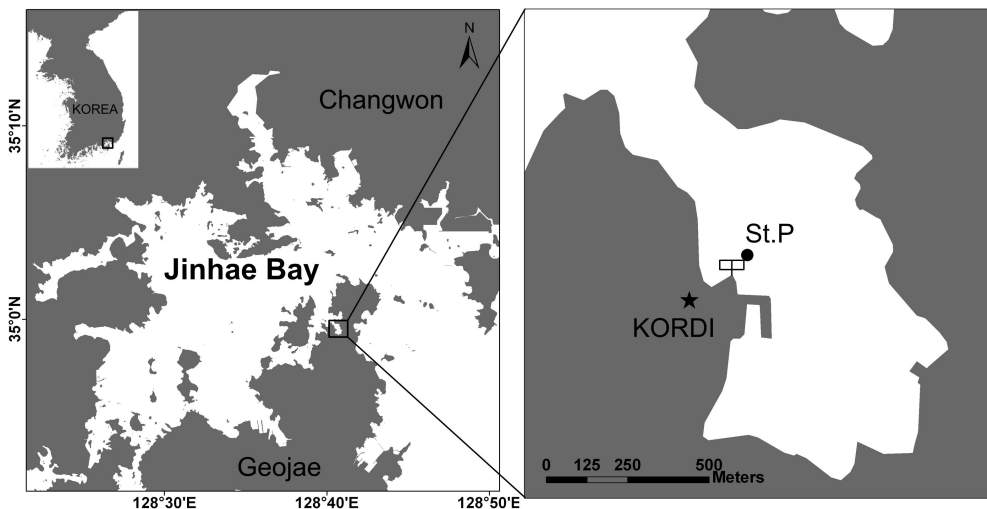


그림 3. 4. 10. Map of the sampling site (St.P) and location of large scale experiment in Jinhae Bay located in the southeastern part of Korea.

본 실험은 장목만의 자연 상태에서 배양한 만큼 대기 중의 환경요인에 의한 영향을 크게 받을 것으로 예상되어 1일 간격으로 4일간 실험을 수행하였다(그림 3. 4. 10). 특히

MS과 LS실험에서는 pH meter을 이용하여 시계열 pH변화를 모니터링 함과 더불어 Chl.a농도를 측정하였다.

Chl.a농도는 각 실험구의 배양수 100 mL를 GF/F여과지 (25 mm Whatman glass fiber filters)로 여과한 후 15 튜브에 넣어 90% acetone (8 mL)으로 24시간 냉암소에서 엽록소를 추출한 후 형광측정기(Turner Designs 10-AU Fluorometer)로 수행하였다. 또한 모든 실험은 현미경하에서 *A. sanguinea*의 생사여부와 배양시간의 경과와 더불어 식물플랑크톤 종조성(균집레벨)의 변화를 조사하였다.

진해만에 귀속된 장목만에서 10월 중순에서 12월말까지 *A. sanguinea*의 단일종에 의한 적조가 발생하였다. *A. sanguinea*의 적조가 언제까지 지속적으로 유지되는 것을 파악하기 위해서 한국해양연구원 남해분원 앞 연구어장 피어에서 11월 7일 12월 7일 사이 (1개월)에는 표층수를 매일 조사하였고, 12월 7일 이후는 3-4일 간격으로 모니터링 하였다. 해양시료를 0.1⁻¹ mL을 Sedgwick-Rafter chamber에 분주한 후 Lugol용액으로 최종농도가 1%로 되게 고정하여 광학현미경 하에서 곧 바로 식물플랑크톤을 검경 및 계수하였다.

3.4.2.6. 연안에서 우점하는 적조생물(20종)을 대상으로 TD49물질 제어특성

연안에서 우점하는 20종(*Heterocapsa triquetra*, *Scrippsiella trochiodea* Akashiwo *sanguinea*, *Alexandrium tamarense*, *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum minimum*, *Prorocentrum dentatum*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Heterocapsa circularisquama* HY9433, *H. circularisquama* HCLG-1, *H. circularisquama* HA92-1, *H. circularisquama* HO4, *H. circularisquama* HU9433, *Rhodomonas salina*, *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*, *Actinocyclus octonarius*, *Chaetoceros atlanticus*, *Chaetoceros didymus*, *Odontella longicruris*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira conferta*, *Thalassiosira weissflogii*)을 두껍이 달린 70 mL의 시험관(ø22 mm X 200 mm; PYREX®)에 50 mL 넣고. 대조군과 TD49 처리군(2 μM)로 평가하였다.

TD49물질에 대한 각 생물대항 살조능은 TD49 접종 후 Phyto PAM 장비로 활성 엽록소(Activity Chlorophyll)를 측정하여 평가하였다.

3.4.3. 연구결과

3.4.3.1. 소규모실험에서 성장단계 및 TD49물질 농도별 적조생물제어특성

살조물질 TD49을 이용하여 해양적조생물 칩편모조류 *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*, *Chattonella* sp.를 대상으로 살조능을 평가하였다.

*Heterosigma akashiwo*의 성장단계별로 TD 49에 대한 살조평가를 그림 3. 4. 11에 나타

내었음. 초기성장단계(initial growth phase)에서 주입한 살조물질의 반응은 대조구와 0.02 μM 의 두 실험구에서는 나타나지 않았으나, 0.2 와 2.0 μM 에서 *H. akashiwo*가 성장하지 않은 것으로 보아 살조효과를 나타낸 것으로 판단된다. 하지만 살조물질 투입 14일 후 0.2 μM 에서는 일정한 형광값이 지속적으로 증가하였고, 현미경으로 검경한 결과 *H. akashiwo*의 성장이 확인 된 것으로 보아 TD 49물질농도가 0.2 μM 에서는 살조효과가 미약한 것으로 판단되었다.

대수증식기(logarithmic growth phase)에는 2.0 μM 의 TD49물질에서만 *H. akashiwo*의 살조효과를 보였고, 대조구를 포함한 0.02, 0.2 μM 실험구에서는 지속적인 성장을 보였음. 또한 안정적인 성장기(stationary growth phase)에서는 2 μM 실험구에서만 *H. akashiwo* 살조효과를 보였다. 결과적으로 내만폐쇄지역에서 빈번하게 적조를 유발하는 *H. akashiwo* 를 제어하려면 발생초기단계에 TD49물질을 살포하면 낮은 농도(0.2 μM)의 살조물질로 일시적으로 그들의 성장을 제어할 수 있는 기능을 가질 수 있다고 판단된다.

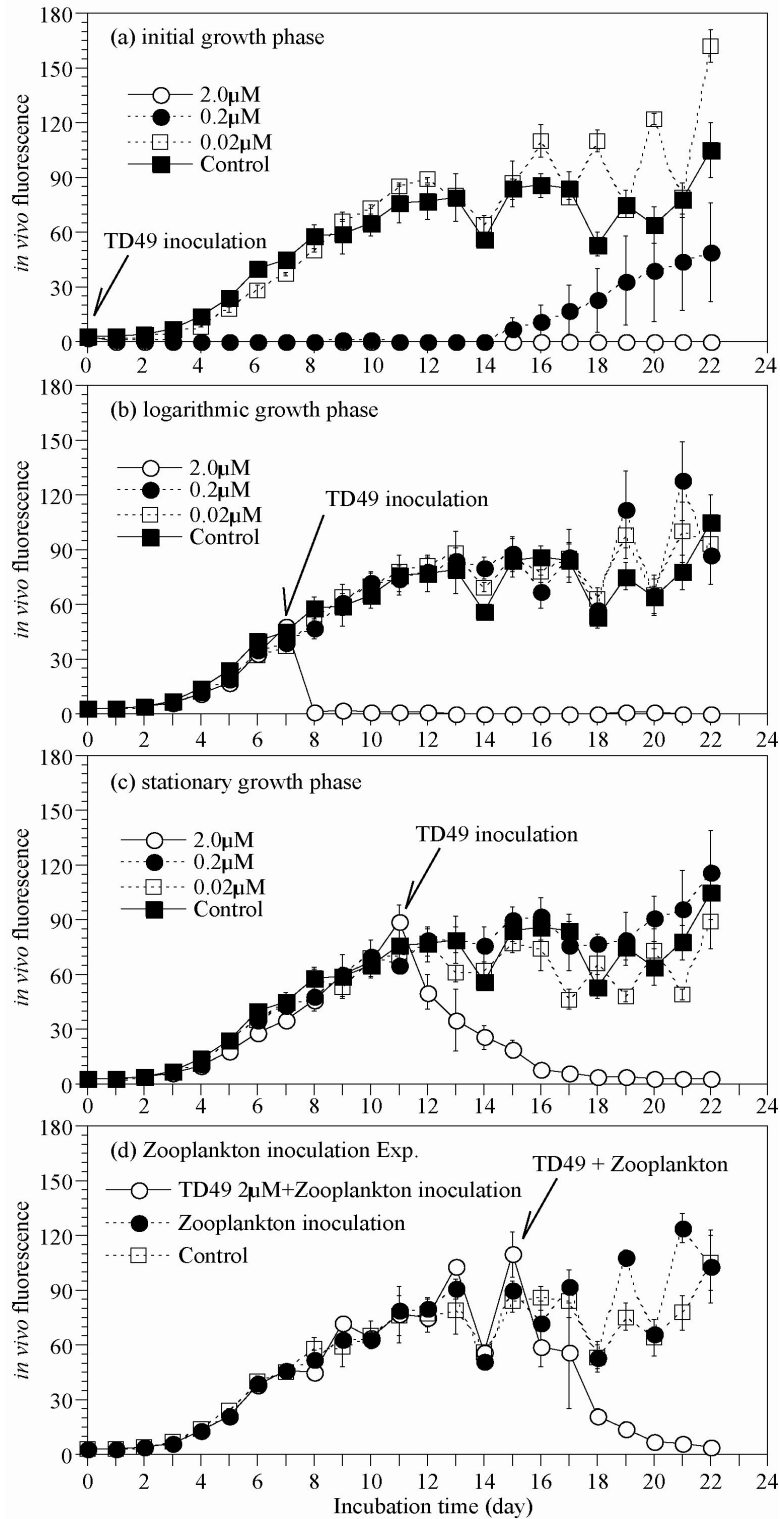


그림 3. 4. 11. Growth of *Heterosigma akashiwo* at lag, logarithmic and stationary growth phase in cultures inoculated with concentration levels (0.02, 0.2 and 2 μM) of TD49 substance. Controls were algal cultures without TD49 substance. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

성장단계별 *Chattonella marina*와 *Chattonella* sp.에 대한 TD 49 물질의 농도별 살조능을 그림 3. 4. 12 와 3. 4. 13에 나타내었음.

*Chattonella*의 두 종 모두 초기성장단계에서는 0.2 와 2.0 μM 에서 살조효과를 나타내었다. 하지만 대수증식기에는 *H. akashiwo* 에서 보인 살조효과와 비슷하게도 0.2 μM 에서 살조능을 관찰할 수 없었음.

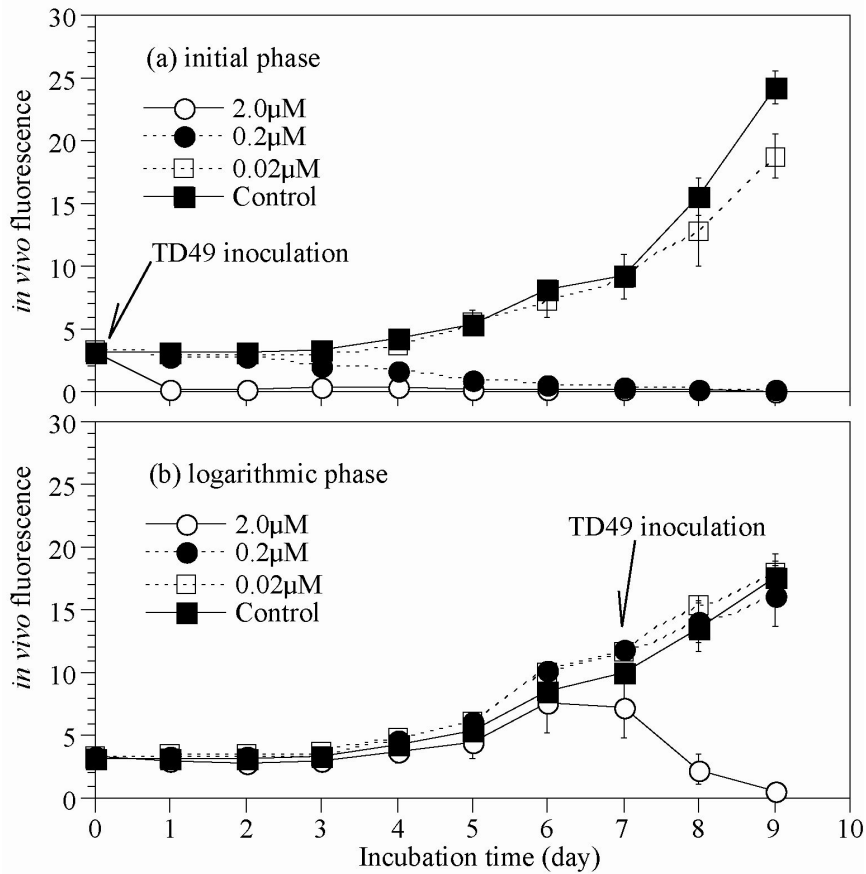


그림 3. 4. 12. Growth of *Chattonella marina* at lag and logarithmic growth phase in cultures inoculated with concentration levels (0.02, 0.2 and 2 μM) of TD49 substance. Controls were algal cultures without TD49 substance. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

본 실험에서 사용된 침편모조류 3종 모두 유사한 살조물질의 농도에서 살조능을 보였고, 성장단계별로는 초기에 0.2 μM 농도에서는 살조효과를 관찰할 수 있었으나, 대수증식기와 안정기의 높은 개체수가 유지 되었을 경우에는 최종농도가 2 μM 전후의 살조물질로 침편모조류를 제어 할 필요가 있다고 판단됨.

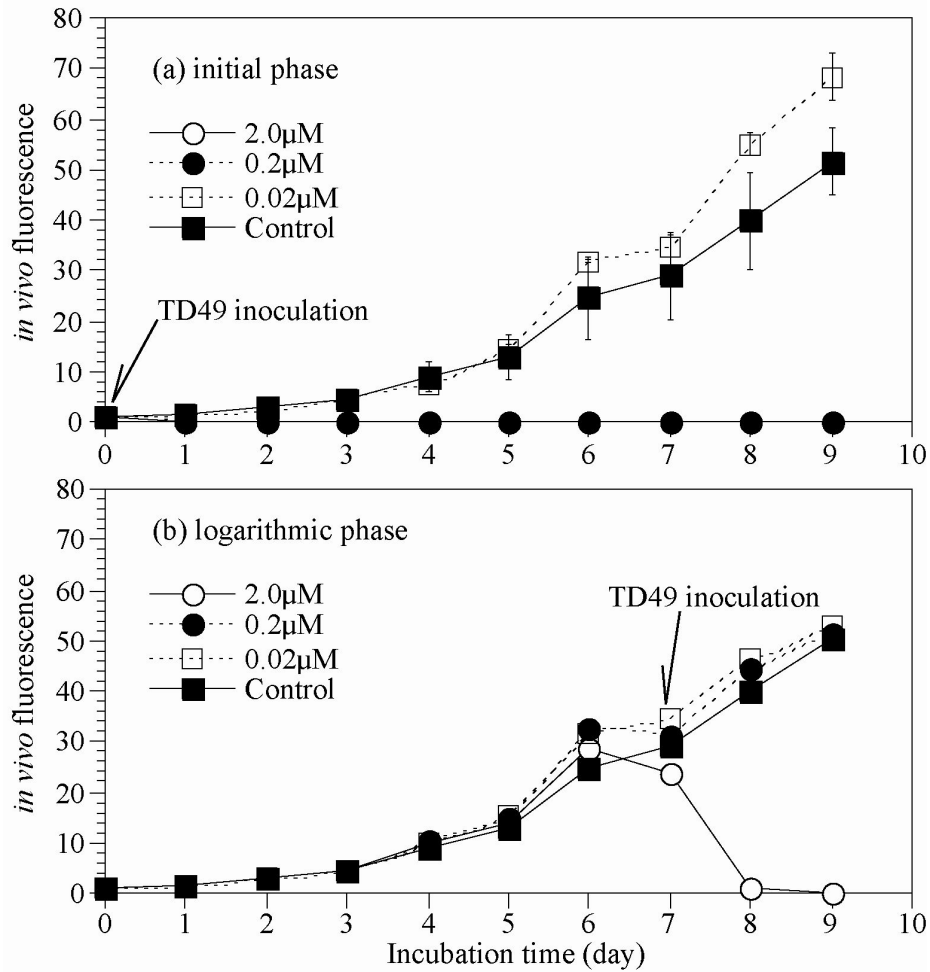


그림 3. 4. 13. Growth of *Chattonella* sp. at lag and logarithmic growth phase in cultures inoculated with concentration levels (0.02, 0.2 and 2 μ M) of TD49 substance. Controls were algal cultures without TD49 substance. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

살조물질에 대한 적조대상생물의 생존여부는 독립영양생물일 경우 광합성에 의하여 생성되는 고유엽록소의 활성정도로 평가할 수 있음.

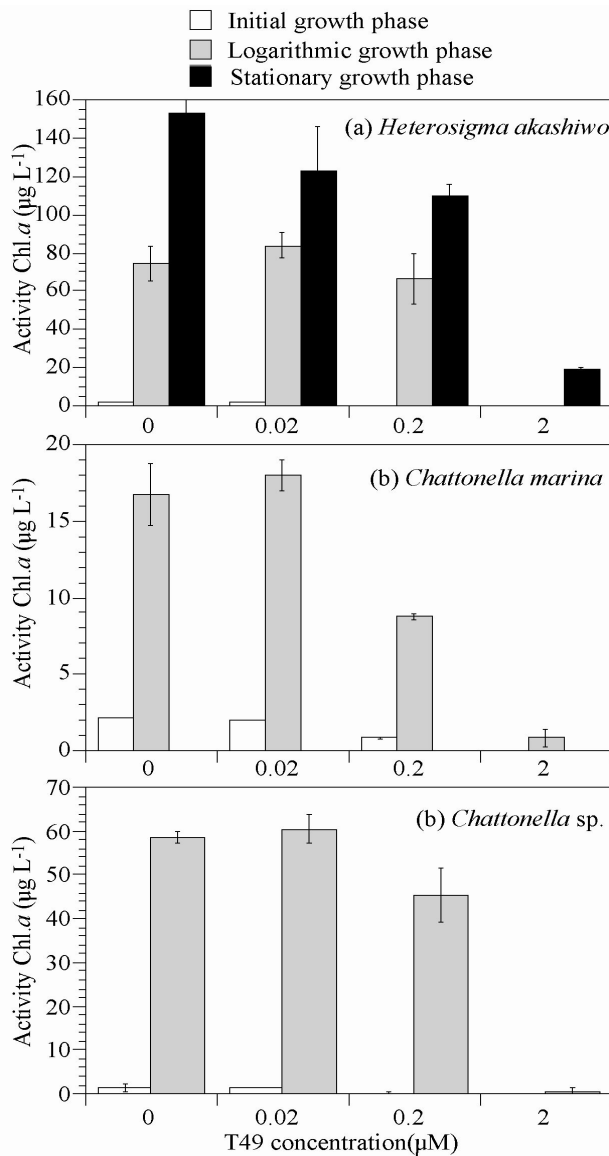


그림 3. 4. 14. Changes in active Chl. *a* concentration of *Heterosigma akashiwo* (a), *Chattonella marina* (b) and *Chattonella sp.* (c) after TD49 substance in oculation in three (lag, logarithmic and stationary) growth pahses. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

본 연구에서 TD 49물질을 접종 후 곧바로 대상 침편모조류 3종과 와편모조류 1종에 관해서 성장단계별로 활성엽록소(Active Chlorophyll-*a*)를 측정하였음(그림. 3. 4. 14 and 3. 4. 15). *H. akashiwo*의 경우 0.02 μM 농도에서 Active Chl. *a*는 성장단계별로 대조군과 거의 차이 없이 높은 값을 유지하였으나, 0.2 μM 에서는 초기성장단계에서는 Active Chl. *a*이 관찰되지 않았고, 대수증식기와 안정기에 높게 나타났음. 반면 2 μM 농도에서는 초기와 대수증식기에는 Active Chl. *a*이 관찰되지 않았고 안정적인 성장단계에서만 상대적으로 낮은 값($19.59 \mu\text{g L}^{-1}$)을 보였음. 즉 2 μM 농도에서 적조생물을 제어 가능하다고 판단 됨.

Chattonella 의 두 종의 성장단계별 Active Chl. *a*의 값은 *H. akashiwo* 의 경향과 유사하게 나타났고, 2 μ M에서 와편모조류 *H. circularisquama* 또한 대조군대비 Active Chl. *a*가 현저하게 감소한 것으로 보아 살조효과가 우수하다고 판단됨.

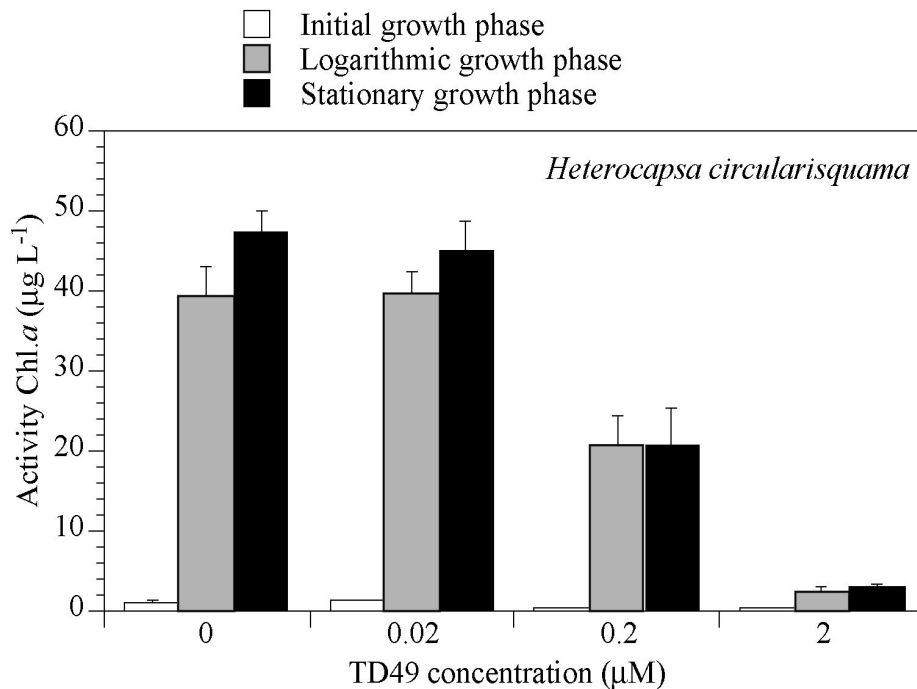


그림 3. 4. 15. Changes in active Chl. *a* concentration of *Heterocapsa circularisquama* after TD49 substance in oculation in three (lag, logarithmic and stationary) growth pahses. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

살조물질 TD49는 대상 침편모조류 3종과 와편모조류1종의 세포벽을 파괴하여 엽록소를 분산 분해시키는 살조 특이성을 관찰하였음 (그림 3. 4. 16 and 3. 4. 17). 다시 말하면 TD 49물질 접종 1일 후 형광값(FSU)은 대조군대비 절반이상을 유지한 반면, Phyto PAM에 의한 Active Chl. *a*은 1/5 수준에도 미치지 못하는 극히 낮은 값이 관찰된 것은 세포의 분해기작과 연관성이 있음. 이것은 세포의 분해과정에서 살조물질이 세포벽을 파괴시켜 잔여 엽록소를 배양용기내 분산되었기 때문에 형광값(FSU)은 지속적으로 일정한 값을 유지되었으나, 실제로 그들의 성장에 영향을 미치는 Active Chl. *a*는 세포분해로 인하여 거의 관찰되지 않았다고 판단됨.

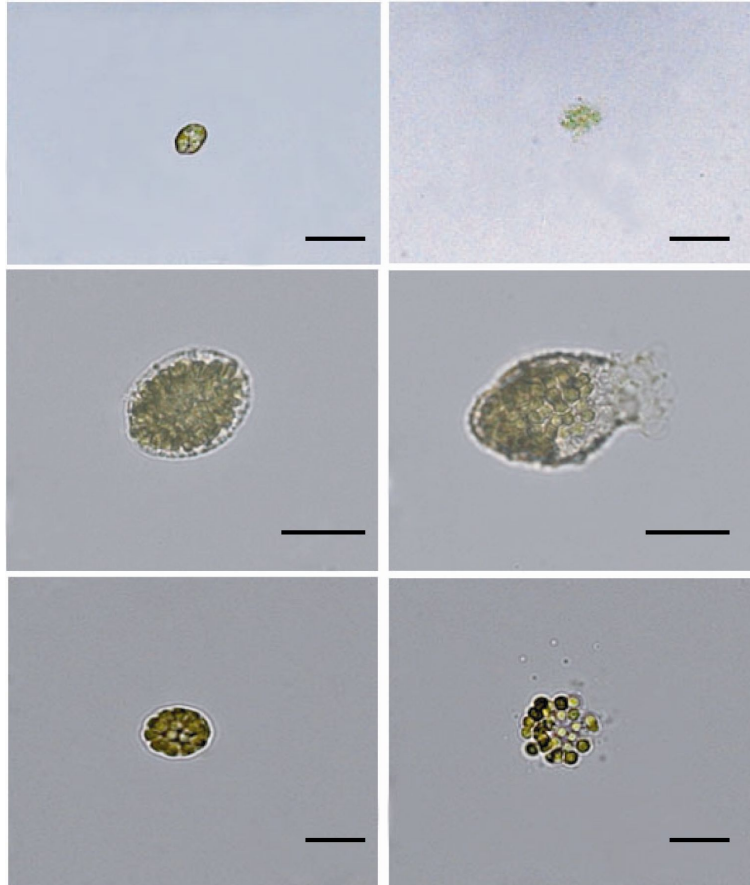


그림 3. 4. 1. 16. Light microscopic observation of *Heterosigma akashiwo* (above), *Chattonella marina* (middle) and *Chattonella* sp. (below) in cultures with the absence (left) and presence of algicidal substance (right). Scale bar: 50 μm .

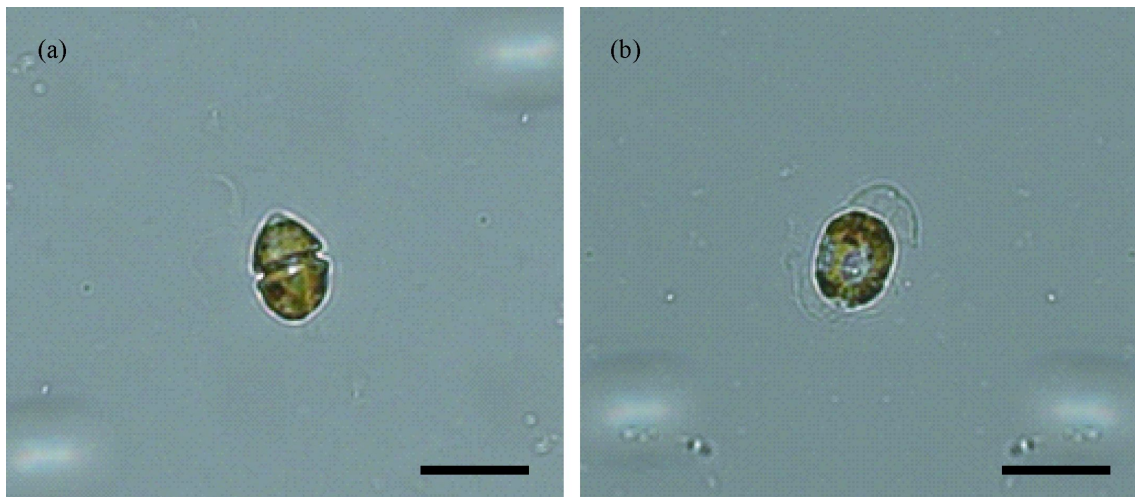


그림 3. 4. 1. 17. Light microscopic observation of *Heterocapsa circularisquama* in cultures with the absence (a) and presence of algicidal substance (b). Scale bar: 50 μm .

3.4.3.2. 동물플랑크톤에 대한 TD49물질 농도별 위해성 평가

TD49 물질의 농도가 높을수록 동물플랑크톤의 생존율은 급격히 떨어졌고, 48시간 후 20 μM 이상의 농도에서는 생존을 관찰 할 수 없었음.(그림 3. 4. 18)

TD49 물질이 적조생물을 살조할 수 있는 최적의 효과를 발휘하는 농도 중 가장 낮은 2 μM 에서 동물플랑크톤의 생존율 (24h: 40%, 48h: 15%)또한 그다지 높지 않았음.

하지만, 본 연구는 실험실 내에서 좁은 공간의 폐쇄적인 상태에서 동물플랑크톤의 독성을 평가한 결과로서 개방상태의 현장에서는 해류에 의한 희석 등의 다양한 저감 변수가 존재하기 때문에 동물플랑크톤이나 상위단계의 생태독성은 우려할 만큼의 영향을 미치지 않을 것으로 생각되지만, 추후 그들의 생태독성여부의 평가를 메스코즘(대용량)실험에서 세심하게 이루어져야 한다고 판단됨.

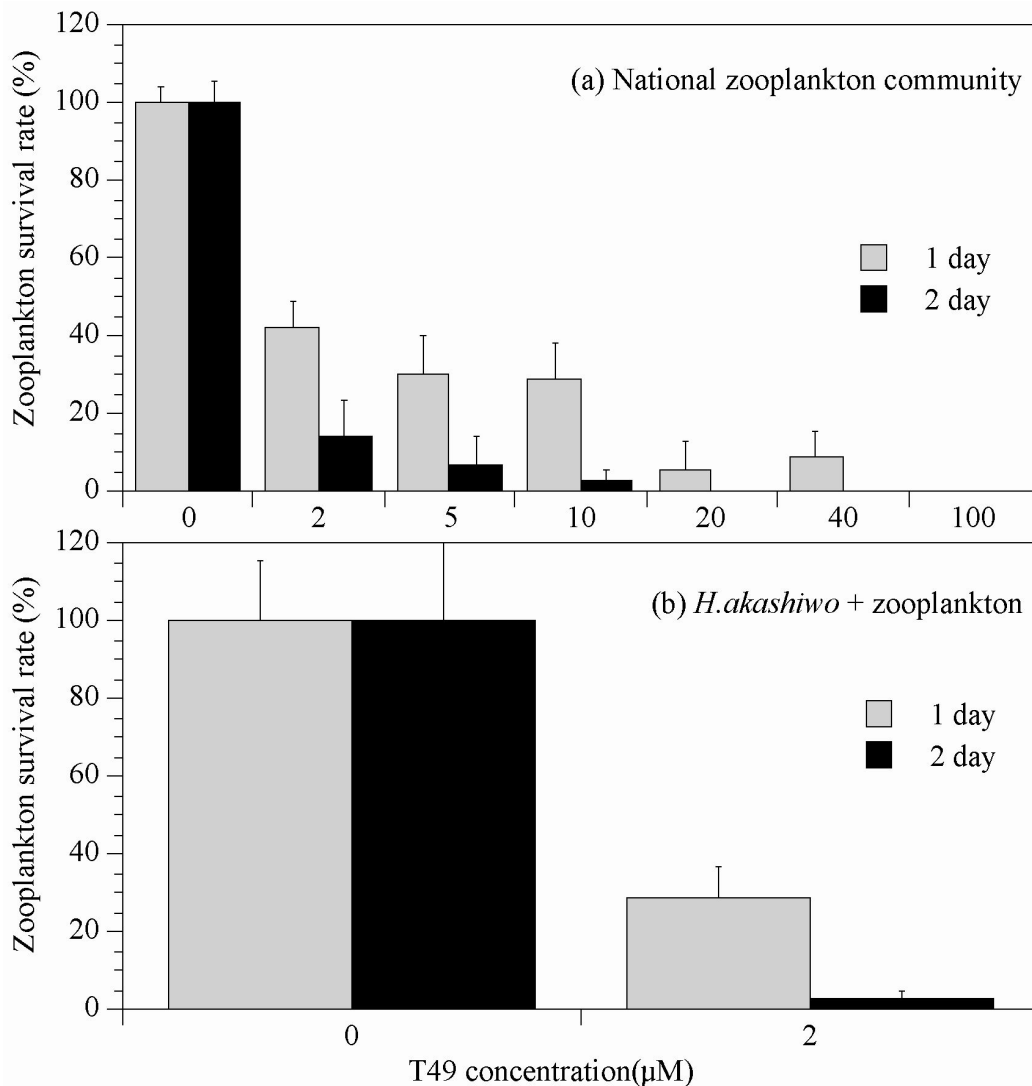


그림 3. 4. 18. Survival rates of zooplankton in various concentration of TD 49 at 24h and 48h. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

3.4.3.3. 중규모실험에서 TD49물질에 대한 *Heterosigma* 와 *Chattonella*의 살조능

TD49물질에 대한 *Heterosigma* 실험에서 환경요인의 결과를 그림 3. 4. 3. 19에 나타내었음.

수온은 모든 실험구에서 유사하게 변동하였고($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), 염분은 실험초기 30 psu에서 실험종료 32 psu로 천천히 증가하는 경향을 관찰하였음.

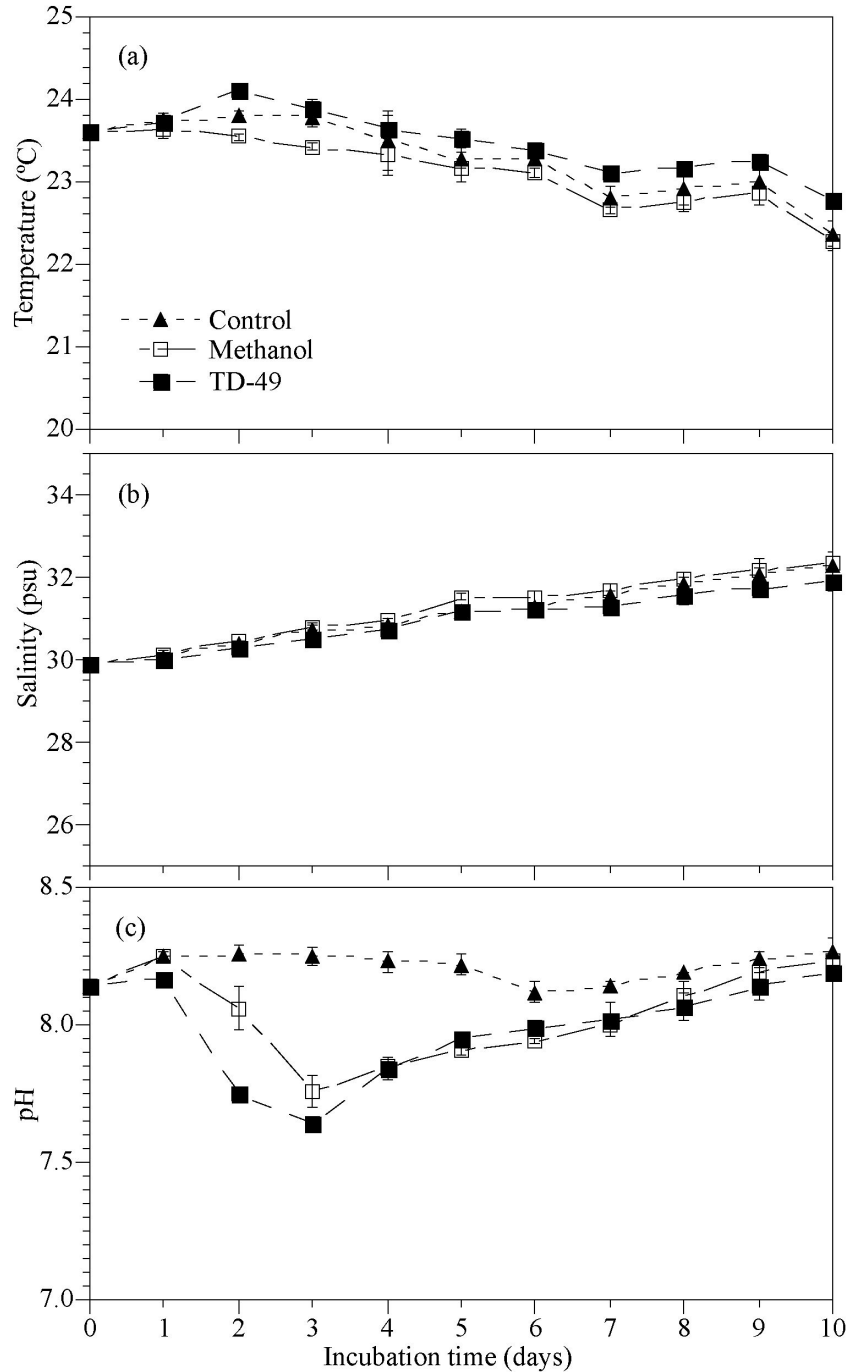


그림 3. 4. 19. Changes in temperature (a), salinity (b) and pH (c) of *Heterosigma akashiwo*. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

pH는 대조군에서는 실험기간내 8.2 전후를 보였고, Methanol과 TD 49 처리군에서는 실험1일 후 천천히 감소하였으며, 3일째 최소값(7.6)이 관찰된 후 서서히 증가하는 경향을 보였음.

Methanol 처리군과 대조군에서는 *Heterosigma akashiwo*가 지속적으로 관찰되었으나, TD49 물질 처리군에서는 2일 후 95%이상 사멸되었음(그림 3. 4. 20).

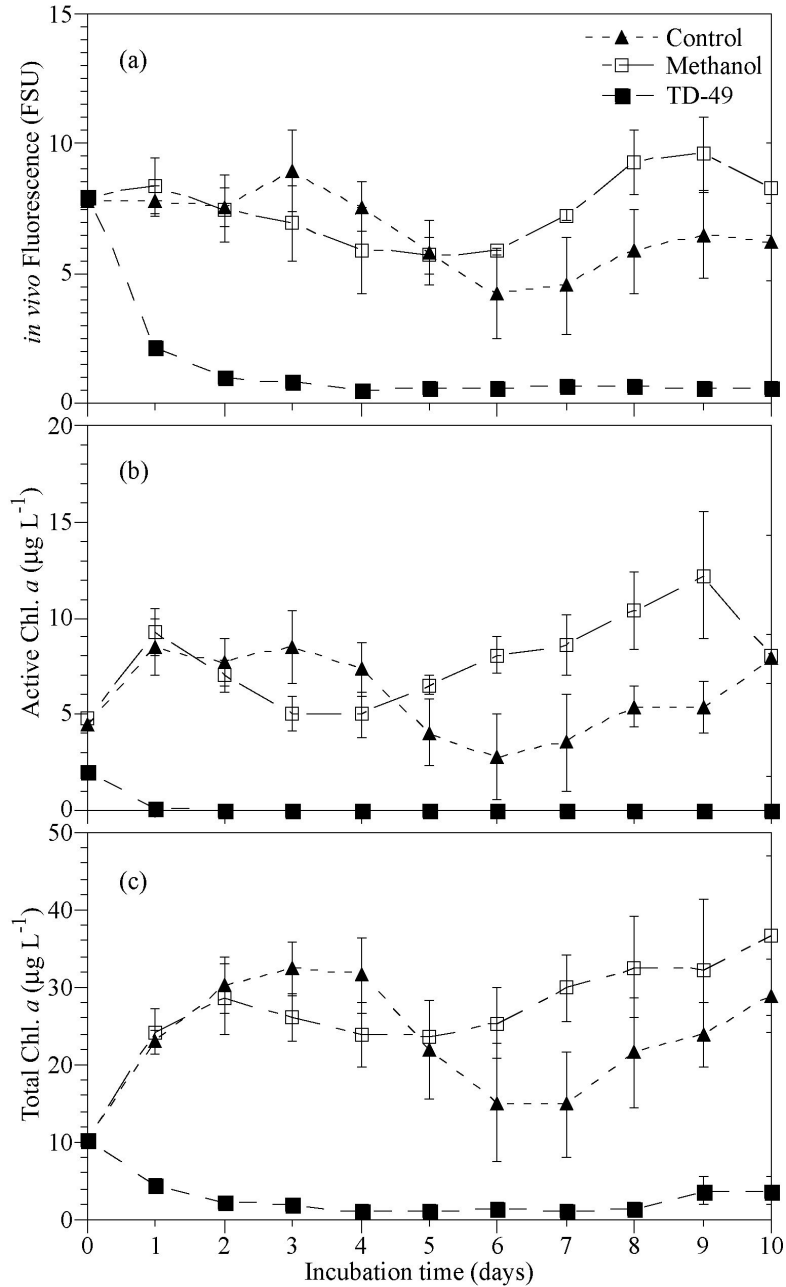


그림 3. 4. 20. Changes in *in vivo* fluorescence (a), Active Chl. *a* (b) and Total Chl. *a* (c) of *Heterosigma akashiwo*. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

H. akashiwo 살조능 실험시 동물플랑크톤의 군집변화양상을 그림 3. 4. 21에 나타내었음. 동물플랑크톤의 전체 개체수는 대조군에서는 시간의 경과와 더불어 재생산(reproduction)이 일어나서 증가하였다. 반면 Methanol 처리군과 TD 49물질 처리군에서는 시간의 경과와 더불어 감소하는 경향을 보였음.

대조군에서는 전체 동물플랑크톤의 대부분이 *Oithona*의 개체의 재생산에 크게 기여한 반면, Methanol 과 TD49물질 처리군에서는 *Oithona*가 성공적으로 재생산에 기여하지 못 하였음.

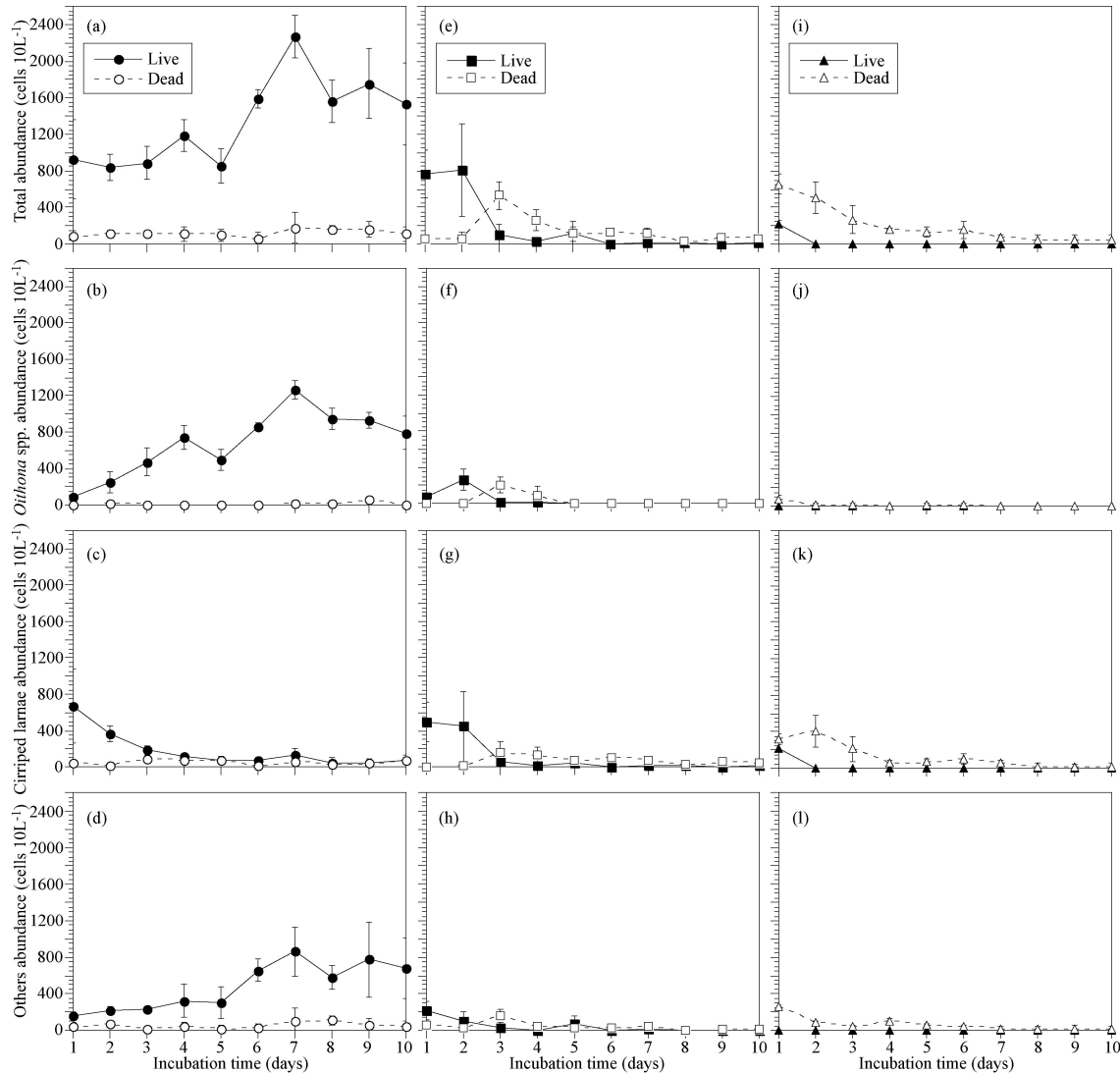


그림 3. 4. 21. Changes in Zooplankton of *Heterosigma akashiwo*. for experiment of control total abundance (a) *Oithona* spp. abundance (b), Cirriped larvae abundance (c) others abundance (d), Methanol (e-h) and 2 μ M of TD 49 (i-l). Controls were algal cultures without TD 49 substance. Experiment of methanol and TD 49 substance were algal cultures after inoculated each substance. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

TD49물질에 대한 *Chattonella* 실험에서 환경요인의 결과를 그림 3. 4. 22에 나타내었음.

수온은 염분은 *Heterosigma* 실험에서 나타난 것과 유사하게 수온은 모든 실험구에서 유사하게 변동하였고($23\pm 1^\circ\text{C}$), 염분은 30 - 32 psu로 천천히 증가하는 경향을 관찰하였음.

pH는 대조군에서는 실험기간내 8.2 전후를 보였고, Methanol과 TD 49처리군에서는 실험1일 후 천천히 감소하였으며, 3일째 7.6으로 최소값이 관찰된 후 서서히 증가하는 경향을 보였음.

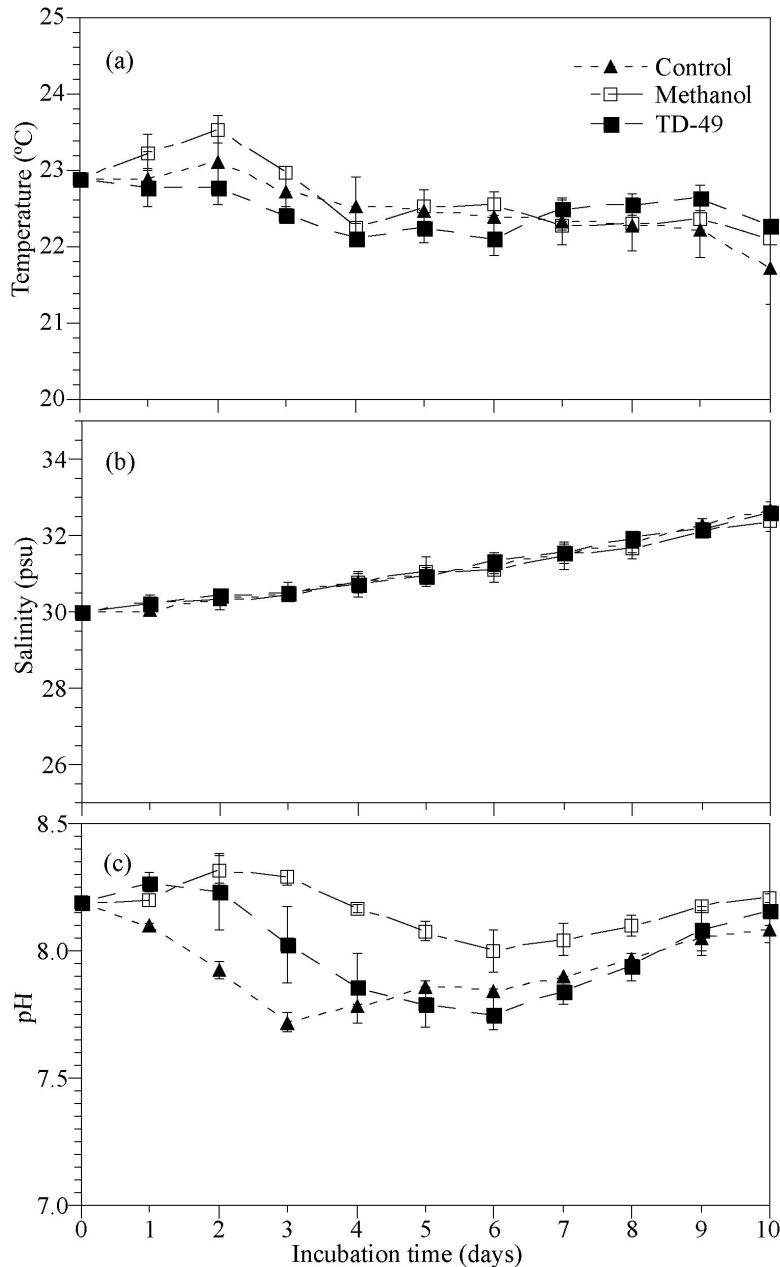


그림 3. 4. 22. Changes in temperature (a), salinity (b) and pH (c) of *Chattonella marina*. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

Methanol 처리군과 대조군에서는 *Chattonella* 가 실험2-3일 사이 1.5배정도 증식하는 경향을 관찰하였고, 그 후 급격히 감소하여 평형을 이루었음. 반면 TD 49물질 처리군에서

는 실험 2일째 *Chattonella* 가 95%이상 사멸되었다. 결과적으로 대부분의 *Heterosigma* 와 *Chattonella* 가 TD 49물질에 의하여 선택적으로 사멸된다는 것을 알 수 있었음(그림 3. 4. 23).

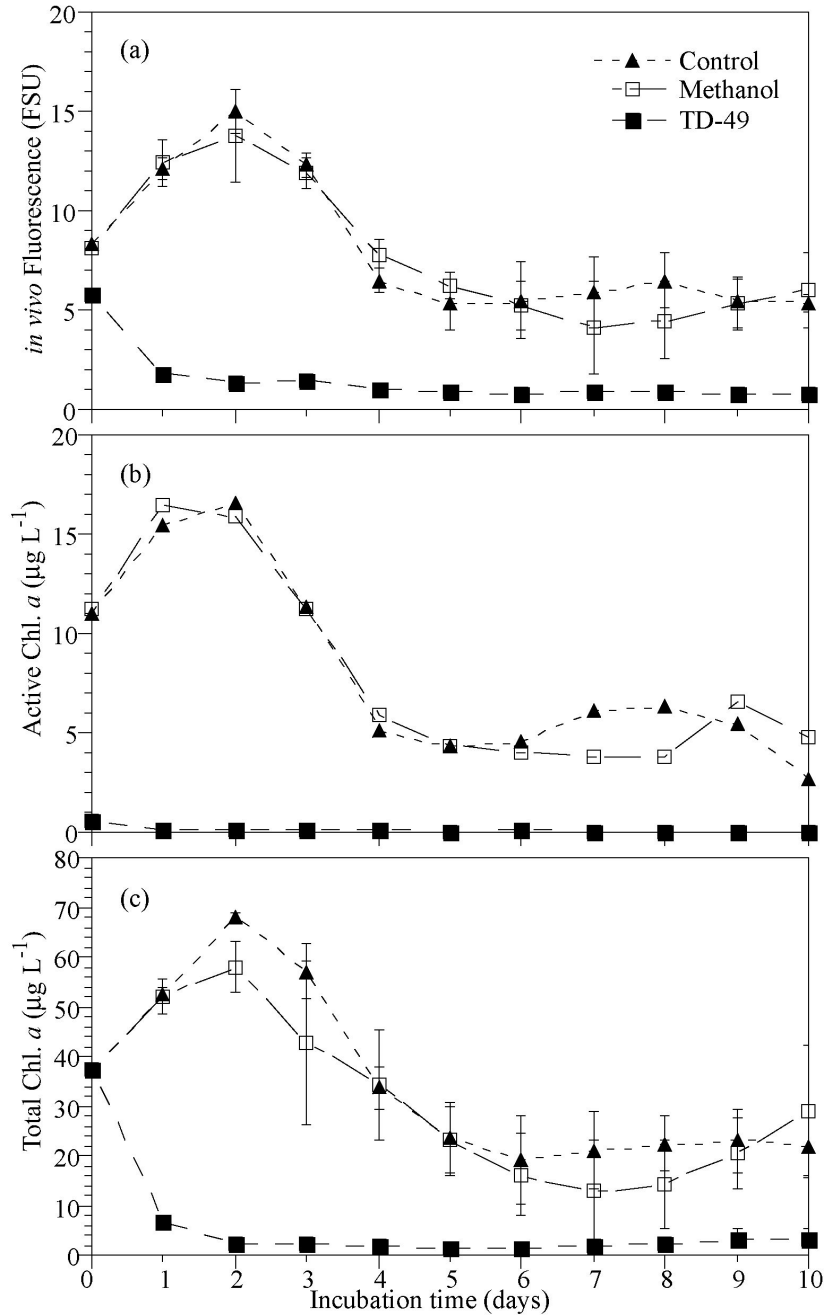


그림 3. 4. 23. Changes in *in vivo* fluorescence (a), Active Chl. *a* (b) and Total Chl. *a* (c) of *Chattonella marina*. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

Chattonella 살조능 실험시 동물플랑크톤의 군집변화양상을 그림 3. 4. 24에 나타내었음. 동물플랑크톤의 전체 개체수는 대조군에서는 시간의 경과와 더불어 증감을 반복하는 경

향을 관찰함. 또한 Methanol 처리군에서도 생존한 동물플랑크톤의 개체수가 실험기간동안 높은 밀도를 유지하였음. 반면 TD 49물질 처리군에서는 시간의 경과와 더불어 감소하는 경향을 보였음.

대조군과 Methanol 처리군에서는 전체 동물플랑크톤의 대부분이 *Oithona*의 개체의 재생산에 크게 기여한 반면, TD 49물질 처리군에서는 *Oithona*가 성공적으로 재생산에 기여하지 못 하였음.

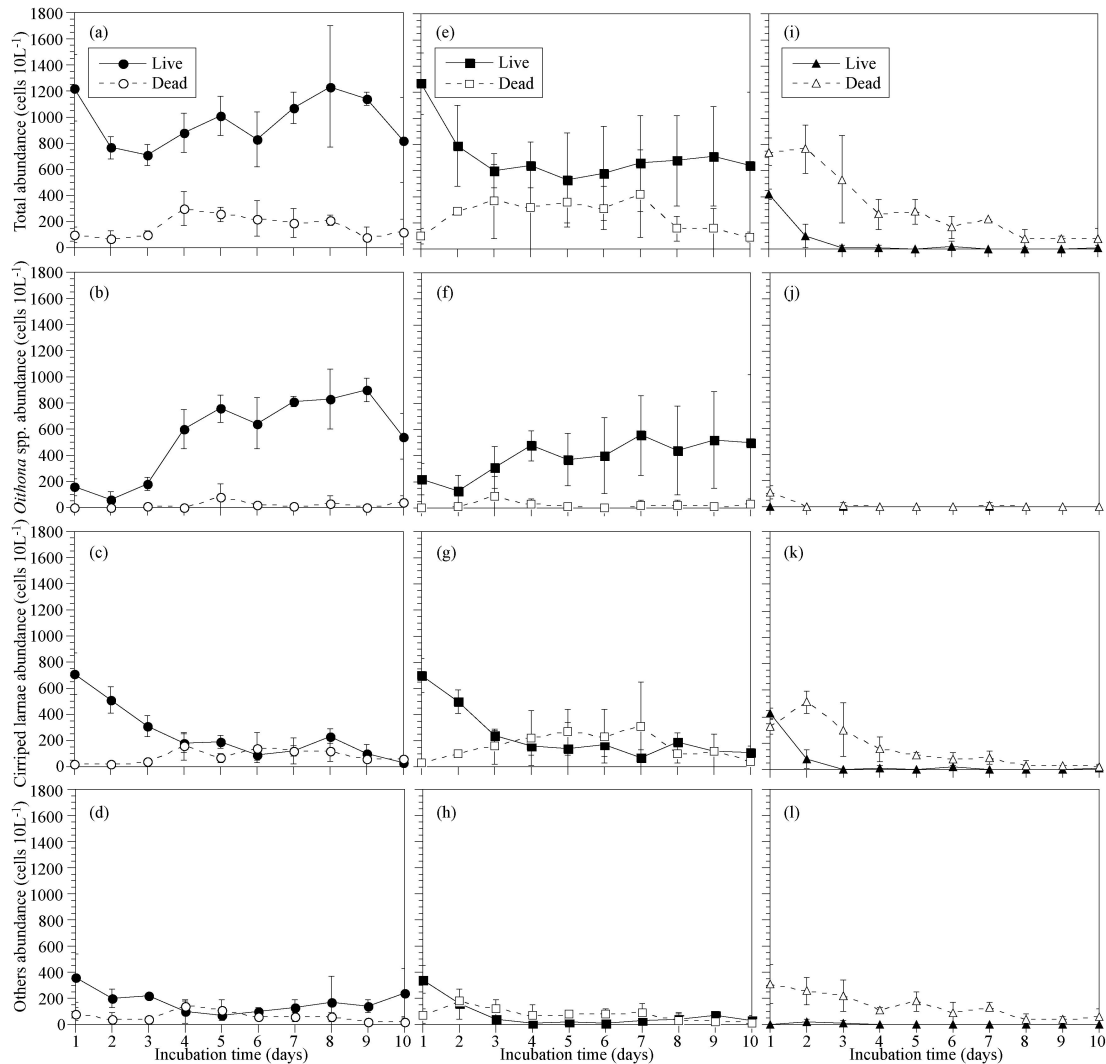


그림 3. 4. 24. Changes in Zooplankton of *Chattonella marina* for experiment of control total abundance (a) *Oithona* spp. abundance (b), Cirriped larvae abundance (c) others abundance (d), Methanol (e-h) and 2 μM of TD 49 (i-l). Controls were algal cultures without TD 49 substance. Experiment of methanol and TD 49 substance were algal cultures after inoculated each substance. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

3.4.3.4. 진해만에서 *Akashiwo sanguinea*의 적조제어효과

SS실험에서 *A. sanguinea* 의 살조능에 관한 결과를 그림 3. 4. 25 에 나타내었음. 실험 시작 후 대조군과 Methanol실험군에서는 형광값(FSU)이 지속적으로 평형을 이룬 반면, TD49물질의 처리군에서는 접종 후 기하급수적으로 감소해 3일부터 극히 낮은 값이 8일 까지 유지되었음.

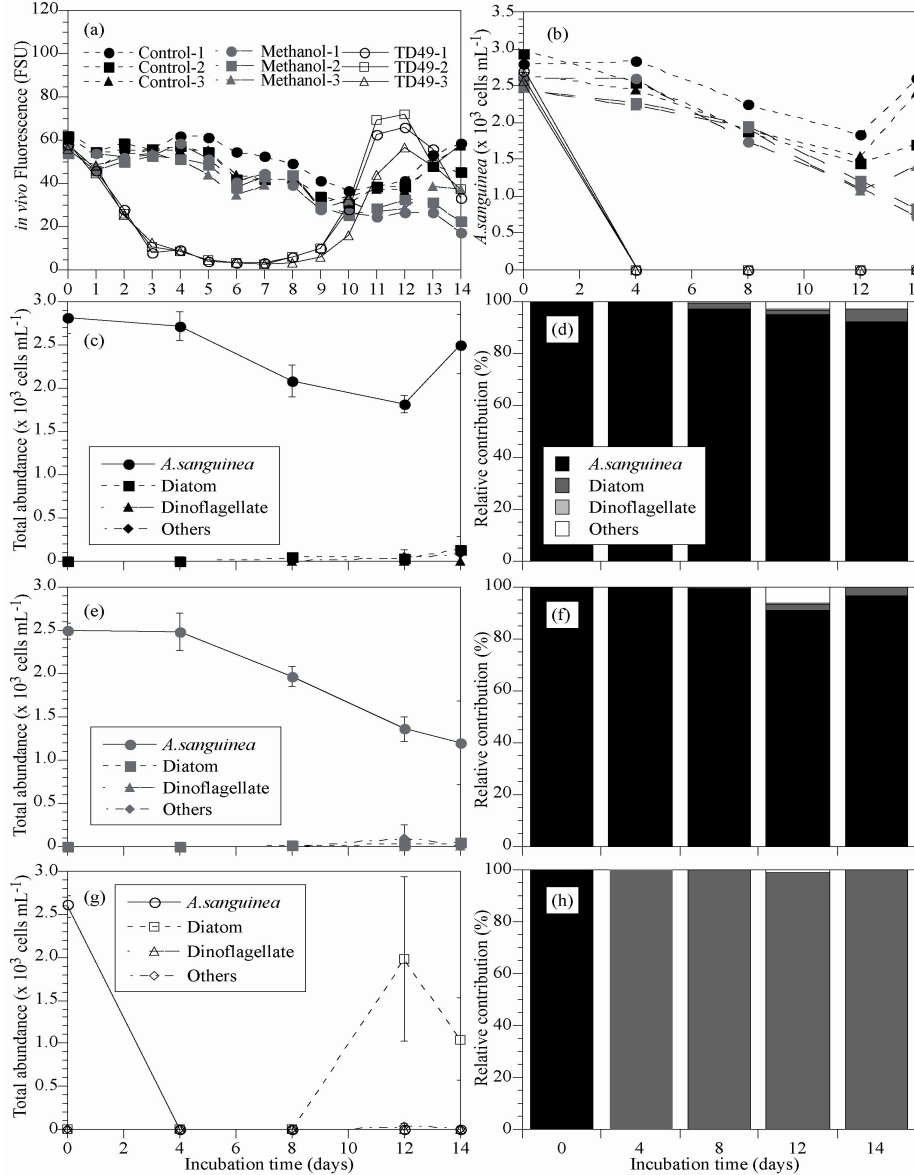


그림 3. 4. 25. Growth curve and total abundances of *Akashiwo sanguinea* for experiments of control, methanol Exp. and TD 49 substance (a and b) in small scale experiments (SS). Controls were algal cultures without TD 49 substance. Experiment of methanol and TD 49 substance were algal cultures after inoculated each substance. Total abundances and relative contribution (%) of *A.sanguinea* in experiments of control (c and d), methanol (e and f) and TD 49 substance (g and h).

즉 *A. sanguinea* 의 생존세포는 실험 4일후 전혀 관찰되지 않은 것으로 보아 TD49물질에 의하여 살조되었다. 실험기간동안 대조군과 Methanol실험군의 전체 식물플랑크톤 군

집변화는 8일째까지 *A. sanguinea* 단일종이 99.9% 이상으로 극우점하였으나, 그 후 시간의 경과와 더불어 다른 생물군이 점차적으로 늘어나는 것을 알 수 있었음. 반면, TD 49 처리군에서는 접종당일에만 *A. sanguinea*가 관찰되었고, 그 이후는 전혀 관찰되지 않았음.

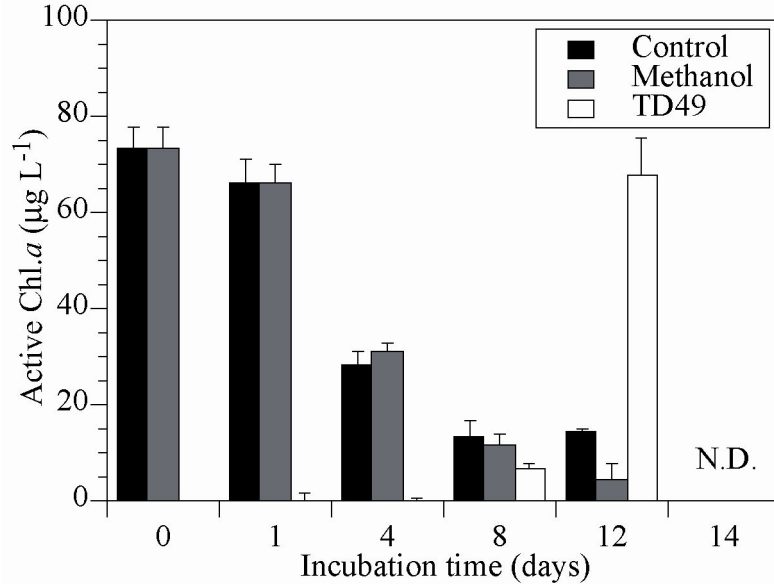


그림 3. 4. 26. Changes in active chl.a of *Akashiwo sanguinea* in small scale experiments (SS). Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

TD 49물질을 접종 후 *A. sanguinea*의 활성엽록소(Active Chlorophyll-*a*)를 측정된 결과, 대조군과 Methanol 실험군에서는 활성엽록소가 시간의 경과와 더불어 점차적으로 감소하는 경향을 관찰하였으나, TD 49 처리군에서 접종초기에서 4일까지는 대상생물이 제어되어 Active Chl. *a*이 전혀 관찰되지 않았음. 하지만 TD49처리군에서는 8일째부터 점차적으로 증가하기 시작하여 12일째 최고치(68µg L⁻¹)을 기록하였으며, 중심목 규조류의 대발생에 의한 발생된 것으로 판단됨(그림 3. 4. 26).

MS실험에서 *A. sanguinea*의 살조능에 관한 결과를 그림 3. 4. 27 과 28에 나타내었음. 대조군과 비교하여 TD49 처리군에서는 접종 후 pH가 급격히 감소하였으며, 시간을 경과와 더불어 점차적으로 증가하여 조사 종료시에는 대조군과 비슷한 값을 보였음. 즉, MS 실험의 대조군에서도 *A. sanguinea*의 생물이 소멸되면서 다른 생물군으로 시프트되는 양상이 관찰되었고, 이는 TD49 물질을 처리한 후 SS실험에서도 시간의 경과와 더불어 규조류로 시프트화 되는 규모의 차이를 보였지만 유사한 경향을 관찰하였음. 결과적으로 생태계내에서 어떤 생물이 사멸되면 분해과정에서 기인된 영양염류가 다른 생물군에게 긍정적으로 작용하여 증식을 유도하여 계(system)내 식물플랑크톤군집의 변화를 초래하였음.

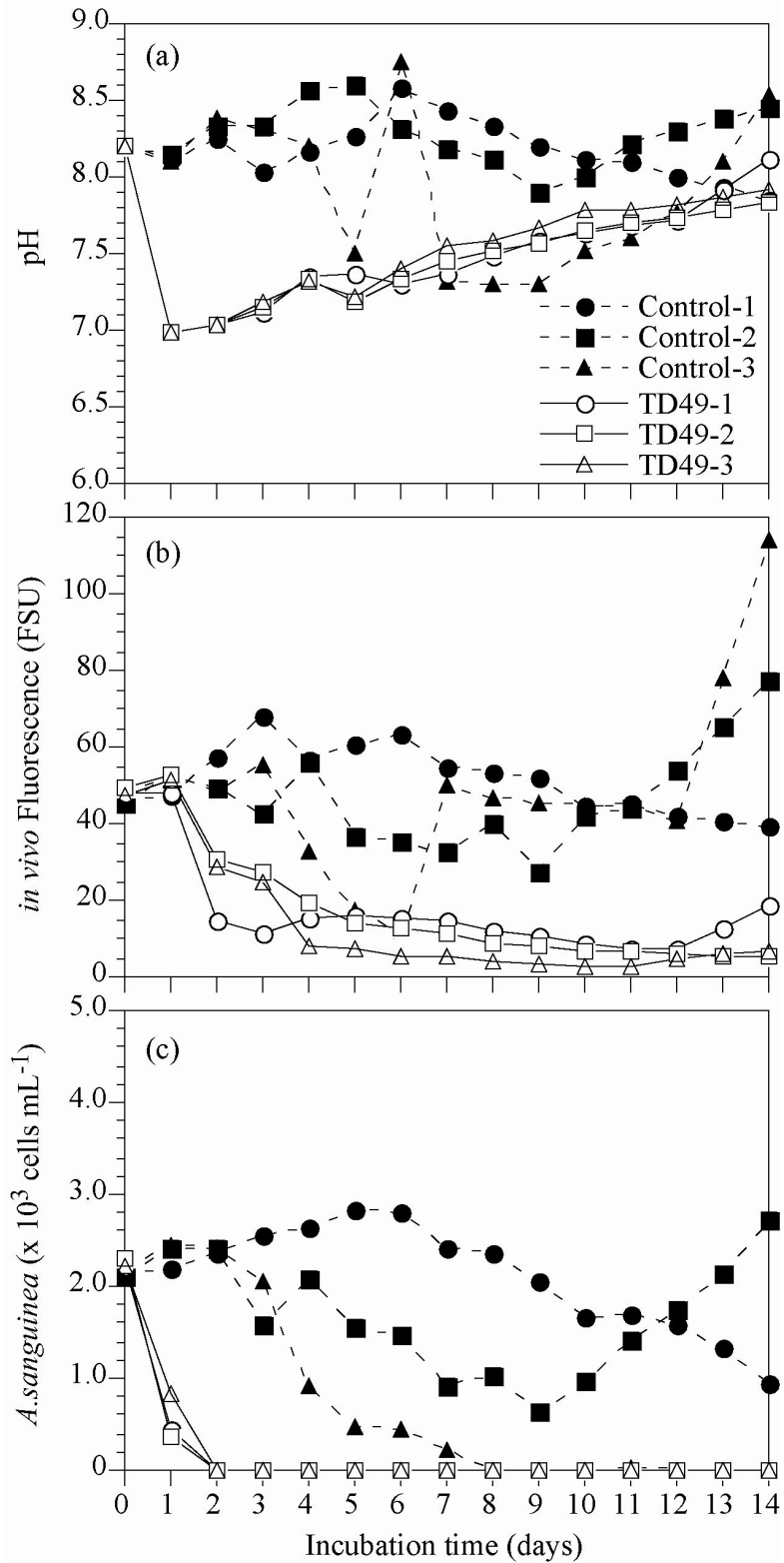


그림 3. 4. 27. Changes in pH (a), *in vivo* fluorescence (b) and abundances (c) of *Akashiwo sanguinea* in middle scale experiments (MS).

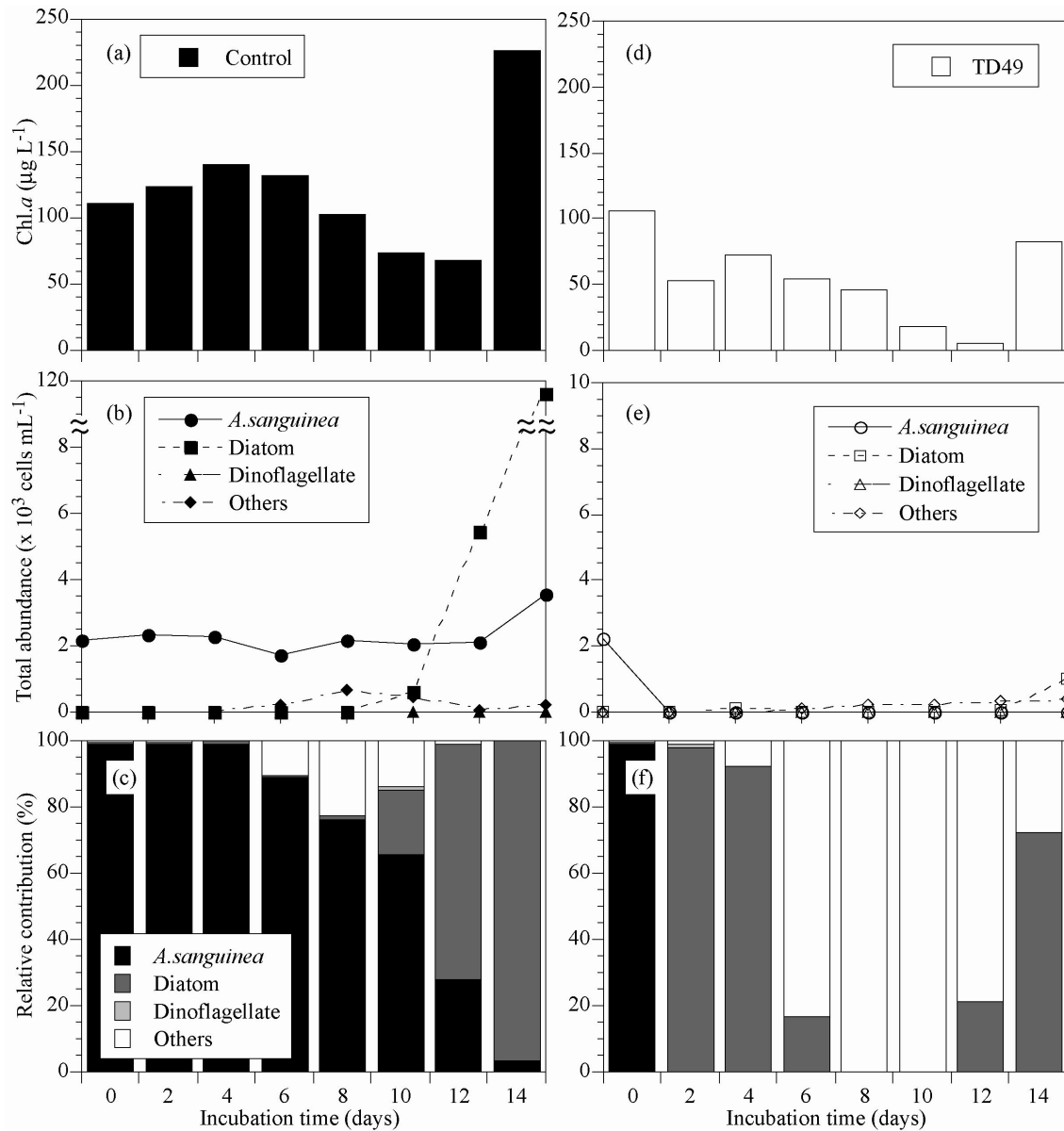


그림 3. 4. 28 Change in chl.a of *Akashiwo sanguinea* for experiment of control (a) and TD 49 substance (b) in middle scale experiments (MS). Total abundances and relative contribution (%) of *Akashiwo sanguinea* for experiments of control (b-c) and TD 49 substance (e-f). Controls were algal cultures without TD 49 substance. Experiment of methanol and TD 49 substance were algal cultures after inoculated each substance. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

일반적으로 해수내 pH는 8.2전후의 값을 나타내며, 본 실험에서의 대조군에서도 이와 유사한 값을 보였지만, TD49 물질을 처리한 후 급격히 감소한 것은 대상생물이 사멸한 것에 의하여 기인된 것으로 판단됨.

LS실험에서도 TD49 처리군에서 *A. sanguinea* 의 개체수가 급격히 감소한 후 pH농도가 감소하는 경향을 관찰하였음(그림 3. 4. 29 and 3. 4. 30).

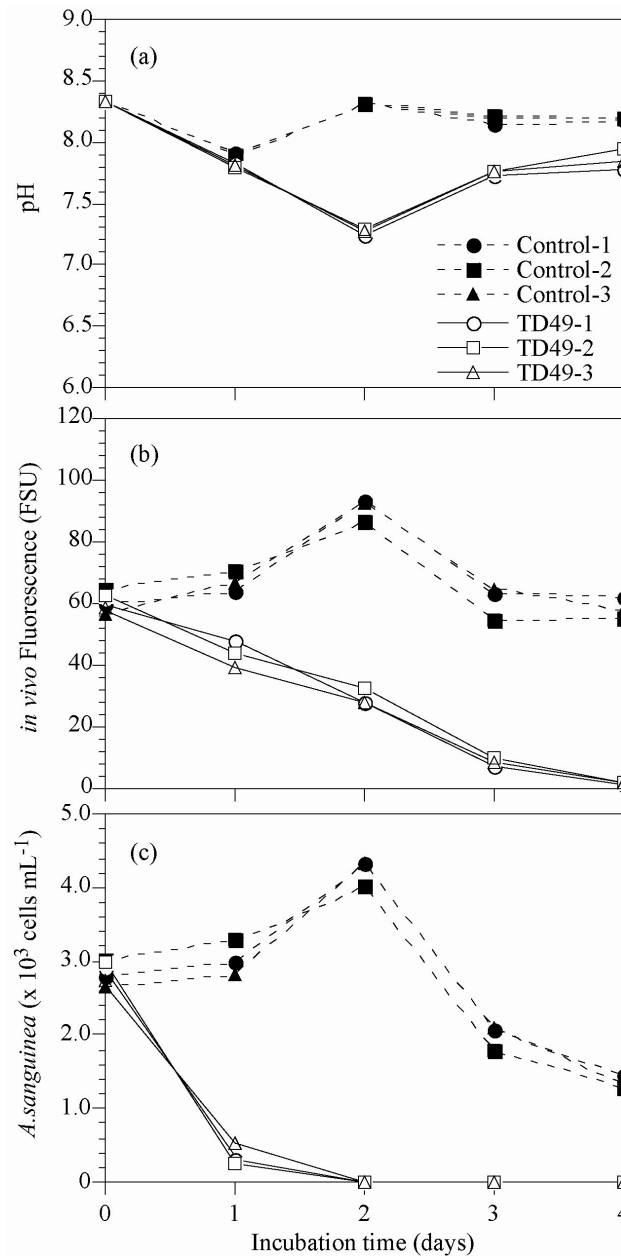


그림 3. 4. 29. Changes in pH (a), *in vivo* fluorescence (b) and abundances (c) of *Akashiwo sanguinea* in large scale experiments (LS).

LS실험에서 대조군과 비교하여 TD49 처리군에서는 접종 후 pH가 급격히 감소하였으며, TD 49물질 처리후 곧바로 살조물질의 영향을 받아 *Akashiwo sanguinea* 급격히 감소하였음.

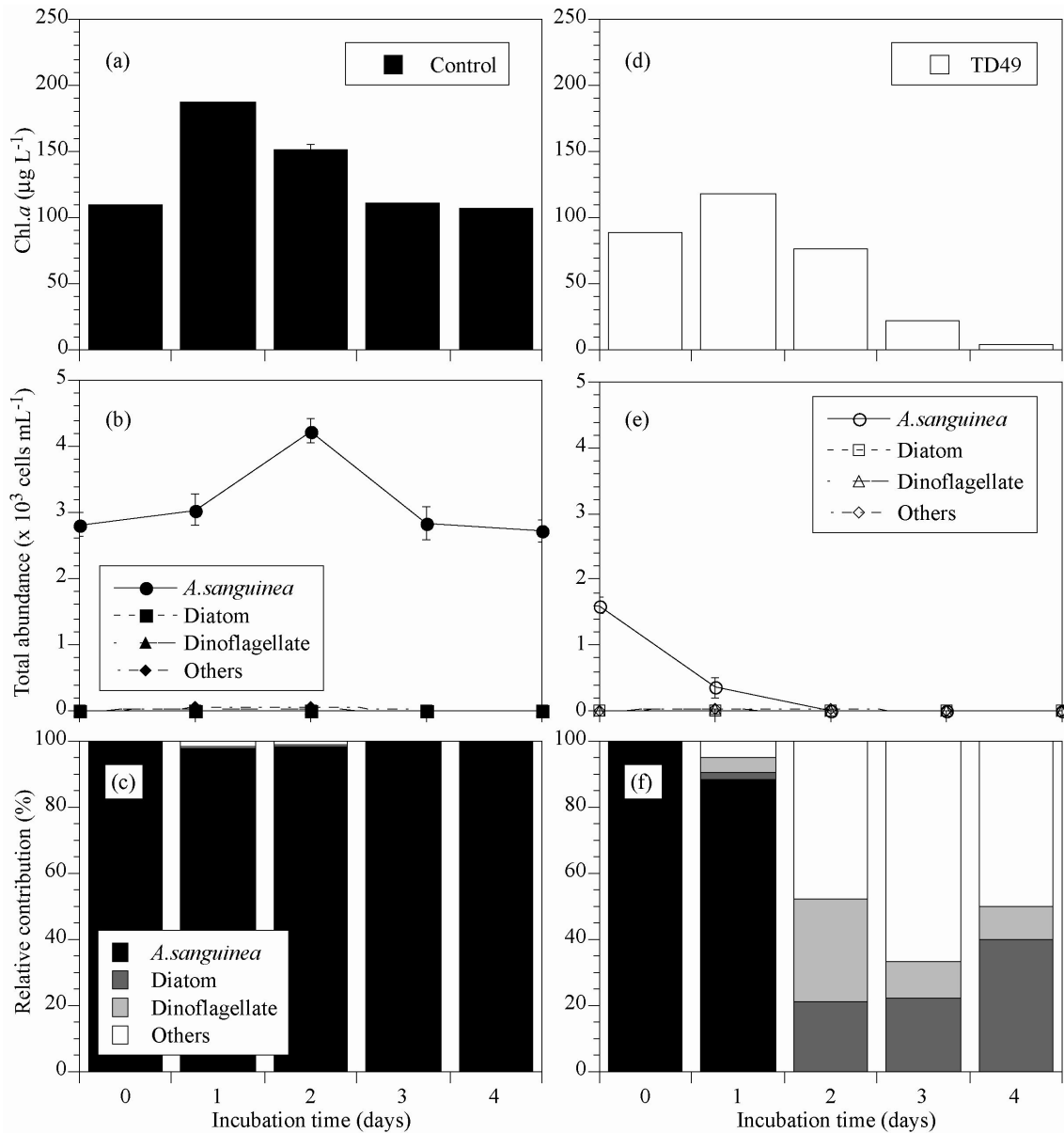


그림 3. 4. 30. Change in chl.a of *Akashiwo sanguinea* for experiment of control (a) and TD 49 substance (b) in large scale experiments (LS). Total abundances and relative contribution (%) of *Akashiwo sanguinea* for experiments of control (b-c) and TD 49 substance (e-f). Controls were algal cultures without TD 49 substance. Experiment of methanol and TD 49 substance were algal cultures after inoculated each substance. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

대조군에서 이분법에 의한 *A. sanguinea* 의 세포분열과정과 TD 49 물질 처리군에서 대 상생물이 분해되는 과정을 그림 3. 4. 31에 나타내었음. 본 생물의 상추는 반구형 또는 원 뿔형이며, 하추는 종구가 등측까지 연결되어 두 개의 열편(lobe)으로 나누어져 있음. 세포 핵은 구형 또는 장방형으로 국내 배양주는 세포중앙에 존재하지만, 국외 배양주에서는 세 포 상추에 존재함.

본 연구에서 *A. sanguinea* 의 세포분열은 핵이 없는 하주의 종구를 중심으로 두개의 열편이 벌어지기 시작하여 점차적으로 세포중앙으로 번져 세포핵이 분열하였으며, 그 후 딸세포가 형성되어 2개체가 되는 것으로 나타났음.

TD 49 물질 처리군에서 *A. sanguinea* 의 파멸과정은 세포 외벽을 중심으로 세포형태가 점차적으로 매끄럽게 응축된 후 세포벽이 파괴되어 점차적으로 분해되는 경향을 보였음. 여기서 살조 된 생물의 세포벽이 파괴되었지만 지속적으로 Chl. *a*가 완전히 분해되지 않고 시간의 경과와 더불어 점차적으로 파손되는 것으로 나타났음. 이것은 MS와 LS실험의 TD 49처리군에서 *A. sanguinea* 의 개체수는 관찰되지 않았지만, Chl. *a*가 일정한 값을 지속적으로 유지한 것과 관련이 있다고 판단됨.

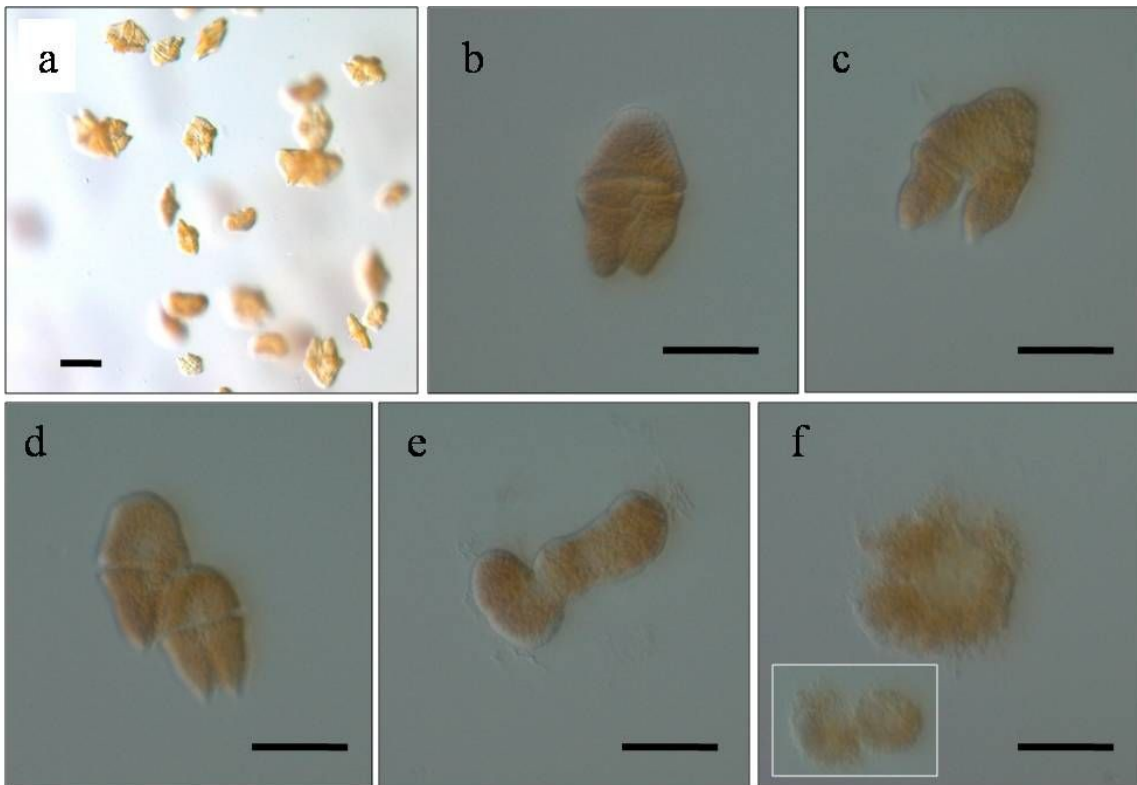


그림 3. 4. 31. Light microscopic observation of *Akashiwo sanguinea* in experiment of control (a - d) and TD 49 substance (e - f).

요약하면, 연안내만에서 빈번하게 발생하는 유해적조생물에 대해 선택적으로 살조능력을 향상시키기 위해 신규로 합성된 Thiazolidinedione 유도체 TD49 물질을 와편모조류 *A. sanguinea* 에 대하여 검토한 결과 우수한 살조능을 보였음. 만약 현장에서 장기 지속적으로 발생하는 *A. sanguinea*의 제어하기 위해서 낮은 농도의 TD49물질을 살포하여도 효과적으로 제어 가능한 친환경적인 방법이라 판단됨.

3.4.3.5. 연안에서 우점하는 적조생물(20종)을 대상으로 TD49물질 제어특성

연안에서 우점하는 해양적조생물 20종을 대상으로 살조능 실험을 한 결과 대부분의 유

해유독 편모조류(*Scrippsiella trochiodea* Akashiwo *sanguinea*, *Alexandrium tamarense*, *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum minimum*, *Prorocentrum dentatum*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Heterocapsa circularisquama* HY9433, *H. circularisquama* HCLG-1, *H. circularisquama* HA92-1, *H. circularisquama* HO4, *H. circularisquama* HU9433, *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*)에 관해서는 *in vivo* 형광값과 Active Chl. *a*가 대조군대비 급격히 감소하여 우수한 살조능을 보였다(그림. 3. 4. 32 and 3. 4. 33). 반면, 규조류는 종에 따라서 살조능을 보인 종(*Actinocyclus octonarius*, *Odontella longicruris*, *Skeletonema costatum*)과 그렇지 못한 종(*Chaetoceros didymus*, *Chaetoceros atlanticus*, *Thalassiosira conferta*, *Thalassiosira weissflogii*)이 구분되었음. 특히 은편모조류 *Rhodomonas salina*는 TD49 물질에 의하여 성장에 촉진작용을 하였음.

흥미롭게도 와편모조류 *Heterocapsa* 속(*H. triquetra*, *H. circularisquama*; 2종은 형태가 유사한 유각종임)중에서도 유독종 *H. circularisquama* 의 5 strain은 TD49물질에 의하여 우수한 살조능을 보였음에도 불구하고, 유해하지 않은 *H. triquetra*에 관해서는 살조능이 50%수준에 머물렀음. 이와 같은 결과는 같은 속수준의 생물군에서도 살조능이 다르게 나타날 수 있다는 것을 시사 할 수 있고, TD49물질이 어떤 기작으로 적조생물을 사멸시키는지 추후 검토가 요구됨.

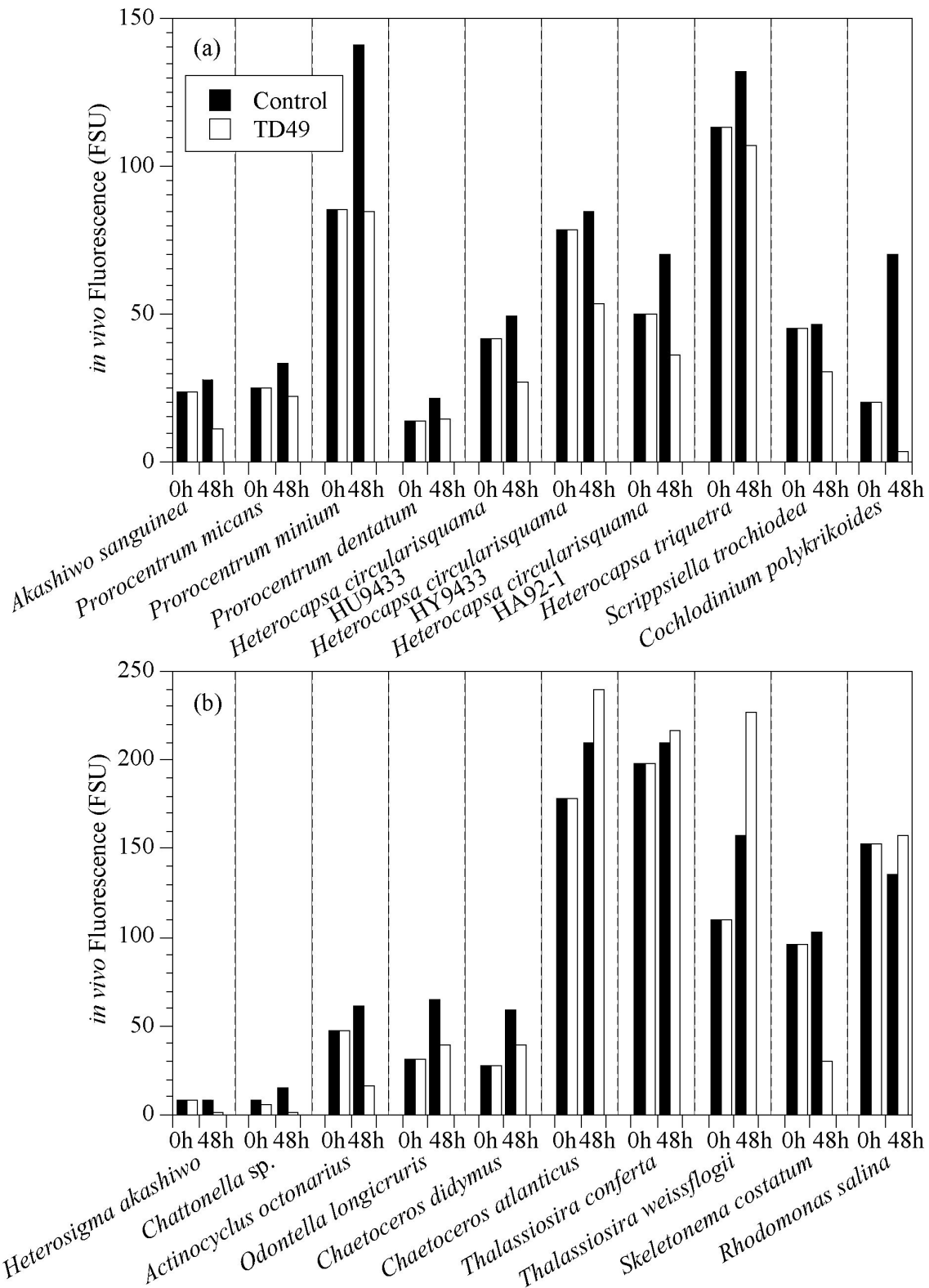


그림 3. 4. 32. Changes in *in vivo* fluorescence of 20 species after TD 49 substance inoculation in 0 hour and 48 hour.

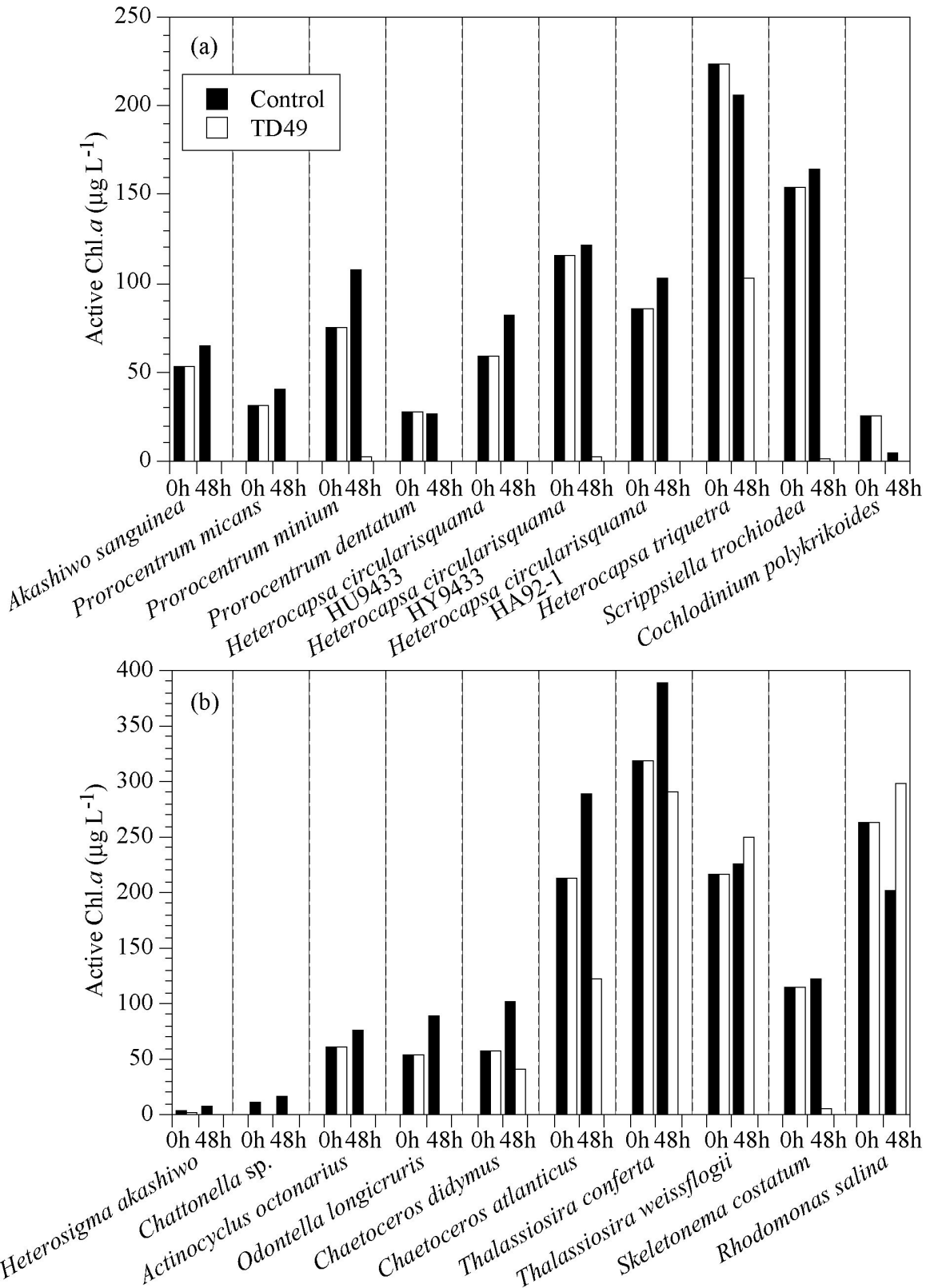


그림 3. 4. 33. Changes in active Chl. *a* concentration of 20 species after TD 49 substance inoculation in 0 hour and 48 hour.

2011년도 수행한 결과를 요약하면, 연안내만에서 빈번하게 발생하는 유해적조생물에 대해 선택적으로 살조능력을 향상시키기 위해 신규로 합성된 Thiazolidinedione 유도체 TD49 물질을 유해유독 종을 검토했던 결과 우수한 살조능을 보였음. 만약 현장에서 장기 지속적으로 발생하는 유해유독종의 제어하기 위해서 낮은 농도의 TD49물질을 살포하여도 효과적으로 제어 가능한 친환경적인 방법이라 판단됨.

연안에서 우점하는 동물플랑크톤 군집을 대상으로 평가한 결과, TD 49물질은 동물플랑크톤의 성장에 직·간접적으로 영향을 미치는 것으로 판단되었으나, 이는 실험실 내의 좁은 공간의 폐쇄적인 상태에서 독성영향을 평가한 결과로서 개방상태의 현자에서는 해류에 의한 희석 등의 다양한 저감변수가 존재하기 때문에 동물플랑크톤이나 상위영양단계의 생물군에 미치는 영향은 그다지 높지 않을 것으로 판단됨.

3.5 폐쇄생태계(mesocosm)에서 TD49 농도별 *H.circularisquama* 제어능 평가 (2단계 2차년도: 2012년)

3.5.1. 연구배경

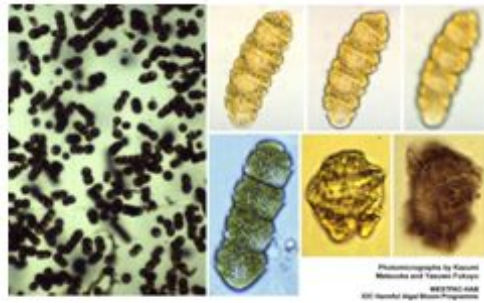
개발된 TD49의 현장 살포시 적조제어 효과 및 해양생태계에 미치는 영향을 평가하기 위해서 메소코즘을 설치하여 해양부유생태계 생물에 대한 독성과 적조생물에 대한 살조능을 확인하였음. 본 연구(2012년도)에는 I. 메소코즘에서 적조피해를 유발하는 적조생물 (*Heterocapsa.circularisquama*)에 대한 TD49물질 농도별 살조효과, II) TD49 살포 후 해양부유생생물에게 미치는 영향평가에 관한 실험을 수행하였음.

3.5.2. 실험방법

3.5.2.1. 실험 주요종의 선별

1980년 이전에는 수산피해가 거의 없는 규조류 등에 의한 적조가 발생한 것으로 보고되었으나, 1980년 이후 차츰 편모조류에 의한 적조가 빈번하게 발생하였고, 1990년 이후부터는 적조에 의한 피해가 꾸준히 보고되었음. 특히 *Cochlodisium polykrikoides*는 1990년 이후 적조피해를 유발한 대표종이며, *C. polykrikoides*는 일본에서도 1970년 이후 약 20년 이상 수산업에 피해를 준 것으로 보고하였음(그림 3. 5. 1).

본 연구에서 선별된 *Heterocapsa circularisquama*도 1990년 이후 약 20년간 일본에서 적조를 일으켜 굴, 가리비양식에 피해를 입힌 종이지만, 국내에서는 *H. circularisquama* 적조발생에 대한 대비책은 전무함. 이에 메소코즘에서 대량배양된 *H. circularisquama*의 TD49에 의한 적조제어 효과를 조사하였음(그림 3. 5. 2).



Cochlodinium polykrikoides



그림 3. 5. 1. The photos of *Cochlodinium polykrikoides*와(left), and aquacultural damage on Kyeongsangnam-do, Korea(data source by Kyeongsangnam-do)

	주요 적조피해 종	출처 : 국립수산과학원 적조정보시스템, http://portal.nfrdi.re.kr
Before 1990	Diatom(1980년 이전) <i>Chaetoceros curvisetus</i> , <i>Skeletonema cf costatum</i> , <i>Thalassiosira rotula</i> , <i>Pseudonitzschia pungens</i>	
	Flagellates(1980년 이후) <i>Gymnodinium</i> sp <i>Prorocentrum</i> spp. <i>Heterosigma akashiwo</i> <i>Noctiluca miliaris</i>	
1990 - 2010	<i>Cochlodinium polykrikoides</i> <i>Chattonella</i> spp. <i>Katodinium glaucum</i> <i>Alexandrium</i> spp.	
After 2010 예상	<i>Alexandrium</i> spp., <i>Heterocapsa circularisquama</i> = 맹독성 와편모조류 <i>Heterosigma akashiwo</i> <i>Chattonella</i> spp., = 고밀도발생 어류 대량폐사	

그림 3. 5. 2. Major harmful algal species since 1980

3.5.2.2. 메소코즘의 설치

메소코즘은 한국해양과학기술원 남해연구소의 실험용 Pier에 설치하였음(그림 3. 5. 3). 각 메소코즘은 지름 1m, 높이 1m의 스페인레스 금속으로 제작된 틀에 동일한 지름과 높이가 3m의 빛이 투과가 가능한 폴리에틸렌 제질의 bag을 고정하여 수행함. 메소코즘틀 하부에는 해수면과 평형을 유지하기 위해 타원형의 부위를 총 16개 설치하였음. 실험에 활용된 메소코즘은 대조구 1개, 실험구 5개로 총 6개를 활용하였으며, 메소코즘에서의 배양 실험에 활용된 해수는 4m 수심의 인근해수를 활용하였고, 총 1.3 ton 주입하였음. 모든 메소코즘은 해수면에서 1m 높이 세워져 있고, 타원형 덮개를 씌워, 외부와 내부로 부터의 오염원등에 대한 유출을 제어하였음. 타원형 덮개는 빛의 투과가 용이하여, 메소코즘 내부의 식물플랑크톤이 광량의 감소에 의한 영향을 최소화 하였음(그림 3. 5. 4).

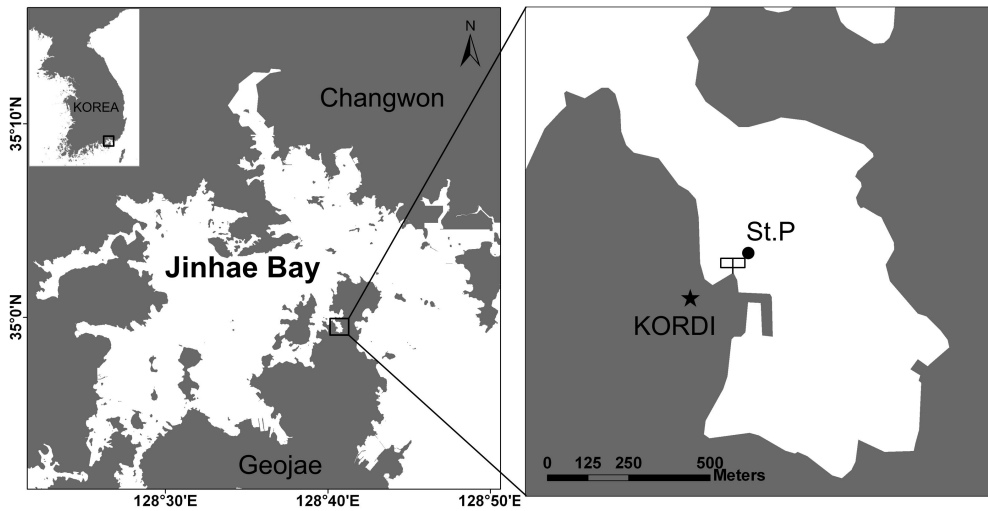


그림 3. 5. 3. Mesocosm study site in Jangmok Bay, South Korea



그림 3. 5. 4. Setting procedure of the mesocosm

3.5.2.3. 적조생물배양 및 메소코즘에 접종

선별된 적조 생물 *H. circularisquama*를 메소코즘에 적용하기 위해 총 186 L로 대량배양 하였으며, 최종농도는 4×10^6 cells L^{-1} 였다. 대량배양된 *H. circularisquama*를 배양실에서 혼합하여 동일한 농도로 멸균된 20 L bottle에 분배하였고, 이를 현장의 메소코즘에 접종하였음. 메소코즘에 접종된 *H. circularisquama*의 최종농도는 2×10^5 cells L^{-1} 였다. *H. circularisquama*를 메소코즘에 접종 후 1일간 적응시킨 후 TD49를 농도별로 투입하여 조사하였음(그림 3. 5. 5).

생물 배양 및 메소코즘에 접종

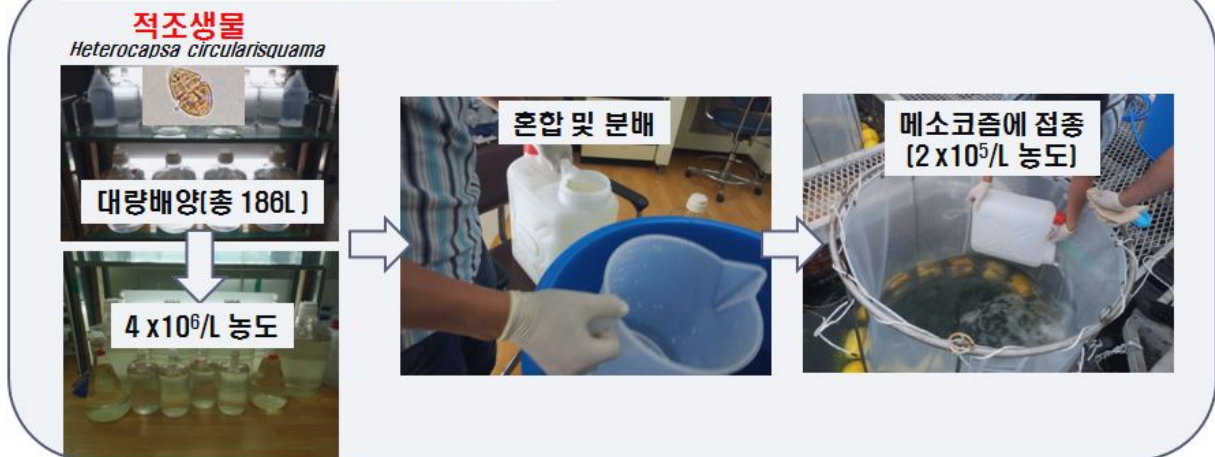


그림 3. 5. 5. The mass culture of *Heterocapsa circularisquama* and introducing procedure in the mesocosm

3.5.2.4. TD49에 의한 영향 조사

TD49에 의한 *H. circularisquama*들의 살조효과를 알아보기 위한 메소코즘 내 TD49 주입농도는 전년도에 선행된 소규모 연구를 바탕으로 최종농도는 0, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 μM 로 설정하였다. 또한 0.1% tetra-amidoethylamine를 0.1%로 주입하여 비교 대조구로 활용하였음.

TD49에 의한 생태계내의 영향을 조사하기 위해 인근 해수에 서식하는 200 μm 이상 크기의 동물플랑크톤을 100 individual L^{-1} 의 농도로 메소코즘에 주입하였음. 주입된 동물플랑크톤의 약 90%는 야광충(*Noctiluca scintillans*)이었음. 그리고 인위적으로 부화시킨 *Artemia* sp.도 70 individual L^{-1} 의 농도로 메소코즘에 주입하였음.

TD49에 의한 영향조사는 TD49 주입 후 10일간 매일 07:00, 19:00에 2회 모니터링 하였음. 수온, 염분, 용존산소는 YSI 6600 data sonde(YSI, USA)를 활용하여, 현장에서 바로 측정하였음(그림 3. 5. 6).

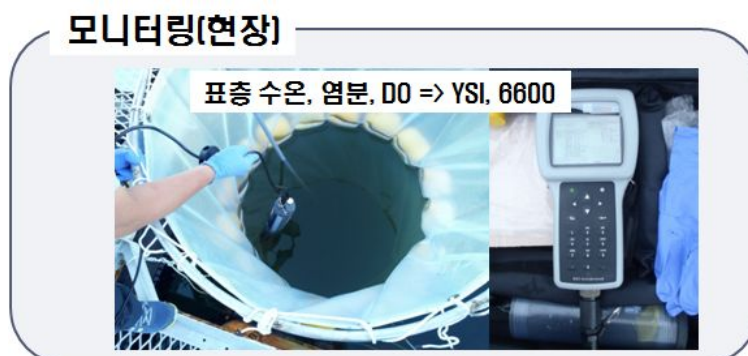


그림 3. 5. 6. Monitoring (Temperature, salinity, dissolved oxygen) by YSI 6600

각 메소코즘내의 해수는 Mixer로 균일하게 혼합한 후, 4L 비이커를 활용하여 채수하였

고, 4L 멸균팩에 즉시 옮겨 담아 실험실로 운반하였음. 모든 메소코즘내 해수를 채수하는 과정은 세척 및 살균과정을 거쳐 주변 오염원으로 부터의 유입 및 메소코즘으로 부터의 유출을 최소화하였음(그림 3. 5. 7).



그림 3. 5. 7. Sampling procedure in mesocosm

실험실로 운반된 각 메소코즘에서의 4L 해수는 pH, *in vivo* fluorescence, Chlorophyll *a*(Chl*a*), Active Chl*a*, 영양염(질산염, 암모니움, 인산염, 규산염), 식물플랑크톤과 동물플랑크톤의 정량 및 정성분석에 활용되었음. pH는 pH meter를 이용하였고, Chl*a*는 100mL의 해수를 GF/F 여과지에 거른 후 90% Aceton으로 냉암실에서 Chl*a*를 추출한 다음 형광측정기(Turner 10-AU, Biosystems, USA)를 이용하여 측정하였음. Active Chl*a*는 식물플랑크톤의 제2광계에서 발생하는 형광을 측정하여 활성 엽록소를 계산하는 PhytoPAM(Walz, Germany)을 이용하여 측정하였음. 영양염 분석을 위해 GF/F로 여과한 40ml의 시료를 산세척한 채수병에 담아 -20°C에 측정 전까지 보관하였고, Parsons et al.(1984)의 분석법에 따라서 자동영양염분석기(BranLubbe)로 분석하였음. 식물플랑크톤 정량/정성 분석을 위해 50mL Cornical tube에 subsample 하여, Lugol 용액으로 최종농도 1%로 고정한 후 5배 농축하여, 동정 및 계수하였음. 동물플랑크톤의 정량/정성 분석을 위해 2L의 해수를 200µm mesh를 활용하여 최종 부피 20mL로 100배 농축한 다음 Formaldehyde 최종농도 1%로 고정하여 보관하였고, 해부현미경(Olympus, SZX2-TR30, JAPAN)으로 동정 및 계수하였음.

3.5.2.5. 소규모 실험 병행

소규모 실험은 메소코즘에서의 동물플랑크톤 섭식 등 TD49 이외에 다른 요인이 식물플랑크톤에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되어, 외부요인을 배제하고 *H. circularisquama*에 대한 영향평가를 수행하기 위해 수행되었다. *H. circularisquama*는 메소코즘에 접종하기 직전에 배양용 Tube(50mL, PYREX)에 옮겨, 배양기에서 12:12(Light:Dark), 60 µmol photons m⁻² s⁻¹의 광조건으로 10일간 모니터링 하였음(그림 3. 5. 8). TD49의 처리농도

는 메소코즘에서와 동일하게 적용하였고, *H. circularisquama*의 개체수 변화는 형광측정기(10-AU, USA)를 이용하여 FSU를 측정하여 조사하였음. TD49에 의한 살조효과는 메소코즘에서와 마찬가지로 PhytoPAM을 활용하여 Active Chl.a를 측정하여 조사하였음.

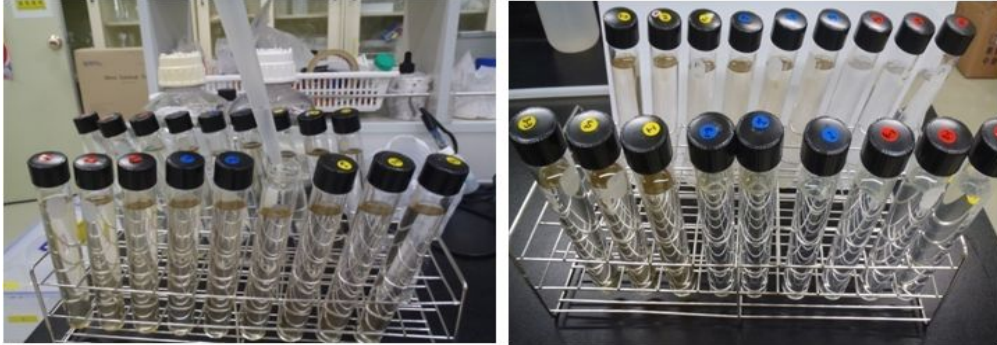


그림 3. 5. 8. Small scale test for algicidal effects by TD49 on *H. circularisquama*

3.5.3. 연구결과

3.5.3.1. 소규모 실험에서 TD49 농도별 적조생물제어특성

*H. circularisquama*에 대한 TD49의 살조효과를 외부 요인을 배제한 소규모 실험을 통해 검증해 보았음. 메소코즘 실험과 병행된 소규모 실험결과에서 0.2 μM 이상의 TD49 농도는 *H. circularisquama*의 성장에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되었고, TD49 농도 별로 상대적으로 살조효과의 차이를 나타내었음. 또한 TD49의 살조효과는 주입 즉시 나타났으며, TD49를 처리하지 않은 대조구와 비교한 *H. circularisquama*의 살조효율은 모니터링 1일째 모든 TD49농도에서 85%이상으로 나타났음(그림 3. 5. 9).

0.2 μM TD49로 처리한 실험구에서는 5일 경과 후 개체수와 Active Chl.a가 점차 증가한 것으로 나타났고, 이러한 결과는 0.2 μM 이하의 낮은 TD49 농도에서는 일정기간 이후 *H. circularisquama*의 재성장이 가능한 것을 나타냄.

결과적으로 메소코즘에 비해 소규모로 수행된 본 연구는 *H. circularisquama*가 TD49에 의해 성장에 민감한 반응을 보인 것으로 나타났으며, 메소코즘에서의 살조효과 결과와 비교하여 추후 현장에서의 활용에 있어서 최종농도를 설정하기 위한 가이드라인 설정에 도움이 될 수 있을 것으로 판단됨.

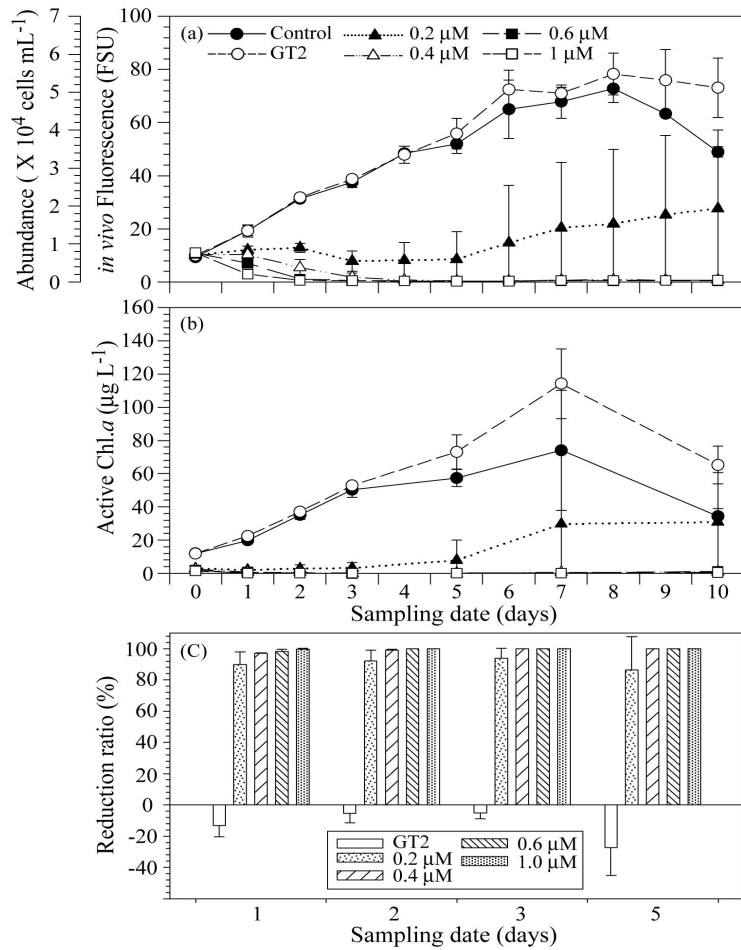


그림 3. 5. 9. Changes in in vivo fluorescence(a), active Chl.a concentration(b) and the reduction ratio of *H. circularisquama* (c) in the control, blank and TD49 treatments in the small scale experiment. Error bars represent the standard deviation of triplicate samples.

3.5.3.2. 메소코즘에서 TD49 농도별 *H. circularisquama*의 살조효과

메소코즘에서 TD49를 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 μM 을 최종농도로 맞추어 주입하여 *H. circularisquama*의 성장을 조사하였함. 대조구에 비해 TD49가 처리된 실험구에서는 0.2 μM 농도 이상에서는 *H. circularisquama*의 성장을 저해하는 것으로 나타난 가운데, TD49 주입 후 1일 경과 후 0.6, 1.0 μM 농도에서 *H. circularisquama*의 개체수는 70% 이상 감소하였고, 0.4 μM TD49에서는 4일 경과 후 70% 이상 감소한 경향을 나타내었음. 결과적으로 0.4 μM TD49 이상의 농도에서는 *H. circularisquama*의 성장에 저해를 준 것으로 해석됨(그림 3. 5. 10).

본 실험과 병행된 소규모 실험에서는 0.2 μM 에서도 높은 살조효과를 보인 반면, 메소코즘에서의 실험에서는 0.4 μM 이상에서 살조효과를 나타내었음. 또한 소규모 실험에서는 초기 살조효과가 0.2 μM 에서 85% 이상으로 나타난 반면, 메소코즘에서는 70%로 보였고, 소규모 실험에 비해 장기간 *H.circularisquama*의 개체수가 유지되는 경향을 나타내었음.

따라서 메소코즘과 같은 대규모 폐쇄생태계는 소규모에 비해 살조물질 등에 의한 영향이 상대적으로 낮게 나타나며, 이러한 결과는 현장에서의 살조물질 적용농도의 설정을 위한 선행연구로서 반드시 필요한 것임.

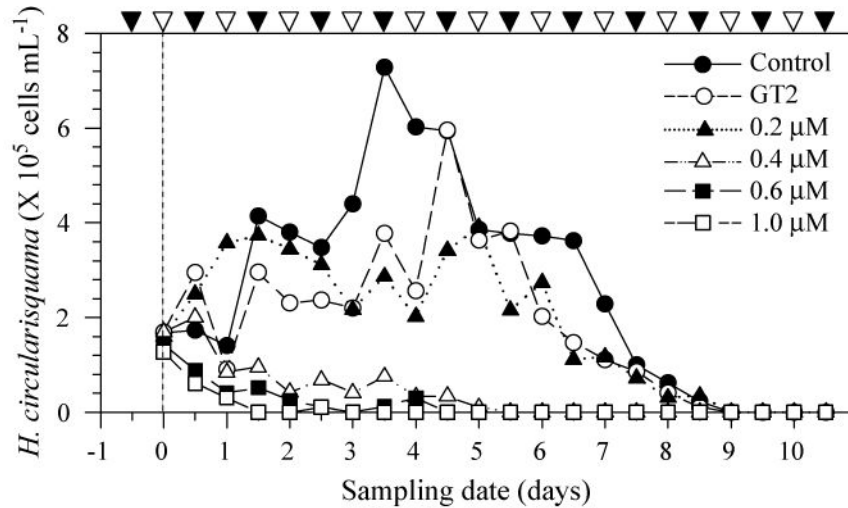


그림 3. 5. 10. Changes in *H. circularisquama* abundance in the control, blank and TD49 treatment

3.5.3.3. 메소코즘에서의 환경요인변화

TD49로 처리한 실험구는 직접적인 TD49의 영향 뿐 만 아니라 환경요인의 변화에 의한 간접적인 요인도 메소코즘내 생태적 변화에 영향을 주게 됨. 이에 메소코즘내 환경요인의 변화를 수온, 염분, pH, 용존산소(DO, dissolved oxygen), 영양염(질산염, 암모늄, 인산염, 규산염)을 중심으로 측정하였음. 이러한 결과는 식물플랑크톤 및 동물플랑크톤 군집의 생태적 변화에 대한 분석에 활용하였음.

수온은 20.2 ~ 23.3°C, 염분은 32.7 ~ 33.0 psu의 범위로 나타났으며, 시간이 경과함에 따라 수온은 점차 낮아지고, 염분은 점차 증가하는 경향을 보였음. 또한 모든 실험구별 수온, 염분은 큰 차이를 나타내지 않아, 실험구별 수온, 염분에 따른 영향의 차이는 없을 것으로 판단되었음.

pH와 DO는 대조구에 비해 실험구에서 상대적으로 큰 폭의 차이를 나타내었고, pH와 DO의 측정값은 모든 실험구에서 유사한 경향으로 증가와 감소를 반복하였음. pH는 초기 8.1에서 대조구는 최고 8.3의 값을 보인가운데 5일 이후 점차 감소하는 경향을 나타내었고, 상대적으로 가장 낮은 pH 값을 보인 1.0μM TD49 실험구에서 최저값 7.7을 나타내었음. DO는 초기 7.6 mg L⁻¹ 이었고, 대조구에서 최고 11.0 mg L⁻¹ 의 높은 값을 보였으나, TD49가 주입된 실험구에서 상대적으로 낮은 값을 보인가운데, 1.0 μM TD49에서 최저값 2.9 mg L⁻¹이 관측되었음. pH와 DO의 측정값이 07:00에 채집한 시료에 비해 19:00에 채집한 시료에서 높은 값을 보인 것은 식물플랑크톤의 광합성에 따른 DO의 증가에 따른 결과로 판단됨(그림 3. 5. 11). 또한 0.4, 0.6 μM TD49로 처리한 실험구에서 pH와 DO의 값이 매우 유사한 증가와 감소의 경향을 보여, 0.4와 0.6 μM TD49로 처리한 실험

구는 환경요인간의 차이는 거의 나타나지 않을 것으로 해석할 수 있었음.

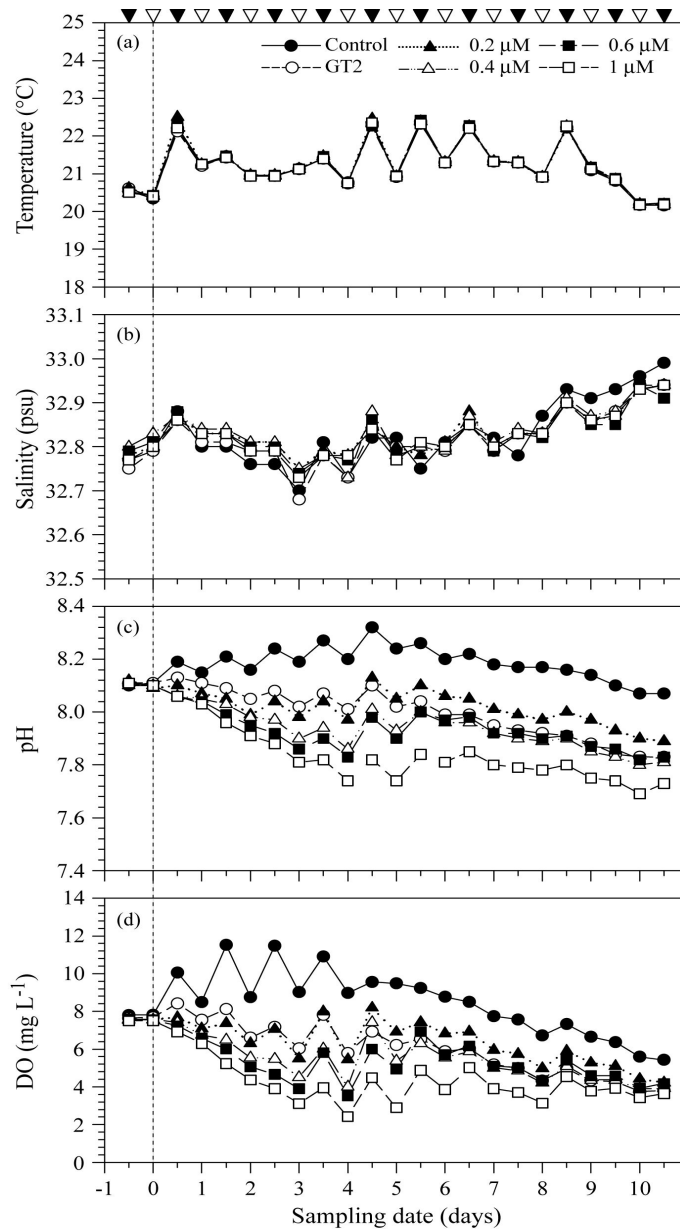


그림 3. 5. 11. Changes in temperature(a), salinity(b), pH(c) and dissolved oxygen(d) in the control, blank and TD49 treatment mesocosm. The black and white triangles are the 07:00 h and the 19:00 h sampling times, respectively.

영양염은 식물플랑크톤의 성장에 반드시 필요한 요인으로, 특정영양염의 결핍은 성장에 저해를 주게 된다. 질산염과 아질산염을 합한 농도(이하 질산염+아질산염)는 최초 18.0 μ M의 농도였으나, 이후 빠르게 감소하여 6일 이후 측정범위 이하의 값을 나타내었음. 질산염+아질산염은 대조구에서 3일째 측정범위 이하로 감소되어 가장 빨리 소모되었으며, TD49로 처리한 실험구에서는 대체적으로 유사한 경향을 보이며 감소한 가운데, 1.0 μ M의 TD49 처리구에서 가장 오랜 기간(6일) 관측되었음. 반면 암모니움은 대조구와 실험구 모두 증가와 감소를 반복하는 경향을 나타내었고, 실험구별 차이를 보이지 않았음. 규산

염은 초기 23.0 μM 의 농도를 보였고, 모니터링 2일째 1.0 μM TD49를 제외한 다른 실험구에서 급격한 감소를 보였음. 이후 대조구에서 가장 낮은 값을 보이며 점차 감소하는 경향을 보인 가운데, 1.0 μM TD49에서 5일 이후 급격한 감소를 나타내어 최종농도가 3.7 μM 로 가장 낮은 값을 나타내었음. 인산염은 질산염의 감소 경향과 유사한 가운데, 모니터링 5일 이후 모든 실험구에서 0.1 μM 이하로 낮은 값을 나타내었음(그림 3. 5. 12). 이러한 영양염의 변화는 대부분 메소코즘에서의 식물플랑크톤 군집의 분포특성 및 성장에 의해 영향을 받았을 것으로 판단됨.

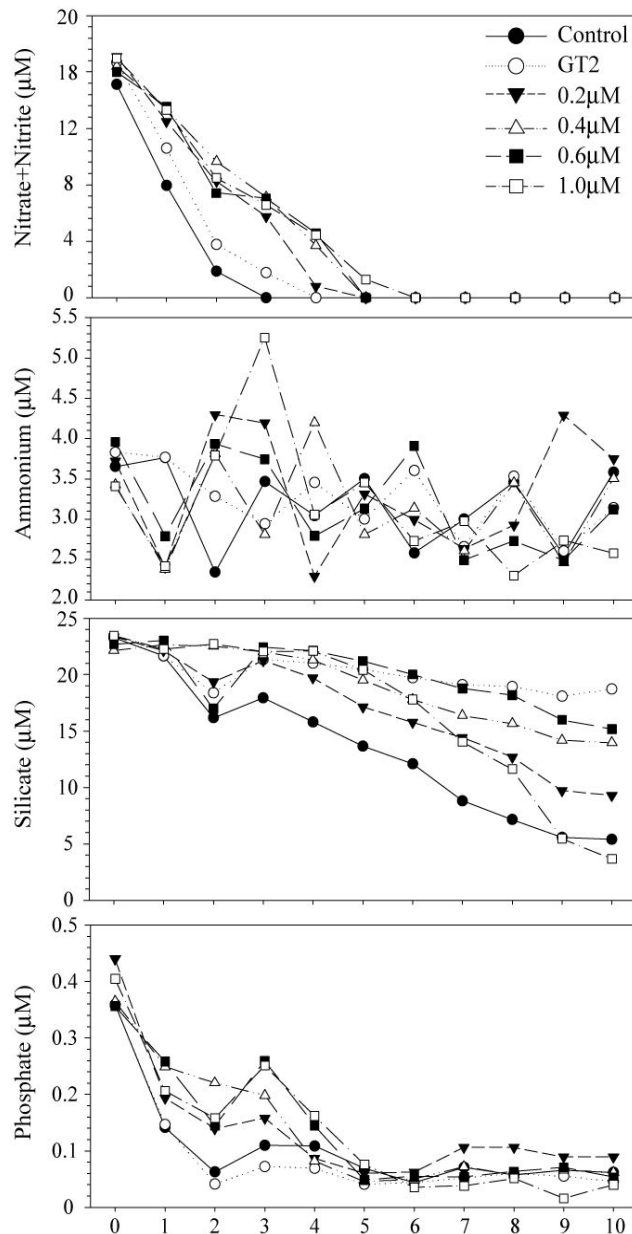


그림 3. 5. 12. Changes in Nitrate+nitrite, ammonium, silicate and phosphate concentration in the control, blank and TD49 treatment mesocosm.

3.5.3.4. 메소코즘에서의 식물플랑크톤의 활성 변화

메소코즘내 식물플랑크톤의 생물량을 알아보기 위해 측정된 *in vivo* fluorescence(FSU)와 Chl.a는 유사한 경향을 보였음. 실험 5일까지는 대조구가 TD49로 처리한 실험구에 비해 상당히 높은 농도를 보였으나, 5일 이후에는 모든 실험조건에서 유사한 경향을 보였음. 특히 1.0 μM TD49 실험구는 전반적으로 낮은 식물플랑크톤 생물량을 보였으나, 5일 이후 차츰 증가하는 경향을 보이고, 실험 종료일에는 가장 높은 농도를 보였음. 그리고 모든 실험조건에서 19:00시에 채집한 시료가 07:00의 시료보다 상대적으로 높은 값을 보였고, 이러한 주기적인 결과는 앞서 언급한 pH와 DO 결과와도 일치하였음(그림 3. 5. 13). 식물플랑크톤의 광합성 활성을 측정된 Active Chl.a는 실험 5일까지 실험조건의 TD49 농도에 따라 점차 활성이 낮은 경향을 보였으나, 5일 이후 점차 실험구별 감소폭이 점차 줄어들어 실험 종료일에는 모든 실험구에서 유사한 값을 나타내었음. 식물플랑크톤은 1.0 μM 이하의 TD49 농도에서 약 5일 이내에 생물량이 회복 가능한 것으로 판단하였고, 이러한 경향은 추후 TD49의 현장 살포 후 생태계내에서 식물플랑크톤의 회복기간을 산정하는 자료로도 활용 가능할 것으로 판단됨.

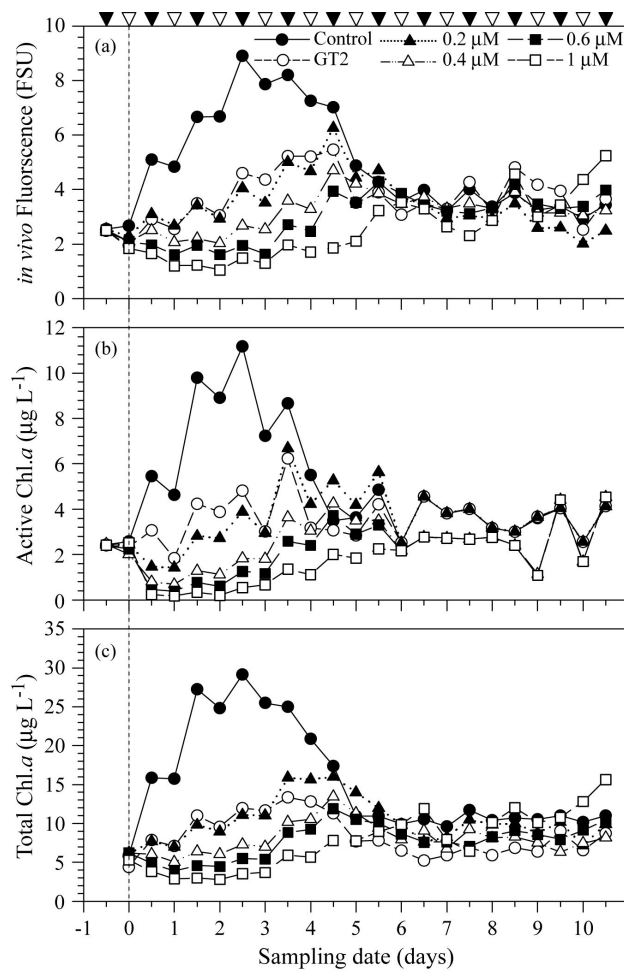


그림 3. 5. 13. Changes in *in vivo* fluorescence (a), active Chl.a and total Chl.a concentration in the control, blank and TD49 treatment mesocosm.

3.5.3.5. 식물플랑크톤의 구성 변화

TD49 주입 이후 식물플랑크톤의 전체 군집의 변화양상을 알아보기 위해 군집별 변화추이를 관찰하였음. 초기 주요 우점 군집은 Cryptomonad(은편모조류)였으나, 이후 Diatom(규조류)이 우점하는 경향으로 나타났고, Dinoflagellate(와편모조류)는 전체의 20% 정도의 분포를 유지하였으나 시간이 경과함에 따라 점차 감소하는 경향을 나타내었음(그림 3. 5. 14). 모든 실험구에서 시간이 경과함에 따라 와편모조류와 은편모조류 등 운동성 편모를 가진 분류군이 점차 분포비율이 감소되고, 규조류의 분포비율이 높아지는 경향을 나타내었음. 총 개체수의 변화에서 대조구의 경우 초기 급격한 성장을 보이며, 모니터링 1 일째에 총 개체수가 7.6×10^6 cells L⁻¹로 높은 개체수 밀도를 보였음. 반면 TD49를 주입한 실험구에서는 개체수가 점차 실험 종료일 까지 지속적으로 증가하는 경향을 보였고, 특히 1.0 μ M TD49 실험구에서는 모니터링 9일째부터 규조류의 급격한 성장으로 높은 개체수 밀도를 나타내었음.

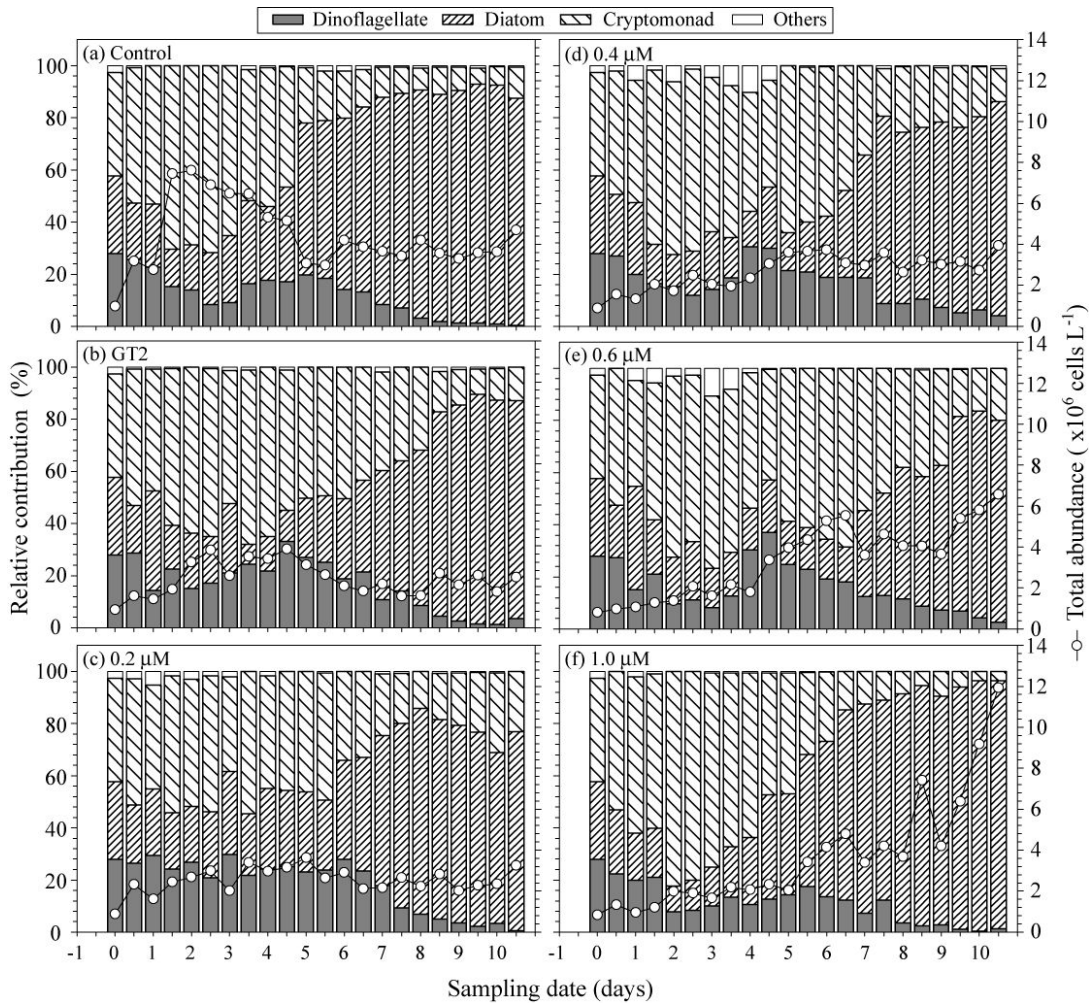


그림 3. 5. 14. Changes in phytoplankton populations in the control, blank and TD49 treatment mesocosm. Open circle indicate total phytoplankton abundance.

본 연구의 주요 식물플랑크톤인 *H. circularisquama*는 와편모조류에 속하며 이들의 개체수 변화에 대한 모니터링은 매우 중요함. 본 연구에서 와편모조류 중 주요 우점종은 *H. circularisquama*와 *Prorocentrum* sp. 이었으며, 그 외 와편모조류로 구분할 수 있었음. *H. circularisquama*는 와편모조류에서 60.2%를 차지하였고, 개체수 농도는 0.15×10^6 cells L⁻¹이었음. 대조구에서는 대부분 *H. circularisquama*가 상대적으로 높은 비율을 보였으나, 실험 종료 시점인 9일 이후에는 *Prorocentrum* sp.와 그 외 와편모조류가 높은 비율을 보였음. TD49로 처리한 실험구에서는 TD49의 농도가 높을수록 *H. circularisquama*가 빨리 감소하는 경향을 보인 가운데, 1.0 μ M의 TD49 농도에서는 TD49 주입 후 3일째 소멸하는 것으로 나타남. TD49에 의해 *H. circularisquama*가 직접적인 영향을 받아 대조구에 비해 빨리 감소한 것으로 판단됨. 그리고 TD49를 처리한 실험구에서 *H. circularisquama*의 비중이 감소하는 동시에 *Prorocentrum* sp.가 증가하는 경향을 나타내었음. 이러한 결과는 TD49의 와편모조류에 따른 선택적인 살조효과를 준 것으로 해석되며, 또한 TD49 주입 후 환경에 빠르게 적응하는 기회종이 우점을 초래할 수 있을 것으로 예측 할 수 있음 (그림 3. 5. 15).

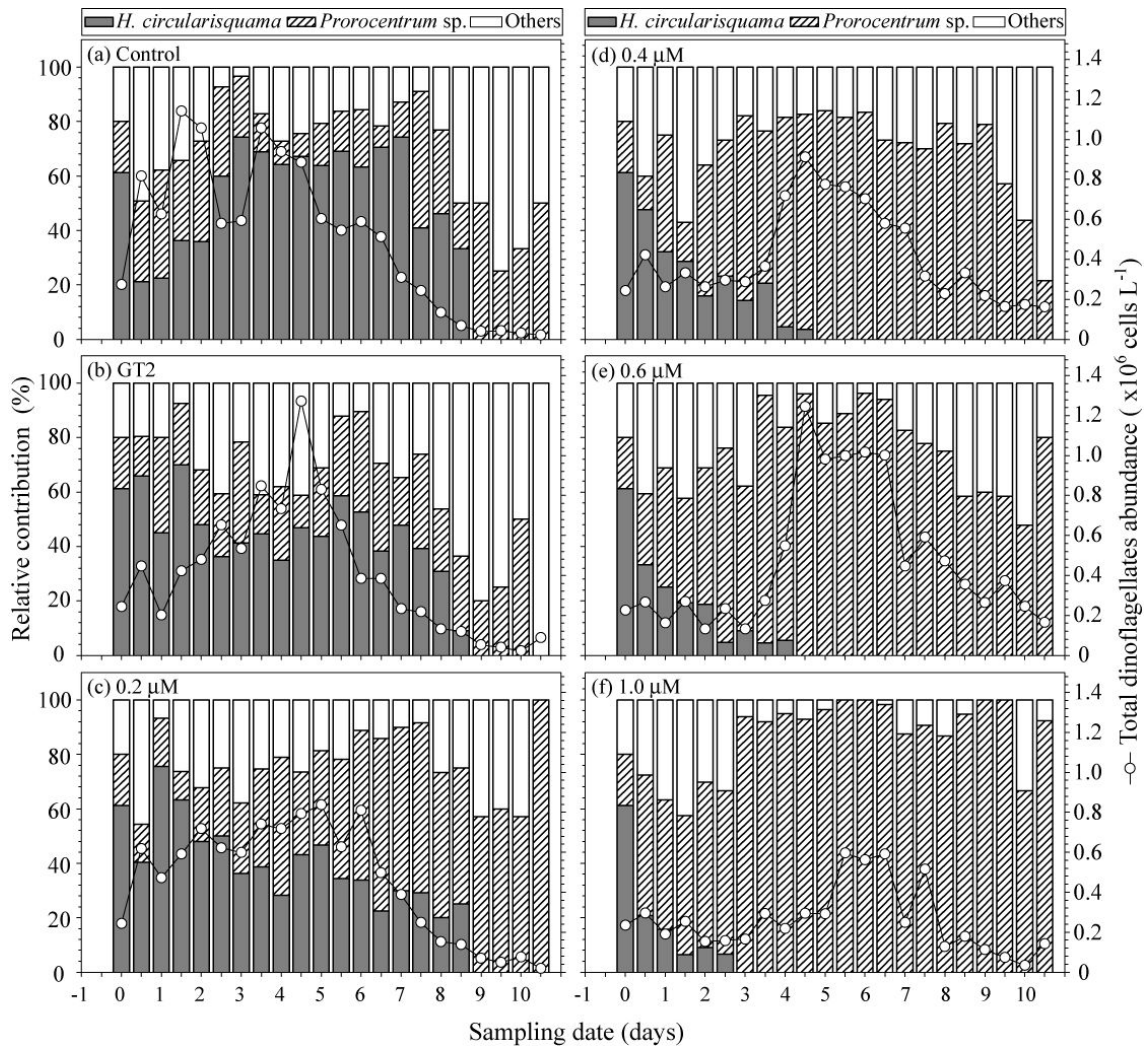


그림 3. 5. 15. Changes in dinoflagellates abundance as a result of the algicidal activity of TD49 on *H.circularisquama* in the control, blank and TD49 treatment mesocosm. open circle indicate the total dinoflagellates abundance

TD49 주입 후 모든 실험구에서 규조류가 점차 우점하는 것으로 나타났다. 이러한 인위적인 살조 물질의 살포 후 대부분의 경우 환경에 적응된 기회종이 우점하게 되는데 본 연구 결과에서는 규조류가 환경의 적응성이 뛰어난 것으로 나타났다. TD49 주입 시 주요 우점종은 *Chaetoceros* spp. 였으나, 점차 *Cylindrotheca* spp. 와 *Entomoneis* spp. 와 같은 소형 부착성 규조류의 우점 비율이 높았음(그림 3. 5. 16). 특히 *Cylindrotheca* spp. 와 *Entomoneis* spp. 와 같은 소형 부착성 규조류의 높은 비율은 기존 연구에서 부착성 규조류가 환경요인에 대한 적응성이 좋은 주요 기회종으로 보고된 바 있음(Adams and Stauber 2004). 본 연구에서도 메소코즘내 DO, 영양염등 환경요인이 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였으나, 이러한 환경에 적응가능한 부착성 규조류에 속한 종들이 우점한 것으로 해석됨. 앞서 와편모조류와 마찬가지로 살조물질의 주입 후 특정 종의 환경적응성에 따라 군집의 변화가 나타난 것을 알 수 있었음. 이러한 결과로 인해 살조물질인 TD49의 살포 후 생태계내의 식물플랑크톤 군집의 조성변화에 대한 영향도 고려해야 할 것으로 판단됨. 영양염 조사결과에서도 규산염의 지속적인 감소를 보인 바 있으며, 특히 1.0 μ M TD49 처리 실험구에서 5일 이후 규산염의 급격한 감소를 보였음. 이러한 결과는 질산염이나 인산염이 제한된 환경이었으나, 규산염의 이용이 가능한 규조류 중에서 소형의 부착성 규조류인 *Cylindrotheca* spp. 와 *Entomoneis* spp.가 기회종으로서 빠른 성장을 보인 것으로 판단됨.

폐쇄생태계에서 조사된 본 연구는 외부 유입수와의 혼합 및 희석이 일어나지 않은 결과임. TD49의 살조효과는 본 연구결과 투입 직후 1일 이내에 80% 이상의 살조효과를 보인 바, 현장에 살포시 즉각적인 살조효과를 보이고 이후 외부 유입에 의한 혼합으로 식물플랑크톤 생태에는 본 연구조사 만큼의 영향은 미치지 않을 것임. 따라서 TD49의 살포시 폐쇄적 공간을 제외하고, 표층에 우점한 적조생물에 선택적으로 살포한다면, 높은 살조효과 뿐 만 아니라 생태계에서의 영향도 줄일 수 있을 것으로 판단됨.

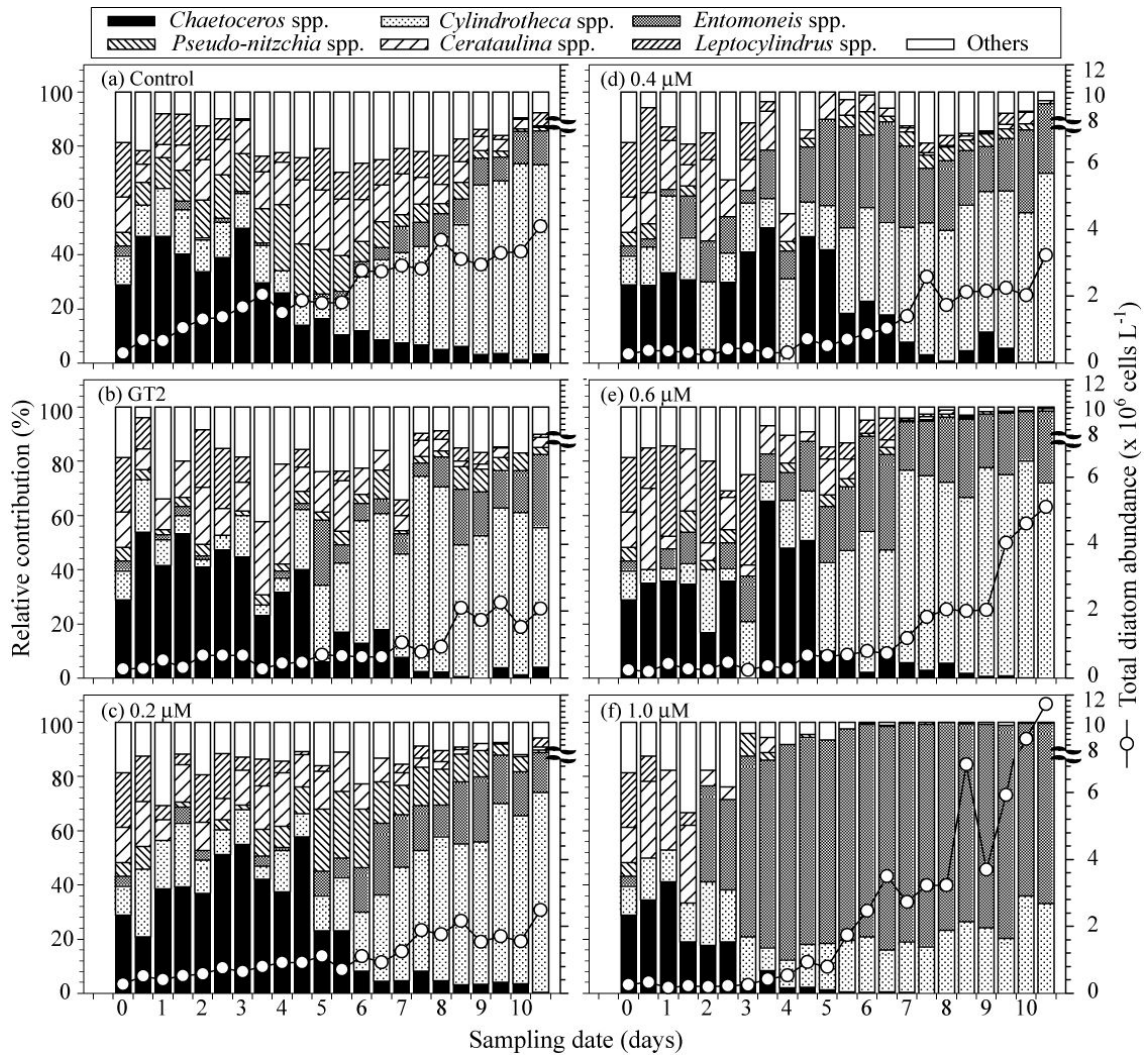


그림 3. 5. 16. Changes in Diatom abundance as a result of the algicidal activity of TD49 on *H.circularisquama* in the control, blank and TD49 treatment mesocosm. open circle indicate the total diatom abundance.(수정)

3.5.3.6. 동물플랑크톤의 분포 변화

상위단계의 동물플랑크톤에 대한 TD49의 영향을 조사한 결과, 1.0 μM TD49 농도 처리구는 초기 농도에 비해 지속적으로 낮은 개체수농도를 보였고, 대조구는 증가와 감소를 반복함. 반면, 0.2, 0.4 μM은 지속적으로 증가하는 경향을 보였고, 0.6 μM은 7일 이후 급격히 감소하는 경향을 나타내었음. 모든 실험구에서 초기 *Artemia*를 인위적으로 주입하여 높은 농도를 보였으나, 이후 급격히 감소하여 야광충(*Noctiluca sintillans*)으로 우점종이 바뀌는 경향을 나타내었음(그림 3. 5. 17). 야광충은 식물플랑크톤, 박테리아 등 먹이원에 따라 성장의 특성이 변하였음(Kim et al. 2011). 식물플랑크톤 총 개체수의 변화에서도 0.2, 0.4 μM TD49 농도로 처리한 실험구에서는 개체수 변화의 폭이 크게 나타나지 않은 반면, 0.6 μM에서는 야광충이 급격히 성장하다 감소하는 시점인 7일 이후 식물플랑

크톤의 급격한 성장을 보인 것을 나타내었음. 1.0 μM TD49 농도에서는 동물플랑크톤이 직접적인 영향을 받아 개체수의 감소에 영향을 준 것으로 판단됨.

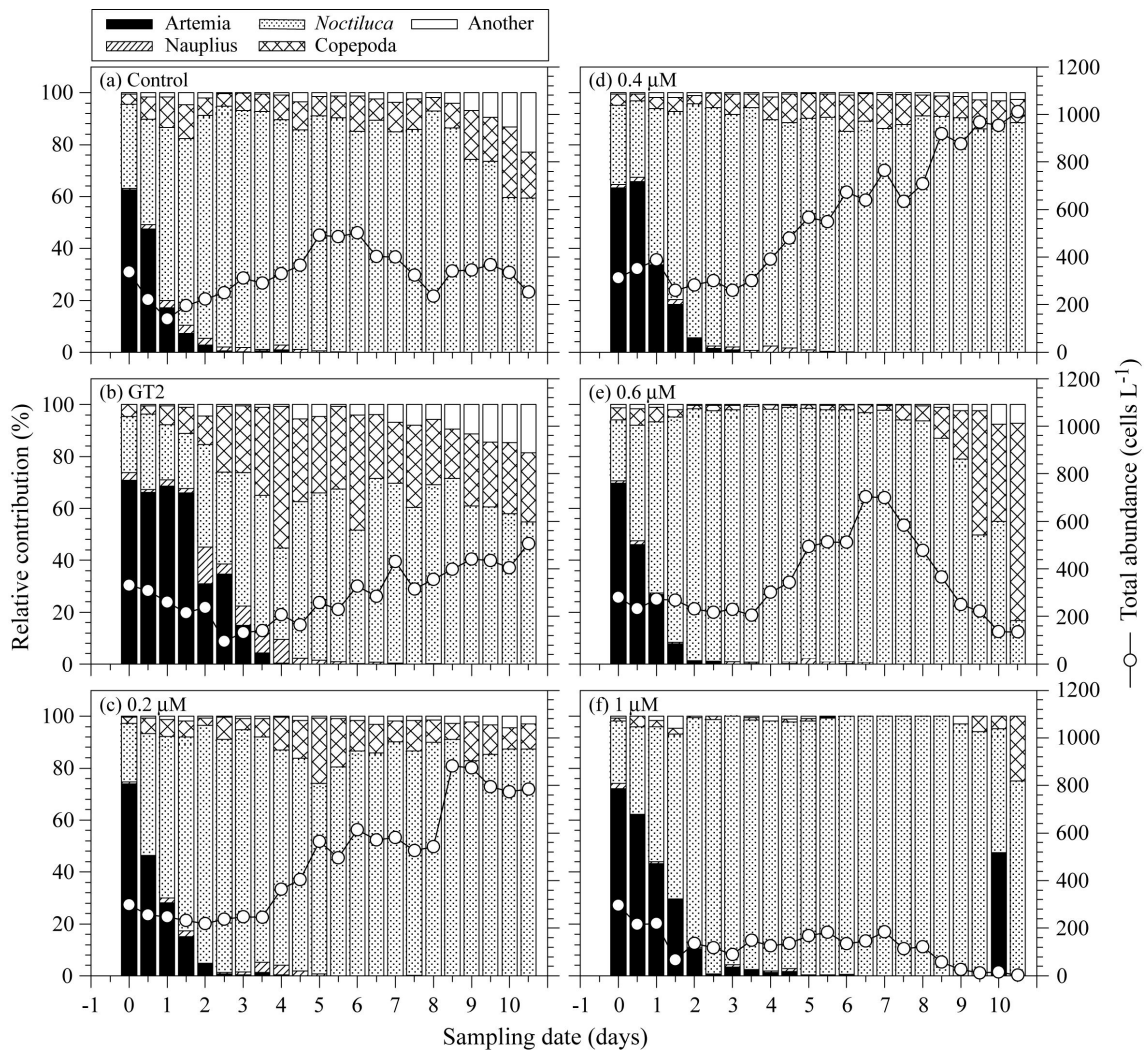


그림 3. 5. 17. Changes in zooplankton abundance as a result of the algicidal activity of TD49 on *H.circularisquama* in the control, blank and TD49 treatment mesocosm. open circle indicate the total zooplankton abundance.

2012년에는 1.3톤 규모의 메소코즘을 설치하여 총 10일간 주요 적조생물인 *H. circularisquama*의 살조효과와 환경변화에 따른 동,식물플랑크톤의 군집구조의 변화를 모니터링하였음. 결과를 요약하면, Thiazolidinedione 유도체 TD49를 메소코즘에 적용한 연구에서 0.4 μM TD49 이상의 농도로 살포 후 1일 이내에 *H. circularisquama*의 50% 이상이 감소되는 높은 살조효과를 나타내었음. 메소코즘 실험과 병행된 소규모 실험에서는 0.2 μM 에서도 1일 이내 85% 이상의 높은 살조효과를 보여, 추후 실험의 규모와 생태환경의 조건에 따른 TD49에 의한 살조효과는 큰 차이를 보일 것으로 판단됨. TD49 투입 후 식물플랑크톤은 초기 우점한 편모조류에서 규조류로 우점군집이 천이되었고, 규조류 중에서 소형 부착성 규조류인 *Cylindrotheca* spp.와 *Entomoneis* spp.가 우점하였음. 또한 와편모조류 중에서도 초기 *H.circularisquama*가 높은 비율을 차지하였지만, 이후 *Prorocentrum* sp. 가 높은 비율을 차지하여 1차년도에 결과에 마찬가지로 TD49의 종 특이적 살조효과를 나타내었음. 동물플랑크톤은 야광충(*Noctiluca sintillans*)가 주요 우점종으로 나타났고, 동물플랑크톤 전체 개체수의 변화는 TD49에 의한 직접적인 영향보다 pH, 먹이원 등의 감소에 의한 환경요인의 변화에 의한 간접적 영향이 큰 것으로 해석됨.

3.6. 폐쇄생태계(mesocosm)에서 황토와 TD49 물질에 대한 해양환경위해성 평가(2단계 3차년도:2013년)

3.6.1. 연구배경

유해조류의 대발생 (Harmful Algal Blooms)은 식물플랑크톤(주로 와편모조류나 침편모조류)이 대량으로 번식하여 바닷물 색깔이 변하는 현상을 지칭하며, 우리나라에서는 1997년 이후 해마다 적조발생 해역과 발생빈도가 증가하고 있으며, 그 피해액도 급증하고 있는 추세에 있음. 이들 적조생물은 양식어류의 호흡장애 및 아가미에 막혀 질식사시켜 수산업의 막대한 피해를 유발시킴. 아울러 사멸된 어류를 육상으로 옮겨 처리하는 비용도 막대하게 소진되고 있고, 2차 오염 및 질병의 우려도 심각한 실정임(그림 3. 6. 1)



그림 3. 6 1. Fish culture cage damages and burial process.

우리나라에서 이들 생물을 제거하기 위해 막대한 재원과 인력을 투입하고 있으나, 현 시점에서는 황토살포를 제외하면 현장에 적용한 물질에 대한 사례가 없음. 먼저 황토살포에 의한 적조생물의 방제과정 및 살조기작에 관하여 다음과 같이 요약 및 정리할 수 있음. 처음으로 황토를 사용한 곳은 일본임. 일본에서는 황토사용을 정부차원에서 적극 권장하지 않고, 영소규모로 어민들이 자기 주변어장을 보호하는 목적으로 황토를 국부적으로 사용하고 있음. 황토에는 점액성 물질을 가진 *Cochlodinium polykrikoides* 생물을 흡착시켜 해저로 침강시키는 원리로 적조생물을 제어함. 아울러 황토에 포함된 높은 농도의 철분(Fe)이나 기타 미량금속(Na, Mg)에 의하여 적조생물을 파괴시키는 역할도 병행함. 하지만, 적조가 발생한 주변해역에 살포할 수 있는 대량의 황토를 조달하는 과정이 쉽지 않아 인근 육상의 황토를 사용하는 경우가 적지 않음. 이와 같은 문제 때문에 황토의 구제효율은 10-90%의 차이를 보일 뿐만 아니라, 황토에는 적조생물이 활발하게 증식할 수 있는 성장 촉진제 작용을 하는 미량 금속이 대량 포함되어 있고, 구제효율이 낮은 황토를 살포하게 되면, 오히려 적조생물의 성장을 활성화시켜 적조현상을 부추기는 더 큰 부작용을 초래할 수 있음(그림 3. 6. 2).



그림 3. 6. 2. Yellow clay application and the mechanism for controlling HABs by yellow clay

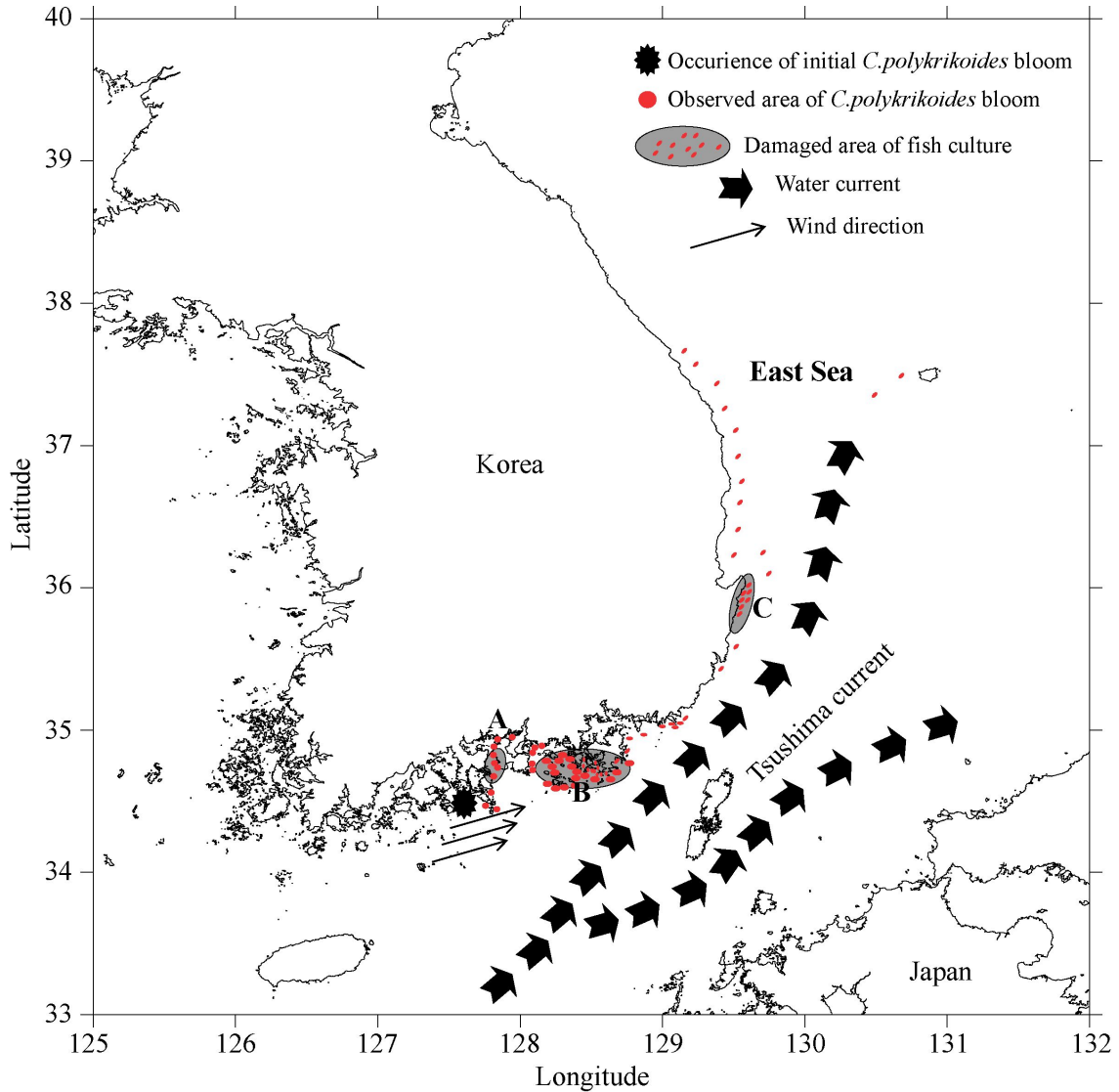


그림 3. 6. 3. Descriptions of the *Cochlodinium polykrikoides* bloom and fish culture losses that occurred in Korea during the June - August period, 2013. A total of USD \$27 million losses to fisheries occurred in the areas A, B and C, based on NFRDI (National Fishers Research and Development Institute) annual report (NFRDI 2013).

실제, 2013년에 발생한 *Cochlodinium polykrikoides* 적조에서는 황토살포에 의한 적조생물의 구제효율이 좋지 않아서, 적조생물이 급속도로 확산되어 동해 울릉도 연안해역까지 적조의 띠가 발견된 바 있음(그림 3. 6. 3). 이와 같은 문제점 때문에 황토에 의한 적조구제방법은 심각하게 고려하여 사용하여야 할 필요가 있다. 따라서 적조생물을 보다 **효과적이고 효율적으로 방제할 수 있는 물질의 개발**이 절실히 요구됨. 아울러, 개발된 물질에 대한 해양 생태계에 미칠 수 있는 영향을 평가하는 것이 중요함. 일차적으로 자연 생태계에 살조물질을 적용하여 유발되는 위해성을 인공생태계 (마이크로코즘 & 메소코즘)

를 통한 일차적 검증은 거칠 필요가 있을 뿐만 아니라, 살포비용을 절감하면서 살조효율의 극대화가 시키는 과정이 무엇보다 중요하다고 판단됨. 이는 개발된 물질의 안전성 기술 확보차원에서 중요하며, 자연생태계에 직접 적용 시 야기되는 문제점을 사전에 평가가능함(그림 3. 6. 4). 즉 이와 같은 일련의 위해성 평가방법은 살조물질 살포 후 자연서식생물 또는 양식생물의 피해를 저감시킴으로 수산경제의 미치는 악영향을 단계적으로 줄일 수 있는 최선의 방법이라 사료됨.

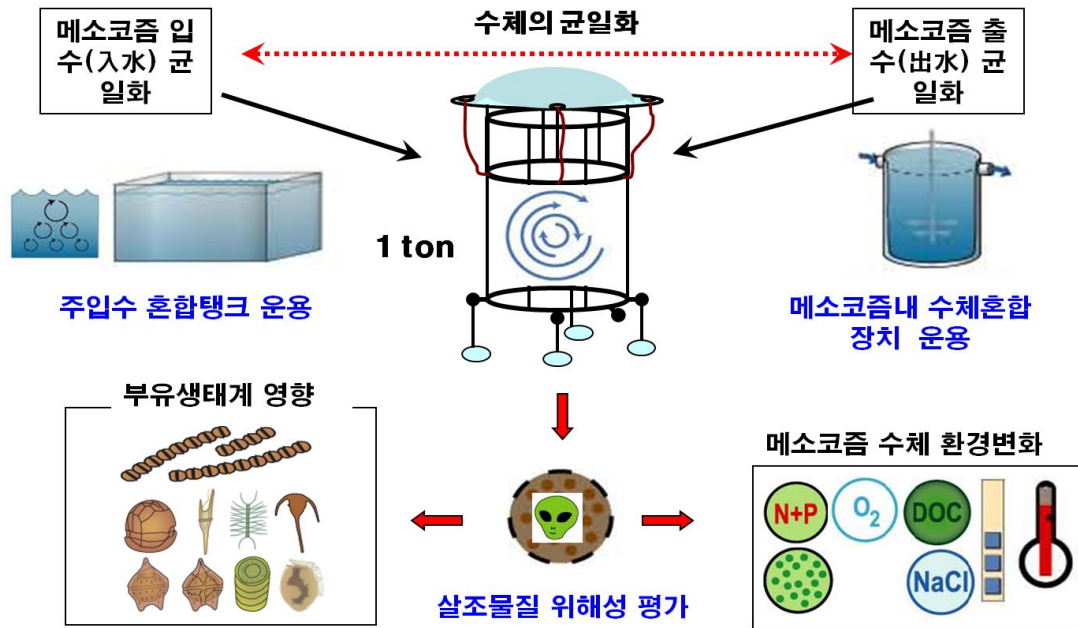


그림 3. 6. 4. The process of ecological risk assessment for HABs with the use of yellow clay and the chemical algaecides in mesocosmenclature.

본 연구에서는 기존에 개발된 TD49의 현장 살포시 적조제어 효과 및 해양생태계에 미치는 영향을 평가하기 위해서 메소코즘을 설치하여 해양부유생태계 생물에 대한 독성과 적조생물에 대한 살조능을 확인하였음. 당해년도(2013년도)에는 I). 메소코즘에서 적조피해를 유발하는 *Heterosigma akashiwo*에 대한 TD49물질 농도별 살조효과 및 살포 후 해양부유생물에게 미치는 영향평가에 관한 실험을 수행하였고, II). 메소코즘에서 적조피해를 유발하는 *Chattonella marina*에 대한 TD49물질 농도별 살조효과 및 살포 후 해양부유생물에게 미치는 영향평가와 아울러 III).현장에서 대발생한 적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*을 대상으로 TD49물질의 살조능 평가 및 위해성 평가를 마이크로코즘에서 수행하였음. 마지막으로 IV)에서는 TD49 물질이 어류에 미치는 영향을 평가하기 위해서 마이크로코즘실험을 병행하였음.

3.6.2. 실험방법

3.6.2.1 *Heterosigma akashiwo*(1차)와 *Chattonella marina*(2차)생물 배양

2013년도 폐쇄생태계에서 살조물질TD49의 생태계 위해성 평가를 수행하기 위해서 선별

된 종은 *Heterosigma akashiwo*와 *Chattonella marina*이다. 메소코즘실험은 6월과 7월에 각각 수행되었음. 메소코즘실험을 수행하기 전단계로 적조생물을 대량 배양하는 것과 메소코즘백의 제작 및 백 누수실험이 필요함. 먼저 적조생물을 대량 배양하기 위해서는 장목만 인근해역에서 채수한 해수 300L(각각의 종별 실험에 필요한 해수)를 여과한 후 고온 멸균 처리하였음(그림 3. 6. 5).



그림 3. 6. 5. Preparation process of filtered seawater and sterilization seawater.

처리한 여과해수는 그림 3. 4. 3. 5와 같이 각각의 용기에 주입한 후 일정의 *Heterosigma akashiwo*(2013년 5월 준비)와 *Chattonella marina*(6월 준비)를 접종하여 대량 배양하였음. 적조생물의 배양은 20°C, 염분 30 psu이고, 광량은 12:12(Light:Dark)조건에서 40-60 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 유지하여 2주일간 수행하였음. 배양된 대상 적조생물을 균일하게 각각의 실험구에 접종하기 위해서 200L의 플라스틱 통에 넣고, 핸드버커로 계속해서 혼합하여 각각의 메소코즘 백에 접종할 수 있도록 20L의 말통의 용기에 7개씩(7개 실험구에 사용하기 위함) 번갈아 가면서 분배하였음. 이와 같은 일련의 과정을 통하여 20L의 용기를 *H. akashiwo*실험시 14개를 준비하였고, *C.marina*실험시 14개를 각각 준비하여 메소코즘실험백에 접종하였음(그림 3. 6. 6). 메소코즘백 1톤의 현장해수에 접종한 1차 실험(6월말)의 *H. akashiwo* 개체수는 1000cells mL^{-1} , 2차 실험 *Chattonella marina*(7월중순)는 80 cells mL^{-1} 를 각각 접종하였음.



그림 3. 6. 6. The mass culture of target HABs and procedure of application in the mesocosm

3.6.2.2. 메소코즘백 제작 및 현장설치

각 메소코즘은 폴리에틸렌 제질의 bag을 고정하기 위해서 지름 1m, 높이 1m의 스텐인레스 금속으로 제작된 프레임에, 지름1m의 링을 연결하여 고정하였음. 또한 메소코즘 프레임의 하부에는 해수면과 평형을 유지하기 위해 타원형의 부위를 총 16개 설치하였음. 아울러 현장수가 유입되는 것을 방지하기 위해서 일정의 물을 넣어서 백의 누수검수를 수행하였음(그림 3. 6. 7). 제작된 메소코즘 백은 한국해양과학기술원 남해연구소의 실험용 Pier로 각각 옮겨 설치하였음(그림 3. 6. 8).

실험에 활용된 메소코즘은 대조군 1개, TD49 처리군 3개, 황토처리군 2개, 황토와 TD49의 혼합군1개로 총 7개를 설치하였음(그림 3. 6. 9). 메소코즘에서의 배양실험에 활용된 해수는 1m 수심의 인근해수를 활용하였고, 총 1.0 톤을 주입하였음. 모든 메소코즘은 해수면에서 1m 높이 세워져 있고, 타원형 덮개를 씌워, 외부와 내부로 부터의 오염원 등에 대한 유출을 방지하였음. 타원형 덮개는 빛의 투과가 용이하여, 메소코즘 내부의 식물플랑크톤이 광량의 감소에 의한 영향을 최소화하였다. 조사기간동안 빈번하게 항해하는 선박의 이동으로 메소코즘백내 일정의 수층 혼합이 일어나, 자연생태에 가까운 현장 재현 실험(폐쇄생태계)이라 판단됨.



그림 3. 6. 7. The procedure of mesocosm installation and making.



그림 3. 6. 8. The input process of the outside seawater in the mesocosm bag

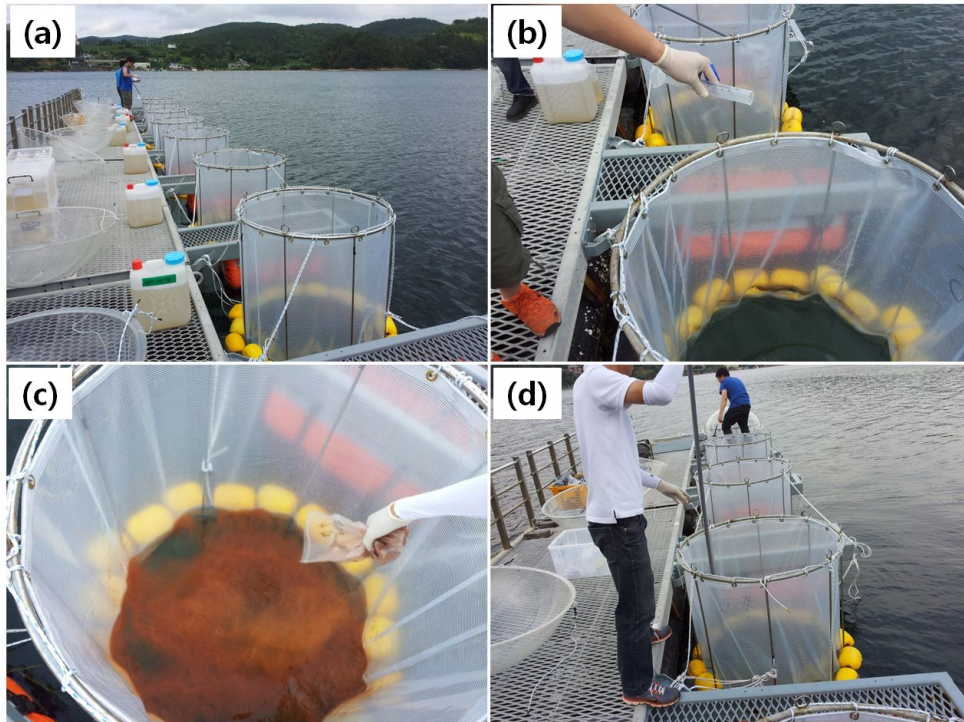


그림 3. 6. 9. The application of yellow clay and chemical algicides in the mesocosm bag

3.6.2.3. 살조물질 및 황토살포 실험구의 모니터링

TD49와 황토에 대한 *Heterosigma akashiwo*와 *Chattonella marina*의 살조효과를 알아보기 위한 메소코즘을 수행하였음. TD49 첨가농도는 전년도(2012년도)에 수행한 *H. circularisquama*의 메소코즘연구를 바탕으로 *H. akashiwo* 실험군의 최종농도는 0, 0.5, 1.0, 1.5 μ M로 황토는 400g /ton, 1kg/ton 2개의 실험군를 포함한 황토(400g /ton)+TD49(0.4 μ M)의 혼합실험군을 두었으며, *C. marina* 실험군의 최종농도는 0, 0.2, 0.4, 0.8 μ M로 황토는 400g /ton, 1kg/ton 2개의 실험군를 포함한 황토(400g /ton)+TD49(0.4 μ M)의 혼합실험군을 두었다. TD49와 황토에 의한 생태계내의 영향을 평가하기 위해 인근 해수에 서식하는 200 μ m 이상 크기의 동물플랑크톤을 *H. akashiwo*의 실험시 600 individual L⁻¹로, *C. marina*의 실험시 300 individual L⁻¹로 메소코즘에 각각 주입하였음.

TD49와 황토의 영향조사는 물질을 주입 한 후 5일간 매일 06:00, 18:00에 2회 모니터링하였고, 6-10일 사이에는 06:00에 1회 모니터링하였음. 모니터링시 수온, 염분, 용존산소는 YSI 6600 data sonde(YSI, USA)를 활용하여, 현장에서 바로 측정하였음(그림 3. 6. 10). 각 메소코즘내의 해수는 Mixer로 균일하게 혼합한 후, 4L 비이커를 활용하여 채수하였고, 4L 멸균팩에 즉시 옮겨 담아 실험실로 운반하였음(그림 3. 6. 11). 모든 메소코즘내 해수를 채수하는 과정은 세척 및 살균과정을 거쳐 주변 오염원으로 부터의 유입 및 메소코즘으로 부터의 유출을 최소화하였음.

실험실로 운반된 각 메소코즘에서의 4L 해수는 pH, *in vivo* fluorescence, Chlorophyll *a*(Chl.a), Active Chl.a, 영양염(질산염, 암모늄, 인산염, 규산염), 식물플랑크톤과 동물플

랑크톤의 정량 및 정성분석에 활용되었음. pH는 pH meter를 이용하였고, Chl.a는 100mL의 해수를 GF/F 여과지에 거른 후 90% Aceton으로 냉암실에서 Chl.a를 추출한 다음 형광측정기(Turner 10-AU, Biosystems, USA)를 이용하여 측정하였음. Active Chl.a는 식물플랑크톤의 제2광계에서 발생하는 형광을 측정하여 활성 엽록소를 계산하는 PhytoPAM(Walz, Germany)을 이용하여 측정하였음. 영양염 분석을 위해 GF/F로 여과한 40ml의 시료를 산세척한 채수병에 담아 -20°C에 측정 전까지 보관하였고, Parsons et al.(1984)의 분석법에 따라서 자동영양염분석기(BranLubbe)로 분석하였음. 식물플랑크톤 정량/정성 분석을 위해 50mL Conical tube에 subsample 하여, Lugol 용액으로 최종농도 1%로 고정된 후 5배 농축하여, 동정 및 계수하였음. 동물플랑크톤의 정량/정성 분석을 위해 2L의 해수를 200 μ m mesh를 활용하여 최종 부피 20mL로 100배 농축한 다음 Formaldehyde 최종농도 1%로 고정하여 보관하였고, 해부현미경(Olympus, SZX2-TR30, JAPAN)으로 동정 및 계수하였음.

두 차례의 메소코즘(*Heterosigma akashiwo*;1차 *Chattonella marina*;2차) 실험에서 박테리아의 생물량은 수단블랙(Sudan Black)용액에 0.2 μ m membrabe filter (Millipore)를 염색한 후 고정된 시료를 잘 혼합 희석하여 일정량(0.5-2 mL)을 취해 여과후 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 5분간 염색하여 형광현미경(Axioplane, Zeiss)으로 1000배 하에서 검경 및 계수하였음. 각 샘플은 임의의 field에서 총 세포수가 300개 이상 계수하여 그에 해당하는 field 수가 전체 field 수에 해당하는 부분을 환산하여 총 박테리아의 생물량을 산출하였음(Porter and Feig 1980). HNF의 생물량은 수단블랙(Sudan Black)용액에 2 μ m membrabe filter (Millipore)를 염색한 후 고정된 시료를 일정량 (10-30 mL)을 취해 Primulin 염색후 1000 배 하에서 계수하였음(Caron 1983).

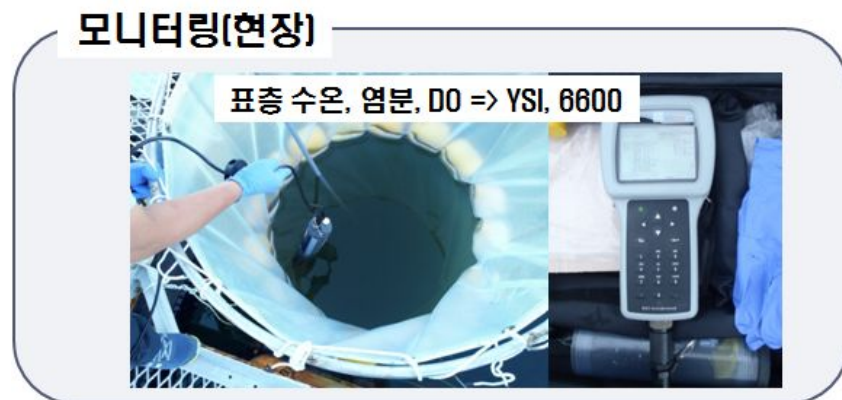


그림 3. 6. 10. Monitoring (Temperature, salinity, dissolved oxygen) by YSI 6600



그림 3. 6. 11. Sampling procedure in mesocosm

3.6.2.4. 현장적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*의 살조능 실험-마이크로코즘

자연계에서 일어나는 적조생물 *C. polykrikoides*을 제어하기 위하여, 황토와 TD49물질을 이용하여 마이크로코즘 실험을 수행하였음. 본 실험에서 사용한 적조생물은 통영주변해역(34°45' 44" N, 128°23' 42" E)에서 채집하여 실험실로 운반하였음. 채집한 시료의 *C. polykrikoides*의 세포밀도(c.a. $6 \times 10^3 \text{ cell ml}^{-1}$)가 너무 높아 장목만의 해수로 반씩 희석하여 살조능실험을 수행하였음. 황토는 통영주변해역에서 적조제어를 위해서 살포하는 것을 사용하였음. 모든 실험은 12 L의 플라스틱 케이지(30 cm long' 20 cm wide ' 20 cm depth)에 10L의 시료를 넣고, 대조군을 포함하여 TD49처리군(0.4, 0.8 μM), 황토처리군(4g 과 10g per 10L), 황토와 TD49혼합처리군(0.4 μM +4g per 10L)에서 살조능실험 및 생태계에 미치는 영향평가를 수행하였음. 마이크로코즘실험은 실험실의 room 온도(거의 23°C)의 f/20 배지에서 염분 30 psu이고, 광량은 12:12(Light:Dark)조건에서 40-60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 로 유지하여 2주일간 수행하였다. 동물플랑크톤은 자연에서 서식하는 것을 200 μm 로 네트해서 최종농도가 700 ind. L^{-1} 가 되도록 맞췄음. 적조생물을 포함한 플랑크톤군집의 모니터링은 초기 3일 동안은 12시간 간격으로 수행하였고, 그 이후는 2일 간격으로 9일 동안 수행하였음. 수온, 염분, pH, 용존산소는 YSI(professional Plus of portable type)를 사용하여 측정하였다. 각 실험군의 살조효율은 PytoPAM장비(phytoplankton analyzer; PHYTO-ED, S/N: EDEF0139, Germany)를 이용하여 활성엽록소(active Chl. *a*)을 측정함과 동시에 대상생물*C. polykrikoides*의 세포밀도로 각각 산출하였다. 식물플랑크톤과 섬모충의 개체수밀도는 5%의 루골용액으로 고정한 후 현미경하(Zeiss, Axiovert 135M, Germany)에서 SR 챔버(Sedgwick-Rafter chamber)로 검경 및 계수하였음. 동물플랑크톤의 계수는 동물플랑크톤 계수 챔버를 이용하여 해부현미경(Olympus, SZX2-TR30, Japan)으로 검경 및 계수하였음. 모든 실험은 2배수(duplicate) 실험으로 수행하였음.

각 실험군의 박테리아의 생물량은 수단블랙(Sudan Black)용액에 0.2 μm membrabe filter

(Millipore)를 염색한 후 고정된 시료를 잘 혼합 희석하여 일정량(0.5-2 mL)을 취해 여과 후 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 5분간 염색하여 형광현미경(Axioplane, Zeiss)으로 1000배 하에서 검경 및 계수하였음. 각 샘플은 임의의 field에서 총 세포수가 300개 이상 계수하여 그에 해당하는 field 수가 전체 field 수에 해당하는 부분을 환산하여 총 박테리아의 생물량을 산출하였음(Porter and Feig 1980). HNF의 생물량은 수단블랙(Sudan Black)용액에 2 μ m membrabe filter (Millipore)를 염색한 후 고정된 시료를 일정량 (10-30 mL)을 취해 Primulin 염색후 1000 배 하에서 계수하였음(Caron 1983).

3.6.2.5. Toxicity test of TD49 and yellow clay on Striped beakerch fish, *Oplegnathus fasciatus*

어류에 대한 살조물질(TD49, 황토)에 대한 독성 평가는 부화시키고 3개월 된 줄돔(Striped beakerch fish; *Oplegnathus fasciatus* 4.8±0.5cm in length)을 이용하였음. 줄돔은 거제시에 있는 어류 수산농장에서 구입하였음. 어류의 실험에 앞서, 각 25L 실험어항(40 cm long × 25 cm wide × 28 cm depth)에 염분 32psu인 해수 17L에 어류 30마리씩 넣고, 12:12의 명암조건에서 에어 버블을 공급하면서 2일정도 순치시켰음(그림 3. 6. 12). 실험에서의 TD49 농도는 0, 0.2, 0.4, 0.8, 2.0, 4.0, 10 μ M로 조절하였고, 황토의 농도는 4g L⁻¹ 과 10g L⁻¹.으로 맞춰 48시간 노출실험을 수행하였음. 모든 실험에서 수온, 염분, ph, 용존산소를 포함한 어류의 치사율을 12시간 간격으로 48시간 행하였음.

3.6.2.6. 데이터 분석

각 대상생물(1차 메소코즘: *H. akashiwo*, 2차 메소코즘: *C. marina*, 3차 마이크로코즘: *C. polykrikoides*)에 대한 황토와 TD49물질의 살조효과는 다음과 같은 식에 대입하여 구하였다. algicidal effect (%) = $(1 - Tt/Ct) \times 100$, 여기서, 각 살조물질의 농도에서 *T* (treatment) 와 *C* (control) 의 대상생물의 세포 개체수 및 활성엽록소를 나타내었고, *t*는 배양시간임. 각 실험군의 농도별 살조물질에 대한 영향의 차이는 SPSS 프로그램을 이용하여 Tukey's 방법의 One-way ANOVA로 확인하였음.



그림 3. 6. 12. Toxicity test of TD49 and yellow clay on Striped beakerch fish

3.6.3. 연구결과

3.6.3.1. *H. akashiwo* 메소코즘에서의 환경요인변화

살조물질의 처리군에서는 살조물질인 TD49와 황토의 직접적인 영향 뿐 만 아니라 물질을 처리함으로써 발생하는 2차적인 환경요인의 변화에 의해서도 간접적으로 영향을 받을 수 있음. 따라서 메소코즘내 환경요인의 변화를 수온, 염분, pH, 용존산소(DO, dissolved oxygen)을 측정하였고, 이러한 결과는 식물플랑크톤 및 동물플랑크톤 군집의 변화양상에 어떠한 영향을 미쳤는지 유추할 수 있음.

수온은 초기 23.3°C에서 점차적으로 증가하여 실험 종료시 25.6°C로 나타났음. 모든 실험군의 수온의 차이는 크지 않았고, 염분은 31.6 ~ 32.1 psu의 범위로 나타났으며, 염분은 배양시간의 경과와 더불어 점차적으로 증가하였음. 또한 모든 실험구별 염분의 차이는 보이지 않았음.

pH와 DO는 대조군과 황토 실험군에 비하여 TD49실험군에서 상대적으로 큰 폭으로 감소하는 경향을 관찰하였음. 먼저 대조군의 pH는 초기 8.0에서 점차적으로 증가하여 조사 2일째 최고치 8.4를 기록하였고, 그 후 점차적으로 8.3전후를 기록하면서 감소하였음. 황토 첨가군의 pH는 0.4g L⁻¹의 첨가군이 0.8g L⁻¹황토첨가군보다 조금 높게 기록되었고, 이와 같은 경향은 대조군과 유사하였으며 배양시간의 경과에 따른 2 황토실험군의 변화 추이는 비슷하였음. 반면, TD49실험군과 황토와 TD49를 혼합한 실험군에서는 물질 투입 이후 4일 동안 지속적으로 pH가 감소하는 경향을 관찰하였고, 그 이후부터 농도별로 차이를 보였으나, 점차적으로 증가하는 경향을 관찰하였음. 특히 상대적으로 가장 낮은 pH 값을 보인 실험군은 TD49 1.0 μM 이고, 최저값 7.6을 기록하였음. 모든 실험군의 초기 DO는 8.5 mg L⁻¹ 이었고, 대조군과 황토 처리군에서는 점차적으로 증가하였고, 조사 2일째 대조군에서 최고치 16.0 mg L⁻¹을 기록하였음. TD49가 주입된 실험구에서 상대적으로 낮은 값을 보인가운데, 1.0 μM TD49에서 최저값 1.0 mg L⁻¹이 관측되었음. 또한 pH와 DO의 측정값이 06:00에 채집한 시료에 비해 18:00에 채집한 시료에서 높은 값을 보인 것은 식물플랑크톤의 광합성에 따른 DO의 증가에 따른 결과로 판단됨(그림 3. 6. 13). TD49물질의 처리군에서는 농도에 따라서 pH와 용존산소의 감소경향이 뚜렷하게 관찰되었음.

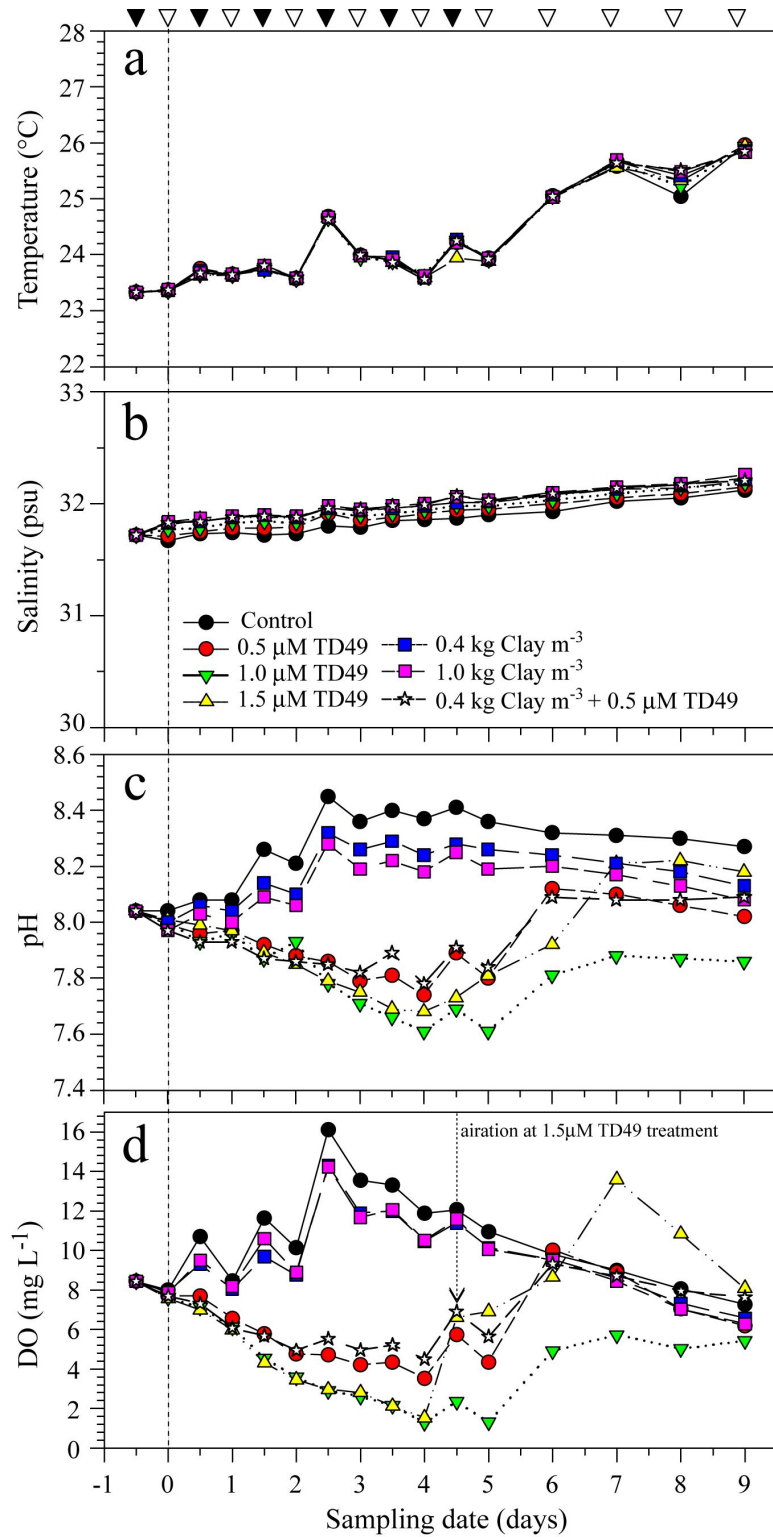


그림 3. 6. 13. Changes in temperature (a), salinity (b), pH (c), dissolved oxygen (d) in the control and treatments with TD49 and yellow clay in mesocosm enclosures. Arrow with dotted line on (d) is indicated the aeration in 1.5 µM TD49 treatment at day 4 PM.

3.6.3.2. 메소코즘에서 TD49 농도별 *H. akashiwo*의 살조효과

폐쇄생태계(메소코즘)에서 대조군, TD49 3개(0.5, 1.0, 1.5 μM)처리군, 황토(0.4g, 0.8g L^{-1})2개 처리군, TD49와 황토(TD49 0.5 μM + 황토 0.4g L^{-1})의 혼합처리군을 만들어 *H. akashiwo*의 살조효과를 파악하였다. 대조군은 살조효과를 나타내지 않은 반면, TD49 처리군의 0.5 μM 농도 이상에서는 *H. akashiwo*의 성장을 저해하는 것으로 나타난 가운데, TD49 주입 후 1일 경과 후 모든 TD49 처리군과 TD49 + 황토혼합처리군에서 *H. akashiwo*의 개체수는 90%로 감소하였고, TD49 0.5 μM 에서는 2일 경과 후 95% 이상 감소한 경향을 나타내었음. 결과적으로 TD49처리군과 혼합처리군에서 명확하게 *H. akashiwo*의 살조효과를 보이는 것으로 나타났음. 한편, 황토처리군은 대조군과 유사하게 *H. akashiwo*의 살조효과는 전혀 보이지 않았고, 오히려 대조군보다 성장의 촉진제 역할을 하는 것으로 나타났음(그림 3. 6. 14).

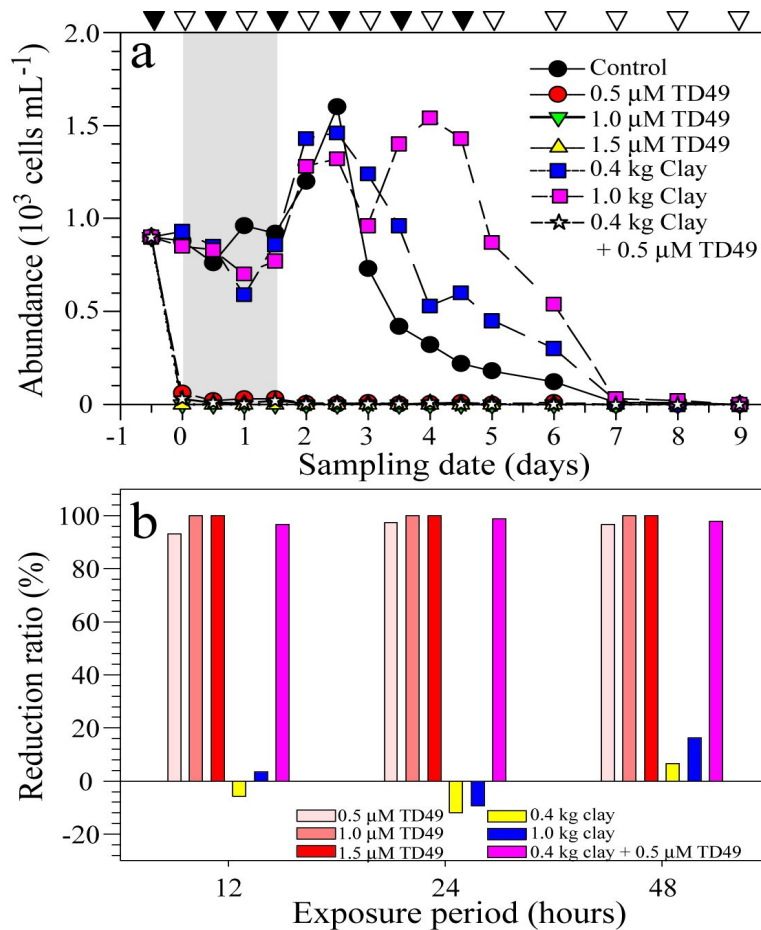


그림 3. 6. 14. Changes in abundance (a) and reduction ratio (b) of *Heterosigma akashiwo* in the control and treatments with TD49 and yellow clay. The filled and open triangles are the 06:00 h and the 18:00 sampling times, respectively.

3.6.3.3. *H. akashiwo* 메소코즘에서 식물플랑크톤의 활성 변화

메소코즘내 식물플랑크톤의 생물량을 알아보기 위해 측정된 *in vivo* fluorescence(FSU), Chl.*a*, 활성엽록소(active Chl.*a*) 유사한 경향을 보였음(그림 3. 6. 15). 실험 5일까지는 대조구가 TD49로 처리한 실험구에 비해 상당히 높은 농도를 보였으나, 5일 이후에는 모든 실험조건에서 유사한 경향을 보였음. TD49 처리군에서는 전반적으로 낮은 식물플랑크톤 생물량을 보였으나, 5일 이후 차츰 증가하는 경향을 보였으나, 시간의 경과와 더불어 점차적으로 감소하였음. 황토처리군에서 대조군과 비슷하게 2-3일까지 *in vivo* fluorescence(FSU), Chl.*a*, 활성엽록소(active Chl.*a*) 값이 일정하게 증가하였으나, 그 이후 점차적으로 감소하는 경향을 보였음. 모든 실험조건에서 19:00시에 채집한 시료가 07:00의 시료보다 상대적으로 높은 값을 보였고, 이러한 주기적인 결과는 앞서 언급한 pH와 DO 결과와도 일치하였음(그림 3. 6. 13). 상대적으로 높은 농도의 TD49 처리군(1.0 와 1.5 μM)에서도 약 5일 경과 후 활성엽록소의 값이 회복 및 증가하였는데 이는 대상생물의 증가가 아니고, 다른 식물플랑크톤 군집의 성장에 의한 것으로 판단됨.

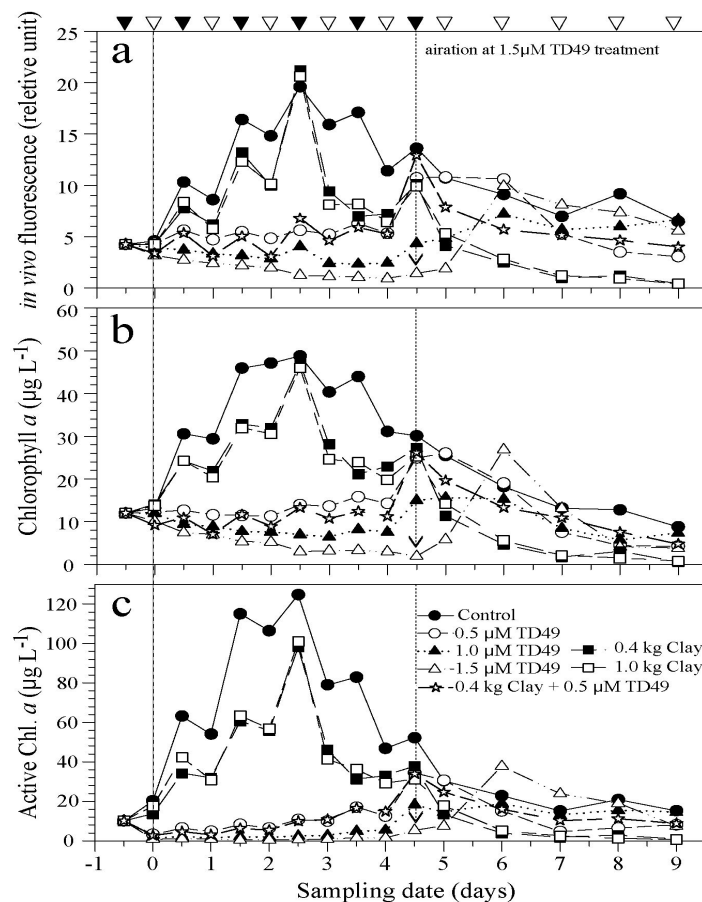


그림 3. 6. 15. Changes in *in vivo* fluorescence (a), active Chl.*a* and total Chl.*a* concentration in the control, blank and TD49 treatment mesocosm.

3.6.3.4. *H. akashiwo* 메소코즘에서 식물플랑크톤의 군집구성

대조군을 포함한 TD49 처리군, 황토처리군, 혼합군에서 식물플랑크톤의 군집조성은 규조류가 압도적으로 우점하였음. TD49 높은 처리군(1.0 와 1.5 μM)에서는 규조류가 90% 이상 우점하였으나 시간의 경과와 더불어 은편모조류가 10-20%로 점유율이 확대됨. 황토 처리군에서는 규조류가 90%이상 우점한 환경에서 황토 처리후 와편모조류의 우점율이 시간의 경과와 더불어(6일까지) 높아지는 것을 알 수 있었고, 특히 조사 6일에는 와편모조류의 점유율이 규조류보다 우위를 점하였음(그림 3. 6. 16). 이는 황토가 와편모조류의 성장에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다는 것을 시사 함.

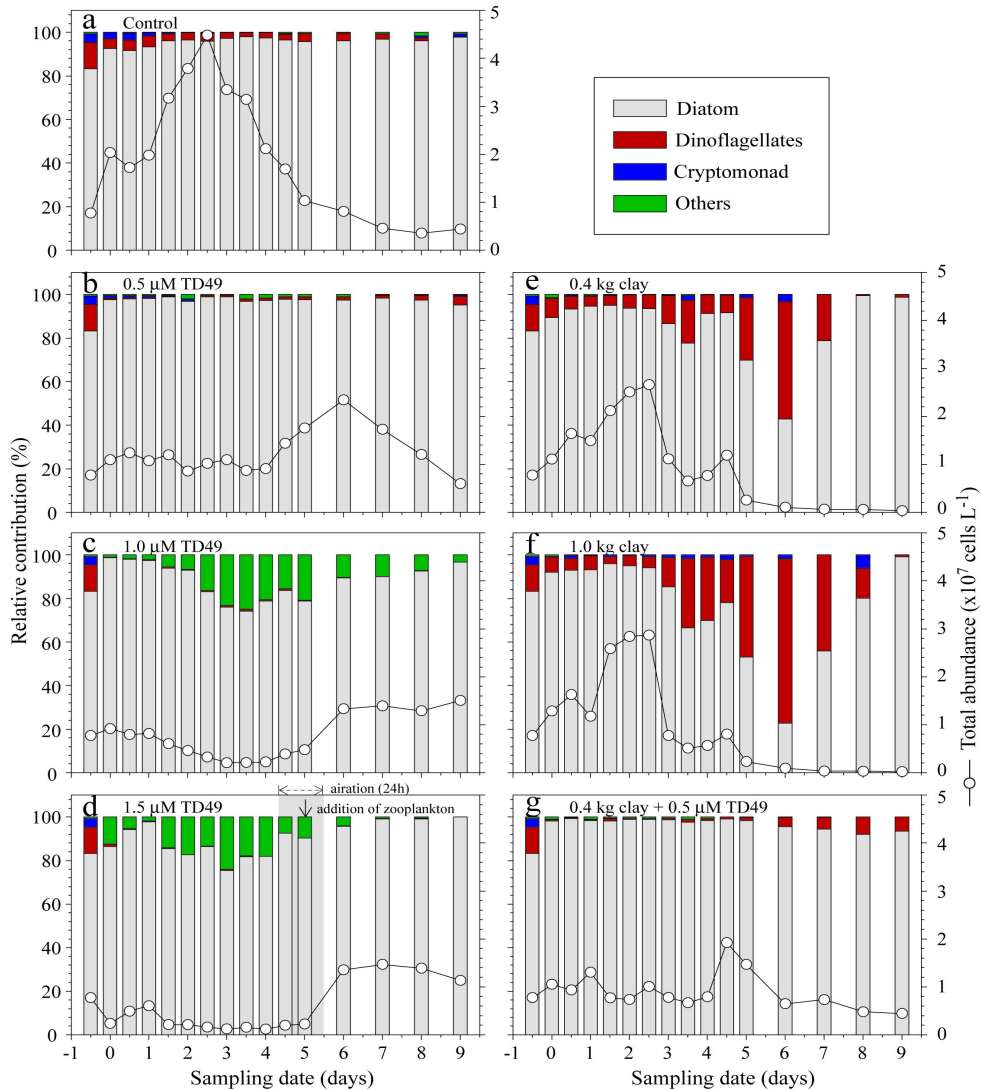


그림 3. 6. 16. Changes in phytoplankton populations as a result of the algicidal activity of TD49 and yellow clay on *H. akashiwo* in the control (a), treatments with the TD49 (b-d), the yellow clay (e-f), and the mixture with TD49 and yellow clay (g). Open circle is indicated the total abundance, and arrow with dotted line on (d) is indicated the aeration for 24 hours with additional zooplankton in 1.5 μM TD49 treatment at day 4 PM.

3.6.3.5. *H. akashiwo* 메소코즘에서 대상생물과 와편모조류의 군집조성

대조군과 황토처리군에서는 살조물질의 접종초기부터 5일까지 살조대상생물 *H. akashiwo* 가 극우점하는 경향을 관찰하였음. 반면, 낮은 농도 TD49(0.5 μM) 처리군에서는 살조대상생물은 시간의 경과와 더불어 기하급수적으로 감소한 반면 *Prorocentrum* spp.이 극우점하는 양상을 보였다. 높은 농도 TD49(1.0, 1.5 μM) 처리군에서는 *Prorocentrum* spp.와 더불어 *Ceratium* spp. 의 점유율이 확인되었음(그림 3. 6. 17). 하지만, 전체 개체수 밀도가 그다지 높지 않아 우점종의 명확한 경향은 관찰할 수 없었으나, *Prorocentrum* 속은 TD49물질에 적응 능력이 있다는 것을 확인하였음.

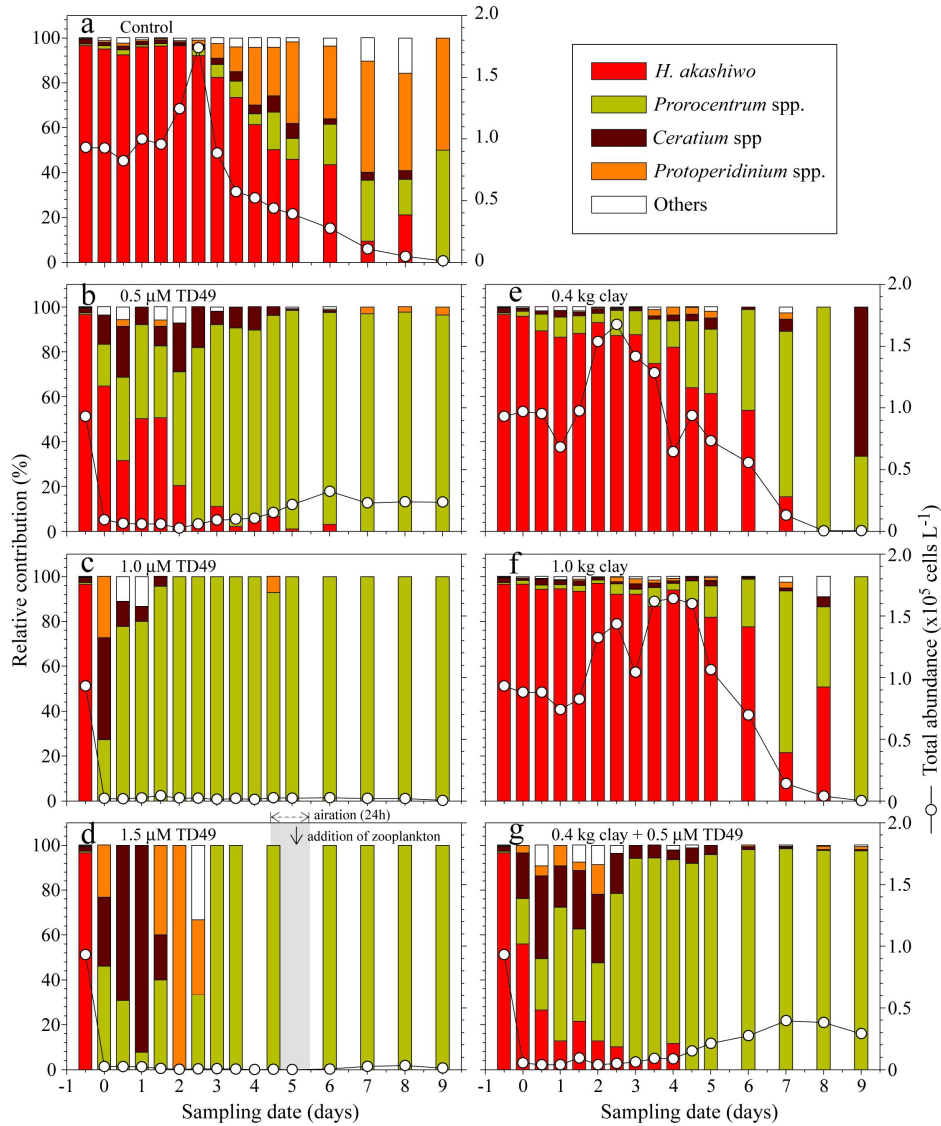


그림 3. 6. 17. Changes in dinoflagellate communities as a result of the algicidal activity of TD49 and yellow clay on *H. akashiwo* in the control (a), treatments with the TD49 (b-d), the yellow clay (e-f), and the mixture with TD49 and yellow clay (g). Open circle is indicated the total abundance, and arrow with dotted line on (d) is indicated the aeration for 24 hours with additional zooplankton in 1.5 μM TD49 treatment at day 4 PM.

3.6.3.6. *H. akashiwo* 메소코즘에서 규조류의 군집조성

모든 실험군에서 초기에 *Skeletonema* spp.가 80%이상 우점하였음. TD49 처리군에서는 *Skeletonema* spp.가 초기 높게 우점을 하였으나, 점차적으로 감소하여 4-5일경과 후에는 거의 관찰되지 않았음. 반면 *Thalassisira* spp. 와 *Chaetoceros* spp. 높은 우점율을 보였음. 황토처리군에서는 *Skeletonema* spp.가 지속적으로 관찰되었고, 0.4g L⁻¹의 실험구에서는 50%이상으로 우점하였음(그림 3. 6. 18). 황토와 TD49의 혼합처리군에서는 TD49의 0.5 μM의 규조류의 군집조성과 유사한 점으로 미루어 보아 황토에 의한 영향보다는 TD49에 의한 영향이 큰 것으로 사료되었음.

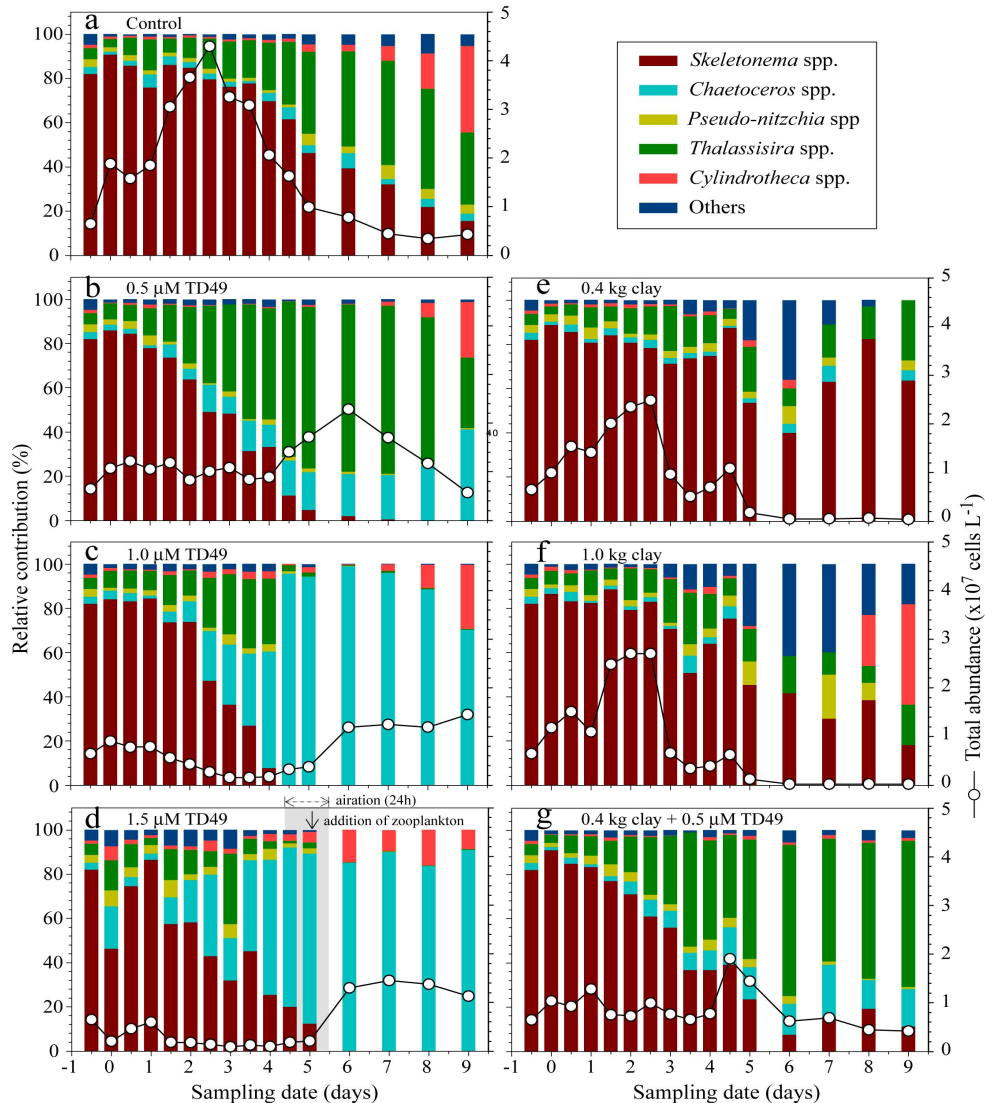


그림 3. 6. 18. Changes in diatom communities as a result of the algicidal activity of TD49 on and yellow clay *H. akashiwo* in the control (a), treatments with the TD49 (b-d), the yellow clay (e-f), and the mixture with TD49 and yellow clay (g). Open circle is indicated the total abundance, and arrow with dotted line on (d) is indicated the aeration for 24 hours with additional zooplankton in 1.5 μM TD49 treatment at day 4 PM.

3.6.3.7. *H. akashiwo* 메소코즘에서 동물플랑크톤의 변화양상

상위단계의 동물플랑크톤에 대한 TD49의 영향을 조사한 결과, 대조군에서는 초기 개체수를 유지하면서 증감을 반복하였음. TD49의 0.5 μM 에서는 대조군과 유사하여 동물플랑크톤에 크게 영향을 미치지 않은 것으로 판단되었으나, 1.0 μM 과 1.5 μM 동물플랑크톤의 총개체수가 전반적으로 감소하였음. 그 중 *Noctiluca scintillans*는 그다지 영향을 받지 않는 것으로 나타났음(그림 3. 6. 19). 황토와 TD49의 혼합처리군에서도 Copepoda가 60-70%로 우점하였음. 반면 황토 처리군에서는 동물플랑크톤의 총 개체수가 초기농도대비 2배로 증가하는 양상을 보였고, 주 우점종이 Copepoda로 나타나, 황토에 의한 상위영양생물의 영향은 없을 것으로 사료되었고, 오히려 동물플랑크톤의 성장의 촉진제 역할을 할 것으로 판단됨.

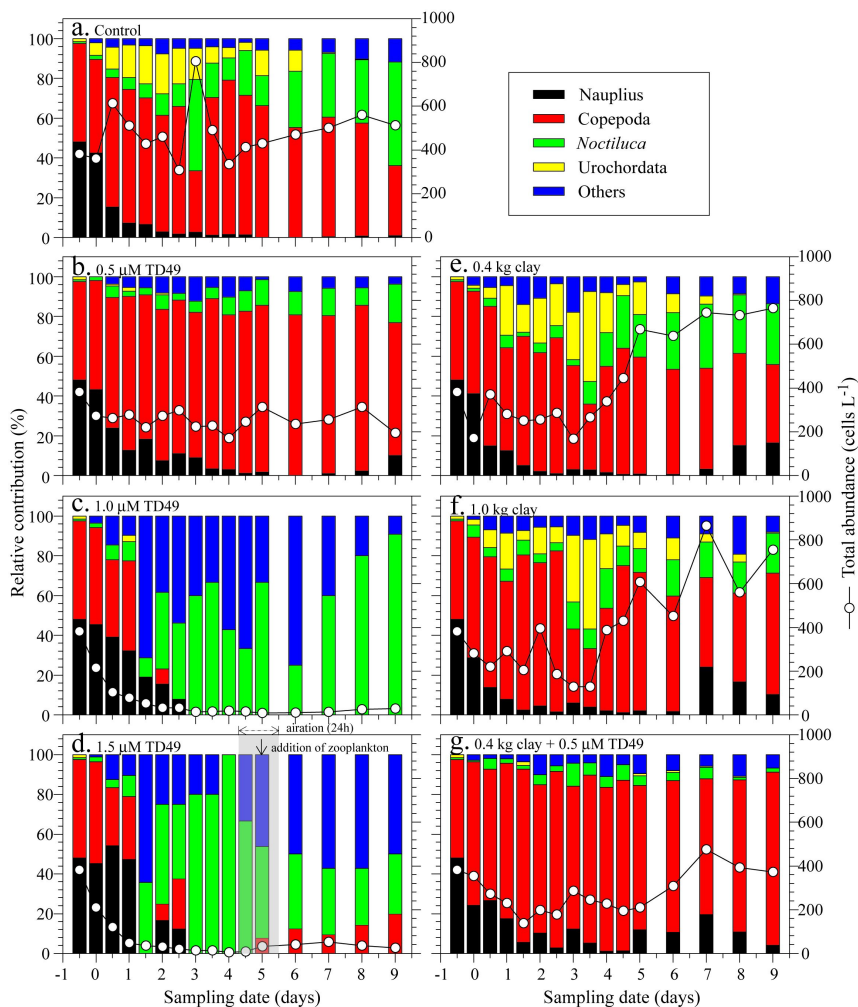


그림 3. 6. 19. Changes in zooplankton composition as a result of the algicidal activity of TD49 and yellow clay on *H. akashiwo* in the control (a), treatments with the TD49 (b-d), the yellow clay (e-f), and the mixture with TD49 and yellow clay (g). Open circle is indicated the total abundance, and arrow with dotted line on (d) is indicated the aeration for 24 hours with additional zooplankton in 1.5 μM TD49 treatment at day 4 PM.

3.6.3.8. 분해자 박테리아와 그 포식자 종속영양편모류의 변화

살조물질을 살포하여 대상적조생물이 사멸되면 분해되는 과정에서 박테리아가 높은 밀도로 출현할 것을 가정하여, 본 실험에서도 박테리아와 그의 포식자 종속영양편모류 (Heterotropic Nanoflagellate; HNF)의 변화양상을 조사하였음(그림 3. 6. 20). 대조군에서는 초기에 낮은 농도의 박테리아 개체수($<1.0 \times 10^6$ cell mL^{-1})가 점차적으로 증가하여 조사4-5일째 최고 밀도 9.7×10^6 cell mL^{-1} 로 나타난 후 점차적으로 감소하는 경향을 관찰하였음. 반면, TD49 처리군에서는 첨가후 1일째 적조대상생물이 사멸되면서 기하급수적으로 박테리아의 개체수가 증가한 후 감소하는 경향을 관찰하였고, 황토처리군에서는 대조군과 유사하게 천천히 증가하여 조사종료일까지 평형을 이루는 것을 파악하였다. 황토와 TD49 혼합처리군에서는 TD49처리군과 유사하게 초기에 기하급수적으로 증가한 후 계속적으로 높은 밀도를 유지하였음. HNF의 개체수는 TD49의 농도가 상대적으로 높은 1.0 μM , 1.5 μM 에서 박테리아의 개체수가 기하급수적으로 증가한 1일 후에 HNF의 개체수의 최고치를 기록하는 것을 알 수 있었는데, 이는 HNF가 박테리아를 포식하여 기하급수적으로 증가한 것을 반증할 수 있고, 상대적으로 높은 농도의 TD49 실험군에서 박테리아가 포식되어 조사 2일째에는 점차적으로 감소하는 경향을 관찰하였음. 황토실험군의 HNF의 개체수의 특이한 경향은 관찰할 수 없었고, 실험종료시까지 상대적으로 낮은 개체수를 유지하였음.

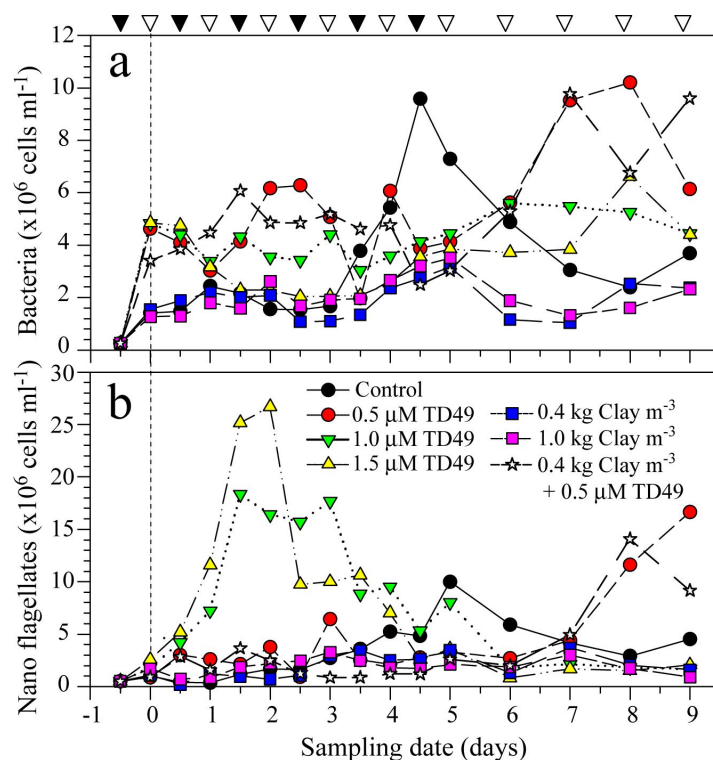


그림 3. 6. 20. Changes in abundance of bacteria (a) and nano-flagellates in the control and treatments with TD49 and yellow clay. The filled and open triangles are the 06:00 h and the 18:00 sampling times, respectively.

3.6.4. *Chattonella marina* 메소코즘에서 TD49와 황토의 살조효과

3.6.4.1. *Chattonella marina* 메소코즘에서의 환경요인변화

C. marina 메소코즘내 수온, 염분, pH, 용존산소(DO, dissolved oxygen)등과 같은 환경요인은 *H. akashiwo*의 메소코즘(3.4.3 결과)에서 나타난 변화양상과 유사하게 나타났음. 즉 수온은 현장의 7월 수온변화양상과 유사하게 25.5-28°C로 변화하였고, 염분은 31.6 ~ 32.0 psu의 범위로 나타났음. 염분은 배양시간의 경과와 더불어 점차적으로 증가하였으나, 모든 실험군별 염분농도의 차이는 크지 않았음. pH와 DO는 TD49실험군에서 대조군과 황토 실험군에 비하여 상대적으로 큰 폭으로 감소하는 경향을 관찰하였음. 모든 실험군의 초기 DO는 8.0 mg L⁻¹ 이었고, 대조군과 황토 처리군에서는 점차적으로 증가하였고, 조사1일째 대조군에서 최고치 11.5 mg L⁻¹을 기록하였음. TD49가 주입된 실험군에서 상대적으로 낮은 값을 보인 가운데, 0.8 μM TD49에서 최저값 5.0 mg L⁻¹이 관측되었음. 또한 TD49의 처리군에서는 각 TD농도에 따라서 높은 농도 순으로 DO의 농도가 낮게 관찰되는 것을 파악하였음. pH의 농도 변화에 관해서는 대조군의 pH는 초기 8.1에서 점차적으로 증가하여 조사1일째 최고치 8.3을 기록하였고, 그 후 점차적으로 8.3전후를 기록하면서 감소하였음(그림 3. 6. 21). 황토 첨가군의 pH는 0.4g L⁻¹의 첨가군이 0.8g L⁻¹황토첨가군보다 조금 높게 기록되었음. TD49첨가군의 pH는 DO농도 변화와 같이 TD49의 농도가 높을수록 낮게 관찰되었음. TD49와 황토의 혼합처리군에서는 조사3일째까지는 초기 농도인 8.1전후의 값을 유지하였으나 그 이후부터 점차적으로 증가한 후 천천히 감소하였음.

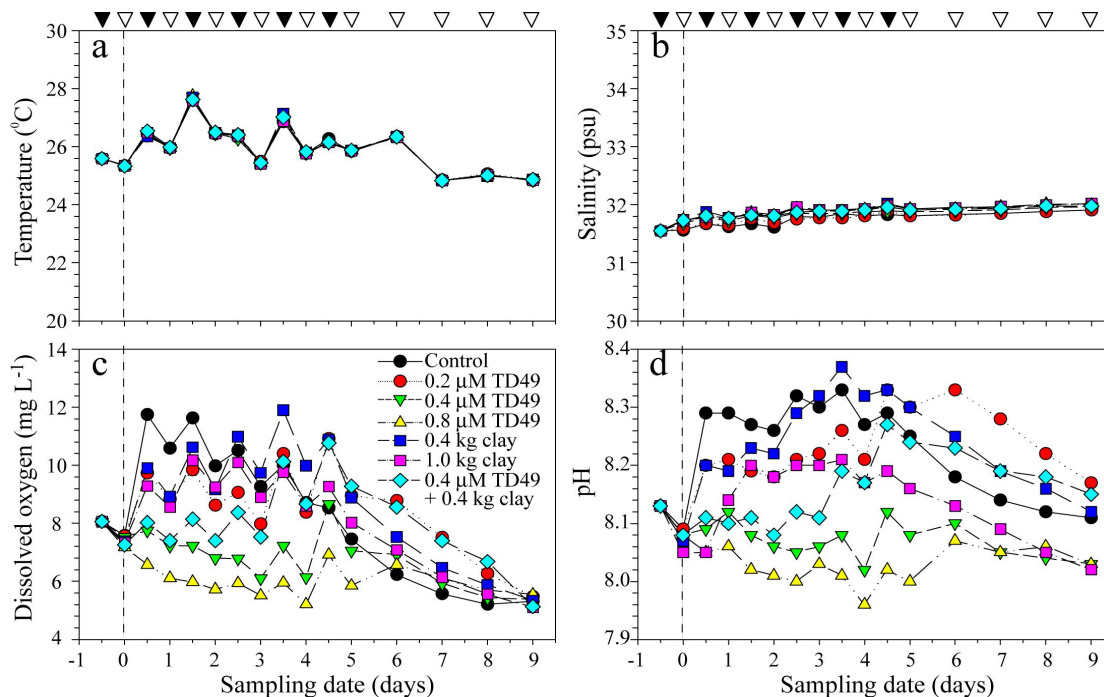


그림 3. 6. 21. Changes in temperature (a), salinity (b), dissolved oxygen (c), pH (d) in the control and treatments with TD49 and yellow clay in mesocosm enclosures. The dotted lines are indicated the first samples after treatment, and the filled and open triangles are the 06:00 h and the 18:00 h sampling times, respectively.

3.6.4.2. *Chattonella marina* 메소코즘에서 식물플랑크톤의 활성 변화

C. marina 메소코즘내 식물플랑크톤의 생물량을 알아보기 위해 측정된 *in vivo* fluorescence(FSU), Chl. *a*, 활성엽록소(active Chl. *a*) 유사한 경향을 보였음(그림 3. 6. 22). 실험 1일까지는 대조구가 TD49로 처리한 실험구에 비해 상당히 높은 농도를 보였으나, 그 이후 점차적으로 감소하는 양상을 보였음. TD49 처리군에서는 전반적으로 낮은 식물플랑크톤 생물량을 보였으나, 3-4일 이후 차츰 증가하는 경향을 보였으나, 시간의 경과와 더불어 점차적으로 감소하였음. 황토처리군에서 대조군과 비슷하게 2-3일까지 *in vivo* fluorescence(FSU), Chl. *a*, 활성엽록소(active Chl. *a*) 값이 일정하게 증가하였으나, 그 이후 점차적으로 감소하는 경향을 보였음.

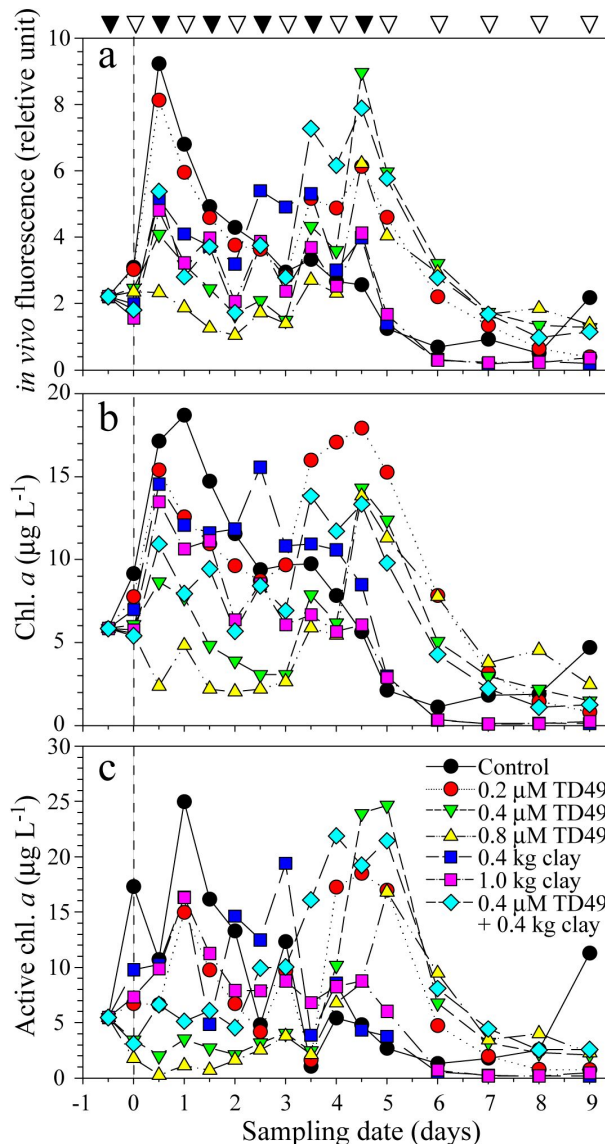


그림 3. 6. 22. Changes in *in vivo* fluorescence (a), chlorophyll *a* (b), and active Chl. *a* (c) in the control and treatments with TD49 and yellow clay in mesocosm enclosures. The dotted lines are indicated the first samples after treatment, and the filled and open triangles are the 06:00 h and the 18:00 sampling times, respectively.

3.6.4.3. 메소코즘에서 TD49 농도별 *Chattonella marina*의 살조효과

메소코즘에서 대조군, TD49 3개(0.2, 0.4, 0.8 μM)처리군, 황토(0.4g, 0.8g L^{-1})2개 처리군, TD49와 황토(TD49 0.4 μM + 황토 0.4g L^{-1})의 혼합처리군에서 *C. marina*의 살조효과를 파악하였다. 대조군에서는 *C. marina*살조효과를 나타내지 않았으나, TD49 처리군에서는 24시간 경과 후 0.2 μM 에서 60%, 0.4 μM 이상의 농도에서는 *C. marina*의 80% 제어하는 것으로 나타났다(그림 3. 6. 23). 특히 TD49 + 황토혼합처리군에서 같은 농도의 TD49 (0.4 μM)보다 살조효율이 떨어지는 것을 알 수 있었음. 한편, 황토처리군은 대조군과 유사한 *C. marina*의 성장패턴을 보였고, 24시간 후의 살조효율을 분석해 보면, 황토 0.4g L^{-1} 에서 40%전후로 기록되었고, 황토 0.8g L^{-1} 에서 50%전후의 살조효율을 보여, TD49와 살조효과를 비교해 보면 그다지 높지 않다는 것을 알 수 있었음.

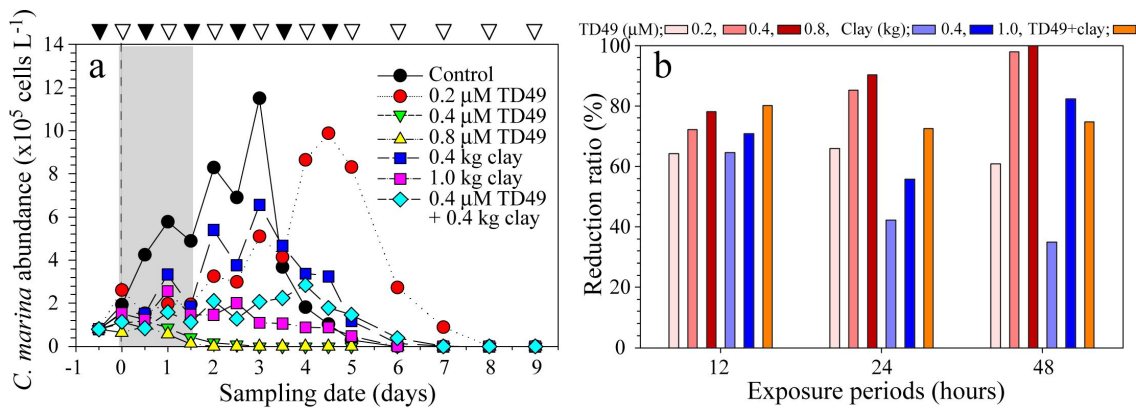


그림 3. 6. 23. Changes in abundance (a) and reduction ratio (b) of *Chattonella marina* in the control and treatments with TD49 and yellow clay. The filled and open triangles are the 06:00 h and the 18:00 h sampling times, respectively.

3.6.4.4. *Chattonella marina* 메소코즘에서 식물플랑크톤의 군집조성

대조군을 포함한 TD49 처리군, 황토처리군, 혼합군에서 식물플랑크톤의 군집조성은 초기에는 규조류가 압도적으로 우점하였으나, 시간의 경과와 더불어 다른 그룹으로 종의 천이 되는 양상을 기록하였음. 먼저 대조군의 식물플랑크톤 군집의 변화양상을 보면, 살조 대상생물 *C. marina*는 조사 5일 까지 일정한 밀도를 유지하면서 증감을 반복하였으나, 규조류는 초기보다 5일까지 지속적으로 감소하여, 그 이후는 은편모그룹(80%전후)과 와편모조류(10%전후)로 천이되었음. 낮은 농도의 TD49(0.2 μM)처리군에서는 살조대상생물인 *C. marina*이 초기에는 제어되는 것 같았으나, 4-7일사이에는 초기 농도의 3-4배로 증가하는 양상을 보였음(그림 3. 6. 24). 즉 낮은 TD49농도에서는 *C. marina*의 제어가 불가능 할 것으로 판단되었음. TD49(0.4와 0.8 μM)처리군은 *C. marina*의 제어가 가능하였고, TD49 (0.4 μM)의 처리군에서는 초기 규조류군집에서 은편모조류로 천이 되었고, TD49 (0.8 μM)에서는 규조류가 5일까지 점차적으로 감소하였으나, 그 이후 6일째부터 점차적으로 증가하여 은편모조류와 대등한 점유율을 보였음. 즉 TD49처리군에서는 은편모조류의 증식을 촉진시키는 역할을 하는 것을 판단되었음. 황토처리군에서는 황토처리 농도와

관계없이 유사한 식물플랑크톤의 군집구조로 나타났고, *C. marina*의 제어가 불가능할 것으로 판단되었고, 식물플랑크톤의 군집조성에 있어서도 초기에는 규조류가 우점하였으나, 점차적으로 다양한 분류군이 대등하게 출현하는 것을 알 수 있었음. 즉 황토는 와편모조류뿐만 아니라 은편모조류의 증식을 촉진시키는 역할을 하는 것으로 나타났으며, 안정된 식물플랑크톤 조성을 보였음. 황토와 TD49의 혼합처리군에서는 대조군과 유사한 식물플랑크톤의 군집조성이 확인되었음.

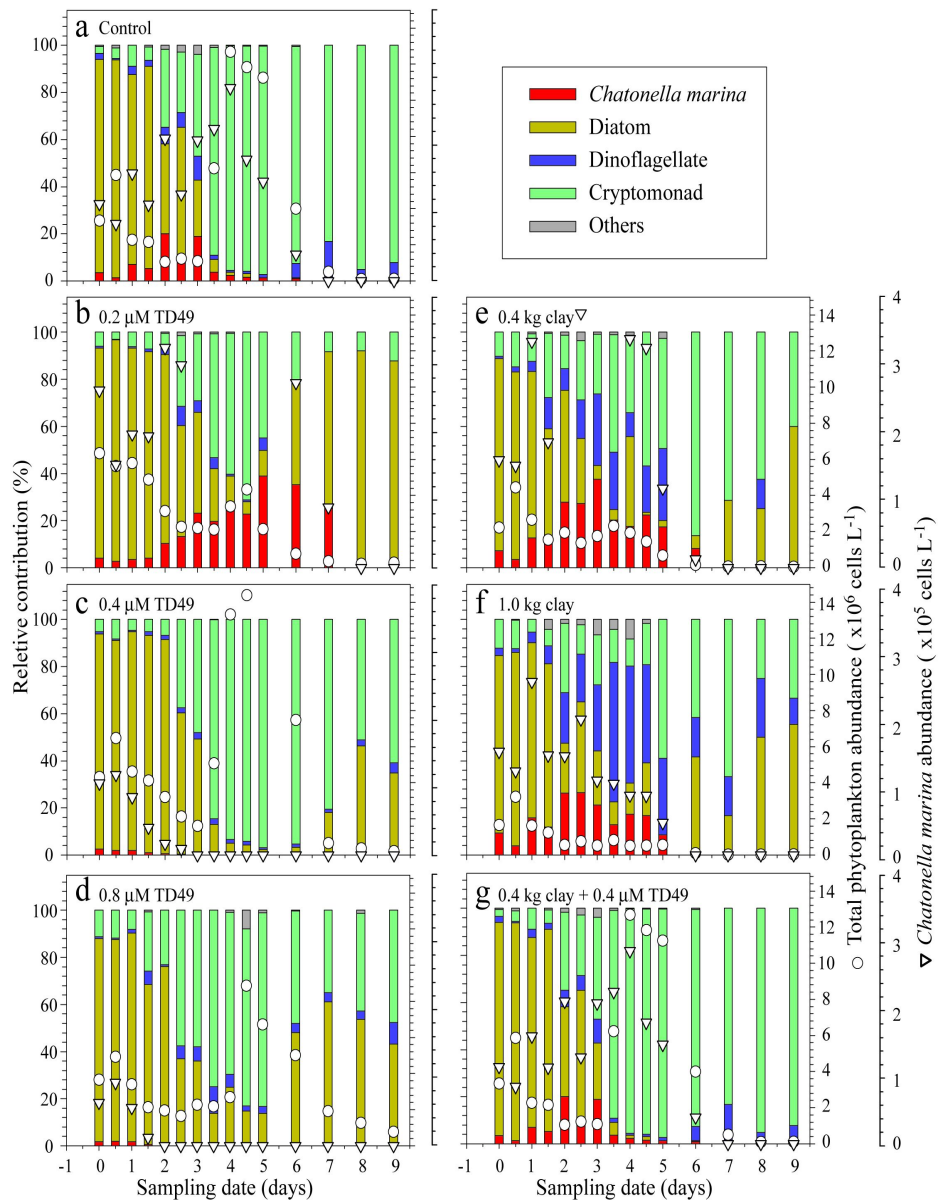


그림 3. 6. 24. Changes in phytoplankton composition as a result of the algicidal activity of TD49 and yellow clay on *C. marina* in the control (a), treatments with the TD49 (b-d), the yellow clay (e-f), and the mixture with TD49 and yellow clay (g). Open circle and open triangle are indicated the abundance of total phytoplankton and *C. marina*, respectively.

3.6.4.5 *Chattonella marina* 메소코즘에서 동물플랑크톤의 변화양상

살조물질 처리 후 상위단계 동물플랑크톤의 영향을 조사한 결과, 대조군에서는 초기 개체수를 유지하면서 5일까지 증가한 후 감소하였음. TD49처리군 0.2 μM , 0.4 μM 와 황토처리군(0.4g L^{-1} 과 0.8g L^{-1})는 대조군의 변화양상과 유사하였으며, 동물플랑크톤에 그다지 영향을 미치지 않았음. 하지만, TD49처리군 0.8 μM 에서는 처리후 동물플랑크톤의 전체 개체수가 급격히 감소하였으나, 5일후 점차적으로 회복하여 초기 동물플랑크톤의 개체수 밀도와 유사하였음(그림 3. 6. 25). 즉 TD49(0.8 μM)의 처리군에서는 일시적으로 동물플랑크톤 군집에 영향을 받을 것이지만 점차적으로 환경이 개선되어 동물플랑크톤의 생존에 문제가 없다는 것을 의미함.

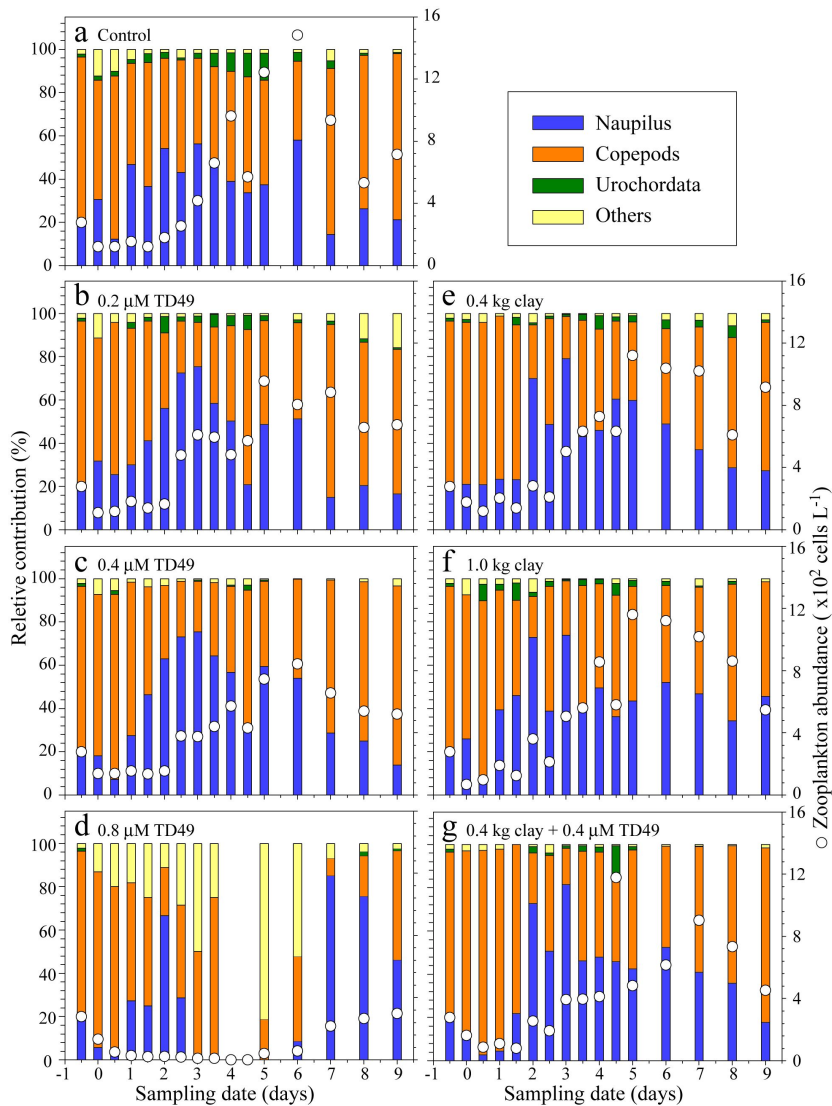


그림 3. 6. 25. Changes in zooplankton composition as a result of the algicidal activity of TD49 and yellow clay on *C. marina* in the control (a), treatments with the TD49 (b-d), the yellow clay (e-f), and the mixture with TD49 and yellow clay (g). Open circle is indicated the abundance of total zooplankton.

3.6.4.6. *Chattonella marina* 메소코즘에서 분해자 박테리아와 그 포식자 종속영양편모류의 변화

대조군에서는 초기에 낮은 농도의 박테리아 개체수($<2.0 \times 10^6$ cell mL⁻¹)가 점차적으로 증가하여 조사2-3일째 최고 밀도 8.5×10^6 cell mL⁻¹로 나타난 후 점차적으로 감소하는 경향을 관찰하였음(그림 3. 6. 26). 반면, TD49 (0.8 μ M)처리군에서는 첨가 후 1일째 적조대상생물이 사멸되면서 기하급수적으로 박테리아의 개체수가 증가한 후 감소하는 경향을 관찰하였고, 5일 후 재차 증가하여 실험종료시 14×10^6 cell mL⁻¹로 최고치를 기록하였음. TD49 (0.4 μ M)처리군에서는 점차적으로 박테리아의 개체수가 증가하여 7일째 최고치 14×10^6 cell mL⁻¹를 기록하였음. 황토와 TD49 혼합처리군에서는 3일까지 점차적으로 증가한 후 황토처리군에서는 점차적으로 감소하였으나, 황토와 TD49의 혼합처리군에서는 TD49(0.4 μ M)의 변동과 유사한 패턴으로 증가하였음. HNF의 개체수는 모든 실험군에서 박테리아가 높은 밀도로 증가한 후 1일 늦게 높은 밀도를 개체수 밀도를 보였음. 즉 먹이생물인 박테리아가 높은 밀도로 관찰된 후 그 먹이원을 이용하여 HNF의 개체수가 증가한 것을 의미함. 이와 같은 경향은 TD49의 처리군($>0.4 \mu$ M)과 더불어 TD49와 황토의 혼합처리군에서 두드러졌음.

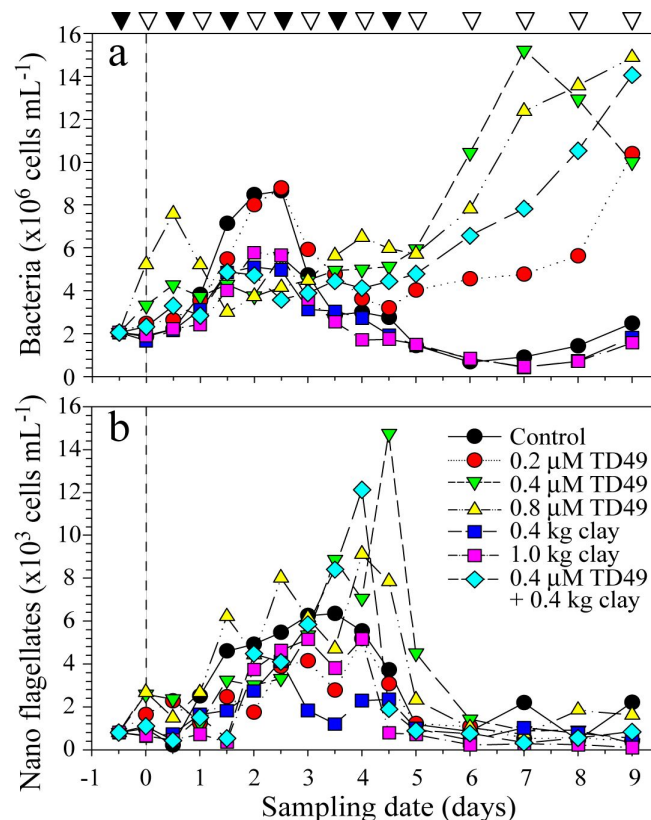


그림 3. 6. 26. Changes in abundance of bacteria (a) and nano-flagellates in the control and treatments with TD49 and yellow clay. The filled and open triangles are the 06:00 h and the 18:00 sampling times, respectively.

3.6.5. *Cochlodidnium polykrikoies* 마이크로코즘에서 TD49 및 황토에 대한 살조효과

3.6.5.1. *Cochlodidnium polykrikoies* 마이크로코즘에서의 환경요인변화

C. polykrikoies 메소코즘내 수온은 18.2-24.8°C로 변동하였고, 염분은 시간의 경과와 더불어 점차적으로 증가하였음. 각 실험구간 염분의 차이는 보이지 않았음. pH의 변화는 용존산소(DO, dissolved oxygen)의 변동양상과 유사하였고, 3-9일 사이 유사한 값(6전후)으로 평형을 이루었음. pH와 DO는 TD49실험군에서 대조군과 황토 실험군에 비하여 상대적으로 큰 폭으로 감소하는 경향을 관찰하였으나, 변화양상은 황토와 대조군과 유사하였다. 또한 TD49의 처리군에서는 각 TD농도에 따라서 높은 농도 순으로 DO의 농도가 낮게 관찰되는 것을 파악하였음(그림 3. 6. 27).

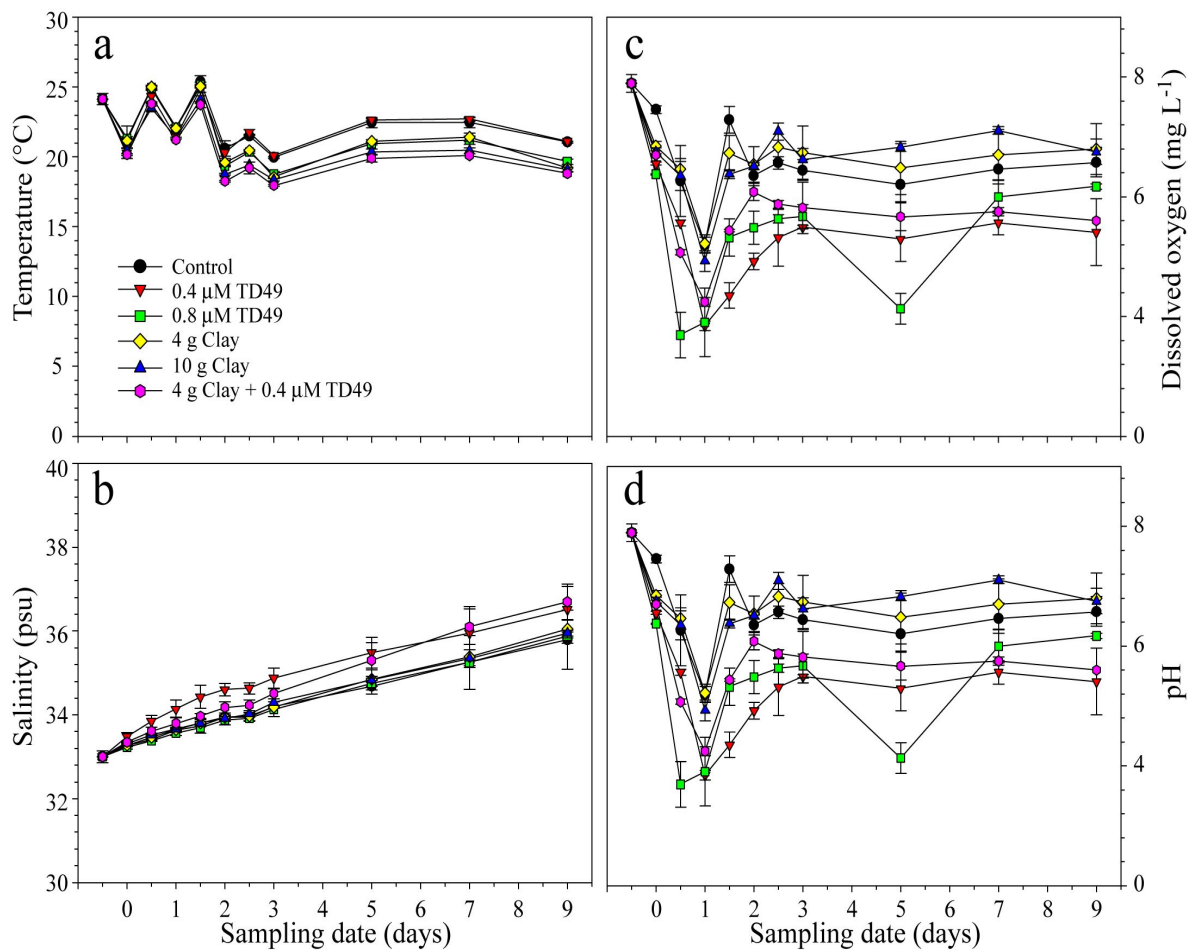


그림 3. 6. 27. Changes in temperature (a), salinity (b), dissolved oxygen (c), pH (d) in the control and treatments with TD49 and yellow clay in mesocosm enclosures.

3.6.5.2. 마이크로코즘에서 TD49 농도별 *C. polykrikoies*의 살조효과

*C. polykrikoies*의 마이크로코즘에서 대조군, TD49 2개(0.4, 0.8 μM)처리군, 황토(0.4g, 0.8g L^{-1})2개 처리군, TD49와 황토(TD49 0.4 μM + 황토 0.4g L^{-1})의 혼합처리군에서 적조대상생물의 살조효과를 파악하였음. 대조군에서는 *C. polykrikoies*살조효과를 나타내지 않았으나, TD49 처리군에서는 48시간 경과 후 0.4 μM 에서 20%의 살조효과로 극히 낮게 나타났고, 0.8 μM 의 농도에서는 *C. polykrikoies*의 80% 제어하는 것으로 나타났음. 특히 TD49 + 황토혼합처리군에서 같은 농도의 TD49 (0.4 μM)보다 살조효율이 높았음. 한편, 황토처리군은 황토 농도가 높은 처리군이 약간 높은 살조효과를 나타내었으며, 황토의 2개 처리군에서 48시간 경과 후 살조효과는 20%전후로 극히 낮게 나타나, 황토에 의한 살조효과는 그다지 기대하기 어렵다고 판단됨(그림 3. 6. 28).

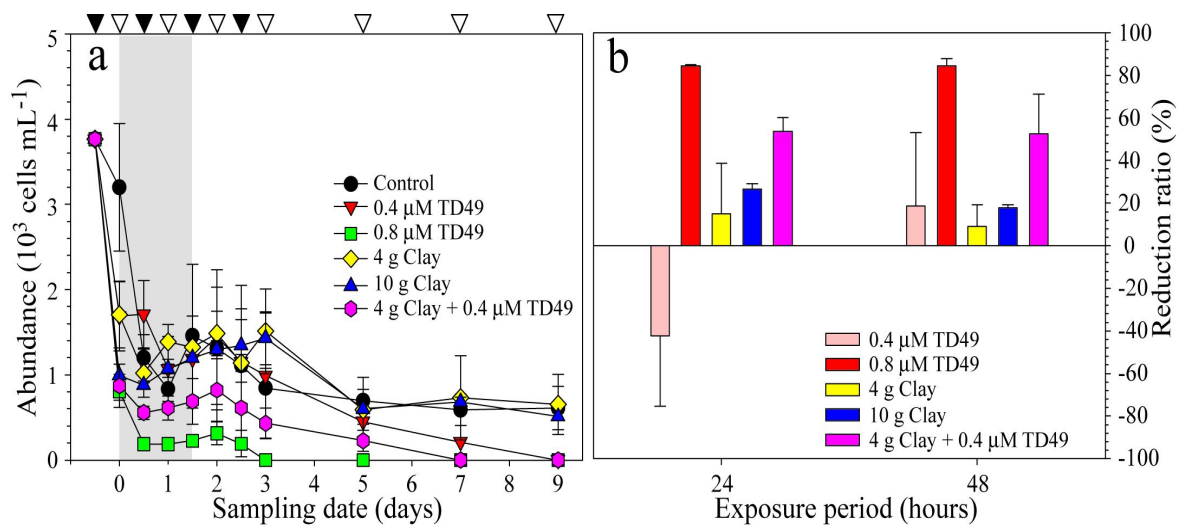


그림 3. 6. 28. Changes in abundance (a) and reduction ratio (b) of *C. polykrikoies* in the control and treatments with TD49 and yellow clay. The filled and open triangles are the 06:00 h and the 18:00 sampling times, respectively.

3.6.5.3. *C. polykrikoies* 마이크로코즘에서 식물플랑크톤의 군집조성

대조군을 포함한 TD49 처리군, 황토처리군, 혼합군에서 식물플랑크톤의 군집조성은 초기에는 적조생물 *C. polykrikoies*가 90%이상 압도적으로 우점하였음. 대조군에서는 전체 개체수가 점차적으로 감소하는 경향을 보였으나, 조사 3일 까지 *C. polykrikoies*가 높은 점유율(>90%)을 보였고, 그 이후 점차적으로 감소하였으나, 조사 종료일에도 전체의 50%이상을 유지하였음. TD49 처리군에서는 낮은 농도(0.4 μM)에서 대조군과 유사한 양상을 보였으나, 높은 농도(0.8 μM)에서는 *C. polykrikoies*의 전체 개체수는 급격히 감소하였고, 3일 이후 *C. polykrikoies*이 전멸하였음. 즉, TD49(0.8 μM)처리군에서는 *C. polykrikoies*을 제어 할 수 있다는 것을 의미함. 반면, 황토 처리군에서는 *C. polykrikoies*의 농도가 지속적으로 유지되었고, 조사 종료시까지 안정적으로 성장하여 대조군보다 더 활성을 보이는 특이적 양상을 확인하였음. 즉, 황토에 포함된 미량의 금속이 *C. polykrikoies*의 증식의 촉진제 역할을 한 것으로 판단됨. 황토와 TD49의 혼합처리군에서

는 단일 농도의 TD49농도보다 효과적으로 *C. polykrikoies*의 개체수가 감소하는 것을 알 수 있었고, 시간의 경과와 더불어 *C. polykrikoies*의 개체수가 급감하면서 규조류로 종이 천이되는 양상을 확인하였음(그림 3. 6. 29).

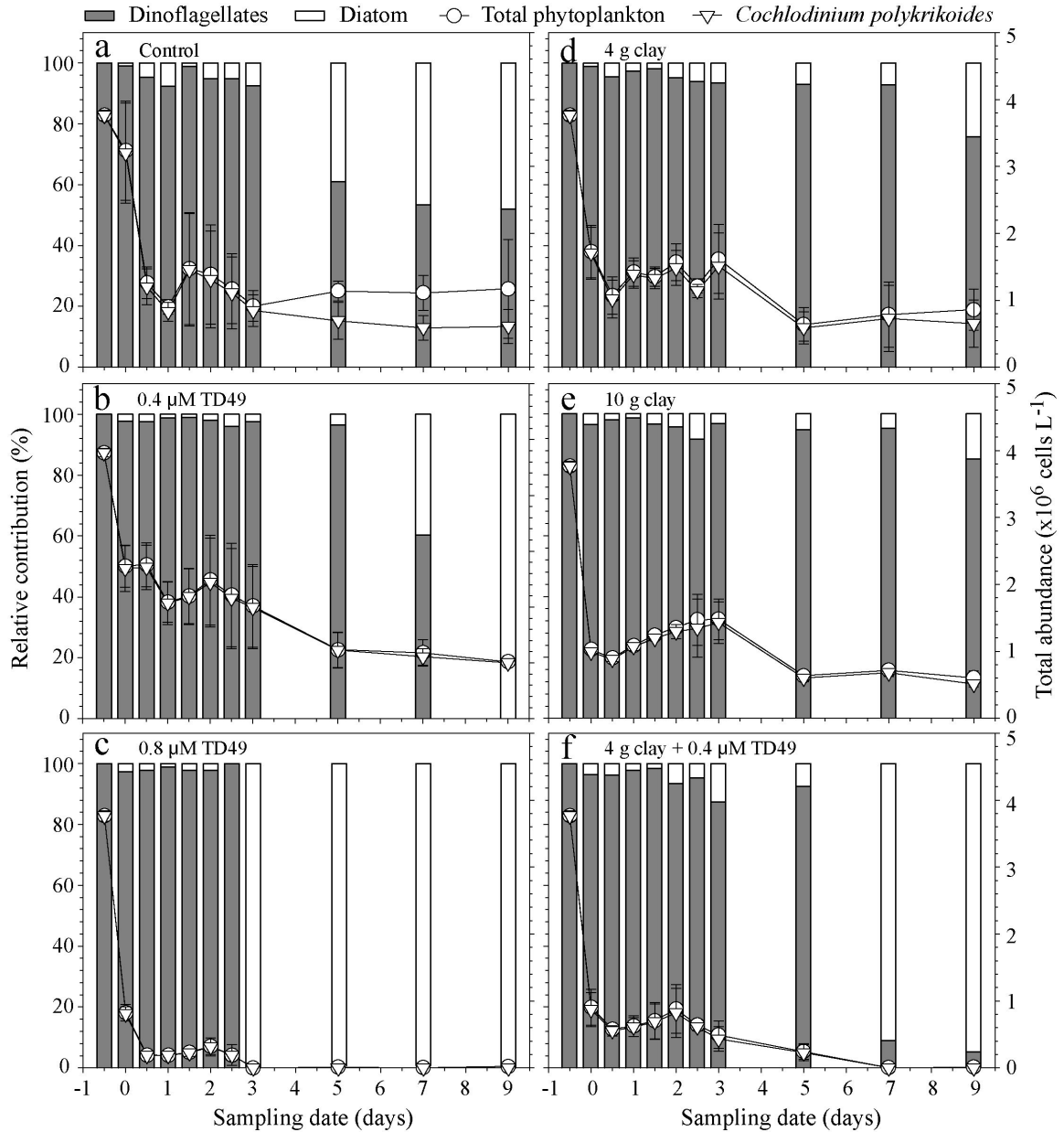


그림 3. 6. 29. Changes in phytoplankton composition as a result of the algicidal activity of TD49 and yellow clay on *C. polykrikoies* in the control (a), 0.4 μM TD49, (b) 0.8 μM TD49 (c), 4 g yellow clay (d), 10 g yellow clay (e) and 0.4 μM TD49 + 4 g yellow clay (f) microcosms. Open circle and open triangle indicates the abundance of total phytoplankton and *C. polykrikoies*, respectively.

3.6.5.4. *C. polykrikoies* 마이크로코즘에서 동물플랑크톤의 변화양상

대조군을 포함한 모든 실험군에서 동물플랑크톤이 시간의 경과와 더불어 개체수가 감소하였음. 대조군에서는 동물플랑크톤의 유생(Nauplius)의 개체수가 초기부터 조사 5일까지 지속되었고, 우점종은 요각류(Copepoda)로 나타났으며, 시간의 경과와 더불어 점차적으로 야광충의 개체수밀도가 높게 나타났음. 황토 처리군(0.4g L^{-1} 과 0.8g L^{-1})은 대조군의 변화양상과 유사하였으며, 동물플랑크톤에 그다지 영향을 미치지 않은 것으로 판단되었음. 아울러, TD49($0.4\ \mu\text{M}$)에서는 대조군과 유사한 변화양상을 보였음. 반면, TD49($0.8\ \mu\text{M}$)의 처리군에서는 전체 개체수밀도의 감소경향은 대조군과 유사하였으나, 5일 이후에는 동물플랑크톤의 출현이 나타나지 않았음. 혼합구에서는 대조군과 유사하였고, 시간의 경과와 더불어 야광충의 개체수밀도가 높아지는 것을 알 수 있었음(그림 3. 6. 30).

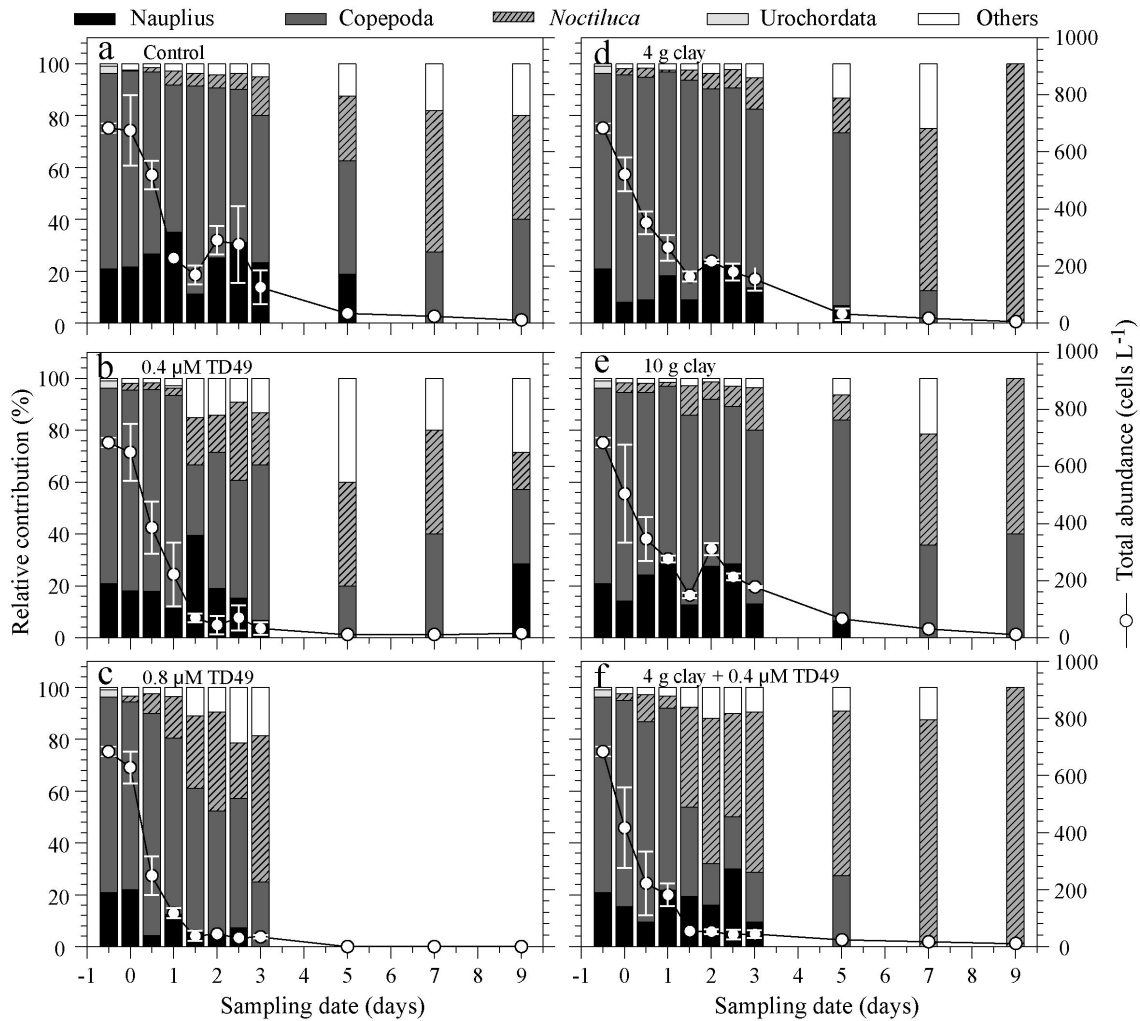


그림 3. 6. 30. Changes in zooplankton composition as a result of the algicidal activity of TD49 and yellow clay on *C. polykrikoies* in the control (a), $0.4\ \mu\text{M}$ TD49, (b) $0.8\ \mu\text{M}$ TD49 (c), 4 g yellow clay (d), 10 g yellow clay (e) and $0.4\ \mu\text{M}$ TD49 + 4 g yellow clay (f) microcosms. Open circle indicates the abundance of total zooplankton.

3.6.5.5. *C. polykrikoies* 마이크로코즘에서 박테리아와 종속영양편모류의 변화

박테리아는 모든 실험구에서 잘 성장하였고, 그들의 변화양상 또한 유사하였음. 초기 살조물질 접종 후 1-2일 경과 후 기하급수적으로 증식하여 최고치에 도달하였고, 그 후 점차적으로 감소하면서 평형을 이루는 패턴을 보였음. 한편 종속영양편모류는 대조군 뿐만 아니라 모든 실험군에서 3-5일 경과 후 기하급수적으로 증식하였음. 이는 박테리아의 포식으로 인한 Time lag을 두고 성장한 것으로 판단됨. 아울러 *C. polykrikoies* 마이크로코즘 실험에서 종속영양편모류뿐만 아니라 사이즈가 작은 섬모충(*Uronema* sp.)이 박테리아를 선택적으로 섭식하여 조사 2일부터 점차적으로 증가하였음(그림 3. 6. 31). 이와 더불어 *Uronema* sp를 포식하여 증식하는 *Euplotes* sp. 5일부터 조사종료일까지 지속적으로 증가하는 것을 확인하였음(그림 3. 6. 32). 모든 실험군에서 박테리아의 증가는 적조생물 *C. polykrikoies*이 일정량 사멸되는 과정 생성된 탄소원을 잘 이용하여 증식하였고, 특히 TD49처리군에서 이와 같은 양상이 다른 실험군보다 두드러졌음.



그림 3. 6. 31. Cell morphology of *Uronema* sp. (left) and *Euplotes* sp. (right) in the microcosm experiment. All scale bars are 50µm.

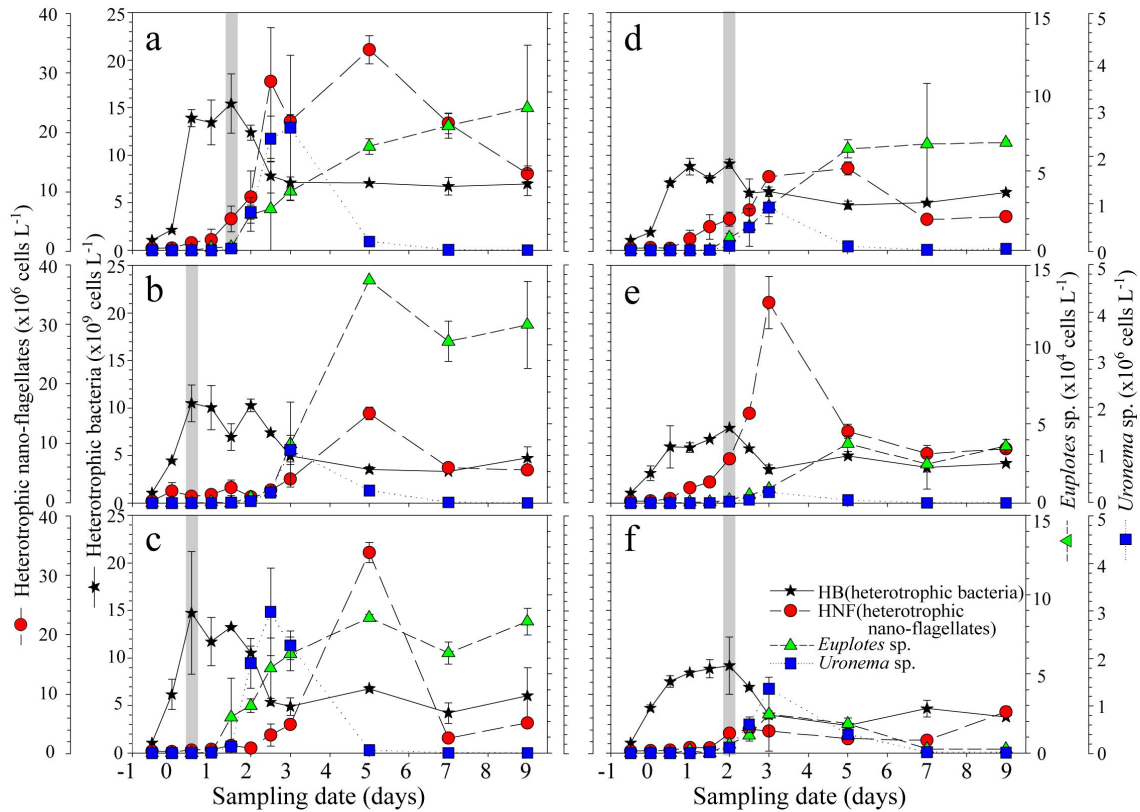


그림 3. 6. 32. Changes in abundance heterotrophic bacteria (filled star), heterotrophic nano-flagellates (filled circle) and ciliates (filled triangle; *Euplotes* sp., filled square; *Uronema* sp.) as a result of the algicidal activity of yellow clay and TD49 on *Cochlodinium polykrikoides* in the control(a), 0.4 μ M TD49, (b) 0.8 μ M TD49 (c), 4 g yellow clay (d), 10 g yellow clay (e) and 0.4 μ M TD49 + 4 g yellow clay (f) microcosms.

다시 말하면, *C. polykrikoides*이 분해되면서 생성된 부산물을 박테리아가 잘 이용하여 현저한 증식을 보였고, 그 박테리아를 먹이원으로 하는 종속영양편모류 뿐만 아니라 작은 사이즈의 섬모충이 일정의 Time lag(1-2일)을 두고 증식하였고, 그 후 일정(1-2일)의 시간 경과 후 큰 섬모충 *Euplotes* sp.가 증식하는 양상을 잘 확인 할 수 있었음(그림 3. 6. 33).

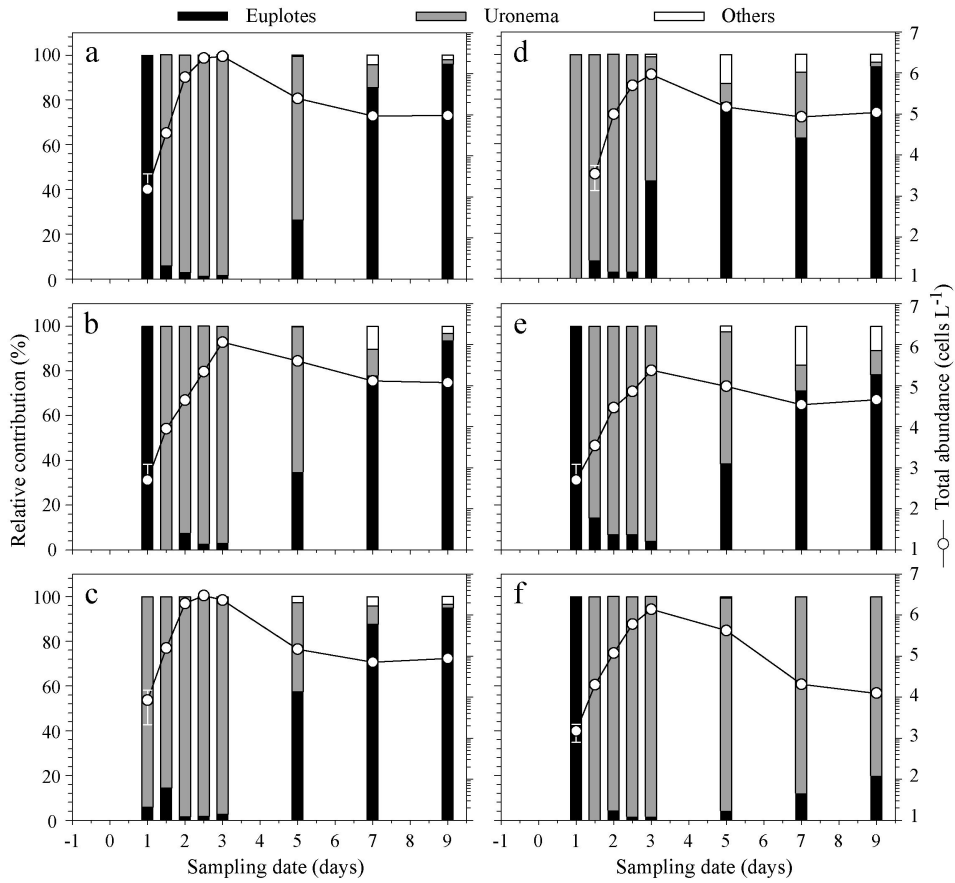


그림 3. 6. 33. Changes in zooplankton abundance as a result of the algicidal activity of yellow clay and TD49 on *Cochlodinium polykrikoides* in the control(a), 0.4 μM TD49, (b) 0.8 μM TD49 (c), 4 g yellow clay (d), 10 g yellow clay (e) and 0.4 μM TD49 + 4 g yellow clay (f) microcosms

3.6.6.1. TD49 농도에 따른 *Striped beakerch*(줄돔)의 생존율 및 환경요인변화

황토와 TD49물질의 농도에 따른 어류(줄돔;*striped beakerch*)의 생존율과 생물에 영향을 줄 수 있는 환경요인의 변동을 그림 3. 6. 34에 나타내었음. 모든 실험은 살조물질 투여 한 후 48시간 경과 후 어류의 생존율을 구하여 평가하였음. 실험기간동안 수온, 염분, pH, 용존산소등과 같은 환경요인의 큰 변화는 없었음. 줄돔의 생존율에는 황토에 의한 영향은 관찰되지 않았음. 반면, TD49의 4.0 μM 이상의 극히 높은 농도에서 노출할 경우 생존율(4.0 μM : 90%이상 생존 10 μM :68% 생존)에 어류의 생존에 직간접적으로 영향을 주는 것을 확인하였음. 하지만 TD49의 2.0 μM 이하의 농도에서는 어류에 전혀 영향을 받지 않는 것으로 나타났음. 만약 자연상태의 적조생물에 살포할 경우 1.0 μM 전후의 농도에서 살조효율이 우수하기 때문에 1.0 μM 전후의 TD49농도를 유지하면서 살조대상생물을 사멸시키면 어류에는 직접적으로 영향은 주지 않을 것으로 사료됨.

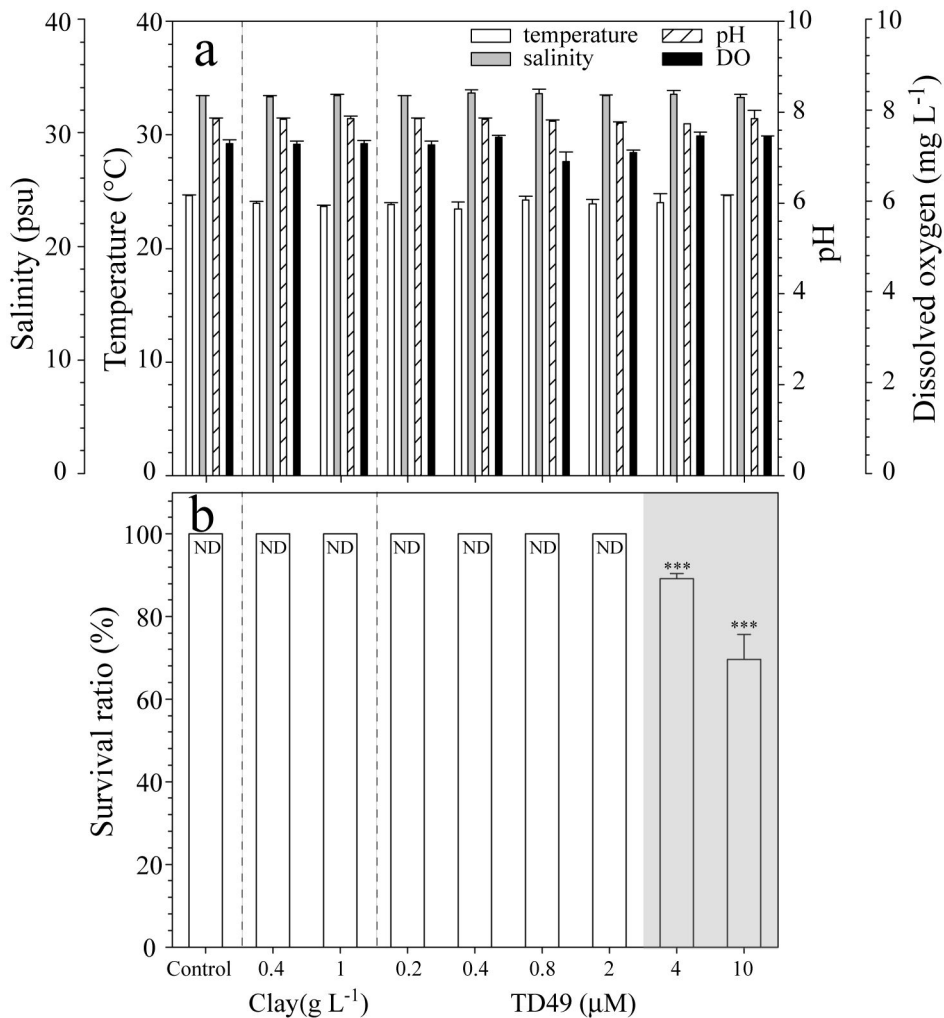


그림 3. 6. 34. Changes in (a) abiotic factors (temperature, salinity, pH and dissolved oxygen) and % survival ratios (b) for striped beakerch *Oplegnathus fasciatus* in each concentration of TD49 and yellow clay. The values are shown as means \pm SE.

최종적으로 모든 메소코즘, 마이크로코즘을 종료하고 난 후 아래의 그림과 같이 적조대

상 생물이 자연상태에서 교란시키는 것을 방지하기 위해서 폐수처리용차를 이용하여 모두 처리하였음(그림 3. 6. 35).



그림 3. 6. 35. Managing process after mesocosm experiments

2013년 결과를 요약하면,

1. *Heterosigma akashiwo*의 살조효과의 폐쇄생태계(메소코즘)에서 대조군, TD49 3개 (0.5, 1.0, 1.5 μM)처리군, 황토(0.4g, 0.8g L^{-1})2개 처리군, TD49와 황토(TD49 0.5 μM + 황토 0.4g L^{-1})의 혼합처리군을 만들어 평가한 결과, 대조군은 살조효과를 나타내지 않은 반면, TD49 처리군의 0.5 μM 농도 이상에서는 *H. akashiwo*의 성장을 저해하는 것으로 나타난 가운데, TD49 주입 후 1일 경과 후 모든 TD49 처리군과 TD49 + 황토혼합처리군에서 *H. akashiwo*의 개체수는 90%로 감소하였고, TD49 0.5 μM 에서는 2일 경과 후 95% 이상 감소한 경향을 나타내었음. 결과적으로 TD49처리군과 혼합처리군에서 명확하게 *H. akashiwo*의 살조효과를 보이는 것으로 나타났음. 한편, 황토처리군은 대조군과 유사하게 *H. akashiwo*의 살조효과는 전혀 보이지 않았고, 오히려 대조군보다 성장의 촉진제 역할을 하는 것으로 나타났음.

2. *Chattonella marina* 메소코즘에서 대조군, TD49 3개(0.2, 0.4, 0.8 μM)처리군, 황토 (0.4g, 0.8g L^{-1})2개 처리군, TD49와 황토(TD49 0.4 μM + 황토 0.4g L^{-1})의 혼합처리군에서 *C. marina*의 살조효과를 파악한 결과, 대조군에서는 *C. marina*살조효과를 나타내지 않았으나, TD49 처리군에서는 24시간 경과 후 0.2 μM 에서 60%, 0.4 μM 이상의 농도에서는 *C. marina*의 80% 제어하는 것으로 나타났음. 특히 TD49 + 황토혼합처리군에서 같은 농도의 TD49 (0.4 μM)보다 살조효율이 떨어지는 것을 알 수 있었음. 한편, 황토처리군은 대조군과 유사한 *C. marina*의 성장패턴을 보였고, 24시간 후의 살조효율을 분석해 보

면, 황토 0.4g L⁻¹에서 40%전후로 기록되었고, 황토 0.8g L⁻¹에서 50%전후의 살조효율을 보여, TD49와 살조효과를 비교해 보면 그다지 높지 않다는 것을 알 수 있었음.

3. *Cochlodidnium polykrikoies* 마이크로코즘에서 대조군, TD49 2개(0.4, 0.8 μM)처리군, 황토(0.4g, 0.8g L⁻¹)2개 처리군, TD49와 황토(TD49 0.4 μM + 황토 0.4g L⁻¹)의 혼합처리군에서 적조대상생물의 살조효과를 파악한 결과, 대조군에서는 *C. polykrikoies*살조효과가 나타나지 않았으나, TD49 처리군에서는 48시간 경과 후 0.4 μM에서 20%의 살조효과로 극히 낮게 나타났고, 0.8 μM의 농도에서는 *C. polykrikoies*의 80% 제어되는 것으로 나타났음. 특히 TD49 + 황토혼합처리군에서 같은 농도의 TD49 (0.4 μM)보다 살조효율이 높았음. 한편, 황토처리군은 황토 농도가 높은 처리군이 약간 높은 살조효과를 나타내었으며, 황토의 2개 처리군에서 48시간 경과 후 살조효과는 20%전후로 극히 낮게 나타나, 황토에 의한 살조효과는 그다지 기대하기 어렵다고 판단되었음.

4. 부유생물 생태계 위해성 평가-미소생물환 Microbial loop(박테리아, HNF, 섬모충)

2013년도 상기에서 언급한 3번의 폐쇄생태계의 실험에서 공통적인 점을 요약하면, TD49 물질의 처리구에서 **박테리아**는 초기 살조물질 접촉 후 1-2일 경과 후 기하급수적으로 증식해 최고치에 도달하였고, 그 후 점차적으로 감소하면서 평형을 이루는 패턴을 보였음. 한편 **중속영양편모류(HNF)**는 대조군 뿐만 아니라 모든 실험군에서 3-5일 경과 후 기하급수적으로 증식하였음. 이는 박테리아의 포식으로 인한 Time lag을 두고 성장하였음. 아울러 모든 살조능 실험에서 중속영양편모류뿐만 아니라 사이즈가 작은 **섬모충**이 박테리아를 선택적으로 섭식하여 조사 2일부터 점차적으로 증가하였음. 이와 더불어 *Uronema* sp를 포식하여 증식하는 *Euplotes* sp. 5일부터 조사종료일까지 지속적으로 증가하였음. **결과적으로** 살조물질이 미소생물환의 에너지 흐름에 긍정적으로 작용하고 있다는 것이 명확하게 나타났고, 이는 살조대상생물이 사멸되면서 기인한 탄소원을 이용하여 박테리아의 증식이 현저하게 나타났고, 다음영양단계인 HNF, 섬모충의 현저한 증식으로 이어졌음.

5. 살조물질(TD49)에 대한 식물플랑크톤에서 TD49물질은 살조대상생물인 유해유독조류에는 0.5μM이상의 농도에서 90%이상의 선택적 살조효과를 보였음. 반면, 유해하지 않은 규조류, 은편모조류에서는 살조효과가 극히 낮거나 오히려 증식 촉진제 작용을 하여 종천이를 유발하는 요인으로 작용하였음. 따라서 실제로 현장에서 적조가 일어난 지역에 살포할 경우 대상생물은 현저하게 제어할 수 있고, 유해하지 않은 규조류와 같은 부유생물에는 영향이 극히 적을 것으로 사료되었음.

6. 살조물질(TD49)에 대한 동물플랑크톤 살조물질 처리후 상위단계 동물플랑크톤의 영향을 조사한 결과, 대조군에서는 초기 개체수를 유지하면서 5일까지 증가한 후 감소하였음. TD49처리구 0.2 μM, 0.4 μM와 황토 처리군(0.4g L⁻¹ 과 0.8g L⁻¹)는 대조군의 변화양상과 유사하였으며, 동물플랑크톤에 그다지 영향을 미치지 않았음. 하지만, TD49처리구 0.8 μM에서는 처리후 동물플랑크톤의 전체 개체수가 급격히 감소하였으나, 5일후 점차적으로 회복하였음. 즉 TD49(0.8 μM)의 처리군에서는 일시적으로 동물플랑크톤 군집에 영향을 받을 것이지만 점차적으로 환경이 개선되어 동물플랑크톤의 생존에 문제가 없다는 것을 의미함. 결과적으로 TD49물질을 현장에 살포하면, 물질의 농도는 시간의 경과와 더

불어 현저하게 감소함과 아울러, 해류, 조석과 같은 물리적인 영향으로 희석되어 상위영양단계인 동물플랑크톤에 영향이 극히 적을 것으로 사료되었음.

7. 살조물질(TD49)에 대한 어류의 영향: TD49의 4.0 μM 이하의 농도에서는 어류에게 직접적인 영향은 없을 것으로 판단되었고, 그 이상의 농도에서는 노출할 경우, 어류의 생존(4.0 μM : 90%이상 생존 10 μM :68% 생존)에 직간접적으로 영향을 주는 것을 확인하였음. 하지만 TD49의 2.0 μM 이하의 농도에서는 어류에 전혀 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 만약 자연상태의 적조생물에 살포할 경우 1.0 μM 전후의 농도에서 살조효율이 우수하기 때문에 1.0 μM 전후의 TD49농도를 유지하면서 살조대상생물을 사멸시키면 어류에는 직접적으로 영향은 주지 않을 것으로 사료되었음.

3.6.7. TD49물질의 이용방안

1. 우리나라에서 치명적으로 어류에 영향을 미치는 적조생물은 *Cochlodidinium polykrikoies* 이고, 이들 생물의 적조발생 메커니즘은 나로도 인근의 외양에서 생물집적이 되어 적조를 발생하고, 시간의 경과와 더불어 연안내만으로 침투하는 경향이 강함. 남해연안 해역은 무수히 많은 섬으로 둘러 쌓여있어 섬과 섬사이의 이동길목에서 초기 진압하는 목적으로 TD49을 효과적으로 사용할 필요성이 대두됨(TD49물질 이용방안 1). 아울러 양식어장 주변에서 피해 방어막을 설치한 후 적조생물이 집적되면 일정의 TD49물질의 농도를 살포하여 사멸시키는 방안을 검토할 수 있음(TD49물질 이용방안 2)(그림 3. 6. 36).

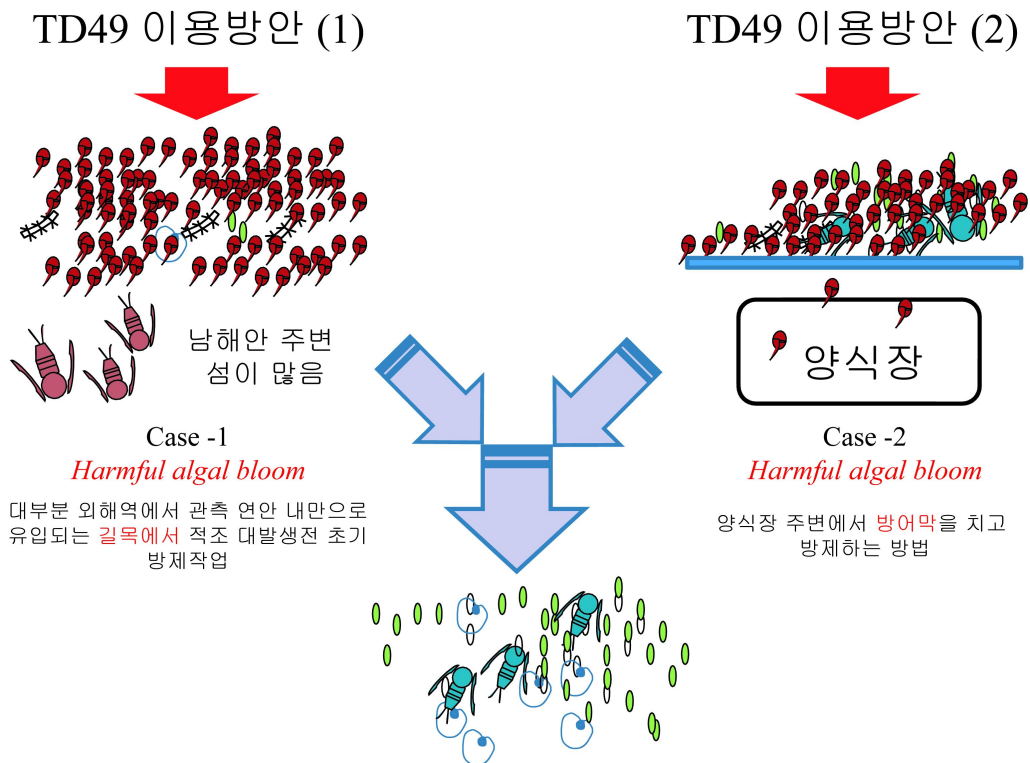


그림 3. 6. 36. Field application strategy of TD49 algicide

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

4.1.1. 2단계 1차년도 연구내용요약(2011년도)

연 구 내 용	연 구 결 과
TD49의 생물 농축계수(BCF)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 측정된 TD49의 농도 - 내장 > 아가미 > 근육 순으로 나타났고, 내장 부위에서 가장 높은 농도를 보였음. ◦넙치에서의 BCF - 내장:67.70, 아가미:63.32, 근육:20.25
TD49의 생물 축적계수(BAF)	<ul style="list-style-type: none"> ◦넙치에서의 BAF - 내장:175.89, 아가미:114.88, 근육:32.59
TD49의 옥탄올/물 분배계수 및 QSAR값과의 BCF값의 비교	<ul style="list-style-type: none"> ◦옥탄올/물 분배계수 값(log K_{ow} = 3.66) ◦ QSAR식과 비교하였을 때 K_{ow}로부터 계산되는 여러 가지 식 가운데 BCF 값이 상대적으로 낮게 도출되는 Neely et al 등이 제안한 모델에 근접.
유해조류의 성장단계 및 T49물질의 농도별 살조특성	<ul style="list-style-type: none"> ◦성장단계별로 유해유독 적조생물의 살조 특성의 차이를 보였음 ◦초기성장단계에서 TD49의 낮은 농도(0.02μM)에서 살조 효과가 나타남. ◦대수증식기와 안정기 에서는 상대적으로 높은 2μM에서 살조 효과
TD49물질을 이용한 폐쇄생태계에서 해양생태계 위해성 검토	<ul style="list-style-type: none"> ◦TD49 물질은 대상적조생물은 완벽하게 제어 가능함. ◦유해하지 않은 자연상태의 규조류 군집에는 영향을 미치지 않음 ◦상위영양단계의 동물플랑크톤은 잠재적으로 위협할 가능성 보였음 추후 대용량(1ton)의 메스코즘 실험에서 재검토가 요구됨
TD49물질을 이용한 현장적조생물 <i>Akashiwo sanguinea</i> 살조능 평가	<ul style="list-style-type: none"> ◦현장적조생물 <i>Akashiwo sanguinea</i>는 1μM농도에서 제어 가능함. ◦유해하지 않은 자연상태의 생물군집에는 영향이 그다지 크지 않음.

4.1.2. 2단계 2차년도 연구내용요약(2012년도)

연구 내용	연구 결과
TD49물질에 대한 연안우점 20종의 살조제어 특성	<ul style="list-style-type: none"> ◦ TD49물질은 유해편모조류(12종)에 대하여 우수한 살조능을 보임. ◦ 규조류는 종특이적인 살조효과를 보였음(즉 종에 따라서 증식촉진과 제어효과) ◦ 유해하지 않은 은편모조류는 오히려 증식 촉진제 역할을 함.
국내유입 가능 신규 유해적조생물 (<i>Heterocapsa circularisquama</i>)의 균주 확보 및 유지	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 바이러스를 분리하기 위하여 안정적 배양균주 확보. ◦ TD49물질에 대한 균주별 살조효과의 차이는 보이지 않음. ◦ TD49물질은 유독종 <i>Heterocapsa circularisquama</i>에 선택적 살조효과
메소코즘에서 <i>H. circularisquama</i> 에 대한 살조물질의 살조능 평가 및 부유생물생태계 위해성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 메소코즘에서 TD49를 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 μM 최종농도로 맞추어 주입하여 평가한 결과, 0.4 μM TD49 이상의 농도에서는 <i>H. circularisquama</i> 성장의 70%이상이 제어 가능함. ◦ 메소코즘내 환경요인의 변화는 TD49농도 구배에 따라서 pH와 DO가 점차적으로 감소함. ◦ 메소코즘내 영양염농도의 변화는 질산염, 아질산염, 인산염은 조사5일에는 고갈되는 양상을, 규산염은 TD49농도가 높은 실험군(1.0 μM)에서 조사5일부터 시간의 경과와 더불어 현저하게 고갈됨. 즉, 조사 후반기에 와편모조류에서 규조류로 종 바뀌고 있었다는 것을 영양염거동으로 파악됨. 하지만, 암모니아의 농도는 조사기간동안 증감의 반복하는 특이적 양상을 보였음. ◦ 살조물질 살포후 시간이 경과함에 따라 와편모조류와 은편모조류 등 운동성 편모를 가진 분류군이 점차 분포비율이 감소되고, 규조류의 분포비율이 높아짐. ◦ TD49 주입시 주요 우점종은 <i>Chaetoceros</i> spp. 였으나, 점차적으로 <i>Cylindrotheca</i> spp. 와 <i>Entomoneis</i> spp.와 같은 소형 부착성 규조류의 우점 비율이 높게 나타남. ◦ 동물플랑크톤은 0.6μM 의 농도에서는 영향을 받지 않았으나, 1.0 μM부터 점차적으로 영향을 받음. 주요 우점종으로는 아광충이 관찰됨.

4.1.3. 2단계 3차년도 연구내용 요약

연구 내용	연구 결과
<p>메소코즘에서 적조생물 <i>Heterosigma akashiwo</i> 살조효과 및 생태계 위해성 평가</p>	<p>-살조효과의 폐쇄생태계(메소코즘)에서 대조군, TD49 3개(0.5, 1.0, 1.5 μM)처리군, 황토(0.4g, 0.8g L^{-1})2개 처리군, TD49와 황토(TD49 0.5 μM + 황토 0.4g L^{-1})의 혼합처리군으로 평가하였음</p> <p>- TD49 처리군의 0.5 μM 농도 이상에서는 <i>H. akashiwo</i>의 제어 가능함.</p> <p>- TD49 처리군과 TD49 + 황토혼합처리군에서 <i>H. akashiwo</i>의 개체수는 90%로 감소하였고, TD49 0.5 μM 에서 95% 이상 제어. 즉 황토에 의한 영향이 아닌, TD49농도에 의한 영향으로 판단됨.</p> <p>-황토(0.4g, 0.8g L^{-1})처리군에서는 살조효과가 명확하지 않음.</p>
<p>메소코즘에서 적조생물 <i>Chattonella marina</i>살조효과 및 생태계 위해성 평가</p>	<p>- 대조군, TD49 3개(0.2, 0.4, 0.8 μM)처리군, 황토(0.4g, 0.8g L^{-1})2개 처리군, TD49와 황토(TD49 0.4 μM + 황토 0.4g L^{-1})의 혼합처리군에서 <i>C. marina</i>의 살조효과를 파악함.</p> <p>- TD49 처리군에서 0.2 μM은 60%, 0.4 μM이상의 농도에서는 80% 0.8 μM이상의 농도에서 95%제어됨.</p> <p>-TD49 + 황토혼합처리군에서 같은 농도의 TD49 (0.4 μM)보다 살조효율이 떨어짐.</p> <p>- 황토처리군은 대조군과 유사한 <i>C. marina</i>의 성장패턴을 보였고, 황토 0.4g L^{-1}에서 40%전후로 기록되었고, 황토 0.8g L^{-1}에서 50%전후의 살조효율을 보여, TD49와 살조효과를 비교해 보면 그다지 높지 않음.</p>
<p>마이크로코즘에서 적조생물 <i>Cochlodinium polykrioides</i>에 대한 살조물질의 살조능 평가</p>	<p>-대조군, TD49 2개(0.4, 0.8 μM)처리군, 황토(0.4g, 0.8g L^{-1})2개 처리군, TD49와 황토(TD49 0.4 μM + 황토 0.4g L^{-1})의 혼합처리군에서 적조대상생물의 살조효과를 파악함.</p> <p>- TD49 처리군에서는 48시간 경과 후 0.4 μM에서 20%의 살조효과로 극히 낮게 나타났고, 0.8 μM의 농도에서는 <i>C. polykrioides</i>의 80% 제어됨.</p> <p>- TD49 + 황토혼합처리군에서 같은 농도의 TD49 (0.4 μM)보다 살조효과 조금 높음.</p> <p>-황토처리군의 살조효과는 20%전후로 극히 낮게 나타나, 황토에 의한 살조효과는 그다지 기대하기 어렵다고 판단됨.</p>
<p>부유생물 생태계 위해성 평가</p>	<p>- TD49물질은 살조대상생물인 유해유독조류에는 0.5μM이상의 농도에서 90%이상의 선택적 살조효과를 보인 반면, 유해하지 않은 규조류, 은편모조류에서는 살조효과가 극히 낮거나 오히려 증식 촉진제 작용을 하여 종천이를 유발하는 요인으로 작용함.</p> <p>- TD49 1.0 μM이상의 처리군에서는 일시적으로 동물플랑크톤 군집에 영향을 받음. 하지만 TD49물질을 현장에 살포하면, 물질의 농도는 시간의 경과와 더불어 현저하게 감소함과 아울러, 해류, 조석과 같은 물리적인 영향으로 희석되어 상위영양단계인 동물플랑크톤에 영향이 극히 적을 것으로 사료됨.</p>

연구 내용	연구 결과
어류의 영향평가	<p>-TD49의 4.0 μM이하의 농도에서는 어류에게 직접적인 영향은 없음.</p> <p>- 4.0 μM에서 90%이상 생존하였고, 10 μM에서는 68% 생존율을 보였음.</p> <p>- 만약 자연상태의 적조생물에 살포할 경우 1.0 μM 전후의 농도에서 살조효율이 매우 우수하였기 때문에 1.0 μM 전후의 TD49농도를 유지하면서 살조대상생물을 사멸시키면 어류에는 직접적으로 영향은 주지 않을 것으로 사료됨.</p>
현장적용 방안모색	<p>- 우리나라에서 치명적으로 어류에 영향을 미치는 적조생물은 <i>Cochlodinium polykrikoies</i> 이고, 이들 생물의 적조발생기작은 나로도 인근의 외양에서 생물집적이 되어 적조가 발생된 후 연안으로 확산됨.</p> <p>하고, 시간의 경과와 더불어 연안내만으로 침투하는 경향이 강하다.</p> <p>-TD49물질 이용방안 1: 남해연안 해역은 무수히 많은 섬으로 둘러싸여있어 섬과 섬사이의 이동길목에서 초기 진압하는 목적으로 TD49의 사용이 적절할 것임.</p> <p>-TD49물질 이용방안 2: 양식어장 주변에서 피해 방어막을 설치한 후 적조생물이 집적되면 일정의 TD49물질을 살포하여 사멸시키는 방안을 검토할 수 있음.</p>

4.2. 목표 및 달성도 및 자체 평가

목 표	달 성 도(%)	내 용
TD49의 생물 농축계수(BCF)	100	- TD49의 넙치에 대한 BCF값 도출.
TD49의 생물 축적계수(BAF)	100	- TD49의 먹이(새우)를 통한 넙치에 대한 BAF값 도출.
TD49의 옥탄올/물 분배계수 및 QSAR값과의 비교	100	- Low stirring 법을 통한 Kow 도출.
유해조류의 성장단계 및 T49물질의 농도별 살조특성	100	- 성장단계별 TD49물질의 최적 살조조건 도출
TD49물질을 이용한 폐쇄생태계에서 해양생태계 위해성 검토	100	- 폐쇄생태계에서 해양생태계에 미치는 영향 도출
TD49물질을 이용한 현장적조생물 <i>Akashiwo sanguinea</i> 살조능 평가	100	- 현장유해적조생물 제어 가능성 제시
TD49물질에 대한 연안 우점 20종의 살조제어 특성	100	- 다양한 미세조류에 대한 TD49물질의 선택적 살조특성 파악
국내유입 가능 신규 유해적조생물 (<i>Heterocapsa circularisquama</i>)의 균주 확보 및 유지	100	-바이러스를 분리하기 위하여 배양균주 확보
메소코즘에서 <i>H. circularisquama</i> 에 대한 살조물질의 살조능 평가	100	-TD49에 대한 <i>H. circularisquama</i> 효과 및 살조 최적 농도 도출
<i>H. circularisquama</i> 메소코즘실험에서 부유생물생태계 위해성 평가	100	- <i>H. circularisquama</i> 살조 후 폐쇄생태계에서 살조물질이 부유생물에게 미치는 영향 평가
메소코즘에서 <i>Heterosigma akashiwo</i> 에 대한 살조물질의 살조능 평가	100	-폐쇄생태계에서 <i>Heterosigma akashiwo</i> 의 TD49의 살조효과 및 물질 최적 농도 도출 - <i>Heterosigma akashiwo</i> 에 대한 황토의 제어효과 검토
<i>Heterosigma akashiwo</i> 살조 후 살조물질이 부유생물 생태계 위해성 평가	100	- <i>Heterosigma akashiwo</i> 살조 후 폐쇄생태계에서 살조물질이 부유생물에게 미치는 영향 평가
메소코즘에서 <i>Chattonella marina</i> 에 대한 살조효과	100	-폐쇄생태계에서 <i>Chattonella marina</i> 의 TD49의 살조효과 및 물질 최적 농도 도출 - <i>Chattonella marina</i> 에 대한 황토의 제어효과 검토
<i>Chattonella marina</i> 살조 후 살조물질이 부유생물 생태계 위해성 평가	100	- <i>Chattonella marina</i> 살조 후 폐쇄생태계에서 살조물질이 부유생물에게 미치는 영향 평가
마이크로코즘에서 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 에 대한 살조물질 및 황토의 제어 효율 평가	100	-마이크로코즘에서 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 의 TD49의 살조효과 및 물질 최적 농도 도출 - <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 에 대한 황토의 제어효과 검토
부유생물 생태계 위해성 평가	100	-살조물질 및 황토가 식물플랑크톤 군집에 미치는 영향 평가 -살조물질 및 황토가 동물플랑크톤 군집에 미치는 영향 평가
어류의 영향평가	100	살조물질 및 황토가 어류에 미치는 영향 평가
살조물질의 현장적용 방안	100	살조물질의 현장적용 방안 검토

평가의 착안점	자 체 평 가
TD49의 생물 농축계수(BCF)	신규살조제의 해양 생태계에 있어서의 급성독성평가에서 구한 PNEC의 10배 해당하는 TD49를 이용하여 BCF를 평가하여 넘치에 대한 생물 농축도를 평가함.
TD49의 생물 축적계수(BAF)	생물체를 직접 이용하여 평가한 BAF의 데이터가 많지 않은 가운데 넘치의 먹이 생물인 새우를 이용하여 먹이를 통한 TD49의 넘치에 대한 생물 축적을 평가함.
TD49의 옥탄올/물 분배계수 및 QSAR값과의 비교	신규 살조제에 대한 Kow를 평가함으로써 QSAR값과의 비교 평가가 가능하였으며, TD49는 다른 다양한 화학물질이나 중금속의 BCF값보다 낮게 측정되었음.
유해조류의 성장단계 및 T49물질의 농도별 살조특성	신규개발된 살조물질 TD49에 대하여 유해조류의 성장단계별 제어 특성이 각각 다르게 나타남으로 실제 현장적용시와 적용전의 대규모 메스코즘실험에서 최적의 농도를 평가할 수 있는 척도로 사용 가능함.
TD49물질을 이용한 마이크로코즘에서 해양생태계 위해성 검토	대상유해조류는 완벽하게 제어 가능하였으나, 상위영양단계의 동물플랑크톤의 성장에 영향을 미칠 것으로 사료되어, 추후 대용량 메스코즘실험에서 재검토가 요구됨.
TD49물질을 이용한 현장적조생물 <i>Akashiwo sanguinea</i> 살조능 평가	현장에서 발생한 유해적조생물 <i>Akashiwo sanguinea</i> 를 완벽하게 제어 가능하였고, 유해하지 않은 자연 상태의 생물군집에는 영향이 그다지 크지 않았음
TD49물질에 대한 연안 우점 20종의 살조제어 특성	TD49물질은 유해편모조류(12종)에 대하여 우수한 살조능을 보였으나, 유해하지 않은 규조류와 은편모조류의 일부 종은 증식의 촉진제 역할을 함. 따라서 TD49물질은 선택적으로 유해대생생물만 제어 가능한 우수한 살조물질로 판단됨.
메스코즘에서 <i>H. circularisquama</i> 에 대한 살조물질의 살조능 평가 및 부유생물생태계 위해성 평가	TD49물질로 1.3ton 규모의 대형 메스코즘에서 <i>H. circularisquama</i> 를 완벽하게 제어 가능하였고, 유해하지 않은 규조류의 성장에는 영향을 미치지 않았을 뿐만 아니라 상위영양단계의 동물플랑크톤의 성장에도 그다지 영향을 미치지 않았음
메스코즘에서 적조생물 <i>Hetrosigma akashiwo</i> 살조효과 및 생태계 위해성 평가	-TD49물질로 1.0ton 규모의 대형 메스코즘에서 <i>Hetrosigma akashiwo</i> 를 완벽하게 제어 가능하였고, 유해하지 않은 규조류의 성장에는 영향을 미치지 않았음. - TD49물질1.0 µM이상의 농도에서 동물플랑크톤에 영향을 미쳤으나, 황토는 동물플랑크톤의 다양성을 촉진하였음. -황토는 <i>Hetrosigma akashiwo</i> 의 부유생물의 성장에 긍정적인 작용을 하였으며, 특히 적조생물의 성장을 촉진제 역할을 함.
메스코즘에서 적조생물 <i>Chattonella marina</i> 살조효과 및 생태계 위해성 평가	-TD49물질로 1.0ton 규모의 대형 메스코즘에서 <i>Chattonella marina</i> 를 제어할 수 있었고, 규조류의 성장에는 영향을 미치지 않았을 뿐만 아니라 상위영양단계의 동물플랑크톤의 성장에도 그다지 영향을 미치지 않았음. 반면 황토가 <i>Chattonella marina</i> 의 제어율에 크게 기여하지 못하였음.

평가의 착안점	자 체 평 가
<p>마이크로코즘에서 적조생물 <i>Cochlodinium polykrikoides</i>에 대한 살조물질의 살조능 평가</p>	<p>10L 규모에서 마이크로코즘에서 2013년 현장에서 발생한 적조생물을 이용하여 <i>Cochlodinium polykrikoides</i>을 제어능을 평가하기 위해서 황토와 TD49물질의 농도별 평가를 수행한 결과, 황토에서는 적조생물의 살조효과가 기대할 수 없었고, 낮은 농도(0.4μM)의 TD49물질에서도 체인의 형성한 <i>C. polykrikoides</i>을 사멸시킬 수 없었음. 하지만 TD49 0.8μM에서는 완벽하게 적조생물을 제어 가능하였음. 아울러, TD49물질은 유해하지 않은 규조류의 성장에는 영향을 그다지 미치지 않았을 뿐만 아니라 상위영양단계의 동물플랑크톤의 성장에도 그다지 영향을 미치지 않았음. 특히 황토는 외편모조류의 증식을 촉진 시킨 것으로 판단되어 추후 황토의 살포를 심도 있게 검토할 필요성이 대두되었음.</p>
<p>어류의 영향평가</p>	<p>TD49의 4.0 μM이하의 농도에서는 어류에게 직접적인 영향이 없기 때문에 어장 주변에 적조를 제어가 가능하다고 판단됨.</p>
<p>현장적용 방안모색</p>	<p>-남해연안 해역은 무수히 많은 섬으로 둘러 쌓여있어 섬과 섬사이의 이동길목에서 초기 진압하는 목적으로 TD49의 사용이 적절할 것으로 판단됨. -양식어장 주변에서 피해 방어막을 설치한 후 적조생물이 집적되면 일정의 TD49물질을 살포하면 적절한 제어효과를 가져올 것으로 판단됨.</p>

5. 연구성과

※ 연구성과 다운 매뉴얼(<http://maru.nrf.go.kr/manual/pms/>)을 참고하여 연구마루에 입력된 성과를 다운받아 연차실적계획서에 첨부

사업명	미래유망 융합기술 파이오니아사업	연구책임자	백승호	주관기관	한국해양과학기술원
과제번호	2011-0001813	과제명	나노캡시드의 생태계 위해성 평가 원천기술 개발		

※산학강좌,기술이전 및 기술평가는 현재 입력 받지 않는 항목입니다.

과학기술/학술적 연구성과(단위 : 건)													
전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적	
국내논문		국외논문			국내	국제	출원		등록			저역서	보고서
SCI	비SCI	SCI	비SCI				국내	국외	국내	국외			
0	3	4	0	0	8	3	1	0	0	0	0	0	0

인력양성 및 연구시설(단위 : 명,건)							
학위배출		국내외 연수지원				산학강좌	연구기자재
박사	석사	장기		단기			
		국내	국외	국내	국외		
0	0	0	0	0	0	0	0

국제협력(단위 :명,건)						
과학자교류		국제협력기반			학술회의개최	
국내과학자 해외파견	외국과학자 국내유치	MOU체결	국제공동연구	국제사업참여	국내	국제
0	0	0	0	0	0	0

산업지원 및 연구성과 활용(단위 : 건)							
기술확산				연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)			
기술실시계약	기술이전	기술지도	기술평가	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료	기타목적활용
0	0	0	0	0	0	0	0

기타 성과(단위 : 건)				
언론보도 성과	원자력연구개발사업실적(원자력연구개발사업에한함)			
	기술보고서	설계문서	장비구축 및 개발	분석방법개발
0	0	0	0	0

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2011-00 01813	201103	Effects of temperature and nutrient depletion and reintroduction on growth of <i>Stephanodiscus hantzschii</i> (Bacillariophyceae): implications for the blooming mechanism	Jung, Seung Woon; Joo, Hyoung Min; Kim, Young-Ok; Lee, Jin Hwan; Han, Myung-So	SCI	JOURNAL OF FRESHWATER ECOLOGY	26(1)	국외	SCI등재	0.4	아니오	100
2011-00 01813	201109	Structural shift of planktonic communities in seawater enclosures: from autotrophic to heterotrophic communities	Kim, Young-Ok; Kang, Jung-Hoon; Kwon, Oh Youn; Jung, Seung Woon; Kim, Si-Wook;	직접입력	AQUATIC ECOSYSTEM HEALTH & MANAGEMENT	14(3)	국외	SCI등재	0.71	아니오	100
2011-00 01813	201308	Algicidal effects on <i>Heterosigma akashiwo</i> and <i>Chattonella marina</i> (Raphidophyceae), and toxic effects on natural plankton assemblages by a thiazolidinedione derivative TD49 in a microcosm	Baek, Seung Ho; Jang, Min-Chul; Son, Moonho; Kim, Si Wook; Cho, Hoon; Kim, Young Ok;	SCI	JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY	25(4)	국외	SCI등재	2.326	아니오	50

전문화술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2011-00 01813	201310	Algicidal activity of the thiazolidinedione derivative TD49 against the harmful dinoflagellate <i>Heterocapsa circularisquama</i> in a mesocosm enclosure	B a e k , S e u n g H o ; S o n , M o o n h o ; B a e , S i W o o ; S h i n , K y o u n g s o o n ; N a , D o n g H e e ; C h o , H o o n ; Y a m a g u c h i , M i n e o ; K i m , Y o u n g O k ; K i m , S i W o u k ;	SCI	JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY	25(5)	국외	SCI등재	2.326	예	50
2011-00 01813	201202	해양적조생물제어를 위한 살조물질 Thiazolidinedione 유도체(TD49) 평가	백승호; 장민철; 주혜미; 손문호; 조훈; 김영옥	직접입력	바다	17(1)	국내	SCI미등재		아니오	50
2011-00 01813	201206	Thiazolidinedione 유도체(TD49) 물질을 이용한 적조생물 <i>Akashiwo sanguinea</i> 의 제어	백승호; 신현호; 장민철; 김시욱; 손문호; 조훈; 김영옥	직접입력	Ocean and P o l a r Research	34(2)	국내	SCI미등재		아니오	50
2011-00 01813	201312	반폐쇄적 내만 광양민에서 종속영양적조생물 야광총의 수문학적 및 생태학적 특성	백승호; 김동선; 최현우; 김영옥	KCI	환경생물	31(4)	국내	SCI미등재		아니오	50

지식재산권 성과정보

과제번호	출원등록연월	재산권구분	출원등록 구분	발명제목	출원등록인	출원등록국	발명자명	출원등록번호	활용형태	기여도
2011-000 1813	20130514	특허	출원	생태환경 실험 용 장치 및 이 를 포함하는 폐 쇄생태계 모델 시스템	정승원	대한민국	정승원;백 승호;배세 진;신현호; 임동일;윤 석만;최충 현	10-2013-005 4361	보유기관자체 활용	20

학술대회 논문발표 성과정보

과제번호	발표년월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
2011-0001813	201205	한국해양학회	주혜미, 백승호, 김영옥	TD49 물질을 이용한 Akashiwo sanguinea의 살조능 평가	국내학술대회	대한민국
2011-0001813	201211	한국해양학회	배시우, 백승호, 손문호, 조훈, 나동희, 김시욱	폐쇄생태계를 이용한 Heterocapsa circularisquama의 살조능 평가	국내학술대회	대한민국
2011-0001813	201211	한국해양학회	손문호, 백승호	유해적조생물 제어를 위한 살조물질이 상위 영양단계의 생물에 미치는 영향	국내학술대회	대한민국
2011-0001813	201302	한국환경생물학회	백승호, 손문호, 배시우	Algicidal activity of the thiazolidinedione derivative TD49 against the harmful dinoflagellate Heterocapsa circularisquama in a mesocosm enclosure	국내학술대회	대한민국
2011-0001813	201305	한국해양학회	손문호, 백승호	Responses of microbial communities to dosing with the algicide thiazolidinedione derivative TD49 in a mesocosm experiment	국내학술대회	대한민국
2011-0001813	201308	한국환경생물학회	손문호, 백승호, 배시우	유해적조생물 제어를 위한 살조물질의 효과와 생태계에 미치는 영향 연구	국내학술대회	대한민국
2011-0001813	201309	한국조류학회	백승호, 손문호, 김영옥, 조훈, 김시욱	TD49 물질을 이용한 성장단계별 적조생물 제어능 평가	국내학술대회	대한민국
2011-0001813	201309	한국조류학회	손문호, 백승호, 배시우, 조훈, 김시욱	황토와 신규 살조제에 의한 Heterosigma akashiwo 제어 효과와 생태계에 미치는 영향	국내학술대회	대한민국
2011-0001813	201210	International Conference on Harmful Algae	백승호, 손문호, 김시욱, 나동희, 김영옥	Algicidal effects of a newly developed thiazolidinedione derivative, TD49, on dinoflagellate Akashiwo sanguinea	국제학술대회	대한민국
2011-0001813	201210	International conference on Harmful Algae	백승호, 김시욱, Mineo Yamaguchi, 조훈, 김영옥	Species-specific chemical control of thiazolidinedione derivative (TD49) on	국제학술대회	대한민국

				harmful and non-harmful algal bloom species		
2011-0001813	201310	DINO 10	백승호, 손문호, 김영욱	Enhanced species-specific chemical control of red tide organism by the thiazolidinedione derivative TD49	국제학술대회	미국

현재 인쇄 및 채택 논문 리스트	
1. Baek S.H., Son M.H., Jung S.W., Na D.H., Cho H., Yamaguchi M., Kim S.W., Kim Y.O., (2014), Enhanced species-specific chemical control of harmful and non-harmful 망미 bloom species by the thiazolidinedione derivative TD49. <i>Journal Applied Phycology</i>. 26:311-321 (SCI)	
2. Baek S.H., Shin K.S., Son M.H., Bae S.W., Cho H., Na D.H., Kim Y.O., Kim S.W., (2014), Algicidal effect of yellow clay and the thiazolidinedione derivative TD49 on the fish-killing dinoflagellate <i>Cochlodinium polykrikoides</i> in microcosm experiments. <i>Journal Applied Phycology</i>. 채택(SCI)	

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 유체 및 입자의 유동장 해석을 통해 깊은 수심에 다양한 segment 흐름을 해석함으로써 목적 입자가 난류상태에 따라 어떠한 거동으로 확산 및 침강 예측에 이용.
- 살조 후보물질에 대한 2종의 생물노출 독성평가는 무영향농도수준(PNEC)을 도출에 이용.
- 살조 후보물질에 대한 여러 가지 생물노출 급성독성평가 결과들을 이용하여 예측무영향농도(PNEC)를 도출하고 다른 기법의 독성자료와 비교분석하는데 이용.
- 3차년도까지 다양한 생물을 이용한 급성독성평가 결과를 mesocosm 규모의 위해성평가의 기초자료로 이용하고, 검토된 급성독성평가 기법들의 장단점을 분석하여 보다 현실적이고 타당성 있는 급성독성 평가기법을 개발하는데 이용.
- 차년도의 생물농축계수(BCF)결과와 함께 신규살조물질들의 해양생태계에 대한 종합적인 독성예측에 사용.
- 향후 폐쇄생태계 연구의 가이드라인 제시
- 유체 및 입자의 유동장 해석을 통해 깊은 수심에 다양한 segment 흐름을 해석함으로써 목적 입자가 난류상태에 따라 어떠한 거동으로 확산 및 침강 예측에 이용.
- 살조 후보물질에 대한 2종의 생물노출 독성평가는 무영향농도수준(PNEC)을 도출에 이용.
- 향후 폐쇄생태계 연구의 가이드라인 제시
- 살조 후보물질에 대한 여러 가지 생물노출 급성독성평가 결과들을 이용하여 예측무영향농도(PNEC)를 도출하고 다른 기법의 독성자료와 비교분석하는데 이용.

- 1차 및 2차년도 연구에서 획득한 결과를 가지고 폐쇄생태계 연구의 프로토콜 개발
- 생태계에서 살조후보물질의 생태계 위해성 평가 가이드라인 제시
- 3차년도까지 다양한 생물을 이용한 급성독성평가 결과를 mesocosm 규모의 위해성평가의 기초자료로 이용하고, 검토된 급성독성평가 기법들의 장단점을 분석하여 보다 현실적이고 타당성 있는 급성독성 평가틀을 개발하는데 이용.
- 차년도의 생물농축계수(BCF)결과와 함께 신규살조물질들의 해양생태계에 대한 종합적인 독성예측에 사용.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 유전자 DNA손상 관련 자료

Comet assay는 개별 세포들의 DNA 가닥 손상을 높은 감도로 측정 할 수 있어 in vitro와 in vivo를 통해 다양한 화합물의 유전독성평가에 적용된다. Comet assay는 1990년대 초반부터 다양한 응용 과학분야에 이용되었다. Comet assay는 특정 조직이나 기관뿐 아니라 핵을 가지고 있는 세포라면 어느 조직이나 이용 가능하고 수천 개의 세포만 있으면 분석이 가능하고 시료의 양도 수 mg이면 충분하며 분석 방법이 간단하여 분석에 걸리는 시간이 짧고 분석 단가가 저렴하다는 장점이 있다. 일반적으로 DNA 손상유도물질들이 DNA 이중 가닥보다 DNA단일가닥을 5~200배 정도 더 유발하기 때문에 DNA 이중가닥 손상을 측정하는 기존의 방법에 비해 더욱 유용하다. 이러한 장점으로 인해 최근 해양오염 모니터링에 적용되어 해양생물에 있어서 DNA단일가닥 손상을 감지하는 수단으로 사용되어지기 시작하였다. 갯지렁이 혈구세포를 이용한 신규 살조물질의 DNA손상 정도를 파악하기 위한 방법으로 채택하여 본 연구에 응용하였다.

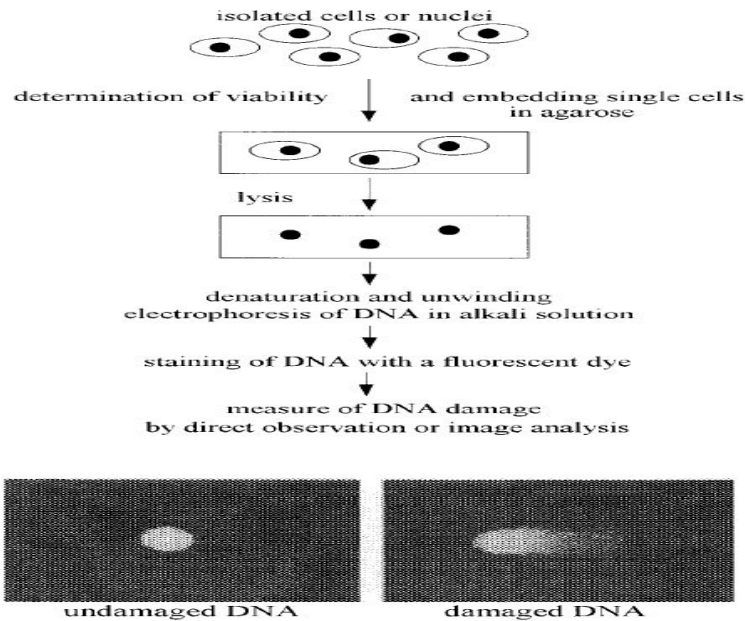


그림 6-1. Comet assay

- 해양생태계의 생물이 아닌 담수성 갑각류인 물벼룩에 대한 평가 결과로부터 해수성 갑각류인 새우의 급성독성평가 결과로 전환이 가능함을 시사.
- Mesocosm 적용 평가의 체계화
미국 EPA의 OPP에서 권장하는 mesocosm을 이용한 위해성 평가방법은 아래 그림과 같이 체계적인 순서를 밟고 있다. OPP의 전문가들이 mesocosm 실험방법을 검토한 후, mesocosm 연구를 유도하고, mesocosm 연구의 최종 검토를 다시 거친다. 이때 실

험에 사용되는 메소코즘의 적절성, 살충제의 적용법, 잔류성, 생물영향, 데이터의 정확성, 데이터의 정리, 통계분석의 항목들을 검토한 후, 최종적으로 실험의 결과에 대한 결론을 내리고 있다 (Graney et al, 1994).

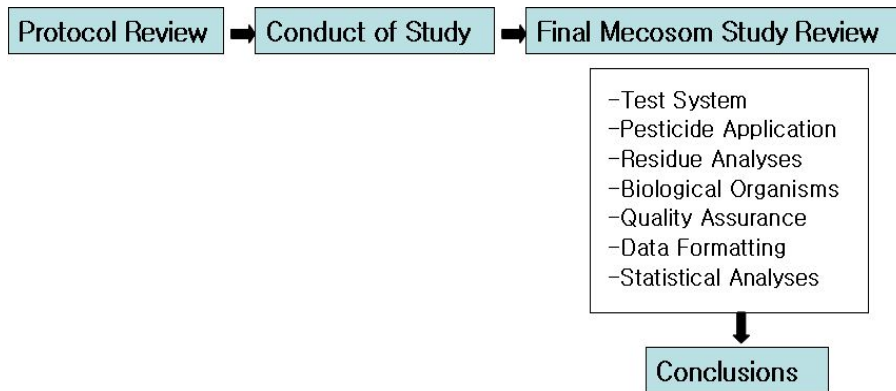


그림 6-2. 미국 EPA의 메소코즘을 적용한 생태계 위해성 평가를 위한 과정

- 메소코즘 적용 생태계 위해성 평가의 탄력성

메소코즘은 평가대상 생물과 평가목적에 따라 맞춤형으로 모양과 크기가 제작되며 각 모양과 크기에 따른 효율성과 신뢰성을 확보하고자 기계적, 기술적 방안을 다각적으로 고안하고 있다 (Petersen et al., 2003).

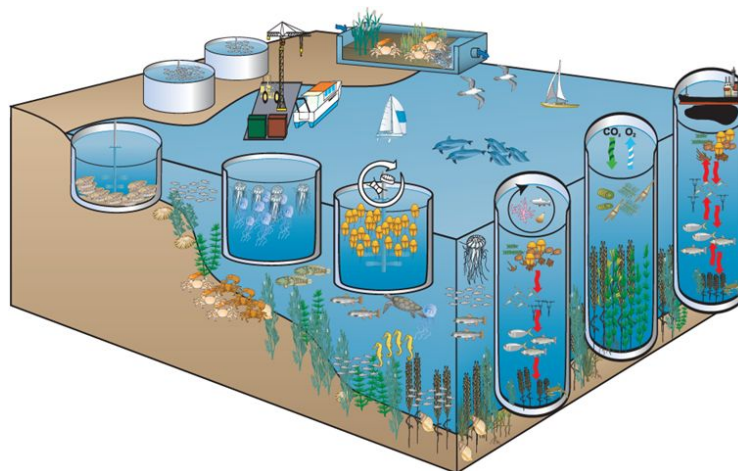


그림 6-3. 미국 Multiscale Experimental Ecosystem Reserach Center (MEERC)의 메소코즘을 적용한 생태계 위해성 평가의 다양화

- 자연생태계를 대신하는 인공생태계의 대형화

미국, 호주, 캐나다는 메소코즘의 크기를 대형화하여 Marine Biosphere로의 활용 방안을 제시하고 있으며 연구, 교육, 관람을 동시에 하는 다목적형으로 발전시키고 있다 (Petersen et al., 2009)

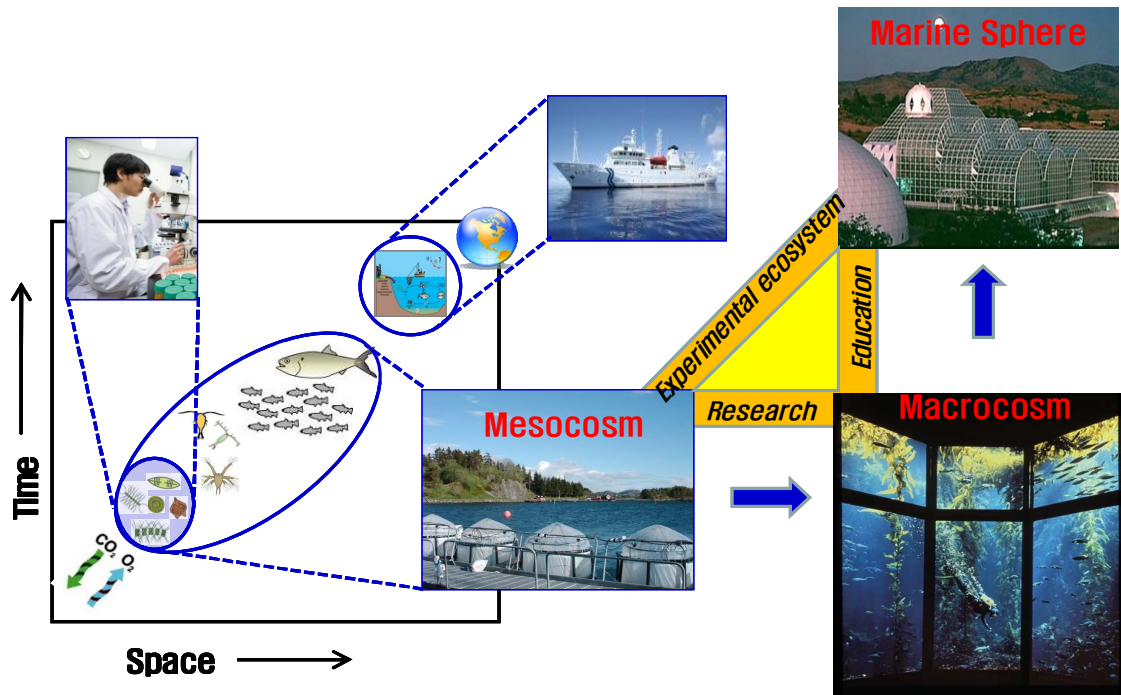


그림 6-4. 메소코즘의 대형화를 통한 연구, 교육, 관람의 발전 모식도

제 7 장 참고문헌

- Adams, M. S., Stauber J. L. 2004. Development of a whole-sediment toxicity test using a benthic marine microalgae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1957-1968.
- Chiou, C. T., Schmedding, D. W. and Manes, M. (2005) Improved prediction of octanol-water partition coefficients from liquid-solute water solubilities and molar volumes, *Environ. Sci. Technol.*, Vol.39, 8840-8846.
- Cho, Y. G. and Kim, G. B. (2007) Bioaccumulation of Pb and Cd in Blue Mussel (*Mytilus edulis*) and Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Exposed to Rearing Media, *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Eng.*, Vol.10, 21-28.
- Fisk, A. T., Rosenberg, B., Cymbalisty, C. D., Stern, G. A. and Muir, D. C. G. (1999) Octanol/water partition coefficients of toxaphene congeners determined by the "slow-stirring" method, *Chemosphere*, Vol. 39, 2549-2562.
- Kelly, B. C. Ikonou, M. G. Blair, J. D., Morin, A. E. and Gobas, F. A. P. C. (2007) Food-web specific biomagnification of persistent organic pollutants, *Science*, 2007, Vol. 317, 236-239.
- Kim, N. S., Hong, S. H., Shim, W. J. and Jeon, J. K. (2007) Accumulation of Tributyltin (TBT) in Blood, Liver and Muscle of Olive Flounder, *J. Environ. Toxicol.*, Vol. 22, 19-26.
- Kim, S. J., Yim, E. C., Park, I. T., Kim, S. W. and Cho H. (2011) Comparison of the acute toxicities of novel algicides, thiazolidinedione derivatives TD49 and TD53, to various marine organisms, *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 30, 2810 - 2816.
- Kim Y. O., Kang J. H., Kwon O. Y., Jung S. W. and Kim S. W. (2011) Structural shift of planktonic communities in seawater enclosures: from autotrophic to heterotrophic communities. *Aquat Ecosys Health Manage* 14:239-245
- Kwon, J. H. (2008) Bioaccumulation and Baseline Toxicity of Hydrophobic Chemicals: Molecular Size Cutoff, Kinetic Limitations, and Chemical Activity Cut-off, *J. Environ. Toxicol.*, Vol. 23, 67-77
- Leeuwen, C. J. V and Hermens, J. L. M. (2001) Risk assessment of chemicals : An introduction. 89-111.
- Leeuwen, C. J. V and Hermens, J. L. M. (2001) Risk assessment of chemicals : An introduction. 367-373.
- Meylan, W. M. and Howard. P. H. (1995) Atom/Fragment contribution method for estimating octanol-water partition-coefficients, *J. Pharm. Sci.*, Vol. 84, 83-92.
- Munger, C. and Hare, L. (1997) Relative Importance of Water and Food as Cadmium Sources to an Aquatic Insect (*Chaoborus punctipennis*): Implications for Predicting Cd Bioaccumulation in Nature, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 31, 891-895.

- OECD guideline for testing of chemicals (1996) Bioconcentration, Flow-through Fish Test(No.305).
- OECD guideline for testing of chemicals (2006) Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method(No.123).
- Palaniappan, P. L. R. M., Nishanth, T. and Renju, V. B. (2010) Bioconcentration of zinc and its effect on the biochemical constituents of the gill tissues of *Labeo rohita*: An FT-IR study, *Infrared Phys. Technol.*, Vol. 53, 103 - 111.
- Parsons, T. R., Y. Maita and C. M. Lalli. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, New York. 173pp.
- Porte, C. and Albaigés J. (1993) Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans and fishes, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 26. 273-281.
- Sangster, J. (1989) Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, Vol. 18, 1111-1229.
- Seguchi, K. and Asaka, S. (1981) Intake and excretion of diazinon in freshwater fishes. *Bull. Environm. Contain. Toxicol.*, Vol. 27, 244-249.

[첨부 1] 연구개발 결과 활용계획서

1. 기대성과 및 활용방안

- 신규 살조물질의 해양 위해성 평가에 대한 체계적인 평가 방법 제시
- 자연생태계에 직접 적용 시 야기되는 문제점을 사전에 감지/방지함으로써 자연서식생물의 피해를 저감시키는 방안 제시
- 자연 생태계에 살조물질 적용을 통해 유발되는 위해성을 인공생태계를 통해 일차적 검증할 수 있는 안전성 기술이 확보됨
- 인공생태계 상품화를 위한 재현성 연구 및 추가 및 보완을 병행하여 확립된 기술을 노하우 축적
- 다양한 형태입자의 침강 및 거동해석결과는 응집성 입자들의 거동을 해석하는데 이용
- 수조 내에서 유체의 유량 및 유속분석결과는 연안의 폐쇄수역의 파도발생 시 전 수체의 거동 해석에 이용

2. 연구개발성과 활용 추진방법 및 일정계획

활용방법	활용계획			활용분야
	2011년	2012년	2013년	
인공생태계 적용 생태계 위해성 평가 한국형 가이드라인 제시	→	→	→	메소코즘 생태계 위해성 평가법
메소코즘의 인공 시스템을 적용한 미세조류 대양배양 시스템 구축		→		친환경 미세조류대량생산 시스템
다목적 맞춤형 인공생태계 시스템 구축 및 연구, 교육, 관람의 임해 marine sphere 설계			→	인공생태계 상품화 기획
응집성 입자의 거동 해석	→			해역에서의 나노입자의 확산 예측
연안 폐쇄수역 파도발생 수체의 거동 해석			→	연안 폐쇄수역의 파도의 거동 예측
살조물질 무영향농도수준(PNEC) 도출		→		살조물질의 현장 살조농도 도출

[별지 제7호서식]

자체평가의견서

1. 과제현황


					과제코드	
부처사업명(대)	원천기술개발사업					
사업명(중)	첨단융합기술개발사업					
세부사업명(소)	미래유망 융합기술 파이오니어사업					
국가과학기술 표준분류체계	O0602	E0703	E0808	국가기술지도 (NTRM)	B030302	
총괄과제				총괄책임자(기관)		
과제명	나노캡시드 살포 및 생태계 위해성 평가 원천기술 개발		연구단계		1단계 종료후 2단계 (2011-2014년)	
연구기관	한국해양연구원		연구책임자		김영옥	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계	
	1차연도	2011. 03 -2012. 02	100,000		100,000	
	2차연도	2012. 03 -2013. 02	100,000		100,000	
	3차연도	2013. 03 -2014. 02	140,000		140,000	
	4차연도					
	5차연도					
계						
참여기업						
상대국			상대국 연구기관			

주1) 부처 기술분류코드 기재 불필요.

비 고 : 총괄과제란은 총괄과제에 해당하는 경우에만 기재합니다.

2. 평가일 : 2012. 2. 13

3. 평가자(총괄 연구책임자)

소속	직위	성명	서명
조선대학교	교수	김시욱	

4. 평가자 확인

본인은 평가대상 과제의 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 이 자료가 전문가 및 전문기관 평가시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다

확약	김시욱
----	-----

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성 및 창의성

-메소코즘을 적용한 생태계 위해성 평가는 국내에서 처음으로 적용된 사례 연구임. 선진국의 방법을 벤치마킹하여 국내 실정에 맞게 메소코즘을 설계 제작하였음. 메소코즘 내의 폐쇄효과를 최소화하고 자연생태계의 리얼리즘을 극대화하고자 크기와 모양에 따른 수체내 환경요소와 생물요소의 모니터링을 체계적으로 실시함. 따라서 인공생태계 (마이크로코즘 & 메소코즘) 적용 생태계 위해성 평가 가이드라인 정립을 위한 기반을 구축함

-입자의 거동 해석 연구는 신규 개발 될 살조물질 탑재 나노캡시드의 거동을 해석하는데 이용될 것이며, 나노캡시드의 실제 현장적용에 있어서 중요한 자료로 이용될 수 있지만 아직 국내외적으로 보고된 사례가 없음. 신규 살조물질에 대해 다양한 생물체를 대상으로 한 생물노출 급성평가를 통해 살조물질의 해양해역에서의 안정한 농도 PNEC를 도출하였음.

-살조물질 TD49와 황토에 대한 적조생물 *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*, *Heterocapsa circularisquama*, *Cochlodinium polykrikoides* 제어를 위한 과학적인 근거자료 제시함과 아울러 살조물질에 대한 해양생물 생태계 위해성 평가를 체계적으로 수행하였음.

-TD49 물질을 현장에 적용할 수 있는 기반구축

2. 연구개발결과의 파급효과

-본 연구를 통해 향후 개발될 신물질의 안전성 평가 시, 체계적인 인공생태계 평가를 통한 국내 제품의 신뢰성이 확보되며 나아가 평가기술의 국내외 이전을 통해 국가기술 이미지 향상과 파급에 기여함

-나노입자의 거동 해석은 앞으로 개발될 다양한 나노입자에 대한 수계 내에서의 거동을 파악하는 기초 자료가 될 것임. 다양한 생물을 이용한 급성독성평가 결과는 mesocosm 규모의 위해성평가의 기초자료로 이용하고, 검토된 급성독성평가 기법들의 장단점을 분석하여 보다 현실적이고 타당성 있는 급성독성 평가 기법을 개발하는데 이용함.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

- 평가목적에 따른 다양한 모양, 크기와 재질, 기타 하드웨어적 기술의 개발을 통해 인공생태계의 상품화가 기대되며, 위해성 평가 연구 뿐 아니라 관련 분야의 교육프로그램 개발 및 나아가 연구현장 모습과 인공생태계를 관람용으로 공개하는 다목적 Marine Ecosystem로의 발전이 기대됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

-인공생태계를 현장 바다에 직접 설치하여 운용하는 작업은 고도의 기술과 함께 막대한 노동력이 요구되는 작업으로 본 연구진은 임해연구소라는 장점을 보유하고 있는 동시에 현장조사의 기술적 노하우를 축적하고 있는 브레인 풀임. 연구 목표와 내용에 부합하는 연구를 성실하게 수행함

5. 공개발표된 연구개발성과(논문·지적재산권·발표회 개최 등)

-메소코즘 연구를 통해 얻은 결과를 토대로 현재 SCI 논문이 2편 게재 승인되었으며, 메소코즘을 이용한 미세조류 대량배양 시스템 개발을 통해 특허 출원을 1건 하였음. 기타 관련 학술발표를 11건 수행함.
-TD49물질의 적조생물제어 등 연구를 통해 국내 논문 3편게재 되었음.
- 본 연구를 통하여 SCI논문 총 4편 게재 되었고, 1편은 인쇄 중, 1편은 투고 중으로 6편의 실적을 기대할 수 있음.

II. 연구목표 달성도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	메소코즘 제작	초기형과 보완형 (수직, 수평 scale-up) 제작	100 %
2	메소코즘 폐쇄효과 완화 방안 강구	균일 주입수 시스템 및 수체 교반기 제작	100 %
3	살조후보물질 마이크로 코즘 위해성 평가	부유생물 군집에 미치는 영향 모니터링	100 %
4	나노 입자 거동해석	수조 제작 및 입자거동 해석	100 %
5	신규 살조물질의 생물노출 급성독성평가	TD49, TD53의 NOEC 및 PNEC 도출	100 %
6	살조물질TD49에 대한 메소코즘에서 해양생태계 위해성 평가	적조대상생물뿐만 아니라, 식물플랑크톤, 동물플랑크톤, 어류의 거동을 모니터링함	100%
7	황토에 대한 메소코즘에서 해양생태계 위해성 평가	해양생물군집에 미치는 영향평가	100%
8	살조물질의 현장적용방안	현장적용 방안 모색	100%

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

1단계에서는 메소코즘 제작과 현장 운용의 노하우가 축적됨에 따라서 2단계에서 본격적으로 폐쇄생태계를 활용하여 유해유독 적조생물 *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*, *Heterocapsa circularisquama*, *Cochlodinium polykrikoides*의 살조효과를 파악함과 아울러 해양생태계에 미치는 영향을 평가하였음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

2단계에서는 우리나라에서 항상 출현하고 때때로 적조를 유발하여 막대한 피해를 입히는 적조생물 *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*, *Heterocapsa circularisquama*, *Cochlodinium polykrikoides*을 대상으로 살조후보물질의 위해성 평가를 주로 마이크로코즘, 메소코즘에서 실시하였으며 해양생태계에 미치는 위해성 평가를 성실하게 수행하여 다양한 과학적 기초자료를 확보하는데 주력하였음

3. 연구개발결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

국내 신물질 개발 시 수서생태계 위해성 평가에 기술적 적용이 가능하며 향후 담수권을 포함한 전체 수권에 활용이 가능한 방안이 제시되도록 선택과 집중적인 후속 연구가 요구됨. 나노 입자 거동해석은 현장적용시 살조물질의 수평 및 수직 확산을 예측하고 살포농도 산정에 이용할 수 있음. 살조물질에 대한 현장적용 방안을 모색하여 평가되었으나, 해양수산부고시“적조구제물질·장비의 사용승인에 관한 고시”에 대한 승인을 받기 위해서는 현장적용 실험이 추후 요구됨. 본 고시는 국립수산과학원에서 한국해양과학기술원 남해연구소에서 수행된 다양한 폐쇄생태계의 실험을 바탕으로 단계적으로 보완해 나갈 예정임.

IV. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

제 3세부과제에 한해서 공개 가능함

2. 연구기관 자체의 검토결과

한국해양과학기술원 남해연구소는 가두리, 해상 플랫폼 등의 임해 연구시스템이 구축된 국내 유일한 연구기관으로, 특히 본 연구와 같은 인공폐쇄생태계 설치 및 운용에 관한 연구 분야는 향후 확대 발전시켜 추진된다면 명실공의 국내 해양 인공생태계 시스템 구축의 선도 역할을 하리라 기대됨.

주 의

1. 이 보고서는 교육과학기술부에서 시행한 미래유망 융합기술 파이오니어사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 교육과학기술부에서 시행한 미래유망 융합기술 파이오니어사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.