

미래유망 융합기술 파이오니아 사업
바이오나노캡시드 융합기술개발 연구단
(제 3 세부)

나노캡시드 살포 및 생태계 위해성 평가 원천기술 개발

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

1단계 최종보고서

2011. 02. 07

한국해양연구원

교육과학기술부

제 출 문

과학기술부장관 귀하

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

2011 . 02 . 07

주관연구기관명 : 한국해양연구원

주관연구책임자 : 김 영 옥 (해양연)

연 구 원 : 강 정 훈 (해양연)

” : 정 승 원 (해양연)

” : 권 오 윤 (해양연)

” : 신 현 호 (해양연)

” : 이 은 선 (해양연)

” : 김 은 송 (해양연)

보고서 요약서

| | | | | | |
|---|--------------|---|---------------------------------|-------------|--|
| 과제고유번호 | 2008-2000127 | 해 당 단 계 연구 기 간 | 2008. 04. 15 - 2011. 02. 28 | 단 계 구 분 | 1/2 |
| 연구사업명 | 중사업명 | 첨단융합기술개발사업 | | | |
| | 세부사업명 | 미래유망 융합기술 파이오니아사업 | | | |
| 연구과제명 | 총괄과제명 | 유해조류 제어를 위한 바이오나노 캡시드 제조 및 탑재 융합기술 개발 | | | |
| | 세부과제명 | 나노캡시드 살포 및 생태계 위해성 평가 원천기술 개발 | | | |
| 연구책임자 | 김영옥 | 해당단계 참여 연구원수 | 총 : 7 명 내부 : 2 명 외부 : 5 명 | 해당단계 연구비 | 정부 : 270,000 천원 기업 : 천원 계 : 270,000 천원 |
| | | 총연구기간 참여 연구원수 | 총 : 7 명 내부 : 2 명 외부 : 5 명 | 총연구비 | 정부 : 270,000 천원 기업 : 천원 계 : 270,000 천원 |
| 연구기관명 및 소속부서명 | 한국해양연구원 | | 참여기업명 | | |
| 국제공동연구 | 상대국명 : | | 상대국연구기관명 : | | |
| 위탁연구 | 연구기관명 : | | 연구책임자 : | | |
| 요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내) | | | | 보고서면수 | 92 |
| <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"/> 살조물질 평가 맞춤형 중형폐쇄생태계(메소코즘) 설계, 제작, 설치 하드웨어 기반구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - 메소코즘 국외 적용 사례 분석을 통한 메소코즘 제작과 설치 - 메소코즘의 폐쇄영향 최소화 방안 탐색 <p><input type="checkbox"/> 메소코즘을 적용한 생태계 위해성 평가기술 기반구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - 메소코즘 내 부유생태계의 폐쇄환경 영향 평가 - 메소코즘 내 살조물질의 부유생태계 위해성 평가 - 시험어장을 통한 부유, 유영, 저서생태계 통합 위해성 평가 - 메소코즘 적용 살조물질의 해양생태계 위해성 평가 가이드라인 구축 <p><input type="checkbox"/> 살조입자의 적조방제 현장적용 테스트</p> <ul style="list-style-type: none"> - 나노 모방입자 확보 및 다양한 크기, 형상의 입자제조 및 밀도측정 - 다양한 난류상태의 적조띠 수심에 확산 및 분포 가능한 입자의 최적 밀도, 크기 제안 | | | | | |
| 색인어 (각 5개 이상) | 한글 | 유해조류, 바이러스, 캡시드 단백질, 나노 바이오, 탑재, 생태계 안전성 | | | |
| | 영어 | 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 효과적인 현장적용을 위한 실용성을 강구하고자 함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 살조물질 평가 맞춤형 중형폐쇄생태계(메소코즘) 설계, 제작, 설치 하드웨어 기반구축
 - 메소코즘 국외 적용 사례 분석을 통한 메소코즘 제작과 설치
 - 메소코즘의 폐쇄영향 최소화 방안 탐색
 - 메소코즘 운용의 기계적 효율성 확보 방안 탐색
- 메소코즘을 적용한 생태계 위해성 평가기술 기반구축
 - 폐쇄생태계의 자체 생태학적 특성 규명
 - 메소코즘 내 부유생태계의 폐쇄환경 영향 평가
 - 메소코즘 내 살조물질의 부유생태계 위해성 평가
 - 시험어장을 통한 부유, 유영, 저서생태계 통합 위해성 평가
 - 메소코즘 적용 살조물질의 해양생태계 위해성 평가 가이드라인 구축
- 살조입자의 적조방제 현장적용 테스트
 - 나노 모방입자 확보
 - 다양한 크기, 형상의 입자제조 및 밀도측정
 - 층류상태에서 다양한 형태입자의 침강속도 해석
 - 다양한 난류상태에서 입자의 거동특성 해석
 - 폐쇄 수조내 수체 36개 segment별 유속 및 유향 조사
 - 파도 발생시 폐쇄 수체의 Re수 및 침강속도 해석
 - 다양한 난류상태의 적조띠 수심에 확산 및 분포 가능한 입자의 최적 밀도, 크기 제안

IV. 연구개발결과

- 1세부와 2세부과제에서 제조한 나노입자를 실제 수 환경 (마이크로코즘과 메소코즘)에 살포하여 유해조류에 특이하게 감염시킨 다음 유해조류가 선택적으로 치사하는지와 더불어 수 환경에 어떠한 위해성이 나타나는지를 탐색하는 기술로서 마이크로코즘과 메소코즘을 통한 살조물질의 위해성 검증 시스템을 확립하였다.
- 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 판단된다.

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
- 다양한 형태입자의 침강 및 거동해석결과는 응집성 입자들의 거동을 해석하는데 이용
- 수조 내에서 유체의 유향 및 유속분석결과는 연안의 폐쇄수역의 파도발생 시 전 수체의 거동 해석에 이용

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

- Building-up of infrastructure for design, manufacture and deployment of mesocosm fit for assessment of algicidal capsid
 - Manufacture & deployment by mechanical analysis of mesocosm developed from other countries
 - Scheme for minimization of containment effect while mesocosm operation
 - Scheme for enhancement of mechanical efficiency in mesocosm operation
- Establishment of ecological risk assessment techniques using mesocosm
 - 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
 - Integrated risk assessment of planktonic, benthic and nektonic ecosystem using a test fishing ground
 - Set-up of guidelines for marine ecological risk assessment in use of mesocosm by algicidal nano-capsid
- Technical development for effective natural dispersion of algicidal nano-capsid
 - Preparation of nano imitation particles
 - Particle preparation in various sizes and shapes and the measurement of their densities
 - Analysis of sedimentation characteristics using various shaped particles in laminar flow
 - Analysis of behavior characteristics of particles in various turbulent flows
 - Investigation of flow rate and flow direction in 36 sections in closed water tank
 - Analysis of sedimentation rate and Reynolds number in closed water tank with wave generation
 - Suggestion of optimum density and size of particle enabling diffusion and distribution in the range of red-tide in various turbulent flows

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
- The results of sedimentation and behavior analysis of various shape particles can be applied for the behavior analysis of cohesive particles
- The results of rate and direction of flow in the water tank can be applied for rheology analysis in closed sea area generating wave

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 |
| 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 | 10 |
| I. 나노 모입자의 침강속도 및 거동해석 | 10 |
| 1. 연구내용 | 10 |
| 2. 연구결과 | 11 |
| VI. 메소코즘을 이용한 환경위해성 평가 | 42 |
| 1. 프로타입 메소코즘제작 | 42 |
| 2. 메소코즘 평가 | 44 |
| 3. 살조물질을 이용한 적조제어 평가 및 생태계 위해성 마이크로코즘 평가 | 49 |
| 4. 연구결과 | 54 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 75 |
| 1. 목표 및 달성도 | 75 |
| 2. 기여도 | 81 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 | 84 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 85 |
| 제 7 장 참고문헌 | 87 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

I. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 제 3 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 위해성평가와 ii) 현장 생태계를 통한 종합 위해성 평가, iii) 살조 나노입자의 적조때에서 살조효과를 극대화하는 살포기 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 중 소 규모의 실제의 인공생태계를 구축하여 실제 위해도를 가장 정확히 분석하는 평가

체계를 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 (< 1m³), 중형 (1-1000m³), 대형(>1000m³)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.

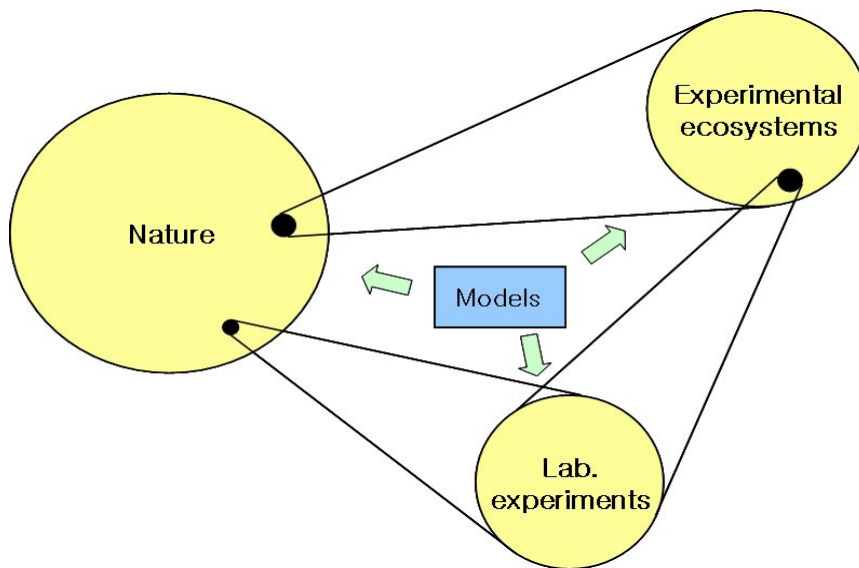


그림1-1. 자연생태계와인공생태계사이의관계 (Lalli,1990)

(3) 나노입자 살포기 개발

- 적조유발 생물의 분포가 수심 5-20 m에서 높은 농도로 검출되고 있다. 그래서 개발된 나노캡시드가 적조생물과 반응하여 살조효과를 높이기 위해서는 수심 20 m 까지 확산되어 체류하도록 하는 기술이 필요하다. 나노캡시드가 일정수

심에서 분포하도록 하는 방법에는, 나노캡시드의 크기를 콜로이드입자와 유사한 크기와 밀도로 조절하여 적조때 수심에 부유 확산시키는 방법과, 적조때 수심부에서의 물리적인 강제접촉기술을 고려할 수 있다. 적조생물과 나노캡시드의 살조기전이 살조물질의 화학적 독성에 의하고, 나노캡시드의 특이성반응에 의해 적조생물에 결합하고 한번 결합하면 재분리 되지 않기 때문에 순간적인 접촉 강도 또는 빈도를 높이는 물리적인 강제접촉기술이 효과적인 살포방법이라 할 수 있다.

- 본 연구에서는 나노입자(나노캡시드)가 해수에서 어떠한 분포를 보이는지 조사하고, 너울 파도 등의 해양환경조건에서 동력학적 분석을 수행한다. 종래의 공중살포방식으로 효과적인 분포수심을 이루지 못할 경우에는 최적수심(적조때)에서 나노입자와 적조생물간의 접촉빈도를 높이는 수평와류형 분사기 즉 타겟형 살포기를 새롭게 개발하여 현장 살포에 이용하고자 한다.

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
- ▶ 종래의 공중살포기와 차별화된 수평와류형 분사기를 개발하여 최적수심에서 나노입자와 적조생물 간의 접촉빈도를 높이는 타겟형 살포기 개발

- 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.
- 종래의 공중살포기는 나노입자의 콜로이드성 성질 때문에 나노입자를 적조때 수심으로 확산시키지 못하고 해수표면에만 장기 체류하게 되는 반면, 본 연구의 수평와류형 분사기는 적조때 수심에서 수식확산보다 수평확산을 크게 하는 방식으로 나노입자와 적조생물간의 접촉빈도를 높이는 타겟형 살포기이기 때문에 효과적인 살조반응이 진행될 것이다.

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
- ▶ 수평와류형 분사기를 이용하여 최소한의 살조물질 살포로 대량 적조생물 제거가 가능해지면 수산양식업 뿐만 아니라 국민의 건강증진에도 기여함

- 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 인공생태계를 가두리를 비롯한 양식장의 기능에 맞추어 적용하면 경제적 손실을 최소화 할 수 있다.
- 살조물질의 인공생태계내의 성공적 적용개발 시 수산물의 안정성이 확보되어 어민의 소득증대에 이바지 한다.
- 수평와류형 분사기는 적조때 수심에서 적조생물체를 타겟형으로 반응하여 살조하기 때문에 비반응 살조제(나노입자)를 크게 감소시킴으로서 최소한의 살조물질로 최대의 적조생물 제거가 가능하게 되어 수산양식업 뿐만 아니라 국민의 건강을 도모한다.

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.
- ▶ 살조물질의 특이성, 살포기의 높은 반응효율 등은 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 통계 자료의 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. 한국해양연구원에서 “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 연구선례라 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 mesocosm연구라 할 수 있다 (과기부, 2005).
- 국내의 경우 현재까지 개발된 살조물질은 없으며 개발된 신물질의 현장적용과 관련된 인공생태계를 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).

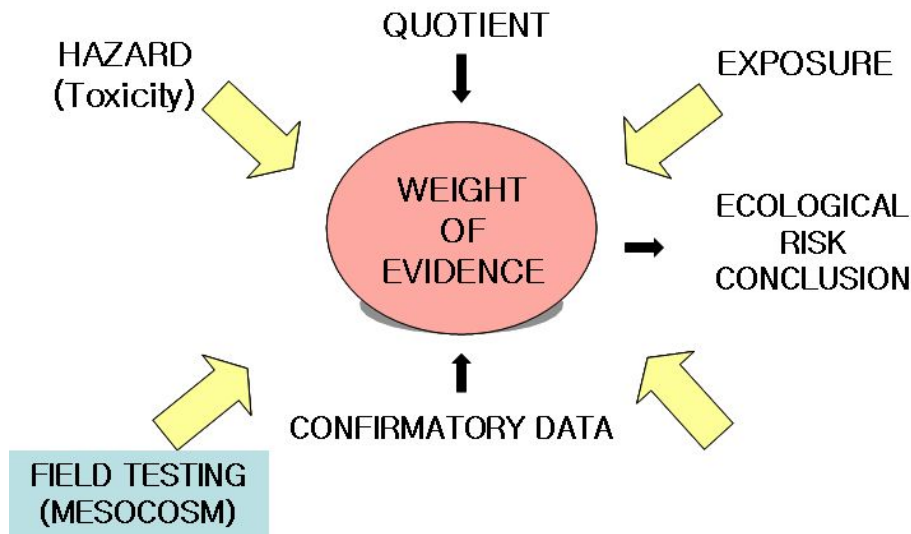


그림 2-1. 생태계 위해성 평가를 위한 과정과 체계

(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.

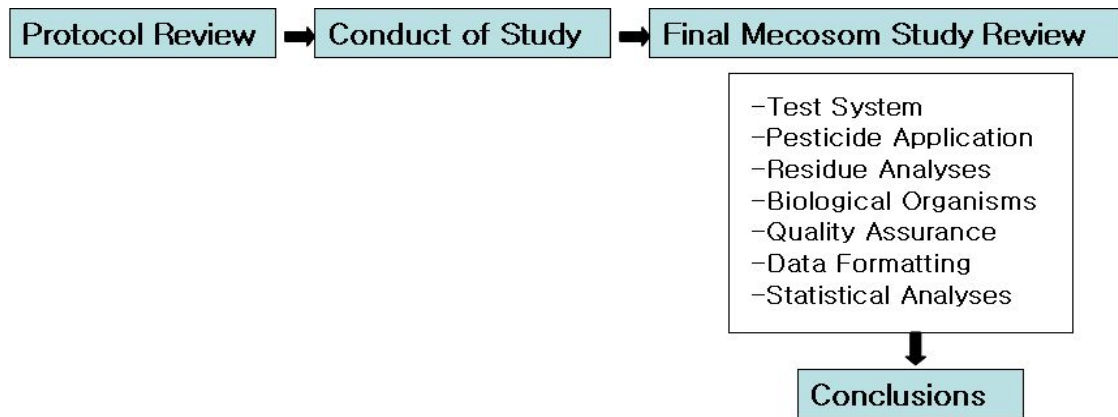


그림 2-2. 미국 EPA의 메소코즘을 적용한 생태계 위해성 평가를 위한 과정

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 편리성을 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 적조띠 수심에서 살포한다면 지금 보다 살조효과를 어느 정도 개선할 수 있으리라 사료된다. 그러한 살조방식에는 본 연구에서 개발하려고 하는 와류형 수평분사기가 아주 효과적일 것이다. 황토입자는 응집반응에 의해 플럭화 되면서 제거되는 기구이기 때문에 응집반응,

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.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

I. 나노 모입자의 침강속도 및 거동해석

1. 연구내용

(1) 나노 모방입자 확보

(가) 효모균

- 효모균 *Saccharomyces italicus* KJ1은 습윤상태에서 염색이 잘 되지 않고, 건조상태에서는 서로 응집되어 침강속도 해석에 부적절함.

(나) 무기물입자 (마이크로 사이즈)

- 제품화된 Fullerene(C60/C70)은 수 μm 크기로써 고가이고 염색이나 형광표식이 가능한지 불확실함
- 단구균, 비운동성 *Stomatococcus mucilaginosus* (2 ~ 3 μm)도 서로 응집되어 침강속도 해석에 부적절함.

(다) Fullerene 나노입자

- 나노 크기의 형광안료입자 확보 : 유기입자이기 때문에 부정형의 수 μm 크기로 제조되어 부적합.

(라) 단구균

- 단구균, 비운동성 *Stomatococcus mucilaginosus* (2 ~ 3 μm)도 서로 응집되어 침강속도 해석에 부적절함.

(마) HiPS 입자

- HiPS를 형광염색하여 침강속도 해석에 사용

(2) 입자의 침강 속도 해석

(가) 염분농도, 입자형태에 따른 침강속도

(나) 유리컬럼에서 입자의 침강속도

- 입자의 침강속도 분석용 컬럼을 주문제작 (재질: 원통형 유리, H: 130 cm, D: 30 cm)

(다) 수조내 36 segment의 유체흐름

- 입자의 거동해석용 수조 주문제작 (재질: 강화유리, L: 240 cm, W: 120 cm, H: 120 cm)

(라) 파도세기에 따른 단입자의 침강속도

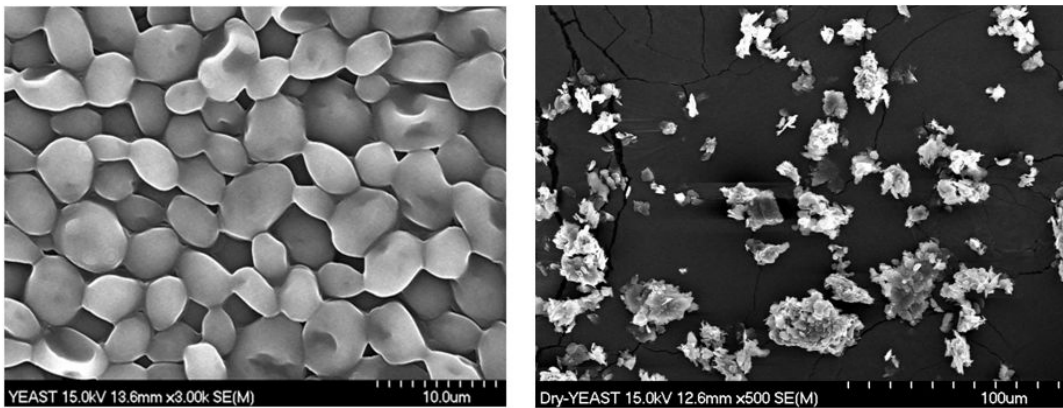
- 다양한 크기, 형상의 입자제조 및 밀도측정
- 층류상태에서 다양한 입자의 침강속도 해석
- 폐쇄 수조내 수체 36개 segment별 유속 및 유향 조사

- 파도 발생시 폐쇄 수체의 Re 수 및 침강속도 해석
- (마) 파도조건 23 rpm에서의 입자의 침강속도 이론적 해석
- (바) 파도발생시 입자의 침강궤적
- (사) 나노입자의 해수중 분포수심, 최적 밀도 및 크기 제안

2. 연구결과

(1) 나노 모방입자 확보

- 모방입자의 조건 : 구형, 유기물, 크기는 50 ~100 nm, 형광 또는 염색입자이어야 한다.



| | Wet Yeast (Left) | Dry Yeast (Right) |
|------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 균 주 | <i>Saccharomyces italicus</i> KJ1 | <i>Saccharomyces italicus</i> KJ1 |
| 염색시약 | Toluidine blue (SDS-PAGE 염색액) | Toluidine blue |
| 염색상태 | 부분 염색됨 | 염색 잘됨 |
| 입자크기 | 3~6 μm | 5 ~ 50 μm |
| 존재상태 | 단일균체로 존재하지 않고 쌍구균 형태로 존재 | 불균일한 상태로 존재 |
| 침강특성 | 염색이 되지 않아 침강특성을 분석하지 못함 | 침강속도가 매우 빠름 |

그림 3-1. 실험에 사용한 효모균.

(가) 효모균

효모균 *Saccharomyces italicus* KJ1을 배양하여 균주만을 수집하여 습윤상태의 효모(좌측)와 건조상태의 효모(우측)를 염색시켜 침강속도를 관찰하였다. 그 결과 효모균은 단구균 형태로 존재하지 않고 서로 응집되어 빠른 속도로 침강하였다. 그리하여 효모는 나노 모방입자로 사용하기에는 부적합하였다.

※ 1 L 메스실린더 : (H : 350 mm, D : 60 mm), 염색한 단구균의 크기 : 수십 μm








| 경과 시간 | 0 min | 3 min | 7 min | 9 min | 15 min | 30 min | 55 min | 4 hr | 19 hr |
|-------|---|---|---|---|---|---|--|---------------|---------------|
| 침강 특성 | | | 침강이 빠른 입자 침강 완료 | | 남색이 전체적으로 분산된 상태 | 전체적으로 남색이며, 큰 변화 없음 | 전체적으로 남색, 저부에 남색입자들 침강 | 전체적으로 균질한 연남색 | 전체적으로 균질한 연남색 |
| 침강 사진 |  |  |  |  |  |  |  | " | " |

그림 3-3. 실험에 사용된 단구균과 침강특성.

단구균으로 알려진 *Stomatococcus mucilaginosus* (KCTC No. 19322)를 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양하였다. 이 균주는 방선균이며 호흡기내 정상 세균총으로 현막을 갖는 그람양성구균으로 그람염색을 하여 침강특성을 분석하였다. 단구균의 크기는 SEM 사진을 통해 관찰한 결과 $700\text{ nm} \sim 1\ \mu\text{m}$ (좌)이었으며, 그람염색시약의 크기는 약 $20 \sim 30\ \mu\text{m}$ (우)이었다. 단구균 *S. mucilaginosus*도 그람염색에 의해 효모와 마찬가지로 서로 응집되어 빠른 속도로 침강하여 나노입자의 모방입자로 사용할 수 없었다. 대부분의 *Micrococcus* 속은 점질물(Slime)을 형성하는 특성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.

(마) HiPS 입자

나노 모방입자를 확보하기 위하여 당 연구실에서는 효모균, 무기물입자 (마이크로 사이즈), 단구균 등을 염색하여 예비실험을 하였지만 단일 구형 형태로 유지하기 매우 힘들었다. 그리하여 이러한 입자들은 침강특성 해석에 부적합한 것으로 사료되었다. 또한 $50 \sim 100\text{ nm}$ 의 유기성 나노입자는 제조가 불가하고, 탄소수 $60 \sim 70$ 개의 구형 나노입자인 Fullerenene 는 단가가 비싸고 소량 주문이 불가하며 입자에 염색이나 형광표식이 가능한지 불확실한 문제점이 있어, 이 두 입자도 나노 모방입자의 사용에 부적합하였다.

그리하여 본 연구에서는 polystyrene 재질의 HiPS 입자를 나노 모방입자로 사용하였다. HiPS 입자의 직경은 $5.97\ \mu\text{m}$, 무게는 $0.1157 \pm 0.00065\ \text{g}$, 밀도는 1027.7

kg/m³ 이었다.

- 입 자 : HiPS 입자
(직경 5.97 mm재질 : High Impact Polystyrene, 제조회사 : 알라딘상사)
- 염 분 농 도 : 1%, 2%, 3.5%
- 유 리 켈 럽 : 내경 28.9 cm, 면적(A): $\frac{\pi}{4}D^2 = 656 \text{ cm}^2$, 침강깊이 123 cm
원통부분 부피 : 80688 cm³, 하부부피 : 5000 cm³,
총물부피 : 85688 cm³, (켈럽 상부 10cm부터)
- 수 조 : 내부크기 235 cm × 114 cm × 107 cm
= 2,866,530 cm³ - 4 L (실리콘)
= 2,862.53 L
- 첨 가 물 : 소금(3.5%) = 2,862 L × 35 g/L = 100.17 kg
NaN₃(0.1%) = 2862 L × 1 g/L = 2862 g

수조안의 소금물속 미생물 성장을 억제하기 위하여 0.1%의 아지드화 나트륨을 첨가하였다.

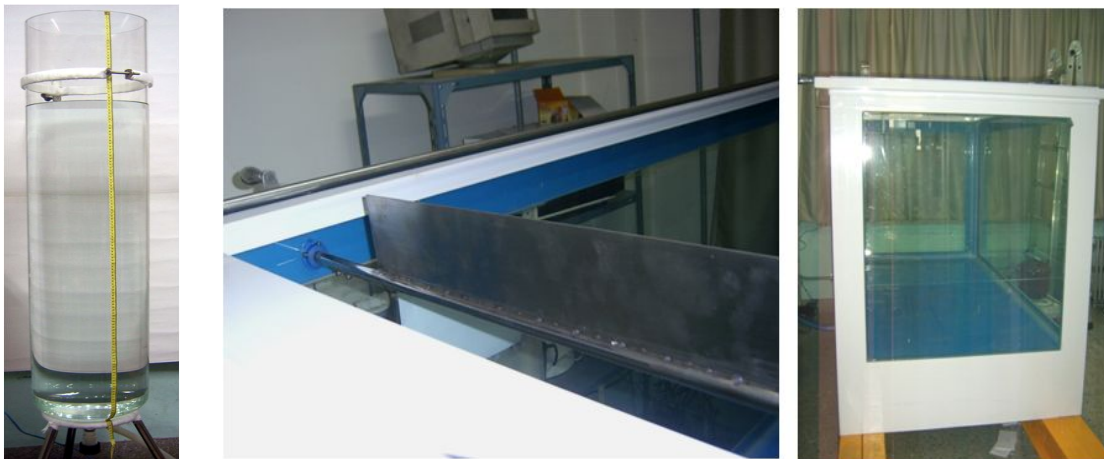


그림 3-4. 실험에 사용한 유리켈럽과 수조.

표 3-1. 사용한 입자의 형태 및 무게

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|----------|----------|----------|----------|-----------|-------------|--------------|----------|
| 직선형 | 형태 | O | OO | OOO | OOOO | OOOOO | OOOOO OO | OOOOOO OO | |
| | 무게 | 0.1145 g | 0.2287 g | 0.3450 g | 0.4648 g | 0.5975 g | 0.8384 g | 0.9460 g | |
| | 표현형 | 1 | 2-L | 3-L | 4-L | 5-L | 7-L | 8-L | |
| 평면형 | 형태 | O | OO | O OO | OO OO | OO OOO | OO OOO | | |
| | 무게 | 0.1153g | 0.2287g | 0.3500g | 0.4798g | 0.5852g | 0.5869g | | |
| | 표현형 | | 2-P | 3-P | 4-P | 5-Pi | 5-Pc | | |
| 구형 | 형태 | O | | | 4개 | 5개 | 7개 | 8개 | 13개 |
| | 무게 | 0.1150 g | | | 0.4823 g | 0.5964 g | 0.8602 g | 0.9527 g | 1.7515 g |
| | 표현형 | | | | 4-S | 5-S | 7-S | 8-S | 13-S |

(2) 입자의 침강속도 해석

(가) 염분농도, 입자형태에 따른 침강속도

본 연구에서 사용한 각 입자의 형태와 무게는 표1에 보여주고 있다. 각 형태의 입자는 HiPS 입자를 순간접착제로 접착한 후 락커로 염색하여 사용하였다. 입자(직선형, 평면형, 구형)가 정류상태의 유리컬럼에서 염분농도를 1%, 2%, 3.5%로 하였을 때 123 cm 침강할 때 걸리는 시간을 측정하였다. 각 입자의 침강시간은 4회 동일 반복하여 실험한 평균치이다.

가. 직선형 (Linear form)

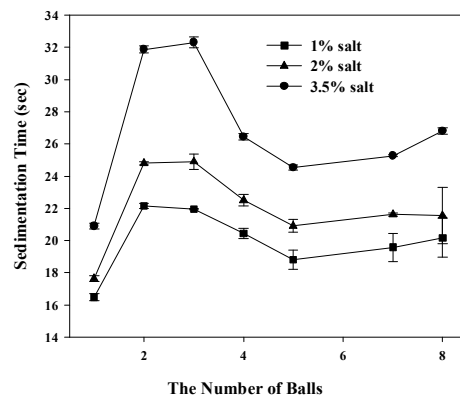
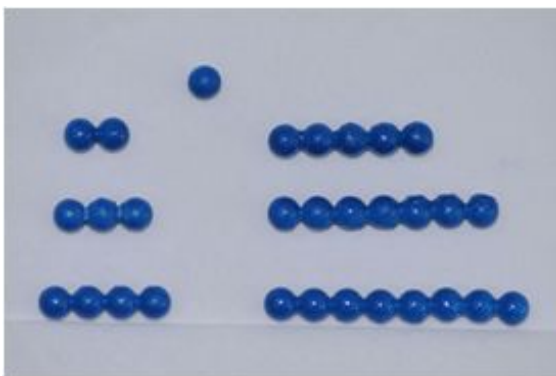


그림 3-5. 직선형 입자의 모형과 침강시간.

입자의 개수가 1개 일때 가장 빠른 속도로 침강하였고, 입자가 2개, 3개일 때 입자의 침강시간은 비교적 길게 나타났으며, 입자의 개수가 4개~8개일 때는 거의 비슷한 속도로 침강하였다.

나. 평면형 (Plane form)

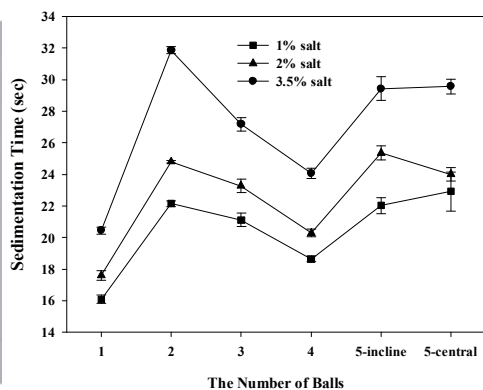
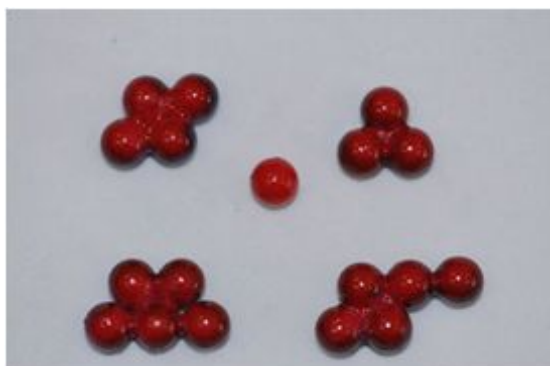


그림 3-6. 평면형 입자와 침강시간

입자의 개수가 4개 일 때 침강속도가 제일 빨랐고, 그 외 2개 이상의 입자는 비슷한 속도로 침강하였다.

다. 구형 (Spherical form)

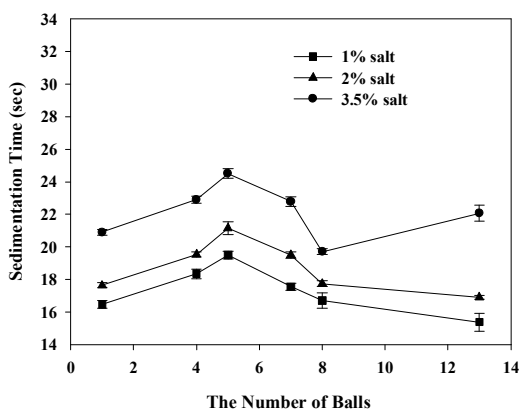


그림 3-7. 구형입자와 침강시간.

구형입자는 직선형과 평면형 입자에 비해 모두 빠른 침강속도를 나타내었으며, 그 중에서 5개로 구성된 구형 입자가 약간 느린 침강속도를 보여주었다. 그 이유는 구의 형태에서 가장 왜곡된 형태를 갖고 있기 때문이다.

라. 입자개수별

염분농도가 높을수록 입자의 침강속도가 낮았다. 입자 4개로 구성된 직선형, 판형, 구형 입자들의 침강속도를 비교해 본 결과, 직선형보다는 판형, 판형보다는 구형의 침강속도가 빨랐다. 이는 구형 입자인 경우 입자 침강시 받는 항력을 가장 적게 받기 때문이다. 입자

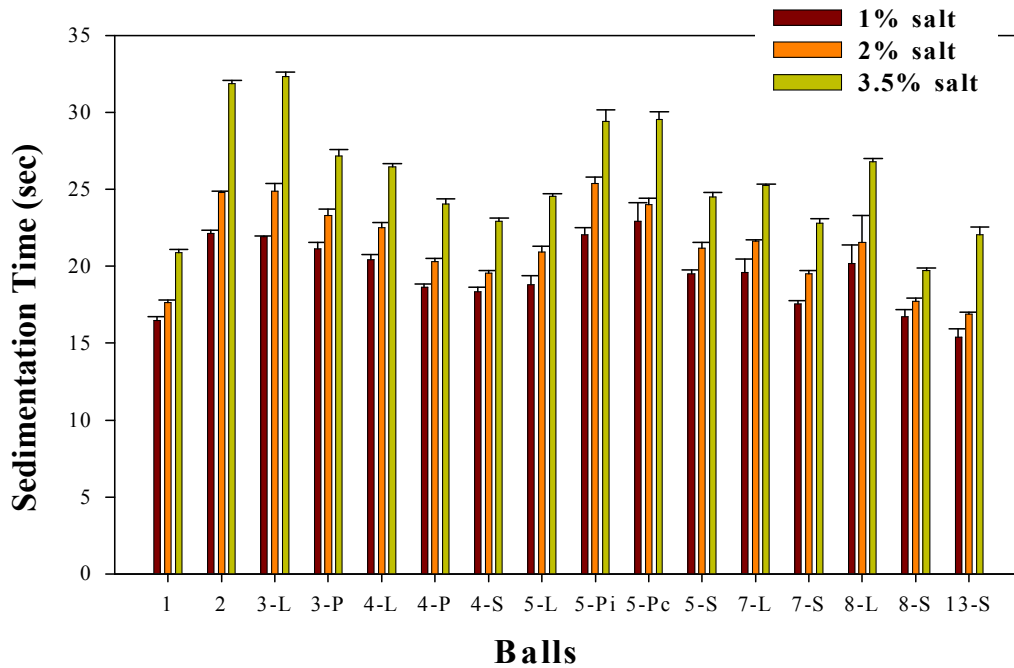


그림 3-8. 입자의 개수별 침강시간.

5개로 구성된 판형은 직선형 및 구형보다 가장 느리게 침강하였다. 이는 입자의 침강 수직 단면적이 가장 크기 때문이다.

(나) 유리컬럼에서 입자의 침강속도
가. 해수의 밀도와 점성계수

표 3-2. 해수의 염분에 대한 밀도와 단위중량 (17.5℃)

| 염분(%) | 밀도(kg/m ³) | 단위중량 (N/m ³) |
|-------|------------------------|--------------------------|
| 24.95 | 1018 | 9983 |
| 29.99 | 1022 | 10023 |
| 35.05 | 1025 | 10052 |

표 3-3. 담수와 해수의 점성계수

| | 점성계수 μ (g/s cm) | 점성계수 μ (kg/s m) |
|---------|------------------------|------------------------|
| 담수 | 1.005×10^{-2} | 1.005×10^{-3} |
| 해수 3.5% | 1.092×10^{-2} | 1.092×10^{-3} |

염분에 대한 밀도 증가율 : $(1025-1018)\text{kg/m}^3/(35.05-24.95)\% = 7/10.1 = 0.6931 \text{ kg/m}^3/\%$

ρ (염분 1%) : $1025-(35-10)\% * 0.6931 \text{ kg/m}^3 = 1007.7 \text{ kg/m}^3$

ρ (염분 2%) : $1025-(35-20)\% * 0.6931 \text{ kg/m}^3 = 1014.6 \text{ kg/m}^3$

염분에 대한 점성 증가율: $[(1.092 \times 10^{-3}) - (1.005 \times 10^{-3})] / (35\% - 0) = 2.486 \times 10^{-6} \text{ kg/s} \cdot \text{m}/\%$

μ (해수 1%): $1.092 \times 10^{-3} - 2.486 \times 10^{-6} \times (35\% - 10\%) = 1.030 \times 10^{-3} \text{ kg/s} \cdot \text{m}$

μ (해수 2%): $1.092 \times 10^{-3} - 2.486 \times 10^{-6} \times (35\% - 20\%) = 1.055 \times 10^{-3} \text{ kg/s} \cdot \text{m}$

나. Stoke식 :

$$V_s = \frac{g(\rho_s - \rho)d^2}{18\mu}$$

V_s : 침강속도 (m/s), g : 중력가속도 (m/s^2)
 ρ_s : 입자의 밀도 (kg/m^3), ρ : 유체의 밀도 (kg/m^3)
 d : 입자의 직경 (m)

다. 유리컬럼에서 입자의 실제 침강속도의 측정

실제 침강속도의 측정은 유리컬럼의 침강깊이 123 cm까지 떨어질 때의 시간을 측정하여 계산하였다.

라. 유리컬럼에서 입자의 실제 침강속도와 Stoke식에 의한 침강속도의 비교

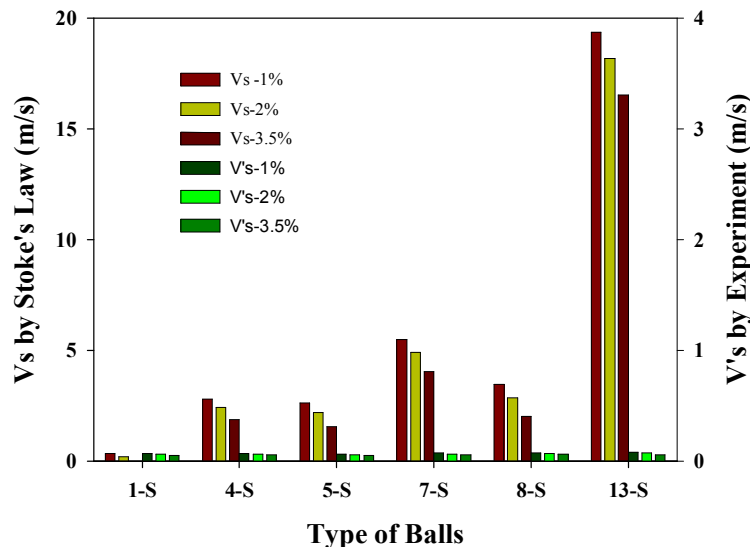


그림 3-9. 입자의 종류에 따른 침강속도.

V_s : Stoke 식에 의한 입자의 침강속도; $V's$: 입자의 실제 침강속도

Stoke 식에 의한 입자의 침강속도와 입자의 실제 침강속도는 입자 하나(1-S)에서는 비슷한 값을 나타내었다. 입자가 많아진 경우, 구형입자의 체적으로 가정 한 입자를 Stoke 법칙에 적용한 결과 입자 개수가 많아질수록 더욱 큰 왜곡도를 나타내었다. 이는 입자가 구형입자 한 개로 가정한 경우 밀도는 단입자와 같

지만 입자직경이 커져서 이론적 침강속도가 큰 값으로 나타나지만, 실제 입자들은 침강단면이 커져서 항력이 크게 작용하여 실제 침강속도가 낮게 측정되었다. 그래서 입자 개수가 많아짐에 따라 점차 커져 큰 왜곡도를 나타낸 것으로 사료된다.

마. 수조내 36 segment의 유체흐름

아래 그림에 보이고 있는 것처럼 수조의 영역을 폭 120 cm를 3등분(25 cm, 60 cm, 95 cm)하고 수조 길이 방향은 파도 발생기로부터 15, 35, 55 inch 즉 38, 89, 140 cm 떨어진 곳에서 각 포인트에서 수심 5, 30, 60, 90 cm segment로 나누어 각 유속을 유속계(AEM1-D, Alec electronic Co., Japan)로 측정하였다. 수조내에 총 segment 수는 36개이며, 그래프에 각 segment에서의 유체의 흐름방향과 유속을 보여주고 있다. 빨간색은 파도발생기의 유체흐름과 같은 정방향이며, 하부의 푸른색은 역방향의 흐름과 유속을 보여주고 있다. 이때 수조의 수온은 17.5℃, 염분 농도는 3.5%, 파도속도는 23 rpm 이었다.

수심 60 cm까지는 정방향의 흐름을 보이고 있으며, 수심이 깊어질수록 유속이 작아졌다. 수조 반대편의 벽면의 영향으로 반사된 유체의 흐름은 수심이 깊을수록 역방향의 속도가 크게 나타났다. 상부 표면에서의 흐름은 중앙부가 가장 빠른 유속을 보이고 있고, 길이방향 89 cm 영역의 경우 양 side 부분의 속도는 중앙부분의 약 25% 정도의 유속을 보였다.

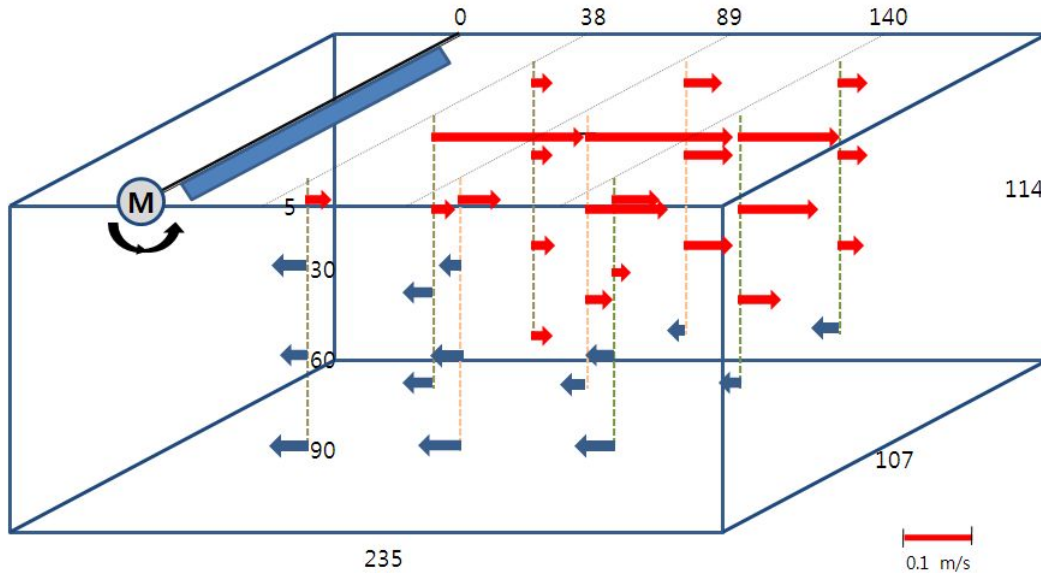


그림 3-10. 수조내 유체 흐름.

바. 파도세기에 따른 단입자의 침강속도

수조에서 파도의 세기를 18, 23, 28, 33, 36 rpm으로 달리하여 파도발생기로부터 15 inch 떨어진 곳에서 입자를 침강시켜 수조의 밑바닥까지 침강할 때 걸리는 시간을 측정하여 입자의 침강속도를 계산하였다. 3~5회의 동일 실험의 평균치를

아래 그래프에 보이고 있다. 전체적으로 파도세기에 따른 입자의 침강속도는 큰 차이는 보이고 있지 않다. 한편, 인공파도에 의한 유체 흐름의 영향을 가장 많이 받는 파도의 세기는 28 rpm 이었고, 비교적 난류가 심한 33 rpm에서 입자의 침강속도가 빠른 이유는 하강부 유체의 흐름을 많이 받았기 때문이다.

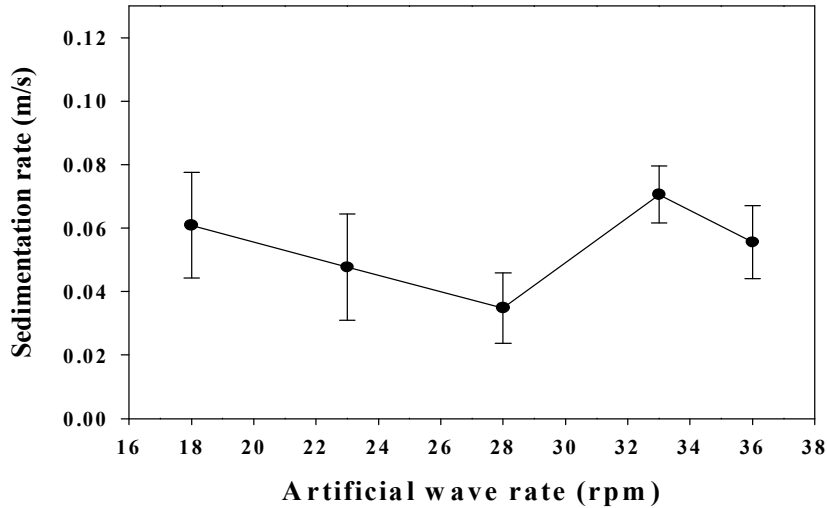


그림 3-11. 파도세기에 따른 침강속도.

사. 파도조건 23 rpm에서의 입자의 침강속도 이론적 해석

* 유체의 Re 수 측정 : $Re = \frac{D_{eq} V \rho}{\mu}$

유동하는 유체속에서 입자의 침강속도를 해석하기 위해서, Re 수를 먼저 구한 다음 항력계수를 구하여 구형 입자를 가정한 침강법칙에 적용하여 이론적 침강속도를 해석하고자 한다. 본 연구에서는 관형 흐름에서 관형내부 유체라 가정하고 Re 수를 구하였다. Re 수를 구하기 위해서 파도 발생부에서 균일하게 발생하는 유체의 평형직경(D_{eq})을 아래에 표시한 방법에 의거, 4각형의 유체 통과단면적을 가정하여 단면적을 구하고 유체 통과부분의 단면길이를 계산한다. 그리고 아래와 같이 수리반경을 구한 다음 수리반경의 4배의 값을 유동 유체의 평형직경으로 한다.

침강속도는 난류의 정도를 나타내는 Re 수가 수조 segment 마다 다르므로, 입자의 공동 침강궤도 부분에 유체의 유속을 이용한다. 공동 침강궤도의 유속은 파도발생기로부터 수평거리 35 inch 중앙부 수심 5 cm와 30 cm의 평균치를 적용하고, 55 inch 영역의 값은 수심 30 cm와 60 cm의 평균값을 적용하였다.

$$\begin{aligned}
S &= 30 \text{ cm} \times 15 \text{ cm} = 450 \text{ cm}^2 && (S : \text{유체 통과 단면적}) \\
L_p &= (30 + 15) \text{ cm} \times 2 = 90 \text{ cm} && (L_p : \text{유체 통과부분의 단면길이}) \\
r_H &= S/L_p = 450 \text{ cm}^2/90 \text{ cm} = 5 \text{ cm} && (r_H : \text{수리반경}) \\
D_{eq} &= 4 \times r_H = 4 \times 5 \text{ cm} = 20 \text{ cm} = 0.2 \text{ m} && (D_{eq} : \text{평형직경})
\end{aligned}$$

다합체 입자의 침강속도를 이론적으로 해석하기 위하여, 다합체를 하나의 구형 입자로 가정하여 그 직경을 다음과 같이 구하였다.

$$* \text{ 다합체 구형 가정입자의 직경 } (D') : n \frac{\pi}{6} D^3 = \frac{\pi}{6} D'^3 \Rightarrow D' = n^{\frac{1}{3}} D$$

$$\begin{aligned}
\blacklozenge V_1 \text{ (35 inch에서의 평균유속)} &= (V_{5\text{cm}} + V_{30\text{cm}})/2 = 0.1595 \text{ m/s} \quad (\text{at } 23 \text{ rpm}) \\
\blacklozenge V_2 \text{ (55 inch에서의 평균유속)} &= (V_{30\text{cm}} + V_{60\text{cm}})/2 = 0.0800 \text{ m/s} \quad (\text{at } 23 \text{ rpm})
\end{aligned}$$

$$\text{침강궤도 유체의 } Re = \frac{D_{eq} V \rho}{\mu} = \frac{0.2\text{m} \times V \times 1025 \text{ kg/m}^3}{1.092 \times 10^{-3} \text{ kg/s-m}}$$

(*Re*: Reynolds 수, *V*: 유체의 유속, μ : 유체의 점성계수)

$$\therefore Re_1 \text{ (35 inch)} = 29943$$

$$Re_2 \text{ (55 inch)} = 15018$$

입자의 침강속도 해석에 단일 *Re*수를 적용하기 위해, 35 inch 영역과 55 inch 영역의 평균치를 적용하였다.

$$\therefore Re' = (Re_1 + Re_2)/2 = (29943 + 15018)/2 = 22481$$

*Re*수에 따라서 입자의 침강속도 해석에 이용되는 식은 다음과 같다.

$$\blacklozenge \text{ Stoke 식 : } Re < 0.5 \text{ 또는 } < 1 \text{ 일 때 ; } V_s = \frac{g(\rho_s - \rho) d^2}{18\mu}$$

$$\blacklozenge \text{ Allen 식 : } 1 < Re < 1000, C_D = 12.65/Re^{0.5} ; V_s = \left(\frac{g}{18} \frac{\rho_s - \rho}{\rho} \right)^{0.667} \nu^{-0.333} d$$

(ν : 동점성계수)

$$\blacklozenge \text{ Newton 식 : } 1000 < Re < 250000, C_D = 0.4 ; V_s = \sqrt{3.33g \left(\frac{\rho_s - \rho}{\rho} \right) d}$$

$$\bullet Re = 0.5 \sim 10^4 \text{ 일 때, } C_D = \frac{24}{Re} + \frac{3}{\sqrt{Re}} + 0.34$$

$$\bullet Re < 0.5 \text{ 일 때, } C_D = \frac{24}{Re}, (C_D : \text{Newton의 저항계수})$$

$$\bullet Re > 10^4 \text{ 일 때, } C_D = 0.4$$

∴ $1000 < Re = 22481 < 250000$, $C_D = 0.4$
 ∴ 항력계수는 C_D 는 0.4를 적용하였다.

$$V_s = \sqrt{3.33g \left(\frac{\rho_s - \rho}{\rho} \right) d} = \sqrt{3.33 \times 9.8 \text{ m/s}^2 \times \frac{1025.66 - 1025}{1025} \times d} = \sqrt{0.021 d}$$

여기에서 d 는 단일 구형 입자로 가정한 다양한 형태 입자의 직경이다. Newton 법칙에 의한 침강속도와 실제 침강속도를 비교한 결과, Newton 법칙에 의한 침강속도가 실제 침강속도보다 약 10배 정도 큰 값을 나타내었다. 이 결과는 층류상태의 유리컬럼에서 해석한 값과 유사한 경향을 보였다.

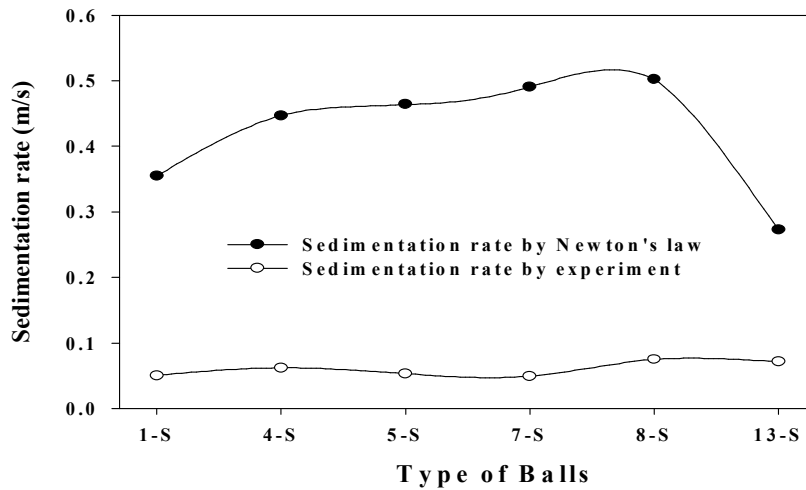


그림 3-12. 입자의 종류에 따른 침강속도 해석.

아. 파도발생시 입자의 침강궤적

수조에서 입자 하나를 파도발생기로부터 20 inch 떨어진 곳에서 침강시켜 수조의 밑바닥까지 침강할 때 걸리는 시간 13.97초 동안 사진촬영하여 그 궤적을 그래프로 나타내었다. 이때 파도의 세기는 18 rpm 이었다. 입자는 유체의 흐름과 유사하게 포물선 형태를 그리며 침강하는 모습을 보였다.

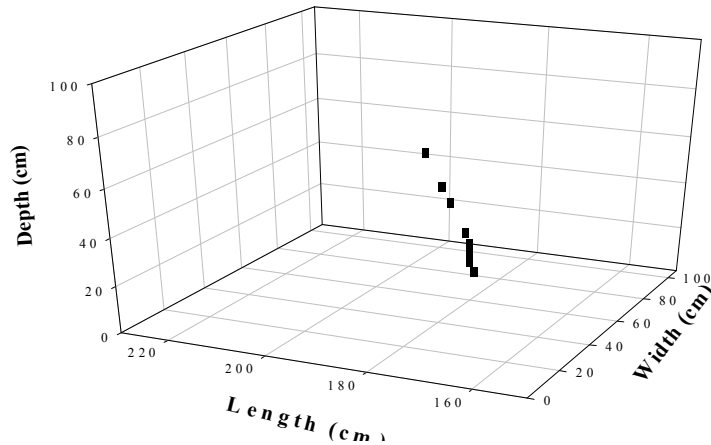


그림 3-13. 파도발생시 입자의 침강궤적.

자. 나노입자의 해수중 분포수심, 최적 밀도 및 크기 제안

- 적조때 수심 : 20 m 까지
- 침강깊이 : 20 m
- 체류시간 : 14 일
- 침강속도 = 1.653×10^{-5} m/s

| | Stoke 식 | Allen 식 | Newton 식 |
|---|--|--|--|
| 밀도 1.050 g/cm^3 으로 가정할 때 입자의 최적 크기는 ? | $d = 3.640 \times 10^{-5} \text{ m}$ = $36.4 \mu\text{m}$ | $d = 3.704 \times 10^{-6} \text{ m}$ = $3.70 \mu\text{m}$ | $d = 3.433 \times 10^{-10} \text{ m}$ = 34.3 nm |
| 입자의 크기가 100 nm 로 가정할 때 입자의 최적밀도는? | $\rho_s = 1.025 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ | $\rho_s = 1.528 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ | $\rho_s = 1.0251 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ |

(다) 결론

- 입자 해석용 유리컬럼 (재질: 원통형 유리, H: 130 cm, D: 30 cm) 및 수조 (재질: 강화유리, L: 240 cm, W: 120 cm, H: 120 cm)를 제작하였다.
- 층류상태에서 입자의 침강속도 해석: 유리컬럼에서 Stoke 법칙에 의한 입자의 이론적 침강속도를 실제 침강속도와 비교해본 결과, 입자가 하나 일 때 비교적 비슷한 결과를 보였고, 단일 구형 가정입자의 이론적 침강속도에 비해 응집성 입자의 실제 침강속도는 입자 개수가 많아질수록 침강 수직 단면적의 항력이 커져서 이론치보다 훨씬 낮은 침강속도를 보여 입자 형태에 따른 침강속도의 왜곡도가 아주 큼을 알 수 있다. 형태별 침강속도는 단일 입자 4개를 응집시킨 경우 선형, 판형, 구형 순으로 침강속도가 빨랐다.
- 수조에서 입자의 거동해석 : 수조내의 36개 수체 segment별 속도크기 및 방

향성분을 조사하여 폐쇄 수역의 유체의 유동을 해석하는데 기초자료를 확보하였다. 파도가 있을 때 입자는 포물선 모양으로 침강하는 궤적을 보였으며, 하나의 구형 입자를 가정한 Newton 법칙에 의한 입자의 이론적 침강속도는 실제 다양한 형태 입자의 침강속도보다 10배 정도의 큰 침강속도를 보였다. 응집입자의 형태에 따른 침강속도의 왜곡도가 층류상태에서 얻어진 경향과 비슷하나, 난류의 영향 때문에 층류에 비해 침강속도 왜곡도가 약간 낮았다.

(3) 노출 평가 대상 생물종 및 특징

- 본 실험에서 선택된 시험생물 4종은 해양생태계의 기초 생산자인 식물플랑크톤 (*Skeletonema costatum*) 1종, 이차소비자인 어류 2종 (넙치 *Paralichthys olivaceus*, 황복 *Takifugu obscurus*), 생산자인 해조류(파래) 1종을 택하여 독성 노출평가를 실시하였다. 국내 생물인 녹조구멍갈파래(*Ulva pertusa Kjellman*)를 이용한 생태 독성 평가 기술은 ISO 국제표준(2009)으로 채택되어, 환경부가 표준 생태독성 공정시험법으로 제정한 물벼룩(*Daphnia magna*)을 이용한 24시간 급성독성 시험법 단점을 보완할 것으로 사료된다. 파래는 분포의 광역성, 채집의 용이성, 배양보관의 간편성, 독성반응의 민감성 등이 충족되어 이상적인 생물종으로 사료되며, 담수와 해양수 모두사용이 가능하다는 장점을 가지고 있으므로, 독성평가에 유용한 대상종으로 사료된다.

(가) 식물 플랑크톤 (*Skeletonema costatum*)

해산규조류 해양생태계의 기초 생산자인 식물플랑크톤의 대표 종으로써 생태독성평가에 널리 실시되고 있으며, 경기만을 비롯하여 우리나라 서남해안의 내만에 많이 분포하고 있다.

가. 식물성플랑크톤(*Skeletonema costatum*)을 이용한 급성독성평가

① 대상 생물의 배양 조건 및 배지

본 실험에 사용한 한국해양미세조류은행에서 분양받아 배양기(DAIHAN LABTECH Co., LTD)에 배양하였으며, 식물 플랑크톤(*S. costatum*)의 배양환경은 20°C, 습도 80%, Light:Dark=12:12(hr)이며, 조도 1500 lux 이다. 배지는 f/2배지를 제조하여 멸균한 후 사용하였으며, 이외의 모든 실험기구들을 멸균하여 실험을 실시하였다.

② Chlorophyll a 측정 방법

우선, 500 ml mass flask 에 f/2배지 200 ml 와 조류배양액 50 ml 를 넣고 배양하였으며, sampling은 식물플랑크톤(*S. costatum*) 10 ml 와 neutral formalin 10 ml 를 centrifuge tube 에 혼합하여 고정시킨 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 10 ml acetone (90%)을 넣어 24시간 실온 보관하였다. 실온 보관된 tube를 UV로 665 nm, 645 nm, 630 nm 색소의 흡광도

를 각각 측정하여 Parsons and Strickland (1968)의 방법으로 chlorophyll a 를 구하여 각각의 농도에 대하여 신개발 살조제 TD53의 급성독성평가를 평가하였다.

③ TD53의 처리 농도

TD53의 농도는 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 uM으로 하여 실험을 실시하였으며, 용매인 DMSO를 control로 하여 독성평가 실험을 실시하였다.

(나) 어류

가. 넙치 치어(*Paralichthys olivaceus*) 급성 독성평가

① 재료 및 사육환경

본 연구에 사용된 넙치 치어(*Paralichthys olivaceus*), 황복 치어(*Takifugu obscurus*)는 목포 갈릴리수산에서 분양하여 사용하였다.

넙치치어(*Paralichthys olivaceus*)의 크기는 25~40 mm 고 중량은 0.7 ± 0.3 g 이며, 넙치치어의 사육 환경은 온도 21~23°C, 사료양은 어체중(습중량)의 5%로 2회에 걸쳐서 나누어 공급하였고, 광주기는 12시간 조명, 12시간 무조명을 유지하였다. 해수는 해수염(TetraMarine salt pro, United Pet Group. Inc)을 구입하여 증류수 1 L 당 33 g을 넣어 제조하여 사용하였다.

② 어류 급성독성평가 실험 조건

해수는 한 수조에 5 L씩 사용하였으며, 실험 시 사용 된 개체 수는 한 수조에 20마리, 특정농도에 3개의 수조를 설치하여 신개발 살조제 TD53의 어류 급성 독성평가를 실시하였다.

③ TD53의 처리 농도

TD53의 농도는 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.5 uM으로 하여 실험을 실시하였다. 또한 용매 DMSO의 독성을 평가하기 위해 각 농도에 DMSO를 control로 하여 TD53의 급성 독성을 평가하였다.

나. 황복 치어(*Takifugu obscurus*) 급성 독성평가

① 재료 및 사육조건

황복 치어(*T. obscurus*)의 크기는 40~60 mm이며, 중량은 2.8 ± 0.3 g 으로 21~23°C에서 사육했으며, 사료양은 0.2 ± 0.04 g/day로 2회에 걸쳐 공급하였다. 광주기는 Light:Dark=12:12 hr로 유지하여 사용하였으며, 해수는 위에 언급된 바와 같이 해수염으로 제조하여 사용하였다.

② 어류 급성독성평가 실험 조건

해수는 한 수조에 5 L씩 사용하였으며, 실험 시 사용 된 개체 수는 한 수조에

5마리, 특정농도에 3개의 수조를 설치하여 신개발 살조제인 TD53의 어류 급성 독성평가를 실시하였다.

③ TD53의 처리 농도

TD53의 농도는 1.0, 2.0, 3.0 μM 로 하여 실시하였으며, 각 농도에 DMSO를 control로 하여 TD53의 급성 독성을 평가하였다.

다. 녹조구멍갈파래(*Ulva pertusa* Kjellman)

- 본 시험에 사용한 녹조구멍갈파래(*Ulva pertusa* Kjellman)는 접근이 쉬운 조건대에 서식하고 군집을 이루고 있어 채집이 용이하며, 풍부한 시료획득이 가능하다. 실험실내에서의 배양 및 조작이 용이하여 다양한 환경 요인에 대한 생이 반응 연구에 편리한 종이라고 할 수 있다. 엽체는 단독 또는 2~3개체씩 뭉쳐서 자라고, 체장은 10~30 cm 에 이르고, 엽면에는 동형 또는 불규칙한 구멍이 있다. 구멍갈파래는 성숙하면 72~96시간 후에 엽체 가장자리 부위가 황색, 갈색, 흰색을 띠며 생식세포가 형성 및 방출되는데 이러한 특징을 이용하여 구멍갈파래의 엽체를 다양한 농도의 시험 물질에 노출시킨 후, 포자가 형성되는 면적을 백분율로 산정하여 유해물질의 독성을 평가 할 수 있다.

① 구멍갈파래를 이용한 해양생태 급성독성평가 방법

가) 신규 살조물질의 준비

신규로 합성한 TD53과 TD49를 조선대학교 조훈교수로부터 제공받아 사용하였다. TD53과 TD49의 처리농도별 희석수는 Coralife[®]배양용액이 사용되었는데 Corali-fe[®]배양용액 조제는 Coralife[®] 35 g을 1 L의 증류수에 넣고 5 ml의 K_2HPO_4 (20 mM)와 1 ml의 KNO_3 (1 M)을 첨가하여 사용하였다.

나) 구멍갈파래를 이용한 급성독성평가 방법

구멍갈파래를 이용한 시험방법은 ISO 국제표준(2009)으로 리트머스식 시험기법처럼 진단키트를 이용해 파래 잎의 색상 변화 면적에 따라 독성여부를 알 수 있다. 본 시험생물인 *Ulva pertusa* Kjellman는 우리나라 동서남해안에 분포하는 대표적 해조류로서 채집이 쉽고 실험실에서 2~3개월 정도 보관 배양이 가능하며, 포자형성률, 발아율, 성장률, 광합성률, 호흡률 등의 여러 가지 다양한 측정 요소를 end point로 선정할 수 있는 장점이 있다. 특히, 독성물질에 대한 해조류의 반응은 생식과정을 대상으로 평가할 경우 매우 민감하게 나타나는 것으로 알려져 있는데, 본 시험법에서 endpoint로 선정된 포자형성률 또한 생식과정을 대상으로 평가한 시험방법이며, 독성 민감성의 우수성이 검증된 방법이라 할 수 있다.

다) 시험생물 준비

구멍갈파래의 색깔이 녹색인 건강한 엽체(전장 10 cm 이상)를 배양기에서 꺼내어 직경 6 mm의 코르크 보어러(cork borer)로 원형절편을 뽑아냈다. 이때, 반드시 엽체의 가장자리로부터 10~20 mm 이내의 부위에서만 원형절편을 취했다.

라) 시험용액 준비

6-well cell plate에 시험용액을 농도별로 10 mL씩 분주했다. 희석 시험의 경우, 시험대상물질용액의 각 농도와 대조구로 설정했다.

마) 시험생물의 노출

원형절편을 각각의 시험구에 8엽체씩 노출시켰다. 이때, 각 시험구별로 한번에 2엽체씩 4번으로 나누어 투입했다.

바) 독성실험

배양 온도, 염분, 광조사량, 광주기 조건은 각각 15°C, 30 psu, 80~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$ 의 광량, 12:12 h 명암주기로 하였다. 시험 시 TD53의 농도는 0, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0, 10 μM 이며, 용매인 DMSO의 실험 시에도 같은 농도로 하였다. TD49의 농도는 0, 0.04, 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 μM 이며, 용매인 Solutol의 농도는 0, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0, 10 μM 으로 처리하였다. 용매 및 분산제로 사용되는 DMSO와 Solutol에 대해서도 background 독성으로서의 자체 독성을 조사하였다. 본 노출실험은 96시간 후 시험을 종료하였으며, 영상분석 장치를 이용하여 엽체 전체 면적과 포자형성 면적을 측정했다.

사) TD53과 TD49의 EC₅₀ 도출 및 통계처리

본 연구의 자료는 비모수 통계적 방법으로 모든 시험구와 대조구의 반복수가 같은 경우에 적용할 수 있는 Steel's many-one rank test를 이용하였으며 통계처리 프로그램은 TOXCALC 5.0 (Tidepool Scientific Software, USA)을 사용하여 선형내삽법(linear interpolation)으로 산출하였다.

아) NOEC와 PNEC 결과 도출

급성독성 평가결과인 NOEC (No Observation Effect Concentration; 이하 NOEC)와 EC50값으로부터 PNEC (Predicted No Effect Concentration, 이하 PNEC)를 도출한다. 이는 OECD지침에 따라 화학물질이 나타내는 독성 등에 관한 영향평가에서 제한된 독성자료만이 얻어진다면 일정평가인자 (constant assessment factor)가 생태계에 대한 PNEC를 산출하기 위해서 각 외삽단계에서 인자를 적용한다. 구멍갈파래는 1차 생산자로서 한 종에 대한 평가에 해당되므로 인자 1000을 적용하여 PNEC 값을 도출했다.

(4) 노출평가 결과

(가). 식물 플랑크톤을 이용한 급성독성평가

72 hr 후의 *S. costatum*은 신개발 살조제 TD53에 1 uM 이상부터 영향을 받는 것으로 보이며 1차(0~2 uM)에 실험한 EC₅₀ 은 1.5 uM이며, 2차 (1~3 uM)에 실험한 EC₅₀ 은 1.9 uM 이므로 TD53 의 EC₅₀ 은 1.5~1.9 uM 의 사이 값으로 추정된다. Symbol이 없는 그래프는 LC₅₀ 을 도출하기 위한 predicted 그래프이다 (그림 3-14).

DMSO 0.25%, 0.50%, 0.75%는 각각 TD53농도 1, 2, 3 uM에 포함된 DMSO 양과 같다. 72 hr 후의 *S. costatum*은 DMSO의 농도에 상관없이 비교적 일정하게 자라고 있음을 보여주고 있으므로, DMSO는 *S. costatum* 성장률에 영향을 나타내지 않는 것으로 사료된다(그림 3-15).

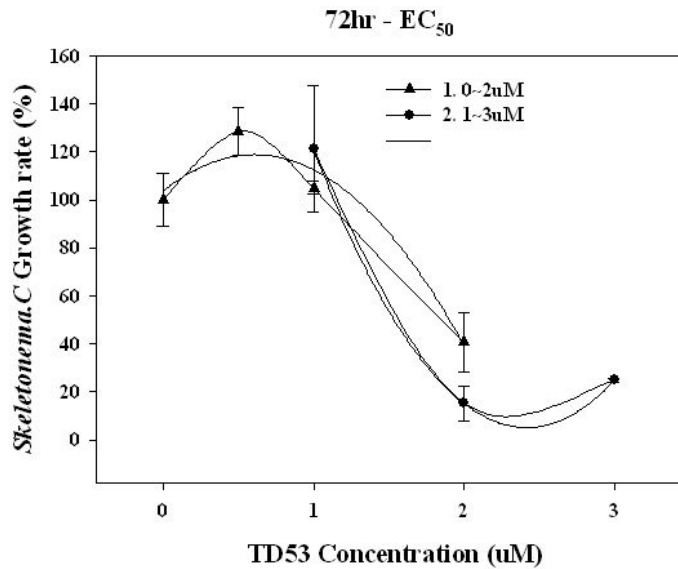
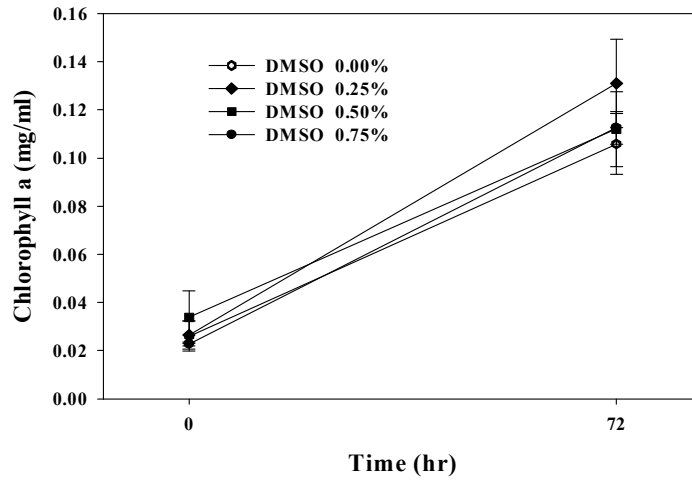


그림 3-14. TD53의 농도에 따른 *S. costatum* 성장률



3

그림 3-15. DMSO의 농도에 따른 *S. costatum* 성장영향 평가

(나) 넙치치어를 이용한 급성독성평가

72 hr 후의 LC₅₀ 은 1.19 uM이며, 각 농도의 control은 급성독성에는 영향이 없다(그림 3-16). 넙치치어(*P. olivaceus*)는 다른 종에 비해 신개발 살조제 TD53에 영향을 가장 많은 영향을 받는 것으로 사료된다.

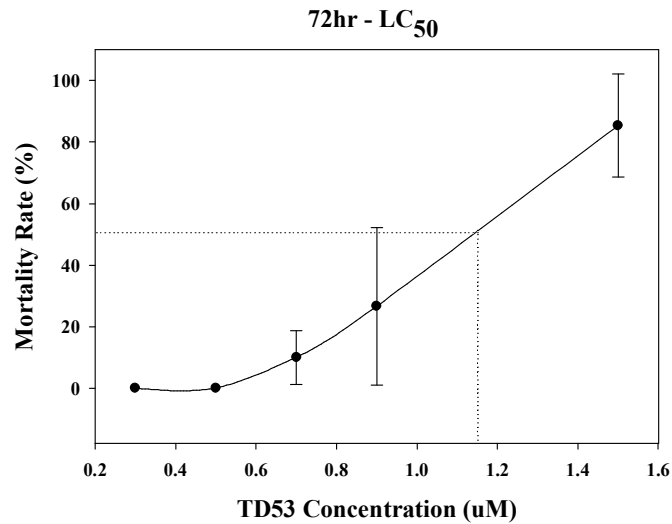


그림 3-16. TD53의 농도에 따른 넙치 치어(*Paralichthys olivaceus*)의 치사율.

(다) 황복치어를 이용한 급성독성평가

96 hr 후의 LC₅₀은 2.9 uM이며, 각 농도의 control은 급성독성에는 영향이 없다(그림 3-17). 황복 치어(*T. obscurus*)는 TD53에 대해 비교적 낮은 독성을 보였다. 그 원인은 황복치어(크기 40~60 mm, 중량 2.8±0.3 g)는 넙치치어(크기 25~40 mm, 중량 0.7±0.3 g)에 비해 크기가 커서 후보 살조물질인 TD53에 대해 낮은

독성을 나타낸 것으로 사료된다. 최종적으로, *S. costatum*, 넙치치어, 황복치어 등 3종을 이용하여 TD53에 대한 급성독성평가를 실시한 결과, LC₅₀값은 각각 1.5~1.9 uM, 1.19 uM, 2.9 uM로써 가장 민감한 종은 넙치치어인 것으로 사료된다. 넙치치어의 LC₅₀값 1.19 uM에 factor 100을 적용한 결과, PNEC는 0.01 uM 인 것으로 추정할 수 있다.

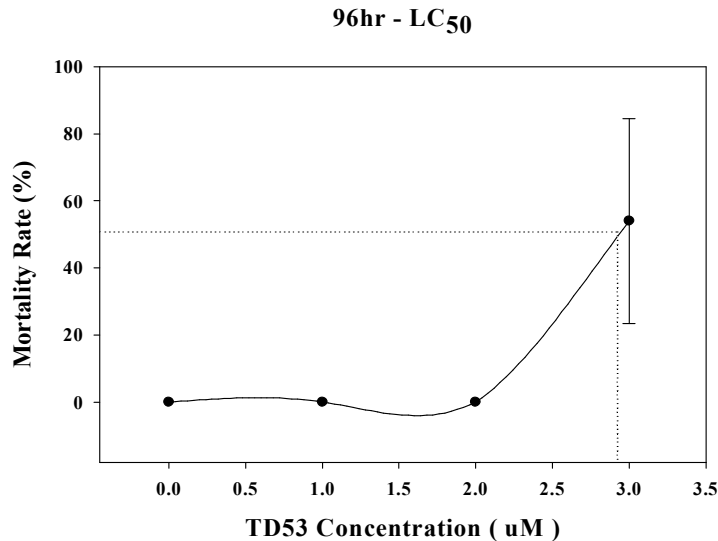


그림 3-17. TD53의 농도에 따른 황복 치어(*Takifugi obscurus*)의 치사율.

(라) 구명갈파래을 이용한 급성독성평가

- TD53에 대한 급성독성 노출평가

TD53의 처리농도는 0, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0, 10 μM로, TD53에 대한 96시간 후의 EC₅₀은 1.65 μM 이며, 95%신뢰한계는 0.93~3.01 μM 이었다(그림 3-18). 실험결과 NOEC를 산출한 결과는 0.63 μM로 나타났으며, EC₅₀값에 factor 1000을 적용하여 PNEC 1.65 nM 값을 도출하였다.

DMSO는 실험상 0.1% 이내의 함량에서 독성영향이 없는 것으로 간주되고 있다. 그래서 용매독성을 알아보기 위해, TD53 처리농도에 포함되는 농도의 범위(0~10 μM)에서 조사한 결과 DMSO는 거의 독성이 없는 것으로 나타났다(그림 3-18).

- TD49에 대한 급성독성 노출평가

TD49의 처리농도는 0, 0.04, 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 μM로, 96시간 후의 EC₅₀은 0.18 μM이며, 95% 신뢰한계는 0.12~ 0.27 μM 이었다(그림 3-19).

TD49의 분산제인 Solutol에 대해서도 그 자체의 background 독성을 조사하였다. Solutol의 조사 농도 범위를 TD49에 사용하는 농도보다 더 높은 농도(10 μM)까지 조사하였다. 96시간 후의 EC₅₀은 1.70 μM 이다. 95% 신뢰한계는 1.16~ 1.98 μM 이었다(그림 3-19).

TD49에 대한 NOEC는 0.08 μM 이며 EC_{50} 값에 factor 1000을 적용한 결과, PNEC는 0.18 nM이다. Solutol에 대한 NOEC는 1.25 μM 이며 EC_{50} 값에 factor 1000을 적용한 결과, PNEC는 1.70 nM 이다.

- TD53 와 TD49의 급성독성평가 비교

신규 살조물질의 구멍갈파래에 대한 급성독성을 조사한 결과, TD53의 EC_{50} 은 1.65 μM , NOEC는 0.63 μM , PNEC는 1.65 nM로 산출되었다. TD49의 EC_{50} 은 0.18 μM 이며, NOEC는 0.08 μM , PNEC는 0.18 nM이다(표 3-3).

- TD53과 TD49의 독성을 EC_{50} 으로 판단할 때 TD49가 TD53보다 약 9배 강한 독성을 나타낸다. 이 실험으로부터 구멍갈파래에 대한 독성을 PNEC 값에 한정해 판단 한다면, TD49에 비해 TD53이 9배 낮은 농도에서 안전하다는 것을 알 수 있었다. TD49의 파래에 대한 독성평가치인 PNEC가 0.18 nM 로 산출되어 주변 환경 생태계에 어느 정도 독성이 예측된다. 하지만 해양에서의 살포는 적조가 발생하는 1~5m수심에 해당되는 층을 주 목표로 하기 때문에 깊은 수심과 광역적인 해양을 고려할 때 파도 등의 조류에 의해 신속히 확산되기 때문에 PNEC 이상의 농도로 살포하더라도 유해적조에 대해 선택적 살조 특이성이 높다면 그다지 큰 영향이 없을 것으로 판단된다. TD53의 용매인 DMSO는 구멍갈파래에 대해서 전혀 독성을 나타내지 않았으나 TD49의 분산제로 사용된 Solutol의 EC_{50} 은 1.70 μM 로서 TD49와의 혼합 상태에 비해 10%의 독성을 보였다. 분산제의 독성은 TD49의 구멍갈파래에 대한 독성에 일정 부분 영향을 끼쳤을 것으로 사료된다. 분산제인 Solutol은 구멍갈파래에 대해서 어느 정도 독성이 나타남을 알 수 있었다. 이 결과로부터 분산제인 Solutol의 독성이 TD49의 독성의 강도를 더 높였을 것으로 사료된다. 따라서 해양생태계에 대한 독성을 줄이고 유해적조에 살조 특이성을 높이기 위해서는 TD49의 용해도 개선을 위해 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

- 본 연구에서는 새로 고안된 신규 살조제 TD53과 TD49가 수생태계에 미치는 독성영향을 평가하고자 구멍갈파래를 이용한 독성평가를 실시하였다. 신규 살조물질의 급성독성 노출평가 결과, 각각의 독성도 EC_{50} 을 비교할 때 TD49 > TD53 > Solutol (분산제) 의 순으로 TD49의 독성이 가장 높게 나타났다. NOEC 및 PNEC 농도는 Solutol > TD53 > TD49의 순으로 독성도가 낮을수록 크게 나타났다. TD49의 경우 유해적조에 선택적 살조능력이 높지만 파래에 끼치는 독성영향으로 판단할 때 주변 생태계에 대한 독성도 강하다고 판단된다. 물론 해양 조류에 의한 희석효과를 고려한다면 신규 살조물질의 살조농도가 해양생태계에 별 영향을 미치지 않을 수도 있으나, 구멍갈파래 한 종에 대한 평가만으로 수생태계에 끼치는 독성영향을 평가하기에는 다소 무리가 있다고 판단된다. 따라서 수생태 먹이사슬에 관련된 몇 종에 대한 급성독성평가가 더 진행되어야 할 것이며 현재 본 연구팀이 수행 중에 있다.

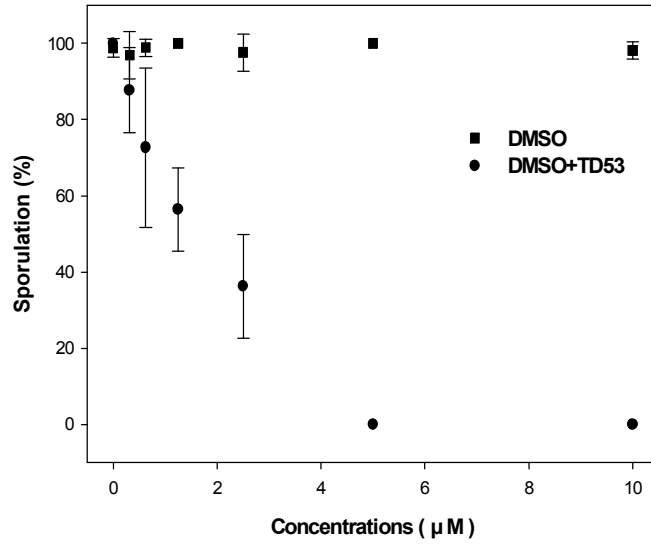


그림 3-18. Sporulation ratio of *Ulva pertusa* kjellman exposed to different concentrations of TD53+DMSO and DMSO.

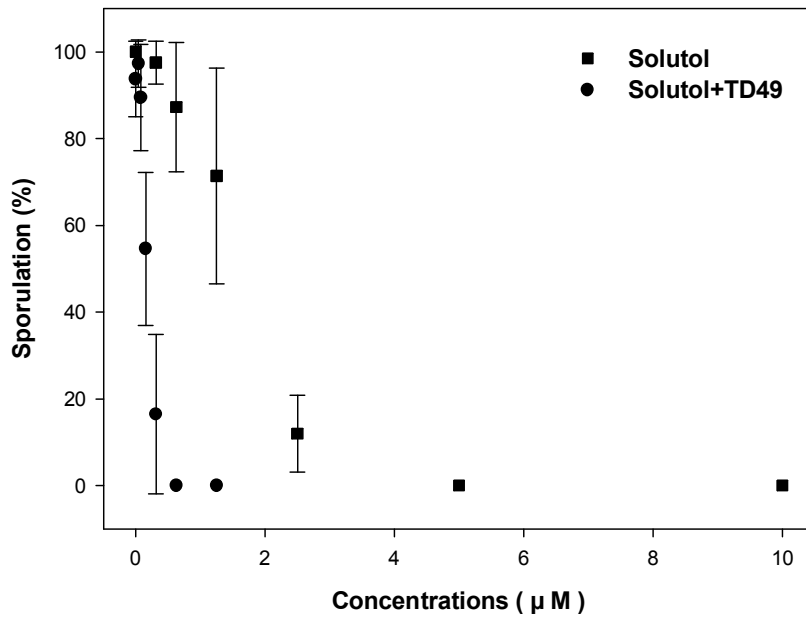


그림 3-19. Sporulation ratio of *Ulva pertusa* kjellman exposed to different concentrations of TK49+Solutol and Solutol.

표 3-3. Comparison of EC₅₀, NOECs and PNECs of TD53 and TD49 in toxic assessment using *Ulva pertusa* kjellman

| | EC ₅₀ (μ M) | NOEC ^{a)} (μ M) | Factor | PNEC ^{b)} (nM) |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------|--------|-------------------------|
| DMSO | NA ^{c)} | NA | 1000 | NA |
| TD53 +DMSO | 1.65 | 0.63 | 1000 | 1.65 |
| Solutol | 1.70 | 1.25 | 1000 | 1.70 |
| TD49 +Solutol | 0.18 | 0.08 | 1000 | 0.18 |

^{a)} NOEC : No Observed Effect Concentration

^{b)} PNEC : Predicted No Effect Concentration

^{c)} NA : Not Affected

(5) 생물 노출 독성평가

(가) 식물성플랑크톤(*Skeletonema costatum*)을 이용한 급성독성평가

가. 대상 생물의 배양 조건 및 배지

실험에 이용된 *S. costatum*은 OECD에서 지정한 대표 생물종을 대상으로 하였다. 초기 세포농도 (7.7×10^4 cells/ml), 광주기 (14L/10D), $20 \pm ^\circ\text{C}$, 습도 80%를 실험 기간 동안 유지하고 OD_{750 nm}, Chlorophyll a(Parsons and Strickland), 세포수 (혈구 계산판)를 계수한다. TD49와 그 분산제 Solutol 을 각 농도별 (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 μ M), TD53과 그 용매 DMSO를 각 농도별 (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 μ M)로 3개씩 처리하여 (n=3), EPA기준에 준하여 96시간 EC₅₀를 조사하였다. 각 농도별 희석수는 Guillard *et al.*가 제시한 실험방법에 의거 f/2배지를 이용하였다. 또한 실험 기간 동안 초기와 최종상태에서의 pH 및 온도를 모니터링하여 실험과정에서의 *S. costatum*에 대한 영향정도를 조사하였다.

(나) 물벼룩 (*Daphnia magna*)을 이용한 급성독성평가

가. 실험방법

본 연구에서는 해양성 갑각류에 대한 평가 대신에 실험실에서 사육중인 담수성 *D. magna* 에 대한 독성평가를 실시하였다. 물벼룩 (*Daphnia magna*)은 화학독성평가 연구원에서 분양받아 이용하였으며 이는 OECD에서 지정한 대표 생물종이다. 생후 1일 미만의 *D. magna*를 10마리씩 100 ml 비커에 넣고 TD49는 TD49 및 분산제(Solutol)을 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.8 μ M 각 농도를 3개씩 준비하여 노출실험을 실시하였고, TD53은 TD53 및 용매(DMSO)를 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μ M로 각 농도를 3개씩 처리한 후 24, 48시간의 생존 수를 조사하였다. 각 농도별 희석수는 Elendt and Bias, Samel *et al.*가 제시한 실험방법에 의거 M4배지를 이용하였다. 이때 움직임이 거의 없는 것도 죽은 것으로 간주한다. 실험 기간 동안 pH, 온도를 모니터링하여 다른 외적 요인을 관찰하였다.

(다) 넙치 치어 (*Paralichthys olivaceus*)를 이용한 급성독성평가

가. 실험재료 및 사육환경

실험에 이용된 넙치 치어 (*P. olivaceus*)는 전라남도 무안군 소재 육상 수조식 치어 부화장 (D수산)으로부터 분양받아 사용하였다. 넙치 치어는 평균체중 0.38 g, 평균전장 3.71 cm로 부화 된지 약 60 ~ 70일이 경과된 상태로 실험실에서 2일간 순치시킨 후 실험에 이용하였다. 넙치 치어의 사육 환경은 온도 21~23°C, 사료양은 어체중 (습중량)의 5%로 2회에 걸쳐서 나누어 공급하였고, 실험 기간 동안에는 먹이 공급을 중단하였다. 광주기는 12시간 조명, 12시간 무조명으로 실험기간 동안 유지하였다. 실험에 사용된 해수는 해수염 (TetraMarine salt pro, United Pet Group, Inc)을 구입하여 증류수 1 L당 33 g을 넣어 제조하여 사용하였다.

나. 어류 급성노출평가 실험 조건

해수는 5 L 수조에 3 L 인공해수를 사용하였으며, 실험 시 사용된 개체 수는 한 수조에 10마리, 처리농도별로 3개의 수조를 설치하여 공기를 공급하였다. 살조제 TD49 및 분산제(Solutol)에 대해서는 예비실험을 바탕으로 0.1 ~ 1.6 μM 의 범위에서 대조구를 포함하여 6개 농도구 (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 μM)를 각 3개씩 준비하였다. TD53 및 용매(DMSO)는 예비실험을 바탕으로 0.5 ~ 8.0 μM 의 범위에서 대조구를 포함하여 6개 농도구 (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μM)를 각 3개씩 준비하였다. 각 농도별 희석수는 인공해수를 이용하였다. 24시간마다 치사한 개체를 관찰하였으며, 급성독성의 결과로서 72시간 LC_{50} 은 SPSS program에 의해 통계처리 하여 산출하였다. 또한 실험 기간 동안 수조의 타 환경인자인 pH, DO, 염분도 (ATAGO, S/Mill-E, Japan)의 변화를 측정하였다.

(라) 갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*)

가. 실험방법 및 통계처리 분석

① 식물 플랑크톤 (*Skeletonema costatum*)

농도 1.6, 3.2 μM 의 TD53에서 *S. costatum*의 세포 수는 거의 사멸되어 증가하지 않았으나, 더 낮은 농도 0.2 ~ 0.8 μM 에서는 대조구와 비슷한 성장률을 보였으며 96시간에는 0.4, 0.8 μM 에서 약간 더 높은 성장률을 나타냈다. TD53의 세포수에 대한 96시간 EC_{50} 은 1.72 μM , 흡광도에 대한 96시간 EC_{50} 은 1.89 μM 로 나타났다(그림 3-18).

DMSO는 *S. costatum*에 대해서 거의 독성이 나타나지 않았다. 농도 0.4 μM 의 TD49에서 *S. costatum*의 세포 수의 증가가 상당히 억제 되는 경향을 보이나, 보다 더 낮은 농도인 0.025 ~ 0.2 μM 에서는 대조구와 비슷한 성장률을 보여 독성영향이 거의 없음을 알 수 있다. 낮은 농도의 TD49 가 *S. costatum*의 성장을 상당히 억제함을 알 수 있다. *S. costatum*에 대해서 TD49의 세포수에 대한 96시간 EC_{50} 을 도출한 결과 0.37 μM 을 나타내었다 (그림 3-18). Solutol은

*S. costatum*에 대해서 거의 독성이 나타나지 않았다.

나. 물벼룩 (*Daphnia magna*)을 이용한 급성독성평가

*D. magna*는 먹이사슬의 1차 소비자 단계이면서 어류의 먹이가 되기에 위치상 매우 중요하다. TD53의 *D. magna*에 대한 48시간에서 EC₅₀은 0.61 μM을 나타내었다. 이는 *S. costatum*에 대한 EC₅₀값인 1.53 ~ 1.89 μM보다 강한 독성값이었다. 그러나 DMSO의 경우는 동 범위 내에서 전혀 독성을 나타내지 않았다 (그림 3-19).

*D. magna*의 시간경과에 따른 생존율을 대조구와 비교하여 조사한 결과 TD49의 경우 0.8 ~ 1.6 μM에서 급격하게 저하되는 것을 알 수 있었다 (그림 3-19). 그러나 Solutol의 경우는 동 범위 내에서 거의 독성을 나타내지 않았다.

*D. magna*의 치사율을 대조구에 대한 백분율로 나타낸 결과, TD49 농도의 증가에 따라 줄어드는 것을 확인 하였으나 분산제인 Solutol의 경우에는 거의 영향이 없음을 알 수 있다 (그림 3-19). 이때에 *D. magna*의 48시간 EC₅₀은 0.68 μM을 나타내었다. 이는 *S. costatum*에 대한 EC₅₀ 값 (0.34 ~ 0.38 μM) 보다 높게 나타났기에 TD49 독성에 대해 좀 더 강함을 알 수 있었다.

다. 넙치 치어 (*Paralichthys olivaceus*)를 이용한 급성독성평가

TD53에 대한 넙치 치어의 72시간 LC₅₀은 2.14 μM로서 다른 생물종에 비해 높은 농도를 차지한다. 한편 DMSO는 다른 생물종에 대해서 전혀 독성을 나타내지 않았으나 넙치 치어에 대해서는 72시간 LC₅₀이 2.14 μM로서 TD53과 비슷한 정도의 강한 독성을 나타냈다 (그림 3-20). 자연 증발량은 수조의 놓인 위치에 따라 100 ~ 400 ml의 증발량을 나타냈으며 염분도는 8.0 μM에서 가장 높은 53‰로 일반 해수의 30‰에 비해 56.6% 높은 염분도를 나타냈다. 그림 3-20에 보이는 바와 같이, 넙치 치어 (*P. olivaceus*)에 대한 TD49의 LC₅₀은 0.582 μM로 계산되었다. 그러나 같은 농도 내에서의 Solutol의 독성은 치사율이 최대 10% 정도로 독성이 그다지 없음을 알 수 있었다. 넙치 치어의 TD49에 대한 LC₅₀ 값은 *D. magna*의 EC₅₀ 0.68 μM에 비해 보다 약간 낮아 넙치 치어가 물벼룩보다는 TD49독성에 민감하게 나타났다.

라. 구멍갈파래를 이용한 해양생태 급성독성평가 방법

① TD53에 대한 급성독성 노출평가

TD53의 처리농도는 0, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0, 10 μM로, TD53에 대한 96시간 후의 EC₅₀은 1.65 μM 이며, 95%신뢰한계는 0.93~3.01 μM 이었다(그림 3-21). 실험결과 NOEC를 산출한 결과는 0.63 μM로 나타났으며, EC₅₀값에 factor 1000을 적용하여 PNEC 1.65 nM 값을 도출하였다.

DMSO는 실험상 0.1% 이내의 함량에서 독성영향이 없는 것으로 간주되고 있다. 그래서 용매독성을 알아보기 위해, TD53 처리농도에 포함되는 농도의 범

위 (0~10 μM)에서 조사한 결과 DMSO는 거의 독성이 없는 것으로 나타났다 (그림 3-21).

② TD49에 대한 급성독성 노출평가

TD49의 처리농도는 0, 0.04, 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 μM 로, 96시간 후의 EC₅₀은 0.18 μM 이며, 95% 신뢰한계는 0.12~ 0.27 μM 이었다 (그림 3-21).

TD49의 분산제인 Solutol에 대해서도 그 자체의 background 독성을 조사하였다. Solutol의 조사 농도 범위를 TD49에 사용하는 농도보다 더 높은 농도 (10 μM) 까지 조사하였다. 96시간 후의 EC₅₀은 1.70 μM 이다. 95% 신뢰한계는 1.16~ 1.98 μM 이었다 (그림 3-22).

TD49에 대한 NOEC는 0.08 μM 이며 EC₅₀값에 factor 1000을 적용한 결과, PNEC는 0.18 nM이다. Solutol에 대한 NOEC는 1.25 μM 이며 EC₅₀값에 factor 1000을 적용한 결과, PNEC는 1.70 nM 이다.

③ TD53 와 TD49의 급성독성평가 비교

신규 살조물질의 구멍갈파래에 대한 급성독성을 조사한 결과, TD53의 EC₅₀은 1.65 μM , NOEC는 0.63 μM , PNEC는 1.65 nM로 산출되었다. TD49의 EC₅₀은 0.18 μM 이며, NOEC는 0.08 μM , PNEC는 0.18 nM이다(표 3-3).

④ 갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*)

갯지렁이 혈구세포를 이용하여 TD53, DMSO, TD49, Solutol에 대한 DNA 손상 정도를 평가하였다. TD53의 농도가 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μM 에 노출하였을 때 처리하지 않은 대조구에 비해서 높은 DNA 손상도를 나타냈다 (그림 3-23). 특히 0.001 μM 보다 0.01 μM 에서 두 배 이상의 손상을 확인 할 수 있었다. 이러한 경향은 DMSO(그림 3-24)와 TD49(그림 3-25) 및 Solutol(그림 3-26)에서도 나타났으며 갯지렁이 혈구세포의 DNA에는 화학물질이 민감하게 작용하는 것을 알 수 있었다.

⑤ NOEC, PNEC 도출 및 종합적 독성평가

TD53의 경우 3종 가운데 가장 민감하게 반응한 *D. magna*에 대한 결과로부터 NOEC를 산출한 결과 0.25 μM 로 나타났으며, EC₅₀ 0.61 μM 값에 일정평가인자 100을 적용하여 PNEC값을 도출한 결과 6.10 nM이었다(표 3-4). 또한 DMSO의 독성을 알아보기 위해 TD53과 같은 농도 구간에서 살펴본 결과 *S. costatum*과 *D. magna*에 대해서는 독성 영향이 없는 것으로 나타났다. 그러나 넙치 치어에 대해서 72시간 LC₅₀은 2.79 μM 로 높은 독성을 나타냈다. 반면 TD49의 경우 3종에 대한 급성 생물노출 독성평가 결과로부터, *S. costatum*에 대한 독성이 가장 민감하게 나타나, *S. costatum*의 독성치로부터 NOEC 값 0.20 μM 을 도출하였다. 그리고 가장 민감한 종인 *S. costatum*의 EC₅₀ 값에 불확실성 외삽 평가인자 100을 적용하여 PNEC를 계산한 결과, 3.40 nM로 예측되었다 (표 3-5). 한편, TD49의 분산제인 Solutol은 TD49 와 같은 농도 범위 내에서 전혀 독성을 나타내지 않았다.

구멍갈파래를 이용한 TD53의 96시간 EC₅₀은 1.65 μM , NOEC는 0.63 μM , 단

일종에 대한 평가이므로 EC₅₀에 일정평가인자 1000을 적용하여 PNEC는 1.65 nM이었다. TD49의 경우에는 96시간 EC₅₀은 0.18 μM, NOEC는 0.08 μM, EC₅₀에 일정평가인자 1000을 적용하여 PNEC는 0.18 nM로 나타났다(표 3-6). 다양한 생물종에 대한 PNEC예측과 단일종에 대한 PNEC 예측값을 비교하면 TD53은 3.7배, TD49는 18.9배 높게 평가된다. 이는 다양한 생물종을 대상으로 할 경우 일정평가인자가 완화되므로 PNEC값이 높아짐으로 보다 독성영향의 안정한 값을 얻을 수 있다. 본 연구를 통해 살조제에 따라 각 생물종에 반응하는 독성도가 상이함을 확인할 수 있었다. 따라서 다양한 생물종을 대상으로 할 경우 급성독성평가의 신뢰성이 더욱 향상 될 것으로 판단된다.

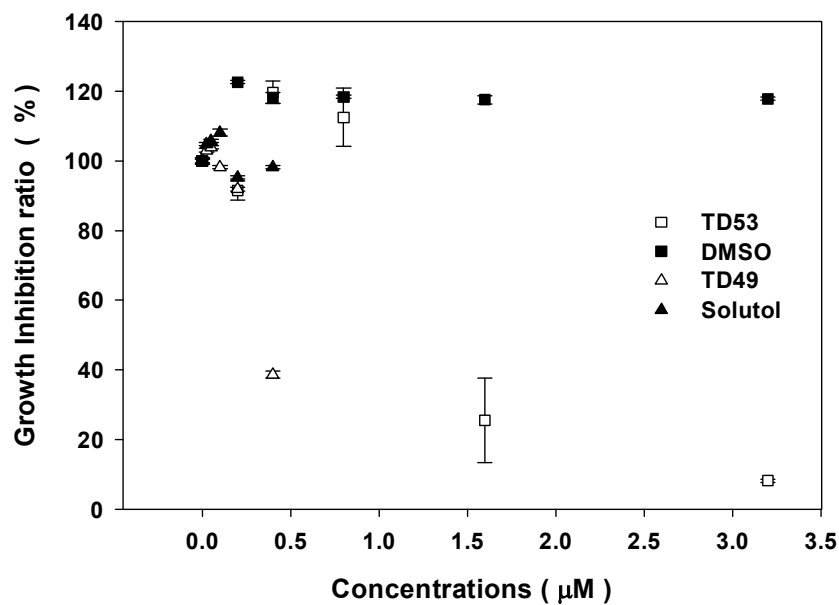


그림 3-20. EC₃₀ of TD53 and TD49 at 96-h by cell number.

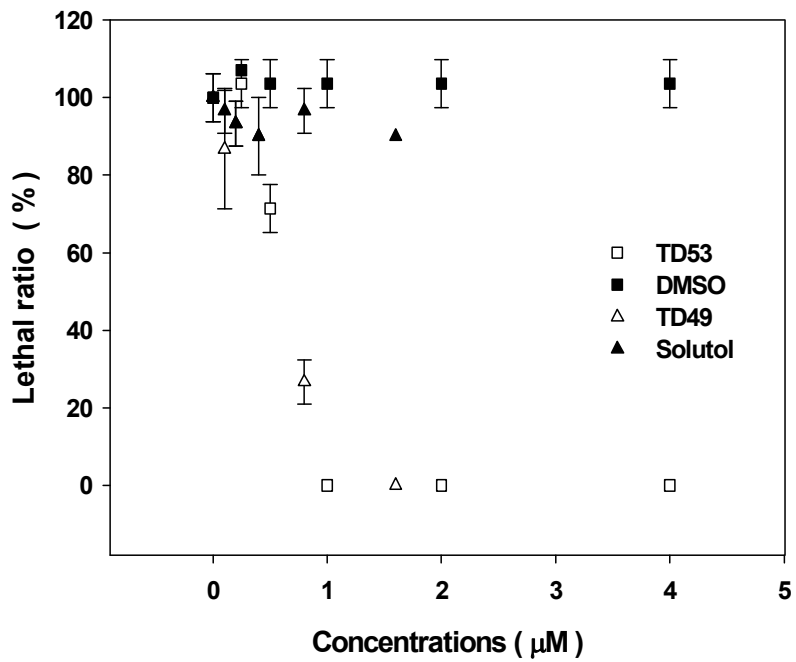


그림 3-21. Lethal ratio of *D. magna* in different concentraion of TD53 and TD49.

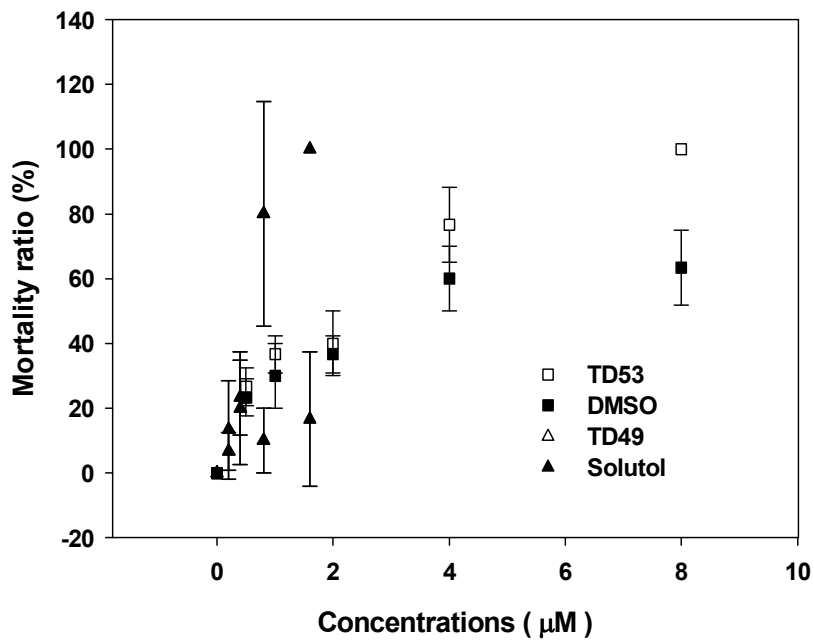


그림 3-22. Mortality ratio of *P. oliaceus* in various concentraion of TD53 and TD49 at 72-h.

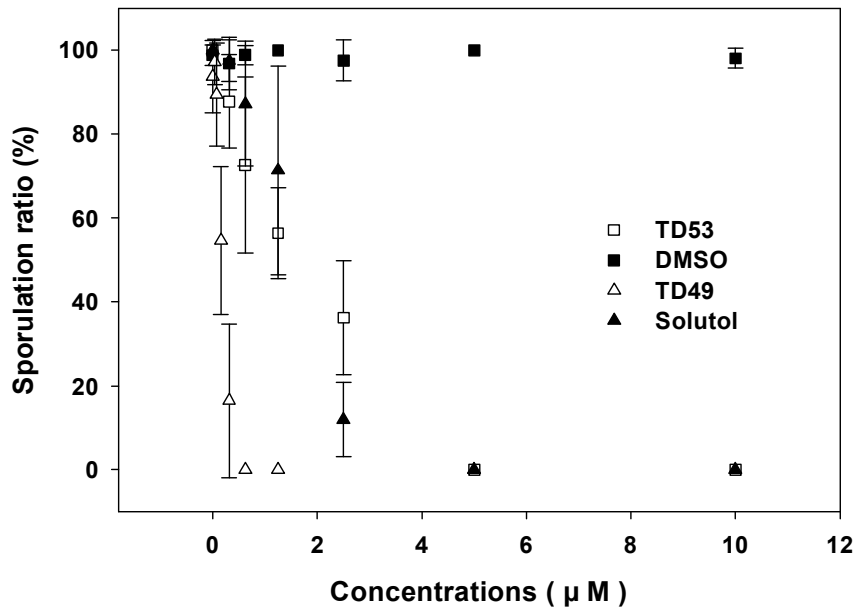


그림 3-23. Sporulation ratio of *Ulva pertusa* kjellman exposed to different concentrations of TD53 and TD49.

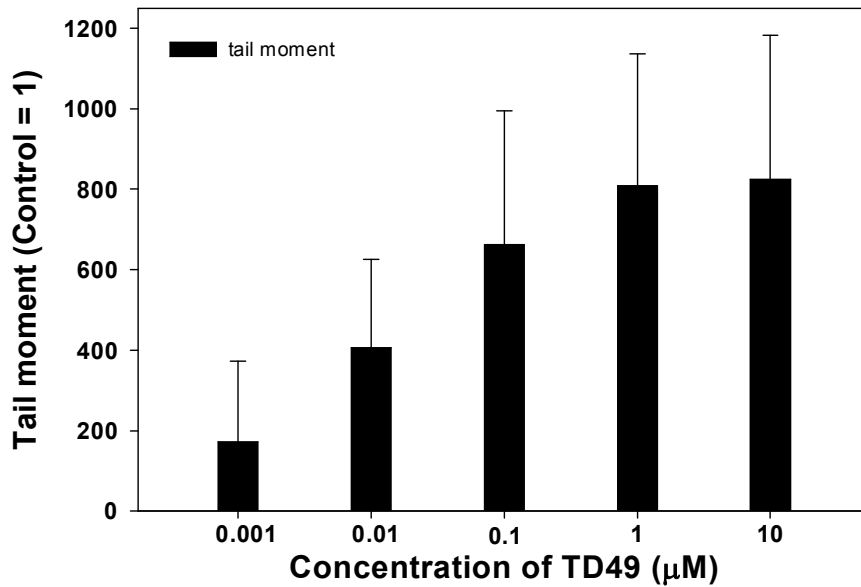


그림 3-24. Effect of genotoxicity of TD53 on polychaetous (*Perinereis aibuhitensi*) blood cells.

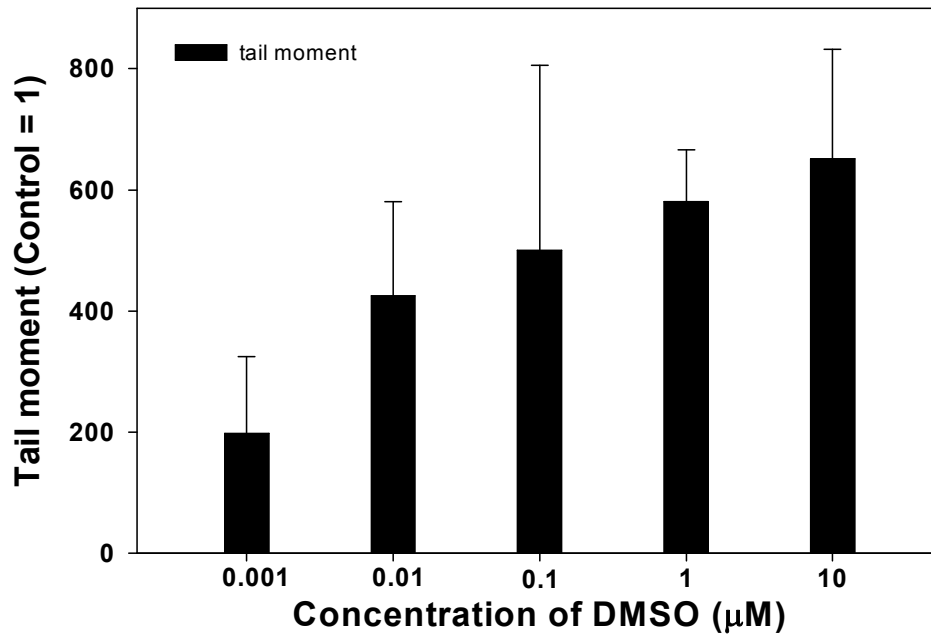


그림 3-25. Effect of genotoxicity of DMSO on polychatous (*Perinereis aibuhitensi*) blood cells.

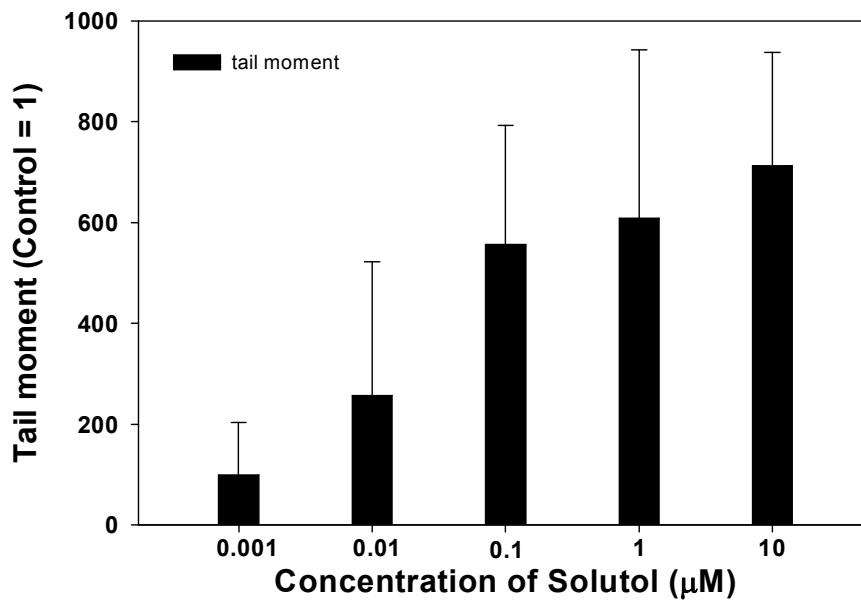


그림 3-26. Effect of genotoxicity of Solutol on polychatous (*Perinereis aibuhitensi*) blood cells.

☒ 3-4. Comparison of EC₅₀, NOECs and PNECs of TD53 and TD49 in toxic assessment using *Ulva pertusa* Kjellman

| | EC ₅₀ (μM) | NOEC ^{a)} (μM) | PNEC ^{b)} (nM) |
|------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| TD53 | 1.65 | 0.63 | 1.65 |
| TD49 | 0.18 | 0.08 | 0.18 |

☒ 3-5. The values of EC₅₀ or LC₅₀ of TD53 and TD49 obtained from the acute toxic assessment using *S. costatum*, *D. magna*, and *P. olivaceus*

| | Algicides | EC ₅₀ or LC ₅₀ (μM) |
|---------------------|-----------|---|
| <i>S. costatum</i> | TD53 | 1.53 |
| | TD49 | 0.34 |
| <i>D. magna</i> | TD53 | 0.61 |
| | TD49 | 0.68 |
| <i>P. olivaceus</i> | TD53 | 2.14 |
| | TD49 | 0.58 |

☒ 3-6. NOEC and PNEC of TD53 and TD49 obtained from the acute toxic assessment using *S. costatum*, *D. magna*, and *P. olivaceus*

| Algicides | NOEC ^{a)} (μM) | PNEC ^{b)} (nM) |
|-----------|-------------------------|-------------------------|
| TD53 | 0.25 | 6.1 |
| TD49 | 0.2 | 3.4 |

a) NOEC : No Observed Effect Concentration

b) PNEC : Predicted No Effect Concentration

c) NA : Not Affected

VI. 메소코즘을 이용한 환경위해성 평가.

1. 프로타입 메소코즘제작

(1) 프로타입 메소코즘 설계 및 제작

(가) 메소코즘 구조 고안, 설계, 및 시험어장 설치

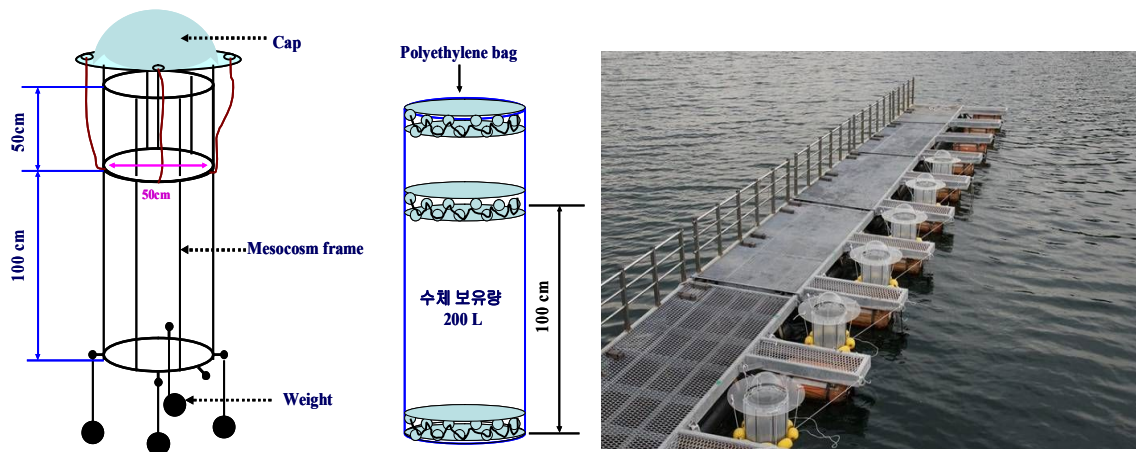


그림 3-27. 메소코즘 구조 및 설계 도안 및 시험어장 설치 사진

(나) 메소코즘 수체 수환경 특성 및 부유생태계 특성 파악

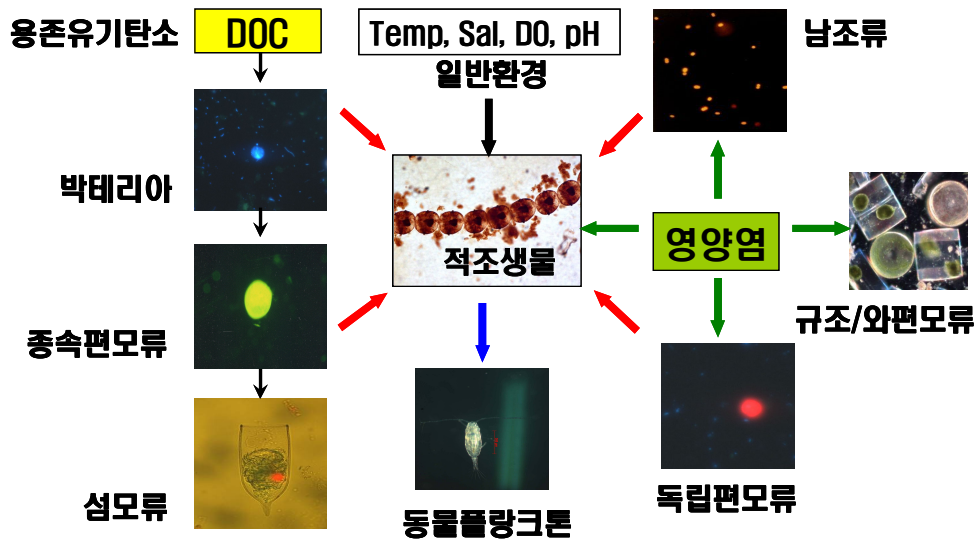


그림 3-28. 수환경요인과 다양한 부유생물 군집의 상호관계

- 가. 제작된 메소코즘 수체 내의 폐쇄효과가 수환경요인과 부유생물 군집의 상호 관계에 미치는 영향 진단
- 나. 수환경요인 모니터링: 수온, 염분, 용존산소, pH, 무기영양염(N, P, Si), 유기영양염 (DOC)
- 다. 부유생물 모니터링: 박테리아, 남조류, 종속 및 독립편모류, 식물성플랑크톤 (규조류, 와편모조류, 적조생물), 섬모류, 동물플랑크톤

(다) 나노 모방입자 확보

- 가. 효모균: 효모균 *Saccharomyces italicus* KJ1은 습윤상태에서 염색이 잘 되지 않고, 건조상태에서는 서로 응집되어 침강속도 해석에 부적절함.
- 나. 무기물입자 (마이크로 사이즈): 제품화된 Fullerene(C60/C70)은 수 μm 크기로써 고가이고 염색이나 형광표식이 가능한지 불확실함
- 다. 단구균: 비운동성 *Stomatococcus mucilaginosus* (2 ~ 3 μm)도 서로 응집되어 침강속도 해석에 부적절함
- 라. Fullerene 나노입자: 나노 크기의 형광안료입자 확보: 유기입자이기 때문에 부정형의 수 μm 크기로 제조되어 부적합
- 마. HiPS 입자: HiPS를 형광 염색하여 침강속도 해석에 사용

(라) 입자의 침강 속도 해석

- 가. 염분농도, 입자형태에 따른 침강속도
- 나. 유리컬럼에서 입자의 침강속도: 입자의 침강속도 분석용 컬럼을 주문제작 (재질: 원통형 유리, H: 130 cm, D: 30 cm)
- 다. 수조 내 36 segment의 유체흐름: 입자의 거동해석용 수조 주문제작(재질: 강화유리, L: 240 cm, W: 120 cm, H: 120 cm)
- 라. 파도세기에 따른 단입자의 침강속도
 - ① 다양한 크기, 형상의 입자제조 및 밀도측정
 - ② 층류상태에서 다양한 입자의 침강속도 해석
 - ③ 폐쇄 수조 내 수체 36개 segment별 유속 및 유향 조사
 - ④ 파도 발생 시 폐쇄 수체의 Re수 및 침강속도 해석
- 마. 파도조건 23 rpm에서의 입자의 침강속도 이론적 해석
- 바. 파도발생 시 입자의 침강궤적
- 사. 나노입자의 해수 중 분포수심, 최적 밀도 및 크기 제안

2. 메소코즘 평가

(1) 수직적 scale-up 메소코즘 설치에 따른 부유생물의 군집 영향 파악

(가) 메소코즘 scale-up 제작 및 수체 주입 기술 개발

(나) 크기 확대에 따른 메소코즘 내 수환경요인과 부유생물 군집의 변동 파악

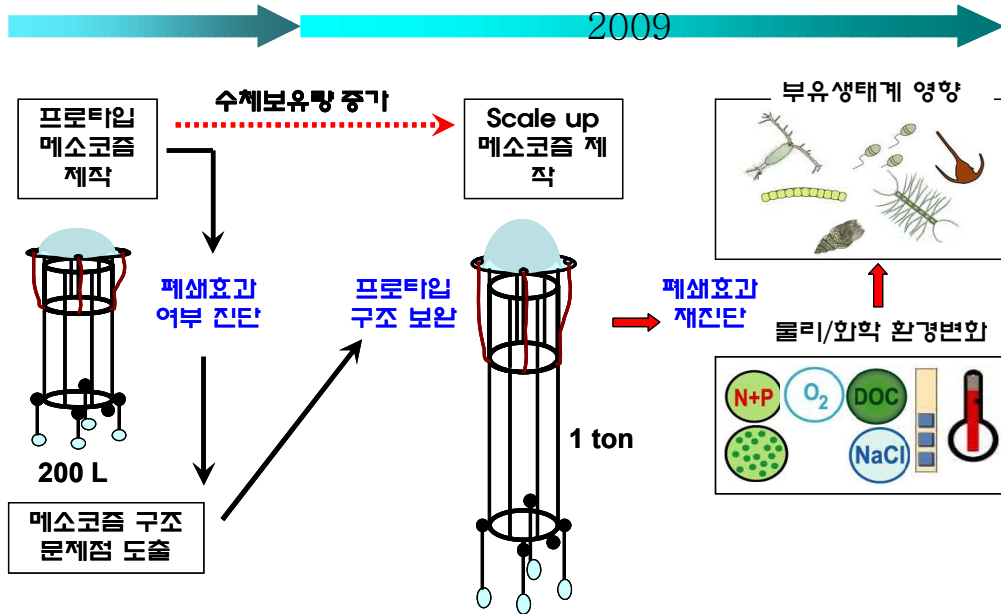


그림 3-29. 수직적 scale-up 메소코즘 적용 폐쇄효과의 진단 모식도

가. 살조후보물질의 살조능 및 생태계 위해성 현장 마이크로코즘 적용 평가

- ① 현장 자연해수 이용 온도조절 마이크로코즘 설계
- ② 실외 마이크로코즘 제작 및 운용 기술 (그림 3-30)
- ③ 6종류 살조후보물질 (TD 45, 48, 49, 53, 57, 60)의 부유생태계 위해성 평가



그림 3-30. 연구어장에 설치된 현장 마이크로코즘 시스템과 부유생태계 위해성 평가법

- ④ TD 45, 49, 57 의 Target species (*Cochlodinium polykrikoides*) 살조능 평가 (그림 3-31)

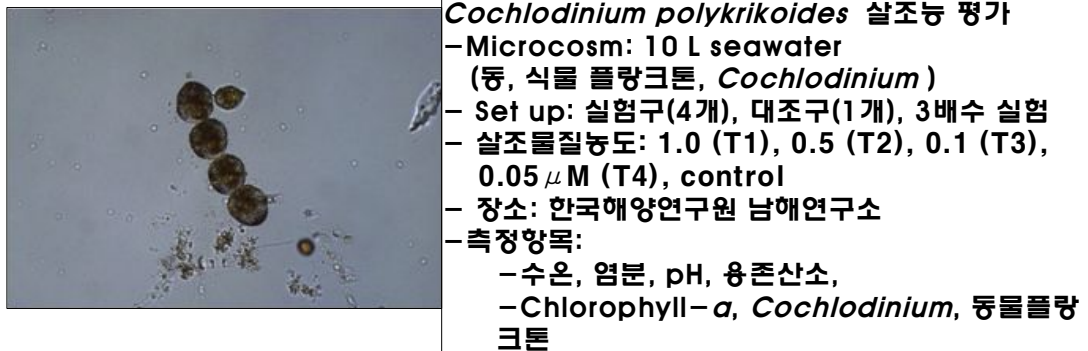


그림 3-31. *Cochlodinium polykrikoides* 군체 모습과 살조능 평가법 개요.

(3) Mg-Clay의 살조능 및 생태계 위해성 마이크로코즘 적용 평가

- (가) 실내 마이크로코즘 디자인 및 설치 (그림 3-32)
 (나) 실내 환경조건 안정화 유지

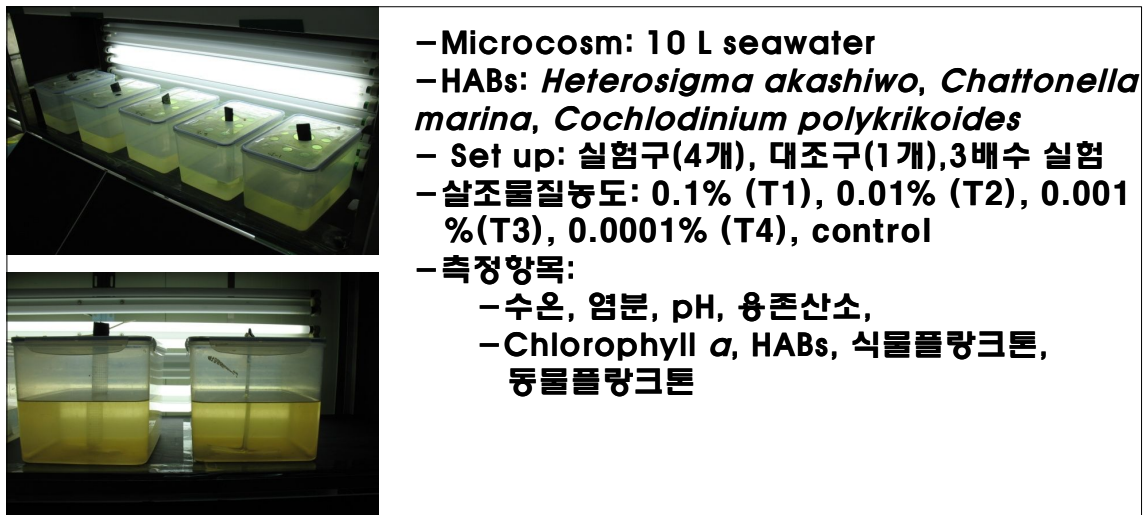


그림 3-32. 실내 마이크로코즘을 적용한 HABs에 대한 Mg-Clay 살조능 및 동식물 플랑크톤 위해성 평가법

(4). 후보살조물질 준비

(가) TD53

조선대학교 조훈박사 연구팀으로부터 신규로 합성한 TD53과 TD49를 제공받았다(Lee et al. 2010). 신규 살조제인 TD53 (MW : 303.38)은 증류수에 거의 녹지 않으므로 용매인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 100 ml당 12 mg(396 μ M)을 넣어 제조하여 사용하였다.

(나) TD49

TD49(MW : 337.8)와 분산제 Solutol® HS15(MW : 960), (BASF, Ludwigshafen, Germany)를 함께 100% 에탄올에 완전히 용해시킨 후에, 용매는 상온에서 진공펌프를 이용하여 진공 하에서 제거시킨다. 얻어진 고체 분산제는 spatula를 이용해서 긁어내고 12시간 동안 진공 하에서 완전히 건조시킨다. 이 건조물을 실험 시에 증류수를 넣고 초음파를 이용하여 재용해한 후 stock solution(296 μ M)으로 사용하였다.

(다) 노출 평가 대상 생물종 및 특징

본 실험에서 선택된 시험생물 4종은 해양생태계의 기초 생산자인 식물플랑크톤 (*Skeletonema costatum*) 1종, 이차소비자인 어류 2종 (넙치 *Paralichthys olivaceus*, 황복 *Takifugu obscurus*), 생산자인 해조류(파래) 1종을 택하여 독성 노출평가를 실시하였다. 국내 생물인 녹조구멍갈파래(*Ulva pertusa*)를 이용한 생태 독성 평가 기술은 ISO 국제표준(2009) (Han and Choi, 2005; Han et al., 2007a, b, 2008)으로 채택되어, 환경부가 표준 생태독성 공정시험법으로 제정한 물벼룩(*Daphnia magna*)을 이용한 24시간 급성독성 시험법 단점을 보완할 것으로 사료된다. 파래는 분포의 광역성, 채집의 용이성, 배양보관의 간편성, 독성반응의 민감성 등이 충족되어 이상적인 생물종으로 사료되며, 담수와 해양수 모두 사용이 가능하다는 장점을 가지고 있으므로, 독성평가에 유용한 대상종으로 사료된다.

가. 식물 플랑크톤 (*Skeletonema costatum*)

해산규조류 해양생태계의 기초 생산자인 식물플랑크톤의 대표 종으로써 생태독성평가에 널리 실시되고 있으며, 경기만을 비롯하여 우리나라 서남해안의 내만에 많이 분포하고 있다.

① 식물성플랑크톤(*Skeletonema costatum*)을 이용한 급성독성평가

가) 대상 생물의 배양 조건 및 배지: 본 실험에 사용한 한국해양미세조류은행에서 분양받아 배양기(DAIHAN LABTECH Co., LTD)에 배양하였으며, 식물 플랑크톤(*S. costatum*)의 배양환경은 20°C, 습도 80%, Light:Dark=12:12(hr)이며, 조도 1500 lux 이다. 배지는 f/2배지(Guillard and Ryther, 1962)를 제조하여 멸균한 후 사용하였으며, 이외의 모든 실험 기구들을 멸균하여 실험을 실시하였다.

나) Chlorophyll *a* 측정 방법: 우선, 500 mL mass flask 에 f/2배지 200 mL

와 조류배양액 50 mL 를 넣고 배양하였으며, sampling은 식물플랑크톤(*S. costatum*) 10 mL 와 neutral formalin 10 mL 를 centrifuge tube 에 혼합하여 고정시킨 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 10 mL acetone (90%)을 넣어 24시간 실온 보관하였다. 실온 보관된 tube 를 UV로 665 nm, 645 nm, 630 nm 색소의 흡광도를 각각 측정하여 Parsons 등 (1972)의 방법으로 chlorophyll a 를 구하여 각각의 농도에 대하여 신개발 살조제 TD53의 급성독성평가를 평가하였다.

다) TD53의 처리 농도: TD53의 농도는 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 uM으로 하여 실험을 실시하였으며, 용매인 DMSO를 control로 하여 독성평가 실험을 실시하였다.

나. 어류 치어의 급성 독성평가

① 넙치 치어(*Paralichthys olivaceus*) 급성 독성평가

가) 재료: 본 연구에 사용된 넙치 치어(*Paralichthys olivaceus*), 황복 치어 (*Takifugu obscurrus*)는 목포 갈릴리수산에서 분양하여 사용하였다.

나) 사육환경: 넙치치어(*Paralichthys olivaceus*)의 크기는 25~40 mm 고 중량은 0.7 ± 0.3 g 이며, 넙치치어의 사육 환경은 온도 21~23°C, 사료량은 어체 중(습중량)의 5%로 2회에 걸쳐서 나누어 공급하였고, 광주기는 12시간 조명, 12시간 무조명을 유지하였다. 해수는 해수염(TetraMarine salt pro, United Pet Group.Inc)을 구입하여 증류수 1 L 당 33 g을 넣어 제조하여 사용하였다.

다) 어류 급성독성평가 실험 조건: 해수는 한 수조에 5 L씩 사용하였으며, 실험 시 사용 된 개체 수는 한 수조에 20마리, 특정농도에 3개의 수조를 설치하여 신개발 살조제 TD53의 어류 급성 독성평가를 실시하였다.

라) TD53의 처리 농도: TD53의 농도는 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.5 uM으로 하여 실험을 실시하였다. 또한 용매 DMSO의 독성을 평가하기 위해 각 농도에 DMSO를 control로 하여 TD53의 급성 독성을 평가하였다.

② 황복 치어(*Takifugu obscurrus*) 급성 독성평가

가) 재료 및 사육조건: 황복 치어(*T. obscurrus*)의 크기는 40~60 mm이며, 중량은 2.8 ± 0.3 g 으로 21~23°C에서 사육했으며, 사료량은 0.2 ± 0.04 g/day로 2회에 걸쳐 공급하였다. 광주기는 Light:Dark=12:12 hr로 유지하여 사용하였으며, 해수는 위에 언급된 바와 같이 해수염으로 제조하여 사용하였다.

나) 어류 급성독성평가 실험 조건: 해수는 한 수조에 5 L씩 사용하였으며, 실험 시 사용 된 개체 수는 한 수조에 5마리, 특정농도에 3개의 수조를 설치하여 신개발 살조제인 TD53의 어류 급성 독성평가를 실시하였다.

다) TD53의 처리 농도: TD53의 농도는 1.0, 2.0, 3.0 uM로 하여 실시하였으며, 각 농도에 DMSO를 control로 하여 TD53의 급성 독성을 평가하였다.

③ 녹조구멍갈파래(*Ulva pertusa*)의 독성 평가

가) 본 시험에 사용한 녹조구멍갈파래(*Ulva pertusa*)는 접근이 쉬운 조간대에 서식하고 군집을 이루고 있어 채집이 용이하며, 풍부한 시료획득이 가능하다. 실험실내에서의 배양 및 조작이 용이하여 다양한 환경 요인에 대한 생이 반응 연구에 편리한 종이라고 할 수 있다. 엽체는 단독 또는 2~3개체씩 뭉쳐서 자라고, 체장은 10~30 cm 에 이르고, 엽면에는 동형 또는 불규칙한 구멍이 있다. 구멍갈파래는 성숙하면 72~96시간 후에 엽체 가장자리 부위가 황색, 갈색, 흰색을 띠며 생식세포가 형성 및 방출되는데 이러한 특징을 이용하여 구멍갈파래의 엽체를 다양한 농도의 시험 물질에 노출시킨 후, 포자가 형성되는 면적을 백분율로 산정하여 유해물질의 독성을 평가할 수 있다.

나) 구멍갈파래를 이용한 해양생태 급성독성평가 방법

- 1) 신규 살조물질의 준비: 신규로 합성한 TD53과 TD49를 조선대학교 조훈교수로부터 제공받아 사용하였다.
- 2) TD53과 TD49의 처리농도별 희석수는 Coralife[®]배양용액이 사용되었는데 Corali-fe[®]배양용액 조제는 Coralife[®] 35 g을 1 L의 증류수에 넣고 5 mL의 K₂HPO₄(20 mM)와 1 mL의 KNO₃(1 M)을 첨가하여 사용하였다.
- 3) 구멍갈파래를 이용한 급성독성평가 방법: 구멍갈파래를 이용한 시험방법은 ISO 국제표준(2009)으로 리트머스식 시험기법처럼 진단키트를 이용해 파래 잎의 색상 변화 면적에 따라 독성여부를 알 수 있다. 본 시험생물인 구멍갈파래는 우리나라 동서남해안에 분포하는 대표적 해조류로서 채집이 쉽고 실험실에서 2~3개월 정도 보관 배양이 가능하며, 포자형성률, 발아율, 성장률, 광합성률, 호흡률 등의 여러 가지 다양한 측정 요소를 end point로 선정할 수 있는 장점이 있다. 특히, 독성물질에 대한 해조류의 반응은 생식과정을 대상으로 평가할 경우 매우 민감하게 나타나는 것으로 알려져 있는데, 본 시험법에서 end point로 선정된 포자형성률 또한 생식과정을 대상으로 평가한 시험방법이며, 독성 민감성의 우수성이 검증된 방법이라 할 수 있다.
- 4) 시험생물 준비: 구멍갈파래의 색깔이 녹색인 건강한 엽체(전장 10 cm 이상)를 배양기에서 꺼내어 직경 6 mm의 코르크 보어리(cork borer)로 원형 절편을 뽑아냈다. 이때, 반드시 엽체의 가장자리로부터 10~20 mm 이내의 부위에서만 원형절편을 취했다.
- 5) 시험용액 준비: 6-well cell plate에 시험용액을 농도별로 10 mL씩 분주했다. 희석 시험의 경우, 시험대상물질용액의 각 농도와 대조구로 설정했다.
- 6) 시험생물의 노출: 원형절편을 각각의 시험구에 8엽체씩 노출시켰다. 이때, 각 시험구별로 한번에 2엽체씩 4번으로 나누어 투입했다.
- 7) 독성실험: 배양 온도, 염분, 광주사량, 광주기 조건은 각각 15°C, 30 psu, 80~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$ 의 광량, 12:12 h 명암주기로 하였다. 시험 시 TD53

의 농도는 0, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0, 10 μM 이며, 용매인 DMSO의 실험 시에도 같은 농도로 하였다. TD49의 농도는 0, 0.04, 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 μM 이며, 용매인 Solutol의 농도는 0, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0, 10 μM 으로 처리하였다. 용매 및 분산제로 사용되는 DMSO와 Solutol에 대해서도 background 독성으로서의 자체 독성을 조사하였다. 본 노출실험은 96 시간 후 시험을 종료하였으며, 영상분석 장치를 이용하여 엽체 전체 면적과 포자형성 면적을 측정했다.

다. TD53과 TD49의 EC_{50} 도출 및 통계처리

본 연구의 자료는 비모수 통계적 방법으로 모든 시험구와 대조구의 반복수가 같은 경우에 적용할 수 있는 Steel's many-one rank test를 이용하였으며 통계처리 프로그램은 TOXCALC 5.0 (Tidepool Scientific Software, USA)을 사용하여 선형내삽법(linear interpolation)으로 산출하였다.

라. NOEC와 PNEC 결과 도출

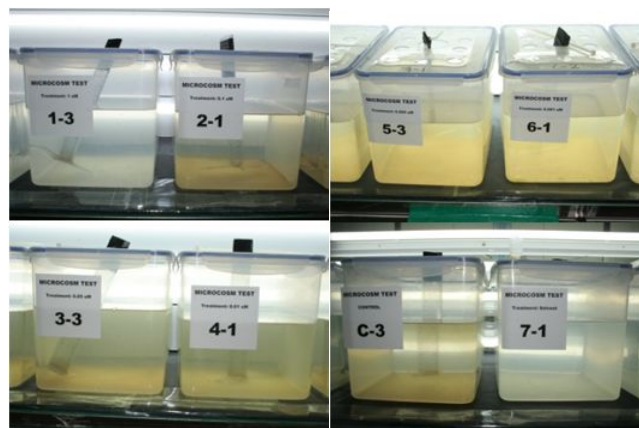
급성독성 평가결과인 NOEC (No Observation Effect Concentration; 이하 NOEC)와 EC_{50} 값으로부터 PNEC (Predicted No Effect Concentration, 이하 PNEC)를 도출한다. 이는 OECD지침에 따라 화학물질이 나타내는 독성 등에 관한 영향평가에서 제한된 독성자료만이 얻어진다면 일정평가인자 (constant assessment factor)가 생태계에 대한 PNEC를 산출하기 위해서 각 외삽단계에서 인자를 적용한다. 구멍갈파래는 1차 생산자로서 한 종에 대한 평가에 해당되므로 인자 1000을 적용하여 PNEC 값을 도출했다 (Leeuwen and Hermens, 2001).

3. 살조물질을 이용한 적조제어 평가 및 생태계 위해성 마이크로코즘 평가

(1) 용해도를 개량한 TD49의 적조제어 및 생태계 위해성 마이크로코즘 평가

(가) TD49의 용매로 DMSO 사용: DMSO 자체의 독성평가 (그림 3-33)

(나) 수용성 TD 49의 적용한 살조능과 위해성 평가 (그림 3-34)



Microcosm: 10 L seawater
 sal조물질(농도): 수용성 TD49
 농도구배 (1, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001 μ M)
 측정항목: 동물플랑크톤, HABs, Chlorophyll a

그림 3-33. TD 49의 용매 DMSO의 부유생태계 위해성 평가.

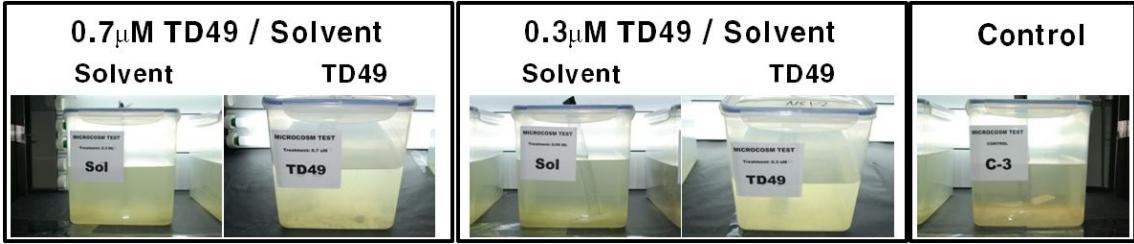


그림 3-34. 수용성 TD 49의 부유생태계 위해성 평가.

(2) Mg-Clay의 어류치어 참돔 (*Pagrus major*)의 반수치사농도

- (가) 농도별 참돔 (*Pagrus major*)의 사망률
- (나) 세부농도(0.1-0.01%) 농도별 참돔 (*Pagrus major*)의 사망률
- (다) Mg-Clay의 어류치어 참돔 (*Pagrus major*)의 반수치사농도
- (라) 참돔 (*Pagrus major*)의 pH test
- (마) 참돔 (*Pagrus major*)의 아가미 관찰

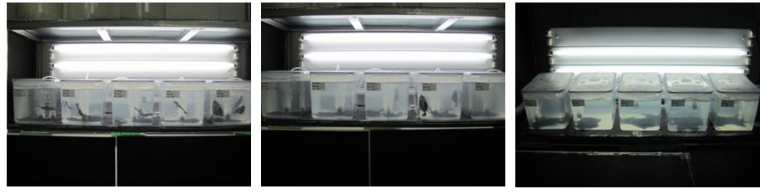
(3) Mg-Clay의 어류치어 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 반수치사농도

- (가) 농도별 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 사망률
- (나) 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 아가미 관찰
- (다) 참돔(*Pagrus major*) 및 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 LC₅₀ 농도

대상어종: 참돔 (*Pagrus major*): 체장 약 5cm, 각 마이크로코즘 당 15개체 실험
 광어 (*Paralichthys olivaceus*): 체장 약 10cm, 각 마이크로코즘 당 10개체
 Mg-Clay 농도: 0.1%, 0.07%, 0.03%, 0.01% (3배수 실험)



참돔 독성 평가



광어 독성 평가

그림 3-35. Mg-Clay의 어류(치어) 위해성 평가법.

(4) Scale-up 메소코즘에서 Mg-Clay의 유해적조 제어 및 생태계 위해성 평가

- (가) 수평적 (폭 1 m) scale-up 메소코즘 제작 및 수체혼합장치의 개발
- (나) 메소코즘을 이용한 유해적조 *Heterosigma akashiwo*의 배양
- (다) Scale-up 메소코즘에서 Mg-Clay 투입후 유해적조 *Heterosigma akashiwo*의 살조능 및 생태계 위해성 평가

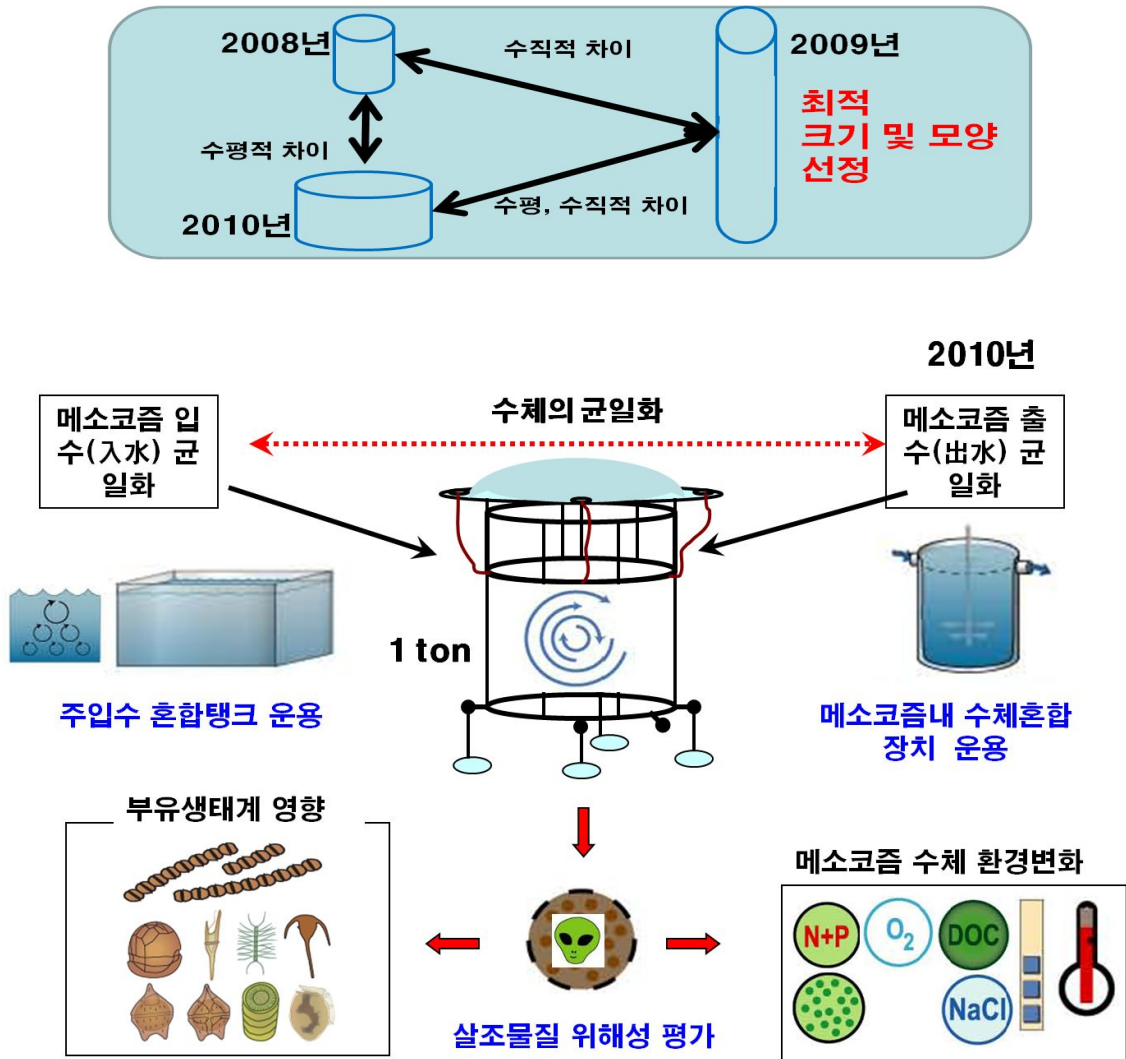


그림 3-36. 메소코즘 Scale-up과 수체의 균일화에 따른 메소코즘 내 수환경과 부유생태계의 영향

(5) 신규 살조물질에 대한 생물 노출평가

- (가) 신규 살조물질의 준비: 조선대학교 조훈교수로부터 신규로 합성한 TD53과 TD49를 제공받아 사용하였다
- (나) 노출 평가 대상 생물종: 본 실험에서 선택된 시험생물 4종은 해양생태계의 기초 생산자인 식물플랑크톤(*Skeletonema costatum*) 1종, 이차소비자인 어류 넙치 치어(*Paralichthys olivaceus*), 생산자인 해조류(파래) 1종을 택하여 독성 노출평가를 실시하였다. 일차소비자인 물벼룩은 저서생물인 두토막눈썹 참갯지렁이(*P. aibuhitensis*)로 대신하여 comet assay법에 의한 평가를 실시하였다.

(다) 생물 노출 독성평가

가. 식물성플랑크톤(*Skeletonema costatum*)을 이용한 급성독성평가

- ① 대상 생물의 배양 조건 및 배지: 실험에 이용된 *S. costatum*은 OECD (1984)에서 지정한 대표 생물종을 대상으로 하였다. 초기 세포농도 (7.7×10^4 cells mL^{-1}), 광주기 (14L/10D), $20 \pm ^\circ\text{C}$, 습도 80%를 실험 기간 동안 유지하고 OD750 nm, Chlorophyll a (Parsons and Strickland, 1968), 세포수 (혈구 계산판)를 계수한다. TD49와 그 분산제 Solutol 을 각 농도별 (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 μM), TD53과 그 용매 DMSO를 각 농도별 (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 μM)로 3개씩 처리하여 (n=3), EPA기준에 준하여 96시간 EC₅₀를 조사하였다. 각 농도별 희석수는 Guillard and Ryther (1962)가 제시한 실험방법에 의거 f/2배지를 이용하였다. 또한 실험 기간 동안 초기와 최종 상태에서의 pH 및 온도를 모니터하여 실험과정에서의 *S. costatum*에 대한 영향정도를 조사하였다.

나. 물벼룩 (*Daphnia magna*)을 이용한 급성독성평가

- ① 실험방법: 본 연구에서는 해양성 갑각류에 대한 평가 대신에 실험실에서 사육중인 담수성 *D. magna*에 대한 독성평가를 실시하였다. 물벼룩 (*Daphnia magna*)은 화학독성평가 연구원에서 분양받아 이용하였으며 이는 OECD (2004)에서 지정한 대표 생물종이다. 생후 1일 미만의 *D. magna*를 10마리씩 100 ml 비커에 넣고 TD49는 TD49 및 분산제(Solutol)을 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.8 μM 각 농도를 3개씩 준비하여 노출실험을 실시하였고, TD53은 TD53 및 용매(DMSO)를 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μM 로 각 농도를 3개씩 처리한 후 24, 48시간의 생존 수를 조사하였다. 각 농도별 희석수는 Elendt and Bias (1990)과 Samel et al. (1999)가 제시한 실험방법에 의거 M4배지를 이용하였다. 이때 움직임이 거의 없는 것도 죽은 것으로 간주한다. 실험 기간 동안 pH, 온도를 모니터하여 다른 외적 요인을 관찰하였다.

다. 넙치 치어 (*Paralichthys olivaceus*)를 이용한 급성독성평가

- ① 실험재료 및 사육환경: 실험에 이용된 넙치 치어 (*P. olivaceus*)는 전라남도 무안군 소재 육상 수조식 치어 부화장 (D수산)으로부터 분양받아 사용하였다. 넙치 치어는 평균체중 0.38 g, 평균전장 3.71 cm로 부화 된지 약 60 ~ 70일이 경과된 상태로 실험실에서 2일간 순치시킨 후 실험에 이용하였다. 넙치 치어의 사육 환경은 온도 21~23 $^\circ\text{C}$, 사료양은 어체중 (습중량)의 5%로 2회에 걸쳐서 나누어 공급하였고, 실험 기간 동안에는 먹이 공급을 중단하였다. 광주기는 12시간 조명, 12시간 무조명으로 실험기간 동안 유지하였다. 실험에 사용된 해수는 해수염 (TetraMarine salt pro, United Pet Group. Inc)을 구입하여 증류수 1 L당 33 g을 넣어 제조하여 사용하였다.
- ② 어류 급성노출평가 실험 조건: 해수는 5L 수조에 3 L 인공해수를 사용하였으며, 실험 시 사용된 개체 수는 한 수조에 10마리, 처리농도별로 3개의 수조를 설치하여 공기를 공급하였다. 살조제 TD49 및 분산제(Solutol)에 대해

서는 예비실험을 바탕으로 0.1 ~ 1.6 μM 의 범위에서 대조구를 포함하여 6개 농도구 (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 μM)를 각 3개씩 준비하였다. TD53 및 용매 (DMSO)는 예비실험을 바탕으로 0.5 ~ 8.0 μM 의 범위에서 대조구를 포함하여 6개 농도구 (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μM)를 각 3개씩 준비하였다. 각 농도별 희석수는 인공해수를 이용하였다. 24시간마다 치사한 개체를 관찰하였으며, 급성독성의 결과로서 72시간 LC_{50} 은 SPSS program에 의해 통계처리 하여 산출하였다. 또한 실험 기간 동안 수조의 타 환경인자인 pH, DO, 염분도 (ATAGO, S/Mill-E, Japan)의 변화를 측정하였다.

4. 연구결과

(1) 메소코즘 프로타입 제작 및 운용 기술

(가) 국외 메소코즘 구조 분석

가. 나노캡시드 위해성 평가를 위한 타입: 폐쇄형 인공생태계 선정

나. 경제형 인공생태계 타입: 부품 조립식 선정

다. 분리형 인공생태계 타입: 세트형보다 실용성이 높은 분리/합체 가능형

(2) 프로타입 메소코즘 제작 및 운용기술

(가) 메소코즘 제작 백 제작 및 누수 테스트 (그림 3-37)



그림 3-37. 메소코즘 유닛 조립 및 누수 테스트

(나) 메소코즘 현장 설치 기술적 노하우 확보 (그림 3-38)



그림 3-38. 현장 가두리에 설치되는 메소코즘

(다) 메소코즘 적용 현장 모니터링 기술 확보 (그림 3-39)

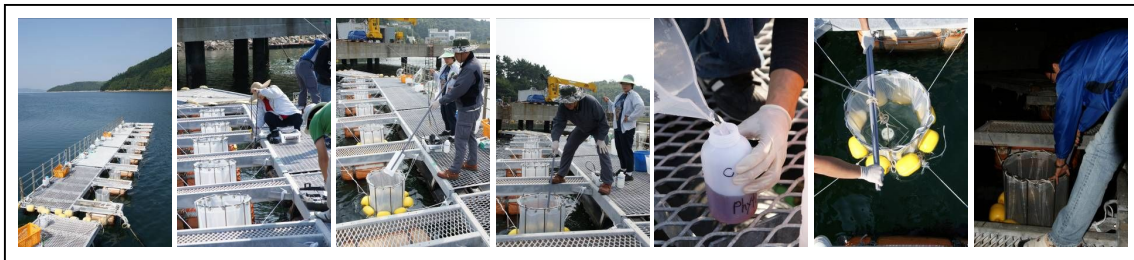


그림 3-39. 설치된 메소코즘 수체의 모니터링 작업

(3) 메소코즘내 부유생태계 특성 파악

(가) 메소코즘 수체 내와 외부 자연해수 내의 부유생태계 특성 차이

가. 수온 차이 없음, 염분, 산소, pH는 3일 이후부터 차이 발생 (그림 3-40)

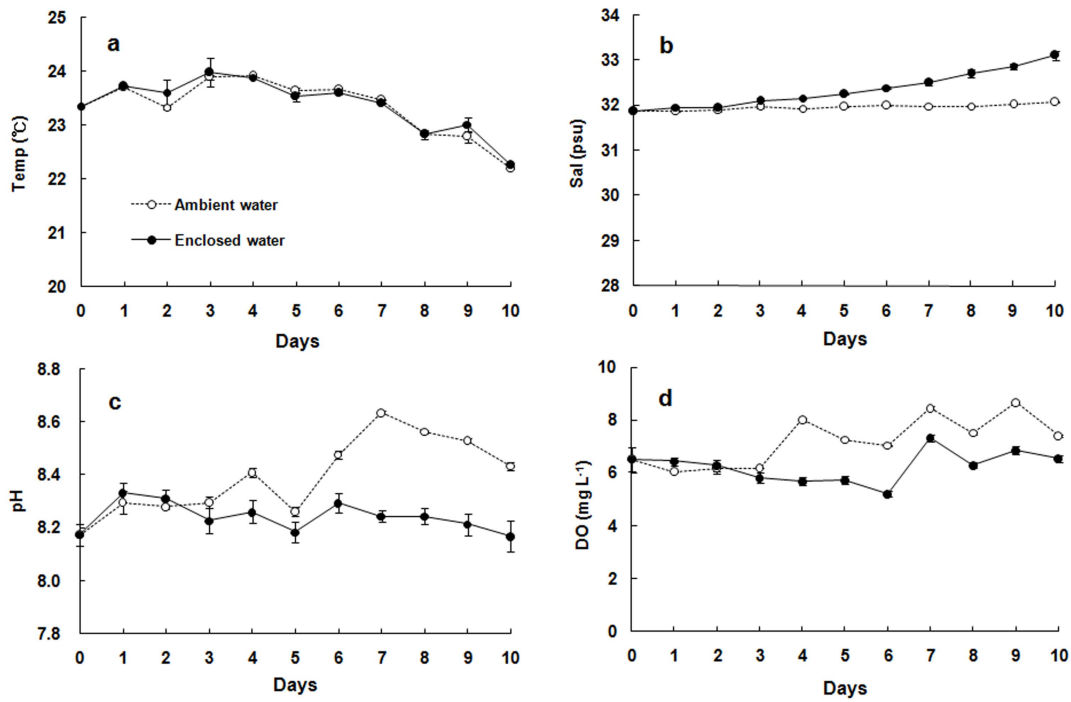


그림 3-40. 메소코즘 내외부 수체의 수환경 요인 변화

나. 무기영양염의 급속한 감소 나타남, 반면 DOC는 차이 없음 (그림 3-41)

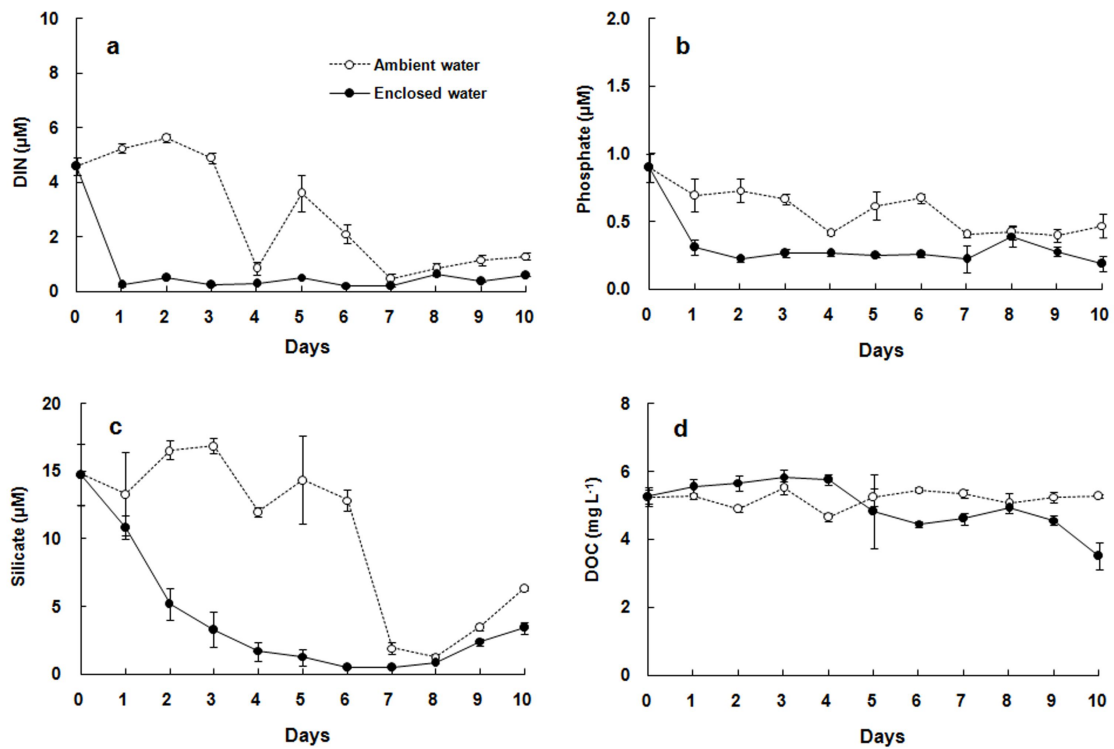


그림 3-41. 메소코즘 내외부 수체의 무기영양염과 DOC 농도 변화

다. Chl. *a*의 점진적 감소를 보이거나 식물플랑크톤 개체수는 증가 (그림 3-42)

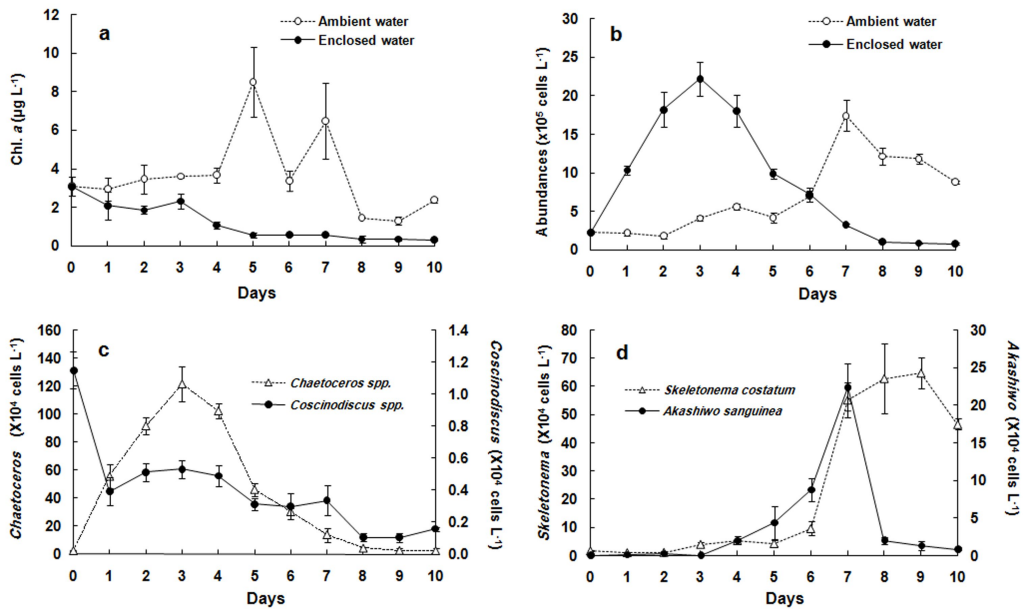


그림 3-42. 메소코즘 내외부 수체의 클로로필, 식물플랑크톤 개체수와 우점종의 변화

라. 종속영양박테리아 & 종속영양미소편모조류의 증가 (그림 3-43, a&b)

마. 섬모류 후반기 급감소 및 동물플랑크톤의 증가 (그림 3-43, c&d)

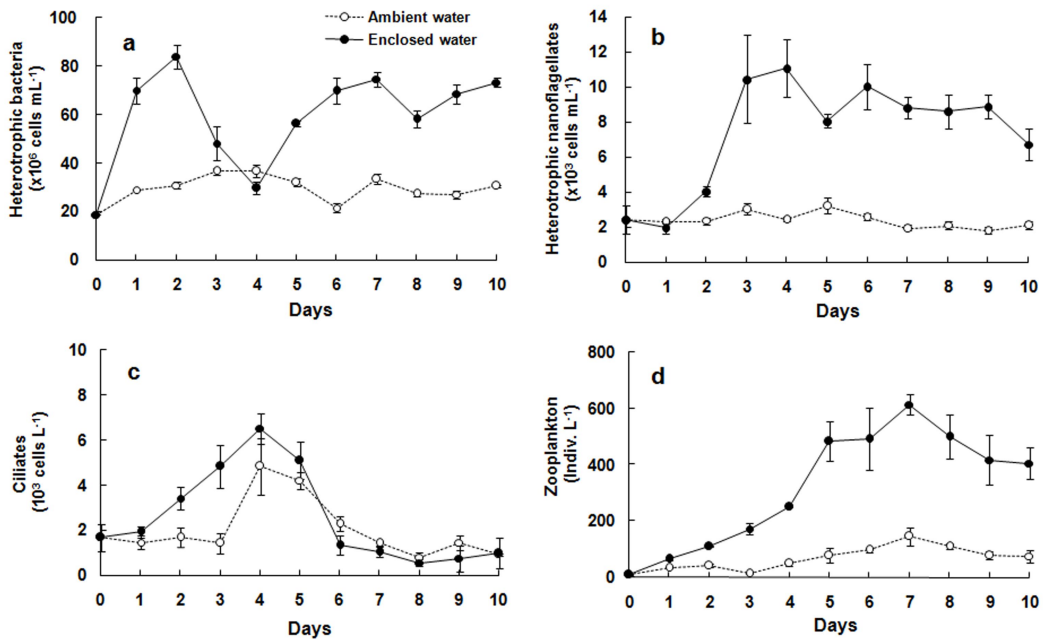


그림 3-43. 메소코즘 내외부의 종속영양박테리아, 종속영양미소편모조류, 섬모류, 동물플랑크톤의 변화

(4) 수직적 메소코즘 scale-up 설치 및 운용 (그림 3-44)

(가) 수심 5 m 메소코즘 scale-up

(나) 메소코즘 내 동일수체 공급 방법 개발

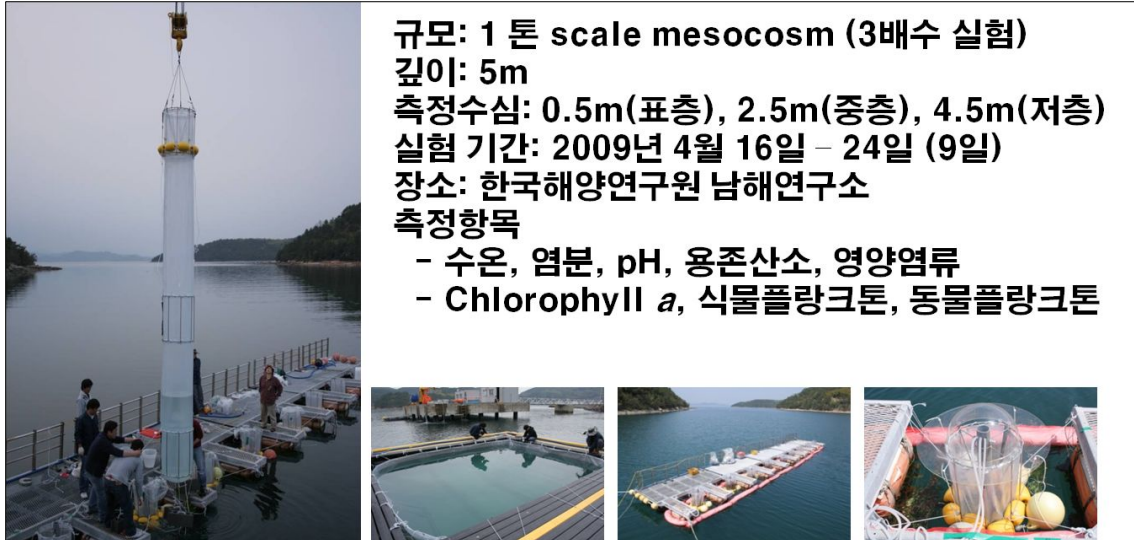


그림 3-44. 수직적 scale-up 메소코즘 시험어장 설치 및 균일수체공급 장치

가. 수직적 scale-up 메소코즘 적용 폐쇄효과 완화 진단

① 메소코즘 수체의 수심별 수환경의 분포 (그림 3-45)

- 수온, pH, 염분, DO, 질산염, 인산염의 표층, 중층, 저층의 균일 농도 분포

② 부유생물 분류군의 수직적 균일 분포 (그림 3-45)

- 종속영양박테리아, 엽록소, 동물플랑크톤의 수심 1-5 m 수체 균일 분포

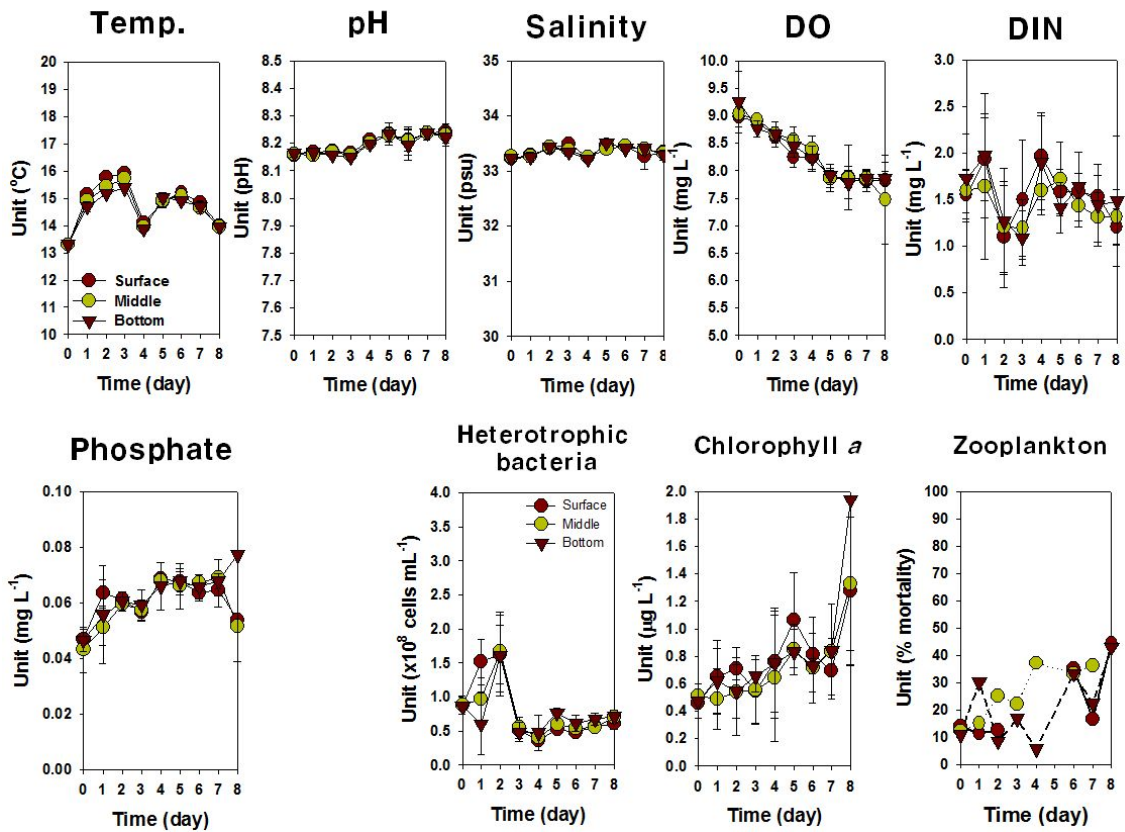


그림 3-45. 수직적 scale-up 메소코즘 수체 내 수심별 수환경요인과 부유생물의 변동

- 나. Thiazolidinedione 유도체의 부유생태계 위해성 실외 마이크로코즘 적용 평가
- ① TD 60, 57, 49, 53 > 48 > 45, control의 순으로 살조능이 강함 (그림 3-36)
 - ② 와편모조류 *Ceratium furca* (2009년 7월 장목만 적조형성)의 살조효과 (그림 3-37)

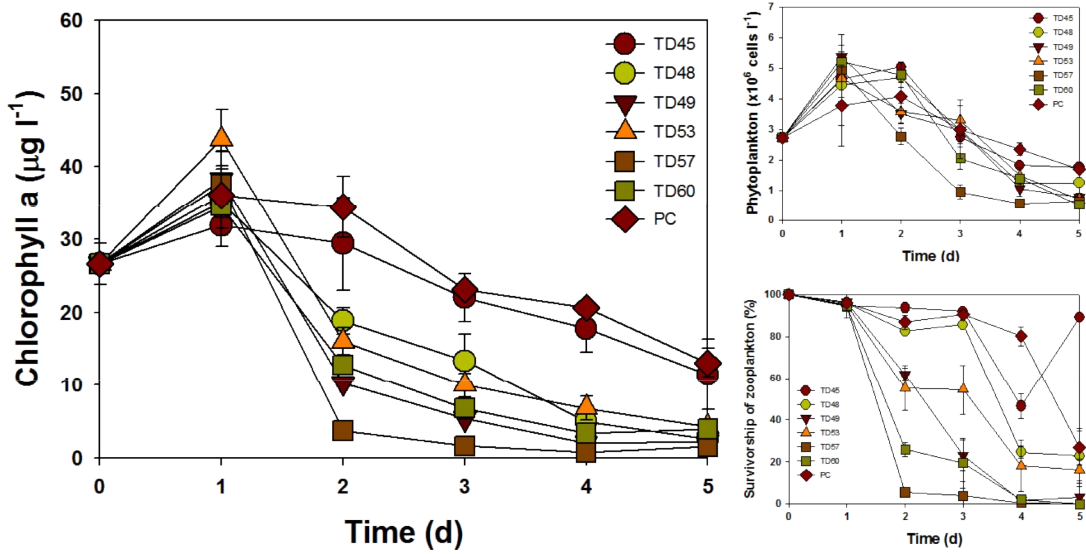


그림 3-46. Thiazolidinedione 유도체의 부유생태계 위해성 마이크로코즘 평가

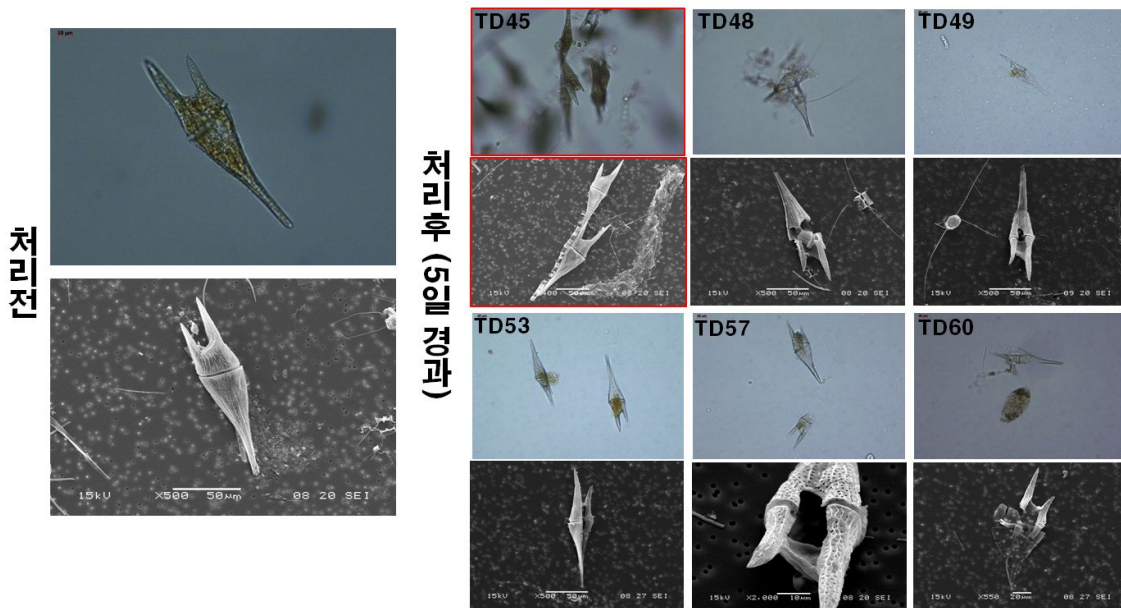


그림 3-47. Thiazolidinedione 유도체의 살조효과에 따른 *Ceratium furca* 형태적 손상

다. *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 TD 45의 살조능 평가

- ① TD 45 처리 결과: *Cochlodinium* 감소, 그러나 살조능보다 동물플랑크톤의 포식효과의 가능성이 있음 (그림 3-48)
- ② 포식자 제거 후 TD 45 처리 결과:
 - *Cochlodinium*의 뚜렷한 감소가 보이지 않음. 즉, 살조능이 없음 (그림 3-237)
 - *Cochlodinium* 세포의 손상이 나타나지 않음 (그림 3-49)

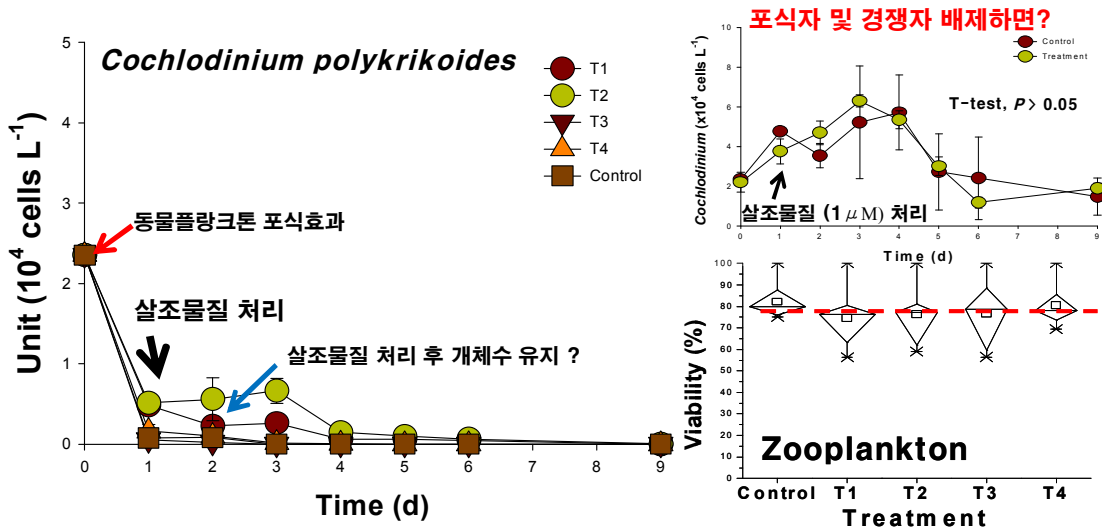


그림 3-48. *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 TD 45의 살조능 마이크로코즘 평가

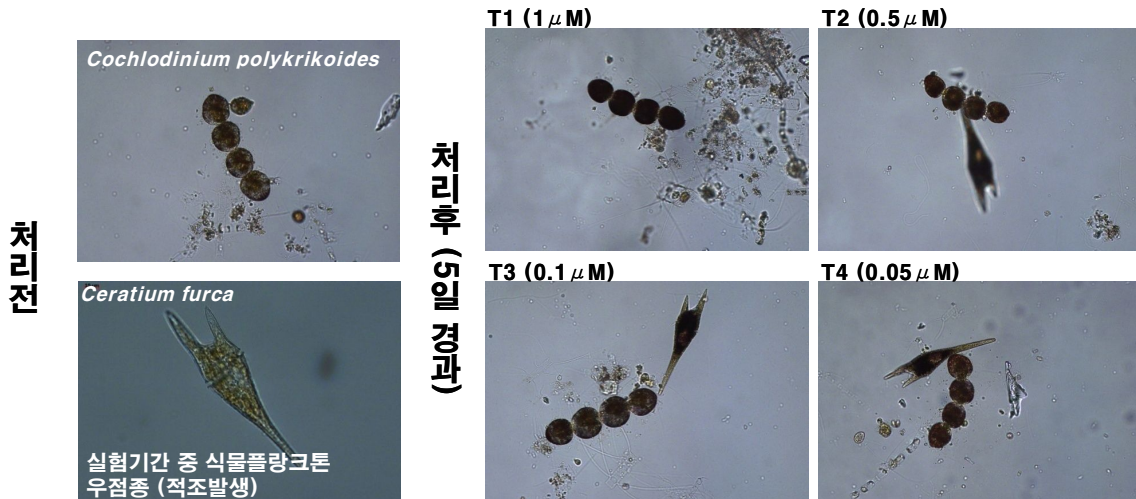


그림 3-49. TD 45 처리 후 *Cochlodinium polykrikoides* 세포의 건강한 모습

라. *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 TD 49의 살조능 평가

- ① T1(1 μ M) > T2(0.5 μ M) > T3(0.1 μ M) > T4(0.05 μ M)의 순으로 *Cochlodinium* 제어 효과 나타남 (그림 3-50)
- ② 동물플랑크톤의 경우 T3와 T4 농도에서 안전함
- ③ 식물플랑크톤 군집의 경우 종에 따라 차이를 보임: *Skeletonema costatum*과 *Scrippsiella trochoidea*는 개체수 감소, nano *Amphiprora* sp.의 경우 개체수 증가를 보임, 즉 tolerance 나타남 (그림 3-51)
- ④ 따라서, 전 농도에서 *C. polykrikoides*을 살조하였고, 동물플랑크톤 군집은 0.1 μ M 이하농도에서 영향을 미치지 않아 TD49를 0.1 μ M 투입 시 생태계 위해성 없이 *C. polykrikoides* 제어할 것으로 판단됨

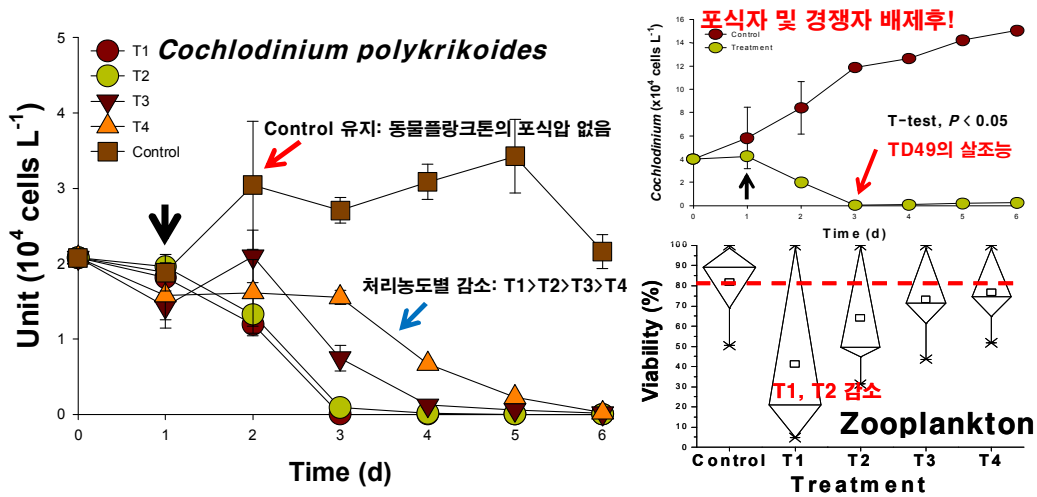


그림 3-50. *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 TD 49의 마이크로코즘 살조능 평가

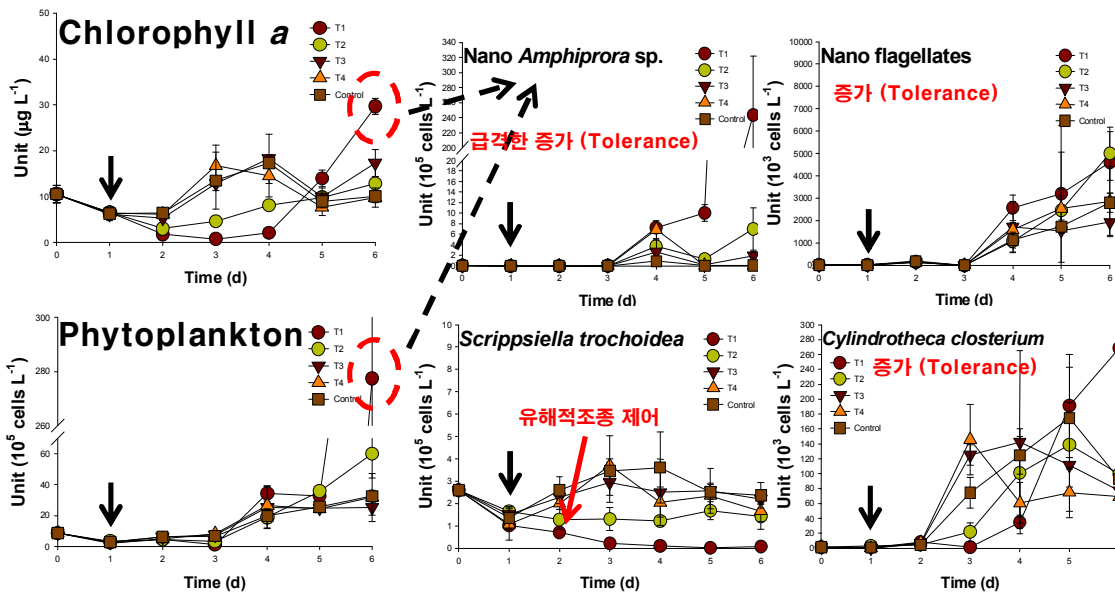


그림 3-51. 식물플랑크톤에 대한 TD 49의 마이크로코즘 살조능 평가

마. *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 TD 57의 살조능 평가

- ① T1(1 μ M) = T2(0.5 μ M) > T3(0.1 μ M) > T4(0.05 μ M)의 순으로 *Cochlodinium* 제어 효과 나타남 (그림 3-52)
- ② 동물플랑크톤의 경우 TD 57 농도별 생존율의 차이를 보임
- ③ 식물플랑크톤 군집의 경우 *Skeletonema costatum*는 개체수 감소, *Cylindrotheca closterium*의 경우 개체수 증가를 보임 (그림 3-53)
- ④ 따라서, TD 57은 *C. polykrikoides*의 강한 살조능을 보이나 동물플랑크톤 군집을 거의 사멸시킬 위해성이 보임

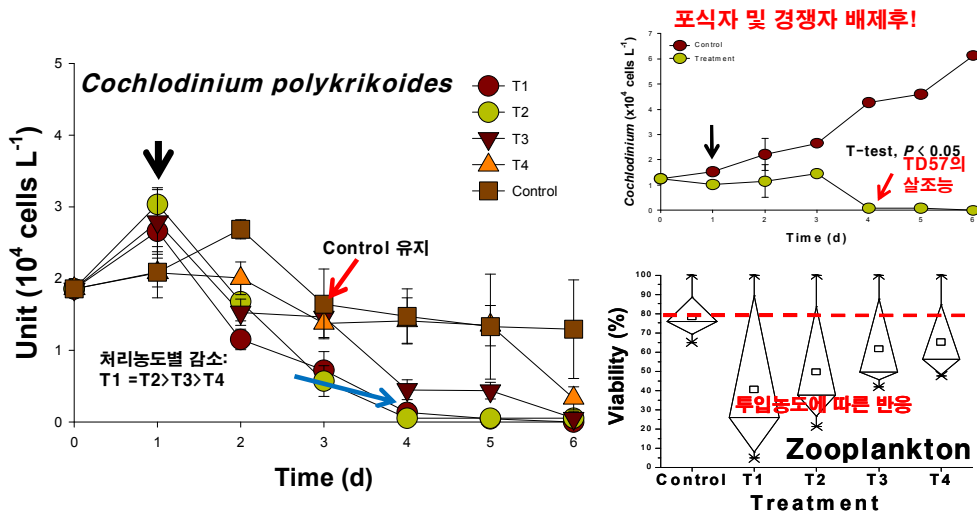


그림 3-52. *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 TD 57의 마이크로코즘 살조능 평가

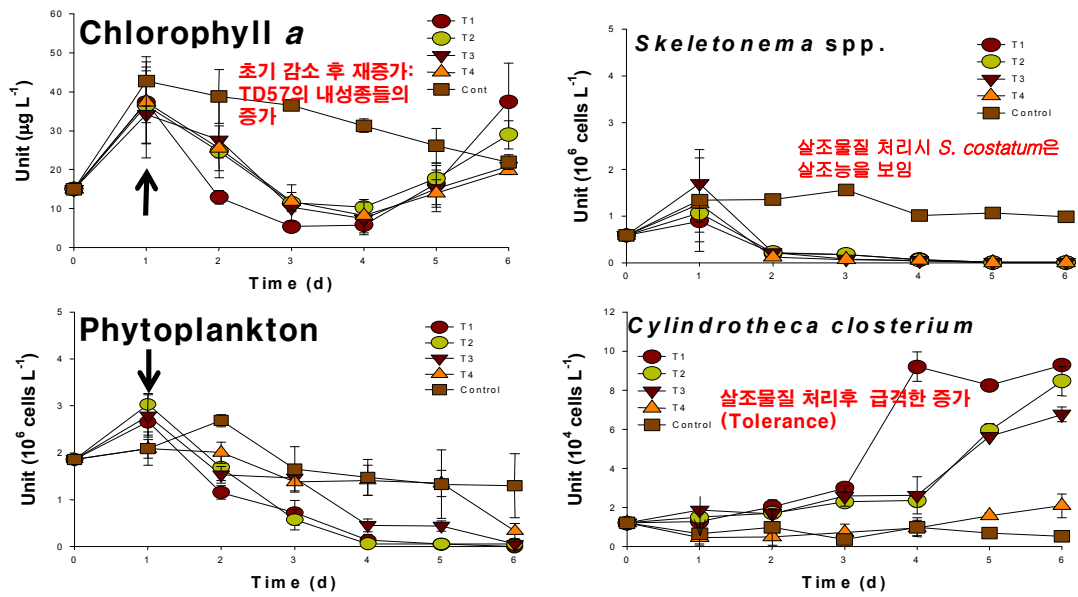


그림 3-53. 식물플랑크톤에 대한 TD 57의 마이크로코즘 살조능 평가

바. Mg-Clay의 살조능 및 생태계 위해성 실내 마이크로코즘 적용 평가

- ① Mg-Clay 0.1% (T1), 0.01% (T2), 0.001% (T3), 0.0001% (T4)의 농도 구배에 따른 HABs 살조 효과를 평가함
- ② HABs (*Chatonella marina*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Heterosigma akashiwo*) 제어 효과 보임 (그림 3-54)
- ③ 동물플랑크톤: Mg-Clay 농도에 따른 생존율의 차이를 보임 (그림 3-55)
- ④ 식물플랑크톤 군집: 전반적인 감소 (그림 3-55)
- ⑤ Mg-Clay 0.001% 투입시 HABs 제어가 가능하고, 동물플랑크톤에 위해성이 없을 것으로 판단됨

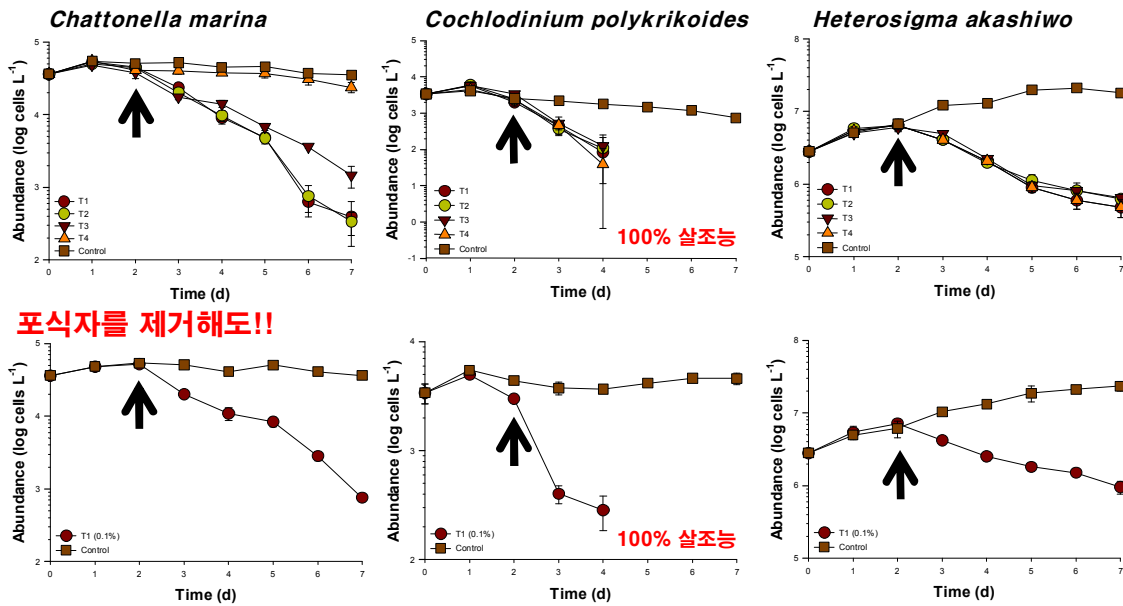


그림 3-54. HABs (*Chattonella marina*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Heterosigma akashiwo*)에 대한 Mg-Clay의 마이크로코즘 살조능 평가

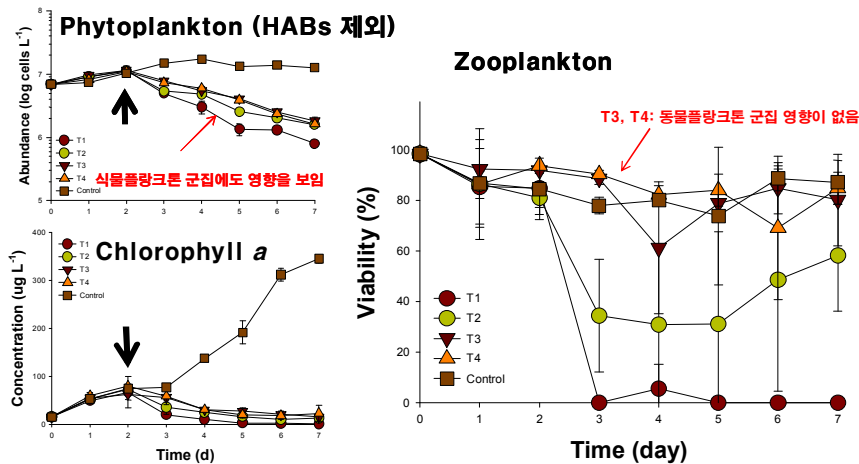


그림 3-55. 식물플랑크톤과 동물플랑크톤 군집에 대한 Mg-Clay의 마이크로코즘 살조능 평가

사. 식물 플랑크톤을 이용한 급성독성평가

- ① 72 hr 후의 *S. costatum*은 신개발 살조제 TD53에 1 uM 이상부터 영향을 받는 것으로 보이며 1차(0~2 uM)에 실험한 EC₅₀은 1.5 uM이며, 2차(1~3 uM)에 실험한 EC₅₀은 1.9 uM 이므로 TD53의 EC₅₀은 1.5~1.9 uM의 사이 값으로 추정된다. Symbol이 없는 그래프는 LC₅₀을 도출하기 위한 predicted 그래프이다 (그림 3-56).

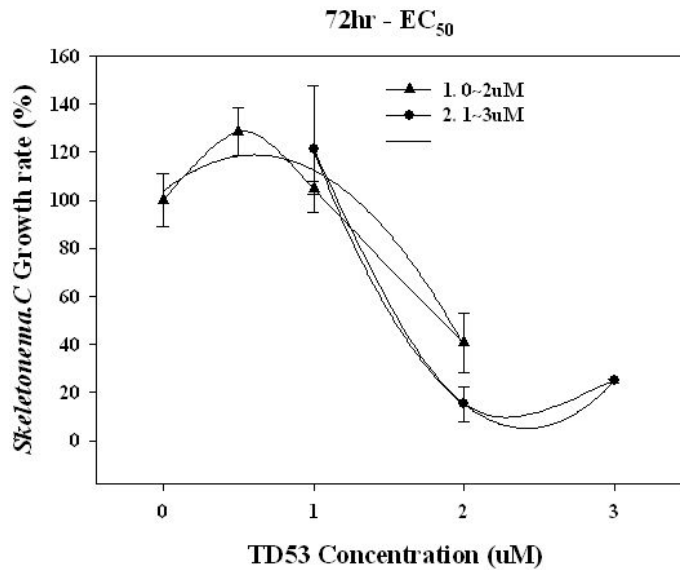


그림 3-56. TD53의 농도에 따른 *S. costatum* 성장률

② DMSO 0.25%, 0.50%, 0.75%는 각각 TD53농도 1, 2, 3 uM에 포함된 DMSO 양과 같다. 72 hr 후의 *S. costatum*은 DMSO의 농도에 상관없이 비교적 일정하게 자라고 있음을 보여주고 있으므로, DMSO는 *S. costatum* 성장률에 영향을 나타내지 않는 것으로 사료된다 (그림 3-57).

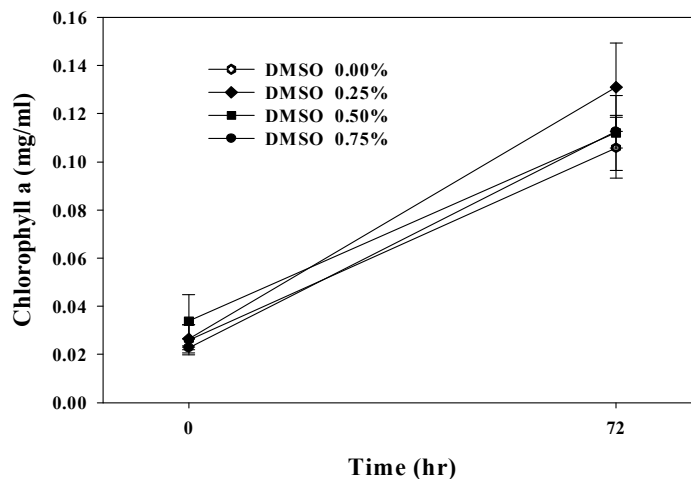


그림 3-57. DMSO의 농도에 따른 *S. costatum* 성장 영향 평가

아. 용해도를 개량한 TD49의 적조제어 및 생태계 위해성 마이크로코즘 평가

① 마이크로코즘에서 수용성 TD49에 대한 생태계 변화

가) 2차년도 (2009년) 실험에서 TD49(DMSO 용해)을 0.05 μ M 투여 시, 효과

적인 살조능을 보였음

나) 그러나 본 연구에서 TD49는 1 μM 에서 살조능을 보임 (그림 3-58)

다) 특히, solvent에서도 같은 살조능을 보여, TD49에 대한 효능인지, solvent의 살조능인지 구분하기 어려움.

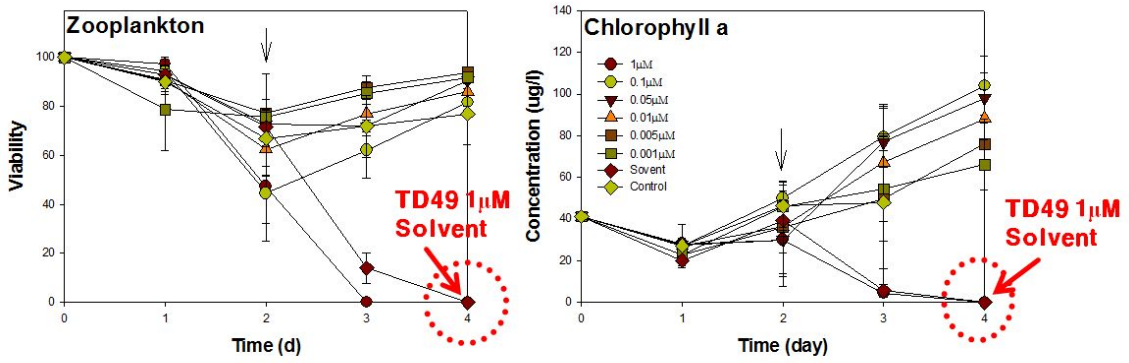


그림 3-58. 마이크로코즘에서 수용성 TD49에 대한 부유생물 군집 변화

② 농도별 TD49/Solvent의 살조능

가) TD49 자체의 살조능보다 solvent에 대한 살조능 판단 (그림 3-59)

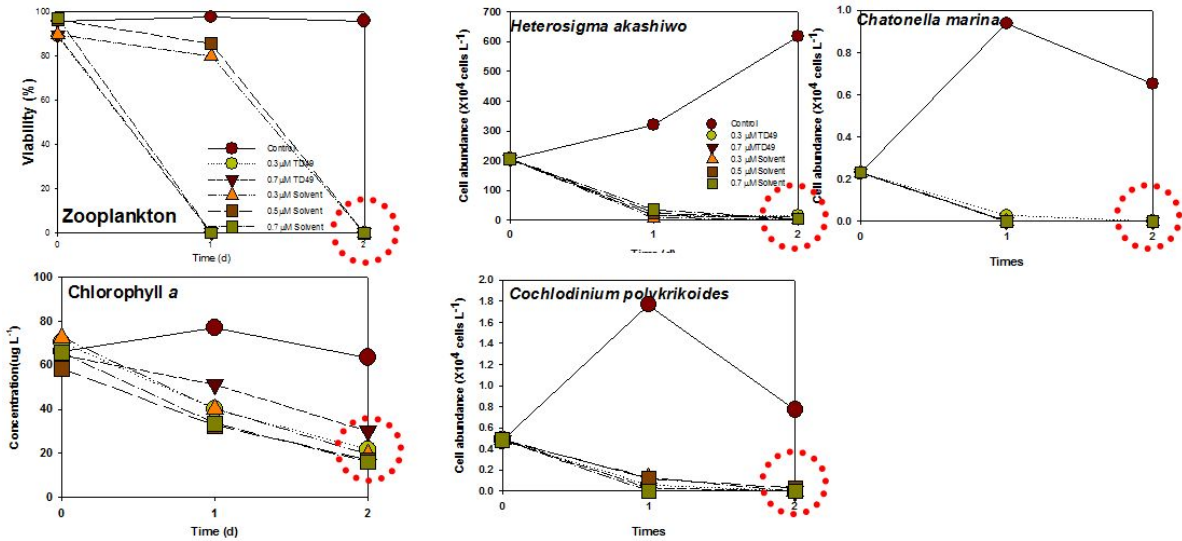


그림 3-59. TD49와 용매(solvent)에 대한 부유생물 군집 위해성 평가

자. Mg-Clay의 어류치어의 반수치사농도

① 농도별 참돔 (*Pagrus major*)의 사망률 (그림 3-60)

가) 0.1%에서 사멸. 따라서 0.1%-0.01%에서 참돔 사망농도 파악이 필요

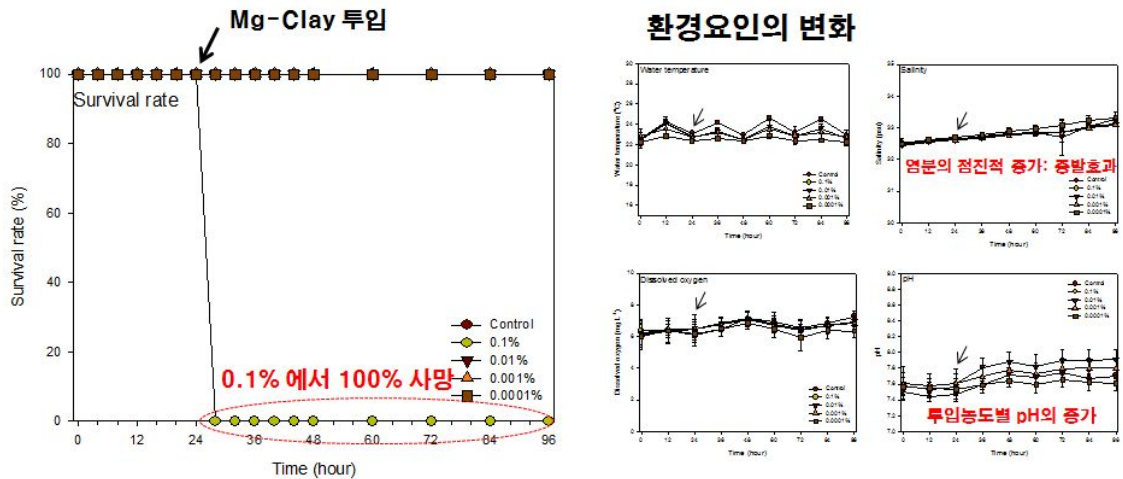


그림 3-60. Mg-Clay의 참돔 치어에 대한 마이크로코즘 위해성 평가

나) 0.1-0.01% 농도별 참돔 (*Pagrus major*)의 사망률 (그림 3-61)

- 1) Mg-Clay 투입 후 0.1%: 5시간, 0.07%: 6시간 만에 100% 사멸, 0.03%는 100% 생존
- 2) Mg-Clay 투입 후 pH 급격히 증가함. 따라서 pH shock에 따른 사망인지 여부판단 필요

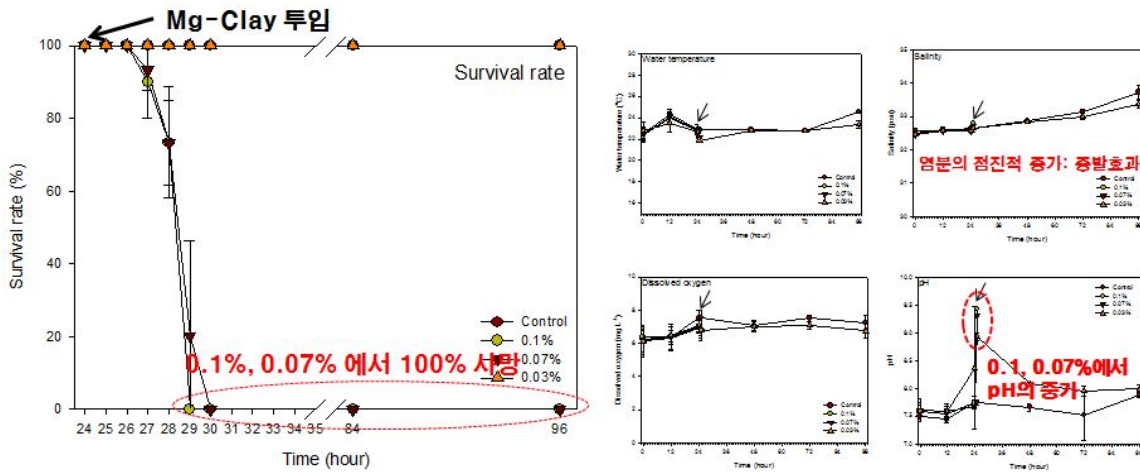


그림 3-61. 0.1-0.01% 농도별 참돔 (*Pagrus major*)의 사망률

다) 참돔 (*Pagrus major*)의 pH test

- 1) pH 변화가 참돔의 생존에 영향을 미치지 않음(그림 3-62)
- 2) 0.07%의 Mg-Clay에서 참돔의 사멸 이유 파악 필요

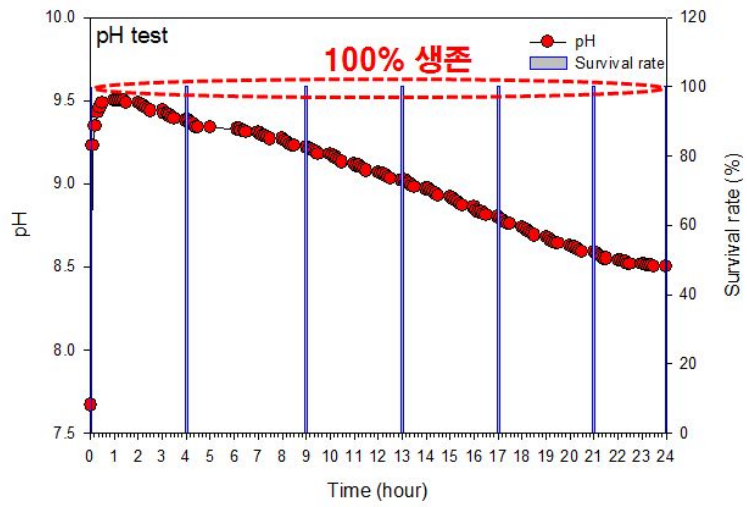


그림 3-62. pH 변화에 따른 참돔 치어의 생존률

라) 참돔 (*Pagrus major*)의 아가미 관찰

1) Mg-Clay가 아가미에 붙어 체내 산소 공급 억제에 따른 사망

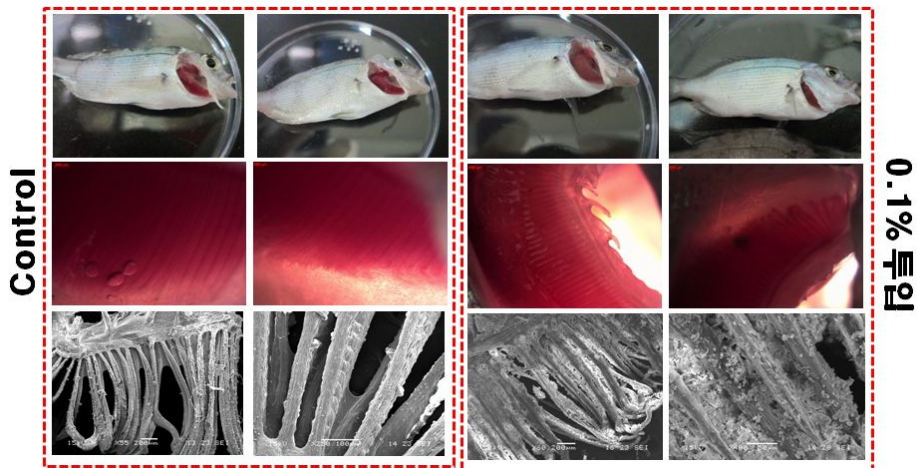


그림 3-63. 참돔 치어 아가미 내에 부착된 Mg-Clay

② 농도별 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 사망률

가) Mg-Clay 투입 후 0.1%와 0.07%에서 각각 66%와 44% 사멸

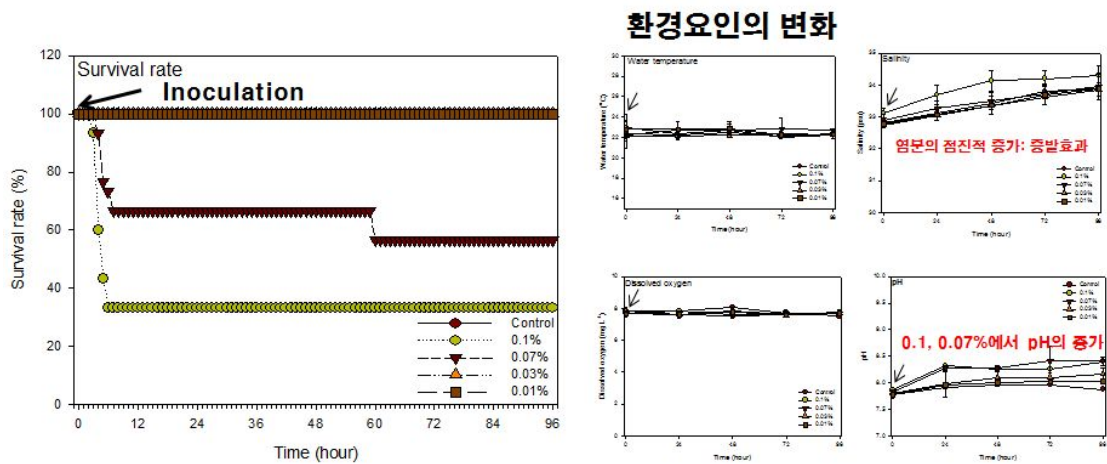


그림 3-64. Mg-Clay의 넙치 치어에 대한 마이크로코즘 위해성 평가

나) 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 아가미 관찰
 1) Mg-Clay가 아가미에 붙어 체내 산소 공급 억제

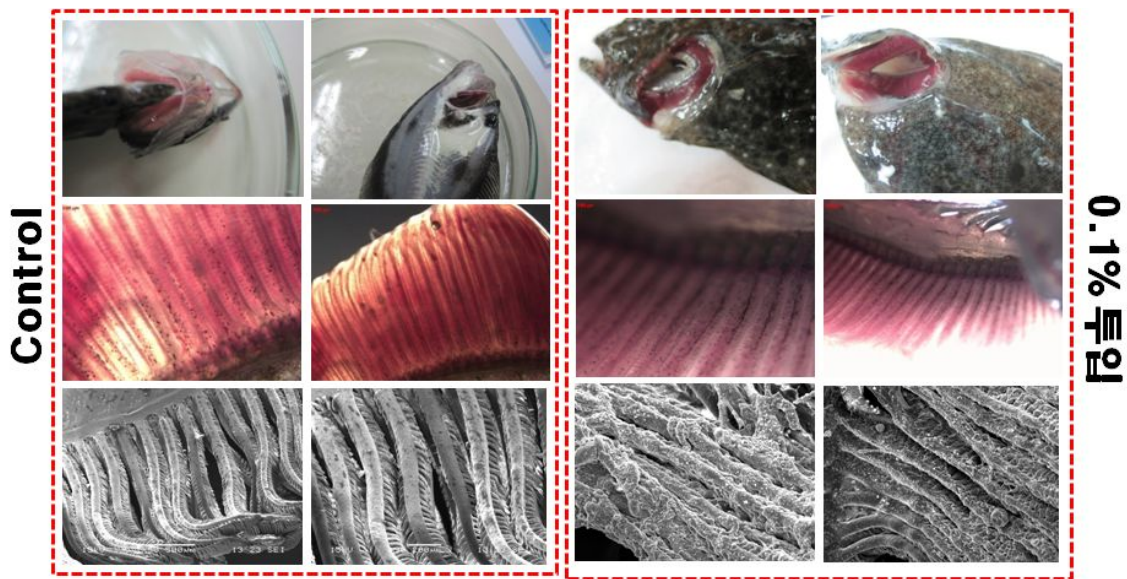


그림 3-65. 넙치 치어 아가미 내에 부착된 Mg-Clay

③ 참돔(*Pagrus major*) 및 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 LC₅₀ 농도

| Species | LC ₅₀ (95% confidence limits between lower con. and upper con.) |
|-------------------------------------|--|
| 참돔(<i>Pagrus major</i>) | 0.050 (0.043-0.056) |
| 넙치(<i>Paralichthys olivaceus</i>) | 0.080 (0.056-0.100) |

(다) Scale-up 메소코즘에서 Mg-Clay의 유해적조 제어 및 생태계 위해성 평가
 가. 수체혼합장치의 개발

- ① 메소코즘 내 최대/최소 수체 혼합속도: 0-120 rpm
- ② 적정 혼합속도(와류 불형성): 30-40 rpm
- ③ 단전 대비 축전지 연결
- ④ 현장 사용 시 안전 대비 정격전압 12V (24V 상향 가능)
- ⑤ 자동 속도 조절 가능
- ⑥ 시간대별 수체 혼합 가능

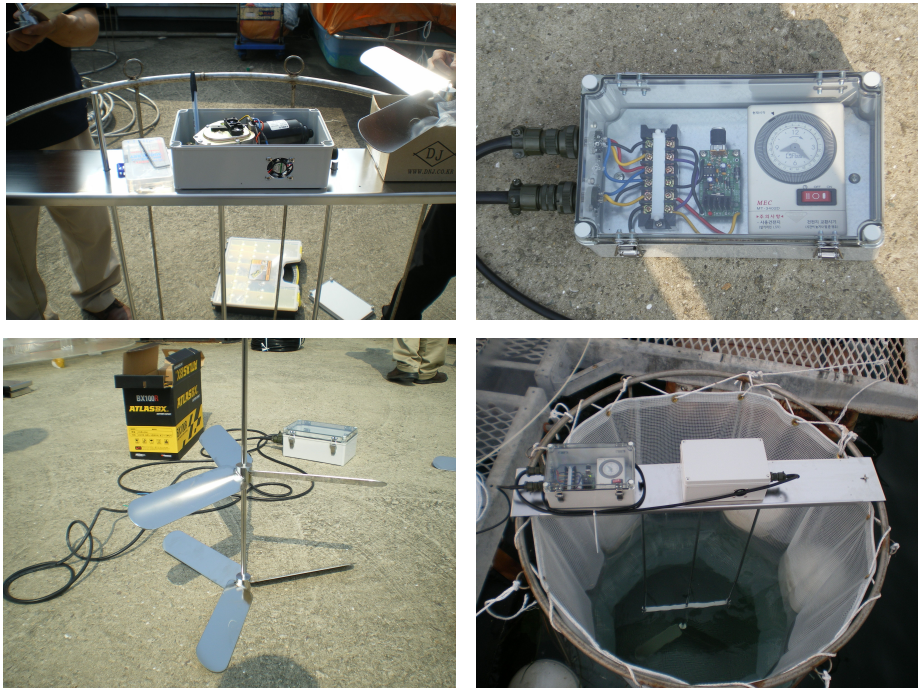


그림 3-66. 메소코즘 내의 수체 교반기

나. 메소코즘을 이용한 유해적조 *Heterosigma akashiwo*의 배양
 접종 후 6일째 외부 생물 오염 없이 2.80×10^6 cells/L로 정지기에 도달

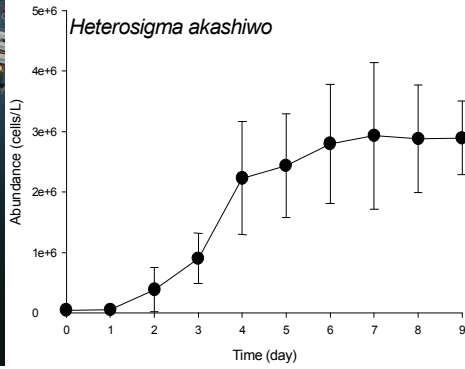


그림 3-67. 수평적 Scale-up 메소코즘의 플랫폼 설치 및 *Heterosigma akashiwo*의 대량배양을 통한 성장을

다. Scale-up 메소코즘에서 Mg-Clay 투입후 유해적조 *Heterosigma akashiwo*의 살조능 및 생태계 위해성 평가

- ① 외부 대기온도의 낮아짐에 따라 수온 감소
- ② 염분: 폐쇄효과에 따른 미약한 증가
- ③ 용존산소: Mg-Clay 투입후 초기 감소후 증가
- ④ pH: Mg-Clay 투입 후 급격한 증가 후 안정

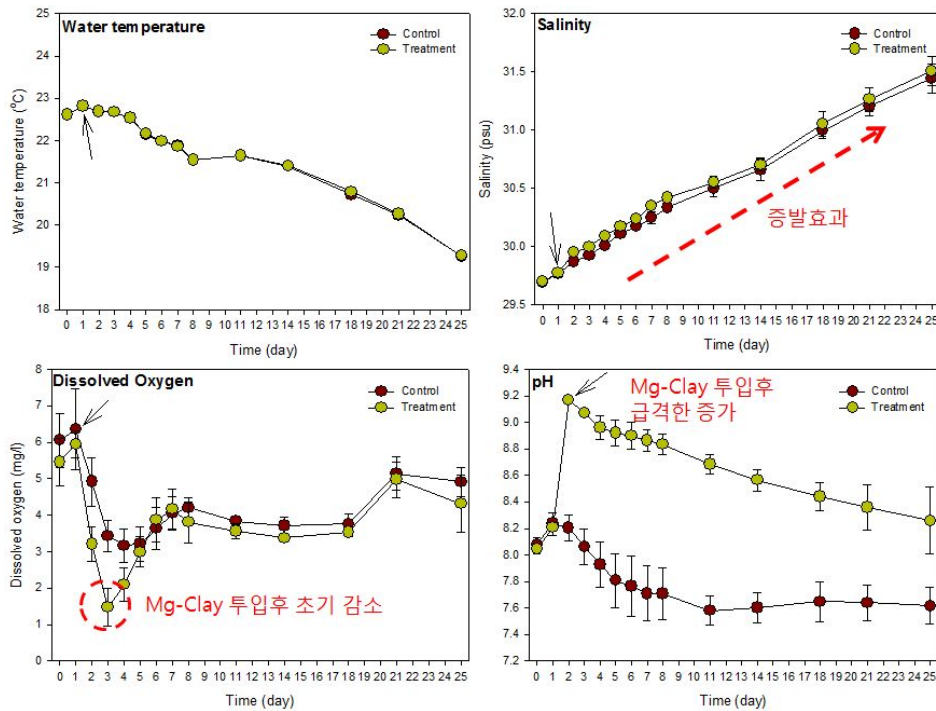


그림 3-68. Mg-Clay 투입에 따른 메소코즘 수체의 수환경 변화

- ⑤ 박테리아: 대조구와 비교시 Mg-Clay 투입후 상대적 감소
- ⑥ HNF: Mg-Clay 투입후 초기 감소후 증가

⑦ pico size 식물플랑크톤: 대조구에서는 후기에 급격히 증가한 반면, 처리구에서는 증감 양상을 보이지 않음

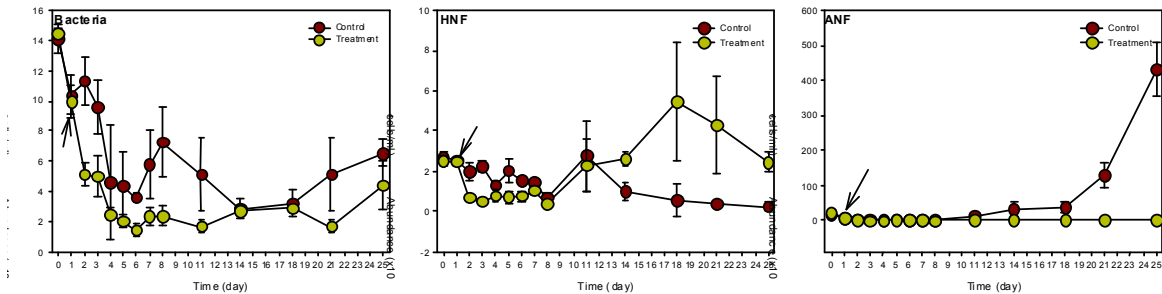


그림 3-69. Mg-Clay 투입에 따른 메소코즘 수체내의 박테리아와 종속, 독립미소편모조류 개체수의 변화

⑧ Chlorophyll a: Mg-Clay 처리시 초기 급감 후, 재증가

⑨ pico-size chlorophyll a: 후기 대조구에서 급격히 증가 (pico-phyto plankton 개체수 급격한 증가)

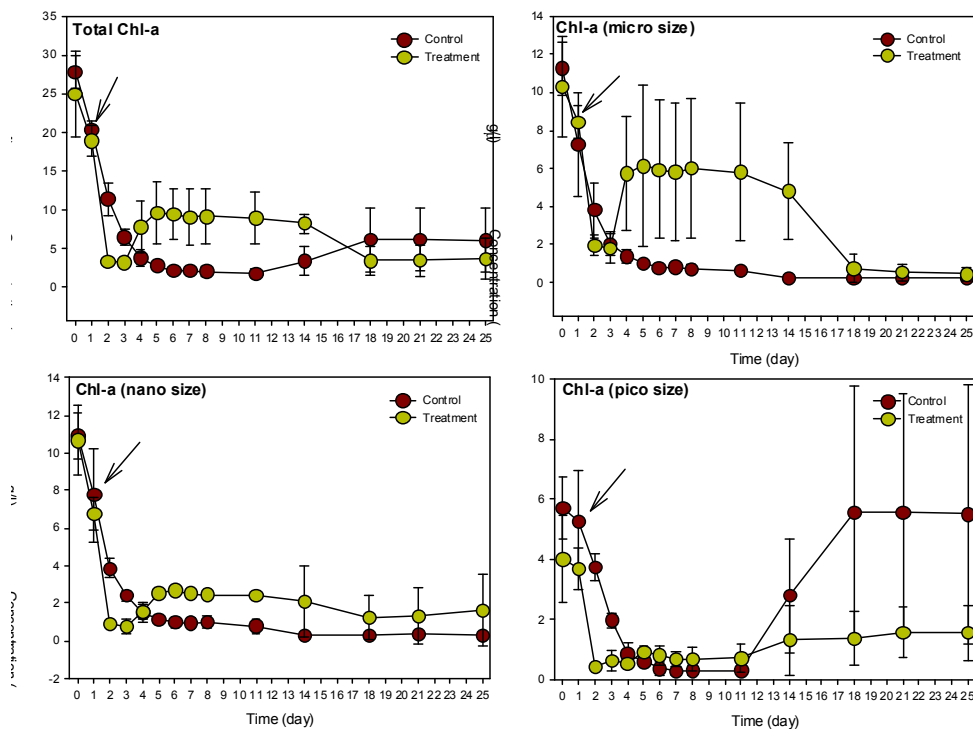


그림 3-70. Mg-Clay 투입에 따른 메소코즘 수체내의 크기 분획별 Chl. a 농도 변화

⑩ 식물플랑크톤 개체수 변동: Mg-Clay 투입후 2일째까지 감소하다가 재증가를 보인면, 대조구에서는 계속적 감소 (동물플랑크톤의 포식압)

⑪ 처리구의 재증가 원인: Mg-Clay에 내성을 보이는 unidentified

pico-flagellates의 증가

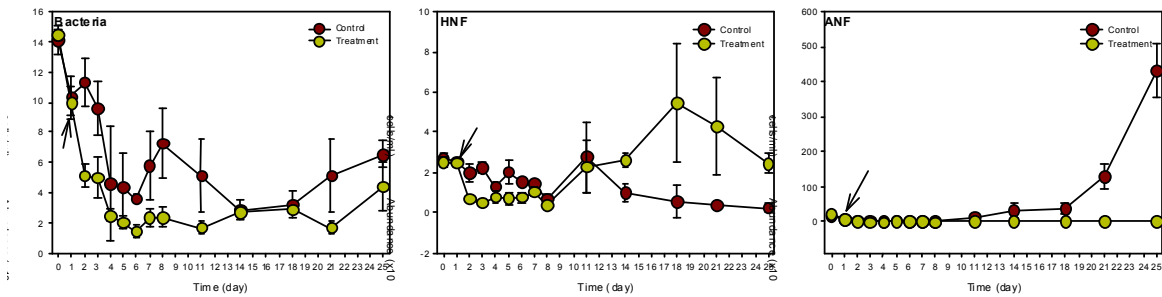


그림 3-71. Mg-Clay 투입에 따른 메소코즘 수체내의 식물플랑크톤과 *Heterosigma akashiwo* 개체수의 변화

- ⑫ 동물플랑크톤 개체수 변동: Mg-Clay가 투입 후 1일째, 개체수가 급감하여 54개체/L까지 감소한 반면, 대조구에서는 1, 249개체/L로 증가 (야광충의 증가가 주도)

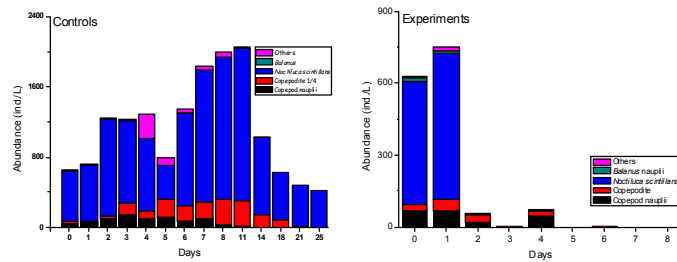


그림 3-72. Mg-Clay 투입에 따른 메소코즘 수체내의 동물플랑크톤 개체수의 변화

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표 및 달성도

| 목 표 | 내 용 | 달성도 (%) |
|---|--|---------|
| 후보 살조물질의 물리화학적 특성조사 및 독성 평가 및 QSAR 자료조사 및 모델 검토 | - 타연구자로부터 후보 살조물질이 아직 확보되지 않았으며, 후보 살조물질에 대한 QSAR 해석 | 100 |
| 컬럼 제작 | - 입자의 침강속도 분석용 컬럼 주문제작 (재질: 원통형 유리, H:130cm, D:30cm) | 100 |
| 확산 분포도 조사용 인공 수조 제작 | - 입자의 거동해석용 수조 주문제작 (재질: 강화유리, L:240cm, W:120cm, H:120cm) | 100 |
| 입자의 침강속도 해석 | - 나노 모방 입자의 확보 다양한 형태의 입자 제작 및 물리적 특성 조사 - 침강속도 조사 및 이론적 해석 | 100 |
| 적조때 수심에서 확산 및 분포 가능한 입자의 최적 밀도 및 크기 제안 | - 입자의 일정 밀도 가정시 입자의 최적 크기 제안 - 입자의 일정 크기 가정시 입자의 최적 밀도 제안 - <i>Re</i> 수에 따른 최적 크기 및 밀도 제안 | 100 |
| 식물성플랑크톤에 대한 생물노출평가 | - TD53에 대한 식물성플랑크톤(<i>Skeletonema costatum</i>)의 급성독성평가 결과, EC_{50} 은 1.5~1.9 μ M로 나타났으며, TD53에 대해 어느 정도 민감도를 나타냄. - DMSO는 <i>S. costatum</i> 성장률에 영향을 나타내지 않는 것으로 사료됨. | 100 |
| 양식어종 치어에 대한 생물노출평가 | - TD53에 대한 넙치치어의 급성독성평가 결과, 돌돔치어, 황복치어에 비해 TD53의 효과가 컸으며, LC_{50} 은 1.19 μ M. - TD53에 대한 황복치어의 급성독성평가 결과, 독성 민감성이 비교적 낮았으며, 96 hr의 LC_{50} 값은 2.9 μ M. - 각 농도의 용매독성(DMSO)은 없음. | 100 |
| 갯지렁이를 이용한 생물노출평가 | - 실험 진행 중. | 50 |

| 목 표 | 내 용 | 달성도 (%) |
|--|--|---------|
| 구멍갈파래를 이용한 독성평가 | TD53 : - DMSO에 대한 용매독성은 없음. - (DMSO + TD53)의 EC ₅₀ : 1.65 uM - (DMSO + TD53)의 NOEC : 0.63 uM TD49 : - Solutol의 EC ₅₀ : 1.70 uM - Solutol의 NOEC : 1.25 uM - (Solutol + TD49)의 EC ₅₀ : 0.18 uM - (Solutol + TD49)의 NOEC : 0.08 uM | 100 |
| 구멍갈파래를 이용한 독성평가 예측무영향농도(PNEC)를 도출 | - (DMSO + TD53)의 PNEC : 1.65 nM - Solutol의 PNEC : 1.70 nM - (Solutol + TD49)의 PNEC : 0.18 nM [Toxicity Assessment of New Algicides of Thiazolidinediones derivatives, TD53 and TD49, using <i>Ulva pertusa</i> Kjellman (in press) The Korean Society for Environmental Healthy & Toxicology]논문 게재. | 100 |
| 식물성플랑크톤(<i>Skeletonema costatum</i>)을 이용한 TD53, 49의 급성독성평가 | - TD53 : 96시간 EC ₅₀ 은 1.53 μM로 평가됨. - TD49 : 96시간 EC ₅₀ 은 0.34 μM로 평가됨. - DMSO 및 Solutol : 독성영향이 거의 나타나지 않음. | 100 |
| 물벼룩(<i>Daphnia magna</i>)을 이용한 TD53, 49의 급성독성평가 | - TD53 : 48시간 EC ₅₀ 은 0.61 μM로 평가됨. - TD49 : 48시간 EC ₅₀ 은 0.68 μM로 평가됨. - DMSO 및 Solutol : 독성영향이 거의 나타나지 않음. | 100 |
| 넙치 치어(<i>Paralichthys olivaceus</i>)을 이용한 TD53, TD49의 급성독성평가 | - TD53 : 72시간 LC ₅₀ 은 2.14 μM로 평가됨. - TD49 : 72시간 LC ₅₀ 은 0.58 μM로 평가됨. - DMSO : 72시간 LC ₅₀ 은 2.79 μM로 평가됨. - Solutol : 독성영향이 거의 나타나지 않음. | 100 |
| 구멍갈파래를 이용한 TD53, 49의 독성평가 | - TD53 : 96시간 EC ₅₀ 은 1.65 μM, NOEC : 0.63 uM, 1.65 nM로 평가됨. - TD49 : 96시간 EC ₅₀ 은 0.18 μM, NOEC : 0.08 uM, PNEC : 0.18 nM로 평가됨. - DMSO : 독성영향이 거의 나타나지 않음. - Solutol : 96시간 EC ₅₀ 은 1.70 μM로 평가됨. PNEC값은 일정평가인자 1000적용. (PNEC = EC ₅₀ / 1000) | 100 |

| 목 표 | 내 용 | 달성도 (%) |
|-------------------------------------|---|---------|
| 갯지렁이 혈구세포를 이용한 TD53, 49의 DNA 유전독성평가 | <ul style="list-style-type: none"> - TD53 : 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μM에서 DNA손상이 일어남. 0.001과 0.01 μM은 약 두 배 이상의 차이를 나타냄. - TD49 : 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μM에서 DNA손상이 일어남. - DMSO : 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μM에서 DNA손상이 일어남. - Solutol : 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μM에서 DNA손상이 일어남. - 갯지렁이 혈구세포의 경우 모든 실험에서 정도의 차이는 있으나 DNA손상을 일으켰다. | 100 |
| 예측무영향농도 (PNEC)를 도출 | <ul style="list-style-type: none"> - TD53 : <i>D. magna</i>에 대한 결과로부터 EC₅₀ 0.61 μM, NOEC 0.25 μM, EC₅₀ 0.61 μM, PNEC 6.10 nM이었다. DMSO는 독성 영향이 없는 것으로 나타났다. - TD49 : <i>S. costatum</i>의 독성치로부터 EC₅₀ 0.34 μM, NOEC 0.20 μM, PNEC 3.40 nM로 예측되었다. - TD49의 분산제인 Solutol은 TD49 와 같은 농도 범위 내에서 전혀 독성을 나타내지 않았다. - 구멍갈파래를 이용한 TD53의 96시간 EC₅₀은 1.65 μM, NOEC는 0.63 μM, PNEC는 1.65 nM이었다. DMSO는 독성 영향이 없는 것으로 나타났다. TD49의 경우에는 96시간 EC₅₀은 0.18 μM, NOEC는 0.08 μM, PNEC는 0.18 nM로 나타났다. - Solutol은 EC₅₀은 1.70 μM, NOEC는 1.25 μM, PNEC는 1.70 nM로 독성이 나타났다. | 100 |
| 메소코즘 구조 비교 및 장단점 파악 | - 나노캡시드 처리효과 고려: 폐쇄형, 무독성, 외부 오염원 차단 cap | 100 |
| 메소코즘 구조 고안 및 설계 | - 수체의 부피 결정: 현시점 운용 가능한 크기 100L - polyethylene bag과 지지 프레임 설계 | 100 |
| 메소코즘 제작 및 시험어장 설치 | - 제작 후 설치하여 예비조사를 통한 운용의 문제점 파악 | 100 |

| 목 표 | 내 용 | 달성도 (%) |
|---|--|---------|
| 후보 살조물질의 물리화학적 특성조사 및 독성 평가 및 QSAR 자료조사 및 모델 검토 | - 타연구자로부터 후보 살조물질이 아직 확보되지 않았으며, 후보 살조물질에 대한 QSAR 해석은 조훈 및 한효경 교수가 맡기로 하였음 | 100 |
| 컬럼 제작 | - 입자의 침강속도 분석용 컬럼 주문제작 (재질: 원통형 유리, H:130cm, D:30cm) | 100 |
| 확산 분포도 조사용 인공 수조 제작 | - 입자의 거동해석용 수조 주문제작 (재질: 강화유리, L:240cm, W:120cm, H:120cm) | 100 |
| 입자의 침강속도 해석 | - 나노 모방 입자의 확보 다양한 형태의 입자 제작 및 물리적 특성 조사 - 침강속도 조사 및 이론적 해석 | 100 |
| 적조띠 수심에서 확산 및 분포 가능한 입자의 최적 밀도, 크기 제안 | - 입자의 일정 밀도 가정시 입자의 최적 크기 제안 - 입자의 일정 크기 가정시 입자의 최적 밀도 제안 - Re수에 따른 최적 크기 및 밀도 제안 | 100 |
| 수직적 메소코즘 설계 및 설치 | - 살조 후보물질 처리를 고려하여, 폐쇄성, 외부 오염원 차단 - 수심별 변화를 파악하기 위한 5m 수직적 메소코즘 운용 - 수체의 부피 scale-up: 1000L까지 메소코즘 부피의 증가 - polyethylene bag과 지지 프레임 설계 개발 | 100 |
| 동일수체 공급 장치 개발 | - 부유생물 사멸없이 메소코즘 내 동일 수체 공급 장치 개발 - 제작 후 설치하여 운용의 문제점 파악 | 100 |
| 마이크로코즘에서 살조 후보물질의 살조능 탐색 및 생태계 위해성 평가 | -Thiazolidinedione 유도체 TD45, 48, 49, 53, 57, 60의 생태계 위해성 평가 - TD45, 49, 57의 살조능 및 생태계 위해성 평가 - Mg-clay의 살조능 및 생태계 위해성 평가 | 100 |
| 식물성플랑크톤에 대한 생물노출평가 | - TD53에 대한 식물성플랑크톤(<i>Skeletonema costatum</i>)의 급성독성평가 결과, EC ₅₀ 은 1.5~1.9 uM로 나타났으며, TD53에 대해 어느 정도 민감도를 나타냄. - DMSO는 <i>Skeletonema</i> 성장률에 영향을 나타내지 않는 것으로 사료됨. | 100 |

| 목 표 | 내 용 | 달성도 (%) |
|--------------------------------------|---|---------|
| 양식어종 치어에 대한 생물노출평가 | <ul style="list-style-type: none"> - TD53에 대한 넙치치어의 급성독성평가 결과, 돌돔치어, 황복치어에 비해 TD53의 효과가 컸으며, LC₅₀은 1.19 uM. - TD53에 대한 황복치어의 급성독성평가 결과, 독성 민감성이 비교적 낮았으며, 96 hr의 LC₅₀ 값은 2.9 uM. - 각 농도의 용매독성(DMSO)은 없음. | 100 |
| 갯지렁이를 이용한 생물노출평가 | <ul style="list-style-type: none"> - 실험 진행 중. | 50 |
| 구멍갈파래를 이용한 독성평가 | <p>TD53 : - DMSO에 대한 용매독성은 없음.</p> <p>TD53 : - (DMSO + TD53)의 EC₅₀ : 1.65 uM</p> <p>TD53 : - (DMSO + TD53)의 NOEC : 0.63 uM</p> <p>TD49 : - Solutol의 EC₅₀ : 1.70 uM</p> <p>TD49 : - Solutol의 NOEC : 1.25 uM</p> <p>TD49 : - (Solutol + TD49)의 EC₅₀ : 0.18 uM</p> <p>TD49 : - (Solutol + TD49)의 NOEC : 0.08 uM</p> | 100 |
| 구멍갈파래를 이용한 독성평가 예측무영향농도(PNEC)를 도출 | <ul style="list-style-type: none"> - (DMSO + TD53)의 PNEC : 1.65 nM - Solutol의 PNEC : 1.70 nM - (Solutol + TD49)의 PNEC : 0.18 nM <p>[Toxicity Assessment of New Algicides of Thiazolidinediones derivatives, TD53 and TD49, using <i>Ulva pertusa</i> (in press) The Korean Society for Environmental Healthy & Toxicology]논문 게재.</p> | 100 |
| 수평적 Scale-up 메소코즘 설계 및 설치 | <ul style="list-style-type: none"> - 살조 후보물질 처리를 고려하여, 폐쇄성, 외부 오염원 차단 - 증발효과를 최소화하면서 외부 유해물질 유입 방지 - 수평적 변화를 파악하기 위한 직경 1m 수평적 메소코즘 운용 - 수체의 부피 scale-up: 1000L까지 메소코즘 부피의 증가 - polyethylene bag과 지지 프레임 설계 개발 | 100 |
| 동일수체 공급 장치 개발 | <ul style="list-style-type: none"> - 부유생물 사멸 없이 메소코즘 내 동일 수체 공급 장치 개발 - 제작 후 설치하여 운용의 문제점 파악 | 100 |
| 수체혼합 장치 개발 | <ul style="list-style-type: none"> - 속도 및 시간 조절 기능 개발 - 와류 형성 없이 균일 수체 형성 - 현장 적용시 견고성 파악 | 100 |

| 목 표 | 내 용 | 달성도 (%) |
|--|---|---------|
| 수체혼합 장치 개발 | - 속도 및 시간 조절 기능 개발 - 와류 형성 없이 균일 수체 형성 - 현장 적용시 견고성 파악 | 100 |
| 마이크로코즘에서 살조 후보물질의 살조능 탐색 및 생태계 위해성 평가 | - Thiazolidinedione 유도체 TD49의 생태계 위해성 평가 - Mg-clay의 어류 치어 반수치사농도 파악 | 100 |
| 식물성플랑크톤(<i>Skeletonema costatum</i>)을 이용한 TD53, 49의 급성독성평가 | - TD53 : 96시간 EC ₅₀ 은 1.53 μM로 평가됨. - TD49 : 96시간 EC ₅₀ 은 0.34 μM로 평가됨. - DMSO 및 Solutol : 독성영향이 거의 나타나지 않음. | 100 |
| 물벼룩(<i>Daphnia magna</i>)을 이용한 TD53, 49의 급성독성평가 | - TD53 : 48시간 EC ₅₀ 은 0.61 μM로 평가됨. - TD49 : 48시간 EC ₅₀ 은 0.68 μM로 평가됨. - DMSO 및 Solutol : 독성영향이 거의 나타나지 않음. | 100 |
| 넙치 치어(<i>Paralichthys olivaceus</i>)을 이용한 TD53, 49의 급성독성평가 | - TD53 : 72시간 LC ₅₀ 은 2.14 μM로 평가됨. - TD49 : 72시간 LC ₅₀ 은 0.58 μM로 평가됨. - DMSO : 72시간 LC ₅₀ 은 2.79 μM로 평가됨. - Solutol : 독성영향이 거의 나타나지 않음. | 100 |
| 구멍갈파래를 이용한 TD53, 49의 독성평가 | - TD53 : 96시간 EC ₅₀ 은 1.65 μM, NOEC : 0.63 μM, 1.65 nM로 평가됨. - TD49 : 96시간 EC ₅₀ 은 0.18 μM, NOEC : 0.08 μM, PNEC : 0.18 nM로 평가됨. - DMSO : 독성영향이 거의 나타나지 않음. - Solutol : 96시간 EC ₅₀ 은 1.70 μM로 평가됨. PNEC값은 일정평가인자 1000적용. (PNEC = EC ₅₀ / 1000) | 100 |
| 갯지렁이 혈구세포를 이용한 TD53, 49의 DNA 유전독성 평가 | - TD53 : 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μM에서 DNA손상이 일어남. 0.001과 0.01 μM은 약 두 배 이상의 차이를 나타냄. - TD49 : 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μM에서 DNA손상이 일어남. - DMSO : 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μM에서 DNA손상이 일어남. - Solutol : 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μM에서 DNA손상이 일어남. 갯지렁이 혈구세포의 경우 모든 실험에서 정도의 차이는 있으나 DNA손상을 일으켰다. | 100 |

| 목 표 | 내 용 | 달성도 (%) |
|------------------|--|---------|
| 예측무영향농도(PNEC) 도출 | <ul style="list-style-type: none"> - TD53 : <i>D. magna</i>에 대한 결과로부터 EC₅₀ 0.61 μM, NOEC 0.25 μM, EC₅₀ 0.61 μM, PNEC 6.10 nM이었다. DMSO는 독성 영향이 없는 것으로 나타났다. - TD49 : <i>S. costatum</i>의 독성치로부터 EC₅₀ 0.34 μM, NOEC 0.20 μM, PNEC 3.40 nM로 예측되었다. - TD49의 분산제인 Solutol은 TD49 와 같은 농도 범위 내에서 전혀 독성을 나타내지 않았다. - 구멍갈파래를 이용한 TD53의 96시간 EC₅₀은 1.65 μM, NOEC는 0.63 μM, PNEC는 1.65 nM이었다. DMSO는 독성 영향이 없는 것으로 나타났다. TD49의 경우에는 96시간 EC₅₀은 0.18 μM, NOEC는 0.08 μM, PNEC는 0.18 nM로 나타났다. - Solutol은 EC₅₀은 1.70 μM, NOEC는 1.25 μM, PNEC는 1.70 nM로 독성이 나타났다. | 100 |

2. 기여도

- 동일 입자가 다양한 형태로 응집된 입자들에 대한 폐수계의 층류 및 난류 영역에서 입자들의 궤적 및 침강특성을 해석함.
- 폐쇄 수계의 상부에서 한방향 난류 발생시 전(全) 수체의 유동해석이 가능하게 됨.
- 관형 흐름 유체에 적용하는 *Re*수 해석방법을 폐 수계의 유체에 적용하는 방법을 개발해 다양한 유체 흐름 속에서 입자의 침강궤적 및 침강속도를 해석할 수 있게 됨.
- 폐 수계의 segment별 속도, 방향성분 조사를 통한 *Re*수 해석 및 segment별 침강속도 해석가능.
- 살조물질인 TD53에 대한 식물성 플랑크톤, 양식 어종치어(돌돔치어, 황복치어, 넙치치어), 구멍갈파래를 이용한 급성독성평가의 cross checking을 통하여 PNEC를 도출함.
- 2009년 ISO 국제표준으로 제정한 구멍갈파래를 이용한 급성독성평가를 실시하여 살조물질 (TD53, TD49)에 대한 PNEC를 도출함.
- 살조물질인 TD49와 TD53에 대해 3가지 : i) 구멍갈파래를 이용한 신규의 급성독성평가, ii) 해양생태계 먹이사슬의 주요 3종을 이용한 독성평가, iii) comet assay 를 이용한 갯지렁이 유전자 손상에 의한 방법 의 급성독성 노출평가를 실시 완료하여, 각 방법에 따른 독성예측치를 상호비교하여 급성노출평가의 신뢰성을 제고하였음.

- 다양한 방법의 급성 노출 독성평가를 실시하여 독성치를 상호 비교하여 급성독성평가의 불확실성을 줄임.
- 각 방법에서 도출한 PNEC를 통해 신규 살조물질 (TD53, TD49)의 현장살포시 안정한 수준의 가이드라인을 제공할 수 있게 됨.
- 가장 민감한 종에 대한 PNEC를 도출하여 살조물질의 현장적용시 안정한 살포기준에 대한 가이드를 제공함.
- 나노캡시드의 생태계 위해성 평가를 위한 사전 단계에서 제작된 메소코즘의 자체에서 발생하는 부유생태계의 변화 여부를 파악함으로써 차후 나노캡시드 주입 효과의 간접요인을 제어할 수 있는 과학적 자료를 확보함.
- 현재 국내에서 수서생태계 위해성 평가에 메소코즘을 적용한 사례는 없으며 특히 개발된 물질의 유해성 유무를 사전에 충분히 평가하기 위해 자연생태계에 최대한 근접된 환경조건 즉 현장에 설치된 인공생태계에서 평가함은 현재 미국 EPA에서도 권장하고 있는 방법이다. 따라서 본 연구방법은 국내에서는 파이오니아적 방법론으로 창의성이 매우 높다고 판단됨.
- 동일 입자가 다양한 형태로 응집된 입자들에 대한 폐수계의 층류 및 난류 영역에서 입자들의 궤적 및 침강특성을 해석함.
- 폐쇄 수계의 상부에서 한방향 난류 발생시 전(全) 수체의 유동해석이 가능하게 됨.
- 관형 흐름 유체에 적용하는 Re수 해석방법을 폐 수계의 유체에 적용하는 방법을 개발해 다양한 유체 흐름 속에서 입자의 침강궤적 및 침강속도를 해석할 수 있게 됨.
- 폐 수계의 segment별 속도, 방향성분 조사를 통한 Re수 해석 및 segment별 침강속도 해석가능.
- 메소코즘 연구의 가이드라인 제시를 위한 수직적 메소코즘 연구에서, 수심에 따른 부유생물상의 변화 및 환경요인을 파악함으로써 차후 최적 메소코즘 선정을 위한 가이드라인을 제시할 수 있는 과학적 자료를 확보하였으며, 메소코즘의 scale-up을 통한 수체 부피의 증가에 따른 수체 이질화를 방지할 수 있는 동일 수체 공급 방법 개발
- 현재 국내에서 해양생태계에서 위해성 평가에 폐쇄생태계를 적용한 사례는 없으며 특히 개발된 물질의 유해성 유무를 사전에 충분히 평가하기 위해 자연생태계에 최대한 근접된 환경조건 즉 현장에 설치된 인공생태계에서 평가함은 현재 미국 EPA에서도 권장하고 있는 방법이다. 따라서 본 연구방법은 국내에서는 파이오니아적 방법론으로 창의성이 매우 높다고 판단됨.
- 마이크로코즘을 통한 살조후보물질의 살조능 탐색은 적정 투입 농도 선정 및 살조후보물질의 적절성, 생태계 위해성 평가를 실시함으로써, 향후 자연생태계와 더욱 유사한 scale-up 메소코즘에서의 연구 방향을 제시할 수 있음.
- 살조물질인 TD53에 대한 식물성 플랑크톤, 양식 어종치어(돌돔치어, 황복치어, 넙치치어), 구멍갈파래를 이용한 급성독성평가의 cross checking을 통하여 PNEC를 도출함.
- 메소코즘 연구의 가이드라인 제시를 위한 수평적 scale-up 메소코즘 연구에서, 부유생물상의 변화 및 환경요인을 파악함으로써 차후 최적 메소코즘 선정을 위한 가이드라인을 제시할 수 있는 과학적 자료를 확보하였으며, 메소코즘의 scale-up을 통한 수체 부

- 피의 증가에 따른 수체 이질화를 방지할 수 있는 동일 수체 공급 방법 개발하였음.
- 폐쇄생태계는 해류의 흐름을 제어되어 있기 때문에, 인위적인 혼합을 시켜줘야 하는 단점을 가지고 있음. 따라서 본 연구에서 이러한 단점을 극복하고자 시간에 따라 적정 속도의 수체를 혼합할 수 있는 장치를 개발하였음. 이는 자연 생태계에 근접한 생태계 환경을 만들 수 있으며, 이와 같은 현장 메소코즘에서 수체혼합장치의 적용은 국내의에서의 연구가 미진한 부분으로, 창의성이 매우 높다고 판단됨.
 - 현재 국내에서 해양생태계에서 위해성 평가에 폐쇄생태계를 적용한 사례는 없으며 특히 개발된 물질의 유해성 유무를 사전에 충분히 평가하기 위해 자연생태계에 최대한 근접된 환경조건 즉 현장에 설치된 인공생태계에서 평가함은 현재 미국 EPA에서도 권장하고 있는 방법이다. 따라서 본 연구방법은 국내에서는 파이오니아적 방법론으로 창의성이 매우 높다고 판단됨.
 - 마이크로코즘을 통한 살조후보물질의 살조능 탐색은 적정 투입 농도 선정 및 살조후보 물질의 적절성, 생태계 위해성 평가를 실시함으로, 향후 자연생태계와 더욱 유사한 scale-up 메소코즘에서의 연구 방향을 제시할 수 있음
 - 살조물질인 TD49와 TD53에 대해 3가지 : i) 구멍갈파래를 이용한 신규의 급성독성평가, ii) 해양생태계 먹이사슬의 주요 3종을 이용한 독성평가, iii) comet assay 를 이용한 갯지렁이 유전자 손상에 의한 방법 의 급성독성 노출평가를 실시 완료하여, 각 방법에 따른 독성예측치를 상호비교하여 급성노출평가의 신뢰성을 제고하였음.
 - 다양한 방법의 급성 노출 독성평가를 실시하여 독성치를 상호 비교하여 급성독성평가의 불확실성을 줄임.
 - 각 방법에서 도출한 PNEC를 통해 신규 살조물질(TD53, TD49)의 현장살포시 안정한 수준의 가이드라인을 제공할 수 있게 됨.
 - 가장 민감한 종에 대한 PNEC를 도출하여 살조물질의 현장적용시 안정한 살포기준에 대한 가이드를 제공함.

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 평가기법을 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.

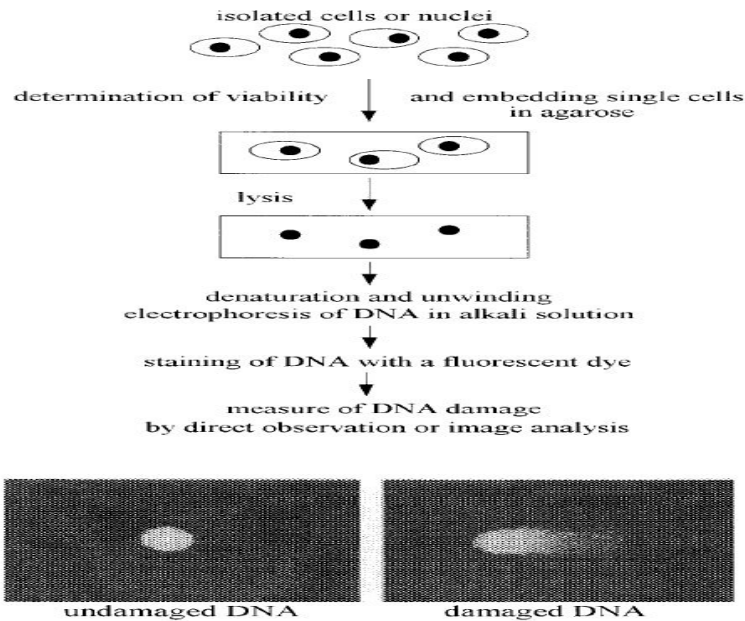


그림 6-1. Comet assay 방법

- 해양생태계의 생물이 아닌 담수성 갑각류인 물벼룩에 대한 평가 결과로부터 해수성 갑각류인 새우의 급성독성평가 결과로 전환이 가능함을 시사.
- Mesocosm 적용 평가의 체계화 (그림 62)

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).

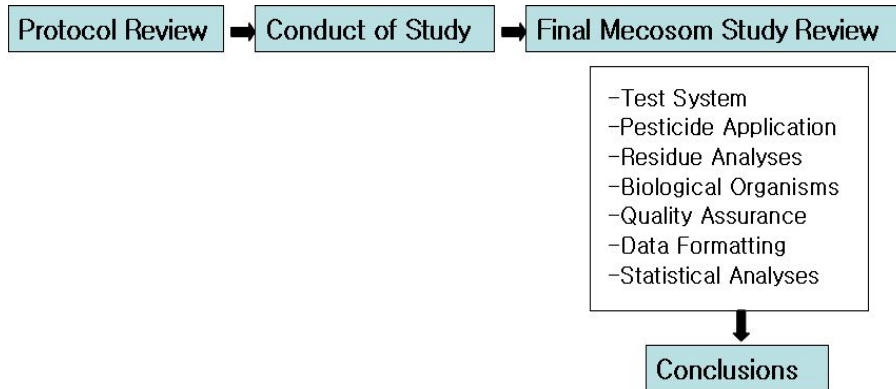


그림 6-2. 미국 EPA의 메소코즘을 적용한 생태계 위해성 평가를 위한 과정

- 메소코즘 적용 생태계 위해성 평가의 탄력성 (그림 63)

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).

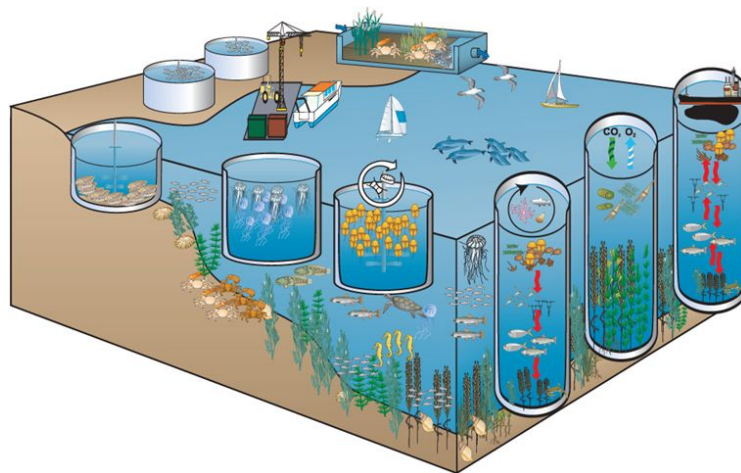


그림 6-3. 미국 Multiscale Experimental Ecosystem Reserach Center (MEERC)의 메소코즘을 적용한 생태계 위해성 평가의 다양화

- 자연생태계를 대신하는 인공생태계의 대형화 (그림 64)

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

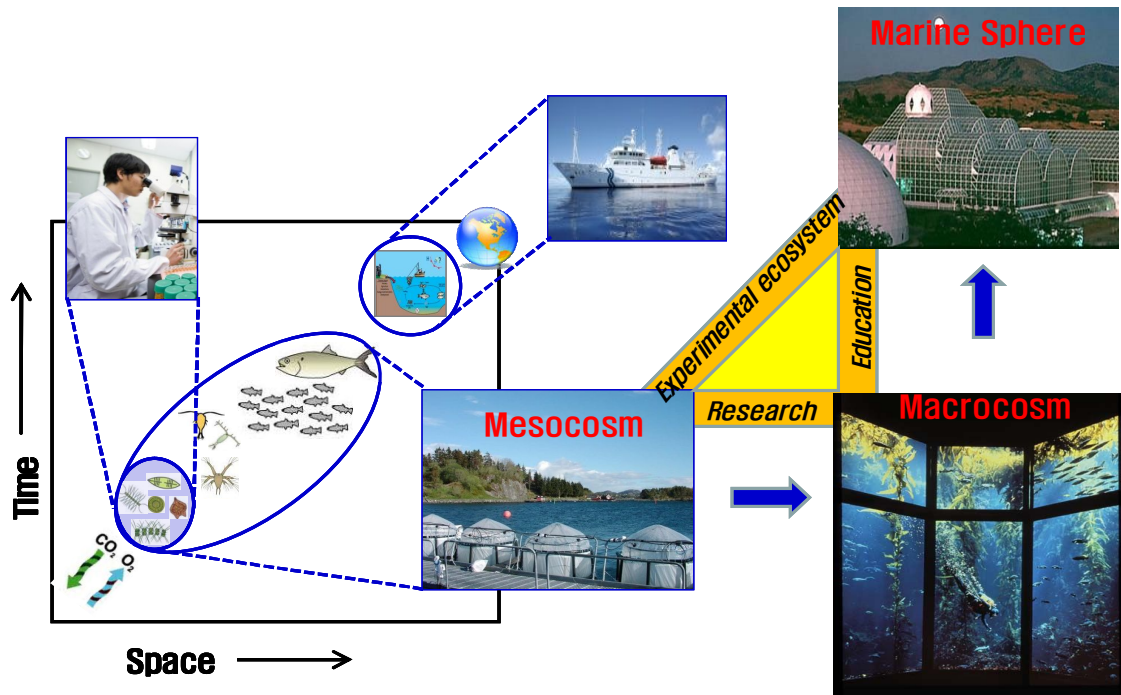


그림 6-4. 메소코즘의 대형화를 통한 연구, 교육, 관람의 발전 모식도

제 7 장 참고문헌

- Anderson, D.M. (1997) Turning back the harmful red tide, *Nature*, 388: 513-514.
- Anderson, D.M. (2009) Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs), *Ocean Coastal Management*, 52: 342-347.
- Boesch, D.F., D.M. Anderson, R.A. Horner, S.E. Shumway, P.A. Tester and T.E. Whittedge (1997) Harmful Algal Blooms in Coastal Waters: Options for Prevention, Control and 12. Mitigation, NOAA Coastal Ocean Program Decision Analysis Series No. 10. NOAA Coastal Office. Silver Spring., MD. p. 46.
- Chambouvet, A., P. Morin, D. Marie et al. (2008) Control of toxic marine dinoflagellate blooms by serial parasitic killers, *Science*, 322: 1254-1257.
- Corrales, R.A., J.L. Maclean (1995) Impacts of harmful algae on seafarming in the Asia-Pacific areas, *J Appl Phycol.*, 7: 151-162.
- DellaGreca, M., A. Fiorentino, M. Isidori, P. Monaco, F. Temussi and A. Zarrelli (2001) Antialgal furano-diterpenes from *Potamogeton natans* L, *Phytochem.*, 299-304.
- Elendt, B.P. and W.R. Bias (1990) Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing: effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Wat. Res.*, 24: 1157-1167.
- Fonseca, M.G. and C. Airoldi (2000) Mercaptopropyl magnesium phyllosilicate-thermodynamic data on the interaction with divalent cations in aqueous solution, *Thermochim. Acta.*, 359: 1 - 9.
- Geiser, M., B. Rothen-Rutishauser, N. Kapp, S. Schurch, W. Kreyling, H. Schulz, M. Semmler, V.I. Hof, J. Heyder and P. Gehr (2005) Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells, *Environ. Health Perspect.*, 113: 1555 - 1560.
- Gregg, M.D. and G.M. Hallegraeff (2007) Efficacy of Three Commercially Available Ballast Water Biocides against Vegetative Microalgae, Dinoflagellate Cysts and Bacteria, *Harmful Algae*, 6: 567.
- Gustafsson, S., M. Hultberg, R.I. Figueroa and K. Rengefors (2009) On the control of HAB species using low biosurfactant concentrations, *Harmful Algae*, 8: 857-863.


- Hallegraeff, G.M. (1993) A review of harmful algal blooms and their apparent global increase, *Phycologia*, 32: 79–99.
- Han, T. and G.W. Choi (2005) A novel marine algae toxicity bioassay based on sporulation inhibition in the green macroalgae *Ulva pertusa* (chlorophyta), *Aquatic Toxicology*, 75: 202–212.
- Han, T, S.H. Kang, J.S. Park, H.K. Lee and M.T. Brown (2008) Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure, *Aquat. Toxicol.*, 86: 176–1184.
- Han, T, Y.S. Han, C.Y. Park, Y.S. Jun, M.J. Kwon and M.T. Brown (2007) Spore release by the green alga *Ulva*: a simple and sensitive method to evaluate aquatic toxicants, *Environmental Pollution*, (on-line available).
- Han, T. and G.W. Choi (2005) A novel marine algae toxicity bioassay based on sporulation inhibition in the green macroalgae *Ulva pertusa* (chlorophyta), *Aquatic Toxicology*, 75: 202–212.
- Han, T., Y.S. Han, C.Y. Park, Y.S. Jun, M.J. Kwon and M.T. Brown (2007) Spore release by the green alga *Ulva*: a simple and sensitive method to evaluate aquatic toxicants, *Environmental Pollution*, (on-line available)
- Han, T., S.H. Kang, J.S. Park, H.K. Lee and M.T. Brown (2008) Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure, *Aquat. Toxicol.*, 86: 176–1184.
- Han, Y.S., M.T. Brown, G.S. Park and T. Han (2007) Evaluating aquatic toxicity by visual inspection of thallus color in the green microalgae *Ulva*: testing a novel bioassay, *Environmental Science & Technology*, 41: 3667–3671.
- Jasti, S., M.E. Sieracki, N.J. Poulton, M.W. Giewat, and J.N. Rooney-Varga. (2005) Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium* spp. and other phytoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 3483–3494.
- Jeong, J.H., H.J. Jin, C.H. Sohn, K.H. Suh and Y.K. Hong (2000) Algicidal activity of the seaweed *Corallinapilulifera* against redtide microalgae, *J. Appl. Phycol.*, 12: 37–43.
- Jeong, N., J.Y. Kim, S.C. Park, J.K. Lee, R. Gopal, S. Yoo, B.K. Son, J.S. Hahm, Y. Park and K.S. Hahm (2010) Antibiotic and synergistic effect of Leu-Lys rich peptide against antibiotic resistant microorganisms isolated from patients with cholelithiasis, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 399: 581 - 586.

- Kirkpatrick, B., L.E. Fleming, D. Squicciarini et al. (2004) Literature review of Florida red tide: implications for human health effects. *Harmful Algae*, 3: 99-115.
- Larsen, J.B., A. Larsen, G. Bratbak and R.A. Sandaa (2008) Phylogenetic analysis of members of the Phycodnaviridae virus family, using amplified fragments of the major capsid protein gene, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 3048 - 3057.
- Lauro, F.M., R.A. Chastain, L.E. Blankenship, A.A. Yayanos and D.H. Bartlett (2007) The unique 16S rRNA genes of Piezophiles reflect both phylogeny and adaptation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 838-845.
- Lawrence, J.E., A.M. Chan and C.A. Suttle (2001) A novel virus (HaNIV) causes lysis of the toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), *J. Phycol.*, 37: 216-222.
- Li, H., J.L. Miao, F.X. Cui and G.Y. Li (2006) Promotion of Hexadecyltrimethylamine Bromide to the Damage of *Alexandrium* sp. Lc3 by Cupric Glutamate, *Journal of Environmental Sciences*, 18: 1152-1156.
- Liu, Q.H., J. Huang, W.J. Han (2006) Expression, purification and characterization of WSSV-VP37 in *Pichia pastoris*. *Aquaculture*, 258: 55-62.
- OECD (1984) OECD Guideline for Testing of Chemicals., 201: Alga, growth inhibition test. Paris.
- OECD (2004) *Daphnia* sp. acute immobilization test. OECD test guideline 202. Organization for the Economic Cooperation and Development, Paris
- Paerl, H.W. and C.S. Tucker (1995) Ecology of blue-green algae in aquaculture ponds, *J. World Aquacult. Soc.*, 31: 173-180.
- Parsons, T.R., Y.M. Maita and C.M. Lalli (1972) A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, pp 173.
- Peterson, J.E., W.M. Kemp, R. Bartleson, W.R. Boynton, C.C. Chen, J.C. Cornwell, R.H. Gardner, D.C. Hinkle, T.C. Houde, T.C. Malone, W.P. Mowitt, L. Murray, L.P. Sanford, J.C. Stevenson, K.L. Sunberg and S.E. Suttles (2003) Multiscale experiments in coastal ecology: Improving realism and advancing theory, *BioScience*, 53: 1181-1197.
- Peterson, J.E., V.S. Kennedy, W.C. Dennison and W.M. Kemp (2009) Enclosed Experimental Ecosystem and Scale : Tools for understanding and managing coastal ecosystems, Springer, pp 219.
- Pierce, R.H., M.S. Henry, C.J. Higham, P. Blum, M.R. Sengco and D.M. Anderson

- (2004) Removal of harmful algal cells (*Karenia brevis*) and toxins from seawater culture by clay flocculation, *Harmful Algae.*, 3: 141-148.
- Riemann, L., G.F. Steward and F. Azam (2000) Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 578-587.
- Rosi, N.L., D.A. Giljohann, C.S. Thaxton, A.K. Lytton-Jean, M.S. Han, C.A. Mirkin. (2006) Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation, *Science*, 312: 1027-1030.
- Roth, B.L., M. Poot, S.T. Yue and P.J. Millaard (1997) Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2421-2431.
- Samel, A., M. Ziegenfuss, C.E. Goulden, S. Banks, and K.N. Baer. (1999) Culturing and bioassay testing of *Daphnia magna* using Elendt M4, Elendt M7, and COMBO media, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 43: 103-119.
- Schrader, K.K. (2005) Evaluation of several commercial algicides for control of odor-producing cyanobacteria, *J. Aquat. Plant Manage.*, 43: 100-102.
- Schrader, K.K. and M.D. (2001) Harries Compounds with selective toxicity toward the musty-odor cyanobacterium *Oscillatoria perornata*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 6: 801-807.
- Schrader, K.K. and N.P. Nanayakkara (2005) Selective algaecides for control of cyanochlorota, *U.S. Patent* 6, 949, 250.
- Schrader, K.K., F.E. Dayan, S.N. Allen, M.Q. de Regt, C.S. Tucker and R.N. Paul Jr (2000) 9,10-Anthraquinone Reduces the Photosynthetic Efficiency of *Oscillatoria perornata* and Modifies Cellular Inclusions, *Int. J. Plant. Sci.*, 161: 265-270.
- Schrader, K.K., N.P. Nanayakkara, C.S. Tucker, A.M. Rimando, M. Ganzera and B.T. Schaneberg (2003) Novel derivatives of 9,10-anthraquinone are selective algicides against the musty-odor cyanobacterium *Oscillatoria perornata*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 5319-5327.
- Sengco, M.R and D.M. Anderson (2004) Controlling harmful algal blooms through clay flocculation. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 51: 169-172.
- Shirota, A. (1989) Red tide problem and countermeasures (2), *Int. J. Aquat. Fish. Technol.*, 1: 195-223.
- Solé, J, M. Estradaa and E. Garcia-Ladona (2006) Biological control of harmful

- algal blooms: a modelling study. *J. Marine Syst.*, 61: 165–179.
- Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons (1968) *A practical handbook of seawater analysis*. pp. 167. Bulletin 167 2nd ed., Fisheries Research Board of Canada, Canada.
- Suttle, C.A. (2005) Viruses in the sea. *Nature*, 437: 356–361.
- Suttle, C.A. (2007) Marine viruses—major layers in the global ecosystem. *Nature Rev. Microbiol.*, 5: 801–812
- Van Dolah, F.M., D. Roelke and R.M. Greene (2001) Health and ecological impacts of harmful algal blooms: risk assessment needs, *Hum. Ecol. Risk. Assess.*, 7: 1329–1345.
- Van Leeuwen, C.J. and J.L.M. Hermens (2001) *Risk Assessment of Chemicals: An Introduction*. Kluwer Academic Publishers, USA. pp 326–327.
- Yang, C.Z., Albright and A.N. Yousif (1995) Oxygen-radical-mediated effects of the toxic phytoplankter *Heterosigma carterae* on juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Dis. Aquat. Org* 23., 101–108.
- Yim, E.C., I.T. Park, H.K. Han, S.W. Kim, H. Cho, and S.J. Kim (2010) Acute toxicity assessment of new algicides of thiazolidinediones derivatives, TD53 and TD49 using *Ulva pertusa* Kjellman, *Kor. J. Environ. Health. Toxicol.*, 25 in print.
- Yim, E.C., J.J. Shin, I.T. Park, H.K. Han, S.W. Kim, H. Cho and S.J. Kim (2010) Acute Toxicity assessment of New Algicides, Thiazolidinedione Derivative (TD49) to Marine Ecosystem. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 25(6) in print.
- Yim, E.C., J.J. Shin, I.T. Park, H.K. Han, S.W. Kim, H. Cho and S.J. Kim (2010) Acute Toxicity Assessment of New Algicides, Thiazolidinedione Derivative (TD49) to Marine Ecosystem. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 25(6) in print.
- Yoshida, M., T. Yoshida, A. Kashima, Y. Takashima, N. Hosoda, K. Nagasaki and S. Hiroishi (2008) Ecological dynamics of the toxic bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and its cyanophages in freshwater, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 3269–3273.
- Yu, Z., J. Zou and X. Ma (1994) Applications of clay store moval of redtide organisms I. Coagulation of redtide organisms with clays, *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 12: 193–200.

[별지 제13호 서식 준용]

| 연구개발 결과 활용계획서 | | | |
|--|--------------|---------------------------------------|-----|
| 사업명 | 중사업명 | 첨단융합기술개발사업 | |
| | 세부사업명 | 미래유망 융합기술 파이오니어사업 | |
| 과제명 | | 나노캡시드 살포 및 생태계 위해성 평가 원천기술 개발 | |
| 연구기관 | 한국해양연구원 | 연구책임자 | 김영옥 |
| 총연구기간 | | 2008. 4. 15. ~ 2011. 2. 28. (34.5개월) | |
| 총 연구비 (단위 : 천원) | 정부출연금 | 민간부담금 | 합계 |
| | 270,000 (천원) | | |
| 기술분야 | | | |
| 참여기업 | | | |
| 공동연구기관 | | | |
| 위탁연구기관 | | | |
| <p>국가연구개발사업의 관리등에 관한 규정 제 15조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부1 : 연구결과 활용계획서 1부 첨부2 : 기술 구매 예상 기업 관계자 의견서 1부.</p> <p style="text-align: right;">2011 년 1 월 24 일</p> <p style="text-align: center;">연구책임자 : 김영옥 연구기관장 : 강정극</p> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">  </div> | | | |
| <p>교육과학기술부장관 귀하</p> | | | |

[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 | |
| 연구기관 | 한국해양연구원 | | 연구책임자 | | 김영옥 | |
| 연구기간 연구비 (천원) | 연차 | 기간 | 정부 | 민간 | 계 | |
| | 1차연도 | 2008. 04 -2009. 02 | 70,000 | | 70,000 | |
| | 2차연도 | 2009. 03 -2009. 02 | 100,000 | | 100,000 | |
| | 3차연도 | 2010. 03 -2009. 02 | 100,000 | | 100,000 | |
| | 4차연도 | | | | | |
| | 5차연도 | | | | | |
| 계 | | | | | | |
| 참여기업 | | | | | | |
| 상대국 | | | | 상대국 연구기관 | | |

주1) 부처 기술분류코드 기재 불필요.

비고 : 총괄과제란은 총괄과제에 해당하는 경우에만 기재합니다.

2. 평가일 : 2011. 1. 24

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 기초 자료로 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.

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 Ecosphere로의 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 수행함은 물론 향후 1단계에서 수확된 결과를 바탕으로 2단계 연구 속도와 튜닝이 병행되는 운용이 가능하리라 확신함.

-나노입자의 거동 해석을 위한 연구를 위해 실제 해역의 조건을 재현하고자 파도발생장치 및 수온조절 장치, 염분도를 고려하여 235 x 107 x 114 cm의 수조를 제작하고 다양한 형태의 입자를 적용하여 거동 해석에 충실하고자 노력했다. 생물 노출 급성독성평가에서는 가능한 어리고 건강한 넙치치어를 확보하기 위해 노력하였으며 실험오차를 줄이기 위해 인공해수를 실험실내에서 직접 제조(실험 1회당 약 200L)하였으며 한 농도 당 3 수조씩 평가함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문·지적재산권·발표회 개최 등)

-메소코즘 연구를 통해 얻은 결과를 토대로 현재 SCI 논문이 2편 게재 승인되어 인쇄 중에 있으며, 메소코즘을 이용한 미세조류 대량배양 시스템 개발을 통해 특허 출원을 하였음. 기타 관련 학술발표를 4건 수행함.

-나노입자 거동해석 연구를 통해 국내 논문 1편이 게재되었고, 생물노출 급성독성평가 연구에서는 3개의 국내논문이 게재 되었으며, 1편의 SCI급 논문 게재요청 중에 있음. 기타 학술발표 생물공학회 등 4건 수행함.

II. 연구목표 달성도

| 번호 | 세 부 연 구 목 표 | 달 성 내 용 | 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 % |

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

메소코즘 제작과 현장 운용의 노하우가 축적됨으로 향후 2단계에서 본격적인 활용이 기대됨. 나노입자의 거동해석은 2단계 사업에서 나노입자 살포기 개발에 활용될 것임. 생물노출 급성독성평가 결과와 4차년도의 생물농축도 조사를 토대로 종합적 위해성 평가 타당성을 제고함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

살조후보물질의 위해성 평가는 주로 마이크로코즘에서 실시하였으며 본격적인 메소코즘 위해성 평가는 2단계에서 추진 할 예정이며, 1단계에서는 메소코즘 제작과 운용의 기술적 문제에 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.

IV. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

제 3세부과제에 한해서 공개 가능함

2. 연구기관 자체의 검토결과

한국해양연구원 남해연구소는 가두리, 해상 플랫폼 등의 침해 연구시스템이 구축된 국내 유일한 연구기관으로, 특히 본 연구와 같은 인공생태계 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 아니됩니다.