

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “열대 토착 요각류를 이용한 열대 해양생태독성평가기법 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2015. 3.

총괄연구책임자 : 이 균 우

보고서 초록

과제고유 번호	PE99243	해당단계 연구기간	2014.01.01- 2014.12.31	단계 구분	1차년
연구사업명	중사업명	주요사업			
	세부사업명	신진연구자지원사업			
연구과제명	대과제명	2014년 신진연구자 지원사업			
	세부과제명	열대 토착 요각류를 이용한 열대 해양생태독성평가기법 개발			
연구책임자	이균우	해당단계 참여연구원 수	총 : 1 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구비	정부: 30,000 천원 기업: 천원 계 : 천원
		총연구기간 참여연구원 수	총 : 1 명 내부: 명 외부: 명	총 연구비	정부: 30,000 천원 기업: 천원 계 : 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원/ 태평양해양과학기술지		참여기업명		
국제공동연 구					
위탁연구					
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	30
<p>○ 분리된 열대 요각류는 총 16종이었으며 최종적으로 배양이 유지된 3개종 중에서 비교적 배양밀도가 높은 <i>Nitocra</i> sp.를 시험생물로 선정하였다.</p> <p>○ 이들의 보다 안정적인 배양을 위해 최적배양환경조건을 조사한 결과, <i>Nitocra</i> sp.는 수온 29℃, 염분 24~34‰에서 먹이로 <i>Tetraselmis suecica</i>를 공급하였을 때, 비교적 빠른 발달기간과 생존율을 보였다.</p> <p>○ 급성독성시험 결과, 구리와 비소의 각 노출농도에 따라 민감하게 잘 반응해서 반수치사농도 즉 LC50값과 영향을 미치지 않는 농도인 NOEC값을 얻을 수 있었다.</p> <p>○ 만성독성시험 결과, 구리와 비소노출 모두, 성비와 생산력은 유의적인 차이가 없었던 반면, 발달기간과 생존율은 농도에 따라 반응을 보였기 때문에 endpoint로 사용이 가능할 것으로 판단된다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	열대요각류, 독성시험, 생태독성학적 시험법, 종말점, 니토크라			
	영 어	tropical copepods, toxicity test, ecotoxicological testing protocols, endpoint, <i>Nitocra</i>			

요 약 문

I. 제 목

열대 토착 요각류를 이용한 열대 해양생태독성평가기법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 필요성

최근 열대해역의 오염도가 증가하고 있다. 열대지역과 같은 특정지역에서 오염 물질의 독성평가 시, 그 지역의 생태환경에 적합한 위해성평가를 위해서는 그 지방 고유의 생물에 대한 독성실험이 요구된다. 예를 들어, 같은 종일지라도 온대지역과 열대지역에 서식하는 생물의 특정 독성에 대한 민감성은 확연히 다르게 나타난다. 이러한 차이에도 불구하고 현재까지 열대역 생태독성실험을 위해 개발된 시험생물은 온대생물에 비해 한정적이다. 따라서 열대 해양생태계에 적합한 보다 다양한 독성실험용 모델생물의 개발이 요구되며 이를 위해서는 실험실 내에서 안정적으로 유지, 관리될 수 있는 열대생물의 적절한 선정과 배양/관리기술이 필요하다.

2. 연구개발의 목적

본 연구는 열대 해양생태독성시험법개발을 위한 일환으로 열대해역에 분포하는 다양한 요각류를 채집/분리하고 배양 가능종의 최적배양조건을 규명한 후, 이를 이용한 열대 해양 생태독성평가기법을 개발하는 것을 목적으로 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구기간

2014년 1월 1일 ~ 2014년 12월 31일

2. 연구내용 및 범위

- 열대 토착 요각류의 채집 및 분리
- 표준 생태독성시험생물의 선정 및 최적 배양환경조건규명
- 생태독성평가를 위한 endpoint 조사 및 생태독성평가 적용

IV. 연구개발결과

분리된 열대 요각류는 총 16종이었으며 최종적으로 배양이 유지된 3개종 중에서 비교적 배양밀도가 높은 (5 inds./mL) *Nitocra* sp.를 시험생물로 선정하였다. 이들의 보다 안정적인 배양을 위해 최적배양환경조건을 조사한 결과, *Nitocra* sp.는 수온 29℃, 염분 24~34‰에서 먹이로 *Tetraselmis suecica*를 공급하였을 때, 비교적 빠른 발달기간과 생존율을 보였다. 최적배양조건을 바탕으로 구리와 비소에 대한 독성평가를 실시하였다. 급성독성시험 결과, 구리와 비소의 각 노출농도에 따라 민감하게 잘 반응해서 반수치사농도 즉 LC50값과 영향을 미치지 않는 농도인 NOEC값을 얻을 수 있었다. 만성독성시험 결과, 구리와 비소노출 모두, 성비와 생산력은 유의적인 차이가 없었던 반면, 발달기간과 생존율은 농도에 따라 반응을 보였기 때문에 endpoint로 사용이 가능할 것으로 판단된다. 급성독성과 만성독성결과를 종합해 보았을 때, 본 연구사업에 적용된 열대요각류 *Nitocra* sp.는 열대해양생태독성평가법에 활용이 가능한 것으로 판단되며 차후 다양한 독성물질의 평가에 활용이 기대된다.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 열대 해양오염물질의 생태독성평가를 위한 입체적 독성평가기법 개발 기대
- 각종 독성물질의 영향 정량화를 통한 생태계영향 판단기준제시

S U M M A R Y 및 KEYWORDS

I. Title

Development of ecotoxicological testing protocols with tropical marine copepods for a tropical marine environment

II. Necessities and Objectives of the Study

1. Necessities of the Study

The increasing impacts from anthropogenic activities on tropical marine ecosystems have been a global concern for decades. For toxicity assessments in tropical regions, indigenous species are needed to more accurate toxicity assessments. For example, the sensitivities between temperate and tropical species are different even if same species. Nevertheless, the use of tropical organisms for toxicity tests are limited compared to temperate species. Thus, not only the development of ecotoxicological methods using various model organisms in tropical marine environment but also the stable culture techniques for the maintenance of the organisms in a laboratory are required.

2. Objectives of the Study

The project focused on the isolation of tropical copepods and finding optimum culture conditions for the copepod selected, on the development of ecotoxicological assessment methods using indigenous species in tropical regions.

III. Contents and Scopes of the Study

1. Research period

January 1, 2014 - December 31, 2014

2. Contents and scopes of the study

- The collection and isolation of tropical indigenous copepods
- The selection of the copepod for ecotoxicological assessments and optimum culture conditions for the organism selected
- The mining and application of endpoints in the copepod for the toxicity test

IV. Results

Sixteen copepods were isolated from tropical region (Weno island in Micronesia) and 3 copepods were cultured and maintained up to now. *Nitocra* sp. with high culture density (5 inds./mL) in three copepods was selected as a model organism for toxicity test. The optimum temperature and salinity for the copepod were 29°C and 24~34 psu, and *Nitocra* sp. fed *Tetraselmis suecica* had relatively faster development and higher survival than other microalga. Under the optimum culture conditions, toxicity tests were carried out. NOECs (no observed effect concentrations) level of copper and arsenic were calculated in the acute toxicity test. In the chronic test of Cu and As, the developmental time and survival traits were usable endpoints for toxicity assessments. As a result, tropical copepod, *Nitocra* sp. seems to be a potential candidate organism for toxicity assessment.

V. Application plans of the study results

- For the development of the species sensitivity distributions (SSDs) analysis in tropical regions
- For the establishment of evaluation standard through finding concentration- response relationship between the organism and toxicants

Keywords: tropical copepods, toxicity test, ecotoxicological testing protocols, endpoint, *Nitocra*

C O N T E N T S

Summary	3
Chapter 1. Outline of the study	10
Section 1. Necessities of the study	10
Section 2. Objectives and contents of the study	12
Chapter 2. States of technical trends and outlook	13
Section 1. Trends of study in Korea	13
Section 2. Trends of study in foreign countries	13
Chapter 3. Results of the study	15
Chapter 4. Achievements of objectives and contributions to the related area ...	28
Section 1. Achievements of objectives	28
Section 2. Contributions to the related area	28
Chapter 5. Application plans of the study results	29
Chapter 6. References	30

목 차

요약문	3
제 1 장 서론	10
제1절 연구개발의 필요성	10
제2절 연구개발 목표 및 내용	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제1절 국내 연구동향	13
제2절 국외 연구동향	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	15
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도	28
제1절 목표 달성도	28
제2절 대외 기여도	28
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	29
제 6 장 참고문헌	30

Figure List

Fig. 1. Sampling sites in weno island, Chuuk, Micronesia	16
Fig. 2. Effect on the developmental time (N - C, nauplius to copepodid and N - A, nauplius to adult), sex ratio, survival and fecundity of <i>Nitocra</i> sp. exposed to different concentrations of copper	26
Fig. 3. Effect on the developmental time (N - C, nauplius to copepodid and N - A, nauplius to adult), sex ratio, survival and fecundity of <i>Nitocra</i> sp. exposed to different concentrations of arsenic	27

Table List

Table 1. Characteristics of sampling sites	17
Table 2. The culture of isolated copepods	19
Table 3. Size and maximum density of cultured copepods	20
Table 4. The developmental phase and survival of <i>Nitocra</i> sp. cultured with <i>Tetraselmis suecica</i> at the different salinities	21
Table 5. The developmental phase and survival of <i>Nitocra</i> sp. cultured with <i>Tetraselmis suecica</i> at the different temperatures	22
Table 6. The developmental phase and survival of <i>Nitocra</i> sp. cultured with different algae at 29°C, 34‰ salinity	22
Table 7. EC ₁₀ , EC ₅₀ , 95% confidence intervals (CI) and no observed effect concentration (NOEC) for <i>Nitocra</i> sp. adult female exposed to copper and arsenic for 48 hours	24
Table 8. LC ₁₀ , LC ₅₀ , 95% confidence intervals (CI) and no observed effect concentration (NOEC) for <i>Nitocra</i> sp. nauplius (N1~2) exposed to copper and arsenic for 48 hours	25

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 과학과 산업의 발달에 따라 해양오염은 전 세계에서 광범위하게 발생하고 있으며 극지나 열대해역과 같은 청정해역도 인간의 활동 증가로 인한 오염정도가 증가하여 세계적 걱정거리가 되고 있다.
- 특히, 열대 산호초 지역은 전 해양에서 가장 높은 생물 다양성과 생산성을 가지며 일부 선진국에서는 열대해역의 중요성을 인식하고 해양생물과 기후변동 연구를 진행 중에 있다.
- 생활폐수, 플라스틱, 농약, 중금속, 기름 또는 화학물질 누출사고 및 대기를 통해 이동하는 잔류유기오염물질 (POPs) 등은 열대 해양오염의 원인이 되며 이들은 열대 해양생물에 직/간접적으로 악영향을 미친다. 특히, 대부분의 열대해양은 빈영양 환경에 의한 제한적인 분해 미생물군의 서식으로 다른 해역보다 오염에 더 민감한 것으로 알려져 있다(Hansen, 2003). 따라서 열대 해양생태계는 전 지구적으로 보호되어야 할 필요성이 있으며 열대 해양오염에 대한 지속적인 모니터링과 생물영향평가는 반드시 필요하다.
- 한편, 지구온난화로 인해 열대지역은 수표면 온도상승, 대기 CO₂ 및 자외선 투과율 증가 등의 물리적 환경변화가 일어나고 있으며 이러한 변화는 열대해양생물에 악영향을 미치고 있다(Hansen, 2003). 대표적으로, 지구온난화로 인한 열대역 산호의 백화현상에 대해 알려져 있으나 그 이외의 열대생물에 대한 열대환경변화의 영향조사는 아직까지 미흡한 실정이다. 따라서 열대 환경변화의 생태학적 영향을 보다 구체적으로 이해하기 위해서는 다양한 열대생물을 대상으로 한 영향조사가 요구된다.
- 해양에는 다양한 요각류가 서식하며 이들은 대부분 1차 소비자로서 생산자와 소비자사이의 에너지흐름을 연결해 주는 핵심적인 역할을 수행한다. 또한 이들은 짧은 생활사를 가지고 취급이 쉽기 때문에 지속적이고 일정한 배양/유지를 통해 필요시에 즉시 안정적으로 사용할 수 있을 뿐 아니라 작은 크기는 오염물질의 독성평가지 사용되는 독성물질의 양을 최소화할 수 있는 장점이 있어 다양한 기관에서 독성실험생물로 개발하기 위한 지속적인 노력이 진행되고 있다 (OECD, 2007; USEPA, 2002; ISO, 1997; ASTM, 2012).

- 특정지역에서 오염물질의 독성평가 시, 그 지역의 생태환경에 적합한 위해성평가를 위해서는 그 지방 고유의 생물에 대한 독성실험이 요구된다. 예를 들어, 같은 종일지라도 온대지역과 열대지역에 서식하는 생물의 특정 독성에 대한 민감성은 확연히 다르게 나타난다(Kwok et al., 2007; Howe et al., 2012; Gissi et al., 2013). 이러한 차이에도 불구하고 현재까지 열대역 생태독성실험을 위해 개발된 시험생물은 온대생물에 비해 한정적이다. 따라서 열대 해양생태계에 적합한 보다 다양한 독성실험용 모델생물의 개발이 요구되며 이를 위해서는 실험실 내에서 안정적으로 유지, 관리될 수 있는 열대생물의 적절한 선정과 배양/관리기술이 필요하다.

나. 경제·산업적 측면

- 열대 해양생태계는 생물다양성이 높아 아시아에서만 매년 경제적으로 약 천만 명을 지원할 수 있는 생산성을 제공할 뿐 아니라(Hansen, 2003), 산호초와 홍수림은 세계적으로 광범위한 관광활동을 제공해 주기 때문에 산업적가치가 매우 높아 그 중요성은 대단히 크다. 그러나 현재 증가하고 있는 열대 해양오염은 생물다양성은 물론, 산호초와 홍수림을 감소시키고 있으며 이는 결과적으로 경제적 손실로 이어질 수밖에 없다.
- 이러한 상황에서, 다양하고 민감한 열대 요각류를 이용한 열대 해양오염물질의 생태독성평가는 조기에 오염여부를 판단할 수 있어 보다 강화된 해양배출수 규제와 같은 사전조치가 가능하다. 따라서 열대 생태독성평가기법의 확보는 해양환경개선으로 인한 열대해양생물의 다양성 및 생물량 증가효과를 가져오고 결국 해양오염으로 인한 경제적 손실 예방이 가능할 것으로 사료된다.

다. 사회·문화적 측면

- 열대역 산호초와 홍수림은 다양한 해양무척추동물과 어류에게 서식처를 제공해 줄 뿐 아니라 해안 침식을 직접적으로 막는 역할도 한다. 그러나 열대지역의 개발과 오염이 가속화되면서 산호초와 홍수림 및 해초지대가 감소하고 있으며 이는 전 세계 육지의 감소를 의미한다.
- 열대 생태독성평가기법의 확보와 지속적인 환경평가는 위와 같은 현상을 조기에 예방할 수 있는 효과를 기대할 수 있어 전 세계 육지 감소 완화에도 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발의 최종목표

- 본 연구는 열대 해양생태독성시험법개발을 위한 일환으로 열대해역에 분포하는 다양한 요각류를 채집/분리하고 배양 가능종의 최적배양조건을 규명한 후, 이를 이용한 열대 해양 생태독성평가기법을 개발하는 것을 목적으로 한다.

나. 연구개발 내용

- 열대 토착 요각류의 채집 및 분리
- 표준 생태독성시험생물의 선정 및 최적 배양환경조건규명
- 생태독성평가를 위한 endpoint 조사 및 생태독성평가 적용

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 연구동향

- 국내의 해양생태독성평가기법개발에 관한 연구는 2002년부터 2012년까지 국립 연구소 및 대학교를 중심으로 다음의 10종이 개발된 바 있으나 일부 종을 제외하고는 아직 실용화 단계는 아니다: 해산 발광박테리아(*Vibrio fischeri*), 해산규조류(*Skeletonema costatum*), 녹조구멍갈파래(*Ulva pertusa*), 해산윤충류(*Brachionus plicatilis*), 저서요각류(*Tigriopus japonicus*), 저서단각류 2종(*Mandibulophoxus mai* and *Monocorophium acherusicum*) 및 어류 2종(*Oryzias latipes* and *Paralichthys olivaceus*), 새뱅이 (*Neocaridina denticulata*).
- 국내에서 법제화된 해양생태독성평가기법에 사용되고 있는 생물은 매우 한정적이다. 국내 해양환경공정시험기준 내 해양폐기물공정시험기준에서 생태독성 실험생물로 사용되고 있는 종은 해양발광박테리아(*Vibrio fischeri*)와 해양 저서성 단각류 (*Monocorophium* sp.) 단 2종이다.
- 위 개발된 평가기법들도 우리나라 고유생태에 적합한 생물을 대상으로 개발되었으며 열대 해양생태독성평가를 위한 생물개발의 시도는 전무하다.
- 현재 국가 연구사업에 의해 10종정도 개발되어 있으나 모두 사용되고 있지 않고 일부 환경평가업체에서 연구용역사업차원의 평가만 이루어지고 있다. 아직까지 국내 해양환경평가를 위해 국외의 평가기준을 사용하는 경우도 허다하다. 따라서 정부 차원에서 국내 해양생태계에 적합한 보다 입체적이고 신뢰성이 높은 실용 가능한 생태독성평가기법의 개발이 계속적으로 필요한 실정이다.

제 2 절 국외 연구동향

- 열대역 해양생태독성실험을 위해 개발된 시험생물은 온대생물에 비해 한정적이다. 최근 호주는 미세조류, 산호, 게, 굴 및 어류와 같은 열대해양생물을 이용한 독성시험법을 운용 중에 있는데, 최근 호주 및 뉴질랜드의 담수 및 해수 질을 위한 가이드라인 ANZECC/ARMCANZ (Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and the Agriculture and Resource

Management Council of Australia and New Zealand, 2000)에서 해양 환경위해성평가지 중 민감도분포 (species sensitivity distributions, SSDs)를 적용시킬 때 적어도 4개 분류군에서 최소 8종을 사용할 것을 권장하고 있다.

- 따라서 호주는 온대성 해양생물을 이용한 열대해양에서의 생태독성평가가 부적합함을 인식하고 열대 해양 독성시험생물의 개발을 시도하고 있다. 최근, 열대 말미잘 *Aiptasia pulchella* (Howe et al, 2012), 열대 요각류 *Acartia sinjiensis* (Gissi et al., 2013)를 이용한 해양생태독성평가법이 최근 보고된 바 있다.
- 그 외에, 열대해양 생태독성평가를 위해 브라질에서 열대 새우류 *Penaeus schmitti* 및 *P. paulensis* (Moraes, 2000), 말레이시아에서 열대 식물플랑크톤 *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis tetrathele* and *Tetraselmis* sp. (Ismail, 2002) 등이 연구된 바 있다.
- 현재까지 개발되어져 있는 해양생태독성시험법은 경제협력개발기구 (OECD, Organization for economic Cooperation and Development), 미국환경보호국 (USEPA, United States Environmental Protection Agency), 국제표준화기구 (ISO, International Standardization Organization), 미국재료시험협회 (ASTM, American Society of Testing and Materials) 및 일부 국가 등에서 약 100여종 이상이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 이들 시험방법은 각 지역 생태계에 적합한 생물 및 시험법을 개발하여 사용하고 있으므로 열대 해양생태계의 환경오염을 평가하기에는 부적합 할 수밖에 없다.
- 호주와 뉴질랜드의 경우, 해양 환경위해성평가지 입체적이고 신뢰성이 높은 결과를 얻기위해 적어도 4개 분류군에서 최소 8종을 사용할 것을 권장하고 있고, USEPA에서는 보다 정확한 평가를 위해 3개 분류군에서 각 1종씩 최소 3종을 포함하는 Battery test를 권장하고 있다. 그러나 현재까지 열대 해양생태독성평가를 위해 개발되어진 열대 생물은 상기에 기술한 대로 매우 한정적이다. 따라서 계속적으로 다양한 생물종의 추가가 요구된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 열대 토착 요각류의 채집 및 시험생물의 선정

가. 재료 및 방법

(1) 요각류의 채집 및 시험생물의 선정

2014년 3-4월에 마이크로네시아 Chuuk주 Weno섬에서 4회에 걸쳐 총 13개 지점에서 sampling을 시도하였다. 채집지역의 지형특성에 따라 채집도구로 네트와 스포이드를 사용하였다. 각 채집지역의 기본적 물리화학적 환경을 굴절염분계, pH meter 및 DO meter를 이용해 조사하였으며(Fig. 1; Table 1), 채집된 sample은 500 mL 샘플병에 담았고 온도유지를 위해 아이스박스에 넣어 실험실로 이동하였다. 각 샘플은 해부현미경하에서 isolation되었고 수온 $29\pm 1^{\circ}\text{C}$, 염분 33 psu에서 먹이로 *Tetraselmis suecica*와 *Isochrysis galbana*의 혼합먹이를 공급하면서 기초배양을 실시하였다. 기초배양 시, 각 요각류의 부화, 발달, 번식 및 라인의 유지 여부를 조사하였으며, 계속적으로 유지/배양된 종중에서 최종적으로 시험생물 선정을 위해 각 요각류의 배양 최고밀도를 조사하였다.

(2) 종의 동정

분리되어 배양/유지되고 있는 종을 대상으로 DNA 동정을 실시하였다. 요각류의 DNA동정을 위해 18s rDNA 유전자를 사용하였다. PCR 시 사용된 primer는 universal primer인 18SE (F), CTGGTTGATCCTGCCAGT (Hillis and Dixon, 1991)와 18SL (R), CACCTACGGAACCTTGTTACGACTT (Hamby and Zimmer, 1988) 이었다. PCR 은 98°C 에서 10 sec, 55°C 에서 30 sec, 72°C 에서 60 sec의 조건으로 40 cycle 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동 후 cloning 및 sequencing하였다. 밝혀진 염기서열은 GenBank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)을 통하여 동정하였다.



Fig. 1. Sampling sites in weno island, Chuuk, Micronesia

Table 1. Characteristics of sampling sites

Site No.	GPS	Salinity (‰)	Temperature (°C)	pH	DO (mg/L)	Characteristic of point
1	7°26'38.3"N 151°53'42.8"E	32	28.4	7.81	4.17	shore
2	7°26'37.7"N 151°53'46.3"E	33	28.0	7.85	5.38	tide (pipe) pool
3	7°26'38.9"N 151°54'02.2"E	33	28.1	8.13	5.70	tide (coral) pool
4	7°24'41.6"N 151°50'36.5"E	33	29.2	8.15	6.77	shore
5	7°26'40.6"N 151°50'23.5"E	33	29.4	8.13	5.53	shore (port)
6	7°27'25.7"N 151°50'11.5"E	34	29.4	8.16	5.84	rock (breakwater) pool (airport)
7	7°27'07.9"N 151°51'19.2"E	15	29.5	8.22	7.56	brackish water lake
8	7°27'15.1"N 151°51'29.0"E	24	29.3	8.10	7.01	brackish water lake
9	7°24'40.3"N 151°52'27.1"E	37	36.6	8.43	12.05	rock pool (small island)
9-1	7°24'40.3"N 151°52'27.1"E	38	34	8.68	10.56	rock pool (small island)
9-2	7°24'40.3"N 151°52'27.1"E	47	34.5	8.76	8.30	rock pool (small island)
10	7°25'47.8"N 151°51'25.5"E	3	31.0	7.26	5.13	shore (mangrove area)
11	7°25'47.9"N 151°51'29.1"E	15	31.2	7.51	5.08	shore (mangrove area)
12	7°25'48.3"N 151°51'29.7"E	20	32.1	7.66	5.28	shore (mangrove area)
13	7°27'07.4"N 151°53'52.0"E	33	29.2	7.98	5.89	shore




나. 결과 및 토의

분리된 열대 요각류는 총 16종으로 각 목에 따라 calanoid 2종, cyclopoid 4종 및 harpacticoid 10종이었으며, 각 종의 포란한 암컷을 분리하여 단일기초배양을 시도하였다 (Table 2). 최종적으로 배양이 유지된 3개종은 18s rDNA 유전자 동정 결과, *Nitocra* sp., *Pseudodiaptomus* sp., *Tigriopus* sp.로 동정되었으며 이들 3종중에서 배양이 안정적인 종을 선정하기위해 배양밀도가 다른 종에 비해 비교적 높은 (5 inds./mL) *Nitocra* sp.를 시험생물로 선정하였다. 특히 이 요각류는 작은 크기 (488×125 μ m)를 가져 독성실험 시 최소량의 독성물질을 사용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 이후 보다 안정적인 *Nitocra* sp.의 배양을 위해 이들의 최적배양환경조건을 조사하였다.

Table 2. The culture of isolated copepods.

Site No.	Order	Hatch (Yes/No)	Development (N: nauplius, C: copepodid, A: adult)	Reproduction (Yes/No)	Line maintenance (Yes/No)
1	Cyclopoid	Yes	N	–	–
	Harpacticoid	Yes	N	–	–
2	Harpacticoid	Yes	C	No	–
3	Harpacticoid	Yes	A	Yes	No
6	Harpacticoid	Yes	C	No	–
8	Cyclopoid	Yes	C	No	–
9	Harpacticoid	Yes	A	No	–
9-1	Harpacticoid	Yes	A	No	–
9-2	Harpacticoid	Yes	A	No	–
	Harpacticoid	Yes	A	Yes	Yes
11	Harpacticoid	Yes	A	Yes	Yes
	Harpacticoid	Yes	N	–	–
12	Calanoid	Yes	A	Yes	Yes
	Cyclopoid	Yes	N	No	–
13	Cyclopoid	Yes	N	–	–
	Calanoid	Yes	C	–	–

Table 3. Size and maximum density of cultured copepods.

Species	Size	Maximum density (cell or inds./mL)	Picture
<i>Nitocra</i> sp.	488×125 μ m	5	
<i>Pseudodiaptomus</i> sp.	735×324 μ m (prosome)	2	
<i>Tigriopus</i> sp.	553×210 μ m	0.2	

2. *Nitocra* sp.의 최적 배양환경조건규명

가. 재료 및 방법

Nitocra sp.의 안정적인 배양을 위해 이들의 최적배양조건을 조사하였다. 염분 (24, 29, 34, 39 및 44‰), 수온(25, 29, 33, 37 및 41℃) 및 먹이(*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp., *Rhodomonas* sp., *Chaetoceros simplex*)에 따른 *Nitocra* sp.의 발달기간 및 생존률을 조사하였다. 12 well culture plate (배양수 2 mL)에 갓 부화한 nauplius를 접종하여 1일 간격으로 발달단계를 관찰하였다. 수온별 실험을 위해 설정 온도가 일정하게 유지되는 multi-thermo 배양기를 사용하였다. 염분별 실험은 미리 멸균된 해수와 담수, 증발법 사용하여 각각의 설정염분으로 조정된 후 29℃로 유지되는 배양기 내에서 실시하였다. 염분 및 수온별 실험에서 먹이로 *Tetraselmis suecica*를 1일 1회로 공급하였으며, 실험기간 동안 환수는 실시하지 않았다.

나. 결과 및 토의

독성실험생물로 선정된 *Nitocra* sp.의 최적염분 및 수온의 조사 결과, nauplius에서 copopodite까지 소요되는 시간 및 copopodite에서 adult까지 도달하는 시간은 44‰를 제외하곤 모든 실험구간에서 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 한편, 성체까지 도달하는 시간에서는 모든 실험구간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$). 염분별 실험에서 발달기간은 염분에 따라 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. 이는 *Nitocra* sp.가 광염종이기 때문에 염분 변화에 따른 발달 단계에서는 차이를 보이지 않았던 것으로 판단된다. 다만, 가장 고염분 실험구에서는 성체까지 도달하는 개체수가 다른 실험구에 비해 낮은 특징을 보였다(생존율이 낮았음). 이는 발달기간과 달리 광염성 종이기 하지만 40‰ 이상의 고염분에서는 체내 대사기작이나 삼투압 조절능력과 관련하여 에너지를 다른 염분구보다 많이 소모하였기 때문으로 사료된다. 본 실험을 종합해 보았을 때, *Nitocra* sp.는 수온 29℃, 염분 24~34‰에서 먹이로 *Tetraselmis suecica*를 공급하였을 때, 비교적 빠른 발달기간과 생존율을 보였기 때문에(Table 4, 5, 6), 차후 모든 독성실험은 수온 29℃, 염분 34‰에서 실시하였고 만성독성실험의 경우는 먹이로 *Tetraselmis suecica*를 공급하면서 실시하였다.

Table 4. The developmental phase and survival of *Nitocra* sp. cultured with *Tetraselmis suecica* at the different salinities*

Salinity (‰)	Developmental time		Survival (%)
	N-C (day)	N-A (day)	
24	3.9±1.06 ^{ab}	7.6±1.19 ^a	53.3
29	3.4±0.79 ^a	7.4±0.52 ^a	66.7
34	3.5±1.13 ^{ab}	7.9±1.45 ^a	69.2
39	4.0±1.54 ^{ab}	8.0±1.22 ^a	69.2
44	4.5±1.27 ^b	8.5±1.29 ^a	30.8

*Values (mean±S.D) in the same column not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$).

Table 5. The developmental phase and survival of *Nitocra* sp. cultured with *Tetraselmis suecica* at the different temperatures*

Temperature (°C)	Developmental time		Survival (%)
	N-C (day)	N-A (day)	
25	4.7±0.65 ^c	9.7±0.50 ^a	69.2
29	3.7±0.65 ^b	8.1±0.83 ^b	91.7
33	3.2±0.42 ^a	7.4±0.53 ^c	69.2
37	¹	-	0.0
41	-	-	0.0

*Values (mean±S.D) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

¹No data

Table 6. The developmental phase and survival of *Nitocra* sp. cultured with different algae at 29°C, 34‰ salinity.

Alga	Developmental time		Survival (%)
	N-C (day)	N-A (day)	
<i>Tetraselmis suecica</i>	4.2±0.10 ^a	8.7±0.21 ^a	80.0
<i>Isochrysis galbana</i>	5.1±0.20 ^b	9.1±0.36 ^b	53.3
<i>Nannochloropsis</i> sp.	-	-	-
<i>Rhodomonas</i> sp.	4.9±0.35 ^b	9.6±0.15 ^c	43.3
<i>Chaetoceros simplex</i>	4.8±0.20 ^b	9.5±0.06 ^{bc}	63.3

*Values (mean±S.D) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

¹No data

3. 생태독성평가를 위한 endpoint 조사 및 생태독성평가 적용

가. 재료 및 방법

(1) *Nitocra* sp.를 이용한 급성독성시험

열대 harpacticoid copepod인 *Nitocra* sp.를 이용한 급성독성시험을 위한 표준 독성물질로 구리와 비소를 사용하였다. 실험 요각류로 24h이 지나지 않은 성체 암컷을 사용하였고 12 well culture plate (Nunc, Inc., USA; working volume, 4mL)에 각 hole당 10 마리를 수용하여 34 psu, 29°C에서 48h 동안 폐사율을 조사하였다. 각 중금속의 처리농도는 Cu는 0, 0.032, 0.063, 0.13, 0.25, 0.5, 1 mg/L, As는 0, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0 mg/L으로 설정하였다. *Nitocra* sp.의 폐사율은 1분이상 움직임이 없는 개체를 counting하는 것에 의해 입체현미경 하에서 관찰하였으며 실험결과는 probit 분석법 (Finney, 1989)에 의해 LC10 및 LC50을 얻었고 Dunnett's test에 의해 NOEC (no observed effect concentration)를 계산하였다.

(2) *Nitocra* sp.를 이용한 만성독성시험

Nitocra sp.의 개체발생기간과 성체까지의 생존율, 성비 및 생산력을 조사하기 위한 실험으로 Lee et al. (2008)의 방법에 근거하여, 부화 후 24시간이 지나지 않은 *Nitocra* sp.의 nauplius (N1~N2기)를 일정농도의 각 배출수 4 mL가 담겨있는 12 wells tissue culture plate에 각각 10 마리를 넣고 20°C, 32 psu에서 광주기 12L:12D하에서 먹이로 *Tetraselmis suecica*를 1일 1회 공급하여 배양하였다. Nauplius기는 1일 1회 ~50%, copepodite 변태이후는 ~100% 배양수환수를 실시하며 copepodite기와 암컷의 포란시기까지의 개체발생기간과 성숙 후 이들의 생존율 및 성비를 스테레오현미경하에서 관찰 후 기록하였다. 다시 포란한 암컷개체를 1마리씩 분리하여 12 wells tissue culture plate에 넣고 위와 같은 환경조건에서 성체암컷의 첫 번째 nauplius 생산수 (fecundity)를 조사하였다. Fecundity는 부화한 nauplius를 성체암컷과 분리한 다음 현미경하에서 계수하는 방법으로 측정하였다.

나. 결과 및 토의

(1) *Nitocra* sp.를 이용한 급성독성시험

독성물질로 구리와 비소를 사용하여, 성체암컷(Table 7)과 갓 부화한 유생(Table 8)을 대상으로 독성평가를 실시한 결과, 구리와 비소의 각 노출농도에 따라 민감하게 잘 반응해서 반수치사농도 즉 LC50값과 영향을 미치지 않는 농도인 NOEC값을 얻었다(Table 7, 8). 따라서 독성시험시 endpoint로 폐사(mortality)의 활용이 가능한 것으로 나타났다. 성체암컷과 nauplius 모두, 구리에 노출시, 반수치사농도가 각각 0.96과 0.46으로 비소노출시(성체 : 6.43, nauplius: 4.58)보다 낮게 나타나 구리의 급성독성이 강한 것으로 나타났다. 일반적으로 모든 생물에 있어서 구리가 비소에 비해 독성이 강한 것으로 알려져 있다. 또한 전체적으로 nauplius가 성체암컷보다 민감한 것으로 나타났다.

Table 7. EC₁₀, EC₅₀, 95% confidence intervals (CI) and no observed effect concentration (NOEC) for *Nitocra* sp. adult female exposed to copper and arsenic for 48 hours.

Heavy metals	NOEC* (mg/L)	EC10 (95% CI; mg/L)	EC50 (95% CI; mg/L)
Cu	0.32	0.50 (0.33-0.64)	0.96 (0.80-1.14)
As	2.5	3.34 (2.43-4.09)	6.43 (5.45-7.59)

*NOEC was calculated by Dunnett's test.

Table 8. LC₁₀, LC₅₀, 95% confidence intervals (CI) and no observed effect concentration (NOEC) for *Nitocra* sp. nauplius (N1~2) exposed to copper and arsenic for 48 hours.

Heavy metals	NOEC* (mg/L)	LC10 (95% CI; mg/L)	LC50 (95% CI; mg/L)
Cu	0.13	0.26 (0.19-0.31)	0.46 (0.39-0.53)
As	1.25	2.49 (1.82-3.03)	4.58 (3.90-5.38)

*NOEC was calculated by Dunnett's test.

(2) *Nitocra* sp.를 이용한 만성독성시험

구리와 비소노출 모두, 성비와 생산력은 유의적인 차이가 없었던 반면 ($P>0.05$), 발달기간과 생존율은 농도에 따라 반응을 보였기 때문에 ($P<0.05$) endpoint로 사용이 가능할 것으로 판단된다(Fig. 2, 3). 구리에 대한 LOAEL 즉 최소악영향농도는 0.13 mg/L, 비소는 1.25 mg/L로 나타났다. 급성독성과 만성독성결과를 종합해 보았을 때, 본 연구사업에 적용된 열대요각류 *Nitocra* sp.는 열대해양 생태독성평가법에 활용이 가능한 것으로 판단되며 차후 다양한 독성물질의 평가에 활용이 기대된다.

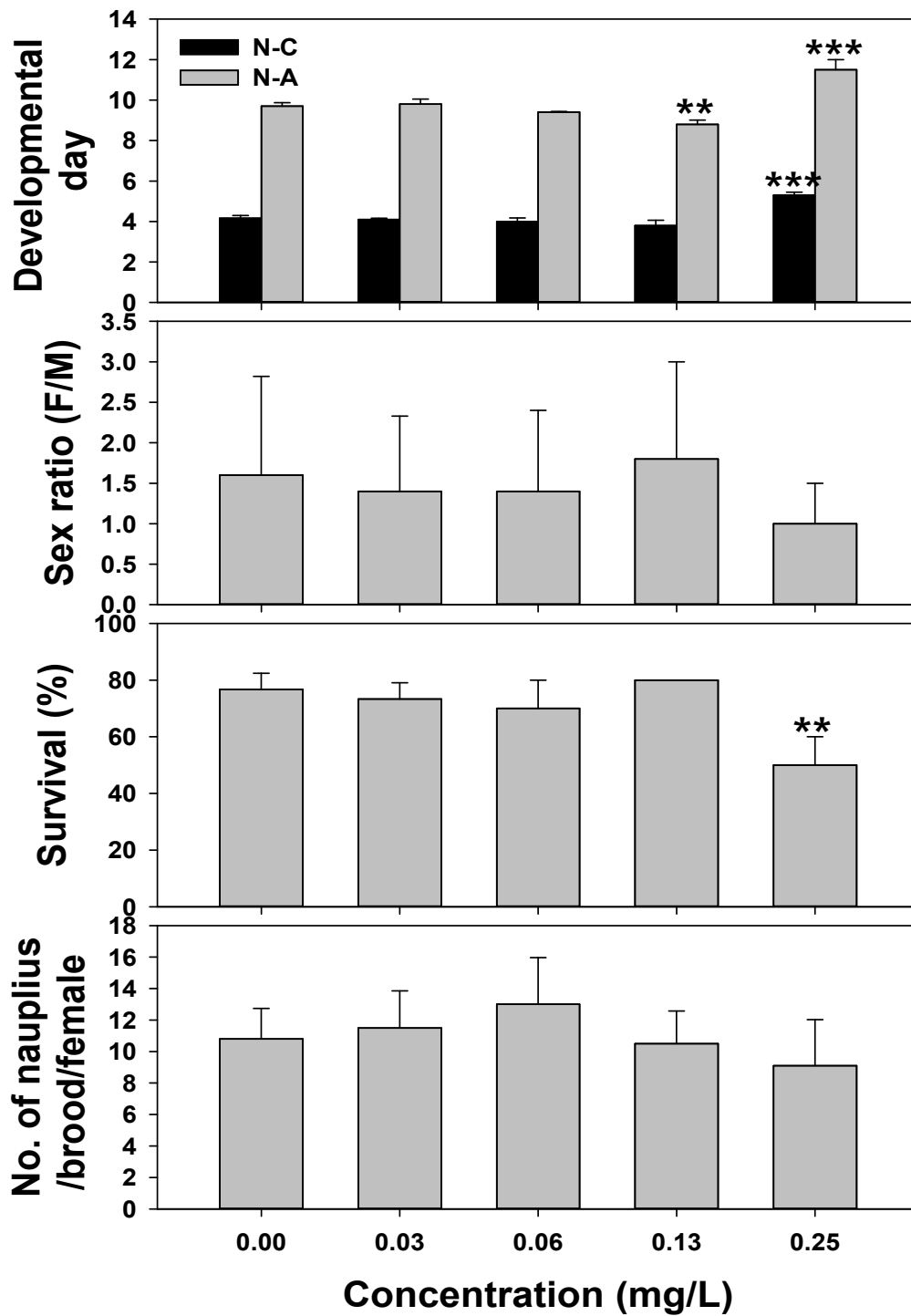


Fig. 2. Effect on the developmental time (N - C, nauplius to copepodid and N - A, nauplius to adult), sex ratio, survival and fecundity of *Nitocra* sp. exposed to different concentrations of copper.

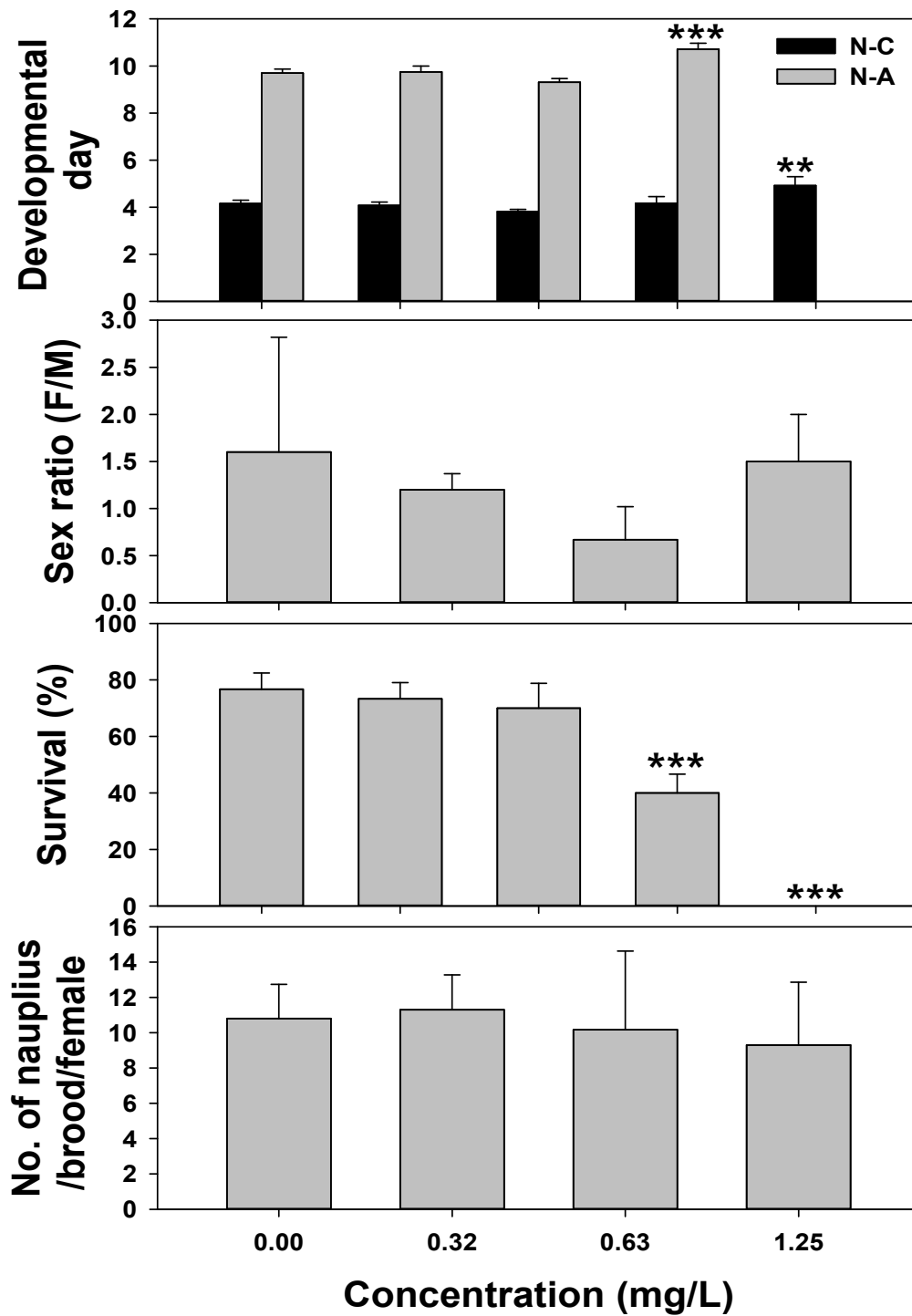


Fig. 3. Effect on the developmental time (N - C, nauplius to copepodid and N - A, nauplius to adult), sex ratio, survival and fecundity of *Nitocra* sp. exposed to different concentrations of arsenic.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 목표 달성도

- 열대역 독성평가를 위한 열대요각류를 분리하였으며 이 중 *Nitocra* sp.의 안정적인 배양을 위한 최적배양조건을 연구목표에 따라 구명하였음.
- 선정된 열대요각류를 이용하여 표준오염물질 중 구리 및 비소에 대한 급성 및 만성독성평가가 가능하였으므로 본 연구의 목표달성도는 100% 수준임.

제 2 절 대외 기여도

- 열대지역에서 해양독성물질이나 환경변화에 대한 생물영향을 평가하기 위한 열대토착 실험생물의 확보로 차후 보다 다양한 열대생물군을 이용한 입체적 독성평가 (battery test 또는 중 민감도분포 적용 시험)에 기여할 것으로 기대.
- 열대해양 환경오염을 보다 조기에 예측하기 위한 분자생물학/생화학적 바이오마커 및 평가방법 개발에 기여.
- 개발된 독성평가기법은 열대국가의 해양 오염물질 배출규제를 위한 판단기준으로 활용이 가능하므로 열대도서국에 국가간 친선을 위한 기증물로 활용가능.
- 궁극적으로 열대역 해양환경 개선에 의한 해양생물의 다양성 및 자원의 증가효과에 기여.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 열대 해양오염물질의 생태독성평가를 위한 입체적 독성평가기법 개발 기대
- 각종 독성물질의 영향 정량화를 통한 생태계영향 판단기준제시
- 개발된 시험생물 및 독성검사법 활용을 통한 연구활동 증대

제 6 장 참고문헌

- Hansen, L. (2003) Increasing the Resistance and Resilience of Tropical Marine Ecosystems to Climate Change. In: L. J. Hansen, J. L. Biringerm and J. R. Hoffman (eds) *BUYING TIME: A USER'S MANUAL*. pp. 157-176.
- Kwok, K., Leung, K., Lui, G., Chu, S., Lam, P., Morritt, D., Maltby, L., Brock, T., Van Den Brink, P., Warne, M. and Crane, M. (2007) Comparison of tropical and temperate freshwater animal species' acute sensitivities to chemicals: implications for deriving safe extrapolation factors. *Integr Environ Assess Manag*, **3**, 49-67.
- Howe, P. L., Reichelt-Brushett, A. J. and Clark, M. W. (2012) *Aiptasia pulchella*: a tropical cnidarian representative for laboratory ecotoxicological research. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **31**, 2653-2662.
- Gissi, F., Binet, M. T. and Adams, M. S. (2013) Acute toxicity testing with the tropical marine copepod *Acartia sinjiensis*: Optimisation and application. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **97**, 86-93.
- Moraes, R. B. C., Pfeiffer, W. C., Guimaraes, J. R. D., Borges, A. L. N. and Campos, A. N. (2000) Development of sediment toxicity test with tropical penaeid shrimps. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**, 1881-1884.
- Ismail, M., Phang, S. M., Tong, S. L. and Brown, M. T. (2002) A modified toxicity testing method using tropical marine microalgae. *Environmental Monitoring and Assessment*, **75**, 145-154.
- Hillis, D. M. and Dixon, M. T. (1991) Ribosomal DNA - Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *Quarterly Review of Biology*, **66**, 411-453.
- Hamby, R. K. and Zimmer, E. A. (1988) Ribosomal-Rna Sequences for Inferring Phylogeny within the Grass Family (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **160**, 29-37.
- Lee, K. W., Raisuddin, S., Hwang, D. S., Park, H. G., Dahms, H. U., Ahn, I. Y. and Lee, J. S. (2008) Two-generation toxicity study on the copepod model species *Tigriopus japonicus*. *Chemosphere*, **72**, 1359-1365.