

선박평형수 처리장치 효율 검증을 위한 해양미소부유생물 생사판별기법

백승호¹, 신경순^{1*}

¹한국해양과학기술원 남해연구소

A staining method to determine marine microplanktonic organism viability and investigate the efficacy of a ship's ballast water treatment system

Seung Ho Baek¹, kyoungsoon Shin^{1*}

¹South Sea Institute, Korea Institute of Ocean Science & Technology

요약 본 연구는 선박평형수처리장치 성능을 평가하기 위한 일환으로 Evan blue, Aniline blue 그리고 CMFDA 염색방법을 활용하여 해양부유생물의 생사판별을 이해하고자 하였다. Evans blue와 Aniline blue의 염색은 죽은 생물을 파란색으로 염색하여 죽은 생물을 평가하는 방법이고, CMFDA의 방법은 살아있는 생물을 녹색으로 염색하여 평가한다. 현장 동·식물플랑크톤 군집을 대상으로 Evans blue와 Aniline blue의 방법을 적용한 결과, 죽은 생물을 90%이상 염색시키는 것으로 나타났다. 하지만, 살아있는 일부 식물플랑크톤의 군집에서도 파란색으로 염색 되어, 실제 선박평형수 처리장치의 성능을 평가하기에는 일정한 한계성을 나타내었다. 한편, 살아있는 생물을 염색하는CMFDA방법을 적용한 결과, 현장의 부유생물의 70%의 염색효과를 보였다. CMFDA방법은 FDA방법과 유사하게 살아있는 생물을 녹색으로 염색하여 생물 생사판별이 가능하게 함으로, 두 가지 방법을 중복염색(double staining)하는 방법을 고안해 보다 높은 효율의 생사판별방법을 찾고자 노력하였다. 그 결과, 두 가지의 염색시약을 중복으로 염색한 실험군에서 95%이상의 높은 효율을 보였고, 이는 단일 염색한 실험군보다 상대적으로 높은 염색효율을 얻을 수 있었다. 따라서 CMFDA+ FDA를 중복염색한 평가법이 해양생물의 생사를 판별하는데 보다 높은 효율을 보였고, 선박평형수처리장치의 성능을 평가하는 방법으로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

Abstract We determined a method to determine marine planktonic organism viability using Evan's blue, Aniline blue, and 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA). The Evan's blue and Aniline blue methods produced bright blue light for dead phytoplankton and zooplankton and were the best dyes to detect dead cells. The staining efficiency of Evan's blue and Aniline blue were $\geq 90\%$ of the original field sample. However, it was difficult to test the efficiency of a ship's ballast water treatment system because detection of living cells. In contrast, the CMFDA method, which is based on measuring cell esterase activity using a fluorimetric stain, was the best dye to detect live cells of almost all phytoplankton species, and staining efficiency was 70%. The CMFDA method is similar to the fluorescein diacetate (FDA) staining method. Therefore, we estimated viability of phytoplankton species using a double-staining method by combining CMFDA and FDA to determine optimum staining efficiency. As a result, the frequency of dying cells based on the double-staining method was 95%, which was significantly higher than that of single CMDFA staining. Our results suggest that a CMDFA + FDA assay is more effective to determine survival of marine plankton and that this method was applicable to investigate the efficacy of a ship's ballast water treatment system.

Key Words : Ballast water, Evan blue, Aniline blue, CMFDA, cell viability

본 논문은 KIMST사업 [PM57480]으로 수행되었음. 연구에 도움을 준 배시우연구원께 감사의 마음을 전함.

*Corresponding Author : kyoungsoon Shin (Korea Institute of Ocean Science & Technology)

Tel: +82-55-639-8510 email: ksshin@kiost.ac

Received March 11, 2015

Revised March 31, 2015

Accepted June 11, 2015

Published June 30, 2015

1. 서론

선박평형수는 화물이 없는 공선선박의 평형 및 안정을 유지하기 위해서 싣는 물이며, 전 세계적으로 연간 50-100억톤 규모로 이송되고 있다[1]. 선박평형수에 이송된 대부분의 생물은 환경이 다른 해역에 옮겨질 경우, 선박평형수내 극한 환경조건에 적응하지 못하여 치명적인 손상을 입어 사멸하지만, 일부 내성이 강한 종과 더불어, 휴면포자 및 휴면란을 생성하는 종은 살아남게 되어 항만고유의 생태계를 교란시킬 수 있다[2]. 따라서 국제해사기구(IMO: International Maritime Organization)에서는 이와 같이 선박평형수에 포함되어 있는 해양생물이 다른 지역으로 옮겨져 해양 생태계 교란을 사전에 방지하기 위해서 선박평형수를 처리하여 생물을 제거 및 사멸시킨 후 배출할 수 있는 협약(국제선박평형수관리협약, IMO D2 regulation)을 만들었고, 오는 2016년에는 모든 선박에 처리 장치 설치를 의무화하려고 하고 있다. 특히, 선박평형수 처리 장치의 적합성을 확인하기 위하여, 처리된 시험수내 기준은 대장균 $250 \text{ cfu } 100 \text{ mL}^{-1}$, 비브리오와 같은 위협 및 유해 균주는 $1 \text{ cfu } 100 \text{ mL}^{-1}$ 이하로 지정하였고, $10\text{-}50 \mu\text{m}$ 크기의 생물(주로 식물플랑크톤)은 10 cells mL^{-1} 미만으로, 그리고 $>50 \mu\text{m}$ 크기그룹(동물플랑크톤)은 10 inds m^{-3} 미만으로 각각 지정하였다[1, 3]. 특히, IMO협약 이후 향후 8년간 9만척의 선박에 대해 처리장치설비가 강제적으로 장착되어야 한다. 결과적으로 선박평형수 처리장치 개발업체의 입장에서는 많은 선박에 제품을 공급하기 위해서 처리장치모듈의 단순화 및 생산능력을 확충하는 것이 무엇보다 시급할 것이다. 하지만, 선박평형수 처리설비를 개발하는 과정에서 해양미소 생물이 정확하게 처리되고 있는지 여부를 평가할 수 있는 방법론 정립이 미흡하여 산업계의 부정적인 영향을 줄 수 있다. 즉 처리장치와 관련된 설비 기술은 살아있는 생물을 명확하게 처리되었다는 것을 정량적으로 제시할 수 있어야 하는데, 현 시점에서는 이와 같은 근거를 제시할 수 있는 생사판별법이 명확하지 않아 산업계에서는 많은 어려움이 따르고 있다. 아울러, 최근에 개정된 미국형식승인(USCG phase II)기준은 기존 IMO D2 규정에 비하여 1000배 강화된 처리장치의 개발 및 시험 결과를 제시하도록 하고 있으나, 처리장치에 대한 신뢰도 확보 및 처리 결과에 대한 정확한 분석 방법이 명확하게 정립되지 않고 있다. 따라서 선박평형수

처리장치 및 USCG phase II의 승인을 얻을 수 있는 처리 장치의 개발과 시험수를 평가할 수 있는 생물생사판별 기법이 매우 중요하므로 이들 방법론 정립이 무엇보다 시급한 실정이다.

부유생물의 생물생사판별법은 크게 식물과 동물플랑크톤으로 구분할 수 있으며, 식물플랑크톤을 대상으로는 식물고유의 염색소 활성을 평가하는 자가형광관찰법과 더불어 다양한 염색법(FDA(fluorescein diacetate assay), Calcein-AM, CMFDA(5-choromethylfluorescein diacetate), SYTOX Green nucleic acid)이 있다[4, 5, 6]. 동물플랑크톤의 평가는 부속지의 운동성 여부와 뾰족한 침으로 자극하는 자극법과 더불어 NR (Neutral red), Evan blue, Aniline blue 등의 염색법이 있다[7, 8, 9]. 이들 동·식물플랑크톤의 염색법은 단일 배양종으로 평가한 사례는 많으나, 자연상태의 생물군집을 대상으로 평가한 연구는 극히 드물다. 그 중 현장시료를 이용한 생사판별은 Neutral red[7], Calcein-AM[6], FDA[6]에 관해서는 한국해양과학기술원의 연구팀이 선행연구를 수행한 것이 유일하다.

본 연구는 해양에서 자연 상태의 동·식물플랑크톤의 군집을 대상으로 Evan blue, Aniline blue 그리고 CMFDA의 염색방법을 적용하여 생물생사판별이 가능한지 여부를 평가함과 아울러, 가장 적절한 염색농도범위를 파악하기 위해서 농도구배 및 교차 염색법(FDA+CMFDA)으로 가장 효율적인 평가방법을 모색하고자 노력하였다.

2. 재료 및 방법

생사판별에 이용한 동·식물플랑크톤은 거제시 장목면에 위치한 한국해양과학기술원 남해연구소 부두에서 2014년 10월에서 12월에 걸쳐 채집하였다. 식물플랑크톤은 망목이 $20 \mu\text{m}$ 의 네트로 채집하였고, 동물플랑크톤은 $200 \mu\text{m}$ 네트를 이용해서 저층에서 표층까지 수직 인양하여 채집하였다. 채집된 시료는 250 mL 과 500 mL 채수병(PC bottle)에 각각 옮겨 담고, 실험실로 운반하였다. 채집 후 환경 변화에 따른 동·식물플랑크톤의 스트레스를 최소화하기 위해 실험실 온도를 해수 온도(표층수온: 20°C)와 유사한 상태로 유지 시킨 후 빠른 시간 내에 염색하여 분석하였다. 아래에 언급하는 Evans blue와

Aniline blue의 염색법은 죽은 생물을 염색하는 방법이고, CMFDA의 방법은 살아있는 생물을 염색하는 방법이다. 특히 죽은 부유생물을 확보하기 위해서 채집된 네티시료를 15 mL 튜브에 일정량 (10 mL) 넣고, 60 °C 에서 3시간 정도 사멸시킨 시료와 중성포르말린(1%)로 사멸시켜 각각 평가하였다. 아울러, 5가지의 염색방법에 대한 각각의 염색시약에 대한 working solution의 농도 구배는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. The list of difference concentration for each staining method in the experiments. The working solution (μL) was added in natural seawater of 1 mL. Unit: μL

Staining method	T1	T2	T3	T4	T5
Evans Blue	1	10	20	50	100
Aniline Blue	1	10	20	50	100
CMFDA	10	50	-	-	-
FC: FDA(25 μL fix)+ CMFDA	5	10	20	40	100
CF: CMFDA(10 μL fix) + FDA	5	10	25	50	100

Evans blue염색법은 0.3g의 evans blue 파우더를 300 mL의 3차 증류수에 12시간 이상 완전히 녹여 working solution을 만들어 갈색유리병에 넣어 실온 보관하였다. 네티로 채집한 시료 1 mL 에 Evans blue의 working solution을 1, 10, 20, 50, 100, 200 μL의 농도구배로 각각 넣고, 15분간 실온 암실에서 반응시킨 뒤 광학현미경에서 관찰 및 사진 촬영하였다.

Aniline blue의 염색법은 1g의 aniline blue diammonium salt 파우더를 30 mL 3차 증류수에 12시간 이상 완전히 녹여 working solution을 만들어, 갈색 암병에 넣고 실온에서 보관하여 3일 이내에 사용하였다. 네티로 채집한 시료 1 mL 에 Aniline blue의 working solution을 농도구배를 1, 10, 20, 50, 100 μL로 넣고 15분간 암실에서 반응시킨 뒤 광학 현미경에서 관찰 및 사진을 촬영하였다.

CMFDA(5-chloromethylfluorescein diacetate)의 염색법은 백과 신[6]이 언급한 FDA의 염색방법과 유사하게 살아있는 세포를 염색하여 녹색 형광을 띄는 생물을 계수하여 생사판별하는 방법으로 생세포 염색용 형광색소 5-chloromethylfluorescein diacetate 시약 50 μg을 0.5 mL의 Dimethylsulfoxide(DMSO)의 비율로 녹여

working solution을 제조하여 냉암 조건에 보관하였다. 여기서 working solution은 여과해수에 희석하는 순간 CMFDA시약이 반응하기 때문에 염색할 때마다 일정량 여과해수에 분주 희석하여 농도를 100 μM로 만들어 사용하였고, 시료 1 mL에 CMFDA최종농도가 1μM과 5 μM이 되도록 염색하여 평가하였다. 생물생사판별은 형광현미경(excitation: 365nm, emission: 445/450nm)에서 관찰 및 사진 촬영하였다.

FDA와 CMFDA의 생사판별방법이 유사하여 농도별로 교차 주입(중복염색:double staining)하여 최적의 염색효율을 알아보고자 하였다. FC(FDA농도고정, CMFDA의 농도변화)실험구는 1.7 mL의 micro-tube에 대상생물이 들어 있는 해수 1 mL 을 넣고 여과해수에 400배로 희석한 용액을 1:40으로 반응시킨 FDA를 25 μL 씩 동일하게 주입하고 CMFDA working solution 용액을 5, 10, 20, 40, 100 μL 로 농도구배로 두어 염색정도를 평가하였다[4]. 반대로, CF(CMFDA농도고정, FDA의 농도변화) 실험구는 1.7 ml의 micro-tube에 대상생물이 들어 있는 해수 1 mL 을 넣고 CMFDA를 10 μL씩 동일하게 주입한 뒤 여과해수에 400배로 희석한 FDA를 5, 10, 25, 50, 100 μL 농도로 주입하여 염색 효율을 파악하였다[Table 1].

3. 결과 및 고찰

각 염색법에 대한 농도별 염색효율은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. The staining efficiency (%) under difference concentration using natural phytoplankton communities.

Staining method	T1	T2	T3	T4	T5
Evans Blue	-	>90	>90	>90	-
Aniline Blue	-	>90	>90	-	-
CMFDA	53	72			
FC: FDA(25 μL fix)+ CMFDA	77	98	85	74	73
CF: CMFDA(10 μL fix) + FDA	67	85	87	85	66

Evans blue염색법은 죽은 세포를 파란색으로 변화시켜 생물 사멸을 평가하는 방법이다. Evans blue농도별로

염색한 결과, 가장 낮은 1 μL 의 Evans blue working solution을 주입한 실험구에서는 염색반응이 일어나지 않았고, 동일하게 살아있는 생물에도 염색이 나타나지 않은 것으로 보아 극히 낮은 농도에서는 생사판별이 불가능하다는 것을 알 수 있었다. 또한, Evans blue working solution의 농도가 10-50 μL 에서는 살아있는 동물플랑크톤 시료에 대해 전체 개체수의 10% 미만이 염색율을 나타내었고, 100 μL 이상의 농도에서는 높은 염색농도의 영향으로 바탕(background) 전체가 파란색으로 보여 생물의 염색정도를 명확하게 판단할 수 없었다. 반면, 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 가열하여 사멸시킨 시료에 Evans blue working solution의 농도를 10-50 μL 로 주입하였을 경우 동물플랑크톤의 90%이상 파란색으로 염색이 되었고, 중성포르말린으로 사멸시킨 시료에서는 85% 전후의 염색효율을 보였다. 죽은 식물플랑크톤 염색은 Evans blue working solution을 20 μL 농도에서 최적의 염색효율을 보였고, 특히 최적농도에서도 종별로 특이적인 염색효과를 나타내었다[Fig. 1].

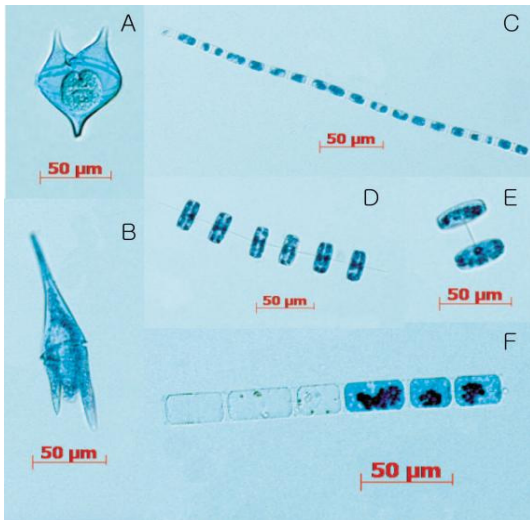


Fig. 1. Various dead phytoplankton species from Jangmok Bay stained with Evan blue (AB). (A) *Protoperidinium depressum*; (B) *Ceratium furca*; (C) *Skeletonema* sp. (D, E) *Thalassiosira rotula*; (F) *Stephanopyxis* sp.

특히 대부분의 규조류는 80%를 넘는 염색효율이 관찰되었고, 그 중 *Chaetoceros* 속의 80-90%의 염색효율을 나타냈으며, *Leptocylindrus danicus*, *Pseudo-nitzschia* sp., *Skeletonema costatum*, *Thalassionema frauenfeldii*,

Thalassionema nitzschioides 는 100%에 준하는 염색효과를 관찰하였다. 반면, 와편모조류 *Ceratium* 속은 부분적으로 염색이 되거나 염색이 되지 않는 세포들이 다수 확인되어 전체 50% 미만의 염색효율을 보였다. 100 μL 농도에서는 Evans blue 농도가 너무 높아 현미경으로 염색특성을 구분할 수 없었다. 특히 세포 피각이 상대적으로 약한 종들과 세포내 물질이 파괴되어 세포외측으로 용출된 종은 생사판별이 극히 어려웠다.

Aniline blue염색법 또한 Evans blue와 유사하게 죽은 세포를 파란색으로 염색하여 생물의 사멸여부를 구분한다. Evans blue와 유사하게 Aniline blue 1 μL 농도에서는 염색반응이 나타나지 않았다. Aniline blue 10-20 μL 의 농도에서는 전체 개체수 90% 이상의 염색율을 나타냈으나, 염색되는 정도가 명확하지 않았고, 종별로 염색반응이 다르게 나타났다. 규조류 중에서도 *Ditylum brightwellii* 와 *Asterionella glacialis* 종은 염색효율이 각각 57%와 33%로 나타내었으며, *Chaetoceros* 속은 100% 염색되었다. Aniline blue염색법에서도 Evans blue와 유사하게 50 μL 이상의 농도에서는 염색농도가 너무 강하여 현미경으로 생물염색을 구분할 수 없었다 [Fig. 2].

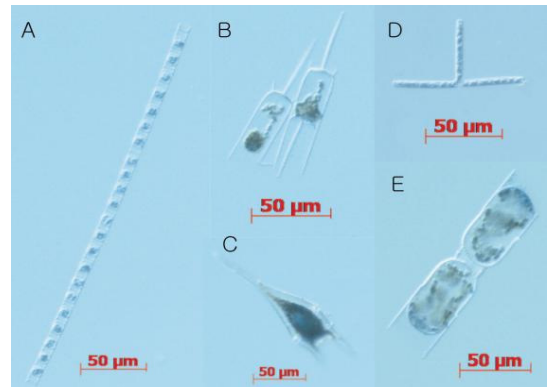


Fig. 2. Various dead phytoplankton species from Jangmok Bay stained with Aniline blue (AB). (A) *Skeletonema* sp.; (B) *Ditylum brightwellii*; (C) *Ceratium furca* (D) *Thalassiosira nitzschioides*; (E) *Stephanopyxis palmeriana*

아울러, Figure 1F와 같이 사멸된 세포중 세포내부 물질이 세포외벽으로 용출된 것은 염색이 되지 않았고, 이는 세포가 이미 사멸되었음에도 불구하고, 염색이 되지 않기 때문에 염색결과의 오류를 야기할 수 있다. 결과적

으로 동물과 식물플랑크톤을 동시에 생사를 판별하는 기법을 규명하는 것은 쉽지 않았으며, 특히 죽은 생물을 염색하여 평가하는 Evan blue와 Aniline blue의 방법은 오히려 생물의 생사를 과소평가할 가능성이 높기 때문에 선박평형수 처리장치 개발 후 USCG Phase II에 근거한 평가방법으로 적합하지 않을 것으로 사료된다.

CMFDA 염색의 최종농도 1 μM 에서 전체 식물플랑크톤의 군집의 53.3% 염색효율을 보였고, 5 μM 에서는 72.1%로 높게 나타났다. 백과 신[6]이 보고한 FDA법과 유사하게 CMFDA 염색에서도 형광현미경 형광필터 (excitation: 365 nm, emission: 445/450 nm)에서 관찰하였을 때 FDA 염색에서 나타난 세포내의 녹색형광을 방해하는 적색형광이 너무 강하여 부분적으로 녹색형광이 관찰되었다. 이와 같은 현상은 규조류중 *Chaetoceros* spp., *Skeletonema costatum*에서 두드러지게 나타났다 [Fig. 3].

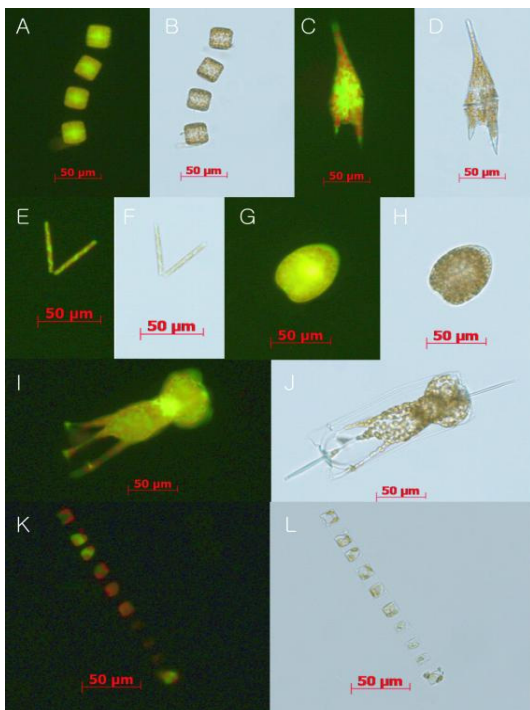


Fig. 3. Various phytoplankton species from Jangmok Bay stained by with 5-chloromethylfluorescein diacetate(CMFDA). (A, B) *Thalassiosira* sp.; (C, D) *Ceratium furca*; (E, F) *Thalassionema nitzschioides*; (G, H) *Akashiwo sanguinea*; (I, J) *Ditylum brightwellii*; (K, L) *Skeletonema* sp.

아울러, 체인을 형성하는 규조류중 세포내 엽록소가 파괴되거나, 소실된 세포에서는 녹색형광이 발하지 않아 생물의 생사를 명확하게 구분할 수 없었다. 60 $^{\circ}\text{C}$ 드라이 오븐에서 15분간 방치하여 사멸시킨 시료와 포르말린으로 고정하여 사멸시킨 시료를 염색한 뒤 형광을 확인한 결과, 각각의 사멸된 시료에서는 형광이 관측되지 않았다. 특히 규조류 중에서 *Thalassionema* 속의 대부분은 CMFDA에 대해 95% 이상의 높은 염색효율을 나타냈으며, *Pseudo-nitzschia* sp., *Asterionella glacialis*, *Cylindrotheca closterium* 종은 적색 형광의 간섭이 심하게 나타나 녹색 형광필터에서는 명확하게 구분 할 수 없었다. 또한 중성 포르말린으로 사멸시킨 플랑크톤은 사멸 시간에 관계없이 CMFDA에 따른 염색반응이 나타나지 않았다. 염색하지 않은 살아있는 생물을 형광현미경에서 관찰하였을 경우, 엽록소 기원의 세포내부물질이 자가형광을 발하여 적색을 나타내지만, 녹색 형광은 관찰할 수 없었다[Fig. 3]. 결과적으로 CMFDA로 염색하여 녹색 형광필터로 관찰하였을 경우, 명확한 녹색이 나타났고, 이는 대상생물의 세포내 물질에 염색된 결과로 판단되며, 이를 근거로 생물의 생사판별이 가능하였다.

백과 신[6]에 의하면, FDA염색방법은 다른 염색법과 비교하여 높은 염색 효율을 나타내었고, 본 연구에서도 선행연구의 결과를 바탕으로 보다 효율적인 생사판별법을 찾아내기 위해서 상대적으로 염색효율이 높으면서 유사한 염색방법인 CMFDA와 중복염색하여 평가하였다. FDA와 CMFDA를 농도별로 중복염색(double staining)하여 염색효율을 알아본 결과는 Table 2 와 Figure 4에 나타내었다. FDA를 25 μL 일정량 주입한 FC 실험군에서는 CMFDA를 10 μL 주입한 FC Treatment_2에서 98%로 가장 높은 염색효율을 보였으며, CMFDA를 10 μL 로 일정량 주입한 CF(CF treatment_3)에서도 FC 실험군과 유사하게 86.7%로 높은 염색효율을 나타내었다. 나머지 실험군에서는 농도구배에 따른 명확한 특색은 보이지 않았고, 염색효율이 66-85% 범위로 나타났다. 특히 중복염색에서도 *Chaetoceros* spp., *Skeletonema costatum*에서 적색 형광이 간섭하는 현상이 나타났으며, 그중 *Chaetoceros* 속의 일부종은 적색 형광의 간섭이 강하게 나타나는 것을 관찰하였다. Steinberg et al.[5]의 보고에 의하면, 중속영양외편모조류와 혼합영양외편모조류 *Scrippsiella trochoidea*, *Prorocentrum micans*, *Dinophysis* spp. 염색한 결과, 살아 있는 생물에 녹색형

광이 발하여 생물의 생사판별을 할 수 있다고 하였다. 아울러, 다양한 생물을 평가한 결과 살아있는 생물은 74%-90%의 염색효율을 보고하였고, 이는 본 연구의 결과와 유사하였다. 결과적으로 부유성 플랑크톤의 종특이적으로 생물의 생사판별이 어려운 것은 여기 CMFDA를 활용한 연구에서도 다른 염색 시약과 유사하게 생사판별의 한계를 보였다.

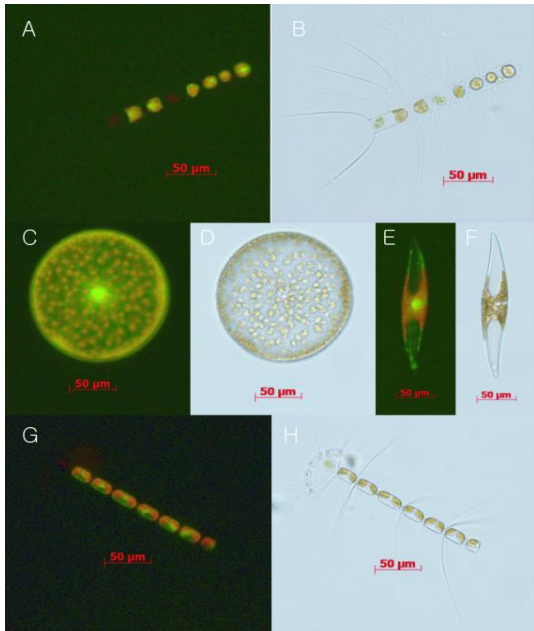


Fig. 4. Various phytoplankton species from Jangmok Bay stained by intermingle Fluorescein diacetate (FDA) with 5-chloromethylfluorescein diacetate(CMFDA). (A, B) *Chaetoceros* sp.; (C, D) *Coscinodiscus waileisii*.; (E, F) *Pleurosigma normanii*.; (G, H) *Chaetoceros compressus*.

하지만 본 연구의 FDA + CMFDA 이중 염색방법에서는 상대적으로 높은 생사판별 효율을 보였고, 규조류의 일부종을 제외하면, 대체적으로 생물의 생사판별을 할 수 있는 좋은 염색방법이라고 사료된다. 아울러, 식물플랑크톤과 같은 독립영양세포는 엽록소에서 고유의 자체 형광을 발하므로, 만약 이중염색에서조차 생사판별이 명확하게 이루어지지 않은 규조류의 일부 종에 관해서는 엽록소기원의 자체 형광을 발하는 것을 이용하게 되면, 생물생사판별이 가능하다. 이와 같이 FDA+CMFDA의 2중염색법에 더하여 엽록소 기원 자체 형광을 종합적으로 평가하면, 98%이상의 높은 효율로 생물의 생사판별

이 가능할 것으로 판단된다. 다시 말하면, FDA+CMFDA에서도 염색되지 않고, 엽록소가 소실되어 형광을 발하지 않는 생물은 세포의 기능을 잃을 가능성이 높다. 이는 선박평형수 처리하는 과정에서 세포 내 엽록소와 같은 세포물질이 처리장치를 통과하면서 또는 암조건에서 5일 동안 두는 과정(D-2규정)에서 광합성을 할 수 있는 기능이 파괴되었다고 간주할 수 있고, 이들 생물에 대하여 re-growth 성장실험을 할 경우에도 재성장이 불가능한 것으로 파악되었다. 결과적으로 FDA+CMFDA의 이중염색법은 모든 해양부유생물에게 완벽하게 적용할 수 있는 생사판별법은 아니지만, 상대적으로 극히 높은 염색효율(>95%)을 보이고 있으므로, 자가영양생물에서 발하는 형광을 혼합하여 평가하면 생물의 생사를 최대효율로 평가 할 수 있을 것으로 기대된다.

4. 결론

선박평형수 처리장치를 통과한 처리수의 해양생물에 대한 생사판별은 다음과 같은 사항을 충족하는 것이 중요하다. 첫째, 염색 방법이 간단명료해야 한다. IMO-D2에 의하면, 선박평형수 처리장치를 통과한 생물의 생사판별은 6시간 이내로 간단하면서 신속 정확하게 수행되어야 한다. 상기 5가지 방법은 염색이 간단하고 염색 후 반응 시간 또한 약 15분 정도 이내로 적절할 것으로 판단된다. 둘째, 대상생물을 염색한 후 일정 시간 이상 지속 되어야 한다. 셋째, 대상 생물에 대한 염색 효율이 높아야 한다. 이것이 가장 중요한 항목으로 생물의 염색이 부분적으로 되거나 같은 종임에도 불구하고 염색 유무가 명확하지 않으면 생사판별시 매우 큰 혼란을 야기할 수 있다. 결과적으로 본 연구에서 식물플랑크톤과 원생생물을 대상으로 생물의 생사판별을 확인한 결과, FDA와 CMFDA의 중복염색 실험에서 나타났고, 최적의 농도구배는 FDA 25 µL와 CMFDA 10 µL에서 95% 이상으로 관찰되었다. 추후 상기의 농도 구배에서 생물의 생사판별을 수행하면 USCG phase II의 선박평형수 처리장치의 개발에서도 효율적인 평가가 가능하다고 판단된다. 반면, Evan blue와 Aniline blue의 방법은 광학현미경 하에서 관찰하는 이점이 있으나, 살아있는 생물에서도 부분적으로 염색되어 선박평형수 처리장치의 성

능을 평가하는 방법으로는 적합하지 않을 것으로 사료되었다.

References

- [1] IMO "Report on the ballast water treatment standards workshop". In 1st International ballast water treatment standards workshop, IMO London, 28-30 March. <http://globallast.Imo.org/workshopreport.htm>, 2001.
- [2] N. Bax, A. Williamson, M. Agüero, E. Gonzalez, W. Geeves, "Marine invasive alien species: a threat to global biodiversity". *Mar. Policy*, 27, 313-323, 2003. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-597X\(03\)00041-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-597X(03)00041-1)
- [3] E. M. Zetsche, F. J. R. Meysman, "Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton". *J. Plankton Res.*, 34, 493-509, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/plankt/fbs018>
- [4] M. Garvey, B. Moriceau, U. Passow, "Applicability of the FDA assay to determine the viability of marine phytoplankton under different environmental conditions". *Mar. Ecol.* 352:17-26, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.3354/meps07134>
- [5] M. Steinberg, E. Lemieux, L. Drake, "Determining the viability of marine protists using a combination of vital, fluorescent stains". *Mar. Biol.*, 158, 1431-1437, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-011-1640-8>
- [6] S. H. Baek, K. Shin, "Applicability of fluorescein diacetate (FDA) and Calcein-AM to determine the viability of marine plankton". *Ocean Polar Res.*, 31, 349-357, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.4217/OPR.2009.31.4.349>
- [7] D. M. Dressel, D. R. Heinle, M. C. Grote, "Vital staining to sort dead and live copepods". *Ches. Sci.*, 13, 156-159, 1972. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/1351022>
- [8] R. W. Crippen, J. L. Perrier, "The use of neutral red and Evans blue for live-dead determinations of marine plankton (with comments on the use of rotenone for inhibition of grazing)". *Biotech. Histochem.*, 49, 97-104, 1974. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/10520297409116949>
- [9] S. L. Bickel, K. W. Tang, H. P. Grossart, "Use of aniline blue to distinguish live and dead crustacean zooplankton composition in freshwaters". *Freshwater Biol.* 54, 971-981, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02141.x>

백 승 호(Seung Ho Baek)

[정회원]



- 2004년 3월 : 요코하마국립대 환경정보학과 (환경학석사)
- 2007년 3월 : 요코하마국립대 환경정보학과 (환경학박사)
- 2009년 1월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 책임연구원

<관심분야>

해양환경오염, 수질, 해양생물학, 식물플랑크톤 생태학

신 경 순(kyoungsoon Shin)

[정회원]



- 1988년 2월 : 인하대학교 해양학과 (이학석사)
- 1997년 2월 : 인하대학교 해양학과 (이학박사)
- 1997년 4월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 책임연구원

<관심분야>

선박평형수, 외래생물 생리, 생태학, 해양생물학,