

## 메소코즘에서 USCG phase-II 형식승인 대비 영양염 첨가에 따른 식물플랑크톤 대량 배양조건 확립 및 군집구조의 단주기변화

백승호<sup>1</sup>, 이민지<sup>1</sup>, 신경순<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한국해양과학기술원 남해연구소

### Short-term changes of phytoplankton communities after nutrient addition and establishment of stable mass culture condition to prepare the type approval test of USCG Phase-II in mesocosm enclosure

Seung Ho Baek<sup>1</sup>, Min Ji Lee<sup>1</sup>, Kyoungsoon Shin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>South Sea Institute, Korea Institute of Ocean Science & Technology

**요약** 본 연구는 USCG Phase-II 형식승인에 대비하여 여름철 메소코즘에서 영양염 첨가(+N, +P, +NP)에 따른 식물플랑크톤의 대량 배양 가능성의 검토와 더불어, 영양염 조성의 차이에 따른 자연 식물플랑크톤 군집의 반응과 시간경과에 따른 종천이 양상을 파악하였다. 메소코즘에서 식물플랑크톤은 영양염 첨가후 곧바로 반응하여 1-3일 이내 최고 개체수 밀도에 도달하였다. +NP 실험군(N:30  $\mu$ M, P:3  $\mu$ M)에서 식물플랑크톤 군집의 성장율은 2.47 d<sup>-1</sup>로 현저하게 높게 나타났고, +N실험군(N:30  $\mu$ M)에서도 1.98 d<sup>-1</sup>로 나타났다. 반면, +P실험군(P:3  $\mu$ M)에서는 대조군과 유사한 성장율을 보여, 영양염 첨가 효과가 명확하지 않았다. 특히, 식물플랑크톤 개체수 밀도 또한 +NP실험군에서 대조군 보다 약 50배 높게 나타나, 선박평형수의 형식승인 시험용 시료를 확보하는 대량 배양가능성을 시사할 수 있었다. 식물플랑크톤의 군집조성은 자연 상태에서 우점한 *Pseudo-nitzschia* spp. 종이 영양염첨가와 더불어 압도적으로 우점하였고, 실험시간의 경과와 함께 영양염 고갈로 인하여 총 식물플랑크톤이 급격하게 감소하였다. 결과적으로 USCG Phase-II 형식승인에 대비하여 시험수로 활용하기 위한 자연생물 대량배양의 최적 영양염(질산염: 30  $\mu$ M과 인산염: 3 $\mu$ M)과 수확시기(하계기준 실험3일 후)를 제시할 수 있었고, 이와 같은 과학적 근거는 선박평형수 처리장치를 개발하는 산업계에 크게 도움이 될 것이다.

**Abstract** In order to prepare for the type approval test for the United States Coast Guard (USCG) Phase-II of Ballast Water Treatment System (BWTS), a phytoplankton mass culture was conducted in a mesocosm enclosure. We evaluated the response of the phytoplankton community after nutrient addition (+N, +P, and +NP) and investigated the development of the species with increasing culture time. After nutrient dosing, the phytoplankton population significantly ( $p < 0.05$ ) increased from day 1 to day 3, depending on the nutrient treatments. In particular, the specific growth rate of the phytoplankton community in the case of +NP treatment and + N treatment were estimated to be 2.47 d<sup>-1</sup> and 1.98 d<sup>-1</sup>, respectively. The phytoplankton population density in the case of + NP treatment was approximately 50 times higher than that of the control group, suggesting that these treatments could be useful for mass culturing phytoplankton (> 75% of natural community) for the approval regulation of USCG Phase-II. In the phytoplankton community of the mesocosm, *Pseudo-nitzschia* spp. dominated in the logarithmic growth phase. The cell density decreased significantly ( $p < 0.05$ ) with increasing time, coinciding with the nutrient limitation. At that time, the dominance of *Pseudo-nitzschia* spp. shifted to that of *Cylindrotheca closterium*. Therefore, the optimum nutrient concentration (N: 30  $\mu$ M, P: 3  $\mu$ M) and reasonable harvesting time (after 3 days in summer) found in this study for the mass culturing of phytoplankton may be helpful to meet the USCG Phase-II biological criteria to be used in BWTS.

**Keywords** : Phytoplankton, Bio-assay, Nitrogen, Phosphorus, Mesocosm, Ballast water

본 논문은 KIMST사업 [PM57480]과 KIOST 주요사업[PE99432]으로 수행되었음.

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

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

Received January 8, 2016

Revised (1st March 24, 2016, 2nd March 29, 2016)

Accepted April 7, 2016

Published April 30, 2016

## 1. 서론

메소코즘(폐쇄생태계)은 바다 환경과 유사한 조건에서 해양생물이 반응하여 항상성을 유지할 수 있도록 만든 실험 장치로 실내실험과 현장의 중간 매개체 역할을 하는 중요한 기능을 담당한다. 해양 수서 생태계의 평가는 기능적 측면과 구조적 측면으로 구분할 수 있고, 생태계의 기능적 측면은 수계 1차 생산자에서 소비자 간의 에너지관계, 영양염 순환에 따른 먹이사슬의 안정적 균형 관계로 판단할 수 있다. 반면, 구조적 측면은 생태계 내 군집구조의 다양성, 복잡성, 민감성을 분석하여 수치정량화함과 아울러, 생물 상호관계를 종합적으로 평가하여 판단할 수 있다. 특히 부유생물의 생리·생태적 변화와 종간경쟁 및 수서환경과의 관계를 종합적으로 부유생태계를 평가하기 위해서는 메소코즘과 같은 폐쇄생태계의 조성이 중요하다고 할 수 있다.

해양에서 영양염 공급과 소비는 식물플랑크톤의 대증식과 종천이를 유발하는 중요한 요인으로 분석되고 있다 [1]. 식물플랑크톤 성장에 필수적인 영양염류의 제한은 자연상태의 영양염분포 특성과 식물플랑크톤의 상호관계로 유추할 수 있고, 이와 더불어 현장해수에 부족한 영양염을 첨가하여 식물플랑크톤의 반응을 통하여 평가할 수 있다. 현장의 제한요인을 구체적으로 살펴보면, 해역의 특성이 다른 각각의 정점에서 영양염류를 측정하여 Redfield 비율(Si:N:P = 16:16:1)에 따른 영양염 성분 구성비의 차이와 더불어 영양염 최저값의 제한(Si=2.0  $\mu$ M, N=1.0 $\mu$ M, P=0.2  $\mu$ M)으로 평가가 가능하다[1, 2]. 하지만 이러한 방법은 어떠한 영양염이 식물플랑크톤의 성장에 제한요인으로 작용 될 수 있는지에 대한 예측은 할 수 있지만, 식물플랑크톤 군집의 성장특성과 관련된 우점종의 변화양상을 종합적으로 평가하기에는 한계가 있다. 결과적으로 이러한 문제점을 보완하기 위해서는 현장수에 인위적으로 영양염을 첨가하여 자연 식물플랑크톤군집의 성장과 더불어 영양염 소비와의 관계를 폐쇄생태계에서 수행하는 것이 중요하다고 할 수 있다.

선박평형수는 공선선박의 평형을 유지하기 위해서 신는 물이며, 선박평형수에 이송된 생물은 항만고유의 생태계를 교란시킬 수 있다[3]. 따라서 국제해사기구(IMO: International Maritime Organization)에서는 선박평형수에 포함되어 있는 수서생물이 다른 지역으로 옮겨져 생태계파괴 및 교란시키는 것을 사전에 방지하기 위해서 선박평형수처리 장치(BWTS: Ballast Water Treatment

System)를 개발하여 이동된 항만에서 생물배출을 최소화하기 위해서 국제선박평형수관리협약(IMO D-2 regulation)을 제정하였다[4]. IMO의 D-2기준으로 선박평형수 처리 장치의 적합성을 확인하기 위하여, 처리된 시험수 기준으로  $\geq 10 \mu\text{m}$  와  $\leq 50 \mu\text{m}$  크기의 생물군(주로 식물플랑크톤)은  $10 \text{ cells mL}^{-1}$  미만으로 규정하고 있다. 그 이후 미국에서는 IMO D-2기준보다 1000배 강화된 USCG(U.S Coast Guard) Phase-II 형식승인기준을 만들려고 준비하고 있다. 특히, 예상되는 USCG Phase-II 형식승인 기준에서는 현재 IMO 형식승인 시험수 기준으로 사용되고 있는 방법인 해양에서 우점하지 않는 식물플랑크톤을 단일 분리한 후 고밀도로 배양하여 시험생물로 활용하는 것을 엄격히 규제하기 위하여 선박평형수 처리 장치의 개발에 필요한 시험수(test water)조건을 자연상태 생물군집을 75% 이상으로 유지하도록 새로운 조항을 추가하려고 한다[5]. 따라서 USCG Phase-II 형식승인기준을 충족시키는 육상시험을 수행하기 위해서는 높은 밀도의 자연생물을 얻는 것이 무엇보다 중요하다. 결과적으로 10-50  $\mu\text{m}$  크기의 자연 생물을 확보하기 위해서는 첫 번째로 해수에서 생물을 채집할 수 있는 네트 등의 도구를 이용하여 고밀도의 자연생물시료를 확보한 후 선박평형수 처리장치 시험수의 생물농도를 맞추는 방법과, 두 번째로는 폐쇄생태계(mesocosm)를 조성한 후 일정의 영양염을 첨가하여 2-3일 동안 자연상태의 생물군집을 고밀도로 배양한 후 시험수로 활용하는 방법 등을 고려 해 볼 수 있다. 본 연구에서는 2가지 방법 중 폐쇄생태계(mesocosm)를 통하여, 어느 정도의 생물량을 확보할 수 있는 방안을 모색하고자 한다. 본 연구에서는 폐쇄생태계에서 영양염 첨가 후 USCG Phase-II 형식승인기준에 대비하여 선박평형수 처리장치의 개발에 필요한 10-50  $\mu\text{m}$  크기 부유생물을 대량 배양가능성을 검토하였다. 또한 질소(+N), 인(+P), 질소+인(+NP) 영양염 첨가에 따른 식물플랑크톤의 반응특성과 시간의 경과에 따른 종천이 양상을 단주기 변화를 파악하여, 어떤 영양염 조건에서 최적으로 생물을 대량 배양하여 선박평형수의 시험수로 활용할 수 있는지 폐쇄생태계의 생물 및 환경요인 변화를 파악하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 메소코즘 제작 및 설치

메소코즘백의 제작은 지름 1m, 높이 1m의 원통형 스테인레스재질로 제작된 형틀(frame)을 이용하여, 동일한 원통형 지름과 높이가 2.5m인 반투명 폴리에틸렌 재질의 bag을 바깥에서 입혀 고정로프로 견고하게 묶었다. 그 후 해상설치를 위하여 해수면에 플로팅할 수 있는 타원형 부이를 위쪽에서 1m 떨어진 위치에 고정로프로 묶어 장착하였다[Fig. 1그림 참조]. 상기의 방법으로 4개의 메소코즘 백을 제작하여 담수를 넣어 백 누수검사 및 자연 순치시켰다. 그 후 고압 세척기로 깨끗하게 세척한 후 건조하였다. 메소코즘 백은 한국해양과학기술원 남해연구소의 실험용 pier에 견고하게 고정 설치하였다[Fig. 1]. 실험에 활용한 메소코즘 백은 대조군 1개와 +N실험군, +P실험군, +NP실험군 총 4개로 구성되었다. 배양 실험에 활용된 해수는 pier 주변의 장목만 1 m 수심의 자연해수를 펌프로 메소코즘백에 1톤 주입하였다. 모든 메소코즘은 해수를 주입한 후 해수면과 같은 높이로 유지하였고, 해수가 주입되지 않은 상부 공간을 해수면 보다 1m 높게 설치하였다. 이는 선박의 운항 및 파도에 의하여 외부의 자연해수가 메소코즘백의 내부로 들어가는 것을 방지하기 위한 것이다. 아울러 대기 중 외부 오염물질이 내부로 들어가는 것을 방지하기 위해 타원형 투명 덮개를 덮어 견고하게 고정하였다. 실험 후 매일 모니터링 시 덮개를 떼어내고 채수한 후 다시 덮는 것을 반복하여 오염을 최소화 하였다.

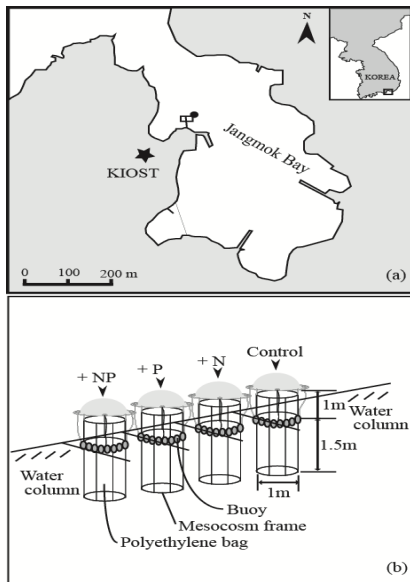


Fig. 1. Mesocosm study site in Jangmok Bay, South Korea (a) and a schematic diagram of the mesocosm (b).

## 2.2 메소코즘 실험

하계 장목만의 폐쇄생태계(메소코즘)에서 대조군과, 질산염 실험군(+N), 인산염 실험군(+P), 질산염+인산염 실험군(+NP)으로 설정하여 평가하였다. 기본적으로 규산염은 일괄적으로 대조군을 포함한 모든 실험군에 30  $\mu\text{M}$ 를 넣었다. 특히 갑작스러운 영양염 첨가로 인하여 생물에 미치는 부정적인 영향을 최소화하기 위해서 해양 식물플랑크톤의 배양에 일반적으로 사용되는 F/2배지를 만들 때 활용하는 N, P 영양염을 이용하였다.

규산염 제조는  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (분자량284.20)의 분말을 이용하였고, 질산염은  $\text{NaNO}_3$  (분자량 84.99)의 분말을, 인산염은  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (분자량156.01)분말을 각각 이용하였다. 자연해수 1톤에 최종농도가 +N실험군은 30  $\mu\text{M}$ , +P실험군은 3  $\mu\text{M}$ , +NP실험군은 질산염 30  $\mu\text{M}$ 과 인산염 3  $\mu\text{M}$ 로 조성하여, 자연상태의 환경조건에서 수행하였다. 생물량의 변동 및 환경요인의 모니터링은 실험 4일까지는 1일 간격으로 그 이후는 2일 간격으로 수행하였다. 모니터링 시 메소코즘 내 수온, 염분, 용존산소, pH는 YSI 6600 data sonde(YSI, USA)장비를 이용하여 메소코즘 백 내 수층 혼합 이전에 표층에서 1회 측정하였고, 그 이후 인위적으로 PVC로 제작한 3m의 “Γ”자 도구를 이용하여 잘 혼합한 후 측정하여 평균값을 구하였다. 메소코즘 백내 환경요인의 변화 및 식물플랑크톤의 현존량을 조사하기 위해서 3 L의 해수를 멸균 채수병에 옮겨 담아 실험실로 운반하여 분석하였다. 식물플랑크톤의 성장은 *in vivo* 상태의 형광값을 Fluorometer (Turner design 10-AU, USA)로 측정하였고, 식물플랑크톤 균집조성은 500 mL의 subsample을 취하여 Lugol-용액으로 최종농도 1%로 고정하여 보관하였다. 식물플랑크톤의 균집분포는 최고 성장기의 주요 우점종을 중심으로 분석하였고, 백분율(%)로 환산하였다. 모든 실험은 2반복(duplicate) 시료의 평균값을 구하였다.

$$G.R.(Growth\ rate) = \frac{(\log_2 N_t - \log_2 N_0)}{T}$$

여기서  $N_0$ : 초기 생물량,  $N_t$ : 최고성장기의 생물량, T: 최고 성장기까지의 배양기간(day)으로 나타내었다. 아울러 각각의 실험군에서 Chlorophyll-*a*(Chl. *a*)농도의 분석은 총 식물플랑크톤의 개체수와 *in vivo* 형광값의 관계를 비교하기 위하여 조사하였다. Chl. *a* 농도는 먼저 sub-sample 300 mL를 Whatman GF/F glass fiber filters

(a 47-mm diameter; pore size 0.45  $\mu\text{m}$ )를 이용하여 여과하였고, 여과지는 15 mL 튜브에 넣어 분석 전까지 영하 20 °C에서 냉동보관한다. 실험실에서 냉동 보관한 여과지를 90% Acetone에 넣어 냉암소에서 24시간동안 색소를 추출한 후 형광측정기(Turner BioSystems, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

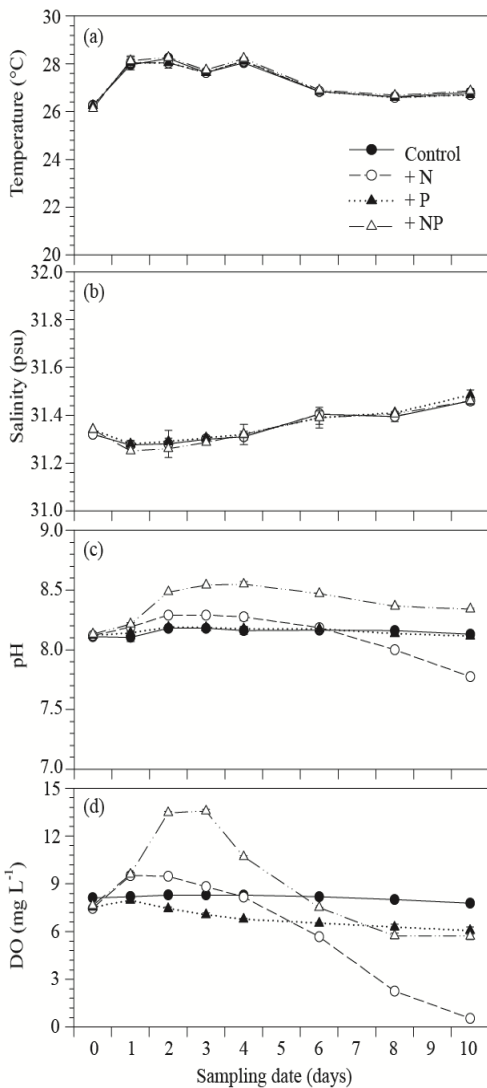


Fig. 2. Changes in temperature (a), salinity (b), pH (c), and dissolved oxygen (d) in the control, +N treatment, +P treatment and +NP treatment mesocosms.

부유생물은 수환경 변화에 민감하게 반응할 수 있고, 특히 용존산소와 pH는 생물 재생산 및 사멸과 같은 생물학적 반응에 의하여 크게 영향을 받는다. 본 연구에서 폐쇄생태계 내 환경요인의 변화를 시계열로 분석한 결과, 수온은 초기 26.3°C에서 1일 경과 후 소폭 상승한 28.3°C 전후를 유지하였으나, 실험 중반부터 다시 하락하여 26.5°C를 보였다[Fig. 2a]. 염분은 실험 초기 31.3 psu 전후를 보였고, 시간의 경과와 더불어 아주 미소하게 증가하는 양상을 확인하였다. 이는 폐쇄생태계에서 일부 수분이 대기 중으로 증발한 것을 의미한다. 실험기간동안 수온과 염분의 실험군간의 차이는 나타나지 않았다[Fig. 2b]. pH변화는 대조군과 +P실험군에서는 유사하게 8.1 전후의 값을 보였다. +N실험군의 pH는 소폭 상승한 8.3전후의 값을 유지하였으며, 실험 4일 후부터 지속적으로 감소하였다. 아울러, +NP실험군의 pH는 +N 실험군과 유사하게 일정기간 증가하여 최고치 8.5를 보인 후 감소하는 경향을 관찰하였다[Fig. 2c].

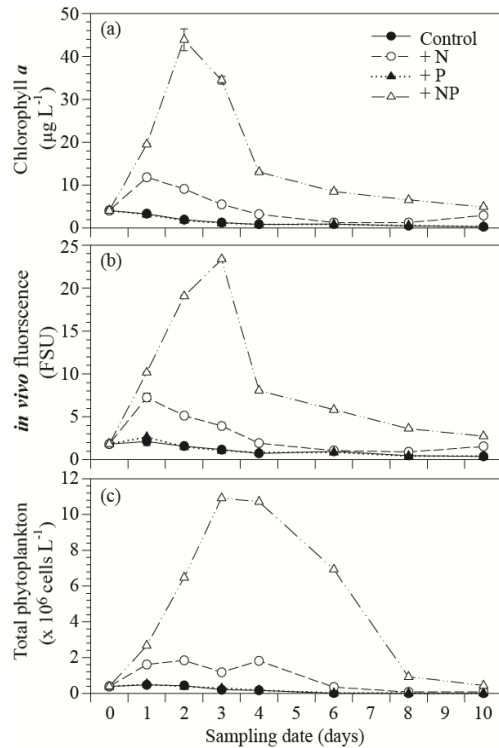


Fig. 3. Changes in Chl. a (a), in vivo fluorescence (b) and total phytoplankton abundances in the control, +N treatment, +P treatment and +NP treatment mesocosms.

용존산소(DO)는 대조군에서는 변동 없이 8.2 mg L<sup>-1</sup>를 유지하였고, +P실험군에서는 지속적으로 하강하여 실험 10일 후 6.0 mg L<sup>-1</sup>를 유지하였다. +N실험군의 DO는 실험 1일 경과 후 9.5 mg L<sup>-1</sup>로 소폭 상승하였으나, 지속적으로 감소하여 실험 종료시점에서는 무산소 상태를 유지하였다. 특히, +NP실험군의 DO는 실험 2일째까지 급격하게 수직상승하여 13.4 mg L<sup>-1</sup>로 관찰된 후, 다시 급격한 감소를 보여 실험 6일째는 초기농도와 유사하게 나타났고, 이후 계속 하강하여 실험 종료에는 5.7 mg L<sup>-1</sup>을 나타내었다[Fig. 2d]. 이와 같이 급격하게 변화한 용존산소의 실험군간의 큰 차이는 나중에 언급할 식물플랑크톤의 성장과 사멸 후 분해과정에서 소모된 산소와 연관성이 있을 것이다. 폐쇄생태계 내 식물플랑크톤 현존량의 시계열 모니터링은 살아있는 생물의 엽록소량을 평가하는 *in vivo* 형광값(FSU)과 엽록소를 추출한 후 평가하는 Chl.a와 함께 식물플랑크톤의 총 개체수로 각각 평가할 수 있다[Fig. 3].

먼저 Chl.a 값의 변동을 살펴보면, 대조군과 +P실험군에서는 초기 4.0 µg L<sup>-1</sup>에서 점차적으로 감소하여 실험 종료시에는 0.3 µg L<sup>-1</sup>전후로 극히 낮게 관찰되었다. +N 실험군에서는 실험 1일째 초기 농도보다 3배 정도 상승한 11.8 µg L<sup>-1</sup>로 관찰된 후 지속적으로 감소하였다. +NP실험군에서는 조사 2일째 초기 농도대비 10배 정도 상승한 43.8 µg L<sup>-1</sup>로 관찰되었다. 그 후 급격하게 감소하여 8.0 µg L<sup>-1</sup>전후의 값을 보였다. 모든 실험군에서 *in vivo* 형광값의 변화양상은 Chl. a와 유사하게 나타났고, 아울러 총 식물플랑크톤 개체수와도 유사하게 나타났다. 하지만, +NP실험군에서 최고치에 도달하는 시간은 Chl. a 농도기준으로 2일, *in vivo* 형광값과 총 식물플랑크톤의 개체수는 각각 3일씩 걸려 시간의 차이를 보였다. 이는 식물플랑크톤이 급격하게 증가하지만, 엽록소의 활성 정도에 따라서 Chl.a농도와 *in vivo* 형광값에 약간의 차이를 보일 수 있다는 것을 시사한다. 특히, Chl.a농도는 영양염 첨가에 따른 생물의 성장이 급격하게 이루어질 때 높게 나타날 수 있고, 그 이후 영양염이 제한되면, 생물의 활성이 떨어져 Chl.a농도가 지속적으로 감소할 수 있다. 이와 반대로 식물플랑크톤의 총 개체수는 Chl.a농도의 활성이 낮은 개체 또한 폐쇄생태계내 포함되어 있어 시간 경과에도 불구하고 누적된 개체수가 반영되어, 일정기간 지속적으로 높은 개체수 밀도를 유지할 수 있었다고 판단된다.

폐쇄생태계에서 출현한 식물플랑크톤의 군집조성을 살펴보면, 초기 3일 동안 모든 실험군에서 *Pseudo-nitzschia* spp.가 높은 개체수 밀도를 보였다[Fig. 3]. 그 후 실험 중기에는 대조군과 +P실험군에서는 다양한 식물플랑크톤의 군집조성이 형성되었고, 최종적으로 *Cylindrotheca closterium*의 점유율이 높게 나타났다. +N실험군에서는 상대적으로 총 식물플랑크톤의 개체수 밀도가 높게 나타난 실험 2일까지 *Pseudo-nitzschia* spp.의 개체수 밀도가 전체의 2/3을 차지하였으나, 그 후 개체수 감소와 더불어 실험 중반에는 *Pseudo-nitzschia* spp., *Chaetoceros* spp., *Thalassionema nitzschioides*, *C. closterium* 4속이 높은 점유율을 보였다. 최종적으로 시간의 경과와 더불어 실험 종료시 *C. closterium*가 높게 점유하는 것을 관찰하였다. +NP실험군에서는 총식물플랑크톤의 개체수가 다른 실험군 보다 10-50배정도 높게 나타났다. 그 중 *Pseudo-nitzschia* spp.가 실험 3일까지 50%이상의 점유율을 보였으나, 최고치 도달 후 급격히 감소하여 *C. closterium*종으로 shift화 되는 양상을 관찰하였다. 결과적으로 영양염 첨가 후 영양염 농도가 높게 유지되는 기간은 실험 초기에 존재한 *Pseudo-nitzschia* spp.속이 빠른 성장을 하였으나, 시간의 경과와 더불어 식물플랑크톤의 총 개체수 밀도가 급격하게 감소하는 시점부터 *C. closterium*종으로 천이되는 양상을 확인 할 수 있었다.

손 등[7]의 보고에 의하면, 진해만에서 *Pseudo-nitzschia* spp.는 계절적으로 높은 현존량을 보고하였다. 또한 진해만의 해역별로 생물검증실험 결과에서도 질소계열의 영양염이 공급되면 내만 어느 해역에서도 *Pseudo-nitzschia* spp.가 급격히 증가 할 수 있다는 것을 시사하였다[8]. 반면, 유해적조생물에 대한 구체물질을 평가하는 실험에서 *Cylindrotheca* 속과 *Entomoneis*속은 영양염이 결핍되는 실험 후반기에 높은 밀도로 출현하는 양상을 관찰하였고[9], 본 연구에서도 실험 중반부터 영양염이 극히 낮게 관찰되는 기간 동안 *C. closterium*종이 높게 나타나는 것과 잘 일치한다. 또한, Magaletti et al.[10]의 보고에 의하면, *Cylindrotheca* 속은 영양염이 제한되는 환경에서 유리하게 증식하는 것을 보고하였다. 아울러, Baek et al. [11]의 유류노출 실험에서 *C. closterium*종은 다른 규조류와 비교하여 상대적으로 유류오염에 대한 적응능력이 우수한 종으로 구분되었다. 결과적으로, *Pseudo-nitzschia* spp.은 N기원의 영양염이 공급되면, 기하급수적으로 증식하여 대발생 할 수 있을 것을 시사함

과 아울러, *C. closterium* 은 영양염농도가 낮은 해역에서도 일정량 높은 밀도를 유지할 수 있을 것으로 판단되었으며, 그 결과 본 연구의 폐쇄생태계에서도 낮은 영양염 농도가 관찰되는 실험 중반부터 종 shift화 되는 양상이 뚜렷하게 관찰된 것으로 판단되었다.

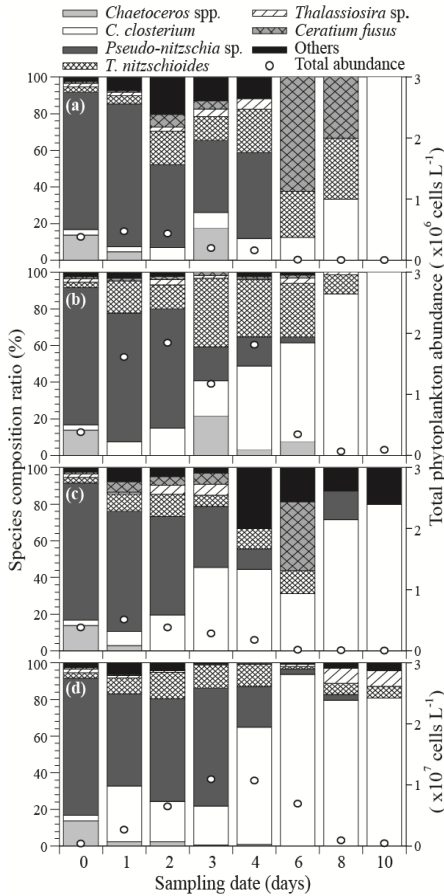


Fig. 4. Changes in phytoplankton populations and species composition as a result of the nutrient addition activity of control, +N treatment, +P treatment and +NP treatment mesocosms.

각 실험군별 성장률은 +NP실험군에서 2.47 d<sup>-1</sup>로 가장 높았고, 다음으로 +N실험군으로 나타났다. 특히 대조군과 +P실험군에서 식물플랑크톤의 성장은 0.52 d<sup>-1</sup> 관찰되었다. 각 실험군별 상대적인 성장반응에서도 대조군 대비 +NP실험군과 +N실험군에서 각각 4.7배(450%)와 3.8배로 높게 나타났으나, +P실험군은 대조군과 유사하게 나타나 P영양염의 첨가 효과가 없는 것으로 확인되었다[Fig. 5].

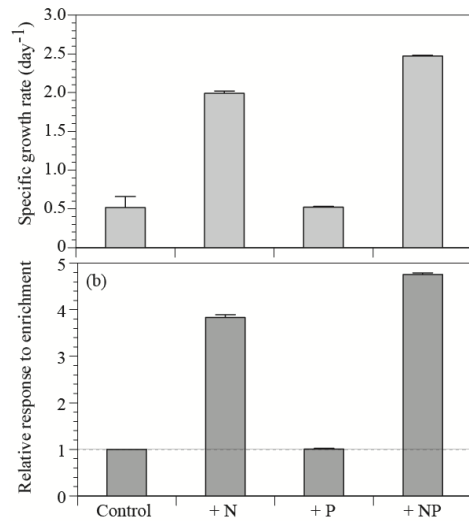


Fig. 5. The specific growth rate (a) of phytoplankton communities and comparison (b) of N, P and NP nutrient additional efficiency vs. control based on Fig. 3.

USCG Phase-II 형식승인에 대비하여 자연생물군집 ( $\geq 10$  and  $< 50 \mu\text{m}$  크기에 해당하는 식물플랑크톤)을 75%를 초과해야 하는 시험수 조건을 충족시키기 위해 메소코즘에서 영양염류를 첨가한 결과, 단일 질소기원 (N)과 인(P)을 각각 첨가하는 실험군보다 +NP를 혼합하여 첨가한 실험군이 식물플랑크톤의 현저한 증식을 유도하는데 크게 도움이 될 것으로 판단된다. 만약 하계에 수온이 25°C전후에서 USCG Phase-II 형식승인을 위한 실험을 수행하기 위한 시험수 조건의 생물을 적합하게 맞추기 위해서는 질산염(30  $\mu\text{M}$ )과 인산염(3  $\mu\text{M}$ )을 혼합하여 자연생물군집을 대량 배양하는 것이 적절할 것으로 판단되며, 용존산소와 pH등의 환경조건을 고려할 때 영양염 첨가후 3일 경과 후 시험수로 사용하는 것이 적합할 것으로 검토되었다.

만약 영양염농도를 조금 높게 설정하면, 식물플랑크톤의 개체수는 보다 고밀도로 확보할 수 있을 것이지만, 수환경의 용존산소와 pH에 부정적인 영향을 미칠 수 있을 가능성이 높다. 반대로 영양염류의 농도를 낮게 설정하면, 식물플랑크톤의 효과적인 대량 확보가 어려울 것으로 판단된다. Back et al.[12]의 보고에 의하면, 메소코즘에서 질산염을 농도별 첨가한 실험에서 식물플랑크톤의 최적 성장은 20-50 $\mu\text{M}$ 에서 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 이와 같은 선행연구를 고려할 때, 본 연구에서 수행한 질산염 30  $\mu\text{M}$ 과 인산염 3  $\mu\text{M}$ 의 농도가 USCG

Phase-II 시험수를 충족할 수 있는 자연상태의 군집을 조성하는데 적절할 것으로 판단된다. 일반적으로 연안해역에서 강우에 의한 육상담수에 의한 영양염 공급과 외양에서는 태풍과 같은 물리적인 수층혼합에 의하여 영양염이 공급되면, 식물플랑크톤의 급격한 증식 후 영양염류가 제한된다. 이와 같은 환경하에서는 미세조류의 활성이 현저하게 떨어져 식물플랑크톤의 성장은 더 이상 이루어 질수 없게 되고, 표층주변에 부유할 수 없어 해저에 침강한다[13]. 아울러 대증식한 일부 식물플랑크톤은 분해되는 과정에서 용존산소가 급격하게 떨어질 수 있다. 결과적으로 수환경을 일정하게 호조건을 유지하면서 효율적으로 식물플랑크톤을 대량 배양하기 위해서는 최적의 폐쇄생태계의 조건을 찾는 것이 중요하며, 본 연구를 통하여, USCG Phase-II 시험수로 활용하기 위한 최적의 영양염조건(질산염:30  $\mu\text{M}$  + 인산염:3  $\mu\text{M}$ )과 시기(3일)를 제시할 수 있었다.

IMO 또는 USCG Phase-I의 선박평형수 처리장치의 형식승인을 위한 육상시험에 필요한 10-50  $\mu\text{m}$  크기 생물군의 시험수 조건은 배양생물이나 자연생물군집에 관계없이 최소 3문(phylum) 5종(species) 이상으로 유지시켜야 한다. 아울러 시험수내 살아있는 10-50  $\mu\text{m}$  크기 생물의 개체수 밀도가  $>1.0 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ 로 유지하도록 규정하고 있다. 만약 자연시료에서 3문 5종을 만족할 수 없으면, 단일 배양된 생물을 2-3종을 혼합하여 충족할 수 있으나, 그 개체수 밀도의 비율은 전체 25%를 초과하지 말아야 하는 규정이 있어 신중을 기해야 한다. 따라서 본 연구에서 자연생물을 대량 배양한 결과, 3문 5종을 명확하게 충족하는 것을 파악할 수 있었다. 특히 현장 시료에서 영양염류를 첨가하고 시계열적으로 모니터링한 결과, 시간별 개체수 밀도 및 우점종의 차이는 보였지만, 종구성은 크게 차이 나지 않는 것을 파악할 수 있어, 메소코즘 백의 규모를 크게 하면 자연시료를 75% 이상을 유지하는데 큰 어려움이 없을 것으로 기대된다. 또한 살아 있는 생물의 활성정도를 평가하면 그들 생물의 생존여부를 일부분 유추할 수 있고, 이와 같은 식물플랑크톤의 활성을 잃는 시점을 명확하게 파악하기 위해서는 본 연구에서는 *in vivo* 형광값(FSU)을 지속적으로 모니터링을 수행하였다. 그 결과, 4일째 모든 실험군에서 *in vivo* 형광값이 현저하게 떨어지고 있다는 것을 파악할 수 있었다. 만약 활성을 잃은 식물플랑크톤을 시험수로 활용할 경우, 죽은 생물의 개체수밀도가 높게 나타날

가능성이 높다. 그렇게 되면, 시험수에서 살아있는 생물의 개체수 기준을 충족시키기 위해서 적어도 2-3배 높은 개체수 밀도의 생물을 시험수를 유지시켜야 할 것이다. 이와 같은 문제점을 사전에 방지하기 위해서 최적조건의 생물을 시험수로 활용하여야 하며, 본 연구에서 제시한 시계열 생물활성을 모니터링하고, 종구성을 명확하게 제시한 것은 선박평형수 처리장치의 형식승인을 위한 시험수 조건을 충족시킬 수 있는 중요한 근거자료로 활용 가능할 것으로 기대된다.

자연생물군집을 대용량으로 확보하는 방안 중에서 자연시료를 네트로 농축하는 방법이 있는데, 이와 같은 방법은 계절별 출현 개체수 밀도의 차이, 생물생사판별에 중요한 생물활성의 차이, 생물의 공간적 분포특성의 차이 등과 같은 문제점이 내포하고 있어, 생물 농축을 정확하게 유추할 수 있는 명확한 근거를 제시하기에는 일정한 한계를 지닌다. 따라서, 본 연구와 같이 일정량 자연생물군집에 영양염류를 첨가하여 2-3일 배양하여 선박평형수 처리장치를 평가하는 시험수로 활용하면, 보다 쉽게 자연생물 군집을 대량확보 가능할 것으로 판단된다. 본 육상시험설비가 있는 경남 거제시 장목만에는 200톤 규모의 배양시설을 확보할 수 있는 어장환경이 바다위에 조성되어 있어, 본 연구에서 수행한 영양염류를 첨가하여 2-3일간 배양하면 육상시험에 필요한 500톤의 시험수를 쉽게 만들 수 있을 것으로 기대된다, 따라서 본 연구는 추후 배양시설을 scale-up할 경우에 발생할 수 있는 문제점을 사전에 평가할 수 있는 유용한 기초자료로 활용 가능할 것으로 판단된다. 아울러, 이와 같은 연구는 미국에서 앞으로 발효될 USCG Phase-II 형식승인시험 절차를 충족시키기 위한 과학적인 근거 자료로 활용 가능할 뿐만 아니라, 선박을 건조하는 산업계에서 선박평형수의 처리장치를 개발하여 성능을 검증 및 평가할 수 있도록, BWTS시험수의 생물공급방안을 산업체에 제시할 수 있는 중요한 근거자료로 활용 가능할 것으로 판단된다.

#### 4. 결론

하계 장목만에서 폐쇄생태계를 이용하여 주요 영양염 첨가(+N, +P and +NP)가 식물플랑크톤의 군집조성에 어떠한 영향을 미치는지 살펴본 결과, 식물플랑크톤은

곧바로 반응하여 1-3일 이내 급격하게 성장하여 최고의 개체수밀도를 유지하는 것을 알 수 있었다. 아울러, 이와 같은 경향은 +NP 실험군과 +N실험군에서 두드러졌다. 특히 식물플랑크톤의 군집조성은 영양염 첨가시 실험 해역에서 우점한 *Pseudo-nitzschia* spp. 종이 압도적으로 성장하였으나, 영양염류가 제한되는 실험 중반부터 *C. closterium* 가 높은 점유율을 보여, 영양염농도에 따른 종의 shift화 현상이 뚜렷하게 구분되었다. 특히 본 연구를 통하여 수행된 대량배양 조건과 최적의 시기는 USCG Phase-II 형식승인에 대비한 시험수 조건인 자연생물 군집을 75%로 유지하는데 중요한 기초자료로 활용 가능할 뿐만 아니라, 선박평형수 처리하는 산업계에 크게 도움이 될 것으로 기대된다.

## References

- [1] A. R. Dzialowski, S. -H. Wang, N. -C. Lim, W. W. Spotts, D. G. Huggins, "Nutrient limitation of phytoplankton growth in central plain reservoirs, USA". *J. Plankton Res.*, 27, 587-595, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/plankt/fbi034>
- [2] D. Justic, N.N. Rabalais, R.E. Turner, Q. Dortch, "Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters: stoichiometric nutrient balance and its consequences". *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 40, 339-356. 1995.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0272-7714\(05\)80014-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0272-7714(05)80014-9)
- [3] N. Bax, A. Williamson, M. Agüero, E. Gonzalez, W. Gieves, "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)
- [4] 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.
- [5] A.W. Miller, M. Frazier, G.E. Smith, E.S. Perry, G.M. Ruiz, M.N. Tamburri, "Enumerating sparse organisms in ships' ballast water: Why counting to 10 is not so easy". *Environ. Sci. Technol.*, 45, 3539-3546, 2011  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/es102790d>
- [6] B. Hyun, S.H. Baek, W.J. Lee, K. Shin, "Viability test and harvest of natural marine phytoplankton communities to verify the efficacy of a ship's ballast water treatment system"
- [7] M. Son, D. Kim, S.H. Baek, "Distributional characteristics of phytoplankton and nutrient limitation during spring season in Jinhae Bay". *JKAIS*, 15, 3345-3350, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2014.15.5.3345>
- [8] M. Son, S.H. Baek, "The distinct characteristics of phytoplankton growth response and their community structure following seven different nutrients addition in spring season of Jinhae Bay". *J. Kor. Academia-Industrial coop. Soc.*, 16, 6567-6574, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2015.16.10.6567>
- [9] S.H. Baek, M. Son, S.W. Bae, K. Shin, D.H. Na, H. Cho, M. Yamaguchi, Y.O. Kim, S.W. Kim, "Algicidal activity of the thiazolidinedione derivative TD49 against the harmful dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* in a mesocosm enclosure". *J. App. Phycol.*, 25, 1555-1565, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-012-9953-7>
- [10] E. Magaletti, R. Urbani, P. Sist, C.F. Ferrari A.M. Cicero. "Abundance and chemical characterization of extracellular carbohydrates released by the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* under Nand P-limitation". *Eur. J. Phycol.*, 39, 133-142, 2004.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/0967026042000202118>
- [11] S.H. Baek, M. Son, W.J. Shim, "Effects of chemically enhanced water-accommodated fraction of Iranian heavy crude oil on periphytic microbial communities in microcosm experiment". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 90, 605-610, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-013-0963-1>
- [12] S.H. Baek, M. Son, D.S. Kim, H.W. Chio, Y.O. Kim. "Assessing the Ecosystem Health Status of Korea Gwangyang and Jinhae Bays based on a Planktonic Index of Biotic Integrity (P-IBI)". *Ocean Sci. J.*, 49, 291-311, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12601-014-0029-2>
- [13] G.M. Zheng, D.L. Tang. "Offshore and nearshore chlorophyll increases induced by typhoon winds and subsequent terrestrial rainwater runoff. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 333, 61-74. 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3354/meps333061>

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, 선박평형수



이 민 지(Min Ji Lee)

[정회원]



- 2014년 9월 ~ 현재 : 부경대학교 해양학과 (석사 과정)
- 2014년 8월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 연수생

<관심분야>

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, 외래 생물 생리, 생태학, 해양생물학