

선박평형수처리장치 성능 평가를 위한 해양 바이러스 생사판별 방법 개발

현봉길, 우주은, 장풍국, 장민철, 이우진, 배미경, 신경순*
한국해양과학기술원 선박평형수연구센터

Development of Marine Virus-like Particles Live/Dead Determination Method for the Performance Evaluation of Ballast Water Treatment System

Bonggil Hyun, Joo-Eun Woo, Pung-Guk Jang, Min-Chul Jang,
Woo-Jin Lee, Mi-Kyung Bae, Kyoungsoon Shin*

Ballast Water Research Center, Korea Institute of Ocean Science and Technology

요약 본 연구는 향후 보다 강화될 것으로 예측되어지는 USCG Phase II 형식승인시험을 대비하기 위해 SYBR Green I과 SYBR Gold의 염색 효율을 비교한 후 염색 효율이 높은 시약을 실제 선박평형수처리장치(electrolysis type, UV + electrolysis type)를 통과한 처리수에 적용해서 보았다. 시료의 부피가 0.5 mL ~ 2 mL, 염색 시약 (Stock solution)을 100배 및 200배 희석한 조건에서 염색된 바이러스가 가장 선명하게 관찰되었다. SYBR Green I과 SYBR Gold의 염색효율은 장목한 해수조건의 실험구에서 유의한 차이를 보이지 않았지만, SYBR Gold의 노란 색에 비해 SYBR Green I으로 염색된 시료에서 발현하는 녹색 형광이 보다 선명해서 관찰이 용이한 것으로 확인 되었다. 선박평형수처리장치(electrolysis type, UV + electrolysis type)를 통과하지 않은 실험수 및 대조수에서의 해양 바이러스 현존량은 약 $10^9 \sim 10^{10}$ VLP 100 mL^{-1} 으로 확인된 반면, 처리수에서는 살아 있는 바이러스가 관찰 되지 않았다. 실험수 결과를 보면, SYBR Green I은 해수, 기수, 담수 조건에서 효과적으로 염색이 되는 것으로 확인되었다. 다양한 선박평형수처리기술에 따른 추가적인 검증 및 염색 방법 개발이 필요하지만, SYBR Green I 염색 방법은 USCG Phase II 미국형식승인시험 바이러스 생사판별에 좋은 대안이 될 수 있을 것으로 판단된다.

Abstract To prepare more stringent regulations for USCG Phase II ballast water management, this study investigated the staining efficiency of SYBR Green I(SGI) and SYBR Gold(SG) on the virus-like particle (VLP). A dye with high staining efficiency was applied to the treated water that was passed through the ballast water treatment system (BWTS). VLP staining was observed most clearly under the 100-fold and 200-fold dilution of the stock solution when the volume of filtered samples was 0.5 mL to 2 mL. The staining efficiency of SGI and SG did not show a significant difference. On the other hand, the green fluorescence of viruses in the sample stained with SGI was more pronounced than in the samples stained with SG (expressed yellow fluorescence), making it easier to observe. The abundance of VLP in the test water and control water treatments that did not pass through the two types of BWTS (electrolysis type, UV + electrolysis type) was approximately $10^9 - 10^{10}$ VLP 100 mL^{-1} . In contrast, no stained VLP was observed in the treated water treatments. Moreover, SGI was confirmed to be effectively stained under various salinity conditions, including seawater, brackish water, and freshwater. Further verification tests and development of staining methods under various BWTS are required, but the SGI staining method is believed to be a good alternative to the VLP live/dead determination of the USCG Phase II type approval test.

Keywords : USCG Phase II, BWTS, Virus-like particle, SYBR Green I, SYBR Gold

본 논문은 한국해양과학기술원 연구과제 [PE99813] 및 해양수산과학기술진흥원 연구개발과제 [PM61820 & PM60240]로 수행되었음.

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

email: ksshin@kiost.ac.kr

Received September 4, 2020

Revised October 12, 2020

Accepted January 8, 2021

Published January 31, 2021

1. 서론

선박평형수를 통해 이동되어지는 생물에는 어패류 유생, 동·식물플랑크톤 및 아주 크기가 작은 박테리아와 바이러스도 포함된다. 바이러스는 해양 생태계에서 가장 많은 개체수를 갖는 생물학적 인자로, 연안에서는 일반적으로 mL 당 $10^7 \sim 10^9$ virus-like particles(VLP)으로 존재하며, 전반적으로 외해로 갈수록 개체수는 감소하는 경향을 보인다[1]. 따라서 바이러스는 수생환경 어디에서나 존재하는 생물학적 요소이지만, 해양 생물의 사망과 미생물 유전자구조의 조절 등 해양 생태계 및 인간의 건강에 부정적인 영향을 미칠 수 있다[2].

국제해사기구(IMO: International Maritime Organization)에서는 선박평형수에 의한 해양생태계 교란을 방지하기 위해 2004년 2월에 ‘선박평형수관리협약(IMO D2 regulation)’을 채택하였고[3], 2017년 9월 8일 발효되었다. 따라서 진조선은 의무적으로 선박평형수처리장치(BWTS: Ballast Water Treatment System)를 설치해야 하고, 발효 전에 건조된 선박은 2024년까지 순차적으로 선박평형수처리장치를 설치해야 한다. 또한 선박평형수관리협약은 IMO가 규정하고 있으나, 미국해양경비대(USCG: United States Coast Guard)는 자국의 해양생태계 보호를 위해 자국 법에 따라 IMO 기준보다 엄격한 기준(USCG Phase I)을 요구하고 있으며[4], 향후 선박평형수내 바이러스를 포함해서 현재 기준보다 약 1000배 정도 강화된 새로운 배출수 기준(USCG Phase II)도 제정할 계획을 가지고 있다[Table 1]. 하지만 USCG Phase II 잠정 기준에서 바이러스인 경우 처리수 기준 100 mL 당 $<10^4$ VLP로 검출되어야 한다는 기준만 있지 아직까지 어떠한 방법론적 가이드라인도 제시하고 있지 않다.

해양 바이러스 관찰을 위해 과거에는 DAPI 염색을 통

한 형광현미경 관찰 방법과 투과전자현미경을 이용한 방법이 많이 사용되어져 왔다. 하지만 DAPI를 이용한 관찰 방법은 염색된 바이러스의 발광 세기가 충분치 않아서 바이러스를 직접 계수하기에 용이하지 않았으며[5], 투과전자현미경 방법도 관찰 결과의 정확성은 높았지만, 형광현미경 방법에 비해 조작이 복잡하고, 시료를 처리하는데 있어서 많은 시간을 필요로 하였다[6-7]. 따라서 새로운 관찰 방법 개발이 필요한 상황이었으며, 최근에 DAPI 염색법에 비해 강한 형광을 발현시키는 SYBR Green I(SGI)과 SYBR Gold(SG) 염색 방법이 개발되어서 사용되어지고 있다. Leichsenring, and Lawrence [8]의 연구에서도 형광현미경을 활용한 염색 방법이 투과전자현미경 방식보다 정확도가 높다고 보고하였다. 두 염색 방법 모두 세포내 DNA와 RNA를 포함하는 핵산(nucleic acid)을 염색하는 방법으로 SGI는 형광 현미경하에서 강한 녹색을 띄고, SG는 노란색을 띤다. Patel et al. [9]의 Nature Protocol 저널에 발표한 내용을 보면, SGI와 SG방법은 다른 염색법에 비해 간단하고 염색 효율이 높아 많이 사용되고 있지만, 해역의 특성이나 생물량에 따라서 시료와 염색시약의 양을 조금씩 다르게 적용해야 한다고 보고되고 있다. 또한 이러한 염색 방법이 실제 선박평형수처리장치 바이러스 시험방법으로 적합한지를 규명한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 SGI와 SG 염색방법 개발을 위해 먼저 적정 시료 여과 부피 및 염색약 농도를 확인한 후 두 염색방법의 염색 효율을 비교하였다. 염색 효율이 높은 시약을 BWTS(Electrolysis type, UV+Electrolysis type)를 통과한 처리수에 적용해서 해수, 담수, 기수 조건하에서 USCG Phase II 시험 적용 가능성을 확인해 보고자 하였다. BWTS를 활용한 실험은 현재의 USCG Phase I 형식 승인 시험 기준에 준해서 실험수를 구성하였다.

Table 1. Comparison of discharge standard.

Classification	IMO D-2 & USCG Phase I	USCG Phase II
Organisms greater than 50 μm in minimum dimension	$< 10 / \text{m}^3$	$< 0.01 / \text{m}^3$
Organisms 10-50 μm in minimum dimension	$< 10 / \text{mL}$	$< 0.01 / \text{mL}$
Organisms less than 10 μm in minimum dimension	-	$< 10^3$ Bacteria / 100 mL $< 10^4$ Viruses & Viruses-like particles / 100 mL
Toxicogenic <i>Vibrio cholera</i>	$< 1 \text{ cfu}^* / 100 \text{ mL}$	$< 1 \text{ cfu} / 100 \text{ mL}$
<i>Escherichia coli</i>	$< 250 \text{ cfu} / 100 \text{ mL}$	$< 126 \text{ cfu} / 100 \text{ mL}$
Intestinal <i>Enterococci</i>	$< 100 \text{ cfu} / 100 \text{ mL}$	$< 33 \text{ cfu} / 100 \text{ mL}$

Table 2. Experimental preparation.

실험 준비
(1) SYBR Green I(Molecular Probes-Invitrogen, cat. no. S-7563) 시약을 초순수(0.02 μm filter-autoclaved MilliQ H ₂ O)를 이용해서 100배 희석함.
(2) 염색된 부분에 형광이 빨리 유실되는 것을 방지하기 위해 slowfade diamond antifade mountant 사용(여과되어지는 샘플 하나당 약 30 μL를 주입해야 함으로 실험 당일 시료 수에 맞게끔 준비)
(3) 형광의 세기가 100W 혹은 그 이상의 세기를 갖는 광원이 장착된 형광 현미경(100×배율 관찰 가능해야 함)과 바이러스 계수를 위해 10×10 square gide가 필요함.
(4) 깨끗하게 세척 및 멸균 처리된 여과 세트(25mm glass type filtration sets)와 펌프를 연결하고 <25 cm Hg (~1/3 atm) 압력 하에서 여과해야 함. 여과 세트의 타워(filter funnel) 안쪽의 지름은 바이러스 계수 후 환산을 위해서 반드시 숙지하고 있어야 함.

Table 3. Staining Procedure.

염색절차
(1) 샘플 용기는 50 mL conical tube를 사용하며, 샘플링 시 3회 washing 후 시료를 채취함
(2) 샘플링 한 시료는 0.02 μm로 여과를 한 포르말린[37~39% (wt/vol) formaldehyde solution]으로 가능한 빠르게 최종농도가 2% 되도록 고정해야 함. 고정된 샘플은 얼음에 10분정도 숙지 후 염색 작업을 시작. 만약 4시간 이내에 실험하지 못하고 장기간 보관할 경우 액체질소를 이용해서 급속냉동 숙지 후 -80°C에서 보관함
(3) 바이러스 염색을 수행하기 위해서 실험 당일에 SYBR Green I working stock 과 slowfade diamond antifade mountant를 준비함. 준비된 시약은 실험이 진행되는 동안 얼음 위에서 사용을 하며, 빛을 차단하기 위해 시약 용기(2 mL centrifuge tube)는 알루미늄 호일 등으로 덮어서 보관함
(4) Anodisc filter에 SYBR Green I 염색약을 이용해서 염색을 수행하기 위해 준비한 페트리디쉬(petridish)에 유성펜을 이용해서 밀면(여과지를 염색시 킬 면이 아닌 반대편)에 필요한 정보를 기록함
(5) 채취한 시료를 여과하기 전, 대조구 슬라이드를 0.02 μm로 여과 멸균된 MilliQ H ₂ O 1 mL를 이용해서 먼저 만듦(7~19번 참고). 이 과정은 준비된 초순수 및 여과세트에 바이러스의 유무 확인을 위한 것이기 때문이 반드시 최소 2회 이상 수행할 것을 권장함
(6) 연안수인 경우 2 mL, 외양수이거나 수심이 깊은 해역의 저층수는 5~20 mL 여과함
(7) 샘플을 주입하기 전 필터 타워(15 mL 용량) 내부를 여과 멸균된 3차 증류수로 세척하고, 다시 에탄올로 세척한 후 킴와이프스(kimwipe)를 이용해서 타워 내부의 물기를 제거함
(8) 0.8 μm AA mixed-ester membrane filter를 필터 홀더에 얹은 후 여과 멸균 3차 증류수를 이용해서 필터를 충분히 적셔줌. 필터가 충분히 젖었다고 판단되면 펌프를 이용해서 필터의 수분을 제거한 다음, 0.02 μm anodisc filter를 위에 얹음. 이때 anodisc filter는 제조사에서 패킹 후 배송된 상태의 방향으로 AA-필터 위에 얹어야 함
(9) 샘플이 새어나가지 않게 집게(clamp)를 이용해서 확실하게 고정함
(10) 피펫을 이용해서 시료를 필터 타워(funnel)에 주입한 후 여과를 진행함(여과 시 압력은 20 kPa 혹은 20 cm Hg VAC를 넘지 않도록 주의)
(11) 여과지 상부에 물이 다 빠져서 여과가 끝났다고 판단이 되어도 수 초간 더 지켜본 후 핀셋을 이용해서 Anodisc filter를 분리함. 그리고 분리된 anodisc filter는 킴와이프스 위에 얹어서 수분을 제거함
(12) 한차례 수분이 제거된 anodisc filter는 실험대 서랍(암상태)에 미리 준비된 새 킴와이프스 위에 얹은 후 서랍을 닫고 암상태에서 약 3~4분간 다시 재 건조시킴(충분히 건조시키지 않을 시 염색이 제대로 되지 않음)
(13) 피펫을 이용해서 SYBR Green I working 시약 10 μL를 중앙에 분주하고 여과에 이용되지 않은 면을 그 위에 살며시 얹어서 약 15~20분간 암실에서 염색함(현미경 관찰 결과 염색이 잘 되지 않았을 경우 염색 시간을 30분까지 늘려도 무방함)
(14) 여과가 끝나면 핀셋을 이용해서 필터를 들어 올린 후, 필터의 아래쪽 부분을 킴와이프스를 이용해서 빠르게 닦아줌. 필터는 염색시약 효과에 의해 얼은 오렌지색을 띄게 됨
(15) 여과지의 뒷면을 닦아준 후, 다시 (12)의 건조 과정을 수행함
(16) 건조된 여과지를 슬라이드에 올리기 전에, slowfade diamond antifade mountant 10 μL를 슬라이드 위에 분주하고 필터를 얹은 후 다시 약 20 μL를 분주한 후 단단히 고정되게끔 커버글라스(cover glass)를 올림
(17) 형광 전용 오일(immersion oil)를 커버글라스 위에 떨어뜨린 후 100배, blue excitation 파장에서 관찰함. SYBR Green I 시약을 이용해서 최대 488 nm 파장을 갖는 dsDNA 관찰은 BP blue-excitation and long-pass (LP) green-emission filter를 사용하면 용이함
(18) 10 × 10 gride를 이용해서 10 field 이상 계수를 해서 결과를 산출함(10 field를 관찰 했음에도 불구하고 전체 바이러스 수가 200 개체 미만이면 추가적으로 몇 개의 필드를 더 계수해서 200 개체 이상 계수하는 것을 추천함)
(19) 바이러스 계산식 Virus (or bacteria) (mL ⁻¹)= RSF × X × (100/n)/V RSF: 여과지 면적/eyepiece grid 면적 X: 생물 개체수, n: 관찰 field 수, V: 여과 부피 (mL)

2. 재료 및 방법

2.1 해양 바이러스 염색 방법

2개의 염색(SYBR Green I, SYBR Gold)용액(stock solution)을 이용해서 working solution(50~400배 희석)을 만든 후 시료 당 0.1 mL를 주입하였으며, 염색된 바이러스의 빠른 형광 유실을 방지하기 위해 10%(wt/vol) *p*-phenylenediamine을 1:1 glycerol:PBS 용액을 시료 당 30 μ L 주입하였다. 모든 염색 절차는 Patal et al. [9]의 논문에 명시되어 있는 방법에 준해서 Table 2 and 3과 같은 방법으로 실시하였다.

2.2 적정 시료 여과 부피 및 염색 시약 농도

해양 바이러스 현존량은 부영양화 정도 및 해역 환경 등에 따라 달라지기 때문에 적정 시료 여과 양 및 염색 시약 농도를 확인하기 위해서 5개의 여과 시료 부피(0.1 mL, 0.2 mL, 0.5 mL, 1.0 mL, 2.0 mL)와 4개의 염색 시약 농도(50, 100, 200, 400배 희석)를 설정해서 바이러스 염색 유무 정도 및 계수 가능 여부를 확인했다.

2.3 실제 규모 실증 실험

한국해양과학기술원 남해연구소 선박평형수처리장치 정부형식승인 육상시험설비를 이용해서 전기분해방법은 2회, UV+전기분해방식은 해수, 기수, 담수 각각 2회 시험을 진행하였다. 각 회차 시험은 500톤 시험수 탱크에서 대조수 탱크와 처리수 탱크로 시험수를 보내는 시작 시험(Ballasting)과 대조수 탱크와 처리수 탱크 내 물을 배출하는 종료시험(de-ballasting)으로 나누어서 진행하였다[Fig. 1]. 시작 시험 시 시험수는 USCG Phase I 기준 준수를 위해 첨가물(starch, glucose, silica) 및 농축된 자연생물종 일정량을 주입하였다[Table 4]. 해양바이러스 시료는 시작 시험 시 시험수, 종료 시험 시 대조수 및 처리수를 시험이 진행되는 동안 연속적으로(continuous) 샘플링 하였다.

Table 4. Minimum water quality parameters according to the ETV protocol (USCG Phase I).

Parameter	Test water	
	Fresh water(<1 PSU), Brackish water(10-20 PSU), Marine water(28-36 PSU)	
*DOC	6 mg L ⁻¹	
*POC	4 mg L ⁻¹	
*TSS	24 mg L ⁻¹	

*DOC: Dissolved organic carbon, POC: Particulate organic carbon, TSS: Total suspended solid

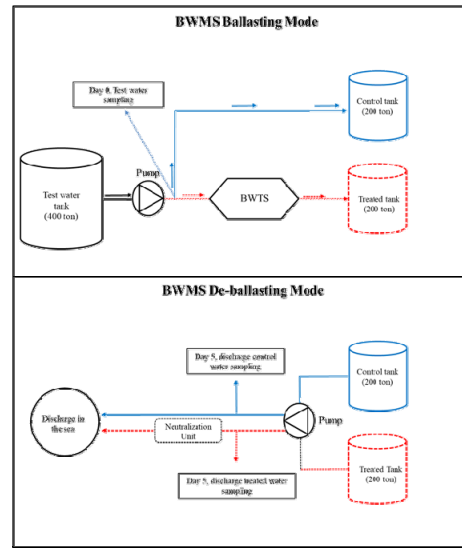


Fig. 1. Ballast water treatment system schematic diagram, showing ballasting and de-ballasting modes.

3. 결과 및 고찰

3.1 적정 시료 여과 부피 및 염색 시약 농도

Patel et al. [9]은 바이러스 계수 시 SGI 염색 시약을 SG로 대체할 수 있으며, 위 두 시약은 동일한 농도로 사용가능하다고 보고하였다. 그래서 본 연구에서는 먼저 SGI 염색 시약에 대해서 시료 부피에 따른 염색 시약의 농도를 확인한 후 같은 농도로 SG와 염색 효율 비교 실험을 진행하였다. SGI 염색 시 적절한 여과 시료 양 및 염색 시약 농도를 결정하기 위해 Table 5와 같은 실험구를 설정한 후 실험을 진행하였다. 시료 0.1 mL ~ 2 mL를 넣고 SGI 시약 농도 구배에 따라 바이러스의 염색 유무를 확인 한 결과, SGI stock solution이 100배와 200배 희석된 조건에서는 바이러스 관찰이 용이한 반면[Fig. 2d, 2e], 400배 희석된 조건에서는 바이러스가 상대적으로 약하게 염색이 되어서 계수하는데 다소 어려움이 있었다[Fig. 2f]. 시료 0.1 mL과 0.2 mL를 주입하였을 경우 상대적으로 적은 수의 바이러스 개체가 관찰되었는데 [Fig. 2b, 2c], 이는 계수된 개체수가 적어서 결과의 신뢰성을 확보하기 어렵다고 판단되었을 뿐 만 아니라 생물에 흡수되지 않은 잉여의 염색시약이 배경(Background)을 밝게 해서 바이러스를 계수하기가 어려웠다. 계절에 따른 변화(수온 및 생물량 변화)와 해역마다의 유효한 시료 여

과 부피가 다를 것으로 판단되지만, 본 연구 해역인 장목만과 유사한 환경인 경우 바이러스 계수에 용이한 부피는 0.5 mL ~ 2.0 mL이며, SGI 염색시약 농도는 100 ~ 200배 인 것으로 확인되었다[Table 5].

Table 5. Heatmap showing the relative convenience of observation using epifluorescence microscope according to the concentration of SYBR Green I and sampling filtration volume.

Sample volume (mL)	Dilution ratio of SYBR Green I Stock solution			
	× 400	× 200	× 100	× 50
0.1	-	-	-	-
0.2	-	-	-	-
0.5	+	++	++	+
1.0	+	++	++	+
2.0	+	++	++	+

++	Good to observe	+	Observable	-	Unobservable
----	-----------------	---	------------	---	--------------

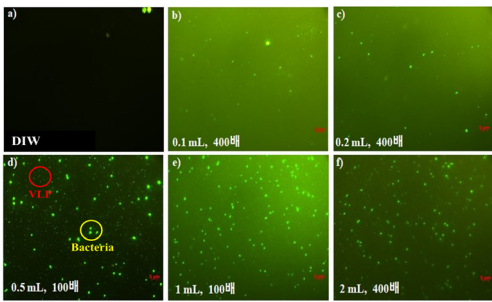


Fig. 2. Photographs of stained viruses according to the concentration of SYBR Green I and sampling filtration volume.

3.2 염색 효율 비교 평가

장목만 해수를 이용해서 4개의 희석구간(×1, ×10, ×20, ×50)에서 SGI와 SG 염색 효율 비교 실험을 진행하였다. 희석을 진행하지 않은 실험구에서 해양 바이러스의 평균 개체수를 보면, SGI가 8.3×10^8 VLP 100 mL⁻¹으로 9.2×10^8 VLP 100 mL⁻¹인 SG보다 다소 낮게 나타났다 [Fig. 3]. 하지만 10배 희석한 실험구에서는 SGI가 2.9×10^8 VLP 100 mL⁻¹으로 2.2×10^8 VLP 100 mL⁻¹인 SG보다 높았으며, 20배 및 50배 실험구에서는 두 염색방법간의 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었다. 일반적으로 박테리아나 바이러스와 같은 크기가 매우 작은 미생물 계수 시 같은 자릿수 내에서의 변동은 차이가 크다고 판단하지 않기 때문에, SGI와 SG의 염색 효율은 비슷한 것

으로 판단된다. 또한 선행 연구에서도 두 염색 시약의 염색효율은 유의한 차이를 보이지 않는다고 보고되었다 [10]. SGI로 염색된 바이러스에서 발견되는 녹색 형광이 노란색을 띠는 SG로 염색된 바이러스 보다 밝게 발현된다는 특성과 몇몇 선행 연구에서 SG로 염색된 노란색 보다 SGI로 염색된 밝은 녹색이 관찰하기가 용이했다는 선행 연구 결과를 고려해서, 선박평형수처리장치를 활용한 실증 실험에서는 SGI 염색법을 사용해서 평가를 수행했다[9]. 또한 염색된 바이러스의 형광 유실 정도를 확인해 본 결과, 단독으로 SGI와 SG를 사용할 경우 형광 유실이 매우 빠른 시간 내에 발생하지만, slow-fade diamond antifade mountant를 사용할 경우 오랜 시간 (약 30~60분) 형광의 유실 없이 안정적으로 사용이 가능했다.

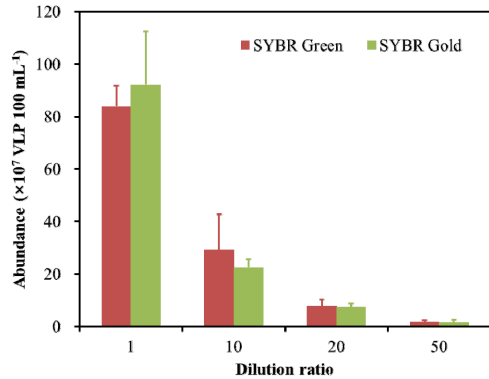


Fig. 3. Comparison of virus staining efficiency between SYBR Green I and SYBR Gold.

3.3 USCG Phase II 형식승인시험 적용 가능성 평가

USCG Phase II 시험에서 바이러스 분석은 배출시 처리수에서만 진행하며, 배출 가능한 처리수내 바이러스 개체수는 10,000 VLP 100 mL⁻¹로 보고되었다. 본 연구에서는 시작실험 시 실험수와 5일간의 보관기간 후 종료실험 시 대조수 및 처리수를 이용해서 SGI 염색법이 USCG Phase II 바이러스 시험 방법으로 적용 가능한지 확인해 보았다. 전기분해 방식의 BWTS 실험은 해수에서 2회 진행이 되었으며, 시작 실험 시 실험수내 바이러스의 개체수는 모두 2.1×10^9 VLP 100 mL⁻¹이며, 종료 실험 시 대조수에서는 각각 1.5×10^9 VLP 100 mL⁻¹과 9.6×10^9 VLP 100 mL⁻¹으로 확인되었다[Fig. 4]. 5일후 처리수에서는 염색된 바이러스가 관찰되지 않았다. 해수, 기수, 담수 각각 2회 시험을 진행한 UV+전기분해방식에서도 실험수는 6.6×10^9 VLP 100 mL⁻¹ ~ 1.3×10^{10}

VLP 100 mL⁻¹의 범위를 보였고, 종료 실험 시 대조수에서는 4.5×10⁹ VLP 100 mL⁻¹ ~ 1.1×10¹⁰ VLP 100 mL⁻¹의 범위를 보였다. 종료 실험 시 처리수에서는 전기분해방식과 마찬가지로 염색된 바이러스가 관찰되지 않았다. 본 연구 결과에서 처리수내에 염색된 바이러스의 개체수가 확인되지 않았지만, 몇몇 처리수 시료에서 염색된 종속영양박테리아가 관찰되었고, 본 연구 전 소규모 모의실험연구에서도 다양한 생물 사멸 조건(UV, 전기분해 포함)에 노출시킨 처리수내 해양 바이러스가 염색된 결과를 고려하였을 경우, UV와 전기분해방식을 통해 생성된 화학물질(NaOCl)은 SGI의 염색 효율에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 전세계 BWTS 시장에서 현재까지 승인받은 BWTS의 약 90%가 UV 와 전기분해장치를 사용하고 해수, 기수, 담수 조건에서 모두 적용이 가능하다는 사실을 고려하면, SGI 염색 방법은 USCG Phase II 선박평형수처리장치 형식승인시험 바이러스 생사판별에 적용 가능할 것으로 판단된다. 하지만 선박평형수처리장치의 종류(오존, UV, Heating, NADCC 등), 처리수내 환경 조건(수온, 염분, pH, 용존산소, 유기물 농도 등) 및 처리 후 경과 시간 등 여러 가지 인자가 바이러스 생사판별 결과에 영향을 미칠 수 있기 때문에 추가적인 검증 실험이 필요한 것으로 판단된다.

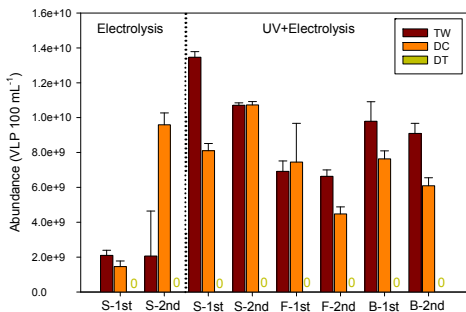


Fig. 4. Viral abundance in each experimental treatment passed through by 2 type of BWTS under sea water, brackish water, and fresh water conditions. The brown, orange, green bars represent the Test Water (TW), Discharge Control Water (DC), Discharge Treated Water (DT).

4. 결론

BWTS를 통과한 해양생물에 대한 생사판별은 첫째 염

색방법이 간단해서 빠른 시간 내 시료를 처리할 수 있어야 하며, 둘째 염색한 후 일정 시간 동안 염색 효율이 안정적으로 유지되어야 하고, 마지막으로 염색 효율이 높아야 한다. SGI 염색법은 염색이 간단해서 다른 염색 방법(e.g., Yo-Pro)에 비해 상대적으로 시료 전처리 시간이 짧으며, 염색된 바이러스가 발현하는 형광도 안정적(30분 이상)으로 유지 될 뿐만 아니라 크기가 매우 작은 바이러스가 충분히 계수 가능할 정도로 밝은 녹색 형광을 발현하였다. 또한 SGI가 해수, 기수, 담수 조건 및 전기분해시 발생하는 화학물질(NaOCl)이 함유된 처리수 조건에서도 염색이 가능한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 현재의 선박평형수처리장치 형식승인시험 생물 분석 시간(6시간)을 고려할 경우, SGI 염색법은 USCG Phase II 시험 시 바이러스 생사판별에 좋은 대안이 될 수 있다고 판단된다. 하지만, 현재 잠정 고시된 USCG 바이러스 기준 적용 시 처리수 시료 1 mL을 여과하여 20 filed를 관찰하여 계수하였을 때, 1개체만 관찰되어도 81,920 VLP 100 mL⁻¹로 배출수 기준을 충족하지 못하게 된다. 또한 이로 인해 여과하는 시료의 양을 증가시키면 여과 시간 증가 및 여과지내 생물이 과다 증척으로 인한 분석 오차가 발생할 수도 있다. 따라서 USCG Phase II 바이러스 분야 잠정 기준이 보다 완화되어 적용되지 않는다고 가정할 경우, 시료를 먼저 전처리(Pre-filter)하여 크기가 큰 생물을 제거해서 많은 시료를 여과할 수 있는 방법 등 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

References

- [1] A. I. Culley, N. A. Welschmeyer, "The abundance, distribution, and correlation of viruses, phytoplankton, and prokaryotes along a Pacific Ocean transect", *Limnology and Oceanography*, Vol. 47, No. 5, pp. 1508-1513, 2002.
DOI: <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.5.1508>
- [2] E. S. Choi, G. Lee, D. Kim, C. K. Auh, J. Park, Y. Chung, T. K. Lee, "Seasonal Fluctuations of Marine Viral Abundances and Physicochemical Parameters in Gwangyang Bay", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol. 13, No. 11, pp.5615-5622, 2012
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2012.13.11.5615>
- [3] IMO, "International convention for the control and management of ship's ballast water and sediments", IMO BWM/CONF/36. International Maritime Organization, London, UK, 2004
<http://www.imo.org/en/About/Conventions/ListOfConventions/Pages/International-Convention-for-the-Co>

[ntrol-and-Management-of-Ships%27-Ballast-Water-a-and-Sediments-\(BWM\).aspx](#)

- [4] U.S. Coast Guard, "USCG ballast water discharge standard final programmatic environmental impact statement", 2012.
<http://www.regulations.gov/#!documentDetail:D%4USCG-2001-10486-0468>
- [5] S. Hara, K. Terauchi, L. Koike, "Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy", *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 57, pp.2731-2734, 1991.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1128/AEM57.9.2731-2734.1991>
- [6] M. G. Weinbauer, C. A. Suttle, "Comparison of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural marine waters", *Aquatic Microbial Ecology*, Vol. 13, pp.225-232, 1997.
DOI: <https://dx.doi.org/10.3354/ame013225>
- [7] R. T. Noble, J. A. Fuhrman, "Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria", *Aquatic Microbial Ecology*, Vol. 14, pp.113-118, 1998.
DOI: <https://dx.doi.org/10.3354/ame014113>
- [8] J. Leichsenring, J. Lawrence, "Effect of mid-oceanic ballast water exchange on virus-like particle abundance during two trans-Pacific voyages", *Marin Pollution Bulletin*, Vol. 62, No. 5, pp.1103-1108, 2011.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.034>
- [9] A. Patel, R. T. Noble, J. A. Steele, S. S. Michael, I. Hewson, J. A. Fuhrman, "Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I", *Nature Protocols*, Vol. 2, No. 2, 269-276, 2007.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.6>
- [10] A. Shibata, Y. Goto, H. Saito, T. Kikuchi, T. Toda, S. Taguchi, "Comparison of SYBR Green I and SYBR Gold stains for enumerating bacteria and viruses by epifluorescence microscopy", *Aquatic Microbial Ecology*, Vol. 43, No. 3, pp. 221-231, 2006.
DOI: <https://dx.doi.org/10.3354/ame043223>

현 봉 길(Bonggil Hyun)

[정회원]



- 2005년 2월 : 목포해양대학교 해양환경공학과 (이학석사)
- 2015년 2월 : 부경대학교 해양학과 (이학박사)
- 2020년 2월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 선임연구원

<관심분야>

해양 생물학, 해양침입외래생물 생리·생태학

우 주 은(Joo-Eun Woo)

[정회원]



- 2019년 2월 : 경상대학교 해양생명과학과 (이학석사)
- 2014년 10월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 무기계약직기능원

<관심분야>

해양 생물학, 미생물학

장 품 국(Pung-Guk Jang)

[정회원]



- 1998년 2월 : 경남대학교 환경보호학과 (환경학석사)
- 2008년 8월 : 부산대학교 해양학과 (해양학박사)
- 2008년 9월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 선임연구원

<관심분야>

선박평형수, 해양환경오염, 수질, 해양화학

장 민 철(Min-Chul Jang)

[정회원]



- 1996년 2월 : 한국해양대학교 해양공학과 (환경학 석사)
- 2014년 2월 : 부산대학교 해양학과 (해양학 박사)
- 2006년 6월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 책임연구원

<관심분야>

외래생물, 해양생물학, 동물플랑크톤 생태학

이 우 진(Woo-Jin Lee)

[정회원]



- 1997년 2월 : 수원대학교 대학원 생물학과 (이학석사)
- 1998년 11월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 책임기술원

<관심분야>

해양생물, 선박평형수, 해파리

배 미 경(Mi-kyung Bae)

[정회원]



- 2006년 2월 : 인제대학교 환경시스템학부 환경학과 (이학사)
- 2013년 1월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 무기계약직 기능원

<관심분야>

해양생물학

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,