

**개불 대량종묘생산 기술개발**

Development of Mass Culture and  
Seed Reproduction of *Urechis unicinctus*

2002. 12

여 수 대 학 교

해 양 수 산 부

## 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “개불 대량종묘생산 기술개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서  
로 제출합니다.

2002년 12월 20일

주관연구기관명 : 여수대학교

총괄연구책임자 : 최 상 덕

연 구 원 : 한경호, 백재민  
이원교, 강경호  
김 정, 서대철  
김경재, 라성주  
윤호섭, 곽은주  
한종석, 김재민  
차용백, 김용구  
정형택, 김도완  
문성용, 추부관

# 요 약 문

## I. 제 목

개불 대량종묘생산 기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

### 1. 연구개발의 목적

남해안 특산종인 개불, *Urechis unicinctus*을 인공종묘생산하기 위하여 자연 서식지 어장의 환경적 특성, 생식과 발생기작을 구명하여 개불의 완전 양식을 위한 부화자어의 착저유인물질을 개발하고 아울러 대량 종묘생산기술개발 체계 및 종보존 등을 수립하고자 한다.

### 2. 연구개발의 중요성

#### (1) 기술적 측면

유용 해산무척추동물의 다양화를 위해서는 많은 종류의 종묘생산을 위한 성체의 서식환경특성 연구, 생리화학적 연구 및 기초 생물학적 연구가 반드시 수행되어야 한다. 그리고 UR, EEZ선포 및 수산생물의 수입개방에 능동적으로 대처하기 위해서는 생산성이 높은 품종과 아울러 친환경적인 신품종의 양식이 절실히 요구된다. 따라서 남획 및 환경오염 등으로 인하여 개불의 자원이 키조개(현재 인공종묘생산 불가) 처럼 고갈될 가능성이 매우 높고, 인공종묘생산에 많은 어려움이 있는 개불의 완전 양식을 위해, 인공수정란의 생산을 위한 기초기술연구 즉, 개불서식지의 환경(수질, 저질, 먹이생물 등), 생식기작의 구명이 필요하며, 아울러 대량 종묘생산을 위한 기초 생리·생태적 연구가 수행되어야 한다.

## (2) 경제·산업적 측면

개불류는 일명 “spoon-worm”이라고 불리우며 전세계적으로 3과 37속 157종이 분포 서식하는 것으로 알려져 있다. 이들은 온대, 적도 및 극지방의 조간대에서 심해 저층의 암석, 모래 및 펄에 서식한다. 개불의 체형은 체절이 없고, 체강을 갖는 대칭형이다. 크기는 수 mm에서 수십 cm이며, 부드러운 표피를 갖는다(Clark, 1969; Stephen and Edmonds, 1972; Storch, 1984).

우리 나라에 서식하는 개불(*U. uncinatus*)의 분류학적 위치는 의충동물문(Echiurida), 의강(Echiurida), Xenopneusta목, *Urechidae*과에 속하며 *Urechis*속에는 4종이 있다. 특히, 개불류 중 *Urechis caupo*의 경우 황화합물을 분해하는 해마틴이라는 성분이 풍부한 것으로 알려져 있으며(Arp, et al., 1992), 개불의 체내에는 다른 무척추동물에서 합성할 수 없는 5종의 sterols 등을 함유하고 있어 생리활성 물질을 추출하고 있다. 이러한 특성으로 인해 실제 양식현장 및 환경단체 등에서는 개불을 방류하여 친환경적인 양식을 시도하려고 한다. 그러나 종묘생산방법이 확립되어 있지않아 친환경적인 개불양식도 어려움에 있는 실정이다. 따라서 본 종에 대한 인공종묘생산 기술이 개발되고 친환경적인 신품종이 개발된다면 양식어종의 정착은 물론 수산양식업의 생산성 향상을 위해 기여하는 바가 클 것이다.

## Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

남해안 특산종인 개불, *Urechis uncinatus*을 인공종묘생산하기 위하여 자연 서식지 어장의 환경적 특성, 생식과 발생기작을 구명하며, 개불의 완전 양식을 위하여 부화자어의 착저유인물질을 개발하고 아울러 대량 종묘생산기술개발 체계 및 종묘존 등을 수립하고자 하였다.

## 1. 서식어장의 환경 특성

개불은 연안 생태계에서 강한 군집성을 나타내며 “U”자형의 구멍을 파고 서식한다(60~100마리/m<sup>2</sup>). 따라서 개불이 서식하고 있는 어장의 환경적 특성을 파악해 두면 착저유인물질 개발과 대량 종묘생산 및 양성에 있어 유리한 점이 있다.

본 연구에서는 자연 서식지의 물리화학적 특성을 파악하기 위하여 조금과 사리 때의 유향과 유속을 조사하고 매월 수온, 염분농도, pH, DO, COD, 영양염류를 정기적으로 조사하였으며 서식지 어장의 먹이 생물학적 특성을 파악하기 위하여 phytoplankton의 종류와 천이 양상 등을 조사하였다. 또한, 저질의 입도분석과 그 저질에 서식하는 저서생물상도 조사하였다. 자원조성 방안 제시를 위한 저질입도조성에 따른 개불의 잠입여부와 생존율 조사함과 동시에 개불 양성시 수질 및 저질환경변화를 상법에 따라 조사하였다.

## 2. 생식기작 및 착저유인물질 구멍

어떤 생물의 종묘생산을 위해서는 반드시 생식기작 등이 밝혀져 있어야 효율적으로 인공종묘생산을 할 수 있다. 본 연구자들이 개불의 생식주기를 조사한 결과에 의하면 연 2회 산란하는 것으로 추정된다. 따라서 본 연구에서는 개불의 완전 양식을 위하여 생식기작 및 착저 유인물질 개발을 아래와 같이 추진하고자 하였다.

개불의 생식기구를 밝히기 위해 생식생리학적 특성을 조사하고, 매월 개불을 채집하여 생식소와 신장을 절취하고, 이들에 대하여 조직학적 방법으로 생식관련 세포와 조직 및 기관의 특징과 계절적 변동을 조사하여 난과 정자 형성과정, 생식년주기, 산란기 등을 조사하였고, 채집된 재료의 전장은 0.01cm, 체중은 0.01g까지 측정된 뒤, 곧 해부하여 생식소와 신장을 절취하여 정량하였다. 생식소의 성숙상태는 생식소 체중비(Gonadosomatic index : GSI = 생식소중량/체중×100(%))로 나타내었으며, 복부절개 후 꺼낸 난을 0.01mm까지 측정하며, 난을 clearing solution을 이용하여 세포내 핵포위치 또는 함입구를 구분하여 난세포 발달 상태를 파악하였다. 생식소 형태변화를 조사하기 위하여 개불을 해부하여 생식소와 신장을 절취하

여 정량 후, Bouin's solution에 하루동안 고정한 후 고정된 조직은 상법인 파라핀 절편법에 의하여 난소는 5~8 $\mu$ m로 정소는 4~5 $\mu$ m의 두께로 연속절편하여 조직표본을 만들며, 염색방법은 Delafield hematoxin-0.5% eosin으로 이중염색하여 조직의 발달상태를 광학현미경 하에서 검경하였다. 생식소의 발달을 관찰함으로써 배우자 형성 단계를 알 수 있다.

개불의 담륜자기 유생은 착저유인물질에 노출되지 않았을 때 변태하지 않고 계속적인 부유생활로 인하여 폐사되는 경우가 있다. 따라서 본 연구에서는 담륜자기 유생을 착저시키기 위하여 개불 서식지의 저질과 해수, 개불의 점액질 및 체성분 등을 추출하여 착저 유무를 조사하고, 아울러 착저 유인물질의 물리화화적인 안정성을 조사하였다. 개불을 월별로 채집하여 개불의 일반성분 및 생리활성물질을 상법에 따라 비교분석 하였다.

### 3. 대량 종묘생산기술 개발

대량종묘생산의 일환으로 여수대학교 중앙식연구센터에서 대량산란유발 및 유생사육기술시험을 실시하였다. 또한, 치어의 생존률을 높일 수 있는 최적 먹이생물을 구명하고, 사료의 공급량, 공급횟수 등 종묘생산에 필요한 인위적 요인을 연구하고, 개불 체내에 서식하는 요각류를 대상으로 공생생물과의 관계를 연구하였고, 사육환경 조건에 따른 부유유생의 생리적 특성을 조사하였다. 저질의 입도 및 환경조건에 따른 개불의 성장, 생존률 및 잡입 여부 등을 각각 조사하고, 육상축양장에서 친어사육 기술과 종보존 방법을 구명한다.

본 연구에서는 개불 인공종묘생산을 위하여 어미의 사육환경, 개불의 난경, 난발생 및 자치어 발달양상을 조사하여 종묘생산 기술개발에 직접 이용 가능하도록 하며, 물리, 화학적(수온, 간출 등) 자극에 의한 개불의 최적 산란방법을 구명하기 위한 실험과 종묘생산시 난발생에 미치는 적정 수온, 염분, pH 등을 조사하였다. 개불유생과 치어 사육을 위한 최적 조건구명을 위해 사육수온의 범위, 크기별 사육밀도, 수조의 형태, 조도, 적정 사료의 종류, 공기의 공급량 등 제반 요인에 대해 조사와 더불어 개불의 종묘단계에서 발생하는 질병의 형태를 조사하고, 그 원인 및 대

책을 연구하였다.

## IV. 연구개발결과 및 활용방안

### 1. 서식어장의 환경특성

#### 가. 수질 및 저질 성상

조사해역은 개불을 상업적인 목적으로 채취하고 있는 전남 여수시 돌산읍 개도리 주변 해역으로 가막만 입구에 위치하고 있으며, 안쪽으로는 어류양식과 굴양식의 생산성이 매우 높은 해역이다. 이 어장은 잠수기수산업협동조합에서 잠수부들에 의해 개불을 채취하고 있는 지역으로서 주변에 간석지가 넓게 형성되어 있다.

주변 해역의 수질 및 저질 환경을 알아보기 위하여 수온, 염분농도, 용존산소, 화학적산소요구량(COD) 등을 조사하였으며, 용존무기질소는(DIN,  $\mu\text{g-at}/\ell$ )는 Indophenol법으로 비색 정량한 암모니아성질소, Sulfanilamide-NED법으로 비색정량한 아질산성질소, Cadmium reduction법으로 비색정량한 질산성질소의 합으로 계산하였고, 인산성인( $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ,  $\mu\text{g-at}/\ell$ )은 Ascorbic acid법으로 비색정량하였다. 그리고 저질환경을 알아보기 위하여 정점별 저질의 입도조성을 각각 조사하였다. 즉 저질에 30% 과산화수소와 염산을 넣어 유기물질 등을 제거한 후, 105~110°C에서 24시간 건조시켜 평량한 다음, 습식체질을 통하여 입도별 백분율을 구하였고, 강열감량은 건조시료를 회화로에서 550°C로 태워 감량을 무개당으로 환산하였다.

조사기간동안 개불 서식지의 저질입도 조성을 살펴보면 station 1은 자갈(coarse sand)이 93.1% 이상으로 나타났으며, 모래(sand)와 니질(silt and clay)의 함량은 4%로 낮게 나타나 표층 퇴적물은 사력질로 분류되었다. station 2와 3의 표층 퇴적물은 니질 함량이 각각 45.0%, 47.1%, 자갈의 함량이 36.1%, 35.8%를 차지하여 사니질로 분류되었다. 그리고 정점 4의 표층 퇴적물은 니질 함량이 84.5%이었고, 자갈 함량이 8.2%를 차지하여 니사질로 분류되었다. 특히 개불이 서식하고 있는 지역의 경우 저질 함량 중 니질과 사니질이 다량 함유되어 있었으며, 사질과 자갈이 섞

인 지역의 경우 개불이 잘 서식하지 않은 것으로 나타났다.

또한, 조사기간동안 수온, 염분, 용존산소(DO), 화학적 산소요구량(COD), 용존 무기질소(DIN), 인산성인( $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ )의 변화는 각 정점별로 월별 조사를 실시하였으나, 연중 변화의 추세는 4개의 정점이 모두 비슷한 경향을 나타내었다.

따라서, 일반 수질 성상이 각 station별로 비슷한 경향을 나타낸 것으로 미루어 저질이 개불의 서식환경 중 큰 영향을 미치는 요인으로 생각되며, 특히, 개불의 서식지역을 조사한 결과 사질과 니질이 포함된 사니질에서 서식하는 것으로 사료되며, 니질 또는 자갈만으로 구성된 경우 개불이 서식하기 어려운 곳으로 판단된다.

#### 나. 먹이생물 조사

개불 서식지 주변해역에서 4개 정점을 선정하여 2000년 12월부터 2001년 10월 까지 월별로 총 11회에 걸쳐 기초생산력을 조사하였다(Fig. 1). 식물성플랑크톤 채집은 정량분석을 위해 각 정점에서 채수기로 채수하여 폴리에틸렌 병에 옮겼고, 정성분석을 위해서는 구경 30cm, 망목 60 $\mu\text{m}$ 의 플랑크톤 네트를 이용하여 수직 예인하였다. 채집한 시료는 선상에서 Lugol 용액으로 고정하였다. 고정한 시료는 실험실에서 24시간 이상 정착시킨 후 상등액을 미세 사이폰으로 제거한 다음 Sedgwick-Rafter slide를 사용하여 고배율 현미경하에서 동정 및 계수하였다.

조사기간중 10%이상의 우점율을 나타낸 종은 다음과 같다 : *Skeletonema costatum*, *Paralia sulcata*, *Pseudonitzschia seriata*, *Chaetoceros decipiens*, *C. debilis*, *C. affinis*, *C. curvisetus*, *Eucampia zodiacus*, *Ceratium furca*, *C. fusus*, *Asterionella galacialis* 였다. 조사기간중 *Skeletonema costatum*은 12월, 5월, 8월에 가장 우점하는 종이였으며, 특히 8월에 52.6%의 우점율을 나타내었다. 그리고 *Eucampia zodiacus*는 1~4월에 가장 우점하는 종이였으며, 특히 2~3월에 65%이상의 우점율을 나타내었고 그 이후 5월에는 출현하지 않았다. *Chaetoceros decipiens*는 12월과 7~8월에 10%의 우점율을 보였고, 그 이후에는 2%이하의 낮은 점유율을 나타내었다. 그러나 *C. debilis*, *C. curvis*, *C. affinis*는 각각 1월, 5~8월, 10에 10%이상의 점유율을 나타내었다.

먹이량 변화와 개불발생시기를 고려하여 개불유생의 먹이를 추정한다면, 개불



의 주 산란시기(4월과 11월)에 출현하였던 식물성플랑크톤이 개불유생의 먹이원으로 사용 되어졌을 것으로 추정된다. 즉, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros debilis*, *C.curvisetur*, *Eucampia zodiacus*, *Asterionella galacialis* 등이 개불유생의 주 먹이원으로 사용되어졌을 것으로 추정된다.

#### 다. 저서생물 및 공생생물 조사

개불 서식지 주변해역에서 저서생물과 개불의 출현양상을 계절별로 2000년 12월부터 2001년 11월까지 매월 조사하였다. 각각의 조사 정점에서 SCUBA에 의해 저질과 함께 채취한 다음, 선상에서 10mm 체로 걸러 중성포르말린으로 고정한 후 실험실로 운반하였다. 채집된 저서생물은 분류한 다음  $m^2$  당 개체수를 측정하였다.

저서생물의 월별 출현양상은 키조개(*Atrina pectinata*), 참굴(*Crassostrea gigas*), 새조개(*Fulvia mutica*), 개조개(*Saxidomus purpuratus*), 살조개(*Protothaca jedoensis*), 바지락(*Tapes philippinarum*), 개불(*Urechis unicinctus*), 환형동물(*Polychaeta*) 등 모두 7개 분류군이 출현하였다.

조사기간 중 저서동물은 5월에 가장 많이 출현하였고, 6~7월에 가장 적게 출현하였다. 이중 개불과 환형동물은 매월 출현하였으며, 특히 개불 (*Urechis unicinctus*)은 늦가을부터 늦봄(3월)까지 가장 많이 출현하였고, 여름철(8월)에 가장 적게 출현하였다. 한편, 조사기간중 환형동물은 12월과 5월에 가장 높은 비율로 출현하였고, 4~7월(5월제외)에 가장 낮은 우점율을 나타내었다. 그리고 개조개는 조사기간 중 1월과 6월을 제외하고 매월 출현하였다. 이와 같이 조사해역에서의 개불 자원량은  $m^2$ 당 4.91개체로서 다른 유용 저서생물에 비해 자원량이 훨씬 많은 것으로 판단되었다.

#### 라. 개불 사육시 환경변화

개불 사육시 유입되는 유기물에 의한 환경변화에 대하여 개불의 적응도와 개불의 서식 특성 중 저질에 U자형 관을 파고 잠입하는 특성이 환경개선효과에 영향을 미치는 정도 및 타생물과의 복합양식에서의 효과를 파악하기 위하여 일반적으로 양식되어지는 넙치를 이용하여 실험하였다. 실험 결과 개불이 투입되어진 수조에서는

수질과 저질에서 안정되게 나타났으며, 특히 폐사율이 감소하였고, 또한, 성장률 또한 안정적으로 나타났다. 반면 개불이 투입되어지지 않은 대조구에서는 넙치의 폐사율이 가장 높았으며, 성장률 또한 낮아 개불의 투입이 수질 및 저질을 정화함으로써 넙치 사육시 폐사율을 낮추는 것으로 나타났다. 또한 개불의 경우 전 실험 시기동안 폐사가 없어 환경변화에 대하여 적응력이 뛰어난 것으로 사료되며, 수질과 저질의 성상이 안정되어지는 것으로 미루어 개불에 있어 수질 및 저질개선 효과가 있는 것으로 사료된다.

## 2. 생식기작 및 착저유인물질 개발

### 가. 생식기작

한국산 개불의 명확한 생식주기를 밝히고 종묘생산을 위한 기초 자료를 얻기 위하여 1998년 9월부터 1999년 8월까지 주로 조직학적 방법에 의해 생식소의 발달양상과 산란시기를 조사하였다.

생식소 중량 지수(GSI)는 11월에 암, 수 각각 7.01, 6.24로 연중 최고 값을 보였으며, 이후 급격히 감소하여 2월에 암수 각각 0.52, 1.04로 연중 최소 값을 보였다. 그 후 GSI는 급격히 증가하여 3~4월에 높은 값을 나타내었고, 5월부터 다시 감소하기 시작하여 8월까지 특이한 변화가 없었다. 그리고 GSI는 10~11월에 다시 증가하였다.

개불의 난경 변화는 산란기인 12월에 평균난경은  $96.16\mu\text{m}$ 였으며, 이후 급격히 감소하나 3월부터 서서히 증가하기 시작하여 4월에 평균난경  $81.52\mu\text{m}$ , 5월에  $29.60\sim 105.20\mu\text{m}$ 의 높은 변화를 보였다.

개불의 난소에 있어 조직학적인 가장 큰 변화는 GSI가 가장 높은 11월과 3월에 주변인기의 난모세포가 관찰되었고, 생식소내 난모세포들의 성숙은 일괄적으로 일어난다. 정소는 정소내벽에서 분화·성숙되어 정소 내부로 떨어져 나오며 완숙시의 정소 조직은 초기의 정소와 비교하여 얇은 막으로만 이루어졌다.

## 나. 착저유인물질 탐색

실험실에서 수정 후 사육된 개불, *Urechis unicinctus*의 유생에 대한 착저반응을 유도하는 물질에 대하여 실험하였다. 실험에 사용한 개불의 유생은 약 30일간 실험실에서 사육된 것을 이용하였고, 착저반응을 유도하는 유인물질인 UM(가칭)에 노출시켰다.

실험은 *Urechis unicinctus*의 유생에 대한 착저유인물질(UM)의 영향, 개불유생의 착저반응의 선택성 실험, UM의 온도변화에 대한 효율성 실험을 하였다.

UM에 노출된 개불의 유생은 빠른 착저를 보였으며, 이와는 대조적으로 해수와 고막의 체액, 개불의 혈액에 대하여는 착저반응을 나타내지 않는 결과를 나타내었다. 또한 UM의 가열실험에서는 70°C이상에서 UM의 효과가 나타나지 않았으며, 70°C이하에서는 전 실험구간에서 개불유생의 착저가 진행되었다.

본 실험에서 개불의 유생은 성체에서 추출한 화학적 유인물질(UM)에 대하여 신속한 반응을 나타내었으며, UM의 온도변화에 대한 효율성 실험을 통하여 UM의 일반적 화학특성을 밝히었다.

## 다. 유리아미노산에 대한 개불유생의 착저반응

개불성체와 유생, 점액질, 정소와 난소, 먹이생물인 *Chlorella* sp., 자연해수, 꼬막, *Tegillarca granosa*,의 체액을 아미노산 자동분석기로(Biochrom 20, USA) 분석하여 이 중 glycine, L-leucine, L-alanine, L-lysine, L-aspartic acid, glutamic acid에 대한 유생의 착저반응을 관찰하였다. 각각의 아미노산 등의 착저유도시약은  $1.0 \times 10^{-2}M$ 에서  $1.0 \times 10^{-8}M$ 의 농도로 준비하였으며, 모든 시약은 멸균여과해수에 희석하여 제조하였다. 멸균여과해수에 희석한 각각의 농도에 아미노산은 시험관에 30ml씩 분주하였고 착저 전 유생을 각 시험관에 20개체씩 분주하여 착저 유무를 관찰하였다. 실험은 각 3회 반복하였으며 일조상태에서 수온 18°C, 24시간동안 실험하였다. 각 시간별로 착저한 개불유생을 계수하였고, 대조구로서 일반해수에 대한 착저율도 계수하여 조사하였다. 착저반응의 기준은 유생의 착저율이 20%이상일 때를 착저반응으로 판단하였다.

Glycine, L-leucine, L-alanine, L-lysine, L-aspartic acid, glutamic acid에 대한

개불유생의 착저반응을 실험한 결과, Glycine의 경우  $1.0 \times 10^{-2} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 까지 유생의 반응이 일어났으며,  $1.0 \times 10^{-2} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{M}$  실험구에서 착저율이 20%이상 나타났고, 24시간 경과하여서는  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 과  $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 에서만 20%이상의 착저율을 나타내었다.

L-leucine은  $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 에서 100%의 착저율을 나타내었으며  $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 까지 20%이상의 높은 착저율을 나타내었다. 24시간 경과 후 역시  $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$  실험구에서 20%이상 착저하는 것으로 나타나 다른 실험구에 비하여 높은 착저율을 보였다. L-alanine은 3시간째에  $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 에서 측정시 28%로서 효율이 낮게 나타났으며, 24시간 경과 후 역시 23%로 나타났다. L-lysine, L-aspartic acid, glutamic acid의 경우 각각  $1.0 \times 10^{-2} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ ,  $1.0 \times 10^{-2} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ ,  $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 에서 각각 폐사한 개체가 나타났으며, 특히,  $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$  실험구에서는 3개 실험구 모두 100% 폐사하였다. 반면, L-lysine에서 3시간 경과하여 100%착저를 나타낸  $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$  실험구는 24시간 경과하여  $56 \pm 3\%$ 의 착저율을 보였으나, 폐사한 개체가  $40 \pm 5\%$ 로 나타나 효율을 나타내지 못하였다.

### 3. 종묘생산기술개발

#### 가. 개불어미의 저질입도별 선택성과 굴의 형태

개불어미의 저질입도별 선택성을 조사하기 위하여 입도별 실험구에 개불의 성체를 입식한 후 개불의 잠입율을 조사하였으며, 검은 비닐로 차광한 유리수조에 저질을 채운 후 개불의 성체가 잠입 후 굴의 형태를 관찰하였다. 개불어미는 펄질을 채운 A구에서는 4가 잠입하여 20.0%의 잠입율을 보인 반면, 시판용 모래인 입도가 0.10 mm 이하인 B구에서는 25.0%의 잠입율을 나타내었고, 입도 1.01~2.00 mm인 E구에서는 15.0%의 잠입율을 보여 저질의 입도가 커질수록 잠입율이 낮아지는 경향을 보였다.

한편 저질이 없는 F구의 경우는 한 마리도 관찰되지 않았다. 개불의 서식환경 특성에서 관찰한 바와 같이 개불은 사니질에서 서식하므로 개불의 종묘생산시에도 저질을 사니질로 형성하는 것이 바람직하다고 생각된다. 또한, 개불이 저질 속에서

만드는 굴의 형태는 J형, L형, S형 및 U형등으로 다양하였고 모든 굴속에는 한 개 체씩 들어가 있었다.

#### 나. 난발생과 유생의 변태과정

인공수정을 위하여 구강부터 절개한 후 인위적으로 압박을 가하여 개불의 난낭과 정낭을 채취하였다. 저정낭은 투명성이 있는 회백색이고, 저난낭은 노란색 혹은 흰 유백색이므로 난자와 정자의 구별이 가능하다. 그리고 채취된 난은 nylon mesh로 걸러 난의 크기가  $100\mu\text{m}$ 이상인 것을 실험에 사용하였다.

개불의 수정난은 수정 후, 2, 4, 8, 16, 32, 64세포기, 배부유유생기 그리고 담륜자유생기까지 발생되는데 평균 2.7, 4.2, 5.5, 6.3, 7.0, 7.9, 15.6, 16.0시간이 각각 소요되었다. 그리고 개불유생의 형태 변화와 운동성은 다음과 같다. 수정 후 16시간이 경과하면 저층에서 표층으로 활발히 움직이는 담륜자 유생(trochophore)을 관찰할 수 있으며, 크기가  $150\times 140\mu\text{m}$ 였다. 초기 담륜자 유생의 표피 전체에 많은 섬모가 관찰되었고, 시간이 경과하면서 유생 앞쪽에 섬모총(apical tuft)이 발달하였다. 그리고 유생들은 수정 후 약 30일경에 유생의 앞쪽과 뒤쪽에 섬모가 탈락되고, 몸의 중앙에 긴 섬모환을 형성하였고, 크기는  $350\times 340\mu\text{m}$ 였다. 담륜자 유생의 소화관은 식도, 위, 장으로 구분되어지며, 후강(posterior cavity)이 크게 발달하였다. 그리고 담륜자 유생의 특징으로서 안점도 관찰되었으며, 몸의 신축성이 매우 강하였다. 수정 후 35일이 경과하면 표층에서 저층으로 서서히 움직이는 초기 변태유생(premetamorphosis larvae)을 관찰할 수 있으며, 크기가  $370\times 325\mu\text{m}$ 였다. 변태유생은 표면에 섬모가 탈락되어 유영력을 상실하였다. 그리고 약 56일이 경과하면 착저자어(young pelagosphe)를 관찰할 수 있으며, 체장은  $550\sim 950\mu\text{m}$ , 체폭은  $350\sim 430\mu\text{m}$ 였다.

#### 다. 난발생에 미치는 환경요인

한국산 개불, *Urechis unicinctus* (von Drasche)의 종묘생산을 위한 생물학적 기초자료를 얻기 위하여 난발생에 미치는 pH와 염분의 영향을 조사하였다.

실험에 사용된 개불의 성체는 여수 잠수기조합에서 구입하여 여수대학교 양식

장환경(무척추동물학)실험실에서 5주간 사육하던 것이며, 성숙한 개체를 해부하여 알과 정자를 채취하고 인공수정을 시켜 pH(4~10)와 염분 (0~45%) 실험구에서 배 발생과정을 조사하였다. pH 4에서 수정란은 2세포기까지 발달하지 못하고 모든 개체가 폐사하였으며, 염분 0%, 10%, 40%, 45%에서도 수정란은 2세포기까지 진행하지 못하고 폐사 또는 기형으로 발생하였다. 기형 발생은 주로 8세포기와 16세포기에서 나타났다. 그러나 pH 5~10과 20~35%에서 수정란은 수정 후 2세포기를 지나 배 부유유생기까지 정상적으로 발달하였다. 이러한 결과는 개불이 조건대에서 널리 분포하고 있음을 의미한다. pH 5~10 실험구의 수정란은 수정 후 16세포기까지 발생하는 데 5.3~5.6시간이 소요되었으며, 염분 20~30% 실험구의 수정란은 5.1~5.8시간이 소요되었다. 또한, 모든 실험구에서 수정 후 배 부유유생기까지 발생하는 데 소요시간은 13.1~14.1시간으로 거의 비슷하였다.

#### 라. 먹이별 유생의 성장 및 생존율

연속 통기배양법으로 순수배양된 *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*였고, 실험구 설정은 각 먹이생물별 단독구, *C. calcitrans*+*I. galbana*구, *C. calcitrans*+*P. lutheri*구, *I. galbana*+*P. lutheri*구, *C. calcitrans*+*I. galbana*+*P. lutheri*구와 대조구로서 무투이구를 반복 설정하였다. 공급량은 매일 30,000 cells/ml 농도로 공급하였고, 유생이 30  $\mu\text{m}$ 씩 성장함에 따라 10,000 세포씩 증가하여 공급하였다.

개불은 *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* 혼합 공급구에서 성장률이 가장 높았고, 생존율 또한 30일 경과후 62.4%로 가장 높았다. 반면에 먹이생물을 공급하지 않은 대조구에서는 실험 18일째에 모두 폐사하였다. 2가지 먹이생물을 혼합하여 공급한 실험구에서는 *I. galbana*+*P. lutheri* 공급구에서  $500 \pm 7.81 \mu\text{m}$ 로 성장하여 가장 성장률이 높았고, *C. calcitrans*+*P. lutheri* 공급구가  $492 \pm 5.66 \mu\text{m}$ , *I. galbana*+*C. calcitrans* 공급구  $486 \pm 8.32 \mu\text{m}$  순이었으나 성장의 유의한 차이는 없었다. 먹이생물 단일종을 공급할 경우 30일 경과 후 *P. lutheri* 공급구가  $443 \pm 6.21 \mu\text{m}$ 로 성장하였고, *I. galbana* 공급구가  $427 \pm 8.34 \mu\text{m}$ , *C. calcitrans* 공급구가  $406 \pm 6.62 \mu\text{m}$ 로 성장한 반면 먹이생물을 공급하지 않은 대조구는 18일 경과

후 모두 폐사 하였다. 생존율은 대조구를 제외한 전 실험구에서 58.7~62.4%의 범위로 유의차가 없었다.

#### 마. 먹이별 치충의 성장 및 생존율

무척추동물의 먹이생물로 가장 많이 이용되는 순수배양된 *Chaetoceros calcitrans*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloris oculata*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis seucica*을 먹이로 공급하여 개불 유생의 성장 실험을 한 결과, 실험개시시 평균체장  $163 \pm 2.52 \mu\text{m}$ 이던 유생이 30일 경과 후, *Chaetoceros calcitrans* 공급구에서  $503 \pm 21.34 \mu\text{m}$ , *Dunaliella tertiolecta* 공급구에서  $621 \pm 27.21 \mu\text{m}$ , *Nannochloris oculata* 공급구에서  $465 \pm 31.29 \mu\text{m}$ , *Phaeodactylum tricornutum* 공급구에서  $768 \pm 26.10 \mu\text{m}$ , *Tetraselmis seucica* 공급구에서  $472 \pm 33.85 \mu\text{m}$ 의 성장을 보여 *P. tricornutum* 공급구에서 가장 빠른 성장을 보였고, 32일째 수조 바닥으로 모두 착저하였다.

또한 평균체장  $768 \pm 26.10 \mu\text{m}$ 인 잠입 치충을 120일간 사육한 결과, *P. tricornutum* 공급구에서 평균  $3.74 \pm 0.53 \text{ cm}$ 으로 가장 빠른 성장을 보였다.

실험결과 단독투입한 먹이 생물 중 *P. tricornutum* 가 성장률에서 가장 뛰어나 개불의 초기 먹이 생물로서 적합하다고 여겨진다.

#### 마. 자치어 사육시 적정환경요인 조사

개불 자치어의 저질선택성을 실험개시 30일 경과 후 조사한 결과, 저질이 펄인 A구에서 31마리, 조개껍질과 모래의 혼합구인 C구에서 23마리, 펄과 모래의 혼합구인 D구에서 21마리, 펄, 모래와 조개껍질 혼합구인 E구에서 32마리가 관찰된 것에 반해 저질이 모래인 B구에서는 한 마리도 관찰되지 않았다. 또한 개불의 잠입깊이를 조사하기 위한 실험 결과, 2.5~5 cm, 5~7.5 cm구간에서 각각 10마리가 관찰되었으나, 이외의 구간에서는 관찰되지 않았다. 또한, 각 발생 단계의 수온별 소요시간을 나타낸 표로서 8세포기까지 10℃에서 4.2시간, 20℃에서 1.9시간이 걸린 반면, 25℃에서는 1.2시간이 소요되는 것으로 나타났다. 한편, 부화기까지의 발생소요시간은 10℃에서 97시간, 20℃에서 68시간 그리고, 25℃에서 55시간이 소요되었다.

## V. 연구개발결과의 활용계획 및 건의

유용무척추동물인 개불, *U. uncinatus* 는 남해안 특산종이며, 특히 고부가가치의 수산생물이다. 본 연구에 의하여 *U. uncinatus* 의 기초생태학적 연구와 종묘생산시 기초자료가 되어지는 초기사육환경과 먹이생물의 구명, 서식 저질의 분석을 통하여 개불의 종묘생산이 가능할 것으로 사료되어지나 종묘단계까지의 생존율을 높일 수 있는 방안과 사육수조의 모델 개발이 미진한 부분으로 남아 있어 이에 대한 연구가 요구되어진다.

*U. uncinatus* 의 종묘생산은 완전양식으로의 밑거름이 되며, 또한 자원이 감소되어지고 있는 현재의 상황에서 개불과 같은 산업적 가치가 높은 종의 자원보호 및 증대는 매우 중요하다. 또한, 품종의 다양화를 이루지 못하여 과잉생산된 양식생물의 가격 저하로 인한 어민의 소득 감소에 대한 대안을 제시할 수 있을 뿐 아니라 기타 양식생물의 안정된 생산과 소득 확보에 기여할 수 있을 것으로 사료되어진다.

### 1. 연구목표의 달성도(기술성, 경제성)

유용무척추동물인 개불, *U. uncinatus* 에 대하여 생태, 생리 등 생물학적 기초연구 결과를 기반으로 하여 종묘생산을 실시하여 이에 대한 Know-How를 이용하여 새로운 양식품종의 개발을 이룰 수 있을 것으로 기대되며, 특히, 산업적 가치가 높으나 양식품종으로 이용되어지지 못하는 기타 무척추동물에 대하여 접목시킬 수 있을 것으로 기대된다.

*U. uncinatus* 의 양식은 세계에서 처음으로 시도되어졌으며, *U. uncinatus* 의 식용도가 남해안에 집중되어있으나 국내에서도 이를 점차 고급식품으로 인식하고 있어 수산물의 이용도가 높은 아시아 국가권내에서의 소비가 이루어질 경우 기술의 수출과 더불어 외화소득의 효과를 기대할 수 있다.

국내 양식산업은 특정 종에 한정되어 대량으로 양식되어진 결과 어민의 소득이 점차 감소하고 있는 추세이며, 각 종의 특성이 대량생산으로 인하여 고급상품으로서의



인식이 점차 감소하고 있다. 따라서, *U. uncinatus* 의 종묘생산기술이 확립되어지고, 완전양식이 가능하였을 경우 이에 대한 대책으로 적용가능하며, 어가 소득의 향상 효과가 있다.

또한, *U. uncinatus* 의 사육환경 조사시 나타난 환경에 대한 적응성과 저질 및 수질 개선효과를 이용한 생물학적 객토 및 수질정화를 이용하여 자원 증대효과 및 환경개선 효과를 동시에 기대할 수 있을 것으로 사료되어진다.

## 2. 연구결과의 활용가능정도

*U. uncinatus* 의 양식기술개발은 양식품의 다양화 및 UR에 대비한 수익성 높은 양식 종의 보급을 통한 경쟁력 강화를 유도할 수 있으며, *U. uncinatus* 을 양식하고자 하는 어민들을 대상으로 인공종묘생산기술과 사육법을 교육시켜 기술을 이전한다. 또한, 연안 수산자원의 증가를 위해 방류용으로 활용할 수도 있으며, 개불의 생태적 특성을 이용하여 저질을 개선할 수도 있다.

더불어, 본 연구 결과 축적된 기술(착저 유인물질 개발 등)을 새로운 해산 무척추동물의 종묘생산기술개발에 이용할 것이다.

# S U M M A R Y

## I . Title

Development of mass culture and seed reproduction of *Urechis unicinctus*.

## II . Object and significance

### 1. Objective

The objective of this study is to develop new cultivation technology for available marine invertebrate(*Urechis unicinctus*), mass culture and seed reproduction system and ultimately cultivated *Urechis unicinctus* and improving the farmers net incomes.

### 2. Significance

The cultivation of marine invertebrates in Korea has encountered many problems such as: overproduction, decrease domestic price and deteriorated quality. To solve these problems and to prepare for the WTO forced, open market, it is urgent that we develop improved cultivation techniques, focused on the higher valued species.

*Urechis unicinctus* is intertidal invertebrate and specially they have are ate people in Korea. Further, *U. unicinctus* is one of the important commercial invertebrates in southern Korea coast. *U. unicinctus* lives highly density and limited area in intertidal. It is possible to culture and restock this species in

intertidal zone. Replacing *U. uncinatus* will produce a much more economic value. If conditions such as ecological investigation, biological and physiological basal data, reproduction, gamete culture technique and inductive method for larvae settlement are clarified in the *U. uncinatus* cultivation, mass production will be possible with artificial seeding production.

*U. uncinatus* is very valuable species primarily dependent on natural collection, they are produced Chunnam province respectively. Subsequently, it is necessary to develop the artificial seed reproduction and cultivation techniques for the other species base on the ecological investigation, biological reproductive and physiological experiments on these commercially available species.

### **III. The contents and result of the study**

#### **1. Environmental and ecological study**

##### **A. Water and sediment quality**

This study was performed to characterize the monthly variation of water quality and sediment environment from December, 2000 to November, 2001 in Kaedo island to live *Urechis uncinatus*.

In the survey of seawater quality, DO and COD concentrations were lowest in bottom layer at summer, but DIN and DIP contents were higher than those in surface layer.

In the survey of sediment environment, chemical oxygen demand (COD), DIN and DIP were in the range of 10.3~60.6mg/g-dry, 5.053~1.810mg/ℓ and 0.065~0.324mg/ℓ, respectively.

The grain distribution of beaches are measured by classification of sediments by grain diameter and this range is 2μm~200mm. *U. uncinatus*

collected station 2 and 3 where is composition of sand and silt.

## **B. Food organism**

This study was conducted to describe the distribution and appearance of phytoplankton in Kaedo island to live *U. unicinctus*, the southern coastal of Korea. Sampling was seasonally using plankton net from December, 2000 to November 2001.

A major dominant species were *Skeletonema costatum*, *Paralia sulcata*, *Pseudonitzschia seriata*, *Chaetoceros decipiens*, *C. debilis*, *C. affinis*, *C. curvisetus*, *Eucampia zodiacus*, *Ceratium furca*, *C. fusus*, *Asterionella galacialis*.

Accordingly *U. unicinctus*'s food organism was guess that *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros debilis*, *C. curvisetur*, *Eucampia zodiacus*, *Asterionella galacialis*. Because they were bloom in April and November when period of spawning *U. unicinctus*.

## **C. Benthic animal and commensal**

This study was conducted to describe the distribution and appearance pattern of macrobenthos in Kaedo island to live *U. unicinctus* the southern coastal of Korea. Sampling was perfound seasonally using Van Veen grab(0.1m<sup>2</sup>) from December, 2000 to November, 2001. A total of 8 macroinvertebrates in sampling area.

Major species were *Atrina*(*Servatrina*) *pinnata*, *Crassostrea gigas*, *Fulvia mutica*, *Saxidomus purpuratus*, *Protothaca jechoensis*, *Tapes philippinarum*, *U. unicinctus* and *Polychaeta*.

There are relatively high monthly variation in the abundance of *U. unicinctus* with a range of 12 ~ 1ind./m<sup>2</sup> from December, 2000 to November, 2001.

## **2. Reproductive cycle and inductive settlement**

### **A. Reproductive cycle**

In order to obtain the basic information for seeding production of Echiuroid worm, *Urechis unicinctus*, gonadosomatic index(GSI) was used as the indicator reproductive cycle during a period from September 1998 to August 1999.

In November, GSIs of male and female reached maximum values of 6.24 and 7.01, respectively. In February, however, lowest GSI values of 1.04 and 0.52 occurred in male and female, respectively. Then GSIs increased rapidly and reached high values in March and April. In both sex, GSIs decreased from May and then was not changed significantly until August. GSIs increased again in October and November. Annual values on GSI indicated that two spawning events of *U. unicinctus* occurred in a year; April to May and December. Reproductive cycle was classified into the following successive stages: in female, multiplication(January ~February, June ~September), maturation(March ~April, November), spent(May and December), degeneration and resting(June and January), and in male, multiplication(January ~February, June ~September), maturation(March ~April, October ~November), spent(May and December)and degeneration and resting(January and June).

Histological observations revealed that oocytes in the ovary matured simultaneously in November and March. At the same time, the matured testis envelopes became thinner than those in the early stage.

### **B. Induction of settlement**

In this study, larvae of *Urechis unicinctus* reared in the laboratory were exposed to the thing of which potential material settlement stimulus(UM; *Urechis unicinctus*'s material)) that obtained from the skin of adult *U. unicinctus*. Within 10 minutes after addition of UM, metamorphosis of

trochopores to pelagosphera occurred. Larvae of *U. uncinatus* responded to UM but do not to normal sea water, sticky liquid substance of *Tegillarca granosa* and blood of *U. uncinatus*. Exposed larvae of *Urechis uncinatus* settled rapidly and specifically after contact with UM.

UM quickly lost its effectiveness in promoting settlement after it was heated to 70°C, but was relatively stable at an ambient ocean temperature.

### **C. Induction of settlement by mono amino acid**

In this study, we were using a useful marine invertebrate, Gae-bul (*Urechis uncinatus*), which has a gregarious trait, commercially important and also has a high chance to diminish throughout the overfishing in Korea. When they are at the pelagic period, we will search out where they have settled, and provided the necessary material which induces settlement and metamorphosis.

On exposure to amino acids, larval response varied depending on the amino acids and its concentration. The present observation with glycine, leucine, alanine showed the same result. Mono-amino acids were glycine, leucine, alanine, which were effective at a concentration of  $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$  to  $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ . On the other hand, lysine could induce settlement at a concentration of  $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$  to  $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$  and also had a settlement inhibiting effect in the concentration at  $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ . But the reason for this is not clear. Glutamic acid was found to be effective in the concentration range  $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$  to  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ . L-aspartic acid showed to be effective in the concentration range  $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$  to  $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ .

In this study, lysine and should be considered an important settlement inducer as settlement cues present in the natural environment may have an inducing effect at a micromole concentration level.

### **3. Development of seed reproduction technique**

#### **A. Burrow shape and preference of Grain-size of *Urechis unicinctus***

The highest densities and biomass of *U. unicinctus* were found in areas of the sand silt. In the laboratory, all echiurans performed burrowing success in coarse sand and sand within 24hours, but none did in silt and clay within 10 days. In sand silt, echiurans enabled to dig 0.7~2.8 burrows/day/ind. And *U. unicinctus* made a burrow of J, L, S and U shape

#### **B. Egg development and metamorphosis**

Using the artificially inseminated eggs of *U. unicinctus*, development process of embryos were investigated under temperature 15°C. Mean duration times after fertilization of 2, 4, 8, 16, 32, 64-cell stages, swimming embryos and trochopores were 2.7, 4.2, 5.5, 6.3, 7.0, 7.9, 15.6, 16.0 hours, respectively. For 56 days, trochopores took rapid growth from 150×140 μm to 550×350-950×430μm. Within 5-10 minutes after addition of mucus taken from the skin of *U. unicinctus* adult, metamorphosis of trochopores to pelagosphera occurred.

#### **C. The effect of environmental factor on egg development**

In order to obtain the basic information for seeding production of Echiuroid worm, *Urechis unicinctus*, the influence of pH and salinity on egg development was investigated.

Mature adult of *U. unicinctus* were collected at the Diving Cooperation of Yosu in Korea and reared during 5 weeks. We carried out the artificial insemination in the laboratory on Dec. 29, 1998, and reared the embryo under different pH and salinity. Treatments were carried out with different pH(4~10) and salinity(0~45‰). Embryos in pH 4, salinity 0‰, 10‰, 40‰ and 45‰ tanks did not develop after fertilization and became deformed or dead, before swimming

embryo. In these pH and salinity conditions, deformation rate of embryo was high at 8-cell stage and 16-cell stage. But embryos in pH 5~10, salinity 20~35‰ tanks developed into swimming embryo stage.

These result indicate that an echiuran inhabits in both intertidal and subtidal mudflats. After fertilization, sixteen-cell stage took 5.3~5.6 hours in pH 5~10 tanks, and 5.1~5.8 hours in 20~35‰ tanks. And swimming embryo took 13.3~14.1 hours in all conditions. The desirable pH and salinity for egg development were 7~8 and 30‰, respectively.

#### **D. Growth and survival rate on larvae of *U. unicinctus* by food organism**

This study was conducted to determine the growth rate and survival rate on various kinds of feed and optimum feeding rate of *U. unicinctus*'s larvae in the laboratory culture.

On various feeds such as *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *C. calcitrans*+*I. galbana*, *C. calcitrans*+*P. lutheri*, *I. galbana*+*P. lutheri* and *C. calcitrans*+*I. galbana*+*P. lutheri*, the highest survival and growth rates of *U. unicinctus*'s larvae were obtained when they were fed on *C. calcitrans*+*I. galbana*+*P. lutheri*

#### **E. Growth and survival rate on young *U. unicinctus* by food organism**

This study was conducted to determine the growth rate and survival rate on various kinds of feed and optimum feeding rate of young *U. unicinctus* in the laboratory culture.

On various feeds such as *Chaetoceros calcitrans*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloris oculata*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis seucica*, the highest survival and growth rates of *U. unicinctus*'s larvae were obtained when they were fed on *P. tricornutum*



#### **IV. Suggestion for the practical application of this study**

We established the technology development of cultivation for new available marine invertebrate that *U. uncinatus*. *U. uncinatus* culture will give fishermen more income and fulfill the UR agreement.

The artificial seed reproduction technology of regional endemic species is possible as an enterprise product, and will prevent the over production of special species such as oyster, flatfish, rockfish and give an appropriate production

# 목 차

List of tables .....	29
List of figures .....	31
제 1 장 서 론 .....	38
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	41
제 3 장 서식어장의 환경특성 .....	42
제 1 절 수질 및 저질 성상 .....	42
1. 재료 및 방법 .....	42
2. 연구결과 및 고찰 .....	43
제 2 절 먹이생물조사 .....	48
1. 재료 및 방법 .....	48
2. 연구결과 및 고찰 .....	48
제 3 절 저서생물 및 공생생물 조사 .....	52
1. 재료 및 방법 .....	52
2. 연구결과 및 고찰 .....	52
제 4 절 개불 사육시 환경변화 .....	54
1. 재료 및 방법 .....	54
1. 1. 실험어 .....	54
1. 2. 사육수조 .....	54
1. 3. 실험 방법 .....	55
2. 연구결과 및 고찰 .....	57
2. 1. 넙치 폐사 개체 수 .....	57

2. 2. 넙치 증중량 및 성장률 .....	57
2. 3. 개불의 생잔울 및 체중, 체장변화 .....	61
2. 4. 사육 환경(수질) .....	64
2. 5. 사육환경(저질) .....	68
제 4 장 생식기작 및 착저유인물질 개발 .....	71
제 1 절 생식주기 조사 .....	71
1. 재료 및 방법 .....	71
2. 연구결과 및 고찰 .....	71
2. 1. 생식소 증량 지수(GSI)의 월 변화 .....	72
2. 2. 난경 변화 .....	72
제 2 절 생식소 변화 양상 .....	76
1. 재료 및 방법 .....	76
2. 연구결과 .....	76
2. 1. 난소 .....	76
2. 2. 정소 .....	80
3. 고찰 .....	82
제 3 절 착저유인물질 탐색 .....	84
1. 재료 및 방법 .....	84
1. 1. <i>Urechis unicinctus</i> 의 유생에 대한 착저유인물질(UM)의 영향 ....	84
1. 2. 개불유생의 착저반응의 선택성 실험 .....	84
1. 3. UM의 온도변화에 대한 효율성 실험 .....	85
2. 연구결과 .....	85
2. 1. <i>Urechis unicinctus</i> 의 유생에 대한 착저유인물질(UM)의 영향 ....	85
2. 2. 개불유생의 착저반응의 선택성 실험 .....	86
2. 3. UM의 온도변화에 대한 효율성 실험 .....	86
3. 고찰 .....	86
제 4 절 유리아미노산에 대한 개불유생의 착저반응 .....	92
1. 재료 및 방법 .....	92

2. 연구결과 .....	92
3. 고찰 .....	93
제 5 장 종묘생산기술개발 .....	109
제 1 절 개불어미의 저질입도별 선택성과 굴의 형태 .....	109
1. 재료 및 방법 .....	109
2. 연구결과 및 고찰 .....	110
제 2 절 난발생과 유생의 변태과정 .....	116
1. 재료 및 방법 .....	116
2. 연구결과 및 고찰 .....	116
제 3 절 난발생에 미치는 환경요인 .....	119
1. 재료 및 방법 .....	119
2. 연구결과 및 고찰 .....	119
제 4 절 먹이별 유생의 성장 및 생존율 .....	126
1. 재료 및 방법 .....	126
2. 연구결과 및 고찰 .....	127
제 5 절 먹이별 치충의 성장 및 생존율 .....	130
1. 재료 및 방법 .....	130
2. 연구결과 및 고찰 .....	131
제 6 절 자치어 사육시 적정환경요인 조사 .....	135
1. 재료 및 방법 .....	135
2. 연구결과 및 고찰 .....	138
제 6 장 연구 성과 및 활용계획 .....	146
제 1 절 기술적 측면 .....	146
제 2 절 경제·산업적 측면 .....	146
제 3 절 연구 성과 .....	147
제 4 절 활용방안 .....	149

제 7 장 참고문헌 ..... 150

첨부자료(특허등록증) ..... 155

## List of tables

Table 1. Sedimentary composition of the sampling sites .....	45
Table 2. Monthly change temperature, salinity, DO, COD, DIN and PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P in sampling area .....	46
Table 3. Monthly phytoplankton amount in sampling stations .....	50
Table 4. Monthly change dominant species in sampling stations .....	51
Table 5. Monthly abundance of benthic macroinvertebrates in sampling area ....	53
Table 6. Number of <i>Urechis unicinctus</i> and <i>Paralichthys olivaceus</i> in each experimental group .....	56
Table 7. Compare with response to amino acid .....	108
Table 8. Burrowing rates of <i>Urechis unicinctus</i> after 20 days in each experimental tank with different grain size .....	113
Table 9. Distribution and body weight of burrowing <i>Urechis unicinctus</i> in every 10cm depth of sediment. ....	113
Table 10. Mean weight, length and GSI of <i>Urechis unicinctus</i> .....	126
Table 11. Survival rate and survival rate of <i>Urechis unicinctus</i> fed with different feeds .....	129
Table 12. Measurement of <i>Urechis unicinctus</i> used in spawning induction the experiment .....	130
Table 13. Growth rate and survival rate of <i>Urechis unicinctus</i> fed with different feed .....	132
Table 14. Measurement of <i>Urechis unicinctus</i> used in spawning induction the experiment .....	136
Table 15. Burrowing of <i>Urechis unicinctus</i> after 30 days in each experimental tank with different grain size .....	139
Table 16. Distribution of <i>Urechis unicinctus</i> in every 2.5 cm depth of sediment	

..... 140

Table 17. Relationships between water temperature and time (hour) required to  
each developmental stage from fertilization egg ..... 140

## List of figures

Fig. 1. Map showing the sampling station. ....	44
Fig. 2. Mortality rate of <i>Paralichthys olivaceus</i> in each experimental groups. ...	59
Fig. 3. Weight gain of <i>Paralichthys olivaceus</i> in each experimental groups. ....	60
Fig. 4. Change of <i>Urechis unicinctus</i> 's body weight in each experimental group. .....	62
Fig. 5. Change of <i>Urechis unicinctus</i> 's body length in each experimental group. .....	63
Fig. 6. Change of $\text{NH}^4\text{-N}$ in each experimental group. ....	66
Fig. 7. Change of $\text{NO}^2\text{-N}$ in each experimental group. ....	67
Fig. 8. Change of BCOD in each experiment group. ....	69
Fig. 9. Change of AVS in each experiment group. ....	70
Fig. 10. Adult <i>Urechis unicinctus</i> . ....	73
Fig. 11. Monthly change of the gonadosomatic index(GSI) in <i>Urechis unicinctus</i> . .....	74
Fig. 12. Monthly change of egg size composition of <i>Urechis unicinctus</i> .....	75
Fig. 13. Histological identifications of internal morphology and developmental phases of ovary in <i>Urechis unicinctus</i> . ....	78
Fig. 14. Monthly change in frequency of the ovarian development stage in <i>Urechis unicinctus</i> . ....	79
Fig. 15. Histological identifications of internal morphology and the developmental phases of testis in the <i>Urechis unicinctus</i> . ....	81
Fig. 16. Larval settlement responses to UM in sea water, to sea water alone and to UM coating to test tube. ....	89
Fig. 17. Larval settlement responses to UM in sea water, to blood of <i>Urechis unicinctus</i> and to sticky liquid substance of <i>Tegillarca granosa</i> . ....	90



Fig. 18. The heat lability of <i>Urechis unicinctus</i> "UM" : larvae were examined for settlement at heating different temperature; there were 20 larvae in treatment. ....	91
Fig. 19. Mean percent settlement of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in response to glycine for 3h(p<0.05). ....	95
Fig. 20. Mean percent settlement of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in response to glycine for 24h(p<0.05). ....	96
Fig. 21. Mean percent settlement of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in response to L-leucine for 3h(p<0.05). ....	97
Fig. 22. Mean percent settlement of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in response to L-leucine for 24h(p<0.05). ....	98
Fig. 23. Mean percent settlement of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in response to L-alanine for 3h(p<0.05). ....	99
Fig. 24. Mean percent settlement of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in response to L-alanine for 24h(p<0.05). ....	100
Fig. 25. Mean percent settlement of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in response to L-lysine for 3h(p<0.05). ....	101
Fig. 26. Mean percent settlement of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in response to L-lysine for 24h(p<0.05). ....	102
Fig. 27. Mean percent settlement of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in response to L-aspartic acid for 3h(p<0.05). ....	103
Fig. 28. Mean percent settlement of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in response to L-aspartic acid for 24h(p<0.05). ....	104
Fig. 29. Mean percent settlement of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in response to glutamic acid for 3h(p<0.05). ....	105
Fig. 30. Mean percent settlement of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in response to glutamic acid for 24h(p<0.05). ....	106
Fig. 31. Mortality of <i>Urechis unicinctus</i> 's larva in each concentration(p<0.05).	

.....	107
Fig. 32. Schematic diagram for burrowing behavior of <i>Urechis uncinctus</i> on the various sediment size. ....	112
Fig. 33. Variation of water temperature(■) and pH(●) of rearing sea water during the experiment period. ....	114
Fig. 34. The various types of <i>Urechis uncinctus</i> burrow. ....	115
Fig. 35. Development stage of <i>Urechis uncinctus</i> . ....	118
Fig. 36. Survival rate of fertilized eggs of <i>Urechis uncinctus</i> at various pH. .	122
Fig. 37. Hatching rate of fertilized eggs of <i>Urechis uncinctus</i> at various pH.	123
Fig. 38. Survival rate of fertilized eggs of <i>Urechis uncinctus</i> at various salinities. ....	124
Fig. 39. Hatching rate of fertilized eggs of <i>Urechis uncinctus</i> at various salinities. ....	125
Fig. 40. Survival rate of <i>Urechis uncinctus</i> on rearing day. ....	133
Fig. 41. Relationships between body length and body breadth of <i>Urechis uncinctus</i> larvae. ....	134
Fig. 42. Schematic diagram for burrowing behavior of <i>Urechis uncinctus</i> of the various sediment size. ....	137
Fig. 43. Triangular diagrams of sediment composition in sampling areas. Closed circles indicate <i>Urechis uncinctus</i> distribution. ....	139
Fig. 44. Relationship between water temperature and time required to each developmental stage after spawning. ....	141
Fig. 45. Relationships between time required to developmental stage and integral water temperature. ....	142
Fig. 46. Survival rate of <i>Urechis uncinctus</i> on development stage. ....	143
Fig. 47. Relationships between body length and body breadth of <i>Urechis uncinctus</i> larva. ....	144
Fig. 48. Developmental stage of <i>Urechis uncinctus</i> in laboratory. ....	145

# CONTENTS

List of tables .....	29
List of figures .....	31
Chapter I. Introduction .....	38
Chapter II. The present state of technique .....	41
Chapter III. Environmental and ecological study .....	42
Section 1. Water and sediment quality .....	42
1. Materials and methods .....	42
2. Result and discussion .....	43
Section 2. Food organism .....	48
1. Materials and methods .....	48
2. Result and discussion .....	48
Section 3. Benthic animal and commensal .....	52
1. Materials and methods .....	52
2. Result and discussion .....	52
Section 4. Environment change on <i>Urechis unicinctus</i> cultured .....	54
1. Materials and methods .....	54
1. 1. Experimental fish .....	54
1. 2. Cultured tank .....	54
1. 3. Methods .....	55
2. Result and discussion .....	57
2. 1. Mortality of flatfish .....	57

2. 2. Gain weight and growth rate of flatfish .....	57
2. 3. Weight and length of change of <i>Urechis unicinctus</i> .....	61
2. 4. Water quality .....	64
2. 5. Sediment quality .....	68
Chapter IV. Reproductive cycle and inductive settlement .....	71
Section 1. Reproductive cycle .....	71
1. Materials and methods .....	71
2. Result and discussion .....	71
2. 1. Monthly change of GSI .....	72
2. 2. Monthly change of egg diameter .....	72
Section 2. Change of gamete .....	76
1. Materials and methods .....	76
2. Result .....	76
2. 1. Ovary .....	76
2. 2. Testis .....	80
3. Discussion .....	82
Section 3. Induction of settlement .....	84
1. Materials and methods .....	84
1. 1. The rapidity of settlement in response to UM .....	84
1. 2. The specificity of larval responses to UM in promoting settlement .....	84
1. 3. Stability of UM for temperature change .....	85
2. Result .....	85
2. 1. The rapidity of settlement in response to UM .....	85
2. 2. The specificity of larval responses to UM in promoting settlement .....	86
2. 3. Stability of UM for temperature change .....	86

3. Discussion .....	86
Section 4. Induction of settlement by mono amino acid .....	92
1. Materials and methods .....	92
2. Result .....	92
3. Discussion .....	93
Chapter V. Development of seed reproduction technique .....	109
Section 1. Burrow sharpe and preference of grain-size of <i>U. uncinctus</i> ...	109
1. Materials and methods .....	110
2. Result and discussion .....	116
Section 2. Egg development and metamorphosis .....	116
1. Materials and methods .....	116
2. Result and discussion .....	119
Section 3. The effect of environmental factor on egg development .....	119
1. Materials and methods .....	119
2. Result and discussion .....	126
Section 4. Growth and survival rate on larvae of <i>U. uncinctus</i> by food organism .....	126
1. Materials and methods .....	127
2. Result and discussion .....	130
Section 5. Growth and survival rate on young <i>U. uncinctus</i> by food organism .....	130
1. Materials and methods .....	130
2. Result and discussion .....	131
Section 6. Suitable environment of young <i>U. uncinctus</i> cultured .....	135
1. Materials and methods .....	135
2. Result and discussion .....	138

Chapter VI. Research achievement and practical application .....	146
Section 1. Technique .....	146
Section 2. Economical .....	146
Section 3. Research achievement .....	147
Section 4. Practical application .....	149
Chapter VII. Reference .....	150

# 제 1 장 서 론

우리나라에서의 수산식품의 이용도는 역사적으로나 현실적으로 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 과거에는 단순한 어획에 의해 수요를 공급해 왔으나 최근에는 연안 환경오염으로 연안해역에서의 어업생산은 위축되고 상대적으로 고급어종의 집약양식에 의존하는 경향이 계속되고 있다. 또 경제수준의 향상에 따른 식품문화의 고급화로 고급어종의 인위적 양식의 필요성은 더욱 강조되고 있다. 따라서 천해양식업은 수익성이 매우 유망한 새로운 산업으로 각광 받아 왔다. 특히, EEZ 선포에 따른 신품종 개발 및 기르는 양식산업은 시기적으로 매우 중요하다. 우리나라에서 유용 해산무척추동물 중 개불, *Urechis unicinctus*(von Drasche)은 예로부터 식용으로 사용해 왔으며 고급음식으로 인식되어 있다. 개불, *Urechis unicinctus*(von Drasche)의 분류학적 위치는 의충동물문(Echiurida), 의강(Echiurida), Xenopnuesta목, *Urechidae*과에 속하며 *Urechis*속에는 4종이 있다. 특히, 개불류는 조간대에서 수심 100m 정도까지 분포하며, 저질은 사질, 니질, 사니질인 해역에서 U자형 관을 만들어 서식하고 있다(Clark, 1969; Stephen and Edmonds, 1972; Storch, 1984). 개불류에 관한 연구로는 *Urechis caupo*의 초기 배 발생(Newby, 1932), 부유유생의 착저에 관한 연구(Suer and Phillips, 1983), *Siphonosoma cumanense*와 *Sipunculus nudus*의 변태와 발생에 대한 비교(Rice, 1988), *Themiste lageniformis*의 생식생리와 발생(Pilger, 1987), *Urechis caupo*의 수소이온 농도에 따른 처녀생식(Stephano and Gould, 1997) 및 *Bonellia viridis* 유생의 성 결정에 관한 연구(Jaccarini et al., 1983) 등이 있다.

우리 나라에서 개불, *U. unicinctus*은 예로부터 식용으로 사용해 왔으며 고급음식으로 인식되어 있으나 아직까지 이 종에 대한 초기 생활사, 생태 및 분포 등에 대한 연구가 거의 이루어지지 않고 있다. 특히, 여름철에 하면을 하는 것으로 알려져 있으나 아직까지 구체적으로 연구되어진 바 없으며, 처녀생식에 대한 구분도 불확실한 상태에 있다.

특히, 개불은 지질, 지방산 및 sterol조성 등이 풍부하여 날 것 또는 건조품으로 만들어 식용으로서 이용도가 매우 높다. Lee (1968)에 의하면 개불의 단맛은

glycine와 alanine에 의한 것이라고 보고하였으며, Joh and Kim (1983)는 일반적으로 다른 무척추동물에서 합성할 수 없는 5종의 sterols (Van Arrem et al., 1964; Ferezou, et al., 1972; Voogt et al., 1974)를 개불에서 분리하였다. 그러나 해양 환경오염 및 남획 등으로 인하여 바다에 서식하는 많은 유용생물자원이 고갈되고 있어 버려진 자원을 이용하려는 추세에 있으나, 최근, 종묘생산이 불가능했던 유용생물(예를 들면, 키조개)과 같이 개불자원도 고갈될 가능성이 매우 높다. 또한 해양생태계에서 인간이 쉽게 이용하고 생산성이 매우 높은 조간대의 저질은 임해공단의 배출수, 양식장 노후화 및 환경오염 등에 의하여 호기성인 저질이 혐기성인 환경으로 전이되는 경우가 많다 (Pritchard and White, 1981; Eaton and Arp, 1990; Choi, 1997; Choi et al., 1998). 저질이 혐기성상태로 전이되면 해양생태계는 파괴되어 많은 생물이 살 수 없게 된다. 따라서 최근에는 양식장의 생산능을 높이기 위하여 국가적인 차원에서 저질을 경운, 객토 및 정화사업 등을 시행한다.

그러나 그러한 사업의 단점으로는 인위적 (강제적)으로 저질을 개선하기 때문에 많은 비용이 들고, 생태계 파괴를 촉진하는 경우도 있다. 특히, 개불은 저질에 잠입할 때 “U”자형의 관을 파기 때문에 개불에 의한 저질개선 효과도 있다. 그러므로 개불을 이용한 저질개선은 비용이 적게 들고 친환경적인 저질개선이라고 볼 수 있다. 그러나 국내에서 개불 종묘생산에 관한 연구로는 Choi et al. (1998)에 의하여 초기 배 발생에 미치는 온도의 영향이 있을 뿐 거의 없다. 한편, 개불류는 조간대에서 수심 100m 정도까지 분포하여 내륙에서 배출되는 담수와 유기물, 강우 등의 자연적 현상으로 인한 pH와 염분의 변화가 많은 조간대 지역에 주로 서식하고 있다. pH와 염분은 생물에게 직접적, 간접적 영향을 주며, 특히 생물의 서식장소와 난 발생을 좌우하는 매우 중요한 요소이다(Stephen, 1972; Strathmann, 1987). 개불, *Urechis unicinctus*의 서식형태를 보면 군집을 이루는 것이 특징으로 이것은 개불이 서식하는 장소가 한정되어있다는 것을 나타낸다 (Suer and Phillips, 1983; Arp et al., 1992). 따라서 pH와 염분은 개불의 서식장소에 대한 기준이 될 수 있으며, 또한 인공종묘생산의 기초적인 지식으로서 이용할 수 있다. pH와 염분이 난발생과 서식지의 결정에 미치는 영향에 대해서는 양식되고 있는 어류와 패류 외에도 다양하게 연구되어있다. 이에 대한 연구로는 참가자미, *Limanda herzensteini*의 난발생



에 미치는 수온과 염분의 영향 (Lee et al., 1997), 수온과 염분이 로티퍼, *Brachionus*의 번식에 미치는 영향 (Hwang and Pyen, 1995), 갯지렁이류의 생태 및 인공산란부화에 미치는 영향 (Yoshida, 1984; Sato and Tsuchiya, 1987; Kang, 1992) 등이 있다. 그리고 Stephano and Gould (1997)은 *Urechis caupo*의 처녀생식을 pH를 달리하여 유도하였으며, Jaccarini et al. (1983)은 개불이 서식하는 물리화학적 환경 특성을 이용하여 *Bonellia viridis* 유생의 성을 유도하였다. 또한, Akesson (1977)은 발전소의 온배수로 인한 온도변화가 *U. caupo*의 배 발생에 미치는 영향을 보고하였다.

그러나 일반적으로 무척추동물의 배 발생은 수온, 염분 등의 환경요인과 어미의 성숙도에 따라 그 속도 및 소요되는 시간이 좌우된다고 할 수 있다. 특히, 개불의 경우 수온 뿐 만 아니라 염분, pH는 난 발생을 좌우하는 매우 중요한 요인임에도 불구하고, 여러 가지 염분, pH 조건하에서의 배 발생과정을 밝힌 연구는 거의 없다. 그러므로 개불을 이용한 저질개선은 비용이 적게 들고 친환경적인 저질개선이라고 볼 수 있다. 그러나 국내에서 개불 종묘생산에 관한 연구로는 Choi et al. (1998, 1999)에 의하여 초기 배 발생에 미치는 온도, 염분, pH의 영향이 있을 뿐 거의 없다.

따라서 본 연구에서는 위와 같은 문제점(신품종 개발 및 저질개선 등)을 해결하기 위하여 남해안 특산종인 개불 유생의 착저유도와 대량 종묘생산 기술을 개발코자 하였으며, 또한 완전양식을 위하여 인공종묘생산된 치어를 이용하여 양식체계를 확립하고, 개불 양식에 대한 기초지식을 확립하는 계기로 인공수정에 의한 개불의 알을 수정시키고 배 발생의 적정 pH와 염분을 밝히며, 종묘 생산 기술을 확립하는데 이용할 수 있는 암·수 생식세포 형성과정을 조직학적으로 조사하여 생식소 변화양상을 파악하고 산란시기를 명확히 밝히고자 하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재 국내의 기술개발 현황은 개불의 체성분 연구를 제외한 본 연구 외에는 개불에 대한 연구가 진행된 것이 없으며, 특히, 외국의 경우 개불류에 대한 연구가 진행중이나 인공종묘생산 및 양식분야에 대한 연구는 전무한 실정이다. 개불의 종묘생산을 연구하기 위해 본 과제에서는 기초적 연구에서 종묘생산시 필요한 조건에 따른 개불의 특성을 파악하기 위해 연구하였으며 생물의 특성에 따른 계획생산을 위한 연구까지 더불어 시행하였다.

따라서, 본 연구는 남해안 특산종이라는 이점과 더불어 세계최초로 개불류의 양식에 시도한바 기술의 축적과 앞으로의 연구에 따라 기술이전 및 수출에 도움이 될 것으로 기대되어진다.

## 제 3 장 서식어장의 환경특성

자연 서식지의 저질 및 수질의 물리화학적 특성을 파악하기 위하여 조금과 사리 때의 유향과 유속을 조사하고 매월 환경 특성을 조사하여 개불의 서식특성을 파악하며, 서식지 어장의 먹이 생물학적 특성을 파악하기 위하여 phytoplankton의 종류와 천이 양상 등을 조사함으로써 개불의 먹이생물을 조사하여 개불양식에 대한 기초조사를 실시하였다.

### 제 1 절 수질 및 저질 성상

#### 1. 재료 및 방법

조사해역은 개불을 상업적인 목적으로 채취하고 있는 전남 여수시 돌산읍 개도리 주변 해역으로 가막만 입구에 위치하고 있으며, 안쪽으로는 어류양식과 굴양식의 생산성이 매우 높은 해역이다(Fig. 1). 이 어장은 잠수기수산업협동조합에서 잠수부들에 의해 개불을 채취하고 있는 지역으로서 주변에 간석지가 넓게 형성되어 있다. 수심은 10m 전후이며, 유속은 23.6~32.4 cm/sec로 다소 빠르다. 특히, 일부 지역에서는 와류가 형성되기도 한다.

개불 서식지 주변 해역의 수질 및 저질 환경을 알아보기 위하여 4개 지점을 선정하여 수온, 염분농도, 용존산소, 화학적산소요구량(COD) 등을 조사하였다. 수온( $^{\circ}\text{C}$ ), 염분( $\text{‰}$ ), 용존산소( $\text{mg}/\ell$ )는 수질측정기(Hydrolab, Data Sonde III + Scout II)로 현장 측정하였고, COD( $\text{mg}/\ell$ )는 알카리성 과망간산 칼륨으로 측정하였다. 용존무기질소는(DIN,  $\mu\text{g-at}/\ell$ )는 Indophenol법으로 비색 정량한 암모니아성질소, Sulfanilamide-NED법으로 비색정량한 아질산성질소, Cadmium reduction법으로 비색정량한 질산성질소의 합으로 계산하였고, 인산성인( $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ,  $\mu\text{g-at}/\ell$ )은 Ascorbic acid법으로 비색정량하였다.

그리고 저질환경을 알아보기 위하여 4개정점을 선정하여 저질의 입도조성을 각

각 조사하였다. 즉 저질에 30% 과산화수소와 염산을 넣어 유기물질 등을 제거한 후, 105~110℃에서 24시간 건조시켜 평량한 다음, 습식체질을 통하여 입도별 백분율을 구하였고, 강열감량은 건조시료를 회화로에서 550℃로 태워 감량을 무게당으로 환산하였다.

## 2. 연구결과 및 고찰

조사기간동안 개불 서식지의 저질입도 조성은 Table 1에서 보는 바와 같다. station 1은 자갈(coarse sand)이 93.1% 이상으로 나타났으며, 모래(sand)와 니질(silt and clay)의 함량은 4%로 낮게 나타나 표층 퇴적물은 사력질로 분류되었다. Station 2와 3의 표층 퇴적물은 니질 함량이 각각 45.0%, 47.1%, 자갈의 함량이 36.1%, 35.8%를 차지하여 사니질로 분류되었다. 그리고 정점 4의 표층 퇴적물은 니질 함량이 84.5%이었고, 자갈 함량이 8.2%를 차지하여 니사질로 분류되었다. 특히 개불이 서식하고 있는 지역의 경우 저질 함량 중 니질과 사니질이 다량 함유되어 있었으며, 사질과 자갈이 섞인 지역의 경우 개불이 잘 서식하지 않은 것으로 나타났다.

또한, 조사기간동안 수온, 염분, 용존산소(DO), 화학적 산소요구량(COD), 용존 무기질소(DIN), 인산성인( $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ )의 변화는 Table 2에서 보는 바와 같다. 각 정점 별로 월별 조사를 실시하였으나, 연중 변화의 추세는 4개의 정점이 모두 비슷한 경향을 나타내었다.

따라서, 일반 수질 성상이 각 station별로 비슷한 경향을 나타낸 것으로 미루어 저질이 개불의 서식환경 중 큰 영향을 미치는 요인으로 생각되며, 특히, 개불의 서식지역을 조사한 결과 사질과 니질이 포함된 사니질에서 서식하는 것으로 사료되며, 니질 또는 자갈만으로 구성된 경우 개불이 서식하기 어려운 곳으로 판단된다.

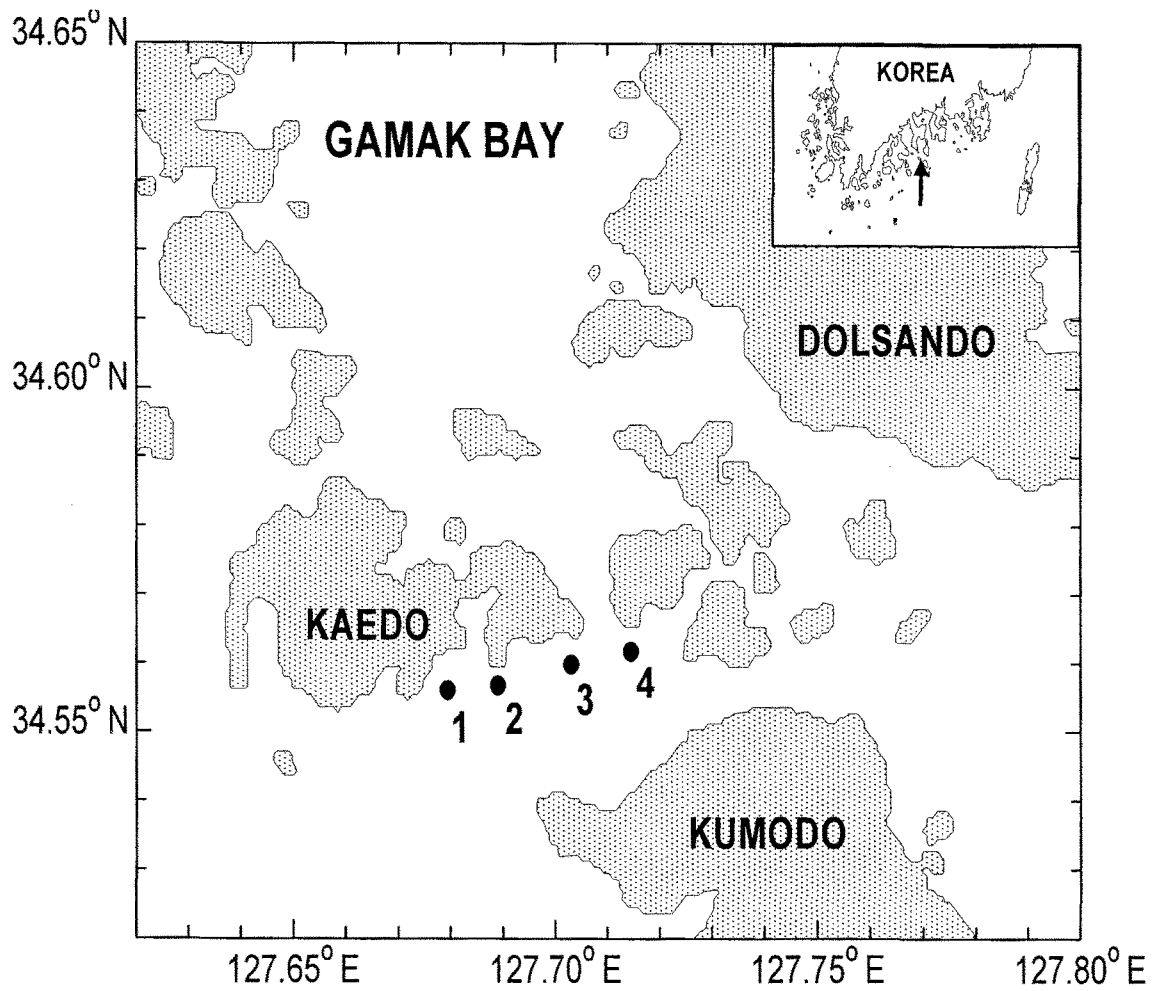


Fig. 1. Map showing the sampling station.

Table 1. Sedimentary composition of the sampling sites

Station	Sediment			Sediment type
	Coarse sand ( $> \phi 2.000\text{mm}$ )	Sand ( $\phi 2.000 \sim 0.062\text{mm}$ )	Silt and clay ( $< \phi 0.062\text{mm}$ )	
1	93.1	3.0	3.9	Coarse sand
2	36.1	18.9	45.0	Sandy silt
3	35.8	17.1	47.1	Sandy silt
4	8.2	7.6	84.2	Silty sand

Table 2. Monthly change temperature, salinity, DO, COD, DIN and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P in sampling area

Date (Month)	Station	Temp. (°C)	Salinity (‰)	DO (mg/ℓ)	COD (mg/ℓ)	DIN (μg-at/ℓ)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P (μg-at/ℓ)
12	1	11.9	31.5	7.8	0.71	5.11	0.42
	2	12.2	31.2	8.6	0.67	5.21	0.45
	3	12.4	31.2	8.5	0.70	5.14	0.43
	4	13.1	31.5	8.7	0.71	4.92	0.41
1	1	9.4	32.1	7.5	0.48	4.73	0.39
	2	9.7	32.0	7.3	0.52	4.85	0.38
	3	9.5	32.4	7.9	0.53	4.21	0.36
	4	9.6	32.3	8.1	0.55	4.81	0.31
2	1	8.0	32.8	7.1	0.51	3.23	0.35
	2	8.3	32.4	7.4	0.49	3.22	0.39
	3	8.1	32.5	7.6	0.53	3.61	0.37
	4	8.7	32.4	8.1	0.50	3.96	0.32
3	1	12.8	33.1	7.3	0.21	2.97	0.39
	2	12.9	32.6	8.3	0.20	3.13	0.38
	3	12.5	32.9	8.5	0.19	3.26	0.40
	4	13.0	32.8	8.4	0.23	3.03	0.39
4	1	14.6	32.6	7.1	0.15	3.11	0.40
	2	14.7	32.5	7.2	0.12	3.04	0.41
	3	14.6	32.4	7.0	0.17	2.92	0.39
	4	14.9	32.7	7.8	0.14	2.75	0.42
5	1	17.7	31.2	7.7	0.21	3.43	0.35
	2	17.5	31.3	7.9	0.23	3.58	0.32
	3	17.4	31.2	7.8	0.21	3.18	0.31
	4	17.4	31.0	7.9	0.26	3.61	0.35
6	1	18.6	31.4	8.1	0.18	3.12	0.23
	2	18.3	31.6	7.9	0.20	3.21	0.35
	3	18.4	31.5	7.9	0.13	3.23	0.36
	4	18.4	31.7	8.0	0.14	3.25	0.39

Table 2. Continued

Date (Month)	Station	Temp. (°C)	Salinity (‰)	DO (mg/ℓ)	COD (mg/ℓ)	DIN (μg-at/ℓ)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P (μg-at/ℓ)
7	1	20.8	31.9	7.4	0.15	3.25	0.19
	2	21.3	31.5	7.3	0.13	3.19	0.29
	3	21.2	31.5	7.5	0.14	3.19	0.21
	4	21.1	31.6	7.5	0.16	3.21	0.23
8	1	23.1	32.1	7.9	0.14	2.12	0.21
	2	23.7	32.2	7.9	0.11	2.16	0.23
	3	23.9	32.1	8.3	0.15	2.31	0.28
	4	23.8	32.1	8.1	0.16	2.21	0.21
9	1	23.1	32.3	8.2	0.12	3.22	0.33
	2	23.0	31.8	7.8	0.15	3.12	0.25
	3	23.4	31.6	7.9	0.16	3.19	0.27
	4	23.5	31.6	7.9	0.14	3.01	0.29
10	1	22.1	31.2	8.1	0.08	3.98	0.32
	2	21.7	32.1	8.2	0.10	3.86	0.31
	3	21.9	32.2	8.0	0.09	3.78	0.33
	4	21.9	32.3	8.1	0.11	3.88	0.31
11	1	17.2	31.3	7.9	0.09	3.99	0.37
	2	16.9	31.6	8.2	0.21	3.97	0.35
	3	17.1	31.4	8.1	0.08	4.12	0.39
	4	17.1	31.5	8.4	0.13	3.95	0.28
Mean		16.72	31.93	7.88	0.26	3.54	0.33



## 제 2 절 먹이생물조사

### 1. 재료 및 방법

개불 서식지 주변해역에서 4개 정점을 선정하여 2000년 12월부터 2001년 10월 까지 월별로 총 11회에 걸쳐 기초생산력을 조사하였다(Fig. 1). 식물성플랑크톤 채집은 정량분석을 위해 각 정점에서 채수기로 채수하여 폴리에틸렌 병에 옮겼고, 정성분석을 위해서는 구경 30cm, 망목 60 $\mu$ m의 플랑크톤 네트를 이용하여 수직 예인하였다. 채집한 시료는 선상에서 Lugol 용액으로 고정하였다.

고정한 시료는 실험실에서 24시간 이상 정치시킨 후 상등액을 미세 사이폰으로 제거한 다음 Sedgwick-Rafter slide를 사용하여 고배율 현미경하에서 동정 및 계수하였다.

### 2. 연구결과 및 고찰

개불서식지에서 식물성플랑크톤의 월별 현존량의 변화를 Table 3에 나타냈으며, 조사시기중 현존량의 10% 이상 우점율을 나타낸 주요 우점종의 출현비율은 Table 4에 나타내었다. 조사기간중 식물성플랑크톤의 현존량은 4월에 가장 적은 101.25 cells/ml 였고, 2월에 가장 많은 1,194.50 cells/ml 였다. 그리고 대체적으로 2~3월과 7~8월에 400 cells/ml 이상의 높은 현존량을 나타내었다. 이러한 현존량의 변화는 같은 시기에 인근 해역인 득량만과 비교할 때 최저 3 cells/ml 에서 최고 5,327 cells/ml (이와 허, 1983)의 현존량을 보여 본 조사해역이 비교적 낮게 나타났다. 그러나 여자만과 비교할 때 90.3 cells/ml에서 최고 1,272.0 cells/ml(한 등, 1998)의 현존량을 보여 본 조사해역과 비슷하게 출현하였다. 특히, 개불의 발생시기(산란시기 4월과 11월)를 감안한다면 3~4월에 출현한 식물성플랑크톤이 개불 부유유생의 먹이원으로서 사용되어졌을 것으로 사료된다.

한편, 조사기간중 10%이상의 우점율을 나타낸 종은 다음과 같다 :

*Skeletonema costatum*, *Paralia sulcata*, *Pseudonitzschia seriata*, *Chaetoceros decipiens*, *C. debilis*, *C. affinis*, *C. curvisetus*, *Eucampia zodiacus*, *Ceratium furca*, *C. fusus*, *Asterionella galacialis* 였다. 조사기간중 *Skeletonema costatum*은 12월, 5월, 8월에 가장 우점하는 종이였으며, 특히 8월에 52.6%의 우점율을 나타내었다. 그리고 *Eucampia zodiacus*는 1~4월에 가장 우점하는 종이였으며, 특히 2~3월에 65%이상의 우점율을 나타내었고 그 이후 5월에는 출현하지 않았다. *Chaetoceros decipiens*는 12월과 7~8월에 10%의 우점율을 보였고, 그 이후에는 2%이하의 낮은 점유율을 나타내었다. 그러나 *C. debilis*, *C. curuis*, *C. affinis*는 각각 1월, 5~8월, 10에 10%이상의 점유율을 나타내었다.

먹이량 변화와 개불발생시기를 고려하여 개불유생의 먹이를 추정한다면, 개불의 주 산란시기(4월과 11월)에 출현하였던 식물성플랑크톤이 개불유생의 먹이원으로 사용 되어졌을 것으로 추정된다. 즉, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros debilis*, *C. curvisetur*, *Eucampia zodiacus*, *Asterionella galacialis* 등이 개불유생의 주 먹이원으로 사용되어졌을 것으로 추정된다.

Table 3. Monthly phytoplankton amount in sampling stations (Cells/ml)

Date(Month)	Stations				Mean
	1	2	3	4	
Dec.	209	196	191	216	203.00
Jan.	195	189	179	198	190.25
Fed.	1,142	1,243	1,237	1,156	1,194.50
Mar.	483	476	468	491	479.50
Apr.	106	98	102	99	101.25
May	128	113	118	121	120.00
June	309	332	341	298	320.00
July	415	426	429	397	416.75
Aug.	923	914	971	1,013	954.75
Sep.	134	125	116	123	124.50
Oct.	226	217	218	226	221.75
Nov.	201	150	209	199	189.75
Mean	372.58	373.25	381.58	378.08	393.30

Table 4. Monthly change dominant species in sampling stations (%)

Dominant species	Months											
	Dec.	Jan.	Fed.	Mar.	Apr.	May	June	July	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.
<i>Skeletonema costatum</i>	23.6	1.6	0.2	0.2	12.9	47.5	9.8	5.8	52.6	23.8	2.1	19.3
<i>Paralia sulcata</i>	12.8	1.1	-	0.3	0.3	12.9	0.9	2.4	0.9	3.6	2.1	3.2
<i>pseudonitzschia seriata</i>	16.5	4.9	0.3	0.5	3.5	6.8	5.3	3.7	1.1	11.1	12.9	14.1
<i>Chaetoceros decipiens</i>	10.1	-	0.3	1.6	-	0.1	-	11.8	15.2	-	1.1	-
<i>C. debilis</i>	6.5	16.7	7.3	6.8	0.1	0.6	4.6	15.9	27.8	4.7	19.5	14.1
<i>C. affinis</i>	-	2.8	0.9	2.4	0.4	10.6	3.1	1.3	1.1	0.7	3.1	2.2
<i>C. curvisetus</i>	-	10.3	1.8	3.1	5.8	3.5	24.5	0.1	-	-	29.9	16.4
<i>Eucampia zodiacus</i>	-	17.9	84.9	67.1	39.8	-	0.1	-	-	-	-	2.7
<i>Ceratium furca</i>	-	-	0.1	-	-	0.1	1.9	21.1	0.6	-	-	-
<i>C. fusus</i>	0.1	-	-	-	-	0.1	0.6	15.2	-	-	-	-
<i>Asterionella galacialis</i>	-	6.9	2.1	0.3	11.6	2.4	1.9	-	-	-	0.9	9.3
Total	69.6	62.2	97.9	82.3	74.4	84.6	52.7	77.3	99.3	43.9	71.6	81.3

## 제 3 절 저서생물 및 공생생물 조사

### 1. 재료 및 방법

개불 서식지 주변해역에서 저서생물과 개불의 출현양상을 계절별로 2000년 12월부터 2001년 11월까지 매월 조사하였다. 각각의 조사 정점에서 SCUBA에 의해 저질과 함께 채취한 다음, 선상에서 10mm 체로 걸러 중성포르말린으로 고정한 후 실험실로 운반하였다. 채집된 저서생물은 분류한 다음  $m^2$  당 개체수를 측정하였다.

### 2. 연구결과 및 고찰

저서생물의 월별 출현양상을 Table 5에 나타낸 바와 같이 키조개(*Atrina pectinata*), 참굴(*Crassostrea gigas*), 새조개(*Fulvia mutica*), 개조개(*Saxidomus purpuratus*), 살조개(*Protothaca jedoensis*), 바지락(*Tapes philippinarum*), 개불(*Urechis uncinatus*), 환형동물(*Polychaeta*) 등 모두 7개 분류군이 출현하였다.

조사기간중 저서동물은 5월에 가장 많이 출현하였고, 6~7월에 가장 적게 출현하였다. 이중 개불과 환형동물은 매월 출현하였으며, 특히 개불 (*Urechis uncinatus*)은 늦가을부터 늦봄(3월)까지 가장 많이 출현하였고, 여름철(8월)에 가장 적게 출현하였다. 한편, 조사기간중 환형동물은 12월과 5월에 가장 높은 비율로 출현하였고, 4~7월(5월 제외)에 가장 낮은 우점율을 나타내었다. 그리고 개조개는 조사기간중 1월과 6월을 제외하고 매월 출현하였다. 이와 같이 조사해역에서의 개불 자원량은  $m^2$ 당 4.91개체로서 다른 유용 저서생물에 비해 자원량이 훨씬 많은 것으로 판단되었다.

Table 5. Monthly abundance of benthic macroinvertebrates in sampling area  
(unit : ind./m<sup>2</sup>)

Species	Month											
	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	June	July	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.
<i>Atrina pectinata</i>	-	1	-	-	1	1	-	-	1	-	-	-
<i>Crassostrea gigas</i>	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1
<i>Fulvia mutica</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Saxidomus purpuratus</i>	1	-	1	3	1	2	-	1	1	1	1	-
<i>Protothaca jedoensis</i>	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Tapes philippinarum</i>	-	-	-	1	-	-	1	-	1	1	-	-
<i>Urechis uncinatus</i>	4	7	9	12	8	4	2	2	1	2	9	10
<i>Polychaeta</i>	14	5	2	2	1	18	1	1	3	2	5	4
<i>Total</i>	19	15	13	20	11	25	4	4	8	7	17	16

## 제 4절 개불 사육시 환경변화

개불 사육시 유입되는 유기물에 의한 환경변화에 대하여 개불의 적응도와 개불의 서식 특성 중 저질에 U자형 관을 파고 잠입하는 특성이 환경개선효과에 영향을 미치는 정도 및 타생물과의 복합양식에서의 효과를 파악하기 위하여 일반적으로 양식되어지는 넙치를 이용하여 실험하였다.

### 1. 재료 및 방법

#### 1.1. 실험어

가두리에서 사육한 넙치는 2001년 11월에 부화하여 사육한 것으로 돌산읍 군내리에 위치한 A종묘 배양장에서 운반하여 200ℓ 수조에서 2주간 순치 한 후 전장 10cm 이상인 것을 선별하여 사용하였다.

또한, 실험에 사용된 개불은 2002년 3월 4일 여수시에 위치한 잠수기수협에서 구입하여 여수시 돌산읍에 위치한 여수대학교 수산증양식연구센터에 수조를 설치하여 입식 후 60일 동안 순치 한 것을 사용하였다.

#### 1.2. 사육수조

실험에 사용된 수조는 200ℓ FRP 원형 수조이며 수조내부는 밀봉하여 누수되지 않도록 하였고 수산증양식 센터 앞의 간석지에 설치된 굴 단련장의 저질을 채취해 높이 20cm로 각각의 실험수조에 채웠다. 그리고 넙치를 수용하기 위해 22절망으로 30×30×50(cm)크기의 가두리를 제작하여 저질에서 약15cm 띄어서 설치하였다. 각 수조 상부에 동일한 수량이 되는 곳을 표지 하여 자연해수를 주수 함으로서 사육수를 채웠고 충분한 포기를 시켜 주었다. 설치된 실험 구는 반복 구를 설정하였으며 사육수조에 투입된 넙치와 개불 개체 수는 Table 6와 같다.

### 1.3. 실험 방법

실험기간은 10주로 설정하였으며 실험기간 중 지수상태를 유지하였고 Sample 을 위한 채수시 보충수를 채워 주었다. 수온변화는 실내기온에 의해서만 변화하였으며 7일 간격으로 저질과 사육수를 채수하였다. 이때 용존산소와 수온을 DO meter(YSI #52)를 이용해 측정하였다. 저질은 200g이상을 수직으로 채취하여 밀봉하였고 사육수는 채수병에 80%정도를 채수 하여 -70℃상태로 냉동 보관하였다.

실험어에 공급한 사료는 S사에서 생산중인 부상사료를 1일 2회 오전7시와 오후 5시에 급이 하였다. 실험에 사용된 넙치와 개불은 투입 전에 체중과 전장을 측정하였고 실험 종료시 체중과 전장을 측정하였다. 냉동 보관된 시료는 상법에 따라 수온, 염분, pH, DO, BCOD, AVS,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , 등을 분석하였다.

또한, 각각의 실험 값을 얻기 위해 사용된 공식은 다음과 같다.

- \* 증중량: 실험종료시 무게 - 실험시작시 무게
- \* 성장률(%):  $\frac{\text{최종중량} - \text{최초중량}}{\text{최초 중량}} \times 100$
- \* 일간성장률  $\frac{\text{최초중량} + \text{최종중량}}{2} \times \text{사육일수} / \text{증중량} \times 100$ ;
- \* 사료계수:  $\frac{\text{총 사료공급량(섭취량, 건 중량)}}{\text{증중량}}$
- \* 사료 효율(%):  $\frac{\text{증중량}}{\text{총 사료공급량(섭취량, 건 중량)}} \times 100$
- \* 생존률(%):  $\frac{\text{실험시작시 개체 수}}{\text{실험종료시 개체 수}} \times 100$



Table 6. Number of *Urechis unicinctus* and *Paralichthys olivaceus* in each experimental group

Parameter	Experimental group				
	A	B	C	D	E
No. <i>Paralichthys olivaceus</i>	5	5	5	5	5
No. <i>Urechis unicinctus</i>	0	1	3	6	9

## 2. 연구결과 및 고찰

### 2.1. 넙치 폐사 개체 수.

개불이 투입되어지지 않은 대조구에서는 폐사가 가장 많이 나타난 반면, 개불 개체수가 가장 많이 투입된 E실험구에서는 실험종료까지 폐사가 일어나지 않았다 (Fig. 2). 또한, 개불 개체수가 적었던 B실험구와 C실험구는 사육시 산발적으로 폐사가 일어난 반면 B, C실험구에 비하여 D실험구에서는 안정적으로 성장하였다. 결과적으로 개불이 투입되어진 실험구에서는 폐사가 점진적 또는 개불이 투입되어진 개체 수에 비례하여 폐사가 감소하였고, 따라서 개불의 유무가 실험어의 생존율을 높이는 효과가 있다고 사료되어진다.

### 2.2. 넙치 증중량 및 성장률

실험을 위해 투입한 넙치들의 초기 무게는 비슷하였으나 실험 후 측정값에서는 확연한 차이를 나타내었다(Fig. 3). 개불 투입개체가 많았던 D실험구와 E실험구에서 높게 나타났으며 그중 D실험구에서 가장 높게 나타났으며 A실험구에서 가장 낮게 나타났다. B실험구와 C실험구는 A실험구에 비해 높게 나타났지만 각각의 차이는 많지 않았다. 전체적으로 개불이 투입된 실험구에서 성장이 높게 나타났으며 개불 개체수가 가장 많은 E실험구에서 가장 높게 나타날 것으로 생각되었지만 D실험구에 비해 낮게 나타났다.

실험구별 성장률에서도 D실험구가 가장 높게 나타났으며 A실험구에서 가장 낮게 나타났다. 대조구에 비해 B실험구와 C실험구의 성장률은 큰 차이가 없었다. B실험구의 성장률이 C실험구에 비해 높은 것은 C실험구의 폐사량이 더 많았기 때문으로 생각되어지며, D실험구와 E실험구는 실험구별로 비슷한 성장을 보였으나 전체적인 성장률은 D실험구에서 높게 나타났다.

일간성장률도 D실험구에서 가장 높게 나타났으나 E실험구와 큰 차이는 없었으며 B실험구와 C실험구 간에 역시 큰 차이는 없었으나 B실험구에서 좀더 높게 나타

났다. 그러나 전체적으로 A실험구에 비해 높은 성장률을 보였다.

실험중 어류가 충분히 먹이를 먹은 상태에서 사료공급을 중지하고 공급전의 사료량으로부터 남은 사료량을 뺀 무게를 사료공급량으로 하였다. 사료효율은 Morizane(1984)의 방법에 의해 증중량 기준으로 구하였다. 사료효율은 E실험구에서 가장 높게 나타났으며 A실험구에서 가장 낮게 나타났다. E실험구에 비해 상대적으로 폐사개체수가 많았던 실험구들에서 사료효율이 낮게 나타난 것은 새로이 투입된 개체들의 먹이불임 기간에 상대적으로 섭취했던 먹이량이 적었기 때문이라고 생각되며 증중량과 일간성장률이 E실험구보다 높았던 D실험구 역시 E실험구에 비해 사료효율이 낮게 나타난 것으로 나타내었다.

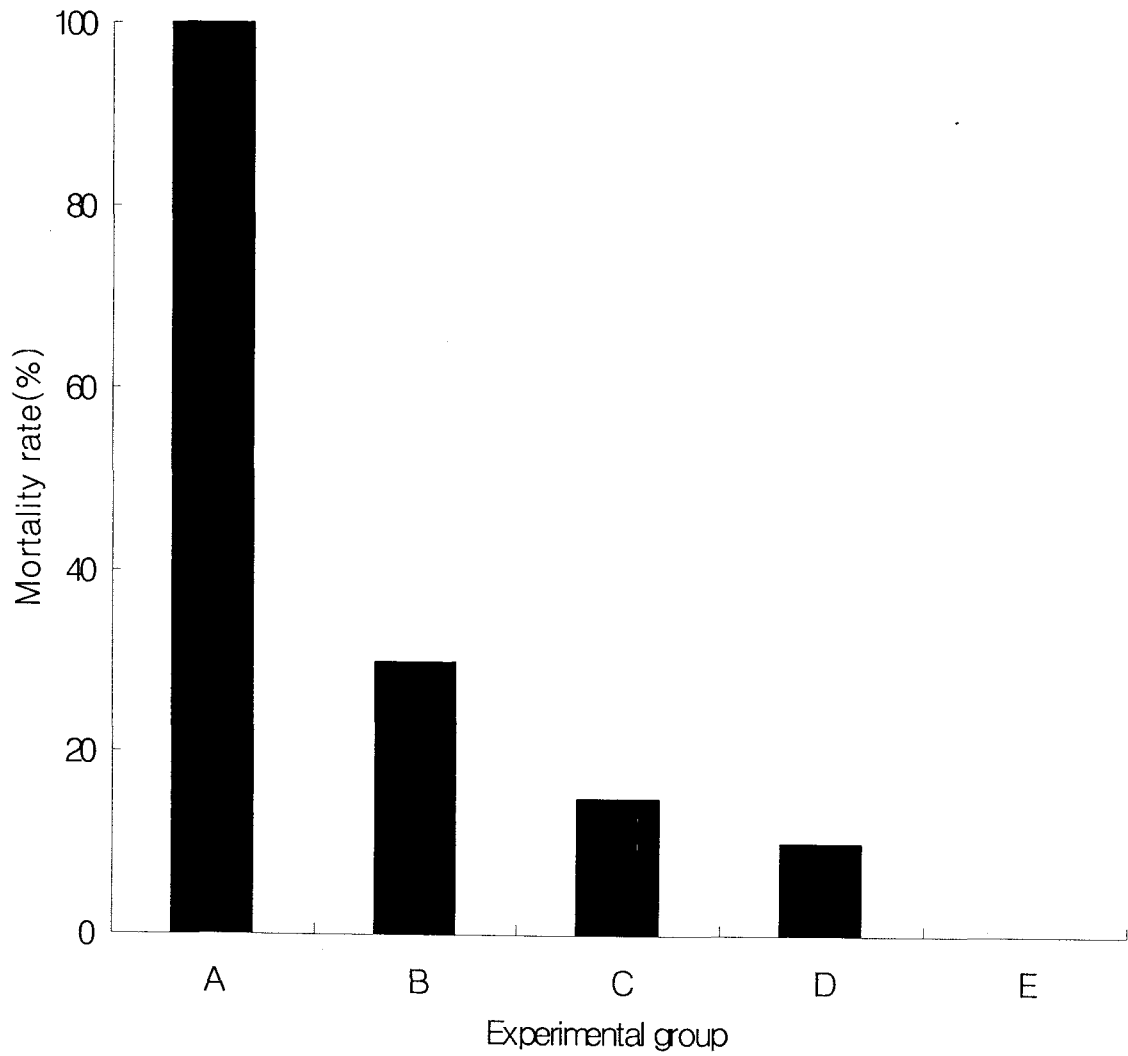


Fig. 2. Mortality rate of *Paralichthys olivaceus* in each experimental groups.

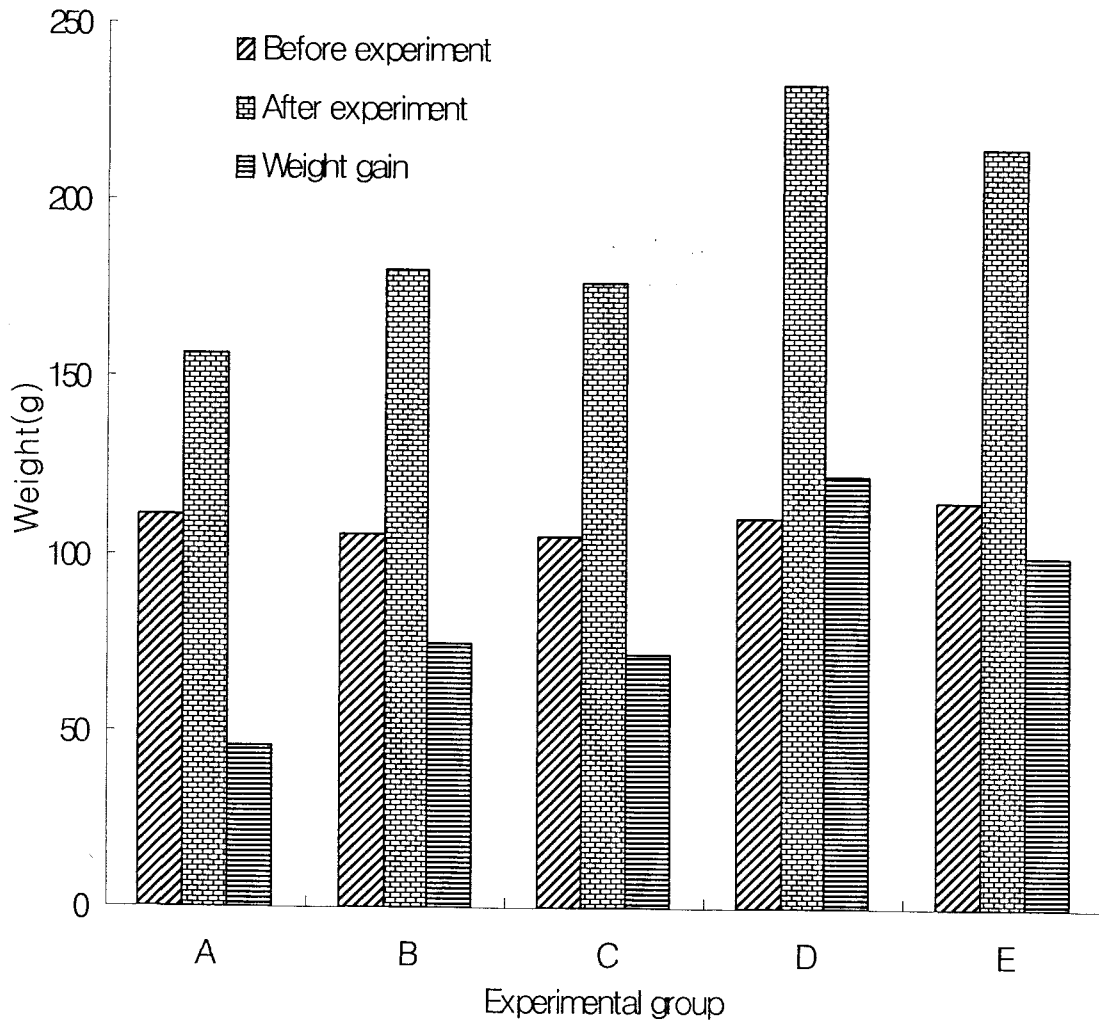


Fig. 3. Weight gain of *Paralichthys olivaceus* in each experimental groups.

### 2.3. 개불의 생산율 및 체중, 체장변화

개불의 무게 변화는 실험개시시 평균무게와 실험종료시 평균무게를 구하여 비교하였다(Fig. 4). C실험구와 D실험구에서 성장이 높았으나 B실험구에서 높게 나타난 이유는 개체수가 적었기 때문에 섭취할 유기물이 많았기 때문이라고 사료되며 이와 반대로 E실험구에서는 개체수가 많았기 때문에 섭취할 유기물이 상대적으로 적었기 때문으로 생각된다. 그러나 개체수가 상대적으로 적었던 C, B 실험구에서는 D실험구에 비해 성장이 낮았으나 E실험구보다는 높게 나타났다.

개불의 체장변화는 실험 개시시 평균체장과 실험 종료시 평균체장을 구하여 비교하였다(Fig. 5). E실험구에서 약간의 감소가 낮게 나타났으나 다른 실험구에서는 전체적으로 성장한 것으로 나타났다.

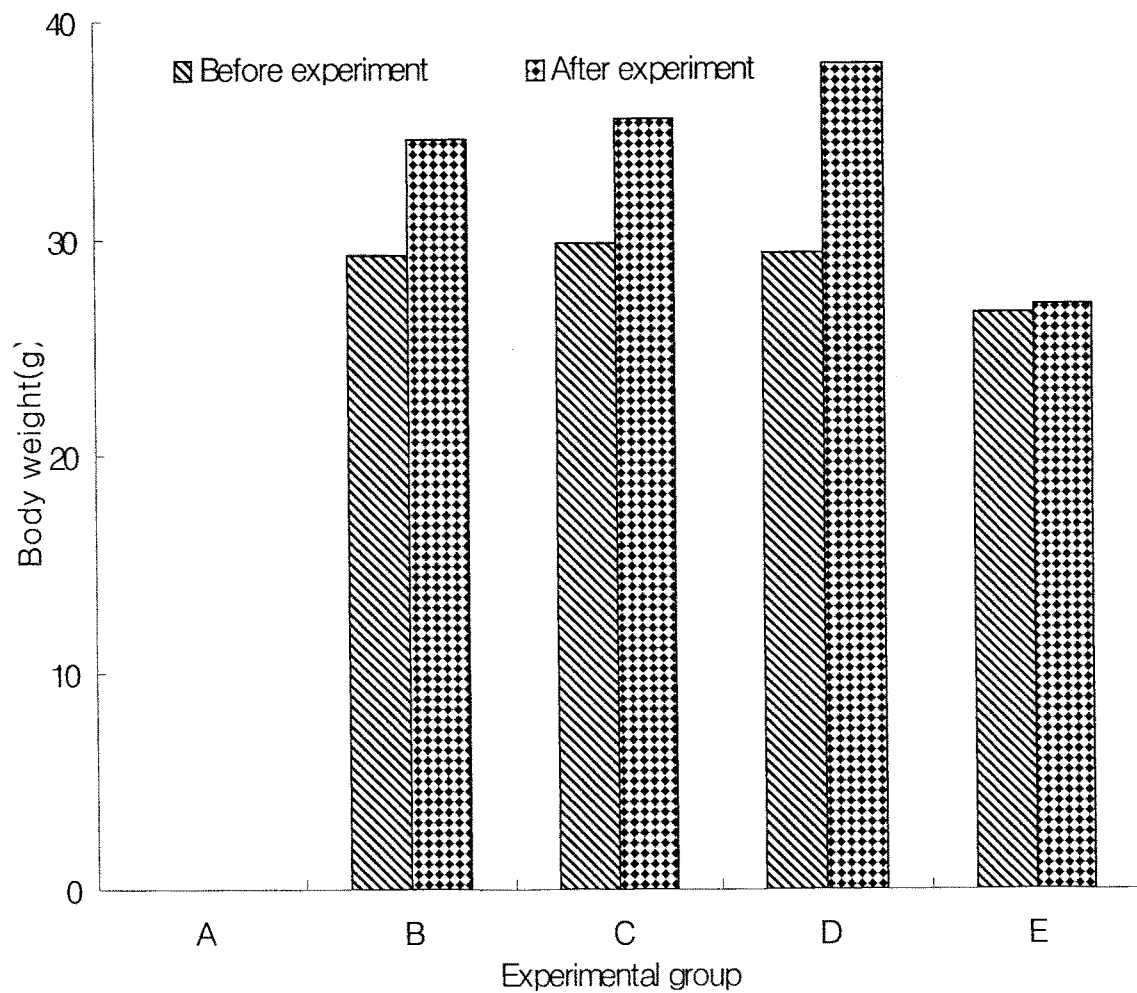


Fig. 4. Change of *Urechis uncinatus*'s body weight in each experimental group.

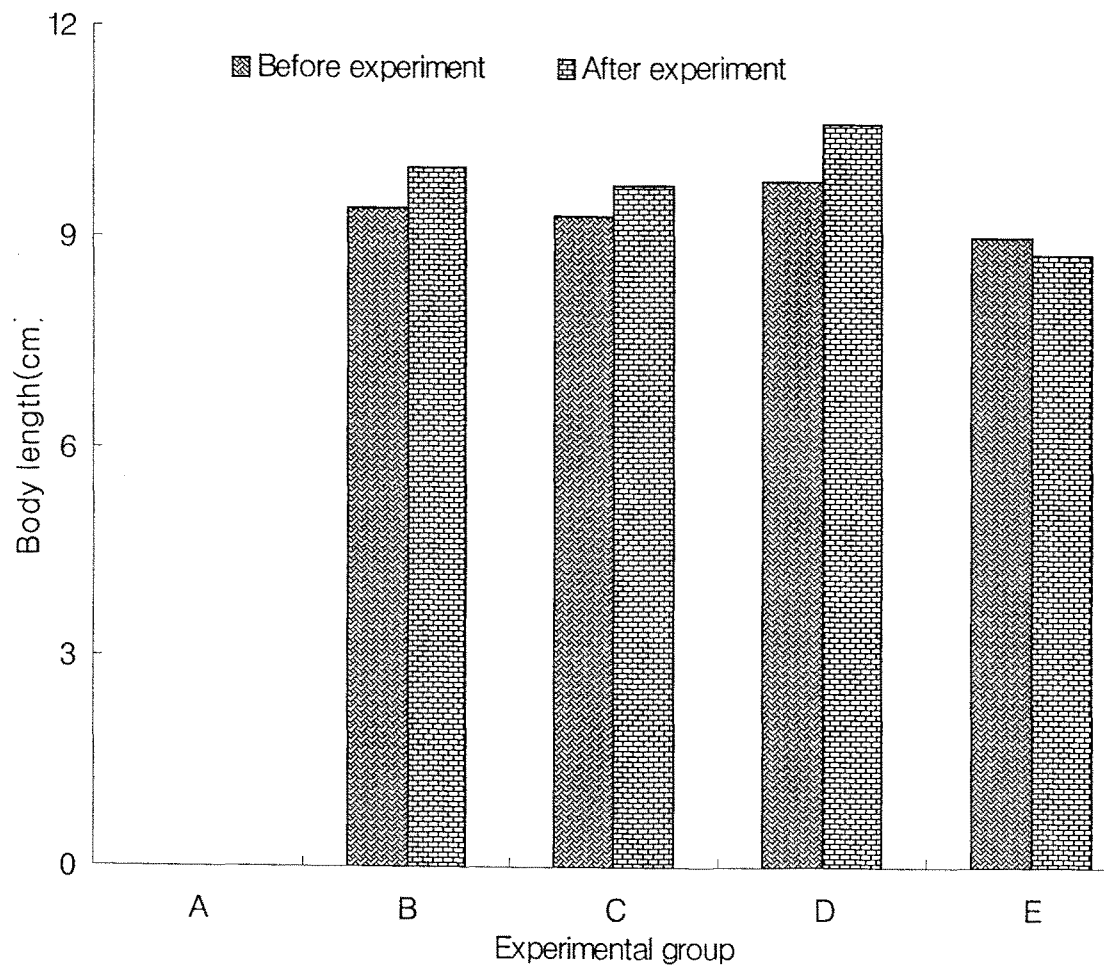


Fig. 5. Change of *Urechis unicinctus*'s body length in each experimental group



## 2. 4. 사육 환경(수질)

양식장에서 사육수의 수질 환경은 양식어류의 성장과 질병 및 생존에 절대적인 영향을 미치고 있다. 여러 가지요인이 복합적으로 수질 환경을 구성하고 있으며 특히 암모니아는 양식어류에 치명적인 영향을 미칠수 있는 요인이다. 암모니아가 허용한계를 넘어 고농도로 수중에 존재할 경우 양식어류는 성장률이 감소하게 되고 치사에 이르기도 한다. pH는 총암모니아를 (TA-N)를 이루는 이두가지 형태의 암모니아 비율에 관계하며 pH가 알카리역으로 상승하게 되면 비이온화된 암모니아의 양이 증가하여 독성이 강하게 나타난다. 수온의 상승또한 비이온화된 암모니아의 비율을 증가시키는 작용을 한다고 보고되어있다. 따라서, 폐쇄적인 수계환경에서는 수온과 pH 상승에 따른 암모니아 독성의 증가는 매우 치명적이라 할수 있다.

실험 시작시 자연수온이 17°C였고 점차 실내기온에 의해 수온이 상승하여 실험 7일째 실내기온과 비슷한 수온으로 상승하였으나 12일째 증수하여 수온이 약간 하강하였으나 점차 실내기온에 의해 상승하였다. 또한, 실험 시작시 35.5% 이었던 사육수가 시간이 경과함에 따라 약간 높아졌으며 실험 종료시에는 36.5%로 상승하였으나 넙치와 개불의 생존에 영향을 줄만큼의 변화는 나타나지 않았다. 자연해수는 34.8%로 실험 시작시 실험수조 염분과는 큰 차이가 없었다.

실험 시작시 pH 6 전후로 전 구간에서 비슷한 값을 나타냈으나 실험후 7일 이후에 pH 8전후로 급격히 상승하나 그 이후로는 완만한 하강을 하며 실험 종료시에는 pH 7.5 전후로 나타났다. 실험 시작후 급격한 pH 상승은 실험시 투입했던 저질의 영향으로 pH값이 내려갔으나 서서히 수질이 안정되기 시작하면서 서서히 pH값이 상승하다 12일에 주입했던 사육수의 영향으로 일시에 pH값이 상승했을 것으로 생각된다.

COD의 경우에는 실험 시작 후 2주까지는 COD의 변화폭이 적었으나 섭이활동이 활발해지는 3주부터는 COD의 량이 급격히 증가하기 시작하였다. 28일에는 COD의 양이 가장 많아지는데 이때 용존산소의 양도 감소하는 경향을 나타내었다.

어류성장에 영향을 미치는 어류사육조내의 암모니아 농도는 초기 증가하였다가 21일째 감소하였고, 다시 42일째 전 실험구에서 증가하는 경향을 나타내었다

(Fig. 6). 또한 아질산 역시 같은 경향을 나타내었다(Fig. 7). 반면 질산의 경우 실험 구별로 다양한 경향을 나타내었으며 수온이 높은 시기에 많은 증가를 나타내었다. 또한,  $\text{NO}_3\text{-N}$  1mg이 질산화 과정을 거칠 때 요구되는 알칼리도의 소비량은 일반적으로 7.14mg 정도로 보고 있다. 암모니아성 질소의 제거량이 많은 부분에서 알칼리도의 소비량도 증가하므로 pH가 약간 낮게 나타나는 경향이 보일 수 있다.

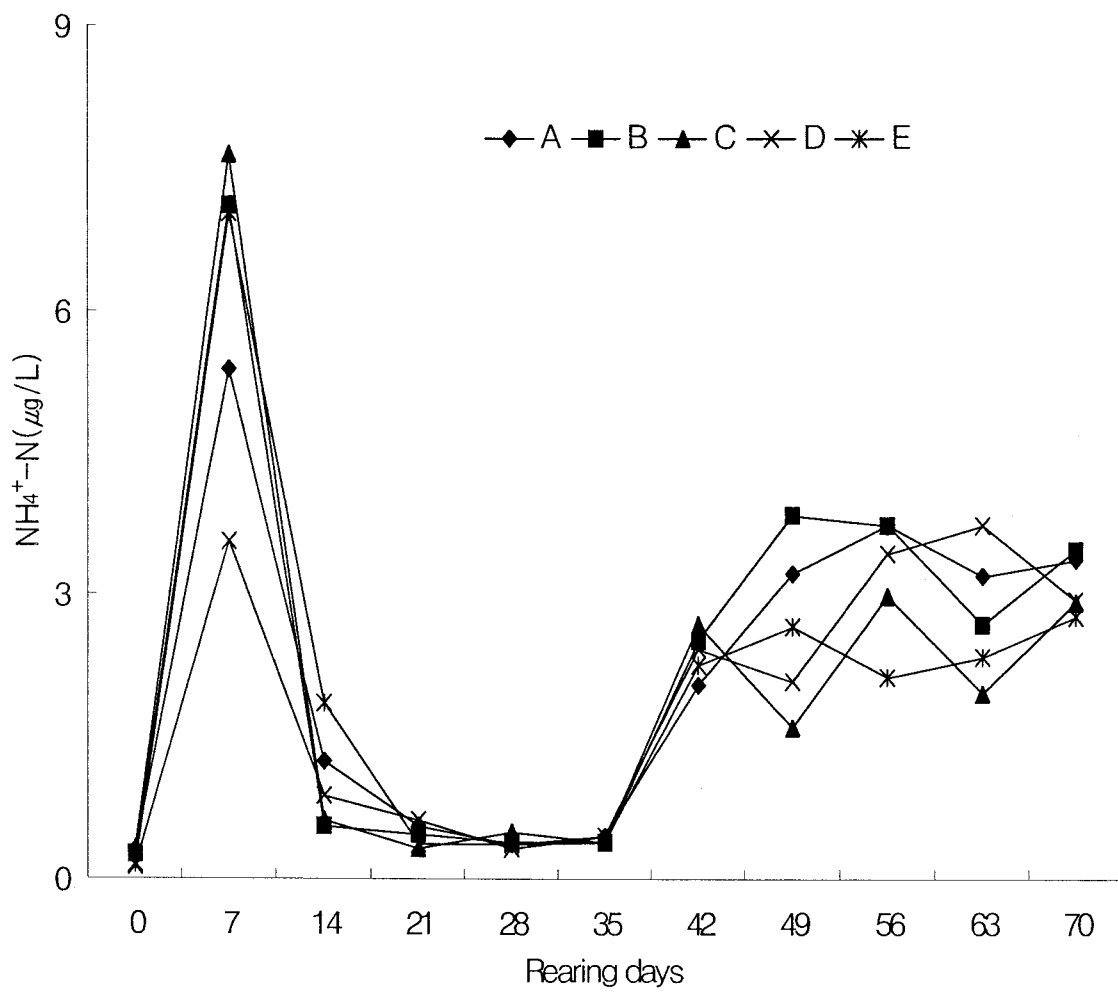


Fig. 6. Change of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  in each experimental group.

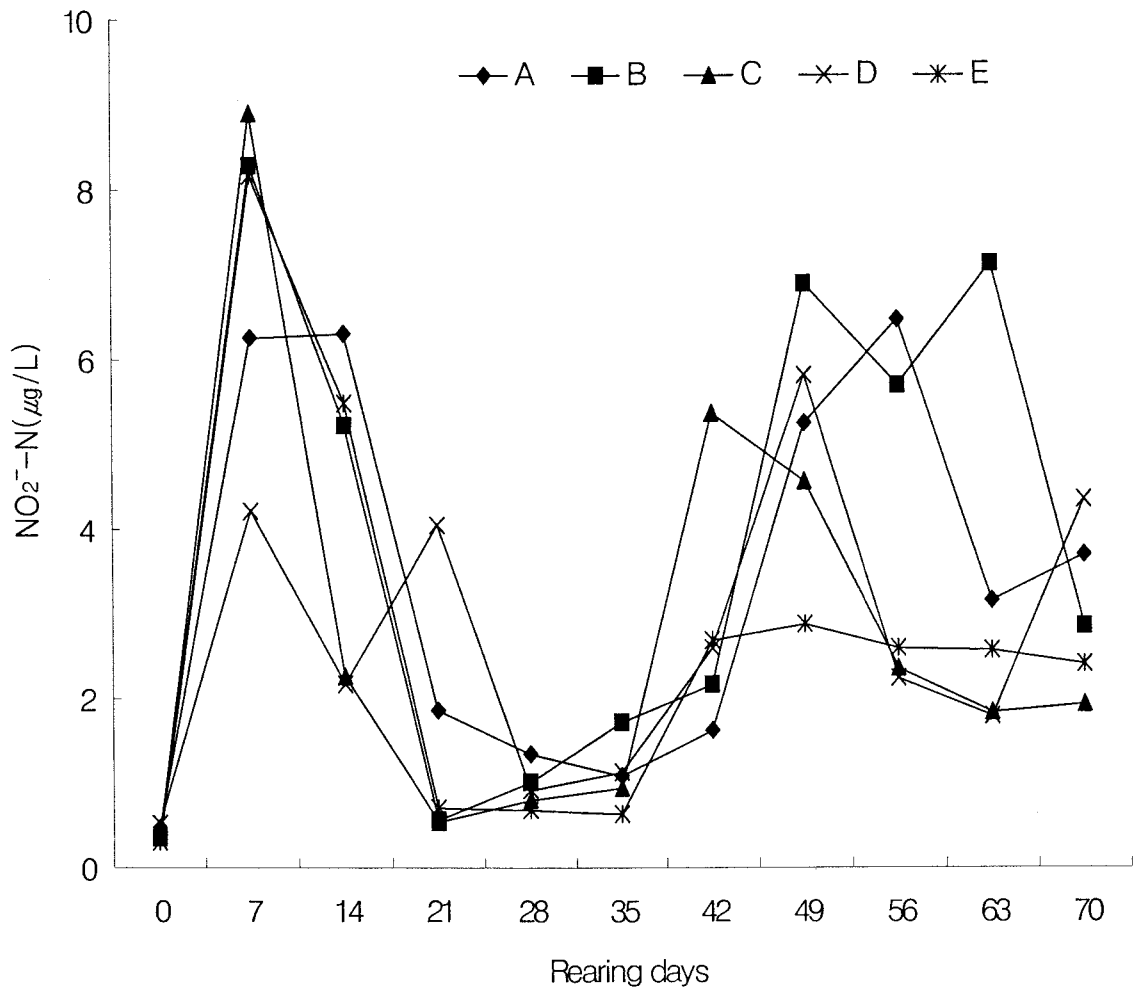


Fig. 7. Change of  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  in each experimental group.

## 2.5. 사육환경(저질)

양식장의 저질상태는 양식장의 가치를 판단하는 중요한 기준이 되고 있다. 저질의 화학적 산소 요구량은 수중의 유기물이나 저서생물에 의해 공급된 유기물량을 나타내는 것으로 일반적으로 사질의 함량이 90%이상일때는 1mg O<sub>2</sub>/g건니 이하인 것이 정상적이라고 할 수 있다. 실험종료 후 BCOD는 개불이 전혀 투입되지 않은 A실험구가 가장 높았으며 개불이 투입되어진 B, C, D, E실험구의 순으로 낮았다 (Fig. 8).

또한, 저질 중의 유기물이 분해되면서 산소가 소비되어 저산소 상태에 이르면 환원세균의 증식에 의하여 황화수소가 발생하게되어 저서생물에 악영향을 미치게되고 2차적으로는 수질에까지 영향을 미치게 된다. COD와 황화물의 수준으로 관정할 때도 일본의 천해 양식장기준인 5-30mg/g건니 및 0.03-0.3ppm(일본수산학회, 1973)에 비해 기존의 연구 결과에 의하면 담수어류에 대한 황화수소의 독성은 수온이 10°C증가에 따라 5.5배, pH 1.0 이하에 따라 1.5배, 용존산소가 4ppm 이하에 따라 1.5배가 강하게 작용했다고 할 수 있다. 따라서 총황화물의 양은 저질의 혐기성화를 판단하는 기준이 될 수 있으며, 본 실험에서는 개불의 투입이 없는 A실험구에서 1.68mg/L로 가장 높았으며(Fig. 9), 개불이 투입된 실험구에서는 BCOD와 같은 경향을 나타내어 개불이 투입됨에 따라 저질환경이 투입되지 않은 실험구에 비하여 개선 또는 나아진 것으로 나타났다.

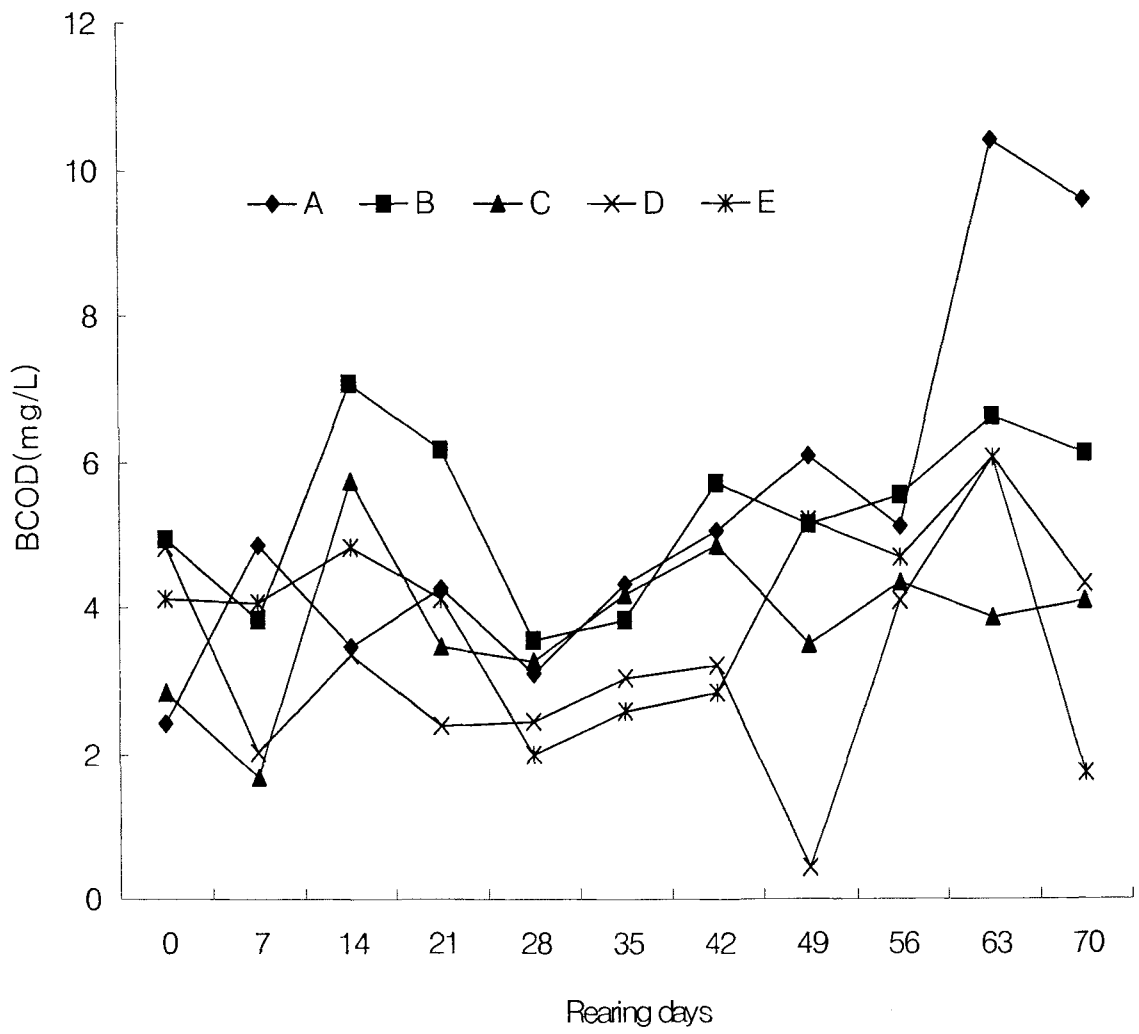


Fig. 8. Change of BCOD in each experiment group.

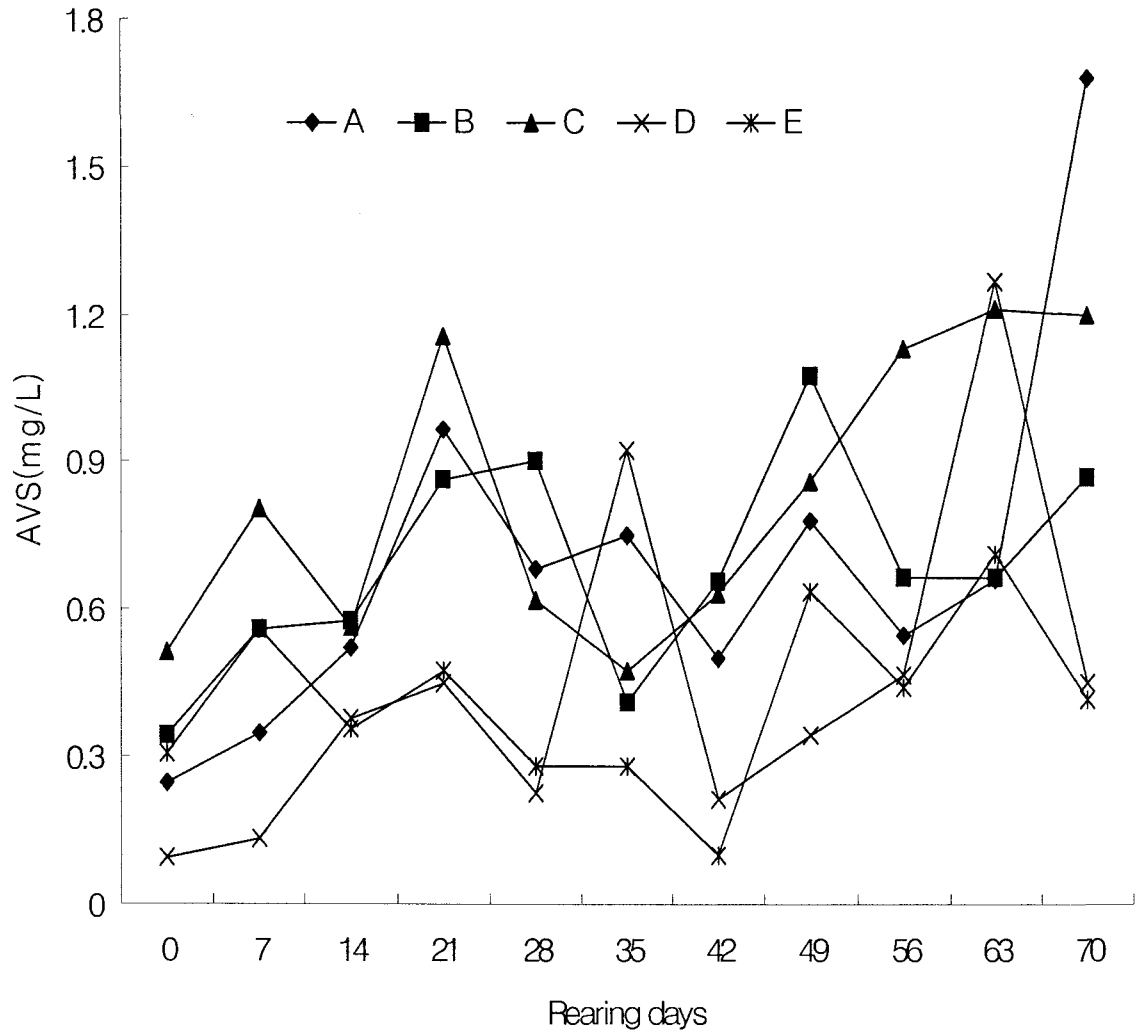


Fig. 9. Change of AVS in each experiment group.

## 제 4 장 생식기작 및 착저유인물질 개발

어떤 생물의 종묘생산을 위해서는 반드시 생식기작 등이 밝혀져 있어야 효율적으로 인공종묘생산을 할 수 있다. 개불의 생식주기를 조사한 결과에 의하면 연 2회 산란하는 것으로 추정된다.

따라서 본 연구에서는 개불의 완전 양식을 위하여 생식생리학적 특성을 조사하고, 매월 개불을 채집하여 생식소와 신장을 절취하고, 이들에 대하여 조직학적 방법으로 생식관련 세포와 조직 및 기관의 특징과 계절적 변동을 조사하여 난과 정자형성과정, 생식년주기, 산란기 등을 조사한다. 또한, 개불의 계획생산을 위한 부유유생시기에 일시 착저를 위한 유인 및 변태 촉진 물질을 탐구한다.

### 제 1 절 생식주기 조사

#### 1. 재료 및 방법

생식주기를 밝히기 위하여 매월 개불을 채집하여 실험실에서 체장, 체중을 0.1cm, 0.01g까지 측정하고, 곧 해부하여 생식소를 적출하였다(Fig. 10). 그리고 생식소 중량을 0.01g까지 측정한후 즉시 Bouin's solution에 고정하였다. 조직학적인 관찰을 위해 상법인 paraffin 절편법에 의해 5~7 $\mu$ m의 두께로 연속절편하여 Delafield's haemstoxylin과 eosin으로 이중염색을 하여 조직 표본을 제작하였고, 광학현미경하에서 생식소의 발달양상을 조사하였다. 생식소의 중량 지수(Gonadosomatic index : GSI)는 생식소 중량(GW) 및 체중(BW)으로부터 다음식에 준하여 산출하였다.

$GSI = (GW/BW) \times 100\%$ . 그리고 난경은 광학현미경하에서의 마이크로메타를 이용하여 장경과 단경을 측정한 평균값을 사용하였다.

#### 2. 연구결과 및 고찰



## 2.1. 생식소 중량 지수(GSI)의 월 변화

1998년 9월부터 1999년 8월까지 조사된 암·수 각각의 생식소 중량 지수(GSI)의 월 변화는 Fig. 11에서 보는 바와 같다. 조사된 암·수 각각의 체장 및 체중의 월 변화는 주 어획시기(10~4월)에 큰 개체가 출현하였다. 특히, 11월과 4월에는 생식소가 가득 차 있어 연중 가장 높은 값을 보였다.

1998년 9월 생식소 중량 지수는 암·수 각각 0.37 및 0.43이었으며 10월에는 암 1.21, 수 1.04로 다소 큰 폭으로 증가하기 시작하여 11월에는 암, 수 각각 7.01, 6.24로 연중 최고 값을 나타내었다. 이후 12월과 1월을 지나면서 급격히 감소하였으나, 2월에는 암, 수 각각 0.52, 1.04로 서서히 증가하기 시작하여 3월과 4월에 다시 암·수 모두 2.22이상의 높은 값을 유지하였다. 암·수 각각의 GSI는 5월에 크게 감소하여 암컷은 0.31, 수컷은 0.44로 연중 최저 값을 나타냈고 6월부터 하계인 8월까지 유의한 변화는 보이지 않았다.

## 2.2. 난경 변화

개불 난소내 난모세포의 변화는 Fig. 12에서 보는 바와 같다. 난모세포는 1998년 9월에 평균난경  $4.06\mu\text{m}$ 였던 것이 산란기가 시작되는 12월에 평균  $96.16\mu\text{m}$ 로 성장하였으며 방란 직전의 성숙 난모세포의 직경은 최대  $100.00\sim 106.00\mu\text{m}$ 였다. 산란 후 잔존 난모세포가 퇴화·흡수된 다음 1월과 2월에는  $5.00\mu\text{m}$  미만의 새로운 난원세포가 출현하기 시작하였다. 난원세포는 서서히 증가하기 시작하는 난모세포로 발달하여, 3월을 거쳐 4월에는 평균난경  $81.52\mu\text{m}$ 의 빠른 성장을 보였다. 그리고 산란후인 5월에는 최대  $105.20\mu\text{m}$ 부터 최소  $29.60\mu\text{m}$ 로 다양한 크기의 난모세포가 나타났으나 이들의 비율은 10~30%로 거의 유사했다. 이후 6월부터 8월까지는 평균난경  $3.94\mu\text{m}$  미만의 난원세포가 관찰되었다.

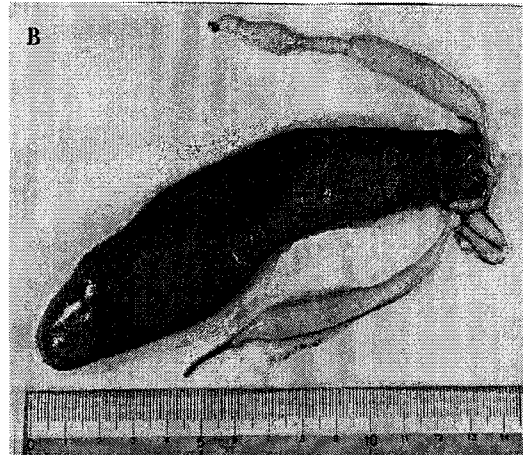
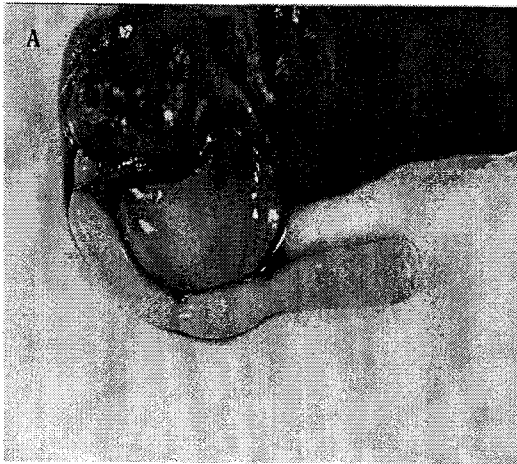
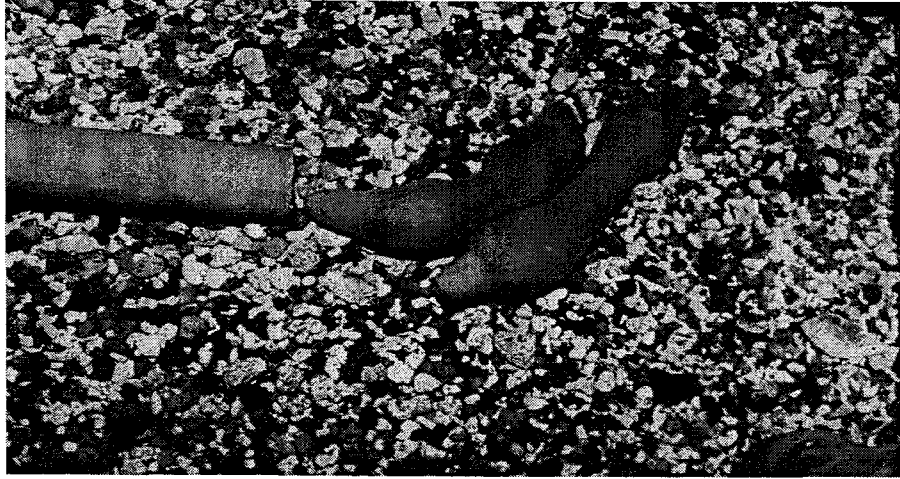


Fig. 10. Adult *Urechis uncinatus*.

Up : blood stock; A: female; B: male.

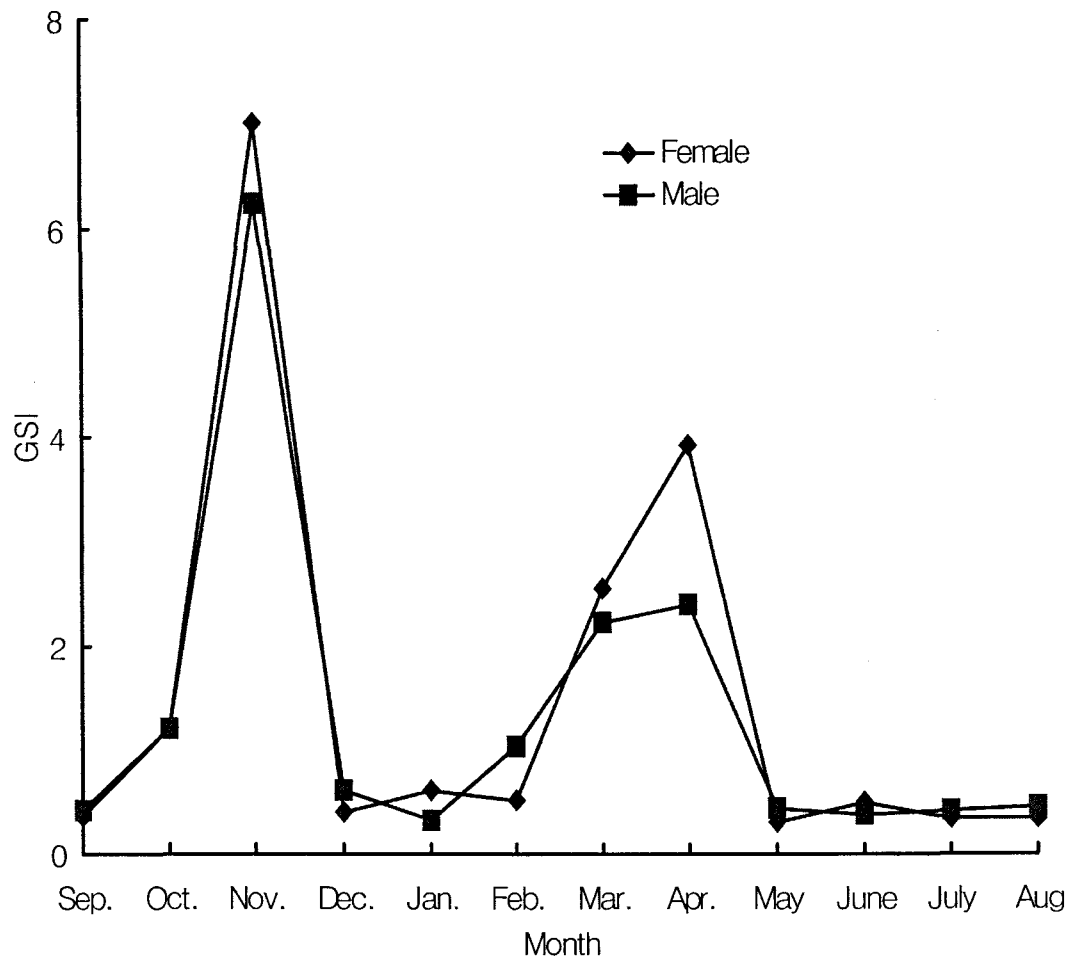


Fig. 11. Monthly change of the gonadosomatic index(GSI) in *Urechis unicinctus*.

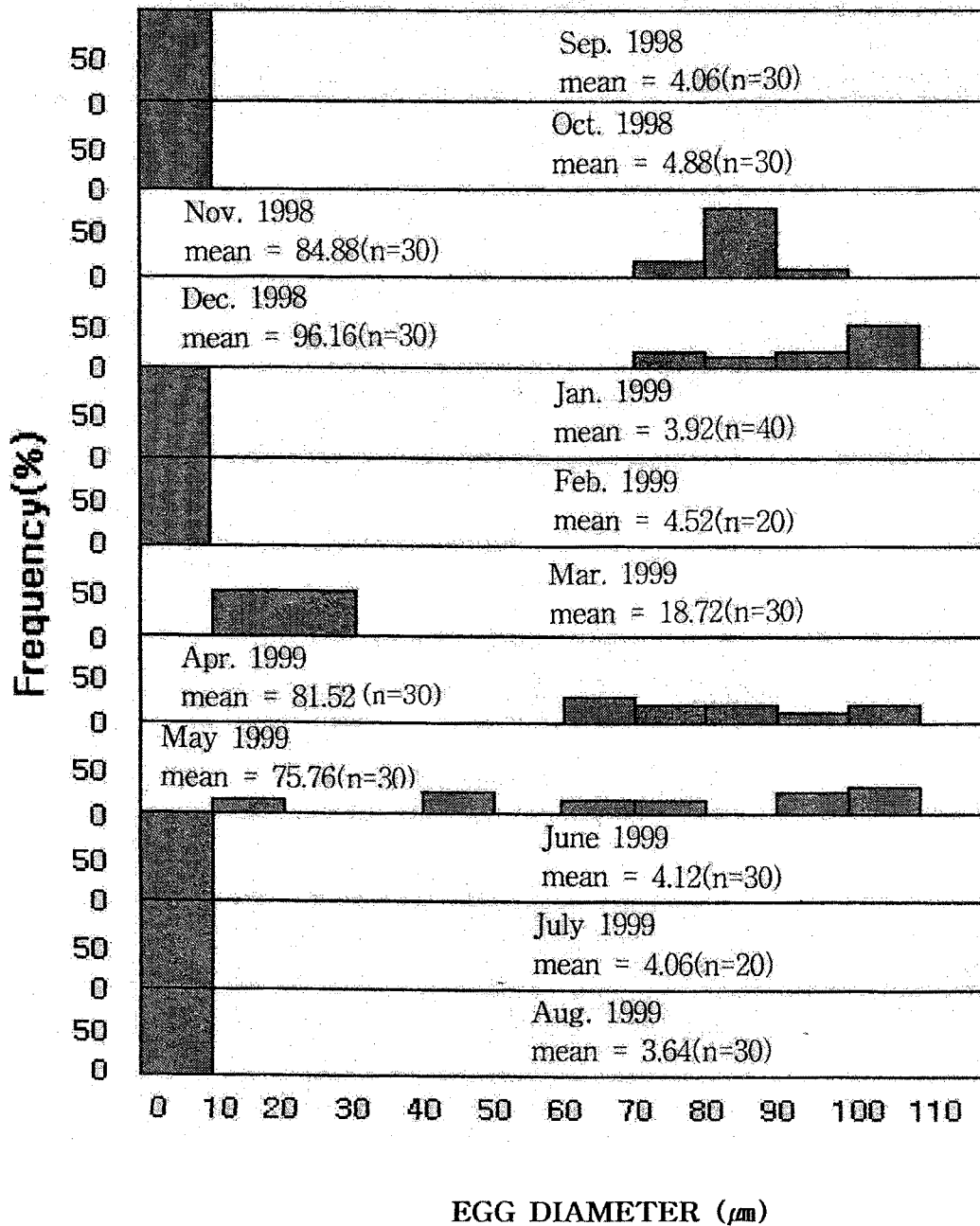


Fig. 12. Monthly change of egg size composition of *Urechis uncinatus*.

## 제 2 절 생식소 변화 양상

### 1. 재료 및 방법

생식주기를 밝히기 위하여 매월 개불을 채집하여 실험실에서 체장, 체중을 0.1cm, 0.01g까지 계측하고, 곧 해부하여 생식소를 적출하였다. 그리고 생식소 중량을 0.01g까지 계측한후 즉시 Bouin's solution에 고정하였다. 조직학적인 관찰을 위해 상법인 paraffin 절편법에 의해 5~7 $\mu$ m의 두께로 연속절편하여 Delafield's haemstoxylin과 eosin으로 이중염색을 하여 조직 표본을 제작하였고, 광학현미경하에서 생식소의 발달양상을 조사하였다

### 2. 연구결과

#### 2.1. 난소

개불의 난소는 2쌍의 원추형으로 각각의 내벽에는 주로 난원세포와 염색인기 단계의 초기 난모세포가 관찰된다(Fig. 13A). 생식소 내벽에 산재해 있는 난원세포들은 분열 증식하고 있으며, 난모세포들은 직경 5.00 $\mu$ m 전후로서 세포질에 대한 핵의 비율이 차츰 감소하게 되었다. 이후 난모세포들이 차츰 성장하면서 난경 96.16 $\mu$ m 전후까지 발달하며, 두터웠던 생식소 외피는 뚜렷이 얇아지는 등 주변인기의 난모세포로 발달되었으며, 인의 수는 1~3개 존재했다(Fig. 13B).

생식소내 난모세포들의 증식은 동시에 진행되었고, 다른 어류나 유용 무척추동물과는 달리 난모세포를 둘러싼 여포세포들은 관찰되지 않았으며, 성숙 난모세포는 소량의 난황을 축적하고(Fig. 13C), 체외로 방란하였다(Fig. 13D). 산란기 이후의 난모세포의 크기도 급격히 감소하고 잔존 난모세포들은 퇴화·흡수되었다(Fig. 13E, F).

한편, 계절별 생식소 발달의 조직학적 변화는 Fig. 14에서 보는 바와 같이 개불

은 자웅이체로서 난형성과정, 각 생식소 발달단계에 있는 출현빈도 등으로 미루어 볼 때 생식년주기는 분열증식기(Multiplication phase, 1~2월, 6~9월), 성장기(mature phase, 3월, 10월), 방출기(spent phase, 4월, 11월), 그리고 퇴화 및 재흡수기(degeneration and resting phase, 5월, 12월)로 나눌 수 있었다.

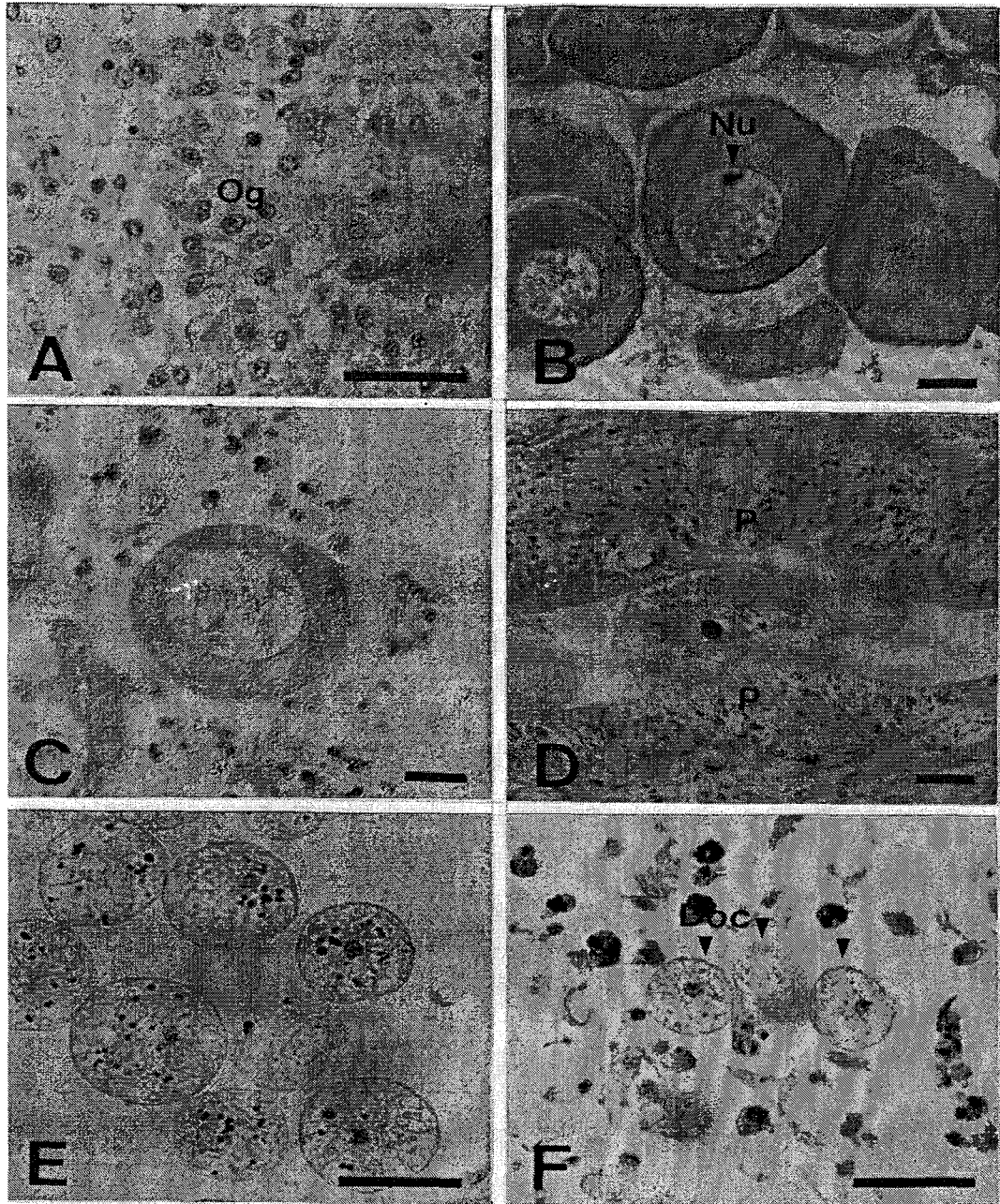


Fig. 13. Histological identifications of internal morphology and developmental phases of ovary in *Urechis uncinatus*. A, Section of premature oocytes; B, Section of mature oocytes; C, Section of spawning stage; D, Section of oocyte in between parietes; E, Section of degenerated ovary; F, Section of the resting ovary. Og, oogonia; Nu, nucleolus; P, parietes; Doc, degenerative oocyte. Scale bars indicate 24.6 $\mu$ m.

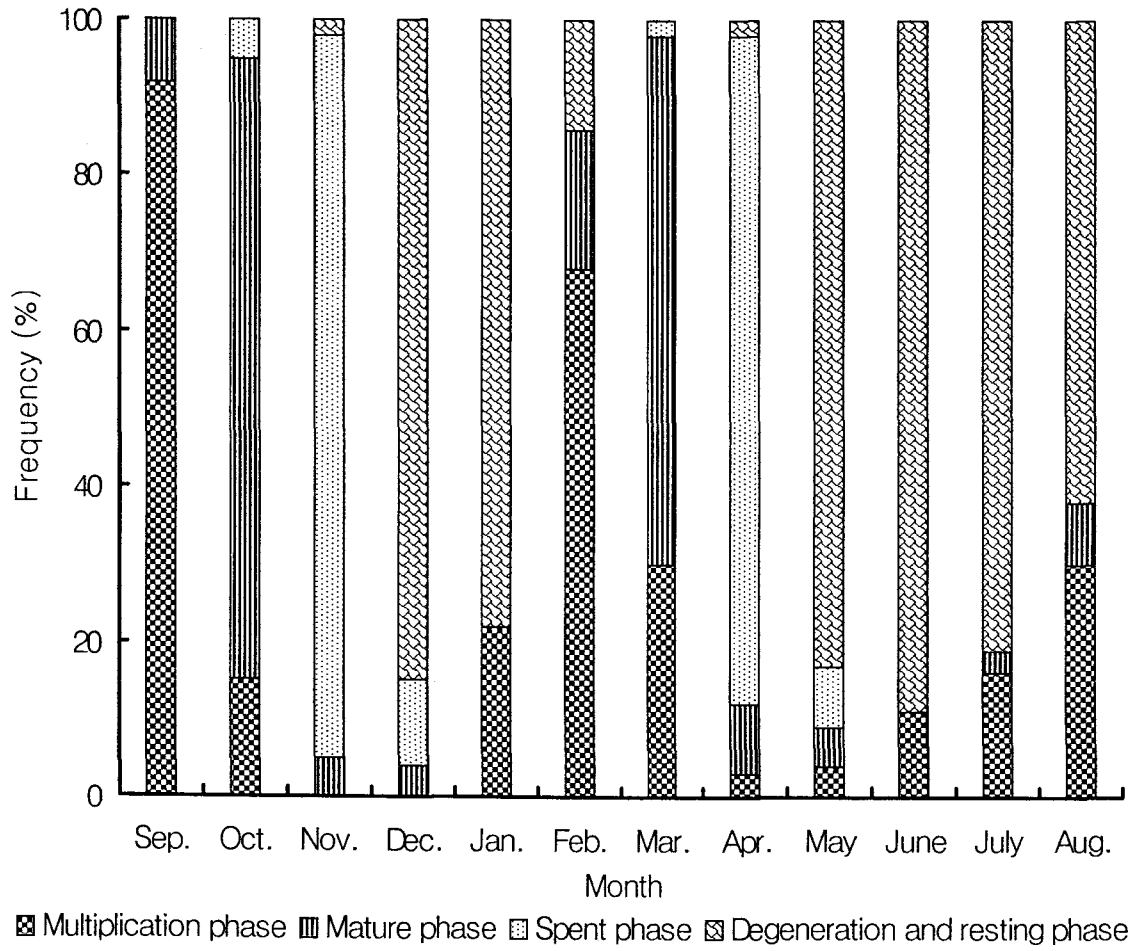


Fig. 14. Monthly change in frequency of the ovarian development stage in *Urechis unicinctus*.



## 2.2. 정소

개불의 정소 역시 난소와 마찬가지로 2쌍의 원추형으로 되어있으며 정소 내벽에 둥근 모양의 정원세포가 산재해 있는 것이 관찰되었고(Fig. 15A) 산재된 정원세포는 정소의 내벽에 일렬로 배치하며 활발히 분열증식하고 모양 또한 타원형으로 점차 변화하였다(Fig. 15B). 정모세포들은 정소발달과 함께 정소 외피에서 감수분열을 거쳐 발달하며, 분열을 마친 정모세포들은 haematoxylin에 강한 염기성 반응을 나타내는 정세포로 발달하였다(Fig. 15C).

분열된 정자들은 정소 내부로 떨어져 나오며 이때의 정자들은 부케모양의 다발을 형성하였고 이때에는 완전한 수정 능력을 갖고 있지는 않았다(Fig. 15D). 그후 정자 완성기를 거쳐 완숙기의 정소는 정자로 충만되어 있었고, 이때 정소 외피는 초기의 정소와 비교하여 얇은 막으로만 이루어져 있었다(Fig. 15E). 방정 후 정소 내부에는 정원세포들이 산재해 있고 잔존정자와 성장 및 성숙이 중지된 생식세포들이 퇴화·흡수되어 정소자체가 위축되는 조직상이 관찰되었다(Fig. 15F). 이런 형태의 정자형성은 개불만의 특징으로 원추형의 정소에서 일괄적으로 동시에 진행되었다.

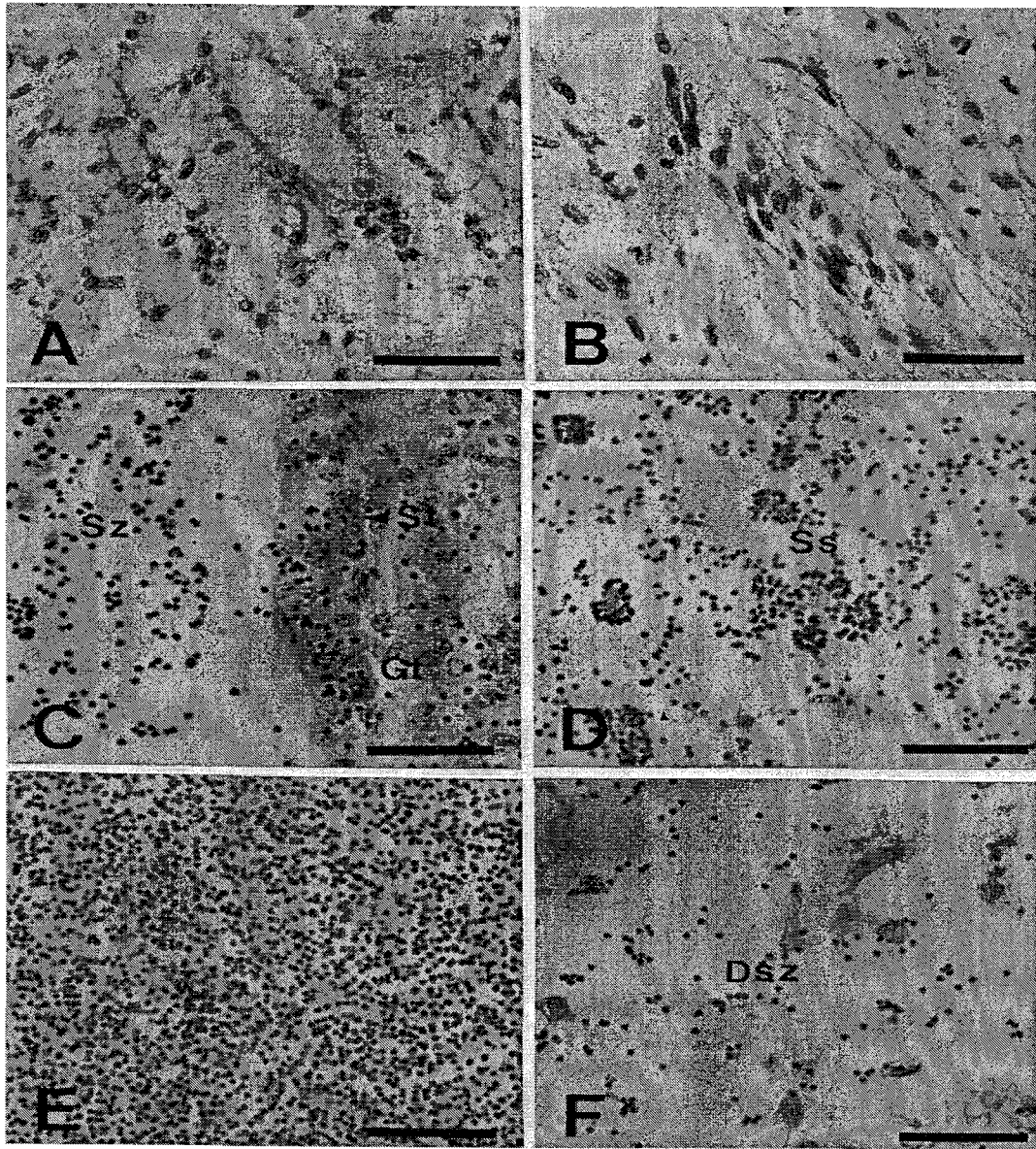


Fig. 15. Histological identifications of internal morphology and the developmental phases of testis in the *Urechis unicinctus* : A, Section of the testis of the multiplication stage; B, Section of primary spermatocytes in the testis; C, Section of growing testis; D, Section of mature testis; E, Section of ripe testis; F. Section of degenerated testis. Gt, gonadosomatic; St, spermatid; Sz, spermatozoa; Ss, spermozeugma sphaulariales; Dsz, degenerative spermatozoa. Scale bars indicate 24.6 $\mu$ m.

### 3. 고찰

한국산 개불, *Urechis unicinctus*는 자웅이체로서 생식소는 2쌍의 긴 원추형으로 되어있으며 매우 얇고 투명하며 체벽과 연결되어 체외방출을 한다.

생식소를 싸고 있는 외피는 초기에는 매우 두텁고, 여러 층으로 형성되어 있지만 성숙하면서 얇은 상피세포층으로 변화되어갔고, 성숙기의 난소는 담황색을, 정소는 유백색을 띄어 식별이 가능하지만 휴지기에는 육안적 식별이 불가능했다. 그리고 성숙한 암컷은 4개의 알주머니에 약 60만개의 난을 갖고 있으며, 수컷은 4개의 정자주머니에 약 70억개의 정자를 갖는다.

Kurashige(1943)는 생식세포의 방출시에는 비만도의 값이 급격히 감소함으로 조직학적 관찰에 의해 구해진 산란기는 비만도의 값이 최대로부터 최소로 향하는 시기와 일치한다고 보고하였다. 본 종에서도 생식소 지수와 조직학적 조사를 근거로 하여 산란기를 추정하였다. 생식소지수와 난경 크기를 조사한 결과 11월과 4월에 높게 나타났다. 따라서 한국산 개불의 주 산란기는 년 2회로 추정된다. 대부분의 체외 수정 종들은 산란기를 지난 후 휴지기에 들어가며 이때 생식소내에서 생식세포는 찾아볼 수 없다(Looasanoff, 1962). 이런 형태는 복족류의 일종인 삿갓조개, *Pattela vulgate* 등이 겨울철에 휴지기를 갖는 것과 비슷한 양상을 나타내었다(Orten et al., 1956).

Pilger(1987)은 의충동물중 *Themiste lageniformis*는 8~9월에 왕성한 산란을 하고, 다산의 암컷은 6일동안 5번의 산란을 한다고 보고하였으며, 난모세포의 생성은 큰 난모세포와 작은 난모세포가 보조를 맞추어 성장한다고 보고하였다. 본 연구에서 개불은 방란, 방정 후 오랜 휴지기를 거치지만 회복기로 접어들면서 새로운 생식세포가 급격히 발달하는 변화를 보였다. 생식세포의 형성에 있어 개불은 생식소 외피에서 분화되는 양상을 나타내고 있으나 이러한 형태의 생식소 발달은 아직 보고되어 있지 않으므로, 생식세포 발달양식의 정확한 구명을 위하여 이에 대한 미세구조적 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 또한 개불의 생식세포형성은 체강속에서 이루어지나 다른 동물의 경우와는 달리 여포세포(follicle cell), 영양세포(nurse cell) 등의 체세포들과 접촉없이 성분화된다. 따라서 성숙란은 산란직전에 자

성 storage sac에 집적되며 수정은 체외에서 수행된다. 이와 같이 개불의 경우 생식 세포들은 자유세포로 관찰할 수 있기 때문에 발생학, 세포학, 생화학 등의 여러 가지 측면에서 연구의 대상이 되어 왔다(Engstrom, 1971; Flank et al., 1985; Davis, 1986).

체외수정종들의 산란시작은 여러 가지 환경요인의 영향을 받지만(Giese, 1959; Kinne, 1983), 생식세포형성과정을 조절하는 것에는 외적요인과 내적요인 두 가지가 있다(Webber and Giese, 1969). 생식과 관계되는 외적작용요인으로 수온이 주로 언급된다. 개불에서는 수온이 하강하는 12월과 상승하는 3,4월에 산란하는 점으로 미루어 수온의 변화가 산란 유발을 일으키는 것으로 추정된다.

해산무척추동물에서 생식세포형성과정에 영향을 주는 내적조절계는 환형동물의 다모류, 빈모류 등을 포함하여 연체동물의 두족류 등에서 비교적 잘 알려져 있고, 패류와 복족류에 대해서도 일부 보고되어 있으나(Euler and Heller, 1963), 개불의 생식세포형성과정에 작용하는 내적조절계는 알려진 바가 거의 없다. 따라서 생식세포형성과정에 작용하는 내적조절계에 대한 다각적인 연구가 선결되어야 할 것으로 사료된다.

## 제 3 절 착저유인물질 탐색

### 1. 재료 및 방법

모든 생물은 어미와 그 동족에게 자연스럽게 다가가는 특징을 가지고 있다. 따라서 개불의 유생 또한 성체에 끌리지 않을까 하는 의문을 가지게 한다. 따라서 본 연구에서는 개불유생에 대한 변태 촉진 및 착저유도를 위한 유인물질은 개불성체의 표피에서 추출하였으며, 추출된 유인물질(UM)은 멸균여과해수 100 ml에 착저유인물질 1 ml을 희석시켜 UM solution을 제조하여 유인물질의 효과에 관한 검증을 하였다. 실험은 50 ml 시험관에서 실시하였고, UM의 개불유생에 대한 효과와 착저유도 가능성 여부에 대하여 3가지 실험을 행하였다.

#### 1.1. *Urechis unicinctus*의 유생에 대한 착저유인물질(UM)의 영향

UM에 대한 개불유생의 반응실험은 3가지 실험조건하에서 실험하였다. 개불유생에 대한 UM의 효과를 판단하기 위하여 상기 방법에 의해 멸균여과해수에 UM을 용해시킨 UM solution과 시험관의 바닥에 UM 원액을 코팅하여 멸균여과해수를 채운 시험관, 그리고 멸균여과해수만 이용한 시험관에 각 30ml씩 분주하고, 개불유생을 20개체씩 분주하여 시간경과에 따른 개불유생의 착저의 유무를 관찰하였다.

#### 1.2. 개불유생의 착저반응의 선택성 실험

UM에 대한 개불유생의 반응 외에 같은 지역에 서식하는 무척추동물 중 꼬막, *Tegillarca granosa*의 체액 1ml을 멸균여과해수 100ml에 용해한 것과 개불성체의 혈액 1ml를 멸균여과해수 100ml에 용해시킨 해수 및 UM solution을 각 시험관에 30ml씩 분주하고, 개불유생을 20개체씩 분주하여 시간경과에 따른 개불유생의 착저

반응을 관찰하였다.

UM에 대한 개불유생의 반응 외에 같은 지역에 서식하는 무척추동물 중 꼬막, *Tegillarca granosa*의 체액을 멸균여과해수에 용해한 것과 개불성체의 혈액을 용해시킨 해수 및 UM solution을 각 시험관에 30ml씩 분주하고 이에 대한 개불유생의 반응을 관찰하였다.

### 1.3. UM의 온도변화에 대한 효율성 실험

UM solution을 증탕하여 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90℃로 가열한 후 17℃로 냉각하여 각각 시험관에 30ml씩 분주하고, 개불의 유생을 20개체씩 분주하여 개불유생의 착저유무를 관찰하여, 온도 변화에 대한 UM의 효과를 실험하였다.

## 2. 연구결과

### 2.1. *Urechis unicinctus*의 유생에 대한 착저유인물질(UM)의 영향

개불의 유생은 UM solution을 담은 실험구와 UM을 시험관의 바닥에 코팅한 후 멸균여과해수를 채운 실험구 및 멸균여과해수만을 채운 실험구에 개불유생을 노출시킨 결과, 반응개체간의 발생정도와 비만도의 차이는 약간 있었으나 약 30일이 지난 개체의 경우 반응시간의 차이는 있었으나 UM solution과 UM을 시험관의 바닥에 coating 한 후 멸균여과해수를 채운 실험구에서는 개불유생이 모두 착저반응을 보였으나 멸균여과해수만을 채운 시험관에서는 개불유생의 착저가 일어나지 않았다(Fig. 16). 결과로 미루어 보면, UM의 효과는 나타났으며, 시간의 차이가 있는 점은 UM이 해수중에 섞여 있는 상태와 coating되어 용출되는데 약간의 시간차가 있는 점으로 사료된다.

또한, 멸균여과해수 실험구에 실험시작으로부터 50분이 경과될 때까지 개불유생은 반응을 보이지 않았으나, UM을 첨가한지 5분 안에 빠르게 착저하는 반응을 보였다.

## 2.2. 개불유생의 착저반응의 선택성 실험

고막의 체액을 이용한 실험구에서는 시간이 경과하여도 개불유생의 반응이 나타나지 않았으며, 개불성체의 혈액을 용해시킨 실험구 또한 반응을 보이지 않았다 (Fig. 17). UM에 노출된 개불의 유생은 실험 1과 같은 결과를 나타내었으며, 빠르게 반응하는 양상을 나타내었다. 또한 50분이 경과한 후 고막의 체액을 용해한 실험구와 개불의 혈액을 용해한 실험구에 각각 UM을 첨가한 결과 10분내에 유생의 80~90%가 착저반응을 나타내었고, 실험 시작 1시간 경과 후 대부분의 개불 유생이 착저하는 것이 관찰되었다.

## 2.3. UM의 온도변화에 대한 효율성 실험

UM의 온도변화에 대한 효율성 실험의 결과는 Fig. 18에서 보는 바와 같다. UM의 경우 20~60℃의 실험구간에서는 약간의 시간차이가 있을 뿐 개불유생의 착저반응은 일어났으나 70, 80, 90℃로 가열한 실험구간에서는 개불유생의 착저반응이 일어나지 않았다.

그리고 개불유생의 착저반응은 50~60℃로 중탕한 후 실험에 사용한 UM의 실험구보다는 20~30℃로 중탕한 후 실험에 사용한 UM 실험구에서 빠르게 나타났다. 결과적으로 UM의 경우 50~60℃ 이상으로 수온이 상승하지 않는 한 그 효과를 잃지 않는다고 볼 수 있으며 실제 해양조건에서는 일어나지 않는 상황이나 UM에 대한 기본적인 특성을 밝힌 것이라 할 수 있겠다.

## 3. 고찰

개불의 유생은 유인물질(UM)을 입힌 표면이나, 용해시킨 해수에서 접촉한 후 신속하고 정확하게 착저하였다. 이런 자극들이 결여된 상태에서는 착저가 지연되거나 반응을 나타내지 않는 결과를 나타내었다. 과거의 연구에 의하면 전복유생은 *γ*-amono butyric 산에 의하여 착저 유도되며, *Opisthobranch mollusc* 유생의 정착

을 향상시키기 위해 succinyl choline chloride를 이용한다(Suer and Phillips, 1983). 따라서 UM의 존재는 개불유생의 착저를 촉진시키는데 중요할 것으로 사료되며, UM에 대한 개불유생의 반응은 본 실험에서 시험관의 유리바닥에 자연적으로 정착함으로써 끝이 났다. 즉 본 연구에서 얻어진 결과들은 야기된 자극이 없이는 착저가 UM을 첨가한 것보다 일정기간동안 지연될 수도 있으며 유생의 착저 시기가 해양환경과는 달리 인위적으로 조정되어진다면 착저의 시기를 조정할 수도 있다는 것을 뒷받침하는 결과라 할 수 있을 것이다. 또한 Newby(1940)가 개불류인 *U. caupo*의 실험에서 착저속도는 점진적 변이가 영구 불변하게 일어난다고 기술한 과거의 논문과 반대된다. 이러한 차이점은 과거의 연구에서 유생의 신속한 착저 및 변태를 유도하기 위해 어떠한 조건에도 노출시키지 않았기 때문이라 생각되며, 자연상태의 조건에 있는 개불 유생은 착저에 있어서 연동운동의 시작과 섬모환의 소실 등 착저하기 위해 야기되는 기본적인 변화를 자극하는 요소에 더욱 노출되어 있을 것으로 사료된다. 여기에서 밝힌 UM은 이러한 물질 중 하나이며, 이러한 물질은 개불 유생에 있어서 자원조성을 위한 해역 근처에 착저 할 기회를 증가시킬 것으로 사료된다.

부유생활로부터 착저 후 은신하는 형태까지의 신속한 변이에 대한 형태적 적응들은 많은 해양무척추동물들에서 기술되었다(Cloney, 1978). 유생은 착저 후 외부섬모의 상실과 이동의 기초적 방법으로서 연동운동을 활발히 시작하게 되는데 이것은 개불성체에서도 관찰되는 기초적인 이동방법이다. 개불유생의 빠른 착저 및 UM에 대하여 동시에 반응을 보인 것은 개불이 군집을 이루며 서식하는 것과 상통되는 부분이며 UM에 의하여 개불의 서식지가 한정될 수도 있다는 가능성을 보여주고 있다. 또한, 개불의 유생이 UM 외의 다른 종의 물질에 대하여는 반응하지 않는 결과를 보였다. 따라서, 개불의 유생이 특정 물질에만 반응한다는 것을 나타냈으며 위의 가능성을 뒷받침하는 결과라 사료되며 개불이 군집을 이루는데 다른 생물이 내는 물질에 대하여 반응하지 않고 군집을 이루고 있다는 가능성을 나타낸다. 그러나 실험조건 중 해수의 경우 멸균여과해수를 이용하여 미생물 또는 plankton 등 생물에게 다른 영향을 줄 수 있는 요인을 제거하여 실험하였으므로 해양내에 유생의 착저를 유발시키는 다른 요인이 존재할 수도 있다는 가능성은 배제 할 수가 없다.



온도 변화에 대한 UM의 효율성 실험에서 나타난 결과는 70°C 이상까지 가열을 하지 않는다면 UM 자체의 효율성을 유지하는 결과를 보였다. 일반적으로 개불이 서식하는 조간대 지역에서의 수온이 40°C 이상으로 높아지지 않으므로 자연생태에서는 일어나지 않으나 UM의 화학적 특성을 부분적으로 밝힌 것이다. 그러나 가열로 인하여 UM의 성질을 바꾸거나 용해된 UM이 환원되는 것인지에 대하여도 아직 미진한 부분이 있다.

한편, UM에 대한 실험결과와는 달리 amino acid 분석을 통한 mono-amino acid 에 대한 개불유생의 반응은 농도별로 또한 amino acid 별로 달리 나타났다. 특히, 농도가 높음에 있어 폐사되나, 낮은 농도에서는 착저반응을 나타내는 것은 개불의 착저를 유도하는 유인물질이 해양에서는 매우 다양하게 나타날 수 있으며, 특히 농도의 차이에 대하여 반응을 하는 것으로 미루어 부유유생시기에 어미의 근처에서 특정한 농도 및 물질에 영향을 받아 착저하는 것으로 사료된다.

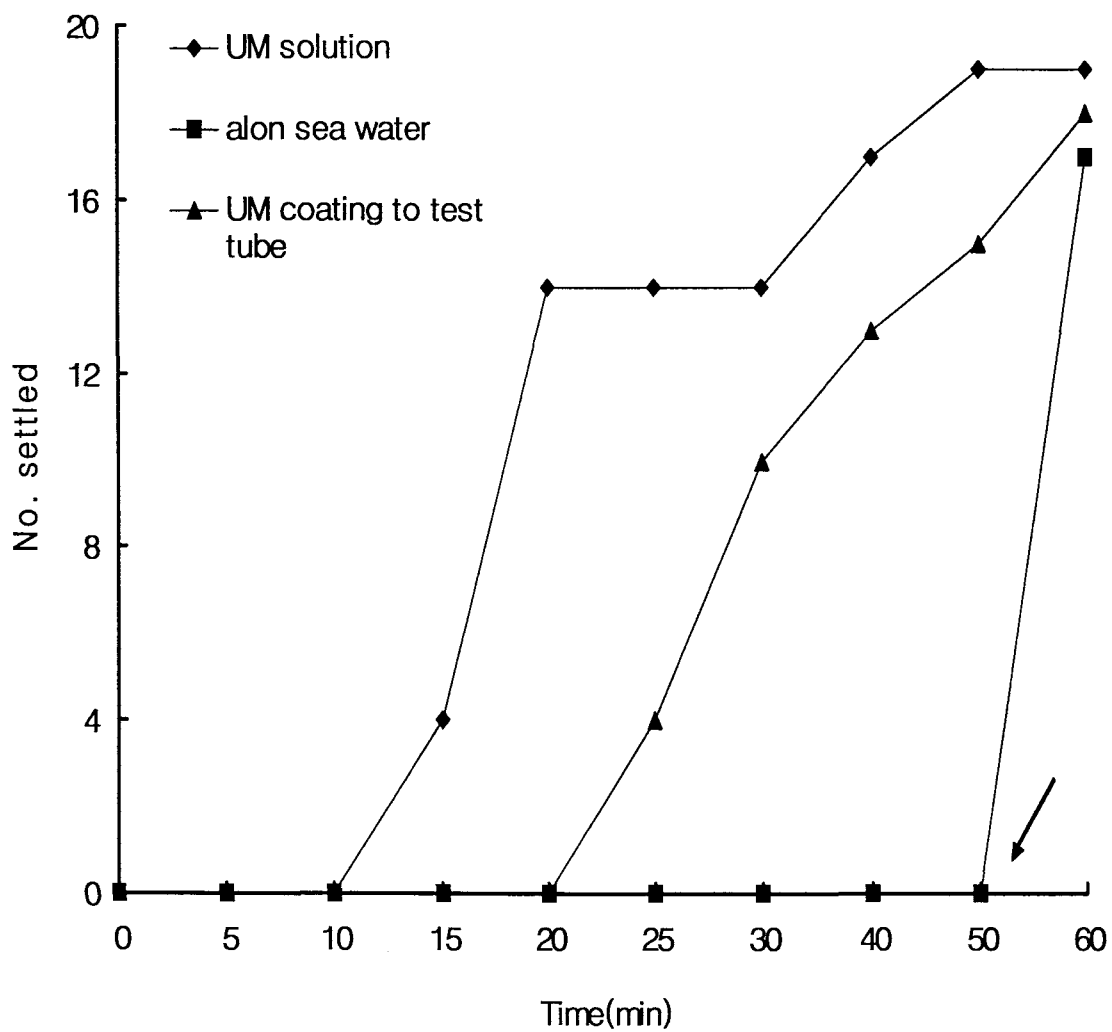


Fig. 16. Larval settlement responses to UM in sea water, to sea water alone and to UM coating to test tube. → : added to UM.

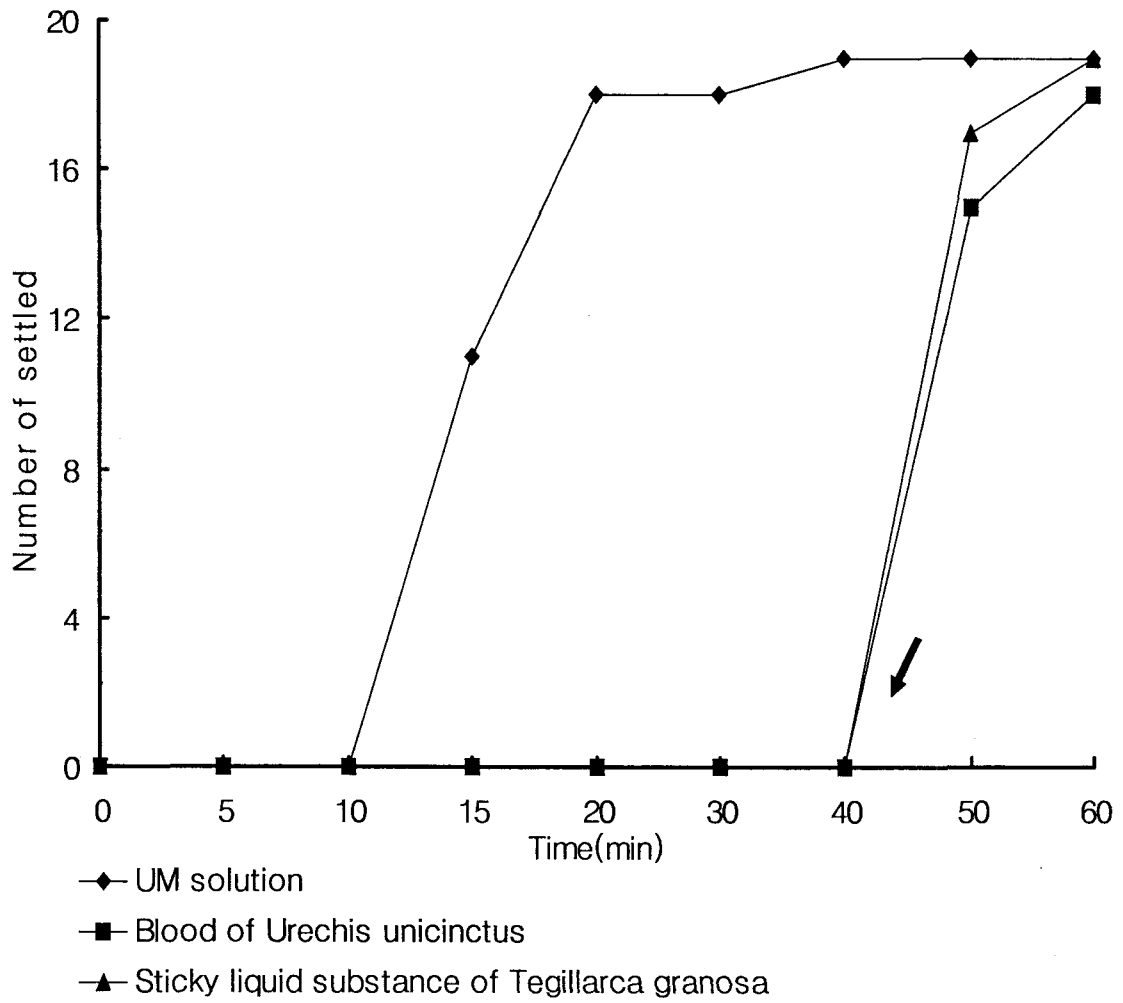


Fig. 17. Larval settlement responses to UM in sea water, to blood of *Urechis unicinctus* and to sticky liquid substance of *Tegillarca granosa*. → : added to UM.

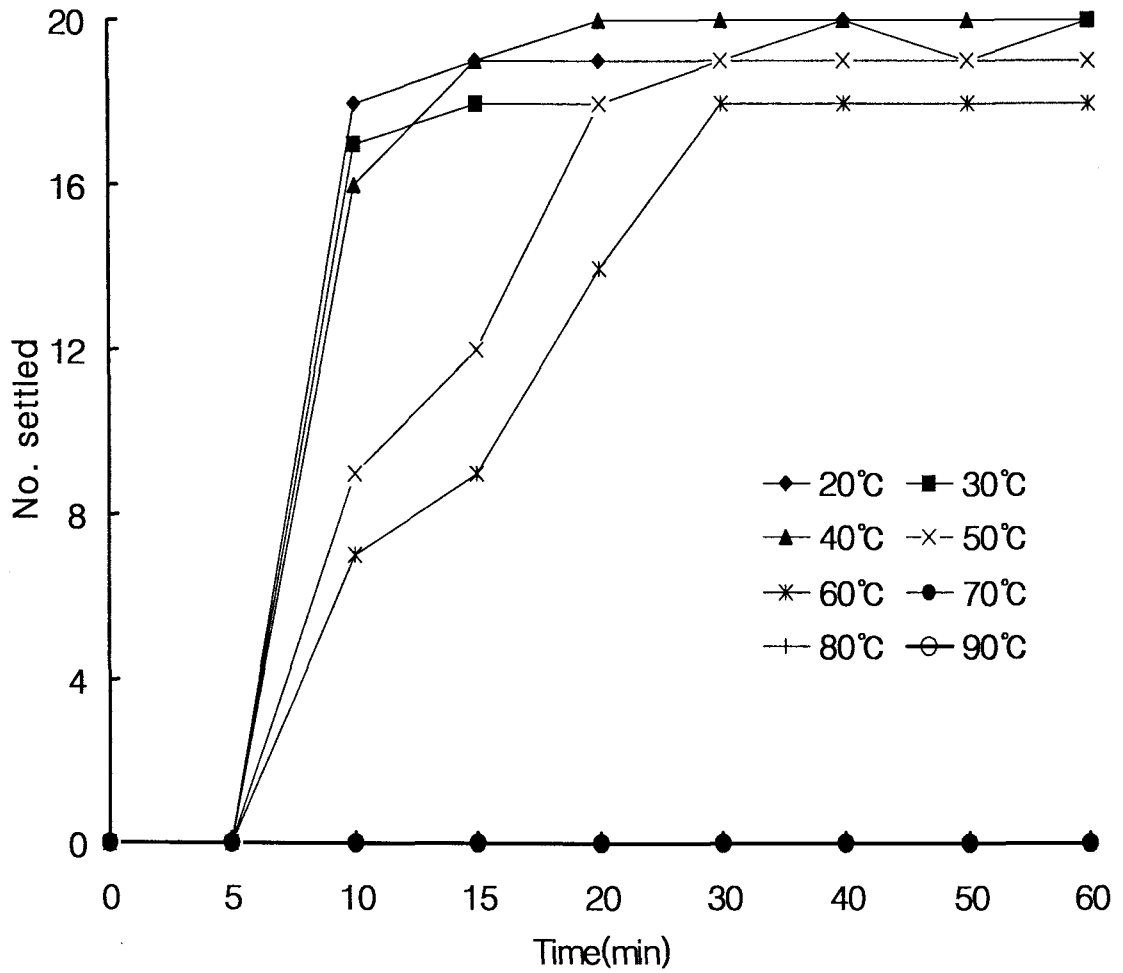


Fig. 18. The heat lability of *Urechis unicinctus* "UM" : larvae were examined for settlement at heating different temperature; there were 20 larvae in treatment.

## 제 4 절 유리아미노산에 대한 개불유생의 착저반응

### 1. 재료 및 방법

개불성체와 유생, 점액질, 정소와 난소, 먹이생물인 *Chlorella* sp., 자연해수, 꼬막, *Tegillarca granosa*,의 체액을 아미노산 자동분석기로(Biochrom 20, USA) 분석하여 이 중 glycine, L-leucine, L-alanine, L-lysine, L-aspartic acid, glutamic acid에 대한 유생의 착저반응을 관찰하였다. 각각의 아미노산 등의 착저유도시약은  $1.0 \times 10^{-2}M$ 에서  $1.0 \times 10^{-8}M$ 의 농도로 준비하였으며, 모든 시약은 멸균여과해수에 희석하여 제조하였다.

멸균여과해수에 희석한 각각의 농도에 아미노산은 시험관에 30ml씩 분주하였고 착저 전 유생을 각 시험관에 20개체씩 분주하여 착저 유무를 관찰하였다. 실험은 각 3회 반복하였으며 일조상태에서 수온 18℃, 24시간동안 실험하였다. 각 시간별로 착저한 개불유생을 계수하였고, 대조구로서 일반해수에 대한 착저율도 계수하여 조사하였다. 착저반응의 기준은 유생의 착저율이 20%이상일 때를 착저반응으로 판단하였다.

### 2. 연구결과

Glycine, L-leucine, L-alanine, L-lysine, L-aspartic acid, glutamic acid에 대한 개불유생의 착저반응을 실험한 결과, Glycine의 경우  $1.0 \times 10^{-2} \sim 1.0 \times 10^{-5}M$ 까지 유생의 반응이 일어났으며,  $1.0 \times 10^{-2}M \sim 1.0 \times 10^{-4}M$ 실험구에서 착저율이 20%이상 나타났고, 24시간 경과하여서는  $1.0 \times 10^{-3}M$ 과  $1.0 \times 10^{-4}M$ 에서만 20%이상의 착저율을 나타내었다(Fig. 19).

L-leucine은  $1.0 \times 10^{-2}M$ 에서 100%의 착저율을 나타내었으며  $1.0 \times 10^{-7}M$ 까지 20%이상의 높은 착저율을 나타내었다(Fig. 20). 24시간 경과 후 역시  $1.0 \times 10^{-7}M$ 실험구에서 20%이상 착저하는 것으로 나타나 다른 실험구에 비하여 높은 착저율을

보였다. L-alanine은 3시간째에  $1.0 \times 10^{-2}M$ 에서 측정시 28%로서 효율이 낮게 나타났으며, 24시간 경과 후 역시 23%로 나타났다(Fig. 21).

L-lysine, L-aspartic acid, glutamic acid의 경우 각각  $1.0 \times 10^{-2}M \sim 1.0 \times 10^{-5}M$ ,  $1.0 \times 10^{-2}M \sim 1.0 \times 10^{-3}M$ ,  $1.0 \times 10^{-2}M$ 에서 각각 폐사한 개체가 나타났으며, 특히,  $1.0 \times 10^{-2}M$  실험구에서는 3개 실험구 모두 100% 폐사하였다(Fig. 25). 반면, L-lysine에서 3시간 경과하여 100%착저를 나타낸  $1.0 \times 10^{-5}M$  실험구는 24시간 경과하여  $56 \pm 3\%$ 의 착저율을 보였으나, 폐사한 개체가  $40 \pm 5\%$ 로 나타나 효율을 나타내지 못하였다(Fig. 22). 각 실험구에 있어 시간에 따른 개불유생의 변화는 큰 차이가 없었으나 L-lysine, L-aspartic acid, glutamic acid에서는 폐사되기전 유생은 체강내에서 체액이 분비되었고, 소화기관이 불투명해지며, 섬모의 움직임이 둔화되고, 연동운동은 매우 미약하였다. 또한 3시간 경과 후 관찰과 24시간 경과 후 관찰하였을 때 개불유생의 착저율에는 차이가 있었으며, 특히, glycine의 경우 시간경과에 따라 그 효과가 감소되었다.

Glycine, L-leucine, L-alanine의 경우 폐사가 일어나지 않은 반면 glycine과 L-leucine은  $1.0 \times 10^{-2}M \sim 1.0 \times 10^{-3}M$ 의 실험구에서 개불유생의 활력이 떨어진 반면 L-alanine의 경우 활력이 좋고 탐색 활동 후 수직이동을 자주하는 모습은 나타내었으나, 3가지 시약 중 L-alanine의 효과가 가장 낮아 유인물질로서의 기능은 glycine, L-leucine보다 낮았다. 자연해수를 넣은 실험구의 경우 시간이 경과하여도 착저반응은 나타나지 않았으며, 자연적인 착저 또한 일어나지 않아 자연해수에 의한 유인효과는 없었다.

### 3. 고찰

*Balanus amphitrite*와 *Hydroides elegans*의 경우 전 세계에 분포하는 만각류와 다모류로서 그 연구가 다양하게 진행되어져 있는데 그 중 부유유생기에서 착저로 진행되는 동안의 연구가 매우 활발히 진행되어져 있다. 특히 신경전달물질인 GABA에 의한 착저유도와 변태유도로 연구가 다양하게 진행되어져 있는데, 각 종마다 반응을 하는 amino acid 계열 및 그 종류가 차이가 있다(Table 7).

또한 농도에 따라서 착저를 지연 또는 단축시킬 수 있다고 밝혀 생물에게 있어 적절한 조건에 대한 차이가 있음을 나타내고 있다(Jayant & Hitoshi, 2000; Tilman & Qian, 1999). 본 실험에서 alanine, glycine, aspartic acid, glutamic acid 에서는 모두  $1.0 \times 10^{-2} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 의 농도에서 높은 반응을 보였을 뿐 그 이하의 농도에서는 매우 낮은 착저율을 나타내었다. 반면 leucine과 lysine의 경우는 그 이하의 농도에서도 비교적 높은 착저율을 나타내었는데 중요한 점은 leucine이 농도별로 착저율이 낮아지는 반면 lysine의 경우  $1.0 \times 10^{-2} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 에서 모두 폐사하였지만  $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 에서만 높은 반응을 나타내고 또한  $1.0 \times 10^{-7} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ 에서는 반응하지 않았다는 점이다. Leucine은  $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$  실험구에서도 25%의 착저율을 나타내  $1.0 \times 10^{-2} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 까지 전 실험구에 고르게 반응한 것과 비교할 때 lysine은 고농도에서 개불유생에게 치명적이지만 특정 농도에 있어서는 유인물질로서의 역할을 할 수 있다는 가능성을 나타내는 동시에 착저억제 역할로서의 두가지 측면을 가질 수 있다고 볼수 있을 것이다. 예를들어, Barnacle, *Balanus amphitrite*(Jayant & Hitoshi, 2000)의 유생에서도 tryosine이  $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 의 농도에서 착저를 유도하고, 또한,  $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 에서  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 에서는 착저를 억제하였고, glycine 같은 nonpolar amino acid 역시  $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 에서는 착저유인의 영향을  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 에서는 착저억제의 영향을 나타내었다.

지금까지는 개불의 변태 전 유생에 대한 UM과 amino acid 분석에 의한 mono-amino acid의 효과에 대하여만 다루었으나 이후 이에 대한 정확한 물질분석, 지금까지 밝혀진 것 외에 해양에 있을 다른 유인물질을 분석, 규명하는 것, 착저유인 외에도 착저억제에 대한 연구도 필요하다. Bryan et al.(1998)는 *Hydroides elegans*의 경우 같은 종이 아닌 *Bugula neritina*에서 추출한 물질에 대하여 *H. elegans*의 유생이 착저 및 변태하였고, 따라서 착저와 변태를 유발시키는 유인물질이 단지 같은 종에서 추출되어지는 물질뿐만이 아니라는 것을 입증하였다.

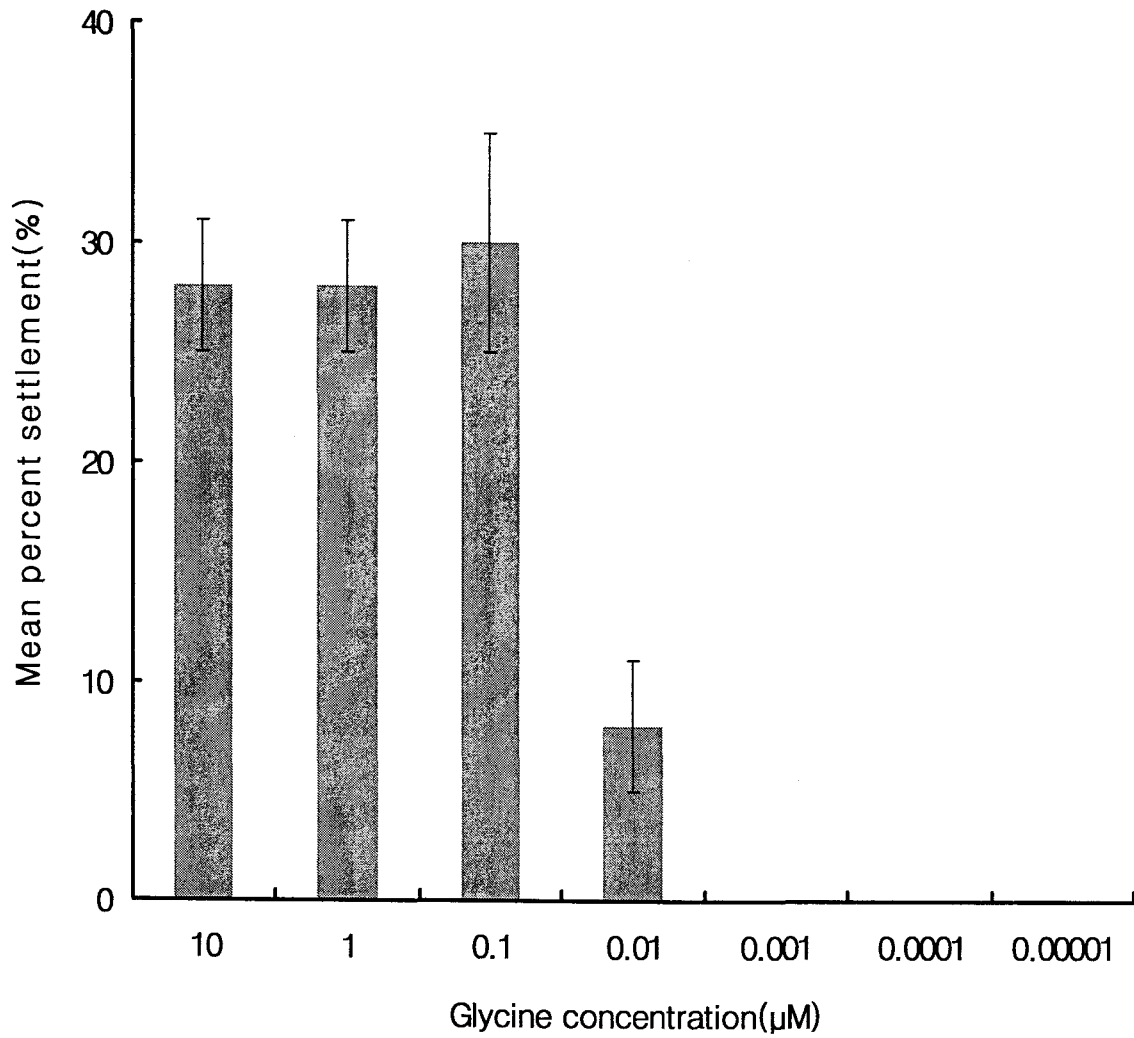


Fig. 19. Mean percent settlement of *Urechis unicinctus*'s larva in response to glycine for 3h( $p < 0.05$ ).



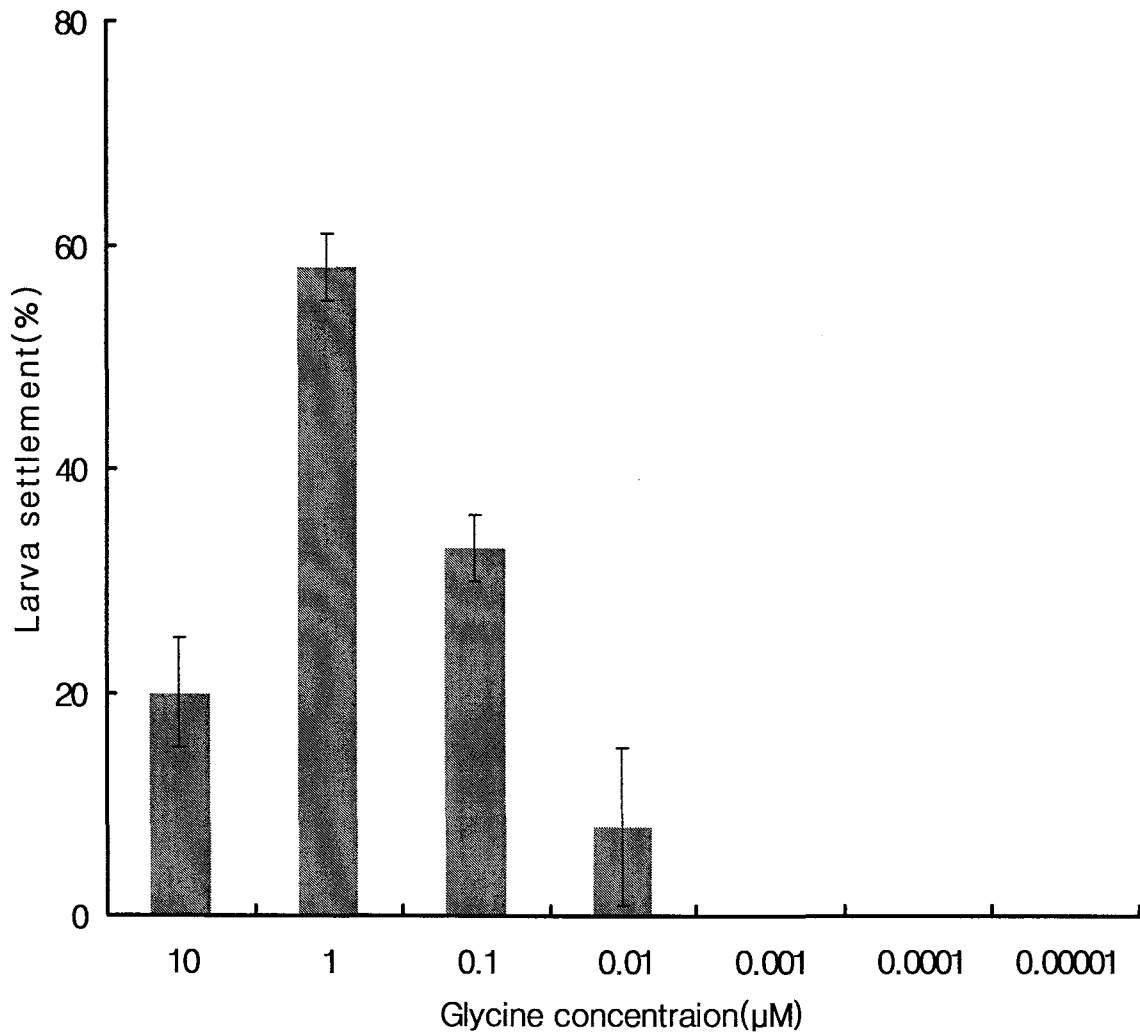


Fig. 20. Mean percent settlement of *Urechis unicinctus*'s larva in response to glycine for 24h( $p < 0.05$ ).

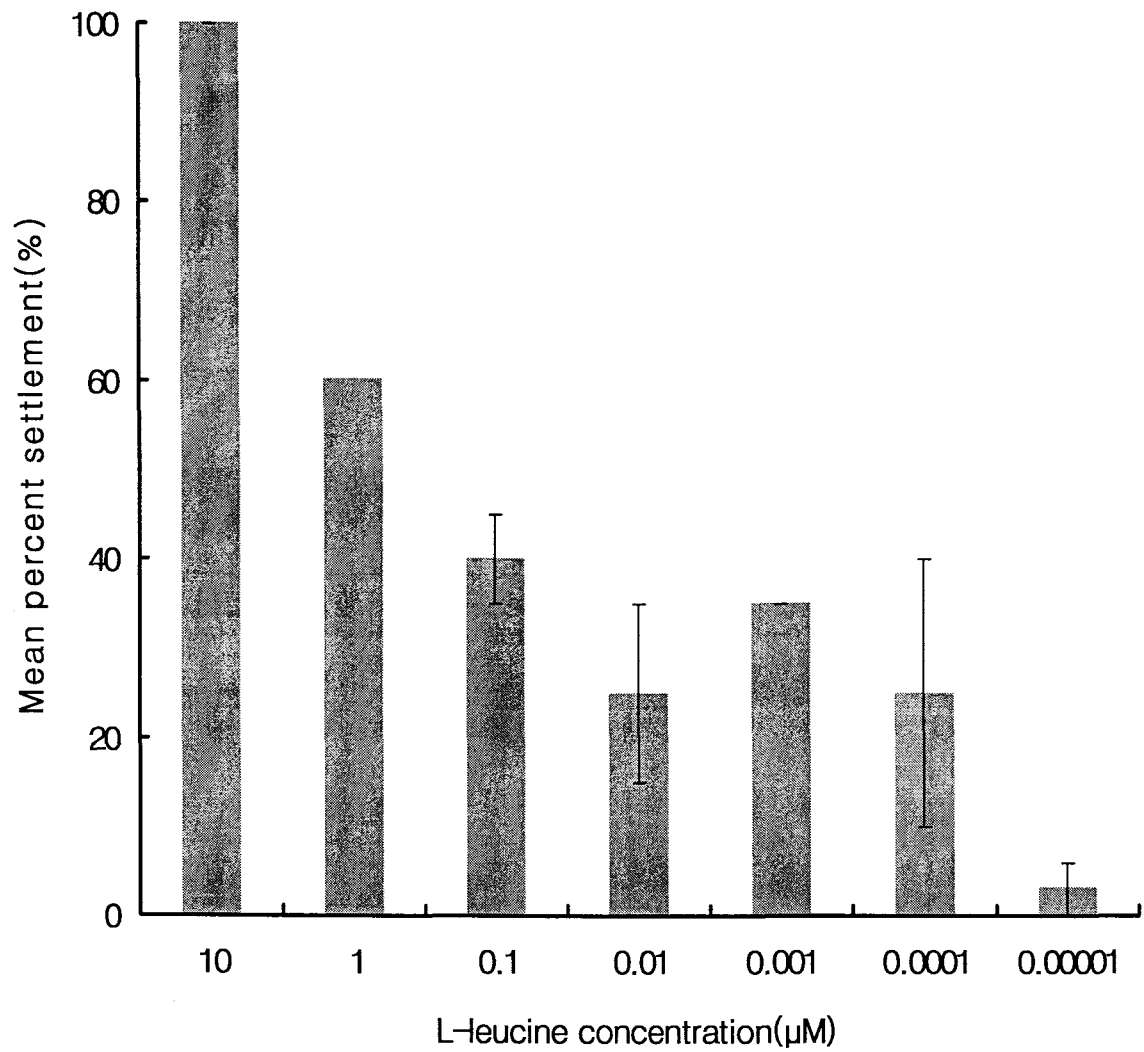


Fig. 21. Mean percent settlement of *Urechis unicinctus*'s larva in response to L-leucine for 3h( $p < 0.05$ ).

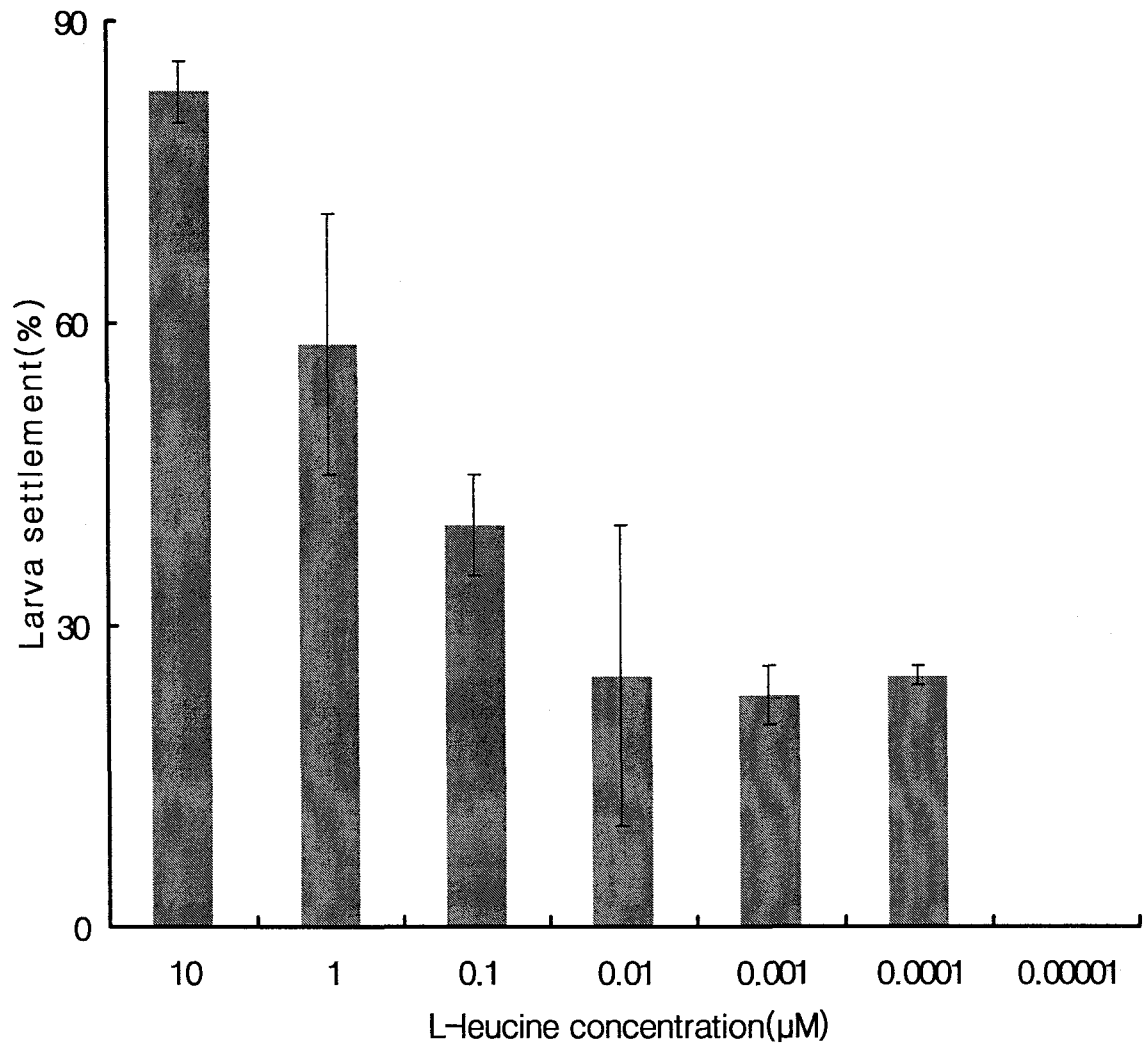


Fig. 22. Mean percent settlement of *Urechis unicinctus*'s larva in response to L-leucine for 24h( $p < 0.05$ ).

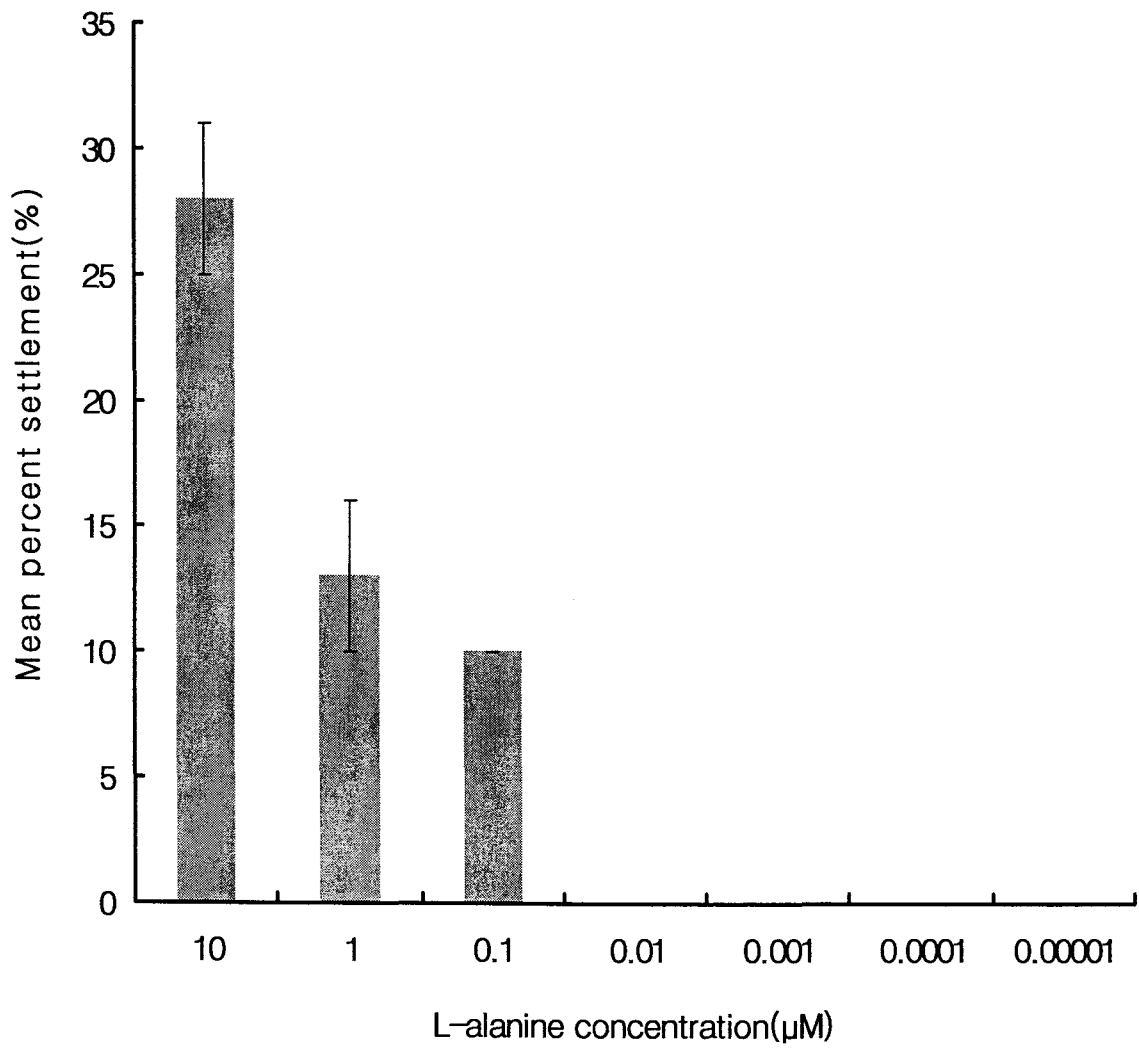


Fig. 23. Mean percent settlement of *Urechis unicinctus*'s larva in response to L-alanine for 3h( $p < 0.05$ ).

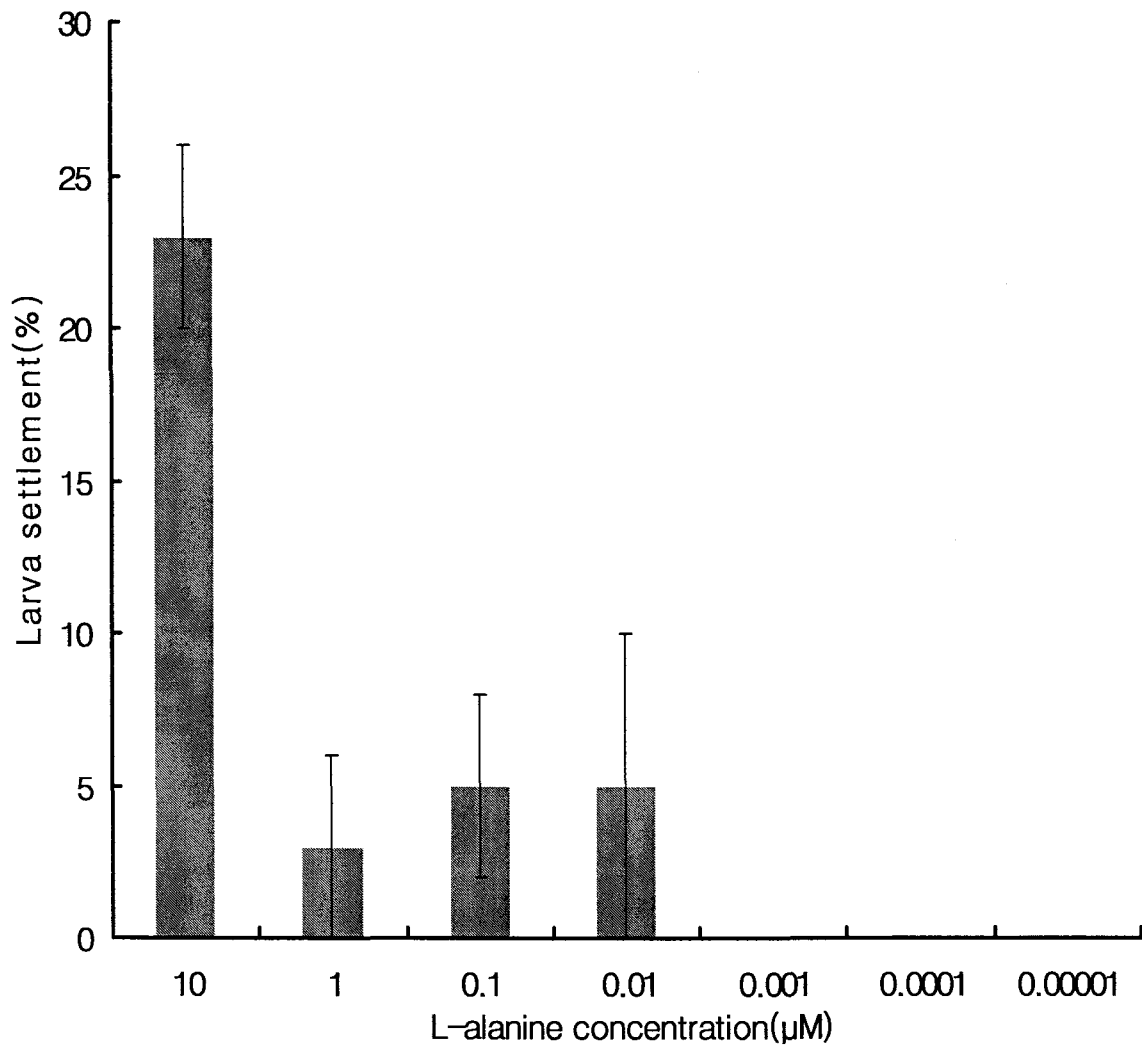


Fig. 24. Mean percent settlement of *Urechis unicinctus*'s larva in response to L-alanine for 24h( $p < 0.05$ ).

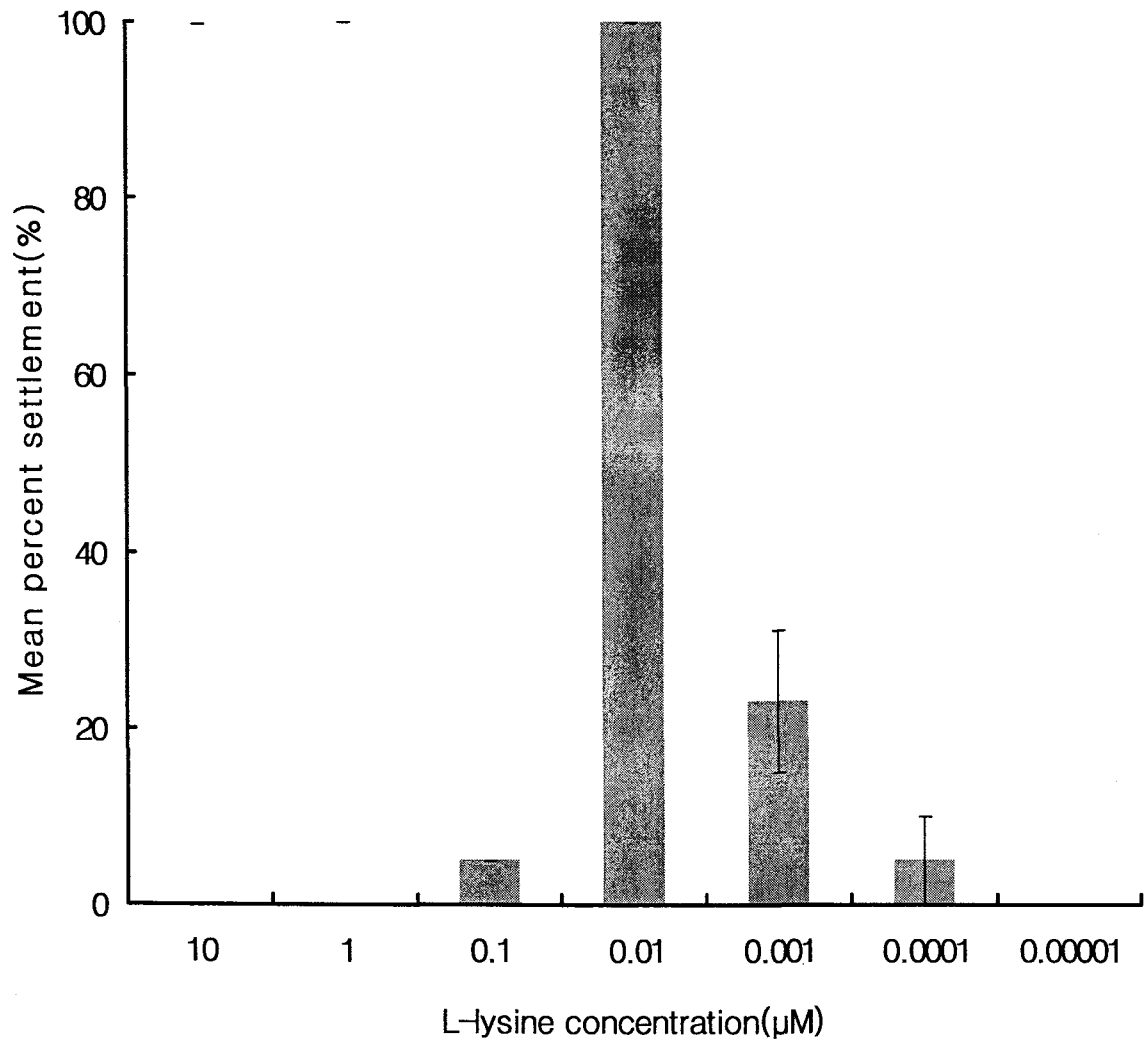


Fig. 25. Mean percent settlement of *Urechis unicinctus*'s larva in response to L-lysine for 3h( $p < 0.05$ ).

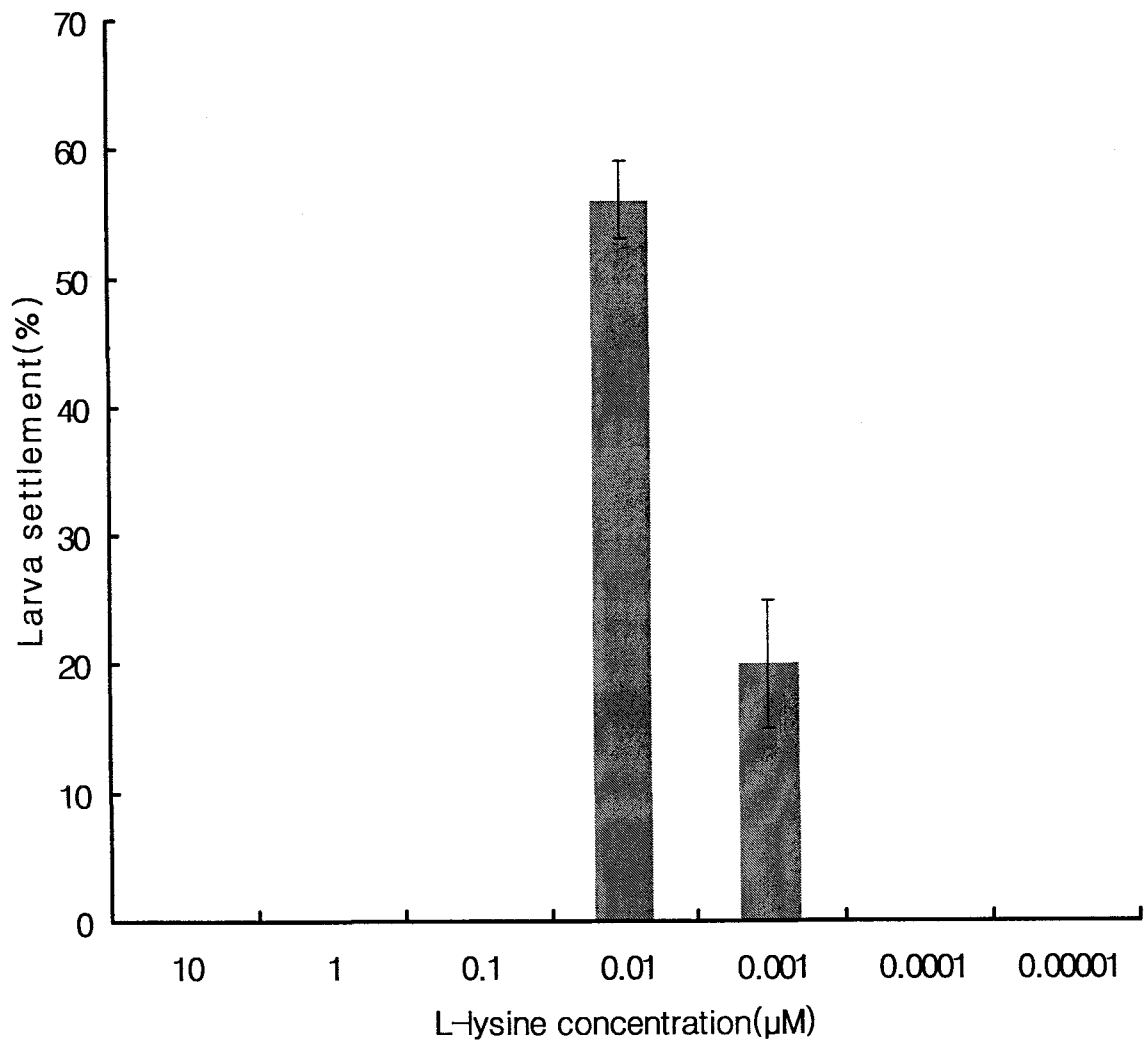


Fig. 26. Mean percent settlement of *Urechis unicinctus*'s larva in response to L-lysine for 24h( $p < 0.05$ ).

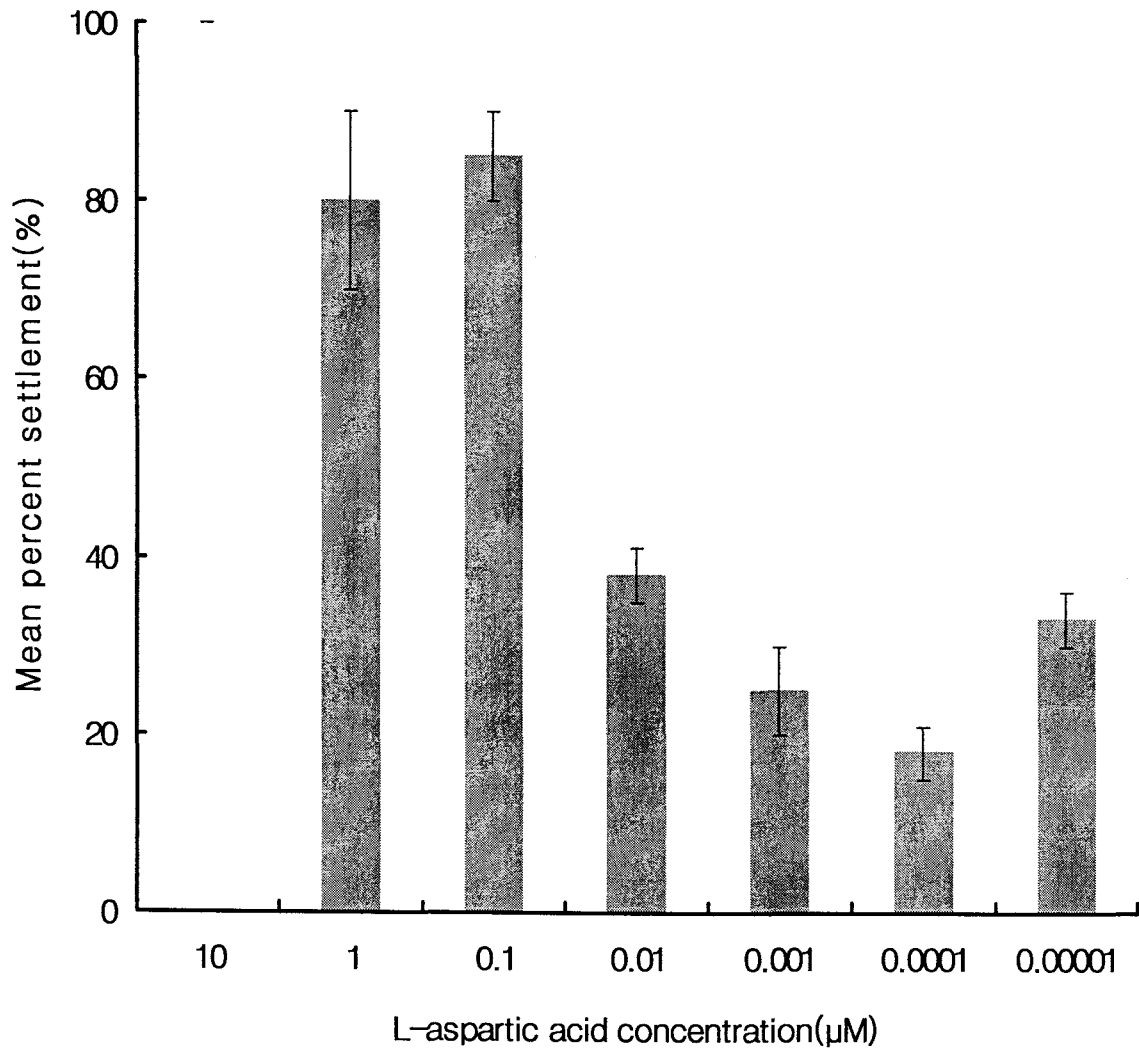


Fig. 27. Mean percent settlement of *Urechis unicinctus*'s larva in response to L-aspartic acid for 3h(p<0.05).



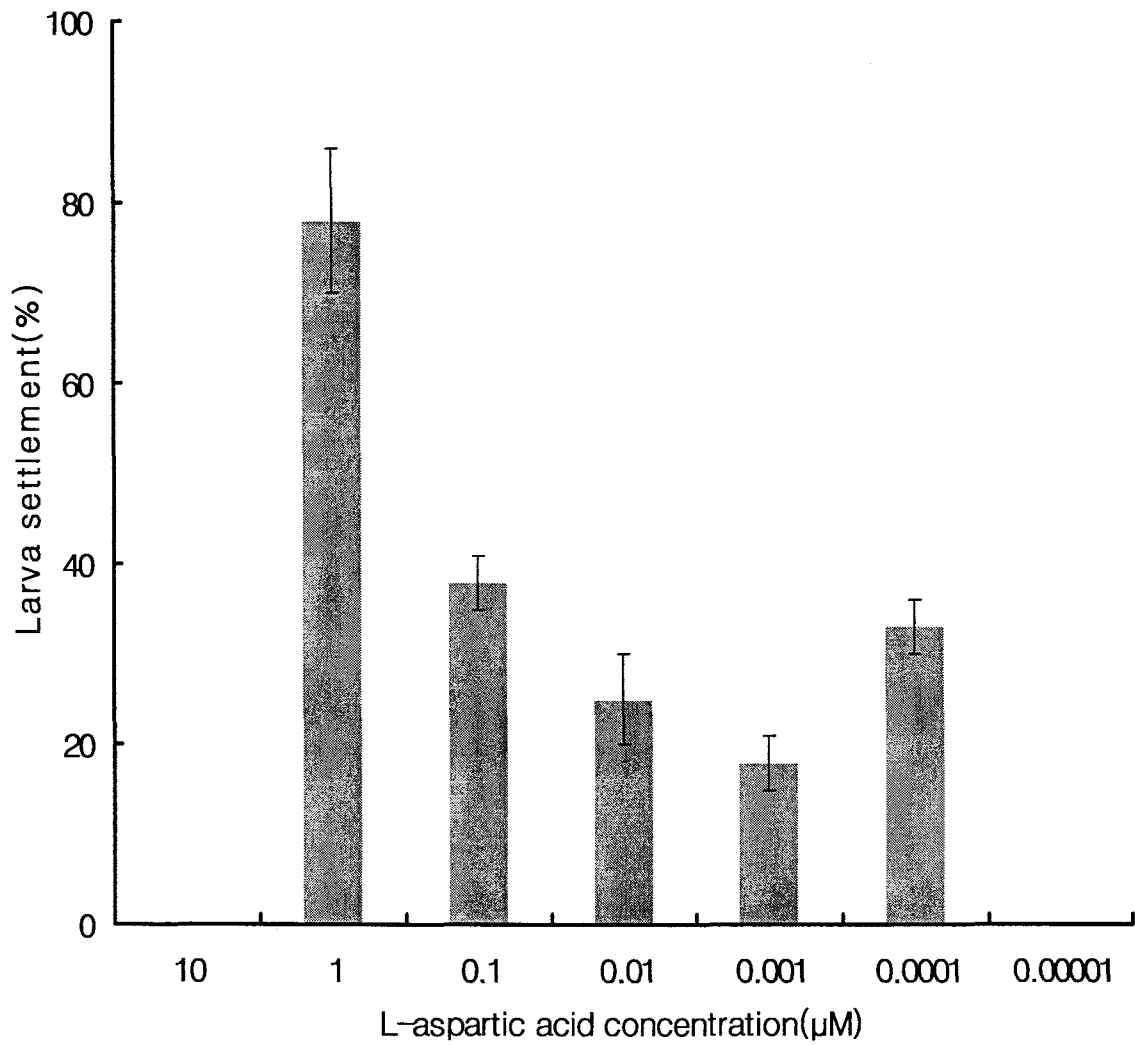


Fig. 28. Mean percent settlement of *Urechis unicinctus*'s larva in response to L-aspartic acid for 24h( $p < 0.05$ ).

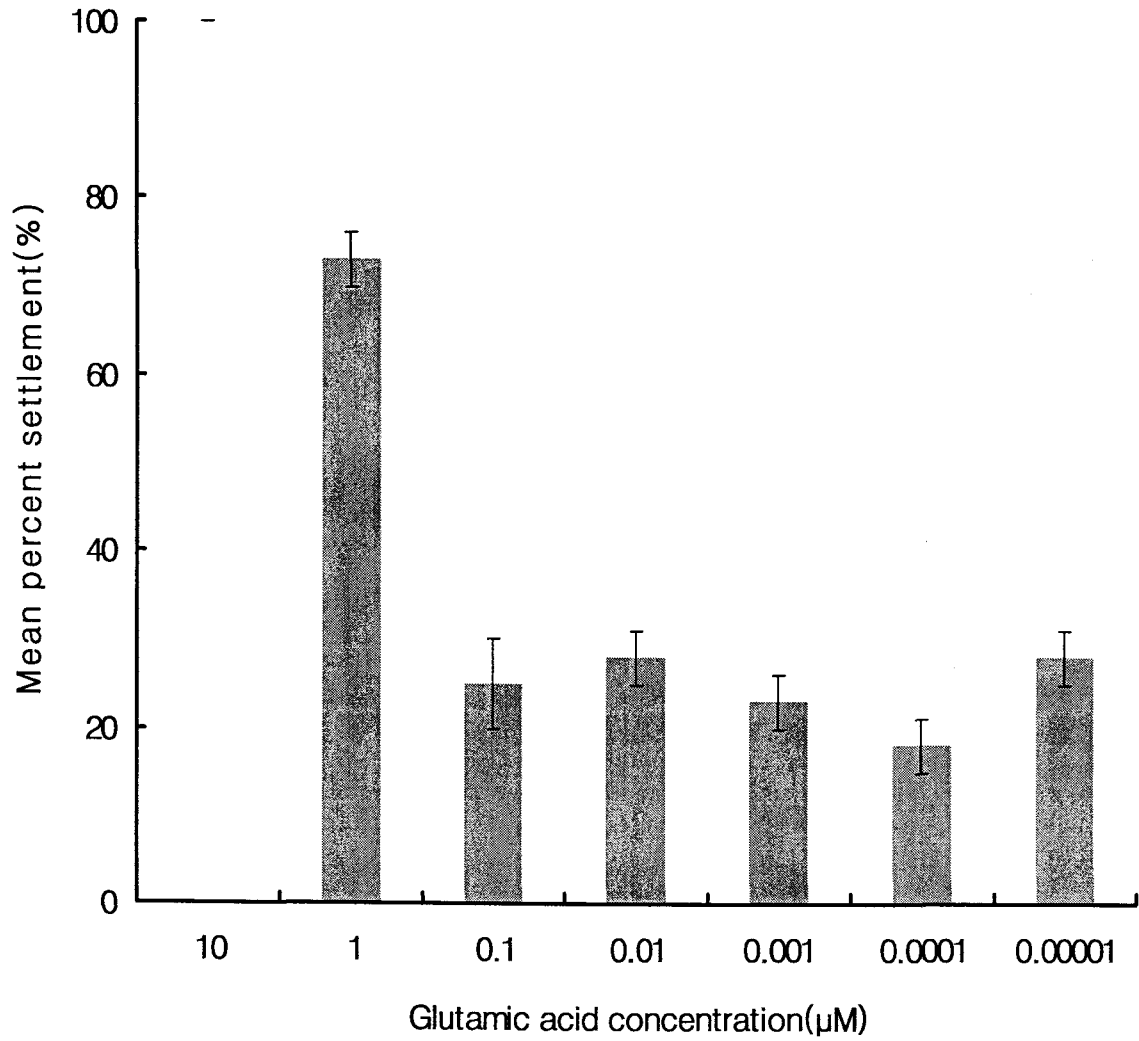


Fig. 29. Mean percent settlement of *Urechis unicinctus*'s larva in response to glutamic acid for 3h( $p < 0.05$ ).

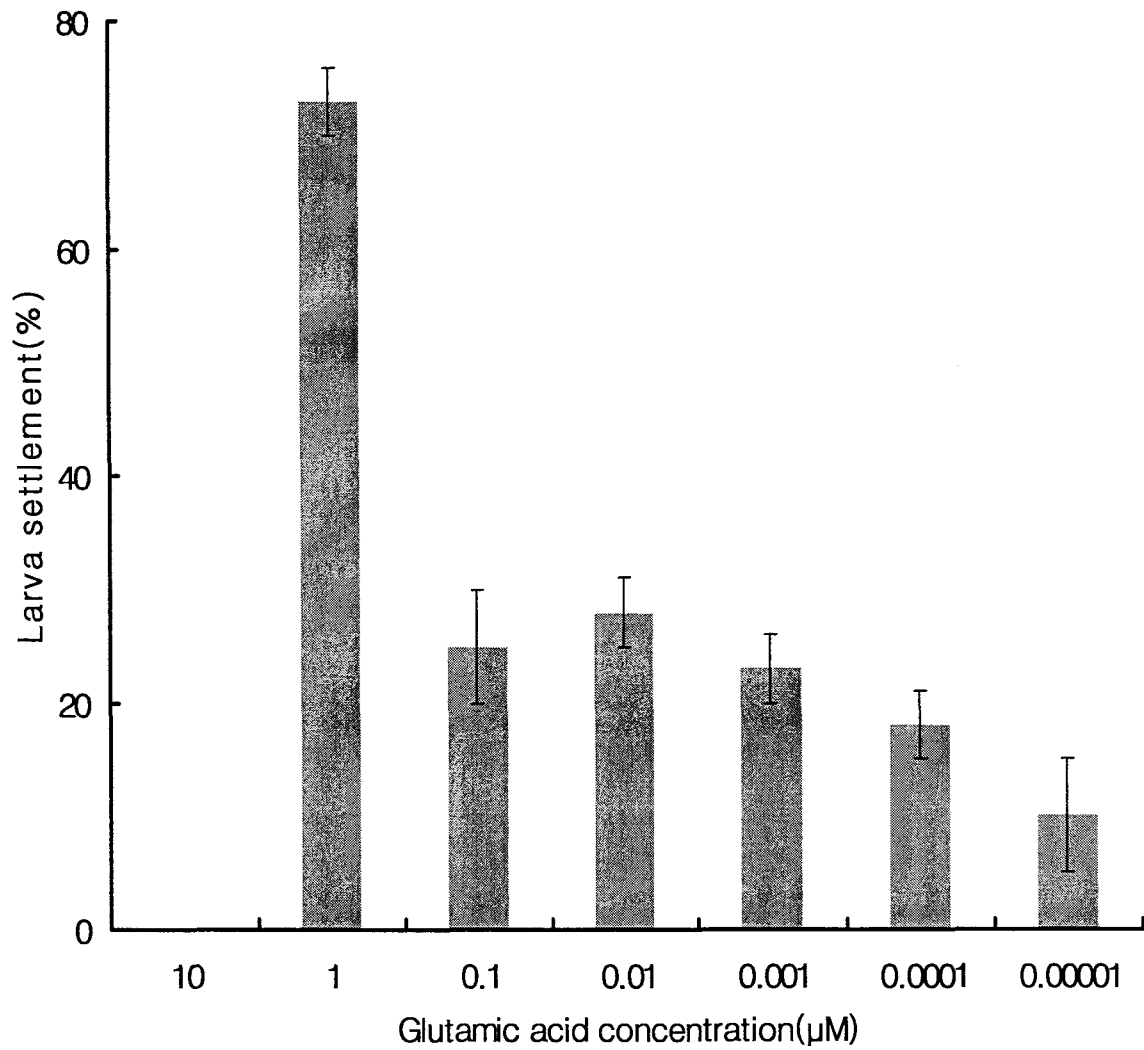


Fig. 30. Mean percent settlement of *Urechis unicinctus*'s larva in response to glutamic acid for 24h(p<0.05).

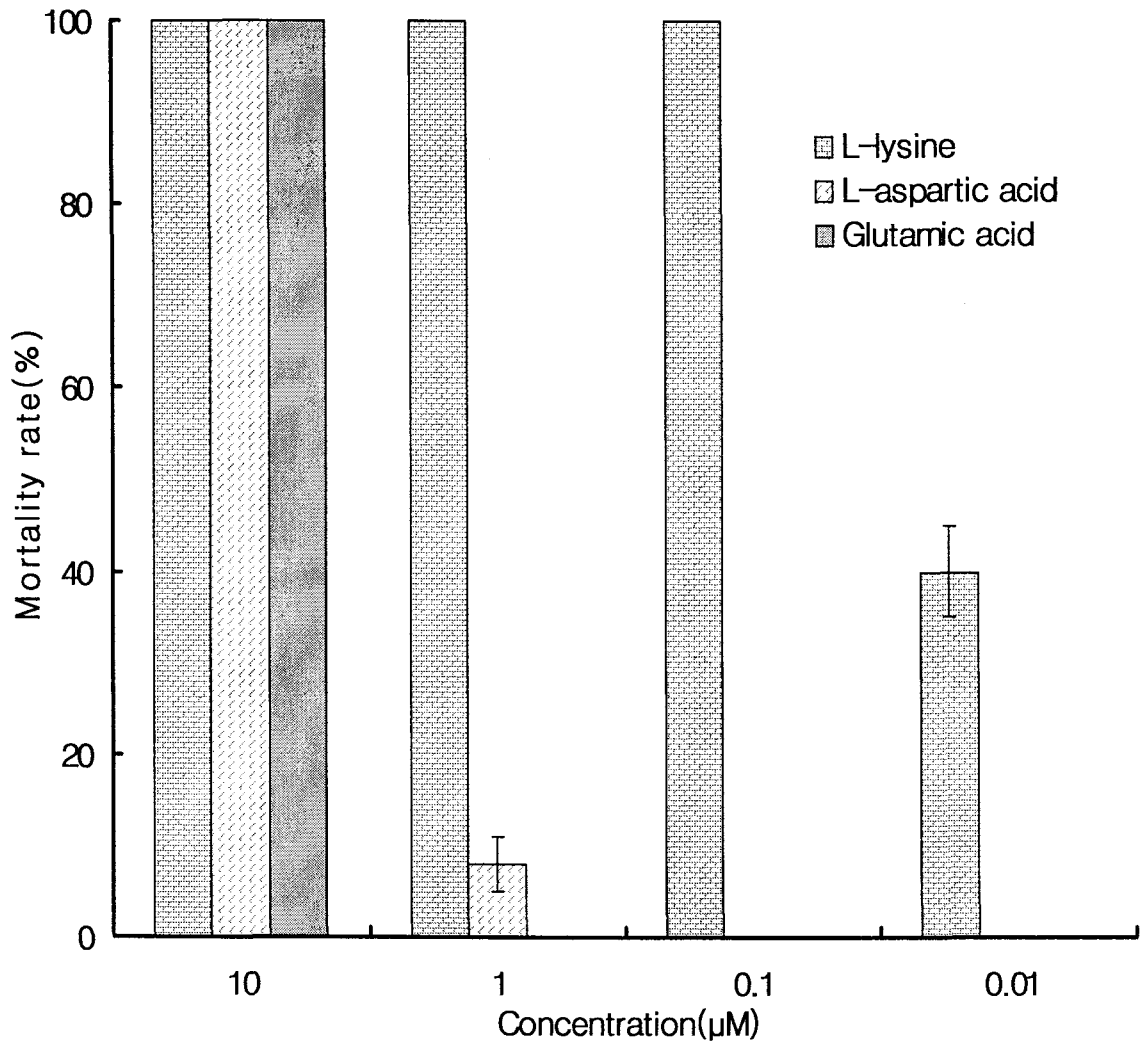


Fig. 31. Mortality of *Urechis uncinatus*'s larva in each concentration (p<0.05).

Table 7. Compare with response to amino acid

Amino acid	Species		
	<i>Urechis uncinatus's</i> larva	<i>Banulnus amphitrite's</i> larva (Yayant & Hitoshi, 2000)	<i>Dugesia dorotoce's</i> (小泉 修, 1982)
Glycine (10 <sup>-5</sup> M)	—	+	—
Lysine (10 <sup>-5</sup> M)	++	—	++
Leucine (10 <sup>-5</sup> M)	+	++	—
Aspartic acid(10 <sup>-5</sup> M)	+	--	--
Glutamic acid(10 <sup>-5</sup> M)	+	+	—
Alanine (10 <sup>-5</sup> M)	—	—	—

\* ++: much; +: moderate; -: little or none.

## 제 5 장 종묘생산기술개발

개불 양식을 가능케 하는데 있어 종묘생산기술개발은 중요한 부분으로 본 연구에서는 개불 인공종묘생산을 위하여 난의 건강도를 파악하고, 개불의 난경, 난발생 및 자치어 발달양상을 조사하여 종묘생산 기술개발에 직접 이용 가능하도록 한다.

또한, 종묘생산시 난발생에 미치는 적정 수온, 염분, pH 등을 조사하여 개불유생과 치어 사육을 위한 최적 조건구명을 위해 사육수온의 범위, 크기별 사육밀도, 수조의 형태, 조도, 적정 사료의 종류, 공기의 공급량 등 제반 요인에 대해 조사한다. 아울러 치어의 생존률을 높일 수 있는 최적 먹이생물을 구명하고, 사료의 공급량, 공급횟수 등 종묘생산에 필요한 인위적 요인을 연구한다.

### 제 1 절 개불어미의 저질입도별 선택성과 굴의 형태

#### 1. 재료 및 방법

개불의 양식시 사용가능한 저질의 입도별 선택성 및 잠입을 실험에서는 Fig. 32과 같은 원형수조(지름 60 cm×높이 25 cm)를 이용하여 5개의 실험구를 설치하고, 저질을 입도별로 넣은 4개구의 저질층은 저질 15 cm깊이로 하였다. 각 실험구는 저질의 입도별로 나누어 전라남도 여수시 돌산읍 해안의 펄질(평균입도 0.02 mm)을 A구, 직경 0.10 mm이하의 구역을 B구, 직경 0.11~0.50 mm의 구역을 C구, 직경 0.51~1.00 mm의 구역을 D구, 1.01~2.00 mm의 구역을 E구, 그리고 저질이 없는 구역을 F구로 한 뒤 평균체중  $40.8 \pm 1.2$  g의 개불을 저질이 없는 F구에 수용하여 20일 후에 개불이 위치해 있는 저질을 조사하였으며, 이와 병행하여 잠입된 개체수도 파악하였다. 또한 실험기간 중 폐사개체는 매일 관찰하였다.

저질선택성 조사시 공급한 먹이생물은 연속통기배양법으로 순수배양된 *Chaetoceros calcitrans*였으며, 사용할 때의 접종일시는 접종후 5일이 경과한 것으로 먹이공급량을 매일 ml당 50,000 세포로 공급하였다.

개불이 저질속에서 서식하면서 만드는 굴의 형태를 알아보기 위하여는 검은 비닐로 덮은 유리수조(길이 30 cm × 두께 3.0 cm × 높이 20 cm)에 평균체중  $43.7 \pm 0.8$  g의 개체 5마리를 수용하여 서식하는 굴의 형태를 관찰하였다.

개불의 저질잠입에 대한 수직분포를 알아보기 위한 실험장치에서는 직경 10 cm, 길이 10 cm의 PVC 파이프 5개를 50 cm가 되도록 테이프로 연결하여, 그 속에 저질을 채운 원통 2개에 개불을 10개체씩 수용하여 저질 깊이별 개불의 분포를 조사하였다. 이 때 환수량은 분당 100 ml로 하였고 먹이는 공급하지 않았다.

## 2. 연구결과 및 고찰

개불의 저질선택성 실험기간 중 수조내 자연해수의 수온 및 pH의 변화는 Fig. 32와 같이 각각  $13.0 \sim 18.5^\circ\text{C}$ ,  $7.64 \sim 7.83$ 로 비교적 안정적이었다.

저질의 입도별 선택성을 조사한 결과는 Table 8과 같이, 전남 여수시 돌산읍 굴전리 해안의 펄 질을 채운 A구에서는 4개체가 잠입하여 20.0%의 잠입율을 보인 반면, 시판용 모래인 입도가 0.10 mm 이하인 B구에서는 25.0%의 잠입율을 나타내었고, 입도 1.01~2.00 mm인 E구에서는 15.0%의 잠입율을 보여 저질의 입도가 커질수록 잠입율이 낮아지는 경향을 보였다. 한편 저질이 없는 F구의 경우는 한 마리도 관찰되지 않았다. 개불의 서식환경 특성에서 관찰한 바와 같이 개불은 사니질에서 서식하므로 개불의 종묘생산시에도 저질을 사니질로 형성하는 것이 바람직하다고 생각된다.

또한, 개불이 저질속에서 만드는 굴의 형태는 Fig. 33에서 보는 바와 같이 J형, L형, S형 및 U형등으로 다양하였고 모든 굴속에는 한 개체씩 들어가 있었다. 개불의 수직분포에 대한 결과는 Table 9와 같이 10개체를 수용하였을 경우, 10cm깊이에는 30.0%의 잠입율을 보였고, 10~20cm 깊이에는 27.4%가 잠입해 있었다. 이외에도 그 잠입율은 극히 낮지만 20~30cm 깊이의 저질에서도 잠입하고 있었다. 또한 잠입 깊이별 체중의 분포를 보면 평균 체중  $47.8 \pm 1.7$ g 범위인 개체들이 위쪽에 서식하고 있고,  $65.3 \pm 4.5$ g 범위인 중형개체들이 10~20cm 깊이에  $93.0 \pm 0$ g 범위인 대형개체가 가장 깊은 곳에 잠입하고 있었다. 본 연구에서 나타난바와 같이 개불이 성장함에

따라 서식깊이가 달라지는 것을 단적으로 나타낸 것으로 생각되어지며, 또한 층별로 양식이 가능할 것으로 생각되어지므로 고밀도의 양식이 가능할 것으로 사료되어진다.



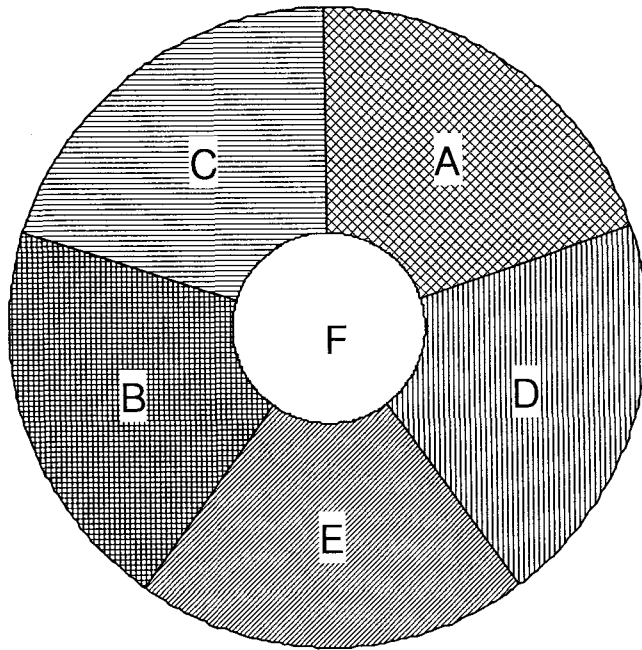


Fig. 32. Schematic diagram for burrowing behavior of *Urechis unicinctus* on the various sediment size. A : 0.02 mm in mean diameter, B : <0.10 mm, C : 0.11~0.50 mm, D : 0.51~1.00mm, E : 1.01~2.00 mm, F : blank

Table 8. Burrowing rates of *Urechis unicinctus* after 20 days in each experimental tank with different grain size

	Experimental group					
	A	B	C	D	E	F
No. of burrowed	4	5	7	3	1	0
Burrowing rate(%)	20.0	25.0	35.0	15.0	5.0	0

A : 0.02 mm, B : <0.10 mm, C : 0.11~0.50 mm, D : 0.51~1.00 mm E : 1.01~2.00 mm, F : blank.

Table 9. Distribution and body weight of burrowing *Urechis unicinctus* in every 10cm depth of sediment.

Sediment depth	Individual	Body weight
0 ~ 10	3	47.8±1.7
10 ~ 20	6	65.3±4.5
20 ~ 30	1	93.0±0
30 ~ 40	0	-
40 ~ 50	0	-

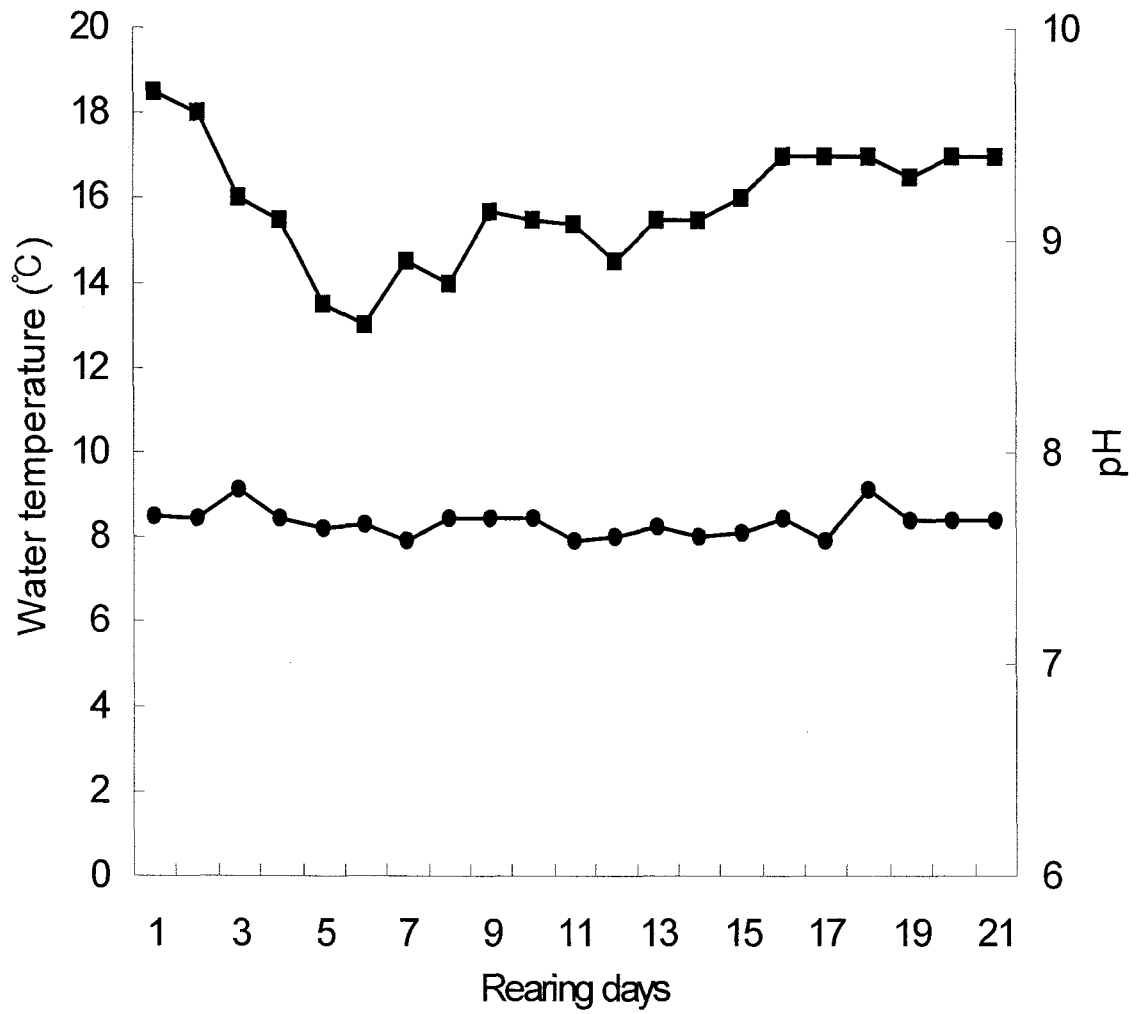


Fig. 33. Variation of water temperature(■) and pH(●) of rearing sea water during the experiment period.

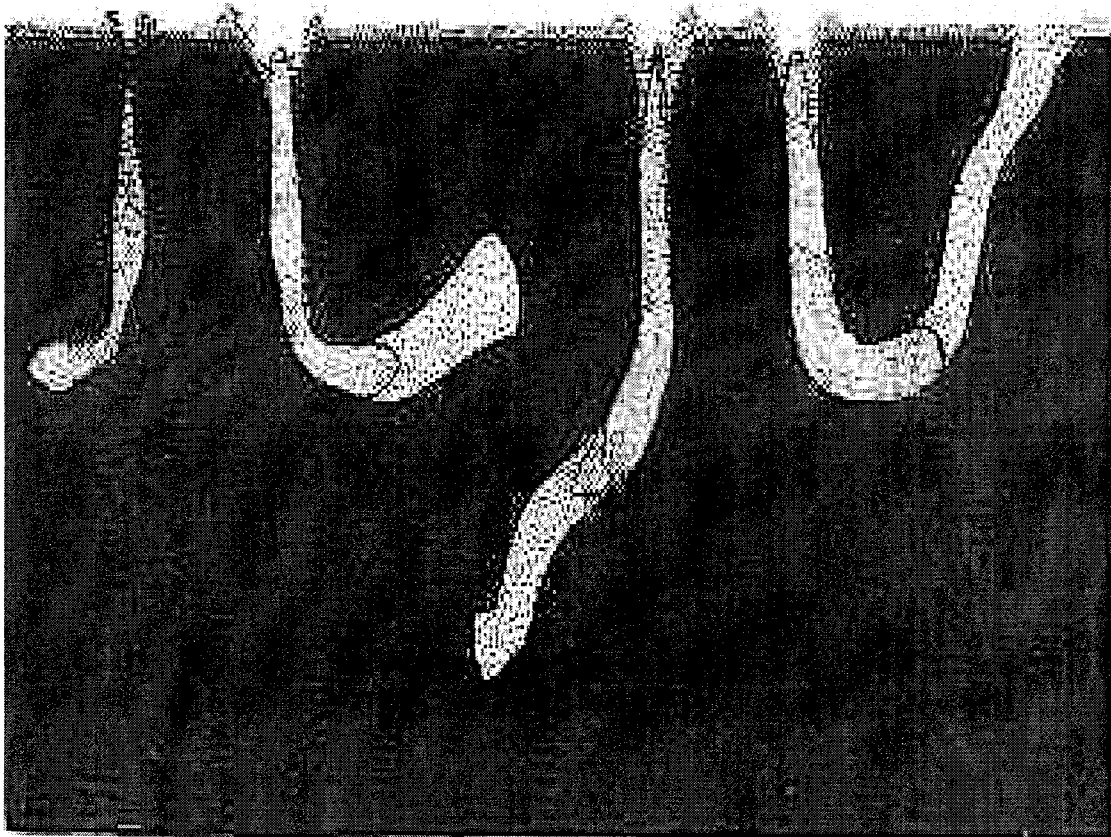


Fig. 34. The various types of *Urechis uncinatus* burrow.

## 제 2 절 난발생과 유생의 변태과정

### 1. 재료 및 방법

인공수정을 위하여 구강부터 절개한 후 인위적으로 압박을 가하여 개불의 난낭과 정낭을 채취하였다. 저정낭은 투명성이 있는 회백색이고, 저난낭은 노란색 혹은 흰 유백색이므로 난자와 정자의 구별이 가능하다. 그리고 채취된 난은 nylon mesh로 걸러 난의 크기가  $100\mu\text{m}$  이상인 것을 실험에 사용하였다. Millipore( $0.45\mu\text{m}$ )로 여과시킨 해수  $1000\text{ml}$ 를 비이커에 넣고, 그속에 개불의 알을 넣어 비이커 바닥에 한 층으로 고르게 하였다. 정자는 개불의 수컷에서 정낭을 채취한 후 멸균피펫으로  $1\text{ml}$ 를 채취하여 여과해수에 약 100배로 희석시켜 개불의 난이 들어 있는 비이커에 정자현탁액을  $1\text{ml}$ 을 넣어 수정을 시켰다. 난은 95% 수정되었으며, 수정한 후 상등액을 제거하고, 다시 여과해수로 채워주는 과정을 반복하는 것으로 세란시켜 polyspermy가 되지 않도록 유의하였다.

### 2. 연구결과 및 고찰

성숙한 개불의 난은 난경이  $110\mu\text{m}$ (평균)로 원형이며, 담황색이고, 핵안의 극체가 중앙에서 약간 빗겨져 한쪽으로 치우쳐있는 분리침성난이었다.

성숙한 개불 어미로부터 채취한 난을 정자현탁액으로 수정시켜 난 발생과정을 조사하였다(Fig. 34). 정자와 난자가 결합하면 난의 표면에 수정막이 나타나고, 다른 정자는 안으로 들어오지 못하게 된다. 수정된 후 약 10분 정도 경과되면 크기가 확대되고, 수정난의 내부는 핵이 없어지고 핵융합이 일어난다. 제1극체와 제2극체는 차례로 밀려져 올라가며, 어떤 경우에는 제1극체가 분리하여 극체가 3개로 나타나기도 했다. 이 과정은  $15^{\circ}\text{C}$ 에서 약 25~30분 정도 걸렸다. 수정된 후 핵융합이 끝나면 극체가 방출되고, 극체방출 뒤에는 세포분열이 진행되었다. 수정된 후 2세포기까지는 약 2시간 30분이 소요되었으며, 수정난은 분열과정을 거쳐 2개의 똑같은 세포

로 나뉘어졌고, 합몰되어 나뉘어진 후에 다시 극체를 형성하여 방출하였다. 수정란은 다시 극체를 방출하였는데 이것은 2개의 크기가 같게 나뉘어진 세포에서 각각 1개씩 방출되어 4세포기로 발달하였다. 수정란에서 4세포기까지는 약 4시간 10분정도가 소요되었다. 발생이 정상적인 난은 세포가 정방향으로 배치가 되었다. 4세포기 이후에 4개의 똑같은 세포에서 각 세포마다 약간의 시간차이가 있게 극체가 방출되어 8세포기로 발달하였다. 수정란에서 8세포기까지는 약 5시간 30분이 소요되었다. 극체방출 후에 다시 세포분열이 진행되었고, 정상적인 세포로 형성되면 같은 크기의 8개 세포가 되었는데, 이때 난의 크기는 변하지 않고, 각 세포의 크기만 줄어들었다. 8세포기 이후 내부의 극체가 각 세포에서 방출되어 16세포기로 진행되었다. 난 안에 있는 세포들은 계속해서 그 크기가 작아지고, 조밀해지며 대칭을 이루어 발달하였다. 16세포기까지 진행이 된 난은 사란이 되거나 기형이 되지 않고 거의 대부분 32세포기로 진행이 되었다. 수정된 후 7시간 20분 경과하면 64세포기가 출현하였고, 7시간 55분 후에는 대부분의 수정란이 64세포기로 발달하였다.

한편, 16세포기 이후의 수정란은 사란 또는 기형 없이 진행되는 안정된 발달과정을 보였다. 배 발생 단계 중 섬모의 출현은 64세포기가 지나면서 수정막 밖으로 나타났으며, 수정후 배 부유유생시기까지는 15시간 35분이 소요되었다. 그리고 수정후 배 부유유생시기까지는 먹이섭취 없이도 난황만으로 발생이 진행되었으며, 이때부터는 섬모운동에 의하여 움직이기 시작하였다.

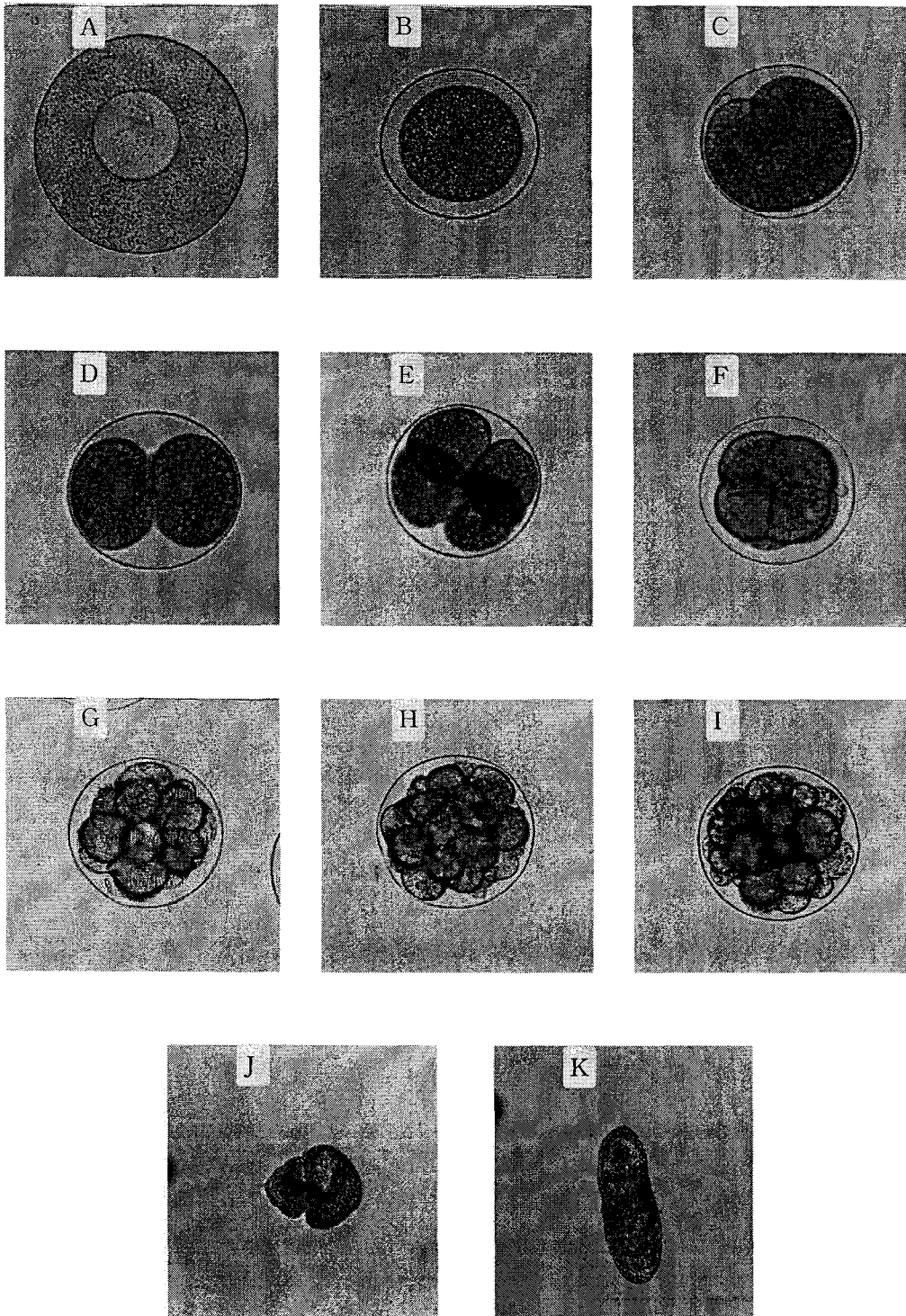


Fig. 35. Development stage of *Urechis uncinatus*.

## 제 3 절 난발생에 미치는 환경요인

### 1. 재료 및 방법

개불의 수정은 Choi et al. (1998)의 방법에 준하여 실시하였으며, 수정된 개불의 알은 다시 pH와 염분이 다른 50 ml 시험관에 약 500립씩 분주하여 난발생과정, 생존율 및 부화율을 조사하였다. pH는 여과해수에 NaOH 수용액과 HCl을 사용하여 실험에 필요한 pH를 조절하였고, pH meter (Mettler Toledo)를 이용하여 측정하였다. 염분은 증류수에 NaCl을 용해하여 실험에 필요한 인공해수를 제조하였다. 실험에 사용된 pH는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10이었으며, 이때 염분은 개불의 성체가 서식하던 곳과 비슷한 30 ‰였다. 그리고 실험에 사용된 염분은 0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ‰이었으며, 이때 pH도 개불 성체가 서식하던 곳과 비슷한 7.8이었다.

한편, 염분 및 pH 조건에 따른 개불 난발생 과정은 광학현미경 (Olympuse CN30)을 이용하여 관찰하였으며, 알에 정액을 첨가한 시각을 기준으로 발생단계별로 해당 단계에 달한 수정란의 비율이 50%가 될 때의 소요되는 시간과 각 발생단계마다의 생존율을 구하였다. 또한 온도별 난발생실험을 위하여 5, 10, 15, 20, 25°C의 실험구간에서 난발생을 관찰하였다. 그리고 모든 실험은  $14.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 에서 2회 반복 실시하였으며, 생존율과 배 발생과정에 소요되는 시간은 평균값을 사용하였다.

### 2. 연구결과 및 고찰

개불, *Urechis unicinctus*의 난낭(storage sac)에서 채취된 성숙란은 평균 직경 110  $\mu\text{m}$ 로 구형, 담황색이었고 핵은 중앙에서 약간 빗겨져 한쪽으로 치우쳐 있는 분리침성란이었다. 수정은 Choi et al.(1998)의 방법에 준하여  $15 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 에서 채취한 알을 정자현탁액으로 수정시켰다. 난 발생과정 중 소요시간에 따른 수정란의 pH별 생존율을 조사한 결과는 Fig. 35에서 보는 바와 같다. pH 4에서는 실험시작 2.8시간이 소요되었을 때 약 10%의 수정란이 2세포기로 까지 진행되었으나, 배 발생은 더



이상 진행되지 못하고 모두가 사란으로 되었다. 그러나 pH 5~10에서의 수정란은 64세포기를 걸쳐 배 유생기까지 진행되었다. 수정 후 16세포기까지 발생되었을 때 수정란의 생존율은 pH 5, 6, 7, 8, 9, 10에서 각각 70, 70, 80, 75, 60, 70%이었고, 그후 32세포기, 64세포기를 걸쳐 배 부유유생기가 되었을 때 수정란의 생존율은 각각 60, 60, 70, 70, 60, 55%이었다.

한편, 수정란은 pH 7과 8을 제외한 다른 실험구에서 기형과 사란이 일부 나타났으며, 주로 8세포기와 16세포기에서 기형과 사란으로 발생하였다. 한편, pH별 수정란의 부화율을 나타내면 Fig. 36와 같다. pH 4 이하의 산성에서 수정란은 모두 난막이 붕괴되었으며, 부화율은 0%였다. 그러나 pH 5~10에서는 55~70%의 부화율을 보인 반면, pH 10에서는 21.8%의 부화유생이 비정상적인 발생으로 인하여 부유하지 못하고 바닥에 남아 있는 것이 관찰되었다. 한편, pH별 각 발생단계에 이르기까지의 평균 소요 시간은 큰 차이가 없었다. 수정 후 16세포기까지 발생되는데 소요되는 시간은 pH 5, 6, 7, 8, 9, 10에서 각각 5.5, 5.4, 5.4, 5.3, 5.5, 5.6시간이었다. 그후 32세포기, 64세포기를 거쳐 배 부유유생기까지 발생하는 데 소요되는 시간은 각각 14.1, 13.9, 13.4, 13.3, 13.6, 14.0시간이었다.

개불 배 발생과정 중 소요시간에 따른 수정란의 염분별 생존율을 조사한 결과는 Fig. 33에서 보는 바와 같다. 염분 0%와 10%에서 수정란은 2세포기까지 발생하지 않았으며, 염분 40%인 실험구에서는 4시간 30분 경과 후에 2세포기로 진행되었으나 기형란이 90%이상 이었다. 그리고 염분 45%에서는 극체방출후 배 발생은 더 이상 진행되지 않은 반면, 염분 20~35%에서 수정란은 64세포기를 걸쳐 배 유생기까지 진행되었다. 염분 20, 25, 30, 35%에서 수정 후 16세포기까지 발생되었을 때 수정란의 생존율은 각각 70, 66, 80, 60%이었고, 그후 32세포기, 64세포기를 거쳐 배 부유유생기가 되었을 때 수정란의 생존율은 각각 60, 63, 78, 60%이었다. 한편, 수정란은 염분 20%와 35%에서 기형과 사란이 일부 나타났으며, 주로 8세포기와 16세포기에서 기형과 사란이 관찰되었다. 한편, 염분별 수정란의 부화율을 나타내면 Fig. 34과 같다. 염분10% 이하의 저염분과 40% 이상의 고염분에서 수정란은 모두 난막이 붕괴되었으며, 부화율은 0%였다. 그러나 염분 20~35%에서는 60~78%의 부화율을 보인 반면, 염분 20%에서는 10%의 부화유생이 비정상적인 발생으로 인하

여 부유하지 못하고 바닥에 남아 있는 것이 관찰되었다. 염분별 각 발생단계에 이르기까지의 평균 소요 시간은 큰 차이가 없었다. 수정 후 16세포기까지 발생되는데 소요되는 시간은 염분 20, 25, 30, 35‰에서 각각 5.2, 5.1, 5.5, 5.8시간이었다. 그후 32세포기, 64세포기를 거쳐 배 부유유생기까지 발생하는데 소요되는 시간은 각각 13.9, 13.8, 13.7, 14.0시간이었다.

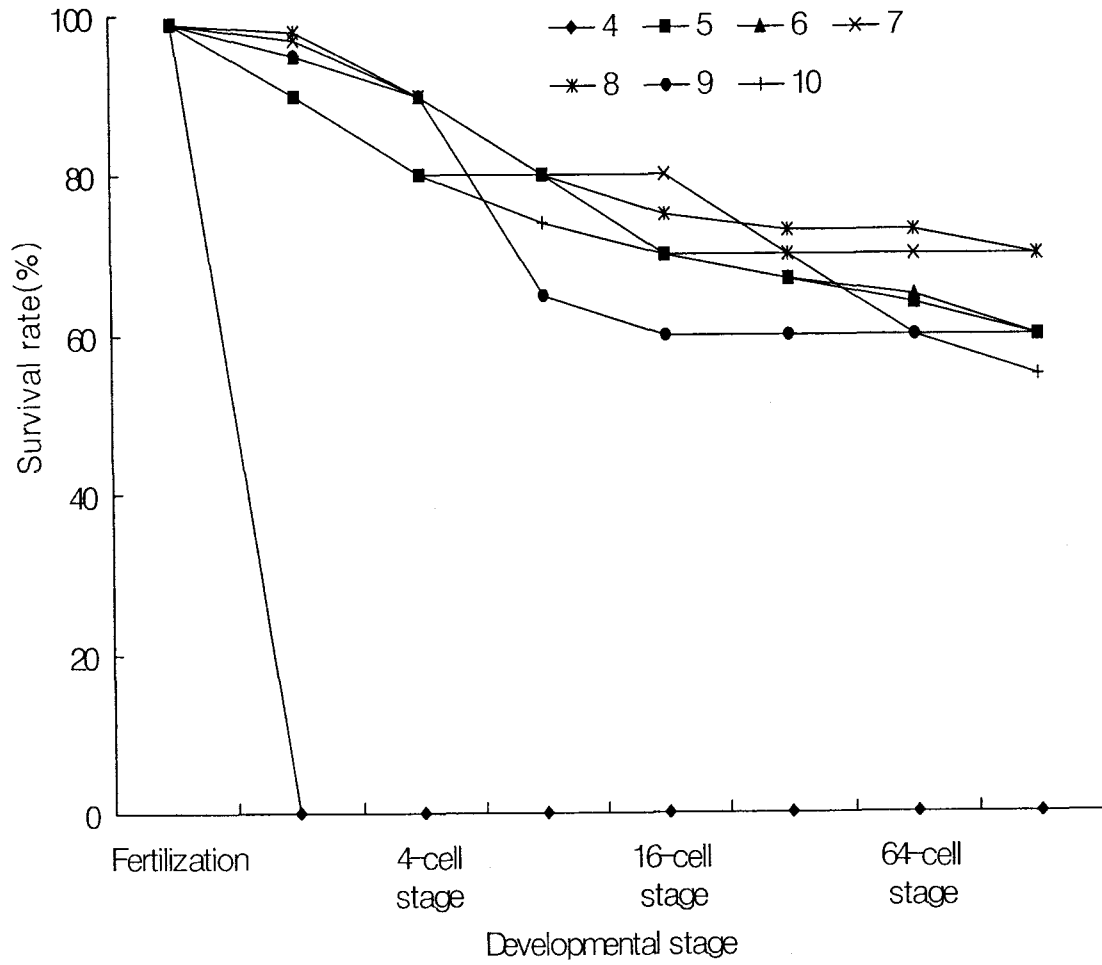


Fig. 36. Survival rate of fertilized eggs of *Urechis unicinctus* at various pH.

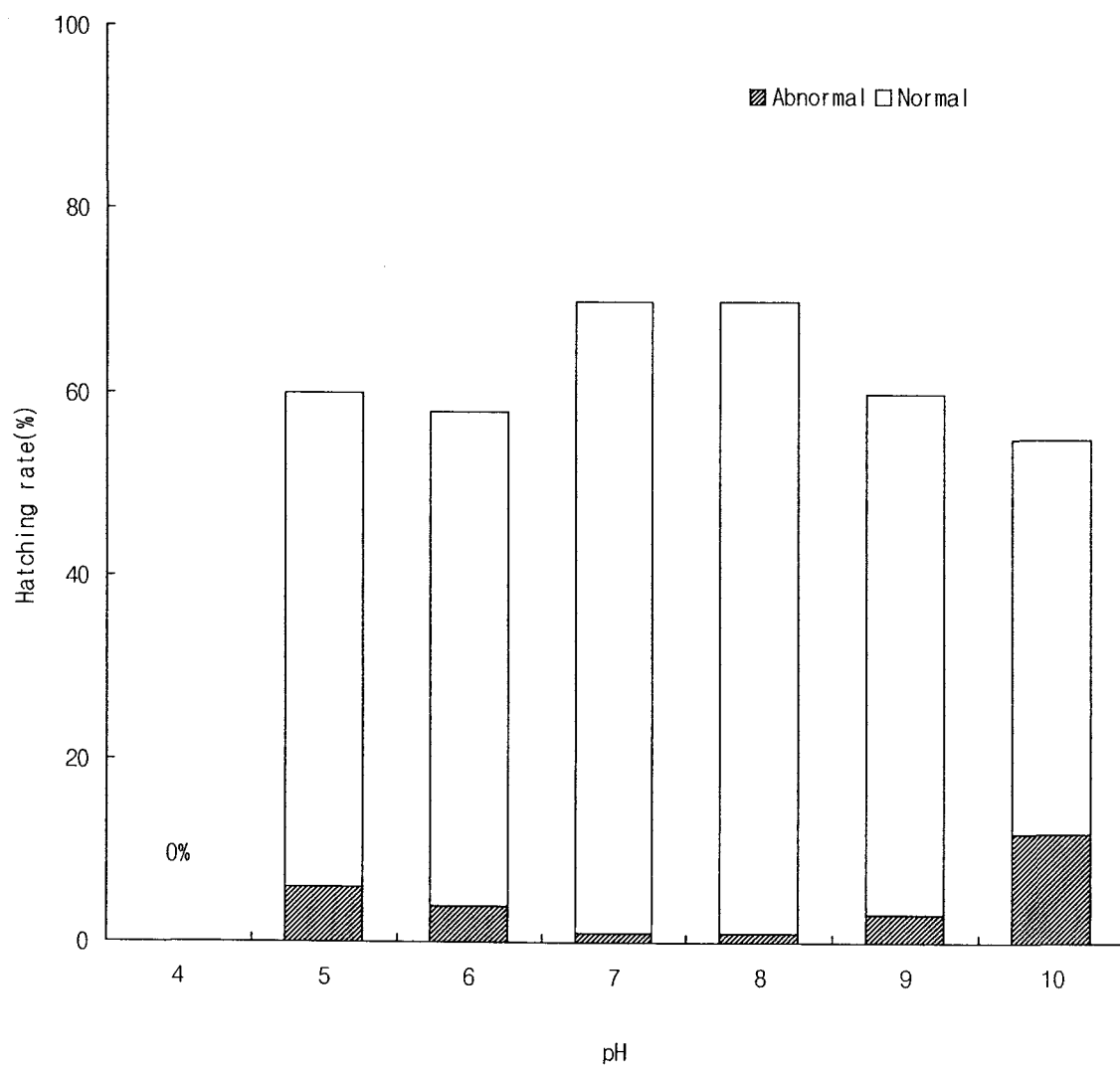


Fig. 37. Hatching rate of fertilized eggs of *Urechis uncinatus* at various pH.

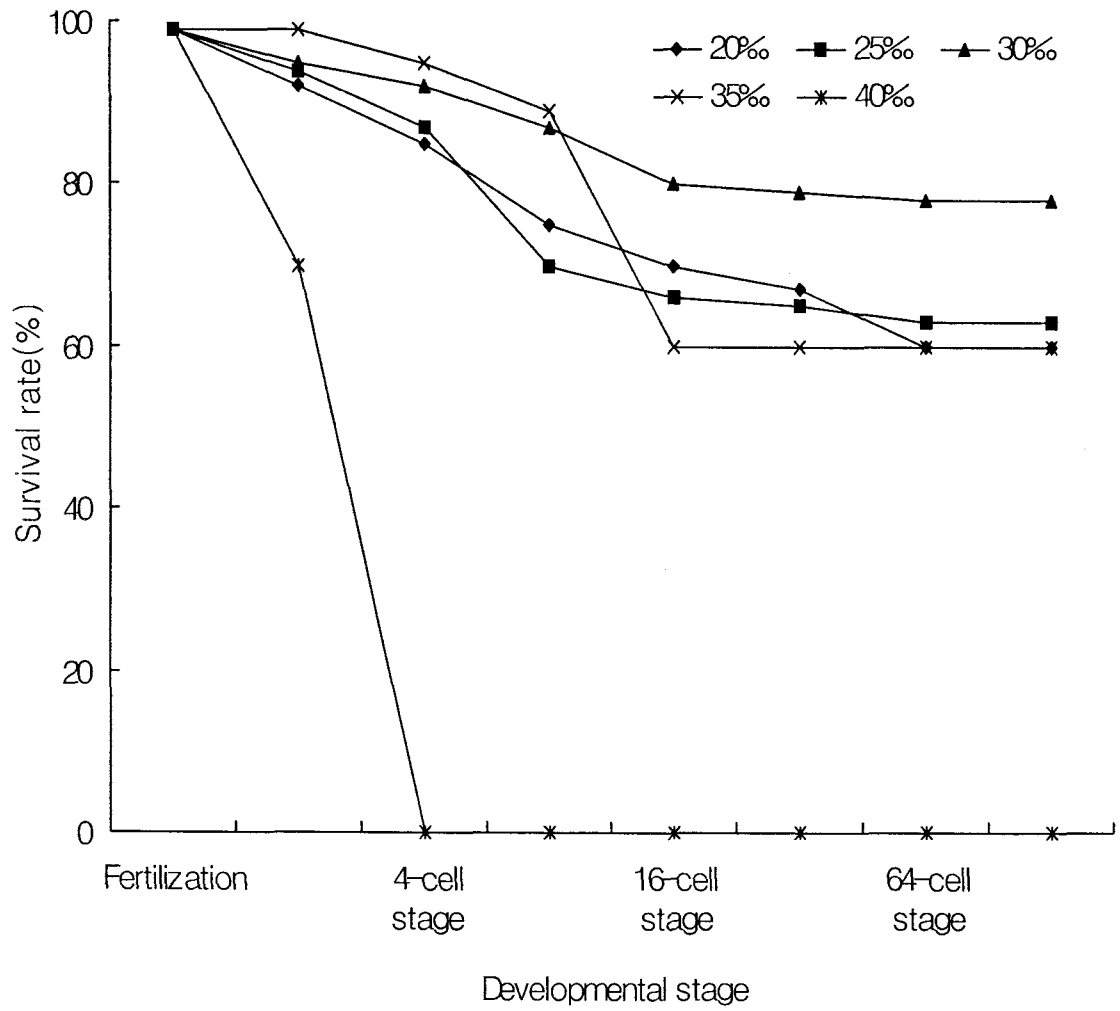


Fig. 38. Survival rate of fertilized eggs of *Urechis uncinctus* at various salinities.

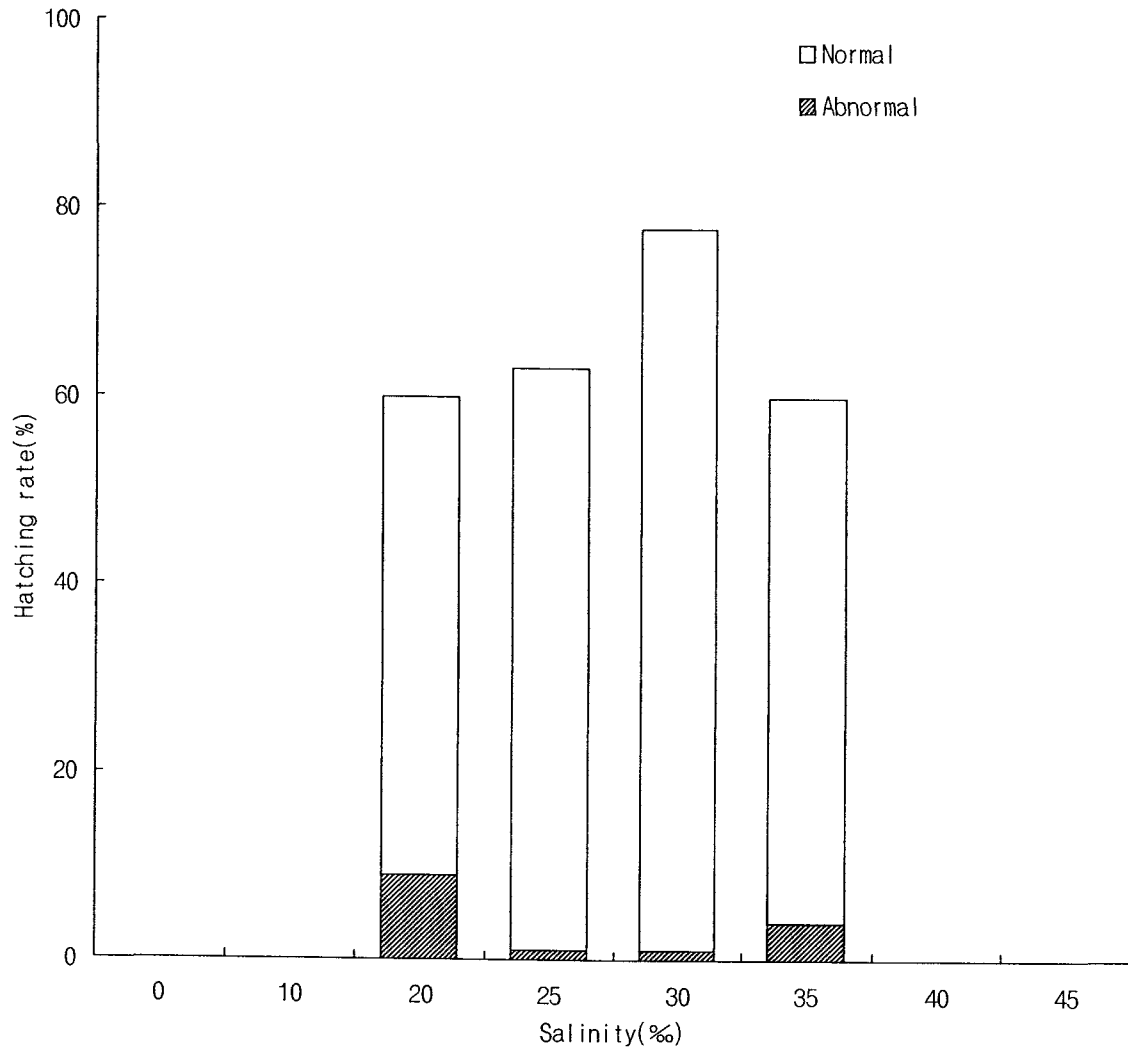


Fig. 39. Hatching rate of fertilized eggs of *Urechis uncinatus* at various salinities.

## 제 4 절 먹이별 유생의 성장 및 생존율

### 1. 재료 및 방법

전라남도 여수시 제 3·4지구 잠수기 수협에서 어획한 개불로서, 크기와 활력이 비슷한 암컷 10마리와 수컷 4마리를 이용하여 절개법에 의하여 수정한 후 유생에 대한 먹이별 성장과 생존율, 그리고 혼합투여시 성장과 생존율을 구하였다. 실험에 사용한 개불의 어미에 GSI는 각각 21.2와 20.1이었다(Table 10).

실험에 사용된 부화유생은 수정 후 3일이 경과된 평균체장  $172 \pm 5.78 \mu\text{m}$ 인 담륜자유생이었다. 실험에 사용된 먹이생물은 연속 통기배양법으로 순수배양된 *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*였고, 실험구 설정은 각 먹이생물별 단독구, *C. calcitrans*+*I. galbana*구, *C. calcitrans*+*P. lutheri*구, *I. galbana*+*P. lutheri*구, *C. calcitrans*+*I. galbana*+*P. lutheri*구와 대조구로서 무투이구를 반복 설정하였다. 공급량은 매일 30,000 cells/ml 농도로 공급하였고, 유생이 30  $\mu\text{m}$ 씩 성장함에 따라 10,000 세포씩 증가하여 공급하였다. 유생사육 밀도는 1 ind./ml 였고, 사육 수온은 20℃였으며, 사육수는 2일마다 전환수 하였다. 사육기간중의 성장과 생존은 5일마다 관찰하였고, 성장은 광학현미경하에서 체장을 측정하였다. 생존율은 사육수 전체를 교반한 후에 일정량을 10 ml 피펫으로 추출하여 계산한 뒤 용적비례로 산정하였다.

Table 10. Mean weight, length and GSI of *Urechis unicinctus*

No. of adult		Body length ±SD (cm)	Total weight ±SD (g)	GSI (Female : Male)
Female	Male			
10	4	14.5±2.1	84.8±14.7	21.2 : 20.1

## 2. 연구결과 및 고찰

무척추동물의 먹이생물로 가장 많이 배양되는 *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*를 먹이로 공급하여 개불 유생의 성장과 생존을 실험 결과는 Table 11와 같다.

실험개시시 평균체장  $17 \pm 5.42 \mu\text{m}$ 이던 개체가 30일 경과 후 3가지 혼합 공급구에서  $541 \pm 8.21 \mu\text{m}$ 로 성장하여 가장 높은 성장과 생존율을 나타내었고, 실험 25일째에는 13체절가유생이 저면에서 연동운동에 의해 이동하는 것을 볼 수 있었다. 또한 2가지 먹이생물을 혼합하여 공급한 실험구에서는 *I. galbana*+*P. lutheri* 공급구에서  $500 \pm 7.81 \mu\text{m}$ 로 성장하여 가장 성장률이 높았고 *C. calcitrans*+*P. lutheri* 공급구가  $492 \pm 5.66 \mu\text{m}$ , *I. galbana*+*C. calcitrans* 공급구  $486 \pm 8.32 \mu\text{m}$  순이었으나 성장의 유의한 차이는 없었다. 먹이생물 단일종을 공급할 경우 30일 경과 후 *P. lutheri* 공급구가  $443 \pm 6.21 \mu\text{m}$ 로 성장하였고, *I. galbana* 공급구가  $427 \pm 8.34 \mu\text{m}$ , *C. calcitrans* 공급구가  $406 \pm 6.62 \mu\text{m}$ 로 성장한 반면 먹이생물을 공급하지 않은 대조구는 18일 경과 후 모두 폐사 하였다. 생존율은 대조구를 제외한 전 실험구에서 58.7~62.4%의 범위로 유의차가 없었다(Table 11).

지금까지 개불 유생의 먹이 선택성에 관하여 연구된 바는 없으나, 무척추동물 양식시 가장 많이 배양되고 있는 *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*를 먹이로 공급하여 성장과 생존을 조사한 결과 3가지 혼합 공급구에서 가장 높은 성장과 생존을 나타내었다. 따라서 개불 인공종묘생산시에는 혼합 공급하는 것이 적절하다고 생각되며 자연 조건 하에서 개불의 먹이생물 연구가 뒤따라야 할 것이라 판단된다.

한국산 개불 중에서 산업적으로 가장 중요한 *Urechis unicinctus*의 양식기법 개발에 관한 기초자료를 얻기 위하여, 개불 유생의 먹이선택성을 조사한 결과, 개불은 *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* 혼합 공급구에서 성장률이 가장 높았고, 생존율 또한 30일 경과후 62.4%로 가장 높았다. 반면에 먹이생물을 공급하지 않은 대조구에서는 실험 18일째에 모두 폐사하였다. 2가지 먹이생물을 혼합하여 공급한 실험구에서는 *I. galbana*+*P. lutheri* 공급구에서  $500 \pm 7.81$



$\mu\text{m}$ 로 성장하여 가장 성장률이 높았고, *C. calcitrans*+*P. lutheri* 공급구가  $492\pm 5.66$   $\mu\text{m}$ , *I. galbana*+*C. calcitrans* 공급구  $486\pm 8.32$   $\mu\text{m}$  순이었으나 성장의 유의한 차이는 없었다. 먹이생물 단일종을 공급할 경우 30일 경과 후 *P. lutheri* 공급구가  $443\pm 6.21$   $\mu\text{m}$ 로 성장하였고, *I. galbana* 공급구가  $427\pm 8.34$   $\mu\text{m}$ , *C. calcitrans* 공급구가  $406\pm 6.62$   $\mu\text{m}$ 로 성장한 반면 먹이생물을 공급하지 않은 대조구는 18일 경과 후 모두 폐사 하였다. 생존율은 대조구를 제외한 전 실험구에서 58.7~62.4%의 범위로 유의차가 없었다.

Table 11. Survival rate and survival rate of *Urechis unicinctus* fed with different feeds

Feed	Body length ( $\mu\text{m}$ )			Survival rate (%)
	Initial	15 days	30 days	
Control	172 $\pm$ 5.42	238 $\pm$ 7.63	-	-
<i>I. galbana</i>	172 $\pm$ 5.42	304 $\pm$ 6.38	427 $\pm$ 8.34 <sup>cd</sup>	59.3 <sup>a</sup>
<i>P. lutheri</i>	172 $\pm$ 5.42	315 $\pm$ 5.32	443 $\pm$ 6.21 <sup>c</sup>	60.0 <sup>a</sup>
<i>C. calcitrans</i>	172 $\pm$ 5.42	300 $\pm$ 6.84	406 $\pm$ 6.62 <sup>d</sup>	58.7 <sup>a</sup>
<i>I+P</i>	172 $\pm$ 5.42	356 $\pm$ 8.10	500 $\pm$ 7.81 <sup>b</sup>	60.9 <sup>a</sup>
<i>I+C</i>	172 $\pm$ 5.42	346 $\pm$ 7.21	486 $\pm$ 8.32 <sup>bc</sup>	60.2 <sup>a</sup>
<i>C+P</i>	172 $\pm$ 5.42	350 $\pm$ 6.98	492 $\pm$ 5.66 <sup>b</sup>	59.4 <sup>a</sup>
<i>I+P+C</i>	172 $\pm$ 5.42	387 $\pm$ 9.24	541 $\pm$ 8.21 <sup>a</sup>	62.4 <sup>a</sup>

Data presented as mean $\pm$ SD

\*values within the same column with different letters are significantly different (P<0.05). *C* : *Chaetoceros calcitrans*, *I* : *Isochrysis galbana*, *P* : *Pavlova lutheri*.

## 제 5 절 먹이별 치층의 성장 및 생존율

### 1. 재료 및 방법

실험에 사용된 어미는 전라남도 여수시 제 3·4지구 잠수기수협에서 어획한 개불로서, 크기와 활력이 비슷한 암컷 5마리와 수컷 2마리를 이용하여 절개법에 의하여 수정하였는데, 각각의 GSI는 13.1와 12.3이었다(Table 12).

Table 12. Measurement of *Urechis unicinctus* used in spawning induction the experiment

No. of adult		Body length $\pm$ SD(cm)	Total weight $\pm$ SD(g)	GSI(Female : Male)
Female	Male			
5	2	15.1 $\pm$ 3.1	94.7 $\pm$ 12.5	13.1 : 12.3

실험에 사용된 유생은 부화 직후의 평균체장  $163 \pm 2.52 \mu\text{m}$ 인 trochopore유생를 이용하였다. 먹이생물은 연속 통기배양법으로 순수배양된 *Chaetoceros calcitrans*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloris oculata*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Tetraselmis seucica*으로, Conwy culture medium (Walne, 1974)을 사용하였다. 실험구 설정은 각 먹이생물별 단독 공급구를 반복 설정하였고, 공급량은 매일 30,000 cells/ml 농도로 공급하였으며, 유생이 30  $\mu\text{m}$ 씩 성장함에 따라 10,000 세포씩 증가하여 공급하였다

유생사육 밀도는 1 ind./ml였고, 사육 수온은 20°C였으며, 2일마다 전량 환수 하였다. 사육기간중의 성장은 5일마다 조사하였다.

## 2. 연구결과 및 고찰

무척추동물의 먹이생물로 가장 많이 이용되는 순수배양된 *Chaetoceros calcitrans*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloris oculata*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis seucica*을 먹이로 공급하여 개불 유생의 성장 실험을 한 결과, 실험개시시 평균체장  $163 \pm 2.52 \mu\text{m}$ 이던 유생이 30일 경과 후, *Chaetoceros calcitrans* 공급구에서  $503 \pm 21.34 \mu\text{m}$ , *Dunaliella tertiolecta* 공급구에서  $621 \pm 27.21 \mu\text{m}$ , *Nannochloris oculata* 공급구에서  $465 \pm 31.29 \mu\text{m}$ , *Phaeodactylum tricornutum* 공급구에서  $768 \pm 26.10 \mu\text{m}$ , *Tetraselmis seucica* 공급구에서  $472 \pm 33.85 \mu\text{m}$ 의 성장을 보여 *P. tricornutum* 공급구에서 가장 빠른 성장을 보였고, 32일째 수조 바닥으로 모두 착저하였다.

또한 평균체장  $768 \pm 26.10 \mu\text{m}$ 인 잠입 치충을 120일간 사육한 결과, *P. tricornutum* 공급구에서 평균  $3.74 \pm 0.53 \text{ cm}$ 으로 가장 빠른 성장을 보였다(Table 13). 이러한 결과를 이용하여 사육일수와 체장에 관한 상대성장식을 구해보면  $BL = 25.798RD - 207.76$  ( $r^2=0.9203$ )이었고(Fig. 39), 체장과 체폭의 상대성장식은  $BD = 0.2189BL + 22.383$  ( $r^2=0.9766$ )로 나타났다(Fig. 40).

실험결과 단독투입한 먹이 생물 중 *P. tricornutum* 가 성장률에서 가장 뛰어나 개불의 초기 먹이 생물로서 적합하다고 여겨진다.

Table 13. Growth rate and survival rate of *Urechis unicinctus* fed with different feed

Feed	Body length ( $\mu\text{m}$ )		
	Initial	30 days	Final
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	163 $\pm$ 2.52	503 $\pm$ 21.34	29840 $\pm$ 414 <sup>c</sup>
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	163 $\pm$ 2.52	621 $\pm$ 27.21	31520 $\pm$ 572 <sup>b</sup>
<i>Nannochloris oculata</i>	163 $\pm$ 2.52	465 $\pm$ 31.29	15720 $\pm$ 359 <sup>d</sup>
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	163 $\pm$ 2.52	768 $\pm$ 26.10	37400 $\pm$ 540 <sup>a</sup>
<i>Tetraselmis seucica</i>	163 $\pm$ 2.52	472 $\pm$ 33.85	18960 $\pm$ 412 <sup>d</sup>
Control	163 $\pm$ 2.52	-	-

Data presented as mean  $\pm$  SD.

\*values within the same column with different letters are significantly different (P<0.05).

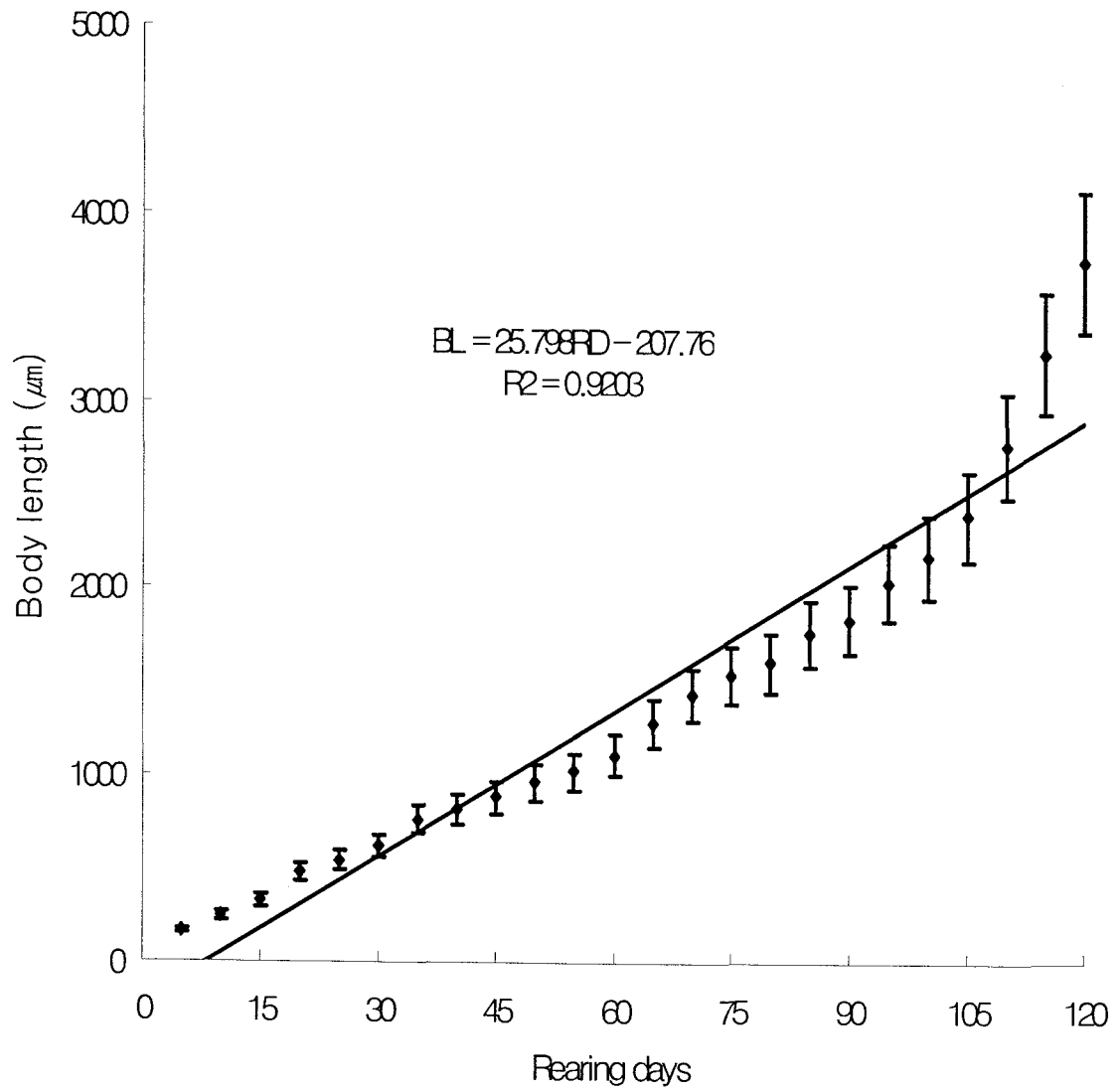


Fig. 40. Survival rate of *Urechis unicinctus* on rearing day.

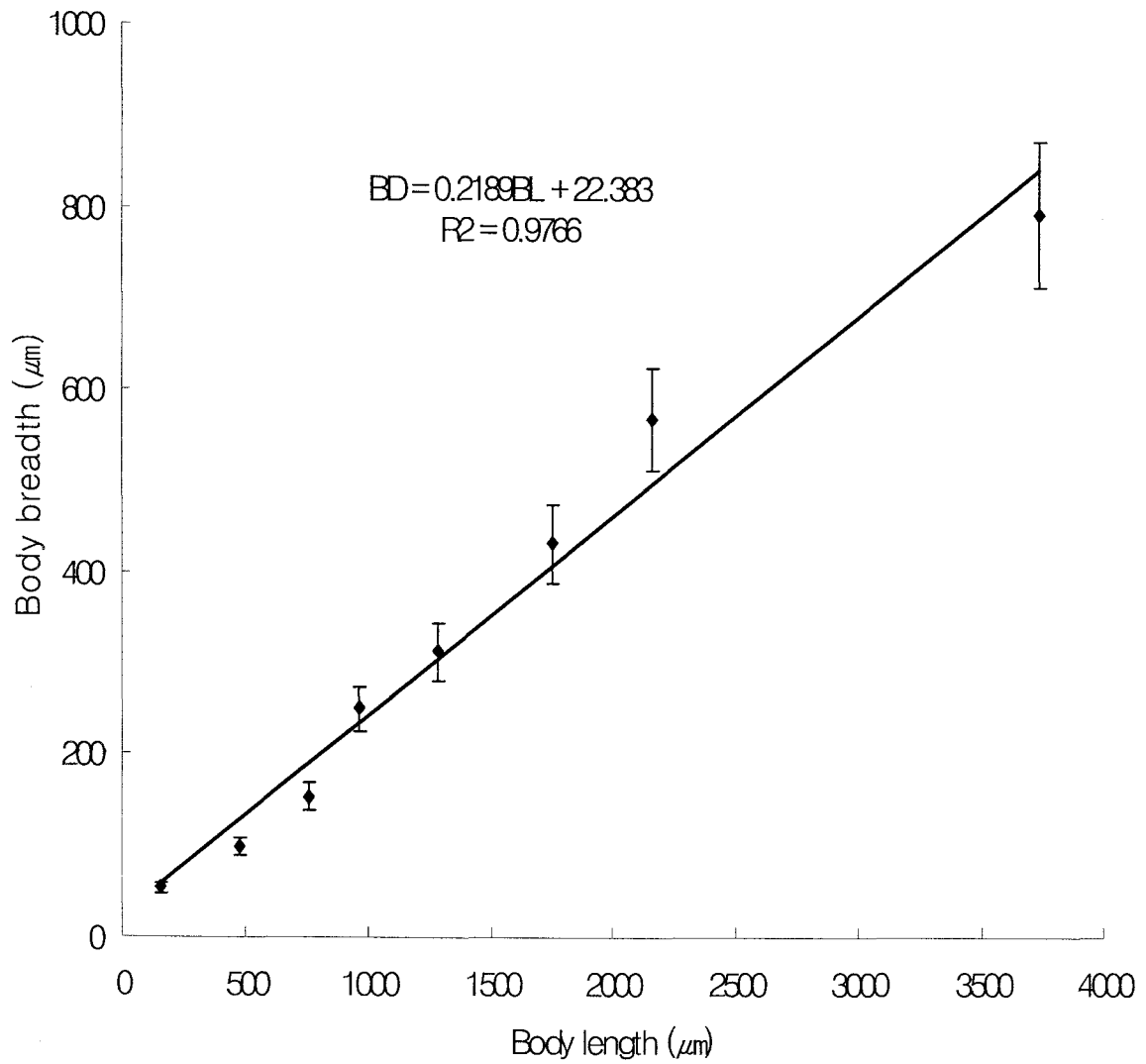


Fig. 41. Relationships between body length and body breadth of *Urechis unicinctus* larvae.

## 제 6 절 자치어 사육시 적정환경요인 조사

### 1. 재료 및 방법

저질선택성 실험에 사용된 개불 유생은 착저직전의 평균체장  $624 \pm 21.49 \mu\text{m}$ 인 부유유생이었다. 실험구 설정은 저질이 0.10 mm이하의 빨질을 A구, 직경 1.01~2.00 mm의 모래를 B구, 직경 3.0 mm이상의 조개껍질과 모래의 혼합구를 C구, 빨과 모래의 혼합구를 D구, 빨과 모래, 조개껍질 3가지 혼합구를 E구로 설정하고 부유유생 500마리를 수용한 뒤, 30일 후 관찰하였다(Fig. 41). 또한 개불의 잠입깊이를 조사하기 위해서  $\varnothing 75 \text{ mm}$  PVC파이프를 2.5 cm씩 절단하여 붙인 높이 30 cm의 원기둥을 만들고, 빨과 모래가 3 : 7의 비율로 섞인 저질을 넣었다. 그 후 평균체장  $5.3 \pm 0.92 \text{ mm}$ 인 개불 치총 30마리를 수용한 뒤, 3일 후 관찰하였다.

먹이로 공급된 먹이생물은 연속 통기배양법으로 순수배양된 *Phaeodactylum tricornutum*이었으며, 배양시의 영양배지는 Conwy culture medium (Walne, 1974)을 사용하였다. 먹이공급량은 매일 30,000 cells/ml 농도로 공급하였으며, 유생이 30  $\mu\text{m}$ 씩 성장함에 따라 10,000 세포씩 증가하여 공급하였다. 또한, 수온별 개불의 난발생 실험에 사용된 재료는 잠수기 수협에서 확보한 산란기 파악에 이용된 어미에서 절개법에 의하여 난과 정자를 추출한 후, 인공수정시켰는데, 산란에 참가한 성숙한 어미의 외부적 형태와 생식소중량지수(gonadosomatic index ; GSI)는 체장  $13.5 \pm 2.4 \text{ cm}$ , 전중  $94.8 \pm 24.7 \text{ g}$  및 14.3과 17.7으로 각각 나타났다(Table 14).

수정란의 판정은 2세포기로 난할이 진전된 개체를 수정이 이루어진 상태로 보고, 수정된 난에 충격이 가지 않도록 물을 충분히 교반시켜 난의 분산을 유도한 후, 10 ml 스포이드를 사용하여 스포이드내의 난수를 현미경하에서 계수하였으며, 이와 같은 방법을 3번 반복하여 얻은 평균치를 해수용적에 곱하여 산정하였다.

수정란의 난발생 과정에 대한 조사는 5°C부터 30°C까지 5°C간격으로 6개 실험구를 설정한 후, 각 수온구별로 난발생을 실시한 수량 2 l 실험구에 ml당 1개의 밀도로 수용한 뒤, 한시간 간격으로 광학현미경 하에서 각 발생단계별 개체수를 헤아



렸으며 발생배의 50% 이상이 해당 발생단계에 달했을 때의 소요시간을 계산하여 분석하였다. 또한 각 발생단계에 이른 발생배 가운데 형태적으로 기형을 나타내는 것은 죽은 개체로 간주하였으며, 상실배 이후의 담륜자 유생은 섬모로 선회 유영하는 것을 살아있는 것으로 판정하여 생존율을 조사하였다. 수온별 초기발생속도를 파악하기 위한 난 및 유생발생과정의 중요한 단계는 8세포, 상실배 및 담륜자기로 구분하였다. 수온과 각 발생단계별 소요시간과의 관계식과 각 발생단계까지의 소요시간 및 적산수온과의 관계식은 강(1988)에 의한 방법을 사용하였다.

Table 14. Measurement of *Urechis unicinctus* used in spawning induction the experiment

No. of adult		Body length ±SD(cm)	Total weight ±SD(g)	GSI (Female : Male)
Female	Male			
40	40	13.5±2.4	94.8±24.7	14.3 : 17.7

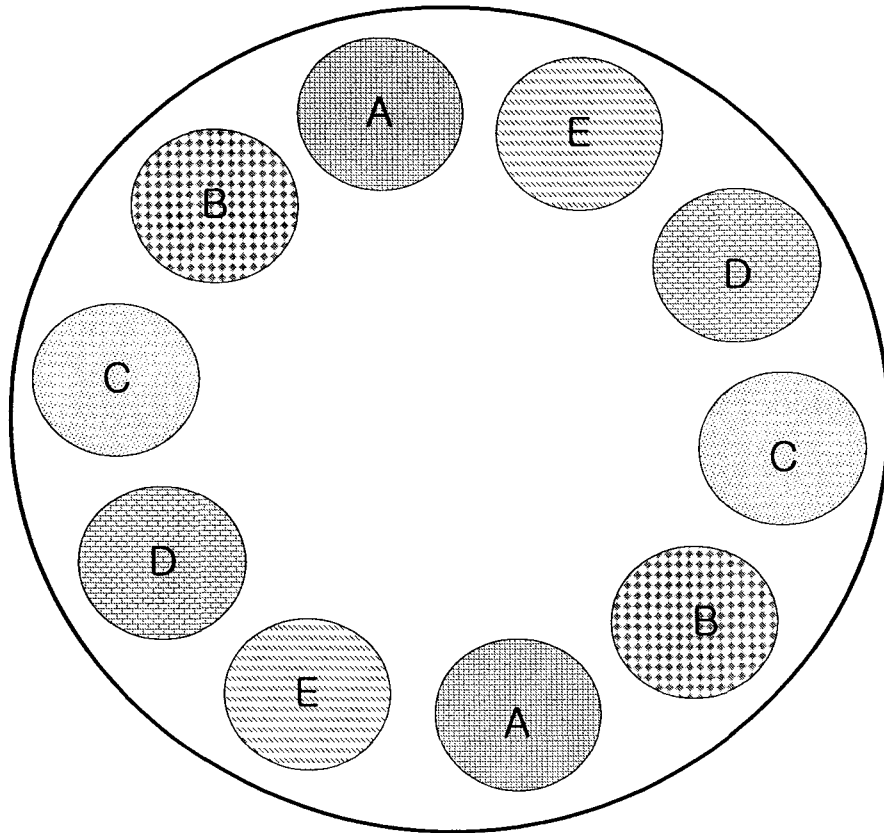


Fig. 42. Schematic diagram for burrowing behavior of *Urechis uncinatus* of the various sediment size. A :  $<0.10$  mm, B : 1.01~2.00 mm, C :  $>3.01$  mm  
Shell+B, D : A+B, E : A+C

## 2. 연구결과 및 고찰

개불의 저질선택성을 실험개시 30일 경과 후 조사한 결과, 저질이 펠인 A구에서 31마리, 조개껍질과 모래의 혼합구인 C구에서 23마리, 펄과 모래의 혼합구인 D구에서 21마리, 펄, 모래와 조개껍질 혼합구인 E구에서 32마리가 관찰된 것에 반해 저질이 모래인 B구에서는 한 마리도 관찰되지 않았고(Table 15), 이러한 결과를 도식화해 보면 Fig. 42과 같은 분포양상을 나타내었다. 또한 개불의 잠입깊이를 조사하기 위한 실험 결과, 2.5~5 cm, 5~7.5 cm구간에서 각각 10마리가 관찰되었고, 나머지 구간에서는 관찰되지 않았다(Table 16).

Table 17은 각 발생 단계의 수온별 소요시간을 나타낸 표로서 8세포기까지 10℃에서 4.2시간, 20℃에서 1.9시간이 걸린 반면, 25℃에서는 1.2시간이 소요되는 것으로 나타났다. 한편, 부화기까지의 발생소요시간은 10℃에서 97시간, 20℃에서 68시간 그리고, 25℃에서 55시간이 소요되었다.

이를 그림으로 나타내면 Fig. 38와 같이 수온(T, ℃)과 발생단계별 소요시간(h, hour)과의 관계식은

$$\text{8-cell} \quad 1/h = 0.0455 T - 0.3880 \quad (r = 0.8460)$$

$$\text{morula} \quad 1/h = 0.0057 T + 0.0102 \quad (r = 0.9859)$$

$$\text{gastrula} \quad 1/h = 0.0019 T + 0.0017 \quad (r = 0.9861)$$

으로 표시된다. 따라서, 수온이 높을수록 발생 소요시간이 짧아지고 있으며, 이 관계식에 의해 Y축이 0일때의 온도치를 구하여 본 개불의 난 발생에 있어 생물학적 영도의 평균은 2.00℃ 였다.

Fig. 39은 각 발생단계에 이르는 소요시간에 대한 수온·시간 적산치의 직선 회귀 관계를 발생 수온별로 보여주는 것으로, X축은 소요시간, 좌측의 Y축은 각 발생수온에서 생물학적영도를 넘어선 수온의 시간적인 적산치, 우측의 Y축은 각 발생단계의 Initial을 표시하였다. Fig. 40은 각 발생단계별 개불의 생존율을 나타낸 것으로서 10℃에서 2체절기에 100% 폐사하였으나 20℃에서는 13체절기까지 60%정도의 생존율을 보이고 있다. 이러한 결과로 볼 때 개불의 유생사육시 적정 수온은 15℃에서 20℃가 적당하다고 판단된다. 개불 유생의 성장단계별 체장과 체폭에 대한 상대성장은 Fig. 41과

같으며,  $BB=0.0952BL+153.86$  ( $r=0.8808$ )의 직선회귀식으로 나타났다.

Table 15. Burrowing of *Urechis unicinctus* after 30 days in each experimental tank with different grain size

Item	Sediment				
	A	B	C	D	E
No. of Burrowed	31	-	23	21	32

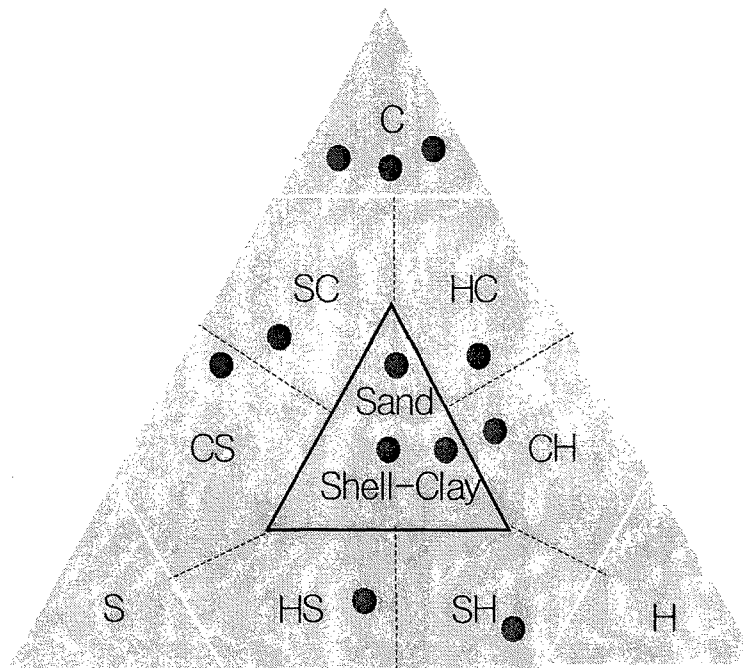


Fig. 43. Triangular diagrams of sediment composition in sampling areas. Closed circles indicate *Urechis unicinctus* distribution. C : clay, SC : sandy clay, HC : shell clay, CH : clay shell, SH : sandy shell, H : shell, HS : shell sand, CS : clayey sand, S : sand.

Table 16. Distribution of *Urechis unicinctus* in every 2.5 cm depth of sediment

Sediment depth (cm)	No. of <i>Urechis unicinctus</i>	Survival rate (%)
0~2.5	-	-
2.5~5.0	10	33.3
5.0~7.5	10	33.3
7.5~10.0	-	-
10.0~12.5	-	-
12.5~15.0	-	-

Table 17. Relationships between water temperature and time (hour) required to each developmental stage from fertilization egg

Developmental stage	Water temperature (°C)					
	5	10	15	20	25	30
8 cell	-	4.2	2.8	1.9	1.2	-
Morula	-	16.3	9.8	7.9	6.8	-
Gastrula	-	44.5	35.2	27.0	20.2	-
Trochophore	-	97	74	68	55	-

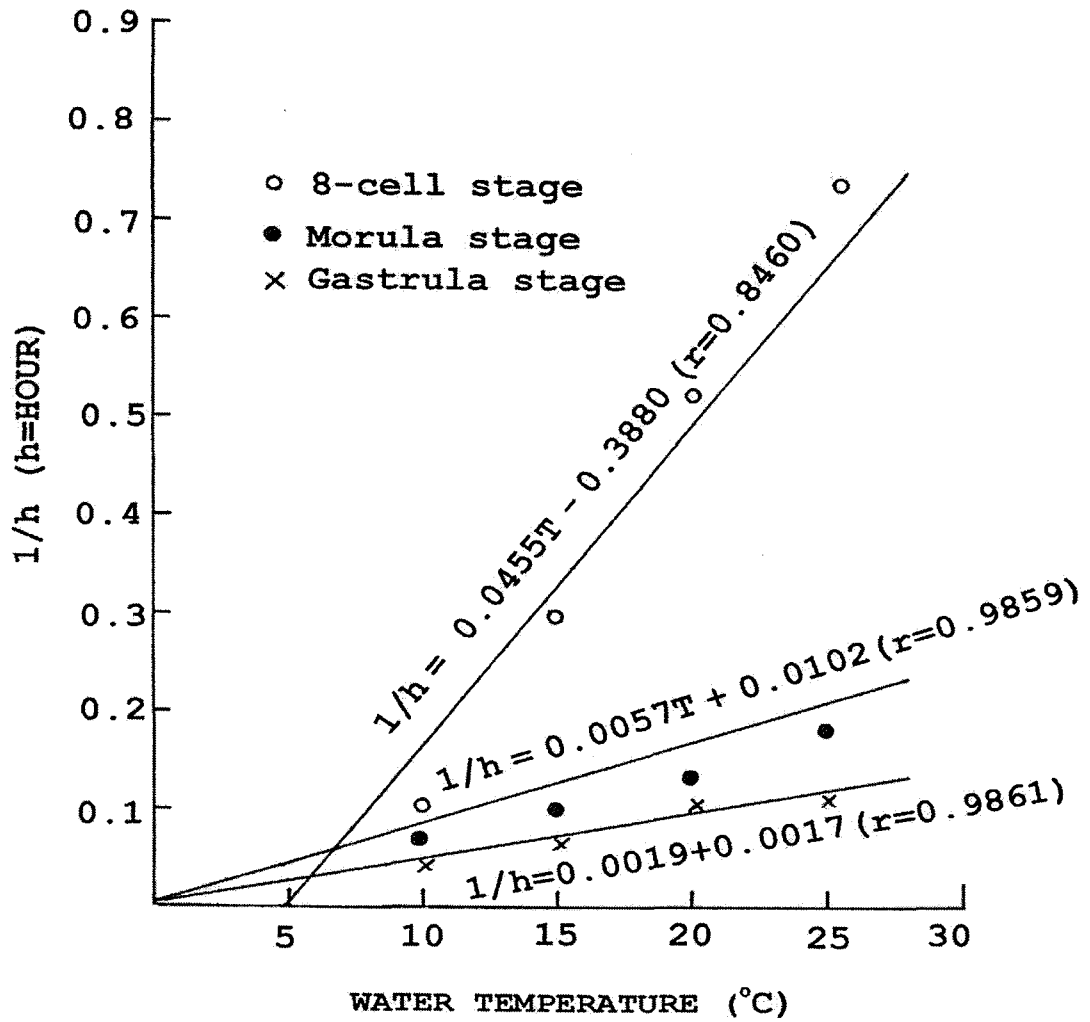


Fig. 44. Relationship between water temperature and time required to each developmental stage after spawning.

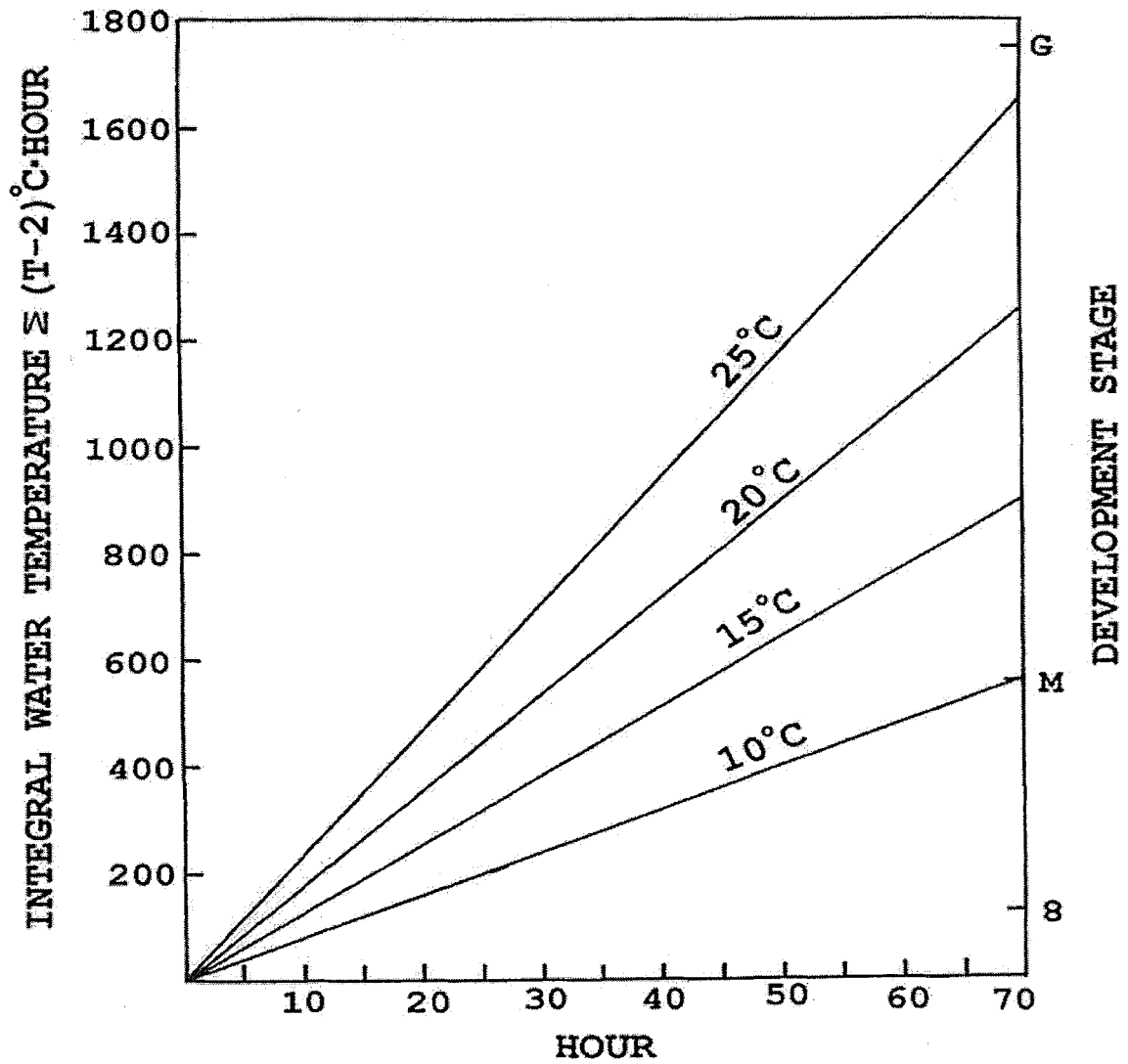


Fig. 45. Relationships between time required to developmental stage and integral water temperature. 8 : 8-cell stage, M : Morula stage, G : Gastrula stage.

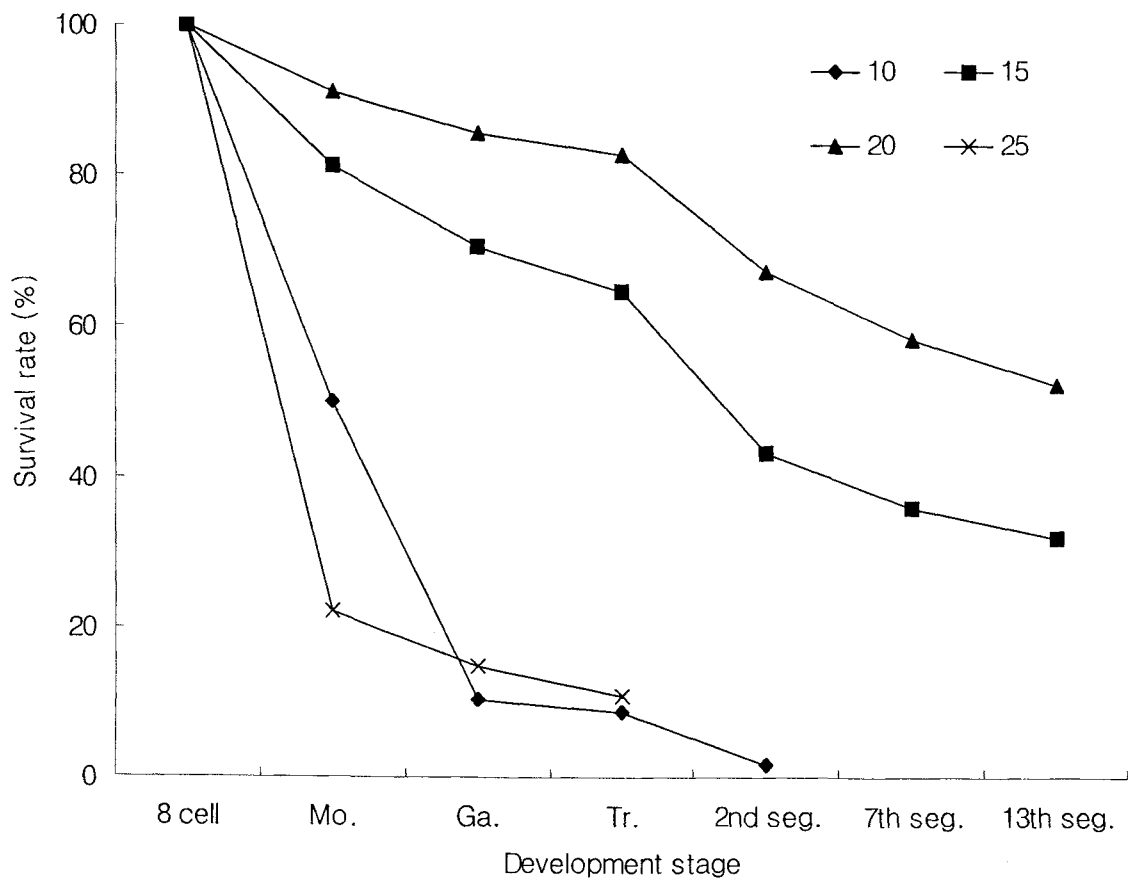


Fig. 46. Survival rate of *Urechis unicinctus* on development stage.

Mo : Morula stage, Ga : Gastrula stage, Tr : Trochophore stage, seg  
segmentation.



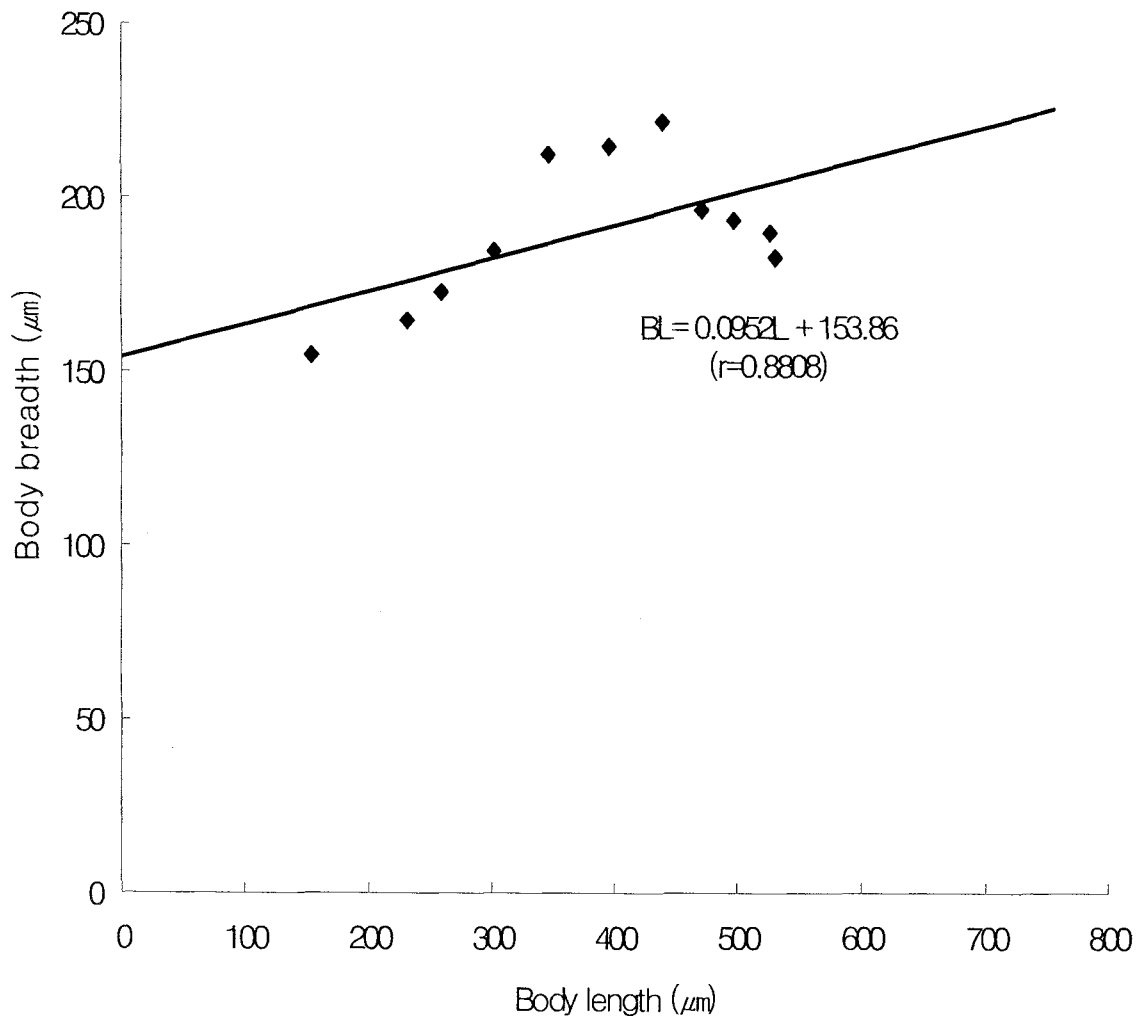


Fig. 47. Relationships between body length and body breadth of *Urechis uncinatus* larva.

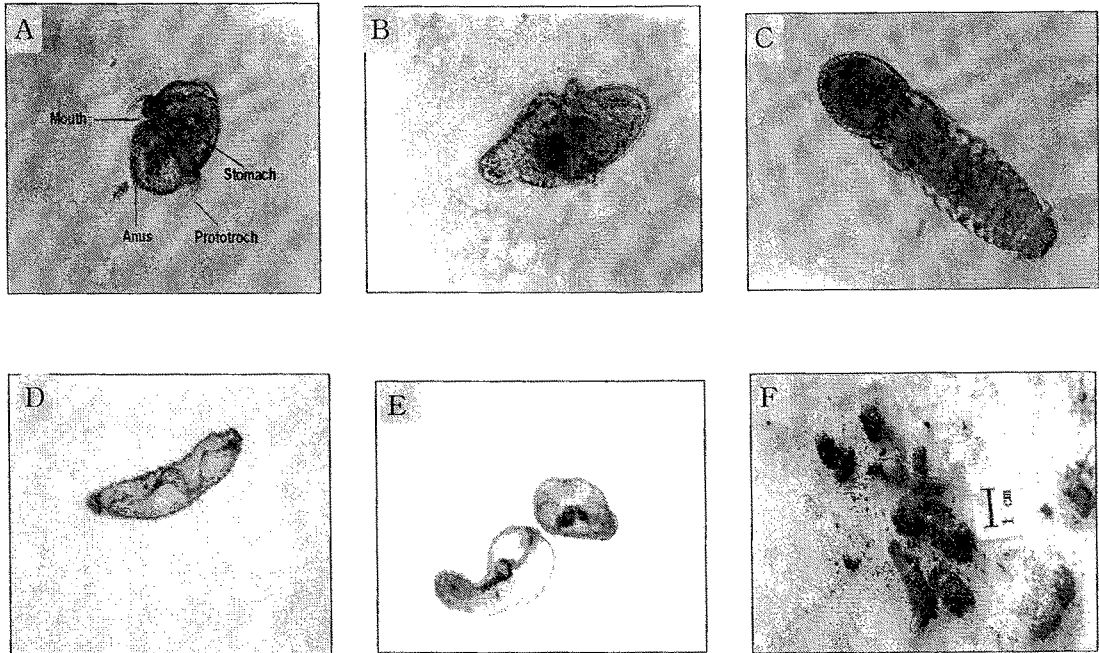


Fig. 48. Developmental stage of *Urechis unicinctus* in laboratory.

A. Trochophore stage. scale bar : 160  $\mu\text{m}$

B. 2nd segmentation stage. scale bar : 440  $\mu\text{m}$

C. 13th segmentation stage. scale bar : 540  $\mu\text{m}$

D. *Urechis unicinctus* juvenile. scale bar : 750  $\mu\text{m}$

E. *Urechis unicinctus* juvenile. scale bar : 950  $\mu\text{m}$

F. *Urechis unicinctus* juvenile. scale bar : 1.5~2.0 cm

## 제 6 장 연구 성과 및 활용계획

### 제 1 절 기술적 측면

유용 해산무척추동물의 다양화를 위해서는 많은 종류의 종묘생산을 위한 성체의 서식환경특성 연구, 생리화학적 연구 및 기초 생물학적 연구가 반드시 수행되어야 한다. 그리고 UR, EEZ선포 및 수산생물의 수입개방에 능동적으로 대처하기 위해서는 생산성이 높은 품종과 아울러 친환경적인 신품종의 양식이 절실히 요구된다. 우리나라는 지리적 특성에 의하여 수산업이 예로부터 행하여져왔으며, 특히 양식기술의 발달에 따라 넙치, 조피볼락 등 고급 어종 및 굴, 피조개 등 패류의 양식이 행하여 졌으나, 국한된 종에 대하여만 양식이 되고 있음에 따라 과잉생산과 양식능의 감소로 인하여 새로운 양식품종의 개발이 절실히 요구되어지고 있다.

특히, 개불은 남해안 특산종이며 현재는 전국에서 수산식품으로의 그 가능성이 높아지고 있는 품종으로서 본 연구의 기술개발에 대한 어민으로의 기술이전은 새로운 양식품종의 개발에 기여함과 동시에 개불의 국제적 상품화가 진행되었을 시 타국으로의 기술이전과 이를 바탕으로 한 새로운 양식품종의 기술개발을 도모할 수 있을 것으로 예상된다.

잠입성 저서생물의 경우 그 양식의 용이성이 떨어져 매우 힘든 양식품종으로 여겨져 왔으나 이를 극복하는 기술의 개발은 새로운 품종으로의 양식기술개발에 도움이 되어질 것이다. 따라서 본 연구는 새로운 품종의 양식대상 종으로서의 개발 뿐 아니라 기술의 축적을 통한 새로운 종의 양식화와 수산선진국으로 나아가는 밑거름이 될 것으로 생각한다.

### 제 2 절 경제·산업적 측면

개불류는 일명 “spoon-worm”이라고 불리우며 전세계적으로 3과 37속 157종이 분

포 서식하는 것으로 알려져 있다. 이들은 온대, 적도 및 극지방의 조간대에서 심해 저층의 암석, 모래 및 펄에 서식한다. 개불의 체형은 체절이 없고, 체강을 갖는 대칭형이다. 크기는 수 mm에서 수십 cm이며, 부드러운 표피를 갖는다(Clark, 1969; Stephen and Edmonds, 1972; Storch, 1984). 개불류는 조간대에서 수심 100 m 정도까지 분포하며, 저질은 사질, 니질, 사니질인 해역에서 U자형 관을 만들어 서식하고 있다(Clark, 1969; Stephen and Edmonds, 1972; Storch, 1984). 우리 나라에 서식하는 개불(*U. uncinatus*)의 분류학적 위치는 의충동물문(Echiurida), 의강(Echiurida), Xenopneusta 목, *Urechidae*과에 속하며 *Urechis*속에는 4종이 있다. 특히, 개불 체내에는 황화합물을 분해하는 헤마틴이라는 성분이 풍부한 것으로 알려져 있다(Arp, et al., 1992).

또한 개불의 체내에는 다른 무척추동물에서 합성할 수 없는 5종의 sterols 등을 함유하고 있어 생리활성 물질을 추출하고 있다. 이러한 특성으로 인해 실제 양식현장 및 환경단체 등에서는 개불을 방류하여 친환경적인 양식을 시도하려고 한다. 그러나 종묘생산방법이 확립되어 있지 않아 친환경적인 개불양식도 어려움에 있는 실정이다. 따라서 본 종에 대한 인공종묘생산 기술이 개발되고 친환경적인 신품종이 개발된다면 양식어종의 정착은 물론 수산양식업의 생산성 향상을 위해 기여하는 바가 클 것이다.

### 제 3 절 연구 성과

#### 가. 논문발표

1. 최상덕, 김호진, 라성주, 서해립, 1998. 한국산 개불, *Urechis uncinatus*(von Drasche)의 산업화를 위한 연구. I. 난발생에 미치는 온도의 영향. 여수대학교논문집, 13(2) : 973~981.
2. 최상덕, 김호진, 라성주, 홍성윤, 이원교, 이우범, 1999. 한국산 개불, *Urechis uncinatus* (von Drasche)의 난 발생에 미치는 pH와 염분의 영향. 한국양식학회지, 12(2) : 155~161.
3. 최상덕, 김호진, 라성주, 정형택, 윤호섭, 신종암, 이원교, 1999. 온도, pH, 염분 내성 및 충격이 개불, *Urechis uncinatus* 유생에 미치는 영향. 여수대학교

환경연구논문집, 2 : 35~42.

4. 최상덕, 김호진, 라성주, 서해림, 홍성윤, 2000. 개불, *Urechis unicinctus* 유생의 빠른 착저를 위한 유인물질. 한국양식학회지, 13(2) : 175~179.
5. 최상덕, 김호진, 이원교, 서호영, 이우범, 2000. 한국산 개불, *Urechis unicinctus*의 서식생태에 관한 연구. 여수대 환경연구논문집, 3 : 7~14.
6. 최상덕, 김호진, 라성주, 주용석, 정관식, 이원교, 신태선, 2000. 개불, *Urechis unicinctus*의 생식주기에 따른 아미노산 변화. 여수대 논문집, 9 : 128~132.
7. 최상덕, 김호진, 이원교, 박은주, 윤호섭, 라성주, 이인곤, 2000. 한국산 개불, *Urechis unicinctus*의 생식주기. 한국양식학회지, 13(2) : 169~174.
8. Rapid settlement and metamorphosis of the larvae of marine spoon worm, *Urechis unicinctus*, 2000. 한일증양식국제심포지움(일본, 동북대학교)
9. The Effect of Amino Acids on Larval Settlement of *Urechis unicinctus*, 2002. 한일증양식국제심포지움(한국, 군산대학교)

#### 나. 특허등록

- 특허등록일 : 2002년 4월 01일
- 특허등록번호 : 제0332474호
- 특허명 : 개불 종묘생산 방법 및 이를 이용한 개펄 개선

#### 다. 기술이전(교육, 홍보 등)

1. 2000년 3월 5일 MBC 신품종양식기술개발
2. 2000년 8월 8일 무척추동물양식 실무 및 전망교육, 전라남도
3. 2000년 11월 9일 수산기술 특별 강의, 해양수산부
4. 2001년 5월 30일 바다의 날 특별강연, 여주시청
5. 2001년 11월 15일 수산기술 특별강의, 목포해양수산청
6. 2002년 1월 21일 MBC 9시 뉴스, 신품종 개불 대량종묘생산
7. 2002년 1월 25일 MBC 아침뉴스, 개불 대량종묘생산 및 분양

8. 2002년 1월 25일 KBC 라디오, 신품종 개불대량종묘생산
9. 2002년 1월 27일 MBC 라디오, 신품종 개불대량종묘생산
10. 2002년 3월 8일 KBC, 화제의 현장 : 신품종 개불대량종묘생산
11. 2002년 3월 10일 개불종묘 방류; 장소 : 여수시 돌산 금천; 방류미수 : 10만마리; 참석자: 최상덕외 10명.
12. 2002년 4월 24일 신품종 개불종묘생산, 공무원 해양수산행정과정교육
13. 2002년 7월 7일 전라남도 어민후계자 위탁교육, 신품종 개불종묘생산
14. 2002년 7월 11일 패류양식전문기술교육, 신품종 개불종묘생산, 전라남도
15. 양식기술정보(11권 2호), 한국산 개불의 산업화를 위한 연구(채란과 수정란의 발생과정)
16. 양식기술정보(11권 2호), 한국산 개불의 산업화를 위한 연구(변태 및 착저유인물질 탐색)

#### 제 4 절 활용방안

- 개불을 양식하고자 하는 어민들을 대상으로 인공종묘생산기술과 사육법을 교육시켜 기술을 이전한다.
- 연안 수산자원의 증가를 위해 방류용으로 활용할 수도 있으며, 개불의 생태적 특성을 이용하여 저질을 개선할 수도 있다.
- 또한 본 연구 결과 축적된 기술(착저 유인물질 개발 등)을 새로운 해산 무척추동물의 종묘생산기술개발에 이용할 것이다.

## 제 7 장 참고문헌

- Akesson, T.R., 1977. The effect of temperature change on the development of *Urechis caupo* Fisher and MacGinitie 1928 (Echiuroidea). *Estuarine and Coastal Marine Science*, 5 : 445~453.
- Arp, A.J., B.M. Hansen and D. Julian, 1992. Burrow environment and coelomic fluid characteristics of the echiuran worm *Urechis caupo* from populations at three sites in northern California. *Marine Biology*, 113 : 613~623.
- Bryan P. J., Kreider J. L., Qian P. Y., 1998. Settlement of the serpulid polychaete *Hydroides elegans*(Haswell) on the arborescent bryozoan, *Bugula neritina*(L.): evidence of a chemically mediated relationship. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 220 : 171~190.
- Burke R. D., 1980. Podial sensory receptors and the induction of metamorphosis in ehinoids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 47 : 223~234.
- Choi, S.D., 1997. Present situation of diseases occurred with cultured marine fishes in Kamak Bay. *J. Aquaculture*, 10 : 9~15.
- Choi, S.D., Y.S. Kim and K.H. Han, 1998. The Characteristics of zooplankton community in Kwangyang Bay, Korea. *Bull. Yosu. Nat'l. Univ.* 13 : 993~1006.
- Choi, S.D., H.J. Kim, S.J. Rha, K.J. Choe and H.L. Suh, 1998. Studies on the commercial scale production of *Urechis unicinctus* (von Drasche) in southern Korea. I. The effect of temperature on embryos development. *Bull. Yosu. Nat'l. Univ.* 13 : 983~992.
- Choi, S.D., H.J. Kim, S.J. Rha, S.Y. Hong, W.K. Lee and W.B. Lee. 1999. The effect of pH and salinity on egg development of *Urechis unicinctus* (von Drasche) in southern Korea. *J. Aquaculture*, 12 : 155~161.
- Clark, R.B., 1969. Systematics and phylogeny: Annelida, Echiura, Sipuncula. In

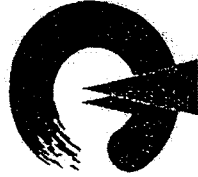
- M. Florkin and B.T. Scheer (eds.). Chemical Zoology, Vol. 4. Academic Press, New York, pp.68.
- Eaton, R.A. and A.J. Arp, 1990. The effect of sulfide on the oxygen consumption rate of *Urechis caupo*. Am. Zool., 30 : 1~69.
- Ferezou, J.P., M. Davys and M. Barbier, 1972. Sur L'absence de biosynthese des sterols et  $\alpha$  squalene chez un coelentere (Anthozoaire), L'Anemone de Mer *Calliactis parasitica*. Experienta, 15 : 407~408.
- Fisher, W.K., G.E. Macginitie, 1928. The natural history of an echiuroid worm. Ann. Mag. Nat. Hist., 10 : 204~213.
- Gould-Somero, M. and L. Holland, 1975. Fine structural investigation of the insemination response in *Urechis caupo*. Dev. Biol., 46 : 358~369.
- Hunter, E., Okano, K., Tomono, Y. and Fusetani, N., 1998. Functional partitioning of energy reserves by larvae of the marine bryozoan *Bugula neritina*(L.). J. Exp. Biol., 201 : 2857~2865.
- Jaccarini, V., L. Agius, P.J. Schembri and M. Rizzo, 1983. Sex determination and larval sexual interaction in *Bonellia viridis* Rolando (Echiura : Bonelliidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 66 : 25~40.
- Joh, Y.G. and K.S. Kim, 1983. Studies on lipids of *Urechis unicinctus* -on the composition of lipids, fatty acids and sterol-. Bull. Korean Fish. Soc., 16 : 255~259.
- Jorgensen, C. B., 1981. Mortality, growth and grazing impact of a cohort of bivalve larvae, *Mytilus edulis*. Ophelia 20 : 185~192.
- Julian D., J. G. Menon and A. J. Arp, 1991. Structural and functional adaptations to hypoxia and sulfide in *Urechis caupo*. Am. Zool., 31 : 73~74.
- Larman V. N., Gabbott P., A., East J., 1982. Physicochemical properties of the settlement factor protein from the barnacle, *Balanus balanoides*. Comp. Biochem. Physiol., 72B: 329~338.
- Lawry, J.V., 1966. Neuromuscular mechanisms of burrow irrigation in the



- echiuroid worm *Urechis caupo* Fisher and MacGinitie. I. Anatomy of the neuromuscular system and activity of intact animals. *J. Exp. Biol.*, 45 : 343~353.
- Lee, E.H., 1968. The taste of the extract of the sun-dried "Gae-bul", *Urechis unicinctus*. *Bull. Pusan Fish. Coll.*, 8 : 59~63.
- Matsumura K., Nagono M., Yoshinaga Y. K., Fusetani N., 1998. Purification of a larval settlement inducing protein complex(SIPC) of the barnacle, *Balanus amphitrite*. *J. Exp. Zool.*, 281 : 12~20.
- Menon, J. G. and A. J. Arp, 1991. Ultrastructure of the body wall of the marine echiuran worm *Urechis caupo*. *Am. Zool.*, 31 : 71~72.
- Menon, J. G. and A. J. Arp, 1993. The integument of the marine echiuran worm *Urechis caupo*. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, 185 : 440~454.
- Morse D. E., 1985. Neurotransmitter-mimetic inducers of larval settlement and metamorphosis. *Bull. Mar. Sci.*, 37 : 697~706.
- Morse D. E., 1990. Recent progress in larval settlement and metamorphosis : closing the gaps between molecular biology and ecology. *Bull. Mar. Sci.*, 46 : 465~483.
- Newby, W.W., 1932. The early embryology of the Echiuroid, *Urechis*. *Biol. Bull.*, 63 : 389~399.
- Pawlik J. R., 1992. Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 30 : 273~335.
- Pawlik J. R., Hadfield M. G., 1990. A symposium on chemical factors that influence the settlement and metamorphosis of the marine invertebrate larvae: introduction and perspective. *Bull. Mar. Sci.*, 46 : 450~454.
- Pilger, J.F., 1987. Reproductive biology and development of *Themiste lageniformis*, a parthenogenic sipunculan. *Bull. Mar. Sci.*, 41 : 59~67.
- Pritchard, A. and F.N. White, 1981. Metabolism and oxygen transport in the innkeeper *Urechis caupo*. *Physiol. Zool.*, 54 : 44~54.

- Rice, M.E., 1988. Observations on development and metamorphosis of *Siphonosoma cumanense* with comparative remarks on *Sipunculus nudus* (Sipuncula, Sipunculidae). Bull. Mar. Sci., 42 : 1~15.
- Rodriguez S. R., Ojeda F. P., Inestrosa C., 1993. Settlement of benthic marine invertebrates. Mar. Ecol. Prog. Ser., 97 : 193~207.
- Scheltema, R. S., 1974. Biological interactions determining larval settlement of marine Invertebrates. Thalassia Jugosl., 10 : 263~296.
- Stephano, J.L. and M.C. Gould, 1997. Parthenogenesis in *Urechis caupo*(Echiura) 2. Role of intracellular pH in parthenogenesis induction. Dev. Growth Differ. 39 : 99~104.
- Stephen, A.C. and S.J. Edmonds, 1972. The Phyla Sipuncula and Echiura. British Museum (Natural History), London. 527 pp.
- Storch, V., 1984. Echiura and Sipuncula. In J. Bereiter-Hahn, A.G. Matolsky and K.S. Richards (eds.). Biology of the Integument, Springer-Verlag, Berlin, pp. 368~375.
- Strathmann, M.F., 1987. Reproduction and development of marine invertebrates of the northern Pacific Coast. Univ. Washington Press, 670 pp.
- Suer, A.L., 1982, Larval settlement growth and reproduction of the marine echiuran *Urechis caupo*. Ph.D. dissertation, Univ. California, Davis, California, 198 pp.
- Suer, A.L. and D.W. Phillips, 1983. Rapid, gregarious settlement of the larvae of the marine Echiuran, *Urechis caupo* Fisher & MacGinitie 1928. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 67 : 243~259.
- Tegtmeyer K., Rittschof D., 1989. Synthetic peptide analogs to barnacle settlement pheromone. Peptides, 9 : 1403~1406.
- Thorson, G., 1946. Reproduction and larval development of Danish marine bottom invertebrates, with special reference to planktonic larvae in the Sound(Resund). Medd. Komm. Dan. Fish. Hav. Plankton 4 : 1~523

- Thorson, G., 1950. Reproduction and larval ecology of marine bottom invertebrate. *Biol. Rev.* 25 : 1-40.
- Tilman harder and Pei-Yuan Qian, 1999. Induction of larval attachment and metamorphosis in the serpulid polychaete *Hydroides elegans* by dissolved free amino acids: isolation and identification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 179 : 259~271.
- Toomey, B. H. and D. Epel, 1993. Multixenobiotic resistance in *Urechis caupo* embryos : Protection from environmental toxins. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, 185 : 355~363.
- Van Arrem, H.E., H.J. Vonk and D.I. Zandee, 1964. Lipid metabolism in *Rhizostoma*. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, 72 : 606~614.
- Voogt, P.A., J.M. Van de Ruit and J.W.A. Van Rheenen, 1974. On the biosynthesis and composition of setrols and sterol esters in some sea Anemones (*Anthozoa*). *Comp. Biochem. Physiol.* 48 : 47~57.
- Yoshida, S., Marikawa, Y. and Satoh, N., 1996. Posterior end mark, a novel maternal gene encoding a localized factor in the ascidian embryo. *Dev.*, 122 : 2005~2012.
- 小泉 修, 1982. 攝食行動のメカニズム(現代の行動生物學 2, 森田弘道ほか編),
- 梶原武, 1984. 海洋生物の付着 機構. 財団法人 水産無脊椎動物研究所. 214 pp.



## 특 허 증

특 허 제 0332474 호

출원 번호 제 1999-0002616 호  
출원 일 1999년 01월 22일  
등록 일 2002년 04월 01일

발명의명칭      개불 증요생산 방법 및 이를 이용한 개필 개선

특허 권자      대한민국(관리청:특허청장, 송계청:여수대학교총장)

발명자      등록 사항관에 기재

위의 발명은 특허법에 의하여 특허등록원부에  
등록되었음을 증명합니다.

2002년 04월 01일

특 허 청

