

미세조류와 패류의 성장에 미치는 Triorganotin의 급성 독성영향 및 만성독성 실험을 위한 Chemostat System의 설계

탁건태 · 이형호 · 홍용기 · 김중균[†]

부경대학교 생물공학과

The Acute Toxicity Effect of Triorganotin on the Growth of Microalgae and Shellfish and A Design of A Chemostat System for the Chronic Toxicity Experiment

Keon-Tae Tak, Hyong-Ho Lee, Yoog-Ki Hong and Joong Kyun Kim[†]

Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

The acute toxicity effect of triorganotin on the growth of microalgae and shellfish was investigated through flask culture. The value of 120 hr-LC₅₀ that is the median lethal concentration of TBTO on the shellfish (*R. philippinarum*) was found to be 6 µg/L. The acute toxicity effect of TBTO on *T. suecica* was obviously shown even at the concentration of 0.5 µg/L, and the effect diminished as the initial cell density increased. The effect also diminished less in the experiment done under aeration than in that done under non-aeration.

To design a chemostat system for the test of chronic toxicity, the culture of *T. suecica* was executed in photobioreactor. In batch culture, the profiles of chlorophyll *a* and D.C.W. showed the growth of *T. suecica* very well, and the maximum specific growth rate was estimated to be 0.54 d⁻¹. With this value, as a dilution rate in continuous culture, pH was nicely maintained between 7 and 9 when air was supplied with 3% CO₂. From all results and the natural environment of clam, a novel chemostat system was invented. Through this system, we can observe each independent toxicity effect of TBTO and plankton and the combined toxicity effect as well.

Key words : acute toxicity, triorganotin, *R. philippinarum*, *T. suecica*, chronic toxicity, chemostat system

서 론

우리의 생활이 편리해지는 것에 비례하여 해양은 1천여만 종의 화학 합성물질, 가정과 산업폐기물, 중금속을 포함한

폐수 그리고 원유 등에 의하여 날로 오염되어 가고 있으며, 이러한 오염물질들은 태양에너지나 미생물 등에 의하여 분해되어지기도 하지만, 대부분의 물질들은 생태계에 잔존하여 그 특성을 그대로 지니면서 유기물 등에 흡착하여 오랜

[†] Corresponding author

기간동안 부유하기도 한다. 이러한 오염물질 중 triorganotin, polychlorinated biphenyl (PCB), 살충제, 제초제, 원유 및 중금속 등은 식물성 플랑크톤에서 동물성 플랑크톤 또는 어패류로의 먹이사슬에까지 영향을 줌으로써 이 먹이사슬의 군집 구성을 파괴시켜 생태계의 균형까지도 변화시킬 수 있다고 보고되었다¹⁻²⁾. 특히 triorganotin은 갯조개, 따개비 및 단세포 조류 등이 선박 밑바닥이나 어망 등에 부착되지 못하도록 칠하는 방오도로 물질로서, 49속 72종의 고등류에서 광범위하게 발견되는 암컷 성기관이 수컷 성기관으로 전환되는 imposex 현상을 유발한다고 보고되고 있으나³⁻⁵⁾, triorganotin 이외의 독성물질에서는 아직까지 보고되고 있지 않다⁶⁾. Triorganotin은 또한 굴의 폐각을 단단하게 하여 그 내용물의 형성을 저해하고⁷⁻⁸⁾, 식물성 플랑크톤의 생존에도 영향을 미친다고 보고되고 있다⁹⁾.

Triorganotin 중의 하나인 tributyltin (TBT)는 전 세계적으로 그 사용량이 연간 3만 5천 톤에 이르고 있어, 미연방 환경보호국은 거의 모든 수산생물에 회복능의 만성적 독성을 나타내는 농도인 20ng/L 이하로 그 사용을 규제하고 있는 등¹⁰⁾, 1980년대 말부터 선진국을 중심으로 그 사용을 규제하고 있으나, 우리나라에서는 그간 조선 산업의 발달에도 불구하고 마땅한 TBT 대체 도료가 개발되지 않고 있어 그 사용이 규제되지 않고 있다. 실제로 해양 환경에서 TBT 등의 오염 물질들은 해수보다 모래 등의 바다 침전물에 더 많이 축적되어 있기 때문에 장기간의 TBT 독성 노출은 침전물과의 반응에 의해 패류 등의 저서 생물에 더 나쁜 영향을 줄 수 있으며¹¹⁾, 해양 생태계에서의 독성 물질은 거의 평형 (equilibrium) 상태에서 유입되고 유출된다. 따라서, 이 독성 물질에 대한 생태계의 타격 실험은 수개월에 걸친 연속배양 시스템¹²⁻¹³⁾에서 행해야만 해양 환경과 매우 흡사한 조건에서 실험할 수 있으며 식물성 플랑크톤을 균일한 세포 농도와 생리학적 조건으로 유지시킬 수 있다¹⁴⁾.

따라서, 본 논문에서는 최근 우리나라 근해의 주요 오염물질 중의 하나인 triorganotin을 규제하기 위한 기초자료를 마련하기 위하여 미세조류 및 패류의 성장에 대한 급성독성영향을 조사하였고, 이 물질의 장기 독성영향 즉, 먹이사슬 (triorganotin→식물성플랑크톤→패류)에 의한 영향을 조사하기 위한 chemostat system을 고안하였다.

재료 및 방법

1. 해양독성물질

해양 독성물질로는 tributyltin chloride와 함께 해양 중에 가장 많이 존재하는 triorganotin의 하나인 tributyltin oxide (TBTO)를 본 실험에 사용했는데, 해수중의 용해도는 2mg/L이었다.

2. 해양생물 및 급성독성영향

본 실험에 사용한 triorganotin의 독성 대상생물로서는 비부착성으로서 모래와 진흙 속에 잠입하는 속성과 먹이생물로서 식물성 플랑크톤을 섭이하는 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)을 선택하였다. 이 바지락은 평균 각장 25여mm의 운동성이 활발한 것을 경남 남해군 창선면 지족리 앞 바다에서 1,000여 개체를 채집하여, 수온이 20°C가 넘지 않도록 하고 공기를 계속적으로 공급하면서 실험실로 가져왔다. 본 실험에 사용하기 전에 먹이생물인 *Tetraselmis suecica*를 약 50×10^4 cells/ml씩 3일간 공급한 후 매일 전량 환수하여 실험 환경에 적응시켰다.

*R. philippinarum*에 대한 급성 독성 영향을 알아보기 위하여 6개의 2L 비이커에 5N-HCl로 씻은 모래를 800ml씩 깔고, air를 100ml/min으로 기포 시키면서 각 비이커에 2~3cm 크기의 바지락을 9개체씩 넣고 항온수조에서 18°C를 유지시킨후, TBTO를 0, 1, 10, 20 및 50 µg/L의 농도로 각 비이커마다 다르게 처리하여 매일 바지락의 성장 상태를 조사하였다. 이때, TBTO의 독성에 의해 족사 (foot)의 반응도가 현저히 떨어진 개체는 즉시 끄집어내어 다른 개체에 영향을 주지 않도록 하였고, 4회 반복 실험하였다.

3. 먹이생물

3.1 배양

미세조류 *Tetraselmis suecica* (크기, 10-15 µm)를 f/2 배지¹⁵⁾에 20°C, air flow rate 10 L/min (0.5% CO₂ 함유), 교반속도 100 rpm, 조도 4,000 lux, 16시간 조명 8시간 암기의 주기로 빛을 공급하여 flask에서 배양했다. 사용한 f/2배지의 성분은 해수 1리터당 NaNO₃, 150 mg; NaH₂PO₄, 8.69 mg; Fe-EDTA, 10 mg; Na₂SiO₃ · 9H₂O, 60 mg; MnCl₂, 0.22 mg; CoCl₂, 0.11 mg; CuSO₄ · 5H₂O,

O, 0.0196 mg; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.044 mg; Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.012 mg; Thiamine · HCl, 0.2 mg; Biotin, 1.0 µg; B₁₂, 1.0 µg 이었다. *T. suecica*의 건강 상태 및 다른 미생물에 의한 오염정도는 현미경을 통하여 관찰하였으며, 가장 건강한 상태인 late-log phase에서 10%의 접종량으로 tube에서 flask로 옮겼다. Chemostat system 고안을 위한 광생물 반응기 (PBR) 내에서의 배양에서는 초기 배양 농도가 30×10⁴ cells/ml 이상이 되도록 집중했다.

3.2 성장도 측정

*T. suecica*의 성장 정도는 세포수, 건조중량 및 chlorophyll *a* 함량으로 측정했다. *T. suecica* 세포수는 Lugol 용액으로 고정된 후 hemocytometer를 이용하여 각 시료당 4회 이상씩 계수하여 그 평균값을 구했다. 건조중량은 18 ml 시료를 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 105°C의 dry oven에서 12 시간 건조시켜 그 질량을 구했다. Chlorophyll *a* 농도는 6개의 endorf tube에 배양액 1.5 ml씩 넣어 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 pellet에 0.01% MgCO₃을 함유한 90% acetone을 첨가하여 4°C 냉장고에서 24시간 추출한 다음, 752 UV Grating Spectrophotometer를 사용하여 파장 663, 645 및 630 nm에서 흡광도를 각각 측정하여 Strickland와 Parsons¹⁶⁾의 방법으로 구하였다.

3.3 급성 독성 영향

Aeration여부에 따른 TBTO의 급성독성 영향을 알아보기 위하여 500ml의 삼각 flask (working volume, 250 ml)에 배양 초기의 cell density를 4×10⁴ cells/ml로 하고, TBTO 농도를 0.5, 1, 5 µg/L 및 대조군으로 처리하면서 100 ml/min air를 공급하였다. Initial cell density 차이에 따른 TBTO의 급성독성 영향을 알아보기 위하여서는 배양 초기의 cell density를 4×10⁴, 10×10⁴ 및 12×10⁴ cells/ml로 하고, 각각의 TBTO 농도를 0.5, 1, 2 µg/L 및 대조군으로 처리하여 aeration없이 실험하였다.

3.4 광생물반응기 (PBR) 내에서의 배양

만성 및 간접적인 독성영향을 측정할 수 있는 chemostat system 고안을 위한 자료를 얻기 위하여 아크릴로 만든 40 L 광생물 배양기에서 먹이생물을 배양하였다. 이때 수온은 20°C로 water bath를 사용하여 유지하였고, 조도는 4,000 lux를 16 : 8의 명암주기로 공급하였는데, 광원은 형광등을 중앙에 위치하도록하여 충분히 빛을 공급하도록 하였다. 반

응기 내의 pH는 공기에 3% 이산화탄소를 첨가 공급하여 유지하였는데, 이때 air 및 이산화탄소 공급시 밑으로부터 위로 기포가 올라가도록하여 cell의 침전 방지와 혼합효과를 최대한 내도록 하였다. 또한, 거품발생시 antifoam을 사용하여 빛을 차단하지 않도록 하였다.

결과 및 고찰

1. *R. philippinarum*에 대한 급성 독성 영향

Fig. 1에는 바지락에 대한 TBTO의 직접적인 독성실험 결과를 나타내었다. 실험 종료시까지 대조군은 50% 정도 생존하였으나 TBTO를 처리한 모든 군에서 8일째 거의 모두 폐사하였으며, TBTO의 농도가 높을수록 그 영향은 심했다. Fig. 2에는 Fig. 1에서 구한 개체의 반이 죽은 시간을 개체의 TBTO의 농도와 함께 나타내었는데, 그래프에서 구한 120시간의 반치사농도(120hr-LC₅₀)는 6 µg/L 이었다. 그러나, 해저 바닥 침전물에 함유된 TBT의 농도는 해수보다 10배 이상 높으면서 대합조개에 축적되는 정도는 침전물에 결합된 TBT농도의 10배에서 20배에 이르며, 결국 저서 어패류의 조직 내에 축적되는 TBTO 농도는 해수중의 농도보다 100~200배 정도 높다고 보고되고 있으므로¹¹⁾, 만성 독성실험에서는 급성 독성농도 실험결과인 120시간 반치사농도 6 µg/L보다는 훨씬 더 낮은 농도에서 바지락에 독성영향을 미칠 것으로 보인다.

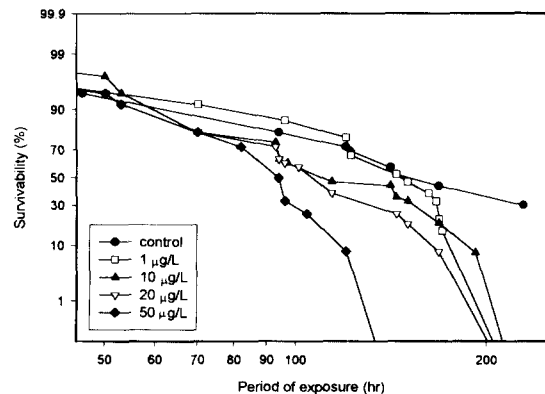


Fig. 1. The survivability of *R. philippinarum* exposed at various TBTO concentrations.

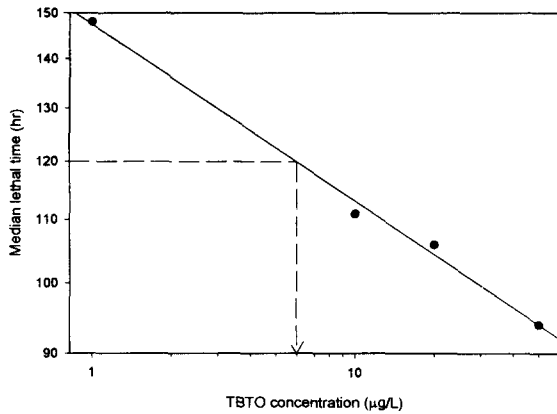


Fig. 2. Median lethal time against TBTO concentrations.

2. *T. suecica*에 대한 급성 독성 영향

초기 접종농도 4×10^4 cells/ml에서 air를 100 ml/min으로 공급했을 때 대조군의 cell 수는 지속적으로 조금씩 성장하는데 비하여, 0.5 µg TBTO/L의 농도에서는 접종 밀도의 10% 정도로 cell 수가 감소하여 일정 농도로 유지되었고, 1 및 5 µg/L의 농도에서는 급격히 cell 수가 감소하여 배양 7일만에 거의 모두 죽었다 (Fig. 3). Fig. 4에서는 air를 공급하지 않았을 때 접종초기의 cell의 농도에 따른 TBTO의 독성효과를 나타내었는데, 모든 접종 농도의 대조군이 지속적으로 성장하였으나, TBTO를 처리한 모든 실험군에서 배양 6일만에 대부분의 cell이 죽었다. 그러나 접종 밀도가 높을수록 cell수의 감소 정도는 완만하였고, 독성 영향이 천천히 나타났으나 6일 이후에는 모든 cell이 TBTO의 독성영향으로 인해 살아있는 cell수를 측정하기 어려웠다. 이는 접종밀도가 높으면 단위 cell 당에 적재된 TBTO의 농도가 감소하는 효과에 의해 나타나는 결과로 보이며, 모든 TBTO 처리 농도에서 결국에는 cell이 죽는 것은 본 실험에서 처리한 TBTO 농도가 공기를 공급하지 않은 환경에서는 크게 영향을 받음을 알 수 있다. 또한 접종농도 4×10^4 cells/ml에서 Fig. 3의 공기를 공급한 경우와 Fig. 4의 공기를 공급하지 않은 경우를 비교할 때, 공기를 공급하지 않은 경우에 더 큰 영향을 받는 것은 aeration에 의해 이산화탄소가 공급될 뿐만 아니라 모든 TBTO가 cell에 흡착하지 않고 배양환경에 분산시키는 역할을 하기 때문으로 보인다.

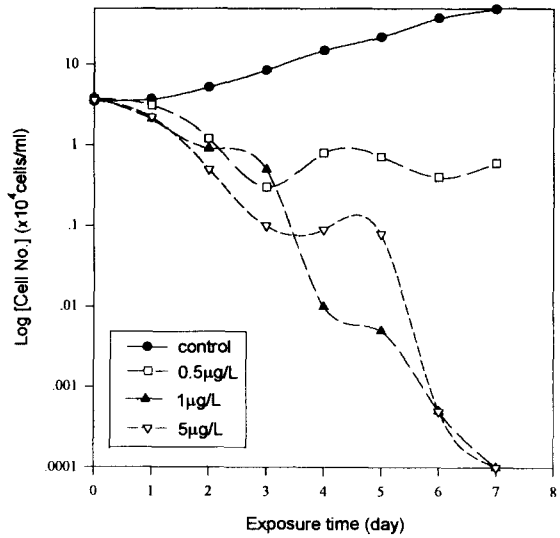


Fig. 3. The toxic effect of TBTO on the growth of *T. suecica* at various TBTO concentrations (Cells were grown on f/2 medium at 20°C, 4,000 lux, and 100 ml air/min).

3. 광생물 배양기내의 먹이생물 배양

TBTO의 만성 독성영향을 알아보기 위한 chemostat system 구축을 위하여 먼저 광생물배양기 (PBR)에서 *T. suecica*를 배양하였다. Fig. 5의 그래프는 처음 14일간은 batch 형태의 배양결과를 15일 이후는 continuous 형태의 배양 결과를 나타내고 있는데, batch 형태의 배양결과 배양시간에 따른 건조중량 및 클로로필 *a* 농도는 viable cell수와 비슷한 경향의 곡선을 나타내었으므로, *T. suecica*의 cell수와 상관관계를 가짐을 알 수 있었다. 이때, 반응기내의 pH는 cell이 성장함에 따라 감소하였으나 stationary-phase에 도달하면 *T. suecica*가 잘 자랄 수 있는 pH 범위를 유지하였다. 이러한 batch 형태의 배양을 4회 하였을 때 μ_{max} 의 평균값은 0.54 d^{-1} 이었다. 따라서, 이 값을 연속배양시의 growth rate인 dilution rate으로 정하여, 30 L의 working volume으로 flask 배양에서 얻은 data를 바탕으로 11.24 ml/min의 flow rate로 f/2 배지를 흘러 주면서 15일 이후부터 35일간 연속배양하였다 (Fig. 5). 연속배양시 광 반응기내의 pH를 유지시키기 위해 air 공급시 3% CO₂를 함께 공급하였는데 pH를 7~9 사이에서 일정하게 유지시

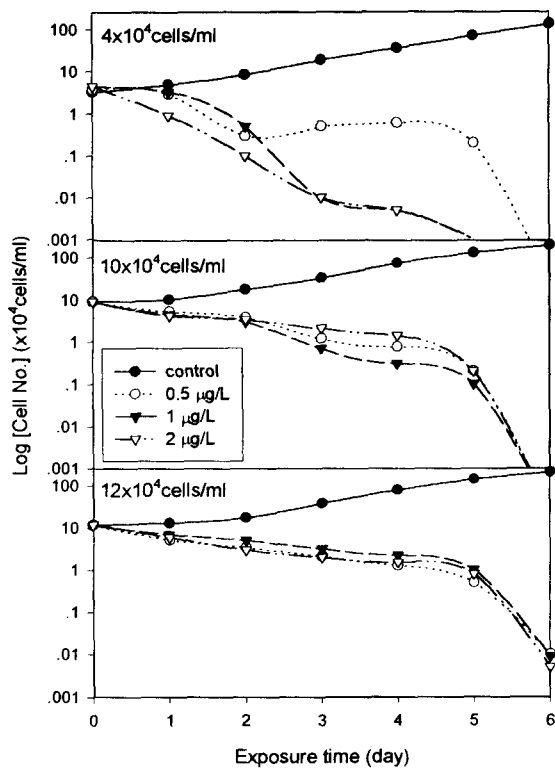


Fig. 4. The effect of TBTO concentration on the growth of *T. suecica* at various initial cell densities under non-aeration (Initial cell densities were 4×10^4 , 10×10^4 , and 12×10^4 cells/ml, respectively).

킬 수 있어, 일반적으로 CO_2 를 공급하지 않고 식물성플랑크톤을 배양할 때 pH가 10 이상으로 증가하여 식물성플랑크톤이 살수 없게 되는 현상을 방지할 수 있었다. 이는 반응기내의 용존된 CO_2 가 OH^- 와 반응하여 HCO_3^- 가 됨으로써, 완충역할을 함을 알수 있었다. 그러나 예비실험 결과 CO_2 의 양을 5% 이상으로 과잉 공급하였을 때의 pH는 수 시간 이내에 급격히 떨어졌다. 따라서, 반응기의 크기 및 형태에 따라 air 공급시 첨가될 CO_2 의 알맞은 함량을 구하는 것이 중요함을 알 수 있었다.

4. A designed chemostat system

광생물배양기에서의 예비실험과 실제적인 바지락 양식에 있어서의 환경을 최대한 고려하여, Fig. 6과 같이 전체적인

연속배양시스템을 설계하였다. 먼저, 플랑크톤 배양조는 water bath에 넣어 식물성 플랑크톤의 최적온도에 알맞게 20°C 에서 조절하며, 15 L/min 이상의 공기를 air compressor를 통해 주입하게 된다. 이때, 배양조 내의 pH가 일정하게 유지될 수 있도록 3% CO_2 를 air 공급시 첨가하도록 하고, 거품 발생시 cell이 반응기의 벽에 부착되거나, 빛이 차단되는 것을 막기 위해 10% Dow Corning antifoam을 필요시 첨가해 주도록 했다. 플랑크톤의 영양배지는 f/2 배지를 autoclave로 멸균하여 연속적으로 흘러 주게 되며, 해수는 유기물 등에 오염이 덜 된 깨끗한 해역의 것을 $1\mu\text{m}$ filter cartridge로 여과하여 연속적으로 흘러주면서 식물성 플랑크톤의 성장에 따른 최적 flow rate인 $10\text{ml}/\text{min}$ 으로 system 전체로 흘러 보내게 고안하였다. 이 때 바지락에 공급될 식물성 플랑크톤의 양은 바지락의 성장을 위해 10×10^5 cells/ml 이상으로 공급하도록 했다.

바지락을 키울 수조는 실제 양식 상황에 맞게, 어두운 색의 무독성 플라스틱 수조 ($35 \times 50 \times 30\text{cm}$)를 사용하며 지나친 밀도에 의한 성장저해를 막기 위해 1마리/ 25cm^2 의 밀도로 배양하고, 온도, pH, 염도 및 DO는 각각 18°C , 7.8~8.5, 35‰과 7 ppm 이상으로 유지하도록 하고 조도는 10 lux이하로 유지시키도록 설계했다. 바닥은 깨끗한 모래를 10cm 깊이 이상으로 깔아 바지락의 각장과 입·출수공의 길이를 감안하여 충분히 모래에 파묻히도록 했다.¹⁸⁾ 또한, 바지락은 지각 변동이 심하면 잘자라지 못하며 해수의 유통이 좋고 먹이 생물이 풍부해야 하므로, 수조를 고정시키고 모래와 해수가 만나는 바로 위 지점에 플랑크톤이 공급되어 바지락이 쉽게 조류를 섭이할 수 있도록 하며, 해수는 연속적으로 over flow되도록 하였다.

따라서, 고안된 chemostat system에서는 장기간에 걸친 다음 3가지 경우의 TBTO의 직접 및 간접 독성영향을 대조군과 비교하여 볼 수 있도록 했다. 즉, 1) TBTO를 처리하지 않고 배양한 식물성플랑크톤과 TBTO를 처리한 해수를 바지락 수조에 공급하여, TBTO만의 독성영향, 2) TBTO를 처리하여 배양한 식물성플랑크톤과 순수한 해수를 바지락에 수조에 공급하여, 플랑크톤만에 의한 영향, 3) TBTO를 처리하여 배양한 식물성플랑크톤과 TBTO를 처리한 해수를 바지락에 동시에 공급하여, TBTO와 플랑크톤의 복합적 영향 등의 직·간접 독성영향을 알아볼 수 있도록 설계하였다.

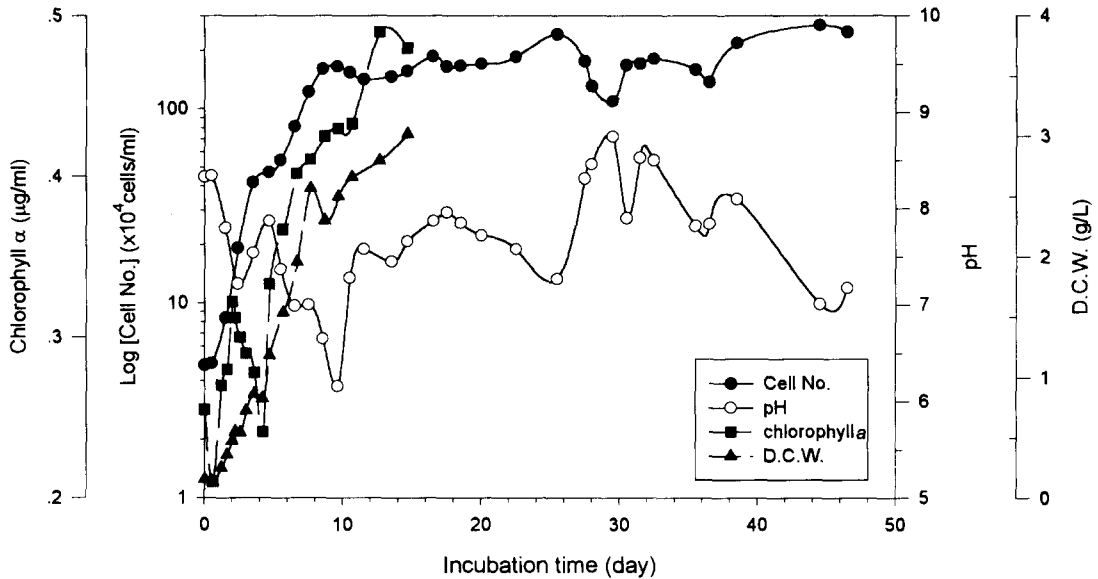


Fig. 5. The growth profile of *T. suecica* in PBR (Cells were grown on f/2 medium at 20°C, 15 L air/min (3% CO₂), 4,000 lux, L:D=16:8, 0.54 d⁻¹ of dilution rate from day 15, and 30 L-working volume).

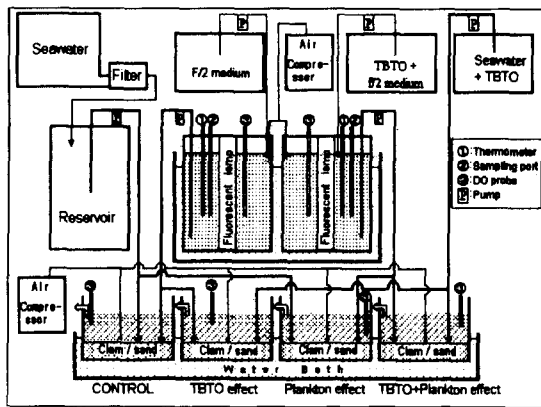


Fig. 6. A designed chemostat system to execute TBTO toxicity test.

요 약

Triorganotin의 미세조류와 패류의 성장에 미치는 급성독성 영향을 flask culture를 통해 조사하였다. 패류 (*R. philippinarum*)에 미치는 TBTO의 급성독성 영향의 결과는

120시간 반치사농도 (120hr-LC₅₀) 값이 6 µg/L로 밝혀졌다. *T. suecica*에 미치는 TBTO의 급성 독성도는 0.5 µg/L 농도에서도 그 영향이 뚜렷히 나타났으며, cell의 집종밀도가 높을수록 독성영향을 적게 받았고, 공기를 공급하였을 경우가 공기를 공급하지 않았을 경우보다 독성영향이 적었다.

만성독성실험을 위한 chemostat system 고안을 위해 광생물배양기에서 *T. suecica*를 배양하였는데, batch 형태의 배양에서 시간에 따른 chlorophyll *a* 및 D.C.W. 곡선은 *T. suecica*의 성장을 잘 나타내었고 최대비증식속도는 0.54 d⁻¹로 구해졌다. 이 값을 희석율로한 연속배양시, air를 3% CO₂와 함께 공급할 때 pH는 7~9 사이에서 잘 유지되었다. 이상의 결과와 바지락의 자연환경을 고려하여 새로운 chemostat system을 고안하였는데, 이 시스템을 통해 TBTO와 플랑크톤의 각각의 독립적 독성영향과 결합된 독성영향을 다 알아볼 수 있도록 설계했다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 동원학술 연구비 지원에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Schober, U. and Lampert, W. : Effects of sublethal concentration of the herbicide Atrazine on growth and reproduction of *Daphnia pulex*. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, 17, 269(1977).
2. Lederman, T. C. and Rhee, G. Y. : Bioconcentration of a hexachlorobiphenyl in Great Lakes planktonic algae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39, 380(1982).
3. Lindblad, C., U. Kautsky, Andre, C., Kautsky, N. and Tedengren, M. : Functional response of *Fucus vesiculosus* communities to tributyltin measured in an *in situ* continuous flow-through system. *Hydrobiologia*, 188/189, 277(1989).
4. Cleary, J. J. : Organotin in the marine surface micro-layer and subsurface waters of south-west England : Relation to toxicity thresholds and the UK environmental quality standard. *Marine Environ. Res.*, 32, 213(1991).
5. Brick, M. : Ultrastructural investigations of the penis epithelia cells of three neogastropods, collected from TBT (tributyltin)-polluted areas. *Aquatic Toxicology*, 27, 113(1993).
6. Stroben, E. : The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda : Buccinidae) - a potential indicator of tributyltin pollution. *Mar. Biol.*, 113, 625(1992).
7. Alzieu, Cl., Chagot, D. J., Sanjuan K. and Grizel, H. : Sublethal and histopathological effects of trace levels of tributyltin fluoride on adult oysters *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.*, 3, 121(1990).
8. Waldock, M. J. and Thain, J. E. : Shell thickening in *Crassostrea gigas* : Organotin antifouling or sediment induced ? *Mar. Pollut. Bull.*, 14, 411(1983).
9. Chiles, T. C., Pendoley, P. D. and Laughlin, R. B. Jr. : Mechanisms of tri-n-butyltin bioaccumulation by marine phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46 (5), 859(1989).
10. Wade, T. L. : Oysters as biomonitors of butyltins in the Gulf of Mexico. *Mar. Environ. Res.*, 32, 233 (1991).
11. Langston, W. J. and Burt, G. R. : Bioability and effects of Sediment-bound TBT in Deposit-feeding Clams, *Scrobicularia plana*. *Mar. Environ. Res.*, 32, 61(1991).
12. DeNoyelles, F. Jr., Knoechel, R., Reinke, D., Treanor, D. and Altenhofer, C. : Continuous culturing of natural phytoplankton communities in the experimental lake area : Effects of enclosure, in situ incubation, light, phosphorous, and cadmium. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37, 424(1980).
13. Rhee, G. Y. : Continuous culture algal bioassay for organic pollutants in aquatic ecosystems. *Hydrobiologia*, 188, 247(1989).
14. Madagiaga, I. and Joint, I. : A comparative study of phytoplankton physiological indicators. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 158, 149(1992).
15. Guillard, R. R. and Ryther, J. H. : Studies of marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula convervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8, 229(1962).
16. Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R. : Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments with revised equation for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Mar. Research*, 21, 155(1963).
17. Hall, L. W., Bushong, S. J., Ziegenfuss M. C. and Unger, M. S. : Chronic tributyltin toxicity experiments with the Chesapeake Bay copepod, *Acartia tonsa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9(3), 359(1990).
18. 유성규 : 양식개론, pp. 149-156, 태화 출판사.(1986).