

북쪽말뚝성게, *Strongylocentrotus intermedius*를 이용한 생물검정 최적 발생조건

류태권^{1,2}, 성찬경³, 한기명¹, 황인영², 이택권¹, 이창훈^{3,*}

¹한국해양연구원 남해연구소, ²인제대학교 자연과학대학 환경공학부,
³(주)네오엔비즈 환경안전연구소

Optimal Conditions for the Embryonic Development of Sea Urchin, *Strongylocentrotus intermedius* for Using the Bioassay

Tae-Kwon Ryu^{1,2}, Chan-Gyoung Sung³, Gi-Myung Han¹, In-Young Hwang²,
Taek-kyun Lee¹ and Chang-Hoon Lee^{3,*}

¹South Sea Institute, KORDI, Geoje 656-830, Korean

²School of Environmental Science & Engineering, Inje University

³Institute of Environmental Protection and Safety, NeoEnBiz Co. Rm 1017,
Byuksan Digital Valley II, Gasan dong 481-10, Seoul, Korea

ABSTRACT

Even though some standard developmental bioassay protocols for environmental assessment using sea urchins have already been described, there have not been many attempts to apply and modify these protocols with Korean species. Therefore, there is a strong need to establish standard bioassay protocols using sea urchins commonly found in Korea. Prior to developing a new protocol, it is essential to know the optimal conditions for the bioassay procedures. We investigated the optimal conditions (temperature, salinity, and embryo density) of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. The ideal temperature for developmental bioassay of *S. intermedius* was determined to be 15°C and the time required for the embryo to become pluteus larva was 72 hr. The optimal range of salinity for the embryo toxicity test using *S. intermedius* was between 30 to 32 psu, which is similar to the range found in the natural habitats of adult populations. The optimum density of embryos at the beginning of bioassays was 100 embryos/mL. When the assays were carried out at higher densities, the proportion of normally developed larvae decreased significantly.

Key words : *Strongylocentrotus intermedius*, temperature, salinity, density, embryonic development

서 론

해양 또는 육상의 수질과 퇴적물 내에 존재하는 미량의 유해한 물질들은 화학분석기법의 발달로 더욱 정확하게 분석할 수 있게 되었다. 하지만 해

※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-863-4744, Fax: +82-2-863-4745
E-mail: chlee@neoenbiz.com

양이나 담수의 수질과 퇴적물로 유입되는 오염물질이나 변형된 2차 산물들의 생물학적 영향을 화학적인 방법만으로 정확하게 측정하는 것은 여전히 어렵다. 해양환경 내에 좋지 않은 영향을 미치는 오염물질들은 생물학적인 기준에 근거하여 생태학적으로 의미 있는 평가가 수행되어 질 때 비로서 생물 영향에 관한 의미 있는 연구가 된다고 보고되었다(His *et al.*, 1999). 해양오염의 정도를 판정하기 위해 오래전부터 시도된 방법들 중, 생물검정법은 해양환경을 신속하게 평가할 수 있다는 장점이 있다. 생물검정법(Bioassay)이란 어떤 물질이 살아있는 생물에게 미치는 영향을, 표준적인 조건에서 동일한 생물에게 미치는 영향을 상대적으로 비교 평가하는 실험으로 정의하고 있다. 그리고 생물검정법은 특정 오염물질이 매우 낮은 농도에서 일으키는 독성뿐만 아니라 심지어는 화학분석으로는 검출할 수 없거나, 분석이 어려운 미지의 오염물질에 의한 영향을 검출하는데 이용될 수 있다(Kobayashi and Okamura, 2004). 게다가 생물검정법에서 유생을 이용한 검정방법은 성체를 이용하는 것보다 더 짧은 시간에 해양오염을 판정할 수 있는 장점을 가지고 있다. 일반적으로, 해양 무척추동물의 초기 발생 단계가 성체단계보다 독성물질에 더 민감하다고 알려져 있다(Martin *et al.*, 1981). 그 예로, 굴의 유생을 이용한 독성실험이 알려져 있고(Geffard *et al.*, 2004), 굴뿐만 아니라 홍합을 이용한 유생독성실험도 많이 적용되고 있다(Beiras and Albetosa, 2004). 성체의 발생에서 있어서도 다양한 중금속이 포함된 수질에서 비정상적인 모습의 유생이 기인된다고 보고되어 왔다. 이러한 성체, 유생 그리고 수정란의 발생단계에서 비정상적인 형태는 생물검정의 지시자들로(biomarkers) 사용되고 있다(His *et al.*, 1996).

우리나라 동해안에 주로 서식하고, 극동 아시아권에 분포하는 무척추동물인 북쪽말뚝성게(*Strongylocentrotus intermedius*)는 조간대에서부터 수심 35 m 되는 곳까지 분포한다. 발생 과정에 큰 영향을 미칠 수 있는 조건으로는 온도, 염분, 수정란의 밀도 등이 있다. 이들 조건이 적절하지 못하다면 유생의 발생이 정상적으로 이루어지지 않을 수 있으므로, 생물검정을 실시했을 때 신뢰할 수 없는 결과를 초래할 수 있다. 그러므로 이들 조건의 최적 범위를 우선적으로 알아야 할 것이다. 따라서

본 연구는 북쪽말뚝성게의 배아를 이용한 생물검정의 최적 실험조건을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험생물의 준비 및 수정란 준비

실험생물인 북쪽말뚝성게(*Strongylocentrotus intermedius*)의 성체는 2005년 8월에 강원도 고성 앞바다 조하대에서 채집하였다. 실험실로 옮긴 성체 성체는 자연적인 산란을 억제하기 위하여 18°C로 유지하여 약 1개월간 순치하였다. 실험에 사용하기 직전 개체의 표면에 묻어있을지 모르는 원생동물과 기타 이물질들을 제거하기 위해 담수를 분사하여 세척하여 성체를 준비하였다. 준비된 성체로부터 알과 정자의 방출을 유도하기 위하여 0.5 M KCl 1 mL를 입주위의 연약한 부분을 통해 주입한 후 알과 정자를 각각 따로 수집하였다(Cherr *et al.*, 1987; Chapman, 1992).

정자는 생식공을 통해 정소에서 나온 것을 직접 pasteur pipette으로 모아 뚜껑이 있는 2개의 1.5 mL centrifuge tube에 넣어 실험에 사용하기 전까지 냉장 보관하였다. 알의 수거는 개체의 지름보다 입구가 작은 비커에 GF/F filter로 여과된 해수를 가득 담아 개체의 입이 위로 향하도록 올려두었고 약 30분 동안 채취하였다.

이렇게 하여 얻은 정자와 난자를 500-mL 비커에 함께 넣어 20분간 수정시킨 후 125- μ m의 망목의 나일론 망을 통과시켜 큰 물질을 제거하고 50- μ m 망목의 나일론 망을 이용하여 약 7차례 세척하여 정자 및 작은 물질들, 그리고 크기가 작은 미성숙란을 제거하여 실험에 사용될 수정란을 준비하였다.

2. 최적의 온도결정 실험

실험의 최적 온도를 결정하기 위하여 1- μ m 카트리지 필터를 통과한 여과해수로 10, 15, 18, 20 그리고 25°C의 5개실험구를 설정하였다. 각 실험구마다 수정란의 밀도를 여과해수 1 mL당 약 100개가 되도록 조절하여 폴리카보네이트 재질의 1-L 투명용기(Nalgene)에 1- μ m 카트리지 필터를 통과한 여과해수(32 psu) 1L를 채워 넣고, 각각 실험 온도마다의 배양기에 넣어 발생이 진행되도록 배양하였다.

주요 발생 단계까지 도달하는 시간을 알아보기 위하여 수정 후 144시간까지 3시간 간격으로 5 mL 씩 취하여 4% 포름알데히드로 고정하였다. 시료 내의 배아를 Sedgewick Rafter Chamber (1 mL)에 담아 현미경으로(100배) 관찰하여 6개의 발생단계(수정란, 2세포기-32세포기, 상실기, 포배기, 프리즘, 플루테우스) 각각에 해당되는 배아의 백분율을 계산하였다. 각각의 발생 단계에 해당되는 개체의 비율이 50% 이상이 되는 시간을 그 단계의 발생시간으로 간주하였다.

각 온도별로 부화한 배아의 백분율(부화율)과 정상적으로 발생한 유생의 백분율(정상 발생율)을 계산하였다. 각 온도별 부화율과 정상 발생률 결과에 대하여 SPSS 프로그램을 이용하여 분산분석(one-way ANOVA, 유의수준 $\alpha=0.05$)을 실시하였고(Zar, 1984), 정상 발생률이 70% 이상인 온도 범위를 찾아내었다.

3. 최적의 염분범위 결정 실험

발생 최적의 염분 범위를 결정하기 위하여 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 그리고 50 psu의 10개 실험구를 준비하였다. 1- μ m 카트리지가 필터를 통과한 여과해수를 이용하여 고염도의 해수를 소용량 이상 제조하고, 초순수(deionized water)를 첨가하여 각 염분별 실험구를 준비하였다.

10개의 염분이 조절된 유리 재질의 20-mL 바이알에 수정란의 밀도를 여과해수 1-mL 당 약 100개가 되도록 조절하여 주입하고 15°C에서 72시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후 4%의 포름알데히드로 고정하였고 시료 내의 배아를 관찰하여 A 자형의 정상적인 플루테우스(pluteus)의 백분율을 계산하였다.

실험 완료 후 조금 더 세밀한 결과를 얻기 위하여 전과 동일한 실험법으로 24~38 psu까지 2 psu 간격으로 8개의 시료를 준비하여 각 시료별 정상 발생률을 구하였다. 각각의 모든 염분별 정상 발생률 자료에 대하여 SPSS 프로그램을 이용하여 분산분석을 실시하였고, 정상 발생률이 70% 이상인 염분 범위를 찾아내었다.

4. 최적 수정란의 밀도 결정 실험

발생의 최적 밀도를 결정하기 위하여 수정란의

밀도가 여과해수 1 mL 당 25, 50, 100, 200, 400, 800 그리고 1,600개가 되도록 조절한 7개 실험구를 준비하였다. 1- μ m 카트리지가 필터를 통과한 여과해수를 사용하였고, 20-mL 유리 바이알을 배양용기로 하여 15°C에서 72시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후 시료는 4%의 포름알데히드로 고정하였고, 각 시료마다 정상 발생률을 계산하였다. 각 밀도별 정상 발생률 자료에 대하여 SPSS 프로그램을 이용하여 분산분석을 실시하였고, 정상 발생률이 70% 이상인 밀도 범위를 찾아내었다.

검정실험 최적의 밀도를 결정하기에 앞서 최적 온도와 최적 염분의 결정 실험에 적용된 수정란의 노출 밀도는 성체(*Paracentrotus lividus*)의 배아를 이용한 생물검정에서 mL당 500개의 수정란을 이용한 연구(Radenac *et al.*, 2001) 내용을 참고하였고 최적의 염분이 결정되기 이전의 실험에서는 성체 서식환경의 평균염분(32 psu)으로 실험하였다.

결 과

실험의 초기단계에서 알의 수정 여부는 알 표면에서 수정막의 형성 여부로 판단하였다. 이때의 수정률은 90% 이상이었다. 그리고 각 발생 단계별 형태는 크게 6가지로 구분하여 Fig. 1에 나타내었다.

1. 온 도

온도별로 각 발생단계까지 발생 시간은 10°C에서는 144시간이 경과한 후에 플루테우스 단계로 발생하였다. 15°C에서는 72시간이 경과한 후 플루테우스 유생이 되었고, 18, 20°C에서는 60시간, 25°C에서는 48시간 경과 후 플루테우스로 발생하였다(Fig. 2).

온도별로 부화율과 정상 발생률을 계산하였다. 부화율은 10°C에서 15°C까지는 70% 이상으로 통계적으로 차이가 없었다. 하지만 18°C부터는 부화율이 감소하기 시작하여 20°C 이상에서는 50% 이하로 감소하였다(ANOVA, $p < 0.05$) (Fig. 3A).

정상 발생률은 15°C에서 80% 내외로 높았고, 통계학적으로는 차이가 없지만 18°C 이상부터는 점차 감소하였다. 10°C의 경우는 플루테우스 유생까지 도달하는데 정상 발생률은 60%에 가까웠고 발생 시간은 144시간으로 많이 걸렸다. 18~20°C에

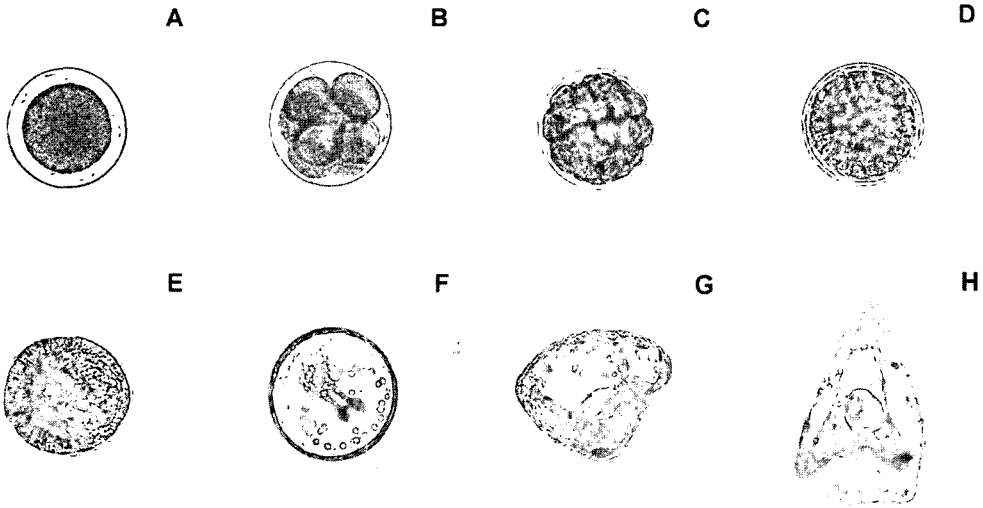


Fig. 1. Developmental stages of *S. intermedius*. A: fertilized egg, B: 8-cell stage, C: morula stage, D: blastula (before hatching) stage, E: blastula (after hatching) stage, F: gastrula stage, G: prism stage, H: pluteus stage.

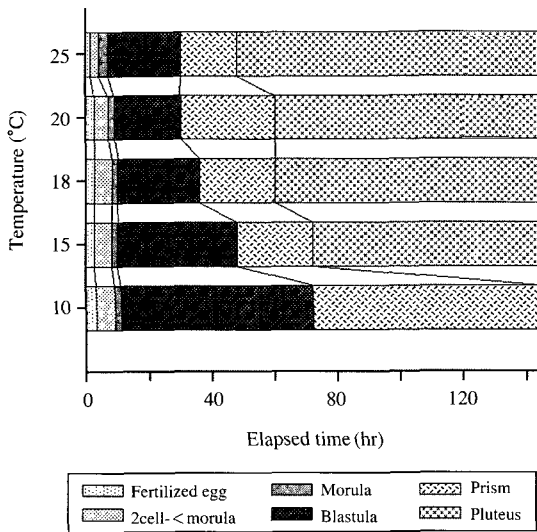


Fig. 2. Effect of temperature on the developmental time of each stage of *S. intermedius*.

서는 60시간으로 발생 시간은 짧아졌지만 정상발생률이 70% 이하로 감소하였다. 그리고 25°C에서는 48시간으로 발생기간은 짧았지만 정상 발생률이 20% 정도까지 낮아졌다 (ANOVA, $p < 0.05$) (Fig. 3B).

2. 염 분

북쪽말뚝성게의 발생과정은 염분의 영향을 크게 받고 있었다 (ANOVA, $p < 0.05$) (Fig. 4A). 염분이 20 psu 이하일 경우 정상적인 발생은 이루어지지 않았다. 25 psu에서는 정상 발생률이 10% 이하로 매우 낮았고, 30 psu일 때 정상 발생률이 90% 이상으로 가장 높았다. 이후 염분이 증가함에 따라 정상 발생률은 감소하여 40 psu 이상일 경우 정상발생이 이루어지지 않았다. ASTM (1994)에서는 대조구에서의 정상 발생률이 70% 이상이 될 때 그 생물검정의 결과를 수용할 수 있도록 정해놓고 있다. 이 기준을 본 실험의 결과에 적용하여 보면, 70% 이상의 정상 발생률이 관찰된 염분 조건은 30 psu 조건뿐이었다. 하지만 본 실험의 결과는 염분 처리구의 간격이 넓어 생물검정 대상 시료의 염분을 보정 할 때 모호성을 나타낼 우려가 있었다. 그래서 염분 처리구의 간격을 좁혀 추가적인 실험을 하였다 (Fig. 4B). 24 psu부터 2 psu 간격으로 8개의 처리구로 실험하였고, 기타 발생조건은 선행된 실험과 동일하게 주었다. 24~28 psu까지의 최고 정상 발생률이 60%에도 이르지 못하였고 36~38 psu에서도 낮은 정상 발생률을 나타내었다. 그리고 30~32 psu 범위 내에서는 80%를 상회하는 정상 발생률을 보였으며 통계적으로도 차이가 없었다

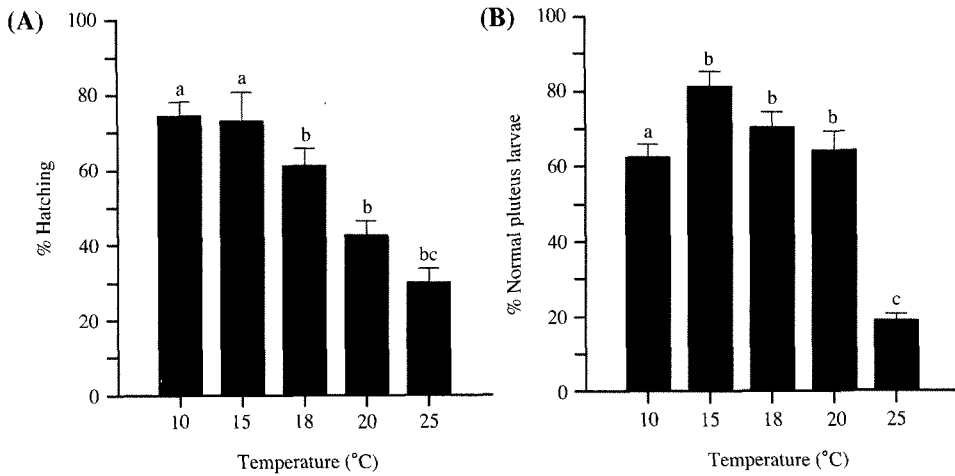


Fig. 3. Proportions of hatched blastulae (A) and normal larvae (B) of *S. intermedius* at each temperature. Error bar represents SD (n=3).

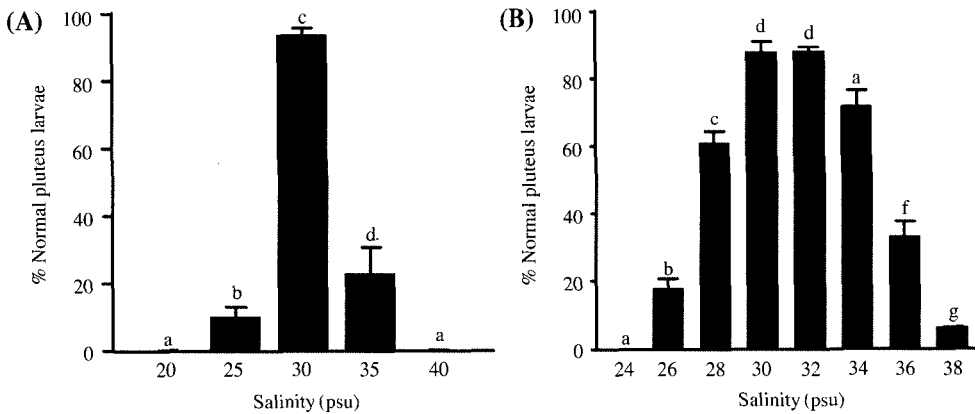


Fig. 4. Comparison of proportion of normal larvae of *S. intermedius* among different salinities ((A): the first experiment, (B): the second experiment). Error bar represents SD (n=3). Values with the same character showed no significance (ANOVA, $p > 0.05$).

(ANOVA, $p > 0.05$).

3. 밀도

북쪽말뚝성계의 정상 발생률은 초기 수정란의 밀도에 영향을 받고 있었다(Fig. 5). 수정란의 밀도가 mL당 25~100개인 범위에서는 정상 발생률이 90% 내외로 일정하게 유지되었고, 통계학적으로도 차이가 없었다(ANOVA, $p > 0.05$). 그러나 수정란의 밀도가 mL당 200개인 경우는 정상 발생률이

70% 정도로 감소하였고 통계학적으로 25~100개의 경우와 차이가 있다고 계산되었다(ANOVA, $p < 0.05$). 밀도가 더욱 증가함에 따라 정상 발생률은 지속적으로 감소하여 밀도가 mL당 1,600개인 경우는 정상 발생률이 20%에도 미치지 못하였다.

고찰

북쪽말뚝성계의 각 발생단계별 발생시간은 온도

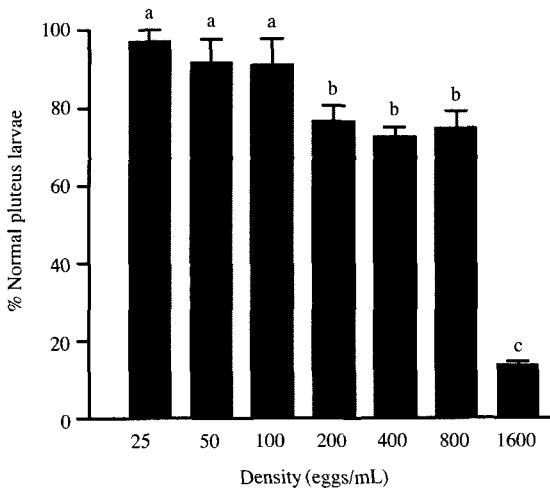


Fig. 5. Comparison of proportion of normal larvae of *S. intermedius* among densities. Error bar represents SD (n=3). Values with the same character showed no significance (ANOVA, $p > 0.05$).

에 따라 큰 차이를 나타내었다 (Fig. 2). 전반적으로 온도가 상승함에 따라 각 발생단계까지 이르는 경과시간은 감소하였다. 하지만 낮은 온도는 유생의 발생에 심각한 악영향을 미치지 않지만 발생시간이 길어진다. 즉, 144시간이란 시간은 50%가 정상적인 플루테우스 유생에 도달하는 시간으로 더 오랜 시간동안 배양한다면 정상 발생률 또한 더욱 상승하리라 예상된다. 하지만 25°C 같이 높은 온도에서는 유생의 개체수 감소로 보아 발생에 악영향을 미치는 온도임을 알 수 있었다. 온도는 발생시간 뿐 아니라 부화율과 정상 발생률에도 큰 영향을 미치고 있었다 (Fig. 3). 온도가 가장 낮은 10°C에서 정상 발생률은 60% 이상이었으나 사망률은 그리 높지 않았다. 이는 온도가 너무 낮아 발생속도가 느렸기 때문에 나타난 결과이다. 따라서 이는 낮은 온도 그 자체가 발생에 악영향을 미치는 것이 아니라는 것을 의미하고, 단지 플루테우스 유생까지 도달하는 시간이 길어진다는 것이다. 다시말해 낮은 온도는 발생시간을 지연시킴을 알 수 있었다. 하지만, 이렇게 길어진 실험 시간은 생물검정에 적합하지 않다. 왜냐하면, 생물검정은 가능하면 신속하고 간편하게 해양환경을 진단하기 위한 목적으로 이용되어야 하기 때문이며, 실험 시간이 길어진다는 것은 그만큼 시료의 상태가 변할 확률이

높아짐을 의미하기도 한다. 온도가 15°C 경우는 정상 발생률이 80% 이상으로 높았으며, 이 온도 범위에서는 성계의 배아가 비교적 건강한 상태로 발생을 진행하였다. 18°C와 20°C의 온도에서는 통계적으로는 15°C와 차이가 없다고 산출되었지만, 정상적으로 발생한 유생이 약 70, 65% 정도이었고, 죽거나 기형인 유생이 나머지를 차지하였다. 이는, 18°C 이상의 온도에서는 온도 자체가 발생을 저해하기 시작하였음을 의미한다. 25°C에서는 배아의 대부분인 80%가 사망하거나 기형을 보였음을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합하면, 성계의 발생이 가장 정상적으로 이루어지는 온도는 15°C이다. 10°C와 15°C에서 부화율은 이 두 온도에서 큰 차이가 없었다. 반면, 발생 시간은 10°C에서 144시간, 15°C에서 72시간으로 2배정도 차이가 났다. 이는, 10°C에서 실험을 완료하기 위해서는 약 6일이 필요하고, 15°C에서는 약 3일이 필요하다는 의미이다. 동일한 결과를 얻는다면 보다 짧은 시간 내에 얻는 것이 더 나을 것이다. 15°C와 18, 20°C를 비교하면 부화율과 정상 발생률에 있어 15°C가 정상적으로 발생이 이루어졌기 때문에 본 연구에서는 15°C를 성계 배아를 이용한 생물검정 실험의 최적 온도로 결정하였다.

염분 처리구의 발생 실험의 결과, 대조구를 포함한 전체 염분범위에서 사망개체의 비율은 10% 미만으로 낮았으며, 비교적 낮은 염분인 25 psu 이하와 비교적 높은 염분인 38 psu 이상에서 유사하게 정상적으로 발생하지 못한 개체의 비율이 90% 이상의 결과를 얻었다. 이러한 결과들에서도 염분에 의해 북쪽말뚝성계의 발생에 미치는 영향을 반영하여 주었다. 25 psu 이하의 염분 농도에서는 계수되는 생물의 숫자가 적고, 찌꺼기가 많은 것으로 보아 삼투압에 의한 세포사멸이 일어났다고 예상할 수 있었고, 높은 염분 농도에서는 세포가 수축되거나 더 이상 발생하지 못하고 수정란 상태에서 사멸한 것들을 확인할 수 있었다. 수정란 상태로 사망한 것과 부화 후 쪼그라든 것, 그리고 숫자가 줄어든 것 등의 결과를 보면 수정란 상태, 부화 직후는 물론 부화 후에도 지속적인 염분의 영향이 있는 것으로 판단되었다. 저염이나 고염 모두에서 같은 결과가 나타난다면 수정막이 있다하더라도 물질교환이 일어나는 것이며 삼투영향을 받는 것으로 판단된다.

Table 1. Comparison of conditions for sea urchin development tests among different sea urchin species. V: volume of test solution (mL), DD: density of embryos in development test (embryos/mL), S: salinity (psu)

Species	V	S	DD	Reference
<i>Arbacia punctulata</i>		30		U.S. EPA (1994)
		30		Nacci <i>et al.</i> (1986)
<i>Arbacia spatuligera</i>		31~36		Riveros <i>et al.</i> (1996)
<i>Dendraster excentricus</i>	10	34	25	U.S. EPA (1995)
<i>Diadema setosum</i>	10	30	20	Ramachandran <i>et al.</i> (1997)
<i>Paracentrotus lividus</i>	5000	34	100	Fichet <i>et al.</i> (1998)
<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	250		20	Dinnel and Stober (1987)
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	20	34	50	U.S. EPA (1995)
	10	34	25	Garman <i>et al.</i> (1997)
<i>Strongylocentrotus intermedius</i>	5	30~32	100	This study

30~32 psu 범위 내에서는 80%를 상회하는 정상 발생률을 보였고, 34 psu에서도 70% 이상 정상 발생율을 나타내었지만, 최적의 염분 조건은 정상 발생률이 가장 높은 30~32 psu가 적당하다고 결정하였다.

북쪽말뚝성게 배아가 밀도 자체의 영향을 받지 않고 정상적으로 발생할 수 있는 밀도범위는 정상 발생률이 90% 이상인 mL당 25~100개 정도인 것으로 나타났다. 하지만, 결과계수과정에서의 확률적으로 오류를 최소한으로 감소시키기 위해서는 위험부담이 큰 25개보다는 100개가 적합한 것으로 판단된다. 따라서 최적의 밀도는 100 embryos/mL로 결정하였다.

밀도가 증가하면서 정상 발생률이 감소하는 것은 발생 속도가 느려졌기 때문인 것으로 여겨진다. 실제로 실험 과정에서 관찰한 결과, mL당 200개 이상의 밀도에서 비정상 유생의 대부분이 플루테우스 유생까지 도달하지 못하고, 프리즘 상태였거나, 크기가 평균보다 1/2 정도 작은 플루테우스 유생의 모습을 나타내었다. 실험 중에 북쪽말뚝성게 배아가 포배기 때 부화한 후 배양액의 표면에 모여드는 현상을 관찰할 수 있었다. 즉, 배양액의 총 부피가 20 mL이라고 하지만, 부화 후 운동성을 가지면 20 mL의 공간을 모두 이용하는 것이 아니라 표면 근처의 일부 공간만을 이용하는 것이다. 이와 같이 좁은 공간에 모여들게 되면 서로 접촉할 확률은 높아지고 이로 인한 물리적 스트레스가 발생 지연을 초래하였을 수 있으며, 용존산소에 대한 경쟁 또한 증가하였을 것이다. 이러한 밀도종속적인 효과로 인해 mL당 200개 이상의 고밀도에서 북쪽

말뚝성게의 발생 속도가 느려진 것으로 판단된다.

본 연구와 유사한 다른 연구들의 결과를 비교해 보면, 북쪽말뚝성게의 염분에 대한 민감도는 같은 성게류들 (*Arbacia punctulata*, *Arbacia spatuligera*, *Diadema setosum*)과 유사한 민감도를 보여주었다. 밀도에 있어서는 *Paracentrotus lividus*를 제외한 모든 생물들보다 더 작은 부피에서 더 많은 유생을 배양할 수 있다는 결과를 얻었다 (Table 1).

결 론

본 연구를 통해 북쪽말뚝성게 (*Strongylocentrotus intermedius*)의 배아를 이용한 생물검정의 최적 실험 조건을 결정하였다. 결정된 조건은 다음과 같다.

생물검정 시 노출배양의 온도는 부화율이나 정상 발생률에 있어 15°C가 가장 적합하였으며, 이 온도에서 72시간이 정상적인 북쪽말뚝성게 유생인 플루테우스(pluteus) 유생단계까지 발생하는 시간이었다. 배양 가능한 시료의 염분 범위는 30~32 psu이다. 검정생물 발생의 최적 염분범위이므로 공장폐수 및 강이나 강 하구지역 같은 곳에서의 시료를 이용한 생물검정을 할 때에는 염분을 적절히 보정해 주어야 할 것이다. 배양 시 발생 도중 일어날 수 있는 밀도 종속적 효과가 나타나지 않는 최대의 밀도는 100 embryos/mL이었다.

감사의 글

본 연구는 한국해양연구원 기관고유 사업

(PE97801)의 지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- ASTM. Standard guide for conducting acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs, ASTM E724-94. 1994; pp. 334-351. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Beiras R and Albentosa M. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; Implication for the implementation of seawater quality criteria, *Aquaculture* 2004; 230: 205-213.
- Chapman GA. Sea urchin fertilization test method, Newport, OR; U.S. EPA, ERL-Narragansett, Pacific Ecosystem Branch 1992; 1-35.
- Cherr GN, Shenker J, Lundmark C and Turner KO. Toxic effects of selected bleached kraft mill effluent constituents on the sea urchin sperm cell, *Environ. Toxicol. Chem.* 1987; 6: 561-569.
- Dinnel PA and Stober VJ. Application of the sea urchin sperm bioassay to sewage treatment efficiency and toxicity in marine waters, *Mar. Environ. Res.* 1987; 21: 121-133.
- Fichet D, Radenac G and Miramand P. Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity, *Mar. Pollut. Bull.* 1998; 36: 509-518.
- Garman GD, Anderson SL and Cherr GN. Developmental abnormalities and DNA-protein crosslinks in sea urchin embryos exposed to three metals. *Aquat. Toxicol.* 1997; 39: 247-265.
- Geffard OE His H, Budzinski JF, Chiffoleau A, Coynel and Etcheber H. Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of *Crassostrea gigas* oysters, *Environmental Pollution* 2004; 129: 457-465.
- His E, Heyvang I, Geffard O and Montaudouin X. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies, *Water Research* 1999; 33(7): 1706-1718.
- His E, Seaman MNL and Beiras R. A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Research*, 1996; 31(2): 351-355.
- Martin M, Osborn KE, Bilig P and Glicksten N. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and Cancer magister larvae. *Mar. Pollu. Bull.* 1981; 12(9): 305-308
- Nacci D, Jackim E and Walsh R. Comparative evaluation of three rapid marine toxicity test: Sea urchin early embryo growth test, sea urchin sperm cell toxicity test and Microtox. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1986; 5: 521-526.
- Naomasa k and Okamura k. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects, *Chemosphere*, 2004; 55: 1403-1412.
- Radenac G, Fichet D and Maramand P. Bioaccumulation and toxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus* sea-urchin embryo. *Mar. Environ. Res.* 2001; 51: 151-166.
- Ramachandran S, Patel TR and Colbo MH. Effect of copper and cadmium on three Malaysian tropical estuarine invertebrate larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 1997; 36: 183-188.
- Riveros A, Zuñiga M, Larrain A and Becerra J. Relationships between fertilization of the southeastern pacific sea urchin *Arbacia spatuligera* and environmental variables in polluted coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1996; 134: 159-169.
- U.S. EPA. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to marine and estuarine organisms. Second edition. 1994; EPA-600/4-91/003. Environmental monitoring systems laboratory, Cincinnati, Ohio.
- U.S. EPA. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms. 1995; EPA-600/R95/136. National exposure reseach, laboratory, Cincinnati, Ohio.
- Zar JH. Biostatistical analysis, 2nd ed. 718 pp. Prentice-Hall International, Inc., Engelwood DLIffs, NJ. 1984.