「The Sea」 Journal of the Korean Society of Oceanography
Vol. 13, No. 2, pp. 112 — 120, May 2008

식물플랑크톤의 개체군성장저해율을 이용한 해양생태독성 시험방법에 관한 연구

이승민 · 박경수[1,*] · 안경호 · 박승윤 · 이상희[2]
국립수산과학원 서해수산연구소
[1]안양대학교 해양생명공학과
[2]한국기초과학지원연구원

Application of the Ecotoxicological Standard Method using Population Growth Inhibition of Marine Phytoplankton

SEUNG MIN LEE, GYUNG SOO PARK[1,*], KYOUNG HO AN, SOUNG YUN PARK AND SANG HEE LEE[2]
Marine Environment Division, West Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Incheon 400-420, Korea
[1,]Department of Marine Biotechnology, Anyang University, Incheon 417-833, Korea*
[2]Division of Electron Microscopic Research, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-333, Korea

해양생태독성평가를 위한 공정시험방법으로 해양생태계의 기초생산자를 대표하는 식물플랑크톤인 *Skeletonema costatum*, *Heterosigma akashiwo*, *Prorocentrum micans*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*를 이용하여 생물검정 예비 실험을 수행하였다. 그중 표준시험생물로 해산규조류인 *S. costatum*을 표준시험생물종으로 선정하였으며, Endpoint는 72~96시간 개체군성장저해율(EC_{50})로 설정하였다. 시험방법은 비교환정수방식(non-renewal static test)을 선택하였으며, 시험적합도 기준은 대조구의 시간당 개체군성장률 0.04(r > 0.04/hr) 이상으로 설정하였다. *S. costatum*은 우리나라는 물론 전 세계적으로 널리 분포하며, 표준시험방법개발은 국제표준화기구(ISO, International Standardization Organization)의 시험방법을 참고하였다. 본 종을 이용한 독성시험은 시험대상물질의 염분이 20~35 psu의 범위에서 가능하며, 반복실험 및 교차분석결과 표준독성물질에 대한 민감도가 유사하게 나타남으로써 실험의 재현성이 입증되었다. 하수오니 용출액을 이용한 독성실험 결과, 식물플랑크톤의 개체군성장저해율(EC_{50})을 이용한 독성실험은 윤충류(*Brachionus plicatilis*) 신생개체(neonate)의 사망률(LC_{50}), 발광박테리아(*Vibrio fischeri*)의 발광저해율(IC_{50}), 해조류(*Ulva pertusa*)의 생식률(EC_{50})을 이용한 시험방법보다 낮은 농도에서 EC_{50}을 나타냈다. 식물플랑크톤의 개체군성장저해율을 이용한 생물검정 방법은 유해물질의 해양 기초생산자에 대한 독성평가에 매우 유용한 실험 방법으로 판단된다.

A series of experiments were conducted to establish a marine ecotoxicological standard method using marine primary producers, *Skeletonema costatum*, *Heterosigma akashiwo*, *Prorocentrum micans*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* as candidate test species. Marine diatom, *S. costatum* was selected as standard test species in terms of the ecological roles and international uses as test species. Test methods and test acceptability criteria are as follows; 72~96 hr population growth inhibition EC_{50} as endpoint. Static non-renewal method, and population growth rates over 0.04/hr in control as test acceptability criterium. *S. costatum* is widely distributed in the world ocean and used for standard species of marine toxicity test method by ISO (International Standardization Organization). Possible salinity ranges for this test method are 20~35 psu, and reproducibility and interlaboratory test results were consistent through the calibration tests. Sensitivity of the test method was comparable or better than other toxicity tests such as rotifer neonate mortality, bioluminescent bacterial inhibition, seaweed sporulation and sea urchin fertilization tests.

Keywords: Standard Method, Toxicity, Phytoplankton, *S. costatum*, Population Growth Inhibition

서 론

유해물질의 생태독성평가는 화학분석에서 간과될 수 있는 미지의 물질에 대한 독성이나 다양한 물질이 공존하면서 발생하는 독성 상승효과에 대한 보완방법으로 국제적으로 널리 이용되는 독성평가 방법중 하나이다(Chapman, 1992; Ghirardini *et al.,* 1999; Anderson *et al.,* 2001; Silvia *et al.,* 2004). 특히 수서생태계의 기초생산자를 이용한 독성시험은 국제적으로 다양한 시험방법이 개발되어 사용 중이다(ISO, 1995; NIWA, 1998; APHA *et al.,* 1995).

*Corresponding author: gspark@anyang.ac.kr

현재 국제적으로 가장 보편적으로 이용되는 해양 식물플랑크톤은 *Skeletonema costatum*(ISO, 1995), *Dunaliella tertiolecta*(NIWA, 1998)이며, 상기 두 종은 이미 공정시험법이 개발되어 상용되고 있다. 특히 해산규조류인 *S. costatum*은 퇴적물 독성평가(Wong *et al.*, 1995; Cheung *et al.*, 1997) 및 중금속 등을 포함하는 유해물질 독성평가에 다양하게 이용되고 있다(Jensen *et al.*, 1974; Overnell, 1976; Walsh and Alexander, 1980; Rao and Mohanchand, 1990; Weideborg *et al.*, 1997, Park *et al.,* 2005). 또한 담수생태계에서는 개구리밥 (*Lemna minor*), *Selenastrum capricornutum, Microcystis aeruginosa* (APHA *et al.*, 1995) 등이 이용되며, 해조류인 *Ulva fasciata*의 유주자를 이용한 독성실험방법도 정립되어 있다(Hooten and Carr, 1997).

이렇듯 해양생태계의 생산자를 대표하는 많은 생물중 국제적 이용도와 국내 해양생태계 내에서의 중요성 및 종의 유용성 등을 고려하여 표준시험생물을 선정하였다. 표준시험생물로서의 가능성을 확인하기 위하여 각종의 72~96시간 개체군성장저해율을 이용하여 염분내성, 표준독성물질에 대한 민감도 및 해양유입 오염물질에 대한 현장 적용 실험 등을 수행하였으며(박 등, 2005), 온산공단 주변 해역의 퇴적물현탁액에 대한 독성평가는 교차분석을 실시하여 실험실간 분석결과의 재현성을 입증하였다.

따라서 해양으로 유입되는 유해물질의 위해성 평가에 있어서 식물플랑크톤은 해양생태계의 기초생산자로서 반드시 포함되어야할 시험생물로 판단되며, 상기 생물을 이용한 표준시험방법을 적용해 보았다.

재료 및 방법

시험생물종

본 실험에 이용된 식물플랑크톤 5종은 해산규조류인 *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, 라피도조류인 *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada, 와편모조류인 *Prorocentrum micans* Ehrenberg, 착편모조류인 *Isochrysis galbana* Parke, 담녹조류인 *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher이다. *S. costatum*은 한국해양미세조류은행(KMCC)에서 나머지 종은 국립수산과학원(NFRDI) 환경연구부 유해생물팀에서 분양받아 항온실에서 6개월 이상 계대 배양하였다. 배양 온도는 20~25 ℃, 조도는 형광등을 이용하여 3,000~ 10,000 Lux(연속명기)를 유지하였으며, 영양배지는 f/2 배지를 이용하였다.

시험방법

시험 항목

식물플랑크톤 염분 내성 실험은 종별 염분에 대한 내성이 각각 다르기 때문에 염분범위를 0~35 psu까지 5 psu 구간으로 나눈 후(반복수=3), 멸균한 자연해수에 3차 증류수를 이용하여 희석하여 사용하였으며, 35 psu의 경우는 인공염을 첨가하여 염분농도를 조절하였다. 각각의 실험구별로 72시간 동안 개체군 성장률을 측정하여 대조구(배양 염분, 약 30 psu)와 비교하였으며 평균 개체군성장률의 차이에 대한 유의성을 검증하였다.

각각의 식물플랑크톤 종별 독성물질에 대한 민감도를 확인하기 위하여 ISO(1995)에서 제시한 표준독성물질인 Potassium dichromate (CAS# 7778509, $K_2Cr_2O_7$, Merck 4864.1000)를 이용하였으며, 각 노출 농도별(0~10 mg/L) 개체군성장률을 측정하였다.

또한 해양으로 유입되는 유해물질에 대한 독성실험을 위하여 총 11개 하수처리장에서 하수오니를 채취하여 독성실험에 이용하였다. 각각의 하수오니는 해양 배출 이전에 탈수된 상태이나 함수율이 약 70~80%에 이른다. 하수오니는 생활하수, 공장폐수 및 축산 폐수 등을 포함하는 다양한 처리장으로부터 채취하였다. 하수오니를 해수로 추출하기 위하여 본 연구소 전면 수역(인천광역시 중구 을왕동)에서 채취된 해수를 고압 모래 여과기에 통과시킨 후 카본 필터로 재여과 하였다. 재여과된 해수는 다시 0.45 μm membrane filter (Advantec MFS Inc.)로 여과한 후 고압, 멸균하여 사용하였다. 하수오니의 추출은 환경오염공정시험법(환경교육연구회, 2000)을 따랐으나, 실험대상 물질이 해양생물에 미치는 영향을 구명하는데 목적이 있으므로 추출용매를 증류수 대신 해수(30.0 psu)를 사용하였다. 하수오니를 해수로 추출하기 위해서 해수/하수오니를 10/1(V/W)의 비율로 1L 분액여두(separate funnel)에 넣은 후 진폭 4~5 cm, 분당 약 200~250회로 6시간 동안 진탕하여 추출하였다. 추출액의 부유물질 농도가 높은 경우에는 침전시켜 상등액만 이용하였다. 독성실험을 위한 하수오니 추출액은 0, 6.25, 12.5, 25, 50 및 100%로 하여 각 실험 농도마다 3 반복으로 실험하였다.

본 연구에서 제시한 예비공정시험법에 따라 서해수산연구소와 네오엔비즈 환경안전연구소가 각각 온산만 퇴적물현탁액에 대한 *S. costatum* 종의 72시간 개체군성장저해율을 이용하여 교차분석을 실시하였다. 상기 기술한 현장오염물질 실험방법과 같고, 퇴적물의 공극수량이 적어서 퇴적물:해수를 1:1로 추출한 퇴적물현탁액을 이용하여 실험하였으며, 상기 모든 실험의 조건은 Table 1과 같다.

개체군성장률 측정법

식물플랑크톤의 개체군성장률 측정은 SR chamber를 이용하여 Inverted microscope(Olympus IX70)으로 계수하거나, Fluorometer (Tuner Designs Model 10-AU, USA)를 이용하여 엽록소 량을 측정하였다.

Table 1. Test conditions for the definitive chronic toxicity and salinity tolerance test for phytoplankton species.

Parameters	Test condition
Test type	static non-renewal
End point	population growth inhibition (EC_{50})
Test organism	*S. costatum*, *H. akashiwo*, *P. micans*, *I. galbana*, *T.suecica*
Test duration	72 or 96 hr (72hr recommended)
Test temperature	20 ℃~25 ℃ (22 ℃ recommended)
Test salinity	20~35 psu (30 psu recommended)
Light type	fluorescent lamp (universal white)
Light intensity	3000~10000 Lux
Light period	continuous
Test chamber	50 mL test tube or 125~250 mL flask
Dilution water	natural or artificial seawater/deionized water
Renewal of test solution	none
Test solution volume	30 mL
Culture media	f2
Initial density	5,000~10,000 cells/mL
Test concentrations	five+control
Number of replicates per concentration	4-5
Test acceptability criterion	r=0.04(hr^{-1}) or greater growth rates in control

식물플랑크톤의 개체군성장률(specific population growth rate)은 형광량을 이용한 클로로필 농도를 식물플랑크톤 종별로 회귀방정식(형광량-세포밀도)을 이용하여 세포밀도로 환산한 후 $r = (\ln N_t - \ln N_o)/t$($r$=개체군성장률, N_t=실험 종료 후의 세포밀도, N_o=초기세포밀도, t=배양시간)의 식으로 개체군성장률을 계산하였다. 또한 엽록소농도와 세포밀도간의 회귀방정식을 구하기 위하여(단순직선회귀-simple linear regression) 세포밀도는 Log_{10}으로 그리고 형광량에 의한 엽록소 농도는 double square root 변형으로 자료를 정규분포화 하였다.

결 과

표준시험생물의 선정

생물검정 실험은 염분의 영향으로 인하여 실험생물을 선정하는데 많은 어려움이 있다. 특히 실험생물이 협염성(stenohaline)일 경우, 실험대상물질의 염분을 인위적으로 조절하여야하며, 이 경우 독성실험 대상물질이 가지는 본래의 독성이 변하게 되므로 일반적으로 염분 조절 없이 실험을 수행하게 된다. 따라서 각 종별 염분 내성을 구명하기 위하여 염분에 따른 개체군성장률을 비교한 결과, 모든 종이 염분에 따른 성장률 차이가 뚜렷하였으며($p<0.0001$), 대부분의 종이 15 psu 이하에서는 대조구와 유의적 차이를 보였다 (Fig. 1). 분산분석을 이용한 염분별 평균 개체군성장률의 차이에 대한 유의성 검정 결과, *S. costatum*, *I. galbana*, *H. akashiwo*, *P. micans*는 15 psu 이하에서, 그리고 *T. suecica*는 5 psu 이하에서 대조구와 유의한 성장률의 차이를 보였다. 따라서 *T. suecica*가 가장 염분에 대한 내성이 높았으며, 나머지 종은 독성실험 대상물질이 20 psu 이상일 경우에만 실험이 가능할 것으로 판단된다.

식물플랑크톤 5종에 대한 시간당 개체군성장률을 측정한 결과, r=0.028~0.042(hr^{-1})의 범위를 보였으며, *H. akashiwo*가 가장 낮은 성장률을 보인 반면, *S. costatum*이 가장 높은 성장률을 보였다(Fig.

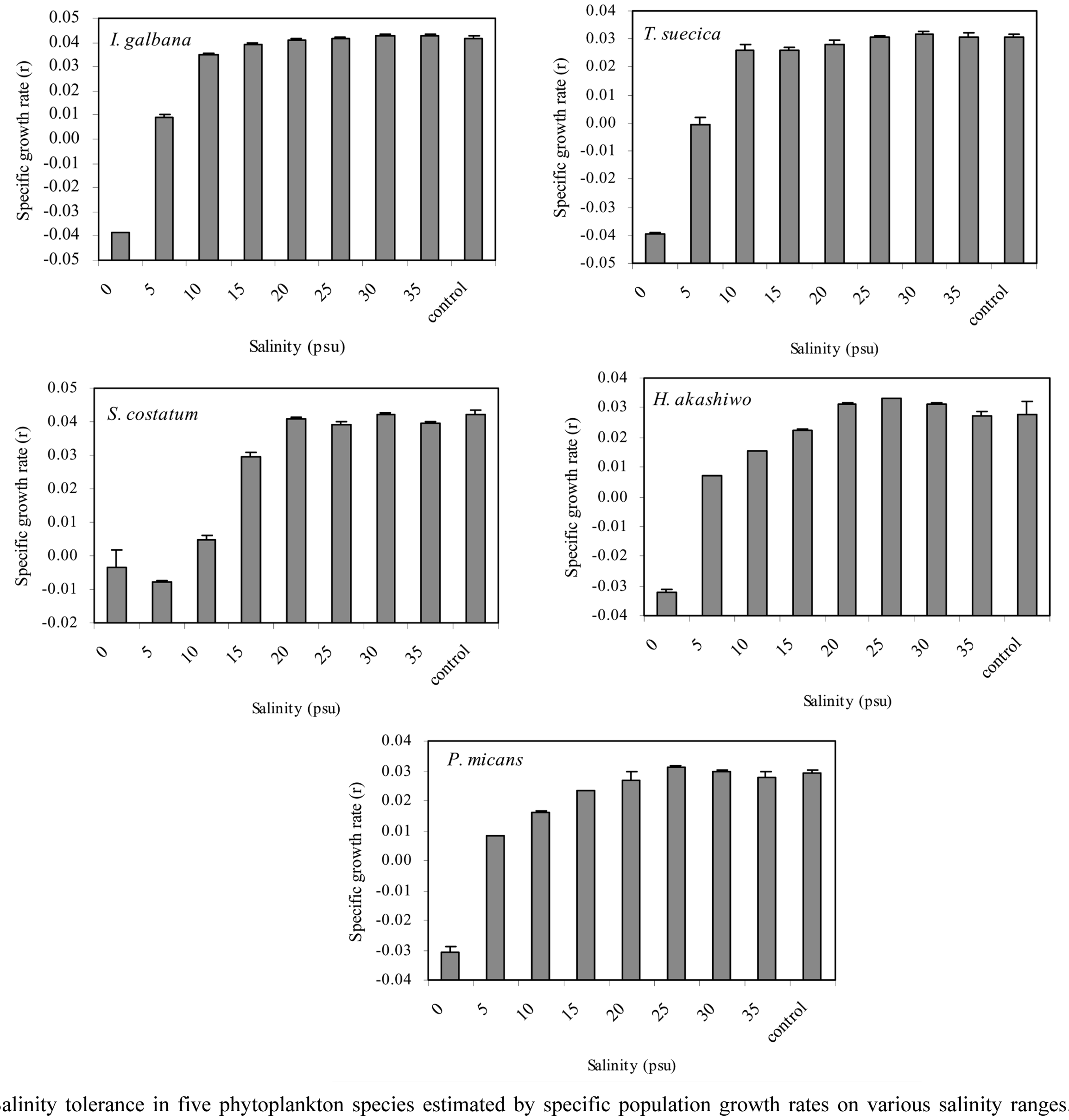

Fig. 1. Salinity tolerance in five phytoplankton species estimated by specific population growth rates on various salinity ranges.

1). 그러나 식물플랑크톤의 개체군성장률은 생물종에 따라 다르므로, 독성실험의 최소 조건을 만족시키는 대조구 개체군성장률을 *S. costatum*과 *I. galbana*는 r=0.04(hr^{-1})이상, *T. suecica*, *H. akashiwo* 및 *P. micans*는 r=0.03(hr^{-1}) 이상으로 설정하는 것이 타당할 것으로 생각된다.

식물플랑크톤의 개체군성장률을 산정하기 위해서는 각 노출 농도별 세포밀도를 산정하여야 한다. 그러나 세포수의 계수에 의한 개체군성장률 측정은 많은 시간과 노력이 필요하므로 형광량을 이용한 엽록소 농도와 세포밀도에 관한 상관관계를 이용하여 직접 계수하지 않고 세포밀도를 환산할 수 있는 회귀방정식으로 구하였다. 우선 모든 종에서 엽록소농도-세포밀도의 상관계수는 r=0.98 ($p<0.0001$) 이상으로 매우 높았으며, 선형관계 또한 뚜렷하였다. 따라서 단일종을 이용한 독성실험에서 세포수를 현미경하에서 계수하기보다는 형광량을 이용한 엽록소 농도 측정으로 세포수를 환산할 수 있을 것으로 판단된다.

상기 실험결과, 식물플랑크톤 5종 중 *S. costatum*을 본 연구의 대상 시험종으로 선정하였다. *S. costatum*은 우리나라 연안 생태계의 대표종이며, 또한 국제표준기구 (ISO)에서 표준시험생물로 지정한 종이다. 또한 상기 종은 기존 독성실험에 대한 자료가 충분히 확보되어 있고, 국내에서도 한국미세조류은행을 통하여 항상 시험종을 분양받을 수 있는 장점이 있다. 그러나 다른 후보 생물 역시 시험생물로 이용이 가능하며, 단 독성시험 결과를 제시할 때 식물플랑크톤의 표준독성물질인 potassium dichromate를 이용한 민감도 시험결과를 제공하여야 한다.

시험방법

식물플랑크톤을 이용한 독성시험은 주로 개체군성장률을 이용한 시험방법이 보편적이다(ISO, 1995; NIWA, 1998). 이는 식물플랑크톤의 개체 크기가 매우 작으므로 독성시험에서 가장 일반적 endpoint인 사망률을 산정할 수 없고 또한 개체의 크기 변화를 측정할 수 없기 때문이다. 따라서 본 시험방법은 일정 농도의 세포를 시험대상물질에 노출한 후 일정 시간 후에 개체군의 밀도변화를 측정하는 시험방법이다. 따라서 모든 시험물질은 액상이어야 하며, 배양중인 식물플랑크톤이 지수성장기인 시기에 독성시험을 수행하여야 한다. 시험방법의 요약은 다음과 같다.

시험생물의 준비 : 본 시험방법을 이용한 독성시험을 위해서는 국제표준시험생물인 *S. costatum*을 실험실에서 배양하거나, 또는 한국해양미세조류은행과 국립수산과학원에서 구할 수 있다. 표준시험생물은 독성시험 이전에 시험 조건과 동일한 환경에서 최소 2회 이상의 계대배양(일주일 배양)이 이루어져야 하며, 독성 시험 이전에 개체군성장이 지수성장기에 도달하여야 한다.

시험용액의 준비 : 50 mL 시험관에 시험용액을 농도별로 30 mL 씩 분주한다. 시험농도는 대조구를 포함하여 6구간이며, 각 시험구별 반복수는 5이다. 시험농도는 대상물질이 용액인 경우 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%와 대조구로 설정한다. 시험대상물질의 pH에 의한 독성을 배제할 경우, 염산이나 수산화나트륨을 이용하여 pH를 중성으로 조절한다.

시험생물의 노출 : 지수성장기의 시험생물을 30 mL 시험용액에 초기 세포농도가 약 10,000 cells/mL이 되도록 접종한 후 f/2 영양배지를 넣어준다. 시험생물 접종시 각 시험구마다 최소 3회 이상 나누어 접종한다. 조도는 형광등을 이용하여 3000~10000 Lux(연속명기)를 유지하고, 20~25 °C에서 실험한다. 그 외의 실험 조건은 Table 1에 제시하였다.

독성실험 : 시험 시작시 각 시험구별로 염분, 수온, 용존산소 및 pH를 측정하여 독성시험지에 기록하며, 24시간 간격으로 형광량 또는 세포밀도를 측정한다. 시험용기는 유리로 된 삼각플라스크나 시험관을 이용할 수 있으며, 구리 성분이 함유된 용기는 이용할 수 없다. 시험용기는 하루에 최소 2회 이상 흔들어 주어야 한다.

실험의 종료 : 시험대상물질, 수질, 실험조건, 일시, 실험자 및 책임자 등을 독성시험지에 명확히 기입하고, 시험시작 72시간 또는 96시간 후 시험을 종료하고 최종 식물플랑크톤 농도 및 수질을 측정하여 독성시험지에 기록한다.

자료분석 : 독성실험에 대한 end points는 대조구의 개체군성장률 대비 50%에 이르는 성장저해율(EC_{50}, 50% population growth inhibition concentration)을 계산한다. 계산 방법은 각 실험구에서의 개체군성장률을 계산한 후, Linear interpolation 방법으로 EC_{50}을 산정한다. 성장률 자료는 Shapiro-Wilk's test(1965)로 자료의 정규분포를 그리고 Bartlett's test(Snedecor and Cochran, 1989)로 분산의 동일성을 검정하고, NOEC(No observed effective concentration)와 LOEC(Lowest observed effective concentration)의 산출은 Dunnett's test(1964)를 이용하여 유의수준 $\alpha=0.05$에서 검정한다. 상기 자료 분석은 독성자료 처리 프로그램인 TOXCALC(Tidepool Scientific Software, USA)을 이용할 수 있다.

시험결과의 타당성 및 일관성 검증

표준독성물질에 대한 식물플랑크톤의 민감도 평가

생물검정용 표준시험생물은 배양 상태 및 생활사에 따라 독성물질에 대한 민감도가 달라질 수 있다. 따라서 평가 대상 물질의 독성실험과 병행하여 표준독성물질을 이용한 민감도 실험을 병행하게 된다. 일반적으로 식물플랑크톤을 이용한 독성실험용 표준물질은 Potassium dichromate를 이용하게 되며(ISO, 1995), 본 실험에서도 동일한 물질을 이용하여 민감도 실험을 수행하였다. 72시간 개체군성장률을 이용한 Potassium dichromate에 대한 반수개체군성장률저해농도(EC_{50})를 산출한 결과, *H. akashiwo*의 72시간 EC_{50} = 0.76 ppm으로 가장 민감하였으며, *T. suecica*는 EC_{50} = 8.89 ppm으로 독성물질에 가장 둔감한 것으로 나타났다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Comparison of EC_{50}'s using potassium dichromate as a reference material with 5 phytoplankton species. unit=mg/L.

Species name	EC_{50} (mg/L)	95% CI	NOEC	LOEC	Normality	Equal variance
Heterosigma akashiwo	0.76	0.53-1.00	0.34	0.63	confirmed	confirmed
Prorocentrum micans	1.32	0.87-1.90	0.63	1.25	confirmed	confirmed
Isochrysis galbana	3.31	3.21-3.41	0.34	0.63	confirmed	confirmed
Skeletonema costatum	4.64	4.31-4.92	2.50	5.00	confirmed	confirmed
Tetraselmis suecica	8.89	8.65-9.14	2.50	5.00	confirmed	confirmed

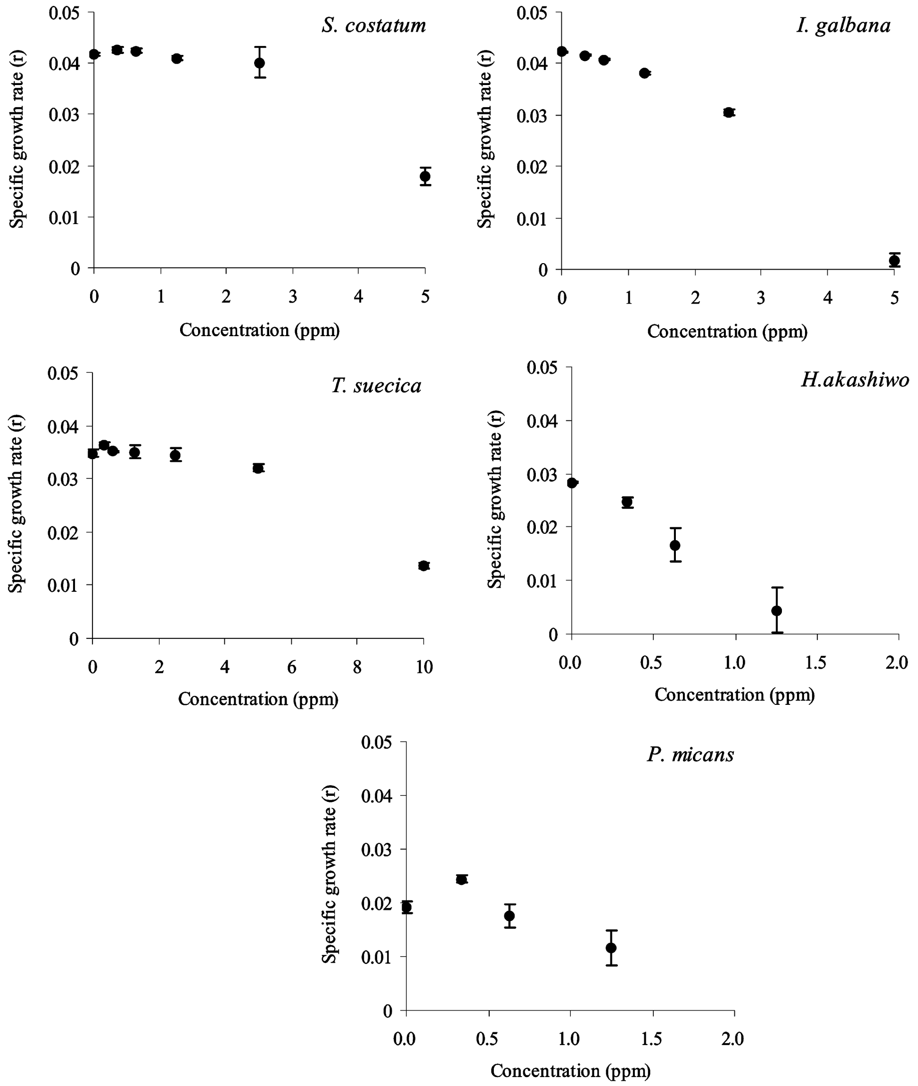

Fig. 2. Specific population growth rates of five phytoplankton species exposed to potassium dichromate as a toxicity reference material.

Table 3. Phytoplankton bioassay using 11 sludge extracts with marine diatom, *S. costatum* population growth inhibition. unit=%.

Sludge	EC_{50}(%)	95% CI	NOEC	LOEC	Normality	Equal variance
Dyeing plant waste	1.94	1.88-1.99	0.4	0.8	confirmed	confirmed
Industrial waste	0.80	0.64-0.96	0.4	0.8	confirmed	confirmed
Livestock farm waste	0.54	0.49-0.58	<0.4	0.4	confirmed	confirmed
Leather processing waste	0.44	0.36-0.51	<0.4	0.4	confirmed	confirmed
Urban domestic sewage	0.59	0.57-0.61	<0.4	0.4	confirmed	confirmed
Food processing waste	3.58	2.55-4.64	1.6	3.13	confirmed	confirmed
Textile industry waste	5.90	5.14-6.79	1.6	3.13	confirmed	confirmed
Mixed sewage	0.58	0.53-0.63	<0.4	0.4	confirmed	confirmed
Industrial sewage	5.80	4.77-6.95	1.6	3.13	confirmed	confirmed
Rural domestic sewage	1.10	1.01-1.19	0.4	0.8	confirmed	confirmed
Filtration plant waste	30.50	22.48-34.73	12.5	25	confirmed	confirmed

해양 유입 오염물질을 이용한 독성평가

식물플랑크톤의 개체군성장률을 이용한 독성실험을 현장 오염물질에 실제 적용하였다. 해양에 투기되는 하수오니 11종에 대한 *S. costatum*의 72시간 개체군성장저해율에 대한 독성 실험을 수행하였다. 하수오니 추출물을 이용한 독성실험 수행결과, 피혁공장폐수오니가 가장 독성이 강하였으며(EC_{50}=0.44%), 정수장 오니가 가장 약하였다(EC_{50}=30.50%, Table 3, Fig 3). 대부분의 하수오니가 해수 추출액(10:1) 기준으로 2% 이하에서 매우 심각한 식물플랑크톤독성(phytotoxicity)을 보였다. 특히 무영향농도(NOEC, No Observed Effective Concentration)가 0.4% 이하로서 하수오니 추출

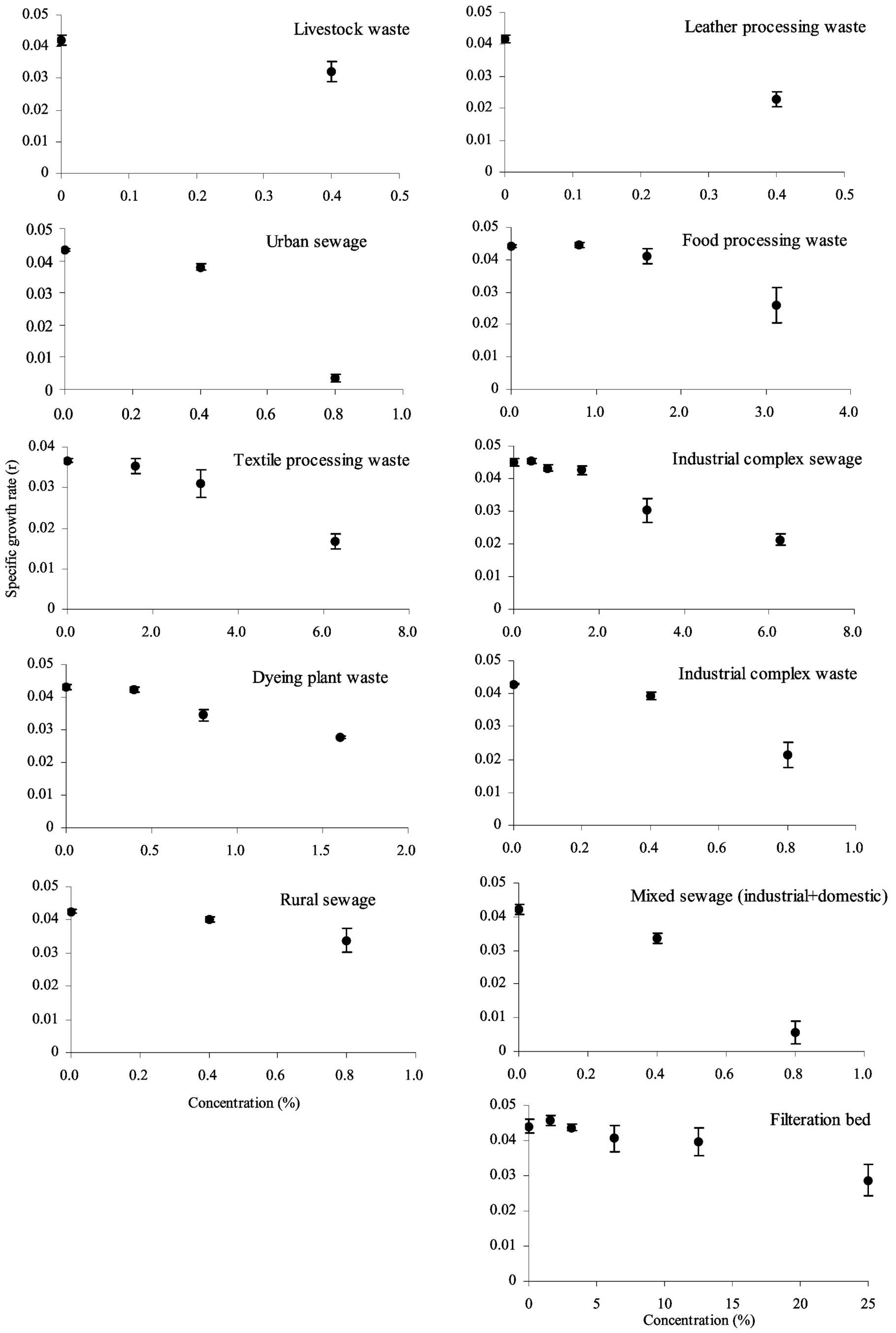

Fig. 3. Specific population growth rates of *S. costatum* exposed to various sludge extracts.

액에 대한 식물플랑크톤의 개체군 성장 저해가 심각한 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 식물플랑크톤을 이용한 독성실험은 실험대상물질간의 독성에 뚜렷한 차이를 보여 본 시험방법이 실제로 해양으로 유입되는 물질에 대한 변별력이 있음을 입증하였다.

분석결과의 재현성

국제표준화기구(ISO)가 표준독성물질인 potassium dichromate를 사용하여 10개의 실험실을 대상으로 72시간 *S. costatum*의 개체군 성장저해율 비교시험을 실시한 결과, EC_{50}이 2.5±1.1 mg/L을 나타났다(ISO, 1995). 본 연구에서 실험결과의 재현성을 확인하기 위하여 국립수산과학원 서해수산연구소와 (주)네오엔비즈 환경안전연구소에서 총 5회의 실험실간 교차분석을 실시한 결과 EC_{50}이 2.7±1.2 mg/L로 매우 유사한 값을 나타냈다(Table 4). 상기 실험 결과 *S. costatum*의 개체군성장저해율을 이용한 독성실험은 실험방법의 재현성과 정확도가 매우 탁월하고 안정적인 해양생태독성평가 시험방법으로 판단된다.

또한 온산공단 주변의 퇴적물 현탁액을 이용한 실험실간 교차분석결과, 두 실험실간에 동일한 결과를 보였다. 우선 오염도가 가장 심한 정점 1과 대조구인 정점 5에서 100% 퇴적물 현탁액에 대하여 두 기관의 시험결과가 유사하게 나타났으며, 정점 2~4의 경우

Table 4. Interlaboratory test results using 96 hr population growth Inhibition of *S. costatum.*

Reference material	Laboratory names	No. of tests	Endpoints	Mean value (mg L^{-1})	Standard deviation (mg L^{-1})
Potassium dichromate	WSFRI	5	EC_{50}	2.9 (1.7~4.4)	1.2
	NeoEnBiz	5	EC_{50}	2.5 (1.4~4.7)	1.4
			Average	2.7 (1.4~4.7)	1.2

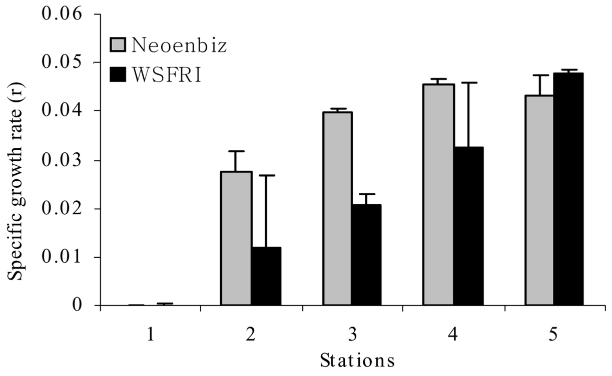

Fig. 4. Interlaboratory test of *S. costatum* population growth rates exposed to estuarine and marine sediments collected in the tidal flats of Onsan Industrial Complex.

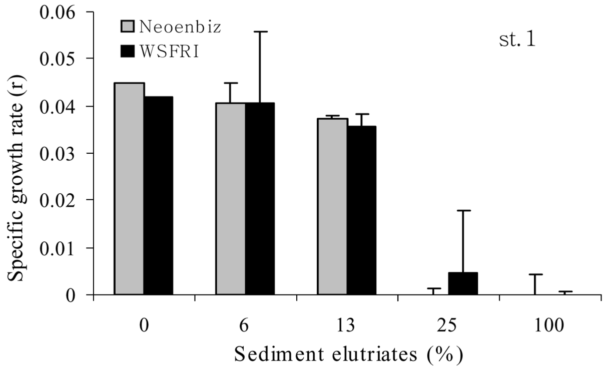

Fig. 5. Interlaboratory test of *S. costatum* population growth rates using sediment elutriate collected in the station 1 located in the tidal flat of Onsan Industrial Complex.

에는 네오엔비즈 환경안전연구소의 성장률이 대체로 크게 나타났다(df=8, p=0.24, Fig. 4). 독성이 강하게 나타난 정점 1의 퇴적물현탁액의 농도에 따른 두 기관의 실험결과는 퇴적물현탁액 25%이상에서 *S. costatum* 종의 개체군성장저해가 나타났다(Fig. 5).

고 찰

일반적으로 생태독성평가시 해양생태계를 대표하는 분해자, 생산자 및 소비자 그룹중 생태계 내에서의 영양학적 역할, 경제성 및 종의 유용성 등을 고려하여 표준시험생물을 선정하게 된다(Rand and Petrocelli, 1985; Burton, 1992; 박 등, 2005). 해양생태계를 대표하는 생산자중 식물플랑크톤은 하루에 한번이상 세대교번하는 점을 감안할 때, 72시간 개체군성장저해 실험기간동안 만성독성까지 볼 수 있다는 장점이 있기 때문에 표준시험생물로 선정함에 있어 매우 유용한 생물군으로 사료된다. 또한 생물종을 단순화할 경우 시험생물의 부재로 인하여 독성실험에 제한을 받으므로 가능한 한 다수의 실험종을 선정하여 제공하는 것이 바람직하다. 따라서 본 실험 결과에서 제시된 바와 같이 상기 5종의 경우 종의 민감도, 유용성 및 생태적 중요도를 고려할 때 해양생태독성용 표준시험생물로서 이용 가능할 것으로 판단된다. 특히 해양 식물플랑크톤인 *S. costatum*과 같은 토착종은 환경에 대한 실험실 독성시험의 적절성을 증대시킬 수 있다. Ravail and Robert(1985)에 따르면 기수역(1~26 psu)에서 채집한 *S. costatum*의 염분 적응 하한선은 8 psu로 보고하였으며, 박 등(2005)의 연구에서는 10 psu에서도 성장은 이루어졌으나, 대조구와 성장률에 유의적 차이가 있었다. 따라서 *S. costatum*의 염분 내성은 매우 큰 것으로 사료되나(Shimura *et al.*, 1979), 20 psu 이하의 저염분에 해당되는 독성 실험을 위해서는 실험 대상 물질의 염분에 해당되는 저염에 순치된 strain을 사용하는

Table 5. Comparison of sensitivity of various test species using 11 sludge extracts. Sea urchin and amphipod toxicity data were sited from MOMAF(2004), and seaweed toxicity data were provided by Dr. Han at Incheon University.

Sludge sources	Bacteria	Rotifer	Sea urchin*		Sea weed**	phytoplankton
	Bioluminescent	Mortality	Fertilization	Development	Sporulation rates	Specific growth rate
	IC_{50}(%)	LC_{50}(%)	EC_{50}(%)	EC_{50}(%)	EC_{50}(%)	EC_{50}(%)
Dyeing plant waste	21.84	2.9	1.82	0.024	12.88	1.94
Industrial waste	22.31	37.7	0.02	0.004	10.66	0.80
Livestock farm waste	34.78	95.7	5.34	0.040	12.28	0.54
Leather processing waste	44.02	80.9	0.16	0.014	13.48	0.44
Urban domestic sewage	44.62	74.9	0.17	0.005	9.66	0.59
Food processing waste	48.71	88.5	1.65	0.005	10.97	3.58
Textile industry waste	67.25	>100.0	8.06	0.088	61.52	5.90
Mixed sewage	68.13	>100.0	0.25	0.022	11.15	0.58
Industrial sewage	76.50	>100.0	0.32	0.003	6.56	5.80
Filtration plant waste	78.41	67.7	5.49	0.113	29.29	30.50
Rural domestic sewage	>100.00	64.0	1.33	0.033	13.17	1.10

것이 타당할 것으로 판단된다.

다양한 시험생물을 이용하여 하수오니별 추출물에 대한 end point를 비교하였다(Table 5). 피혁공장폐수오니 추출물의 농도가 0.44%일때 식물플랑크톤의 반수개체군성장률저해(EC_{50})가 나타남으로서 하수오니중 식물플랑크톤 개체군성장률에 미치는 독성이 가장 강한 것으로 나타났다. 따라서 식물플랑크톤에 강한 독성으로 작용한 피혁공장폐수오니 추출물에 대한 각 생물군의 독성결과를 비교하였다. 피혁공장폐수오니 추출물은 성게 성장률에 가장 강한 독성을 보였으며, 그 다음으로 성게(*Strongylocentrotus intermedius*) 수정률, 식물플랑크톤의 개체군성장저해율, 해조류(*Ulva pertusa*) 포자형성률, 발광박테리아(*Vibrio fischeri*)의 발광저해율, 윤충류(*Brachionus plicatilis*) 신생개체(부화 2시간 이내)의 사망률 순으로 나타났다. 이는 단일종의 개체별 노출에 의한 사망률 보다는 개체군에 미치는 영향이 더 민감함을 보여 주며, 단일종에 의한 생물검정과 더불어 multiple species을 이용한 실험을 병행하는 것이 바람직하다(Walsh and Alexander, 1980; 박 등, 2005).

따라서 식물플랑크톤인 *S. costatum* 종은 배양이 용이하고 세대 교번이 빠르게 일어나서 72시간 개체군성장저해 실험기간동안 만성독성까지 볼 수 있다는 장점이 있다. 또한 피혁공장폐수오니 추출물에 대한 독성이 다른 생물군과 비교하여 성게 다음으로 식물플랑크톤의 독성이 강하게 나타났으며, 그 외의 하수오니 추출물에 대한 독성도 성게 다음으로 식물플랑크톤이 높게 나타났다. 식물플랑크톤은 반복 시험시 유사한 결과를 도출하여 재현성이 뛰어나고, 실험실간 교차분석결과도 매우 유사하였다. 따라서 해양생태계의 기초생산자를 대표하여 해양규조류인 *S. costatum*을 이용한 독성평가용 시험방법은 해양유입 유해물질의 생태독성평가에 있어 매우 유용하고, 또한 실질적인 독성평가 방법으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 R&D과제(RP-2008-ME-026)로 수행되었으며, 교차분석을 실시해주신 네오엔비즈 환경안전연구소의 이정석 박사님께 감사드립니다. 또한 본 연구의 시험생물인 식물플랑크톤 시료를 제공해주신 국립수산과학원 환경연구부 유해생물팀의 연구원분들과 한국해양미세조류은행에 감사드립니다. 본 연구 결과는 금번 특별호의 취지인 "해양생태독성시험방법의 소개" 차원에서 그동안 개발된 6개의 생태독성시험법을 출간하는바 기존에 발표된 박 등(2005)의 사전 연구 결과가 포함되었습니다.

참고문헌

박경수, 이상희, 이승민, 윤성진, 박승윤, 2005. 해양생태독성평가를 위한 표준시험생물로서의 식물플랑크톤에 관한 연구. 한국환경과학회지, **14**: 1129–1139.

환경교육연구회, 2000. 환경오염공정시험법(폐기물 토양오염분야). 대학서림. 564pp.

Anderson, B.S., J.W. Hunt, B.M. Phillips, R. Fairey, C.A. Roberts, J.M. Oakden, H.M. Puckett, M. Stephenson, R.S. Tjeerdema, E.R. Long, C.J. Wilson and J.M. Lyons, 2001. Sediment quality in Los Angeles Harbor, USA: A triad assessment, Environ. Toxicol. Chem., **20**: 359–370.

APHA, AWWA and WEF, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, DC, 1–47pp.

Burton, G.A., 1992. Sediemnt Toxicity Assessment. Lewis Publishers Inc., Chelsea. 457pp.

Chapman, P.M., 1992. Pollution status of North Sea sediments- an international integrative study. Mar. Ecol. Prog. Ser., **91**: 313–322.

Cheung, Y.H., A. Neller, K.H. Chu, N.F.Y. Tam, C.K. Wong, Y.S. Wong and M.H. Wong, 1997. assessment of sediment toxicity using different trophic organisms. Arch. Environ. Contam. Toxicol., **32**: 260–267.

Dunnett, C.W., 1964. New table for multiple comparisons with a control. Biometrics, **20**: 482.

Ghirardini, A.V., T. Birkemeyer, A.A. Novelli, E. Delaney, B. Pavoni and P.F. Ghetti, 1999. An integrated approach to sediment quality assessment: the Venetian lagoon as a case study. Aquat. Ecosyst. Health Manage., **2**: 435–447.

Hooten, R.L. and R.S. Carr, 1997. Development and application of a marine sediment pore-water toxicity test using *Ulva fasciata* zoospores. Environ. Toxicol. Chem., **17**: 932–940.

ISO, 1995. Water quality- marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. the International Organization for Standardization. ISO 10253, 7pp.

Jensen, A., B. Rystad and S. Melsom, 1974. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. 1. the tolerance of three algal species to zinc in coastal sea water. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., **15**: 145–157.

MOMAF, 2004. Development of Assessment Framework on the Sewage Sludge for Ocean Disposal. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Korea, 390pp.

NIWA, 1998. Marine Algae (*Dunaliella tertiolecta*) Chronic Toxicity Test Protocol. National Institute of Water and Atmospheric Research, New Zealand, 30pp

Overnell, J., 1976. Inhibition of marine algal photosynthesis by heavy metals. Mar. Biol., **38**: 335–342.

Park. G.S., C.S. Chung, S.H. Lee, G.H. Hong, S.H. Kim, S.Y. Park, S.J. Yoon and S.M. Lee, 2005. Ecotoxicological evaluation of sewage sludge using bioluminescent marine bacteria and rotifer. Ocean Science Journal, **40**: 91–100.

Rand, G.M. and S.R. Petrocelli, 1985. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publishing Corporation, Washington. 666pp.

Rao, M.U. and V. Mohanchand, 1990. Toxicity of zinc smelter wastes to some marine diatoms. Indian J. of Marine Sciences, **19**: 181–186.

Ravail, B. and J.M. Robert, 1985. Influence of salinity on the growth of *S. costatum* (Greville) Cleve in the waters of the Loire Estuary. Cryptogramie: Algol., **6**: 51–60.

Shapiro, S.S. and M.B. Wilk, 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika, **52**: 591–611.

Shimura, S., H. Shibuya and S. Ichimura, 1979. Growth and photosynthesis properties of some planktonic marine diatoms at various salinity regimes. Umi/la mer, Tokyo, **17**(3): 149–155.

Silvia, S., A. Re, P. Pestana, A. Rodrigues and V. Quintino, 2004. Sediment disturbance off the Tagus Estuary, Western Portugal: chronic contamination, sewage outfall operation and runoff

events. Mar. Pollut. Bull., **49**: 154–162.

Snedecor, G.W. and W.G. Cochran, 1989. Statistical Methods. Eighth Edition, Iowa State University Press.

Walsh, G.E. and S.V. Alexander, 1980. A marine algal bioassay method: results with pesticides and industrial waste. Water Air Soil Pollut., **13**: 45–55.

Weideborg, M., E.A. Vik, G.D. Ofjord and O. Kjonno, 1997. Comparison of three marine screening tests and four Oslo and Paris commission procedures to evaluate toxicity of offshore chemicals. Environ. Toxicol. Chem., **16**: 384–389.

Wong, Y.S. N.F.Y. Tam, P.S. Lau and X.Z. Xue, 1995. The toxicity of marine sediments in Victoria Harbour, Hong Kong. Mar. Pollut. Bull., **31**: 4–12.

2008년 5월 2일 원고접수
2008년 5월 13일 수정본 채택
담당편집위원: 이창훈