

## 염분과 표준 독성물질(Cu, Cd)이 등근성게 (*Strongylocentrotus nudus*)의 수정 및 배 발생률에 미치는 영향

황운기 · 이충원 · 이승민 · 안경호 · 박승윤

서해수산연구소 환경연구과

(2008년 3월 20일 접수; 2008년 6월 16일 채택)

## Effects of Salinity and Standard Toxic Metals (Cu, Cd) on Fertilization and Embryo Development Rates in the Sea Urchin (*Strongylocentrotus nudus*)

Un-Ki Hwang, Chung-Won Lee, Seung-Min Lee,  
Kyoung-Ho An and Seung-Youn Park

West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development  
Institute, 707, Eulwang-dong, Jung-gu, Incheon 400-420, Korea

(Manuscript received 20 March, 2008; accepted 16 June, 2008)

### Abstract

Effects of salinity and standard toxic metals on fertilization and embryo development rates were investigated in the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. Spawning was induced by injecting 1ml of 0.5 M KCl into the coelomic cavity. The fertilization and embryo development rates were below 20% when salinity was 25 psu or lower, but were above 90% when salinity was between 30 and 35 psu. The fertilization and embryo development rates in the control condition (not including Cu and Cd) were greater than 90%, but decreased with a high negative correlation ( $r$ ) of 0.89 and 0.91 with the increasing of Cu and Cd concentrations, respectively. These results suggest that salinity concentrations for successful fertilization and normal embryogenesis of *S. nudus* are between 30 and 35 psu, and the biological assays of fertilization and embryo development rates using *S. nudus* are useful methods for the ecological toxicity test of marine pollution elements.

**Key Words** : *Strongylocentrotus nudus*, Fertilization rate, Embryogenesis, Salinity, Toxicity

### 1. 서론

급속한 경제성장과 산업화에 의해 발생하는 오염

물질의 대부분은 직·간접적으로 해양으로 유입된다. 유입된 많은 양의 오염물질은 해양으로 분산·희석되지 않고 탄과 같이 육지에 인접한 연안해역에 집중되어 나타나<sup>1,2)</sup>, 해양이 자정능력을 발휘하기도 전에 오염현상을 유발시켜 생물생산력이 가장 높은 연안어장을 황폐화 시키는 일이 빈번하게 발생하고 있다<sup>3,4)</sup>. 이러한 오염현상을 판단하기 위하

Corresponding Author: Un-Ki Hwang, West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, 707, Eulwang-dong, Jung-gu, Incheon 400-420, Korea  
Phone: +82-32-745-0676  
E-mail: ungi2222@yahoo.co.kr

여 연안해역에서 많은 환경조사가 실시되고는 있지만, 매년 새롭게 만들어지는 400여종 이상의 유해물질을 분석하여 규제한다는 것은 현실적으로 어려운 실정이다.

이러한, 이·화학적 분석 방법을 보완하기 위하여 외국 (United States Environmental Protection Agency, USEPA) 에서는 유해물질이 생물체의 생리·생태 등에 미치는 영향을 조사하여, 유해성을 검증함으로써 이·화학적 분석의 문제점을 보완하기 위한 많은 노력을 기울이고 있다. 본 연구자의 실험실에서도 해양 생태독성 평가를 위한 방법으로 해양의 분해자, 생산자 및 소비자를 이용한 공정시험법이 정리되고는 있으나, 민감도 혹은 유해물질의 특성에 따른 새로운 생물 종에 대한 체계적인 시험방법이 요구되어지고 있다.

성게의 수정 및 배 발생 단계를 이용한 유해물질의 독성평가는 재료의 취급이 용이하고 시험비용이 적게 들 뿐만 아니라, 유해물질에 대한 높은 민감성과 다양한 지표적 특징을 지녀 정확한 평가가 가능할 것으로 판단된다. 또한, 성게 각 종에 대한 실험 방법을 체계화시킨다면 산란시기를 달리하는 종을 사용하여 연중 생물검정을 수행할 수 있는 많은 장점을 지니고 있다. 이러한 이유로 인해서 외국에서는 중금속<sup>5~7)</sup> 기름 및 유화제<sup>8,9)</sup>, 산업폐수 및 자연해수<sup>10~12)</sup>에 대한 생물학적 검증에 관한 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 국내에서도 성게의 수정 및 배 발생단계를 이용한 다양한 연구가 진행되고 있으나<sup>13~15)</sup>, 각 종의 배아 및 배우자를 적절하게 이용하기 위한 실험방법을 설정하는 연구는 다소 미흡한 것으로 판단된다.

실제로 산업폐수, 기름 및 유화제 등과 같은 유해물질의 평가는 실험해수의 염분 농도와 수소이온 농도와 같은 실험조건을 급격히 변화시켜 인위적으로 일정 조건을 조정함으로써 유해물질이 가지고 있는 고유독성에 변화를 줄 수 있다<sup>16)</sup>. 각 종에 대한 적절한 염분 내성 범위와 같은 실험조건을 설정하고 유해물질의 독성에 대한 민감도를 좀 더 체계화 시켜 관찰한다면, 성게의 수정 및 배 발생단계를 이용한 실험을 해양 생태독성 평가를 위한 공정시험법으로 더욱 널리 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

따라서, 본 연구에서는 실험조건상 해양생물이라는 특수성을 고려하여 성게의 한 종인 등근성게 (*Strongylocentrotus nudus*)의 수정 및 배 발생을 위한 적정 염분농도 범위를 조사하고자 하였다. 또한, 표준 독성물질인 Cu(Aldrich, USA)와 Cd(Aldrich, USA)가 *S. nudus*의 수정 및 배 발생에 미치는 영향을 조사하여 해양 유해물질의 생태독성 평가를 위한 공정시험법으로서의 타당성을 파악하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험생물 및 채집

본 연구에 사용된 실험생물은 분류학적으로 극피동물문(Echinodermata)의 일종인 등근성게(*Strongylocentrotus nudus*)로 2007년 주 산란시기인 7~9월에 강원도 강릉 경포대 인근해역, 수심 2~10 m의 암반지대에서 채취하여 서식처와 유사한 환경조건을 조성하여 운반 및 실험에 사용하였다.

### 2.2. 방정 및 방란

방정과 방란을 위해 사용된 실험생물 수는 30개 체였으며, 크기는 각경 9.50±3.60 cm이었다. 해수는 membrane filter(pore size 0.45 μm)로 여과된 자연해수를 멸균하여 사용하였다. 300 ml의 비이커에 여과된 자연해수를 가득 넣고 생식공이 충분히 잠기게 한 후, 0.5M KCl 용액 1 ml를 채강 내로 주입시켰다. 30분 동안 방정·방란 시켜 얻은 배우자를 정자용액은 1회, 난자용액은 3회 세정하여 실험에 사용하였다.

### 2.3. 시험액의 농도별 조성

실험에 사용된 염분은 인공염(Tropic Marine CO.)을 이용하여 10, 15, 20, 25, 30 및 35 psu가 되도록 6개의 시험액을 조성하여 각각의 시험액에서 정제 배양을 실시하였다.

중금속인 Cu(Aldrich, USA)와 Cd(Aldrich, USA)를 표준 독성물질로 이용하였으며, 실험생물의 배우자와 배아에 노출시킬 중금속 시료로서는 여과된 자연해수와 중금속 1000 μg/ml의 표준용액을 이용하여 아래와 같이 각 농도별로 조성하였다. 즉, 사전실험에 의해 Cu 농도는 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppb의 6개 농도구로, Cd의 농도는 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 및 800 ppb의 8개 농도구로 설정하였다.

#### 2.4. 수정률 및 배 발생률을 이용한 생물검정

각각의 다른 농도로 조성된 염분 및 중금속 시료에 방정과 방란을 통해서 얻은 정자를 30분씩 노출시키고, 난자를 접종해 10분 경과 후 수정막의 형성 유·무로 수정률을 파악하였다. 수정막의 유·무는 cap tube에 분주하여 formalin 용액 (3%)으로 고정해 광학현미경으로 관찰하였다(Fig. 1).

정상적인 배 발생률은 난자를 첨가한지 48h에 formalin 용액 (3%)으로 고정해 광학현미경으로 관찰하여, 정상과 비정상 (작은 크기 혹은 기형) pluteus으로 나누어 관찰하였다<sup>17,18)</sup>(Fig 2).

실험은 각 실험액 별로 3회 실시한 후, 실험액에 노출된 100개 이상의 배아를 3회 반복 계수하여 고정된 배아 수에 대한 정상적인 배아 수의 백분율을 산출하였다. 이들 결과를 이용하여, 표준 독성물질이 수정 및 배 발생률에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 반수영향농도(50% effective concentration, EC<sub>50</sub>)를 산출하였다.

#### 2.5. 배양조건

실험에 사용된 염분 및 표준 독성물질인 중금속 농도를 조성한 배양액의 pH는 8.0~8.3, 온도는 20±0.5℃를 유지하였다. 적정량의 정자 첨가를 위한

사전실험을 통하여 정자는 2,000~2,500배 희석하였으며, 실험 수 1 ml에 수정란 1,500~2,000개를 첨가해 아래 Table 1의 조건으로 배양하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 염분이 수정 및 배 발생률에 미치는 영향

각기 다른 농도의 염분에 30분간 노출시킨 정자를 난자에 첨가하여 10분경과 후, 수정막의 유·무로 수정의 여부를 판단하였다. 또한, 배 발생률은 수정시킨 후, 48h 경과 후에 정상 pluteus 유생의 수를 계수하였다.

염분 농도 25 psu 이하에 노출된 정자의 수정률은 20% 미만으로 낮았으나, 30 psu와 35 psu에서는 각각 97%와 96%로 높은 수정률을 나타내었다 (Fig. 3).

한편, 염분 농도 25 psu 이하에서는 정상적인 pluteus 유생을 거의 찾아 볼 수가 없었으나, 염분 농도 30 psu와 35 psu에서는 91%와 91%를 나타내, 수정률과 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 3). 이 결과로부터, 등근성게에 있어 정상적인 수정 및 배 발생을 위한 염분농도는 30~35 psu의 범위인 것으로 판단되었다. 또한, 25 psu 이하의 염분에서는 수정 및 배 발생률이 급격히 감소하였으나 30 psu 이상에서는

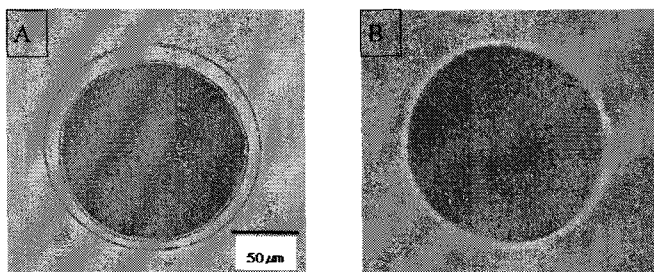


Fig. 1. Diagnostic features of normal (A) and abnormal (B) fertilized egg in the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*.

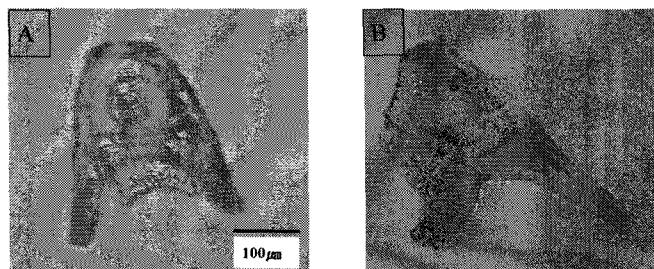
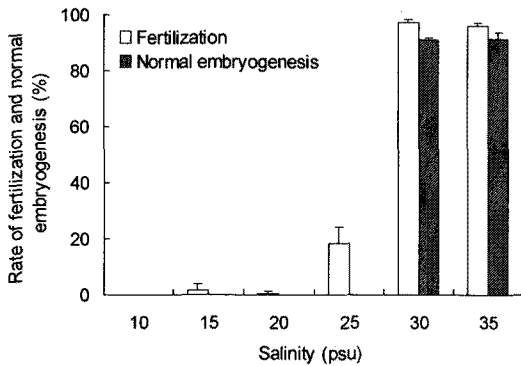


Fig. 2. Diagnostic features of normal (A) and abnormal (B) pluteus in the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*.

**Table 1.** Experimental culture conditions using the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*

Test parameters	Conditions
Culture type	Static non-renewal 30min~48h chronic toxicity test
Photoperiod	Ambient light condition and 8L:16D periods
Temperature	20±0.5°C
pH	8.0~8.3
Salinity	32±1.0 psu
Chamber volume	250 mL glass
Solution	Filtered (0.45 µm) and sterilized seawater
Solution exchange	None
Experiment period	10 min~48 hr
Investigation item	Fertilization, larval development rates
Acceptability criterion	> 90% fertilized eggs and pluteus larvae at control

**Fig. 3.** Changes in the rate of fertilization and normal embryogenesis according to the salinity in the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*.

90% 이상을 나타내, 염분 25~30 psu 사이에서 급격한 변화를 나타내는 것으로 판단되었다.

해양생태 독성 평가를 실시함에 있어 실험생물이 광염성 인지를 판단하는 것은 중요한 의미를 지니고 있다. 실험생물이 광염성이면 해수에서 뿐만 아니라 기수지역에서 발생하는 오염물질에 대한 생물 영향 또는 방조제 건설 등으로 인해 염분 농도가 낮은 지역의 해수 혹은 퇴적물에 대한 평가가 가능하기 때문이다. 물론, 조사하고자 하는 유해물질에 대한 염분 농도를 인위적으로 조절하여 생물의 영향 정도를 나타낼 수는 있지만, 대상물질이 가지고 있는 고유 독성에 변화를 줄 수 있으므로<sup>16)</sup>, 가능한 한 인위적 염분 조절 없이 유해물질에 대한 독성실험을 수행해야 한다. 우리가 산업 혹은 생물검정에 이용하는 성게에는 남방계인 등근성게(*Strongylocentrotus*

*nudus*) 말뚝성게(*Henicentrotus pulcherrimus*), 보라성게(*Anthocidaris crassispina*)와 북방계인 북쪽말뚝성게(*Strongylocentrotus intermedius*) 등이 있다. 이들 4종 중 *H. pulcherrimus*는 조간대의 암반에 주로 서식하고 본 실험에 사용된 *S. nudus*는 *A. crassispina*와 *S. intermedius* 처럼 조하대에 서식하는 종이다. 따라서, 염분과 같은 환경 변화에 대해서 조하대에 서식하는 *S. nudus*가 *H. pulcherrimus*에 비해 훨씬 민감할 것으로 판단된다. 따라서, 성게를 이용한 해양생태 독성평가 공정시험법으로 이용하기 위해서는 중에 다른 실험조건 혹은 유해물질에 대한 민감성이 사전에 연구되어야 할 것으로 판단된다.

### 3.2. 표준 독성물질이 수정 및 배 발생률에 미치는 영향

6~8개의 Cu와 Cd 농도 용액에 30분간 노출된 정자를 난자에 첨가하여 10분 후에 수정률과 48h 후에 배 발생률을 관찰하였다.

Cu를 첨가하지 않은 대조구는 91%로 높은 수정률을 나타내었다. Cu 농도가 증가할수록 수정률은 급격히 감소해 ( $r=-0.89$ ), 50 ppb에서는 28%를 나타냈으며 100 ppb에서는 13%의 수정률을 나타내었다 (Fig. 4). Cu가 배 발생률에 미치는 영향을 Fig. 5에 나타내었다. 수정률과 유사하게 Cu의 농도가 증가할수록 배 발생률은 급격히 감소하는 경향을 나타내( $r=-0.91$ ), 50 ppb에서는 19%를 그리고 100 ppb에서는 0%를 나타내었다.

Cd의 경우에도 Cd 을 첨가하지 않은 대조구의 수정률은 91%로 높게 나타났으나, Cd의 농도가 증가

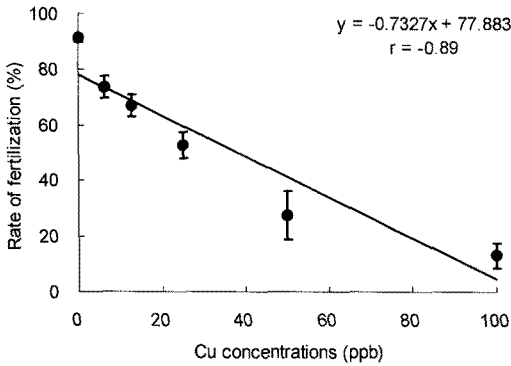


Fig. 4. Relationship between the rate of fertilization and Cu concentrations in the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. The values are expressed as mean±SE.

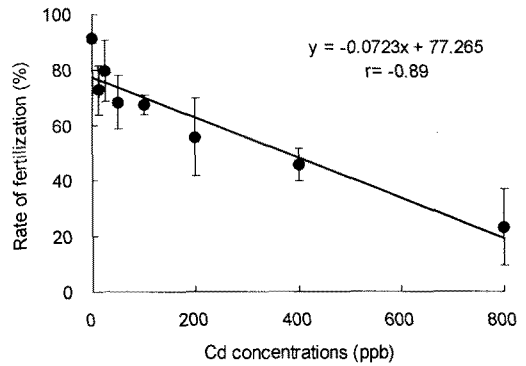


Fig. 6. Relationship between the rate of fertilization and Cd concentrations in the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. The values are expressed as mean±SE.

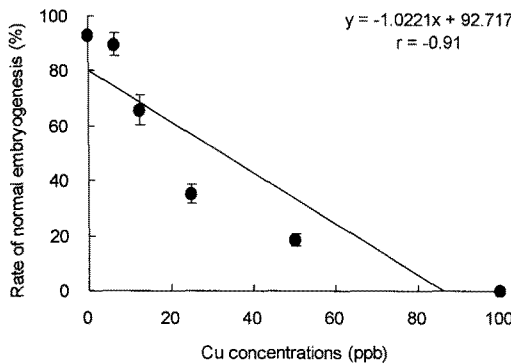


Fig. 5. Relationship between the rate of normal embryogenesis and Cu concentrations in the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. The values are expressed as mean±SE.

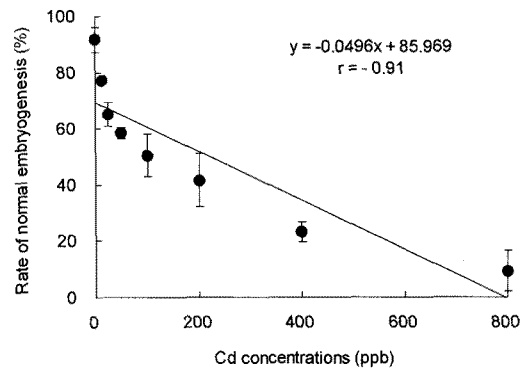


Fig. 7. Relationship between the rate of normal embryogenesis and Cd concentrations in the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. The values are expressed as mean±SE.

할수록 수정률은 감소해 ( $r=-0.89$ ), 최대농도인 800 ppb에서 23%의 낮은 수정률을 나타내었다(Fig. 6). Cd가 배 발생에 미치는 영향은 Fig. 7에 나타내었다. 수정률과 유사하게 Cd 농도가 증가할수록 배 발생률은 급격히 감소하는 경향을 나타내( $r=-0.91$ ), 최대농도인 800 ppb에서 9%의 배 발생률을 나타내었다(Fig. 7).

표준 독성물질인 Cu와 Cd에 노출된 성게의 수정 및 발생률이 독성물질의 농도가 증가할수록 급격히 감소하는 경향을 나타내는 점으로 미루어 보아, 성게의 수정 및 배 발생률은 독성물질의 노출에 따른 생물 영향의 정도를 파악하기에 적절한 것으로 판단된다. 동일 독성물질 농도에 대한 영향은 수정률

보다 배 발생률의 저해현상이 크게 나타나는 것으로 보아, pluteus 유생시기의 배아가 표준 독성물질에 더 오랫동안 노출되어 있어 배 발달 과정 시 그 저해정도가 증가되었을 것으로 생각된다. 독성물질에 대한 노출은 pluteus 이전에 저해를 받았다 할지라도 형태적으로 빈약한 시기보다는 분화 정도가 진전된 pluteus 유생시기의 배아가 독성에 대해 더욱 증폭되어 표현되기 때문에, 환경에 대한 배아의 저해현상이 pluteus 형성시기에 더욱 뚜렷하게 관찰되는 것으로 판단된다<sup>19)</sup>.

### 3.3. 표준 독성물질에 의한 수정 및 배 발생률의 반수영향농도 (50% effective concentration, EC<sub>50</sub>)

Cu와 Cd이 성게의 수정 및 배아 형성에 미치는

영향에 대한 실험 결과를 바탕으로, probit 통계법을 이용하여 산출한 반수영향 농도(EC<sub>50</sub>)를 Table 2에 나타내었다.

Cu에 대한 수정률의 EC<sub>50</sub>은 21.37±4.33 ppb 이고, Cd에 대한 수정률의 EC<sub>50</sub>은 430.52±147.12 ppb으로 수정률에 대한 저해 영향은 Cu가 Cd에 비해 높은 것으로 나타났다. 배 발생률에 대한 Cu의 EC<sub>50</sub>은 18.85±2.51 ppb 이고, Cd의 EC<sub>50</sub>은 78.46±20.19 ppb로 저해 영향은 수정률과 유사하게 Cu가 Cd에 비해 높은 것으로 나타났다.

Kobayashi<sup>20)</sup>는 본 연구 결과와 유사하게 중금속이 성계의 초기 배 발생에 미치는 영향에서 중금속 중 Hg가 초기 배 발생에 가장 큰 저해를 보였으며, Cu>Zn>Ni>Cd의 순으로 영향을 미치는 것으로 보고하고 있다. 하지만, 독성물질의 영향에 있어 성계의 종, 혹은 같은 종이라 할지라도 환경·생태학적인 종의 특이성에 따라 다소 차이가 있을 수 있다고 보고하고 있다. 성계 배아를 이용한 실험의 대부분은 조건대에 서식하여 채집이 용이한 *H. pulcherrimus*를 이용하고 있으나, 조건대에 서식하는 생물은 일상적으로 외부환경 변화에 노출됨으로 스스로 변화에 능동적으로 대처함으로 인해 조건대에 사는 생물보다도 독성물질에 덜 민감한 반응을 보일 수 있을 것으로 판단된다. Yu<sup>13)</sup>에 의하면 말뚝성계의 수정률인 경우 Cu에 대한 EC<sub>50</sub>은 350±0.01 ppb, Cd에 대해서는 723±0.14 ppb 이며, 배 발생률인 경우의 EC<sub>50</sub>은 340±0.01 ppb, Cd에 대해서는 465±0.10 ppb를 나타내었다. Yu<sup>13)</sup>의 결과와 본 연구 결과를 비교하였을 때 실제로 조건대에 서식하는 *S. nudus*가 조건대에 서식하는 *H. pulcherrimus*에 비해 독성에 다소 민감하게 반응하는 것을 알 수 있다.

이상의 결과로부터 *S. nudus*의 수정 및 배 발생률을 이용하여 해양 유해물질의 생태 독성을 평가할 때 염분 농도는 30~35 psu의 범위가 적절한 것으로

판단되며, 표준 독성물질에 대하여 민감한 반응을 나타내는 *S. nudus*의 수정률 및 배 발생률은 해양 유해물질의 생태독성 평가를 위한 공정시험법으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

#### 4. 결 론

본 연구는 등근성계, *Strongylocentrotus nudus*의 수정 및 배 발생률을 이용해, 해양에 유입되는 유해물질의 생태독성을 타당하게 평가할 수 있는가를 살펴보았다. 실험조건상 해양생물이라는 특수성을 고려하여 염분과 표준 독성물질인 Cu와 Cd 농도 변화에 따른 수정 및 배 발생률이 조사되었다.

염분 25 psu 이하에서 수정 및 배 발생률은 20% 미만을 나타냈으나, 30~35 psu에서는 90% 이상을 나타내 *S. nudus*의 수정 및 배 발생률을 이용하여 해양 유해물질의 독성평가를 실시할 경우, 염분농도는 30~35 psu가 적절한 것으로 판단된다. 또한, 표준 독성물질인 Cu와 Cd의 농도가 증가할수록 수정은  $r=-0.89$ , 배 발생률은  $r=-0.91$ 의 높은 상관관계로 독성물질에 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 이들 결과를 바탕으로, *S. nudus*의 수정 및 배 발생률은 해양 유해물질의 생태독성평가를 위한 유용한 생물학적 방법으로 판단된다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Carlsson L., Persson J., Håkanson L., 1999, A management model to predict seasonal variability in oxygen concentration and oxygen consumption in thermally stratified coastal waters, *Ecol. Model.*, 119, 117-134.
- 2) Hata K., Nakata K., Suzuki T., 2004, The nitrogen cycle in tidal flats and eel grass beds of Ise Bay., *J. Mar. Sys.*, 45, 237-253.
- 3) Asakawa M., Miyazawa K., Noguchi T., 1993, Studies on paralytic shellfish poison (PSP) toxification of bivalves, in association with appearance of *Alexandrium tamarense*, in Hiroshima Bay, *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, 34, 50-54.
- 4) Asakawa M., Miyazawa K., Takayama H., Noguchi T., 1995, Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* as the source of paralytic shellfish poison(PSP) contained in bivalves from Hiroshima Bay, *Toxicon.*, 33, 691-697.

**Table 2.** EC<sub>50</sub> (ppb) of heavy metals for *Strongylocentrotus nudus* to form a fertilization membrane and normal pluteus

Heavy metals	Fertilization membrane	Normal pluteus
Cu (ppb)	21.37±4.33	18.85±2.51
Cd (ppb)	430.52±147.12	78.46±20.19

Each number is the average±standard error.

- 5) Pagano G., Esposito A., Bove P., Angelis M., Rota A., Giordano G. G., 1983, The effects of hexavalent and trivalent chromium on fertilization and development in sea urchins, *Environ. Res.*, 30, 442-452.
- 6) Pagano G., Cipollaro M., Corsale G., Esposito A., Ragucci G., Trieff N. N., 1986, The sea urchin: Bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants, In: Cairns J. Jr (ed), *Community Toxicity Testing ASTM STP 920*, Amer. Soc. for Testing and Materials Philadelphia, 67-92.
- 7) Dinnel P. A., 1989, Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassay to metals and pesticides, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18, 748-755.
- 8) Kobayashi N., 1980, Comparative toxicity of various chemicals, oil extracts and oil dispersant to Canadian and Japanese sea urchin eggs, *Publ. Setomar. Biol.*, 27, 76-84.
- 9) Greenwood P. J., 1983, The influence of an oil dispersant chemserve OSE-DH on the viability of sea urchin gametes. Combined effects of temperature, concentration and exposure time on fertilization, *Aqua. Toxicol.*, 4, 15-29.
- 10) Oshida P. S., Goochey T. K., 1980, A new test for measuring seawater toxicity, In: *Southern California Coastal Wat. Res. Proj., Biennial Report 1979~1980*, Long beach, CA, 149-159.
- 11) Dinnel P. A., Stober Q. J., 1987, Application of the sea urchin sperm bioassay to sewage treatment efficiency and toxicity in marine waters, *Mar. Environ. Res.*, 21, 121-133.
- 12) Lee C. H., Choi J. W., 2003, Toxicity evaluation of surface waters from artificial lakes (Shihwa, Asan, Busa) and Mankyung river using sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) sperm and embryo, *J. Environ. Toxicol.*, 18(4), 277-285.
- 13) Yu C. M., 1998, A study on the effect of heavy metals on embryos formation of sea urchins, *Kor. J. Env. Hlth. Soc.*, 24(3), 6-10.
- 14) Wui I. S., Lee J. B., Yoo S. H., 1992, Bioassay on marine sediment pollution by using sea urchin embryo culture in the southwest inland sea of Korean, *J. Environ. Biol.*, 10(2), 92-99.
- 15) Yu C. M., 2004, The effects of pH on early embryo development of sea urchins, *Kor. J. Env. Hlth. Soc.*, 30(2), 104-107.
- 16) Hall L. W., Ziegenfuss M. C., Anderson R. D., Lewis B. L., 1995, The effect of salinity on the acute toxicity of total and free cadmium to a Chesapeake Bay copepod and fish, *Mar. Pollut. Bull.*, 30, 376-384.
- 17) Pagano G., Cipollaro M., Corsale G., Esposito A., Ragucciand E., Giordano G. G., 1985a, pH-induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis, I. Exposure of embryos, *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 5, 101-112.
- 18) Pagano G., Cipollaro M., Corsale G., Esposito A., Ragucciand E., Giordano G. G., 1985b, pH-induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis, II. Exposure of sperm, *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 5, 113-121.
- 19) Pagano G., Cipollaro G. A., Corsale A., Esposito E., Mineo G. G., Ragucci G., Giordano G., Kobayashi N., Trieff N. M., 1988, Effects of sodium azide on sea urchin embryos and gametes, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis* 8, 363-376.
- 20) Kobayashi N., 1995, Bioassay data for marine pollution using echinoderms, *Ency. Environ. Con. Tech.*, 9, 539-609.