

# 둥근성게 (*Strongylocentrotus nudus*)의 수정 및 배 발생률을 이용한 해양배출 폐기물의 독성평가

황윤기\*, 이충원, 김광섭, 김형철, 안경호, 박승윤

서해수산연구소 환경연구과

## Toxicity Assessment of Ocean Dumping Wastes Using Fertilization and Embryo Development Rates in the Sea Urchin (*Strongylocentrotus nudus*)

Un-Ki Hwang\*, Chung-Won Lee, Kwang-Soup Kim, Hyoung-Choul Kim, Kyoung-Ho An and Seung-Youn Park

West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Incheon 400-420, Korea

### ABSTRACT

Toxicity of ocean dumping wastes (dye waste, urban sewage, food waste) were examined by observing fertilization and embryo development rates of the Sea Urchin, *Strongylocentrotus nudus*. Spawning was induced by injecting 1 mL of 0.5 M KCl into coelomic cavity. Males released white or cream-colored sperms and females released yellow or orange-colored eggs. Experiments were began within 30 min after the collection of both gametes. The fertilization and embryo development rates tests were performed for 10 min and 48 h after fertilization, respectively. The fertilization and embryo development rates in the control condition (not including ocean dumping wastes sludge elutriate) were greater than 90%, but markedly decreased with increasing concentrations of ocean dumping waste sludge elutriate. The fertilization and normal embryogenesis rates were significantly inhibited in all waste sludge elutriate from dye waste ( $EC_{50}=5.76$ ;  $EC_{50}=4.53$ ), urban sewage ( $EC_{50}=9.82$ ;  $EC_{50}=9.67$ ) and food waste ( $EC_{50}=3.90$ ;  $EC_{50}=3.27$ ), respectively. The NOEC (> 3.13%) and LOEC (3.13%) of fertilization and normal embryogenesis rates very similar in all waste sludge elutriate.

These results suggest biological assay using the fertilization and embryo development rates of *S. nudus* are very useful test method for the ecological toxicity assessment of ocean dumping wastes.

**Key words** : *Strongylocentrotus nudus*, fertilization rate, embryogenesis, ocean dumping wastes, toxicity

### 서 론

해양환경 보전에 대한 국민적 관심이 높아지면서 인위적으로 해양에 투기되는 폐기물이 해양생태계에 어느 정도 피해를 주는 지에 관한 궁금증

\* To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-32-745-0676, Fax: +82-32-745-0678  
E-mail: vngi1@nfrdi.go.kr

이 나날이 증가하고 있다. 이러한 국민적 관심으로 인해 해양에 투기되는 폐기물의 총량은 감소하는 추세를 보이고 있으나(해양수산부, 2007), 폐기물에 함유된 유해물질이 다양화 되면서 투기지역의 환경오염은 심화될 것으로 판단된다. 지금까지, 폐기물이 해양생태계에 미치는 영향을 평가하기 위해서는 대부분의 조사가 폐기물 또는 투기지역의 해수 및 퇴적물에 대한 이·화학적 분석을 통해 유해물질의 양만을 파악하여 왔다. 하지만, 폐기물에는 다양한 유해물질이 존재하면서 서로 고유의 독성을 증가 혹은 감소시키는 상승작용과 길항 작용을 함으로(Rand and Petrocelli, 1985), 개별 오염물질의 양을 판단하는 방법만으로 유해물질의 독성을 평가하기에는 한계가 있다. 이로 인해, 미국 및 유럽 국가를 비롯한 대부분의 국가가 자기나라 실정에 적합한 다양한 독성시험방법을 개발하여, 유해물질의 독성평가에 이용하고 있으며 그중 수서생태독성 시험법만 약 100여 종에 이른다(APHA *et al.*, 1995; ISO, 1995; ASTM, 1996; NIWA, 1998; USEPA, 2002). 본 연구실에서도 식물플랑크톤(Lee *et al.*, 2008)이나 동물플랑크톤(Lee *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008)같이 실내사육이 간단한 생물 종만을 이용한 시험법이 만들어져 유해물질의 독성평가에 사용되고 있으나, 유해물질의 증가와 더불어 다양한 단계의 생태계 영향을 평가하기 위해서 새로운 시험 종에 대한 시험법이 요구되어지고 있다.

전 세계적으로 산업시설에서 발생하는 산업폐수와 오니를 해양에 배출하고 있는 국가는 많지 않기 때문에 해양배출 물질에 대한 생물독성시험을 실시하고 있는 나라도 거의 찾아 볼 수는 없으나, 우리나라에서는 2006년 2월 21일 개정된 해양오염방지법 시행규칙에 의해 2011년 2월 22일부터 배출 적합성을 판정하기 전에 생물독성시험 등의 정밀평가를 거치게 되어 있다. 해양배출 물질과 같은 유해물질의 독성에 대한 생물영향을 평가하기 위해서는 무엇보다도 실험생물 종을 선택하는 것이 중요한 것으로 판단된다. 실험생물은 취급이 용이하고 시험비용이 적게 들 뿐만 아니라, 독성물질에 대한 높은 민감성과 다양한 지표적 특징을 지니 정확한 평가가 가능해야 한다(Hwang *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008).

성게는 유용수산 생물자원일 뿐만 아니라 산란시기를 달리하는 종을 사용하면 연중 생물검정을

수행할 수 있는 장점을 지니고 있으며, 수정 및 배 발생률과 같은 초기생활사를 독성평가에 이용함으로써 독성에 대한 민감성이 뛰어난 뿐만 아니라 짧은 시간 내에 급성과 만성독성을 평가할 수 있다(Kobayashi, 1980; Greenwood, 1983). 이러한 이유로 인해 국내에서도 성게의 수정 및 배 발생단계를 이용한 연구가 진행되었으나(Wui *et al.*, 1992; Yu, 1998; Yu, 2004; Hwang *et al.*, 2008), 다양한 유해물질이 존재하는 해양폐기물질의 독성을 평가한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구는 Hwang *et al.* (2008)에 의해 발표된 둥근성게, *Strongylocentrotus nudus*의 수정 및 배 발생률에 관한 실험법을 이용하여, 2007년 해양에서 가장 많이 투기되었던 유기성 오니류의 일종인 염색폐수처리오니, 하수처리오니 및 식품처리오니의 독성을 평가하였으며 향후, 해양폐기물 배출적합성을 판단하는 유용한 생물검정시험법으로 널리 활용되기를 기대한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험생물 및 채집

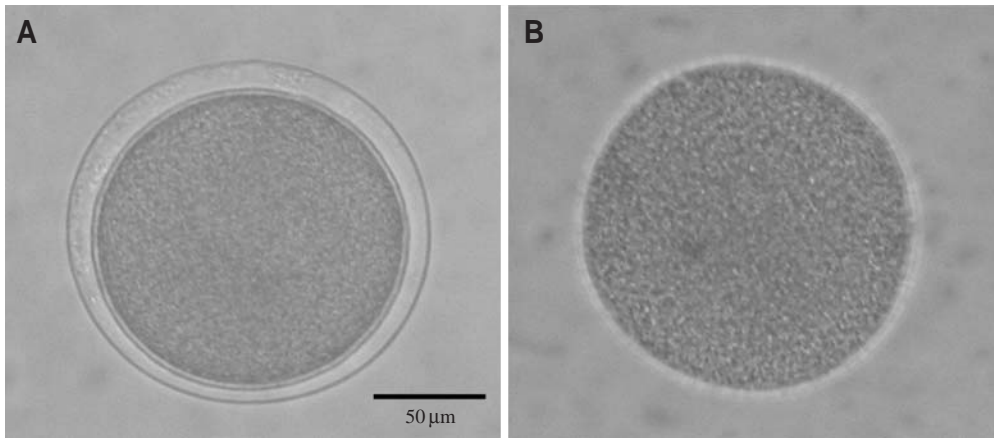
본 연구에 사용된 실험생물은 분류학적으로 극피동물문(Echinodermata)의 일종인 둥근성게(*Strongylocentrotus nudus*)로 2007년 주 산란시기인 7~9월에 강원도 강릉 경포대 인근해역, 수심 2~10m의 암반지대에서 채취하여 서식처와 유사한 환경조건을 조성하여 운반 및 실험에 사용하였다.

### 2. 방정 및 방란

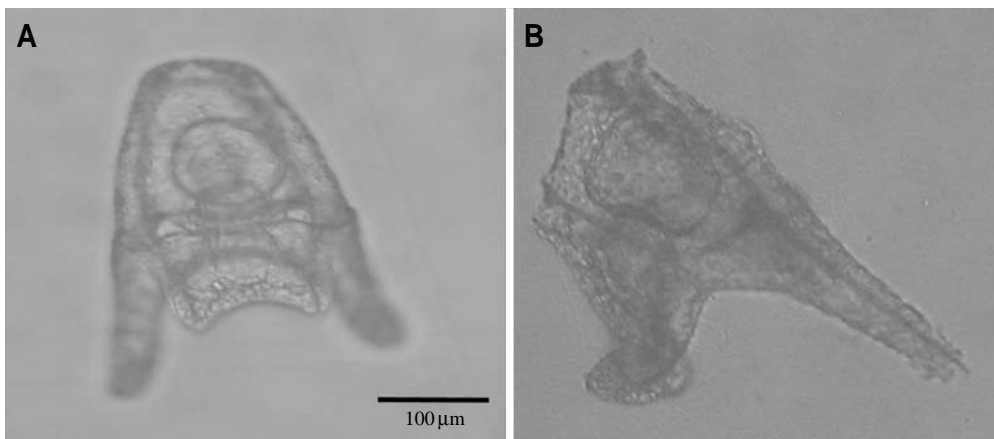
방정과 방란을 위해 사용된 실험생물 수는 32개 체였으며, 크기는 각경  $8.60 \pm 2.90$  cm였다. 해수는 membrane filter (pore size  $0.45 \mu\text{m}$ )로 여과된 자연해수를 멸균하여 사용하였다. 300 mL의 비이커에 여과된 자연해수를 가득 넣고 생식공이 충분히 잠기게 한 후, 0.5 M KCl 용액 1 mL를 체강내로 주입시켰다. 30분 동안 방정·방란시켜 얻은 배우자를 정자용액은 1회, 난자용액은 3회 세정하여 실험에 사용하였다.

### 3. 폐기물의 농도별 조성

실험에 이용된 3종의 폐기물(염색폐수처리오니,



**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*.

하수처리오니 및 식품폐수처리오니)은 위탁업체에서 배출업체로 운반된 차량으로부터 채취해, 독성 실험을 위하여 냉동 보관 후 실험에 사용하였다.

폐기물 50 g에 0.45 μm으로 여과된 멸균해수 450 mL를 1L 테프론 진탕용기에 넣어 진폭 4~5 cm로 6시간 진탕시켰다. 진탕 후, 고형물질을 제거하기 위하여 2~3시간 동안 침전시켰다. 그 후, 4,000 rpm에 20분간 원심 분리하여 상등액을 추출액으로 사용하였다. 실험에 사용된 폐기물 농도는 여과된 자연해수와 추출액을 이용하여 0, 3.13, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00%로 조성하였다.

#### 4. 수정률 및 배 발생률을 이용한 생물검정

각각의 폐기물 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 48 h에 formalin 용액 (3%)으로 고정해 광학현미경으로 관찰하여, 정상과 비정상(작은 크기 혹은 기형) pluteus

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

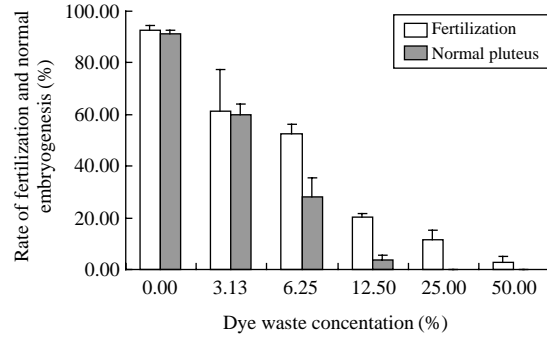
Test parameters	Conditions
Culture type	Static non-renewal 30 min ~ 48 h chronic toxicity test
Photoperiod	Ambient light condition and 8L : 16D periods
Temperature	20 ± 0.5°C
pH	8.0 ~ 8.3
Salinity	32 ± 1.0
Chamber volume	250 mL glass
Solution	Filtered (0.45 µm) and sterilized seawater
Solution exchange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

으로 나누어 관찰하였다 (Pagono *et al.*, 1995a, b) (Fig. 2).

실험은 각 폐기물로부터 추출해 조성한 실험농도별로 3회를 실시한 후, 실험액에 노출된 100개 이상의 배아를 3회 반복 계수하여 고정된 배아 수에 대한 정상적인 배아 수의 백분율을 산출하였다. 이들 결과를 이용하여 폐기물의 독성을 평가하기 위하여 수정 및 배 발생률에 대한 반수영향농도 (50% Effective Concentration, EC<sub>50</sub>)와 EC<sub>50</sub>에 대한 95% 신뢰한계범위 (95% Confidence limit, 95% CI)를 probit 통계법을 이용하여 분석하였다. 또한, 무영향관찰농도 (No Observed Effective Concentration, NOEC), 최소영향관찰농도 (Lowest Observed Effective Concentration, LOEC)는 Dunnett's test를 이용하여 분석하였다.

## 5. 배양조건

실험에 사용된 폐기물 농도를 조성한 배양액의 pH는 8.0 ~ 8.3, 온도는 20 ± 0.5°C를 유지하는 배양 조건으로 조성하였다. 적정량의 정자 첨가를 위한 사전실험을 통하여 정자는 2,000 ~ 2,500배 희석하였으며, 실험수 1 mL에 수정란 1,500 ~ 2,000개를 첨가해 아래 Table 1의 조건으로 배양하였다.



**Fig. 3.** Changes in the rate of fertilization and normal embryogenesis according to the dye waste in the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. Vertical bars represent the SE of the mean for three times.

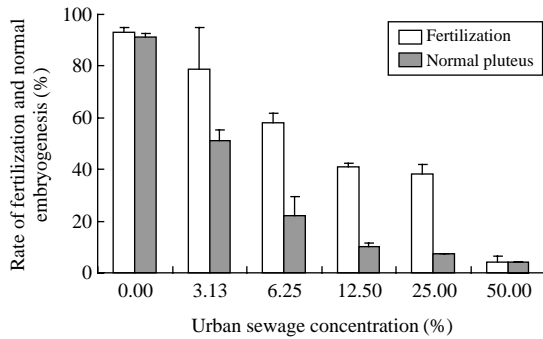
## 결과 및 고찰

### 1. 수정 및 배 발생률의 변동

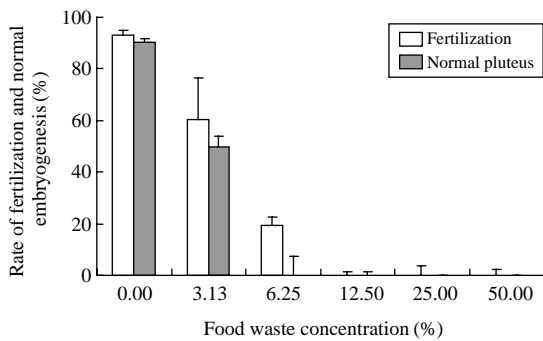
각기 다른 염색, 하수 및 식품폐수처리오니의 추출물을 여과된 자연해수를 이용해 0, 3.13, 6.25, 12.50, 25.00 및 50.00%의 농도로 조성하여 실험을 실시하였다. 실험 농도별로 정자를 30분간 노출시킨 후, 난자에 첨가한지 10분경과 후에 수정막의 유·무로 수정률을 나타냈으며, 배 발생률은 수정 후 48h에 정상 pluteus 유생을 계수하여 백분율로 나타내었다.

염색폐수처리 오니의 추출물을 첨가하지 않은 자연해수에서의 수정률은 92.63%를 나타냈고, 배 발생률은 91.34%를 나타냈으나, 수정 및 배 발생률은 최소농도인 3.13%에서 61.31%와 60.02%로 급격히 감소하였다. 염색폐수처리오니의 추출물 농도가 증가할수록 수정 및 배 발생률은 급격히 감소해 25%의 농도에서 각각 11.36%와 0%를 나타냈으며, 최고 농도인 50%에서는 수정 및 배 발생률은 0%를 나타내었다 (Fig. 3).

하수처리오니의 경우에는 첨가하지 않은 자연해수에서의 수정률은 92.86%를 나타냈고, 배 발생률은 91.37%를 나타냈으나, 최소농도인 3.13%에서 수정률은 79.00%를, 배 발생률은 51.24%로 급격히 감소하였다. 추출물 농도가 증가할수록 수정 및 배 발생률은 급격히 감소해 25%의 농도에서는 38.25%



**Fig. 4.** Changes in the rate of fertilization and normal embryogenesis according to the urban sewage in the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. Vertical bars represent the SE of the mean for three times.



**Fig. 5.** Changes in the rate of fertilization and normal embryogenesis according to the food waste in the sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. Vertical bars represent the SE of the mean for three times.

와 7.56%를 나타냈으며, 50%에서는 4.06%와 4.23%를 나타내었다(Fig. 4).

식품폐수처리오니의 경우에도 추출물을 첨가하지 않은 자연해수에서 수정률은 91.86%를 나타냈고, 배 발생률은 90.28%로 높은 값을 나타냈지만, 3.13%의 농도에서 60.30%와 49.97%로 급격히 감소했다. 식품폐수처리오니도 추출물 농도가 증가할수록 수정 및 배 발생률은 급격히 감소해 12.25% 이상의 농도에서는 수정 및 배 발생률은 0%를 나타내었다(Fig. 5).

본 실험에서 폐기물의 추출물을 첨가하지 않은 대조 실험 구에서는 수정 및 배 발생률의 실험결

과가 매년 90% 이상을 나타내, 시험기준에 적합한 재현성을 나타냈다. 실험에 사용한 3종의 폐기물처리오니의 추출액으로 조성된 시험에서 성게 수정 및 배 발생률을 최소농도인 3.13%에서 급격히 감소하였으며, 농도 증가와 더불어 수정 및 배 발생률이 급격히 감소해 농도 의존성이 뚜렷하게 나타나는 것으로 보아 Hwang *et al.* (2008)에 의해 발표된 성게의 수정 및 배 발생률에 관한 실험은 해양 폐기물의 독성평가에도 적합한 것으로 판단된다. 또한, 동일 폐기물처리오니의 추출물 농도에서 배 발생률이 수정률보다 저해현상이 더 민감하게 나타나는데, 이는 pluteus 유생시기의 배아가 유해물질에 더 오랫동안 노출되어 배 발달 과정시 저해 정도가 증가되었을 것으로 판단된다. 폐기물처리오니의 추출물에 의해 pluteus 유생 이전 시기부터 영향을 받았다 할지라도, 형태적으로 분화정도가 진전된 pluteus 유생시기의 배아가 독성에 대해 증폭되어 표현되기 때문에 pluteus형성 시기가 수정률에 비해 더욱 민감하게 나타나는 것으로 판단된다(Wui *et al.*, 1992; Hwang *et al.*, 2008).

## 2. 수정 및 배 발생률을 이용한 독성평가

염색폐수, 하수처리 및 식품폐수처리오니의 추출물이 수정 및 배 발생률에 미치는 영향에 대한 실험결과를 바탕으로, probit 통계법을 이용해 EC<sub>50</sub>과 95% CI를 산출하였고, Dunnett's test을 이용하여 산출한 NOEC와 LOEC를 Table 2에 나타내었다.

염색폐수처리오니의 추출물에 대한 수정률의 EC<sub>50</sub>은 5.76%를 나타냈고, 배 발생률에 대한 EC<sub>50</sub>은 4.53%를 나타냈다. EC<sub>50</sub>에 대한 95% CI는 수정률의 경우 3.45~8.12%를 나타냈고, 배 발생률은 4.18~4.86%를 나타냈다. 수정 및 배 발생률의 NOEC는 <3.13%를 나타냈으며, LOEC는 최소농도인 3.13%를 나타냈다(Table 2).

하수처리 오니의 추출물에 대한 수정률의 EC<sub>50</sub>은 9.82%를 나타냈고, 배 발생률의 EC<sub>50</sub>은 9.67%를 나타냈다. EC<sub>50</sub>에 대한 95% CI는 수정률의 경우 8.85~10.80%, 배 발생률은 5.73~14.65%를 나타냈다. 수정 및 배 발생률의 NOEC는 <3.13%를 나타냈으며, LOEC는 최소농도인 3.13%를 나타냈다(Table 2).

식품폐수처리 오니의 추출물에 대한 수정률의

**Table 2.** Toxicological estimation using the form of a fertilization membrane and normal pluteus in the *Strongylocentrotus nudus* exposed to ocean dumping wastes sludge elutriates

Items	Toxicity (End-points)	Wastes sludge elutriate (%)		
		Dye waste	Urban sewage	Food waste
EC <sub>50</sub>	Fertilization membrane	5.76	9.82	3.90
	Normal pluteus	4.53	9.67	3.27
95% CI	Fertilization membrane	3.45 ~ 8.12	8.85 ~ 10.80	3.63 ~ 4.15
	Normal pluteus	4.18 ~ 4.86	5.73 ~ 14.65	3.10 ~ 3.43
NOEC	Fertilization membrane	< 3.13	< 3.13	< 3.13
	Normal pluteus	< 3.13	< 3.13	< 3.13
LOEC	Fertilization membrane	3.13	3.13	3.13
	Normal pluteus	3.13	3.13	3.13

EC<sub>50</sub> : 50% Effective concentration, 95% CI : 95% Confidence limit, NOEC : No observed effective concentration, LOEC : Lowest observed effective concentration.

EC<sub>50</sub>은 3.90%를 나타냈고, 배 발생률에 대한 EC<sub>50</sub>은 3.27%를 나타냈다. EC<sub>50</sub>에 대한 95% CI는 수정률의 경우 3.63~4.15%를 나타냈고, 배 발생률은 3.10~3.43%를 나타냈다. 수정 및 배 발생률의 NOEC는 <3.13%를 나타냈으며, LOEC는 최소농도인 3.13%를 나타냈다(Table 2).

이들의 결과를 바탕으로 단순히 EC<sub>50</sub>만으로 독성의 강·약을 판단한다면 식품폐수처리오니>염색폐수처리 오니>하수처리오니 순으로 나타났다. Lee *et al.* (2008)에 의하면 해산 규조류인 *Skeletonema costatum*의 개체군 성장률에 대한 독성실험 결과는 하수처리오니>염색폐수처리오니>식품폐수처리오니 순으로 독성이 강한 것으로 나타나 현재의 결과와는 다소 차이를 나타내고 있다. 따라서, 폐기물과 같은 유해물질에 대한 생물독성은 실험종에 따라 상이한 결과가 나타날 수 있으므로, 단일 종에 대한 생물검정을 실시하기 보다는 다양한 종을 이용한 실험이 병행 되어야 할 것으로 판단된다(Walsh and Alexander, 1980; Park *et al.*, 2008).

성게의 수정 및 배 발생률을 이용한 본 실험에서 3종의 폐기물 추출액에서 동일하게 NOEC는 <3.13%로 나타났으며, LOEC는 최소농도인 3.13%로 나타나 성게는 유해물질의 독성에 대단히 민감한 것으로 판단된다(Hwang *et al.*, 2008). 또한, 3종의 폐기물이 해양에 투기되었을 때는 확산 및 희석으로 인해 대부분 정화되겠지만 오랜 기간 동안 투기되어 퇴적물 내에 축적된다면 해양생물에 미

치는 영향은 대단히 클 것으로 판단된다. 해조류인 파래의 포자 형성률을 이용한 염색폐수처리오니의 추출물에 대한 EC<sub>50</sub>은 13.45%를 나타냈고, NOEC는 <6.25%를 LOEC는 6.25%를 나타내 (Han *et al.*, 2008), 성게에 비해서는 다소 독성에 덜 민감한 것으로 나타났으며 저서요각류인 경우에도 염색폐수 처리오니에 대한 48시간 LC<sub>50</sub>이 40.40~70.20%, NOEC와 LOEC가 6.25%와 12.50%로 나타나(Lee *et al.*, 2008), 생물 종 차이에 따른 독성의 영향에는 차이가 있다는 것을 분명히 밝히고 있다. 지금까지 해양의 생태독성을 평가하기 위한 생물검정 시험은 사육이나 관리가 쉬운 동·식물 플랑크톤을 대상으로 실시되었으나, 최근에 대두되고 있는 식품안전성과 관련하여 해양오염물질에 대한 유용수산생물의 영향에 관한 관심이 집중될 것으로 판단된다. 따라서, 유용수산 생물에 대한 독성평가를 할 수 있는 공정시험법의 개발과 더불어 실험의 재현성과 실험실간 교차분석을 통해 정확한 결과를 도출하기 위한 노력도 한층 더 필요할 것으로 판단된다.

본 실험실에 사용한 동근성게의 생물검정시험법(Hwang *et al.*, 2008)은 폐기물의 독성을 평가하기 위한 유용한 실험 방법으로 판단되며, 향후 이 실험 방법과 결과가 폐기물 투기를 위한 생물검정시험법의 유용한 기초자료로 널리 활용되기를 기대한다.

## 결 론

본 연구는 둥근성게, *Strongylocentrotus nudus*의 수정 및 배 발생률을 이용해 해양배출 폐기물인 염색폐수처리오니, 하수처리오니 및 식품폐수처리오니의 생태독성을 평가하였다.

실험에 사용한 3종의 오니추출물의 첨가는 수정 및 배 발생률을 감소시켰으며, 추출물의 농도가 증가할수록 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다. 염색폐수처리오니에 대한 수정 및 배 발생률의 EC<sub>50</sub>은 5.76과 4.53%로 나타났으며, 하수처리오니의 경우는 9.82와 9.67%, 식품폐수처리오니는 3.90과 3.27%로 나타났다. 3종의 오니추출물에 대한 NOEC는 3.13% 이하였으며, LOEC는 3.13%로 나타났으며, 성게의 수정 및 배 발생률에 미치는 독성은 식품폐수처리오니 > 염색폐수처리오니 > 하수처리오니 순으로 나타났다. 이들 결과를 바탕으로 *S. nudus*의 수정 및 배 발생률은 해양배출 폐기물의 독성을 평가하기 위한 유용한 생물검정시험법으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

- 해양수산부. 폐기물 해양배출 종합관리시스템 (IV), 2007.
- APHA, Awwa and Wef. Standard methods for the examination of water and wastewater. American public health association, American water works association, Water environment federation, Washington, DC, USA 1995.
- ASTM. Standard guide for acute toxicity test with rotifer *Brachionus*, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, USA 1996.
- Greenwood PJ. 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* 1983; 4: 15-29.
- Han TJ, Han YS, Park GS and Lee SM. Development of marine ecotoxicological standard methods for *Ulva* sporulation test, *Kor J Soc Oceanography* 2008; 13(2): 121-128.
- Hwang UK, Lee CW, Lee SM, An KH and Park SY. Effects of salinity and standard toxic metals (Cu, Cd) on fertilization and embryo development rates in the sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*), *J Environ Sci* 2008; 17(7): 775-781.
- ISO. Water quality-marine algae growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum triocornutum*. International Organization for Standardization, ISO 1995, 7pp.
- Kobayashi N. Comparative toxicity of various chemicals, oil extracts and oil dispersant to Canadian and Japanese sea urchin eggs, *Publs Setomar Biol* 1980; 27: 76-84.
- Lee JS, Lee SM and Park GS. Development of sediment toxicity test protocols using Korea indigenous marine benthic amphipods, *Kor J Soc Ocean* 2008; 13(2): 147-155.
- Lee SM, Park GS, An KH, Park SY and Lee SH. Application of the ecotoxicological standard method using population growth inhibition of marine phytoplankton, *Kor J Soc Ocean* 2008; 13(2): 112-120.
- Lee SM, Park GS, Yoon SJ, Kang SY and Oh JH. Development of ecotoxicological standard methods using early life stage of marine rotifer *Brachionus plicatilis* and benthic copepod *Tigriopus japonicus*, *Kor J Soc Ocean* 2008; 13(2): 129-139.
- NIWA. Marine algae (*Dunaliella tertiolecta*) chronic toxicity test protocol, National Institute of Water and Atmospheric Research, 1998, 30pp.
- Park GS, Kang JC, Yoon SJ, Lee SM and Hwang UK. Establishment of marine ecotoxicological standard method for larval fish survival test, *Kor J Soc Ocean* 2008; 13(2): 140-146.
- Pagano G, Cipollaro M, Corsale G, Esposito A, Ragucciand E and Giordano GG. pH-induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis, I. Exposure of embryos, *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 1985a; 5: 101-112.
- Pagano G, Cipollaro M, Corsale G, Esposito A, Ragucciand E and Giordano GG. pH-induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis, II. Exposure of sperm, *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 1985b; 5: 113-121.
- Rand GM and Petrocelli SR. Fundamentals of Aquatic toxicology, Gemisphere Publishing Corporation, Washington 1985.
- USEPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marine organisms, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA 2002.
- Walsh GE and Alexander SV. A marine algal bioassay method: results with pesticides and industrial waste, *Water Air Soil Pollut* 1980; 13: 45-55.
- Wui IS, Lee JB and Yoo SH. Bioassay on marine sediment pollution by using sea urchin embryo culture in the south-

- west inland sea of Korean, *J Environ Biol* 1992; 10(2): 92-99.
- Yu CM. A study on the effect of heavy metals on embryos formation of sea urchins, *Kor J Env Hlth Soc* 1998; 24(3): 6-10.
- Yu CM. The effects of pH on early embryo development of sea urchins, *Kor J Env Hlth Soc* 2004; 30(2): 104-107.