

코발트(II)가 말뚝성게 (*Hemicentrotus pulcherrimus*)의 수정 및 배아 발생에 미치는 영향

황운기 · 류향미 · 최용환 · 이승민 · 강한승*

국립수산과학원 서해수산연구소 해양생태위해평가센터

Effect of Cobalt (II) on the Fertilization and Embryo Development of the Sea Urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*)

Un-Ki Hwang, Hyang-Mi Ryu, Yong-Hwan Choi, Seung-Min Lee and Han Seung Kang*

National Fisheries Research & Development Institute, West Sea Fisheries Research Institute,
Marine Ecological Risk Assessment Center, Incheon 400-420, Korea

Abstract – Cobalt is a naturally occurring element found in rocks, soil, water and/or is among the harmful pollutants as generated by industrialized. In the environment, cobalt has two oxidation states, cobalt (II) (Co (II)) and cobalt (III) (Co (III)). If coastal water is contaminated by cobalt, it through the food chain can have an impact on marine ecosystems. Therefore, we examined the gametotoxic and embryotoxic effects of Co (II) at various concentrations (10, 100, 500, 1000, 2500 ppb) in the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. 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. Experiment was begun within 30 min the collection of both gametes. The fertilization and embryo development rates test were performed for 10 min and 64 h after fertilization, respectively. The fertilization rates in the control condition (not including Co (II)) and experimental group were not significantly changed. The embryo development rates in the control condition were greater than 90% and were significantly decreased with concentration dependent manner. The normal embryogenesis rate was significantly inhibited in exposed to cobalt (II) ($EC_{50}=71.84$ ppb, 95% CI=16.71 – 203.36 ppb). The NOEC and LOEC of normal embryogenesis rate were <10 ppb and 10 ppb, respectively. These results suggest that the early embryo stages of *H. pulcherrimus* have toxic effect at greater than 10 ppb of Co (II) concentration.

Key words : *H. pulcherrimus*, fertilization, embryogenesis, cobalt (II), EC_{50} , 95% CI, NOEC, LOEC

서 론

생물체는 환경에 존재하는 다양한 물리적, 화학적 요인의 영향을 받으면서 생활하고 있다. 특히 수서생태계

에 서식하는 생물들은 주위의 환경 요인으로부터 직접적인 영향을 받는다. 이런 요인으로는 각종 중금속, 농약, 인공 및 자연 방사선 등의 화학물질과 수온, pH, 빛, 유속 등의 물리적 요인이 있다(Han *et al.* 2009). 경제성장에 따른 산업화와 도시화에 의한 인구증가로 인해 산업폐수 및 도시하수 등의 오염물질이 증가하고 있으며, 이들 물질의 수서생태계로 유입에 따른 오염현상이 나타나고 있

* Corresponding author: Han Seung Kang, Tel. 032-745-0684,
Fax. 032-745-0686, E-mail. kanghs@nfrdi.go.kr

다. 해양에 유입된 중금속은 퇴적물과의 결합에 따라 축적률이 높으며, 기타 오염물질보다 상대적으로 긴 반감기를 갖고 있어 미량일지라도 생리적 장애를 일으킨다 (Martin and Whitfield 1983; Phillips and Segar 1986). 또한 먹이사슬을 통해 인간에게까지 영향을 미치는 오염물질이다.

코발트는 아프리카, 캐나다, 모로코 등을 비롯한 세계 17개국에서 생산되는 금속으로 암석, 토양, 물과 식물 등에 분포 한다 (Palit *et al.* 1994; Krauskopf and Bird 1995; Nagpal 2004). 환경으로의 코발트 노출은 화산활동, 산불 및 토양으로부터의 침출과 같은 자연적 경로와 화석연료 연소, 쓰레기 소각 및 자동차 배기가스와 같은 인위적 경로에 따른다.

코발트는 인간과 포유류에게 필요한 비타민 B₁₂ 구성체의 필수 원소로서 결핍 시 빈혈과 신경계통의 이상을 초래하며, 과도한 경우 적혈구과다증, 심근경색, 남성생식기 관 이상 등의 부작용을 유발할 수 있다 (Smith and Carson 1981). 코발트의 식물에 대한 독성은 잎이 빨리 떨어지고 검은 녹색으로 변하며, 줄기의 탈색 및 반점 등을 생기게 한다 (Chatterjee and Chatterjee 2000).

코발트 등의 중금속 및 환경유해물질의 독성 정도를 연구하기 위해서는 자극에 민감하게 반응하는 생물을 이용하여 이들의 생체 내 손상 정도를 평가 및 예측하는 연구가 선행되어야 함은 물론, 효과적인 생물검정기술의 확립이 필요하다. 또한 중금속에 노출되는 생물종이 다양하고 농도에 대한 영향이 뚜렷하여 많은 연구가 진행되었으며, 중금속의 이용이 증대됨에 따라 이에 대한 안전성 연구는 생물학적 영향을 근거로 하여 범위가 점차 확대되고 있다 (Han *et al.* 2009). 최근에는 우리나라에서도 성게의 수정 및 배아 발생률을 이용하여 연안해역내에서 중금속에 대한 생물 안전농도 (Hwang *et al.* 2008, 2009a)를 설정하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있을 뿐만 아니라 해양 폐기물 (Hwang *et al.* 2009b, 2010)에 대한 생물 영향을 판단하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

성게는 중요한 수산자원이며, 발생학 연구가 시작된 이래 해양생물 발생연구의 모델이 되어왔다. 최근 시료 확보와 배아의 실험실 배양이 쉽고, 세포의 이동과 기관 형성 등 배아의 발달과정이 명확히 관찰되며, 배아에 대한 인위적 세포 조작과 유전자조작 등이 가능하다는 장점들 때문에 성게의 배아 (embryo)는 분자발생학 및 환경오염이나 독성 연구의 모델 생물로서 자주 이용되고 있다 (Kobayashi 1973, 1977, 1981; Greenwood 1983; Monroy 1986; Wui *et al.* 1992; Davidson *et al.* 1998; Yu 1998).

본 연구는 유용 수산생물로서 조간대 암반 지역에 서식하는 말뚝성게 (*Hemicentrotus pulcherrimus*)의 수정률

및 배아 발생률을 이용하여 코발트의 생태위해성을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험생물 및 채집

말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)는 서식지역의 수온에 따라 산란시기가 다르고, 우리나라 전 연안의 조간대 암반지역에 서식하고 있어 채집이 용이하다. 실험에 사용된 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)는 2011년 3~4월에 전라북도 부안군 변산면 격포리 인근 해역의 조간대 암반지역에서 채집하여 국립수산과학원 서해수산연구소 해양생물배양실에서 1주일 순치한 후 실험에 이용하였다. 해양생물배양실 수조환경은 유수식으로 온도 $9 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 수온을 유지하였다.

2. 방정 및 방란 유도

말뚝성게 표면의 원생동물 및 이물질을 제거하기 위하여 멸균된 해수를 이용하여 표면을 세척한 후, 실험에 이용하였다. 방정과 방란을 유도하기 위해 사용된 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)는 암, 수 각 6개체로, 크기는 직경 3.5 cm 이상을 사용하였으며, 해수는 membrane filter (pore size 0.45 μm)로 여과된 자연해수를 멸균하여 사용하였다. 성게에 0.5 M KCl 용액 1 mL을 체강내로 주입시킨 후, 여과된 자연해수가 담긴 100 mL 용량의 비이커에 넣고 생식공이 충분히 잠기게 하였다. 30분 동안 방정, 방란을 유도시켜 얻은 배우자를 정자용액은 1회, 난자용액은 3회 세정하여 실험에 사용하였다.

3. Cobalt 노출

실험에 사용한 독성물질인 Cobalt (Co (II) Chloride Hexahydrate 99.9%, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CAS No. 7791-13-1)는 Kanto chemicals (Tokyo, Japan) 제품을 이용하였다. 실험생물의 수정 및 배아 발생률에 미치는 Co(II)의 영향을 살펴보기 위하여, 멸균된 해수를 이용하여 10 ppm (10,000 ppb) 농도로 조성한 stock solution을 이용한 사전실험에 의해 농도를 설정하였다. Co(II) 노출에 의한 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)의 수정률 및 배아 발생률을 조사하기 위한 Co(II) 농도는 0, 10, 100, 500, 1000, 2500 ppb로 설정하였다.

4. 배양조건

실험에 사용된 Co(II) 농도를 조성한 멸균해수 배양액

의 pH는 7.8~8.2, 배양 온도는 $16 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 인공수정 (artificial insemination)시 적절한 정자 접종을 위한 사전조사를 통하여 정자는 2,000~2,500배 희석하였으며, 멸균해수 배양액 1 mL에 수정란 1,500~2,000개를 준비해 Table 1의 조건으로 배양하였다.

5. 수정 및 배아 발생 관찰

방정 유도를 통해서 얻은 정자는 각각의 Co (II) 농도에 30분간 노출시킨 후, 방란 유도를 통해 얻은 정상 난자와 인공수정을 시켰다. 수정 10분 경과 후 수정막의 형성 유·무로 수정률을 관찰하였다 (Fig. 1). 정상적인 배아 발생은 수정 후 64시간째인 pluteus 유생기에 정상과 비정상 (작은 크기 혹은 기형)으로 나누어 관찰하였다 (Pagono *et al.* 1985a, b) (Fig. 1).

실험은 농도별로 3회 반복 실시하였으며 100개 이상의 배아를 3회 반복 계수하여 고정된 배아 수에 대한 정상적인 배아 수의 백분율을 산출하였다. 이들 결과를 이용하여 수정 및 배아 발생률에 대한 반수영향농도 (50% Effective Concentration, EC_{50})와 95% 신뢰구간 (95% Confidence Limit, 95% CI)를 probit 통계법을 이용하여 분석하였다. 또한 무영향농도 (No Observed Effective Concen-

Table 1. Experimental culture conditions using the sea urchin, *H. pulcherrimus*

Test parameters	Conditions
Culture type	Static non-renewal 10 min ~ 64 h toxicity test
Photoperiod	Ambient light condition and 8L:16D periods
Temperature	$16 \pm 0.5^\circ\text{C}$
pH	7.8~8.2
Salinity	32 ± 1.0
Chamber volume	80 mL glass
Solution	Filtered (0.45 μm) and sterilized seawater
Solution exchange	None
Experiment period	10 min ~ 64 hr
Investigation item	Fertilization, larval development rates
Acceptability criterion	>90% fertilized eggs and pluteus larvae at control

tration, NOEC), 최소영향농도 (Lowest Observed Effective Concentration, LOEC)는 Dunnett's test를 이용하여 분석하였다.

6. 통계학적 분석

대조군과 실험군과의 유의성 검정은 Student's *t*-test로 비교하였으며, *p*가 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. Cobalt 처리에 따른 말뚝성게의 수정 및 정상 배아 발생

말뚝성게 (*H. pulcherrimus*) 정자를 각각의 Co (II)에 30분간 노출시킨 후, 정상 난자와 10분간 수정시킨 후 수정률을 관찰한 결과 Co (II) 농도에 유의적인 영향을 받지 않았다 (Fig. 2). 수정 후 64시간째의 pluteus 유생기의 정상 배아 발생률은 대조군이 91.67%를 보였으며, Co (II) 농도 10, 100, 500, 1000, 2500 ppb 처리군에서의 정상 배아 발생률은 각각 83.33%, 77.33%, 59.33%, 23.33%, 12.33%를 나타내었다. Pluteus 유생기의 정상 배아 발생률은 Co (II) 처리농도가 증가할수록 농도 의존적으로 유의적인 감소를 나타내었다 (Fig. 3).

2. 수정 및 배아 발생률을 이용한 독성평가

Co (II)가 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)의 수정 및 배아 발생률에 미치는 영향에 대한 실험결과를 바탕으로, probit 통계법을 이용해 EC_{50} 과 EC_{50} 에 95% CI를 산출하였고, Dunnett's test를 이용하여 NOEC와 LOEC값을 산출하였다.

배아 발생률은 Co (II) 농도 증가에 따라 표준독성반응으로 잘 알려진 S자형 곡선을 나타냈다 (Fig. 4). 말뚝성

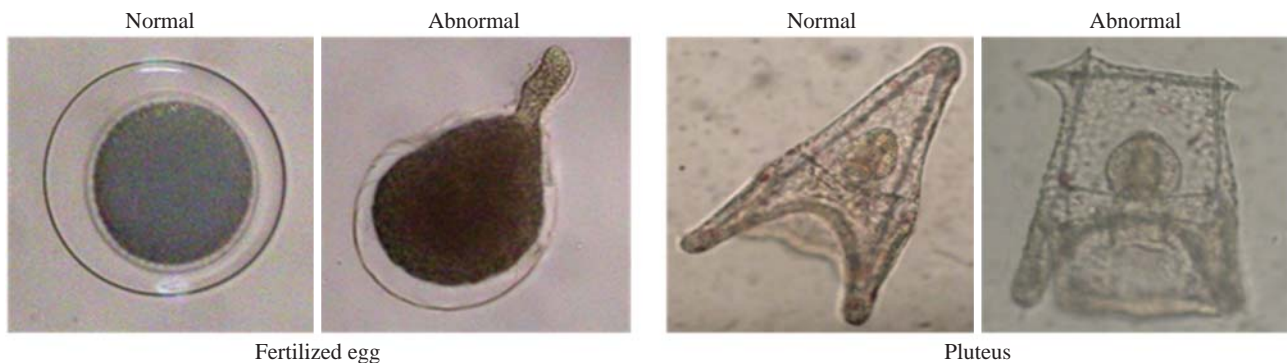


Fig. 1. Normal and abnormal forms in fertilized egg and pluteus of sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*).

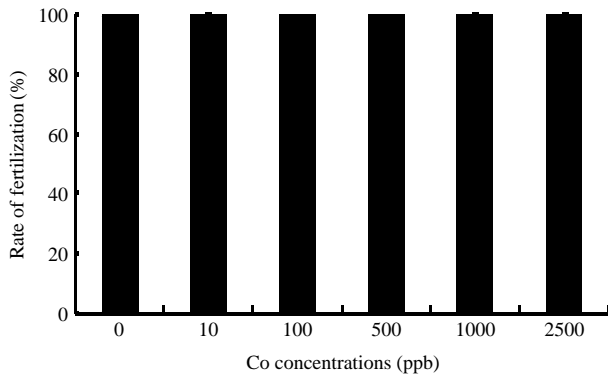


Fig. 2. Fertilization rates of *Hemicentrotus pulcherrimus* eggs exposed to Co (II).

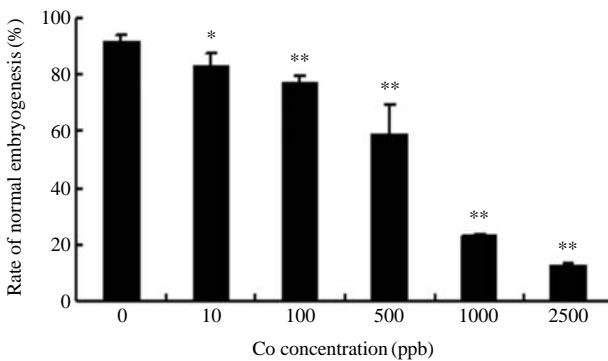


Fig. 3. Normal embryogenesis rates of *Hemicentrotus pulcherrimus* embryos exposed to Co (II). All the points showed a statistically significant difference from the control group according to Student's *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

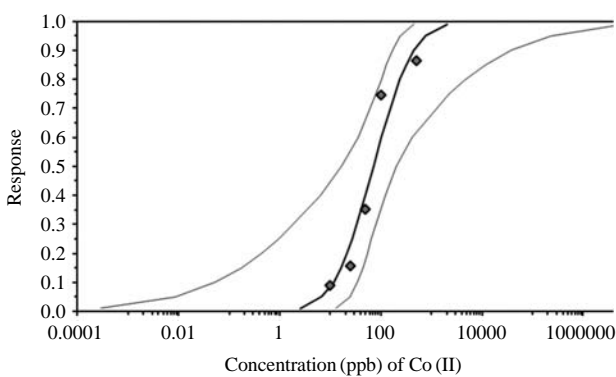


Fig. 4. Concentration-response by Co (II) treatment.

계 (*H. pulcherrimus*)의 배아 발생률에 대한 Co (II)의 영향을 독성치로 나타냈을 때, EC₅₀는 71.84 ppb를 나타냈고, EC₅₀에 대한 95% CI는 16.71~203.36 ppb를 나타냈다. 배아 발생률에 대한 NOEC는 <10 ppb로 나타났고, LOEC는 10 ppb로 나타났다 (Table 2).

Table 2. Toxicological estimation using the form of a fertilization membrane and normal pluteus in the *Hemicentrotus pulcherrimus* exposed to Co (II)

Items	Toxicity (End-points)	Co (II) (ppb)
EC ₅₀	Normal pluteus	71.84
95% CI	Normal pluteus	16.71 ~ 203.36
NOEC	Normal pluteus	< 10
LOEC	Normal pluteus	10

EC₅₀: 50% Effective concentration, 95% CI: 95% Confidence limit, NOEC: No observed effective concentration, LOEC: Lowest observed effective concentration.

고 찰

코발트는 생물, 환경 및 경제적으로 중요한 미량금속으로 원자번호 27, 원자량 58.9 g mole⁻¹이며 광물에서 니켈 (Nickel, Ni), 납 (Lead, Pb), 은 (Silver, Ag), 구리 (Copper, Cu)와 결합한 형태로 존재한다. 따라서 이러한 광물 주위, 고속도로 주변 및 공단주위의 토양에서 코발트의 함량이 높게 나타난다. 생물학적으로는 모든 유기물의 필수 영양소로 비타민 B₁₂ (Cobalamine)의 구성물질이며 많은 신경전달물질과 호르몬의 생합성에 관여한다 (Gottschalk 1979; Fricker 1988; Lee and Tebo 1994). 환경에서 코발트는 Co (II)와 Co (III)의 두 가지 산화물로 존재하며 Co (II)는 pH 범위에 따라 열역학적으로 불안정하나 Co (III)는 Co (II)에 비하여 열역학적으로 안정하다 (Pan and Susak 1991).

중금속 등의 독성물질 노출에 따른 위해 연구는 주로 사람을 포함한 포유류를 중심으로 이루어져 왔으며, 환경에서 직접 노출되는 생물 중에 대해서는 연구가 부족한 실정이다. 따라서 해양을 비롯한 수서생태계 생물종을 대상으로 한 연구는 포유류의 연구 결과와의 비교 및 실제 생태계의 위해 정도를 파악하는 데 있어서 매우 중요하다.

최근 해양생물종을 이용하여 해양에 유입되는 독성물질에 대한 생물 반응 연구가 활발히 진행되고 있을 뿐만 아니라 연구의 범위도 점차 넓어지고 있다. 그러나 시험생물 및 독성물질 노출시기 등의 방법의 차이로 인해 독성물질에 대한 생체 내 미치는 영향이 다양하게 나타날 수 있는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 시험방법의 표준화 및 유용 시험생물종을 선정하는 연구는 매우 중요하다. 시험생물로서 성체는 세계 전역의 바다에 서식하며 산란기가 길고 생식세포인 정자, 난자를 쉽게 얻을 수 있으며 실험실에서 배아 발생을 관찰하기 용이한 장점으로 인해 생태독성학적 연구에도 활발하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서 수정물은 Co(II)에 영향을 받지 않았으나 배아 발생률은 Co(II)농도가 증가 할수록 농도 의존적으로 유의적인 감소를 나타내었다. 동일 독성물질 농도에 대한 영향이 수정물보다 배아 발생률에서 저해현상이 크게 나타나는 것으로 보아, pluteus 유생시기의 배아가 독성물질에 더 오랫동안 노출되어 배 발달과정 중 저해 정도가 증가되었을 것으로 생각된다. 또한 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 (Wui *et al.* 1992; Hwang *et al.* 2008). 본 연구결과는 성계를 이용한 중금속 등의 독성 영향을 관찰한 연구결과와 유사하게 나타났다 (Agca *et al.* 2009; Hwang *et al.* 2009a, 2010; Xue *et al.* 2011). 이들 연구결과로부터 중금속 및 유해물질들의 종류에 따라 정도의 차이는 있지만 성계 초기 배아의 발생에 있어서 유해하게 작용한다는 것을 알 수 있으며, 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)를 이용한 생태독성 시험법은 연안해역에 대한 생물영향을 평가하기 위하여 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다. 포유류인 생쥐, 흰쥐, 토끼 등을 대상으로 한 Co(II)의 연구에서도 임신한 모체에 Co(II)노출 시 배아는 죽거나, 기형 특히 골격의 발달이 지연되는 현상이 나타났다 (Szakmáry *et al.* 2001). 무척추동물 중에서 지렁이 (*Eisenia foetida*)를 대상으로 한 Co(II)의 연구결과는 토양중의 Co(II)농도 이상으로 체내에 농축하지 않았고, 섭취량의 10% 미만이 체내에 흡수되고 나머지는 체내로부터 배출되었다 (Crossley *et al.* 1995).

말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)의 배아 발생률에 대한 Co(II)의 영향을 독성치로 나타냈을 때, EC₅₀는 71.84 ppb를 나타냈고, EC₅₀에 대한 95% CI는 16.71~203.36 ppb를 나타냈다. 배아 발생률에 대한 NOEC는 <10 ppb로 나타났고, LOEC는 10 ppb로 나타났다. 이전 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)를 대상으로 구리 (Cu)의 독성평가 결과 EC₅₀는 10.32 ppb, NOEC는 <6.25 ppb, LOEC는 12.50 ppb로 나타났다 (Hwang *et al.* 2009a). 카드뮴 (Cd)은 EC₅₀는 244.04 ppb, NOEC는 <125 ppb, LOEC는 125 ppb로 나타났다 (Hwang *et al.* 2009a). 배아 발생률에 의한 Co(II), Cu 및 Cd의 독성평가에서 EC₅₀를 비교 평가 시 독성 영향은 Cu>Co(II)>Cd 순으로 나타났다. Kobayashi (1995)는 중금속이 성계의 초기 배아 발생에 미치는 영향에서 중금속 중 Hg가 가장 큰 저해를 보였으며, Cu>Zn>Ni>Cd의 순으로 영향을 미치는 것으로 보고하여 현재의 연구결과와 유사하게 Cu가 Cd보다 독성이 큰 것으로

나타났다.

성계는 먹이연쇄에서 기초생산자인 해조류를 섭식하는 제1차 소비자 단계의 생물이다. 따라서 상위 소비자 및 분해자 등의 주요 먹이생물로서 중요한 위치를 갖는다. 따라서 환경오염에 의한 문제는 단순히 연안 생태계의 문제일 뿐만 아니라 먹이연쇄의 상위단계인 인간에게는 섭식에 따른 위험한 경우가 생길 수 있다.

본 연구결과 Co(II)가 연안 해역에 유입되어 10 ppb를 초과할 경우 연안 생태계 내에 서식하는 생물의 재생산에 유해한 영향을 미칠 것으로 판단된다. 또한 해양생태독성평가 시에 동, 식물 플랑크톤 중심의 연구에서 유용수산생물자원으로의 연구가 유도되는 상황에서 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)는 발생학적인 장점과 함께 오염물질에 대한 반응이 민감한 시험 생물로 유용하게 이용될 것으로 판단된다.

적 요

코발트는 자연적으로 암석, 토양 물 등에서 발견되는 요소일 뿐만 아니라 산업화에 의해 생성되는 유해물질 중의 하나이다. 환경에서는 코발트(II)와 코발트(III)의 두 가지 산화물로 존재하며, 연안 해역으로 유입 시 먹이연쇄를 통해 해양생태계 전반에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 본 연구는 유용 수산생물로서 조간대 암반 지역에 서식하는 말뚝성게 (*Hemicentrotus pulcherrimus*)를 이용하여 cobalt (Co(II); 10, 100, 500, 1000, 2500 ppb)가 배우자 및 배아에 미치는 독성 영향을 조사하였다. 성숙한 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*) 체강에 0.5 M KCl을 주입하여 방란 및 방정을 유도하였으며 수컷은 흰색 또는 크림색 정자를 분비하고 암컷은 노란색 또는 오렌지색 난자를 분비하였다. 실험은 30분 내에 배우자를 수집한 후 실행하였다. 수정률 및 배아 발생률을 조사하기 위한 실험은 수정 후 각각 10분 및 64시간 실시하였다. 수정률은 대조군과 실험군과의 유의적인 변화가 없었다. 배아발생률은 대조군에서 90% 이상 나타났고 실험군에서는 농도 의존적으로 유의적인 감소를 나타냈다. 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)의 정상 배아 발생에 대한 Co(II)의 독성치는 반수영향농도 (EC₅₀) 71.84 ppb와 95% CI 16.71~203.36 ppb로 나타났다. 또한 무영향농도 (NOEC)는 <10 ppb로 나타났고, 최소영향농도 (LOEC)는 10 ppb로 나타났다. 본 연구 결과, Co(II)가 연안해역에 유입시, 10 ppb 이상의 농도로 존재할 경우 말뚝성게 (*H. pulcherrimus*)와 같은 연안정착성 생물의 초기 배아 발생단계는 심각한 영향을 받을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2011년도 국립수산과학원 경상과제연구비 지원으로 국립수산과학원 서해수산연구소 해양생태위해 평가센터에서 수행하였다.

참 고 문 헌

- Agca C, WH Klein and JM Venuti. 2009. Respecification of ectoderm and altered nodal expression in sea urchin embryos after cobalt and nickel treatment. *Mechanisms of Development* 126:430-442.
- Chatterjee J and C Chatterjee. 2000. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environ. Pollut.* 109: 69-74.
- Crossley DA, ER Blood, PF Hendrix and TR Seastedt. 1995. Turnover of cobalt-60 by earthworms (*Eisenia foetida*) (*Lumbricidae, Oligochaeta*). *Appl. Soil Ecol.* 2:71-75.
- Davidson EH, RA Cameron and A Ransick. 1998. Specification of cell fate in the sea urchin embryo: Summary and some proposed mechanisms. *Development* 125:3269-3290.
- Fricker LD. 1988. Carboxypeptidase E. *Annu. Rev. Physiol.* 50:309-321.
- Gottschalk G. 1979. Bacterial metabolism. Springer-Verlag, New York.
- Greenwood PJ. 1983. The influence of an oil dispersant chem-serve OSE-DH on the viability of sea urchin gametes. Combined effects of temperature, concentration and exposure time on fertilization. *Aqua. Toxicol.* 4:15-29.
- Han M, KM Hyun, M Nili, IY Hwang and JK Kim. 2009. Synergistic effects of ionizing radiation and mercury chloride on cell viability in fish hepatoma cells. *Korean J. Environ. Biol.* 27:140-145.
- Hwang UK, CW Lee, SM Lee, KH An and SY Park. 2008. Effects of salinity and standard toxic metals (Cu, Cd) on fertilization and embryo development rates in the sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*). *J. Environ. Sci.* 17:775-781.
- Hwang UK, CW Rhee, KS Kim, KH An and SY Park. 2009a. Effects of salinity and standard toxic metals (Cu, Cd) on fertilization and embryo development rates in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *J. Environ. Toxicol.* 24:9-16.
- Hwang UK, CW Rhee, KS Kim, HC Kim, KH An and SY Park. 2009b. Toxicity assessment of ocean dumping wastes using fertilization and embryo development rates in the sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*). *J. Environ. Toxicol.* 24:25-32.
- Hwang UK, HM Ryu, SG Kim, JS Park and KH An. 2010. Toxicity assessment of ocean dumping wastes using fertilization and embryo development rates in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *J. Environ. Toxicol.* 25:11-18.
- Kobayashi N. 1973. Studies on the effects of some agents on fertilized sea urchin eggs, as a part of the bases for marine pollution bioassay I. *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.* 21:109-114.
- Kobayashi N. 1977. Preliminary experiments with sea urchin pluteus and metamorphosis in marine pollution bioassay. *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.* 24:9-21.
- Kobayashi N. 1981. Comparative toxicity of various chemicals, oil extracts and oil dispersant to Canadian and Japanese sea urchin eggs. *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.* 27:76-84.
- Kobayashi N. 1995. Bioassay data marine pollution using echinoderms. *Encyclopedia of Environmental Control Technology* 9:539-609.
- Krauskopf KB and DK Bird. 1995. Introduction to geochemistry. New York: McGraw Hill.
- Lee Y and BM Tebo. 1994. Cobalt (II) oxidation by the marine manganese (II)-oxidizing *Bacillus* sp. Strain SG-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 2949-2957.
- Martin JM and M Whitfield. 1983. The significance of river input of chemical elements to the ocean. In *Trace Metals in Sea Water*. New York. pp. 265-296.
- Monroy A. 1986. A centennial debt of developmental biology to the sea urchin. *Biol. Bull.* 171:509-519.
- Nagpal NK. 2004. Water quality guidelines for cobalt. Ministry of water, land and air protection, water protection section, water, air and climate change branch, Victoria.
- Pagano G, M Cipollaro, G Corsale, A Esposito, E Ragucciand and GG Giordano. 1985a. Ph-induced changes in mitotic and development patterns in sea urchin embryogenesis, I. Exposure of embryos. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 5: 101-112.
- Pagano G, M Cipollaro, G Corsale, A Esposito, E Ragucciand and GG Giordano. 1985b. Ph-induced changes in mitotic and development patterns in sea urchin embryogenesis, II. Exposure of sperm. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 5:113-121.
- Palit S, A Sharma and G Talukder. 1994. Effects of cobalt on plants. *Bot. Rev.* 60:149-181.
- Pan P and NJ Susak. 1991. The speciation of cobalt in seawater and freshwater at 25°C. *Geochem. J.* 25:411-420.
- Phillips DJH and DA Segar. 1986. Use of bioindicators in monitoring conservative contaminants: programme design impa-ratives. *Mar. Pollut. Bull.* 17:10.
- Smith IC and BL Carson. 1981. Trace metals in the environment. Cobalt, vol. 6. Ann Arbor: Ann Arbor Science Publ. Inc.
- Szokmáry E, G Ungváry, A Hudák, E Tátrai, M Náráy and V Morvai. 2001. Effects of cobalt sulfate on prenatal development of mice, rats, and rabbits, and on early postnatal devel-

- opment of rats. J. Toxicol. Environ. Health A. 62:367-386.
- Wui IS, JB Lee and SH Yoo. 1992. Bioassay on marine sediment pollution by using sea urchin embryo culture in the southwest inland sea of Korean. J. Environ. Biol. 10:92-99.
- Xue X, W Xia, L Yan, W Yonghua and W Yuan. 2011. Acute toxicity and synergism of binary mixtures of antifouling biocides with heavy metals to embryos of sea urchin glyptocidaris crenularis. Hum. Exp. Toxicol. 30:1009-1021.
- Yu CM. 1998. A study on the effect of heavy metals on embryos formation of sea urchins. Kor. J. Env. Hlth. Soc. 24:6-10.

Manuscript Received: August 23, 2011

Revision Accepted: October 15, 2011

Responsible Editor: Insil Kwak