

## 중금속 (Cd, Cu, Zn)이 해산규조류 (*Skeletonema costatum*)의 개체군 성장률에 미치는 독성영향

황운기 · 류향미 · 이주욱 · 이승민 · 강한승\*

국립수산과학원 서해수산연구소 해양생태위해평가센터

### Toxic Effects of Heavy Metal (Cd, Cu, Zn) on Population Growth Rate of the Marine Diatom (*Skeletonema costatum*)

Un-Ki Hwang, Hyang-Mi Ryu, Ju-Wook Lee, 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** - In this study, we evaluated the toxic effects of heavy metals (Cd, Cu, Zn) on the population growth rate ( $r$ ) of the marine diatom, *Skeletonema costatum*. *S. costatum*. The population growth rate ( $r$ ) of the species was determined after 96 hrs. of exposure to Cd (0, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 ppm), Cu (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 ppm) and Zn (0, 0.31, 0.63, 1.25, 2.00, 2.50, 5.00 ppm). It was observed that ' $r$ ' in the control (absence of Cd, Cu and Zn) were greater than 0.05, however suddenly decreased with increased heavy metal concentrations. Cd, Cu and Zn reduced ' $r$ ' in a dose-dependent manner and a significant reduction were occurred at concentration of greater than 1.25, 1.25 and 2.50 ppm, respectively. Based on the toxicity, the heavy metal were ranked as  $Cu > Zn > Cd$ , with  $EC_{50}$  values of 1.11, 2.13 and 6.84 ppm, respectively. The lowest-observed-effective-concentration (LOEC) of ' $r$ ' in exposed to Cd, Cu and Zn were 1.25, 1.00, 2.00 ppm, respectively. Precisely, a concentration of greater than 1.25 ppm of Cd, 1.00 ppm of Cu and 2.00 ppm of Zn in marine ecosystems induced toxic effect on the ' $r$ ' of *S. costatum*. Based on our results, we suggested that the ' $r$ ' of *S. costatum* might be a useful bio indicator for the toxicity assessment of heavy metals in marine ecosystems.

**Key words** : *Skeletonema costatum*, heavy metal, population growth rate ( $r$ ), toxicity

## 서 론

도시화와 산업화에 따른 경제성장과 함께 생성된 각종 오염물질로 인해 연안역을 중심으로 해양생태계에 서식하는 다양한 해양생물이 영향을 받는 것으로 알려

져 있다 (DeForest *et al.* 2007; Atici *et al.* 2008). 이들 오염물질들 가운데에서도 특히 중금속은 퇴적물에 침착하기 용이하여 축적률이 높으며 반감기가 길어 다른 오염물질에 비해 해양생물에 미치는 영향이 크며 이와 같은 영향은 먹이연쇄를 통해 상위포식자인 인간에게도 나쁜 영향을 미친다 (Reiley 2007).

카드뮴 (Cd)은 플라스틱 안정제, 다양한 색의 안료 및 도금 등에 사용되어지는 독성이 높은 중금속으로 심각한 독성을 일으킨다 (Novelli *et al.* 1999; Hwang *et al.* 2008;

\* Corresponding author: Han Seung Kang, Tel. 032-745-0684, Fax. 032-745-0686, E-mail. hanseungkang66@gmail.com

Hwang *et al.* 2009; Hwang *et al.* 2012a). 구리 (Cu)와 아연 (Zn)은 황동 생산 시 첨가 금속으로 이용되며 Cu는 우수한 열 전도성과 내식성이 있어 전선 및 산업 용기에 많이 사용되어지고 있으며, 또한 선박의 외부 및 그물망의 부착 방지 도료에도 널리 사용되고 있다 (Lundebye *et al.* 1999; McGeer *et al.* 2000). 이들 두 중금속은 생체 내의 생명활동을 유지하기 위한 필수 미량원소로 잘 알려져 있다. 하지만 체내 농도가 높으면 세포의 구조적 이상과 생화학적 기능 장애로 인한 생리학적 불균형을 나타내 생물에게 나쁜 영향을 미친다 (Viarengo 1985; Maage *et al.* 1989).

우리나라도 중금속의 해양유입에 따른 오염정도에 대한 위해성의 조사를 연안역에서 실시하고 있으며, 조사 항목은 해수 및 퇴적물의 중금속 함량과 더불어 일부 서식생물의 체내 중금속 함량에 대한 조사가 활발하게 진행되고 있다 (Hwang *et al.* 2012a, b). 이러한 자연생태계 내에서 중금속의 위해성을 평가하기 위해서는 실내 실험을 통해 해양의 생태계를 고려한 단일 중금속의 안전농도와 더불어 오염물질의 혼합독성에 대한 생태독성 자료가 충분히 제시되어야 한다. 최근에 우리나라도 이 화학적 분석방법의 단점을 보완하기 위하여 중금속 등과 같은 오염물질의 독성을 생물반응을 통해서 영향을 조사하여 해양생태계에 서식하는 다양한 생물에게 미치는 영향을 판단한다. 또한 시험생물의 생물반응으로 나타난 결과를 토대로 무영향농도 (No Observed Effective Concentration, NOEC)와 최소영향농도 (Lowest Observed Effective Concentration, LOEC)를 제시하여 중금속 농도개념의 화학적 평가방법의 기준치로 사용하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Hwang *et al.* 2012a, b).

해산 규조류 (*Skeletonema costatum*)는 해양생태계의 생산자를 대표하는 식물 플랑크톤으로 국제표준화기구 (ISO 1995)에서 시험생물로 인정하는 종이다. 인류가 바다로부터 섭취하는 수산생물의 대부분은 해양생태계 내에서 소비자 역할을 담당하고 있지만 이들 소비자의 먹이원을 담당하고 중금속과 같은 유해물질의 축적성 및 긴 반감기 등을 고려할 때 *S. costatum* 같은 생물의 중금속 영향을 평가하는 것은 인류의 보건과도 깊은 관계가 있을 것으로 판단된다. 본 연구는 *S. costatum*의 개체군 성장률에 미치는 중금속 (Cd, Cu, Zn)의 영향을 판단하고, 그 결과를 이용하여 자연생태계 내에서 *S. costatum*와 같은 식물플랑크톤에 대한 중금속의 안전 농도를 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험생물

실험에 이용된 식물플랑크톤인 해산규조류인 *S. costatum*은 한국해양미세조류은행 (Korean Marine Microalgae Culture Center, KMCC)에서 분양받아 항온실에서 3개월 이상 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

### 2. 시험액

실험에 사용한 중금속은 Cd (Cadmium Chloride, Sigma), Cu (Copper Nitrate Hydrate, Sigma) 및 Zn (Zinc Oxide, Sigma)이었다. *S. costatum*의 개체군 성장률에 미치는 중금속의 영향을 살펴보기 위하여 멸균된 자연해수를 이용하여 stock solution (1000 ppm)을 준비한 후, 희석하여 사용하였다. 중금속 농도별 실험 농도는 예비실험을 통하여 Cd (0, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 ppm), Cu (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 ppm), Zn (0, 0.31, 0.63, 1.25, 2.00, 2.50, 5.00 ppm) 농도구로 설정하였다.

### 3. 배양조건

50 mL 시험관에 시험용액을 각 농도별로 30 mL씩 분주하였으며, 시험농도는 대조구를 포함하여 6구간이며, 각 시험구별 3반복을 실시하였다. 지수성장기의 *S. costatum*을 각각의 시험용액에 세포농도 약 150,000 cell mL<sup>-1</sup> 정도를 접종한 후 f/2 영양 배지를 넣어주었다. 조도는 3,000~10,000 Lux, 배양온도는 20±1°C를 유지하면서

**Table 1.** Experimental culture condition using the population growth rate in the diatom, *S. costatum*

Test parameter	Condition
Culture type	Static non-renewal 96 h toxicity test
Photoperiod	Ambient light condition and 8L : 16D period
Light intensity	3000~10000 Lux
Temperature	20±1.0°C
Salinity	30±1.0 psu
pH	8.0±0.2
Chamber volume	50 mL test tube
Solution	Filter (0.45 µm) and sterilized seawater
Solution change	None
Test solution volume	30 mL
Culture medium	f/2
Initial cell density	150,000 cells mL <sup>-1</sup>
Experiment period	96 h
Acceptability criterion	>0.04 population growth rate by the hour
Test materials	Cd, Cu, Zn

실험을 실시하였으며, 그 이외의 실험 조건은 Table 1에 나타내었다. 24시간 간격으로 형광량 또는 세포밀도를 측정하였으며, 시험용기인 유리 시험관은 하루에 최소 2회 이상 흔들어 주면서 실험을 실시하였다. 실험시작 96시간 후 실험을 종료하고 최종 *S. costatum*의 농도를 측정하였다.

4. 개체군 성장률 측정

*S. costatum*의 개체군 성장률 측정은 fluorometer (Tuner Designs Model 10-AU, USA)를 이용하여 엽록소 양을 측정하였다. 식물플랑크톤의 개체군성장률 (specific population growth rate)은 형광량을 이용한 클로로필 농도를 회귀방정식 (형광량=세포밀도)을 이용하여 세포밀도로 환산한 후  $r=(\ln N_t - \ln N_0)/t$  ( $r$ =개체군성장률,  $N_t$ =실험종료 후의 세포밀도,  $N_0$ =초기세포밀도,  $t$ =배양시간)의 식으로 개체군 성장률을 계산하였다. 또한, 엽록소 농도와 세포밀도간의 회귀방정식을 구하기 위하여 (단순직선회귀-simple linear regression) 세포밀도는  $\log_{10}$ 으로, 형광량에 의한 엽록소 농도는 double square root 변형으로 자료를

정규 분포화 하였다. 본 실험에서 Cd을 96시간 노출시에 Cd 농도가 증가할수록 대조구에 비하여 세포밀도가 급격히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

5. 통계학적 분석

실험군의 유의성 검정은 Student's *t*-test로 하였으며 *P*가 0.05 이하인 것을 유의한 것으로 판단하였다. 독성실험에 대한 종말점은 probit 통계법을 이용하여 대조구의 개체군성장률에 대비하여 50%에 이르는 성장저해율 (50% population growth inhibition concentration,  $EC_{50}$ )과 95% 신뢰구간 (95% Confidence Limit, 95% CI)을 분석하였다. NOEC와 LOEC는 Dunnett's를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 중금속에 의한 해산규조류 개체군 성장률 (r)의 변동

Cd이 *S. costatum*의 개체군 성장률에 미치는 영향 실험

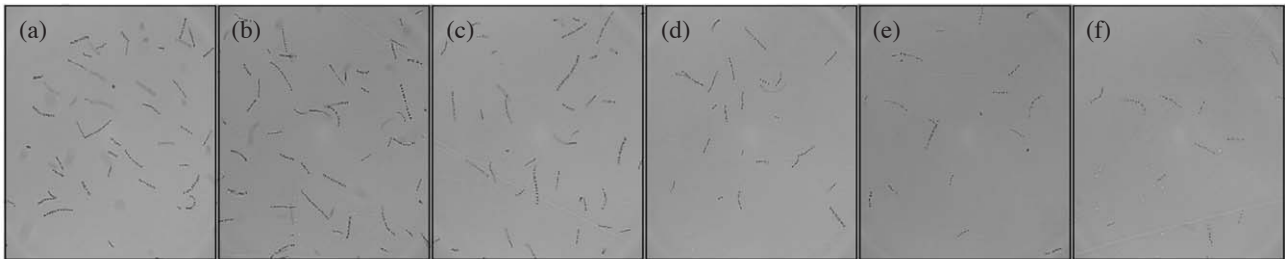


Fig. 1. Cell density of marine diatom, *S. costatum* in exposure to Cd for 96 h. a: control, b: 0.63 ppm, c: 1.25 ppm, d: 2.50 ppm, e: 5.00 ppm, f: 10.00 ppm

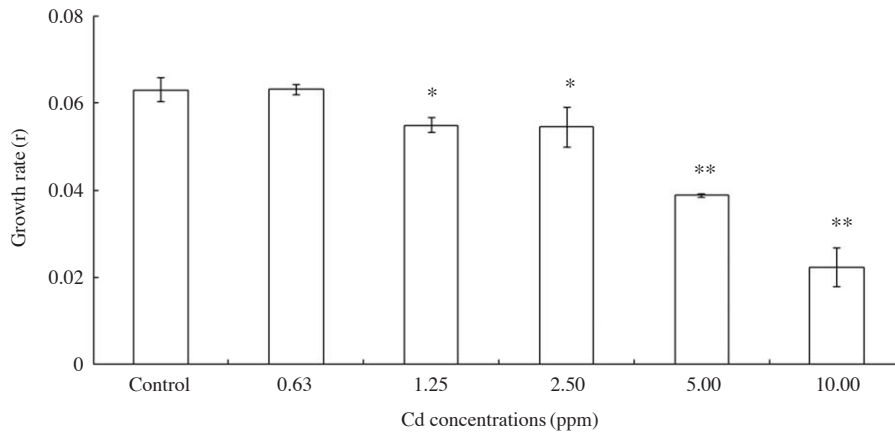
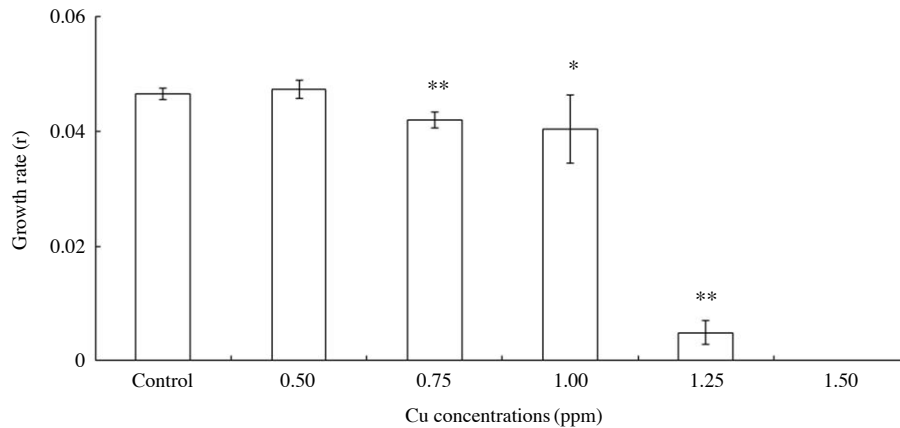
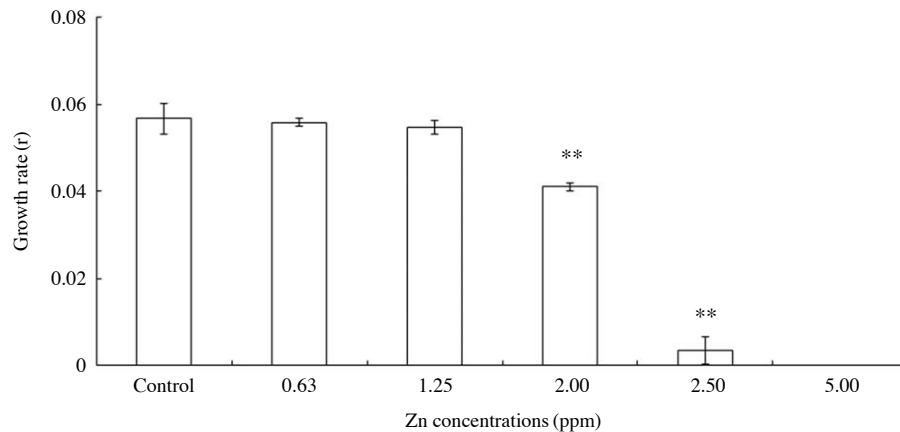


Fig. 2. Change of population growth rates in the *S. costatum* exposed to Cd. Vertical bars represent the means  $\pm$ SD for three times. \**P*<0.05 and \*\**P*<0.01 for control (not include Cd).



**Fig. 3.** Change of population growth rates in the *S. costatum* exposed to Cu. Vertical bars represent the means  $\pm$  SD for three times. \*\* $P < 0.01$  for control (not include Cu).



**Fig. 4.** Change of population growth rates in the *S. costatum* exposed to Zn. Vertical bars represent the means  $\pm$  SD for three times. \*\* $P < 0.01$  for control (not include Zn).

험은 각 농도별로 3회 반복 실시하였으며 Cd 농도가 증가할수록 세포밀도가 급격히 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 1). Cd 첨가하지 않은 대조구의 시간당 개체군 성장률( $r$ )은  $0.063 \pm 0.003$ 을 나타냈으며, 최소농도인 0.63 ppm에서  $r$  값은  $0.063 \pm 0.001$ 로 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았으나 Cd 농도가 증가할수록  $r$  값이 감소하는 경향을 나타내었다. 1.25 ppm의 Cd 농도에서 유의적인 차이를 나타내 최고농도인 10.00 ppm에서  $r$  값은  $0.022 \pm 0.005$ 로 대조구에 비해 65% 감소하였다 (Fig. 2).

Cu가 *S. costatum*의 개체군 성장률에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다.  $r$  값은 1.00 ppm까지는 대조구에 비해 큰 차이를 나타내지 않았으나, 1.25 ppm의 Cu 농도에서는 유의적으로 급격히 감소해 대조구에 비해 90%의 감소를 나타냈다. 최고농도인 1.50 ppm에서는  $r$  값이 관찰되지 않았다 (Fig. 3).

Zn이 *S. costatum*의 개체군 성장률에 미치는 영향을 살펴보았다 (Fig. 4). Zn을 첨가하지 않은 대조구에서  $r$  값은  $0.057 \pm 0.004$ 을 나타냈으며,  $r$  값은 Zn 농도 1.25 ppm까지 큰 변화를 나타내지 않았다. 하지만, Zn 농도 2.50 ppm에서  $r$  값은  $0.004 \pm 0.003$ 으로 급격히 감소해 대조구에 비해 95% 감소했으며 최고농도인 5.00 ppm에서는  $r$  값이 관찰되지 않았다 (Fig. 4).

## 2. 해산규조류 개체군 성장률 ( $r$ )을 이용한 중금속의 독성평가

*S. costatum*의  $r$ 은 중금속 농도가 증가할수록 반응이 급격히 증가하는 농도 의존적인 양상을 나타냈다 (Fig. 5). 농도반응 관계식은 표준 독성반응으로 잘 알려진 Sigmoid 형태를 나타내고 있으나, Cu의 경우는 농도반응

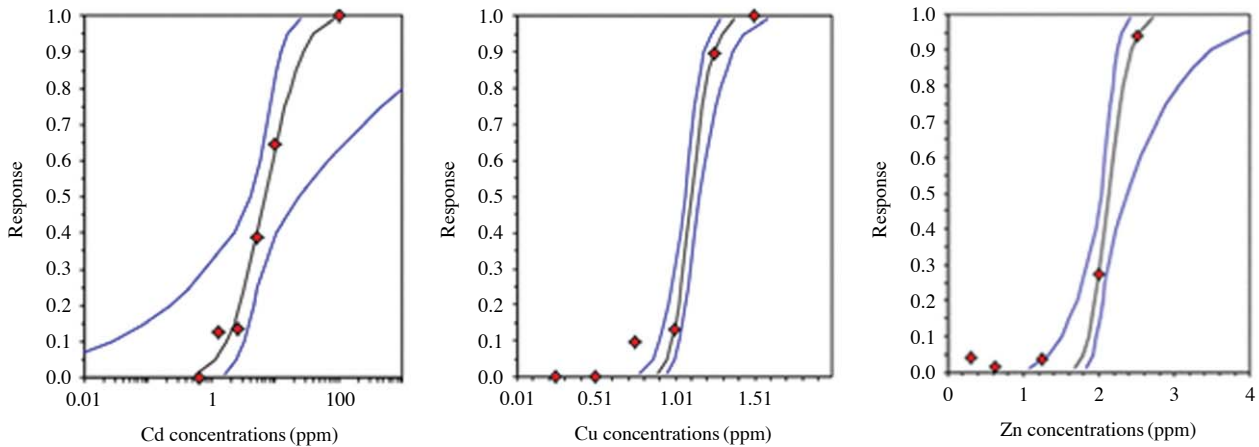


Fig. 5. Concentration-response by Cd, Cu and Zn treatment using the population growth rate of marine diatom, *S. costatum*.

Table 2. Toxicity evaluation using population growth rate in the *S. costatum* exposed to Cd, Cu and Zn

Items	Cd (ppm)	Cu (ppm)	Zn (ppm)
EC <sub>50</sub>	6.84	1.11	2.13
95% CI	4.10~22.95	1.06~1.17	2.03~2.37
NOEC	0.625	0.75	1.25
LOEC	1.25	1.00	2.00

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

관계가 Cd과 Zn에 비해 급격히 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

중금속(Cd, Cu, Zn)이 *S. costatum*의 r에 미치는 결과를 바탕으로 독성값을 제시하였는데 EC<sub>50</sub>과 95% CI는 probit 통계법을 이용하여 산출하였고, NOEC 및 LOEC 값은 Dunnett's를 이용하여 산출하였으며, 이들 값들은 Table 2에 나타났다.

Cd에 대한 *S. costatum*의 r의 EC<sub>50</sub>은 6.84 ppm을 나타냈고 EC<sub>50</sub>에 대한 95% CI는 4.10~22.95 ppm을 나타냈다. NOEC와 LOEC는 각각 0.63, 1.25 ppm을 나타냈다. Cu에 대한 EC<sub>50</sub>은 1.11 ppm을 나타냈으며 95% CI는 1.06~1.17 ppm을 나타냈고 NOEC와 LOEC는 각각 0.75, 1.00 ppm을 나타냈다. Zn에 대한 EC<sub>50</sub>은 2.13 ppm을 나타냈으며 95% CI는 2.03~2.37 ppm을 나타냈고 NOEC와 LOEC는 각각 1.25, 2.00 ppm을 나타냈다.

### 고찰

유해물질의 유입으로 인한 연안역의 오염이 심화되고 있어 연안역의 오염정도를 상시 평가하는 과정은 매우

중요하다. 오염정도를 평가하기 위하여 여러 가지 조사 방법이 개발되고 있다(Bidwell *et al.* 1998). 가장 광범위하게 이용되는 방법은 이·화학적 방법으로 특정 유해 물질을 정량하여 기준치와 비교하는 방법이다. 이러한 조사 방법은 해양에 존재하는 유해물질의 개별 정보를 제공한다는 점에서는 유용하다. 그러나 해양생태계에 서식하는 생물에게 미치는 영향을 직접적으로 판단하기 어려울 뿐만 아니라 모든 화학물질을 분석하는데 있어서는 분석기술의 부족으로 우리가 판단할 수 없는 유해물질에 대한 분석은 제한되어 있다. 또한, 연안역은 다양한 유해 물질이 공존하는 지역으로 이들 물질들 간의 화학적 상호작용에 의해 발생 가능한 독성의 상승(synergism), 부가(addition) 및 길항(antagonism) 작용에 대해서는 정확히 알 수 없다는 단점이 있다(Ahlf *et al.* 2002; Chu and Chow 2002). 이러한 이·화학적 방법의 단점을 보완하기 위하여 미국 환경보호청(USEPA) 등에서는 연안 역으로 유입되는 산업폐수와 도시하수에 대한 whole effluent test(WET)를 실시하기 위하여 생태독성 시험법이 활발하게 이용되고 있다. 우리나라의 경우도 산업폐수의 위해성을 평가하기 위하여 담수산 물벼룩(*Daphnia magna*)을 이용한 생태독성 시험법이 제도적으로 활용되고 있다. 그러나 연안역으로 유입되는 유해물질에 대한 생물의 생리반응을 이용한 독성의 평가는 최근에 활발하게 진행되고 있다(Lee *et al.* 2008).

*S. costatum*은 우리나라 전 연안 역에 분포하는 종으로 해양생태독성 평가 시 해양생태계의 생산자를 대표하는 시험생물 종이다(Rand and Petrocelli 1985; Burton 1992). 실내에서 연중 계대배양이 가능하여 시험생물을 상시 공급할 수 있다는 장점을 가지고 있으며, 세대교번이 빠르게 일어나 96시간 개체군성장률 변동 시험기간 동안 만

성독성까지 볼 수 있다는 장점이 있다(Rao and Mohan-chand 1990; ISO 1995; APHA *et al.* 1995; Weideborg *et al.* 1997). 본 결과에서도 *S. costatum*의 개체군성장률은 중금속 농도가 증가할수록 감소하여 농도의존성이 강하게 나타났으며 농도반응 관계식이 표준 독성반응로 잘 알려진 Sigmoid 형태를 나타내 중금속 생태독성 평가를 위한 적절한 시험생물로 사용이 가능한 것으로 생각된다.

본 연구결과에서 상대적 독성정도를 평가하기 위해 사용한 EC<sub>50</sub> 값을 이용하여 중금속 3종이 *S. costatum*의 개체군 성장률에 미치는 영향을 살펴보면 Cu>Zn>Cd의 순으로 독성 영향이 나타나는 것을 알 수 있다. Cu와 Zn의 경우는 필수 미량원소 잘 알려진 금속임으로 상대적으로 생물에게 불필요한 Cd이 독성이 가장 강할 것으로 판단했으나, 본 연구결과에서는 Cu와 Zn이 높게 나타났다. 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 수정란의 부화율을 이용한 결과도 본 연구결과와 유사하게 Cu와 Zn이 Cd보다도 독성이 큰 것으로 나타났다(Hwang *et al.* 2012a). EC<sub>50</sub>의 결과를 바탕으로 중금속에 대한 말뚝성게 (*Hemicecentrotus pulcherrimus*)의 초기 배아 발생에 미치는 독성의 영향 정도는 Cu>As>Zn>Pb>Cr>Co>Cd 순서로 나타났다(Hwang *et al.* 2013). 아므로불가사리 (*Asterias amurensis*)의 경우는 Hg>Cu>Zn>Cd>Ni 순서로 독성의 영향을 나타냈으며, 별불가사리 (*Asterias pectinifera*)는 Cu>Hg>Zn>Cr>Ni 순서로 독성의 정도를 보고하였다(Yu 1998). EC<sub>50</sub>의 결과를 통해 조사한 중금속의 독성 정도는 생물종에 따라 민감도와 상대적 독성 영향은 차이가 있는 것으로 판단된다. 또한 시험 생물종에 따른 노출시기와 같은 표준화된 시험방법도 고려해야 할 것이다. 본 연구결과와 유사하게 대부분의 연구결과에서 생체내의 필수 미량금속원소로 잘 알려진 Cu와 Zn이 상대적으로 독성의 정도가 높게 나타나는 원인으로 Cu와 Zn 같은 필수 미량원소는 체내 수용체가 존재해서 Cd보다도 흡수율이 높을 것으로 생각된다. 그러나 추후 Cu와 Zn의 정확한 독성영향 기작을 알기위해서는 좀 더 구체적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구결과를 활용한 통계분석에 의한 LOEC에 의하면 Cd의 경우는 1.25, Cu와 Zn은 각각 1.00와 2.00 ppm을 초과할 경우에 자연 생태계 내에서 식물플랑크톤인 *S. costatum*의 개체군 성장률은 억제될 것으로 판단된다. 본 연구결과는 해양생태계 내에서 생산자 역할을 담당하고 있는 식물플랑크톤을 대상으로 이루어진 생태독성 연구로 향후 해양으로 유입 가능한 환경 유해물질에 대한 위해성 평가 시에 시험생물로 유용하게 활용될 것으로 생각된다.

## 적 요

해산규조류 *Skeletonema costatum*의 개체군성장률(r)을 사용하여 중금속 3종(Cd, Cu, Zn)의 독성영향 평가를 수행하였다. *S. costatum*을 Cd (0, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 ppm), Cu (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 ppm) 그리고 Zn (0, 0.31, 0.63, 1.25, 2.00, 2.50, 5.00 ppm)에 노출하고 96 h 이후에 r 값을 도출하였다. 대조구(Cd, Cu 그리고 Zn을 포함하지 않은)에서 r은 0.05보다 높았으며 중금속 농도가 증가할수록 r은 감소하였다. 중금속에 의해 농도의존적으로 r이 감소되었고 Cd 농도 1.25, Cu 농도 1.25 그리고 Zn 농도 2.50 ppm 이상의 농도에서 명확한 감소를 나타냈다. 중금속의 독성영향은 Cu>Zn>Cd 순서이며, 이때 EC<sub>50</sub> 값은 각각 1.11, 2.13 그리고 6.84 ppm으로 나타났다. 중금속 3종(Cd, Cu 그리고 Zn)에 노출된 r의 최소영향농도는 각각 1.25, 1.00, 2.00 ppm으로 나타났다. 이 결과를 바탕으로, 해양환경에서 *S. costatum*의 r은 Cd 농도가 1.25 ppm 이상, Cu 농도가 1.00 ppm 이상, Zn 농도가 2.00 ppm 이상인 경우에 독성영향을 받았다. 그러므로 *S. costatum*의 r은 해양환경에서 중금속 독성영향 평가를 위한 매우 유용한 방법으로 판단된다.

## 사 사

본 연구는 2014년도 국립수산과학원 경상과제 연구비 지원으로 국립수산과학원 서해수산연구소 해양생태위해평가센터에서 수행하였다.

## REFERENCES

- Ahlf W, H Hollert, H Neumann-Hensel and M Ricking. 2002. A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality: A german approach based on ecotoxicological and chemical measurements. *J. Soil. Sediment.* 2:37-42.
- 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, pp.1-47.
- Atici T, S Ahiska, A Altindag and D Aydin. 2008. Ecological effects of some heavy metals (Cd, Pb, Hg, Cr) pollution of phytoplanktonic algae and zooplanktonic organisms in Sariyay Dam Reservoir in Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 7:1972-1977.
- Bidwell JR, KW Wheeler and TR Burrigge. 1998. Toxicant

- effects on the zoospore stage of the marine macroalga *Ecklonia radiata*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 163:259-265.
- Burton GA. 1992. Sediment Toxicity Assessment. Lewis Publishers Inc., Chelsea. pp.457.
- Chu KW and KL Chow. 2002. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. Aquat. Toxicol. 61:53-64.
- DeForest DK, KV Brix and WJ Adams. 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: the inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. Aquat. Toxicol. 84:236-246.
- Han TJ, YS Han, GS Park and SM Lee. 2008. Development marine ecotoxicological standard methods for *Ulva* sporulation test. Kor. J. Soc. Ocean. 13:121-128.
- Hwang UK, CW Rhee, 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. 2009. 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, HM Ryu, SG Kim, SY Park and HS Kang. 2012a. Acute toxicity of heavy metal (Cd, Cu, Zn) on the hatching rates of fertilized eggs in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Korean J. Environ. Biol. 30:136-142.
- Hwang UK, JS Park, JN Kwon, S Heo, Y Oshima and HS Kang. 2012b. Effect of nickel on embryo development and expression of metallothionein gene in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 57:145-149.
- Hwang UK, HM Ryu, J Yu and HS Kang. 2013. Toxic effects of arsenic and chromium on the fertilization and embryo development rates in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). Korean J. Environ. Biol. 31:69-77.
- ISO. 1995. Water quality-marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricoratum*. The International Organization for Standardization. ISO 10253. pp.7.
- Lee JS, SM Lee and GS Park. 2008. Development of sediment toxicity test protocols using korea indigenous marine growth inhibition of marine phytoplankton. Kor. J. Soc. Ocean. 13:147-155.
- Lundebye AK, MHG Berntssen, SE Wendelar and A Maage. 1999. Biochemical and physiological responses in atlantic salmon (*Salmo salar*) following dietary exposure to copper and cadmium. Mar. Poll. Bull. 39:137-144.
- Maage A, H Sveir and K Julshamn. 1989. A comparison of growth rate and trace element accumulation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry four different commercial diets. Aquaculture 79:267-273.
- McGeer JC, C Szebedinszky, DG McDonald and CM Wood. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. Aquat. Toxicol. 50:231-243.
- Novelli ELB, AM Lopes, ASE Rodrigues, BO Ribas. 1999. Superoxide redical and nephrotoxic effect of cadmium exposure. International J. Environ. Heal. Res. 9:109-116.
- Rand GM and SR Petrocelli. 1985. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publishing Corporation, Washington. pp.666.
- Rao MU and V Mohanchand. 1990. Toxicity of zinc smelter wastes to some marine diatoms. Indian J. Mar. Sci. 19:181-186.
- Reiley MC. 2007. Science, policy and trends of metals risk assessment at EPA: how understanding metals bioavailability has changed metals risk assessment at USEPA. Aquat. Toxicol. 84:292-298.
- Viarengo A. 1985. Biochemical effects of trace metals. Mar. Pollut. Bull. 16:153-158.
- Weideborg M, EA Vik, GD 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.
- Yu CM. 1998. A study on the effect of heavy metals on early embryos development of starfish, Kor. J. Environ. Biol. 16:151-156.

Received: 13 June 2014

Revised: 11 September 2014

Revision accepted: 12 September 2014