

중금속 오염에 따른 부착규조 (*Ulnaria ulna*)의 성장 및 형태 변화

신라영^{1a} · 류희성² · 이정호^{1b,†}

¹대구대학교 생물교육전공 · ²국립환경과학원 영산강물환경연구소

Abnormalities of Growth and Morphology in the Attached Diatoms (*Ulnaria ulna*) according to Heavy Metal Pollution

Ra-Young Shin^{1a} · Hui-Seong Ryu² · Jung-Ho Lee^{1b,†}

¹Department of Biology Education, Daegu University

²Yeongsan River Environment Research Center, National Institute of Environmental Research

(Received 10 September 2020, Revised 30 November 2020, Accepted 30 November 2020)

Abstract

The abnormal responses on growth and morphology of attached diatoms by various heavy metals were studied. *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compère was employed as experimental species and exposed to the five heavy metals such as Cu, Zn, Pb, Cd, and As with four concentrations (0, 0.01, 0.1, and 2 mg L⁻¹), respectively. The samples of *Ulnaria ulna* were examined on the changes of cell growth and teratological forms on the 7th, 14th, 21th, and 28th day, respectively, after exposure to the heavy metals. The samples exposed to the highest concentration, 2.0 mg L⁻¹, of all the heavy metals showed the most obvious decreases of growth. The samples exposed to Cd ($\mu=0.049\text{day}^{-1}$) and As ($\mu=0.048\text{day}^{-1}$) showed the highest decreasing rate of growth ($p=0.021(\text{Cd})$, $p=0.002(\text{As})$) and the highest morphological changes of diatom valves were also samples exposed to Cd (10.41%) and As (10.13%) ($p=0.009(\text{Cd})$, $p=0.005(\text{As})$). In contrast, Pb induced the lowest decreasing rate ($\mu=0.090\text{day}^{-1}$) and the least change in valve morphology (3.31%). The Cd and As showed relatively stronger effects on growth rates compared to Cu, Zn, and Pb. For the percentage of emergence of morphological species by the type, the highest percentage were observed in sampled exposed to type 1 (43.4%) and followed by type 2 (29.1%). The type 2 and 4 were most abundant in samples exposed to Zn and Pb while the type 3 was most abundant in Cd and As. The Cu induced only type 1, suggesting that the frequency of emergence of each type varied among heavy metals. This research suggests that the degrees of abnormal changes on growth rate and valve morphology of *Ulnaria ulna* can be used as a bioindicator species for heavy metal contamination in freshwater.

Key words : Abnormal changes, Attached diatom, Biological monitoring, Heavy metal contamination, Teratological valve forms

^{1a} 박사과정(Ph.D. Student), shinry0515@gamil.com, <https://orcid.org/0000-0001-8248-0463>

² 환경연구사(Researcher), huistar715@korea.kr, <https://orcid.org/0000-0002-8850-3838>

^{1b,†} Corresponding author, 교수(Professor), jungho@daegu.ac.kr, <https://orcid.org/0000-0002-1426-4555>

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

도시화 및 산업화의 발달로 인해 수체로 유입되는 중금속의 종류와 양은 점차 증가하고 있으며, 이로 인해 중금속 오염에 대한 수질 모니터링의 필요성은 더욱 증대되고 있다 (Panday et al., 2014; Woo et al., 2012). 국내에서 수행 중인 중금속 수질 모니터링은 대부분 이화학적 분석방법을 통해 정성적·정량적 분석을 실시하고 있다 (Ri, 2000). 그러나 이러한 분석 방법은 검량한계 이하의 농도가 수체에 존재하는 경우, 검출하지 못하는 한계가 있으며, 극미량의 중금속에 의한 생물농축 가능성 및 생태계 영향을 파악할 수 없다 (Woo et al., 2012).

부착규조는 어류 및 저서무척추동물 등 타 생물분류군과 비교하여 생활주기가 짧고, 수체 내 빈번히 출현하며, 이동성이 적어 전 생활사 동안 장기간에 걸친 수환경의 변화를 잘 반영하는 이점이 있어 수생태계를 평가하는 생물지표로서 좋은 재료가 된다 (Choi et al., 2015; Larned, 2010). 또한 타 생물군에 비해 중금속 오염에 대한 민감성이 높아 미량의 농도에도 피각의 형태 변이가 쉽게 발생하는 것으로 알려져 있어 (Cantonati et al., 2014; Falasco et al., 2009) 최근 중금속 오염에 대해 생물분류군을 이용한 생물학적 모니터링 방법이 검토되고 있으며 (Kim and Yun, 2010; Lee and Ko, 2001; Panday et al., 2014; Zhou et al., 2008), 그 중 부착규조의 형태적 변이를 이용하는 방안이 새롭게 제기되고 있다 (Morin et al., 2012).

본 연구에 사용된 *Ulnaria* 속 (Genus *Ulnaria* (Kutzing) Compère)은 국내 수계에서 가장 빈번하게 출현하는 규조 분류군으로, 중금속에 대해 높은 민감도를 지니고 있을 뿐만 아니라 (Duong et al., 2008; Lavoie et al., 2012; Morin et al., 2008), 특히 중금속 농도의 증가에 따라 형태 변이가 뚜렷하게 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Jonge et al., 2008; Shin et al., 2017; Silva et al., 2009).

본 연구에서는 *Ulnaria ulna*의 배양실험을 통하여 부착규조의 성장 및 형태 변이율에 미치는 중금속의 영향을 조사하였으며, 그 결과를 바탕으로 국내 수생태계의 중금속 오염에 대한 생물학적 모니터링의 지표로써 부착규조의 형태 및 성장 변화율의 활용 가능성을 타진하고자 하였다.

2. Material and Methods

2.1 실험 균주 분리 및 배양

연구에 사용된 균주 *Ulnaria ulna*는 2017년 3월 금호강 대부 잠수교 지점 (N 35° 53' 50.8", E 128° 48' 5.6")에서 채수하여 순수 분리하였다. 균주의 동정은 Krammer and Lange-Bertalot (1986; 1988; 1991a; 1991b)와 Lange-Bertalot and Compère (2001)를 이용하였다. 분리된 종들은 100 mL의 DM medium (Beakes et al., 1988)이 각각 담긴 250 mL Erlenmeyer flask에서 20±2°C의 온도와 120 μm m⁻² s⁻¹ (LI-250 Light Meter, LI-COR. U.S.A)의 광량, 18h^L:6h^D의 광주기를 지속적으로 유지하며 진탕배양기 (Hanbaek, HB-

201SLI)에서 반연속 회분식 배양방식으로 전배양 (pre-culture) 하였다.

2.2 중금속에 따른 *Ulnaria ulna*의 성장률 조사

시험 물질로는 수계 유해물질 중 인간이나 동식물에게 직접 또는 간접적인 영향을 미치는 물질로 지정된 28종의 특정 수질유해물질 중의 중금속 4종 (Cu, Cd, Pb, As)과 각종 화학산업에서 높은 사용량을 보이며 인간이나 동식물에게 미치는 독성영향정도 등의 고려사항에서 높은 우선순위를 보이는 중금속 1종 (Zn)을 추가하여 총 5종의 중금속을 선정하였다.

실험에 사용된 중금속은 납 (PbCl₂, Sigma-Aldrich Co., LLC., USA), 카드뮴 (CdCl₂, Sigma-Aldrich Co., LLC., USA), 아연 (ZnCl₂, Sigma-Aldrich Co., LLC., USA), 비소 (AsNaO₂, Sigma-Aldrich Co., LLC., USA), 구리 (CuCl₂·2H₂O, Sigma-Aldrich Co., LLC., USA)이었다. 중금속의 주입 농도는 낙동강 수계 내 위치한 산단 하천의 2016년 현장 조건을 고려하여 0 (대조구), 0.01, 0.1, 2 mg L⁻¹로 설정하였다 (ME, 2017).

약제는 증류수에 중금속을 용해시킨 표준용액 (1,000 ppm)을 준비한 후, 희석해서 사용하였다. 250 mL Erlenmeyer flask에 멸균된 DM medium 200 mL를 주입한 후, 설정된 농도 별로 각 중금속을 첨가하여 1 시간 동안 안정화시켰다. 배양액에서 배양된 지수성장기의 *Ulnaria ulna*를 각 flask에 세포 농도 약 4.5 × 10³ cell mL⁻¹로 접종하였다. 접종 후 앞서 설명한 배양조건을 동일하게 유지하며 실험을 진행하였으며, 7 일, 14 일, 21 일, 28 일 간격으로 1 mL씩 채수하여 3회 계수하였고, 시간에 따른 각 실험군별 *Ulnaria ulna*의 성장률 (μ)은 아래의 식과 같이 계산하였다 (APHA, 2005).

$$\mu (d^{-1}) = \ln (X_2/X_1)/(T_2-T_1)$$

X₁: 초기 세포밀도 (cells mL⁻¹)

X₂: T₂ 시간 경과 후 세포밀도 (cells mL⁻¹)

(T₂-T₁): 배양실험 경과 시간 (day)

2.3 중금속에 따른 *Ulnaria ulna*의 형태 변이도 조사

*Ulnaria ulna*의 형태 변이종 조사는 앞서 설명한 배양조건을 유지하며, 7 일, 14 일, 21 일, 28 일 후 각 flask 마다 40 mL씩 채수하여 영구 표본을 제작하였다. 시료의 세정은 KMnO₄ 법 (Hendey, 1974)을 사용하였고, Pleurax로 봉입하였다. 제작된 슬라이드는 Nikon Eclipse 80i 광학 현미경으로 400~1000 배하에서 관찰하였고, 100~500 개체 당 출현한 형태 변이종을 계수하여 출현빈도를 구하였다. 또한 Falasco et al. (2009)의 연구를 참고하여 출현한 형태 변이종을 다음과 같은 4 가지 유형으로 나누어 그 출현 빈도를 조사하였으며, Nikon DS-5M 디지털 카메라로 촬영하였다.

유형 1 : 뚜껑 (valve)의 비정상적인 외형

유형 2 : 점무늬열 (striations)의 불균일한 분포 및 불규칙인 분지

유형 3 : 세로축역 (longitudinal area)의 변이

유형 4 (복합형) : 단일 피각 (frustules) 내 두 개 이상의 유형이 존재

2.4 통계분석

실험군간 각 분석항목의 차이에 대한 통계적 유의성을 검증하기 위하여 일원분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였으며, 실험군간 차이는 Tukey's HSD test를 사용하여 사후검정 하였고, 유의 수준은 P<0.05를 기준으로 하였다 (SPSS Inc., v. 18.0).

3. Results and Discussion

3.1 중금속에 따른 *Ulnaria ulna*의 성장 변화

조사 기간 동안 모든 샘플에서 *Ulnaria ulna*의 세포밀도는 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 0 → 14일까지는 개체 밀도가 4,500~최대 17,600 cells mL⁻¹의 범위로 그 증가폭이 적었던 반면, 14 → 28일까지는 17,600~최대 81,700 cells mL⁻¹의 범위로 이전에 비해 대폭 증가한 것으로 나타났다 (Fig. 1). 개체 밀도는 또한 대조군과 실험군 사이에서도 큰 차이를 보였는데, 대조군 (중금속 주입 농도 0 mg L⁻¹)의 개체 밀도는 평균 30,668 cells mL⁻¹이었던 반면, 실험군 (중금속의 주입 농도 0.01, 0.1, 2mg L⁻¹)의 개체 밀도는 평균 19,785 cells mL⁻¹로 조사되어 대조군에 비해 크게 감소한 것으로 나타났다. 특히 카드뮴 (Cd)과 비소 (As)의 경우, 대조군에서 각각 평균 30,880 cells mL⁻¹와 29,640 cells mL⁻¹의

개체 밀도를 보였으나, 최대 농도 2 mg L⁻¹에서는 각각 평균 21,700 cells mL⁻¹와 10,680 cells mL⁻¹의 개체 밀도를 보여 타 중금속에 비해 가장 큰 폭으로 감소하였다. 이렇듯 중금속을 주입하지 않은 대조군에 비해 중금속을 주입한 실험군의 개체 밀도가 낮게 조사된 것은 중금속 유입이 부착규조의 생육에 생물학적 스트레스 요인으로 작용하여 개체군의 성장을 저해한 것으로 판단된다 (Cantonati et al., 2014; Duong et al., 2010; Luis et al., 2011).

*Ulnaria ulna*의 성장률은 중금속의 종류에 따라 차이를 보이는 것으로 나타났다 (Table 1). 카드뮴 (Cd)과 비소 (As)의 경우, 최대 농도 2 mg L⁻¹에서 각각 0.049 day⁻¹와 0.048 day⁻¹의 성장률을 보이며 타 중금속에 비해 대조군 ($\mu=0.099$ day⁻¹(Cd), $\mu=0.097$ day⁻¹(As))에 비하여 가장 큰 폭으로 감소하였다. 이 두 중금속은 통계적으로도 농도와 개체군 성장률간의 유의미한 차이를 보이는 것으로 나타났으며 (p=0.021(Cd), p=0.002(As)), 사후분석 결과 또한 대조군과 2 mg L⁻¹ 농도 사이에 통계적으로 뚜렷하게 구분되는 특징을 보였다. 구리 (Cu)와 아연 (Zn)의 경우, 최대 농도 2 mg L⁻¹에서 각각 0.073 day⁻¹, 0.069 day⁻¹의 성장률을 보이며 대조군 ($\mu=0.100$ day⁻¹)에 비해 소폭 감소하는 경향을 나타냈다. 납 (Pb)은 2 mg/L의 농도에서 0.090 day⁻¹의 성장률을 보이며 타 중금속과 비교하여 대조군 ($\mu=0.102$ day⁻¹)에 비해 극히 낮은 감소를 보였다. 규조류의 성장에 요구되는 필수 중금속 (Fe, Zn 및 Cu)등은 개체 성장, 광합성 및 호흡 과정을 위해 규조류에 흡수되어 사용된다. 하지만 규조류인 *Thalassiosira*

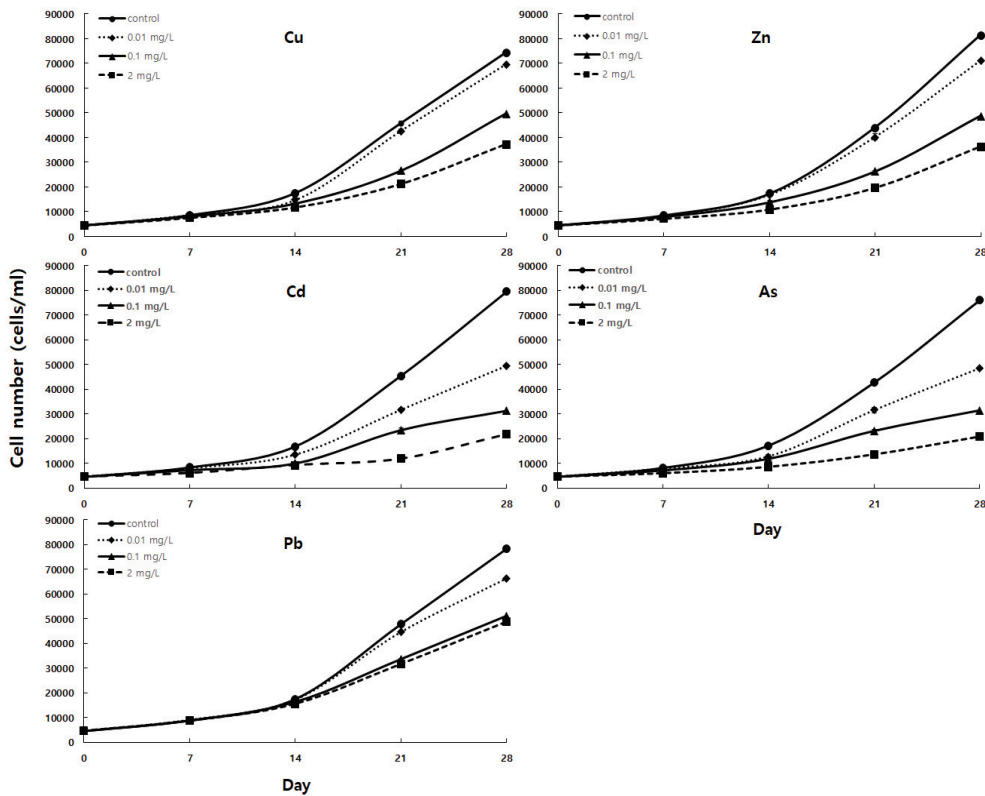


Fig. 1. Change of the cell growth in the *Ulnaria ulna* in situ on heavy metal injection concentrations. Results shown are the means of three replicates.

Table 1. Cell growth rate (day⁻¹) according to injection concentration the heavy metal

| | Concentration (mg/L) | | | |
|----|----------------------|-------|-------|-------|
| | 0 (control) | 0.01 | 0.1 | 2 |
| Cu | 0.100 | 0.096 | 0.083 | 0.073 |
| Zn | 0.100 | 0.096 | 0.082 | 0.069 |
| Pb | 0.102 | 0.099 | 0.092 | 0.090 |
| Cd | 0.099 | 0.084 | 0.068 | 0.049 |
| As | 0.097 | 0.083 | 0.070 | 0.048 |

*weissflogii*가 0.065 µg L⁻¹ 이상의 Zn 농도에서부터 성장에 영향을 받는다는 보고에서와 같이 (Anderson et al., 1978), 조류 성장을 위한 필수 중금속 농도의 최적 범위는 일반적으로 낮다 (Filippis and Pallaghy, 1994; George, 1990; Martin and Coughtrey, 1982). 따라서 중금속은 극히 미량일지라도 부착규조의 물질대사를 방해하여 성장 저해를 유발할 수 있으며, 비필수 중금속 (Hg, Cd, Pb, As 등)이 필수 중금속에 비해 더 낮은 농도에서도 부착규조의 성장에 영향을 미친다 (Morin, 2003). 특히 Cd와 As는 미량일지라도 생물체 내로 유입될 경우 다른 오염물질에 비해 상대적으로 긴 반감기를 가지며 (Phillips, 1980; Phillips and Segar, 1986), 효소에 필요한 필수 금속군 대신 결합하여 효소의 활성 저해 및 생리적 장애를 유발한다 (Simkiss et al., 1982).

Hwang et al. (2014)는 해산 규조류 (*Skeletonema costatum*)의 성장에 중금속 (Cd, Cu, Zn)이 미치는 영향에 대해 분석하였으며, 중금속 농도의 증가에 따라 세포밀도가 유의미하게 감소함을 밝혔다. 그러나 각 중금속에 따른 규조류 성장에 대한 영향은 본 연구와 차이를 보였으며, 특히 Cd와 As에 의해 가장 큰 영향을 받는 *Ulnaria ulna*와 달리, *S. costatum*는 Cu와 Zn에 의해 가장 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 이는 개체군별 중금속의 특이성에 의한 결과로 판단되며, 향후 추가연구를 통해 중금속별 지표종을 선정하는 주요한 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

3.2. 중금속에 따른 *Ulnaria ulna* 형태 변이종의 출현 양상

조사 시기별 *Ulnaria ulna*의 형태 변이율을 살펴본 결과, 시간의 경과에 따라 형태 변이종의 출현 비율이 증가하는 것으로 나타났다. 조사 시기별 형태 변이율은 28일째 가장 증가한 Pb를 제외하고 나머지 4 종류의 중금속은 모두 21일째 그 증가폭이 가장 큰 것으로 조사되었다.

본 연구에서는 중금속이 규조 피각의 형태적 변이를 야기하는 요인으로 작용하였으며, 중금속의 종류에 따라 그 형태 변이율에 뚜렷한 차이를 보였다. 또한 통계적으로도 Pb를 제외한 4개 중금속에서 형태 변이종의 농도별 출현비율에 유의미한 차이가 있는 것으로 나타났다. 가장 큰 형태 변이율을 보인 중금속은 As와 Cd이었으며, 다음으로 Zn, Cu, Pb 순이었다 (Table 2). Cd와 As의 경우, 0.01 mg L⁻¹의 농도에서 *Ulnaria ulna*의 형태 변이율이 각각 평균 2.46%와 2.16%

%이었으며, 0.1 mg L⁻¹의 농도에서는 평균 5.11%와 5.28%, 2 mg L⁻¹의 농도에서는 10.41%와 10.13%로 각각 조사되어 주입 농도가 높을수록 형태 변이율이 대폭 증가하는 것으로 나타났다 (p=0.005(As), p=0.009(Cd)). Zn과 Cu, Pb은 0.01 mg L⁻¹의 농도에서 각각 평균 1.74%, 0.62%, 0.15% 순으로 나타났으며, 0.1 mg L⁻¹의 농도에서 3.28%, 1.84%, 0.88% 순으로, 최대 농도인 2 mg L⁻¹에서 6.94%, 5.67%, 3.31% 순으로 나타났다. 이를 통해 Cd와 As가 Zn, Cu, Pb과 비교하여 부착규조의 형태 변이를 유발하는데 더 큰 영향을 미치는 것으로 판단되었다. Morin et al. (2008)은 0.1 mg L⁻¹ 이상의 Cd 농도에서부터 부착조류의 형태 변이종이 출현하였다고 보고하였으나, 본 연구에서는 Cd와 As의 경우 선행연구에서 보다 더 낮은 농도인 0.01 mg L⁻¹ 농도에서 1% 이상의 형태 변이율을 보였다. Zn과 Cu 역시 농도에 따라 출현한 형태 변이종이 점차 증가하였는데 (p=0.025(Zn), p=0.016(Cu)), 1% 이상의 형태 변이율을 보인 농도는 Zn의 경우, 0.01 mg L⁻¹(1.74%), Cu는 0.1 mg L⁻¹(1.84%)이었다. Cattaneo et al. (2004)는 2 mg L⁻¹ 이상의 Cu 농도에서 부터 *Ulnaria tenera*의 형태 변이종이 관찰되었다고 언급하여 본 연구 결과와 차이를 보였다. Pb의 경우, 최고 농도인 2 mg L⁻¹에서 평균 3.31%의 형태 변이율을 보이며 타 중금속에 비해 그 변화폭이 가장 작은 것으로 조사되었다. Pandey et al. (2014)는 부착규조의 형태 변이율과 Cu 및 Zn 농도 간에 통계적으로 유

Table 2. Relative abundance (%) of the abnormal frustules according to injection concentration the heavy metal

| | Day | Concentration (mg/L) | | | |
|----|-----|----------------------|------|------|-------|
| | | 0 (control) | 0.01 | 0.1 | 2 |
| Cu | 7 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 14 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.90 |
| | 21 | 0.00 | 0.00 | 0.61 | 3.78 |
| | 28 | 0.00 | 0.00 | 1.38 | 4.52 |
| Zn | 7 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 14 | 0.00 | 0.00 | 0.83 | 1.83 |
| | 21 | 0.00 | 0.00 | 1.87 | 4.18 |
| | 28 | 0.02 | 0.09 | 2.24 | 4.56 |
| Pb | 7 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 14 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.43 |
| | 21 | 0.00 | 0.00 | 0.33 | 1.72 |
| | 28 | 0.00 | 0.08 | 0.86 | 3.35 |
| Cd | 7 | 0.00 | 0.08 | 1.71 | 2.40 |
| | 14 | 0.00 | 0.71 | 3.17 | 4.63 |
| | 21 | 0.00 | 1.53 | 4.98 | 11.86 |
| | 28 | 0.02 | 2.09 | 6.96 | 13.16 |
| As | 7 | 0.00 | 0.00 | 1.69 | 2.86 |
| | 14 | 0.00 | 0.64 | 2.96 | 5.16 |
| | 21 | 0.00 | 1.63 | 5.41 | 10.50 |
| | 28 | 0.01 | 2.03 | 7.41 | 12.52 |

의미한 양의 상관성을 보여 주었으나 Pb에 노출된 경우에는 상관성이 낮은 것으로 보고하였으며, 이는 Cu와 Zn에 비해 Pb이 기질로부터 매우 느리게 용해되기 때문일 것이라 하였다. Rai et al. (1981)는 Cu와 Zn이 부착생물 군집에 상당한 영향을 미치지만 Pb은 그에 비해 생물 군집에 독성이 낮다고 언급하였다. 본 연구에서도 Pb은 다른 4개의 중금속에 비해 형태 변이율이 가장 낮게 조사되어 부착규조의 성장에 비교적 영향이 적은 중금속일 것으로 판단되었다 (Fig. 2). 이러한 중금속의 노출과 관련된 형태 변이종의 출현 이외에 다양한 환경 조건의 변화에 따른 보고들도 있었다. Antoine and Benson-Evans (1984)에 따르면 낮은 유속과 흐름 상태, 가뭄 조건, 높은 조도 및 수온이 규조류 피각의 형태적 변이와 밀접한 관련이 있으며, 주로 비정상적인 피각 외형과 불규칙한 점무늬열 패턴을 보였다고 하였다. Barber and Carter (1981)은 규조류가 성장하는데 낮거나 높은 pH 조건이 피각의 형태적 변이를 유발하며, 이는 *Fragilaria virescens* (매우 낮은 pH 조건, 3)와 *Nitzschia sinuata* (높은 pH 조건, 8.5)에서 나타났다고 보고하였다. Aleem (1950)은 염분 농도가 높은 연안에서 *Navicula cryptocephala*, *Synedra tabulate* 및 *S. hyperborea*의 피각 비대칭 및 뒤틀림을 보였다고 하였으며, Stoermer and Andresen (2006)은 염분이 높은 조건에서 *Tabularia* 속의 피각 비대칭 및 비정상적인 점무늬열 패턴, 불규칙한 가장자리를 보였다고 하였다. Feldt et al. (1973)은 시안화물, 다환 방향족 탄화수소 (PAH) 및 농약과 같은 독성 화합물이 피각의 형태적 변이를 유발한다고 하였으며, Szabo et al. (2005)는 헝가리 티사강 (Tisza River)에서 2000년 2월과 이른 봄에 많은 양의 시안화물과 중금속에 의해 심하게 오염되었는데, 이 때 *Cyclotella atomus*, *C. meneghiniana*와 *C. pseudostelligera*에서 비정상적인 피각 외형을 보였고, 주로 점무늬열 패턴이 정상 세포와 달랐다고 하였다. Falasco et al. (2009)은 실험실의 인공 조건에서 장시간 배양된 규조류 세포에서 형태적 변이를 일으킨 피각이 종종 발견되었다고 하였다. 실험실의 비 자연적 성장 조건이 조류 세포에 대한 스트레스를 나타낼 수 있으며, 주로 세포 성장에 영향을 미치는 변수는 부적합한 배지 (Hostetter and Rutherford, 1976; Schmid, 1975, 1979) 또는 삼투압 스트레스 (Schmid, 1979, 1980, 1984; Schultz, 1971), 장시간 노출에 따른 과일집 (McMillan and Johansen, 1988) 등이 형태 변이를 일으킬 수 있다고 하였다. 본 연구의 몇몇 대조군 시료에서도 형태 변이종이 출현하였는데 이는 이전 연구들에서 보고된 대조군의 형태 변이율 범위에 속하였다 (Arini et al., 2012; Duong et al., 2008). 대조군에서 관찰된 세포의 변이율은 0.01 - 0.02 %로 낮은 값을 보였으며, 4 주치의 시료에서 모두 관찰되었다. 대조군에 출현한 형태 변이종이 모두 4 주치의 시료에서 관찰된 점을 미루어 볼 때 장시간에 걸친 배양이 영향을 미친 것으로 판단되었다.

결과적으로 본 연구를 통해 중금속의 농도와 부착규조 형태 변이종의 출현비율에 간에 유의미한 상관관계가 있었으며, 중금속의 주입 농도가 높을수록 형태 변이율이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 하천 내 중금속 오염도의 평가 지표

로서 부착규조의 형태 변이율에 대한 적용 가능성을 시사한다. 중금속에 따른 형태종의 출현비율은 $Cd > As > Zn > Cu > Pb$ 순으로 나타났으며, 이는 Cd와 As가 Cu, Zn, Pb에 비해 비교적 부착규조의 성장에 더 큰 영향을 미치는 중금속으로 판단되었다. 또한 현장 시료에서 부착규조의 형태 변이율이 10 % 이상 차지할 경우 그 대상 하천의 중금속 농도가 2 mg L^{-1} 이상 검출될 가능성이 있으므로 중금속 오염에 대한 정밀조사가 필요할 것으로 사료되었다.

3.3 *Ulnaria ulna* 형태변이종의 유형별 출현 특성

형태 변이율이 가장 높았던 28일차 조사를 대상으로, 출현한 형태 변이종을 4 가지 유형 별로 나누어 그 출현빈도를 살펴보았다 (Fig. 3). 실험군인 5가지 중금속에서 모두 valve (뚜껑)의 비정상적인 외형 (outline)을 갖는 유형 1이 평균 43.4 %를 차지하며 가장 많은 것으로 조사되었다. 다음으로 점무늬열 (striations)에 변이를 보이는 유형 2가 평균 29.1 %

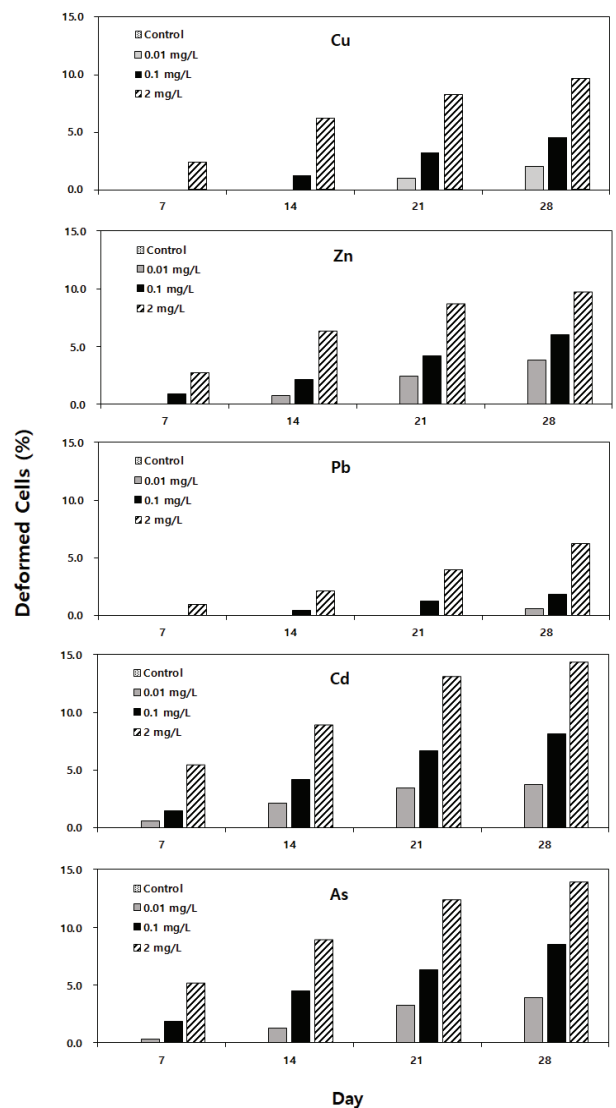


Fig. 2. Percentage of deformed cells in the *Ulnaria ulna* exposed to heavy metal stress during 28 days.

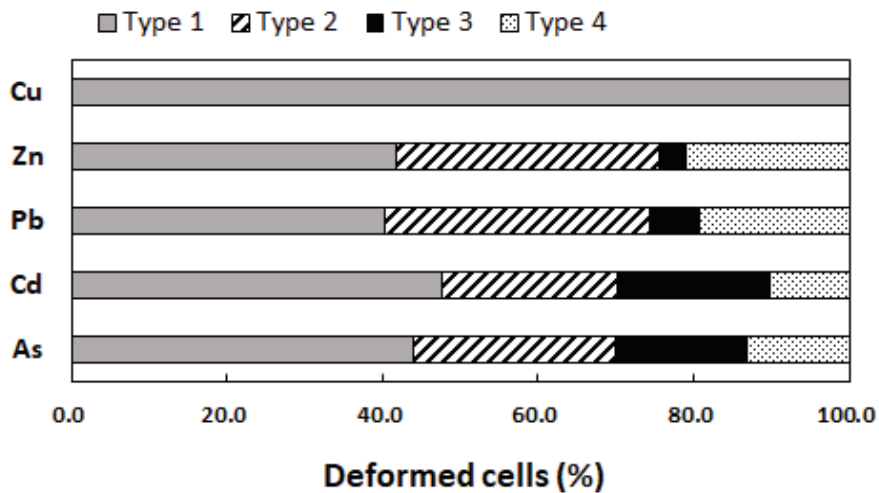


Fig. 3. Percentage of four different types of deformities in the *Ulnaria ulna*. The counting was performed 28 days after the heavy metal injection. (Type 1) : deformed valve outline; (Type 2) : deformed striations; (Type 3) : deformed longitudinal area; (Type 4) : mixed deformities (more than one type of deformity in the same frustules).

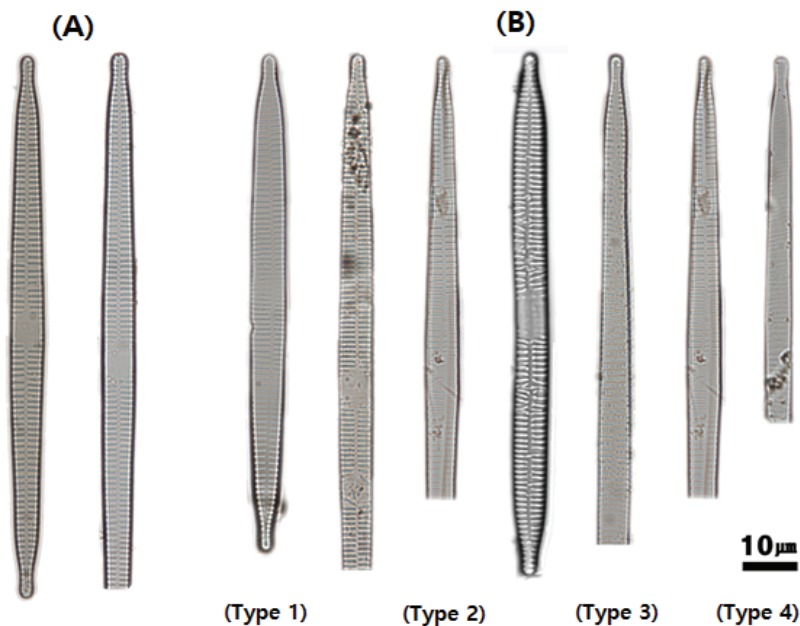


Fig. 4. Normal and abnormal frustules according to four types of the *Ulnaria ulna*. (A) : normal type; (B) : abnormal type; (Type 1) : deformed valve outline; (Type 2) : deformed striations; (Type 3) : deformed longitudinal area; (Type 4) : mixed deformities (more than one type of deformity in the same frustules); scale bar = 10µm.

를 차지하며 많았다. 유형 1은 주로 뚜껑 (valve) 외형이 물결모양 (wavy)을 이루거나, 일부분이 잘리거나 (incised), 구부러지는 (bent) 형태를 보였으며, 유형 2는 점무늬열 (striations)이 불규칙적인 분포 (irregularly distributed)를 갖거나, 갈래가 생기거나 (forked), 혹은 물결모양을 이루는 점무늬열 패턴 (wavy striation patterns)이 현미경을 통해 관찰되었다. 중금속 별로 살펴본 결과, Cd과 As의 경우, 유형 1

이 전체 형태 변이종의 47.7%와 43.9%를 각각 차지하였으며, 다음으로 유형 2가 전체의 22.6% (Cd), 26.2% (As), 세로축역 (longitudinal area)의 비정상적인 형태를 갖는 유형 3이 19.5% (Cd), 16.8% (As), 단일 뚜껑 (valve) 내 두 개 이상의 유형이 존재하는 유형 4 (복합형)가 10.3% (Cd)와 13.2% (As)를 각각 차지하였다. Zn과 Pb의 경우, 유형 1이 전체 형태 변이종의 41.9%와 40.4%를 각각 차지하였고, 유형 2

가 33.7% (Zn), 33.9% (Pb), 유형 3이 3.5% (Zn), 6.4% (Pb), 유형 4가 21.0% (Zn), 19.3% (Pb)를 각각 차지하였다 (Fig. 3-4). Zn과 Pb은 타 중금속에 비해 유형 2와 유형 4의 비율이 비교적 높은 것으로 나타난 반면, 유형 3은 Zn과 Pb에 비해 Cd과 As에 노출된 경우에 더 많이 발견되었으며, 주로 구부러지거나 (curved), 변위된 (displaced) 세로축역 (longitudinal area)의 형태를 보였고, Cu는 모두 유형 1에서만 관찰되었다. 이는 Zn에 노출된 부착규조의 경우 유형 2와 유형 4 (복합형)에 해당하는 형태 변이가 타 중금속에 비해 더 많이 발생하였다는 Pandey et al. (2014)의 연구 결과와 일치하였으며, 실험을 통해 Cu에 노출된 경우 부착규조 뚜껑 (valve)의 내부 무늬 (ornamentations)와 패턴은 변하지 않은 채 외형 (outline)에만 형태 변이가 유발하였다는 Falasco et al. (2009)의 연구 결과와도 일치하는 것으로 나타났다.

또한, 회귀분석 결과는 Cd, Cu, Fe 및 Zn이 구조종의 기형 발생의 원인임을 보여주었다. McFarland et al. (1997)과 Morin et al. (2008)은 Cd과 Zn 등의 중금속과 부착규조 형태 변이종 사이에 유의미한 양의 상관관계를 밝혔으며, 특히 *Fragilaria ulna*의 피각 (frustules)에서 비대칭적으로 구부러지거나 깊이 갈라진 valve (뚜껑)의 외형과 비정상적인 점무늬 패턴, 변위 (displaced)된 세로축역 (longitudinal area)이 많이 보였다고 언급하였다. Ruggiu et al. (1998)은 이탈리아의 Orta 호수에서 1920년대 이래로 Cu가 호수에서 주요 독성 오염 물질로 인식되었으며, 이로 인해 부착규조의 종 조성 및 세포 체적 (biovolume)의 변화 외에도 *Synedra tenera*의 형태적 변이가 빈번히 발생하는 것으로 보고하였고, 그 유형으로는 valve (뚜껑)의 찌그러짐 등 비정상적인 외형을 언급하였다. 본 연구 결과 역시 위의 연구들과 유사한 결과를 보이는 것으로 나타났다.

4. Conclusion

구리 (Cu), 아연 (Zn), 납 (Pb), 카드뮴 (Cd), 비소 (As) 등의 5가지 중금속에 대하여 각각의 농도 조건 (0, 0.01, 0.1, 2 mg L⁻¹) 하에서 구조종 *Ulnaria ulna*의 성장률 및 형태 변이종 출현 빈도를 조사하고, 변이 유형별로 형태 변이종의 출현 양상을 파악하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1) 중금속의 농도와 부착규조 개체군 성장률 및 형태 변이종의 출현비율에 간에 유의미한 상관관계를 보였다. 중금속의 주입농도가 증가함에 따라 *Ulnaria ulna*의 개체 밀도는 감소하였으며, 형태 변이율은 증가하는 것으로 나타났다.

2) *Ulnaria ulna*의 개체군 성장률은 중금속의 종류에 따라 차이를 보였다. 2.0 mg L⁻¹농도에서 Cd과 As가 각각 0.049 day⁻¹와 0.048 day⁻¹의 성장률을 보였으며, Zn과 Cu, Pb은 각각 0.069 day⁻¹, 0.073 day⁻¹, 0.090 day⁻¹의 성장률을 보여, Cd과 As가 부착규조의 성장을 저해하는데 더 큰 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

3) 중금속이 구조 피각의 형태적 변이를 야기하는 요인으로 작용하였으며, 중금속의 종류에 따라 그 형태 변이율에 뚜렷한 차이를 보였다. 가장 큰 형태 변이율을 보인 중금속

은 Cd과 As로, 2.0 mg L⁻¹농도에서 각각 10.41%, 10.13%로 나타났으며, 다음으로 Zn과 Cu, Pb이 각각 6.94%, 5.67%, 3.31% 순으로 나타나, Cd과 As가 부착규조의 형태 변이를 유발하는데 더 큰 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

4) 본 연구의 결과를 통하여 수생태계의 중금속 오염도에 대한 생물학적 모니터링 지표로서 부착규조의 성장률 및 기형 발생의 변화 양상이 유용하게 활용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

References

- Aleem, A. A. (1950). Distribution and ecology of British marine littoral diatoms, *The Journal of Ecology*, 38, 75-106.
- American Public Health Association (APHA). (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21st ed, American Public Health Association, Washington, D. C. USA.
- Anderson, D. M., Morel, M. M., and Guillard, R. R. L. (1978). Growth limitation of a coastal diatom by low zinc ion activity, *Nature*, 276, 70-71.
- Antoine, S. E. and Benson-Evans, K. (1984). *Teratological variations in the River Wye diatom flora*, Wales, UK., Ricard, M. (ed.), Proceedings of the 8th International Diatom Symposium, Paris 1984. Koeltz, Koenigstein, 59-66.
- Arini, A., Feurtet-Mazel, A., Maury-Brachet, R., Pokrovsky, O. S., Coste, M., and Delmas, F. (2012). Recovery potential of periphytic biofilms translocated in artificial streams after industrial contamination (Cd and Zn), *Ecotoxicology*, 21, 3-14.
- Barber, H. G. and Carter, J. R. (1981). Observations on some deformities found in British diatoms, *Microscopy* 34, 214-226.
- Beakes, G., Canter, H. M., and Jaworski, G. H. M. (1988). Zoospores. Ultrastructure of *Zygorhizidium affluens* Canter and *Z. planktonicum* Canter, Two Chytrids Parasitizing the Diatom *Asterionella formosa* Hassall, *Canadian Journal of Botany*, 66, 1054-1067.
- Cantonati, M., Angeli, N., Virtanen, L., Wojtal, A. Z., Gabrieli, J., Falasco, E., Lavoie, I., Morin, S., Marchetto, A., Fortin, C., and Smirnova, S. (2014). *Achnanthes minutissimum* (Bacillariophyta) valve deformities as indicators of metal enrichment in diverse widely-distributed freshwater habitats, *Science of the Total Environment*, 475, 201-215.
- Cattaneo, A., Couillard, Y., Wunsam, S., and Courcelles, M. (2004). Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in LacDufault (Québec, Canada), *Journal of Paleolimnology*, 32, 163-175.
- Choi, J. S., Chae, H. S., and Kim, H. S. (2015). Analysis of the epilithic diatom community and comparison of water quality in the Kumho river, *Korean Journal of Limnology*, 48(2), 115-121. [Korean Literature]
- Duong, T. T., Morin, S., Coste, M., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., and Boudou, A. (2010). Experimental toxicity and bioaccumulation of cadmium in freshwater periphytic Diatoms in relation with biofilm maturity, *Science of the*

- Total Environment*, 408, 552-562.
- Duong, T. T., Morin, S., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., and Boudou, A. (2008). Seasonal effects of cadmium accumulation in periphytic diatom communities of freshwater biofilms, *Aquatic Toxicology*, 90, 19-28.
- Falasco, E., Bona, F., Badino, G., Hoffmann, L., and Ector, L. (2009). Diatom teratologica forms and environmental alterations a review, *Hydrobiologia*, 623, 1-35.
- Feldt, L. E., Stoermer, E. F., and Schelske, C. L. (1973). Occurrence of morphologically abnormal synedra populations in lake superior phytoplankton, *Proceedings of the 16th Conference Great Lakes Research*, Huron, Ohio, USA, *International Association for Great Lakes Research*, Ann Arbor, MI, 34-39.
- Filippis, L. F. and Pallaghy, C. K. (1994). *Heavy metals: Sources and biological effects*, Rai, L. C., Gaur, J. P. and Soeder, C. J. (eds), *Algae and Water Pollution*, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, E., Stuttgart, 31-77.
- George, S. G. (1990). *Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals*, Furness R. W. and Rainbow, P. S. (eds), *Heavy Metals in the Marine Environment*, CRC Press, Boca Raton, 123-142.
- Hendey, N. I. (1974). The permanganate method for cleaning freshly gathered diatoms, *Microscopy*, 32, 423-426.
- Hostetter, H. P. and Rutherford, K. D. (1976). Polymorphism of the diatom *pinnularia brebissonii* in culture and a field collection, *Journal of Phycology*, 12, 140-146.
- Hwang, U. K., Ryu, H. M., Lee, J. W., Lee, S. M., and Kang, H. S. (2014). Toxic effects of heavy metal (Cd, Cu, Zn) on population growth rate of the marine diatom (*Skeletonema costatum*), *Korean Journal of Environmental Biology*, 32(3), 243-249. [Korean Literature]
- Jonge, M., Vijver, B. V., Blust, R., and Bervoets, L. (2008). Responses of aquatic organisms to metal pollution in a lowland river in flanders : A comparison of diatoms and macroinvertebrates, *Science of the Total Environment*, 407, 615-629.
- Kim, S. Y. and Yun, N. N. (2010). *The annual report of Busan metropolitan city institute of health & environment*, Busan Institute of Health and Environment, 131-142. [Korean Literature]
- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. (1986). *Susswasserflora von mitteleuropa. Band 2/1. Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae* (Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., and Mollenhauer, D. eds.), Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, 1-876.
- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. (1988). *Susswasserflora von mitteleuropa. Band 2/2. Bacillariophyceae 2. Teil: Bacillariaceae Epithemiaceae, Surirellaceae* (Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., and Mollenhauer, D. eds.), Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1-596.
- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. (1991a). *Susswasserflora von Mitteleuropa. Band 2/3. Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae* (Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., and Mollenhauer, D. eds.), Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1-576.
- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H. (1991b). *Susswasserflora von Mitteleuropa. Band 2/4. Bacillariophyceae 4. Teil: Achnantheaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema* (Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., and Mollenhauer, D. eds.), Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1-437.
- Lange-Bertalot, H. and Compère, P. (2001). *Fragilaria* subgen. *Ulnaria*, comb. nov., the correct name of the genus including *Synedra ulna*, when treated in *Fragilaria*, *Diatom Research* 16(1), 103-104.
- Larned, S. T. (2010). A prospectus for periphyton: Recent and future ecological research, *Journal of the North American Benthological Society*, 29, 182-206.
- Lavoie, I., Lavoie, M., and Fortin, C. (2012). A mine of information: Benthic algal communities as biomonitors of metal contamination from abandoned tailings, *Science of the Total Environment*, 425, 231-241.
- Lee, D. P. and Ko, S. K. (2001). The incidence of abnormalities in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, and their heavy metal accumulations in the Yeongsan river system, *Korean Journal of Ecology and Environment*, 15(2), 153-158. [Korean Literature]
- Luis, A. T., Teixeira, P., Almeida, S. F. P., Matos J. X., and Silva, E. F. (2011). Environmental impact of mining activities in the Lousal area (Portugal) : Chemical and diatom characterization of metal-contaminated stream sediments and surface water of Corona stream, *Science of the Total Environment*, 409, 4312-4325.
- Martin, M. H. and Coughtrey P. J. (1982). *Biological monitoring of heavy metal pollution: Land and air*, Applied Science Publishers, London, 475.
- McFarland, B. H., Hill, B. H., and Willingham, W. T. (1997). Abnormal *Fragilaria* spp. (Bacillariophyceae) in streams impacted by mine drainage, *Journal of Freshwater Ecology*, 12, 141-149.
- McMillan, M. and Johansen, J. R. (1988). Changes in valve morphology of *Thalassiosira decipiens* (Bacillariophyceae) cultured in media of four different salinities, *British Phycological Journal*, 23, 307-316.
- Ministry of Environment (ME). (2017). *Water Environment Information System (WEIS)*, http://water.nier.go.kr/waterData/generalSearch.do?menuIdx=3_1_1&siteTypeCd=A (accessed May 2017).
- Morin, S. (2003). Amelioration des techniques de bioindication diatomique et D'analyse des Donnees, Appliquees a la revelation des effets des pollutions a toxiques, *ENTTA de Bordeaux*, 1-70.
- Morin, S., Cordonier, A., Lavoie, I., Arini, A., Blanco, S., Duong, T. T., Tornés, E., Bonet, B., Corcoll, N., Faggiano, L., Laviale, M., Pérès, F., Becares, E., Coste, M., Feurtet-Mazel, A., Fortin, C., Guasch, H., and Sabater, S. (2012). Consistency in diatom response to metal-contaminated environments. Emerging and

- priority pollutants in rivers, *Springer Berlin Heidelberg, Berlin*, 117-146.
- Morin, S., Duong, T. T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Durrieu, G., Schäfer, J., Winterton, P., Blanc, G., and Coste, M. (2008). Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France, *Environmental pollution*, 151, 532-542.
- Pandey, L. K., Kumar, D., Yadav, A., Rai, J., and Gaur, J. P. (2014). Morphological abnormalities in periphytic diatoms as a tool for biomonitoring of heavy metal pollution in a river, *Ecological Indicators*, 36, 272-279.
- Philips, D. J. H. (1980). *Quantitative aquatic biological indicator: Their use to monitor trace metal and organochlorine pollution*, Applied Science Publishers, London, 1-460.
- Philips, D. J. H. and Segar, D. A. (1986). Use of bio-indicator in monitoring conservation contaminants: Programme design imparatives, *Marine Pollution Bulletin*, 17, 1-10.
- Rai, L. C., Gaur, J. P., and Kumar, H. D. (1981). Phycology and heavy metal pollution. Biological reviews, *Cambridge Philosophical Society*, 56, 99-151.
- Ri, C. S. (2000). Analysis of water quality and heavy metals for surface water and sediments of upsteam and midstream in Nakdong river, *Journal of the Korean Cemical Society*, 44(6), 547-555.
- Ruggiu, D., Luglio, A., Cattaneo, A. and Panzani, P. (1998). Paleocological evidence for diatom response to metal pollution in lake Orta (N. Italy), *Journal of Paleolimnology*, 20, 333-345.
- Schmid, A. M. (1975). Über eine teratologisch entwickelte *Synedra ulna*, *Nova Hedwigia*, 26, 431-433.
- Schmid, A. M. (1979). Influence of environmental factors on the development of the valve in diatoms, *Protoplasma*, 99, 99-115.
- Schmid, A. M. (1980). Valve morphogenesis in diatoms: a pattern-related filamentous system in pennates and the effect of APM, colchicine and osmotic pressure, *NovaHedwigia* 33, 811-847.
- Schmid, A. M. M. (1984). Wall morphogenesis in thalassiosira eccentrica: Comparison of auxospore formation and the effect of MT-Inhibitors, Mann, D. G. (ed.), *Proceedings of the 7th International Diatom Symposium*, Koeltz, Koenigstein, 47-70.
- Schultz, M. E. (1971). Salinity related polymorphism in the brackish-water diatom *Cyclotella cryptica*, *Canadian Journal of Botany*, 49, 1285-1289.
- Shin, R. Y., Ryu, H. S., and Lee, J. H. (2017). Influence of heavy metal (Zn) inflow on species composition and morphological abnormalities of epilithic diatom in the river, *Journal of Korean Society on Water Environment*, 34(4), 424-433. [Korean Literature]
- Silva, E. F., Almeida, S. F. P., Nunes M. L., Luís, A. T., Borg, F., Hedlund, M., Sá, C. M., Patinha, C., and Teixeira, P. (2009). Heavy metal pollution downstream the abandoned Coval da Mó Mine (Portugal) and associated effects on epilithic diatom communities, *Science of the Total Environment*, 407, 5620-5636.
- Simkiss, K., Taylor, M., and Mason, A. Z. (1982). Metal detoxification and bioaccumulation in Mollusc, *Marine biology letters*, 3, 187-201.
- Singh, A. K. and Rai, L. C. (1990). Use of in situ structural and functional variables of phytoplankton of river Ganga for assessment of heavy metal toxicity, *Biomedical and Environmental Sciences*, 3, 397-405.
- Stoermer, E. F. and Andresen, N. A. (2006). *Atypical tabularia in coastal lake Erie, USA*, Ognjanova-Rumenova, N. and Manoylov, K. (eds), Fossil and Recent Phycological Studies, Pensoft Publishers, Moscow, 9-16.
- Szabó, K., Kiss, K. T., Taba, G., and Ács, E. (2005). Epiphytic diatoms of the Tisza river, Kiskore reservoir and some oxbows of the Tisza river after the cyanide and heavy metal pollution in 2000, *Acta Botanica Croatica* 64, 1-46.
- Woo, M. H., Lee, G. Y., Kim, J. H., Lim, J. H., and Lee, Y. W. (2012). Toxicity assessment of heavy metals in Shihwa lake and its tributaries using the algae, *Journal of Korean Society on Water Environment*, 28(2), 171-177. [Korean Literature]
- Zhou, Q., Zhabg, J., Fu, J., Shi, J., and Jiang, G. (2008). Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem, *Analytica Chimica Acta*, 606, 135-150.