

해양생태독성시험 표준생물로서 미세조류의 특성 비교 연구 (*Skeletonema* sp., *Dunaliella tertiolecta*)

김태원* · 문창호**† · 이수진***

* 해양생태기술연구소 책임연구원, ** 부경대학교 교수, *** 해양생태기술연구소 선임연구원

Comparative Study on the Characteristics of Microalgae as Standard Species for Marine Ecotoxicity Tests (*Skeletonema* sp., *Dunaliella tertiolecta*)

Tae Won Kim* · Chang Ho Moon**† · Su Jin Lee***

* Principal research scientist, Marine Eco-Technology Institute, Busan 48520, Korea

** Professor, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

*** Senior research scientist, Marine Eco-Technology Institute, Busan 48520, Korea

요 약 : 해양생태독성시험의 국제표준시험종 중 생산자에 속하는 대표적인 *Skeletonema* sp.와 *Dunaliella tertiolecta*의 생태독성학적 차이점을 알아보기 위해 각 표준시험법(규격)을 비교하였고 환경에 대한 종 적합성과 다양한 시험물질에 대한 민감도를 비교 분석하였다. 그 결과, 시험법의 경우 대부분 동일하였으나 시험 유효성의 기준에서 pH 변화 제한과 초기접종밀도에서 차이가 나타났으며 이는 *D. tertiolecta*의 낮은 성장률에 기인된 것으로 추정된다. 적합성에서는 두 종 모두 규격에서 요구하는 유효성의 기준을 연속 만족하여 시험수행의 일관성을 보였고 시험한계 염분범위는 *Skeletonema* sp.와 *D. tertiolecta* 각각 20 및 10 psu로 나타났다. 마지막으로 민감도의 경우, 시험규격에서 제시하는 참조물질, 실제 오염 배출수(선박평형수) 및 기타 다양한 화학물질에서 모두 *Skeletonema* sp.가 *D. tertiolecta*에 비해 독성 민감도가 상대적으로 높음을 확인하였으며 이는 해양생태독성시험 수행에 있어 생산자를 이용한 시험의 경우 최소 2종 이상의 다른 분류군의 미세조류를 이용하는 것이 시험결과의 신뢰성과 객관성을 높일 수 있는 방법임을 시사한다.

핵심용어 : 해양생태독성시험, 표준시험종, 적합성, 민감도, 선박평형수, *Skeletonema* sp., *Dunaliella tertiolecta*

Abstract : To understand the ecotoxicological differences between representative *Skeletonema* sp. and *Dunaliella tertiolecta*, both producers as international standard test species for marine ecotoxicity testing, we compared each standard test method, and comparatively analyzed the suitability of the species for environmental assessment and their sensitivity to various test substances. Although most of the test conditions were the same in each method, there were differences in limitation of pH changing and the initial inoculation density in the validation criteria, which is supposed to originate from the low growth rate of *D. tertiolecta*. In terms of suitability, both species showed consistency in test performance by repeatedly meeting the validation criteria required by the standard test methods. The salinity ranges available for testing were 20 and 10 psu for *Skeletonema* sp. and *D. tertiolecta*, respectively. Finally, regarding sensitivity, the toxicity sensitivity of *Skeletonema* sp. was relatively higher than that of *D. tertiolecta* for the reference toxicant, actual polluted water discharged (ballast water), and other chemicals. This implies that using at least two species of microalgae from different classification groups could help increase the reliability and objectivity of test results in the performance of marine ecotoxicity tests using producers.

Key Words : Ecotoxicity test, Standard organism, Suitability, Sensitivity, Ballast water, *Skeletonema* sp., *Dunaliella tertiolecta*

* First Author : twkim@marine-eco.co.kr, 051-611-4271

† Corresponding Author : chmoon@pknu.ac.kr, 051-629-6573

1. 서론

생태독성시험(ecotoxicity test)은 환경에 유입된 유해물질이 생태계에 미치는 영향을 평가하는 생물검정기법(bioassay)의 일환으로써 기존의 화학분석에 의한 물질 농도를 기준으로 유해성을 평가하는 개념에서 나아가 실제 생물의 신진대사, 생식 및 생존 등과 관련한 직접적인 영향을 토대로 단일물질 외에 복합적으로 일어날 수 있는 유해성에 대해서 통합적으로 평가할 수 있는 기법이다(Rand and Petrocelli, 1985; Min et al., 2000; An et al., 2008).

1863년 Penny and Adams의 최초 수서생태독성시험법 적용 이후 미국 및 유럽 등 선진국을 중심으로 수서생태독성학(aquatic toxicology)의 중요성이 부각되기 시작하여(Hoffman et al., 2002), 1950년대 이후부터 다양한 수서생물을 이용한 수서생태독성시험법이 국제표준화기구(ISO, International Organization for Standardization), 경제협력개발기구(OECD, Organization for Economic Cooperation and Development), 미국환경보호청(USEPA, US Environmental Protection Agency), 미국재료시험협회(ASTM, American Society of Testing and Materials) 및 미국공중보건협회(APHA, American Public Health Association) 등을 중심으로 개발되었으며, 이 중 현재까지 개발된 해양생물을 이용한 해양생태독성시험법은 약 50여개가 존재한다(Rand, 1995; Park et al., 2008).

현재까지 개발된 해양생물을 이용한 해양생태독성시험법은 특히 해양생태계의 통합적인 영향을 평가하기 위해 생태계 내 영양단계를 대표할 수 있는 생산자, 소비자, 포식자 및 분해자를 고려하여 각 단계별로 1종 또는 그 이상을 제시하고 있다(US EPA, 2002).

상기 해양생태독성시험법에서 제시하는 시험생물 중에서 생산자의 경우 대부분 해양에서 부유하는 미세조류를 이용하여 성장저해율(growth inhibition rate)을 종말점(end point)으로 하는 시험법이 일반적이다. 표준시험종으로는 규조류의 경우 *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricorutum* 및 *Thalassiosira pseudonana* 3종이 있으며(ASTM, 2004; ISO, 2016) 이 중 *S. costatum*이 ISO 10253(2016)의 시험법과 함께 표준시험종으로 가장 많이 이용되고 있다(ISO, 2008). 이 밖에 녹조류로는 유일하게 *Dunaliella tertiolecta*가 ASTM E 1218-04(2004)의 시험법에 표준시험종으로 제시되어 있다(ASTM, 2004).

*Skeletonema costatum*은 1873년에 최초로 홍콩만에서 Greville에 의해 발견된 종으로 오랫동안 해양 미세조류 중에서 가장 눈에 잘 띄는 구성원으로 여겨져 왔다(Sarno et al., 2007). 현재까지도 전세계 연안에 많이 분포하며 강한 염분 내성으로 기수역에서도 발견된다. 형태는 규산질의 세포벽(뚜껑)을 구성하고 세포 간에 체인을 형성하여 분열한다.

*S. costatum*은 1980년대 이후 유전학적으로 재분류되어 *S. menzeli*, *S. tropicum* 등 다양한 분류군이 발견되면서 현재 생태독성시험 분야에서는 국제 표준규격에서의 생물명 표기 문제와 규격을 기초로 한 기존 시험결과의 객관성 유지를 위하여 학명을 *S. costatum*으로 규정짓지 않고 *S. costatum* s.l. 또는 *Skeletonema* sp.로 통용되고 있다(Kooistar et al., 2008; ISO, 2016). 최근 국내에서도 *Skeletonema* sp.을 중심으로 국내의 다양한 해양미세조류를 이용한 해양생태독성시험법 개발과 관련한 연구가 활발히 진행되어 왔으며(An et al., 2008; Lee et al., 2008), 2018년에는 *S. costatum*을 이용한 해양생태독성시험법이 해양환경관리법의 ‘해양공정시험기준(해양생물편)’으로 지정되었다.

*Dunaliella tertiolecta*는 전세계 연안에 많이 분포하며 염분 등 환경변화에 대한 내성이 강해 염전 지역에서도 생존이 가능한 종으로 *Sekeletonema* sp.와 달리 세포벽 없이 둥근 방추형태로 존재한다(Moon, 2016). 최근에는 *D. tertiolecta*의 환경변화에 따른 지질 함량 증가 특성을 이용하여 대량배양을 통한 식품, 화장품 및 바이오디젤에 대한 연구에도 적용되고 있다(Rizwan et al., 2017).

본 연구에서는 현재까지 수행된 다양한 해양미세조류를 이용한 독성시험적용 연구와는 별도로 위에서 언급한 해양생태독성시험의 국제적인 표준시험종으로 지정된 미세조류 중 규조류이며 가장 많이 이용되는 *Skeletonema* sp.와 유일하게 녹조류로 지정된 *D. tertiolecta* 두 종의 생태독성학적 특성의 차이점을 알아보기 위해 각 표준시험법(규격)의 세부항목을 비교하였고 실제 시험을 통해 적합성과 다양한 시험물질에 대한 독성영향의 민감도를 비교 분석하여 최종적으로 두 시험종의 특성과 시험방법에 따른 제한점과 개선방향을 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

본 연구에 이용된 표준시험법(규격)은 ISO에서 제정된 미세조류를 이용한 성장저해시험법인 ISO 10253 ‘Water quality-Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema* sp. and *Phaeodactylum tricorutum*’ 규격과 ASTM에서 제정된 동일한 시험법인 ASTM E 1218-04 ‘Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae’ 규격을 각각 이용하였다(Table 1).

시험종의 적합성과 민감도 비교 분석을 위해 이용된 시험생물의 경우 *Skeletonema* sp.(CCAP 1077/1C strain)와 *D. tertiolecta* (CCAP 19/5 strain) 모두 ISO 10253 규격에서 권고하는 CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, UK)에서 공급을 받아 시험에 이용하였다. 적합성 비교를 위해 대조구의 유효성 기준(validation criteria) 비교시험을 반복 수행하였고 염분별

Table 1. Summary of test conditions and validation criteria for the microalgae growth inhibition test (ISO 10253 and ASTM E 1218-04)

Test parameter	ISO 10253 (<i>Skeletonema</i> sp.)	ASTM E 1218-04 (<i>Dunaliella tertiolecta</i>)
Test type	Static	Static
Temperature	20 ± 2°C	20 ± 2°C
Light quality	'Cool white' fluorescent lamp	'Cool white' fluorescent lamp
Light intensity	60 μmol m ⁻² s ⁻¹	60 μmol m ⁻² s ⁻¹
Photoperiod	Continuous illumination	Continuous illumination
Test chamber type	Glass flask	Glass flask
Test chamber size	250 mL	Any size flask can be used
Test solution volume	100 mL	Not exceed 50 % of the flask volume
Initial cell density	Not exceed 10,000 cells/mL	10,000-20,000 cells/mL
No. replicate per conc.	3	3
Shaking rate	100 r/min	100 r/min
Dilution water	Natural or artificial sea water (0.2 μm filtered)	Natural or Artificial sea water (0.2 μm filtered)
Test concentration	Not exceed 3.2 ratio	6
Test duration	72 hr	72 hr
Endpoint	Growth inhibition	Growth inhibition
Validation criteria (in the control)	- 72 h specific growth rate : > 0.9 day ⁻¹ - C.V. value ¹ : < 7 % - pH change : < 1.0	- 72h specific growth rate : > 0.9 day ⁻¹ - C.V. value ¹ : < 7 % - Temperature change (highest/lowest) : < 4°C

¹Coefficient of variation of average specific growth rates

성장을 실험을 수행하였다. 또한 민감도 비교 분석을 위해 규격에서 권고하는 중크롬산칼륨(K₂Cr₂O₇, potassium dichromate)을 이용한 참조물질독성시험(reference toxicant test)과 실제 오염수(활성물질로 처리된 선박평형수)를 대상으로 농도구배(100, 62.5, 50, 25, 12.5, 6.25 및 0%)하여 독성시험을 수행하였고, 기타 다양한 화학물질에 대한 두 시험종의 영향농도를 ECOTOX database(US EPA, 2009)를 활용하여 비교하였다.

모든 시험은 시험 시작 전 2주 이상 계대배양(batch culture)을 거친 후 72~96시간의 전 배양(pre-culture)을 수행하여 지수성장기 시기의 세포들을 시험에 이용하였다. 모든 시험수는 시험규격에서 요구하는 영양배지를 첨가한 후 농도 구배하여 시험에 이용하였고 4반복으로 수행되었다. 성장률 측정은 매 24시간마다 시험용액을 1 mL씩 분취하여 세포밀도를 광학현미경(CKX31SF, Olympus, Japan)을 이용해 직접 계수한 후 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$r = (\ln N_d - \ln N_0) / d \quad (1)$$

- r : 식물플랑크톤의 개체군 성장률
- N_d : d 일 후의 세포밀도
- N_0 : 실험 시작시의 세포밀도
- d : 배양기간(일)

시험결과로 산출된 시험생물의 성장률을 ANOVA (analysis of variance)를 이용하여 대조구와 비교하여 유의한 차이가 나타나는 실험구 중 가장 낮은 농도구간인 최저영향관찰농도(LOEC, lowest effect observed concentration)와 대조구와 비교하여 유의한 차이가 나타나지 않는 농도 중 가장 높은 농도구간인 무영향관찰농도(NOEC, no observed effect concentration)를 산출하였다. 또한 반수영향농도(EC₅₀, 50 % effect concentration)는 점추정법(point estimation)을 이용하여 산출하였고 모든 결과값에 대한 통계분석은 TOXCALC 5.0 program(Tidepool scientific software, USA)를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 표준시험법 비교 분석

미세조류를 이용한 성장저해시험의 국제 표준시험종인 *Skeletonema* sp.와 *D. tertiolecta*의 특성 비교를 위해 1차적으로 각 시험종을 표준시험종으로 제시하고 있는 시험규격인 ISO 10253(2016)과 ASTM E 1218-04(2004)의 시험조건을 비교하였다. 그 결과, 모든 시험조건 중 대부분 동일하거나 유의미한 차이가 나지 않았지만 초기접종밀도와 시험의 유효성의 기준에서는 서로 상이했다(Table 1). ASTM E 1218-04에서는 초기접종 밀도를 10,000 ~ 20,000 cells/mL의 범위로 수행할 것을

Table 2. Results of reference toxicant test (Potassium dichromate) with *Skeletonema* sp. and *Dunaliella tertiolecta*

Test substance	Test organisms (Standard method)	Varidation criteria (in the control)				72h-EC ₅₀ (mg/L)	Acceptable range (mg/L)	Initial inoculum (cells/mL)
		growth rate	C.V. value ¹	mC.V. value ²	pH change			
Potassium dichromate (K ₂ Cr ₂ O ₇)	<i>Skeletonema</i> sp. (ISO 10253)	1.56	6.5	13.5	0.80	2.39	1.4-3.6 (ISO, 2016)	5,000
		1.41	4.9	19.4	0.96	2.29		
		1.21	3.0	8.7	0.74	2.99		
	<i>Dunaliella tertiolecta</i> (ASTM E 1218-04)	1.13	5.3	26.6	0.73	12.16	7.02-15.41 (Prato et al., 2012)	10,000
		1.07	5.9	14.7	0.81	13.67		
		1.10	0.4	7.8	0.73	10.26		

¹Coefficient of variation of average specific growth rates, ²mean Coefficient of variation for section by section growth rates (OECD 201, 2011)

명시하고 있으나 ISO 10253에서는 10,000 cells/mL를 초과하지 말 것을 권고하고 있으며, 시험의 유효성에서는 ASTM E 1218-04와 달리 시험 시작과 종료시점의 pH 변화를 1.0 미만으로 제한하고 있다. 그 원인은 *Skeletonema* sp.의 초기 접종 밀도가 높으면 지수성장기에 왕성한 광합성 작용으로 인해 한정된 배양액과 시험용기 공기 중의 CO₂가 고갈되고 이를 보완하기 위해 배양액 내의 HCO₃⁻에서 추출된 CO₂로 대체된다. 이에 따라 발생하는 OH⁻로 인해 배양액의 pH가 높아지며 결과적으로 *Skeletonema* sp.는 더 이상 지수성장을 유지할 수 없음과 동시에 시험물질의 독성영향 역시 왜곡되어 나타날 수 있다(Hailing-Sørensen et al., 1996; ISO, 2008). 따라서 ISO 10253에서는 접종밀도를 일정 수준으로 낮게 제한하고 pH 변화 역시 시험의 유효성 기준으로 제시하여, 시험결과에 대한 신뢰성을 확보하고자 한 것으로 판단된다.

반면 ASTM E1218-04의 경우 시험의 유효성 기준에서 pH 변화에 대한 제한을 두지 않았으며 초기 접종밀도 역시 ISO 10253에 비해 비교적 많은 10,000~20,000 cells/mL의 밀도로 접종할 것을 권고하고 있다. 그 원인에 대해서는 최초 시험법 제정 시에 어떠한 논의가 되었는지 확인할 수는 없지만, 몇몇 미세조류의 특성에서 보는 시각에서는 시험에서 생기는 pH 변화는 미세조류 자신으로부터 기인한 것으로, 조밀한 개체수에서 발생하는 고유한 생물의 특성으로 여겨질 수 있다는 점에서 pH 변화에 대한 제한을 두지 않은 것으로 추정된다(ISO, 2008). 또한 형광등의 파장 특성상 녹조류가 규조류에 비해 성장률이 떨어지는 특성 역시 이를 뒷받침해주며(Oh et al., 2015), 실제 실험을 통한 성장률 비교에서도 *D. tertiolecta*(1.10±0.03 day⁻¹)가 *Skeletonema* sp.(1.39±0.17 day⁻¹)보다 약 21% 낮은 것으로 나타났다(Table 2).

일반적으로 자연상태에서는 녹조류의 성장률이 규조류

보다 높다고 알려져 있지만(Kremer et al., 2017), 인위적으로 구성된 제한적인 영양배지 조건하에서는 이와 같은 성장률의 역전현상이 나타나는 것으로 보이며, 이러한 낮은 성장률이 ASTM E 1218-04에서 *D. tertiolecta*의 비교적 높은 초기 접종밀도를 권고하고 pH 변화에 대한 제한을 두지 않은 원인 중 하나로 추정된다.

그러나 이러한 *D. tertiolecta*의 낮은 성장률을 고려한다 하더라도 허용범위 내의 비교적 높은 접종밀도는 다른 미세조류와 마찬가지로 지수성장기의 광합성 과정에서 CO₂ 고갈을 일으킬 수 있으며, 배지제조 과정 및 시험기간 중 환경 변화 등 다양하게 일어날 수 있는 이상현상의 발생을 방지하고, 시험결과에 대한 정확도 관리(Accuracy control)를 위해서라도 과학적 근거가 바탕이 되는 pH 변화에 대한 기준이 필요할 것으로 판단된다. 실제로 담수조류(규조류, 녹조류 및 남조류)를 이용한 미세조류 성장저해 시험법인 OECD 201에서도 모든 시험에서 pH 변화 기준을 1.5로 제한하고 있다(OECD, 2011).

3.2 적합성 비교 분석

Skeletonema sp.와 *D. tertiolecta*의 국제표준 시험생물이 각 시험규격 및 시험 환경변화와 관련하여 종(種) 적합성을 비교하기 위하여 시험의 유효성 기준의 만족 여부를 반복 검증하였고, 염분별 성장률 실험을 수행하여 시험수행 한계 염분범위를 비교하였다.

각 시험종의 유효성 기준의 만족 여부를 확인하기 위해 ISO 10253과 ASTM E 1218-04에서 생물의 민감도의 품질확인을 위해 동일하게 제시하고 있는 참조물질(reference toxicant)인 중크롬산칼륨(Potassium dichromate, K₂Cr₂O₇)을 이용하여 참조물질독성시험을 각 생물을 대상으로 3회 수행하였고 매

Table 3. Results of microalgae growth inhibition test on ballast water treated by BWMS¹ with *Skeletonema* sp. and *Dunaliella tertiolecta*

Test substance	After treatment	Salinity (psu)	Test organisms	Effective concentration (%)			End point
				NOEC	LOEC	EC ₅₀	
Treated ballast water by BWMS (A type)	Day 2	33	<i>Skeletonema</i> sp.	50.00	100.00	>100.00	72h-EC ₅₀
			<i>Dunaliella tertiolecta</i>	100.00	>100.00	>100.00	
		20	<i>Skeletonema</i> sp.	25.00	50.00	>100.00	
			<i>Dunaliella tertiolecta</i>	100.00	>100.00	>100.00	
Treated ballast water by BWMS (B type)	Day 2	33	<i>Skeletonema</i> sp.	50.00	62.50	>100.00	
			<i>Dunaliella tertiolecta</i>	100.00	>100.00	>100.00	
		20	<i>Skeletonema</i> sp.	62.50	100.00	>100.00	
			<i>Dunaliella tertiolecta</i>	100.00	>100.00	>100.00	
	Day 5	33	<i>Skeletonema</i> sp.	50.00	62.50	>100.00	
			<i>Dunaliella tertiolecta</i>	100.00	>100.00	>100.00	
		20	<i>Skeletonema</i> sp.	50.00	62.50	>100.00	
			<i>Dunaliella tertiolecta</i>	100.00	>100.00	>100.00	

¹Ballast Water Management System

회 시험의 대조구에 대한 유효성의 기준을 비교하였다. 그 결과, 두 종 모두 규격에서 공통적으로 요구하는 평균성장률과 C.V.(Coefficient of variation)값의 경우 각각 0.9 day⁻¹ 이상과 7% 이하로 3회 모두 만족하는 것을 확인하였다. 또한 pH의 변화에서도 *D. tertiolecta*의 경우 3회 모두 1.0을 초과하지 않아 ISO 10253의 요구조건에도 부합하였다. 추가적으로 두 시험규격에서는 요구하지 않으나 OECD 201에서 요구하고 있으며 대조구의 각 반복구 사이뿐만 아니라 일간 성장률(section-by-section growth rate)의 변화까지도 제한을 두는 mC.V.(mean Coefficient of variation)값의 허용기준(<35%)을 적용하여도 두 종 모두 만족함을 확인하였다(Table 2).

또한 배출수를 이용한 독성시험에서 가장 큰 영향을 미칠 수 있는 환경요인인 염분에 대한 두 시험종 이용에 대한 한계범위를 알아보기 위해 염분별 성장률 비교실험을 수행하였다. 그 결과, *Skeletonema* sp.와 *D. tertiolecta* 모두 20 psu까지는 대조구(35 psu)와 비교하여 성장률에 유의한 차이가 나지 않았지만(Fig. 1; p > 0.05) 10과 5 psu에서는 대조구와 비교하여 유의한 차이가 나타나(Fig. 1; p < 0.05) Lee et al.(2008)의 연구와 유사한 결과가 나타났다. 그러나 *D. tertiolecta* 경우 10 psu에서 72시간 평균성장률이 1.08 day⁻¹로 규격에서 요구하는 유효성의 기준(>0.9 day⁻¹)을 만족하여 시험적용이 가능함을 확인하였다.

Skeletonema sp.와 *D. tertiolecta*의 시험종의 적합성을 확인한 결과, 두 종 모두 규격에서 요구하거나 OECD 201에서 요구하는 유효성의 기준을 연속적으로 만족하여 시험수행의 일관성을 보였고 *Skeletonema* sp.의 경우 20 psu, *D. tertiolecta* 경우 10 psu의 염분조건이 시험가능 한계범위임을 파악하였다.

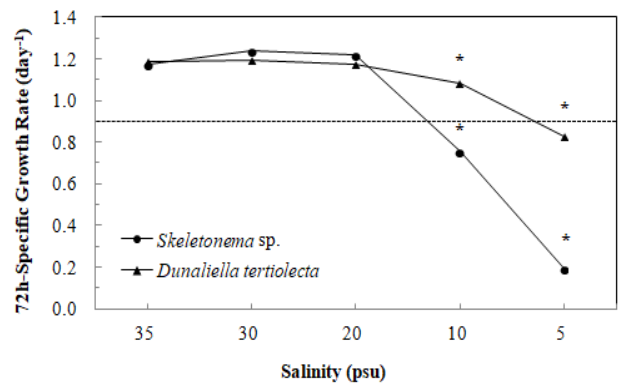


Fig. 1. 72 hr specific growth rates of *Skeletonema* sp. and *D. tertiolecta* on each salinity conditions. *Significant differences (p < 0.05) compared with control (35 psu). The dotted line represent at 0.9 day⁻¹ growth rate.

3.3 민감도 비교 분석

Skeletonema sp.와 *D. tertiolecta*의 국제표준 시험생물이 다양한 화학물질 및 오염된 배출수에 대해 나타내는 독성영향을 비교하기 위하여 적합성 비교 분석에서 이용된 참조물질 독성시험의 결과를 이용하였고, 실제 오염배출수(수중 생물체를 사멸하기 위해 선박평형수처리시스템(BWMS, Ballast Water Management System)으로 소독(처리)한 선박평형수)를 대상으로 처리 후 보관 기간과 염분구간(해수, 기수)으로 구분하여 각 생물을 대상으로 배출수독성시험(WET test, whole effluent toxicity test)을 수행하였다.

3회의 참조물질 독성시험결과, *Skeletonema* sp.와 *D. tertiolecta*의 72h-EC₅₀ 값들이 시험규격(ISO 10253) 및 Prato et al.(2012)

Table 4. Microalgae growth inhibition test data of chemicals using both *Skeletonema* sp. and *Dunaliella tertiolecta*

Chemicals (CAS No.)	Duration (days)	EC ₅₀ Value (mg/L)		Reference
		<i>Skeletonema</i> sp.	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	
Cu (7440-50-8)	3	> 0.25	0.58	Peterson and Stauber (1996), Stauber (1995)
C ₂₅ H ₂₄ F ₆ N ₄ (67485-29-4)	3	0.00018	0.0108	Walsh (1983)
C ₁₉ H ₂₀ O ₄ (85-68-7)	3	0.5	2	ECOTOX database
CuSO ₄ ·5H ₂ O (7758-99-87)	4/3	0.29	> 0.98	Franklin et al. (2001), Bao et al. (2011)
C ₆ HCl ₅ O (87-86-5)	4	0.0203	0.17	ECOTOX database
C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S (151-21-3)	4/3	1.2	15	Peterson and Stauber (1996), Masten et al. (1994)
C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O (330-54-1)	4	0.0059	0.0092	Bao et al. (2011), DeLorenzo et al. (2013)
C ₈ Cl ₄ N ₂ (1897-45-6)	4	0.013	0.064	Bao et al. (2011), DeLorenzo and Serrano (2003)
C ₈ H ₁₄ ClN ₅ (1912-24-9)	4	0.067	0.069	DeLorenzo and Serrano (2003), Hoberg (1998)
C ₂ F ₃ NaO ₂ (2923-18-4)	4/3	> 2400	> 124	ECOTOX database
C ₁₁ H ₁₉ N ₅ S (28159-98-0)	4	0.00029	0.00073	Zhang et al. (2008), DeLorenzo and Serrano (2006)
C ₂₅ H ₂₄ F ₆ N ₄ (67485-29-4)	3	0.00018	0.0108	ECOTOX database

이 제시한 허용범위 안에 모두 만족하여 정상적인 민감도를 유지하는 것으로 나타났다. 그러나 상대적인 독성영향에서는 *Skeletonema* sp.의 경우 72h-EC₅₀ 값이 2.29~2.99 mg/L로 나타났고 *D. tertiolecta*의 경우 10.26~13.67 mg/L로 나타나 *D. tertiolecta*가 약 5배 가량 중크롬산칼륨에 대해 낮은 독성영향(민감도)을 보이는 것으로 나타났다(Table 2).

실제 소독 처리한 선박평형수를 대상으로 WET test 수행결과, *D. tertiolecta*의 경우 A, B Type 모두 처리 후 보관시간 및 염분에 상관없이 독성영향이 나타나지 않았지만 *Skeletonema* sp.의 경우 72h-EC₅₀은 모두 > 100.00 %로 나타났으나 NOEC는 25.00~100.00 %, LOEC는 50.00~100.00 %로 독성영향이 나타나 *Skeletonema* sp.가 오염된 배출수를 대상으로 *D. tertiolecta*보다 상대적으로 높은 독성영향을 보이는 것으로 나타났다(Table 3). 그러나 본 시험에 이용된 선박평형수의 경우 수중생물에게 비교적 낮은 독성영향을 보여 72h-EC₅₀이 시험농도 구간 내에서 추정되지 않았으며 다양한 해양배출물질에 대한 시험결과로 대표될 수 없는 한계가 따랐다. 따라서 해양배출물질에 대한 명확한 독성영향 차이에 대한 규명은 추후 다양하고 비교적 생물에게 높은 독성영향을 줄 수 있는 각종 하수오니 및 폐기물 등을 이용한 시험결과 비교가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

기타 다양한 화학물질에 대한 독성영향을 비교하기 위하여 ECOTOX database 내에 *Skeletonema* sp. 또는 *D. tertiolecta*를 이용하여 독성시험이 이루어진 화학물질 총 192종을 선별하였으며, 이 중 두 시험생물 모두를 이용하여 독성시험이 수행된 화학물질에 대해 독성시험결과를 Table 4에 정리하여 영향농도를 비교하였다. 그 결과, 두 종 모두 시험이 수행된 화학물질은 총 12종으로 나타났으며, 이 중 시험과정에서

시험농도구간의 한계로 인해 명확한 72h-EC₅₀ 값이 추정되지 않은 Copper(Cu), Sulfuric acid copper(2+) (CuSO₄·5H₂O) 및 2,2,2-Trifluoroacetic acid sodium salt(1:1) (C₂F₃NaO₂)의 3종을 제외하더라도 9종의 모든 화학물질에서 시험결과로 나타난 EC₅₀값이 *Skeletonema* sp.가 *D. tertiolecta*보다 낮게 나타나 독성영향이 높은 것을 확인하였다.

종합적으로 중크롬산칼륨을 포함한 다양한 화학물질과 실제 배출수를 이용한 독성시험의 결과 비교에서 모두 *Skeletonema* sp.가 *D. tertiolecta*보다 독성물질에 상대적으로 높은 독성영향을 나타냈으며 이러한 원인에는 다양한 생물학적 특성 차이가 있을 것으로 판단된다. DeLorenzo et al. (2004)과 Weiner et al.(2004)은 작은 세포 크기의 미세조류가 독성물질에 대한 민감성이 큰 세포에 비해 높다고 보고하고 있으나 본 연구에 이용된 *Skeletonema* sp.(8-13 μm)와 *D. tertiolecta*(7-12 μm)의 경우 세포크기의 차이가 현저하게 나지 않았으며 오히려 *Skeletonema* sp.가 긴 두께축(11-20 μm)을 가지는 것으로 볼때(Lee, 2015; Kim, 2015) 이러한 독성영향의 차이는 미세조류의 세포 크기의 차이보다는 독성물질에 반응하는 종 특이성 또는 분류군 특이성에 기인한 것으로 추정된다(An et al., 2008). 추가적으로 본 연구 및 Lee et al.(2008)의 연구에서도 *Skeletonema* sp.에 비해 염분내성이 강한 종들이 특정 화학물질(중크롬산칼륨)에 비교적 낮은 독성영향이 나타났으며, 이는 미세조류의 대사과정(이온수지교환 등)에서 나타나는 종 고유의 생리적 특성 또한 독성영향의 차이와 연관이 있을 것으로 추정된다.

이와 같이 동일한 영양단계(생산자)의 국제표준 독성시험 중이라 할지라도 그 분류군의 생태독성학적 특성에 따라 화학물질 및 오염수에 대한 독성영향이 뚜렷하게 차이가 남을

알 수 있으며, 이는 다시 말해 미지의 물질에 대한 생태독성 정도를 평가함에 있어 평가자의 시험종 선택에 따라 그 결과 해석의 유효성이 작용한다는 것을 의미한다. 따라서 이러한 독성시험법에 대한 제한점을 극복하기 위해서는 영양단계별 독성시험에서 일반적으로 가장 민감하다고 알려진 생산자(미세조류)를 이용한 독성시험의 종 선정 시에는 단일종이 아닌 다른 분류군을 이용한 최소 2종 이상을 이용한 독성시험 수행이 바람직할 것으로 판단된다.

4. 결론

해양생태독성시험의 국제표준시험종 중 생산자에 속하는 대표적인 *Skeletonema* sp.와 *D. tertiolecta*의 생태독성학적 차이점을 알아보기 위해 각 표준시험법(규격)을 비교하였고, 종 적합성과 다양한 시험물질에 대한 민감도를 비교 분석하였다. 그 결과, 시험법의 경우, 대부분 동일하였으나 시험의 유효성의 기준에서 pH 변화에 대한 제한과 초기접종밀도에서 차이가 있었다. 이는 형광등 조건하에서 *D. tertiolecta*가 보이는 낮은 성장률에서 기인된 것으로 추정되며 ASTM E 1218-04에서도 ISO 10253과 같이 과학적 근거가 바탕이 되는 pH 변화에 대한 제한기준이 필요할 것으로 판단된다. 적합성에서는 두 종 모두 m.C.V. 값을 포함하여 각 시험규격에서 요구하는 유효성의 기준을 연속으로 만족하여 시험수행의 일관성을 보였고, 시험한계 염분범위는 *Skeletonema* sp.와 *D. tertiolecta* 각각 20 및 10 psu로 나타났다. 마지막으로 민감도의 경우, 시험규격에서 제시하는 참조물질, 실제 오염 배출수(소독처리한 선박평형수) 및 기타 9가지의 다양한 화학물질에 대해 *Skeletonema* sp.가 *D. tertiolecta*에 비해 모두 독성 민감도가 상대적으로 높음을 확인하였으며 이는 해양생태독성시험 수행에 있어 생산자를 이용한 시험의 경우 최소 2종 이상의 다른 분류군의 미세조류를 이용하는 것이 시험결과와 신뢰성과 객관성을 높일 수 있는 방법임을 시사한다. 또한 현재해양환경관리법 내 해양환경공정시험기준(해양생물편)의 *S. costatum*을 이용한 해양생태독성시험법 역시 국제적인 추세에 따라 *Skeletonema*속으로의 명칭통합과 함께 2종 이상의 미세조류 분류군을 이용하는 시험법의 개정(안) 등이 고려되어야 할 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2019년)에 의하여 연구되었음.

References

- [1] An, Y. J., S. H. Nam, and Y. W. Baek(2008), Fundamentals of ecotoxicity evaluation methods using domestic aquatic organisms in Korea: (III) Green algae, Korean Journal of Ecology and Environment, Vol. 40, No. 1, pp. 1-13.
- [2] ASTM(2004), Standard guide for conducting static toxicity tests with microalgae, American Society of Testing and Materials International, Pennsylvania, USA, E 1218-04.
- [3] Bao, V. W., K. M. Leung, J. W. Qin, and M. H. Lam(2011), Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species, Marine pollution bulletin, Vol. 62, No. 5, pp. 1147-1151.
- [4] DeLorenzo, M. E. and L. Serrano(2003), Individual and mixture toxicity of three pesticides; atrazine, chlorpyrifos, and chlorothalonil to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*, Journal of Environmental Science and Health, Part B, Vol. 38, No. 5, pp. 529-538.
- [5] DeLorenzo, M. E. and L. Serrano(2006), Mixture toxicity of the antifouling compound irgarol to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*, Journal of Environmental Science and Health, Part B, Vol. 41, No. 8, pp. 1349-1360.
- [6] DeLorenzo, M. E., L. E. Danese, and T. D. Baird(2013), Influence of increasing temperature and salinity on herbicide toxicity in estuarine phytoplankton, Environmental toxicology, Vol. 28, No. 7, pp. 359-371.
- [7] DeLorenzo, M. E., M. Leatherbury, J. A. Weiner, A. J. Leaitus, and M. H. Fulton(2004), Physiological factors contributing to the species-specific sensitivity of four estuarine microalgal species exposed to the herbicide atrazine, Aquatic Ecosystem Health & Management, Vol. 7, No. 1, pp. 137-146.
- [8] Franklin, N. M., M. S. Adams, J. L. Stauber, and R. P. Lim(2001), Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. 40, No. 4, pp. 469-480.
- [9] Hailing-Sørensen, B., N. Nyhohn, and A. Baun(1996), Algal toxicity tests with volatile and hazardous compounds in air-tight test flasks with CO₂ enriched headspace. Chemosphere, Vol. 32, No. 8, pp. 1513-1526.
- [10] Hoberg, J. R.(1998), GS 26575—Toxicity to the Marine Diatom, *Skeletonema costatum*, No. 98-2, SLI Report, p. 7241.

- [11] Hoffman, D. J., B. A. Rattner, G. A. Burton Jr, and J. Cairns Jr(Eds.)(2002), Handbook of ecotoxicology, CRC press company, Washington, p. 1290.
- [12] ISO(2008), Water quality - scientific and technical aspects of batch algae growth inhibition tests. International Standard Organisation, Geneva, Switzerland, TR 11044.
- [13] ISO(2016), Water quality - marine algal growth inhibition test with *Skeletonema* sp. and *Phaeodactylum tricoratum*. International Standard Organisation, Geneva, Switzerland, 10253.
- [14] Kim, S. K.(2015), Handbook of marine microalgae: Biotechnology advances, Academic Press, Korea, 604pp.
- [15] Kooistar, W. H., D. Sarno, S. Balzano, H. Gu, R. A. Andersen and A. Zingone(2008), Global diversity and biogeography of *Skeletonema* species (Bacillariophyta), Protist, Vol. 159, No. 2, pp. 177-193.
- [16] Kremer, C. T., M. K. Thomas, and E. Litchman(2017), Temperature and size scaling of phytoplankton population growth rates: Reconciling the Eppley curve and the metabolic theory of ecology. Limnology and oceanography, Vol. 62, No. 4, pp. 1658-1670.
- [17] Lee, J. H.(2015), Algae flora of Korea: marine diatom, Vol. 3, No. 14, National Institute of Biological Resources, Incheon, Korea.
- [18] Lee, S. M., G. S. Park, K. H. An, S. Y. Park, and S. H. Lee(2008), Application of the ecotoxicological standard method using population growth inhibition of marine phytoplankton, Journal of the Korean Society of Oceanography, Vol. 13, No. 2, pp. 112-120.
- [19] Masten, L. W., R. L. Boeri, and J. D. Walker(1994), Strategies employed to determine the acute aquatic toxicity of ethyl benzene, a highly volatile, poorly water-soluble chemical, Ecotoxicology and environmental safety, Vol. 27, No. 3, pp. 335-348.
- [20] Min, S. H., S. T. Kim, and G. H. Kim(2000), Evaluation of metal toxicity by alga, water fleas and luminescent bacteria, KSCE Journal of Civil Engineering, Vol. 20, No. 3B, pp. 421-427.
- [21] Moon, S. J.(2016), Analysis of pigments and fatty acid of marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* on its culture conditions, M.Sc. thesis, Gunsan National University, Gunsan, Korea.
- [22] OECD 201(2011), Guidelines for the Testing of Chemicals, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 201.
- [23] Oh, S. J., H. K. Kwon, J. Y. Jeon, and H. S. Yang(2015), Effect of monochromatic light emitting diode on the growth of four microalgae species (*Chlorella vulgaris*, *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum tricoratum*, *Skeletonema* sp.), Journal of the Korean Society of Marine Environment & Safety, Vol. 21, No. 1, pp. 1-8.
- [24] Park, K. S., S. M. Lee, T. Han, and J. S. Lee(2008), Establishment standard methods for marine ecotoxicological test, Journal of the Korean Society of Oceanography, Vol. 13, No. 2, pp. 106-111.
- [25] Peterson, S. M. and J. L. Stauber(1996), New algal enzyme bioassay for the rapid assessment of aquatic toxicity. Bulletin of environmental contamination and toxicology, Vol. 56, No. 5, pp. 750-757.
- [26] Prato, E., I. Parlapiano, and F. Biandolino(2012), Evaluation of a bioassays battery for ecotoxicological screening of marine sediments from Ionian Sea (Mediterranea Sea, Southern Italy), Environmental monitoring and assessment, Vol. 184, No. 9, pp. 5225-5238.
- [27] Rand, G. M.(Eds.)(1995), Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment, CRC press company, Washington, 1125pp.
- [28] Rand, G. M. and S. R. Petrocelli(1985), Fundamentals of aquatic toxicology, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, p. 666.
- [29] Rizwan, M., G. Mujtaba, and K. Lee(2017), Effects of multiple stress factors including iron supply on cell growth and lipid accumulation in marine microalga *Dunaliella tertiolecta*, Applied Chemistry for Engineering, Vol. 28, No. 3, pp. 306-312.
- [30] Samo, D., W. H. Kooistra, S. Balzano, P. E. Hargraves, and A. Zingone(2007), Diversity in the genus *Skeletonema* (BACILLARIOPHYCEAE): III. Phylogenetic position and morphological variability of *Skeletonema costatum* and *Skeletonema grevillei*, with the description of *Skeletonema ardens* sp., Journal of Phycology, Vol. 43, No. 1, pp. 156-170.
- [31] Stauber, J. L.(1995), Toxicity testing using marine and freshwater unicellular algae, Australasian journal of ecotoxicology, Vol. 1, pp. 15-24.
- [32] US EPA(2002), Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 1200 Pennsylvania Avenue NW Washington, DC 20460, EPA-821-R-02-012.
- [33] US EPA(2009), The ECOTOX (ECOTOXicology) database.

Retrived from http://www.epa.gov/ecotox/ecotox_home.htm.

- [34] Walsh, G. E.(1983), Cell death and inhibition of population growth of marine unicellular algae by pesticides, *Aquatic Toxicology*, Vol. 3, No. 3, pp. 209-214.
- [35] Weiner, J. A., M. E. DeLorenzo, and M. H. Fulton(2004), Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species, *Aquatic Toxicology*, Vol. 68, No. 2, pp. 121-128.
- [36] Zang, A. Q., K. M. Leung, K. W. Kwok, V. W. Bao, and M. H. Lam(2008), Toxicities of antifouling biocide Irgarol 1051 and its major degraded product to marine primary producers. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 57, No. 6-12, pp. 575-586.

Received : 2020. 07. 01.

Revised : 2020. 07. 20. (1st)

: 2020. 08. 04. (2nd)

Accepted : 2020. 08. 28.