

안동지역 하천의 환경오염물질과 곤충면역 생체지표 분석

유건상* · 고성운 · 조성환¹ · 이화성² · 김용균¹안동대학교 응용화학과, ¹안동대학교 농생물학과, ²경상북도 보건환경연구원

Environmental Pollutants in Streams of Andong District and Insect Immune Biomarker

Keon Sang Ryoo*, Seong-Oon Ko, Sunghwan Cho¹, Hwasung Lee², Yonggyun Kim¹

Department of Applied Chemistry, Andong National University, Andong 760-749, Korea

¹Department of Agricultural Biology, Andong National University, Andong 760-749, Korea²Gyeongbuk Government Public Institute Health & Environment, Daegu 702-839, Korea

ABSTRACT : Samples of water, soil, and sediment were taken from 10 streams near Andong, Korea in May 2004. To assess the degree of environmental pollution of each stream, chemical pollutants such as total nitrogen (T-N), total phosphorus (T-P), chemical oxygen demand (COD), heavy metals, organophosphorus pesticides, organochlorine pesticides, and dioxin-like PCB congeners were analyzed by standard process tests or U.S. EPA methods. In addition, biomarkers originated from insect immune systems of beet armyworm, *Spodoptera exigua*, were used to analysis of the environmental samples. Except Waya-chun stream showing T-N content of 9.12 mg/L, most streams were contaminated with relatively low levels of overall pollutants in terms of T-N, T-P, and COD, compared to their acceptable environmental levels designated by the Ministry of Environment. Contents of Pb and Cd in samples of each stream were much lower than environmentally permissible levels. However, several times higher concentrations of Pb and Cd were found in locations at Mi-chun, Kilan-chun, and Hyunha-chun streams, in comparison with other streams. Diazinon, parathion, and phenthoate compounds among organophosphorus pesticides were detected as concentrations of 0.19, 0.40, and 1.13 $\mu\text{g/g}$, respectively, from soil sample collected in the vicinity of Mi-chun stream. On the other hand, 16 organochlorine pesticides and 12 dioxin-like PCB congeners, known as endocrine disrupting chemicals, selected in this study were not found above the limit of detection. Biomarker analyses using insect immune responses indicated that Waya-chun stream was suspected as exposure to environmental pollutants. Limitation and compensation of both environmental analysis techniques are discussed.

KEY WORDS : T-N, T-P, COD, Heavy metal, Organophosphorus pesticide, Organochlorine pesticide, Dioxin-like PCB congener, Insect immune, Biomarker

초 록 : 경북 안동지역의 10개 하천 및 하천 주변으로부터 2004년 5월에 물, 토양, 퇴적물의 시료를 채취하였다. 이들 지역의 환경오염 수준을 평가하기 위해 표준공정시험법이나 U.S. EPA 법을 이용하여 시료 중의 총질소, 총인, 화학적 산소요구량, 중금속, 유기인 및 유기염소계 잔류농약, 그리고 dioxin-like PCBs 등의 오염물질의 분석을 실시하였으며, 이와 더불어 과밤나방(*Spodoptera exigua*)을 이용한 면역교란의 생체지표 분석을 병행하였다. 일반적으로 총질소가 9.12 mg/L 수준의 외야천을 제외하고는, 각 하천 중의 총질소, 총인, 화학적 산소요구량은 환경부에서 정한 허용기준치보다는 비교적 낮았다. 각 하천 시료 중의 납과 카드뮴의 함량은 허용 기준보다도 매우 낮았지만, 하천에 따라

*Corresponding author. E-mail: ksr@andong.ac.kr

차이가 있어서 미천, 길안천, 현하천의 납과 카드뮴 함유량은 다른 하천의 시료들에 비해서 몇 배 이상 높게 검출되었다. 잔류농약은 미천 주변의 토양에서 유기인계 살충제인 다이아지논, 파라치온, 그리고 펜토에이트가 0.19, 0.40, 1.13 $\mu\text{g/g}$ 농도로 검출되었다. 반면에 내분비계 교란물질로 알려져 있는 16종의 유기염소계 농약과 12종의 dioxin-like PCB congeners는 검출한계 미만으로는 확인할 수 없었다. 그러나 와야천의 시료에 대한 곤충면역 교란효과를 고려해 볼 때, 이 하천의 수질과 주변의 토양이 조사한 오염원 이외의 화합물에 오염되어 있을 가능성을 제시해 준다. 이상의 분석 결과를 토대로 화학적 및 생물학적 검정 기술의 제약점과 상호 보완성이 기술되었다.

검색어 : 총질소, 총인, 화학적 산소요구량, 중금속, 유기인계 농약, 유기염소계 농약, Dioxin-like PCB congeners, 곤충면역, 생체지표

총질소, 총인, 중금속, 잔류농약, dioxin-like PCBs 등은 대표적인 환경오염물질로서 전 세계적으로 많은 국가가 환경모니터링을 실시하고 있다. 이들 화학물질 중 질소와 인과 같은 영양염류는 자연수에 일정량 존재하나, 산업발달에 따른 폐기물 방류로 급격히 증가되어 하천, 호소, 연안해역의 부영양화(eutrophication)를 초래하여 녹조와 적조현상을 일으키고 있다(Kim *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004a; Lee, 2001). 유기염소계 잔류농약과 dioxin-like PCBs는 지속성 유기오염물질(persistent organic pollutant)로 환경에 장기간 잔류함으로써 먹이연쇄를 통하여 최종영양단계 생물에 농축되며 대기와 물에 의한 장거리 이동에 의해 오염원이 존재하지 않은 극지방에서도 발견되고 있다(Ann *et al.*, 2003; Shu *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004b). 이러한 지속성 유기오염물질들은 생식 장애, 개체군 감소, 그리고 각종 독성발현(발암성, 기형유발 작용, 면역독성 등)을 하는 것으로 알려져 있어 인체의 건강 및 생태계에 커다란 위협이 되고 있는 실정이다.

경북 안동지역은 임하댐과 안동댐이 위치하고 동서남북에 걸쳐 많은 하천이 흐르고 있으며, 이들 하천 및 하천 주위는 도시화나 산업 활동에 의한 영향을 비교적 적게 받아 환경보존이 잘 유지되어 있는 지역이다. 일반적으로 하천의 생태계를 잘 유지하기 위해서는 하천에 서식하는 생물종을 조사하고, 하천의 환경조건과 생물생태와의 역학적인 관계를 정립하는 과정이 필요하다. 또한 각 하천 및 하천 주변에 있는 환경오염물질들의 잔류량을 측정하여 폭 넓게 하천을 평가할 필요가 있다. 그러나 현재까지 안동지역 주변에 있는 하천의 전반적인 환경오염 현황은 구체적이고 명확히 보고되고 있지 않다.

본 연구는 안동지역에 위치해 있는 다수의 하천과 하천 주변에서 물, 토양, 퇴적물을 채취하여, 이들 시료 중의 총질소, 총인, 화학적 산소요구량, 중금속, 잔류농약, 그

리고 dioxin-like PCBs 등을 분석하였다. 또한 이들 환경 시료에 대해서 생체지표 분석이 병행되었다. 이는 최근 Ryoo *et al.* (2005)이 보고한 바와 같이, 파밤나방(*Spodoptera exigua*) 면역반응들이 다이옥신류 노출 농도에 비례하여 억제된다는 사실에 기인되어 개발된 생체 분석법을 이용하였다. 이러한 화학적 및 생물학적 평가 기법을 통해 이들 하천이 현재 처하고 있는 환경오염현황을 평가하는 데 목적을 두었다.

재료 및 방법

시료 채취지점

경북 안동지역에 위치해 있는 10개 하천(Fig. 1)을 선정하여 각 하천의 이름이 명시되어 있는 표지판 주변의 물, 토양, 퇴적물을 채취하였다. 채취한 시료 중 물은 유리섬유 여지(GF 50)로 여과하고, 토양 및 퇴적물은 실온에서 건조시킨 후 850 μm mesh 체를 통과한 것만을 모아 분석을 마칠 때 까지 공정시험법의 보존방법에 의거하여 보관하였다.

시약

시료의 추출 및 정제, 유기인계 농약(Supelco, Ltd., USA), 유기염소계 농약(AccuStandard, Inc., USA) 및 dioxin-like PCBs (Cambridge Isotope Laboratory, Inc., USA)의 표준용액 조제를 위하여 사용한 유기용매(n-hexane, acetone, iso-octane, MTBE, dichloromethane)는 모두 Analyzed HPLC급(Malinkrodt Baker, Inc., USA)을 사용하였다. 시료 추출액의 정제는 사전에 110°C 오븐에서 활성화시킨 실리카겔(Silica gel 60, M

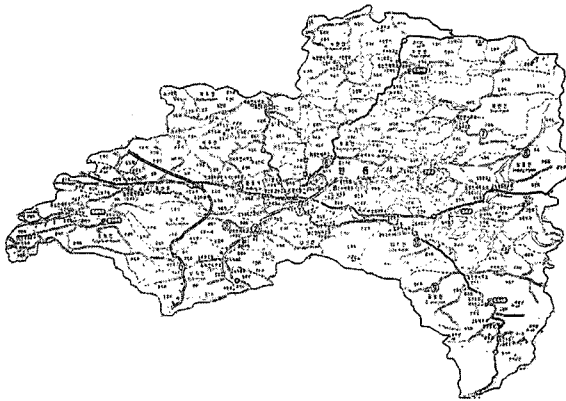


Fig. 1. Sampling sites near Andong, Korea: ① Banbyun-chun ② Norym-chun ③ Mi-chun ④ Poongsan-chun ⑤ Songya-chun ⑥ Waya-chun ⑦ Kookye-chun ⑧ Daekok-chun ⑨ Hyunha-chun ⑩ Kilan-chun

erck, Germany)을 컬럼에 충전시켜 시행하였다. 총질소, 총인, 화학적산소요구량 분석을 위해서 과황산칼륨, 아스코르빈산, 몰리브덴산암모늄(4수화물), 주석산안티몬칼륨, 술퍼민산암모늄, 인산이수소칼륨, 질산칼륨, 염산, 황산, 수산화나트륨 등의 시약은 모두 Sigma Aldrich Korea의 제품을 사용하였다. 납과 카드뮴의 표준용액은 Kanto Chemical Company, Inc., Japan의 제품을 사용하였고 검량선(calibration curve)을 얻기 위하여 표준용액을 단계적으로 3차 증류수를 이용하여 희석하였다. 또한 납과 카드뮴의 시료 전처리는 Merck, Germany에서 제조한 염산, 황산, 과염소산을 사용하였다.

총질소와 총인 분석

시료 중 질소 함량은 과황산칼륨의 존재 하에 120°C의 고압증기멸균기를 이용하여 질산이온으로 산화시킨 다음 산성에서 흡광도(220 nm)를 측정하여 총질소를 정량하였다(EDHT, 2003). 분석기기는 UV-vis spectrophotometer (UVmini 1240CE, Shimadzu)를 이용하였다. 시료 중의 모든 인화합물은 120°C의 고압증기멸균기를 이용하여 인산염(PO₄³⁻) 형태로 변화시킨 다음 인산염을 아스코르빈산환원 흡광광도법(EDHT, 2003)으로 UV-vis spectrophotometer (UVmini 1240CE, Shimadzu)를 사용하여 880 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 함량을 산출하였다.

화학적 산소요구량(COD) 분석

시료를 황산산성으로 하여 과망간산칼륨 일정량을 넣고 30분간 수용액상에서 가열 반응시킨 다음 소비된 과망간산칼륨으로부터 이에 상응하는 산소의 양을 측정하여 COD를 구하였다(EDHT, 2003).

납과 카드뮴 분석

원자흡수분광기(SpectraAA-220FS, Varian)를 사용하여 납은 283.3 nm, 카드뮴은 228.8 nm의 파장에서 흡광도를 구하여 함량을 계산하였다(EDHT, 2003).

잔류농약 분석

유기인계 잔류농약 중 EPN, parathion, dementon-s-methyl, diazinon, phenthoate 화합물(Fig. 2)을 염광 검출기(flame photometric detector)가 장착된 가스 크로마토그래프(Varian CP 3800)로 확인하고 정량하였다(EDHT, 2003). 유기염소계 잔류농약 중 aldrin, alpha-BHC, beta-BHC, delta-BHC, dieldrin, endosulfan(alpha), endosulfan(beta), endosulfan sulfate, eldrin, eldrin aldehyde, gamma-BHC, heptachlor, methoxychlor, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, 4,4-DDT 16 종(Fig. 3)을 U.S. EPA Method 8080에 따라 시료 전처리 한 후 전자포획검출기(electron capture detector)가 장착된 가스 크로마토그래프(GC Trace 2000, Italy)를 사용하여 확인하고 정량하였다(Keith, 1996).

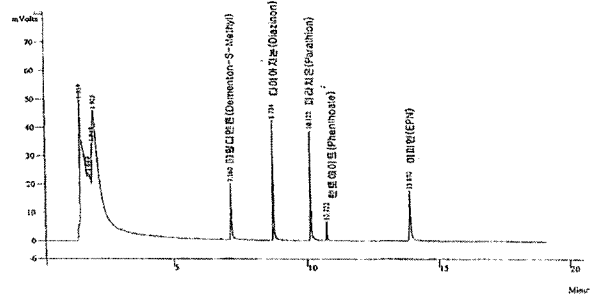


Fig. 2. GC chromatogram of organophosphorus pesticides. See the details of running condition in *Materials and Methods*.

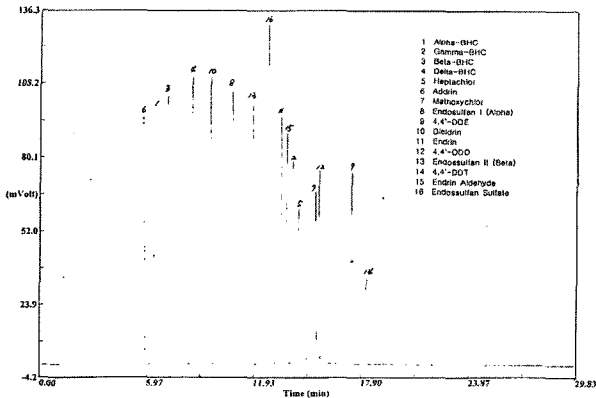


Fig. 3. GC chromatogram of organochlorine pesticides. See the details of running condition in *Materials and Methods*.

Dioxin-like PCBs 분석

209종의 PCBs (polychlorinated biphenyls) 중 다이옥신과 같이 coplanar 구조를 가지고 있는 12개의 PCB congeners (Fig. 4)를 표준공정시험방법에 의거하여 시료전처리 한 후, 전자포획검출기(electron capture detector)가 장착된 가스크로마토그래프(GC Trace 2000, Italy)를 사용하여 정성 및 정량 분석하였다(EDHT, 2003).

세포성 면역 분석

Park and Kim (2000)의 방법으로 사육된 파밤나방 5령 유충에 미리 준비된 농도의 환경오염물질들을 미량주사기를 이용하여 곤충의 혈장으로 8 μ l씩 접종하였다. 그리고 실온에서 30분간 방치 후 LB배지에서 24시간 배양된 2 μ l (1×10^7 cfu/유충)의 *Escherichia coli* Top10을 접종하

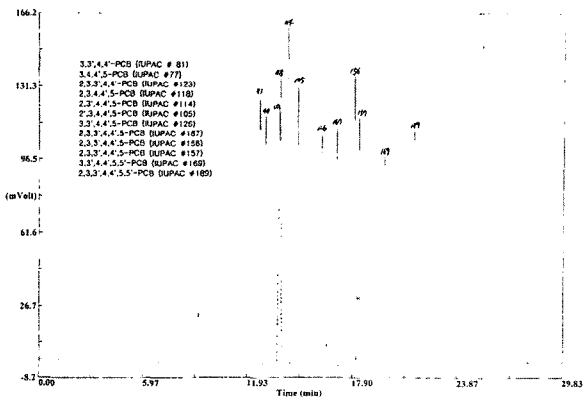


Fig. 4. GC chromatogram of dioxin-like PCB congeners. See the details of running condition in *Materials and Methods*.

였다. 세균을 접종한 후 실온에서 12시간 방치한 후 유충을 해부하여 혈장에 생긴 혈구소낭수를 해부 현미경상에서 40배로 확대하여 관찰하였다.

체액성 면역 검정

체액성 면역 검정은 곤충혈액을 이용한 페놀옥시다(ph-enoloxidase, PO) 활성 측정법(Park and Kim, 2003)을 이용하여 분석하였다. PO 활성 측정법은 먼저 500배로 농축된 환경오염 분석용 시료 1 μ l, 파밤나방 5령 혈액 10 μ l 및 laminarin (Sigma, USA) 1 μ g을 8분 동안 실온에서 혼합 후 면역반응을 유도하였다. 반응 후 PO와 반응할 수 있는 기질인 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA, Sigma, USA) 1 μ g이 용해되어 있는 인산완충용액 (pH 7.0) 988 μ l에 반응물들을 처리하여 PO 활성을 495 nm의 파장에서 5분 간격으로 3회 측정하였다.

면역 신호체계 검정

면역 신호체계 검정은 곤충혈액을 이용한 phospholipase A₂ (PLA₂) 활성 측정법(Park and Kim, 2003)을 이용하여 분석하였다. PLA₂ 활성 측정법은 PO 활성 측정법에서 인위적인 면역반응을 일으키기 전에 50% 에탄올 1 μ l로 처리하였고, PLA₂ 활성 구제효과 조사 시에는 100 ng의 아라키도닉산(Sigma, USA)가 용해되어 있는 50% 에탄올 1 μ l로 처리하였다. 그리고 인위적으로 면역반응을 PO 활성 측정법과 동일하게 PO 활성을 495 nm의 파장에서 측정하였다.

면역세포 치사 효과

파밤나방 5령 유충 혈액 속에 존재하는 혈구세포를 이용하여 세포치사 현상을 분석하였다(Cho and Kim, 2004). 곤충의 혈액을 1.5 ml의 micro-tube에 넣은 후 6,500 rpm에서 3분간 원심 분리하여 혈장을 제거하고, Grace's insect medium (Sigma, USA)을 이용해서 3회 세척 후, 세포 수를 10 μ l당 약 50개가 존재하도록 배양 용액을 첨가했다. 커버 글라스 위에 30 μ l의 혈구 용액을 처리한 후 25°C의 과습한 상태의 배양기에 30분간 방치하였다. 다시 혈구 배양액을 500배로 농축된 환경오염 분석용 물 시료 10 μ l로 치환하였고 25°C의 과습한 상태의 배양기에서 2시간동안 반응을 시켰다. 이후 혈구세포의 세포치사 형태를 도립현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

하천수의 총질소, 총인, COD

안동지역에 위치해 있는 각 하천의 총질소, 총인, COD의 측정 결과를 Table 1에 나타내었다. 일반적으로 호소는 환경부 기준(생활환경 구분)으로 5등급으로 나뉘는데, 등급 중에서 최하위인 5급(공업용수 3급)의 호소는 총질소, 총인, COD의 농도가 각각 1.5 mg/L 이하, 0.15 mg/L 이하, 10.0 mg/L 이하를 적용한다(Jung, 1997). 반면에 하천의 경우는 호소와 달리 환경부에서 총질소, 총인, COD의 환경 기준치를 설정해 놓지 않고 있으나 논문이나 보고서에 의하면 호소의 환경부 기준으로 각 하천의 수질 오염도를 판단하고 있다. 따라서 본 연구도 호소의 환경부 기준치를 근거로 하여 안동 시 지역에 있는 각 하천들의 오염현황을 파악하였다.

Table 1에 나타낸 바와 같이 1급 하천인 반변천은 총질소의 농도가 1.24 mg/L로 환경부 호소 기준치보다 약간 낮은 수준이었으나, 와야천은 총질소의 농도가 9.12 mg/L로 반변천을 제외한 다른 하천들과 비교해서 2배정도 높은 수치를 보였고, 환경부 호소 기준치보다는 무려 6배 이상 높게 검출되었다. 총인의 경우, 송야천과 와야천에서 측정된 총인의 농도는 각각 0.166, 0.169 mg/L로 다른 하천과 비교해서 매우 높게 나타났으나 환경부 호소 기준치인 0.15 mg/L보다는 약간 상회하는 수준을 보였다. 또한 각 하천의 COD 농도를 측정된 결과, 하천의 COD 농도는 대략 5-11 mg/L로 구계천(11.0 mg/L)을 제외하고는 환경부 호소 기준치 이하를 나타내었다. 전반적으로 고찰해 볼 때 안동지역 부근에 있는 하천들은 외부로부터의 오염이 크지 않은 것으로 나타났으나, 와야천의 총질소는 환경부의 기준을 크게 상회하였다.

하천수의 납, 카드뮴

국내 환경기준에 의하면 하천, 호소 등을 포함해서 수질 중의 납은 100 $\mu\text{g/L}$ 이하, 카드뮴은 10 $\mu\text{g/L}$ 이하로 검출되어야 하며, 토양의 경우는 토양오염 우려기준으로 납은 100 $\mu\text{g/g}$, 카드뮴은 1.5 $\mu\text{g/g}$ 으로 규정하고 있다(Jung, 1997). 그러나 수질 및 토양과는 달리 하천과 호소의 퇴적물 중에 존재하는 납과 카드뮴 등의 중금속에 대해서는 아직 환경부 기준이라든가 관련법규가 미비하여, 2004년 현재 퇴적물 중에 존재하는 중금속의 환경 기준치는 아직 설정되어 있지 않고 있다.

Table 2에 나타낸 바와 같이, 하천수 중의 납과 카드뮴은 검출되지 않았거나 검출되었다 하더라도 환경 기준치에 비하면 상당히 낮은 수준이었다. 하천 인근 지역에서 채집한 토양 중의 납 함유량을 보면 미천 3.06 $\mu\text{g/g}$, 현하천 4.68 $\mu\text{g/g}$, 길안천 11.34 $\mu\text{g/g}$ 로 다른 하천 주변의 토양보다 높았고, 토양 중의 카드뮴 농도도 납의 경우와 마찬가지로 경향을 보였다. 각 하천 바닥에서 수거한 퇴적물 중의 납과 카드뮴을 분석한 결과, 다른 하천에 비하여 길안천, 현하천, 풍산천, 미천의 퇴적물이 납과 카드뮴의 함량이 비교적 높았다. 전반적으로 고찰해 볼 때, 납과 카드뮴의 농도는 환경부에서 제시하고 있는 환경기준치보다는 매우 낮아 크게 우려할 수준이 아니었으나, 현하천, 길안천, 미천의 수질과 퇴적물, 그리고 주변 토양은 다른 지역보다 납과 카드뮴이 보다 높게 검출되어 향후 이들 하천 및 하천 주변의 오염정화를 위한 사후관리가 요구된다.

하천수, 토양, 퇴적물 중의 농약 잔류량

유기인계 농약의 잔류량 분석결과를 Table 3에 나타내었다. 10개 하천 지역 모두 하천수와 퇴적물에서는 유기인계 잔류농약이 전혀 검출되지 않았다. 그러나 다른

Table 1. Concentration of total nitrogen (T-N), total phosphorous (T-P), and chemical oxygen demand (COD) in water of 10 streams

Sampling sites	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)	COD (mg/L)
Banbyun-chun	1.24	0.014	5.0
Daekok-chun	4.08	0.015	6.0
Songya-chun	3.53	0.166	7.0
Kilan-chun	3.43	0.035	6.0
Mi-chun	3.39	0.010	6.0
Norym-chun	3.77	0.020	4.0
Kookye-chun	3.95	0.005	11.0
Poongsan-chun	3.82	0.101	7.0
Hyunha-chun	4.83	0.024	5.0
Waya-chun	9.12	0.169	8.0

Table 2. Concentrations of lead (Pb) and cadmium (Cd) of 10 streams in Andong district

Sampling sites	Pb			Cd		
	Water ($\mu\text{g/L}$)	Soil ($\mu\text{g/g}$)	Sediment ($\mu\text{g/g}$)	Water ($\mu\text{g/L}$)	Soil ($\mu\text{g/g}$)	Sediment ($\mu\text{g/g}$)
Banbyun-chun	1.52	2.21	0.81	N.D. ¹	0.017	0.014
Daekok-chun	N.D.	1.04	1.23	0.005	0.018	0.012
Songya-chun	1.27	0.22	0.50	N.D.	0.012	0.016
Kilan-chun	0.97	11.34	2.24	N.D.	0.152	0.032
Mi-chun	1.13	3.06	6.05	N.D.	0.066	0.130
Norym-chun	0.68	1.13	0.81	N.D.	0.027	0.025
Kookye-chun	0.06	0.75	1.75	0.101	0.010	0.014
Poongsan-chun	0.24	1.76	6.23	0.056	0.021	0.165
Hyunha-chun	0.50	4.68	2.53	N.D.	0.051	0.055
Waya-chun	N.D.	0.45	1.42	N.D.	0.004	0.030

¹ N.D. represents "under limit of detection, 0.001 $\mu\text{g/L}$ ".

하천 주변지역의 토양의 경우와는 달리 미천 주변에서 채취한 토양에서는 다이아지는 0.19 $\mu\text{g/g}$, 파라치온 0.40 $\mu\text{g/g}$, 펜토에이트는 1.13 $\mu\text{g/g}$ 이 검출되었다. 이러한 분석 결과를 고찰해 볼 때 농경지에 살포한 유기인계 농약이 하천주변의 토양은 물론 하천수에서도 검출될 수 있음을 의미한다.

유기염소계 농약의 잔류량 분석결과를 Table 4에 나타내었다. Table 4에서 나타낸 바와 같이, 하천수, 토양, 퇴적물에서 유기염소계 농약은 검출한계(각각의 유기염소계 잔류농약에 대하여 5 ppb) 이상에서 전혀 검출되지 않았다.

하천수, 토양, 퇴적물 중의 dioxin-like PCBs

PCBs는 매우 안정한 화합물로 쉽게 분해되지 않고 생물

농축성이 높은 물질로 환경매체와 생태계에서 널리 탐지되고 있다(Bowadt and Johansson, 1994; David and Anders, 1991). PCBs는 독성실험 결과 발암물질로 분류되어 있으며 209종의 PCB congeners 중에서 dioxin-like PCB congeners로 명명된 non- and mono-ortho PCB congeners는 2,3,7,8-tetra chlorinated dibenzo-p-dioxin (TCDD)와 유사한 coplanar 구조로 구성되어 있어 다른 PCB congeners보다도 독성등가인자(toxicity equivalence factor) 값이 상대적으로 높은 편이다(Safe, 1990; Safe, 1998a,b).

하천수, 인근 토양, 퇴적물 중에 잔류하고 있는 dioxin-like PCB congeners의 분석결과를 각 하천별로 Table 5 나열하였다. Table 5에서 나타낸 바와 같이, dioxin-like PCB congeners는 어떠한 시료에서도 검출한계(5 ng/g) 이상에서는 전혀 검출되지 않았다.

Table 3. Concentrations of organophosphorus pesticides in soil near 10 streams of Andong district

Sampling sites	Dementon-S-methyl ($\mu\text{g/g}$)	Diazinon ($\mu\text{g/g}$)	Parathion ($\mu\text{g/g}$)	Phenthoate ($\mu\text{g/g}$)	EPN ($\mu\text{g/g}$)
Banbyun-chun	N.D. ¹	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Daekok-chun	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Songya-chun	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Kilan-chun	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Mi-chun	N.D.	0.19	0.40	1.13	N.D.
Norym-chun	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Kookye-chun	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Poongsan-chun	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Hyunha-chun	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Waya-chun	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

¹ N.D. represents "under limit of detection, 5 ppb".

Table 4. Concentrations of organochlorine pesticides in water, soil, and sediment of 10 streams in Andong district

Analytical residues	Concentrations present in sampling sites ^{1,2}									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
ALPHA-BHC	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
GAMMA-BHC	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BETA-BHC	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DELTA-BHC	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
HEPTACHLOR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ALDRIN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
METHOXYCHLOR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ENDOSULFAN I (ALPHA)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4,4'-DDE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DIELDRIN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ENDRIN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4,4'-DDD	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ENDOSULFAN II (BETA)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4,4'-DDT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ENDRIN ALDEHYDE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ENDOSULFAN SULFATE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

¹ A: Daekok-chun, B: Hyunha-chun, C: Kilan-chun, D: Mi-chun, E: Norym-chun, F: Poongsan-chun, G: Songya-chun, H: Banbyun-chun, I: Waya-chun, J: Kookye-chun

² N.D. represents "under limit of detection, 5 ppb".

생체지표 분석

환경오염원에 대한 화학분석은 오직 분석 대상 화합물에 대해서 정확한 존재와 정량적 분석이 가능하다. 그러나, 자연 환경에 존재하는 다양한 오염원에 대해서 전체적 개별 분석은 비용이나 시간적 문제를 고려하여 보면 불가능하다(Melancon, 1995). 또한 화학분석으로 얻어진 잔류 화합물질의 정보가 궁극적으로 생태계에 미치는 영향과

의 연계성을 해석하는 데는 제약점을 가지게 된다. 이러한 화학분석의 제약점을 보완하기 위해 생체지표의 필요성이 있게 된다. 본 연구에서는 파밤나방의 면역 반응을 대상으로 생리지표가 고안되었고, 이를 자연 환경 시료에 접목하여 이에 대한 응용성과 개발 방향을 모색하였다. 본 생체지표는 다이옥신류를 대상으로 반응성이 높았고, 다이옥신 노출농도별 검출한계를 분석하였다(Ryoo *et al.*, 2005).

Table 5. Concentrations of dioxin-like PCB congeners in water, soil, and sediment of 10 streams in Andong district

Dioxin-like PCB congeners (IUPAC Number)	Concentrations present in sampling sites ^{1,2}									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
3,3',4,4'-PCB (81)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3,4,4',5-PCB (77)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2,3,3',4,4'-PCB (123)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2,3,4,4',5-PCB (118)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2,3',4,4',5-PCB (114)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2',3,4,4',5-PCB (105)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3,3',4,4',5-PCB (126)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2,3,3',4,4',5-PCB (167)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2,3,3',4,4',5-PCB (156)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2,3',4,4',5,5'-PCB (157)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3,3',4,4',5,5'-PCB (169)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2,3,3',4,4',5,5'-PCB (189)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

¹ A: Daekok-chun, B: Hyunha-chun, C: Kilan-chun, D: Mi-chun, E: Norym-chun, F: Poongsan-chun, G: Songya-chun, H: Banbyun-chun, I: Waya-chun, J: Kookye-chun

² N.D. represents "under limit of detection, 5 ppb".

면역반응을 대상으로 고안된 4 종의 생체지표는 세포성 면역반응, 체액성면역반응, 면역중개반응 및 세포자연치사반응을 조사하였으며 화학분석에서 이용된 동일 시료에 대해서 분석하였다. 세포성 면역반응의 일종인 소낭형성 반응을 기초로 분석한 결과를 살펴보면 (Fig. 5), 수집된 물, 퇴적물, 토양 시료 가운데에서 와야천에서 수집된 시료들만이 곤충의 세포성 면역반응에 영향을 미치는 것으로 조사되었다. 와야천을 제외한 다른 하천들의 물, 퇴적물, 토양 시료들은 각각 통계적으로 유의차가 나지 않아서 세포성 면역반응에 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다.

소낭 형성은 주입된 세균에 대해서 혈구세포들의 응집 반응으로서 최소 3단계의 반응으로 구성되고 있다(Gillespie and Kanost, 1997; Lavine and Strand, 2002). 첫째로 과립혈구에 의해 외래 인자를 인식하고 다양한 사이토카인을 분비하게 하여 외래인자 주변으로 부정형혈구를 유인하게 된다. 여기에 관여하는 사이토카인의 일종이 *Pseudoplasia includens*에서 발견된 PSP1 (plasmacyte spreading peptide 1)이다(Clark *et al.*, 1997). 또한 특별히 세균 침입에 대해서 다양한 아이코사노이드류가 활성화된 PLA₂와 이후 산화 반응을 통해 나타나게 된다(Stanley, 2000; Park *et al.*, 2004). 둘째로 유인된 부정형혈구는 세포모양 변화와 부착기능 활성화로 외래인자 주변에 여러 층으로 모이게 되고, 페놀옥시다제에 의해 응고반응에 소낭을 형성하게 된다. 마지막 단계로 다시 과립혈구가 최종 단일외피를 페놀옥시다제의 도움으로 형성하면서 소낭 형성반응을 마치게 된다. 이러한 과정을 살펴보면, 페놀옥시다제의 활성이 소낭 형성에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다는 것을 알 수 있다.

페놀옥시다제의 활성을 중심으로 생체지표가 고안되었고, 이를 이용하여 환경시료를 분석하였다(Fig. 6). 와야천의 모든 시료는 페놀옥시다제의 활성을 억제하였고, 기타 다른 환경시료는 소낭 형성에서 보듯이 페놀옥시다제의 활성을 억제하지 못하였다. 이는 소낭 형성 반응에 관여하는 여러 인자 중에 환경시료에 존재하였던 화합물이 페놀옥시다제의 활성을 억제하여 궁극적으로 소낭형성억제를 유도하였다는 사실을 유추할 수 있다. 페놀옥시다제는 타이로신의 유도체인 L-dihydrophenylalanine과 같은 monophenol의 hydroxylation 반응을 촉매하여 quinone 물질로 형성하게 하는 효소이다(Sugumaran, 1998). 혈액의 응고에 관여하는 것으로 이 효소의 무분별한 활성화는 곤충 자신에게 매우 위험하다. 이를 위해 페놀옥시다제는 비활성화 상태인 프로페놀옥시다제로 존재하며, 다시 활

성이 조절되는 serine protease 작용에 의해 활성화된다(Söderhäll and Cerenius, 1998). 파밤나방에서는 이러한 프로페놀옥시다제가 활성화된 페놀옥시다제로 전환하는데 아이코사노이드류가 관여한다고 밝혔다(Park and Kim, 2003; Ji and Kim, 2004). 아이코사노이드류는 PLA₂의 작용에 기인된 아라키도닉산의 산화형태로 나타나는데, 궁극적으로 환경물질에 존재한 소낭형성 억제물질이 페놀옥시다제의 활성화를 억제함으로써 나타났다면, 이는 PLA₂를 먼저 억제했을 가능성을 가지고 있다.

PLA₂를 대상으로 고안된 생체지표를 이용하여 와야천의 시료를 대상으로 분석하였다(Fig. 7). 존재하는 오염원이 PLA₂를 억제하는 지는 이 효소의 촉매 결과물인 아라키도닉산을 부가하여 줌에 따라 억제된 반응이 구제되는지를 밝힘으로 결정하게 된다. 와야천의 시료는 PLA₂와 기능적으로 연결된 페놀옥시다제의 활성을 억제하였으며, 아라키도닉산을 처리한 결과, 이 억제가 회복된다는 것을 나타냈다. 이는 이 와야천에 존재하는 화합물이 PLA₂를 직접적으로 억제하는 물질이라는 것을 보여주는 결과이다. 이러한 PLA₂ 억제물질로서 다이옥신류가 억제 농도별로 결정되었고(Ryoo *et al.*, 2005), 중금속류가 이러한 억제를 유도한다는 것이 최근의 결과이다(미보고자료). 이와 유사한 환경오염화합물중에 PCB류는 PLA₂를 억제하지 않고, 페놀옥시다제 활성과 소낭형성을 억제하는 것으로 판명되었다. 이러한 결과는 앞의 화학분석 결과를 뒷받침하는 것으로 사려 된다.

세포자연치사(apoptosis) 반응을 통한 생체지표는 또한 와야천의 모든 시료에 대해서 유도된다는 것이 밝혀졌다(Fig. 8). 세포자연치사반응은 개체의 발육 과정을 통해 퇴화되는 조직을 제거하는 생리반응이다. 이러한 자연세포치사과정을 병적으로 나타나는 괴사(necrosis)와 치사과정에서 구별된다(Arends and Wyllie, 1991). 세포자연치사과정을 밝는 세포는 세포막소포(membrane blebbing)를 형성하고, 이는 궁극적으로 아포토시스 소낭을 형성하게 된다. 또한 세포내에서는 염색사용축 및 DNA 단편현상이 일어나게 된다. 본 분석에서는 이중 세포막소포를 중심으로 분석하여 세포자연치사를 추정하였다.

이상의 화학적 및 생물적 환경시료 분석결과를 종합하여 본다. 경북 안동지역에 위치해 있는 하천수와 퇴적물, 그리고 하천 주변의 토양을 수집하여 이들 시료에 존재하는 총질소, 총인, 화학적 산소요구량, 중금속(납, 카드뮴), 잔류농약, dioxin-like PCB congeners 등의 오염물질이 분석되었고, 또한 생체지표를 이용하여 각 시료별로 세포성 면역분석, 체액성 면역분석, 면역신포 체계분석, 면역

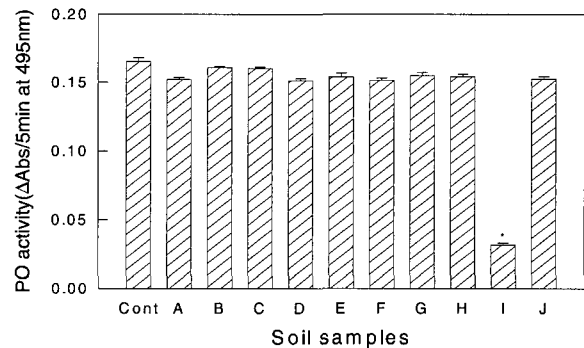
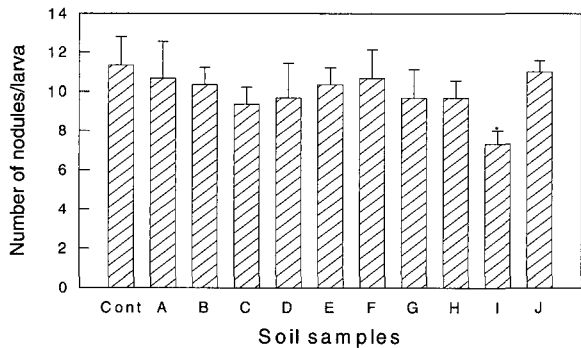
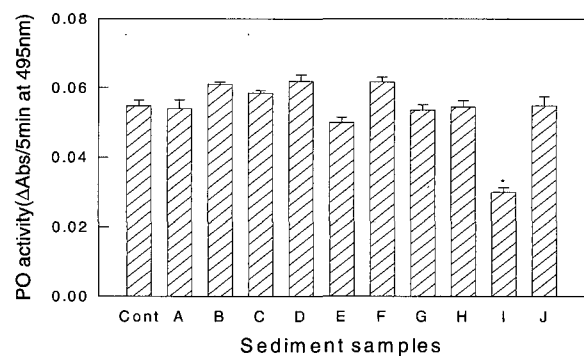
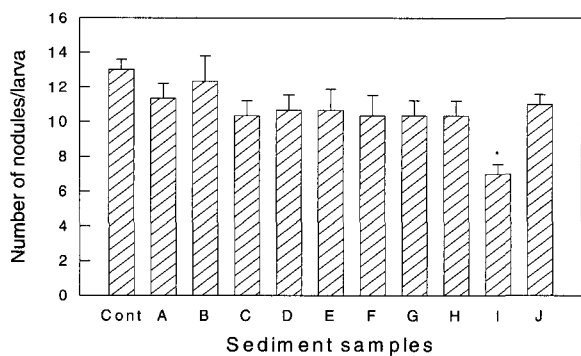
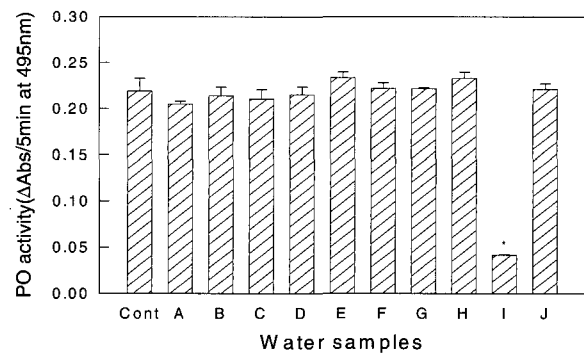
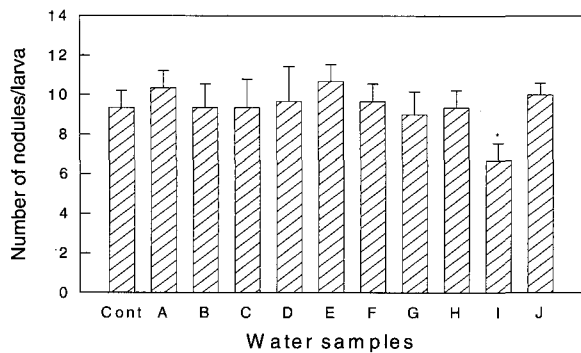


Fig. 5. Hemocyte nodulation biomarker to detect exposure of chemical pollutants in 10 Andong streams (A: Daekok-chun, B: Hyunha-chun, C: Kilan-chun, D: Mi-chun, E: Norym-chun, F: Poongsan-chun, G: Songya-chun, H: Banbyun-chun, I: Waya-chun, J: Kookye-chun). Effect of field water, sediment, and soil samples on cellular immune response of *Spodoptera exigua*, was analyzed by counting hemocyte nodule in response to bacterial injection with *Escherichia coli*. The error bars indicate standard deviations of three measurements. The asterisk above the error bar indicate significant difference of the mean at Type I error = 0.05 (LSD test). 'Cont' represents deionized distilled water.

Fig. 6. Phenoloxidase biomarker to detect exposure of chemical pollutants in 10 Andong streams (A: Daekok-chun, B: Hyunha-chun, C: Kilan-chun, D: Mi-chun, E: Norym-chun, F: Poongsan-chun, G: Songya-chun, H: Banbyun-chun, I: Waya-chun, J: Kookye-chun). Effect of field water, sediment, and soil samples on phenoloxidase (PO) activation of the hemolymph of *Spodoptera exigua* larvae was estimated. The error bars indicate standard deviations of three measurements. The asterisk above the error bar indicate significant difference of the mean at Type I error = 0.05 (LSD test). 'Cont' represents deionized distilled water.

세포 치사효과 분석을 통하여 안동지역 주변의 하천이 현재 처해 있는 환경오염 수준이 얼마나 되는지 파악하였다. 각 하천의 총질소, 총인, 그리고 화학적산소요구량을

측정한 결과 대부분의 하천 수질오염도는 환경부 호소 기준치에 비해 비슷하거나 낮은 수준으로 밝혀졌으나, 와야천의 경우는 총질소가 환경 기준치보다 6배 이상 검

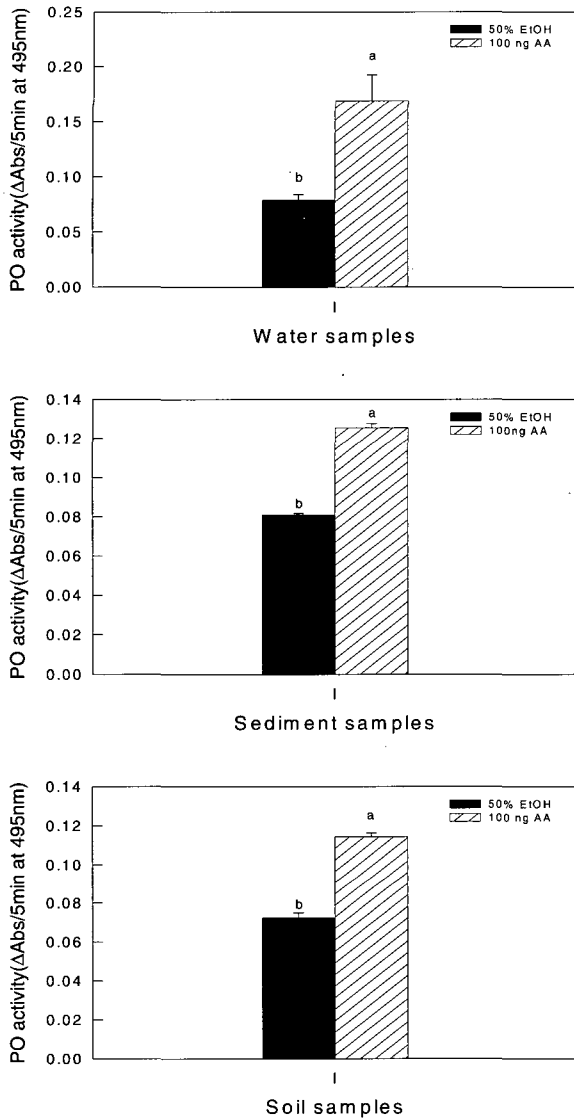


Fig. 7. Phospholipase A2 (PLA2) biomarker to determine nature of chemical pollutants present in Waya-chun near Andong. Effect of Waya-chun water, sediment, and soil sample on PLA2 activity in the hemolymph of *Spodoptera exigua* larvae was analyzed. PLA2 activity was measured indirectly by monitoring phenoloxidase (PO) activity in the presence or absence of arachidonic acid (AA). The error bars indicate standard deviations of three measurements. Different letters above the error indicate significant difference between at Type I error = 0.05 (LSD tests).

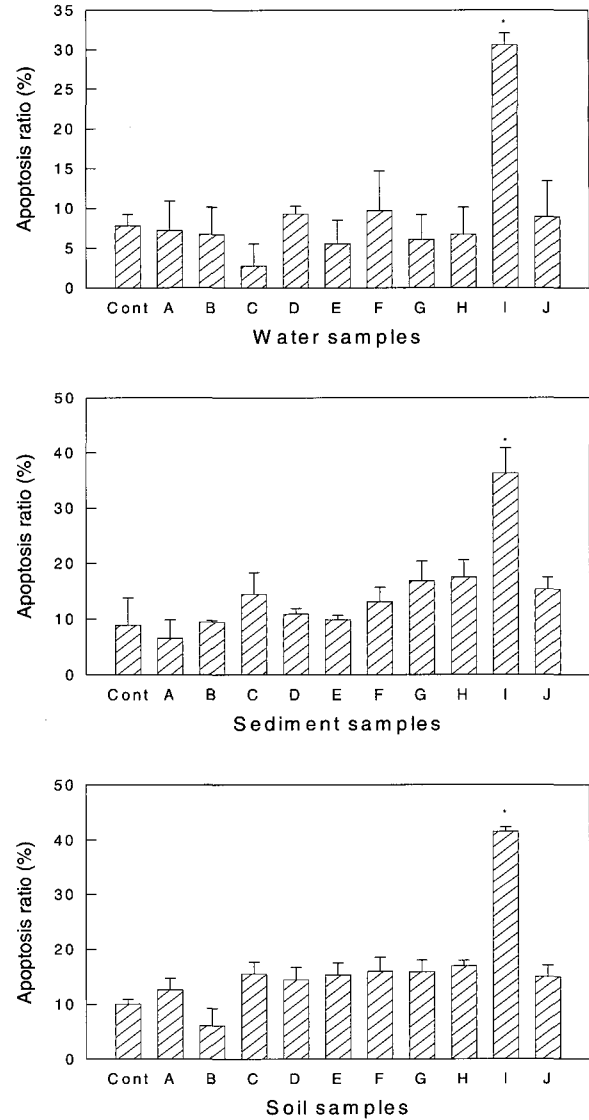


Fig. 8. Apoptosis biomarker to detect exposure of chemical pollutants in 10 Andong streams (A: Daekok-chun, B: Hyunha-chun, C: Kilan-chun, D: Mi-chun, E: Norym-chun, F: Poongsan-chun, G: Songya-chun, H: Banbyun-chun, I: Waya-chun, J: Kookye-chun). Effect of field water, sediment, and soil samples on hemocyte apoptosis in the hemolymph of *Spodoptera exigua* larvae was analyzed. The error bars indicate standard deviations of three measurements. The asterisk above the error bar indicates significant difference of the mean at Type I error = 0.05 (LSD test). 'Cont' represents deionized distilled water.

출되었다. 각 하천의 시료별 중금속(납과 카드뮴) 잔류량은 물이나 토양에서의 환경 허용기준치보다는 비교적 낮아 우려할 만한 상황은 아니나 미천, 길안천, 현하천의

중금속 농도는 다른 하천에 비해서는 비교적 높게 나타났다. 각 하천의 수질이나 퇴적물 중의 유기인 잔류농약은 다이아지논, 파라치온, 그리고 펜토에이트가 0.1-1.0 ppm

농도의 범위 내에서 미천 주변의 토양에서만 검출되었다. 지속성 유기화합물로 분류되어 있는 유기염소계 농약과 dioxin-like PCB congeners는 모든 시료에서 검출되지 않았다. 각 하천의 시료별로 곤충(파밤나방)을 이용한 세포성 면역, 체액성 면역, 면역신호 체계, 면역세포 치사효과와 같은 면역교란 분석을 통해, 와야천에서 채취한 시료만이 오염의 정도는 알 수 없으나 유일하게 위에서 언급한 여러 가지 영향에 심각하게 노출되어 있어, 앞으로 좀 더 이 하천에 대해 본 시험분석 오염물질 이외의 다른 오염물질에 대한 잔류량 분석이 필요하다고 본다.

화학적 잔류량분석과 생체지표를 이용한 다점오염원 존재 가능성을 시도한 본 연구 결과는 상호 보완적 기능을 보여주었다고 판단된다. 즉, 화학분석이 갖는 제약적인 특정분석대상 화합물 존재 유무 및 정량 분석에서, 생체지표가 나타내는 다인자 존재가능성 결과를 가미하여 환경오염원 추적 기법을 제고시킬 수 있다는 가능성을 보였다. 그러나 이러한 화학 기법이 갖는 환경 분석기술을 제고시키기 위한 생체지표는 검출한계 및 화학오염원별 특수성을 갖추어야 한다는 숙제를 남게 한다. 이를 위해서는 동일 시료에 대해서 다양한 생체지표의 접목으로 태생적 생체지표의 모호성을 극복하는 기술이 필요하다고 본다.

사 사

본 연구는 2004년도 경북지역환경기술개발센터와 한국환경기술진흥원에서 지원하는 차세대핵심 환경기술개발사업의 일환으로 수행되어 이루어졌으며, 이에 대한 깊은 감사를 드립니다.

Literature Cited

- Ann Y.H., I.S. Kim, E.K. Kim and M.H. Kim. 2003. Contamination and clean of soil environment. Goomibook. Seoul.
- Arends, M.J. and A.H. Wyllie. 1991. Apoptosis: mechanic and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Path.* 32: 223-354.
- Bowadt, S. and B. Johansson. 1994. Analysis of PCBs in sulfur-containing sediments by off-line supercritical fluid extraction and HRGC-ECD. *Anal. Chem.* 66: 667-673.
- Cho, S. and Y. Kim. 2004. Hemocyte apoptosis induced by entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, in *Bombyx mori*. *J. Asia-Pacific Entomol.* 7: 195-200.
- Clark, K.D., L.L. Pech and M.R. Strand. 1997. Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*. *J. Biol. Chem.* 272: 23440-23447.
- David, L.S. and W.A. Anders. 1991. Aqueous-phase oxidation of polychlorinated biphenyls of hydroxyl radicals, *Environ. Sci. Technol.* 25: 1419-1427.
- Editor of Dong-Hwa Technology (EDHT). 2003. Standard methods of water, waste and soil pollution. Dong-Hwa Technology. Seoul.
- Gillespie, J.P. and M.R. Kanost. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 29: 180-183.
- Ji, D. and Y. Kim. 2004. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits the expression of an antibacterial peptide, cecropin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* 50: 489-496.
- Jung, Y. 1997. Environmental water quality standards: New environmental science. pp. 419-420. Jigu Publishing Co. Seoul.
- Keith, L.H. 1996. Compilation of EPA's, U.S. EPA Method 8080, CRC Press, New York.
- Kim, D.C., J.H. Bae and K.H. Mun. 2001. Chemistry for environmental engineering. Dong-Hwa Technology. Seoul.
- Kim, S.J., M.T. Park, S.H. Sin, J.S. Ann, K.S. Lee, E.K. Lee, T.Y. Lee, H.S. Yim and I.S. Jang. 2004. Environmental Chemistry. Dong-Hwa Technology. Seoul.
- Kim, Y., J.S. Sin and K.J. Cho. 2004. Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing, and assessment. Jung-Haeng Sa. Seoul.
- Lavine, M.D. and M.R. Strand. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295-1309.
- Lee, P.Y. 2001. Comprehensive counterplan for the present environmental condition of the coastal district. *J. Environ. Hi-tech.* 9: 5-13.
- Melancon, M.J. 1995. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. pp. 220-240. *In Handbook of ecotoxicology*, eds. by D.J. Hoffman, B.A. Rattner, G.A. Burton, Jr. and J. Cairns, Jr. Lewis Publishers, Boca Raton, Fl.
- Park, Y. and Y. Kim. 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J. Insect Physiol.* 11: 1469-1476.
- Park, Y. and Y. Kim, Y. 2003. *Xenorhabdus nematophilus* inhibits p-bromophenacyl bromide (BPB)-sensitive PLA₂ of *Spodoptera exigua*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54: 134-142.
- Park, Y., Y. Kim and D. Stanley. 2004. The bacterium *Xenorhabdus nematophila* inhibits phospholipase A₂ from insect, prokaryote, and vertebrate sources. *Naturwissenschaften* 91: 371-373.
- Ryoo, K.S., S.-O. Ko, Y.P. Hong, J.-H. Choi, S. Cho, Y. Kim and Y.J. Bae. 2005. Levels of PCDDs and PCDFs in Korean river sediments and their detection by biomarkers. *Chemosphere* (In press).
- Shu, Y.Y., S.S. Wang, M. Tardif and Y. Huang. 2003. Analysis of polychlorinated biphenyls in aqueous samples by microwave-assisted headspace solid-phase microextraction. *J. Chromatography A.* 1008: 1-12.
- Safe, S. 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs) dibenzo-p-dioxins (PCDDs) dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *CRC Crit Rev. Toxicol.* 21: 51-88.
- Safe, S. 1998a. Development validation and problems with the toxic equivalency factor. Approach of risk assessment of dioxins

- and related compounds. *J. Anim. Sci.* 76: 134-141.
- Safe, S. 1998b. Limitations of the toxic equivalency factor approach for risk assessment of TCDD and related compounds. *Terat. Carcin. Mut.* 17: 285-304.
- Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 23-28.
- Stanley, D.W. 2000. Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems. 277 pp. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Sugumaran, M. 1998. Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Adv. Insect Physiol.* 27: 229-334.

(Received for publication 22 April 2005;
accepted 9 May 2005)