

파래의 포자형성률을 이용한 해양생태독성시험 방법에 관한 연구

한태준^{1,2} · 한영석² · 박경수^{3,*} · 이승민⁴

¹인천대학교 생물학과

²인천대학교 녹색기술연구소

³인양대학교 해양생명공학과

⁴국립수산과학원 서해수산연구소

Development of Marine Ecotoxicological Standard Methods for *Ulva* Sporulation Test

TAEJUN HAN^{1,2}, YOUNG-SEOK HAN², GYUNG SOO PARK^{3,*} AND SEUNG MIN LEE⁴

¹Department of Biology, University of Incheon, Incheon 402-749, Korea

²Institute of Green Technology, University of Incheon, Incheon 402-749, Korea

³Department of Marine Biotechnology, Anyang University, Incheon 417-833, Korea

⁴Environment Research Division, West Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Incheon 400-420, Korea

해조류를 이용한 수생태독성시험법으로 대형 녹조 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)의 포자형성률을 endpoint로 사용하는 독성시험법이 개발되었다. 생태독성시험을 위한 최적 조건은 광조사량 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 수소이온농도(pH) 7~9, 염분 25~35 psu 그리고 수온 15~20 °C이다. 본 시험법의 민감도는 표준중금속(Cd, Cu, Pb, Zn)을 가지고 확인하였고, 오염 시료에 적용 가능성은 9 지역의 산업폐수 또는 생활하수 오니 용출액(elutriate)을 이용하여 이루어졌다. 네 종의 중금속에 대한 포자형성률 억제 반응의 EC₅₀ 값을 산출한 결과, 구리($0.062 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) > 카드뮴($0.208 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) > 납($0.718 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) > 아연($0.776 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 순으로 민감하게 나타났는데, 이러한 결과는 US EPA에서 제공하는 ECOTOX DB에 탑재되어 있는 국제적으로 공인된 수생태 독성시험법 결과와 비교해 볼 때, 더 높은 중금속 민감성을 보였다. 현장시료에 대한 포자형성률 억제 반응의 EC₅₀ 값을 살펴보면 산업폐수오니(EC₅₀=6.78%)에서 가장 높고 정수장오니(EC₅₀=15.00%)에서 가장 낮은 독성 반응을 보이는 것으로 나타났다. 산업폐수 또는 생활하수 오니 용출액내에 함유된 독성원 농도와 산출된 EC₅₀ 값 사이에 상관성을 밝히기 위해 Spearman rank correlation test를 실시한 결과, 구리, 카드뮴, 납 그리고 아연이 구멍갈파래의 포자형성 저해 반응과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 확인되었다. 본 시험법은 독성 민감성이 높고, 사용이 간편하고, 경제적이고, 해석이 용이하며, 대량의 시험재료 확보가 상시 가능하고, 배양이 어렵지 않아 매우 편리한 시스템이라고 할 수 있다. 특히, 파래의 포자형성 과정이 파래 집단의 성쇠와 밀접한 관련이 있으므로 생태적인 의미까지 포함하기에 보다 다양한 독성물질을 대상으로 독성민감성이 확인될 경우, 수서 생태독성을 진단하는데 유용한 프로토콜로 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 파래류는 넓은 지리적 분포와 속 수준에서 포자형성 과정의 유사성 때문에 전 세계적으로 광역적 적용이 가능할 것으로 기대된다.

As an aquatic ecotoxicity test method, a bioassay using the inhibition of sporulation of the green macroalga, *Ulva pertusa*, has been developed. Optimal test conditions determined for photon irradiance, pH, salinity and temperature were $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 7~9, 25~35 psu and 15~20 °C, respectively. The validity of the test endpoint was evaluated by assessing the toxicity of four metals (Cd, Cu, Pb, Zn) and elutriates of sewage or waste sludge collected from 9 different locations. When the metals were assayed, the EC₅₀ values indicated the following toxicity rankings: Cu ($0.062 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) > Cd ($0.208 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) > Pb ($0.718 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) > Zn ($0.776 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). When compared with other commonly used bioassays of metal pollution listed on US ECOTOX database, the sporulation test proved to be the most sensitive. *Ulva* sporulation was significantly inhibited in all elutriates with the greatest and least effects observed in elutriates of sludge from industrial waste (EC₅₀=6.78%) and filtration bed (EC₅₀=15.0%), respectively. The results of the Spearman rank correlation analysis for EC₅₀ data versus the concentrations of toxicants in the sludge presented a significant correlation between toxicity and four heavy metals (Cd, Cu, Pb, Zn). The method described here is sensitive to toxicants, simple to use, easy to interpret and economical. It is also easy to procure samples and maintain cultures. The present method would therefore probably make a useful assessment of aquatic toxicity of a wide range of toxicants. In addition, the genus *Ulva* has a

*Corresponding author: gspark@anyang.ac.kr

wide geographical distribution and species have similar reproductive processes, so the test method would have a potential application worldwide.

Keywords: Aquatic Toxicity, Bioassays, Elutriates, Heavy Metals, Sporulation, Standard method, *Ulva pertusa*

서 론

산업 활동 부산물의 다량 배출과 화학비료 사용의 급증, 그리고 육지에서 유입되는 도시 하수 등에 함유된 독성오염물질의 발생으로 수서생태계 환경이 위협에 처할 가능성이 높아짐에 따라 수서생태 환경을 감시할 수 있는 효과적인 전략 체제의 필요성이 부각되었다(Bidwell *et al.*, 1998). 전통적으로, 수질 평가를 위한 가장 보편적인 접근법으로 수체 내의 특정 화학물질을 이화학적으로 정량하여 기준치와 비교하는 방식을 택해왔는데 이러한 이화학적 분석방식은 시료 내 존재하는 독성원에 대한 정밀한 개별정보를 제공한다는 점에서 매우 유용하나, 생물과 생태에 대한 독성 정보를 반영할 수 없고, 미지의 독성원에 대한 탐지 능력에 제한되고, 특히 현장시료에서 나타나는 독성원간의 상호작용, 상승(synergism), 부가(addition), 길항(antagonism) 작용에 대한 정보를 전혀 제공할 수 없다는 점에 한계가 있음이 인식되어 왔다(Ahlf *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2002).

이러한 이화학적 수질 분석방식이 지닌 한계성에 대한 보완책으로 등장한 것이 바로 생물검정법이라고 할 수 있다. 일반적으로 생물검정법은 단일 수질 항목을 개별적으로 관찰하기 보다는 살아있는 생물의 생리적 반응 또는 행동반응을 이용하여 수체 내의 통합물질의 독성을 평가하는 방식으로서, 이상적인 생물검정법은 다음과 같은 몇 가지 중요 특성이 충족되어야 하는데, 1) 낮은 농도의 화학적 독성을 인지할 수 있는 민감성, 2) 다량의 시료를 대상으로 동시 분석이 가능한 간편성, 3) 고가의 분석 장비를 필요로 하지 않는 경제성, 4) 시험중 반응의 생태적 관련성 등이 여기에 해당하는 기준이다(Bengtsson *et al.*, 1999).

그동안 생물검정법 연구에는 해양 식물에 비해서 해양 동물이 많이 이용되어 오고 있는데, 이러한 이유는 해조류를 대상으로 한 실험 연구의 재료로 사용했던 해조류들이 대부분 형태적으로 매우 견고한 속성을 지닌 것들이었고, 무엇보다도 endpoint를 설정 시기의 영양 생장에 맞춘 까닭에 독성에 대한 민감도가 높게 나타나지 않았기 때문인 것으로 사료된다(Eklund and Kautsky, 2003). 반면, 최근 유럽에서는 홍조 *Gracilaria tenuisipitata*의 성장 과정을 endpoint로 하여 중금속에 대한 새로운 독성 평가법이 제시된 바 있다(Haglund *et al.*, 1996). 또한, 여러 종류의 대형 갈조류들도 독성 검정에 많이 사용되고 있는데 *Macrocystis pyrifera*와 같은 식물은 이미 1960년을 전후해서 미국과 유럽 등지에서 산업 폐수의 영향을 평가하는데 이용되어 왔다(Anderson *et al.*, 1990). 갈조류의 생식 과정을 사용한 독성 검사 기법은 또한 기름 유출에 의한 오염 정도를 파악하는데 사용된 바 있는데 endpoint로는 단상 유주자의 발아, 배우체의 발아관 출현, 포자체 형성 등이 있다. 미국에서는 조하대에 서식하는 홍조류인 *Champia parvula*를 재료로 하여 중금속과 시안화물의 만성적인 영향을 평가하는 작업이 이루어지고 있고(Steele and Thursby, 1983), 비산염과 아비산염 그리고 10 가지

의 유기 화합물에 대해서도 유사한 검사가 수행됨으로써 이 식물의 생식 과정이 민감하고 실질적인 endpoint가 될 수 있다는 것이 확증된 바 있다(Thursby and Steele, 1995).

그러나, 홍조류와 갈조류는 실내에서 배양하고자 할 때, 생식 유도 과정과 생식 세포의 발아 단계에 있어서 온도와 광량 그리고 영양 배지의 종류에 따라 크게 영향을 받는다는 문제점을 지니고 있다. 따라서 지금까지 이러한 해조류를 대상으로 수행된 대부분의 독성 연구에서는 야외에서 이미 생식이 충분히 유도된 개체를 채집해서 그 개체로부터 생식 세포를 받아 실험에 사용해 왔는데 이러한 점은 몇 가지 면에서 보완되어야 할 내용인 것으로 사료 된다. 왜냐하면, 야외에서 생식이 유도된 개체는 이미 그 개체가 생육한 주변의 환경, 더 나아가 수체 환경 내에 존재하는 이질 물질에 적응된 상태이기에 다양한 해양 환경에서 채집한 개체들에서 생산된 생식 세포의 반응성을 상호 비교하여 일반화하는 작업을 수행하지 않는 한 결과 해석에 대한 신뢰성이 떨어지기 때문이다. 아울러, 일반화 작업이 이루어졌다고 할지라도 시간적 추이에 따라 개체군의 특성이 변화된다면 실험을 수행할 때마다 재차 일반화 작업을 거쳐야 한다는 어려움을 내포하고 있다. 야외에서의 개체 생식은 특정 계절에 국한되는 경우가 많아서 샘플을 획득하기가 어렵다는 점도 홍조류와 갈조류를 대상으로 한 실험 연구가 가진 한계점이라고 할 수 있다.

위에서 언급한 바와 같이 해조류에서 홍조류와 갈조류의 생식 과정에 대한 독성 실험 연구는 그 동안 몇 차례 있었지만 녹조류의 경우 배우자와 무성 포자간의 구별이 불확실하여 각 생식 단계의 endpoint를 설정하는데 어려움이 있기 때문에 녹조류를 재료로 수행한 독성 연구는 거의 전무한 실정이라고 할 수 있다(Hooten and Carr, 1998). 반면, 해산 녹조류는 비교적 단순한 생활사를 나타내고 생식 구조가 복잡하지 않으며 생식 세포 획득이나 생식 세포 및 발아체 배양이 용이한 관계로 일단 배양 기법을 숙달할 경우, 다양한 형태의 독성 실험을 수행할 수 있는 장점을 지니고 있다. 실험실에 얻어진 해양 생물 독성 검정 결과는 독성 물질의 수준을 결정하여 해양 생태계의 안정성을 판단하는 중요한 척도로 사용될 것이므로 독성 시험용 생물은 광역 분포성, 획득 용이성, 배양 가능성, 실험의 반복 재현성 등의 요건들이 기본적으로 충족되어야 한다. 이 점에서 볼 때, 해산 녹조류는 해양생태독성 연구에 이상적인 재료가 될 수 있는 충분한 가능성을 내포하고 있다고 할 수 있다.

일반적으로 바다상추로 알려져 있는 갈파래 분류군은 지리적으로 광범위한 분포 특성을 보이며 조간대 상부와 기수역에 생육한다(Van den Hoek *et al.*, 1995). 갈파래 속 식물은 독성 연구에 비교적 많이 사용된 재료임에도 불구하고 해양생태독성평가 재료로는 이용된 경우가 많지 않은데(Eklund and Kautsky, 2003), 이는 갈파래 속 식물이 독성에 대한 높은 내성을 가지고 있어 중금속의 생물학적 농축자와 폐기용 무기 영양분의 생물학적 필터로 자주 이용되어 왔기 때문인 것으로 사료된다(Cohen and Neori, 1991);

Haritonidis and Malea, 1999; Lee and Wang, 2001; Mata and Santos, 2003). 그러나 갈파래류는 일부 독성물질에 대하여 보편적인 해양 시험 생물종으로 사용되고 있는 성체보다 더 민감하게 반응한다는 보고가 나오므로써 독성 시험용 생물로서 파래류를 후보종으로 보다 심도 있게 탐색해볼 필요성을 느끼게 되었다(Hooten and Carr, 1998; Han and Choi, 2005).

본 시험 종은 녹조 구멍갈파래(*Ulva pertusa* Kjellman)로 접근이 쉬운 조건대에 서식하고 군집을 이루고 있기에 채집이 용이하고 풍부한 시료 획득이 가능하며, 실험실내에서의 배양 및 조작이 용이하여 다양한 환경 요인에 대한 생리 반응 연구에 편리한 종이라고 할 수 있다. 엽체는 단독 또는 2~3 개체씩 뭉쳐서 자라고, 체장은 10~30 cm에 이르고, 엽면에는 동형 또는 불규칙한 구멍이 있다(강, 1968). 구멍갈파래는 성숙하면 72~96시간 후에 엽체 가장자리 부위가 황색, 갈색, 흰색을 띠며 생식세포가 형성 및 방출되는데 이러한 특징을 이용하여 구멍갈파래의 엽체를 다양한 농도의 시험 물질에 노출시킨 후, 포자가 형성되는 면적을 백분율로 산정하여 유해물질의 독성을 평가할 수 있다.

본 시험법은 해양 생태계의 일차 생산자인 해조류 녹조 구멍갈파래(*Ulva pertusa* Kjellman)의 기초생리생태학적 연구결과를 기반으로 포자형성률을 이용하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법을 개발한 것으로서 국내 환경평가 및 유해화학물질의 생태계 위해성 평가에 유용하게 이용 가능할 것이다.

재료 및 방법

한국 동해안 안인에서(37.4°N, 129.1°E) 채집한 구멍갈파래를 4 L의 인공 배양액이 담긴 flask에 넣고, 5~10 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광조사량, 12:12-h LD의 광주기, 15±0.5 °C의 온도 하에서 배양하였다. 이때, 전기 기포 발생기(SPP-40GJ-L, Dakaski Co., Japan)를 사용하여 0.1 kgf·cm²의 세기로 24시간 유동 처리하였다. 배양액은 질산염(1 mM KNO₃)과 인산염(0.1 mM K₂HPO₄)이 추가된 인공해수(Coralife, Energy Savers, California, USA)를 제조 사용하였으며, 배양액은 2일 간격으로 전량 교체하여 주었다.

파래의 포자형성은 엽체의 색의 변화로 알 수 있는데, 정상적인 엽체의 색은 녹색을 띠는 반면, 포자가 형성된 엽체는 황색, 갈색, 흰색을 나타낸다(Fig. 1). 이렇게 변화된 부분을 포자형성 면적으로 간주한다. 육안으로 엽체의 색 변화를 판정하기에 용이하지 않을 경우에는 슬라이드 글라스를 만들어 광학현미경 하에서 100배, 필요하면 400배의 배율로 포자형성 부위를 확인한 다음 측정하였다. 구멍갈파래의 포자형성률은 Macro-영상분석장치(MW-200, Samsung Co., Korea)를 이용하여 엽체 전체 면적과 포자형성 면적을 측정한다. 다음, 엽체 전체 면적에 대한 포자형성 면적의 상대 비율로 나타내었으며, 대조구의 포자형성률 대비 50%에 이르는 유효 포자형성저해 농도(EC₅₀, median sporulation inhibition concentration)를 계산하였다.

구멍갈파래의 포자형성 유도를 위한 최적 환경 조건을 알아보고자 다양한 광조사량, 수소이온농도(pH), 염분 및 수온 하에서 96시간 동안 배양 실험을 수행하였다. 광조사량은 백색광원 5, 10, 30, 60, 100, 150, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 와 암조건으로 이루어졌다. 수소이온농도(pH) 결정 실험에서는 4, 5, 6, 7, 8, 9의 구배를 두었고,

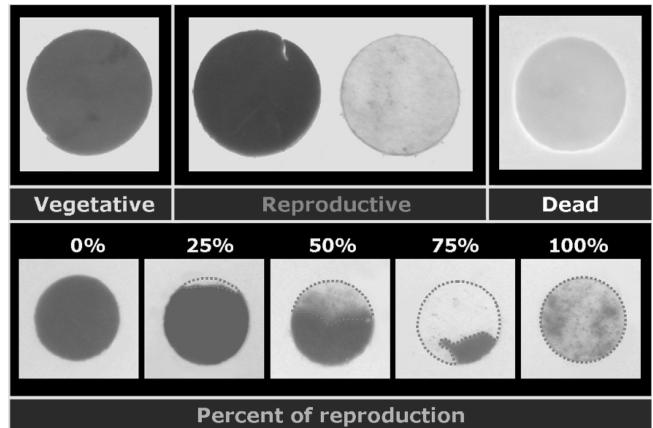


Fig. 1. Indices of reproductive percentage of *Ulva* based on order classification of reproductive area with thallus color change, adapted from Han *et al.* (2007).

염분 실험에서는 5, 15, 25, 35, 45, 55 psu의 염분 구배를 두었으며, 0 psu는 희석수로 사용한 초순수를 사용하였다. 수온 결정 실험은 5, 10, 15, 20, 25 °C 하에서 수행하였다.

표준독성물질은 카드뮴(Cadmium standard solution, Junsei Chemical Co., Japan), 구리(Copper standard solution, Junsei Chemical Co., Japan), 납(Lead standard solution, Junsei Chemical Co., Japan), 아연(Zinc standard solution, Junsei Chemical Co., Japan)의 중금속 분석용 표준용액(1000 mg·L⁻¹)을 배양해수에 희석하여 준비하였다. 이 때 중금속 농도는 카드뮴의 경우 0.0375~0.6 mg·L⁻¹, 구리는 0.0125~0.2 mg·L⁻¹ 그리고 납과 아연은 0.125~2 mg·L⁻¹의 농도로 설정하였다. 농도 구배 시, 최고 농도의 표준용액을 제조한 후 배양해수를 이용하여 반수 희석하여 사용하였다. 실험은 6-well cell plate (6 well cell culture cluster, Costar, USA)에 시험용액 10 mL를 넣고 준비된 원형질편을 투입하고 뚜껑을 닫아 배양기에 넣어 96시간 배양하는 과정으로 이루어졌다. 배양 온도, 염분, 광조사량, 광주기 조건은 각각 15 °C, 30 psu, 80~100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광량, 12:12h 명암주기로 하였다.

현장시료에 대한 민감성 실험은 국내의 9개 지역에서 획득한 생활오수 및 산업폐수오니 용출액(elutriate)을 국립수산과학원 서해수산연구소에서 제공받아 이루어졌다. 이 때, 용출원액을 100%로 설정한 후 배양해수로 6.25, 12.5, 25, 50, 100%로 희석 구배하였고, 표준 배양조건에서 실험을 실시하였다. 오니 용출액의 pH와 염분은 배양 시작과 종료 지점에서 각각 pH 7.5~8.4과 26~34 psu으로 나타나 파래의 최적 포자형성 범위 내에 있는 것으로 파악되었다.

포자형성률의 EC₅₀은 TOXCALC 5.0(Tidepool Scientific Software, USA) 통계 프로그램을 사용하여 선형내삽법(linear interpolation)으로 산출하였으며, NOEC(no observed effective concentration)값은 Dunnett's test 가설 검정 방법을 거쳐 결정하였다.

결 과

최적 시험 조건의 설정

구멍갈파래의 포자형성 유도를 위한 최적 조건을 알아보고자

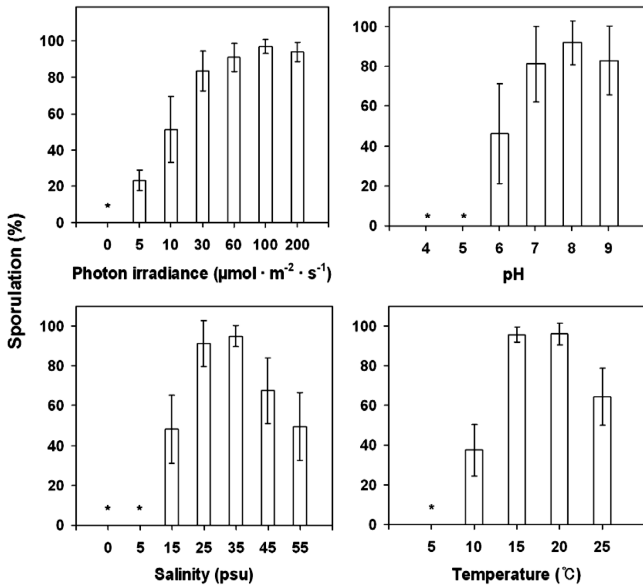


Fig. 2. The effects of photon irradiance, pH, salinity and temperature on sporulation of *Ulva pertusa*, partly adapted from Han and Choi (2005).

다양한 광조사량, 수소이온농도(pH), 염분 및 수온 하에서 96시간 동안 배양 실험하였다(Fig. 2). 포자형성을 위한 광조사량의 유효범위는 60~200 μmol · m⁻² · s⁻¹로 나타났으며, 최적 광조사량은 100 μmol · m⁻² · s⁻¹로서 97%의 포자형성률을 보이는 것으로 관찰되었다. 수소이온농도(pH) 실험 결과 최적범위는 80% 이상 포자형성률은 보인 pH 7~9 범위인 것으로 나타났고 pH 6에서는 포자형성률이 46%로 저해되었으며, pH 4와 5에서는 96시간 동안 포자가 형성되지 않았다. 염분 조건은 25~35 psu 범위에서 90% 이상의 높은 포자형성률을 보인 반면, 15 psu에서는 48%, 45 psu에서는 67%, 55 psu에서는 50%로 포자형성률이 감소되는 추세를 보였고, 0~5 psu 범위에서는 포자가 전혀 형성되지 않았다. 포자형성을 위한 수온의 최적 범위는 95%의 포자형성률을 보인 15~20 °C 범위인 것으로 나타났고, 10 °C에서는 37%, 25 °C에서는 64%로 감소되었으며, 5 °C에서는 포자가 형성되지 않았다.

시험방법

본 시험방법은 해양 생태계의 일차 생산자인 해조류를 이용한 독성시험방법으로서 유해물질이 구멍갈파래의 포자형성에 미치는 영향을 파악하는데 그 목적이 있다. 시험원리는 구멍갈파래의 엽체를 다양한 농도의 시험 물질에 96시간 동안 노출시킨 후, 포자가 형성되는 면적을 백분율로 산정하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법으로 Table 1에 본 시험법을 요약 정리하였다.

가. 시험생물 준비: 구멍갈파래의 색깔이 녹색인 건강한 엽체(전장 10 cm 이상)를 배양기에서 꺼내어 직경 6 mm의 코르크 보어(cork borer)로 원형절편을 뽑아낸다. 이때, 반드시 엽체의 가장자리로부터 10~20 mm 이내의 부위에서만 원형절편을 취하며, 독성시험에 필요한 엽체수는 반복수를 고려하여 한 종류의 시료 독성평가시 약 150 개의 원형절편이 필요하다.

나. 시험용액 준비: 6-well cell plate (6 well cell culture cluster,

Table 1. Summary of test conditions and test acceptability criterion for marine seaweed *Ulva pertusa*, sporulation inhibition toxicity tests, modified from Han et al. (2007).

Parameters	Test conditions
Test type	static, non-renewal
Endpoint	sporulation inhibition (EC ₅₀)
Test organism	<i>Ulva pertusa</i>
Test duration	96 hr
Test temperature	15±2 °C
Test salinity	25~35 psu (30 psu recommended)
Light quality	“cool white” fluorescent lighting
Light intensity	4000~5000 lux (80~100 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹)
Photoperiod	12:12hr LD
Test vessel	6-well cell plate (ø35 mm)
Test solution volume	10 mL
Number of individuals per vessel	8 disks (ø6 mm)
Dilution water	artificial seawater
Renewal of test solution	none
Aeration	none
Culture media	artificial seawater
Test concentrations	five+control
Number of replicates per concentration	3~4 (4 recommended)
Sample volume required	0.5~1 L depending on test volume
Test acceptability criterion	>80% of sporulation rates in control

Costar, USA)에 시험용액을 농도별로 10 mL씩 분주한다. 시험농도는 대조구를 제외하고 5구간으로 설정한다. 희석 시험의 경우, 시험대상물질 용액의 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%와 대조구로 설정한다. 시험 시작시 각 시험구 별로 염분, 수온 및 pH를 측정한다. pH의 경우 필요하면 염산(1 M) 또는 수산화나트륨(1 M)을 써서 pH를 8.0±0.2로 조절한다.

다. 시험생물의 노출: 원형절편을 각각의 시험구에 8 엽체씩 노출한다. 이때 각 시험구별로 한번에 2 엽체씩 4번으로 나누어 투입한다. 그 이유는 통계적임의 분배 방식을 따르기 위함이다.

라. 독성실험: 배양 온도, 염분, 광조사량, 광주기 조건은 각각 15 °C, 30 psu, 80~100 μmol · m⁻² · s⁻¹의 광량, 12:12h 명암주기로 하였다.

마. 실험의 종료: 시험시작 96 시간 후 시험을 종료한다. 엽체를 꺼내어 슬라이드 글라스 위에 올려놓고 영상분석장치를 이용하여 엽체 전체 면적과 포자형성 면적을 측정한다 다음 시험용액 농도별로 기록한다. 이때 시험대상물질, 수질, 실험조건, 일시, 실험자 및 책임자 등을 명확히 기입하여 한다.

바. 자료분석: 시험결과를 이용하여 무영향농도(NOEC) 및 포자형성률 억제농도 (EC₅₀)와 신뢰구간을 계산한다. 무영향농도(NOEC) 값은 Dunnett 검정을 이용하여 구할 수 있다. EC₅₀ 값 추정과 NOEC 값 추정은 TOXCALC (version 5.0)과 같은 독성자료처리용 통계 프로그램을 사용한다.

사. 비교: 최저농도에서 포자형성률이 20% 미만일 때에는 시험구의 농도를 재조정하여 실험해야 하며, 대조구에서의 포자형성률이 80% 미만일 경우 또는 동일농도의 반복구간의 변동계수(coefficient of variation, CV=100*표준편차/평균)가 30% 이상일 경우에는 재실험 한다.

독성물질에 대한 민감도 및 현장시료에의 적용

독성시험의 정밀도는 표준독성물질시험과 동일 농도구의 반복실

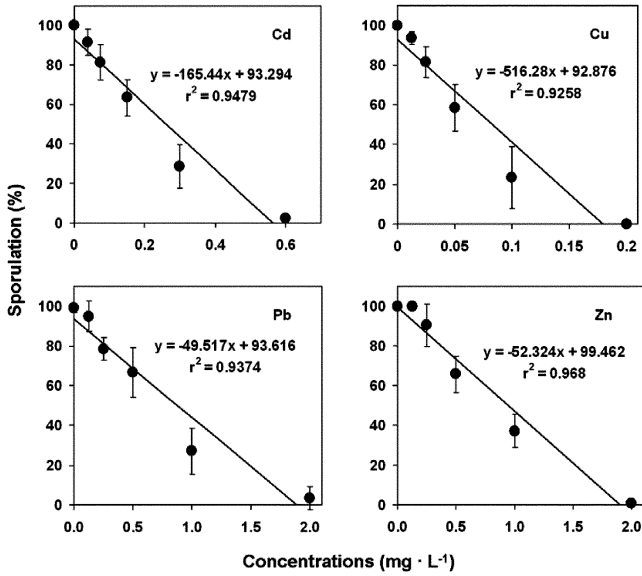


Fig. 3. The inhibition of sporulation in *Ulva pertusa* as a function of metal concentrations.

험을 통하여 검증할 수 있다. 중금속 표준용액(카드뮴, 구리, 납, 아연)을 여러 농도로 구배하여 구멍갈과래의 포자형성 반응을 살펴 본 결과, 모든 중금속에 대하여 뚜렷한 농도-반응 관계를 나타냈다 (Fig. 3). NOEC 값은 구리 0.025 mg · L⁻¹, 카드뮴 0.075 mg · L⁻¹, 납 0.125 mg · L⁻¹ 그리고 아연 0.250 mg · L⁻¹ 이었다. EC₅₀ 값은 구리 0.062 mg · L⁻¹, 카드뮴 0.208 mg · L⁻¹, 납 0.718 mg · L⁻¹ 그

Table 2. NOEC and EC₅₀ values for sporulation inhibition of *Ulva pertusa* exposed to different toxicants for 96 hr, partly adapted from Han and Choi (2005).

Toxicants	NOEC	EC ₅₀ (95% CI range)
Cd (mg·L ⁻¹)	0.075	0.208 (0.154~0.262)
Cu (mg·L ⁻¹)	0.025	0.062 (0.033~0.085)
Pb (mg·L ⁻¹)	0.125	0.718 (0.546~0.901)
Zn (mg·L ⁻¹)	0.250	0.776 (0.600~0.958)
Industrial waste (S1) (%)	6.25	9.15 (7.96~9.85)
Livestock waste (S2) (%)	6.25	10.60 (9.43~12.70)
Leather waste (S3) (%)	6.25	13.45 (10.30~16.50)
Urban sewage (S4) (%)	<6.25	8.25 (5.42~9.40)
Food waste (S5) (%)	6.25	9.47 (7.80~10.50)
Mixed waste (S6) (%)	6.25	9.53 (9.04~10.33)
Industrial sewage (S7) (%)	< 6.25	6.78 (4.74~8.46)
Filtration bed (S8) (%)	6.25	15.00 (11.53~19.08)
Rural sewage (S9) (%)	6.25	13.96 (11.90~16.00)

리고 아연 0.776 mg · L⁻¹로서 과래의 생식 억제 반응은 구리에 가장 민감한 것으로 나타났다(Table 2).

생활오수 또는 산업폐수오니의 용출액에 대한 구멍갈과래의 포자형성 민감도 평가한 결과, 모든 용출액에 대하여 설정된 농도 중 가장 낮은 농도였던 6.25% 또는 그 이하의 NOEC 값을 보였다(Fig. 4). 현장 시료별 EC₅₀ 값을 산출한 결과, 산업폐수오니(EC₅₀=6.78%)에서 가장 높은 독성 반응을 보였으며, 정수장오니(EC₅₀=15.00%)에서 가장 낮은 독성 반응을 보였다(Table 2). 오니 내에 함유된 중금속 농도와 산출된 EC₅₀값 사이에 상관성을 밝히기 위해 Spearman

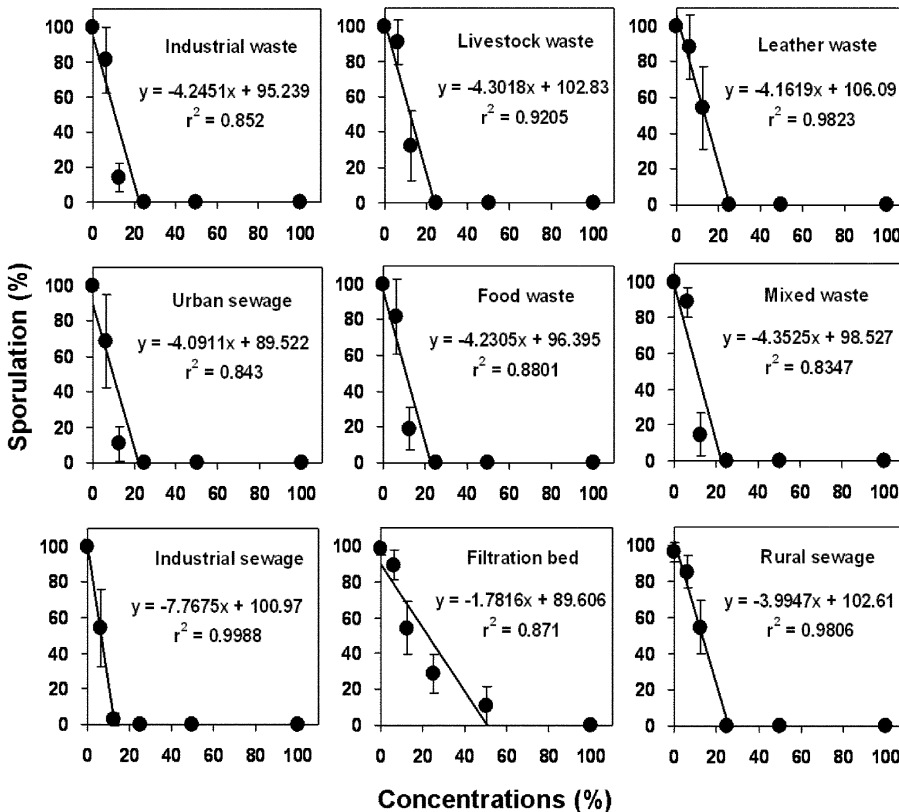


Fig. 4. The inhibition of sporulation in *Ulva pertusa* exposed to different concentrations of sludge elutriates, adapted from Han and Choi (2005).

Table 3. Correlations between the toxicants retained in the sludge and EC₅₀ values for the corresponding sludge elutriates, adapted from Han and Choi (2005).

Chemicals	r value	P value
Cu	0.77	P < 0.05
Cd	0.73	P < 0.05
Zn	0.72	P < 0.05
Pb	0.67	P < 0.05
Total organic C	0.53	P > 0.05
Hg	0.51	P > 0.05
Cr	0.50	P > 0.05
PAHs	0.47	P > 0.05
Co	0.37	P > 0.05
As	0.18	P > 0.05
Standard r value	0.60	at P = 0.05

rank correlation test를 실시한 결과, 구리, 카드뮴, 납 그리고 아연이 구멍갈파래의 포자형성 저해와 밀접한 상관관계가 있는 것으로 확인되었다(Table 3).

고 찰

본 시험생물인 *Ulva pertusa*는 우리나라 동서남해안에 분포하는 대표적 해조류로서 채집이 쉽고 실험실에서 2~3개월 정도 보관 배양이 가능하며, 포자형성률, 발아율, 성장률, 광합성률, 호흡률 등의 여러 가지 다양한 측정 요소를 endpoint로 선정할 수 있는 장점이 있다(Han and Choi, 2005; Han et al., 2007; Han et al., 2008). 특히, 독성물질에 대한 해조류의 반응은 생식과정을 대상으로 평가할 경우 매우 민감하게 나타나는 것으로 알려져 있는데, 본 시험법에서 endpoint로 선정된 포자형성률 또한 생식과정을 대상으로 평가한 시험방법이며, 선행연구에서 독성 민감성의 우수성이 검증된 방법이라 할 수 있다(Han and Choi, 2005; Han et al., 2007).

구멍갈파래의 포자형성 유효 광량범위는 60~200 μmol · m⁻² · s⁻¹이고 100 μmol · m⁻² · s⁻¹의 광조사량에서 최적 형성률을 나타내는데, 이는 선행 연구 결과들과 일치한다(Kim et al., 1992; Han et al., 2003).

본 시험생물의 포자형성 과정중 pH에 대한 내성 범위는 최소 7에서 최대 9까지 나타났다. 해양생태독성 평가 시 일부 독성물질들

은 낮은 pH 상태로 처리되고 있는데, 이러한 독성물질을 pH 보정 없이 평가한다면 pH에 의한 영향과 독성에 의한 영향사이의 차이를 구분하는데 어려운 점이 있다. 따라서 독성평가 시, 실험용수를 pH=7~9(최적 pH 8)로 조절한 후 평가하는 것을 제안한다.

염분 내성실험의 결과, 25~35 psu 염분 범위에서 90% 이상의 높은 포자형성률을 보이는 것으로 나타났는데, 같은 속에 속하는 한국산 *Ulva intestinalis*의 생식 연구에서도 비슷한 염분 내성범위(24~32 psu)를 보이는 것으로 나타났다(Kim et al., 1992).

포자형성을 위한 수온의 최적 범위는 15~20 °C에서 나타났는데, 녹조 *Ulva intestinalis*의 유주자형성에 있어 최적 온도가 20 °C라고 하는 타 연구 결과와 유사하다(Kim et al., 1992).

중금속에 대한 구멍갈파래의 포자형성 민감도를 조사한 결과, 카드뮴, 구리, 납, 아연에 대한 뚜렷한 농도-반응 관계가 관찰되었다(Fig. 3). 네 종의 중금속에 대한 EC₅₀ 값은 구리(0.062 mg · L⁻¹) > 카드뮴(0.208 mg · L⁻¹) > 납(0.718 mg · L⁻¹) > 아연(0.776 mg · L⁻¹) 순으로 민감하게 나타났다. 독성 분류 시스템에 따르면 중금속 독성의 EC₅₀ 값이 <1 mg · L⁻¹ 일때 ‘강한 독성’으로 분류되는데(GESAMP, 1989), 이러한 면에서 본 시험 종은 해양생태독성 평가 시 특히 상기 중금속에 대한 민감한 탐지 능력을 지닌 것으로 평가할 수 있다.

본 연구에서 사용한 파래가 보인 반응 민감성과 국제적으로 공인된 미세조류, 담수식물, 물벼룩, 성게, 무지개 송어 등이 나타내는 민감성을 비교하기 위하여 동일한 CAS No.를 가진 중금속에 대한 EC₅₀ 값을 상호 비교한 결과, 본 시험방법이 외국의 다른 시험방법에 비하여 비교적 높은 민감성을 보였다(Table 4). 네 종류 중금속에 대한 민감성은 파래 시험법 > 해양 성게 시험법 > 물벼룩(*Daphnia*) 시험법 > 미세조류(*Pseudokirchneriella subcapitata*) 시험법 > 무지개 송어(rainbow trout) 시험법 > 수생식물(*Lemna minor*) 시험법 순으로 나타났다(Chen et al., 1997; GESAMP, 1989; Goettl et al., 1974; Goettl et al., 1976; Kazlauskienė et al., 1994; Mount and Norberg, 1984; Rai et al., 1981; Schuytema et al., 1984; Shcheglov et al., 1990; Wang, 1986).

현장시료 실험에 사용된 현장 용출액은 해양투기 직전의 생활오수 또는 산업폐수오니로부터 용출된 액체로서 이때의 오니물질은 중금속, 유기물 입자, PAHs와 PCBs 등이 포함되어 있는 복합 혼합물임에도 불구하고, 현재로서는 화학적 기준에 의존하여 투기여부를 확인 할 뿐 생물학적 독성평가는 이루어지지 않고 있는 실정

Table 4. Comparisons of EC₅₀ values (mg·L⁻¹) obtained from the various established test methods and the *Ulva* test for four heavy metals.

Toxicants (mg·L ⁻¹) (CAS No.)	Test organisms					
	<i>Ulva</i> (96h)	Microalga ^a (96h)	Aquatic plant ^b (96h)	<i>Daphnia</i> ^c (48h)	Sea urchin ^d (48h)	Rainbow trout ^e (96h)
Cd (7440-43-9)	0.208 [3]	0.341 [4]	0.200 [2]	0.071 [1]	9.240 [6]	1.160 [5]
Cu (7440-50-8)	0.062 [3]	0.400 [5]	1.100 [6]	0.054 [2]	0.030 [1]	0.103 [4]
Pb (7439-92-1)	0.718 [2]	2.655 [3]	8.000 [6]	4.450 [5]	0.509 [1]	3.295 [4]
Zn (7440-66-6)	0.776 [2]	0.178 [1]	10.000 [6]	1.590 [4]	1.080 [3]	3.725 [5]
/mean rank	2.50	3.25	5.00	3.00	2.75	4.5

[]: Rank value.

^aData from Chen et al., 1997; *Pseudokirchneriella subcapitata* - population

^bData from Wang, 1986; *Lemna minor* - growth

^cData from Schuytema et al., 1984; Mount, 1984; Kazlauskienė et al., 1994; *Daphnia magna* - mortality

^dData from Shcheglov et al., 1990; *Strongylocentrotus intermedius* - mortality

^eData from Goettl et al., 1974; Goettl et al., 1976; *Oncorhynchus mykiss* - mortality

이다(해양수산부, 2005).

실제로 해양으로 유입되는 오염물질에 대한 본 시험방법의 적용 가능성을 규명하기 위하여, 해양배출 오니의 용출액에 대한 독성시험을 수행하였다. 9개의 오니 용출액에 대한 구멍갈파래의 포자형성률은 뚜렷한 농도-반응 관계를 보였으며, 오니의 종류에 따라 상이한 독성을 보였다. 또한 오니 시료에 들어있는 유해물질 중 어떤 물질이 독성에 기여하는지를 분별해내기 위하여 Spearman rank correlation test를 이용하여 각 용출수 내의 유해물질 농도와 EC₅₀ 값과의 상관관계를 산출한 결과(Table 3), 구리, 납, 아연 그리고 카드뮴이 포자형성 저해와 밀접한 상관관계가 있는 것으로 확인되었다. 따라서 상기 독성 시험방법은 실제로 해양으로 유입되는 오염물질에 대한 유해성 여부를 판정하는 유용한 수단으로 활용될 수 있다.

본 연구에서 제시하는 해조류 생태독성 검정법은 유해도가 높은 미지의 액체 시료에 대한 유해성 정보를 제공해줄 수 있고, 일반적인 화학물질 검색과는 달리 독성 평가시 시간과 비용을 줄일 수 있으며, 독성동정평가와 병행하여 시행할 때 어떤 화학물질이 독성에 기여하고 있는지에 대한 정보까지도 제공해 줄 수 있는 장점을 지니고 있다(Bisson *et al.*, 1989; Han *et al.*, in preparation).

결론적으로 본 연구에서 수행된 파래 포자형성률 억제반응을 이용한 독성 시험법은 1) 시험법 수행과정에 특별한 전문지식을 필요로 하지 않으며, 2) 비용 및 시간적 측면에서 경제적이고, 3) 국제적으로 현재 통용되고 있는 다른 생물검정법과 비교해 볼 때 민감성이 높고, 4) 파래의 넓은 생물지리적 분포특성 때문에 연안역 수질의 수직적 영역뿐만 아니라 국제적으로 공용할 수 있다는 수평적 광역성 때문에 현재 알려진 타 기술보다 탁월한 장점을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 논문은 국립수산물품질관리원(RP-2008-ME-028), 농림수산식품부 수산특정연구개발사업과 인천대학교 교내연구비 지원에 의해 연구되었습니다.

참고문헌

- 강제원, 1968. 한국동식물도감, 제8권 식물편(해조류). 문교부, 465pp.
- 해양수산부, 2005. 해양환경공정시험법. 해양수산부, 400pp.
- 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. Soils Sediments*, **2**: 37-42.
- Anderson, B.S., J.W. Hunt, S.L. Turpen, A.R. Coulon and M. Martin, 1990. Copper toxicity to microscopic stages of giant kelp *Macrocystis pyrifera*: interpopulation comparisons and temporal variability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **68**: 147-159.
- Bengtsson, B.-E., J.P. Bongo and B. Eklund, 1999. Assessment of duckweed *Lemma aequinoctialis* as a toxicological bioassay for tropical environments in developing countries. *AMBIO*, **28**: 152-155.
- Bidwell, J.R., K.W. Wheeler and T.R. Burrige, 1998. Toxicant effects on the zoospore stage of the marine macroalga *Ecklonia radiata* (Phaeophyta: Laminariales). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **163**: 259-265.
- Bisson, S., C. Blaise and N. Bermingham, 1989. Assessment of the inorganic bioaccumulation potential of aqueous samples with two algal bioassays. In: *Aquatic Toxicology and Water Quality Management*, John Wiley & Sons, New York, pp. 205-215.
- Chen, C.Y., K.C. Lin and D.T. Yang, 1997. Comparison of the relative toxicity relationships based on batch and continuous algal toxicity tests. *Chemosphere*, **35**: 1959-1965.
- Chu, K.W. and K.L. 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.
- Cohen, I. and A. Neori, 1991. *Ulva lactuca* biofilters for marine fish-pond effluents I. Ammonium uptake kinetics and nitrogen content. *Bot. Mar.*, **34**: 475-482.
- Eklund, B.T. and L. Kautsky, 2003. Review on toxicity testing with marine macroalgae and the need for method standardization-exemplified with copper and phenol. *Mar. Poll. Bull.*, **46**: 171-181.
- GESAMP, 1989. The evaluation of the hazards of harmful substances carried by ships. Revision of GESAMP reports and studies No. 17, GESAMP reports and studies No. 35, International Maritime Organization (IMO) London.
- Goettl, J.P. Jr., J.R. Sinley and P.H. Davies, 1974. Water Pollution Studies Job Progress Report, Federal Aid Project F-33-R-9, Colorado Division Wildlife, Fort Collins, CO.
- Goettl, J.P. Jr., P.H. Davies and J.R. Sinley, 1976. Colorado Fish. Res. Rev. 1972-1975, DOW-R-R-F72-75, Colorado Division Wildlife, Fort Collins, CO.
- Haglund, K., M. Bjorklund, S. Gunnare, A. Sandberg, U. Olander and M. Pedersen, 1996. New methods for toxicity assessment in marine and brackish environments using the macroalga *Gracilaria tenuistipitata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, **326/327**: 317-325.
- Han, T., Y.-S. Han, J. Kain and D.-P. Häder, 2003. Thallus differentiation of photosynthesis, growth, reproduction and UV-B sensitivity in the green alga *Ulva pertusa* Kjellman. *J. Phycol.*, **39**: 712-721.
- Han, T. and G.-W. Choi, 2005. A novel marine algal toxicity bioassay based on sporulation inhibition in the green macroalga *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Aquat. Toxicol.*, **75**: 202-212.
- Han, T., S.-H. Kang, J.-S. Park, H.-K. Lee and M.T. Brown, 2008. Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure. *Aquat. Toxicol.*, **86**: 176-184.
- Han, Y.-S., M.T. Brown, G.S. Park and T. Han, 2007. Evaluating aquatic toxicity by visual inspection of thallus color in the green macroalga *Ulva*: testing a novel bioassay. *Environ. Sci. Technol.*, **41**: 3667-3671.
- Haritonidis, S. and P. Malea, 1999. Bioaccumulation of metals by the green alga *Ulva rigida* from Thermaikos Gulf, Greece. *Environ. Pollut.*, **104**: 365-372.
- Hooten, R.L. and R.S. Carr, 1998. Development and application of a marine sediment pore-water toxicity test using *Ulva fasciata* zoospores. *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**: 932-940.
- Kazlauskienė, N., A. Burba and G. Svecevicius, 1994. Acute toxicity of five galvanic heavy metals to hydrobionts. *Ekologija*, **1**: 33-36.

- Kim, K.Y., I.K. Lee and I.C. Chung, 1992. The combined effects of irradiance and salinity, and temperature and salinity on germination and zoosporegenesis of *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. Kor. J. Env. Biol., **10**: 56–65.
- Lee, W.-Y. and W.-X. Wang, 2001. Metal accumulation in the green macroalga *Ulva fasciata*: effects of nitrate, ammonia and phosphate. Sci. Total. Environ., **278**: 11–22.
- Mata, L. and R. Santos, 2003. Cultivation of *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyta) in raceways, using semi-intensive fishpond effluents: yield and biofiltration. In: Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium, Oxford University Press, Oxford, pp. 237–242.
- Mount, D.I. and T.J. Norberg, 1984. A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test. Environ. Toxicol. Chem., **3**: 425–434.
- Rai, L.C., J.P. Gaur and H.D. Kumar, 1981. Phycology and heavy-metal pollution. Biol. Rev., **56**: 99–151.
- Steele, R.L. and G.B. Thursby, 1983. A toxicity test using life stages of *Champia parvula* (Rhodophyta). In: Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, edited by Bishop, W.E., R.D. Cardwell and B.B. Heidolph, American Society for Testing and Materials, Baltimore, pp. 73–89.
- Schuyttema, G.S., P.O. Nelson, K.W. Malueg, A.V. Nebeker, D.F. Krawczyk and A.K. Ratcliff, 1984. Toxicity of cadmium in water and sediment slurries to *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem., **3**: 293–308.
- Shcheglov, V.V., G.V. Moiseichenko and L.T. Kovekovdova, 1990. Effect of copper and zinc on embryos, larvae and adult individuals of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* and the sea cucumber *Stichopus japonicus*. Biol. Morya (Vladivost), **3**: 55–58.
- Thursby, G.B. and R.L. Steele, 1995. Sexual reproduction tests with marine seaweeds (macroalgae). In: Fundamentals of Aquatic Toxicology, edited by Rand, G.M., Taylor & Francis, Washington, D.C., pp. 171–188.
- Van den Hoek, C., D.G. Mann and H.M. Jahns, 1995. Algae. Cambridge University Press, Cambridge, 613 pp.
- Wang, W., 1986. Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environ. Pollut. Ser. B., **11**: 1–14.

2008년 5월 2일 원고접수

2008년 5월 13일 수정본 채택

담당편집위원: 이창훈