

T0024414

최 종
연구보고서

연안습지 해초군락 보호를 위한 유해물질 오염 독성
영향평가와 보호안전 기준 및 관리방안

Risk assessment, protection, safety criteria,
management for protecting marine macrophytes
community in coast from harmful substances
contamination and its toxic effect

2007. 9.

연구기관
전남대학교

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “연안습지 해초군락 보호를 위한 유해물질 오염 독성 영향평가와 보호안전 기준 및 관리방안” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 9 월 일

주관연구기관명 : 전남대학교
주관연구책임자 : 김 광 용
세부연구책임자 : 이 병 권
연 구 원 : 정선경, 양송이
강은주, 김주형
김지혁

위탁연구기관명 : (주)네오엔비즈
위탁연구책임자 : 이 정 석
연 구 원 : 최태섭, 박건호

요 약 문

I. 제 목

연안습지 해초군락 보호를 위한 유해물질 오염 독성 영향평가와 보호안전 기준 및 관리방안

II. 연구개발의 목적 및 필요성

유해물질로 인한 환경오염은 연안습지 생태계의 주요 일차생산자인 다양한 해초(seagrass), 해조(marine algae), 그리고 염생식물(salt plant)로 구성된 연안습지(연안 해양환경) 식물군락에 커다란 위협이 되고 있다. 이들 연안습지 식물군락은 생산력이 가장 높은 생태계 중의 하나이며, 어류 및 패류를 비롯한 경제적 가치가 높은 다양한 수산자원의 서식처와 산란처를 제공하고, 높은 일차 생산량을 통해 연안 및 하구생태계의 기초를 담당하고 있다. 또한 영양염을 빠르게 흡수하기 때문에 부영양화를 제어할 수 있고, 연안습지 식물군락의 높은 밀도 형성은 저층 퇴적물을 안정하게 하고 대규모 해일 및 파도를 약화시켜 서식 생물에게 안정된 보금자리를 제공한다. 따라서 연안습지 식물군락은 높은 경제적 가치와 생태적 가치를 함께 지닌, 연안의 생산성 향상과 수산자원을 위해 보호해야 할 중요한 천혜 자원이다. 우리나라의 습지의 대부분을 차지하는 연안습지 식물군락 중 해초류(seagrasses)의 경우 하구역 또는 조간대에 연안습지와 연결되어 넓은 해초군락(seagrass meadows)을 형성하고 있고, 염습지(salt marsh)의 경우 육지와 해양의 경계면에서 다양한 염생식물이 서식하고 있어 자연생태관광의 자원으로서 높은 잠재력을 가진다.

유해물질에 의한 독성영향은 해산식물의 종류, 유해물질의 특성 및 농도, 또는 유해물질 스트레스를 동반한 환경적인 조건 등에 따라서 다양하게 나타난다. 특히 모든 연안 생태계의 에너지를 공급하는 가장 기본적인 생리기작인 해산식물 광합성에 대한 유해물질의 저해는 연안 생태계의 생산성을 감소시킬 뿐만 아니라 생태계 전체의 에너지 수지에 막대한 영향을 미침으로써 생태계 구조와 기능에 치

명적인 손상을 가져올 수 있다.

이에 본 연구에서는 유해물질의 독성으로부터 연안습지의 식물군락을 보호하고, 유해물질에 의한 연안습지 생태계의 파괴로 2차적인 연안 수산자원의 감소를 방지하기 위해 독성 영향평가 기술 및 기법을 개발하고, 연안습지 보호안전 기준 및 안전관리 방안을 수립하는 것을 목적으로 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 범위 및 내용은 다음과 같다.

1. 연안 수산자원 보존을 위한 유해물질 생리영향 및 위해성 연구
 - 보존 가치가 높은 연안 해산 식물 군락에 대한 기본 생리, 생태 문헌 연구
 - 연안 생태계를 파괴하는 주요 유해물질의 위해성에 대한 문헌 연구
 - 해산 식물 광합성 독성 영향 평가 해외연구 사례 연구
2. 연안습지 식물군락에 대한 유해물질의 광합성 저해 독성 영향 평가
 - 해산식물을 이용 유해물질의 광합성 저해 영향 평가 기술 개발에 대한 연구
 - 단일 및 다중 유해물질에 의한 광합성 저해 독성 영향 평가
 - 해산식물의 유해물질 노출 후 광합성 능력 회복에 관한 연구
3. 유해물질의 독성 발현과 환경요인과의 관계 규명
 - 유해물질의 광합성 저해에 대한 환경 요인의 관계성 규명
 - 온도, 영양염 조건별 독성 영향 연구
4. 유해물질 오염에 의한 독성 모델링 및 위해성 평가 기법 개발
 - 유해물질에 대한 생물학적 지시자(bio-indicators)로서 해산식물의 이용 방안
 - 다중 유해물질에 의한 독성영향
 - 유해물질 영향과 환경요인 변화의 관계성
 - 유해물질 독성 저감을 위한 보호안전 기준 및 관리 방안

IV. 연구개발 결과

본 연구를 통해 도출된 결과를 정리하면 다음과 같다.

- 유해물질에 노출된 갈파래의 광합성 및 양자 수율 변화
- 유해물질의 96시간 급성독성 효과에 의한 갈파래 색소함량의 변화
- 잘피에 의한 중금속 흡수능
- 잘피에 대한 중금속 및 유해물질의 독성 영향
- 칠면초 (halophyte)의 광양자수율 (effective quantum yield)에 대한 유해물질의 독성 영향
- 잘피 (seagrass)의 광양자수율 (effective quantum yield)에 대한 유해물질의 독성 영향
- 단일 및 다중 유해물질에 노출된 미세편모조류의 72시간 급성독성 영향
- 다중 유해물질에 노출된 갈파래와 잘피의 72시간 급성독성 영향
- 다양한 환경요인 중 온도 및 영양염 변화와 결합된 유해물질의 갈파래와 잘피에 대한 다중 독성영향
- 유해물질에 대한 생태독성평가 방법의 표준화를 위한 비교
- 유해물질에 대한 생물학적 지시자 (bio-indicator)로서 해산식물의 이용 방안 도출
- 연안 식물군락 보호 안전기준 마련을 위한 중-민감도 분포 모델 (SSD model)의 응용

V. 연구개발 결과의 활용계획

향후 연안습지 식물군락을 대상으로 가능한 모든 종류의 유해물질에 대한 효과를 엽록소형광반응을 이용하여 식물 생태생리학적으로 구분해 내고 유용한 생물학적 지시자 (bio-indicators) 및 생물지표 (biomarkers)를 개발하는데 응용자료로서 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이며, 연안습지 식물을 이용한 생물독성시험의 표준화에 기초자료가 될 것이다. 또한 연안습지 생태계에 대한 오염의 잠재적인 충격을 평가하는데 있어서 활용될 수 있다.

SUMMARY

I. Title

Risk assessment, protection, safety criteria, and management for protecting marine macrophytes community in coast from harmful substances contamination and its toxic effect.

II. Background and Objectives of the Research

Harmful substances have a negative affect on the distribution and growth of structurally and functionally dominating marine macrophytes in coastal salt marsh communities, there may directly and indirectly be a large and harmful influence on the whole marine coastal ecosystem. For this reason the research on marine macrophytes should be included in control programs for protecting ecosystem along the coasts.

When environmental contamination takes place, usually complex communities comprising a large number of species are exposed. They interact with the abiotic and biotic characteristics of their environment and are adapted to their ecosystem. Demonstrating toxic effects at the community level of marine macrophytes under lab and field exposure and ascertaining their causes still poses a challenge for ecotoxicologists. Predicting effects in the environment solely from single-species laboratory tests also is beset by limitations.

Hence, the chlorophyll fluorescence methods measuring tools is a promising new methods to allow fast harmful substances effect screening for high amounts of samples with little time and material and thus offers scope for high-throughput biotesting using marine macrophytes species.

III. Contents and Scope of the Research

The scope and contents of the present research are summarized as follows:

- 1) Physiological effect and risk assessment of harmful substance on marine macrophytes for preserving coastal fisheries resources
- 2) Toxic inhibition effect of harmful substances on photosynthesis of marine macrophytes in coastal marsh community
- 3) Examination in relation of environmental factors and toxicity of harmful substances
- 4) Development of method on risk assessment and modelling on harmful substances contamination

IV. Major Results of the Research

The following items are reviewed or suggested by the present research:

- Changes on photosynthesis activity and quantum yield of marine macroalga *Ulva pertusa* exposed to harmful substances
- Changes on pigment content of marine macroalga *Ulva pertusa* by 96hrs acute toxic effect
- Absorption ability for various heavy metals by seagrass *Zostera marina*
- Toxic effect of various heavy metals and organic substances on seagrass *Zostera marina*
- Toxic effect of harmful substances on effective quantum yield of halophyte *Suaeda japonica*
- Toxic effect of harmful substances on effective quantum yield of seagrass *Zostera marina*
- 72hrs acute toxic effect on micro-flagellate exposed to single and multi-harmful substances
- 72hrs acute toxic effect on marine macroalga *Ulva pertusa* and seagrass

Zostera marina exposed to multi-harmful substances

- Combined effect with harmful substances and a range of temperature and nutrient conditions on marine macroalga *Ulva pertusa* and seagrass *Zostera marina*
- Comparing ecological risk assessment with harmful substance for standardization of method using micro flagellate
- Development for usage of marine macrophytes on harmful substances as bio-indicator
- Application of species-sensitivity distribution (SSD) model on development of criteria for protecting macrophyte communities in coasts

V. Recommended Application of the Results

The results of the present study will be provided basic technical guideline for the R&D program on the development and validation of ecological risk assessment on various harmful substances to be carried out in the near future.

CONTENTS

Summary (in Korean)	ii
Summary	v
Contents	viii
Contents (in Korean)	x
Chapter 1. Introduction	1
Chapter 2. Background of the Subject	7
Chapter 3. Research Contents and Results	17
Part 1. Research Methods and Contents	17
1. Preparation of samples for toxic test	18
2. Selection of harmful substances for ecological risk assessment	20
3. Determination of toxic effect of harmful substances on photosynthesis of marine macrophytes	22
4. Determination of absorption activity on heavy metals by seagrass	25
5. Determination of photosynthetic pigment contents in the tissue of marine macroalga	27
6. Ecological risk assessment on single or multiple effect of harmful substances	27
7. Relationship between revelation of toxic effect and environmental factors	29
8. Comparison of methods for standardization of ecological risk assessment ..	30
Part 2. Research Results	34
1. Changes on photosynthesis activity and quantum yield of marine macroalga <i>Ulva pertusa</i> exposed to harmful substances	35
2. Changes on pigment content of marine macroalga <i>Ulva pertusa</i> by 96-hrs acute toxic effect	41
3. Absorption ability for various heavy metals by seagrass <i>Zostera marina</i>	45

4. Toxic effect of various heavy metals and organic substances on seagrass <i>Zostera marina</i>	50
5. Toxic effect of harmful substances on effective quantum yield of halophyte <i>Suaeda japonica</i>	56
6. Toxic effect of harmful substances on effective quantum yield of seagrass <i>Zostera marina</i>	59
7. 72-hrs acute toxic effect on micro-flagellate exposed to single and multi-harmful substances	63
8. 72-hrs acute toxic effect on marine macroalga <i>Ulva pertusa</i> and seagrass <i>Zostera marina</i> exposed to multi-harmful substances	75
9. Combined effect with harmful substances and a range of temperature on marine macroalga <i>Ulva pertusa</i> and seagrass <i>Zostera marina</i>	82
10. Combined effect with harmful substances and a range of nutrient conditions on marine macroalga <i>Ulva pertusa</i> and seagrass <i>Zostera marina</i>	88
11. Comparing ecological risk assessment with harmful substance for standardization of method using micro flagellate	99
12. Development for usage of marine macrophytes on harmful substances as bio-indicator	108
13. Application of species-sensitivity distribution (SSD) model on development of criteria for protecting macrophyte communities in coasts	117
Part 3. Discussion	123
Chapter 4. Extents of Attainment and Contribution	124
Part 1. Attain of the Goal	124
Part 2. Extent of Contribution	125
Chapter 5. Application of the Subject	127
Part 1. Expectation and Necessity for Additional Research	127
Chapter 6. References	129

목 차

요약문	ii
Summary	v
Contents	viii
목차	x
제 1 장 연구개발과제의 개요	1
1. 연구개발 필요성	1
2. 연구개발 목적	5
3. 연구내용 및 범위	6
제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보	7
1. 대형해산식물 (marine macrophytes)을 이용한 생태독성영향평가에 관련된 국내외 연구 동향	8
2. 엽록소형광을 이용한 생태독성영향 평가의 최근 동향	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	17
제 1 절 연구수행 방법	17
1. 시료의 채집과 준비	18
가. 유해물질 생태독성평가를 위한 시험종 선별	18
나. 1차년도 유해물질 생태독성평가를 위한 시료채집 및 준비	19
다. 2차년도 유해물질 생태독성평가를 위한 시료채집 및 준비	20
2. 생태독성평가 대상 유해물질의 선정	20
3. 해산식물의 광합성에 대한 유해물질 독성효과	22
가. 광양자수율(quantum yield) 계산 및 광반응곡선(RLCS) 피팅	22
4. 해산식물 증 잘피에 의한 중금속 흡수	25

5. 해산 식물 중 갈파래 조직 내 광합성 색소(photosynthetic pigments)함량 측정	27
6. 유해물질 단일 또는 다중 생태독성영향 평가	27
가. 단일 및 다중 유해물질의 독성영향 평가	28
7. 유해물질의 독성발현과 환경요인과의 관계	29
가. 환경요인 중 온도변화에 따른 유해물질의 독성영향 평가	29
나. 환경요인 중 영양염 농도변화에 따른 유해물질의 독성영향 평가	29
8. 생태독성평가 방법의 표준화를 위한 비교 실험	30
제 2 절 연구수행 내용 및 결과	34
1. 유해물질에 노출된 갈파래의 광합성 및 양자 수율	35
2. 유해물질의 96시간 급성독성 효과에 의한 갈파래 색소함량의 변화	41
3. 잘피에 의한 중금속 흡수능 조사	45
4. 잘피의 광합성에 대한 중금속 및 유해물질의 영향	50
5. 칠면초 (halophyte)의 광양자수율 (effective quantum yield)에 대한 유해물질의 독성	56
6. 잘피 (seagrass)의 광양자수율 (effective quantum yield)에 대한 유해물질의 영향	59
7. 단일 및 다중 유해물질에 노출된 미세편모조류의 72시간 급성독성영향	63
8. 다중 유해물질에 노출된 갈파래와 잘피의 72시간 급성독성영향	75
9. 환경요인 중 온도변화에 따른 유해물질의 갈파래와 잘피에 대한 72시간 급성독성 시험	82
10. 환경요인 중 영양염 농도 변화에 따른 유해물질의 갈파래와 잘피에 대한 72시간 급성독성시험	88
11. 유해물질에 대한 생태독성평가 방법의 표준화를 위한 비교 실험	99
12. 유해물질에 대한 생물학적 지시자 (bio-indicator)로서 해산식물의 이용 방안	108
가. 해산식물을 이용한 유해물질 생태독성평가 방법의 표준화	112
나. 엽록소 형광측정법을 이용한 해산식물종에 대한 표준화된 생태독성평가방법의 개발 및 이용	114

13. 연안 식물군락 보호 안전기준 마련을 위한 중-민감도 분포 모델 (SSD model)	117
제 3 절 고찰	123
제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	124
제 1 절 연구개발 목표달성도	124
제 2 절 대외 기여도	125
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	127
제 1 절 기대효과 및 추가연구의 필요성	127
제 6 장 참고문헌	129

제 1 장 연구개발 개요

본 보고서는 연안습지 해산식물 군락이 유해물질에 의한 환경오염에 의해 위협을 받고 있으나, 관련 연구가 거의 없어 해산식물 군락 보호를 위한 유해물질의 생태독성 영향을 평가하여 관리방안 마련을 위해 수행되었다.

제 1장에서는 먼저 연안습지에 서식하는 해산식물 군락 보호를 위한 유해물질 오염 독성영향평가와 보호안전 기준 및 관리방안 마련을 위한 본 연구의 필요성, 목적, 범위 및 내용, 그리고 주요 결과를 요약하여 제시하였다.

1. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

유해물질에 의한 환경의 오염으로 연안습지 생태계의 파괴는 19세기 후반부터 20세기 초반에 걸쳐서 광업을 비롯한 산업화의 발달로 더욱 가속화되고 있는 현실이다. 또한, 생활환경의 개선 및 삶의 질이 풍부해지면서 다양한 화학물질의 사용으로 인하여 연안해역은 부영양화되고, 그로 인하여 연안습지 생태계의 파괴는 더욱 더 가속화되고 있는 실정이다. 그러나 이 문제에 대한 인식은 낮고, 대중 및 관련 정부당국자의 무관심 속에 연안습지 생태계의 보존이나 보호에 대한 노력들은 요원하기만 하다. 현재, 전 세계적으로 광산을 비롯한 도시하수, 산업폐수 등 강을 통해 연안 해양환경으로 유입되는 유해물질의 양은 무시하기 힘들 정도로 많은 양이다 (Kennish 1996, Batley 1996).

다양한 해초(seagrass), 해조(marine algae), 그리고 염생식물(salt plant)로 구성된 연안습지(연안 해양환경) 식물군락은 지구상에서 생산력이 가장 높은 생태계 중의 하나이며, 어류 및 패류를 비롯한 경제적 가치가 높은 다양한 수산자원의 서식처와 산란처를 제공하고, 높은 일차 생산량을 통해 연안 및 하구생태계의 기초를 담당하고 있다. 또한 영양염을 빠르게 흡수하기 때문에 부영양화를 제어할 수 있고, 연안습지 식물군락의 높은 밀도 형성은 저층 퇴적물을 안정하게 하고 대규모 해일 및 파도를 약화시켜 서식 생물에게 안정된 보금자리를 제공한다. 따라서 연안습지 식물군락은 높은 경제적 가치와 생태적 가치를 함께 지닌, 연안의 생산성 향상과 수산자원을 위해 보호해야 할 중요한 천혜자원

이다. 이렇듯 연안습지 식물군락이 형성된 연안생태계 식생을 통해 인간은 직간접적으로 많은 혜택을 얻고 있다는 것이다. 이와는 반대로 높은 경제적 가치의 식물군락이 육상으로부터 유입되는 여러 가지 유해물질의 독성 영향에 의해 연안으로부터 쉽게 사라져 버릴 수 있다는 것에 대해서는 많은 이들이 외면하고 있다.

연안 해양환경에서 중금속, 농약, 제초제, TBT를 포함한 다양한 유해물질들은 농경지를 포함한 인근 담수생태계로부터 유입되며, 해양에서의 사고 및 선박에서의 유출을 포함하여 다양한 경로로 연안습지 생태계에 유입된다 (Van den Brink et al. 1997). 특히 Irgarol이나 Diuron 등과 같은 제초제 성분의 유해물질들은 배의 선창에 이용되는 방오도료로서 최근 그 사용량이 늘어나고 있는 화학물질이나 (Thomas et al. 2000), 이들 화학물질의 연안습지 식물생리에 대한 효과는 아직 연구된 바가 거의 없다 (Leadbitter et al. 1999). 게다가 연안습지 환경에 서식하는 다양한 식물들을 대상으로 하는 독성 실험의 경우 거의 이루어지지 않았다 (Lytle and Lytle 2001). 유해물질 중, 중금속의 경우는 해수 또는 퇴적물 공극수를 통해 연안 습지 식물의 조직에 농축된다 (Lyngby et al. 1982, Ward 1987). 농축된 유해물질의 독성은 해산식물의 종류, 유해물질의 특성 및 농도, 또는 유해물질 스트레스를 동반한 환경적인 조건 등에 따라서 다양하게 나타난다. 유해물질에 의해 손상을 입는 것으로 제안되는 기작들 중에는 효소의 저해 (Stobart et al. 1985), 광합성 기구 중 광계 반응중심의 다양한 곳에서의 저해 (Baron et al. 1995, Clijsters and Van Assche 1985), 광저해 현상의 상승 (Vavilin et al. 1995) 그리고 산화스트레스 (Clijsters et al. 1999, Luna et al. 1994, Okamoto et al. 1996, Weckx and Clijsters 1996), 플라스토시아닌 (plastocyanin) 기능의 장애 (Kimimura and Katoh 1972), 지질 대사 작용의 변화 (Jones and Harwood 1993), 중요한 미량원소 흡수기작의 교란 (Zolotukhina 1995) 등이 있다. 특히 광합성은 모든 연안 생태계의 에너지를 공급하는 가장 기본적인 생리기작으로 이에 대한 유해물질의 저해는 연안 생태계의 생산성을 감소시킬 뿐만 아니라 생태계 전체의 에너지 수지에 막대한 영향을 미침으로써 생태계 구조와 기능에 치명적인 손상을 가져올 수 있다.

연안습지 식물군락의 생육환경이 각종 유해물질로 인한 환경오염 및 기상이변 등 여러 가지 이유로 악화되고, 그에 따라 해양생태계의 축소가 인류의 가장 큰 우려로 다가오고 있기 때문이다. 최근의 경우에는 연안환경의 부영양화, 간척과 같은 육지의 확장 또는 육지의 이용방안 변경에 의한 난개발과 도시하수, 산업폐수 등의 강을 통한 유입

등과 같은 인간 활동에 의한 원인이 연안습지 식물군락의 소멸에 그 주요한 원인을 차지하고 있다. 이러한 인간 활동에 의한 연안 습지 식물군락의 감소는 연안 생태계의 축소 또는 파괴를 유발하고 더 나아가서 수산자원의 감소로 인하여 연안습지의 무한한 잠재력의 감소 및 소멸을 유발하고 있다.

2) 경제·산업적 측면

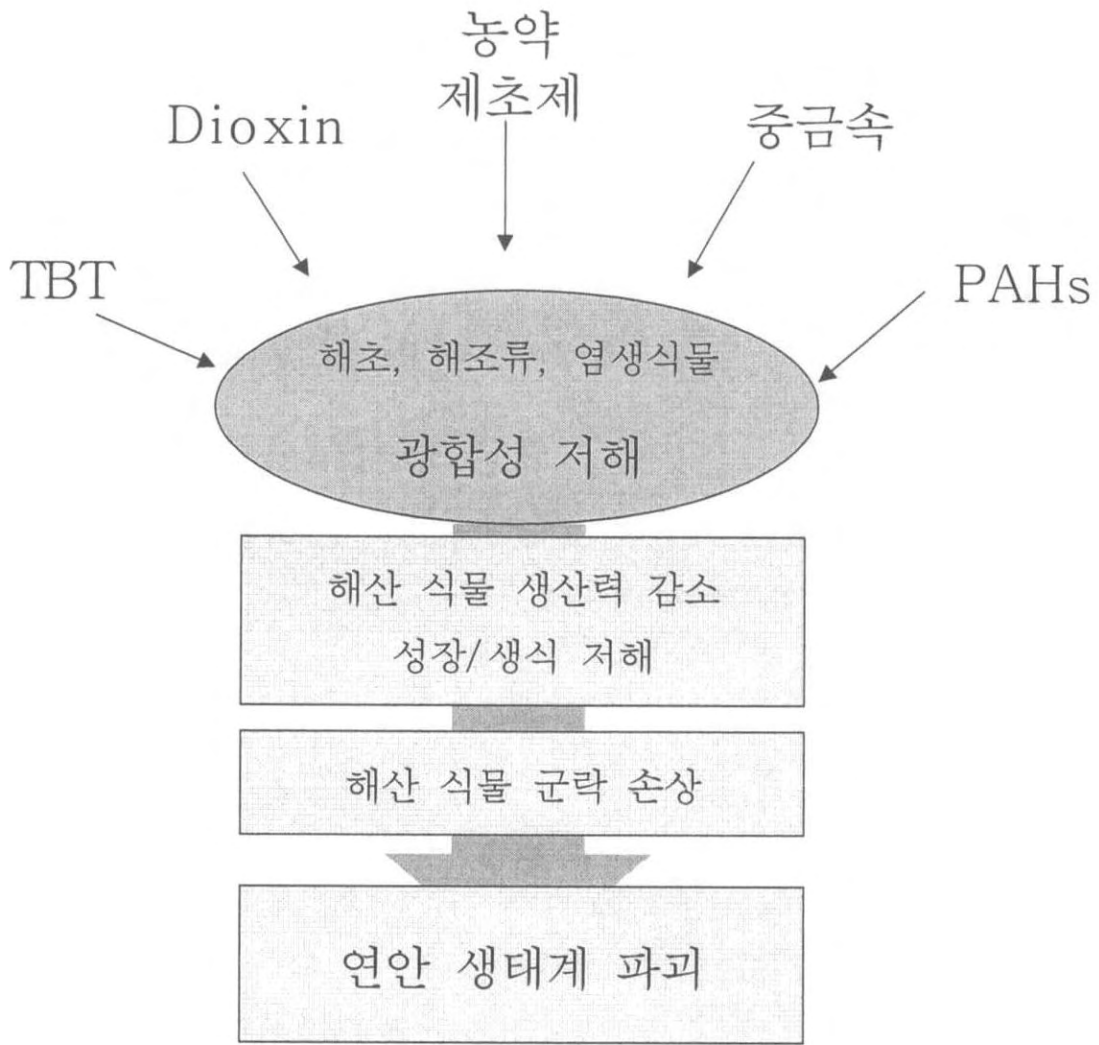
연안습지 식물군락 중 해초류(seagrasses)는 오랜 역사를 가지고, 다양한 목적으로 인간에게 유용하게 이용되고 있다. 18, 19세기부터 해초류 씨앗은 주요한 식용자원으로 탄수화물이 풍부한 밀가루로 가공되어 이용되었다는 보고도 있으며 (Felger et al. 1980). 북서태평양 지역에서는 해초류의 지하경과 엽조 하단부를 직접 식용하였다는 보고도 있다 (Turner and Bell 1973). 남동아시아의 경우, 연안지역에서는 오늘날까지도 식용으로 이용되고 있다고 알려져 있다. 우리나라의 경우, 남해연안의 해초류가 번무한 도서지방에서는 과거 수십 년 전까지도 연안의 농가들은 해초류를 수확하여 농업용 퇴비로 사용하였으나, 지금은 연안습지 식물군락의 감소와 화학비료의 발달로 인하여 사용하지 않는다고 알려지고 있다. 일부 해초류의 씨앗은 탄수화물이나 단백질 함량이 월등하고 영양학적 가치도 뛰어난 것으로 알려져 가루로 빻아서 식용이 가능하고, 이들 씨앗의 가루에는 칼슘, 철 그리고 인의 함량이 월등하다 (Montano et al. 1999). 향후 본 연구결과를 기초로 유해물질로부터 연안습지 식물군락의 보호와 보존이 가능해 진다면, 연안의 수산자원의 회복 및 식물 자체를 이용한 기능성 식품과 천연물 화학을 이용한 유용물질의 추출에도 크게 도움이 될 것으로 판단된다.

해산 식물을 이용한 독성 평가기법은 향후 해마다 수 만종씩 쏟아져 나오는 각종 화학물질의 유해성을 평가하는 수단으로 유용하게 이용될 수 있다. 기존의 평가 방식은 주로 물벼룩이나 어류와 같은 동물에 대한 치사독성을 통한 평가법이었으나 점증하는 생물검정 평가법에 대한 수요를 충족하기 위해서는 해산 식물과 같은 다양한 실험 생물에 대한 평가법이 추가적으로 이용될 필요성이 있다. 선진국에서는 이미 다양한 생물학적 독성 영향 평가에 해산 식물을 활용하고 있으며, 특히 제초제와 같이 식물에 특이적인 독성을 일으키는 유해물질의 경우 식물을 통한 독성 검정이 절실하게 요구된다. 이와 같은 유해 오염물질의 생물학적 평가에 대한 수요는 점증하고 있는 실정이나, 아직까지 국내에서는 이에 대한 연구가 매우 부족하다. 향후 국내에서도 연안 생태계 보호와 환경 개선을 위한 노력과 관심이 크게 증가할 것으로 예상되며 이에 맞춰 적절한 오염 평가 기

법 및 이를 통한 관리 방안 마련을 위한 보다 많은 연구가 필요하다.

3) 사회·문화적 측면

우리나라의 습지의 대부분은 내륙습지가 아닌 해수가 흐르는 지역의 연안습지이다. 연안습지는 세계 대부분의 대규모 습지를 차지하는 것으로, 강에 의해 이동되어진 토양 침전물이 유속이 느려짐에 따라 강 하류 또는 큰 강의 어귀 또는 하구(estuary)에 넓게 침적되어 이루어지거나, 해수에 의해 육지가 침식되어 이루어진 것들로 삼각주 지역이나 해안 갯벌이 대표적이라 할 수 있다. 특히, 삼면이 바다로 둘러싸인 우리나라에서 다양한 연안습지 중 갯벌에 관해서는 세계 5대 갯벌에 포함될 정도로 그 규모가 방대한 것으로 알려져 있다. 연안습지 식물군락 중 해초류(seagrasses)의 경우 하구역 또는 조간대에 연안습지와 연결되어 넓은 해초군락(seagrass meadows)을 형성하고 있고, 염습지(salt marsh)의 경우 육지와 해양의 경계면에서 다양한 염생식물이 서식하고 있어 자연생태관광의 자원으로 높은 잠재력을 가진다고 볼 수 있다. 본 연구 결과를 바탕으로 연안습지의 보존 및 보호가 가능해 진다면, 연안습지 식물군락을 이용하여 자연생태공원화한 해안습지는 해양과 육지의 경계지역에서 다양한 생물들의 서식처로 제공될 것이며, 종다양성을 증진시키고 자연생태계의 생물들을 관찰, 체험할 수 있는 건강한 생태공간으로 제공하고 환경의 중요성을 일깨워 주는 공간으로 재탄생할 것으로 사료된다.



<유해물질의 해산식물 광합성 저해 영향에 의한 피해>

2. 연구개발 목적

본 연구는 유해물질의 독성으로부터 연안습지의 식물군락을 보호하고, 유해물질에 의한 연안습지 생태계의 파괴로 2차적인 연안 수산자원의 감소를 방지하기 위해 독성 영향 평가 기술 및 기법을 개발하고, 연안습지 보호안전 기준 및 안전관리 방안을 수립하는 연구로서 다음과 같은 사항을 밝히는 것을 연구목표로 한다.

1. 연안 수산자원 보존을 위한 유해물질 생리영향 및 위해성 연구
 - 보존 가치가 높은 연안 해산 식물 군락에 대한 기본 생리, 생태 문헌 연구
 - 연안 생태계를 파괴하는 주요 유해물질의 위해성에 대한 문헌 연구
 - 해산 식물 광합성 독성 영향 평가 해외연구 사례 연구
2. 연안습지 식물군락에 대한 유해물질의 광합성 저해 독성 영향 평가
 - 해산식물을 이용한 유해물질의 광합성 저해 영향 평가 기술 개발에 대한 연구
 - 단일 및 다중 유해물질에 의한 광합성 저해 독성 영향 평가
 - 해산식물의 유해물질 노출 후 광합성 능력 회복에 관한 연구
3. 유해물질의 독성 발현과 환경요인과의 관계 규명
 - 유해물질의 광합성 저해에 대한 환경 요인의 관계성 규명
 - 온도, 광량, 영양염 조건별 독성 영향 연구
4. 유해물질 오염에 의한 독성 모델링 및 위해성 평가 기법 개발
 - 유해물질에 대한 생물학적 지시자(bio-indicators)로서 해산식물의 이용 방안 연구
 - 다중 유해물질에 의한 독성영향 모델
 - 유해물질 영향과 환경요인 변화의 관계성 모델
 - 유해물질 독성 저감을 위한 보호안전 기준 및 관리 방안 도출

3. 연구범위 및 내용

본 연구는 연안습지 해초군락 보호를 위한 유해물질 오염 독성 영향 평가하고 보호안전 기준 및 관리방안 도출을 위하여 유해물질에 대한 생태독성평가 방법을 개발하거나 표준화하기 위한 자료를 축적하고 이를 활용하여 효율적인 해초군락 보호에 제안을 하고자 하는 목적 하에서 작성되었다.

이를 위하여 먼저 연안습지 해산식물 생태, 생리 특성을 이용한 유해물질 위해성 평가 관련 국내외 연구 동향을 파악하고 생태독성평가 방법의 유형 및 장단점을 포괄적으로 살펴보고 이를 토대로 국내에서의 동향과 문제점을 도출하여 이를 기반으로 장기적인 연안습지 해초군락 보호에 대해 상세하게 연구·분석하고자 하였다. 이와 관련한 연구 내용 및 범위는 다음과 같다.

- 1) 연안습지 해산식물 군락의 생리, 생태 및 유해물질의 독성 위해성 관련 문헌 연구
 - 보존 가치가 높은 연안 해산 식물 군락에 대한 기본 생리, 생태 문헌 연구
 - 연안 생태계를 파괴하는 주요 유해물질의 위해성에 대한 문헌 연구
- 2) 해산 식물 이용 오염물질 독성영향 평가 이용 방안 연구
 - 해산 식물 광합성 독성 영향 평가 해외연구 사례 연구
 - 연안습지 식물에 대한 유해물질의 독성 발현 연구
 - 단일 및 다중 유해물질에 의한 해산 식물 광합성 저해 독성 영향 평가
 - 유해물질의 독성 발현과 온도, 영양염과 같은 환경요인과의 관계
- 3) 유해물질에 대한 생물학적 지시자 (bio-indicators)로서 해산식물의 이용방안 연구
- 4) 유해물질 독성 저감을 위한 보호안전 기준 및 관리방안

제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보

연안습지 해산식물에 대한 유해물질의 생태독성영향 평가에 관련된 대부분의 연구들은 다양한 endpoints의 이용으로 직접적인 비교에 있어서 많은 어려움이 있다. 상대적으로 연안에 서식하는 동물들을 이용한 연구에서보다 식물의 특성상 다양한 생리, 생태적인 특성인 것으로 사료된다. 이러한 이유로 인하여 제한된 연구결과들이 데이터베이스화(예, www.epa.gov/ecotox) 검색이 가능하지만 아직도 여전히 부족한 것으로 판단된다. 또한 많은 연구들이 무척추동물을 이용하여 측정된 생태독성영향평가 결과와 비교하여 해산식물의 민감도가 떨어진다는 것을 보고하고 있다. 그래서 일부 해산식물을 대상으로 수행된 연구들은 극단적으로 너무 높은 유해물질의 농도를 적용하여 생태적으로 거리가 있는 연구들을 진행하였다.

먼저 개괄적인 국내의 연구동향을 개괄적으로 정리하고, 최근까지(1959년부터 2000년까지) 대형해산식물(marine macrophytes)을 대상으로 연구한 결과들을 분석하였다.

- 국내

- ◎ 우리나라의 경우 해조류를 대상으로 일부 중금속에 의한 독성효과를 확인하는 정도이며, 다양한 연안습지 식물군락에 대하여 위해한 유해물질의 종류도 확인되지 않고 있으며, 유해물질로 인한 식물군락의 파괴 및 서식처 오염에 대한 기초적인 인식이 전무한 상태임.
- ◎ 일부 해조류를 대상으로 한 연구들은 단일 유해물질의 세포독성 효과나 유해물질의 흡수능 등 일부 한정된 형태로 행해지기 때문에 자료의 이용이나 분석에 한계가 있음.
- ◎ 연안 수산자원 보호 및 보존에 필요한 기초 자료의 지속적인 수집, 자료정리 및 분석 체계를 확립하여 장기 모니터링 기법을 수립해야 함.
- ◎ 유해물질에 관한 기준치 마련을 위해 일부 특정 해역에 국한되어 유해물질의 농도 및 독성에 대한 연구결과들이 보고되고 있으나, 유해물질 기준치의 적정성에 대해서는 많은 논란을 있음.
- ◎ 특히 연안 습지에 서식하는 식물군락을 대상으로 한 유해물질 오염 독성 영향에 대한 전무하며, 독성 발현 과정에 대해서는 연구 보고된 적이 없음.

- 국외

- ◎ 다양한 해산식물을 대상으로 유해물질의 독성효과를 연구하고 있으며, 현재 존재하는 독성물질의 환경규제를 위한 연구들이 진행되고 있음.
- ◎ 연안 습지의 염습지(salt marsh) 및 해초지(seagrass meadows)의 실제적인 보호 및 보존을 위하여 가이드라인을 제시하고 주로 유해물질 저감 방안 기술 개발에 초점을 맞추고 있음.
- ◎ 기존에 개발된 다양한 독성영향 평가 기법 및 기술을 중심으로 보호안전 기준 및 관리 방안 마련에 관심을 두고 적절한 기술개발에 많은 노력을 기울이고 있음.
- ◎ 유해물질의 독성 발현과 관련된 환경요인과의 관계를 규명하고 있으며, 이를 통한 생태적 적정성을 가지는 기준을 제시하고 있으며, 2차적으로 유해물질 제거에 탁월한 기능을 보이는 식물군을 탐색하여 실제 응용에 대한 연구 등 연안습지 생태계가 건강성을 보존하고 유지될 수 있도록 많은 연구가 수행되고 있음.
- ◎ 유해물질 독성 저감 및 제거를 위한 수치모델링을 개발 중에 있으며, 이를 통한 보호안전기준 마련 및 관리방안 등 종합적인 연구 활동이 전개되고 있음.

1. 대형해산식물 (marine macrophytes)을 이용한 생태독성영향평가에 관련된 국내·외 연구 동향

유해물질에 의해 오염된 환경시료나 화학물질의 독성을 평가하기 위한 기존의 생태독성평가 시스템에서 가장 많이 이용되고 자주 사용되는 방법은 단세포조류(unicellular alge)를 이용한 bioassays이다 (Kuster and Altenburger 2007). 이와 비교해서 해산 대형식물종을 이용한 생태독성평가 시험법 또는 생물학적 지시자 (bio-indicator)로서의 이용은 생물자체의 크기가 크고, 종마다 서로 다른 생태적인 요구조건이 상이한데서 오는 차이와 bioassay를 위한 노력과 시간이 많이 소요되어 현실적으로 많은 단점들을 가지고 있다.

Eklund and Kautsky (2003)에 의하면, 1959년부터 2000년까지 대형 해산식물 (marine macrophytes)을 대상으로 유해물질에 대한 생태독성을 연구한 논문은 총 82편이었다. 이들 연구논문에서 유해물질에 대한 생태독성평가를 위해 시험종 (test species)으로 이용된 해산식물의 종수는 총 65종이었고, 총 120가지 유해물질에 대해서 생태독성평가를 수행

한 결과를 담고 있다고 보고했다. 먼저 해산식물을 시험종으로 이용하여 수행된 120가지 유해물질은 유기화합물이 33%, 유기금속화합물이 35%, 유류 14%, 금속 8%, 세제류 7.5%, 그리고 무기화합물 2.5%를 차지하고 있었다 (그림 2-1). 생태독성평가의 대상이 된 유해물질 중 50% 정도는 단일 종에 대하여 생태독성평가를 수행한 결과였다. 하지만 이들의 결과만으로는 해산식물에 대한 생태독성 효과에 대한 자료들이 너무 부족하여 유용한 자료로서 활용되기에는 한계를 가지고 있다는 것을 지적하고 있다. 또한 해산식물을 시험종으로 하여 수행된 생태독성평가 자료들이 너무나 다양한 방법 (서로 다른 노출시간, 온도, 광량, 광주기, 염분 등)으로 측정된 결과여서 자료들 간에 상호 직접적인 비교가 쉽지 않음을 지적하였다.

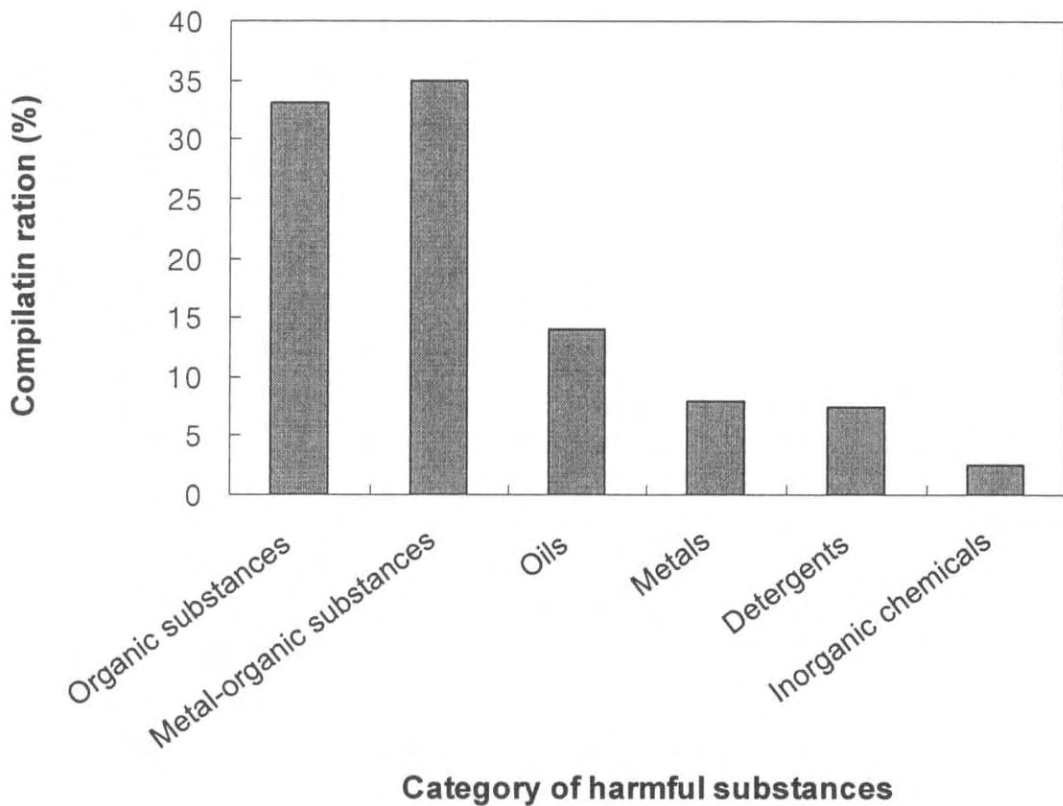


그림 2-1. 1959년부터 2000년까지 대형해조류를 대상으로 독성시험이 수행된 유해물질 구성비 (자료: Eklund and Kautsky 2003).

해산식물을 대상으로 유해물질의 생태독성영향을 평가한 국외연구에서 가장 많은 연구가 이루어진 금속은 구리 (Cu)였으며, 총 82편의 연구논문 중 구리를 대상으로 한 논문의 비

율은 41%였다 (그림 2-2). 이 외에 아연 (Zn), 카드뮴 (Cd), 수은 (Hg) 납 (Pb) 순으로 연구가 이루어졌으며, 비소, 크롬, 셀레니움 등을 연구한 논문은 빈약하였다. 구리에 의한 독성효과를 측정하는데 대상이 된 대형해조류의 종수는 24종이었으며, 16종은 아연, 15종은 수은, 13종의 서로 다른 대형해조류를 대상으로 카드뮴의 독성효과를 평가한 것으로 나타났다. 많은 종류의 중금속 중 구리가 가장 많이 연구되는 이유는 동식물을 망라하여 미량으로 필요한 필수원소지만, 과량으로 존재할 때 보여지는 독성효과 때문에 가장 많은 관심을 받고 있는 것으로 보인다.

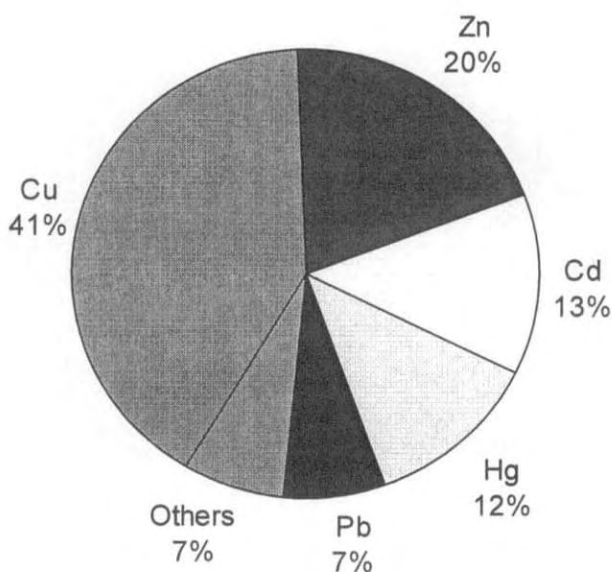


그림 2-2. 1959년부터 2000년까지 대형해조류를 시험종으로 이용하여 중금속에 대한 생태독성영향을 평가한 총 82편의 논문 중 개별 중금속에 대한 비율 (Eklund and Kautsky 2003).

각 유해물질별로 연구된 논문 편수는 중금속에 대한 논문이 39편으로 가장 많았으며, 유기화합물을 대상으로 한 논문이 24편, 그 외에 유기금속화합물 (TBT 등), 석유계열 등은 10편미만으로 미미한 편이었다 (그림 2-3). 유기화합물을 대상으로 한 논문은 거의 대부분이 제초제나 살충제 등을 포함하는 농약에 관련된 것이 거의 대부분이었다.

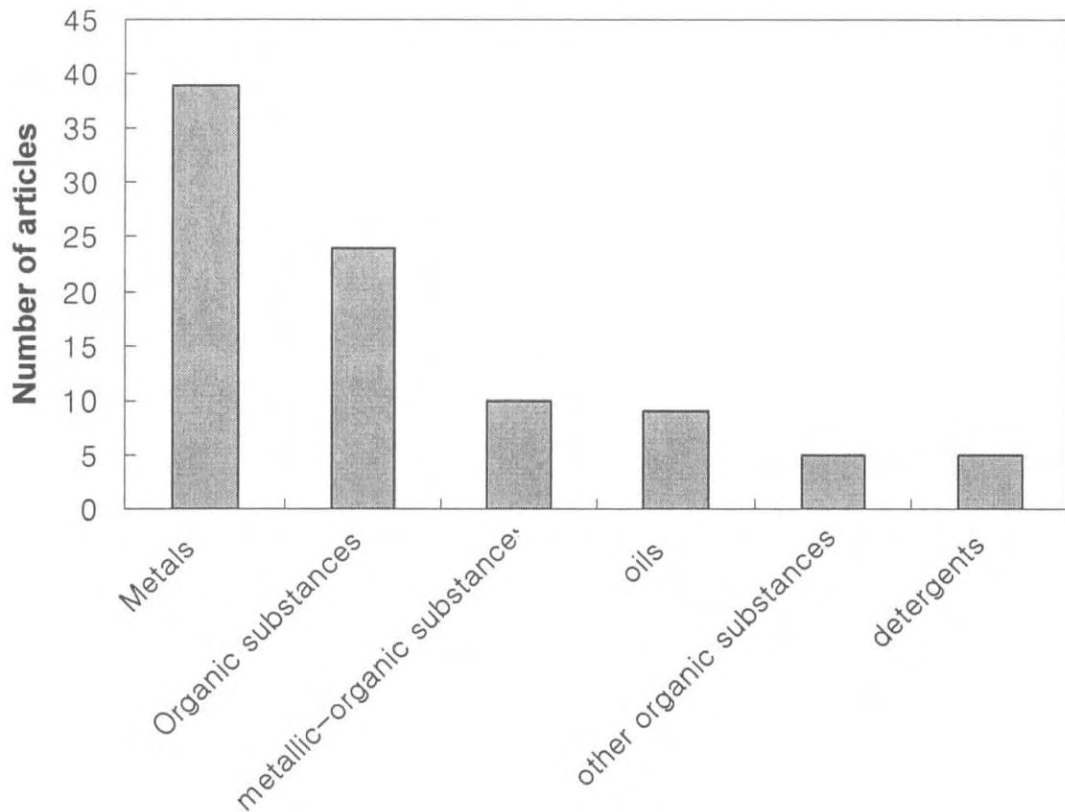


그림 2-3. 대형해조류를 이용하여 유해물질의 생태독성효과를 측정한 1959년부터 2000년까지 출판된 유해물질별 논문 수 (Eklund and Kautsky 2003).

Eklund and Kautsky (2003)가 분석한 해산식물에 대한 유해물질의 생태독성평가에서 이용된 시험종들은 총 65종으로 갈조류 28종, 홍조류 26종, 녹조류 11종으로 분류되었다 (표 2-1). 이 중에서 가장 많은 종류의 유해물질에 대해 생태독성평가가 이루어진 종은 녹조류 *Enteromorpha intestinalis* 였으며, 총 26가지의 서로 다른 유해물질을 대상으로 생태독성평가가 이루어졌다. 그 다음으로는 홍조류 *Champia parvula*, 갈조류 *Laminaria hyperborea* 등이 각각 18가지, 16가지 개별 유해물질에 대해 생태독성평가가 수행된 것으로 나타났다. 생태독성평가에 이용된 해산식물의 대부분 (약 45 종)은 5가지 미만의 개별 유해물질에 대해서 평가가 수행되었다. 유해물질에 대한 생태독성평가를 보고한 해산식물 중에서 가장 많은 논문에서 언급되고 있는 종은 갈조류 *Fucus vesiculosus*로 11편의 논문에서 생태독성평가 시험종으로 이용되었다. 그 다음으로는 갈조류 *Laminaria saccharina*와 녹조류 *Enteromorpha intestinalis*가 각각 9편과 6편으로 많은 논문에서 이용

되는 시험종으로 나타났다.

표 2-1. 1959년부터 2000년까지 독성자료를 다루고 있는 논문에서 찾아진 대형해조류 목록 (Eklund and Kautsky 2003).

Rhodophyta	Phaeophyta	Chlorophyta
Bangiales	Ectocarpales	Pyramimonadales
<i>Porphyra yezoensis</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	<i>Prasinocladus marinus</i>
<i>Porphyra suborbiculata</i>	<i>Pylaiella littoralis</i>	Ulotrichales
<i>Erythrotrichia carnea</i>	<i>Giffordia granulosa</i>	<i>Enteromorpha compressa</i>
Nemaliales	Scytosiphonales	<i>E. prolifera</i>
<i>Nemalion multifidum</i>	<i>Petalonia fascia</i>	<i>E. intestinalis</i>
Cryptonemiales	Laminariales	<i>E. linza</i>
<i>Grateloupa dichotoma</i>	<i>Laminaria saccharina</i>	<i>Ulva lactuca</i>
Gigartinales	<i>L. hyperborea</i>	<i>U. fasciata</i>
<i>Gigartina tenuistipitata</i>	<i>L. digitata</i>	<i>Ulothrix flacca</i>
<i>G. verrucosa</i>	<i>L. dentigera</i>	<i>Urospora penicilliformis</i>
<i>Phyllophora truncata</i>	<i>L. ephemera</i>	Siphonocladales
Rhodymeniales	<i>L. farlowi</i>	<i>Monostroma nitidum</i>
<i>Champia parvula</i>	<i>Nereocystis luetkeana</i>	<i>Cladophora glomerata</i>
Ceramiales	<i>Eisenia arborea</i>	
<i>Antithamnion plumula</i>	<i>Pterygophora californica</i>	
<i>Plumaria elegans</i>	<i>Macrocystis pyrifera</i>	
<i>Ceramium strictum</i>	<i>Macrocystis angustifolia</i>	
<i>C. flabelligerum</i>	<i>Ecklonia radiata</i>	
<i>C. rubrum</i>	Fucales	
<i>C. pedicellatum</i>	<i>Hormosira banksii</i>	
<i>C. ciliatum</i>	<i>Fucus spiralis</i>	
<i>Callithamnion hookeri</i>	<i>F. vesiculosus</i>	
<i>Callithamnion tetricum</i>	<i>F. serratus</i>	
<i>Spermothamnion repens</i>	<i>F. edentatus</i>	
<i>Tiffaniella snydereae</i>	<i>Pelvetia canaliculata</i>	
<i>Polysiphonia lanosa</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i>	
<i>P. brodiaei</i>	<i>Phyllospora comosa</i>	
<i>P. nigrescens</i>	<i>Cystoseira osmundacea</i>	
<i>P. urceolata</i>	<i>Cystoseira barbata</i>	
<i>P. opaca</i>	<i>Sargassum muticum</i>	
<i>Brogniartella byssoides</i>	<i>Sargassum agardhianum</i>	
Total		
26	28	11

국내에서 보고된 유해물질 생태독성평가 관련 연구는 다양하게 이루어졌다. 하지만 대부분이 해산무척추동물을 대상으로 평가한 것이었으며, 해산식물을 시험종으로 이용한 논문은 10여 편 내외로 매우 빈약한 실정이다. 유해물질의 종류는 중금속 (Cd, Cu, Pb,

Zn)과 유기화합물 (fluoranthene, endosulfan)이 있었으며, 시험종 (test species)으로 이용된 종은 녹조류 *Ulva pertusa* (구멍갈파래) (Kim et al. 1994, 김과 한 1999, Han et al. 2005), 홍조류인 *Porphyra* sp. (김 등, 1999)와 담수 미세녹조류인 *Chlorella* sp.(손 등 2006)를 이용하여 연구한 결과가 보고되어 있다.

2. 엽록소형광을 이용한 생태독성영향 평가의 최근 동향

연안습지 식물군락을 대상으로 가능한 모든 종류의 유해물질에 대한 효과를 광합성 형광반응을 이용하여 식물 생태생리학적으로 구분해 내고 유용한 생물학적 지시자 (bio-indicators) 및 생물지표 (biomarkers)를 개발하고자 하는 많은 연구들이 진행되고 있다. 식물군락에 대한 스트레스의 징후를 찾기 위하여 치사량 수준의 유해물질에 노출시킨 후 광합성 생리반응 연구와 같은 고도로 조직화된 연구들을 실험실에서 뿐만 아니라 현장에서도 수행함으로써 유해물질의 효과를 보다 정밀하고 정교하게 측정함으로써 탁월한 연구결과들이 또한 보고되고 있다. 본 연구를 통해 연안습지 식물을 이용한 표준 생물독성평가 방법을 개발하고, 이것은 식물세포의 생리생태학적변화에 대한 오염물질의 효과를 측정하는데 유용한 도구가 될 것이다. 유해물질에 대한 최대 저항수준을 설정하는 것에 의해 생물계에 대한 예상 가능한 피해를 방지하는데 목표를 둔 이들 시험들은 특히 연안습지 생태계에 대한 오염의 잠재적인 충격을 평가하는데 있어서 특히 중요하다고 할 수 있다.

◎ 국내의 관련분야의 환경변화

엽록소 형광 (Chlorophyll variable fluorescence)은 식물에 의해 흡수된 빛에너지의 일부이며, 흡수된 빛에너지의 소멸 경로를 추적하는 방법을 응용하여 은 시간 내에 효과적으로 식물의 광합성을 측정하고, 이를 통해 식물에 대한 유해물질의 독성 및 위해정도를 신속히 평가하고, 이로부터 얻어진 결과로 해산식물에 대한 보호안전 및 관리방안을 수립하는 것이 본 연구의 목적이었다. 하지만 본 연구에서 집중적으로 사용되는 엽록소 형광 측정법 (PAM Fluorometry)은 최근 눈부신 발전을 통해 엽록소 내의 광계 (Photosystem I 또는 II)의 상태와 전자전달계의 성을 보다 빠른 시간 내에 관찰할 수 있는 식물 고유의 초기 형광 유도 (Kautsky 효과)과정을 통해 식물의 개별 특성을 구분하고, 이를 이용하여 식물생태독성 시험 (Phyto-ecotoxicity testing)에 많이 이용되고 있다

(Tyystjärvi et al. 1999). Kautsky 효과는 식물을 암상태 (dark condition)에 방치하여 암적응 (dark adaptation) 시킨 후, 은 시간의 포화광을 조사하여 얻어지는 형광의 곡선 (O-J-I-P)을 지칭하며, 형광곡선의 다양한 변형은 유해물질에 의한 스트레스나 광합성 과정의 손상정도를 의미한다. 이것은 식물의 생리적 요인들에 대한 유해물질의 독성영향을 스크리닝 하는데 가장 적절하고 유효한 것으로 최근 알려지고 있다 (Rohacek and Bartak 1999, Rohacek 2002).

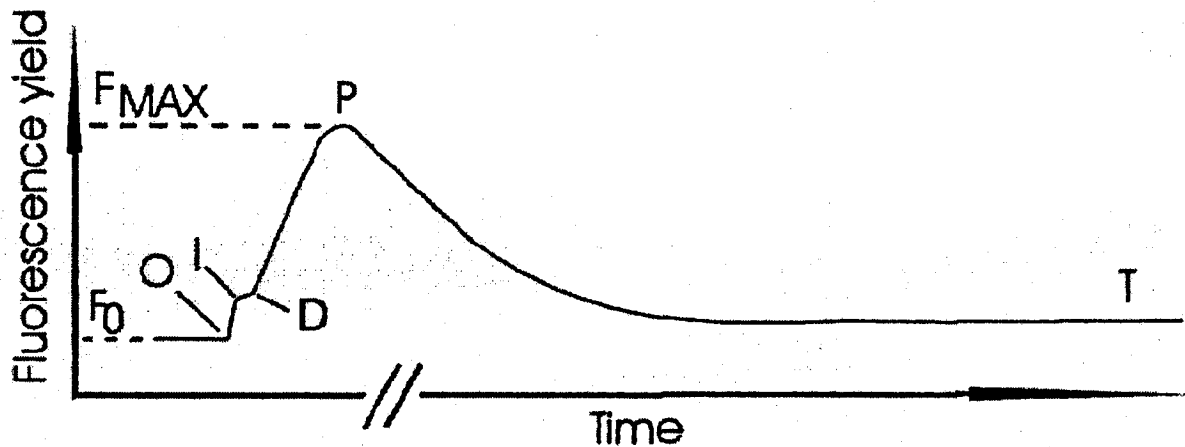


그림 2-4. Kautsky 곡선에 대한 모식도. O, I, D, P, 그리고 T는 전형적인 Kautsky 곡선에서 변곡점들을 지시하는 용어임 (Tyystjärvi et al. 1999).

그림 2-4는 전형적인 Kautsky 곡선의 모양을 보여주고 있다. 식물을 암적응시킨 후, 은 시간 (수 ns (nano-seconds)에서 수 ms (milli-seconds) 수준)의 포화광을 조사하여 얻을 수 있는 이 곡선은 식물 광합성 기관에서의 초기 산화과정을 보여주는 것으로 유해물질에 노출되었을 때 (또는 식물이 다양한 환경 스트레스를 받았을 때), F_0 에서 F_{max} 까지의 초기 곡선의 모양이 변형되는 것으로 알려졌다. 이를 이용하여 특정한 해산식물에 대하여 유해물질의 독성효과를 정량화하는 방법들 새롭게 시도되고 응용되고 있다.

최근 발달하고 있는 또 다른 새로운 식물독성평가 기법들 중 CCD 형광 이미지 (CCD fluorescence image)는 거의 모든 종류의 식물에 있어서 독성효과를 평가하는데 새롭게 이용되고 있다 (Gravel and Marsalek 2004). 그림 2-5는 형광유도과정에서 보여지는 유도곡선의 면적은 광합성 활성의 잠재적인 크기를 의미하는 상보면적 (Complementary area)으로 알려져 있다.

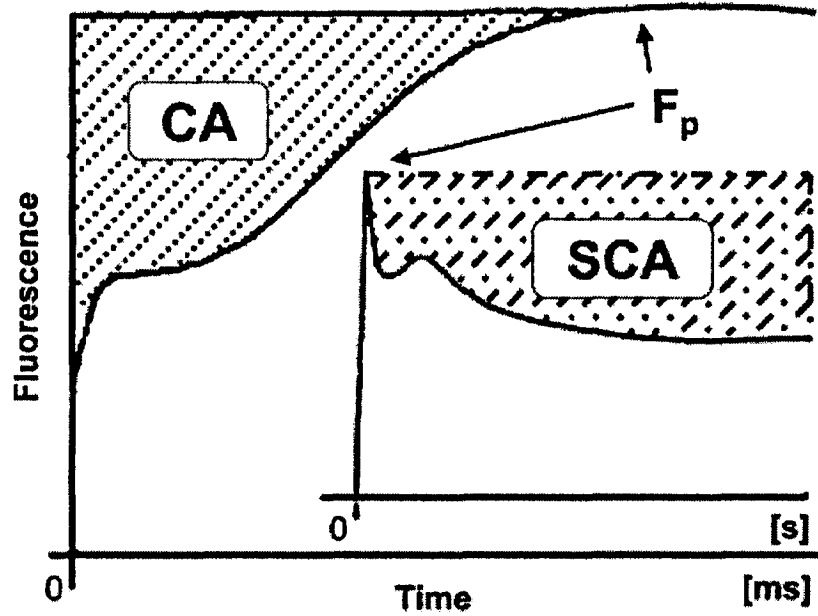


그림 2-5. 엽록소 형광 kinetics 모식도. CA: fast part of complementary areas, SCA: slow part of complementary areas. F_p 는 해산식물이 포화광에 노출된 후 2초 이내에 도달하는 지점이며, slow part는 수 백초 동안 지속됨.

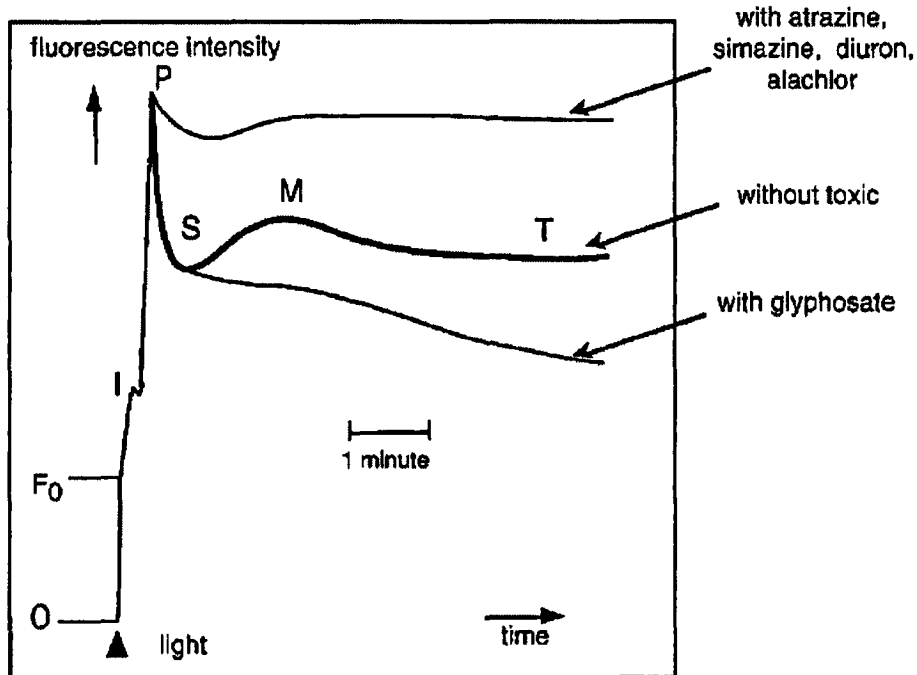


그림 2-6. 해산식물의 형광유도과정에 미치는 다양한 제초제 (atrazine, simazine, diuron, alachlor)의 효과

그림 2-6은 해산식물의 유해물질에 의한 독성영향이 형광유도곡선의 상보면적 변화를 보여주는 것이다. 독성물질의 유무에 따라 상보면적 (SCA)의 변화를 확인할 수 있으며, 영양염 (glyphosphate)이 추가됨에 따라 상보면적 (SCA)이 증가하고 있다. 이러한 상보면적의 변화는 식물 광합성기구의 물리적인 변화를 반영함으로써 유해물질의 독성효과를 짧은 시간 (수 ms) 내에 분명하게 측정할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

엽록소형광을 응용한 다양한 방법들 상대적인 형광소멸 (Relative fluorescence decay, Rfd)과 결합하여 보다 더 민감하고 빠른 독성반응을 측정하는 기법으로 발전하고 있다. 유해물질에 의한 독성기작을 좀 더 완전히 이해하기 위해서는 세포막, 양자펌프, ATP 합성 등과 같은 독성 신호들을 감지하고 이해하는 것이 필요하다. 이러한 방법들은 서식환경의 건강성 여부와 관계없이 독성영향을 평가하고 조기경보 시스템 (Early-warning system)을 구축하는데 있어 매우 유용할 것으로 판단된다. 그러므로 본 연구를 통해서 얻어진 결과를 활용하고, 유해물질로부터 연안 식물군락을 보호하는데 있어서 새로운 연구 방법들을 보충하고, 또 개발해야 할 것으로 사료된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 연구수행 방법

연안습지 식물군락의 건강성은 광합성 효율과 직접 관계가 있기에 다양한 유해물질로 인한 식물군락 위해성은 광합성을 중심으로 평가하는 것이 타당하다. 해산식물의 엽록소 형광을 이용한 생태독성시험에 있어서, 생물검정에 응용가능하고 유용한 해초류 및 해조류를 이용하는 방안을 연구 개발하는데 중점을 두었다. 그리고 해산식물 중 해조 개체군에 대한 독성물질의 효과를 평가하는데 있어서 새롭고 강력한 도구인 Toxy-PAM을 적용함으로써 저서식물 뿐만 아니라 식물플랑크톤에 대한 독성효과도 측정할 수 있는 시스템을 개발하고자 하였다. 본 연구를 통해 연안습지 해산식물을 이용한 표준 생물독성시험은 세포의 성장 및 번이에 대한 오염물질의 효과를 측정하는데 유용한 도구가 될 것으로 예상하였다. 이외에도 연안습지 해산식물의 생리생태 연구에 있어서 엽록소 형광 측정 기술을 이용한 유해물질 독성연구들을 수행하였으며, 연구결과의 적용 및 해석에 많은 노력을 기울였다. 특히, 최근에 발달된 PAM(pulse amplitude modulated) fluorometry 측정 시스템은 정량적이고, 비파괴적이며, 상대적 빠른 기술들을 제공하고 있다. 이러한 기술들은 연안습지에 서식하는 해산식물들의 광합성 특성을 이용하여 다양한 연구들을 진행하는 데 매우 유용하였다 (Schreiber et al. 1994, Ralph et al. 1998).

광합성 활성에 대한 엽록소 형광 측정은 유해물질에 의한 연안습지 식물의 광합성 스트레스를 효과적으로 설명할 수 있을 것으로 기대하였다. 연안습지 식물 엽록소 a의 형광을 이용한 실험방법은 중금속이나 제초제 같은 유해물질들이 직접적으로 식물의 광합성 기구 중 광계2의 광화학 저해를 목표로 작용하기 때문에 이러한 측정방법의 응용이 효율적일 것으로 예상하였다 (Solomon et al. 1996, Voulvoulis et al. 1999). 모든 유해물질들은 광합성 기작 및 기구에 대해 비슷한 작용점을 갖는다. 연안습지 식물은 이러한 유해물질에 노출되었을 때 광합성 활성의 감소를 유도하는 광계2의 환원상태에 영향을 미친다. 광합성 활성의 유의한 감소에 있어서 보다 장기적인 효과에 대한 연구는 유해물질 노출에 대한 만성적인 효과에 대한 이해가 완전하게 이해되어야만 가능한 것이다. 본 연구를 통해 유해물질에 대하여 짧은 시간 노출된 후 나타나는 급성효과 및 장시간 노출에 따른 만성효과, 광합성 활성의 반응 및 회복에 대한 연구가 이루어졌다. 그리고 이외에 해산식물의 광합성 활성에 영향을 미치는 다른 생화학적 과정에 대한 문헌조사도

병행되었다. 또한 해수 및 퇴적물 내에서 유해물질의 농도에 영향을 미치는 요인들은 광량, 온도, 산화-환원 전위 등 다양하게 존재한다. 이러한 환경요인 중 해산식물의 생육과 성장에 중요한 요인인 온도와 영양염 조건의 변화에 따른 연안습지 식물에 독성효과를 갖는 유해물질에 대한 환경 영향 요인을 평가하였으며, 연구를 통해 얻어진 결과들이 좀 더 유의성을 가지고 적용될 수 있는 기반을 마련하고자 하였다.

1. 시료의 채집과 준비

가. 유해물질 생태독성평가를 위한 시험종 선별

연안습지 해산식물 군락의 대표적인 식물군인 해초류 (seagrass)와 해조류 (macroalgae) 그리고 염생식물 (halophytes) 중 생태적으로 대표적인 생물종들을 선택하여 생리 반응에 대한 유해물질의 영향을 평가하였다. 먼저 해초류 중에서는 가장 서식범위가 넓고 연안생태 또는 경제적으로 중요한 거머리말 (*Zostera marina*, 이하 잘피)을, 해조류 중에서는 서식 범위 및 생태적 역할 등을 고려하여 구멍갈파래 (*Ulva pertusa*, 이하 갈파래)를, 마지막으로 염생식물 중에서는 칠면초 (*Suaeda japonica*)를 대상으로 본 연구를 수행하였다. 그러나 염생식물인 칠면초의 경우에는 시료를 채집하여 실험실로 운반한 후 유해물질에 의한 식물의 광합성 생리 반응을 관찰하기 위해서는 실험실 환경에서 짧게는 1주일, 길게는 1개월 정도 유지가 되어야 함에도 불구하고, 실험실 조건에의 순응 및 적응과정이 어렵고 쉽지 않아 유해물질에 의한 유해성을 평가하기가 용이하지 않았다. 그래서 이를 대체하기 위하여 해조류 중 미역 (*Undaria pinnatifida*) 포자를 대상으로 각종 유해물질에 의한 광합성 생리 스트레스를 측정하였다. 당초 계획서에는 포함되어 있지 않았지만 2차년도 연구에서는 식물플랑크톤을 추가하여 실험실 내에서 배양이 용이하며, 손쉽게 유해물질의 독성영향을 평가할 수 있는 여러 가지 식물플랑크톤 중 *Isocrysis galbana* (편모조류)를 선택하여 추가적인 연구를 수행하였다.

유해물질에 대한 위해성 평가 대상 해산식물 및 유해물질 목록은 표 3-1과 같다.

표 3-1. 유해물질에 의한 독성영향 평가 대상 및 유해물질 목록

해산 식물의 종류	생물명	독성 영향	독성 물질
식물플랑크톤 (Phytoplankton)	<i>Isocrysis galbana</i> (편모조류)	광합성 저해	제초제(Herbicide) 살충제(Insecticide) 중금속(Cd, Cu, Pb) 유기주석화합물 (TBT) 유기화합물 (PAHs 등)
해초류 (Seagrasses)	<i>Zostera marina</i> (거머리말)		
해조류 (Macroalgae)	<i>Ulva pertusa</i> (구멍갈파래)		
	<i>Undaria pinnatifida</i> (미역)		
염생식물 (Halophytes)	<i>Suaeda japonica</i> (칠면초)		

나. 1차년도 유해물질 생태독성평가를 위한 시료채집 및 준비

유해물질에 의한 광합성 저해 및 생리 스트레스 측정을 위한 시료 중 잡피는 2004년 10월, 2005년 2월과 4월에 3회에 걸쳐 경상남도 거제군 영북(128° 30' E, 34° 50' N) 조간대에서 엽장 (total length) 크기 50 cm 정도의 개체만을 대상으로 채집하여 실험에 이용하였다. 갈파래는 잡피를 채집한 같은 지역에서 잡피와 혼생하는 시료를 대상으로 같은 시기에 채집하여 실험에 이용하였으며, 칠면초는 전남 무안의 사질 조간대에서 군락을 이루며 서식하는 개체를 대상으로 2005년 1월 1회 채집하여 실험을 수행하였다. 칠면초를 대상으로 유해물질의 광합성 저해 측정 실험이 용이하지 않아 이를 대체하기 위한 미역포자 실험에 이용된 미역은 전라남도 해남군 송지면에 위치한 개인 해조 양식장에서 미역귀(미역 생식세포 발달부분)만을 채취하여 아이박스에 냉장 보관하여 실험실로 운반하였다.

채집된 시료들은 매 실험마다 동일하게 직사광선을 피하여 아이스박스에 담은 후 실험실로 옮겼다. 실험실로 운반된 잡피와 갈파래 시료는 여과된 해수를 이용하여 부드럽

게 세척하였으며, 특히 잘피 잎이나 갈파래 엽상체에 부착하여 서식하는 부착생물을 시료가 상하지 않게 주의하여 제거하였다. 특히 잘피 지하경의 경우는 뿌리가 상하지 않도록 여과된 해수를 뿌려가며 퇴적물만을 주의하여 제거하였다. 그리고 계획한 실험을 시작하기 전 2-3일 동안 30 psu, 15°C, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16시간 명주기 하에서 실험실 조건에 순응시켰다.

다. 2차년도 유해물질 생태독성평가를 위한 시료채집 및 준비

유해물질에 의한 광합성 저해 및 생리 스트레스 측정을 위한 시료 중 갈파래는 2006년 2월, 4월과 5월에 3회에 걸쳐 경상남도 하동군 금남면 노량리 (127° 53'E, 34° 57' N) 조간대와 남해군 서면 작장리 (127° 49'E, 34° 50'N)에서 엽장 (total length) 크기 50 cm 정도의 개체만을 대상으로 채집하여 실험에 이용하였다. 잘피의 경우는 전라남도 해남군 송지면 통호리(126° 33'E, 34° 19'N) 조간대에서 갈파래와 혼생하는 잘피를 대상으로 2006년 5월, 7월에 채집하여 실험에 이용하였다. 갈파래와 잘피의 채집지역을 다양화함으로써 해조류나 해초류의 지역적 특성에 의한 유해물질의 스트레스 발현을 최소화하고자 하였다. 칠면초의 경우, 2차년도 연구에서 유해물질의 광합성 저해 측정 실험이 용이하지 않아 이를 대체하기 위한 식물플랑크톤을 이용한 유해물질의 광합성 저해 영향을 평가하는 연구를 추가하였으며, 실험에 이용된 식물플랑크톤은 연구실에서 상시 배양 중인 *Isocrysis*를 이용하여 실험하였다.

채집된 시료들은 1차년도와 동일하게 매 실험마다 직사광선을 피하여 아이스박스에 담은 후 실험실로 옮겼다. 실험실로 운반된 잘피와 갈파래 시료는 여과된 해수를 이용하여 부드럽게 세척하였으며, 특히 잘피 잎이나 갈파래 엽상체에 부착하여 서식하는 부착생물을 시료가 상하지 않게 맨손으로 비벼서 주의하여 제거하였다. 특히 잘피 지하경의 경우는 뿌리가 상하지 않도록 여과된 해수를 뿌려가며 퇴적물만을 주의하여 제거하였다. 그리고 계획한 실험을 시작하기 전 2-3일 동안 30 psu, 15°C, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 명암주기 16:8로 하여 실험실 조건에 순응시켰다.

2. 생태독성평가 대상 유해물질의 선정

유해성 평가 대상 유해물질은 우리나라 연안 환경을 고려하고, 문헌연구를 통해 주된 문제를 야기할 수 있는 대표적인 유해물질을 선정하여 해산 식물에 대한 독성영향을 평가하였다. 평가 대상 유해물질의 종류를 기능 또는 성분에 따라 제초제나 살충제와 같은 농약류, 카드뮴이나 구리와 같은 독성 중금속, 선박 등의 방오도료로 이용되는 TBT와 같은 유기주석화합물, 유류 내 잔류성분인 PAHs이나 맹독성 물질인 다이옥신과 같은 지속성유기화합물 등으로 구분하였으며, 각각에 해당하는 개별 유해물질의 수는 헤아릴 수 없을 정도로 많지만 우리나라 연안에서 오염 문제를 야기하거나 국내 사용량이 많은 물질들을 우선적으로 선정하여 평가 대상 물질을 표 3-2와 같이 선정하였다. 일부 유해물질의 경우 물질 특성상 유해성의 발현이 즉각적이지 못하고 식물 조직 내 장기간 잠복하여 만성독성을 보임으로 인해 신속한 영향평가가 용이하지 않아 최초 과제 협약서에서 제시한 물질들 중 일부는 제외하였으며, 이를 대체하기 위한 새로운 물질을 추가하여 해산 식물에 대한 독성영향을 평가하였다.

2차년도 생태독성영향 평가 대상 유해물질은 1차년도에 평가했던 물질 외에 1차년도 연구결과를 바탕으로 하여 5가지 유해물질 그룹 중 각 그룹에서 대표적인 유해물질을 선정하였으며, 일부물질은 추가적인 추적연구의 필요성에 따라 선정하여 해산 식물에 대한 독성영향을 평가하였다. 1차년도 연구에서 평가 대상 유해물질의 종류를 기능 또는 성분에 따라 제초제나 살충제와 같은 농약류, 카드뮴이나 구리와 같은 독성 중금속, 선박 등의 방오도료로 이용되는 TBT와 같은 유기주석화합물, 유류 내 잔류성분인 PAHs이나 다양한 지속성유기화합물을 포함하였다.

표 3-2. 해산식물에 대한 유해성 평가 대상 단일 유해물질 목록

구분	유해물질명
제초제	Paraquat dichloride*, Alachlor, Butachlor
살충제	Endosulfan*, Methomyl, Chlorpyrifos
중금속	Cd, Cu, Pb, Cr(IV), Hg*, Zn
유기주석화합물	TBT
유기화합물	Fluoranthene, Fluorene, Pyrene, 2'3'-dichlorophenol, sea nine

* 2차년도 실험 대상 유해물질

3. 해산식물의 광합성에 대한 유해물질 독성효과

해산식물의 광합성에 대한 다양한 유해물질의 독성효과를 파악하기 위하여 72시간 또는 96시간 급성 독성실험을 수행하였다. 잘피의 경우 먼저 건강한 잘피를 선택하여 생장 점을 기준으로 지하경을 제거하였으며, 갈파래나 칠면초 또한 실험에 편의를 위하여 적당한 크기로 잘라내어 이용하였으며, 이들 실험 대상 해산 식물들은 모두 상처로 인한 스트레스로부터 회복하기까지 암 상태로 하루 동안 방치하였다. 해산 식물에 대한 유해물질의 96시간 독성 측정은 광합성 형광을 이용한 광양자수율 (quantum yield) 측정을 통해 이루어졌다. 잘피의 경우 중금속에 대한 흡수 kinetics를 측정하기 위해 수행된 중금속 흡수 실험과는 달리 잘피의 엽조 (shoot) 전체를 이용하였으며, 광양자수율은 엽조 중 3번 잎만을 골라 sheath를 기준으로 정단부 쪽으로 약 10 cm 되는 위치를 매 측정시마다 반복하여 측정하였다. 먼저 해산 식물에 대한 농도의 영향을 측정하기 위해 제초제와 살충제를 비롯한 시험평가 대상 유해물질들에 대해 1 mg L^{-1} 농도의 표준용액을 만들고, 이를 희석시켜 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg L^{-1} 의 농도 구배를 만들었다. 갈파래의 경우 일부 제초제와 살충제에 대해서는 독성영향 발현의 하한 농도를 파악하기 위하여 한 구배의 농도에만 노출시켰으며, 유기주석화합물(TBT)과 중금속에 대해서는 농도에 따른 영향을 살펴보기 위하여 5가지 농도구배에 모두 노출하였다. 잘피의 경우에는 TBT와 중금속에 대해서 3가지 농도구배에 노출하여 광합성 저해 영향을 평가하였다. 실험 대상 해산식물들은 2 L 크기의 비이커에 유해물질로 오염시킨 1.8 L의 배양액 ($0.2 \mu\text{m}$ 로 여과한 해수와 영양염을 첨가한 것)에 넣고, 15°C , $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 16시간 명주기 하에서 96시간 동안 배양하면서 1, 3, 6, 9, 30, 47, 54, 70, 96 시간째에 광양자수율을 측정하였으며, 또한 1 mg L^{-1} 농도 처리구는 30, 54, 96시간째에 빠른 광반응곡선 (rapid light curve; RLC)을 함께 측정하였다. TBT의 경우는 표준용액을 아세톤 (acetone)을 이용해 만들었기 때문에 TBT로 오염시킨 처리구는 동일한 양의 아세톤이 들어갈 수 있도록 하였으며, 또한 순수하게 아세톤만을 넣은 아세톤 대조구 (acetone control)를 설정하였다.

가. 광양자수율(quantum yield) 계산 및 광반응곡선(RLCs) 피팅

엽록소 형광 측정법 (Pulse amplitude modulation; PAM fluorometry)은 식물의 광합성

효율을 측정하는 데 있어서 민감하고, 비파괴적인 기술로서 최근에 널리 이용되고 있다 (Schreiber et al. 1994, Macinnis-Ng and Ralph 2002).

연안습지 식물군락의 광합성 특성 및 유해물질 독성평가를 위해 주로 이용될 PAM fluorometry 방법은 주어진 환경에서 어느 정도의 광이 식물을 투과하여 광합성에 이용되는가를 손쉽게 알아낼 수 있다는 장점을 가지고 있다. 일반적으로, 식물의 엽록소가 흡수한 빛에너지는 3가지 경로를 통하여 소멸되는데, 이들의 소멸경로는 크게 열, 형광 및 광합성(초기 광화학반응)이며, 각각의 소멸경로는 양자수율(ϕ)에 의하여 식 (1)과 같이 정량화 시킬 수 있다.

$$\phi = \text{광화학반응으로 사용된 양자수} / \text{흡수된 전체 양자수} \quad (1)$$

그러므로, 광합성 활성은 정량화된 형광세기 (양자수율)의 변화로 간접적으로 측정할 수 있다. 여기서 형광의 증가는 광합성 활성의 감소를 의미한다.

연안습지 식물의 광합성 특성과 유해물질로 인한 즉각적인 독성효과는 다양한 종류의 PAM(Walz, Germany)을 이용하여 광량에 대한 양자수율(quantum yield)과 전자전달속도(electron transport rate)를 구하였으며, 이들의 상대적인 비율로 독성의 세기를 추정하였다. 또한 광합성-광 곡선을 추정하여 상대적인 광합성 변수들 (rETRmax, initial slope)을 구하여 유해물질로 인한 광합성의 저해를 판단하였으며, 광량은 0 - 1000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 범위 내에서 총 9개의 광구배 (light gradient)에서 측정하고, 광합성-광 곡선을 이용하여 다양한 광합성 매개변수들을 구하였다 (식5, 6, 7).

해산 식물에 대한 유해물질들의 72시간 또는 96시간 생태독성실험은 해산식물을 배양하면서 일정한 시간 간격으로 엽록소 형광 측정법을 이용해 측정하였다. 광합성 명반응의 반응중심 중 하나인 광계 II (photosynthesis system II, PS II)의 광화학 반응에 대한 양자수율 또는 양자효율(quantum efficiency; ϕ_{p_0})은 다음 식 (2)와 같이 계산되어진다.

$$\phi_{p_0} = (F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m \quad (2)$$

여기서, F_0 는 암적응(dark-adapted) 상태에서의 최저형광 또는 초기형광, F_m 는 암적응된 시료에서 포화광에 의해 야기된 최대형광, F_v / F_m 는 암적응된 시료의 광계 II 광화학 반응에 대한 최대 또는 잠재적 양자수율을 의미하며 광합성 효율(photochemical efficiency)이라고 부르기도 한다.

Genty et al. (1989)에 따르면, 광계 II에 있어서 광화학적 에너지 전환의 양자수율 (quantum yield)은 측정된 형광 값으로부터 다음 식 (3)을 이용하여 얻을 수 있다.

$$\phi_p = (F_m' - F) / F_m' = \Delta F / F_m' \quad (3)$$

F_m' 는 명적응 (light-adapted) 상태에서 포화광에 의해 유도된 최대형광 (maximum fluorescence)을 의미하며, F 는 명적응 후에 매우 낮은 광도에서 초기형광 (minimum fluorescence)을 의미한다. 여기서 구해진 광계 II 광화학 양자수율 (PSII quantum yield; ϕ_p)에 photosynthetic photon flux density (PPFD)를 곱하여 전자전달속도 (rETR; relative electron transport rate)를 식 (4)로부터 산출할 수 있다 (Schreiber et al. 1997, Ralph et al. 1998).

$$rETR = \phi_p \times PPFD \times 0.84 \times \sigma_{PSII} \quad (4)$$

ϕ_p 는 PSII의 양자수율, PPFD는 광량 (photosynthetic photon flux density; $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 0.84는 해산식물 엽체에 의해 흡수된 평균 빛의 비율을 의미하고 σ_{PSII} 는 광계 II에 흡수된 빛을 의미한다. 보통 엽록소에 흡수된 빛은 광계1과 광계2에 똑같은 비율로 나뉜다고 가정하기 때문에 σ_{PSII} 은 보통 0.5를 사용한다.

연안습지 식물의 광합성 특성은 증가하는 광 단계에 대한 잎의 광합성 반응으로서 기본적으로 실내 연구에서 결정가능하다고 보고된 바 있다 (Hemminga and Durate 2000). 또, 연안습지에 서식하는 식물들을 대상으로 실내와 현장에서 광합성 특성을 측정해 본 예비실험 결과 광합성 특성 반응에 있어 큰 차이를 보이지 않았다. 유해물질의 독성영향 평가를 위한 실험이 실내외에서 동시에 수행하더라도 자료의 비교 및 분석이 가능할 것이며, 독성영향 평가 대상 식물들의 빠른 광반응 곡선 (rapid light response curves: RLCs)를 측정하기 위해 'dark leaf clip'를 이용하여 암적응시킨 후 광반응 특성을 측정하였다.

PAM fluoremetry를 이용하여 측정된 광도에 따른 전자전달속도(relative ETR)를 비선형 회귀법으로 적합화하여 매개변수들을 구하였으며, 광저해가 없을 경우에는 다음 식 (5)를 사용하였다 (Webb et al. 1974).

$$P(rETR) = P_m^B \left(1 - \exp \left[\frac{-\alpha^B}{P_m^B} I \right] \right) \quad (5)$$

여기에서 P는 구하고자하는 총 일차생산력이고, P_m^B 는 포화광에서의 단위 엽록소당 최대 광합성량으로 동화율 (assimilation number)과 같은 의미를 가지며, α^B 는 광합성의 최대 양자수율 (maximum quantum yield)과 관련된 매개변수로서 세포가 입사광을 모을 수 있는 능력을 나타내는 값으로 (Platt et al. 1980), 포화광 이하에서 광합성-광도 모델의 초기 기울기를 나타낸다. 또, 광저해 현상이 일어난 경우에는 다음의 식 (6)을 이용하였다 (Platt et al. 1980).

$$P(rETR) = P_s^B \left(1 - \exp \left[\frac{-\alpha^B}{P_s^B} I \right] \right) \exp \left[\frac{-\beta^B}{P_s^B} I \right] \quad (6)$$

여기에서 β 는 광저해 정도를 나타내는 매개변수이고, P_s^B 는 광저해가 없을 때의 최대 잠재 광합성량으로 $\beta=0$ 일 경우 P_s^B 는 P_m^B 와 동일하게 된다.

광저해가 있을 경우의 P_m^B 는 아래의 식 (7)로 구할 수 있다.

$$P_m^B = P_s^B \left(\frac{\alpha}{\alpha + \beta} \right) \left(\frac{\beta}{\alpha + \beta} \right)^{\frac{\beta}{\alpha}} \quad (7)$$

또한, 유해물질의 독성영향 평가에서 중요한 변수로 고려될 광적용 매개변수 k 는 Talling의 정의 (Cullen 1991)에 의하여 아래의 식으로 구하였다.

$$I_k = \frac{P_s^B}{\alpha} \quad (8)$$

연안습지 식물군락 중 생태적 유의성을 갖는 식물을 선택한 후 유해물질에 급성 또는 만성으로 노출시킨 후, PAM fluorometry를 이용하여 광합성 특성 및 환경에 따른 각종 광합성 매개변수들을 구할 예정이다. 이 자료는 유해물질 오염 독성평가에 응용하고 독성의 정도를 판단하는 주요 근거로 이용될 것이다.

4. 해산식물 중 잘피에 의한 중금속 흡수

잘피에 의한 카드뮴(Cd)와 아연(Zn)의 흡수 실험은 잎과 지하경을 분리하여 측정하였으며, 잘피 잎 간의 연령차에 따른 오차를 줄이기 위하여 건강한 잘피를 선택하여 3번 잎만을 골라냈으며, 선택한 3번 잎에서는 sheath로부터 약 15 ~ 18 cm 부위를 기준으로 잎의 정단부 쪽으로 약 15cm 길이로 잘라내어 실험에 이용하였다. 그리고 지하경의 경우에는 잘피의 성장점 (meristem)을 기준으로 4마디 정도를 잘라내어 사용하였다. 이때 상처로 인한 호흡의 증가를 피하기 위해 회복될 때까지 하루정도 암 상태로 방치하였다. 또한 실험에 이용된 잘피 잎은 Diving-PAM (Walz, Effeltrich, Germany)을 이용 양자수율을 측정하여 초기 건강상태를 확인하였으며, 그 결과 잘피 잎의 평균 양자수율은 평균 0.74 ± 0.03 (S.E)로 매우 건강함을 확인하였다. 잘피 잎과 지하경은 용존태의 중금속에 노출시켰으며, 약 400 mL의 배양액에 습중량을 기준으로 5g 정도를 각 처리구에 넣었으며, 다른 처리구와의 교차오염을 방지하기 위하여 통기 (aeration)는 하지 않았다. 잘피에 의한 중금속의 흡수를 측정하는 24시간 동안 모든 처리구는 15°C , $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 조건 하에서 배양되었으며, 지하경의 경우는 모든 처리구를 호일을 이용하여 빛이 들어가지 않도록 처리하였다.

중금속 흡수를 24시간동안 실시간으로 추적하기 위하여 방사선 동위원소를 사용하였으며, 카드뮴은 반감기 462일에 0.1 N 염산에 희석된 ^{109}Cd 를 사용하였으며, 아연은 반감기 244일에 0.1 N 염산에 희석된 ^{65}Zn 을 추적자로 이용하였다. 또한 농도에 따른 중금속 흡수의 영향을 측정하기 위하여 중금속 시약을 이용하여 1 mg L^{-1} 농도의 표준용액을 만들고, 이를 희석하여 카드뮴은 0.5, 2, 10, 30, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 을, 아연은 1, 5, 10, 30, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 의 농도구배를 만들었다. 방사선 동위원소의 방사능 측정은 노출된 후 2, 3, 9, 9.4, 12.7, 24.1 시간째에 각각 측정되었으며, 각 처리구에 오염시킨 방사선 동위원소의 세기는 두 개의 중금속 모두 46.3 kBq L^{-1} 수준이었다.

방사능 측정을 통한 중금속 흡수는 dpm값으로 환산되었으며, 최종적으로 dpm g dry wt^{-1} 로 표시되었다. 농도에 따른 중금속 흡수의 kinetics를 계산하기 위하여 kinetic 모델을 변형하여 이용하였으며 (Warnau et al. 1996), 그 식은 다음과 같다.

$$U_t = U_{\text{equil}} (1 - e^{-kt}) \quad (7)$$

여기서, U_t 는 시간 t 에서 흡수율을 의미하며, U_{equil} 은 화학평형이 일어났을 때의 흡수율, k 는 흡수상수 (hr^{-1})를 의미한다.

잘피에 의한 중금속의 흡수 효율을 측정하기 사용한 방사선 물질의 방사능은 well 타입의 NaI 크리스탈 감지기가 장착된 감마 카운터를 이용하여 측정하였다. ^{109}Cd 에 의한 광전자의 방출 (photon emission)은 22 keV 대역에서, ^{65}Zn 에 의한 광전자 방출은 1115 keV 대역에서 측정되었다. 광전자 방출을 통해 방사능 세기에 대한 측정시간은 5분 동안이었으며, 얻어진 값들은 표준 방사능 세기와 반감기 교정을 통해 dpm (disintegration per minute)으로 전환하였다.

5. 해산 식물 중 갈파래 조직 내 광합성 색소(photosynthetic pigments) 함량 측정

갈파래의 경우 유해물질 독성효과에 의한 조직 내 광합성 색소 함량의 감소를 살펴보기 위하여 유해물질에 96시간 노출 시킨 후 갈파래 엽상체로부터 직경 22 mm의 코르크 보러를 이용하여 엽체 디스크를 얻어 광합성 색소함량을 분석하였다. 갈파래 조직 내 엽록소 a (Chlorophyll a)와 엽록소 b (Chlorophyll b), 그리고 카로티노이드의 함량을 분석하기 위해 96시간 급성독성 실험을 종료한 후 엽체 디스크를 만들고, 이 시료를 알루미늄 호일로 싸인 유리 vial에 넣고 DMF(N,N-dimethyl-formamide; $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$) 4 ml을 첨가한 후, 냉암소에서 20시간 이상 방치하여 색소를 추출하였다. 추출된 시료는 분광광도계를 이용하여 각 파장별(664, 647, 480, 725 nm)로 흡광도를 측정하여 Wellburn (1994) 식으로 계산하였다. 또한 각 색소함량은 엽록소 a 의 함량과의 비율을 구하여 유해물질에 의한 독성효과가 특정 색소함량의 변화에 더 치명적인지의 여부를 분석하였다.

6. 유해물질 단일 또는 다중 생태독성영향 평가

해산식물의 광합성에 대한 단일 및 다중 유해물질의 생태독성을 파악하기 위하여 72시간 급성 독성실험을 수행하였다. 잘피의 경우 먼저 건강한 잘피를 선택하여 성장점 기준으로 지하경을 제거하였으며, 갈파래의 경우는 실험에 편의를 위하여 적당한 크기로 잘라내어 이용하였으며, 이들 실험 대상 해산 식물들은 모두 상처로 인한 스트레스로부터 회복하기까지 암 상태로 하루 동안 방치하였다. 해산 식물에 대한 유해물질의 72시간

독성 측정은 광합성 형광을 이용한 광양자수율 (quantum yield) 측정을 통해 이루어졌다. 잘피의 경우 생물계절에 따라 최대 150-200 cm 이상의 크기로 자라기 때문에 전체 엽조 (shoot)를 대상으로 독성영향을 평가하기에는 측정기기의 민감성 때문에 연구 자료의 일관성이 저하되기 때문에 전체 엽조 중 3번 잎(leaf)만을 택하여 광양자 수율(quantum yield)을 측정하였으며, 구체적인 광양자수율은 3번 잎의 sheath를 기준으로 정단부 쪽으로 약 10 cm 되는 위치를 매 측정시마다 반복하여 측정하였다. 먼저 해산 식물에 대한 농도의 영향을 측정하기 위해 제초제와 살충제를 비롯한 시험평가 대상 유해물질들은 1 mg L⁻¹ (1000 ppm) 농도의 표준용액을 만들고, 이를 희석시켜 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg L⁻¹의 농도 구배를 만들어 측정하였다.

가. 단일 및 다중 유해물질의 독성영향 평가

당초 계획서에서는 없었으나, 2차년도 연구에서 추가된 식물플랑크톤(편모조류)에 대한 단일 유해물질의 독성영향 평가의 경우 각 유해물질의 농도구배를 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg L⁻¹로 만들었으며, 16:8 명암주기와 100 μ mol photons m⁻² s⁻¹ 광조건, 20°C 조건 하에서 실험하였다. 유해물질은 실험 시작 하루 전에 준비된 비이커에 오염시켜 하루 동안 방치하여 평형상태를 만든 후 고밀도로 배양된 식물플랑크톤을 소량 주입하여 노출시켰다. 다중 유해물질에 의한 독성영향평가 실험은 식물플랑크톤과 해조류, 해초류를 대상으로 모두 실험하였으며, 다중 유해물질의 혼합은 제초제를 기본으로 하여 제초제 + 살충제 (Paraquat dichloride + Endosulfan), 제초제 + 중금속 (Paraquat dichloride + Hg), 그리고 제초제 + 유기화합물 (Paraquat dichloride + Fluoranthene)로 혼합하여 각각의 해산식물에 노출하여 실험하였다. 식물플랑크톤, 갈파래, 그리고 잘피에 대한 다중 유해물질 노출에 대한 독성영향 평가는 1차년도 단일 유해물질을 이용한 실험조건과 동일하게 하여 실험하였으며, 제초제 + 살충제 또는 제초제 + 중금속의 경우는 단일 유해물질 독성 실험결과를 바탕으로 0.1 ppm 이하 수준에서 4 농도 구배 (0.03 ppm + 0.03 ppm, 0.05 ppm + 0.05 ppm, 0.08 ppm + 0.08 ppm, 0.1 ppm + 0.1 ppm) 조건에서 실험하였으며, 제초제 + 유기화합물의 경우는 식물플랑크톤의 경우에만 0.03 ppm + 0.03 ppm, 0.03 ppm + 0.1 ppm, 0.1 ppm + 0.3 ppm, 0.1 ppm + 1ppm 구배조건에서 72시간 동안 노출하여 실험하였으며, 갈파래와 잘피의 경우는 제초제 + 살충제, 제초제 + 중금속의 경우와 동일한 농도 구배 조건에서 실험하였다.

갈파래와 잘피의 경우는 실험 대상 해산식물들을 2 L 크기의 비이커에 유해물질로 오염시킨 1.8 L의 배양액 (0.2 μm 로 여과한 해수와 영양염을 첨가한 것)에 넣고, 15 $^{\circ}\text{C}$, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16시간 명주기 하에서 72시간 동안 배양하면서 8회 (1, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 시간째) 정도 광양자수율을 측정하였으며, 또한 노출초기, 36, 72시간째에 빠른 광반응곡선 (rapid light curve; RLCs)을 함께 측정하였다. 살충제(Endosulfan)와 유기화합물(Fluoranthene)의 경우는 표준용액을 아세톤 (acetone)을 이용해 만들었기 때문에 살충제와 유기화합물로 오염시킨 처리구는 동일한 양의 아세톤이 들어갈 수 있도록 하였으며, 또한 순수하게 아세톤만을 넣은 용매 대조구 (solvent control)를 설정하였다. 유해물질에 노출되는 동안 영양염 부족으로 인하여 독성효과의 교란을 방지하기 위하여 영양염을 첨가하여 5 μM 질산염과 0.7 μM 인산염 농도 (N:P ratio 16)가 되도록 하였다.

7. 유해물질의 독성발현과 환경요인과의 관계

가. 환경요인 중 온도변화에 따른 유해물질의 독성영향 평가

환경요인 중 온도에 의한 유해물질의 독성영향과의 복합효과를 측정하기 위하여 3구배 (10, 20, 30 $^{\circ}\text{C}$)의 온도조건을 만들어 실험하였으며, 유해물질 노출 농도는 1차년도 연구결과를 바탕으로 제초제(Paraquat dichloride)의 경우는 0.1 ppm, 살충제(Endosulfan) 0.1 ppm, 중금속(Hg) 0.1 ppm, 그리고 유기화합물(Fluoranthene) 0.25 ppm 농도 조건에 72시간 동안 노출하여 실험하였다. 광양자수율 측정은 1, 4, 10, 24, 36, 48, 60, 72 시간째에 측정하였으며, 및 빠른 광반응 곡선 (RLCs)의 측정은 1, 72시간째에만 측정하였다.

나. 환경요인 중 영양염 농도변화에 따른 유해물질의 독성영향 평가

환경요인 중 영양염 농도구배에 의한 유해물질 독성영향과의 복합효과를 측정하기 위하여 4 조건의 영양염 농도 구배를 다음과 같이 만들었다.

<영양염 농도변화에 따른 유해물질의 독성영향 평가>

농도구배	질산염 농도	인산염 농도	N:P ratio
Low Nitrogen Low Phosphorus (LNLP)	5	0.7	16 : 1
Low Nitrogen High Phosphorus (LNHP)	5	7	2 : 1
High Nitrogen Low Phosphorus (HNLP)	50	0.7	158 : 1
High Nitrogen High Phosphorus (HNHP)	50	7	16 : 1

유해물질 노출 농도는 1차년도 연구결과를 바탕으로 온도변화에 따른 독성영향 평가 실험과 동일하게 제초제(Paraquat dichloride)의 경우는 0.1 ppm, 살충제(Endosulfan) 0.1 ppm, 중금속(Hg) 0.1 ppm, 그리고 유기화합물(Fluoranthene) 0.25 ppm 농도 조건에 72시간 동안 노출하여 실험하였다. 광양자수율 측정은 1, 5, 14, 21, 28, 38, 51, 72 시간째에 측정하였으며, 및 빠른 광반응 곡선 (RLCs)의 측정은 1, 72시간째에만 측정하였다.

8. 생태독성평가 방법의 표준화를 위한 비교 실험

가. 실험용 독성 물질의 준비

본 연구에서 실험 대상 물질로는 2차년도의 결과를 바탕으로 하여 살충제, 중금속, 유기화합물, 제초제 종류 중 대표적인 물질 각 1개씩 선정하였다. 선정된 물질로는 endosulfan (살충제), Hg (중금속), fluoranthene (유기화합물), paraquat dichloride (제초제)이며 본 연구에서 설정된 실험 농도는 표 3-3과 같다. 실험 농도를 선정하기 위하여 일차적으로 범위찾기 실험을 각 물질별로 1, 0.1, 0.01, 0.001 ppm 에서 먼저 실시하였으며, 이 범위 찾기 실험의 결과를 토대로 최종 실험 농도를 결정하였다.

표 3-3. 실험에 사용된 독성물질의 종류 및 실험 농도

Group	Chemical	Experimental concentration (ppm)
Insecticide	Endosulfan	0.001, 0.003, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1
Metal	Hg	0.001, 0.003, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1
Organic compound	Fluoranthene	0.001, 0.003, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1
Herbicide	Paraquat dichloride	0.01, 0.03, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1

나. 실험용 미세조류(*Isochrysis galbana*)의 배양

본 연구의 실험대상 종인 *Isochrysis galbana*는 (주)네오엔비즈에서 연속 배양중인 생물을 사용하였다. *I. galbana*의 배양을 위한 배지는 f/2 배지(Guillard,1983, 표 3-4)를 이용하였고, 배양을 위한 광도는 500 lux, 광주기는 16hr:8hr (light:dark), 온도는 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 이었다. 실험용 배지는 autoclave로 멸균하여 준비하였고, 배양 중 무균상태를 유지하였고, 폭기는 하지 않았다. 실험에 사용된 생물은 지수성장 상태(exponential growth phase)의 건강한 개체를 이용하였다.

표 3-4. f/2 배지의 영양성분 조성 (Guillard, 1983)

Nutrient	Final concentration
NaNO ₃	75.0 mg/l
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5.0 mg/l
Na ₂ · EDTA	4.36 mg/l
FeCl ₃ · 6H ₂ O	3.15 mg/l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 mg/l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.022 mg/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.01 mg/l
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.00018 mg/l
Na ₂ Mo ₄ · H ₂ O	0.006 mg/l
Thiamin · HCl	0.1 mg/l
Biotin	0.0005 mg/l
B ₁₂	0.0005 mg/l

다. 실험 과정

각 농도별로 준비된 시약을 50ml 용량의 유리재질의 삼각 플라스크에 넣고, 고밀도로 배양되어 있는 (해양 미세조류(*Isochrysis galbana*))를 최종 세포밀도가 $1 - 2 \times 10^4$ cells/ml 이 되도록 주입하였다. 실험액의 초기 부피는 30 ml 이며, 여기에 미세조류의 성장이 잘 이루어지도록 배지를 주입하였다 (f/2). 각 농도별 반복구는 3개씩 준비하였다. 이렇게 준비된 실험 용기를 200 rpm으로 연속적으로 회전하는 진탕 배양기(shaking incubator)에 넣어 96시간 동안 배양하였다. 배양기간 동안 폭기는 하지 않았으며, 세포의 성장을 측정하기 위하여 24, 48, 72, 96시간째 마다 2 ml씩 시험액을 취하였다. 세포수의 측정은 편의와 정확도를 고려하여 세포수를 일일이 직접 계수하지 않았고, 형광량만 측정한 후 이를 다시 세포수로 환산하였다. 세포수와 형광량간의 상관관계를 구하기 위하여 별도의 미세조류를 다단계의 밀도로 준비한 후, 각각의 세포수와 형광량을 동시에 측정하여 둘 사이의 상관관계식을 구하였다 (그림 3-1).

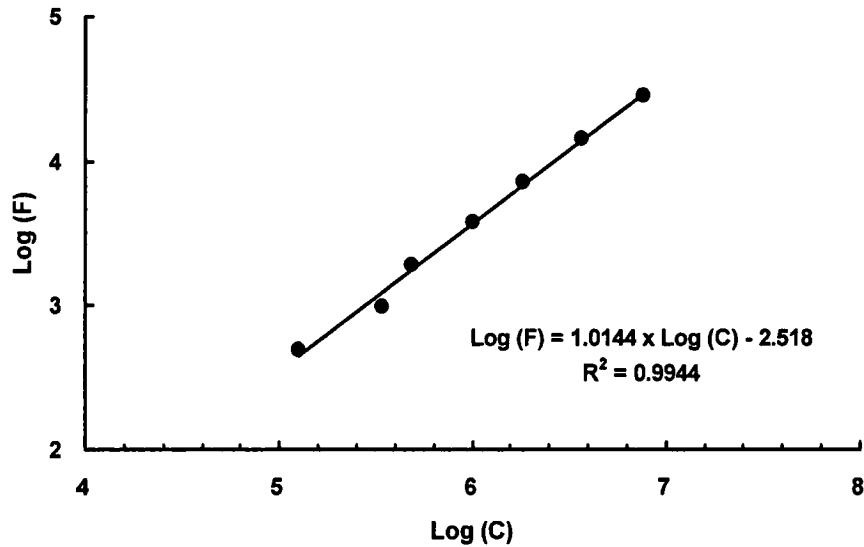


그림 3-1. 해양 미세조류인 *Isochrysis galbana*의 세포수(C)와 형광량(F) 간의 상관관계

라. 자료 처리

독성물질 각 농도별 및 시간대별로 측정된 형광량은 그림 1의 관계식($\text{Log}(F) = 1.0144 \times \text{Log}(C) - 2.518$)을 토대로 하여 세포수로 환산하였고, 일간 성장률 (r) 은 지수 함수 성장식을 이용하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{일간 성장률}(r) = [\ln(C_t) - \ln(C_0)] / t,$$

이때, t 는 배양시간 (일), C_0 와 C_t 는 각각 초기 및 t 시간 경과 후의 세포수이다.

마. 독성 파라미터 산출

실험 결과로부터 NOEC, LOEC, EC50을 독성 파라미터로 산출하였다. NOEC은 대조구에서의 성장률과 통계적으로 유의한 차이가 없는 농도 중 최대값으로, LOEC은 대조구와 통계적으로 유의한 차이가 있는 농도 중 최소값으로 산출하였고, 통계 처리에 사용된 검정은 Dunnett's t-test(유의수준 $\alpha = 0.05$)를 이용하였다. EC50은 성장률이 대조구의 절반 정도로 감소할 때의 농도값을 의미하며, 물질의 각 농도별 반응곡선으로부터 maximum likelihood method로 산출하였고, 독성반응 모델은 Probit 모델을 적용하였다. 독성 파라미터 산출의 모든 과정은 Toxcalc 프로그램을 이용하여 수행되었다.

제 2 절 연구수행 내용 및 결과

1차년도 연구에서는 갈파래, 잘피, 칠면초 등 대표적인 우리나라 연안의 해산식물에 대한 각종 유해물질의 영향을 규명하기 위한 다양한 생리 실험을 실시하였다. 본 연구에서 이용한 잘피나 칠면초와 같은 식물은 전 세계적으로도 유해물질의 생리적 영향에 대한 연구가 매우 드문 것이 사실이다. 따라서 본 연구의 1차 년도에서는 유해물질의 영향을 정량화할 수 있는 실험 기법을 체계화하기 위해 많은 노력을 하였다. 특히 잘피의 중금속 흡수능에 대한 실험은 전 세계적으로 처음 시도되는 것으로 향후 중금속의 잘피에 대한 생리적 영향을 규명함에 있어 기본적인 자료로 활용할 수 있을 것이다.

2차년도 연구에서는 1차 년도에 생태독성평가의 시험종으로 이용된 갈파래와 잘피 등 대표적인 우리나라 연안의 해산식물과 대형식물 (macrophytes)만이 아닌 추가적으로 미세조류 (microalgae)인 편모조류 (*Isocrysis galbana*)에 대한 각종 유해물질의 영향을 규명하기 위한 추가 생태독성 실험을 실시하였다. 2차 년도에서는 1차 년도에서 체계화된 유해물질의 영향을 정량화 기법을 이용하여 좀 더 구체적으로 다중 유해물질, 또는 환경요인과 결합된 유해물질의 독성효과를 평가하기 위해 많은 노력을 하였다.

3차년도 연구에서는 1차, 2차년도 연구결과에 엽록소형광측정법을 이용한 생태독성측정방법의 표준화 및 정립을 위해 미세조류인 편모조류 (*Isocrysis galbana*)의 성장률을 endpoint로 이용하여 생태독성평가를 실시하였다. 또한 유해물질에 대한 생물학적 지시자 (bio-indicator)로서 해산식물을 이용하기 위한 방안을 연구하기 위하여 문헌조사를 통한 review를 실시하였으며, 유해물질에 대한 해산식물의 종-민감도 분포 (species-sensitivity distribution, SSD) 분석 모델을 이용하여 종별 생태적 특성을 확인하였다.

본 연구에서 각 년차별로 실시한 세부 연구내용을 아래와 같이 구분하여 이어지는 절에서 제시하였다.

(1차년도)

- 유해물질에 노출된 갈파래의 광합성 및 양자 수율
- 유해물질의 96시간 급성독성 효과에 의한 갈파래 색소함량의 변화

- 잘피에 의한 중금속 흡수능 조사
- 잘피에 대한 중금속 및 유해물질의 독성효과
- 칠면초 (halophyte)의 광양자수율 (effective quantum yield)에 대한 유해물질의 독성
- 잘피 (seagrass)의 광양자수율 (effective quantum yield)에 대한 유해물질의 영향

(2차년도)

- 단일 및 다중 유해물질에 노출된 미세편모조류의 72시간 급성독성 영향
- 다중 유해물질에 노출된 갈파래와 잘피의 72시간 급성독성 영향
- 환경요인 중 온도 및 영양염변화와 결합된 유해물질의 갈파래와 잘피에 대한 다중 독성영향

(3차년도)

- 유해물질에 대한 생태독성평가 방법의 표준화를 위한 비교 실험
- 유해물질에 대한 생물학적 지시자 (bio-indicator)로서 해산식물의 이용 방안
- 연안 식물군락 보호 안전기준 마련을 위한 종-민감도 분포 모델 (SSD model)

1. 유해물질에 노출된 갈파래의 광합성 및 양자 수율

갈파래에 대한 유해물질의 96시간 급성독성 효과를 측정하기 위하여 갈파래를 유해물질에 노출시킨 후 11시간, 48시간, 96시간째에 엽록소 형광 측정법 (PAM Fluorometry)을 이용하여 빠른 광반응곡선 (RLC, rapid light curve)을 측정하였다(그림 3-2과 3-3). 먼저 문헌 연구를 통하여 선정한 13종의 유해물질 중 제초제 (Paraquat), 살충제 (Methomyl, Chlorpyrifis), 그리고 유기화합물 (Fluoranthene, Fluorene)에 노출시켜 측정한 광반응곡선의 결과는 그림 3-2과 같았다. 유해물질의 독성 지표로 이용할 수 있는 다양한 영향농도를 산출하기에 앞서 갈파래 광합성에 대한 저해 발현 농도를 알아보기 위하여 제초제와 살충제, 유기화합물에 대해서는 각각 단일 농도에 노출시켰다. 노출 농도는 Paraquat, Methomyl, Chlorpyrifos의 경우 0.1 ppm에, 유기화합물 중 Fluoranthene에는 0.25 ppm, Fluorene에는 2 ppm 농도에 노출시켜 갈파래 광합성에 대한 저해 정도를 측정하였다. 제초제 Paraquat 0.1 ppm 농도에 노출된 갈파래에 대하여 11시간, 48시간, 96시간째에 측정된 전자전달율-광곡선 (rETR vs Irradiance curve) 결과는 그림 5-1과 같다. Paraquat 0.1

ppm에 노출된 갈파래로부터 11시간째에 측정된 빠른 광반응곡선에서 추정된 광합성 변수들을 대조구와 비교하였을 때, 대조구에서의 최대 전자전달율 (rETR_{max})은 54.7이었으며 Paraquat 처리구는 27.5로 대조구에 비해 약 49% 수준으로 감소하였으며, 이에 따라 전자전달율-광 곡선의 다른 광합성 변수인 초기 기울기(α)도 대조구 0.29에서 0.22 수준으로 약 23% 감소하였다. 이후 48시간과 96시간째에 측정된 결과에서도 유사한 결과를 보였으며, 전자전달율-광 곡선의 초기기울기는 약 0.19로 유해물질에 대한 노출 시간이 길어질수록 광에 대한 초기반응 속도도 함께 감소하는 것으로 나타났다. 살충제인 Methomyl의 경우에 있어서도 Paraquat에서와 유사한 결과를 보였으며, 초기 11시간째에 대조구에 비해 최대전자전달율이 약 48% 수준으로 감소하였으며, 이후 노출시간에도 더 이상의 감소는 보이지 않았으며 그 상태를 유지하였다. 전자전달율-광 곡선의 초기기울기 또한 11시간째에 약 20% 감소에서 96시간째에는 약 30% 정도까지 감소하여 광에 대한 초기 반응속도 또한 현저하게 줄어들었다. 또 다른 살충제인 Chlorpyrifos에 대해서는 96시간째에 최대 전자전달율은 약 30%, 초기기울기는 약 42% 정도 감소하였다. 유기화합물인 Fluoranthene과 Fluorene에 노출된 갈파래의 경우도 11시간째에 최대전자전달율이 각각 30.9와 26.9로 대조구에 비해 약 50% 수준으로 감소하였다. 또한 전자전달율-광 곡선의 초기기울기도 각각 0.23으로 약 20% 수준으로 감소하였다. 하지만 11시간 이후 48시간과 96시간째의 최대 전자전달율은 비슷한 수준을 유지하였으며, 초기 기울기도 또한 96시간째 각각 0.21과 0.18로 대조구에 비해 약 40% 수준까지 감소하였다.

유기화합물 중 Fluoranthene은 다환방향족탄화수소 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)의 일종으로 다양한 경로를 거쳐 수서생물에 농축되며, 특히 여과섭식을 하는 패류의 경우에는 최고 1000배 정도까지 축적되는 것으로 알려져 있다 (Brounson et al. 1998, van Hattum et al. 1998). PAHs의 일종인 benzo[a]pyrene은 갈조류인 *Fucus*, 홍조류인 *Furcellaria*, 녹조류의 일종인 *Enteromorpha*의 조직으로 침투하여 일부는 대사효소들에 의해 분해되나 대부분은 조직 내에 장기간 그대로 머무르는 것으로 알려져 있다 (Kirso and Irha 1998). Fluoranthene을 사용하여 김의 사상체 증식에 미치는 영향을 조사한 국내 연구결과가 있었다 (김 등 1999). 김의 유리사상체를 조제하여 Fluoranthene 0.01, 0.1, 1, 10 ppm 농도에 5주간 노출시켜 김사상체 성장저해를 측정하였다. 그 결과 0.01-1 ppm 농도 구간에서 최대 5배정도 Fluoranthene을 축적하는 결과를 보였으며, 뚜렷한 성장저해는 보이지 않았다. 하지만 1-10 ppm 구간에서 엽록소 a와 carotenoids 색소함량이 현저히 감소되는 결과를 보여준 연구였다.

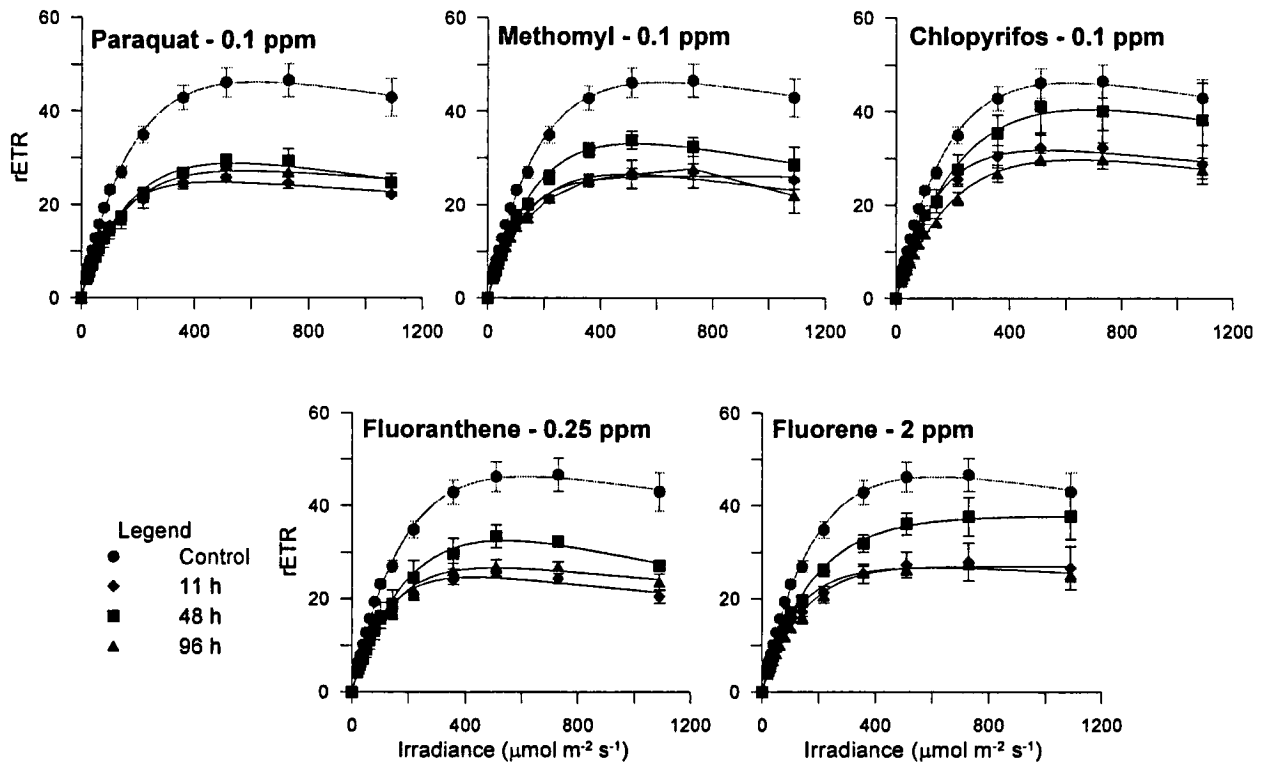


그림 3-2. 유해물질 중 제초제 (Paraquat), 살충제 (Methomyl, Chlorpyrifos), 유기화합물 (Fluoranthene, Fluorene)에 대해 측정된 갈파래 빠른 광반응곡선(RLC)에서의 광합성 저해.

갈파래를 유기주석 화합물(TBT)와 중금속(Cd, Cu, Pb)에 노출시켜 96시간 급성 독성효과를 측정한 결과는 그림 3-3와 같다. 본 연구를 통하여 단일물질 독성시험(single-chemical toxicity test)을 실험한 9종의 유해물질 중 갈파래의 광합성에 가장 심각하게 영향을 미치는 유해물질은 유기주석화합물 (TBT)인 것으로 나타났다. 96시간 급성 독성측정을 위해 노출시킨 후 11시간째에 빠른 광반응곡선을 측정했을 때 이미 대조구와 비교해서 최대 전자전달율을 기준으로 약 98%이상 감소하였으며, 곡선의 초기기울기는 99% 감소하여 더 이상의 생리반응을 측정할 수 없었다. 11시간 이후 48시간과 96시간째에 측정한 결과에서도 더 이상의 광합성을 측정할 수 없었으며, 육안으로 관찰했을 때에도 TBT에 노출 된지 1시간이 지나면서 갈파래 엽상체의 색소가 탈색되기 시작하였으며, 10시간이 지나면서는 거의 탈색되어 갈파래 조직 내에 더 이상의 광합성 색소가 남아있지 않은 것으로 관찰되었다. 금속의 한 종류인 주석 (Sn)은 그 자체로서는 환경적인 문제를 크게 유발하지 않는다. 하지만, 주석에 부틸기 (butyl)나 페닐기 (phenyl)와 같은 작용

기가 결합된 유기주석화합물 (TBT 또는 TPhT)은 강력한 생물 독성으로 인해 선박의 하부나 수중 구조물 등의 표면에 생물의 부착을 방지하는 방오도료 (antifouling paint)나 biocide로 널리 활용되어 왔다 (Hugget et al. 1992, Pflugmacher et al. 2000, Terlizzi et al. 2001). 그러나 이들 유기주석화합물이 극히 저 농도에서도 일부 수생 생물의 생식이상을 유발하는 내분비계 장애물질 (endocrine disrupting chemical)로 알려지면서 우리나라를 비롯한 많은 국가에서 사용을 제한하고 있다. 하지만 현재 상당한 수준의 유기주석화합물이 국내외의 연안환경에 잔존하고 있으며, 가장 문제가 되는 오염물질의 하나로 분류되고 있다 (Shim et al. 2000).

중금속(Cd, Cu, Pb)에 노출 시켜 갈파래의 96시간 급성독성을 측정한 결과, 대체적으로 11시간째에 대조구 광반응곡선의 최대전자전달율에 비해 50% 이상 감소하는 결과를 보였으며, 빠른 광반응곡선에서 추정된 최대전자전달율을 기준으로 할 때 납(Pb) > 구리(Cu) > 카드뮴(Cd) 순으로 독성효과가 나타나는 것으로 측정되었다. 먼저 카드뮴(Cd)의 경우 11시간째의 전자전달율-광 곡선의 초기 기울기는 대조구에 비해 약 30% 정도 감소하였으며, 마지막 96시간째에는 43%까지 감소하였다. 구리(Cu)는 카드뮴에 비해 좀 더 독성효과를 보여주고 있으며, 최종 96시간째에 측정된 곡선의 초기기울기는 대조구에 비해 약 54%까지 감소하였다. 이에 반해 납(Pb)의 경우는 48시간째의 측정된 곡선의 초기기울기가 대조구에 비해 95% 감소하였음에도 불구하고, 96시간째에 측정된 빠른 광반응곡선이 광합성을 회복하는 양상을 보인 것은 자료 분석과정에서 발생한 오류로 인한 것으로 판단된다.

갈파래에 대한 유해물질의 96시간 급성 독성효과 및 독성 매개변수를 분석하기 위해 96시간 동안 일정시간 간격으로 갈파래의 양자수율 (quantum yield)을 측정한 결과는 그림 5-6에서 보여주고 있다. 96시간 동안 5종의 제초제와 살충제, 유기화합물에 노출된 갈파래의 양자수율은 전체적으로 노출시간이 경과하면서 감소하는 경향을 보였다. 또한 대체로 11시간까지는 급격하게 감소하는 경향을 보인 반면 11시간 이후 96시간까지는 양자수율의 증가와 감소를 반복하는 결과를 보였다. 제초제와 살충제, 유기화합물에 노출된 갈파래의 양자수율의 변화를 대조구와 비교하면 마지막 96시간째의 양자수율은 대조구에 비해 약 20 ~ 33%까지 감소하는 경향을 보였다. 대조구에 비해 가장 뚜렷한 양자수율의 감소를 보인 처리구는 살충제인 Methomyl과 Chlorpyrifos 0.1 ppm에 노출된 처리구였으며, 가장 적은 감소를 보인 처리구는 Fluoranthene 0.25 ppm에 노출된 처리구가 약 20%의 감소로 가장 적은 감소를 보였다.

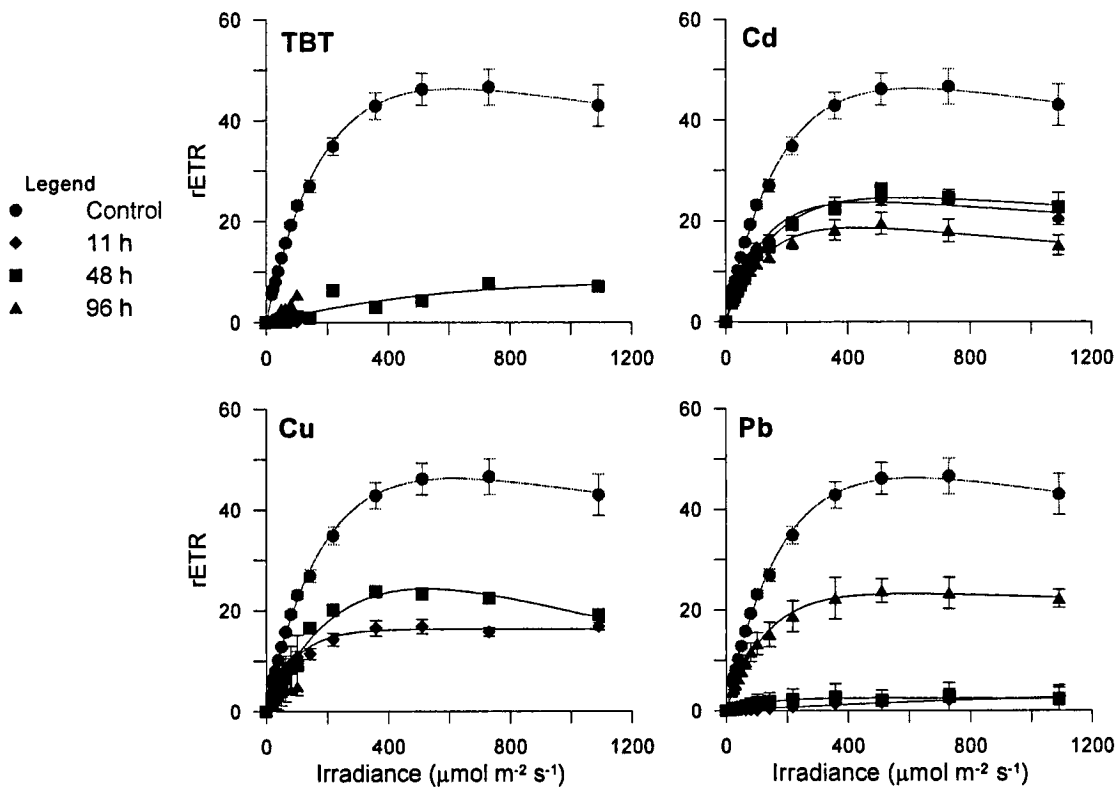


그림 3-3. 유해물질 중 유기주석화합물 (TBT)과 중금속 (Cd, Cu, Pb)에 의한 갈파래 광합성의 저해.

TBT의 5가지 농도 구배에 노출된 갈파래의 경우 농도와 노출시간이 증가하면서 갈파래의 양자수율은 지속적으로 감소하였다. 특히 노출 초기 11시간까지 양자수율의 급격하게 감소는 제초제나 살충제에 노출한 처리구와 유사한 결과를 보였으며, 11시간 이후 96시간까지의 감소는 다소 느리게 감소하는 경향을 보였다. 특히 TBT 1 ppm에 노출된 갈파래의 경우 노출 후 2시간 만에 양자수율은 대조구에 비해 92% 이상 감소하였으며, 이후 이 상태가 지속되었다. 중금속에 노출된 갈파래의 양자수율의 변화는 대체로 구리 (Cu) > 납 (Pb) > 카드뮴 (Cd)의 순서로 양자수율에 대한 독성효과가 강하게 나타났다. 노출 초기 11시간까지의 급격한 감소는 TBT와 유사하게 나타났으며, 모든 중금속에 대해서도 유사한 경향을 보였다. 11시간 이후 96시간까지의 양자수율의 변화는 감소와 증가를 반복하였지만 대체로 감소하는 경향을 보였다. 카드뮴의 경우 가장 고농도인 1 ppm에 노출된 갈파래의 96시간째의 양자수율은 대조구에 비해 약 30%가 감소하였으며, 구리의 경우에는 약 53%가 감소하여 카드뮴에 비해 강한 독성을 갖는 것으로 나타났으며, 납의 경

우에는 약 31%가 감소함으로써 카드뮴과 비슷한 정도의 독성을 보였다. 구리 1 ppm에 노출된 갈파래의 양자수율의 변화는 다른 처리구와는 다르게 11시간 이후에도 양자수율이 지속적으로 감소하거나 유지되는 경향을 보였다. 이 외 다른 처리구의 경우 노출시간이 계속됨에 따라 양자수율의 증가와 감소를 반복하는 경향은 96시간 급성독성 실험동안 실험 조건 상 명암주기를 조절함으로 인해 빛이 없는 암상태 (dark condition)에서는 유해물질의 독성효과가 분명하고 뚜렷하게 나타나는 반면, 빛이 주어지는 명상태 (light condition) 하에서는 갈파래의 광합성으로 인해 약간의 양자수율 회복이 측정됨으로 인해 양자수율의 증가와 감소가 관찰되었던 것으로 판단된다. 하지만 독성효과가 가장 뚜렷한 TBT의 경우나 고농도의 구리 처리구에서는 이러한 양자수율의 증가와 감소가 관찰되지 않은 것이 이 현상에 대한 반증이라 할 것이다.

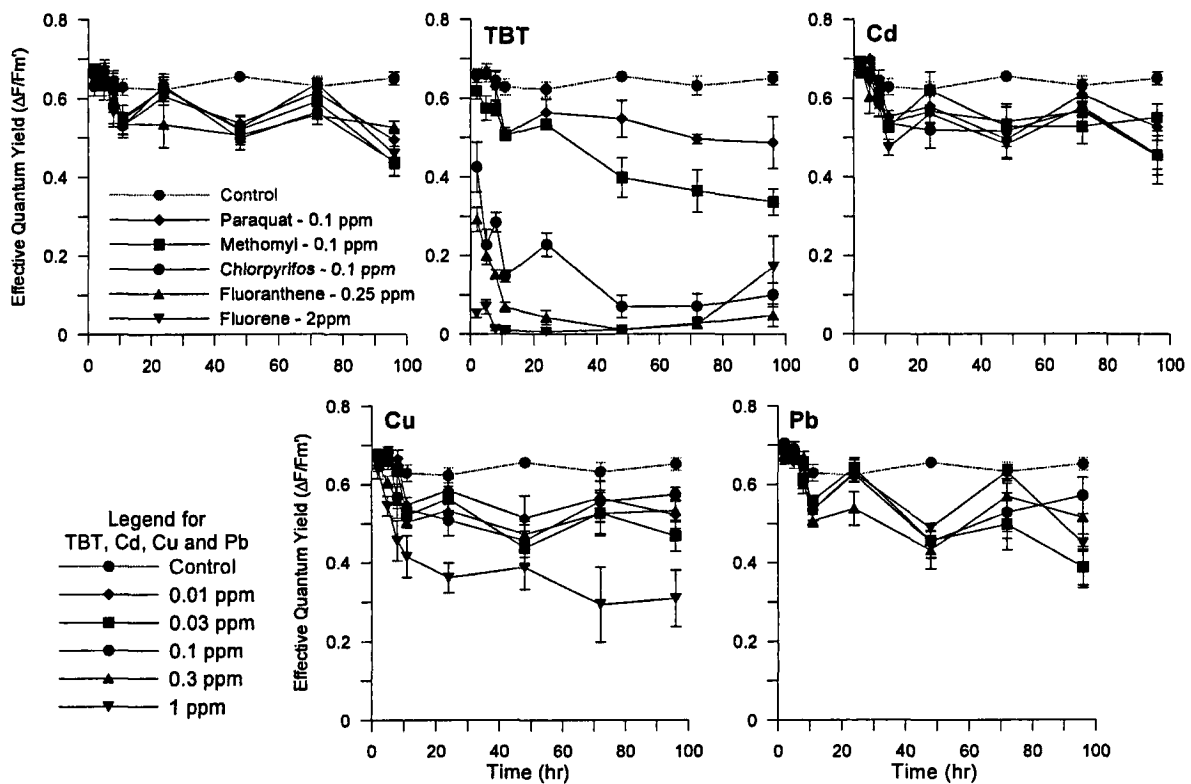


그림 3-4. 유해물질 독성효과에 의한 갈파래 양자수율 (Effective quantum yield)의 96시간 변화.

갈파래의 광합성 양자수율 (T=96h)에 미치는 유해물질의 독성효과에 대한 통계적 유의성을 확인하기 위해 통계처리를 수행하였으며 (paired T-test와 one-way ANOVA), 그

결과는 표 3-5와 3-6이다. 제초제와 유기화합물의 단일 농도조건에서 측정된 갈파래 양자수율은 대조구와 비교하였으며, 제초제 중 methomyl 만이 대조구와 유의한 차이를 보였다 (표 3-5, $p < 0.05$). 유기금속 (TBT)과 중금속 (Cd, Cu, Pb)에 대해서 측정된 갈파래 광합성 양자수율 중 TBT ($p < 0.001$)와 Cu ($p < 0.01$)의 농도 증가에 따라 유의한 독성 효과의 차이를 보였다 (표 3-6).

표 3-5. 갈파래의 광합성 양자수율 (T=96h)에 미치는 제초제와 유기화합물 독성효과에 대한 paired T-test 결과.

유해물질	T value	df	Probability
Paraquat	-0.065	4	0.951
Methomyl	3.478	4	0.025*
Chlorpyrifos	0.835	4	0.451
Fluoranthene	-0.849	4	0.443
Fluorene	0.609	4	0.575

표 3-6. 갈파래의 광합성 양자수율 (T=96h)에 미치는 유기금속과 중금속 독성효과에 대한 one-way ANOVA 결과.

유해물질	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Probability
TBT	0.721	5	0.144	14.948	< 0.001***
Cd	0.044	5	0.009	0.861	0.521
Cu	0.183	5	0.037	5.350	0.002**
Pb	0.095	5	0.19	2.068	0.105

2. 유해물질의 96시간 급성독성 효과에 의한 갈파래 색소함량의 변화

갈파래의 광합성에 대한 유해물질의 96시간 독성효과를 측정된 후, 갈파래 시료의 광합성 색소함량 변화를 알아보기 위하여 색소를 추출하여 분석하였다. 그림 3-5는 갈파래 광합성 색소함량에 대한 제초제(Paraquat), 살충제(Methomyl, Chlorpyrifos), 유기화합물(Fluoranthene, Fluorene)에 96시간 노출 후 색소함량의 변화를 보여주고 있다. 대체로 제

초제나 살충제, 유기화합물 모두 갈파래의 광합성 색소함량에 대한 뚜렷한 영향은 없었으며, 특히 유기화합물의 경우 갈파래의 색소함량 및 색소의 비율에 거의 영향을 미치지 않았다. 유해물질 중 상대적으로 가장 큰 영향을 미친 물질은 살충제 중 Chlorpyrifos로, 대조구에서의 엽록소 a 함량이 $2.45 \mu\text{g g}^{-1}$ 에 비해 96시간 노출 시킨 후, 엽록소 a의 함량이 $2.24 \mu\text{g g}^{-1}$ 로 약 8% 정도 감소했으며, 엽록소 b는 대조구에서 $1.66 \mu\text{g g}^{-1}$ 이었으나 96시간 후 $1.45 \mu\text{g g}^{-1}$ 로 약 13%, 카로티노이드는 대조구에서 $0.760 \mu\text{g g}^{-1}$ 이었으나, 96시간 후 $0.67 \mu\text{g g}^{-1}$ 로 약 12% 정도 각각 감소하였다. 하지만 엽록소 b와 카로티노이드에 대한 엽록소 a의 비율은 대조구와 차이가 거의 없는 것으로 나타나 색소에 대한 유해물질의 영향이 특정 색소에 집중되지 않음을 보였다(그림 3-5). 제초제 Paraquat에 의한 갈파래 광합성 색소함량의 변화는 엽록소 a의 경우 $2.22 \mu\text{g g}^{-1}$ 으로 대조구에 비해 약 10%, 엽록소 b의 경우 $1.51 \mu\text{g g}^{-1}$ 으로 약 10%, 카로티노이드는 $0.66 \mu\text{g g}^{-1}$ 으로 약 13% 정도 각각 감소하였다. 또한 엽록소 b와 카로티노이드에 대한 엽록소 a의 비율은 살충제 Chlorpyrifos와 유사한 결과를 보였다.

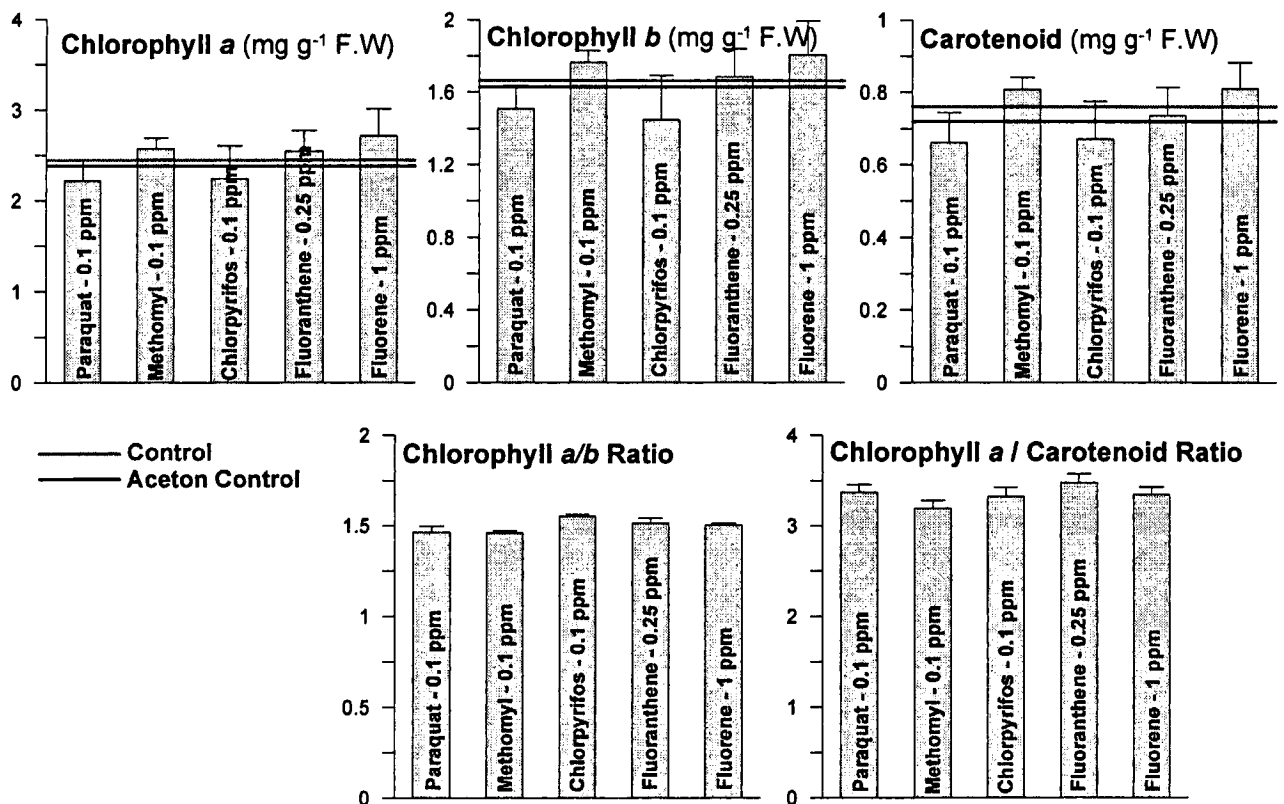


그림 3-5. 유해물질 중 제초제 (Paraquat), 살충제 (Methomyl, Chlorpyrifos), 유기화합물

(Fluoranthene, Fluorene)에 의한 갈파래의 광합성 색소함량의 변화.

유기주석화합물 (TBT)과 중금속 (Cd, Cu, Pb)의 독성효과에 의한 갈파래 광합성 색소함량의 변화는 유해물질 각각에 대하여 5단계의 농도구배를 만들고, 96시간 노출 후 농도별로 색소함량을 측정하여 분석하였다 (그림 3-6). 4가지 유해물질 중 가장 강하게 갈파래 광합성 색소함량에 영향을 미친 것은 유기주석 화합물인 TBT 이었으며, 중금속의 경우는 구리 (Cu) > 카드뮴 (Cd) > 납 (Pb)의 순서로 독성효과가 강하게 나타났다. 유기주석 화합물인 TBT의 경우 0.01 ppm의 농도 노출한 갈파래는 대조구와 비교하여 엽록소 a의 농도는 2.35 으로 대조구에 비해 약 4%, 엽록소 b의 경우 1.54 로 약 7%, 카로티노이드는 0.75로 약 1% 정도 각각 감소하였다. 그러나 TBT 1 ppm에 노출한 갈파래는 엽록소 a의 경우 0.01 로 대조구에 비해 약 99%, 엽록소 b의 경우 0.03 으로 98%, 카로티노이드의 경우 0.04 으로 약 95% 각각 감소하여 광합성 생리반응이 전혀 나타나지 않았다. TBT 농도에 따른 갈파래 광합성 색소함량의 변화는 0.01 ppm에서 0.1 ppm까지 광합성 색소함량이 급격하게 감소하였으며, 그 이상의 농도에서 광합성 색소함량은 대체로 일정하게 유지되고 있었으나, 이미 광합성 색소함량이 90% 이상 줄어들어 더 이상 광합성을 할 수 없는 것으로 보여지며, 양자수율과 같은 생리반응이 더 이상 검출되지 않았다. 중금속 중 구리 (Cu)의 경우는 0.01에서 0.1 ppm농도까지는 광합성 색소함량이 일정하게 유지하고 있었으나, 그 이상의 농도에서 1 ppm까지 광합성 색소함량이 급격하게 감소하는 경향을 보였다. 연안환경에 유입되는 미량금속 (trace metals) 중에서 구리 (Cu)나 아연 (Zn)과 같은 일부 미량 금속은 생물체에게 필수적인 영양소이다 (Lyngby and Brix 1982, Lobban and Harrison 1997). 하지만 은 (Ag), 카드뮴 (Cd), 수은 (Hg)은 필수영양소가 아니면서 그 독성은 매우 강한 것으로 알려져있다 (Ralph and Burchett 1998). 또한 중금속 중 일부 미량금속들은 모두 자연적으로 존재하는 물질로서 일정 농도 이하에서는 독성이 나타나지 않는 특성을 보여 대부분의 중금속들이 해산식물의 광합성에 대해 잠재적인 독성을 갖지만, 독성이 발현되는 농도 수준은 해산식물의 종류 및 생리특성에 따라 각각 다르게 나타날 수 있다. 카드뮴 (Cd)의 경우 낮은 농도 수준 (0.01에서 0.1 ppm)에서는 농도가 증가함에 따라 광합성 색소함량의 감소를 보였으나, 그 이상의 농도 수준에서는 광합성 색소함량이 다시 증가하는 경향을 보였다. 이는 카드뮴이 식물 조직 내에서 또 다른 무독성 (detoxification)화 작용에 의한 것으로 추측이 되며, 이의 원인에 대한 자세한 연구가 추가되어야 할 것으로 판단된다. 납 (Pb)에 의한 갈파래 광합성 색소함량에의 영향은 뚜렷한 색소함량의 감소가 관찰되지 않았다. 납 (Pb) 농도가 증가함에 따라 각각의 색소함

량이 약간의 증가를 보이다가 고농도로 갈수록 약 감소하는 경향을 보였으며, 납 (Pb) 1 ppm 처리구에서 대조구에 비해 엽록소 a는 약 25%, 엽록소 b는 약 29%, 카로티노이드는 약 24% 각각 감소하였다.

엽록소 b와 카로티노이드에 대한 엽록소 a의 비율은 유기주석화합물인 TBT를 제외하고는 특별한 차이를 보이지 않았다. TBT 처리구에서만 농도가 증가함에 따라 엽록소 b에 대한 엽록소 a의 비율이 감소하는 경향을 보였다. 이는 TBT의 영향이 엽록소 b에 비해 상대적으로 엽록소 a의 감소에 많은 영향을 미치고 있는 것으로 보이며, 나머지 중금속은 특정한 색소에 대해 뚜렷한 독성효과를 보이는 것은 아닌 것으로 판단된다. 특히 카로티노이드에 대한 엽록소 a의 비율은 모든 유해물질이 모든 종류의 색소에 비슷한 영향을 끼치는 것으로 판단된다.

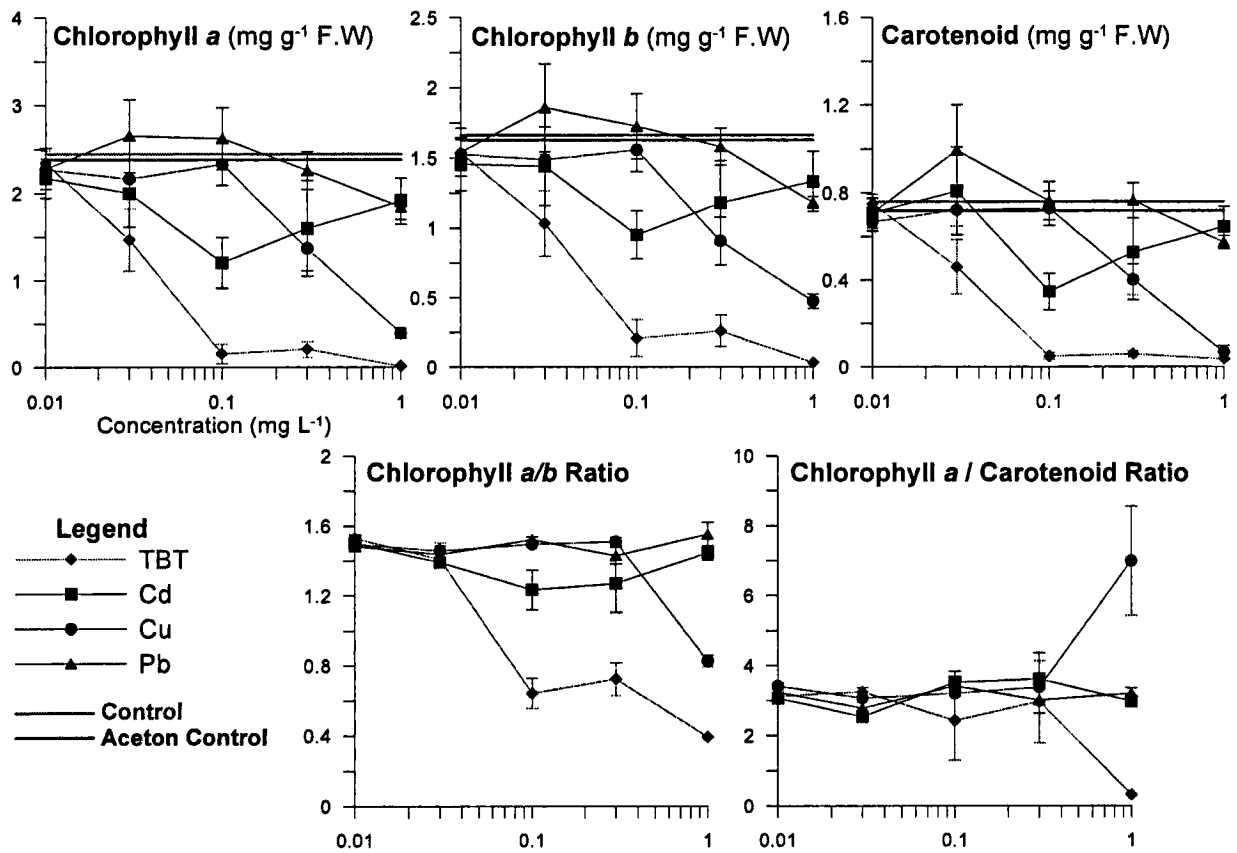


그림 3-6. 유해물질 중 유기주석화합물 (TBT)과 중금속 (Cd, Cu, Pb)의 농도에 따른 갈파래 광합성 색소함량의 변화.

3. 잘피에 의한 중금속 흡수능 조사

잘피 잎과 지하경에 의한 카드뮴과 아연의 흡수는 노출시간과 함께 증가하였으며, 잘피 잎과 지하경 모두 일정 시간이 지나면서 포화되는 경향을 보였다 (그림 3-7). 하지만 잘피의 중금속 흡수에 대한 포화 속도는 잎과 지하경에서 약간의 차이를 보였다. 잘피 부위별 시간에 따른 포화 패턴의 차이는 용존태의 중금속이 식물 조직 내로 흡수될 때 보여주는 금속 특이성이나 종 특이성 때문인 것으로 추측된다 (Wang and Dei 1999). 흡수상수 (k, hr^{-1}) 값은 잘피 잎의 경우 아연은 0.343, 카드뮴은 0.302로, 상대적으로 카드뮴보다는 아연에 대한 흡수속도가 약간 빠른 것으로 보이며, 지하경에서도 아연에 대한 흡수상수 값이 0.109이며, 카드뮴은 0.102로 잘피 잎에서와 마찬가지로 아연이 약간 더 빠른 속도로 흡수되는 것으로 보인다. 아연은 구리, 철, 망간과 같이 식물의 대사 작용과정 중에 요구되는 필수 미량금속인데 반해 카드뮴은 식물에게는 필요하지 않은 비필수 금속에 속한다 (Lobban and Harrison 1997, Ralph and Burchett 1998). 그래서 상대적으로 카드뮴보다 아연에 대한 흡수속도가 빠른 것으로 보인다.

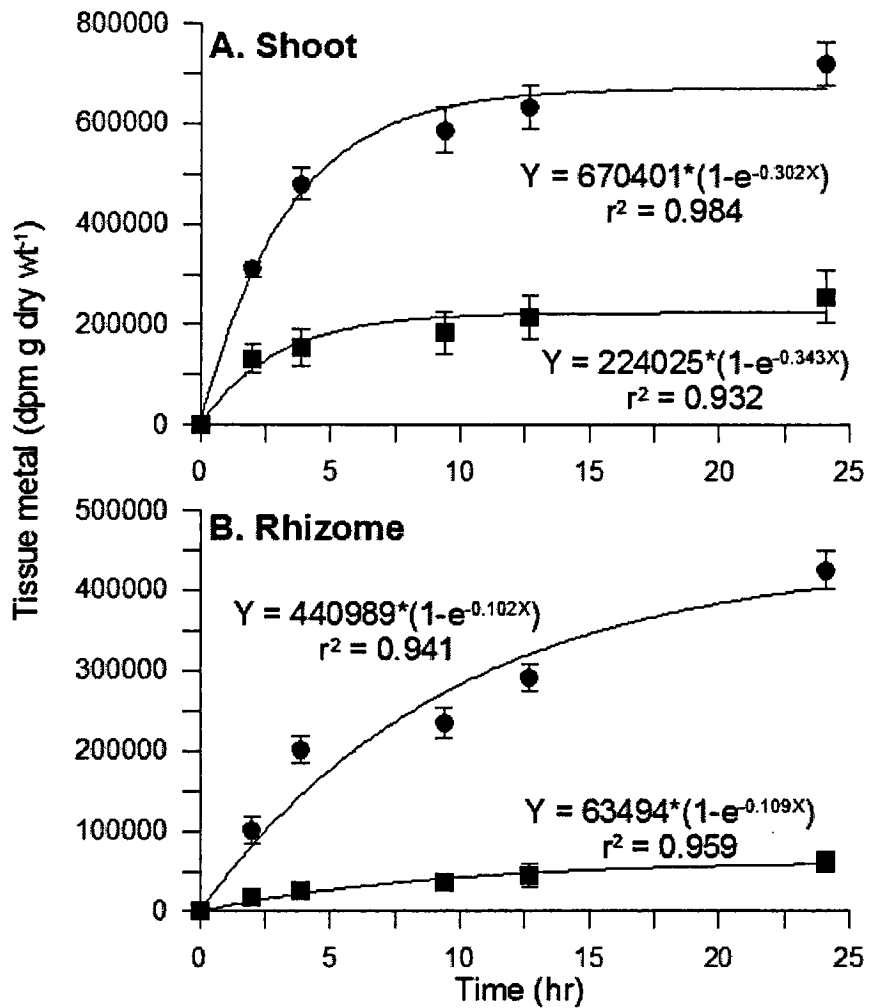


그림 3-7. 잘피의 부위별 중금속(Cd(●)과 Zn (■)) 흡수 kinetics.

중금속 농도와 잘피에 의한 흡수율 사이의 상관관을 알아보기 위해 계산된 값들을 로그 전환 후 파워함수를 이용하여 피팅하였다 (그림 3-8). 이때 사용한 파워함수 식 (1)은 다음과 같다.

$$I_w = k_u C_w^b \quad (1)$$

여기서, I_w 는 잘피의 조직 내로의 중금속 흡수율 ($\mu\text{g metal g}^{-1} [\text{dry wt}] \text{d}^{-1}$)을 의미하며, k_u 는 용존태 중금속으로부터 잘피 조직 내로 흡수되는 효율에 대한 상수, C_w 는 해수 중에 들어있는 중금속의 농도, b 는 파워상수로 I_w 와 C_w 사이의 로그 상관관계의 경사도를 의미한다. 위 식은 이매패류를 포함한 저서 무척추 동물의 중금속 흡수를 평가하는데 혼

히 사용되는 식이다 (Lee et al. 1998).

이 식을 이용해서 얻은 결과에 따르면 카드뮴과 아연 모두 중금속 농도에 대한 잘피의 흡수율은 역 상관관계를 보였다 (그림 3-8). 카드뮴의 경우 잘피 앞에서의 상관관계 경사도는 -0.24로 농도가 증가함에 따라 흡수율은 감소하는 것으로 나타났으며, 지하경은 -0.04로 잘피 앞에 비해 해수 중의 중금속 농도와는 상관없이 일정한 속도로 흡수하는 것으로 보인다 (그림 3-8A). 아연에 대해서도 카드뮴과 유사한 역 상관관계의 결과를 얻었다 (그림 3-8B). 잘피 앞의 흡수율과 아연 농도와의 상관관계는 카드뮴보다는 약간 작지만 -0.18로 뚜렷한 역 상관을 보였으며, 지하경은 -0.01로 앞에 비해 아연의 농도와 관계없이 일정한 속도로 중금속을 잘피의 조직 내로 흡수한다는 결과를 보였다. 또한 중금속 흡수 효율에 대한 상수는 카드뮴의 경우 앞과 지하경에서 0.77과 0.72로 유사한 값을 보인 반면, 아연에 대해서는 앞에서 0.95, 지하경에서 0.65로 앞에서의 흡수 효율 상수가 약간 높은 값을 보였다.

잘피의 생물량과 중금속 흡수와의 상관을 살펴보기 위하여 파워함수인 다음 식 (2)을 이용하여 분석하였다.

$$I = aW^c \quad (2)$$

여기서, a 는 절편상수이며, c 는 로그로 전환된 I ($\text{dpm g}^{-1} [\text{dry wt.}] \text{ hr}^{-1}$)와 생물량 (W) 사이의 상관에서 경사도를 의미한다. 이 함수 또한 파워함수를 이용하여 저서 무척추 동물에 의한 중금속 흡수와 생물 크기 사이의 상관을 평가하는데 가장 많이 이용되고 있는 식이다 (Nichols and Thompson 1982).

잘피의 생물량과 조직 내로의 중금속 흡수 사이의 관계는 카드뮴이나 아연 모두 역 상관임을 보였다 (그림 3-9). 카드뮴에 대한 잘피 앞 무게 사이의 상관에서 경사도는 -0.47, 지하경과의 상관에서 경사도는 -0.27이었으며 (그림 3-9A), 아연에 대해서는 잘피 앞과 지하경에 대해서 각각 -0.41과 -0.53의 경사도 값을 보였다 (그림 3-9B). 즉 이는 잘피의 생물량과 관계없이 잘피가 생육하는 곳이라면 지속적으로 해수 중의 중금속이 잘피에 의해 제거될 수 있음을 보여주는 결과라 할 것이다.

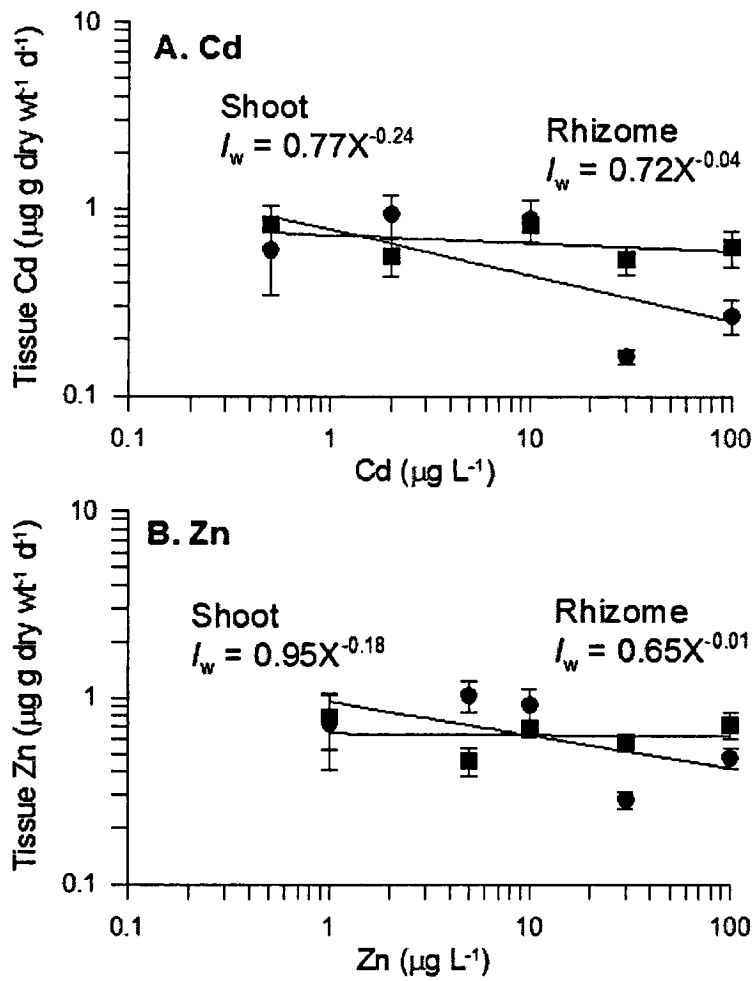


그림 3-8. 잘피의 부위별(엽조(●)와 지하경(■)) 중금속 흡수율과 용존 중금속 농도와의 상관관계.

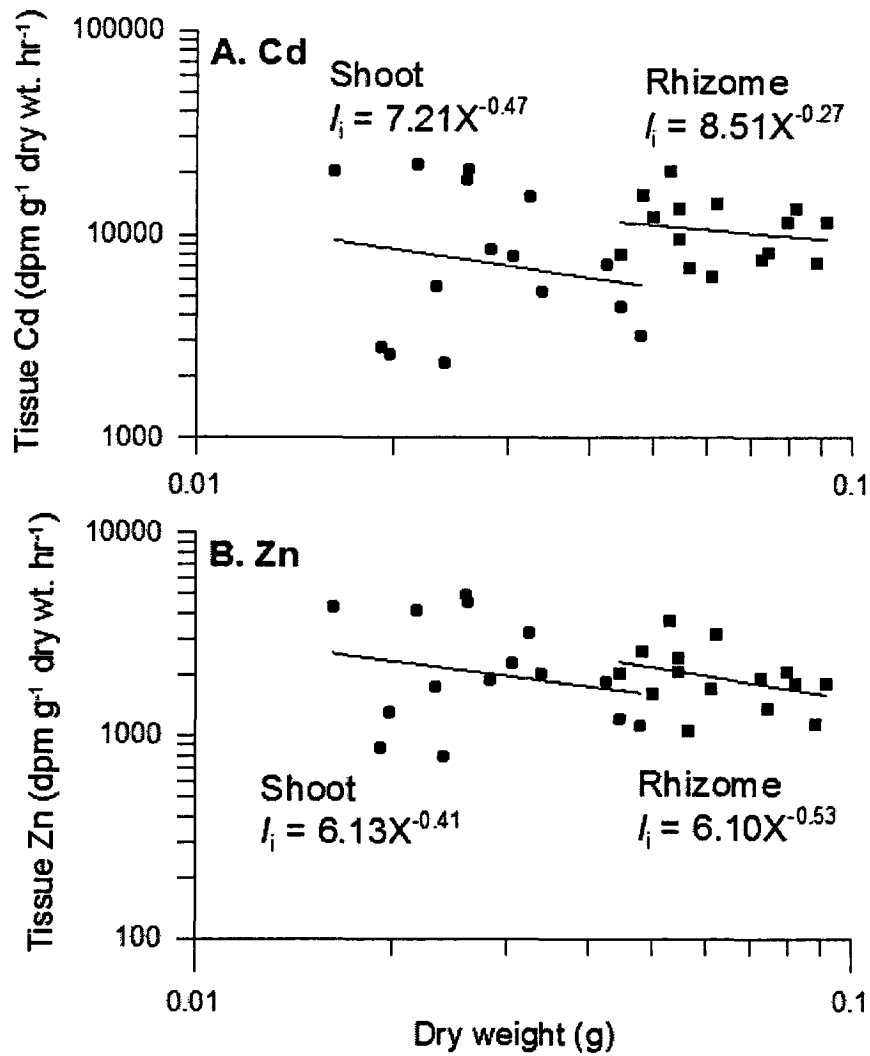


그림 3-9. 잘피의 부위별(엽조(●)와 지하경(■)) 중금속 흡수율과 건중량과의 상관관계.

아연에 대한 잘피 잎과 지하경의 흡수 상수 (k)는 카드뮴에 비해 상대적으로 약간 높은 값을 보였다 (그림 3-7). 이것은 아연이 카드뮴에 비해 알콜 탈수소효소, RNA 중합효소, 호흡효소 활성, 식물 성장호르몬의 생합성 등과 관련된 필수 영양염이므로 해수 중에 들어있는 필수 영양염에 대해서는 확산 등과 같은 수동적인 흡수보다 좀 더 능동적으로 잘피 조직 내로 흡수된 결과로 보인다 (Wahbeh 1984, Lobban and Harrison 1997). 또한 중금속 농도에 따른 흡수율의 차이가 역 상관을 보이거나 아니면 상관이 없는 결과를 보인 것도 잘피에 의한 중금속의 흡수가 수동적이지만은 않다는 것을 보여준 것이다 (그림 3-8). 잘피의 생물량과 중금속 흡수율 사이의 관계에서도 상관이 없거나 약간의 역 상관을 보인 것은 다른 연구 결과와도 일치하고 있으며 (그림 3-9, Price and Coles 1992), 또

한 잘피의 생육이 오염된 연안생태계에서 중금속의 제거 및 생태계의 보존에 기여할 수 있을 것이다.

4. 잘피의 광합성에 대한 중금속 및 유해물질의 영향

잘피의 광양자수율에 대한 TBT, 카드뮴(Cd), 구리(Cu)의 효과를 측정하기 위해 세 개의 농도구배에서 96 시간동안 잘피를 노출시켜 일정한 시간간격으로 잘피의 양자수율 ($\Delta F/Fm$)을 측정하였다 (그림 3-10). TBT는 농도 증가와 노출시간에 따라 양자수율이 급격하게 감소하였다 (그림 3-10A). 특히, 0.3과 1 mg L⁻¹ 농도로 오염시킨 처리구는 96 시간 뒤에 회복할 수 없는 수준의 양자수율 값을 보였으며, 잘피 엽조는 색소의 파괴로 인하여 완전히 탈색되어 버렸다. TBT 0.3과 1 mg L⁻¹ 농도 처리구는 잘피 엽조를 넣은 후 1시간째부터 급격하게 양자수율이 감소하였으며, 이후 약간 회복되는 경향을 보인다 24 시간에서 48시간 사이에 잘피의 양자수율은 두드러지게 감소하였다. 카드뮴의 경우에는 노출 후 초기 10시간까지 양자수율의 감소를 보이다가 10시간 이후 96시간 까지 약간의 회복과 함께 뚜렷한 변화 없이 일정수준으로 지속되었다. 하지만 카드뮴 1 mg L⁻¹ 농도 처리구는 노출 초기 10시간까지 양자수율이 감소한 후, 회복 없이 일정수준을 유지하였으며, 70시간째에는 다른 처리구에 비해 뚜렷한 차이를 보였다 (그림 3-10B). 구리도 카드뮴과 유사한 반응을 보였으며, 노출 초기 10시간 내에 가장 큰 독성 효과를 발휘하였으며, 그 이후 96시간까지 일정한 수준의 양자수율을 유지하였다 (그림 3-10C). 하지만 카드뮴보다는 구리 농도가 증가하면서 이와 함께 독성효과도 분명하게 나타났다.

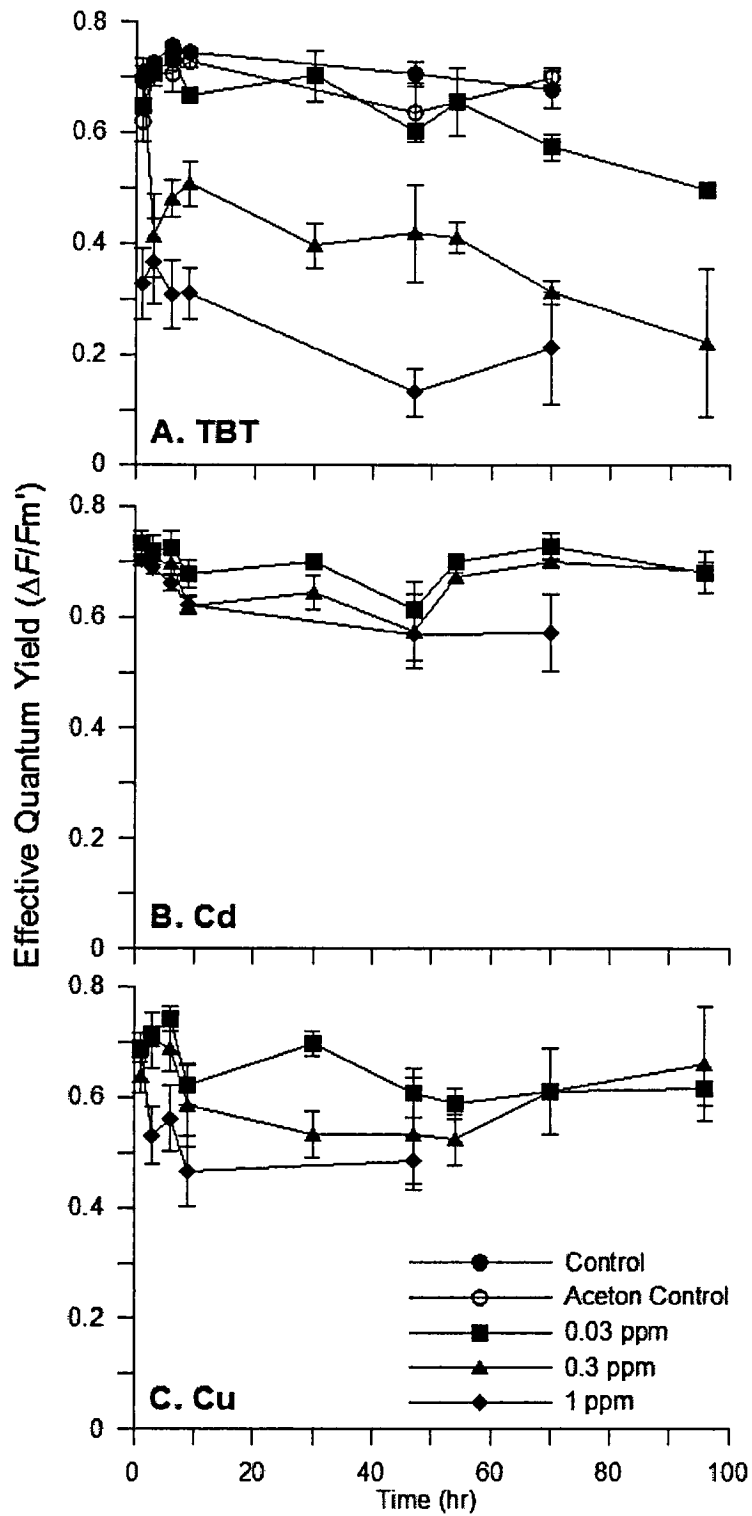


그림 3-10. 유기주석화합물 (TBT)와 중금속 (Cd, Cu)에 대한 잘피의 양자수율 (quantum yield)의 96시간 급성 독성 결과.

잘피 광합성에 대한 TBT, 카드뮴, 구리의 독성효과는 최대전자전달율 (rETRmax)를 기준으로 TBT > Cd > Cu 순으로 나타났다 (그림 3-11과 표 3-5). 세 가지 유해물질에 대해서 96시간 급성 독성을 실험하는 동안 30, 54, 96시간째에 측정된 빠른 광반응곡선 (RLCs)에서 계산된 매개변수인 최대전자전달율 또한 시간이 경과하면서 감소하였다 (표 3-5). TBT의 경우 54, 96시간째, 구리는 96시간째에 강력한 독성효과로 인하여 빠른 광반응곡선을 측정하였지만 광합성-광도 모델을 이용하여 피팅할 수 없었다. 그래서 다양한 광합성 매개변수들을 구하지 못했다 (표 3-5). TBT의 경우, 이미 30시간째의 빠른 광반응곡선은 대조구에 비해 두드러지게 낮아졌으며 (그림 3-11A), 카드뮴은 시간이 경과할수록 단계적으로 감소하는 경향을 보였다 (그림 3-11B). 하지만 구리 처리구의 경우 30시간과 54시간째에 뚜렷한 차이가 없었으나, 96시간째에는 빠른 광반응곡선의 측정도 불가능하였다 (그림 3-11C). 광합성 매개변수 중 초기경사 (α)는 TBT를 제외하고 대조구와 카드뮴, 구리 처리구 간에 뚜렷한 차이가 없었으며, 광적용 매개변수 또한 분명한 값의 차이를 보여주진 않았다 (표 3-5). 하지만 카드뮴 처리구에서는 시간이 경과하면서 감소하는 경향을 보였다.

표 3-7. 잘피의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 유기주석화합물 (TBT)과 중금속 (Cd, Cu) 독성효과에 대한 one-way ANOVA 결과.

유해물질	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Probability
TBT	0.407	3	0.136	12.967	0.003**
Cd	0.041	3	0.014	2.716	0.115
Cu	0.057	3	0.019	2.874	0.103

잘피의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 유기주석화합물 (TBT)과 중금속 (Cd, Cu)의 독성효과에 대한 통계적 유의성을 확인하기 위해 72시간째의 양자수율 값을 이용하여 통계처리를 수행하였으며 (one-way ANOVA), 그 결과는 표 3-7이다. 유해물질에 대한 독성 시험은 96시간 동안 수행하였으나, 일부 처리구의 경우 96시간째에 유해물질에 의한 독성효과에 의해 잘피의 상태가 좋지 않아 양자수율 측정이 의미가 없어 양자수율 측정을 실시하지 않았으며, 그래서 72시간째의 광합성 양자수율 값을 이용하여 처리구간 유의성을 검증하였다. 유기주석화합물 (TBT)과 중금속 (Cd, Cu)에 대해서 72시간째에 측정된

잘피 광합성 양자수율 중 TBT ($p < 0.01$)만이 유일하게 농도 증가에 따라 유의한 독성 효과를 보였다 (표 3-7).

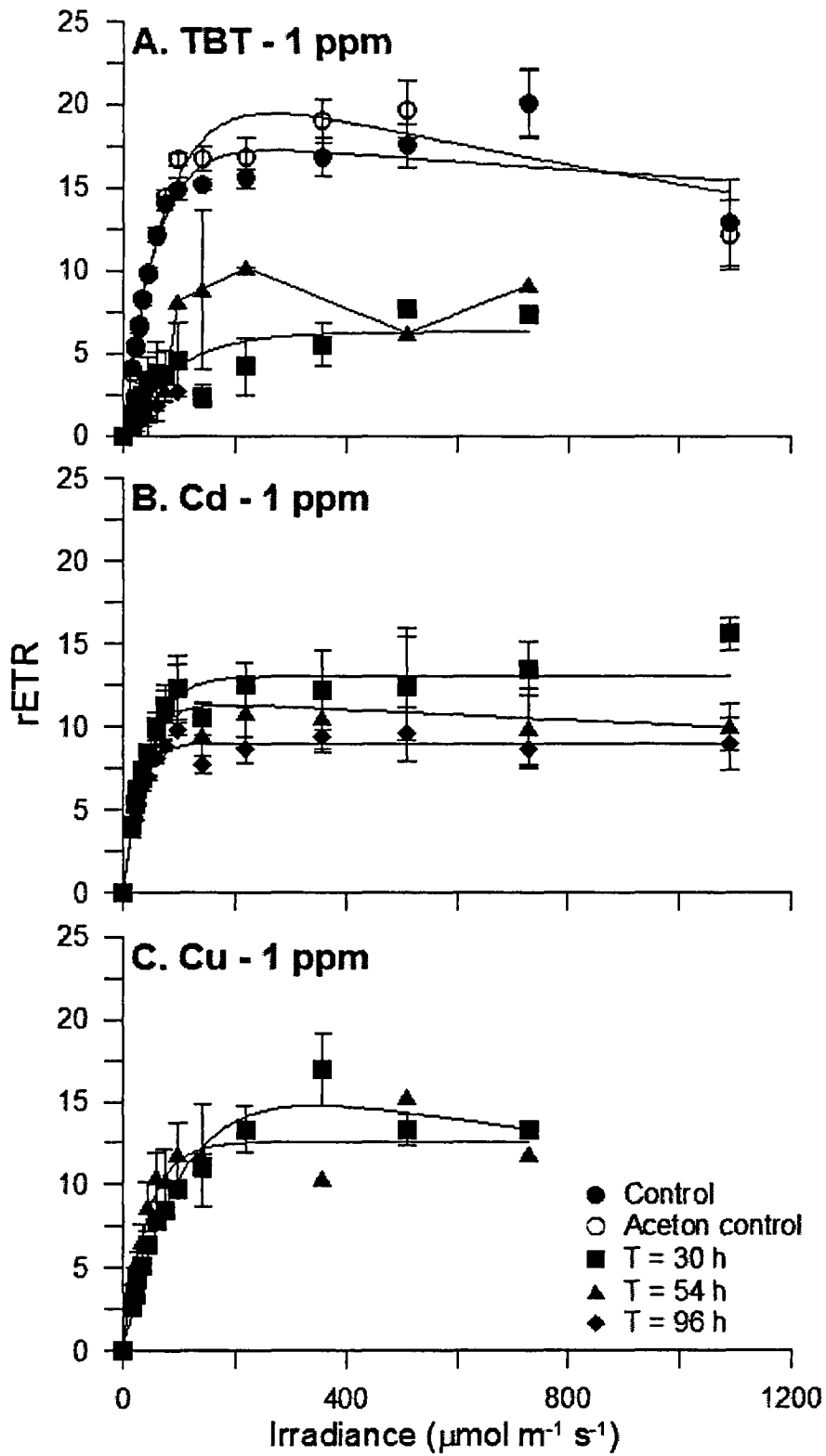


그림 3-11. 유기주석화합물 (TBT)와 중금속 (Cd, Cu)에 대한 잘피의 빠른 광반응곡선 (RLC)의 96시간 급성 독성 결과.

잘피의 광합성에 대한 유해물질 독성 효과를 측정한 본 연구의 결과는 TBT가 가장 강력한 독성효과를 발휘하였으며, 카드뮴(Cd)과 구리(Cu)는 서로 비슷한 독성 효과를 갖는 것으로 보인다 (그림 3-10과 3-11). 양자수율 ($\Delta F/F_m$)을 기준으로 한다면 카드뮴보다는 구리의 독성이 강하게 나타났으며 (그림 3-10), 최대전자전달율 (rETRmax)에서는 카드뮴의 독성이 구리보다 강하였다 (표 3-5). TBT는 강력한 독성효과 때문에 국내에서 사용이 금지되었다. 하지만, 사용금지 이전까지 유입되어 해양퇴적물이 농축된 TBT는 앞으로도 지속적인 공급원으로 작용할 수 있다 (Shim et al. 2000).

표 3-8. 유기주석화합물(TBT)와 중금속(Cd, Cu)에 대한 96시간 급성 독성 시험 중 측정된 잘피의 빠른 광반응곡선(RLC)에서 추정된 광합성 매개변수.

Treatment	Photosynthetic Parameters			
	P_{max}	Initial slope (α)	E_k	r^2
Control ^a	18.63	0.327	53.98	0.940
Aceton Control ^a	23.71	0.301	78.68	0.948
TBT				
30 h ^b	6.30	0.070	90.63	0.750
54 h ^a	-	-	-	-
96 h ^a	-	-	-	-
Cd				
30 h ^b	13.03	0.317	41.10	0.945
54 h ^a	11.94	0.327	36.53	0.943
96 h ^a	9.03	0.347	26.02	0.962
Cu				
30 h ^a	18.89	0.167	113.06	0.972
54 h ^b	12.56	0.301	41.70	0.928
96 h ^a	-	-	-	-

^aRapid light curve had fitted using equation with photoinhibition

^bRapid light curve had fitted using equation without photoinhibition

즉, 해수에서 TBT의 반감기는 수일에서 수주 정도에 농도 수준은 $ng\ L^{-1}$ — $\mu g\ L^{-1}$ 수준이지만, 퇴적물에서 반감기는 수개월에서 수 년 이상이며 농도 수준도 $\mu g\ kg^{-1}\ dw$

— mg kg⁻¹ dw 으로 무시할 수 없는 수준이며 (Fent 1996, Jensen et al. 2004), 해수에서 TBT의 공급원이 차단된다 하더라도 TBT를 함유한 해양퇴적물이 공급원으로 작용하여 주변에 서식하는 생물들에게 지속적으로 영향을 줄 수 있다. (de Mora et al. 1995, Evans et al. 1995, Fent 1996). 특히 잘피와 같은 해산 종자식물은 퇴적물에 지하경을 두고 해조류와는 달리 지하경의 뿌리를 통해 많은 양의 영양분을 흡수하는 생태 특성 때문에 치명적인 결과를 초래할 것이다.

5. 칠면초 (halophyte)의 광양자수율 (effective quantum yield)에 대한 유해물질의 독성

칠면초 (halophyte)는 흔히 조간대 (tidal flats)나 사구 (sand dunes)의 중·하부에 서식하며, 통상 뿌리는 퇴적물에 줄기와 잎은 대기 중에 노출되어 서식한다 (Shim et al. 2001). 이런 특성로 인하여 칠면초를 대상으로 유해물질의 독성효과를 측정하는 것은 거의 대부분의 시간을 물에 잠겨 서식하는 해조류나 잘피에 비하여 많은 어려움을 갖는다. 본 연구에서는 먼저 칠면초의 잎 부분만을 용존태의 유해물질에 노출하여 96시간 급성독성효과를 측정하였다 (그림 3-12). 칠면초에 대한 독성효과를 평가하기 위해 이용된 유해물질의 종류는 제초제 2종 (paraquat dichloride, alachlor), 살충제 1종 (endosulfan), 중금속 3종 (Cr(VI), Cu, Hg), 유기주석화합물 (TBT), 그리고 유기화합물 1종 (pyrene)이었으며, 유해물질의 유해성 평가를 위한 독성발현 농도를 찾기 위해 각각 한 구배의 농도 조건에서 96시간 동안 광양자수율의 변화를 추적하였다. 그 결과는 그림 5-11과 같다. 칠면초의 광양자수율에 가장 강한 독성을 가지는 유해물질은 제초제인 paraquat 이었으며, 초기 광양자수율이 0.837 ± 0.012 에서 노출 후 96시간이 경과한 후 최종 광양자수율은 0.418 ± 0.165 로 약 50% 수준까지 감소하였다. 대조구의 광양자수율은 96시간 급성효과 실험 초기에 0.84였으며, 실험이 진행되는 동안 약간의 광양자수율 증가와 감소를 보였으며, 96시간째에 약 0.8 수준으로 보였다. Paraquat을 제외한 나머지 제초제나 살충제의 경우 뚜렷한 독성효과를 보이지 않았으며, 중금속 중에서는 6가 크롬 (Cr(VI))만이 다른 유해물질에 비하여 분명한 독성효과를 갖는 것으로 측정되었다. 6가 크롬 (Cr(VI))의 경우 초기 광양자수율에 비하여 96시간째 광양자수율은 0.782로 약 7% 정도 감소하는 수준이었다. 6가 크롬 (Cr(VI))을 제외한 중금속 중 뚜렷한 독성효과를 보이는 것은 없었으며, 잘피나 갈파래에 대한 강력한 독성효과를 보였던 유기주석화합물 (TBT)의 경우에도 분명

한 독성효과를 보이지는 않았다. 마지막으로 유기화합물인 pyrene의 경우 6가 크롬 (Cr(VI))과 유사한 수준에서 초기 광양자수율에 비하여 96시간째의 광양자수율은 약 6% 정도 감소하는 결과를 보였다.

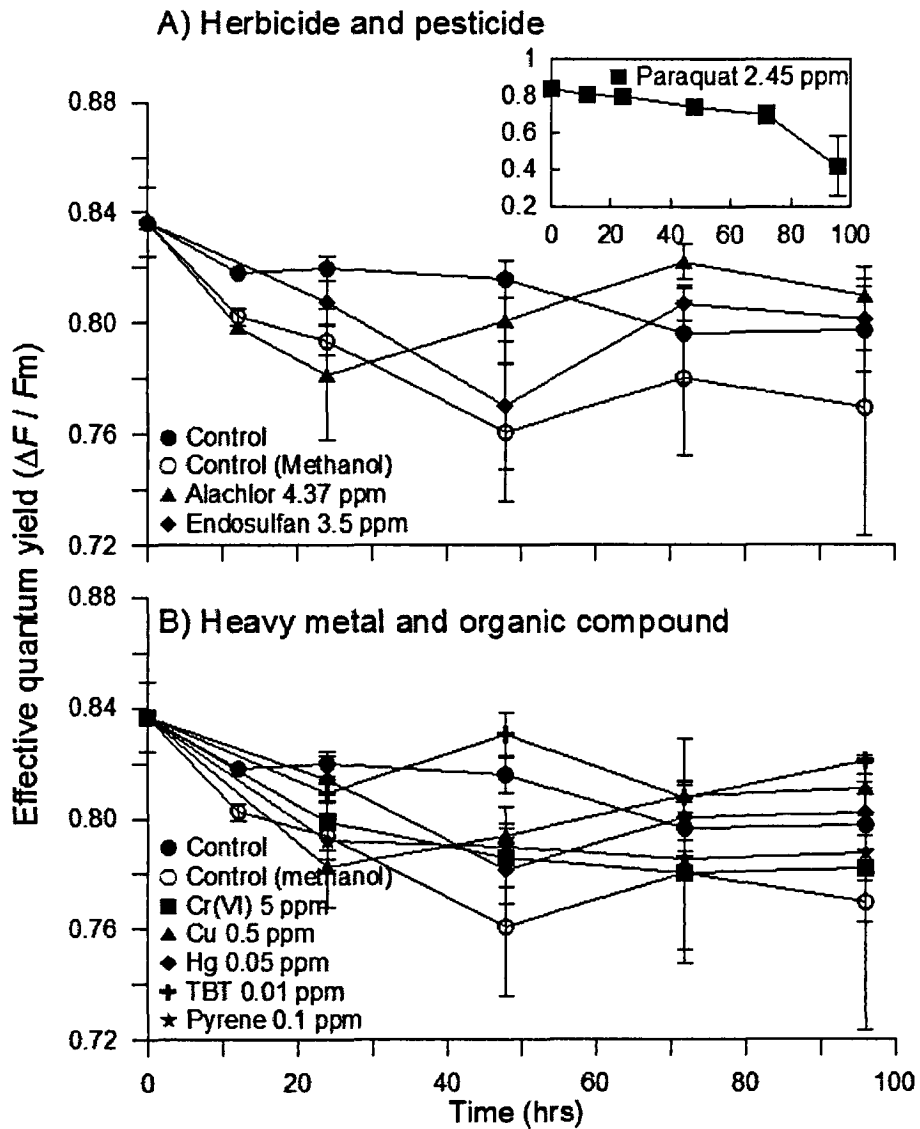


그림 3-12. 칠면초 (halophyte)의 광양자수율 (effective quantum yield)에 대한 유해물질의 96시간 급성독성효과.

표 3-9. 칠면초의 광합성 양자수율 (T=96h)에 미치는 유해물질의 독성효과에 대한 paired T-test 결과.

유해물질	T value	df	Probability
Paraquat	2.386	3	0.097
Alachlor	-0.477	3	0.666
Endosulfan	-0.148	3	0.891
Cr (IV)	1.620	3	0.204
Cu	-0.853	3	0.456
Hg	-0.271	3	0.804
TBT	-1.600	3	0.208

칠면초의 광합성 양자수율 (T=96h)에 미치는 유해물질의 독성효과에 대한 통계적 유의성을 확인하기 위해 96시간째의 대조구와 처리구의 양자수율 값을 비교하기 위한 통계 처리를 수행하였으며 (paired T-test), 그 결과는 표 3-9이다. 유해물질의 단일 농도조건에서 측정된 칠면초의 광합성 양자수율 값은 대조구와 비교하여 유의한 차이를 보여주는 유해물질은 없었다 (표 3-9).

칠면초에 대한 유해물질의 생리적 저해영향은 이번 광합성 양자수율의 변화에 대한 실험을 통해서 크게 드러나지 않음을 알 수 있었다. 하지만 이와 같은 결과가 유해물질이 칠면초에 대해 영향을 미치지 않는 것으로 판단하여서는 안된다. 현재 전 세계적으로 칠면초와 같은 염생식물을 이용한 독성시험은 거의 이루어지지 않은 상황에서 보다 많은 체계적인 연구가 필요한 실정이다. 향후 보다 장기적인 노출조건에서 광양자수율을 포함한 보다 다양한 생리적 지수에 대한 평가를 통해 현실적인 오염 수준에서 칠면초가 받는 스트레스 정도를 정량화 할 수 있는 실험기법의 개발이 요구된다.

○ 칠면초에 대한 유해물질 독성평가에 있어서 문제점

조간대 (tidal flats)나 사구 (sand dunes) 중하부에 서식하는 칠면초 (halophyte)는 뿌리는 퇴적물에 줄기와 잎은 대기 중에 노출되어 있다 (Shim et al. 2001). 이러한 특징으로 인하여 칠면초에 대한 유해물질의 독성측정은 식물 전체를 대상으로 하기에는 규모의 문제뿐만 아니라 일정한 유해물질의 농도에 칠면초 전체를 노출시키는데 있어서 극복해야

할 실험상의 많은 문제점들을 가지고 있다. 또한 칠면초는 생태특성상 창조 (spring tide) 시에도 줄기와 잎은 해수에 잠기지 않으며, 지하경부분만 규칙적으로 해수에 노출된다. 본 연구에서 칠면초에 대한 유해물질 독성평가는 줄기와 잎을 대상으로 하였으며, 지하경을 이용하여 독성평가를 수행하기 위해서는 퇴적물에 유해물질을 첨가(spiking)하고, 숙성(aging)하여 평형상태(equilibrium)에 도달할 때까지 많은 시간을 소비하여야 한다, 또한 퇴적물 내에서 유해물질이 평형상태에 도달한 시료를 이용하여 지하경의 산소소모량 (oxygen consumption)을 측정하는 것은 식물의 광합성을 이용하여 유해물질의 효과를 정량화하고자 한 본 연구의 목적에 부합하지 않아 실시하지 않았다. 향후 연안에 서식하는 칠면초와 같은 염생식물 (halophytes)을 대상으로 유해물질의 독성효과를 측정하는 것은 연구를 수행하는데 있어서 몇 가지 문제점을 극복한다면 다양한 조건에서의 연구결과를 획득할 수 있을 것으로 판단되며, 식물 시료와 직접적인 접촉을 통해서 광합성을 측정하는 엽록소형광 (chlorophyll fluorescence) 방법보다는 밀폐된 공간에서 이산화탄소의 양을 측정할 수 있는 방법들을 이용하는 향후 연구를 통해서 개발되어야 할 것으로 사료된다.

6. 갈피 (seagrass)의 광양자수율 (effective quantum yield)에 대한 유해물질의 영향

갈피의 광양자수율에 대한 유해물질의 96시간 급성독성효과는 앞서 4항에서 제시한 1차 실험결과를 바탕으로 다양한 유해물질을 추가하여 실시하였다. 1차 실험결과에서 뚜렷한 영향을 보여주었던 구리 (Cu)나 유기주석화합물 (TBT)의 경우는 보다 낮은 농도구배에서 실험을 실시하였다. 갈피를 대상으로 96시간 급성독성효과를 측정한 유해물질은 제초제 3종 (paraquat dichloride, alachlor, butachlor), 살충제 1종 (endosulfan), 중금속 3종 (Cr(VI), Cu, Hg), 유기주석화합물 (TBT), 유기화합물 3종(pyrene, 2'3'-dichlorophenol, sea nine)이었다. 갈피에 대한 유해물질의 96시간 급성독성효과는 그림 3-13에서 보여주고 있다.

총 12종의 유해물질 중 가장 뚜렷한 독성효과를 보인 것은 구리 (Cu)였다. 구리 0.5 ppm에 노출된 갈피의 초기 광양자수율은 0.80 수준이었으며, 96시간째의 광양자수율은 0.124로 초기에 비하여 약 15% 수준까지 감소하였다. 제초제 중에서는 paraquat 2.45 ppm에 노출된 갈피의 광양자수율만이 유의한 저해영향을 보였고, butachlor와 alachlor에 노출된 경우에는 유의한 영향이 나타나지 않았다. 유기염소계 살충제인 endosulfan과 독

성 중금속인 수은 (Hg)이 유의한 저해영향을 보였다. 다환방향성탄화수소 (PAHs)인 pyrene 0.1 ppm과 방오도료인 sea-nine 0.01 ppm에 노출된 잘피의 광양자수율은 대조구에 비해 다소 낮아지기는 하였으나 유의한 수준은 아니었다. 하지만 산업폐수에 많은 유기오염물질인 2'3'-dichlorophenol 0.1 ppm에 노출된 잘피의 광양자수율은 대조구에 비해 10% 이상 유의하게 감소하였다.

광양자수율에 대한 유해물질의 영향은 일부 물질에 대해서만 뚜렷한 저해영향을 보였다. 이는 유해물질에 급성 노출된 잘피의 생리적 교란 정도를 광양자수율의 변화를 통해서만 파악하기는 어려움을 보여주는 결과라고 할 수 있다. 따라서 향후 잘피에 대한 유해물질의 생리적 저해 영향을 규명하기 위해서는 보다 장기적인 노출과 함께 다양한 생리적 지수에 대한 평가가 병행되는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

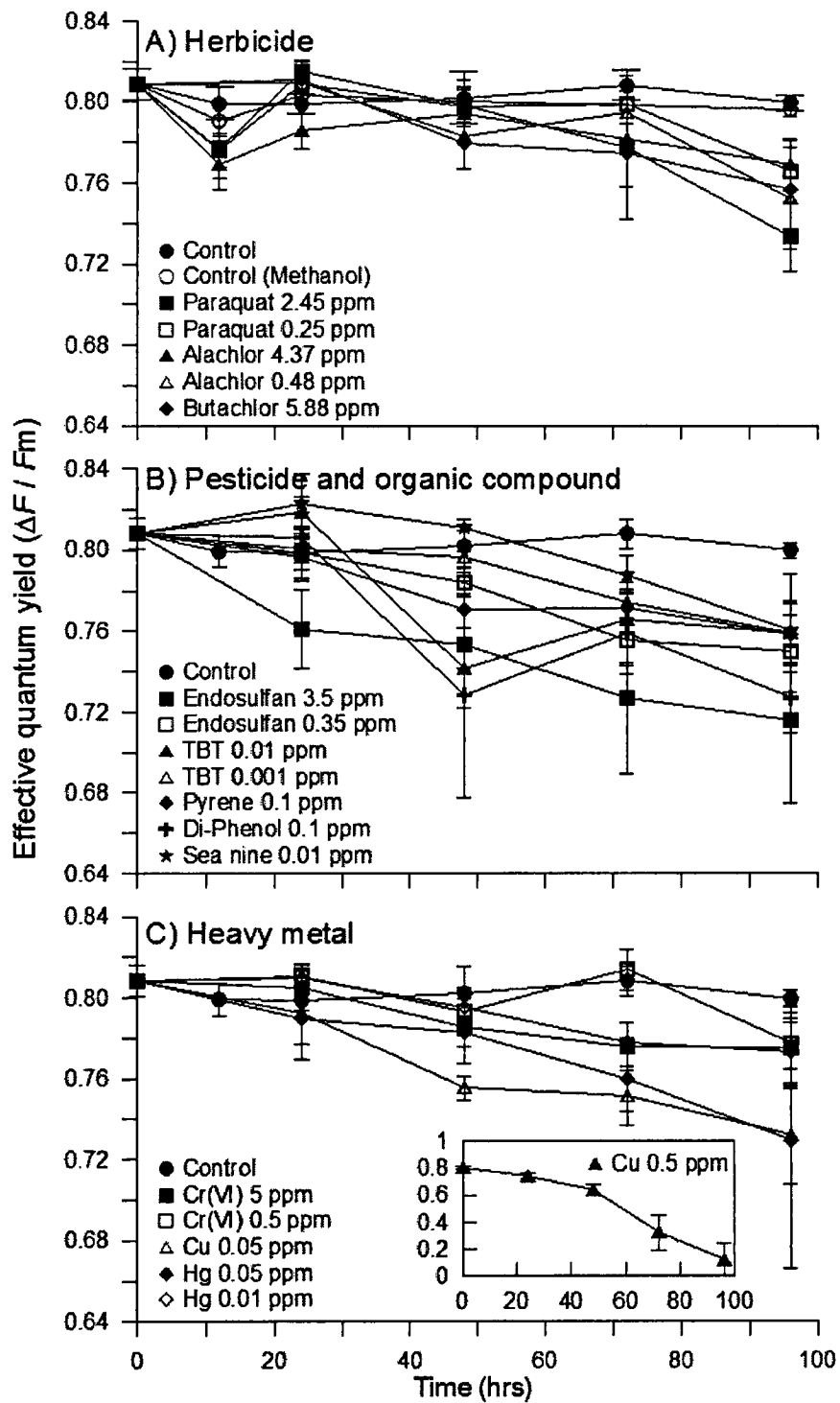


그림 3-13. 잘피 (seagrass)의 광양자수율 (effective quantum yield)에 대한 유해물질의 96 시간 급성독성효과.

표 3-10. 잘피의 광합성 양자수율 (T=96h)에 미치는 유해물질의 급성독성효과에 대한 one-way ANOVA 결과.

유해물질	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Probability
Paraquat	0.07	2	0.03	4.561	0.043
Alachlor	0.03	2	0.001	1.349	0.303
Endosulfan	0.012	2	0.006	1.908	0.194
Cr (IV)	0.001	2	0.000	0.284	0.758
Cu	1.338	2	0.669	23.524	<0.001***
Hg	0.002	2	0.001	1.119	0.361
TBT	0.003	2	0.001	0.882	0.444

표 3-11. 잘피의 광합성 양자수율 (T=96h)에 미치는 유해물질의 독성효과에 대한 paired T-test 결과.

유해물질	T value	df	Probability
Pyrene	1.879	3	0.157
Di-phenol	4.367	3	0.022*
Sea-nine	3.209	3	0.049*
Butachlor	2.220	3	0.113

잘피의 광합성 양자수율 (T=96h)에 미치는 제초제, 살충제, 중금속, 유기주석화합물, 유기화합물 등 다양한 유해물질의 독성효과에 대한 통계적 유의성을 확인하기 위해 통계 처리를 수행하였으며 (paired T-test와 one-way ANOVA), 그 결과는 표 3-10와 3-11이다. 4종의 유기화합물 단일 농도조건에서 측정된 잘피의 광합성 양자수율은 대조구와 비교하였으며 (paired T-test), Di-phenol과 Sea-nine이 대조구와 유의한 차이를 보였다 (표 3-11, $p < 0.05$). 제초제와 중금속, 유기주석화합물의 농도구배에서 측정된 잘피의 광합성 양자수율 중에서는 구리(Cu)에 대해서 측정된 광합성 양자수율만이 농도 증가에 따라 유의한 독성 효과의 차이를 보였다 (표 3-10, $p < 0.001$).

7. 단일 및 다중 유해물질에 노출된 미세편모조류의 72시간 급성독성 영향

미세편모조류 *Isocrysis galbana*에 대한 단일 유해물질의 72시간 급성독성 영향을 측정하기 위하여 *I. galbana*를 유해물질에 노출시킨 후 1, 4, 8, 27, 34, 46, 58, 72시간째에 엽록소 형광 측정법 (PAM Fluorometry)을 이용하여 엽록소 형광을 측정하였다 (그림 3-14, 3-15, 3-16). 빠른 광반응곡선 (RLCs)은 노출 초기 1시간째와 34, 72시간째에 측정하였다 (그림 3-16a와 b). 1차년도 연구에서 이용된 13종의 유해물질 중 종류별로 한 종의 유해물질을 선택하여 제초제 (Paraquat dichloride), 살충제 (Endosulfan), 중금속 (Hg), 그리고 유기화합물 (Fluoranthene)에 노출시켰다. 먼저 유해물질 노출 72시간 동안의 초기 형광값 (F_0)의 변화는 0.3과 1 ppm 농도의 살충제와 중금속에 노출된 편모조류는 초기 형광값이 지속적으로 감소하여 72시간째에는 대조구에 비하여 1% 미만으로 감소하였으며, 거의 사멸하여 초기 형광값이 매우 낮게 측정되었다 (그림 3-14). 제초제의 경우는 농도가 증가할수록 72시간째의 초기 형광값이 감소하여 측정되었으며, 72시간째의 대조구 초기형광값과 비교한다면, 65, 36, 35, 26 % 수준까지 감소하는 것을 보여주었다. 살충제의 경우는 0.03과 0.1 ppm 농도수준에서는 거의 영향이 없는 것으로 나타났으나, 그 이상의 농도 수준인 0.3과 1 ppm 농도수준에서는 유해물질의 독성영향이 급격하게 나타나는 것으로 측정되었다. 중금속인 수은의 경우에는 살충제의 경우와 유사하게 독성영향이 나타나고 있었다. 유기화합물의 경우에는 가장 낮은 농도인 0.03 ppm의 72시간째에 대조구와 비교하여 76% 수준까지 감소하였으며, 다른 농도구배에서는 7-14% 정도만의 감소를 보였다. 대조구의 초기 형광값이 시간에 따라 증가하고 있는 것은 독성실험이 진행되는 동안에도 편모조류 개체군이 성장을 통하여 증가하고 있음을 보여주고 있는 것이며, 독성실험이 정상적인 조건 하에서 진행되었음을 반증하는 것이다.

편모조류의 광양자수율 (quantum yield)의 유해물질 노출에 따른 변화는 일부 초기형광값의 변화와 일치하고 있었으며, 일부는 다른 결과를 보였다 (그림 3-15). 제초제의 경우는 72시간째에 대조구와 비교하여 가장 낮은 농도 (0.03 ppm)에 70% 수준까지 감소하는 결과를 보였고, 또한 노출 초기 24시간정도만 광양자 수율이 감소하였으며, 그 이후 다시 회복하는 양상을 보였다. 이외의 농도구배 조건에서는 대조구와 비교하여 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 살충제와 중금속은 초기형광값의 변화와 일치하는 결과를 보였으며, 유기화합물의 경우에는 유해물질에 의한 독성영향이 전혀 나타나지 않았다. 유기화합

물은 통상 지속성으로 수천종이 존재하며, 환경 내에서 생물축적, 생물독성의 특성을 보여준다 (임 등, 2003). 유기화합물류와 같은 유기오염물질들 중 유기염소계 화합물의 경우 먹이사슬을 통한 생물확대 (biomagnification)가 진행되기 때문에 상위영양단계의 생물들에게 보다 치명적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (McElroy et al. 1989). 이런 이유로 인하여 유기화합물로 인한 식물플랑크톤에 대한 독성영향이 다른 유해물질과 비교하여 뚜렷하게 나타나지 않는 이유인 것으로 판단된다. 또한 저농도 (50 ppt 미만)의 용존성 석유계탄화수소에 노출된 경우는 광합성을 촉진하는 경우도 있음이 보고되어 있다 (Clark 1993)

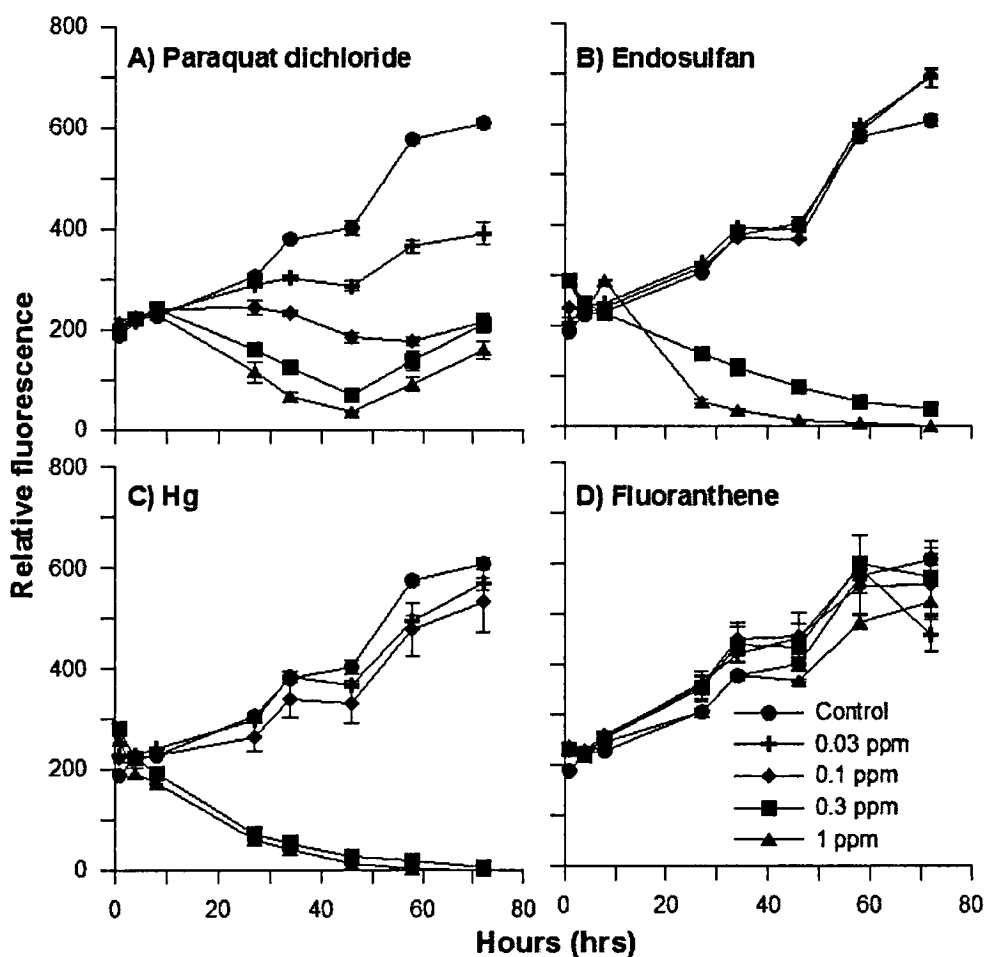


그림 3-14. 제초제 (Paraquat dichloride), 살충제 (Endosulfan), 중금속 (Hg), 그리고 유기화합물 (Fluoranthene) 단일 유해물질에 노출된 식물플랑크톤의 초기 형광값 (F_0) 변화.

편모조류의 4종의 유해물질에 대한 빠른 광반응곡선의 반응은 초기형광값 (F_0)의 변화와 유사하게 나타났다 (그림 3-16a, 3-16b). 제초제인 paraquat dichloride에 노출된 편모조류는 노출 농도가 증가하면서 광반응 곡선의 감소를 보였으며, 살충제인 endosulfan은 72시간째에 거의 사멸되어 광반응곡선의 측정이 거의 이루어지지 않았다. 제초제의 경우에는 72째의 광반응곡선은 대조구와 노출 초기 ($T=1$)에 비하여 50% 미만의 수준으로 감소하였으며, 하지만 유해물질 노출 중반 ($T=34$)까지 보다는 중반이후에 급격하게 광반응 곡선이 낮아지는 것을 보였다. 살충제의 경우는 초기형광값이나 광양자수율 자료와 유사하게 낮은 두 가지 농도구배에서는 독성영향이 작게 나타났으며, 높은 두 가지 농도 구배에서는 독성영향이 급격하게 나타나는 것으로 보인다.

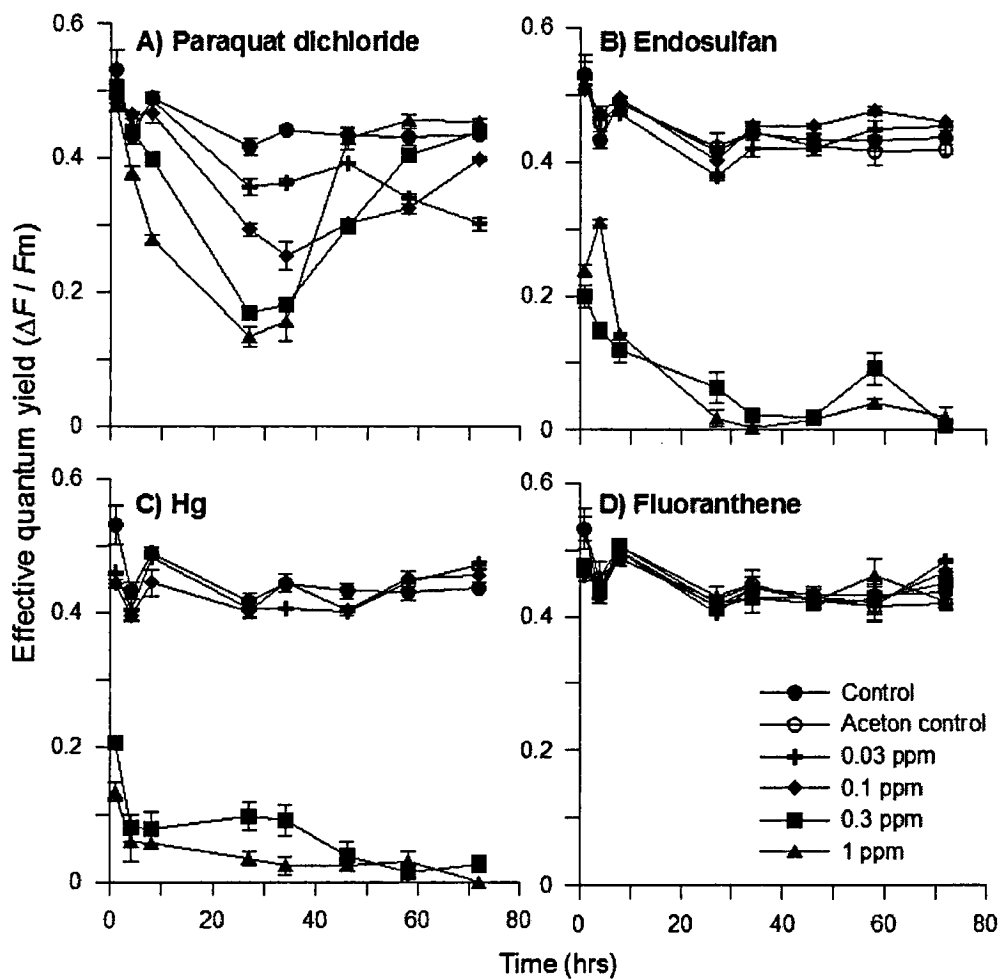


그림 3-15. 제초제 (Paraquat dichloride), 살충제 (Endosulfan), 중금속 (Hg), 그리고 유기화합물 (Fluoranthene)과 같은 단일 유해물질에 노출된 식물플랑크톤의 광양자수율 (quantum yield) 변화.

일반적으로 광반응곡선의 초기기울기는 유해물질에 대한 노출 시간이 길어질수록 광에 대한 초기반응 속도도 함께 감소한다 (Ralph and Burchett 1998). 중금속인 수은 (Hg)에 노출된 편모조류에서 측정된 빠른 광반응곡선도 또한 살충제에서와 유사한 독성영향을 나타내었다. 하위 2농도 구배에서는 72시간째에 대조구와 비교하여 약 30%의 감소를 보인 반면, 상위 두 가지 농도 구배에서는 34시간째와 72째에 급격한 감소를 보여 거의 사멸되고 있음을 보였다.

유기화합물인 Fluoranthene에 노출된 편모조류는 초기형광값이나 광양자수율의 결과와는 달리 34시간째에 측정된 광반응곡선이 대조구 또는 노출초기 (T=1)에 측정된 광반응곡선에 비하여 45% 수준까지 감소하였다가 72시간째에 다시 회복하는 것으로 측정되었다. 이는 유기화합물이 편모조류에 대하여 뚜렷한 독성영향을 갖지 않는 것으로 보인다 (그림 3-16b).

표 3-12. 미세편모조류의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 유해물질의 급성독성효과에 대한 one-way ANOVA 결과.

유해물질	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Probability
Paraquat	0.046	4	0.011	126.571	<0.001***
Endosulfan	0.687	4	0.172	834.526	<0.001***
Hg	0.705	4	0.176	1011.684	<0.001***
Fluoranthene	0.007	4	0.002	8.610	0.003**

미세편모조류의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 다양한 유해물질의 독성효과에 대한 통계적 유의성을 확인하기 위해 통계처리를 수행하였으며 (one-way ANOVA), 그 결과는 표 3-12이다. 4종의 유해물질 농도구배에서 측정된 미세편모조류의 광합성 양자수율은 제초제 (paraquat), 살충제 (endosulfan), 중금속 (Hg)이 농도 증가에 따라 유의한 독성효과를 보였다 (표 3-12, $p < 0.001$). 유기화합물 (fluoranthene) 또한 농도 증가에 따른 유의한 독성효과를 보였다 ($p < 0.01$).

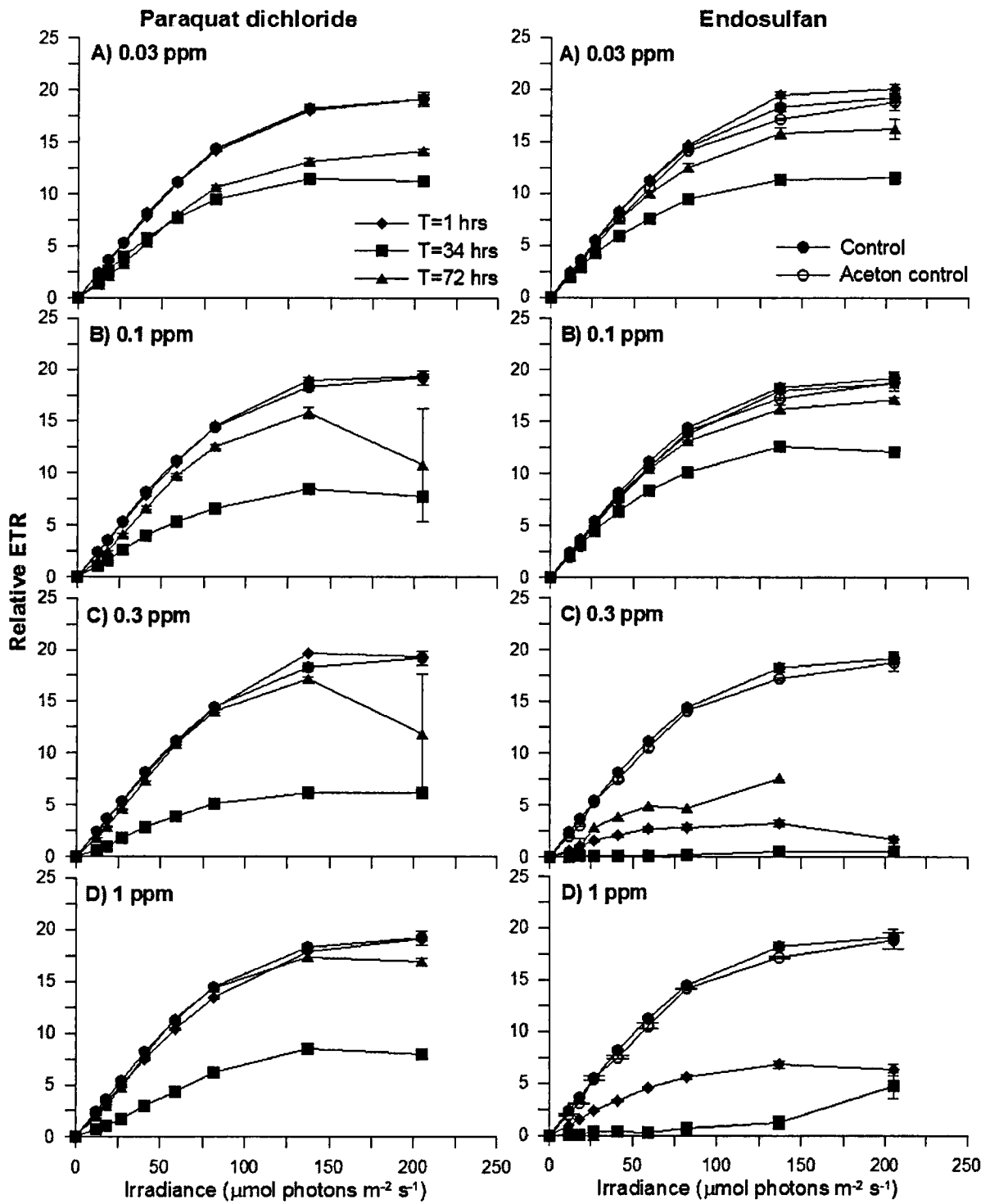


그림 3-16a. 제초제 (Paraquat dichloride), 살충제 (Endosulfan)와 같은 단일 유해물질에 노출된 식물플랑크톤의 빠른 광반응곡선 (RLCs) 변화.

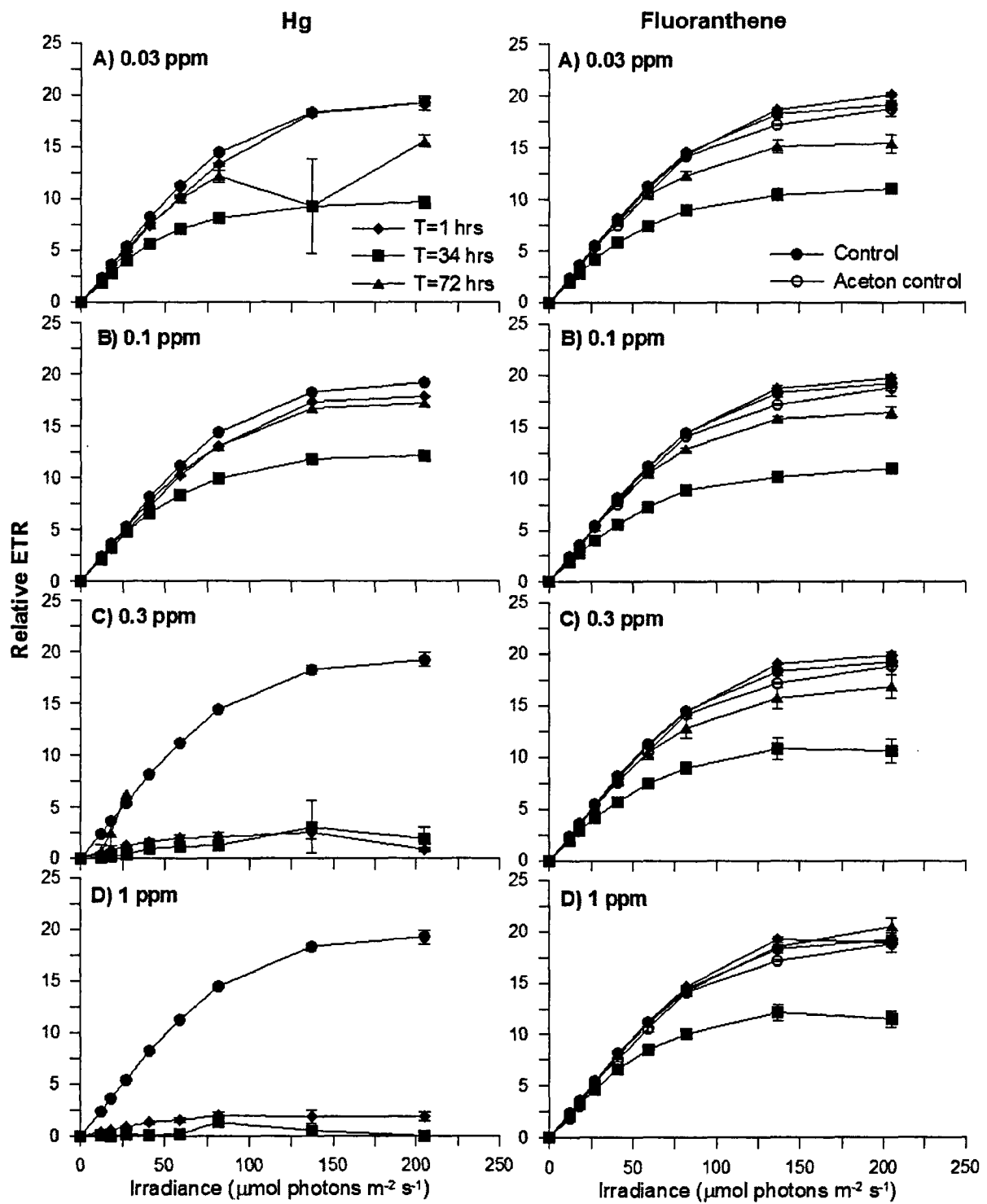


그림 3-16b. 중금속 (Hg), 유기화합물 (Fluoranthene)와 같은 단일 유해물질에 노출된 식물플랑크톤의 빠른 광반응곡선 (RLCs) 변화.

다중 유해물질에 편모조류를 72시간동안 노출하여 초기형광값 (F_0), 광양자수율 (quantum yield, $\Delta F/F_m$), 빠른 광반응곡선의 변화를 2, 8, 12, 24, 36, 48, 72시간째에 측정하였다 (그림 3-17, 3-18, 3-19a, 3-19b). 본 연구를 통하여 다중물질 독성시험 (multi-chemical toxicity test)을 실험한 2조합 3종류의 유해물질 중 편모조류의 광합성에 가장 심각하게 영향을 미치는 다중 유해물질 조합은 제초제 + 중금속인 것으로 나타났다.

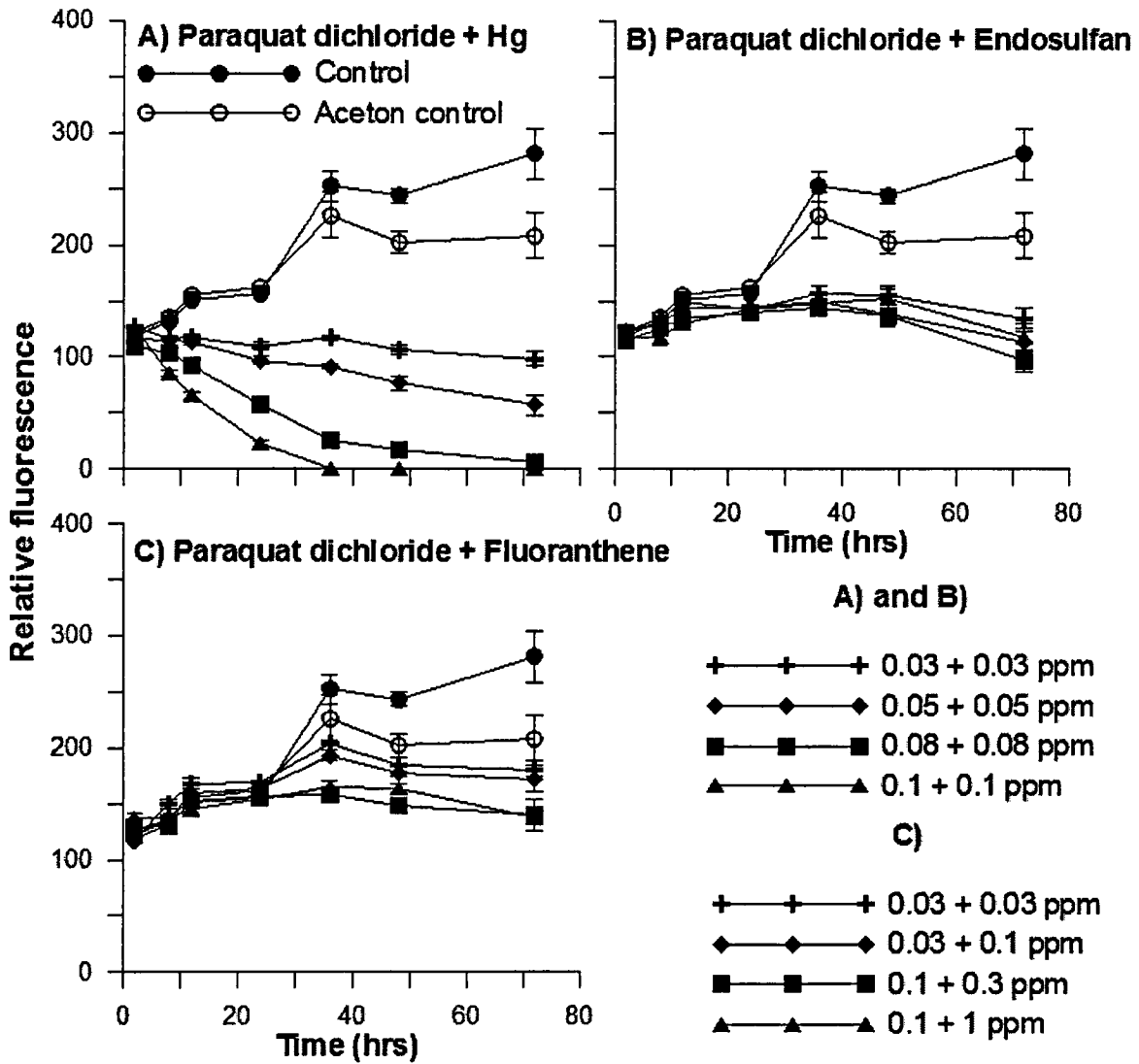


그림 3-17. 다중 유해물질 조합인 제초제(Paraquat dichloride) + 중금속(Hg), 제초제 + 살충제(Endosulfan), 제초제 + 유기화합물(Fluoranthene)에 노출된 식물플랑크톤(편모조류)의 초기 형광값(F_0) 변화.

제초제와 중금속 조합에 노출된 편모조류의 초기형광값은 노출시간이 지남에 따라 감소하였으며, 또한 노출농도가 증가함에 따라 급격하게 감소하였다. 다른 다중 유해물질 조합에서는 노출시간이 지남에 따라 초기형광값이 감소하지는 않았지만, 대조구가 시간에 지남에 따라 증가한 것에 비하여 더 이상 증가하지 않는 양상을 보임으로서 편모조류 개체군의 성장이 정지되었음을 보였다 (그림 3-17B와 3-17C). 이 결과로 볼 때 유해물질에 다중으로 노출되었을 때 조합에 따라 복합적인 효과를 보여줄 수 있음을 보여주었다. 제초제와 중금속 조합의 경우 상승작용 (synergism)으로 인하여 단일 유해물질에 노출되었을 때보다 더 빠른 속도로 초기형광 값이 감소하였다.

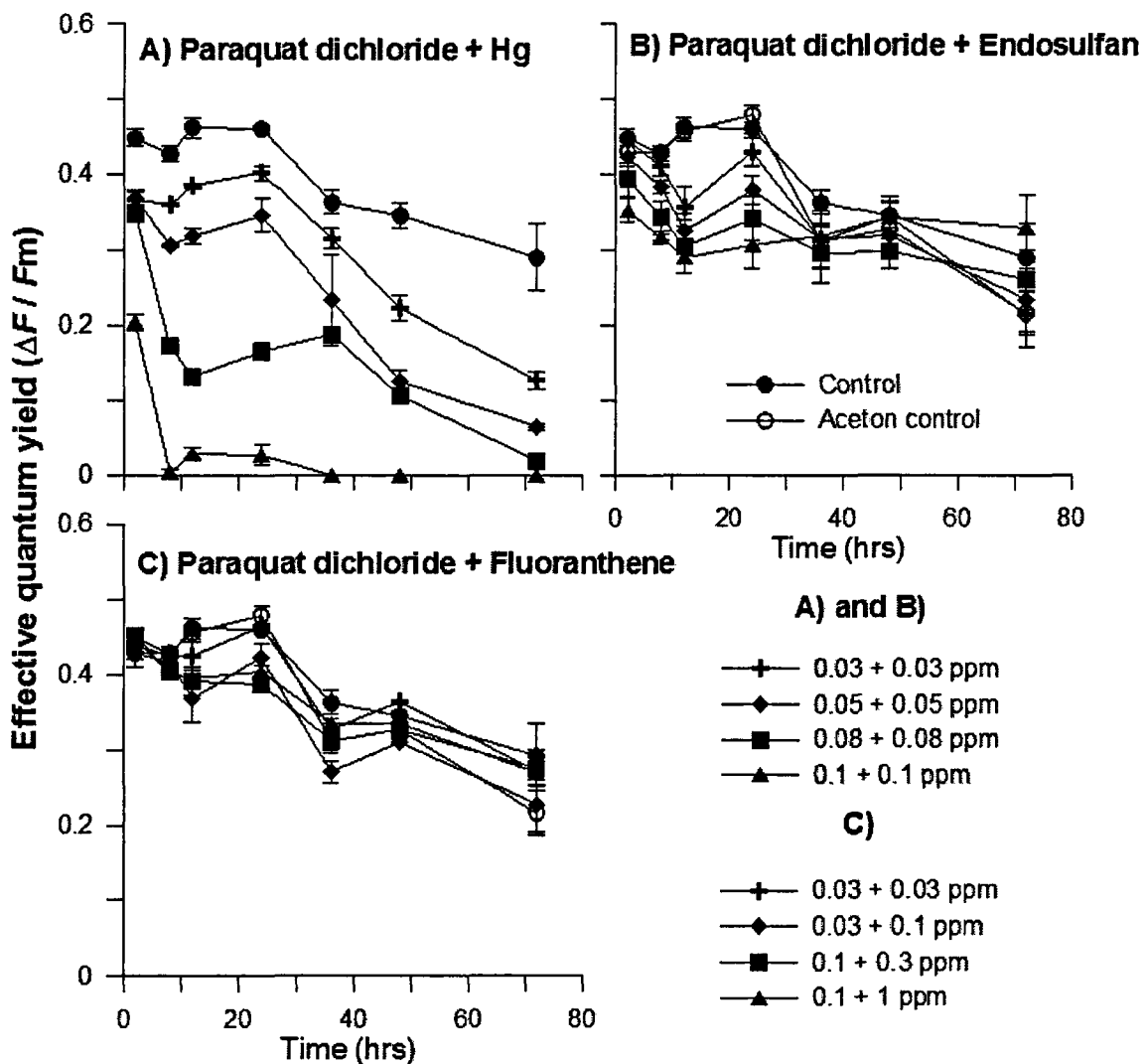


그림 3-18. 다중 유해물질 조합인 제초제(Paraquat dichloride) + 중금속(Hg), 제초제 + 살충제(Endosulfan), 제초제 + 유기화합물(Fluoranthene)에 노출된 식물플랑크톤(편

모조류)의 광양자수율($\Delta F/F_m$) 변화.

표 3-13. 미세편모조류의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 다중 유해물질의 급성독성효과에 대한 two-way ANOVA 결과.

Source	SS	df	MS	F	Probability
Paraquat	0.190	4	0.048	23.435	<0.001***
Hg	0.000	0	-	-	-
Paraquat × Hg	0.000	0	-	-	-
Error	0.026	13	0.002		
Paraquat	0.023	4	0.006	1.099	0.398
Endosulfan	0.000	0	-	-	-
Paraquat × Endosulfan	0.000	0	-	-	-
Error	0.067	13	0.005		
Paraquat	0.003	2	0.002	0.615	0.560
Fluoranthene	0.003	2	0.002	0.572	0.582
Paraquat × Fluoranthene	0.000	0	-	-	-
Error	0.028	10	0.003		

미세편모조류의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 다중 유해물질에 의한 복합 급성 독성효과에 대한 통계적 유의성을 확인하기 위해 통계처리를 수행하였으며 (two-way ANOVA), 그 결과는 표 3-13이다. 제초제 (paraquat)와 중금속 (Hg), 제초제와 살충제 (endosulfan), 그리고 제초제와 유기화합물 (fluoranthene)과 같이 다중 유해물질의 농도구배에서 측정된 미세편모조류의 광합성 양자수율은 제초제 (paraquat)와 결합된 수은 처리구에서 제초제의 농도 증가에 따른 독성 효과만이 유의한 차이를 보였으며 (표 3-13, $p < 0.001$), 그 외 나머지 단일 유해물질 또는 다중 유해물질에 의한 복합 급성독성은 농도구배에 따라 유의한 차이를 보이지는 않았다 (표 3-13).

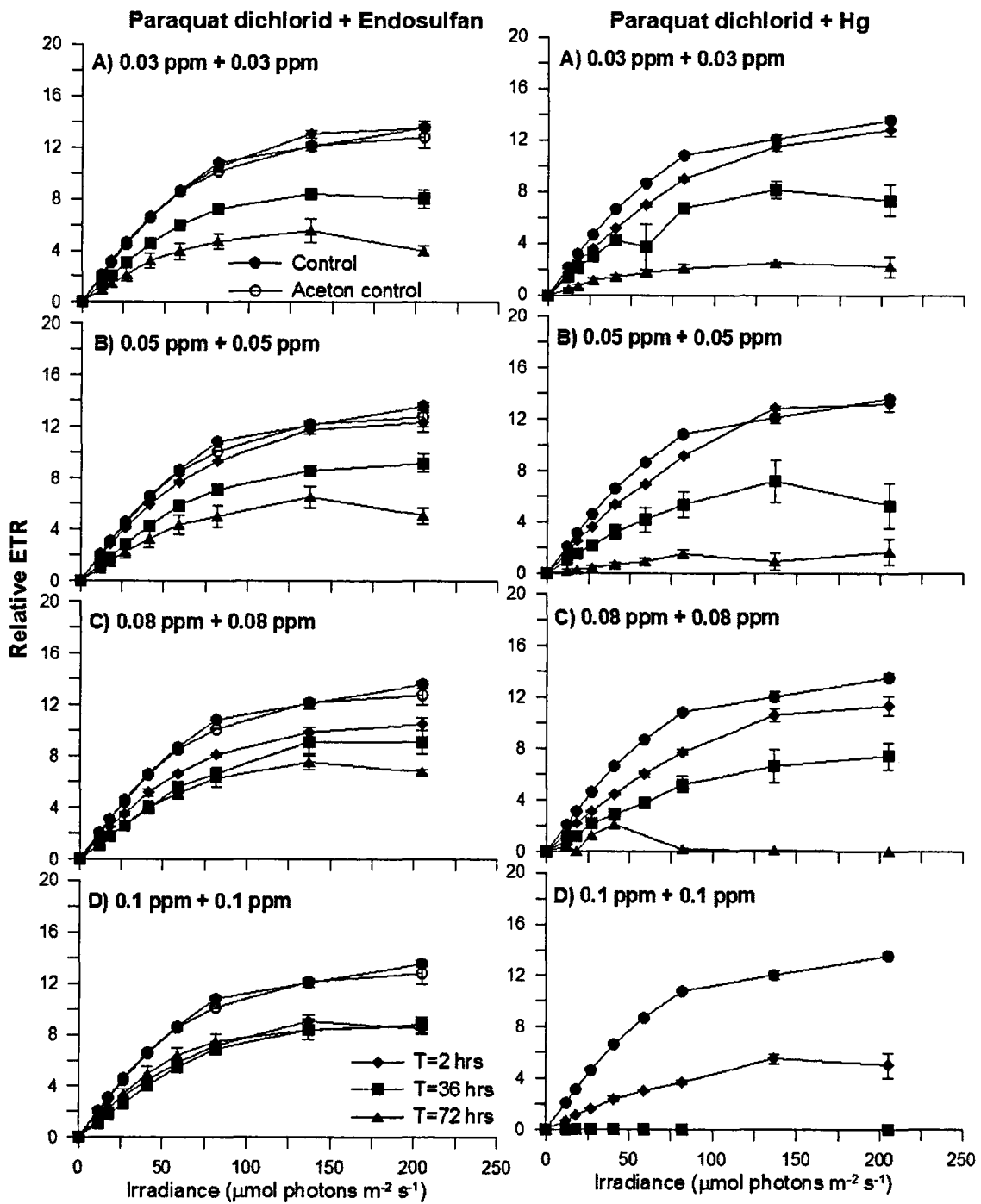


그림 3-19a. 다중 유해물질 조합인 제초제 (Paraquat dichloride) + 중금속 (Hg), 제초제 + 살충제 (Endosulfan), 제초제 + 유기화합물 (Fluoranthene)에 노출된 식물플랑크톤 (편모조류)의 빠른 광반응곡선 (RLCs)의 변화.

다중 유해물질에 노출된 편모조류의 광양자수율의 변화도 초기형광값의 변화와 거의 일치하고 있으며, 제초제와 중금속 조합의 경우 최고 농도구배인 0.1 ppm + 0.1 ppm의 경우 초기 2시간째에 0.2 수준까지 감소하였으며, 8시간째에는 거의 사멸되어 광양자수율이 0에 가까운 값을 보였다. 다른 농도구배에서는 36시간째까지 약간 회복하는 양상을 보였으나 이후 광양자수율은 급격하게 감소하였다 (그림 3-17A). 제초제와 살충제, 제초제와 유기화합물의 조합에서는 대조구와 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

다중 유해물질 조합에 노출된 편모조류의 빠른 광반응곡선은 2, 36, 72시간째에 측정되었다 (그림 3-19a, 3-19b). 제초제와 중금속 조합의 유해물질에 노출된 편모조류는 0.08 ppm + 0.08 ppm 농도조건과 그 이상의 농도에서는 이미 2시간째부터 광반응곡선의 감소를 보였다. 최대 전자전달율을 기준으로 약 10% 이상의 감소를 보였으며, 36시간째에는 40% 수준까지 감소하였으며, 72시간째에는 완전히 사멸하여 광반응곡선이 측정되지 않았다. 제초제와 살충제의 조합에서는 농도에 따른 독성영향의 정도를 구분하기 어려웠으나 72시간째에는 대조구에 비하여 최고 30% 수준까지 감소하는 경향을 보였다 (그림 3-19a).

제초제와 유기화합물의 조합에 노출된 편모조류는 제초제와 살충제 조합에 노출된 경우와 유사한 결과를 보였다. 이 경우에도 노출중간(T=36)에는 대조구와 비교하여 뚜렷한 감소를 보이지 않았으나 모든 농도구배에서 72시간째에는 뚜렷한 감소를 보였다 (그림 3-19b).

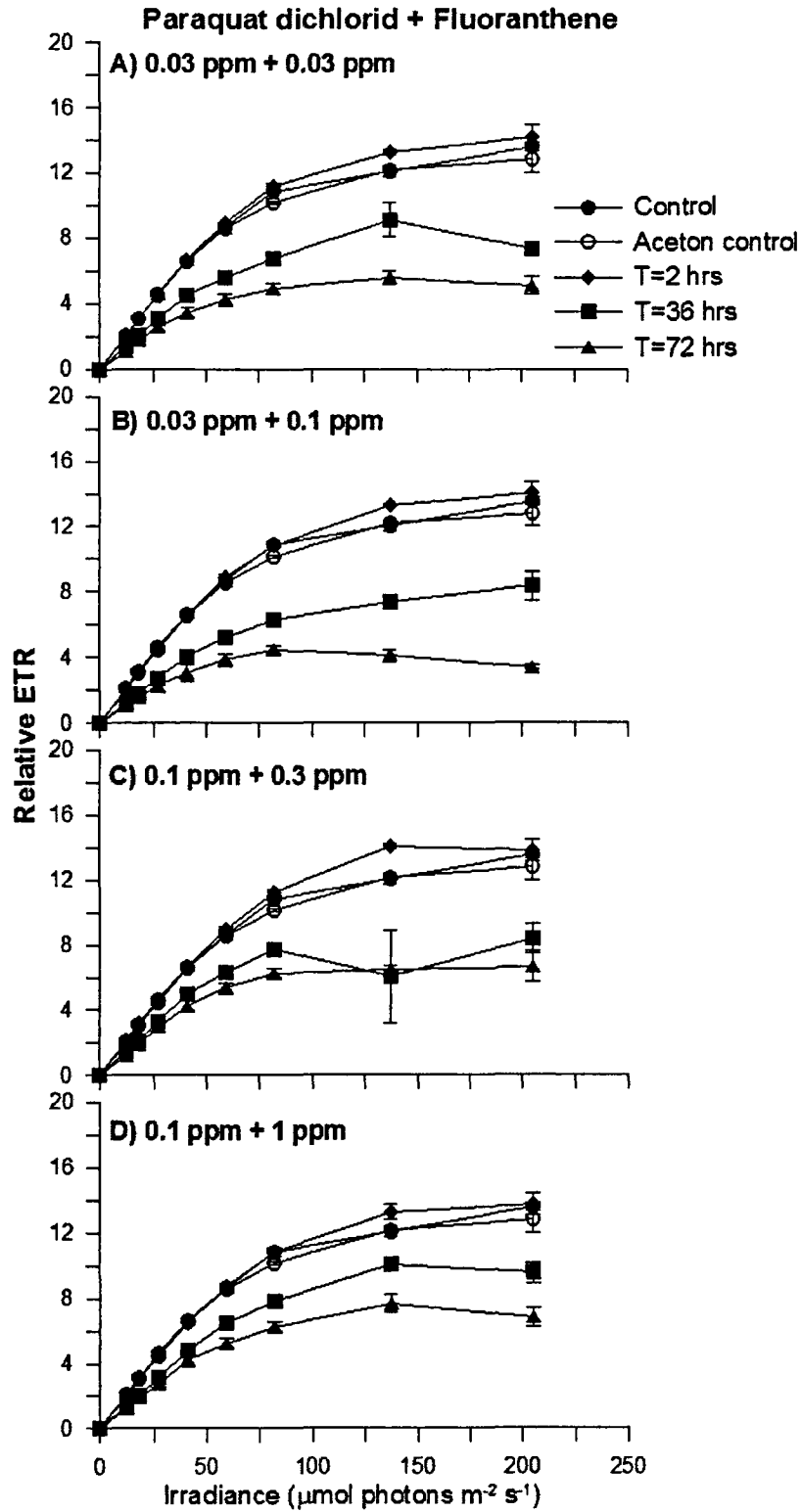


그림 3-19b. 다중 유해물질 조합인 제초제(Paraquat dichloride) + 중금속(Hg), 제초제 + 살충제(Endosulfan), 제초제 + 유기화합물(Fluoranthene)에 노출된 식물플랑크톤(편모조류)의 빠른 광반응곡선(RLCs)의 변화.

8. 다중 유해물질에 노출된 갈파래와 잘피의 72시간 급성독성영향

갈파래와 잘피에 대하여 다중 유해물질 독성영향을 평가하기 위하여 72시간 다중물질 독성시험 (multi-chemical toxicity test)을 수행하였다. 유해물질의 2조합인 제초제 (Paraquat dichloride) + 살충제 (Endosulfan), 제초제 + 중금속 (Hg), 제초제 + 유기화합물 (Fluoranthene)에 갈파래와 잘피를 노출시킨 후 0, 6, 12, 24, 36, 48, 72시간째에 광량자수율($\Delta F/F_m$)을 측정하였다. 빠른 광반응곡선 (RLCs)은 갈파래의 경우는 6, 36, 72시간째에 측정하였으며, 잘피는 72시간째에만 측정하였다 (그림 3-20).

다중 유해물질에 노출된 갈파래 광량자수율의 변화는 3가지 조합 모두 유사한 유형을 보였으나, 특히 제초제와 중금속의 조합된 처리구에서 72시간째에 대조구에 비하여 57%까지 광량자 수율이 감소하였다 (그림 3-20A). 제초제 + 살충제에 노출된 갈파래의 경우는 최대 75% 수준까지 감소하였으나 0.08 ppm + 0.08 ppm 농도 수준이었다. 최대 0.1 ppm + 0.1 ppm 농도 수준에서는 약 80% 수준까지 감소하였다 (그림 3-20B). 다중 유해물질에 노출된 갈파래의 광량자수율은 노출시간이 경과함에 따라 전체적으로 감소하는 경향은 3가지 조합 모두에서 일관되게 나타났다. 하지만 제초제 + 중금속 조합의 경우는 다른 경우에 비하여 노출시간에 따른 광량자수율의 변동이 심하게 나타났다. 제초제 + 유기화합물의 경우에는 가장 낮은 농도조건과 0.08 ppm 농도수준에서 71% 수준까지 감소하였으며, 그 외의 경우에는 81%와 76% 수준까지 감소하였다. 하지만 대체로 노출시간이 경과함에 따라 지속적으로 광량자수율이 감소하였다. 다중 유해물질에 의한 광합성 저해의 정도는 제초제 + 중금속 > 제초제 + 유기화합물 > 제초제 + 살충제 순으로 독성영향이 감소하였다. 갈파래의 경우는 제초제와 중금속이 결합된 다중 유해물질에 노출되는 경우 유해물질 독성의 상승효과가 있는 것으로 보인다. 일부 경우에 노출시간이 계속됨에 따라 광량자수율의 증가와 감소를 반복하는 경향은 72시간 급성독성 실험동안 실험 조건 상 명암주기가 반복적으로 주어짐으로 인해 빛이 없는 암상태(dark condition)에서는 유해물질의 독성효과가 분명하고 뚜렷하게 나타나는 반면, 빛이 주어지는 명상태(light condition) 하에서는 갈파래의 광합성으로 인해 약간의 양자수율 회복이 측정됨으로 인해 양자수율의 증가와 감소에 따른 변동(fluctuation)이 관찰되었던 것으로 판단된다.

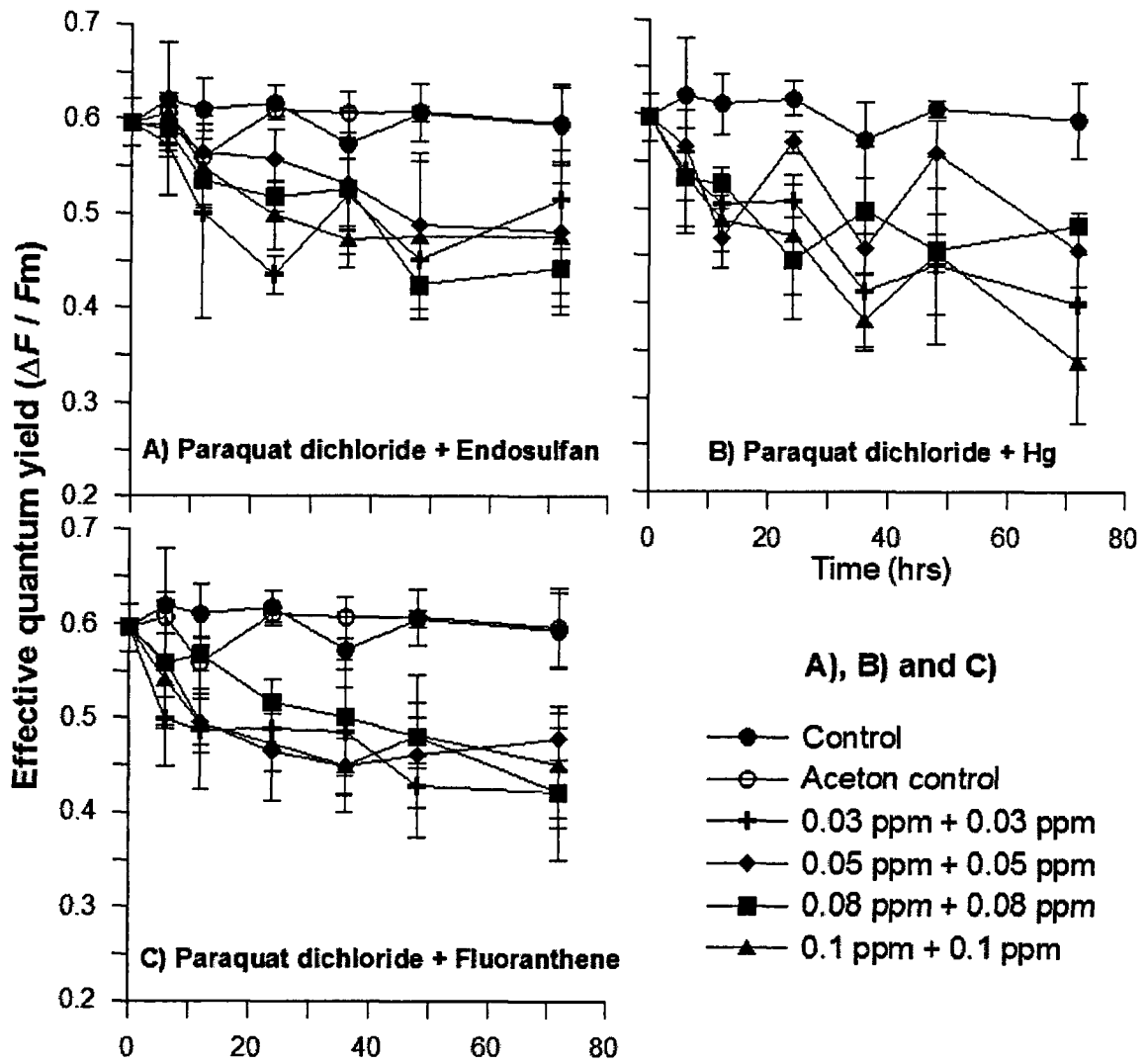


그림 3-20. 다중 유해물질 조합인 제초제(Paraquat dichloride) + 중금속(Hg), 제초제 + 살충제(Endosulfan), 제초제 + 유기화합물(Fluoranthene)에 노출된 갈파래의 광양자수율($\Delta F/F_m$) 변화.

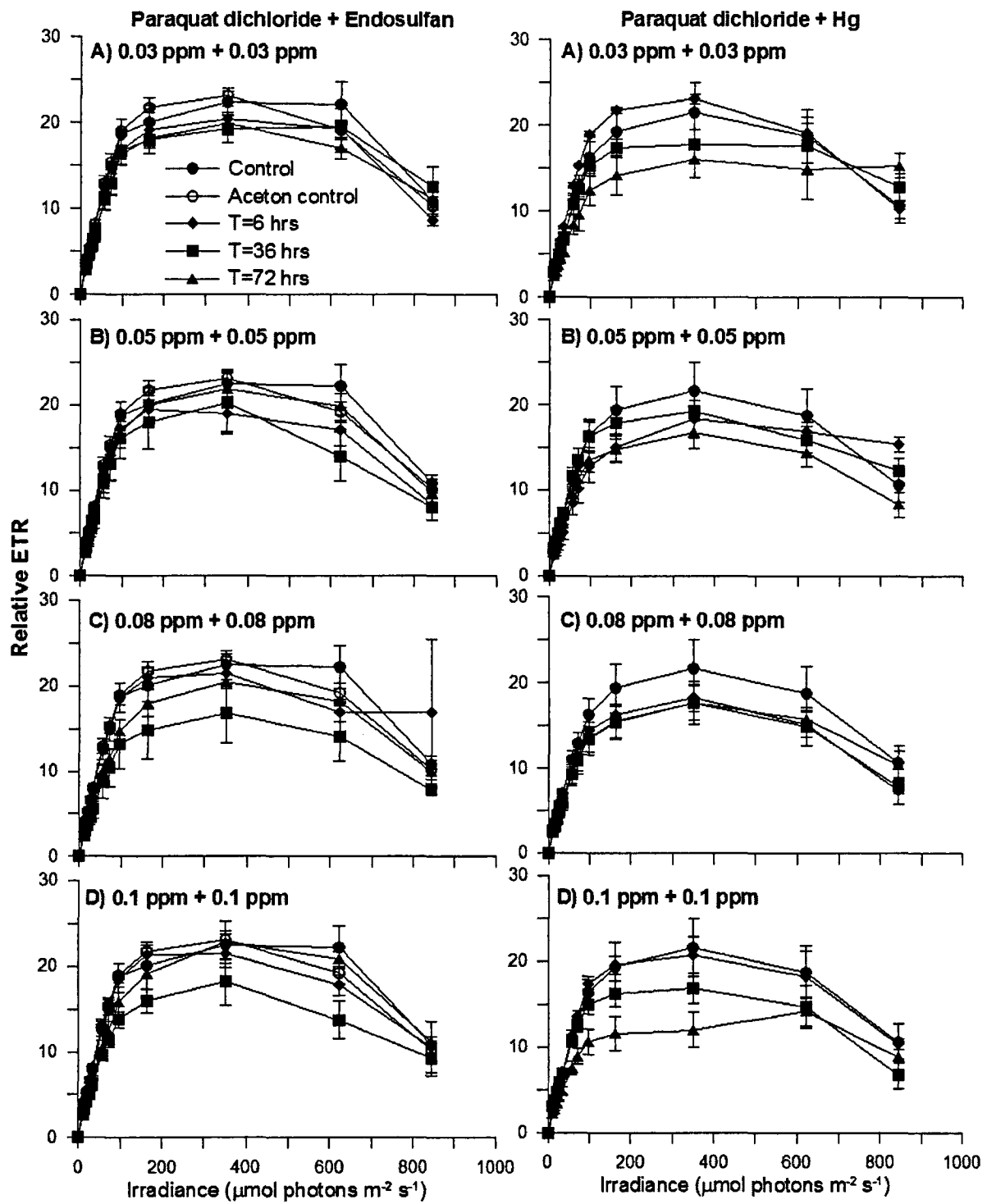


그림 3-21a. 다중 유해물질 조합인 제초제 (Paraquat dichloride) + 중금속 (Hg), 제초제 + 살충제 (Endosulfan)에 노출된 갈파래의 빠른 광반응곡선 (RLCs)의 변화.

다중 유해물질에 노출된 갈파래의 광반응곡선은 제초제 + 살충제의 경우 0.08 ppm + 0.08 ppm 농도수준에서 72시간째에 측정된 곡선은 대조구에 비해 가장 많이 감소하였으며, 0.1 ppm + 0.1 ppm 농도수준은 이보다는 높게 나타났다 (그림 3-21a, 왼쪽). 대조구에 비해 유해물질의 조합에 노출된 갈파래는 대체로 36시간째까지는 광반응곡선의 감소는 뚜렷하지 않았으나, 고농도 조건에서는 72시간째에는 뚜렷한 감소를 보였다 (그림 3-21b, 오른쪽). 제초제와 중금속 조합의 경우 최대 농도조건인 0.1 ppm + 0.1 ppm의 경우에 가장 많은 감소를 보였다. 최대 전자전달율을 기준으로 약 50% 수준까지 감소하였다. 그러나 농도가 증가함에 따라 광반응곡선이 감소하지는 않았다. 제초제와 유기화합물의 조합에서는 36시간째에 가장 많이 감소하였으며, 72시간째에는 다시 회복하는 양상을 보임으로서 유해물질의 조합에 의한 상승효과는 없는 것으로 보인다. 대체로 6, 36, 72시간째 모두 대조구와 아세톤 대조구(acetone control)에 비해 뚜렷한 감소는 분명하였다.

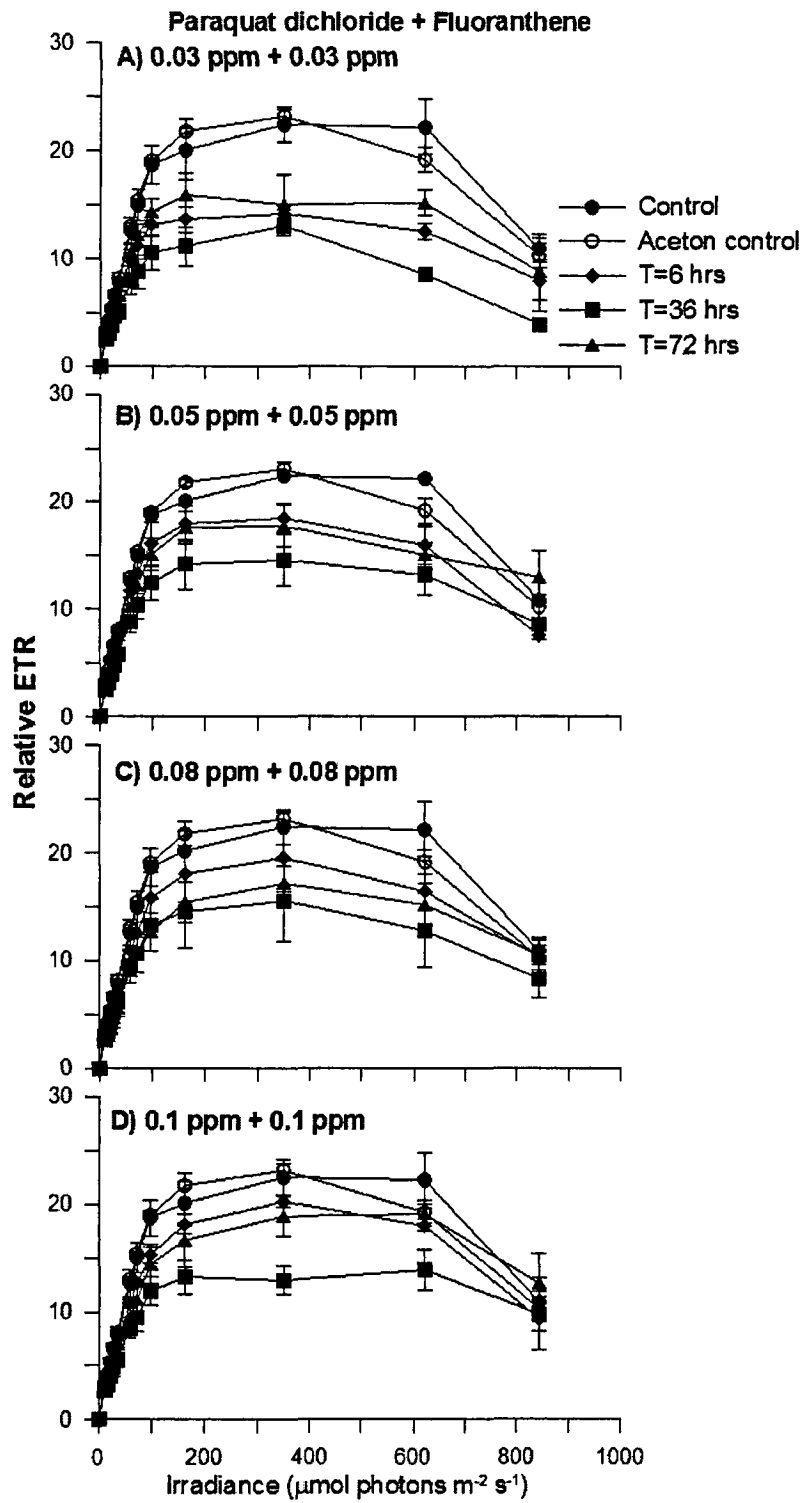


그림 3-21b. 다중 유해물질 조합인 제초제 + 유기화합물 (Fluoranthene)에 노출된 갈파래의 빠른 광반응곡선(RLCs)의 변화.

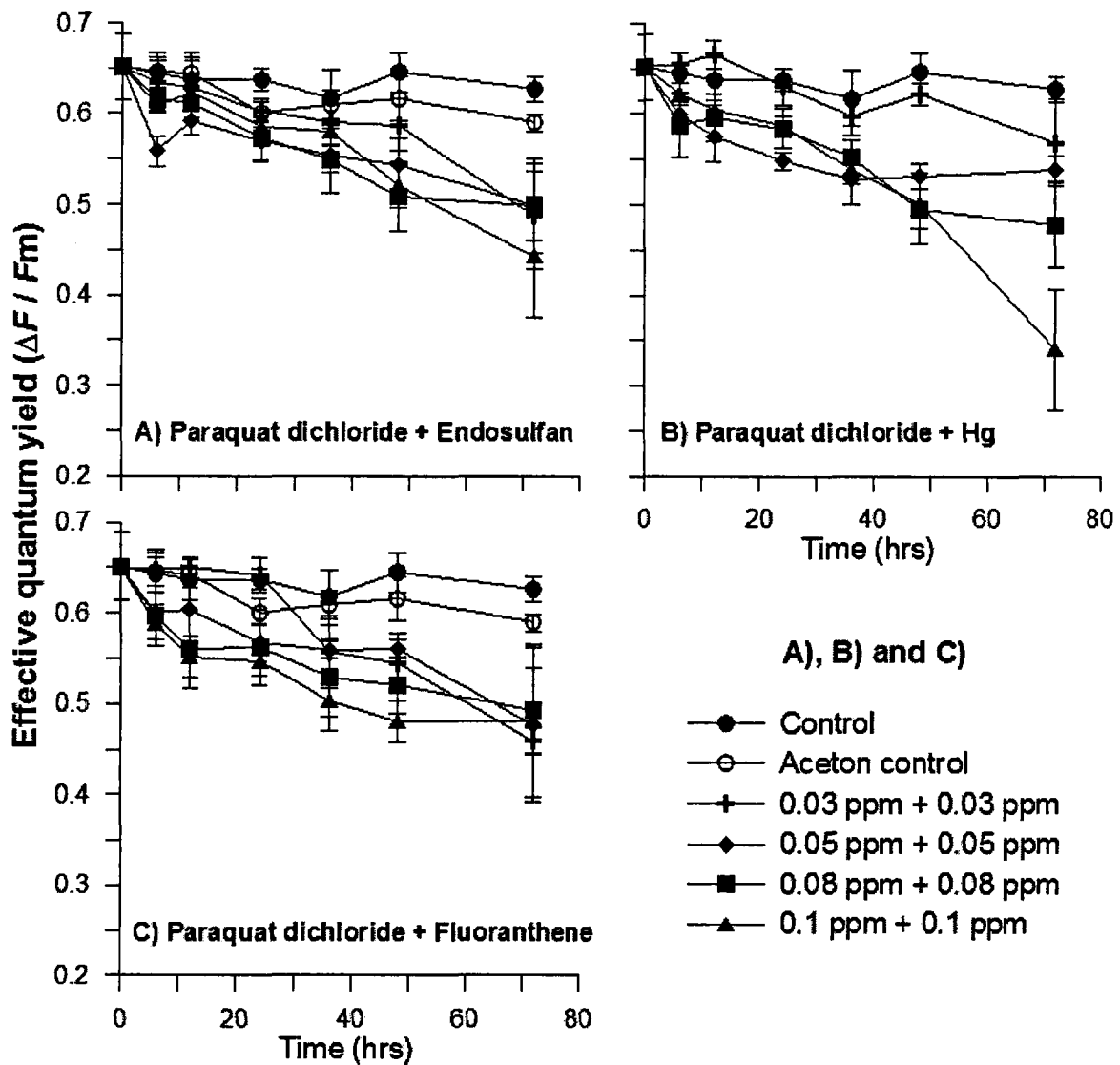


그림 3-22. 다중 유해물질 조합인 제초제 (Paraquat dichloride) + 중금속 (Hg), 제초제 + 살충제 (Endosulfan), 제초제 + 유기화합물 (Fluoranthene)에 노출된 잘피의 광양자수율 ($\Delta F/Fm$) 변화.

다중 유해물질에 노출된 잘피의 광양자수율 또한 0, 6, 12, 24, 36, 48, 72시간째에 측정하였다 (그림 3-22). 제초제와 중금속 조합의 최고 농도수준인 0.1 ppm + 0.1 ppm에서 가장 많이 감소하여 54% 수준까지 감소하였다. 제초제와 살충제 조합에서는 0.03 ppm 농도수준에서 0.1 ppm 농도수준으로 가면서 78%, 80%, 79.5%, 71% 수준까지 감소하였다. 대체로 다중 유해물질의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향은 보였다. 제초제와 중금

속 조합에서는 유해물질의 농도가 증가함에 따라 91%, 86%, 76%, 54%까지 뚜렷이 감소하는 경향을 보였다. 제초제와 유기화합물의 조합에서는 모든 농도수준에서 72시간째에 대조구와 비교하여 75% 수준까지 분명한 감소를 보였지만 농도구배 간에 차이는 없는 것으로 나타났다.

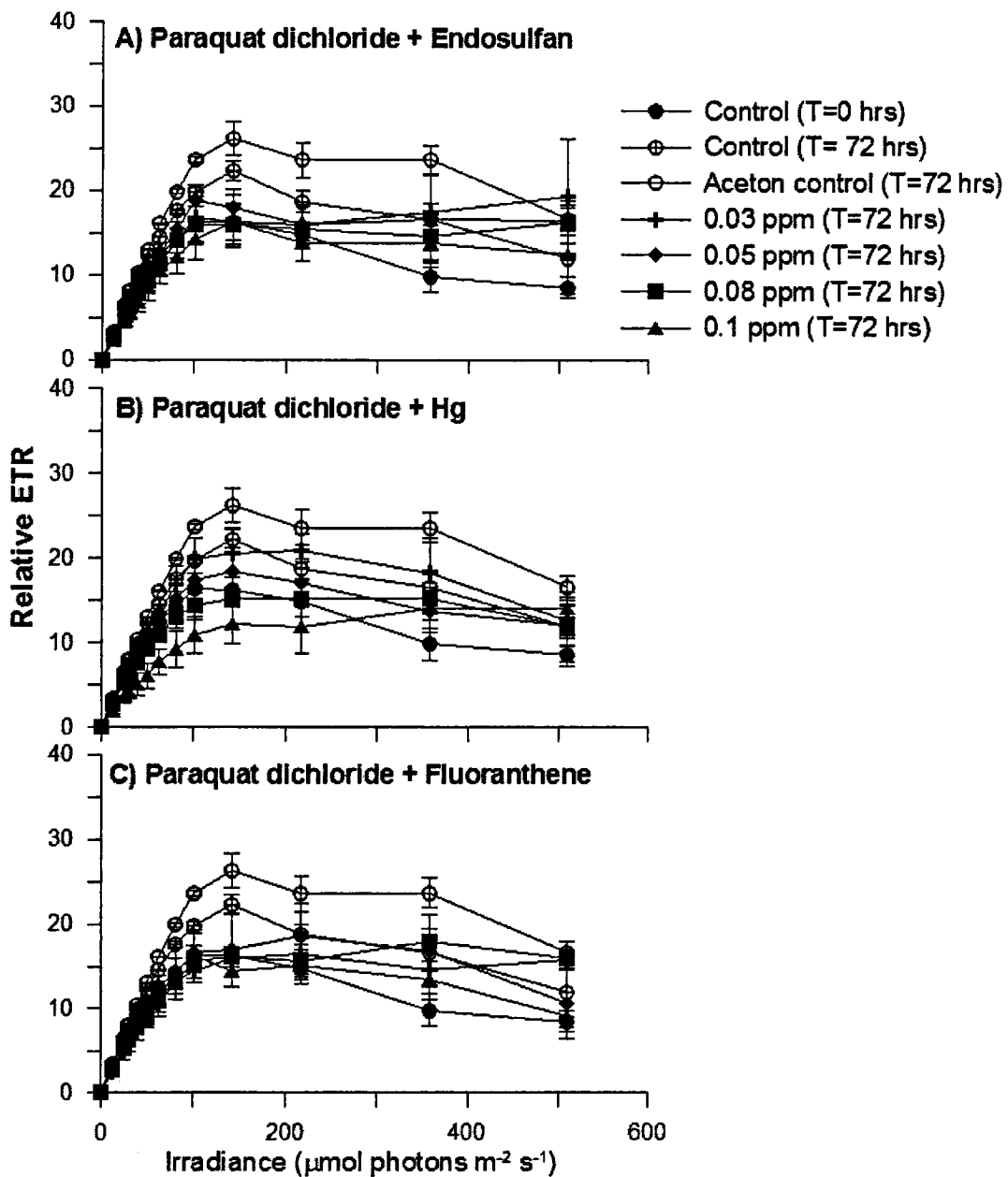


그림 3-23. 다중 유해물질 조합인 제초제 (Paraquat dichloride) + 중금속 (Hg), 제초제 + 살충제 (Endosulfan), 제초제 + 유기화합물 (Fluoranthene)에 노출된 잘피의 빠른 광반응곡선(RLCs)의 변화.

다중 유해물질에 노출된 잘피의 빠른 광반응곡선은 72시간째에만 측정되었다 (그림 3-23). 잘피의 광반응곡선의 결과 또한 광량자수율의 변화와 대체로 일치하였다. 제초제와 중금속 조합에서는 농도가 증가함에 따라 광반응곡선이 감소하였으나, 제초제와 살충제, 제초제와 유기화합물 조합에서는 농도가 증가함에 따라 뚜렷한 감소는 보이지 않았다. 하지만 유해물질에 노출된 처리구는 대조구에 비하여 농도에 관계없이 뚜렷이 감소하였으며, 대조구의 경우는 노출초기 (T=0)와 72시간째에 모두 측정하였으나 72시간째의 광반응곡선이 노출초기보다 분명히 증가하였다.

9. 환경요인 중 온도변화에 따른 유해물질의 갈파래와 잘피에 대한 72시간 급성독성시험

갈파래의 광합성에 대한 유해물질과 온도의 72시간 독성효과를 측정하였다. 광량자수율 ($\Delta F/Fm$)의 경우, 1, 4, 8, 13, 25, 36, 48, 72시간째에 측정하였으며 (그림 3-24), 빠른 광반응곡선 (RLCs)은 노출초기 (T=1)와 72시간째에 측정하여 대조구와 비교하였다 (그림 3-25).

갈파래를 노출시킨 유해물질의 농도는 제초제 (Paraquat dichloride)의 경우 0.1 ppm, 살충제 (Endosulfan) 0.1 ppm, 중금속 (Hg) 0.1 ppm, 유기화합물 (Fluoranthene) 0.25 ppm이었으며, 노출시간에 따라 광량자수율의 뚜렷한 감소를 보이는 온도조건은 30°C 처리구였다 (그림 3-24C). 유해물질과 온도의 복합효과에서 중금속 수은(Hg)의 경우는 분명한 상승효과가 있었으며, 10°C와 20°C 처리구에서는 비슷한 효과를 보이는 것으로 나타났다. 72시간 노출시험에서 온도의 효과는 대체로 30°C > 20°C > 10°C의 순서로 독성효과가 강해지는 것으로 보이며, 30°C 처리구의 경우 온도효과가 좀 더 크게 나타나는 것으로 보인다. 10°C 처리구에서 수은의 경우 72시간째에 대조구에 비하여 41% 수준까지 감소하였으며, 20°C에서는 39%, 30°C에서는 4% 수준까지 감소하였다.

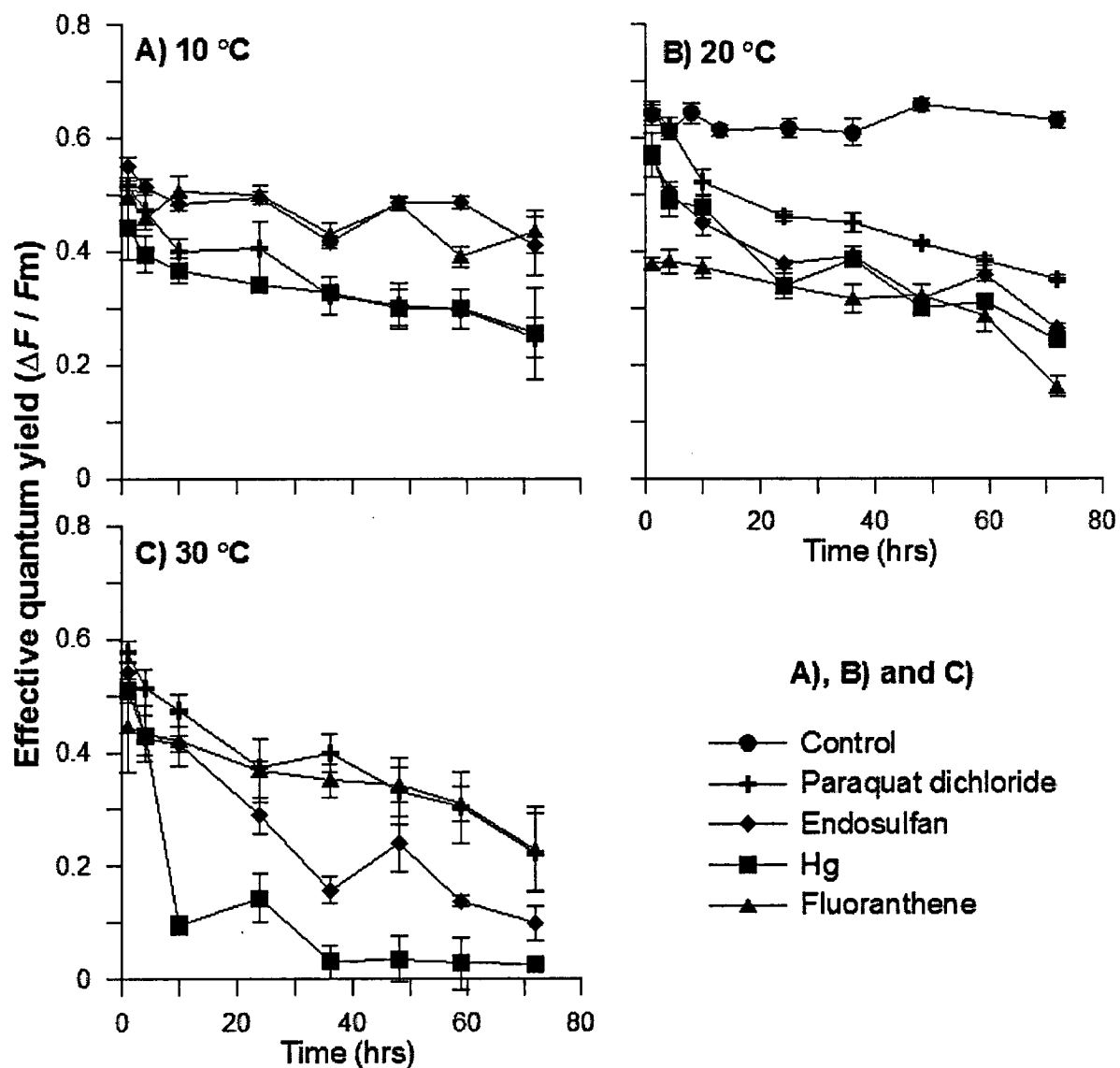


그림 3-24. 유해물질에 노출된 갈파래의 온도변화에 따른 광양자수율 ($\Delta F/F_m$) 변화.

표 3-14. 갈파래의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 유해물질과 온도의 급성독성효과에 대한 one-way ANOVA 결과.

유해물질	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Probability
Paraquat	0.037	2	0.018	3.542	0.087
Endosulfan	0.148	2	0.074	18.259	0.002**
Hg	0.114	2	0.057	9.375	0.010**
Fluoranthene	0.113	2	0.056	4.903	0.041*

갈파래의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 유해물질과 온도의 복합 급성독성효과에 대한 통계적 유의성을 확인하기 위해 통계처리를 수행하였으며 (one-way ANOVA), 그 결과는 표 3-14이다. 제초제 (paraquat)를 제외한 살충제 (endosulfan, $p < 0.001$), 중금속 (Hg, $p < 0.001$), 유기화합물 (fluoranthene, $p = 0.01$)에 노출된 갈파래는 온도 조건이 변함에 따라 유의한 독성효과를 보이는 것으로 나타났다 (표 3-14). 제초제 (paraquat)에 노출된 갈파래의 경우는 온도 조건의 변이에 따른 급성 독성효과는 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다.

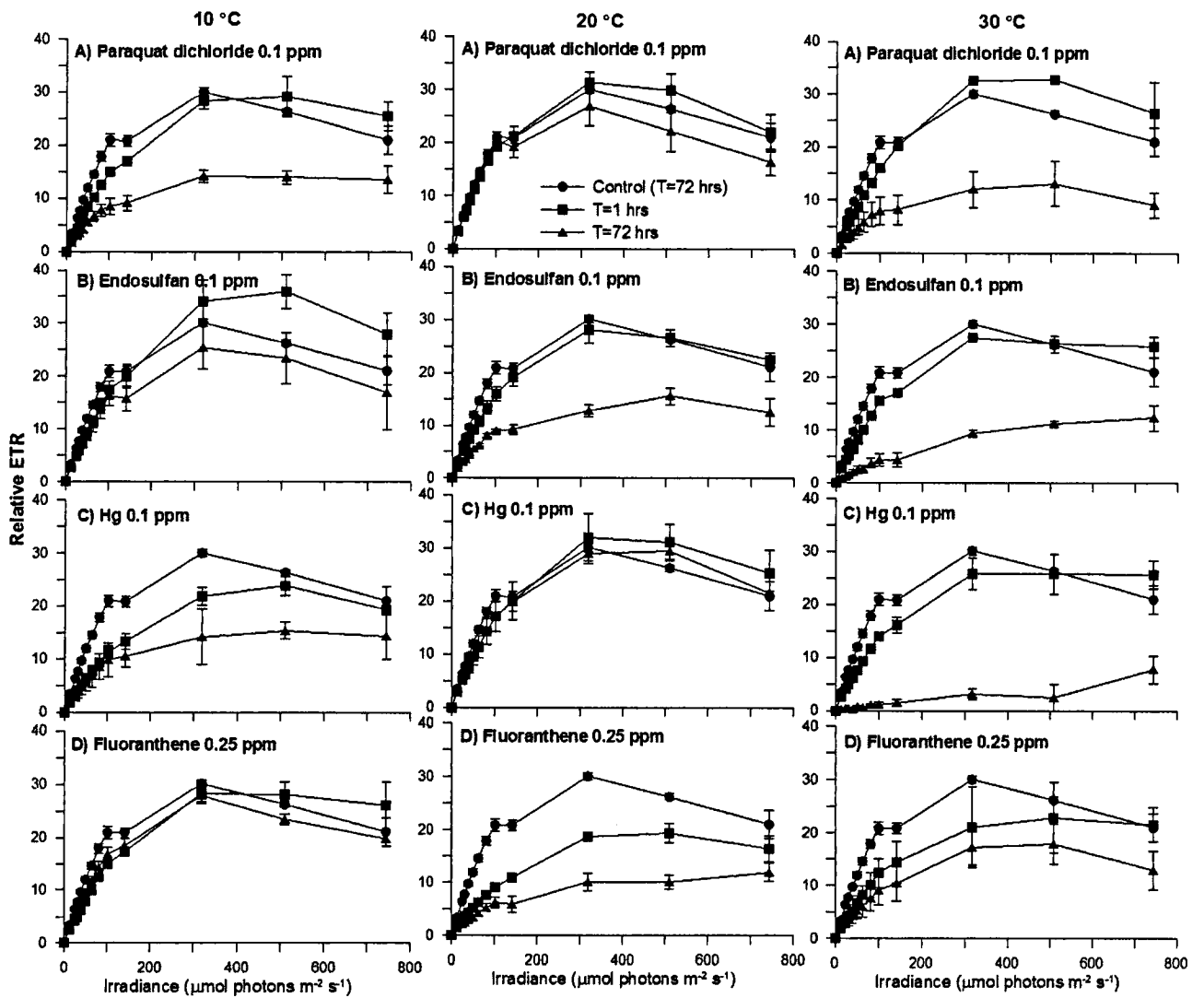


그림 3-25. 유해물질에 노출된 갈파래의 온도에 따른 빠른 광반응곡선(RLCs)의 변화.

갈파래의 유해물질과 온도의 복합효과에 대한 빠른 광반응곡선의 측정은 노출초기

(T=1)와 72시간째에 측정하였으며 (그림 3-25), 10°C에서는 제초제 (Paraquat dichloride)와 수은 (Hg)이 비슷한 수준의 독성효과를 보였으며, 20°C에서는 살충제 (Endosulfan)와 유기화합물 (Fluoranthene)이 유사한 수준에서 독성효과를 보였다. 30°C에서는 중금속 (Hg)이 가장 강한 독성효과를 보였으며, 살충제, 제초제, 유기화합물 순으로 독성효과가 작아지는 것으로 나타났다.

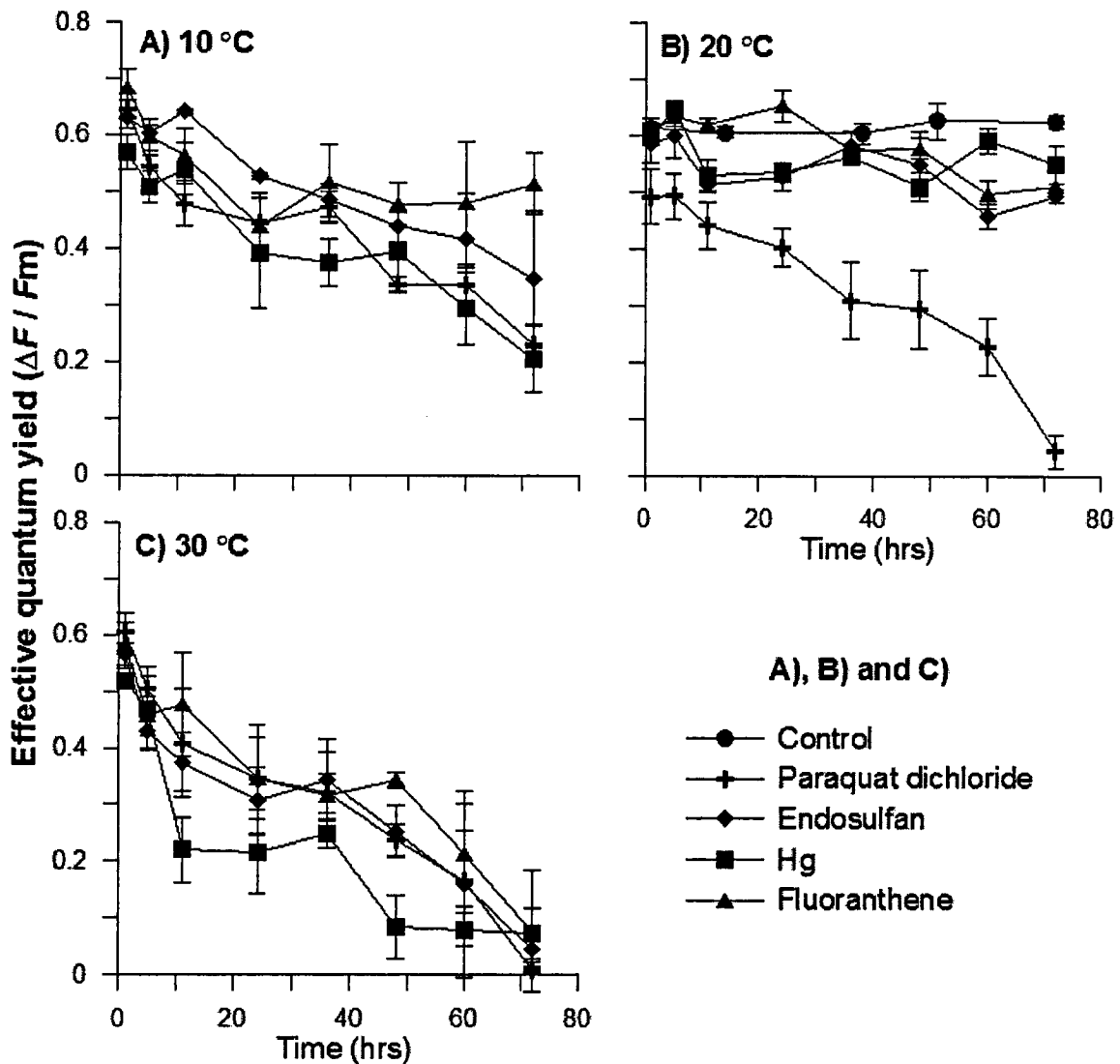


그림 3-26. 유해물질에 노출된 잘피의 온도변화에 따른 광양자수율 ($\Delta F/F_m$) 변화.

유해물질에 노출된 잘피에 온도의 혼합효과는 1, 5, 14, 21, 28, 38, 51, 71시간째에 광양자수율을 측정하였으며 (그림 3-26), 또한 노출초기 (T=1)와 72시간째에 광반응곡선을

측정하여 대조구와 비교하였다 (그림 3-27). 유해물질과 온도의 혼합효과는 갈파래의 경우와 유사하게 나타났으며, 갈파래의 경우는 10℃와 20℃가 비슷한 독성효과를 보였으나, 잘피의 경우는 10℃ 처리구가 20℃ 처리구보다 독성효과가 뚜렷하게 나타나는 것으로 보인다. 온도에 따른 유해물질의 독성효과는 30℃ > 10℃ > 20℃ 순으로 작아지는 것으로 보인다. 이는 해산식물의 생육과 분명한 관련이 있는 것으로 갈파래의 경우는 보통 25℃ 조건에서 최대성장률을 보이는 것으로 알려져 있다 (Lobban and Harrison 1994). 이보다 저온조건 하에서는 보통 생장이 멈추는 것으로 알려져 있으며, 이보다 높은 고온조건에서는 빠르게 생리활동이 감소하는 것으로 알려져 있다. 잘피의 경우는 이와 유사한 결과를 보이는 것으로 판단된다. 4가지 유해물질 중 가장 뚜렷한 독성효과를 보이는 것은 갈파래에서와 동일하게 중금속 수은 (Hg)이었으며, 10℃ 72시간째에는 대조구와 비교하여 33% 수준까지 감소하였으며, 30℃에서는 12% 수준까지 감소하였다. 특이하게도 20℃ 조건에서 제초제의 경우 72시간째의 광량자수율이 대조구에 비해 7% 수준까지 감소하였다. 30℃ 경우에도 제초제는 1.5%, 살충제는 7.5% 수준까지 감소하여 수은보다 더 뚜렷한 독성효과를 갖는 것으로 나타났다. 유기화합물의 경우에도 대조구에 비하여 12.3%까지 감소하여 30℃ 처리구의 유해물질과 온도의 혼합효과는 더욱 분명한 것으로 나타났다.

표 3-15. 잘피의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 유해물질과 온도의 급성독성효과에 대한 one-way ANOVA 결과.

유해물질	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Probability
Paraquat	0.084	2	0.042	21.233	0.002**
Endosulfan	0.312	2	0.156	10.317	0.011*
Hg	0.360	2	0.180	26.857	0.001***
Fluoranthene	0.404	2	0.202	30.610	0.001***

잘피의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 유해물질과 온도의 복합 급성독성효과에 대한 통계적 유의성을 확인하기 위해 통계처리를 수행하였으며 (one-way ANOVA), 그 결과는 표 3-15이다. 제초제 (paraquat, $p < 0.01$)를 비롯한 살충제 (endosulfan, $p < 0.05$), 중금속 (Hg, $p < 0.001$), 유기화합물 (fluoranthene, $p < 0.001$)에 노출된 갈파래는 온도 조건이 변함에 따라 유의한 독성효과를 보이는 것으로 나타났다 (표 3-15).

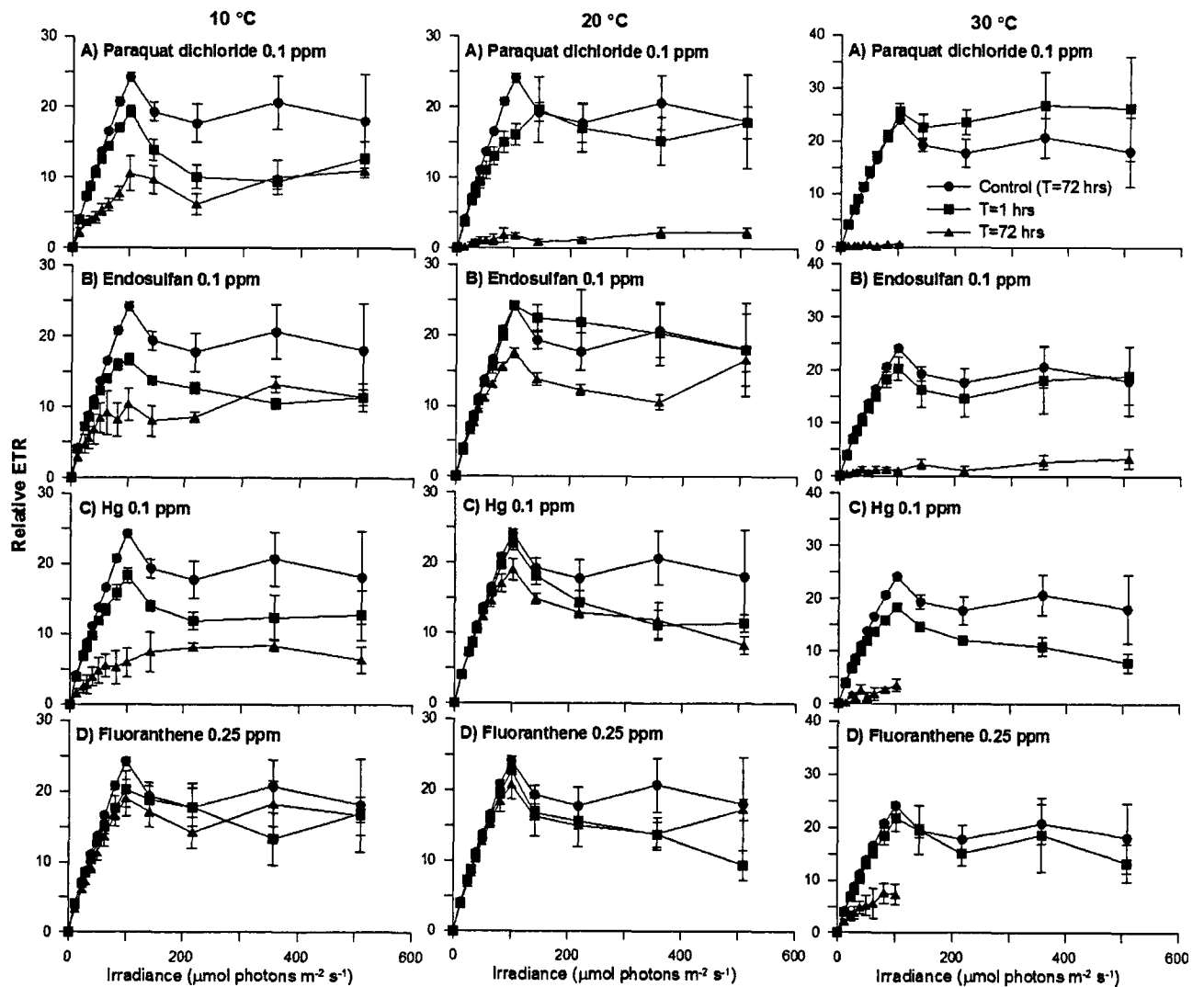


그림 3-27. 유해물질에 노출된 잘피의 온도에 따른 빠른 광반응곡선 (RLCs)의 변화.

유해물질과 온도의 혼합효과에 대한 잘피의 빠른 광반응곡선의 유형은 대체로 광량자 수율의 결과와 일치하고 있다. 20°C 조건의 제초제의 경우 72시간째에 측정된 광반응곡선은 대조구에 비하여 현저히 낮게 측정되었으며, 30°C 조건의 제초제와 살충제, 중금속에 노출된 잘피의 경우 광반응곡선을 측정하는 것이 무의미할 만큼 매우 낮은 수준에서 광반응곡선이 측정되었다. 광반응곡선에서도 또한 30°C > 10°C > 20°C 순서로 유해물질과 혼합효과가 감소하고 있었다. 일반적으로, 수은 (Hg), 은 (Ag), 카드뮴 (Cd)과 같은 중금속은 필수영양소가 아니면서 그 독성은 매우 강한 것으로 알려져 있다 (Ralph and Burchett 1998). 또한 중금속 중 일부 미량금속들은 모두 자연적으로 존재하는 물질로서 일정 농도 이하에서는 독성이 나타나지 않는 특성을 보이지만 대부분의 중금속들이 해산

식물의 광합성에 대해 잠재적인 독성을 갖고 있으며, 독성이 발현되는 농도 수준이나 시간은 해산식물의 종류 및 생리특성에 따라 각각 다르게 나타날 수 있다.

10. 환경요인 중 영양염 농도 변화에 따른 유해물질의 갈파래와 잘피에 대한 72시간 급성독성시험

유해물질과 영양염 농도와의 혼합효과를 측정하기 위하여 4가지 영양염 구배를 만들고, 유해물질로 오염시킨 비이커에 갈파래와 잘피를 노출하였다. 영양염 구배는 일반적인 N:P ratio 16 : 1을 기준으로 하였으며, 저농도의 질산염과 인산염(Low Nitrogen Low Phosphorus, LNLP) 구배에 5 μ M N과 0.7 μ M P가 되게 하였으며, 이를 기준으로 나머지 저농도의 질산염과 고농도의 인산염(Low Nitrogen High Phosphorus, LNHP), 고농도의 질산염과 저농도의 인산염(High Nitrogen Low Phosphorus, HNLP), 그리고 고농도의 질산염과 고농도의 인산염(High Nitrogen High Phosphorus, HNHP) 구배를 만들어 주었다. 각각의 농도구배는 LNHP의 경우 5 μ M N과 7 μ M P, HNLP는 50 μ M N과 0.7 μ M P, HNHP는 50 μ M N과 7 μ M P가 되게 하였다 (연구방법 참조). 그리고 72시간 동안 노출하였으며, 갈파래의 경우 1, 4, 8, 13, 25, 36, 48, 72 시간째에 광량자수율 ($\Delta F/F_m$)을 측정하였으며 (그림 3-28), 또한 빠른 광반응곡선은 노출초기(T=1)와 72시간째에 측정하여 대조구와 비교하였다 (그림 3-29a와 3-29b).

제초제와 영양염의 혼합효과는 가장 고농도 조건인 HNHP 조건에서 72시간째에 측정된 광량자수율은 대조구에 비하여 28% 수준까지 감소하였으며, 대체로 영양염의 농도가 증가함에 따라 유해물질과 영양염의 혼합효과가 강하게 나타나는 것으로 측정되었다. 살충제의 경우는 72시간째의 광량자수율이 평균 43% 정도로 영양염의 농도구배와는 뚜렷한 상관성을 보이지는 않았다. 중금속인 수은의 경우 또한 저농도 조건에서 72시간째에 대조구와 비교하여 39% 수준까지 감소하였으며, 나머지 경우에는 50% 수준까지 감소하는 것으로 보아 영양염과 유해물질의 혼합효과는 분명하지 않은 것으로 판단된다. 수은(Hg)의 경우 수은 자체의 독성영향만으로 광량자수율이 감소하는 것으로 보인다. 유기화합물 또한 저농도 조건에서 26% 수준까지 감소하였으며, 나머지 농도조건에서는 평균 50%까지 감소하였다. 온도과 유해물질의 혼합효과나 단일 유해물질에서의 독성영양과 비교하였을 때, 유기화합물의 경우는 영양염과 결합된 유해물질의 혼합효과는 약간의 상승작용을 갖는 것으로 판단된다.

제초제인 Paraquat dichloride와 영양염 농도와의 혼합효과 측정을 위한 광반응곡선 또한 광량자수율의 결과와 유사하게 영양염의 농도가 증가하면서 광반응곡선의 감소가 뚜렷하게 보였으며, HNLTP 처리구의 노출초기에 이미 독성영향이 나타나는 것으로 보인다. 살충제의 경우도 영양염 농도구배와 관계없이 비슷한 수준에서 독성영향을 보여주고 있음을 광반응곡선을 통해서도 알 수 있었다.

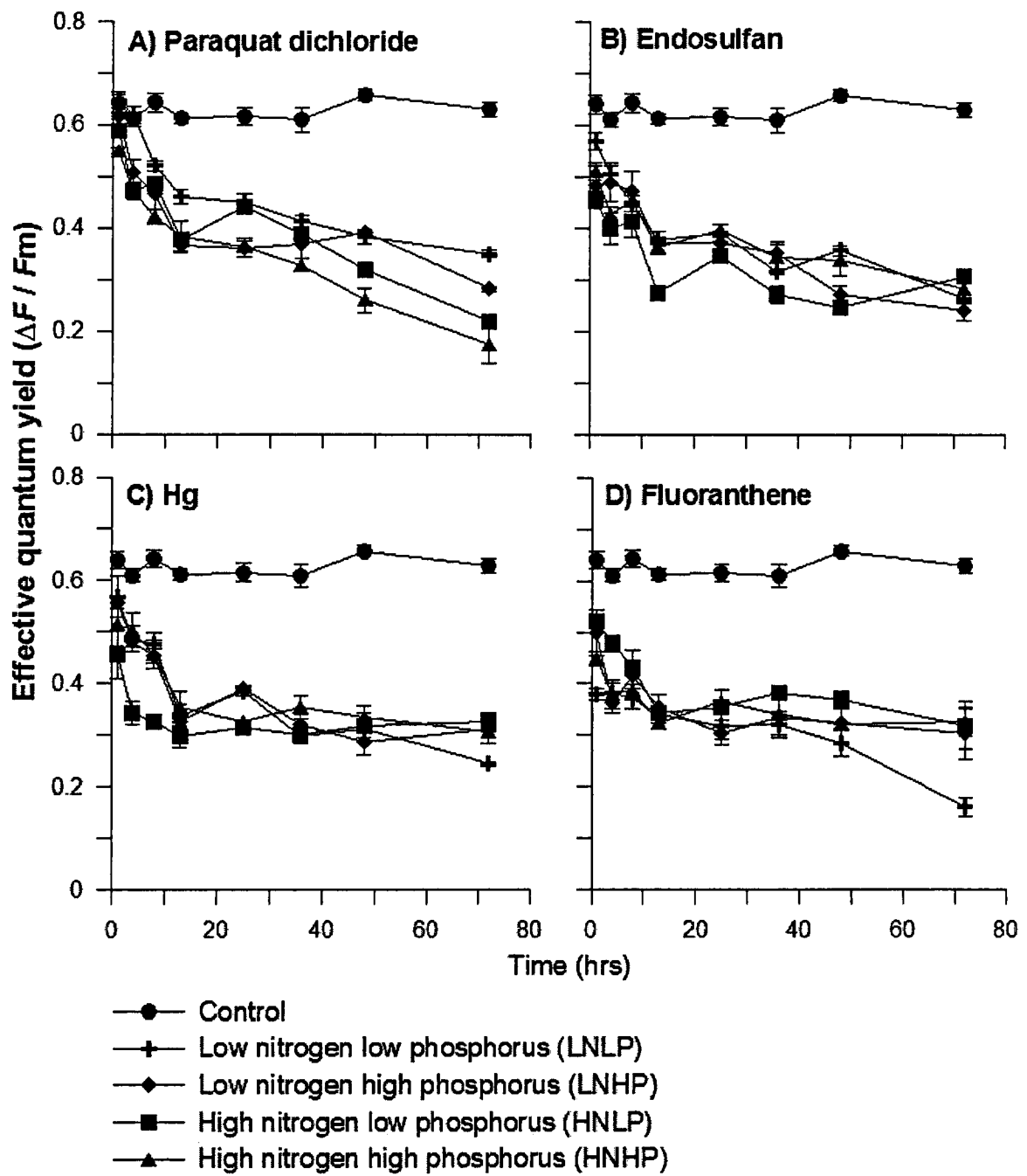


그림 3-28. 유해물질에 노출된 갈파래의 영양염 농도 변화에 따른 광양자수율 ($\Delta F/F_m$) 변화.

표 3-16. 갈파래의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 유해물질과 결합된 영양염의 급성 독성효과에 대한 two-way ANOVA 결과.

Factor	Source	SS	df	MS	F	Probability
Paraquat	Nitrogen	0.052	1	0.052	15.802	0.002**
	Phosphorus	0.009	1	0.009	2.879	0.116
	N × P	2.50E-007	1	2.50E-007	0.000	0.993
	Error	0.40	12	0.003		
Endosulfan	Nitrogen	0.002	1	0.002	0.819	0.385
	Phosphorus	0.001	1	0.001	0.319	0.584
	N × P	0.002	1	0.002	0.648	0.438
	Error	0.026	11	0.002		
Hg	Nitrogen	0.005	1	0.005	3.063	0.108
	Phosphorus	0.002	1	0.002	1.023	0.334
	N × P	0.003	1	0.003	1.652	0.225
	Error	0.017	11	0.002		
Fluoranthene	Nitrogen	0.024	1	0.024	3.497	0.086
	Phosphorus	0.012	1	0.012	1.744	0.211
	N × P	0.015	1	0.015	2.222	0.162
	Error	0.082	12	0.007		

갈파래의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 유해물질과 영양염의 복합 급성독성효과에 대한 통계적 유의성을 확인하기 위해 통계처리를 수행하였으며 (two-way ANOVA), 그 결과는 표 3-16이다. 제초제 (paraquat)에 노출된 갈파래에 질산염과 인산염의 농도 조건을 달리한 처리구에서 유의한 독성효과를 보인 것은 제초제와 결합된 질산염 ($p < 0.01$) 조건에서만 유의한 독성효과를 갖는 것으로 나타났다 (표 3-16). 그 외에 살충제 (endosulfan), 중금속 (Hg), 유기화합물 (fluoranthene)과 결합된 영양염 농도 조건에서는 유의한 복합 독성효과가 나타나지 않았다 (표 3-16).

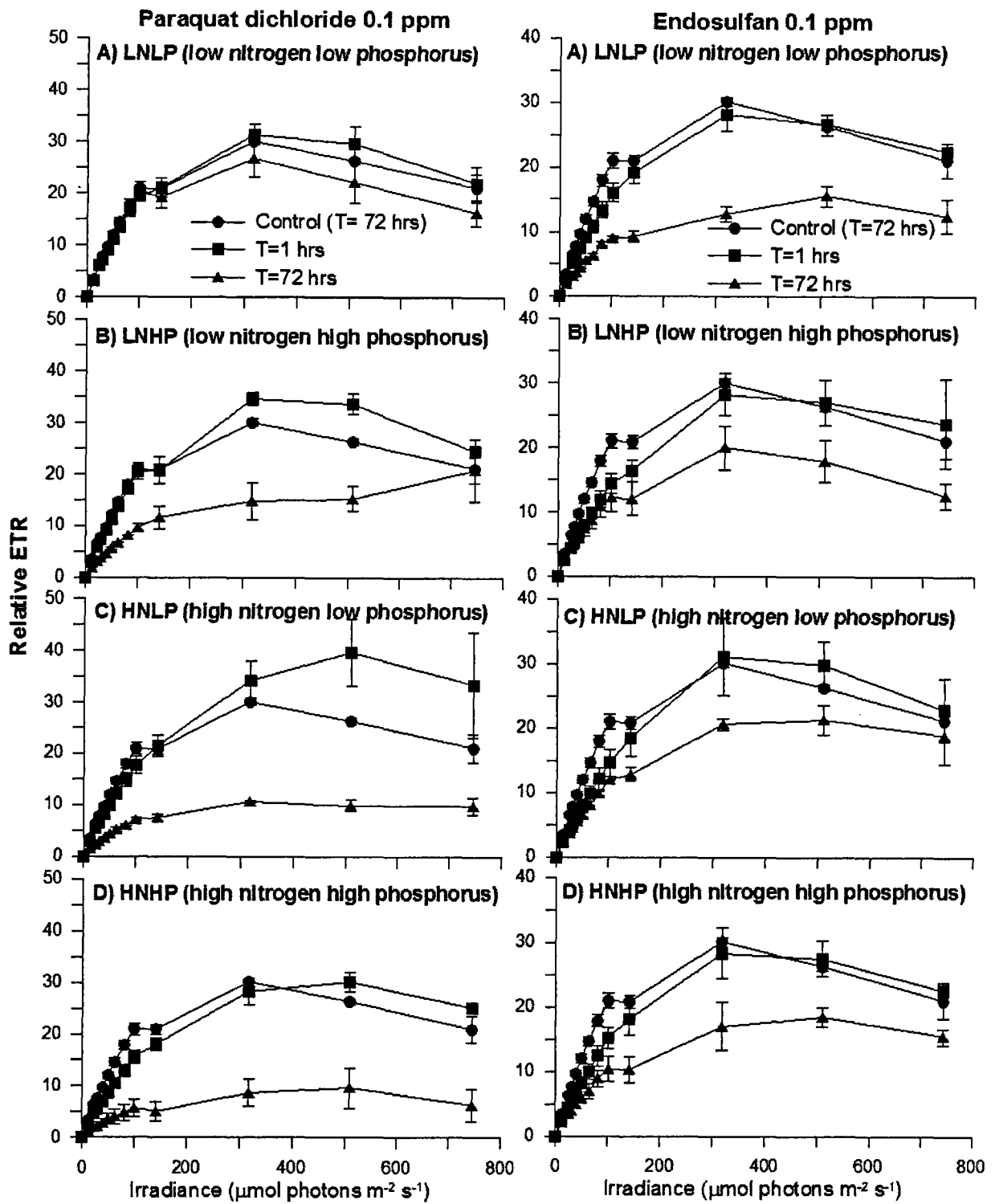


그림 3-29a. 유해물질에 노출된 갈파래의 영양염 농도 변화에 따른 빠른 광반응곡선 (RLCs)의 변화.

중금속 수은 (Hg)의 경우 온도와 유해물질의 혼합효과에서 보여주었던 결과와는 다른

결과를 보였다. 광량자수율의 결과와는 대체로 일치하고 있었으나, HNLP 농도조건에서만 광반응곡선의 초기 기울기가 뚜렷한 감소를 보였고, HNHP 농도조건에서도 광반응곡선의 초기기울기가 감소하는 경향을 보였다 (그림 3-29b, 왼쪽). 이는 중금속의 독성효과와 고농도 조건의 질산염과의 혼합효과로 보인다. 고농도의 질산염의 경우 독성을 보일 수 있음이 밝혀져 있다 (Lobban and Harrison 1994). 인산염의 경우는 농도에 상관없이 독성영향을 보이지 않았다. 유기화합물의 경우에는 LNLP 농도조건에서 가장 높은 수준의 독성영향을 보였다 (그림 3-29b, 오른쪽). HNHP 농도조건에서도 약간의 독성영향을 보였다. 나머지 농도조건에서는 뚜렷한 독성영향을 보이지는 않았다.

잘피의 광량자수율에 대한 유해물질과 영양염의 혼합효과는 제초제 > 중금속 > 유기화합물 > 살충제 순으로 독성영향이 감소하는 것으로 나타났다. 제초제의 경우는 모든 조건의 영양염 농도구배에서 독성영향이 나타나는 것으로 보이며, 이는 영양염과의 혼합효과라기 보다는 제초제 자체의 독성영향이 매우 강한 것으로 보인다.

중금속 수은 (Hg)의 경우에는 HNLP와 HNHP 농도조건에서 보다 강한 독성영향이 나타나고 있으며, 살충제나 유기화합물의 경우는 LNHP 농도조건에서 독성영향이 노출중반 (T=36 hrs)까지 나타났다가 다시 회복되는 경향을 보였다.

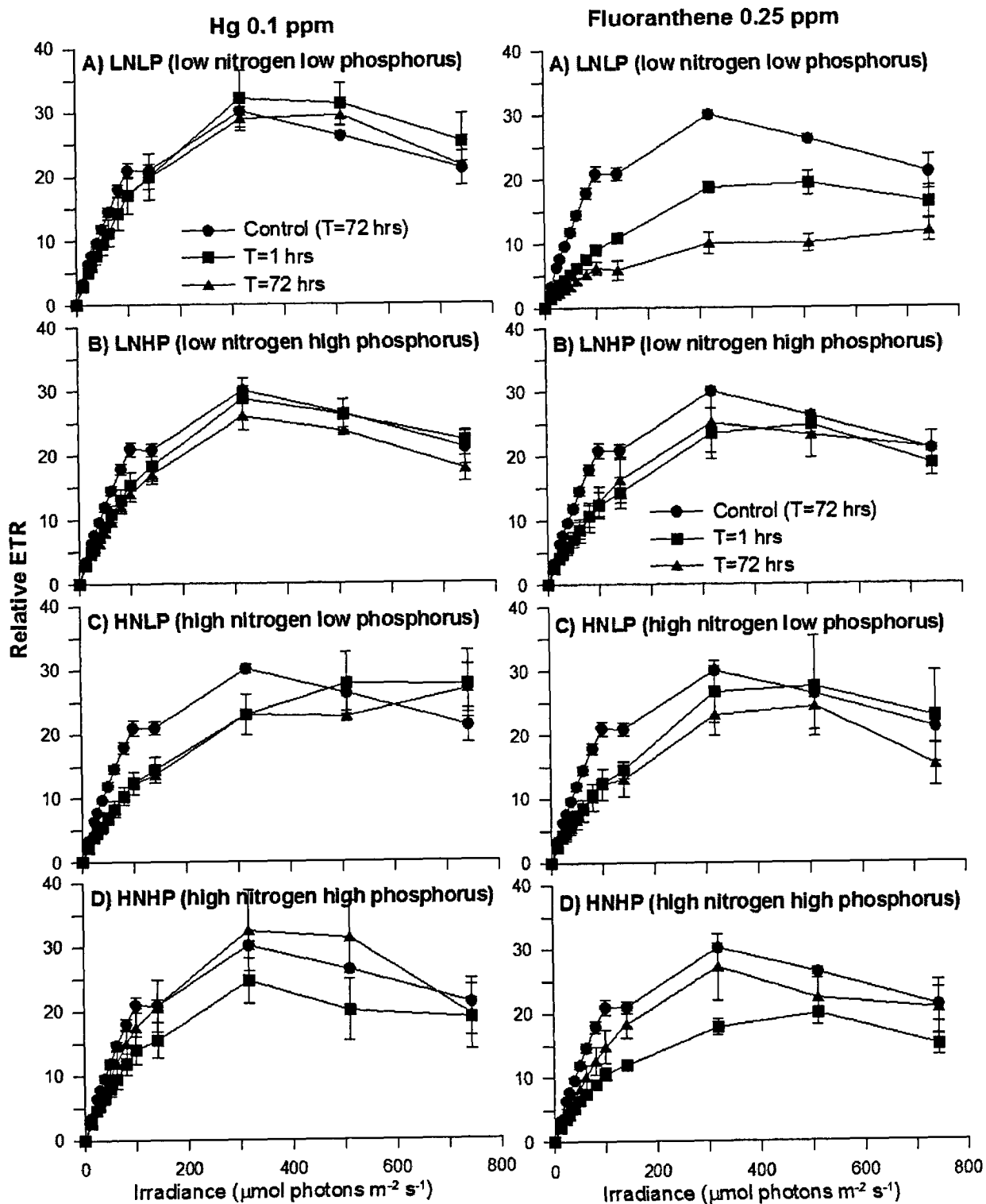


그림 3-29b. 유해물질에 노출된 갈파래의 영양염 농도 변화에 따른 빠른 광반응곡선 (RLCs)의 변화.

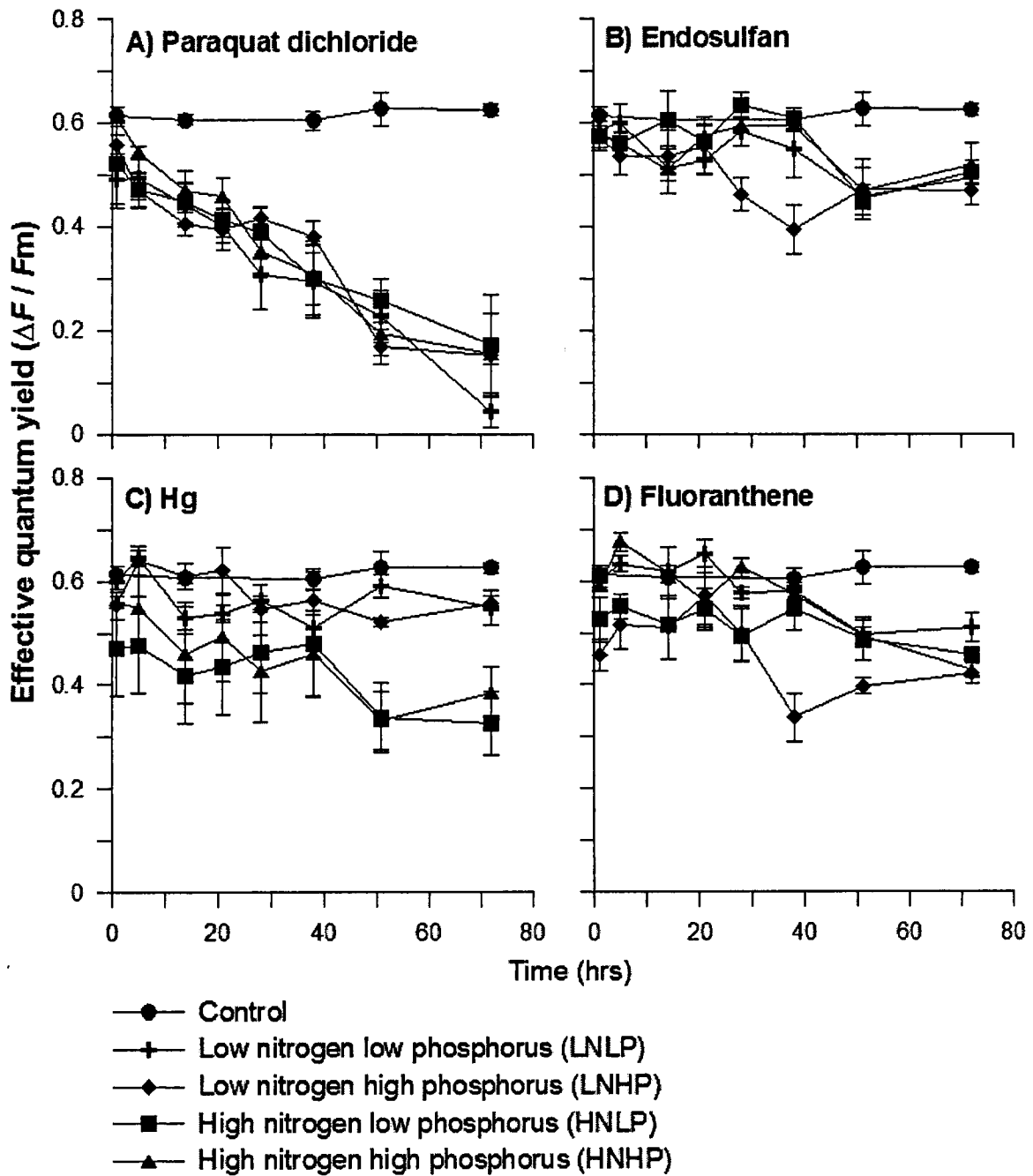


그림 3-30. 유해물질에 노출된 잘피의 영양염 농도 변화에 따른 광양자수율 ($\Delta F/F_m$) 변화.

잘피의 유해물질과 영양염 농도의 혼합효과에 대한 빠른 광반응곡선은 대체로 광양자수율 (quantum yield) 결과와 일치하고 있다 (그림 3-30, 3-31a, 3-31b). 제초제의 경우 가장 뚜렷한 감소를 보여준 영양염 농도는 LNL과 HNHP 농도조건이었으며 (그림 3-31a,

오른쪽), 나머지 LNHP와 HNLP 농도조건의 경우 유사한 수준에서 광반응곡선의 감소를 보였다. 살충제의 경우는 대체로 모든 농도조건에서 약간의 감소를 보였으나, 초기기율기의 경우는 대조구와 비교하여 거의 감소하지 않은 것으로 나타났다.

중금속 수은 (Hg)의 경우는 노출초기 (T = 1 hrs)에 이미 광반응곡선의 감소가 나타나고 있으며, 이러한 감소가 72시간째까지 유지되고 있는 것으로 보인다. 노출초기에 나타난 독성영향이 더 이상 진행되지 않고 유지되는 것으로 판단된다. 유기화합물의 경우에는 노출초기에 보였던 독성영향이 노출시간이 지남에 따라 다시 회복하는 경향을 보였다.

표 3-17. 잘피의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 유해물질과 결합된 영양염의 급성독성효과에 대한 two-way ANOVA 결과.

Factor	Source	SS	df	MS	F	Probability
Paraquat	Nitrogen	0.013	1	0.013	1.055	0.334
	Phosphorus	0.006	1	0.006	0.506	0.497
	N × P	0.012	1	0.012	0.948	0.359
	Error	0.100	8	0.012		
Endosulfan	Nitrogen	0.000	1	0.000	0.213	0.657
	Phosphorus	0.004	1	0.004	1.832	0.213
	N × P	0.001	1	0.001	0.643	0.446
	Error	0.018	8	0.002		
Hg	Nitrogen	0.007	1	0.007	1.234	0.299
	Phosphorus	0.007	1	0.007	1.211	0.303
	N × P	0.004	1	0.004	0.813	0.394
	Error	0.043	8	0.005		
Fluoranthene	Nitrogen	0.001	1	0.001	0.659	0.440
	Phosphorus	0.003	1	0.003	3.377	0.103
	N × P	0.006	1	0.006	6.583	0.033
	Error	0.008	8	0.001		

잘피의 광합성 양자수율 (T=72h)에 미치는 유해물질과 결합된 영양염의 복합 급성독성효과에 대한 통계적 유의성을 확인하기 위해 통계처리를 수행하였으며 (two-way ANOVA), 그 결과는 표 3-17이다. 제초제 (paraquat)를 비롯한 살충제 (endosulfan), 중금속 (Hg), 유기화합물 (fluoranthene)과 결합된 영양염 농도 조건에서는 유의한 복합 독성

효과가 나타난 처리구는 없었다 (표 3-16).

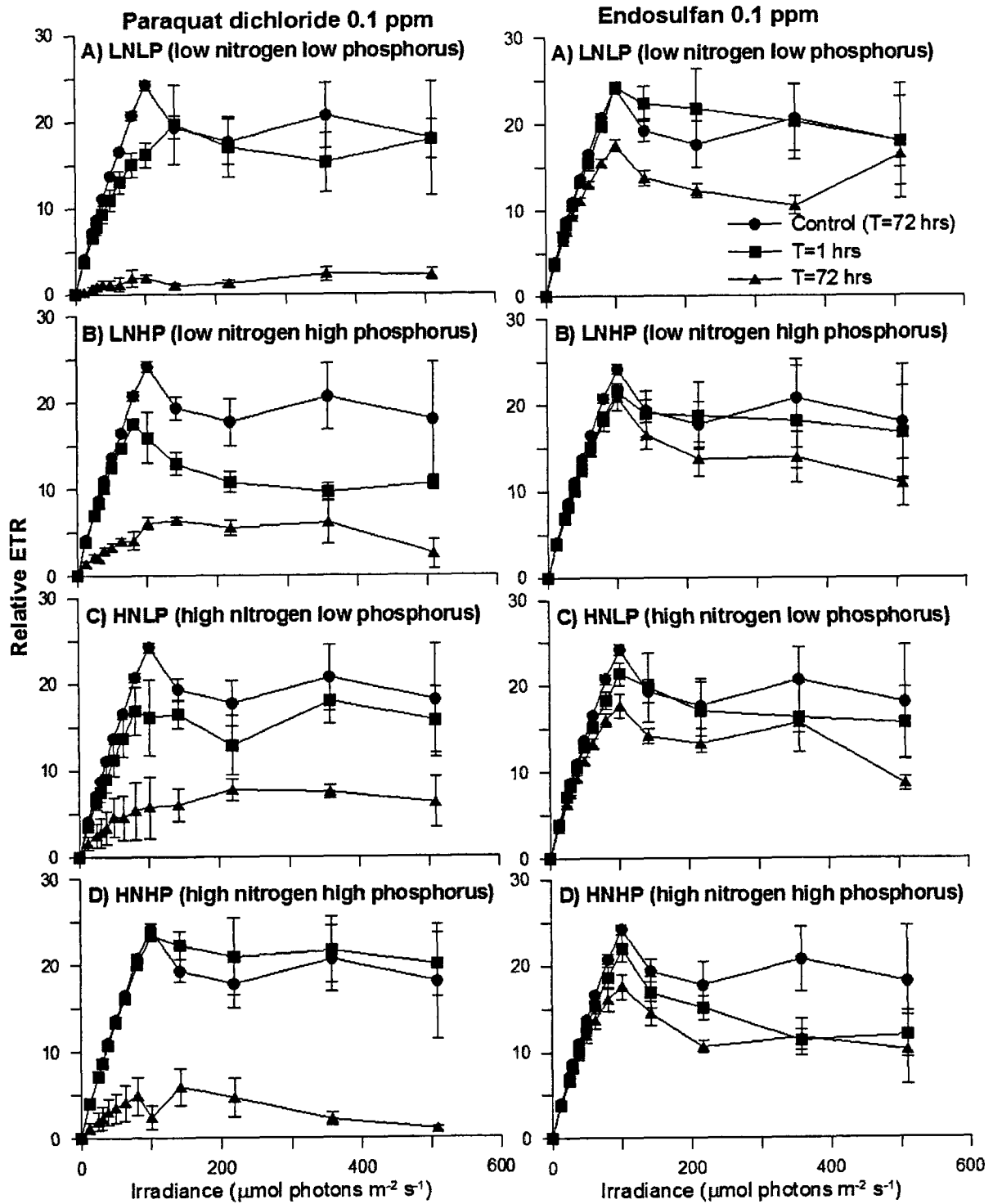


그림 3-31a. 유해물질에 노출된 작물의 영양염 농도 변화에 따른 빠른 광반응곡선(RLCs)의 변화.

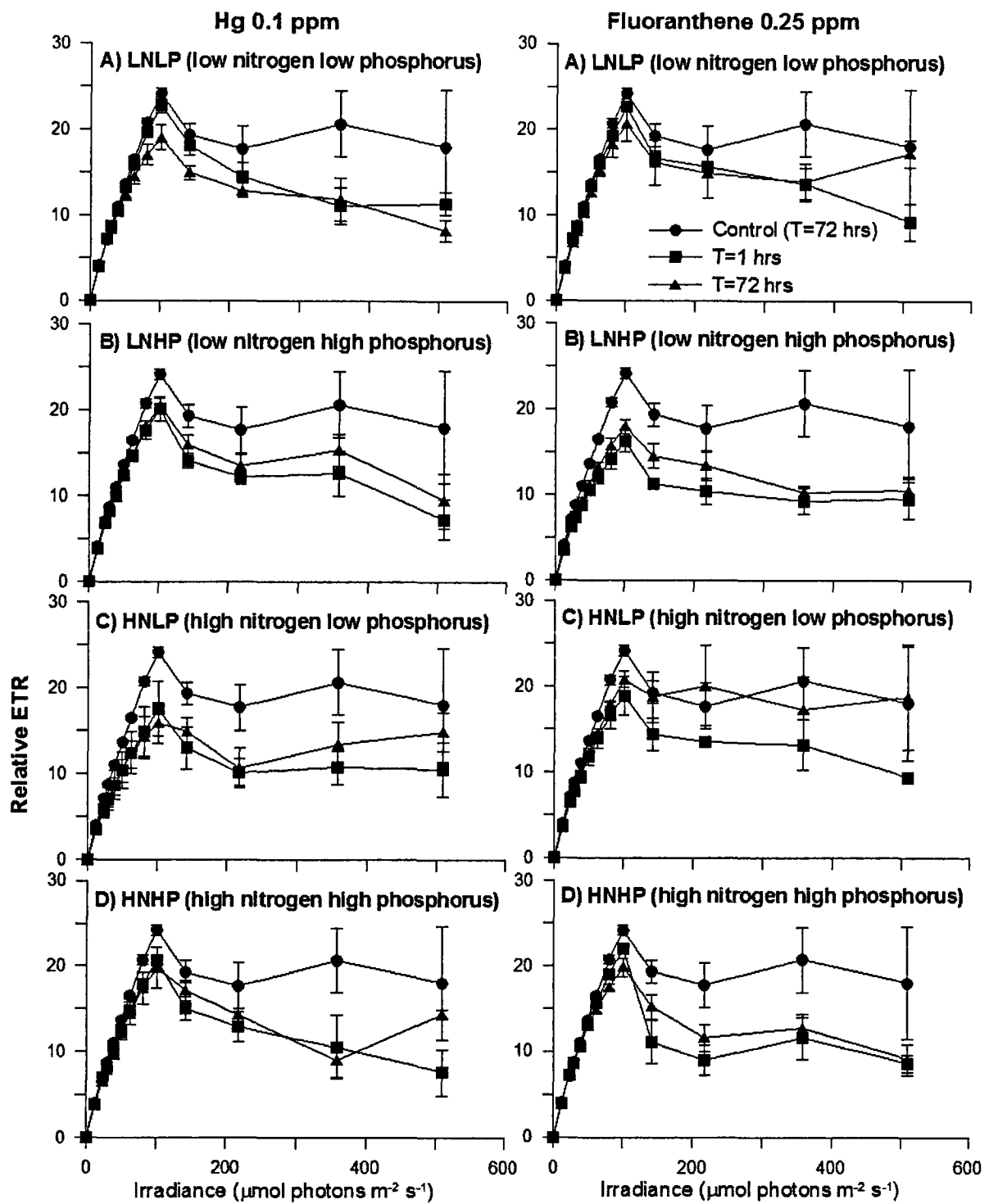


그림 3-31b. 유해물질에 노출된 잘피의 영양염 농도 변화에 따른 빠른 광반응곡선 (RLCs)의 변화.

엽록소 형광을 이용한 광양자수율과 빠른 광반응곡선을 이용한 유해물질 독성영향의

평가는 물질의 종류에 따라 다양하게 측정되었다. 일부 물질에 대해서는 뚜렷한 저해영향을 측정할 수 있었으며, 이에 반해 일부물질에 대해서는 두 가지 요인이 일치하지 않는 결과를 보이는 경우도 있었다. 이는 다중 유해물질이나 환경요인과 결합된 유해물질의 급성 노출에 갈파래나 잘피의 생리적 교란 정도를 엽록소형광의 변화를 통해서만 파악하기는 어려움을 보여주는 결과라고 할 수 있다. 따라서 향후 잘피에 대한 유해물질의 생리적 저해 영향을 규명하기 위해서는 보다 장기적인 노출과 함께 다양한 생리적 지수에 대한 평가가 병행되는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

11. 유해물질에 대한 생태독성평가 방법의 표준화를 위한 비교 실험

해산식물을 이용한 유해물질의 광합성 저해 영향평가 기술을 표준화하는데 있어서 엽록소 형광측정방법에 기초한 생태독성평가 기법을 정립하고자 미세조류를 이용하여 유해물질의 독성시험을 진행하였으며, 미세조류의 성장률을 endpoint로 이용하였다.

가. 살충제 (Endosulfan)가 미세편모조류 (*I. galbana*)의 성장에 미치는 영향

그림 3-32는 살충제인 endosulfan의 각 농도에서 미세편모조류 (*I. galbana*)의 시간대별 세포수의 변화를 보여주고 있다. 최고농도인 0.1 ppm 을 제외하고는 모든 농도에서 시간이 경과함에 따라 세포수가 증가하였다. 2일 경과 후 0.02 ppm 미만의 농도에서는 대조구와 세포수의 차이가 나타나지 않았으나, 0.04 ppm 이상의 농도에서는 차이가 나타나기 시작하였다. 4일 경과 후에는 0.001 ppm과 0.003 ppm에서는 대조구보다 세포수가 더 높게 나타났고, 0.01 ppm 이상의 농도에서는 대조구보다 낮게 나타났으며, 농도가 증가할수록 세포수도 감소하는 경향을 보였다. Endosulfan에 노출된 미세편모조류 (*I. galbana*)의 일간 성장률 (daily growth rate)은 농도가 0.01 ppm (NOEC) 이하에서는 대조구와 유의한 차이가 없었으며 (그림 3-33), 0.02 ppm (LOEC) 에서는 대조구와 유의한 차이가 나타났다. 96hr-EC50은 0.089 ppm으로 산출되었다.

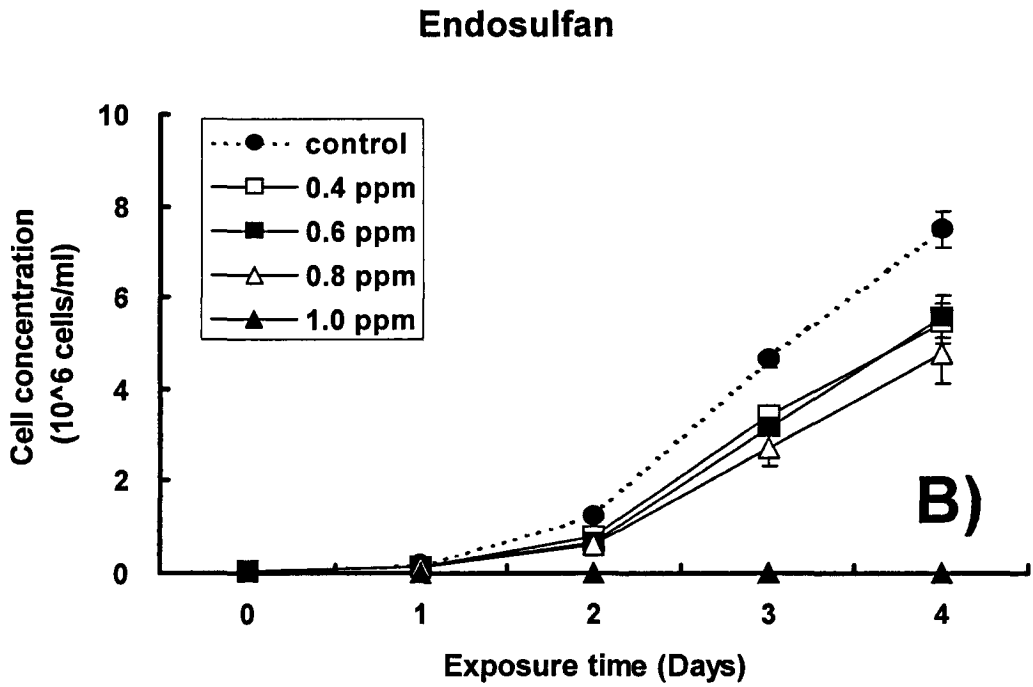
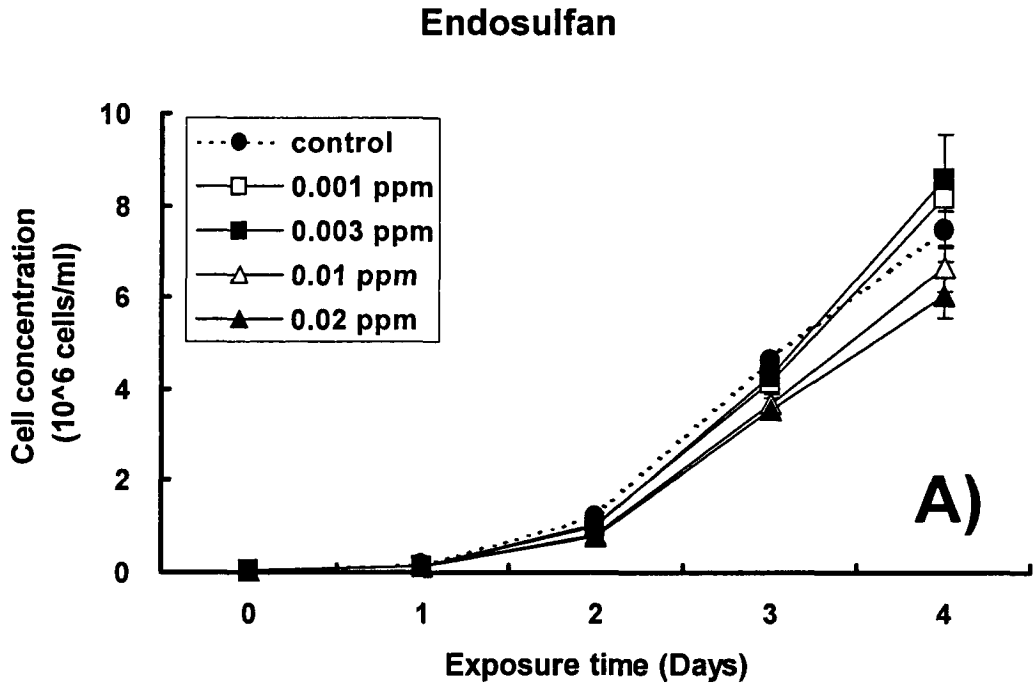


그림 3-32. 살충제 (Endosulfan)의 각 농도별 노출시간에 따른 미세편모조류 (*Isochrysis galbana*)의 세포수 변화.

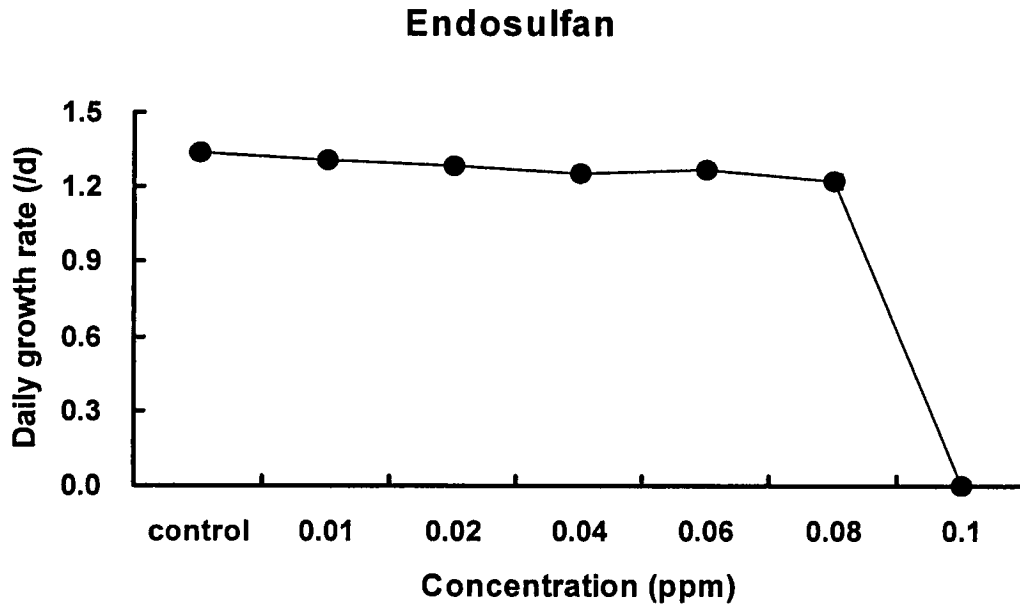


그림 3-33. 살충제 (Endosulfan) 각 실험 농도에 96시간 동안 노출된 미세편모조류 (*Isochrysis galbana*)의 일간 성장률 변화.

나. 중금속 (Hg)이 미세편모조류 (*I. galbana*)의 성장에 미치는 영향

그림 3-34는 중금속인 수은 (Hg)의 각 농도에서 *I. galbana*의 시간대별 세포수의 변화를 보여주고 있다. 최고농도인 0.1 ppm 을 제외하고는 모든 농도에서 시간이 경과함에 따라 세포수가 증가하였다. 그러나, 실험 2일째부터는 0.02 ppm 이상에서 대조구보다 세포수가 낮게 나타나기 시작하였고, 4일 경과 후에는 0.02 ppm 이상의 농도에서는 농도에 따른 세포수 감소가 뚜렷하게 나타났다. Hg에 노출된 *I. galbana*의 성장률은 농도가 0.01 ppm (NOEC) 이하에서는 대조구와 유의한 차이가 없었으며 (그림 3-35), 0.02 ppm (LOEC) 에서는 대조구와 유의한 차이가 나타났다. 96hr-EC50은 0.081 ppm으로 산출되었다.

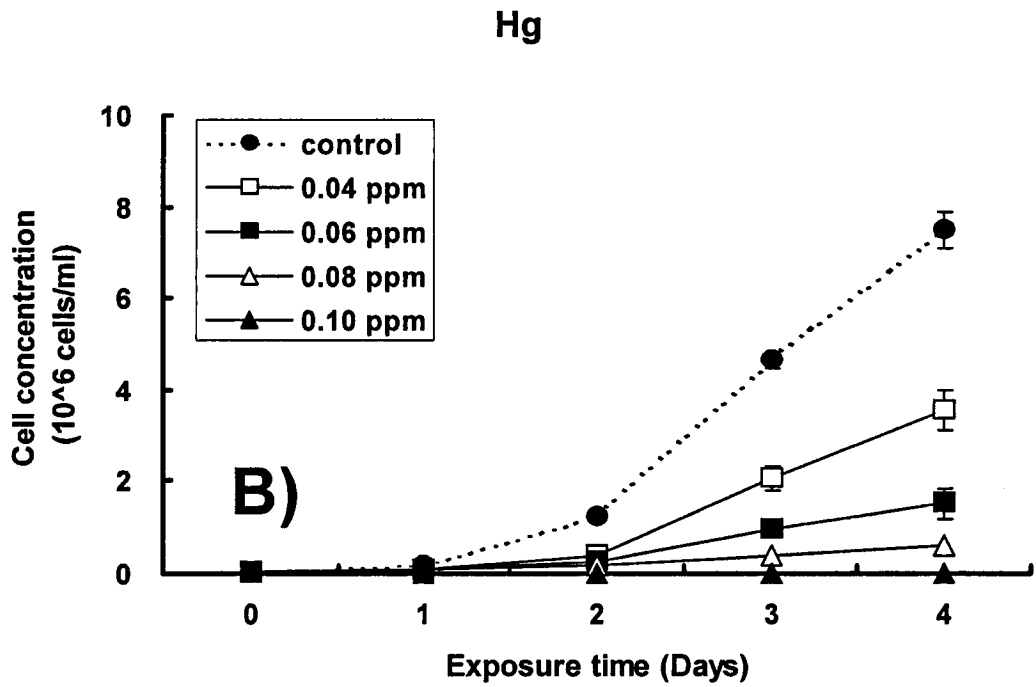
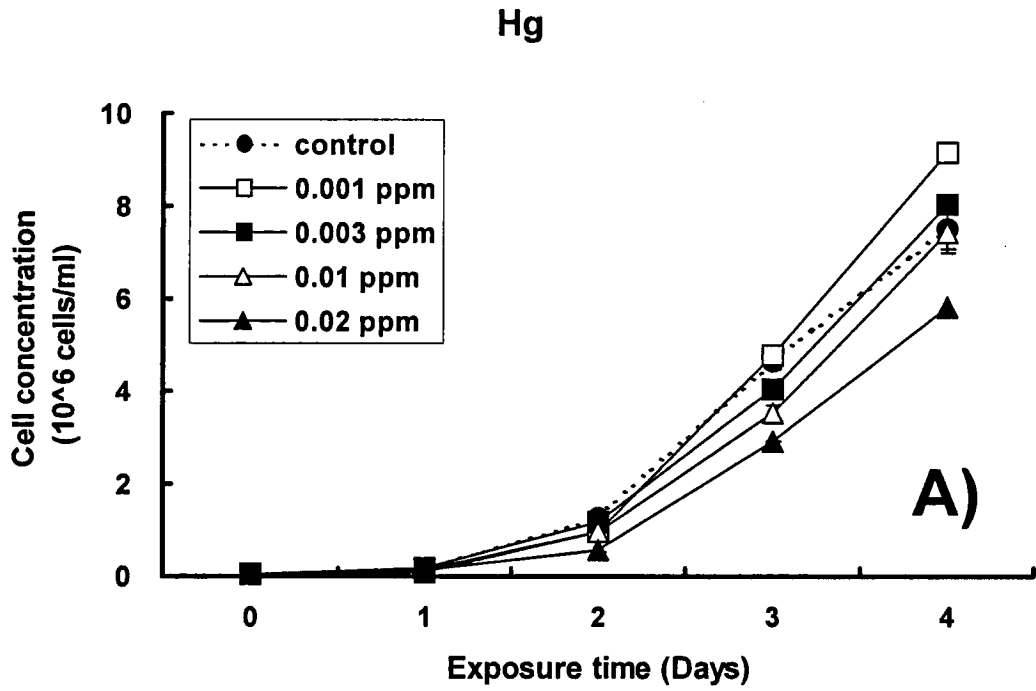


그림 3-34. 중금속 (Hg)의 각 농도별 노출시간에 따른 해양미세조류(*Isochrysis galbana*)의 세포수 변화.

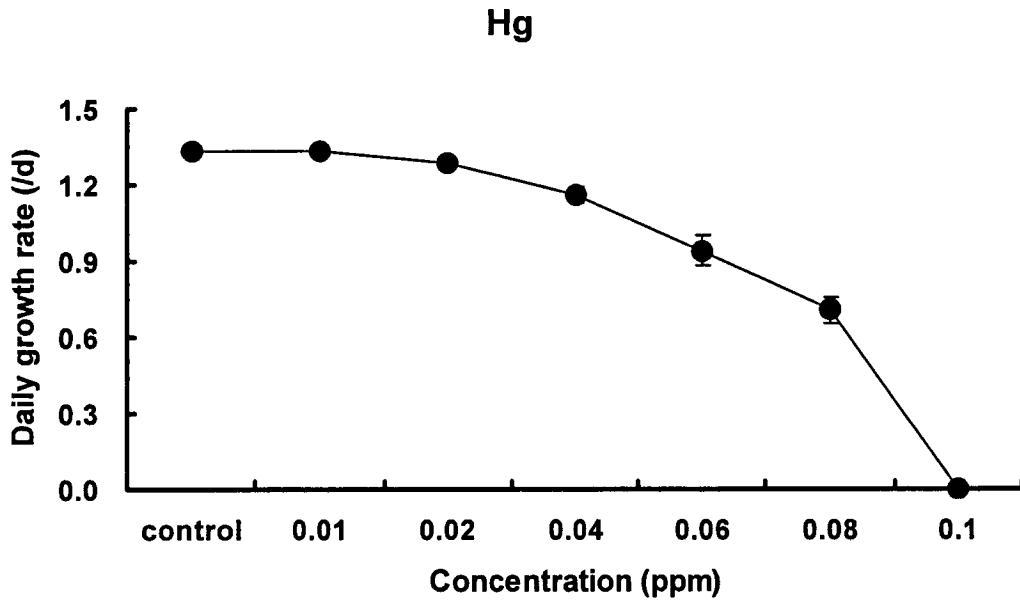


그림 3-35. 중금속 (Hg) 각 실험 농도에 96시간 동안 노출된 해양 미세조류(*Isochrysis galbana*)의 일간 성장률 변화.

다. 유기화합물 (Fluoranthene)이 해양미세조류 (*I. galbana*)의 성장에 미치는 영향

그림 3-36은 유기화합물인 fluoranthene의 각 농도에서 *I. galbana*의 시간대별 세포수의 변화를 나타내고 있다. 최고농도인 0.1 ppm 을 제외하고는 모든 농도에서 시간이 경과함에 따라 세포수가 증가하였다. 최고농도를 제외하고는 모든 농도에서 시간대별 세포수가 대조구와 큰 차이가 없었다. Fluoranthene에 노출된 *I. galbana*의 성장률은 농도가 0.08 ppm (NOEC) 이하에서는 대조구와 유의한 차이가 없었으며 (그림 3-37), 0.1 ppm (LOEC) 에서는 대조구와 유의한 차이가 나타났다. 96hr-EC50은 0.090 ppm으로 산출되었다.

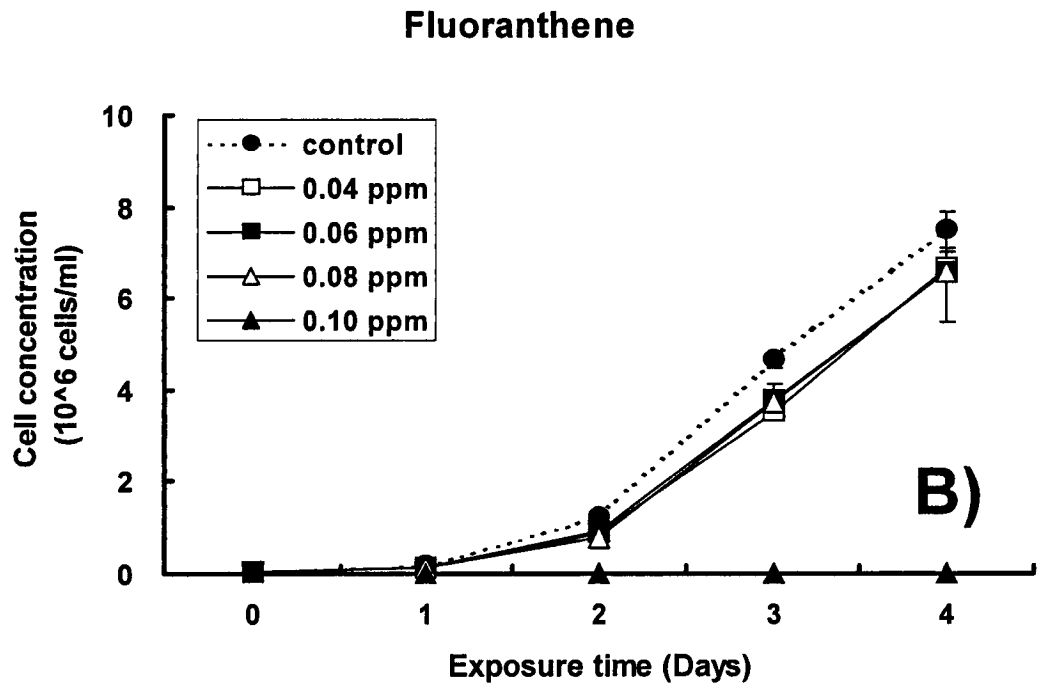
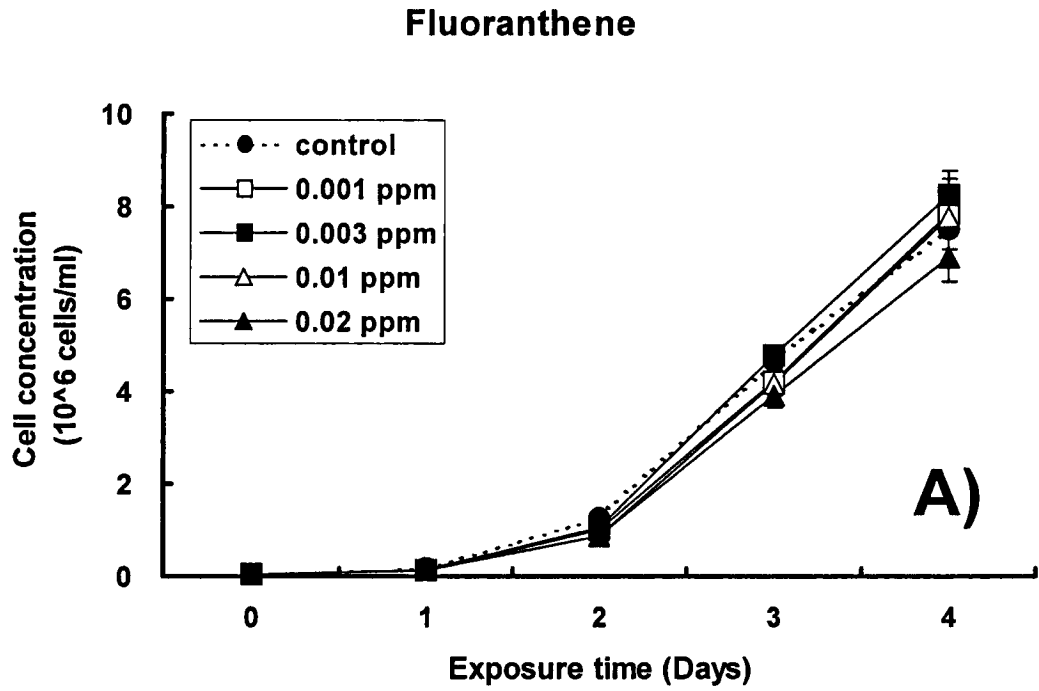


그림 3-36. 유기화합물 (Fluoranthene)의 각 농도별 노출시간에 따른 해양미세조류 (*Isochrysis galbana*)의 세포수 변화.

Fluoranthene

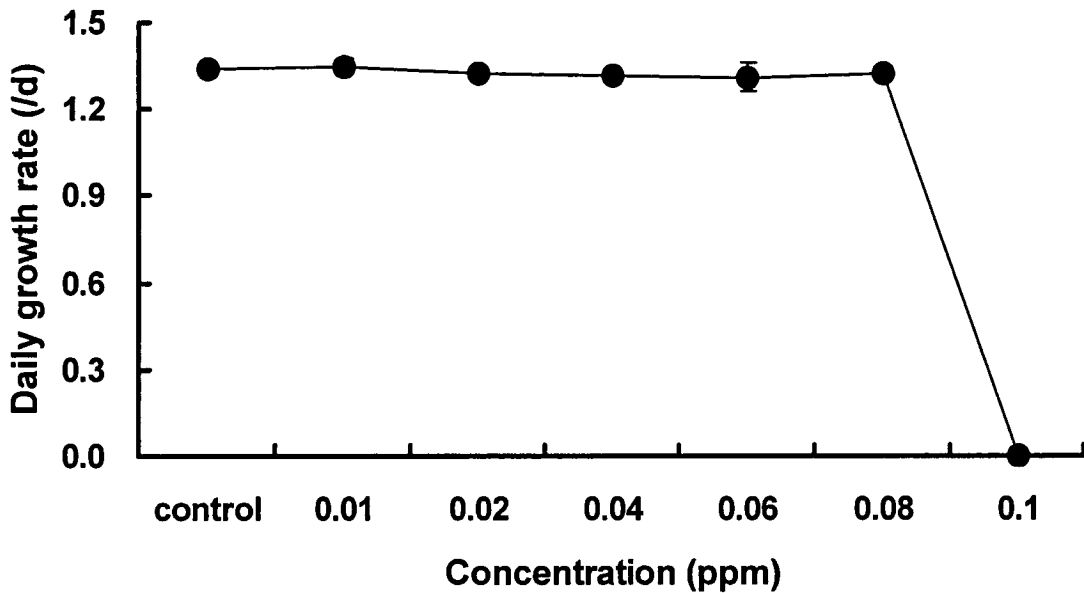
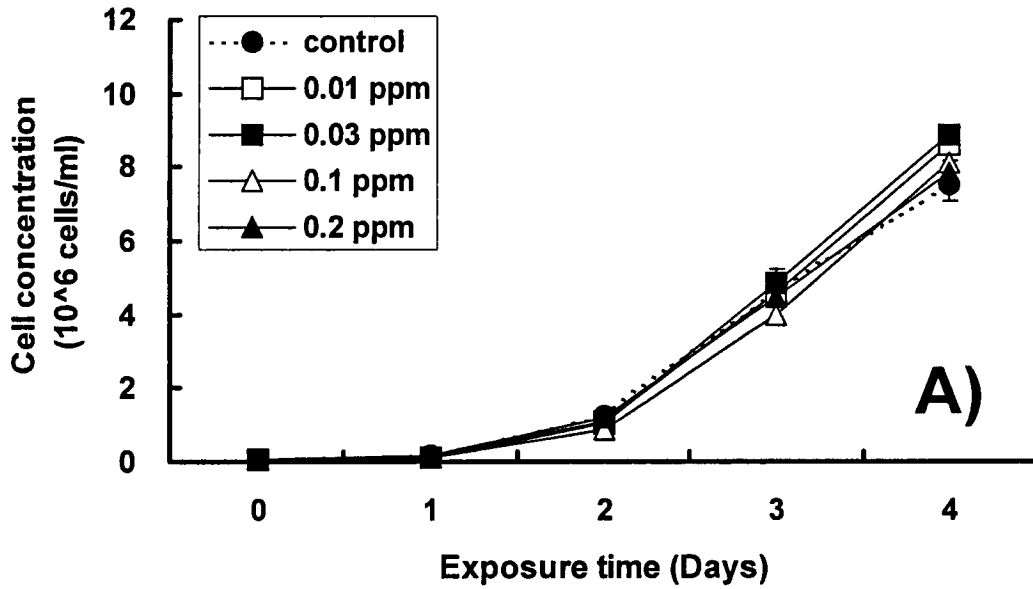


그림 3-37. 유기화합물 (Fluoranthene) 각 실험 농도에 96시간 동안 노출된 해양 미세조류 (*Isochrysis galbana*)의 일간 성장률 변화.

라. 제초제 (Paraquat dichloride)가 해양미세조류 (*I. galbana*)의 성장에 미치는 영향

그림 3-38은 제초제인 paraquat dichloride의 각 농도에서 *I. galbana*의 시간대별 세포수의 변화를 나타내고 있다. 최고농도인 1.0 ppm 을 제외하고는 모든 농도에서 시간이 경과함에 따라 세포수가 증가하였다. Paraquat dichloride의 경우도 fluoranthene과 마찬가지로 최 농도를 제외하고는 시간대별 세포수가 대조구와 거의 유사하였다. Paraquat dichloride에 노출된 *I. galbana*의 성장률은 농도가 0.6 ppm (NOEC) 이하에서는 대조구와 유의한 차이가 없었으며 (그림 3-39), 0.8 ppm (LOEC) 에서는 대조구와 유의한 차이가 나타났다. 96hr-EC50은 0.898 ppm으로 산출되었다.

Paraquat dichloride



Paraquat dichloride

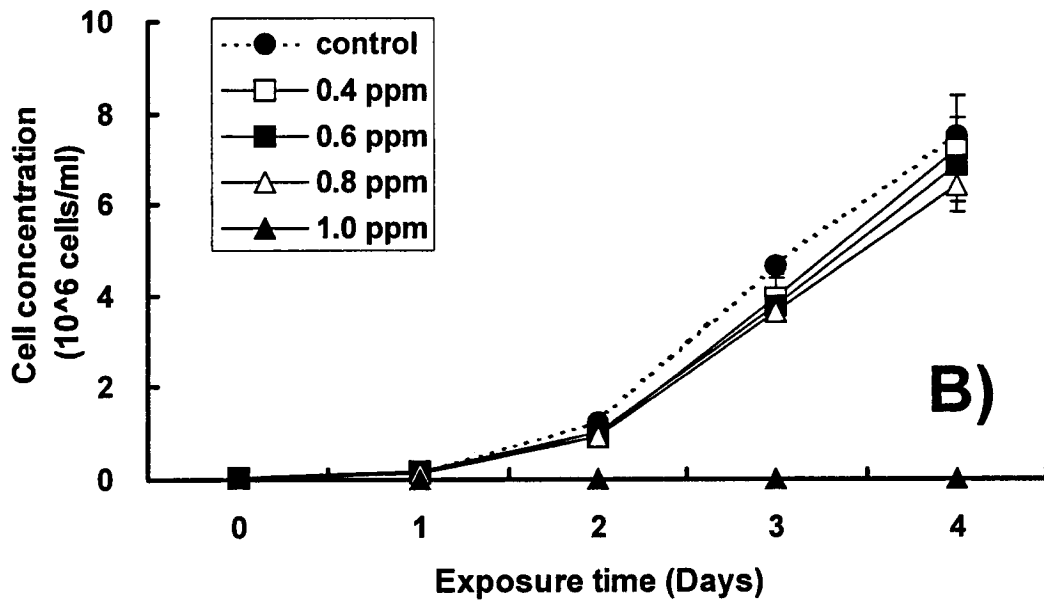


그림 3-38. 제초제 (Paraquat dichloride)의 각 농도별 노출시간에 따른 해양미세조류 (*Isochrysis galbana*)의 세포수 변화.

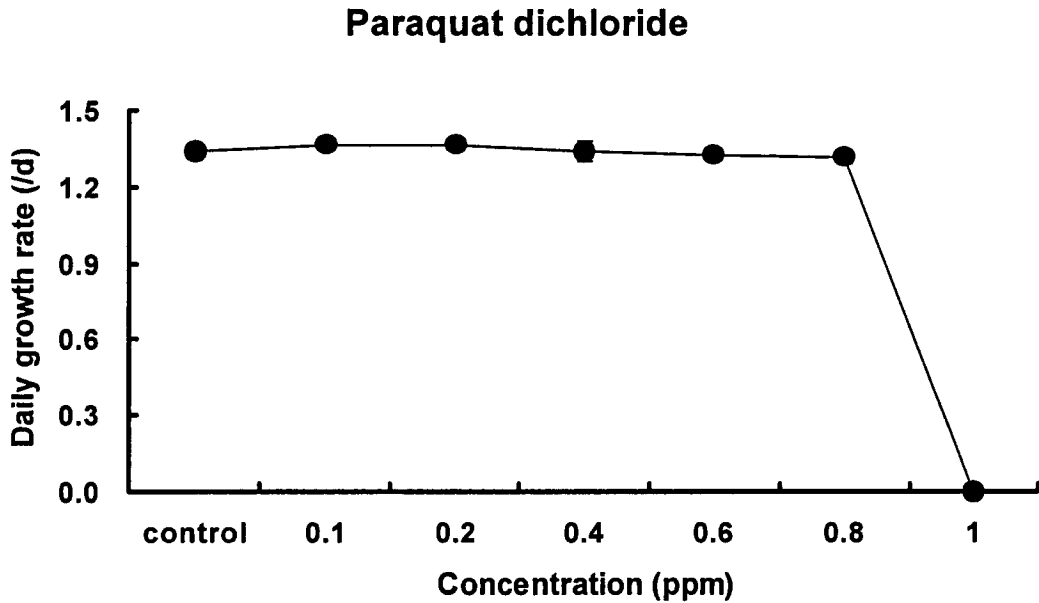


그림 3-39. 제초제 (Paraquat dichloride) 각 실험 농도에 96시간 동안 노출된 해양 미세조류(*Isochrysis galbana*)의 일간 성장률 변화.

마. 각 물질별 독성 파라미터 비교

표 3-18은 본 연구의 실험 결과로 산출된 독성 파라미터를 각 물질별로 나타내고 있다. NOEC, LOEC, 96hr-EC50은 endosulfan과 Hg가 유사하였고, fluoranthene이 이보다 약간 높았으며, 제초제인 paraquat dichloride가 가장 높게 나타났다.

표 3-18. 각 유해물질별 해양 미세조류(*Isochrysis galbana*) 성장 저해 독성 파라미터 비교

(단위: ppm)				
Group	Chemical	NOEC	LOEC	96hr-EC50
Insecticide	Endosulfan	0.01	0.02	0.089
Metal	Hg	0.01	0.02	0.081
Organic compound	Fluoranthene	0.08	0.1	0.090
Herbicide	Paraquat dichloride	0.6	0.8	0.898

12. 유해물질에 대한 생물학적 지시자 (bio-indicator)로서 해산식물의 이용 방안

연안습지를 포함하는 연안해양생태계를 오염시키고 여기에 부정적인 효과를 미치는 유해물질 중 최근 관심이 집중되는 오염물질은 크게 중금속, 석유화합물, 그리고 제초제나 살충제와 같은 유기화합물 세 가지로 구분할 수 있으며, 그 중에 본 연구를 통해 독성영향을 평가하고 보호안전기준 및 관리방안을 마련하고자 하는 유해물질은 유기주석화합물을 포함하는 중금속류와 유기화합물이었다. 석유계열의 탄화수소, 중금속, 그리고 살충제와 같은 유해 오염물질들은 연안생태계로 유입되었을 때 직접적인 독성효과를 발휘하게 된다. 오염에 민감한 종은 아치사 충격을 받을 수 있으며, 장기적으로는 사망에 의한 생물 개체의 감소가 발생한다. 그리고 이러한 생태적인 변화는 생태계 영양단계의 교란을 초래하여 경쟁을 유발함으로써 오염물질에 내성을 가지는 종이 우점할 수 있다. 유기주석화합물을 포함하여 중금속으로 인한 오염의 경우 해산식물에 대한 생리적인 스트레스, 군집 천이의 변형, 그리고 뚜렷한 해산식물 사망의 증가 등으로 유해물질에 의한 부정적인 효과가 분명하게 나타난다. 유류오염에 의한 경우는 전체 천해 연안 생태계를 파괴할 수 있으며, 이로부터 회복되는 데에는 수년이 걸리기도 한다. 유기화합물인 제초제에 오염되는 경우는 극단적으로 연안 해초군락이 파괴되어 복원에 많은 어려움이 뒤따를 수 있으며, 특히 산호군락에서 동물과 조류의 공생에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이와는 다르게 제초제와 유사한 살충제의 경우는 다양한 생물들의 재생산과 재가입을 포함하는 중요한 생물학적인 과정에 참여하는 물질을 교란하여 생물에 대한 부정적인 효과를 미친다.

이러한 직접적인 영향이외에 유해물질에 의한 생태계 교란 (소비자와 자원의 상호작용을 통해 유발되는 간접적 효과)이 가져올 수 있는 간접효과에 대해서도 많은 연구가 있었다 (Pace et al., 1999). 일반적인 용어로 'top-down' (포식자에 의해 하위영양단계가 영향을 받는 것) 또는 'bottom-up' (영양염/먹이 등에 의해 상위영양단계에 영향을 미치는 것)의 원인이 이러한 간접적인 영향에 의해서 발생한다. 일반적으로 'top-down' 효과는 수서군집에서 관찰되고 있으며, 플랑크톤 (Brett and Goldman 1996), 유영생물 (Estes et al. 1998), 산호초 (Hay 1997), 경질 조간대와 조하대 (Menge 1995), 그리고 연질 퇴적물 시스템 (Posey and Ambrose 1994)에서 관찰되고 있다. 일부 수서시스템의 경우는

'bottom-up'과 'top-down' 요인 모두에 반응하는 것도 있다 (Posey et al. 1999). 이렇듯 유해물질에 의한 오염이 가져오는 직간접적인 효과에 의해 교란되는 생태계를 보호하고 관찰하는데 있어서 해산식물은 생태계의 기반을 담당하는 구성원으로서 생물학적 지시자 (bio-indicators)로서 매우 유용할 것으로 판단된다. 또한 적절한 대형해조류 (marine macrophytes)를 대상으로 표준화된 독성평가방법을 개발하고 이용하는 것은 유해물질의 연안생태계에 대한 영향을 효율적으로 평가하고 관련된 지식을 축적하는데 많은 도움을 줄 수 있을 것이다.

Molfetas and Blandin (1981)은 다양한 생물 중에서 생물학적 지시자로 활용될 수 있는 종은 부착종이며, 생태적으로 중요하고, 광범위한 분포를 보여주어야 하며, 다양한 환경적 변이에 대한 민감도가 폭넓게 연구되어진 종이어야 한다고 지적하고 있다. 또한 환경오염에 대한 생물학적 지시자의 이용은 연안습지 생태계의 보존에 적용될 수 있는 생태적인 연구와 평가에 활용될 수 있어야 한다 (Rainbow and Philips 1993).

연안 생태계에서 녹조류의 대발생으로 흔히 발견되는 갈파래 (*Ulva* sp.)나 파래류 (*Enteromorpha* sp.)의 경우는 부영양화에 대한 생물학적 지시자로서 흔히 이용되며 (Sfriso and Marcomini 1997, Fong et al. 1998), 미량 중금속 오염에 대한 생물학적 모니터링에 있어서 대형해조류의 이용은 많은 연구들에서 보여주고 있다 (표 3-19). 이제까지는 모자반류 (*Fucus* sp., *Ascophyllum* sp., *Sargassum* sp., *Ulva lactuca* 등이 이용되어 왔다 (Rainbow and Phillips 1993, Phillips 1994).

지역별로는 온대해역에서 가장 많이 이용되는 bio-monitoring 종은 녹조류인 *Ulva lactuca*이며, 최근 *Enteromorpha* 속이 bio-monitoring 종으로 가장 많은 지지를 받고 있다. 그러나 *Enteromorpha* 속내에서도 다양한 종이 존재하고 이들이 동정이 쉽지 않은 점을 들어 bio-monitors로의 이용에 적절함이 문제로 지적되고 있다 (Phillips 1994). 유럽이나 미국에서 가장 많이 이용되는 종은 *Fucus vesiculosus*가 가장 광범위하게 이용되고 있다 (Rainbow and Philips 1993). 녹조류에서는 *Enteromorpha* 속이 가장 폭넓게 이용되고 있으며 (Phillips 1995), 홍콩의 경우에는 *Enteromorpha crinita*가 중금속 오염에 대한 bio-monitoring 종으로 활용되고 있다 (Wong et al. 1978).

표 3-19. 중금속 오염에 대한 생물학적 지시자로서 이용되는 해산식물.

Marine Plant Species	Metals	References
<i>Amphibolis antarctica</i>	Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn	Harris et al. (1979)
<i>Cymodocea nodosa</i>	Cr, Cu, Ni, Al, Ca, Cd, Fe, K, Mg, Na, Pb, Zn	Catsiki and Panayotidis (1993), Malea (1993) Malea and Haritonidis (1995)
<i>Cymodocea rotundata</i>	Cd, Cu, Pb, Zn	Nienhuis (1986)
<i>Enhalus acoroides</i>		
<i>Halodule uninervis</i>		
<i>Halophila ovalis</i>		
<i>Halophila stipulacea</i>	Al, Cd, Cu, Fe, K, Na, Pb, Zn	Malea and Haritonidis (1989) Malea (1994a,b) Malea and Haritonidis (1996)
<i>Heterozostera tasmanica</i>	Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn	Harris et al. (1979) Fabris et al. (1982)
<i>Posidonia australis</i>	Cd, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn	Ward (1987)
<i>P. oceanica</i>	Cd, Cr, Cu, Pb, Zn, Hg, all	Campanella et al. (2001) Capiomont et al. (2000) Pergent-Martini and Pergent (2000)
<i>Syringodium isoetifolium</i>	Cd, Cu, Pb, Zn	Nienhuis (1986)
<i>Thalassia hemprichii</i>		
<i>Thalassodendron ciliatum</i>		
<i>Zostera marina</i>	Cd, Cu, Cr, Pb, Zn	Faraday and Churchill (1979), Brix et al. (1983) Lyngby (1991)
<i>Zostera muelleri</i>	Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn	Harris et al. (1979) Carter and Eriksen (1992)

이 외에도 다양한 환경스트레스에 대한 biomarkers로서 해산식물의 페놀화합물의 변이를 추적하는 연구 (표 3-20), 해산식물의 산화스트레스분자에 있어서 변화 (in vitro experiment), 중금속 또는 외부기원물질에 의한 해산식물 bio-transformation 분자와 효소의 유도 등 해산식물의 생리적인 특성을 용하여 bio-indicators로 용할 수 있는 다양한 연구들이 보고되어 있다. 하지만 우리나라 연안에 서식하는 해산식물을 대상으로 다양한 유해물질에 대한 생물학적 지시자 (bio-indicator) 또는 biomarkers에 관련된 다양한 독성효과에 대한 정보의 부재는 유해물질에 의한 환경오염으로부터 회복을 더디게 할 뿐만 아니라 효율적인 관리방안의 수립 및 연안습지 해초군락의 보호를 더욱 어렵게 만들

고 있는 실정이다.

표 3-20. 환경스트레스에 대한 biomarkers로서 해산식물의 페놀화합물을 이용한 연구.

Stress	Species	References	
Infection by microorganisms	<i>Zostera marina</i>	Vergeer et al. (1995)	
Interspecific competition	<i>Posidonia oceanica</i>	Vergeer and Develi (1997)	
		Cuny et al. (1995)	
Hg	<i>P. oceanica</i>	Agostini et al. (1998)	
		Ferrat (2001)	
		Agostini et al. (1998)	
Cu	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Ferrat (2001)	
Grazing/phenolic compounds concentration	<i>Different species of Chlorophyta, Phaeophyta, Rhodophyta</i>	Toth and Pavia (2000)	
		Anderson and Velimirov (1982)	
		<i>Alaria marginata</i>	Steinberg (1984)
		<i>Fucus vesiculosus,</i>	Steinberg (1985)
		<i>Halidrys siliquosa,</i>	
		<i>Eisenia arborea</i>	
		<i>Dictyota spiralis,</i>	Steinberg and Paul (1990)
		<i>Dictyopteris australis,</i>	
		<i>Lobophora variegata,</i>	
		<i>Cystoseira trinodis,</i>	
<i>Sargassum sp.</i>			
<i>Different species of</i>	Steinberg (1985)		
<i>Chlorophyta, Phaeophyta,</i>	Steinberg and Van Altena (1992)		
<i>Rhodophyta</i>			
<i>Sargassum sp.</i>	Steinberg et al. (1991)		
Grazing, desiccation, UVB	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Pavia and Brock (2000)	

생물학적 지시자 (bio-indicators)로서 해산식물의 민감도를 다른 생물에 비교하여 월등하다는 것을 보여주는 연구사례에서 구리의 경우에 가장 민감한 경우는 구리 $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ 을 첨가할 때, *F. vesiculosus* 발아가 저해되는 경우였다. 페놀(phenol)에 대한 자료들은 많은 대형해조류들이 다른 수서생물들보다는 더 민감하다는 것을 보여주고 있다. 경우에 따라서는 대형해조류의 생사 중 특정시기에 측정된 독성자료는 더 민감한 결과를 보여

줄 수 있으며, 예를들어 홍조류인 *Ceramium strictum*의 reproduction에 대한 EC50값은 40 mg L⁻¹ phenol로 매우 민감한 결과를 보여준다. 또한 암배우체의 reproduction organs의 발달은 단지 2 mg L⁻¹ phenol의 농도만으로도 저해현상이 나타날 수 있다 (표 3-21).

표 3-21. 구리와 페놀에 대한 대형해조류와 다른 수서생물과의 민감도 비교 (예시, Data from AQUIRE database (www.epa.gov/ecotox)).

Marine organisms	LC/EC50	
	Cu (ug L ⁻¹)	Phenol (mg L ⁻¹)
Marine phytoplankton (<i>Phaeodactylum tricornutum</i>)	<10-50	100-500
Amphipods	90-50,000	
Saltwater invertebrates		10-250
bivalves	5.3-40,000	
Fish	460-58,300	1-300

가. 해산식물을 이용한 유해물질 생태독성평가 방법의 표준화

연안생태계에서 일차생산자인 해산식물은 생태계를 유지하는 가장 기본적인 요소이며, 해조류와 같은 독립영양생물들은 다른 생물의 대사작용과 먹이연쇄에 에너지와 빛을 결합시켜 생태계를 유지하는데 있어서 의심의 여지없이 최우선적인 것이다. 연안생태계에 대한 서로 다른 요구들은 충족하기 위해서 그곳에서 생육하는 생물들에 대한 다양한 영향을 평가하기 위하여 적절한 평가방법을 개발하는 것은 매우 중요하다는 것이다. 일반적으로 단일 종에 대한 독성시험은 단일화합물 또는 복잡한 배출수에 대한 독성도를 측정하는 데 흔히 이용되며, 즉 이러한 독성시험은 ISO 또는 OECD 등에서 표준화된 방법을 이용하게 된다.

유해물질에 대한 생태독성시험을 수행하는데 있어서 식물보다 동물이 좀 더 민감할 것이라는 가정은 수서생물들이 그곳에 사는 식물보다 화학물질에 좀 더 민감하다는 것을 발견한 오래된 연구 (e.g. Morgan, 1972; Kenaga and Moolenaar, 1979)에 그 밑받침을 두고 있다. 하지만 Benenati (1990)의 연구결과에 따르면 유해물질에 대한 독성연구들의 50% 정도가 동물보다 조류(algae)가 더 민감하다는 것을 보여주고 있으며, 30% 만이 동물이 더 민감하다는 결과를 보여주고 있다고 보고하였다. 그래서 Benenati (1990)는 독성평

가에 이용되는 생물의 민감도(sensitivity)는 독성평가에 이용되는 유해물질과 생물에 따라 다를 것이라고 결론내리고 있다. 그래서 이들을 일반화시키기는 매우 힘들며, 유해물질 오염으로부터 효율적인 환경영향평가를 위해서는 식물과 동물 모두 서로 다른 생물로부터 다양한 독성평가 결과를 얻는 것이 필요하다고 결론짓고 있다.

최근의 독성평가에 이용되는 식물은 미세조류 (microalgae)가 대부분이며, 기본적으로, 국제표준방법 (ISO, 1989, 1995)에 이용되는 담수종은 *Selenastrum capricornutum*이며, 해산종은 *Phaedactylum tricornutum*이 거의 대부분 이용되고 있다. 그러나, 연안환경의 조간대 지역에서 생태계의 기반은 대형해조류들이 담당하고 있으며, 일차생산자이자 연안 조간대 생태계의 구성원임에도 불구하고 이들을 이용하는 독성평가는 매우 드문 실정이며, 표준화된 방법은 전무하다. 그래서 단일화합물질 그리고 인간의 다양한 활동에 따른 배출수 등에 대한 대형해조류를 이용한 독성효과에 대한 지식이 이들을 다양한 환경적인 위협으로부터 보호하고 평가하기 위하여 시급하게 필요하며 본 연구를 통해 그 기반을 마련 다고 할 수 있다

국제적으로 표준화된 생태독성평가 방법 중에 대형해조류를 이용하는 방법은 지금 현재 존재하지 않으며, 미국과 캐나다에서는 ASTM에서 정한 홍조류의 일종인 *Champia parvula*의 재생산에 대한 독성평가 방법을 이용하고 있다 (USEPA 1998). 이 방법은 Steele and Thursby (1983)에 의해 최초로 개발된 대형해조류를 이용한 독성평가 방법이었으며, 이 종에 대해서는 여러 유해물질에 대한 독성효과들이 보고되어 있다 (Thursby and Steele, 1984; Thursby et al., 1985). *C. parvula*는 열대와 아열대 종으로 Eklund (1993, 1995, 1998)가 온대지역에 서식하는 홍조류 *Ceramium strictum*을 이용하여 동일한 방법을 개발하였다. 대형해조류를 이용한 독성시험 프로토콜은 갈조류인 *Laminaria* spp. 와 *Fucus* spp.를 이용하는 방법도 개발되어 있다 (Steele and Thursby, 1995).

유해물질에 의한 생태독성효과의 일반적인 메커니즘은 광합성이나 미토콘드리아에서 전자수송을 차단하는 것과 같은 생물학적인 과정을 저해하는 것이 일반적이다 (Babu et al., 2005). 제초제의 phytotoxic한 활동은 광계2에서의 전자전달을 차단하거나 교란하는 것에 기초를 두고 있으며, 일부 다른 제초제는 엽록소 내의 틸라코이드 세포막 안에 존재하는 D1 단백질의 quinone site에 결합함으로써 광합성의 기능을 저해하는 것들도 있다. 이외에도 이제까지의 연구에서 유해물질의 식물독성 (phyto-toxicity)에 의한 위해는 광합성의 활성, 2차대사산물, heat shock proteins, 무독화효소, 그리고 산화스트레스에 대

한 biomarkers 등 은 빛, 온도, hydric/haline 스트레스, 또는 제초제, 중금속, 유기오염물질과 같은 다양한 스트레스에 대한 지시자로 측정되어 왔다 (Ferrat et al. 2003).

다양한 endpoints를 사용하는 해산식물을 이용한 생태독성평가 방법에서 구체적인 평가 프로토콜 또한 표준화 되어 있지 않아 자료의 직접적인 비교를 힘들게 하는 가장 중요한 문제로 지적되고 있다. 이제까지 연구에서 노출시간의 경우, 홍조류나 녹조류를 대상으로 한 생태독성영향평가에서는 1-7일까지가 가장 보편적이었으며, 갈조류의 경우에는 좀 더 길어져 2주까지 유해물질에 노출하는 경우가 가장 일반적이었다. 생태독성시험이 이루어지는 동안에 주어지는 온도조건은 홍조류의 경우는 15℃ 이상에서 이루어지는 것이 일반적이었으며, 반면에 갈조류의 경우에는 15℃ 이하에서 이루어지는 것이 가장 보편적이었다. 녹조류를 대상으로 한 독성시험의 70% 이상은 10-15℃ 사이에서 생태독성시험이 수행되는 것이 가장 일반적인 경우였다. 광 조사 조건 또한 20-200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이 가장 보편적이었으며, 명암주기는 12h L:12h D가 가장 일반적이었다. 유해물질의 생태독성 평가 자료의 직접적인 비교를 위해서는 다양한 생태독성평가 방법의 표준화는 가장 시급하게 이루어져야 할 것으로 사료된다.

나. 엽록소 형광측정법을 이용한 해산식물중에 대한 표준화된 생태독성평가방법의 개발 및 이용

최근의 국내, 외의 연구들은 독성평가시스템을 간소화하여 빠르고 간편하게 많은 양의 시료를 제한된 시간 안에 생태독성시험을 수행할 수 있는 방법에 대해 많은 연구를 하였다. 단세포조류를 이용하는 경우, 간편화된 독성평가시스템으로 이제까지 많은 연구에 이용되어 왔다 (Blaise et al. 1997, Eisentrager et al. 2003). 이와 비교해서 대형 해산식물을 이용하는 생태독성평가시스템은 식물 엽상체의 느린 성장률로 인하여 생태독성을 평가하는데 많은 시간을 요구한다. 또한 생태독성평가에 이용되는 종의 생태적 특징인 느린 성장률 때문에 유해물질에 대한 독성평가시험에서 대상 유해물질에 대한 노출시간 또한 2주 또는 그 이상 장기적으로 노출시키는 경우가 대부분이었다. 대형 해산식물에 대한 유해물질의 생태독성시험법은 정확한 실험을 위해 많은 양의 해수를 필요로 하며, 큰 수조나 메소코즘에 장기간 노출하는 등 많은 노력이 시간을 필요로 한다. 또한 생태독성시험을 유지하는 동안에도 많은 양의 해수 (0.1 - 50 L)를 소모하므로 그에 따라 유

해물질 또한 정확한 독성효과를 얻고 효율적인 테스트 농도를 유지하기 위하여 많은 양이 소모될 수 있을 것이다. 게다가, 일정한 시험조건을 유지하기 위해, 예를 들면 지속적인 flow-through water system 등, 시험조건을 유지하고 안정적인 영양염 및 pH 조건을 유지하는 등에 많은 노력이 필요한 것이 사실이다. 이러한 이유로 대형 해산식물을 이용한 유해물질에 대한 빠른 생태독성평가 방법은 여전히 일반화되지 않고 있으며, 부가적으로 대형 해산식물을 이용한 생태독성평가 방법을 표준화하기 위하여 이용할 수 있는 자료 또한 매우 제한적이다.

대형해조류를 이용한 생태독성영향평가 방법에서 이제까지의 연구는 다양한 endpoints를 이용하고 있었다. 대형해조류의 성장저해, 비정상적인 성장, 발아성공율, 배우체 성숙 지연과 gametogenesis, 근경과 사상체 길이생장, 포자 사망률, 광합성 및 호흡 저해, 난자 생산저해 등이 endpoints로 사용되고 있었으며, 많은 대형해조류들이 복잡한 생사(예를 들면, 단상과 복상시기)를 갖기 때문에 생사 단계별로 서로 다른 단계에서 독성효과를 측정할 수 있기 때문인 것으로 보인다. 대부분의 연구들이 이러한 다양한 endpoints들을 사용함으로써 문제가 되는 것은 독성영향평가의 기본적인 dose-response curve를 통해 계산되는 반수치사농도(LC50) 또는 반수영향농도(EC50)과 같은 독성효과를 비교할 수 있는 수치들을 계산하기 어렵다는 문제가 있으며, 다른 결과와 직접적인 비교를 어렵게 하는 원인이 된다.

본 연구를 비롯한 많은 연구들에서 미세조류를 포함한 해산식물을 이용하여 유해물질의 생태독성을 평가하는데 있어서 광합성에 대한 저해를 감지하는 것은 다양한 endpoints들 중 가장 일반적이며 신뢰할 수 있는 생리적 특성이다 (Huang et al., 1995, 1997). 또한 서로 다른 화학적 요인에 대한 반응으로서 해산식물이 받는 스트레스에 대한 빠르고 민감한 bio-indicator로서 엽록소형광을 측정하는 방법의 실제적인 적용은 용도에 있어서도 가장 유용할 것이다 (Mallakin et al., 2002). 게다가 지난 10여년 동안, 많은 연구를 통해 식물의 광합성에 대한 비파괴적인 방법으로 다양한 엽록소 형광을 이용하여 측정하는 기술은 좀 더 정교하게 발전해왔으며, 측정은 단일 엽록소, 세포에서부터 미세조류, 대형조류 그리고 고등식물까지 가능하다 (Grunwald and Köhl, 2004).

엽록소형광측정법에 기초한 생태독성평가 방법은 광합성 과정 중의 하나인 광계2의 작동을 저해하는 효과를 측정하는데 있어서 1)대형 해산식물을 대상으로 한 bioassay를 정립하고 다른 독성평가 결과들을 비교하며, 2)대형 해산식물에 대한 시험법을 실시하는데 소요되는 시간을 절약할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 엽록소형광측정법을 이용한 생태독성시험법은 다른 방법에 비교하여 빠르고 많은 양의 시료를 처리가 가능하며

다른 생태독성측정법과 비교한 결과 EC50s값에서 양호한 상관관계를 보여주고 있다 (표 3-22). 이러한 결과를 바탕으로 새로운 bioassay 방법으로 정립할 수 있을 것으로 사료된다.

표 3-22. 제초제를 대상으로 엽록소형광과 성장률로 측정된 독성 파라미터의 비교.

Marine Plants	EC50 for Atrazine ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Chlorophyll Fluorescence	Growth rate
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	4.0	2.45
<i>Synechococcus elongatus</i>	0.51	20.4

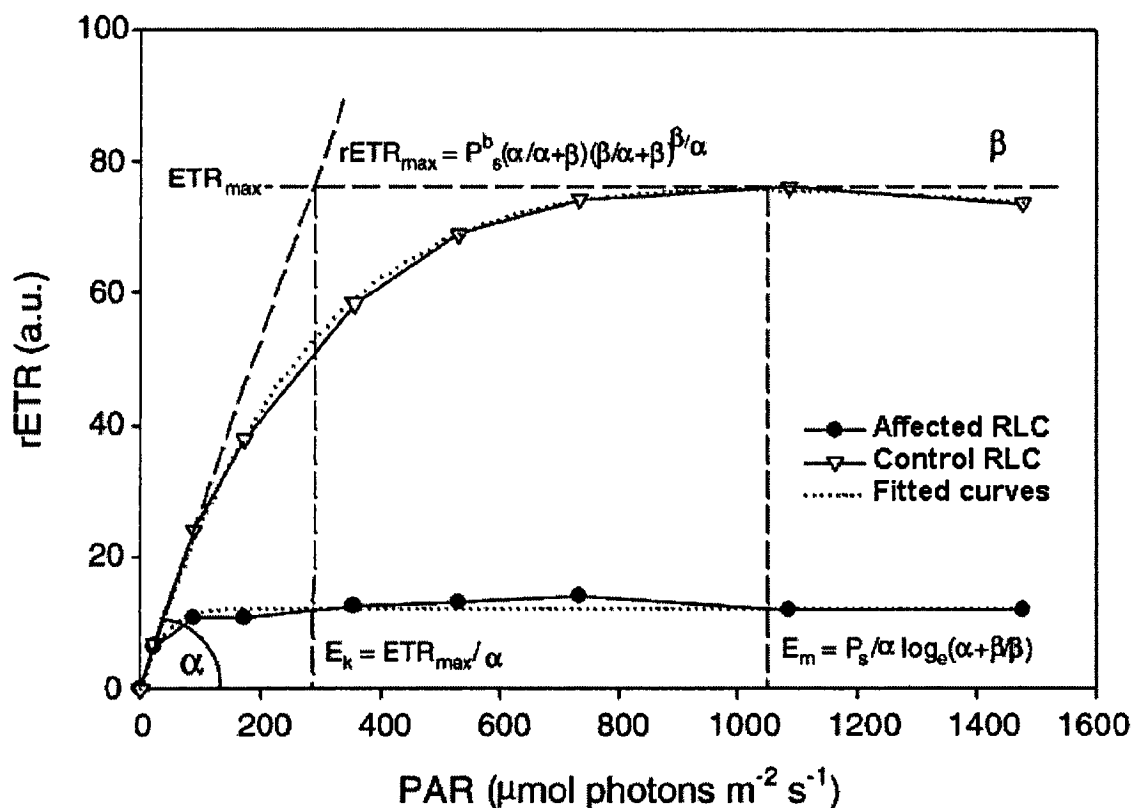


그림 3-40. 엽록소형광측정법을 이용하여 측정된 빠른 광반응곡선 (Rapid Light Curves, RLCs).

그림 3-40는 엽록소형광측정법을 이용하여 측정된 빠른 광반응곡선 (RLCs)으로 식물

의 광합성을 측정하는데 있어서 가장 많이 측정하는 일차생산력 그래프로 잠재적인 일차 생산력을 의미하고 있다. 그림에서 볼 수 있듯이 유해물질에 의한 영향을 가장 극명하게 보여줄 수 있는 endpoints의 하나로 유해물질의 일정한 농도범위에서 측정함으로써 손쉽게 생태독성 파라미터들을 구할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

13. 연안 식물군락 보호 안전기준 마련을 위한 종-민감도 분포 모델 (SSD model)

유해물질에 의한 환경오염이 발생을 때, 실제로는 많은 종류의 종들로 구성되어 있는 복잡한 군집이 오염에 노출된다는 것을 의미한다. 복잡한 군집구조를 갖는 환경에서 해산식물에 대한 유해물질의 위해성을 평가하고 보호안전기준 마련을 위해서는 고려하여야 할 많은 요소들이 존재한다. 광량, 온도, 영양염과 같은 식물의 생육에 필수적인 환경요인에서부터 경쟁, 포식 등 고려하여야 할 환경요인은 너무나 다양하다. 다양한 요인의 변화 하에서 유해물질에 대한 생태위해성을 평가하고 모델을 통하여 적절한 안전기준 마련을 위한 절차와 과정의 정립은 매우 중요하다 (그림 3-41). 이러한 절차와 과정 중에 생태독성 발현에 대한 예측모델 (종-민감도 분포 모델)을 이용하여 시뮬레이션을 통한 다양한 조건하에서 주요 해산식물에 대한 생리적인 영향을 미칠 수 있는 각 유해물질의 농도를 계산할 수 있다는 것은 매우 중요하다. 또한 각각의 해산식물을 보호할 수 있는 안전농도 기준은 유해물질별 최저영향농도에 안전계수 (safety factor)를 고려하여 작성하여야 한다. 유해물질의 생태독성 영향은 노출 시간에 비례하여 증가하는 것이 일반적이며, 실제 환경에서의 생태독성 영향은 단기간의 실험 (급성영향)에서 영향을 미치는 농도보다 훨씬 낮은 농도에서 영향을 미칠 수 있다. 따라서 실험을 통하여 구해지는 영향 농도에 일정한 안전계수를 곱해 현실적으로 해산식물을 보호할 수 있는 안전기준을 마련하는 것이다. 또한 보다 정확한 예측을 위해서는 장기적인 배양 실험 (만성영향)을 통해 각 해산식물별, 유해물질별 정확한 영향 농도 범위를 구하려는 노력이 요구되며, 실제 자연환경과 동일한 기간과 조건에서 실험을 한다는 것은 불가능하므로 다양한 접근 방식을 통해 그 결과를 도출해야 한다.

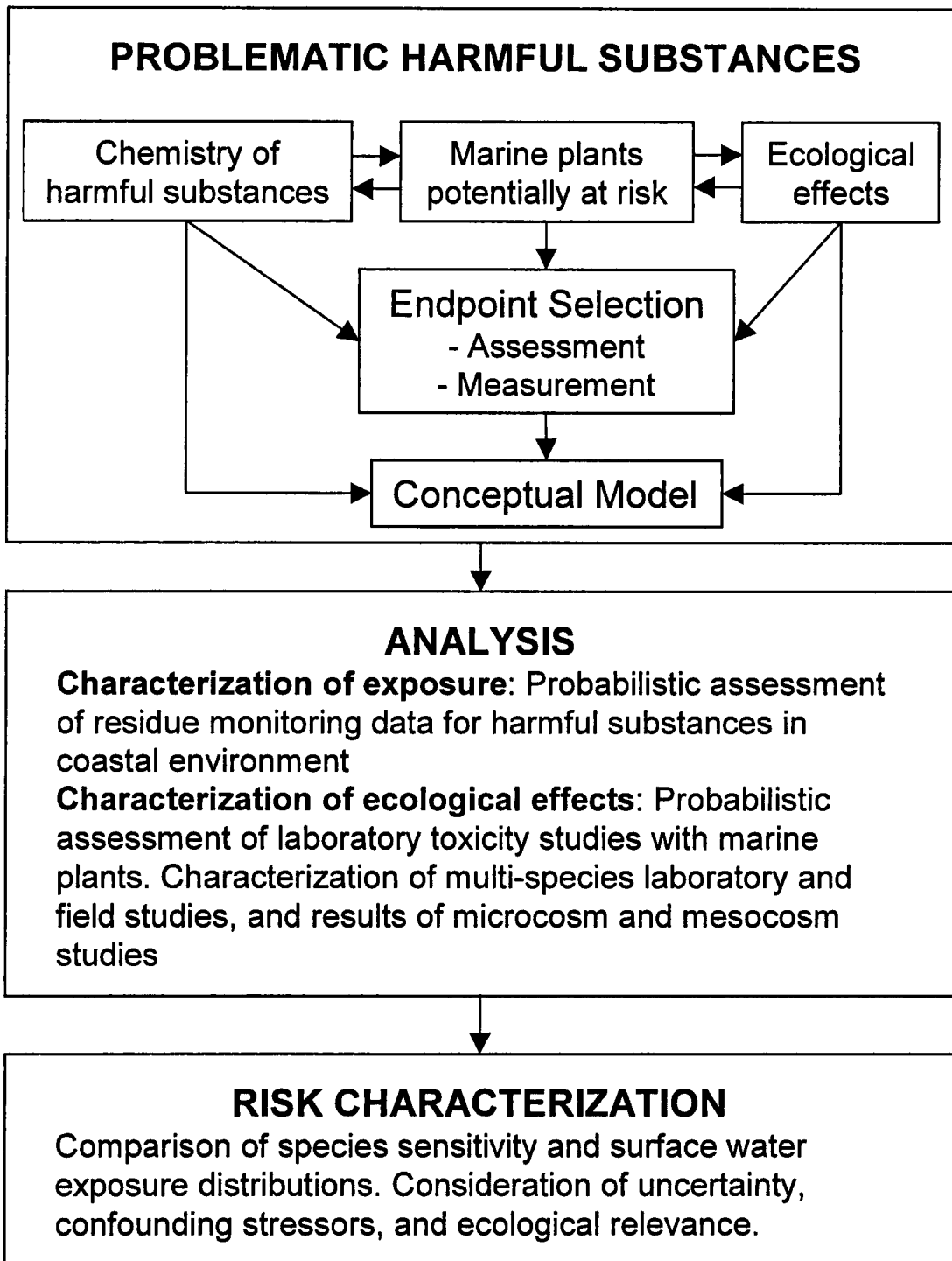


그림 3-41. 해산식물에 대한 안전기준 마련을 위한 유해물질 생태위해성평가 과정.

유해물질에 대한 생태위해성평가에는 외삽을 이용하는 두 가지 접근방법이 있으며, 하나는 안전계수 (safety factors)를 적용하는 방법과 또 하나는 종-민감도 분포 (species-sensitivity distributions, SSDs)를 이용하는 방법이 있다. 전자의 방법은 생태계 보

호를 위하여 기준이 되는 요인에 가장 민감한 endpoints를 이용하여 얻은 영향농도를 가지고 예상되는 독성물질의 효과가 발생하지 않은 농도를 산출하는 방법이다. 종-민감도 분포는 가장 민감한 종에 초점이 맞춰져 있지 않고, 생태계 군집을 대표할 수 있다고 판단되는 시험종의 다양한 민감도의 분포에 초점이 맞춰져 있다. 종-민감도 분포 (SSD) 모델의 목적은 유해물질의 영향농도 분포 누적에 의하여 환경에서 대부분의 종 (95% 이상, Wheeler et al. 2002)을 보호할 수 있는 유해물질의 화학적 농도를 추정하는 것이고, 종 민감도에 대한 주의 깊은 선택에 기초를 두고(Van Straalen 2002) 모델링 후 누적 농도분포의 가장 낮은 농도 수준을 측정하는 것이다 (Duboudin et al. 2004).

종-민감도 분포 모델을 이용한 접근방식은 환경 안전기준을 도출하기 위한 결정과정에서 가장 유용한 방법으로 알려져 있으며, 유해물질의 생태위해성 평가를 위한 도구로 여러 연구에서 이용되고 있다 (Solomon et al. 1996, Steen et al. 1999, Posthuma et al. 2002). 종-민감도 분포 모델은 생물군집 안에서 유해물질에 대한 다양한 범위의 민감도들을 포괄할 수 있는 서로 다른 분류군을 대표할 수 있는 선택된 종에 의해 단일종을 이용한 독성자료의 집합이다. 종-민감도 분포 모델의 장점은 개체 또는 개체군 수준에서 이용되는 endpoints (growth rate 또는 reproduction)에 기초한 단일종 생태독성자료로부터 이용가능한 대부분의 자료를 용할 수 있다는 것이다. 비록 종-민감도 분포 모델이 기존의 이용 가능한 자료를 용해야 한다는 제한은 있으나, 이 모델은 복잡한 군집수준에서의 영향을 평가하는데 반드시 필요하다는 것이다.

유해물질에 의한 생태 위해성을 평가하기 위한 대부분의 독성학적 자료들은 단일종에 대한 시험결과들이며, 독성영향 농도들은 보통 개체 또는 개체군을 대상으로 희석한 농도구배에 대해서 시험한 것들이다. 또한 서로 다른 영양단계별 생물들을 대표하는 생물 (예를 들면, 조류, 물벼룩 또는 어류 시험)들을 이용하여 얻은 결과들이다. 해산식물을 이용하여 측정한 독성자료가 엽록소형광측정법을 이용한 결과이던 성장률을 endpoints로 이용하여 얻은 결과이든 독성평가 시험에서 유해물질에 대한 노출시간은 1시간에서 3주까지 변이가 심하기 때문에 이를 통하여 측정한 반수영향농도 (median effect concentration EC50)는 직접적인 비교가 매우 어려운 것임을 앞서도 논의하였다 (Snel et al. 1998). 하지만 이러한 결과들을 취합하여 유해물질이 다양한 대형 해산식물에 대해 독성영향을 미칠 수 있는 농도를 종-민감도 분포 (species-sensitivity distribution, SSD) 모델을 이용하여 결정할 수 있다. 또한 대형 해산식물에 대한 특정 유해물질의 생태독성영향농도가 미세조류에 비하여 상대적으로 높기 때문에 미세조류와 대형 해산식물의 독성민감도에 대한 차

이는 효율적인 SSD 모델 분석을 통하여 그 격차를 줄일 수 있다 (그림 3-42).

그림 X는 9개 분류군의 대형 수서식물과 10개 분류군의 미세조류를 대상으로 유해물질에 대한 독성시험 결과 (EC50)를 이용하여 종-민감도 분포 모델 (Species-sensitivity distribution model)을 통하여 미세조류와 대형식물 간에 매우 유사한 독성결과를 보여주고 있으며, 그 차이는 거의 없다는 것을 보여주고 있다 (Brock et al. 2004).

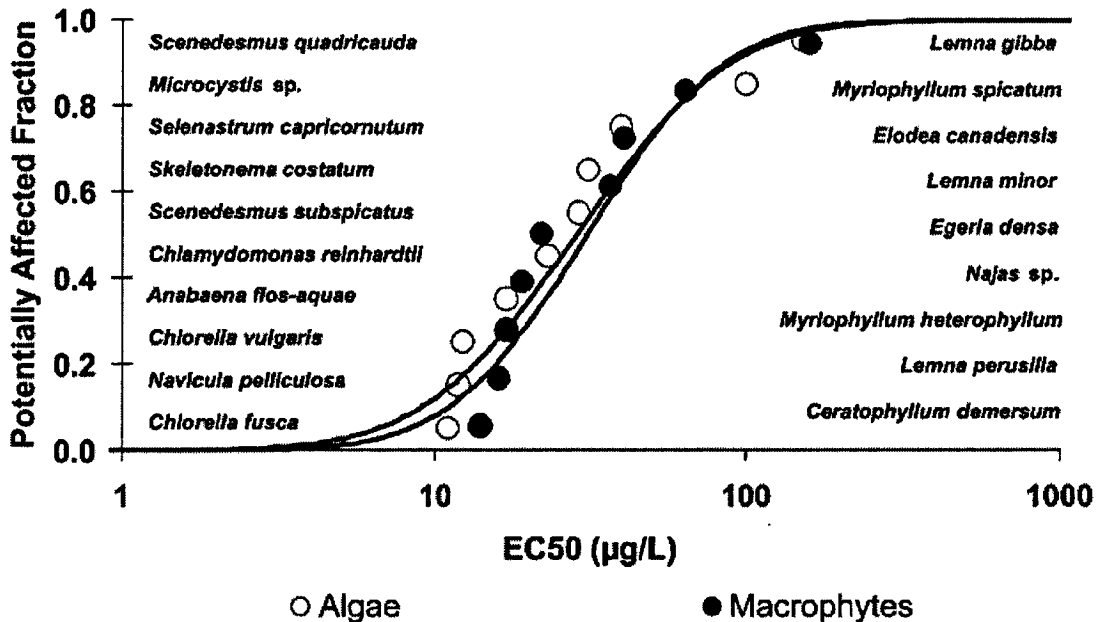


그림 3-42. 종-민감도 분포 모델 (Species-sensitivity distribution model)을 이용하여 분석한 특정 유해물질에 대한 미세조류와 대형 수서식물 간의 독성민감도 비교 (from Brock et al. 2004).

대형 수서식물 6개 분류군에 대하여 만성독성 (NOEC) 결과와 19개 분류군에서 얻은 급성독성 (EC50) 결과를 피팅하여 분석한 종-민감도 분포를 보여주고 있으며, 유해물질에 의한 대형 수서식물의 급성과 만성영향에는 안전계수가 약 5정도 되고 있음을 보여주고 있다 (그림 3-43). 또한 본 연구를 통해서 얻은 *Isochrysis galbana*의 성장률에 대한 NOEC 값을 표시한 결과 종-민감도 분포 모델 (SSD model)의 피팅 라인에 위치하고 있으며, 종-민감도 분포 모델의 피팅과정에서 HC5 (hazardous 5%) 또는 HC10 (hazardous 10%) 즉, 5% 또는 10% 생물이 피해를 받는 농도 값을 구할 수 있으며, 이런 값들은 보호 안전 기준을 마련하는데 이용할 수 있을 것이다.

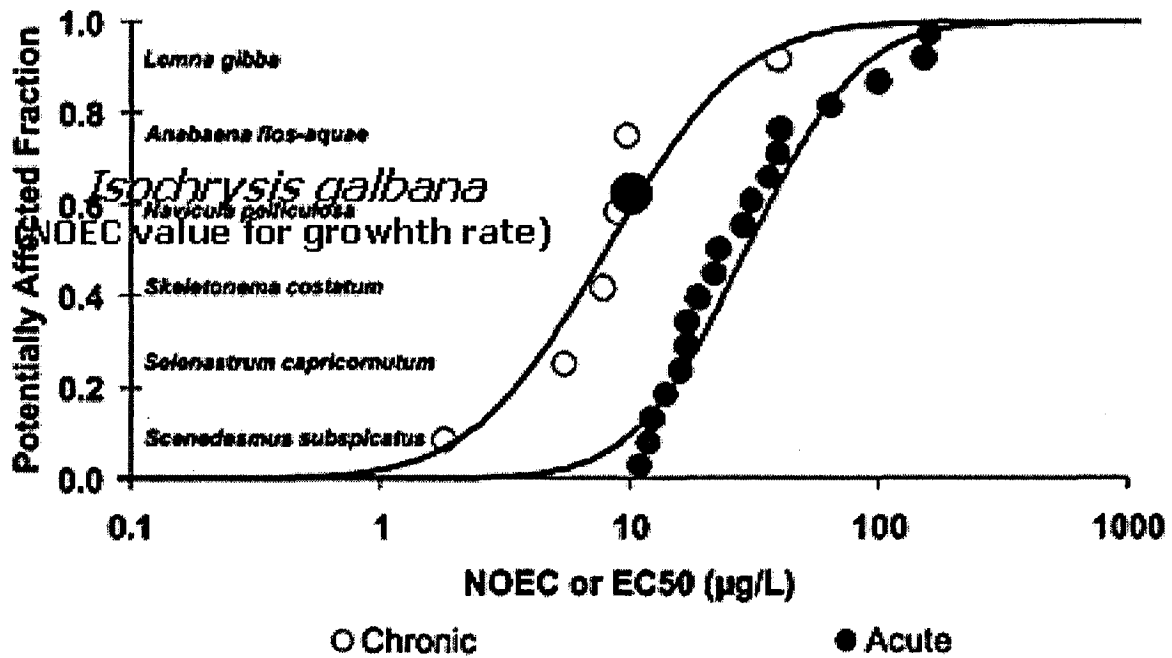


그림 3-43. 종-민감도 분포 모델 (Species-sensitivity distribution model)을 이용하여 분석한 특정 유해물질에 대한 수서식물 간의 만성독성과 급성독성의 민감도 비교 (from Brock et al. 2004).

그림 3-44는 수서식물과 수서동물 (무척추동물 포함) 간의 급성독성 자료를 기초로 하여 종-민감도 분포 모델을 이용하여 특정 유해물질에 대한 민감도를 비교한 결과, 수서식물이 최소 100배에서 1000배까지 민감하다는 것을 보여주고 있다.

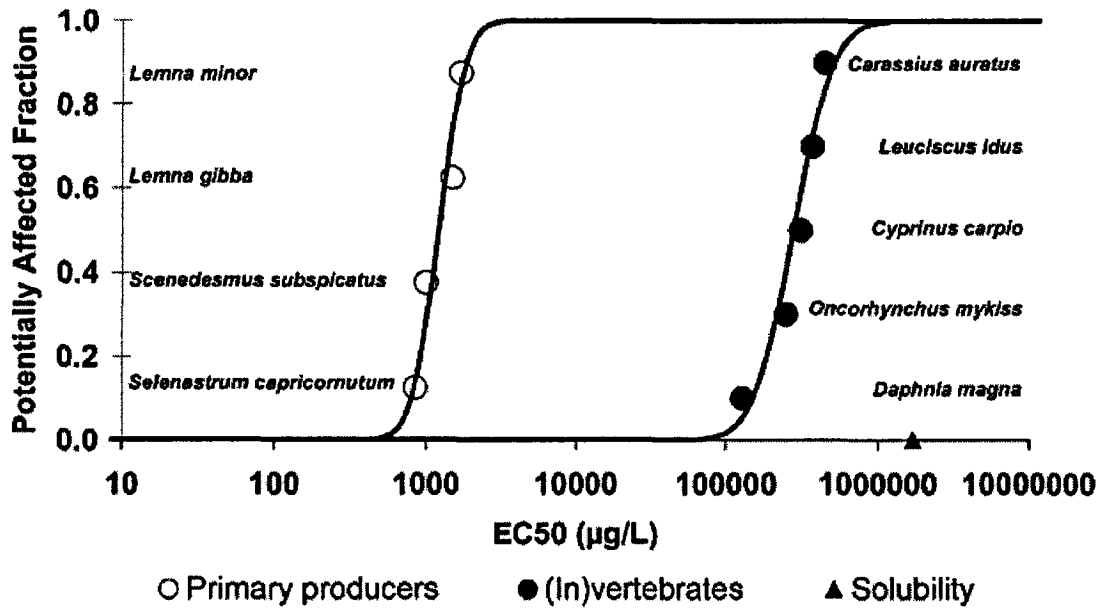


그림 3-44. 특정 유해물질에 대한 수서식물과 수서동물 (무척추동물 포함) 간의 중-민감도 분포 모델에 따른 민감도 비교 (from Brock et al. 2004).

가장 높은 수준의 생태위해성 평가는 분명한 규칙을 가지고 환경에 적절히 부합할 수 있는 가장 낮은 수준에서의 생태독성 평가 결과들을 활용하여 관리목적에서 생태적으로 수용 가능한 농도수준을 제시할 수 있다 (Campbell et al. 1999, Van Dijk et al. 2000, Giddings et al. 2002). 이러한 결과들은 생태적 유의성을 기준으로 실제 유해물질 부하에 관련한 기준치 마련 및 관리보호 대책을 수립할 수 있는 자료로서 매우 유용할 것이며, 더 이상의 가치있는 연안습지 파괴를 막을 수 있을 것이다.

제 3 절 고찰

연안습지 (연안생태계)에서 흔히 관찰할 수 있는 다양한 해초(seagrass), 해조(marine algae), 그리고 염생식물(salt plant)들은 연안습지르 구성하는 식물군락으로 지구상에서 생산력이 가장 높은 생태계 중의 하나이다. 또한 이들은 높은 일차 생산력으로 연안 및 하구생태계를 지탱하고, 어류 및 패류 등과 같은 수산자원의 서식처와 산란처로 이용됨으로서 경제적 가치가 매우 높은 지역이기도 한다. 따라서 연안의 생산성 향상과 수산자원을 위해 보호해야 할 중요한 지역이다. 하지만 이러한 연안습지가 인간 활동에 의해 육지로부터 유입되는 다양한 유해물질에 노출됨으로 인하여 회복하기 힘든 위해를 받고 있으며, 결국에는 파괴되어 사라질 수 있다는 것에 많은 주의를 기울여야 한다.

연안습지 생태계로 유입되는 중금속, 농약, 제초제, TBT, 유기화합물을 포함한 다양한 유해물질들에 의한 연안습지 식물군들에 대한 독성효과는 연구된 바가 미미한 실정으로 본 연구를 통해 유해물질에 대한 영향평가를 실시하고 이를 근거로 보호안전 기준 및 관리방안을 도출하고자 하였다. 유해물질에 의한 연안 환경오염이 발생했을 때, 실제로는 많은 종류의 종들로 구성되어 있는 복잡한 군집이 오염에 노출된다는 것을 의미하며, 복잡한 군집구조를 갖는 환경에서 해산식물에 대한 유해물질의 위해성을 평가하고 보호안전기준 마련을 위해서는 고려하여 할 많은 요소들이 존재한다. 광량, 온도, 영양염과 같은 식물의 생육에 필수적인 환경요인에서부터 경쟁, 포식 등 고려하여야 할 환경요인은 너무나 다양하다. 또한 다양한 요인의 변화 하에서 유해물질에 대한 생태위해성을 평가하고 모델을 통하여 적정한 안전기준 마련을 위한 절차와 과정의 정립은 매우 중요하다.

본 연구를 통해서 측정된 다양한 유해물질에 의한 대형해산식물 (marine macrophytes)의 광합성 저해에 대한 결과들은 실제 현장에서 찾아보기 힘든 농도조건에 이루진 것이 많았다. 그럼에도 불구하고 일부 유해물질은 대형해산식물에 심각한 광합성 저해를 유발하고 있음을 알 수 있었고, 이러한 결과를 바탕으로 실제 연안환경에서 측정될 수 있는 농도 조건을 바탕으로 다양한 연구들이 계속되어야 할 것이다. 그러한 점에서 본 연구의 결과들은 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대되어 진다. 이러한 연구가 진행되기 위해서는 유해물질에 의한 대형해산식물의 위해성을 평가할 수 있는 표준화된 방법이 빨리 정립되어야 할 것이며, 표준화된 방법을 이용하여 측정된 결과들이 누적됨으로서 좀 더 현실적인 보호안전 기준 및 관리방안들이 마련될 수 있을 것으로 기대한다.

제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표달성도

연구개발 목표	달성도
<ul style="list-style-type: none"> ● 연안 수산자원 보존을 위한 유해물질 생리영향 및 위해성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 연안습지 해산 식물 군락의 주요 종에 대한 기본 광합성 생리, 생태 문헌 연구 - 연안 생태계를 파괴하는 주요 유해물질의 위해성에 대한 문헌 연구 - 해산 식물 광합성 저해 영향 평가 해외연구 사례 연구 	<p>100 %</p> <p>100 %</p> <p>100 %</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 연안습지 식물군락에 대한 유해물질의 광합성 저해 독성 영향 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 단일 및 다중 유해물질에 의한 광합성 저해 영향 평가 - 해산식물의 유해물질 노출 후 광합성 능력 회복 	<p>100 %</p> <p>100 %</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 유해물질에 의한 스트레스 발현과 환경요인과의 관계 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 유해물질의 광합성 저해에 대한 환경요인과의 관계성 규명 - 환경요인 조건별 스트레스 영향 규명 	<p>규명함</p> <p>규명함</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 유해물질 오염에 의한 독성 모델링 및 위해성 평가 기법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 생물학적 지시자로서 해산식물 이용방안 - 유해물질에 의한 독성영향 모델 - 유해물질 독성저감을 위한 보호 안전기준 	<p>확보함</p> <p>개발함</p> <p>기초제공</p>

제 2 절 대외기여도

1. 학술지 게재 논문

- 1) 최태섭, 김광용, 이병권, 이정석. 2005. 잘피의 광합성에 대한 중금속 및 TBT의 독성영향과 중금속 흡수에 대한 연구. *Algae* 21(1): 47-56.
- 2) 강은주, 최태섭, 김광용. 2007. 일부 중금속과 제초제에 대한 저서규조류 *Nitzschia* sp.의 광합성 반응. *Algae* 22(4): 319-323.

2. 초청강연

- 1) 최태섭. 엽록소 형광을 이용한 해조류 광합성의 측정. 한국조류학회 제14차 Workshop, 2007년 2월 1일 - 2일, 국립수산과학원 해조류연구센터 (목포).

3. 학술회의 논문 발표

- 1) 최태섭, 이정석, 박건호, 이병권, 김광용. Biokinetics of selected heavy metals in seagrass *Zostera marina*. 2005년도 한국해양과학기술협의회 공동학술대회 한국해양학회 춘계 학술대회, 2005년 5월 12 - 13일, 부산 BEXCO.
- 2) 최태섭, 이정석, 박건호, 이병권, 김광용. Short-term response of photosynthesis after exposure to harmful substances in two marine macrophytes: seagrass *Zostera marina* and greenalga *Ulva pertusa*. 2005년도 한국해양과학기술협의회 공동학술대회, 한국해양학회 춘계 학술대회, 2005년 5월 12 - 13일, 부산 BEXCO.
- 3) 강은주, 김광용. Toxicity of Cu, Cr(VI) and herbicides to benthic diatom. 한국조류학회, 2006년도 정기총회 및 학술발표회, 2006년 4월 20일 - 22일, 부경대학교.
- 4) 강은주, 김광용. Photosynthetic responses of a benthic diatom to selected heavy metals and herbicides. 2006년도 해양과학기술협의회 공동학술대회, 한국해양학회 춘계 학술대회, 2006년 5월 15일 - 16일, 부산 BEXCO
- 5) 최태섭, 이정석, 이병권, 김광용. Toxic effect of multiple harmful substances on photosynthetic characteristics of marine macroalga, *Ulva pertusa*. 2007년도 한국해양과학기술협의회 공동학술대회, 한국해양학회 춘계 학술대회, 2007년 5월 31일 - 6월 1일, 서울 COEX.
- 6) 최태섭, 이정석, 이병권, 김광용. Toxic effect of harmful substances on marine

macroalga and seagrass grown under variable temperature and nutrient conditions. 2007년도 한국해양과학기술협의회 공동학술대회, 한국해양학회 춘계 학술대회, 2007년 5월 31일 - 6월 1일, 서울 COEX.

- 7) 최태섭, 이정석, 이병권, 김광용. Toxic effect of harmful substances on photosynthetic characteristics of marine phytoplankton, *Isochrysis galbana*. 2007년도 한국해양과학기술협의회 공동학술대회, 한국해양학회 춘계 학술대회, 2007년 5월 31일 - 6월 1일, 서울 COEX.
- 8) 김주형, 강은주, 김광용. Study of primary production of microphytobenthos at different types of benthic environments: unvegetated sediment, inside and outside of seagrass bed. 2007년도 한국해양과학기술협의회 공동학술대회, 한국해양학회 춘계 학술대회, 2007년 5월 31일 - 6월 1일, 서울 COEX.
- 9) 김주형, 강은주, 김광용. 잘피밭에서 일차생산에 의해 이용되는 탄소의 양 추정. 2007년도 한국해양과학기술협의회 공동학술대회, 한국해양학회 춘계 학술대회, 2007년 5월 31일 - 6월 1일, 서울 COEX.
- 10) 성찬경, 류태권, 한기명, 서진영, 최태섭, 이창훈. Relationships between toxicity and chemical concentration of surface sediments in Masan Bay, Korea. 2007년 한국환경독성학회 춘계학술대회, 2007년 5월 18일, 충남대학교
- 11) 문성대, 성찬경, 최태섭, 이수연, 이창훈. 국내 해산 단각류를 이용한 만성 생물검정에의 먹이조건. 2007년도 한국해양과학기술협의회 공동학술대회, 한국해양학회 춘계 학술대회, 2007년 5월 31일 - 6월 1일, 서울 COEX.
- 12) 성찬경, 문성대, 최태섭, 이창훈, 정의영. 부니가 해양생물 (붕장어, 흰다리새우 그리고 넙치치어와 수정란)의 생존과 부화에 미치는 영향. 2007년도 한국해양과학기술협의회 공동학술대회, 한국해양학회 춘계 학술대회, 2007년 5월 31일 - 6월 1일, 서울 COEX.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 기대효과 및 추가연구의 필요성

본 연구의 결과들은 유해물질로부터 연안습지 식물의 보호 및 보존을 위한 최초의 실제적인 연구로서 그 파급효과는 매우 클 것으로 판단된다. 연안 수산자원 보호를 위한 유해물질에 대한 생태독성평가 기법의 개발은 연안습지 생태계의 잠재적인 가치를 보호할 수 있는 보호안전 기준 및 관리방안 마련의 기초를 제공할 것이며, 생태적 유의성을 가지고 실제 유해물질 부하에 관련한 기준치 마련 및 관리보호 대책을 마련할 수 있는 기초자료로서 매우 유용할 것으로 판단된다. 또한 본 연구결과를 기초로 연안 수산자원 보호를 위한 유해물질로부터 식물생태계 보호 및 안전관리에 대한 해법을 제시하고, 또한 유해물질로부터 취약한 특성을 갖는 해산식물의 연안 서식환경의 보호를 위해서 이들의 위해로부터 쉽고 빠르게 독성 효과 및 진행과정을 평가할 수 있는 기법의 개발 및 표준화에 많은 기여를 할 것으로 기대된다. 엽록소 형광을 이용한 PAM fluorometry는 생태독성학적 기법 및 기술에 적용할 수 있는 충분한 가능성을 보여주고 있으며, 이에 대한 추가적인 연구는 유해물질 독성 평가를 위한 생물검정 방법 개발 및 표준화의 기반이 될 것이다.

- ◎ 연안 환경의 중요 해산 식물군의 서식에 미치는 다양한 환경요인 중 온도와 영양염 변화에 대한 광화학 반응이 파악됨으로써 식물 생태계의 효율적인 보존에 기여
- ◎ 연안 식물 개체군 각각에 대한 광합성 생리특성 연구를 통해 국내 연안 생태계의 유해물질 오염과 관련한 현안 문제 해결에 단서를 제공하고 정책수립의 기초자료를 제시할 수 있을 것으로 기대
- ◎ 유해물질에 노출된 연안 환경의 중요 해산 식물군에 대하여 만성독성 실험을 통하여 광합성 능력회복에 관련된 연구결과를 얻음으로서 생태계의 보존 장기적인 계획 및 관리방안 도출에 기여
- ◎ 중요 연안 식물군에 대한 생물학적 지시자(bio-indicator)로서의 능력을 연구함으로써 이용방안에 대한 구체적인 방향 제시 및 향후 연구의 기초자료를 활용할 수 있을 것으로 기대

연안습지 식물생태계를 보호하고 아울러 유해물질의 오염 또는 남용으로부터 환경을 보호하고자 하는 궁극적인 목표를 달성하기 위해서는 이에 대한 근본적이면서 과학적인 연구는 필수적이다. 이러한 측면에서 중금속과 제초제를 포함한 유해물질의 작용기작에 대한 정보들은 보다 대중화되어야 할 필요성이 있다고 여겨진다. 본 연구는 연안 해양 환경에서 중금속과 제초제를 포함한 유해물질의 해산식물 위해성에 대한 본격적인 최초 연구가 되었으며, 또한 본 연구를 통해 얻어진 해산 식물에 대한 유해물질의 작용기전 정보는 연안습지 및 해양생태계 영향을 평가하고, 대책을 수립하고자 할 때 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대한다. 본 연구결과를 바탕으로 유해물질에 대한 생태독성평가 방법의 표준화와 생태독성 자료의 축적을 위하여 좀 더 다양한 종을 대상으로 관련연구를 수행함으로써 연안환경 및 해양 식물생태계의 관리와 보존에 다양하게 적용될 수 있을 것이다.

제 6 장 참고문헌

- 김강전, 임완수, 김갑호, 이중화, 황인영, 김정상, 최선남, 김종학, 박관하. 1999. 다환방향족탄화수소 fluoranthene이 김사상체의 증식에 미치는 영향. *Algae* 14: 195-200.
- 김장균, 한태준. 1999. 녹조 구멍갈파래 (*Ulva pertusa* Kjellman)의 생장 및 색소조성에 미치는 무기 영양염류 및 중금속의 영향. *환경생물학회지* 17: 427-438.
- 손호용, 금은주, 김종식, 이중복, 권기석. 2006. 미세조류를 이용한 유기염소계 농약 endosulfan 및 endosulfan 분해산물의 독성평가. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 357-362.
- 임운혁, 홍상희, 오재룡, 심원준, 심재형. 2003. 광양만 내 동물플랑크톤에 축적된 다환방향족탄화수소의 분포 및 특성. *한국의 생물학 -한국연안해역의 플랑크톤 생태학 (최중기 역음). 동화기술* p 365-381.
- Agostini S., Desjobert J.M. and Pergent G. 1998. Distribution of phenolic compounds in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Phytochemistry* 48: 611-617.
- Anderson R.J. and Velimirov B. 1982. An experimental investigation of palatability of kelp bed algae to the sea urchin *Parechinus angulosus* Leske. *Mar. Ecol.* 3: 357-373.
- Babu T.S., Tripuranthakam S. and Greenberg B.M. 2005. Biochemical responses of the aquatic higher plant *Lemna gibba* to a mixture of copper and 1,2-Dihydroxyanthraquinone: Synergistic toxicity via reactive oxygen species. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 3030-3036.
- Barón M., Arellano J.B. and Gorge J.L. 1995. Copper and photosystem II: a controversial relationship. *Physiol. Plant.* 94:174-80.
- Batley G.E. 1996. Heavy metals and tributyltin in Australian coastal and estuarine waters. pollution. In: Zann, L.P., Sutton, D.C. (Eds.), *The State of the Marine Environment Report for Australia. Technical Annex: 2. Pollution.* Department of the Environment, Sport and Territories, Canberra, pp.63-72.
- Benenati F. 1990. Keynote address: plants—eystone to risk assessment. In: Wang, W., Gorsuch, J.W., Lower, W.R. (Eds.), *Lower Plants for Toxicity Assessment.* American Society for Testing and Material, W.R. ASTM STP 1091, Philadelphia, pp. 5-13.
- Brent Nichols, P., Couch, J.D. and Al-Hamdani, S.H. 2000. Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. *Aquat. Bot.* 68, 313-319.
- Brett M.T. and Goldman C.R. 1996. A metal-analysis of the freshwater trophic cascade.

- Proc. Nat. Acad. Sci. 93: 7723-7726.
- Brix H., Lyngby J.E. and Schierup H. 1983. Eelgrass (*Zostera marina* L.) as an indicator organism of trace metals in the Limfjord, Denmark. Mar. Environ. Res. 8: 165-181.
- Brock T.C.M., Crum S.J.H., Deneer J.W., Heimbach F., Roijackers R.M.M. and Sinkeldam J.A. 2004. Comparing aquatic risk assessment methods for the photosynthesis-inhibiting herbicides metribuzin and metamilon. Environ. Pollut. 130: 403-426.
- Brunson E.L., Canfield T.J. Dwyer F.J., Ingersoll C.G. and Kemble N.E. 1998. Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the upper Mississippi River using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35:191-201.
- Campanella L., Conti M.E., Cubadda F. and Sucapane C. 2001. Trace metals in seagrass algae and mollusks from an uncontaminated area in the Mediterranean. Environ. Pollut. 111: 117-126.
- Campbell P.J., Arnold D.J.S., Brock T.C.M., Grandy N.J., Heger W., Heimbach F., Maund S.J. and Streloke M. (Eds.), 1999. Guidance Document on Higher-tier Aquatic Risk Assessment for Pesticides (HARAP). SETAC Europe Publication, Brussels, Belgium.
- Capiomont A., Piazzzi L. and Pergent G. 2000. Seasonal variations of total mercury in foliar tissues of *Posidonia oceanica*. J. Mar. Biol. Assoc. UK 80: 1119-1123.
- Carter R.J. and Eriksen R.S. 1992. Investigations into the use of *Zostera muelleri* (Irmisch ex Aschers) as a sentinel accumulator for copper. Sci. Total Environ. 125: 185-192.
- Catsiki V.A. and Panayotidis P. 1993. Copper, chromium and nickel in tissues of the Mediterranean seagrasses *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* (Potamogetonaceae) from Greek coastal areas. Chemosphere 26: 963-978.
- Clark, R.B. 1993. Marine pollution. Clarendon Press, Oxford, pp 28-52.
- Clijsters H. and Van Assche F. 1985. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. Photosynth. Res. 7: 31-40.
- Clijsters H., Cuypers A. and Vangronsveld, J. 1999. Physiological response to heavy metals in higher plants—defence against oxidative stress. Z. Naturforsch. C54:730-734.
- Cuny P., Serve L., Jupin H. and Boudouresque C.F. 1995. Water soluble phenolic compounds of the marine phanerogam *Posidonia oceanica* in a Mediterranean area colonized by the introduced chlorophyte *Caulerpa taxifolia*. Aquat. Bot. 52 237-242.

- de Mora S.J., Stewart C. and Phillips D. 1995. Sources and rate of degradation of tri(n-butyl)tin in marine sediments near Auckland, New Zealand. *Mar. Pollut. Bull.* 30: 50-57.
- Duboudin C., Ciffroy P. and Magaud H. 2004. Effects of data manipulation and statistical methods on species sensitivity distributions. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 489-499.
- Eklund B. 1993. A 7-day reproduction test with the marine red alga *Ceramium strictum*. In: Slooff, W., deKruif, H. (Eds.), *The Science of the Total Environment. Proceedings from 2nd European Conference on Ecotoxicology, Supplement, Part 1*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 749-759.
- Eklund B. 1995. Manual for the reproduction test using the marine red algae *Ceramium strictum*. Report no. 41, Institute of Applied Environmental Research, Stockholm University, Sweden.
- Eklund B. 1998. Reproductive performance and growth response of the red alga *Ceramium strictum* under the impact of phenol. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 167: 119-126.
- Eklund B. and Kautsky L. 2003. Review on toxicity testing with marine macroalgae and the need for method standardization - exemplified with copper and phenol. *Mar. Pollut. Bull.* 46: 171-181.
- Estes J.A., Tinker M.T., Williams T.M. and Doak D.F. 1998. Killer whale predation on sea otters linking oceanic and nearshore ecosystems. *Science* 282: 473-476.
- Evans S.M., Leksono T. and McKinnell P.D. 1995. Tributyltin pollution: a diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Marine Pollution Bulletin* 30: 14-21.
- Fabris G.J., Harris J.E. and Smith J.D. 1982. Uptake of cadmium by the seagrass *Heterozostera tasmanica* from Corio Bay and Western Port Victoria. *Aust. J. Freshwater Res.* 33: 829-836.
- Faraday W.E. and Churchill A.C. 1979. Uptake of cadmium by the eelgrass *Zostera marina*. *Mar. Biol.* 53: 293-298.
- Fargasova A., 1999. Toxicity of Cd²⁺ in mixture with Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Fe²⁺ on growth and chlorophyll content of alga *Scenedesmus quadricauda*. *Biologia* 54 (6), 661-666.
- Felger R.S., Moser M.B. and Moser E.W. 1980. Seagrasses in Sri Indian culture. In *Handbook of Seagrass Biology: an ecosystem perspective*, ed. R.C. Phillips and C.P. McRoy, pp. 260-276. New York: Garland STPM Press.
- Fent K. 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology* 26: 1-117.
- Ferrat L., Gnassia-Barelli M., Pergent-Martini C. and Romeo, M. 2003. Mercury and

- non-protein thiol compounds in the seagrass *Posidonia oceanica*. Comp. Biochem. Physiol. C 134: 147-155.
- Ferrat L., Pergent-Martini C. and Romeo M. 2003. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. Aqua. Toxicol. 65: 187-204.
- Fong P., Boyer K.E. and Zedler J.B. 1998. Developing an indicator of nutrient enrichment in coastal estuaries and lagoons using tissue nitrogen content of the opportunistic alga, *Enteromorpha intestinalis* (L. Link). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 231: 63-79.
- Genty B., Briantais J.M. & Baker N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. biophys. Acta. 990:87-92.
- Giddings J.M., Brock T.C.M., Heger W., Heimbach F., Maund S.J., Norman S.M., Ratte H.T., Schafers C. and Strelake M. (Eds.), 2002. Community Level Aquatic System Studies- Interpretation Criteria. Proceedings from the CLASSIC Workshop held at the Fraunhofer Institute Schmallenberg, Germany 30 Maye2 June 1999. SETAC PRESS, Pensacola, Florida.
- Gravel A. and Marsalek, B. 2004. A novel approach for phytotoxicity assessment by CCD fluorescence imaging. Environ. Toxicol. 19: 429-432.
- Hader D.P., Herrmann H., Schafer J. and Santas, R. 1997. Photosynthetic fluorescence induction and oxygen production in two Mediterranean *Cladophora* species measured on site. Aquat. Bot. 56, 253-264.
- Hader D.P., Lebert M., Figueroa F.L., Jimenez C., Vinegla B. and Perez-Rodriguez E. 1998. Photoinhibition in Mediterranean macroalgae by solar radiation measured on site by PAM fluorescence. Aquat. Bot. 61, 225-236.
- Han T and Choi G-W. 2007. A novel marine algal toxicity bioassay based on sporulation inhibition in the green macroalga *Ulva pertusa* (Chlorophyta). Aqua. Toxicol. 75: 202-212.
- Han, T., Park, B.J., Han, Y.S., Kang, S.H. and Lee, S.H. 2002. Photosynthesis and fromation of UV-absorbing substances in Antartic macroalgae under different levels of UV-B radiation. Korean J. Environ. Biol. 20: 205-215.
- Harris J.E., Fabris G.J., Statham P.J. and Tawfik F. 1979. Biogeochemistry of selected heavy metals in Western Port, Victoria, and use of invertebrates as indicators with emphasis on *Mytilus edulis planulatus*. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 30: 159-178.
- Hay M.E. 1997. The ecology and evolution of seaweed-herbivore interactions on coral reefs. Coral Reefs 16(suppl): 67-76.

- Hemminga M.A. and Durate C.M. 2000. Seagrass ecology. Cambridge University Press, Cambridge. pp.298.
- Hugget R.J., Seligman P.F. and Valkiers A.O. 1992. The marine biocide tributyltin. Assessing and managing the environmental risks. Environmental Science Technology 26: 232-237.
- ISO 1989. Water quality—fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. International Organization of Standardization (ISO) 8692.
- ISO 1995. Water quality—marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricorutum*. ISO International Organization of Standardization (ISO) 10253.
- Jensen H.F., Holmer M. and Dahllóf I. 2004. Effects of tributyltin (TBT) on the seagrass *Ruppia maritima*. Mar. Pollut. Bull. 49: 564-573.
- Jones, A.L. & Harwood, J.L. 1993. Lipid metabolism in the marine brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. J. Exp. Bot. 44:1203-1210.
- Kenaga E. and Moolenaar R. 1979. Fish and daphnia toxicity as surrogates for aquatic and vascular plants and algae. Environmental Science of Technology 13, 1479-1480.
- Kennish, M.J. 1996. Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution. CRC Press, New York, 535 pp.
- Kim MG, Lee C-H and Chung IK. 1994. Seasonal variation of photosynthetic activities and heavy metal toxicities of *Ulva pertusa* Kjellman. Kor. J. Phycol. 9(2): 225-235.
- Kim, J.K. and Han, T. 2001. Effects of inorganic nutrient and heavy metals on germination of the green alga, *Ulva pertusa* Kjellman. Korean J. Environ. Biol. 19:7-17.
- Kim, K.-J., W.-S. Lim, K.-H. Kim, J.-H. Lee, I.-Y. Hwang, J.-S. Kim, S.-N. Choe, J.-B. Kim, and K.H. Park. 1999. Bioconcentration of fluoranthene, a polycyclic aromatic hydrocarbon, and its effects on the conchocelis growth in *Porphyra*. Algae. 14: 195-200.
- Kimimura, M. & Katoh, S. 1972. Studies on electron transport associated with photosystem I. I. Functional site of plastocyanin, inhibitory effects of HgCl₂ on electron transport and plastocyanin in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 283:279-292.
- Kirso U. and Irha N. 1998. Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Ecotoxicol. Environ. Saf. 41: 83-89.
- Küster A. and Altenburger R. 2007. Development and validation of a new

- fluorescence-based bioassay for aquatic macrophyte species. *Chemosphere* 67: 194-201.
- Leadbitter, D., Lee Long, W. & Dalmazzo, P. 1999. Seagrass and their management-implications for research. In: Butler, A., Jernakoff, P. (Eds.), *Seagrass in Australia: Strategic Review and Development of an R&D Plan*. CSIRO Publishing, Collingwood, pp. 140-171.
- Lee B.-G., Wallace W.G. and Luoma S.N. 1998. Uptake and loss kinetics of Cd, Cr and Zn in the bivalves *Potamocorbula amurensis* and *Macoma balthica*: effects of size and salinity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 175: 177-189.
- Lobban C.S. and Harrison P.J. 1997. *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge. 366 pp.
- Luna, C.M., González, C.A. & Trippi, V.S. 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 35:11-15.
- Lyngby J.E. 1991. Age-dependent accumulation of heavy metals in eelgrass (*Zostera marina* L.) and mussels (*Mytilus edulis* L.). International Conference on 'Heavy metals in the environment' Edinburgh, September 1991, vol. 2, pp. 153, 156.
- Lyngby, J.E., Brix, H. & Schierup, H.H. 1982. Absorption and translocation of zinc in eelgrass (*Zostera marina* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 58:259-270.
- Lytle, J.S. & Lytle, T.F. 2001. Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:68-83.
- Macinnis-Ng C.M.O. and Ralph P.J. 2002. Towards a more ecologically relevant assessment of the impact of heavy metals on the photosynthesis of the seagrass, *Zostera capricorni*. *Marine Pollution Bulletin* 45: 100-106.
- Malea P. 1993. Bioaccumulation of aluminium in the seagrasses *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers and *Posidonia oceanica* (L) Delile and in macroalgae of the gulf of Antikyra (Greece). *Bot. Mar.* 36: 423-431.
- Malea P. 1994a. Seasonal variation and local distribution of metals in the seagrass *Halophila stipulacea* (Forsk) Aschers in the Antikyra gulf, Greece. *Environ. Pollut.* 85: 77-85.
- Malea P. 1994b. Uptake of cadmium and the effect on viability of leaf cells in the seagrass *Halophila stipulacea* (Forsk) Aschers. *Bot. Mar.* 37: 67-73.
- Malea P. and Haritonidis S. 1989b. Concentration of aluminium in *Halophila stipulacea* (Forsk) Aschers and the substrate of the Antikyra Gulf, Greece. *Toxicol. Environ. Chem.* 20/21: 241-248.
- Malea P. and Haritonidis S. 1995. Local distribution and seasonal variation of Fe, Pb, Zn, Cu, Cd, Na, K, Ca, and Mg concentrations in the seagrass *Cymodocea nodosa*

- (Ucria) Aschers in the Antikyra Gulf, Greece. *Pszni. Mar. Ecol.* 16: 41-56.
- Malea P. and Haritonidis S. 1996. Toxicity and uptake of aluminium by the seagrass *Halophila stipulacea* (Forsk) Aschers, in response to aluminium exposure. *Fresenius Environ. Bull.* 5: 345-350.
- McElroy, A.E., Farrington J.W. and Teal, J.M. 1989. Bioavailability of PAHs in the aquatic environment. In: *Metabolism of PAHs in the aquatic environment*, edited by Varanasi, U. CRC Press, Florida. pp 1-39.
- Menge B.A. 1995. Indirect effects in marine rocky intertidal interaction webs: patterns and importance. *Ecol. Monogr.* 65: 21-74.
- Montano N.M., Bonifacio, R.S. and Rumbaoa, G.O. 1999. Proximate analysis of the flour and starch from *Enhalus acoroides* (L.f.) Royle seeds. *Aquatic Botany* 65: 321-325.
- Morgan J.A. 1972. Effects of Aroclor 1242 and DDT on cultures of an alga, protozoan, daphnid, ostracod and guppy. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 8: 129-137.
- Nicholas F.H. and Thompson J.K. 1982. Seasonal growth in the bivalve *Macoma balthica* near the southern limit of its range. *Estuaries* 5: 110-120.
- Nienhuis P.H. 1986. Background levels of heavy metals in nine tropical seagrass species in Indonesia. *Mar. Poll. Bull.* 17: 508-511.
- Okamoto, O.K., Asano, C.S., Aidar, E. & Colepicolo, P. 1996. Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis*. *J. Phycol.* 32:74-79.
- Pace M.L., Cole J.J., Carpenter S.R. and Kitchell J.F. 1999. Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. *Trend Ecol. Evolut.* 14: 483-488.
- Pavia H. and Brock E. 2000. Extrinsic factors influencing phlorotannin production in the brown alga. *Ascophyllum Nodosum* 193: 285-294.
- Pergent-Martini C. and Pergent G. 2000. Are marine phanerogams a valuable tool in the evaluation of marine trace-metal contamination: example of the Mediterranean sea? *Int. J. Environ. Pollut.* 13: 126-147.
- Pflugmacher S., Schwarz S., Pachur H.J. and Steinberg C.E.W. 2000. Effects of tributyltin chloride (TBTCI) on detoxication enzymes in aquatic plants.
- Phillips D.J.H. 1994. Macrophytes as biomonitors of trace metals. In: Kramer, K.J.M. (Ed.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Inc, Boca Raton, pp. 85-103.
- Phillips D.J.H. 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 31: 183-192.
- Platt T., Gallegos C. & Harrison W.G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural

- assemblage of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 38:687-701.
- Posey M.H. and Ambrose W.G. 1994. Effects of proximity to an offshore hard-bottom reef on infaunal abundances. *Mar. Biol.* 118: 745-753.
- Posey M.H., Alphin T.D., Cahoon L., Lindquist D. and Becker M.E. 1999. Interactive effects of nutrient additions and predation on infaunal communities. *Estuaries* 22: 785-792.
- Posthuma L, Traas TP and Sutter II, GW. 2002. General introduction to species sensitivity distributions. (In: Posthuma L, Traas TP and Sutter II, GW, eds, *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*). Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp. 3-11.
- Price A.R.G. and Coles S.L. 1992. Aspects of seagrass ecology along the western Arabian Gulf-Coast. *Hydrobiologia* 234: 129-141.
- Rainbow P.S. and Philips D.J.H. 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.* 26: 593-601.
- Ralph P.J. and Burchett M.D. 1998. Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environmental Pollution* 103: 91-101.
- Ralph P.J. and Gademann R. 2005. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aqua. Bot.* 82: 222-237.
- Ralph, P.J. 1999. Photosynthetic response of *Halophila ovalis* (R. Br.) Hook. f. to combined environmental stress. *Aquat. Bot.* 65, 83-96.
- Ralph, P.J., 2000. Herbicide toxicity of *Halophila ovalis* assessed by chlorophyll a fluorescence. *Aquat. Bot.* 66, 141-152.
- Ralph, P.J., Burchett, M.D. 1995. Photosynthetic responses of the seagrass *Halophila ovalis* (R Br) Hook. f. to high irradiance stress, using chlorophyll a fluorescence. *Aquat. Bot.* 51 (1-2), 55-66.
- Ralph, P.J., Burchett, M.D. 1998. Impact of petrochemicals on the photosynthesis of *Halophila ovalis* using chlorophyll fluorescence. *Mar. Pollut. Bull.* 36 (6), 429-436.
- Ralph, P.J., Gademann, R., Dennison, W.C., 1998. In situ seagrass photosynthesis measured using a submersible, pulse-amplitude modulated fluorometer. *Mar. Biol.* 132:367-373.
- Ralph, P.J., Short, F.T. 2002. Impact of the wasting disease pathogen, *Labyrinthula zosterae*, on the photobiology of eelgrass *Zostera marina*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 226, 265-271.
- Rijstenbil, J.W., Sandee, A., Van Drie, J., Wijnholds, J.A. 1994b. Interaction of toxic trace metals and mechanisms of detoxification in the planktonic diatoms *Ditylum brightwellii* and *Thalassiosira pseudonana*. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 387-396.

- Rohacek, K and Bartak, M. 1999. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37: 339-363.
- Rohacek, K. 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40: 13-29.
- Schreiber U., Gademan R., Ralph P.J. & Larkum A.W.D. 1997. Assessment of photosynthetic performance of Prechloron in *Lissoclinum patella* in hospite by chlorophyll fluorescence measurements. *Pl. Cell. Physiol.* Tokyo 38:945-951.
- Schreiber, U., Bilger, W. & Neubauer, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D., Caldwell, M.M. (Eds.), *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer, Berlin, pp. 49-70.
- Seddon, S., Cheshire, A.C. 2001. Photosynthetic response of *Amphibolis antartica* and *Posidonia australis* to temperature and dessication using chlorophyll fluorescence. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 220, 119-130.
- Sfriso A. and Marcomini, A. 1997. Macrophyte production in a shallow coastal lagoon. Part I: coupling with chemico-physical parameters and nutrient concentrations in waters. *Mar. Environ. Res.* 44: 351-375.
- Shim H.B., Jung J.Y. and Choi B.H. 2001. A taxonomic study on *Lilium* plant in Korea Based on cluster analysis data. *Kor. J. Plant Taxon.* 31: 381-386.
- Shim W.J., Kahng S.H., Hong S.H., Kim N.S., Kim S.K. and Shim J.H. 2000. Imposex in the rock shell *Thais clavigera* as evidence of organo-tin contamination in the marine environment of Korea. *Mar. Environ. Res.* 49: 435-451.
- Snel, J.F.H., Vos, J.H., Gylstra, R. and Brock, T.C.M. 1998. Inhibition of photosystem II (PSII) electron transport as a convenient endpoint to assess stress of the herbicide linuron on freshwater plants. *Aquat. Ecol.* 32: 113-123.
- Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon DR, Klaine SJ, LaPoint TW, Kendall RJ, Weisskopf CP, Giddings JM, Giesy JP, Hall LW and Williams WM. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 31-74.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Dixon, K.R., Klaine, S.J., La Point, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J.P., Hall, L.W. & Williams, W.M. 1996. Ecological risk assessment of Atrazine in North American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:31-76.
- Steele R. and Thursby G.B. 1995. Sexual reproduction tests with marine seaweeds (Macroalgae). In: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. Ecological Services Inc., North Palm

- Beach, FL, pp. 171-188.
- Steen RJCA, Leonards RJCA, Brinkman PEG, Steen UAT, Barcelo D, Tronzynski T, Albanis TA and Cofino WP. 1999. Ecological risk assessment of agrochemicals in European estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1574-1581.
- Steinberg P.D. 1984. Algal chemical defense against herbivores: allocation of phenolic compounds in the kelp *Alaria marginata*. *Science* 223: 405-407.
- Steinberg P.D. 1985. Feeding preferences of *Tegula funebris* and chemical defenses of marine brown algae. *Ecol. Monogr.* 55: 333-349.
- Steinberg P.D. and Paul V.J. 1990. Fish feeding and chemical defenses of tropical brown algae in Western Australia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 58: 253-259.
- Steinberg P.D. and Van Altena I. 1992. Tolerance of marine invertebrate herbivores to brown algal phlorotannins in temperate Australasia. *Ecol. Monogr.* 62: 189-222.
- Steinberg P.D., Edyvane K., De Nys R., Birdsey R. and Van Altena I.A. 1991. Lack of avoidance of phenolic-rich brown algae by tropical herbivorous fishes. *Mar. Biol.* 109: 335-343.
- Stobart, A.K., Griffiths, W.T., Ameen-Bukhari, I. & Sherwood, R.P. 1985. The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant.* 63:293-298.
- Terlizzi A., Graschetti S., Gianguzza P., Faimal M. and Boero F. 2001. Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 11: 311-317.
- Thomas K.V., Blake S.V. and Waldock M.J. 2000. Antifouling paint booster biocide contamination in UK marine sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 40:739-745.
- Thursby G.B. and Steele R.L. 1984. Toxicity of arsenite and arsenate to the marine macroalga *Champia arvola*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 3: 391-397.
- Thursby G.B., Steele R.L. and Kane M.E. 1985. Effect of organic chemicals on growth and reproduction in the marine red alga *Champia parvula*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 4: 797-05.
- Toth G. and Pavia H. 2000. Lack of phlorotannin induction in the brown seaweed *Ascohyllum nodosum* in response to increased copper concentrations. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 192: 119-126.
- Turner N.C. and Bell A.M. 1973. The ethnobotany of the Southern Kwakiutl Indians of British Columbia. *Economic Botany* 27:257-310.
- Tyystjärvi E., Koski A., Keränen M and Nevalainen O. 1999. The kautsky curve is a built-in barcode. *Biophysical J.* 77: 1159-1167.
- USEPA 1998. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. EPA/600/491/003, Method

1009.0, Environmental Protection Agency of USA.

- Van den Brink, P.J., Hartgers, E.M., Fettweis, U., Crum, S.J.H., Van Donk, E. & Brock, T.C.M. 1997. Sensitivity of macrophyte-dominated freshwater microcosms to chronic levels of the herbicide Linuron. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38:13-24.
- Van Dijk, H.F.G., Brussaard, L., Stein, A., Baerselman, F., De Heer, H., Brock, T.C.M., Van Donk, E., Vet, L.E.M., Van der Gaag, M.A., Van Gestel, C.A.M., Van der Hoeven, N., De Jong, F.M.W., Van der Linden, A.M.A., Van Noort, P.C.M., Oomen, P.A., Van Vliet, P.J.M., 2000. Field research for the authorization of pesticides. *Ecotoxicology* 9: 377-381.
- van Hattum B., Pons M.J.C. and Montanes J.F.C. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater isopods and field-partitioning between abiotic phases. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35:257-267.
- Van Straalen N.M. 2002. Threshold models for species sensitivity distributions applied to aquatic risk assessment for zinc. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11: 167-272.
- Vavilin, D.V., Polynov, V.A., Matorin, D.N. & Venediktov, P.S. 1995. Sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol.* 146:609-614.
- Vergeer L.H.T. and Develi A. 1997. Phenolic acids in healthy and infected leaves of *Zostera marina* and their growth-limiting properties towards *Labyrinthula zosterae*. *Aquat. Bot.* 58: 65-72.
- Vergeer L.H.T., Aarts T.L. and Groot J.D. 1995. The wasting disease and the effect of abiotic factors (light intensity, temperature, salinity) and infection with *Labyrinthula zosterae* on the phenolic content of *Zostera marina* shoots. *Aquat. Bot.* 52: 35-44.
- Voulvoulis, N., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 1999. Alternative antifouling biocides. *Appl. Organomet. Chem.* 13:135-143.
- Wahbeh M.I. 1984. Levels of zinc, manganese, magnesium, iron and cadmium in three species of seagrasses from Aqaba (Jordan). *Aquatic Botany* 20: 179-183.
- Wang W.-X. and Dei R.C.H 1999. Kinetic measurements of metal accumulation in two marine macroalgae. *Marine Biology* 135: 11-23.
- Ward T.J. 1987. Temporal variation of metals in the seagrass *Posidonia australis* and its potential as a sentinel accumulator near a lead smelter. *Mar. Biol.* 95: 315-321.
- Ward, T.J. 1987. Temporal variation of metals in the seagrass *Posidonia australis* and its potential as a sentinel accumulator near a lead smelter. *Mar. Biol.* 95:315-321.
- Webb W.L., Newton M. and Starr D. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*: a mathematical model. *Oecologia.* 17: 281-291.
- Weckx, J.E.J. & Clijsters, H.M.M. 1996. Oxidative damage and defence mechanisms in

primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiol. Plant.* 96:506-512.

Wellburn A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307-313.

Wheeler J.R., Grist E.P.M., Leung K.M.Y., Morritt D. and Crane M. 2002. Species sensitivity distributions: Data and model choice. *Mar. Pollut. Bull.* 45: 192-202.

Wong M.H., Chan K.C. and Choy C.K. 1978. The effect of iron ore tailings on the coastal environment of Tolo Harbour, Hong Kong. *Environ. Research* 15:342-356.

Yakovleva, I.M., Titlyanov, E.A. 2001. Effect of high visible and UV irradiance on subtidal *Chondrus crispus*: stress, photoinhibition and protective mechanisms. *Aquat. Bot.* 71, 47-61.