

(뒷면)

(앞면)

과제번호

2cm ↓

발간등록번호

1cm →

11-1541000-000578-01

↑ ↓ 2cm

↔ 4.5cm

국내산

보안과제(), 일반과제(○)

5cm

↓

국내산 다시마 사상체를 사용한
BT-ET 융합형 해양생태위해도 측정
기법 개발 및 국제인증화

(18 포인트 고딕계열)

(Development of BT-ET integrated
technology for the marine
ecological risk assessment using
domestic laminarian filaments and
its international licensing)

(17 포인트 명조계열)

농림수산식품부

↑
3cm
↓

인천대학교 산학협력단

(17 포인트 명조계열)

↑

9cm

↓

농림수산식품부

↑

4cm

↓

주 의
(편집순서 8)

(15 포인트 고딕계열)

↑
6cm
↓

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내산 다시마 사상체를 사용한 BT-ET 융합형 해양생태위해도 측정 기법 개발 및 국제인증화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 9 월 20 일

주관연구기관명 : 인천대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 한 태 준

연 구 원 : 공 정 애, 한 영 석
수 례 쉬, 박 지 숙
이 한 균, 윤 정 현
진 교 선, 왕 영 자
김 선 진, 최 훈

연구개발보고서 초록

과 제 명	국내산 다시마 사상체를 사용한 BT-ET 융합형 해양생태위해도 측정 기법 개발 및 국제인증화에 관한 연구				
	Development of BT-ET integrated technology for the marine ecological risk assessment using domestic laminarian filaments and its international licensing				
주관연구기관	인천대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 인천대학교	
참 여 기 업	-			(성명) 한 태 준	
총연구개발비 (300,000천원)	계	300,000천원	총 연 구 기 간	2007. 9.- 2010. 9.(3년)	
	정부출연 연구개발비	300,000천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	18
	기업부담금			내부인원	18
	연구기관부담금			외부인원	-

1. 연구개발 목표 및 내용

- BT-ET 융복합기술을 이용하여 국내산 다시마 초기발생단계와 사상체를 사용한 해양 생태독성평가기법과 매뉴얼을 확정하고, 이를 ISO 국제기술인증화하며 현장적용 가능한 해양오염 경보시스템으로의 전환에 필요한 기반기술을 확립함
- 환경제어에 의한 무한 배양 및 상시 생물 공급기법 확립을 위한 국내산 다시마 두 종의 초기 발생단계와 사상체의 기초생리학적 연구
- 다시마 초기 발생단계와 사상체를 사용한 독성진단 표준 환경 조건 정립
- Endpoints (발아, 발아관 길이, 성장, 엽록소 형광) 별 환경유해물질 독성반응 조사(중금속, VOCs, 제초제 등)
- 해양퇴적물과 산업폐수를 사용한 생태독성평가기법의 현장 적용성 평가
- 독성평가로부터 산출된 데이터의 체계적 수집 (NOEC, LOEC, EC₁₀와 EC₅₀) 및 QA/QC (CV를 이용한 재연성 및 정밀성 타진)
- Endpoint별 독성평가 기법 프로토콜 작성
- 국내산 생태독성모니터링 기법 프로토콜의 ISO 국제인증화를 위한 application
- mPAM과 iPAM을 이용한 로봇형 독성진단 기반기술 연구 및 효율성과 적용성 진단

2. 연구결과

○ 국내산 다시마 두 종의 초기 발생단계와 사상체의 기초생리학적 탐색을 통한 생물 무한 공급시스템 조건 확립

1) 광량 및 광질 효과 타진 및 결론:

-발아 과정에서 광량은 크게 차별적인 영향을 주지 않으나 사상체의 생장은 광량에 비례하여 증가함으로 높은 광량 (최고 광량은 $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 조사로 바이오매스의 인위적 증가가 가능함

-광질효과는 뚜렷하여 청색광 (400~500 nm)과 녹색광 (500~600 nm)을 조사할 경우 발아 생장이 향상되며 사상체에서는 생식 유도되는 효과가 나타나는 반면 적색광 (600~700 nm) 하에서는 생식력이 떨어지고 대신 무한생장이 이루어지며 근적외광 (700~800 nm) 조사 시에는 성장과 생식이 동시 억제됨

[결론] 적색광에서 배양함으로써 사상체의 무한 공급이 가능함

2) 영양염 효과 타진 및 결론:

-휴면포자의 경우 10 mM 이상의 질산염 처리군에서 생장은 지속하되 유성생식을 하지 못하고 반면, 0.05~5 mM 농도 범위의 질산염 처리를 하면 유성생식이 유도되는 것으로 판단됨

-인산염이 휴면포자에 미치는 영향을 조사한 결과, 유성생식발생 농도는 0.05~0.1 mM 인 것으로 나타남

[결론] 무한 성장을 유도할 경우, 질산염은 고농도 (> 5 mM), 인산염은 0.01 mM의 저농도나 0.5~1 mM의 농도 처리를 하면 될 것으로 사료됨

3) 질산염과 온도의 복합효과 타진 및 결론:

-사상체 성장 및 유성생식은 질산염의 농도보다는 온도에 더 큰 영향을 받음

-사상체 생장은 5~20°C에서 큰 차이를 보이지 않는 반면, 유성 생식은 15~20°C에서 높게 나타남

[결론] 유성생식을 방해한 가운데 바이오매스를 확보하기 위해서는 우선 5°C 이하의 배양온도로 설정을 하는 것이 유리하나, 바이오매스의 빠른 확보를 위해서는 광질 조건 등과의 조화로운 조합이 필요할 것으로 판단됨

4) 암처리에 의한 사상체 보관 효율 타진 및 결론:

-바이알과 원심분리기용 튜브를 활용한 사상체 무한 보관을 시도했을 때, 엽록소 형광에 의한 활성효율 (최적광자수율, F_v/F_m)이 23개월 이후에도 초기와 마찬가지로 0.5 가량의 수치를 보임

[결론] 사상체를 무한 배양하는데 사용할 단순기구 및 조건을 확립함

○ 다시마와 미역을 사용한 독성진단 표준 환경 조건 정립

종말점 (Endpoints)		광량 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	염도 (psu)	온도 ($^{\circ}\text{C}$)	pH
참다시마 (<i>S. japonica</i>)	포자발아율I	0~120	6~9	10~20	6~9
	포자발아율II	0~120	25~45	5~15	8~9
	포자의 발아관 길이 성장	0~120	35	15~20	7~9
	배우체 면적 성장	10~80	35~55	10~15	6~8
	포자체 발생률	30~80	25~35	5~10	5~8
	어린 포자체 엽록소 형광	10~50	15~55	15~20	6~9
	수배우체 엽록소 형광	0	35	15	8
미역 (<i>U. pinnatifida</i>)	포자발아율	0~80	35~55	5~20	5~9
	포자의 발아관 길이 성장	0~120	35~55	10~20	8
	배우체 면적 성장	30~100	25~55	5~20	8
	배우체 엽록소 형광	10	15~55	20	5~9
	수배우체 엽록소 형광	0	35	15	8

○ Endpoints (발아, 발아관 길이 성장, 배우체 성장, 포자체 생성, 엽록소 형광)별 환경유해물질 독성반응 조사 (중금속, VOCs, 제초제 등)

- 국내산 다시마와 미역의 어린 시기를 대상으로 채택한 12가지 endpoints를 이용하여 환경 대표 유해물질 (수은 등 중금속 8종, VOCs 등 환경유해물질 9종, diuron 등 제초제 4종) 총 21종에 대한 단일독성 평가를 수행하였으며, 독성원의 종류에 따라 차별적인 반응을 나타냄

[결론] 중금속 평가 결과를 한 예로 들면, 표준 중금속 구리에 대한 다시마와 미역 시험법의 생태독성 민감성과 국제적으로 공인된 해산종 *Ecklonia radiata*와 *Hormosira bankii* (ANZECC), *Macrocystis pyrifera* (US EPA)에서 보고된 민감성을 비교한 결과, 국제 공인종들보다 다시마와 미역의 민감성이 뛰어난 것으로 나타남

○ 해양퇴적물과 산업폐수를 사용한 생태독성평가기법의 현장 적용성 평가

-Endpoints (밭아, 밭아관 길이 생장, 배우체 생장, 엽록소 형광)별 21종 해양퇴적물과 19종의 산업폐수를 사용한 생태독성평가기법의 현장 적용성 평가를 수행하여 TU를 산출하였으며, 산업체의 종류에 따라 생태독성결과와 이화학적 분석수치가 유사하기도 하고, 다르기도 한 것으로 나타남

[결론] 이화학적 기법으로 탐지할 수 없는 미지의 독성원의 존재 또는 독성원간의 시너지와 길항성 등을 종합적으로 신속하게 평가할 수 있는 생태독성평가 기법의 도입 필요성을 부각시키는 결과로 평가됨

○ 독성평가로부터 산출된 데이터의 체계적 수집 (NOEC, LOEC, EC₁₀와 EC₅₀) 및 QA/QC (CV를 이용한 재연성 및 정밀성 타진)

-8종의 표준 중금속과 9종의 환경유해물질, 4종의 제초제 및 19종의 산업폐수에 대하여 참다시마 시험법과 미역 시험법을 이용한 생태독성평가를 실시하고, 선형테스트 (linearity test)와 ANOVA에 이은 Toxcalc 프로그램의 활용으로 NOEC, LOEC, EC₁₀와 EC₅₀를 산출함

-각 독성원에 대한 자료의 CV를 계산한 결과, 전체적으로 20% 이하인 것으로 나타남

[결론] 타연구 결과와의 비교가 용이하도록 다양한 임계 수치를 제공하였으며 CV의 경우, 국제적으로 규정되어 있는 생태독성평가결과의 재연성 및 정밀성 허용치인 30~40% 이하인 것으로 나타나 기술의 객관성과 신뢰성을 확인함

○ Endpoints별 독성평가 기법 프로토콜 작성

[결론] 다시마와 미역을 사용한 8가지 생태독성시험법의 국영문 매뉴얼을 ISO 표준기술 매뉴얼 양식으로 완성함

○ 국내산 생태독성모니터링 기법 프로토콜의 ISO 국제인증화를 위한 application

[결론] 차기 ISO water quality 총회에 상정할 수 있는 형태로 다시마/미역 생태독성 프로토콜의 application form을 작성함

○ mPAM과 iPAM을 이용한 로봇형 독성진단 기반기술 연구 및 효율성과 적용성 진단

-중금속과 제초제를 사용하여 로봇형 진단기술의 개발 가능성을 타진한 결과, 제초제의 경우 1시간 이내에 독성을 판단할 수 있는 가능성을 발견하였고, 중금속의 경우는 독성 판정에 72시간 이상 소요됨을 알 수 있었음

[결론] 제초제 독성의 경우, 실시간 검사가 필요한 곳에 로봇 적용을 하고, 중금속의 경우, 산업폐수 등 일정한 검사 시간 확보가 허용되는 폐수관리 제도에 도입할 수 있는 가능성을 보임

○ 생태독성 DB (www.kekotox.co.kr) 확충

-본 연구팀에 의하여 구축된 실시간 생태독성 DB에 본 연구에서 획득한 자료들을 입력하여 국내 생태독성 자료를 확장함

[결론] 독성원별, 생물별, 독성매뉴얼, 관련논문과 보고서 등을 종합적으로 탑재한 국내최초의 해양생태독성 DB로 확장시켜나갈 것임

3. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 연구 성과

- 1) 학술적 측면 - 국내논문 5편, 국제 SCI 논문 3편, 국내외 학회발표 6회
- 2) 산업 재산권 - 국내 특허 2건, 국제특허 PCT 2건
- 3) 국내외 네트워크 구축 - 본 연구진이 국내최초로 구축한 생태독성 DB (www.kekotox.co.kr) 확충 및 유럽생태독성 DB (<http://www.mokkka.hu/>)에 자료 등록 요청받음
- 4) 프로토콜 완성 - 8개의 독창적이며 실용적인 생태독성 프로토콜 완성 (국영문)
- 5) ISO 기술 표준화 작업 - application form 완성
- 6) 차세대 전문 인력 양성 및 녹색일자리 창출 - 박사1인, 석사 6인, 학사 6인을 배출하고, 대학 내 학교기업을 설립하여 4명의 직원을 고용함

○ 성과활용 계획

- 1) 2011년부터 국토해양부에서 시행하는 해양생태독성평가제도에 기존의 Microtox와 N-tox 기법에 더하여 battery 기법으로 가입하여 활용하고 KS 표준기술화
- 2) ISO 표준기술로 등록하여 전 세계에 국내기술을 전수하고, 국가 해양환경기술 수준의 제고에 기여
- 3) ISO 표준기술화를 통한 REACH등의 국제 무역 분쟁 해결 및 비용절감 효과 창출
- 4) 유해물질의 확인과 추적이 가능한 독성동정평가법 (TIE) 확립과 Surfer프로그램을 활용한 생물독성지수화 작업을 통하여 미래적이고 진보적인 해양환경 종합생태계 위해성 시스템 구축의 발판마련
- 5) 간편하고 경제적이며 사용자 위주의 생태독성진단키트 및 자동화 장치 생산으로 국제 환경기술시장 진출을 통한 국익창출 및 블루이코노미 이룩

요 약 문

I. 제 목

국내산 다시마 사상체를 사용한 BT-ET 융합형 해양생태위해도 측정 기법 개발 및 국제인증화에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 급속한 산업화, 임해공업단지의 조성 및 연안 개발 그리고 도시화에 따른 인구 집중 현상 등과 관련하여 다양한 오염물질 및 폐기물의 해양 유입이 증가 추세에 있음
- 해양오염 파악을 위해 실시하는 이화학적 분석 방식은 연간 10,000여종 이상의 오염물질이 환경 내로 유입되고 있고, 그중 약 300여종이 새로운 화학물질인 현 상 황에서 분석 한계를 보임
- 최근 국제 사회에서는 해양오염을 진단하는데 이화학적 분석 방식의 보완책으로 생 물검정법 차용을 법제화하고 있고, 미국, 유럽, 호주 등에서는 자국 내 해조류를 이 용한 생태독성진단기술 개발에 박차를 가하고 있음
- 한편, 생태독성진단기법은 해양오염 경보시스템의 근간을 이룰 수 있는 기반기술이 될 수 있는데, 이는 약 6,260억 달러 규모의 세계 환경산업 시장과 13조 1800억 원의 국내 환경산업 시장 규모를 고려할 때 주목할 만한 신성장 동력 근간 기술임
- 국내에서는 성게, 미생물, 어류를 이용한 해양생태독성진단기술에 대한 연구가 수행 되고 있으나 매우 초기단계에 있음
- 국내산 해조류 연구 분야에서는 본 연구진에 의하여 개발된 녹조류 파래를 이용한 생태독성 진단 기법이 최근 ISO 표준기술 (ISO water quality 13308)로 채택된 바 있음
- 본 연구에서는 국내산이면서 양식종으로 잘 알려진 다시마 두 종 (*Saccharina japonica*와 *Undaria pinnatifida*)의 초기발생 시기와 사상체의 생리생태학적 종말 점을 사용하여 해양생태독성평가 원천기술을 개발하고 실용적 프로토콜 (3개 이 상)을 제작하여 이를 2011년부터 실시예정인 국내 해양환경 생태독성 평가과정에 배터리 기법으로 활용하고자 하였으며, 나아가 국내산 기술을 ISO 국제인증화시켜

국가 해양환경기술의 국제화에 기여하고, 특히, BT-ET융복합기술을 이용한 로봇형 독성진단 기반기술을 확보함으로써 독창적이고 실용적인 해양오염경보시스템으로의 전환에 필요한 기술 정보를 축적하고자 함

- 특히, 다시마 사상체를 이용한 독성진단 기술은 종래 사상체의 배양시스템을 업그레이드하고 무한 배양 시스템화하여 동일한 클론과 대량 샘플 확보가 가능하고, 계절에 상관없이 상시 시험수행이 가능하게 함으로써 매우 이상적인 독성시험기법이 될 가능성 높음
- 또한 본 연구에서는 iPAM과 mPAM을 이용하여 종래에 시도된 바 없는 로봇형 독성진단기반기술을 확보하여 국내기술을 기반으로 한 선진국형 해양환경기술 창출의 기반을 조성하고자 함

III. 연구개발 내용 및 범위

- BT-ET 융복합기술을 이용하여 국내산 다시마 초기발생단계와 사상체를 사용한 해양 생태독성평가기법과 매뉴얼을 확정하고, 이를 ISO 국제기술인증화하며 현장 적용 가능한 해양오염 경보시스템으로의 전환에 필요한 기반기술을 확립함
- 환경제어에 의한 무한 배양 및 상시 생물 공급기법 확립을 위한 국내산 다시마 두 종의 초기 발생단계와 사상체의 기초생리학적 연구
- 다시마 초기 발생단계와 사상체를 사용한 독성진단 표준 환경 조건 정립
- Endpoints (발아, 발아관 길이, 생장, 엽록소 형광) 별 환경유해물질 독성반응 조사 (중금속, VOCs, 제초제 등)
- 해양퇴적물과 산업폐수를 사용한 생태독성평가기법의 현장 적용성 평가
- 독성평가로부터 산출된 데이터의 체계적 수집 (NOEC, LOEC, EC₁₀와 EC₅₀) 및 QA/QC (CV를 이용한 재연성 및 정밀성 타진)
- Endpoints별 독성평가 기법 프로토콜 작성
- 국내산 생태독성모니터링 기법 프로토콜의 ISO 국제인증화를 위한 application
- mPAM과 iPAM을 이용한 로봇형 독성진단 기반기술 연구 및 효율성과 적용성 진단

IV. 연구개발결과

○ 국내산 다시마 두 종의 초기 발생단계와 사상체의 기초생리학적 탐색을 통한 생물 무한 공급시스템 조건 확립

1) 광량 및 광질 효과 타진 및 결론:

-발아 과정에서 광량은 크게 차별적인 영향을 주지 않으나 사상체의 생장은 광량에 비례하여 증가함으로 높은 광량 (최고 광량은 $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 조사로 바이오매스의 인위적 증가가 가능함

-광질효과는 뚜렷하여 청색광 (400~500 nm)과 녹색광 (500~600 nm)을 조사할 경우 발아 생장이 향상되며 사상체에서는 생식 유도되는 효과가 나타나는 반면 적색광 (600~700 nm) 하에서는 생식력이 떨어지고 대신 무한생장이 이루어지며 근적외광 (700~800 nm) 조사 시에는 생장과 생식이 동시 억제됨

[결론] 적색광에서 배양함으로써 사상체의 무한 공급이 가능함

2) 영양염 효과 타진 및 결론:

-휴면포자의 경우 10 mM 이상의 질산염 처리군에서 생장은 지속하되 유성생식을 하지 못하고 반면, 0.05~5 mM 농도 범위의 질산염 처리를 하면 유성생식이 유도되는 것으로 판단됨

-인산염이 휴면포자에 미치는 영향을 조사한 결과, 유성생식발생 농도는 0.05~0.1 mM인 것으로 나타남

[결론] 무한 생장을 유도할 경우, 질산염은 고농도 (> 5 mM), 인산염은 0.01 mM의 저농도나 0.5~1 mM의 농도 처리를 하면 될 것으로 사료됨

3) 질산염과 온도의 복합효과 타진 및 결론:

-사상체 생장 및 유성생식은 질산염의 농도보다는 온도에 더 큰 영향을 받음

-사상체 생장은 5~20°C에서 큰 차이를 보이지 않는 반면, 유성 생식은 15~20°C에서 높게 나타남

[결론] 유성생식을 방해한 가운데 바이오매스를 확보하기 위해서는 우선 5°C 이하의 배양온도로 설정을 하는 것이 유리하나, 바이오매스의 빠른 확보를 위해서는 광질 조건 등과의 조화로운 조합이 필요할 것으로 판단됨

4) 암처리에 의한 사상체 보관 효율 타진 및 결론:

- 바이알과 원심분리기용 튜브를 활용한 사상체 무한 보관을 시도했을 때, 엽록소 형광에 의한 활성효율 (최적광자수율, F_v/F_m)이 23개월 이후에도 초기와 마찬가지로 0.5 가량의 수치를 보임

[결론] 사상체를 무한 배양하는데 사용할 단순기구 및 조건을 확립함

○ 다시마와 미역을 사용한 독성진단 표준 환경 조건 정립

종말점 (Endpoints)		광량 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	염도 (psu)	온도 ($^{\circ}\text{C}$)	pH
참다시마 (<i>S. japonica</i>)	포자발아율I	0~120	6~9	10~20	6~9
	포자발아율II	0~120	25~45	5~15	8~9
	포자의 발아관 길이	0~120	35	15~20	7~9
	배우체 면적 성장	10~80	35~55	10~15	6~8
	포자체 발생률	30~80	25~35	5~10	5~8
	어린 포자체 엽록소 형광	10~50	15~55	15~20	6~9
	수배우체 엽록소 형광	0	35	15	8
미역 (<i>U. pinnatifida</i>)	포자발아율	0~80	35~55	5~20	5~9
	포자의 발아관 길이	0~120	35~55	10~20	8
	배우체 면적 성장	30~100	25~55	5~20	8
	배우체 엽록소 형광	10	15~55	20	5~9
	수배우체 엽록소 형광	0	35	15	8

○ Endpoints (발아, 발아관 길이 성장, 배우체 성장, 포자체 생성, 엽록소 형광)별 환경유해물질 독성반응 조사 (중금속, VOCs, 제초제 등)

-국내산 다시마와 미역의 어린 시기를 대상으로 채택한 12가지 endpoints를 이용하여 환경 대표 유해물질 (수은 등 중금속 8종, VOCs 등 환경유해물질 9종, diuron 등 제초제 4종) 총 21종에 대한 단일독성 평가를 수행하였으며, 독성원의 종류에 따라 차별적인 반응을 나타냄

[결론] 중금속 평가 결과를 한 예로 들면, 표준 중금속 구리에 대한 다시마와 미역 시험법의 생태독성 민감성과 국제적으로 공인된 해산종 *Ecklonia radiata*와 *Hormosira bankii* (ANZECC), *Macrocystis pyrifera* (US EPA)에서 보고된 민감성을 비교한 결과, 국제 공인종들보다 다시마와 미역의 민감성이 뛰어난 것으로 나타남

○ 해양퇴적물과 산업폐수를 사용한 생태독성평가기법의 현장 적용성 평가

-Endpoints (발아, 발아관 길이 성장, 배우체 성장, 엽록소 형광)별 21종 해양퇴적물과 19종의 산업폐수를 사용한 생태독성평가기법의 현장 적용성 평가를 수행하여 TU를 산출하였으며, 산업체의 종류에 따라 생태독성결과와 이화학적 분석 수치가 유사하기도 하고, 다르기도 한 것으로 나타남

[결론] 이화학적 기법으로 탐지할 수 없는 미지의 독성원의 존재 또는 독성원간의 시너지와 길항성 등을 종합적으로 신속하게 평가할 수 있는 생태독성평가 기법의 도입 필요성을 부각시키는 결과로 평가됨

○ 독성평가로부터 산출된 데이터의 체계적 수집 (NOEC, LOEC, EC₁₀와 EC₅₀) 및 QA/QC (CV를 이용한 재연성 및 정밀성 타진)

-8종의 표준 중금속과 9종의 환경유해물질, 4종의 제초제 및 19종의 산업폐수에 대하여 참다시마 시험법과 미역 시험법을 이용한 생태독성평가를 실시하고, 선형 테스트 (linearity test)와 ANOVA에 이은 Toxcalc 프로그램의 활용으로 NOEC, LOEC, EC₁₀와 EC₅₀을 산출함

-각 독성원에 대한 자료의 CV를 계산한 결과, 전체적으로 20% 이하인 것으로 나타남

[결론] 타연구 결과와의 비교가 용이하도록 다양한 임계 수치를 제공하였으며 CV의 경우, 국제적으로 규정되어 있는 생태독성평가결과의 재연성 및 정밀성 허용치인 30~40% 이하인 것으로 나타나 기술의 객관성과 신뢰성을 확인함

○ Endpoints별 독성평가 기법 프로토콜 작성

[결론] 다시마와 미역을 사용한 8가지 생태독성시험법의 국영문 매뉴얼을 ISO 표준

기술 매뉴얼 양식으로 완성함

- 국내산 생태독성모니터링 기법 프로토콜의 ISO 국제인증화를 위한 application
 - [결론] 차기 ISO water quality 총회에 상정할 수 있는 형태로 다시마/미역 생태독성 프로토콜의 application form을 작성함
- mPAM과 iPAM을 이용한 로봇형 독성진단 기반기술 연구 및 효율성과 적용성 진단
 - 중금속과 제초제를 사용하여 로봇형 진단기술의 개발 가능성을 타진한 결과, 제초제의 경우 1시간 이내에 독성을 판단할 수 있는 가능성을 발견하였고, 중금속의 경우는 독성 판정에 72시간 이상 소요됨을 알 수 있었음
 - [결론] 제초제 독성의 경우, 실시간 검사가 필요한 곳에 로봇 적용을 하고, 중금속의 경우, 산업폐수 등 일정한 검사 시간 확보가 허용되는 폐수관리 제도에 도입할 수 있는 가능성을 보임
- 생태독성 DB (www.kekotox.co.kr) 확충
 - 본 연구팀에 의하여 구축된 실시간 생태독성 DB에 본 연구에서 획득한 자료들을 입력하여 국내 생태독성 자료를 확장함
 - [결론] 독성원별, 생물별, 독성매뉴얼, 관련논문과 보고서 등을 종합적으로 탑재한 국내최초의 해양생태독성 DB로 확장시켜나갈 것임

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 연구 성과
 - 1) 학술적 측면 - 국내논문 5편, 국제 SCI 논문 3편, 국내외 학회발표 6회
 - 2) 산업 재산권 - 국내 특허 2건, 국제특허 PCT 2건
 - 3) 국내외 네트워크 구축 - 본 연구진이 국내최초로 구축한 생태독성 DB (www.kecotox.co.kr) 확충 및 유럽생태독성 DB (<http://www.mokkka.hu/>)에 자료 등록 요청받음
 - 4) 프로토콜 완성 - 8개의 독창적이며 실용적인 생태독성 프로토콜 완성 (국영문)
 - 5) ISO 기술 표준화 작업 - application form 완성
 - 6) 차세대 전문 인력 양성 및 녹색일자리 창출 - 박사1인, 석사 6인, 학사 6인을 배출하고, 대학 내 학교기업을 설립하여 4명의 직원을 고용함

○ 성과활용 계획

- 1) 2011년부터 국토해양부에서 시행하는 해양생태독성평가제도에 기존의 Microtox와 N-tox 기법에 더하여 battery 기법으로 가입하여 활용하고 KS 표준기술화
- 2) ISO 표준기술로 등록하여 전 세계에 국내기술을 전수하고, 국가 해양환경기술 수준의 제고에 기여
- 3) ISO 표준기술화를 통한 REACH등의 국제 무역 분쟁 해결 및 비용절감 효과 창출
- 4) 유해물질의 확인과 추적이 가능한 독성동정평가법 (TIE) 확립과 Surfer프로그램을 활용한 생물독성지수화 작업을 통하여 미래적이고 진보적인 해양환경 종합생태계 위해성 시스템 구축의 발판마련
- 5) 간편하고 경제적이며 사용자 위주의 생태독성진단키트 및 자동화 장치 생산으로 국제환경기술시장 진출 통한 국익창출 및 블루이코노미 이룩

SUMMARY

I. Title

Development of BT–ET integrated technology for the marine ecological risk assessment using domestic laminarian filaments and its international licensing

II. Objectives and necessities for the research

- A rapid rise in industrialization, building of industrial complexes in the vicinity of sea, coastal developments and concentration of population establishments following urbanization, over the past few years has led to increasing environmental threats in the form of pollutants and wastewater (particularly to the oceans).
- Out of the 10,000 chemicals produced annually, 300 chemicals belong to the brand new category; hence, it becomes essential to evaluate the dramatic ecotoxicological implications that these chemicals would cause. Several chemical toxicity testing methods have been employed till date, but most of them do not comprise the testing of the new chemical toxicants. Furthermore, they also have several other limitations such as secondary pollution.
- A need to overcome the aforesaid problem has been recognized by various international regulatory authorities, who proposed the use of alternative biological methods or bioassays which not only aid marine pollution assessment but also help in suggesting waste management strategies. For e.g. the use of domestic seaweeds as ecotoxicological bioassay tools has gained popularity in USA, Europe, Australia, etc. Further, unlike chemical assays, these assays do not cause secondary pollution.
- Studies on basic but novel ecotoxicological test batteries would lead to development of bioassays which would further lead to development of sensitive “marine pollution warning systems” , that would be a pioneer in the greened (eco–friendly) “pollution detectors technology” (We should note that the value of the world's current environmental market is at \$626 billion and the domestic market is approximately \$US13 billion).
- Endeavors to commercialize the use of marine ecotoxicological bioassays using sea urchins, microorganisms and fish are under progress domestically, but these

efforts are yet at the teething stage and need to be implemented more scrupulously. Moreover, it is also vital to utilize domestic species as ecotoxicity tools. This would not only provide better detection (as the species would be adapted to the local climate) but would also prove to be more cost-effective.

- Our team has registered an ISO standard for an ecotoxicological bioassay using a green alga (*Ulva pertusa*) i. e. ISO (ISO water quality 13308); this is the only method of its kind registered domestically. Looking at its sensitivity and simplicity, our team focuses on the development of several similar methods that could be put to use as green tools for toxicity detection.
- The present study focuses on development of ecotoxicological bioassays based on the early stages of two domestic species, *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*, which are commercially exploited. Studies on several physiological end points were undertaken in order to develop a basic technology which would be sensitive. Based on these studies, eight practical protocols were developed which fulfilled the national marine ecotoxicological assessment criterion. Based on the sensitivity of the technologies developed, an application to enlist the developed technology in the ISO standards has been made submitted in order to receive international recognition for this national environmental science technology. Efforts have also been carried out to collect the information required in order to convert this, “robot type ecotoxicological assessment technology” based on converged BT-ET technology, into a “marine pollution warning system for the future” .
- It is noteworthy to mention that we have successfully accomplished a technology that provides continuous supply of test battery (or biological samples); thus it would be possible to obtain large quantities of identical clones throughout the year.
- This new robot type ecotoxicological assessment technology would involve the use of modern sophisticated instrumentation i.e. iPAM and mPAM, which aids in easy detection of endpoints. Thus the technology would be almost error-free, hassle-free, innovative and a world-class marine environment technology based on basic domestic technological know-how.

III. Research development and its scope

- Physiological studies of domestic *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*

filaments using mass culture method under controlled environmental conditions.

- Standardization of environmental conditions for the ecotoxicological tests using the early stages of *S. japonica* and *U. pinnatifida*, and their filaments
- Studies on ecotoxicological assessment methods in order to detect environmentally hazardous substances (such as heavy metal, VOCs and etc.), based on assessment of physiological endpoints (germination, growth, chlorophyll fluorescence, and sporophyte production).
- Establishing applicability of the developed ecotoxicological test methods by testing them in monitoring industrial wastewater containing contaminants.
- Statistical analysis of the data obtained(NOEC, LOEC, EC₁₀ and EC₅₀) to emphasize on the sensitivity of the ecotoxicological test method established herein. Further establishment of Quality Assurance/Quality Control (Precision and regeneration assessment using CV values).
- Outlining the protocols describing the ecotoxicological test methods (8 protocols)
- Completing an application form for the technology to be registered as a ISO recognized bioassay.
- Research on the “robot type ecotoxicological assessment technology” using mPAM and iPAM, and establishing its applicability and sensitivity.

IV. Results

- Standardization of environmental conditions for the system for mass culture of organisms. These studies were carried out based on studies on physiology of the early stages of *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida* and their filaments.

1) Effects of light quantity and quality:

- The light quantity did significantly influence germination. However, the growth rate of filaments was proportional to the light quantity (the maximal growth rate at $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); thus mass production of biomass could be achieved by increasing light quantity.
- Blue (400~500 nm) and green lights (500~600 nm) enhanced the growth of germ tubes and also induced the reproduction of filaments; however, in red light (600~700 nm), the filaments showed continuous growth with decreasing reproduction. The near infrared light (700~800 nm) inhibited both growth and reproduction of filaments.

[Conclusion] The use of red light would help in continuous production of filaments; this fact could be beneficial.

2) Effects of nutrient quantity and quality:

- At nitrate concentrations > 10 mM, the embryo spores grew but did not undergo sexual reproduction. However, at $0.05\sim 5$ mM of nitrate, sexual reproduction of the spores was induced.
- Under $0.05\sim 0.1$ mM phosphate concentrations, sexual reproduction of embryo spores was observed.

[Conclusion] Continuous growth of embryo spores could be induced under high (> 5 mM) concentrations of nitrate and low (0.01 mM or $0.5\sim 1$ mM) concentration of phosphate.

3) Simultaneous effects of nitrate and temperature:

- As compared with the nitrate content, the temperature had a tremendous effect on the growth and the sexual reproduction of filaments.
- Temperatures ranging from $5\sim 20^{\circ}\text{C}$ did not significantly influence the growth of the filaments; but it is essential to note that at $15\sim 20^{\circ}\text{C}$ the sexual reproduction rate was the highest.

[Conclusion] In order to get biomass of filaments without sexual reproduction, it is advisable to incubate filaments at below 5°C . However, to obtain biomass rapidly, it is necessary to provide appropriate light quality simultaneously.

4) Storage in the dark:

- Long-term storage of filaments in the dark (in vials and effendorf tubes) and assessment of their physiological efficiency (optimal quantum yield, F_v/F_m , 0.5) after an interval of 23 months revealed that the samples were healthy.

[Conclusion] Long-term storage of the filaments was successfully established with the use of simple instruments and the environmental conditions defined herein.

- The standard environmental conditions for ecotoxicological assessment using *S. japonica* and *U. pinnatifida* have been outlined as follows.

Endpoints		Photon irradiance ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Salinity (psu)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	pH
<i>S. japonica</i>	Spore germination I	0~120	6~9	10~20	6~9
	Spore germination II	0~120	25~45	5~15	8~9
	Spore germ tube length	0~120	35	15~20	7~9
	Gametophyte growth	10~80	35~55	10~15	6~8
	Sporophyte production	30~80	25~35	5~10	5~8
	Immature sporophyte chlorophyll fluorescence	10~50	15~55	15~20	6~9
	Male gametophyte chlorophyll fluorescence	0	35	15	8
<i>U. pinnatifida</i>	Spore germination	0~80	35~55	5~20	5~9
	Spore germ tube growth	0~120	35~55	10~20	8
	Gametophyte growth	30~100	25~55	5~20	8
	Gametophyte chlorophyll fluorescence	10	15~55	20	5~9
	Male gametophyte chlorophyll fluorescence	0	35	15	8

○ Ecotoxicological response of the two species to environmentally hazardous substances (heavy metal, VOCs, herbicides and etc.) were tested using several endpoints (germination, growth of germ tube, gametophyte growth, sporophyte production, chlorophyll fluorescence)

–Based on the data obtained, 12 endpoints of the early stages of *S. japonica* and *U. pinnatifida* were investigated, in order to conduct ecotoxicological assessment of total 21 types of hazardous substances which included 8 heavy metal including mercury, 9 hazardous substances including VOCs, 4 herbicides including diuron. All the endpoints studied showed distinct sensitivity to the various toxicants.

[Conclusion] *S. japonica* and *U. pinnatifida* bioassay methods outlined herein showed

higher sensitivity to heavy metals as compared to the internationally recognized *Ecklonia radiata*, *Hormosira banksii* (ANZECC) and *Macrocystis pyrifera* (USEPA) assays.

○ Field applicability of ecotoxicity bioassays using industrial wastewater and ocean sediments

–The TU values were calculated by conducting site applicability test for the ecotoxicity bioassays using 21 ocean sediments and 19 industrial wastewater for all endpoints (germination, growth of germ tube, gametophyte growth, sporophyte production, chlorophyll fluorescence). Results obtained revealed similarities and differences in sensitivity to various toxicants and industrial effluents.

[Conclusion] The results obtained established the need for an ecotoxicity bioassay which could rapidly and clearly detect the presence of unknown toxic substances; and the bioassay should also be able to determine the synergistic effects and their antagonistic effects of a toxicant mixture. The prevalent or established chemical methodologies in vogue do not fulfil this, hence it is essential to use bioassay technologies such as those established based on the two species herein.

○ Systematic collection of statistical data (NOEC, LOEC, EC₁₀ and EC₅₀) from the toxicity assessment; and Quality Assurance/ Quality Control (Precision and regeneration assessment using CV values)

–Ecotoxicity tests were conducted on 8 heavy metals, 9 environmentally hazardous substances, 4 herbicides, and 19 industrial wastewaters using the test methods involving *S. japonica* and *U. pinnatifida*. The NOEC, LOEC, EC₁₀ and EC₅₀ values were calculated through the linear interpolation method, ANOVA and Toxcalc program.

–The coefficient of variance (CV) obtained for all toxicants was < 20%.

[Conclusion] In order to compare the previously established and reported research results, various critical level values have been provided. It has traditionally been acknowledged that if the CV value is < 30~40%, the proposed technology is reliable at international levels. The endpoints tested and the technologies defined here hence fulfill this (< 20%) and hence demonstrate reproducibility and precision of the test results complying with international standards, which helps in establishment of this method as an international ecotoxicity assessment method.

- Outlining toxicity bioassay protocols for the endpoints
 - [Conclusion] A set of ISO standard technology manuals for 8 ecotoxicity bioassays using *S. japonica* and *U. pinnatifida* have been successfully been prepared in Korean and English.
- Preparation of an application to establish these methods under the ISO standard and for domestic ecotoxicity monitoring
 - [Conclusion] An application form for the protocol on ecotoxicity test using *S. japonica* and *U. pinnatifida* has been prepared and it is to be submitted to the ISO water quality conference very soon.
- Evaluation of applicability and efficiency of the robot type toxicity assessment technology using mPAM and iPAM
 - The robot type assessment technology could detect toxicity of herbicides within an hour, while it took > 72 hours for the detection of heavy metals.
 - [Conclusion] This robot type assessment could hence be applied for real time testing of herbicide toxicity, while in the case of heavy metals, there are possibilities to apply this technology in wastewater management systems where the testing period of > 72 hours was not an impendence.
- Expansion of an ecotoxicity domestic bank (DB)
 - Our research team has uploaded a domestic ecotoxicological database bank on the established real time ecotoxicity DB.
 - [Conclusion] Plans to expand the DB into the nation's first comprehensive marine ecotoxicity DB are underway; and preparation of various papers and reports are under progress.

V. Research accomplishments and applications

- Research accomplishment
 - 1) Research papers Published – 5 domestic, 3 international SCI papers; Presentations – 6(both domestic and international).
 - 2) Patents filed – 2 domestic and 2 international PCT patents.
 - 3) National and international collaboration – The research team has established the nation's first ecotoxicity DB(www.kecotox.co.kr) and has also received proposal to list data on Europe ecotoxicity DB(<http://www.mokkka.hu/>).
 - 4) Protocols developed – 8 new innovative and practical ecotoxicity protocols

have been developed and described in Korean and English.

- 5) Protocol standardization for ISO - An application form in order to establish the technologies under the ISO standards has been prepared.
- 6) Fostering human resources and creating green jobs - 1 Ph.D., 2 Masters and 6 Bachelors fostered and 4 employees in the spin-off company.

○ Application plans of the accomplishments

- 1) Register the method as a new battery method with effect from 2011 as compared to the previous Microtox and N-tox methods for the marine ecotoxicity assessment system, and register them as KS standards.
- 2) Register the technologies as standard ISO protocols in order to make the methods internationally renowned, this would in turn prove a credit and strength to the nation as its contribution in the field marine environmental technology.
- 3) Provide cost-effective solutions to the international trade disputes, such as cases of REACH, with the standardization at ISO.
- 4) Provide strategic, progressive and comprehensive ecosystem warning system by defining TIE methods for detecting and tracking hazardous materials, and further, creating a toxicity calculation system using the Surfer program.
- 5) By entering into the global environmental business with user-friendly and economic ecotoxicity test kits and automated instruments, it would be obvious that this blue technology would not only earn returns financially but would also be a credit to the nation by helping to achieve Blue Economy.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of the research project	1
Clause 1 The consequence and necessity of research	1
Chapter 2. Current states of domestic and international research	5
Clause 1. Current states of domestic and international research	5
Chapter 3. Contents and results of research	9
Clause 1. Contents of research	9
1. Organisms	9
2. Ecotoxicological tests	12
Clause 2. Results of research	21
1. Physiological studies of <i>Laminaria</i> filaments for mass culture and continuous production	21
2. Development of ecotoxicity protocols	27
Clause 3. Summary of research results	144
Chapter 4. Research achievements and contribution to the related fields	163
Chapter 5. Application plan of research results	165
Chapter 6. Overseas scientific and technical information obtained during research	169
Chapter 7. References	175
Appendix	185

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	1
제 1절 연구개발의 중요성 및 필요성	1
1. 연구개발의 과학기술적 측면	1
2. 연구개발의 사회경제적 차원	2
3. 연구개발의 사회문화적 필요성	3
제2장 국내외 기술개발 현황	5
제 1 절 국내외 기술개발 현황	5
1. 국내기술동향	5
2. 국외기술동향	5
3. 향후 전망	7
4. 기술동향 분석 결론	7
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	9
제 1 절 연구개발 수행 내용	9
1. 표준시험생물	9
2. 생태독성시험	12
제 2 절 연구개발 결과	21
1. 다시마 사상체의 무한 배양 및 공급을 위한 기초생리학적 연구	21
2. 생태독성진단 프로토콜 개발	27
제 3 절 연구개발 결과 요약	144
1. 시험생물 상시 공급 시스템의 간편성과 무한제공 가능성	144
2. 신기술 생태독성 시험법 요약	145
3. 생태독성 민감성 비교	147
4. 생태독성평가 기법의 CV 차트	150
5. 생태독성평가 시스템의 구성	152
6. 지표생물 독성평가 DB에 실험 data 및 문헌 자료 입력	154
7. 연안 수질 오염 분포도 작성	157
8. 생태독성 원인 물질 규명을 위한 평가법	158

9. 생태위해도 저감 및 관리방안	161
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	163
제 1 절 연구개발 수행 내용	163
제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	165
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	169
제7장 참고문헌	175
부 록	185

표 목 차

표 1. 해조류 중금속 독성 평가 연구사례	6
표 2. 표층수 생태독성진단기법	7
표 3. 퇴적물 및 퇴적물 용출액 생태독성진단기법	7
표 4. 금속 종류 및 제품 정보	15
표 5. 휘발성 유기화합물 (VOCs) 종류 및 제품 정보	15
표 6. 환경유해물질 종류 및 제품 정보	16
표 7. 제초제 종류 및 제품 정보	16
표 8. 연안해수 채수지점 및 수질등급	17
표 9. 해역별 수질기준	18
표 10. 산업폐수 업종	19
표 11. 수질오염물질의 배출허용기준	20
표 12. OTT's 인공해수의 주요 성분	29
표 13. 참다시마 포자 발아를 이용한 중금속의 생태독성평가 결과	34
표 14. 참다시마 포자 발아를 이용한 휘발성 유기화합물의 생태독성평가 결과	36
표 15. 참다시마 포자 발아를 이용한 환경유해물질의 생태독성평가 결과	37
표 16. 산업폐수의 지점별 이화학적 분석 결과	38
표 17. 참다시마의 포자 발아를 이용한 산업폐수의 생태독성평가 결과	40
표 18. 참다시마의 포자발아율 (II)을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과	46
표 19. 참다시마 포자 발아관 길이 생장을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과	52
표 20. 참다시마 포자 발아관 길이 생장을 이용한 휘발성 유기화합물 의 생태독성평가 결과	54
표 21. 참다시마 포자 발아관 길이 생장을 이용한 환경유해물질의 생태독성평가 결과	55
표 22. 6월 산업폐수의 지점별 이화학적 분석 결과	56
표 23. 참다시마의 포자 발아관 길이 생장을 이용한 산업폐수의 생태독성평가 결과	58

표 24. 참다시마의 발아관 길이 생장과 미세조류 성장 및 과래의 생식률을 이용한 산업폐수의 생태독성평가 결과	60
표 25. 참다시마 배우체 상대생장률을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과	67
표 26. 참다시마 배우체 상대생장률을 이용한 휘발성 유기화합물의 생태독성평가 결과	69
표 27. 참다시마 배우체 상대생장률을 이용한 환경유해물질의 생태독성평가 결과	70
표 28. 6월 산업폐수의 지점별 이화학적 분석 결과	71
표 29. 참다시마의 배우체 상대생장율을 이용한 산업폐수의 생태독성평가 결과	73
표 30. 참다시마 포자체 발생률을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과	78
표 31. 참다시마 어린 포자체 엽록소 형광을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과	82
표 32. 다시마 배우체 형광을 이용한 시간추이별 제조체의 생태독성평가 결과	89
표 33. 미역 포자 발아를 이용한 중금속의 생태독성 평가 결과	95
표 34. 미역 포자 발아를 이용한 폐놀의 생태독성 평가 결과	95
표 35. 산업폐수 (3월)의 지점별 이화학적 분석 결과	96
표 36. 미역 포자발아율을 이용한 산업폐수 (3월)의 생태독성평가 결과	98
표 37. 산업폐수 (6월)의 지점별 이화학적 분석 결과	99
표 38. 미역 포자발아율을 이용한 산업폐수 (6월)의 생태독성평가 결과	101
표 39. 미역 포자 발아관 길이 생장을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과	107
표 40. 미역 포자 발아관 길이 생장을 이용한 폐놀의 생태독성평가 결과	107
표 41. 해양오니의 지점별 이화학적 분석 결과	108
표 42. 산업폐수 (3월)의 지점별 이화학적 분석 결과	109
표 43. 미역 포자 발아관 길이 생장율을 이용한 산업폐수 (3월)의 생태독성평가 결과	111
표 44. 산업폐수 (6월)의 지점별 이화학적 분석 결과	112
표 45. 미역 포자 발아관 길이 생장율을 이용한 산업폐수 (6월)의 생태독성평가 결과	114
표 46. 미역 배우체 생장을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과	120
표 47. 미역 배우체 상대생장률을 이용한 휘발성 유기화합물의 생태독성평가 결과	122

표 48. 미역 배우체 상대생장률을 이용한 환경유해물질의 생태독성평가 결과	123
표 49. 산업폐수 (6월)의 지점별 이화학적 분석 결과	124
표 50. 미역 배우체 상대생장률을 이용한 산업폐수 (6월)의 생태독성평가 결과	126
표 51. 미역 배우체 엽록소 형광을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과	130
표 52. 미역 배우체 형광을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과	135
표 53. 미역 배우체 형광을 이용한 휘발성 유기화합물 (VOCs)의 생태독성평가 결과	137
표 54. 미역 배우체 형광을 이용한 시간추이별 제초제의 생태독성평가 결과 ..	141
표 55. 산업폐수의 지점별 이화학적 분석 결과	143
표 56. 미역 배우체 형광을 이용한 산업폐수 (6월)의 생태독성평가 결과	143
표 57. 생태독성 평가법 요약 I	145
표 58. 생태독성 평가법 요약 II	146
표 59. 본 과제에서 개발된 지표생물과 국제공인 지표생물과의 구리 독성 민감성 (EC ₅₀) 비교	147
표 60. 본 과제에서 개발된 지표생물과 국제공인 지표생물과의 Phenol 독성 민감성 (EC ₅₀) 비교	148
표 61. 본 과제에서 개발된 지표생물과 국제공인 지표생물과의 Diuron 독성 민감성 (EC ₅₀) 비교	149
표 62. 중금속 생태독성평가 기법의 CV 차트	150
표 63. 환경유해물질 생태독성평가 기법의 CV 차트	151
표 64. 산업폐수 생태독성평가 기법의 CV 차트	151
표 65. 단일독성물질 시험결과 입력 DB	154
표 66. 산업폐수현장시료 시험결과 입력 DB	155
표 67. 대형 해조류를 이용한 생태독성 시험법	169

그 립 목 차

그림 1. 참다시마 사상체와 미역 사상체	9
그림 2. 다시마류의 생활사	10
그림 3. 생식세포 유도 모식도	11
그림 4. 암수배우체 분리배양 모식도	11
그림 5. PAM의 독성 진단 원리	13
그림 6. iPAM을 이용한 독성진단 예시	13
그림 7. 수체 및 생체내 독성물질 분석기기	14
그림 8. 연안해수의 채수지점망	17
그림 9. 저온에서 장기간 보관된 미역 휴면 포자의 활성화에 미치는 광질의 영향 평가	21
그림 10. 저온에서 장기간 보관된 미역 휴면 포자의 활성화에 미치는 질산염과 인산염의 영향 평가	22
그림 11. 다시마 휴면 포자의 광합성 활성화 특이성	23
그림 12. 미역 배우체 생장에 미치는 온도와 질산염의 복합효과	24
그림 13. 미역 배우체의 포자체 형성에 미치는 온도와 질산염의 복합효과	25
그림 14. 사상형 참다시마 배우체의 생리활성	26
그림 15. 생태독성 진단을 위한 어린 시기 단계별 종말점	27
그림 16. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 참다시마 포자의 발아율	30
그림 17. 발아율 측정	31
그림 18. 24시간 후 측정한 발아율 대조군 차트	32
그림 19. 중금속 농도에 따른 참다시마 포자의 발아율	33
그림 20. 휘발성 유기화합물에 따른 참다시마 포자발아율	35
그림 21. 환경유해물질의 농도에 따른 참다시마 포자의 발아율	37
그림 22. 참다시마의 포자발아율을 이용한 산업폐수 예비 실험 결과	38
그림 23. 산업폐수 농도에 따른 참다시마 포자의 발아율	39
그림 24. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 참다시마 포자의 발아율	43
그림 25. 24시간 후 측정한 발아율 대조군 차트	44
그림 26. 중금속 농도에 따른 참다시마 포자의 발아율	45
그림 27. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 참다시마 포자의 발아관 길이	49

그림 28. 발아관 길이 측정	49
그림 29. 24시간 후 측정된 발아관 길이 대조군 차트	50
그림 30. 중금속 농도에 따른 참다시마 포자 발아관 길이 생장	51
그림 31. 휘발성 유기화합물에 따른 참다시마 포자 발아관 길이 생장	53
그림 32. 환경유해물질의 농도에 따른 참다시마 포자의 발아관 길이 생장	55
그림 33. 참다시마의 포자 발아관을 이용한 산업폐수 수질 평가 예비 실험 결과	58
그림 34. 산업폐수 농도에 따른 참다시마 포자 발아관 길이 생장	57
그림 35. 다시마의 발아관 길이 생장을 이용한 하천수질 평가 예비 실험 결과	59
그림 36. 다시마의 발아관 길이 생장을 이용한 하천수질 평가 예비 실험 결과	60
그림 37. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 참다시마 배우체 성장률	64
그림 38. 144시간 후 측정된 배우체 성장률 대조군 차트	65
그림 39. 중금속 농도에 따른 참다시마 배우체 상대성장률	66
그림 40. 휘발성 유기화합물에 따른 참다시마 배우체 상대성장률	68
그림 41. 환경유해물질의 농도에 따른 참다시마 배우체 상대성장률	70
그림 42. 참다시마의 배우체 상대성장률을 이용한 산업폐수 수질 평가 예비 실험 결과	71
그림 43. 산업폐수 농도에 따른 참다시마 배우체 상대성장률	72
그림 44. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 참다시마 포자체 발생률	76
그림 45. 144시간 후 측정된 포자체 발생률 대조군 차트	77
그림 46. 중금속 농도에 따른 참다시마 포자체 발생률	78
그림 47. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 참다시마 어린 포자체 엽록소 형광	81
그림 48. 구리 농도에 따른 참다시마 어린 포자체의 엽록소 형광	82
그림 49. 1시간 후 측정된 수배우체의 엽록소 형광률 대조군 차트	85
그림 50. 30분 후 측정된 제조제 농도에 따른 다시마 수배우체 형광	86
그림 51. 1시간 후 측정된 제조제 농도에 따른 다시마 수배우체 형광	87
그림 52. 24시간 후 측정된 제조제 농도에 따른 다시마 수배우체 형광	88
그림 53. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 미역포자의 발아율	92
그림 54. 24시간 후 측정된 발아율 대조군 차트	93

그림 55. 중금속 농도에 따른 미역 포자의 발아율	94
그림 56. 폐놀 농도에 따른 미역 포자의 발아율	95
그림 57. 미역 포자발아율을 이용한 산업폐수 (3월) 수질 평가 예비 실험 결과	96
그림 58. 미역의 포자발아율을 이용한 산업폐수 (3월) 수질 평가 결과	97
그림 59. 미역 포자발아율을 이용한 산업폐수 (6월) 수질 평가 예비 실험 결과	99
그림 60. 미역의 포자발아율을 이용한 산업폐수 (6월) 수질 평가 결과	100
그림 61. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 미역 포자의 발아관 길이	104
그림 62. 48시간 후 측정된 발아관 길이 대조군 차트	105
그림 63. 중금속 농도에 따른 미역 포자 발아관 길이 성장	106
그림 64. 폐놀 농도에 따른 미역 포자 발아관 길이 성장	107
그림 65. 미역 포자 발아관 길이 성장을 이용한 연안 퇴적물 시료의 평가	108
그림 66. 미역 포자 발아관 길이 성장을 이용한 산업폐수 (3월)의 평가	109
그림 67. 미역의 포자 발아관 길이 성장률을 이용한 산업폐수 (3월) 수질 평가 결과	110
그림 68. 미역 포자 발아관 길이 성장을 이용한 산업폐수 (6월)의 평가	112
그림 69. 미역 포자 발아관 길이 성장률을 이용한 산업폐수 (6월) 수질 평가 결과	113
그림 70. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 미역 배우체 성장률	117
그림 71. 144시간 후 측정된 미역 배우체 상대성장률 대조군 차트	118
그림 72. 중금속 농도에 따른 미역 배우체 상대성장률	119
그림 73. 휘발성 유기화합물에 따른 미역 배우체 상대성장률	121
그림 74. 트리부틸주석의 농도에 따른 미역 배우체 상대성장률	123
그림 75. 미역의 배우체 상대성장율을 이용한 산업폐수 (6월)의 수질 평가 예비 실험 결과	124
그림 76. 산업폐수 (6월) 농도에 따른 미역 배우체 상대성장률	125
그림 77. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 미역 배우체 엽록소 형광	129
그림 78. 배우체 형광 측정 (mPAM)	129
그림 79. 구리 농도에 따른 미역 배우체의 엽록소 형광	130
그림 80. 30분 후 측정된 수배우체의 엽록소 형광률 대조군 차트	133
그림 81. 중금속 농도에 따른 미역 수배우체 형광	134

그림 82. 휘발성 유기화합물 (VOCs) 농도에 따른 미역 수배우체 형광	136
그림 83. 30분 후 측정된 제초제 농도에 따른 미역 수배우체 형광	138
그림 84. 1시간 후 측정된 제초제 농도에 따른 미역 수배우체 형광	139
그림 85. 24시간 후 측정된 제초제 농도에 따른 미역 수배우체 형광	140
그림 86. 산업폐수 농도에 따른 미역 수배우체 형광	142
그림 87. 생물시료 상시 공급 시스템 모식도 - I. 휴면포자 보관 조건	144
그림 88. 생물시료 상시 공급 시스템 모식도 - II. 사상체 보관 조건	144
그림 89. Laminariakit	152
그림 90. LaminariaTox	152
그림 91. Surfer 프로그램을 이용한 지도작성	157
그림 92. 독성 물질의 특성화 작업을 위한 흐름도	158
그림 93. 파래를 이용한 독성원인물질의 특성파악 (TIE Phase I)	160
그림 94. 파래를 이용한 독성원인물질 분석 및 규명 (TIE Phase II)과 독성원인 물질 확인 (TIE Phase III)의 실례	160
그림 95. KORECORisk 프로그램 결과 예시	161
그림 96. 생태위해성평가 모듈	162
그림 97. 생태위해도 저감 목표 산정 및 관리방안 도출 모식도	162

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 중요성 및 필요성

1. 연구개발의 과학기술적 측면

- 급속한 산업화, 임해공업단지의 조성 및 연안 개발 그리고 도시화에 따른 인구 집중 현상 등과 관련하여 다양한 오염물질 및 폐기물이 해양으로 유입되고 있음
- 해양환경 오염의 심각성을 고려하여 세계 모든 나라에서는 해양환경 보호를 위한 종합적인 수질보전 정책을 입안하고 수질오염측정기술을 개발하는데 막대한 노력과 재정을 투자하고 있는 실정임
- 선진국의 경우, 미국에서 국가 규모의 EMAP (Environmental Monitoring and Assessment Program)과 NWQA (National Water Quality Assessment)를 실시하고 있고, 유럽에서는 해양오염방지를 목적으로 하는 헬싱키협약을 개정하는 등 국가별, 또는 국가 간 협력 하에 해양오염 모니터링 체계를 보장하는 추세임
- 최근에는 선진국뿐 아니라 황해와 접한 중국에서도 기존의 해양 모니터링 지침을 조정하고 기준항목을 확대, 강화시켜 새로운 국가 모니터링 프로그램을 시작함
- 가까운 일본에서도 각 지방정부에서 수행하는 공공용수 수질조사에 연안 역 조사를 포함시켜 담수와는 다른 측정 항목과 분석법을 창출하려는 노력을 기울이고 있음
- 국내에서도 최근 해양오염에 대한 인식이 고양되면서 해양을 보호하며, 해양환경보전을 위한 국제 동향에 대응하기 위해서 해양 수질을 과학적으로 진단하고, 오염 부하량의 증가 또는 감소 등에 따른 해양 수질의 변화양상을 정밀하고 합리적으로 예측하는 해양오염 모니터링 체계의 구축 필요성에 대한 요구가 비등함
- 이를 위해서는 해양오염 모니터링 체계상의 문제들을 점검하고 해양오염 모니터링 체계와 운영방식을 개선하는데 필요한 기반기술을 확립하는 일이 시급한 과제라 할 수 있음
- 해양의 오염정도를 파악하기 위해서 종래에는 특정 유해성분에 대한 이화학적 분석을 실시함으로써 위해성 판정의 토대로 삼았으나, 많은 단점이 있는 것으로 알려짐
- 그 예로는 첫째, 실제로 10,000여종 이상의 오염물질이 환경 내로 유입되고 있고, 과학기술의 진보와 기술혁신에 힘입어 매년 약 300여종의 새로운 화학물질이 생산되어 수체에 유입되고 있는 현황에서 이러한 오염물질들을 모두 개별적으로 분석해내는 일은 현실적으로 불가능하다는 것임
- 둘째, 다양한 화합물이 공존함으로써 나타낼 수 있는 생물 또는 생태계에 대한 복합적이고 직접적인 위해성을 탐지해내지는 못한다는 것임
- 셋째, 오염물질이 생물농축 현상 등을 통해 생물과 생태계에 피해를 끼칠 수 있음에도 불구하고 환경 중에 저농도로 존재할 경우 이에 대한 파악이 힘들다는 것 등이 있음
- 이러한 점에서, 최근 국제 사회에서 환경 독성을 평가하는데 생물검정법 차용을 법제화하고 있는 경향을 보이는 것은 주목할 만 함
- 생물검정법 (bioassay)이란 생물을 사용하여 환경 내에 존재하는 단독 혹은 혼합의 이질 물

- 질을 정량화 하거나 그 물질의 잠재적인 위해성을 평가하는 방법이라고 정의할 수 있음
- 생물검정법은 이화학적 독성탐지 방식이 갖는 단점을 보완해주는 기법으로 ① 위해요인을 복합적, 종합적으로 파악할 수 있고, ② 광역 및 장단기적인 오염정도를 진단할 수 있고, ③ 고가의 측정기기가 불필요하며, ④ 사용이 간편하여 고도의 기술 및 전문기술을 요구하지 않고, ⑤ 특정오염물질의 영향을 구별할 수 있음
 - 한 예로, 미국에서는 the Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA), the Clean Water Act (CWA), the Marine Protection, Research, and Sanctuaries ACT (MPRSA)와 the Toxic Substances Control Act (TSCA) 등에서 환경 내 유해물질의 위해성 진단법으로서 생물 검정법을 도입하여 곤쟁이류, 연준모치류, 굴류를 사용하라고 권장하고 있음
 - 이와 같이, 과거 생물 검정법에 해양 동물이 주로 사용되었는데 이는 해조류의 생리적 민감성이 동물과 비교할 때 매우 떨어지는 것으로 생각했기 때문임
 - 그러나, 최근 국제 학술지에 발표되는 수많은 연구 논문들은 그것이 편견임을 증명하여 현재 미국 환경 보호국 (EPA)에서는 홍조류 *Champia parvula*와 갈조류 *Laminaria saccharina*를 비롯한 여러 가지 해조류의 생리반응을 공식적인 오염 지표 protocol로 인정하고 있음
 - 그 외 유럽에서는 홍조류인 *Ceramium*, 호주에서는 갈조류인 *Phyllospora*를 생물검정생물로 지정한 바 있으나, 현재까지 국제적으로 공용되는 생물검정법은 아직 개발된 사례가 없음
 - 국내에서는 해양오염진단을 위해 생물검정방식의 도입 타당성이 조사된 경우가 매우 제한적인데, 그나마 기 수행된 연구에서 사용된 재료는 해양 동물, 특히 성게나 어류 등에 국한되어 있음
 - 반면, 최근 해조류 과래를 이용한 생물검정 방법이 국내에서 개발되어 다양한 중금속, 휘발성 유기물질 및 해양 투척폐기물의 독성을 민감하게 진단하는 신 기법으로 국제 환경관련 학술지에 소개된 바 있음
 - 화학 물질의 유입을 차단하거나 일단 유입되었을 때 해양 생태계에 미치는 영향을 평가하는 일은 생태계의 안정성 유지는 물론이고 인류의 안녕 및 복지 차원에 있어서도 매우 중요한 작업이 아닐 수 없으나, 대개의 경우 오염원의 출처가 다양하고 산발적이기 때문에 오염물질의 해수 유입을 사전에 방재하는 일은 매우 힘들고 큰 경제적 부담이 있으므로, 해양 생태계를 보호하고 유지시키고자 하는 노력이 실효를 거두기 위해서는 해수 내 독성물질의 위험성을 사전에 진단하고 경보하는 기술개발이 급선무임
 - 해양환경오염 모니터링의 핵심은 실질적이고 효율적으로 해양환경의 질을 측정할 수 있는 신뢰할만한 기술을 정립하여, 해수질에 대한 측정 자료의 신뢰성과 정확도를 높이고 생태학적 개념을 도입하여 이를 표준화함으로써 생태계와 인류 건강이라는 최종적인 기치에 부합하는 종합적이고 과학적인 해양 환경 감시체제를 확립하는 것임

2. 연구개발의 사회경제적 차원

- 국내의 환경오염 진단 기술은 연구자, 관련 공무원, 산업체 관계자들의 관심이 고조되고 있는 가운데 진보를 거듭하고 있지만 미국 등 선진국과 비교할 때 여전히 초보적인 상태에 있다고 할 수 있음

- 그나마 발전을 보이고 있는 기술은 외국과의 기술 제휴나 외국 기법의 직접적인 도입에 의존한 것이 많아서 독창적이고 한국적인 기술의 창출이 이루어지지 않고 있음
- 이러한 환경 진단 기술의 열악성 문제는 기술 후진화 단계라는 면으로 단순하게 끝나는 것이 아니라 지속적인 외국 기술의 수입으로 경제적 손실을 가져올 뿐 만 아니라 국내 기술에의 관심과 투자를 약화시켜 기술 후진화를 영구히 정착시키는 폐단을 불러 올 수 있음
- 따라서, 한국산 해산 식물을 사용한 생물 검정 기법을 개발하게 되면 해양 환경의 오염을 진단하여 환경 방제에 기여할 수 있다는 일차적인 목적이외에도 기술의 국산화로 외화를 절약할 수 있고 국내의 관심과 투자를 유발함으로써 한국기술의 비약적 발전 및 유사 국내 기법의 다양화 기반을 이룰 수 있는 계기가 됨으로써 기술의 선진화 이룩은 물론이고 국가의 위상을 강화하는 역할을 해줄 것으로 기대됨
- 본 기술은 BT와 ET가 융합된 국내 원천 기술이라는 측면에서 기술의 국산화로 인한 외화 절약, 국내의 관심과 투자 유발로 인한 기술의 비약적 발전, 유사 국내 기법의 다양화 및 시스템의 로봇환경 작동기술과의 융합을 통하여 특히 환경과 보건의료 분야에 요긴한 산업화 기반기술이 될 것임
- 한편, 해양 수질 및 생태계의 위해성을 평가하는 독성 진단용 키트나 경보기는 국제적으로도 품귀현상에 있어서 이 분야에 대한 원천기술 연구 개발과 생태독성 진단기기 등의 제품화는 연간 6,260억 달러 규모의 국제 환경 기술 시장의 잠재적인 블루오션 선점에 기여할 것임
- 본 기술의 국제 학술지 논문 발표 및 국내외 특허 취득으로 국내 바이오모니터기술의 선진화 및 세계화를 이룩함으로써 기술 수출 제고에 기여할 것임

3. 연구개발의 사회문화적 필요성

- 한국산 생물검정법의 개발은 국내 환경 기술을 업그레이드함으로써 동 분야에 종사하는 연구 인력의 수급을 원활하게 하고 국제 경쟁력을 지닌 기술의 국산화 및 자원화에 대한 자공심을 고취할 것임
- 본 기술은 청정 해역을 유지하는데 기여함으로써 해양과 관련된 사회의 다양한 분야 (음식, 의약품, 관광 등)에 혜택을 부여할 것임
- 국내산 생물을 이용한 기법의 창출로 인하여 국내 생물에 대한 보다 큰 관심과 보호 노력이 나타날 것이고 이 같은 변화는 환경 보존 의식으로 자연스레 승화되어 갈 것임
- 환경진단에 있어 국내 중 사용으로 보다 현실적이고 과학적인 환경 관리가 이루어져 국민 복지 향상에 기여할 것임
- 외국 진단 기법에 사용되는 외래종의 도입으로 야기될 수 있는 국내산 종의 소멸 혹은 생태계의 교란 현상을 방지할 수 있음

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

1. 국내기술동향

- 부산대학교 연구팀이 국내산 녹조류 구멍갈파래의 광합성에 미치는 중금속 수준의 영향에 대한 연구를 수행하여 1992년도에 국내잡지에 결과를 게재함
- 인천대학교 연구팀에서 역시 같은 해조류를 가지고 두 종 (Cu, Pb)의 중금속이 다양한 생리파라미터 (발아, 발아체 성장, 생식) 등에 미치는 영향에 대하여 1999~2000년도에 연구결과를 국내학술지에 게재함
- 두 선행 연구는 독성진단기법 창출을 의도한 연구가 아니었기에 프로토콜, EC₅₀, NOEC 그리고 QA/QC 등에 대한 독성 관련 정보를 제공하지 못함
- 인천대학교 연구팀은 다양한 중금속과 환경유해물질 (오일, 주석, 포르말린 등)의 독성탐지에 있어서 세계적으로 활용되고 있는 어떤 종보다 더욱 민감하고, 산업 폐수 및 생활하수 슬러지 용출액에 대하여 기존의 Microtox의 6배 이상되는 진단효과를 지닌 국내산 조류를 시험 종류로 확정하고 생태독성진단프로토콜을 작성한 바 있음
- 이 기술은 세계 최초로 녹조류 파래를 이용하여 수질오염물질의 독성을 진단할 수 있는 시험분석방법으로서 2009년 9월 14일부터 9월 19일까지 오스트리아 비엔나에서 개최된 ISO/TC147 (수질) 회의에서 국제표준으로 채택됨
- 이외에 해조류를 재료로 독성진단 기법을 연구한 사례가 없고, 다른 생물에서는 부경대학교에서 넙치와 홍합을 이용한 해양오염 진단 기법 연구를 수행한 바 있고, 주식회사 네오엔비즈에서 무척추동물을 재료로 독성기법을 개발하는 도중에 있음

2. 국외기술동향

- 미국의 환경보호국 (EPA)에서 홍조 *Champia*와 갈조 *Macrocystis* 그리고 다시마류 (*Laminaria*)를 공식 생태독성진단용 생물로 인정하고 이를 사용한 독성진단기법의 사용을 법제화한바 있음
- 미국의 Connecticut 대학 연구팀에서 다시마류 (*Laminaria longicuris*)의 노성엽체를 중금속 모니터링에 이용하고자 하는 연구를 수행함
- 유럽에서는 영국의 Liverpool 대학과 Portsmouth 대학 연구팀을 중심으로 다시마류 (*Laminaria digitata*)와 *Fucus*류 그리고 파래류 (*Ulva lactuca*)를 이용하여 단일독성물질 또는 현장시료의 독성을 평가하는 연구가 수행된 바 있음
- 독일의 Biologische Anstalt Helgoland 연구팀과 포르투갈의 CIIMAR 연구팀에서 다시마류 (*Laminaria saccharina*)와 *Lessonia*에 미치는 중금속의 영향을 진단함
- 스웨덴의 Uppsala 대학 연구팀에서 홍조 *Gracilaria tenuistipitata*를 재료로 다양한

endpoint의 민감성을 비교한 바 있음

- 호주-뉴질랜드 환경보호관리위원회 (ANZECC)에서는 갈조 *Hormosira*를 비롯한 수개의 해조류 독성진단 기법을 법제화하여 수질 평가 시 적용하고 있음
- 호주의 Sydney대학과 PIRVic 연구소 팀을 중심으로 어린 시기 갈조류의 독성 민감성 연구가 최근 활발히 진행되고 있음
- 일본의 Hokkaido 대학 연구팀은 다시마 (*Laminaria religiosa*)의 생장에 미치는 금속의 영향에 대한 연구를 수행한 바 있음
- 중국의 Academy of Science에서는 다시마 (*Laminaria japonica*)의 사상체에 미치는 중금속의 영향을 연구한 바 있음
- 그 밖에 다양한 국가에서 수행된 해조류 중금속 독성 평가 연구사례를 표 1에 정리함

표 1. 해조류 중금속 독성 평가 연구사례

연구 생물종	중금속 분석	연구자	연구자 소속	발표저널
<i>Fucus, Ulva, Palmaria, Polysiphonia</i>	chromium	Murphy et al.	Waterford Institute of Technology (아일랜드)	Chemosphere 70 (2008)
<i>Ascophyllum nodosum</i>	chromium, cobalt, cadmium and lead	Morrison et al.	National University of Ireland (아일랜드)	Environmental Pollution 152 (2008)
<i>Fucus Vesiculosus, Zostera marina</i>	Calcium, magnesium, sodium, potassium	Szefer	University of Gdansk (폴란드)	Oceanologia, 44 (2) (2002)
<i>F. vesiculosus</i>	Copper and cadmium	Morris et al.	University of Wales (영국)	Biochem. J. (1999)
<i>Codium, Gracillaria, Hypnea, Sargassum, Pandina</i>	Iron, cobalt, nickel, zinc, chromium, arsenic, silver, and other metals	Rodriguez et al.	Instituto de Investigaciones Oceanologicas (멕시코)	Environmental Pollution 114 (2001)
<i>Sargassum</i>	lead, copper, zinc, and manganese	Vijayaraghavan et al.	National University of Singapore (싱가포르)	Journal of Hazardous Materials (2007)
<i>Enteromorpha prolifera</i>	Copper	Ozer et al.	University of Mersin (터키)	Chemical Engineering Journal 146 (2009)
<i>Ceramium rubrum, Bryopsis plumosa</i>	Cadmium, iron, copper, lead, chromium, manganese	Strezov et al.	Bulgarian Academy of Sciences (불가리아)	Journal of Environmental Radioactivity 100 (2009)

- 현재까지 국외에서 개발된 해양 생태독성진단기법의 경우 일차생산자를 사용한 퇴적물 독성 평가나 대형의 해조류를 이용한 생태독성진단 키트가 개발된 사례가 없음 (표 2, 3)

표 2. 표층수 생태독성진단기법 (<http://www.microbiotests.be/>)

Trophic level	Group of organisms	Toxkit	Type of test	Test criterion	Test duration	Test species
Producers	Micro-algae	Marine Algaltokit	Short-chronic	Growth inhibition	72h	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
Consumers	Rotifers	Rotokit M	Acute	Mortality	24 ~ 48h	<i>Brachionus plicatilis</i>
	Crustaceans	Artokit M	Acute	Mortality	24h	<i>Artemia salina</i>
Decomposers	Bacteria	Microtox*, N-tox®	Acute	Inhibition of luminescence	15 ~ 30 min	<i>Vibrio fischeri</i>

표 3. 퇴적물 및 퇴적물 용출액 생태독성진단기법 (<http://www.microbiotests.be/>)

Trophic level	Group of organisms	Toxkit	Type of test	Test criterion	Test duration	Test species
Producers		No specific Toxkit available	?	?	?	?
Consumers		No specific Toxkit available	?	?	?	?
Decomposers	Bacteria	Microtox solid phase*	Acute	Inhibition of luminescence	30 min	<i>Vibrio fischeri</i>

3. 향후 전망

- 현재 국제적으로 독성연구에 사용된 해조류 수는 녹조류 11종, 갈조류 28종, 그리고 홍조류 26종해서 총 65종이 사용되었고, 이때 검사된 독성물질은 약 120여 종임
- 최근 국제 학술지에 보면 해조류를 이용한 독성진단기법에 관련된 연구보고가 전에 비해 매우 활발하게 눈에 띄고 있으며 이러한 추세는 점차 증가될 것으로 추정됨
- 이러한 새로운 기법의 등장은 또한 이 기법을 활용한 해양생태독성진단기법의 시스템화의 도래를 알리는 신호이기도 하기에 현재까지 세계적으로 전무한 해양오염 경보시스템의 개발 선취권 경쟁이 치열해질 것으로 예상함

4. 기술동향 분석 결론

- 현재까지 국제적으로 공용될 수 있는 해조류 생태독성진단 기법이 창출되지 못한 이유는

해조류의 지속적 보관 및 대량배양시스템의 확충이 이루어지지 않은 연고로 판단됨

- 따라서, 본 연구에서 지향하는 다시마 사상체의 무한배양 시스템의 확립기술은 작금의 국제 환경 기술 수준에서 넘지 못하고 있는 기술적인 장벽을 넘는 계기를 마련할 것임
- 개발될 기술은 생물의 대량공급 외에 균일한 클론 제공, 간편한 microtechnique 그리고 로봇형 시스템을 이용한 선진국형 기술이라는 점에서 차후에 시스템 공정화 연구를 수행하면 국제 환경 시장의 블루오션을 선점유하는 기술이 될 것으로 확신함

- [국내 연구개발 투자 현황 및 전망]

국내 환경보건 기술 특히, 위해성 평가 및 안전 관리 기술 분야에 대한 국내 연구개발투자는 2001년도 정부지원금 932억 원, 민간 투자는 810억 원, 합계 1,742억 원이며, 2010년까지 매년 1,000억 원의 총 1조원의 투자가 이루어질 전망이다 (자료출처: 환경부, 환경백서, 2001)

- [향후 5년 내 기술경쟁력 확보가능성]

생태독성진단 기술은 현재 선진국 대비 환경유해물질의 독성평가 연구 분야 20%, 신속, 정확한 새로운 독성평가 기술개발연구 분야 10%, 유해물질 노출 평가 연구측면에서 15% 정도, 유해물질 위해성 평가 연구측면에서 20%, 위해성 평가의 한국적 모델 개발 연구에서 10%의 기술수준 차이가 있으나, 앞으로 사전오염예방 기술 및 환경보건 위해성 영향평가 기술 개발이 활발하게 진행되면 5년 후에는 기술수준이 선진국 대비 80% 정도로 격차를 줄일 수 있고, 환경보건 정책 및 관리 시스템 보완이 따른다면 적어도 해양생태독성진단기술측면에서는 선진국과 대등한 수준에 이를 수 있음 (자료 : 한국환경정책평가연구원, 차세대핵심환경기술개발사업 10개년 종합계획 수립, 2002)

- [현재의 기술 수요]

생태독성진단기술은 환경서비스분야, 환경자원분야, 환경건설팅분야와 관련이 있으며, 2003년 세계 환경산업의 시장 규모는 약 6,260억 달러이며, 국내 환경 산업의 시장 규모는 13조 1800억원으로 세계 환경산업 시장 규모의 1.8%의 비중을 차지하는 것으로 나타남

<관련 공공기관 및 산업체 list>

산업자원부 : 청정생산기술사업, 1995~2001년까지 총 1,936억원 투자

환경부 : 차세대핵심기술개발사업 , 2001~2010년까지 총 1조원 투자

과학기술부 : 21세기 프론티어 연구개발사업, 2000~2009년까지 총 1,342억원 투자

- [향후 기술 수요 전망]

해양생태계의 독성진단 기술은 수질, 대기, 토양의 통합진단으로 응용 또는 확대 전개 될 것이고, 이에 따라 위해성 평가 및 감시기술의 개발, 환경유해물질의 사전 예방적 관리를 위한 종합적인 환경질의 평가 및 저감기술 개발, 인간과 자연환경이 조화되는 환경관리기법 등 관련 기술의 다양화와 동반적 비약 발전이 이루어 질 것으로 기대됨

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 연구개발 수행 내용

1. 표준시험생물

가. 시험 종의 특성

(1) 시험종

Laminariales (다시마 목), Laminariaceae (다시마 과), *Saccharina* (다시마 속), *Saccharina japonica* (참다시마 종)와 Laminariales (다시마 목), Alariaceae (미역과), *Undaria* (미역 속), *Undaria pinnatifida* (미역 종)을 사용하였다 (그림 1).

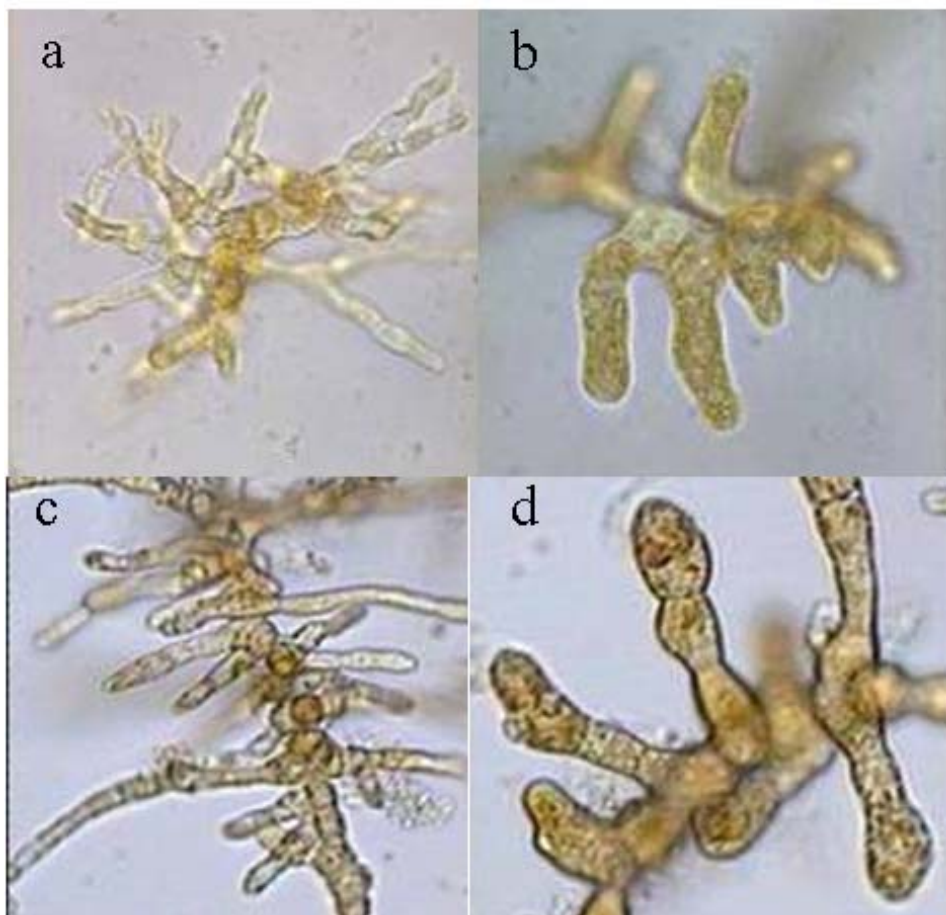


그림 1. 참다시마 (*S. japonica* (Areschoung) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders) 사상체 (a. 수배우체, b. 암배우체)와 미역(*U. pinnatifida* (Harvey) Suringer) 사상체 (c. 수배우체, d. 암배우체)

(2) 시험 종의 생리·생태 특성

- 다시마과에 속하는 다시마속 (*Saccharina*)과 미역속 (*Undaria*)은 대형의 조체로 발달하는 포자체가 저 수온기에 성장과 성숙을 하지만, 하절기의 고 수온기에는 소실되며, 미소한 배우체 세대로 여름을 넘기고, 수온의 저하와 함께 성숙하여 다음의 포자체 세대를 만든다 (그림 2).

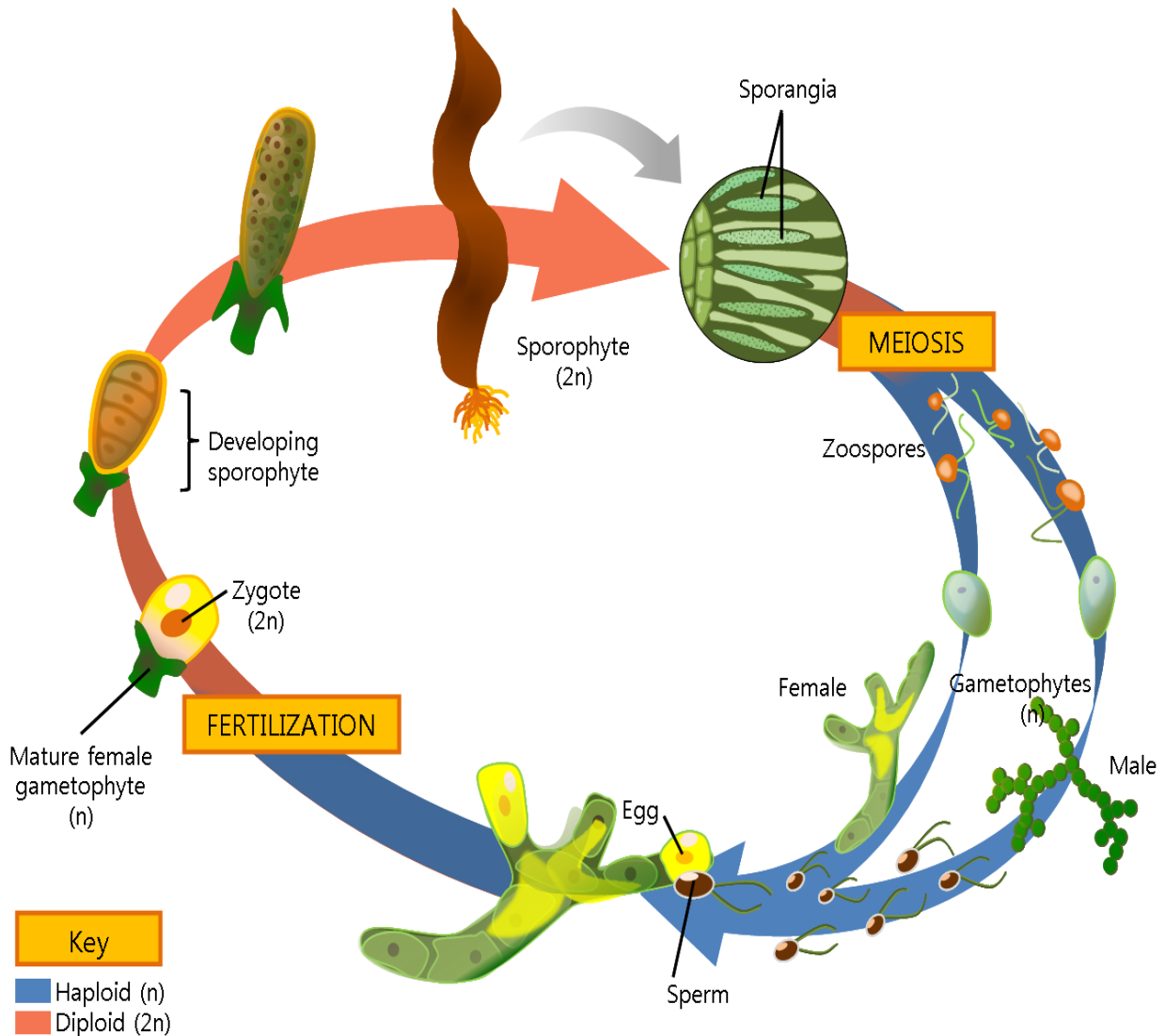


그림 2. 다시마류의 생활사

(3) 생식세포 방출 유도

- 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생 생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척하였다.
- 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관하였다.
- 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣고 운동성 포자의 방출을 유도하였다 (그림 3).

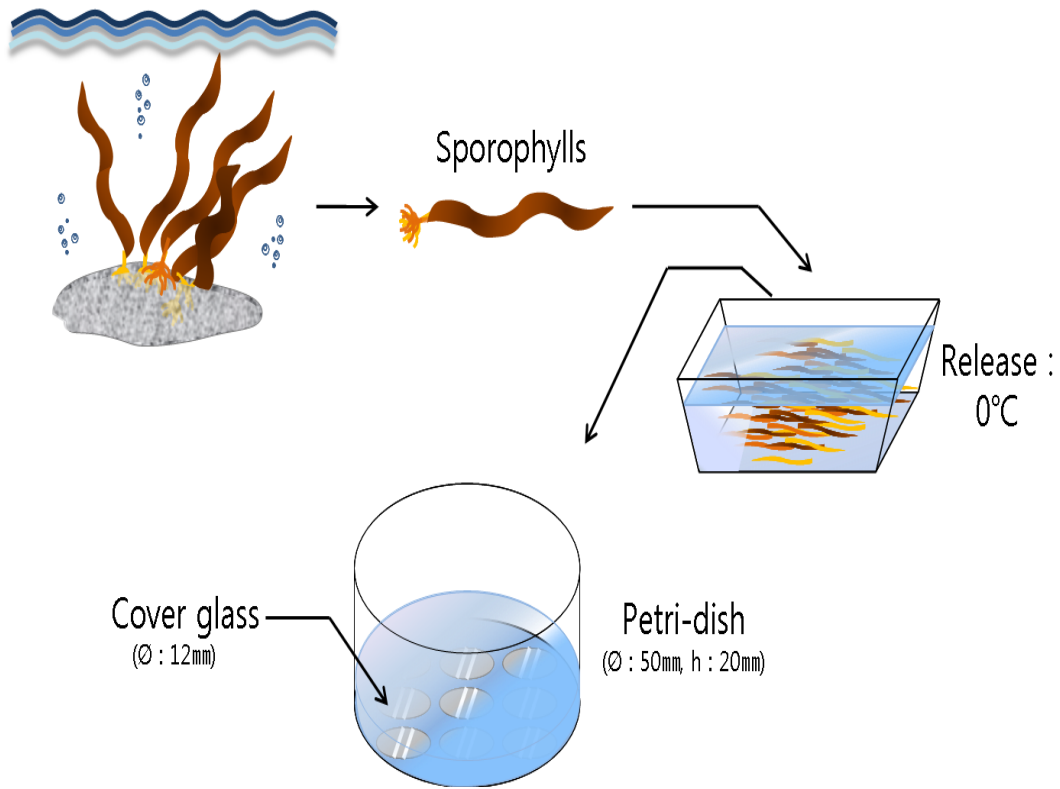


그림 3. 생식세포 유도 모식도

(4) 사상체 배양

- 페트리디쉬 바닥에 커버 글라스 (19 × 19 mm, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda – Königshofen, Germany)를 놓아 부착기질로 하고, 20 mL의 포자용액을 넣었다.
- 항온 배양기 (10 ± 0.5°C)에서 12:12 LD 광주기 하에서 정지 배양하였다.
- 사상체형으로 발달한 암수 배우체를 분리하여 동일한 조건에서 유동 배양하였다 (그림 4).

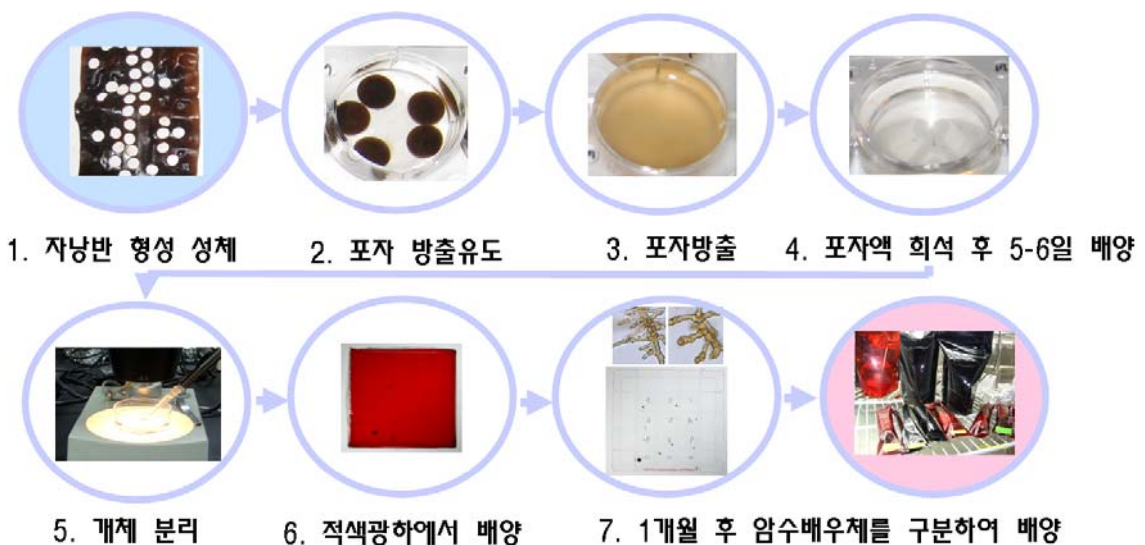


그림 4. 암수배우체 분리배양 모식도

(5) 최적 배양조건 구축

- 광조사량 효과 연구를 위해서는 백색 형광등 (TLD 18W/865, Philips Co., Thailand)을 이용하며 5가지 광조사량 0, 10, 30, 60, 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 배양하였다.
- 광질 효과 연구는 청색광 (470 nm), 녹색광 (545 nm), 적색광 (660 nm) 및 근적외광 (730 nm)이 출력되는 발광 다이오드 등 (LED lamp, Good-feeling Co., Gyeonggi-Do, Korea)을 사용하여 실시하였다.
- 온도 효과 연구는 온도조절이 되는 배양기 (5, 10, 15, 20°C)에서 실시하였다.
- 염도 효과 연구는 인공해수에 염을 첨가하여 염도를 15, 25, 35, 45, 55 psu로 조절한 후 배양을 실시하였다.
- pH 효과 연구는 배양액 pH를 4.5~9.5 범위로 조절하여 배양을 실시하였다.

2. 생태독성시험

가. 생태독성시험

- 일반적으로 생태독성시험은 생산자, 소비자 및 분해자를 대상으로 기존의 확립된 기초생리 생태 학적 배양 기법을 활용하여 실시하고 독성시험 결과는 EC_{50} 또는 LC_{50} 값으로 표현하는데 값이 작을수록 독성도가 커지므로 이런 문제를 보완하고자 다음과 같은 식에 의하여 독성단위 (Toxic Unit, TU)로 전환하였다.

$$TU = 100/LC_{50} \text{ 값 또는 } 100/EC_{50} \text{ 값}$$

$$0 \text{ TUa if mortality is } 0 \sim 10\%$$

$$TUa = 0.02 \times \% \text{ mortality if mortality is } 10 \sim 49\%$$

$$\text{Example; Mortality in 100\% effluent} = 25\%$$

$$TUa = 0.02 \times 25 = 0.5 \text{ TUa}$$

- TU값은 클수록 독성도가 커지기 때문에 여러 가지 결과를 해석하는데 매우 용이하므로 생태독성시험에 관련된 결과는 모두 TU 값으로 전환하여 결과를 정리하였다.
- 대상 재료 및 독성평가 종말점 (endpoint)
 - 1) 2종 해조류, 총 10가지 종말점
 - 참다시마의 발아 (I, II)와 발아관 길이 성장, 배우체 성장, 포자체 발생율, 포자체 형광
 - 미역의 발아와 발아관 길이 성장, 배우체 성장, 배우체 형광

□ 형광 측정법

로봇형 진단은 iPAM과 mPAM을 사용하여 측정하는데 이 때 사용되는 엽록소 형광 측정 장치는 광합성의 활성이 변화하는 것을 탐지하기 위해서 고안되었으며, 환경 스트레스 하에

서 식물의 광합성 기구 활성을 신속하고 비파괴적인 방법으로 탐지 할 수 있는 기구로 알려져 있고 아래와 같은 원리로 독성을 진단한다 (그림 5). 그림 6은 iPAM을 이용한 독성 진단 예시이다.

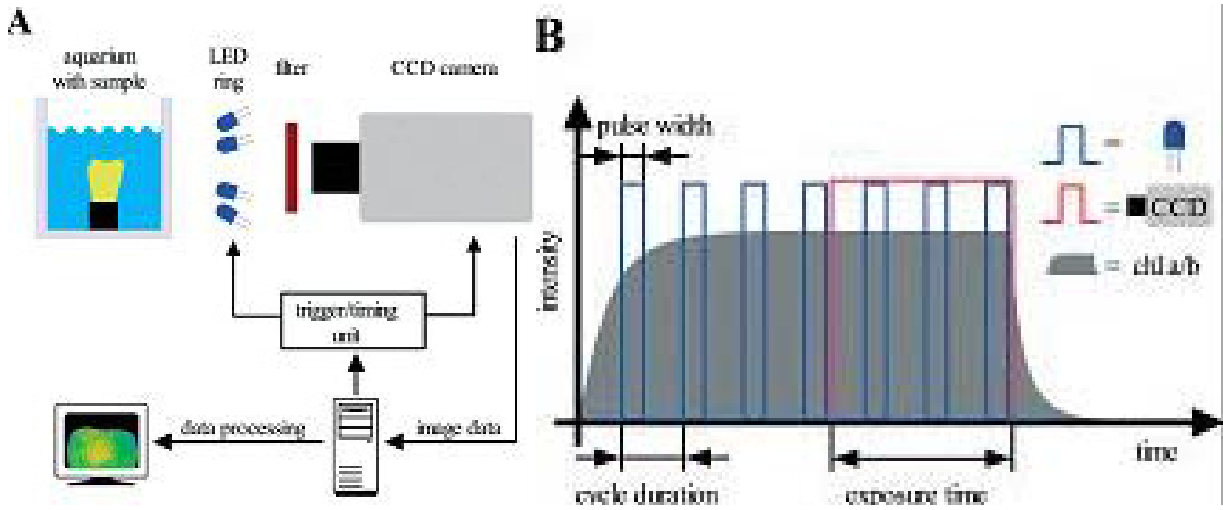


그림 5. PAM의 독성 진단 원리

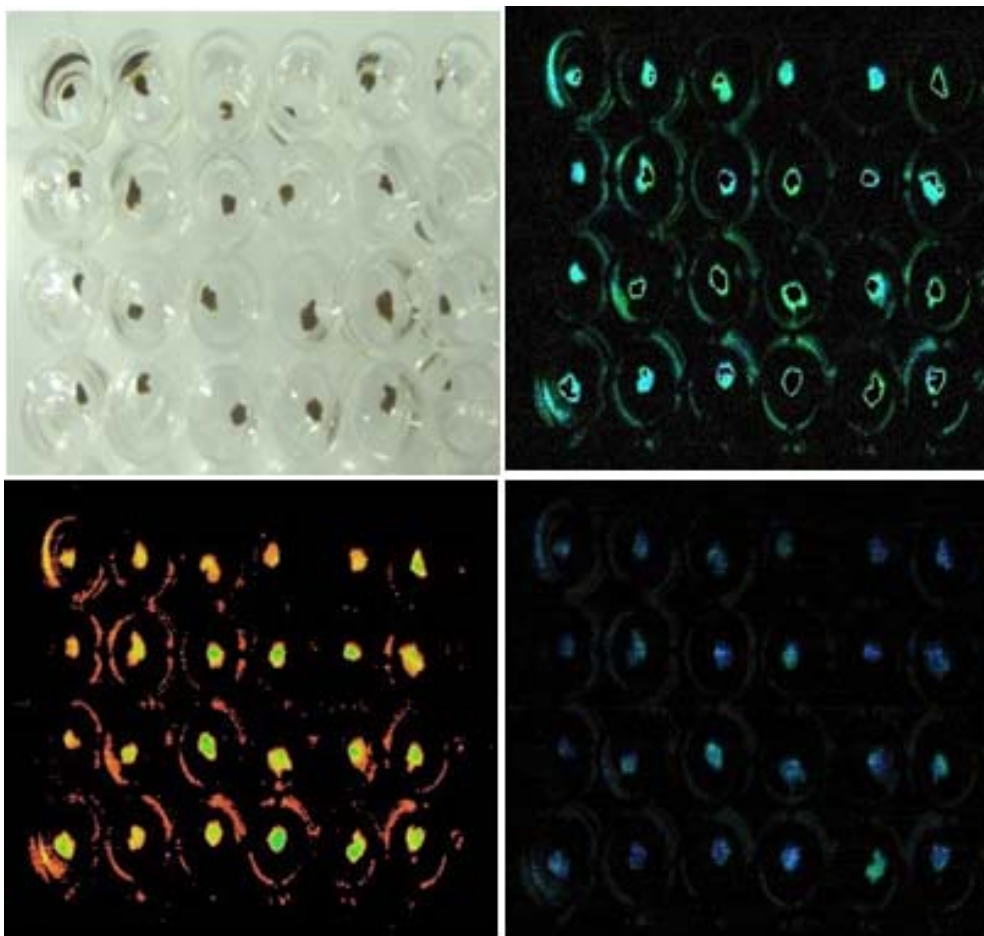


그림 6. iPAM을 이용한 독성진단 예시

나. 이화학적 수질분석방법 (수질오염공정시험방법에 의거)

- 총질소, 총인 : BRAN+LUEBBE 사의 AACS-III로 측정
- 화학적산소요구량 (COD) : 산성 100℃에서 과망간산칼륨에 의한 방법
- 중금속류 : 질산에 의한 분해 처리 후 원자흡광광도계 AA280FS (VARIAN 사) 장비를 이용하여 분석 (그림 7)
- 수온, 전기전도도, pH, 용존산소 : YSI-556 측정기를 이용한 현장 측정
- 불소, 색도 : 흡광광도계 (UV-2550, SHIMADZU 사)를 이용한 흡광광도법
- 시안, 페놀, ABS : BRAN+LUEBBE 사 AutoAnalyzer 3 장비를 이용한 자동분석



그림 7. 수체 및 생체내 독성물질 분석 기기 (MA-2, AA280FS)

다. 생태독성평가에 사용한 단일독성원

(1) 금속류 (metals)

금속류는 총 8종을 단일독성평가에 사용하였다. 카드뮴 (Cd; Cadmium), 코발트 (Co; Cobalt), 6가 크롬 (Cr; Chromium), 구리 (Cu; Copper), 수은 (Hg; Mercury), 니켈 (Ni; Nickel), 납 (Pb; Lead), 아연 (Zn; Zinc)등 총 8종의 표준 용액을 희석 사용하였다 (표 4).

(2) 휘발성 유기화합물 (VOCs; Volatile Organic Compounds)

휘발성 유기화합물은 아세톤 (Acetone), 클로로포름 (Chloroform), 디메틸황산화물 (DMSO; Dimethyl sulfoxide), 에틸알코올 (Ethyl alcohol), 포르말린 (formaldehyde), 메틸알코올 (methanol), 페놀 (Phenol) 등 총 7종을 단일독성평가에 사용 하였다 (표 5).

(3) 환경유해물질

환경유해물질은 나트륨 Dodecyl 황산염 (SDS; Sodium dodecyl sulfate)과 트리부틸주석 (TBT; Tributyl(phenylethynyl)tin)을 단일독성평가에 사용하였다 (표 6).

(4) 제초제

제초제는 아트라진 (Atrazine), 클로리뮴론에틸 (Chlorimuronethyl), 디우론 (Diuron; 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), 헥사지논 (Hexazinone), 파라쿼트 (Paraquat) 등 5종의 제초제를 단일독성평가에 사용하였다 (표 7).

표 4. 금속 종류 및 제품 정보

Metals	CAS No.	Manufacturer
Cd	7440-43-9	Junsei Chem., Japan
Co	7440-48-4	Junsei Chem., Japan
Cr	7789-00-6	Sigma, USA
Cu	7440-50-8	Junsei Chem., Japan
Hg	7439-97-6	Junsei Chem., Japan
Ni	7440-02-0	Junsei Chem., Japan
Pb	7439-92-1	Junsei Chem., Japan
Zn	7440-66-6	Junsei Chem., Japan

표 5. 휘발성 유기화합물 (VOCs) 종류 및 제품 정보

VOCs	CAS No.	Manufacturer
Acetone	67-64-1	Showa, Japan
Chloroform	67-66-3	Sigma, USA
Dimethyl sulfoxide	67-68-5	Sigma, USA
Ethyl alcohol	64-17-5	Merck, Germany
Formalin	50-00-0	DC Chem., Korea
Methyl alcohol	67-56-1	Merck, Germany
Phenol	108-95-2	Sigma, USA

표 6. 환경유해물질 종류 및 제품 정보

Toxicants	CAS No.	Manufacturer
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	151-21-3	Sigma, USA
Tributyl(phenylethynyl)tin (TBT)	3757-88-8	Sigma, USA

표 7. 제초제 종류 및 제품 정보

Toxicants	CAS No.	Manufacturer
Atrazine	1912-24-9	Merck, Germany
Chlorimuronethyl	90982-32-4	Supelco, USA
Diuron	330-54-1	Sigma, USA
Hexazinone	51235-04-2	Sigma, USA
Paraquat	4685-14-7	Merck, Germany

라. 현장시료의 생태독성평가 및 이화학적 분석

생태독성평가에는 연안해수 16지점, 산업폐수 13점에 대한 생태독성을 비교하여 평가하였다.

(1) 해수시료

가) 해수 퇴적물 채취

연안해수는 인천광역시 관할 지역내에서 수질 등급 (COD 기준) 2등급 6지점, 3등급 8지점, 등급외 2지점, 총 16지점을 선정하여 채수하였다 (그림 8, 표 8). 채수한 시료는 실험실로 운반하여 0.45 μm 의 막여과지를 이용하여 여과한 후 4°C 저온실에 보관 사용하였다. 퇴적시료는 각 지점에서 채취한 퇴적물을 해수와 4:1 비율로 (vol:vol) 넣어 200 rpm으로 30분간 shaking하고 이를 다시 막여과지로 여과한 후, 용출수를 독성실험에 사용하였다.

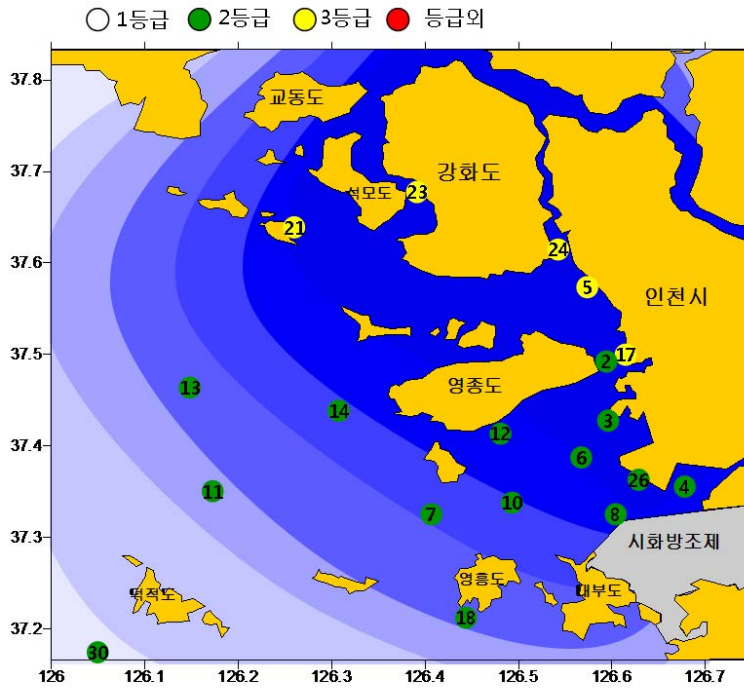


그림 8. 연안해수의 채수지점망

표 8. 연안해수 채수지점 및 수질등급

시료번호	채수지점	수질 등급 (COD 기준)
S1	인천항 도크내	2등급
S2	만석동 영종도 중간	2등급
S3	인천남항 전면	2등급
S4	오이도 북방	2등급
S5	세어도 우측	3등급
S6	영종도 동남방	2등급
S7	무의도 남방	2등급
S8	큰가리섬 서북방향	2등급
S9	대부도 북단	2등급
S10	영흥도 북단	2등급
S11	덕적도 북방(1)	2등급
S12	인천공항 하단	2등급
S13	덕적도 북방(2)	2등급
S14	용유도 서방	2등급
S17	만석부두 부근	3등급
S18	영흥도 남방	2등급
S21	서도 주문도 아래	3등급
S23	외포리 앞바다	3등급
S24	초지리 앞바다	3등급
S26	LNG기지 북방	2등급
S30	선갑도 북방	2등급

나) 연안 퇴적물 시료의 이화학적 분석

표 9는 해양수산부장관이 환경정책기본법 제10조의 규정에 의한 환경기준을 유지하기 위하여 해양오염방지법 제4조의 2 (해역별 수질기준의 설정)에 따라서 설정·고시한 우리나라의 해역별수질기준이다. 연안 퇴적물 시료의 이화학적 분석은 인천 보건환경연구원에 의뢰 분석하였으며 이 때, 해수 분석방법은 "해양환경공정시험방법 (국토해양부)"을 따라 수행하였다.

표 9. 해역별 수질기준

항목등급 ¹⁾		I	II	III
수소이온농도		7.8~8.3	6.5~8.5	6.5~8.5
화학적산소요구량 (mg/L)		1이하	2이하	4이하
용존산소 (%)		포화율 95이상	포화율 85이상	포화율 80이상
부유물질 (mg/L)		10이하	25이하	-
유분 (mg/L)		검출되어서는 안됨	검출되어서는 안됨	-
대장균군 (MPN mg/L)		200이하	1,000이하	-
총질소 (mg/L)		0.05이하	0.1이하	0.2이하
총인 (mg/L)		0.007이하	0.015이하	0.03이하
무기물질 등 (mg/L)	6가 크롬	0.05이하		
	비 소	0.05이하		
	카드뮴	0.01이하		
	아 연	0.1이하		
	납	0.1이하		
	구 리	0.02이하		
	시안, 유기 인, 총 수은, 포리크로리네이트드비페닐은 검출되어서는 안됨			

- 1) 1. 등급 I 은 수산생물의 서식, 양식 및 산란에 적합한 수질을 말한다.
2. 등급 II 는 해수욕 등 해양에서의 관광 및 여가선용과 등급 I 이외의 수산생물에 적합한 수질 등을 말한다.
3. 등급 III 은 공업용 냉각수, 선박의 정박 등에 이용되는 수질을 말한다.
4. 용존산소 포화율에 불구하고 농도로서 등급 I 은 6mg/L, 등급 II 와 III 은 5mg/L 이상이어야 한다.
5. 유분은 N-Hexane 추출물을 말한다.
6. 총질소는 NO₂-N, NO₃-N의 합계를 말한다.
7. 총인은 PO₄-P의 형태를 말한다.
8. 시험방법은 환경오염공정시험법에 의한다.

(2) 산업폐수 시료

가) 산업폐수 시료의 채수

인천광역시 소재지 산업폐수 처리 업체 9곳을 선정하여 3월과 6월 2차례에 걸쳐 산업폐수를 채수하였으며, 시료는 0.45 μm 의 막여과지를 이용하여 여과 후 사용하였다 (표 10). 시료는 grab sampling으로 채수하였으며, 실험실로 운반한 후 시험기간 동안 4 $^{\circ}\text{C}$ 저온실에 보관 사용하였다.

표 10. 산업폐수 업종

시료번호		종2)	업종
3월	W1	4	폐수처리업
	W2	4	폐수처리업
	W3	1	석유정제업
	W4	4	영상음향 및 통신장비
	W5	4	염색업
	W6	4	비철금속재생재료
	W7	3	PCB제조업
	W8	3	PCB제조업
	W9	5	인쇄회로기판
6월	W10	4	금속제조업
	W11	4	병원시설
	W12	4	인쇄회로기판제조
	W13	3	인쇄회로기판제조
	W14	2	기타화학물질제조업
	W15	4	인쇄회로기판제조
	W16	4	육지동물가공처리업
	W17	1	기초무기화합물제조업
	W18	4	폐수처리업
	W19	4	도금업

2) 사업장의 규모별 구분 (제44조 2항 관련)

- 제 1 종 : 1일 폐수배출량이 2,000 m^3 이상인 사업장
- 제 2 종 : 1일 폐수배출량이 700 m^3 이상, 2,000 m^3 미만인 사업장
- 제 3 종 : 1일 폐수배출량이 200 m^3 이상, 700 m^3 미만인 사업장
- 제 4 종 : 1일 폐수배출량이 50 m^3 이상, 200 m^3 미만인 사업장

나) 산업폐수 시료의 이화학적 분석

수질오염물질의 배출허용기준을 표 11에 정리하였다. 2011년 1월 1일부터는 현재 적용되는 기준 항목에 생태독성 (TU)값이 추가되어 사용된다. 산업폐수의 이화학적 분석은 인천 보건환경연구원에 의뢰 분석하였으며 이 때, 산업폐수 분석방법은 "수질오염공정시험방법 (환경부)"에 의거하여 수행하였다.

표 11. 수질오염물질의 배출허용기준 (2011년 1월 1일부터 적용)

항목	지역구분			
	청정 지역	가 지역	나 지역	특례 지역
수은이온농도	5.8~8.6	5.8~8.6	5.8~8.6	5.8~8.6
노말핵산 추출물질 함유량	광유류 (mg/L)	1 이하	5 이하	5 이하
	동식물유지류 (mg/L)	5 이하	30 이하	30 이하
페놀류함유량 (mg/L)	1 이하	3 이하	3 이하	5 이하
시안함유량 (mg/L)	0.2 이하	1 이하	1 이하	1 이하
크롬함유량 (mg/L)	0.5 이하	2 이하	2 이하	2 이하
용해성철함유량 (mg/L)	2 이하	10 이하	10 이하	10 이하
아연함유량 (mg/L)	1 이하	5 이하	5 이하	5 이하
구리 (동)함유량 (mg/L)	1 이하	3 이하	3 이하	3 이하
카드뮴함유량 (mg/L)	0.02 이하	0.1 이하	0.1 이하	0.1 이하
수은함유량 (mg/L)	0.001 이하	0.005 이하	0.005 이하	0.005 이하
유기인함유량 (mg/L)	0.2 이하	1 이하	1 이하	1 이하
비소함유량 (mg/L)	0.05 이하	0.25 이하	0.25 이하	0.25 이하
납함유량 (mg/L)	0.1 이하	0.5 이하	0.5 이하	0.5 이하
6가크롬함유량 (mg/L)	0.1 이하	0.5 이하	0.5 이하	0.5 이하
용해성망간함유량 (mg/L)	2 이하	10 이하	10 이하	10 이하
플로오르 (불소)함유량 (mg/L)	3 이하	15 이하	15 이하	15 이하
PCB함유량 (mg/L)	불검출	0.003 이하	0.003 이하	0.003 이하
총대장균군 (mℓ)	100 이하	3,000 이하	3,000 이하	3,000 이하
색도 (도)	200 이하	300 이하	400 이하	400 이하
온도 (℃)	40 이하	40 이하	40 이하	40 이하
총질소 (mg/L)	30 이하	60 이하	60 이하	60 이하
총인 (mg/L)	4 이하	8 이하	8 이하	8 이하
트리클로로에틸렌 (mg/L)	0.06 이하	0.3 이하	0.3 이하	0.3 이하
테트라클로로에틸렌 (mg/L)	0.02 이하	0.1 이하	0.1 이하	0.1 이하
음이온계면활성제 (mg/L)	3 이하	5 이하	5 이하	5 이하
벤젠 (mg/L)	0.01 이하	0.1 이하	0.1 이하	0.1 이하
디클로로메탄 (mg/L)	0.02 이하	0.2 이하	0.2 이하	0.2 이하
생태독성 (TU)	1 이하	2 이하	2 이하	2 이하
셀레늄함유량 (mg/L)	0.1 이하	1 이하	1 이하	1 이하
사염화탄소 (mg/L)	0.004 이하	0.04 이하	0.04 이하	0.04 이하
1,1-디클로로에틸렌 (mg/L)	0.03 이하	0.3 이하	0.3 이하	0.3 이하
1,2-디클로로에탄 (mg/L)	0.03 이하	0.3 이하	0.3 이하	0.3 이하
클로로폼 (mg/L)	0.08 이하	0.8 이하	0.8 이하	0.8 이하

제 5 종 : 위 제1종부터 제4종까지의 사업장에 해당하지 아니하는 배출시설

제 2절 연구개발 결과

1. 다시마 사상체의 무한 배양 및 공급을 위한 기초생리학적 연구

가. 휴면 포자의 활성화 회복을 위한 광질과 영양염 조건 연구

2008년 5월 미역의 자낭반에서 생식세포 유도 후 부착기질에 부착시켜 10℃, 암상태로 55일간 보관되었던 휴면포자를 대상으로 다양한 광질하에서 발달 초기 단계의 미역의 성장 능력을 조사하였다. 배양 12일 후 적색광과 근적외광 보다 청색광과 녹색광에서 빠른 성장률을 보였으며, 배양 20일 경과시 청색광과 녹색광에서는 여전히 높은 성장을 보였으나, 적색광과 근적외광에서는 배양 20일 후에 개체가 부착기질에서 유실되는 결과를 나타냈다 (그림 9).

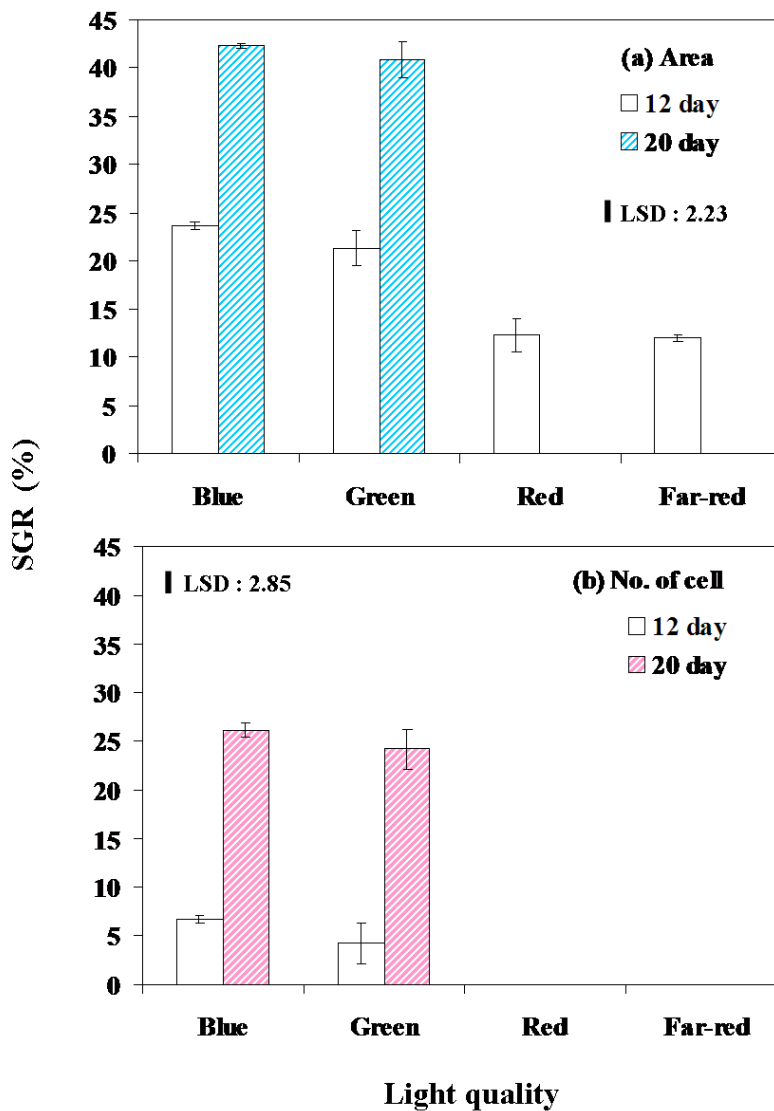


그림 9. 저온에서 장기간 보관된 미역 휴면 포자의 활성화에 미치는 광질의 영향 평가 (10℃, 55일 배양). (a) 암배우체 면적, (b) 암배우체 세포수

동일한 휴면포자를 대상으로 생리활성 과약을 위한 두 가지 영양염 (질산염과 인산염)의 효과를 조사하였다 (그림 10). 질산염의 경우 모든 농도 조건에서 유사한 성장양상을 보였으며, 10 mM의 농도를 제외한 모든 농도에서 포자체가 발생하였고, 또한 높은 성장양상을 나타냈다. 인산염의 경우 가장 낮은 농도인 0.01 mM에서 배우체 생장이 다른 조건구와 비교해 높은 수준을 유지한 반면 포자체는 발생되지 않았다. 실험된 5가지 농도구 중 0.05와 0.1 mM 두 가지 농도에서만 포자체가 발생하였다.

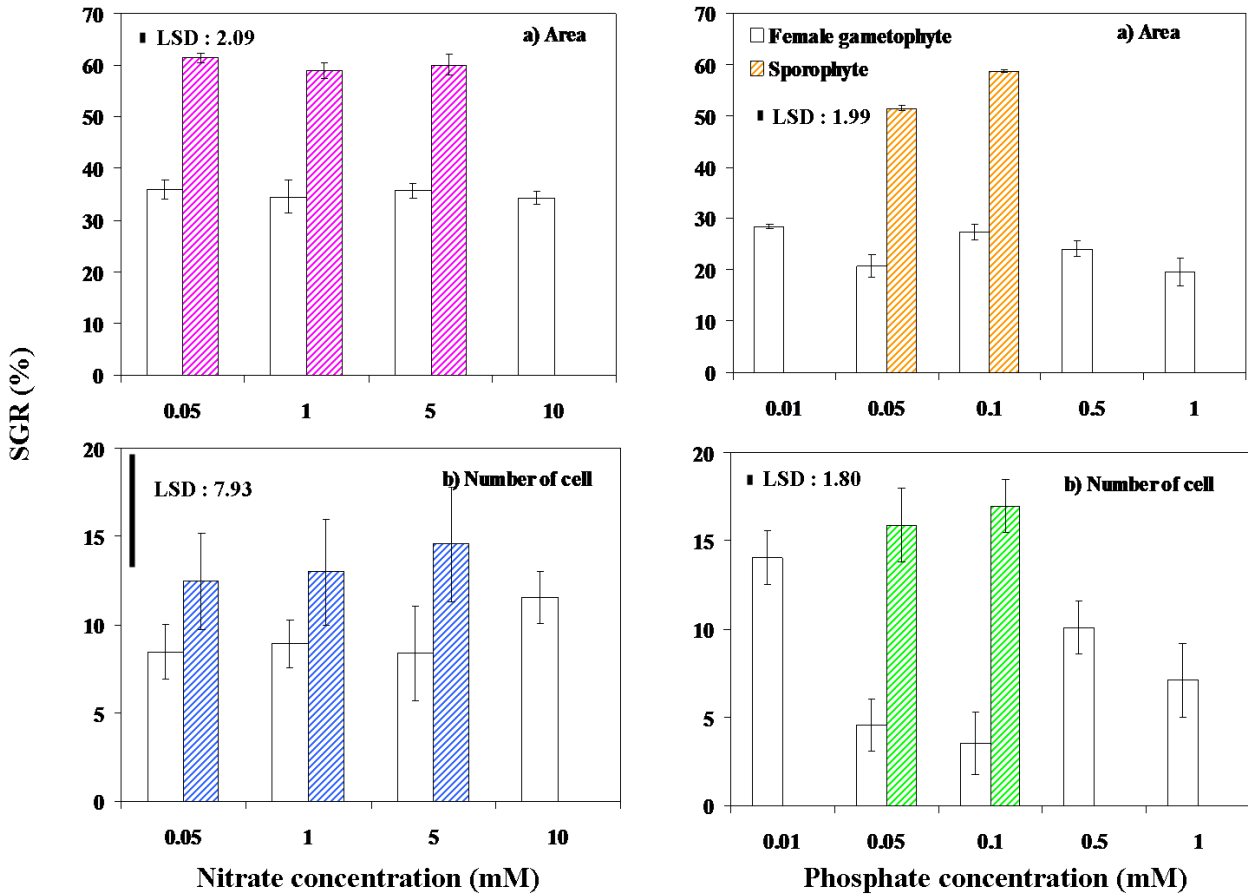


그림 10. 저온에서 장기간 보관된 미역 휴면 포자의 활성화에 미치는 질산염과 인산염의 영향 평가 (10°C, 55일 배양). (a) 암배우체와 포자체의 면적, (b) 암배우체와 포자체의 세포수

이상의 결과로 미역의 경우, 휴면포자의 상태로 55일 동안 암상태 보관이 가능하며, 이후 빠른 성장과 생리 활성 회복을 위해서 단색광의 경우 청색과 녹색광하에의 배양이 유리하며, 질산염과 인산염 농도는 각각 0.05~5 mM와 0.05~0.1 mM이 필요한 것을 확인하였다.

휴면포자 상태로 보관 실시할 때 얼마나 오랫동안 생리활성 회복 능력이 나타나는지 조사한 결과, 4°C, 암상태에서 8개월 이상 보관된 다시마류 (*Saccharina lassistima*) 휴면포자의 경우 5~10°C의 온도에서 6일 배양시 생리활성이 100% 회복됨에 따라 8개월 이상된 휴면포자도 활발한 생리 활성을 보인다는 것을 확인하였다 (그림 11).

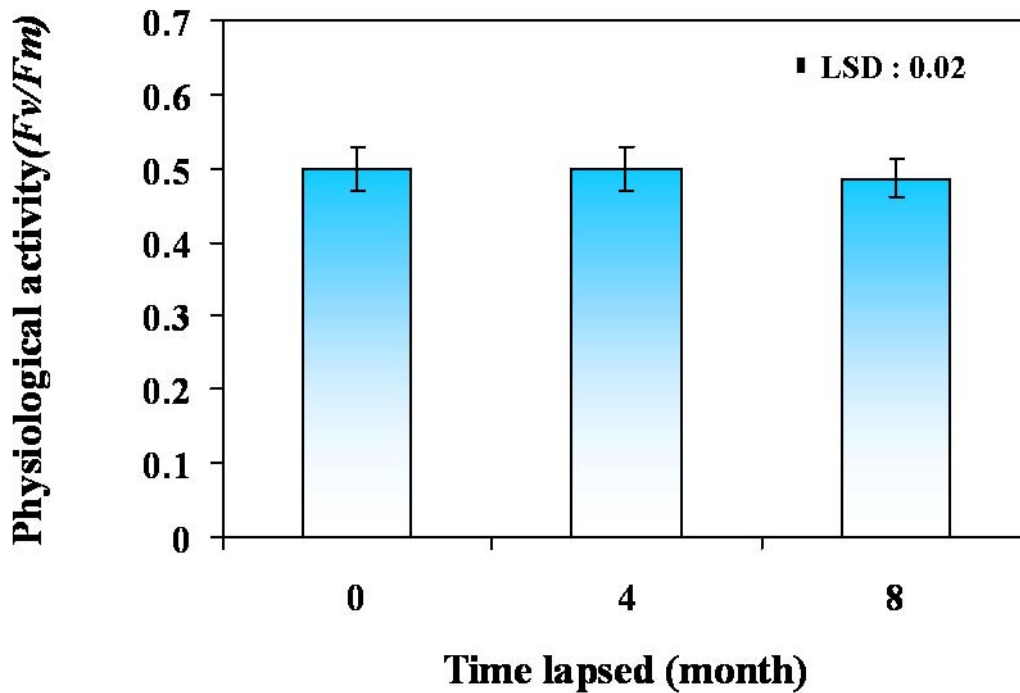


그림 11. 다시마 (*Saccarina latissima*) 휴면 포자의 광합성 활성 특이성 (4℃, 8개월, 암배양)

나. 휴면 사상체의 활성 회복을 위한 광질과 영양염 조건 연구

2006년 6월에 한국의 남해 완도 정도리에서 생육하는 미역 (*U. pinnatifida*)에서 얻어진 배우체 필라멘트 (직경 2 mm)를 핀셋으로 분리, homogenizer로 미세하게 으갠 다음, 20 mL의 해수 (35 psu coralife)가 들어있는 페트리디쉬 (50 mm in diameter, 20 mm high, Bibby sterilin Ltd. stone, staffs, U.K.)에 두 가지 배우체를 함께 넣어 주었다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스 (19 × 19 mm, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany)를 놓아 부착기질로 삼았고, 암상태로 항온배양기에서 (10 ± 0.5℃) 2일간 배양하여 부착을 유도하였다.

5가지 농도의 질산염과 4가지 서로 다른 온도의 적색광과 청색광에서 각각 10일간 배양된 휴면 사상체의 성장 및 생식활성을 조사하였다.

적색광에서 배양된 휴면 사상체의 경우, 측정된 모든 질산염 농도구에서 유사한 성장 양상을 보였으나, 온도 조건에 따라 5, 10℃ 그리고 15, 20℃ 두 가지 그룹으로 특성이 구분되었으며, 저온 그룹보다 고온 그룹에서 높은 성장 반응을 보였다 (그림 12). 청색광에서 나타난 생식양상은 5℃와 10~20℃ 두 그룹으로 구분되며, 5℃에서는 모든 질산염 조건구에서 생식이 진행되지 않았으나, 10~20℃에서는 생식활성을 보였다 (그림 13).

a) Area of female gametophyte

b) No. of cell of female gametophyte

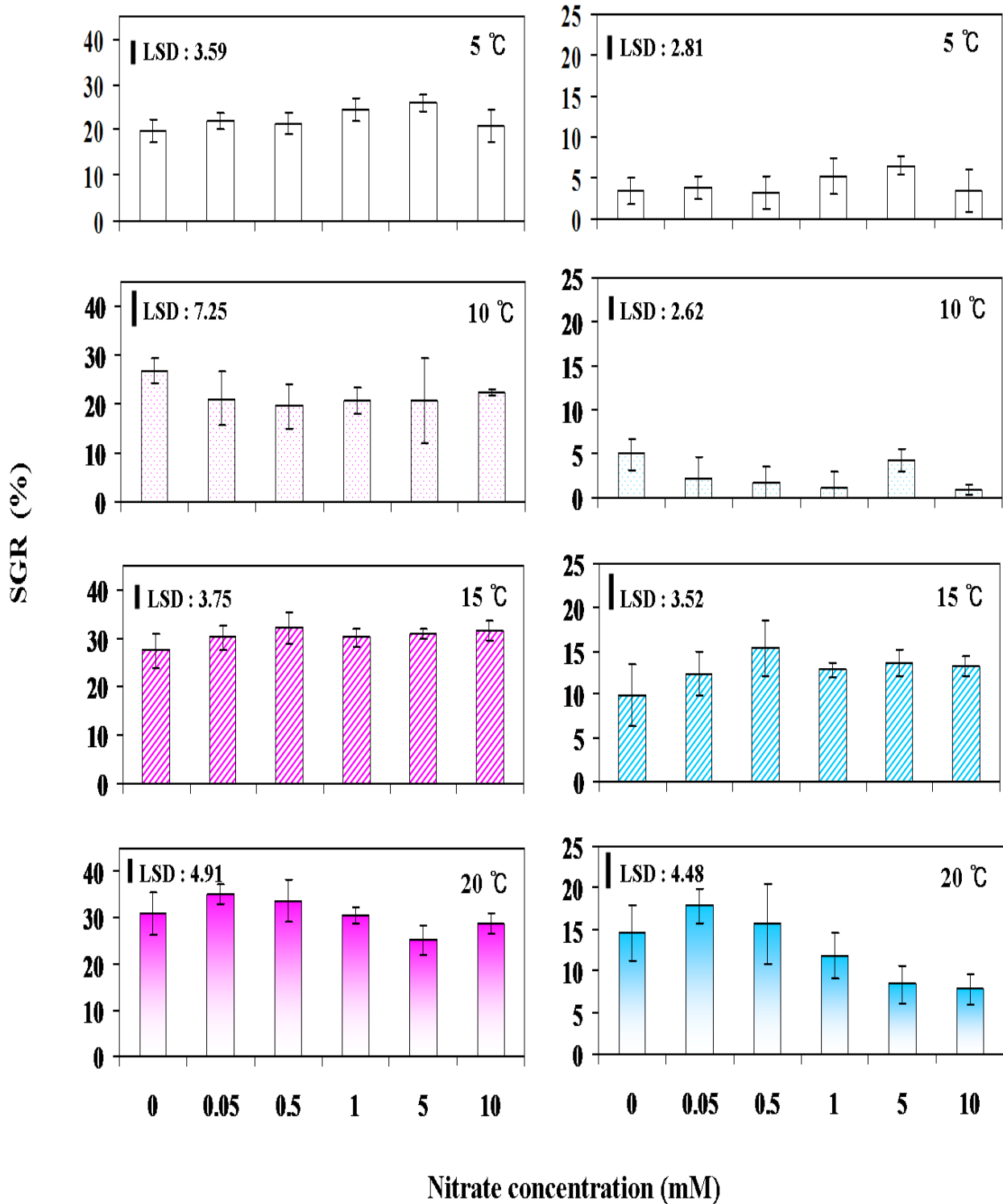


그림 12. 미역 배우체 성장에 미치는 온도와 질산염의 복합효과 (적색광, 10일 배양). (a) 암배우체의 면적, (b) 암배우체의 세포수

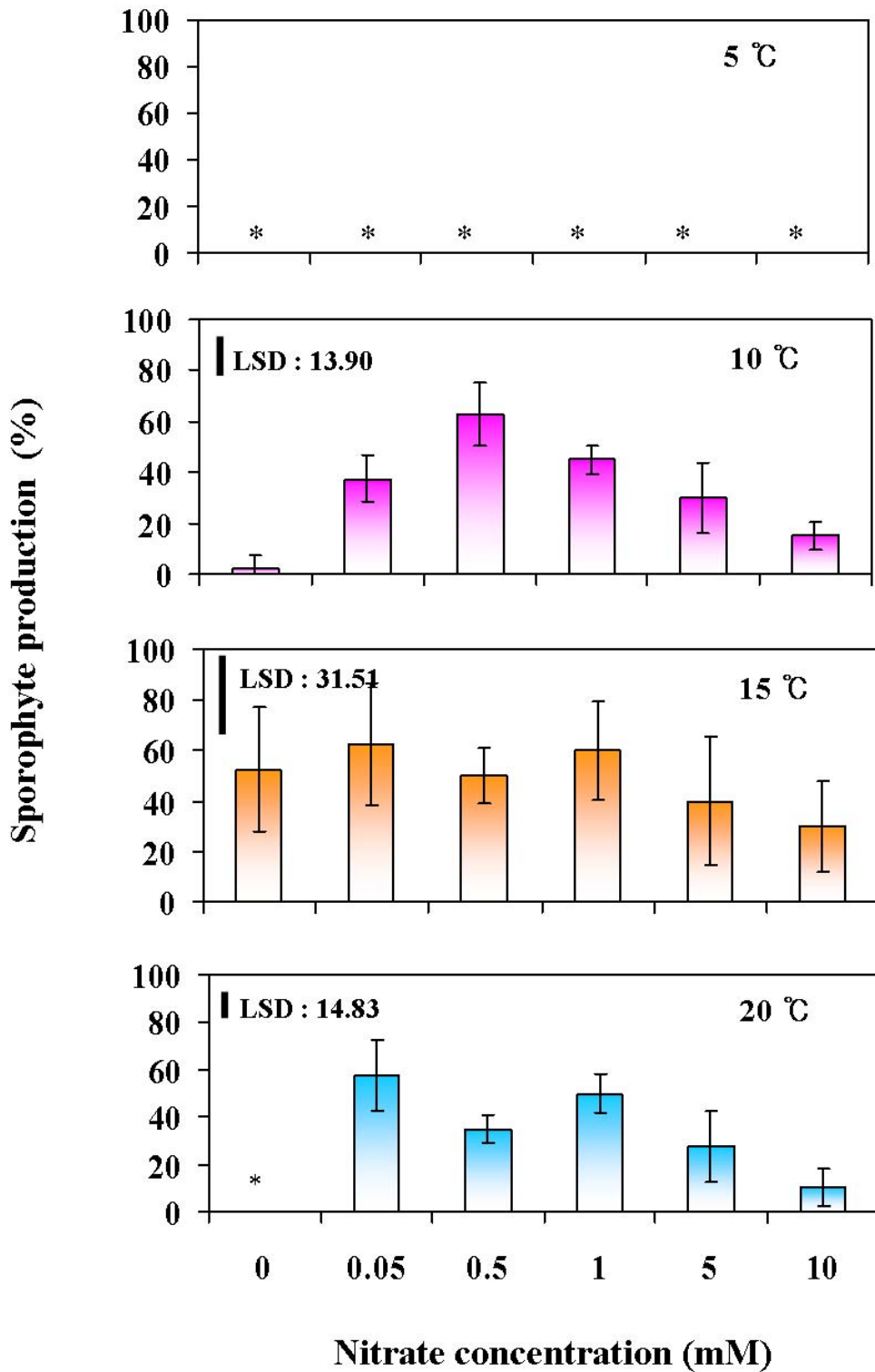


그림 13. 미역 배우체의 포자체 형성에 미치는 온도와 질산염의 복합효과 (청색광, 10일 배양)

이상의 결과를 종합해보면 미역 휴면 사상체의 생장은 15~20℃에서 가장 유리하고, 생식 활성은 이보다 낮은 온도인 10℃부터 나타나는 것으로 확인되었다. 미역의 휴면 사상체의 경우 생장을 위한 최적 온도 조건이 생식을 위한 온도 조건보다 높고, 고농도의 질산염은 생식 활성을 저해하는 것으로 나타났다.

2006년 6월에 한국의 남해 완도 정도리에서 생육하는 참다시마 (*S. japonica*)에서 얻어진 배우체 필라멘트를 실험실에서 인공배양하면서 시간경과에 따른 휴면 사상체의 활성도를 측정된 결과, 실내 배양된 사상형 배우체의 생리 활성도는 2년 보관기간동안 초기 상태와 다르지 않은 것으로 관찰되었다 (그림 14).

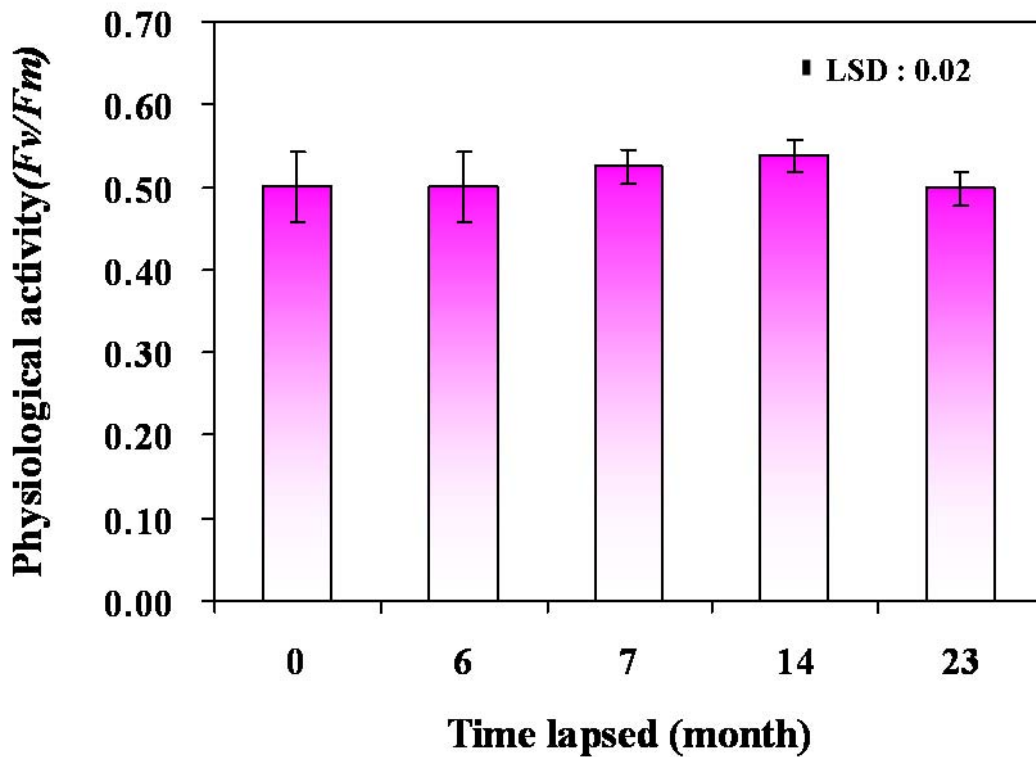


그림 14. 사상형 참다시마 배우체의 생리활성 (F_v/F_m) (n=5)

2. 생태독성진단 프로토콜 개발

참다시마 (*Sacharina japonica*)와 미역 (*Undaria pinnatifida*)의 어린 시기를 대상으로 시간경과에 따라 3개 단계로 구분하여 각 단계별로 종말점 (endpoints)을 측정항목으로 설정, 총 10종의 생태독성진단 프로토콜을 개발 하였다(그림 15).

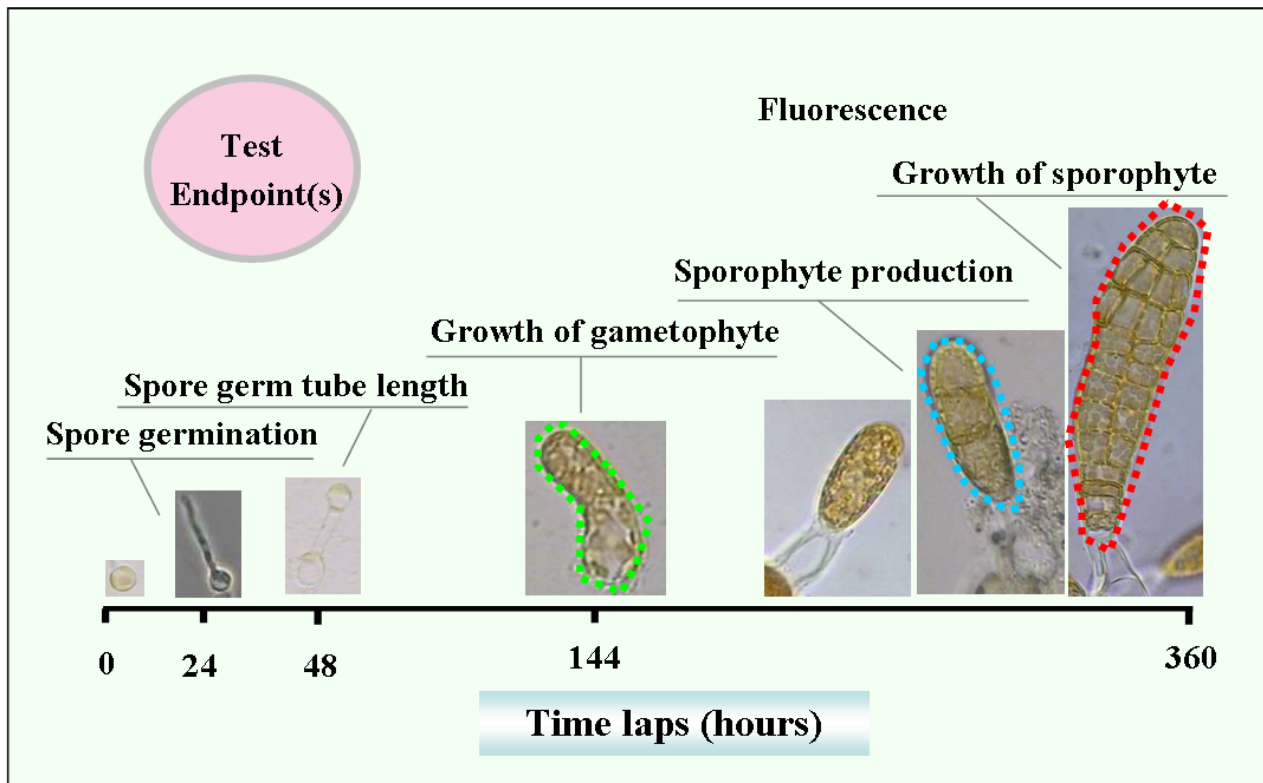


그림 15. 생태독성 진단을 위한 어린 시기 단계별 종말점

가. 참다시마 (*Saccharina japonica*) 포자 발아 평가기법 (15℃, 24시간)

“특허 출원 10-2009-0076636” “국제특허출원 PCTKR2010004642”

항목	시험조건
측정요소	다시마 포자발아율 (EC ₅₀)
시험생물	참다시마 <i>Saccharina japonica</i>)
시험기간	24 h
온도	15 ± 1℃
염분	25 ~ 35 psu
광종류	-
광도	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)
광주기	암기
시험용기	24구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음
시험용액 부피	2.5 mL/replicate
시험생물 크기	지름 25 μm
반복구당 시험생물 수	1 x 10 ⁶
시험농도	대조구 + 최소 5 개 농도 구간
반복수	4개
측정요소	총 500개체당 발아한 개체수
시험적합도	대조구에서의 발아율이 95.72 ± 1.01
공기주입	주입하지 않음

(1) 시험 종

시험 종으로 Laminariales (다시마 목), Laminariaceae (다시마 과), *Saccharina* (다시마 속), *Saccharina japonica* (참다시마 종)를 사용하였다.

(2) 평가방법

가) 평가 기간

; 시험개시 후 24시간

나) 시험농도

; 대조군, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100%

다) 시험용액제조

① 시험용액은 OTT's (1965) 인공해수를 사용하였다 (인공해수 조성 표 12 참조).

표 12. OTT's 인공해수의 주요 성분

주요 성분	농도 (g/L)
NaCl	21.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.00
KCl	0.80
NaBr	0.10
NaNO ₃	0.20
NaHCO ₃	0.20
H ₃ BO ₃	0.06
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	0.01
Sr(NO ₃) ₂	0.03
Na ₂ HPO ₄	0.02

② 시험용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 준비하였다.

(3) 배양방법

가) 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척하였다.

- 나) 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관하였다.
- 다) 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도하였다.
- 라) 유도된 포자액을 20 mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 주었다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼았고, 항온배양기에서($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양하였다.
- 마) 포자가 부착된 커버글라스를 24구 웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣었다.
- 바) 배양 온도는 15°C 로 암배양 하였다.

(4) 최적 환경조건 확립

; 포자 발아를 위한 최적 환경 조건을 알아보기 위하여 다양한 광조사량, pH, 염분 및 온도하에서 24시간 배양연구를 수행하였다 (그림 16). 그 결과, 포자발아를 위한 최적 광조사량은 $0\sim 120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH는 6~9, 염분은 25~55 psu 그리고 온도는 $10\sim 20^\circ\text{C}$ 로 나타났다.

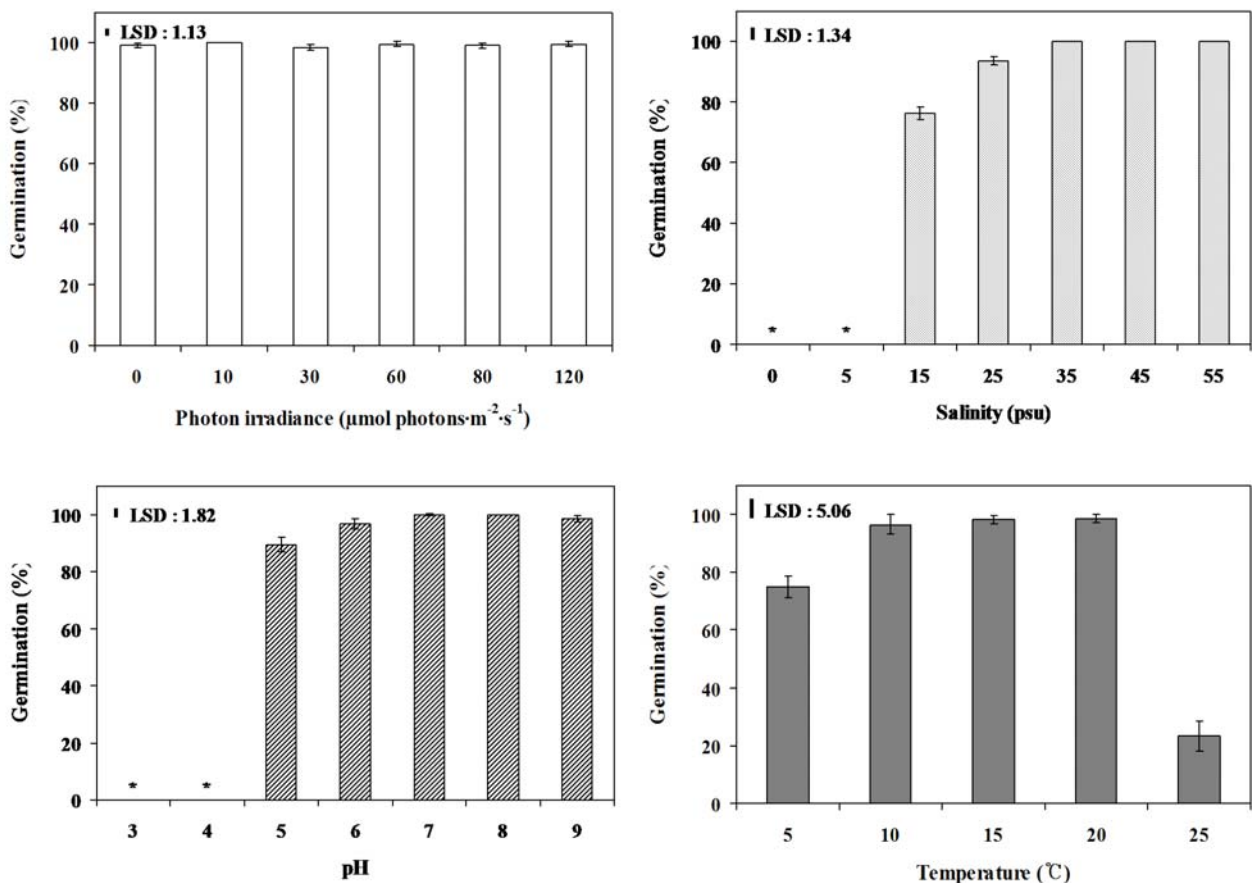


그림 16. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 참다시마 포자의 발아율

(5) 측정방법

; 광학현미경상에서 관찰되는 다시마 포자는 현미경 콘덴서를 조절하여 사용하게 되면

발아관의 윤곽이 명확해져서 흰색의 발아관을 검은색으로 관찰 할 수 있다 (그림 17). 포자에서 관이 발생되었을 때를 “발아” 라고 정의하고, 관이 형성되어 있으면 발아되었다 그렇지 않으면 발아하지 않은 것으로 판단하였다. 총 500개체의 발아정도를 개수하여 발아율을 판정하여 수질의 오염도를 평가하였다. 발아율 계수 과정은 영상분석장치 (Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 포자를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어졌다.



그림 17. 발아율 측정

(6) 자료분석

가) 자료정리

; 발아율은 100개체 당 발아한 발아체 수를 비율로 나타내었다.

나) 통계처리

; 다시마 포자를 이용한 독성시험의 측정값 (endpoints)은 발아 억제 효과에 기반을 두었다. 포자발아율에 대한 EC₅₀은 점예측기법 (point estimation techniques)을 써서 계산하였다. LOEC 및 NOEC값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였고, EC₅₀ 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다. 독성시험 결과는 EC₅₀ 값으로 표현할 경우, 값이 작을수록 독성도가 커지므로, 이런 문제를 보완하고자 독성값을 비교하기 위하여 독성단위 (Toxic Unit, TU)를 아래와 같이 계산하여 사용하였다.

$$TU = 100 / EC_{50} (\%)$$

(7) 대조군 차트

; 17회의 서로 다른 발아율 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다 (그림 18). 다시마의 평균 발아율은 95.72 ± 1.01 로 나타났다.

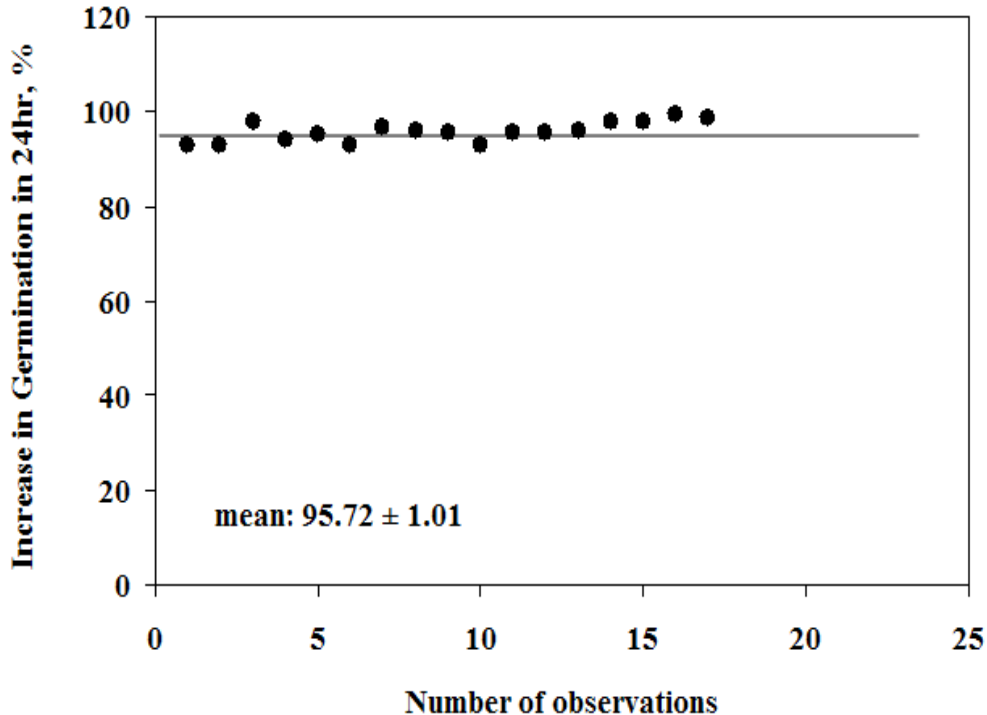


그림 18. 24시간 후 측정된 발아율 대조군 차트

(8) 단일독성원에 대한 생태독성평가

가) 중금속 (heavy metals)

표준 금속류 8종을 여러 가지의 농도로 구배하여 다시마 포자의 발아율을 이용하여 독성 평가를 시행하였을 때, 대부분의 중금속에서 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 19).

표준 중금속과 포자발아율의 관계로부터 얻은 EC_{50} 값을 기준으로 보았을 때, 포자발아율은 중금속 종류에 따라 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 평가되었다 (표 13).

중금속 8종의 농도와 다시마 포자발아율을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 카드뮴 (Cd)의 경우, 15.052 mg/L에서 발아율이 대조군에 비하여 약 50% 수준을 나타냈다. 구리 (Cu)의 경우, 0.120 mg/L에서 발아율이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 0.4 mg/L에서는 발아가 일어나지 않았다. 수은 (Hg) 노출군에서는 농도 0.041 mg/L에서 발아가 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 0.010 mg/L에서는 포자 발아가 일어나지 않았다. 니켈 (Ni) 노출군에서는 농도 2.009 mg/L에서 포자발아율이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 10 mg/L 이상의 농도에서는 발아가 일어나지 않았다.

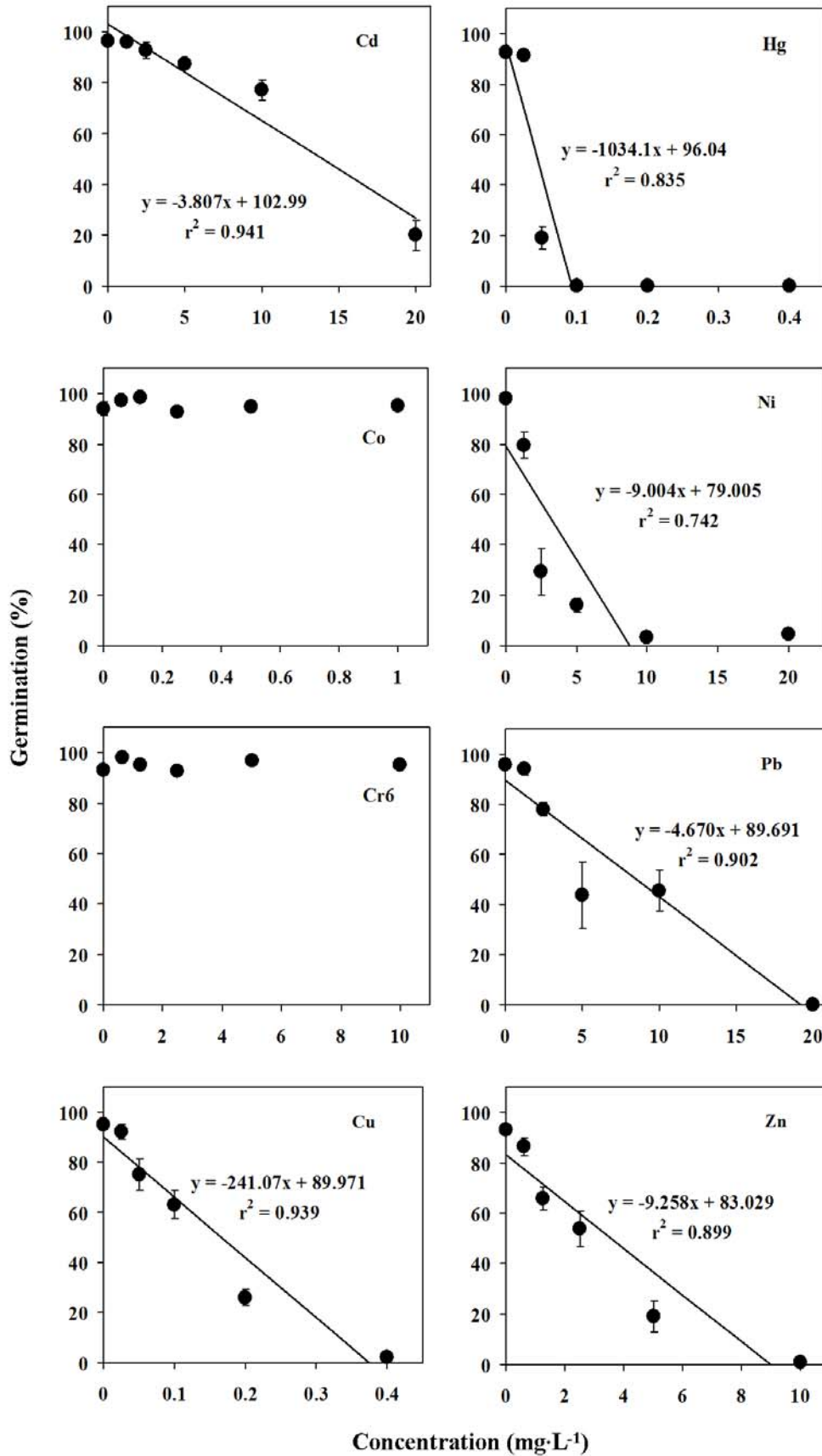


그림 19. 중금속 농도에 따른 참다시마 포자의 발아율

표 13. 참다시마 포자 발아를 이용한 중금속의 생태독성평가 결과 (단위 mg/L)

Metals	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV(%)
Cd (20 mg/L)	2.5	5	9.962 (7.990~10.937)	15.052 (14.169~15.806)	1.971
Co (1 mg/L)	NA	-	-	-	-
Cr6 (10 mg/L)	NA	-	-	-	-
Cu (0.4 mg/L)	0.025	0.05	0.049 (0.034~0.059)	0.120 (0.090~0.148)	7.851
Hg (0.4 mg/L)	0.025	0.05	0.028 (0.026~0.029)	0.041 (0.040~0.042)	1.290
Ni (20 mg/L)	< 1.25	1.25	0.666 (0.437~0.961)	2.009 (1.854~2.196)	3.247
Pb (20 mg/L)	1.25	2.5	1.858 (1.603~2.071)	4.760 (4.152~13.193)	37.285
Zn (10 mg/L)	< 0.625	0.625	0.706 (0.503~0.842)	3.024 (2.415~3.512)	6.676

납 (Pb)에서는 4.760 mg/L에서 포자발아율이 대조군의 약 50% 수준으로 감소하였고, 10 mg/L 이상의 농도에서는 발아가 일어나지 않았다. 아연 (Zn) 3.024 mg/L에 노출된 포자는 대조군에 비하여 약 50% 수준에 해당하는 포자발아율을 나타냈다. 코발트 (Co)와 크롬 (Cr6)은 실험된 농도에서 각각 발아율 억제 현상을 관찰하지 못했으며, 더 높은 농도하에서의 중금속 추가 실험이 요구된다.

EC₅₀값을 기준으로 한 중금속 민감성은 Hg > Cu > Ni > Zn > Pb > Cd 순으로 나타났다. 포자발아율을 종말점으로 중금속 생태독성 평가기법은 CV가 40%이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

나) 휘발성 유기화합물 (VOCs; Volatile Organic Compounds)

휘발성 유기화합물 (VOCs) 7종을 여러 가지의 농도로 구배하여 다시마의 포자발아율을 비교하였을 때, 포자발아율은 휘발성 유기화합물 (VOCs) 7종 모두와 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 20).

휘발성 유기화합물 (VOCs) 7종의 농도와 다시마 포자발아율을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 아세톤 (Acetone)에 노출된 경우 10.402 mL/L에서 포자발아율이 대조군의 약 50% 수준으로 감소하였으며, 20 mL/L에서는 발아가 일어나지 않았다. 클로로포름 (Chloroform)은 0.617 mL/L에서 포자발아율이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났으며, 1.0 mL/L에서는 발아가 일어나지 않았다.

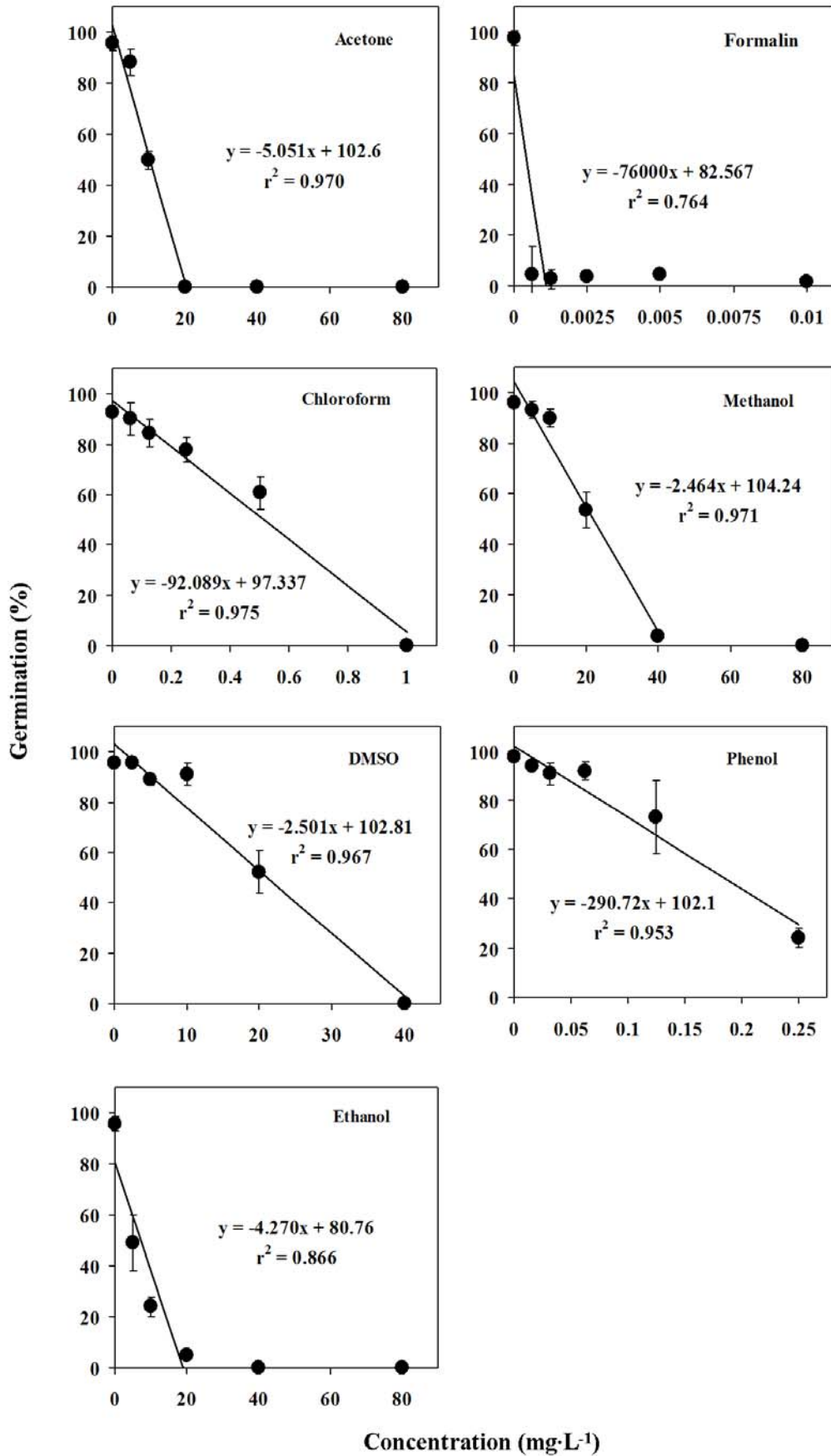


그림 20. 휘발성 유기화합물에 따른 참다시마 포자발아율

디메틸황산화물 (DMSO; Dimethyl sulfoxide)은 21.705 mL/L에서 포자발아율이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났으며, 40 mL/L에서는 발아가 일어나지 않았다. 에틸알코올 (Ethyl alcohol) 처리군에서는 5.240 mL/L에서 대조군의 약 50%에 해당되는 포자발아율을 나타냈으며, 40 mL/L에서는 발아가 일어나지 않았다. 포르말린 (Formaldehyde)에 노출된 경우 노출된 최저 농도 (625 μ L/L)에서 0에 가까운 발아율을 보였으며, 좀 더 낮은 농도에서의 추가 실험이 요구된다. 메틸알코올 (Methyl alcohol)에 노출된 경우, 22.240 mL/L에서 포자발아율이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 40 mL/L에서는 발아가 일어나지 않았다. 페놀 (Phenol)에 노출된 경우 0.187 mL/L에서 포자발아율이 대조군의 약 50%수준으로 감소하였다.

휘발성 유기화합물 (VOCs) 7종과 포자발아율의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 비교해 보았을 때, 휘발성 유기화합물 (VOCs) 종류에 따른 발아관 길이생장의 민감성은 Formaldehyde > Phenol > Chloroform > Ethyl alcohol > Acetone > DMSO > Methyl alcohol 순으로 나타났다 (표 14).

포자발아율을 종말점으로 한 환경유해물질 생태독성 평가기법은 CV가 20%이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

표 14. 참다시마 포자 발아를 이용한 휘발성 유기화합물의 생태독성평가 결과 (단위 mL/L)

VOCs	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)
Acetone (80 mL/L)	< 5	5	5.281 (3.444~6.232)	10.402 (9.529~11.163)	2.750
Chloroform (1 mL/L)	0.125	0.25	0.142 (0.076~0.221)	0.617 (0.555~0.673)	17.399
DMSO (40 mL/L)	2.5	5	11.048 (9.755~11.926)	21.705 (17.750~25.242)	8.152
Ethyl alcohol (80 mL/L)	<5	5	1.026 (0.791~1.482)	5.240 (3.897~7.469)	6.876
Formalin (0.01 mL/L)	< 0.000625	0.000625	0.0001 (NA)	0.0003 (NA)	-
Methyl alcohol (80 mL/L)	10	20	10.989 (9.736~12.413)	22.240 (18.570~25.340)	4.881
Phenol (0.25 mL/L)	0.0625	0.125	0.074 (0.059~0.105)	0.187 (0.146~0.208)	5.970

다) 환경유해물질

환경유해물질 2종을 여러 가지의 농도로 구배하여 참다시마의 포자발아율을 비교하였을 때, 포자발아율은 환경유해물질 나트륨 도데실 황산염 (SDS; Sodium dodecyl sulfate)과 농도반비례적인 선형관계를 나타냈으나, 트리부틸주석 (TBT; Bis-tributyltin)은 실험된 최소농도 (0.0125 mL/L)에서 사멸함에 따라 EC₅₀ 산출이 불가하며 추가 시험이 요구된다 (그림 21).

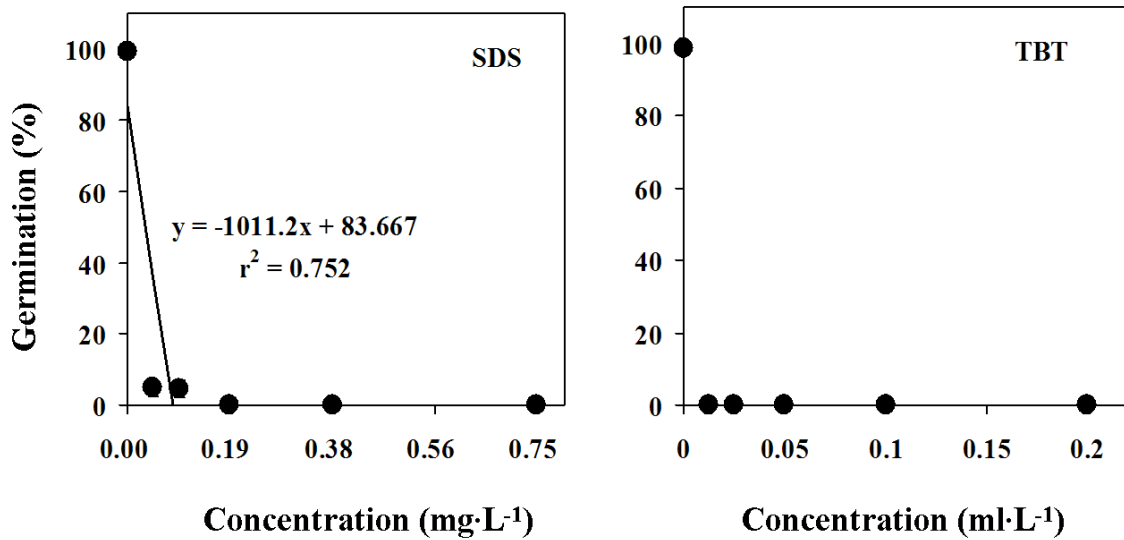


그림 21. 환경유해물질의 농도에 따른 참다시마 포자의 발아율

환경유해물질 나트륨 도데실 황산염 (SDS; Sodium dodecyl sulfate)은 0.0254 mL/L에서 포자발아율이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났으며, 표 15와 같이 평가되었다.

표 15. 참다시마 포자 발아를 이용한 환경유해물질의 생태독성평가 결과 (단위 mL/L)

VOCs	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV(%)
SDS (0.75 mg/L)	<0.0483	0.0483	0.0051 (0.0049~0.0053)	0.0254 (0.0248~0.0263)	0.95
TBT (0.2 mL/L)	-	-	-	-	-

(9) 산업폐수의 생태독성평가

산업폐수 10개 지점에서 채수한 시료 원수에 대한 포자발아율 실험을 수행한 결과와 이화학적 분석 결과는 그림 22, 표 16과 같다. 조사 지점 10개 지역 중 9개 지역에서 50% 이하의 낮은 포자 발아율을 보였으며, 특히 W16 지점에서는 포자 발아가 거의 일어나지 않는 것으로 보여 가장 오염도가 높은 지역으로 평가되었다.

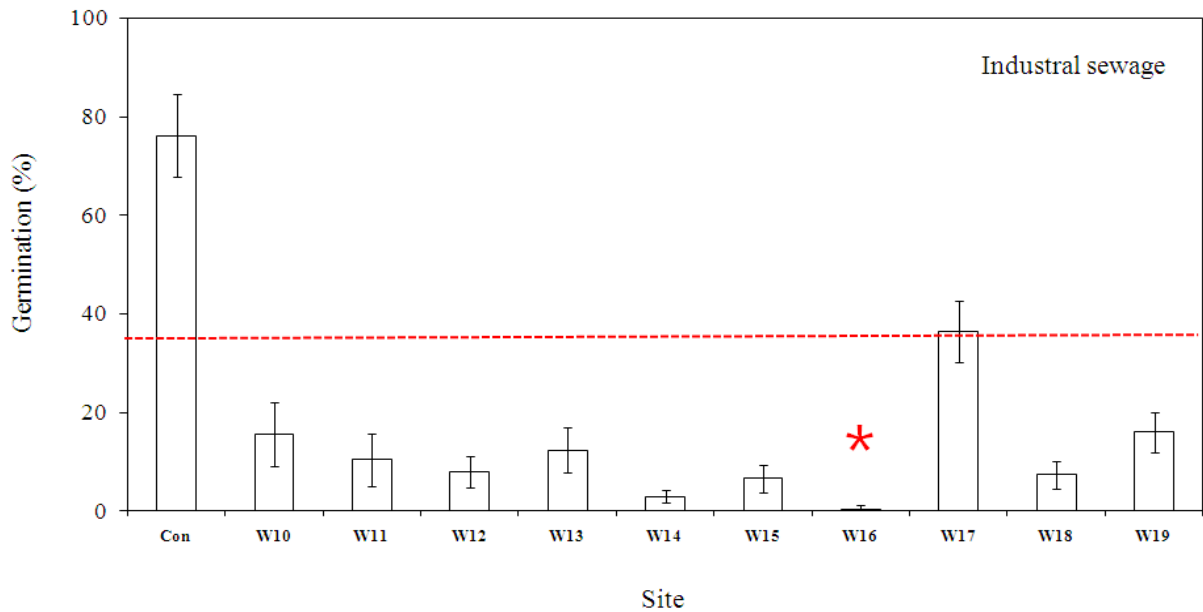


그림 22. 참다시마의 포자발아율을 이용한 산업폐수 (2010년 6월) 수질 평가 예비 실험 결과

표 16. 산업폐수의 지점별 이화학적 분석 결과 (2010년 6월)

조사항목 채취지점	TN	TP	SS	CN	phenol	F	Cu	Pb	Cd	Cr	Cr6	Zn	Mn	Fe	As	Hg
W10	1.884	0.168	5.2	ND	ND	0.34	ND	ND	ND	ND	ND	0.056	0.010	0.134	ND	ND
W11	8.417	0.046	1.2	ND	ND	ND	0.034	ND	ND	ND	ND	0.114	0.009	0.339	ND	0.001
W12	78.608	0.051	13.0	0.750	ND	25.55	5.522	0.226	ND	0.019	ND	0.039	0.037	2.879	ND	0.001
W13	53.089	0.143	4.8	2.000	ND	1.55	0.247	ND	ND	0.039	ND	0.020	0.106	0.656	ND	0.002
W14	4.911	0.053	9.8	ND	ND	ND	0.011	ND	ND	0.133	ND	0.019	0.061	0.235	ND	ND
W15	12.338	1.409	2.0	0.360	ND	ND	0.700	ND	ND	0.033	ND	0.011	0.110	2.253	ND	0.001
W16	130.202	48.780	38.00	ND	ND	0.34	1.739	0.119	ND	0.101	ND	2.068	0.739	25.822	ND	0.001
W17	7.997	ND	1.2	ND	ND	2.230	ND	ND	ND	0.035	ND	ND	0.217	0.036	ND	ND
W18	10.777	0.060	15.0	13.230	12.377	ND	0.013	ND	ND	ND	ND	0.388	0.046	0.727	ND	ND
W19	45.780	0.315	8.8	ND	ND	0.21	1.018	ND	ND	0.111	ND	0.480	0.077	2.176	ND	ND

산업폐수 시료 원수에 대한 포자발아율 실험에서 대조군 대비 50% 이하의 발아율을 나타내는 9 지점을 대상으로 반수 희석, 다시마 포자의 발아율을 이용하여 독성 평가를 시행하였을 때, 6 지점에서 농도 반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 23).

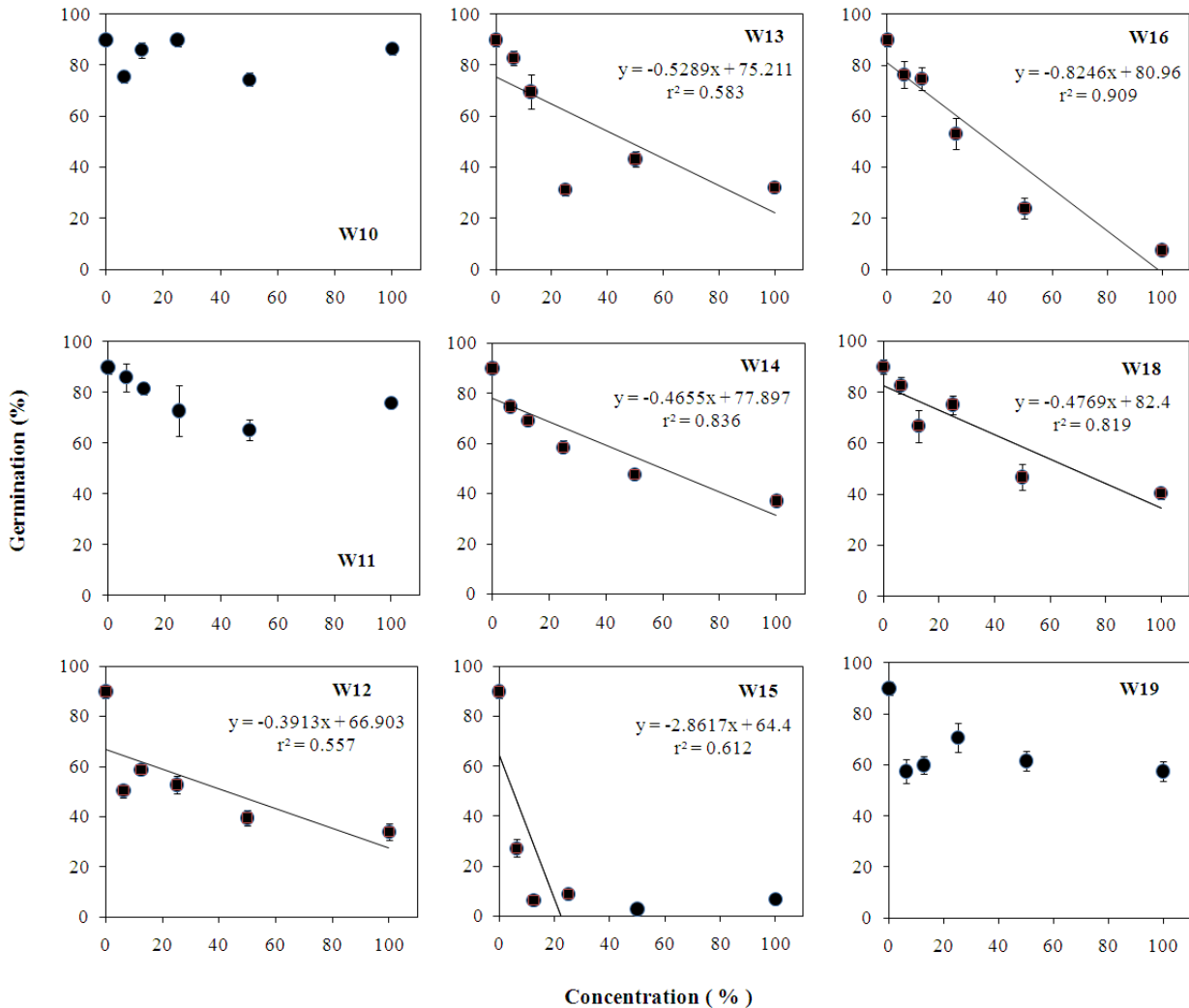


그림 23. 산업폐수 농도에 따른 참다시마 포자의 발아율

산업폐수와 포자발아율의 관계로부터 얻은 TU값을 통해, W15 지점이 평균 TU값 22.33으로 오염 정도가 가장 심하였으며, W13 지점 (TU 4.55)과 W16 지점 (TU 3.12) 순으로 오염 정도가 평가되었다 (표 17). 그러나 W15 지점의 원수 속에 포함된 중금속의 농도와 단일독성원 테스트 결과 (중금속 5종 : Cu, Pb, Cd, Zn, Hg)와 비교하였을 때 발아율을 저해하는 농도보다 낮게 산출되었다. 이는 서로 다른 중금속이 혼합되어 각각의 영향보다 더 큰 영향을 끼친 것으로 판단되며, 복합적인 중금속 실험이 추가적으로 요구된다. 6차 산업폐수의 이화학적 분석 결과와 W12의 EC₅₀ 간의 관계를 보고 농도를 계산한 결과, 39.773%의 원수 속에 구리가 2.196 mg/L 들어 있음을 산출 하였고, 또한 W16의 구리함량은 원수 32.021% 속에 0.557 mg/L 들어 있음을 알아내었다. 이는 참다시마 포자 발아율 단일독성원 테스트 결과에서 산출된 구리의 EC₅₀ 값인 0.120 mg/L 보다 높은 수치임을 알 수 있다. 따라서 포자 발아율의 저해요인으로 구리의 영향이 있었을 것으로 판단된다. 산업폐수의 이화학적 분석 결과에

유일하게 페놀을 포함하는 W18의 페놀 농도를 계산한 결과 원수 64.063% 속에 7.929 mL/L를 함유하고 있음을 알아내었다. 이는 휘발성유기화합물 테스트 결과에서 산출된 페놀의 EC₅₀ 값인 0.187 mL/L보다 높은 값을 알 수 있으며, 다른 중금속의 함유량을 보면 발아율을 저해하는 농도보다 낮은 것으로 산출된 것을 종합하면, W18 지점의 저해요인으로 페놀이 크게 작용한 것으로 해석된다. 포자발아율을 종말점으로 한 산업폐수 생태독성 평가기법은 CV가 20%이하로 나타나 안정된 진단기법으로 사료된다.

표 17. 참다시마의 포자 발아를 이용한 산업폐수의 생태독성평가 결과 (단위 %)

채취지점	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	TU
W10	<6.25	6.25	45.673	> 100	-	< 1
W11	25	50	13.352 (0~44.198)	> 100	-	< 1
W12	<6.25	6.25	1.589 (1.351~2.025)	39.773 (17.203~60.545)	-	2.514
W13	6.25	12.5	7.102 (2.894~15.616)	21.991 (18.808~24.560)	4.611	4.547
W14	<6.25	6.25	3.701 (2.211~8.865)	62.500 (-)	-	1.600
W15	<6.25	6.25	0.896 (0.780~1.066)	4.479 (3.898~5.330)	6.028	22.326
W16	<6.25	6.25	4.136 (1.846~18.240)	32.021 (19.171~41.374)	12.695	3.123
W18	6.25	12.5	7.203 (2.437~13.636)	64.063 (-)	-	1.561
W19	<6.25	6.25	2.068 (1.605~3.101)	> 100	-	< 1

나. 참다시마 (*Saccharina japonica*) 저온 포자 발아 평가법 (5℃, 24시간)

“특허 출원예정”

항목	시험조건
측정요소	다시마 포자발아율 (EC ₅₀)
시험생물	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)
시험기간	24 h
온도	5 ± 1℃
염분	25 ~ 35 psu
광종류	—
광도	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)
광주기	암기
시험용기	24구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음
시험용액 부피	2.5 mL/replicate
시험생물 크기	지름 25 μm
반복구당 시험생물 수	1 x 10 ⁶
시험농도	대조구 + 최소 5 개 농도 구간
반복수	4개
측정요소	총 500개체당 발아한 개체수
시험적합도	대조구에서의 발아율이 93.61 ± 1.05
공기주입	주입하지 않음

(1) 시험 종

시험 종으로 Laminariales (다시마 목), Laminariaceae (다시마 과), *Laminaria* (다시마 속), *Sacharina japonica* (참다시마 종)를 사용하였다.

(2) 평가방법

가) 평가 기간

; 시험개시 후 24시간

나) 시험농도

; 대조군, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100%

다) 시험용액제조

① 시험용액은 OTT's (1965) 인공해수를 사용하였다.

② 시험용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 준비하였다.

(3) 배양방법

가) 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척하였다.

나) 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관하였다.

다) 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도하였다.

라) 유도된 포자액을 20 mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 주었다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼았고, 항온배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양하였다.

마) 포자가 부착된 커버글라스를 24구 웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣었다.

바) 배양 온도는 5°C 로 암배양 하였다.

(4) 최적 환경조건 확립

; 포자 발아 유도를 위한 최적 환경 조건을 알아보기 위하여 다양한 광조사량, pH, 염분 및 온도하에서 24시간 배양연구를 수행하였다 (그림 24). 그 결과, 포자발아를 위한 최적 광조사량은 $0 \sim 120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH는 8~9, 염분은 25~45 psu 그리고 온도는 $5 \sim 15^\circ\text{C}$ 로 나타났다.

(5) 측정방법

; 광학현미경상에서 관찰되는 다시마 포자는 현미경 콘덴서를 조절하여 사용하게 되면 발아관의 윤곽이 명확해져서 흰색의 발아관을 검은색으로 관찰 할 수 있다. 포자에서 관이 발생되었을 때를 “발아” 라고 정의하고, 관이 형성되어 있으면 발아되었다 그렇지 않으면 발아하지 않은 것으로 판단하였다. 총 500개체의 발아정도를 개수하여 발아율을 판정하여 수질의 오염도를 평가하였다. 발아율 계수 과정은 영상분석장치 (Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 포자를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어졌다.

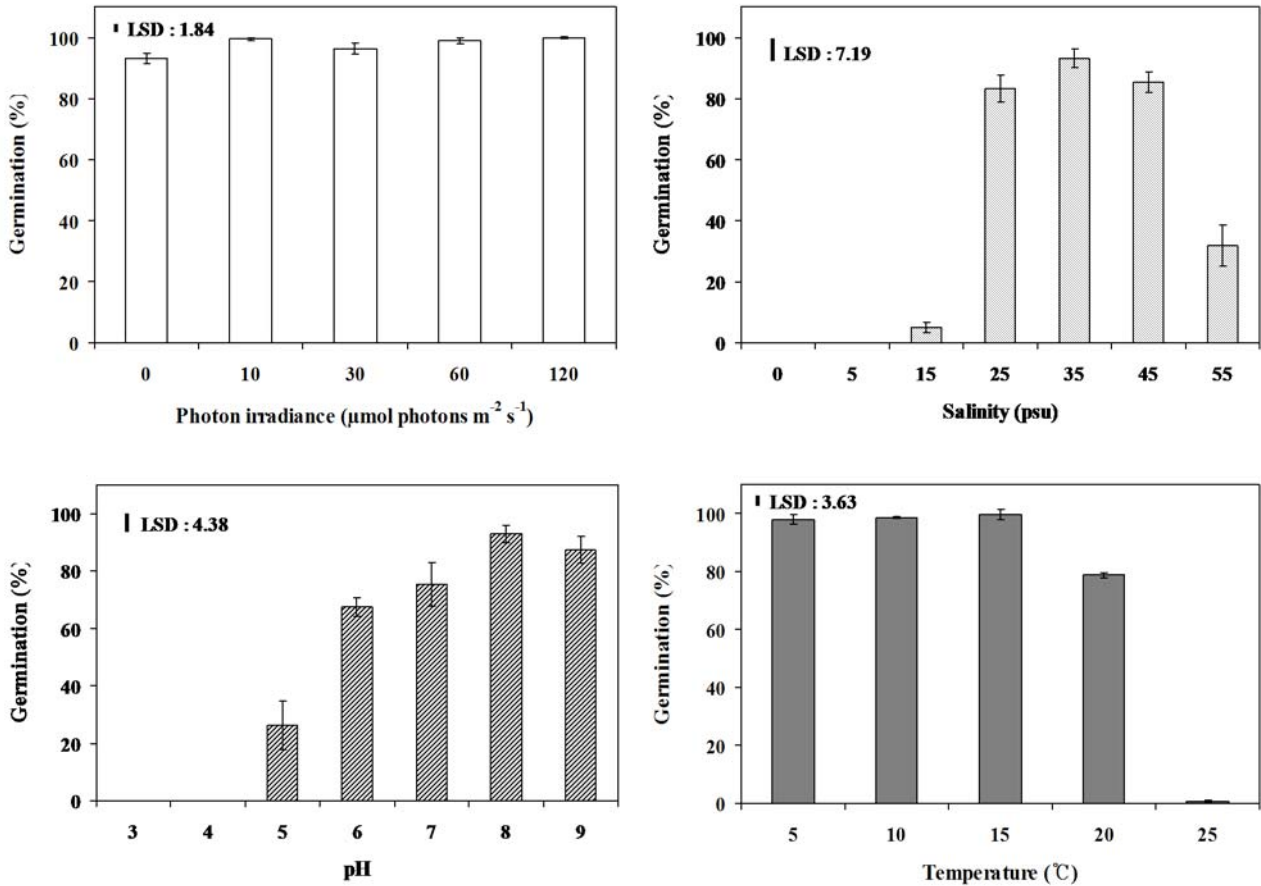


그림 24. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 참다시마 포자의 발아율

(6) 자료분석

가) 자료정리

; 발아율은 100개체 당 발아한 발아체 수를 비율로 나타내었다.

나) 통계처리

; 다시마 포자를 이용한 독성시험의 측정값 (endpoints)은 발아 억제 효과에 기반을 두었다. 포자발아율에 대한 EC_{50} 은 점예측기법 (point estimation techniques)을 써서 계산하였다. LOEC 및 NOEC값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였고, EC_{50} 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다. 독성시험 결과는 EC_{50} 값으로 표현할 경우, 값이 작을수록 독성도가 커지므로, 이런 문제를 보완하고자 독성값을 비교하기 위하여 독성단위 (Toxic Unit, TU)를 아래와 같이 계산하여 사용하였다.

$$TU = 100 / EC_{50} (\%)$$

(7) 대조군 차트

; 17회의 서로 다른 발아율 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다 (그림 25). 다시마의 평균 발아율은 93.61 ± 1.05 로 나타났다.

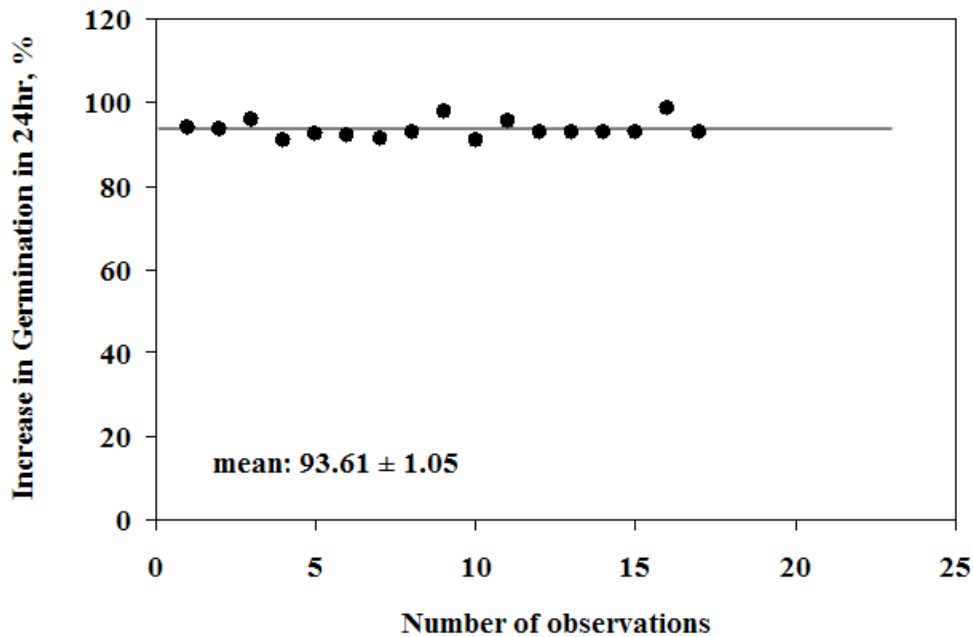


그림 25. 24시간 후 측정된 발아율 대조군 차트

(8) 단일독성원에 대한 생태독성평가

가) 중금속 (heavy metals)

표준 금속류 8종을 여러 가지의 농도로 구배하여 다시마 포자의 발아율을 이용하여 독성 평가를 시행하였을 때, 대부분의 중금속에서 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 26).

표준 중금속과 포자발아율의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 보았을 때, 포자발아율은 중금속 종류에 따라 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 평가되었다 (표 18).

중금속 4종의 농도와 다시마 포자발아율을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 카드뮴 (Cd)의 경우, 2.024 mg/L에서 발아율이 대조군에 비하여 약 50% 수준을 나타냈다. 구리 (Cu)의 경우, 0.029 mg/L에서 발아율이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 0.2 mg/L에서는 발아가 일어나지 않았다. 수은 (Hg) 노출군에서는 농도 0.008 mg/L에서 발아가 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 0.050 mg/L에서는 포자 발아가 일어나지 않았다. 아연 (Zn) 2.214 mg/L에 노출된 다시마는 대조군에 비하여 약 50% 수준에 해당하는 발아율을 나타냈다. 납 (Pb)은 실험된 최고 농도 이상의 범위에서 50% 발아 억제 농도가 나타났고, 코발트 (Co)와 크롬 (Cr6) 그리고 니켈 (Ni)은 실험된 농도에서 각각 발아율 억제 현상을 관찰하지 못하였다. 이들 중금속 세 종은 보다 높은 농도 범위하에서의 추가 실험이 요구된다.

EC₅₀값을 기준으로 한 중금속 민감성은 Hg > Cu > Cd > Zn > Pb순으로 나타났다. 포자발아율을 종말점으로 한 중금속 생태독성 평가기법은 CV가 15%이하로 비교적 안정된 진단 기법임을 시사했다.

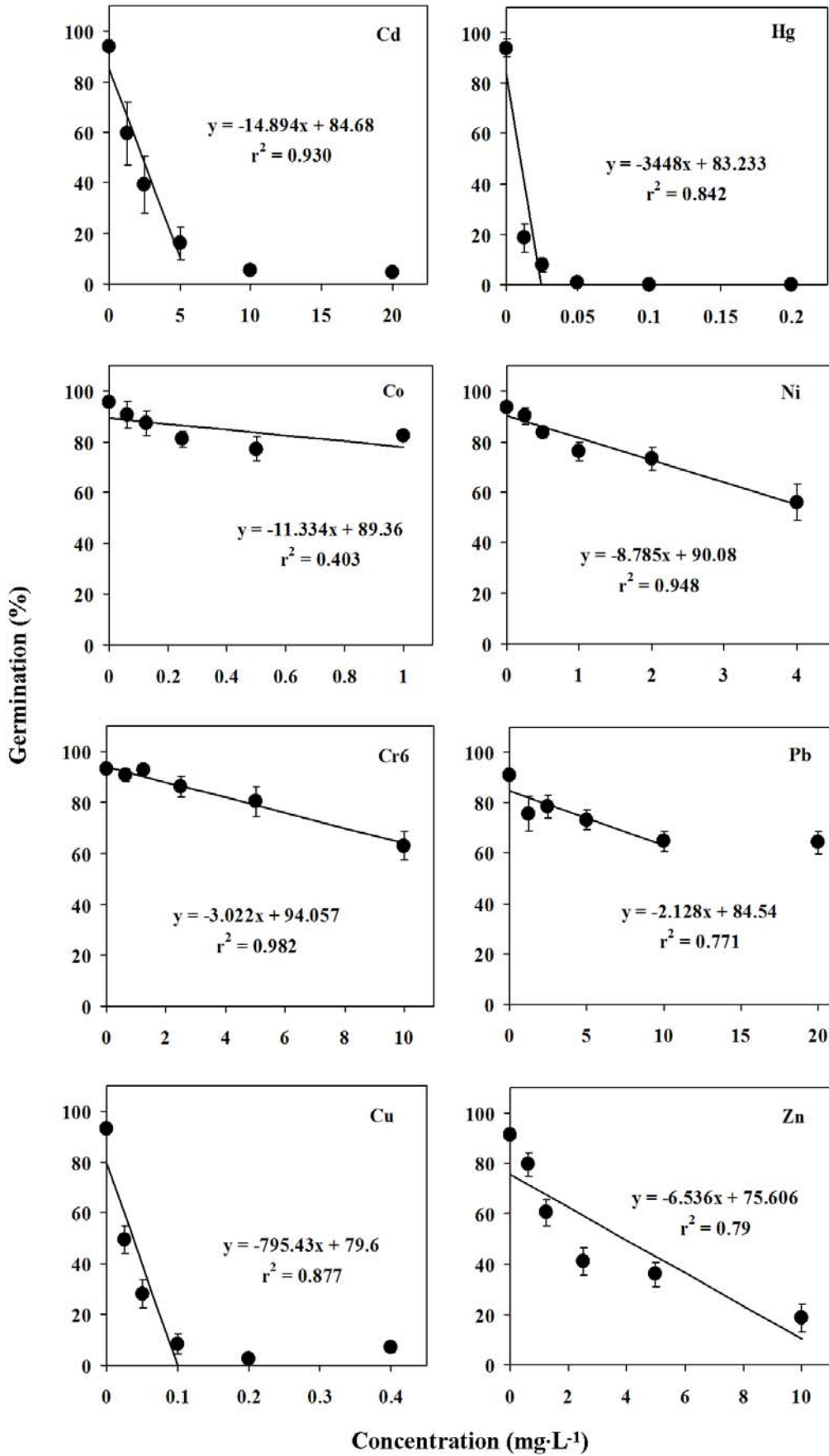


그림 26. 중금속 농도에 따른 참다시마 포자의 발아율

표 18. 참다시마의 포자발아율 (II)을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과 (단위 mg/L)

Metals	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)
Cd (20 mg/L)	< 1.25	1.25	0.341 (0.219~0.577)	2.024 (1.250~2.948)	13.845
Co (1 mg/L)	NA	-	-	-	-
Cr6 (10 mg/L)	NA	-	-	-	-
Cu (0.4 mg/L)	< 0.025	0.025	0.0054 (0.0045~0.0063)	0.029 (0.022~0.035)	8.714
Hg (0.4 mg/L)	< 0.013	0.013	0.0016 (0.0014~0.0017)	0.008 (0.007~0.009)	3.704
Ni (20 mg/L)	NA	-	-	-	-
Pb (20 mg/L)	< 1.25	1.25	0.813 (0.563~1.252)	> 20	NA
Zn (10 mg/L)	< 0.625	0.625	0.491 (0.286~0.762)	2.214 (1.850~2.605)	6.24

다. 참다시마 (*Saccharina japonica*) 포자 발아관 길이 성장 평가법 (15℃, 24시간)

“특허 출원 10-2009-0076637” “국제특허출원 PCTKR2010004682”

항목	시험조건
측정요소	다시마 포자의 발아관 길이 (EC ₅₀)
시험생물	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)
시험기간	24 h
온도	15 ± 1℃
염분	25~35 psu
광종류	-
광도	0 μmol m ⁻² s ⁻¹
광주기	암기
시험용기	24구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음
시험용액 부피	2.5 mL/replicate
시험생물 크기	지름 25 μm
반복구당 시험생물 수	1 x 10 ⁶
시험농도	대조구 + 최소 5 개 농도 구간
반복수	4개
측정요소	총 30개체의 발아관 길이
시험적합도	대조구에서의 평균 발아관 길이는 20.62 ± 0.70 μm
공기주입	주입하지 않음

(1) 시험 중

시험 중으로 Laminariales (다시마 목), Laminariaceae (다시마 과), *Saccharina* (다시마 속), *Saccharina japonica* (참다시마 종)를 사용하였다.

(2) 평가방법

가) 평가 기간

; 시험개시 후 24시간

나) 시험농도

; 대조군, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100%

다) 시험용액제조

① 시험용액은 OTT's (1965) 인공해수를 사용하였다.

② 시험용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 준비하였다.

(3) 배양방법

가) 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척하였다.

나) 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관하였다.

다) 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도하였다.

라) 유도된 포자액을 20 mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 주었다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼았고, 항온배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양하였다.

마) 포자가 부착된 커버글라스를 24구 웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣었다.

바) 배양 온도는 15°C 로 암배양 하였다.

(4) 최적 환경조건 확립

; 포자의 발아관 길이 생장 유도를 위한 최적 환경 조건을 알아보기 위하여 다양한 광조사량, pH, 염분 및 온도하에서 24시간 배양연구를 수행하였다 (그림 27). 그 결과, 포자발아를 위한 최적 광조사량은 $0 \sim 120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH는 7~9, 염분은 35 psu 그리고 온도는 $15 \sim 20^\circ\text{C}$ 로 나타났다.

(5) 측정방법

; 광학현미경상에서 관찰되는 다시마 포자는 현미경 콘덴서를 조절하여 사용하게 되면 발아관의 윤곽이 명확해져서 흰색의 발아관을 검은색으로 관찰 할 수 있다. 발아관 생장은 24시간 종말점에서 30개체를 대상으로 발아관 시작부분부터 발아관 끝까지의 길이를 측정하였다 (그림 28). 모든 과정은 영상분석장치 (Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 포자를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어졌다.

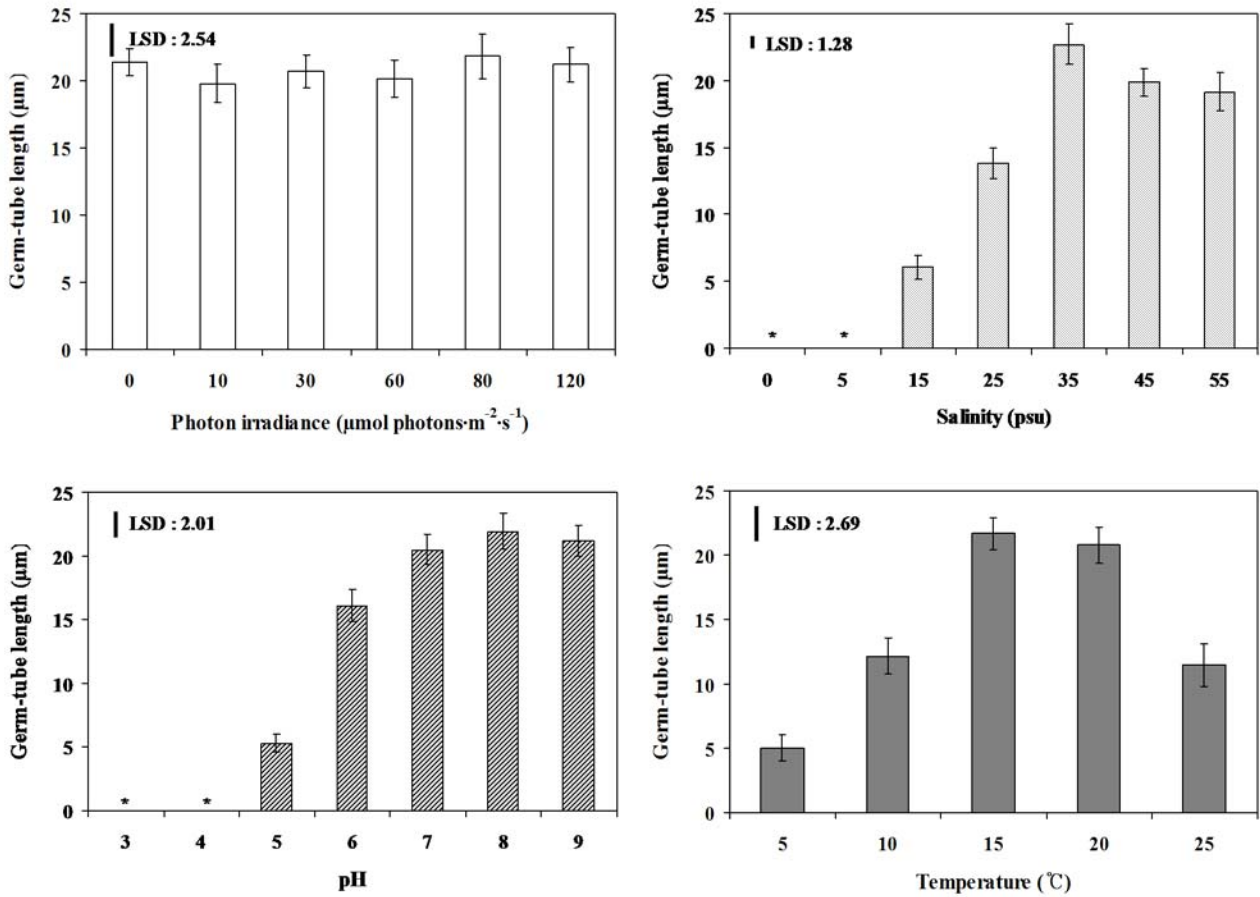


그림 27. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 참다시마 포자의 발아관 길이

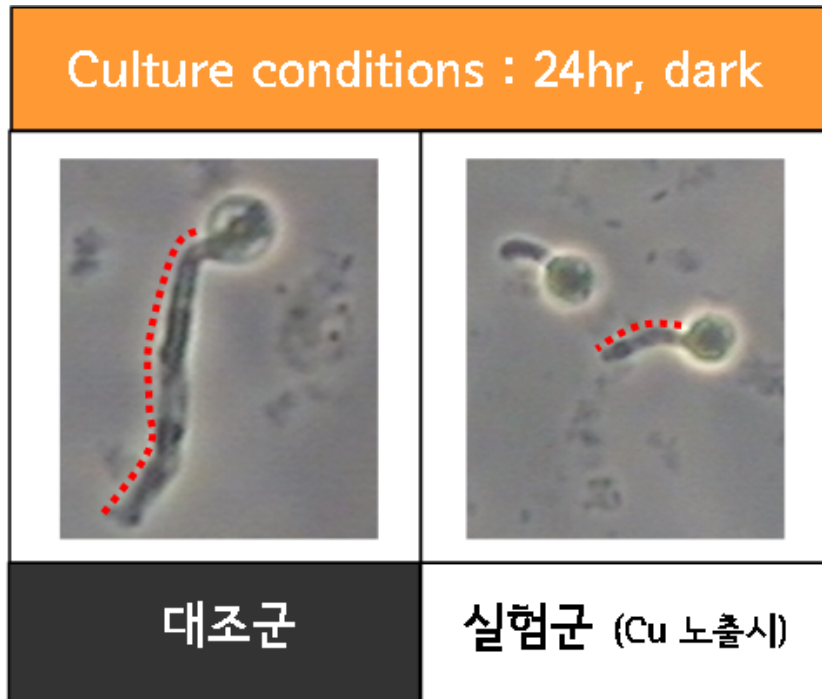


그림 28. 발아관 길이 측정

(6) 자료분석

가) 자료정리

; 발아관 길이는 대조군의 발아관 길이 생장에 대한 실험군의 발아관 길이 생장을 비교하여 나타내었다.

나) 통계처리

; 참다시마 포자를 이용한 독성시험의 측정값 (endpoints)은 발아 억제 효과에 기반을 두었다. 포자발아율에 대한 EC₅₀은 점예측기법 (point estimation techniques)을 써서 계산하였다. LOEC 및 NOEC값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였고, EC₅₀ 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다. 독성시험 결과는 EC₅₀ 값으로 표현할 경우, 값이 작을수록 독성도가 커지므로, 이런 문제를 보완하고자 독성값을 비교하기 위하여 독성단위 (Toxic Unit, TU)를 아래와 같이 계산하여 사용하였다.

$$TU = 100 / EC_{50} (\%)$$

(7) 대조군 차트

; 22회의 서로 다른 발아관 길이 측정 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다 (그림 29). 다시마의 평균 발아관 길이는 20.62 ± 0.70 μm로 나타났다.

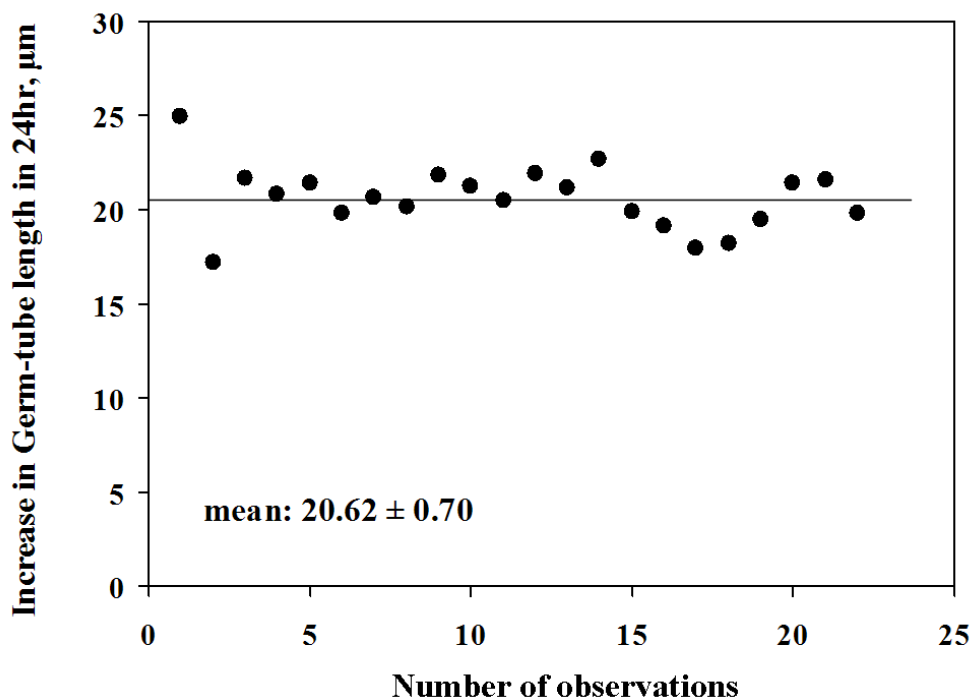


그림 29. 24시간 후 측정된 발아관 길이 대조군 차트

(8) 단일독성원에 대한 생태독성평가

가) 중금속 (heavy metals)

표준 금속류 8종을 여러 가지의 농도로 구배하여 참다시마 포자의 발아관 길이 생장을 이용하여 독성평가를 시행하였을 때, 모든 중금속에서 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 30).

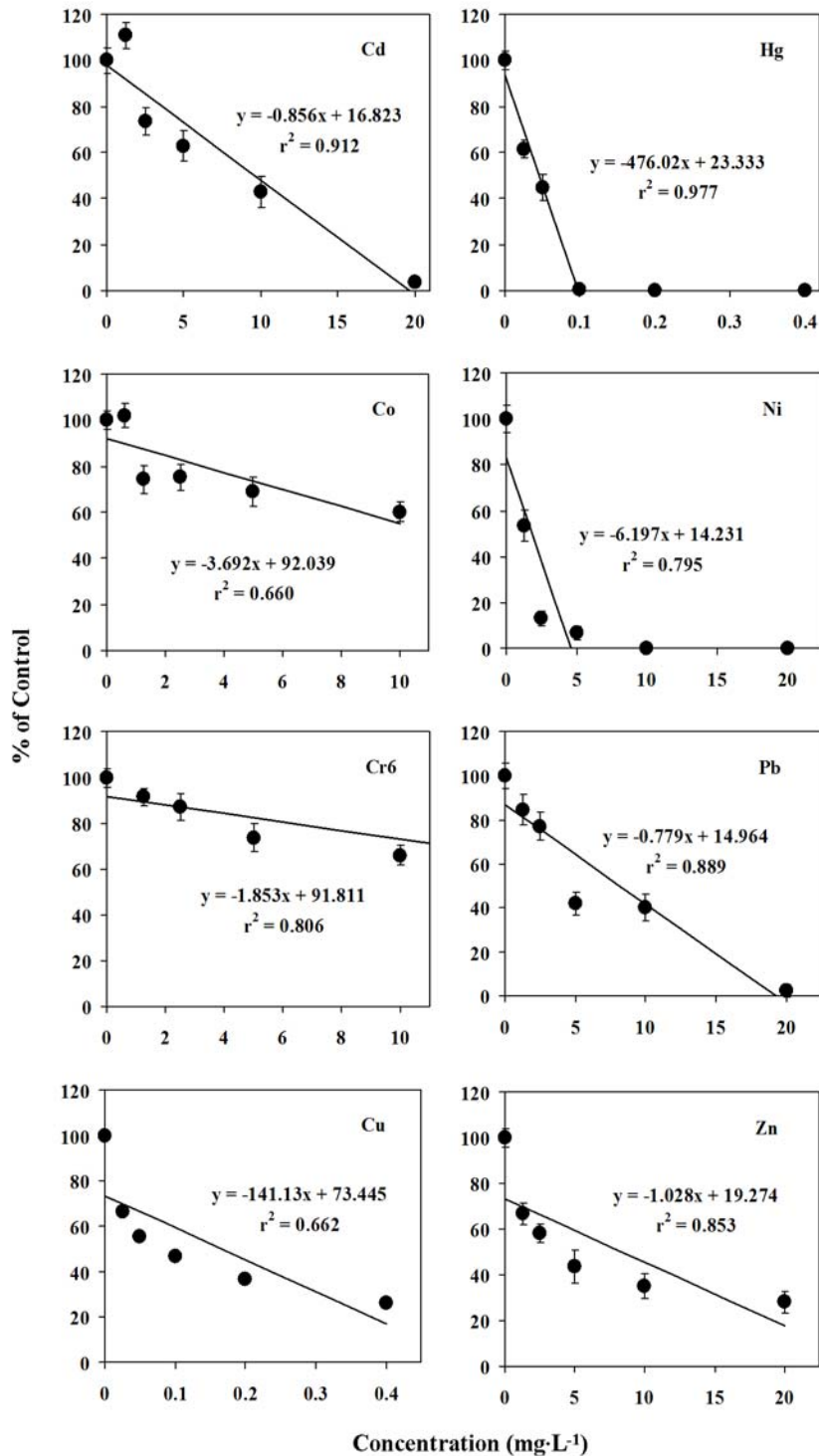


그림 30. 중금속 농도에 따른 참다시마 포자 발아관 길이 생장

표준 중금속과 포자 발아관 길이 생장의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 보았을 때, 포자발아율은 중금속 종류에 따라 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 평가되었다 (표 19).

표 19. 참다시마 포자 발아관 길이 생장을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과 (단위 mg/L)

Metals	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)
Cd (20 mg/L)	1.25	2.5	1.663 (1.601~1.787)	7.541 (6.545~8.994)	8.379
Co (10 mg/L)	0.625	1.25	0.865 (0.801~0.924)	> 10	
Cr6 (20 mg/L)	< 1.25	1.25	1.711 (0.923~2.884)	> 20	
Cu (0.4 mg/L)	< 0.025	0.025	0.008 (0.007~0.009)	0.081 (0.060~0.113)	16.792
Hg (0.4 mg/L)	< 0.025	0.025	0.0065 (0.0058~0.0073)	0.042 (0.037~0.051)	8.779
Ni (20 mg/L)	< 1.25	1.25	0.269 (0.235~0.335)	1.360 (1.173~1.568)	7.667
Pb (20 mg/L)	< 1.25	1.25	0.820 (0.550~1.680)	4.429 (4.069~4.785)	4.881
Zn (20 mg/L)	< 1.25	1.25	0.375 (0.327~0.432)	3.897 (3.314~5.547)	13.857

중금속 8종의 농도와 다시마 포자 발아관 길이 생장을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 카드뮴 (Cd)의 경우, 7.541 mg/L에서 발아관 길이 생장이 대조군에 비하여 약 50% 수준을 나타냈다. 구리 (Cu)의 경우, 0.081 mg/L에서 발아관 길이 생장이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 0.4 mg/L에서는 발아관의 길이 생장이 일어나지 않았다. 수은 (Hg) 노출군에서는 농도 0.042 mg/L에서 발아관 길이 생장이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 0.010 mg/L에서는 발아관의 길이 생장이 일어나지 않았다. 니켈 (Ni) 노출군에서는 농도 1.360 mg/L에서 발아관의 길이 생장 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 10 mg/L에서는 발아관의 길이 생장이 일어나지 않았다. 납 (Pb)에서는 4.429 mg/L에서 발아관의 길이 생장이 대조군의 약 50% 수준으로 감소하였고, 10 mg/L에서는 발아관의 길이 생장이 일어나지 않았다. 아연 (Zn) 0.078 mg/L에 노출된 포자는 대조군에 비하여 약 50% 수준에 해당하는 발아관 길이 생장을 나타냈다. 코발트 (Co)와 크롬 (Cr6)은 실험된 농도에서 각각 발아율 억제 현상을 관찰하지 못했으며, 더 높은 농도에서의 중금속 추가 실험이 요구된다.

EC₅₀값을 기준으로 한 중금속 민감성은 Hg > Cu > Ni > Pb > Zn > Cd 순으로 나타났다. 포자 발아관 길이생장을 종말점으로 중금속 생태독성 평가방법은 CV가 20%이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

나) 휘발성 유기화합물 (VOCs; Volatile Organic Compounds)

휘발성 유기화합물 (VOCs) 7종을 여러 가지의 농도로 구배하여 다시마의 포자 발아관 길이생장을 비교하였을 때, 포자 발아관 길이생장은 휘발성 유기화합물 (VOCs) 6종 모두와 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 31).

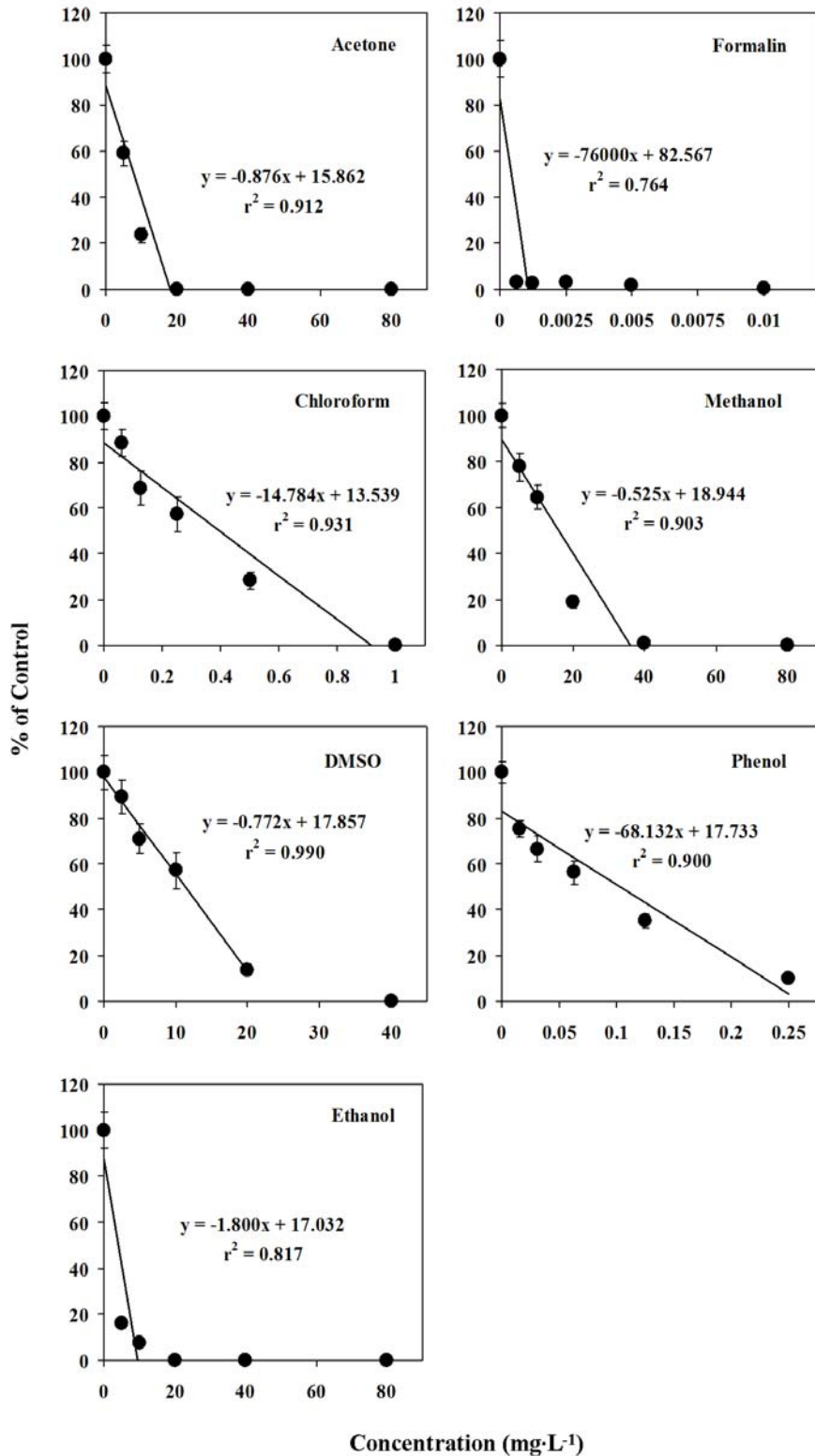


그림 31. 휘발성 유기화합물에 따른 참다시마 포자 발아관 길이 생장

휘발성 유기화합물 (VOCs) 7종의 농도와 참다시마 포자 발아관 길이생장을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 아세톤 (Acetone)에 노출된 경우 6.273 mL/L에서 발아관 길이 생장이 대조군의 약 50% 수준으로 감소하였으며, 20 mL/L에서는 발아관 길이생장이 일어나지 않았다. 클로로포름 (Chloroform)은 0.313 mL/L에서 발아관 길이생장이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났으며, 1.0 mL/L에서는 발아관 생장이 일어나지 않았다. 디메틸황산화물 (DMSO; Dimethyl sulfoxide)은 11.649 mL/L에서 발아관 생장이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났으며, 40 mL/L에서는 발아관 생장이 일어나지 않았다. 에틸알코올 (Ethyl alcohol) 처리군에서는 2.974 mL/L에서 대조군의 약 50%에 해당되는 발아관 생장을 나타냈으며, 20 mL/L에서는 발아관 생장이 일어나지 않았다. 포르말린 (Formaldehyde)에 노출된 경우 노출된 최저 농도 (625 μ L/L)에서 0에 가까운 발아관 길이 생장을 보였으며, 좀 더 낮은 농도에서의 추가 실험이 요구된다. 메틸알코올 (Methyl alcohol)에 노출된 경우, 13.161 mL/L에서 발아관 생장이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났으며, 40 mL/L에서는 발아관 생장 일어나지 않았다. 페놀 (Phenol)에 노출된 경우 0.081 mL/L에서 발아관 생장이 대조군의 약 50%수준으로 감소하였다.

휘발성 유기화합물 (VOCs) 7종과 발아관 길이생장의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 비교해 보았을 때, 휘발성 유기화합물 (VOCs) 종류에 따른 발아관 길이생장의 민감성은 Formaldehyde > Phenol > Chloroform > Ethyl alcohol > Acetone > DMSO > Methyl alcohol 순으로 나타났다 (표 20).

발아관 길이생장을 종말점으로 한 환경유해물질 생태독성 평가기법은 CV가 10%이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

표 20. 참다시마 포자 발아관 길이 생장을 이용한 휘발성 유기화합물들의 생태독성평가 결과(단위 mL/L)

VOCs	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)
Acetone (80 mL/L)	< 5	5	1.221 (1.067~1.452)	6.273 (5.527~6.905)	5.897
Chloroform (1 mL/L)	< 0.063	0.063	0.054 (0.035~0.081)	0.313 (0.252~0.362)	8.927
DMSO (40 mL/L)	2.5	5	2.341 (1.242~3.413)	11.649 (9.644~13.047)	7.529
Ethanol (80 mL/L)	< 5	5	0.595 (0.580~0.610)	2.974 (2.900~3.052)	1.432
Formalin (0.01 mL/L)	< 0.000625	0.000625	0.0001 (NA)	0.0003 (NA)	NA
Methanol (80 mL/L)	< 5	5	2.234 (1.702~3.254)	13.161 (12.042~14.019)	3.910
Phenol (0.25 mL/L)	< 0.016	0.016	0.006 (0.005~0.008)	0.081 (0.065~0.091)	8.394

다) 환경유해물질

환경유해물질 2종을 여러 가지의 농도로 구배하여 참다시마의 포자 발아관 길이 생장을 비교하였을 때, 포자 발아관 길이 생장은 환경유해물질 나트륨 도데실 황산염 (SDS; Sodium dodecyl sulfate)과 농도반비례적인 선형관계를 나타냈으나, 트리부틸주석 (TBT; Bis-tributyltin)은 실험된 최소농도 (0.0125 mL/L)에서 사멸함에 따라 EC₅₀ 산출이 불가하며 추가 시험이 요구된다 (그림 32).

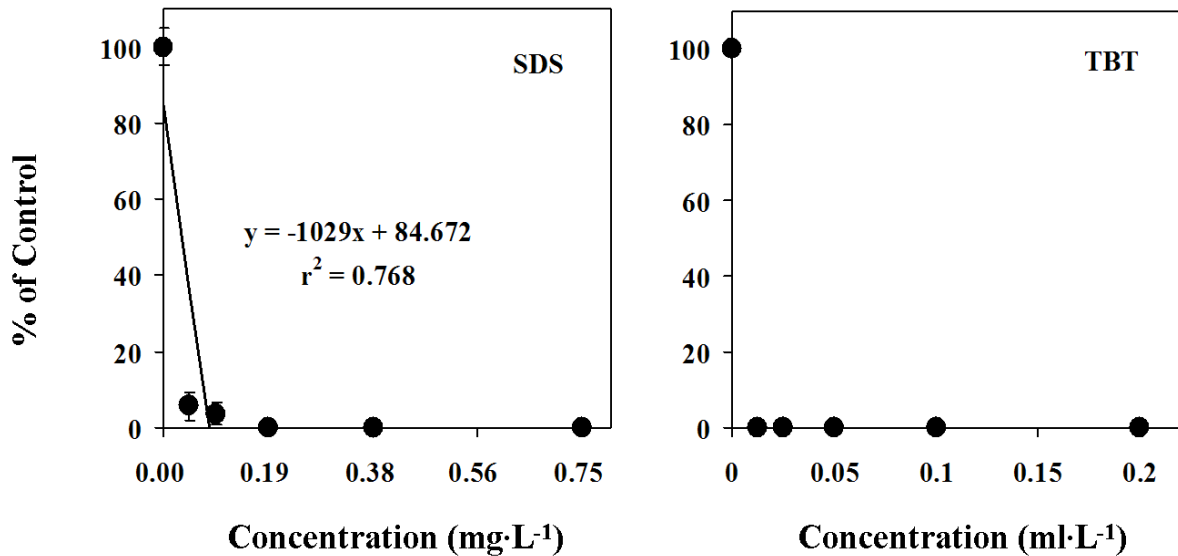


그림 32. 환경유해물질의 농도에 따른 참다시마 포자의 발아관 길이 생장

환경유해물질 나트륨 도데실 황산염 (SDS; Sodium dodecyl sulfate)은 0.0249 mL/L에서 포자발아율이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났으며, 표 21과 같이 평가되었다.

표 21. 참다시마 포자 발아관 길이 생장을 이용한 환경유해물질의 생태독성평가 결과 (단위 mL/L)

환경유해물질	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)
SDS (0.75 mg/L)	< 0.048375	0.048375	0.0050 (0.0048 ~ 0.0052)	0.0249 (0.0241 ~ 0.0260)	1.933
TBT (0.2 mL/L)	—	—	—	—	—

(9) 산업폐수의 생태독성평가

산업폐수 10 개 지점에서 채수한 시료 원수에 대한 포자 발아관 실험을 수행한 결과와 이 화학적 분석 결과는 그림 33과 표 22와 같다. 조사 지점 10 개 지역 중 6 지점에서 50% 이하의 낮은 포자 발아관 길이 성장을 보였으며, 특히 W16 지점에서는 포자 발아관 길이 생장이 일어나지 않는 것으로 보여 가장 오염도가 높은 지역으로 평가되었다.

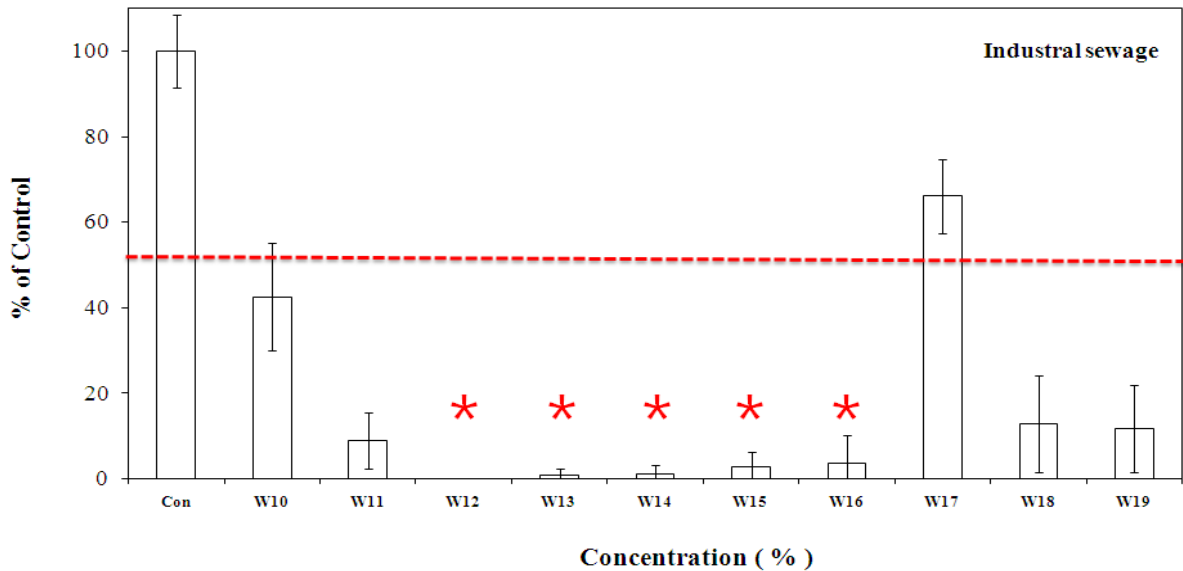


그림 33. 참다시마의 포자 발아관 길이 성장을 이용한 산업폐수 (6월) 수질 평가 예비 실험 결과

표 22. 6월 산업폐수의 지점별 이화학적 분석 결과

검사항목 채취지점	TN	TP	SS	CN	phenol	F	Cu	Pb	Cd	Cr	Cr6	Zn	Mn	Fe	As	Hg
W10	1.884	0.168	5.2	ND	ND	0.34	ND	ND	ND	ND	ND	0.056	0.010	0.134	ND	ND
W11	8.417	0.046	1.2	ND	ND	ND	0.034	ND	ND	ND	ND	0.114	0.009	0.339	ND	0.001
W12	78.608	0.051	13.0	0.750	ND	25.55	5.522	0.226	ND	0.019	ND	0.039	0.097	2879	ND	0.001
W13	53.089	0.143	4.8	2.000	ND	1.55	0.247	ND	ND	0.039	ND	0.020	0.106	0.656	ND	0.002
W14	4.911	0.053	9.8	ND	ND	ND	0.011	ND	ND	0.133	ND	0.019	0.061	0.235	ND	ND
W15	12.338	1.409	2.0	0.360	ND	ND	0.700	ND	ND	0.033	ND	0.011	0.110	2.253	ND	0.001
W16	130.202	48.780	388.0	ND	ND	0.34	1.739	0.119	ND	0.101	ND	2.068	0.739	25.822	ND	0.001
W17	7.997	ND	1.2	ND	ND	2.290	ND	ND	ND	0.035	ND	ND	0.217	0.096	ND	ND
W18	10.777	0.060	15.0	13.290	12.377	ND	0.013	ND	ND	ND	ND	0.388	0.046	0.727	ND	ND
W19	45.780	0.315	8.8	ND	ND	0.21	1.018	ND	ND	0.111	ND	0.480	0.077	2.176	ND	ND

다시마 포자 발아관 길이 생장이 대조군 대비 50% 이하의 산업폐수에 대해 반수 희석법으로 정밀 실험을 한 결과 9 지점 중 7 지점에서 농도 반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 34).

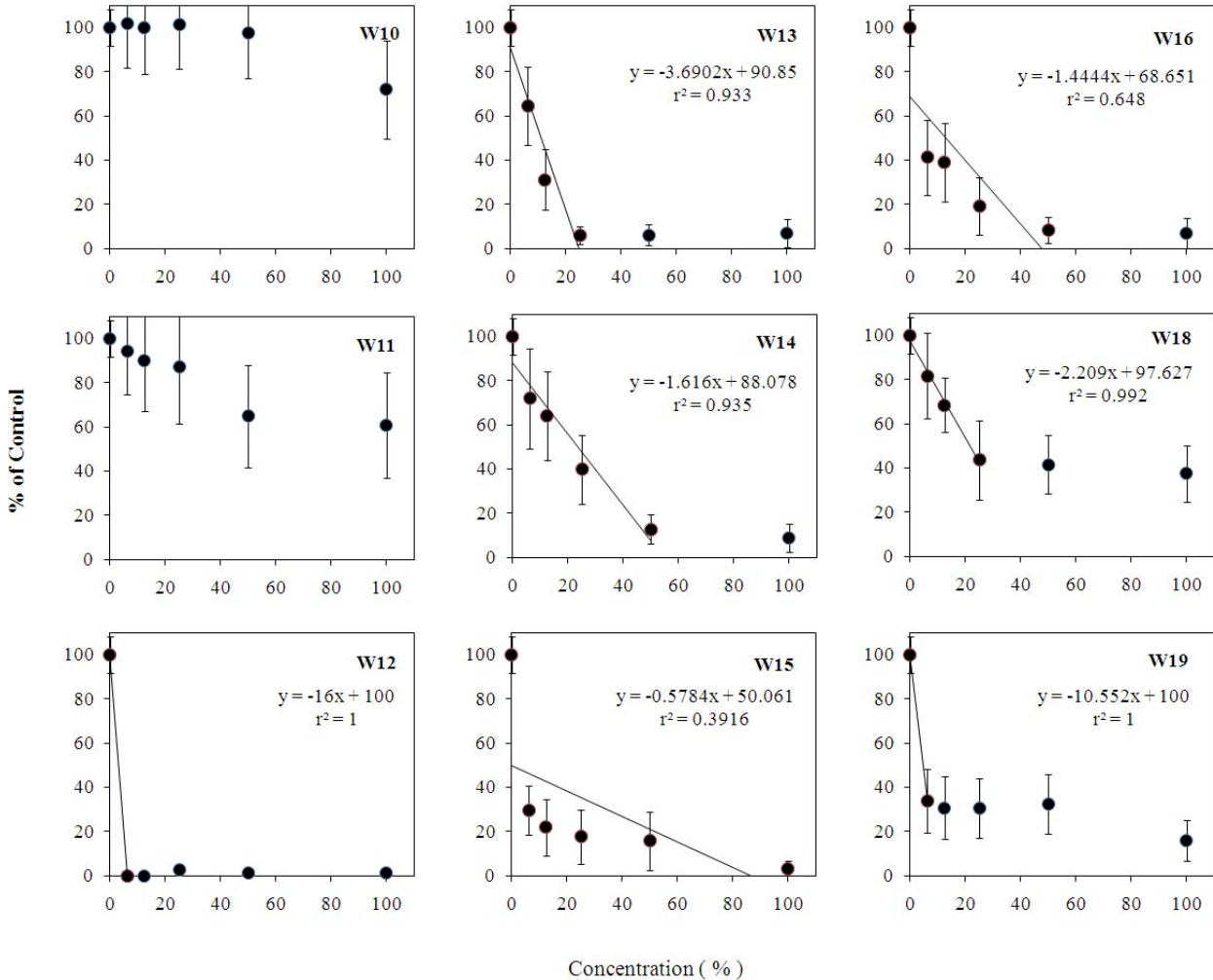


그림 34. 산업폐수 농도에 따른 참다시마 포자 발아관 길이 성장

산업폐수와 포자 발아관 길이 생장의 관계로부터 얻은 TU값을 통해, W12 지점이 평균 TU값 31.65로 오염 정도가 가장 심하였으며, W15 지점 (TU 22.46)과 W19 지점 (TU 21.11) 순으로 오염 정도가 평가되었다(표 23). W12 지점의 이화학적 분석결과를 살펴보면, 다른 지점과 비교해 볼 때 가장 높은 수준의 TN, TP, SS를 함유하였으며, 중금속의 경우 아연 (2.068 mg/L)과 구리 (1.739 mg/L)가 높은 수준으로 검출되었다. W12 지점 속의 여러 오염원 중에서 포자 발아관 길이 성장저해에 직접적인 영향을 주었을 것으로 예상되는 것은 구리로, 50%의 저해율을 보이는 농도인 3.16%의 원수 속에 구리가 0.174mg/L 있는 것으로 산출되었으며 이는 구리의 EC₅₀ 값 0.081mg/L 보다 더 많이 함유하고 있는 것을 통해 판단된다. 포자 발아율을 이용하여 수행한 W16 지점의 결과와 포자 발아관 길이 생장을 이용하여 얻은 결과를 비교하였을 때, 포자 발아율은 약간의 수치가 있지만 포자 발아관 길이 생장은 아

예 일어나지 않은 것으로 미루어 같은 중금속에 노출되었을 때 발아율 보다 발아관 길이 생장이 좀 더 민감하게 반응하는 것으로 사료된다. 이는 포자 발아관 길이 생장저해에 두 개의 중금속이 영향을 준 것으로 판단되며, 구리와 아연이 해당한다. 원수 5.331% 속에 구리는 0.093 mg/L, 아연은 0.110 mg/L 함유한 것으로 각각의 EC₅₀ 값보다 크게 산출되었다. 또한 W18 지점은 페놀의 영향 뿐 아니라 아연의 영향으로 발아율을 이용한 독성평가에서 보다 더 큰 저해를 받았을 것으로 생각된다. 발아율을 이용하여 수행한 결과와 발아관 길이를 이용하여 수행한 결과를 비교하면 각각 EC₅₀ 값이 64.063%, 21.824%로 발아관 길이를 이용한 것이 더 민감한 것으로 판단된다. 반면 TU 값을 통해서 W15 지점과 W19지점이 독성이 높은 것으로 나타났으나 단일독성테스트를 수행한 중금속의 저해 농도보다 낮은 농도로 산출되었다. 이는 서로 다른 독성원이 복합적으로 작용한 결과일 수도 있으며, 수행하지 않은 다른 독성원의 영향일 가능성도 있다고 사료된다.

표 23. 참다시마의 포자 발아관 길이 생장을 이용한 산업폐수의 생태독성평가 결과 (단위 %)

채취지점	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	TU
W10	100	> 100	63.002 (-)	> 100	-	< 1
W11	50	100	12.650 (3.346~34.982)	> 100	-	< 1
W12	< 6.25	6.25	0.632 (0.628~0.638)	3.160 (3.140~3.190)	0.411	31.646
W13	< 6.25	6.25	1.764 (1.234~3.524)	8.983 (6.171~11.549)	13.637	11.132
W14	6.25	12.5	2.230 (1.422~6.652)	19.800 (11.689~28.691)	21.616	5.051
W15	< 6.25	6.25	0.891 (0.790~1.068)	4.452 (3.949~5.340)	8.356	22.462
W16	< 6.25	6.25	1.066 (0.896~1.575)	5.331 (4.482~13.543)	37.685	18.758
W18	6.25	12.5	3.415 (1.717~8.352)	21.824 (16.410~55.602)	45.574	4.582
W19	< 6.25	6.25	0.948 (0.848~1.237)	4.738 (4.242~6.185)	13.402	21.106

(10) 하천수와 산업폐수의 생태독성평가

인천 관내 지방 2급 하수종말처리장과 산업폐수에서 채수한 시료를 가지고 생물학적 독성을 비교 평가하였다. 하수종말처리장의 유입수와 방류수를 배양액으로 사용하여 참다시마의 포자발아율과 물벼룩 생존율을 관찰 한 결과 다시마 포자발아율의 경우 모든 조건에서 대조군과 동일한 100% 포자발아율을 보였으나, 물벼룩 생존율 관찰 결과는 1번 방류수를 제외한 모든 조건에서 대조군과 동일한 100% 생존율을 보였다 (그림 35).

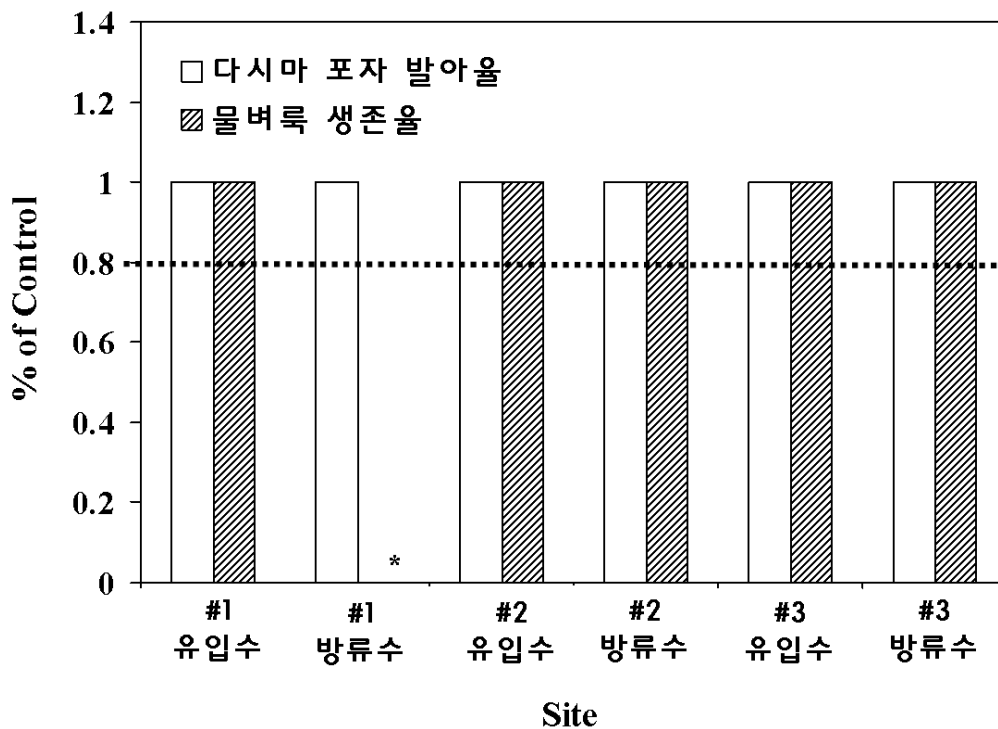


그림 35. 다시마의 발아관 길이 생장을 이용한 하천수질 평가 예비 실험 결과

1번 지점의 방류수는 종말처리시설에서 방류전 염소 소독이 이루어진 관계로 염소를 함유하고 있었으며, 이로 인하여 담수산 생물인 물벼룩은 전원 사멸한 반면 해산종인 다시마는 100%의 생존율을 유지한 것으로 판단된다. 따라서, 염소함유 수체에서는 염소에 대한 내성결여로 타 독성원에 대한 진단기능을 발휘하지 못하는 물벼룩기법에 비하여 다시마 평가법은 염소 소독제에 반응하지 않고 정확한 수질 건강성을 판정해 내는 것을 확인 할 수 있었다.

산업폐수의 유입수와 방류수를 배양액으로 사용하여 다시마 기법과 파래 기법 (ISO) 그리고 미세조류 기법 (ISO)의 생물독성 평가 결과를 비교하였다. 발아관 길이 생장이 대조군 대비 80% 미만의 산업폐수에 대해 반수 희석법으로 정밀 실험을 한 결과 시료의 농도와 발아관 길이 생장 사이에 모두 r^2 값이 0.8 이상을 기록하는 역회귀관계를 나타내었다 (그림 36). 다시마와 파래 기법은 공통적으로 고염에 반응하지 않았고, 파래기법은 유입수와 방류수 사이에 독성차이를 보이지 않는 것으로 결과를 산출했으나 다시마 발아관 길이를 사용한 평가에서는 유입수에서의 독성이 높은 것으로 나타났다 (표 24).

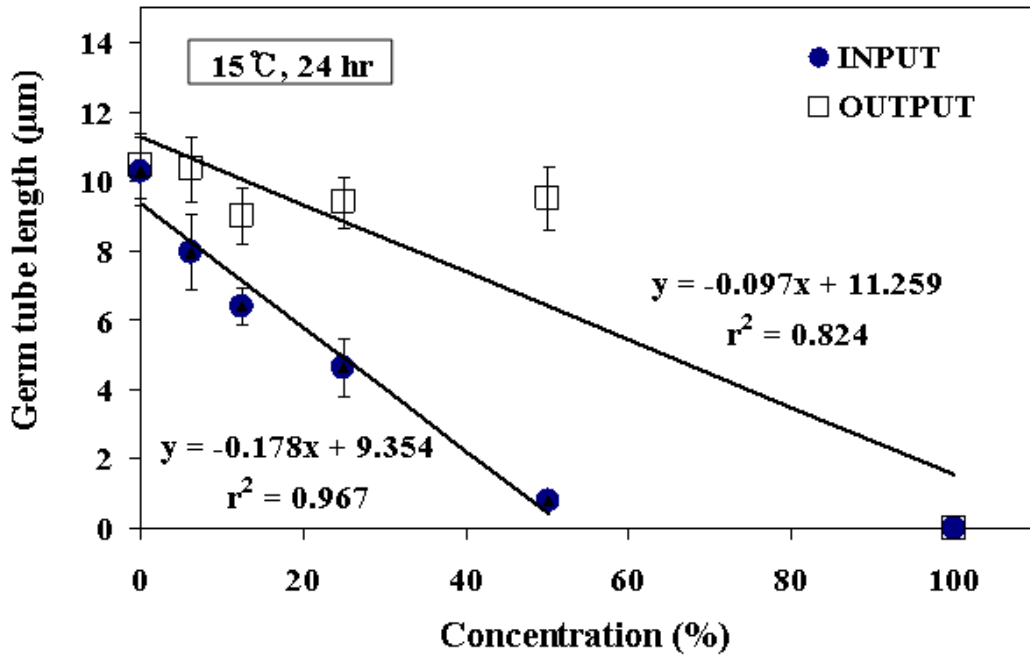


그림 36. 다시마의 발아관 길이 생장을 이용한 하천수질 평가 예비 실험 결과

표 24. 참다시마의 발아관 길이 생장과 미세조류 성장 및 파래의 생식률을 이용한 산업폐수의 생태독성평가 결과 (단위 %)

종류	시험생물 (종말점)	Salinity (psu)	pH	NOEC	LOEC	EC ₅₀	Min	Max	CV (%)	TU
유입수	다시마 (발아관 길이생장)	40	7.56	<6.25	6.25	21.24	15.78	26.17	12.06	4.71
	미세조류 (생장)	40	7.56	<6.25	6.25	18.11	1.48	34.66	24.14	5.52
	파래 (생식율)	40	7.56	25	50	73.40	59.11	75.96	4.57	1.36
방류수	다시마 (발아관 길이생장)	32	7.77	50	100	71.94	67.63	74.41	2.56	1.39
	미세조류 (생장)	32	7.77	6.25	12.5	77.44	5.36	57.91	6.92	1.29
	파래 (생식율)	32	7.77	25	50	75.00	63.47	75.00	2.45	1.33

반면, 미세조류 성장저해 평가결과 72시간째 세포밀도가 모든 농도에서 대조구보다 낮으므로 미세조류의 성장에 저해가 되는 물질을 포함하고 있는 것으로 판단되었으나, 유입수에서 염분이 40 psu로 담수종이 살기에 높은 염분도를 나타내어 실질적으로 독성원에 의한 영향인지 판단하기 어렵다. 그리고 방류수에서는 6.25%에서 다른 농도보다 높은 세포밀도를 나타내지만 이 역시 대조구보다 낮은 수치이므로 성장에 저해가 되는 물질을 포함하고 있거나 방류수가 포함한 염분 (32 psu) 때문인지 알기 어렵다. 따라서, 다시마 발아관 길이 측정기법이 두 종의 ISO 인증기법(파래기법과 미세조류기법)에 비하여 분별성이 보다 높은 것으로 판단되나 이후 더 많은 연구를 통한 확인 작업이 필요하다고 사료된다. 발아관 길이 생장을 종말점으로 한 산업폐수 생태독성 평가기법은 CV가 13%이하로 매우 안정된 진단기법임을 시사했다.

라. 참다시마(*Saccharina japonica*) 배우체 성장 평가법(15℃, 144시간)

항목	시험조건
측정요소	다시마 배우체 면적 성장 (EC ₅₀)
시험생물	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)
시험기간	144 h
온도	15 ± 1℃
염분	25~35 psu
광종류	백색형광등
광도	500~4000 lux (10~80 μmol m ⁻² s ⁻¹)
광주기	12 h 명기, 12 h 암기
시험용기	24구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음
시험용액 부피	2.5 mL/replicate
시험생물 크기	지름 25 μm
반복구당 시험생물 수	1 x 10 ⁶
시험농도	대조구 + 최소 5 개 농도 구간
반복수	4개
측정요소	총 면적 상대성장률
시험적합도	대조구에서의 배우체 성장률은 46.62 ± 2.16 μm ²
공기주입	주입하지 않음

(1) 시험 중

시험 중으로 Laminariales (다시마 목), Laminariaceae (다시마 과), *Saccharina* (다시마 속), *Saccharina japonica* (참다시마 종)를 사용하였다.

(2) 평가방법

가) 평가 기간

; 시험개시 후 144시간

나) 시험농도

; 대조군, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100%

다) 시험용액제조

① 시험용액은 OTT's (1965) 인공해수를 사용하였다.

② 시험용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 준비하였다.

(3) 배양방법

가) 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척하였다.

나) 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관하였다.

다) 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도하였다.

라) 유도된 포자액을 20 mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 주었다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼았고, 항온배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양하였다.

마) 포자가 부착된 커버글라스를 24구 웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣었다.

바) 배양 온도, 광선, 광주기 조건은 각각 15°C , $30\sim 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량, 12:12-h 명암주기로 하였다.

(4) 최적 환경조건 확립

; 배우체 성장 유도를 위한 최적 환경 조건을 알아보기 위하여 다양한 광조사량, pH, 염분 및 온도하에서 24시간 배양연구를 수행하였다 (그림 37). 그 결과, 배우체 성장을 위한 최적 광조사량은 $10\sim 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH는 6~8, 염분은 35~55 psu 그리고 온도는 $10\sim 15^\circ\text{C}$ 로 나타났다.

(5) 측정방법

; 광학현미경 상에서 배우체 30개체를 대상으로 배양 직전의 초기치 면적을 측정된 뒤 144시간 배양 후 면적을 측정하여 상대성장률로 계산하였다. 모든 과정은 영상분석장치 (Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 배우체를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어졌다.

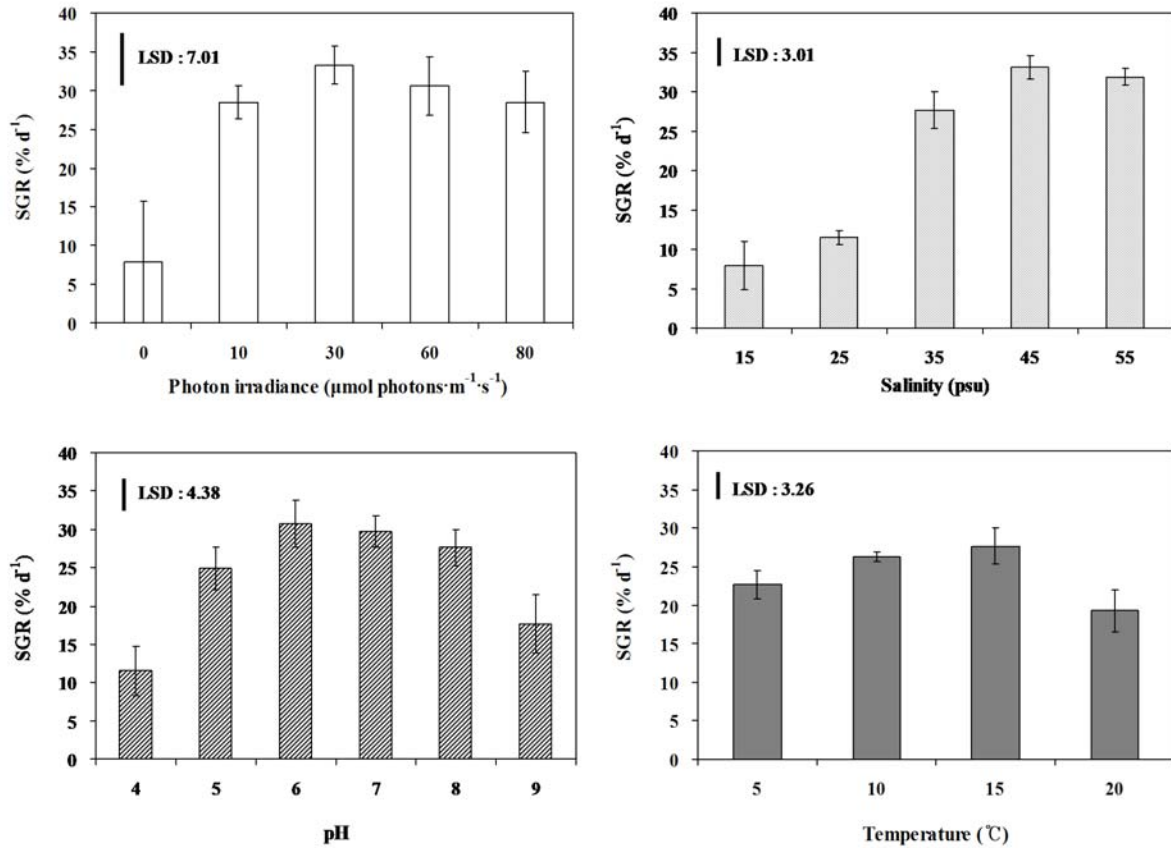


그림 37. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 참다시마 배우체 성장률

(6) 자료분석

가) 자료정리

; 배우체 성장률은 대조군의 배우체 성장률에 대한 실험군의 배우체 성장률을 비교하여 나타내었다.

나) 통계처리

; 참다시마 배우체 성장을 이용한 독성시험의 측정값 (endpoints)은 성장 억제 효과에 기반을 두었다. 배우체 성장에 대한 EC₅₀은 점예측기법 (point estimation techniques)을 써서 계산하였다. LOEC 및 NOEC값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였고, EC₅₀ 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다. 독성시험 결과는 EC₅₀ 값으로 표현할 경우, 값이 작을수록 독성도가 커지므로, 이런 문제를 보완하고자 독성값을 비교하기 위하여 독성단위 (Toxic Unit, TU)를 아래와 같이 계산하여 사용하였다.

$$TU = 100 / EC_{50} (\%)$$

(7) 대조군 차트

; 17회의 서로 다른 배우체 성장 측정 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다 (그림 38). 다시마의 평균 배우체 성장률은 $46.62 \pm 2.16 \mu m^2$ 로 나타났다.

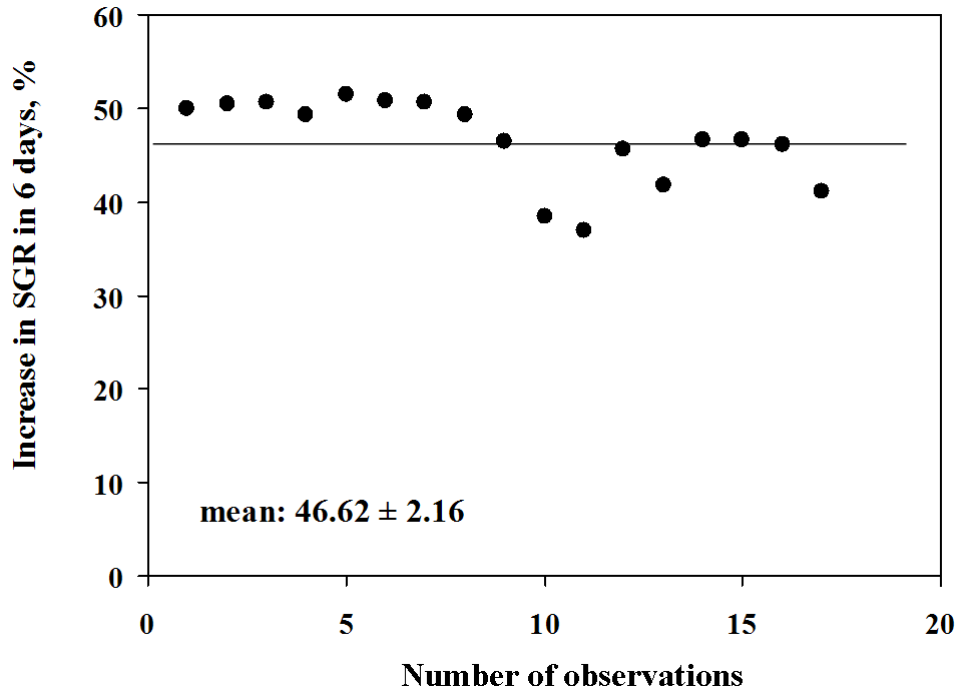


그림 38. 144시간 후 측정된 배우체 성장률 대조군 차트

(9) 단일독성원에 대한 생태독성평가

가) 중금속 (heavy metals)

표준 중금속 8종을 여러 가지의 농도로 구배하여 참다시마 배우체의 상대성장률을 이용하여 독성평가 하였을 때, 모든 중금속에서 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 39).

표준 중금속과 배우체 상대성장률의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 보았을 때, 배우체 상대성장률은 중금속 종류에 따라 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 평가되었다 (표 25).

중금속 8종의 농도와 다시마 배우체 상대성장률을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 카드뮴 (Cd)의 경우, 5.281 mg/L에서 상대성장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준을 나타냈다. 코발트 (Co) 노출군에서는 농도 0.132 mg/L에서 상대성장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준을 나타냈다. 6가 크롬 (Cr)의 경우, 4.577 mg/L에서 상대성장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 구리 (Cu) 0.251 mg/L에 노출된 배우체 상대성장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났다. 수은 (Hg) 노출군에서는 농도 0.087 mg/L에서 상대성장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 0.2 mg/L에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다. 니켈 (Ni)에서는 2.930 mg/L에서 배우체의 상대성장률이 대조군의 약 50% 수준으로 감소하였다. 납 (Pb)과 아연 (Zn)에서는 각각 10 mg/L 이상과 6.149 mg/L에서 상대성장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으나, 수행된 농도 이상의 범위에서 재실험이 요구된다. 니켈 (Ni)에서는 2.930 mg/L에서 배우체의 상대성장률이 대조군의 약 50% 수준으로 감소하였다.

EC₅₀값을 기준으로 한 중금속 민감성은 Hg > Co > Cu > Ni > Cr6 > Cd > Zn > Pb순으로 나타났다. 배우체 상대성장률을 종말점으로 중금속 생태독성 평가기법은 CV가 20%이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

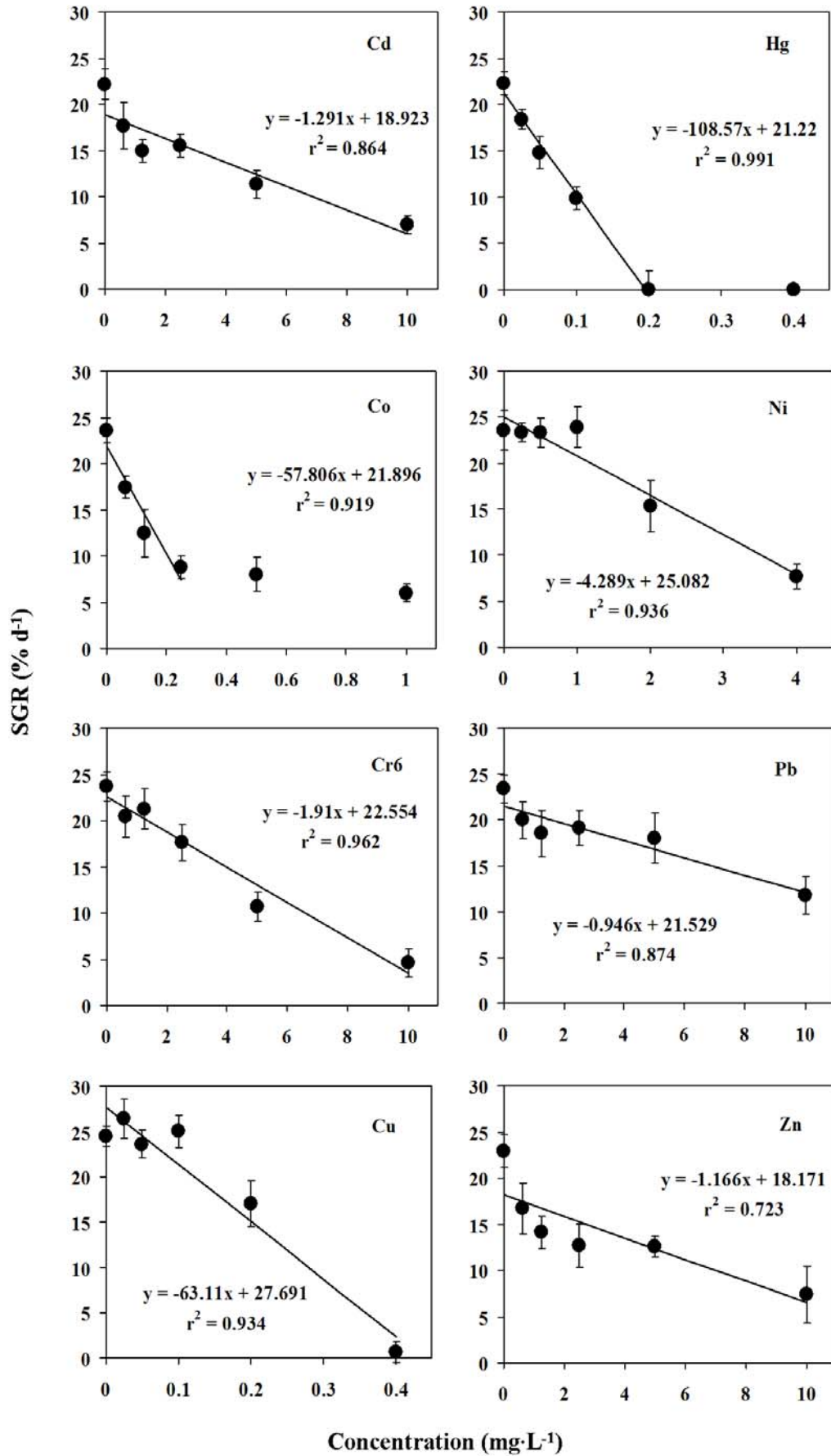


그림 39. 중금속 농도에 따른 참다시마 배우체 상대성장률

표 25. 참다시마 배우체 상대생장률을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과 (단위 mg/L)

Metals	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)
Cd (10 mg/L)	< 0.625	0.625	0.310 (0.190~0.700)	5.281 (4.378~6.803)	12.742
Co (1 mg/L)	< 0.0625	0.0625	0.024 (0.019~0.030)	0.132 (0.109~0.152)	8.927
Cr6 (10 mg/L)	< 0.625	0.625	0.515 (0.300~1.858)	4.577 (4.126~5.228)	6.167
Cu (0.4 mg/L)	0.1	0.2	0.120 (0.089~0.134)	0.251 (0.226~0.267)	4.078
Hg (0.4 mg/L)	< 0.025	0.025	0.014 (0.011~0.022)	0.087 (0.074~0.101)	7.431
Ni (4 mg/L)	1	2	1.283 (0.375~1.394)	2.930 (2.097~3.153)	8.818
Pb (10 mg/L)	0.625	1.25	0.433 (0.279~1.157)	> 10	
Zn (10 mg/L)	< 0.625	0.625	0.232 (0.162~0.477)	6.149	

나) 휘발성 유기화합물 (VOCs; Volatile Organic Compounds)

휘발성 유기화합물 (VOCs) 7종을 여러 가지의 농도로 구배하여 참다시마의 배우체 상대생장률을 비교하였을 때, 배우체 상대생장률은 휘발성 유기화합물 (VOCs) 7종과 모두 농도에 반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 40).

휘발성 유기화합물 (VOCs) 7종의 농도와 참다시마 배우체 상대생장률을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 아세톤 (Acetone)에 노출된 경우 6.711 mL/L에서 상대생장률이 대조군의 약 50% 수준으로 감소하였으며, 10 mL/L에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다. 클로로포름 (Chloroform)은 0.694 mL/L에서 상대생장률이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났다. 디메틸황산화물 (DMSO; Dimethyl sulfoxide)은 20.350 mL/L에서 상대생장률이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났으며, 40 mL/L에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다. 포르말린 (Formaldehyde)에 노출된 경우, 0.0009 mL/L에서 상대생장률이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났으며, 0.0025 mL/L에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다. 페놀 (Phenol)에 노출된 경우 0.035 mL/L에서 상대생장률이 대조군의 약 50%수준으로 감소하였으며, 0.25 mL/L에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다. 에틸알코올 (Ethyl alcohol)과 메틸알코올 (Methyl alcohol) 처리군에서는 수행된 농도범위에서 배우체가 모두 사멸하여 저농도 범위에서의 재실험이 요구된다.

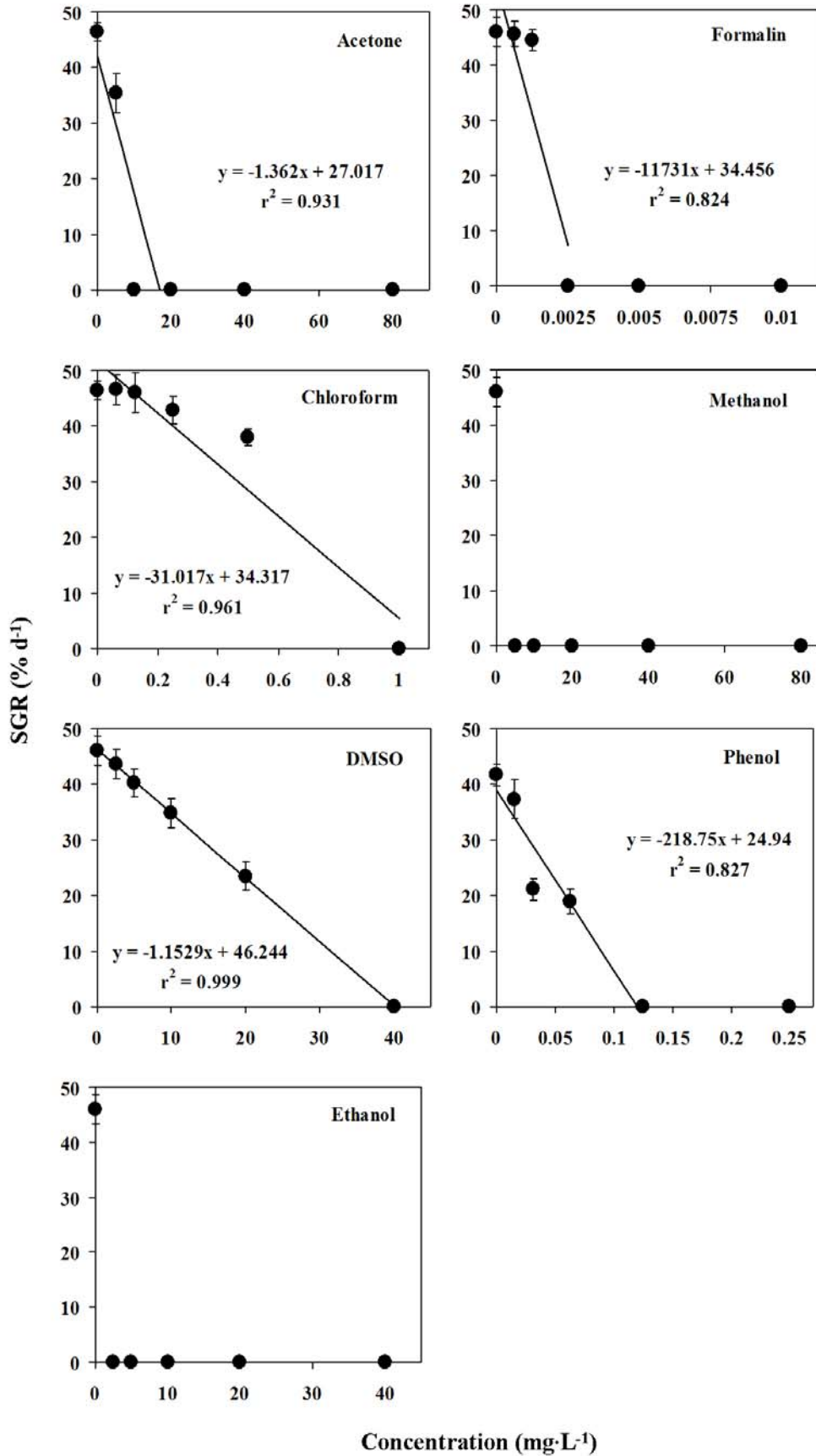


그림 40. 휘발성 유기화합물에 따른 참다시마 배우체 상대성장률

휘발성 유기화합물 (VOCs) 7종과 배우체 상대생장률의 관계로부터 얻은 EC₅₀ 값을 기준으로 비교해 보았을 때, 휘발성 유기화합물 (VOCs)과 환경유해물질 종류에 따른 배우체 상대생장률은 다음 표 26과 같이 평가되었다.

참다시마 배우체 상대생장률을 종말점으로 한 환경유해물질 생태독성 평가기법은 CV가 30%이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

표 26. 참다시마 배우체 상대생장률을 이용한 휘발성 유기화합물의 생태독성평가 결과 (단위 mL/L)

VOCs	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)
Acetone (80 mL/L)	< 5	5	2.084 (1.584~3.061)	6.711 (6.347~7.012)	2.713
Chloroform (1 mL/L)	0.25	0.5	0.301 (0.194~0.368)	0.694 (0.677~0.706)	1.091
DMSO (40 mL/L)	2.5	5	4.108 (2.094~6.402)	20.350 (18.203~22.721)	5.727
Ethanol (40 mL/L)	NA	—	—	—	—
Formalin (0.01 mL/L)	0.000625	0.00125	0.00067 (0.00063~0.00068)	0.00092 (0.00090~0.00093)	0
Methanol (80 mL/L)	NA	—	—	—	—
Phenol (0.25 mL/L)	< 0.016	0.016	0.020 (0.016~0.022)	0.035 (0.030~0.063)	25.162

다) 환경유해물질

환경유해물질 2종을 여러 가지의 농도로 구배하여 참다시마의 배우체 생장률을 비교하였을 때, 배우체 상대생장률은 환경유해물질 나트륨 도데실 황산염 (SDS; Sodium dodecyl sulfate)은 수행된 농도 범위에서 대조군 대비 50% 미만의 억제 결과를 보인 반면, 트리부틸주석 (TBT; Bis-tributyltin)에서는 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 41).

환경유해물질 트리부틸주석 (TBT; Bis-tributyltin) 처리군에서는 0.0007 mL/L에서 대조군의 약 50%에 해당되는 상대생장률을 나타냈으며, 0.00125 mL/L에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다 (표 27).

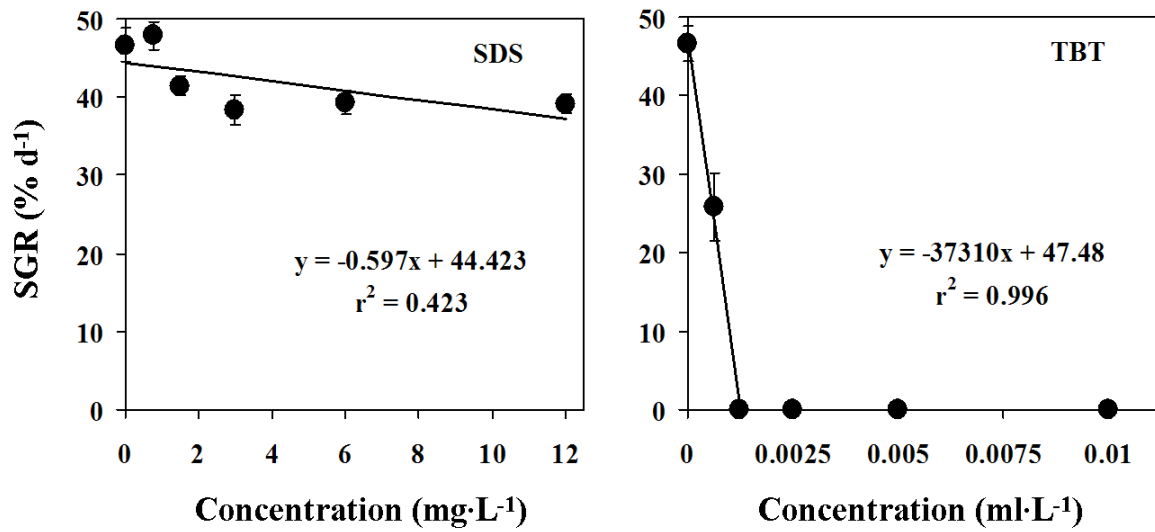


그림 41. 환경유해물질의 농도에 따른 참다시마 배우체 상대성장률

표 27. 참다시마 배우체 상대성장률을 이용한 환경유해물질의 생태독성평가 결과 (단위 mg/L)

환경유해물질	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV(%)
SDS (12 mg/L)	1.5	3	—	—	—
TBT (0.01 mL/L)	< 0.000625	0.000625	0.00014 (0.00012~0.00017)	0.0007 (0.0006~0.0008)	6.792

(10) 산업폐수의 생태독성평가

산업폐수 10개 지점에서 채수한 시료 원수에 대한 참다시마 배우체의 상대성장률 실험을 수행한 결과와 이화학적 분석 결과는 그림 42와 표 28와 같다. 조사 지점 10 개 지역 중 7 지점이 50% 이하의 낮은 배우체 성장률을 보였으며, 특히 W12,13 지점과 W15,16 지점에서는 배우체생장이 일어나지 않는 것으로 보여 가장 오염도가 높은 지역으로 평가되었다.

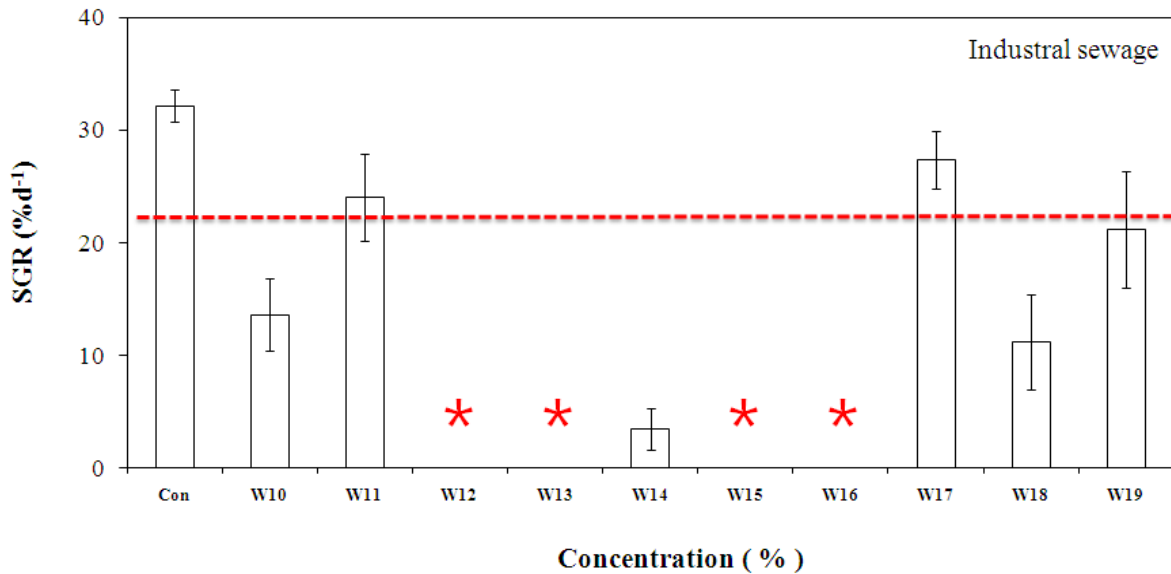


그림 42. 참다시마의 배우체 상대성장률을 이용한 산업폐수 수질 평가 예비 실험 결과

표 28. 6월 산업폐수의 지점별 이화학적 분석 결과

조사항목 채취지점	TN	TP	SS	CN	phenol	F	Cu	Pb	Cd	Cr	Cr6	Zn	Mn	Fe	As	Hg
W10	1.884	0.168	5.2	ND	ND	0.34	ND	ND	ND	ND	ND	0.056	0.010	0.134	ND	ND
W11	8.417	0.046	1.2	ND	ND	ND	0.034	ND	ND	ND	ND	0.114	0.009	0.339	ND	0.001
W12	78.608	0.051	13.0	0.750	ND	25.55	5.522	0.226	ND	0.019	ND	0.039	0.097	2879	ND	0.001
W13	53.089	0.143	4.8	2.000	ND	1.55	0.247	ND	ND	0.039	ND	0.020	0.106	0.656	ND	0.002
W14	4.911	0.053	9.8	ND	ND	ND	0.011	ND	ND	0.133	ND	0.019	0.061	0.235	ND	ND
W15	12.338	1.409	2.0	0.360	ND	ND	0.700	ND	ND	0.033	ND	0.011	0.110	2.253	ND	0.001
W16	130.202	48.780	588.0	ND	ND	0.34	1.739	0.119	ND	0.101	ND	2.068	0.739	25.822	ND	0.001
W17	7.997	ND	1.2	ND	ND	2.290	ND	ND	ND	0.035	ND	ND	0.217	0.096	ND	ND
W18	10.777	0.060	15.0	13.290	12.377	ND	0.013	ND	ND	ND	ND	0.388	0.046	0.727	ND	ND
W19	45.780	0.315	8.8	ND	ND	0.21	1.018	ND	ND	0.111	ND	0.480	0.077	2.176	ND	ND

산업폐수 시료 원수에 대한 참다시마 배우체 상대성장률 실험에서 대조군 대비 50% 미만의 성장을 나타내는 7 지점을 대상으로 반수 희석, 배우체 상대성장률을 이용하여 독성 평가를 시행하였을 때, 5 지점에서 농도 반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 43).

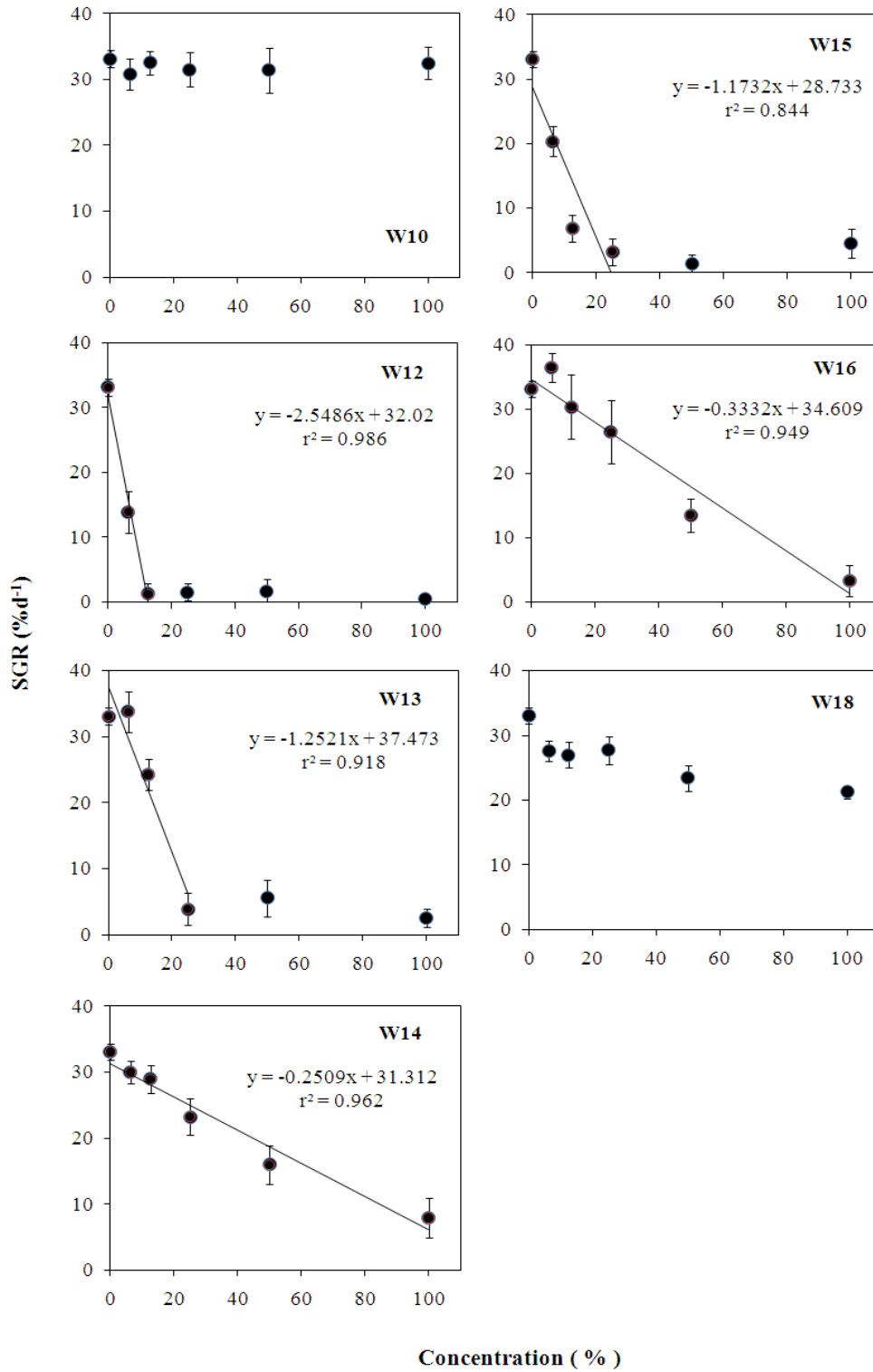


그림 43. 산업폐수 농도에 따른 참다시마 배우체 상대성장률

7지점의 산업폐수 농도와 참다시마 배우체 상대생장률을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 5 지점에서 r^2 값이 0.8 이상을 기록하는 역회귀관계를 나타내었다. 산업폐수와 배우체 상대생장률의 관계로부터 얻은 TU값을 보면, W12 지점과 W15 지점의 시료에서는 평균 TU값이 18.55와 12.48로 매우 오염된 지역으로 평가되었다 (표 29).

6차 산업폐수의 이화학적 분석 결과와 W12 지점의 EC_{50} 의 관계를 보고 계산한 결과, 5.392%의 원수 속에 구리가 0.298 mg/L 들어 있음을 알아내었고 이는 참다시마 배우체 상대생장률 단일독성원 테스트 결과에서 산출된 구리의 EC_{50} 값인 0.251 mg/L 보다 높은 수치임을 알 수 있다. 반면 다른 중금속의 경우 EC_{50} 값 보다 작은 수치를 나타내므로 배우체 상대생장저해에 구리가 영향을 크게 준 것으로 생각된다. 또한 W16 지점은 42.409%의 원수 속에 구리가 0.737 mg/L 포함된 것으로 산출되었고 W12 지점과 마찬가지로 배우체 상대생장저해에 구리가 영향을 준 것으로 판단된다. W18 지점은 페놀의 함량이 다른 산업폐수중에 비해 높게 나왔으며, 발아율, 발아관 길이 생장에 저해요인으로 작용했으나, 배우체 상대생장에는 저해요인으로 작용하지 않은 점이 주의 깊게 살펴야 할 점이다. 이는 페놀에 대한 참다시마의 포자 발아율, 포자 발아관 길이 생장, 배우체 상대생장 간의 차이를 알아보는 실험이 요구된다. 반면, 독성이 높은 것으로 판단되는 W15 지점의 경우 모든 중금속의 함유량이 저해하는 양보다 작게 나타났는데 이와 더불어 이외의 다른 지점의 결과는 여러 중금속이 복합적으로 작용하여 독성이 크게 작용한 것으로 사료된다. 배우체 상대생장률을 종말점으로 한 산업폐수 생태독성 평가기법은 CV가 20%이하로 나타나 안정된 진단기법임을 시사했다.

표 29. 참다시마의 배우체 상대생장률을 이용한 산업폐수의 생태독성평가 결과 (단위 %)

채취지점	NOEC	LOEC	EC_{10} (95% CI range)	EC_{50} (95% CI range)	CV (%)	TU
W10	100	> 100	> 100	> 100	-	< 1
W12	< 6.25	6.25	1.078 (0.932~1.235)	5.392 (4.66~6.175)	8.049	18.546
W13	6.25	12.5	8.532 (7.199~9.180)	17.337 (15.995~18.379)	3.190	5.768
W14	6.25	12.5	7.493 (4.354~14.959)	48.092 (41.204~62.335)	11.996	2.079
W15	< 6.25	6.25	1.624 (1.415~1.954)	8.016 (7.313~8.724)	4.928	12.475
W16	12.5	25	11.080 (8.846~19.769)	42.409 (37.966~45.873)	5.081	2.358
W18	< 6.25	6.25	3.781 (3.061~5.322)	> 100	-	< 1

마. 참다시마 (*Saccharina japonica*) 배우체의 포자체 발생률 평가법 (15°C, 144시간)

항목	시험조건
측정요소	다시마 포자체 발생률 (EC ₅₀)
시험생물	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)
시험기간	144 h
온도	10 ± 1°C
염분	25~35 psu
광종류	백색형광등
광도	1500~4000 lux (30~80 μmol m ⁻² s ⁻¹)
광주기	12 h 명기, 12 h 암기
시험용기	24구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음
시험용액 부피	2.5 mL/replicate
시험생물 크기	지름 500 μm ²
반복구당 시험생물 수	300
시험농도	대조구 + 최소 5 개 농도 구간
반복수	4개
측정요소	총 50개체의 포자체 발생률
시험적합도	대조구에서의 포자체 발생률은 28.7 ± 4.08
공기주입	주입하지 않음

(1) 시험 중

시험 중으로 Laminariales (다시마 목), Laminariaceae (다시마 과), *Saccharina* (다시마 속), *Saccharina japonica* (참다시마 종)를 사용하였다.

(2) 평가방법

가) 평가 기간

; 시험개시 후 144시간

나) 시험농도

; 대조군, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100%

다) 시험용액제조

① 시험용액은 OTT's (1965) 인공해수를 사용하였다.

② 시험용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 준비하였다.

(3) 배양방법

가) 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척하였다.

나) 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관하였다.

다) 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도하였다.

라) 유도된 포자액을 20 mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 주었다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼았고, 항온배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양하였다.

마) 포자가 부착된 커버글라스를 24구 웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣었다.

바) 배양 온도, 광선, 광주기 조건은 각각 15°C , $30\sim 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량, 12:12-h 명암주기로 하였다.

(4) 최적 환경조건 확립

; 포자체 발생 유도를 위한 최적 환경 조건을 알아보기 위하여 다양한 광조사량, pH, 염분 및 온도하에서 24시간 배양연구를 수행하였다 (그림 44). 그 결과, 포자체 발생을 위한 최적 광조사량은 $30\sim 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH는 5~8, 염분은 25~35 psu 그리고 온도는 $5\sim 10^\circ\text{C}$ 로 나타났다.

(5) 측정방법

; 포자체 발생률은 사상형 개체 내 하나 이상의 포자체가 발생되었을 때 포자체가 형성되었다고 간주하였고, 현미경하에서 4개의 커버글라스를 대상으로 각각의 커버글라스에 부착된 배우체 10개체 가운데 포자체가 형성된 개체를 계수 하였으며, 5회 반복하였다. 포자체 형성률 계수 과정은 영상분석장치 (Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 배우체를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어졌다.

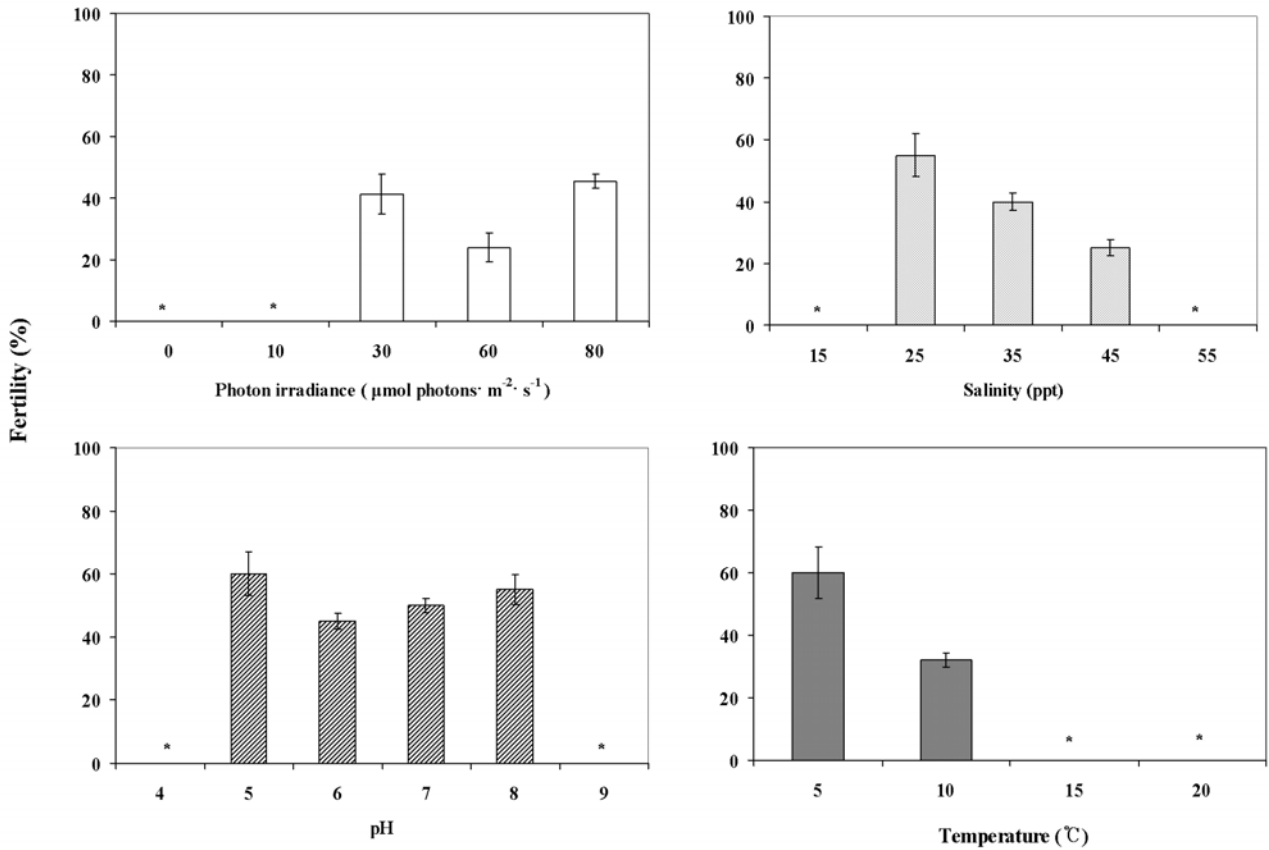


그림 44. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 참다시마 포자체 발생률

(6) 자료분석

가) 자료정리

; 포자체 발생률은 대조군의 포자체 발생률에 대한 실험군의 포자체 발생률을 비교하여 나타내었다.

나) 통계처리

; 참다시마 포자체 발생률을 이용한 독성시험의 측정값 (endpoints)은 포자체 발생 억제 효과에 기반을 두었다. 포자체 발생률에 대한 EC_{50} 은 점예측기법 (point estimation techniques)을 써서 계산하였다. LOEC 및 NOEC값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였고, EC_{50} 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다. 독성시험 결과는 EC_{50} 값으로 표현할 경우, 값이 작을수록 독성도가 커지므로, 이런 문제를 보완하고자 독성값을 비교하기 위하여 독성단위 (Toxic Unit, TU)를 아래와 같이 계산하여 사용하였다.

$$TU = 100 / EC_{50} (\%)$$

(7) 대조군 차트

; 10회 측정된 서로 다른 포자체 발생률 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다 (그림 45). 다시마의 평균 포자체 발생률은 28.7 ± 4.08 로 나타났다.

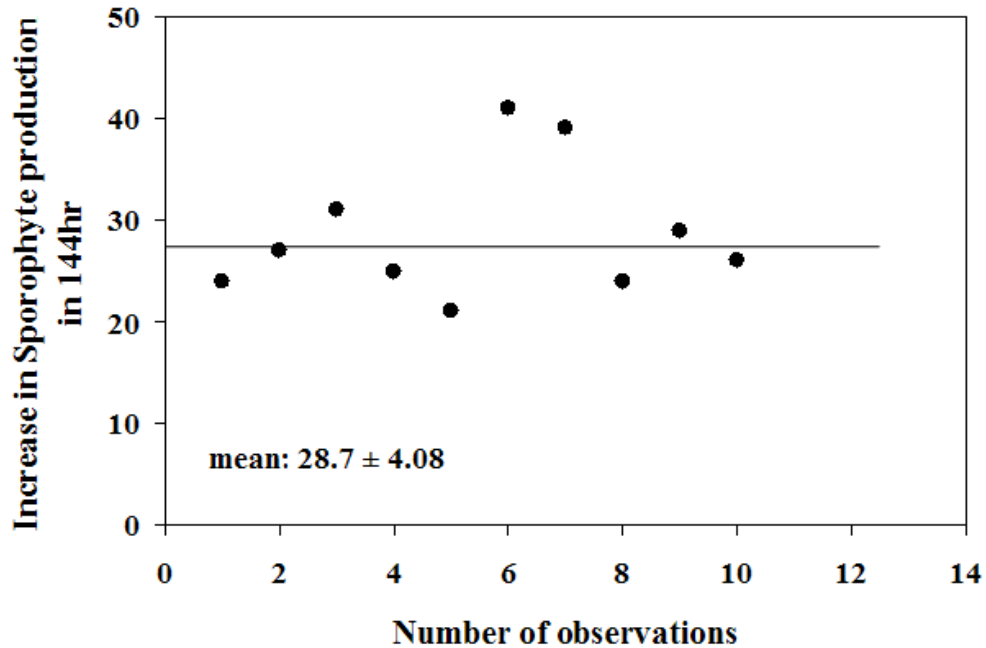


그림 45. 144시간 후 측정된 포자체 발생률 대조군 차트

(8) 단일독성원에 대한 생태독성평가

가) 중금속 (heavy metals)

표준 중금속 4종을 여러 가지의 농도로 구배하여 다시마 포자체 발생률을 이용하여 독성 평가 하였을 때, 모든 중금속에서 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 46).

표준 중금속과 포자체 발생률의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 보았을 때, 포자체 발생률은 중금속 종류에 따라 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 평가되었다 (표 30).

중금속 4종의 농도와 다시마 포자체 발생률을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 6가 크롬 (Cr)의 경우, 3.408 mg/L에서 포자체 발생률이 대조군에 비하여 약 50% 수준을 나타냈다. 구리 (Cu)의 경우, 0.018 mg/L에서 포자체 발생률이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 0.040 mg/L에서는 포자체 발생이 일어나지 않았다. 수은 (Hg) 노출군에서는 농도 0.036 mg/L에서 포자체 발생률이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 0.020 mg/L 이상에서는 포자체 발생이 일어나지 않았다. 아연 (Zn) 0.819 mg/L에 노출된 배우체는 대조군에 비하여 약 50% 수준에 해당하는 포자체 발생률을 나타냈다.

EC₅₀값을 기준으로 한 중금속 민감성은 Cu > Hg > Zn > Cr6 순으로 나타났다. 포자체 발생률을 종말점으로 하는 중금속 생태독성 평가기법은 CV가 10%이하로 비교적 안정된 진단 기법임을 시사했다.

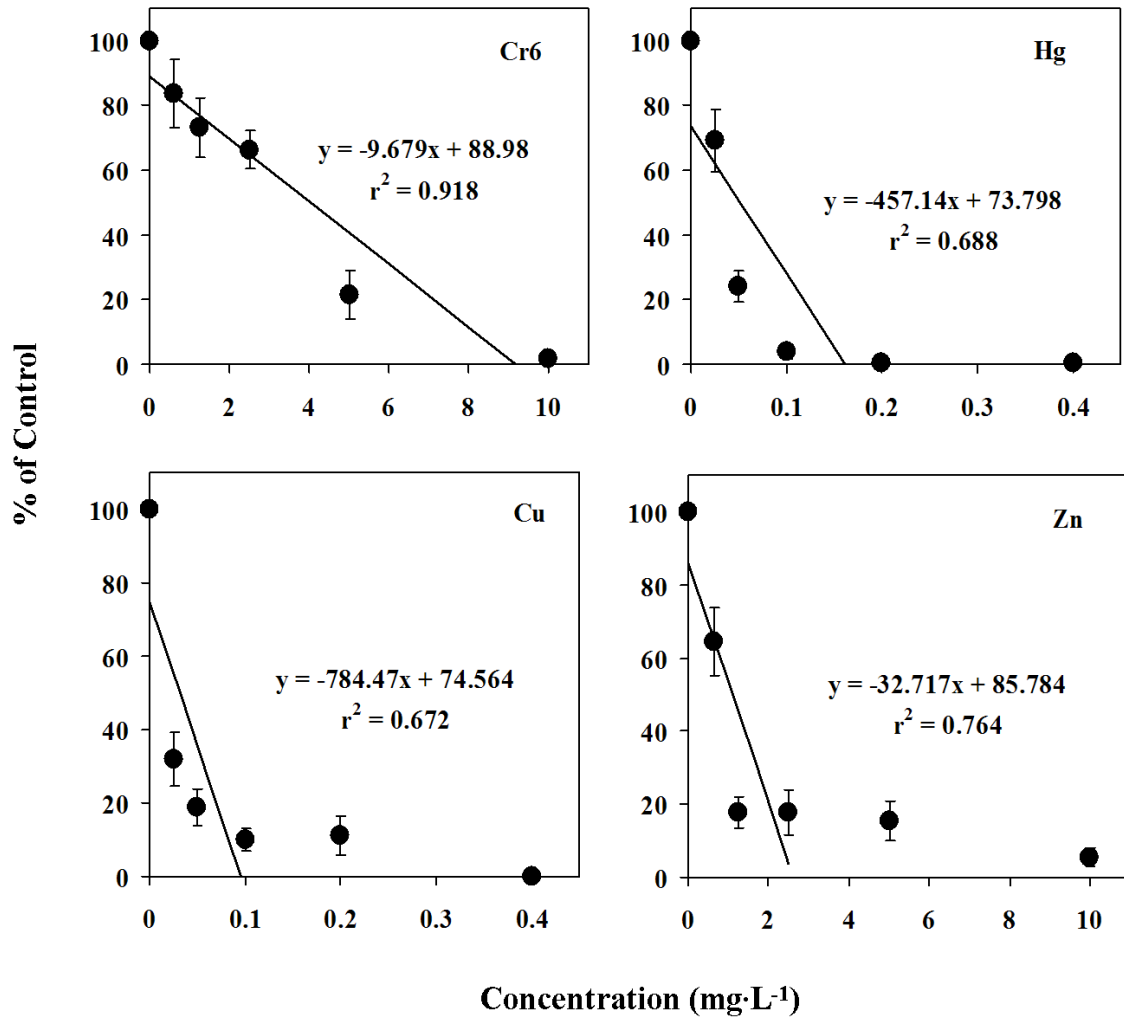


그림 46. 중금속 농도에 따른 참다시마 포자체 발생률

표 30. 참다시마 포자체 발생률을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과 (단위 mg/L)

Metals	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)
Cr6 (10 mg/L)	< 0.625	0.625	0.382 (0.249~0.717)	3.408 (3.193~3.633)	3.430
Cu (0.4 mg/L)	< 0.025	0.025	0.0037 (0.0034~0.0041)	0.018 (0.168~0.021)	5.410
Hg (0.4 mg/L)	< 0.025	0.025	0.082 (0.0065~0.0120)	0.036 (0.033~0.039)	4.606
Zn (10 mg/L)	< 0.625	0.625	0.176 (0.013~0.230)	0.819 (0.743~0.897)	5.160

바. 참다시마 (*Saccharina japonica*) 어린 포자체의 로봇형 엽록소 형광 평가법 (10℃, 144시간)

항목	시험조건
측정요소	다시마 어린 포자체 엽록소 형광값 (EC ₅₀)
시험생물	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)
시험기간	144 h
온도	10 ± 1℃
염분	25~35 psu
광종류	백색형광등
광도	1500~2500 lux (30~50 μmol m ⁻² s ⁻¹)
광주기	12 h 명기, 12 h 암기
시험용기	24구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음
시험용액 부피	2.5 mL/replicate
시험생물 크기	0.25 mm ²
반복구당 시험생물 수	300
시험농도	대조구 + 최소 5 개 농도 구간
반복수	4개
측정요소	총 5개체의 포자체 엽록소 형광값
시험적합도	대조구에서의 엽록소 형광값이 80% 이상
공기주입	주입하지 않음

(1) 시험 중

시험 중으로 Laminariales (다시마 목), Laminariaceae (다시마 과), *Saccharina* (다시마 속), *Saccharina japonica* (참다시마 종)를 사용하였다.

(2) 평가방법

가) 평가 기간

; 시험개시 후 144시간

나) 시험농도

; 대조군, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100%

다) 시험용액제조

① 시험용액은 OTT's (1965) 인공해수를 사용하였다.

② 시험용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 준비하였다.

(3) 배양방법

가) 어린 포자체를 6웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣었다.

나) 배양 온도, 광선, 광주기 조건은 각각 10°C, 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량, 12:12-h 명암 주기로 하였다.

(4) 최적 환경조건 확립

; 엽록소 형광 유도를 위한 최적 환경 조건을 알아보기 위하여 다양한 광조사량, pH, 염분 및 온도하에서 96시간 배양연구를 수행하였다 (그림 47). 그 결과, 엽록소 형광을 위한 최적 광조사량은 10~50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH는 5.5~9.5, 염분은 15~55 psu 그리고 온도는 15~20°C로 나타났다.

(5) 측정방법

; 어린 포자체의 형광을 Image-PAM (Walz GmbH, Effeltrich, Germany)을 이용하여 측정하였다. 이 기계는 PAM control unit 그리고 시스템 조작을 위한 소프트웨어 (WinControl) 구동 컴퓨터로 구성되며 이미지 형광을 분석한다. Image-PAM은 효과적인 양자수율 $\Phi_{psII} = (F_m' - F) / F_m'$ 을 측정하였다 (Genty et al. 1989).

(6) 자료분석

가) 자료정리

; 엽록소 형광은 대조군의 형광값 대한 실험군의 형광값을 비교하여 나타내었다.

나) 통계처리

; 참다시마 어린 포자체의 엽록소 형광을 이용한 독성시험의 측정값 (endpoints)은 엽록소 형광 억제 효과에 기반을 두었다. 엽록소 형광에 대한 EC₅₀은 점예측기법 (point estimation techniques)을 써서 계산하였다.

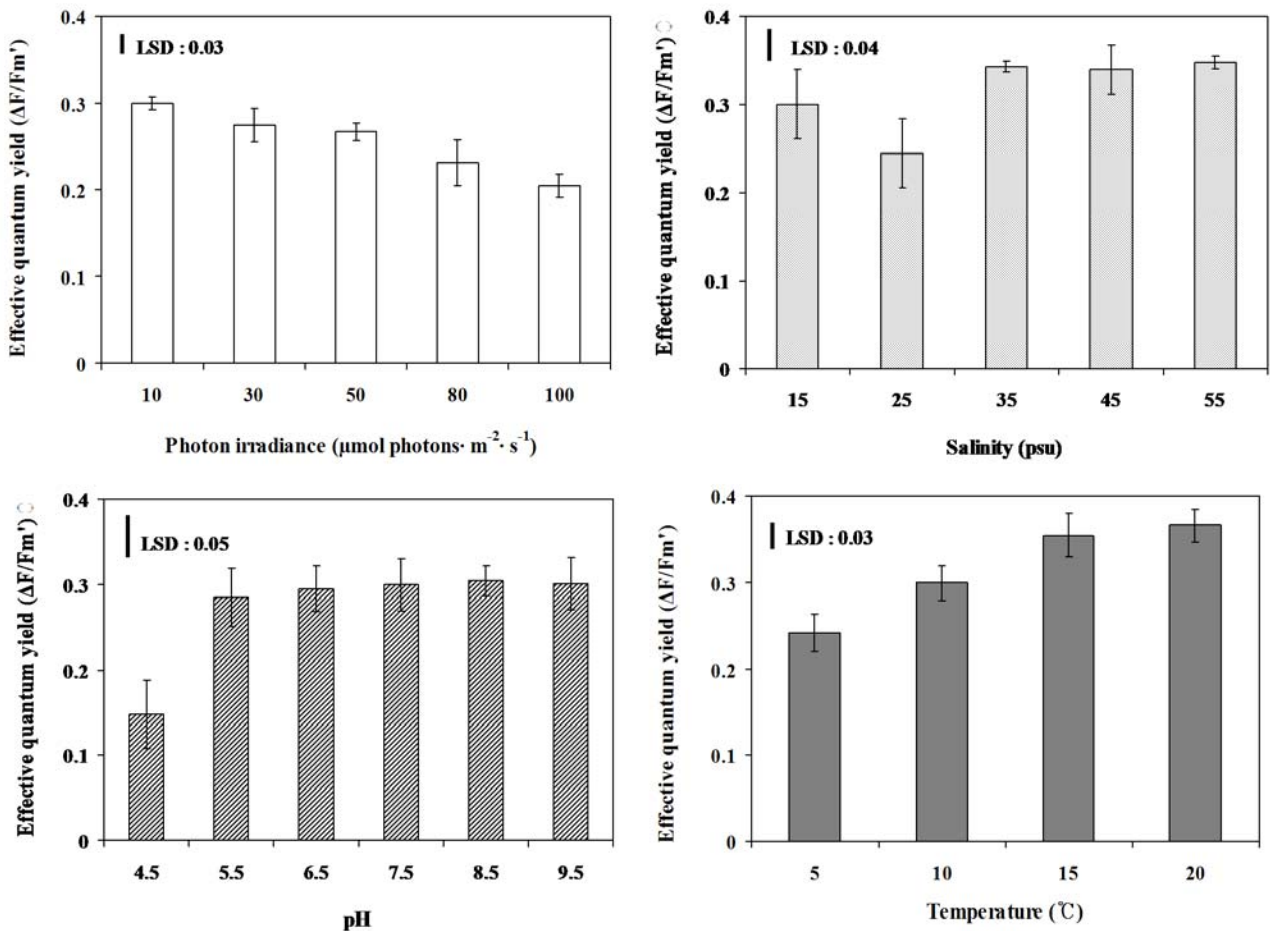


그림 47. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 참다시마 어린 포자체 엽록소 형광

LOEC 및 NOEC값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였고, EC₅₀ 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다. 독성시험 결과는 EC₅₀ 값으로 표현할 경우, 값이 작을수록 독성도가 커지므로, 이런 문제를 보완하고자 독성값을 비교하기 위하여 독성단위 (Toxic Unit, TU)를 아래와 같이 계산하여 사용하였다.

$$TU = 100 / EC_{50} (\%)$$

(7) 단일독성원에 대한 생태독성평가

가) 중금속 (heavy metals)

표준 중금속 구리를 여러 가지의 농도로 구배하여 다시마 엽록소 형광의 독성 민감성을 평가하였다. 참다시마 포자체의 엽록소 형광은 구리 중금속 농도에 반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 48).

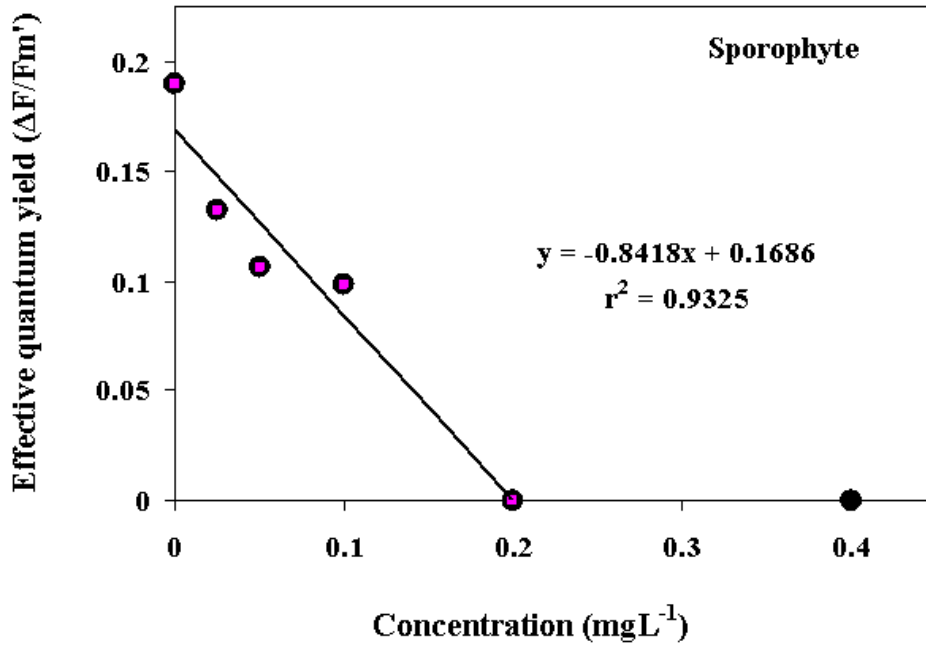


그림 48. 구리 농도에 따른 참다시마 어린 포자체의 엽록소 형광

표준 중금속 구리 농도와 참다시마 어린 포자체의 엽록소 형광값을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 0.081 mg/L에서 엽록소 형광값이 대조군에 비하여 약 50% 수준을 나타냈다 (표 31). 참다시마 어린 포자체의 엽록소 형광값은 CV가 20%이하로 나타나 중금속 생태독성 평가기법의 종말점으로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

표 31. 참다시마 어린 포자체 엽록소 형광을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과 (단위 mg/L)

Metal	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)
Cu	0.025	0.05	0.020 (0.002~0.054)	0.081 (0.052~0.116)	13.337

사. 참다시마 (*Saccharina japonica*) 수배우체의 로봇형 엽록소 형광 평가법 (15℃, 1시간)

항목	시험조건
측정요소	다시마 수배우체 엽록소 형광값 (EC ₅₀)
시험생물	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)
시험기간	1시간
온도	15 ± 1℃
염분	25~35 psu
광도	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)
시험용기	96구 well 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음
시험용액 부피	300 μL/replicate
시험생물 크기	0.25 mm ²
시험농도	대조구 + 최소 5개 농도 구간
측정요소	배우체 엽록소 형광률
시험적합도	다시마 수배우체의 평균 엽록소 형광값은 0.456 ± 0.018
공기주입	주입하지 않음

(1) 시험 종

시험 종으로 Laminariales(다시마 목), Laminariaceae(다시마 과), *Saccharina*(다시마 속), *Saccharina japonica*(참다시마 종)를 사용하였다.

(2) 평가방법

가) 평가 기간

; 시험개시 후 1시간

나) 시험농도

; 대조군, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100%

다) 시험용액제조

① 시험용액은 OTT's(1965) 인공해수를 사용하였다(인공해수 조성 표 8 참조).

② 시험용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 준비하였다.

(3) 배양방법

가) 수배우체를 Homogenizer로 갈아서 현탁액을 제조 후 96웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣었다.

나) 배양 온도, 광선, 광주기 조건은 각각 15°C, 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량으로 하였다.

(4) 측정방법

; 다시마 수배우체의 형광을 Imaging-PAM(Walz GmbH, Effeltrich, Germany)을 이용하여 측정하였다. 이 기계는 PAM control unit 그리고 시스템 조작을 위한 소프트웨어(WinControl) 구동 컴퓨터로 구성되며 이미지 형광을 분석한다. Imaging-PAM은 유효 양자수율 $\Phi_{psII} = (F_m' - F')/F_m'$ 을 측정하였다(Genty et al. 1989).

(5) 자료분석

가) 자료정리

; 엽록소 형광은 대조군의 형광값에 대한 실험군의 형광값을 비교하여 나타내었다.

나) 통계처리

; 다시마 수배우체의 엽록소 형광을 이용한 독성시험의 측정값(endpoints)은 엽록소 형광 억제 효과에 기반을 두었다. 엽록소 형광에 대한 EC₅₀은 점예측기법(point estimation techniques)을 써서 계산하였다. EC₅₀ 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalcc(version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다.

(6) 대조군 차트

; 24회 측정된 서로 다른 수배우체 엽록소 형광 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다(그림 49). 미역 수배우체의 평균 엽록소 형광값은 28.7 ± 4.08로 나타났다.

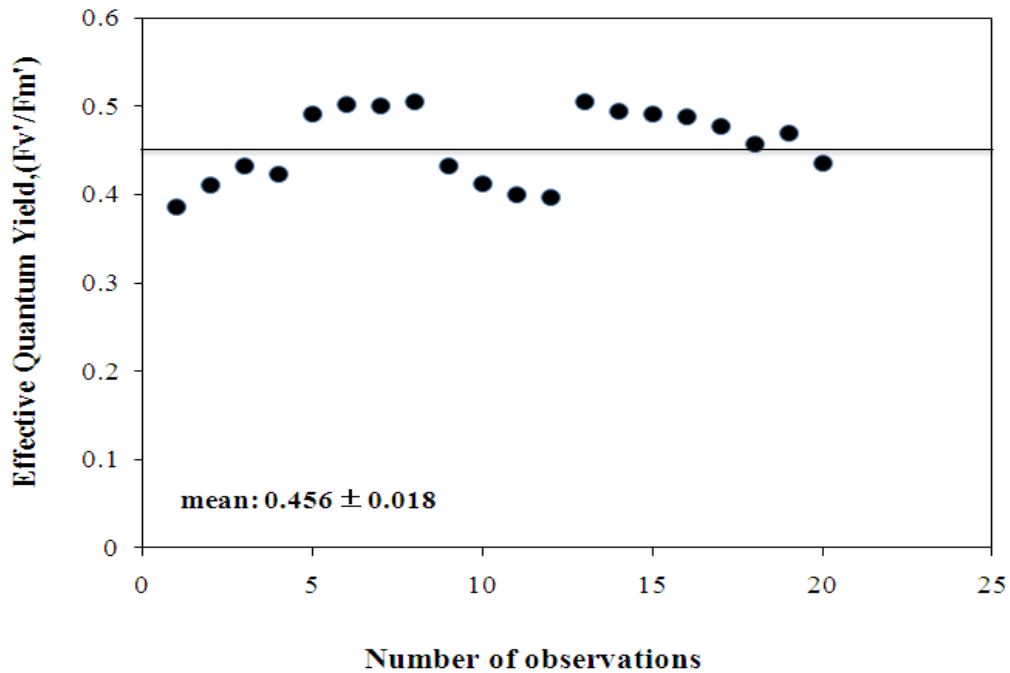


그림 49. 1시간 후 측정한 수배우체의 엽록소 형광률 대조군 차트

(7) 단일독성원에 대한 생태독성평가

가) 제초제 - 시간추이별 독성평가

제초제 4종을 여러 가지의 농도로 구배하여 시간 추이별 다시마 수배우체 형광을 비교하였을 때, 다시마 수배우체 형광은 시간추이별로 제초제 3종에 대해 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 50, 51, 52).

제초제와 다시마 수배우체 형광의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 보았을 때, 노출 30분 보다는 1시간 후 좀 더 민감한 반응을 보였으며, 노출 1시간 이후부터는 민감도에 큰 차이를 나타내지 않았다 (표 32). 그리고 수배우체 형광은 제초제 종류에 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 평가되었다.

제초제 3종의 농도와 미역 수배우체 형광을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 구하였고, 시간 추이별 결과에 따라 단 시간내 가장 민감한 반응을 보였던 노출 1시간 이후의 결과를 비교분석하였다. Atrazine을 다시마 수배우체에 처리하였을 때, 0.0107 mg/L에서는 대조군의 약 50%에 해당하는 형광을 나타내었고 0.005 mg/L 이하에서는 저해가 일어나지 않았다. Diuron 처리군에서는 0.0026 mg/L에서 대조군의 약 50%에 해당되는 수배우체 형광을 나타냈으며, 0.005 mg/L 이하의 농도에서는 수배우체 형광이 일어나지 않았다. Hexazinone에 노출된 경우, 0.0028 mg/L에서 수배우체 형광이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났으며, 0.005 mg/L 이하의 농도에서는 수배우체 형광이 일어나지 않았다. Shimazine은 수행된 농도 범위(최고농도 0.004mg/L)에서 형광 저해현상이 나타나지 않았다. 다시마 수배우체 형광에 대한 제초제 민감성은 Diuron > Hexazinone > Atrazine > Shimazine 순으로 나타났다. 수배우체 형광을 종말점으로 한 제초제 생태독성 평가기법은 CV가 20%이하로 비교적 안정된 진단 기법임을 시사했다.

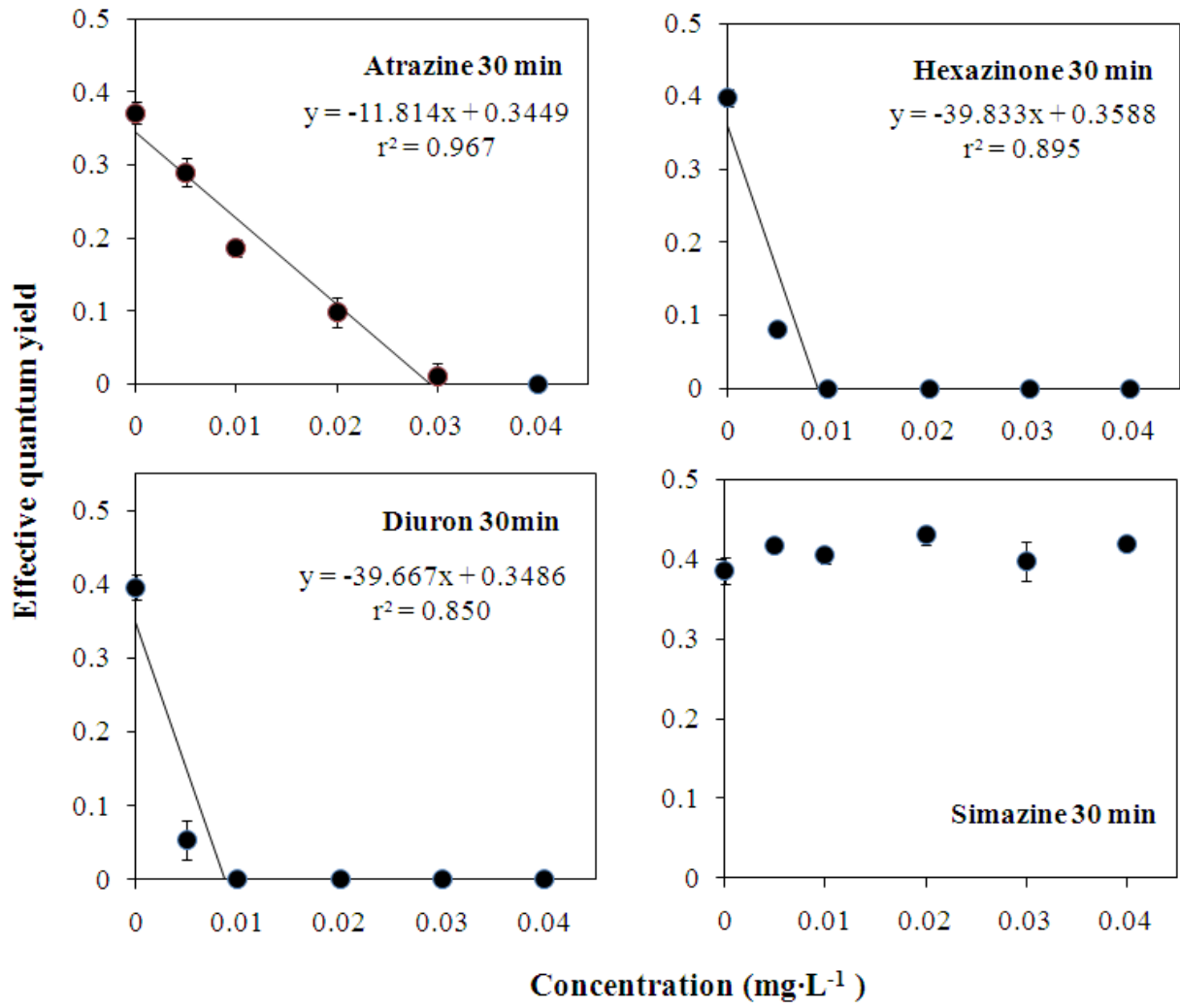


그림 50. 30분 후 측정된 제초제 농도에 따른 다시마 수배우체 형광

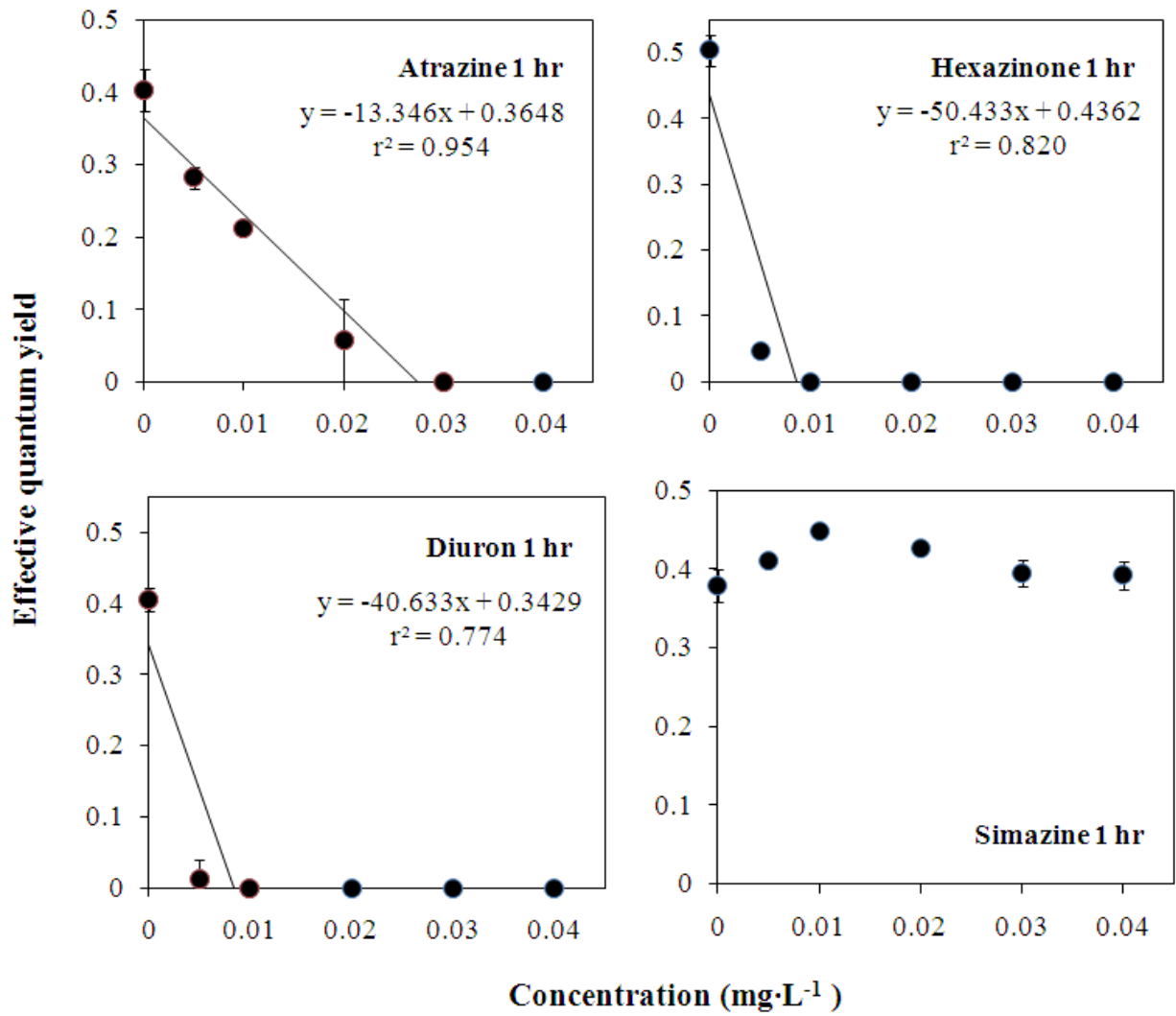


그림 51. 1시간 후 측정된 제초제 농도에 따른 다시마 수배우체 형광

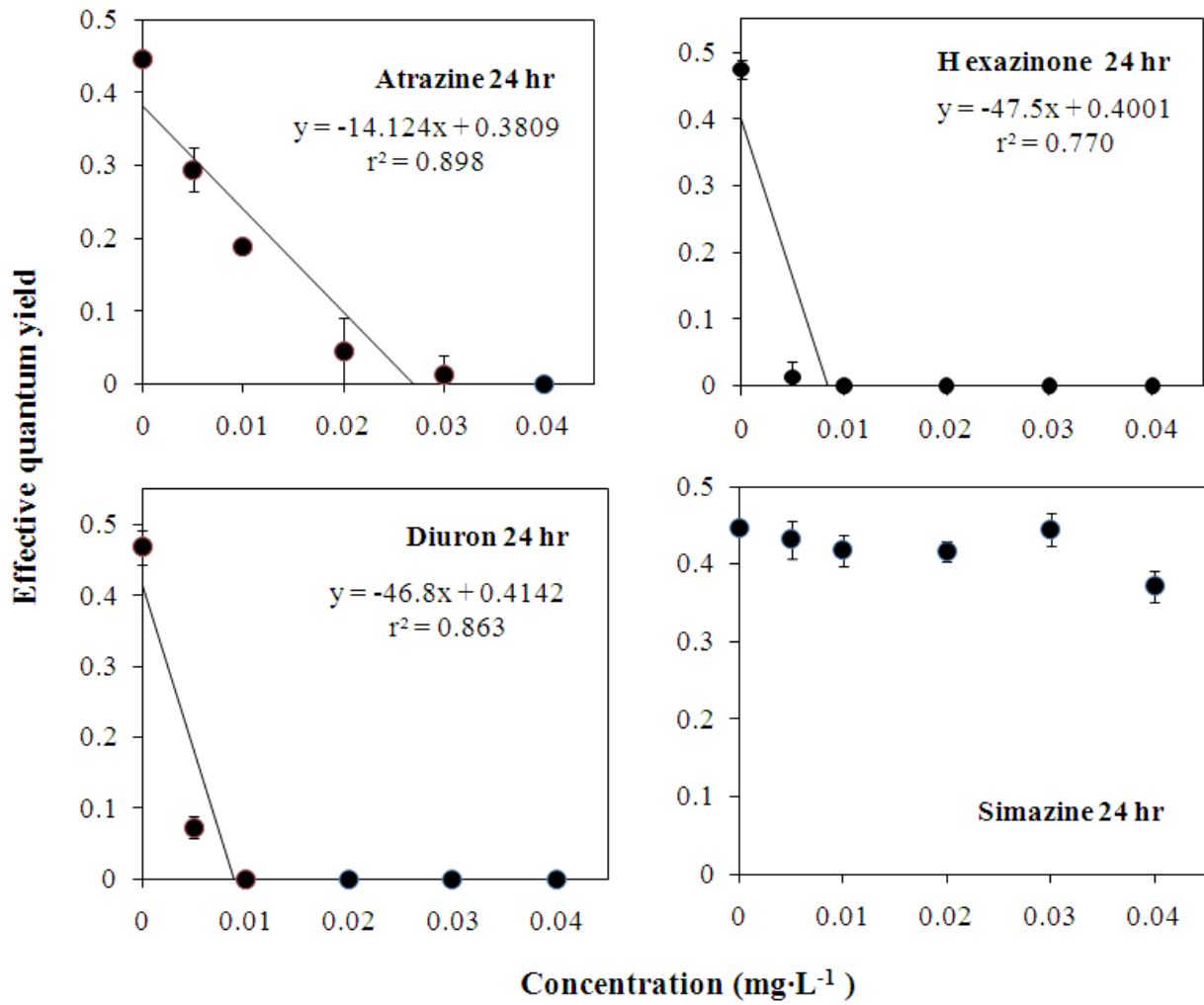


그림 52. 24시간 후 측정된 제초제 농도에 따른 다시마 수배우체 형광

표 32. 다시마 배우체 형광을 이용한 시간추이별 제초제의 생태독성평가 결과(단위 mg/L)

Herbicide	Exposed time	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV(%)
Atrazine (0.04 mg · L ⁻¹)	30 min	<0.005	0.005	0.0023 (0.0015-0.0035)	0.0101 (0.009-0.0128)	0.495
	1 h	<0.005	0.005	0.0017 (0.0012-0.0024)	0.0107 (0.0089-0.0125)	4.673
	24 h	<0.005	0.005	0.0015 (0.0010-0.0021)	0.0084 (0.0073-0.0091)	2.381
Diuron (0.04 mg · L ⁻¹)	30 min	<0.005	0.005	0.0006 (0.0005-0.0006)	0.0029 (0.0027-0.0030)	0
	1 h	<0.005	0.005	0.0006 (0.0005-0.0006)	0.0026 (0.0024-0.0030)	3.846
	24 h	<0.005	0.005	0.0006 (0.0006-0.0006)	0.0030 (0.0028-0.0032)	0
Hexazinone (0.04 mg · L ⁻¹)	30 min	<0.005	0.005	0.0006 (0.0006-0.0006)	0.0031 (0.0031-0.0032)	0
	1 h	<0.005	0.005	0.0006 (0.0005-0.0006)	0.0028 (0.0027-0.0029)	0
	24 h	<0.005	0.005	0.0005 (0.0005-0.0006)	0.0026 (0.0024-0.0029)	3.846
Simazine (0.04 mg · L ⁻¹)	30 min	0.005	>0.005	-	-	-
	1 h	0.005	>0.005	-	-	-
	24 h	0.01	0.005	-	-	-

아. 미역 (*Undaria pinnatifida*) 포자 발아 평가기법 (15℃, 24시간)

항목	시험조건
측정요소	미역 포자발아율 (EC ₅₀)
시험생물	미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>)
시험기간	24 h
온도	15 ± 1℃
염분	35 psu
광종류	-
광도	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)
광주기	-
시험용기	24구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음
시험용액 부피	2.5 mL/replicate
시험생물 크기	지름 25 μm
반복구당 시험생물 수	1 x 10 ⁶
시험농도	대조구 + 최소 5 개 농도 구간
반복수	4개
측정요소	총 500개체당 발아한 개체수
시험적합도	대조구에서의 발아율은 87.40 ± 1.37%
공기주입	주입하지 않음

(1) 시험 중

시험 종으로 Laminariales (다시마 목), Alariaceae (미역 과), *Undaria* (미역 속), *Undaria pinnatifida* (미역 종)를 사용하였다.

(2) 평가방법

가) 평가 기간

; 시험개시 후 24시간

나) 시험농도

; 대조군, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100%

다) 시험용액제조

① 시험용액은 OTT's (1965) 인공해수를 사용하였다.

② 시험용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 준비하였다.

(3) 배양방법

가) 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척하였다.

나) 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관하였다.

다) 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도하였다.

라) 유도된 포자액을 20 mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 주었다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼았고, 항온배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양하였다.

마) 포자가 부착된 커버글라스를 24구 웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣었다.

바) 배양 온도는 15°C 로 암배양 하였다.

(4) 최적 환경조건 확립

; 포자 발아 유도를 위한 최적 환경 조건을 알아보기 위하여 다양한 광조사량, pH, 염분 및 온도하에서 24시간 배양연구를 수행하였다 (그림 53). 그 결과, 포자발아를 위한 최적 광조사량은 $0 \sim 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH는 5~9, 염분은 35~55 psu 그리고 온도는 $5 \sim 20^\circ\text{C}$ 로 나타났다.

(5) 측정방법

; 광학현미경상에서 관찰되는 미역 포자는 현미경 콘덴서를 조절하여 사용하게 되면 발아관의 윤곽이 명확해져서 흰색의 발아관을 검은색으로 관찰 할 수 있다. 포자에서 관이 발생되었을 때를 “발아” 라고 정의하고, 관이 형성되어 있으면 발아되었다 그렇지 않으면 발아하지 않은 것으로 판단하였다. 총 500개체의 발아정도를 개수하여 발아율을 판정하여 수질의 오염도를 평가하였다. 발아율 계수 과정은 영상분석장치 (Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 포자를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어졌다.

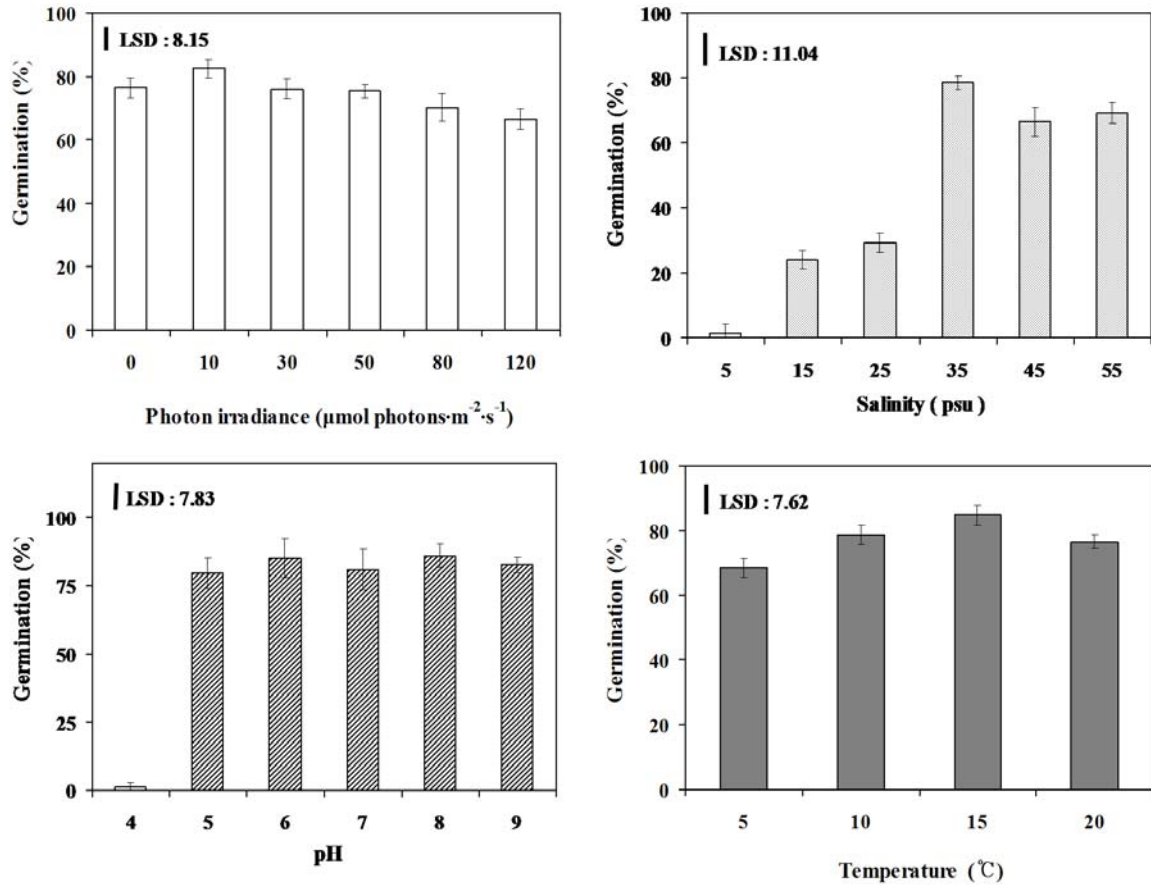


그림 53. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 미역포자의 발아율

(6) 자료분석

가) 자료정리

; 발아율은 100개체 당 발아한 발아체 수를 비율로 나타내었다.

나) 통계처리

; 미역 포자를 이용한 독성시험의 측정값 (endpoints)은 발아 억제 효과에 기반을 두었다. 포자발아율에 대한 EC₅₀은 점예측기법 (point estimation techniques)을 써서 계산하였다. LOEC 및 NOEC값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였고, EC₅₀ 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다. 독성시험 결과는 EC₅₀ 값으로 표현할 경우, 값이 작을수록 독성도가 커지므로, 이런 문제를 보완하고자 독성값을 비교하기 위하여 독성 단위 (Toxic Unit, TU)를 아래와 같이 계산하여 사용하였다.

$$TU = 100 / EC_{50} (\%)$$

(7) 대조군 차트

; 25회의 서로 다른 발아율 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다 (그림 54). 미역의 평균 발아율은 $87.40 \pm 1.37\%$ 로 나타났다.

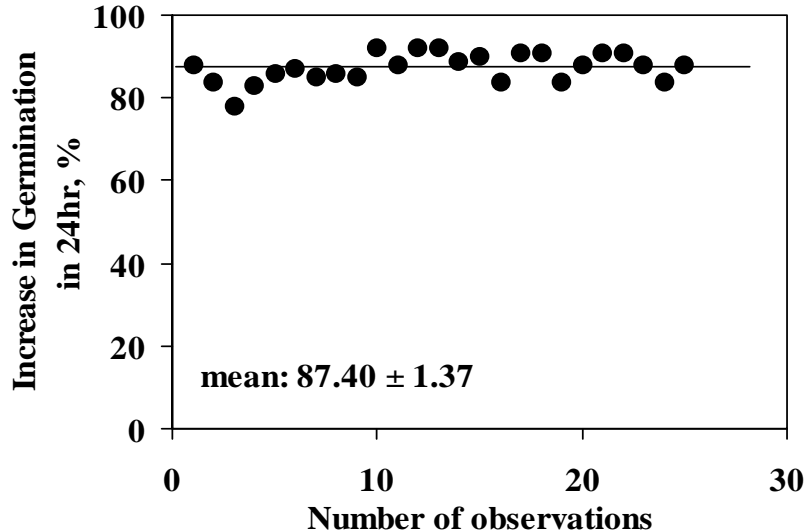


그림 54. 24시간 후 측정된 발아율 대조군 차트

(8) 단일독성원에 대한 생태독성평가

가) 중금속 (heavy metals)

표준 금속류 8종을 여러 가지의 농도로 구배하여 미역 포자의 발아율을 이용하여 독성평가를 시행하였을 때, 구리 (Cu)와 수은 (Hg)에서 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 55).

표준 중금속과 포자발아율의 관계로부터 얻은 EC₁₀값을 기준으로 보았을 때, 포자발아율은 중금속 종류에 따라 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 평가되었다 (표 33).

중금속 8종의 농도와 다시마 포자발아율을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 수은 (Hg) 노출군에서는 농도 0.027 mg/L에서 발아가 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났다. 미역 발아의 경우 중금속에 대한 민감도가 낮아 수행된 농도범위에서 중금속 8종에 대한 EC₅₀값을 비교할 수 없었으나, EC₁₀값을 기준으로 한 중금속 민감성은 Hg > Cu > Cr6 > Zn > Ni > Cd > Pb 순으로 나타났다.

나) 휘발성 유기화합물 (VOCs; Volatile Organic Compounds)

다양한 휘발성 유기화합물 (VOCs) 중 페놀 (Phenol)을 여러 가지의 농도로 구배하여 미역 포자발아율의 독성 민감성을 평가하였다. 미역 포자의 발아율은 페놀 농도에 반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 556).

휘발성 유기화합물 페놀 농도와 미역 포자의 발아율을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 0.121 mL/L에서 포자발아율이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났다 (표 34). 미역 포자의 발아율은 CV가 20%이하로 나타나 휘발성 유기화합물 생태독성 평가기법의 종말점으로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

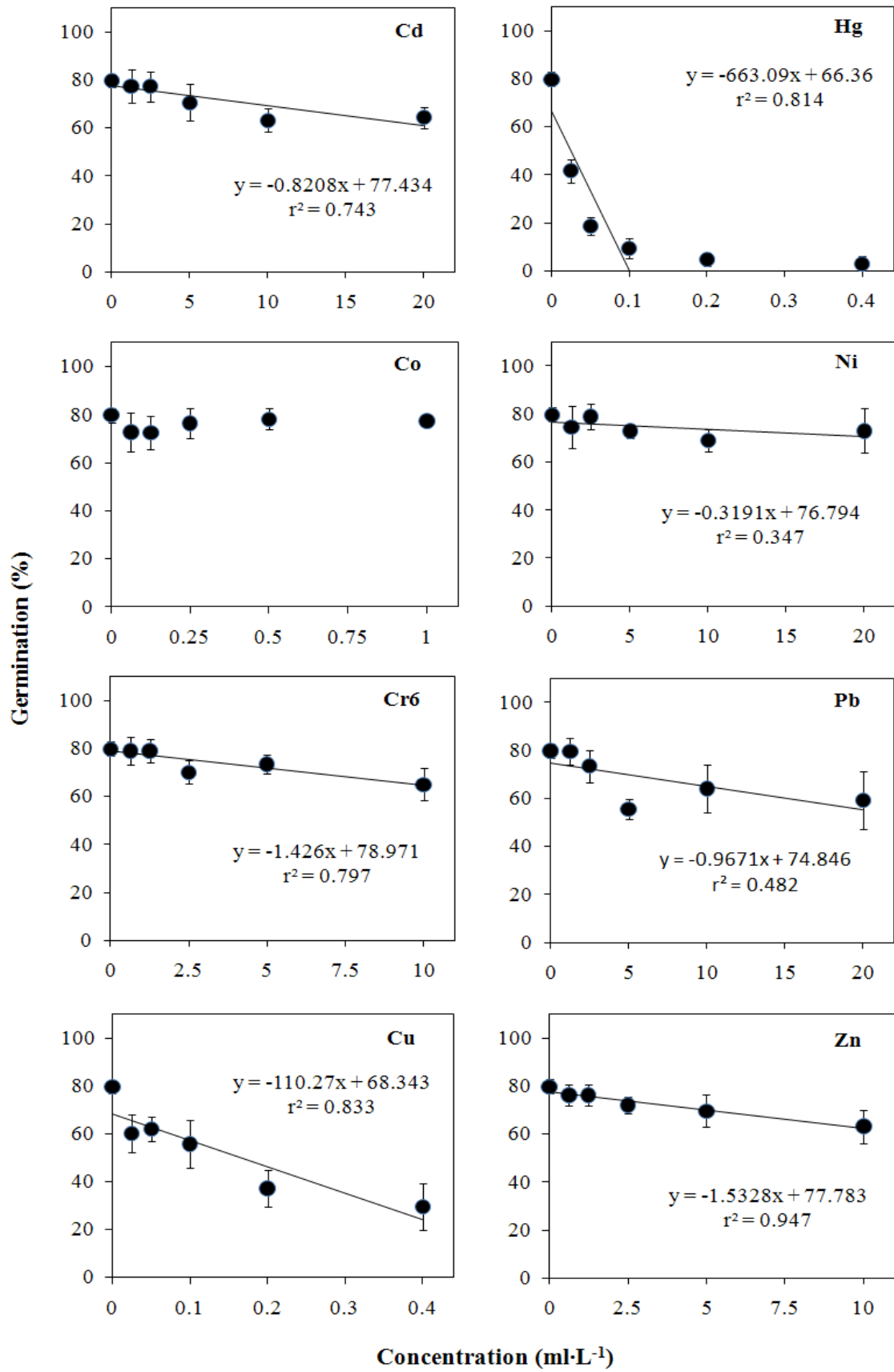


그림 55. 중금속 농도에 따른 미역 포자의 발아율

표 33. 미역 포자 발아를 이용한 중금속의 생태독성 평가 결과 (단위 mg/L)

Metals	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	p-value
Cd (20 mg/L)	5	10	4.483 (1.100~8.378)	> 20	-	< 0.001
Co (1 mg/L)	1	> 1	>1	> 1	-	> 0.05
Cr6 (10 mg/L)	1.25	2.5	2.480 (1.464~9.330)	73.613	-	< 0.001
Cu (0.4 mg/L)	< 0.025	0.025	0.011 (0.002~0.008)	0.1855	-	< 0.001
Hg (0.4 mg/L)	< 0.025	0.025	0.005 (0.004~0.006)	0.027 (0.021~0.032)	7.888	< 0.001
Ni (20 mg/L)	2.5	5	2.790 (1.353~3.845)	> 20	-	< 0.001
Pb (20 mg/L)	5	10	7.950	-	-	> 0.05
Zn (10 mg/L)	2.5	5	2.688 (0.451~8.445)	> 10	-	< 0.001

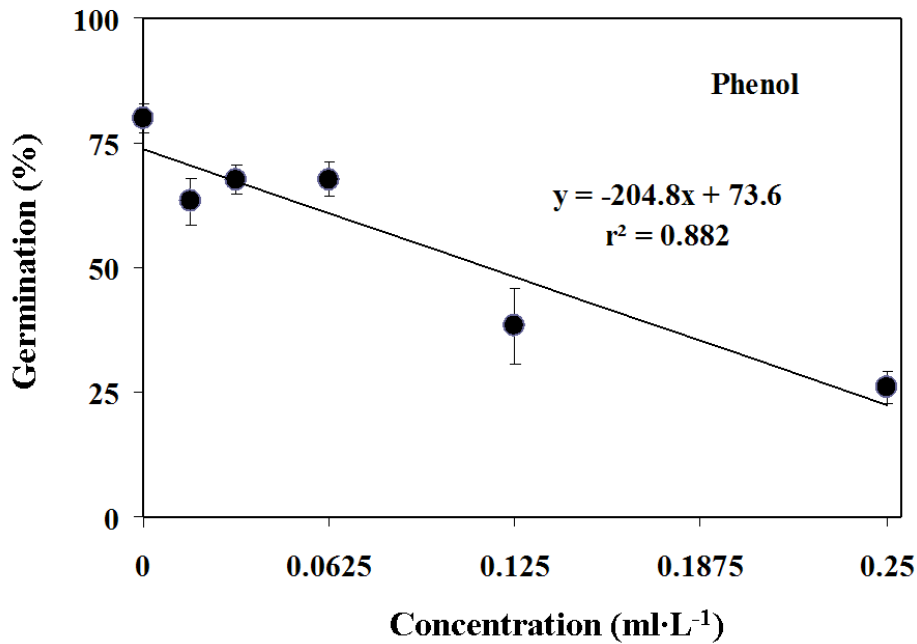


그림 56. 페놀 농도에 따른 미역 포자의 발아율

표 34. 미역 포자 발아를 이용한 페놀의 생태독성 평가 결과 (단위 mL/L)

VOC	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	p-value
Phenol (0.25 mL/L)	< 0.017	0.016	0.009 (0.007~0.013)	0.121 (0.103~0.180)	11.232	< 0.001

(9) 현장시료의 생태독성평가

2010년 3월 산업폐수 9개 지점에서 채수한 시료 원수에 대한 미역 포자의 발아율 실험을 수행한 결과와 이화학적 분석 결과는 그림 57와 표 35과 같다. 조사 지점 9지역 중에서 4개 지점(W2, W4, W7, W8)에서 50% 이하의 낮은 포자발아율을 보였으며, 특히, W8 지점에서는 50% 이하의 낮은 발아율을 보여 가장 오염도가 높은 지역으로 평가되었다.

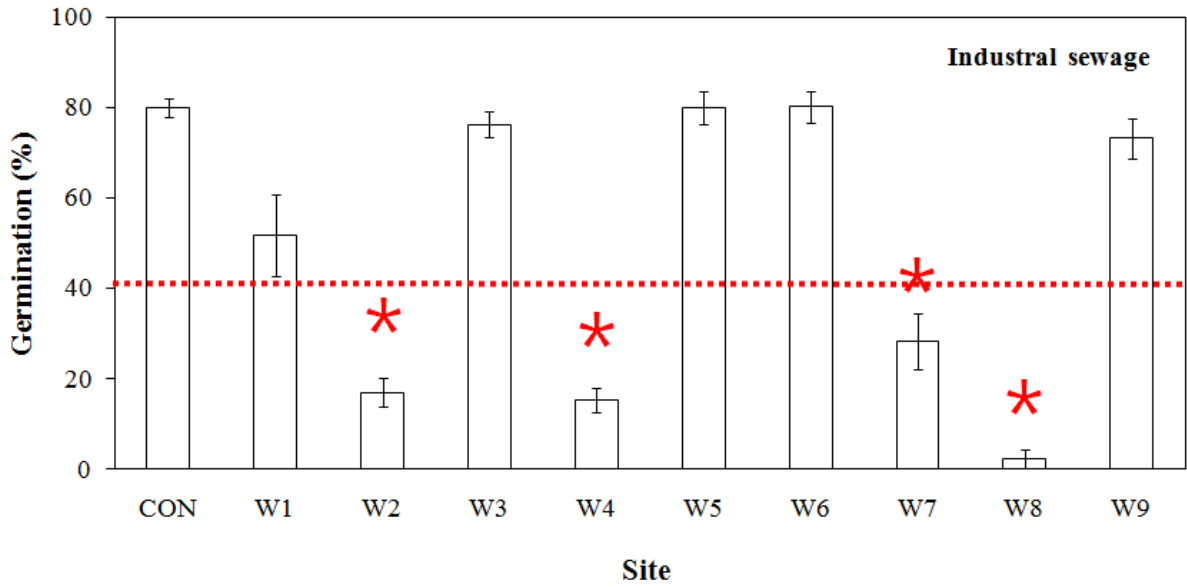


그림 57. 미역 포자발아율을 이용한 산업폐수 (3월) 수질 평가 예비 실험 결과

표 35. 산업폐수 (3월)의 지점별 이화학적 분석 결과

검사항목 채취지점	TN	TP	SS	CN	phend	F	Cu	Pb	Cd	Cr	G6	Zn	Mn	Fe	As	Hg
	W1	43.833	0.035	7.2	ND	0.013	0.303	0.014	ND	ND	ND	ND	0.016	0.015	0.417	ND
W2	69.527	0.595	61.4	0.030	0.002	1.06	0.015	0.00	ND	ND	ND	0.047	0.039	1.883	ND	0.000
W3	0.956	0.024	1.2	0.000	0.004	0.145	ND	ND	ND	ND	ND	0.036	0.194	0.126	ND	0.000
W4	130.700	0.051	26.0	0.009	0.007	2637	0.645	ND	ND	ND	ND	0.012	0.186	5.139	ND	0.000
W5	2.346	0.098	2.0	0.001	0.005	0.042	ND	ND	ND	ND	ND	0.020	0.015	0.094	ND	0.000
W6	2.189	0.038	0.2	0.003	0.006	0.088	0.012	ND	ND	ND	ND	0.013	ND	0.056	ND	0.000
W7	10.435	0.846	62.0	0.001	0.005	1.265	2.821	ND	ND	ND	ND	0.051	0.378	14.578	ND	0.000
W8	6.522	0.739	15.0	0.152	9.700	0.89	33048	ND	ND	0.288	ND	0.114	0.549	188.691	ND	0.000
W9	2.088	0.030	10.0	0.003	0.005	0.461	0.426	ND	ND	ND	ND	0.067	0.033	3.316	ND	0.000

3월 채수한 산업폐수 시료 원수에 대한 포자발아율 실험에서 대조군 대비 50% 이하의 발아율을 나타내는 지점과 추가적으로 W1에 대해 반수 희석법으로 정밀 실험을 한 결과 시료의 농도와 포자발아율 사이에 r^2 값이 0.7이상을 기록하는 역회귀관계를 나타내었다 (그림 58).

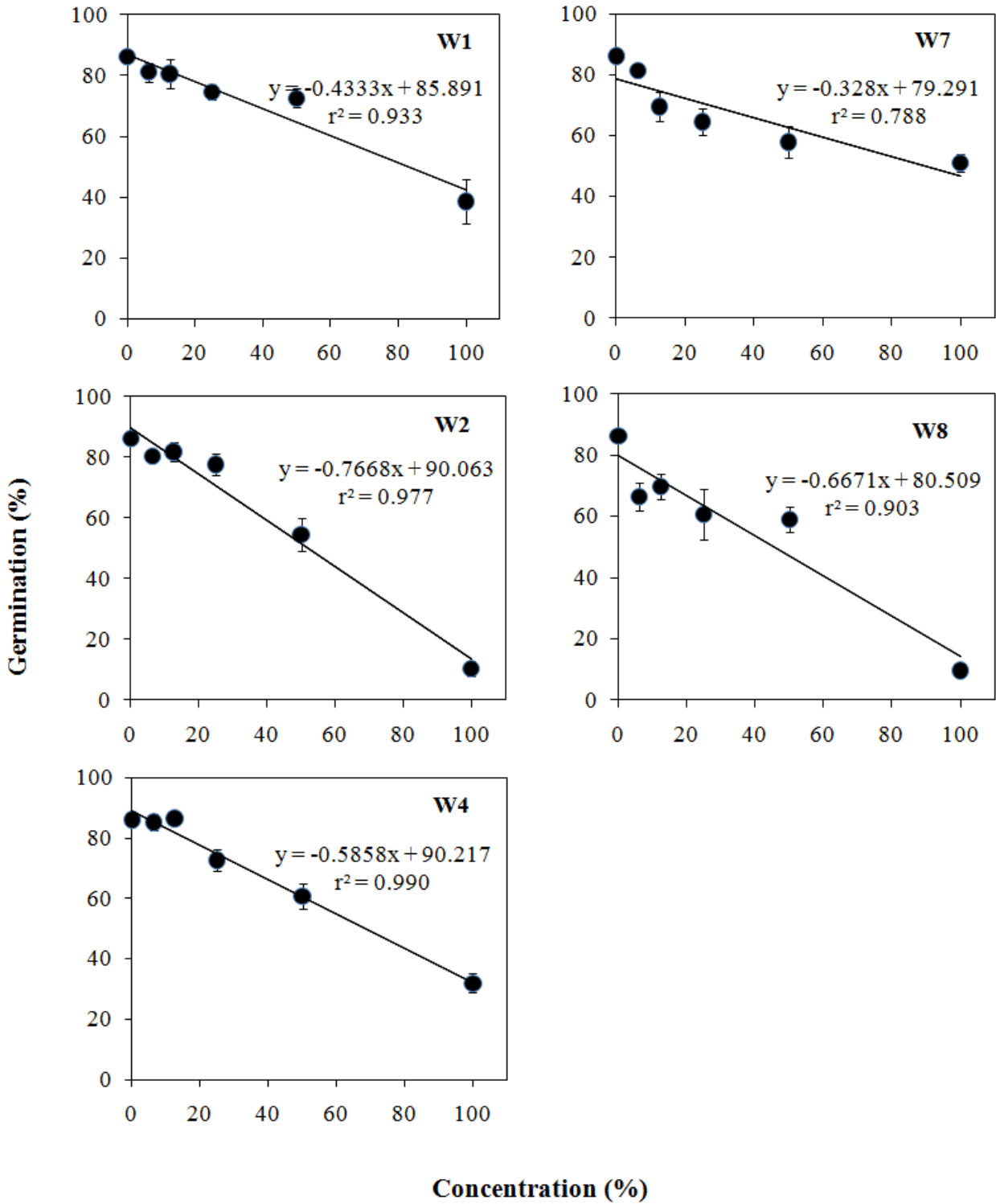


그림 58. 미역의 포자발아율을 이용한 산업폐수 (3월) 수질 평가 결과

시료와 포자발아율의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 수질을 평가해 보았을 때, 조사된 5지점 중 4지점이 유사한 오염도를 보였으며, 이중 W2 지점과 W8 지점의 원수가 가장 오염도가 높은 것으로 나타났다 (표 36).

표 36. 미역 포자발아율을 이용한 산업폐수(3월)의 생태독성평가 결과(단위 %)

채수지점	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	TU
W1	12.5	25	18.792 (6.000~27.524)	93.381	-	1.071
W2	< 6.25	6.25	25.022 (13.763~28.725)	63.009 (56.425~69.266)	3.496	1.587
W4	12.5	25	20.473 (17.633~23.653)	80.729 (74.029~86.443)	2.605	1.239
W7	6.25	12.5	8.273 (6.876~10.331)	> 100	-	< 1
W8	< 6.25	6.25	2.977 (2.390~3.703)	66.093 (62.059~68.897)	1.889	1.513

3월 산업폐수의 이화학적 분석 결과와 W8 지점의 EC₅₀ 간의 관계를 보고 농도를 계산한 결과, 66.093%의 원수 속에 구리가 21.842 mg/L 들어 있음을 산출하였고, W4 지점의 구리 함량은 원수 80.729% 속에 0.520 mg/L 들어 있음을 알아내었다. 이는 미역 포자 발아율 단일독성원 테스트 결과에서 산출된 구리의 EC₅₀값 0.1855 mg/L 보다 높은 수치임을 알 수 있다. 따라서 포자 발아율의 저해요인으로 구리의 영향이 있었을 것으로 판단된다. 휘발성유기화합물인 페놀의 경우, W8 지점의 원수 66.093% 속에 6.411 mL/L를 함유하고 있음을 알아내었다. 이는 휘발성유기화합물 테스트 결과에서 산출된 페놀의 EC₅₀값인 0.121 mL/L보다 높은 값을 알 수 있으며, 이는 페놀에 영향을 받았다고 생각된다. 반면 W2 지점은 단일 독성원 테스트 결과와 비교하였을 때 모든 중금속에서 발아율을 저해하는 농도보다 낮게 산출되었다. 이는 서로 다른 단일독성원이 혼합되어 각각의 영향보다 더 큰 영향을 끼친 것으로 판단되며, 복합적인 독성원 실험이 추가적으로 요구된다. W2지점과 W4 지점의 경우 다른 시료와 비교해 볼 때 높은 수준의 TN이 검출되었다.

포자의 발아율을 종말점으로 한 산업폐수 생태독성 평가기법은 CV가 10%이하로 매우 안정된 진단기법임을 시사했다.

2010년 6월 산업폐수 9개 지점에서 채수한 시료 원수에 대한 미역 포자의 발아율 실험을 수행한 결과와 이화학적 분석 결과는 그림 59과 표 37과 같다. 조사 지점 9지역 중에서 5개 지점 (W12, W13, W14, W15, W16)에서 50% 이하의 낮은 포자발아율을 보였으며, 특히, W16 지점에서는 0%에 가까운 낮은 발아율을 보여 가장 오염도가 높은 지역으로 평가되었다.

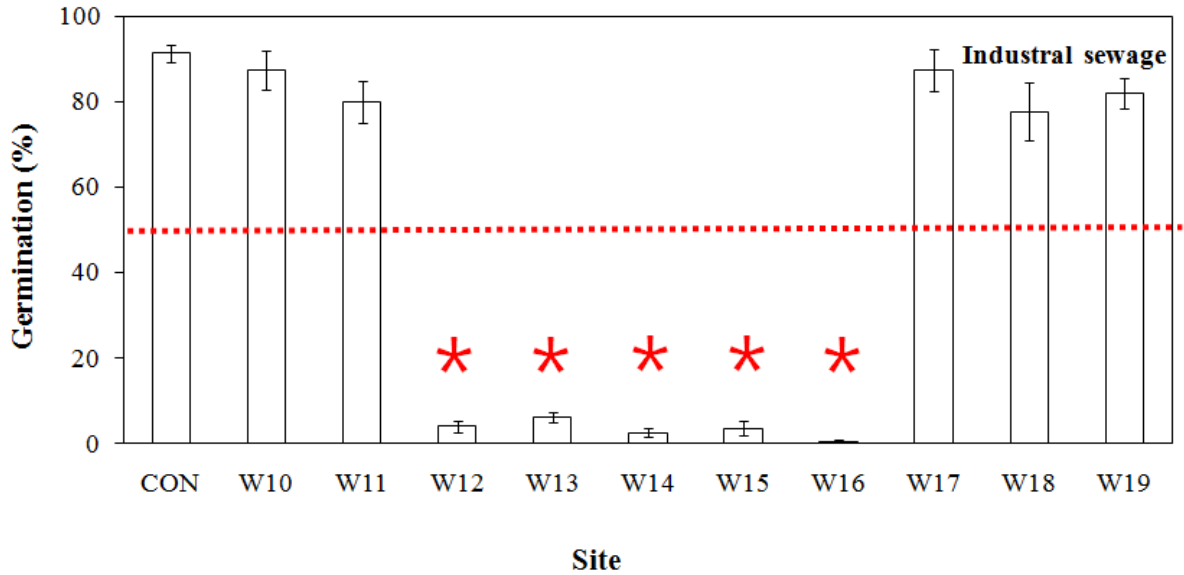


그림 59. 미역 포자발아율을 이용한 산업폐수 (6월) 수질 평가 예비 실험 결과

표 37. 산업폐수 (6월)의 지점별 이화학적 분석 결과

검사항목 채취지점	TN	TP	SS	CN	phenol	F	Cu	Pb	Cd	Cr	Cr6	Zn	Mn	Fe	As	Hg
W10	1.884	0.168	5.2	ND	ND	0.34	ND	ND	ND	ND	ND	0.056	0.010	0.134	ND	ND
W11	8.417	0.046	1.2	ND	ND	ND	0.034	ND	ND	ND	ND	0.114	0.009	0.339	ND	0.001
W12	78.608	0.051	13.0	0.750	ND	25.55	5.522	0.226	ND	0.019	ND	0.039	0.037	2.879	ND	0.001
W13	53.089	0.143	4.8	2.000	ND	1.55	0.247	ND	ND	0.039	ND	0.020	0.106	0.656	ND	0.002
W14	4.911	0.053	9.8	ND	ND	ND	0.011	ND	ND	0.133	ND	0.019	0.061	0.235	ND	ND
W15	12.338	1.409	2.0	0.360	ND	ND	0.700	ND	ND	0.033	ND	0.011	0.110	2.253	ND	0.001
W16	130.202	48.780	588.0	ND	ND	0.34	1.739	0.119	ND	0.101	ND	2.068	0.739	25.822	ND	0.001
W17	7.997	ND	1.2	ND	ND	2.290	ND	ND	ND	0.035	ND	ND	0.217	0.096	ND	ND
W18	10.777	0.060	15.0	13.290	12.377	ND	0.013	ND	ND	ND	ND	0.388	0.046	0.727	ND	ND
W19	45.780	0.315	8.8	ND	ND	0.21	1.018	ND	ND	0.111	ND	0.480	0.077	2.176	ND	ND

6월 채수한 산업폐수 시료 원수에 대한 포자발아율 실험에서 대조군 대비 50% 이하의 발아율을 나타내는 5지점에 대해 반수 희석법으로 정밀 실험을 한 결과 시료의 농도와 포자발아율 사이에 r^2 값이 0.8이상을 기록하는 역회귀관계를 나타내었다 (그림 60).

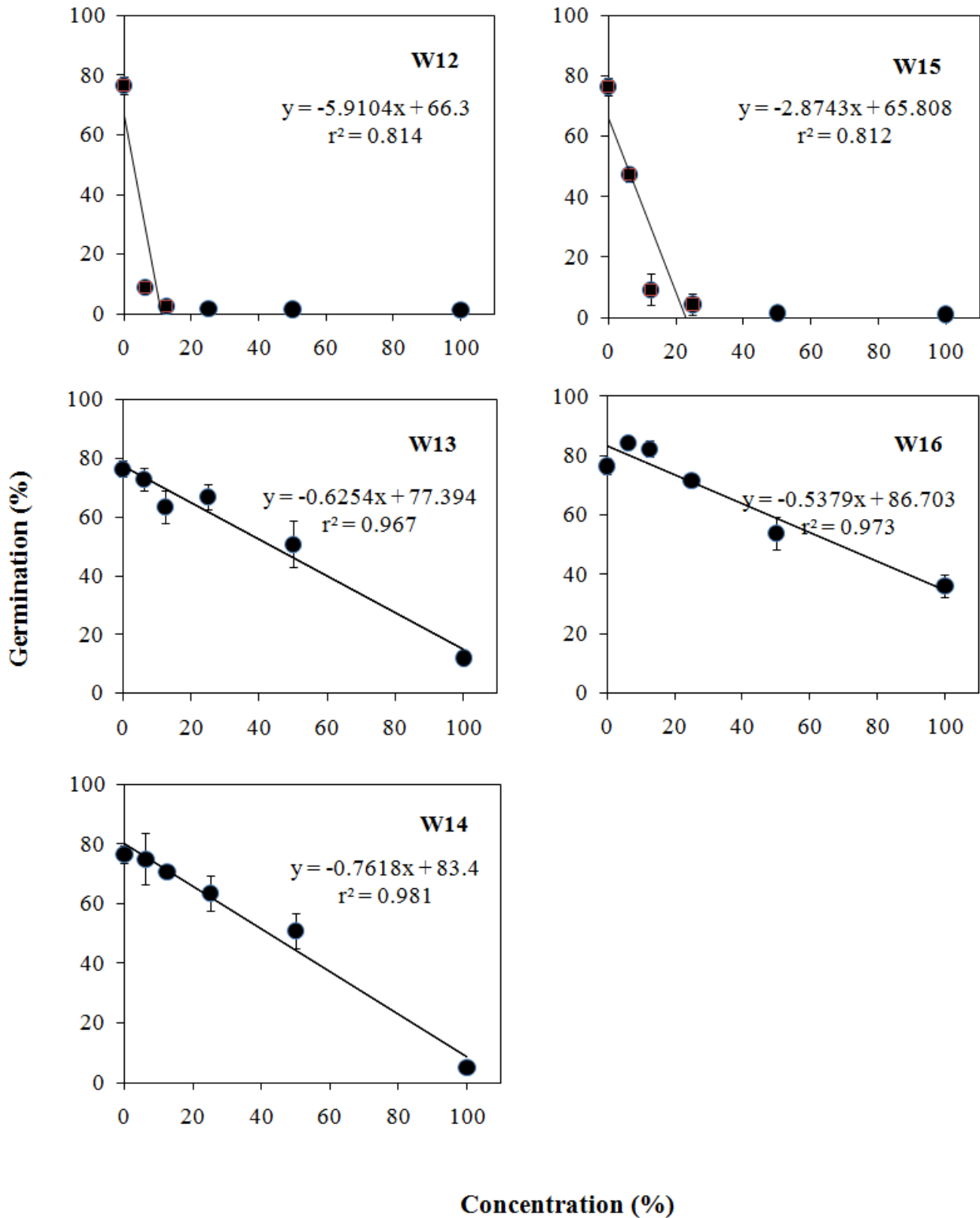


그림 60. 미역의 포자발아율을 이용한 산업폐수 (6월) 수질 평가 결과

시료와 포자발아율의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 수질을 평가해 보았을 때, 조사된 5지점 중 W12 지점의 원수가 가장 오염도가 높은 것으로 나타났다 (표 38).

표 38. 미역 포자발아율을 이용한 산업폐수 (6월)의 생태독성평가 결과 (단위 %)

채수지점	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	TU
W12	< 6.25	6.25	0.708 (0.690~0.728)	3.541 (3.450~3.642)	0.960	28.241
W13	6.25	12.5	9.467 (3.859~33.001)	66.108 (54.472~73.886)	4.721	1.513
W14	12.5	25	15.464 (0.546~23.483)	63.865 (55.894~69.804)	3.665	1.566
W15	< 6.25	6.25	1.6396 (1.452~1.880)	7.738 (7.188~8.353)	2.561	12.923
W16	25	50	23.271 (19.894~28.137)	87.360	-	1.145

6월 산업폐수의 이화학적 분석 결과와 W12 지점의 EC₅₀ 간의 관계를 보고 농도를 계산한 결과, 3.541%의 원수 속에 구리가 0.195 mg/L 들어 있음을 산출하였고, W16 지점의 구리함량은 원수 87.360% 속에 1.519 mg/L 들어 있음을 알아내었다. 이는 미역 포자 발아율 단일독성원 테스트 결과에서 산출된 구리의 EC₅₀값 0.1855 mg/L 보다 높은 수치임을 알 수 있으며 포자 발아율의 저해요인으로 구리의 영향이 있었을 것으로 판단된다. 반면 W13, W14, W15 지점은 단일 독성원 테스트 결과와 비교하였을 때 모든 중금속에서 발아율을 저해하는 농도보다 낮게 산출되었다. 이는 서로 다른 단일독성원이 혼합되어 각각의 영향보다 더 큰 영향을 끼친 것으로 판단되며, 복합적인 독성원 실험이 추가적으로 요구된다. 특히, W12 지점과 W15 지점의 시료에서는 평균 TU값이 10이상을 보여 오염정도가 심각한 것으로 평가되었다. 포자의 발아율을 종말점으로 한 산업폐수 생태독성 평가기법은 CV가 10%이하로 매우 안정된 진단기법임을 시사했다.

자. 미역 (*Undaria pinnatifida*) 포자 발아관 길이 성장 평가법 (15℃, 48시간)

항목	시험조건
측정요소	미역 포자의 발아관 길이 (EC ₅₀)
시험생물	미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>)
시험기간	48 h
온도	15 ± 1℃
염분	25~35 psu
광종류	-
광도	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)
광주기	-
시험용기	24구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음
시험용액 부피	2.5 mL/replicate
시험생물 크기	지름 25 μm
반복구당 시험생물 수	1 x 10 ⁶
시험농도	대조구 + 최소 5 개 농도 구간
반복수	4개
측정요소	총 30개체의 발아관 길이
시험적합도	대조구에서 발아관 길이는 25.77 ± 1.91 μm
공기주입	주입하지 않음

(1) 시험 중

시험 중으로 Laminariales (다시마 목), Alariaceae (미역 과), *Undaria* (미역 속), *Undaria pinnatifida* (미역 종)를 사용하였다.

(2) 평가방법

가) 평가 기간

; 시험개시 후 48시간

나) 시험농도

; 대조군, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100%

다) 시험용액제조

① 시험용액은 OTT's (1965) 인공해수를 사용하였다.

② 시험용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 준비하였다.

(3) 배양방법

가) 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척하였다.

나) 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관하였다.

다) 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도하였다.

라) 유도된 포자액을 20 mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 주었다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼았고, 항온배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양하였다.

마) 포자가 부착된 커버글라스를 24구 웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣었다.

바) 배양 온도는 15°C 로 암배양 하였다.

(4) 최적 환경조건 확립

; 포자의 발아관 길이 생장 유도를 위한 최적 환경 조건을 알아보기로 다양한 광조사량, pH, 염분 및 온도하에서 24시간 배양연구를 수행하였다 (그림 61). 그 결과, 포자발아를 위한 최적 광조사량은 $0\sim 120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH는 8, 염분은 35~55 psu 그리고 온도는 $10\sim 20^\circ\text{C}$ 로 나타났다.

(5) 측정방법

; 광학현미경상에서 관찰되는 미역 포자는 현미경 콘덴서를 조절하여 사용하게 되면 발아관의 윤곽이 명확해져서 흰색의 발아관을 검은색으로 관찰 할 수 있다. 발아관 생장은 24시간 종말점에서 30개체를 대상으로 발아관 시작부분부터 발아관 끝까지의 길이를 측정하였다. 모든 과정은 영상분석장치 (Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 포자를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어졌다.

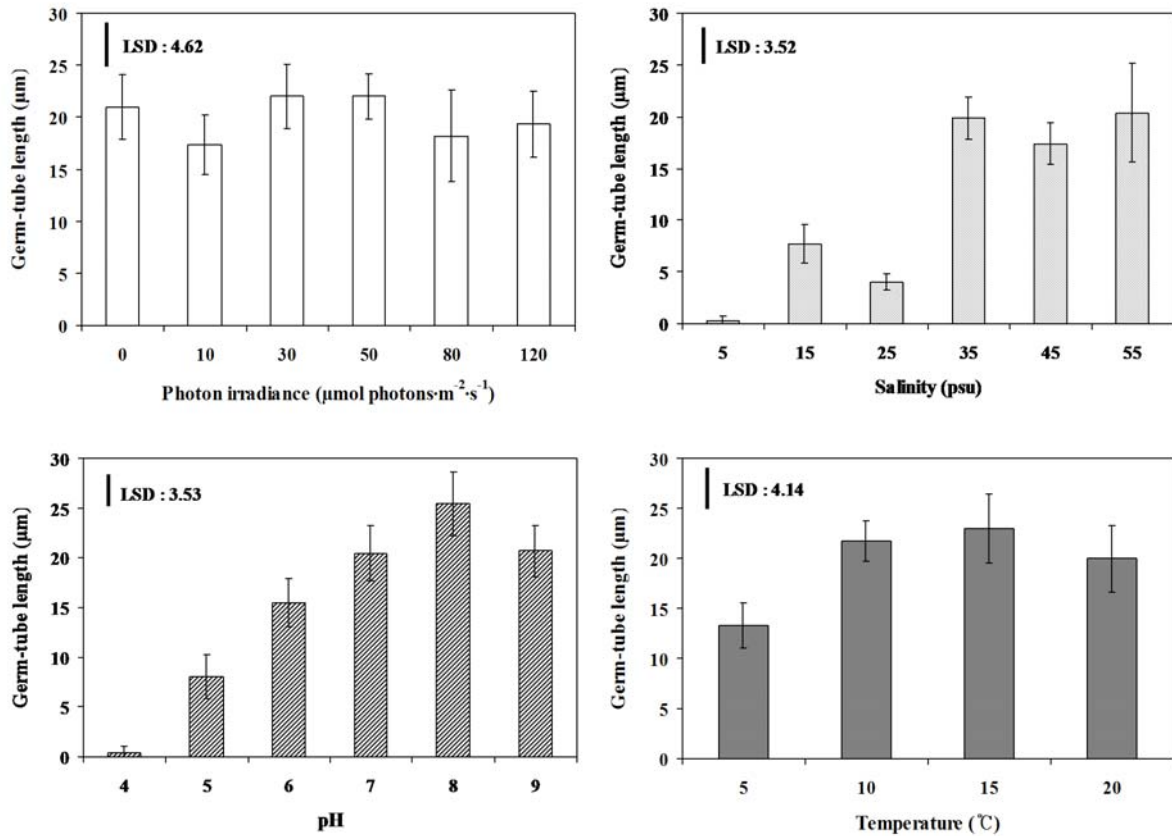


그림 61. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 미역 포자의 발아관 길이

(6) 자료분석

가) 자료정리

; 발아관 길이는 대조군의 발아관 길이 생장에 대한 실험군의 발아관 길 성장을 비교하여 나타내었다.

나) 통계처리

; 미역 포자를 이용한 독성시험의 측정값 (endpoints)은 발아 억제 효과에 기반을 두었다. 포자발아율에 대한 EC₅₀은 점예측기법 (point estimation techniques)을 써서 계산하였다. LOEC 및 NOEC값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였고, EC₅₀ 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다. 독성시험 결과는 EC₅₀ 값으로 표현할 경우, 값이 작을수록 독성도가 커지므로, 이런 문제를 보완하고자 독성값을 비교하기 위하여 독성 단위 (Toxic Unit, TU)를 아래와 같이 계산하여 사용하였다.

$$TU = 100 / EC_{50} (\%)$$

(7) 대조군 차트

; 25회의 서로 다른 발아관 길이 측정 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다 (그림 62). 발아관 길이 성장 시험법의 평균 발아관 길이는 25.77 ± 1.91 µm로 나타났다.

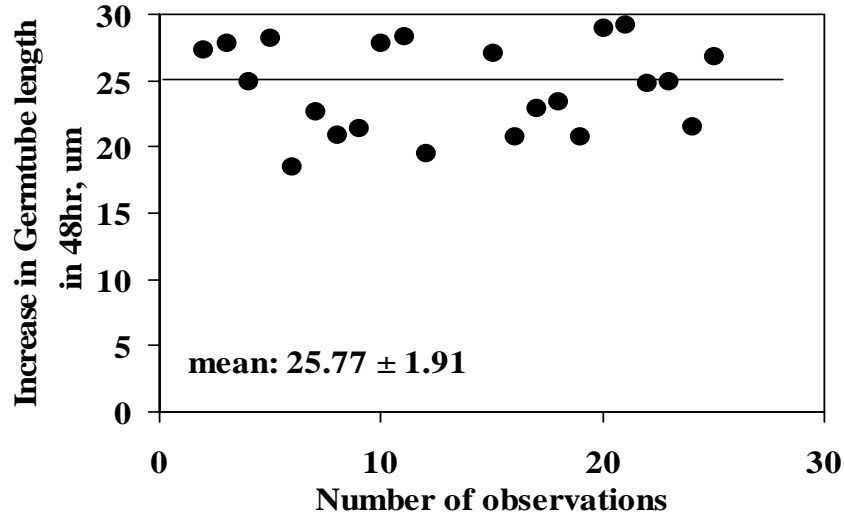


그림 62. 48시간 후 측정된 발아관 길이 대조군 차트

(8) 단일독성원에 대한 생태독성평가

가) 중금속 (heavy metals)

표준 금속류 8종을 여러 가지의 농도로 구배하여 참다시마 포자의 발아관 길이 생장을 이용하여 독성평가를 시행하였을 때, 2중에서 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 63).

표준 중금속과 포자 발아관 길이 생장의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 보았을 때, 포자 발아관 길이는 중금속 종류에 따라 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 평가되었다 (표 39).

중금속 8종의 농도와 다시마 포자 발아관 길이 생장을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 구리 (Cu)의 경우, 0.045 mg/L에서 발아관 길이 생장이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났다. 수은 (Hg) 노출군에서는 농도 0.016 mg/L에서 발아관 길이 생장이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 0.1 mg/L 이상의 농도에서는 발아관의 길이 생장이 일어나지 않았다.

미역 포자의 발아관 길이 생장은 중금속에 대한 민감도가 낮아 시험된 중금속 8종 중에서 수은과 구리 두 종에 대한 EC₅₀값 산출이 가능하였으며, 산출된 EC₅₀값을 기준으로 중금속 민감성을 비교해보면 구리 (Cu)보다 수은 (Hg)에 더 민감한 것으로 나타났다. 포자 발아관 길이생장을 종말점으로 중금속 생태독성 평가기법은 Hg과 Cu에 대해 CV가 30%이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

나) 휘발성 유기화합물 (VOCs; Volatile Organic Compounds)

휘발성 유기화합물 (VOCs) 페놀 (Phenol)을 여러 가지의 농도로 구배하여 다시마의 포자 발아관 길이생장을 비교하였을 때, 포자 발아관 길이 생장은 휘발성 유기화합물 페놀 (Phenol)에 대해 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 64). 페놀의 농도와 다시마 포자 발아관 길이 생장을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 0.050 mg/L에서 발아관 길이 생장이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났다 (표 40). 포자 발아관 길이생장을 종말점으로 중금속 생태독성 평가기법은 Phenol에 대해 CV가 20%이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

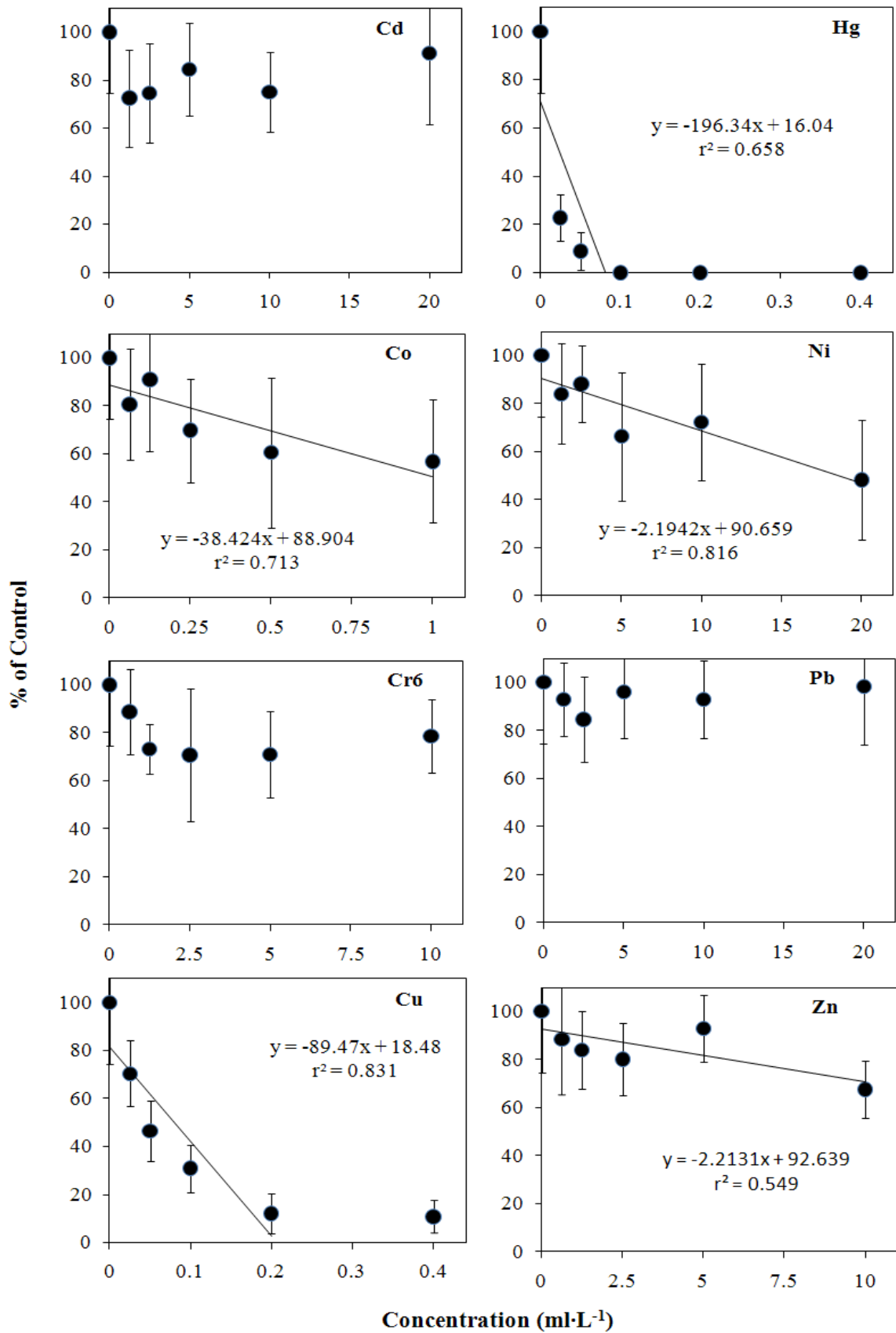


그림 63. 중금속 농도에 따른 미역 포자 발아관 길이 생장

표 39. 미역 포자 발아관 길이 생장을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과 (단위 mg/L)

Metals	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	p-value
Cd (20 mg/L)	20	> 20	–	> 20	–	< 0.01
Co (1 mg/L)	1	> 1	–	> 1	–	< 0.001
Cr6 (10 mg/L)	10	> 10	–	> 10	–	> 0.05
Cu (0.4 mg/L)	0.025	0.05	0.008 (0.005~0.025)	0.045 (0.031~0.076)	27.653	< 0.001
Hg (0.4 mg/L)	< 0.025	0.025	0.0032 (0.0030~0.0041)	0.016 (0.014~0.020)	9.017	< 0.001
Ni (20 mg/L)	10	20	0.898 (0.391~7.752)	–	–	< 0.001
Pb (20 mg/L)	20	> 20	–	> 20	–	> 0.05
Zn (10 mg/L)	5	10	–	> 10	–	< 0.01

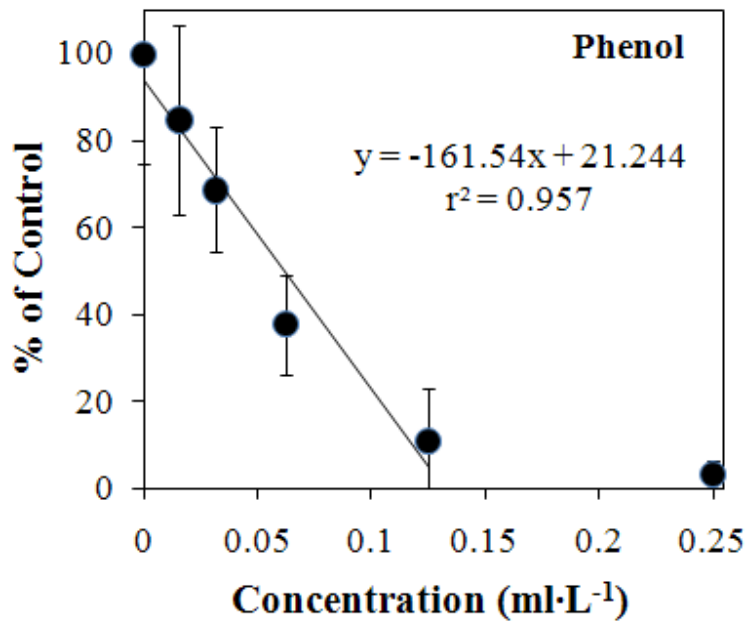


그림 64. 페놀 농도에 따른 미역 포자 발아관 길이 생장

표 40. 미역 포자 발아관 길이 생장을 이용한 페놀의 생태독성평가 결과 (단위 mL/L)

VOC	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	p-value
Phenol (0.25mL/L)	5	10	0.010 (0.003~0.033)	0.050 (0.030~0.064)	16.881	< 0.001

(9) 현장시료의 생태독성평가

가) 해양오니의 생태독성평가

해양오니 19개 지점에서 채수한 퇴적물 시료 용출수에 대한 포자발아율 실험을 수행한 결과와 이화학적 분석 결과는 그림 65과 표 41와 같다. 조사 지점 19개 지역 모두에서 50% 이상의 포자 발아관 길이 성장을 보였으며, 생물독성 평가 결과 모두 비오염 지역으로 평가되었다.

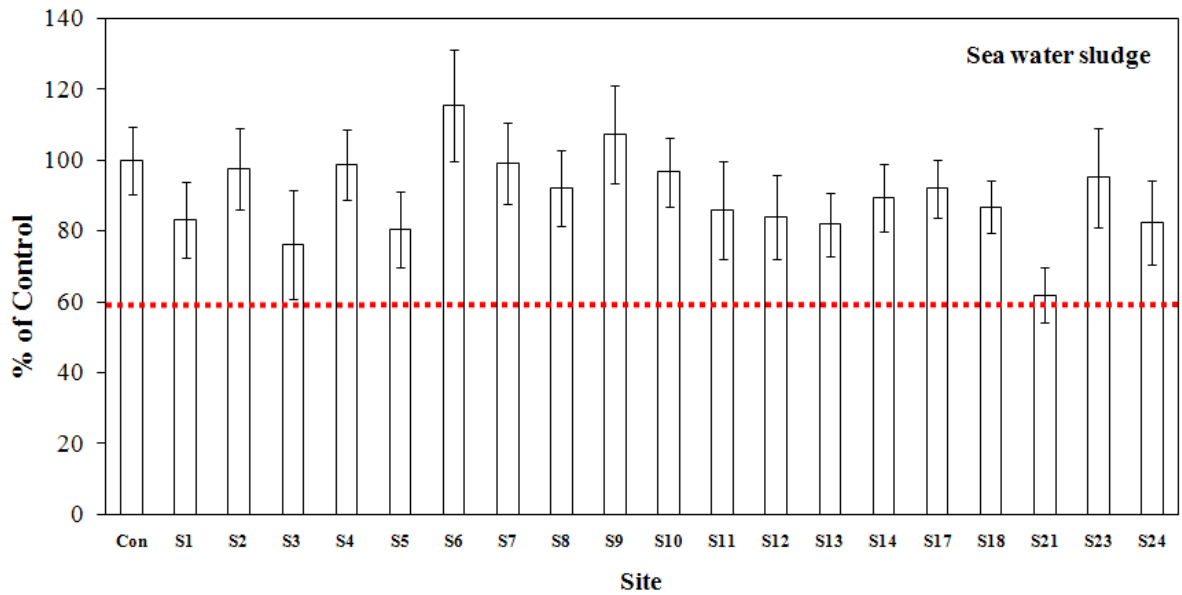


그림 65. 미역 포자 발아관 길이 성장을 이용한 연안 퇴적물 시료의 평가

표 41. 해양오니의 지점별 이화학적 분석 결과

검사항목 채취지점	COD (mg/kg)	T-S (%)	Ignition Loss(%)	Cu (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Hg (mg/kg)	TOC (%)
S1	6,564.4	0.065	3.96	29.018	12.430	1.020	347.915	130.685	11,278.743	26.601	0.0284	0.542
S2	6,643.7	0.075	3.80	11.352	11.044	0.884	243.708	112.209	10,554.237	17.811	0.0288	0.525
S3	5,822.7	0.094	4.57	13.698	13.538	1.015	284.509	102.962	11,700.610	23.426	0.0269	0.706
S4	3,685.9	0.081	2.44	9.037	9.154	0.745	177.454	86.833	9,576.928	19.975	0.0088	0.263
S5	9,320.3	0.081	5.43	15.701	16.586	1.185	443.377	120.129	13,150.580	33.251	0.0762	0.833
S6	3,561.4	0.064	2.39	6.099	7.021	0.531	182.672	52.390	6,876.101	13.217	0.0136	0.308
S7	4,870.0	0.028	2.33	6.091	8.903	0.585	276.737	81.582	7,804.281	14.534	0.0090	0.307
S8	8,762.0	0.105	6.56	18.534	14.201	1.091	466.787	104.621	12,181.803	26.495	0.0322	1.006
S9	5,185.3	0.084	3.68	11.033	10.962	0.908	195.715	90.390	10,138.097	17.913	0.0196	0.520
S10	4,105.2	0.056	2.29	5.781	8.102	0.610	216.299	73.715	7,980.295	10.548	0.0108	0.315
S11	2,579.0	0.049	2.54	8.311	10.595	0.720	365.459	71.219	9,010.406	11.994	0.0094	0.351
S12	873.5	0.029	1.74	5.320	6.376	0.528	142.473	46.239	6,892.107	9.138	0.0063	0.101
S13	1,763.4	0.010	1.35	5.665	6.314	0.525	199.076	54.291	6,871.431	6.804	0.0001	0.081
S14	1,381.2	0.019	1.32	3.340	8.206	0.460	383.757	60.304	6,298.479	9.185	0.0000	0.079
S17	10,905.5	0.098	5.80	16.799	13.688	0.959	379.812	81.377	11,091.001	26.188	0.0842	0.907
S18	3,506.3	0.098	4.46	10.831	9.762	0.813	240.360	71.732	10,013.270	18.019	0.0076	0.872
S21	8,423.4	0.086	3.68	9.538	10.333	0.874	275.400	74.821	10,458.454	13.701	0.0187	0.533
S23	3,621.0	0.006	1.96	9.044	7.227	0.729	157.298	74.603	8,983.042	12.092	0.0072	0.199
S24	8,610.4	0.081	5.33	16.621	14.839	1.015	376.956	84.818	11,755.439	29.517	0.0385	0.814
S26	5,303.6	0.049	2.35	6.730	8.135	0.644	158.705	54.052	8,101.070	16.164	0.0053	0.241
S30	225.0	0.013	0.93	5.732	3.501	0.204	282.098	42.578	3,104.241	4.305	0.0000	0.000

나) 산업폐수 (3월과 6월)의 생태독성평가

2010년 3월에 산업폐수 10개 지점에서 채수한 시료 원수에 대한 포자 발아관 길이 생장 실험을 수행한 결과와 이화학적 분석 결과는 그림 66와 표 42과 같다. 조사 지점 10개 지역 중 4개 지점에서 50% 이하의 낮은 포자 발아관 길이 생장을 보였으며, 특히 W4, W8 지점에서는 포자 발아관 길이 생장이 일어나지 않는 것으로 보여 가장 오염도가 높은 지역으로 평가되었다.

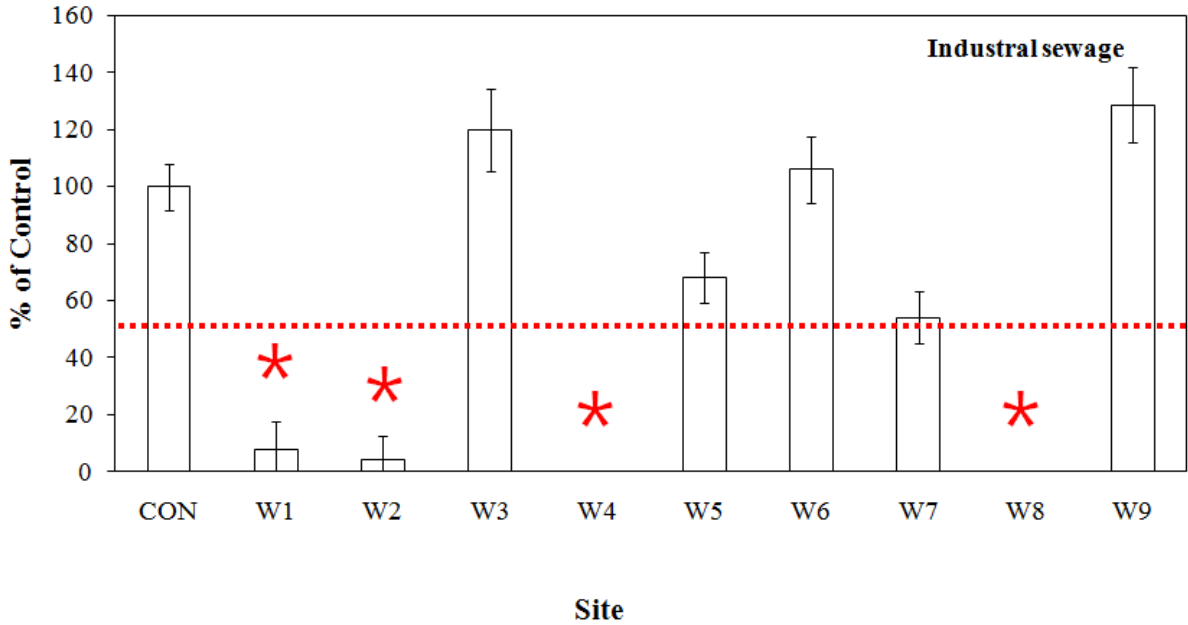


그림 66. 미역 포자 발아관 길이 생장을 이용한 산업폐수 (3월)의 평가

표 42. 산업폐수 (3월)의 지점별 이화학적 분석 결과

검사항목 채취지점	TN	TP	SS	CN	phend	F	Cu	Pb	Cd	Cr	G6	Zn	Mn	Fe	As	Hg
W1	43.833	0.035	7.2	ND	0.013	0.303	0.014	ND	ND	ND	ND	0.016	0.015	0.417	ND	0.000
W2	69.527	0.595	61.4	0.030	0.002	1.06	0.015	0.00	ND	ND	ND	0.047	0.039	1.883	ND	0.000
W3	0.956	0.024	1.2	0.000	0.004	0.145	ND	ND	ND	ND	ND	0.036	0.194	0.126	ND	0.000
W4	130.700	0.051	26.0	0.009	0.007	26.337	0.645	ND	ND	ND	ND	0.012	0.186	5.139	ND	0.000
W5	2.346	0.098	2.0	0.001	0.005	0.042	ND	ND	ND	ND	ND	0.020	0.015	0.094	ND	0.000
W6	2.189	0.038	0.2	0.003	0.006	0.088	0.012	ND	ND	ND	ND	0.013	ND	0.056	ND	0.000
W7	10.435	0.846	62.0	0.001	0.005	1.265	2.821	ND	ND	ND	ND	0.051	0.378	14.578	ND	0.000
W8	6.522	0.739	15.0	0.152	9.700	0.89	330.8	ND	ND	0.268	ND	0.114	0.549	188.691	ND	0.000
W9	2.088	0.030	10.0	0.003	0.005	0.461	0.426	ND	ND	ND	ND	0.067	0.033	3.316	ND	0.000

3월 산업폐수 시료 원수에 대한 포자 발아관 길이 성장 실험에서 대조군 대비 50% 이하의 발아율을 나타내는 4개 지점과 추가적으로 W7 지점을 대상으로 반수 희석 미역 포자 발아관 길이 성장을 이용하여 독성 평가를 시행하였을 때, 5지점에서 농도 반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 67).

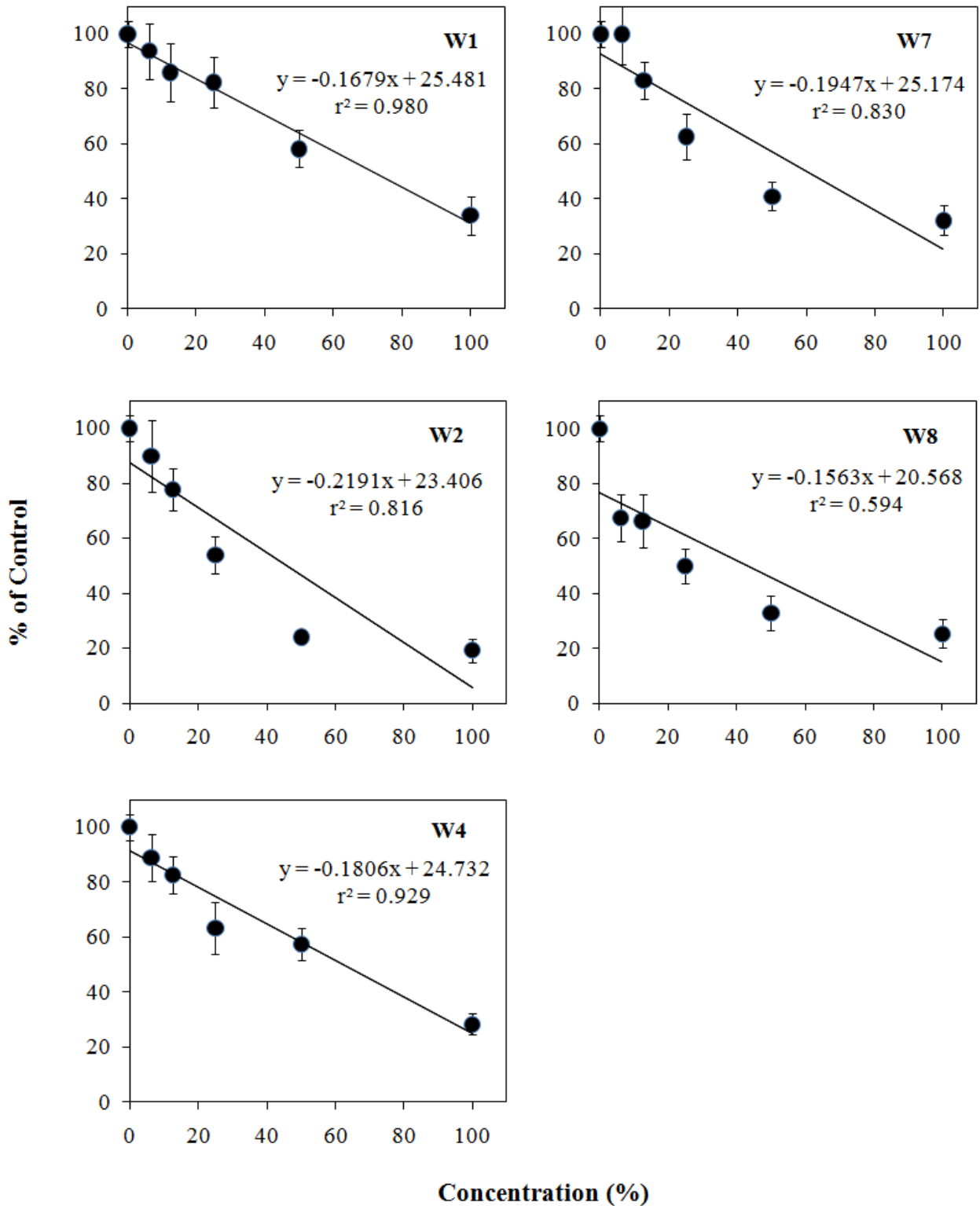


그림 67. 미역의 포자 발아관 길이 성장률을 이용한 산업폐수 (3월) 수질 평가 결과

산업폐수와 포자 발아관 길이 생장의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 수질을 평가해 보았을 때, 조사된 5지점 중 W8 지점의 원수가 가장 오염도가 높은 것으로 나타났다 (표 43).

표 43. 미역 포자 발아관 길이 생장률을 이용한 산업폐수 (3월)의 생태독성평가 결과 (단위 %)

채수지점	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	TU
W1	6.25	12.5	9.322 (4.138 ~ 22.309)	67.031 (52.887 ~ 78.835)	9.404	1.492
W2	6.25	12.5	6.243 (2.856 ~ 9.576)	28.385 (24.143 ~ 33.081)	8.328	3.523
W4	6.25	12.5	5.599 (3.118 ~ 12.435)	62.622 (52.002 ~ 68.936)	6.774	1.597
W7	6.25	12.5	9.927 (5.065 ~ 11.567)	39.604 (33.011 ~ 44.807)	7.528	2.525
W8	<6.25	6.25	1.923 (1.613 ~ 2.792)	24.983 (21.180 ~ 32.661)	13.182	4.003

3월 산업폐수의 이화학적 분석 결과와 W4 지점의 EC₅₀ 간의 관계를 보고 농도를 계산한 결과, 62.622%의 원수 속에 구리가 0.403 mg/L 들어 있음을 산출하였고, W7 지점의 구리함량은 원수 39.604% 속에 0.903 mg/L 들어 있음을 알아내었으며, W8 지점의 구리함량은 원수 24.983% 속에 8.256 mg/L 들어 있음을 알아내었다. 이는 미역 포자 발아율 단일독성원 테스트 결과에서 산출된 구리의 EC₅₀값 0.045 mg/L 보다 높은 수치임을 알 수 있다. 따라서 포자 발아율의 저해요인으로 구리의 영향이 있었을 것으로 판단된다. 반면 W1 지점과 W2 지점은 단일 독성원 테스트 결과와 비교하였을 때 모든 중금속에서 발아율을 저해하는 농도보다 낮게 산출되었다. 이는 서로 다른 단일독성원이 혼합되어 각각의 영향보다 더 큰 영향을 끼친 것으로 판단되며, 복합적인 독성원 실험이 추가적으로 요구된다.

포자의 발아율을 종말점으로 한 산업폐수 생태독성 평가기법은 CV가 15%이하로 매우 안정된 진단기법임을 시사했다.

2010년 6월에 산업폐수 10개 지점에서 채수한 시료 원수에 대한 포자 발아관 길이 성장 실험을 수행한 결과와 이화학적 분석 결과는 그림 68과 표 44와 같다. 조사 지점 9개 지역 중 5개 지점에서 50% 이하의 낮은 포자 발아관 길이 성장을 보였으며, 특히 5개 지점 모두 포자 발아관 길이 생장이 일어나지 않는 것으로 보여 오염도가 높은 지역으로 평가되었다.

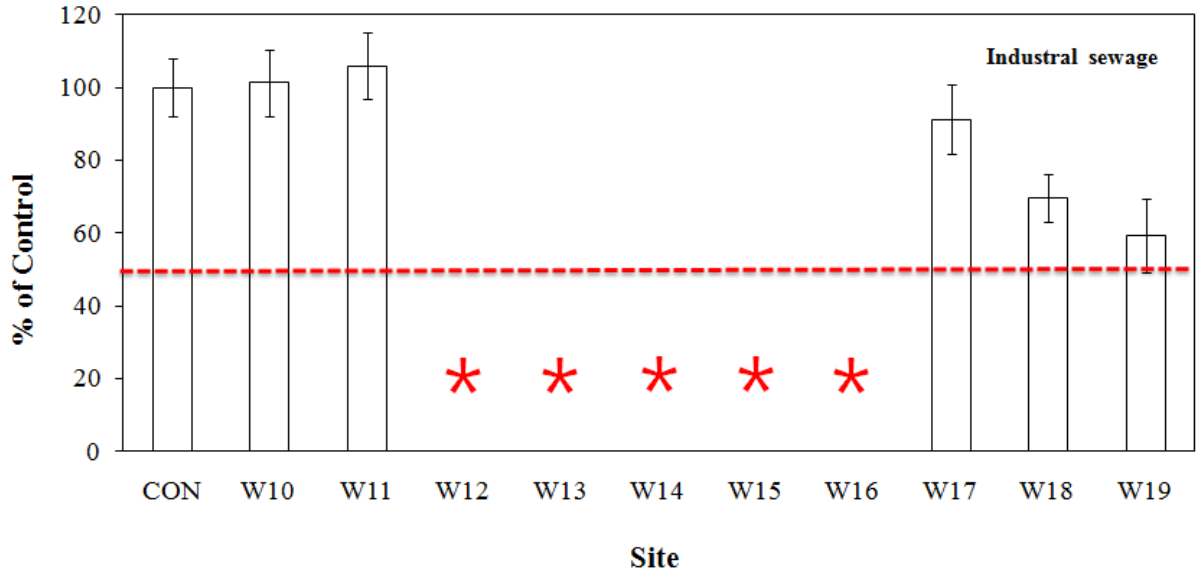


그림 68. 미역 포자 발아관 길이 성장을 이용한 산업폐수 (6월)의 평가

표 44. 산업폐수 (6월)의 지점별 이화학적 분석 결과

검사항목 채취지점	TN	TP	SS	CN	phenol	F	Cu	Pb	Cd	Cr	Cr6	Zn	Mn	Fe	As	Hg
W10	1.884	0.168	5.2	ND	ND	0.34	ND	ND	ND	ND	ND	0.056	0.010	0.134	ND	ND
W11	8.417	0.046	1.2	ND	ND	ND	0.034	ND	ND	ND	ND	0.114	0.009	0.339	ND	0.001
W12	78.608	0.051	13.0	0.750	ND	25.55	5.522	0.226	ND	0.019	ND	0.039	0.037	2.879	ND	0.001
W13	53.089	0.143	4.8	2.000	ND	1.55	0.247	ND	ND	0.039	ND	0.020	0.106	0.656	ND	0.002
W14	4.911	0.053	9.8	ND	ND	ND	0.011	ND	ND	0.133	ND	0.019	0.061	0.235	ND	ND
W15	12.338	1.409	2.0	0.360	ND	ND	0.700	ND	ND	0.033	ND	0.011	0.110	2.253	ND	0.001
W16	130.202	48.780	588.0	ND	ND	0.34	1.739	0.119	ND	0.101	ND	2.068	0.739	25.822	ND	0.001
W17	7.997	ND	1.2	ND	ND	2.290	ND	ND	ND	0.035	ND	ND	0.217	0.096	ND	ND
W18	10.777	0.060	15.0	13.290	12.377	ND	0.013	ND	ND	ND	ND	0.388	0.046	0.727	ND	ND
W19	45.780	0.315	8.8	ND	ND	0.21	1.018	ND	ND	0.111	ND	0.480	0.077	2.176	ND	ND

6월 채수한 산업폐수 시료 원수에 대한 포자 발아관 길이 성장 실험에서 대조군 대비 50% 이하의 성장을 나타내는 5지점에 대해 반수 희석법으로 정밀 실험을 한 결과 시료의 농도와 포자 발아관 길이 성장 사이에 r^2 값이 0.7이상을 기록하는 역회귀관계를 나타내었다 (그림 69).

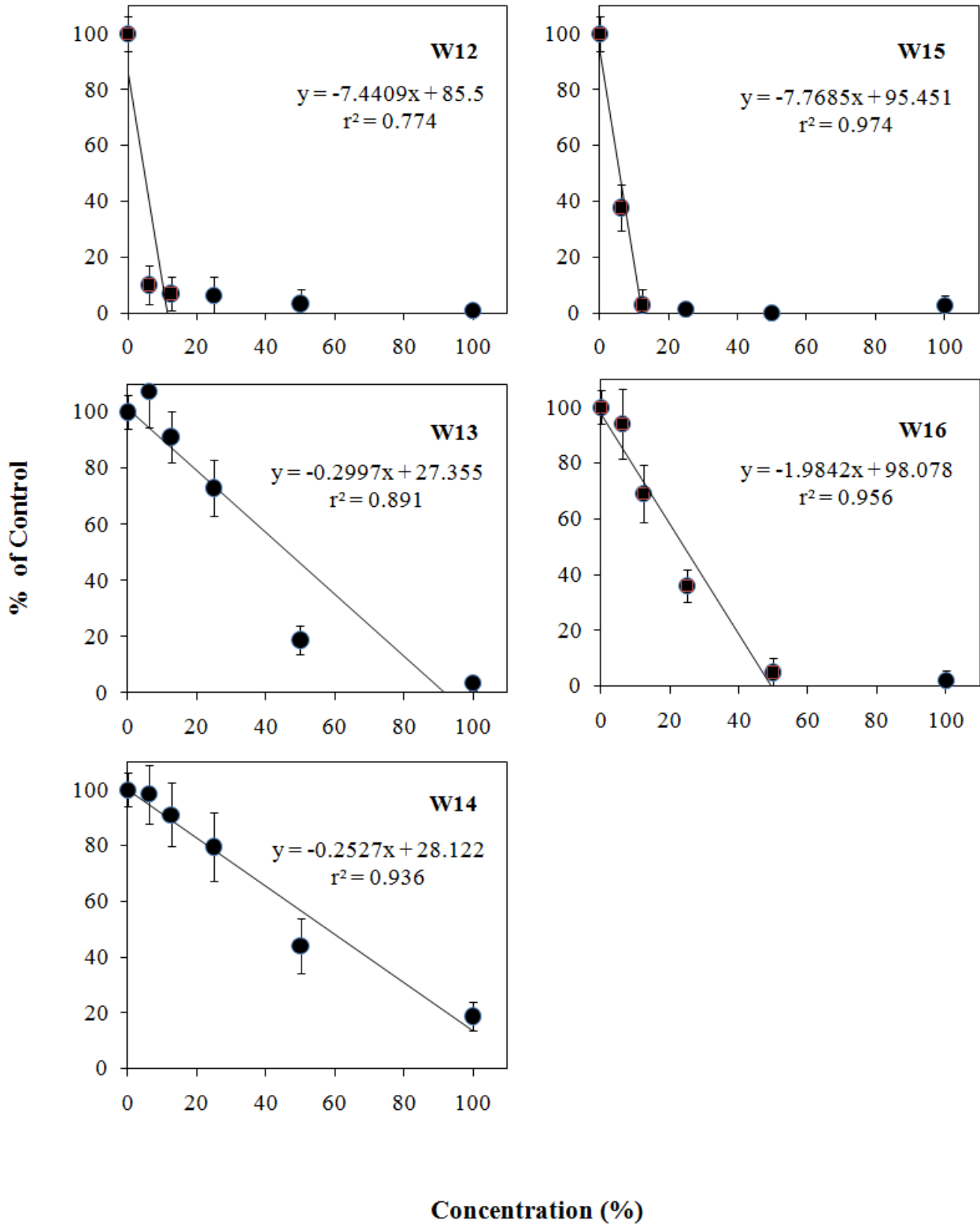


그림 69. 미역 포자 발아관 길이 성장률을 이용한 산업폐수 (6월) 수질 평가 결과

산업폐수와 포자 발아관 길이 생장의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 수질을 평가해 보았을 때, 조사된 5지점 중 W12 지점의 원수가 가장 오염도가 높은 것으로 나타났다 (표 45).

표 45. 미역 포자 발아관 길이 성장률을 이용한 산업폐수 (6월)의 생태독성평가 결과 (단위 %)

채수지점	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	TU
W12	< 6.25	6.25	0.694 (0.663~0.742)	3.472 (3.314~3.712)	3.045	28.802
W13	12.5	25	11.446 (8.935~17.424)	34.784 (30.667~37.490)	4.878	2.875
W14	12.5	25	13.719 (5.873~21.716)	45.771 (40.275~54.823)	8.010	2.185
W15	< 6.25	6.25	1.004 (0.896~1.1635)	5.024 (4.481~5.817)	7.031	19.904
W16	6.25	12.5	7.280 (3.972~8.829)	19.737 (17.345~21.598)	5.913	5.067

6월 산업폐수의 이화학적 분석 결과와 W12 지점의 EC₅₀ 간의 관계를 보고 농도를 계산한 결과, 3.472%의 원수 속에 구리가 0.191 mg/L 들어 있음을 산출하였고, W13 지점의 구리함량은 원수 34.784% 속에 0.085 mg/L 들어 있음을 알아내었으며, W16 지점의 구리함량은 원수 19.737% 속에 0.343 mg/L 들어 있음을 알아내었다. 이는 미역 포자 발아율 단일독성원 테스트 결과에서 산출된 구리의 EC₅₀값 0.045 mg/L 보다 높은 수치임을 알 수 있다. 따라서 포자 발아율의 저해요인으로 구리의 영향이 있었을 것으로 판단된다. 반면 W14 지점과 W15 지점은 단일 독성원 테스트 결과와 비교하였을 때 모든 증금속에서 발아율을 저해하는 농도보다 낮게 산출되었다. 이는 서로 다른 단일독성원이 혼합되어 각각의 영향보다 더 큰 영향을 끼친 것으로 생각되며, 복합적인 독성원 실험이 추가적으로 요구된다. 특히, W12 지점과 W15 지점의 시료에서는 평균 TU값이 10이상을 보여 오염정도가 심각한 것으로 평가되었다.

포자의 발아율을 종말점으로 한 산업폐수 생태독성 평가기법은 CV가 10%이하로 매우 안정된 진단기법임을 시사했다.

차. 미역 (*Undaria pinnatifida*) 배우체 성장 평가법 (15℃, 144시간)

항목	시험조건
측정요소	미역 배우체 면적 성장 (EC ₅₀)
시험생물	미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>)
시험기간	144 h
온도	15 ± 1℃
염분	25~35 psu
광종류	백색형광등
광도	1500~4000 lux (30~80 μmol m ⁻² s ⁻¹)
광주기	12 h 명기, 12 h 암기
시험용기	24구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음
시험용액 부피	2.5 mL/replicate
시험생물 크기	지름 25 μm
반복구당 시험생물 수	1 x 10 ⁶
시험농도	대조구 + 최소 5 개 농도 구간
반복수	4개
측정요소	총 10개체의 면적 상대성장률
시험적합도	대조구에서의 배우체 면적 상대성장률은 29.54 ± 1.81%
공기주입	주입하지 않음

(1) 시험 중

시험 중으로 Laminariales (다시마 목), Alariaceae (미역과), *Undaria* (미역 속), *Undaria pinnatifida* (미역 종)를 사용하였다.

(2) 평가방법

가) 평가 기간

; 시험개시 후 144시간

나) 시험농도

; 대조군, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100%

다) 시험용액제조

① 시험용액은 OTT's (1965) 인공해수를 사용하였다.

② 시험용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 준비하였다.

(3) 배양방법

가) 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척하였다.

나) 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관하였다.

다) 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도하였다.

라) 유도된 포자액을 20 mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 주었다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼았고, 항온배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양하였다.

마) 포자가 부착된 커버글라스를 24구 웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣었다.

바) 배양 온도, 광선, 광주기 조건은 각각 15°C , $30\sim 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량, 12:12-h 명암주기로 하였다.

(4) 최적 환경조건 확립

; 배우체 성장 유도를 위한 최적 환경 조건을 알아보려고 다양한 광조사량, pH, 염분 및 온도하에서 24시간 배양연구를 수행하였다 (그림 70). 그 결과, 배우체 성장을 위한 최적 광조사량은 $30\sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH는 8, 염분은 25~55 psu 그리고 온도는 $5\sim 20^\circ\text{C}$ 로 나타났다.

(5) 측정방법

; 광학현미경 상에서 배우체 30개체를 대상으로 배양 직전의 초기치 면적을 측정한 뒤 144시간 배양 후 면적을 측정하여 상대성장률로 계산하였다. 모든 과정은 영상분석장치 (Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 배우체를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어졌다.

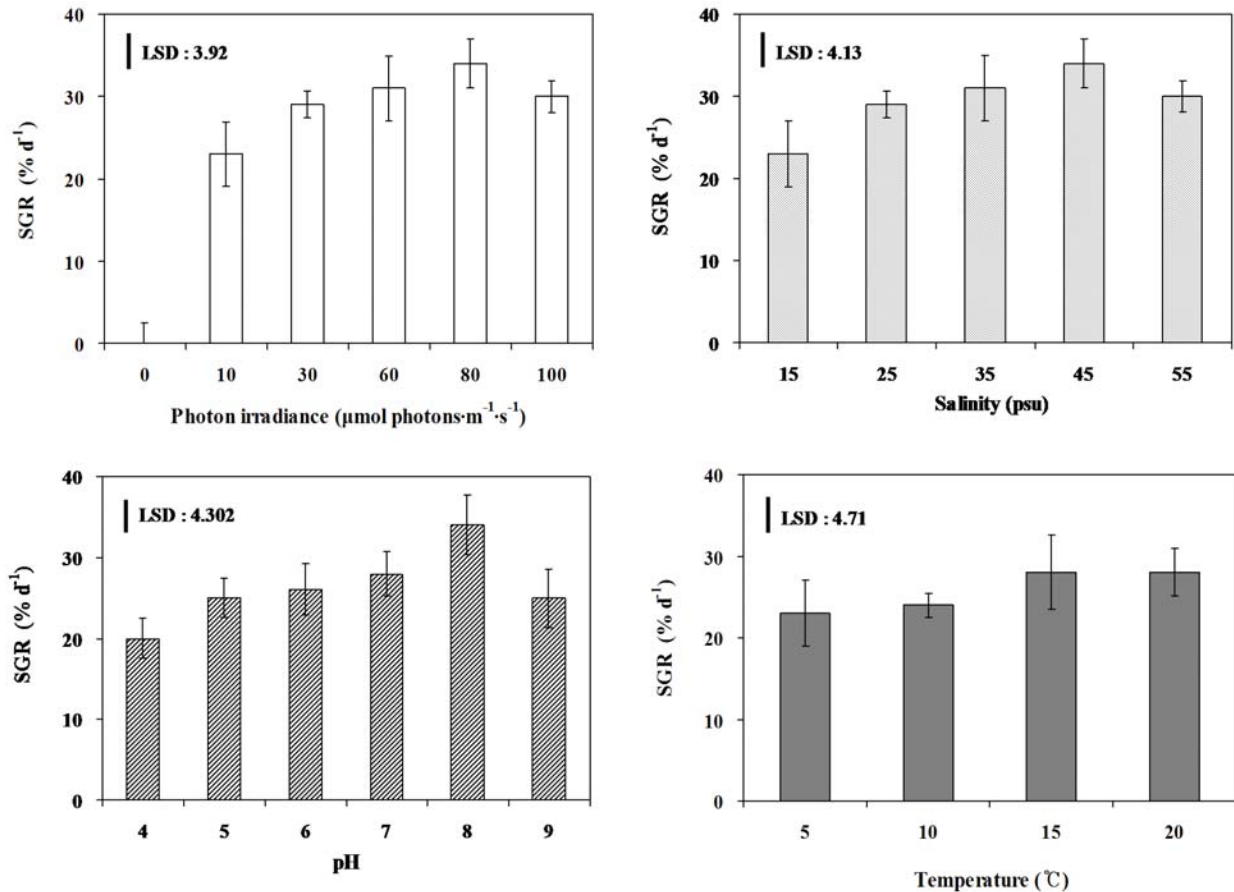


그림 70. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 미역 배우체 성장률

(6) 자료분석

가) 자료정리

; 배우체 성장률은 대조군의 배우체 성장률에 대한 실험군의 배우체 성장률을 비교하여 나타내었다.

나) 통계처리

; 미역 배우체 성장을 이용한 독성시험의 측정값 (endpoints)은 성장 억제 효과에 기반을 두었다. 배우체 성장에 대한 EC₅₀은 점예측기법(point estimation techniques)을 써서 계산하였다. LOEC 및 NOEC값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였고, EC₅₀ 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다. 독성시험 결과는 EC₅₀ 값으로 표현할 경우, 값이 작을수록 독성도가 커지므로, 이런 문제를 보완하고자 독성값을 비교하기 위하여 독성단위 (Toxic Unit, TU)를 아래와 같이 계산하여 사용하였다.

$$TU = 100 / EC_{50} (\%)$$

(7) 대조군 차트

; 25회의 서로 다른 배우체 상대성장률 측정 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다 (그림 71). 배우체 상대성장률 측정 시험법의 평균 배우체 상대성장률은 29.54 ± 1.81 %로 나타났다.

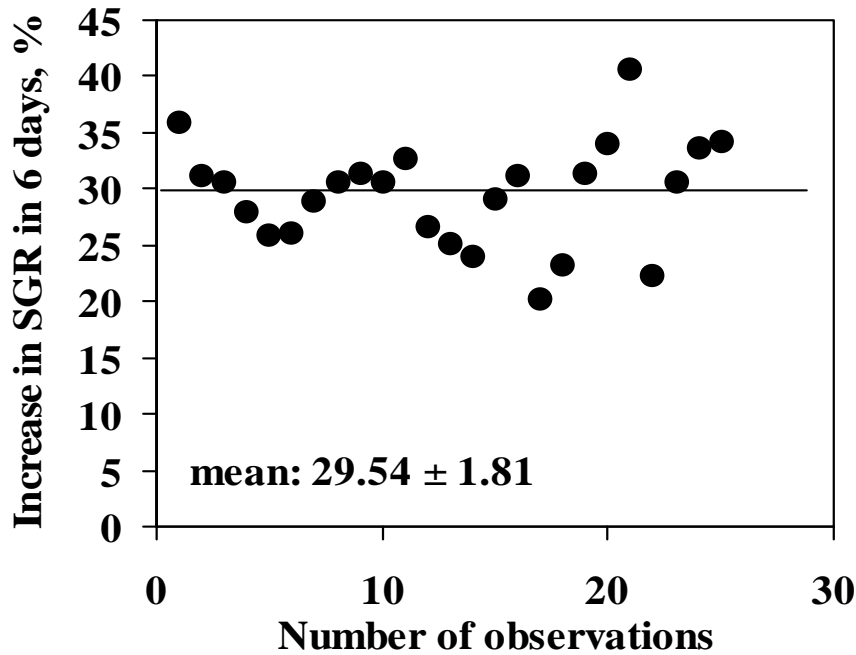


그림 71. 144시간 후 측정된 미역 배우체 상대성장률 대조군 차트

(8) 단일독성원에 대한 생태독성평가

가) 중금속 (heavy metals)

표준 중금속 8종을 여러 가지의 농도로 구배하여 미역 배우체의 상대성장률을 이용하여 독성평가 하였을 때, 모든 중금속에서 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 72).

표준 중금속과 배우체 상대성장률의 관계로부터 얻은 EC_{50} 값을 기준으로 보았을 때, 배우체 상대성장률은 중금속 종류에 따라 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 평가되었다 (표 46).

중금속 8종의 농도와 미역 배우체 상대성장률을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 카드뮴 (Cd)의 경우, 3.708 mg/L에서 상대성장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준을 나타냈다. 코발트 (Co) 노출군에서는 농도 1.000 mg/L에서 상대성장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준을 나타냈다. 6가 크롬 (Cr)의 경우, 1.983 mg/L에서 상대성장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 구리 (Cu) 0.063 mg/L에 노출된 배우체 상대성장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났다. 수은 (Hg) 노출군에서는 농도 0.053 mg/L에서 상대성장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 0.1 mg/L 이상의 농도에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다. 니켈 (Ni)에서는 2.674 mg/L에서 배우체의 상대성장률이 대조군의 약 50% 수준으로 감소하였다. 납 (Pb)과 아연 (Zn)에서는 각각 4.738mg/L과 1.070 mg/L에서 상대성장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났다.

EC_{50} 값을 기준으로 한 중금속 민감성은 $Hg > Cu > Co > Zn > Cr6 > Ni > Cd > Pb$ 순으로 나타났다. 배우체 상대성장률을 종말점으로 중금속 생태독성 평가기법은 CV가 30%이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

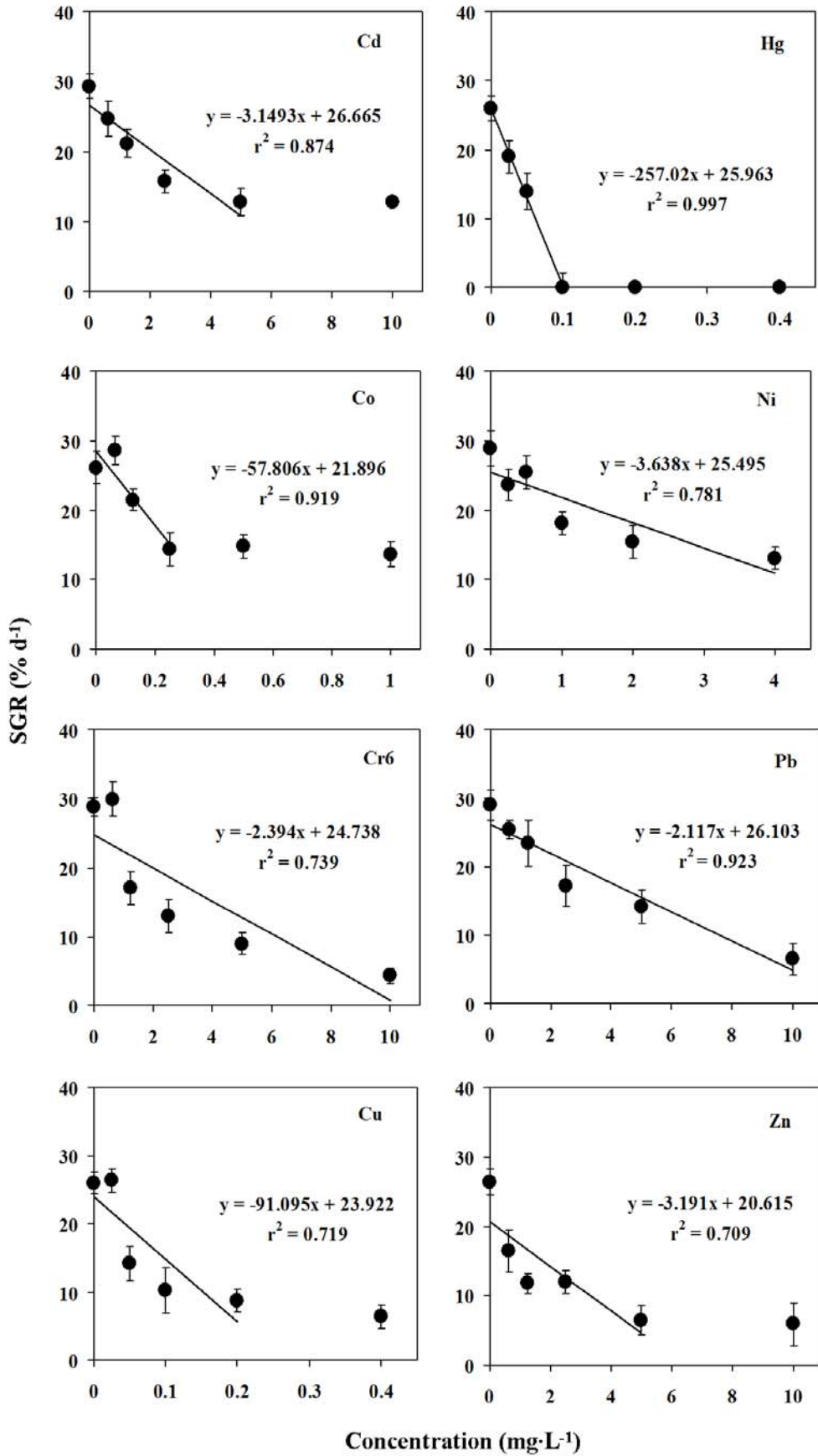


그림 72. 중금속 농도에 따른 미역 배우체 상대성장률

표 46. 미역 배우체 생장을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과 (단위 mg/L)

Metals	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)
Cd (10 mg/L)	< 0.625	0.625	0.390 (0.262~0.739)	3.708 (-)	NA
Co (1 mg/L)	0.0625	0.125	0.092 (0.084~0.105)	1.000 (-)	NA
Cr6 (10 mg/L)	0.625	1.25	0.774 (0.711~0.812)	1.983 (1.249~2.880)	18.420
Cu (0.4 mg/L)	0.025	0.05	0.030 (0.026~0.032)	0.063 (0.047~0.106)	24.094
Hg (0.4 mg/L)	< 0.025	0.025	0.009 (0.007~0.015)	0.053 (0.045~0.062)	8.551
Ni (20 mg/L)	< 0.25	0.25	0.165 (0.107~0.547)	2.674 (-)	NA
Pb (20 mg/L)	0.625	1.25	0.507 (0.332~1.324)	4.738 (2.870~5.949)	16.676
Zn (10 mg/L)	< 0.625	0.625	0.167 (0.131~0.242)	1.070 (0.817~1.683)	24.385

나) 휘발성 유기화합물 (VOCs; Volatile Organic Compounds)

휘발성 유기화합물 (VOCs) 6종을 여러 가지의 농도로 구배하여 미역의 배우체 상대생장률을 비교하였을 때, 배우체 상대생장률은 휘발성 유기화합물 (VOCs) 6종 모두와 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 73).

휘발성 유기화합물 (VOCs) 6종의 농도와 미역 배우체 상대생장률을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 아세톤 (Acetone)에 노출된 경우 7.901 mL/L에서 상대생장률이 대조군의 약 50% 수준으로 감소하였으며, 40 mL/L에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다. 클로로포름 (Chloroform)은 0.629 mL/L에서 상대생장률이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났다. 디메틸황산화물 (DMSO; Dimethyl sulfoxide)은 9.370 mL/L에서 상대생장률이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났으며, 40 mL/L에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다. 에틸알코올 (Ethyl alcohol) 처리군에서는 1.569 mL/L에서 대조군의 약 50%에 해당되는 배우체 상대생장률을 나타냈으며, 10 mL/L에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다. 포르말린 (Formaldehyde)에 노출된 경우, 0.0018 mL/L에서 상대생장률이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났으며, 0.005 mL/L에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다. 페놀 (Phenol)에 노출된 경우 0.027 mL/L에서 상대생장률이 대조군의 약 50%수준으로 감소하였으며, 0.25 mL/L에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다.

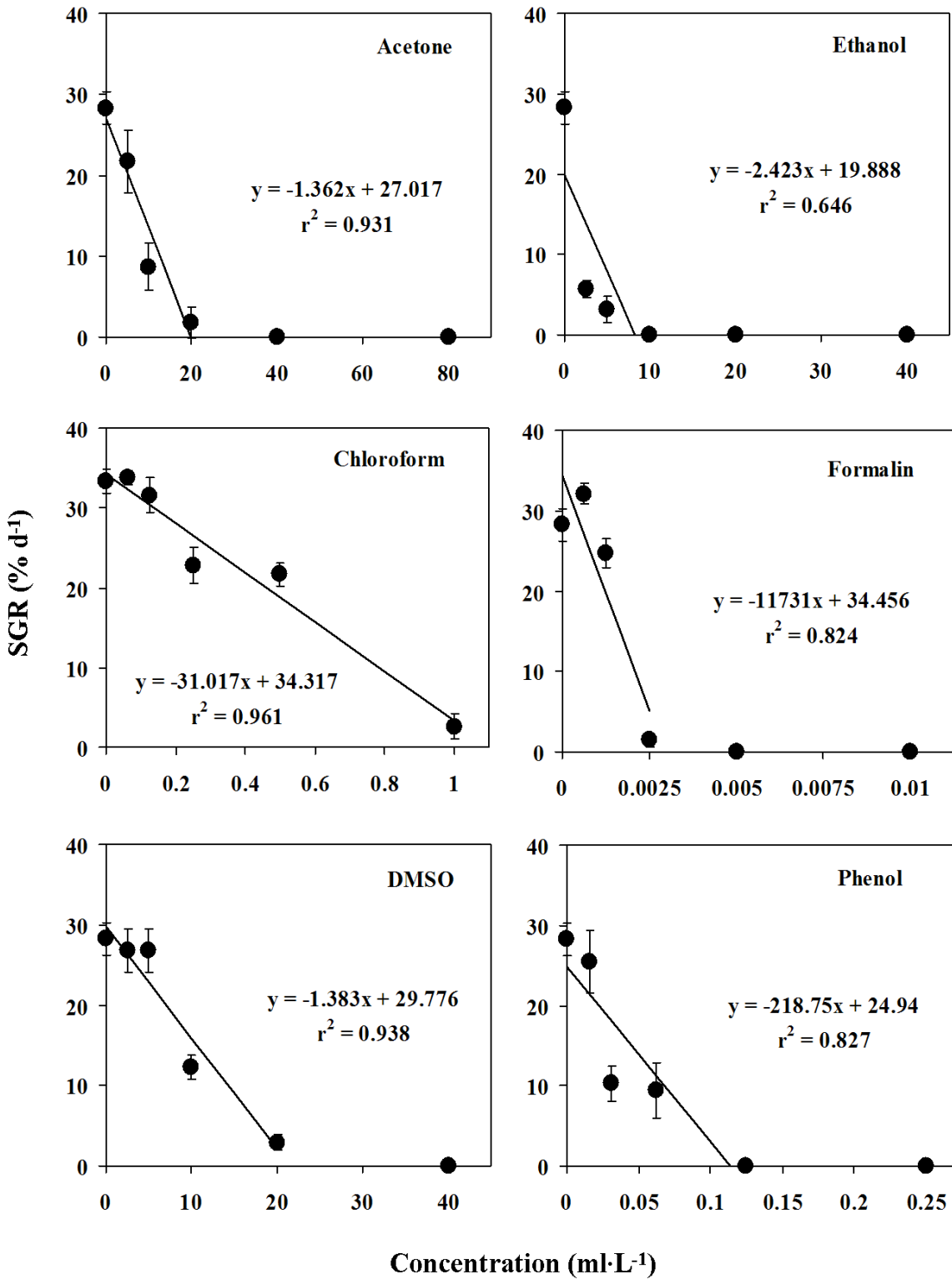


그림 73. 휘발성 유기화합물에 따른 미역 배우체 상대성장률

휘발성 유기화합물 (VOCs) 6종과 배우체 상대성장률의 관계로부터 얻은 EC₅₀ 값을 기준으로 비교해 보았을 때, 휘발성 유기화합물 (VOCs) 종류에 따른 배우체 상대성장률은 다음 표 47과 같이 평가되었다.

미역 배우체 상대성장률을 종말점으로 한 환경유해물질 생태독성 평가기법은 CV가 10% 이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

표 47. 미역 배우체 상대성장률을 이용한 휘발성 유기화합물의 생태독성평가 결과 (단위 mL/L)

VOCs	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)
Acetone (80 mL/L)	< 5	5	2.145 (1.266~5.028)	7.901 (6.735~8.845)	6.405
Chloroform (1 mL/L)	0.125	0.25	0.145 (0.112~0.167)	0.629 (0.596~0.657)	2.517
DMSO (40 mL/L)	5	10	5.456 (2.035~5.918)	9.370 (8.794~9.808)	3.122
Ethanol (40 mL/L)	< 2.5	2.5	0.314 (0.301~0.331)	1.569 (1.506~1.653)	2.457
Formalin (0.01 mL/L)	0.000625	0.00125	0.0010 (0.0009~0.0012)	0.0018 (0.0017~0.0018)	1.837
Phenol (0.25 mL/L)	0.016	0.031	0.016 (0.007~0.018)	0.027 (0.026~0.029)	3.360

다) 환경유해물질

환경유해물질 트리부틸주석 (TBT; Bis-tributyltin)을 여러 가지의 농도로 구배하여 참다시마의 배우체 성장률을 비교하였을 때, 배우체 성장률은 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 74).

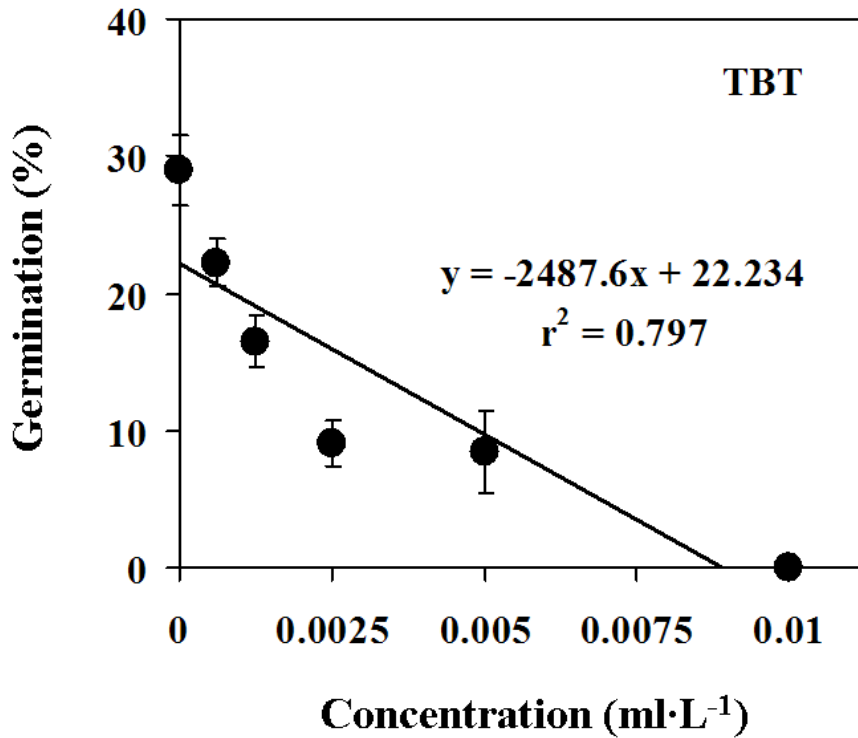


그림 74. 트리부틸주석의 농도에 따른 미역 배우체 상대성장률

환경유해물질 트리부틸주석 (TBT; Bis-tributyltin) 처리군에서는 0.0016 mL/L에서 대조군의 약 50%에 해당되는 상대성장률을 나타냈으며, 0.01 mL/L에서는 배우체 생장이 일어나지 않았다 (표 48).

표 48. 미역 배우체 상대성장률을 이용한 환경유해물질의 생태독성평가 결과 (단위 mL/L)

환경유해물질	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)
TBT (0.01 mL/L)	< 0.000625	0.000625	0.0003 (0.0002~0.0005)	0.0016 (0.0013~0.0019)	9.241

(9) 현장시료의 생태독성평가

가) 산업폐수 (6월)의 생태독성평가

2010년 6월 산업폐수 10개 지점에서 채수한 시료 원수에 대한 미역 배우체 상대생장률 실험을 수행한 결과와 이화학적 분석 결과는 그림 73과 표 49과 같다. 조사 지점 10개 지역 중 4개 지점에서 50% 이하의 낮은 배우체 성장을 보였다.

산업폐수 (6월) 시료 원수에 대한 배우체 상대생장률 실험에서 대조군 대비 50% 이하의 성장률을 나타내는 지점을 대상으로 반수 희석하여 미역 배우체 상대생장을 이용하여 독성 평가를 시행하였을 때, 5지점에서 농도 반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 75).

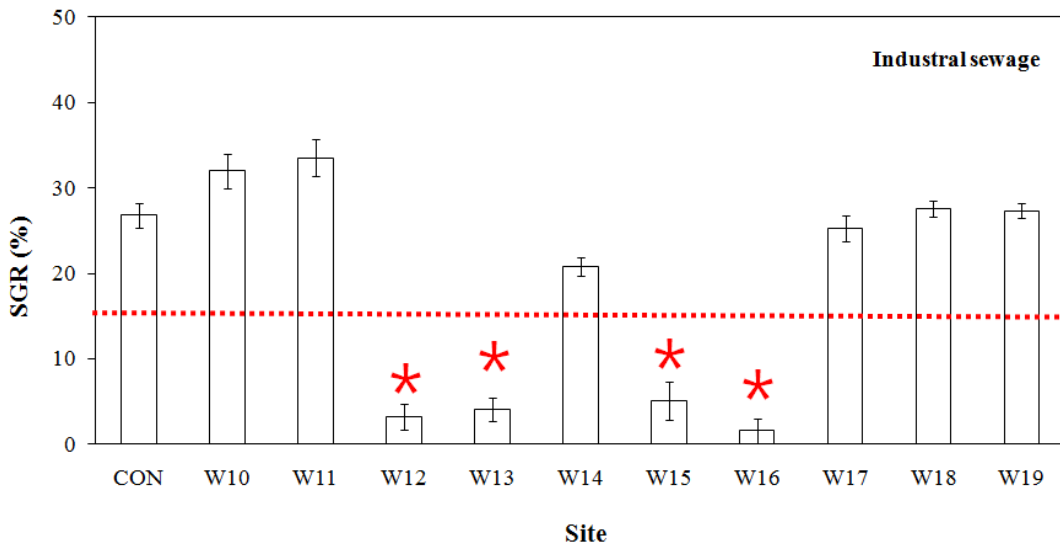


그림 75. 미역의 배우체 상대생장률을 이용한 산업폐수 (6월)의 수질 평가 예비 실험 결과

표 49. 산업폐수 (6월)의 지점별 이화학적 분석 결과

검사항목 채취지점	TN	TP	SS	CN	phenol	F	Cu	Pb	Cd	Cr	Cr6	Zn	Mn	Fe	As	Hg
W10	1.884	0.168	5.2	ND	ND	0.34	ND	ND	ND	ND	ND	0.056	0.010	0.134	ND	ND
W11	8.417	0.046	1.2	ND	ND	ND	0.034	ND	ND	ND	ND	0.114	0.009	0.339	ND	0.001
W12	78.608	0.051	13.0	0.750	ND	25.55	5.522	0.226	ND	0.019	ND	0.039	0.037	2879	ND	0.001
W13	53.089	0.143	4.8	2.000	ND	1.55	0.247	ND	ND	0.039	ND	0.020	0.106	0.656	ND	0.002
W14	4.911	0.053	9.8	ND	ND	ND	0.011	ND	ND	0.133	ND	0.019	0.061	0.235	ND	ND
W15	12.338	1.409	2.0	0.360	ND	ND	0.700	ND	ND	0.033	ND	0.011	0.110	2.253	ND	0.001
W16	130.202	48.780	580.0	ND	ND	0.34	1.739	0.119	ND	0.101	ND	2.068	0.739	25.822	ND	0.001
W17	7.997	ND	1.2	ND	ND	2.230	ND	ND	ND	0.035	ND	ND	0.217	0.036	ND	ND
W18	10.777	0.060	15.0	13.230	12.377	ND	0.013	ND	ND	ND	ND	0.388	0.046	0.727	ND	ND
W19	45.780	0.315	8.8	ND	ND	0.21	1.018	ND	ND	0.111	ND	0.480	0.077	2.176	ND	ND

산업폐수 (6월) 시료 원수에 대한 배우체 상대생장률 실험에서 대조군 대비 50% 이하의 성장률을 나타내는 지점을 대상으로 반수 희석 미역 배우체 상대생장률 이용하여 독성 평가를 시행하였을 때, 5지점에서 농도 반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 76).

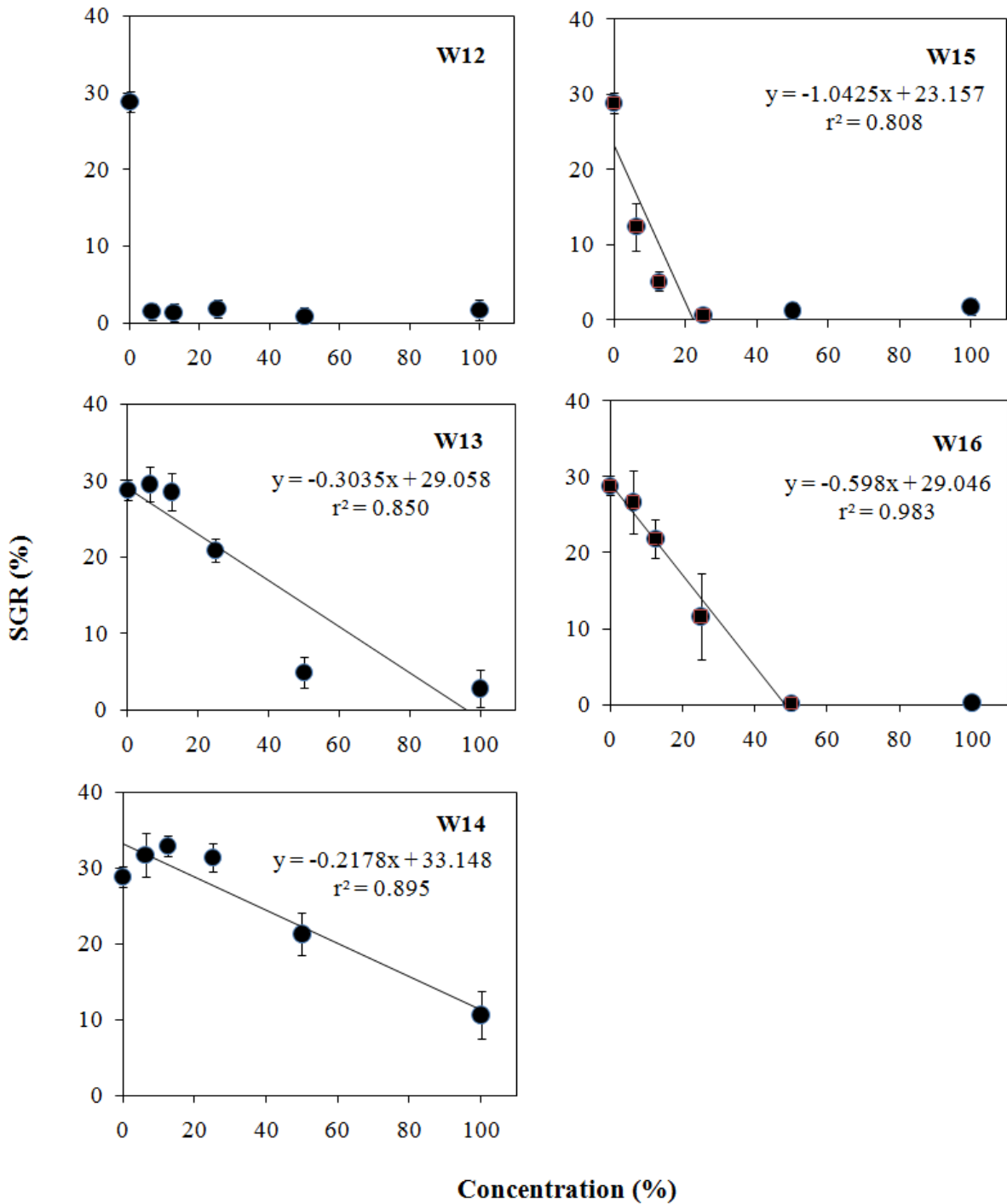


그림 76. 산업폐수 (6월) 농도에 따른 미역 배우체 상대생장률

산업폐수와 배우체 상대성장률의 관계로부터 얻은 TU값을 보면, W12 지점과 W15 지점의 시료에서는 평균 TU값이 30.29와 18.25로 매우 오염된 지역으로 평가되었다 (표 50).

표 50. 미역 배우체 상대성장률을 이용한 산업폐수 (6월)의 생태독성평가 결과 (단위 %)

채수지점	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	TU
W12	< 6.25	6.25	0.660 (0.651~0.687)	3.301 (3.259~3.438)	1.391	30.294
W13	12.5	25	16.245 (12.031~17.591)	34.874 (32.769~36.643)	2.932	2.867
W14	25	50	32.883 (28.321~35.344)	76.737 (67.026~85.863)	6.498	1.303
W15	< 6.25	6.25	1.095 (0.933~1.373)	5.478 (4.667~7.050)	10.729	18.255
W16	6.25	12.5	7.187 (3.351~9.505)	21.585 (18.260~29.943)	14.332	4.633

6월 산업폐수의 이화학적 분석 결과와 W12 지점의 EC₅₀ 간의 관계를 보고 농도를 계산한 결과, 3.301%의 원수 속에 구리가 0.182 mg/L 들어 있음을 산출하였고, W13 지점의 구리함량은 원수 34.874% 속에 0.086 mg/L 들어 있음을 알아내었으며, W16 지점의 구리함량은 원수 21.585% 속에 0.375 mg/L 들어 있음을 알아내었다. 이는 미역 포자 발아율 단일독성원 테스트 결과에서 산출된 구리의 EC₅₀값 0.063 mg/L 보다 높은 수치임을 알 수 있다. 따라서 포자 발아율의 저해요인으로 구리의 영향이 있었을 것으로 판단된다. 반면 W14 지점과 W15 지점은 단일 독성원 테스트 결과와 비교하였을 때 모든 중금속에서 발아율을 저해하는 농도보다 낮게 산출되었다. 이는 서로 다른 단일독성원이 혼합되어 각각의 영향보다 더 큰 영향을 끼친 것으로 판단되며, 복합적인 독성원 실험이 추가적으로 요구된다.

미역 배우체 상대성장률을 종말점으로 한 산업폐수 생태독성 평가기법은 CV가 20%이하로 나타나 안정된 진단기법으로 사료된다.

카. 미역 (*Undaria pinnatifida*) 배우체의 로봇형 엽록소 형광 평가법 (10℃, 144시간)

항목	시험조건
측정요소	미역 배우체 엽록소 형광값 (EC ₅₀)
시험생물	미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>)
시험기간	144 h
온도	20± 1℃
염분	25~35 psu
광종류	백색형광등
광도	500 lux (10 μmol m ⁻² s ⁻¹)
광주기	12 h 명기, 12 h 암기
시험용기	24구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음
시험용액 부피	2.5 mL/replicate
시험생물 크기	300 μm ²
반복구당 시험생물 수	300
시험농도	대조구 + 최소 5 개 농도 구간
반복수	4개
측정요소	총 5개체의 배우체 엽록소 형광값
시험적합도	대조구에서의 엽록소 형광값이 80% 이상
공기주입	주입하지 않음

(1) 시험 중

시험 중으로 Laminariales (다시마 목), Alariaceae (미역과), *Undaria* (미역 속), *Undaria pinnatifida* (미역 종)를 사용하였다.

(2) 평가방법

가) 평가 기간

; 시험개시 후 144시간

나) 시험농도

; 대조군, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100%

다) 시험용액제조

① 시험용액은 OTT's (1965) 인공해수를 사용하였다.

② 시험용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 준비하였다.

(3) 배양방법

가) 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척하였다.

나) 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관하였다.

다) 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도하였다.

라) 유도된 포자액을 20 mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 주었다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼았고, 항온배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 보관하였다.

마) 배우체가 부착된 커버글라스를 24구 웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣었다.

바) 배양 온도, 광선, 광주기 조건은 각각 20°C , $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량, 12:12-h 명암주기로 하였다.

(4) 최적 환경조건 확립

; 엽록소 형광 유도를 위한 최적 환경 조건을 알아보기 위하여 다양한 광조사량, pH, 염분 및 온도하에서 144시간 배양연구를 수행하였다 (그림 77). 그 결과, 엽록소 형광을 위한 최적 광조사량은 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH는 4.5~9.5, 염분은 15~55 psu 그리고 온도는 20°C 로 나타났다.

(5) 측정방법

; 배우체의 형광을 microscopy-PAM (Walz GmbH, Effeltrich, Germany)을 이용하여 측정하였다 (그림 78). 이 기계는 형광현미경 (model Axiostar plus, Zeiss GmbH, Göttingen, Germany), PAM control unit 그리고 시스템 조작을 위한 소프트웨어 (WinControl) 구동 컴퓨터로 구성되며 형광을 분석한다. Microscopy-PAM은 PSII의 최대 양자수율 (F_v/F_m)과 효과적 양자수율 $\Phi_{\text{psII}} = (F_m' - F)/F_m'$, 그리고 비광화학적 소광($\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'$)을 측정하였다 (Genty et al. 1989). 광범위하게 흡수계수가 개발되지 않은 관계로 PSII와 PSI 사이의 상대적인 전자전달율은 $r\text{ETR} = \Phi_{\text{psII}} \times \text{PFD} \times 0.5$ 로 계산되었다.

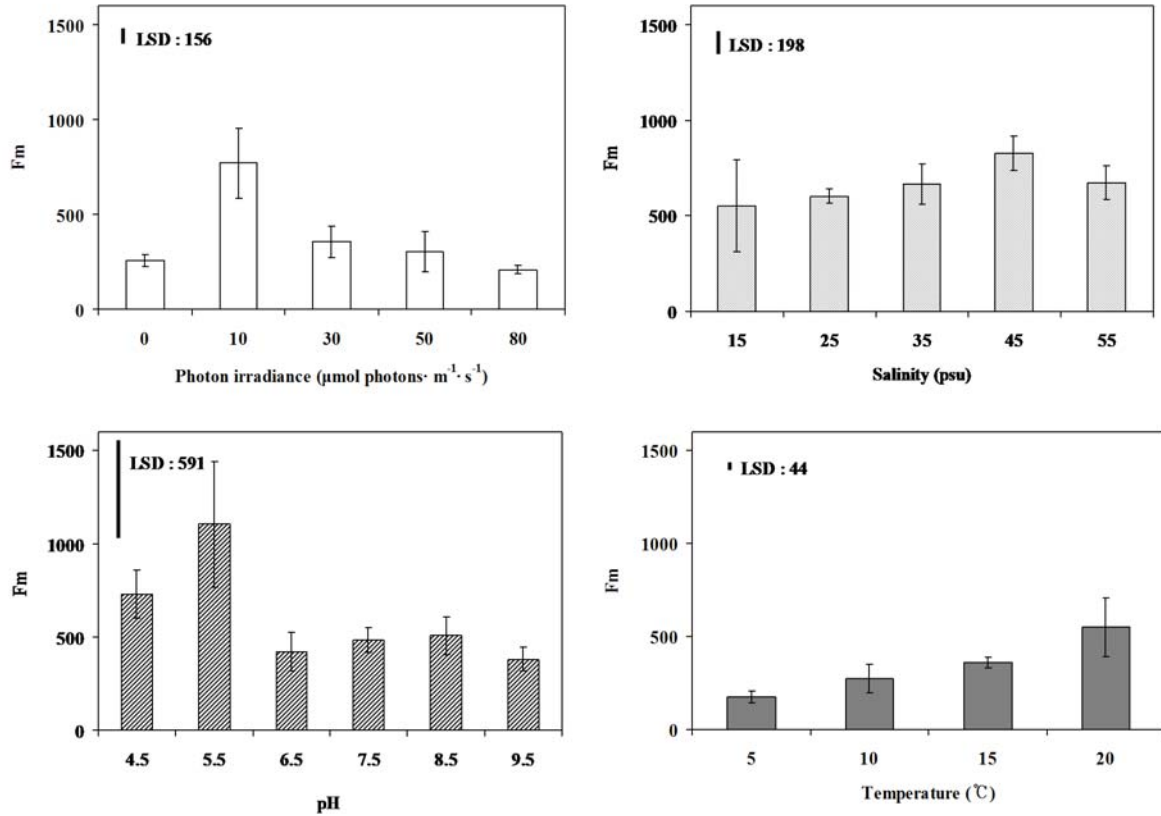


그림 77. 광조사량, pH, 염분, 온도에 따른 미역 배우체 엽록소 형광

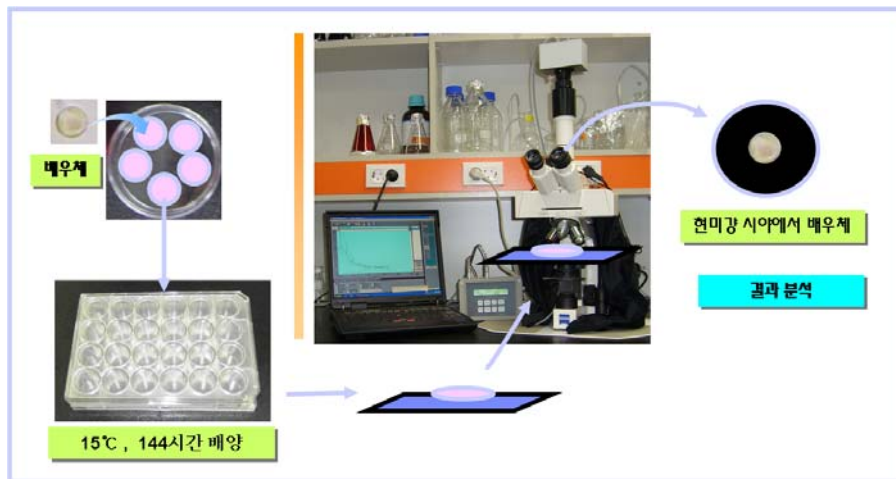


그림 78. 배우체 형광 측정 (mPAM)

(6) 자료분석

가) 자료정리

; 엽록소 형광은 대조군의 형광값 대한 실험군의 형광값을 비교하여 나타내었다.

나) 통계처리

; 미역 배우체 엽록소 형광을 이용한 독성시험의 측정값 (endpoints)은 엽록소 형광 억제 효과에 기반을 두었다. 엽록소 형광에 대한 EC₅₀은 점예측기법 (point estimation techniques)을 써서 계산하였다. LOEC 및 NOEC값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정

방법을 써서 계산하였고, EC₅₀ 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다. 독성시험 결과는 EC₅₀ 값으로 표현할 경우, 값이 작을수록 독성도가 커지므로, 이런 문제를 보완하고자 독성값을 비교하기 위하여 독성단위 (Toxic Unit, TU)를 아래와 같이 계산하여 사용하였다.

$$TU = 100 / EC_{50} (\%)$$

(7) 단일독성원에 대한 생태독성평가

가) 중금속 (heavy metals)

표준 중금속 구리를 여러 가지의 농도로 구배하여 미역 배우체 엽록소 형광의 독성 민감성을 평가하였다. 미역 배우체의 엽록소 형광은 구리 중금속 농도에 반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 79).

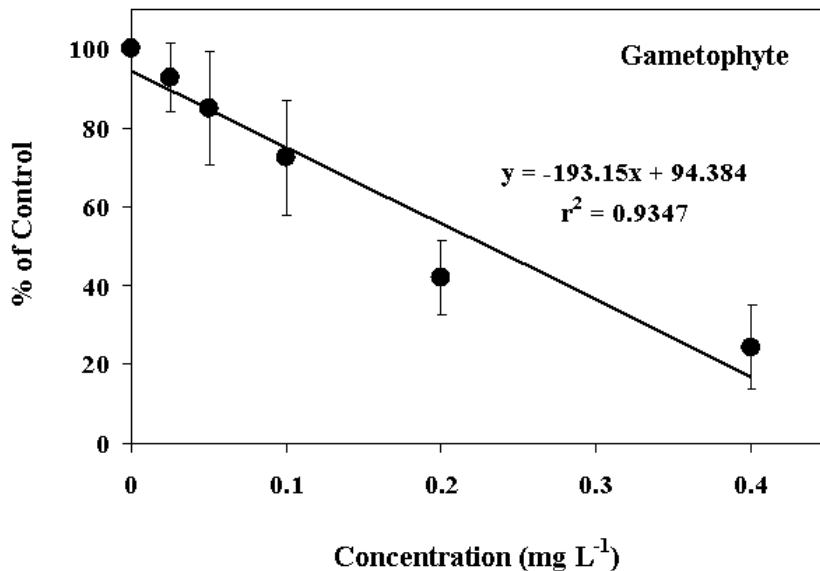


그림 79. 구리 농도에 따른 미역 배우체의 엽록소 형광

표준 중금속 구리 농도와 미역 배우체의 엽록소 형광값을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 0.174 mg/L에서 엽록소 형광값이 대조군에 비하여 약 50% 수준을 나타냈다 (표 51). 미역 사상체의 엽록소 형광값은 CV가 10%이하로 나타나 중금속 생태독성 평가기법의 종말점으로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

표 51. 미역 배우체 엽록소 형광을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과 (단위 mg/L)

Metal	NOEC	LOEC	EC ₅₀	Min	Max	CV (%)
Cu	< 0.025	0.025	0.174	0.150	0.201	4.890

타. 미역 (*Undaria pinnatifida*) 수배우체의 로봇형 엽록소 형광 평가법 (15℃, 30분)

항목	시험조건
측정요소	미역 수배우체 엽록소 형광값 (EC ₅₀)
시험생물	미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>)
시험기간	30 min
온도	15 ± 1℃
염분	25~35 psu
광도	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)
시험용기	96구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음
시험용액 부피	300 μL/replicate
시험생물 크기	지름 25 μm
시험농도	대조구 + 최소 5개 농도 구간
측정요소	배우체 엽록소 형광
시험적합도	미역 수배우체의 엽록소 형광값은 28.7 ± 4.08
공기주입	주입하지 않음

(1) 시험 중

시험 중으로 Laminariales (다시마 목), Alariaceae (미역 과), *Undaria* (미역 속), *Undaria pinnatifida* (미역 종)를 사용하였다.

(2) 평가방법

가) 평가 기간

; 시험개시 후 30분

나) 시험농도

; 대조군, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100%

다) 시험용액제조

① 시험용액은 OTT's (1965) 인공해수를 사용하였다.

② 시험용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 준비하였다.

(3) 배양방법

가) 수배우체를 Homogenizer로 갈아서 현탁액을 제조 후 96웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣었다.

나) 배양 온도, 광선 조건은 각각 15°C, $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량으로 하였다.

(4) 측정방법

; 미역 수배우체의 형광을 Imaging-PAM (Walz GmbH, Effeltrich, Germany)을 이용하여 측정하였다. 이 기계는 PAM control unit 그리고 시스템 조작을 위한 소프트웨어 (WinControl) 구동 컴퓨터로 구성되며 이미지 형광을 분석한다. Imaging-PAM은 유효 양자수율 $\Phi_{psII} = (F_m' - F') / F_m'$ 을 측정하였다 (Genty et al. 1989).

(5) 자료분석

가) 자료정리

; 엽록소 형광은 대조군의 형광값에 대한 실험군의 형광값을 비교하여 나타내었다.

나) 통계처리

; 미역 수배우체의 엽록소 형광을 이용한 독성시험의 측정값 (endpoints)은 엽록소 형광 억제 효과에 기반을 두었다. 엽록소 형광에 대한 EC₅₀은 점예측기법 (point estimation techniques)을 써서 계산하였다. EC₅₀ 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다.

(6) 대조군 차트

; 24회 측정된 서로 다른 수배우체 엽록소 형광 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다 (그림 80). 미역 수배우체의 평균 엽록소 형광값은 28.7 ± 4.08 로 나타났다.

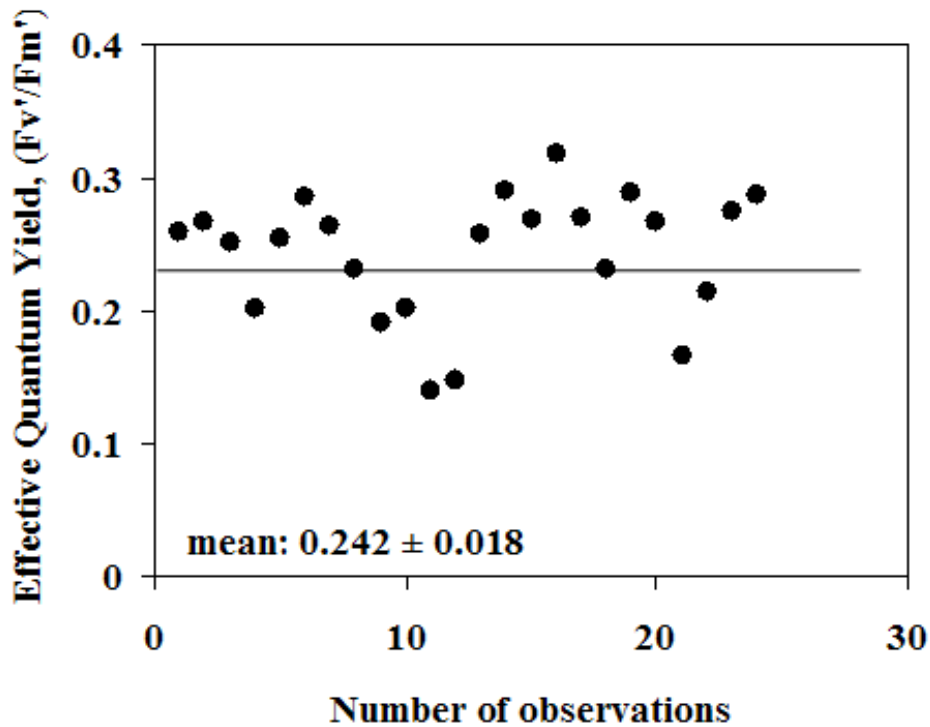


그림 80. 30분 후 측정된 수배우체의 엽록소 형광률 대조군 차트

(7) 단일독성원에 대한 생태독성평가

가) 중금속 (heavy metals)

표준 금속류 8종을 여러 가지의 농도로 구배하여 미역 수배우체 형광을 이용하여 독성평가를 시행하였을 때, 수은 (Hg)에서 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 81).

표준 중금속과 미역 수배우체 형광의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 보았을 때, 배우체 형광은 수은에서 다른 중금속과 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 평가되었다 (표 52). 수은을 제외한 7종의 중금속에 대해서는 낮은 민감성을 보였으며, 농도 범위 재설정을 통한 추가 실험이 요구된다.

중금속 8종의 농도와 미역 수배우체 형광을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 수은 (Hg) 노출군에서는 농도 0.123 mg/L에서 미역 수배우체 형광이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 나타났다. 미역 수배우체 형광을 종말점으로 중금속 생태독성 평가 기법은 Hg에 대해 CV가 11%이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

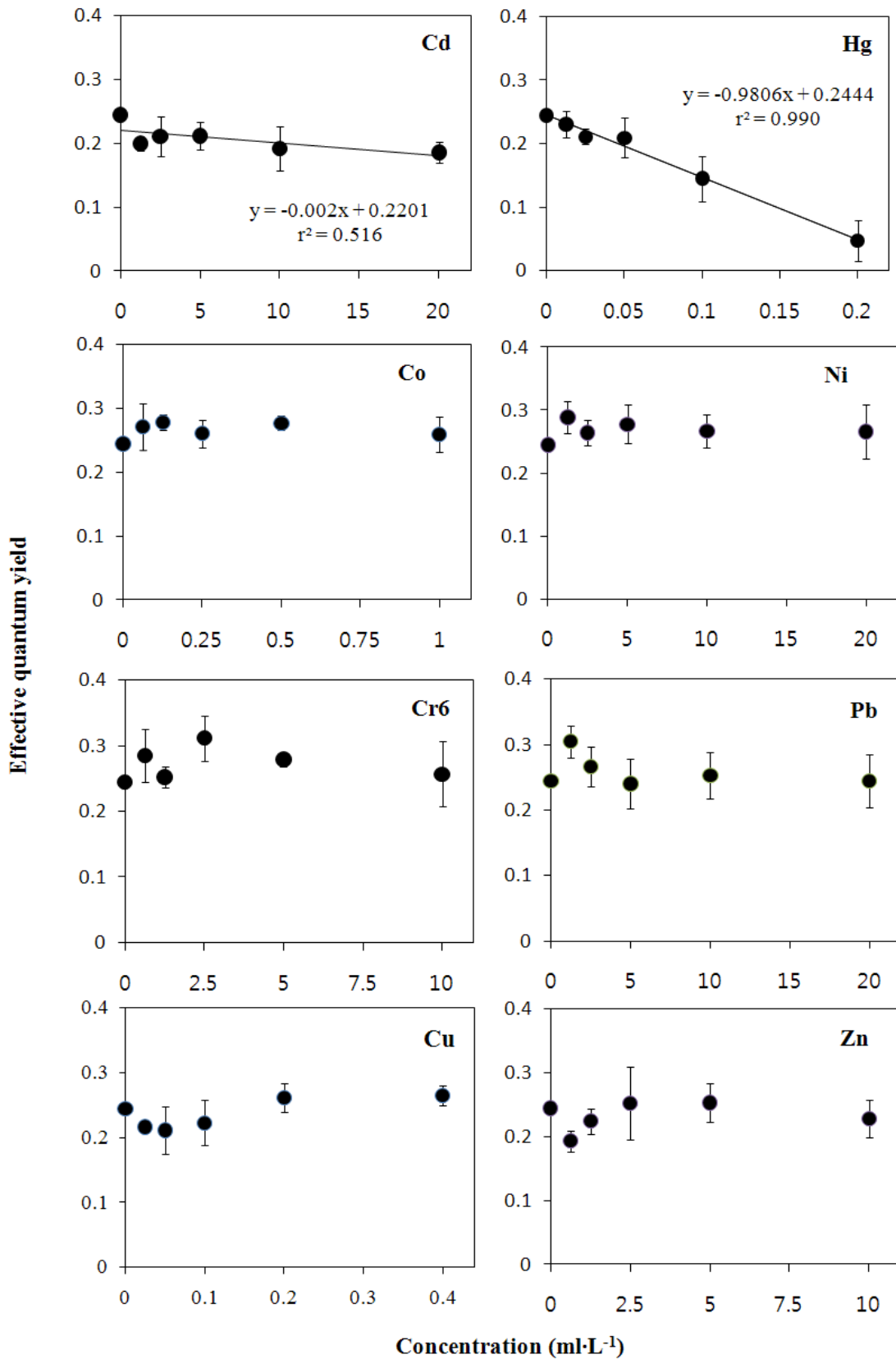


그림 81. 중금속 농도에 따른 미역 수배우체 형광

표 52. 미역 배우체 형광을 이용한 중금속의 생태독성평가 결과 (단위 mg/L)

Metals	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	p-value
Cd (20 mg/L)	20	> 20	> 20	> 20	-	> 0.05
Co (1 mg/L)	1	> 1	> 1	> 1	-	> 0.05
Cr6 (10 mg/L)	10	> 10	> 10	> 10	-	> 0.05
Cu (0.4 mg/L)	0.4	> 0.4	> 0.4	> 0.4	-	< 0.001
Hg (0.2 mg/L)	0.05	0.1	0.019 (0.003~0.071)	0.123 (0.079~0.157)	10.988	< 0.001
Ni (20 mg/L)	20	> 20	> 20	> 20	-	> 0.05
Pb (20 mg/L)	20	> 20	4.972	> 20	-	> 0.05
Zn (10 mg/L)	10	> 10	> 10	> 10	-	> 0.05

나) 휘발성 유기화합물 (VOCs; Volatile Organic Compounds)

휘발성 유기화합물 (VOCs) 6종을 여러 가지의 농도로 구배하여 미역 수배우체 형광을 비교하였을 때, 미역 수배우체 형광은 휘발성 유기화합물 4종에 대해 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 82).

휘발성 유기화합물 (VOCs)과 미역 수배우체 형광의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 보았을 때, 수배우체 형광은 휘발성 유기화합물 종류에 따라 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 평가되었다 (표 53).

휘발성 유기화합물 (VOCs) 6종의 농도와 미역 수배우체 형광을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 얻은 결과, 에틸알코올 (Ethyl alcohol) 처리군에서는 32.285 mL/L에서 대조군의 약 50%에 해당되는 수배우체 형광을 나타냈다. 메틸알코올 (Methanol)에 노출된 경우, 33.226 mL/L에서 수배우체 형광이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났다. 디메틸황산화물 (DMSO; Dimethyl sulfoxide)은 11.649 mL/L에서 수배우체 형광이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났다. 클로로포름 (Chloroform)은 31.745 mL/L에서 수배우체 형광이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났다. 수배우체 형광을 종말점으로 한 휘발성 유기화합물 생태독성 평가기법은 CV가 15%이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

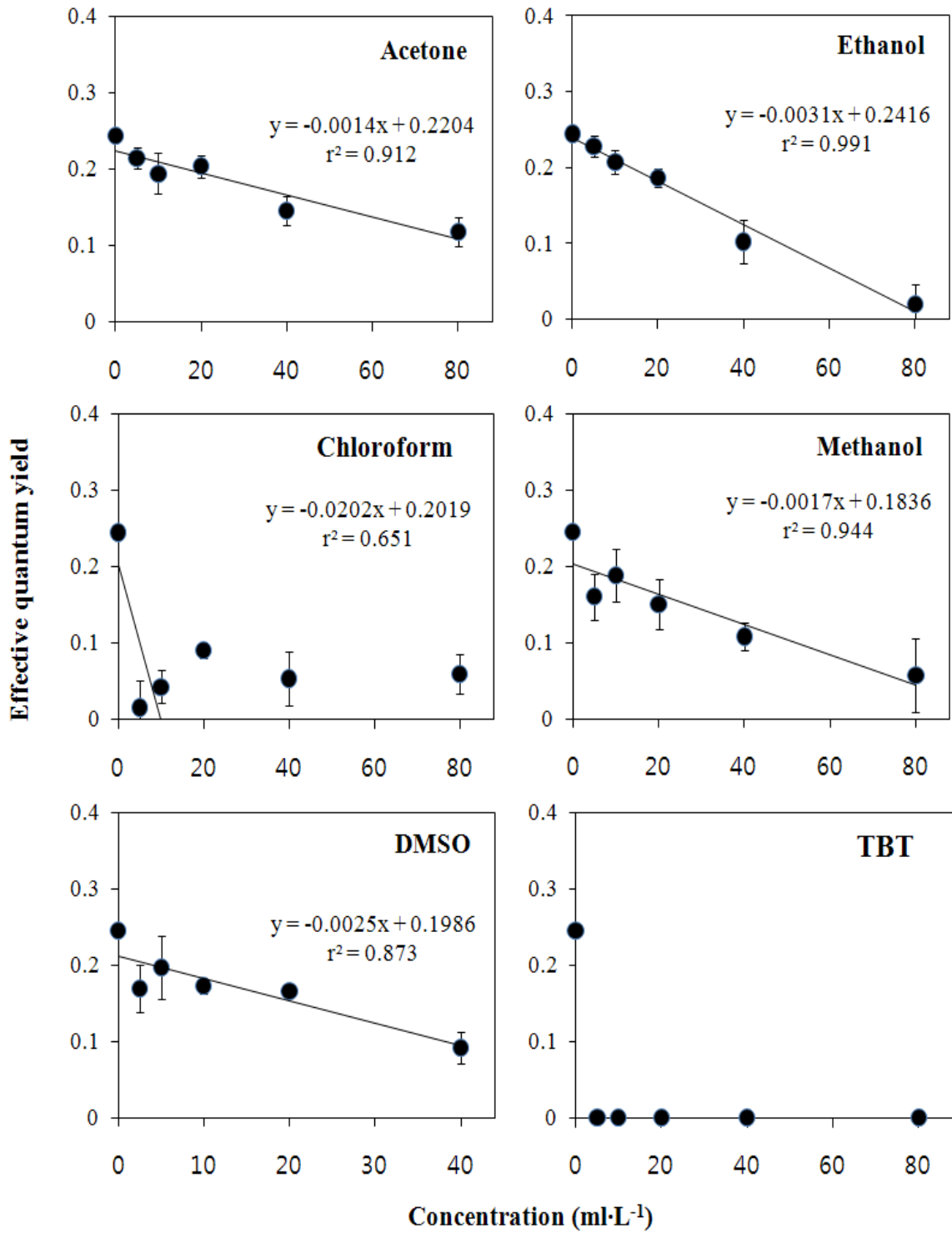


그림 82. 휘발성 유기화합물 (VOCs) 농도에 따른 미역 수배우체 형광

표 53. 미역 배우체 형광을 이용한 휘발성 유기화합물 (VOCs)의 생태독성평가 결과 (단위 mL/L)

VOCs	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	p-value
Acetone (80 mL/L)	5	10	4.173 (2.141~8.445)	74.787	-	< 0.001
Chloroform (80 mL/L)	< 5	5	0.638 (0.599~0.695)	3.194 (2.995~3.476)	2.555	> 0.05
DMSO (40 mL/L)	< 2.5	2.5	0.987 (0.641~1.896)	31.745 (27.936~37.320)	5.029	< 0.001
Ethanol (80 mL/L)	5	10	6.933 (2.732~11.821)	32.285 (30.145~47.056)	7.623	< 0.001
Methanol (80 mL/L)	< 5	5	1.734 (1.191~2.875)	33.226 (15.543~45.808)	13.559	< 0.001
TBT (80 mL/L)	< 5	5	-	-	-	< 0.01

다) 제초제 - 시간추이별 독성평가

제초제 4종을 여러 가지의 농도로 구배하여 시간 추이별 미역 수배우체 형광을 비교하였을 때, 미역 수배우체 형광은 시간추이별로 제초제 3종에 대해 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다 (그림 83, 84, 85).

제초제와 미역 수배우체 형광의 관계로부터 얻은 EC₅₀값을 기준으로 보았을 때, 노출시간에 따른 민감도의 경향성은 노출시간이 길어질수록 민감도가 높아지는 듯 하나 단정하기 어려웠으며, 추가 실험을 수행중에 있다(표 54). 하지만 수배우체 형광은 제초제 종류에 따라 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 평가되었다.

제초제 3종의 농도와 미역 수배우체 형광을 가지고 선형회귀를 수행하여 직선의 방정식을 구하였고, 시간 추이별 결과에 따라 단 시간내 가장 민감한 반응을 보였던 노출 30분 이후의 결과를 비교분석하였다. Atrazine을 미역 수배우체에 처리하였을 때, 0.0065 mg/L에서는 대조군의 약 50%에 해당하는 형광을 나타내었고 0.005 mg/L 이하에서는 저해가 일어나지 않았다. Diuron 처리군에서는 0.0025 mg/L에서 대조군의 약 50%에 해당되는 수배우체 형광을 나타냈으며, 0.005 mg/L 이하의 농도에서는 수배우체 형광이 일어나지 않았다. Hexazinone에 노출된 경우, 0.0043 mg/L에서 수배우체 형광이 대조군에 비하여 약 50%수준으로 나타났으며, 0.005 mg/L 이하의 농도에서는 수배우체 형광이 일어나지 않았다. Shimazine은 수행된 농도 범위(최고농도 0.004mg/L)에서 형광 저해현상이 나타나지 않았다. 다시마 수배우체 형광에 대

한 제초제 민감성은 Diuron > Hexazinone > Atrazine > Shimazine 순으로 나타났다. 미역 수배우체 형광을 종말점으로 한 제초제 생태독성 평가기법은 CV가 20%이하로 비교적 안정된 진단기법임을 시사했다.

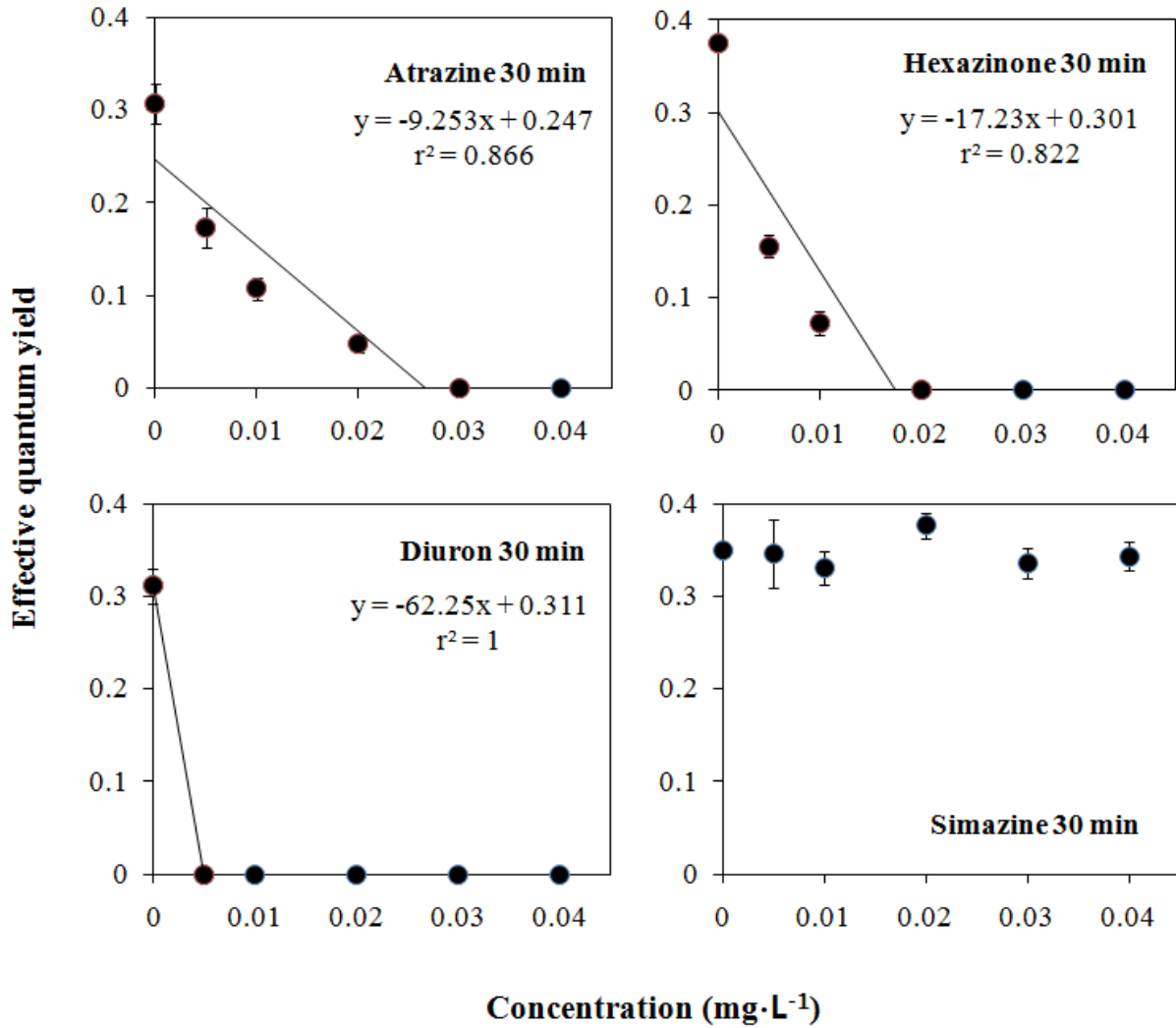


그림 83. 제초제 30분 처리 후 독성농도에 따른 미역 수배우체 형광

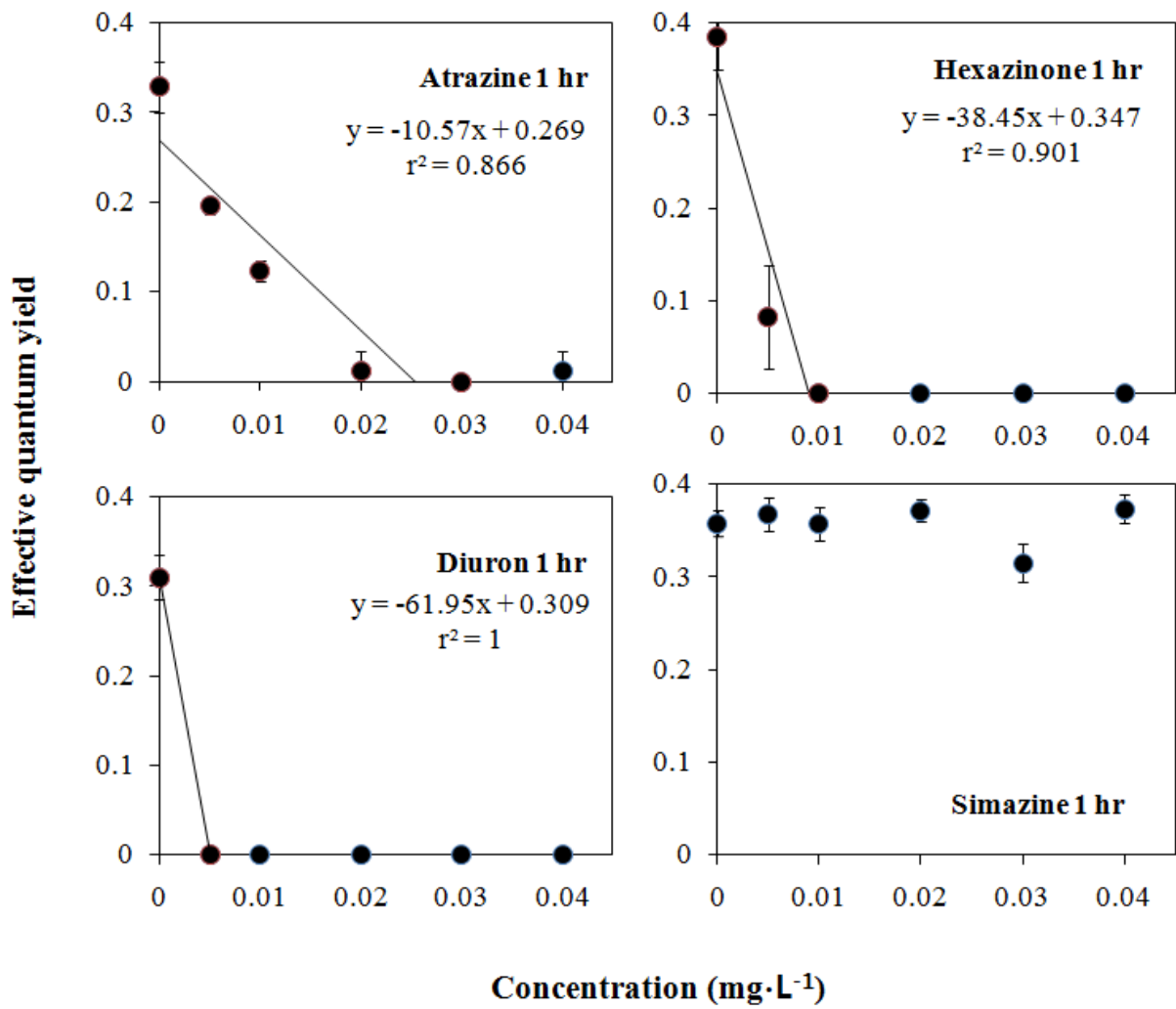


그림 84. 제초제 1시간 처리 후 독성농도에 따른 미역 수배우체 형광

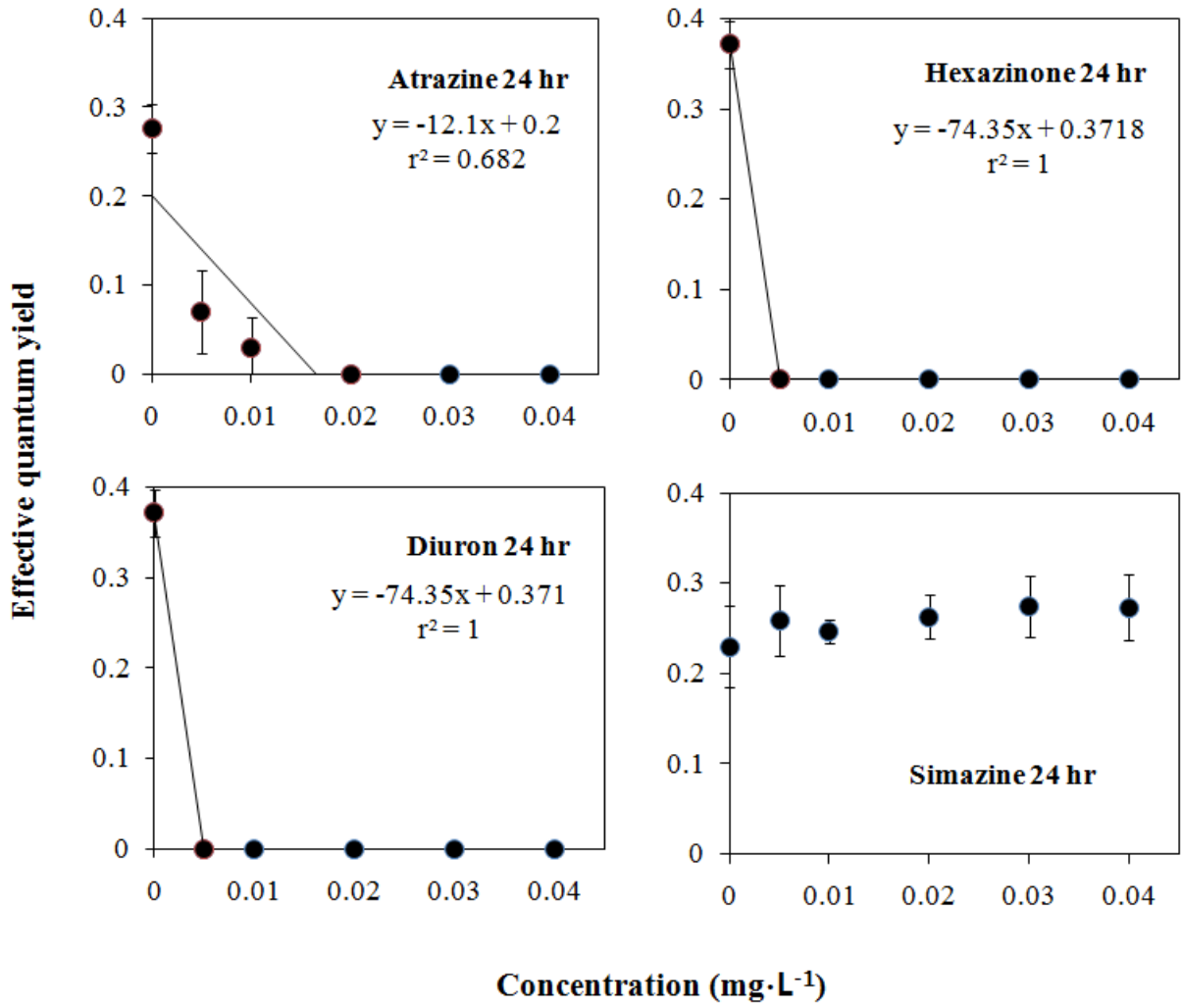


그림 85. 제초제 24시간 처리 후 독성농도에 따른 미역 수배우체 형광

표 54. 미역 수배우체 형광을 이용한 시간추이별 제초제의 생태독성평가 결과(단위 mg/L)

Herbicide	Exposed time	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV(%)
Atrazine (0.04 mg · L ⁻¹)	30 min	<0.005	0.005	0.0012 (0.0009-0.0015)	0.0065 (0.0041-0.0082)	9.949
	1 h	<0.005	0.005	0.0012 (0.0010-0.0016)	0.0072 (0.0057-0.0088)	6.932
	24 h	<0.005	0.005	0.0007 (0.0005-0.0009)	0.0033 (0.0026-0.0043)	9.435
Diuron (0.04 mg · L ⁻¹)	30 min	<0.005	0.005	0.0005 (0.0005-0.0005)	0.0025 (0.0025-0.0025)	0
	1 h	<0.005	0.005	0.0005 (0.0005-0.0005)	0.0025 (0.0025-0.0025)	0
	24 h	<0.005	0.005	0.0005 (0.0005-0.0005)	0.0025 (0.0025-0.0025)	0
Hexazinone (0.04 mg · L ⁻¹)	30 min	<0.005	0.005	0.0009 (0.0008-0.0009)	0.0043 (0.0040-0.0047)	2.653
	1 h	<0.005	0.005	0.0006 (0.0005-0.0008)	0.0032 (0.0024-0.0039)	8.213
	24 h	<0.005	0.005	0.0005 (0.0005-0.0005)	0.0025 (0.0025-0.0025)	0
Simazine (0.04 mg · L ⁻¹)	30 min	0.04	>0.04	>0.04	>0.04	-
	1 h	0.04	>0.04	>0.04	>0.04	-
	24 h	0.04	>0.04	>0.04	>0.04	-

(8) 산업폐수의 생태독성평가

2010년 6월 산업폐수 4개 지점에서 채수한 시료 원수에 대한 수배우체 엽록소 형광실험을 수행한 결과와 이화학적 분석 결과는 그림 86와 표 55과 같다.

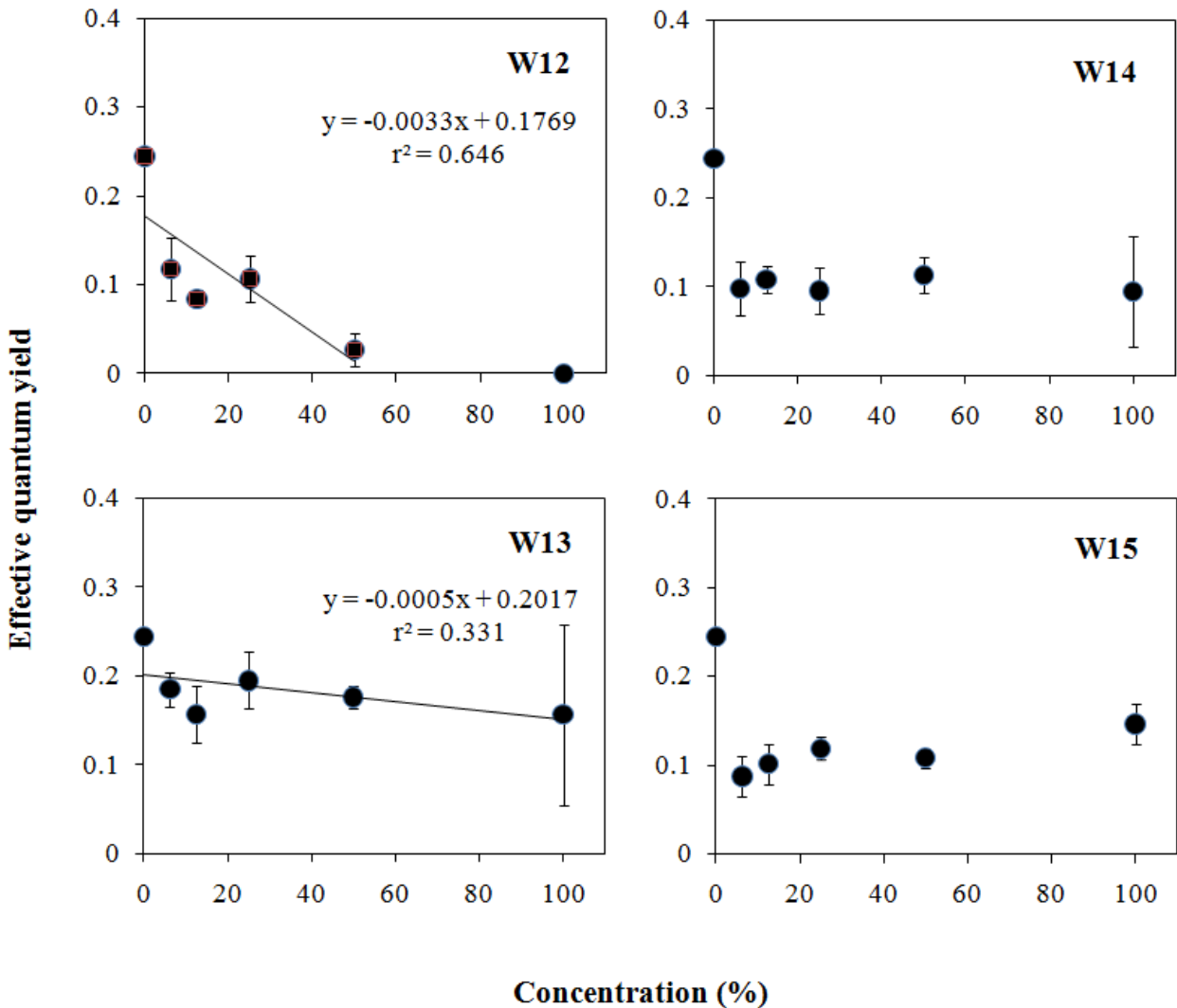


그림 86. 산업폐수 농도에 따른 미역 수배우체 형광

산업폐수 4종을 여러 가지의 농도로 구배하여 미역 수배우체 형광을 비교하였을 때, 미역 수배우체 형광은 산업폐수 2종에 대해 농도반비례적인 선형관계를 나타냈다.

산업폐수와 미역 수배우체 엽록소 형광 소멸률의 관계로부터 얻은 TU값을 보면, W13 지점을 제외한 3지점의 시료에서 평균 TU값이 16~18로 매우 오염된 지역으로 평가되었다 (표 56). 6월 산업폐수의 이화학적 분석 결과와 W8 지점의 EC₅₀ 간의 관계를 보고 농도를 계산한 결과, 단일 독성원 테스트 결과와 비교하였을 때 모든 중금속에서 형광을 저해하는 농도보다 낮게 산출되었다. 이는 서로 다른 단일독성원이 혼합되어 각각의 영향보다 더 큰 영향을 끼친 것으로 판단되며, 복합적인 독성원 실험이 추가적으로 요구된다.

표 55. 산업폐수의 지점별 이화학적 분석 결과

검사항목 채수지점	TN	TP	SS	CN	phenol	F	Cu	Pb	Cd	Cr	Cr6	Zn	Mn	Fe	As	Hg
W10	1.884	0.168	5.2	ND	ND	0.34	ND	ND	ND	ND	ND	0.056	0.010	0.134	ND	ND
W11	8.417	0.046	1.2	ND	ND	ND	0.034	ND	ND	ND	ND	0.114	0.009	0.339	ND	0.001
W12	78.608	0.051	13.0	0.750	ND	25.55	5.522	0.226	ND	0.019	ND	0.039	0.097	2879	ND	0.001
W13	53.089	0.143	4.8	2.000	ND	1.55	0.247	ND	ND	0.039	ND	0.020	0.106	0.656	ND	0.002
W14	4.911	0.053	9.8	ND	ND	ND	0.011	ND	ND	0.133	ND	0.019	0.061	0.235	ND	ND
W15	12.398	1.409	2.0	0.360	ND	ND	0.700	ND	ND	0.033	ND	0.011	0.110	2.253	ND	0.001
W16	130.202	48.780	580.0	ND	ND	0.34	1.739	0.119	ND	0.101	ND	2.068	0.739	25.822	ND	0.001
W17	7.997	ND	1.2	ND	ND	2.230	ND	ND	ND	0.035	ND	ND	0.217	0.096	ND	ND
W18	10.777	0.060	15.0	13.230	12.377	ND	0.013	ND	ND	ND	ND	0.388	0.046	0.727	ND	ND
W19	45.780	0.315	8.8	ND	ND	0.21	1.018	ND	ND	0.111	ND	0.480	0.077	2.176	ND	ND


표 56. 미역 배우체 형광을 이용한 산업폐수 (6월)의 생태독성평가 결과 (단위 %)

채수지점	NOEC	LOEC	EC ₁₀ (95% CI range)	EC ₅₀ (95% CI range)	CV (%)	TU
W12	< 6.25	6.25	1.201 (0.862~1.575)	6.005 (4.311~10.913)	21.971	16.653
W13	< 6.25	6.25	2.563 (1.781~3.666)	> 100	-	< 1
W14	< 6.25	6.25	1.084 (0.986~1.347)	5.421 (4.932~6.743)	7.155	18.447
W15	< 6.25	6.25	1.156 (1.054~1.272)	5.783	-	17.292

하지만 W14 지점의 경우, 다시마와 미역의 발아율, 발아관 길이, 배우체생장에서 TU값이 3미만으로 산출된 반면, 엽록소 형광에서 TU값이 18.45 로 다른 평가기법과 TU값 약 15이상의 차이가 산출된다. 이것은 이화학적분석의 범위나 다른 독성평가기법이 분석하지 못하는 독성원에 대해 독성평가가 가능하다는 것을 시사한다. 엽록소 형광 소멸률을 종말점으로 한 산업폐수 생태독성 평가기법은 측정 시간이 짧고, 자동화된 시스템을 구축하였다는 점에서 개발의 가치가 클 것으로 사료된다.

제 3절 연구개발 결과 요약

1. 시험생물 상시 공급 시스템의 간편성과 무한제공 가능성

조건	휴면포자		사상체형 배우자
	저온 암배양법 (I)	저온 암배양법 (II)	적색광 및 저광 배양법
시험생물 상시 공급 시스템의 배양표준조건 	pH 8.5/Dark/35 psu/10 °C 	pH 8.5/Dark/35 psu/5 °C 	pH 8.5/Red light (20 μ mol photons m ⁻² s ⁻¹)/35 psu/ 10 °C 

- 시험생물 상시 무한제공을 위한 휴면포자는 커버글라스와 1.5mL test tube에 부착시켜 배양 유지하거나 공급 할 수 있음 (그림 87)

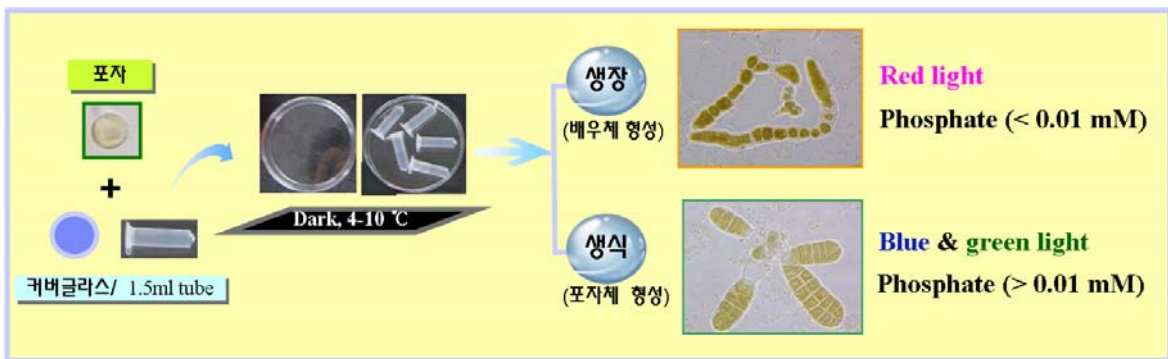


그림 87. 생물시료 상시 공급 시스템 모식도 - I. 휴면포자 보관 조건

- 사상체형 배우자는 pH 8.5, 35 psu, 10°C, 적색광 또는 저광에서 유동 또는 정지배양을 실시한 후 Falcon tube에 넣어 공급할 수 있음 (그림 88)



그림 88. 생물시료 상시 공급 시스템 모식도 - II. 사상체 보관 조건

2. 신기술 생태독성 시험법 요약

참다시마와 미역을 이용하여 개발된 11종의 생태독성 시험법을 요약하였다 (표 57, 58).

표 57. 생태독성 평가법 요약 I

항목	시험조건					
측정요소	다시마 포자발아율 (EC ₅₀)	다시마 포자발아율 (EC ₅₀)	다시마 포자의 발아관 길이 (EC ₅₀)	다시마 배우체 면적 성장 (EC ₅₀)	다시마 포자체 발생률 (EC ₅₀)	다시마 어린 포자체 엽록소 형광 (EC ₅₀)
시험생물	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)
시험기간	24 h	24 h	24 h	144 h	144 h	144 h
온도	15 ± 1℃	5 ± 1℃	15 ± 1℃	15 ± 1℃	10 ± 1℃	10 ± 1℃
염분	25~35 psu	25~35 psu	25~35 psu	25~35 psu	25~35 psu	25~35 psu
광종류	-	-	-	백색형광등	백색형광등	백색형광등
광도	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)	500~4000 lux (10~80 μmol m ⁻² s ⁻¹)	1500~4000 lux (30~80 μmol m ⁻² s ⁻¹)	1500~2500 lux (30~50 μmol m ⁻² s ⁻¹)
광주기	암기	암기	암기	12h 명기 12h 암기	12h 명기 12h 암기	12h 명기 12h 암기
시험용기	24구 웰 플레이트	24구 웰 플레이트	24구 웰 플레이트	24구 웰 플레이트	24구 웰 플레이트	24구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)	인공해수 (OTT's artificial seawater)	인공해수 (OTT's artificial seawater)	인공해수 (OTT's artificial seawater)	인공해수 (OTT's artificial seawater)	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음	교환하지 않음	교환하지 않음	교환하지 않음	교환하지 않음	교환하지 않음
시험용액 부피	2.5 mL/replicate	2.5 mL/replicate	2.5 mL/replicate	2.5 mL/replicate	2.5 mL/replicate	2.5 mL/replicate
시험생물 크기	지름 25 μm	지름 25 μm	지름 25 μm	지름 25 μm	500 μm ²	0.25 mm ²
반복구당 시험생물 수	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	300	300
시험농도	대조구 + 최소 5 개 농도 구간	대조구 + 최소 5 개 농도 구간	대조구 + 최소 5 개 농도 구간	대조구 + 최소 5 개 농도 구간	대조구 + 최소 5 개 농도 구간	대조구 + 최소 5 개 농도 구간
반복수	4개	4개	4개	4개	4개	4개
측정요소	총 500개체당 발아한 개체수	총 500개체당 발아한 개체수	총 30개체의 발아관 길이	총 10개체의 면적 상대성장률	총 50개체의 포자체 발생률	총 5개체의 포자체 엽록소 형광값
시험적합도	대조구에서의 발아율이 95.72 ± 1.01%	대조구에서의 발아율이 93.61 ± 1.05%	대조구에서의 발아관 길이는 20.62 ± 0.70 μm	대조구에서의 배우체 성장률은 46.62 ± 2.16 μm ²	대조구에서의 포자체 발생률은 28.7 ± 4.08%	대조구에서의 엽록소 형광값이 80% 이상
공기주입	주입하지 않음	주입하지 않음	주입하지 않음	주입하지 않음	주입하지 않음	주입하지 않음

표 58. 생태독성 평가법 요약 II

항목	시험조건					
	미역 포자발아율 (EC ₅₀)	미역 포자의 발아관 길이 (EC ₅₀)	미역 배우체 면적 성장 (EC ₅₀)	미역 배우체 엽록소 형광 (EC ₅₀)	미역 수배우체 엽록소 형광 (EC ₅₀)	다시마 수배우체 엽록소 형광 (EC ₅₀)
시험생물	미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>)	미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>)	미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>)	미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>)	미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>)	참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)
시험기간	24 h	24 h	144 h	144 h	30 min	1 h
온도	15 ± 1℃	15 ± 1℃	15 ± 1℃	20 ± 1℃	15 ± 1℃	15 ± 1℃
염분	35 psu	25~35 psu	25~35 psu	25~35 psu	25~35 psu	25~35 psu
광종류	-	-	백색형광등	백색형광등	-	-
광도	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)	1500~4000 lux (30~80 μmol m ⁻² s ⁻¹)	500 lux (10 μmol m ⁻² s ⁻¹)	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)	0 lux (0 μmol m ⁻² s ⁻¹)
광주기	암기	암기	12h 명기 12h 암기	12h 명기 12h 암기	암기	암기
시험용기	24구 웰 플레이트	24구 웰 플레이트	24구 웰 플레이트	24구 웰 플레이트	96구 웰 플레이트	96구 웰 플레이트
배양액	인공해수 (OTT's artificial seawater)	인공해수 (OTT's artificial seawater)	인공해수 (OTT's artificial seawater)	인공해수 (OTT's artificial seawater)	인공해수 (OTT's artificial seawater)	인공해수 (OTT's artificial seawater)
시험용액 교환	교환하지 않음	교환하지 않음	교환하지 않음	교환하지 않음	교환하지 않음	교환하지 않음
시험용액 부피	2.5 mL/replicate	2.5 mL/replicate	2.5 mL/replicate	2.5 mL/replicate	300 μL/replicate	300 μL/replicate
시험생물 크기	지름 25 μm	지름 25 μm	지름 25 μm	300 μm ²	길이 15 μm	길이 15 μm
반복구당 시험생물 수	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	300	10 μL당 500~1000개 체	10 μL당 500~1000개 체
시험농도	대조구 + 최소 5 개 농도 구간	대조구 + 최소 5 개 농도 구간	대조구 + 최소 5 개 농도 구간	대조구 + 최소 5 개 농도 구간	대조구 + 최소 5 개 농도 구간	대조구 + 최소 5 개 농도 구간
반복수	4개	4개	4개	4개	4개	4개
측정요소	총 500개체당 발아한 개체수	총 30개체의 발아관 길이	총 10개체의 면적 상대성장률	총 5개체의 배우체 엽록소 형광값	수배우체 용액의 엽록소 형광값	수배우체 용액의 엽록소 형광값
시험 적합도	대조구에서의 발아율이 87.40 ± 1.37%	대조구에서의 발아관 길이는 25.77 ± 1.91 μm	대조구에서의 배우체 성장률은 29.54 ± 1.81 μm ²	대조구에서의 엽록소 형광값이 80% 이상	대조구에서 의 엽록소 형광값은 28.7 ± 4.08	대조구에서 의 엽록소 형광값은 28.7 ± 4.08
공기주입	주입하지 않음	주입하지 않음	주입하지 않음	주입하지 않음	주입하지 않음	주입하지 않음

3. 생태독성 민감성 비교(예시; 구리)

국내산 해산종 참다시마와 미역을 생물종으로 하여 개발된 국내원천기술을 바탕으로 한 독성진단기법 11종으로 금속류 8종과 휘발성유기화합물 (VOCs) 7종, 환경유해물질 4종 그리고 산업폐수 19종에 대한 생태독성진단을 시행한 결과, 시료에 따라 독성지수의 차이가 나타났으며, 본과제에서 개발된 기술이 외국에서 공인된 종과 국제적으로 확립된 기존의 기술을 앞서는 것으로 나타났다.

표준 중금속 구리 (Cu)에 대하여 본 과제에서 개발된 참다시마와 미역이 보인 반응성과 국제적으로 공인된 해산종 *Ecklonia radiata*, *Hormosira bankii* (ANZECC 차용), *Macrocysti pyrifera* (US EPA 차용) 등이 나타내는 반응성을 EC₅₀값으로 비교하여 보았다 (표 59). 국내산 종인 다시마와 미역의 경우 국제적으로 공인된 시스템에 비하여 민감한 결과를 보였다.

표 59. 본 과제에서 개발된 지표생물과 국제공인 지표생물과의 구리 독성 민감성 (EC₅₀) 비교

Toxicant	Test organism (taxa)	Endpoint	Test period	Effect (μg/L)	References
Copper	<i>Saccharina japonica</i>	Germination I	24 h	120, EC ₅₀	This study
		Germination II	24 h	29, EC ₅₀	
		Germ tube growth	24 h	81, EC ₅₀	
		Gametophyte growth	144 h	251, EC ₅₀	
		Sporophyte production	144 h	18, EC ₅₀	
		Chlorophyll Fluorescence	144 h	81, EC ₅₀	
	<i>Undaria pinnatifida</i>	Germination	24 h	186, EC ₅₀	This study
		Germ tube growth	48 h	45, EC ₅₀	
		Gametophyte growth	144 h	63, EC ₅₀	
		Chlorophyll Fluorescence I	144 h	174, EC ₅₀	
		Chlorophyll Fluorescence II	30 min	>400, EC ₅₀	
	<i>Ecklonia radiata</i> (B)	Germination	48 h	320~470, EC ₅₀	Bidwell <i>et al.</i> (1998)
		Germ tube growth	48 h	180~210, EC ₅₀	
	<i>Hormosira bankii</i> (ANZECC)	Germination	48 h	170, EC ₅₀	Myers <i>et al.</i> (2006)
			72 h	220, EC ₅₀	
		Rhizoid growth	48 h	130, EC ₅₀	
			72 h	90, EC ₅₀	
	<i>Macrocysti pyrifera</i> (B)	Germination	48 h	100, significant inhibition (NOEC=50.1)	Anderson <i>et al.</i> (1990)
		Germ tube growth	48 h	32, significant inhibition (NOEC=10.2)	
	US EPA	Germ tube growth	48 h	120, ca. 30% inhibition (LOEC=40)	Garman <i>et al.</i> (1994)

대표적인 휘발성 유기화합물 페놀 (Phenol) 그리고 제초제 디우론 (Diuron)에 대한 반응성 역시 국내산 종인 다시마와 미역이 가장 민감한 결과를 보였다 (표 60, 61).

국내산 다시마와 미역을 이용한 생태독성평가기술은 민감성이 높으며, 시험시간 단축 및 시험법의 간소화 측면에서 큰 의의를 갖는다. 이러한 기술의 ISO 국제 인증을 추진하여 우리 기술을 국제사회에 알리고 국가 환경기술의 획기적인 발전에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

표 60. 본 과제에서 개발된 지표생물과 국제공인 지표생물과의 Phenol 독성 민감성 (EC₅₀) 비교

Toxicant	Test organism (taxa)	Endpoint	Test period	Effect (μg/L)	References
Phenol	<i>Saccharina japonica</i>	Germination I	24 h	187, EC ₅₀	This study
		Germ tube growth	24 h	81, EC ₅₀	
		Gametophyte growth	144 h	35, EC ₅₀	
	<i>Undaria pinnatifida</i>	Germination	24 h	121, EC ₅₀	This study
		Germ tube growth	48 h	50, EC ₅₀	
		Gametophyte growth	144 h	27, EC ₅₀	
	<i>Hormosira banksii</i>	Germination	48 h	686000, EC ₅₀	Myers <i>et al.</i> (2006)
			72 h	1068000, EC ₅₀	
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Growth, general	96 h	370000, EC ₅₀	Shigeoka <i>et al.</i> (1988)
	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Assimilation efficiency	48 h	5.7, EC ₅₀	Weber <i>et al.</i> (1984)
	<i>Chlorococcales</i>	Assimilation efficiency	24 h	650000, EC ₅₀	Krebs (1991)
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Photosynthesis	1 h	880000, EC ₅₀	McFeters <i>et al.</i> (1983)
		Photosynthesis	24 h	326600, EC ₅₀	
	<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	Population growth rate	96 h	145000, EC ₅₀	Haglund <i>et al.</i> (1996)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Abundance	96 h	63.1, EC ₅₀	St.Laurent <i>et al.</i> (1992)
		Population changes, general		105000, EC ₅₀	Thellen <i>et al.</i> (1989)
	<i>Nitzschia closterium</i>	Population growth rate	72 h	0.00057, EC ₅₀	Stauber (1995)
	<i>Lemna gibba</i>	Reproduction, general	168 h	0.54, EC ₅₀	Barber <i>et al.</i> (1995)

표 61. 본 과제에서 개발된 지표생물과 국제공인 지표생물과의 Diuron 독성 민감성 (EC₅₀) 비교

Toxicant	Test organism (taxa)	Endpoint	Test period	Effect ($\mu\text{g/L}$)	References
Diuron	<i>Saccharina japonica</i>	Chlorophyll Fluorescence II	1 h	2.6, EC ₅₀	This study
	<i>Undaria pinnatifida</i>	Chlorophyll Fluorescence II	30 min	2.5, EC ₅₀	This study
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Photosynthesis	20 min	27.4, EC ₅₀	Podola <i>et al.</i> (2005)
		Photosystem II (PSII) electron transport activity	2 h	39, EC ₅₀	Vedrine <i>et al.</i> (2003)
		Fluorescence	5 min	0.01, EC ₅₀	Naessens <i>et al.</i> (2000)
	<i>Eudorina elegans</i>	Photosynthesis	5 min	13.2, EC ₅₀	Podola <i>et al.</i> (2005)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Photosynthesis	5 min	13.8, EC ₅₀	
	<i>Scherffelia dubia</i>	Photosynthesis	5 min	3.9, EC ₅₀	
	<i>Staurodesmus convergens</i>	Photosynthesis	5 min	4.1, EC ₅₀	
	<i>Tetraselmis cordiformis</i>	Photosynthesis	5 min	3, EC ₅₀	
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Photosynthesis	1 h	20, EC ₅₀	Muller <i>et al.</i> (2005)
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Photosynthesis	1 h	18, EC ₅₀	
	<i>Achnanthes brevipes</i>	Photosynthesis	1 h 30 min	24, EC ₅₀	Hollister <i>et al.</i> (1973)
	<i>Amphora exigua</i>	Photosynthesis	1 h 30 min	31, EC ₅₀	
	<i>Isochrysis galbana</i>	Photosynthesis	1 h 30 min	10, EC ₅₀	
	<i>Navicula incerta</i>	Photosynthesis	1 h 30 min	93, EC ₅₀	
	<i>Pavlova lutheri</i>	Photosynthesis	1 h 30 min	18, EC ₅₀	
	<i>Hormosira banksii</i>	Photosystem II (PSII) electron transport activity	48 h	1.65, EC ₅₀	Seery <i>et al.</i> (2006)

4. 생태독성평가 기법의 CV 차트 - 정밀성

8종의 표준 중금속과 9종의 환경유해물질 및 19종의 산업폐수에 대하여 참다시마 시험법 (6종; 발아율 I, II, 발아관 길이 성장률, 배우체 상대성장률, 포자체 발생률, 엽록소 형광)과 미역 시험법 (5종; 발아율, 발아관 길이 성장률, 배우체 상대성장률, 배우체 엽록소 형광 I, II) 을 이용한 생태독성평가를 실시하였으며, 산출된 CV를 표 62~64에 요약하였다. 산출된 CV가 전체적으로 20% 이하인 것으로 나와 국제적으로 규정되어 있는 생태독성평가결과의 허용치인 20~40% 이하로서 기술의 정밀성을 확인하였다.

표 62. 중금속 생태독성평가 기법의 CV 차트

Test organisms (taxa)	Endpoints	Toxicants								CV (mean)
		Cd	Co	Cr6	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn	
<i>Saccharina</i>	Germination I	1.97			7.85	1.29	3.25	37.29	6.68	9.72
	Germination II	13.85			8.71	3.70			6.24	8.13
	Germ tube growth	8.38			16.79	8.78	7.67	4.88	13.86	10.06
	Gametophyte growth	12.74	8.93	6.17	4.08	7.43	8.82	-	-	8.03
	Sporophyte production			3.43	5.41	4.61			5.16	4.65
	Chlorophyll Fluorescence				13.34					13.34
<i>Undaria</i>	Germination					7.89				7.89
	Germ tube growth				27.65	9.02				18.34
	Gametophyte growth			18.42	24.09	8.55		16.676	24.39	18.43
	Chlorophyll Fluorescence I				4.89					4.89
	Chlorophyll Fluorescence II					10.99				10.99

표 63. 환경유해물질 생태독성평가 기법의 CV 차트

Tests organism (taxa)	Endpoints	Toxicants (mg/l)									CV (mean)
		Acetone	Chloroform	DMSO	Ethyl alcohol	Formalin	Methyl alcohol	Phenol	SDS	TBT	
<i>Saccharina</i>	Germination I	2.75	17.40	8.15	6.88		4.88	5.97	0.96		6.71
	Germination II										
	Germ tube growth	5.90	8.93	7.53	1.43		3.91	8.39	1.93		5.43
	Gametophyte growth	2.71	1.09	5.73				25.16		6.79	8.30
	Sporophyte production										
	Chlorophyll Fluorescence										
<i>Undaria</i>	Germination							11.23			11.23
	Germ tube growth							16.88			16.88
	Gametophyte growth	6.41	2.52	3.12	2.46	1.837		3.36		9.24	4.14
	Chlorophyll Fluorescence I										
	Chlorophyll Fluorescence II		2.56	5.03	7.62			13.56			7.19

표 64. 산업폐수 생태독성평가 기법의 CV 차트

Test organisms (taxa)	Endpoints	Industry											CV (mean)	
		W1	W2	W4	W7	W8	W12	W13	W14	W15	W16	W18		W19
<i>Saccharina</i>	Germination I							461		603	1270			7.78
	Germination II													
	Germ tube growth						0.41	13.64	21.62	8.36	37.69	45.57	13.40	20.10
	Gametophyte growth						8.05	3.19	1200	4.93	5.08			6.65
	Sporophyte production													
	Chlorophyll Fluorescence													
<i>Undaria</i>	Germination		350	261		1.89	0.96	4.72	3.67	256				2.84
	Germ tube growth	9.40	8.33	6.77	7.53	13.18	3.05	4.88	8.01	7.03	5.91			7.41
	Gametophyte growth						30.29	2.87	1.30	18.25	4.63			11.47
	Chlorophyll Fluorescence I													
	Chlorophyll Fluorescence II						21.97		7.16					14.57

5. 생태독성평가 시스템의 구성

가. 제 1 군 : “ Laminariakit ” (단순키트 시스템) (그림 89)

- 우리나라 고유종을 사용
- 배양조건의 단순화 (24시간, 암배양)
- 인력과 경비가 소요되는 배양관리가 불필요한 시스템
- 간편하고 경제적인 시스템
- 급성/만성 진단 조절 가능한 맞춤형 시스템



그림 89. Laminariakit

나. 제 2 군 : “ LaminariaTox ” (로봇형 시스템) (그림 90)

- BT-IT 융복합형태의 로봇형 시스템의 개발로 실시간 (1시간 소요) 생태독성 평가 가능

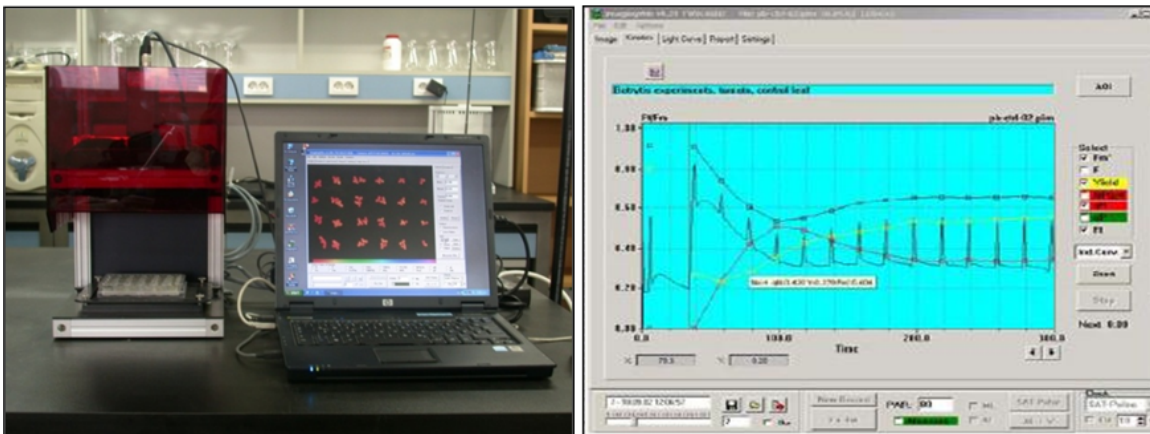


그림 90. LaminariaTox

다. 제 3 군 : “ LaminariaAutoTox ” (자동화 시스템)

- 국내시험생물을 사용
- 저렴한 가격의 생물 바이오웨어 상시적인 공급이 가능
- 생태독성통계처리기능을 탑재한 사용자중심의 장치
- 실시간 생태 독성추적이 가능한 맞춤형 독성탐지 자동 평가 가능
- USN technology와의 융합으로 광역지역에 대한 시계열 생태독성정보 시스템으로 확장

6. 지표생물 독성평가 DB에 실험 data 및 문헌 자료 입력

가. 환경유해물질별 생태독성 DB (KECOTOX: Korea Ecotoxicological Information System)에 생태독성 실험 data 입력

○ 본 연구기관에서는 지표생물을 사용하여 환경유해물질별 생태독성 DB 구축 및 통합정보제공용 Web(www.kecotox.co.kr)을 개발하여 2008년부터 운영하고 있으며, 본 과제에서 도출된 지표생물 독성평가 결과를 입력함

○ 다시마와 미역을 이용하여 개발된 6종 종말점을 이용하여 23종류의 농도별 단일독성물질을 실험하여 결과 값 및 정보를 입력하였다 (표 65).

표 65. 단일독성물질 시험결과 입력 DB

생물명	화학물질명	측정내용	실험농도(단위)	노출시간	측정값
참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)	카드뮴	EC ₅₀	20 mg/L	24시간	15.052 mg/L
	코발트		1 mg/L		-
	크롬		10 mg/L		-
	구리		0.4 mg/L		0.120 mg/L
	수은		0.4 mg/L		0.041 mg/L
	니켈		20 mg/L		3.247 mg/L
	납		20 mg/L		37.285 mg/L
	아연		10 mg/L		6.676 mg/L
	아세트론		80 mg/L		10.402 mL/L
	클로로포름		1 mg/L		0.617 mL/L
	디메틸황산화물		40 mg/L		21.75 mL/L
	에틸 알코올		80 mg/L		5.240 mL/L
	포르말린		0.01 mL/L		0.0003 mL/L
	메틸 알코올		80 mL/L		22.24 mL/L
	페놀		0.25 mL/L		0.187 mL/L
	SDS		0.75 mg/L		0.025 mg/L
트리부틸주석	0.2 mL/L	-			
미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>)	카드뮴	EC ₅₀	20 mg/L	24시간	3.708 mg/L
	코발트		1 mg/L		1.000 mg/L
	크롬		10 mg/L		1.983 mg/L
	구리		0.4 mg/L		0.063 mg/L
	수은		0.4 mg/L		0.053 mg/L
	니켈		20 mg/L		2.674 mg/L
	납		20 mg/L		4.738 mg/L
	아연		10 mg/L		1.070 mg/L
	아세트론		80 mg/L		7.901 mL/L
	클로로포름		1 mg/L		0.629 mL/L
	디메틸황산화물		40 mg/L		9.370 mL/L
	에틸 알코올		80 mg/L		1.569 mL/L
	포르말린		0.01 mL/L		0.0010 mL/L
	메틸 알코올		80 mL/L		-
	페놀		0.25 mL/L		0.027 mL/L
	SDS		0.75 mg/L		-
트리부틸주석	0.2 mL/L	9.241 mL/L			

○ 다시마와 미역을 이용하여 개발된 6종 종말점을 이용하여 19종류의 현장시료를 분석하여 결과 값 및 정보를 입력하였다 (표 66).

표 66. 산업폐수현장시료 시험결과 입력 DB

생물명	현장시료	NOEC	LOEC	EC ₃₀	EC ₅₀	CV (%)	TU
참다시마 (<i>Saccharina japonica</i>)	폐수처리업						
	폐수처리업						
	석유정제업						
	영상음향 및 통신장비						
	염색업						
	비철금속재생재료						
	PCB제조업						
	PCB제조업						
	인쇄회로기판						
	금속제조업	< 6.25	6.25	45.673	> 100	-	< 1
	병원시설	25	50	13.352	> 100	-	< 1
	인쇄회로기판제조	< 6.25	6.25	1.589	39.773	-	2.514
	인쇄회로기판제조	6.25	12.5	7.102	21.991	4.611	4.547
	기타화학물질제조업	< 6.25	6.25	3.701	62.500	-	1.600
	인쇄회로기판제조	< 6.25	6.25	0.896	4.479	6.028	22.326
	육지동물가공처리업	< 6.25	6.25	4.136	32.021	12.695	3.123
	기초무기 화합물제조업						
	폐수처리업	6.25	12.5	7.203	64.063	-	1.561
	도금업	< 6.25	6.25	2.068	> 100	-	< 1
미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>)	폐수처리업	12.5	25	18.792	93.381	-	1.071
	폐수처리업	< 6.25	6.25	25.022	63.009	3.496	1.587
	석유정제업						
	영상음향 및 통신장비	12.5	25	20.473	80.729	2.605	1.239
	염색업						
	비철금속재생재료						
	PCB제조업	6.25	12.5	8.273	> 100	-	<1
	PCB제조업	< 6.25	6.25	2.977	66.093	1.889	1.513
	인쇄회로기판						
	금속제조업						
	병원시설						
	인쇄회로기판제조	< 6.25	6.25	0.708	3.541	0.960	28.241
	인쇄회로기판제조	6.25	12.5	9.467	66.108	4.721	1.513
	기타화학물질제조업	12.5	25	15.464	63.865	3.665	1.566
	인쇄회로기판제조	< 6.25	6.25	1.6396	7.738	2.561	12.923
	육지동물 가공처리업	25	50	23.271	87.360	-	1.145
	기초무기 화합물제조업						
	폐수처리업						
	도금업						

7. 연안 수질 오염 분포도 작성

인천 연안의 해수 또는 해양퇴적물을 대상으로 조사한 생태독성 결과들을 원하는 지점에 입력하여 지도상에 생태독성 결과를 표기 할 수 있다. Surfer 프로그램을 활용한 생물 독성지수화 작업을 통하여 미래적이고 진보적인 해양환경 종합생태계 위해성 시스템 구축의 발판마련이 가능하다 (그림 91).

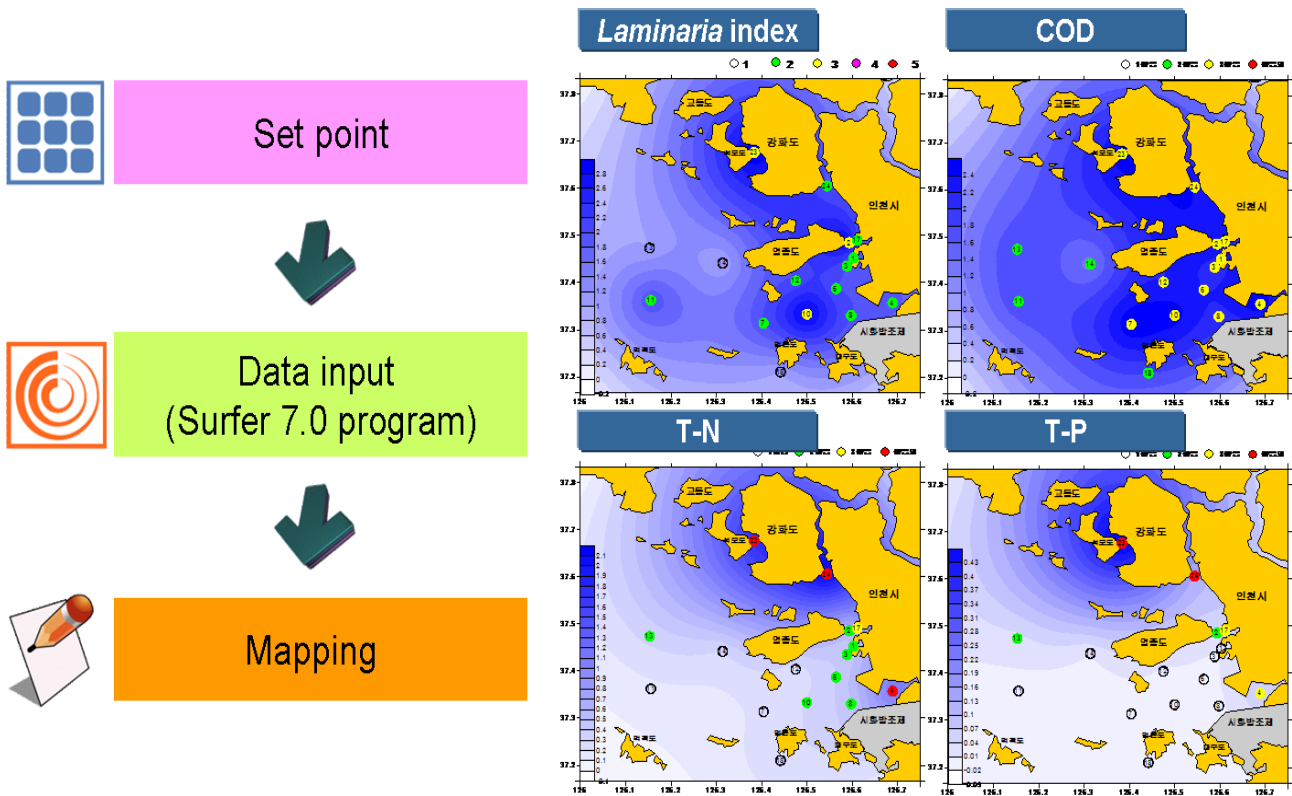


그림 91. Surfer 프로그램을 이용한 지도작성

8. 생태독성 원인 물질 규명을 위한 평가법

가. TIE 기법을 적용한 이화학적 분석과 생물독성평가

- 독성동정평가 (US EPA에 의해 제안된 방법 적용)는 물리화학적 fractionation과 생물독성평가를 병행하여 Toxicity Characterization (Phase I), Toxicity Identification (Phase II), Toxicity Confirmation (Phase III)의 총 3단계로 생물독성의 원인물질을 밝혀내는데 사용할 수 있다. Phase I 과정은 초기 독성실험 (Initial toxicity test)을 포함하여 pH adjustment, pH adjustment/aeration, pH adjustment/filtration, pH adjustment/SPE (C₁₈ solid phase extraction), graduated pH, EDTA addition, sodium thiosulfate addition, ion exchange resin의 조작을 거친 후 독성시험을 실시한다 (그림 92). Initial toxicity test는 시료의 초기 독성값을 측정하는데, 추후 TIE 1단계 나머지 시험의 희석배수를 결정하기 위하여 시행한다. Baseline test는 시료의 독성값의 변화 확인하기 위해 독성동정평가의 다른 독성 시험과 항상 병행하여 시행하고, 시료의 변화유무를 관찰한다.
- 시료와 ISO 배지의 pH를 NaOH와 HCl 용액을 이용하여 pH3과 초기 pH (pH_i), 그리고 11로 조절한 후 Aeration test, Filtration test, SPE test를 시행한다. Aeration test의 경우 시료내의 독성 유발 물질이 휘발성 물질일 경우를 확인하기 위함이다. 시료와 배지의 pH를 조절한 후에 flow rate를 500 mL/min으로 유지한 가운데 1시간 동안 aeration 시킨다. 시료의 희석에는 pH를 조절하지 않은 ISO배지를 사용하고, Control은 pH를 조절한 ISO 배지를 사용한다. Aeration이 끝난 시료와 배지의 pH를 pH_i로 재조정된 후 독성실험을 수행한다.

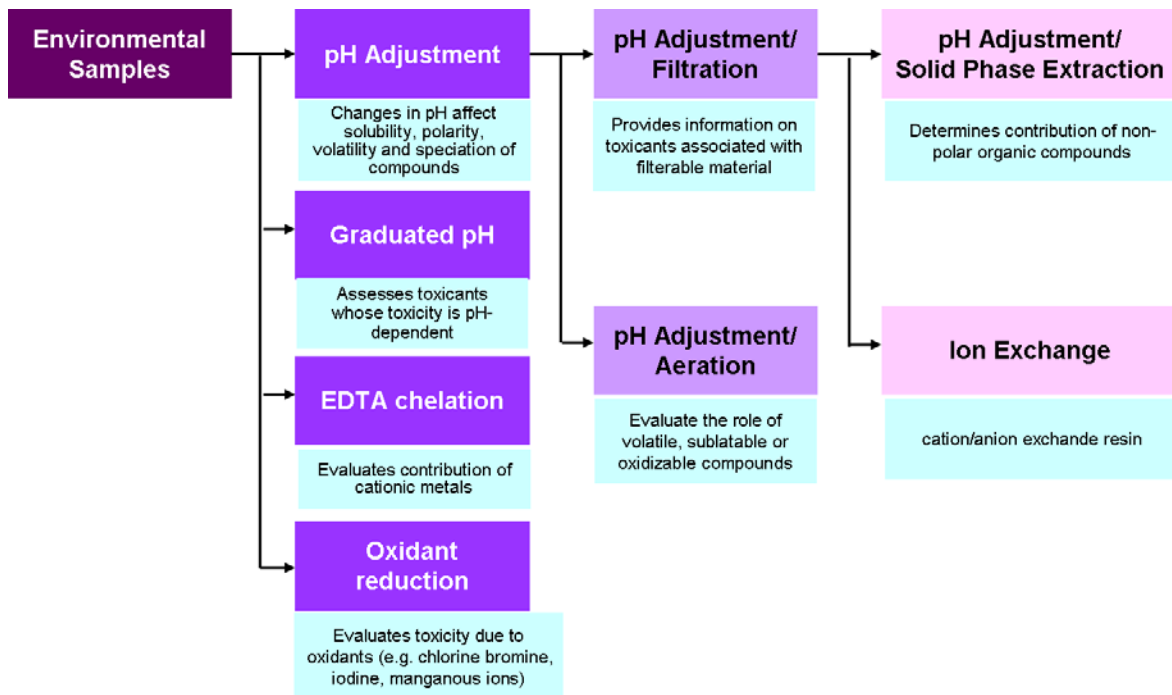


그림 92. 독성 물질의 특성화 작업을 위한 흐름도

- Filtration test는 독성 유발 물질이 부유물질인지를 확인하기 위한 것으로 pH를 조절한 시료를 membrane filter (0.45 μm)를 이용하여 여과하여 수행한다. 이 때, 약 2~4 시간 후 시료와 배지의 pH를 pH_i 로 되돌린 후에 다음날 pH 변화를 확인하고 변화가 있을 경우 pH를 재조정하여 독성 실험을 진행한다. 독성 원인 물질이 유기물인지를 확인하기 위한 SPE test에서는 2 g/12 mL octadecyl C_{18} 컬럼 (Discovery, USA)을 사용한다. 이후, 시료와 배지의 pH를 조절한 후 (pH_3 , pH_i , pH_{11}), 실린지에 컬럼의 활성화 및 세척을 위하여 메탄올 20 mL을 통과시킨다. 이어서 증류수와 pH를 조절한 배지를 각각 20 mL 정도를 컬럼에 통과 시킨 후 60 mL 배지를 통과시켜 실험에 사용한다. 시료의 경우, pH를 조절한 시료를 각각 20 mL을 컬럼에 통과시킨 후 110 mL씩 시료를 2회 회수하여 실험에 사용한다. 실험 전 시료와 배지의 pH를 확인하고 필요한 경우, pH를 pH_i 로 조절한다. EDTA test는 시료내의 양이온 금속이온이 독성을 유발하는 지를 확인하기 위한 것으로서 EDTA가 시료에 첨가되어 시료 내에 있는 양금속 이온을 chelation시켜 독성 저감을 확인하는 것이다. 통합독성 평가 방법을 이용하여 EDTA의 EC_{50} 을 측정한 후에 이 값을 기준으로 EDTA의 양이 1배, 2배, 4배가 되도록 시료에 EDTA를 첨가하여 독성 실험을 한다. 다음으로, Oxidant reduction test를 수행하는데 이는 Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)를 시료에 첨가하여 시료 내 oxidative compounds가 (예를 들면, Chlorine) 독성을 유발하는지 또는 EDTA와 마찬가지로 금속 양이온과 complexation을 이루어 독성을 감소시키는가를 확인하기 위한 것이다. 앞서 언급한 EDTA와 마찬가지로 통합독성평가 방법에 따라 Sodium thiosulfate 자체의 독성값 (EC_{50})을 찾아 이를 기준으로 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 첨가량을 1배, 2배, 4배로 첨가한 후에 독성 저감을 확인한다. Graduated pH test를 위하여 시료의 pH를 HCl과 NaOH를 이용하여 pH 6, pH 7, pH 8로 조절한 후에 통합독성 평가 방법에 따라 독성실험을 하여 독성 저감 여부를 확인한다. 마지막으로 독성 원인 물질이 이온상태로 존재하는 경우를 확인하기 위하여 Ion exchange test를 시행한다. Cation-bed는 acid-regenerated cation (Amberlite IR-120H, Aldrich), anion-bed는 base-regenerated anion (Amberlite IR-410, Aldrich)를 사용한다. Mixed-bed는 cation-bed와 anion-bed를 혼합하여 사용한다. Cation과 Anion resin을 50 mL 실린지에 담고 증류수를 20 mL씩 2회 통과 시킨 후 배지 20mL 통과시킨다. 배지를 resin에 통과 시켜 100 mL을 회수하여 실험에 사용한다. 시료의 경우 시료 20 mL을 실린지에 넣고 통과 시켜 버린 후 150 mL을 회수하여 실험에 사용한다.
- 다양한 토양 및 수질 규제물질 중에서 카드뮴, 구리, 비소, 수은, 납, 아연, 니켈 등과 같은 중금속은 Phase I 분석 중 EDTA chelation test, pH adjustment test, cation exchange test에서 EC_{50} 값이 감소하는 경향을 보이므로 이러한 결과를 통해서 독성이 중금속류에서 기인하는지를 판단하고 이를 토대로 ICP-AES를 이용하여 각 중금속의 정량을 분석하여 실제 대상 샘플내의 중금속 함량이 우려기준이나 대책기준을 초과하는지를 검증한다. BTEX, TPH, TCE와 같은 유기물은 Phase I에서 SPE column test나 filtration test를 통해서 분류 하고, phase II에서는 GC/MS나 HPLC/MS 분석을 통해 샘플 내에 특정 독성 원인 물질의 정확한 함량을 파악한다. TIE Phase III은 앞 단계에서 얻은 결과를 토대로 합성 폐수를 제조하여 독성 검증을 해보는 과정으로서, Mass balance approach, Spiking approach, Correlation approach 등의 방법을 이용할 수 있다. Mass balance approach는 phase I, II를 통해 대상 시료의 독성물질로 확인된 물질을 제거한 후, 동일한 양의 물

질을 다시 첨가하여 (add-back test) 독성값의 변화를 관찰하는 것인데 제거 전과 첨가 후의 독성값이 동일하게 관찰된다면 동정된 원인 물질이 실제로 독성을 유발하는 물질이라고 판단할 수 있다.

- Spiking approach는 대상 시료에 정량 분석하여 얻어진 독성물질의 양만큼 추가로 spiking하여 독성물질의 첨가에 따른 독성의 증가를 알아보는 실험이고, Correlation approach는 phase I, II에서 실험한 대상 샘플을 1, 2 개월 간격으로 주기적으로 채취하여 독성 원인 물질의 함량을 분석하고 독성물질의 농도에 따른 독성의 변화를 관찰하여 상관관계의 유무를 검증하는 방법이다.
- 본 연구진은 파래를 이용한 독성동정평가기법을 개발하여 독성원인물질을 규명한 바 있으며 (그림 93, 94). 이와 동일한 방법을 본 과제에서 개발한 다시마 생물독성평가법에 적용하여 현장시료에 대한 독성원인물질 규명이 가능하다.

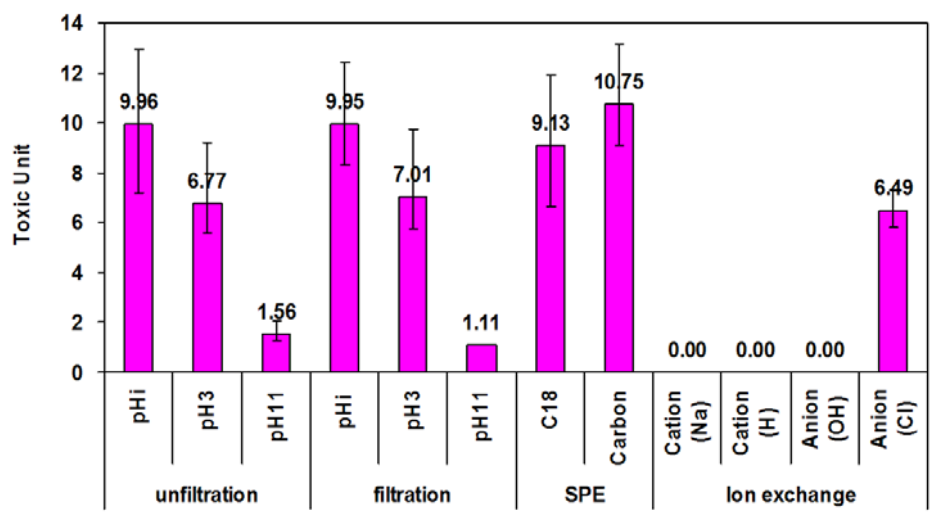


그림 93. 파래를 이용한 독성원인물질의 특성파악 (TIE Phase I)

Metals (mg L ⁻¹)	Concentrations	<i>Ulva</i> EC50
Ag	0.0005	0.0346
Al	0.0212	1.4491
Cd	0.0000	0.2236
Co	0.0002	0.1004
Cr	0.0015	0.8026
Cu	0.0004	0.0803
Fe	0.0103	3.0125
Mn	0.1100	1.4298
Ni	0.0240	0.3059
Pb	0.0011	0.7295
Zn	7.2497	0.7939

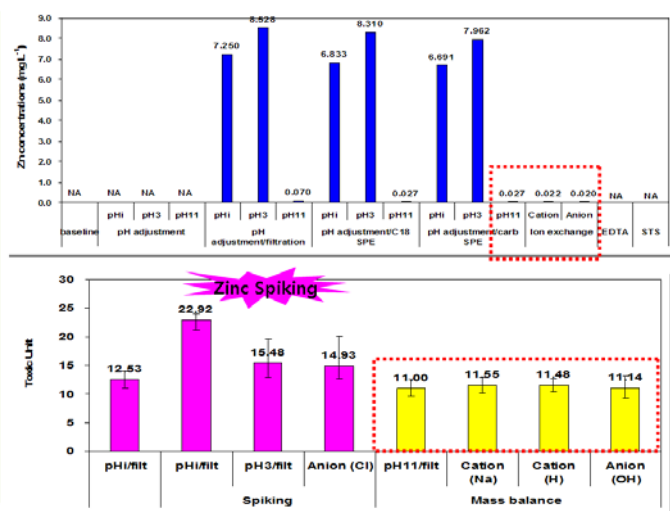


그림 94. 파래를 이용한 독성원인물질 분석 및 규명 (TIE Phase II)과 독성원인물질 확인(TIE Phase III)의 실례

9. 생태위해도 저감 및 관리방안

- 생태위해성예측 프로그램 KORECORisk³⁾ (Korea Risk Assessment)을 활용하여, 오염 유발 원인물질규명 및 저감 방안을 마련할 수 있다 (그림 95).

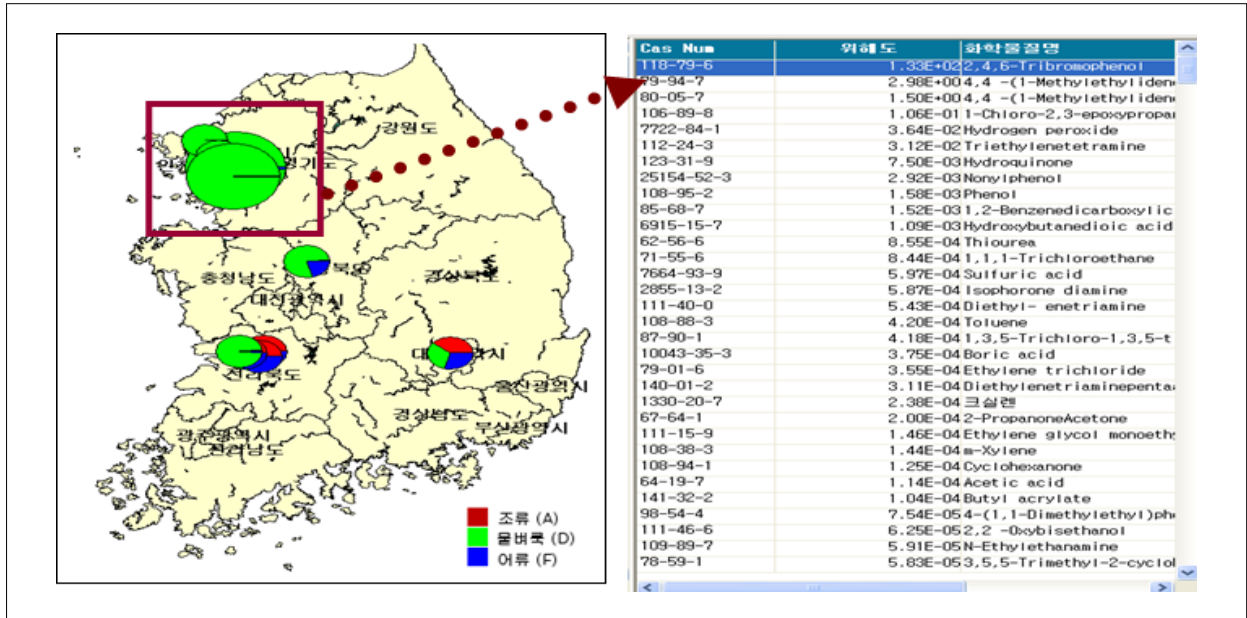


그림 95. KORECORisk 프로그램 결과 예시

- KORECORisk 프로그램은 일반 산업용 화학물질 1,535종의 물리화학적특성값 및 생태독성 데이터베이스와 배출원 정보를 보유하고 있다.
- 전국 공단별 사용량 database를 활용할 수 있는 배출량 산정 모듈을 구축하고 있으며 환경부에서 매 4년마다 시행하고 있는 ‘유통량 조사제도’ 결과의 최신 database로 업그레이드 작업이 필요하다.
- 대전, 대구, 전주, 청수, 울산, 여천, 구미, 인천, 광양, 포항 등의 지역을 대상으로 하여 유역단위 다매체거동모형을 활용한 수서생태위해성평가가 가능하며, 전국을 대상으로 한 남한 모형도 활용가능하다.
- GIS를 기반으로 하여 국내 지역적 특성 (환경 인자, 기후 등)을 고려하여 구축되었으며 수 km에서 수십 km의 해상도를 갖는 전국 수계 노출 평가 및 생태위해성 평가가 가능하다.
- 이미 구축된 데이터베이스를 활용하여 전국 산업단지에서 배출되는 1,000종 이상의 산업용 화학물질을 대상으로 한다.
- 공단별 화학물질 사용량과 수계 배출계수 (EUSES⁴⁾, EU)를 적용하여 공단으로부터 배출되는 화학물질 배출속도를 예측한다 (그림 96).

3) 출처 : 안전성평가연구소 이용주 박사

4) 유럽연합은 1994년 Mackay Level III Multimedia Fugacity Model 형태의 EUSES 프로그램개발, 배출량 산정방식은 사용량과 배출계수의 곱으로 예측

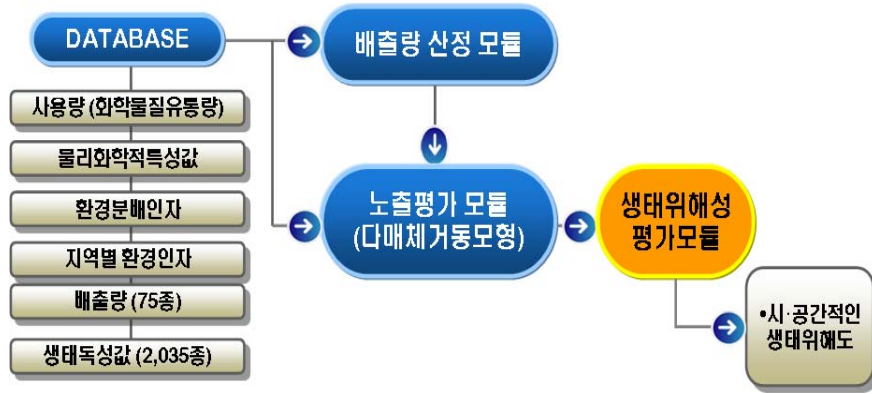


그림 96. 생태위해성평가 모듈

- 최근 공단별 화학물질 사용량 (환경부, 2006b)과 배출량 (환경부, 2009b)자료로 생태위해성예측 프로그램의 데이터베이스 업그레이드 및 보완
- GIS를 기반으로 하여 공단주변 하천 수계의 노출평가
 - 전국 공단을 대상으로 방류수 인근 하천 수계의 노출평가
- GIS를 기반으로 하여 공단주변 하천 수계의 생태위해성평가
 - 전국 공단을 대상으로 방류수 인근 하천 수계의 생태위해성평가
- 노출평가와 생태위해도 산출 결과로부터 **방류 오염원과 독성원인물질 규명**
- 독성원인 물질 사용량 및 배출량 확인
- 사용량 조정 등에 의한 생태위해도 저감 목표 산정과 배출원 관리 정책의 개발
- 생태위해도 저감 목표 설정에 따른 향후 생태 위해도 예측과 **관리 방안 도출** (그림 97)

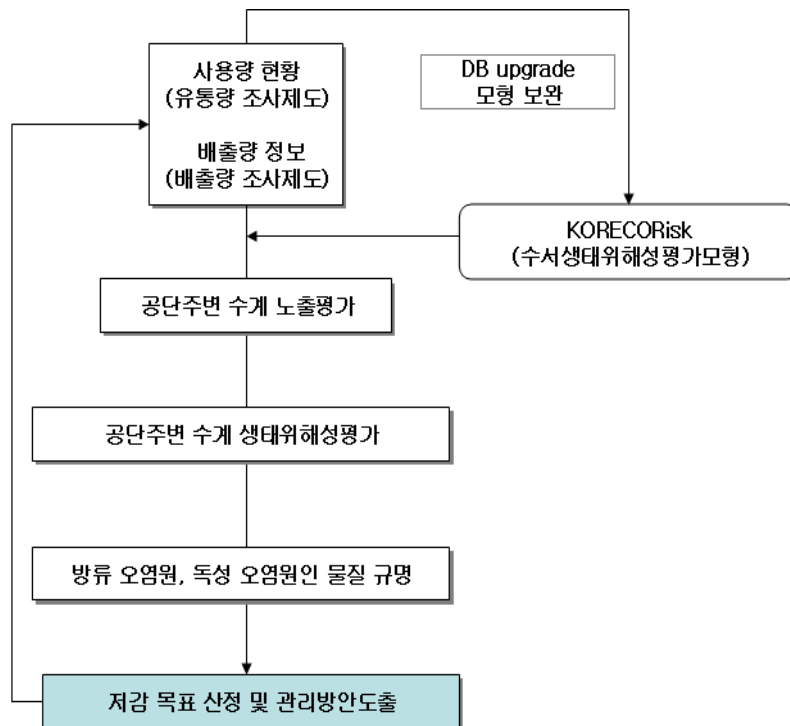


그림 97. 생태위해도 저감 목표 산정 및 관리방안 도출 모식도

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구개발목표의 달성도

구분	연도	당해연도 연구목표	목표대비 결과	목표 달성도 (%)
1차 연도	2007.09 - 2008.09	○ 다시마 사상체의 최적 배양 기법 및 상시공급을 위한 기초생리학적 연구	○ 국내산 다시마의 사상체의 기초생리학적 연구로 휴면 포자와 사상체의 생리활성에 최적의 광질, 영양염 그리고 온도조건 확인 ○ 휴면 포자의 경우 휴면상태로 55일 까지 생리활성이 유지 가능하고, 사상체는 연중 생물량 확보 가능성을 확인 ○ 관리가 용이하고 생물량 공급이 유리한 현미경적 크기의 휴면 포자와 사상체의 배양 시스템 확립	100
	2008.09	○ 다시마 사상체를 사용한 독성진단을 위한 표준 환경조건 확립	○ 상시 독성진단을 위한 표준조건 확립 (광조사량, 광질, 온도, 염도, pH) ○ 다시마 사상체의 생리 파라미터의 최적 반응 조건 정립 (휴면 포자와 사상체의 발아체 성장과 성숙 및 포자체 성장) ○ mPAM을 이용한 robotized 형태의 독성평가기법을 위한 휴면 포자와 사상체의 발아체 및 포자체의 최적 시험 조건 정립	100
2차 연도	2008.09 - 2009.09	○ Endpoint별 독성반응 조사	○ 국내산 다시마 포자와 사상체를 대상으로 환경대표 유해물질별 독성 평가: 6가지 Endpoint별 독성반응 조사 결과 중금속 8종, 환경유해물질 (VOCs, TBT 등) 9종 독성원 농도와 반응간의 농도반비례적 선형관계 도출	100
		○ 독성평가로부터 산출된 데이터의 체계적 수집 및 QA/QC	○ 중금속 8종, 환경유해물질 (VOCs, TBTO 등) 9종 등 총 17종의 단일독성원에 대하여 6가지 Endpoint를 이용한 생태독성평가를 실시하여 EC ₅₀ 과 CV를 산출 ○ 각 독성원에 대한 자료의 CV가 전체적으로 40% 이하인 것으로 나와 국제적으로 규정되어 있는 생태독성평가결과의 허용치인 40% 이하로서 기술의 정밀성을 확인함	100
		○ 환경유해물질에 대한 endpoint별 독성평가 기법 프로토콜 초안 작성	○ 독성평가 표준 환경 조건 및 생태독성기법 시행 절차 확립 ○ 6종의 다시마 생태독성시험법의 프로토콜 초안 완성함 ○ 2종의 프로토콜은 특허출원	100
		○ iPAM과 nPAM을 이용한 로트형 독성진단 기반기술 예비연구	○ iPAM을 이용한 다시마 어린 포자체 엽록소 형광 기법의 구리에 대한 독성진단과 민감성을 진단함 (EC ₅₀ 과 CV 산출) ○ mPAM을 이용한 미역 사상체 엽록소 형광 기법의 구리에 대한 독성진단과 민감성을 진단함 (EC ₅₀ 과 CV 산출)	100

구분	연도	당해연도 연구목표	목표대비 결과	목표 달성도 (%)
3차 연도	2009.09 - 2010.09	○ 국내산 다시마 사상체를 이용한 생태독성진단 프로토콜 완성 및 ISO국제공인 신청	○ 국내산 생태독성모니터링기법 프로토콜 완성 및 ISO 국제인증화를 위한 application - 국내산 다시마 포자와 사상체를 이용한 생태독성진단 원천기법의 프로토콜 및 가이드라인 완성 - 국산기술의 ISO 국제공인화를 위한 서류작성	100
		○ 생태독성진단기법의 현장 적용성 평가	○ 해양 퇴적물과 산업폐수를 사용한 생태독성평가기법의 현장 적용성 평가 - 해양오니 또는 산업폐수를 대상으로 개발된 독성기법의 적용성 및 효율성 평가 완료함	100
		○ 다시마 사상체를 사용한 로봇형 독성진단 시스템 기반 기술 평가	○ 다시마 사상체를 사용한 로봇형 독성진단 기법의 기반기술 효율성 및 적용성 진단 - 다시마 사상체를 사용한 로봇형 독성진단기법의 민감성, 신속성, 경제성, 내구성 등을 진단	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

가. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2008	과래의 포자형성률을 이용한 해양생태독성시험 방법에 관한 연구	○			바다	13(2)	국내	비SCI
2008	해양생태독성평가를 위한 표준시험방법 개발에 관한 연구			○	바다	13(2)	국내	비SCI
2009	Chlorophyll fluorescence based copper toxicity assessment of two algal species	○			Toxicology and Environmental Health Sciences	1(1)	국내	비SCI
2009	Ulva growth bioassay for testing toxic compounds and wastewater flowing into streams	○			Toxicology and Environmental Health Sciences	1(1)	국내	비SCI
2010	Aquatic toxicity tests of the kelp <i>Saccharina japonica</i> using germination and germ tube elongation	○			Environmental Pollution	submit	국외	SCI
2010	Comparative sensitivities of VOCs in early stages of the kelps, <i>Saccharina japonica</i> and <i>Undaria pinnatifida</i>	○			Marine Pollution Bulletin	submit	국외	SCI
2010	Assessing the germination and germ tube elongation of the kelp <i>Undaria pinnatifida</i> using metals and wastewaters	○			Aquatic Toxicology	submit	국외	SCI

나. 학술발표

계재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2008	Aquatic bioassay methods using germination and gametophyte growth of the green macroalga <i>Ulva pertusa</i>	○			The British Societ of Phycology	56	국외	비SCI
2008	해조류의 어린시기 생리활성을 이용한 태안 유류오염 독성평가 연구	○			한국해양학회		국내	비SCI
2009	A novel toxicity biotest with the green maco-alga <i>Ulva pertusa</i>	○			International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA 14)		국외	비SCI
2010	다시마 사상체 생태독성진단 기법 개발을 위한 표준환경 확립 연구	○			한국생물과학 협회	65	국내	비SCI
2010	미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>) 사상체의 엽록소 형광에 기초한 수은 생태독성 평가기법 개발 연구	○			한국생물과학 협회	65	국내	비SCI
2010	한국산 참다시마 (<i>Laminaria japonica</i>) 발아에 영향을 미치는 구리의 농도, 온도와 광량의 영향	○			한국생물과학 협회	65	국내	비SCI

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허 명	등록 인	등록 국	등록 번호
2009	다시마목에 속하는 해조류 포자의 발아율을 이용한 수질 독성 평가 방법 및 수질 독성 평가 키트	한태준 /공정애	대한민국	10-2009-00766362					
2009	다시마목에 속하는 해조류 포자의 발아관 성장속도를 이용한 수질 독성 평가 방법	한태준 /공정애	대한민국	10-2009-0076637					

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2010	Method and kit for evaluating water toxicity using the germination percentage of the spores of marine algae which belongs to Laminariales	Taejun Han and Jeong-Ae Kong	PCT	PCT/KR2010/004642					
2010	Method for evaluating water toxicity using the germ tube growth rate of the spores of marine algae which belongs to Laminariales	Taejun Han and Jeong-Ae Kong	PCT	PCT/KR2010/004682					

라. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
13	1	6	6		7	6	13		

마. 성과활용 계획

(1) 국내의 공정시험법 및 OECD TG 등재 추진

- 다양한 기관과의 교차분석 실행 예정

(2) 3중 생태독성평가 시스템의 산업화

- “ Laminariakit ” (단순키트 시스템), “ LaminariaTox ” (로봇형 시스템), “ LaminariaAutoTox ” (자동화 시스템)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

가. 대형 해조류를 이용한 생태독성 시험법 간의 중금속 민감성 비교

독성평가를 위한 종말점 (endpoints)들이 다양한 연구를 통해 개발되었으며, 이들 종말점들은 성장 억제, 비정상적 성장, 발아 성공률, 배우체 발달 및 생식의 지연, 가근 또는 사상체 형성, 포자 운동성, 광합성, 호흡 그리고 수정란 생성 억제 등에 미치는 영향을 평가한다. 또한 복잡한 생활사를 갖는 다수의 대형 해조류는 단상체 또는 복상체 등 생활사 단계에 따라 서로 다른 독성효과를 측정할 수 도 있다. 표 67은 지금까지 보고된 대형 해조류를 이용한 생태독성 시험법의 내용을 요약하였으며, 시험법간의 중금속 독성 민감성을 비교할 수 있다.

표 67. 대형 해조류를 이용한 생태독성 시험법

Toxicant	Test organism (taxa)	Endpoint	Test period	Effect (µg/L)	References
Cadmium	<i>Champia parvula</i> (R)	Reproduction	48 h +5~7 d	>100, no reproduction	Thursby & Steele (1986)
			2 w	77, no reproduction	
	<i>Fucus serratus</i> (B)	Growth (length)	120 h	1040, significant reduction	Strömngren (1980)
	<i>F. spiralis</i> (B)	Growth (length)	72 h	450, significant reduction	
	<i>F. vesiculosus</i> (B)	Growth (length)	9~10 days	1040, significant reduction	
	<i>Laminaria hyperborea</i> (B)	Germination	48~96 h	>100, inhibition	Hopkins & Kain (1978)
		Sporophyte culture	Not clear	1000, lowest toxic	
	<i>Saccharina latissima</i> (formerly <i>Laminaria saccharina</i>) (B)	Growth (length) Gametophyte survival	144 h 14 d	1,500~2,000, ca. 50% reduction 50,000, lethal	Markham <i>et al.</i> (1980) Ye <i>et al.</i> (2005)
	<i>Ulva fasciata</i> (G)	Germination	96 h	1930, EC ₅₀	Hooten & Carr (1998)
	<i>U. pertusa</i> (G)	Gametophyte growth (length)	96 h	800~1600, ca. 50% reduction	
		Germination	72 h	789, EC ₅₀	Han <i>et al.</i> (2009)
		Gametophyte growth (length) Gametophyte growth (cell no)	144 h 144 h	189, EC ₅₀ 200, ECEC ₅₀	
	<i>U. pertusa</i> (G)	Reproduction	120 h	326, EC ₅₀	Han & Choi (2005)
		Thallus color	96 h	217, EC ₅₀	Han <i>et al.</i> (2007)
		Spore release	96 h	95, EC ₅₀	Han <i>et al.</i> (2008a)
		Sporulation	96 h	262, EC ₅₀	Han <i>et al.</i> (2009)
		Visible color Spore release	96 h 96 h	271, EC ₅₀ 224, EC ₅₀	

표 67. 대형 해조류를 이용한 생태독성 시험법 (계속)

Toxicant	Test organism (taxa)	Endpoint	Test period	Effect (µg/L)	References
Copper	<i>Ascophyllum nodosum</i> (B)	Growth (length)	10 d	66, significant reduction	Strömngren (1979)
	<i>Ceramium strictum</i> (R)	Reproduction	7 d	10~15, EC ₅₀	Eklund (1993)
	<i>C. tenuicorne</i> (R)	Growth (biomass, 7 psu)	7 d	0.52~3.8, EC ₅₀	Eklund (2005)
		Growth (biomass, 20 psu)	7 d	7.9~13, EC ₅₀	
		Growth (length, 7 psu)	7 d	1.9~5.7, EC ₅₀	
		Growth (length, 20 psu)	7 d	7.9~27, EC ₅₀	
		Growth (length)	7 d	6.4, EC ₅₀	Ytreberg <i>et al.</i> (2010)
	<i>Champia</i>	Reproduction	48 h + 5~7 d	7.7, no reproduction	Thursby & Steele (1986)
			2 w	4.6, no reproduction	
	<i>Ecklonia radiata</i> (B)	Germination	48 h	320~470, EC ₅₀	Bidwell <i>et al.</i> (1998)
		Growth (germ tube)	48 h	180~210, EC ₅₀	
	<i>Enteromorpha compressa</i> (G)	Cell viability	144 h	18~96, significant reduction	Reed & Moffat (1983)
	<i>E. flexuosa</i> (G)	Photosynthesis	120 h	250, significant decline	Andrade <i>et al.</i> (2004)
	<i>Fucus serratus</i> (B)	Growth (length)	10 d	25, significant reduction	Strömngren (1979)
		Embryo growth (cell division)	40 h	1350, 52% inhibition	Nielsen <i>et al.</i> (2003)
	<i>F. spiralis</i> (B)	Germling growth	10 d	13.4, about 50% reduction	Bond <i>et al.</i> (1999)
		Growth (length)	10 d	12, significant reduction	Strömngren (1979)
	<i>F. vesiculosus</i> (B)	Growth (length)	10 d	50, significant reduction	
		Fertilization	24 h	10~20, 50% reduction	Andersson & Kautsky (1996)
	<i>Gracilaria tenuistipitata</i> (R)	Growth (dry weight)	96 h	120, EC ₅₀	Haglund <i>et al.</i> (1996)
	<i>Hormosira bankii</i>	Germination	48 h	170, EC ₅₀	Myers <i>et al.</i> (2006)
			72 h	220, EC ₅₀	
		Rhizoid growth	48 h	130, EC ₅₀	
			72 h	90, EC ₅₀	
	<i>Laminaria hyperborea</i> (B)	Germination	48~96 h	100, inhibition	Hopkins & Kain (1978)
		Sporophyte formation	14 d	10, lowest toxic	
		Respiration	5~24 h	25, lowest toxic	
	<i>Lessonia nigrescens</i> (B)	Spore release	8 h	11.7, IC ₅₀	Contreras <i>et al.</i> (2007)
		Spore settlement	8 h	25.3, IC ₅₀	
	<i>Macrocystis pyrifera</i> (B)	Germination	48 h	100, significant inhibition (NOEC = 50.1)	Anderson <i>et al.</i> (1990)
		Germ tube growth	48 h	32, significant inhibition (NOEC = 10.2)	
		Sporophyte production	19~20 d	10.2, decline (NOEC = 10.2)	
		Sporophyte growth	19~20 d	32, significant inhibition (NOEC = 10.2)	
		Germination	42 h	120, ca. 30% inhibition (LOEC = 40)	Garman <i>et al.</i> (1994)

표 67. 대형 해조류를 이용한 생태독성 시험법 (계속)

Toxicant	Test organism (taxa)	Endpoint	Test period	Effect (µg/L)	References
Copper	<i>Macrocystis pyrifera</i> (B)	Nuclear migration	42 h	30~60, ca. 50% inhibition (LOEC = 20)	Garman <i>et al.</i> (1994)
	<i>Saccharina latissima</i> (formerly)	Spore settlement	12 h	> 500, no effect	Chung & Brinkhuis
	<i>Laminaria saccharina</i> (B)	Spore germination	12 h	> 500, no effect	(1986)
		Gametogenesis	20 d	50, significant delay	
		Sporophyte growth	7 d	10, significant reduction	
		Survival of gametophytes	14 d	50,000, lethal	Ye <i>et al.</i> (2005)
		Sporophyte production	14 d	10, ca. 50% inhibition	
	<i>Ulva armoricana</i> (G)	Growth (area)	72 h	50~100, ca. 50% reduction	Han <i>et al.</i> (2008)b
		Chl a	72 h	250, ca. 50% reduction	
		Fv/Fm	72 h	250, ca. 50% reduction	
Chromium	<i>U. pertusa</i> (G)	Growth (area)	72 h	50~100, ca. 50% reduction	
		Chl a	72 h	250, ca. 50% reduction	
		Fv/Fm	72 h	250, ca. 50% reduction	
	<i>Ceramium strictum</i> (R)	Reproduction	120 h	61, EC ₅₀	Han & Choi (2005) Han <i>et al.</i> (2007) Han <i>et al.</i> (2008a) Han <i>et al.</i> (2009)
		Thallus color	72~120 h	63, EC ₅₀	
		Spore release	96 h	40, EC ₅₀	
	Sporulation	96 h	99, EC ₅₀		
	Visible color	96 h	102, EC ₅₀		
	Spore release	96 h	80, EC ₅₀		
	Growth (SMA length)	7 d	4,600, EC ₅₀	Bruno & Eklund (2003)	
	Growth (CIA length)	7 d	3,400, EC ₅₀		
	Growth (cell no)	7 d	4,500, EC ₅₀		
	Growth (CIA area)	7 d	2,300 EC ₅₀		
<i>C. tenuicorne</i> (R)	Growth (SMA length)	7 d	800, EC ₅₀		
	Growth (CIA length)	7 d	700, EC ₅₀		
	Growth (cell no)	7 d	900, EC ₅₀		
	Growth (CIA area)	7 d	600, EC ₅₀		
<i>Ecklonia radiata</i> (B)	Germination	48 h	54,900~65100, EC ₅₀	Bidwell <i>et al.</i> (1998)	
	Growth (germ tube)	48 h	31800~47500, EC ₅₀		
<i>Gracilaria tenuistipitata</i> (R)	Growth (dry weight)	96 h	600~23,000, EC ₅₀ (NOEC = 40~2,200)	Haglund <i>et al.</i> (1996)	
<i>Ulva pertusa</i> (G)	Sporulation	96 h	1448, EC ₅₀	Han <i>et al.</i> (2009)	
	Visual color	96 h	1,500, EC ₅₀		
	Spore release	96 h	803, EC ₅₀		

표 67. 대형 해조류를 이용한 생태독성 시험법 (계속)

Toxicant	Test organism (taxa)	Endpoint	Test period	Effect (µg/L)	References	
Cobalt	<i>U. pertusa</i> (G)	Sporulation	96 h	144, EC ₅₀		
		Visual color	96 h	147, EC ₅₀		
		Spore release	96 h	100, EC ₅₀		
Lead	<i>Ascophyllum nodosum</i> (B)	Growth (length)	10 d	2600, ca. 50% reduction	Strömngren (1980)	
	<i>Fucus serratus</i> (B)	Growth (length)	10 d	2600, ca. 50% reduction		
	<i>F. spiralis</i> (B)	Growth (length)	10 d	2600, ca. 50% reduction		
	<i>U. pertusa</i> (G)	Reproduction	120 h	877, EC ₅₀ (NOEC = 625)	Han & Choi (2005)	
		Thallus color	72~120 h	840, EC ₅₀ (NOEC = 500)	Han <i>et al.</i> (2007)	
		Spore release	96 h	489, EC ₅₀ (NOEC = 250)	Han <i>et al.</i> (2008a)	
		Sporulation	96 h	1043, EC ₅₀	Han <i>et al.</i> (2009)	
		Visual color	96 h	1111, EC ₅₀		
		Spore release	96 h	730, EC ₅₀		
	Mercury	<i>Gracilaria tenuistipitata</i> (R)	Growth (dry weight)	96 h	180, EC ₅₀	Haglund <i>et al.</i> (1996)
<i>Ascophyllum nodosum</i> (B)		Growth (length)	10 d	95~463, ca. 50% reduction	Strömngren (1980)	
<i>Fucus serratus</i> (B)		Growth (length)	10 d	47~95, ca. 50% reduction		
<i>F. spiralis</i> (B)		Growth (length)	10 d	95~463, ca. 50% reduction		
<i>F. vesiculosus</i> (B)		Growth (length)	10 d	47~95, ca. 50% reduction		
<i>Pelvetia canaliculata</i> (B)		Growth (length)	10 d	95~463, ca. 50% reduction		
<i>Laminaria hyperborea</i> (B)		Germination	48~96 h	10, inhibition	Hopkins & Kain (1978)	
		Sporophyte culture	Not clear	50, lowest toxic		
		Respiration	19~22 h	5,000, lowest toxic		
		<i>Ulva pertusa</i> (G)	Sporulation	96 h	48, EC ₅₀	Han <i>et al.</i> (2009)
			Visual color	96 h	52, EC ₅₀	
		Spore release	96 h	36, EC ₅₀		
Nickel	<i>U. pertusa</i> (G)	Sporulation	96 h	945, EC ₅₀	Han <i>et al.</i> (2009)	
		Visual color	96 h	978, EC ₅₀		
		Spore release	96 h	306, EC ₅₀		

표 67. 대형 해조류를 이용한 생태독성 시험법 (계속)

Toxicant	Test organism (taxa)	Endpoint	Test period	Effect (µg/L)	References
Zinc	<i>Ascophyllum nodosum</i> (B)	Growth (length)	10 d	2900 ~ 10,000, ca. 50% reduction	Strömngren (1979)
	<i>Ceramium tenuicorne</i> (R)	Growth (biomass, 7 psu)	7 d	20 ~ 33, EC ₅₀	Eklund (2005)
		Growth (biomass, 20 psu)	7 d	32 ~ 61, EC ₅₀	
		Growth (length, 7 psu)	7 d	19 ~ 69, EC ₅₀	
		Growth (length, 20 psu)	7 d	32 ~ 133, EC ₅₀	
		Growth (length)	7 d	25, EC ₅₀	Ytreberg <i>et al.</i> (2010)
	<i>Eklonia radiata</i>	Germination	48 h	18,100 ~ 18,600, EC ₅₀	Bidwell <i>et al.</i> (1998)
	<i>Fucus serratus</i> (B)	Growth (length)	10 d	7,000 ~ 14,000, ca. 50% reduction	Strömngren (1979)
	<i>F. spiralis</i> (B)	Growth (length)	10 d	2,900 ~ 7,000, ca. 50% reduction	
	<i>F. vesiculosus</i> (B)	Growth (length)	10 d	2,900 ~ 7,000, ca. 50% reduction	
	<i>Hormosira bankii</i> (B)	Germination	48 h	23,000, EC ₅₀	Myers <i>et al.</i> (2006)
			72 h	21,000, EC ₅₀	
		Rhizoid growth	48 h	21,000, EC ₅₀	
			72 h	19,000, EC ₅₀	
	<i>Laminaria hyperborea</i> (B)	Germination	48 ~ 96 h	5,000, inhibition	Hopkins & Kain (1978)
		Sporophyte culture	Not clear	500, lowest toxic	
		Respiration	Immediate-24 h	250,000, lowest toxic	
	<i>Macrocystis pyrifera</i> (B)	Germination	48 h	1730 ~ 5500, NOEC	Anderson & Hunt (1988)
		Growth (germ tube)	48 h	550 ~ 1090, NOEC	
		Sporophyte production	16 d	1070, NOEC	
	<i>Pelvetia canaliculata</i> (B)	Growth (length)	10 d	7,000 ~ 14,000, ca. 50% reduction	Strömngren 1979)
	<i>Ulva fasciata</i> (G)	Germination	96 h	202.2, EC ₅₀	Hooten & Carr (1998)
		Growth (length)	96 h	285, ca. 56% reduction	
		Growth (cell number)	96 h	285, ca. 37% reduction	
	<i>U. pertusa</i> (G)	Germination	72 h	378, EC ₅₀ (NOEC = 125)	Han <i>et al.</i> (2009)
		Gametophyte growth	144 h	307, EC ₅₀ (NOEC < 125)	
		Reproduction	120 h	738, EC ₅₀ (NOEC = 313)	
		Thallus color	72 ~ 120 h	966, EC ₅₀ (NOEC = 500)	Han <i>et al.</i> (2007)
		Spore release	96 h	572, EC ₅₀ (NOEC = 250)	Han <i>et al.</i> (2008)
		Sporulation	96 h	1074, EC ₅₀	Han <i>et al.</i> (2009)

제 7 장 참고문헌

- Abou-Waly, H., Abou-Setta, M.M., Nigg, H.N. & Mallory, L.L. 2008. Growth response of freshwater algae, *Anabaena flos-aquae* and *Selenastrum capricornutum* to atrazine and hexazinone herbicides. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 46, 223–229.
- Adams, N.M. 1994. *Seaweeds of New Zealand. An Illustrated Guide*. Canterbury University Press, Christchurch.
- Adams, N.M. 1997. *Common seaweeds of New Zealand*. Canterbury University Press, Christchurch.
- Adrade, L., Farina, M. & Amado Filho, G.M. 2004. Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) in vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58, 117–125.
- Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. 2004. First record of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta) on the Pacific coast of Mexico. *Botanica Marina* 47, 255–258.
- Anderson, B.S. & Hunt, J.W. 1988. Bioassay methods for evaluating the toxicity of heavy metals, biocides and sewage effluent using microscopic stages of giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Agardh): a preliminary report. *Marine Environmental Research* 26, 113–134.
- Anderson, B.S., Hunt, J.W., Turpen, S.L., Coulon, A.R. & Martin, M. 1990. Copper toxicity to microscopic stages of giant kelp *Macrocystis pyrifera*: interpopulation comparisons and temporal variability. *Marine Ecology Progress Series* 68, 147–156.
- Anderson, S. & Kautsky, L. 1996. Copper effects on reproductive stages of Baltic Sea *Fucus vesiculosus*. *Marine Biology* 125, 171–176.
- ANZECC. 2000. *Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine waters*. Australian and New Zealand Environment Conservation Council.
- Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Bercibar, E., Tapia, P.D., Pereira, R., Santos, R. & Pinto, I.S. 2009. Check list of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Botanica Marina* 52, 24–46.

- Bárbara, I., Cremades, J., Calvo, S., López-Rodríguez, M.C. & Dosil, J. 2005. Checklist of the benthic marine and brackish galician algae (NWSpain). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 62, 69–100.
- Bárbara, I., Cremades, J. & Veiga, A.J. 2004. Floristic study of a maërl and gravel subtidal bed in the Ría de Arousa' (Galicia, Spain). *Botanica Complutensis* 28, 27–37.
- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. 1988. Inventaire bibliographique des macrophytes (Algues, Phanérogames) signalés dans l'Étang de Thau (Hérault, France). *Naturalia Monspel* 52, 71–84.
- Bidwell, J.R., Wheeler, K.W. & BurrIDGE, T.R. 1998. Toxicant effects on zoospore stage of the marine macroalga *Ecklonia radiata* (Phaeophyta: Laminariales). *Marine Ecology Progress Series* 163, 259–265.
- Bond, P.R., Brown, M.T., Moate R.M., Gledhill, M., Hill, S.J. & Nimmo, M. 1999. Arrested development in *Fucus spiralis* (Pheophyceae) germLings exposed to copper. *European Journal of Phycology* 34, 513–521.
- Barber, J.T., Sharma, H.A., Ensley, H.E., Polito, M.A. & Thomas, D.A. 1995. Detoxification of phenol by the aquatic angiosperm, *Lemna gibba*. *Chemosphere* 31, 3567–3574.
- Bolton, J.J. 2010. The biogeography of kelps (Laminariales, Phaeophyceae): a global analysis with new insights from recent advances in molecular phylogenetics. *Helgoland Marine Research* 10, 1007.
- Bruno, E. & Eklund, B. 2003. Two new growth inhibition tests with the filamentous algae *Ceramium strictum* and *C. tenuicorne* (Rhodophyta). *Environmental Pollution* 125, 287–293.
- Casas, G., Scrosati, R., Piriz & M.L. 2004. The invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) reduces native seaweed diversity in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Biological Invasions* 6, 411–416.
- Choi, J.-H., Kim, D.-W., Moon, Y.-S., Park, C.-K., Kim, J. & Yang, D.-B. 1997. Study on biochemical pollutant markers for diagnosis of marine pollution. *Korean Journal of Life Science* 7, 1–9.
- Chapman, V.J. & Chapman, D.J. 1980. *Seaweeds and their uses*. Chapman & Hall,

London & New York.

Chung, I.K. & Brinkhuis, B.H. 1986. Copper effects in early stages of the kelp, *Laminaria saccharina*. Marine Pollution Bulletin 17, 213–218.

Contreras, L., Medina, M., Andrade, S., Oppliger, V. & Correa, J.A. 2007. Effects of copper on early developmental stages of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyceae). Environmental Pollution 145, 75–83.

Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scattolin, M. & Parisi, G. 1998. Distribution of introduced Japanese macroalgae *Undaria pinnatifida*, *Sargassum muticum* (Phaeophyta) and *Antithamnion pectinatum* (Rhodophyta) in the Lagoon of Venice. Hydrobiologia 385, 17–22.

Dizerbo, A.H. & Herpe, E. 2007. Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, Iles Normandes incluses. Editions Anaximandre 1, 315.

Eklund, B. 1993. A 7-day reproduction test with the marine red alga *Ceramium strictum*. In: Slooff, W. and de Kruijf, H. (Eds), The Science of the Total Environment. Proceedings of the 2nd European Conference on Ecotoxicology, Supplement, Part 1. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam. pp. 749–759.

Eklund, B. 2005. Development of a growth inhibition test with the marine and brackish water red alga *Ceramium tenuicorne*. Marine Pollution Bulletin 50, 921–930.

Fletcher, R.L. & Manfredi, C. 1995. The occurrence of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) on the south coast of England. Botanica Marina 38, 355–358.

Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I. 1991. The Japanese brown alga *Undaria pinnatifida* on the coast of France and its possible establishment in European waters. Journal du Conseil International Pour l'Exploration de la Mer 47, 379–390.

Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. 1999. Catalogue of the benthic marine macroalgae of the Italian coast of the Adriatic Sea. Bocconeia 12, 1–214.

Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. 2010. Native and non-native species of hard substrata in the Dutch Wadden Sea. Nederlandse faunistische Mededelingen 33, 21–75.

- Hardy, F.G. & Guiry, M.D. 2003. A check-list and atlas of the seaweeds of Britain and Ireland. British Phycological Society pp.x, 435.
- Haglund, K., Bjorklund, M., Gunnare, S., Sandberg, A., Olander, U. & Pedersn, M. 1996. New method for toxicity assessment in marine and brackish environments using the macroalga *Gracilaria tenuistipitata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 326/327, 317–325.
- Han, T. & Choi, G.-W. 2005. A novel marine algal toxicity bioassay based on sporulation inhibition in the green macroalga *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Aquatic Toxicology* 75, 202–212.
- Han, T., Han, Y.-S., Park, C.Y., Jun, Y.S., Kwon, M.J., Kang, S.-H. & Brown, M.T. 2008. Spore release by the green alga *Ulva*: A quantitative assay to evaluate aquatic toxicants. *Environmental Pollution* 153, 699–705.
- Han, T., Kang, S.-H., Park, J.-S., Lee, H.-K. & Brown, M.T. 2008. Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure. *Aquatic Toxicology* 86, 176–184.
- Han, T., Kong, J.-A. & Brown, M.T. 2009. Aquatic toxicity tests of *Ulva pertusa* Kjellman (Ulvales, Chlorophyta) using spore germination and gametophyte growth. *European Journal of Phycology* 44, 357–363.
- Han, Y.-S., Brown, M.T., Park, G.S. & Han, T. 2007. Evaluating aquatic toxicity by visual inspection of thallus color in the green macroalga *Ulva*: Testing a novel bioassay. *Environmental Science and Technology* 41, 3667–3671.
- Han, Y.-S., Kumar, A.S. & Han, T. 2009. Comparison of metal toxicity bioassays based on inhibition of sporulation and spore release in *Ulva pertusa*. *Toxicology and Environmental Health Science* 1, 24–31.
- Hay, C.H. & Luckens, P.A. 1987. The Asian kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta: Laminariales) found in a New Zealand harbour. *New Zealand Journal of Botany* 25, 329–332.
- Hollister, T.A. & Walsh, G.E. 1973. Differential responses of marine phytoplankton to herbicides: Oxygen Evolution. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 9, 291–295.

Hooten, R.L. & Carr, R.S., 1998. Development and application of a marine sediment pore-water toxicity test using *Ulva fasciata* zoospores. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 932–940.

Hopkin, R. & Kain, J.M. 1978. The effects of some pollutants on the survival, growth and respiration of *Laminaria hyperborea*. *Estuarine and Coastal Marine Science* 7, 531–553.

Inger, W. 2007. Alien species alert: *Undaria pinnatifida* (wakame or Japanese kelp). Conseil International pour l'Exploration de la Mer, Copenhagen.

José, C.B., Jesús, O., César, P., Francisco, F.–Y., Carlos, G.–S. & Raimundo, R. 2010. Marco-environmental modelling of the current distribution of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Ochrophyta) in northern Iberia. *Biological Invasions* 12, 2131–2139.

Juliet, B., David, M.J., Ian, T., Mary, J.H. & David, B.W. 2007. Important plant areas for algae. Plantlife International, Wiltshire.

Kim, J.–K. & Han, T. 1999. Effects of inorganic nutrients and heavy metals on growth and pigmentation of the green alga, *Ulva pertusa* Kjellman. *Korean Journal of Environmental Biology* 17, 427–438.

Kim, J.–K. & Han, T. 2001. Effects of inorganic nutrients and heavy metals on germination of the green alga, *Ulva pertusa* Kjellman. *Korean Journal of Environmental Biology* 19, 7–17.

Kim, M.G., Lee, C.–H. & Chung, I.K. 1994. Seasonal variation of photosynthetic activities and heavy metal toxicities of *Ulva pertusa* Kjellman. *Korean Journal of Phycology* 9, 225–235.

Krebs, F. 1991. Bestimmung der Biologischen Schadwirkung Wassergefährdender Stoffe im Assimilations-Zehrungs-Test (A-Z-Test). *Deutsche Gewässerkundliche Mitteilungen* 35, 161–170.

Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology* 42, 493–512.

Lee, Y. 2008. Marine algae of Jeju. Academy Publication, Seoul.

- Lee, Y. & Kang, S. 2001. A catalogue of the seaweeds in Korea. Cheju National University Press, Jeju.
- Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. 1998. Taxonomy and morphology of *Undaria* (Alariaceae, Phaeophyta) in Korea. *Algae*(The Korean Journal of Phycology) 13, 427–446.
- Loretto, C.L., Medina, M.H., Andrade, S., Oppliger, V. & Correa, J.A. 2007. Effects of copper on early developmental stages of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyceae). *Environmental Pollution* 145, 75–83.
- Magnusson, M., Heimann, K. & Negri, A.P. 2008. Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae. *Marine Pollution Bulletin* 56, 1545–1552.
- Markham, J.W., Kremer, B.P. & Sperling, K.R. 1980. Effects of cadmium on *Laminaria saccharina* in culture. *Marine Ecology–Progress series* 3, 31–39.
- McFeters, G.A., Bond, P.J., Olson, S.B. & Tchan, Y.T. 1983. A comparison of microbial bioassays for the detection of aquatic toxicants. *Water Research* 17, 1757–1762.
- Morris, C.A, Nicolaus, B., Sampson, V., Harwood, J.L. & Kille, P. 1999. Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*. *Biochemical Journal* 338, 553–560.
- Morrison, L., Baumann, H.A. & Stengel, D.B. 2008. An assessment of metal contamination along the Irish coast using the seaweed *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyceae). *Environmental Pollution* 152, 293–303.
- Muller, R., Schreiber, U., Escher, B.I., Quayle, P., Nash, S.M.B. & Mueller, J.F. 2008. Rapid exposure assessment of PSII herbicides in surface water using a novel chlorophyll a fluorescence imaging assay. *Science of the Total Environment* 401, 51–59.
- Murphy, V., Hughes, H. & McLoughlin P. 2008. Comparative study of chromium biosorption by red, green and brown seaweed biomass. *Chemosphere* 70, 1128–1134.
- Myers, H.H., Duba, S., Gunthorpe, L. & Allinson, G. 2006. Assessing the performance of *Hormosira bankii* (Turner) Desicaine germination and growth assay using four reference toxicants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 304–311.

- Naessens, M., Leclerc, J.C. & Tran-Minh, C. 2000. Fiber optic biosensor using *Chlorella vulgaris* for determination of toxic compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 181–185.
- Nelson, W.A. 1999. A revised checklist of marine algae naturalised in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 37, 355–359.
- Nigi, G., Kuma, K. & Matsunaga, K. 2000. Effect of natural organic-Fe(III) complex on iron uptake and growth of a brown alga *Laminaria religiosa* Miyabe. *Fisheries Science* 66, 986–988.
- Nielsen, H.D., Brownlee, C., Coelho, S.M. & Brown, M.T. 2003. Inter-population differences in inherited copper tolerance involve photosynthetic adaptation and exclusion mechanisms in *Fucus serratus*. *New Phytologist* 160, 157–165.
- Ozer, A., Gurbuz, G., Calimli, A. & Korbati, B.K. 2009. Biosorption of copper(II) ions on *Enteromorpha prolifera*: Application of response surface methodology(RSM) *Chemical Engineering Journal* 146, 377–387.
- Paul, C.S., Rachel, A.W., Andrew, N.C., Leslie H.H. & Jeffrey, H.R.G. 2002. First report of the Asian kelp *Undaria pinnatifida* in the northeastern Pacific Ocean. *Biological Invasions* 4, 333–338.
- Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. 2008. Catálogo de las algas bentónicas del Pacífico de México II. Phaeophycota pp. [i–viii], i–vi, 15–146.
- Pena, V. & Bárbara, I. 2008. Biological importance of an Atlantic European maerl bed off Benencia Island (northwest Iberian Peninsula). *Botanica Marina* 51, 493–505.
- Peña, V. & Bárbara, I. 2002. Caracterización florística y zonación de las algas bentónicas marinas del puerto de A Coruña (NO Península Ibérica). *Nova Acta Científica Compestelana (Biología)* 12, 35–66.
- Peterson, H.G., Boutin, C., Freemark, K.E. & Martin, P.A. 1997. Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed. *Aquatic Toxicology* 39, 111–134.
- Podola, B. & Melkonian, M. 2005. Selective real-time herbicide monitoring by an array

chip biosensor employing diverse microalgae. *Journal of Applied Phycology* 17, 261–271.

Reed, R.H. & Moffat, L. 1983. Copper toxicity and copper tolerance in *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 69, 85–103.

Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. 1992. Check-list of mediterranean seaweeds. I. Fucophyceae (Warming 1884). *Botanica Marina* 35, 109–130.

Sanchez-Rodriguez, I., Heerta-Diaz, M.A., Choumiline, E., Holguin-Quinones, O. & Zertuche-Gonzalez, J.A. 2001. Elemental concentrations in different species of seaweeds from Loreto Bay, Baja California Sur, Mexico: implications for the geochemical control of metals in algal tissue. *Environmental Pollution* 114, 145–160.

Schaffelke, B., Campbell, M.L. & Hewitt, C.L., 2005. Reproductive phenology of the introduced kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) in Tasmania, Australia. *Phycologia* 44, 84–94.

Seery, C.R., Gunthorpe, L. & Ralph, P.J. 2006. Herbicide impact on *Hormosira banksii* gametes measured by fluorescence and germination bioassays. *Environmental Pollution* 140, 43–51.

Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. 2007. Revision of the systematics of algae in the order Laminariales (Phaeophyta) from the Far-Eastern Seas of Russia on the basis of molecular-phylogenetic data. *Russian Journal of Marine Biology* 33, 278–289.

Shigeoka, T., Sato, Y., Takeda, Y., Yoshida, K. & Yamauchi, F. 1988. Acute toxicity of chlorophenols to green algae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella vulgaris*, and quantitative structure-activity relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry* 7, 847–854.

Shimshock, N., Sennefelder, G., Dueker, M., Thurberg F. & Yarish, C. 1992. Patterns of metal accumulation in *Laminaria longicruris* from Long Island Sound (Connecticut). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22, 305–312.

Sliwa, C., Johnson, C.R. & Hewitt, C.L. 2006. Mesoscale dispersal of the introduced kelp *Undaria pinnatifida* attached to unstable substrata. *Botanica Marina* 49, 396–405.

- St.Laurent, D., Blaise, C., MacQuarrie, P., Scroggins, R. & Trottier, B. 1992. Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. *Environmental Toxicology and Water Quality* 7, 35–48.
- Stauber, J.L. 1995. Toxicity testing using marine and freshwater unicellular algae. *Australasian Journal of Ecotoxicology* 1, 15–24.
- Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. 2007. Zeewieren van de voormalige oesterputten bij Yerseke. *Gorteria* 32, 125–143.
- Strezov, A. & Nonova T. 2009. Influence of macroalgal diversity on accumulation of radionuclides and heavy metals in Bulgarian Black Sea ecosystems. *Journal of Environmental Radioactivity* 100, 144–150.
- Strömberg, T. 1979. The effect of zinc on the increase in length of five intertidal fucales. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 40, 95–102.
- Strömberg, T. 1980. The effect of lead, cadmium, and mercury on the increase in length of five intertidal fucales. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 43, 107–119.
- Szefer, P. 2002. Metal pollutants and radionuclides in the Baltic Sea – an overview. *Oceanologia* 44, 129–178.
- Thellen, C., Blaise, C., Roy, Y. & Hickey, C. 1989. Round robin testing with the *Selenastrum capricornutum* microplate toxicity assay. *Hydrobiologia* 188/189, 259–268.
- Thursby, G.B. & Steele, R.L. 1986. Comparison of short- and long-term sexual reproduction tests with the marine red alga *Champia parvula*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 5, 1013–1018.
- Tseng, C.K. 1984. *Common seaweeds of China*. Science Press, Beijing.
- USEPA (US Environmental Protection Agency). 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.
- Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. 2006. Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) deduced from mitochondria genes – origins and succession of introduced populations. *Phycologia* 45, 687–695.

- Valentine, J.P. & Johnson, C.R. 2005. Persistence of sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*) barrenson the east coast of Tasmania: inhibition of macroalgal recovery in the absence of high densities of sea urchins. *Botanica Marina* 48, 106–115.
- Vedrine, C., Leclerc, J.C., Durrieu, C. & Tran-Minh, C. 2003. Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosensors and Bioelectronics* 18, 457–463.
- Verlaque, M. 2001. Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanologica Acta* 24, 29–49.
- Vijayaraghavan, K., Teo, T.T., Balasubramanian, R. & Joshi, U.M. 2008. Application of *Sargassum* biomass to remove heavy metal ions from synthetic multi-metal solutions and urban storm water runoff. *Journal of Hazardous Material* 164, 1019–1023.
- Weber, A., Christlieb, T. & Irmer, U. 1984. Die kombination eines unkomplizierten chemikali toxizitätstests mit einem multi-spezies-testsystem zur erfassung synergistischer und sublethaler effekte in aquatischen ekosystemen. Bundesminister für Forschung und Technologie.
- Womersley, H.B.S. 2003. The marine benthic flora of southern Australia—PartIIID Ceramiales—Delesseriaceae, Sarcomeniaceae, Rhodomelaceae. Australian Biological Resources Study & State Herbarium of South Australia, Canberra & Adelaide, pp. 533.
- Ye, N.-H., Wang, G.-C. & Tseng, C.-K. 2005. Effect of heavy metals (Cd, Cu) on the gametophytes of *Laminaria japonica* Aresch. *Journal of Integrative Plant Biology* 47, 942–951.
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. 1990. Check-list of marine algae of Japan (revised in 1990). *Japanese Journal of Phycology* 38, 269–320.
- Ytreberg, E., Karlsson, J. & Eklund, B. 2010. Comparison of toxicity and release rates of Cu and Zn from anti-fouling paints leached in natural and artificial brackish seawater. *The Science of the Total Environment* 408, 2459–2466.
- Yoshida, T. 1998. Marine algae of Japan. Uchida Rokakuho Publishing Co. Ltd, Tokyo.

부록 1. 국문 매뉴얼

다시마 포자 발아를 이용한 생태독성 평가 매뉴얼

1. 측정원리

본 시험방법은 해양생태계의 일차 생산자인 다시마를 이용한 독성시험방법으로써 유해물질이 생태계의 일차생산자에 미치는 영향을 파악하는데 그 목적이 있다. 표준시험생물 종(species)은 갈조류인 참다시마(*Saccharina japonica*)이다. 이 시험법은 액상물질에 노출된 참다시마 포자의 발아 억제 현상을 이용하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법으로 시험 대상 물질이 시험 기간 동안 유의하게 손상되거나 사라지지 않으며 해수에 잘 녹는 물질에 적용된다.

시험원리는 참다시마 포자를 다양한 농도의 시험 물질에 24시간 동안 노출시킨 후, 포자의 발아율을 산정하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법이다(그림 1).



그림 1. 다시마 포자발아율의 독성평가 원리

2. 시험생물

2.1. 본 시험법의 표준시험생물은 해양성 갈조류인 참다시마 *Saccharina japonica* (Areschoung) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders 이다.

2.2. 해양성 갈조류인 참다시마는 대형의 조체로 발달하는 포자체가 저 수온기에 성장과 성

숙을 하지만, 하절기의 고 수온기에는 소실되며, 미소한 배우체 세대로 여름을 넘기고, 수온의 저하와 함께 성숙하여 다음의 포자체 세대를 만든다.

- 2.3. 시험생물은 우리나라 연안역 조간대에서 연중 채집할 수 있으며, 양식산업의 발달로 연중 생물체 공급이 가능하다. 시험생물의 채집이 곤란할 경우 인천대학교 녹색환경과학 센터에서 시험생물을 구할 수 있다. 시험생물은 본 실험 시작 1일전에 확보되어야 한다.

3. 기구 및 기기

- 3.1. 광학현미경 : 배율 100-400의 광학현미경, 포자방출 유무 관찰
- 3.2. 배양기 : 독성시험 과정동안 일정한 온도를 유지할 수 있는 배양기 또는 배양실
- 3.3. 수질측정기 : 염분, 수온, pH
- 3.4. 초순수제조기
- 3.5. 교반기 또는 공기발생기
- 3.6. 플라스틱 수조 (10-20 L) : 시험생물(포자) 방출 유도시 사용
- 3.7. 페트리디쉬와 커버글라스: 시험생물 부착 유도시 사용
- 3.8. 24구 웰 플레이트

4. 시험생물준비

4.1. 배양 배지 제조 방법

4.1.1. 배양용액 및 시험물질 용액을 제조하는데 사용하는 희석수는 탈이온수를 사용하여야 한다. 시험 준비나 저장 기간 동안 희석수가 오염되지 않도록 특별히 주의하여야 하며, 본 시험에는 구리로 만든 도구나 기구는 사용할 수 없다.

4.1.2. 배양용액은 OTT's(1965) 인공해수를 만들어 사용한다(OTT's 성분-표 1참조).

4.2. 시약 및 소모품

4.2.1. 투명용기(500 mL) - 시험용액을 보관하는데 사용하며, 이때 “구리” 성분이 함유되지 않은 용기를 사용한다.

4.2.2. 24구 웰 플레이트 - 시험생물 배양 용기로 사용한다(2.5 mL).

4.2.3. 시험 용액과 접촉하는 모든 기구는 유리 또는 화학적으로 불활성 재질이어야 한다.

4.2.4. 막여과 기구 - 평균 통과 직경 $0.45 \mu\text{m}$ 여과지를 사용한다.

표 1. OTT's 인공해수의 주요 성분

주요 성분	농도 (g/L)
NaCl	21.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.00
KCl	0.80
NaBr	0.10
NaNO ₃	0.20
NaHCO ₃	0.20
H ₃ BO ₃	0.06
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	0.01
Sr(NO ₃) ₂	0.03
Na ₂ HPO ₄	0.02

5. 시험방법

5.1. 농도구간설정

5.1.1. 시험 농도의 선택 : 시험할 물질의 농도는 보통 기하학적인 순열을 따라 그 비가 1.5에서 2.0 사이가 되게 한다. 예를 들면, 2 mg/L; 4 mg/L; 8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 64 mg/L;이며, 배출수 또는 액상 물질일 경우에는 0%, 6.25%, 12.5%, 25.0%, 50.0%, 100.0%로 한다. 가능하면, 농도는 10% 이하에서 90% 이상까지의 범위에서 여러(4-5 구간) 수준의 포자방출이 이루어지도록 선택하여야 한다. 시험 농도 범위는 넓은 범위의 농도 구간을 포함하는 예비실험을 통하여 선택하는 것이 가장 좋다.

5.1.2. 대조구 : 모든 시험은 시험 대상 물질만 없고 배양 용액, 시험조건 및 과정이 동일한 음성대조군(negative control)가 반드시 필요하다. 만약 시험에 운반체(carrier)가 쓰이면, 운반체가 첨가된 운반체 대조구가 필요하다.

5.2. 시험 용액 준비

시험 용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 만든다. 일반적으로 시험은 pH를 조정하지 않고 수행하여야 한다. 하지만, 어떤 물질은 극단적인 산성이나 알칼리성에 의해 독성효과를 나타낼 수 있다. 이 경우 1 mol/L 염산이나 1 mol/L 수산화나트륨을 써서 pH를 8 ± 0.2 로 조절해야 한다.

5.3. 시험 생물 준비

- 5.3.1. 다시마 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척한다.
- 5.3.2. 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관한다.
- 5.3.3. 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도한다.
- 5.3.4. 유도된 포자액을 20 mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 준다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼고, 항온배양기에서($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양한다.
- 5.3.5. 포자가 부착된 커버글라스를 24웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 놓는다.

5.4. 배양방법

- 5.4.1. 배양 온도는 15°C 로 암배양 한다.

5.5. 측정방법

- 5.5.1. 실험 개시 후, 24시간이 경과하면 각 셀에서 핀셋으로 포자가 부착되어 있는 커버글라스를 각 조건별로 꺼내어 한 개의 슬라이드 글라스 위에 40% 글리세롤로 고정한다.
- 5.5.2. 포자에서 관이 발생되었을 때를 “발아” 라고 정의하고, 관이 형성되어 있으면 발아되었다 그렇지 않으면 발아하지 않은 것으로 판단한다. 광학현미경상에서 관찰되는 다시마 포자는 현미경 콘덴서를 조절하여 사용하게 되면 발아관의 윤곽이 명확해져서 흰색의 발아관을 검은색으로 관찰 할 수 있다.
- 5.5.3. 총 500개체의 발아정도를 개수하여 발아율을 판정하여 수질의 오염도를 평가한다. 발아율 계수 과정은 영상분석장치(Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 포자를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어진다.

5.5.4. 다시마 독성시험 기록지에 실험 종료 일자와 측정 일자를 기록하고 각 시험용액 농도별 포자 발아율을 기록한다.

5.6. 시험의 유효성 판정

본 시험법의 표준시험물질은 구리(7440-50-8, Junsei Co., Cu)이다. 구리를 이용한 EC₅₀(24 h)은 0.120 mg/L이며, 최소 0.090 mg/L, 최대 0.148 mg/L 범위에서 유효하다.

5.7. 대조군 차트

17회의 서로 다른 발아율 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다(그림 2). 다시마의 평균 발아율은 95.72 ± 1.01 로 나타났다.

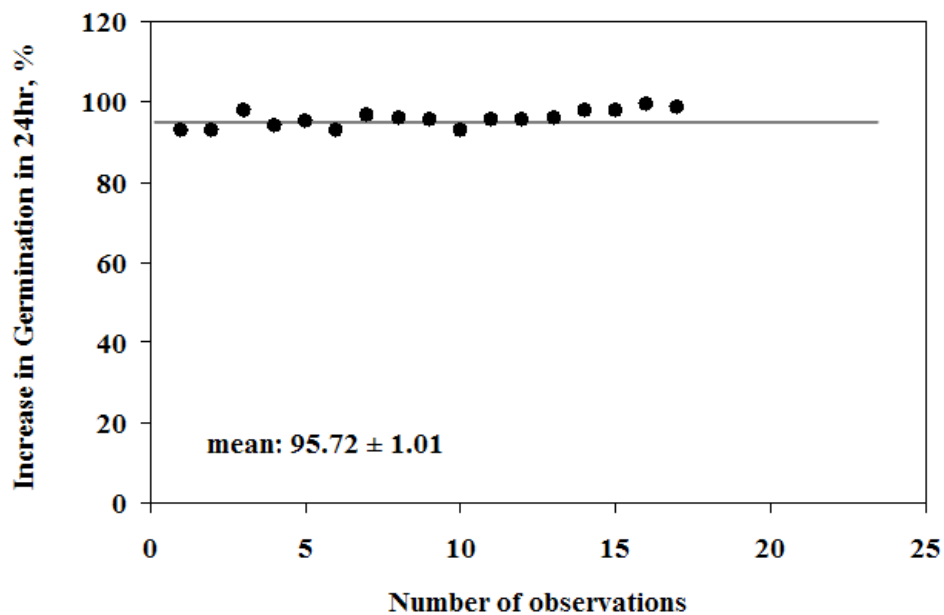


그림 2. 24시간 후 측정된 발아율 대조군 차트

5.8. 시험조건 요약

1. 시험형태:	비교환 정수배양
2. 광조사량:	$0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
3. 광주기:	24h 암기
4. 시험온도:	$15 \pm 1^\circ\text{C}$
5. 염분:	25~35 psu
6. 시험용기:	24구 웰 플레이트
7. 시험용액:	2.5 mL/replicate
8. 시험용액 교환:	교환하지 않음
9. 시험생물 크기:	지름 $25 \mu\text{m}$
10. 반복구당 시험생물 수	1×10^6
11. 배양액:	배양용액 (조성표 참조-표 1)
12. 희석액:	배양용액
13. 평가 농도:	100, 50, 25, 12.5, 6.25%, 대조구 또는 정량농도 (예 mg/L)
14. 시험기간:	24시간
15. 측정요소	총 500개체당 발아한 개체수를 나타낸다.
16. 시험적합도 기준:	대조구에서의 발아율이 $95.72 \pm 1.01\%$

5.9. 평가방법 모식도 (그림 3)

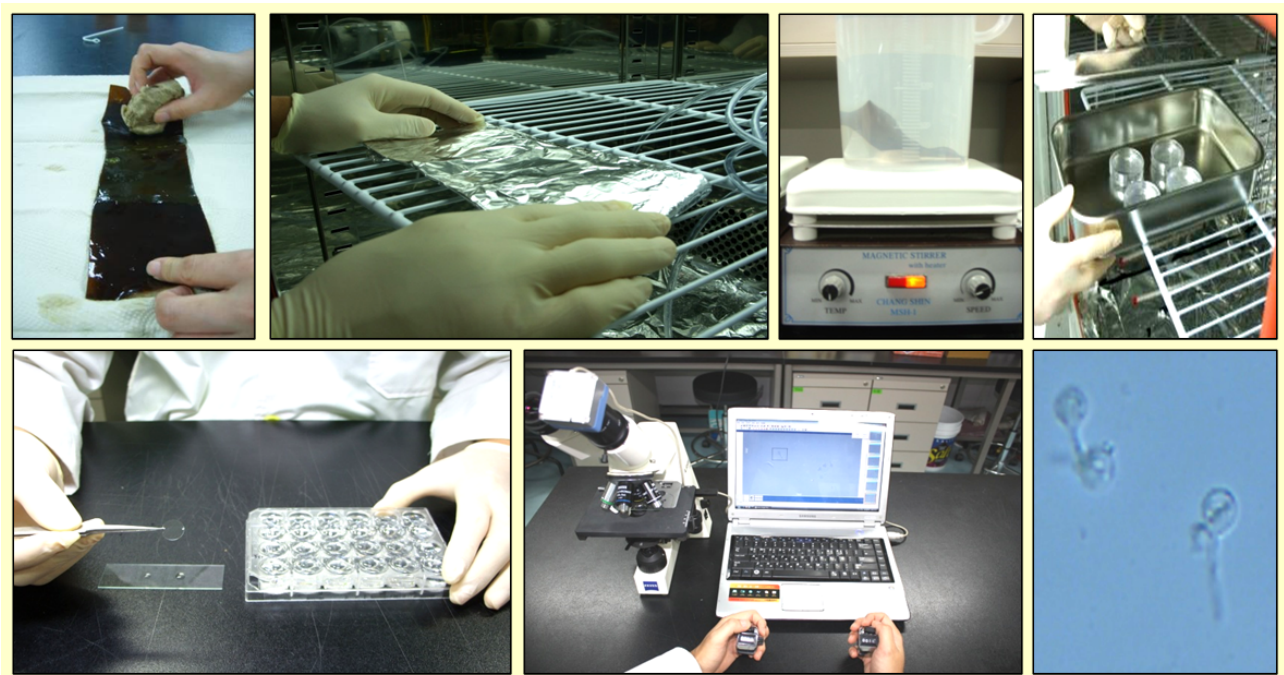


그림 3. 다시마 발아율 평가방법

6. 자료분석

6.1. 자료정리

포자발아율은 개체당 발아된 수를 비율로 나타낸다.

6.2. 통계처리

다시마 포자 발아를 이용한 독성시험의 측정값(endpoints)은 포자 발아에 대한 부정적인 효과에 기반을 두고 있다. 시험결과를 이용하여 무영향농도(NOEC) 및 포자발아율 억제 농도(EC₅₀)와 신뢰구간을 계산한다. 무영향농도(NOEC) 값은 Dunnett 검정을 이용하여 구할 수 있다. EC₅₀ 값 추정과 NOEC 값 추정은 Toxcalcc(version 5.0)과 같은 독성자료처리용 통계 프로그램을 사용한다.

7. 부록

7.1. 시험생물 배양기관

인천대학교 부설 녹색환경과학센터

인천광역시 연수구 송도동 7-46 인천대학교 미래관 201호

전화 : +82 32 850 5711-4 팩스 : +82 32 850 5717

홈페이지 : www.greenpioneer.co.kr

인천대학교 생물학과

인천광역시 연수구 송도동 12-1 인천대학교

전화 : +82 32 835 8245 팩스 : +82 32 850 0763

홈페이지 : www.bioincheon.or.kr

7.2 시험생물의 생리·생태적 특징

시험종은 Laminariales(다시마 목), Laminariaceae(다시마 과), *Saccharina*(다시마 속), *Saccharina japonica*(참다시마 종) 이다. 본 시험종은 길이 2-20m의 긴 띠 모양이며 식용할 수 있다. 뿌리는 나뭇가지 모양이고 줄기는 원기둥 모양으로 짧으며 바위에 붙어 산다. 잎의 중앙부분은 약간 두껍고 양 가장자리는 얇으며 엽체(葉體)의 조직은 색소체가 있는 작은 세포로 이루어진 표층(表層), 색소체가 없는 원형·다각형의 세포로 이

루어진 피층(皮層), 색소체가 없는 사상(絲狀)·관상(管狀)세포가 얇은 수층(髓層)으로 이루어진다. 가을에서 겨울에 걸쳐 엽체 양면에 포자낭(胞子囊)이 생기고 2개의 편모(鞭毛)가 있는 유주자(遊走子)를 방출하는데, 유주자는 발아하여 현미경적으로 갈라진 실 모양의 암수배우체(配偶體)가 되어, 이것에서 남자·정자가 만들어진다. 수정란이 발아하면 보통 우리가 보는 다시마로 자란다. 다시마는 봄과 여름에 급성장하며, 유주자를 방출하고는 끝쪽부터 시든다(그림 4). 엽체의 기부(基部)에 있는 성장점에서 낡은 잎을 밀어 올리는 형상으로 새 잎이 재생하며, 1년째의 엽체는 얇고 2년째 것부터 충실한 엽체가 된다. 수명은 2-4년이다. 주로 한류의 영향을 받는 해역에 분포하는데, 한국에서는 거제도·제주도·흑산도·원산 이북 함경도일대에서 많이 난다.

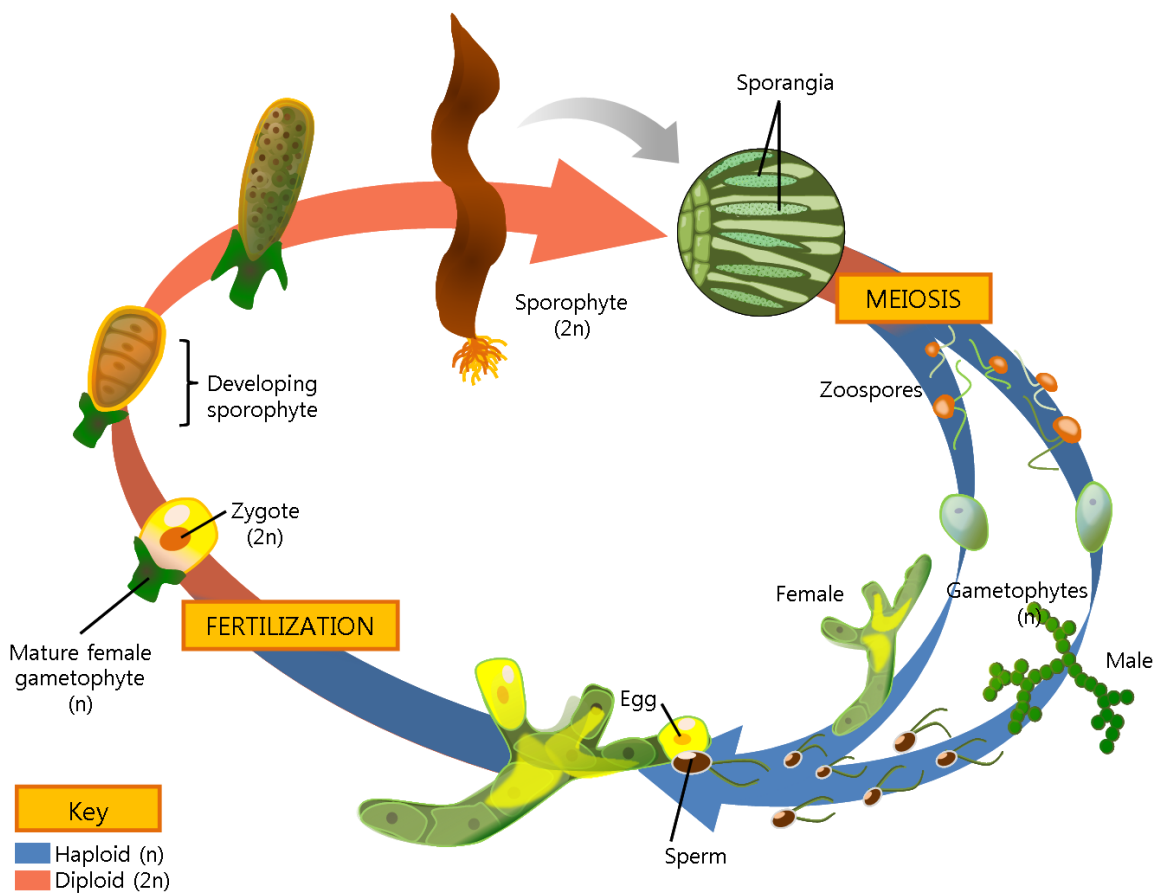


그림 4. 다시마의 생활사

7.3. 시험에 영향을 주는 간접요인

시험에 영향을 주는 요인으로는 광선, 온도, 염분 등의 여러 가지 주요 환경인자에 대한 포자발아율의 차이를 들 수 있다.

7.4. 다시마 독성시험 기록지

시험일자: _____ 시험생물명: _____

시험물질명: _____ 채취일자: _____

채집위치 및 방법: _____

보관시간: _____ (보관조건): _____

시험조건: _____ (희석수): _____

농도	온도 (°C)		염분 (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
대조구 (control)						

시험결과 (단위: 개)

농도		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	전체 개체수						
	발아된 개체수						
R2	전체 개체수						
	발아된 개체수						
R3	전체 개체수						
	발아된 개체수						
R4	전체 개체수						
	발아된 개체수						

부속서 A
(참고)

참다시마(*Saccharina japonica*)의 지리적 분포



유럽: 프랑스

- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).

아시아: 대한민국, 러시아, 중국, 일본

- Tseng, C.K. (1984).
- Chapman, V.J. & Chapman, D.J. (1980).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Yoshida, T. (1998).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

Water quality — Toxicity test based on germination inhibition of the brown macroalga *Saccharina japonica*

Contents

	Page
Introduction.....	196
1 Scope.....	197
2 Normative references.....	197
3 Terms and definitions.....	197
4 Principle.....	198
5 Reagents and media.....	198
6 Apparatus.....	200
7 Procedure.....	200
7.1 Preparation of control medium.....	200
7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products.....	201
7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products.....	201
7.4 Preparation of test solution for assessment of water samples.....	201
7.5 Preparation of zoospores.....	202
7.6 Preparation of test and control cultures.....	202
7.7 Incubation.....	202
7.8 Test duration.....	203
7.9 Measurements and observations.....	203
8 Reference substance.....	204
9 Validity criteria.....	204
10 Expression of results.....	204
10.1 Test results.....	204
10.2 Determination of EC _x values.....	204
10.3 Expression of results.....	204
11 Test report.....	205
12 Data Sheet for <i>Saccharina</i> Toxicity Test.....	206

Introduction

Saccharina japonica grows in temperate cold water zones. In the Asian-Pacific region the species is native to northwest coasts of the Pacific Ocean, occurring south as far as 36° N latitude. *Saccharina* spp. are important representatives of macroalgal communities in coastal waters that are under threat from the frequent inundations of toxic waste derived from industrial and municipal sources. These algae are primary producers constituting the basis of coastal ecosystem and, moreover, provide shelter and habitats for other marine organisms; *Saccharina* products are used for industrial purposes, for medical purposes, for human consumption and as livestock fodder. Reproduction is a critical process by which populations perpetuate, and disturbance of this process can cause failure in recruitment, leading to the disappearance of the population and ultimately to modifications in community structure and dynamics.

The proposed macroalgal toxicity test provides many practical advantages over other currently employed techniques. No specialist expertise is required. The test is cost and time-effective, since it only requires a cell plate, a small volume of water and takes a total of approximately 6 - 7 h to conduct around a 24 h incubation period (dark condition).

Water quality — Toxicity test based on germination inhibition of the brown macroalga *Saccharina japonica*

1. Scope

This International Standard specifies a method for the determination of the germination inhibition of brown alga (*Saccharina japonica*) to substances and mixtures contained in water, wastewater, environmental water samples and waste or sewage sludge elutriates.

2. Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/TS 20281, *Waterquality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*

3. Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

3.1

algal zoospore

the zoospores of the brown alga, *Saccharina japonica*

3.2

artificial sea water medium

mixture (adjusted at salinity: 35 psu) of distilled water and mineral salts

3.3

control medium

artificial sea water with nutrient salts used for stock culturing of the test alga, as medium in control cultures and dilution water in test cultures

3.4

effective concentration

EC_x

concentration of test sample which results in a reduction of x % in reproduction relative to the controls

3.5

extent of germination

percentage of germination

4. Principle

The life cycle of *S. japonica* consists of alternating asexual (sporophyte) and sexual (gametophyte) generations. Specialized blades of mature diploid sporophytes produce haploid zoospores that post-release, settle and germinate. This method provides step-by-step instructions for performing a 24-h day static non-renewal toxicity test using giant kelp to determine the toxicity of substances in marine and estuarine waters.

The zoospores swim through the test solution and eventually settle onto glass microscope slides. The settled spores germinate by extruding the cytoplasm of the spore through the germ-tube into the first gametophytic cell. This stage is often referred to as the "dumbbell" stage. The test endpoints measured after 24 hours are germination success.

5. Reagents and media

5.1 Artificial sea water

Prepare artificial sea water by adding the weighed chemicals according to Table 1 to the desired volume of distilled water for the growth medium and test compound solutions. Aerate the artificial sea water and adjust, if necessary, to pH $8,0 \pm 0,2$ with 1 mol HCl or 1 mol NaOH before use. Maximum storage time for the artificial sea water is 2 months.

Table 1 — Artificial sea water with a salinity of 35 psu (adopted from OTT 1965) [11]

Compounds	Quantity in g/l
NaCl	21
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	6
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1
KCl	0,8
NaBr	0,1

5.2 Nutrients

Add the nutrient salts given in Table 2.

Table 2 — Nutrients

Compounds	Quantity in g/l
NaNO ₃	0,2
NaHCO ₃	0,2
H ₃ BO ₃	0,06
Na ₂ SiO ₃ • 9 H ₂ O	0,01
Na ₂ HPO ₄	0,02
Sr(NO ₃) ₂	0,03

5.3 Test organism

Saccharina japonica (Areschoung) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders

NOTE The strain is available in unialgal, non-axenic plants from the following sources:

Institute of Green Environmental Research,
Mi-Rae Centre,
7-46 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone: +8232850 5711-4 Facsimile: +82 32 850 5717
Website: www.greenpioneer.co.kr

Department of Biology,
University of Incheon,
12-1 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone: +8232835 8245 Facsimile: +82 32 8350763
Website: www.bioincheon.or.kr

6. Apparatus

The test requires standard laboratory apparatus and the following.

- 6.1 **Temperature-controlled cabinet or room**, with a white fluorescent light, providing uniform illumination in accordance with the requirements specified in Table 3.
- 6.2 **Light-meter**, to be used to measure photon irradiance.
- 6.3 **pH meter**
- 6.4 **Tweezers**
- 6.5 **Glassware**, for the preparation of different concentration series and nutrient medium.
 - 6.5.1 **Volumetric flasks**
 - 6.5.2 **Graduated cylinders**
 - 6.5.3 **Pipettes**
 - 6.5.4 **Petri dishes**
- 6.6. **Coverslip**, for each test chamber to serve as the substratum upon which the zoospores will settle
- 6.7 **Cell plates**, for example 24-well cell plates with 2,5 mL per well.
- 6.8 **Microscope (Image analysis system)**, for inspecting zoospores
- 6.9 **Hemocytometer** (bright-line rbc), for measuring zoospore density.
- 6.10 **Counter** (two unit, 0-999), for recording counts of zoospores.

7. Procedure

7.1 Preparation of control medium

Add the nutrients to artificial sea water as given in Table 2.

7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products

When the test material is a chemical or a chemical product a stock solution shall be prepared by dissolving the test material in control medium at an appropriate concentration.

Adjust the pH value of the stock solution to $\pm 0,3$ of the pH value of the medium in the control by adding hydrochloric acid or sodium hydroxide solution. No later adjustment is made.

NOTE *Saccharina* generally has an arrow pH limit (between 7,5 and 8,5) for germination. Therefore, adjustment of pH is necessary when the pH of the sample is beyond these limits.

7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products

An appropriate test design should consist of a geometric series (the ratio between 1,5 and 2,0, e.g. 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l, 32 mg/l, and 64 mg/l) of at least five concentrations exclusive of controls. The concentrations should be chosen to include one measured inhibition value below and one above the to be estimated or to have the expected EC₅₀ to be bracketed.

NOTE A suitable concentration range is best determined by carrying out a preliminary range-finding test using test concentration with several orders of magnitude of difference.

If a solvent or carrier is used to dissolve or suspend the test sample, additional controls containing the solvent or carrier should also be included in the test to determine any effect of the solvent or carrier on the germination of the alga.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

7.4 Preparation of test solutions for water samples

When the test material is a sample of water, e.g. waste water, environmental water sample or an elutriate of solid material, the salinity of this sample shall be adjusted to the same salinity as the control medium by addition of appropriate amounts of the artificial sea water salts (5.1). Then add the nutrient salts as shown in Table 2 (5.2). Mix the water by aeration for a minimum of 16 h to stabilise the pH. Adjust, if necessary, the pH to $\pm 0,3$ of the pH value of the control medium by addition of hydrochloric acid or sodium hydroxide solution.

Prepare a geometric concentration series of at least five concentrations of the test material by diluting the salinity adjusted and nutrient spiked water in control medium. If possible the concentrations shall be chosen to obtain several levels of inhibition ranging from less than 10 % to greater than 90 % inhibition of reproduction.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

NOTE *Saccharina japonica* generally has no germination problems between 25 psu and 40 psu. However, adjustment of salinity is usually necessary so as the effect of temperature is not to be reflected in the test results.

7.5 Preparation of zoospores

To generate the initial bulk of spores, five randomly selected sori were rinsed with running tap water. Cleaned sorus materials were allowed to dry for 12 hours prior to meiospore release and placed in a 1000-mL glass vial containing 500 mL of filtered seawater. After 3 h, densities of spores in suspension were determined by counting the number of cells with a haemocytometer. Aliquots of 10 mL containing average densities of 3×10^3 spores were allowed to settle on round coverslips (12mm in diameter) in Petri dishes (50mm in diameter, 20mm high) each containing 10 mL of medium and the cultures were maintained in the dark for 3 h at a temperature of 10°C before being subjected to experimental treatments.

7.6 Preparation of test and control cultures

Transfer 2,5 mL of control medium to each of four wells on a 24 well cell plate. Starting with the lowest concentration, transfer 2 mL of the test solutions to each of four wells on the cell plate.

Cover-slips bearing attached spores were distributed in each of the wells on the cell plate

The decision on the number of replicates per concentration will depend on the purpose of the testing (e.g. effluent screening vs effluent compliance testing): Statistical confidence in the estimation of effects would be a reason for increasing the number of replicates per concentration or for considering an unequal replication approach, see ISO/TS 20281.

7.7 Incubation

The test cell plates shall be covered with a lid to reduce evaporation. Incubate the test cell plates for 24 h under optimal conditions: temperature $15 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ and dark condition.

Measure temperature at least twice a day; however continuous temperature control is recommended.

Before a toxicity test is conducted with new test facilities, a performance test should be conducted, in which all test plates contain control medium to ensure analyst proficiency. The coefficient of variation of germination should be less than 10 %.

The protocol for the methods using the germination inhibition of *S. japonica* is summarized in Table 3.

Table 3 — Summary of test conditions and test acceptability criteria for the marine seaweed *Saccharina japonica*, germination inhibition toxicity tests

Parameters	Test conditions
Test type	static, non-renewal
Endpoint	germination inhibition (EC ₅₀)
Test organism	<i>Saccharina japonica</i>
Test duration	24 h
Test temperature	15 °C ± 2 °C
Test salinity	25 psu - 35 psu (32 psu recommended)
Light condition	dark
Test vessel	24-well cell plate (Ø 15mm)
Test solution volume	2,5 mL
Test specimen/well	1 x 10 ⁶ spores (settled on coverslip, Ø12mm)
Dilution water	nutrient enriched artificial sea water
Renewal of test solution	none
Aeration	none
Culture media	nutrient enriched artificial sea water
Test concentrations	minimum 4+ control
Number of replicates per concentration	4 (depending on statistical analysis chosen)
Sample volume required	50 mL to 100 mL depending on test volume
Test acceptability criterion	95.72 ± 1.01% of germination in control

7.8 Test duration

The test duration is 24 h.

7.9 Measurements and observation

The endpoints measured for the 24 hour *Saccharina* method are percent germination success and germination tube length. Germination is considered successful if a germ-tube is present on the settled

zoospore. Germination is considered to be unsuccessful if no germination tube is visible. To differentiate between a germinated and non-germinated zoospore, observe the settled zoospores at 400x magnification and determine whether they are circular (non-germinated) or have a protuberance that extends at least one spore diameter (about 5.0 μm) from the edge of the spore (germinated). Spores with a germination tubes are considered germinated.

The first 100 spores encountered while moving across the microscope slide are counted for each replicate of each treatment.

8. Reference substance

Test with reference substance, copper chloride (CAS number 7440508) is required for quality assurance and to check the sensitivity of the alga.

9. Validity criteria

The mean germination percentage in the control shall be $95.72 \pm 1.01\%$.

10. Expression of results

10.1 Test results

Record germination percentage values of each replicate, mean values and standard deviations. The coefficient of variation (CV), the standard deviation expressed as a percentage of the mean, should be calculated to estimate the precision and germination ability of the tests.

Plotting concentration response curves is highly recommended to provide the basis for determining the EC_x values for the inhibition of germination.

10.2 Determination of EC_x values

Apply a linear or non-linear regression model to the experimental data points by regression analysis. Determine EC_x values with their confidence intervals. Guidance on appropriate model given in ISO/TS 20281 and [20].

If data are too few or uncertain for regression analysis, or if inhibitions appear not to follow a regular concentration response relation, then a graphical method may be applied by drawing a smooth eye fitted curve of the concentration response relationship and reading EC_x values from this graph.

10.3 Expression of results

The values calculated for EC_x [e.g. EC_{20} , EC_{25} and/or EC_{80}] and the corresponding confidence intervals

(95 %) and CVs are displayed with the required significant precision (digits).

The values should be given as mg/l for tests with individual chemicals or as percentage for effluent, elutriate or leachate test samples.

11. Test report

This test report shall contain at least the following information:

- a) the test method used, together with a reference to this International Standard (ISO/CD 13308);
- b) name of the laboratory performing the test;
- c) date and period of test;
- d) test organisms (e.g. scientific name, strain, source, holding conditions);
- e) test details;
 - culturing apparatus and incubation procedure;
 - culture types (static, unialgal etc.)
 - composition of medium;
 - preparation of test sample (e.g. pH, salinity of effluent sample) and treatments;
 - concentrations tested;
 - replicates per concentration;
 - number of thallus disks per replicate;
 - size of cell plates;
 - solution volume;
 - light intensity and quality;
 - pH of test solutions including the controls at start and end of test;
 - salinity;
 - temperature range during incubation;
 - method of measuring reproduction percentage;
- f) results;
 - table outlining reproduction percentage in each cell plate at each measuring point;
 - mean reproduction percentage for each test concentration (and control) at each measuring point;
 - relationship between reproduction and concentration in table and graphical representation;
 - EC_x values with 95 % confidence intervals and the corresponding CVs values including the method of determination;

12. Data Sheet for *Saccharina* Toxicity Test

Test Date: _____ Test Species: _____

Sample Source: _____ Collection/Arrival Date: _____

Saccharina Source: _____

Test conditions: _____ (Dilution): _____

Test Cont.	Temp (°C)		Salinity (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
Control						

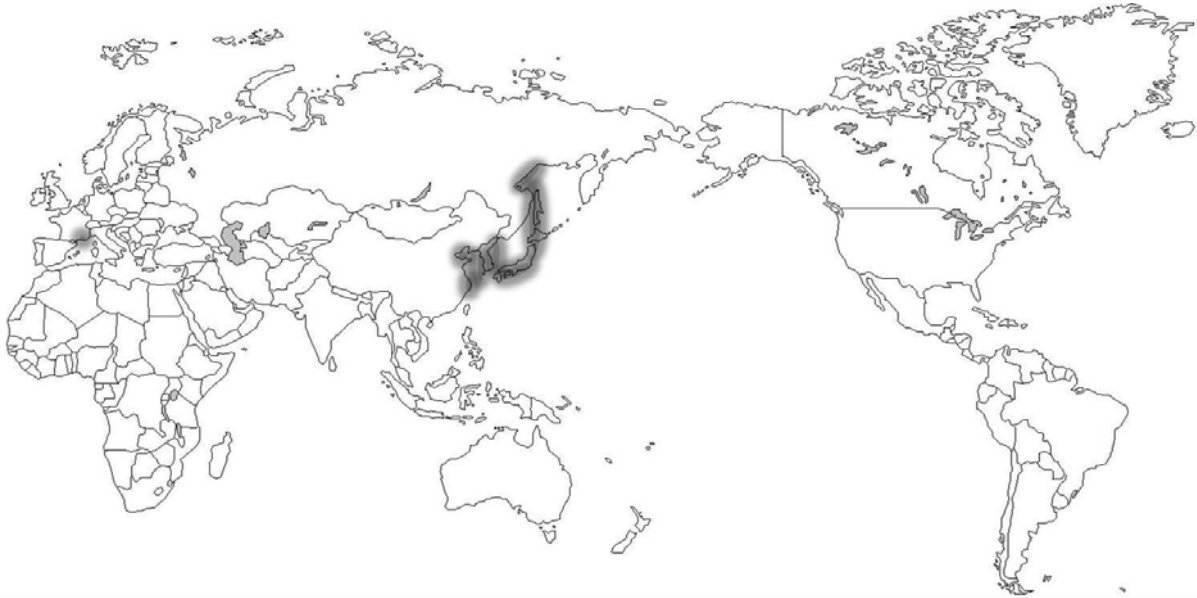
Test Result

Treatment/Replicate		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	Number of Spores Germ.						
	Number of Spores Not Germ.						
R2	Number of Spores Germ.						
	Number of Spores Not Germ.						
R3	Number of Spores Germ.						
	Number of Spores Not Germ.						
R4	Number of Spores Germ.						
	Number of Spores Not Germ.						

Annex E

(informative)

Geographic distribution of *Saccharina japonica* (Areschoug) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders



Europe: France

- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).

Asia: Korea, Russia, China, Japan

- Tseng, C.K. (1984).
- Chapman, V.J. & Chapman, D.J. (1980).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Yoshida, T. (1998).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

Bibliography

- [1] Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. 1988. Inventaire bibliographique des macrophytes (Algues, Phanérogames) signalés dans l'Etang de Thau (Hérault, France). *Naturalia Monspel* 52, 71-84.
- [2] Chapman, V.J. & Chapman, D.J. 1980. *Seaweeds and their uses*. Chapman & Hall, London & New York.
- [3] Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology* 42, 493-512.
- [4] Lee, Y. & Kang, S. 2001. *A catalogue of the seaweeds in Korea*. Cheju National University Press, Jeju.
- [5] Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. 1992. Check-list of mediterranean seaweeds. I. Fucophyceae (Warming 1884). *Botanica Marina* 35, 109-130.
- [6] Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. 2007. Revision of the systematics of algae in the order Laminariales (Phaeophyta) from the Far-Eastern Seas of Russia on the basis of molecular-phylogenetic data. *Russian Journal of Marine Biology* 33, 278-289.
- [7] Tseng, C.K. 1984. *Common seaweeds of China*. Science Press, Beijing.
- [8] Verlaque, M. 2001. Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanologica Acta* 24, 29-49.
- [6] Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. 1990. Check-list of marine algae of Japan (revised in 1990). *Japanese Journal of Phycology* 38, 269-320.
- [9] Yoshida, T. 1998. *Marine algae of Japan*. Uchida Rokakuho Publishing Co. Ltd, Tokyo.

부록 3. 국문 매뉴얼

다시마 발아관 생장을 이용한 생태독성 평가 매뉴얼

1. 측정원리

본 시험방법은 해양생태계의 일차 생산자인 다시마를 이용한 독성시험방법으로써 유해물질이 생태계의 일차생산자에 미치는 영향을 파악하는데 그 목적이 있다. 표준시험생물 종(species)은 갈조류인 참다시마(*Saccharina japonica*)이다. 이 시험법은 액상물질에 노출된 참다시마 포자의 발아 및 발아관 생장을 이용하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법으로 시험 대상 물질이 시험 기간 동안 유의하게 손상되거나 사라지지 않으며 해수에 잘 녹는 물질에 적용된다.

시험원리는 참다시마 포자를 다양한 농도의 시험 물질에 24시간 동안 노출시킨 후, 포자의 발아관 성장률을 산정하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법이다(그림 1).



그림 1. 다시마 발아관 성장 독성평가 원리

2. 시험생물

- 2.1. 본 시험법의 표준시험생물은 해양성 갈조류인 참다시마 *Saccharina japonica*(Areschoung) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders 이다.

- 2.2. 해양성 갈조류인 참다시마는 대형의 조체로 발달하는 포자체가 저 수온기에 성장과 성숙을 하지만, 하절기의 고 수온기에는 소실되며, 미소한 배우체 세대로 여름을 넘기고, 수온의 저하와 함께 성숙하여 다음의 포자체 세대를 만든다.
- 2.3. 시험생물은 우리나라 연안역 조건대에서 연중 채집할 수 있으며, 양식산업의 발달로 연중 생물체 공급이 가능하다. 시험생물의 채집이 곤란할 경우 인천대학교 녹색환경과학센터에서 시험생물을 구할 수 있다. 시험생물은 본 실험 시작 1일전에 확보되어야 한다.

3. 기구 및 기기

- 3.1. 광학현미경 : 배율 100-400의 광학현미경, 포자방출 유무 관찰
- 3.2. 영상 분석 장치 : 포자 발아관 길이 측정에 사용
- 3.3. 배양기 : 독성시험 과정동안 일정한 온도를 유지할 수 있는 배양기 또는 배양실
- 3.4. 수질측정기 : 염분, 수온, pH
- 3.5. 초순수제조기
- 3.6. 교반기 또는 공기발생기
- 3.7. 플라스틱 수조(10-20 L) : 시험생물(포자) 방출 유도시 사용
- 3.8. 페트리디쉬와 커버글라스: 시험생물 부착 유도시 사용
- 3.9. 24구 웰 플레이트

4. 시험생물준비

- 4.1. 배양 배지 제조 방법
 - 4.1.1. 배양용액 및 시험물질 용액을 제조하는데 사용하는 희석수는 탈이온수를 사용하여야 한다. 시험 준비나 저장 기간 동안 희석수가 오염되지 않도록 특별히 주의하여야 하며, 본 시험에는 구리로 만든 도구나 기구는 사용할 수 없다.
 - 4.1.2. 배양용액은 OTT's(1965) 인공해수를 만들어 사용한다(OTT's 성분-표 1참조).
- 4.2. 시약 및 소모품
 - 4.2.1. 투명용기(500 mL) - 시험용액을 보관하는데 사용하며, 이때 “구리” 성분이 함유되지 않은 용기를 사용한다.

4.2.2. 24구 웰 플레이트 - 시험생물 배양 용기로 사용한다(2.5 mL).

4.2.3. 시험 용액과 접촉하는 모든 기구는 유리 또는 화학적으로 불활성 재질이어야 한다.

4.2.4. 막여과 기구 - 평균 통과 직경 0.45 μm 여과지를 사용한다.

표 1. OTT's 인공해수의 주요 성분

주요 성분	농도 (g/L)
NaCl	21.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.00
KCl	0.80
NaBr	0.10
NaNO ₃	0.20
NaHCO ₃	0.20
H ₃ BO ₃	0.06
Na ₂ SIO ₃ ·9H ₂ O	0.01
Sr(NO ₃) ₂	0.03
Na ₂ HPO ₄	0.02

5. 시험방법

5.1. 농도구간설정

5.1.1. 시험 농도의 선택 : 시험할 물질의 농도는 보통 기하학적인 순열을 따라 그 비가 1.5에서 2.0 사이가 되게 한다. 예를 들면, 2 mg/L; 4 mg/L; 8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 64 mg/L;이며, 배출수 또는 액상 물질일 경우에는 0%, 6.25%, 12.5%, 25.0%, 50.0%, 100.0%로 한다. 가능하면, 농도는 10% 이하에서 90% 이상까지의 범위에서 여러(4-5 구간) 수준의 포자방출이 이루어지도록 선택하여야 한다. 시험 농도 범위는 넓은 범위의 농도 구간을 포함하는 예비실험을 통하여 선택하는 것이 가장 좋다.

5.1.2. 대조구 : 모든 시험은 시험 대상 물질만 없고 배양 용액, 시험조건 및 과정이 동일한 음성대조군(negative control)가 반드시 필요하다. 만약 시험에 운반체(carrier)가 쓰이면, 운반체가 첨가된 운반체 대조구가 필요하다.

5.2. 시험 용액 준비

5.2.1. 시험 용액 준비 : 시험 용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 만든다. 일반적으로 시험은 pH를 조정하지 않고 수행하여야 한다. 하지만, 어떤 물질은 극단적인 산성이나 알칼리성에 의해 독성효과를 나타낼 수 있다. 이 경우 1 mol/L 염산이나 1 mol/L 수산화나트륨을 써서 pH를 8 ± 0.2 로 조절해야 한다.

5.3. 시험 생물 준비

5.3.1. 다시마 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척한다.

5.3.2. 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관한다.

5.3.3. 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도한다.

5.3.4. 유도된 포자액을 20 mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 준다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼고, 항온배양기에서($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양한다.

5.3.5. 포자가 부착된 커버글라스를 24구 웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣는다.

5.4. 배양방법

5.4.1. 배양 온도는 15°C 로 암배양 한다.

5.5. 측정방법

5.5.1. 실험 개시 후, 24시간이 경과하면 각 셀에서 핀셋으로 포자가 부착되어 있는 커버 글라스를 각 조건별로 꺼내어 한 개의 슬라이드 글라스 위에 40% 글리세롤로 고정한다.

5.5.2. 광학현미경상에서 관찰되는 다시마 포자는 현미경 콘덴서를 조절하여 사용하게 되면 발아관의 윤곽이 명확해져서 흰색의 발아관을 검은색으로 관찰 할 수 있다. 발

아관 생장은 24시간 종말점에서 30개체를 대상으로 발아관 시작부분부터 발아관 끝까지의 길이를 측정하였다(그림 29). 모든 과정은 영상분석장치(Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 포자를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어졌다.

5.5.3. 다시마 독성시험 기록지에 실험 종료 일자와 측정 일자를 기록하고 각 시험용액 농도별 포자 발아관 길이를 기록한다.

5.6. 시험의 유효성 판정

본 시험법의 표준시험물질은 구리(7440-50-8, Junsei Co., Cu)이다. 구리를 이용한 EC₅₀(24 h)은 0.120 mg/L이며, 최소 0.090 mg/L, 최대 0.148 mg/L 범위에서 유효하다.

5.7. 대조군 차트

22회의 서로 다른 발아관 길이 측정 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다(그림 2). 다시마의 평균 발아관 길이는 $20.62 \pm 0.70 \mu\text{m}$ 로 나타났다.

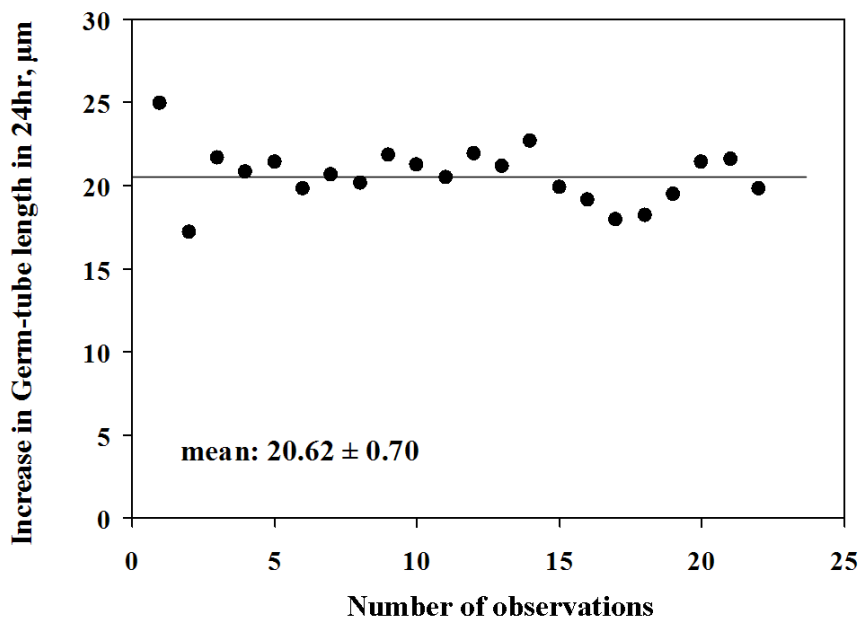


그림 2. 24시간 후 측정된 발아관 길이 대조군 차트

5.8. 시험조건 요약

1. 시험형태:	비교환 정수배양
2. 광조사량:	$0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
3. 광주기:	24h 암기
4. 시험온도:	$15 \pm 1^\circ\text{C}$
5. 염분:	25~35 psu
6. 시험용기:	24구 웰 플레이트
7. 시험용액:	2.5 mL/replicate
8. 시험용액 교환:	교환하지 않음
9. 시험생물 크기:	지름 $25 \mu\text{m}$
10. 반복구당 시험생물 수	1×10^6
11. 배양액:	배양용액 (조성표 참조-표 1)
12. 희석액:	배양용액
13. 평가 농도:	100, 50, 25, 12.5, 6.25%, 대조구 또는 정량농도 (예 mg/L)
14. 시험기간:	24시간
15. 측정요소	총 30개체의 발아관 길이
16. 시험적합도 기준:	대조구에서의 발아관 길이는 20.62 ± 0.70

5.9. 평가방법 모식도 (그림 3)

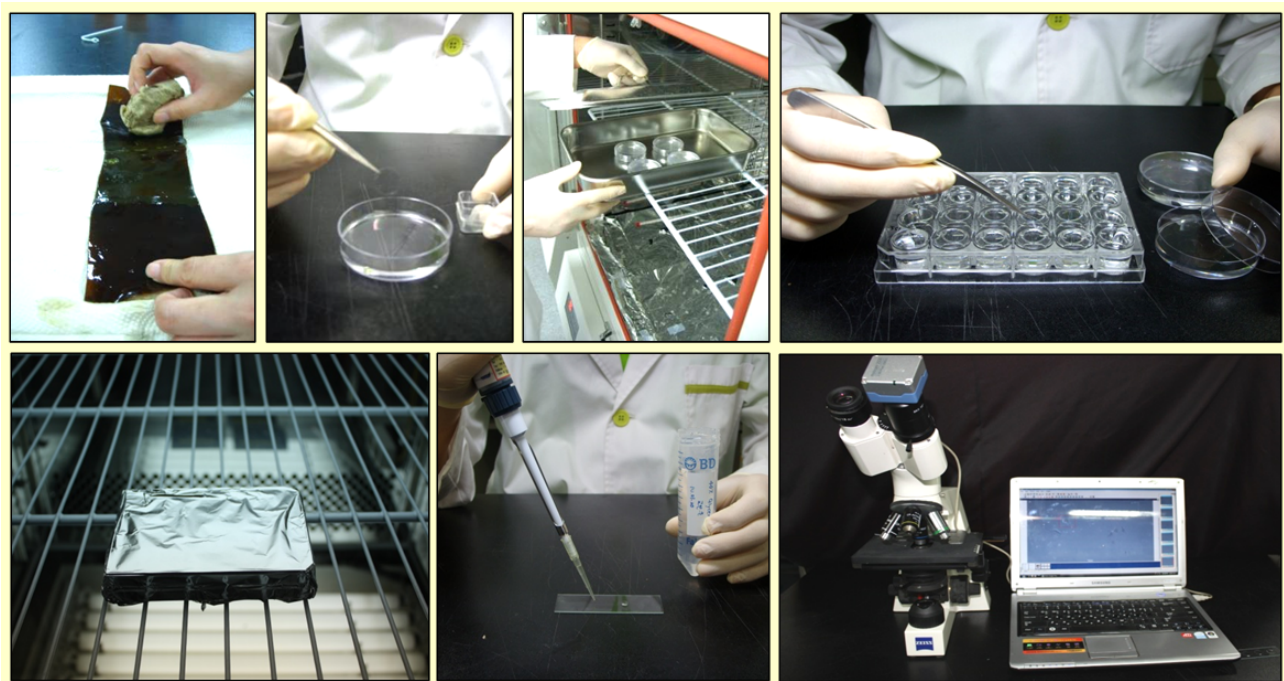


그림 3. 다시마 발아관 성장 독성평가방법

6. 자료분석

6.1. 자료정리

포자의 발아관 길이 생장률은 대조군 대비 개체당 발아관 길이로 나타낸다.

6.2. 통계처리

다시마 포자 발아관 길이 생장을 이용한 독성시험의 측정값(endpoints)은 포자 발아관 길이 생장에 대한 부정적인 효과에 기반을 두고 있다. 시험결과를 이용하여 무영향농도(NOEC) 및 포자발아율 억제농도(EC₅₀)와 신뢰구간을 계산한다. 무영향농도(NOEC) 값은 Dunnett 검정을 이용하여 구할 수 있다. EC₅₀ 값 추정과 NOEC 값 추정은 Toxcalc(version 5.0)과 같은 독성자료처리용 통계 프로그램을 사용한다.

7. 부록

7.1. 시험생물 배양기관

인천대학교 부설 녹색환경과학센터

인천광역시 연수구 송도동 7-46 인천대학교 미래관 201호

전화 : +82 32 850 5711-4 팩스 : +82 32 850 5717

홈페이지 : www.greenpioneer.co.kr

인천대학교 생물학과

인천광역시 연수구 송도동 12-1 인천대학교

전화 : +82 32 835 8245 팩스 : +82 32 850 0763

홈페이지 : www.bioincheon.or.kr

7.2 시험생물의 생리·생태적 특징

시험종은 Laminariales(다시마 목), Laminariaceae(다시마 과), *Saccharina*(다시마 속), *Saccharina japonica*(참다시마 종) 이다. 본 시험종은 길이 2-20m의 긴 띠 모양이며 식용할 수 있다. 뿌리는 나뭇가지 모양이고 줄기는 원기둥 모양으로 짧으며 바위에 붙어 산다. 잎의 중앙부분은 약간 두껍고 양 가장자리는 얇으며 엽체(葉體)의 조직은 색

소체가 있는 작은 세포로 이루어진 표층(表層), 색소체가 없는 원형·다각형의 세포로 이루어진 피층(皮層), 색소체가 없는 사상(絲狀)·관상(管狀)세포가 엮힌 수층(髓層)으로 이루어진다. 가을에서 겨울에 걸쳐 엽체 양면에 포자낭(孢子囊)이 생기고 2개의 편모(鞭毛)가 있는 유주자(遊走子)를 방출하는데, 유주자는 발아하여 현미경적으로 갈라진 실 모양의 암수배우체(配偶體)가 되어, 이것에서 난자·정자가 만들어진다. 수정란이 발아하면 보통 우리가 보는 다시마로 자란다(그림 4). 다시마는 봄과 여름에 급성장하며, 유주자를 방출하고는 끝쪽부터 시든다. 엽체의 기부(基部)에 있는 성장점에서 낡은 잎을 밀어 올리는 형상으로 새 잎이 재생하며, 1년째의 엽체는 얇고 2년째 것부터 충실한 엽체가 된다. 수명은 2-4년이다. 주로 한류의 영향을 받는 해역에 분포하는데, 한국에서는 거제도·제주도·흑산도·원산 이북 함경도일대에서 많이 난다.

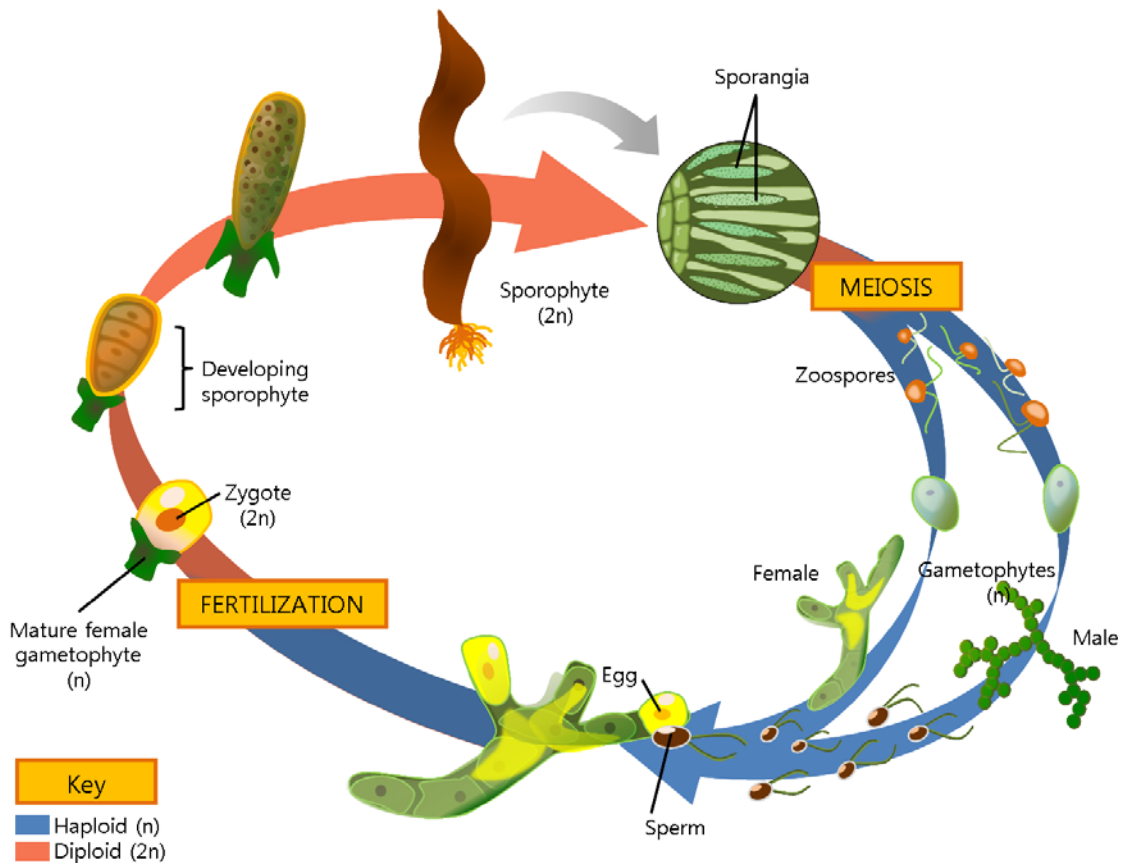


그림 4. 다시마의 생활사

7.3. 시험에 영향을 주는 간접요인

시험에 영향을 주는 요인으로는 광선, 온도, 염분 등의 여러 가지 주요 환경인자에 대한 포자 발아관 생장의 차이를 들 수 있다.

7.4. 다시마 독성시험 기록지

시험일자: _____ 시험생물명: _____
 시험물질명: _____ 채취일자: _____
 채집위치 및 방법: _____
 보관시간: _____ (보관조건): _____
 시험조건: _____ (희석수): _____

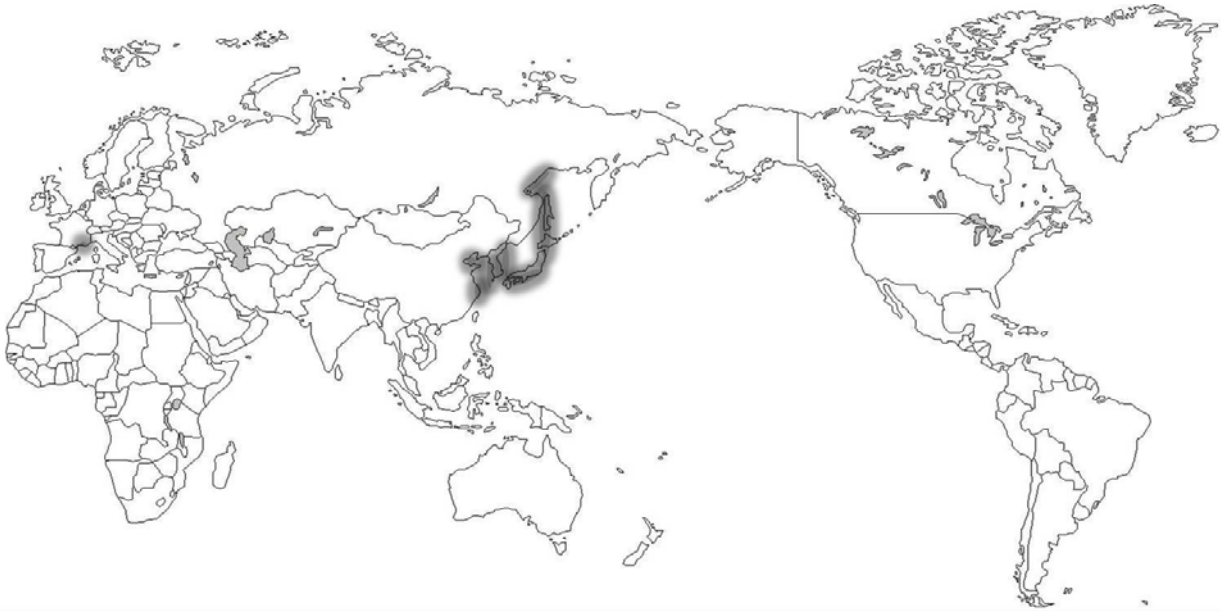
농도	온도 (° C)		염분 (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
대조구 (control)						

시험결과 (단위: μm)

농도		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	발아관 길이	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					
R2	발아관 길이	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					
R3	발아관 길이	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					
R4	발아관 길이	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					

부속서 A
(참고)

참다시마(*Saccharina japonica*)의 지리적 분포



유럽: 프랑스

- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).

아시아: 대한민국, 러시아, 중국, 일본

- Tseng, C.K. (1984).
- Chapman, V.J. & Chapman, D.J. (1980).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Yoshida, T. (1998).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

Water quality — Toxicity test based on germ-tube growth inhibition of the brown macroalga *Saccharina japonica*

Contents

	Page
Introduction.....	221
1 Scope.....	222
2 Normative references.....	222
3 Terms and definitions.....	222
4 Principle.....	223
5 Reagents and media.....	223
6 Apparatus.....	224
7 Procedure.....	225
7.1 Preparation of control medium.....	225
7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products.....	225
7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products.....	226
7.4 Preparation of test solution for assessment of water samples.....	226
7.5 Preparation of zoospores.....	226
7.6 Preparation of test and control cultures.....	227
7.7 Incubation.....	227
7.8 Test duration.....	228
7.9 Measurements and observations.....	228
8 Reference substance.....	228
9 Validity criteria.....	229
10 Expression of results.....	229
10.1 Test results.....	229
10.2 Determination of EC _x values.....	229
10.3 Expression of results.....	229
11 Test report.....	229
12 Data Sheet for <i>Saccharina</i> Toxicity Test.....	230

Introduction

Saccharina japonica grows in temperate cold water zones. In the Asian-Pacific region the species is native to northwest coasts of the Pacific Ocean, occurring south as far as 36° N latitude. *Saccharina* spp. are important representatives of macroalgal communities in coastal waters that are under threat from the frequent inundations of toxic waste derived from industrial and municipal sources. These algae are primary producers constituting the basis of coastal ecosystem and, moreover, provide shelter and habitats for other marine organisms; *Saccharina* products are used for industrial purposes, for medical purposes, for human consumption and as livestock fodder. Reproduction is a critical process by which populations perpetuate, and disturbance of this process can cause failure in recruitment, leading to the disappearance of the population and ultimately to modifications in community structure and dynamics.

The proposed macroalgal toxicity test provides many practical advantages over other currently employed techniques. No specialist expertise is required. The test is cost and time-effective, since it only requires a cell plate, a small volume of water and takes a total of approximately 6 - 7 h to conduct around a 24 h incubation period (dark condition).

Water quality — Toxicity test based on germ-tube growth inhibition of the brown macroalga *Saccharina japonica*

1. Scope

This International Standard specifies a method for the determination of the germ-tube growth inhibition of brown alga (*Saccharina japonica*) to substances and mixtures contained in water, wastewater, environmental water samples and waste or sewage sludge elutriates.

2. Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/TS 20281, *Waterquality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*

3. Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

3.1

algal zoospore

the zoospores of the brown alga, *Saccharina japonica*

3.2

artificial sea water medium

mixture (adjusted at salinity: 35 psu) of distilled water and mineral salts

3.3

control medium

artificial sea water with nutrient salts used for stock culturing of the test alga, as medium in control cultures and dilution water in test cultures

3.4

effective concentration

EC_x

concentration of test sample which results in a reduction of x % in reproduction relative to the controls

3.5

extent of germ-tube

Growth of embryonic gametophyte germination tubes.

4. Principle

The life cycle of *S. japonica* consists of alternating asexual (sporophyte) and sexual (gametophyte) generations. Specialized blades of mature diploid sporophytes produce haploid zoospores that post-release, settle and germinate. This method provides step-by-step instructions for performing a 24-h day static non-renewal toxicity test using giant kelp to determine the toxicity of substances in marine and estuarine waters.

The zoospores swim through the test solution and eventually settle onto glass microscope slides. The settled spores germinate by extruding the cytoplasm of the spore through the germ-tube into the first gametophytic cell. This stage is often referred to as the "dumbbell" stage. The test endpoints measured after 24 hours are growth of the embryonic gametophytes (germ-tube length).

5. Reagents and media

5.1 Artificial sea water

Prepare artificial sea water by adding the weighed chemicals according to Table 1 to the desired volume of distilled water for the growth medium and test compound solutions. Aerate the artificial sea water and adjust, if necessary, to pH $8,0 \pm 0,2$ with 1 mol HCl or 1 mol NaOH before use. Maximum storage time for the artificial sea water is 2 months.

Table 1 — Artificial sea water with a salinity of 35 psu (adopted from OTT 1965) [11]

Compounds	Quantity in g/l
NaCl	21
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	6
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1
KCl	0,8
NaBr	0,1

5.2 Nutrients

Add the nutrient salts given in Table 2.

Table 2 — Nutrients

Compounds	Quantity in g/l
NaNO ₃	0,2
NaHCO ₃	0,2
H ₃ BO ₃	0,06
Na ₂ SiO ₃ • 9 H ₂ O	0,01
Na ₂ HPO ₄	0,02
Sr(NO ₃) ₂	0,03

5.3 Test organism

Saccharina japonica (Areschoung) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders

NOTE The strain is available in unialgal, non-axenic plants from the following sources:

Institute of Green Environmental Research,
Mi-Rae Centre,
7-46 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone:+8232850 5711-4 Facsimile: +82 32 850 5717
Website:www.greenpioneer.co.kr

Department of Biology,
University of Incheon,
12-1 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone: +8232835 8245 Facsimile: +82 32 8350763
Website: www.bioincheon.or.kr

6. Apparatus

The test requires standard laboratory apparatus and the following.

6.1 Temperature-controlled cabinet or room, with a white fluorescent light, providing uniform illumination in accordance with the requirements specified in Table 3.

6.2 Light-meter, to be used to measure photon irradiance.

6.3 pH meter

6.4 Tweezers

6.5 Glassware, for the preparation of different concentration series and nutrient medium.

6.5.1 Volumetric flasks

6.5.2 Graduated cylinders

6.5.3 Pipettes

6.5.4 Petri dishes

6.6. Coverslip, for each test chamber to serve as the substratum upon which the zoospores will settle

6.7 Cell plates, for example 24-well cell plates with 2,5 mL per well.

6.8 Microscope (Image analysis system), for inspecting zoospores and embryonic gametophytes.

6.9 Hemacytometer (bright-line rbc), for measuring zoospore density.

6.10 Image analysis system, for measurements of germ-tube length

7. Procedure

7.1 Preparation of control medium

Add the nutrients to artificial sea water as given in Table 2.

7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products

When the test material is a chemical or a chemical product a stock solution shall be prepared by dissolving the test material in control medium at an appropriate concentration.

Adjust the pH value of the stock solution to $\pm 0,3$ of the pH value of the medium in the control by adding hydrochloric acid or sodium hydroxide solution. No later adjustment is made.

NOTE *Saccharina* generally has an arrow pH limit (between 7,5 and 8,5) for germ-tube growth. Therefore, adjustment of pH is necessary when the pH of the sample is beyond these limits.

7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products

An appropriate test design should consist of a geometric series (the ratio between 1,5 and 2,0, e.g. 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l, 32 mg/l, and 64 mg/l) of at least five concentrations exclusive of controls. The concentrations should be chosen to include one measured inhibition value below and one above the to be estimated or to have the expected EC₅₀ to be bracketed.

NOTE A suitable concentration range is best determined by carrying out a preliminary range-finding test using test concentration with several orders of magnitude of difference.

If a solvent or carrier is used to dissolve or suspend the test sample, additional controls containing the solvent or carrier should also be included in the test to determine any effect of the solvent or carrier on the germination of the alga.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

7.4 Preparation of test solutions for water samples

When the test material is a sample of water, e.g. waste water, environmental water sample or an elutriate of solid material, the salinity of this sample shall be adjusted to the same salinity as the control medium by addition of appropriate amounts of the artificial sea water salts (5.1). Then add the nutrient salts as shown in Table 2 (5.2). Mix the water by aeration for a minimum of 16 h to stabilise the pH. Adjust, if necessary, the pH to $\pm 0,3$ of the pH value of the control medium by addition of hydrochloric acid or sodium hydroxide solution.

Prepare a geometric concentration series of at least five concentrations of the test material by diluting the salinity adjusted and nutrient spiked water in control medium. If possible the concentrations shall be chosen to obtain several levels of inhibition ranging from less than 10 % to greater than 90 % inhibition of germ-tube growth.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

NOTE *Saccharina japonica* generally has no gametophyte growth problems between 25 psu and 40 psu. However, adjustment of salinity is usually necessary so as the effect of temperature is not to be reflected in the test results.

7.5 Preparation of zoospores

To generate the initial bulk of spores, five randomly selected sori were rinsed with running tap water. Cleaned sorus materials were allowed to dry for 12 hours prior to meiospore release and placed in a 1000-mL glass vial containing 500 mL of filtered seawater. After 3 h, densities of spores in suspension were determined by counting the number of cells with a haemocytometer. Aliquots of 10 mL containing average densities of 3×10^3 spores were allowed to settle on round coverslips (12mm in diameter) in Petri dishes (50mm in diameter, 20mm high) each containing 10 mL of medium and the cultures were maintained in the dark for 3 h at a temperature of 10°C before being subjected to experimental treatments.

7.6 Preparation of test and control cultures

Transfer 2,5 mL of control medium to each of four wells on a 24 well cell plate. Starting with the lowest concentration, transfer 2 mL of the test solutions to each of four wells on the cell plate.

Cover-slips bearing attached spores were distributed in each of the wells on the cell plate

The decision on the number of replicates per concentration will depend on the purpose of the testing (e.g. effluent screening vs effluent compliance testing): Statistical confidence in the estimation of effects would be a reason for increasing the number of replicates per concentration or for considering an unequal replication approach, see ISO/TS 20281.

7.7 Incubation

The test cell plates shall be covered with a lid to reduce evaporation. Incubate the test cell plates for 24 h under optimal conditions: temperature $15 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ and dark condition.

Measure temperature at least twice a day; however continuous temperature control is recommended.

Before a toxicity test is conducted with new test facilities, a performance test should be conducted, in which all test plates contain control medium to ensure analyst proficiency. The coefficient of variation of germ-tube growth should be less than 10 %.

The protocol for the methods using the germ-tube growth inhibition of *S. japonica* is summarized in Table 3.

Table 3 — Summary of test conditions and test acceptability criteria for the marine seaweed *Saccharina japonica*, germ-tube growth inhibition toxicity tests

Parameters	Test conditions
Test type	static, non-renewal
Endpoint	germ-tube growth inhibition (EC ₅₀)
Test organism	<i>Saccharina japonica</i>
Test duration	24 h
Test temperature	15 °C ± 2 °C
Test salinity	25 psu - 35 psu (32 psu recommended)
Light condition	dark
Test vessel	24-well cell plate (Ø 15mm)
Test solution volume	2,5 mL
Test specimen/well	1 x 10 ⁶ spores (settled on coverslip, Ø12mm)
Dilution water	nutrient enriched artificial sea water
Renewal of test solution	none
Aeration	none
Culture media	nutrient enriched artificial sea water
Test concentrations	minimum 4+ control
Number of replicates per concentration	4 (depending on statistical analysis chosen)
Sample volume required	50 mL to 100 mL depending on test volume
Test acceptability criterion	20.62 ± 1.70 µm of germ-tube growth in control

7.8 Test duration

The test duration is 24 h.

7.9 Measurements and observation

The endpoints measured for the 24 hour *Saccharina* method are germination tube length. Germ-tube length can be measured using computer assisted image analysis.

8. Reference substance

Test with reference substance, copper chloride (CAS number 7440508) is required for quality assurance and to check the sensitivity of the alga.

9. Validity criteria

The mean reproductive percentage in the control shall be $20.62 \pm 0.70 \mu\text{m}$.

10. Expression of results

10.1 Test results

Record germ-tube length values of each replicate, mean values and standard deviations. The coefficient of variation (CV), the standard deviation expressed as a percentage of the mean, should be calculated to estimate the precision and elongation of the tests.

Plotting concentration response curves is highly recommended to provide the basis for determining the EC_x values for the inhibition of elongation.

10.2 Determination of EC_x values

Apply a linear or non-linear regression model to the experimental data points by regression analysis. Determine EC_x values with their confidence intervals. Guidance on appropriate model given in ISO/TS 20281 and [20].

If data are too few or uncertain for regression analysis, or if inhibitions appear not to follow a regular concentration response relation, then a graphical method may be applied by drawing a smooth eye fitted curve of the concentration response relationship and reading EC_x values from this graph.

10.3 Expression of results

The values calculated for EC_x [e.g. EC_{20} , EC_{25} and/or EC_{80}] and the corresponding confidence intervals (95 %) and CVs are displayed with the required significant precision (digits).

The values should be given as mg/l for tests with individual chemicals or as percentage for effluent, elutriate or leachate test samples.

11. Test report

This test report shall contain at least the following information:

- a) the test method used, together with a reference to this International Standard (ISO/CD 13308);
- b) name of the laboratory performing the test;
- c) date and period of test;
- d) test organisms (e.g. scientific name, strain, source, holding conditions);
- e) test details;

- culturing apparatus and incubation procedure;
 - culture types (static, unialgal etc.)
 - composition of medium;
 - preparation of test sample (e.g. pH, salinity of effluent sample) and treatments;
 - concentrations tested;
 - replicates per concentration;
 - number of thallus disks per replicate;
 - size of cell plates;
 - solution volume;
 - light intensity and quality;
 - pH of test solutions including the controls at start and end of test;
 - salinity;
 - temperature range during incubation;
 - method of measuring reproduction percentage;
- f) results;
- table outlining reproduction percentage in each cell plate at each measuring point;
 - mean reproduction percentage for each test concentration (and control) at each measuring point;
 - relationship between reproduction and concentration in table and graphical representation;
 - EC_x values with 95 % confidence intervals and the corresponding CVs values including the method of determination;

12. Data Sheet for *Saccharina* Toxicity Test

Test Date: _____ Test Species: _____

Sample Source: _____ Collection/Arrival Date: _____

Saccharina Source: _____

Test conditions: _____ (Dilution): _____

Test Cont.	Temp (°C)		Salinity (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
Control						

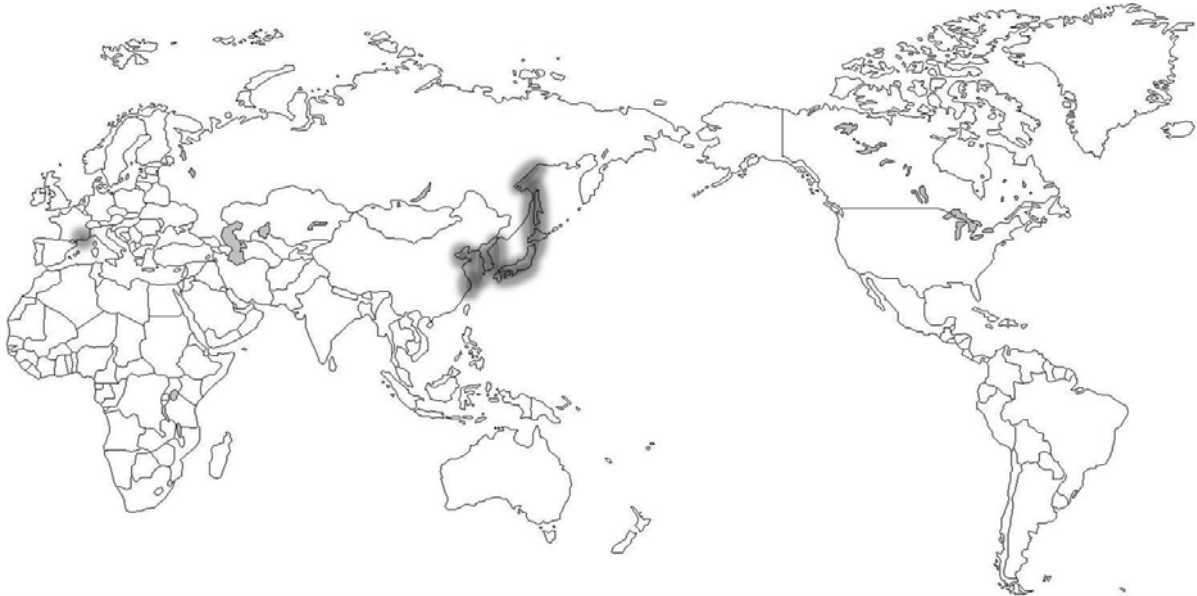
Test Result

Treatment/Replicate		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	Germ-tube length	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					
R2	Germ-tube length	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					
R3	Germ-tube length	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					
R4	Germ-tube length	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					

Annex E

(informative)

Geographic distribution of *Saccharina japonica* (Areschoug) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders



Europe: France

- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).

Asia: Korea, Russia, China, Japan

- Tseng, C.K. (1984).
- Chapman, V.J. & Chapman, D.J. (1980).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Yoshida, T. (1998).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

Bibliography

- [1] Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. 1988. Inventaire bibliographique des macrophytes (Algues, Phanérogames) signalés dans l'Etang de Thau (Hérault, France). *Naturalia Monspel* 52, 71-84.
- [2] Chapman, V.J. & Chapman, D.J. 1980. *Seaweeds and their uses*. Chapman & Hall, London & New York.
- [3] Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology* 42, 493-512.
- [4] Lee, Y. & Kang, S. 2001. *A catalogue of the seaweeds in Korea*. Cheju National University Press, Jeju.
- [5] Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. 1992. Check-list of mediterranean seaweeds. I. Fucophyceae (Warming 1884). *Botanica Marina* 35, 109-130.
- [6] Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. 2007. Revision of the systematics of algae in the order Laminariales (Phaeophyta) from the Far-Eastern Seas of Russia on the basis of molecular-phylogenetic data. *Russian Journal of Marine Biology* 33, 278-289.
- [7] Tseng, C.K. 1984. *Common seaweeds of China*. Science Press, Beijing.
- [8] Verlaque, M. 2001. Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanologica Acta* 24, 29-49.
- [6] Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. 1990. Check-list of marine algae of Japan (revised in 1990). *Japanese Journal of Phycology* 38, 269-320.
- [9] Yoshida, T. 1998. *Marine algae of Japan*. Uchida Rokakuho Publishing Co. Ltd, Tokyo.

부록 5. 국문 매뉴얼

다시마 배우체 생장을 이용한 생태독성 평가 매뉴얼

1. 측정원리

본 시험방법은 해양생태계의 일차 생산자인 다시마를 이용한 독성시험방법으로써 유해물질이 생태계의 일차생산자에 미치는 영향을 파악하는데 그 목적이 있다. 표준시험생물 종(species)은 갈조류인 참다시마 (*Saccharina japonica*)이다. 이 시험법은 액상물질에 노출된 참다시마 배우체의 성장 억제 현상을 이용하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법으로 시험 대상 물질이 시험 기간 동안 유의하게 손상되거나 사라지지 않으며 해수에 잘 녹는 물질에 적용된다.

시험원리는 참다시마 배우체를 다양한 농도의 시험 물질에 144시간 동안 노출시킨 후, 배우체 면적의 상대성장률을 산정하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법이다 (그림 1).



그림 1. 다시마 배우체 성장율의 독성평가 원리

2. 시험생물

2.1. 본 시험법의 표준시험생물은 해양성 갈조류인 참다시마 *Saccharina japonica* (Areschoung) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders 이다.

- 2.2. 해양성 갈조류인 참다시마는 대형의 조체로 발달하는 포자체가 저 수온기에 성장과 성숙을 하지만, 하절기의 고 수온기에는 소실되며, 미소한 배우체 세대로 여름을 넘기고, 수온의 저하와 함께 성숙하여 다음의 포자체 세대를 만든다.
- 2.3. 시험생물은 우리나라 연안역 조간대에서 연중 채집할 수 있으며, 양식산업의 발달로 연중 생물체 공급이 가능하다. 시험생물의 채집이 곤란할 경우 인천대학교 녹색환경과학센터에서 시험생물을 구할 수 있다. 시험생물은 본 실험 시작 1일전에 확보되어야 한다.

3. 기구 및 기기

- 3.1. 광학현미경 : 배율 100-400의 광학현미경, 포자방출 유무 관찰
- 3.2. 배양기 : 독성시험 과정동안 일정한 온도를 유지할 수 있는 배양기 또는 배양실
- 3.3. 수질측정기 : 염분, 수온, pH
- 3.4. 초순수제조기
- 3.5. 교반기 또는 공기발생기
- 3.6. 플라스틱 수조 (10-20 L) : 시험생물(포자) 방출 유도시 사용
- 3.7. 페트리디쉬와 커버글라스: 시험생물 부착 유도시 사용
- 3.8. 24구 웰 플레이트

4. 시험생물준비

- 4.1. 배양 배지 제조 방법
 - 4.1.1. 배양용액 및 시험물질 용액을 제조하는데 사용하는 희석수는 탈이온수를 사용하여야 한다. 시험 준비나 저장 기간 동안 희석수가 오염되지 않도록 특별히 주의하여야 하며, 본 시험에는 구리로 만든 도구나 기구는 사용할 수 없다.
 - 4.1.2. 배양용액은 OTT's (1965) 인공해수를 만들어 사용한다(OTT's 성분-표 1참조).
- 4.2. 시약 및 소모품
 - 4.2.1. 투명용기(500 mL) - 시험용액을 보관하는데 사용하며, 이때 “구리” 성분이 함유되지 않은 용기를 사용한다.

4.2.2. 24구 웰 플레이트 - 시험생물 배양 용기로 사용한다(2.5 mL).

4.2.3. 시험 용액과 접촉하는 모든 기구는 유리 또는 화학적으로 불활성 재질이어야 한다.

4.2.4. 막여과 기구 - 평균 통과 직경 0.45 μm 여과지를 사용한다.

표 1. OTT's 인공해수의 주요 성분

주요 성분	농도 (g/L)
NaCl	21.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.00
KCl	0.80
NaBr	0.10
NaNO ₃	0.20
NaHCO ₃	0.20
H ₃ BO ₃	0.06
Na ₂ SIO ₃ ·9H ₂ O	0.01
Sr(NO ₃) ₂	0.03
Na ₂ HPO ₄	0.02

5. 시험방법

5.1. 농도구간설정

5.1.1. 시험 농도의 선택 : 시험할 물질의 농도는 보통 기하학적인 순열을 따라 그 비가 1.5에서 2.0 사이가 되게 한다. 예를 들면, 2 mg/L; 4 mg/L; 8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 64 mg/L;이며, 배출수 또는 액상 물질일 경우에는 0%, 6.25%, 12.5%, 25.0%, 50.0%, 100.0%로 한다. 가능하면, 농도는 10% 이하에서 90% 이상까지의 범위에서 여러 (4~5 구간) 수준의 포자방출이 이루어지도록 선택하여야 한다. 시험 농도 범위는 넓은 범위의 농도 구간을 포함하는 예비실험을 통하여 선택하는 것이 가장 좋다.

5.1.2. 대조구 : 모든 시험은 시험 대상 물질만 없고 배양 용액, 시험조건 및 과정이 동일한 음성대조군 (negative control)가 반드시 필요하다. 만약 시험에 운반체 (carrier)가 쓰이면, 운반체가 첨가된 운반체 대조구가 필요하다.

5.2. 시험 용액 준비

5.2.1. 시험 용액 준비 : 시험 용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 만든다. 일반적으로 시험은 pH를 조정하지 않고 수행하여야 한다. 하지만, 어떤 물질은 극단적인 산성이나 알칼리성에 의해 독성효과를 나타낼 수 있다. 이 경우 1 mol/L 염산이나 1 mol/L 수산화나트륨을 써서 pH를 8 ± 0.2 로 조절해야 한다.

5.3. 시험 생물 준비

5.3.1. 다시마 엽체에서 포자엽 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아 낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척한다.

5.3.2. 엽체 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관한다.

5.3.3. 엽체를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도한다.

5.3.4. 유도된 포자액을 20mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 준다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼고, 항온배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양한다.

5.3.5. 포자가 부착된 커버글라스를 24구 웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 놓는다.

5.4. 배양방법

5.4.1. 배양 온도, 광선, 광주기 조건은 각각 15°C , $30-40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 광량, 12:12-h 명암주기로 하였다.

5.5. 측정방법

5.5.1. 실험 개시 후, 144시간이 경과하면 각 셀에서 핀셋으로 배우체가 부착되어 있는 커버글라스를 각 조건별로 꺼내어 한 개의 슬라이드 글라스 위에 40% 글리세롤로 고정한다.

5.5.2. 광학현미경 상에서 배우체 30개체를 대상으로 배양 직전의 초기치 면적을 측정한 뒤 144시간 배양 후 면적을 측정하여 상대성장률로 계산하였다. 모든 과정은 영상

분석장치(Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 배우체를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어졌다.

5.5.3. 다시마 독성시험 기록지에 실험 종료 일자와 측정 일자를 기록하고 각 시험용액 농도별 배우체 면적을 기록한다.

5.6. 시험의 유효성 판정

본 시험법의 표준시험물질은 구리(7440-50-8, Junsei Co., Cu)이다. 구리를 이용한 EC₅₀ (24 h)은 0.120 mg/L이며, 최소 0.090 mg/L, 최대 0.148 mg/L 범위에서 유효하다.

5.7. 대조군 차트

17회의 서로 다른 배우체 성장 측정 실험 결과들을 하나의 차트에 표시하였다 (그림 2). 다시마의 평균 배우체 성장률은 $46.62 \pm 2.16 \mu\text{m}^2$ 로 나타났다.

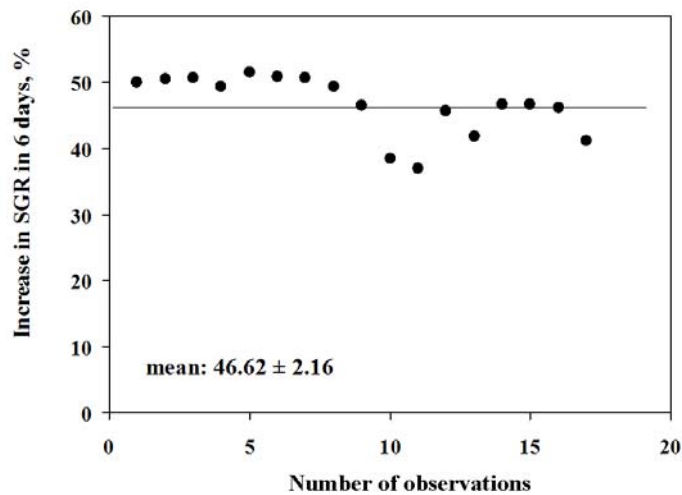


그림 2. 144시간 후 측정된 배우체 성장률 대조군 차트

5.8. 시험조건 요약

1. 시험형태:	비교환 정수배양
2. 광조사량:	500~4000 lux ($10\sim80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
3. 광주기:	12h 명기, 12h 암기
4. 시험온도:	$15 \pm 1^\circ\text{C}$
5. 염분:	25~35 psu
6. 시험용기:	24구 웰 플레이트
7. 시험용액:	2.5 mL/replicate
8. 시험용액 교환:	교환하지 않음
9. 시험생물 크기:	지름 $25 \mu\text{m}$
10. 반복구당 시험생물 수	1×10^6
11. 배양액:	배양용액 (조성표 참조-표 1)
12. 희석액:	배양용액
13. 평가 농도:	100, 50, 25, 12.5, 6.25%, 대조구 또는 정량농도 (예 mg/L)
14. 시험기간:	144시간
15. 측정요소	총 30개체의 배우체 면적 상대성장률
16. 시험적합도 기준:	$46.62 \pm 2.16 \mu\text{m}^2$

5.9. 평가방법 모식도 (그림 3)

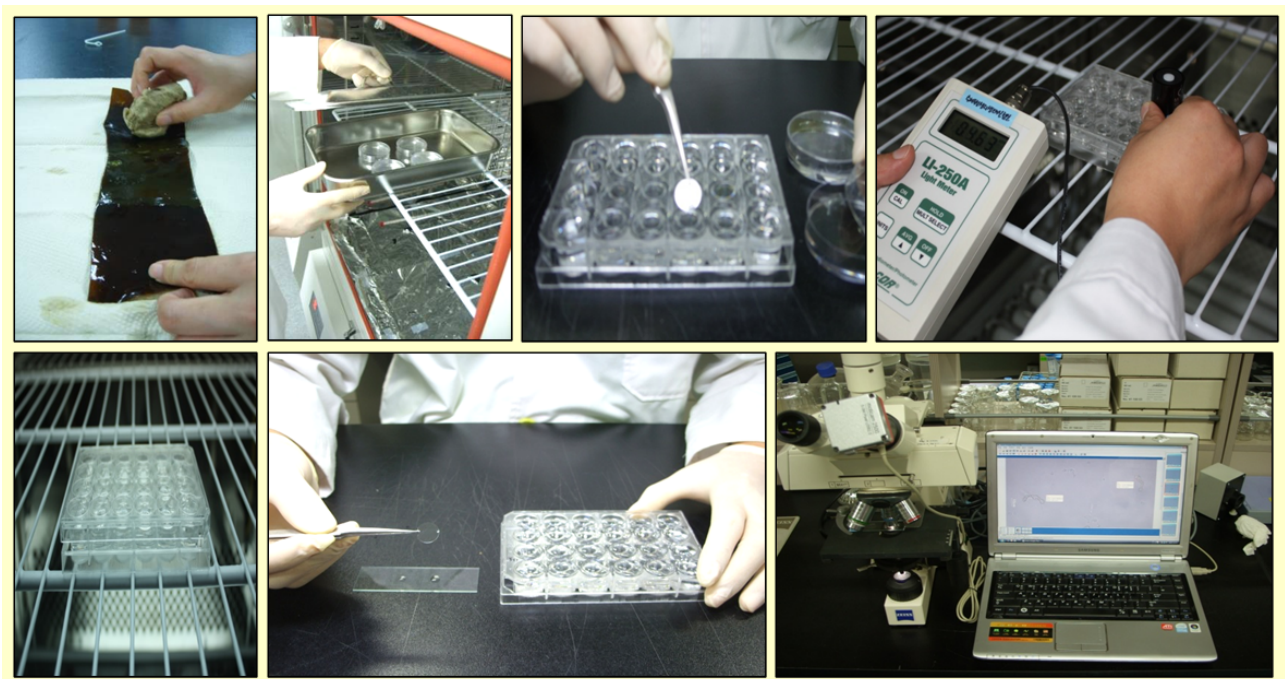


그림 3. 다시마 배우체 성장 평가방법

6. 자료분석

6.1. 자료정리

배우체 면적의 상대성장률로 나타낸다.

6.2. 통계처리

다시마 배우체 생장을 이용한 독성시험의 측정값(endpoints)은 배우체 생장에 대한 부정적인 효과에 기반을 두고 있다. 시험결과를 이용하여 무영향농도(NOEC) 및 포자발아율 억제농도 (EC₅₀)와 신뢰구간을 계산한다. 무영향농도(NOEC) 값은 Dunnett 검정을 이용하여 구할 수 있다. EC₅₀ 값 추정과 NOEC 값 추정은 Toxcalc (version 5.0)과 같은 독성자료처리용 통계 프로그램을 사용한다.

7. 부록

7.1. 시험생물 배양기관

인천대학교 부설 녹색환경과학센터

인천광역시 연수구 송도동 7-46 인천대학교 미래관 201호

전화 : +82 32 850 5711-4 팩스 : +82 32 850 5717

홈페이지 : www.greenpioneer.co.kr

인천대학교 생물학과

인천광역시 연수구 송도동 12-1 인천대학교

전화 : +82 32 835 8245 팩스 : +82 32 850 0763

홈페이지 : www.bioincheon.or.kr

7.2 시험생물의 생리·생태적 특징

시험종은 Laminariales (다시마 목), Laminariaceae (다시마 과), *Saccharina* (다시마 속), *Saccharina japonica* (참다시마 종) 이다. 본 시험종은 길이 2~20m의 긴 띠 모양이며 식용할 수 있다. 뿌리는 나뭇가지 모양이고 줄기는 원기둥 모양으로 짧으며 바위에 붙어 산다. 잎의 중앙부분은 약간 두껍고 양 가장자리는 얇으며 엽체(葉體)의 조직은 색소체가 있는 작은 세포로 이루어진 표층(表層), 색소체가 없는 원형·다각형의 세포로 이루어진 피층(皮層), 색소체가 없는 사상(絲狀)·관상(管狀)세포가 얽힌 수층(髓層)으로 이루어진다. 가을에서 겨울에 걸쳐 엽체 양면에 포자낭(孢子囊)이 생기고 2개의 편모(鞭毛)가 있는 유주자(遊走子)를 방출하는데, 유주자는 발아하여 현미경적으로 갈라진 실 모양의 암수배우체(配偶體)가 되어, 이것에서 난자·정자가 만들어진다. 수정란이 발아하면 보통 우리가 보는 다시마로 자란다 (그림 4). 다시마는 봄과 여름에 급성장하며, 유주자를 방출하고는 끝쪽부터 시든다. 엽체의 기부(基部)에 있는 성장점에서 낡은 잎을 밀어

올리는 형상으로 새 잎이 재생하며, 1년째의 엽체는 얇고 2년째 것부터 충실한 엽체가 된다. 수명은 2~4년이다. 주로 한류의 영향을 받는 해역에 분포하는데, 한국에서는 거제도·제주도·흑산도·원산 이북 함경도일대에서 많이 난다.

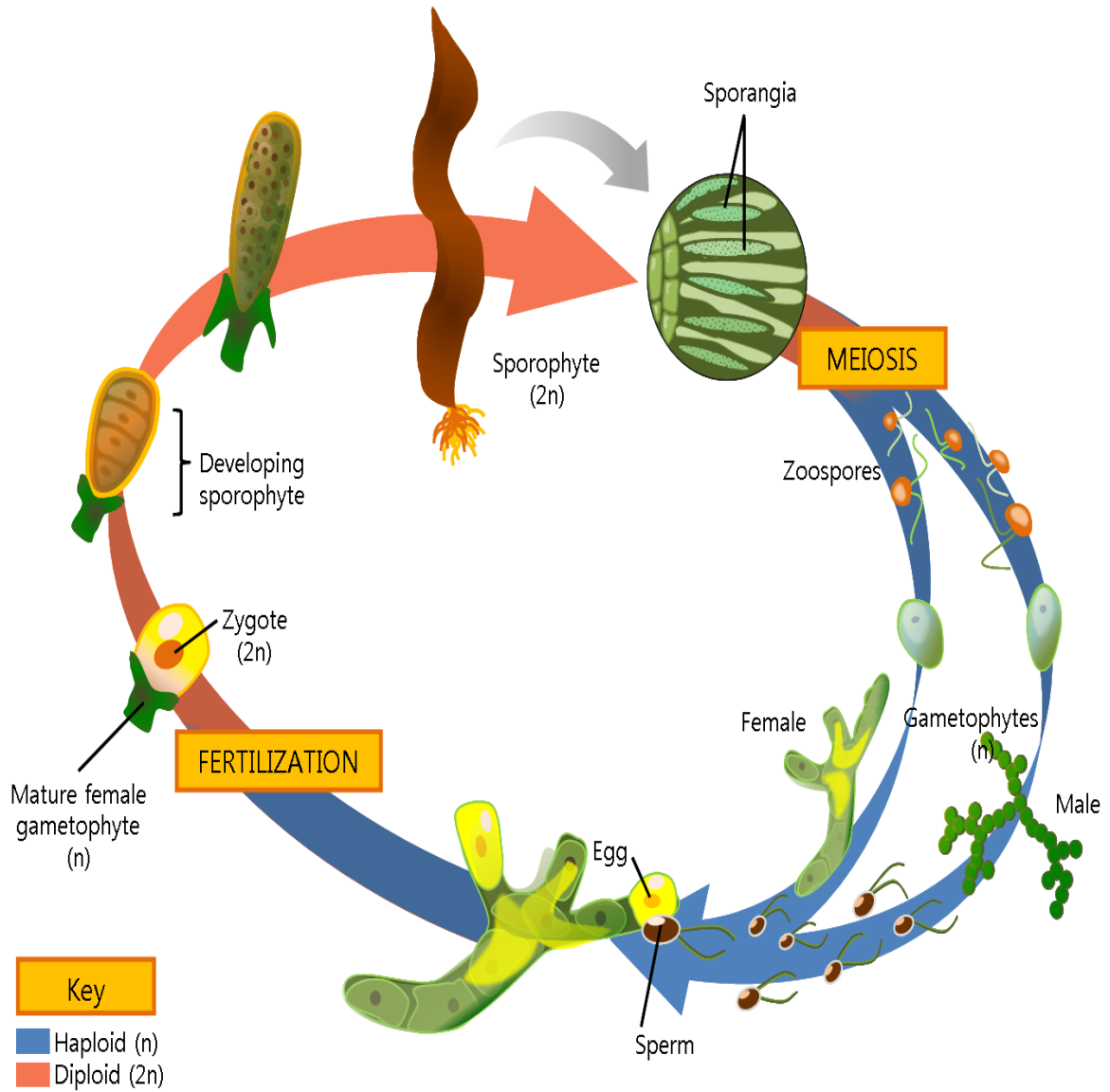


그림 4. 다시마의 생활사

7.3. 시험에 영향을 주는 간접요인

시험에 영향을 주는 요인으로는 광선, 온도, 염분 등의 여러 가지 주요 환경인자에 대한 배우체 면적 생장의 차이를 들 수 있다.

7.4. 다시마 독성시험 기록지

시험일자: _____ 시험생물명: _____
 시험물질명: _____ 채취일자: _____
 채집위치 및 방법: _____
 보관시간: _____ (보관조건): _____
 시험조건: _____ (희석수): _____

농도	온도 (° C)		염분 (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
대조구 (control)						

시험결과 (단위: 개)

농도		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	배우채 크기	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					
R2	배우채 크기	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					
R3	배우채 크기	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					
R4	배우채 크기	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					

부속서 A
(참고)

참다시마(*Saccharina japonica*)의 지리적 분포



유럽: 프랑스

- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).

아시아: 대한민국, 러시아, 중국, 일본

- Tseng, C.K. (1984).
- Chapman, V.J. & Chapman, D.J. (1980).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Yoshida, T. (1998).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

Water quality — Toxicity test based on gametophyte growth inhibition of the brown macroalga *Saccharina japonica*

Contents

	Page
Introduction.....	246
1 Scope.....	247
2 Normative references.....	247
3 Terms and definitions.....	247
4 Principle.....	248
5 Reagents and media.....	248
6 Apparatus.....	249
7 Procedure.....	250
7.1 Preparation of control medium.....	250
7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products.....	250
7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products.....	250
7.4 Preparation of test solution for assessment of water samples.....	251
7.5 Preparation of zoospores.....	251
7.6 Preparation of test and control cultures.....	251
7.7 Incubation.....	252
7.8 Test duration.....	253
7.9 Measurements and observations.....	253
8 Reference substance.....	253
9 Validity criteria.....	254
10 Expression of results.....	254
10.1 Test results.....	254
10.2 Determination of EC _x values.....	254
10.3 Expression of results.....	254
11 Test report.....	254
12 Data Sheet for <i>Saccharina</i> Toxicity Test.....	256

Introduction

Saccharina japonica grows in temperate cold water zones. In the Asian-Pacific region the species is native to northwest coasts of the Pacific Ocean, occurring south as far as 36° N latitude. *Saccharina* spp. are important representatives of macroalgal communities in coastal waters that are under threat from the frequent inundations of toxic waste derived from industrial and municipal sources. These algae are primary producers constituting the basis of coastal ecosystem and, moreover, provide shelter and habitats for other marine organisms; *Saccharina* products are used for industrial purposes, for medical purposes, for human consumption and as livestock fodder. Reproduction is a critical process by which populations perpetuate, and disturbance of this process can cause failure in recruitment, leading to the disappearance of the population and ultimately to modifications in community structure and dynamics.

The proposed macroalgal toxicity test provides many practical advantages over other currently employed techniques. No specialist expertise is required. The test is cost and time-effective, since it only requires a cell plate, a small volume of water and takes a total of approximately 2 - 3 h to conduct around a 144 h incubation period.

Water quality — Toxicity test based on gametophyte growth inhibition of the brown macroalga *Saccharina japonica*

1. Scope

This International Standard specifies a method for the determination of the gametophyte growth inhibition of brown alga (*Saccharina japonica*) to substances and mixtures contained in water, wastewater, environmental water samples and waste or sewage sludge elutriates.

2. Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/TS 20281, *Waterquality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*

3. Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

3.1

algal zoospore

the zoospores of the brown alga, *Saccharina japonica*

3.2

artificial sea water medium

mixture (adjusted at salinity: 35 psu) of distilled water and mineral salts

3.3

control medium

artificial sea water with nutrient salts used for stock culturing of the test alga, as medium in control cultures and dilution water in test cultures

3.4

effective concentration

EC_x

concentration of test sample which results in a reduction of x % in reproduction relative to the controls

3.5

extent of gametophyte growth

Area of gametophyte

4. Principle

The life cycle of *S. japonica* consists of alternating asexual (sporophyte) and sexual (gametophyte) generations. Specialized blades of mature diploid sporophytes produce haploid zoospores that post-release, settle and germinate. This method provides step-by-step instructions for performing a 24-h day static non-renewal toxicity test using giant kelp to determine the toxicity of substances in marine and estuarine waters.

The zoospores swim through the test solution and eventually settle onto glass microscope slides. The settled spores germinate by extruding the cytoplasm of the spore through the germ-tube into the first gametophytic cell. This stage is often referred to as the "dumbbell" stage. The early stage of developing gametophyte increase in cell size. The test endpoints measured after 144 hours are gametophyte growth.

5. Reagents and media

5.1 Artificial sea water

Prepare artificial sea water by adding the weighed chemicals according to Table 1 to the desired volume of distilled water for the growth medium and test compound solutions. Aerate the artificial sea water and adjust, if necessary, to pH $8,0 \pm 0,2$ with 1 mol HCl or 1 mol NaOH before use. Maximum storage time for the artificial sea water is 2 months.

Table 1 — Artificial sea water with a salinity of 35 psu (adopted from OTT 1965) [11]

Compounds	Quantity in g/l
NaCl	21
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	6
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1
KCl	0,8
NaBr	0,1

5.2 Nutrients

Add the nutrient salts given in Table 2.

Table 2 — Nutrients

Compounds	Quantity in g/l
NaNO ₃	0,2
NaHCO ₃	0,2
H ₃ BO ₃	0,06
Na ₂ SiO ₃ • 9 H ₂ O	0,01
Na ₂ HPO ₄	0,02
Sr(NO ₃) ₂	0,03

5.3 Test organism

Saccharina japonica (Areschoung) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders

NOTE The strain is available in unialgal, non-axenic plants from the following sources:

Institute of Green Environmental Research,
Mi-Rae Centre,
7-46 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone:+8232850 5711-4 Facsimile: +82 32 850 5717
Website:www.greenpioneer.co.kr

Department of Biology,
University of Incheon,
12-1 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone: +8232835 8245 Facsimile: +82 32 8350763
Website: www.bioincheon.or.kr

6. Apparatus

The test requires standard laboratory apparatus and the following.

6.1 Temperature-controlled cabinet or room, with a white fluorescent light, providing uniform illumination in accordance with the requirements specified in Table 3.

6.2 Light-meter, to be used to measure photon irradiance.

6.3 pH meter

6.4 Tweezers

6.5 Glassware, for the preparation of different concentration series and nutrient medium.

6.5.1 Volumetric flasks

6.5.2 Graduated cylinders

6.5.3 Pipettes

6.5.4 Petri dishes

6.6. Coverslip, for each test chamber to serve as the substratum upon which the zoospores will settle

6.7 Cell plates, for example 24-well cell plates with 2,5 mL per well.

6.8 Microscope (Image analysis system), for inspecting zoospores and embryonic gametophytes.

6.9 Hemacytometer (bright-line rbc), for measuring zoospore density.

6.10 Image analysis system, for measurements of gametophyte size.

7. Procedure

7.1 Preparation of control medium

Add the nutrients to artificial sea water as given in Table 2.

7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products

When the test material is a chemical or a chemical product a stock solution shall be prepared by dissolving the test material in control medium at an appropriate concentration.

Adjust the pH value of the stock solution to $\pm 0,3$ of the pH value of the medium in the control by adding hydrochloric acid or sodium hydroxide solution. No later adjustment is made.

NOTE *Saccharina* generally has an arrow pH limit (between 7,5and8,5) for gametophyte growth. Therefore, adjustment of pH is necessary when the pH of the sample is beyond these limits.

7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products

An appropriate test design should consist of a geometric series (the ratio between 1,5 and 2,0, e.g. 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l, 32 mg/l, and 64 mg/l) of at least five concentrations exclusive of

controls. The concentrations should be chosen to include one measured inhibition value below and one above the to be estimated or to have the expected EC₅₀ to be bracketed.

NOTE A suitable concentration range is best determined by carrying out a preliminary range-finding test using test concentration with several orders of magnitude of difference.

If a solvent or carrier is used to dissolve or suspend the test sample, additional controls containing the solvent or carrier should also be included in the test to determine any effect of the solvent or carrier on the germination of the alga.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

7.4 Preparation of test solutions for water samples

When the test material is a sample of water, e.g. waste water, environmental water sample or an elutriate of solid material, the salinity of this sample shall be adjusted to the same salinity as the control medium by addition of appropriate amounts of the artificial sea water salts (5.1). Then add the nutrient salts as shown in Table 2 (5.2). Mix the water by aeration for a minimum of 16 h to stabilise the pH. Adjust, if necessary, the pH to $\pm 0,3$ of the pH value of the control medium by addition of hydrochloric acid or sodium hydroxide solution.

Prepare a geometric concentration series of at least five concentrations of the test material by diluting the salinity adjusted and nutrient spiked water in control medium. If possible the concentrations shall be chosen to obtain several levels of inhibition ranging from less than 10 % to greater than 90 % inhibition of gametophyte growth.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

NOTE *Saccharina japonica* generally has no germination problems between 25 psu and 40 psu. However, adjustment of salinity is usually necessary so as the effect of temperature is not to be reflected in the test results.

7.5 Preparation of zoospores

To generate the initial bulk of spores, five randomly selected sori were rinsed with running tap water. Cleaned sorus materials were allowed to dry for 12 hours prior to meiospore release and placed in a 1000-mL glass vial containing 500 mL of filtered seawater. After 3 h, densities of spores in suspension were determined by counting the number of cells with a haemocytometer. Aliquots of 10 mL containing average densities of 3×10^3 spores were allowed to settle on round coverslips (12mm in diameter) in Petri dishes (50mm in diameter, 20mm high) each containing 10 mL of medium and the cultures were maintained in the dark for 3 h at a temperature of 10°C before being subjected to experimental treatments.

7.6 Preparation of test and control cultures

Transfer 2,5 mL of control medium to each of four wells on a 24 well cell plate. Starting with the

lowest concentration, transfer 2 mL of the test solutions to each of four wells on the cell plate.

Cover-slips bearing attached spores were distributed in each of the wells on the cell plate

The decision on the number of replicates per concentration will depend on the purpose of the testing (e.g. effluent screening vs effluent compliance testing): Statistical confidence in the estimation of effects would be a reason for increasing the number of replicates per concentration or for considering an unequal replication approach, see ISO/TS 20281.

7.7 Incubation

The test cell plates shall be covered with a lid to reduce evaporation. Incubate the test cell plates for 144 h under optimal conditions: photon irradiance $10 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ – $80 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, photoperiod 12h:12 h L/D, temperature $15 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Measure temperature at least twice a day; however continuous temperature control is recommended.

Before a toxicity test is conducted with new test facilities, a performance test should be conducted, in which all test plates contain control medium to ensure analyst proficiency. The coefficient of variation of gametophyte growth should be less than 10 %.

The protocol for the methods using the gametophyte growth inhibition of *S. japonica* is summarized in Table 3.

Table 3 — Summary of test conditions and test acceptability criteria for the marine seaweed *Saccharina japonica*, gametophyte growth inhibition toxicity tests

Parameters	Test conditions
Test type	static, non-renewal
Endpoint	gametophyte growth (EC ₅₀)
Test organism	<i>Saccharina japonica</i>
Test duration	144 h
Test temperature	15 °C ± 2 °C
Test salinity	25 psu - 35 psu (32 psu recommended)
Light condition	10 – 80 µmol photons m ⁻² s ⁻¹
Test vessel	24-well cell plate (Ø 15mm)
Test solution volume	2,5 mL
Test specimen/well	1 x 10 ⁶ spores (settled on coverslip, Ø12mm)
Dilution water	nutrient enriched artificial sea water
Renewal of test solution	none
Aeration	none
Culture media	nutrient enriched artificial sea water
Test concentrations	minimum 4+ control
Number of replicates per concentration	4 (depending on statistical analysis chosen)
Sample volume required	50 mL to 100 mL depending on test volume
Test acceptability criterion	46.62 ± 2.16 µm ²

7.8 Test duration

The test duration is 24 h.

7.9 Measurements and observation

The endpoints measured for the 144 hour *Saccharina* method are gametophyte growth. Gametophyte size can be measured using computer assisted image analysis.

8. Reference substance

Test with reference substance, copper chloride (CAS number 7440508) is required for quality assurance and to check the sensitivity of the alga.

9. Validity criteria

The mean gametophyte size in the control shall be $46.62 \pm 2.16 \mu\text{m}^2$.

10. Expression of results

10.1 Test results

Record gametophyte size values of each replicate, mean values and standard deviations. The coefficient of variation (CV), the standard deviation expressed as a percentage of the mean, should be calculated to estimate the precision and relative growth of the tests.

Plotting concentration response curves is highly recommended to provide the basis for determining the EC_x values for the inhibition of growth.

10.2 Determination of EC_x values

Apply a linear or non-linear regression model to the experimental data points by regression analysis. Determine EC_x values with their confidence intervals. Guidance on appropriate model given in ISO/TS 20281 and [20].

If data are too few or uncertain for regression analysis, or if inhibitions appear not to follow a regular concentration response relation, then a graphical method may be applied by drawing a smooth eye fitted curve of the concentration response relationship and reading EC_x values from this graph.

10.3 Expression of results

The values calculated for EC_x [e.g. EC_{20} , EC_{25} and/or EC_{80}] and the corresponding confidence intervals (95 %) and CVs are displayed with the required significant precision (digits).

The values should be given as mg/l for tests with individual chemicals or as percentage for effluent, elutriate or leachate test samples.

11. Test report

This test report shall contain at least the following information:

- a) the test method used, together with a reference to this International Standard (ISO/CD 13308);
- b) name of the laboratory performing the test;
- c) date and period of test;
- d) test organisms (e.g. scientific name, strain, source, holding conditions);
- e) test details;
 - culturing apparatus and incubation procedure;
 - culture types (static, unialgal etc.)

- composition of medium;
 - preparation of test sample (e.g. pH, salinity of effluent sample) and treatments;
 - concentrations tested;
 - replicates per concentration;
 - number of thallus disks per replicate;
 - size of cell plates;
 - solution volume;
 - light intensity and quality;
 - pH of test solutions including the controls at start and end of test;
 - salinity;
 - temperature range during incubation;
 - method of measuring reproduction percentage;
- f) results;
- table outlining reproduction percentage in each cell plate at each measuring point;
 - mean reproduction percentage for each test concentration (and control) at each measuring point;
 - relationship between reproduction and concentration in table and graphical representation;
 - EC_x values with 95 % confidence intervals and the corresponding CVs values including the method of determination;

12. Data Sheet for *Saccharina* Toxicity Test

Test Date: _____ Test Species: _____

Sample Source: _____ Collection/Arrival Date: _____

Saccharina Source: _____

Test conditions: _____ (Dilution): _____

Test Cont.	Temp (°C)		Salinity (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
Control						

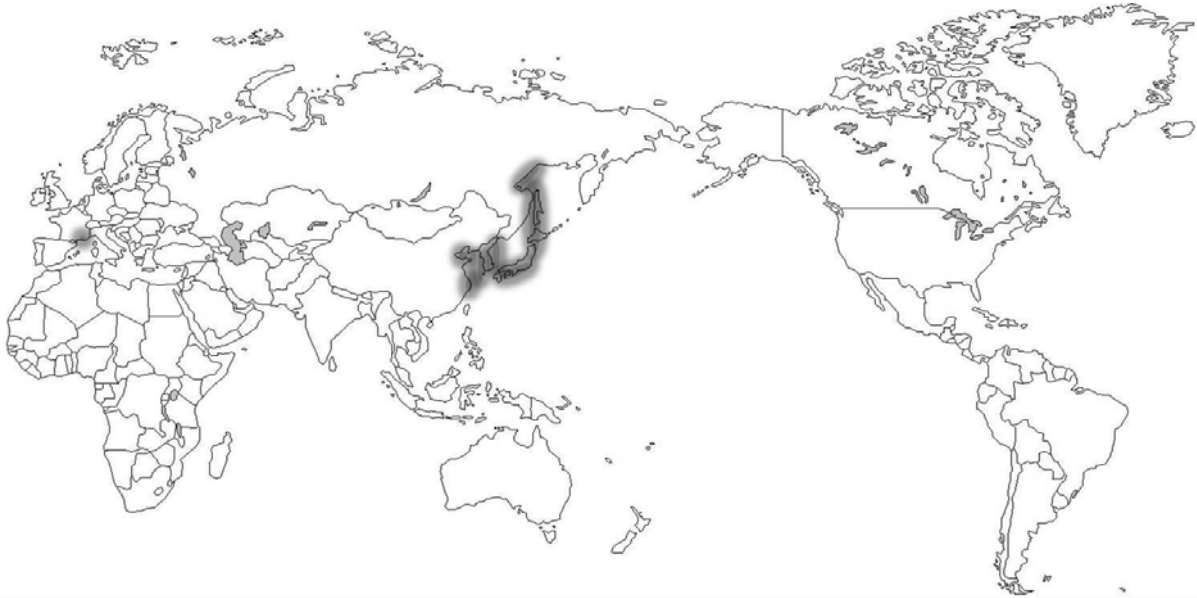
Test Result

Treatment/Replicate		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	Gametophyte size	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					
R2	Gametophyte size	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					
R3	Gametophyte size	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					
R4	Gametophyte size	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					

Annex E

(informative)

Geographic distribution of *Saccharina japonica* (Areschoug) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders



유럽: 프랑스

- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).

아시아: 대한민국, 러시아, 중국, 일본

- Tseng, C.K. (1984).
- Chapman, V.J. & Chapman, D.J. (1980).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Yoshida, T. (1998).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

Bibliography

- [1] Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. 1988. Inventaire bibliographique des macrophytes (Algues, Phanérogames) signalés dans l'Etang de Thau (Hérault, France). *Naturalia Monspel* 52, 71-84.
- [2] Chapman, V.J. & Chapman, D.J. 1980. *Seaweeds and their uses*. Chapman & Hall, London & New York.
- [3] Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology* 42, 493-512.
- [4] Lee, Y. & Kang, S. 2001. *A catalogue of the seaweeds in Korea*. Cheju National University Press, Jeju.
- [5] Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. 1992. Check-list of mediterranean seaweeds. I. Fucophyceae (Warming 1884). *Botanica Marina* 35, 109-130.
- [6] Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. 2007. Revision of the systematics of algae in the order Laminariales (Phaeophyta) from the Far-Eastern Seas of Russia on the basis of molecular-phylogenetic data. *Russian Journal of Marine Biology* 33, 278-289.
- [7] Tseng, C.K. 1984. *Common seaweeds of China*. Science Press, Beijing.
- [8] Verlaque, M. 2001. Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanologica Acta* 24, 29-49.
- [6] Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. 1990. Check-list of marine algae of Japan (revised in 1990). *Japanese Journal of Phycology* 38, 269-320.
- [9] Yoshida, T. 1998. *Marine algae of Japan*. Uchida Rokakuho Publishing Co. Ltd, Tokyo.

다시마 수배우체를 이용한 로봇형 생태독성 평가 매뉴얼

1. 측정원리

본 시험방법은 해양생태계의 일차 생산자인 다시마를 이용한 독성시험방법으로써 유해물질이 생태계의 일차생산자에 미치는 영향을 파악하는데 그 목적이 있다. 표준시험생물 종(species)은 갈조류인 다시마 (*Saccharina japonica*)이다. 이 시험법은 액상물질에 노출된 다시마 수 배우체의 엽록소 형광을 이용하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법으로 시험 대상 물질이 시험 기간 동안 유의하게 손상되거나 사라지지 않으며 해수에 잘 녹는 물질에 적용된다.

시험원리는 다시마 수 배우체를 다양한 농도의 시험 물질에 30분간 노출시킨 후, 엽록소 형광 측정 장치를 이용하여 엽록소 형광을 산정하고 유해물질의 독성을 평가하는 방법이다. 이때 사용되는 엽록소 형광 측정 장치는 광합성의 활성이 변화하는 것을 탐지하기 위해서 고안되었으며, 환경 스트레스 하에서 식물의 광합성 기구 활성을 신속하고 비파괴적인 방법으로 탐지 할 수 있는 기구로 알려져 있고 아래와 같은 원리로 독성을 진단한다(그림 1).

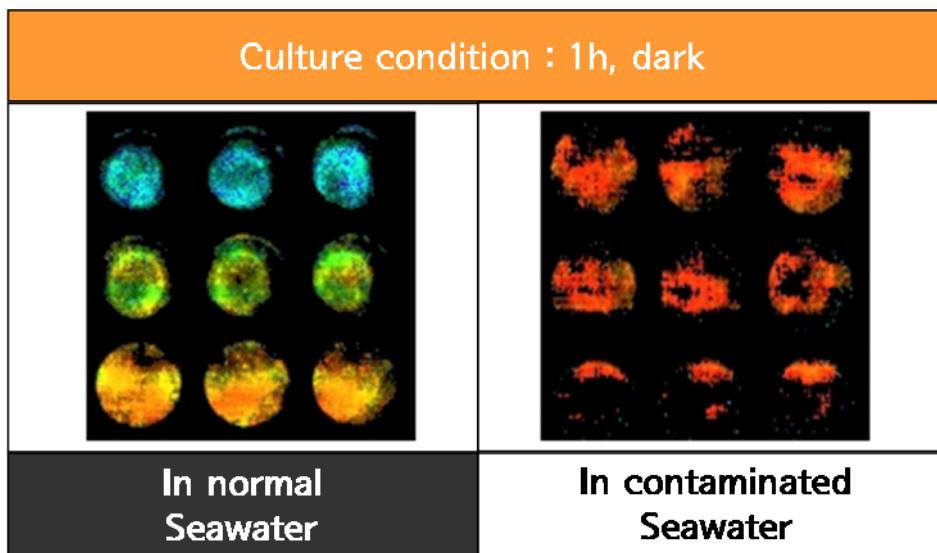


그림 1. 다시마 수배우체의 독성평가 원리

2. 시험생물

- 2.1. 본 시험법의 표준시험생물은 해양성 갈조류인 다시마 *Saccharina japonica* (Areschoung) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders 이다.
- 2.2. 해양성 갈조류인 다시마는 대형의 조체로 발달하는 포자체가 저 수온기에 성장과 성숙을 하지만, 하절기의 고 수온기에는 소실되며, 미소한 배우체 세대로 여름을 넘기고, 수온의 저하와 함께 성숙하여 다음의 포자체 세대를 만든다.
- 2.3. 시험생물은 우리나라 연안역 조간대에서 연중 채집할 수 있으며, 양식산업의 발달로 연중 생물체 공급이 가능하다. 시험생물의 채집이 곤란할 경우 인천대학교 녹색환경과학센터에서 시험생물을 구할 수 있다.

3. 기구 및 기기

- 3.1. 엽록소 형광 측정 장치 : 엽록소 형광 측정에 사용
- 3.2. 배양기 : 독성시험 과정동안 일정한 온도를 유지할 수 있는 배양기 또는 배양실
- 3.3. 균질기 : 배우체 서스펜션 제조시 사용
- 3.4. 96구 웰 플레이트
- 3.5. 초순수제조기

4. 시험생물준비

- 4.1. 배양 배지 제조 방법
 - 4.1.1. 배양용액 및 시험물질 용액을 제조하는데 사용하는 희석수는 탈이온수를 사용하여야 한다. 시험 준비나 저장 기간 동안 희석수가 오염되지 않도록 특별히 주의하여야 하며, 본 시험에는 구리로 만든 도구나 기구는 사용할 수 없다.
 - 4.1.2. 배양용액은 OTT's (1965) 인공해수를 만들어 사용한다(OTT's 성분-표 1참조).
- 4.2. 시약 및 소모품
 - 4.2.1. 투명용기(500 ml) - 시험용액을 보관하는데 사용. 이때 “수은” 성분이 함유되지 않은 용기를 사용한다.

4.2.2. 96구 웰 플레이트 - 시험생물 배양 용기로 사용한다(300 μ l).

4.2.3. 시험 용액과 접촉하는 모든 기구는 유리 또는 화학적으로 불활성 재질이어야 한다.

표 1. OTT's 인공해수의 주요 성분

주요 성분	농도 (g/L)
NaCl	21.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.00
KCl	0.80
NaBr	0.10
NaNO ₃	0.20
NaHCO ₃	0.20
H ₃ BO ₃	0.06
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	0.01
Sr(NO ₃) ₂	0.03
Na ₂ HPO ₄	0.02

5. 시험방법

5.1. 농도구간설정

5.1.1. 시험 농도의 선택 : 시험할 물질의 농도는 보통 기하학적인 순열을 따라 그 비가 1.5에서 2.0 사이가 되게 한다. 예를 들면, 2 mg/L; 4 mg/L; 8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 64 mg/L;이며, 배출수 또는 액상 물질일 경우에는 0%, 6.25%, 12.5%, 25.0%, 50.0%, 100.0%로 한다. 가능하면, 농도는 10% 이하에서 90% 이상까지의 범위에서 여러 (4~5 구간) 수준의 포자방출이 이루어지도록 선택하여야 한다. 시험 농도 범위는 넓은 범위의 농도 구간을 포함하는 예비실험을 통하여 선택하는 것이 가장 좋다.

5.1.2. 대조구 : 모든 시험은 시험 대상 물질만 없고 배양 용액, 시험조건 및 과정이 동일한 음성대조군 (negative control)가 반드시 필요하다. 만약 시험에 운반체

(carrier)가 쓰이면, 운반체가 첨가된 운반체 대조구가 필요하다.

5.2. 시험 용액 준비

5.2.1. 시험 용액 준비 : 시험 용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 만든다. 일반적으로 시험은 pH를 조정하지 않고 수행하여야 한다. 하지만, 어떤 물질은 극단적인 산성이나 알칼리성에 의해 독성효과를 나타낼 수 있다. 이 경우 1 mol/L 염산이나 1 mol/L 수산화나트륨을 써서 pH를 8 ± 0.2 로 조절해야 한다. 또한 서스펜션 제조 시 해수가 첨가 되므로 시험 용액의 농도설정 시 반수 희석되는 것을 고려하여 만들어야 한다.

5.3. 시험 생물 준비

5.3.1. 보관된 다시마의 수 배우체 덩어리를 꺼내어 물기를 제거한 후 무게를 잰다.

5.3.2. 서스펜션의 농도는 2mg/ml로 하며 험거운 호모게나이저를 이용하여 OTT's Medium을 첨가하고 수 배우체 덩어리를 균질화한다.

5.3.3. 균질화 된 수 배우체를 96웰 플레이트에 150 μ l 넣은 후, 시험용액을 같은 부피로 넣어준다.

5.3.4. 배양 온도는 15°C로 암배양 한다.

5.4. 배양방법

5.4.1. 배양 온도는 15°C로 암배양 한다.

5.5. 측정방법

5.5.1. 실험 개시 후, 30분이 경과하면 배양기에서 96웰 플레이트를 꺼낸 후, 엽록소 형광 측정 장치에 뚜껑을 열고 넣는다.

5.5.2. 컴퓨터에 이미지로 보여지는 곳 중에 형광으로 나타내는 부분을 Imaging win 프로그램을 이용하여 설정한 후 측정한다.

5.5.3. 다시마 독성평가 시험지에 측정된 F_0 와 F_m 값을 작성하여 Effective quantum yield를 구한다.

5.6. 시험의 유효성 판정

본 시험법의 표준시험물질은 디유론(330-54-1, SIGMA, Diruon)이다. 디유론을 이용한 EC_{50} (1 hr)은 0.0106 mg/L이며, 최소 0.0094 mg/L, 최대 0.120 mg/L 범위에서 유효하다.

5.7. 시험조건 요약

1. 시험형태:	비교환 정수배양
2. 광조사량:	$0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
3. 광주기:	30 min 암기
4. 시험온도:	$15 \pm 1^\circ\text{C}$
5. 염분:	25~35 psu
6. 시험용기:	96구 well 플레이트
7. 시험용액:	300 μl /replicate
8. 시험용액 교환:	교환하지 않음
9. 시험생물 크기:	지름 25 μm
10. 배양액:	인공해수(OTT's artificial seawater)
11. 희석액:	배양용액
12. 평가 농도:	100, 50, 25, 12.5, 6.25%, 대조구 또는 정량농도(예 mg/L)
13. 시험기간:	30 min
14. 측정요소	배우체 엽록소 형광률
15. 시험적합도 기준:	다시마 수배우체의 평균 엽록소 형광값 0.456 ± 0.018

6. 자료분석

6.1. 자료정리

Effective quantum yield값은 다음과 같은 계산식에 넣어 산출하였으며, 총 4개의 반복수를 두어 그들의 평균값을 사용하였다.

$$\text{Effective quantum yield} = F_m - F_0 / F_m$$

6.2. 통계처리

다시마 수 배우체를 이용한 독성시험의 측정값(endpoints)은 PSII의 광자수율 억제 효과에 기반을 두었다. 사상체 PSII의 광자수율에 대한 EC₅₀은 점예측기법(point estimation techniques)을 써서 계산하였다. LOEC 및 NOEC 값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였고, EC₅₀ 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (Version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다. 독성시험 결과는 EC₅₀ 값으로 표현할 경우, 값이 작을수록 독성도가 커지므로, 이런 문제를 보완하고자 독성값을 비교하기 위하여 독성단위(Toxic Unit, TU)를 아래와 같이 계산하여 사용하였다.

$$TU = 100 / EC_{50} (\%)$$

7. 부록

7.1. 시험생물 배양기관

인천대학교 부설 녹색환경과학센터

인천광역시 연수구 송도동 7-46 인천대학교 미래관 201호

전화 : +82 32 850 5711-4 팩스 : +82 32 850 5717

홈페이지 : www.greenpioneer.co.kr

인천대학교 생물학과

인천광역시 연수구 송도동 12-1 인천대학교

전화 : +82 32 835 8245 팩스 : +82 32 850 0763

홈페이지 : www.bioincheon.or.kr

7.2 시험생물의 생리·생태적 특징

시험 종으로 Laminariales (다시마 목), Laminariaceae (다시마 과), *Saccharina* (다시마 속), *Saccharina japonica* (참다시마 종)를 사용하였다. 본 시험종 참다시마는 수심 1 내지 15 m 지역의 외양을 바라보고 있는 지역이나 외양 부근의 난류의 영향을 받는 지역의 암반이나 암초에 부착하여 서식한다. 이 종의 본래 서식지는 일본 홋카이도인데, 12~3월에 어린잎[幼葉]이 나와서 7월까지 성장한다. 이 종은 아직 엽체가 얇고 가벼워우며 초가을에서 겨울까지 자란 다음, 포자를 내보내고 나면 엽체 끝부분이 점점 녹아버려 심하면 밀동만 남는다. 늦가을부터 초겨울의 재생기에는 잎의 밀동에 있는 생장대가 다시 활동하여 2년째잎을 만들어 여름까지는 매우 두꺼운 엽체가 만들어진다. 2년째의 엽체는 6월부터 다음해 3월까지 포자를 내보내는데, 11월 무렵이 최성기가 된다. 다시마는 2년생 엽체부터 채취할 수 있다. 방출된 포자는 한동안 물속을 헤엄쳐 다니다가 바닥에 착생하며 불과 수십 개의 세포로 된 실 모양 배우체(配偶體)를 형성하고, 수온 10℃ 이하의 조건이 되면 알과 정자를 만들며 수정한다 (그림 2). 수정란은 현미경적인 크기의 아포체(芽胞體)를 이루었다가 새로운 포자체의 어린잎을 만들게 된다. 이들은 포자체가 크고 배수의 염색체를 지닌 복상세대(複相世代)와 현미경적인 크기인 배우체와

반수인 염색체를 가지는 단상세대(單相世代)가 되풀이되는 이형세대교번(異型世代交番)을 한다.

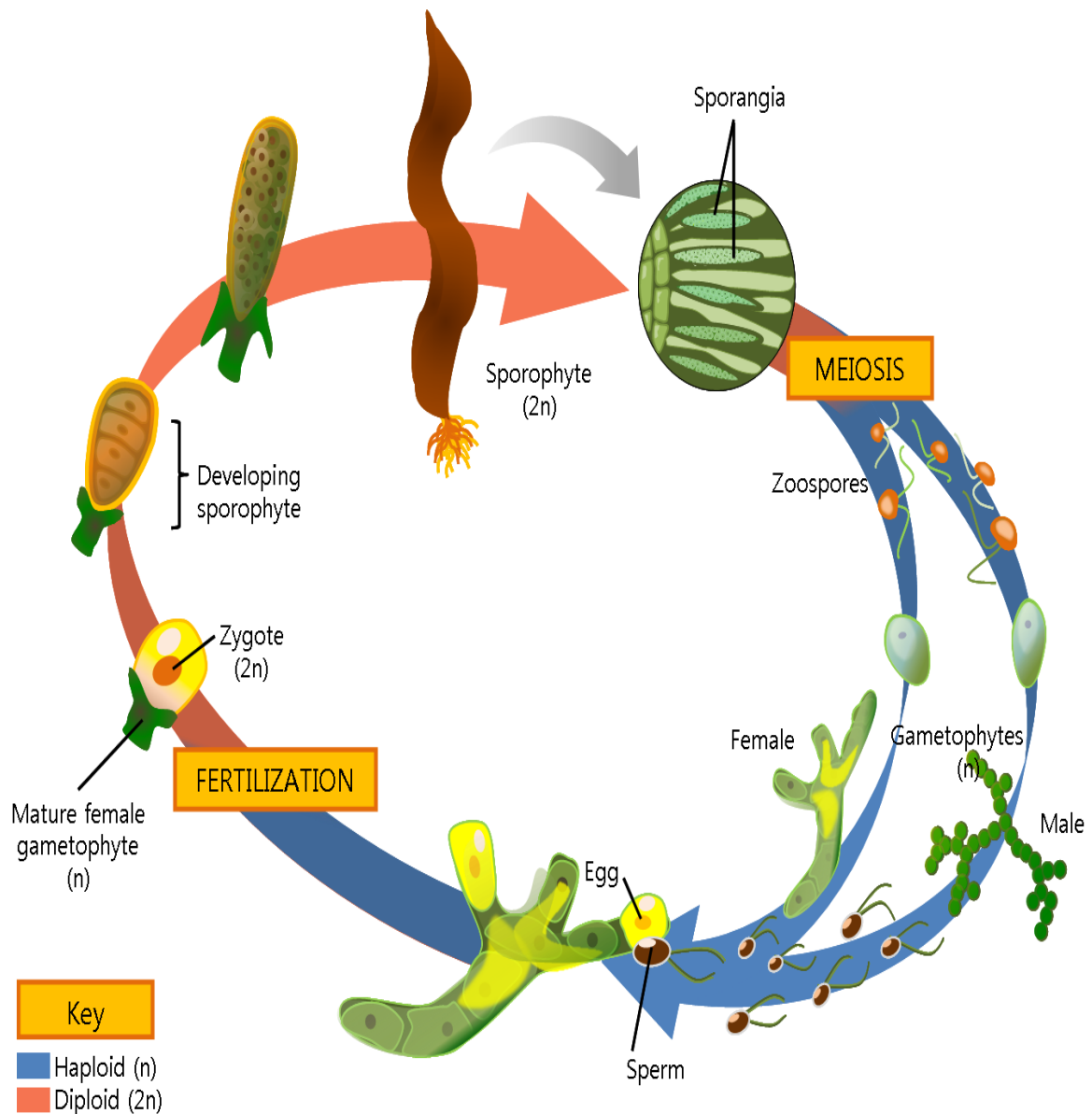


그림 2. 다시마의 생활사

7.3. 시험에 영향을 주는 간접요인

시험에 영향을 주는 요인으로는 광선, 온도, 염분 등의 여러 가지 주요 환경인자에 대한 포자발아율의 차이를 들 수 있다.

7.4. 다시마 수배우체 독성시험 기록지

시험일자: _____ 시험생물명: _____

시험물질명: _____ 채취일자: _____

채집위치 및 방법: _____

보관시간: _____ (보관조건): _____

시험조건: _____ (희석수): _____

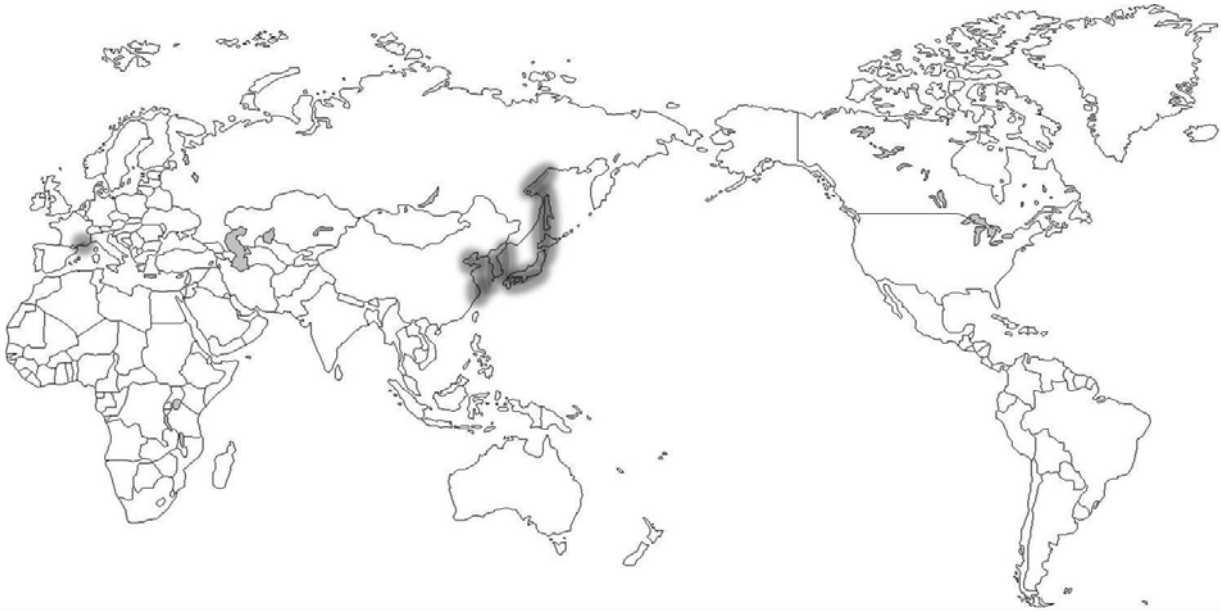
농도	온도 (° C)		염분 (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
대조구 (control)						

시험결과 (단위: effective quantum yield)

농도		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						
R2	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						
R3	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						
R4	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						

부속서 A
(참고)

참다시마(*Saccharina japonica*)의 지리적 분포



유럽: 프랑스

- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).

아시아: 대한민국, 러시아, 중국, 일본

- Tseng, C.K. (1984).
- Chapman, V.J. & Chapman, D.J. (1980).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Yoshida, T. (1998).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

Water quality — Toxicity test based on chlorophyll fluorescence inhibition of the *Saccharina japonica* male gametophyte by robotic system

Contents

	Page
Introduction.....	270
1 Scope.....	271
2 Normative references.....	271
3 Terms and definitions.....	271
4 Principle.....	272
5 Reagents and media.....	272
6 Apparatus.....	273
7 Procedure.....	274
7.1 Preparation of control medium.....	274
7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products.....	274
7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products.....	274
7.4 Preparation of test solution for assessment of water samples.....	275
7.5 Preparation of zoospores.....	275
7.6 Preparation of test and control cultures.....	275
7.7 Incubation.....	275
7.8 Test duration.....	276
7.9 Measurements and observations.....	276
8 Reference substance.....	277
9 Validity criteria.....	277
10 Expression of results.....	277
10.1 Test results.....	277
10.2 Determination of EC _x values.....	277
10.3 Expression of results.....	277
11 Test report.....	278
12 Data Sheet for <i>Saccharina</i> Toxicity Test.....	279

Introduction

Saccharina japonica, is common edible brown seaweed plentiful on the shores of the Korean peninsula and Japanese isles and expanding along some regions of the coastlines of Australia and New Zealand. Coastal area of southern Korea peninsula is a perspective region for growth and cultivation of this brown alga. It is well known that the seaweed cultivation is based on the knowledge of their life histories. Japonica genus is one of the *Laminaria* kelps characterized by a heteromorphic life cycle, with an alternative between highly differentiated diploid sporophytes and microscopic haploid gametophytes. At maturity, the sporophytes release spores that germinate and grow into microscopic gametophytes, and the gametophytes become fertile to release sperms and eggs that join to form embryonic sporophytes. Gametophytes can be propagated vegetatively under controlled conditions as genetically "seeds" for breeding, and a new method of culturing sporelings by use of male and female gametophytes was developed. it is convenient to keep the selected Japonica parent gametophytes in stock culture which can be propagated quickly.

The proposed automatic system toxicity test provides many advantages, eg. easily and simply. The test is cost and time-effective, since it only requires a small amount of sample, a small volume of water and takes a total of approximately 2 - 3 h to control around a 1 h incubation period (dark condition).

Water quality — Toxicity test based on chlorophyll fluorescence inhibition of the brown macroalga *Saccharina japonica* male gametophyte by robotic system

1. Scope

This International Standard specifies a method for the determination of the chlorophyll fluorescence inhibition of brown alga (*Saccharina japonica*) male gametophyte to substances and mixtures contained in water, wastewater, environmental water samples and waste or sewage sludge elutriates.

2. Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/TS 20281, *Waterquality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*

3. Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

3.1

gametophyte

the male gametophyte of the brown alga, *Saccharina japonica*

3.2

artificial sea water medium

mixture (adjusted at salinity: 35 psu) of distilled water and chemicals

3.3

control medium

artificial sea water with nutrient salts used for stock culturing of the test alga, as medium in control cultures and dilution water in test cultures

3.4

effective concentration EC_x

concentration of test sample which results in a reduction of x % in reproduction relative to the controls

3.5

effective quantum yield

the intrinsic quantum efficiency of PS II

4. Principle

The life cycle of *Saccharina japonica* consists of alternating asexual (sporophyte) and sexual (gametophyte) generations. Gametophyte generation is easy to store and cultivate. So this method provides step-by-step instructions for performing a toxicity test using small gametophyte to determine the toxicity of substances in marine and estuarine waters.

The chlorophyll fluorescent measuring instrument not only measure fluorescence, but also provides an estimate of incident light absorptivity. This aspect is particularly important when dealing with lateral heterogeneities of chlorophyll content often accompanying stress- or pathogen-induced damage.

5. Reagents and media

5.1 Artificial sea water

Prepare artificial sea water by adding the weighed chemicals according to Table 1 to the desired volume of distilled water for the growth medium and test compound solutions. Aerate the artificial sea water and adjust, if necessary, to pH $8,0 \pm 0,2$ with 1 mol HCl or 1 mol NaOH before use. Maximum storage time for the artificial sea water is 2 months.

Table 1 — Artificial sea water with a salinity of 35 psu (adopted from OTT 1965) [11]

Compounds	Quantity in g/l
NaCl	21
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	6
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	5
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	1
KCl	0,8
NaBr	0,1

5.2 Nutrients

Add the nutrient salts given in Table 2.

Table 2 — Nutrients

Compounds	Quantity in g/l
NaNO ₃	0,2
NaHCO ₃	0,2
H ₃ BO ₃	0,06
Na ₂ SiO ₃ • 9 H ₂ O	0,01
Na ₂ HPO ₄	0,02
Sr(NO ₃) ₂	0,03

5.3 Test organism

Saccharina japonica (Areschoung) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders male gametophyte

NOTE The strain is available in unialgal, non-axenic plants from the following sources:

Institute of Green Environmental Research,
Mi-Rae Centre,
7-46 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone: +8232850 5711-4 Facsimile: +82 32 850 5717
Website: www.greenpioneer.co.kr

Department of Biology,
University of Incheon,
12-1 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone: +8232835 8245 Facsimile: +82 32 8350763
Website: www.bioincheon.or.kr

6. Apparatus

The test requires standard laboratory apparatus and the following.

6.1 Temperature-controlled cabinet or room, with a white fluorescent light, providing uniform illumination in accordance with the requirements specified in Table 3.

6.2 pH meter

- 6.3 **Homogenizer**, make a male gametophyte suspension
- 6.4 **Glassware**, for the preparation of different concentration series and nutrient medium.
 - 6.4.1 **Volumetric flasks**
 - 6.4.2 **Pipettes**
- 6.5. **Screwcap-plastic tube**
- 6.6 **Cell plates**, for example 96-well cell plates with 300 μ l per well.
- 6.7 **Chlorophyll fluorescent measuring instrument**

7. Procedure

7.1 Preparation of control medium

Add the nutrients to artificial sea water as given in Table 2.

7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products

When the test material is a chemical or a chemical product a stock solution shall be prepared by dissolving the test material in control medium at an appropriate concentration.

Adjust the pH value of the stock solution to $\pm 0,3$ of the pH value of the medium in the control by adding hydrochloric acid or sodium hydroxide solution. No later adjustment is made.

7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products

An appropriate test design should consist of a geometric series (the ratio between 1,5 and 2,0, e.g. 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l, 32 mg/l, and 64 mg/l) of at least five concentrations exclusive of controls. The concentrations should be chosen to include one measured inhibition value below and one above the to be estimated or to have the expected EC₅₀ to be bracketed.

NOTE A suitable concentration range is best determined by carrying out a preliminary range-finding test using test concentration with several orders of magnitude of difference.

If a solvent or carrier is used to dissolve or suspend the test sample, additional controls containing the solvent or carrier should be included in the test to determine any effect of the solvent or carrier on the gametophyte of the alga.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

7.4 Preparation of test solutions for water samples

When the test material is a sample of water, e.g. waste water, environmental water sample or an elutriate of solid material, the salinity of this sample shall be adjusted to the same salinity as the control medium by addition of appropriate amounts of the artificial sea water salts (5.1). Then add the nutrient salts as shown in Table 2 (5.2). Mix the water by aeration for a minimum of 16 h to stabilise the pH. Adjust, if necessary, the pH to $\pm 0,3$ of the pH value of the control medium by addition of hydrochloric acid or sodium hydroxide solution.

Prepare a geometric concentration series at least five concentrations of the test material by diluting the salinity adjusted and nutrient spiked water in control medium. If possible the concentrations shall be chosen to obtain several levels of inhibition ranging from less than 10 % to greater than 90 % inhibition of reproduction.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

7.5 Preparation of gametophyte suspension

Gametophyte was picked from tube and remove the water, measure the dry weight. The gametophyte suspension was made by using suitable homogenizer

NOTE The concentration of gametophyte suspension is 2 mg gametophyte dry weight per 1ml of OTT's medium.

7.6 Preparation of test and control cultures.

This experiment using 96well plate each concentration of testing solution and control culture use four wells. For the control culture transfer 150 μ l of control medium into each well. Testing solution in starting from lowest concentration to highest concentration

The decision on the number of replicates per concentration will depend on the purpose of the testing (e.g. effluent screening vs effluent compliance testing): Statistical confidence in the estimation of effects would be a reason for increasing the number of replicates per concentration or for considering an unequal replication approach, see ISO/TS 20281.

7.7 Incubation

The test well plates shall be covered with a lid to reduce evaporation. Incubate the test well plates for 30min under optimal conditions: temperature 15 °C \pm 2 °C and dark condition.

Measure temperature at least twice a day; however continuous temperature control is recommended.

Before a toxicity test is conducted with new test facilities, a performance test should be conducted, in which all test plates contain control medium to ensure analyst proficiency. The coefficient of variation

of effective quantum yield should be less than 10 %.

The protocol for the methods using the gametophyte chlorophyll fluorescence inhibition of *S. japonica* is summarized in Table 3.

Table 3 — Summary of test conditions and test acceptability criteria for the marine seaweed *Saccharina japonica*, gametophyte fluorescent inhibition toxicity tests

Parameters	Test conditions
Test type	static, non-renewal
Endpoint	chlorophyll fluorescence inhibition (EC ₅₀)
Test organism	<i>Saccharina japonica</i>
Test duration	1 h
Test temperature	15 °C ± 2 °C
Test salinity	25 psu - 35 psu (32 psu recommended)
Light condition	dark
Test vessel	96-well cell plate
Test solution volume	300 µl
Test specimen/well	22,500 gametophyte (each well 300 µl)
Dilution water	nutrient enriched artificial sea water
Renewal of test solution	none
Aeration	none
Culture media	nutrient enriched artificial sea water (OTT's medium)
Test concentrations	minimum 4+ control
Number of replicates per concentration	5 (depending on statistical analysis chosen)
Sample volume required	300 µl depending on test volume
Test acceptability criterion	> 50 % of chlorophyll fluorescence in control

7.8 Test duration

The test duration is 30minutes

7.9 Measurements and observation

The endpoint measured after 30 minutes of test *Saccharina* method are effective quantum yield. The measurement is initiated by switching on the measuring light, giving a measure of the F₀ (minimal) level of fluorescence. A saturating flash light was applied, allowing the measurement of F_m in the dark-adapted state. The effective quantum yield value is calculated by F_m and F₀ value. The effective

quantum yield is given by the equation.

$$\text{Effective quantum yield} = F_m - F_0 / F_m$$

8. Reference substance

Test with reference substance, mercury (CAS number 7439976) is required for quality assurance and to check the sensitivity of the alga.

9. Validity criteria

The mean effective quantum yield value in the control shall be at least 50 %.

10. Expression of results

10.1 Test results

Record fluorescent values of each replicate will be calculated for mean values and standard deviations. The coefficient of variation (CV), the standard deviation expressed as a percentage of the mean, should be calculated to estimate the precision and reproducibility of the experiments. Plotting concentration response curves is highly recommended to provide the basis for determining the EC_x values for the inhibition of chlorophyll fluorescence.

10.2 Determination of EC_x values

Apply a linear or non-linear regression model to the experimental data points by regression analysis. Determine EC_x values with their confidence intervals. Guidance on appropriate model given in ISO/TS 20281 and [20].

If the amount of data are too small or uncertain for regression analysis, or if it has an appearance of inhibitor the result will not follow a regular concentration response relation, then a graphical method may be applied by drawing a smooth eye fitted curve of the concentration response relationship and reading EC_x values from this graph.

10.3 Expression of results

The values calculated for EC_x [e.g. EC₂₀, EC₂₅ and/or EC₈₀] and the corresponding confidence intervals (95 %) and CVs are displayed with the required significant precision (digits).

The values should be given in terms of concentration (mg/ml) for tests with individual chemicals or as

percentage for effluent, elutriate or leachate test samples.

11. Test report

This test report shall contain at least the following information:

- a) the test method used, together with a reference to this International Standard (ISO/CD 13308);
- b) name of the laboratory performing the test;
- c) date and period of test;
- d) test organisms (e.g. scientific name, strain, source, holding conditions);
- e) test details;
 - culturing apparatus and incubation procedure;
 - culture types (static, unialgal etc.)
 - composition of medium;
 - preparation of test sample (e.g. pH, salinity of effluent sample) and treatments;
 - concentrations tested;
 - replicates per concentration;
 - number of gametophyte per replicate;
 - size of cell plates;
 - solution volume;
 - light intensity and quality;
 - pH of test solutions including the controls at start and end of test;
 - salinity;
 - temperature range during incubation;
 - method of measuring effective quantum yield value;
- f) results;
 - table outlining effective quantum yield value in each cell plate at each measuring point;
 - mean effective quantum yield value for each test concentration (and control) at each measuring point;
 - relationship between effective quantum yield value and concentration in table and graphical representation;
 - EC_x values with 95 % confidence intervals and the corresponding CVs values including the method of determination;

12. Data Sheet for *Saccharina* Toxicity Test

Test Date: _____ Test Species: _____

Sample Source: _____ Collection/Arrival Date: _____

Saccharina Source: _____

Test conditions: _____ (Dilution): _____

Test Cont.	Temp (°C)		Salinity (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
Control						

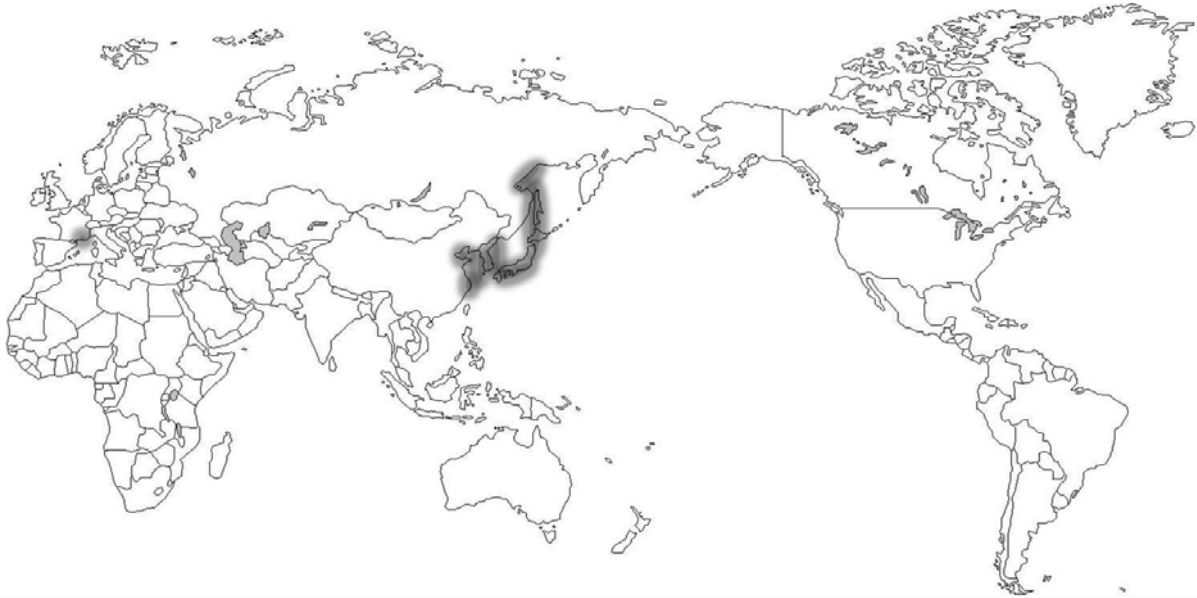
Test Result

Treatment/Replicate		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						
R2	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						
R3	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						
R4	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						

Annex E

(informative)

Geographic distribution of *Saccharina japonica* (Areschoug) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders



유럽: 프랑스

- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).

아시아: 대한민국, 러시아, 중국, 일본

- Tseng, C.K. (1984).
- Chapman, V.J. & Chapman, D.J. (1980).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Yoshida, T. (1998).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

Bibliography

- [1] Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. 1988. Inventaire bibliographique des macrophytes (Algues, Phanérogames) signalés dans l'Etang de Thau (Hérault, France). *Naturalia Monspel* 52, 71-84.
- [2] Chapman, V.J. & Chapman, D.J. 1980. *Seaweeds and their uses*. Chapman & Hall, London & New York.
- [3] Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology* 42, 493-512.
- [4] Lee, Y. & Kang, S. 2001. *A catalogue of the seaweeds in Korea*. Cheju National University Press, Jeju.
- [5] Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. 1992. Check-list of mediterranean seaweeds. I. Fucophyceae (Warming 1884). *Botanica Marina* 35, 109-130.
- [6] Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. 2007. Revision of the systematics of algae in the order Laminariales (Phaeophyta) from the Far-Eastern Seas of Russia on the basis of molecular-phylogenetic data. *Russian Journal of Marine Biology* 33, 278-289.
- [7] Tseng, C.K. 1984. *Common seaweeds of China*. Science Press, Beijing.
- [8] Verlaque, M. 2001. Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanologica Acta* 24, 29-49.
- [6] Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. 1990. Check-list of marine algae of Japan (revised in 1990). *Japanese Journal of Phycology* 38, 269-320.
- [9] Yoshida, T. 1998. *Marine algae of Japan*. Uchida Rokakuho Publishing Co. Ltd, Tokyo.

미역 포자 발아를 이용한 생태독성 평가 매뉴얼

1. 측정원리

본 시험방법은 해양생태계의 일차 생산자인 미역을 이용한 독성시험방법으로써 유해물질이 생태계의 일차생산자에 미치는 영향을 파악하는데 그 목적이 있다. 표준시험생물 종(species)은 갈조류인 미역 (*Undaria pinnatifida*)이다. 이 시험법은 액상물질에 노출된 미역 포자의 발아를 이용하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법으로 시험 대상 물질이 시험 기간 동안 유의하게 손상되거나 사라지지 않으며 해수에 잘 녹는 물질에 적용된다.

시험원리는 미역 포자를 다양한 농도의 시험 물질에 24시간과 노출시킨 후, 포자의 발아율은 유해물질의 독성을 평가하는 방법이다 (그림 1).

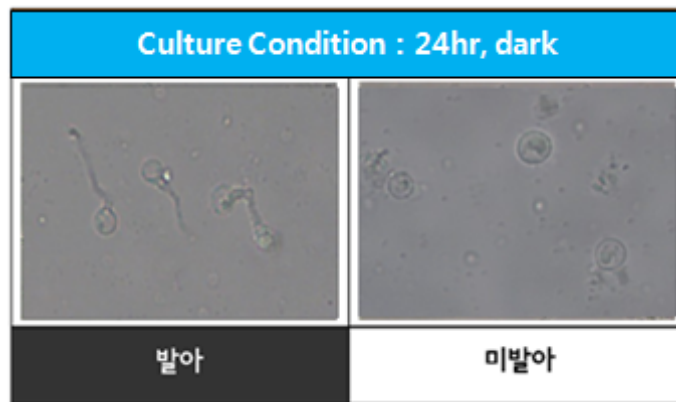


그림 1. 미역 포자의 발아율 독성평가 원리

2. 시험생물

2.1. 본 시험법의 표준시험생물은 해양성 갈조류인 미역 *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringer이다.

2.2. 해양성 갈조류인 미역은 대형의 조체로 발달하는 포자체가 저 수온기에 성장과 성숙을

하지만, 하절기의 고 수온기에는 소실되며, 미소한 배우체 세대로 여름을 넘기고, 수온의 저하와 함께 성숙하여 다음의 포자체 세대를 만든다.

2.3. 시험생물은 우리나라 연안역 조간대에서 연중 채집할 수 있으며, 양식산업의 발달로 연중 생물체 공급이 가능하다. 시험생물의 채집이 곤란할 경우 인천대학교 녹색환경과학센터에서 시험생물을 구할 수 있다. 시험생물은 본 실험 시작 1일전에 확보되어야 한다.

3. 기구 및 기기

- 3.1. 광학현미경 : 배율 100-400의 광학현미경을 사용하여 포자방출 유무 관찰
- 3.2. 영상 분석 장치 : 포자 발아율 측정
- 3.3. 배양기 : 독성시험 과정동안 일정한 온도를 유지할 수 있는 배양기 또는 배양실
- 3.4. 수질측정기 : 염분, 수온, pH를 측정
- 3.5. 초순수제조기
- 3.6. 교반기 또는 공기발생기
- 3.7. 플라스틱 수조 (10-20 L) : 시험생물(포자) 방출 유도시 사용
- 3.8. 페트리디쉬와 커버글라스: 시험생물 부착 유도시 사용
- 3.9. 24구 웰 플레이트

4. 시험생물준비

4.1. 배양 배지 제조 방법

4.1.1. 배양용액 및 시험물질 용액을 제조하는데 사용하는 희석수는 탈이온수를 사용하여야 한다. 시험 준비나 저장 기간 동안 희석수가 오염되지 않도록 특별히 주의하여야 하며, 본 시험에는 구리로 만든 도구나 기구는 사용할 수 없다.

4.1.2. 배양용액은 OTT's (1965) 인공해수를 만들어 사용한다 (OTT's 성분-표 1참조).

4.2. 시약 및 소모품

4.2.1. 투명용기(500 mL) - 시험용액을 보관하는데 사용하며, 이때 “구리” 성분이 함유되지 않은 용기를 사용한다.

4.2.2. 24구 웰 플레이트 - 시험생물 배양 용기로 사용한다(2.5 mL).

4.2.3. 시험 용액과 접촉하는 모든 기구는 유리 또는 화학적으로 불활성 재질이어야 한다.

4.2.4. 막여과 기구 - 평균 통과 직경 0.45 μm 여과지를 사용한다.

표 1. OTT's 인공해수의 주요 성분

주요 성분	농도 (g/L)
NaCl	21.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.00
KCl	0.80
NaBr	0.10
NaNO ₃	0.20
NaHCO ₃	0.20
H ₃ BO ₃	0.06
Na ₂ SIO ₃ ·9H ₂ O	0.01
Sr(NO ₃) ₂	0.03
Na ₂ HPO ₄	0.02

5. 시험방법

5.1. 농도구간설정

5.1.1. 시험 농도의 선택 : 시험할 물질의 농도는 보통 기하학적인 순열을 따라 그 비가 1.5에서 2.0 사이가 되게 한다. 예를 들면, 2 mg/L; 4 mg/L; 8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 64 mg/L;이며, 배출수 또는 액상 물질일 경우에는 0%, 6.25%, 12.5%, 25.0%, 50.0%, 100.0%로 한다. 가능하면, 농도는 10% 이하에서 90% 이상까지의 범위에서 여러 (4~5 구간) 수준의 포자방출이 이루어지도록 선택하여야 한다. 시험 농도 범위는 넓은 범위의 농도 구간을 포함하는 예비실험을 통하여 선택하는 것이 가장 좋다.

5.1.2. 대조구 : 모든 시험은 시험 대상 물질만 없고 배양 용액, 시험조건 및 과정이 동일한 음성대조군 (negative control)가 반드시 필요하다. 만약 시험에 운반체 (carrier)가 쓰이면, 운반체가 첨가된 운반체 대조구가 필요하다.

5.2. 시험 용액 준비

5.2.1. 시험 용액 준비 : 시험 용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 만든다. 일반적으로 시험은 pH를 조정하지 않고 수행하여야 한다. 하지만, 어떤 물질은 극단적인 산성이나 알칼리성에 의해 독성효과를 나타낼 수 있다. 이 경우 1 mol/L 염산이나 1 mol/L 수산화나트륨을 써서 pH를 8 ± 0.2 로 조절해야 한다.

5.3. 시험 생물 준비

5.3.1. 미역 엽체에서 미역귀 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척한다.

5.3.2. 미역귀 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관한다.

5.3.3. 미역귀를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도한다.

5.3.4. 유도된 포자액을 20mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 준다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼고, 항온배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양한다.

5.3.5. 포자가 부착된 커버글라스를 24웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 놓는다.

5.3.6. 배양 온도는 15°C 로 암배양 한다.

5.4. 배양방법

5.4.1. 배양 온도는 15°C 로 암배양 한다.

5.5. 측정방법

5.5.1. 실험 개시 후, 24시간이 경과하면 각 셀에서 핀셋으로 포자가 부착되어 있는 커버 글라스를 각 조건별로 꺼내어 한 개의 슬라이드 글라스 위에 40% 글리세놀로 고정한다.

5.5.2. 포자에서 관이 발생되었을 때를 “발아” 라고 정의하고, 관이 형성되어 있으면 발아되었다 그렇지 않으면 발아하지 않았는 것으로 판단한다. 광학현미경상에서 관찰되는 미역 포자는 현미경 콘덴서를 조절하여 사용하게 되면 발아관의 윤곽이 명확

해져서 흰색의 발아관을 검은색으로 관찰 할 수 있다.

5.5.3. 총 500개체의 발아정도를 개수하여 발아율을 판정하여 수질의 오염도를 평가한다. 발아율 계수 과정은 영상분석장치(Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 포자를 현미경시야의 위쪽에서 부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어진다.

5.5.4. 미역 독성시험 기록지에 실험 종료 일자와 측정 일자를 기록하고 각 시험용액 농도 별 포자 발아율을 기록한다.

5.6. 시험의 유효성 판정

본 시험법의 표준시험물질은 수은(7439-97-6, Junsei Co., Cu)이다. 수은을 이용한 EC₅₀ (48 h)은 0.027 mg/L이며, 최소 0.021 mg/L, 최대 0.032 mg/L 범위에서 유효하다.

5.7. 시험조건 요약

1. 시험형태:	비교환 정수배양
2. 광조사량:	0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
3. 광주기:	24h 암기
4. 시험온도:	15 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$
5. 염분:	35 psu
6. 시험용기:	24구 well 플레이트
7. 시험용액:	2.5 mL/replicate
8. 시험용액 교환:	교환하지 않음
9. 시험생물 크기:	지름 25 μm
10. 반복구당 시험생물 수	1 x 10 ⁶
11. 배양액:	배양용액 (조성표 참조-표 1)
12. 희석액:	배양용액
13. 평가 농도:	100, 50, 25, 12.5, 6.25%, 대조구 또는 정량농도 (예 mg/L)
14. 시험기간:	24시간
15. 측정요소	총 500개체당 발아한 개체수를 나타낸다.
16. 시험적합도 기준:	대조구의 평균 발아율은 87.40 \pm 1.37 %

5.8. 평가방법 모식도 (그림 2)



그림 2. 미역 포자발아율 독성평가방법

6. 자료분석

6.1. 자료정리

포자발아율은 개체당 발아된 수를 비율로 나타낸다.

6.2. 통계처리

미역 포자 발아를 이용한 독성시험의 측정값(endpoints)은 포자 발아에 대한 부정적인 효과에 기반을 두고 있다. 시험결과를 이용하여 무영향농도(NOEC) 및 포자 발아율 억제농도 (EC₅₀)와 신뢰구간을 계산한다. 무영향농도(NOEC) 값은 Dunnett 검정을 이용하여 구할 수 있다. EC₅₀ 값 추정과 NOEC 값 추정은 Toxcalc (version 5.0)과 같은 독성자료처리용 통계 프로그램을 사용한다.

7. 부록

7.1. 시험생물 배양기관

인천대학교 부설 녹색환경과학센터

인천광역시 연수구 송도동 7-46 인천대학교 미래관 201호
전화 : +82 32 850 5711-4 팩스 : +82 32 850 5717
홈페이지 : www.greenpioneer.co.kr

인천대학교 생물학과
인천광역시 연수구 송도동 12-1 인천대학교
전화 : +82 32 835 8245 팩스 : +82 32 850 0763
홈페이지 : www.bioincheon.or.kr

7.2 시험생물의 생리·생태적 특징

시험 종으로 Laminariales (다시마 목), Alariaceae (미역 과), *Undaria* (미역 속), *Undaria pinnatifida* (미역 종)를 사용하였다. 본 시험종 미역은 일년생 식물로 수심 1 내지 15 m 지역의 외양을 바라보고 있는 지역이나 외양 부근의 난류의 영향을 받는 지역의 암반이나 암초에 부착하여 서식한다. 10일간 평균 수온이 14℃를 넘으면 엽상체의 기저부에 형성된 포자엽의 포자낭으로부터 유주자가 방출되게 된다 (그림 3). 유주자의 방출은 수온이 23℃에 이르기까지 계속되는데 그 절정은 17℃에서 22℃사이이다. 방출된 유주자의 길이는 9 μm 이며 편모를 가져 운동성이 있다. 유주자는 해류를 따라 표류하며 부착할 만한 기질이 발견되면 착생한다. 유주자는 수온 24℃ 정도에서 싹트기 시작하여 배우체가 된다. 수온이 24℃를 넘게 되면 성장이 멈추고 고 수온에 견디기 위하여 세포벽이 두꺼운 휴면 배우체를 형성한다. 배우체는 현미경적 크기의 작은 세포로 수온이 20℃에서 성숙할 경우 유성 생식을 하게 되는데 일본 북부의 경우 9월경, 중부의 경우 10월경이다. 수컷의 배우체로부터 방출된 정충은 암컷의 배우체로부터 방출된 난을 수정시킨다. 수정된 알은 포자체로 발달하는데 포자체는 수온이 17℃보다 낮을 때 잘 자란다. 포자체는 겨울 기간 동안 빨리 자라서 식용 가능한 대형 엽상체를 형성한다. 봄이 되면 포자체는 유성 생식을 위한 배우체를 생산하기 위하여 엽상체 기저부에 형성된 포자엽에 포자낭을 만든다. 유주자를 방출한 포자체는 소멸되어 일년간의 생활사를 마감하게 된다.

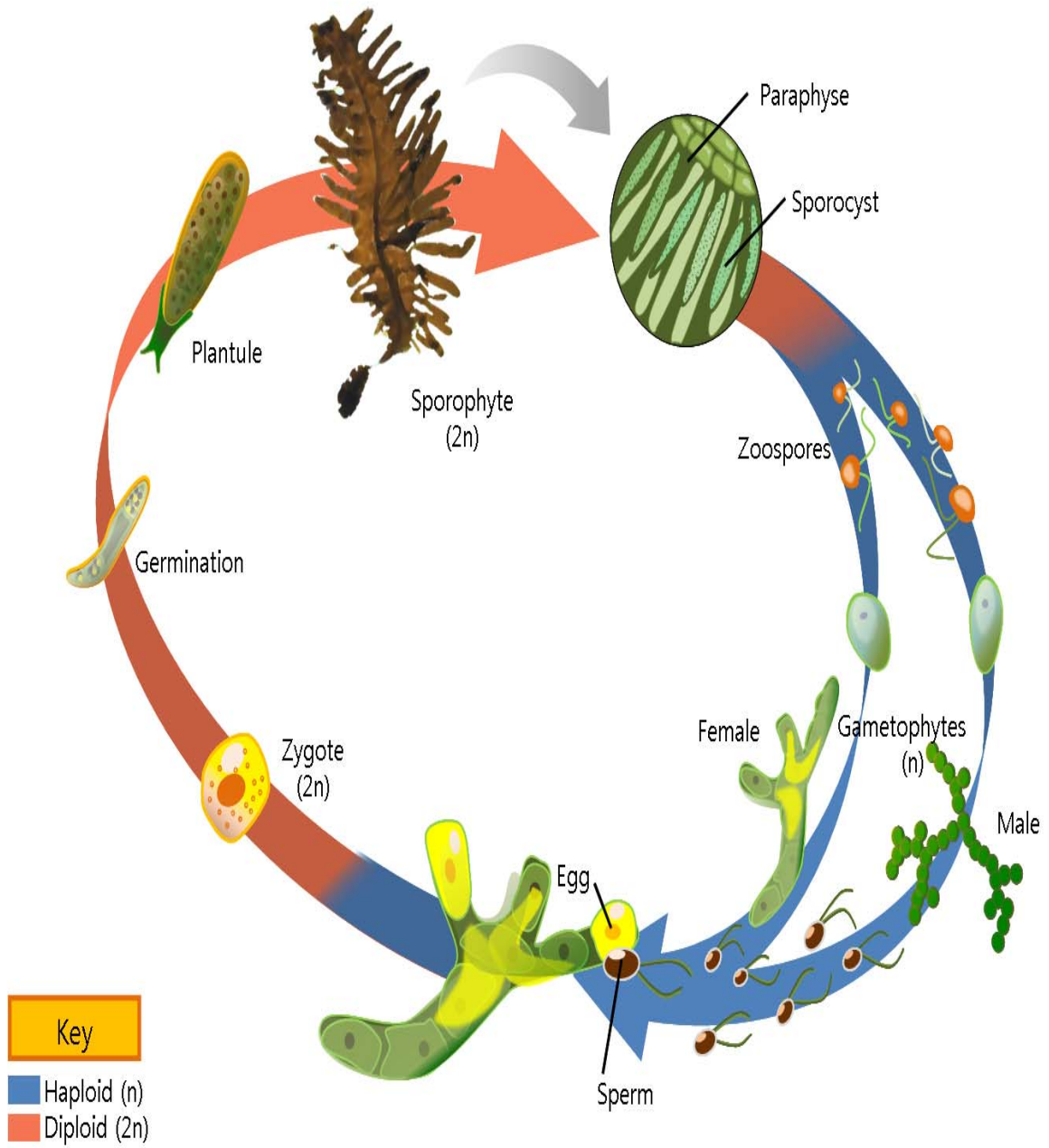


그림 3. 미역의 생활사

7.3. 시험에 영향을 주는 간접요인

시험에 영향을 주는 요인으로는 광선, 온도, 염분 등의 여러 가지 주요 환경인자에 대한 포자발아율의 차이를 들 수 있다.

7.4. 미역 독성시험 기록지

시험일자: _____ 시험생물명: _____

시험물질명: _____ 채취일자: _____

채집위치 및 방법: _____

보관시간: _____ (보관조건): _____

시험조건: _____ (희석수): _____

농도	온도 (°C)		염분 (‰)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
대조구 (control)						

시험결과 (단위: 개)

농도		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	전체 개체수						
	발아된 개체수						
R2	전체 개체수						
	발아된 개체수						
R3	전체 개체수						
	발아된 개체수						
R4	전체 개체수						
	발아된 개체수						

부속서 A
(참고)

미역(*Undaria pinnatifida*)의 지리적 분포



유럽: 네덜란드, 스페인, 아드리아 해, 영국, 이탈리아, 포르투갈, 프랑스

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scattolin, M. & Parisi, G. (1998).
- Fletcher, R.L. & Manfredi, C. (1995).
- Hardy, F.G. & Guiry, M.D. (2003).
- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I.(1991)
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. (2006).
- Dizerbo, A.H. & Herpe, E. (2007).
- Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. (1999).
- Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. (2007).
- Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. (2010).
- Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Bercibar, E., Tapia, P.D., Pereira,R.,Santos,R.&Pinto,I.S.(2009)..
- Peña, V. & Bárbara, I.(2002)

- Bárbara, I., Cremades, J. & Veiga, A.J. (2004).
- Bárbara, I., Cremades, J., Calvo, S., López-Rodríguez, M.C. & Dosil, J. (2005)
- Pena, V. & Bárbara, I. (2008).
- Jose C. Baez , Jesus Olicero , Cesar Peteiro , Francisco Ferri-Yanez , Carlos Garcia-soto , Raimundo real (2009)

북 아메리카 : 멕시코, 캘리포니아

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. (2004).

중앙 아메리카 : 멕시코

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. (2008)

남 아메리카 : 아르헨티나

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Casas, G., Scrosati, R. & Piriz, M.L. (2004).

아시아: 대한민국, 러시아, 일본, 중국

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Tseng, C.K. (1984).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. (1998).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Lee, Y. (2008).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

오세아니아: 뉴질랜드, 호주

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Hay, C.H. & Luckens, P.A. (1987).
- Adams, N.M. (1994).

Water quality — Toxicity test based on germination inhibition of the brown macroalga *Undaria pinnatifida*

Contents

	Page
Introduction.....	295
1 Scope.....	296
2 Normative references.....	296
3 Terms and definitions.....	296
4 Principle.....	297
5 Reagents and media.....	297
6 Apparatus.....	298
7 Procedure.....	299
7.1 Preparation of control medium.....	299
7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products.....	299
7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products.....	299
7.4 Preparation of test solution for assessment of water samples.....	300
7.5 Preparation of zoospores.....	300
7.6 Preparation of test and control cultures.....	300
7.7 Incubation.....	301
7.8 Test duration.....	302
7.9 Measurements and observations.....	302
8 Reference substance.....	303
9 Validity criteria.....	303
10 Expression of results.....	303
10.1 Test results.....	303
10.2 Determination of EC _x values.....	303
10.3 Expression of results.....	303
11 Test report.....	303
12 Data Sheet for <i>Undaria</i> Toxicity Test.....	305

Introduction

Undaria pinnatifida, commonly called Miyeok in Korea, is common edible brown seaweed plentiful on the shores of the Korean peninsula and Japanese isles and expanding along some regions of the coastlines of Australia and New Zealand. Coastal area the south of Korea peninsula is a perspective region for growth and cultivation of this brown alga. It is well known that the seaweed cultivation is based on the knowledge of their life histories. *Undaria* genus is one of the *Laminaria* kelps characterized by a heteromorphic life cycle, with an alternative between highly differentiated diploid sporophytes and microscopic haploid gametophytes. At maturity, the sporophytes release spores that germinate and grow into microscopic gametophytes, and the gametophytes become fertile to release sperms and eggs that join to form embryonic sporophytes. Gametophytes can be propagated vegetatively under controlled conditions as genetically "seeds" for breeding, and a new method of culturing sporelings by use of male and female gametophytes was developed. It is convenient to keep the selected *Undaria* parent gametophytes in stock culture which can be propagated quickly.

The proposed macroalgal toxicity test provides many practical advantages over other currently employed techniques. No specialist expertise is required. The test is cost and time-effective, since it only requires a cell plate, a small volume of water and takes a total of approximately 6 - 7 h to conduct around a 24 h incubation period (dark condition).

Water quality — Toxicity test based on germination inhibition of the brown macroalga *Undaria pinnatifida*

1. Scope

This International Standard specifies a method for the determination of the germination inhibition of brown alga (*Undaria pinnatifida*) to substances and mixtures contained in water, wastewater, environmental water samples and waste or sewage sludge elutriates.

2. Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/TS 20281, *Waterquality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*

3. Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

3.1

algal zoospore

the zoospores of the brown alga, *Undaria pinnatifida*

3.2

artificial sea water medium

mixture (adjusted at salinity: 35 psu) of distilled water and mineral salts

3.3

control medium

artificial sea water with nutrient salts used for stock culturing of the test alga, as medium in control cultures and dilution water in test cultures

3.4

effective concentration

EC_x

concentration of test sample which results in a reduction of x % in reproduction relative to the controls

3.5

extent of germination

percentage of germination(with germ tube production) and length of embryonic gametophyte

germination tubes.

4. Principle

The life cycle of *U.pinnatifida* consists of alternating asexual (sporophyte) and sexual (gametophyte) generations. Specialized blades of mature diploid sporophytes produce haploid zoospores that post-release, settle and germinate. This method provides step-by-step instructions for performing a 24-h day static non-renewal toxicity test using giant kelp to determine the toxicity of substances in marine and estuarine waters.

The zoospores swim through the test solution and eventually settle onto glass microscope slides. The settled spores germinate by extruding the cytoplasm of the spore through the germ-tube into the first gametophytic cell. This stage is often referred to as the "dumbbell" stage. The test endpoints measured after 24 hours is germination success.

5. Reagents and media

5.1 Artificial sea water

Prepare artificial sea water by adding the weighed chemicals according to Table 1 to the desired volume of distilled water for the growth medium and test compound solutions. Aerate the artificial sea water and adjust, if necessary, to pH $8,0 \pm 0,2$ with 1 mol HCl or 1 mol NaOH before use. Maximum storage time for the artificial sea water is 2 months.

Table 1 — Artificial sea water with a salinity of 35 psu (adopted from OTT 1965) [11]

Compounds	Quantity in g/l
NaCl	21
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	6
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	5
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	1
KCl	0,8
NaBr	0,1

5.2 Nutrients

Add the nutrient salts given in Table 2.

Table 2 — Nutrients

Compounds	Quantity in g/l
NaNO ₃	0,2
NaHCO ₃	0,2
H ₃ BO ₃	0,06
Na ₂ SiO ₃ • 9 H ₂ O	0,01
Na ₂ HPO ₄	0,02
Sr(NO ₃) ₂	0,03

5.3 Test organism

Undaria pinnatifida (Harvey) Suringer

NOTE The strain is available in unialgal, non-axenic plants from the following sources:

Institute of Green Environmental Research,
Mi-Rae Centre,
7-46 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone:+8232850 5711-4 Facsimile: +82 32 850 5717
Website:www.greenpioneer.co.kr

Department of Biology,
University of Incheon,
12-1 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone: +8232835 8245 Facsimile: +82 32 8350763
Website: www.bioincheon.or.kr

6. Apparatus

The test requires standard laboratory apparatus and the following.

6.1 Temperature-controlled cabinet or room, with a white fluorescent light, providing uniform illumination in accordance with the requirements specified in Table 3.

6.2 Light-meter, to be used to measure photon irradiance.

6.3 pH meter

6.4 Tweezers

6.5 Glassware, for the preparation of different concentration series and nutrient medium.

6.5.1 Volumetric flasks

6.5.2 Graduated cylinders

6.5.3 Pipettes

6.5.4 Petri dishes

6.6. Coverslip, for each test chamber to serve as the substratum upon which the zoospores will settle

6.7 Cell plates, for example 24-well cell plates with 2,5 mL per well.

6.8 Microscope (Image analysis system), for inspecting zoospores and embryonic gametophytes.

6.9 Hemacytometer (bright-line rbc), for measuring zoospore density.

6.10 Counter (two unit, 0-999), -for recording counts of zoospores.

7. Procedure

7.1 Preparation of control medium

Add the nutrients to artificial sea water as given in Table 2.

7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products

When the test material is a chemical or a chemical product a stock solution shall be prepared by dissolving the test material in control medium at an appropriate concentration.

Adjust the pH value of the stock solution to $\pm 0,3$ of the pH value of the medium in the control by adding hydrochloric acid or sodium hydroxide solution. No later adjustment is made.

NOTE *Undaria* generally has an arrow pH limit (between 7,5and8,5) for germination. Therefore, adjustment of pH is necessary when the pH of the sample is beyond these limits.

7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products

An appropriate test design should consist of a geometric series (the ratio between 1,5 and 2,0, e.g.

2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l, 32 mg/l, and 64 mg/l) of at least five concentrations exclusive of controls. The concentrations should be chosen to include one measured inhibition value below and one above the to be estimated or to have the expected EC50 to be bracketed.

NOTE A suitable concentration range is best determined by carrying out a preliminary range-finding test using test concentration with several orders of magnitude of difference.

If a solvent or carrier is used to dissolve or suspend the test sample, additional controls containing the solvent or carrier should also be included in the test to determine any effect of the solvent or carrier on the germination of the alga.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

7.4 Preparation of test solutions for water samples

When the test material is a sample of water, e.g. waste water, environmental water sample or an elutriate of solid material, the salinity of this sample shall be adjusted to the same salinity as the control medium by addition of appropriate amounts of the artificial sea water salts (5.1). Then add the nutrient salts as shown in Table 2 (5.2). Mix the water by aeration for a minimum of 16 h to stabilise the pH. Adjust, if necessary, the pH to $\pm 0,3$ of the pH value of the control medium by addition of hydrochloric acid or sodium hydroxide solution.

Prepare a geometric concentration series of at least five concentrations of the test material by diluting the salinity adjusted and nutrient spiked water in control medium. If possible the concentrations shall be chosen to obtain several levels of inhibition ranging from less than 10 % to greater than 90 % inhibition of reproduction.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

NOTE *Undaria pinnatifida* generally has no germination problems between 25 psu and 40 psu. However, adjustment of salinity is usually necessary so as the effect of temperature is not to be reflected in the test results.

7.5 Preparation of zoospores

To generate the initial bulk of spores, five randomly selected sori were rinsed with running tap water. Cleaned sorus materials were allowed to dry for 12 hours prior to meiospore release and placed in a 1000-mL glass vial containing 500 mL of filtered seawater. After 3 h, densities of spores in suspension were determined by counting the number of cells with a haemocytometer. Aliquots of 10 mL containing average densities of 3×10^3 spores were allowed to settle on round coverslips (12mm in diameter) in Petri dishes (50mm in diameter, 20mm high) each containing 10 mL of medium and the cultures were maintained in the dark for 3 h at a temperature of 10°C before being subjected to experimental treatments.

7.6 Preparation of test and control cultures

Transfer 2,5 mL of control medium to each of four wells on a 24 well cell plate. Starting with the

lowest concentration, transfer 2 mL of the test solutions to each of four wells on the cell plate.

Cover-slips bearing attached spores were distributed in each of the wells on the cell plate

The decision on the number of replicates per concentration will depend on the purpose of the testing (e.g. effluent screening vs effluent compliance testing): Statistical confidence in the estimation of effects would be a reason for increasing the number of replicates per concentration or for considering an unequal replication approach, see ISO/TS 20281.

7.7 Incubation

The test cell plates shall be covered with a lid to reduce evaporation. Incubate the test cell plates for 24 h under optimal conditions: temperature $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ and dark condition.

Measure temperature at least twice a day; however continuous temperature control is recommended.

Before a toxicity test is conducted with new test facilities, a performance test should be conducted, in which all test plates contain control medium to ensure analyst proficiency. The coefficient of variation of germination should be less than 10 %.

The protocol for the methods using the germination inhibition of *U. pinnatifida* is summarized in Table 3.

Table 3 — Summary of test conditions and test acceptability criteria for the marine seaweed *Undaria pinnatifida*, germination inhibition toxicity tests

Parameters	Test conditions
Test type	static, non-renewal
Endpoint	germination inhibition (EC ₅₀)
Test organism	<i>Undaria pinnatifida</i>
Test duration	24 h
Test temperature	15 °C ± 2 °C
Test salinity	25 psu - 35 psu (32 psu recommended)
Light condition	dark
Test vessel	24-well cell plate (Ø 15mm)
Test solution volume	2,5 mL
Test specimen/well	300 spores (settled on coverslip, Ø12mm)
Dilution water	nutrient enriched artificial sea water
Renewal of test solution	none
Aeration	none
Culture media	nutrient enriched artificial sea water
Test concentrations	minimum 4+ control
Number of replicates per concentration	5 (depending on statistical analysis chosen)
Sample volume required	50 mL to 100 mL depending on test volume
Test acceptability criterion	> 90 % of germination in control

7.8 Test duration

The test duration is 24 h.

7.9 Measurements and observation

The endpoints measured for the 24 hour *Undaria* method are percent germination success. Germination is considered successful if a germ-tube is present on the settled zoospore. Germination is considered to be unsuccessful if no germination tube is visible. To differentiate between a germinated and non-germinated zoospore, observe the settled zoospores at 400x magnification and determine whether they are circular (non-germinated) or have a protuberance that extends at least one spore diameter (about 5.0 µm) from the edge of the spore (germinated). Spores with a germination tubes are considered germinated.

The first 100 spores encountered while moving across the microscope slide are counted for each

replicate of each treatment.

8. Reference substance

Test with reference substance, mercury (CAS number 7439976) is required for quality assurance and to check the sensitivity of the alga.

9. Validity criteria

The mean reproductive percentage in the control shall be at least 80 %.

10. Expression of results

10.1 Test results

Record germination percentage values of each replicate, mean values and standard deviations. The coefficient of variation (CV), the standard deviation expressed as a percentage of the mean, should be calculated to estimate the precision and reproducibility of the tests.

Plotting concentration response curves is highly recommended to provide the basis for determining the EC_x values for the inhibition of reproduction.

10.2 Determination of EC_x values

Apply a linear or non-linear regression model to the experimental data points by regression analysis. Determine EC_x values with their confidence intervals. Guidance on appropriate model given in ISO/TS 20281 and [20].

If data are too few or uncertain for regression analysis, or if inhibitions appear not to follow a regular concentration response relation, then a graphical method may be applied by drawing a smooth eye fitted curve of the concentration response relationship and reading EC_x values from this graph.

10.3 Expression of results

The values calculated for EC_x [e.g. EC_{20} , EC_{25} and/or EC_{80}] and the corresponding confidence intervals (95 %) and CVs are displayed with the required significant precision (digits).

The values should be given as mg/l for tests with individual chemicals or as percentage for effluent, elutriate or leachate test samples.

11. Test report

This test report shall contain at least the following information:

- a) the test method used, together with a reference to this International Standard (ISO/CD 13308);
- b) name of the laboratory performing the test;
- c) date and period of test;
- d) test organisms (e.g. scientific name, strain, source, holding conditions);
- e) test details;
 - culturing apparatus and incubation procedure;
 - culture types (static, unialgal etc.)
 - composition of medium;
 - preparation of test sample (e.g. pH, salinity of effluent sample) and treatments;
 - concentrations tested;
 - replicates per concentration;
 - number of thallus disks per replicate;
 - size of cell plates;
 - solution volume;
 - light intensity and quality;
 - pH of test solutions including the controls at start and end of test;
 - salinity;
 - temperature range during incubation;
 - method of measuring reproduction percentage;
- f) results;
 - table outlining reproduction percentage in each cell plate at each measuring point;
 - mean reproduction percentage for each test concentration (and control) at each measuring point;
 - relationship between reproduction and concentration in table and graphical representation;
 - EC_x values with 95 % confidence intervals and the corresponding CVs values including the method of determination;

12. Data Sheet for *Undaria* Toxicity Test

Test Date: _____ Test Species: _____

Sample Source: _____ Collection/Arrival Date: _____

Undaria Source: _____

Test conditions: _____ (Dilution): _____

Test Cont.	Temp (°C)		Salinity (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
Control						

Test Result

Treatment/Replicate		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	Number of Spores Germ.						
	Number of Spores Not Germ.						
R2	Number of Spores Germ.						
	Number of Spores Not Germ.						
R3	Number of Spores Germ.						
	Number of Spores Not Germ.						
R4	Number of Spores Germ.						
	Number of Spores Not Germ.						

Annex E

(informative)

Geographic distribution of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringer



Europe: Adriatic, Britain, France, Italy, Netherlands, Portugal, Spain

- Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scattolin, M. & Parisi, G. (1998).
- Fletcher, R.L. & Manfredi, C. (1995).
- Hardy, F.G. & Guiry, M.D. (2003).
- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I.(1991)
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. (2006).
- Dizerbo, A.H. & Herpe, E. (2007).
- Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. (1999).
- Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. (2007).
- Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. (2010).
- Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Berecibar, E., Tapia, P.D., Pereira,R.,Santos,R.&Pinto,I.S.(2009)..
- Peña, V. & Bárbara, I.(2002)
- Bárbara, I.,Cremades,J.&Veiga,A.J.(2004).

- Bárbara, I., Cremades, J., Calvo, S., López-Rodríguez, M.C. & Dosil, J. (2005)
- Pena, V. & Bárbara, I. (2008).

North America: California, Mexico

- Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. (2004).

Central America: México(Pacific)

- Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. (2008)

South America: Argentina

- Casas, G., Scrosati, R. & Piriz, M.L. (2004).

Asia: China, Japan, Korea, Russia

- Tseng, C.K. (1984).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. (1998).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Lee, Y. (2008).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

Australia (Tasmania, Victoria) and New Zealand

- Hay, C.H. & Luckens, P.A. (1987).
- Adams, N.M. (1994).
- Adams, N.M. (1997).
- Nelson, W.A. (1999).
- Womersley, H.B.S. (2003).
- Schaffelke, B., Campbell, M.L. & Hewitt, C.L. (2005).
- Valentine, J.P. & Johnson, C.R. (2005).
- Sliwa, C., Johnson, C.R. & Hewitt, C.L. (2006).

Bibliography

- [1] Adams, N.M. 1994. Seaweeds of New Zealand. An Illustrated Guide. Canterbury University Press, Christchurch.
- [2] Adams, N.M. 1997. Common seaweeds of New Zealand. Canterbury University Press, Christchurch.
- [3] Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. 2004. First record of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta) on the Pacific coast of Mexico. *Botanica Marina* 47, 255-258.
- [4] Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Berecibar, E., Tapia, P.D., Pereira, R., Santos, R. & Pinto, I.S. 2009. Check list of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Botanica Marina* 52, 24-46.
- [5] Barber, J.T., Sharma, H.A., Ensley, H.E., Polito, M.A. & Thomas, D.A. 1995. Detoxification of phenol by the aquatic angiosperm, *Lemna gibba*. *Chemosphere* 31, 3567-3574.
- [6] Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. 1988. Inventaire bibliographique des macrophytes (Algues, Phanérogames) signalés dans l'Étang de Thau (Hérault, France). *Naturalia Monspel* 52, 71-84.
- [7] Casas, G., Scrosati, R., Piriz & M.L. 2004. The invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) reduces native seaweed diversity in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Biological Invasions* 6, 411-416.
- [8] Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scatolin, M. & Parisi, G. 1998. Distribution of introduced Japanese macroalgae *Undaria pinnatifida*, *Sargassum muticum* (Phaeophyta) and *Antithamnion pectinatum* (Rhodophyta) in the Lagoon of Venice. *Hydrobiologia* 385, 17-22.
- [9] Dizerbo, A.H. & Herpe, E. 2007. Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, Îles Normandes incluses. Editions Anaximandre 1, 315.
- [10] Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I. 1991. The Japanese brown alga *Undaria pinnatifida* on the coast of France and its possible establishment in European waters. *Journal du Conseil International Pour l'Exploration de la Mer* 47, 379-390.
- [11] Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. 1999. Catalogue of the benthic marine macroalgae of the Italian coast of the Adriatic Sea. *Bocconeia* 12, 1-214.
- [12] Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. 2010. Native and non-native species of hard substrata in the Dutch Wadden Sea. *Nederlandse faunistische Mededelingen* 33, 21-75.
- [13] Hardy, F.G. & Guiry, M.D. 2003. A check-list and atlas of the seaweeds of Britain and Ireland. British Phycological Society pp.x, 435.
- [14] Hay, C.H. & Luckens, P.A. 1987. The Asian kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta: Laminariales) found in a New Zealand harbour. *New Zealand Journal of Botany* 25, 329-332.
- [15] Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology* 42, 493-512.
- [16] Lee, Y. & Kang, S. 2001. A catalogue of the seaweeds in Korea. Cheju National University Press, Jeju.
- [17] Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. 1998. Taxonomy and morphology of *Undaria* (Alariaceae, Phaeophyta) in Korea. *Algae (The Korean Journal of Phycology)* 13, 427-446.
- [18] Nelson, W.A. 1999. A revised checklist of marine algae naturalised in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 37, 355-359.
- [19] Peña, V. & Bárbara, I. 2002. Caracterización florística y zonación de las algas bentónicas marinas del puerto de A Coruña (NO Península Ibérica). *Nova Acta Científica Compestelana*

(Biología) 12, 35-66.

- [20] Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. 1992. Check-list of mediterranean seaweeds. I. Fucophyceae (Warming 1884). *Botanica Marina* 35, 109-130.
- [21] Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. 2008. Catálogo de las algas bentónicas del Pacífico de México II. Phaeophycota pp. [i-viii], i-vi, 15-146.
- [22] Pena, V. & Bárbara, I. 2008. Biological importance of an Atlantic European maerl bed off Benencia Island (northwest Iberian Peninsula). *Botanica Marina* 51, 493-505.
- [23] Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. 2007. Revision of the systematics of algae in the order Laminariales (Phaeophyta) from the Far-Eastern Seas of Russia on the basis of molecular-phylogenetic data. *Russian Journal of Marine Biology* 33, 278-289.
- [24] Sliwa, C., Johnson, C.R. & Hewitt, C.L. 2006. Mesoscale dispersal of the introduced kelp *Undaria pinnatifida* attached to unstable substrata. *Botanica Marina* 49, 396-405.
- [25] Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. 2007. Zeewieren van de voormalige oesterputten bij Yerseke. *Gorteria* 32, 125-143.
- [26] Tseng, C.K. 1984. Common seaweeds of China. Science Press, Beijing.
- [27] Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. 2006. Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) deduced from mitochondria genes - origins and succession of introduced populations. *Phycologia* 45, 687-695.
- [28] Valentine, J.P. & Johnson, C.R. 2005. Persistence of sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*) barren on the east coast of Tasmania: inhibition of macroalgal recovery in the absence of high densities of sea urchins. *Botanica Marina* 48, 106-115.
- [29] Verlaque, M. 2001. Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanologica Acta* 24, 29-49.
- [30] Womersley, H.B.S. 2003. The marine benthic flora of southern Australia-Part III D Ceramiales-Delesseriaceae, Sarcomeniaceae, Rhodomelaceae. Australian Biological Resources Study & State Herbarium of South Australia, Canberra & Adelaide, pp. 533.
- [31] Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. 1990. Check-list of marine algae of Japan (revised in 1990). *Japanese Journal of Phycology* 38, 269-320.

미역 발아관 생장을 이용한 생태독성 평가 매뉴얼

1. 측정원리

본 시험방법은 해양생태계의 일차 생산자인 미역을 이용한 독성시험방법으로써 유해물질이 생태계의 일차생산자에 미치는 영향을 파악하는데 그 목적이 있다. 표준시험생물 종(species)은 갈조류인 미역 (*Undaria pinnatifida*)이다. 이 시험법은 액상물질에 노출된 미역 포자의 발아관 생장을 이용하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법으로 시험 대상 물질이 시험 기간 동안 유의하게 손상되거나 사라지지 않으며 해수에 잘 녹는 물질에 적용된다.

시험원리는 미역 포자를 다양한 농도의 시험 물질에 48시간 동안 노출시킨 후, 발아관 생장을 산정하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법이다 (그림 1).

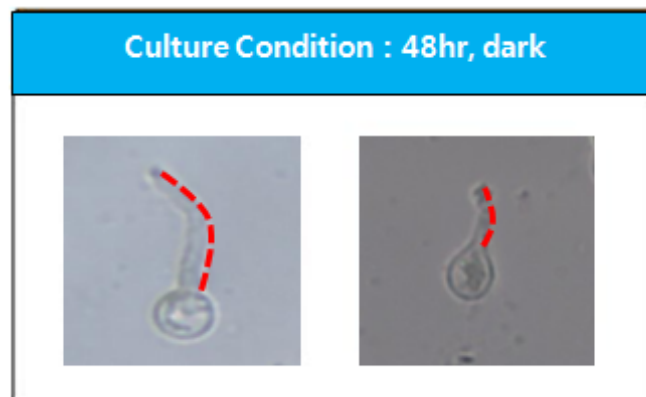


그림 1. 미역 발아관 생장률 독성시험법

2. 시험생물

2.1. 본 시험법의 표준시험생물은 해양성 갈조류인 미역 *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringer 이다.

2.2. 해양성 갈조류인 미역은 대형의 조체로 발달하는 포자체가 저 수온기에 성장과 성숙을 하지만, 하절기의 고 수온기에는 소실되며, 미소한 배우체 세대로 여름을 넘기고, 수온

의 저하와 함께 성숙하여 다음의 포자체 세대를 만든다.

- 2.3. 시험생물은 우리나라 연안역 조간대에서 연중 채집할 수 있으며, 양식산업의 발달로 연중 생물체 공급이 가능하다. 시험생물의 채집이 곤란할 경우 인천대학교 녹색환경과학센터에서 시험생물을 구할 수 있다. 시험생물은 본 실험 시작 1일전에 확보되어야 한다.

3. 기구 및 기기

- 3.1. 광학현미경 : 배율 100-400의 광학현미경을 사용하여 포자방출 유무를 관찰
- 3.2. 영상 분석 장치 : 포자 발아관 길이 측정에 사용
- 3.3. 배양기 : 독성시험 과정동안 일정한 온도를 유지할 수 있는 배양기 또는 배양실
- 3.4. 수질측정기 : 염분, 수온, pH를 측정
- 3.5. 초순수제조기
- 3.6. 교반기 또는 공기발생기
- 3.7. 플라스틱 수조 (10-20 L) : 시험생물(포자) 방출 유도시 사용
- 3.8. 페트리디쉬와 커버글라스: 시험생물 부착 유도시 사용
- 3.9. 24구 웰 플레이트

4. 시험생물준비

4.1. 배양 배지 제조 방법

- 4.1.1. 배양용액 및 시험물질 용액을 제조하는데 사용하는 희석수는 탈이온수를 사용하여야 한다. 시험 준비나 저장 기간 동안 희석수가 오염되지 않도록 특별히 주의하여야 하며, 본 시험에는 구리로 만든 도구나 기구는 사용할 수 없다.
- 4.1.2. 배양용액은 OTT's (1965) 인공해수를 만들어 사용한다 (OTT's 성분-표 1참조).

4.2. 시약 및 소모품

- 4.2.1. 투명용기(500 mL) - 시험용액을 보관하는데 사용하며, 이때 “구리” 성분이 함유되지 않은 용기를 사용한다.
- 4.2.2. 24구 웰 플레이트 - 시험생물 배양 용기로 사용한다(2.5 mL).

4.2.3. 시험 용액과 접촉하는 모든 기구는 유리 또는 화학적으로 불활성 재질이어야 한다.

4.2.4. 막여과 기구 - 평균 통과 직경 0.45 μm 여과지를 사용한다.

표 1. OTT's 인공해수의 주요 성분

주요 성분	농도 (g/L)
NaCl	21.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.00
KCl	0.80
NaBr	0.10
NaNO ₃	0.20
NaHCO ₃	0.20
H ₃ BO ₃	0.06
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	0.01
Sr(NO ₃) ₂	0.03
Na ₂ HPO ₄	0.02

5. 시험방법

5.1. 농도구간설정

5.1.1. 시험 농도의 선택 : 시험할 물질의 농도는 보통 기하학적인 순열을 따라 그 비가 1.5에서 2.0 사이가 되게 한다. 예를 들면, 2 mg/L; 4 mg/L; 8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 64 mg/L;이며, 배출수 또는 액상 물질일 경우에는 0%, 6.25%, 12.5%, 25.0%, 50.0%, 100.0%로 한다. 가능하면, 농도는 10% 이하에서 90% 이상까지의 범위에서 여러 (4~5 구간) 수준의 포자방출이 이루어지도록 선택하여야 한다. 시험 농도 범위는 넓은 범위의 농도 구간을 포함하는 예비실험을 통하여 선택하는 것이 가장 좋다.

5.1.2. 대조구 : 모든 시험은 시험 대상 물질만 없고 배양 용액, 시험조건 및 과정이 동일

한 음성대조군 (negative control)가 반드시 필요하다. 만약 시험에 운반체 (carrier)가 쓰이면, 운반체가 첨가된 운반체 대조구가 필요하다.

5.2. 시험 용액 준비

5.2.1. 시험 용액 준비 : 시험 용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 만든다. 일반적으로 시험은 pH를 조정하지 않고 수행하여야 한다. 하지만, 어떤 물질은 극단적인 산성이나 알칼리성에 의해 독성효과를 나타낼 수 있다. 이 경우 1 mol/L 염산이나 1 mol/L 수산화나트륨을 써서 pH를 8 ± 0.2 로 조절해야 한다.

5.3. 시험 생물 준비

5.3.1. 미역 업체에서 미역귀 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척한다.

5.3.2. 미역귀 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관한다.

5.3.3. 미역귀를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도한다.

5.3.4. 유도된 포자액을 20mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 준다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼고, 항온배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양한다.

5.3.5. 포자가 부착된 커버글라스를 24웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 놓는다.

5.3.6. 배양 온도는 15°C 로 암배양 한다.

5.4. 배양방법

5.4.1. 배양 온도는 15°C 로 암배양 한다.

5.5. 측정방법

5.5.1. 실험 개시 후, 48시간이 경과하면 각 셀에서 핀셋으로 포자가 부착되어 있는 커버글라스를 각 조건별로 꺼내어 한 개의 슬라이드 글라스 위에 40% 글리세놀로 고정한다.

5.5.2. 포자에서 관이 발생되었을 때 그 길이를 측정한다. 광학현미경상에서 관찰되는 미역 포자는 현미경 콘덴서를 조절하여 사용하게 되면 발아관의 윤곽이 명확해져서 흰색의 발아관을 검은색으로 관찰 할 수 있다.

5.5.3. 총 10개체의 발아정도를 개수하여 발아율을 판정하여 수질의 오염도를 평가한다. 발아관 길이 측정 과정은 영상분석장치(Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 포자를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어진다.

5.5.4. 미역 독성시험 기록지에 실험 종료 일자와 측정 일자를 기록하고 각 시험용액 농도별 포자 발아관 길이를 기록한다.

5.6. 시험의 유효성 판정

본 시험법의 표준시험물질은 수은(7439-97-6, Junsei Co., Cu)이다. 수은을 이용한 EC₅₀ (48 h)은 0.016 mg/L이며, 최소 0.014 mg/L, 최대 0.020 mg/L 범위에서 유효하다.

5.7. 시험조건 요약

1. 시험형태:	비교환 정수배양
2. 광조사량:	0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
3. 광주기:	24h 암기
4. 시험온도:	15 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$
5. 염분:	35 psu
6. 시험용기:	24구 웰 플레이트
7. 시험용액:	2.5 mL/replicate
8. 시험용액 교환:	교환하지 않음
9. 시험생물 크기:	지름 25 μm
10. 반복구당 시험생물 수	1 x 10 ⁶
11. 배양액:	배양용액 (조성표 참조-표 1)
12. 희석액:	배양용액
13. 평가 농도:	100, 50, 25, 12.5, 6.25%, 대조구 또는 정량농도 (예 mg/L)
14. 시험기간:	48시간
15. 측정요소	총 10개체의 발아관 길이
16. 시험적합도 기준:	대조구의 평균 발아관 길이는 25.77 \pm 1.91 μm

5.8. 평가방법 모식도 (그림 2)

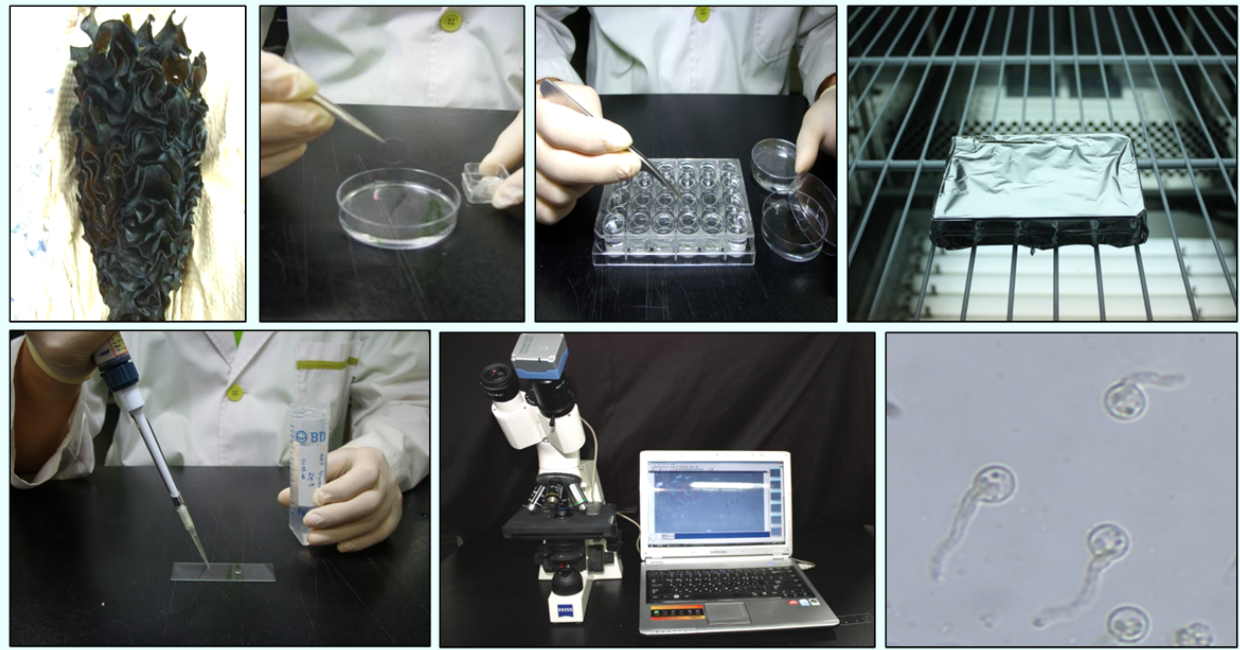


그림 2. 미역 발아관 성장 독성평가방법

6. 자료분석

6.1. 자료정리

포자발아관 길이는 개체당 발아관 길이를 대조군 대비 비율로 나타낸다.

6.2. 통계처리

미역 포자 발아관 성장을 이용한 독성시험의 측정값(endpoints)은 포자 발아에 대한 부정적인 효과에 기반을 두고 있다. 시험결과를 이용하여 무영향농도(NOEC) 및 포자 발아관 길이 성장 억제농도 (EC₅₀)와 신뢰구간을 계산한다. 무영향농도(NOEC) 값은 Dunnett 검정을 이용하여 구할 수 있다. EC₅₀ 값 추정과 NOEC 값 추정은 Toxcalc (version 5.0)과 같은 독성자료처리용 통계 프로그램을 사용한다.

7. 부록

7.1. 시험생물 배양기관

7.1. 시험생물 배양기관

인천대학교 부설 녹색환경과학센터

인천광역시 연수구 송도동 7-46 인천대학교 미래관 201호
전화 : +82 32 850 5711-4 팩스 : +82 32 850 5717
홈페이지 : www.greenpioneer.co.kr

인천대학교 생물학과
인천광역시 연수구 송도동 12-1 인천대학교
전화 : +82 32 835 8245 팩스 : +82 32 850 0763
홈페이지 : www.bioincheon.or.kr

7.2 시험생물의 생리·생태적 특징

시험 종으로 Laminariales (다시마 목), Alariaceae (미역 과), *Undaria* (미역 속), *Undaria pinnatifida* (미역 종)를 사용하였다. 본 시험종 미역은 일년생 식물로 수심 1 내지 15 m 지역의 외양을 바라보고 있는 지역이나 외양 부근의 난류의 영향을 받는 지역의 암반이나 암초에 부착하여 서식한다. 10일간 평균 수온이 14℃를 넘으면 엽상체의 기저부에 형성된 포자엽의 포자낭으로부터 유주자가 방출되게 된다 (그림 3). 유주자의 방출은 수온이 23℃에 이르기까지 계속되는데 그 절정은 17℃에서 22℃사이이다. 방출된 유주자의 길이는 9 μm 이며 편모를 가져 운동성이 있다. 유주자는 해류를 따라 표류하며 부착할 만한 기질이 발견되면 착생한다. 유주자는 수온 24℃ 정도에서 싹트기 시작하여 배우체가 된다. 수온이 24℃를 넘게 되면 성장이 멈추고 고 수온에 견디기 위하여 세포벽이 두꺼운 휴면 배우체를 형성한다. 배우체는 현미경적 크기의 작은 세포로 수온이 20℃에서 성숙할 경우 유성 생식을 하게 되는데 일본 북부의 경우 9월경, 중부의 경우 10월경이다. 수컷의 배우체로부터 방출된 정충은 암컷의 배우체로부터 방출된 난을 수정시킨다. 수정된 알은 포자체로 발달하는데 포자체는 수온이 17℃보다 낮을 때 잘 자란다. 포자체는 겨울 기간 동안 빨리 자라서 식용 가능한 대형 엽상체를 형성한다. 봄이 되면 포자체는 유성 생식을 위한 배우체를 생산하기 위하여 엽상체 기저부에 형성된 포자엽에 포자낭을 만든다. 유주자를 방출한 포자체는 소멸되어 일년간의 생활사를 마감하게 된다.

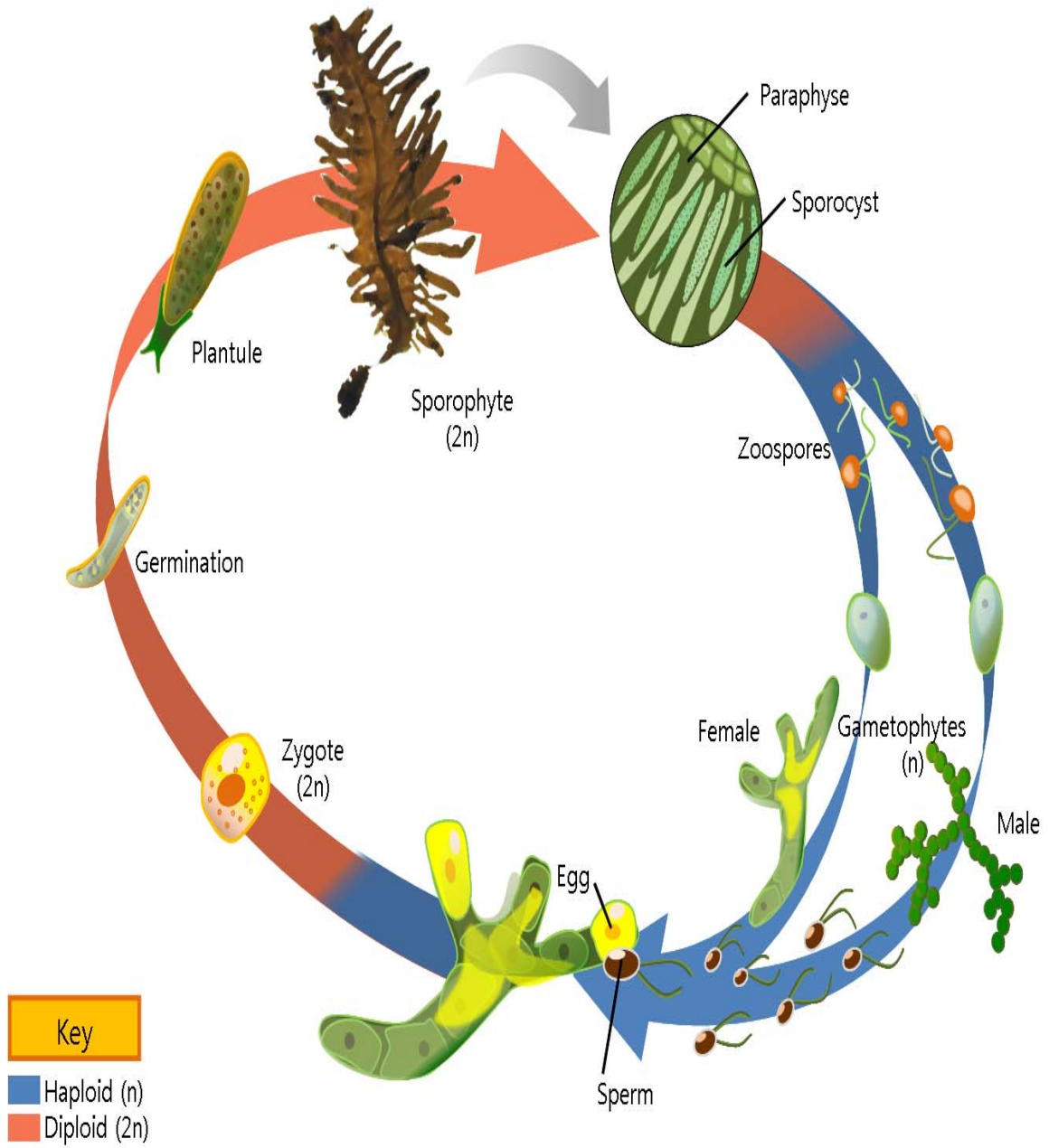


그림 3. 미역의 생활사

7.3. 시험에 영향을 주는 간접요인

시험에 영향을 주는 요인으로는 광선, 온도, 염분 등의 여러 가지 주요 환경인자에 대한 포자발아관 길이 생장의 차이를 들 수 있다.

7.4. 미역 독성시험 기록지

시험일자: _____ 시험생물명: _____
 시험물질명: _____ 채취일자: _____
 채집위치 및 방법: _____
 보관시간: _____ (보관조건): _____
 시험조건: _____ (회석수): _____

농도	온도 (° C)		염분 (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
대조구 (control)						

시험결과 (단위: μm)

농도		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	발아관 길이	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					
R2	발아관 길이	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					
R3	발아관 길이	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					
R4	발아관 길이	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					

부속서 A
(참고)

미역(*Undaria pinnatifida*)의 지리적 분포



유럽: 네덜란드, 스페인, 아드리아 해, 영국, 이탈리아, 포르투갈, 프랑스

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scattolin, M. & Parisi, G. (1998).
- Fletcher, R.L. & Manfredi, C. (1995).
- Hardy, F.G. & Guiry, M.D. (2003).
- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I.(1991)
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. (2006).
- Dizerbo, A.H. & Herpe, E. (2007).
- Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. (1999).
- Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. (2007).
- Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. (2010).
- Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Bercibar, E., Tapia, P.D., Pereira,R.,Santos,R.&Pinto,I.S.(2009)..
- Peña, V. & Bárbara, I.(2002)

- Bárbara, I., Cremades, J. & Veiga, A. J. (2004).
- Bárbara, I., Cremades, J., Calvo, S., López-Rodríguez, M. C. & Dosil, J. (2005)
- Pena, V. & Bárbara, I. (2008).
- Jose C. Baez , Jesus Olicero , Cesar Peteiro , Francisco Ferri-Yanez , Carlos Garcia-soto , Raimundo real (2009)

북 아메리카 : 멕시코, 캘리포니아

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. (2004).

중앙 아메리카 : 멕시코

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. (2008)

남 아메리카 : 아르헨티나

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Casas, G., Scrosati, R. & Piriz, M.L. (2004).

아시아: 대한민국, 러시아, 일본, 중국

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Tseng, C.K. (1984).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. (1998).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Lee, Y. (2008).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

오세아니아: 뉴질랜드, 호주

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Hay, C.H. & Luckens, P.A. (1987).
- Adams, N.M. (1994).

Water quality — Toxicity test based on germ-tube length inhibition of the brown macroalga *Undaria pinnatifida*

Contents

	Page
Introduction.....	323
1 Scope.....	324
2 Normative references.....	324
3 Terms and definitions.....	324
4 Principle.....	325
5 Reagents and media.....	325
6 Apparatus.....	326
7 Procedure.....	327
7.1 Preparation of control medium.....	327
7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products.....	327
7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products.....	327
7.4 Preparation of test solution for assessment of water samples.....	328
7.5 Preparation of zoospores.....	328
7.6 Preparation of test and control cultures.....	328
7.7 Incubation.....	329
7.8 Test duration.....	330
7.9 Measurements and observations.....	330
8 Reference substance.....	330
9 Validity criteria.....	331
10 Expression of results.....	331
10.1 Test results.....	331
10.2 Determination of EC _x values.....	331
10.3 Expression of results.....	331
11 Test report.....	331
12 Data Sheet for <i>Undaria</i> Toxicity Test.....	333

Introduction

Undaria pinnatifida, commonly called Miyeok in Korea, is common edible brown seaweed plentiful on the shores of the Korean peninsula and Japanese isles and expanding along some regions of the coastlines of Australia and New Zealand. Coastal area the south of the Korea peninsula is a perspective region for growth and cultivation of this brown alga. It is well known that the seaweed cultivation is based on the knowledge of their life histories. *Undaria* genus is one of the *Laminaria* kelps characterized by a heteromorphic life cycle, with an alternative between highly differentiated diploid sporophytes and microscopic haploid gametophytes. At maturity, the sporophytes release spores that germinate and grow into microscopic gametophytes, and the gametophytes become fertile to release sperms and eggs that join to form embryonic sporophytes. Gametophytes can be propagated vegetatively under controlled conditions as genetically “seeds” for breeding, and a new method of culturing sporelings by use of male and female gametophytes was developed. It is convenient to keep the selected *Undaria* parent gametophytes in stock culture which can be propagated quickly.

The proposed macroalgal toxicity test provides many practical advantages over other currently employed techniques. No specialist expertise is required. The test is cost and time-effective, since it only requires a cell plate, a small volume of water and takes a total of approximately 6 - 7 h to conduct around a 48 h incubation period (dark condition).

Water quality — Toxicity test based on germ-tube length inhibition of the brown macroalga *Undaria pinnatifida*

1. Scope

This International Standard specifies a method for the determination of the germ-tube length inhibition of brown alga (*Undaria pinnatifida*) to substances and mixtures contained in water, wastewater, environmental water samples and waste or sewage sludge elutriates.

2. Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/TS 20281, *Waterquality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*

3. Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

3.1

algal zoospore

the zoospores of the brown alga, *Undaria pinnatifida*

3.2

artificial sea water medium

mixture (adjusted at salinity: 35 psu) of distilled water and mineral salts

3.3

control medium

artificial sea water with nutrient salts used for stock culturing of the test alga, as medium in control cultures and dilution water in test cultures

3.4

effective concentration

EC_x

concentration of test sample which results in a reduction of x % in reproduction relative to the controls

3.5

extent of germination

percentage of germination (with germ tube production) and length of embryonic gametophyte

germination tubes.

4. Principle

The life cycle of *U.pinnatifida* consists of alternating asexual (sporophyte) and sexual (gametophyte) generations. Specialized blades of mature diploid sporophytes produce haploid zoospores that post-release, settle and germinate. This method provides step-by-step instructions for performing a 48-h day static non-renewal toxicity test using giant kelp to determine the toxicity of substances in marine and estuarine waters.

The zoospores swim through the test solution and eventually settle onto glass microscope slides. The settled spores germinate by extruding the cytoplasm of the spore through the germ-tube into the first gametophytic cell. This stage is often referred to as the "dumbbell" stage. The test endpoints measured after 48 hours is germ-tube length.

5. Reagents and media

5.1 Artificial sea water

Prepare artificial sea water by adding the weighed chemicals according to Table 1 to the desired volume of distilled water for the growth medium and test compound solutions. Aerate the artificial sea water and adjust, if necessary, to pH $8,0 \pm 0,2$ with 1 mol HCl or 1 mol NaOH before use. Maximum storage time for the artificial sea water is 2 months.

Table 1 — Artificial sea water with a salinity of 35 psu (adopted from OTT 1965) [11]

Compounds	Quantity in g/l
NaCl	21
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	6
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	5
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	1
KCl	0,8
NaBr	0,1

5.2 Nutrients

Add the nutrient salts given in Table 2.

Table 2 — Nutrients

Compounds	Quantity in g/l
NaNO ₃	0,2
NaHCO ₃	0,2
H ₃ BO ₃	0,06
Na ₂ SiO ₃ • 9 H ₂ O	0,01
Na ₂ HPO ₄	0,02
Sr(NO ₃) ₂	0,03

5.3 Test organism

Undaria pinnatifida (Harvey) Suringer

NOTE The strain is available in unialgal, non-axenic plants from the following sources:

Institute of Green Environmental Research,
Mi-Rae Centre,
7-46 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone:+8232850 5711-4 Facsimile: +82 32 850 5717
Website:www.greenpioneer.co.kr

Department of Biology,
University of Incheon,
12-1 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone: +8232835 8245 Facsimile: +82 32 8350763
Website: www.bioincheon.or.kr

6. Apparatus

The test requires standard laboratory apparatus and the following.

6.1 Temperature-controlled cabinet or room, with a white fluorescent light, providing uniform illumination in accordance with the requirements specified in Table 3.

6.2 Light-meter, to be used to measure photon irradiance.

6.3 pH meter

6.4 Tweezers

6.5 Glassware, for the preparation of different concentration series and nutrient medium.

6.5.1 Volumetric flasks

6.5.2 Graduated cylinders

6.5.3 Pipettes

6.5.4 Petri dishes

6.6. Coverslip, for each test chamber to serve as the substratum upon which the zoospores will settle

6.7 Cell plates, for example 24-well cell plates with 2,5 mL per well.

6.8 Microscope (Image analysis system), for measuring germ-tube length

6.9 Hemacytometer (bright-line rbc), for measuring zoospore density.

7. Procedure

7.1 Preparation of control medium

Add the nutrients to artificial sea water as given in Table 2.

7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products

When the test material is a chemical or a chemical product a stock solution shall be prepared by dissolving the test material in control medium at an appropriate concentration.

Adjust the pH value of the stock solution to $\pm 0,3$ of the pH value of the medium in the control by adding hydrochloric acid or sodium hydroxide solution. No later adjustment is made.

NOTE *Undaria* generally has an arrow pH limit (between 7,5and8,5) for germination. Therefore, adjustment of pH is necessary when the pH of the sample is beyond these limits.

7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products

An appropriate test design should consist of a geometric series (the ratio between 1,5 and 2,0, e.g. 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l, 32 mg/l, and 64 mg/l) of at least five concentrations exclusive of controls. The concentrations should be chosen to include one measured inhibition value below and

one above the to be estimated or to have the expected EC50 to be bracketed.

NOTE A suitable concentration range is best determined by carrying out a preliminary range-finding test using test concentration with several orders of magnitude of difference.

If a solvent or carrier is used to dissolve or suspend the test sample, additional controls containing the solvent or carrier should also be included in the test to determine any effect of the solvent or carrier on the germination of the alga.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

7.4 Preparation of test solutions for water samples

When the test material is a sample of water, e.g. waste water, environmental water sample or an elutriate of solid material, the salinity of this sample shall be adjusted to the same salinity as the control medium by addition of appropriate amounts of the artificial sea water salts (5.1). Then add the nutrient salts as shown in Table 2 (5.2). Mix the water by aeration for a minimum of 16 h to stabilise the pH. Adjust, if necessary, the pH to $\pm 0,3$ of the pH value of the control medium by addition of hydrochloric acid or sodium hydroxide solution.

Prepare a geometric concentration series of at least five concentrations of the test material by diluting the salinity adjusted and nutrient spiked water in control medium. If possible the concentrations shall be chosen to obtain several levels of inhibition ranging from less than 10 % to greater than 90 % inhibition of reproduction.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

NOTE *Undaria pinnatifida* generally has no germ-tube length problems between 25 psu and 40 psu. However, adjustment of salinity is usually necessary so as the effect of temperature is not to be reflected in the test results.

7.5 Preparation of zoospores

To generate the initial bulk of spores, five randomly selected sori were rinsed with running tap water. Cleaned sorus materials were allowed to dry for 12 hours prior to meiospore release and placed in a 1000-mL glass vial containing 500 mL of filtered seawater. After 3 h, densities of spores in suspension were determined by counting the number of cells with a haemocytometer. Aliquots of 10 mL containing average densities of 3×10^3 spores were allowed to settle on round coverslips (12mm in diameter) in Petri dishes (50mm in diameter, 20mm high) each containing 10 mL of medium and the cultures were maintained in the dark for 3 h at a temperature of 10°C before being subjected to experimental treatments.

7.6 Preparation of test and control cultures

Transfer 2,5 mL of control medium to each of four wells on a 24 well cell plate. Starting with the lowest concentration, transfer 2 mL of the test solutions to each of four wells on the cell plate.

Cover-slips bearing attached spores were distributed in each of the wells on the cell plate

The decision on the number of replicates per concentration will depend on the purpose of the testing (e.g. effluent screening vs effluent compliance testing): Statistical confidence in the estimation of effects would be a reason for increasing the number of replicates per concentration or for considering an unequal replication approach, see ISO/TS 20281.

7.7 Incubation

The test cell plates shall be covered with a lid to reduce evaporation. Incubate the test cell plates for 24 h under optimal conditions: temperature $15\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ and dark condition.

Measure temperature at least twice a day; however continuous temperature control is recommended.

Before a toxicity test is conducted with new test facilities, a performance test should be conducted, in which all test plates contain control medium to ensure analyst proficiency. The coefficient of variation of germ-tube length should be less than 10 %.

The protocol for the methods using the germination inhibition of *U.pinnatifida* is summarized in Table 3.

Table 3 — Summary of test conditions and test acceptability criteria for the marine seaweed *Undaria pinnatifida*, germination inhibition toxicity tests

Parameters	Test conditions
Test type	static, non-renewal
Endpoint	germ-tube length inhibition (EC ₅₀)
Test organism	<i>Undaria pinnatifida</i>
Test duration	48 h
Test temperature	15 °C ± 2 °C
Test salinity	25 psu - 35 psu (32 psu recommended)
Light condition	dark
Test vessel	24-well cell plate (Ø 15mm)
Test solution volume	2,5 mL
Test specimen/well	300 spores (settled on coverslip, Ø12mm)
Dilution water	nutrient enriched artificial sea water
Renewal of test solution	none
Aeration	none
Culture media	nutrient enriched artificial sea water
Test concentrations	minimum 4+ control
Number of replicates per concentration	10 (depending on statistical analysis chosen)
Sample volume required	50 mL to 100 mL depending on test volume
Test acceptability criterion	> 90 % of germ-tube length in control

7.8 Test duration

The test duration is 48 h.

7.9 Measurements and observation

The endpoints measured for the 48 hour *Undaria* method are presented in the germ-tube length. The Germ-tube length value has considered the inhibition to the growth of the germ-tube length. To check the differences in the tube lengths of the spores, we observed the settled zoospores at 400x magnification and determined the germ-tube length. 10 spores were randomly chosen and were measured.

8. Reference substance

Test with reference substance, mercury (CAS number 7439976) is required for quality assurance and to check the sensitivity of the alga.

9. Validity criteria

The mean reproductive percentage in the control shall be at least 80 %.

10. Expression of results

10.1 Test results

Record germination percentage values of each replicate, mean values and standard deviations. The coefficient of variation (CV), the standard deviation expressed as a percentage of the mean, should be calculated to estimate the precision and reproducibility of the tests.

Plotting concentration response curves is highly recommended to provide the basis for determining the EC_x values for the inhibition of reproduction.

10.2 Determination of EC_x values

Apply a linear or non-linear regression model to the experimental data points by regression analysis. Determine EC_x values with their confidence intervals. Guidance on appropriate model given in ISO/TS 20281 and [20].

If data are too few or uncertain for regression analysis, or if inhibitions appear not to follow a regular concentration response relation, then a graphical method may be applied by drawing a smooth eye fitted curve of the concentration response relationship and reading EC_x values from this graph.

10.3 Expression of results

The values calculated for EC_x [e.g. EC_{20} , EC_{25} and/or EC_{80}] and the corresponding confidence intervals (95 %) and CVs are displayed with the required significant precision (digits).

The values should be given as mg/l for tests with individual chemicals or as percentage for effluent, elutriate or leachate test samples.

11. Test report

This test report shall contain at least the following information:

- a) the test method used, together with a reference to this International Standard (ISO/CD 13308);
- b) name of the laboratory performing the test;
- c) date and period of test;

- d) test organisms (e.g. scientific name, strain, source, holding conditions);
- e) test details;
 - culturing apparatus and incubation procedure;
 - culture types (static, unialgal etc.)
 - composition of medium;
 - preparation of test sample (e.g. pH, salinity of effluent sample) and treatments;
 - concentrations tested;
 - replicates per concentration;
 - number of thallus disks per replicate;
 - size of cell plates;
 - solution volume;
 - light intensity and quality;
 - pH of test solutions including the controls at start and end of test;
 - salinity;
 - temperature range during incubation;
 - method of measuring reproduction percentage;
- f) results;
 - table outlining reproduction percentage in each cell plate at each measuring point;
 - mean reproduction percentage for each test concentration (and control) at each measuring point;
 - relationship between reproduction and concentration in table and graphical representation;
 - EC_x values with 95 % confidence intervals and the corresponding CVs values including the method of determination;

12. Data Sheet for *Undaria* Toxicity Test

Test Date: _____ Test Species: _____

Sample Source: _____ Collection/Arrival Date: _____

Undaria Source: _____

Test conditions: _____ (Dilution): _____

Test Cont.	Temp (°C)		Salinity (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
Control						

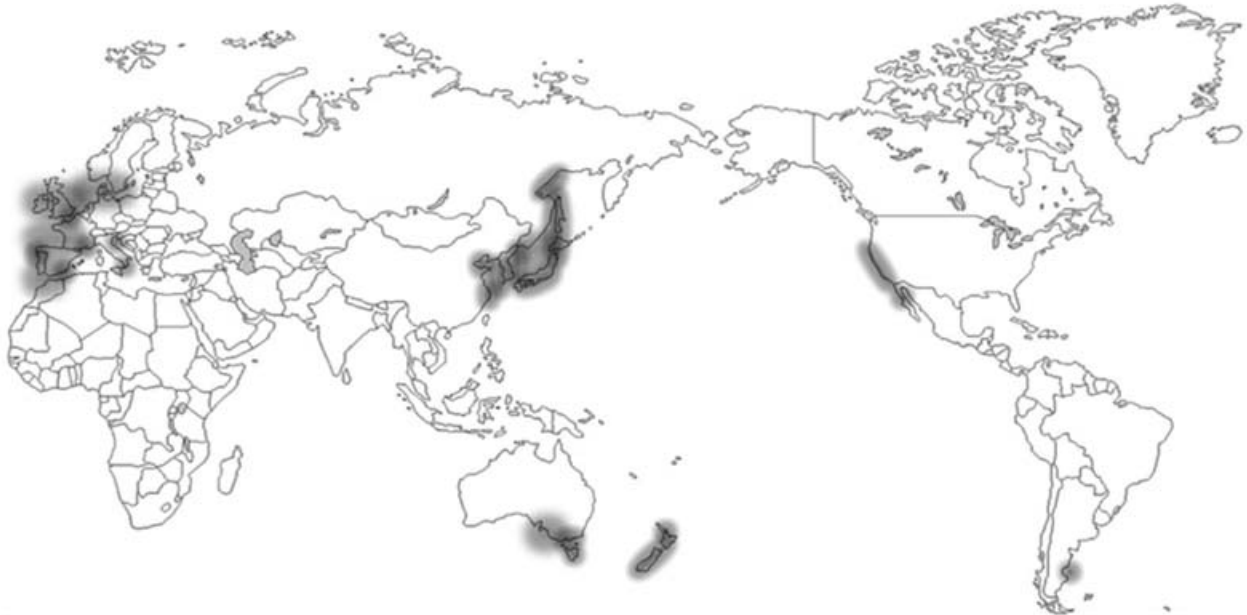
Test Result

Treatment/Replicate		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	Germ-tube length	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					
R2	Germ-tube length	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					
R3	Germ-tube length	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					
R4	Germ-tube length	L1					
		L2					
		L3					
		L4					
		L5					
		L6					
		L7					
		L8					
		L9					
		L10					

Annex E

(informative)

Geographic distribution of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringer



Europe: Adriatic, Britain, France, Italy, Netherlands, Portugal, Spain

- Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scattolin, M. & Parisi, G. (1998).
- Fletcher, R.L. & Manfredi, C. (1995).
- Hardy, F.G. & Guiry, M.D. (2003).
- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I.(1991)
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. (2006).
- Dizerbo, A.H. & Herpe, E. (2007).
- Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. (1999).
- Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. (2007).
- Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. (2010).
- Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Berecibar, E., Tapia, P.D., Pereira,R.,Santos,R.&Pinto,I.S.(2009)..
- Peña, V. & Bárbara, I.(2002)
- Bárbara, I.,Cremades,J.&Veiga,A.J.(2004).

- Bárbara, I., Cremades, J., Calvo, S., López-Rodríguez, M.C. & Dosil, J. (2005)
- Pena, V. & Bárbara, I. (2008).

North America: California, Mexico

- Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. (2004).

Central America: México(Pacific)

- Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. (2008)

South America: Argentina

- Casas, G., Scrosati, R. & Piriz, M.L. (2004).

Asia: China, Japan, Korea, Russia

- Tseng, C.K. (1984).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. (1998).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Lee, Y. (2008).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

Australia (Tasmania, Victoria) and New Zealand

- Hay, C.H. & Luckens, P.A. (1987).
- Adams, N.M. (1994).
- Adams, N.M. (1997).
- Nelson, W.A. (1999).
- Womersley, H.B.S. (2003).
- Schaffelke, B., Campbell, M.L. & Hewitt, C.L. (2005).
- Valentine, J.P. & Johnson, C.R. (2005).
- Sliwa, C., Johnson, C.R. & Hewitt, C.L. (2006).

Bibliography

- [1] Adams, N.M. 1994. Seaweeds of New Zealand. An Illustrated Guide. Canterbury University Press, Christchurch.
- [2] Adams, N.M. 1997. Common seaweeds of New Zealand. Canterbury University Press, Christchurch.
- [3] Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. 2004. First record of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta) on the Pacific coast of Mexico. *Botanica Marina* 47, 255-258.
- [4] Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Berecibar, E., Tapia, P.D., Pereira, R., Santos, R. & Pinto, I.S. 2009. Check list of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Botanica Marina* 52, 24-46.
- [5] Barber, J.T., Sharma, H.A., Ensley, H.E., Polito, M.A. & Thomas, D.A. 1995. Detoxification of phenol by the aquatic angiosperm, *Lemna gibba*. *Chemosphere* 31, 3567-3574.
- [6] Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. 1988. Inventaire bibliographique des macrophytes (Algues, Phanérogames) signalés dans l'Etang de Thau (Hérault, France). *Naturalia Monspel* 52, 71-84.
- [7] Casas, G., Scrosati, R., Piriz & M.L. 2004. The invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) reduces native seaweed diversity in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Biological Invasions* 6, 411-416.
- [8] Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scatolin, M. & Parisi, G. 1998. Distribution of introduced Japanese macroalgae *Undaria pinnatifida*, *Sargassum muticum* (Phaeophyta) and *Antithamnion pectinatum* (Rhodophyta) in the Lagoon of Venice. *Hydrobiologia* 385, 17-22.
- [9] Dizerbo, A.H. & Herpe, E. 2007. Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, Iles Normandes incluses. Editions Anaximandre 1, 315.
- [10] Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I. 1991. The Japanese brown alga *Undaria pinnatifida* on the coast of France and its possible establishment in European waters. *Journal du Conseil International Pour l'Exploration de la Mer* 47, 379-390.
- [11] Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. 1999. Catalogue of the benthic marine macroalgae of the Italian coast of the Adriatic Sea. *Bocconeia* 12, 1-214.
- [12] Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. 2010. Native and non-native species of hard substrata in the Dutch Wadden Sea. *Nederlandse faunistische Mededelingen* 33, 21-75.
- [13] Hardy, F.G. & Guiry, M.D. 2003. A check-list and atlas of the seaweeds of Britain and Ireland. British Phycological Society pp.x, 435.
- [14] Hay, C.H. & Luckens, P.A. 1987. The Asian kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta: Laminariales) found in a New Zealand harbour. *New Zealand Journal of Botany* 25, 329-332.
- [15] Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology* 42, 493-512.
- [16] Lee, Y. & Kang, S. 2001. A catalogue of the seaweeds in Korea. Cheju National University Press, Jeju.
- [17] Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. 1998. Taxonomy and morphology of *Undaria* (Alariaceae, Phaeophyta) in Korea. *Algae (The Korean Journal of Phycology)* 13, 427-446.
- [18] Nelson, W.A. 1999. A revised checklist of marine algae naturalised in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 37, 355-359.
- [19] Peña, V. & Bárbara, I. 2002. Caracterización florística y zonación de las algas bentónicas marinas del puerto de A Coruña (NO Península Ibérica). *Nova Acta Científica Compestelana*

(Biología) 12, 35-66.

- [20] Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. 1992. Check-list of mediterranean seaweeds. I. Fucophyceae (Warming 1884). *Botanica Marina* 35, 109-130.
- [21] Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. 2008. Catálogo de las algas bentónicas del Pacífico de México II. Phaeophycota pp. [i-viii], i-vi, 15-146.
- [22] Pena, V. & Bárbara, I. 2008. Biological importance of an Atlantic European maerl bed off Benencia Island (northwest Iberian Peninsula). *Botanica Marina* 51, 493-505.
- [23] Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. 2007. Revision of the systematics of algae in the order Laminariales (Phaeophyta) from the Far-Eastern Seas of Russia on the basis of molecular-phylogenetic data. *Russian Journal of Marine Biology* 33, 278-289.
- [24] Sliwa, C., Johnson, C.R. & Hewitt, C.L. 2006. Mesoscale dispersal of the introduced kelp *Undaria pinnatifida* attached to unstable substrata. *Botanica Marina* 49, 396-405.
- [25] Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. 2007. Zeewieren van de voormalige oesterputten bij Yerseke. *Gorteria* 32, 125-143.
- [26] Tseng, C.K. 1984. Common seaweeds of China. Science Press, Beijing.
- [27] Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. 2006. Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) deduced from mitochondria genes - origins and succession of introduced populations. *Phycologia* 45, 687-695.
- [28] Valentine, J.P. & Johnson, C.R. 2005. Persistence of sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*) barren on the east coast of Tasmania: inhibition of macroalgal recovery in the absence of high densities of sea urchins. *Botanica Marina* 48, 106-115.
- [29] Verlaque, M. 2001. Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanologica Acta* 24, 29-49.
- [30] Womersley, H.B.S. 2003. The marine benthic flora of southern Australia-Part III D Ceramiales-Delesseriaceae, Sarcomeniaceae, Rhodomelaceae. Australian Biological Resources Study & State Herbarium of South Australia, Canberra & Adelaide, pp. 533.
- [31] Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. 1990. Check-list of marine algae of Japan (revised in 1990). *Japanese Journal of Phycology* 38, 269-320.

미역 배우체 생장을 이용한 생태독성 평가 매뉴얼

1. 측정원리

본 시험방법은 해양생태계의 일차 생산자인 미역을 이용한 독성시험방법으로써 유해물질이 생태계의 일차생산자에 미치는 영향을 파악하는데 그 목적이 있다. 표준시험생물 종(species)은 갈조류인 미역 (*Undaria pinnatifida*)이다. 이 시험법은 액상물질에 노출된 미역 배우체의 생장을 이용하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법으로 시험 대상 물질이 시험 기간 동안 유의하게 손상되거나 사라지지 않으며 해수에 잘 녹는 물질에 적용된다.

시험원리는 미역 배우체를 다양한 농도의 시험 물질에 144시간과 노출시킨 후, 배우체의 생장으로 유해물질의 독성을 평가하는 방법이다 (그림 1).

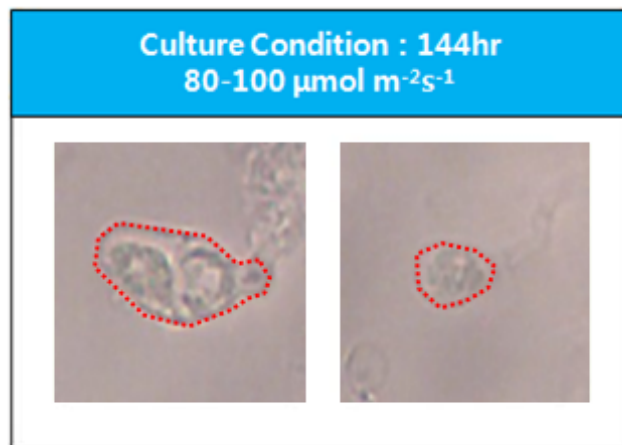


그림 1. 미역 배우체 생장율의 독성평가 원리

2. 시험생물

2.1. 본 시험법의 표준시험생물은 해양성 갈조류인 미역 *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringer 이다.

2.2. 해양성 갈조류인 미역은 대형의 조체로 발달하는 포자체가 저 수온기에 생장과 성숙을

하지만, 하절기의 고 수온기에는 소실되며, 미소한 배우체 세대로 여름을 넘기고, 수온의 저하와 함께 성숙하여 다음의 포자체 세대를 만든다.

2.3. 시험생물은 우리나라 연안역 조간대에서 연중 채집할 수 있으며, 양식산업의 발달로 연중 생물체 공급이 가능하다. 시험생물의 채집이 곤란할 경우 인천대학교 녹색환경과학센터에서 시험생물을 구할 수 있다. 시험생물은 본 실험 시작 1일전에 확보되어야 한다.

3. 기구 및 기기

- 3.1. 광학현미경 : 배율 100-400의 광학현미경을 사용하여 포자방출 유무 관찰
- 3.2. 영상 분석 장치 : 포자 발아율 측정에 사용
- 3.3. 배양기 : 독성시험 과정동안 일정한 온도를 유지할 수 있는 배양기 또는 배양실
- 3.4. 수질측정기 : 염분, 수온, pH을 측정
- 3.5. 초순수제조기
- 3.6. 교반기 또는 공기발생기
- 3.7. 플라스틱 수조 (10-20 L) : 시험생물(포자) 방출 유도시 사용
- 3.8. 페트리디쉬와 커버글라스: 시험생물 부착 유도시 사용
- 3.9. 24구 웰 플레이트

4. 시험생물준비

4.1. 배양 배지 제조 방법

4.1.1. 배양용액 및 시험물질 용액을 제조하는데 사용하는 희석수는 탈이온수를 사용하여야 한다. 시험 준비나 저장 기간 동안 희석수가 오염되지 않도록 특별히 주의하여야 하며, 본 시험에는 구리로 만든 도구나 기구는 사용할 수 없다.

4.1.2. 배양용액은 OTT's (1965) 인공해수를 만들어 사용한다 (OTT's 성분-표 1참조).

4.2. 시약 및 소모품

4.2.1. 투명용기(500 mL) - 시험용액을 보관하는데 사용. 이때 “구리” 성분이 함유되지

얇은 용기를 사용한다.

4.2.2. 24구 웰 플레이트 - 시험생물 배양 용기로 사용(2.5 mL)

4.2.3. 시험 용액과 접촉하는 모든 기구는 유리 또는 화학적으로 불활성 재질이어야 한다.

4.2.4. 막여과 기구 - 평균 통과 직경 0.45 μm 여과지를 사용한다.

표 1. OTT's 인공해수의 주요 성분

주요 성분	농도 (g/L)
NaCl	21.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.00
KCl	0.80
NaBr	0.10
NaNO ₃	0.20
NaHCO ₃	0.20
H ₃ BO ₃	0.06
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	0.01
Sr(NO ₃) ₂	0.03
Na ₂ HPO ₄	0.02

5. 시험방법

5.1. 농도구간설정

5.1.1. 시험 농도의 선택 : 시험할 물질의 농도는 보통 기하학적인 순열을 따라 그 비가 1.5에서 2.0 사이가 되게 한다. 예를 들면, 2 mg/L; 4 mg/L; 8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 64 mg/L;이며, 배출수 또는 액상 물질일 경우에는 0%, 6.25%, 12.5%, 25.0%, 50.0%, 100.0%로 한다. 가능하면, 농도는 10% 이하에서 90% 이상까지의 범위에서 여러 (4~5 구간) 수준의 포자방출이 이루어지도록 선택하여야 한다. 시험 농도 범위는 넓은 범위의 농도 구간을 포함하는 예비실험을 통하여

선택하는 것이 가장 좋다.

5.1.2. 대조구 : 모든 시험은 시험 대상 물질만 없고 배양 용액, 시험조건 및 과정이 동일한 음성대조군 (negative control)가 반드시 필요하다. 만약 시험에 운반체 (carrier)가 쓰이면, 운반체가 첨가된 운반체 대조구가 필요하다.

5.2. 시험 용액 준비

5.2.1. 시험 용액 준비 : 시험 용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 만든다. 일반적으로 시험은 pH를 조정하지 않고 수행하여야 한다. 하지만, 어떤 물질은 극단적인 산성이나 알칼리성에 의해 독성효과를 나타낼 수 있다. 이 경우 1 mol/L 염산이나 1 mol/L 수산화나트륨을 써서 pH를 8 ± 0.2 로 조절해야 한다.

5.3. 시험 생물 준비

5.3.1. 미역 엽체에서 미역귀 부위를 잘라내어 키친타올로 표면에 부착된 착생물들을 닦아낸 다음, 엽체를 해수에 넣어 표면을 다시 한 번 세척한다.

5.3.2. 미역귀 표면의 물기를 닦아낸 다음, 암상태에서 12시간 보관한다.

5.3.3. 미역귀를 꺼내어 해수가 담긴 비이커에 넣어 운동성 포자의 방출을 유도한다.

5.3.4. 유도된 포자액을 20mL의 인공해수가 들어있는 페트리디쉬에 넣어 준다. 이때 페트리디쉬 바닥에는 커버 글라스를 놓아 부착기질로 삼고, 항온배양기에서 ($10 \pm 0.5^\circ\text{C}$) 암상태로 유지 배양한다.

5.3.5. 포자가 부착된 커버글라스를 24웰 플레이트에 넣은 후, 뚜껑을 닫고 배양기에 옮겨 넣는다.

5.3.6. 배양 온도는 15°C 로 암배양 한다.

5.4. 배양방법

5.4.1. 배양 온도는 15°C 로 암배양 한다.

5.5. 측정방법

5.5.1. 실험 개시 후, 144시간이 경과하면 각 셀에서 핀셋으로 포자가 부착되어 있는 커버글라스를 각 조건별로 꺼내어 한 개의 슬라이드 글라스 위에 40% 글리세놀로 고정한다.

5.5.2. 포자에서 배우체로 성장되었을 때 배우체의 면적을 측정한다. 광학현미경상에서 관찰되는 미역 포자는 현미경 콘텐서를 조절하여 사용하게 되면 배우체의 윤곽이 명

확해져서 배우체의 테두리를 검은색으로 관찰 할 수 있다.

5.5.3. 총 30개체의 배우체 면적을 측정하여 상대생장율을 판정하여 수질의 오염도를 평가한다. 배우체 면적 측정 과정은 영상분석장치(Visus image analysis, Ista-Video Test. Ltd., Russia)를 사용하여 각 커버글라스에 부착된 배우체를 현미경시야의 위쪽에서부터 아래로 지그재그형식으로 무작위적으로 이루어진다.

5.5.4. 미역 독성시험 기록지에 실험 종료 일자와 측정 일자를 기록하고 각 시험용액 농도 별 배우체의 면적을 기록한다.

5.6. 시험의 유효성 판정

본 시험법의 표준시험물질은 구리(7440-50-8, Junsei Co., Cu)이다. 구리를 이용한 EC₅₀ (144 h)은 0.063 mg/L이며, 최소 0.047 mg/L, 최대 0.106 mg/L 범위에서 유효하다.

5.7. 시험조건 요약

1. 시험형태:	비교환 정수배양
2. 광조사량:	80~100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
3. 광주기:	24h 암기
4. 시험온도:	15 ± 1°C
5. 염분:	25~35 psu
6. 시험용기:	24구 well 플레이트
7. 시험용액:	2.5 mL/replicate
8. 시험용액 교환:	교환하지 않음
9. 시험생물 크기:	지름 25 μm
10. 반복구당 시험생물 수	1 x 10 ⁶
11. 배양액:	배양용액 (조성표 참조-표 1)
12. 희석액:	배양용액
13. 평가 농도:	100, 50, 25, 12.5, 6.25%, 대조구 또는 정량농도 (예 mg/L)
14. 시험기간:	144시간
15. 측정요소	총 30개체당 발아한 개체수를 나타낸다.
16. 시험적합도 기준:	

5.8. 평가방법 모식도 (그림 2)

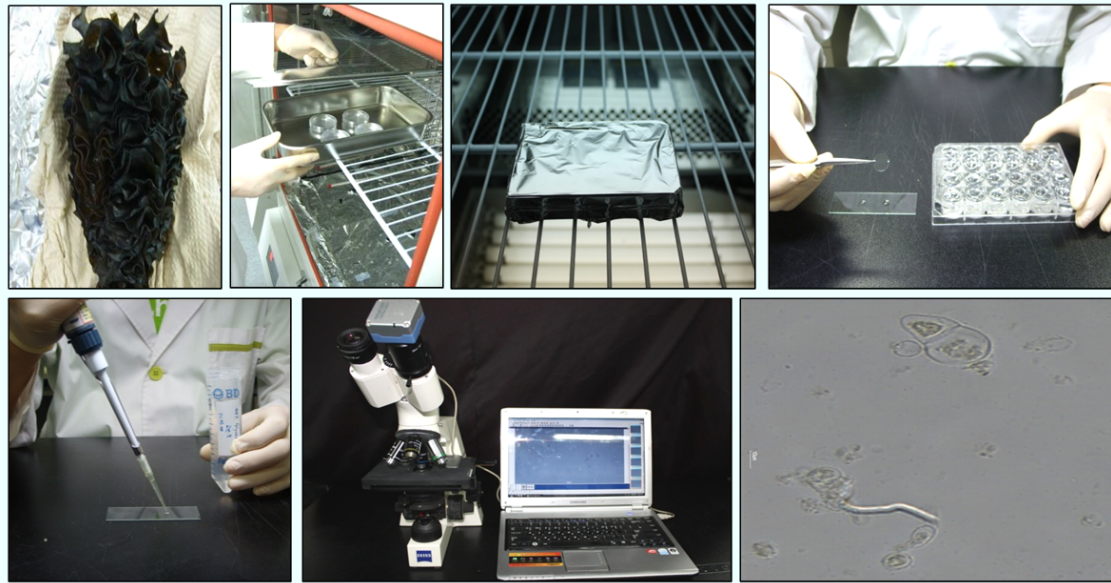


그림 2. 미역 배우체 성장 평가방법

6. 자료분석

6.1. 자료정리

배우체 생장은 개체당 면적을 상대성장률로 나타낸다.

6.2. 통계처리

미역 배우체 성장을 이용한 독성시험의 측정값(endpoints)은 포자 발아에 대한 부정적인 효과에 기반을 두고 있다. 시험결과를 이용하여 무영향농도(NOEC) 및 배우체 성장 억제 농도 (EC₅₀)와 신뢰구간을 계산한다. 무영향농도(NOEC) 값은 Dunnett 검정을 이용하여 구할 수 있다. EC₅₀ 값 추정과 NOEC 값 추정은 Toxcalc (version 5.0)과 같은 독성자료처리용 통계 프로그램을 사용한다.

7. 부록

7.1. 시험생물 배양기관

인천대학교 부설 녹색환경과학센터

인천광역시 연수구 송도동 7-46 인천대학교 미래관 201호

전화 : +82 32 850 5711-4 팩스 : +82 32 850 5717

홈페이지 : www.greenpioneer.co.kr

인천대학교 생물학과

인천광역시 연수구 송도동 12-1 인천대학교

전화 : +82 32 835 8245 팩스 : +82 32 850 0763

홈페이지 : www.bioincheon.or.kr

7.2 시험생물의 생리·생태적 특징

시험 종으로 Laminariales (다시마 목), Alariaceae (미역 과), *Undaria* (미역 속), *Undaria pinnatifida* (미역 종)를 사용하였다. 본 시험종 미역은 일년생 식물로 수심 1 내지 15 m 지역의 외양을 바라보고 있는 지역이나 외양 부근의 난류의 영향을 받는 지역의 암반이나 암초에 부착하여 서식한다. 10일간 평균 수온이 14℃를 넘으면 엽상체의 기저부에 형성된 포자엽의 포자낭으로부터 유주자가 방출되게 된다 (그림 3). 유주자의 방출은 수온이 23℃에 이르기까지 계속되는데 그 절정은 17℃에서 22℃사이이다. 방출된 유주자의 길이는 9 μ m 이며 편모를 가져 운동성이 있다. 유주자는 해류를 따라 표류하며 부착할 만한 기질이 발견되면 착생한다. 유주자는 수온 24℃ 정도에서 싹트기 시작하여 배우체가 된다. 수온이 24℃를 넘게 되면 성장이 멈추고 고 수온에 견디기 위하여 세포벽이 두꺼운 휴면 배우체를 형성한다. 배우체는 현미경적 크기의 작은 세포로 수온이 20℃에서 성숙할 경우 유성 생식을 하게 되는데 일본 북부의 경우 9월경, 중부의 경우 10월경이다. 수컷의 배우체로부터 방출된 정충은 암컷의 배우체로부터 방출된 난을 수정시킨다. 수정된 알은 포자체로 발달하는데 포자체는 수온이 17℃보다 낮을 때 잘 자란다. 포자체는 겨울 기간 동안 빨리 자라서 식용 가능한 대형 엽상체를 형성한다. 봄이 되면 포자체는 유성 생식을 위한 배우체를 생산하기 위하여 엽상체 기저부에 형성된 포자엽에 포자낭을 만든다. 유주자를 방출한 포자체는 소멸되어 일년간의 생활사를 마감하게 된다.

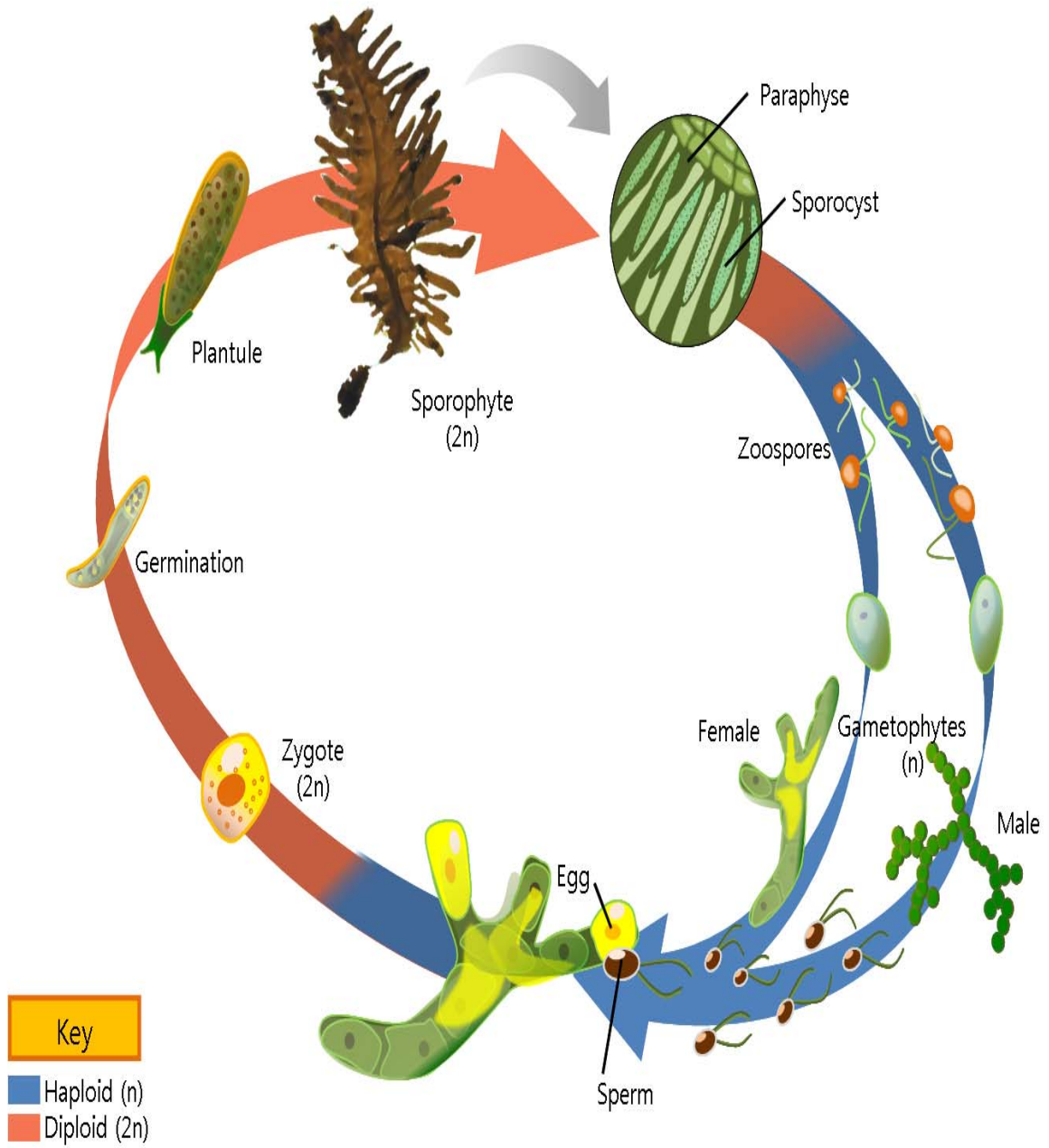


그림 3. 미역의 생활사

7.3. 시험에 영향을 주는 간접요인

시험에 영향을 주는 요인으로는 광선, 온도, 염분 등의 여러 가지 주요 환경인자에 대한 배우체 생장의 차이를 들 수 있다.

7.4. 미역 독성시험 기록지

시험일자: _____ 시험생물명: _____
 시험물질명: _____ 채취일자: _____
 채집위치 및 방법: _____
 보관시간: _____ (보관조건): _____
 시험조건: _____ (희석수): _____

농도	온도 (° C)		염분 (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
대조구 (control)						

시험결과 (단위: 개)

농도		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	배우체 크기	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					
R2	배우체 크기	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					
R3	배우체 크기	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					
R4	배우체 크기	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					

부속서 A (참고)

미역(*Undaria pinnatifida*)의 지리적 분포



유럽: 네덜란드, 스페인, 아드리아 해, 영국, 이탈리아, 포르투갈, 프랑스

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scattolin, M. & Parisi, G. (1998).
- Fletcher, R.L. & Manfredi, C. (1995).
- Hardy, F.G. & Guiry, M.D. (2003).
- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I.(1991)
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. (2006).
- Dizerbo, A.H. & Herpe, E. (2007).
- Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. (1999).
- Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. (2007).
- Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. (2010).
- Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Bercibar, E., Tapia, P.D., Pereira,R.,Santos,R.&Pinto,I.S.(2009)..
- Peña, V. & Bárbara, I.(2002)

- Bárbara, I., Cremades, J. & Veiga, A. J. (2004).
- Bárbara, I., Cremades, J., Calvo, S., López-Rodríguez, M. C. & Dosil, J. (2005)
- Pena, V. & Bárbara, I. (2008).
- Jose C. Baez , Jesus Olicero , Cesar Peteiro , Francisco Ferri-Yanez , Carlos Garcia-soto , Raimundo real (2009)

북 아메리카 : 멕시코, 캘리포니아

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. (2004).

중앙 아메리카 : 멕시코

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. (2008)

남 아메리카 : 아르헨티나

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Casas, G., Scrosati, R. & Piriz, M.L. (2004).

아시아: 대한민국, 러시아, 일본, 중국

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Tseng, C.K. (1984).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. (1998).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Lee, Y. (2008).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

오세아니아: 뉴질랜드, 호주

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Hay, C.H. & Luckens, P.A. (1987).
- Adams, N.M. (1994).

Water quality — Toxicity test based on gametophyte growth rate inhibition of the brown macroalga *Undaria pinnatifida*

Contents

	Page
Introduction.....	351
1 Scope.....	352
2 Normative references.....	352
3 Terms and definitions.....	352
4 Principle.....	353
5 Reagents and media.....	353
6 Apparatus.....	354
7 Procedure.....	355
7.1 Preparation of control medium.....	355
7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products.....	355
7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products.....	355
7.4 Preparation of test solution for assessment of water samples.....	356
7.5 Preparation of zoospores.....	356
7.6 Preparation of test and control cultures.....	356
7.7 Incubation.....	357
7.8 Test duration.....	358
7.9 Measurements and observations.....	358
8 Reference substance.....	359
9 Validity criteria.....	359
10 Expression of results.....	359
10.1 Test results.....	359
10.2 Determination of ECx values.....	359
10.3 Expression of results.....	359
11 Test report.....	360
12 Data Sheet for <i>Undaria</i> Toxicity Test.....	361

Introduction

Undaria pinnatifida, commonly called Miyeok in Korea, is common edible brown seaweed plentiful on the shores of the Korean peninsula and Japanese isles and expanding along some regions of the coastlines of Australia and New Zealand. Coastal area the south of the Korea peninsula is a perspective region for growth and cultivation of this brown alga. It is well known that the seaweed cultivation is based on the knowledge of their life histories. *Undaria* genus is one of the *Laminaria* kelps characterized by a heteromorphic life cycle, with an alternative between highly differentiated diploid sporophytes and microscopic haploid gametophytes. At maturity, the sporophytes release spores that germinate and grow into microscopic gametophytes, and the gametophytes become fertile to release sperms and eggs that join to form embryonic sporophytes. Gametophytes can be propagated vegetatively under controlled conditions as genetically "seeds" for breeding, and a new method of culturing sporelings by use of male and female gametophytes was developed. It is convenient to keep the selected *Undaria* parent gametophytes in stock culture which can be propagated quickly.

The proposed macroalgal toxicity test provides many practical advantages over other currently employed techniques. No specialist expertise is required. The test is cost and time-effective, since it only requires a cell plate, a small volume of water and takes a total of approximately 2 - 3 h to conduct around a 144 h incubation period (dark condition).

Water quality — Toxicity test based on gametophyte growth inhibition of the brown macroalga *Undaria pinnatifida*

1. Scope

This International Standard specifies a method for the determination of the gametophyte growth inhibition of brown alga (*Undaria pinnatifida*) to substances and mixtures contained in water, wastewater, environmental water samples and waste or sewage sludge elutriates.

2. Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/TS 20281, *Waterquality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*

3. Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

3.1

algal zoospore

the zoospores of the brown alga, *Undaria pinnatifida*

3.2

artificial sea water medium

mixture (adjusted at salinity: 35 psu) of distilled water and mineral salts

3.3

control medium

artificial sea water with nutrient salts used for stock culturing of the test alga, as medium in control cultures and dilution water in test cultures

3.4

effective concentration

EC_x

concentration of test sample which results in a reduction of x % in reproduction relative to the controls

3.5

extent of germination

percentage of germination(with germ tube production) and length of embryonic gametophyte

germination tubes.

4. Principle

The life cycle of *U.pinnatifida* consists of alternating asexual (sporophyte) and sexual (gametophyte) generations. Specialized blades of mature diploid sporophytes produce haploid zoospores that post-release, settle and germinate. This method provides step-by-step instructions for performing a 144-h day static non-renewal toxicity test using giant kelp to determine the toxicity of substances in marine and estuarine waters.

The zoospores swim through the test solution and eventually settle onto glass microscope slides. The settled spores germinate by extruding the cytoplasm of the spore through the germ-tube into the first gametophytic cell. After 144 hour, the spore at tip of the germ-tube grow up gametophyte. The test endpoints measured after 144 hours is gametophyte growth

5. Reagents and media

5.1 Artificial sea water

Prepare artificial sea water by adding the weighed chemicals according to Table 1 to the desired volume of distilled water for the growth medium and test compound solutions. Aerate the artificial sea water and adjust, if necessary, to pH $8,0 \pm 0,2$ with 1 mol HCl or 1 mol NaOH before use. Maximum storage time for the artificial sea water is 2 months.

Table 1 — Artificial sea water with a salinity of 35 psu (adopted from OTT 1965) [11]

Compounds	Quantity in g/l
NaCl	21
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	6
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	5
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	1
KCl	0,8
NaBr	0,1

5.2 Nutrients

Add the nutrient salts given in Table 2.

Table 2 — Nutrients

Compounds	Quantity in g/l
NaNO ₃	0,2
NaHCO ₃	0,2
H ₃ BO ₃	0,06
Na ₂ SiO ₃ • 9 H ₂ O	0,01
Na ₂ HPO ₄	0,02
Sr(NO ₃) ₂	0,03

5.3 Test organism

Undaria pinnatifida (Harvey) Suringer

NOTE The strain is available in unialgal, non-axenic plants from the following sources:

Institute of Green Environmental Research,
Mi-Rae Centre,
7-46 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone:+8232850 5711-4 Facsimile: +82 32 850 5717
Website:www.greenpioneer.co.kr

Department of Biology,
University of Incheon,
12-1 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone: +8232835 8245 Facsimile: +82 32 8350763
Website: www.bioincheon.or.kr

6. Apparatus

The test requires standard laboratory apparatus and the following.

6.1 Temperature-controlled cabinet or room, with a white fluorescent light, providing uniform illumination in accordance with the requirements specified in Table 3.

6.2 Light-meter, to be used to measure photon irradiance.

6.3 pH meter

6.4 Tweezers

6.5 Glassware, for the preparation of different concentration series and nutrient medium.

6.5.1 Volumetric flasks

6.5.2 Graduated cylinders

6.5.3 Pipettes

6.5.4 Petri dishes

6.6. Coverslip, for each test chamber to serve as the substratum upon which the zoospores will settle

6.7 Cell plates, for example 24-well cell plates with 2,5 mL per well.

6.8 Microscope (Image analysis system), for inspecting zoospores and embryonic gametophytes.

6.9 Hemacytometer (bright-line rbc), for measuring zoospore density.

7. Procedure

7.1 Preparation of control medium

Add the nutrients to artificial sea water as given in Table 2.

7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products

When the test material is a chemical or a chemical product a stock solution shall be prepared by dissolving the test material in control medium at an appropriate concentration.

Adjust the pH value of the stock solution to $\pm 0,3$ of the pH value of the medium in the control by adding hydrochloric acid or sodium hydroxide solution. No later adjustment is made.

NOTE *Undaria* generally has an arrow pH limit (between 7,5and8,5) for gametophyte growth rate. Therefore, adjustment of pH is necessary when the pH of the sample is beyond these limits.

7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products

An appropriate test design should consist of a geometric series (the ratio between 1,5 and 2,0, e.g. 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l, 32 mg/l, and 64 mg/l) of at least five concentrations exclusive of controls. The concentrations should be chosen to include one measured inhibition value below and

one above the to be estimated or to have the expected EC₅₀ to be bracketed.

NOTE A suitable concentration range is best determined by carrying out a preliminary range-finding test using test concentration with several orders of magnitude of difference.

If a solvent or carrier is used to dissolve or suspend the test sample, additional controls containing the solvent or carrier should also be included in the test to determine any effect of the solvent or carrier on the gametophyte growth of the alga.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

7.4 Preparation of test solutions for water samples

When the test material is a sample of water, e.g. waste water, environmental water sample or an elutriate of solid material, the salinity of this sample shall be adjusted to the same salinity as the control medium by addition of appropriate amounts of the artificial sea water salts (5.1). Then add the nutrient salts as shown in Table 2 (5.2). Mix the water by aeration for a minimum of 16 h to stabilise the pH. Adjust, if necessary, the pH to $\pm 0,3$ of the pH value of the control medium by addition of hydrochloric acid or sodium hydroxide solution.

Prepare a geometric concentration series of at least five concentrations of the test material by diluting the salinity adjusted and nutrient spiked water in control medium. If possible the concentrations shall be chosen to obtain several levels of inhibition ranging from less than 10 % to greater than 90 % inhibition of reproduction.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

NOTE *Undaria pinnatifida* generally has no gametophyte growth problems between 25 psu and 40 psu. However, adjustment of salinity is usually necessary so as the effect of temperature is not to be reflected in the test results.

7.5 Preparation of zoospores

To generate the initial bulk of spores, five randomly selected sori were rinsed with running tap water. Cleaned sorus materials were allowed to dry for 12 hours prior to meiospore release and placed in a 1000-mL glass vial containing 500 mL of filtered seawater. After 3 h, densities of spores in suspension were determined by counting the number of cells with a haemocytometer. Aliquots of 10 mL containing average densities of 3×10^3 spores were allowed to settle on round coverslips (12mm in diameter) in Petri dishes (50mm in diameter, 20mm high) each containing 10 mL of medium and the cultures were maintained in the dark for 3 h at a temperature of 10 °C before being subjected to experimental treatments.

7.6 Preparation of test and control cultures

Transfer 2,5 mL of control medium to each of four wells on a 24 well cell plate. Starting with the lowest concentration, transfer 2 mL of the test solutions to each of four wells on the cell plate.

Cover-slips bearing attached spores were distributed in each of the wells on the cell plate

The decision on the number of replicates per concentration will depend on the purpose of the testing (e.g. effluent screening vs effluent compliance testing): Statistical confidence in the estimation of effects would be a reason for increasing the number of replicates per concentration or for considering an unequal replication approach, see ISO/TS 20281.

7.7 Incubation

The test cell plates shall be covered with a lid to reduce evaporation. Incubate the test cell plates for 24 h under optimal conditions: temperature $15\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ and $80\text{-}100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ condition.

Measure temperature at least twice a day; however continuous temperature control is recommended.

Before a toxicity test is conducted with new test facilities, a performance test should be conducted, in which all test plates contain control medium to ensure analyst proficiency. The coefficient of variation of gametophyte growth should be less than 10 %.

The protocol for the methods using the gametophyte growth rate inhibition of *U.pinnatifida* is summarized in Table 3.

Table 3 — Summary of test conditions and test acceptability criteria for the marine seaweed *Undaria pinnatifida*, gametophyte growth rate inhibition toxicity tests

Parameters	Test conditions
Test type	static, non-renewal
Endpoint	gametophyte growth (area) inhibition (EC ₅₀)
Test organism	<i>Undaria pinnatifida</i>
Test duration	144 h
Test temperature	15 °C ± 2 °C
Test salinity	25 psu - 35 psu (32 psu recommended)
Light condition	80-100 μmol m ⁻² s ⁻¹
Test vessel	24-well cell plate (Ø 15mm)
Test solution volume	2,5 mL
Test specimen/well	300 spores (settled on coverslip, Ø12mm)
Dilution water	nutrient enriched artificial sea water
Renewal of test solution	none
Aeration	none
Culture media	nutrient enriched artificial sea water
Test concentrations	minimum 4+ control
Number of replicates per concentration	30 (depending on statistical analysis chosen)
Sample volume required	50 mL to 100 mL depending on test volume
Test acceptability criterion	> 90 % of gametophyte growth in control

7.8 Test duration

The test duration is 144 h.

7.9 Measurements and observation

The endpoints measured for the 144 hour *Undaria* method is gametophyte growth rate. Gametophyte growth rate is considered how many inhibit the area of gametophyte. To differentiate area of gametophyte each sample of concentration, observe the gametophyte at 400x magnification and determine area of gametophyte and calculate specific growth rate each replication.

The first 30 gametophytes chose while moving across the microscope slide are measured for each replicate of each treatment.

The endpoints measured for the 48 hour *Undaria* method are presented in the germ-tube length. The

Germ-tube length value has considered the inhibition to the growth of the germ-tube length. To check the differences in the tube lengths of the spores, we observed the settled zoospores at 400x magnification and determined the germ-tube length. 10 spores were randomly chosen and were measured.

8. Reference substance

Test with reference substance, copper (CAS number 7440508) is required for quality assurance and to check the sensitivity of the alga.

9. Validity criteria

The mean reproductive percentage in the control shall be at least 80 %.

10. Expression of results

10.1 Test results

Record gametophyte growth rate values of each replicate, mean values and standard deviations. The coefficient of variation (CV), the standard deviation expressed as a percentage of the mean, should be calculated to estimate the precision and reproducibility of the tests.

Plotting concentration response curves is highly recommended to provide the basis for determining the EC_x values for the inhibition of reproduction.

10.2 Determination of EC_x values

Apply a linear or non-linear regression model to the experimental data points by regression analysis. Determine EC_x values with their confidence intervals. Guidance on appropriate model given in ISO/TS 20281 and [20].

If data are too few or uncertain for regression analysis, or if inhibitions appear not to follow a regular concentration response relation, then a graphical method may be applied by drawing a smooth eye fitted curve of the concentration response relationship and reading EC_x values from this graph.

10.3 Expression of results

The values calculated for EC_x [e.g. EC_{20} , EC_{25} and/or EC_{80}] and the corresponding confidence intervals (95 %) and CVs are displayed with the required significant precision (digits).

The values should be given as mg/l for tests with individual chemicals or as percentage for effluent, elutriate or leachate test samples.

11. Test report

This test report shall contain at least the following information:

- a) the test method used, together with a reference to this International Standard (ISO/CD 13308);
- b) name of the laboratory performing the test;
- c) date and period of test;
- d) test organisms (e.g. scientific name, strain, source, holding conditions);
- e) test details;
 - culturing apparatus and incubation procedure;
 - culture types (static, unialgal etc.)
 - composition of medium;
 - preparation of test sample (e.g. pH, salinity of effluent sample) and treatments;
 - concentrations tested;
 - replicates per concentration;
 - number of thallus disks per replicate;
 - size of cell plates;
 - solution volume;
 - light intensity and quality;
 - pH of test solutions including the controls at start and end of test;
 - salinity;
 - temperature range during incubation;
 - method of measuring reproduction percentage;
- f) results;
 - table outlining reproduction percentage in each cell plate at each measuring point;
 - mean reproduction percentage for each test concentration (and control) at each measuring point;
 - relationship between reproduction and concentration in table and graphical representation;
 - EC_x values with 95 % confidence intervals and the corresponding CVs values including the method of determination;

12. Data Sheet for *Undaria* Toxicity Test

Test Date: _____ Test Species: _____

Sample Source: _____ Collection/Arrival Date: _____

Undaria Source: _____

Test conditions: _____ (Dilution): _____

Test Cont.	Temp (°C)		Salinity (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
Control						

Test Result

Treatment/Replicate		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	Gametophyte size	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					
R2	Gametophyte size	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					
R3	Gametophyte size	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					
R4	Gametophyte size	S1					
		S2					
		S3					
		S4					
		S5					
		S6					
		S7					
		S8					
		S9					
		S10					

Annex E

(informative)

Geographic distribution of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringer



Europe: Adriatic, Britain, France, Italy, Netherlands, Portugal, Spain

- Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scattolin, M. & Parisi, G. (1998).
- Fletcher, R.L. & Manfredi, C. (1995).
- Hardy, F.G. & Guiry, M.D. (2003).
- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I.(1991)
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. (2006).
- Dizerbo, A.H. & Herpe, E. (2007).
- Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. (1999).
- Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. (2007).
- Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. (2010).
- Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Berecibar, E., Tapia, P.D., Pereira,R.,Santos,R.&Pinto,I.S.(2009)..
- Peña, V. & Bárbara, I.(2002)
- Bárbara, I.,Cremades,J.&Veiga,A.J.(2004).

- Bárbara, I., Cremades, J., Calvo, S., López-Rodríguez, M.C. & Dosil, J. (2005)
- Pena, V. & Bárbara, I. (2008).

North America: California, Mexico

- Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. (2004).

Central America: México(Pacific)

- Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. (2008)

South America: Argentina

- Casas, G., Scrosati, R. & Piriz, M.L. (2004).

Asia: China, Japan, Korea, Russia

- Tseng, C.K. (1984).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. (1998).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Lee, Y. (2008).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

Australia (Tasmania, Victoria) and New Zealand

- Hay, C.H. & Luckens, P.A. (1987).
- Adams, N.M. (1994).
- Adams, N.M. (1997).
- Nelson, W.A. (1999).
- Womersley, H.B.S. (2003).
- Schaffelke, B., Campbell, M.L. & Hewitt, C.L. (2005).
- Valentine, J.P. & Johnson, C.R. (2005).
- Sliwa, C., Johnson, C.R. & Hewitt, C.L. (2006).

Bibliography

- [1] Adams, N.M. 1994. Seaweeds of New Zealand. An Illustrated Guide. Canterbury University Press, Christchurch.
- [2] Adams, N.M. 1997. Common seaweeds of New Zealand. Canterbury University Press, Christchurch.
- [3] Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. 2004. First record of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta) on the Pacific coast of Mexico. *Botanica Marina* 47, 255-258.
- [4] Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Berecibar, E., Tapia, P.D., Pereira, R., Santos, R. & Pinto, I.S. 2009. Check list of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Botanica Marina* 52, 24-46.
- [5] Barber, J.T., Sharma, H.A., Ensley, H.E., Polito, M.A. & Thomas, D.A. 1995. Detoxification of phenol by the aquatic angiosperm, *Lemna gibba*. *Chemosphere* 31, 3567-3574.
- [6] Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. 1988. Inventaire bibliographique des macrophytes (Algues, Phanérogames) signalés dans l'Étang de Thau (Hérault, France). *Naturalia Monspel* 52, 71-84.
- [7] Casas, G., Scrosati, R., Piriz & M.L. 2004. The invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) reduces native seaweed diversity in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Biological Invasions* 6, 411-416.
- [8] Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scatolin, M. & Parisi, G. 1998. Distribution of introduced Japanese macroalgae *Undaria pinnatifida*, *Sargassum muticum* (Phaeophyta) and *Antithamnion pectinatum* (Rhodophyta) in the Lagoon of Venice. *Hydrobiologia* 385, 17-22.
- [9] Dizerbo, A.H. & Herpe, E. 2007. Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, Îles Normandes incluses. Editions Anaximandre 1, 315.
- [10] Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I. 1991. The Japanese brown alga *Undaria pinnatifida* on the coast of France and its possible establishment in European waters. *Journal du Conseil International Pour l'Exploration de la Mer* 47, 379-390.
- [11] Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. 1999. Catalogue of the benthic marine macroalgae of the Italian coast of the Adriatic Sea. *Bocconeia* 12, 1-214.
- [12] Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. 2010. Native and non-native species of hard substrata in the Dutch Wadden Sea. *Nederlandse faunistische Mededelingen* 33, 21-75.
- [13] Hardy, F.G. & Guiry, M.D. 2003. A check-list and atlas of the seaweeds of Britain and Ireland. British Phycological Society pp.x, 435.
- [14] Hay, C.H. & Luckens, P.A. 1987. The Asian kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta: Laminariales) found in a New Zealand harbour. *New Zealand Journal of Botany* 25, 329-332.
- [15] Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology* 42, 493-512.
- [16] Lee, Y. & Kang, S. 2001. A catalogue of the seaweeds in Korea. Cheju National University Press, Jeju.
- [17] Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. 1998. Taxonomy and morphology of *Undaria* (Alariaceae, Phaeophyta) in Korea. *Algae (The Korean Journal of Phycology)* 13, 427-446.
- [18] Nelson, W.A. 1999. A revised checklist of marine algae naturalised in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 37, 355-359.
- [19] Peña, V. & Bárbara, I. 2002. Caracterización florística y zonación de las algas bentónicas marinas del puerto de A Coruña (NO Península Ibérica). *Nova Acta Científica Compestelana*

(Biología) 12, 35-66.

- [20] Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. 1992. Check-list of mediterranean seaweeds. I. Fucophyceae (Warming 1884). *Botanica Marina* 35, 109-130.
- [21] Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. 2008. Catálogo de las algas bentónicas del Pacífico de México II. Phaeophycota pp. [i-viii], i-vi, 15-146.
- [22] Pena, V. & Bárbara, I. 2008. Biological importance of an Atlantic European maerl bed off Benencia Island (northwest Iberian Peninsula). *Botanica Marina* 51, 493-505.
- [23] Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. 2007. Revision of the systematics of algae in the order Laminariales (Phaeophyta) from the Far-Eastern Seas of Russia on the basis of molecular-phylogenetic data. *Russian Journal of Marine Biology* 33, 278-289.
- [24] Sliwa, C., Johnson, C.R. & Hewitt, C.L. 2006. Mesoscale dispersal of the introduced kelp *Undaria pinnatifida* attached to unstable substrata. *Botanica Marina* 49, 396-405.
- [25] Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. 2007. Zeewieren van de voormalige oesterputten bij Yerseke. *Gorteria* 32, 125-143.
- [26] Tseng, C.K. 1984. Common seaweeds of China. Science Press, Beijing.
- [27] Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. 2006. Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) deduced from mitochondria genes - origins and succession of introduced populations. *Phycologia* 45, 687-695.
- [28] Valentine, J.P. & Johnson, C.R. 2005. Persistence of sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*) barren on the east coast of Tasmania: inhibition of macroalgal recovery in the absence of high densities of sea urchins. *Botanica Marina* 48, 106-115.
- [29] Verlaque, M. 2001. Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanologica Acta* 24, 29-49.
- [30] Womersley, H.B.S. 2003. The marine benthic flora of southern Australia-Part III D Ceramiales-Delesseriaceae, Sarcomeniaceae, Rhodomelaceae. Australian Biological Resources Study & State Herbarium of South Australia, Canberra & Adelaide, pp. 533.
- [31] Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. 1990. Check-list of marine algae of Japan (revised in 1990). *Japanese Journal of Phycology* 38, 269-320.

미역을 이용한 로봇형 생태독성 평가 매뉴얼

1. 측정원리

본 시험방법은 해양생태계의 일차 생산자인 미역을 이용한 독성시험방법으로써 유해물질이 생태계의 일차생산자에 미치는 영향을 파악하는데 그 목적이 있다. 표준시험생물 종(species)은 갈조류인 미역 (*Undaria pinnatifida*)이다. 이 시험법은 액상물질에 노출된 미역 수 배우체의 엽록소 형광을 이용하여 유해물질의 독성을 평가하는 방법으로 시험 대상 물질이 시험 기간 동안 유의하게 손상되거나 사라지지 않으며 해수에 잘 녹는 물질에 적용된다.

시험원리는 미역 수 배우체를 다양한 농도의 시험 물질에 1시간 노출시킨 후, 엽록소 형광 측정 장치를 이용하여 엽록소 형광을 산정하고 유해물질의 독성을 평가하는 방법이다. 이때 사용되는 엽록소 형광 측정 장치는 광합성의 활성이 변화하는 것을 탐지하기 위해서 고안되었으며, 환경 스트레스 하에서 식물의 광합성 기구 활성을 신속하고 비파괴적인 방법으로 탐지할 수 있는 기구로 알려져 있고 아래와 같은 원리로 독성을 진단한다(그림 1). 그림 2는 iPAM을 이용한 독성진단 예시이다.

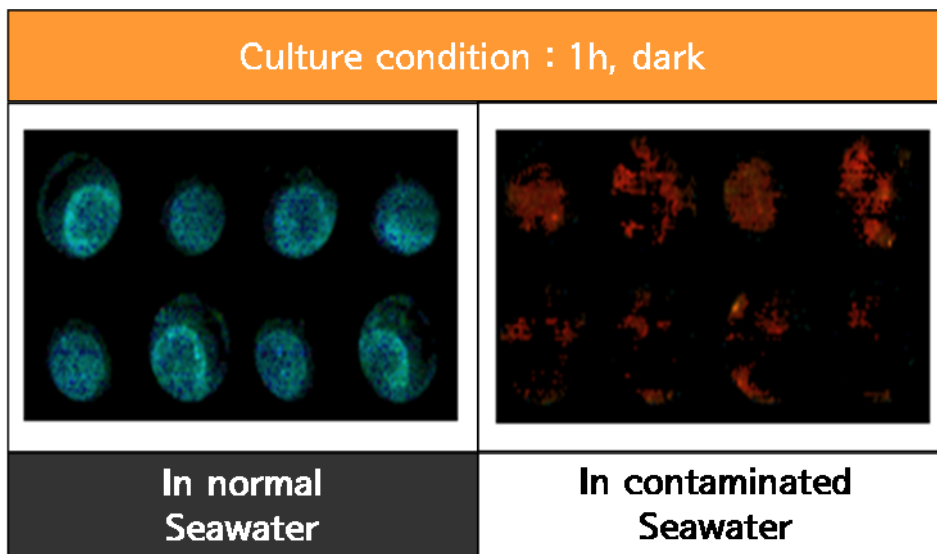


그림 1. 미역의 독성평가 원리

2. 시험생물

- 2.1. 본 시험법의 표준시험생물은 해양성 갈조류인 미역 *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringer 이다.
- 2.2. 해양성 갈조류인 미역은 대형의 조체로 발달하는 포자체가 저 수온기에 생장과 성숙을 하지만, 하절기의 고 수온기에는 소실되며, 미소한 배우체 세대로 여름을 넘기고, 수온의 저하와 함께 성숙하여 다음의 포자체 세대를 만든다.
- 2.3. 시험생물은 우리나라 연안역 조간대에서 연중 채집할 수 있으며, 양식산업의 발달로 연중 생물체 공급이 가능하다. 시험생물의 채집이 곤란할 경우 인천대학교 녹색환경과학센터에서 시험생물을 구할 수 있다.

3. 기구 및 기기

- 3.1. 엽록소 형광 측정 장치 : 엽록소 형광 측정에 사용
- 3.2. 배양기 : 독성시험 과정동안 일정한 온도를 유지할 수 있는 배양기 또는 배양실
- 3.3. 균질기 : 배우체 서스펜션 제조시 사용
- 3.4. 96구 웰 플레이트
- 3.5. 초순수제조기

4. 시험생물준비

- 4.1. 배양 배지 제조 방법
 - 4.1.1. 배양용액 및 시험물질 용액을 제조하는데 사용하는 희석수는 탈이온수를 사용하여야 한다. 시험 준비나 저장 기간 동안 희석수가 오염되지 않도록 특별히 주의하여야 하며, 본 시험에는 구리로 만든 도구나 기구는 사용할 수 없다.
 - 4.1.2. 배양용액은 OTT's(1965) 인공해수를 만들어 사용한다(OTT's 성분-표 1참조).
- 4.2. 시약 및 소모품
 - 4.2.1. 투명용기(500 mL) - 시험용액을 보관하는데 사용하며, 이때 “수은” 성분이 함유되지 않은 용기를 사용한다.
 - 4.2.2. 96구 웰 플레이트 - 시험생물 배양 용기로 사용(300 μ l)한다.

4.2.3. 시험 용액과 접촉하는 모든 기구는 유리 또는 화학적으로 불활성 재질이어야 한다.

표 1. OTT's 인공해수의 주요 성분

주요 성분	농도 (g/L)
NaCl	21.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.00
KCl	0.80
NaBr	0.10
NaNO ₃	0.20
NaHCO ₃	0.20
H ₃ BO ₃	0.06
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	0.01
Sr(NO ₃) ₂	0.03
Na ₂ HPO ₄	0.02

5. 시험방법

5.1. 농도구간설정

5.1.1. 시험 농도의 선택 : 시험할 물질의 농도는 보통 기하학적인 순열을 따라 그 비가 1.5에서 2.0 사이가 되게 한다. 예를 들면, 2 mg/L; 4 mg/L; 8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 64 mg/L;이며, 배출수 또는 액상 물질일 경우에는 0%, 6.25%, 12.5%, 25.0%, 50.0%, 100.0%로 한다. 가능하면, 농도는 10% 이하에서 90% 이상까지의 범위에서 여러(4~5 구간) 수준의 포자방출이 이루어지도록 선택하여야 한다. 시험 농도 범위는 넓은 범위의 농도 구간을 포함하는 예비실험을 통하여 선택하는 것이 가장 좋다.

5.1.2. 대조구 : 모든 시험은 시험 대상 물질만 없고 배양 용액, 시험조건 및 과정이 동일한 음성대조군(negative control)이 반드시 필요하다. 만약 시험에 운반체(carrier)가 쓰이면, 운반체가 첨가된 운반체 대조구가 필요하다.

5.2. 시험 용액 준비

5.2.1. 시험 용액 준비 : 시험 용액은 최고 농도의 용액을 충분한 양으로 제조한 후 이를 2배씩 희석하여 그 이하 농도의 용액을 만든다. 일반적으로 시험은 pH를 조정하지 않고 수행하여야 한다. 하지만, 어떤 물질은 극단적인 산성이나 알칼리성에 의해 독성효과를 나타낼 수 있다. 이 경우 1 mol/L 염산이나 1 mol/L 수산화나트륨을 써서 pH를 8 ± 0.2 로 조절해야 한다. 또한 서스펜션 제조 시 해수가 첨가 되므로 시험 용액의 농도설정 시 반수 희석되는 것을 고려하여 만들어야 한다.

5.3. 시험 생물 준비

5.3.1. 보관된 미역의 수 배우체 덩어리를 꺼내어 물기를 제거한 후 무게를 잰다.

5.3.2. 서스펜션의 농도는 2mg/mL로 하며 험거운 호모게나이저를 이용하여 OTT's Medium을 첨가하고 수 배우체 덩어리를 균질화한다.

5.3.3. 균질화 된 수 배우체를 96구 웰 플레이트에 150 μ l 넣은 후, 시험용액을 같은 부피로 넣어준다.

5.3.4. 배양 온도는 15°C로 암배양 한다.

5.4. 배양방법

5.4.1. 배양 온도는 15°C로 암배양 한다.

5.5. 측정방법

5.5.1. 실험 개시 후, 30분이 경과하면 배양기에서 96웰 플레이트를 꺼낸 후, 엽록소 형광 측정 장치에 뚜껑을 열고 넣는다.

5.5.2. 컴퓨터에 이미지로 보여지는 곳 중에 형광으로 나타내는 부분을 Imaging win 프로그램을 이용하여 설정한 후 측정한다.

5.5.3. 측정 시 setting 조건은 Actign Light 3, Clocks 20s, Delay 40s, Duration 315s 으로 한다.

5.5.4. Effective quantum yield의 수치는 Imaging PAM이 측정한 F_0 , F_m 값을 토대로 계산식에 넣어 산출한다.

5.5.5. 미역 독성평가 시험지에 측정된 F_0 와 F_m 값을 작성하여 Effective quantum yield를 구한다.

5.6. 시험의 유효성 판정

본 시험법의 표준시험물질은 수은(7439-97-6, Junsei Co., Hg)이다. 수은를 이용한 EC₅₀ (30 min)은 0.123 mg/L이며, 최소 0.079 mg/L, 최대 0.157 mg/L 범위에서 유효하다.

5.7. 시험조건 요약

1. 시험형태:	비교환 정수배양
2. 광조사량:	0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
3. 광주기:	30 min 암기
4. 시험온도:	15 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$
5. 염분:	25~35 psu
6. 시험용기:	96구 well 플레이트
7. 시험용액:	300 μl /replicate
8. 시험용액 교환:	교환하지 않음
9. 시험생물 크기:	지름 25 μm
10. 배양액:	인공해수(OTT's artificial seawater)
11. 희석액:	배양용액
12. 평가 농도:	100, 50, 25, 12.5, 6.25%, 대조구 또는 정량농도(예 mg/L)
13. 시험기간:	1h
14. 측정요소	수 배우체 엽록소 형광률
15. 시험적합도 기준:	미역 수배우체의 평균 엽록소 형광값 0.242 \pm 0.018

5.8. 평가방법 모식도 (그림 2)

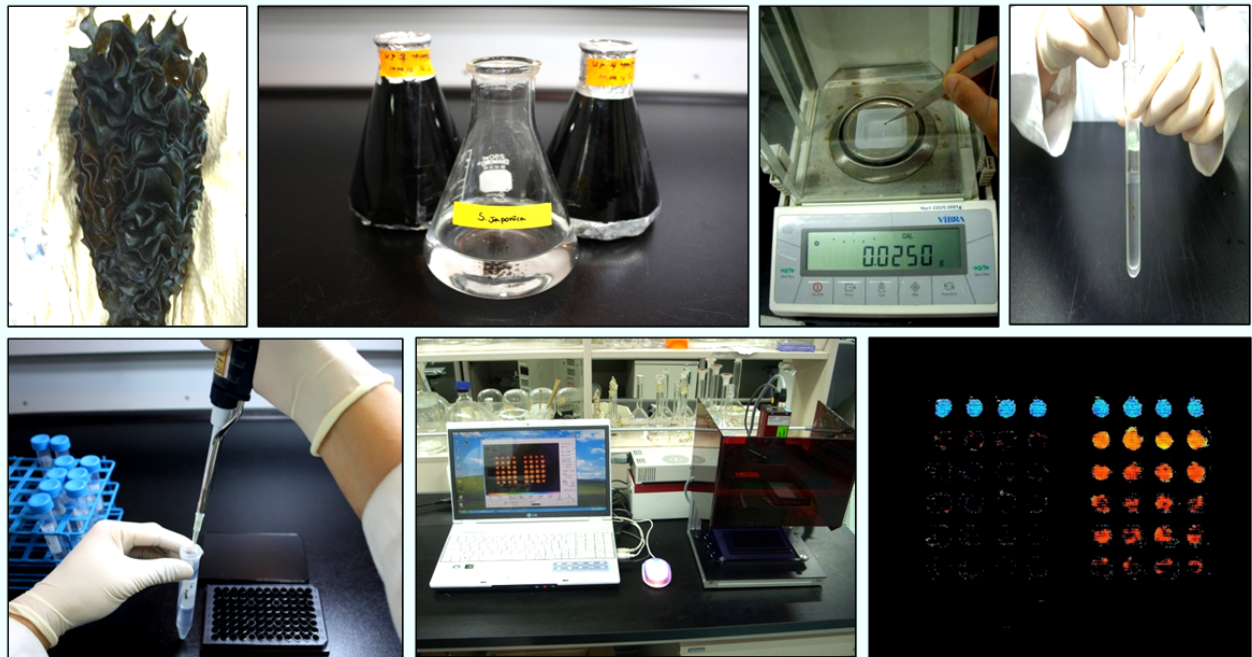


그림 3. 미역 수배우체의 평균 엽록소 형광 평가 기법

6. 자료분석

6.1. 자료정리

Effective quantum yield값은 다음과 같은 계산식에 넣어 산출하였으며, 총 4개의 반복수를 두어 그들의 평균값을 사용하였다.

$$\text{Effective quantum yield} = F_m - F_0 / F_m$$

6.2. 통계처리

미역 수 배우체를 이용한 독성시험의 측정값(endpoints)은 PSII의 광자수율 억제 효과에 기반을 두었다. 사상체 PSII의 광자수율에 대한 EC₅₀은 점예측기법(point estimation techniques)을 써서 계산하였다. LOEC 및 NOEC값은 Dunnett 과정과 같은 가설 검정 방법을 써서 계산하였고, EC₅₀ 값 추정과 LOEC 및 NOEC값 추정은 Toxcalc (Version 5.0) 통계 프로그램을 사용하여 분석을 수행하였다. 독성시험 결과는 EC₅₀ 값으로 표현할 경우, 값이 작을수록 독성도가 커지므로, 이런 문제를 보완하고자 독성값을 비교하기 위하여 독성단위(Toxic Unit, TU)를 아래와 같이 계산하여 사용하였다.

$$TU = 100 / EC_{50} (\%)$$

7. 부록

7.1. 시험생물 배양기관

인천대학교 부설 녹색환경과학센터

인천광역시 연수구 송도동 7-46 인천대학교 미래관 201호

전화 : +82 32 850 5711-4 팩스 : +82 32 850 5717

홈페이지 : www.greenpioneer.co.kr

인천대학교 생물학과

인천광역시 연수구 송도동 12-1 인천대학교

전화 : +82 32 835 8245 팩스 : +82 32 850 0763

홈페이지 : www.bioincheon.or.kr

7.2 시험생물의 생리·생태적 특징

시험 종으로 Laminariales (다시마 목), Alariaceae (미역 과), *Undaria* (미역 속), *Undaria pinnatifida* (미역 종)를 사용하였다. 본 시험종 미역은 일년생 식물로 수심 1 내지 15 m 지역의 외양을 바라보고 있는 지역이나 외양 부근의 난류의 영향을 받는 지역의 암반이나 암초에 부착하여 서식한다. 10일간 평균 수온이 14℃를 넘으면 엽상체의 기저부에 형성된 포자엽의 포자낭으로부터 유주자가 방출되게 된다 (그림 4). 유주자의 방출은 수온이 23℃에 이르기까지 계속되는데 그 절정은 17℃에서 22℃사이이다. 방출된 유주자의 길이는 9 μm 이며 편모를 가져 운동성이 있다. 유주자는 해류를 따라 표류하며 부착할 만한 기질이 발견되면 착생한다. 유주자는 수온 24℃ 정도에서 싹트기 시작하여 배우체가 된다. 수온이 24℃를 넘게 되면 성장이 멈추고 고 수온에 견디기 위하여 세포벽이 두꺼운 휴면 배우체를 형성한다. 배우체는 현미경적 크기의 작은 세포로 수온이 20℃에서 성숙할 경우 유성 생식을 하게 되는데 일본 북부의 경우 9월경, 중부의 경우 10월경이다. 수컷의 배우체로부터 방출된 정충은 암컷의 배우체로부터 방출된 난을 수정시킨다. 수정된 알은 포자체로 발달하는데 포자체는 수온이 17℃보다 낮을 때 잘 자란다. 포자체는 겨울 기간 동안 빨리 자라서 식용 가능한 대형 엽상체를 형성한다. 봄이 되면 포자체는 유성 생

식을 위한 배우체를 생산하기 위하여 엽상체 기저부에 형성된 포자엽에 포자낭을 만든다. 유주자를 방출한 포자체는 소멸되어 일년간의 생활사를 마감하게 된다.

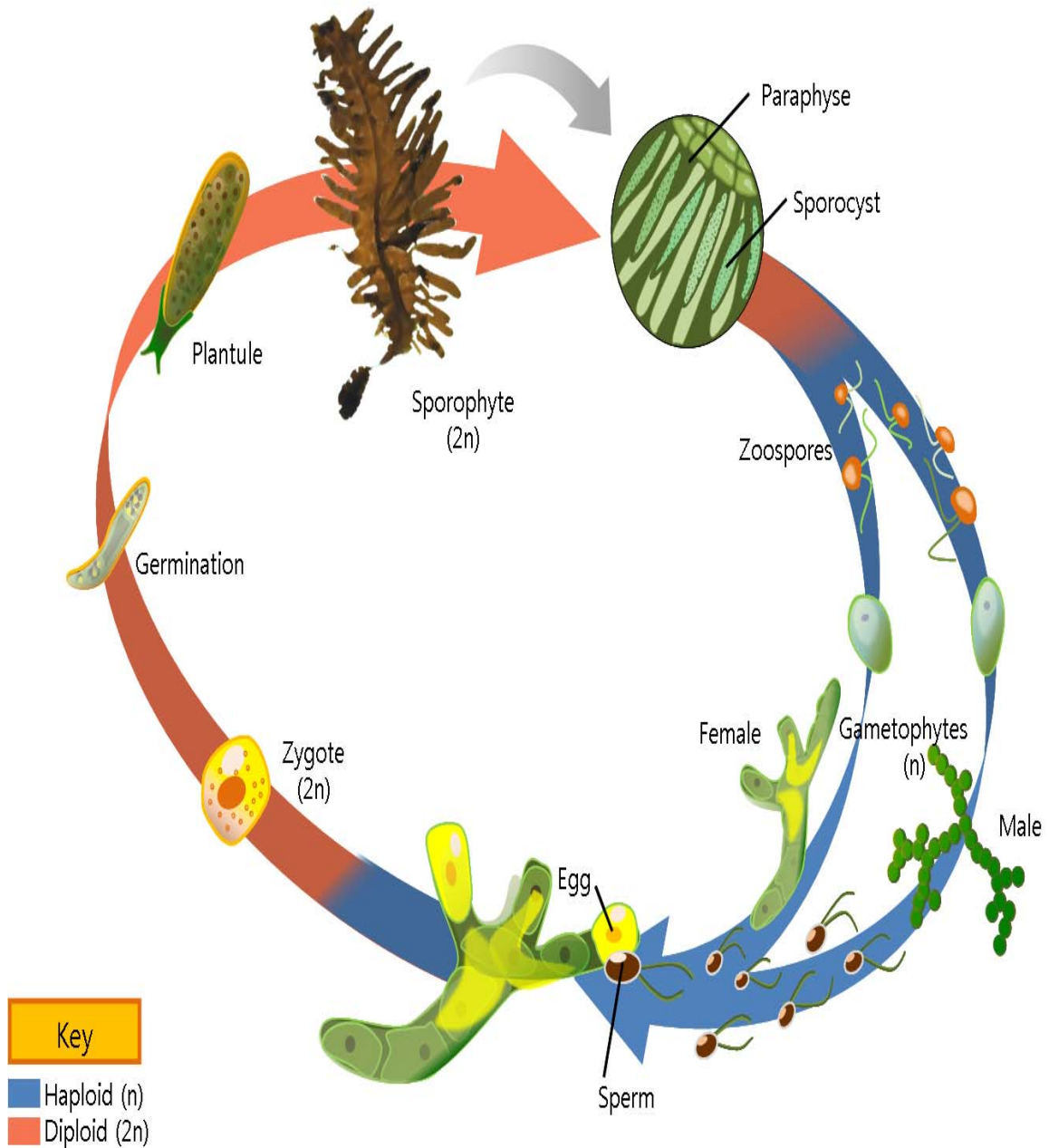


그림 4. 미역의 생활사

7.3. 시험에 영향을 주는 간접요인

시험에 영향을 주는 요인으로는 광선, 온도, 염분 등의 여러 가지 주요 환경인자에 대한 포자발아율의 차이를 들 수 있다.

7.4. 미역 수배우체 독성시험 기록지

시험일자: _____ 시험생물명: _____

시험물질명: _____ 채취일자: _____

채집위치 및 방법: _____

보관시간: _____ (보관조건): _____

시험조건: _____ (희석수): _____

농도	온도 (° C)		염분 (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
대조구 (control)						

시험결과 (단위: effective quantum yield)

농도		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						
R2	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						
R3	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						
R4	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						

부속서 A
(참고)

미역(*Undaria pinnatifida*)의 지리적 분포



유럽: 네덜란드, 스페인, 아드리아 해, 영국, 이탈리아, 포르투갈, 프랑스

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scattolin, M. & Parisi, G. (1998).
- Fletcher, R.L. & Manfredi, C. (1995).
- Hardy, F.G. & Guiry, M.D. (2003).
- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I.(1991)
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. (2006).
- Dizerbo, A.H. & Herpe, E. (2007).
- Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. (1999).
- Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. (2007).
- Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. (2010).
- Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M, Berecibar, E., Tapia, P.D., Pereira,R.,Santos,R.&Pinto,I.S.(2009)..
- Peña, V. & Bárbara, I.(2002)

- Bárbara, I., Cremades, J. & Veiga, A.J. (2004).
- Bárbara, I., Cremades, J., Calvo, S., López-Rodríguez, M.C. & Dosil, J. (2005)
- Pena, V. & Bárbara, I. (2008).
- Jose C. Baez , Jesus Olicero , Cesar Peteiro , Francisco Ferri-Yanez , Carlos Garcia-soto , Raimundo real (2009)

북 아메리카 : 멕시코, 캘리포니아

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. (2004).

중앙 아메리카 : 멕시코

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. (2008)

남 아메리카 : 아르헨티나

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Casas, G., Scrosati, R. & Piriz, M.L. (2004).

아시아: 대한민국, 러시아, 일본, 중국

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Tseng, C.K. (1984).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. (1998).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Lee, Y. (2008).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

오세아니아: 뉴질랜드, 호주

- Paul C. Silva , Rachel A. Woodfield , Andrew N. Cohen , Lesilie H. Harris & Jeffrey H.R goddard (2002)
- Hay, C.H. & Luckens, P.A. (1987).
- Adams, N.M. (1994).

Water quality — Toxicity test based on Chlorophyll fluorescence inhibition of the *Undaria pinnatifida* male gametophyte by robotic system

Contents

	Page
Introduction.....	379
1 Scope.....	380
2 Normative references.....	380
3 Terms and definitions.....	380
4 Principle.....	381
5 Reagents and media.....	381
6 Apparatus.....	382
7 Procedure.....	383
7.1 Preparation of control medium.....	383
7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products.....	383
7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products.....	383
7.4 Preparation of test solution for assessment of water samples.....	384
7.5 Preparation of zoospores.....	384
7.6 Preparation of test and control cultures.....	384
7.7 Incubation.....	384
7.8 Test duration.....	385
7.9 Measurements and observations.....	385
8 Reference substance.....	386
9 Validity criteria.....	386
10 Expression of results.....	386
10.1 Test results.....	386
10.2 Determination of ECx values.....	386
10.3 Expression of results.....	386
11 Test report.....	387
12 Data Sheet for <i>Undaria</i> Toxicity Test.....	388

Introduction

Undaria pinnatifida, commonly called Mi-yeok in Korea, is common edible brown seaweed plentiful on the shores of the Korean peninsula and Japanese isles and expanding along some regions of the coastlines of Australia and New Zealand. Coastal area of southern Korea peninsula is a perspective region for growth and cultivation of this brown alga. It is well known that the seaweed cultivation is based on the knowledge of their life histories. *Undaria* genus is one of the *Laminaria* kelps characterized by a heteromorphic life cycle, with an alternative between highly differentiated diploid sporophytes and microscopic haploid gametophytes. At maturity, the sporophytes release spores that germinate and grow into microscopic gametophytes, and the gametophytes become fertile to release sperms and eggs that join to form embryonic sporophytes. Gametophytes can be propagated vegetatively under controlled conditions as genetically "seeds" for breeding, and a new method of culturing sporelings by use of male and female gametophytes was developed. It is convenient to keep the selected *Undaria* parent gametophytes in stock culture which can be propagated quickly.

The proposed automatic system toxicity test provides many advantages, eg. easily and simply. The test is cost and time-effective, since it only requires a small amount of sample, a small volume of water and takes a total of approximately 2 - 3 h to control around a 30 min incubation period (dark condition).

Water quality — Toxicity test based on chlorophyll fluorescence inhibition of the *Undaria pinnatifida* male gametophyte by robotic system

1. Scope

This International Standard specifies a method for the determination of the chlorophyll fluorescence inhibition of brown alga (*Undaria pinnatifida*) male gametophyte to substances and mixtures contained in water, wastewater, environmental water samples and waste or sewage sludge elutriates.

2. Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/TS 20281, *Waterquality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*

3. Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

3.1

gametophyte

the male gametophyte of the brown alga, *Undaria pinnatifida*

3.2

artificial sea water medium

mixture (adjusted at salinity: 35 psu) of distilled water and chemicals

3.3

control medium

artificial sea water with nutrient salts used for stock culturing of the test alga, as medium in control cultures and dilution water in test cultures

3.4

effective concentration EC_x

concentration of test sample which results in a reduction of x % in reproduction relative to the controls

3.5

effective quantum yield

the intrinsic quantum efficiency of PS II

4. Principle

The life cycle of *U.pinnatifida* consists of alternating asexual (sporophyte) and sexual (gametophyte) generations. Gametophyte generation is easy to store and cultivate. So this method provides step-by-step instructions for performing a toxicity test using small gametophyte to determine the toxicity of substances in marine and estuarine waters.

The chlorophyll fluorescent measuring instrument not only measure fluorescence, but also provides an estimate of incident light absorptivity. This aspect is particularly important when dealing with lateral heterogeneities of chlorophyll content often accompanying stress- or pathogen-induced damage.

5. Reagents and media

5.1 Artificial sea water

Prepare artificial sea water by adding the weighed chemicals according to Table 1 to the desired volume of distilled water for the growth medium and test compound solutions. Aerate the artificial sea water and adjust, if necessary, to pH $8,0 \pm 0,2$ with 1 mol HCl or 1 mol NaOH before use. Maximum storage time for the artificial sea water is 2 months.

Table 1 — Artificial sea water with a salinity of 35 psu (adopted from OTT 1965) [11]

Compounds	Quantity in g/l
NaCl	21
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	6
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1
KCl	0,8
NaBr	0,1

5.2 Nutrients

Add the nutrient salts given in Table 2.

Table 2 — Nutrients

Compounds	Quantity in g/l
NaNO ₃	0,2
NaHCO ₃	0,2
H ₃ BO ₃	0,06
Na ₂ SiO ₃ • 9 H ₂ O	0,01
Na ₂ HPO ₄	0,02
Sr(NO ₃) ₂	0,03

5.3 Test organism

Undaria pinnatifida (Harvey) Suringer male gametophyte

NOTE The strain is available in unialgal, non-axenic plants from the following sources:

Institute of Green Environmental Research,
Mi-Rae Centre,
7-46 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone: +8232850 5711-4 Facsimile: +82 32 850 5717
Website: www.greenpioneer.co.kr

Department of Biology,
University of Incheon,
12-1 Songdo-dong, Yeonsu-gu, 406-840
Incheon, Korea
Telephone: +8232835 8245 Facsimile: +82 32 8350763
Website: www.bioincheon.or.kr

6. Apparatus

The test requires standard laboratory apparatus and the following.

6.1 Temperature-controlled cabinet or room, with a white fluorescent light, providing uniform illumination in accordance with the requirements specified in Table 3.

6.2 pH meter

6.3 Homogenizer

6.4 Glassware, for the preparation of different concentration series and nutrient medium.

6.4.1 Volumetric flasks

6.4.2 Pipettes

6.5. Screwcap-plastic tube

6.6 Cell plates, for example 96-well cell plates with 300 μ l per well.

6.7 Chlorophyll fluorescent measuring instrument

7. Procedure

7.1 Preparation of control medium

Add the nutrients to artificial sea water as given in Table 2.

7.2 Preparation of stock solutions for assessment of chemicals and products

When the test material is a chemical or a chemical product a stock solution shall be prepared by dissolving the test material in control medium at an appropriate concentration.

Adjust the pH value of the stock solution to $\pm 0,3$ of the pH value of the medium in the control by adding hydrochloric acid or sodium hydroxide solution. No later adjustment is made.

7.3 Preparation of test solutions for assessment of chemicals and products

An appropriate test design should consist of a geometric series (the ratio between 1,5 and 2,0, e.g. 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l, 32 mg/l, and 64 mg/l) of at least five concentrations exclusive of controls. The concentrations should be chosen to include one measured inhibition value below and one above the to be estimated or to have the expected EC₅₀ to be bracketed.

NOTE A suitable concentration range is best determined by carrying out a preliminary range-finding test using test concentration with several orders of magnitude of difference.

If a solvent or carrier is used to dissolve or suspend the test sample, additional controls containing the solvent or carrier should be included in the test to determine any effect of the solvent or carrier on the gametophyte of the alga.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

7.4 Preparation of test solutions for water samples

When the test material is a sample of water, e.g. waste water, environmental water sample or an elutriate of solid material, the salinity of this sample shall be adjusted to the same salinity as the control medium by addition of appropriate amounts of the artificial sea water salts (5.1). Then add the nutrient salts as shown in Table 2 (5.2). Mix the water by aeration for a minimum of 16 h to stabilise the pH. Adjust, if necessary, the pH to $\pm 0,3$ of the pH value of the control medium by addition of hydrochloric acid or sodium hydroxide solution.

Prepare a geometric concentration series at least five concentrations of the test material by diluting the salinity adjusted and nutrient spiked water in control medium. If possible the concentrations shall be chosen to obtain several levels of inhibition ranging from less than 10 % to greater than 90 % inhibition of reproduction.

Measure the pH of a sample of each test solution and of the controls.

7.5 Preparation of gametophyte suspension

Gametophyte was picked from tube and remove the water, measure the dry weight. The gametophyte suspension was made by using suitable homogenizer

NOTE The concentration of gametophyte suspension is 2 mg gametophyte dry weight per 1 mL of OTT's medium.

7.6 Preparation of test and control cultures.

This experiment using 96well plate each concentration of testing solution and control culture use four wells. For the control culture transfer 150 μ l of control medium into each well. Testing solution in starting from lowest concentration to highest concentration

The decision on the number of replicates per concentration will depend on the purpose of the testing (e.g. effluent screening vs effluent compliance testing): Statistical confidence in the estimation of effects would be a reason for increasing the number of replicates per concentration or for considering an unequal replication approach, see ISO/TS 20281.

7.7 Incubation

The test well plates shall be covered with a lid to reduce evaporation. Incubate the test well plates for 30min under optimal conditions: temperature 15 °C \pm 2 °C and dark condition.

Measure temperature at least twice a day; however continuous temperature control is recommended.

Before a toxicity test is conducted with new test facilities, a performance test should be conducted, in which all test plates contain control medium to ensure analyst proficiency. The coefficient of variation

of effective quantum yield should be less than 10 %.

The protocol for the methods using the gametophyte chlorophyll fluorescence inhibition of *U.pinnatifida* is summarized in Table 3.

Table 3 — Summary of test conditions and test acceptability criteria for the marine seaweed *Undaria pinnatifida*, gametophyte chlorophyll fluorescence inhibition toxicity tests

Parameters	Test conditions
Test type	static, non-renewal
Endpoint	chlorophyll fluorescence inhibition (EC ₅₀)
Test organism	<i>Undaria pinnatifida</i>
Test duration	30 min
Test temperature	15 °C ± 2 °C
Test salinity	25 psu - 35 psu (32 psu recommended)
Light condition	dark
Test vessel	96-well cell plate
Test solution volume	300 µl
Test specimen/well	47,250 gametophyte (each well 300 µl)
Dilution water	nutrient enriched artificial sea water
Renewal of test solution	none
Aeration	none
Culture media	nutrient enriched artificial sea water (OTT's medium)
Test concentrations	minimum 4+ control
Number of replicates per concentration	5 (depending on statistical analysis chosen)
Sample volume required	300 µl depending on test volume
Test acceptability criterion	> 50 % of chlorophyll fluorescence in control

7.8 Test duration

The test duration is 30minutes

7.9 Measurements and observation

The endpoint measured after 30 minutes of test *Undaria* method are effective quantum yield. The measurement is initiated by switching on the measuring light, giving a measure of the F₀ (minimal) level of fluorescence. A saturating flash light was applied, allowing the measurement of F_m in the dark-adapted state. The effective quantum yield value is calculated by F_m and F₀ value. The effective quantum yield is given by the equation.

$$\text{Effective quantum yield} = F_m - F_0 / F_m$$

8. Reference substance

Test with reference substance, mercury (CAS number 7439976) is required for quality assurance and to check the sensitivity of the alga.

9. Validity criteria

The mean effective quantum yield value in the control shall be at least 50%.

10. Expression of results

10.1 Test results

Record fluorescent values of each replicate will be calculated for mean values and standard deviations. The coefficient of variation (CV), the standard deviation expressed as a percentage of the mean, should be calculated to estimate the precision and reproducibility of the experiments.

Plotting concentration response curves is highly recommended to provide the basis for determining the EC_x values for the inhibition of chlorophyll fluorescence.

10.2 Determination of EC_x values

Apply a linear or non-linear regression model to the experimental data points by regression analysis. Determine EC_x values with their confidence intervals. Guidance on appropriate model given in ISO/TS 20281 and [20].

If the amount of data are too small or uncertain for regression analysis, or if it has an appearance of inhibitor the result will not follow a regular concentration response relation, then a graphical method may be applied by drawing a smooth eye fitted curve of the concentration response relationship and reading EC_x values from this graph.

10.3 Expression of results

The values calculated for EC_x [e.g. EC₂₀, EC₂₅ and/or EC₈₀] and the corresponding confidence intervals (95 %) and CVs are displayed with the required significant precision (digits).

The values should be given in terms of concentration (mg/mL) for tests with individual chemicals or as percentage for effluent, elutriate or leachate test samples.

11. Test report

This test report shall contain at least the following information:

- a) the test method used, together with a reference to this International Standard (ISO/CD 13308);
- b) name of the laboratory performing the test;
- c) date and period of test;
- d) test organisms (e.g. scientific name, strain, source, holding conditions);
- e) test details;
 - culturing apparatus and incubation procedure;
 - culture types (static, unialgal etc.)
 - composition of medium;
 - preparation of test sample (e.g. pH, salinity of effluent sample) and treatments;
 - concentrations tested;
 - replicates per concentration;
 - number of gametophyte per replicate;
 - size of cell plates;
 - solution volume;
 - light intensity and quality;
 - pH of test solutions including the controls at start and end of test;
 - salinity;
 - temperature range during incubation;
 - method of measuring effective quantum yield value;
- f) results;
 - table outlining effective quantum yield value in each cell plate at each measuring point;
 - mean effective quantum yield value for each test concentration (and control) at each measuring point;
 - relationship between effective quantum yield value and concentration in table and graphical representation;
 - EC_x values with 95 % confidence intervals and the corresponding CVs values including the method of determination;

12. Data Sheet for *Undaria* Toxicity Test

Test Date: _____ Test Species: _____

Sample Source: _____ Collection/Arrival Date: _____

Undaria Source: _____

Test conditions: _____ (Dilution): _____

Test Cont.	Temp (°C)		Salinity (psu)		pH	
	T ₀	T()	T ₀	T()	T ₀	T()
Control						

Test Result

Treatment/Replicate		Control	T1	T2	T3	T4	T5
R1	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						
R2	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						
R3	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						
R4	F ₀						
	F _m						
	effective quantum yield						

Annex E

(informative)

Geographic distribution of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringer



Europe: Adriatic, Britain, France, Italy, Netherlands, Portugal, Spain

- Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scattolin, M. & Parisi, G. (1998).
- Fletcher, R.L. & Manfredi, C. (1995).
- Hardy, F.G. & Guiry, M.D. (2003).
- Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. (1988).
- Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I.(1991)
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. (1992).
- Verlaque, M. (2001).
- Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. (2006).
- Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. (2006).
- Dizerbo, A.H. & Herpe, E. (2007).
- Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. (1999).
- Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. (2007).
- Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. (2010).
- Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Berecibar, E., Tapia, P.D., Pereira,R.,Santos,R.&Pinto,I.S.(2009)..
- Peña, V. & Bárbara, I.(2002)
- Bárbara, I.,Cremades,J.&Veiga,A.J.(2004).

- Bárbara, I., Cremades, J., Calvo, S., López-Rodríguez, M.C. & Dosil, J. (2005)
- Pena, V. & Bárbara, I. (2008).

North America: California, Mexico

- Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. (2004).

Central America: México(Pacific)

- Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. (2008)

South America: Argentina

- Casas, G., Scrosati, R. & Piriz, M.L. (2004).

Asia: China, Japan, Korea, Russia

- Tseng, C.K. (1984).
- Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. (1990).
- Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. (1998).
- Lee, Y. & Kang, S. (2001).
- Lee, Y. (2008).
- Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. (2007).

Australia (Tasmania, Victoria) and New Zealand

- Hay, C.H. & Luckens, P.A. (1987).
- Adams, N.M. (1994).
- Adams, N.M. (1997).
- Nelson, W.A. (1999).
- Womersley, H.B.S. (2003).
- Schaffelke, B., Campbell, M.L. & Hewitt, C.L. (2005).
- Valentine, J.P. & Johnson, C.R. (2005).
- Sliwa, C., Johnson, C.R. & Hewitt, C.L. (2006).

Bibliography

- [1] Adams, N.M. 1994. Seaweeds of New Zealand. An Illustrated Guide. Canterbury University Press, Christchurch.
- [2] Adams, N.M. 1997. Common seaweeds of New Zealand. Canterbury University Press, Christchurch.
- [3] Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E., Avila-Serrano, G. & Marcos-Ramirez, R. 2004. First record of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta) on the Pacific coast of Mexico. *Botanica Marina* 47, 255-258.
- [4] Araujo, R., Bárbara, I., Tibaldo, M., Berecibar, E., Tapia, P.D., Pereira, R., Santos, R. & Pinto, I.S. 2009. Check list of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Botanica Marina* 52, 24-46.
- [5] Barber, J.T., Sharma, H.A., Ensley, H.E., Polito, M.A. & Thomas, D.A. 1995. Detoxification of phenol by the aquatic angiosperm, *Lemna gibba*. *Chemosphere* 31, 3567-3574.
- [6] Ben Maiz, N., Boudouresque, C.-F., Lauret, M. & Riouall, R. 1988. Inventaire bibliographique des macrophytes (Algues, Phanérogames) signalés dans l'Etang de Thau (Hérault, France). *Naturalia Monspel* 52, 71-84.
- [7] Casas, G., Scrosati, R., Piriz & M.L. 2004. The invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) reduces native seaweed diversity in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Biological Invasions* 6, 411-416.
- [8] Curiel, D., Bellemo, G., Marzocchi, M., Scatolin, M. & Parisi, G. 1998. Distribution of introduced Japanese macroalgae *Undaria pinnatifida*, *Sargassum muticum* (Phaeophyta) and *Antithamnion pectinatum* (Rhodophyta) in the Lagoon of Venice. *Hydrobiologia* 385, 17-22.
- [9] Dizerbo, A.H. & Herpe, E. 2007. Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, Iles Normandes incluses. Editions Anaximandre 1, 315.
- [10] Floc'h, J.Y., Pagot, R. & Wallentinus, I. 1991. The Japanese brown alga *Undaria pinnatifida* on the coast of France and its possible establishment in European waters. *Journal du Conseil International Pour l'Exploration de la Mer* 47, 379-390.
- [11] Furnari, G., Cormaci, M. & Serio, D. 1999. Catalogue of the benthic marine macroalgae of the Italian coast of the Adriatic Sea. *Bocconeia* 12, 1-214.
- [12] Gittenberger, A., Rensing, M., Stegenga, H. & Hoeksema, B. 2010. Native and non-native species of hard substrata in the Dutch Wadden Sea. *Nederlandse faunistische Mededelingen* 33, 21-75.
- [13] Hardy, F.G. & Guiry, M.D. 2003. A check-list and atlas of the seaweeds of Britain and Ireland. British Phycological Society pp.x, 435.
- [14] Hay, C.H. & Luckens, P.A. 1987. The Asian kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta: Laminariales) found in a New Zealand harbour. *New Zealand Journal of Botany* 25, 329-332.
- [15] Lane, C.E., Mayes, C., Druehl, L.D. & Saunders, G.W. 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology* 42, 493-512.
- [16] Lee, Y. & Kang, S. 2001. A catalogue of the seaweeds in Korea. Cheju National University Press, Jeju.
- [17] Lee, Y.-P. & Yoon, J.T. 1998. Taxonomy and morphology of *Undaria* (Alariaceae, Phaeophyta) in Korea. *Algae (The Korean Journal of Phycology)* 13, 427-446.
- [18] Nelson, W.A. 1999. A revised checklist of marine algae naturalised in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 37, 355-359.
- [19] Peña, V. & Bárbara, I. 2002. Caracterización florística y zonación de las algas bentónicas marinas del puerto de A Coruña (NO Península Ibérica). *Nova Acta Científica Compestelana*

(Biología) 12, 35-66.

- [20] Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. & Giaccone, G. 1992. Check-list of mediterranean seaweeds. I. Fucophyceae (Warming 1884). *Botanica Marina* 35, 109-130.
- [21] Pedroche, P.F., Silva, P.C., Aguilar Rosas, L.E., Dreckmann, K.M. & Aguilar Rosas, R. 2008. Catálogo de las algas bentónicas del Pacífico de México II. Phaeophycota pp. [i-viii], i-vi, 15-146.
- [22] Pena, V. & Bárbara, I. 2008. Biological importance of an Atlantic European maerl bed off Benencia Island (northwest Iberian Peninsula). *Botanica Marina* 51, 493-505.
- [23] Selivanova, O.N., Zhigadlova, G.G. & Hansen, G.I. 2007. Revision of the systematics of algae in the order Laminariales (Phaeophyta) from the Far-Eastern Seas of Russia on the basis of molecular-phylogenetic data. *Russian Journal of Marine Biology* 33, 278-289.
- [24] Sliwa, C., Johnson, C.R. & Hewitt, C.L. 2006. Mesoscale dispersal of the introduced kelp *Undaria pinnatifida* attached to unstable substrata. *Botanica Marina* 49, 396-405.
- [25] Stegenga, H., Karremans, M. & Simons, J. 2007. Zeewieren van de voormalige oesterputten bij Yerseke. *Gorteria* 32, 125-143.
- [26] Tseng, C.K. 1984. Common seaweeds of China. Science Press, Beijing.
- [27] Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T. & Kawai, H. 2006. Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) deduced from mitochondria genes - origins and succession of introduced populations. *Phycologia* 45, 687-695.
- [28] Valentine, J.P. & Johnson, C.R. 2005. Persistence of sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*) barren on the east coast of Tasmania: inhibition of macroalgal recovery in the absence of high densities of sea urchins. *Botanica Marina* 48, 106-115.
- [29] Verlaque, M. 2001. Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Hérault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanologica Acta* 24, 29-49.
- [30] Womersley, H.B.S. 2003. The marine benthic flora of southern Australia-Part III D Ceramiales-Delesseriaceae, Sarcomeniaceae, Rhodomelaceae. Australian Biological Resources Study & State Herbarium of South Australia, Canberra & Adelaide, pp. 533.
- [31] Yoshida, T., Nakajima, Y. & Nakata, Y. 1990. Check-list of marine algae of Japan (revised in 1990). *Japanese Journal of Phycology* 38, 269-320.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 수산기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 수산기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.