

지중해담치, *Mytilus galloprovincialis*의 발생 최적조건

성찬경^{1, 2}, 김기범¹, 서진영^{1, 2}, 이창훈², 류태권², 한기명², 최진우², 김용현³

¹경상대학교 해양환경공학과 해양산업연구소, ²한국해양연구원 남해연구소,
³여수대학교 해양시스템학부

Optimal Conditions for the Embryonic Development of Mussel, *Mytilus galloprovincialis*

Chan-Gyoung Sung^{1, 2}, Gi Beum Kim¹, Jin-Young Seo^{1, 2}, Chang-Hoon Lee²,
Tae-Kwon Ryu², Gi-Myung Han², Jin-Woo Choi², Yong-Hyun Kim³

¹Department of Marine Environmental Engineering, Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University,
Tongyeong 650-160, Korea

²South Sea Institute, Korea Ocean Research and Development Institute, Geoje 656-830, Korea

³Division of Ocean Environment System, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

ABSTRACT

The embryos of marine bivalves have been commonly used in bioassays for the quality assessment of marine environments. Although several standard protocols for developmental bioassay with bivalves have been already proposed, there have been few trials for applying these protocols in environmental assessment, or for developing new protocol with Korean species. So, there is a strong need to establish the standard bioassay protocols using bivalves commonly found in Korean waters. Prior to developing a new protocol, it is essential to know the optimum conditions for the reliable bioassay procedures. Here, we established the purpose of this study to determine the optimum bioassay conditions for successful development of a common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. The conditions considered as critical for developmental bioassay, and determined in this study were; (1) temperature, (2) salinity, and (3) initial density of embryo. The optimal temperature for developmental bioassay of *M. galloprovincialis* was

determined as 15°C. At this temperature, the required time for the embryo to become veliger larva was 48 hr. The acceptable range of salinity for the embryotoxicity test using *M. galloprovincialis* was from 30 to 35 psu, which was narrower than that of the natural habitat of adult populations. The optimum density of embryo at the beginning of bioassay was 100 embryos/ml. Over this density, the proportion of normally developed larvae decreased significantly. The results obtained in this study will serve as a basis for preparation of the standard bioassay protocol using embryo of *M. galloprovincialis*.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*, Embryonic development, Bioassay, Optimal condition.

서 론

담치류는 해양환경의 모니터링과 오염 평가에 널리 사용되고 있다 (Goldberg and Bertine, 2000; Wedderburn *et al.*, 2000; Geffard *et al.*, 2001; Smolders *et al.*, 2004). 해양 오염 평가에 있어서 해수와 퇴적물 내 화학 성분의 분석만으로 생물군집에 미치는 영향을 판단하는 데에는 어려움이 있다. 따라서 화학분석 뿐 아니라 생물 축적 연구 (Nicholson and Szefer, 2003; Kurt and Ozkoc, 2004) 와 더불어 생물 영향 평가 즉 생물검정 (bioassay) 을 함께 실시하는 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Beiras *et al.*, 2003a, b).

이때패류의 발생과정을 이용한 생물검정법은 이미 1980년대부터 개발되기 시작하였으며, 현재 표준화된 지침서가 이미 제시되어 있다 (ASTM, 1989; ASTM, 1994). 담치류는 전 세계 연안에서 흔히 찾아볼 수 있고, 산란 유발이 비교적 용이하기 때문에, 발생과정 자체가 다양한 연구의 대상으로 이용되어 왔다 (His *et al.*, 1996; Jha *et al.*, 2000; Beiras *et al.*, 2003a, b; Beiras and Albentosa, 2004). 우리나라의 경우, 담치류에 관한 연구들은 양식과 관련된 연구가 가장 많으며, 유생을 대상으로 한 연구는 배 발생과정 이후의 단계만을 대상으로 이루어진 바 있다 (Hur and Hur, 2000).

지중해담치 (*Mytilus galloprovincialis*) 는 대서양 연안, 지중해, 홍콩 그리고 일본 남부 등지에 분포하며 우리나라에서는 동, 서, 남해안 그리고 제주도과 울릉도에서도 채집된다 (Choe *et al.*, 1999). 또한 이 종은 ASTM (1994) 에서 제시되어 있는 *Mytilus edulis*와 동일한 속으로, 생물학적 및 생태학적 특징이 매우 유사하다. 즉, ASTM (1994) 에서 제시한 *Mytilus edulis*에 대한 표준 실험법을 적용하기에 적합한 종이라고 여길 수 있다. 하지만, 비록 방법은 동일하게 적용할 수 있다 할지라도, 종이 다르고 생태환경 또한 완전히 동일하지는 않으므로, 모든 실험 조건 또한 동일하게 적용할 수는 없을 것이다.

해양생물의 발생 과정에 큰 영향을 미칠 수 있는 조건으로는 온도, 염분, 수정란의 밀도 등이 있다. 이들 조건이 적절하지 못하다면 유생의 발생이 정상적으로 이루어지지 않을 수 있으므로, 생물검정을 실시했을 때 신뢰할 수 없는 결과를 초래할 수 있다. 그러므로 이들 조건의 최적 범위를 우선적으로 알아야 할 것이다.

따라서 본 연구의 목적을 지중해담치의 배아를 이용한 생물

검정의 최적 실험 조건을 찾는 데에 두었고 지중해담치의 배아로부터 발생하는 정상적인 유생까지의 과정을 관찰하여 각 조건들의 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 실험생물의 준비

지중해담치의 성체는 2004년 2월에 거제도 장목 연안에서 채집하였다. 자연적인 산란을 억제하기 위하여 수온을 10℃로 유지하여 4 주 동안 순치시켰다. 실험에 사용된 성체는 패각을 잘 닦아서 이물질을 제거하였고, 남아있는 원생생물과 부착생물을 제거하기 위하여 담수로 세척하였다. 산란을 유도하기 위하여 공기 중에 1 시간 가량 간출시킨 후, 1 μm 카트리지를 통과한 여과해수 (20℃, 32 psu) 에 다시 집어넣었다. 이렇게 해서 얻어진 수정란은 100 μm 의 나일론 망을 통과시켜 큰 입자의 이물질을 제거하였고, 40 μm 의 나일론 망 위에서 여과해수로 약 7 차례 세척하여 정자 및 미세이물질, 그리고 크기가 작은 미성숙란을 제거하였다.

2. 최적의 온도결정 실험

실험의 최적 온도를 결정하기 위하여 1 μm 카트리지를 통과한 여과해수로 5, 10, 15, 20, 그리고 25℃의 다섯 개 실험구를 설정하였다. 각 실험구마다 수정란의 밀도를 ml 당 약 100 개가 되도록 조절하여 폴리카보네이트 재질의 1-L 투명용기 (Nalgene) 에 넣고, 각 온도에 해당하는 배양기에 넣어 발생이 진행되도록 배양하였다. 각 발생 단계별 경과 시간을 알아내기 위하여 수정 후 120 시간까지 3 시간 간격으로 5 ml 씩 취하여 4% 포르말데히드로 고정하였다. 시료 내의 배아를 현미경으로 (100 배) 관찰하여 5 개의 발생단계 (수정란, 2 세

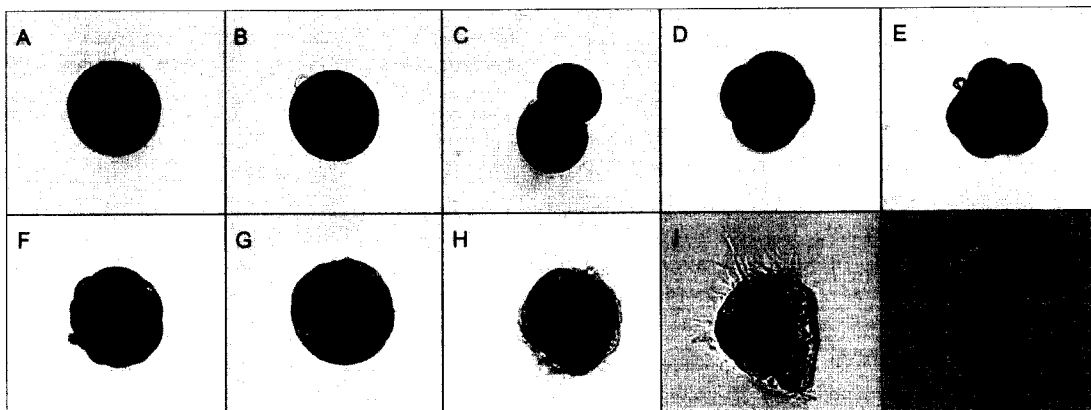


Fig. 1. Developmental stages of *Mytilus galloprovincialis*. A: unfertilized egg, B: fertilized egg, C: 2-cell stage, D: 4-cell stage, E: 8-cell stage, F: morula, G: blastula (before hatching), H: blastula (after hatching), I: trochophore, J: veliger

포기-상실기, 포배기, 담륜자유생, 피면자유생 (Fig. 1) 각각에 해당되는 배아의 백분율을 계산하였다. 각각의 발생 단계에 해당되는 개체의 비율이 전체의 50% 이상이 되는 시간을 그 단계의 발생시간으로 간주하였다. 각 온도별로 부화한 배아의 백분율 (부화율) 과 정상적으로 발생한 유생의 백분율 (정상 발생률) 을 계산하였다. 그리고 온도와 발생시간의 역수 간의 상관관계로부터 생물학적영도를 계산하였고 생물학적 영도를 이용하여 지중해담치의 적산수온을 계산하였다. 각 온도별 부화율과 정상 발생률 결과에 대하여 분산분석 (ANOVA, 유의수준 $\alpha = 0.05$) 을 실시하였고 (Zar, 1984), 정상 발생률이 70% 이상인 온도 범위를 찾아내었다.

3. 최적의 염분범위 결정 실험

시료의 최적의 염분 범위를 결정하기 위하여 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 그리고 50 psu 의 10 개 실험구를 준비하였다. 1 μ m 카트리지를 통과한 여과해수를 이용하여 고염도의 해수를 소요량 이상 제조하고, 초순수 (deionized water) 를 첨가하여 각 염분별 실험구를 준비하였다. 각 실험구마다 수정란의 밀도를 ml 당 약 100 개가 되도록 조절하여 폴리스티렌 재질의 50-ml 배양용 플라스크 (Falcon) 에 넣고, 15°C에서 48 시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후 시료는 4%의 포름알데히드로 고정하였고 시료 내의 배아를 관찰하여 D자형의 정상적인 피면자유생 (veliger) 의 백분율을 계산하였다. 실험 완료 후 조금 더 세밀한 결과를 얻기 위하여 전과 동일한 실험법으로 24-40 psu 까지 2 psu 간격으로 9 개의 시료를 준비하여 각 시료별 정상발생률을 구하였다. 각각의 모든 염분별 정상 발생률 자료에 대하여 분산분석을 실시하였고, 정상 발생률이 70% 이상인 염분 범위를 찾아내었다.

4. 최적 수정란의 밀도 결정 실험

발생의 최적 밀도를 결정하기 위하여 수정란의 밀도가 ml 당

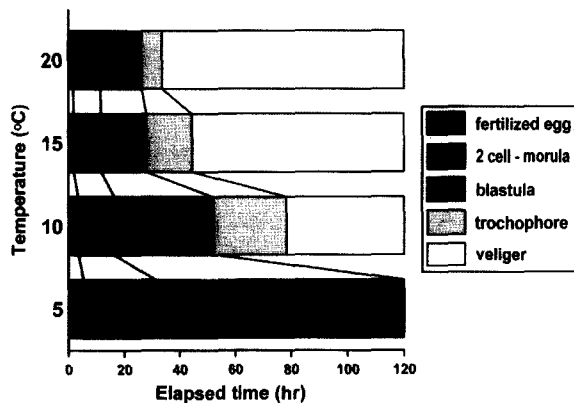


Fig. 2. Effect of temperature on the developmental time of each stage of *Mytilus galloprovincialis*.

25, 50, 100, 200, 400, 800 그리고 1600 개가 되도록 조절한 7 개 실험구를 준비하였다. 1 μ m 카트리지를 통과한 여과해수를 사용하였고 50-ml 배양용 폴리스티렌 플라스크 (Falcon) 를 배양용기로 하여 15°C에서 48 시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후 시료는 4%의 포름알데히드로 고정하였고 각 시료마다 정상 발생률을 계산하였다. 각 밀도별 정상 발생률 자료에 대하여 분산분석을 실시하였고, 정상 발생률이 70% 이상인 밀도 범위를 찾아내었다.

검정실험 최적의 밀도를 결정하기에 앞서 최적 온도와 최적 염분의 결정 실험에 적용된 수정란의 노출 밀도의 산정은 다음과 같다. 같은 이매패류는 아니지만 성게 (*Paracentrotus lividus*) 의 배아를 이용한 생물검정에서 ml당 500 개의 수정란을 이용한 연구가 있다 (Radenac et al., 2001). 지중해담치의 알이 성게의 알보다 더 작은, 즉 표면적이 더 작은 알이다. 그래서 기존의 지중해담치의 배아를 이용한 생물검정 자료 (≤ 30 embryos/ml) 에서 보다 더 높은 밀도조건에서도 정상 발생에 영향을 주지 않을 수 있다는 가설 하에 예비실험을 실시하였고, 예비실험의 결과 정상 발생률이 70% 이상이고, 대조구와 차이가 나지 않는 밀도인 ml당 100 개의 알을 노출하여 실험하였다. 그리고 최적의 염분이 결정되기 이전의 실험에서는 모체서식환경의 평균염분 (32 psu) 으로 실험하였다.

결과 및 토론

실험의 초기단계에서 알의 수정 여부는 알 표면에 극체 (polar body) 의 돌기로 인해 수정막이 돌출되어 있는 알을 수정란으로 판단하였다 (Fig. 1B). 초기의 수정률은 90% 이상이었다.

1. 온도

온도별로 각 발생단계까지의 발생 시간을 그림으로 나타내었다 (Fig. 2). 5°C에서는 120 시간이 경과한 후에도 포배기 이상의 단계로 발생하지 않았다. 10°C에서는 80 시간이 경과한 후 피면자유생이 되었고, 15°C에서는 43 시간, 20°C에서는 35 시간 경과 후 피면자유생으로 발생하였다.

지중해담치의 각 발생단계별 발생시간은 온도에 따라 큰 차이를 보였다. 전반적으로 온도가 상승함에 따라 각 발생단계까지 이르는 경과시간은 감소하였다. 25°C의 경우, 부화가 일어난 이후부터 사망하는 개체가 나타나기 시작하였고, 실험 종료 시에는 전체의 90% 이상이 사망하였다. 즉, 25°C는 지중해담치 유생의 발생에 악영향을 미치는 온도임을 알 수 있었다.

온도실험에서 얻어진 결과를 이용하여 생물학적영도를 구하였다. 온도와 발생시간의 역수간의 상관관계를 나타내는 것이며 (Fig. 3), 이들 회귀식을 통하여 계산된 생물학적영도는 0.6°C로 계산되었다. 생물학적영도는 어떤 생물의 생물적인 활동

이 모두 정지하는 온도로 생물마다 다르며 이 온도 이하에서는 발생하기 힘든 온도를 말한다. 그리고 이 생물학적영도를 이용하여 각 발생단계별 적산수온을 계산하여 결과를 나타내었다. 적산수온은 발생이 진행됨에 따라 지수함수적으로 증가함을 알 수 있었다. 피면자유생 단계까지 발생하는 데 필요한 적산수온은 683°C로 계산되었다 (Fig. 4). 적산수온은 양식 활동에 있어서 아주 중요한 요소로 이 적산수온을 이용하면, 발생과정에 있어 온도의 변화에 따르는 발생시간을 예측할 수 있다.

그리고 온도는 발생시간 뿐 아니라 부화율과 정상 발생률에도 큰 영향을 미치고 있었다 (ANOVA, $p < 0.05$) (Fig. 5). 부화율은 온도가 가장 낮은 5°C일 때 가장 높았고, 온도가 증

가함에 따라 계속 감소하여, 25°C일 때 가장 낮았다 (Fig. 5A). 온도 범위가 5°C에서 20°C 사이에서는 부화율이 모두 70% 이상이었고, 통계적으로도 유의한 차이가 없었다. 그러나 온도가 25°C인 경우는 부화율이 60%에도 미치지 못하였고, 나머지 온도 조건에서와 유의한 차이를 나타내었다.

정상 발생률은 부화율과 다른 양상을 나타내었다 (Fig. 5B). 온도가 가장 낮은 5°C에서 정상 발생률은 0%였다. 이는 온도가 너무 낮아 발생속도가 느렸기 때문에 나타난 결과이다. 낮은 온도에서의 사망률은 그리 높지 않았다. 이는 낮은 온도 그 자체가 발생에 악영향을 미치지 않았음을 의미한다. 온도가 10°C 및 15°C인 경우는 정상 발생률이 90%가까이로 매우 높

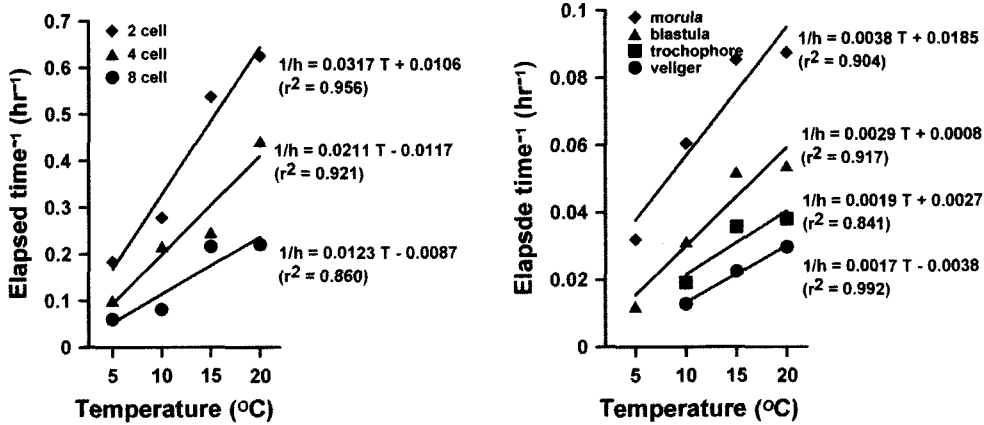


Fig. 3. Relationship between temperature (T) and inverse of time (1/hr) for each developmental stage of *Mytilus galloprovincialis*.

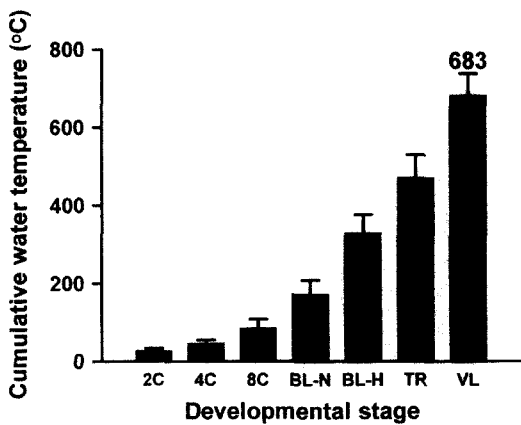


Fig. 4. Cumulative water temperature for each developmental stage of *Mytilus galloprovincialis*. 2C: 2-cell stage, 4C: 4-cell stage, 8C: 8-cell stage, BL-N: non hatched blastula stage, BL-H: hatched blastula stage, TR: trochophore stage, VL: veliger stage.

았다. 이 온도 범위에서는 지중해담치의 배아가 비교적 건강한 상태로 발생을 진행하였음을 의미한다. 20°C의 온도에서는 정상적으로 발생한 유생이 약 50% 정도였고, 죽거나 기형인 유생이 나머지를 차지하였다. 이는, 20°C 이상의 온도에서는 온도 자체가 발생을 저해하기 시작하였음을 의미한다. 25°C에서는 정상 발생률이 0%였다. 부화한 후 정상적으로 발생하지 못하였고 사망률이 높아 이 온도에서는 실험을 수행하기 힘들음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, 지중해담치의 발생이 정상적으로 이루어지는 온도는 10°C와 15°C이다. 부화율과 정상발생률은 이 두 온도에서 차이가 없었다. 반면, 발생 시간은 10°C에서 80 시간, 15°C에서 43 시간으로 약 2 배 정도 차이가 났다. 이는, 10°C에서 실험을 완료하기 위해서는 약 4 일이 필요하고, 15°C에서는 약 2 일이 필요하다는 의미이다. 동일한 결과를 얻는다면 보다 짧은 시간 내에 얻는 것이 더 나은 것이다. 따라서 10°C보다는 15°C가 현실적으로 보다 나은 조건인 것으로 여겨지며, 본 연구에서는 15°C를 지중해담치 배아를 이용한 생물검

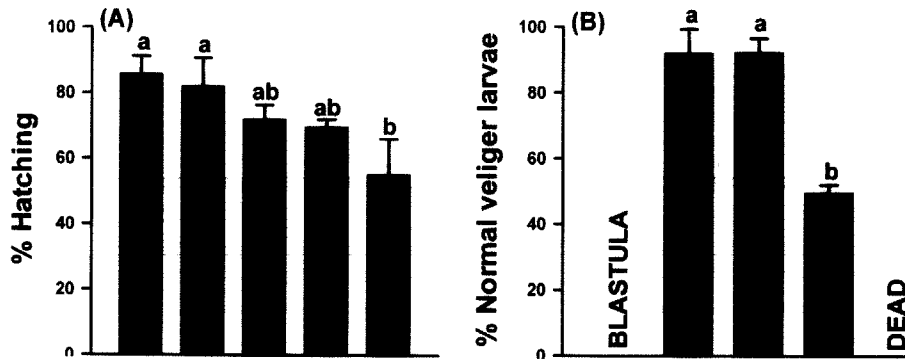


Fig. 5. Proportions of hatched blastulae (A) and normal larvae (B) of *Mytilus galloprovincialis* at each temperature. Error bar represents SD (n = 3). Values with the same character showed no significance (ANOVA, p > 0.05).

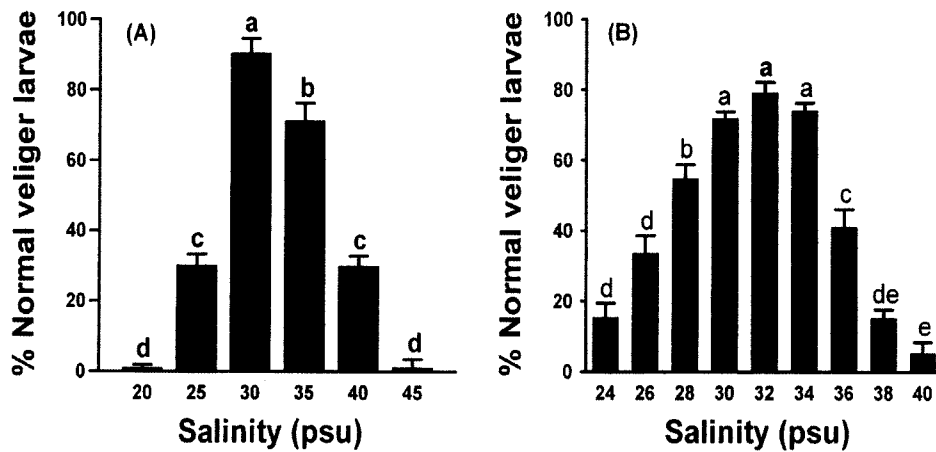


Fig. 6. Comparison of proportion of normal larvae of *Mytilus galloprovincialis* among different salinities (A: the first experiment, B: the second experiment). Error bar represents SD (n = 3). Values with the same character showed no significance (ANOVA, p > 0.05).

정 실험의 최적 온도로 결정하였다.

2. 염분

지중해담치의 발생과정은 염분의 영향을 크게 받고 있었다 (ANOVA, p < 0.05) (Fig. 6A). 염분이 15 psu 이하일 경우 발생은 이루어지지 않았다. 20 psu에서는 정상 발생률이 5% 이하로 매우 낮았고, 25 psu에서는 정상 발생률이 30% 이상으로 증가하였다. 염분이 30 psu일 때 정상 발생률이 90% 이상으로 가장 높았고, 이후 염분이 증가함에 따라 정상발생률은 감소하여 45 psu 이상일 경우 발생률이 5% 미만이었다. ASTM (1994) 에서는 대조구에서의 정상 발생률이 70% 이상이 될 때 그 생물검정의 결과를 수용할 수 있도록 정해놓고 있다. 이 기준을 본 실험의 결과에 적용하여 보면, 70% 이상의 정상 발생률이 관찰된 염분 조건은 30 psu 및 35 psu의 두

조건뿐이었다. 따라서 본 연구에서는 지중해담치의 배아를 이용한 생물검정의 최적 염분 범위를 30-35 psu로 결정하였다. 하지만 본 실험의 결과는 염분 처리구의 간격이 넓어 생물검정 대상 시료의 염분을 보정 할 때 모호성을 나타낼 우려가 있었다. 그래서 염분처리구의 간격을 좁혀 추가적인 실험을 하였다 (Fig. 6B). 24 psu부터 2 psu 간격으로 아홉 개의 처리구로 실험하였고 기타 발생조건은 선행된 실험과 동일하게 주었다. 24-28 psu까지의 최고 정상 발생비율이 60%에도 이르지 못하였고 36-40 psu에서도 낮은 정상 발생비율을 나타내었다. 그리고 30-34 psu 범위 내에서는 70%를 상회하는 정상발생비율을 보였으며 통계적으로도 차이가 없었다. 따라서 본 실험과 추가적인 실험의 결과를 종합해 보면 최적의 염분범위는 30-35 psu라고 할 수 있다.

염분 처리구의 발생 실험의 결과, 대조구를 포함한 전체 염

분범위에서 사망개체의 비율은 10% 미만으로 낮았으며, 비교적 낮은 염분인 24 psu와 비교적 높은 염분인 38, 40 psu에서 유사하게 정상적으로 발생하지 못한 개체의 비율이 77% 이상의 결과를 얻었다. 그러나 이러한 결과가 염분이 지중해담치의 발생에 미치는 영향이 단지 발생속도를 늦추는 것인지 아니면 더 이상 발생하지 못하고 사멸 할 것인지에 대해서는 추가적인 연구로 밝혀야 할 것으로 생각된다.

일반적으로 지중해담치의 성체는 염분에 대한 내성 범위가 넓은 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구 결과, 발생 중인 배아의 염분에 대한 내성 범위는 비교적 좁은 것으로 나타났다. 즉, 성체가 광염성이라고 해서 유생 또한 광염성인 것은 아니었다. 하지만 실제 해양뿐만 아니라 기수지역에서도 지중해담치의 분포를 관찰할 수 있다. 그 이유는 발생과정 중 부화를 한 포배기부터 폐각이 형성되는 피면자유생 직전까지 단계에서 염분에 대한 영향을 받는 것으로 생각되어지며 폐각을 형성한 후 폐각의 개폐로 외부조건의 수용여부를 결정짓는 것으로 생각된다. 그리고 유생단계 중 이 피면자유생 시기가 약 30일 정도로 가장 길며 섬모를 이용하여 헤엄을 칠 수 있어 환경의 선택적 수용이 가능하다. 따라서 향후 지중해담치의 초기발생단계를 이용하여 해양 환경 시료의 독성 평가에 이용하기에 앞서 시료의 염분이 실험에 적합한 범위에 들어 있는지 여부를 우선적으로 확인할 필요가 있다. 이러한 연구결과로부터 공장폐수 및 강이나 강 하구지역 같은 곳에서의 시료를 이용한 생물검정을 할 때에는 염분을 적절히 보정하여 사용하는 것이 필요함을 알 수 있었다.

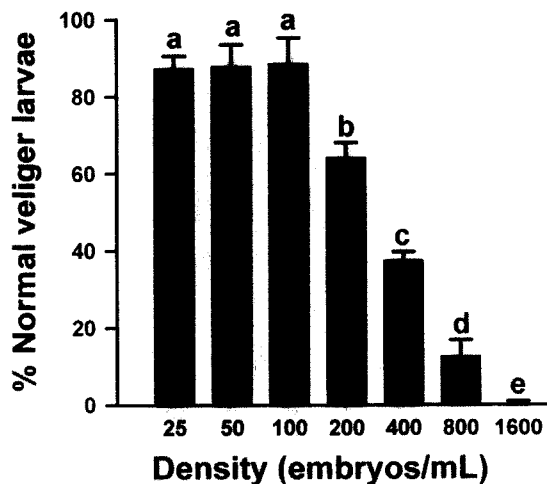


Fig. 7. Comparison of proportion of normal larvae of *Mytilus galloprovincialis* among different densities. Error bar represents SD (n = 3). Values with the same character showed no significance (ANOVA, p > 0.05).

3. 밀도

지중해담치의 정상 발생률은 초기 수정란의 밀도에 크게 영향을 받고 있었다 (ANOVA, p < 0.05) (Fig. 7). 수정란의 밀도가 ml 당 25-100 개인 범위에서는 정상 발생률이 90% 내외로 일정하게 유지되었다. 그러나 수정란의 밀도가 ml 당 200 개인 경우는 정상 발생률이 70% 미만으로 감소하였다. 밀도가 더욱 증가함에 따라 정상 발생률은 지속적으로 감소하여, 밀도가 ml 당 1600 개인 경우는 정상발생률이 5%에도 미치지 못하였다. 따라서 지중해담치 배아가 밀도 자체의 영향을 받지 않고 정상적으로 발생할 수 있는 최대 밀도는 ml 당 100 개 정도인 것으로 나타났다.

밀도가 증가하면서 정상 발생률이 감소하는 것은 발생 속도가 느려졌기 때문인 것으로 여겨진다. 실제로 실험 과정에서 관찰한 결과, ml 당 200 개 이상의 밀도에서 비정상 유생의 대부분이 피면자유생까지 도달하지 못하고 담륜자유생 상태였다. 실험 중에 지중해담치 배아가 포배기 때 부화한 후 배양액의 표면에 모여드는 현상을 관찰할 수 있었다. 즉, 배양액의 총 부피가 50 ml이라고 하지만, 부화 후 운동성을 가지면 50 ml의 공간을 모두 이용하는 것이 아니라 표면 근처의 일부 공간만을 이용하는 것이다. 이와 같이 좁은 공간에 모여들게 되면 서로 접촉할 확률이 높아지고, 용존 산소에 대한 경쟁 또한 증가하였을 것이다. 이러한 밀도 종속적인 효과로 인해 ml 당 200 개 이상의 고밀도에서 지중해담치의 발생 속도가 느려진 것으로 판단된다.

ASTM (1994) 에서는 초기 수정란의 밀도가 ml 당 30 개를 넘지 않도록 권장하고 있으며, ml 당 100 개를 넘을 경우 정상 발생률이 감소할 수 있다고 하였다. 이는 본 연구 결과에서 얻은 결과와 일치하지 않는다. 이러한 차이의 원인은 배양 용기의 부피에서 찾을 수 있다. ASTM (1994) 에서 권장하는 용기의 용량은 1-2 liter이고, 본 연구에서 사용한 용기의 부피는 50 ml이다. 1 liter 배양액에 ml 당 100 개의 수정란을 넣으면 주입된 총 수정란의 개수는 100,000 개이며, 50 ml 배양액에 ml 당 100 개의 수정란을 넣으면 주입된 총 수정란의 개수는 5,000개이다. 총 부피에 대한 평균 밀도는 두 용기에서 동일하다. 하지만, 밀도 종속 효과가 발생하는 포배기 이후에는 부피당 유생의 개수보다는 표면적 당 유생의 개수가 더 크게 작용하게 될 것이다. 그러므로 1 liter 용기의 표면적이 50 ml 용기의 표면적의 20 배 이상 크지 않다면 밀도 종속 효과는 1 liter 용기에서 더욱 크게 나타날 것이다. 즉, 배양액의 표면적이 넓을수록 정상 발생률은 더욱 더 증가할 것이다.

요 약

본 연구를 통해 지중해담치 (*Mytilus galloprovincialis*) 의 배이를 이용한 생물검정의 최적 실험 조건을 결정하였다. 결정

되어진 조건은 다음과 같다.

생물검정 시 노출배양의 온도는 15℃가 가장 적합하였으며, 이 온도에서 48 시간 노출 이후 실험생물이 피면자 (veliger) 유생단계까지 발생하는 시간이었다.

배양 가능한 시료의 염분 범위는 30-35 psu이다. 검정생물 발생의 최적 염분범위이므로 생물검정 시 시료의 염분이 이 조건 범위를 벗어날 경우 시료의 염분을 보정할 필요가 있었다.

배양 시 발생 도중 일어날 수 있는 밀도 종속적 효과가 나타나지 않는 최대의 밀도는 100 embryos/ml 이었다.

REFERENCE

- ASTM (1989) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs. ASTM E724-89. pp. 334-351. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- ASTM (1994) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs. ASTM E724-94. pp. 1-17. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Beiras, R., Bellas, J., Fernández, N., Lorenzo, J.I., Cobelo-Garcia, A. (2003a) Assessment of costal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentration in seawater, sediment and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo-larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Marine Environmental Research*, **56**: 531-553.
- Beiras, R., Fernández, N., Bellas, J., Besada, V., González-Quijano, A. and Nunes, T. (2003b) Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. *Chemosphere*, **52**: 1209-1224.
- Beiras, R. and Albentosa, M. (2004) Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; Implication for the implementation of seawater quality criteria. *Aquaculture*, **230**: 205-213.
- Choe, B.L., Park, M.S., Jeon, L.G., Park, S.R. and Kim, H.T. (1999) Commercial Molluscs from the Freshwater and Continental Shelf in Korea. 197 pp. National Fisheries Research and Development Institute. Kudeok Press, Busan. [in Korean]
- Geffard, O., His, E., Budzinski, H., Seaman, M. and Garrigues, P. (2001) Qualité biologique de l'eau de merévalue in situ par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Serie III. Sciences de la Vie*, **324**: 1149-1155.
- Goldberg, E.D. and Bertine, K.K. (2000) Beyond the mussel watch - new directions for monitoring marine pollution. *The Science of the Total Environment*, **247**(2-3): 165-174.
- His, E., Seaman, M.N.L. and Beiras, R. (1996) A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Research*, **31**(2): 351-355.
- Hur, Y.B. and Hur, S.B. (2000) Development and growth of larvae of four bivalve species. *Journal of Aquaculture*, **13**(2): 119-128. [in Korean]
- Jha, A.N., Cheung, V.V., Foulkes, M.E., Hill, S.J. and Depledge, M.H. (2000) Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutation Research*, **464**(2): 213-228.
- Kurt, P.B. and Ozkoc, B. (2004) A survey to determine levels of chlorinated pesticides and PCBs in mussels and seawater from the Mid-Black Sea Coast of Turkey. *Marine Pollution Bulletin*, **48**(11-12): 1076-1083.
- Nicholson, S. and Szefer, P. (2003) Accumulation of metal in the soft tissues, byssus and shall of the mytilid mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) from polluted and uncontaminated locations in Hong Kong coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, **46**: 1035-1048.
- Radenac, G., Fichet, D. and Miramand, P. (2001) Bioaccumulation and toxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus* sea-urchin embryo. *Marine Environmental Research*, **51**: 151-166.
- Smolders, R., Bervoets, L. and Blust, R. (2004) In situ and laboratory bioassays to evaluate the impact of effluent discharges on receiving aquatic ecosystems. *Environmental Pollution*, **132**(2): 231-243.
- Wedderburn, J., McFadzen, I., Sanger, R.C., Beesley, A., Heath, C., Hornsby, M. and Lowe, D. (2000) The field application of cellular and physiological biomarkers, in the mussel *Mytilus edulis*, in conjunction with early life stage bioassays and adult histopathology. *Marine Pollution Bulletin*, **40**(3): 257-267.
- Zar, J.H., (1984) Biostatistical Analysis, 2nd ed. 718 pp. Prentice-Hall International, Inc., Engelwood Cliffs, NJ.