

가거도 인근 해수에서의 플랑크톤 분포와 분석방법에 따른 검출률의 차이 비교

홍정원¹ · 이경락² · 김윤신³

¹서남대학교 임상병리학과
²국립환경과학원
낙동강물환경연구소
³조선대학교 의학전문대학원
법의학교실

접 수 : 2012년 10월 20일
게재승인 : 2012년 11월 20일

이 논문은 2011학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

책임저자 : 김윤신
(501-759) 광주광역시 동구 서석동 375
조선대학교 의학전문대학원 법의학교실
전화 : +82-62-230-6998
FAX : +82-62-234-4584
E-mail : ysk007@hotmail.com

The Comparison of Plankton Detection by Two Analysis Methods in the Seawater of Gageo Island

Jeong Won Hong¹, Kyung Lak Lee², Youn Shin Kim³

¹Department of Clinical Laboratory Science, Seonam University, Jeollabuk, Korea

²Nakdong River Environment Research Center, National Institute of Environmental Research, Gyeongsangbuk, Korea

³Department of Forensic Medicine, Chosun University School of Medicine, Gwangju, Korea

The acid digestion method for extracting diatoms has been widely used to confirm death by drowning, but its reliability is still disputed because some diatoms can be destroyed during the extraction process due to treatment with strong acid and heat. There is a need to develop an efficient and reliable digestive method to overcome the limitation of the present analytical procedure. In this study, the reliability and efficacy of quantitative and qualitative diatom analysis from seawater by an enzymatic digestion method was evaluated. We confirmed the merit of the enzymatic method that used proteinase K instead of nitric acid in the conventional method. As a result, the enzymatic method showed a higher recovery ratio and better preservation of the diatom structure, which is essential for quantitative (diatom density) and qualitative (species) interpretation of diatom analysis. This result indicates that the enzymatic method can replace the conventional acid digestion method to confirm cases of death by drowning since it is more reliable and yields conclusive results.

Key words : plankton, diatom, drowning, acid digestion, proteinase K

서 론

규조류란 갈색식물문의 한 군(群)으로 단세포로 이루어진 특수한 형태의 조류이다. 외부골격은 규산질이 함유된 두개의 피각으로 구성되어 있으며,¹⁾ 담수와 해수에 널리 분포하는 대표적인 식물 플랑크톤이다. 익사의 과정에서 인체의 폐포 내로 흡입된 익수매질은 확산과 삼투에 의해 혈액으로 들어오고,²⁾ 이때 함께 흡입된 규조류가 심장박동에 따라 혈류를 타고 몸의 여러 장기에 퍼지게 되는데, 이러한 특성에 근거하여 수중시체의 폐에서 검출되는 다량의 규조나 전신의 내부 폐쇄장기에서 검출되는 규조류는 익사를 증명해 주는 결정적인 증거가 된다고 여겨져 왔다. 규조류 외에도 익수 매질 안에 부유하고 있는 다른 조류 역시 같은 경로를 통해 시체의 장기 내로 침투될 수

있지만, 규조류는 규산질로 되어 있는 외부골격이 물리적, 화학적 변화에 강하여 조직 용해 시 사용되는 강산에 용해되지 않고 그 형태를 유지할 수 있기 때문에 인체 조직과 분리하여 규조류를 동정하고 계수할 수 있게 된다. 그러나 이와 같은 규조 분석법을 익사의 확진법으로 적용하기에는 몇 가지 명백한 한계가 있고, 사후 괄약근 이완과 수압 등의 영향에 따른 플랑크톤의 사후유입(passive contamination),³⁾ 비익사 시체의 장기조직에서도 플랑크톤이 검출된다는 보고,^{4,5)} 그리고 조직을 용해시키기 위해 처리한 강산이 규조류까지도 용해시킬 수 있다는 점⁶⁾ 등이 대표적인 문제점들이다. 이러한 이유로 인해 시체의 장기조직에서의 규조류 검출을 통해 익사를 확진하고자 하는 현재의 법의학적 감정기법은 그 신뢰성과 정확성에 대해서 여전히 논쟁이 계속되고 있다.⁷⁾

이런 문제점을 극복하기 위해 다양한 방법이 시도되어 왔고,

그중 하나가 단백분해 효소를 사용하여 인체 조직으로부터 플랑크톤을 분리하는 방법이다. 효소처리법은 실험자의 안전과 환경보호의 측면에서는 물론, 규조류의 검출율과 구조적 형태 유지에 있어서도 강산처리법보다 더 나은 결과를 보여준다고 보고된 바 있다.³⁾ 본 연구에서는 이러한 연구결과의 타당성을 검증하고, 아울러 기존의 강산분해법과 새로운 효소분해법의 검출율의 차이를 비교 분석하고자, 두 가지 분해법을 같은 검체에 적용하여 분석 방법에 따른 검출 개체수의 차이와 플랑크톤 세포구조의 손상 정도를 비교하였다. 그 결과에 근거하여 그간 제기되어 왔던 플랑크톤 검사법의 낮은 민감성을 설명할 수 있는 한 가지 원인을 규명할 수 있었고, 더 나아가 기존의 강산분해법을 대체할 새로운 분석기법으로서 효소처리법의 유용성을 제안하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 가거도 채수

2011년 7월 6일부터 7월 7일 이틀에 걸쳐 가거도(일명 소흑산도)와 인근 해역(국흥도 주변)에서 수심과 장소를 달리하여 채수하였다. 가거도는 한반도의 최서남단에 위치한다는 지리적 특성으로 인해 선택되었고, 국흥도는 가거도 서북방향에 위치하는 무인도로 보호가치가 높은 해양생태자원으로 인해 입도(入島)와 어로작업이 금지되고 있다는 특성을 반영하여 채수지점으로 선정하였다. 구체적인 채수 지점으로는 가거도 본섬 인근 해상의 수표(#1)와 수심 15 m 지점(#2), 국흥도 인근 해상의 수표(#3)와 수심 7 m (#4) 및 수심 11 m (#5)의 각 지점에서 연구자가 직접 잠수장비를 착용하고 잠수하여 1리터씩 채수하였다. 채수 시점은 국흥도는 7월 6일 오후 3시에 채수를 시작하였으며 비교적 맑은 날씨였음에도 해역에 강한 조류가 형성되어 있었다. 가거도 본섬은 7월 7일 오전 11시경에 채수하였으며 마찬가지로 수중 채수 작업 중에 강한 조류가 확인되었다. 이렇게 채수한 각 지점의 해수 검체는 플랑크톤 상호간의 포식작용을 막기 위해 채수작업 후 즉시 현장에서 포르말린(5v/v%)으로 고정 처리하였고, 실험실로 운반하여 냉장 보관한 상태에서 실험하였다.

2. 강산처리군

각 지점의 검체 100 ml씩을 250 ml 삼각플라스크에 분주한 후, 질산 40 ml씩을 더해준 다음 약 200°C의 모래탕(sand bath)에서 1시간 동안 가열하였다. 가열된 검체를 상온에 방치하여 냉각시킨 후에 검체를 50 ml 시험관에 분주하고, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물을 회수하는 방식의 처리를 몇 차례 반복하여 각 채수지점의 검체에서 침전물을 회수하였다. 이렇게 회수된 침전물은 3차 증류수

10 ml로 수세한 후 다시 동일한 조건으로 원심분리를 실행하였고, 다시 상층액은 버리고 남은 침전물을 3차 증류수 600 μ l로 녹여내었다. 얻어진 최종 볼륨의 절반인 300 μ l를 취해 유리슬라이드 위에 올린 후 건조기(slide warmer)에서 건조시켜 봉입제나 커버글라스를 사용하지 않고 표본 슬라이드를 제작하였다. 플랑크톤의 동정과 계수를 위해 위상차 현미경(LEICA DM 2500, Germany)을 이용하여 검경하였다.

3. 효소처리군

각 지점의 검체 100 ml를 취하여 2% SDS가 함유된 0.01 M Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액 20 ml와 Proteinase K(20 mg/ml, TaKaRa) 50 μ l를 더하여 흔들어서 혼합한 다음, 50°C 인큐베이터 안에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 검체를 50 ml 시험관에 분주하고, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물을 회수하는 방식의 처리를 몇 차례 반복하여 각 채수지점의 검체에서 침전물을 회수하였다. 이렇게 회수된 침전물은 3차 증류수 10 ml로 수세한 후 다시 동일한 조건으로 원심분리를 실행하였고, 다시 상층액은 버리고 남은 침전물을 3차 증류수 600 μ l로 녹여내었다. 얻어진 최종 볼륨의 절반인 300 μ l를 취해 유리슬라이드 위에 올린 후 건조기(slide warmer)에서 건조시켜 봉입제나 커버글라스를 사용하지 않고 표본 슬라이드를 제작하였다. 플랑크톤의 동정과 계수를 위해 위상차 현미경(LEICA DM 2500, Germany)을 이용하여 검경하였다.

결 과

1. 규조류의 동정 및 개체수 비교

가거도 본섬과 국흥도 인근 해수에서 분류 동정된 규조류는 총 21 속이었고, 그중 *Nitzschia*속이 국흥도 인근 해수의 수표 지점을 제외한 모든 채수 지점에서 검출되었으며, 개체수에 있어서도 효소 처리한 4개 지점의 검체에서 총 48개체가 검출되어 가장 높은 분포를 보이고 있음을 확인하였다(Table 1). 수심에 따른 분포의 차이를 보면, 전체적으로 수표 지점보다는 수심이 상대적으로 깊은 수체내에서 더 많은 종류와 개체수를 보여주었지만, 국흥도 수심 7 m와 11 m 검체에서 수심 차에 따른 규조류 개체수의 의미 있는 차이를 보이지는 않았다. 검출된 규조류는 효소처리군에서 상대적으로 피각의 고유한 형태학적 특성을 잘 유지하고 있었다. 이러한 피각 형태의 유지는 구조의 동정을 위해서는 매우 중요한 장점이 되는데, 검출된 몇 가지 주요 구조의 형태학적 조건은 그림 1에 제시하였다.

강산처리군과 효소처리군 간의 분석결과를 비교해 보면, 가거도 본섬 수표 지점 검체의 경우, 강산처리군에서는 규조류가 전혀 관찰되지 않은 반면, 효소처리군에서는 *Nitzschia*속,

*Navicula*속, *Fragilaria*속 등을 중심으로 15개체의 규조류가 동정되었다. 가거도 본섬 수심 15 m 검체에서는 강산처리군에서는 오직 *Rhaphdonema*속 1개체만 관찰된데 비해, 효소처리군에서는 *Nitzschia*속, *Navicula*속, *Rhizosolenia*속 등을 중심으로 12속, 47개체의 규조류를 확인할 수 있었다. 국흘도 검체의 경우, 수표지점의 강산처리군에서는 역시 규조류를 관찰할 수 없었고, 효소처리군에서도 오직 *Synedra*속 3개체만이 확인되었다. 그에 비해 국흘도 수심 7 m 지점 검체에서는 강산처리 후 6속, 8개체가 확인되었으나, 효소처리군에서는 13속, 53개체의 규조류를 관찰할 수 있었다. 국흘도 수심 11 m 지점 검체는 강산처리군에서 7속의 16개체가 확인되었고, 효소처리군에서는 *Nitzschia*속을 중심으로 10속의 41개체를 관찰할 수 있었다. 5개 채수지점 전체의 개체수를 비교해 보면, 강산처리군에서 11속, 25개체가 검출되었으나 효소처리군에서는 21속, 159개체가 관찰되어, 강산처리법과 효소처리법 사이에 1대 6.36배의 큰 차이를 보였다.

2. 규조류의 형태 비교

강산처리와 효소처리를 통해 각각 검출된 규조류의 형태를 비교한 결과, 상당한 형태학적 소견의 차이가 확인되었다(Fig.

2). *Nitzschia*속(a, a')에 있어서는, 효소처리 후(a')에도 세포 양 끝의 미세한 가시모양 돌기가 끝부분까지 잘 유지되어 있으나, 강산처리군(a)에서는 그러한 돌기의 상당 부분이 소실되어 있어, 구조적 소실의 정도가 구조의 형태학적 동정에 장애를 초래할 정도가 되고 있음을 보여주었다. *Grammatophora*속(b, b')의 경우, 효소처리군(b')에서는 외골격이 온전하게 유지되고 있음은 물론 세포내 공간도 뚜렷하게 확인되는 반면, 강산처리군(b)에서는 외골격의 비틀림과 내부 공간의 압착이 관찰되었다. *Pleurosigma*속(c, c')의 현미경 검경에서도, 효소처리군(c')에서는 외골격의 미세돌기가 확인될 정도로 형태를 유지하고 있으나, 강산처리군(c)에서는 마치 유령세포를 보는 것처럼 외골격의 윤곽이 흐릿해져 있으면서 세포내 원형질의 소실이 관찰되었다. 그 밖에도 비교적 크기가 작은 *Cyclotella*속의 경우, 강산처리 후에 피각의 1/3이 소실된 경우가 있고, 그보다 크기가 더 큰 *Coscinodiscus*속에서는 피각의 절반 이상이 떨어져 나가기도 했다. 전체적으로 가장 많은 개체수를 차지하고 있는 *Nitzschia*속은 중에 따라서 방사상의 군체(colony)를 형성하기도 하는데 효소처리군에서만 이런 군체의 형태 유지가 확인되었다. *Grammatophora*속의 경우에도 지그재그 형태의 군체를 형성할 수 있는데, 이러한 군체는 효소 처리된 검체에서만 관찰되었을 뿐, 강산처리후에는 발견되지 않

Table 1. Species and Number of Plankton Examined by Two Digestion Method, Strong Acid and Enzyme

No	Species	Site	Gageo main-island				Kukhul-do						Sum	
			Surface		Depth 15 m		Surface		Depth 7m		Depth 11m		Acid	PK
			Acid	PK *	Acid	PK	Acid	PK	Acid	PK	Acid	PK		
1	<i>Achnanthes</i>		0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
2	<i>Amphora</i>		0	0	0	2	0	0	0	5	3	2	3	9
3	<i>Bacillaria</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
4	<i>Climacosphenia</i>		0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	5
5	<i>Cocconeis</i>		0	1	0	0	0	0	0	5	1	2	1	8
6	<i>Coscinodiscus</i>		0	0	0	3	0	0	1	2	0	1	1	7
7	<i>Cyclotella</i>		0	1	0	0	0	0	2	5	1	0	3	6
8	<i>Fragilaria</i>		0	3	0	0	0	0	0	4	0	0	0	7
9	<i>Grammatophora</i>		0	0	0	0	0	0	0	2	1	7	1	9
10	<i>Licmophora</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
11	<i>Navicula</i>		0	3	0	8	0	0	0	7	5	0	5	18
12	<i>Nitzschia</i>		0	4	0	16	0	0	1	10	4	18	5	48
13	<i>Paralia</i>		0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	4
14	<i>Pleurosigma</i>		0	0	0	2	0	0	1	3	0	1	1	6
15	<i>Rhaphdonema</i>		0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0
16	<i>Rhizosolenia</i>		0	0	0	6	0	0	0	1	0	6	0	12
17	<i>Skeletonema</i>		0	0	0	1	0	0	0	5	0	0	0	6
18	<i>Surirella</i>		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
19	<i>Synedra</i>		0	0	0	1	0	3	2	0	0	0	2	4
20	<i>Thalassionema</i>		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
21	<i>Thalassiothrix</i>		0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	4
Total			0	15	1	47	0	3	8	53	16	41	25	159
Sum			15		48		3		61		57		184	

* PK : Proteinase K

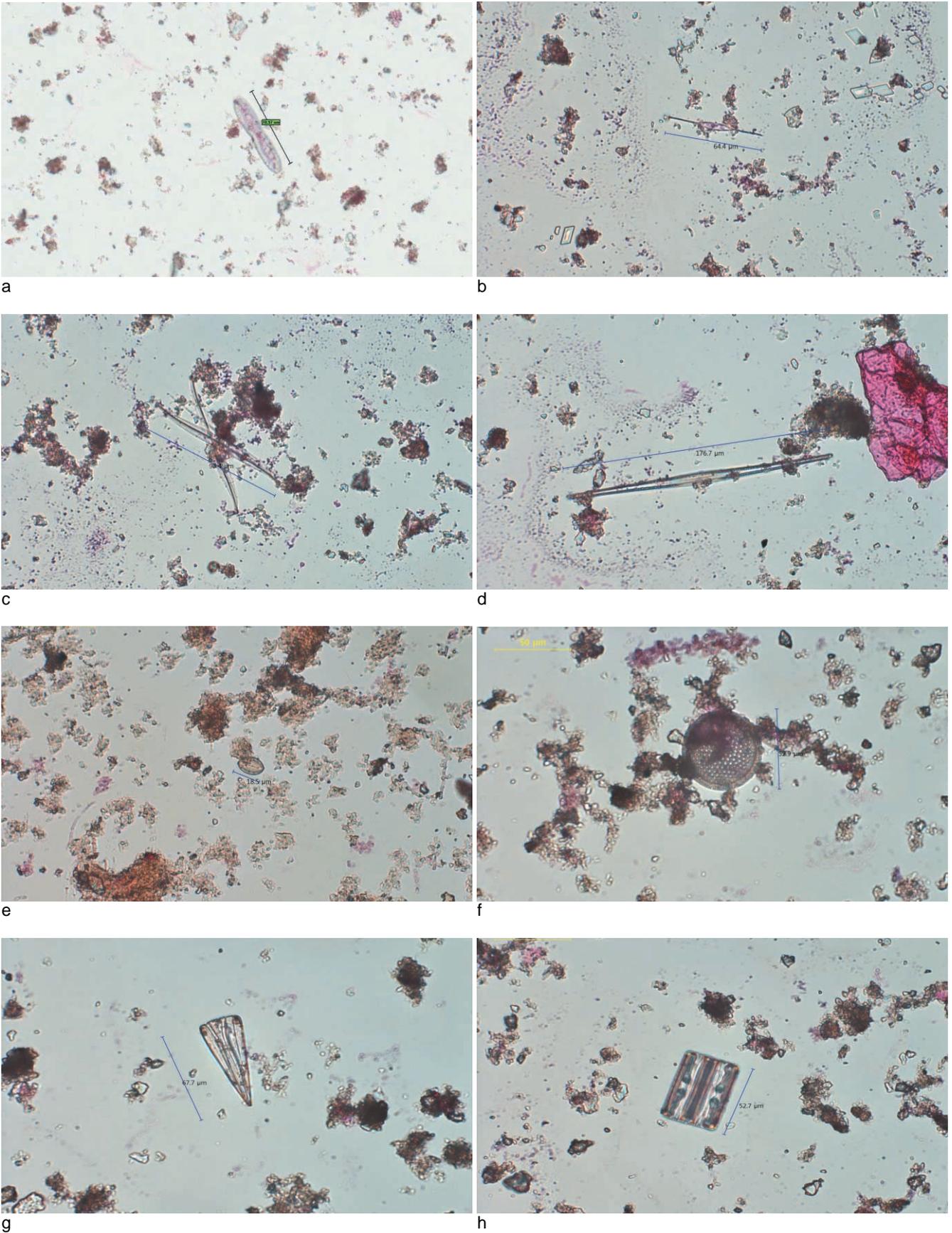


Fig. 1. Dominant species of plankton digested by proteinase-K are presented (400×).

a, b: *Nitzschia*, c: *Pleurosigma*, d: *Synedra*, e: *Cocconeis*, f: *Coscinodiscus*, g: *Licmophora*, h: *Grammatophora*

았다(Fig. 3). 또한 *Fragilaria*속은 선형에서부터 피침상까지 다양한 세포형태를 가지고 있으며, 보통 세포의 중앙부가 부착되어 참빗 모양의 군체를 이루는데, 실험결과 효소처리군에서만 이러한 참빗모양의 군체가 확인되었다.

고찰 및 결론

현재 감정실무에 활용되고 있는 구조분석법의 신뢰성에 대한 논란을 종식시키고, 수중시체의 사인규명을 위한 보다 실질적이고 유용한 감정기법을 확립해야 할 필요성이 시급하다. 이

를 위해서는 지금의 정량적 해석의 한계를 뛰어 넘어, 검출된 플랑크톤의 크기와 형태, 서식환경 및 계절적 생태역동까지를 고려한 정성적 해석이 뒷받침되어야 한다. 구조는 수심에 따른 구조상의 차이가 있다고 보고될 정도로 수생환경의 민감한 지표로 알려져 있으나,⁹⁾ 본 연구결과 수표층과 수심층에서의 분명한 개체수 분포의 차이를 확인할 수 있었을 뿐, 수심의 심도에 따른 주목할 만한 차이를 확인할 수는 없었다. 또한 예상 외로 분포 개체수도 적어서, 효소분해법으로 처리한 결과를 보면 지점에 따라 해수 50 ml당 8개체에서 많아야 53개체 정도에 그쳤다. 그러나 이러한 결과는 수중시체에 대한 플랑크톤 분석

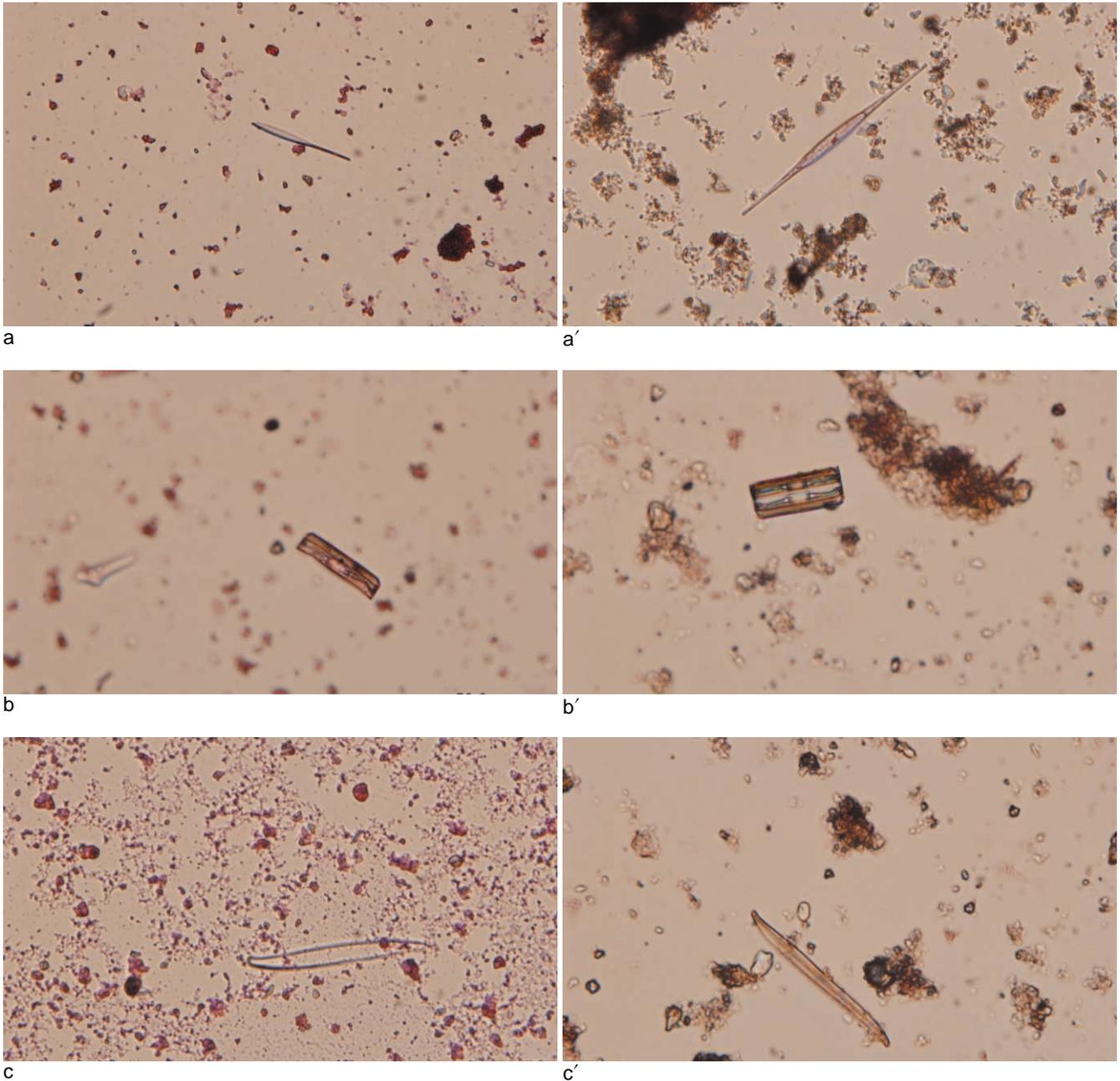


Fig. 2. The plankton features in detail show significant difference between acid digestion and enzyme digestion (400 ×).
a, a' : *Nitzschia*, b, b' : *Grammatophora*, c, c' : *Pleurosigma*

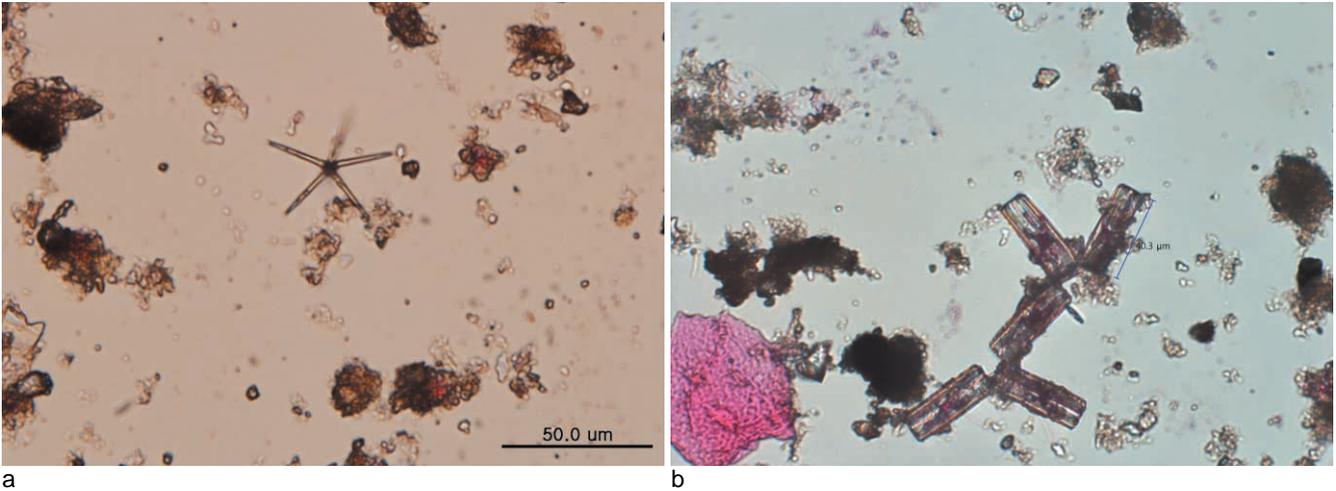


Fig. 3. The colony, stellate (a) and chain-like (b), are detected by enzyme digestion (400×).
a: *Nitzschia*, b: *Grammatophora*

의 낮은 양성율에 대한 이해를 높여 줄 수 있는 중요한 의미를 시사하고 있다. 이는 또한 법의학적인 감정 목적의 플랑크톤 분석은 결코 검출되는 개체수에 대한 정량적 해석에 머물러서는 안되며, 정성적 분석을 가능하게 하기 위해서는 플랑크톤 구조의 형태학적 손상을 최소화할 수 있는 새로운 분석법의 도입이 필요하다는 점을 역설적으로 강조해 주고 있다고 생각된다.

규조류는 규산질로 되어 있는 세포벽으로 인해 강산처리 후에도 구조적 형태를 유지할 수 있다고 알려져 있어서, 적지 않은 논쟁에도 불구하고 강산처리법은 현재까지도 수중시체의 사인규명을 위한 분석법으로 사용되고 있다. 그러나 본 연구의 결과, 강산처리는 예상했던 것보다 훨씬 더 심각하게 플랑크톤의 형태적 손상을 초래하는 물론, 검체 처리과정에서 개체수의 손실도 심하다는 점을 보여주었다. 강산처리 후에는 피각의 외형적 손상은 물론 세포 원형질의 유실도 훨씬 심했을 뿐만 아니라, 군체를 형성하는 규조류의 경우 효소처리군에서만 군체를 유지한 상태의 조류가 확인되었다. 감정실무에서 군체가 파괴됨으로써 구조의 동정에 어려움이 초래될 수도 있는데, 이러한 결과는 강산 처리가 개세포의 손상은 물론 군체의 분리도 일으켜 장기조직에서의 플랑크톤 분석에 상당한 장애를 야기할 수 있음을 시사해 준다. 개체수 손실의 정도에 있어서도, 국홀도 수심 11 m 지점 검체의 경우, 효소처리군에서는 41개체가 검출된 반면, 강산처리군에서는 16개체만이 검출되어 상대적으로 절반이 넘는 개체수가 실험 중에 소실되었을 것으로 추정된다. 가거도 본섬 수심 15 m 지점 검체의 경우는 효소처리 후에는 47개체가 검출된데 비해, 강산처리 후에는 단 1개체만이 검출되어 더욱 극단적인 결과를 보였다. 이와 같이 기존의 강산처리법은 규조류의 내부의 원형질 유실과 외골격의 형태 변화 및 수적 감소를 유발시킬 수 있다는 사실이 분명히 확인되었고, 그 정도는 감정의 목적에 비추어 볼 때, 용인될 수 없을 만큼 심각한 단점으로 작용할 수 있음을 보여주었다. 수중시체

의 사인규명을 위한 플랑크톤 분석에 있어, 현장 및 실험실내 조직 처리과정에서의 오염 가능성이 배제되었다는 전제하에, 장기조직에서 검출되는 개체수가 폐 조직의 경우에는 10 g 당 20개체 이상, 말초장기의 경우에는 10 g 당 5개체 이상이어야 한다는 기준을 제시한 연구보고^{3, 10)}에 비추어, 철저히 통제된 조건에서 분석이 이루어진다면, 플랑크톤 분석은 수중시체의 사인규명을 위한 적극적인 수단이 될 수 있음에는 논란의 여지가 없다고 생각된다. 이를 위해서는 가능한 한 플랑크톤의 고유한 형태학적 특성을 보존하면서 장기내로 유입된 개체수를 정확히 분리해 낼 수 있는 신뢰할만한 플랑크톤 분석법의 확립이 시급하다.

Proteinase K를 이용하여 규조류를 검출하는 방법은 규조류의 외골격을 그대로 유지하고 세포 말단의 돌기구조도 잘 보존되었으며, 세포 원형질도 유실 없이 유지되는 장점을 보였다. 또한 강산처리법에서 보다는 규조류의 개체수에서도 상당한 차이를 보이며 더 많이 검출되었고, 44속의 규조류 분류군 중에서 21속의 규조류가 관찰되어, 강산 처리에 의해서는 상당수의 규조류가 파괴될 수 있음을 보여주었다. 아울러 군체의 파괴 정도도 강산처리법에 비해 상대적으로 덜 하기 때문에 정확한 규조류의 동정을 위해서도 유용성이 높다고 판단된다. 이 결과를 토대로 효소 처리를 통해 규조류를 검출하는 방법은 익사 확인을 위한 강력한 증거의 하나인 규조류에 대한 손상을 최소화시키는 방법으로 기존의 방법을 대체할 수 있는 매우 효과적이고 유용한 분석법이라 사료된다. 다만, 채수한 원수(原水)에서 강산이나 효소를 처리하지 않은 조건에서 자연 분포하는 플랑크톤의 검출을 시도하였으나, 검체에 너무 많은 이물질이 포함되어 있었고 이를 제거하고 플랑크톤을 분류 동정하는 과정에서 많은 플랑크톤이 소실되어 비교데이터로 제시할 수 없었던 점은 본 연구의 한계점으로 남았다. 추후 원수(原水)에 분포하는 플랑크톤에 대한 분류 동정이 적절하게 이루어져서 여름철

가거도 인근 해역의 플랑크톤 서식분포에 관한 가치 있는 근거 자료를 확보할 수 있는 후속 연구가 이어질 필요가 있다.

참 고 문 헌

1. Cox EJ, Willis L, Bentley K. Integrated simulation with experimentation is a powerful tool for understanding diatom valve morphogenesis. *BioSystems* 2012;109:450-9.
2. Piette MHA, De Letter EA. Drowning: Still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Sci Int* 2006;163:1-9.
3. Ludes B, Quantin S, Coste M, Mangin P. Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrified corpses by diatom analysis. *Int J Legal Med* 1994;107:37-41.
4. Peabody AJ. Diatoms and drowning - a review. *Med Sci Law* 1980;20:254-61.
5. Foged N. Diatoms and Drowning - Once More. *Forensic Sci Int* 1983;21:153-9.
6. Ming M, Meng X, Wang E. Evaluation of four digestive methods for extracting diatoms. *Forensic Sci Int* 2007;170:29-34.
7. DiGiancamillo A, Domeneghini C, Gibelli D, Cattaneo C. Diatom extraction with HCl from animal tissue: A technical note. *Int J Leg Med* 2011;13:268-71.
8. Auer A. Qualitative diatom analysis as a tool to diagnose drowning. *Am J Forensic Med Pathol* 1991;12:213-8.
9. Ludes B, Coste M, Tracqui A, Mangin P. Continuous river monitoring of the diatoms in the diagnosis of drowning. *J Forensic Sci* 1996;41:425-8.