

*Daphnia magna*의 배양배지로서 국내 자연수의 적절성 평가

염 동 혁* · 전 찬 식

(안전성평가연구소 경남환경독성본부 환경규제대응센터)

Suitability Assessment of Domestic Natural Waters as a Culture Medium for *Daphnia magna*.
Yeom, Dong-Hyuk* and Chan Sig Jeon (Global Environmental Regulation Compliance, Gyeongnam
Environmental Toxicology Department, Korea Institute of Toxicology, Gyeongsangnam-
Do 660-844, Korea)

The present study was conducted to assess the suitability of domestic natural waters as a *Daphnia magna* culture medium. In order to assess survival rate and reproductive output, young female daphnids (parent animals), aged less than 24 hours at the start of the test and produced in the Elendt M4 medium, were exposed to Elendt M4 medium, de-chlorinated tap water, and natural mineral water for 21 days. *D. magna* cultured in Elendt M4 medium (reference medium) and natural mineral water met the criteria of OECD No. 211, *Daphnia magna* Reproduction Test Guidelines in terms of percent adult survival, first day of reproduction, and average young production. However, the mortalities of adult daphnids observed in de-chlorinated tap water were more than 20% in two reproduction tests for 21 days. Mortality was observed on exposure days 13, 15, and 18 in de-chlorinated water. The use of *D. magna* is recommended in water of hardness >80 mg CaCO_3 L^{-1} . However, the hardness of de-chlorinated tap water used in the present study was $50\sim 53$ mg CaCO_3 L^{-1} . Therefore, it is judged that the delayed mortalities observed in de-chlorinated tap water were caused by a rapid decreased in hardness when the medium was changed from Elendt M4 to de-chlorinated tap water. When *D. magna* is cultured using domestic natural waters (underground water, surface water, and de-chlorinated water), the quality-control (QC) data should be maintained through a standardization for health assessment method, toxicity test method using reference chemical, test intervals of reference toxicant toxicity test, and data treatment and interpretation. In the long term, national research programs are needed for the development of test species which are representative of domestic aquatic environmental conditions among indigenous daphnids.

Key words : *Daphnia magna*, Elendt M4 medium, de-chlorinated water, natural mineral water, survival, reproduction

* Corresponding author: Tel: 055) 750-3710, Fax: 055) 750-3729, E-mail: dhyeom@kitox.re.kr

서 론

Daphnia magna Straus는 소형 종(성체의 크기: 5~6 mm)으로 수명이 짧고, 단위무성생식(parthenogenesis)으로 번식을 하며, 분포범위가 넓을 뿐만 아니라 실험실에서 사육하기 쉬운 장점을 지니고 있다(Adema, 1978; Koivisto, 1995). 이러한 장점들로 인하여 *D. magna*는 1940년대부터 생태독성시험(ecotoxicity test)에서 담수무척추동물의 대표적인 시험생물로 사용되고 있다(Koivisto, 1995). 일반적으로 *D. magna*는 한국과 일본을 제외하고 물의 경도가 80 mg L⁻¹ 이상 되는 담수 호수나 연못에 서식하는 것으로 알려져 있다(Jonczyk and Gilron, 2005; Ministry Environment, 2009).

국가 수질자동측정망은 1991년 낙동강 폐놀유출사고와 1994년 유기용제 유출사고를 계기로 그 필요성이 처음 제기되었다. 수질오염사고에 신속히 대처하기 위한 목적으로 1995년에 국립환경연구원(현 국립환경과학원)이 낙동강 수계에 2개의 측정소를 설치한 것을 시작으로, 2010년 4월 현재 과학적인 하천수질관리 기반구축 및 수질오염총량관리제 등의 정책 기초자료 확보를 위해서 전국 주요 4대강(한강·낙동강·금강·영산강 등) 유역에 약 50개의 수질자동측정망이 환경관리공단에 의해서 설치·운영되고 있다(Jeong, 2010). 그 중에서도 1992년에 호소수질연구소(현 국립환경과학원 한강물환경연구소)가 독일로부터 *D. magna*를 이용한 생물감시장치를 수입하여 가동을 한 이후, 2008년 현재 전국 주요 4대강의 약 33개소에 *D. magna*를 이용한 생물감시장치가 설치·운영되고 있다(Ministry of Environment, 2008). 또한 환경부의 국내 수 생태계 보호를 위한 수질 및 수 생태계 보전에 관한 법률 제 32조 규정에 따라 2011년부터 폐수종말처리시설, 공공하수처리시설, 공공수역으로 직접 배출하는 1, 2종 사업장, 2012년부터는 3, 4, 5종 사업장의 산업폐수 배출수에 대한 *D. magna*를 이용한 생태독성 배출 허용기준이 적용되었다.

국내의 수 생태계 보호를 위한 생물감시장치 및 배출수 규제시험의 시험생물로 국내에는 분포하고 있지 않는 *D. magna*를 사용하는 문제는 시험생물의 선정기준에 따라 면밀하게 검토할 필요가 있다. 시험생물 선정기준의 여러 항목 중에서 논란의 여지가 되는 부분이 생태학적 타당성, 배양 및 사용의 용이성 부분이라 생각된다. 그러나 국내에 서식하지 않는 종에 대하여 생태학적 타당성을 논하는 것은 의미가 없기 때문에, 본 논문에서는 제외를 하였다. 그 다음으로 고려해야 할 점은 배양 및 독성시험에

서 시험생물로서의 사용의 용이성이다. 물론, 국제적으로 화학물질의 관리 및 등록을 위한 *D. magna*의 독성시험에서 배양배지와 희석수(dilution water)로 널리 사용되는 재합성수(reconstituted water)에서 *D. magna*를 배양하는 것은 국내에서도 많은 실험실에서 우수한 배양기술이 확립되어 있다. 그러나 국내의 생물감시장치의 문제점은 *D. magna*가 재합성수가 아닌 경도가 낮은 국내의 자연수에 노출된다는 점이다. 또한 산업폐수 배출수 독성시험에서 100% 배출수 시험용액은 국내의 자연수이다. 그러므로 생물감시장치 또는 산업폐수 독성시험에서 *D. magna*는 경도가 낮은 국내의 자연수에 노출된다는 점이다.

*D. magna*를 독성시험에 사용하기 위해서는 최소한 물의 경도가 80 mg CaCO₃ L⁻¹ 이상이 되어야 한다(Jonczyk and Gilron, 2005). 그리고 실제 자연환경에서 *D. magna*는 경도가 150 mg CaCO₃ L⁻¹ 이상인 물에서 발견된다고 보고하였다(Pennak, 1989). 그러나 국내의 지하수, 표면수, 수도수와 같은 자연수(natural water)는 일반적으로 유럽의 자연수에 비해서 경도가 낮은 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서 사용된 수도수와 먹는 샘물의 정도 범위는 50~100 mg CaCO₃ L⁻¹ 범위 이었다. 그러므로 국내에서 생물감시장치와 산업폐수 배출수 독성시험에서 외래종인 *D. magna*를 사용하는 데 있어서 몇 가지 생각을 해야 되는 부분이 있다. 첫 번째는 *D. magna*가 경도가 낮은 우리나라의 자연수(natural water)에서 정상적으로 성장하고 번식을 할 수 있을까? 하는 점이다. 두 번째는 *D. magna*를 표준화된 재합성수에서 배양을 하고 있다가, 국내의 자연수(지표수 또는 배출수)에서 독성평가를 하는 경우에 급격한 정도 차이로 인하여 독성영향이 과소 또는 과대평가될 가능성이 있다는 점이다. 그러나 현재까지 이에 대한 연구는 미비한 실정이다.

독성시험 및 평가에서 시험생물의 건강에 관한 문제는 기본적인 요소이면서 매우 중요하다. 시험생물인 *D. magna*의 건강 정도를 평가하기 위한 간편하면서도 일반적인 방법은 생존율 및 번식능력을 검사하는 것이다(Jonczyk and Gilron, 2005). 그러므로 본 연구의 목적은 첫 번째로 경도가 낮은 국내의 자연수에서도 *D. magna*를 건강하게 배양할 수 있는지를 평가하고자 하였다. 두 번째는 표준화된 재합성수에서 생산된 *D. magna*가 국내의 자연수에 노출되었을 때, 급격한 정도 차이에 의하여 나타날 수 있는 영향을 파악하고자 하였다. 연구목적에 위하여, 재합성수인 Elendt M4 배지(OECD, 2008)에서 생산된 어린 *D. magna*를 탈염수 수도수와 시판 중인 먹는 샘물에서 21일 동안 배양하면서 *D. magna*의 생존율 및 번식능력을 비교·평가를 하였다.

재료 및 방법

1. 시험생물

본 연구에서 사용한 *D. magna*는 Carolina Biological Supply Company (USA)에서 입수하여, 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 환경독성연구센터에서 계대배양한 개체를 사용하였다. *D. magna*는 3L의 Elendt M4 배지 (OECD, 2008)에서 배양을 하였으며, 수온은 18~22°C, 광주기는 광조건 16시간, 암조건 8시간으로 하였고, 30 분간의 전환기간(transition period)을 주었다. 먹이는 실험실에서 배양한 담수녹조류인 *Pseudokirchneriella subcapitata*를 매일 0.1~0.2 mg carbon/daphnid/day 비율로 공급하였으며, YCT (yeast, cerophyll, and trout feed suspension) (네오엔비즈, 부천)를 1 mL L⁻¹씩 주 2회 공급하였다. 배양조건의 적절성 여부는 단위무성생식에 의해 번식하는 것으로 확인하였다. 어미는 시험시작 24시간 전에 따로 분리하여 그 다음 날 생산된 생후 24시간 미만의 어린 물벼룩 (young daphnids)을 시험에 사용하였다.

2. 배양배지

배양배지에 따른 *D. magna*의 생존율 및 번식능력을 평가하기 위하여 OECD test guideline에서 *D. magna*의 배양배지와 독성시험의 희석수로 추천하고 있는 Elendt M4 배지 (OECD, 2008)를 대조 배지 (reference medium)로 하였으며, 시험배지 (test medium)로서는 본 연구팀에서 어류 사육수로 사용되는 탈염소 수도수 (de-chlorinated tap water) 그리고 시판 중인 먹는 샘물 (natural mineral water) (동원 미네마인, 동원 F&B 중부공장, 소재지: 충북 괴산군 불정면 창산리 115번지)을 선정하였다. 탈염소 수도수는 수돗물을 membrane filter (1 µm)와 활성탄 여과장치를 통과시켜 사용하였다. 본 배양시험에 사용된 3가지 배양배지의 기본적인 수질특성은 다음 Table 1과 같았으며, 3가지 배양배지 모두 배양시험 최소한 24시간 전에 시험조건에서 폭기를 시켜준 다음에

사용하였다.

3. 번식시험 (Reproduction test)

Elendt M4 배지, 탈염소 수도수, 먹는 샘물에서 *D. magna*의 건강 정도를 평가하기 위한 기본적인 시험방법은 OECD Guideline for the Testing of Chemicals, No. 211, *D. magna* Reproduction Test (OECD, 2008) 방법을 적용하여 2회 번식시험을 실시하였다. 번식시험은 100 mL 용량의 비이커에 각각의 배양배지를 100 mL씩을 넣은 다음, 각각의 비이커에 Elendt M4 배지에서 태어난 지 24시간 미만된 어린 *D. magna*을 1마리씩 10반복으로 노출시켜, 21일 동안 반지수식 (semi-static system)으로 시험하였다. 21일 동안의 시험기간 동안 매주 3회 (월, 수, 금) 각각의 배양배지를 교체하였으며, 물벼룩은 배양배지 교체 일에 입구가 큰 스포이드를 사용하여 새로 준비한 배양배지로 옮겨 주었다. 먹이와 광주기는 *D. magna*의 배양조건과 동일하였다. 번식시험을 하는 시험용액에는 공기를 공급하지 않았으며, 시험기간 동안 수온은 20±1°C로 유지시켜 주었으며, pH는 6.0~8.5이었고, 용존산소 농도는 8.2~10.5 mg L⁻¹이었다. 시험기간 동안 매일 어미 *D. magna*의 사망, 살아 있거나 또는 사망한 어린 물벼룩 생산 여부 및 마리 수를 관찰하여 기록하였다.

4. 통계분석

첫 배를 생산하는 시간, 어미 당 생산된 어린 물벼룩의 평균 마리 수를 포함한 번식 데이터에 대한 통계분석은 SYSTAT version 12 (SYSTAT software, Inc., USA)를 사용하여 분석하였다. Shapiro-Wilk's test 또는 Chi-Square test를 사용하여 번식 데이터의 정규성 (normality)을 분석하였으며, Bartlett's test를 사용하여 분산의 동질성 (homogeneity of variance)을 검사하였다. 만일 번식데이터가 이들 두 가지 테스트를 통과한 경우에는 Dunnett's multiple Comparison test를 실시하였으며, 정규성과 분산의 동질성 테스트를 통과하지 못한 경우에는 Steel's Many-One Rank test를 실시하였고, *p*값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 간주하였다.

Table 1. Water quality characteristics of Elendt M4 medium, de-chlorinated tap water, and natural mineral water.

Medium	Hardness (mg L ⁻¹ , as CaCO ₃)	pH	Residual chlorine (mg L ⁻¹)
Elendt M4	234~244	7.5~8.0	NA
De-chlorinated tap water	50~53	7.5~7.8	<0.01
Natural mineral water	100	7.6	NA

NA: Not available

결 과

번식시험 I에서는 Elendt M4 배지와 먹는 샘물에서는 배양한 어미 *D. magna*의 생존율이 100%로 나타났다. 그러나 탈염소 수도수에서 배양한 *D. magna*는 배양 15일째에 40%, 18일째 30%가 사망하여, 21일 실험기간 동안 총 70%의 *D. magna*가 사망을 하여, 생존율은 30%로 나타났다(Table 2, Fig. 1).

Elendt M4 배지와 먹는 샘물에서 배양한 *D. magna*는 배양한 지 평균 8.2일과 8.4일 만에 첫 번째 어린 물벼룩을 생산한 반면에, 탈염소 수도수에서 배양한 개체는 평균 9.8일 만에 첫 번째 어린 물벼룩을 생산하여, Elendt M4 배지에서 배양한 개체에 비해 탈염소 수도수에서 배양한 개체가 첫 번째 어린 물벼룩을 생산하는 시기가 유의하게 지연되었다($p < 0.05$, Table 2). 또한 21일 동안 생존한 어미 *D. magna* 한 마리당 생산된 살아있는 어린 물벼룩 수는 탈염소 수도수에서 평균 90.7마리로 조사가 되어 3개의 사육배지 중에서 가장 낮게 나타났다. 이는 대조 배지인 Elendt M4 배지에서 생산된 평균 153.5마리의 59.1% 수준 밖에는 되지 않는 것으로, Elendt M4 배지에 비해서 탈염소 수도수에서 생산된 어린 물벼룩 수가 유의한 수준으로 감소되는 것으로 나타났다($p < 0.05$, Table 2). 그러나 21일의 번식실험 기간 동안 3개의 배지에서 배양된 *D. magna*에서 생산된 어린 물벼룩 중에서 사망한 개체는 관찰되지 않았다(Table 2).

번식시험 II에서는 번식시험 I과는 다르게 탈염소 수도수에서 배양한 어미 *D. magna*의 생존율이 80%로 관찰되었으나(Table 3), 20%의 사망은 번식시험 I과 비슷하게 배양 14일째에 관찰되었다(Fig. 1). 번식시험 I과 마찬가지로 Elendt M4 배지와 먹는 샘물에서 배양한 어미 *D. magna*의 생존율은 100%로 관찰 되었다(Table 3).

첫 번째 어린 물벼룩을 생산한 시기 역시 번식시험 I과는 다른 양상을 나타냈다. Elendt M4 배지와 먹는 샘물에서 배양한 *D. magna*는 배양한 지 평균 8.4일과 7.7일 만에 첫 번째 어린 물벼룩을 생산하여 번식시험 I과 비슷한 양상을 나타낸 반면에, 탈염소 수도수에서 배양한 개체는 평균 7.4일 만에 첫 번째 어린 물벼룩을 생산하여, 번식시험 I에 비해서 약 2일 정도 빠르게 첫 번째 어린 물벼룩을 생산하였다(Tables 2, 3). 또한 21일 동안 생존한 *D. magna* 한 마리당 생산된 살아있는 어린 물벼룩 수는 대조배지인 Elendt M4 배지에서 평균 177.0마리가 생산된 반면에 탈염소 수도수와 먹는 샘물에서는 각각 평균 107.9마리와 89.6마리로 대조배지인 Elendt M4 배지에 비하여 유의한 수준으로 감소하였으며($p < 0.05$), 먹는 샘물에서 가장 낮게 나타났다(Table 3). Elendt M4 배지와 먹는 샘물에서는 생산된 어린 물벼룩이 사망한 것이 관찰되지 않았으나, 탈염소 수도수에서 배양한 개체 중 2마리가 배양 13일째에 각각 25마리와 23마리의 어린 물

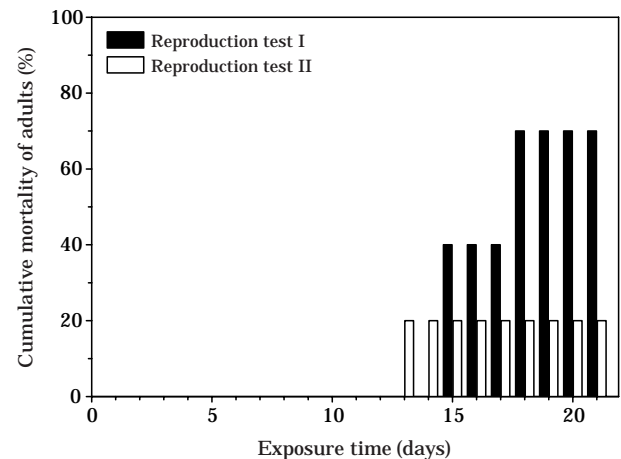


Fig. 1. Cumulative mortality of adults daphnids exposed to de-chlorinated tap water for 21 days.

Table 2. Summary of data for *Daphnia magna* exposed to Elendt M4 medium, de-chlorinated tap water, and natural mineral water in reproduction test I.

Medium	Adult survival ^a (%)	Mean ± Standard deviation		
		First Reproduction day ^b	Total Live Young ^c	Total Dead Young ^d
Elendt M4	100	8.2 ± 0.4	153.5 ± 9.8	0 ± 0
De-chlorinated tap water	30	9.8 ± 0.4*	90.7 ± 5.9*	0 ± 0
Natural mineral water	100	8.4 ± 0.9	100.3 ± 10.7	0 ± 0

^aPercent of adult daphnids alive at the end of the test.

^bFirst day that reproduction was observed.

^cSum of live young produced per surviving adult in 21 days.

^dSum of dead young produced per surviving adult in 21 days.

*Significant difference from Elendt M4 medium at $p < 0.05$.

Table 3. Summary of data for *Daphnia magna* exposed to Elendt M4 medium, de-chlorinated tap water, and natural mineral water in reproduction test II.

Medium	Adult survival ^a (%)	Mean ± Standard deviation		
		First Reproduction day ^b	Total Live Young ^c	Total Dead Young ^d
Elendt M4 medium	100	8.4 ± 1.0	177.0 ± 20.9	0 ± 0
De-chlorinated tap water	80	7.4 ± 0.8*	107.9 ± 15.4*	6.0 ± 11.1
Natural mineral water	100	7.7 ± 0.5	89.6 ± 15.3*	0 ± 0

^aPercent of adult daphnids alive at the end of the test.

^bFirst day that reproduction was observed.

^cSum of live young produced per surviving adult in 21 days.

^dSum of dead young produced per surviving adult in 21 days.

*Significant difference from Elendt M4 medium at $p < 0.05$.

벼룩을 생산하였으나, 모두 사망하였고 (평균 사망률: 6.0 마리), 배양 14일에 죽은 어린 물벼룩을 생산한 어미 2마리가 모두 사망하였다 (Table 3, Fig. 1).

고찰

물벼룩을 이용한 시험결과에 여러 가지 요인들이 영향을 미칠 수가 있는데, 그 중에서도 중요한 요인들은 시험을 수행하는 연구원들의 경험과 기술, 물벼룩의 건강상태, 연령, 그리고 시험물질에 대한 민감도, 온도 조절, 먹이의 공급량과 질이다 (Meyer *et al.*, 1987; Jonczyk and Gilron, 2005). 또한 희석수의 경도, pH, Ca/Mg ratio, 알칼리도, 그리고 방류수 독성시험에서는 시료의 보관조건 및 보관시간과 같은 물리·화학적 요인들도 역시 고려를 해야 한다 (Jonczyk and Gilron, 2005). 그러므로 *D. magna* 배양과 독성시험에서 희석수로 사용되는 물은 매우 높은 수준의 수질을 요구하고 있다. 일반적으로 물벼룩 (*Daphnia sp.*)들은 자연수 즉, 지하수, 표면수, 탈염소 수도수에서도 배양할 수도 있지만, 실제적으로는 재합성수를 강력히 추천하고 있다. 그 이유는 ① 실험실에서 비교적 쉽게 만들 수 있고, ② 사용되는 재합성수의 수질을 알 수 있으며, ③ 재합성수에서 물벼룩들이 생존, 성장 및 번식이 가능하고, ④ 재현 가능한 연구 및 시험결과를 생산할 수 있으며, ⑤ 실험실내 또는 실험실들 사이에서 생산된 시험결과들을 서로 비교할 수 있기 때문이다 (Jonczyk and Gilron, 2005).

국내에 서식하지 않는 *D. magna*를 사용하여 국내의 지표수 또는 배출수에 대한 독성평가에서 기본적으로면서도 중요한 것은 국내의 자연수 환경 및 수질 조건에서 *D. magna*를 건강하게 배양을 하는 것이다. 그리고 배양하는 *D. magna*의 건강상태를 평가할 수 있는 일반적이고

쉬운 방법이 사망률 및 번식능력을 평가하는 것이다 (Jonczyk and Gilron, 2005). *D. magna*의 사망률과 번식특성을 평가한 결과, ① 첫 배를 생산하는 시기가 12일 이상 지연이 되는 경우, ② 배양수조에서 휴면란 (ephippia)이 관찰되는 경우, ③ 사망률이 25%를 초과하는 경우, ④ 한 배에서 생산되는 어린 물벼룩 수가 15마리 이하인 경우에는 그 배치 (batch)에서 생산된 물벼룩은 독성시험에 사용하지 말고, 모든 어미를 도태시켜야 한다 (Jonczyk and Gilron, 2005). 또한, OECD No. 211, *Daphnia magna* Reproduction Test 지침서 (OECD, 2008)의 시험의 유효성 기준 (validity of the test)에 따르면 시험 종료 시, 대조군의 어미 물벼룩의 사망률이 20%를 초과하지 않아야 하며, 생존한 어미 당 생산된 살아있는 어린 물벼룩의 평균수가 60마리 이상이 되어야 한다.

본 연구팀에서 Elendt M4 배지에서 배양하던 *D. magna*를 탈염소 수도수에 적응시키기 위하여 배양을 한 결과, 낮은 생존율, 급격한 번식능력의 감소, 수컷과 휴면란이 관찰되었다. 그러므로 탈염소 수도수에서는 정상적인 계대배양이 되지 않았다. 그러므로 Jonczyk과 Gilron (2005) 및 OECD No. 211, *Daphnia magna* Reproduction Test 지침서 (OECD, 2008)의 기준을 고려하면, 탈염소 수도수에서 계대배양을 한 *D. magna*는 건강상태가 정상적이지 않은 것으로 판단되기 때문에, 성체와 어린 개체 모두 독성평가 또는 시험에서는 사용하지 말아야 한다. 탈염소 수도수에서 계대배양을 통하여 건강한 *D. magna*의 생산이 현실적으로 어렵기 때문에, Elendt M4 배지에서 생산된 어린 개체를 사용하여 배양배지에 따른 21일 동안의 번식시험을 2회 실시하였다. 이렇게 표준화된 재합성수에서 생산된 개체를 사용하여 지표수 또는 배출수에 대한 독성평가를 수행하는 것이 국내에서 적용되는 일반적인 방법이라고 생각된다. 현재 입수할 수 있는 자료에서 국내의 생물감시장치와 배출수 독성시험에 사용되는 *D.*

*magna*의 구체적인 배양방법을 확인할 수는 없었다. 그러나 물벼룩을 이용한 급성독성시험법 (Ministry of Environment, 2007)에서는 희석수로서 탈염소 수도수, 지하수 또는 양질의 천연수로서 총경도가 $160 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, pH 8.0 내외인 것 또는 경도가 $160 \sim 180 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ 인 조제수(즉, 재합성수)를 사용하도록 하고 있다. 이를 미루어 볼 때, 배출수 독성시험에 사용되는 *D. magna*는 최소한 총경도가 $160 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ 이상인 배양배지를 사용할 것으로 생각된다.

재합성수인 Elendt M4 배지에서 연속적으로 배양한 *D. magna*는 어미의 생존율 및 번식능력(첫 배를 생산하는 시기, 생존한 어미 당 생산된 총 어린 물벼룩 평균수, 생존한 어미 당 생산된 죽은 어린 물벼룩 평균수)은 2회의 번식시험에서 일정한 경향을 나타냈으며, Jonczyk과 Gilron (2005) 및 OECD No. 211, *D. magna* Reproduction Test 지침서 (OECD, 2008)의 기준을 벗어나지 않았다 (Tables 2, 3). 그러나 Elendt M4 배지에서 생산된 개체를 자연수의 일종인 탈염소 수도수에서 배양을 한 경우에는 어미의 생존율과 번식능력은 시험마다 서로 다른 양상을 보여 재합성수인 Elendt M4 배지에 비해 재현성이 현저히 떨어지는 것으로 나타났다 (Tables 2, 3). 그 예로서 탈염소 수도수에 대한 번식시험 I에서는 어미의 생존율이 30%로 매우 낮게 나타난 반면에, 번식시험 II에서는 어미의 생존율이 80%로 나타났다. 첫 배를 생산하는 시기 역시 번식시험 I에서는 평균 9.8일인 반면에, 번식시험 II에서는 평균 7.4일로 번식시험 I에 비해서 약 2일 정도가 단축되었다. 또한 생존한 어미 당 생산된 총 어린 물벼룩의 평균수는 번식시험 I에서는 90.7마리인 반면에, 번식시험 II에서는 평균 107.9마리로 실험마다 서로 다른 양상을 나타냈다 (Tables 2, 3). 특히, 탈염소 수도수에서 배양을 한 경우에는 2번 모두 어미의 사망률이 20% 이상으로 OECD No. 211, *Daphnia magna* Reproduction Test 지침서 (OECD, 2008)의 기준을 벗어났다. 어미의 사망률이 2번 모두 20% 이상으로 나타난 이유를 명확하게 밝히지는 못하였지만, 배양배지의 경도를 제외하고는 배양 환경조건 및 배양방법은 동일하였다. 본 번식시험에 사용한 탈염소 수도수의 경도는 $50 \sim 53 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ 이었으며, 앞에서 언급한 바와 같이 *D. magna*는 경도가 $80 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ 이상인 물에서 사용을 추천하고 있다 (Jonczyk and Gilron, 2005). 그러므로 탈염소 수도수에서 관찰된 어미의 사망률은 배양배지의 급격한 정도 차이로 인한 영향으로 판단된다. 그러나 배양 13일과 15일 이후에 사망된 개체가 관찰된 점을 보면 (Fig. 1), 정도차이로 인한 영향이 급성적으로 나타난 것은 아닌 것으로 판단

된다. 이와 같은 결과는 표준화된 재합성수에서 생산된 개체를 사용하여 경도가 $50 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ 정도가 되는 국내의 지표수 또는 배출수에 노출하여 24시간 또는 48시간 동안 급성독성시험을 수행하는 경우, 독성시험결과에는 영향이 없을 것으로 판단되지만, 2주 이상의 노출기간 요구되는 독성평가 또는 번식독성시험에는 많은 주의가 필요하다고 생각된다.

Elendt M4 배지에서 생산된 개체를 자연수의 일종인 먹는 샘물에서 배양을 한 경우에는 어미의 생존율과 번식능력(첫 배를 생산하는 시기, 생존한 어미 당 생산된 총 어린 물벼룩 평균수)은 2번 모두 Jonczyk과 Gilron (2005) 및 OECD No. 211, *Daphnia magna* Reproduction Test 지침서 (OECD, 2008)의 기준을 벗어나지 않았다 (Tables 2, 3). 앞에서 언급한 바와 같이 본 연구에서 사용한 먹는 샘물의 경도는 $100 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ 으로 탈염소 수도수의 2배 정도의 높은 경도를 나타냈으며, *D. magna*는 경도가 $80 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ 이상인 물에서 사용을 추천하고 있는 것 (Jonczyk and Gilron, 2005)과도 일치되는 경향을 나타냈다.

전 세계적으로 다양한 종류의 표준화된 재합성수와 질이 좋은 자연수가 물벼룩류의 배양에 사용되고 있다. 그러나 표준화된 재합성수도 역시 조제방법에 따라 사용되는 시약과 첨가물이 다르며, 질이 좋은 자연수도 또한 각 나라의 자연 환경조건에 따라 수질이 차이가 나타난다 (Jonczyk and Gilron, 2005; OECD, 2008). 그러므로 일반적으로 물벼룩의 배양에 사용되는 자연수 및 재합성수에 대하여 입자성 물질, TOC (total organic carbon), un-ionized ammonia, 잔류염소, 총 유기인계 농약, PCBs (polychlorinated biphenyls)를 포함하는 총 유기 염소계 농약 및 중금속 등의 수질기준이 제시되어 있다 (Jonczyk and Gilron, 2005; OECD, 2008). 본 연구에서는 재합성수인 Elendt M4 배지 (OECD, 2008), 국내의 자연수로서는 탈염소 수도수 그리고 시판중인 먹는 샘물을 대상으로 배양배지가 *D. magna*의 생존율 및 번식능력에 미치는 영향을 평가함으로써 배양배지에 따른 *D. magna*의 건강 정도를 평가하였다. 물론, 본 연구에서 사용된 배지들은 경도를 제외하고는 물벼룩의 생존 및 성장에 영향을 미칠 수 있는 수질항목이 기준치를 초과하지 않았다. 그러므로 본 연구에서 나타난 배양배지에 따른 생존율 및 번식능력의 차이는 사용된 배양배지의 정도 차이에서 나타난 결과라고 볼 수 있다. 즉, 배양배지의 경도가 $100 \text{ CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ 미만인 경우에는 *D. magna*의 생존율 및 번식능력에 해로운 영향을 미칠 수 있으며, 재현성이 있는 결과 (reproducible results)를 생산하지 못하였다. 그러므로 국내의 자연수

(지하수, 표면수, 탈염소 수도수 등)를 사용하여 *D. magna*를 배양할 경우에는 경도를 항상 고려해야 한다. 즉, 자연수의 경도가 80 mg CaCO₃ L⁻¹ 이하인 경우에는 경도를 최소한 100 mg CaCO₃ L⁻¹ 이상으로 강화시켜 사용하는 것이 바람직하다. 그리고 생물감시장치 및 산업폐수 독성시험 결과의 신뢰성을 높이기 위해서는 배양중인 *D. magna*의 건강성 평가방법, 대조물질 (reference chemical)을 이용한 독성시험방법, 시험주기, 데이터 처리 및 해석 방법과 같은 QC (quality control)에 대한 표준화가 필요하다. 그러나 궁극적으로는 국내에 서식하지 않는 *D. magna*를 사용하여 국내의 지표수 또는 배출수에 대한 독성평가를 수행하여 국내의 수 환경을 보호 또는 보전하기 보다는 국내에 서식하는 토착 물벼룩류를 대상으로 국내 수 환경에 적합한 시험생물과 시험방법을 개발하는 국가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

적 요

본 연구에서는 *D. magna*의 배양배지로서의 국내 자연수의 적절성을 평가하기 위하여, Elendt M4 배지에서 생산된 태어난 지 24시간 미만 된 어린 *D. magna*를 Elendt M4 배지, 탈염소 수도수 및 먹는 샘물에 21일 동안 노출시켜 생존율 및 번식능력을 평가하였다. 대조배지인 Elendt M4 배지와 먹는 샘물에서 배양한 *D. magna*는 어미의 생존율, 첫 배를 생산하는 시기, 생존한 어미 당 생산된 총 어린 물벼룩 평균수, 생존한 어미 당 생산된 죽은 어린 물벼룩 평균수는 2회의 번식시험 모두에서 Jonczyk과 Gilron (2005) 및 OECD No. 211, *Daphnia magna* Reproduction Test 지침서 (OECD, 2008)의 기준을 벗어나지 않았다. 그러나 탈염소 수도수에서 배양을 한 경우에는 2번의 번식시험 모두 어미의 사망률이 20% 이상으로, 배양 13일, 15일, 18일에 사망된 개체가 관찰되었다. *D. magna*는 경도가 80 mg CaCO₃ L⁻¹ 이상인 물에서 사용을 추천하고 있으나, 본 연구에서 사용된 탈염소 수도수의 경도는 50~53 mg CaCO₃ L⁻¹ 이었다. 탈염소 수도수에서 나타난 지연된 사망률은 배양배지의 급격한 경도 차이에 의한 영향으로 판단된다. 그러므로 국내의 자연수(지하수, 표면수, 탈염소 수도수 등)를 사용하여 *D. magna*를 배양할 경우, 배양배지의 경도를 100 mg CaCO₃ L⁻¹ 이상 강화시켜 사용하는 것이 필요하다. 그리고 궁극적으로는 국내에 서

식하는 토착 물벼룩류를 대상으로 국내 수 환경에 적합한 시험생물을 개발하는 국가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

인 용 문 헌

- Adema, D.M.M. 1978. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia* **59**: 125-134.
- Jeong, Y.J. 2010. Suggestions on the real-time water quality monitoring system. *Water and Future* **43**: 53-59.
- Jonczyk, E. and G. Gilron. 2005. Acute and chronic toxicity testing with *Daphnia* sp., p. 337-394. In: Small-scale freshwater toxicity investigations: Toxicity test methods (Blaisse, C. and J.F. Féraud, eds.). Springer, Dordrecht.
- Koivisto, S. 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests. *Environmental Pollution* **90**: 263-267.
- Meyer, J.S., C.G. Ingersoll and L.L. McDonald. 1987. Sensitivity analysis of population growth rates estimated from cladoceran chronic toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry* **6**: 115-126.
- Ministry of Environment. 2007. Official test method of water quality (Ministry of Environment Notification No. 2007-142, 2007.09.27.), No. 49., Acute toxicity test method of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) (ES 04751.1).
- Ministry of Environment. 2008. Management plan on the networks of automated water quality measurement.
- Ministry of Environment. 2009. Artificial rearing and restoration techniques for the tadpole shrimp.
- OECD. 2008. OECD Guidelines for the testing of chemicals, No. 211 *Daphnia magna* reproduction test.
- Pennak, R.W. 1989. Freshwater invertebrates of the United States: Protozoa to mollusca, 3rd eds, John Wiley & Sons, New York.
- Yeom, D.H., S.K. Lee and S.S. Choi. 1998. Influence of culture media on the survival, reproduction and susceptibility of *Daphnia magna*. *Korean Journal of Limnology* **31**: 93-96.

(Manuscript received 15 February 2012,
Revised 19 March 2012
Revision accepted 17 July 2012)