

국내산 물벼룩 *Daphnia* sp.를 이용한 연속적인 수질모니터링 장치 개발

윤성진[†] · 이성규 · 박한오*

한국화학연구원 부설 안전성평가연구소

*(주)바이오니아

Development of Continuous Water Quality Monitoring System using the Daphnid *Daphnia* sp.

Sungjin Yoon[†] · Sungkyu Lee · Hanoh Park*

Korea Institute of Toxicology, Korea Research Institute of Chemical Technology

*BIONEER corporation

(Received 12 September 2007, Accepted 26 November 2007)

Abstract

To develop the continuous water quality monitoring system using the daphnid *Daphnia* sp., the growth of test animal, sensitivity, and behaviour response of toxicants were observed. Growth of test animal significantly increased with increasing the food density under the 90~105 mg/L (CaCO₃) hardness, except the concentration of food (*Chrololella* sp.) was exceeded than optimal food supply. Behaviour responses of test animals were continuously analyzed by changes of fractal dimension value (FDV). The FDV sharply decreased after exposure to the concentrations of 0.13 mg/L copper, 0.06 mg/L lead, and 0.38 mg/L cadmium. In these concentrations, mortality and abnormal behaviour of daphnids exhibited within ca. 1.0-h after exposure. Comparison of 24-h LC₅₀ values with other zooplankton species indicated that sensitivity of the *Daphnia* sp. was higher than most zooplankton for lead, and brain shrimp, rotifer, and water flea (*Ceriodaphnia dubia*, *D. magna*) for copper, and brain shrimp, water flea (*D. lumholzi*), and amphipod for cadmium. Based on the above experimental results, significant relationship between toxicity and behaviour response of *Daphnia* sp. was supported the high potential of water quality monitoring system. Consequently, behavioural monitoring method in this study suggests a good estimation tool for detection of the discharged toxicants in water body and for ecotoxicological assessment aquatic organisms.

keywords : Behavioural monitoring, *Daphnia* sp., Ecotoxicological assessment, Toxicant

1. 서론

폐수나 화학물질의 잠재적인 독성을 평가하기 위한 생물학적 모델 연구는 박테리아, 동·식물플랑크톤 및 어류를 대상으로 수행되었으며, 주로 생존율, 성장률 및 생식율 등을 측정기준(endpoint)으로 한 생태독성평가 차원에서 개발되었다(Bodar et al., 1990; Codina et al., 1993; Forget et al., 1998). 그러나 일부 연구자들은 생물의 생태 및 생리적 특성 변화를 관찰하는 방법이 기존의 전통적인 평가방법보다 독성에 대한 생물의 민감도가 높기 때문에 새로운 독성평가의 지표(indicator)로서 사용될 수 있음을 제시하였다(Hurst et al., 2007; Vijayavel et al., 2004). 생태, 생리적 특성 변화는 생물의 행동(Fernández-Casalderrey et al., 1994; Preston et al., 1999; Saglio et al., 2001; Szulkin et al., 2006)이나 대사과정의 변화(Kim et al., 1996, 2004; Vijayavel et al., 2004)를 통해 관찰할 수 있기 때문에 이와

관련된 다양한 연구가 수행되었다. 예를 들면, Fernández-Casalderrey 등(1994)은 농약의 아치사 농도에 노출된 물벼룩 *Daphnia magna*의 섭식행동 변화를 연구하였으며, Charoy 등(1995)은 독성물질에 노출된 윤충류 *Vrachionus calyciflorus*의 유영행동 변화를 관찰하여 행동패턴의 변화가 잠재적인 아치사 독성시험의 수단으로써 가치가 있음을 제시하였다. 이와 더불어 Kim 등(2004)과 Vijayavel 등(2004)은 각각 바지락(*Ruditapes philippinarum*)과 게(*Scylla serrata*)를 이용하여 유기인 농약 chlorpyrifos와 naphthalene에 대한 생리적 측면의 아치사 독성 영향을 평가하였다.

한편, 수생생물을 이용한 연속적인 독성평가기술의 중요성은 이미 국내·외에서도 널리 인식되고 있음에도 불구하고 국내에서는 담수조류를 이용한 독성검출장치가 개발되었을 뿐 어류, 동물플랑크톤 및 미생물을 이용한 평가 기술은 대부분 수입제품에 의존하고 있다. 또한 실험생물은 대부분 국내종이 아닌 외래종이기 때문에 국내 하천으로 유입되어 생태계의 변화를 초래할 우려가 있으며, 장기적으로 사용할 경우, 생물 수입, 사육 및 유지비용이 급격히 증가할 것으로 예측된다. 이에 일부 연구자들은 실험생물의 조건으로 토착

[†] To whom correspondence should be addressed.

sjyon@kitox.re.kr

종을 우선적으로 권장하고 있다(김병석 등, 2004, 2006a, 2006b; 환경부, 2004; Wood and Stark, 2002). 따라서 독성물질에 대한 민감도 및 검출시간이 수입제품보다 뛰어나거나 큰 차이가 없을 경우, 국내에 서식하는 생물을 이용한 수질모니터링 장치가 개발된다면 장치 운영에 소요되는 시간 및 비용을 훨씬 저감할 수 있을 것이다.

독성평가에 사용되는 생물은 분해자인 발광박테리아로부터 2차 소비자인 어류에 이르기까지 다양한 분류군이 사용된다(Eriksson Wiklund et al., 2006; Stark and Vargas, 2003; Villarroel et al., 1999; Wester et al., 1990). 이들 중 일부 동물플랑크톤은 독성물질에 대한 민감도가 높고, 실험실 내에서 쉽게 배양할 수 있으며, 유전적 변이에 의해 야기될 수 있는 실험적 오류를 최소화시킬 수 있는 장점이 있어 농약, 중금속을 포함한 다양한 화학물질 및 산업폐수에 대한 독성평가 생물로써 널리 이용되고 있다(김영희 등, 2004, 2005; 하현중 등, 1995; Bodar et al., 1990; Fraysse et al., 2006; Hanazato, 2001). 그러나 국내의 독성평가에 사용되는 생물은 대부분 외래종에 의존하고 있으며, 측정장치 역시 고가의 수입제품을 사용하고 있어 국내환경에 적합한 실험종 및 측정장치의 개발이 시급한 상황이다.

이에 따라 본 연구는 국내 수서환경에 적합한 생물을 이용한 연속적인 수질모니터링 장치를 개발 및 보급함을 목적으로 수행하였다. 실험생물은 국내 하천에 서식하는 물벼룩 *Daphnia* sp.를 이용하였으며, 실험생물로서의 적합성을 규명하기 위하여 사육 및 성장실험을 실시하였다. 독성물질에 대한 물벼룩의 반응은 독성물질 노출 전과 후에 나타나는 행동패턴의 변화를 이용하여 관찰하였으며, 이와 더불어 타 종과의 독성물질에 대한 민감도를 비교하였다.

2. 연구방법

2.1. 실험생물 사육 및 유지

물벼룩 *Daphnia* sp.는 국내에 서식하는 종으로써, 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소에서 분양받아 사육하였다. 사육용수는 국내 서식환경을 감안하여 인공배지를 첨가하지 않았으며 실험실 주변에서 직접 채수한 지하수를 이용하였다. 물벼룩 성체는 분양받은 후 실험실로 옮겨 지하수가 담긴 3000 mL 용량의 유리수조에 넣고 수온 21~23°C, 광주기 16h : 8h (light : dark)를 유지하며 실험전까지 유지하였다. 먹이생물은 *Chlorella* sp.를 20×10⁴ cells/mL씩 1일 1회 공급하였다. 실험기간 동안 사용된 사육용수의 수소이온농도(pH)는 7.8~8.1, 용존산소(DO)는 7.5~8.7 mg/L, 경도는 90~105 mg/L(CaCO₃) 범위를 유지하였다.

2.2. 물벼룩의 성장실험

성장실험은 성체로부터 6시간 이내에 생산된 유생을 50 개체씩 각각 분리하여 사육용수가 채워진 3개의 2000 mL 유리 비이커에 넣고 4일 동안 수행하였다. 물벼룩 유생의 먹이는 실험목적에 따라 먹이의 양을 1, 2, 3 mL(1 mL=10×10⁴ cells/mL)로 조절하여 각각 1일 1회 공급하였다. 물

벼룩의 체장(mm)은 24시간마다 5개체를 임의로 분리하여 해부현미경(Leica, LEICAMZ 125, Germany) 하에서 0.01 mm 범위까지 계측하였다. 성장실험은 물벼룩 사육조건과 동일한 환경에서 수행하였다. 이와 더불어 수질모니터링 장치 운영 시 행동관찰에 적합한 개체를 선별하기 위하여 체장을 계측한 개체들은 행동관찰용기에 넣어 시스템에서의 개체 인식여부를 확인하여 실험에 사용할 생물의 최소체장을 결정하였다.

2.3. 물벼룩 행동관찰 실험

2.3.1. 행동관찰시스템 개요

물벼룩의 행동패턴은 CCTV를 통해 투시된 실시간 배경영상을 추출하여 현재 프레임과 차영상을 추출하는 기법을 이용하였다. 실험생물의 행동은 이동하는 개체의 좌표 정보를 얻은 후, 프랙탈 차원(fractal dimension) 분석을 통해 인지할 수 있도록 개발된 프로그램(B-Vision, 부산대학교)을 이용하여 추적하였다. 프랙탈 차원 분석은 box counting method를 이용하여 아래 식 (1)을 이용하였다.

$$N = \left(\frac{1}{r}\right)^D, \quad D = \frac{\log N}{\log(1/r)} \quad (1)$$

여기서, N은 궤적을 포함하고 있는 상자의 개수이고, r은 축소율이다. 이 두 변수의 관계는 이중로그 그래프(log(1/r), logN)로 나타낼 때 선형관계가 된다. 궤적을 포함하고 있는 상자의 개수와 축적사이의 관계는 멱 관계이며, 멱함수의 지수가 프랙탈 차원이 된다. 궤적이 직선을 이루면 프랙탈 차원은 1 내지 1에 가까운 값을 보인다. 면을 이룰 시에는 2가되고 측정되는 궤적에 대해서는 1과 2사이 중간의 차원이 실수로 나타나게 된다.

물벼룩 단일개체의 경우, 행동궤적에 대한 프랙탈 차원 값은 행동궤적을 1시간 단위로 나누어 계산하기 때문에 실험시작 시 물벼룩의 행동궤적에 대한 프랙탈 차원 값은 1시간에 한 번 구할 수 있으나 이후에는 궤적이 오버랩(overlap)되어 30분 단위로 연속적인 값의 변화를 계산하게 된다. 본 연구에서는 물벼룩 4개체를 이용한 다개체 프랙탈 차원 값을 구하기 때문에 프랙탈 차원 분석 시간을 단축할 수 있었다. 따라서 물벼룩 4개체의 행동궤적에 대한 실험초기 프랙탈 차원 값은 실험시작 15분 후에 계산되지만 이후로는 오버랩되어 7분 30초마다 계산된다.

실험생물의 행동은 행동추적프로그램을 이용하여 메인 컴퓨터에서 실시간으로 추적하며, 실험결과는 모니터 상에서 직접 확인할 수 있다. 또한 행동 자료는 프랙탈 차원 값으로 변환되어 텍스트 파일로 자동 저장되어 차후 행동 분석을 위한 자료로 활용할 수 있다. 그 외 행동 반응 분석에 관한 수리생물학적인 기본 이론 및 방법은 김철기 등(2003), Kwak 등(2002)의 논문에 잘 설명되어져 있다.

2.3.2. 독성물질 노출에 따른 물벼룩 행동반응

실험은 1000 mL 유리용기에 지하수를 넣은 후 평균 11.0 mL/min의 유량으로 행동관찰용기에 공급하는 재순환식 방법

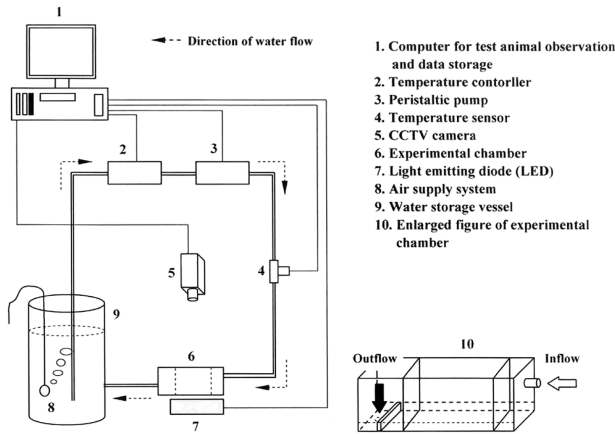


Fig. 1. Schematic (not to scale) of apparatus used to observe behavior pattern in the water flea *Daphnia* sp.

법(recirculating system)을 사용하였다(Fig. 1). 물벼룩의 행동은 행동관찰 프로그램에서 인식할 수 있는 개체를 선별하여 행동관찰용기에 4개체씩 넣고 관찰하였다. 독성물질 노출 실험은 사육조건과 유사한 실험환경에서 수행하였으며, 실험기간 동안 먹이는 공급하지 않았다.

독성물질 노출실험은 2가지 방법으로 수행하였다. 첫 번째, 실험기간동안 독성물질을 노출시키지 않은 상태에서 24시간 동안 물벼룩의 행동을 관찰하였다. 두 번째, 실험초기 6시간 동안 독성물질을 주입하지 않은 상태에서 물벼룩의 행동을 관찰하였으며, 이후 12시간 동안 각각의 독성물질을 일정농도로 조제하여 실험수조에 노출시키면서 독성물질에 대한 물벼룩의 행동반응을 관찰하였다.

실험에 사용한 독성물질은 중금속 액상 표준용액(JUNSEI, Japan)인 구리(Cu), 납(Pb), 카드뮴(Cd)이었다. 실험물질의 농도는 구리의 경우, 표준용액(1000 mg/L)으로부터 0.01, 0.1 mg/L로 희석하여 사용하였으며, 납은 0.1, 0.5 mg/L로 희석하였다. 카드뮴은 1000 mg/L 농도의 표준용액으로부터 0.05, 0.3, 0.5 mg/L 농도로 희석하여 노출실험에 사용하였다.

실험생물의 행동에 영향을 미치는 독성물질의 실제농도를 구하기 위하여 각각의 물질별로 최단시간에 행동반응이 관찰된 시료는 농도분석을 위하여 실험종료 후 각각의 실험물질별로 20 mL씩 채수한 후 분석전까지 4°C이하에서 냉장 보관하였다. 중금속 3종에 대한 실제 노출농도는 ICP-MS(ELAN 9000, PerkinElmer Inc., USA)을 사용하여 분석하였다.

2.4. 독성물질에 대한 물벼룩의 민감도 비교

독성물질에 대한 물벼룩의 민감도는 본 연구에서 물벼룩의 행동반응이 관찰된 독성물질의 실제농도와 기존에 실험되어진 자료를 이용하여 비교하였다. 물벼룩의 독성시험 자료는 US EPA에서 수행한 생태독성시험 자료가 포함된 PAN Pesticide Database(<http://www.pesticideinfo.org/Index.html>)의 결과를 이용하여 사망률을 측정값으로 분석한 24시간 LC₅₀ 값을 참고하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 물벼룩 성장실험

출생 후 12시간이 경과한 물벼룩 유생을 이용하여 96시간 동안 체장 및 체폭 변화를 관찰하였다. 실험결과, 실험기간동안 사망한 *Daphnia* sp.는 관찰되지 않았다. 물벼룩의 체장은 *Chrolorella* sp.를 1 mL씩 공급한 실험구에서 1.73±0.06 mm, 체폭은 1.06±0.04 mm로 측정되었다. 먹이량을 2 mL씩 공급한 경우, 체장 및 체폭은 각각 2.24±0.08, 1.41±0.06 mm이었으며, 3 mL을 공급한 물벼룩의 체장 및 체폭은 각각 2.26±0.08, 1.40±0.06 mm로 측정되었다. 본 실험에서 물벼룩의 성장실험을 수행한 결과, 먹이량을 2 mL과 3 mL씩 공급한 개체들의 체장은 뚜렷하게 구분되지 않았으나($p > 0.05$), 1 mL씩 공급한 실험구에서는 타 실험구에 비해 유의한 성장차이를 보였다($p < 0.05$). 실험기간 중 일부 개체를 분리하여 행동관찰용기에 넣고 행동관찰시스템에서의 개체 인식여부를 확인한 결과, 행동관찰이 가능한 물벼룩의 체장은 1.20 mm보다 큰 개체였으며, 생물의 연령은 먹이공급량을 2, 3 mL씩 공급하였을 경우, 출생 후 약 57시간 이상 경과한 개체들이었다(Fig. 2).

일반적으로 생태독성시험을 위한 실험종은 실험생물의 생활사, 번식능력, 독성물질에 대한 민감도 및 지역적인 특성을 고려하여 선정한다. 그러나 사육 및 실험에 사용되는 물은 각각의 실험수행기관에 따라 다소 차이를 보였다. 예를 들면, US EPA(1992)에서는 *Daphnia magna*를 이용한 표준생태독성시험에서 사육수의 경도를 160~180 mg/L(CaCO₃)인 hard water를 사용하도록 하고 있으며, OECD(1998)에서는 경도가 약 250 mg/L(CaCO₃)인 Elendt M4와 M7 배지

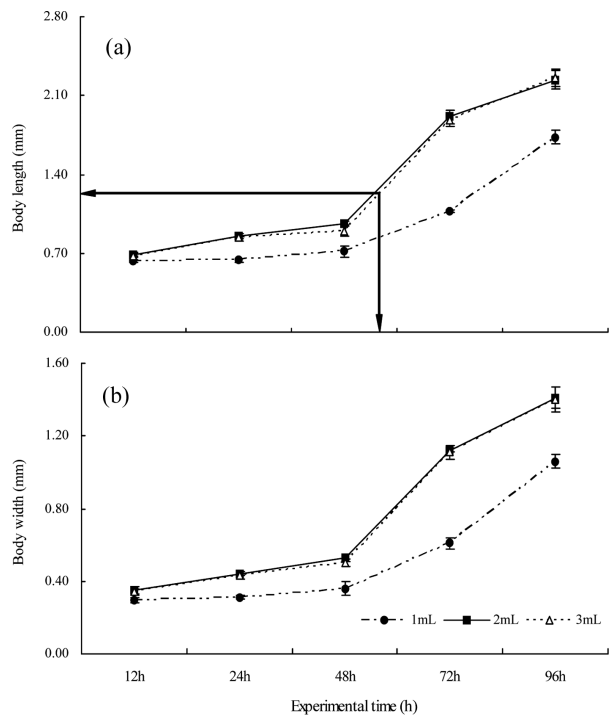


Fig. 2. Growth patterns of the daphnid *Daphnia* sp. during rearing period (96-h).

등이 물벼룩의 장기간 사육에 적절하다고 추천하고 있다. 그러나 본 연구에서 사용한 실험용수의 경도 90~105 mg/L(CaCO₃) 범위로서 국내 하천의 경도는 60.2~127.2 mg/L(CaCO₃) 범위(Kim, 2006)에 해당하며 국제적으로 권장하는 경도 수준과는 다소 차이를 보이고 있다. 이와 같은 조건은 *D. magna*의 경우, 지리적으로 염농도가 높은 해안지역의 저수지나 기수역에 주로 분포하는 생물학적 특성을 반영한 것이다(Koivisto, 1995). 그러나 *D. magna*는 국내 하천에 서식하지 않는 종이며, 독성평가 시 인위적으로 실험용수의 경도를 조절해야 하는 번거로움이 있기 때문에 국내 하천의 독성평가용 생물로는 적합하지 않다는 의견이 제시되었다(김병석 등, 2005; 환경부, 2004). 따라서 실험종 및 실험조건에 대한 재 검토의 필요성이 요구된다.

이와 관련하여 최근 국내에서는 생태독성 실험생물로서 국제표준종인 *D. magna*를 대체할 국내산 물벼룩을 개발하려는 연구를 수행하였다. 연구결과에 따르면, 국내산 물벼룩(*Daphnia* sp., *D. obtusa*, *Monia macrocopa* 및 *Simocephalus vetulus*)은 경도 80~100 mg/L (CaCO₃) 범위의 hard water, 먹이생물은 *Chrololella*를 하루에 25×10⁴~50×10⁴ cells/mL 농도로 공급할 때 생육이 잘 되는 것으로 보고되었다(김병석 등, 2004, 2006a, 2006b). 이는 본 연구결과와 큰 차이가 없는 것으로 나타났는데, 본 종들은 대부분 담수에 서식하는 종이며, *D. magna*와 유사한 실험조건을 적용할 수 있기 때문에 수서독성실험용 생물로서 충분한 가치가 있는 것으로 보고되었다(김병석 등, 2005). 따라서 *Daphnia* sp.를 포함한 대부분의 국내산 물벼룩은 적절한 사육 및 실험환경을 조성해 준다면 독성실험을 수행함에 있어 *D. magna*를 대체할 충분한 가치가 있는 것으로 판단된다.

본 연구에서 국내산 물벼룩 *Daphnia* sp.을 이용한 성장 실험을 통해 최적 먹이량을 공급한 경우, 물벼룩은 출생 후 57시간이 지난 개체들(> 1.20 mm)부터 행동관찰시스템에서 행동패턴을 관찰할 수 있는 수준까지 성장하였다. 국내에서 수질오염 조기감시를 위한 독성경보장치 (*Daphnia* Toximeter, BBE, Germany)에 사용되는 생물은 *D. magna*이다. 그러나 최근 농약의 등록과 관련된 생태독성시험에서 일부 실험자들은 *D. magna*의 지리적 제한성, 오랜 실내사육으로 인해 외부 화학물질 등의 스트레스에 생존하도록 적응되었을 가능성, 수온에 대한 내성한계의 차이를 들어 실험생물로서의 사용을 재검토하는 의견이 제시되고 있다(Bodar et al., 1990; Koivisto, 1995; Lagerspetz, 2000). 이와 반면 국내산 물벼룩 *Daphnia* sp.는 서식지가 담수에 한정되어 있으며, 실내사육 기간이 짧고, 수온변화에 따른 스트레스 영향을 적게 받기 때문에 비교적 넓은 수온구간에서도 안정된 대사활동을 유지할 수 있다는 장점이 있다(김병석 등, 2005). 또한 국내산 물벼룩은 인위적인 먹이공급 없이 현장수를 직접 공급한 경우에도 성장이 가능한 것으로 보고된 바 있다(임병진 등, 1996). 이러한 결과는 만일 실험생물의 행동을 명확히 관찰할 수 있는 tool과 독성물질에 대한 민감도가 뛰어난 생물을 확보한다면 국내종을 이

용한 연속적인 수질독성 모니터링이 가능하다는 것을 추론할 수 있다. 또한 실험생물의 사육 및 실험에 사용되는 물은 *D. magna*의 경우, 자연수보다 독성물질에 대한 민감도가 높은 인공배지를 사용하기 때문에 현장수에 노출된 후 나타나는 결과가 독성물질 노출에 따른 것인지 아니면 실험용수의 교환에 따른 생물의 일시적인 교란현상에 기인된 것인지에 대한 해석이 불투명해질 우려가 있다. 이에 정재원 등(2001)은 수생태계의 독성 영향 등을 파악하기 위해서는 수질에 따라 다양한 수질 환경이 나타나는 자연수가 적합한 것으로 판단하였다. 따라서 장기적으로 국내 수서환경을 모니터링 하기 위해서는 해당지역의 수서환경을 고려한 실험종의 선정 및 실험조건을 확립하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

3.2. 독성물질에 노출된 물벼룩의 행동반응

3.2.1. 독성물질 노출에 따른 물벼룩 행동반응

독성물질을 주입하지 않은 상태에서 물벼룩의 행동반응을 관찰한 결과, 프랙탈 값의 분포는 실험개체들의 행동량에 따라 다른 양상을 보였다. Group-I의 경우, 프랙탈 차원 값은 1.71~1.80(1.76±0.02)의 범위였으며, 분석 값의 진폭 변화는 크지 않은 것으로 나타났다. 또한 실험개체들은 행동관찰용기의 모든 영역에서 활발한 움직임을 보였다. 그러나 Group-II의 경우, 실험용기 내 일부 개체들의 움직임은 Group-I에 비해 활발하지 않았으며 실험용기의 한쪽 측면에서만 움직이는 행동을 보였다. 개체들의 행동패턴을 프랙탈 차원 값으로 산출한 결과, Group-II는 1.53~1.76(1.68±0.04) 범위였으며 분석 값의 진폭은 Group-I보다 훨씬 큰 차이를 보였다(Fig. 3).

독성물질에 노출된 생물의 경우, 행동에 영향을 줄 수 있는 한계 수준보다 높은 농도에서는 프랙탈 차원 값의 변화 폭이 심할 것으로 사료된다. 따라서 실험생물의 행동에 영향을 미치는 프랙탈 차원 값의 한계수준을 결정해야 할 필요성이 있다. 이에 따라 본 연구에서는 독성물질을 처리하지 않은 상태에서 분석된 최소 프랙탈 차원 값을 고려하여 1.50을 독성반응의 한계수준으로 결정된 후 행동분석 자료로 활용하였다.

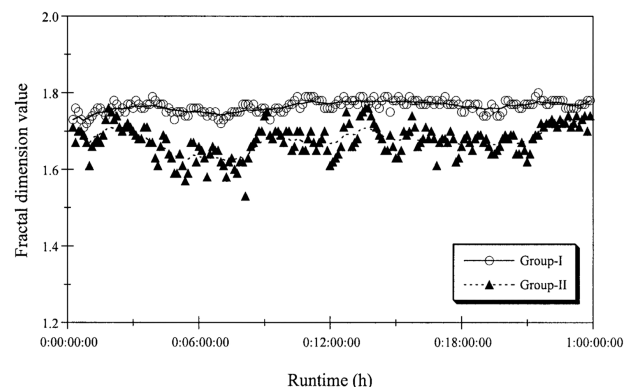


Fig. 3. Fractal dimension (FD) values of the daphnid *Daphnia* sp. not exposed to toxicant. Four fasted daphnids were introduced in the test chambers during 24-h.

3.2.2. 독성물질에 노출된 물벼룩의 행동반응

구리에 노출되기 전과 후 물벼룩의 행동패턴을 프랙탈 차원 값으로 분석한 결과, 구리 0.01 mg/L에 노출되기 전에는 1.65~1.80 범위였으며, 노출 후에는 1.56~1.77 범위로 처리 전에 비해 다소 감소하였다. 프랙탈 차원 값의 진폭은 구리에 노출된 후 소폭의 차이를 보였으나 독성반응의 한계수준인 1.50보다 높은 값이 분석되어 약제 처리에 따른 영향으로 해석하기에는 미흡하였다(Fig. 4). 구리 0.1 mg/L에 노출된 물벼룩의 행동반응은 뚜렷하게 관찰되었다. 구리에 노출되기 전 프랙탈 차원 값은 1.68~1.73 범위였으며, 진폭변화는 크지 않았다. 그러나 구리 0.1 mg/L에 노출된 후 프랙탈 값은 0.11~1.68 범위로 급격한 진폭변화를 보였으며, 모든 생물이 사망하여 더 이상 실험생물의 행동반응을 관찰할 수 없었다. 구리 0.1 mg/L에 노출된 후 프랙탈 차원 값이 한계수준 이하로 떨어지기까지 소요된 시간은 0.8시간이었다(Fig. 4a).

납 0.1 mg/L에 노출된 물벼룩의 움직임은 일시적으로 감소하는 경향을 보였다. 그러나 시간이 경과함에 따라 본래의 행동패턴을 회복하여 납에 의한 독성은 뚜렷하게 관찰되지 않았다(Fig. 5). 납 0.1 mg/L에 노출되기 전 물벼룩의 행동에 대한 프랙탈 값은 1.64~1.76 범위였으며, 노출 후에는 1.53~1.75로 노출 전과 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 그러나 0.5 mg/L에 노출된 경우, 물벼룩의 움직임은 급속히 감소하였으며, 프랙탈 차원 값은 납에 노출된 후 1시간 이내에 한계수준인 1.50 이하로 떨어졌고, 6시간 후 모든 개체가 사망하였다(Fig. 5a). 물벼룩의 행동반

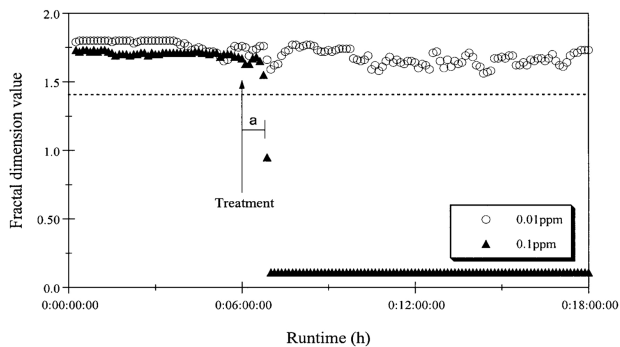


Fig. 4. Fractal dimension (FD) values of the daphnid *Daphnia* sp. exposed to 0.01 and 0.1 mg/L copper concentrations.

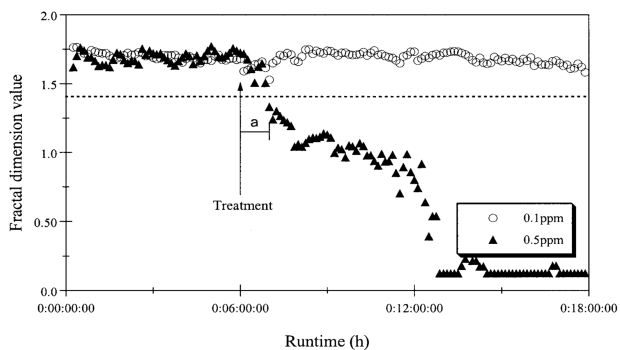


Fig. 5. Fractal dimension (FD) values of the daphnid, *Daphnia* sp. exposed to 0.1 and 0.5 mg/L lead concentrations.

응을 프랙탈 값으로 비교해 보면, 납에 노출되기 전 프랙탈 값의 범위는 1.64~1.76이었으며, 납 0.5 mg/L에 노출된 후에는 최소 0.13까지 감소하여 납에 의한 독성영향이 뚜렷하게 관찰되었다.

카드뮴의 경우, 독성노출 실험은 3개의 농도에서 실시하였다. 물벼룩의 행동반응을 프랙탈 차원 값을 통해 비교한 결과, 0.05 mg/L과 0.3 mg/L에 노출된 개체들은 노출 후 움직임의 변화폭이 심하여 프랙탈 값이 한계수준 이하로 떨어지기 전까지 진폭변화가 크게 나타났다. 이때 프랙탈 값의 범위는 0.05 mg/L에 노출된 경우, 1.10~1.72이었으며, 0.3 mg/L에서는 0.08~1.79 범위였다. 또한 0.5 mg/L으로 농도를 조절하여 물벼룩 노출실험을 실시한 결과, 프랙탈 값은 1.71에서 0.09로 급격히 감소하여 독성영향이 뚜렷하게 나타났다.

독성반응시간을 살펴보면, 카드뮴 0.05 mg/L과 0.3 mg/L에 노출된 물벼룩은 약제에 노출된 후 각각 6.9시간과 7.0시간 지나 독성반응이 관찰되었다(Fig. 6b). 그러나 카드뮴 농도를 0.5 mg/L로 조절하여 노출시킨 후 물벼룩의 행동을 관찰한 결과, 물벼룩은 노출 1.7시간 후 이상반응을 보였으며, 실험생물은 12시간 이내에 모두 사망하였다(Fig. 6a).

본 연구에 사용된 물벼룩 *Daphnia* sp.는 국내에서 채집하고 사육한 종으로써 현재 사육조건 및 생활사 연구를 통해 표준생태독성시험법 개발을 위한 시험종으로써의 가능성이 제시되고 있다(김병석 등, 2006b, 2004; 김영희 등, 2004). 그러나 이러한 연구에도 불구하고 국내에서는 아직 본 종의 독성물질에 대한 민감도 비교 실험 및 기타 관련 연구자료가 미흡한 실정이다. 이에 따라 본 연구에서는 물벼룩의 행동패턴을 수리생물학적 방법으로 관찰하기 위하여 독성물질 노출에 따른 실험생물의 행동변화를 프랙탈 차원 값으로 나타내었다. 독성물질에 노출되기 전 물벼룩의 움직임은 행동관찰용기의 모든 영역에서 관찰되었으며, 프랙탈 차원 값도 높게 산출되었다. 그러나 독성물질에 노출된 후 물벼룩의 움직임은 뚜렷하게 구분되었다. 독성물질에 노출된 물벼룩은 노출 초기에 움직임이 급격히 빨라진 후 서서히 둔화되어 관찰수조 일부 영역에서만 행동체적이 관찰되었으며 대부분 1시간 이내에 사망하였다. 이러한 현상은 기존의 행동 및 생리 연구에서도 유사하게 관찰되었다

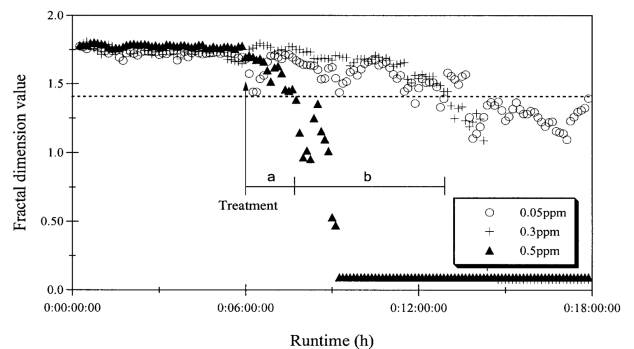


Fig. 6. Fractal dimension (FD) values of the daphnid, *Daphnia* sp. exposed to 0.05, 0.3, and 0.5 mg/L cadmium concentrations.

(Hanazato, 2001; Preston et al., 1999). 예를 들면, 카드뮴에 노출된 *D. magna*의 경우, 빛에 대한 민감도가 둔화되었으며(Michels et al., 2000), 일부 종은 먹이 섭식행동이 감소하였다(Fernández-Casalderrey et al., 1994). 또한 다량의 독성물질에 노출된 생물은 유영속도가 일시적으로 증가한 후 서서히 둔화되거나 사망하여 움직임이 관찰되지 않았다(Charoy et al., 1995). 단각류(*Monoporeia affinis*)의 경우, 독성물질을 회피하기 위하여 서식처인 퇴적물에서 이탈하는 경우도 발생하였다(Eriksson Wiklund et al., 2006). 이러한 현상은 생물의 호흡생리과정에서도 유사하게 나타났다. PCP(pentachlorophenol)에 노출된 황복(*Takifugu obscurus*)은 한계수준 보다 높은 PCP 농도에서 본래의 대사패턴이 교란되어 호흡률이 급격히 증가하였고, 수 시간 이내에 사망하였으며(Kim et al., 1996), 유기인 농약 chlorpyrifos에 노출된 바지락(*Ruditapes philippinarum*)의 호흡대사활동에서도 이와 유사한 현상이 관찰되었다(Kim et al., 2004). 이와 같은 결과는 한계수준 이하의 독성물질에 노출된 생물의 경우, 본래의 행동이나 대사패턴을 회복하는 경향이 있으나 노출농도가 극한치를 넘게되면 생태-생리적으로 심각한 손상을 입게 되어 본래의 정상적인 패턴이 교란되거나 더 이상 유지할 수 없는 경우에는 사망하는 것으로 판단된다.

3.3. 독성물질에 대한 물벼룩의 민감도 비교

독성물질에 대한 물벼룩 *Daphnia* sp.의 행동반응자료는 기존의 생태독성 실험을 통해 얻어진 24시간 LC₅₀ 값과 비교할 때 생물 종에 따라 민감도가 뚜렷하게 구분되었다(Table 1). 구리의 경우, 물벼룩의 행동반응이 뚜렷하게 관찰된 농도는 0.13 mg/L였으며, 이는 브레인 슈림프(*Altemia salinia*), 윤충류(*Brachionus calyciflorus*)의 24시간 LC₅₀

값보다 낮았으며, 단각류(*Gammarus* sp.)와는 유사하였다. 또한 독성물질에 대한 민감도는 물벼룩 *D. lumholzi*보다 낮은 것으로 나타났으나 그 외 *Ceriodaphnia dubia*와 *D. magna*보다 높은 것으로 조사되었다. 물벼룩의 납에 행동반응은 0.06 mg/L에서 뚜렷하게 나타났으며, Opossum shrimp (*Americamysis bahia*), 윤충류 및 물벼룩 *C. dubia*의 24시간 LC₅₀ 값보다 훨씬 낮은 농도에서 관찰되었다. 카드뮴의 경우, 물벼룩의 행동반응은 0.38 mg/L에서 관찰되었다. 카드뮴에 대한 독성은 물벼룩 *C. dubia*와 단각류(*Gammarus* sp.) 보다 민감도가 낮았으며 그 외 브레인 슈림프, 윤충류 (*B. calyciflorus*), 물벼룩 *D. lumholzi* 및 단각류 *G. pulex* 보다는 높은 것으로 나타났다.

본 연구에서 *Daphnia* sp.의 독성은 납 > 구리 > 카드뮴 순으로 나타났다. 이와 반면 임병진 등(1996)과 민선홍 등(2000)은 정치식(static test) 방법을 사용하여 24시간 동안 *D. magna*, 국내산 물벼룩 *Moina macrocopa*, *Simocephalus vetulus*에 대한 독성실험을 수행한 결과, 모든 물벼룩은 구리에 강한 독성반응을 나타냈으며, 다음으로 카드뮴과 납에 대한 독성이 뚜렷하였다. 이러한 결과는 본 연구자료와 다소 상이한 결과를 보였는데, 이는 기존의 독성실험 방법이 주로 정치식에 의존한 반면 본 연구에서는 재순환식 방법을 사용하였기 때문에 실험방법 상의 차이에 따른 독성반응의 상이성 및 독성물질에 대한 실험생물의 반응성 차이에서 기인된 결과로 해석된다.

일반적으로 생태독성 시험을 수행할 때 개체의 사망 또는 유영성 저해 결과는 시험용기를 일정시간 움직임 때 측각의 움직임이나 유영성의 여부에 따라 실험자가 결정하기 때문에 실험자의 주관적인 판단을 배제할 수 없다. 그러나 행동 및 대사과정을 연속적으로 관찰할 수 있는 장치는 독

Table 1. Comparison of the results of this study and 24-h LC₅₀ value (mg/L) of toxicology studies from the primary scientific literature on the zooplankton (PAN Pesticide Database: <http://www.pesticideinfo.org/Index.html>)

	Toxic dose (mg/L)			Medium	Reference
	Copper	Lead	Cadmium		
Brain shrimp					
<i>Altemia salina</i>	0.80		3.10	SW	PAN
Opossum shrimp					
<i>Americamysis bahia</i>		0.16		SW	PAN
Rotifer					
<i>Brachionus calyciflorus</i>	0.23	4.00	1.30	SW	PAN
Water flea					
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0.14	0.20	0.03	FW	PAN
<i>Daphnia</i> sp.	0.13	0.06	0.38	FW	Present study
<i>D. lumholzi</i>	0.07		1.95	FW	PAN
<i>D. magna</i>	0.78			FW	PAN
Scud, Amphipoda					
<i>Gammarus</i> sp.	0.13		0.14	SW	PAN
<i>G. pulex</i>			1.45	FW	PAN

SW: saltwater, FW: freshwater, PAN: PAN Pesticide Database

성반응에 대한 객관성을 확보하고, 독성물질에 대한 반수치사 농도(LC₅₀) 및 아치사 농도(sub-lethal concentration)까지 쉽게 관찰할 수 있을 것이다. 이에 본 연구에서는 비록 24시간 LC₅₀ 값과 명확하게 구분하여 비교하기엔 다소 무리가 따르지만 독성물질에 대한 *Daphnia* sp.의 행동반응을 뚜렷하게 관찰할 수 있음을 입증하였다. 또한 독성물질에 대한 민감도는 일부 종을 제외하면 대부분 기존의 24시간 LC₅₀ 값보다 낮은 것으로 분석되어 생물을 이용한 연속적인 수질모니터링 방법이 기존의 생태독성평가방법보다 더 효율적인 것으로 판단되었다. 실제 현장에서는 물벼룩의 유영성은 자연수 중의 부유물질, BOD, COD와 같은 일반 수질항목에 의해 영향을 받는 것으로 보고되었다(임병진 등, 1996). 이와 더불어 일부 연구자들은 미세조류가 독성물질을 섭취 또는 흡착하기 때문에 물벼룩의 독성에 대한 내성을 증가시킬 수 있음을 제시하였다(정재원 등, 2001). 따라서 수서환경으로 유입되는 다양한 유해물질을 효과적으로 모니터링하기 위해서는 현장에서 직접 채수하여 독성영향을 파악하는 것이 바람직할 것이다. 이에 수서생물을 이용한 수질모니터링 장치는 실제 현장에 존재하는 일반적인 수질항목 관리 뿐만 아니라 배출물질에 대한 독성평가 시 각종 중금속 및 기타 유기화학물질 등이 포함된 복합유해화학물질의 영향을 모니터링할 수 있는 수단으로써 이용 가치가 높은 것으로 판단할 수 있다.

결론적으로 본 연구에 사용된 연속적 수질모니터링 장치는 자연환경으로 배출되는 다양한 독성물질에 대한 생태독성평가 뿐만 아니라 이미 알려져 있거나 알려지지 않은 수계의 모든 배출물질에 대한 독성을 검출하는 수단으로써 충분한 이용가치가 있는 것으로 판단된다.

4. 결론

국내 수서환경에 적합한 연속적인 수질모니터링 장치를 개발하기 위하여 국내 하천에 서식하는 물벼룩 *Daphnia* sp.에 대한 성장실험, 독성물질에 대한 물벼룩의 행동변화 및 민감도를 비교한 결과, 물벼룩은 먹이의 밀도가 증가함에 따라 유의하게 성장하였다. 물벼룩의 행동반응은 독성물질의 농도에 따라 다소 차이를 보여 구리 0.13 mg/L, 납 0.06 mg/L 및 카드뮴 0.38 mg/L 농도의 독성물질에 노출된 후 뚜렷하게 관찰되었으며, 물벼룩의 사망 및 이상행동은 1시간 이내에 관찰되었다. 또한 물벼룩의 구리에 대한 민감도는 브레인 슈림프, 윤충류 및 물벼룩 *Ceriodaphnia dubia*, *D. magna*보다 높게 나타났으며, 납에 의한 독성은 대부분의 동물플랑크톤 종보다 낮은 농도에서 관찰되었고, 카드뮴 독성에 대한 민감도는 브레인 슈림프, 물벼룩 *D. lumholzi* 및 단각류보다 높은 것으로 나타났는데, 이는 본 실험생물의 독성물질에 대한 민감도가 타 종에 비해 다소 높다는 것을 의미한다. 또한 물벼룩의 행동반응시간은 독성물질의 농도와 유의한 상관성을 보였는데, 이는 국내산 물벼룩이 수질모니터링 생물로써 충분한 가치가 있음을 제시하는 결과이다. 이와 더불어 본 연구에서 사용한 생물의

행동모니터링 방법은 수서환경으로 배출되는 다양한 독성물질의 검출 및 수서생물에 대한 생태독성평가 수단으로써 충분한 가치가 있는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 환경부 차세대 핵심기술개발사업의 “생물화학 통합형 수질 독성 시스템 개발” 과제의 일환으로 수행되었음.

참고문헌

- 김병석, 박연기, 박경훈, 김진경, 신진섭, 김진화, 윤성명, 안용준(2006a). 표준생태독성시험법 개발을 위한 한국산 물벼룩의 최적 사육수 선별. *농약과학회지*, **10**(3), pp. 189-195.
- 김병석, 박연기, 박경훈, 김진경, 신진섭, 김진화, 윤성명, 안용준(2006b). 실내사육조건에서 한국산 물벼룩 중간 life cycle 비교. *농약과학회지*, **10**(3), pp. 196-200.
- 김병석, 박연기, 신진섭, 김진화, 안용준(2004). 한국산 물벼룩의 먹이조건별 번식영향. *농약과학회지*, **8**(2), pp. 117-128.
- 김병석, 박연기, 박경훈, 신진섭, 김진화, 안용준(2005). 표준생태독성시험법 개발을 위한 한국산 물벼룩의 최적사육 온도 구명. *농약과학회지*, **9**(3), pp. 221-230.
- 김영희, 이민정, 최경호, 이흥근(2004). 염색폐수의 수질독성 시험을 이용한 한국의 수질허용기준 평가연구. *한국환경보전학회지*, **30**(3), pp. 185-190.
- 김영희, 이민정, 어수미, 유남중, 이흥근, 최경호(2005). 물벼룩을 이용한 일부 염색폐수의 만성 수질독성 특성 연구. *한국환경생물학회지*, **23**(2), pp. 146-151.
- 김철기, 김광백, 차의영(2003). 다층 페셉트론을 이용한 유해물질 유입에 따른 송사리의 행동 반응 분석 및 인식. *멀티미디어학회지*, **6**(6), pp. 1062-1070.
- 민선홍, 김성태, 김건홍(2000). 조류, 물벼룩, 형광성 박테리아를 이용한 금속의 독성평가. *학술발표회논문집*, 대한토목학회, **20**(3), pp. 421-427.
- 임병진, 박수영, 변명섭, 이철우, 임은숙, 윤승모(1996). 수질오염 조기감시를 위한 물벼룩독성경보장치 활용. *한국유수학회지*, **29**(2), pp. 119-131.
- 정재원, 차미선, 조순자, 이상준(2001). 물벼룩(*Daphnia magna*)에 대한 중금속의 급성 및 만성 독성. *한국환경과학회지*, **10**(4), pp. 293-298.
- 하헌중, 김성태, 최종욱, 민선홍, 장태연, 김건홍(1995). 물벼룩과 형광성 박테리아를 이용한 중금속의 급성독성평가. *한국유수학회지*, **28**(3), pp. 369-376.
- 환경부(2004). *위해성 평가, 관리 요소 기술 - 수체에서 유해물질관리를 위한 Aqualarm 개발*.
- Bodar, C. W. M., van der Sluis, I., van Montfort, J. C. P., Voogt, P. A. and Zandee, D. I. (1990). Cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, **16**, pp. 33-40.
- Charoy, C. P., Janssen, C. R., Persoone, G. and Clément, P. (1995). The swimming behaviour of *Branchionus calyciflorus* (rotifer) under toxic stress. I. The use of automated trajectometry for determining sublethal effects of chemicals. *Aquatic Toxicology*, **32**, pp. 271-282.

- Codina, J. C., Pérez-García, A., Romero, P. and De Vicente, A. (1993). A comparison of microbial bioassays for the detection of metal toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **25**, pp. 250-254.
- Eriksson Wiklund, A. K., Börjesson, T. and Wiklund, S. J. (2006). Avoidance response of sediment living amphipods to zinc pyriithione as a measure of sediment toxicity. *Marine Pollution Bulletin*, **52**, pp. 96-99.
- Fernández-Casalderrey, A., Ferrando, M. D. and Andreu-moliner, E. (1994). Effect of sublethal concentrations of pesticides on the feeding behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **27**(1), pp. 82-89.
- Forget, J., Pavillon, J. F., Menasria, M. R. and Bocquéné, G. (1998). Mortality and LC₅₀ values for several stages of the marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Müller) exposed to the metals arsenic and cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malathion. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, **40**, pp. 239-244.
- Frayse, D., Geffard, O., Berthet, B., Quéau, H., Biagianti-Risbourg, S. and Geffard, A. (2006). Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **144C**, pp. 286-293.
- Hanazato, T. (2001). Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental Pollution*, **112**, pp. 1-10.
- Hurst, T. P., Key, B. H., Ryan, P. A. and Brown, M. D. (2007). Sublethal effects of mosquito larvicides on swimming performance of larval fish *Melanotaenia duboulayi* (Atheriniformes: Melanotaeniidae). *Journal of Economic Entomology*, **100**(1), pp. 61-65.
- Kim, B. S. (2006). *Determination of total hardness in laboratory culture waters in environmental studies*. NIAST SOP HSD/ERA-004.
- Kim, W. S., Yoon, S. J. and Yang, D. B. (2004). Effects of chloropyrifos on the endogenous rhythm of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Marine Pollution Bulletin*, **48**, pp. 164-192.
- Kim, W. S., Jeon, J. K., Lee, S. H. and Huh, H. T. (1996). Effects of pentachlorophenol (PCP) on the oxygen consumption rate of the river puffer fish *Takifugu obscurus*. *Marine Ecology Progress Series*, **153**, pp. 293-298.
- Koivisto, S. (1995). Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests?. *Environmental Pollution*, **90**, pp. 263-267.
- Kwak, I. S., Chon, T. S., Kang, H. M., Chung, N. I., Kim, J. S., Koh, Lee, S. K. and Kim, Y. S. (2002). Pattern recognition of the movement tracks of medaka (*Oryzias latipes*) in response to sub-lethal treatments of an insecticide by using artificial neural networks. *Environmental Pollution*, **120**, pp. 671-681.
- Lagerspetz, Y. H. (2000). Thermal avoidance and preference in *Daphnia magna*. *Journal of Thermal Biology*, **25**, pp. 405-410.
- Michels, E., Semsari, S., Bin, C. and De Meester, L. (2000). Effect of sublethal doses of cadmium on the phototactic behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **47**, pp. 261-265.
- OECD (1998). *Daphnia magna* reproduction test, OECD guidelines for testing of chemicals.
- Preston, B. L., Snell, T. W. and Dusenbery, D. B. (1999). The effects of sublethal pentachlorophenol exposure on predation risk in freshwater rotifer species. *Aquatic Toxicology*, **47**, pp. 93-105.
- Saglio, P., Olsén, K. H. and Bretaud, S. (2001). Behavioral and olfactory responses to prochloraz, bentazone, and nicosulfuron-contaminated flows in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **41**, pp. 192-200.
- Stark, J. D. and Vargas, R. I. (2003). Demographic changes in *Daphnia pulex* (leydig) after exposure to the insecticides spinosad and diazinon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**, pp. 334-338.
- Szulkin, M., Dawidowicz, P. and Dodson, S. I. (2006). Behavioural uniformity as a response to cues of predation risk. *Animal Behaviour*, **71**, pp. 1013-1019.
- US EPA (1992). *Aquatic invertebrate acute toxicity test, freshwater Daphnids, Ecological Effects Test Guidelines*.
- Villarroel, M. J., Sancho, E., Ferrando, M. D. and Andreu-Moliner, E. (1999). Effect of an acaricide on the reproduction and survival of *Daphnia magna*. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, **63**, pp. 167-173.
- Vijayavel, K., Gomathi, R. D., Durgabhavani, K. and Balasubramanian, M. P. (2004). Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, pp. 429-433.
- Wester, P. W., Canton, J. H., Van Iersel, A. A. J., Krajnc, E. I. and Vaessen, H. A. M. G. (1990). The toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltin dichloride (DBTC) in the small fish species *Oryzias latipes* (medaka) and *Poecilia reticulata* (guppy). *Aquatic Toxicology*, **16**, pp. 53-72.
- Wood, B. and Stark, J. D. (2002). Acute toxicity of drainage ditch water from a Washington State Crabapple-Growing region to *Daphnia pulex* in laboratory bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **53**, pp. 273-280.