

한국산 물벼룩의 먹이조건별 번식영향

김병석* · 박연기 · 신진섭 · 김진화 · 안용준¹

*농업과학기술원 농산물안전성부, ¹서울대학교 농업생명과학대학 농생명공학부

요약 : 농약 등 화학물질의 생태독성평가에서 주요 이용되는 수서무척추동물로 국제적으로 추천하고 있는 물벼룩은 *D. magna*이다. 하지만 *D. magna*는 국내에 서식하지 않는 종이므로 우리나라 환경에 적합한 생태위해성평가를 위해서는 국내에 서식하는 대표종에 대한 독성시험법을 개발할 필요가 있다. 따라서 본 연구는 국내에 서식하는 물벼룩 중에 농업환경에서의 대표종 4종(*Daphnia obtusa*, *Daphnia* sp., *Moina macrocopa*, *Simocephalus vetulus*)을 선정하여 이들 종에 대한 최적실내사육조건을 확립하고자 3종의 조류를 배양한 후 냉장보관 하면서 먹이의 종류 및 양에 따른 물벼룩의 생육특성을 조사하였다. 그 결과 시험에 사용된 국내산 물벼룩은 국제적인 추천종인 *D. magna*에 비해 먹이의 양이 절반 정도 수준에서도 잘 생육하는 것으로 조사되었고 특히 *Chlorella*가 가장 적합한 먹이인 것으로 나타났는데, *Chlorella*의 최적 투여농도는 $25 \times 10^4 \sim 50 \times 10^4$ cells/mL이었다. (2004년 6월 3일 접수, 2004년 6월 25일 수리)

Key words : eco-toxicological test method, algae, diet condition, *Daphnia magna*, *Daphnia* sp, *Daphnia obtusa*, *Moina macrocopa*, *Simocephalus vetulus*.

서론

물벼룩류는 대부분이 몸길이가 0.3~2 mm인 소형 갑각류로서 전세계적으로 11과 52속 450여 종이 기록되어 있으며, 이 중 95%가 담수산인데 이들은 유속이 빠르지 않은 강이나 개울을 비롯하여 거의 모든 담수역에 서식하는 저서성 또는 부유성 무척추동물이다 (Uéno, 1980; Barnes, 1987; Toshihiko와 Eiji, 1991). 국내에서는 9과 29속 55종의 물벼룩이 서식하고 있는 것으로 보고되고 있으나(김, 1988; 윤, 1993) 이는 전세계적으로 기록된 물벼룩류의 약 12%정도로 이 동물의 광범위한 분포특성을 고려할 때 더 많은 종이 장차 기록될 것으로 보인다. 물벼룩은 생육조건이 양호한 환경에서는 암컷의 단위생식으로 번식이 이루어지며, 수컷은 대개 생육조건이 불량한 시기, 특히 겨울이 되기 전이나 물이 말라 건조해지기 직전에 출현한다. 수컷이 발생하여 암컷과 수정을 하면 휴지란(ephippia)이 생기는데 이것은 건조나 동결에 충분히 견딜 수 있고 바람에 의해 멀리 분산할 수도 있으며, 이듬해 다시 적당한 환경이 되면 단위 생식하는 암컷

으로 부화하게 된다. 이런 휴지란의 생성은 밀도, 온도, 광주기 등에 의해 유도된다고 알려져 있다(Barnes, 1987; 김, 1988).

물벼룩이 생태독성평가분야에서 중요한 시험생물로 선정된 이유는 이 종이 전세계적으로 널리 분포하고 있고, 논, 강, 호수 등 거의 전 지역의 담수역에 서식하며, 담수먹이연쇄에서 중요한 위치를 차지하고 있는 동물성 플랑크톤 집단을 대표하고, 단위생식으로 유전적 동질성 확보도 가능하며, 크기가 작아 취급하기 편리하고 실내사육도 용이할 뿐만 아니라, 무엇보다도 다른 무척추동물에 비해 약제에 대한 감수성이 높기 때문이다(Mark와 Solbé, 1998).

독성시험에 이용가능한 물벼룩종이 다양함에도 불구하고 농약의 등록과 관련된 시험에는 *D. magna*만을 요구하거나 선호하는데(OECD, 1984; US EPA, 1992) 그 이유는 *D. magna*가 환경오염물질에 대한 감수성이 높고(Ferrando, 1995; Hanazato, 1998; Mark와 Solbé, 1998), *Daphnia*속 물벼룩 중에 크기가 가장 커 다루기가 편리하며(최대 길이는 5 mm 이상), 또한 오랜 기간에 걸쳐 수행된 급성·만성시험을 통해서 방대한 독성 data-base를 구축하고 있기 때문이다(Goulden 등, 1982).

*연락처

하지만 *D. magna*는 국내에 서식하지 않는 종이고 국내서식 물벼룩종에 대한 독성시험법도 확립되지 않은 상태이므로, 국내 환경에 적합한 생태위해성평가를 위해서는 국내서식 물벼룩과 *D. magna*와의 사육 특성과 약제 감수성 등을 비교·검토하여 국제적인 추천종인 *D. magna*대신 국내서식 물벼룩의 이용가능성을 조사할 필요가 있다.

따라서 본 연구는 화학물질의 환경독성평가지험에서 국제적 추천종인 *D. magna*대신 국내서식 물벼룩의 이용가능성을 알아보기 위하여 국내환경에서의 대표성, 실내사육가능성 및 독성시험에 적합한 크기 등을 고려하여 선발된 4종의 국내서식 물벼룩(*Daphnia* sp., *Daphnia obtusa*, *Moina macrocopa*, *Simocephalus vetulus*)에 대하여 녹조류의 종류와 양에 따른 번식영향을 조사하여 최적 먹이조건을 구명하고 급성 만성 독성시험기준에 적용이 가능한지 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

시험조류(algae)

시험물벼룩의 먹이로 사용된 조류(algae) 중 2종은 한국화학연구소에서 계대배양중인 것을 분양받았는데, *Selenastrum capricornutum*(ATCC 22662)은 미국 American Type Culture Collection에서, *Scenedesmus subspicatus*(CCAP 276/20)는 영국 Shell Research Limited의 Sittingbourne Research Center에서 분양받은 종이다. 그리고 *Chlorella vulgaris*(CCAP 211/12)는 영

국 Zeneca사의 Brixham Environment Laboratory에서 계대배양 중인 종을 분양 받았다. 이들 3종 모두 농업과학기술원 환경독성실험실에서 계대배양하면서 시험에 사용하였다.

조류(algae) 배양용 배지는 Bold's Basal Medium을 사용하였다. Stock solution은 표 1의 방법에 따라 각 조성별로 만들어 121°C, 1.2기압에서 20분간 멸균한 후, 4°C의 냉장고에 보관하며 제조 후 1개월 이내에 사용하였다. 배지가 필요할 경우에는 보관중인 stock solution을 일정량씩 증류수에 첨가한 뒤 위와 같은 방법으로 멸균하여 조류 배양에 사용하였다.

시험 물벼룩

본 시험에 사용한 국내산 물벼룩은 *Daphnia* sp., *Daphnia obtusa*, 모이나물벼룩(*Moina macrocopa*), 긴눈 시모물벼룩(*Simocephalus vetulus*) 4종으로 광주광역시 소재하는 조선대학교에서 분양받았다.

시험 물벼룩의 순화와 번식을 위해 우리나라의 일반적인 담수의 경도와 비슷한 moderately hard water를 사용하였다. 이 사육수는 제조 후 24시간동안 강하게 폭기시킨 뒤에 사용하였으며, 사용전에는 항상 경도와 알카리도 및 용존산소량을 측정하였다. 일정한 사육조건을 유지하기 위해 사육수 교체를 위한 시간을 제외하고는 20°C로 고정해 놓은 소형 water bath 안에 항상 사육용기를 놓았으며, 이때 수온은 20±1°C, 광조건 16시간(500~800 Lux), 암조건 8시간으로 조절하였다.

Table 1. Preparation of Bold's basal medium

Solution number	Substance	Amount added to deionised water	Amount of stock solution added to medium (mL/L)
Soln. i	NaNO ₃	10 g/200 mL	5
Soln. ii	CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.0 g/200 mL	5
Soln. iii	MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.0 g/200 mL	5
Soln. iv	K ₂ HPO ₄	3.0 g/200 mL	5
Soln. v	KH ₂ PO ₄	7.0 g/200 mL	5
Soln. vi	NaCl	1.0 g/200 mL	5
Soln. vii	EDTA + KOH	(2.5+1.55 g)/50 mL	1
Soln. viii	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.25 g/50 mL	1
Soln. ix	H ₃ BO ₃	0.57 g/50 mL	1
Soln. x	ZnSO ₄ · 7H ₂ O + MnCl ₂ · 4H ₂ O + MoO ₃ + CuSO ₄ · 5H ₂ O + Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	(0.44 g + 0.072 g + 0.036 g + 0.079 g + 0.039 g)/50 mL	1

Table 2. Preparation of synthetic freshwater using reagent grade chemicals(USEPA Water Quality Criteria)

Water type	Reagent added (mg/L)				Final water quality		
	NaHCO ₃	CaSO ₄ · 2H ₂ O	MgSO ₄	KCl	pH	Hardness	Alkalinity
Very soft	12.0	7.5	7.5	0.5	6.4~6.8	10~13	10~13
Soft	48.0	30.0	30.0	2.0	7.2~7.6	40~48	30~35
Moderately hard	96.0	60.0	60.0	4.0	7.4~7.8	80~100	60~70
Hard	192.0	120.0	120.0	8.0	7.6~8.0	160~180	110~120
Very hard	384.0	240.0	240.0	16.0	8.0~8.4	280~320	225~245

먹이조건이 생육에 미치는 영향

*S. subspicatus*와 *S. capricornutum* 및 *C. vulgaris*의 급이량에 따른 물벼룩의 생육차이를 비교하기 위해 대량배양한 3종의 조류를 4℃의 냉장고에 보관하여 가라앉은 조류를 수확하고 cell수를 계수하여 일정량을 매일 급이하였다(표 3).

Table 3. Concentration of algae in test medium

Algae tested	Algae concentration (×10 ⁴ cells/mL)
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	50, 25, 10, 5
<i>Selenastrum capricornutum</i>	50, 25, 10, 5
<i>Chlorella vulgaris</i>	100, 50, 25, 10

시험에 사용한 사육수는 moderately hard water를 사용하였다. 시험용기는 125 mL 유리비이커를 사용하였으며, 각 비이커에 100 mL의 사육수를 채우고 나서 출생 후 24시간이 되지 않은 어린 물벼룩을 1마리씩

5반복으로 투입한 다음 항온수조에서 21일간 관찰하였다. 배양액의 교체는 일주일에 2번 교체하였다. 시험기간은 *M. macrocopa*는 10일로 하였으며 나머지 4종은 21일로 하였다. 광조건은 700~800 Lux의 조도로 16시간 명조건, 8시간 암조건으로 조절하였고 항온수조의 온도는 20±1℃내에서 고정하였다.

주요 조사내용은 시험물벼룩의 탈피여부, 출산한 어린물벼룩의 수, 어미의 치사유무, 이상증상 등을 관찰하고 최종일에는 각 물벼룩의 체장을 해부현미경으로 측정하였다.

결과 및 고찰

Daphnia sp.

*S. subspicatus*를 *Daphnia* sp.의 먹이로 사용한 결과는 표 4에서 보는 바와 같이 21일간 생존율은 모든 농도에서 낮았으며 첫 출산까지 걸리는 시간은 25×10⁴ cells/mL를 먹인 시험구에서 7.5일로 가장 빨랐

Table 4. Effect of feeding concentration of *Scenedesmus subspicatus* on survival, reproduction, and growth of *Daphnia* sp.

Parameter	Algae concentration (x 10 ⁴ cells/mL)			
	50	25	10	5
Survival rate, %	20	40	25	60
Reproduction				
Time to first brood	9.0	7.5±0.7	9.0	8.5±0.7
Total offspring	125.0	116.0±24.0	105.0	53.5±7.8
Number of brood produced	6.0	6.5±0.7	5.0	5.5±0.7
Brood size	20.8	17.8±1.8	9.0	9.9±2.7
Growth				
Length, mm	3.0	3.0±0.1	3.0	2.9±0.1
Molting time	11.0	10.0±0.0	9.0	10.0±1.4
Abnormal symptom	-	-	-	-

Table 5. Effect of feeding concentration of *Selenastrum carpriconutum* on survival, reproduction, and growth of *Daphnia* sp.

Parameter	Algae concentration (x 10 ⁴ cells/mL)			
	50	25	10	5
Survival rate, %	100	80	100	100
Reproduction				
Time to first brood	6.3±0.6	7.0±0.0	7.3±0.6	7.3±0.6
Total offspring	120.3±9.7	97.0±4.2	63.0±4.6	36.3±3.2
Number of brood produced	6.7±0.6	6.0±0.0	6.0±1.0	5.7±0.6
Brood size	18.1±1.9	16.2±0.7	10.6±1.3	6.4±0.7
Growth				
Length, mm	3.0±0.1	2.9±0.0	2.8±0.2	2.6±0.1
Molting time	10.7±1.2	10.0±0.0	10.3±1.5	9.7±0.6
Abnormal symptom	-	-	-	-

다. 어미 한마리 당 21일간 총출산수는 25×10⁴ cells/mL에서 116.0마리로 가장 많았고 이때의 출산횟수는 평균 6.5회였다. 1회 출산시 생산되는 새끼의 수(한배의 크기)에서는 50×10⁴ cells/mL에서 평균 20.8마리로 가장 많았다. 21일 후의 체장은 모든 농도에서 비슷하였고 그 범위는 2.9~3.0 mm 정도였으며, 21일간의 탈피횟수는 9~11회 정도였으나 농도에 따른 차이는 크지 않았다.

*S. carpriconutum*를 먹이로 사용한 결과는 표 5에서 보는 바와 같이 21일간 생존율은 25×10⁴ cells/mL농도에서 80%였고 나머지는 100%였다. 첫 출산 때까지 걸리는 시간은 50×10⁴ cells/mL를 먹인 시험구에서 6.3일로 가장 빠르게 조사되었다. 어미 1마리당 21일간 총출산수는 50×10⁴ cells/mL에서 120.3마리로 가장 많

았고 이때의 출산회수는 평균 6.5회였다. 1회 출산시 생산되는 새끼의 수(한배의 크기)는 50×10⁴ cells/mL에서 평균 20.8마리로 가장 많았다. 21일 후의 체장은 모든 농도에서 2.9~3.0 mm 정도로 비슷하였으며, 21일간의 탈피회수는 9~11회 정도였으나 농도에 따른 차이는 크지 않았다.

*C. vulgaris*를 *Daphnia* sp.의 먹이로 사용한 결과는 표 6에서 보는 바와 같이 21일간 생존율은 10×10⁴ cells/mL농도에서 100%였고 25×10⁴, 50×10⁴ cells/mL농도에서 80%, 100×10⁴ cells/mL에서는 60%였다. 첫 출산 때까지 걸리는 시간은 4농도에서 6.3~7.5일 정도였고, 어미 한 마리 당 21일간 총출산수는 100×10⁴ cells/mL에서 179마리로 가장 많았고 농도가 낮아질수록 적게 출산하였다. 100×10⁴ cells/mL농도에서의 출산

Table 6. Effect of feeding concentration of *Chlorella vulgaris* on survival, reproduction, and growth of *Daphnia* sp.

Parameter	Algae concentration (x 10 ⁴ cells/mL)			
	100	50	25	10
Survival rate, %	60	80	80	100
Reproduction				
Time to first brood	6.3±0.6	7.5±1.0	7.0±0.0	7.0±0.0
Total offspring	179.0±42.0	168.0±22.1	124.0±2.8	47.5±21.9
Number of brood produced	6.7±0.6	6.8±0.5	6.5±0.7	5.0±1.4
Brood size	26.7±4.5	24.8±1.6	19.2±2.5	9.3±1.8
Growth				
Length, mm	3.2±0.1	3.1±0.1	2.9±0.1	2.5±0.0
Molting time	10.0±0.0	10.5±0.6	9.5±0.7	10.0±0.0
Abnormal symptom	-	-	-	-

횃수는 평균 6.7회였고, 이때 1회 출산시 생산되는 새끼의 수(한배의 크기)는 평균 26.7마리로 가장 많았다. 21일 후의 체장은 100×10^4 cells/mL에서 3.3 mm로 가장 길었고 10×10^4 cells/mL에서는 2.5 mm로 가장 짧았다. 21일간의 탈피횟수는 9.5~10.5회 정도였으나 농도에 따른 차이는 크지 않았다.

이상을 종합하면 *Daphnia* sp.의 생존율, 출산수 및 한배의 크기 등을 고려할 때 본시험에 사용한 3종의藻類중에 *C. vulgaris*가 먹이로 가장 우수하였으며 최적 급이농도는 $25 \times 10^4 \sim 50 \times 10^4$ cells/mL의 수준이었다.

D. obtusa

*S. subspicatus*를 *D. obtusa*의 먹이로 사용한 결과는 표 7에서 보는 바와 같이 21일간 생존율은 10×10^4 , 25×10^4 cells/mL에서 100%로 가장 높았으며, 50×10^4 cells/mL의 농도에서는 60%, 5×10^4 cells/mL농도에서는 80%였다. 첫 출산까지 걸리는 시간은 25×10^4 , 50×10^4 cells/mL를 먹인 시험군이 11일로 가장 짧았다. 어미 1마리 당 21일간 총출산수는 50×10^4 cells/mL에서 72.7마리로 가장 많았고 이때의 출산회수는 평균 4.7회였다. 1회 출산시 생산되는 새끼의 수(한배의 크기)는 50×10^4 cells/mL에서 평균 15.6마리로 가장 많았다. 21일 후의 체장은 그 범위가 2.4~2.1 mm 정도였으며 먹이의 농도가 낮아질수록 체장이 짧았다. 21일간의 탈피횟수는 9.4~10.8회 정도였으나 농도에 따른 차이는 크지 않았다.

*S. carpriconutum*를 먹이로 사용한 결과는 표 8에서 보는 바와 같이 21일간 생존율은 50×10^4 , 25×10^4 cells/mL에서 100%로 치사한 개체가 없었으며, 10×10^4 , 5×10^4 cells/mL의 농도에서는 80%였다. 첫 출산까지 걸리는 기간은 50×10^4 , 25×10^4 , 10×10^4 cells/mL의 농도로 급이한 시험군에서는 11.0~11.8일로 비슷하였으나 5×10^4 cells/mL농도에서는 13.8일로 가장 길게 나타났다. 어미 1마리 당 21일간 총출산수는 50×10^4 cells/mL에서 79.6마리로 가장 많았고, 이때의 출산횃수는 평균 5회였다. 1회 출산시 생산되는 새끼의 수(한배의 크기)에서는 50×10^4 cells/mL에서 평균 15.7마리로 가장 많았으며 급이농도가 낮아질수록 적어지는 경향이였다. 21일 후의 체장은 2.3~2.1 mm 정도였으며 먹이의 농도가 낮아질수록 체장이 짧았다. 21일간의 탈피횃수는 9.5~11.3회 정도였으나 농도에 따른 차이는 크지 않았다.

*C. vulgaris*를 먹이로 사용한 결과는 표 9에서 보는 바와 같이 21일간 생존율은 25×10^4 cells/mL에서 100%로 치사한 개체가 없었으며 나머지 농도에서는 60~80%로 약간 낮았다. 첫 출산까지 걸리는 시간은 100×10^4 , 50×10^4 , 25×10^4 cells/mL의 농도로 급이한 시험군에서는 8.3~9.6일로 비슷하였으나 10×10^4 cells/mL농도에서는 11.7일로 가장 느리게 출산을 시작하였다. 어미 1마리 당 21일간 총출산수는 100×10^4 cells/mL에서 62.3마리로 가장 많았고 이때의 출산횃수는 평균 5.5회였다. 1회 출산시 생산되는 새끼의 수

Table 7. Effect of feeding concentration of *Scenedesmus subspicatus* on survival, reproduction, and growth of *Daphnia obtusa*

Parameter	Algae concentration (x 10 ⁴ cells/mL)			
	50	25	10	5
Survival rate, %	60	100	100	80
Reproduction				
Time to first brood	11.0±0.0	11.2±0.4	14.4±2.3	12.5±3.0
Total offspring	72.7±11.9	51.8±7.3	35.6±9.3	29.5±21.5
Number of brood produced	4.7±0.6	4.0±1.0	3.2±0.4	4.0±2.2
Brood size	15.6±1.7	13.5±3.5	11.2±3.1	6.0±3.5
Growth				
Length, mm	2.4±0.2	2.4±0.0	2.3±0.1	2.1±0.1
Molting time	10.0±1.0	10.8±0.8	9.4±0.5	10.3±1.3
Abnormal symptom	sc ^{a)}	-	sc	-

^{a)}Swimming with carrying

Table 8. Effect of feeding concentration of *Selenastrum carpriconutum* on survival, reproduction, and growth of *Daphnia obtusa*

Parameter	Algae concentration (x 10 ⁴ cells/mL)			
	50	25	10	5
Survival rate, %	100	100	80	80
Reproduction				
Time to first brood	11.0±0.0	11.0±0.0	11.8±3.0	13.8±2.9
Total offspring	79.6±22.9	72.2±7.9	40.8±5.2	19.5±7.0
Number of brood produced	5.0±0.7	5.0±0.0	4.0±0.8	3.0±0.8
Brood size	15.7±3.4	14.4±1.6	10.4±1.3	6.9±2.7
Growth				
Length, mm	2.3±0.2	2.3±0.1	2.1±0.1	2.1±0.1
Molting time	10.4±1.5	10.4±0.9	11.3±1.0	9.5±0.6
Abnormal symptom	-	-	sc ^{a)}	-

^{a)}Swimming with carrying

(한배의 크기)는 25×10⁴ cells/mL에서 평균 13.2마리로 가장 많았으나 농도간에 큰 차이는 없었다. 21일 후의 체장은 그 범위가 2.3~2.7 mm 정도였으며 먹이의 농도가 낮아질수록 체장이 짧았다. 21일간의 탈피횟수는 9.7~10.4회 정도였으나 농도에 따른 차이는 크지 않았다.

이상을 종합하면 *D. obtusa*의 생존율과 출산수 및 한배의 크기 등을 고려할 때 시험에 사용한 3종의藻類중 *S. carpriconutum*과 *C. vulgaris*가 *D. obtusa*의 먹이로 가장 우수하였으며 최적 급이농도는 25×10⁴~50×10⁴ cells/mL의 수준이었다.

M. macrocopa

*S. subspicatus*를 *M. macrocopa*의 먹이로 사용한 결과는 표 10에서 보는 바와 같이 10일간 생존율은 50×10⁴, 5×10⁴ cells/mL에서 100%로 치사한 개체가 없었으며 나머지 농도에서는 60, 80%로 약간 낮았다. 첫 출산까지 걸리는 시간은 4농도 모두 4일로 동일하였고 어미 1마리 당 10일간 총출산수는 83~98마리였고, 이때의 출산회수는 평균 4.0~4.3회였다. 1회 출산시 생산되는 새끼의 수(한배의 크기)는 19.8~24.5마리, 체장은 1.8~1.9 mm, 탈피회수는 4처리군 모두 6회였다. *S. subspicatus*의 급이농도에 따른 생육의 차이

Table 9. Effect of feeding concentration of *Chlorella vulgaris* on survival, reproduction, and growth of *Daphnia obtusa*

Parameter	Algae concentration (x 10 ⁴ cells/mL)			
	100	50	25	10
Survival rate, %	80	60	100	60
Reproduction				
Time to first brood	8.5±1.0	8.3±1.2	9.6±1.3	11.7±4.0
Total offspring	62.3±29.8	53.7±26.7	58.6±20.3	41.0±24.6
Number of brood produced	5.5±0.6	4.3±0.6	4.4±1.1	4.0±1.0
Brood size	11.1±4.5	12.9±7.3	13.2±3.2	10.0±4.0
Growth				
Length, mm	2.7±0.1	2.7±0.1	2.5±0.0	2.3±0.1
Molting time	9.8±1.5	9.7±0.6	10.4±0.9	10.0±1.0
Abnormal symptom	sc ^{a)}	-	-	-

^{a)}Swimming with carrying

Table 10. Effect of feeding concentrations of *Scenedesmus subspicatus* on survival, reproduction, and growth of *Moina macrocopa*

Parameter	Algae concentration (x 10 ⁴ cells/mL)			
	50	25	10	5
Survival rate, %	100	80	60	100
Reproduction				
Time to first brood	4.0±0.0	4.0±0.0	4.0±0.0	4.0±0.0
Total offspring	98.0±4.2	87.0±7.8	83.3±5.4	83.0±13.1
Number of brood produced	4.0±0.0	4.0±0.0	4.3±0.5	4.2±0.4
Brood size	24.5±1.1	21.8±2.0	19.8±3.0	20.0±4.0
Growth				
Length, mm	1.9±0.1	1.8±0.1	1.9±0.1	1.8±0.1
Molting time	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
Abnormal symptom	-	-	-	-

는 크지 않았으나 농도가 높을수록 생육이 우수한 경향이였다.

*S. carpriconutum*를 *M. macrocopa*의 먹이로 사용한 결과는 표 11에서 보는 바와 같이 10일간 생존율은 50×10⁴, 25×10⁴ cells/mL에서 100%로 치사한 개체가 없었으며 나머지 농도에서는 60%로 낮았다. 첫 출산까지 걸리는 시간은 4 농도에서 4.0~4.7일로 비슷하였다. 어미 1마리 당 10일간 총출산수는 50×10⁴, 25×10⁴ cells/mL에서 75.6, 85.0마리로 높았고, 10×10⁴, 5×10⁴ cells/mL에서는 50.3, 64.3마리로 낮았다. 출산회수는 4처리군 모두 평균 4.0회로 동일하였다. 1회 출산 시 생산되는 새끼의 수(한배의 크기)는 12.6~21.3

마리로 급이농도가 낮아질수록 수가 작았다. 10일 후의 체장은 1.5~1.8 mm, 탈피횟수는 4 처리군 별로 5.7~6회 정도였다. 전체적으로 급이농도에 따른 생육의 차이는 크지 않았으나 50×10⁴, 25×10⁴ cells/mL의 처리군에서 생육이 가장 우수하였다.

*C. vulgaris*를 *M. macrocopa*의 먹이로 사용한 결과는 표 12에서 보는 바와 같이 10일간 생존율은 100×10⁴, 50×10⁴, 25×10⁴ cells/mL에서 60%였고 10×10⁴ cells/mL농도에서는 100%로 치사한 개체가 없었다. 첫 출산까지 걸리는 시간은 4농도에서 4.0일로 동일하였으며 어미 1마리 당 10일간 총출산수는 59.8~75.3마리의 수준이었다. 이때의 출산회수는 4처리군 모두

Table 11. Effect of feeding concentrations of *Selenastrum carpriconutum* on survival, reproduction, and growth of *Moina macrocopa*

Parameter	Algae concentration (x 10 ⁴ cells/mL)			
	50	25	10	5
Survival rate, %	100	100	60	60
Reproduction				
Time to first brood	4.0±0.0	4.0±0.0	4.7±1.2	4.0±0.0
Total offspring	85.0±4.4	75.6±8.0	50.3±18.2	64.3±2.1
Number of brood produced	4.0±0.0	4.0±0.0	4.0±0.0	4.0±0.0
Brood size	21.3±1.1	18.9±2.0	12.6±4.5	16.1±0.5
Growth				
Length, mm	1.8±0.1	1.7±0.0	1.5±0.1	1.5±0.1
Molting time	6.0±0.0	6.0±0.0	5.7±0.6	6.0±0.0
Abnormal symptom	-	-	-	-

Table 12. Effect of feeding concentrations of *Chlorella vulgaris* on survival, reproduction, and growth of *Moina macrocopa*

Parameter	Algae concentration (x 10 ⁴ cells/mL)			
	100	50	25	10
Survivals %	60	60	60	100
Reproduction				
Time to first brood	4.0±0.0	4.0±0.0	4.0±0.0	4.0±0.0
Total offspring/adult	75.3±12.9	61.3±9.3	74.7±15.9	59.8±12.8
Number of brood produced	4.0±0.0	4.3±0.6	4.3±0.6	4.0±0.0
Brood size	18.8±3.2	14.1±0.3	17.1±1.3	15.0±3.2
Growth				
Length, mm	1.8±0.0	1.8±0.0	1.8±0.1	1.7±0.1
Molting time	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
Abnormal symptom	-	-	-	-

평균 4.0~4.3회로 비슷하였다.

1회 출산시 생산되는 새끼의 수(한배의 크기)는 14.1~18.8마리 였고 10일 후의 체장은 1.7~1.8 mm, 탈피회수는 4처리군 모두 6회 였다. *Chlorella*의 급이 농도에 따른 생육의 차이는 크지 않았으나 100×10⁴, 50×10⁴, 25×10⁴ cells/mL의 급이농도 처리군에서 출산 수나 한배의 크기 등을 고려할 때 생육이 가장 우수 하였다.

이상을 종합하면 *M. macrocopa*의 생존율과 출산수 및 한배의 크기 등을 고려할 때 3종의 藻類가 모두 특별한 차이가 없었으며 최적 급이농도는 25×10⁴~50×10⁴ cells/mL의 수준이었다.

S. vetulus

*S. subspicatus*를 *S. vetulus*의 먹이로 사용한 결과는 표 21에서 보는 바와 같이 21일간 생존율은 10×10⁴ cells/mL에서 80%인 것을 제외하면 모두 100%로 치사 개체가 없었다. 첫 출산까지 걸리는 시간은 4농도에서 7.8~10.6일로 비슷하였으며 어미 1마리가 21일간 낳은 새끼의 총수는 50×10⁴ cells/mL에서 79.6으로 가장 많았으며 농도가 낮아지면 그 수도 감소하였다. 또한 출산횟수 및 1회 출산 시 생산되는 새끼의 수도 50×10⁴ cells/mL에서 5.6회 및 14마리로 가장 많았으며 농도가 낮아지면 그 수도 감소하였다. 21일 후의 체장은 1.8~2.2 mm, 탈피횟수는 4처리군 별로 9.4~10

Table 13. Effect of feeding concentrations of *Scenedesmus subspicatus* on survival, reproduction, and growth of *Simocephalus vetulus*

Parameter	Algae concentration (x 10 ⁴ cells/mL)			
	50	25	10	5
Survival rate, %	100	100	80	100
Reproduction				
Time to first brood	8.4±2.2	7.8±1.1	10.3±1.5	10.6±3.2
Total offspring	79.6±29.4	65.6±7.4	38.0±6.7	22.2±11.1
Number of brood produced	5.6±0.5	5.4±0.5	4.3±0.5	3.4±1.8
Brood size	14.0±4.3	12.2±1.8	9.0±1.9	6.7±1.2
Growth				
Length, mm	2.2±0.1	2.1±0.1	1.9±0.0	1.8±0.1
Molting time	10.0±0.7	9.4±0.5	9.8±1.0	9.4±1.5
Abnormal symptom	-	-	-	-

Table 14. Effect of feeding concentrations of *Selenastrum carpriconutum* on survival, reproduction, and growth of *Simocephalus vetulus*

Parameter	Algae concentration (x 10 ⁴ cells/mL)			
	50	25	10	5
Survival rate, %	100	100	80	80
Reproduction				
Time to first brood	8.0±0.0	8.0±0.0	11.3±1.5	11.3±0.6
Total offspring	85.4±14.2	64.8±15.7	33.8±2.1	21.7±0.6
Number of brood produced	5.8±0.8	5.4±0.9	4.0±0.0	4.0±0.0
Brood size	14.8±1.5	12.1±2.7	8.4±0.5	5.4±0.1
Growth				
Length, mm	2.1±0.1	2.0±0.0	1.9±0.0	1.7±0.1
Molting time	9.0±1.4	8.8±0.4	9.3±0.5	9.3±0.6
Abnormal symptom	-	-	-	-

회 정도였다. 전체적으로 농도가 높은 50×10⁴, 25×10⁴ cells/mL 처리군에서 생육이 우수하였다.

*S. carpriconutum*를 *S. vetulus*의 먹이로 사용한 결과, 표 14와 같이 21일간 생존율은 50×10⁴, 25×10⁴ cells/mL에서 100%였고 나머지는 모두 80%였다. 첫 출산까지 걸리는 시간은 4농도에서 8.0~11.3일로 비슷하였으며 어미 1마리가 21일간 낳은 새끼의 총수는 50 x 10⁴ cells/mL에서 85.4마리로 가장 많았으며 농도가 낮아지면 그 수도 감소하였다. 또한 출산횟수 및 1회 출산시 생산되는 새끼의 수도 50×10⁴ cells/mL에서 5.8회 및 14.8마리로 가장 많았으며 농도가 낮아지면 그 수도 감소하였다. 21일 후의 체장은 1.7~2.1

mm, 탈피횟수는 4처리군 별로 8.8~9.3회 정도였다. 전체적으로 농도가 높은 50×10⁴, 25×10⁴ cells/mL 처리군에서 생육이 우수하였다.

*C. vulgaris*를 *S. vetulus*의 먹이로 사용한 결과, 표 15와 같이 21일간 생존율은 50×10⁴, 25×10⁴ cells/mL에서 100%였고 나머지는 모두 80%였다. 첫 출산까지 걸리는 시간은 4농도에서 7.5~8.6일로 비슷하였으며 어미 1마리가 21일간 낳은 새끼의 총수는 100×10⁴, 50×10⁴, 25×10⁴ cells/mL에서 87.8, 84.6, 88.6으로 가장 많았으며 10×10⁴ cells/mL농도에서는 58.5로 그 수가 가장 낮았다. 출산횟수 및 1회 출산시 생산되는 새끼의 수는 5.5~7.0회, 10.6~15.1마리로 나타났다. 21일

Table 15. Effect of feeding concentrations of *Chlorella vulgaris* on survival, reproduction, and growth of *Simocephalus vetulus*

Parameter	Algae concentration (x 10 ⁴ cells/mL)			
	100	50	25	10
Survival rate, %	80	100	100	80
Reproduction				
Time to first brood	7.5±1.0	8.6±0.9	7.6±0.9	8.0±0.0
Total offspring	87.8±22.3	84.6±17.5	88.6±3.5	58.5±13.8
Number of brood produced	7.0±0.8	5.8±1.3	6.8±0.8	5.5±0.6
Brood size	12.4±2.4	15.1±0.1	13.2±1.9	10.6±1.7
Growth				
Length, mm	2.3±0.1	2.2±0.1	2.3±0.1	2.1±0.1
Molting time	9.5±0.6	9.4±1.5	9.6±0.5	9.8±1.0
Abnormal symptom	-	-	-	-

후의 체장은 2.1~2.3 mm, 탈피횟수는 4처리군별로 9.4~9.8회 정도였다. 전체적으로 50×10^4 , 25×10^4 cells/mL의 급이농도 처리군에서 생육이 우수하였다.

이상의 결과를 종합하여보면 *S. vetulus*의 생존율, 출산수 및 한배의 크기 등을 고려할 때 본시험에 사용한 3종의 藻類중에 *C. vulgaris*가 먹이로 가장 우수한 결과를 얻었으며 최적 급이농도는 $25 \times 10^4 \sim 50 \times 10^4$ cells/mL의 수준이 적절할 것으로 판단되었다.

독성시험결과가 신뢰성과 재현성을 확보하기 위해서는 우선적으로 시험생물의 질(quality)이 항상 일정하게 유지되어야 하며(이, 1994), 이를 위해서는 시험생물을 건강하게 유지 관리하는 기술이 대단히 중요하다. 시험생물의 건전성은 곧바로 독성반응에 영향을 미치게 되는데 먹이, 사육수 등이 중요한 요인으로 작용한다.

Barry(1996)는 *Selenastrum carpicornutum*을 1×10^5 과 5×10^4 cells/mL의 두 가지 농도로 먹이를 공급하면서 *D. magna*의 번식에 미치는 endosulfan의 영향을 연구한 결과 높은 농도의 먹이를 먹인 물벼룩의 체장, 체중, 한배의 크기 등에서 endosulfan의 영향이 더 크게 나타난 반면, 낮은 농도의 먹이를 투여한 군에서는 번식에 걸리는 시간이 유의하게 길어지며, endosulfan의 독성영향을 부분적으로 상쇄시킨다고 보고하였다.

먹이의 양도 시험생물의 사육에 중요한 요인이지만 먹이의 질도 중요한 요인으로 작용한다. Cotelte와 Ferard(1996)는 4, -20, -80, -196°C의 각각 다른 온도에서 저장한 藻類(*Raphidocelis subcapitata*)를 *D. magna*에 먹였을 때 4°C에서 냉장보관한 藻類가 물벼룩의 번식에 가장 양호하였으며, 냉장藻類를 대신하여 냉동한 藻類를 사용할 경우는 -80°C에서 저장할 것을 제시하였다. 또한 저장온도에 따른 藻類의 세포수, 흡광도, 유기탄소함량 및 가수분해효소(esterase) 활성을 조사하여 가수분해효소의 활성이 *D. magna*의 번식력과 밀접한 관련이 있다고 하였다.

또한 Baer와 Goulden(1998)은 냉장한 藻類(*Ankistrodesmus falcatus*)와 -73°C에서 냉동한 藻類를 *D. magna*에 먹인 결과 21일간 출산 물벼룩이 냉장조류에서는 128 ± 12 마리였고 냉동조류에서는 64 ± 7 마리로 두 처리 모두 EEC에서 제시한 시험의 유효성기준을 초과하긴 했으나 냉장조류를 먹인 것에 비해 현저하게 번식률이 낮아 냉동조류의 사용에는 반복시험을 통한 급이량의 최적화 연구가 필요하다고 하였다.

Gorbi 등(1996)은 1, 5, 10 ppm의 크롬(Cr)이 함유된 사육수에 *D. magna*를 넣고 정상적인 *Scenedesmus acutus*와 크롬에 내성을 가진 *S. acutus*를 급이한 결과 크롬내성藻類를 투여한 사육수의 물벼룩은 정상적인 성장과 번식을 유지하였다고 보고하였다. 이는 정상적인 성장을 저해할 정도로 오염된 환경에서도 내성을 가진 藻類가 물벼룩의 유용한 영양원으로 이용될 수 있음을 나타내는 것이다. 그러나 Taylor 등(1998)은 카드뮴 이온(Cd^{2+})은 표면이 음이온인 *Chlorella vulgaris*에 쉽게 흡착되는데 카드뮴 이온이 흡착된 藻類를 급이한 *D. magna*는 섭식행동이 저해되어 성장과 번식이 감소하였으나 치사수준의 카드뮴 농도에서 순수한 藻類를 투여할 경우에는 카드뮴의 독성을 감소시킨다는 결과를 보고하면서 독성시험에서 먹이의 중요성을 강조하였다.

이상과 같이 독성시험용 물벼룩의 먹이조건에 대한 연구는 주로 *D. magna*에 집중되어 있어서 국내산 물벼룩의 실내사육법에 관한 연구사례는 찾아볼 수 없었는데, 본 시험의 결과에서 국내산 물벼룩은 국제적인 추천종인 *D. magna*에 비해 먹이의 양이 절반 정도 수준에서도 양호한 생육을 보여주었다. 특히 먹이 중에는 *Chlorella*가 가장 적합한 먹이인 것으로 나타났으며 *Chlorella*의 최적 투여농도는 $25 \times 10^4 \sim 50 \times 10^4$ cells/mL이었다. 국제적인 추천종인 *D. magna* 대신할 수 있는 국내산 물벼룩에 대한 최적 시험법을 확립하기 위해서는 먹이의 양이나 질과 관련된 생육차이 비교 연구 뿐만 아니라 pH, 온도, 사육수, 사육밀도 등 최적사육조건을 구명하는 추가적인 연구도 요구된다.

인용문헌

- Baer, K. N. and C. E. Goulden (1998) Evaluation of a high-hardness COMBO medium and frozen algae for *Daphnia magna*. *Ecotox. Environ. Safe.* 39:201~206
- Barnes, R. D. (1987) *Invertebrate zoology* 5th ed. pp. 562~665. Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Barry, M. J. (1996) Effects of organochlorine pesticide on different levels of biological organization in *Daphnia*. *Ecotox. Environ. Safe.* 34:239~251.
- Cotelte, S. and Jean-F. Ferard (1996) Effects of frozen at different temperatures on chronic assessment end-

- points observed with *Daphnia magna*. *Ecotox. Environ. Safe.* 33:137~142.
- Ferrando, M. D., E. Sancho, and E. Andreu-Moliner (1995) Chronic toxicity of fenitrothion to an algae (*Nannochloris oculata*), a Rotifer (*Brachionus clayci-florus*), and the Cladoceran (*Daphnia magna*). *Ecotox. Environ. Safe.* 35:112~120.
- Gorbi, G., M. G. Corradi, A. Torelli, and M. Bassi (1996) Comparison between a normal and a Cr-tolerant strain of *Scenedesmus scutus* as a food source to *Daphnia magna*. *Ecotox. Environ. Safe.* 35:109~111.
- Goulden, C. E., R. M. Comotto, J. A. Jr. Hendrickson, L. L. Horing, and K. L. Johnson (1982) Procedures and recommendations for the culture and use of *Daphnia* in bioassay studies. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, fifth Conference*, pp.139~160. ASTM. Philadelphia.
- Hanazato, T. (1998) Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals. *Chemosphere.* 36(8):1903~1909.
- Mark, U. and J. Solbé (1998) Analysis of the ECETOC AQUATIC TOXICITY(EAT) Database, V-The relevance of *Daphnia magna* as a representative test species. *Chemosphere.* 36(1):155~166
- OECD (1984) *Daphnia* sp., acute immobilization test and reproduction test. OECD guideline for testing of chemicals No.202.
- Taylor, G., D. J. Baird. and A. M. V. M. Soares (1998) Surface Binding of contaminants by algae : Consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. *Environ. Toxicol. chem* 17(3):412~419.
- Toshihiko, M. and T. Eiji (1991) An illustrated guide to freshwater zooplankton in Japan. 東海大學出版會. Tokyo. Japan.
- Uéno, M. (1980) *Freshwater Biology of Japan.* pp.409~430. Hokuryukan publishing co., LTD. Tokyo.
- USEPA (1992). Aquatic invertebrate acute toxicity test, freshwater Daphnid, Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1010.
- 김일희 (1988) 한국 담수산 물벼룩류에 대한 검색표. 한국동물분류학회지 특간 제 2호, 43~65.
- 윤성명 (1993) 한국산 새각류(갑각 상강, 새각 강)의 계통분류 및 분자진화에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문.
- 이성규 (1994) 농약의 환경생태독성에 대하여, 농약정보, 7~8월호. pp.32~35.

Effects of algae on chronic assessment endpoints observed with Korean freshwater Cladocerans

Byung-Seok Kim*, Yoen-Ki Park, Jin-Sup Shin, Jin-Hwa Kim, and Young-Joon Ahn¹(*National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA, ¹Division of Agricultural Biotechnology and the Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University*)

Abstract : The influence of different feeding rates of three green algae on growth and reproduction in four Korean cladocera, *Daphnia* sp., *Daphnia obtusa*, *Moina macrocopa*, and *Simocephalus vetulus* was investigated. The growth and reproduction rates of *Daphnia* sp. fed *Chlorella vulgaris* cells were significantly increased than those of daphnid fed *Senedesmus subspicatus* and *Selenastrum carpicornutum*. The total offsprings of *Daphnia* sp. fed 25×10^4 and 50×10^4 cells *Chlorella vulgaris* for 21 days were 124 ± 2.8 and 168 ± 22.1 , respectively. The *Daphnia obtusa* fed 25×10^4 and 50×10^4 cells *Selenastrum carpicornutum* was shown good reproduction rates, 72.2 ± 7.9 and 79.6 ± 22.9 , respectively. The *Moina macrocopa* fed 25×10^4 and 50×10^4 cells *Senedesmus subspicatus* as well as *Simocephalus vetulus* fed 25×10^4 and 50×10^4 cells *Chlorella vulgaris* were shown good reproduction rates. All of algae tested were sufficient as a good diet for Korean Cladocerans in this study. However, the preferred alga was *Chlorella vulgaris* and the optimal feeding concentrations were $2.5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL, because the alga was shown most stable and generally high production rates in all cladocerans tested.

*Corresponding author (Fax : +82-31-290-0506, E-mail : kbs2000@rda.go.kr)