

저서성 해산 요각류 harpacticoid *Tigriopus japonicus* 유생을 이용한 해양생태독성평가

윤성진^{1,†} · 박경수² · 오정환² · 박승윤²
¹안전성평가연구소, ²국립수산과학원 서해수산연구소

Marine Ecotoxicological Assessment Using the Nauplius of Marine Harpacticoid Copepod *Tigriopus japonicus*

Sung Jin Yoon^{1,†}, Gyung Soo Park², Jeong Hwan Oh² and Soung Yun Park²

¹Korea Institute of Toxicology, Yuseong-gu, Daejeon 305-600, Korea
²West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute,
Incheon 400-420, Korea

요 약

저서성 요각류 *Tigriopus japonicus*는 한국연안에 널리 분포하며, 영양단계에서 1차 소비자로서 중요한 역할을 담당한다. 본 연구에서는 해양생태독성평가를 위한 표준 실험생물로서 가능성을 구명하기 위하여 *T. japonicus* 유생(100~200 µm)을 이용하여 염분 및 수소이온농도(pH) 내성실험과 2종의 표준독성물질(황산구리, 카드뮴) 및 3종의 산업폐수오니(피혁, 염색, 염료공장폐수오니)에 대한 48시간 사망률 실험을 실시하였다. *T. japonicus* 유생은 5.0~35.0psu 염분과 pH 6.3~8.2 범위에서 90% 이상 생존하여 염분 및 pH에 대한 강한 내성을 보였다. 또한 표준독성물질에 대한 48시간 LC₅₀은 황산구리의 경우 3.6±0.7 ppm, 카드뮴은 1.7±0.8 ppm 이었으며, 각각의 반복구간의 사망률 편차는 10% 이하였다. 황산구리에 대한 *T. japonicus* 유생의 독성반응은 요각류를 포함한 소형 갑각류에 비해 낮은 것으로 나타났다. 그러나 카드뮴에 대한 *T. japonicus* 유생의 독성반응은 요각류 *T. japonicus*, *Paracalanus parvus* 및 윤충류 *Brachinonus plicatilis* 성체 보다 훨씬 민감하였다. 산업폐수오니의 경우, 염료오니 추출액을 제외한 피혁과 염색오니 추출액은 농도-반응 사이의 선형관계가 뚜렷하였다. 산업폐수오니 추출물에 대한 *T. japonicus*의 48시간 LC₅₀은 피혁 추출물의 경우, 31.1±1.1% 이었으며, 염색 추출물은 54.4±15.1%로 산출되었다. 상기의 실험결과들에 의하면, 요각류 *T. japonicus* 유생을 이용한 생물검정법은 산업폐수나 화학물질에 대한 해양생태독성평가 시 유용한 평가 수단인 것으로 판단된다. 광범위한 염분 및 pH에 대한 내성, 농도-반응(사망률) 사이의 뚜렷한 선형관계는 본 종이 표준시험종으로써 충분한 가치가 있음을 입증하였다.

Abstract – Harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* is widely distributed in coastal waters of Korea and plays important role in marine trophic structure as a first consumer. In this study, a series of experiment were conducted to test the potential of the species as a standard test species for marine bioassay. Tolerance on salinity and pH, sensitivity on the reference materials(copper sulfate and cadmium chloride) and response on the ocean dumping materials(waste sludge) were tested to identify if the species satisfy the basic criteria as standard species for marine bioassay. The nauplius of the species(100~200 µm) showed wide tolerance on salinity with >90.0% survival rates exposed to 5.0~35.0 psu for 48 h. Wide adaptability on pH's were also observed from 6.3 to 8.2 with >90.0% survival rates during the test. LC₅₀ values for copper sulfate and cadmium chloride were 3.6±0.7 ppm, 1.7±0.8 ppm, respectively. The variations in mortality between replicates were less than 10.0%. Comparison of LC₅₀ values indicated that *T. japonicus* nauplius was lower sensitive to copper sulfate than the most marine crustaceans included copepods, however, the sensitivity of test animal to cadmium chloride higher than the adults of copepod *T. japonicus*, *Paracalanus parvus*, and marine rotifer *Brachinonus plicatilis*. There were significant concentration-response relationship in the mortality of *T. japonicus* nauplius using the elutriates of three ocean dumping materials(industrial waste sludge). 48 h LC₅₀ values were 31.1±1.1% for the elutriate

[†]Corresponding author: sjyon@kitox.re.kr

of sludge from leather processing company and $54.4 \pm 15.1\%$ for that of dye production company. Based on the above experimental results, bioassay using benthic harpacticoid *T. japonicus* nauplius must be a good estimation tool for marine ecotoxicological assessment of waste or chemicals. Wide tolerance on the salinity and pH, and significant linear relationship between concentration and response(mortality) supported the high potential of the species as a standard test species.

Keywords: *Tigriopus japonicus*; copepod nauplius(요각류 유생); bioassay(생물검정법); ecotoxicological assessment(생태독성평가)

1. 서 론

생물을 이용한 수서독성평가는 분해자, 생산자, 소비자를 대표 하는 최소 3종 이상을 이용하여 평가하도록 권장하고 있으며, 소비자로서 소형 어류나 동물플랑크톤이 많이 이용되고 있다(USEPA[2002]). 이에 따라 독성평가를 위한 표준 시험생물은 자연환경 내에서 생물이 차지하는 생태적 지위, 지리적 위치 및 독성물질에 대한 종의 민감도를 고려하여 선정한다. 특히 해양생태 독성평가는 해수의 염분 범위가 다양하기 때문에 독성실험 시 실험물질의 염분을 인위적으로 조절할 경우 본래의 독성이 변하게 되므로 가능한 한 염분조절 없이 독성실험을 수행하여야 한다(Hall et al.[1995]; Hall and Anderson[1995]). 따라서 해양생태독성 실험생물은 염분 내성이 강한 광염성 종을 우선적으로 고려해야 한다. 또한 실험생물은 해양으로 배출되는 다양한 오염물질의 산성도(acidity)를 고려하여 수소이온농도(pH)에 대한 내성실험을 거쳐 선정하는 것이 바람직하다.

저서성 요각류 *Tigriopus* 종은 식물플랑크톤을 섭식하고 대부분 조간대에 주로 서식하며, 해양생태계에서 1차 소비자로서 어류의 먹이생물로 중요한 위치를 차지하는 것으로 알려져 있다(Forget et al.[1998]). 또한 온도나 염분과 같은 환경변화에 대해 강한 내성을 보이며, 실험실 내에서도 사육이 용이한 편이다(McAllen et al.[1999]; Kwok and Leung[2005]). 이들 중 몇몇 종은 독성에 대한 민감도가 비교적 높고 반복실험 시 재현성이 높기 때문에 일부 국가에서는 이미 해양 미소 갑각류를 독성평가용 실험생물로 이용하고 있다(Barka et al.[2001]; Forget et al.[1998]; Kwok and Leung[2005]; McAllen and Taylor[2001]). 반면 국내에서는 해양생태독성평가를 수행함에 있어 주로 분해자인 해양성 발광박테리아를 이용하고 있는 실정이다(해양수산부[2005]). 이와 같이 분해자 이외의 타 분류군에 대한 독성평가가 미흡한 원인은 실험생물 및 시험방법이 표준화되어 있지 않기 때문이며, 적용 분야 또한 매우 제한적이기 때문이다. 그러므로 타 분류군에 대한 해양생태 독성시험법은 필연적으로 확립되어야 하며, 이를 위해서는 표준실험생물 선정을 위한 기초 연구가 선행되어야 할 것으로 판단된다.

저서성 요각류인 *Tigriopus japonicus*는 국내 연안의 기수역에 주로 서식하는 토착종으로서 생활사가 짧으며, 현장에서도 다량 채집할 수 있고, 실험실 배양이 쉬운 장점이 있다(Lee and Taga[1985, 1988]; Lee[1991]; Jung et al.[2000]). 특히 본 종은 해양에서 소

형 갑각류를 대별할 수 있기 때문에 염분이나 pH에 대한 내성관계, 표준독성물질에 대한 민감도 및 현장시료에 대한 적용 가능성이 입증된다면 해양생태독성 평가용 실험생물로서 매우 유용할 것으로 판단된다. 또한 독성물질에 대한 민감도는 생물의 생활사(life cycle)에 따라 다르기 때문에 실험생물은 성숙한 개체를 사용하기 보다 개체발생학적으로 민감도가 가장 높은 것으로 알려진 초기 성장단계의 생물을 이용하는 것이 독성물질에 대한 생물의 위해성을 평가하는데 큰 도움이 될 것으로 여겨진다(Forget et al.[1998]).

이에 따라 본 연구에서는 저서성 요각류인 *T. japonicus* 유생(nauplius)에 대한 해양생태독성실험용 표준시험생물로서의 가능성을 구명하기 위하여 실험생물에 대한 염분 및 pH 내성실험, 표준독성물질에 대한 민감도 및 현장시료에 대한 적용 가능성 실험을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험생물 배양

실험생물로 사용된 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus*는 2004년 2월 강릉대학교 먹이생물연구실에서 분양받은 후 실험실로 옮겨 항온실에서 단일종으로 배양하였다. 급작스런 수온 및 염분변화에 따른 생리 스트레스의 영향을 최소화시키기 위하여 배양수조의 수온은 $21.0 \sim 23.0^\circ\text{C}$ 범위를 유지하였다. 해수는 고조시기에 채수한 후 모래 여과기를 거쳐 고압 여과하고, $1 \mu\text{m}$ 카트리지 필터와 carbon filter로 재 여과한 후 사용하였다. 실험에 사용한 모든 해수는 이와 동일한 과정을 거친 후 사용하였다.

배양 해수의 염분은 $26.0 \sim 29.0$ psu 범위였으며, 광주기는 16시간(L):8시간(D)로 조절하였다. 먹이는 해산녹조류(*Tetraselmis suecica*, $4.0 \sim 6.0 \times 10^5$ cell/mL)와 착편모조류(*Isochrysis galbana*, $7.0 \sim 9.0 \times 10^5$ cell/mL)를 2:1 비율로 혼합하여 1일 2회 30 mL씩 공급하였다(Table 1).

2.2 실험생물의 체장변화

대부분의 갑각류는 유생에서 성체까지 성장할 때 수회의 탈피시기를 거치는데, 이 시기 전과 후에는 성장단계가 뚜렷하게 구분된다. 또한 독성물질에 대한 민감도는 성장단계에 따라 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 알려져 있기 때문에 실험생물은 가능하면 실험기간 동안 탈피시기를 겪지 않고, 체장의 변화폭이 크지 않은

Table 1. Summary of culture conditions for the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*

1. Culture type	Renewal
2. Temperature (°C)	21.0~23.0
3. Salinity (psu)	26.0~29.0
4. pH	7.80~8.10
5. Light quality and intensity	Ambient laboratory levels
6. Photoperiod	16 L, 8D
7. Culture chamber volume (mL)	5 L
8. Culture solution volume (mL)	4 L
9. Renewal period (d)	7 days
10. Feeding regime	twice per day(30 mL)
11. Oxygen saturation (%)	80.0~90.0
12. Dilution water	Filtrated seawater(1 µm cartridge filter) mixed with deionized water

개체를 선정하는 것이 바람직하다(Forget et al.[1998]).

본 연구에서는 독성실험에 사용할 생물의 유효 체장을 결정하기 위하여 실험생물의 체장변화를 관찰하였다. 실험생물의 체장은 알에서 부화한 유생단계로부터 성체로 성장하기 까지 일정시간 마다 일부 개체를 채집하여 계측하였다. 부화용 알은 암컷 30개체를 피펫으로 분류하여 여과해수 10 mL가 담긴 바닥이 투명하고 넓은 용기로 옮긴 후 10.0% 중성포르말린 1 mL를 주입하여 성체와 알주머니를 분리한 후 1분 이내에 피펫으로 골라내었다. 알주머니는 분리 즉시 해수에 넣고 3회 이상 흔들어서 알주머니 표면의 포르말린 성분을 제거하였다. 암컷에서 분리된 알주머니는 배양조건과 동일한 수온과 염분에서 해수 200 mL를 각각 3개의 300 mL flask에 채우고 각각의 flask에 10개씩 넣어 배양하였다.

본 실험에서는 체장변화를 관찰하기 위하여 flask에서 부화한 후 4시간이 지난 유생 1단계(N1) 개체만을 따로 분리하였으며, 이를 500 mL 비이커에 넣고 유생단계부터 성체시기까지 배양하면서 Kwak et al.[2005]의 분류 체계에 성장단계별로 구분하였다.

생물의 체장은 일정시간 마다 각각의 flask에서 5~7개체를 임의로 채집하여 해부현미경(Olympus, SZX-ILLB200, Japan) 하에서 0.01 mm까지 계측하였다. 본 연구에서 성체의 경우, 체장은 포란한 암컷 개체만을 동정하여 계측하였다. 실험기간 중 실험환경은 배양조건과 동일하였으며, 먹이생물은 1회당 2 mL씩 공급하였다.

2.3 염분 및 pH 내성실험

동물플랑크톤을 이용한 모든 실험은 ASTM([1996])에 수록된 윤충류(*Brachionus* sp.)를 대상으로 한 시험법을 참조하였다. 또한

실험은 성장실험을 통해 얻어진 결과를 근거로 하여 해당 크기의 *T. japonicus* 유생을 각 실험구 마다 20개체씩 넣고 수행하였다.

염분 및 pH 내성실험은 독성실험을 수행하기 위한 유효 농도 범위를 설정하기 위하여 수행하였다. 실험은 6 well culture plate(6 well cell culture cluster, Costar, USA)에 실험용액 10 mL를 넣고 실시하였다. 염분조절을 위한 희석수는 역삼투 방식을 이용한 초순수(담수)를 이용하였다. 염분은 0~35.0 psu 범위를 설정하였으며, 최고 농도인 35.0 psu를 해수에 인공염(Sea salt, Tropic marine, Germany)을 추가하여 제조한 후 초순수를 섞어 5.0 psu 간격으로 30.0, 25.0, 20.0, 15.0, 10.0, 5.0 psu로 조절하였다. 0 psu는 희석수로 사용된 초순수를 사용하였다. 실험기간 중 수온은 22.0±0.1°C를 유지하였으며, 먹이생물은 공급하지 않았다.

수소이온농도(pH)에 대한 내성실험은 여과해수에 0.1N HCl과 0.1N NaOH를 넣어 pH를 4.1~9.1의 범위로 설정하였으며, 각각 3개의 반복구를 만들어 3회 실험하였다. 실험기간 중 수온은 21.0±0.1°C, 염분은 28.0±0.3 psu를 유지하였으며, 먹이생물은 공급하지 않았다.

염분 및 pH 내성실험은 48시간 동안 실시하였으며, 측정값(end point)은 각각의 농도별로 사망한 개체를 계수한 후 48시간 생존율로 환산하였다.

2.4 표준독성물질 및 현장시료를 이용한 독성실험

표준독성물질 및 현장시료에 대한 독성평가와 관련된 실험환경 및 변수들은 Table 2에 수록하였다. 또한 모든 실험은 생물의 대사활동으로 인한 결과의 오류를 최소화시키기 위하여 먹이를 공급하지 않은 상태로 수행하였다.

2.4.1 표준독성물질에 대한 민감도 시험

표준독성물질은 황산구리(CuSO₄, minimum 99%, Sigma-Aldrich, USA)와 카드뮴(Cadmium standard solution, Junsei Chemical Co., Japan)을 여과해수에 용해하여 제조하였다. 농도별 표준용액은 최고 농도의 표준용액을 제조한 후 이를 순차적으로 희석하여 대조구(0 ppm)와 5개 농도(0.6, 1.3, 2.5, 5.0, 10.0 ppm)를 제조하였다. 실험은 황산구리의 경우 5회, 카드뮴은 3회 실시하였으며, 각각 3개의 반복구를 두고 실험하였다. 측정값은 각각의 농도별 사망한 개체를 계수하여 사망률로 환산한 후 48시간 LC₅₀ 값으로 나타내었다.

2.4.2 현장시료를 이용한 독성시험

현장시료에 대한 적용 가능성을 구명하기 위하여 3종류의 산업 폐수오니(피혁, 염색 및 염료제조공장오니) 추출물에 대한 농도반응 실험을 수행하였다.

Table 2. Summary of environmental factors to measure the mortality of *Tigriopus japonicus* nauplius exposed standard toxicants and waste sludges. Mean values(±SD) are given in parentheses

Items	Standard toxicant		Waste sludge elutriate		
	CuSO ₄	CdCl ₂	Leather	Dye	Mordant
Water temperature (°C)	21.1~22.1(21.6±0.3)	22.2~22.7(22.4±0.2)	22.0~22.2(22.1±0.1)	22.2~22.5(22.4±0.1)	22.0~22.2(22.1±0.1)
Salinity (psu)	27.9~28.4(28.1±0.1)	27.8~28.2(28.0±0.1)	27.3~28.0(27.7±0.3)	27.2~27.8(27.6±0.3)	26.2~27.9(27.3±0.6)
pH	7.76~8.17(8.06±0.12)	7.76~8.00(7.94±0.09)	7.91~8.04(7.95±0.05)	6.94~7.94(7.69±0.39)	7.84~8.07(7.96±0.08)

산업폐수오니는 직접 독성실험용 시료로 사용할 수 없기 때문에 실험에 사용한 용액은 오니와 여과해수(26.2~28.0 psu)의 비율을 1:10으로 혼합하여, shaker(Reipro shaker, JEIO TECH, Korea)로 12시간 동안 잘 흔든 후 용출된 폐수는 GF/C 필터(0.45 μm , Whatman, USA)로 여과하여 실험에 사용하였다.

농도별 표준용액은 용출한 시료를 최고 농도(100%)로 설정한 후 이를 순차적으로 희석하여 대조구(0%)를 포함한 6개 농도(6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0%)를 제조하였다. 실험은 48시간 동안 실시하였으며, 각각의 폐수 농도별 사망개체수를 관찰하여 사망률로 환산한 후 48시간 LC_{50} 값으로 나타내었다. 해수에서 용출된 폐수 오니 추출액의 pH는 피혁, 염료오니의 경우 7.8~8.1 범위였으나 염색폐수오니의 경우, pH는 6.9~7.9의 범위로 폐수오니의 함량이 높을수록 낮았다(Table 2).

2.5 통계처리

각각의 염분 및 pH에 따른 사망률의 유의성 검증을 위하여 SPSS 프로그램(SPSS 10, SPSS Inc., USA)을 이용한 분산분석(ANOVA)을 실시하였으며, 각각의 표준독성물질 및 현장시료에 대한 LC_{50} , NOEC (no observed effective concentration) 및 LOEC(lowest observed effective concentration) 값은 USEPA[2002]에서 제시한 통계처리 과정을 따라 Toxcal 5.0(Toxiccalc 5.0, Tidepool Scientific Software, USA) 프로그램을 이용하여 Dunnett's test와 maximum likelihood probit analysis 과정을 거쳐 산출하였다.

3. 결 과

3.1 실험생물의 체장변화

요각류 *T. japonicus*의 체장변화는 알에서 부화한 후 4시간이 경과한 개체를 이용하여 총 240시간 동안 관찰하였다. 요각류의 체장은 부화 후 72시간 이내에 100~200 μm 범위였으며, 유생단계(N1~N6)로 구분되었고, 개체간의 편차는 크지 않았다. 이 시기는 유생단계로서 단계의 생물인 것으로 분류되었다. 유생단계를 거친 미성숙 개체의 경우, 체장 성장 속도는 빠르게 증가하였으며, 체장은 부화 후 96시간부터 240시간까지 200 μm 에서 760 μm 까지 성장하였다. 또한 개체의 크기가 증가할수록 개체간의 체장 편차는 큰 것으로 나타났다(Fig. 1).

3.2 염분 및 pH 내성실험

T. japonicus 유생은 5.0~35.0 psu의 염분 범위에서 90.0% 이상 생존하였으며, 생존율에는 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 그러나 0 psu 염분에서는 모든 개체가 사망하였다. 염분에 대한 생존율의 하한치를 구명하기 위하여 0~5.0 psu 범위에서 1.0 psu 간격으로 농도를 낮추면서 실험생물에 노출시킨 결과, 1.0 psu 보다 높은 농도에서는 유생 생존율이 90%를 넘었으며, 타 실험구와 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 그러나 0 psu에서는 모두 사망하여 *T. japonicus* 유생의 염분 내성한계는 1.0 psu인 것으로

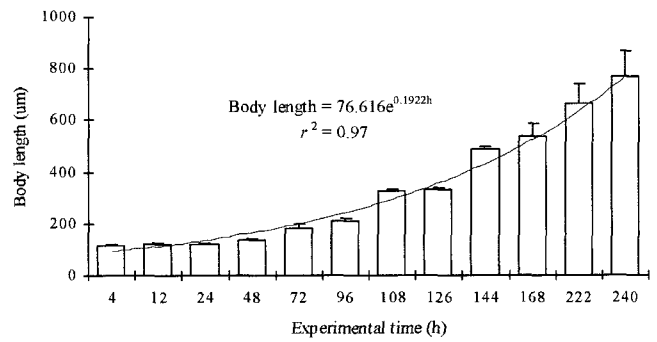


Fig. 1. Growth patterns(μm) of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* from nauplius to adult stage(Ovigerous female).

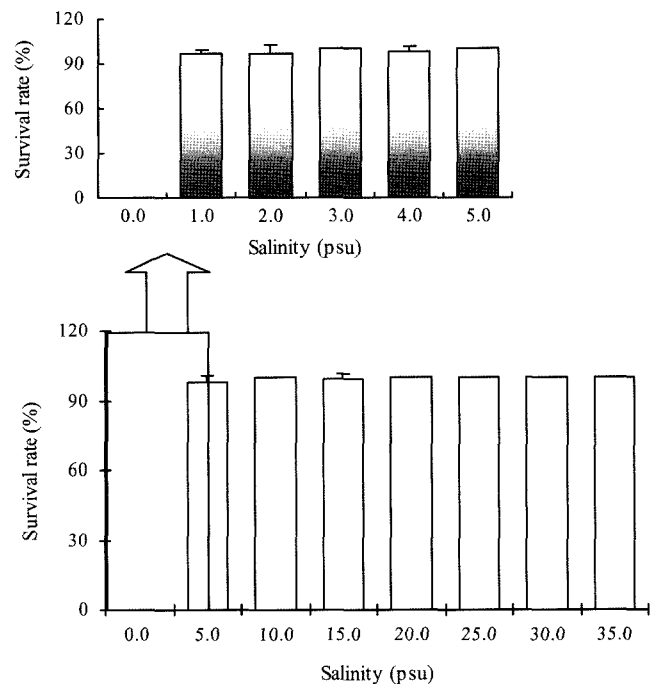


Fig. 2. Survival rate of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* nauplius exposed to various concentrations of salinity for 48 h.

나타났다(Fig. 2).

실험생물에 대한 pH 내성 범위를 구명하기 위하여 48시간 동안 pH 4.1~9.1 범위까지 생존율을 관찰한 결과, *T. japonicus* 유생은 염분농도와 상관없이 pH 6.2~8.2 범위 내에서 90.0% 이상 생존하였으며, 농도 간의 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$). 그러나 유생의 생존율은 pH 5.2에서 감소하여 pH 4.1에서는 모두 사망하였다.

3.3 표준독성물질에 대한 민감도 시험 및 현장시료를 이용한 독성실험

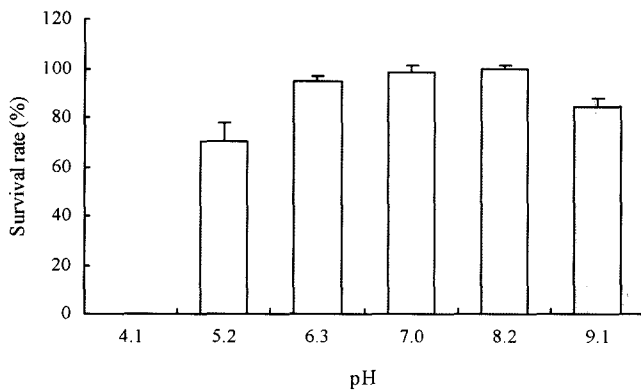
3.3.1 표준독성물질에 대한 민감도 시험

표준독성물질에 대한 *T. japonicus* 유생의 민감도 실험결과, *T. japonicus* 유생의 황산구리 및 카드뮴에 대한 독성반응은 뚜렷

Table 3. Toxicological estimation for nauplius of *Tigriopus japonicus* exposed standard toxicants and Waste sludge elutriates. Mean values (\pm SD) are given in parentheses

Items	Standard toxicant(ppm)		Waste sludge elutriate(%)		
	CuSO ₄	CdCl ₂	Leather	Dye	Mordant
LC ₅₀	2.8~4.4(3.6 \pm 0.7)	1.7~1.8(1.7 \pm 0.8)	30.3~31.8(31.1 \pm 1.1)	40.4~70.2(54.4 \pm 15.0)	NE
NOEC	0.6~1.3(0.8 \pm 0.3)	0.6(0.6 \pm 0.0)	12.5(12.5 \pm 0.0)	6.3(6.3 \pm 0.0)	NE
LOEC	0.6~2.5(1.3 \pm 0.8)	0.6~1.3(0.8 \pm 0.4)	25.0(25.0 \pm 0.0)	6.3~12.5(10.4 \pm 3.6)	NE

LC₅₀: Median lethal concentration, NOEC: No observed effective concentration, LOEC: Lowest observed effective concentration, NE: not estimated

**Fig. 3.** Survival rate of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* nauplius exposed to various of pH's for 48 h.

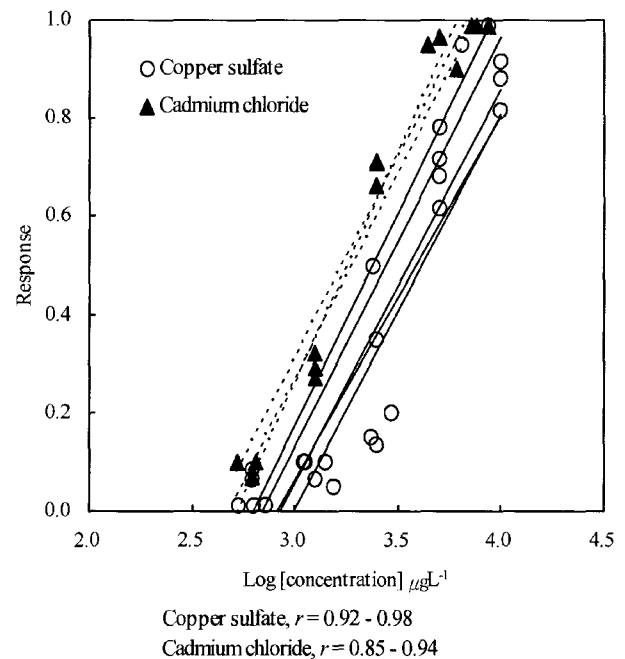
하게 관찰되었으며, 각각의 반복 실험구 내의 분산은 10.0% 이내로 크지 않았다. 황산구리에 대한 유생의 48시간 LC₅₀은 2.8~4.4 ppm 범위였으며, NOEC와 LOEC 값은 각각 0.8 \pm 0.3 ppm과 1.3 \pm 0.8 ppm으로 산출되었다(Table 3). 카드뮴에 대한 *T. japonicus* 유생의 48시간 LC₅₀은 1.7~1.8 ppm 범위로 황산구리보다 낮은 농도에서 산출되었으며, 실험횟수와 상관없이 산출된 반치사농도 값의 차이는 크지 않았다. NOEC와 LOEC 역시 0.6 \pm 0.0 ppm, 0.8 \pm 0.3 ppm으로 황산구리의 실험결과보다 낮았다(Table 3).

본 연구 자료를 probit analysis를 통해 분석한 결과, 상관계수(r)는 황산구리의 경우 0.92~0.98, 카드뮴은 0.85~0.94 범위로 두 실험물질 모두 농도와 독성물질에 대한 반응 사이에 선형관계가 뚜렷하였다. 또한 독성물질에 대한 민감도 차원에서 *T. japonicus* 유생은 카드뮴에 대한 민감도가 황산구리보다 약 2배가량 높은 것으로 나타났다(Fig. 4).

3.3.2 현장시료를 이용한 독성시험

현장시료에 대한 48시간 LC₅₀은 피혁오니 추출액의 경우 30.3~31.8% 이었으며, 염색오니는 40.4~70.2% 범위였다. 염료오니 추출액의 경우, 실험물질에 대한 *T. japonicus* 유생의 독성반응은 뚜렷하지 않았기 때문에 LC₅₀ 값은 산출할 수 없었다.

피혁 및 염색오니 추출액에 대한 LOEC와 NOEC 값은 피혁오니가 각각 12.5%, 25.0%이었으며, 염색오니의 경우, 각각 6.3%와 10.4 \pm 3.6%로 나타났다(Table 3). 본 실험결과, 피혁과 염색오니 추출액은 농도사망률 사이에 상관계수가 각각 0.88~0.92, 0.96~0.99 범위로 선형관계가 뚜렷하여 오니의 독성 영향을 평가

**Fig. 4.** Concentration-response curve for *Tigriopus japonicus* nauplius exposed to standard toxicants for 48 h.

할 수 있었으나 염료폐수오니의 경우에는 농도 증가에 따른 독성의 영향이 관찰되지 않았다(Fig. 5).

4. 고 찰

본 실험생물은 연구자마다 실험한 생물의 발달단계가 다르기 때문에 우선적으로 시험생물의 발달단계를 명확하게 규정해야 할 필요가 있다. 이러한 이유 때문에 실험생물은 독성물질에 대한 민감도를 고려하여 성체보다 유생단계 생물을 선정하였다. 또한 배양시간에 따른 체장변화 관계를 고려하여 해부현미경 상에서 생존 및 사망한 개체를 쉽게 판단할 수 있는 체장 범위를 결정하였다.

본 연구에서 요각류 *T. japonicus*의 체장은 부화 후 72시간 이내에 100~200 μ m 범위로서 유생단계인 것을 쉽게 확인할 수 있었으며, 미성숙 개체나 성체에 비해 개체간의 체장 편차는 크지 않았다. 이러한 결과로 볼 때, 독성평가 시 *T. japonicus* 유생을 실험생물로 이용할 경우, 유생은 100~200 μ m 사이의 망목을 이용하면 쉽게 분리할 수 있는 것으로 판단된다. 또한 본 연구결과 *T.*

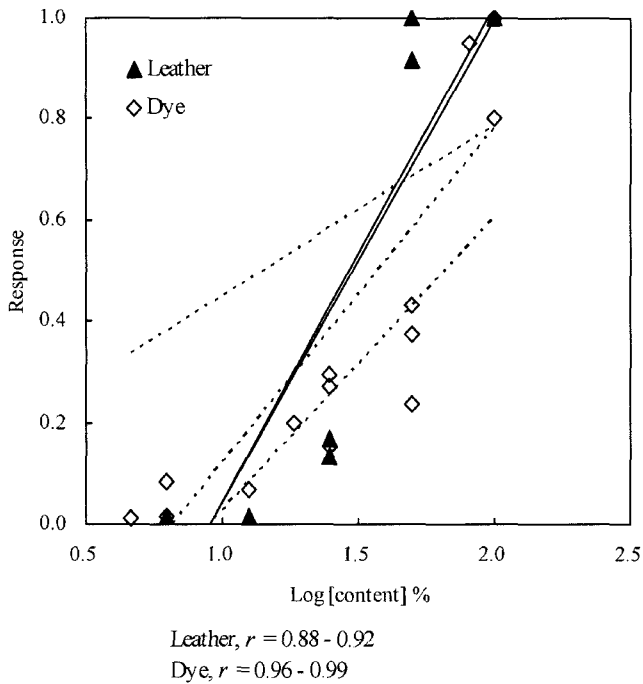


Fig. 5. Concentration-response curve for *Tigriopus japonicus* nauplius exposed to the elutriate of the two industrial waste sludges for 48 h.

*japonicus*는 부화 후 96시간이 되면 미성숙 개체로 성장하게 되는데, 이때 실험시간이 96시간을 넘게 되면 해당 생활사 단계에서는 실험할 수 없게 된다. 이러한 이유 때문에 *T. japonicus* 유생을 이용한 독성평가는 생물의 성장시간을 고려하여 최대 48시간을 경과하지 않는 범위 내에서 수행하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

염분 농도별 *T. japonicus* 유생의 생존율은 5.0~35.0 psu 범위에서 90.0% 이상 유지되었으며, 1.0 psu까지 90.0% 이상 생존하여 타 실험구와 유의한 차이를 보이지 않았으나 1.0 psu 이하 농도에서는 생존율이 0%로 급격히 감소하였다. 이는 *T. japonicus* 유생의 경우 담수를 제외한 저 염분에 대한 적응력이 매우 높으며 실험 시 해당 염분에 대한 순치기간 없이 직접 실험할 수 있는 것으로 해석할 수 있다.

본 연구에서 실험생물의 pH에 대한 최소 내성 한계는 5.2로 조사되었으며, 생존율 90.0%를 실험성공조건으로 결정할 경우, 최적 생존 pH 범위는 6.3~8.2 구간인 것으로 나타났다. 해양생태독성평가를 수행함에 있어 pH는 생물의 생존율을 결정하는 중요한 환경요인이다. 특히, 해양으로 배출되는 일부 독성물질은 낮은 pH 때문에 사망원인이 독성물질에 의한 것인지 아니면 pH에 의한 영향인지를 판단하기 곤란한 경우도 있다. 이와 관련하여 미환경보호청(USEPA)에서는 독성실험 시 pH를 6.5~8.5 범위 내에서 수행하도록 지침 하였으며(USEPA[1993]), 뉴질랜드 국립수자원대기 연구소(NIWA)에서는 실험용수의 pH를 최소 6.0에서 최대 9.0까지 제한하고 있다(NIWA[1998]). 이러한 pH 범위는 본 연구에서 *T. japonicus* 유생의 pH 내성실험에서 산출된 범위와 유사하게 나타났다. 이는 *T. japonicus* 유생의 경우, 해양생태독성실험 시 실험용수의 pH를 적절히 조절해준다면 해양으로 배출되는 다양한 오염물질에 대한 독성실험용 생물로서 충분한 이용가치가 있는 것으로 해석할 수 있다(Hall and Golding[1998]).

생태독성실험을 수행함에 있어 실험시간 및 생물의 배양형태는 각각의 실험생물에 대한 LC₅₀값을 결정하는데 중요한 요인으로 작용한다. 예를 들면(Table 4), Kwok and Leung[2005]는 25°C 수온

Table 4. Comparison of LC₅₀ values(ppm)of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* and other aquatic crustaceans

Species	LC ₅₀ (test duration)			Reference
	Copper(ppm)	Cadmium(ppm)	Medium	
Crustacea, copepoda				
<i>Tigriopus japonicus</i> nauplii ⁺	3.6(48h)	1.7(48h)	SW	Present study
<i>Tigriopus japonicus</i> Ovigerous female(adult) [#]	1.0(96h)		BW	Kwok and Leung [2005]
<i>Tigriopus japonicus</i> Ovigerous female(adult) [#]		15.1(96h)	SW	Chung et al. [1996]
<i>Tigriopus californicus</i> Nauplii [#]	0.7(96h)		BW	O'Brien et al. [1988]
<i>Tigriopus brevicornis</i> Ovigerous female(adult) [#]		0.05(96h)	SW	Forget et al. [1998]
<i>Tigriopus brevicornis</i> Ovigerous female(adult) [#]	0.2(96h)		SW	Barka et al. [2001]
<i>Eurytemora affinis</i> (adult) [#]	0.03(96h)		SW	Sullivan et al. [1983]
<i>Paracalanus parvus</i> (adult) [#]		27.1(24h)	SW	Arnott and Ahsanullah [1979]
<i>Nitocra spinipes</i> (adult) [#]	1.8(96h)		SW	Bengtsson [1978]
Amphipoda				
<i>Elasmopus rapax</i> (adult) [#]		0.2(48h)	SW	Zanders and Rojas [1992]
Marine rotifer				
<i>Brachionus plicatilis</i> (adult) ⁺		36.0~54.9(24h)	SW	Snell and Persoone [1989]

SW: seawater(>30.0 psu), BW: blackish water(5.0~30.0 psu)

+: copepods incubated in laboratory, #: wild copepods

과 34.5 psu 염분에서 *T. japonicus* 성체를 이용하여 96시간 동안 황산구리에 대한 독성평가를 실시한 결과, 구리에 대한 96시간 LC_{50} 값은 1.0 ppm으로 산출하였다. 동일한 실험시간 동안 O'Brien et al.[1988]과 Barka et al.[2001]은 구리에 대한 *T. californicus* 유생 및 *T. brevicornis* 성체의 LC_{50} 값을 각각 0.8 ppm과 0.1 ppm으로 보고하였으며, Bengtsson[1978]은 부유성 요각류인 *Nitocra spinipes* 성체의 LC_{50} 값을 1.8ppm으로 산출하였다. 이러한 결과들은 본 연구결과(48시간 LC_{50} =3.6±0.7 ppm) 보다 상당히 낮은 값이다.

한편, 카드뮴에 대한 동물플랑크톤 및 타 분류군의 독성실험 결과에 따르면, *T. brevicornis* 성체의 경우(Forget et al.[1998], 96시간 LC_{50} 값은 0.05 ppm 이었으며, 단각류 *Elasmopus rapax* 성체의 48시간 LC_{50} 값은 0.2 ppm으로 산출되어(Zanders and Rojas[1992]) 본 연구결과(48시간 LC_{50} =1.7±0.8 ppm)보다 상당히 낮은 값이 산출되었다. 그러나 본 실험생물과 동일종인 *T. japonicus* 성체의 경우, Chung et al.[1996]은 96시간 LC_{50} 값을 15.1 ppm으로 보고하였으며, 부유성 요각류인 *Paracalanus parvus* 성체는 27.1 ppm (Amott and Ahsanulah[1976]), 해산 윤충류인 *Brachinonus plicatilis* 성체는 24시간 LC_{50} 값이 36.0~54.9 ppm 범위로 본 연구결과보다 훨씬 높았다(Snell and Persoone[1989]).

이와 같은 결과들을 종합해 보면, 황산구리와 카드뮴에 대한 독성은 실험시간이나 실험 중에 따라 다소 차이를 보이는 것으로 나타났다. 또한 독성물질에 대한 생물의 민감도 차이는 실험생물이 저서성(benthic)인지 아니면 부유성(pelagic)인지 즉, 정착성 종인지 아니면 해류나 조류에 의해 이동이 자유로운 종인지에 따라 큰 차이가 나는 것을 알 수 있었는데, 이는 실험생물의 지리적 위치, 서식환경(현장 또는 실험실 배양) 및 실험시간의 차이에 기인한 결과로 판단된다. 따라서 각각의 실험결과에 대한 상이성을 해결하기 위해서는 독성물질에 민감하게 반응하며 주변에서 쉽게 채집하고 배양할 수 있는 실험종의 선정 및 실험시간의 단일화 작업이 선행되어야 할 것으로 판단된다.

본 연구에서 독성물질에 대한 민감도는 실험시간의 차이 때문에 타 실험결과와의 명확한 비교는 할 수 없었다. 그러나 황산구리 및 카드뮴의 농도에 따른 *T. japonicus* 유생의 사망률은 뚜렷한 선형관계를 보였다. 또한 48시간 동안 독성실험을 수행한 결과, *T. japonicus* 유생은 황산구리보다 카드뮴에 노출되었을 때 더 민감한 반응을 보이는 것으로 나타나 두 실험물질에 대한 민감도의 차이를 명확히 구분할 수 있었는데, 이러한 결과는 본 실험생물이 해양생태독성평가 시 다양한 독성물질에 대한 민감도를 비교할 수 있는 종으로서의 가능성이 있음을 제시할 수 있다.

현장시료에 대한 독성실험결과, *T. japonicus* 유생의 경우, 피혁과 염색오니 추출액은 농도·사망률 사이에 선형관계가 뚜렷하여 독성의 영향을 평가할 수 있었으며, 현장시료에 대한 독성평가용 생물로서의 가능성을 시사하였다. 피혁, 염색 및 염료오니에서 용출되는 폐수는 보통 난분해성 폐수로 분류한다. 난분해성 폐수는 미생물에 의해 분해되기 어려운 유기물 오염 폐수를 총칭하는 것

으로 본 연구에 사용된 오니 3종을 포함한 폐수 오니는 국내 투기물 중 6.0~54.0%를 차지하였다(환경부[1998]). 이러한 물질들은 과거에는 육상에 매립하였으나 최근에는 대부분 해양에 투기하는 실정이다. 한편 대부분의 산업폐수오니는 주변 생태계에 미치는 영향을 고려하여 투기 전 화학적, 생물학적 처리를 거친 후 생물에 대한 위해성 평가가 이루어져야 하나 현재에는 폐기물 해양배출 처리기준에 의거하여 화학적 기준에만 의존하여 투기여부를 확인할 뿐 기타 생물학적 평가방법은 도입되지 않고 있다(해양수산부[2005]). 따라서 중금속과 같은 단일 성분뿐만 아니라 화학공정에서 발생하는 여러 가지 화합물이 포함된 물질에 대한 생물학적 평가가 시급한 실정이다.

본 연구에서는 생물학적 평가방법 즉, 해양으로 배출되는 모든 물질에 대한 해양생태독성평가를 위한 실험생물로서 해양에서 1차 소비자 또는 2차 생산자의 역할을 담당하는 동물플랑크톤 중 연안지역에서 흔히 채집할 수 있는 *T. japonicus*를 선정하여 해양생태독성평가 생물 및 현장시료에 대한 적용가능성을 구명하고자 하였다. 국내에서 해양의 1차 소비자로서 현재 일부 사용하거나 개발 중인 해양생태독성평가용 표준 시험종은 해산 윤충류인 *Brachionus plicatilis*(Jung et al.[2000])와 저서성 단각류인 *Mandibulophoxus mai*와 *Monocorophium acherusicum* 종이다(Lee et al.[2005]). 이는 상기 종들의 생태·생리적 특성이 잘 알려져 있을 뿐만 아니라 독성물질에 대한 민감도 및 다양한 현장시료에 대한 적용실험을 통해 시험 종으로서 가치가 인정되었기 때문이다.

본 연구에 사용된 요각류 *T. japonicus*의 경우, 국내 연안에서 흔히 채집되는 종이며, 생리·생태적으로 많은 부분 알려져 있는 종이다. 또한 실험실 배양이 용이하고 성장속도가 빠르기 때문에 다량의 유생을 얻을 수 있다. 이러한 이유 때문에 국내뿐만 아니라 국외에서는 본 종의 성체를 이용한 일부 독성평가를 수행해왔다(Barka et al.[2001]; Forget et al.[1998]; McAllen et al.[1999]; Kwok and Leung[2005]; McAllen and Taylor[2001]). 그러나 대부분의 연구는 성체에 국한되어 있었으며, 유생을 이용한 연구는 드문 편이다. 본 연구에서 제시하였듯이 *T. japonicus* 유생은 pH 및 염분 내성 범위가 넓으며, 독성물질 및 현장시료에 적용할 수 있는 장점이 있다.

결론적으로 저서성 요각류 *T. japonicus* 유생은 독성물질에 대한 영향을 평가함에 있어 유용한 생물이며, 차후 해양생태독성평가를 위한 지침서가 확립된다면 소형 갑각류를 포함한 해양의 1차 소비자 단계에 대한 해양생태독성평가 표준시험 종으로서 충분한 가치가 있는 것으로 판단된다.

후 기

상기 연구는 국립수산과학원 R&D 과제중 “해양생태독성공정 시험법” 개발을 위한 연구과제의 일환으로 수행되었다. 본 연구를 위하여 실험생물을 제공해 주신 강릉대학교 박흥기 교수님께 감사드립니다. 논문을 심사해주신 심사위원님께 감사드립니다.

참고문헌

- [1] 해양수산부, 2005, “해양환경공정시험법”, 해양수산부, 400.
- [2] 해양수산부, 2005, “해양오염방지법, 해양오염방지법 시행규칙”, 해양수산부령 290호.
- [3] 환경부, 1998, “해양투기장 해역의 환경모니터링 기술 연구. 제 3차년도 최종보고서”, 53-82.
- [4] ASTM, 1996, “Standard guide for acute toxicity test with rotifer *Brachionus*”, American Society for Testing and Materials, 874-880.
- [5] Arnott, G.H. and Ahsanullah, M., 1979, “Acute toxicity of copper, cadmium and zinc to three species of marine copepod”, Aust. J. Mar. Freshwat. Res., Vol.30, 63-71.
- [6] Barka, S., Pavillon, J.F. and Amiard, J.C., 2001, “Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*”, Comp. Biochem. Physiol., Vol.128C, 497-493.
- [7] Bengtsson, B.E., 1978, “Use of harpacticoid copepod in toxicity test”, Mar. Pollut. Bull., Vol.9, 238-241.
- [8] Chung, E.Y., Shin, K.S. and Yih, W.H., 1996, “Effects of suspended soil and cadmium on the shallow-sea ecosystem. II. Acute and chronic toxicity of cadmium to a herbivorous copepod, *Tigriopus japonicus*”, J. Korean Fish. Soc., Vol.29, No.1, 124-133.
- [9] Forget, J., Pavillon, J.F., Menasria, M.R. and Bocquené, 1998, “Mortality and LC₅₀ for several stages of marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Müller) exposed to the metals arsenic and Cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malathion”, Ecotoxicol. Environ. Saf., Vol.40, 239-244.
- [10] Hall, J.A. and Golding, L.A., 1998, “Standard methods for whole effluent toxicity test: development and application. Report no. MFE80205”, NIWA report for the Ministry for the Environment, Wellington, New Zealand, 1-49.
- [11] Hall, L.W., Ziegenfuss, M.C., Anderson, R.D. and Lewis, B.L., 1995, “The effect of salinity on the acute toxicity of total and free cadmium to a Chesapeake Bay copepod and fish”, Mar. Pollut. Bull., Vol.30, 376-384.
- [12] Hall, L.W. and Anderson, R.D., 1995, “The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota”, Crit. Rev. Toxicol., Vol.25, 281-346.
- [13] Jung, M.M., Rho, S. and Kim, H.S., 2000, “Interspecific relationship between two food organisms in the combination culture tank of rotifer, *Brachionus rotundiformis* and copepod, *Tigriopus japonicus*”, J. Korean Fish. Soc., Vol.33, No.1, 66-99.
- [14] Kwak, I.S., Park, M.O. and Lee, W.C., 2005, “The survival rate and the rate of attached egg sac for female *Tigriopus japonicus* exposure to 4-nonylphenol”, Korean J. Environ. Biol., Vol.23, No.2, 129-134.
- [15] Kwok, K.W.H. and Leung, K.M.Y., 2005, “Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): Effects of temperature and salinity”, Mar. Pollut. Bull., Vol.51, 830-837.
- [16] Lee, K.T., Lee, J.S., Kim, D.H., Kim, C.K., Park, K.H., Kang, S.G. and Park, G.S., 2005, “Influence of temperature on the survival, growth and sensitivity of benthic amphipods, *Mandibulophoxus mai* and *Monocorophium acherusicum*”, J. Korean Soc. Mar. Environ. Eng., Vol.8, No.1, 9-16.
- [17] Lee, W.J. and Taga, N., 1985, “Environmental condition and microbial survey of the tide pools densely inhabited by *Tigriopus japonicus* Mori”, Bull. Korean Fish. Soc., Vol.18, No.1, 57-62.
- [18] Lee, W.J. and Taga, N., 1988, “Investigation of marine bacteria for the food of *Tigriopus japonicus* Mori (Harpacticoida)”, Bull. Korean Fish. Soc., Vol.21, No.1, 50-56.
- [19] Lee, W.J., 1991, “Efficiency of various microbial foods for *Tigriopus japonicus* Mori”, Bull. Korean Fish. Soc., Vol.24, No.2, 117-122.
- [20] McAllen, R. and Taylor, A., 2001, “The effect of salinity change on the oxygen consumption and swimming activity of the high-shore rockpool copepod *Tigriopus brevicornis*”, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., Vol.263, 227-240.
- [21] McAllen, R., Taylor, A.C. and Davenport, J., 1999, “The effects of temperature and oxygen partial pressure on the rate of oxygen consumption of the high-shore rock pool copepod *Tigriopus brevicornis*”, Comp. Biochem. Physiol., Vol.123A, 195-202.
- [22] NIWA, 1998, “Marine fish (*Rhombosolea plebeia*). Acute toxicity test protocol”, National Institute of Water and Atmospheric Research, 1-29.
- [23] Ó'Brien, P., Feldmen, H., Grill, E.V. and Lewis, A.G., 1988. “Copper tolerance of the life history stages of the splash pool copepod *Tigriopus californicus* (Copepoda, Harpacticoida)”, Mar. Ecol. Prog. Ser., Vol.44, 59-64.
- [24] Snell, T.W. and Persoone, G., 1989, “Acute toxicity bioassays using rotifers. I. a test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*”, Aquat. Toxicol., Vol.14, No.1, 65-80.
- [25] Sullivan, B.K., Buskey, E., Miller, D. and Ritacco, P.J., 1983, “Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance on *Eurytemora affinis* (Copepoda)”, Mar. Biol., Vol.77, 299-306.
- [26] USEPA, 2002, “Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marine organisms”, United States Environmental Protection Agency, 1-122.
- [27] Zanders, I.P. and Rojas, W.E., 1992, “Cadmium accumulation, LC₅₀ and oxygen consumption in the tropical marine amphipod *Elasmopus rapax*”, Mar. Biol., Vol.113, 409-413.

2006년 3월 27일 원고접수

2006년 8월 14일 수정본 채택