

물벼룩의 심장박동을 이용한 독성실험

이 찬 원 · 김 인 경 · 전 홍 표
경남대학교 환경공학과

(2006년 5월 12일 접수; 2007년 2월 3일 채택)

The Toxicity Test of Water Flea by Heartbeat Measurement

Chan-Won Lee, In-Kyung Kim and Hong-Pyo Jeon

Department of Environmental Engineering, Kyungnam University, Gyeongnam 631-701, Korea

(Manuscript received 12 May, 2006; accepted 3 February, 2007)

The water flea has been used as a test organism of toxicity test for surface water. Toxicity test with water flea is categorized into two parts. One is acute toxicity test with observing immobility and mortality and the other is chronic toxicity test determined by survival and reproduction of water flea. Heartbeat measurement of water flea was designed as a short-term toxicity test in this study. Direct measurement of heartbeat under microscope by aid of video camera gives an early diagnosis of mortality in short time. Therefore, the effects of measuring illumination, measuring time, and non-feeding during the test on heartbeat of water flea was evaluated to establish a new test approach. Test organisms used in this study are *Daphnia magna*, a well standardized toxicity test organism, and *Simocephalus mixtus*, a newly refined organism. IC_{50} values of these test organism by heartbeat measurement were compared and discussed. It was found that toxicity test by heartbeat measurement was a reproducible, easy and simple method accomplished in a few hours.

Key Words : *Daphnia magna*, *Simocephalus mixtus*, Inhibition 50 %, Toxicity test.

1. 서 론

환경계에 유입되는 화학물질의 종류가 많고, 그 특성이 다양하여 모든 물질을 화학적으로 정성 및 정량하는 것은 어렵다. 만일 분석이 가능하다고 하더라도 독성자료가 부족하기 때문에 각 물질별 규제치를 설정하기 어렵고, 각 물질별 독성자료를 만들기 위해서는 막대한 비용, 시간, 인력이 투입되어야 하므로 실제로는 불가능하다. 환경계에서 화학물질이 생물에 미치는 영향은 복합적으로 나타나기 때문에 단일 물질의 자료만으로는 그 물질의 영향을 정확하게 평가하는 것이 어렵다.

미국 EPA에서는 물벼룩을 수중 먹이사슬에서의 중요한 역할, 온도에 대한 예민성, 넓은 pH범위에서의 저항성, 손쉬운 배양법, 시험생물로서의 편리

성 등의 여러 가지 이유로 독성실험 생물체로 추천하고 있다. 특히 *Daphnia magna*와 같은 종은 TLm이나 LC_{50} 등의 실험을 통한 유해 화학물질들의 독성 테스트용 실험동물로 활용되고 있다. 그러나 TLm이나 LC_{50} 은 치사수준을 의미하므로 생물이 사망하기 전에 독성물질의 영향을 파악하여 생물에 대한 저해정도를 알 수 있는 IC_{50} 등의 독성실험이 바람직하다고 판단된다.

본 연구에서는 국내종인 물벼룩 *Simocephalus mixtus*와 외국종인 *Daphnia magna*의 중금속이 심장박동에 미치는 저해정도를 관찰하고 독성도를 측정하여, 중금속에 대한 IC_{50} 을 비교하였다. 미국, 독일 등에서 물벼룩의 심장박동 측정을 이용한 실험을 수행하고 있는데, 병원에서는 의약품의 임상실험 이전의 실험방안으로 이용되며^{1,2)}, Maryland University에서는 물벼룩의 심장박동을 이용한 'Nature's Early Warning Systems'을 구축하여 교육 자료로 이용하고³⁾ 있다.

Corresponding Author : Chan-Won Lee, Department of Environmental Engineering, Kyungnam University, Gyeongnam 631-701, Korea
Phone: +82-55-249-2988
E-mail: water@kyungnam.ac.kr

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

2.1.1. *Daphnia magna*

담수 무척추 동물에 속하는 *Daphnia magna*는 주로 호수, 강, 늪 등에서 서식하며, 환경 조건에 따라 형태적인 변화를 보이는 종으로 성체가 되었을 때는 5~6 mm 크기에 달한다(Fig. 1). 돌출된 입모양을 한 *Daphnia magna*는 단성생식을 하지만 환경이 악화되면 양성생식을 하기도 하며, 최근 실제 교접모습이 촬영되기도⁴⁾ 하였다. 일반적으로 20°C에서 56일 정도 생존하며 더 낮은 온도일수록 더 오래 사는 것으로⁵⁾ 알려져 있다. 생활주기는 egg, neonate, juvenile, adolescent, adult의 4단계로 나누어지며, juvenile daphnia때에 neonate 신체 크기의 두 배에 이른다. 평균 75일후에는 adult가 되고 7~10일 후에는 첫 출산을 하기 시작하여 2~3일마다 출산을 반복한다.

2.1.2. *Simocephalus mixtus*

물벼룩과 한국산 요술시모 물벼룩으로 0.5~2 mm 크기이며 갑각의 후배각이 낮고 넓게 돌출하였으며, 갑각의 등쪽 가장자리의 뒷부분이 팽창하고 머리의 부리에 가까운 배쪽 가장자리 부위가 깊게 함몰되어 길쭉한 모양의 단안을 가지고 있다(Fig. 2). 후복부 발톱의 기부에 빗모양의 가시군이 없다는 점에서 근연종들과 구별된다⁶⁾.

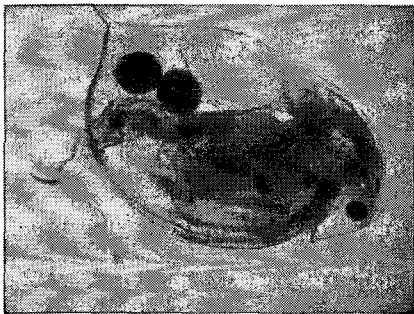


Fig. 1. *Daphnia magna*.

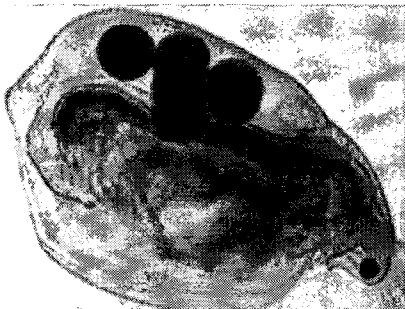


Fig. 2. *Simocephalus mixtus*.

2.1.3. 배양액 조제

배양액의 조제는 USEPA(1993)의 Hard constituted Water Medium 방법에 따라 행하였다. 조제방법은 Table 1에 명시된 방법에 따라 제조된 stock solution No.1~No.4를 각각 20 mL, 20 mL, 40 mL, 1000 mL를 취하여 혼합한 후 증류수를 넣어 최종 18.2 L로 하고 24시간동안 강력히 폭기하였다. *Daphnia magna*의 경우 만들어진 배양액을 그대로(경도 160~180 mg/L as CaCO₃) 사용하였으나, *Simocephalus mixtus*는 증류수로 희석하여(경도 80~100 mg/L as CaCO₃)⁸⁾ 사용하였다.

2.1.4. 조류의 배양

물벼룩의 먹이로 사용되는 *Senedemus* sp.의 배지는 USEPA법에 따랐으며 pH 7.5±0.1로 조정하였다. 만들어진 배양액은 고압 멸균한 멸균수를 사용하여 1 mL/100 mL로 접종시켜 25°C 400 ft/c 아래의 형광등에서 배양하고, Magnetic stirrer로 교반시켜 조류(algae)가 정지되지 않도록 하였다.

2.1.5. 실험대상 물질

실험액의 제조는 Cd, Zn, Cu 모두 1000 µg/L를 조제, 이를 적절히 희석하여 사용하였다. Cd, Zn, Cu의 시약은 원자흡광분석용 표준시약(CuCl₂, CdCl₂, Zn(NO₃)₂)을 사용하였으며 시험농도까지의 희석은 배양액으로 하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 실험조건

실험조건은 배양 조건과 동일하며 Table 2에 나타내었다. 다만 실험기간에는 먹이를 주지 않는다.

2.2.2. 심장박동(heartbeat test)을 이용한 IC₅₀

IC₅₀이란 Inhibitor Concentration 50의 약자로서 대상물질의 저해효과가 50% 정도를 나타낼 때 저해농도를 말한다. 이는 일반적으로 독성실험에 흔히 사용하는 치사율을 보는 LC₅₀이나 LT₅₀과는 다른 개념으로 이미 유입된 유해물질을 사망이 아닌 저해성을 보는 것이다. 이것은 물벼룩의 심장박동의 변화를 관찰함으로써 저농도의 독성물질의 유입에도 감지가 가능하다는 이점이 있다. IC₅₀을 구

Table 1. Hard reconstituted water medium⁷⁾

No.	Stock solution	Preparation method
1	KCl	4 g KCl / 500 ml H ₂ O
2	MgSO ₄	60 g MgSO ₄ / 500 ml H ₂ O
3	NaHCO ₃	48 g NaHCO ₃ / 500 ml H ₂ O
4	CaSO ₄ · H ₂ O	2.4 g CaSO ₄ · H ₂ O / 1000 ml H ₂ O

Table 2. Culturing condition of *Daphnia magna* and *Simocephalus mixtus*

	<i>Daphnia magna</i>	<i>Simocephalus mixtus</i>
Lighting	700 Lux~800 Lux "Cool White" Fluorescent 16 hr light : 8 hr dark	700 Lux~800 Lux "Cool White" Fluorescent 16 hr light : 8 hr dark
Temperature	20 ℃	20 ℃
Hardness (mg as CaCO ₃ /L)	160~180	80~100
pH	7.6~7.8	7.6~7.8

하기 위해서 각 주입농도에서 구한 inhibition 결과를 다음 식으로 변환한 후 최소자승법을 이용한 최적 직선에서 IC₅₀를 구한다.

$$r = \frac{\text{inhibition}(\%)}{100 - \text{inhibition}(\%)} \dots\dots\dots(1)$$

여기서 r=1 인 경우가 50 % inhibition을 주는 경우이고, 이때의 독성물질 농도가 IC₅₀이다.

중금속 Cd, Cu, Zn의 농도에 대하여 100 mL 비커에 50 mL의 시험액을 채운 후 각 비커당 neonate 3마리를 넣어 1 hr, 6 hr, 24 hr, 48 hr 동안 노출한 후 *Daphnia magna*와 *Simocephalus mixtus*의 심장박동의 변화를 측정하였다.

심장박동의 변화를 측정하기위해 neonate를 slide glass에 올려놓고, 물벼룩의 움직임을 없애기 위해 소량의 액만 남긴 뒤 비디오 현미경으로 촬영하였다.

2.2.3. 제한인자 실험

광학현미경 아래에서 물벼룩의 심장을 노출시켜 비디오로 촬영하기 때문에 실험시 고려해야 할 사항은 광학현미경의 빛의 세기와 빛을 쬐여주는 시간, 그리고 실험기간 동안 먹이공급 중단으로 인한 스트레스이다. 그래서 본 실험에 앞서 제한 인자 실험으로 조도, 측정시간, 먹이에 대한 실험을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 제한인자 실험

3.1.1. 측정시간(measurement time)

95% 신뢰구간의 t-test 결과, 광학현미경아래 노출된 시간이 1분 이내일 경우 물벼룩의 심장박동에는 크게 영향을 미치지 않는다. 30초가 경과함에 따라 조금씩 심장박동이 불규칙하게 나타나는데 이는 slide glass 위에 올려져있는 시간이 길어 액이 증발하여 이 스트레스로 인해 심장박동이 불규칙하게 나타나는 것이라 판단된다. 본 실험에서 측정시간이 짧을수록 정확한 실험이 이루어진다는 것을 인지하고 측정시간을 10초로 하였다.

3.1.2. 조도 (Effect of illumination)

조도를 변화시켰을 때와 일정하게 유지시켰을 때 물벼룩 심장박동의 변화를 관찰하여 t-test를 통한 검정을 실시한 결과 조도는 심장박동에 크게 영향을 미치지 않았다.

3.1.3. 먹이

생후 24 hr 미만의 *Daphnia magna*와 *Simocephalus mixtus*를 먹이 공급없이 1시간부터 48시간까지의 심장박동변화를 측정된 결과 생명에는 지장이 없었으나, 먹이를 공급하지 않음에 따라 심장박동은 1시간 후 평균 약 10 % 이내로 감소하였으며, 시간이 지날수록 심장박동은 조금씩 더 감소하여 48시간 이후에는 평균 30 %정도 감소함을 알 수 있었다. 따라서 IC₅₀의 측정시간은 48시간 이내로 빠른 시간 내에 실험을 완료하는 것이 좋으며, IC₅₀ 측정을 위해서는 이에 대한 기준이 마련되어야 할 것으로 생각된다.

3.2. 심장박동에 영향을 미치는 중금속 독성 실험

3.2.1. *Daphnia magna*

중금속이 유입되면 물벼룩의 심장박동에 어떤 변화가 생기는지에 대한 여부를 확인하기 위한 실험으로써 Fig. 3은 Cd과 Zn, Cu를 각각 100 µg/L에 48 시간동안 노출시켜 시간의 경과에 따른 심장박동의 변화를 측정된 그래프이다. 실험결과 Cd과 Cu는 시간 경과에 따라 심장박동수가 감소하였는데, 특히 Cu 100 µg/L에 노출된 *Daphnia magna*는 6시간만에 사망하였다. 그러나 Zn은 100 µg/L 농도에서 크게 영향을 미치지 않았다.

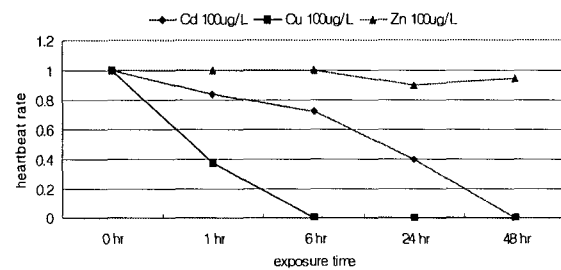


Fig. 3. *Daphnia magna* heartbeat rate exposure heavy metal.

3.2.1.1. Cu에 노출시킨 *Daphnia magna*의 심장박동변화

Fig. 4~7은 각 농도의 Cu에 노출시킨 후 1 hr~48 hr 후의 *Daphnia magna*의 심장박동변화를 측정된 그래프이다. 각 그래프에서 최소자승법을 이용하여 최적 직선의 $\Gamma = 1$ 에 해당하는 부분이 IC_{50} 으로 측정결과 Cu에 1시간 노출 후 *Daphnia magna*는 135 $\mu\text{g/L}$ 의 농도에서 50%의 심장박동감소를 보였다. 6 hr, 24 hr, 48 hr IC_{50} 은 각각 52 $\mu\text{g/L}$,

32 $\mu\text{g/L}$, 27 $\mu\text{g/L}$ 로 나타났다.

3.2.1.2. Cd에 노출시킨 *Daphnia magna*의 심장박동변화

Fig. 8~11은 Cd에 대한 *Daphnia magna*의 심장박동 감소율을 나타낸 그래프이다. 1시간 후 Cd 농도 200 $\mu\text{g/L}$ 이상에서 심장박동저해를 보이며, 24시간 이후에는 50 $\mu\text{g/L}$ 이하의 농도에서 심장박동이 50% 이상 감소하였다. 1 hr~48 hr IC_{50} 은 각각 290 $\mu\text{g/L}$, 135 $\mu\text{g/L}$, 34 $\mu\text{g/L}$, 3 $\mu\text{g/L}$ 로 측정되었다.

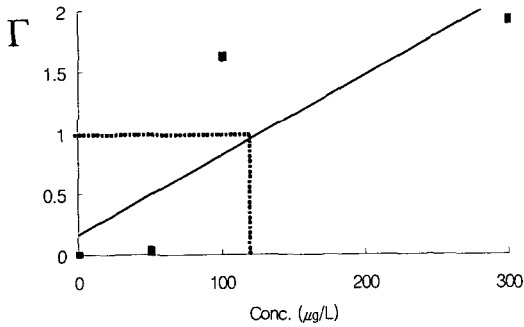


Fig. 4. *Daphnia magna*'s heartbeat rate by 1 hr exposure to copper.

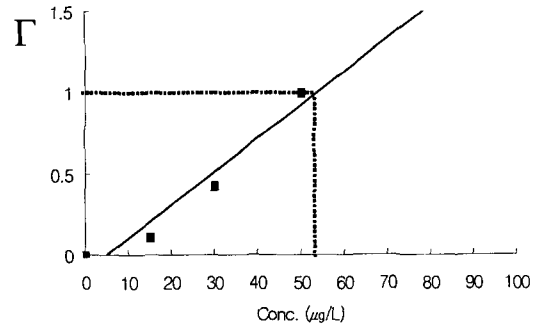


Fig. 5. *Daphnia magna*'s heartbeat rate by 6 hr exposure to copper.

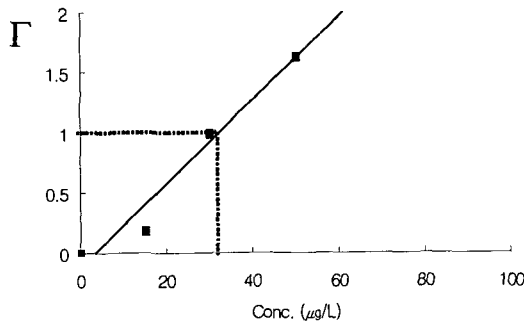


Fig. 6. *Daphnia magna*'s heartbeat rate by 24 hr exposure to copper.

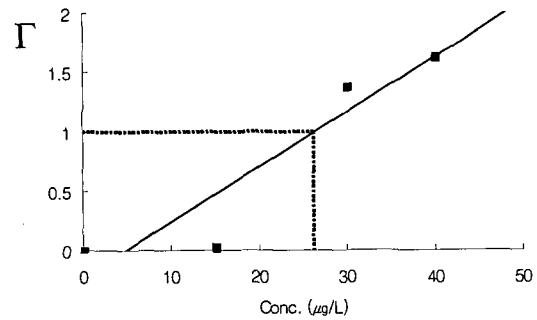


Fig. 7. *Daphnia magna*'s heartbeat rate by 48 hr exposure to copper.

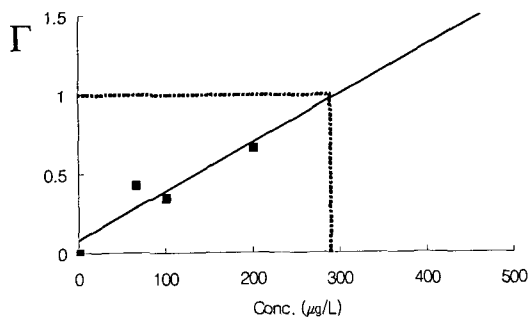


Fig. 8. *Daphnia magna*'s heartbeat rate by 1 hr exposure to cadmium.

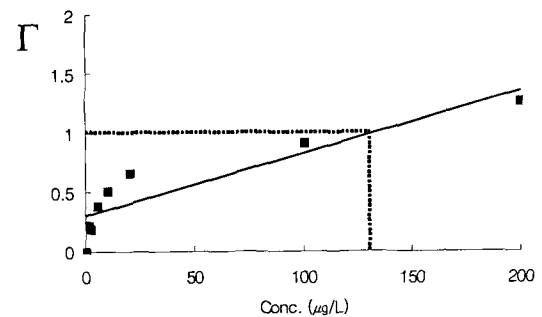


Fig. 9. *Daphnia magna*'s heartbeat rate by 6 hr exposure to cadmium.

3.2.1.3. Zn에 노출시킨 *Daphnia magna*의 심장박동 변화

Fig. 12~15는 최고 1000 $\mu\text{g/L}$ 에 노출시킨 후 시간별 Zn에 대한 *Daphnia magna*의 심장박동변화를 관찰한 그래프이다. *Daphnia magna*는 실험시간 24시간 내에서는 1000 $\mu\text{g/L}$ 의 농도에 심장박동저해를 크게 받지 않은 것으로 나타났으며, 측정된 48 hr-IC₅₀은 512 $\mu\text{g/L}$ 로 측정되었다.

3.2.2. *Simocephalus mixtus*
Simocephalus mixtus 역시 *Daphnia magna*와

마찬가지로 Cu, Cd, Zn을 각각 100 $\mu\text{g/L}$ 에 노출시켜 시간에 따른 심장박동의 변화를 측정하였다. Fig. 16은 Cd과 Zn, Cu를 각각 100 $\mu\text{g/L}$ 에 48시간 동안 노출시켜 시간의 경과에 따른 심장박동 변화를 측정된 그래프이다. *Daphnia magna*와 마찬가지로 시간에 경과함에 따라 심장박동은 감소함을 알 수 있다. 특히 Cu 100 $\mu\text{g/L}$ 노출된 *Simocephalus mixtus*는 1시간 이내에 사망했으며, *Daphnia magna*에 영향을 주지 않았던 Zn도 시간에 따라 심장박동수가 감소함을 알 수 있었다.

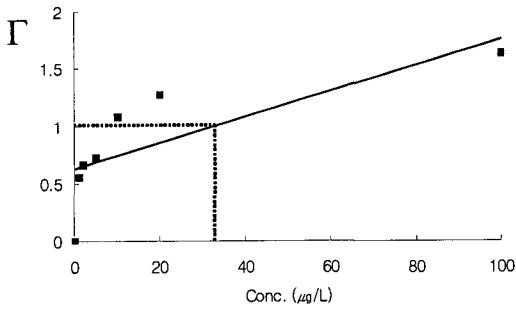


Fig. 10. *Daphnia magna*'s heartbeat rate by 24 hr exposure to cadmium.

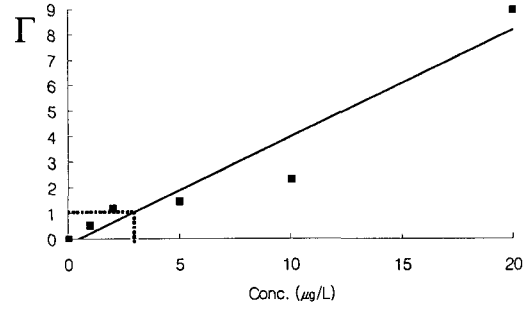


Fig. 11. *Daphnia magna*'s heartbeat rate by 48 hr exposure to cadmium.

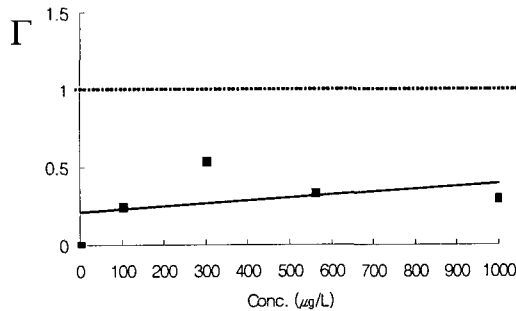


Fig. 12. *Daphnia magna*'s heartbeat rate by 1 hr exposure to zinc.

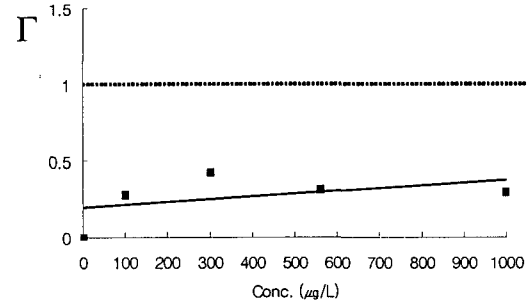


Fig. 13. *Daphnia magna*'s heartbeat rate by 6 hr exposure to zinc.

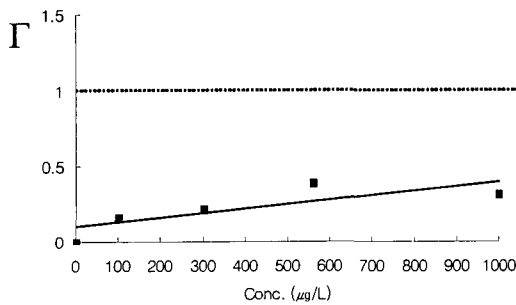


Fig. 14. *Daphnia magna*'s heartbeat rate by 24 hr exposure to zinc.

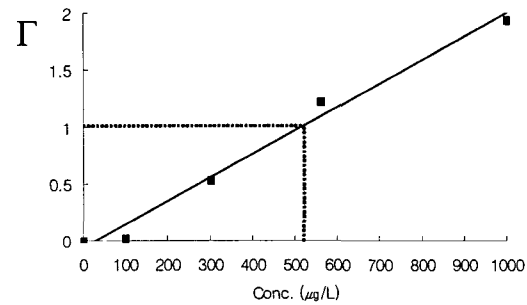


Fig. 15. *Daphnia magna*'s heartbeat rate by 48 hr exposure to zinc.

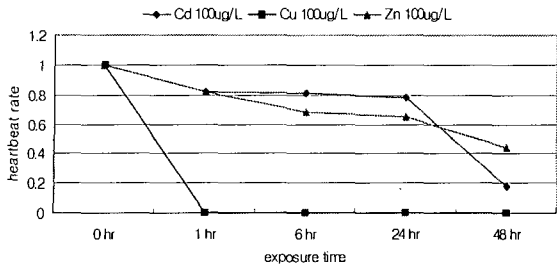


Fig. 16. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate exposure heavy metal.

3.2.2.1. Cu에 노출시킨 *Simocephalus mixtus*의 심장박동변화

Fig. 17~20은 각기 다른 농도의 Cu에 1시간, 6시간, 24시간, 48시간동안 노출시킨 후의 심장박동변화를 관찰한 그래프이다. 각 그래프에서 최소자승법을 이용하여 최적 직선의 $\Gamma = 1$ 에 해당하는 부분이 IC_{50} 으로 각 시간별로 측정된 IC_{50} 값은 각각 74 $\mu\text{g/L}$, 11 $\mu\text{g/L}$, 8 $\mu\text{g/L}$, 7 $\mu\text{g/L}$ 였다.

3.2.2.2. Cd에 노출시킨 *Simocephalus mixtus*의 심장박동변화

Fig. 21~24는 Cd에 노출시킨후 *Simocephalus mixtus*의 심장박동변화를 측정한 그래프이다. 24

hr 이내에는 200 $\mu\text{g/L}$ 이상의 Cd에 노출되었을 때 꾸준한 심장박동의 감소를 보였으며, 48시간 후에는 급격히 심장박동이 느려져 50 $\mu\text{g/L}$ 이하의 농도에서 IC_{50} 를 구할 수 있었다. 24 hr, 4 hr IC_{50} 은 각각 240 $\mu\text{g/L}$, 18 $\mu\text{g/L}$ 이었다.

3.2.2.3. Zn에 노출시킨 *Simocephalus mixtus*의 심장박동변화

Fig. 25~28은 Zn에 노출시킨 후 시간별 *Simocephalus mixtus*의 심장박동변화를 측정한 그래프이다. Zn에 노출시킨 1시간 후 285 $\mu\text{g/L}$ 의 농도에서 심장박동감소율이 50% 였으며, 48 hr 후 50% 심장박동이 감소한 농도는 55 $\mu\text{g/L}$ 였다.

3.3. 중금속에 대한 물벼룩의 IC_{50} 측정결과

*Daphnia magna*와 *Simocephalus mixtus* 두 종에 대한 중금속 IC_{50} 측정결과는 Table 3과 같다. 두 종류의 물벼룩 모두 중금속에 대한 민감성이 $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$ 순으로 나타났으며, 외래종인 *Daphnia magna*보다는 국내종인 *Simocephalus mixtus*가 중금속에 대한 감수성이 더 높게 나타났다. 또한 48시간동안 중금속에 노출시킬 경우 보다 낮은 농도에서 저해 감지가 가능하다는 것을 알 수 있었다.

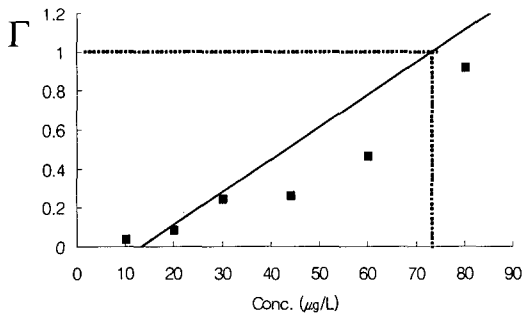


Fig. 17. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate by 1 hr exposure to copper.

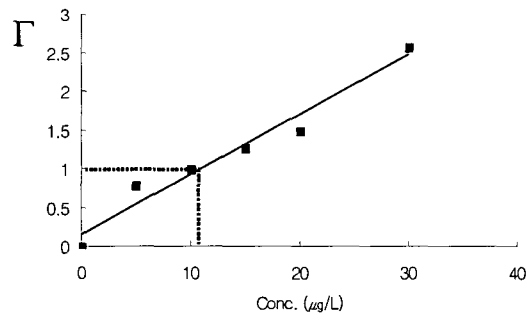


Fig. 18. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate by 6 hr exposure to copper.

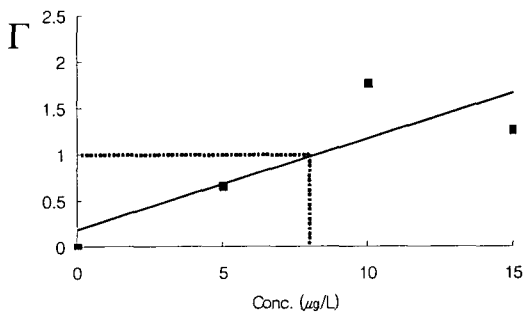


Fig. 19. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate by 24 hr exposure to copper.

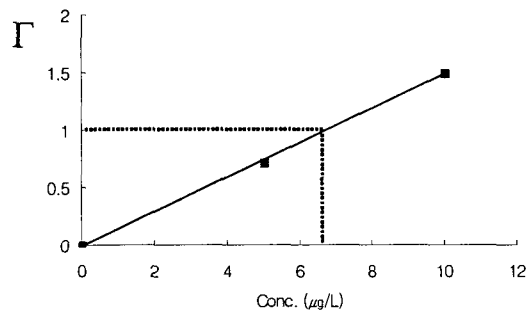


Fig. 20. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate by 48 hr exposure to copper.

물벼룩의 심장박동을 이용한 독성실험

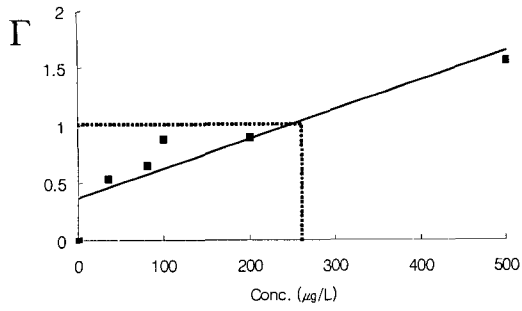


Fig. 21. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate by 1 hr exposure to cadmium.

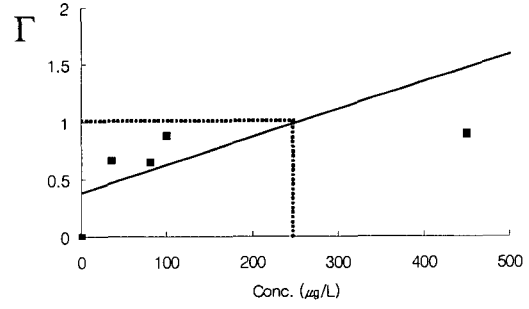


Fig. 22. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate by 6 hr exposure to cadmium.

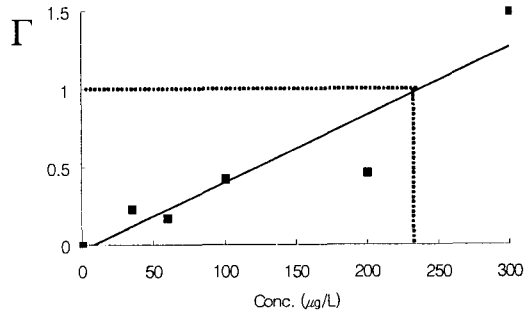


Fig. 23. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate by 24 hr exposure to cadmium.

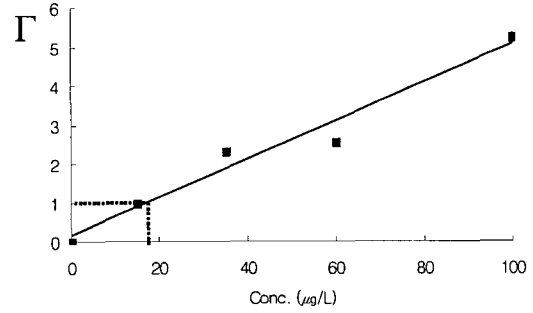


Fig. 24. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate by 48 hr exposure to cadmium.

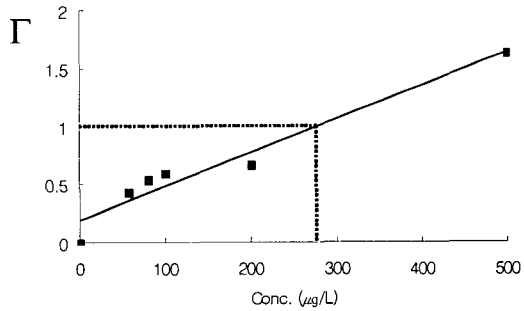


Fig. 25. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate by 1 hr exposure to zinc.

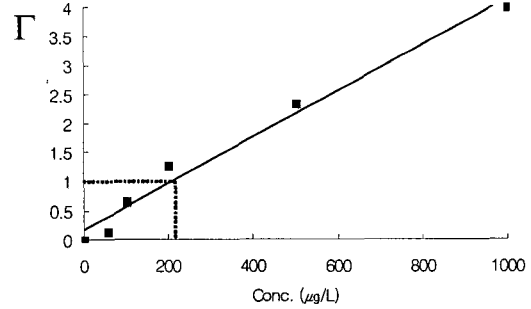


Fig. 26. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate by 6 hr exposure to zinc.

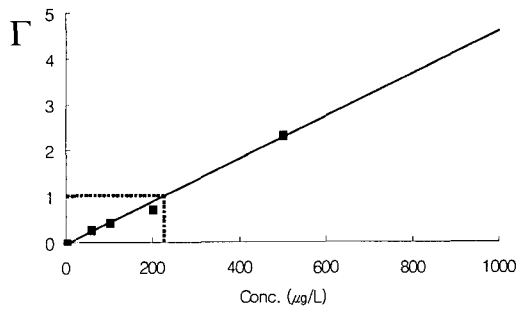


Fig. 27. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate by 24 hr exposure to zinc.

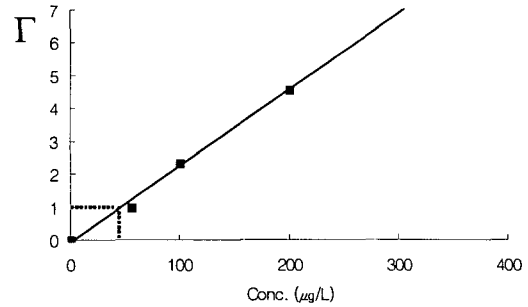


Fig. 28. *Simocephalus mixtus*'s heartbeat rate by 48 hr exposure to zinc.

Table 3. IC₅₀ Values for heavy metal using *Daphnia magna* and *Simocephalus mixtus* (unit : µg/L)

Exposure time - IC ₅₀	<i>D. magna</i>			<i>S. mixtus</i>		
	Cu	Cd	Zn	Cu	Cd	Zn
1hr - IC ₅₀	135	290	>1000	74	276	285
6hr - IC ₅₀	52	135	>1000	11	258	220
24hr - IC ₅₀	32	34	>1000	8	240	210
48hr - IC ₅₀	27	3	512	7	18	55

4. 결 론

1. 중금속에 대한 심장박동을 이용한 독성실험결과 두 실험 중 모두 중금속에 대한 영향을 받았으므로 IC₅₀ (Inhibition concentration 50) 실험이 가능함을 알 수 있었다.
2. 실험결과 중금속에 대한 민감성은 Cu>Cd>Zn 순으로 나타났으며, 외래종인 *D. magna* 보다는 국내종인 *S. mixtus* 의 중금속 민감성이 더 높게 나타났다.
3. 물벼룩의 심장 박동수를 측정한 독성실험은 간편하고 신속할 뿐만 아니라 저농도의 독성 감지에도 아주 유용함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2006학년도 경남대학교 학술연구장려금 지원으로 이루어졌다.

참 고 문 헌

1) Postmes Th. J., Prick R., Brorens, 1989, The deceleration of the heart frequency in the waterflea *Daphnia magna* by derenoceptor agonists and antagonists, *Hydrobiologia*, 171,

141-148.
 2) Florian T., Dietmar Z., Michael C., 1997, Circulation and respiratory controle in milli-metre-sized animals(*Daphnia magna*, *Folsomia candida*) studied by optical methods, *J Comp Physiol B*, 167, 399-408.
 3) Daniel B., 1996, Encouraging student biological research through teacher-scientist partnerships, pp. 333-370.
 4) Lucia G., 2000, Acute toxicity test with *Daphnia magna* : An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity, *Ecotoxicology and Enviromental Safety*, 46, 357-362.
 5) Khangarot B. S., Ray P. K., Chandra, H., 1987, *Daphnia magna* as a model to assess heavy metal toxicity : Comparative assessment with mouse system, *Acta Hydrochem, Hydrobiol*, 15, 427-432.
 6) 윤성명, 김원, 2000, 한국산 시모물벼룩속 종들의 분류학적 검토와 요소시모물벼룩속의 재기재. *Korean J. Limonl*, 33(2), 152-161.
 7) EPA, 1978, Crieria and rationale for dedision making in aquatic hazard evaluation, aquatic hazard of pesticides task group, American Inst. of Biological Science, Arlinton, Virginia, pp. 46.
 8) Lee C. W., Bea J. Y., Jeon H. P., 2004, Optimum Culturing and Testing Conditions for Environmental Toxicity Test with *Simocephalus mixtus*, *Korean Society of Environmental Engineers*, 3(9), 125-129.