

윤충류 *Brachionus plicatilis* 및 저서 요각류 *Tigriopus japonicus*의 초기 생활사를 이용한 해양생태독성시험 방법에 관한 연구

이승민 · 박경수^{1,*} · 윤성진² · 강영실³ · 오정환⁴

국립수산과학원 서해수산연구소

¹인양대학교 해양생명공학과

²(주)바이오니아

³국립수산과학원 해양생태연구과

⁴부산대학교 생명과학과

Development of Ecotoxicological Standard Methods using Early Life Stage of Marine Rotifer *Brachionus plicatilis* and Benthic Copepod *Tigriopus japonicus*

SEUNG MIN LEE, GYUNG SOO PARK^{1,*}, SUNG JIN YOON², YOUNG SHIL KANG³ AND JEONG HWAN OH⁴

Marine Environment Division, WSFRI, NFRDI, Incheon 400-420, Korea

^{1,*}Department of Marine Biotechnology, Anyang University, Incheon 417-833, Korea

²BIONEER Corporation, Daejeon 306-220, Korea

³Ecosystem Conservation Division, NFRDI, Busan 619-705, Korea

⁴Department of Biological Science, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

해양생태독성평가를 위한 표준시험방법 개발을 위하여 해양생태계의 1차 소비자인 윤충류 및 저서 요각류를 이용한 시험방법을 정립하였다. 표준시험생물로 윤충류 *Brachionus plicatilis*와 저서 요각류 *Tigriopus japonicus*를 선정하였으며, endpoint는 윤충류 신생개체의 사망률(24 hr LC₅₀) 및 개체군성장률(48 hr EC₅₀)과 저서 요각류 유생(100~200 µm)의 사망률(48 hr LC₅₀)로 설정하였다. 표준시험방법은 미국재료시험협회 (ASTM)의 독성시험법을 참고하였으며, 표준시험생물은 국내 해양생태계의 특성 및 종의 유용성 등을 고려하여 재설정하였다. 윤충류 *B. plicatilis*와 저서 요각류 *T. japonicus*는 광염성으로 5~35 psu 구간에서 실험이 가능하고, 또한 배양이 용이한 점이 고려되었다. 상기 두 종을 이용한 독성시험은 시험생물 확보 및 배양이 쉽고 시험기간이 짧고 간단한 장점이 있는 반면 독성시험의 민감도가 무척추동물의 유생을 이용한 시험법보다 떨어지는 단점이 있다. 두 종 모두 해양유입 유해물질을 이용한 독성실험결과, 농도-반응의 선형관계가 뚜렷하였다. 카드뮴을 이용한 윤충류 개체군성장에 대한 실험실간 교차분석결과 EC₅₀이 각각 39.3 mg/L와 33.7 mg/L로 유사한 값을 보였다. 따라서 윤충류 및 저서 요각류는 독성시험생물로서 유용한 것으로 판단되며, 위의 두 종중 최소 1종은 해양생태 독성실험의 “battery test”에 포함할 것을 권장한다.

Marine ecotoxicological standard method was applied using marine rotifer and benthic copepod as primary consumer of marine ecosystem. Marine rotifer, *Brachionus plicatilis* and benthic copepod, *Tigriopus japonicus* were designated as standard test species with the endpoints of 24hr neonate mortality (24hr LC₅₀) and 48hr population growth (48hr EC₅₀) for rotifer, and 48hr nauplius mortality (48hr LC₅₀) for benthic copepod. Tests method was referred to those of ASTM (American Society for Testing and Materials) with the replacement of test species which are widely distributed in Korean waters. The two species showed a wide tolerance on salinity (5~35 psu) and can be easily cultured in small space even they were not as sensitive as in the mortality test using the nauplius of marine invertebrates. However, these species revealed the significant “concentration-response relationship” tested with ocean disposal wastes, and reproducibility using cadmium as standard reference material between laboratories. Accordingly, these two species have good potential as test species for marine ecotoxicological test species. Also, we strongly recommend that at least one of these species be included in the test species of “battery test” in marine bioassay.

Keywords: Ecotoxicity, Standard Method, Bioassay, Rotifer, *Brachionus plicatilis*, Benthic Copepod, *Tigriopus japonicus*, Mortality, Population Growth, LC₅₀, EC₅₀

*Corresponding author: gspark@anyang.ac.kr

서 론

해양생태계의 일차소비자를 이용한 해양생태독성평가용 공정시험법 개발을 위하여 표준시험생물을 선정하고 각각의 시험생물에 대한 표준시험방법을 정립하였다. 해양생태계의 일차소비자를 이용한 독성 시험생물로는 윤충류, 요각류 및 소형 갑각류 등이 있으며, 이미 미환경보호국 및 다양한 국제기구에서 많은 시험방법이 개발되어 이용되고 있다(USEPA, 2002; ASTM, 1996; OECD; <http://oberon.sourceoecd.org>). 본 연구에서는 해양 일차소비자중 생태적 대표성 및 종의 유용성 등을 고려하여 국내 실정에 적합한 표준독성시험방법을 개발하였다.

본 연구의 시험생물인 윤충류 *B. plicatilis*는 150~250 μm 크기로 전방보다 후방이 더 넓은 모양을 하고 있으며, 전방은 끝이 뾰족한 톱니 모양의 돌기 6개가 있고 후방은 잘 발달된 2개의 돌기를 갖는다. 전 세계적으로 분포하며, 해양 및 기수 생태계에서 중요한 영양역할을 담당하는 생물이다(Egloff, 1988; Wallace and Snell, 1991; Nogrady *et al.*, 1993). 또한 성장이 빠르고 배양이 용이하여, 먹이생물(Fukusho, 1983; Korunuma and Fukusho, 1987; Fielder *et al.*, 2000) 및 실험생물(Moffat and Snell, 1995; Guerra, 2001)로 광범위하게 이용되고 있다. 특히 담수산 윤충류인 *B. calyciflorus*와 해산 윤충류인 *B. plicatilis*는 이미 수서독성실험을 위한 표준시험법이 마련되어 수서독성 평가를 위한 시험생물로 광범위하게 이용되고 있으며(Snell and Persoone, 1989; ASTM, 1996; Guerra, 2001; Preston *et al.*, 2000; Preston and Snell, 2001a; Preston and Snell, 2001b), biomarker 개발을 위한 생물로도 이용되고 있다(Moffat and Snell, 1995; Wheelock *et al.*, 1998; Wheelock *et al.*, 2002). 또한 *B. plicatilis*는 광염성으로 4~35 psu의 염분에 분포하며(Komis, 1992), 주로 10~20 psu의 염분에서 배양이 잘되는 종으로(Fulks and Main, 1991), 해양 생태

독성평가에 유용한 종으로 generation time이 매우 짧아서(약 1일) 24시간 급성독성실험 및 만성독성실험시 짧은 시간내에 개체군 밀도가 변하기 때문에 사망률을 이용한 실험이 매우 제한되었으나(Ruppert and Barnes, 1994), 본 연구에서는 사망률 실험을 보완하기 위하여 개체군성장률을 이용한 독성실험을 병행하여 수행하였다.

또한 저서 요각류 *Tigriopus japonicus*는 조간대에 주로 서식하며, 해양생태계에서 식물플랑크톤을 섭식하는 1차 소비자이며 어류의 먹이생물로 중요한 위치를 차지한다(Forget *et al.*, 1998). 온도나 염분과 같은 환경변화에 대해 강한 내성을 보이고, 생활사가 짧으며, 현장 채집 및 실험실 배양이 용이한 생물이다(Lee and Taga, 1985; Lee and Taga, 1988; Lee, 1991; McAllen *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2000; Kwok and Leung, 2005). 상기 종은 독성에 대한 민감도가 높고 반복실험 시 재현성이 높기 때문에 일부 국가에서는 이미 해양 미소 갑각류를 독성평가용 실험생물로 이용하고 있다(Forget *et al.*, 1998; Barka *et al.*, 2001; McAllen and Taylor, 2001; Kwok and Leung, 2005).

본 연구에서는 해양생태계의 일차소비자를 대표하는 독성시험용 표준생물 개발 및 표준시험방법 정립을 위하여 윤충류 및 저서 요각류를 이용한 배양 가능성, 독성물질에 대한 민감도 및 시험방법의 용이성 등 다양한 요소를 고려하였다.

재료 및 방법

시험생물종

본 연구를 위한 윤충류인 *Brachionus plicatilis*와 저서 요각류 *T. japonicus*는 강릉대학교 먹이생물 연구실에서 분양받아 서해수산연구소에서 약 3년 동안 계대 사육하였다. 사육 조건은 항온실 내에서 수온 범위 22.0~23.0 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였으며, 사육해수는 자연

Table 1. Summary of test conditions for the definitive acute toxicity test and salinity tolerance test with the marine rotifer *Brachionus plicatilis*

Parameters	Test conditions
Test type	static non-renewal
Duration	24h (mortality test), 48h (population growth inhibition, PGI, test)
Endpoint	LC ₅₀ (mortality test), EC ₅₀ (PGI test)
Test organism	<i>Brachionus plicatilis</i>
Age of test animals	neonates (mortality test), adults (PGI test)
Test temperature	25 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$
Test salinity	1~35 psu
Light intensity	dark
Test chamber size	15 mL
Test solution volume	5~10 mL
Dilution water	filtered seawater (acute toxicity test)/deionized water (salinity tolerance test)
Renewal of test solution	none
Aeration	none
Food	<i>Spirulina</i> or <i>Chlorella vulgaris</i> (PGI test only)
Number of organisms per chamber	10 (mortality test), 5 (PGI test)
Feeding regime	none(mortality test), 24 hr interval (PGI test)
Cleaning	none
Test concentrations	five+control
Number of replicates per concentration	5
Test acceptability criterion	>90% survival rate in control for mortality test and $r > 0.7(d^{-1})$ in control for PGI test

Table 2. Summary of culture conditions for the harpacticoid copepod *T. japonicus*

Parameters	Culture conditions
Culture type	Static renewal
Temperature (°C)	21.0~23.0
Salinity (psu)	26.0~29.0
pH	7.8~8.1
Light quality and intensity	Ambient laboratory levels
Photoperiod	16 L, 8D
Culture chamber volume (mL)	5 L
Culture solution volume (mL)	4 L
Renewal period (d)	7 days
Feeding regime	twice per day (60 mL of <i>Isochrysis galbana</i> and <i>Tetraselmis suecica</i> mixture)
Oxygen saturation (%)	80.0~90.0
Culture medium	Filtrated seawater (1 µm cartridge filter)

해수를 모래 및 카본으로 여과한 후 사용하였다. 사육 염분범위는 26~32 psu였으며, 광주기는 16시간(L):8시간(D)으로 조절하였다. 윤충류 *B. plicatilis*의 먹이는 실험실에서 자체 배양한 클로렐라를 공급하였으며(Table 1), 저서 요각류 *T. japonicus*는 해산녹조류 (*Tetraselmis suecica*, $4.0\sim6.0 \times 10^5$ cells/mL)와 착편모조류 (*Isochrysis galbana*, $7.0\sim9.0 \times 10^5$ cells/mL)를 2:1 비율로 혼합하여 1일 2회 30 mL씩 공급하여 배양하였다(Table 2).

시험방법

시험조건의 설정

염분 내성 실험은 염분범위를 0~35 psu까지 5 psu 구간으로 나눈 후(반복수=3) 각각의 실험구별로 24시간 동안 윤충류의 신생 개체의 사망률과 48시간 동안 윤충류의 개체군성장률 및 저서요각류 유생의 사망률을 측정하여 대조구(배양 염분, 약 30 psu)와 비교하여 평균 사망률 및 개체군성장률의 차이에 대한 유의성을 검정하였다.

독성물질에 대한 민감도를 알아보기 위하여 표준독성물질중 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(반복수=3), 이를 순차적으로 희석하였으며, 대조구를 포함하여 6개 농도 구간(0~10 mg/L)에서 각각의 농도별 살아있는 개체를 계수하여 사망률로 환산하였다. 윤충류 신생개체의 24시간 사망률(LC₅₀)과 저서 요각류 유생의 48시간 사망률(LC₅₀) 및 윤충류의 48시간 개체군성장률(EC₅₀)을 측정하였다.

또한 해양으로 유입되는 유해물질에 대한 독성실험을 위하여 하수 및 폐수오니를 채취하여 독성실험에 이용하였다. 채취된 오니는 냉장 상태로 운반하여 폐기물공정시험법에 따라 용출하였으나, 상기 오니가 해양으로 투기되어 해양생물에 미치는 영향을 구명하고자함으로 모래 및 카본필터로 여과한 자연해수를 0.45 µm membrane filter로 재여과한 해수를 이용하여 용출하였다. 하수오니 추출은 여과해수(26.2~28.0 psu)와 오니의 비율을 10:1(V:W)로 혼합하여, shaker(Reipro shaker, JEIO TECH, Korea)로 6시간 동안 잘 흔든 후 용출된 하수오니 추출액은 GF/C 필터(0.45 µm, Whatman, USA)로 여과하여 실험에 사용하였다. 독성실험을 위한 하수오니 추출액은 최고 농도를 100%로 설정한 후 이를 순차적

으로 희석하여 대조구(0%)를 포함한 6개 농도(0, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0%)를 제조하여 3 반복으로 실험하였다.

개체군성장률 측정법

윤충류의 개체군성장률 실험 조건은 Table 1과 같으며, 실험 시작시 윤충류 성체중 등글고 짙은 갈색의 알을 2개씩 포란한 성체를 선별하여 시험구당 5개체씩 분배하여 48시간 후 개체군성장률을 측정하였다. 실험기간동안 윤충류의 먹이는 시험용액의 농도에 영향을 주지 않기 위하여 동결건조된 스피룰리나 분말을 멸균한 해수에 1:100(w:v)의 비율로 농축하여 위의 거품은 제거하고 맑고 투명한 상태의 농축액을 10 µl씩 투여하였다. 개체군 성장률은 $r = (\ln N_t - \ln N_0) / t$ (r =개체군성장률, N_t =시간 t 에서의 개체수, N_0 =초

Table 3. Summary of test conditions for the definitive acute toxicity test and salinity tolerance test with the harpacticoid copepod *T. japonicus* nauplius

Parameters	Conditions
Test type	static non-renewal
Test duration	48hr
Endpoint	mortality (48hr-LC ₅₀)
Test organism	<i>Tigriopus japonicus</i>
Age of test animals	48~72 hr old nauplius (100~200 µm)
Test temperature	22±1 °C
Test salinity	5~35 psu
Light intensity	ambient laboratory levels
pH	6.2~8.2
Photoperiod	16L, 8D
Test chamber size	20mL
Test solution volume	10mL
Dilution water	filtered seawater/deionized water
Renewal of test solution	none
Aeration	none
Number of organisms per chamber	20
Feeding regime	none
Cleaning	none
Test concentrations	five+control
Number of replicates per concentration	5
Test acceptability criterion	>90% survival rate in control

기 개체수, t=시간)를 이용하여 각 농도별로 r값을 계산한 후 이를 이용하여 48시간 EC₅₀ (개체군성장률을 반으로 하는 농도)를 계산하였다.

사망률 측정법

윤충류 신생개체(휴면난으로부터 부화된지 2시간이내)를 이용한 24시간 LC₅₀(사망률을 반으로 하는 농도) 측정(Table 1)과 저서요각류의 유생(부화 후 72시간 이내의 100~200 μm 크기)을 이용한 48시간 LC₅₀ 측정(Table 3)을 통하여 급성독성 실험을 수행하였다.

결 과

시험생물

해양생태독성시험용 표준시험생물은 시험생물종의 유용성, 독성물질에 대한 민감도등을 고려하여 선정하게 된다. 윤충류와 저서요각류는 광염성이며, 시험생물 확보 및 배양이 용이하다.

해양생태독성평가를 위한 시험생물은 다양한 염분에 노출되어 지므로 일반적으로 광염성 생물(euryhaline species)이 더 유용하다. 실험결과 윤충류 *Brachionus plicatilis*의 개체군성장률은 15 psu 이하의 염분에서는 48시간 개체군성장률이 0.4 이상을 보였으나 20 psu 이상에서는 0.2~0.3으로 저염분 실험구에서 개체군성장률이 높은 것으로 나타났으며, 특히 30 psu 실험구에서는 2차에 걸친 실험에서 모두 r=0.19로 가장 낮게 나타났다. 그러나 0 psu 염분에서는 모든 개체가 사망하였다. *Tigriopus japonicus* 유생의 염분에 대한 생존율의 하한치를 구명하기 위하여 0~5.0 psu 범위에서 1.0 psu 간격으로 염분을 조절하여 시험생물을 노출시킨 결과, 1.0 psu 보다 높은 농도에서는 유생 생존율이 90%이상이었으며, 타 실험구와 유의한 차이를 보이지 않았다(p>0.05). 그러나 0 psu에서는 모두 사망하여 *T. japonicus* 유생의 염분 내성한계는 1.0 psu인 것으로 나타났다.

시험방법

해양생태계의 일차소비자를 이용한 해양생태독성 평가용 표준 시험방법은 상기 두 생물의 초기 사망률 및 개체군성장률을 이용한 시험방법으로 설정하였다. 윤충류는 신생개체의 24시간 사망률과 성체의 48시간 개체군성장률을, 그리고 저서요각류는 유생의 48시간 사망률을 각각 endpoint로 설정하였다. 독성 실험에 필요한 시험생물의 준비 등을 포함하는 시험 절차는 다음과 같다.

시험생물의 준비: 시험생물은 항온실에서 단일종으로 배양하거

나, 국립수산과학원 서해수산연구소에서 구할 수 있다. 특히 윤충류는 상업용 내구란을 구입하여 부화 후 사용할 수 있는 장점이 있다. 윤충류 신생개체의 사망률 실험은 상업용 내구란을 실험 19시간 전에 여과해수가 담긴 비이커 안에 넣어 실온 부화 후 2시간이내의 신생개체를 이용한다. 윤충류 개체군성장률실험을 위해서는 실험 2일전부터 먹이생물인 클로렐라를 충분히 공급하여 성체가 포란할 수 있는 조건을 만들어준 후 비교적 등글고 짙은 갈색의 알을 2개씩 포란한 성체를 선별한다. 저서요각류 *T. japonicus* 유생의 사망률 실험은 체장이 100~200 μm 범위의 유생을 체로 걸러서 준비한다. 이때 필요한 시험생물의 개체수는 실제로 필요한 개체수보다 약 1.5~2.0배를 준비한다. 예로서 윤충류 신생개체 사망률 시험의 경우, 농도구 6개, 반복구 5개에 각각 10개체씩 노출하므로 총 300 개체가 필요하나 실제로는 450~600 개체 정도 준비하여야 한다.

시험용액의 준비: 본 시험의 용기는 6 well plate이며, 총 6개의 실험구에 각 농도별로 시험용액 10 mL씩 분주한다. 시험농도는 대조구를 포함하여 6구간이며, 각 시험구별 반복수는 5이다. 하수오니 및 현장퇴적물과 같은 희석 시험의 경우, 시험대상물질 용액의 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%와 대조구로 설정한다. 일반적으로 시험은 pH를 조절하지 않고 수행해야하지만, 극단적인 산성이나 알칼리성에 의해 독성효과를 나타낼 수 있기 때문에 이러한 경우 pH와 관련이 없는 독성을 측정하기 위해 희석하기 전에 시험액의 pH를 염산이나 수산화나트륨을 이용하여 중성으로 조절한다. 시험용액은 특별한 경우(휘발성이 강한 용액의 독성시험)를 제외하고는 시험시작 24시간 전에 준비해야한다.

시험생물의 노출: 윤충류 사망률 실험은 신생개체 10개체씩 시험용액에 노출하며, 윤충류 개체군성장률 실험은 5개체씩을, 그리고 저서요각류 유생 사망률 시험은 20개체씩을 노출한다. 사망률 시험은 먹이 공급 없이 이루어지며, 윤충류 개체군성장률 시험의 경우, 실험시작시 그리고 24시간 간격으로 동결건조된 스피롤리나 분말을 해수에 고농도로 농축하여 (1:100 w:v) 10 μl씩 투여한다.

독성실험: 시험 시작시 각 시험구별로 염분, 수온, 용존산소 및 pH를 측정하여 독성시험지에 기록하며 윤충류 신생개체의 사망률 실험은 24시간 후, 윤충류 개체군성장률 실험 및 저서요각류 유생의 사망률 실험은 48시간 후 살아있는 개체수를 측정한다. 그 밖의 실험조건은 각각 Table 1과 Table 3에 제시하였다.

실험의 종료: 시험대상물질, 수질, 실험조건, 일시, 실험자 및 책임자 등을 독성시험지에 명확히 기입하고, 각각의 시험구별 사망 개체를 확인하여 기록한다. 이때 생존 개체는 반드시 수거하여 사멸시킨 후 처리하여야 한다.

Table 4. Toxicological estimation of *T. japonicus* nauplius mortality test exposed to standard toxicants and waste sludge elutriates. Figures indicate the ranges and mean values with standard deviations in parentheses

Items	Standard toxicant(mg/L)		Waste sludge elutriate(%)		
	CuSO ₄	CdCl ₂	Leather processing waste	Dye processing waste	Textile production waste
LC ₅₀	2.8~4.4(3.6±0.7)	1.7~1.8(1.7±0.8)	30.3~31.8(31.1±1.1)	40.4~70.2(54.4±15.0)	NE
NOEC	0.6~1.3(0.8±0.3)	0.6(0.6±0.0)	12.5(12.5±0.0)	6.3(6.3±0.0)	NE
LOEC	0.6~2.5(1.3±0.8)	0.6~1.3(0.8±0.4)	25.0(25.0±0.0)	6.3~12.5(10.4±3.6)	NE

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

자료분석: 독성실험에 대한 endpoints는 대조구의 개체군성장률 대비 50%에 이르는 반수영향농도(EC₅₀)와 대조구의 생존율 대비 50%에 이르는 반치사농도(LC₅₀)를 계산한다. 계산 방법은 자료의 특성에 따라 Graphic method, Probit method, Spearman-Karber method 또는 Trimmed spearman-Karber method을 이용한다. 사망률 자료는 arcsine square root 변환을 하며, 성장률 자료는 변환하지 않는다. 자료의 정규분포는 Shapiro-Wilk's test(1965)로 그리고 분산의 동일성은 Bartlett's test(Snedecor and Cochran, 1989)로 검증한다. NOEC(No observed effective concentration)와 LOEC (Lowest observed effective concentration)의 산출은 Dunnett's test (1964)를 이용하여 유의수준 $\alpha=0.05$ 에서 검증한다. 상기 모든 자료 분석은 독성시험자료 분석 프로그램인 TOXCALC(Tidepool Scientific Software, USA)나 기타 통계프로그램을 이용할 수 있다.

시험결과의 타당성 및 일관성 검증
표준독성물질에 대한 동물플랑크톤의 민감도 평가

해양생태독성실험을 위한 표준실험생물은 독성물질에 대한 민감도(sensitivity)가 입증되어야하며, 또한 독성실험시 실험에 대한 신뢰도를 제시하기 위하여 표준물질을 이용한 독성시험을 실시하여야 한다. 따라서 USEPA(US Environmental Protection Agency, 미환경보호청)의 ECOTOX Database System(<http://cfpub.epa.gov/ecotox>)에서 제공하는 표준독성시험물질중 카드뮴(CdCl₂)에 대한 윤충류의 사망률 실험과 개체군성장률 실험을 각각 7번씩 실시하였다. 그 결과, 윤충류 *B. plicatilis*의 평균반수치사농도(LC₅₀)는 51±12(38~75) mg/L이고(Fig. 1, Table 5), 평균반수영향농도(EC₅₀)는 46±11(29~62) mg/L로 나타났다(Fig. 2). 이 결과는 Snell and Persoone(1989)의 카드뮴(CdCl₂)에 대한 윤충류 *B. plicatilis* 신생 개체의 24시간 평균반수치사농도(LC₅₀)인 56.8 mg/L와 비교하여

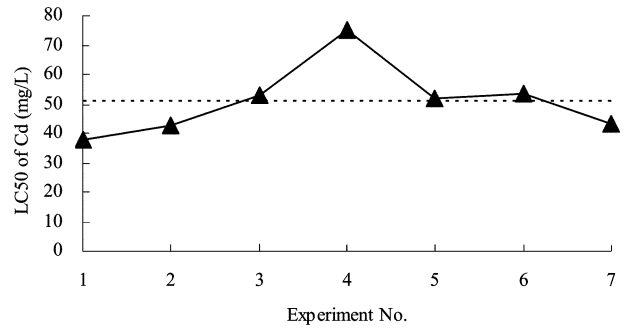


Fig. 1. Variation of median lethal concentrations (LC₅₀) of the marine rotifer neonate exposed to Cd as a reference material (a dotted line indicates the average of LC₅₀).

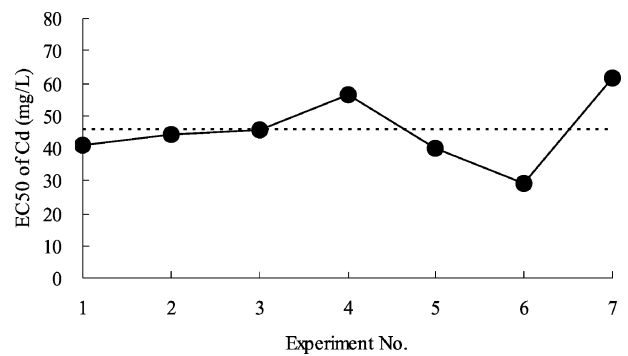


Fig. 2. Variation of median effective concentrations (population growth inhibition EC₅₀) of marine rotifer *B. plicatilis* exposed to Cd as a reference material (a dotted line indicates the average of EC₅₀).

유사한 결과를 나타냄으로서 윤충류 *B. plicatilis*의 strain이 다름에도 불구하고 표준독성물질인 카드뮴에 대한 민감도 차이가 없

Table 5. Comparison of median lethal concentrations (LC₅₀) of harpacticoid copepod *T. japonicus* and other aquatic crustaceans

Species names	LC ₅₀ (test duration)			Reference
	Copper (mg/L)	Cadmium (mg/L)	Medium	
Copepods				
<i>Tigriopus japonicus</i> (nauplius) ⁺	3.6 (48h)	1.7 (48h)	SW	Present study
<i>Tigriopus japonicus</i>				
Ovigerous female (adult) [#]	1.0 (96h)		BW	Kwok & Leung [2005]
Ovigerous female (adult) [#]		15.1 (96h)	SW	Chung <i>et al.</i> [1996]
<i>Tigriopus californicus</i> (nauplius) [#]	0.7 (96h)		BW	O'Brien <i>et al.</i> [1988]
<i>Tigriopus brevicornis</i>				
Ovigerous female (adult) [#]		0.05 (96h)	SW	Forget <i>et al.</i> [1998]
Ovigerous female (adult) [#]	0.2 (96h)		SW	Barka <i>et al.</i> [2001]
<i>Eurytemora affinis</i> (adult) [#]	0.03 (96h)		SW	Suillivan <i>et al.</i> [1983]
<i>Paracalanus parvus</i> (adult) [#]		27.1 (24h)	SW	Arnott & Ahsanullah [1979]
<i>Nitocra spinipes</i> (adult) [#]	1.8 (96h)		SW	Bengtsson [1978]
Amphipod				
<i>Elasmopus rapax</i> (adult) [#]		0.2 (48h)	SW	Zanders & Rojas [1992]
Marine rotifer				
<i>Brachionus plicatilis</i> (neonate) ⁺		56.8 (24h)	SW	Snell & Persoone [1989]
<i>Brachionus plicatilis</i> (neonate) ⁺		51 (24h)	SW	Present study

SW: seawater (>30.0 psu), BW: blackish water (5.0~30.0 psu)
 +: copepods incubated in laboratory, #: copepods collected in field

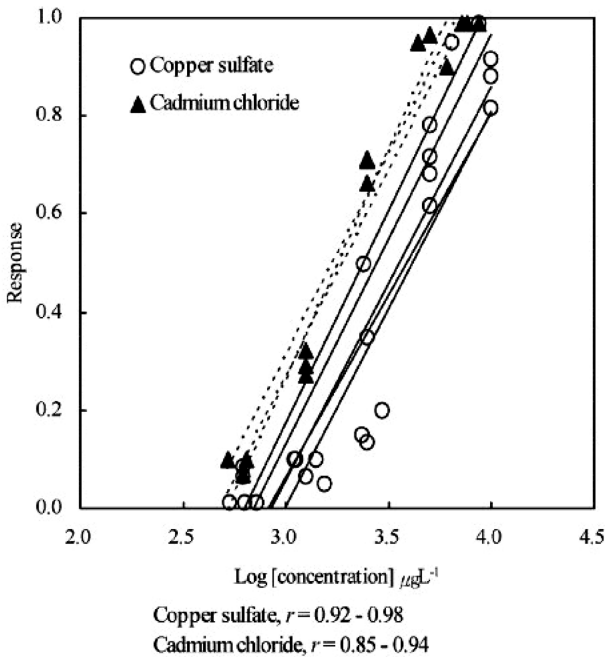


Fig. 3. Concentration-response curve for *T. japonicus* nauplius mortality test exposed to various standard toxicants.

었다(Table 5).

표준독성물질에 대한 *T. japonicus* 유생의 민감도 실험결과, *T. japonicus* 유생의 황산구리 및 카드뮴에 대한 독성반응은 뚜렷하게 관찰되었으며, 각각의 반복 실험구 내의 변동계수는 10.0% 이내로 크지 않았다. 황산구리에 대한 유생의 48시간 LC₅₀은 2.8~4.4 mg/L 범위였으며, NOEC와 LOEC 값은 각각 0.8±0.3 mg/L와 1.3±0.8 mg/L로 산출되었다(Table 4). 카드뮴에 대한 *T. japonicus* 유생의 48시간 LC₅₀은 1.7~1.8 mg/L 범위로 황산구리보다 낮은 농도에서 산출되었으며, 실험간의 오차가 매우 적었다. NOEC와 LOEC 역시 0.6±0.0 mg/L, 0.8±0.3 mg/L로 황산구리의 실험결과보다 낮았다(Table 4). 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 *T. japonicus* 유생의 독성은 카드뮴이 황산구리보다 약 2배가량 높은 것으로 나타났다(Table 4, Fig. 3).

해양 유입 오염물질을 이용한 독성평가

상기 시험방법을 이용하여 해양 유입 유해물질의 독성 검증이 가능한지를 검증하기 위하여 일련의 독성시험을 수행하였다. 해양 투기하수오니 및 폐수오니 용출액에 따른 윤충류의 24시간 사망률 실험과 48시간 개체군성장률 실험 결과, 윤충류 신생개체를 이용한 24시간 사망률 실험에서 상대적으로 가장 높은 독성을 보인 오니는 염색공장 폐수오니로 반수치사농도(LC₅₀)는 2.9%로 나타났으며, 가장 독성이 약한 오니는 염료공장폐수오니로 나타났다(Fig. 4). 동일한 시료를 이용한 48시간 개체군성장률 실험결과 역시 사망률실험에서 가장 강한 독성을 보였던 염색공장폐수오니 용출액은 개체군성장률 실험에서도 가장 강한 독성을 보였으나 나

머지 오니는 사망률 실험과 상이한 결과를 보였다(Fig. 5). 농도 구별별 개체군성장률(r)이 농도-반응관계(concentration-response relationship)를 보이지 않아 독성요소를 계산하지 못했다.

저서 요각류 *T. japonicus* 유생의 현장시료에 대한 48시간 LC₅₀은 피혁공장 폐수오니 추출액의 경우 30.3~31.8% 이었으며, 염색공장 폐수오니는 40.4~70.2% 범위로 나타났으나 염료공장 폐수오니 추출액은 실험물질에 대한 *T. japonicus* 유생의 독성반응은 뚜렷하지 않았기 때문에 LC₅₀ 값을 산출할 수 없었다. 피혁 및 염색공장 폐수오니 추출액에 대한 NOEC와 LOEC 값은 피혁공장 폐수오니가 각각 12.5%, 25.0%이었으며, 염색공장 폐수오니의 경우, 각각 6.3%와 6.3~12.5%로 나타났다(Table 4). 본 실험결과, 피혁과 염색공장 폐수오니 추출액은 농도-사망률 사이에 상관계수가 각각 0.88~0.92, 0.96~0.99 범위로 선형관계가 뚜렷하여 공장 폐수오니의 독성 영향을 평가 할 수 있었으나 염료공장 폐수오니의 경우에는 농도 증가에 따른 독성의 영향이 관찰되지 않았다(Fig. 6).

따라서 실제로 해양으로 유입되는 독성물질을 이용한 실험결과, 물질별로 독성 차이가 명확히 구별되었으며, 독성이 있을 경우 농도-반응의 관계도 뚜렷하여, 상기 시험방법의 유용성에 대한 가능성이 입증되었다.

분석결과의 재현성

본 연구에서 제시된 윤충류 급성 독성시험법에 따라 국립수산과학원 서해수산연구소와 (주)네오엔비즈 환경안전연구소가 표준독성물질인 카드뮴(CdCl₂)을 사용하여 윤충류 *B. plicatilis*의 개체군 성장에 대한 교차분석을 실시하였다. 시험 결과 국립수산과학원 서해수산연구소의 EC₅₀은 39.3 mg/L(95% CI=26.5~58.2 mg/L)였으며, (주)네오엔비즈 환경안전연구소의 EC₅₀은 33.7mg/L(95% CI=12.4~85.9 mg/L)로 매우 유사한 값을 나타냈다. 교차분석 결과 두 기관 모두 대조구에서 가장 높은 개체군성장률 보였으며, 카드뮴의 농도가 높아질수록 개체군성장률이 감소하였으며, 100 mg/L 이상에서는 개체군성장률이 이루어지지 않았다(Fig. 7). 그러나 상기 결과는 1회의 교차 분석 결과이므로 추후 상기 방법을 이용한 독성시험시 표준물질을 이용한 독성 시험을 추가하여 그 시험 결과를 공개할 것을 권장한다.

고 찰

본 시험법에 포함된 시험생물종인 윤충류 *Brachionus plicatilis*와 저서 요각류 *Tigriopus japonicus*는 수서독성평가에 보편적으로 이용되는 독성시험생물이다. 두 종 모두 광범위한 염분에 따라 성장률의 차이는 있으나 광범위한 염분에서 생존 및 성장이 가능한 종으로 해양생태독성평가를 위한 시험생물로서 적합한 종이다(Fulks and Main, 1991; Komis, 1992). *B. plicatilis*는 완전 담수에서 해수에 이르는 모든 염분에 적응력이 매우 탁월하며, 해양생태독성실험시 가장 문제가 되는 시험생물의 염분 적응력에는 문제가 없을 것으로 판단된다.

*B. plicatilis*는 염분에 따른 민감도 변화는 매우 적은 것으로 판단된다. Snell and Persoone(1989)은 서로 다른 염분인 15 psu(LC₅₀=54.9 mg/L)와 30 psu(LC₅₀=56.8 mg/L)에서 표준독성물질인 카드뮴에 대한 *B. plicatilis* 신생개체의 사망률 비교실험을 통

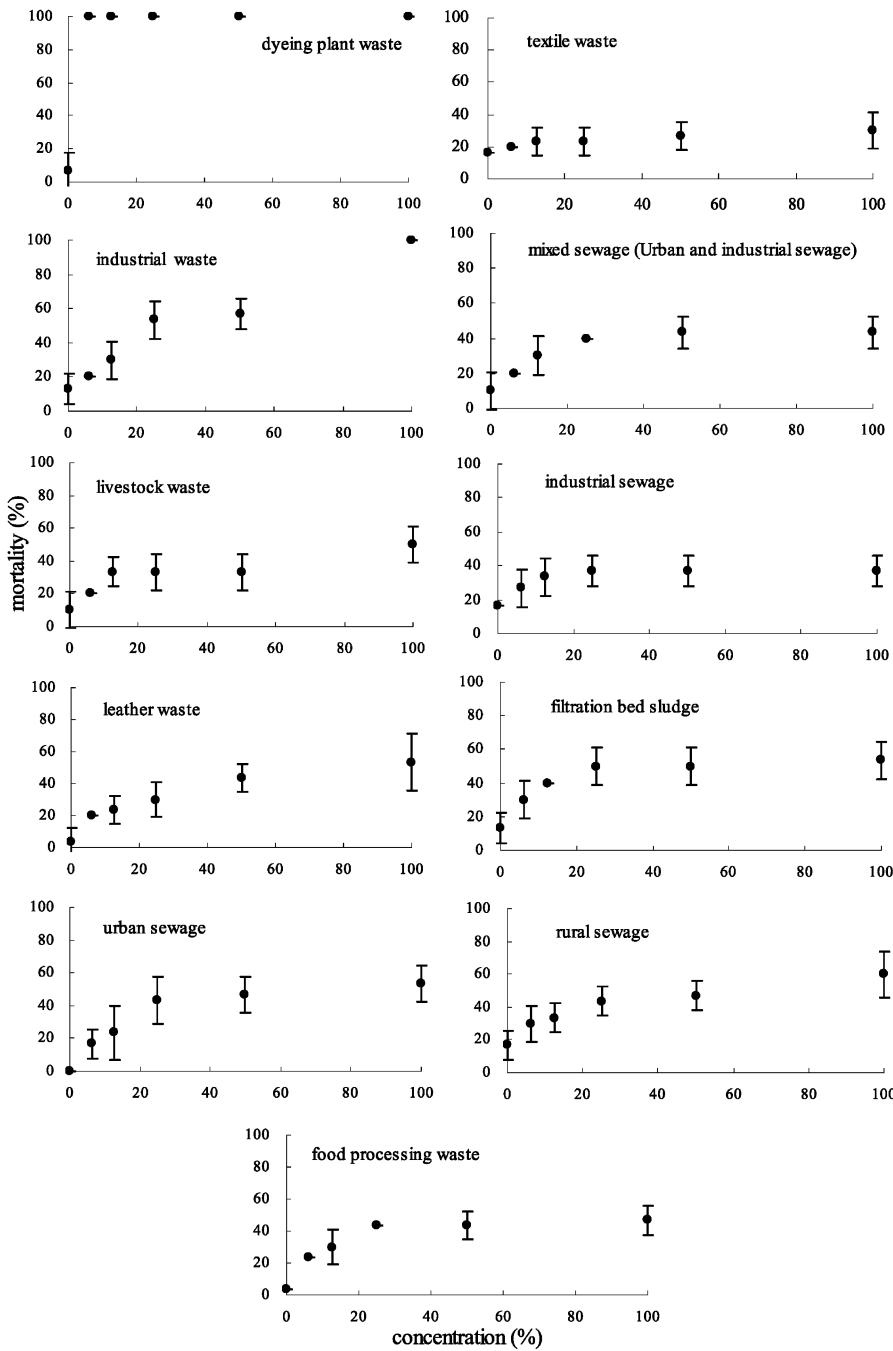


Fig. 4. Rotifer neonate mortality exposed to the sewage sludge extracts by seawater.

하여 민감도가 염분의 차이에 따라 달라지지 않음을 입증하였다. 그러나 염분에 따른 성장률의 차이가 있으므로 실험시 반드시 노출 물질과 동일한 염분의 대조구를 설정하여야 한다(윤 등, 2006). 윤충류는 노출되는 염분에 따라 체성분의 생화학적 변화가 있는 것으로 구명되었으며, 광범위한 염분 적응력은 체성분의 능동적 변화 때문으로 보고되었다(Frolov *et al.*, 1991). 일반적으로 *B. calyciflorus*는 주로 담수에 서식하여 실험대상물질의 염분이 5 psu 이하이면 *B. calyciflorus*의 사용을 권장하고 있다(Snell *et al.*, 1991b; ASTM, 1996). 그러나 그 이상의 염분에서는 반드시 *B. plicatilis*를 이용해야하며, 특히 중금속류에 대한 민감도가 북미 국가에서 주로 이용하는 *Americamysis bahia*(구 *Mysidopsis bahia*)보다 좋은

것으로 보고되고 있다(Snell *et al.*, 1991a; Moffat and snell, 1995).

윤충류는 생활사가 매우 짧기 때문에 성체를 이용한 사망률 독성실험의 경우 실험 도중에 부화 및 성장하는 개체로 인하여 정확한 사망률 측정이 불가하므로 대부분 내구란을 부화시켜 부화된 지 2시간이내의 신생개체를 이용한 사망률 실험 기간을 24시간으로 설정하였다. 또한 성체를 이용한 개체군성장률 시험은 윤충류 성체중 등갈고 짙은 갈색의 알 2개씩 포란한 성체를 선별하여 시험구당 5개체씩 분배하여 48시간동안 개체군성장률을 측정하는 시험방법을 선택하였다(Table 1). 신생개체를 이용한 사망률 독성시험은 급성독성을 반영하는 반면, 개체군성장률(r)을 이용한 시험은 생식물에 의한 독성평가로서 실제로 유해화학물에 대한 윤

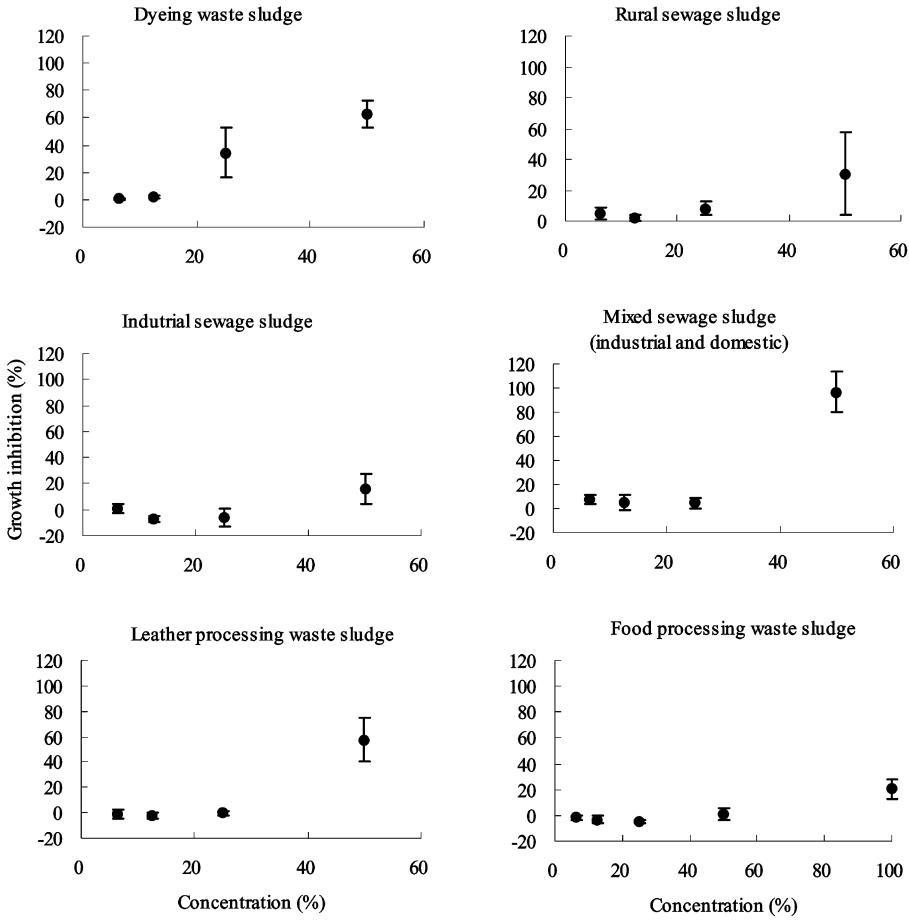


Fig. 5. Population growth inhibition of the marine rotifer exposed to the various sewage sludges extracted by seawater.

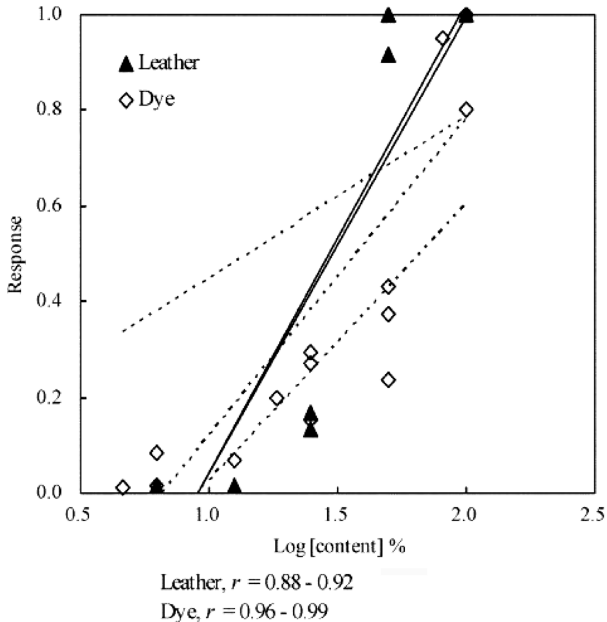


Fig. 6. Concentration-response curve for *T. japonicus* nauplius mortality test exposed to the elutriate of the two industrial waste sludges.

충류 개체군의 미래를 예측할 수 있는 좀더 실질적인 수단으로 사료된다(Snell and Serra, 2000). 윤충류의 성장률을 이용한 독성시험시 적절한 먹이 농도는 매우 중요한 요소이다. 먹이 농도가 낮을

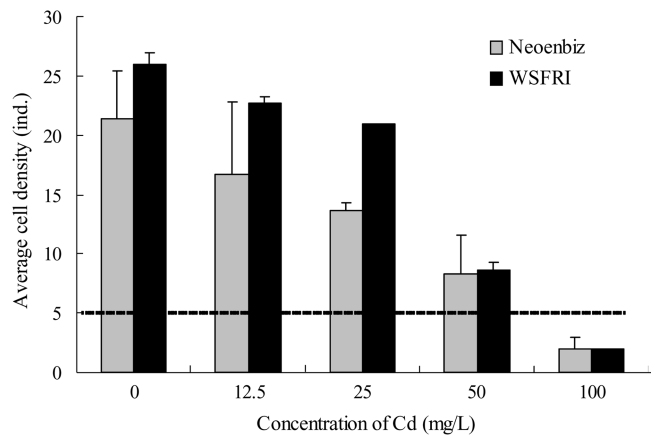


Fig. 7. Interlaboratory test of *B. plicatilis* population growth for 48 hours using cadmium as a toxicity reference material (a dotted line is the initial number of individuals).

경우 독성물질에 대한 민감도가 7배까지 차이를 보이는데 성장률의 정도가 먹이 농도와 밀접한 관계가 있기 때문이다(Cecchine and Snell, 1999). 따라서 실험기간동안 충분한 먹이가 공급될 수 있도록 수시로 투여하여야하나 먹이 투여에 따른 실험용액의 과다한 희석이 발생하지 않도록 최대한 농축하여 투여하여야 한다. 윤충류의 내구란을 이용한 실험은 배양 과정에서 내구란을 형성할 수 있는 환경을 조성하여 대량으로 생산할 수 있으며 이에 관

한 연구논문은 Snell and Hoff(1988), Hagiwara (1994) 및 Hagiwara *et al.*(1997) 등이 있다.

저서 요각류는 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 개체를 선정하여야한다(Forget *et al.*, 1998). 윤 등(2006)의 연구에서는 독성실험에 사용할 생물의 유효 체장을 결정하기 위하여 실험생물의 체장변화를 관찰하여 부화 후 72시간 이내의 100~200 μ m로 시험생물의 크기를 선정하였다. 또한 시험시간을 처음에는 윤충류와 동일하게 24시간으로 설정하였으나, 요각류는 윤충류에 비하여 생활사가 매우 길기 때문에 독성 반응 시간이 충분치 않은 관계로 시험시간을 48시간으로 연장설정하였다(Table 3). *T. japonicus* 유생의 경우 담수를 제외한 저염분에 대한 적응력이 매우 높으며 실험 시 해당 염분에 대한 순치기간 없이 직접 실험할 수 있다. 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 전부 사망하였다.

저서 요각류 *T. japonicus*는 연구자마다 실험한 생물의 발달단계가 다르기 때문에 우선적으로 시험생물의 발달단계를 명확하게 규정해야할 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. 저서 요각류 *T. japonicus*의 유생은 부화한지 72시간 이내에 100~200 μ m 범위로, 미성숙 개체나 성체에 비해 개체간의 체장 편차는 크지 않았다. 따라서 독성시험시 *T. japonicus* 유생을 실험생물로 이용할 경우, 유생은 100~200 μ m 사이의 망목을 이용하면 쉽게 분리할 수 있는 것으로 판단된다. 그러나 *T. japonicus*는 부화 후 96시간이 되면 성체가 되기 전의 미성숙 개체로 성장하기 때문에 *T. japonicus* 유생을 이용한 독성평가는 생물의 성장시간을 고려하여 최대 48시간을 경과하지 않는 범위 내에서 수행하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

표준독성물질인 카드뮴에 대한 동물플랑크톤 및 타 분류군의 독성실험 결과에 따르면, *T. brevicornis* 성체의 96시간 LC₅₀ 값이 0.05 mg/L 로 가장 민감한 결과를 보였으며(Forget *et al.*, 1998), 그 다음으로 단각류 *Elasmopus rapax* 성체의 48시간 LC₅₀ 값이 0.2 mg/L로 산출되어 민감한 결과를 나타냈다(Zanders and Rojas, 1992). 본 연구결과 저서 요각류 *T. japonicus* 유생의 48시간 LC₅₀ (1.7±0.8 mg/L)은 윤충류 *B. plicatilis* 신생개체의 24시간 LC₅₀ (51±12 mg/L) 보다 상당히 낮은 값을 보임으로써 *T. japonicus* 유생이 *B. plicatilis* 신생개체 보다 카드뮴에 대하여 민감함이 입증되었다. Chung *et al.*(1996)은 본 실험생물과 동일종인 *T. japonicus* 성체를 이용하여 실험한 결과, 96시간 카드뮴 LC₅₀ 값이 15.1 mg/L로 유생과 비교하여 둔감한 결과를 보였다. 따라서 같은 종이라도 성장단계에 따라 표준독성물질에 대한 민감도가 다르게 나타나기 때문에 시험시 시험생물의 연령을 고려해야한다. Snell and Persoone (1989)의 연구결과에 따르면, 윤충류 *B. plicatilis* 신생개체의 24

시간 LC₅₀이 56.8 mg/L로 본 연구결과와 유사한 값을 나타냄으로써 실험의 재현성이 우수한 생물종으로 판단된다(Table 5).

윤충류 및 저서 요각류를 이용한 해양 배출 폐수오니 추출액에 대한 독성시험 결과, 오니별로 독성의 구별이 뚜렷하였으며, 또한 농도-반응의 선형관계 또한 명확하였다. 따라서 상기 생물은 실제로 해양으로 유입되는 유해물질의 독성평가에 유용할 것으로 판단된다. 특히 윤충류는 국제적으로 통용되는 시험종이며, 상업용 내구란 등을 구입하여 실험에 이용하거나, 또는 실험실에서 소규모 공간으로 쉽게 배양할 수 있다. 또한 저서 요각류 *T. japonicus*는 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(Forget *et al.*, 1998; McAllen *et al.*, 1999; Barka *et al.*, 2001; McAllen and Taylor, 2001; Kwok and Leung, 2005). 따라서 상기 두 종을 이용한 해양생태독성시험법은 시험종의 유용성, 농도-반응관계 등을 고려할 때 유해물질이 해양생태계의 일차소비자에 미치는 영향을 평가할 수 있는 유용한 방법으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 R&D과제(RP-2008-ME-027)로 수행되었으며, 실험생물을 제공해주신 강릉대학교 먹이생물연구실의 박흥기 교수님께 감사드립니다. 본 연구 결과는 금번 특별호의 취지인 “해양생태독성시험방법의 소개” 차원에서 그동안 개발된 6개의 생태독성시험법을 출간하는바 기준에 발표된 Park *et al.* (2005)과 윤 등(2006)의 사전 연구 결과가 포함되었습니다.

참고문헌

- 윤성진, 박경수, 오정환, 박승윤, 2006. 저서성 해산 요각류 harpacticoid *Tigriopus japonicus* 유생을 이용한 해양생태독성 평가. 한국해양환경공학회지, 9: 160~167.
- Arnott, G.H. and M. Ahsanullah, 1979. Acute toxicity of copper, cadmium and zinc to three species of marine copepod. Aust. J. Mar. Freshwat. Res., 30: 63~71.
- ASTM, 1996. Standard Guide for Acute Toxicity Test with the Rotifer *Brachionus*. ASTM (American Society for Testing and Materials) 11.05, E1440-91. ASTM, W. Conshohocken, PA.
- Barka, S., J.F. Pavillon and J.C. Amiard, 2001. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*. Comp. Biochem. Physiol., 128C: 497~493.
- Bengtsson, B.E., 1978. Use of harpacticoid copepod in toxicity test. Mar. Pollut. Bull., 9: 238~241.
- Cecchine, G. and T.W. Snell, 1999. Toxicant exposure increases threshold food levels in freshwater rotifer population. Environ. Toxicol., 14: 523~530.
- Chung, E.Y., K.S. Shin and W.H. Yih, 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., 29: 124~133.

- Dunnett, C.W., 1964. New table for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, **20**: 482.
- Egloff, D.A., 1988. Food and growth relations of the marine zooplankton, *Synchaeta cecelia* (Rotifera). *Hydrobiologia*, **157**: 129–141.
- Fielder, D.S., G.J. Purser and S.C. Battaglene, 2000. Effect of rapid changes in temperature and salinity on availability of the rotifers *Brachionus rotundiformis* and *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, **189**: 85–99.
- Forget, J., J.F. Pavillon, M.R. Menasria and G. Bocquene, 1998. Mortality and LC₅₀ for several stages of marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Muller) exposed to the metals arsenic and Cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malathion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **40**: 239–244.
- Frolov, A.V., S.L. Pankov, K.N. Geradze and S.A. Pankova, 1991. Influence of salinity on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller) aspect of adaptation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Physiology*, **99**: 541–550.
- Fukusho, K., 1983. Present status and problems in culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* for fry production of marine fishes in Japan. In: *Advances and Perspectives in Aquaculture. Proceedings of a Symposium*, edited by Fuentes, H.R., J.G. Castillo and L.H. Disalvo, Universidad del Norte, Coquimbo, Chile, pp. 361–374.
- Fulks, W. and K.L. Main, 1991. Rotifer (*Brachionus plicatilis*) production systems. In: *Rotifer and Microalgae Production systems. Proceedings of a US-Asia Workshop*, Honolulu, HA, January 28–31, edited by Fulks, W. and K.L. Main, pp 3–52.
- Guerra, R., 2001. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. *Chemosphere*, **44**: 1737–1747.
- Hagiwara, A., 1994. Practical use of rotifer cysts. *The Israeli J. of Aquaculture-Bamidgeh*, **46**: 13–21.
- Hagiwara, A., M.D. Balompapung, N. Munuswamy and K. Hirayama, 1997. Mass production and preservation of the resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformis*. *Aquaculture*, **155**: 223–230.
- Jung, M.M., S. Rho, and H.S. Kim, 2000. Interspecific relationship between two food organisms in the combination culture tank of rotifer, *Brachionus rotundiformis* and copepod, *Tigriopus japonicus*. *J. Korean Fish. Soc.*, **33**(1): 66–99.
- Komis, A., 1992. Improved production and utilization of the rotifer *Brachionus plicatilis* Muller, in European sea bream (*Sparus auratus* Linnaeus) and sea bass (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus) larviculture. Doctor in Agricultural Sciences Thesis, University of Ghent, 277pp.
- Korunuma, K. and K. Fukusho, 1987. Rearing of Marine Fish Larvae in Japan. IDRC, Ottawa, 109pp.
- Kwok, K.W.H. and K.M.Y. Leung, 2005. Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): Effects of temperature and salinity. *Mar. Pollut. Bull.*, **51**: 830–837.
- Lee, W.J. and N. Taga, 1985. Environmental condition and microbial survey of the tide pools densely inhabited by *Tigriopus japonicus* Mori. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **18**: 57–62.
- Lee, W.J. and N. Taga, 1988. Investigation of marine bacteria for the food of *Tigriopus japonicus* Mori (Harpacticoida). *Bull. Korean Fish. Soc.*, **21**(1): 50–56.
- Lee, W.J., 1991. Efficiency of various microbial foods for *Tigriopus japonicus* Mori. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **24**: 117–122.
- McAllen, R. and A. Taylor, 2001. The effect of salinity change on the oxygen consumption and swimming activity of the highshore rockpool copepod *Tigriopus brevicornis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **263**: 227–240.
- McAllen, R., A.C. Taylor and J. Davenport, 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.*, **123A**: 195–202.
- Moffat, B.D. and T.W. Snell, 1995. Rapid toxicity assessment using an *in Vivo* enzyme test for *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Ecotoxicology and Environmental safety*, **30**: 47–53.
- Nogrady, T., R.I. Wallace and T.W. Snell, 1993. *Rotifera*, Vol. 1. *Biology, Ecology and Systematics*. SPB Academica Publishing. The Hague, The Netherlands.
- O'Brien, P., H. Feldmen, E.V. Grill and A.G. Lewis, 1988. Copper tolerance of the life history stages of the splash pool copepod *Tigriopus californicus* (Copepoda, Harpacticoida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **44**: 59–64.
- Park, G.S., C.S. Chung, S.H. Lee, G.H. Hong, S.H. Kim, S.Y. Park, S.J. Yoon and S.M. Lee, 2005. Ecotoxicological evaluation of sewage sludge using bioluminescent marine bacteria and rotifer. *Ocean Science Journal*, **40**: 91–100.
- Preston, B.L., T.W. Snell, T.L. Robertson and B.J. Dingmann, 2000. Use of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* in screening assay for potential endocrine disruptors. *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**: 2923–2928.
- Preston, B.L. and T.W. Snell, 2001a. Full life-cycle toxicity assessment using rotifer resting egg production: implications for ecological risk assessment. *Environ. Poll.*, **114**: 399–406.
- Preston, B.L. and T.W. Snell, 2001b. Direct and indirect effects of sublethal toxicant exposure on population dynamics of freshwater rotifers: a modeling approach. *Aquatic Toxicology*, **52**: 87–90.
- Ruppert, E.E. and R.D. Barnes, 1994. *Invertebrate Zoology*. Sanders College Publishing, Forth Worth. 1056pp.
- Shapiro, S.S. and M.B. Wilk, 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, **52**: 591–611.
- Snedecor, G.W. and W.G. Cochran, 1989. *Statistical Methods*, Eighth Edition, Iowa State University Press.
- Snell, T.W. and F.H. Hoff, 1988. Recent advances in rotifer culture. *Aquaculture Mag.*, **14**: 41–55.
- Snell, T.W. and G. Persoone, 1989. Acute toxicity bioassays using rotifers. I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aquatic Toxicology*, **14**: 65–80.
- Snell, T.W., B.D. Moffat, C. Janssen and G. Persoone, 1991a. Acute toxicity tests using rotifers. III. Effect of temperature, strain, and exposure time on the sensitivity of *Brachionus plicatilis*. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, **6**: 63–75.
- Snell, T.W., B.D. Moffat, C. Janssen and G. Persoone, 1991b. Acute toxicity tests using rotifers. IV. Effects of cyst age, temperature and salinity on the sensitivity of *Brachionus calyciflorus*. *Ecotox-*

- ecology and Environmental Safety, **21**: 63–75.
- Snell, T.W. and M. Serra, 2000. Using probability of extinction to evaluate the ecological significance of toxicant effect. Environ. Toxicol. Chem., **19**: 2357–2363.
- Sullivan, B.K., E. Buskey, D. Miller and P.J. Ritacco, 1983. Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance on *Eurytemora affinis* (Copepoda). Mar. Biol., **77**: 299–306.
- USEPA, 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marine organisms. United States Environmental Protection Agency, 122pp.
- Wallace, R.L. and T.W. Snell, 1991. Rotifera. In: Ecology and classification of North American Freshwater Invertebrates, edited by Thorp, J.H. and A.P. Covich, Academic Press, New York.
- Wheelock, C.E., T.A. Baumgartner, J.W. Newman, M.F. Wolfe and R.S. Tjeerdema, 2002. Effect of nutritional state on Hsp60 levels in the rotifer *Brachionus plicatilis* following toxicant exposure. Aquatic Toxicology, **61**: 89–93.
- Wheelock, C.E., M.F. Wolfe, H. Olsen and R.S. Tjeerdema, 1998. Characterization of Hsp60 response in the rotifer, *Brachionus plicatilis*, exposed to multiple environmental contaminants. Marine Environmental Research, **46**: 453–456.
- Zanders, I.P. and W.E. Rojas, 1992. Cadmium accumulation, LC50 and oxygen consumption in the tropical marine amphipod *Elasmopus rapax*. Mar. Biol., **113**: 409–413.

2008년 5월 5일 원고접수

2008년 5월 13일 수정본 채택

담당편집위원: 이창훈