

화학물질에 대한 독성시험 bi-trophic microcosm 구축에 있어 표준시험생물 녹조류 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)와 물벼룩 (*Daphnia magna*)의 개체군 특성 연구

사카모토마사키* · 마노히로유키¹ · 하나자토타카유키² · 장광현³

토야마현립대학 환경공학과, ¹토목연구소 물환경연구그룹, ²신슈대학 산악과학종합연구소, ³경희대학교 환경학및환경공학과 환경연구센터

Construction of a Simple Bi-trophic Microcosm System Using Standard Test Species (*Pseudokirchneriella subcapitata* and *Daphnia magna*) for Testing Chemical Toxicities. Masaki Sakamoto* (0000-0003-4493-5863), Hiroyuki Mano¹ (0000-0003-2684-5792), Takayuki Hanazato² (0000-0000-0000-0000) and Kwang-Hyeon Chang³ (0000-0002-7952-4047) (Department of Environmental Engineering, Toyama Prefectural University, Kurokawa 5180, Imizu 939-0398, Japan; ¹Water Environment Research Group, Public Works Research Institute, Minamihara 1-6, Tsukuba 305-8516, Japan; ²Institute of Mountain Science, Shinshu University, Kogandori 5-2-4, Suwa, Nagano 392-0027, Japan; ³Center for Environmental Studies, Department of Environmental Science and Engineering, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea)

Abstract Aquatic ecosystems are receiving various harmful effects due to anthropogenic chemical pollutions. To protect wildlife, risk assessments of the chemicals are conducted using reference indexes of toxicity estimated by species-level laboratory tests and/or micro-/mesocosm community-level studies. However, the existing micro-/mesocosm communities are structurally too complicated, and it is also difficult to compare the experimental results directly with those from species-level tests. Here, we developed a procedure of a simple bi-trophic microcosm experiment which contains the common species (a green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and a cladoceran, *Daphnia magna*) for testing chemical toxicities. For the proper operation of bi-trophic microcosm experiment, the minimum required concentration of primary producer (*P. subcapitata*) is 5×10^5 cells mL⁻¹. The microcosm system showed higher stability when the initially introduced *D. magna* population was composed of neonates (<24-h old) than adults and those mixture. This simple microcosm system would be an applicable tool to estimate the disturbing impacts of pollutants on plant-herbivore interactions, and linking the species- and population-/community level risk assessments in the future studies.

Key words: toxicity test, risk assessment, population dynamics

서론

현재 국제적으로 유통되고 있는 화학물질은 약 10만 종류에 이르며, 이들 물질은 수생태계에 의도적 또는 비의도적으로 방출되고 있다 (Amiard-Triquet *et al.*, 2015). 따라서 이들을 관리, 규제하고 수생태계 건강성을 유지하기 위

Manuscript received 17 August 2016, revised 29 September 2016, revision accepted 30 September 2016
* Corresponding author: Tel: +81-766-56-7500, Fax: +81-766-56-6182, E-mail: masaki@pu-toyama.ac.jp

해서는 다양한 화학물질에 대한 위험요소를 정확하게 평가할 필요가 있다. 화학물질의 독성에 관한 평가는 지정된 표준생물의 개체 및 개체군, 표준생물로 구성된 군집을 대상으로 한 급성 및 만성 독성의 평가와 같이 다양한 방법으로 이루어지지만(OECD, 2011), 일반적으로 화학물질에 대한 종합적인 위험요소 평가는 표준시험생물을 대상으로 한 급성독성시험 결과를 바탕으로 산출되는 지수인 무영향농도(PNEC: Predicted No-Effect Concentration)를 이용하여 이루어진다(Nagai, 2016).

농경지 등에 광범위하게 사용되며 하천 및 저수지로 쉽게 유입되는 농약류에 대해서는 단일 종을 이용한 급성독성시험 외 수생생태계 생물군집에 미치는 영향을 종합적으로 평가할 필요가 있으며, 유럽식품안전청(EFSA)에서는 생물군집에 대한 평가 개념을 도입한 새로운 생태계 영향 평가 방법에 대한 가이드라인이 발표되어, 서로 다른 세 영양단계(Tier)의 생물의 독성시험 결과로부터 산출되는 RACs(Regulatory Acceptable Concentrations)를 이용한 영향 평가가 실시되고 있다(EFSA PPR Panel, 2013). RACs는 세 단계로 구별되며, 표준시험생물의 독성시험 결과로부터 산출되는 Tier-1 RACs, 종의 민감도분포(SSD, species sensitivity distribution)를 이용하여 산출하는 Tier-2 RACs 및 마이크로코즘 또는 메소코즘 등의 군집수준의 시험 결과로부터 산출되는 Tier-3 RACs로 정의된다. Tier-3 RACs의 경우 영양단계가 서로 다른 복수의 개체군을 포함하는 군집수준에서의 영향을 평가하며, 직접적인 독성의 영향 외에 생물학적 상호작용에 미치는 간접적인 영향을 포함, 생태계에 미치는 보다 현실적인 영향을 평가하는 것이 가능하다(Van Wijngaarder *et al.*, 2014). 이와 같은 군집수준의 평가의 경우 최근 영양단계가 상이한 두 개체군(bi-trophic) 또는 세 개체군(tri-trophic)으로 구성된 군집을 동시에 화학물질에 노출시킴으로써 독성의 직간접적인 영향을 종합적으로 평가하는 방법들이 제시되고 있다(Bredeson *et al.*, 2015; Welch and Lundgren, 2016).

일반적으로, 종 수준의 시험은 비교적 간단히 독성시험을 실시하는 것이 가능하기 때문에 개체군 또는 군집수준의 시험에 비해 많은 양의 데이터가 축적되어 있다. 하지만 무영향관찰농도(NOEC: no observed effect concentration)의 경우 SSD로부터 계산되는 NOEC와 군집수준 시험에서의 생물량의 증감에 대한 NOEC가 큰 차이를 보이는 경우가 많이 발생하므로, 종 수준의 독성시험 데이터를 기반으로 생태계 전체에 미치는 화학물질의 영향을 정확하게 평가하기에는 어려움이 따른다(Fleeger *et al.*, 2003). 실제 환경은 실내에서 진행되는 독성시험 조건과 달리 불안정하며, 주위 환경은 시공간적으로 불균일하다. 또한 다양한

생물들과 공존하고 있어 개체군 또는 군집은 복잡한 생물학적 상호작용의 영향을 지속적으로 받고 있다. 따라서, 실제 생태계를 고려한 생태계 위험요소 평가를 수행하기 위해서는, 종 수준 독성시험 결과를 통해 얻어진 직접적인 독성 영향을 평가하는 것과 동시에 생물학적 상호작용을 통한 간접적인 영향을 이해하는 것이 필수적이라 할 수 있다. 특히, 군집수준의 독성시험의 경우, 영양단계가 상이한 개체군을 포함하므로 각 생물종의 생존 및 증식속도에 대한 화학물질의 독성 영향과 생물 간 상호작용을 통한 간접적인 영향을 구별하여 평가하는 것이 해결해야 할 문제점이라 할 수 있다(Sakamoto and Ha, 2013).

반면, 군집수준의 독성시험을 위해 제시되고 있는 마이크로코즘 시험계의 모델군집은 많은 생물 종 수를 필요하므로 실제 독성시험을 수행하기에는 어려움이 따른다. 예를 들면, 미국환경청(US EPA) 가이드라인에서 정한 군집수준의 독성시험 방법을 따를 경우, 식물플랑크톤 10종, 물벼룩 1종, 단각류 1종, 조개류 1종, 패충류 1종, 윤충류 1종, 원생생물 1종을 정해진 시기에 일정한 수량을 투입하도록 되어 있다(US EPA, 1996).

본 연구에서는 현실적으로 적용가능하며, 결과의 재현성이 높고 이전에 보고된 종 수준의 시험 결과와 직접 비교가 가능한 두 영양단계의 마이크로코즘(bi-trophic microcosm) 시험계를 개발하는 것을 목적으로, 시험계를 구성하는 적절한 초기조건(시험개시 시점의 생물군집 밀도)을 선정하였다. 시험계를 구성하는 일차생산자와 일차소비자는 녹조인 *Pseudokirchneriella subcapitata*와 물벼룩 *Daphnia magna* 두 종을 이용하였다. 이들 생물은 OECD 등에서 독성시험에 있어 표준시험생물로 지정되어 있어(OECD, 2004, 2011), 다양한 화학물질에 대한 독성자료가 축적되어 있다. *P. subcapitata*는 중금속 및 나노물질 포함 다양한 물질의 1차 생산자 영향을 평가하는 표준 시험종으로 사용되어 왔으며(Gao *et al.*, 2016), 물벼룩 *D. magna*의 경우 국내에서 실시되는 생태독성시험과 물벼룩 독성 경보장치 운용에도 사용되고 있다. 따라서, 이들 종을 사용함으로써, 마이크로코즘 시험 결과를 기존의 종 수준의 다양한 시험 결과와 직접 비교하는 것이 가능하다.

본 연구에서는 동물플랑크톤의 배양에 먹이로 이용되는 *Chlorella vulgaris*와 본 실험에서 사용한 *P. subcapitata*의 세포 내 탄소함유량을 비교하여, *D. magna*의 증식에 필요한 *P. subcapitata*의 초기 밀도를 결정하였다. 또한, 마이크로코즘 독성시험 진행을 위한 시스템의 안정성이 유지되기 위한 적정조건을 선정하기 위해, *D. magna*의 초기 개체군에 대한 성체와 어린 개체의 최적 구성조건을 구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. *C. vulgaris*와 *P. subcapitata*의 유기탄소량 비교

C. vulgaris (Chlorella Industry Co. Ltd, Fukuoka, Japan)와 *P. subcapitata* (NIES-35, 일본 국립환경연구소)에 대한 세포당 탄소중량을 비교하였다. *P. subcapitata*의 배양은 COMBO 배지(Kilham *et al.*, 1998)를 이용하여 인큐베이터 내에서 21°C, 12 h light : 12 h darkness 및 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 빛 조건에서 실시하였다. *Daphnia*의 증식에 충분한 클로렐라의 농도는 1.0 × 10⁵ cells mL⁻¹ 이상이므로(Nandini and Sarma, 2003), 혈구계수판을 이용하여 세포 농도를 5 × 10⁵ cells mL⁻¹이 되도록 조절하였다. *C. vulgaris*와 *P. subcapitata*의 시료를 각각 2,500 mL 채취하여, 초순수를 이용하여 1, 1.3, 2, 4배로 희석하여 600 mL가 되도록 3개의 반복측정용 시료를 준비하였다.

세포 밀도가 서로 다른 각각의 600 mL 시료에서 300 mL를 Whatman GF/C 필터로 여과하여 여액을 용존성 유기탄소(DOC) 시료로 사용하였다. 남은 300 mL는 총유기탄소(TOC) 시료로 분석하였다. 탄소량의 분석은 TOC 분석기(Multi N/C 3100, Analytik Jena AG, Jena, Germany)를 이용하여, 측정된 TOC 분석값에서 DOC 분석값을 뺀 값을 입자성유기탄소값(POC)으로 계산하여, 식물플랑크톤의 세포 중 유기탄소값으로 산정하였다.

C. vulgaris 및 *P. subcapitata*의 세포 밀도와 POC 값의 직선회귀식을 이용, 각각의 세포에 대한 유기탄소함유량으로 산출하였다. 여기서 세포 밀도가 0일 때의 POC 값이 0이라고 가정하고 회귀직선식이 원점을 지나도록 조정하였다. 또한, POC 값을 분석기기의 결과로써 산출된 면적값(AU)을 표시하였다.

2. *D. magna*의 초기조건 설정

*D. magna*의 초기 개체군에 대한 령조성(齡組成)을 결정하기 위해 마이크로코즘 실험을 실시하였다. *D. magna*는, 실험실 조건(20 ± 2°C, 16 h light : 8 h darkness)에서 *C. vulgaris* (5 × 10⁵ cells mL⁻¹)를 먹이로 하여 계대배양한 개체를 이용하였으며, 사용되는 개체 간 크기 차이를 최소화하기 위해 성체로 성숙한 이후 3번째 산란 시 태어난 개체를 사용하였다. 인큐베이터 내에 마이크로코즘 설치를 고려하면 마이크로코즘의 사이즈가 작을수록 실험 공간을 효율적으로 사용할 수 있으므로 *D. magna* 개체군이 유지 가능한 최소 사이즈를 산정하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 예비실험 결과를 바탕으로 500 mL 유리 비이커를 사용하였다(Sakamoto, unpublished data). *D. magna*의 초기

밀도 경우, 실험개시 시점의 밀도 영향을 배제하기 위해 물벼룩 번식시험 방법(OECD, 2012)에 따라 10 inds. 500 mL⁻¹로 설정하였다. 비이커 내의 *D. magna* 초기 개체군은 1) 8일 경과 후의 성체 10개체(이후, ‘성체’로 지칭), 2) 성체 5개체와 1령의 어린 개체 5개체(‘성체 + 미성숙 개체’), 3) 1령의 어린 개체 10개체(‘미성숙 개체’)의 3가지 실험군으로 구성하였다(반복구 각 3군).

실험 개시 3일 전에 새로운 COMBO 배지에서 배양한 *P. subcapitata*의 세포 밀도를 혈구계수판을 이용하여 계수 후 COMBO 배지에 희석하여 세포 밀도를 5.0 × 10⁵ cells mL⁻¹로 조절하였다. 500-mL 비이커에 *P. subcapitata*가 포함된 COMBO 배지를 주입하여, *D. magna*를 위에 명시한 각 조건에 따라 투입한 후, 인큐베이터 내에서 배양하였다(21°C, 12 h light : 12 h darkness, 빛 조건 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). 본 실험의 목적은 시험계 내의 구성 생물 간의 상호작용(생산자-초식자)이 존재하는 환경에서의 독성시험 마이크로코즘 계를 구축하는 것이므로, 실험 기간 동안 추가적인 먹이의 투입 및 배양수의 교환은 실시하지 않았다.

실험 기간 중 배양 비이커 내의 pH, 용존 산소농도(DO), 물벼룩 및 식물플랑크톤의 밀도(*D. magna*와 *P. subcapitata*)를 측정하였다. *D. magna* 초기도입 개체군이 성숙하여 산란하기까지의 기간을 육안으로 관찰하여 기록하고, 개체수가 증가하여 육안으로 계수가 불가능할 경우, 유리병으로 비이커를 교란시켜 생물 분포를 균일하게 한 후, 100 mL(전체 양의 1/5)을 추출하여 추출한 시료 중의 개체수를 계수하였다. 계수 후 추출한 생물시료를 원래의 비이커로 되돌린 후, *P. subcapitata*의 세포 밀도를 계수하기 위해 배지를 다시 균일하게 섞은 후 50 mL를 추출하여 루골용액으로 고정 후(최종농도 2%), 암소에 보관하여 혈구계수판 및 셀카운터(CDA 500, Sysmex, Hyogo, Japan)를 이용하여 계수하였다. 수질측정과 밀도 측정 후, 새로운 COMBO 배지로 추출된 50 mL를 보충하였다. 배양실험은 31일 동안 실시하였고, 수질 및 밀도 측정은 2일 간격으로 실시하였다.

마이크로코즘 계의 안정성을 나타내는 지표로 *D. magna*와 *P. subcapitata* 밀도의 최대 변화 폭(log₁₀(max/min)), 변동계수(CV), 최저 밀도를 산출하였다(Verschoor *et al.*, 2004). 이때, 급격한 밀도 변화로 인해 지표가 크게 영향을 받는 증가 시기(실험 시작으로부터 ‘성체’, ‘성체 + 미성숙 개체’의 경우 10일간, ‘미성숙 개체’의 경우 14일간)는 지표 산출 데이터에서 제외하였다. 추출된 데이터의 등분산성을 Bartlett test를 통해 검증하고 결과에 따라 one-way ANOVA 또는 Kruskal-Wallis test를 실시하였다. 처리군 간 비교는 ANOVA 결과에 따라 post hoc test (Tukey-Kramer

test)를 실시하였다. 모든 통계 분석은 통계처리 소프트웨어 R 3.0.2 (R Development Core Team, 2013)를 이용하였다.

결과 및 고찰

동물플랑크톤을 대상으로 한 실내 실험의 경우, 먹이로 *C. vulgaris*를 사용하는 것이 일반적이다(Nandini and Sarma, 2003). 한편, 화학물질에 의한 영향을 분석하는 경우에는 일반적인 먹이로 사용하는 녹조류로 *C. vulgaris*보다 *P. subcapitata*를 빈번히 사용한다(OECD, 2006). 본 연구 결과, *P. subcapitata*의 세포 크기(약 10 μm)가 *C. vulgaris*(약 2 μm)보다 5배가량 크지만, 세포당 유기탄소 함유량은 *C. vulgaris*가 *P. subcapitata*보다 높은 것으로 나타났다(Fig. 1). 본 결과로부터 1.0 × 10⁵ cells mL⁻¹의 *C. vulgaris*의 탄소량에 해당하는 *P. subcapitata* 세포 밀도는 2.6 × 10⁵ cells mL⁻¹인 것으로 산출되었다. 단, 세포 내 유기탄소 함유량만으로 먹이의 질을 평가하는 데는 다소 무리가 따른다고 할 수 있다. 식물플랑크톤의 세포 내 인함유량은 수중의 인산염 형태의 인농도에 영향을 받으며, 세포 내 C:P비는 환경에 따라 변화한다(Verschoor *et al.*, 2004). 수중의 인산염 형태의 인농도가 낮은 환경에서 식물플랑크톤을 배양할 경우 세포 내 C:P비가 낮아져, 이를 섭식하는 *Daphnia*의 성장 및 번식률이 낮아지게 된다. 서로 다른 3종의 *Daphnia* (*D. galeata*, *D. pulicaria*, *D. tanakai*)를 대상으로 먹이 밀도의 역치값(증식속도가 0이 되는 먹이 밀도)을 *Scenedesmus obliquus*의 탄소와 인 함유량에 주목해 분석한 결과, 물벼룩 종에 따른 먹이 밀도 역치값의 차이가 이들의 중간 경쟁관계에 영향을 미치는 것이 증명되

었다(Iwabuchi and Urabe, 2012). 먹이의 질을 평가하는 데 있어 인농도가 중요함에도 불구하고, 탄소의 경우 생물의 생체구성의 중요 원소로 먹이의 양을 탄소중량으로 계산함으로써 다수의 선행연구 결과와의 비교를 통해 먹이의 과부족 상태의 지표로써 사용하는 것이 가능하다(Müller-Navarra and Lampert, 1996). 본 연구의 결과로부터 마이크로코즘을 이용한 독성시험에 있어 *P. subcapitata*를 먹이로 사용하는 경우 *D. magna*의 성장 및 증식에 있어 충분한 먹이를 공급하기 위해서는 5 × 10⁵ cells mL⁻¹ 이상의 충분한 양이 공급되어야 할 것으로 판단된다.

마이크로코즘 시험계에 있어 *D. magna*의 초기 개체군을 구성하는 성체와 미성숙 개체의 비율을 변화시켜 개체군 증감 경향을 비교하였다. 시험계의 수질의 경우, 실험기간 중 처리구 간 pH 농도의 변화 패턴에 큰 차이는 관찰되지 않았고, 실험 개시일로부터 24일 경과 시점까지 7.1~8.3 사이로 유지되었다(Fig. 2a). 이후에는 모든 처리구에서 pH 값이 증가하여, 실험 종료 시 pH 값은 약 9.0 정도로 유지되었다. 용존산소(DO)의 경우에도 처리구 간의 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았으나, *D. magna* 초기개체군이 1령의 미성숙 개체로만 구성된 처리구에서 실험 개시로부터 8일이 지난 시점까지 다른 처리군에 비해 높은 DO 값이 유지되는 현상이 관찰되었으나, 이후에는 모든 처리구에서 3.7~4.8 mg L⁻¹의 범위로 안정적으로 유지되었다(Fig. 2b). *P. subcapitata*의 세포밀도의 경우, *D. magna*의 증식과 함께 감소하였으며, 실험 시작 18일 경과 후 모든 처리구에서 다시 증가하는 양상이 관찰되었다(Fig. 2c). 실험 개시 때 투입한 *D. magna*의 생존 개체수는 ‘성체’ 및 ‘성체 + 미성숙 개체’의 처리구에서는 약 8일 후, ‘미성숙 개체’ 처리구에서는 약 12일 이후부터 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 2d). *D. magna*의 개체군 밀도는 ‘성체’와 ‘성체 + 미성숙 개체’ 처리구에서 10일 경과 시점, ‘미성숙 개체’ 처리의 경우 14일 경과 시점에서 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 2e). 또한 실험 종료 시점의 *D. magna* 개체군 밀도는 ‘미성숙 개체’ 처리군에서 다른 처리군에 비해 2배 이상 높은 것으로 나타났다. 모든 처리군에서 pH가 실험 24일 경과 시점에서 증가한 이유는 동일한 시점에서 *P. subcapitata*의 밀도가 크게 증가하였기 때문인 것으로 사료된다. DO의 경우 *D. magna*의 개체군 밀도가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었으나, *Daphnia*에 대한 저산소 영향은 2 mg L⁻¹ 이하로 알려져 있어(Nebeker *et al.*, 1992), *D. magna*의 생존 및 증식에는 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다.

*D. magna*의 초기 도입 개체(10 inds. 500 mL⁻¹)의 생존 수는 도입 시 성체의 비율이 높을수록 빠르게 감소하였다.

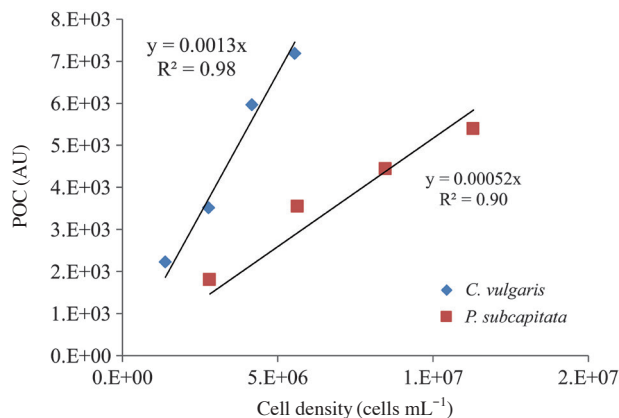


Fig. 1. Relationships between algal cell densities (*Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) and POC contents.

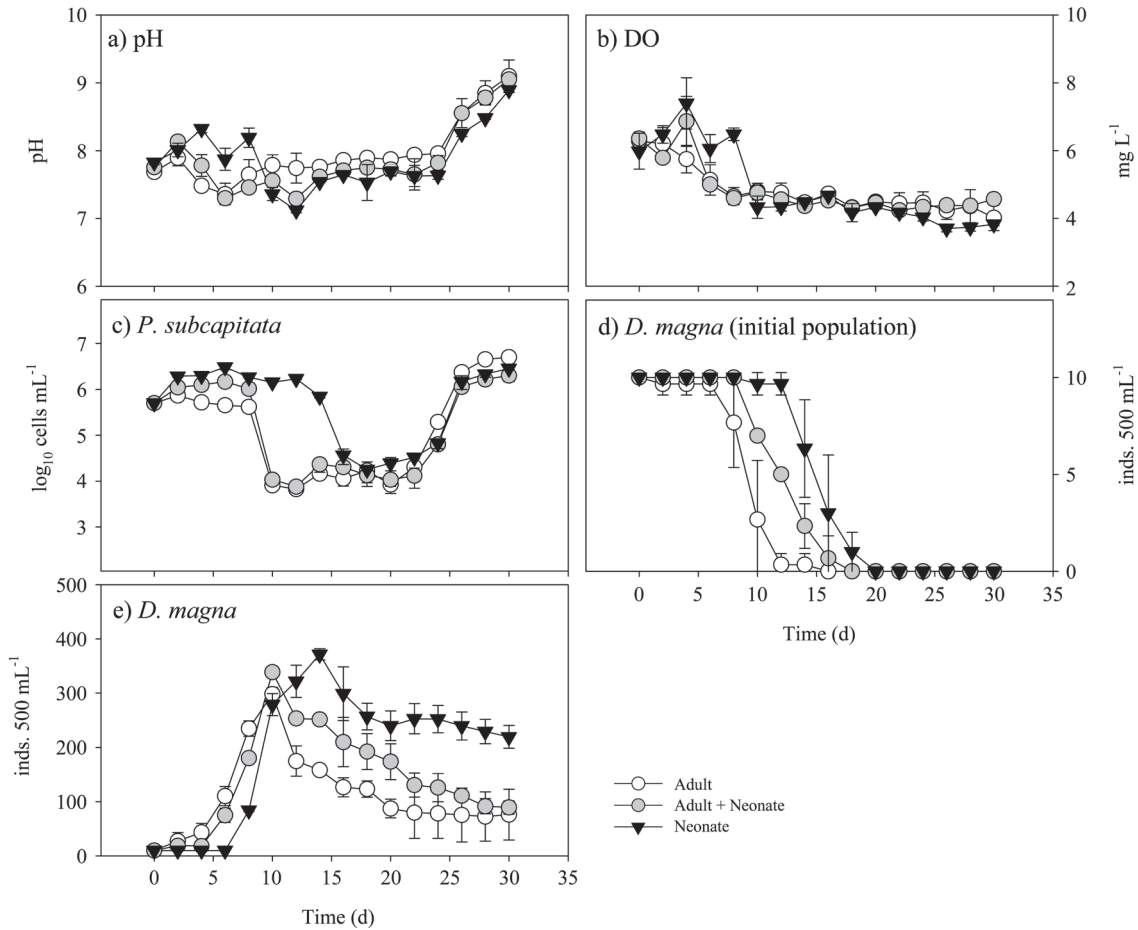


Fig. 2. Temporal changes (mean \pm SD) in physicochemical parameters and densities of organisms (*Pseudokirchneriella subcapitata* and *Daphnia magna*) in each treatment.

실험 후반부에서는 *D. magna*의 개체군 밀도가 평형상태에 도달하여 새로운 개체의 산란이 일어나지 않아 모든 처리구에서 *P. subcapitata*의 밀도가 증가하였다. *D. magna* 개체군은 모든 처리구에서 실험 기간 중 2세대 개체에 의한 산란이 관찰되지 않았으므로 마이크로코즘 내 개체군 밀도 변화는 전적으로 초기 도입된 개체들에 의해 컨트롤된 것으로 판단된다.

시험계에 대한 안정성 지표의 하나가 되는 개체군 밀도의 최대 변동폭은 *P. subcapitata*의 경우 ‘미성숙 개체’ 처리구에서 가장 낮았으며 ($P < 0.05$, Tukey-Kramer test), *D. magna*의 경우 모든 처리구에서 유의한 차이를 나타내지 않았다 ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test, Fig. 3a, b). 최대 변동폭이 큰 경우 확률적으로 개체군 밀도가 0이 될 위험성(멸종 위험성), 또는 급격한 개체군 밀도 증가로 시험계 내의 먹이를 모두 소진시킬 가능성이 높아짐을 의미한다 (Verschoor *et al.*, 2004). 변동계수(CV)의 경우에도 최대

변동폭과 유사하게 멸종 위험성에 대한 지표라 할 수 있으며, *P. subcapitata*의 밀도의 경우 *D. magna*의 ‘성체’ 처리구에서 높은 경향을 나타냈다 ($P < 0.05$, Tukey-Kramer test; Fig. 3c, d). 실험 기간 중 최저밀도는 *P. subcapitata*와 *D. magna* 모두 ‘미성숙 개체’ 처리구에서 높게 나타났다 ($P < 0.05$, Tukey-Kramer test; Fig. 3e, f). 이 결과로부터, 마이크로코즘 시험계에서 *D. magna* 초기 개체군은 1령의 미성숙 개체로만 구성하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

배지 중에 영양자원이 과다하게 공급되면 먹이생물과 포식자(섭식자)의 개체군 진동은 극단적으로 증가하게 되며, 어느 한쪽 또는 양쪽이 멸종될 가능성이 증가한다 (Rosenzweig, 1971). 이와 같은 현상은 paradox of enrichment로 불리며, 실내에서 배양실험을 할 경우 빈번하게 관찰되는 현상이다 (Roy and Chattopadhyay, 2007). 반면, 이와 같은 영양자원의 과다 공급 현상은 자연계에서는 거의 관찰되지 않는다 (Murdoch *et al.*, 1998). 자연계의 경우, 먹이 생

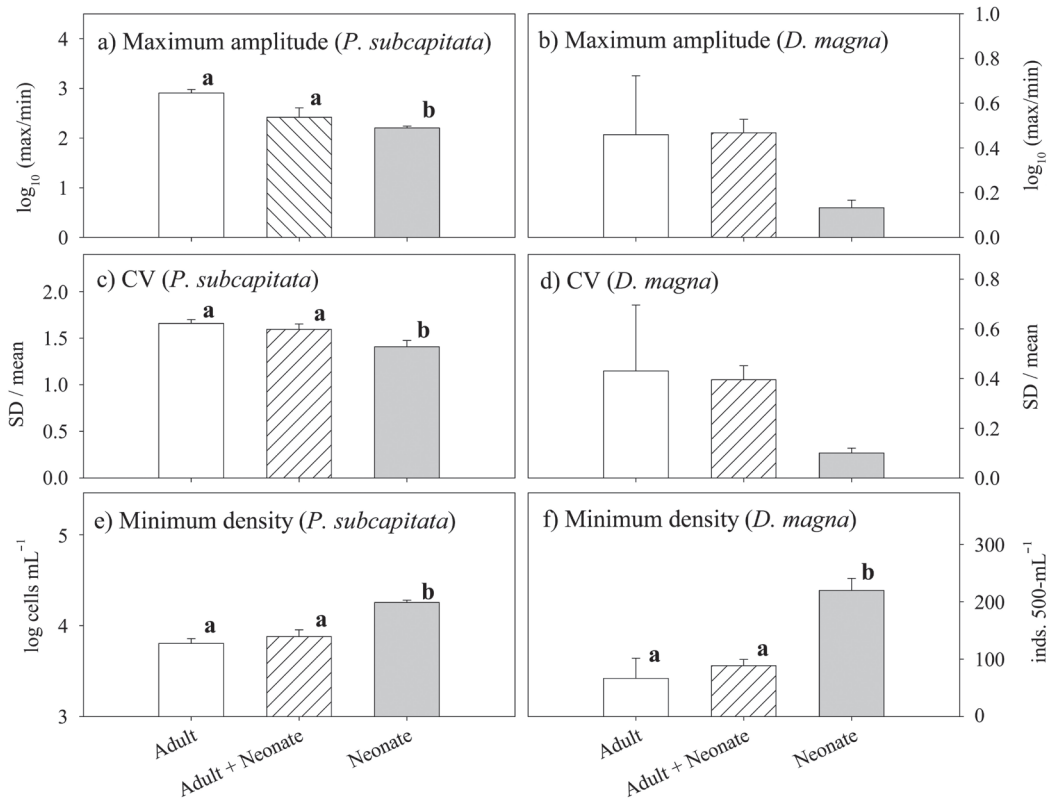


Fig. 3. Maximum amplitudes (a and b), CV (c and d) and minimum densities (e and f) of populations (*Pseudokirchneriella subcapitata* and *Daphnia magna*). Means denoted by the same letter are not significantly different from each other with Tukey-Kramer test ($P > 0.05$). Letters are not given in the panel b and d because no significant difference was detected among the treatments.

물의 방어기작, 포식자의 밀도의존성 사망률 변화 및 환경의 시공간적 불균일성 등이 피식자-포식자 개체군이 안정적으로 유지되도록 작용한다 (Roy and Chattopadhyay, 2007). 본 연구에서 사용한 COMBO 배지 ($P = 1.6 \text{ mg L}^{-1}$, $N = 14.0 \text{ mg L}^{-1}$)는 일반적인 호소수와 비교하여 과다하게 높은 질소 및 인을 함유하고 있으며, *P. subcapitata*는 *D. magna*의 섭식에 대해 방어기작을 전혀 가지고 있지 않으므로, paradox of enrichment가 발생하기 쉬운 조건이라 할 수 있다. 실제로 COMBO 배지를 이용한 마이크로코즘 실험 (녹조와 윤충류로 구성)에서, paradox of enrichment가 발생하는 것이 보고되고 있다 (Verschoor *et al.*, 2004). 본 연구에서는 *D. magna* 초기 개체군의 령조성 (齡組成)에 반응하여 계의 안정성이 변화하는 것이 관찰되었으나, 초기도입개체를 1령의 미성숙 개체만으로 구성할 경우 *P. subcapitata*와 *D. magna* 개체군이 완전 사멸현상 없이 높은 개체군 밀도를 30일 정도 유지 가능한 것으로 확인되었다.

본 연구에서 적절한 마이크로코즘 시험계 구성을 위해 제시된 종들은 모두 OECD 등의 독성시험 가이드라인에

제시된 표준 생물로, 실험실 내 배양과 유지가 용이한 생물종들이다. 따라서, 구성종의 개체군 동태에 대한 화학물질의 영향을 조사하는 데 있어, 마이크로코즘 시험계를 통해 얻어진 결과는 기존의 종 수준의 독성시험 결과 (각 종의 행동 및 성장, 번식에의 영향)와 직접 비교 검토하는 것이 가능하다. 향후 본 연구에서 제시된 마이크로코즘 시험계를 활용함으로써 종 수준의 시험으로는 해석할 수 없는 생물학적 상호작용으로 인한 영향을 고려하여 보다 정확한 생태계 위험요소평가를 수행하는 것이 가능할 것으로 기대된다.

적 요

화학물질의 유입은 수생생태계에 유해한 영향을 미치는 주요 인자 중의 하나로, 수생태계에 미치는 화학물질의 영향을 보다 정확하게 평가하기 위해서는 서로 다른 영양단계의 생물군집들의 생물학적 상호작용을 고려한 군집 수준의 독성시험이 요구된다. 하지만 현재 제시되고 있는 마

이코코즘 및 메소코즘을 이용한 군집 수준의 독성평가 시험 방법은 너무 복잡하고, 기존의 종 수준에서 얻어진 정보와의 직접적 비교가 어렵다. 본 연구에서는 독성시험 표준 생물인 녹조류 *Pseudokirchneriella subcapitata*와 물벼룩 *Daphnia magna*를 이용하여 화학물질의 독성을 생산자와 소비자의 상호작용을 고려한 군집 수준에서 평가할 수 있는 간단한 bi-trophic 마이크로코즘 시험 방법과 이에 대한 생물군집의 적정 조건을 제시하고자 하였다. 마이크로코즘 시험계 및 물벼룩 배양의 경우, 5×10^5 cells mL⁻¹ 이상의 *P. subcapitata* (생산자) 농도를 설정하는 것이 적절할 것으로 분석되었다. 장기 독성시험을 고려할 경우, 물벼룩(소비자)은 태어난 지 24시간이 되지 않은 미성숙 개체로 구성하여 마이크로코즘 시험을 시작하면 성체 및 혼합 개체군이 보다 안정적으로 유지되는 것으로 나타났다. 이와 같은 bi-trophic 마이크로코즘 시험계는 오염원에 의한 생산자-소비자의 생물학적 상호작용의 교란 정도를 평가하고, 수생태계에 대한 위험요소평가를 종 수준의 평가에서 군집수준의 평가로 확대할 수 있는 적절한 시험 방법으로 판단된다.

사 사

본 연구는 일본 학술진흥재단(Japan Society for Promotion of Science)의 학술연구지원사업(Grant-in-Aids for Scientific Research, No. 23510031 and 26340052)에 의하여 수행하였으며, 실험 진행에 도움을 주신 토야마현립대학 수생생태연구실 학생들에게 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Amiard-Triquet, C., J.C. Amiard and C. Mouneyrac. 2015. Aquatic Ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks. Academic Press, New York, USA.
- Bredeson, M.M., R.N. Reese and J.G. Lundgren. 2015. The effects of insecticide dose and herbivore density on tri-trophic effects of thiamethoxam in a system involving wheat, aphids, and ladybeetles. *Crop Protection* **69**: 70-76.
- EFSA PPR Panel. 2013. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. *EFSA J* **11**: 3290, 268 pp.
- Fleeger, J., K.R. Carman and R.M. Nisbet. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* **317**: 207-233.
- Gao, C., K.A.C. De Schampelaere and E. Smolders. 2016. Zinc toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* decreases under phosphate limiting growth conditions. *Aquatic Toxicology* **173**: 74-82.
- Iwabuchi, T. and J. Urabe. 2012. Competitive outcomes between herbivorous consumers can be predicted from their stoichiometric demands. *Ecosphere* **3**: 7.
- Kilham, S.S., D.A. Kreeger, S.G. Lynn, C.E. Goulden and L. Herrera. 1998. COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**: 147-159.
- Müller-Navarra, D. and W. Lampert. 1996. Seasonal patterns of food limitation in *Daphnia galeata*: separating food quantity and food quality effects. *Journal of Plankton Research* **18**: 1137-1157.
- Murdoch, W.W., R.M. Nisbet, E. McCauley, A.M. deRoos and W.S.C. Gurney. 1998. Plankton abundance and dynamics across nutrient levels: tests of hypotheses. *Ecology* **79**: 1339-1356.
- Nagai, T. 2016. Ecological effect assessment by species sensitivity distribution for 68 pesticides used in Japanese paddy fields. *Journal of Pesticide Science* **41**: 6-14.
- Nandini, S. and S.S.S. Sarma. 2003. Population growth of some genera of cladocerans (Cladocera) in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) levels. *Hydrobiologia* **491**: 211-219.
- Nebeker, A.V., S.E. Dominguez, G.A. Chapman, S.T. Onjukka and D.G. Stevens. 1992. Effects of low dissolved oxygen on survival, growth and reproduction of *Daphnia*, *Hyalolella* and *Gammarus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **11**: 373-379.
- OECD. 2004. OECD guidelines for testing of chemicals, no. 202: *Daphnia* sp., acute immobilization test. OECD, Paris.
- OECD. 2011. OECD guidelines for testing of chemicals, no. 202: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. OECD, Paris.
- OECD. 2012. OECD guidelines for testing of chemicals, no. 211: *Daphnia magna* reproduction test. OECD, Paris.
- R Development Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. Accessed 4 July 2016.
- Rosenzweig, M.L. 1971. Paradox of enrichment: destabilization of exploitation ecosystems in ecological time. *Science* **171**: 385-387.
- Roy, S. and J. Chattopadhyay. 2007. The stability of ecosystems: a brief overview of the paradox of enrichment. *Journal of Biosciences* **32**: 421-428.
- Sakamoto, M. and J.Y. Ha. 2013. Importance of comprehension at aquatic food web for conducting ecological risk assessment. *Japanese Journal of Environmental Toxicology* **16**: 49-57. (in Japanese)
- US EPA. 1996. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850. 1900. Generic freshwater microcosm test, laboratory. EPA

- 712-C-96-134.
- Van Wijngaarden, R.P., L. Maltby and T.C. Brock. 2014. Acute tier-1 and tier-2 effect assessment approaches in the EFSA Aquatic Guidance Document: are they sufficiently protective for insecticides? *Pest Management Science* **71**: 1059-1067.
- Verschoor, A.M., M. Vos and I. van der Stap. 2004. Inducible defences prevent strong population fluctuations in bi- and tritrophic food chains. *Ecology Letters* **7**: 1143-1148.
- Welch, K.D. and J.G. Lundgren. 2016. An exposure-based, ecology-driven framework for selection of indicator species for insecticide risk assessment. *Food Webs* (in press) available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fooweb.2016.02.004>