

기술자료

## 물벼룩 지수식 배양방법과 물벼룩 연속식 배양장치를 이용한 연속식 배양 방법의 비교

최등진<sup>†</sup>

한국환경공단 K-eco연구원

## A Comparison of the Water Flea Static Non-Renewal Culture and Water Flea Continuous Culture Methods Using Continuous Culture Apparatus

Dong-Jin Choi<sup>†</sup>

Korea Environment Corporation, K-eco research institute, Incheon, Korea

Received February 04, 2025 / Revised March 12, 2025 / Accepted March 13, 2025

The ecotoxicity value of unknown harmful substances contained in effluent was calculated by determining the health status of *Daphnia magna* (water fleas) through a standard reference toxicity test (ES 04705.1b). For this test, the *Daphnia magna* was cultured with static non-renewal culture and the *Daphnia magna* neonate was separated, which was time-consuming. This problem was solved by developing a continuous water flea culture apparatus and a continuous culture method. Standard reference toxicity tests were performed to confirm the health status of static non-renewal cultured *Daphnia magna* and continuous cultured *Daphnia magna*. We found that the average test value (EC<sub>50</sub>) for neonate separated from static non-renewal cultured *Daphnia magna* was 1.020 mg/L. Additionally, the average test value (EC<sub>50</sub>) for neonate separated in natural flow from continuous cultured *Daphnia magna* was 0.992 mg/L. It was confirmed that the EC<sub>50</sub> values for potassium dichromate were in the satisfactory range of 0.9 to 2.1 mg/L, so it was valid for ES 04705.1b and ISO 6341:2012. In conclusion, there is a high chance for saving time and effort for toxicity evaluation when the continuous culture apparatus is used.

**Key words:** Acute toxicity, continuous culture apparatus, *Daphnia magna*, ecotoxicity, EC<sub>50</sub>

### 1. 서 론

생태독성관리제도는 기존 개별물질에 의한 수질평가의 한계를 극복하기 위해 2011년에 도입한 것으로, 방류수에 포함된 미지의 유해물질을 살아있는 생물체로 독성 여부를 측정함으로써 산업폐수의 수질을 통합적으로 관리하기 위한 제도이다. 아시아에서는 최초로 대한민국이 생태독성관리제도를 도입 운영하고 있다. 생태독성 시험이란 시료에 새끼 물벼룩(네오네이트)들을 투입하여 급성독성을 평가하는 것으로, 물벼룩이 독성에 영향을 받게 되는 정도를 생태독성값(TU, Toxic Unit)으로 계산한

것이다<sup>1)</sup>.

종래에는 Fig. 1과 같이 물벼룩 배양용 용기에 성체 물벼룩을 지수식 배양(Static non-renewal culture)한 후 성체로부터 태어난 생후 24시간 미만의 네오네이트들을 스포이트를 사용하여 한 마리씩 분리한 후에 독성시험에 사용하였다. 이와 같은 분리방법은 성체 물벼룩과 네오네이트를 분리하는데 지나치게 많은 시간과 노력이 소요되는 문제점이 있다. 이를 해결하기 연속배양식 분리장치 개발 등 위해 많은 시도가 있었으나, 기존의 분리장치들은 대다수가 물의 흐름보다는 물벼룩의 양성주광성을 분리의 원리로 이용하고 있어, 성체와 네오네이트의 분리율이 낮

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

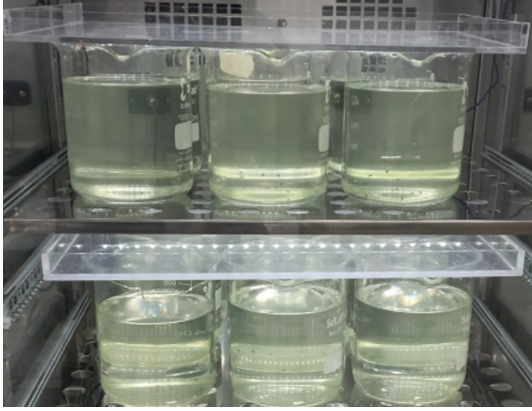


Fig. 1. Static non-renewal culture.

다는 한계가 있다.

또한 물벼룩의 생존을 위해서는 물벼룩이 생존하기 적합한 배양액을 주 3회 교체해 주어야 하는데, 수백 마리의 물벼룩들을 스포이드로 기존의 배양액에서 새로운 배양액이 담긴 비커에 옮겨야 하기 때문에 많은 시간이 소요된다. 이를 해결하기 위해 많은 시도가 있었으나, 기존의 개발된 배양장치들은 물이 정체되는 흐름의 사구역(Dead space)이 생긴다는 문제점이 있다(특허출원번호 10-2023-0083332).

마지막으로 배양액 교체와 더불어 주 먹이인 *Chlorella Vulgaris* (클로렐라)와 보조먹이인 YCT (Yeast, Cerophyll, Trout chow)도 매일 공급해 주어야 하는데, 휴일 등 사람이 직접 먹이를 투여하지 못하는 날에는, 휴일 전 날 먹이를 추가적으로 공급해야 한다. 이때 물벼룩의 성장대비 과도한 먹이가 비커에 축적되어 물벼룩 몸체에 달라붙는 경우, 유영을 방해하여 치사 및 유영저해를 유발한다<sup>2)</sup>. 또한 주 먹이인 클로렐라는 조류로, 물벼룩의 배양환경인 20°C에서 개체수가 두 배로 늘어나는데 걸리는 시간이  $16.1 \pm 1.52$  hr이다<sup>3)</sup>. 클로렐라가 물질대사 후 메탄 등을 배출<sup>4)</sup>하기 때문에, 지수식 배양의 경우 물벼룩의 개체수와 성장률에 따라 먹이투여량을 조절하는 것이 좋다. 먹이 자동공급방법 개발 등의 시도도 있었으나, 기존의 먹이 자동공급방법들은 세 가지 요인으로 인해 실현성이 어려웠다. 먼저 물벼룩 먹이인 클로렐라는 미세조류로, 빛을 쬐어주면 광합성을 통해 빠르게 성장<sup>5)</sup>하므로 암소보관이 요구된다. 또한 냉장보관하여 저온환경하에 덩으로써 클로렐라의 대사를 억제 할 필요가 있다(특허출원번호 10-2009-0130483). 마지막으로 Fig. 2와 같이 침전성이 강하므로 공급 전에 흔들어서 섞어서 균질화 한 후 공급해야 한다.



Fig. 2. *Chlorella Vulgaris*'s precipitation

위의 세 가지 문제(생태독성시험을 위한 네오네이트의 수동분리, 배양액의 수동교체, 먹이의 수동공급)를 해결하기 위해 필자는 물벼룩의 네오네이트 연속식 분리장치, 물벼룩의 연속 배양방법 및 먹이 자동공급방법을 고안하였고, 한국환경공단 명의로 2023년 6월 28일에 특허출원(특허출원번호 10-2023-0083332)하였다. 또한 본 발명은 2025년 1월 6일에 공개되었다.

본 연구는 특허출원한 방식으로 배양·분리한 네오네이트에 대한 표준독성 시험을 수행하고, 그 결과를 기존의 지수식 배양으로 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험결과와 비교하여 유효성을 검증하기 위해 수행되었다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 물벼룩

물벼룩은 갑각류로 담수에서 서식하며, 종에 따라 수명과 크기가 다양하다<sup>6)</sup>. 물벼룩 중 *Daphnia magna*는 수질오염공정시험기준<sup>7)</sup>(ES 04704.1b)에 따라 생태독성 분석에 이용되며, 암컷 성체의 외형은 Fig. 3과 같다<sup>2)</sup>. *Daphnia magna*는 상대적으로 크기가 큰 동물성 플랑크톤이고<sup>8)</sup>, 크기는 보통 0.5 mm에서 6 mm이며, 평균수명은 25°C에서 40일, 20°C에서 56일이다<sup>6)</sup>. 물벼룩의 생식은 단위생식과 수정생식을 통해 이뤄지며, 환경상태에 따라 좌우된다. ES 04704.1b에서 제시하는 배양환경에서, 성체 *Daphnia magna* 암컷은 암컷만을 생산하는데, 이를 단위생식이라고 한다. 20°C에서 하루 보통 6~10개의 알을 가지며 50일 동안 57개 정도의 알을 낳는다<sup>2)</sup>.

### 2.2. 배양액

배양액은 *Daphnia magna*가 생존하기 위한 배지로 ES



Fig. 3. Appearance of female *Daphnia magna*

Table 1. Culture medium analysis: target ingredients and methods

Test item	Analysis method
Potential of Hydrogen	ES 04306.1c
Dissolved Oxygen	ES 04308.2c
Temperature	ES 04307.1b
Hardness	ES 05301.1b
Alkalinity	KS I ISO9963-1

04704.1b에 따라 제조한다. 제조된 배양액은 용존산소 3 mg/L 이상, pH 7.6~8.0, 경도 160~180 mg/L as CaCO<sub>3</sub>, 알칼리도 110~120 mg/L as CaCO<sub>3</sub> 이어야 한다. 상기된 항목들을 Table 1에 따라 주 1회 이상 측정하여 적합성을 확인한다. 월, 수, 금요일에 스포이드를 이용하여 *Daphnia magna*들을 새로 제조된 배양액으로 옮겨주어 쾌적한 환경에서 배양되도록 한다.

### 2.3. 배양조건

ES 04704.1b에 따라 물벼룩의 배양조건은 다음과 같다. 온도는 20±2°C, 조도는 500~1000 Lux으로, 16시간은 빛을 공급해주고, 8시간은 어두운 상태가 되도록 유지해야 한다. 이러한 조건을 만족시키는 물벼룩 배양기 안에서 배양해야 한다.

### 2.4. 먹이

*Daphnia magna*의 먹이로는 녹조류인 *Chlorella vulgaris*와 YCT를 사용한다. *Chlorella vulgaris*의 형태는 Fig. 4와 같으며<sup>2)</sup>, YCT는 Yeast, Cerophyll, Trout chow가 혼합된 것이다. *Chlorella vulgaris*와 YCT는 (주)에버그린 탭에서 제작하는 것을 사용하였다.

### 2.5. 계대배양

생후 24시간 미만의 *Daphnia magna* 네오네이트 50마

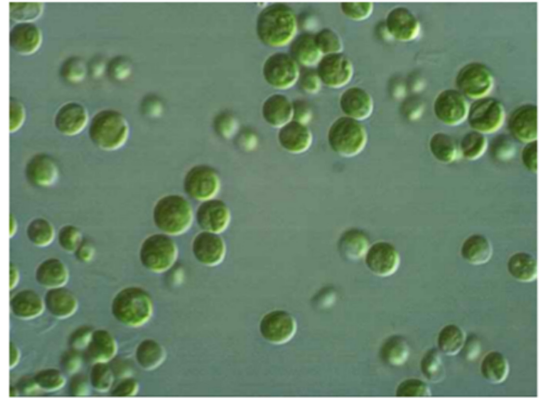


Fig. 4. Appearance of *Chlorella vulgaris*.

리를 배양액이 담긴 2 L 비커에 스포이드로 이동시킨 후 이를 2일차 배양이라고 명명한다. 계대배양은 배양조건 하에서 수행되며, 먹이는 매일 공급하고, 배양일차에 따라 점진적으로 공급량을 증가시킨다(Table 2). 먹이를 투여 할 수 없는 휴일에는, 휴일 전날에 다음날 투여할 양을 추가해서 공급한다. 배양일차가 대략 9일차에 도달하였을 때, 성장한 *Daphnia magna* 10마리를 배양액이 담긴 1 L 비커에 스포이드로 이동시킨다. *Daphnia magna*의 수와 성장대비 과도한 먹이가 공급되면 *chlorella*가 *Daphnia magna*의 몸체에 부착되어 유영을 저해할 수 있기 때문에<sup>2)</sup>, Table 2와 Table 3에 따라 먹이를 공급하였다. 단, 비커바닥이 녹색을 띠면, *chlorella*와 YCT가 과도

Table 2. Feeding amount per 50 neonates according to the culture day

Culture day	<i>C. Vulgaris</i> Input Volume (mL)	YCT Input Volume (mL)
2 <sup>nd</sup> day	0.3 mL/2 L	0.3 mL/2 L
3 <sup>rd</sup> day	0.4 mL/2 L	0.4 mL/2 L
4 <sup>th</sup> day	0.6 mL/2 L	0.6 mL/2 L
5 <sup>th</sup> day	0.9 mL/2 L	0.9 mL/2 L
6 <sup>th</sup> day	1.3 mL/2 L	1.3 mL/2 L
7 <sup>th</sup> day	1.7 mL/2 L	1.7 mL/2 L
8 <sup>th</sup> day after	2.0 mL/2 L	2.0 mL/2 L

Table 3. Feeding amount for 10 adult *Daphnia magna* per one liter after separation

Culture day	<i>C. Vulgaris</i> Input Volume (mL)	YCT Input Volume (mL)
9 <sup>th</sup> day	0.6 mL/1 L	0.5 mL/1 L
10 <sup>th</sup> day	0.7 mL/1 L	0.6 mL/1 L
11 <sup>th</sup> day after	0.7 mL/1 L	0.7 mL/1 L

하게 축적되었다고 가정하여, 먹이투여량을 감소시켰다. 배양 12일차 이상의 성체 *Daphnia magna*로부터 출산된 네오네이트 50 마리를 배양액 2 L에 스포이드로 옮겨 배양한다. 네오네이트가 성체가 될 때까지 배양하며, 계대 배양을 반복하였다.

**2.6. 급성독성시험**

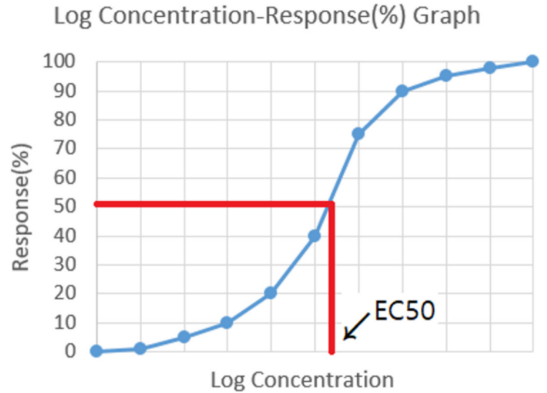
급성독성시험이란 검체를 시험동물에 일회 투여하였을 때 단기간 내에 나타나는 독성을 질적·양적으로 검색하는 시험을 말한다<sup>9)</sup>. ES04704.1b에서의 물벼룩을 이용한 급성독성시험의 시험기간은 24시간으로 한다. 시험절차는 다음과 같다. 시험 하루 전, 생후 약 2주 이상의 성체 물벼룩이 배양되고 있는 비커에서 암컷 네오네이트를 스포이드로 전부 제거한다. 시험당일 성체 물벼룩이 배양되고 있는 비커에 *Chlorella*와 YCT를 각각 0.5 mL씩 공급한다. 시험 전에, 생후 24시간 미만의 암컷 네오네이트 120마리를 배양액이 든 1 L 비커에 스포이드로 옮긴다. 시험 전 먹이에 의한 영향이 없도록 *Chlorella*와 YCT를 각각 1 mL씩 공급한다. 시료를 4개의 50 mL 비커에 각각 50 mL 분취한다. 비커마다 생후 24시간 미만의 네오네이트 5마리씩 스포이드로 옮긴다. 결과적으로 시료 1개당 20마리의 네오네이트가 노출된다. 네오네이트가 든 비커들을 배양조건(Table 4)에서, 먹이공급없이 방치한다. 정확히 24시간 후, 비커를 가볍게 건드리고 15초 동안 영향받은 네오네이트의 수를 센다. 영향받은 개체란 치사하거나 또는 유영에 저해를 받은 개체를 의미하며, ES 04704.1b에서 유영저해란 안테나 또는 부속지가 움직인다 하더라도, 유영을 하지 못하는 상태로 정의한다. 다만, 급성독성시험의 결과는 시험생물의 건강, 시험자의 숙련도에 따라 달라질 수 있다<sup>2)</sup>.

**2.7. EC<sub>50</sub>**

EC<sub>50</sub>은 Effective Concentration of 50%로, 시료를 시험체에 노출 시 24시간내에 반수가 사망하거나 또는 유영저해가 되는 농도<sup>2)</sup>이다. ES 04704.1b에 따라 EC<sub>50</sub>은

**Table 4.** Acute toxicity test condition

Photoperiod	Light : Dark = 16 h : 8 h
Illuminance	500~1000 Lux
Exposure time	24 h
Temperature	20±2
Number of repetition per concentration	4
Number of neonates per concentration	20
Sample volume	50 mL



**Fig. 5.** Example of a function graph showing the log value of the concentration-response (%).

통계적인 방법으로 산출되는데, 먼저 시험생물에 대한 Log농도-반응(%) 곡선이 작성되어야 한다. Log농도-반응(%) 곡선은 시그모이드 곡선이라고도 불리며, 예는 Fig. 5와 같다<sup>10)</sup>. 시그모이드 곡선으로부터 시험생물들의 반수가 영향받는 농도가 결정된다<sup>11)</sup>. EC<sub>50</sub> 산출을 위한 시험절차는 다음과 같다. 시험 하루 전, 생후 12일 이상의 성체 물벼룩이 배양되고 있는 비커에서 네오네이트를 스포이드로 전부 제거한다. 시험당일 오전에 성체 물벼룩이 배양되고 있는 비커에 *Chlorella*와 YCT를 각각 0.5 mL씩 공급한다. 시험 전에, 생후 24시간 미만의 네오네이트 120마리를 배양액이 든 1 L 비커에 스포이드로 옮긴다. 시험 전 먹이에 의한 영향이 없도록 *Chlorella*와 YCT를 각각 1 mL씩 공급한다. 시료원액을 배양액으로 희석하여 각각 6.25%, 12.5%, 25%, 50% 희석시료를 제조한다. 배양액, 희석시료들 및 시료원액을 4개의 50 mL 용량의 비커에 각각 50 mL 씩 분취한다. Fig. 6과 같이<sup>10)</sup> 비커마다 생후 24시간 미만의 네오네이트 5마리씩 스포이드로 옮긴다. 실시에는 Fig. 7과 같으며, 결과적으로 시료 1개당 20마리의 네오네이트가 노출된다. 네오네이트가 든 비커들을 배양조건(Table 4)에서, 먹이공급없이 방치한다. 정확히 24시간 후, 배양액, 6.25% 희석시료가 든 비커에서 시료원액이 든 비커 순으로 가볍게 건드리고 15초 동안 영향받은 네오네이트의 수를 센다. EC<sub>50</sub>값은 Probit법 또는 TSK (Trimmed Spearman Karber)법을 사용하여 산출한다(ES 04704.1b). Probit method는 0%, 100% 치사 및 유영저해 데이터와 1~99% 치사 및 유영저해 데이터가 2개 이상 존재할 경우 적용한다. TSK는 0% 과 100% 치사 및 유영저해 데이터를 제외한 1~99% 치사 및 유영저해 데이터가 1개 이하일 때 사용한다<sup>2)</sup>. 치사 및 유영

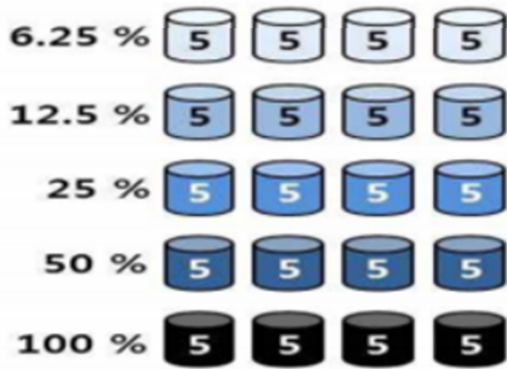


Fig. 6. Schematic diagram of the dilution ratio and number of specimens.



Fig. 7. Example of EC<sub>50</sub> confirmation test.

저해율(%) = 농도당 영향받은 개체수/농도당 노출된 총 개체수 x 100이다. 예를들어 50% 희석시료에서 4마리의 네오네이트가 영향을 받은 경우, 50% 희석시료에서 치사 및 유영저해율(%)은 4/20 x 100으로 20%이다. 농도에 따른 영향개체수를 Probit 프로그램 또는 TSK 프로그램에 입력시, EC<sub>50</sub>값이 산출된다.

**2.8. TU**

TU는 Toxic Unit으로, 생태독성의 지표이다. TU는 100/EC<sub>50</sub>으로 계산된다. 높은 값은 강한 독성을 의미하고, 낮은 값은 낮은 독성을 의미한다. 대한민국 방류수 생태독성 기준은 Table 5와 같다<sup>12)</sup>.

Table 5. Korea's ecotoxicity emission standard

Division	Area	Acceptance standard(TU)
Wastewater discharging facility	Clean area	1≥
Public wastewater treatment facility	I, II, III, IV	1≥

**2.9. 표준독성 시험**

ES 04704.1b에 따라 *Daphnia magna*의 건강상태와 독성민감도를 확인하기 위해 1달에 1회 이상 중크롬산칼륨(potassium dichromate)을 이용하여 표준독성 시험을 수행해야한다. 표준독성 시험의 시험절차는 EC<sub>50</sub> 산출을 위한 시험절차와 같으나, 시료원액을 potassium dichromate으로 제조한다. potassium dichromate 1 g을 정확히 측량한 후 1 L 부피플라스크에 넣고 정제수를 투입하여 표선을 맞춰 potassium dichromate 1000 mg/L의 표준원액을 제조한다. 시험액의 농도는 2~5 mg/L가 되도록 제조해야 함으로<sup>2)</sup>, potassium dichromate 1000 mg/L 표준원액 3 mL를 분취 후 1 L 부피플라스크에 넣고 배양액으로 표선을 맞춰 3 mg/L의 potassium dichromate를 제조하여 이것을 시험원액이라고 칭한다. 이 시험원액을 단계별로 희석 및 물벼룩을 투입하여 EC<sub>50</sub>을 산출한다. 국제적 시험법 중 ‘specifies a method for the determination of the acute toxicity to *Daphnia magna* Straus (ISO 6341: 2012)<sup>13)</sup>에서 potassium dichromate에 대한 EC<sub>50</sub>값의 적절한 농도범위는 0.6~2.1 mg/L라고 언급하고 있다. 그러나 수질오염공정시험기준(ES 04704.1b) 상 potassium dichromate에 대한 EC<sub>50</sub>값의 적절한 농도범위는 0.9~2.1 mg/L으로, 수질오염공정시험기준의 허용 농도범위가 더 좁다. 수질오염공정시험기준을 준수하여 물벼룩을 배양하는 시험기관에서 산출된 EC<sub>50</sub>값이 0.9~2.1 mg/L에 포함되면, 시험기관이 배양중인 물벼룩의 건강상태와 독성민감도는 일정한 수준을 유지하고 있다고 할 수 있다. 만약 범위를 벗어났다면 재시험을 수행한다. 재시험 결과에서도 EC<sub>50</sub>값이 범위를 벗어났다면, ES 04704.1b에 따라 시험을 중지하고 물벼룩을 전량 폐기 후 새로운 개체를 분양받아야 한다.

**2.10. 물벼룩 네오네이트 분리장치**

물벼룩의 네오네이트 분리장치는 주문제작품과 기성품을 결합하여 제작하였다(특허출원번호 10-2023-0083332). 구성요소들이 완전히 결합된 분리장치의 등각투상도는 Fig. 8과 같고, 정면도는 Fig. 9와 같으며, 총 3개의 층으로 구성된다. 1층과 3층에는 배수밸브가 설치되며, 1층의 깔때기는 1층 배수밸브 내부와 연결된다. 깔때기 위, 2층과 3층 사이에는 각각 1 mm 공극이 있는 실리콘시트가 설치된다. 또한 마지막으로 2층과 3층사이에 설치된 실리콘시트 위에, 계단식 원형트랩이 설치되어, 후후 3층에 존재하는 배양액이 제거시 흐름의 사구역이 생기지 않도록 하였다. 2층과 3층 사이에 실리콘시트를 설치하기 전,

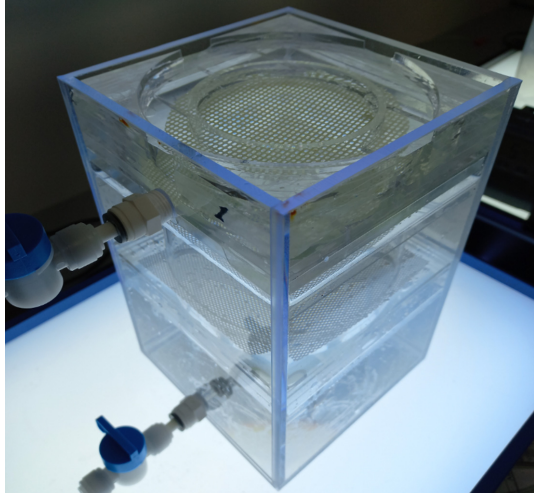


Fig. 8. Isometric view of separation apparatus.

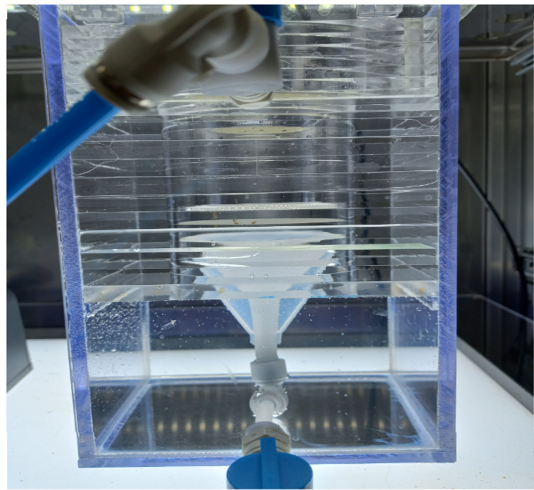


Fig. 9. Front view of separation apparatus.

배양액과 생후 12일차의 성체 *Daphnia magna*를 투입하였다. 성체 *Daphnia magna*의 몸체 크기는 1 mm 이상이므로 2층에서만 유영하게 된다. *Daphnia magna*의 네오네이트는 몸체 크기범위가 0.5~1 mm 이므로<sup>14)</sup>, 실리콘시트를 통과할 수 있어서 모든 층에서 유영할 수 있다.

### 2.11. 물벼룩 연속분리 및 연속배양 방법

물벼룩 연속분리 및 연속배양을 위해 배양액과 생후 12일차의 성체 *Daphnia magna*가 담긴 분리장치를 물벼룩 배양기 안에 위치시키고, 분리장치에 주문제작품과 기성품을 결합시켰다(Fig. 10). 자동펌프들은 작동시간과 흡입량을 설정할 수 있는 제품을 사용하였고, 분리장치의 1층

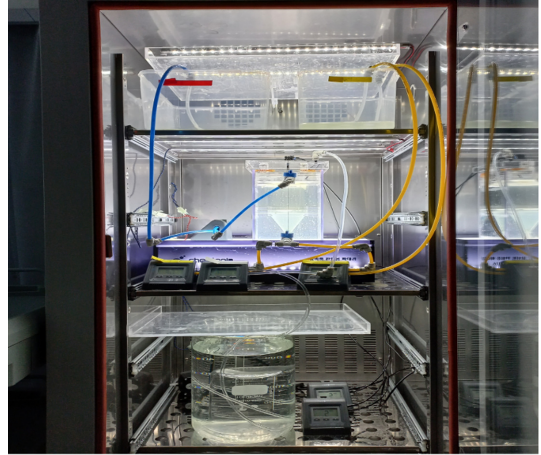


Fig. 10. Combined view of separation apparatus and continuous culture method.

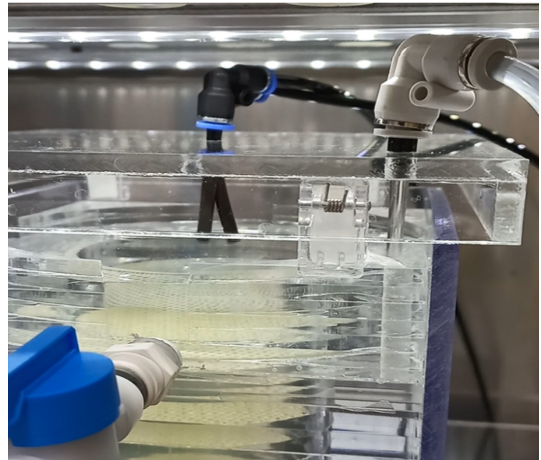


Fig. 11. Supply of new culture medium through the discharge tube.

과 3층에 설치된 배수밸브에, 각각 자동펌프(배양액 제거용)와 연결된 흡입튜브를 결합시켰다. 그 후 분리장치의 덮개에, 자동펌프(배양액 공급용)와 연결된 배출튜브를 결합시켰다. 이 방법을 통해 분리장치로부터 기존의 배양액과 네오네이트는 흡입튜브를 통해 흡입되고, 배출튜브를 통해 제거되어 준비된 포집용기에 포집된다. 또한 새로운 배양액은 펌프에 의해 흡입되어, 배출튜브를 통해 분리장치에 공급된다. 새로운 배양액이 공급되고 있는 사진은 Fig. 11과 같다. 기존의 발명과 다르게, 이 방법은 펌프의 병렬운전 및 1층 깔때기 부분에서 단면이 축소되며 유속이 증가하는 현상(벤츄리 플룸)을 이용하여, 배양공간 내 기존 배양액과 네오네이트를 빠르게 제거할 수 있다. 본 연구에서는 매일 오후 2시 30분에 분리장치 내 기존 배

양액 및 네오네이트가 펌프에 의해 제거되어 포집되도록 설정하였다. 배출량의 경우, 배출 후 남은 배양액의 수위가 1층과 2층 사이에 설치된 실리콘시트 보다 약 1.5 cm 높게 유지되도록 설정하여, 기존 배양액이 제거되어도 성체 물벼룩이 유영 가능하게 하였다. 그리고 매일 오후 3시에 새로 제조하여 담아둔 배양액이 펌프로 자동 공급되어 배양장치를 채우도록 설정하였다.

### 2.12. 먹이 자동공급 방법

먹이 자동공급을 위해 물벼룩 연속분리 및 연속배양 방법에 주문제작품과 기성품을 혼합하였다(Fig. 12). 시판된 클로렐라와 YCT를 각각 배양액으로 희석 후 바닥이 원추형인 용기에 담고, 5°C이하의 온도를 유지할 수 있는 냉장장치 안에 위치시켰다. 그 후 작동시간을 조절할 수 있는 타이머에 폭기장치를 결합하고, 폭기장치에 연결된 튜브의 말단부를 희석된 먹이가 담긴 용기의 바닥에 설치하였다. 자동펌프(먹이 공급용)는 작동시간과 흡입량을 설정할 수 있는 제품을 사용하였으며, 흡입튜브(불투명 흑색)의 말단부를 희석된 먹이가 담긴 용기의 바닥에 설치하였고, 배출튜브(불투명 흑색)는 분리장치의 덮개에 결합하였다. 마지막으로 냉장장치의 문을 폐쇄하였다. 기존의 발명과 다르게, 이 방법은 폭기를 통하여 침전성이 강한 클로렐라와 YCT를 균질화 할 수 있다. 또한 먹이 공급용 튜브가 불투명 흑색이고, 먹이가 담긴 용기는 냉암소의 냉장장치에 보관하므로 온도와 빛에 의한 클로렐라의 부패 또는 증식을 방지할 수 있다. 본 연구에서는 매일 오후 2시에 타이머와 연결된 폭기장치가 작동하도록 하여, 희석된 클로렐라와 YCT를 40분 동안 폭기 및 균

질화시켰다(Fig. 13). 그리고 매일 오후 2시 40분에 자동펌프(먹이 공급용)가 작동하도록 하여, 분리장치에 희석된 클로렐라와 YCT가 공급되도록 하였다.

### 2.13. 생존 확인시험

물벼룩의 네오네이트 연속식 분리장치를 기반으로 한 물벼룩 연속배양방법, 먹이 자동공급방법을 통해 성체 *Daphnia magna*의 40일간 생존가능성을 확인하였다. 1개의 분리장치에 생후 12일차의 성체 *Daphnia magna* 10마리를 투입하였다. 이때 투입된 *Daphnia magna*는 연구를 시작할 당시 배양 중인 55대(55<sub>th</sub> Generation)의 *Daphnia magna*였다. 그 후 Fig. 14와 같이 분리장치 3개를 병렬 연결하여, 펌프에 연결된 흡입튜브와 결합시켰다. 연속배양 및 먹이 자동공급방법을 이용해 배양하였고, 매일 생존한 개체수를 확인하였다.



Fig. 13. Homogenization of *chlorella* and YCT using aeration.



Fig. 12. Combined view of separation apparatus and automatic feeding method.



Fig. 14. Parallel connection of three separation apparatuses.

## 결과 및 고찰

### 3.1. 연속배양 및 먹이 자동공급방법을 통한 생존확인 시험

휴일을 제외하고, 매일 각 분리장치 내 성체 *Daphnia magna*의 생존수를 확인하였다. 생후 40일간 관찰한 결과는 Table 6과 같았다. 3개의 분리장치에서 각각 배양된 10마리의 성체 물벼룩들은 사망하지 않고 생후 40일까지 모든 개체가 생존하였다.

### 3.2. 지수식 배양을 통해 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험

실험 재료 및 방법의 표준독성 시험에 따라 55대 성체 물벼룩을 지수식으로 배양하고, 성체로부터 출산된 움직

임이 활발한 생후 24시간 미만의 네오네이트에 대한 표준독성 시험을 수행하였다. 재현성 확인을 위해 표준독성 시험을 4회 반복 수행하였으며 결과는 Table 7과 같았다. 기존 지수식 배양을 통해 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험을 4회 반복하여 산출된 EC<sub>50</sub>의 최솟값은 0.989 mg/L, 최댓값은 1.098 mg/L, 평균값은 1.043 mg/L였다.

### 3.3. 분리장치로부터 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험

지수식 배양을 통해 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험이 수행된 날, Fig. 12와 같이 분리장치 3층 배수 밸브와 연결된 펌프에 의해 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험을 수행하였다. 실험 재료 및 방법의 표준독

**Table 6.** Survival *Daphnia magna* results in continuous culture apparatus

Date	Culture day	Number 1 Apparatus for survival unit	Number 2 Apparatus for survival unit	Number 3 Apparatus for survival unit
2023.04.17	12 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.04.18	13 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.04.19	14 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.04.20	15 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.04.21	16 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.04.26	21 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.04.27	22 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.04.28	23 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.05.01	26 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.05.02	27 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.05.03	28 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.05.04	29 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.05.05	30 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.05.08	33 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.05.09	34 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.05.10	35 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.05.11	36 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.05.12	37 <sup>th</sup> day	10	10	10
2023.05.15	40 <sup>th</sup> day	10	10	10

**Table 7.** Standard reference toxicity test results of neonate separated from static non-renewal culture (2023.04.20 ~ 2023.05.03)

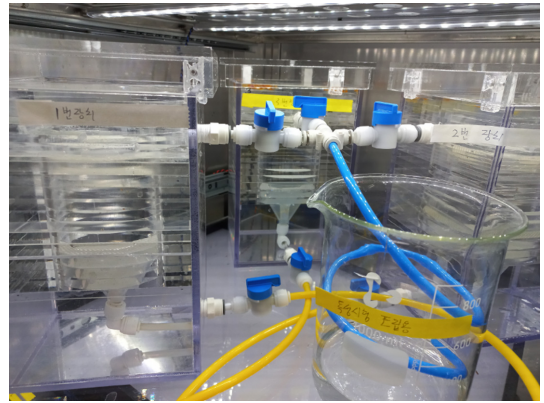
Test date	The test value for neonate separated from static non-renewal culture (mg/L)
2023. 04. 20	1.025
2023. 04. 27	1.061
2023. 05. 02	0.989
2023. 05. 03	1.098
Minimum Concentration (mg/L)	0.989
Maximum Concentration (mg/L)	1.098
Average Concentration (mg/L)	1.043

**Table 8.** Standard reference toxicity test results of neonate separated continuous culture (2023.04.20 ~ 2023.05.03)

Test date	The test value for neonate separated with pump from continuous culture (mg/L)
2023. 04. 20	0.932
2023. 04. 27	0.68
2023. 05. 02	0.83
2023. 05. 03	0.919
Minimum Concentration (mg/L)	0.68
Maximum Concentration (mg/L)	0.932
Average Concentration (mg/L)	0.840

성 시험에 따라 55대 성체 물벼룩이 담긴 분리장치로부터 분리된 움직임이 활발한 생후 24시간 미만의 네오네이트에 대한 표준독성 시험을 수행하였다. 재현성 확인을 위해 표준독성 시험을 4회 반복 수행하였으며 결과는 Table 8과 같았다. 분리장치에 연결된 펌프로 분리한 네오네이트에 대해 표준독성 시험을 4회 반복하여 산출된 EC<sub>50</sub>의 최솟값은 0.68 mg/L, 최댓값은 0.932 mg/L, 평균값은 0.840 mg/L였다.

기존 지수식 배양을 통해 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험 평균값에 비하여, 분리장치에 연결된 펌프로 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험값의 평균값이 0.203 mg/L만큼 낮았다. 또한 분리장치에 연결된 펌프로 분리된 네오네이트에 대한 4회의 표준독성 시험 중 2회 시험의 EC<sub>50</sub>값들이 수질오염공정시험 기준 상 만족범위에 포함되지 않았다. 펌프를 이용하여 *Daphnia magna*의 네오네이트를 포집시, 물벼룩의 건강상태에 이상이 생겨 표준독성 시험결과에 영향을 미칠 수 있다고 생각하였다. 펌프를 이용하여 채수시, 물리적 충격이 발생하여 동물성플랑크톤의 사망율에 영향을 미칠 수 있다는 것<sup>15)</sup>을 확인하였다. 물리적 충격을 방지하기 위해 Fig. 15와 같이 설치한 후 시험 전 3층 배수밸브를 수동으로 열어, 중력에 의한 자연유하로 55대 성체의 네오네이트를 포집하였다. 이후 수질오염공정시험기준에 따라 표준독성 시험을 수행하였다. 재현성 확인을 위해 표준독성 시험을 4회

**Fig. 15.** Neonate separation method in natural flow from continuous culture.

반복 수행하였으며 결과는 Table 9와 같았다. 분리장치로부터 자연유하로 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험을 4회 반복하여 산출된 EC<sub>50</sub>의 최솟값은 0.956 mg/L, 최댓값은 1.026 mg/L, 평균값은 0.992 mg/L였다. 또한 중력에 의한 자연유하로 네오네이트를 포집하여 표준독성 시험이 수행된 날, 지수식 배양을 통해 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험을 수행하였다. 실험 재료 및 방법의 표준독성 시험에 따라 55대 성체 물벼룩이 담긴 분리장치로부터 분리된 움직임이 활발한 생후 24시간 미만의 네오네이트에 대한 표준독성 시험을 수행하였다. 재

**Table 9.** Standard reference toxicity test results of neonate separated in natural flow from continuous culture (2023.05.04 ~ 2023.05.11)

Test date	The test value for neonate separated in natural flow from continuous culture (mg/L)
2023. 05. 04	0.962
2023. 05. 09	0.956
2023. 05. 10	1.025
2023. 05. 11	1.026
Minimum Concentration (mg/L)	0.956
Maximum Concentration (mg/L)	1.026
Average Concentration (mg/L)	0.992

**Table 10.** Standard reference toxicity test results of neonate separated from static non-renewal culture (2023.05.04 ~ 2023.05.11)

Test date	The test value for neonate separated from static non-renewal culture (mg/L)
2023. 05. 04	0.993
2023. 05. 09	1.097
2023. 05. 10	0.962
2023. 05. 11	1.026
Minimum Concentration (mg/L)	0.962
Maximum Concentration (mg/L)	1.097
Average Concentration (mg/L)	1.020

현성 확인을 위해 표준독성 시험을 4회 반복 수행하였으며 결과는 Table 10과 같았다. 기존 지수식 배양을 통해 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험을 4회 반복하여 산출된  $EC_{50}$ 의 최솟값은 0.962 mg/L, 최댓값은 1.097 mg/L, 평균값은 1.020 mg/L였다. 기존 지수식 배양을 통해 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험 평균값에 비하여, 분리장치로부터 자연유하로 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험값의 평균값이 0.027 mg/L만큼 낮았다. 또한 기존 지수식 배양을 통해 분리된 네오네이트에 대한 4회의 표준독성 시험  $EC_{50}$ 값들과 분리장치로부터 자연유하로 분리된 네오네이트에 대한 4회의 표준독성 시험  $EC_{50}$ 값들은 모두 수질오염공정시험 기준 상 만족범위에 포함되었다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 특허출원된 물벼룩의 네오네이트 연속식 분리장치를 기반으로 한 물벼룩 연속 배양방법, 먹이 자동공급방법을 통해 분리장치 내에서 물벼룩의 생존율을 확인하였다. 3개의 분리장치에서 각각 배양된 10마리의 성체 물벼룩들은 생후 40일까지 30마리 모두 생존하였기 때문에, 상기 장치와 방법을 이용하여 물벼룩을 안정적으로 배양할 수 있다는 것을 확인하였다.

또한 물벼룩 네오네이트 연속식 분리장치의 3층 배수밸브와 연결된 펌프에 의해 분리된 네오네이트를 이용하여 수질오염공정시험기준에 따라 표준독성 시험을 수행하였다. 기존 지수식 배양으로 분리한 네오네이트에 대한 표준독성 시험결과, potassium dichromate에 대한  $EC_{50}$ 값이 만족범위인 0.9~2.1 mg/L에 해당하였다. 하지만 분리장치의 펌프에 의해 분리된 네오네이트에 대한 표준독성 시험결과, 0.68~0.932 mg/L에 해당하므로 국제시험법인 ISO 6341:2012에만 유효하다는 것을 확인하였다. 펌프에 의해 네오네이트들이 물리적 충격을 받았을 것이라

가정하고, 3층 배수밸브에 연결된 펌프를 제거하였다. 시험 전 3층 배수밸브를 수동으로 열어, 중력에 의한 자연유하로 네오네이트를 포집하였고, 수질오염공정시험기준에 따라 표준독성 시험을 수행하였다. 기존 지수식 배양으로 분리한 네오네이트에 대한 표준독성 시험과 분리장치로부터 자연유하로 포집된 네오네이트에 대한 표준독성 시험 모두 potassium dichromate에 대한  $EC_{50}$ 값이 만족범위인 0.9~2.1 mg/L에 해당하였기에 수질오염공정시험기준 및 국제시험법인 ISO 6341:2012에 유효하다는 것을 확인하였다.

결론적으로 분리장치를 사용하면, 자동으로 성체 물벼룩 배양과 네오네이트 분리가 가능하여 시간과 노력을 절감할 수 있다. 또한 분리장치의 3층 배수밸브에, 내경이 네오네이트 크기보다 큰 자동 볼밸브를 주문제작 후 연결해 네오네이트를 포집한다면, 물리적인 충격을 방지하여, 재현성 있는 생태독성 시험결과를 도출할 수 있을 것이다.

#### 감사의 글

이 연구는 한국환경공단의 지원으로 수행되었습니다

#### 참고문헌

1. 한국환경공단, <http://www.keco.or.kr>, 2025년 1월.
2. 국립환경과학원, “생태독성 시험방법 및 운영 지침”, 2015, 개정판, 23.
3. 최희정, 이승목, “온도, 광세기 및 pH에 따른 *Chlorella Vulgaris* 증식률”, *대한환경공학회지*, 2011, 33(7), 511-515.
4. A. M. Lakaniemi, C. J. Hulatt, D. N. Thomas, O. H. Tuovinen, and J. A. Puhakka, “Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolectabiomass*”, *Biotechnology for Biofuels*, 2011. 4,

- 1-12.
5. 이연지, 이치현, 조기철, 문혜나, 남궁진, 김기혁, 임병진, 이대경, 여인규, “온도에 의해 유도된 2단계 배양진락을 통한 미세조류 *Chlorella vulgaris*와 *Dunaliella salina*의 지질과 탄수화물의 축적량 변화” *한국수산과학회지*, **2017**, 50(1), 32-40
  6. D. Ebert. “Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*”, **2005**, Bethesda, MD : National Library of Medicine US, National Center for Biotechnology Information.
  7. 국립환경과학원, “수질오염공정시험기준”, **2022**, 제 2022-12호.
  8. S. Koivisto, “Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests?” *Environmental Pollution*, **1995**, 90(2), 263-267
  9. 농림축산검역본부, “동물용의약품등 독성시험지침”, **2016**, 제2016-22호.
  10. 최동진, “Ecotoxicity Assessment of Potassium Hydrogen Phthalate and Verification of Standard Reference Toxicity Test Method Using Potassium Hydrogen Phthalate”, *국립생태원회보*, **2023**, 4(1), 49-62.
  11. G. Indrayanto, G. S. Putra, and F. Suhud, “Chapter Six – Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research” *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, **2021**, 46, 273-307.
  12. 환경부, “물환경보전법 시행규칙”, **2025**, 개정판, 제1150호.
  13. The International Organization for Standardization, “ISO 6341:2012 Water quality-Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test”, **2014**, Edition 4.
  14. M. H. Dehghani, M. Mahmoodi, and A. Zarei, “Toxicity study of UV/ZnO treated solution containing Reactive blue 29 using *Daphnia magna* as a biological indicator”, *MethodsX*, **2019**, 6, 660-665.
  15. 유정규, 남은정, 명철수, “울돌목 해역에서 조류발진 시설 타빈 가동에 따른 동물플랑크톤의 피해 영향”, *한국재생에너지학회 학술대회 초록집*, **2005**, 507-511.