물벼룩(*Daphnia magna*)을 이용한 중금속의 급성 및 만성 독성시험에 관한 연구

정재원 · 정현철 · 김익성 · 홍정혜 · 신명희 · 지기원

환 경 조 사 과

부산광역시 보건환경연구원보 제 8 집, Page(266－286), 1998.
Rep. Pusan Inst. Health & Environ. Vol.8, Page(266－286), 1998.

물벼룩(*Daphnia magna*)을 이용한 중금속의 급성 및 만성 독성시험에 관한 연구

환 경 조 사 과

정재원 · 정현철 · 김익성 · 홍정혜 · 신명희 · 지기원

Acute and Chronic Toxic Test of Various Metals in *Daphnia magna*

Environmental Resaerch Division

J. W. Jung, H. C. Jung, I. S. Kim, J. H. Hong, M. H. Sin, K. W. Ji

Abstract

The toxicities of various metals which are apt to flow in stream from industrial wastes were evaluated by the bioassay in the laboratory using *Daphnia magna*.

For acute tests, they were investigated for the inhibition of their mobilization after 24hrs without food additions.

For the test of reproductive impairment, the states of their reproduction were investigated for 21 days with food additions and exchange of water.

The results of each concentration were assessed by Probit analysis and *t*-test.

1. The change of pH and DO was slight in acute test, and in reproductive test the value of pH was increased as 0.3-1.4 and the concentration of DO had a tendency to increase.
2. The E_iC_{50} values of immobilization to *Daphnia magna* in artificial fresh water were Cu 0.030㎎/ℓ, Cd 0.054㎎/ℓ, Cr 0.12㎎/ℓ, Pb 0.74㎎/ℓ, As 3.4㎎/ℓ and the NOE_iC values were Cu 0.010㎎/ℓ, Cd 0.018㎎/ℓ, Cr 0.010㎎/ℓ, Pb 0.10㎎ℓ, and As 1.8㎎/ℓ.
3. The E_rC_{50} values of reproductive impairment to *D. magna* were Cu 13.8㎍/ℓ, Cd 2.9㎍/ℓ, Cr 15.5㎍/ℓ, Pb 61.7㎍/ℓ, As 759㎍/ℓ, and NOE_rC values were Cu 0.95㎍/ℓ, Cd 0.54㎍/ℓ, Cr 1.2㎍/ℓ, Pb 7.4㎍/ℓ, As 110㎍/ℓ.

Key words : bioassay, *Daphnia magna*, inhibition of mobilization, reproductive im pairment, probit analysis

Ⅰ. 서 론

수질 오염도를 측정하는데 있어서, 단순 이화학적 측정뿐만 아니라 다양한 생물들을 이용해 생태학적 오염영향을 파악하고자 하는 연구는 이미 미국 및 호주, 유럽의 여러나라에서 1930년경부터 수행되어 왔다[1,2].

우리 주변에 존재하는 독성물질의 종류가 다양하고, 많은 혼합물에 대한 독성학적 자료의 결핍, 또 이들 혼합물의 감지와 분석의 어려움, 그들 상호작용에 대한 영향 예측의 어려움 등의 이유에 의해 이화학적 분석 만으로는 생물체에 작용하는 수질의 독성을 평가하는데 한계가 있다[3].

따라서 생물검정은 수계에 존재하는 잠재적인 독성여부를 결정하는데 많은 도움을

줄 수 있으며, 화학적 분석방법의 보완방법으로 사용될 수 있다[4].

생물검정에 사용되는 시험종으로 동물플랑크톤인 물벼룩을 주로 많이 사용하는데, 이 *Daphnia magna*(큰 물벼룩)종은 작은 개체크기, 쉬운 배양, 짧은 생활사 및 높은 번식력 등의 장점에 의해 유해물질의 급성독성을 연구하는 수중생물로 오랜 기간동안 유용하게 사용되어져 왔으며[6], 독성물질에 대한 뚜렷한 감수성도 또한 대표적 시험생물로서의 좋은 요건이 되고 있다[2,6,7].

수생생물을 이용한 실험실내 독성 test의 유용성은 수질의 안정성 평가와 수환경에 잠재적으로 존재할 수 있는 여러가지 화학물질들에 대한 수질범주를 결정짓는데 가치가 있다. 수환경 내에서 생물학적 보전이 유지될 수 있는 독성물질의 영향을 알아내기 위해 한가지 이상의 생물검정 및 독성시험이 수행되어야 하며, 이러한 시험의 결과로부터 양-반응과의 상관성 분석을 통해 적절한 최대허용독성농도(Maximum Acceptable Toxicant Concentration)가 결정되어야 한다[4].

우리나라에서도 주요 4대강의 상수원 등에서 물벼룩, 물고기 등을 이용한 독성물질 조기경보체제가 시험 운영되고 있으며[9], 유해물질에 대한 생물검정에 관한 연구도 차츰 진행되고 있으나, 아직 다양한 데이터가 축적되어 있지 않고 생물을 이용한 독성시험법 또는 평가기법 등도 정립되어 있지 않은 실정이다.

본 실험은 인체 및 여러 생물체에 유해하게 작용하는 몇가지 유해중금속에 대한 *D.magna*의 급성유영저해시험 및 만성번식시험을 APAH의 Standard Methods 및 OECD 시험법 등에 준해 실시하고 그 결과로부터 NOEC 및 EC_{50}을 산출하는 방법에 대해 연구하였다[10,11].

II. 재료 및 방법

1. 물벼룩

실험에 사용한 물벼룩은 *Daphnia magna*(큰 물벼룩)종으로서 동물플랑크톤 중 지각류에 속하며, 수생생태계의 저차영양단계에서 1차 생산자인 식물플랑크톤을 직접 섭식하는 미세초식자로서 식물생산 및 물질순환의 과정에서 중요한 역할을

담담하고 있다.

물벼룩류는 전 세계적으로 11과 52속 450여 종이 기록되어 있으며, 그 중 우리나라에서 발견되는 것은 총 53종 정도이다[12].

본 시험에 사용한 *Daphnia magna*는 1998년 3월 낙동강수질검사소로부터 분양받은 독일산 물벼룩으로, 최대 크기가 5~6mm로 국내산보다는 크기가 더 크고 생장속도도 빠른 장점이 있다[13]. 서식온도는 5~35℃로 알려져 있으며, pH 6.0~10.0의 자연수계에서 관찰되어진다[14].

1) 사육조건

사육수로는 탈염소 수도수, 정호나 호소등의 여과 지표수, 인공담수 등이 있으며, EPA 등에서는 사육효율이 좋은 여과한 자연수의 사용을 추천하고 있으나, 실험의 향상성을 위해 본 실험에서는 인공담수를 조제하였으며, 인공담수의 조성 및 기본 수질은 Table 1, Table 2와 같다.

사육실의 온도는 20± 1℃를 유지시켜 주었으며, 1000~2000Lux의 조명으로 16시간 light, 8시간 dark의 조건을 유지시켰다.

Table 1. Composition of artificial fresh water for *D. magna* culture

Reagent	Concentration(㎎/ℓ)
$NaHCO_3$	192.0
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	120.0
$MgSO_4$	120.0
KCl	8.0

Table 2. Water quality of artificial fresh water for *D. magna* culture

pH	Hardness (㎎/ℓ as $CaCO_3$)	Ca : Mg ratio	Dissolved Oxygen
8.0± 0.2	250± 25	4 : 1	〉 80% of air-saturation value

2) 먹　　이

먹이로는 주로 세균, 조류, yeast가 이용되고 토양추출물(soil extracts), 목화씨 분말과 청어, 건초가루 및 무지개송어 치어용 강화사료와 같은 유기물질도 이용된다. 조류로는 *Selenastrum capricornutam, Scenedesmus guadricanda, Chlorella vulgaris* 등의 녹조류가 많이 이용되는데, 본 시험에서는 *Chlorella vulgaris*의 배양액을 사용하였다[15].

Chlorella 배양을 위해 DIN 배양액[16]과 조류 증식에 효과적인 vitamin stock 용액을 사용하였으며 그 조성은 Table 3, Table 4와 같다.

배양액의 pH는 8.2이고, 사용전에 autoclaving하여 배양액이 오염되지 않도록 하였으며, 배양 온도는 23±2℃, 조도 8000 Lux를 유지시켰다.

Table 3. Composition of DIN medium for *Chlorella vulgaris* culture

A. Nutrient stock solution		B. Iron compounds stock solution		C. Trace elements stock solution	
Compounds	Conc. (g/ℓ)	Compounds	Conc. (mg/ℓ)	Compounds	Conc. (mg/ℓ)
NH_4Cl	1.5				
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1.2	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	80	H_3BO_3	185
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5			$MnMoO_4 \cdot 2H_2O$	7
KH_2PO_4	0.16				

* A. 100mℓ + B. 10mℓ + C. 10mℓ + $NaHCO_3$ 3g → 1ℓ mass up

* Vitamin stock solution 1mℓ add to culture solution 1ℓ

Table 4. Composition of vitamin stock solution for *Chlorella vulgaris* culture

Compounds	Concentration(μg/ℓ)
Biotin	5
Thiamine	100

Compounds	Concentration(μg/ℓ)
Pyridoxine	100
Pyridoxamine	3
Calcium Panthothenate	250
B_{12}(as Mannitol)	100
Nicotinic acid	50
Nicotinomide	50
Folic acid	20
Riboflavin	30
Inositol	90

2. 중금속

급성유영저해시험을 위해 유해중금속으로 널리 알려진 Cu, Cd, Pb, Cr, As의 5가지 중금속을 선택하였으며, 설정 농도별로 사육수를 이용해 희석하였다.

급성유영저해시험 및 번식시험에 사용된 중금속 시약은 중금속분석용 standard solution을 사육수로 희석하였으며, 시험액의 pH가 8보다 낮을 때에는 0.1N NaOH로 조정하였다.

3. 독성 평가

1) EC_{50}의 산정

물벼룩 독성시험에서 EC_{50}(Median Effective concentration)이란 공시물벼룩 50%에 유영저해를 초래하거나 번식률을 50% 감소시키는 공시물질의 농도를 의미한다.

EC_{50}을 구해내는 유용한 방법중의 하나가 Standard Method 800 또는 OECD Test Guidelines 등에서 소개하는 Probit analysis이다. probit 확률지의 probit scale에는 치사율(또는 저해율)을, log scale에는 농도를 plotting한 다음, 각 점을 연결한 직선을

긋고 50% 저해율에 해당하는 농도 값이 EC_{50}이 된다[17].

2) NOEC의 결정

NOEC(No Observable Effect Concentration)란 물벼룩이 유영저해를 당하지 않거나 번식상태에 있어서 대조구와 유의차가 인정되지 않는 무작용농도중의 최고시험농도를 의미한다.

각 시험농도구와 대조구의 결과를 등분산가정 student's *t*-test로 검정하여, 5%의 위험율에서의 유의차가 인정되지 않는 시험 최저농도로 표기하며, 본 실험에서는 Microsoft Excel 통계 program에 의해 구하였다.

3) 독성 시험

(1) 급성유영저해시험(Acute Immobilization Test)

급성유영저해시험(Acute test)은 방류수 규제의 적합성 등 일상적인 조사나 연구로서 LC_{50} 또는 EC_{50}을 결정하는 시험으로, 이 결과에 의해 중·장기시험(Chronic test)의 시험농도가 결정된다. 급성시험은 선택된 시험 유기체에 대하여 독성물질이나 폐수에 관한 상대적 독성을 평가하거나, 온도나 pH와 같은 다양한 환경 상태에 대한 각 유기체의 상대적 예민도 등을 빠른 시간내에 평가하는데 가치가 있다[13].

급성유영저해시험은 유해물질이 첨가된 시험수내에서의 24시간 또는 48시간후의 유영저해를 살펴 보는 것으로, 시험기간동안 사육수 교환 및 먹이 공급 등은 중단하였다.

본 시험은 OECD Guideline for Testing of Chemicals 202편을 기본으로 하였으며, 기타 국내외의 용이하고 효율적인 시험법을 참고하였다[1,10,11,17,18].

각 중금속을 농도구별로 5개씩 50mℓ 유리비이커를 준비하고, 대조구로는 사육수만을 넣은 50mℓ 유리비이커를 5개 더 준비하였다.

각각의 비이커에 생후 24시간 이내의 어린 물벼룩을 5개체씩 넣어 24시간 혹은 48시간이 지난 후의 유영저해수를 기록하였다.

이 때의 유영저해라 함은 시험용기를 천천히 움직여도 물벼룩이 15초간 헤엄치지 못하는 경우를 말하며 촉각만 움직일 경우에도 유영저해 당한 것으로 간주한다[11].

시험 환경조건은 사육 환경조건과 동일하게 유지시켜 주었으며, 시험의 전, 후에

각 시험액과 대조구의 pH, DO를 측정하였다.

EC_{50}, NOEC를 구하기 위한 본 시험을 실시하기 전에 100, 10, 1, 0.1mg/ℓ의 농도로 예비시험을 실시하고, 그 결과에 따라 공비 1.8($\sqrt[4]{10}$)로 농도구를 설정하여 본 시험을 실시하였다[37,38].

본 시험은 결과의 신뢰성을 위해 독성물질마다 3회 이상의 동일시험을 실시하였으며, 그 평균치로서 분석결과를 산출하였다.

(2) 번식저해시험(Chronic Reproduction Test)

번식저해시험은 급성유영저해시험의 결과에 근거하여 적정 시험농도를 설정하게 되는데, 급성유영저해시험의 EC_{50}치를 최고농도로 하고, EC_{50}치의 1/100의 값을 최저농도로 하여 5단계의 농도구를 설정하였다[11].

각 시험물질을 농도구별로 10개의 50mℓ 유리비이커에 준비하고, 생후 24시간이내의 어린 물벼룩을 각 비이커에 1개체씩 넣어 14일~21일간의 생존 및 번식상태를 관찰하였다.

시험조건은 사육조건과 동일하게 유지하였으며, 48시간마다 시험수를 교환하여 주고, 교환시마다 먹이도 주었다.

대조구로 사육수만을 넣은 50mℓ 비이커 10개를 준비하고, 대조구에서 3번이상의 생산이 있을 때까지 시험을 계속하였다.

시험결과는 시험 시작일부터 종료일까지 물벼룩의 유영상태 및 생산된 새끼의 수 등을 매일 기록하였다.

본 시험은 결과의 신뢰성을 위해 독성물질마다 3회 이상의 동일시험을 실시하였으며, 그 평균치로서 분석결과를 산출하였다.

Ⅲ. 결　　과

1. 중금속 농도의 결정

급성유영저해시험의 예비시험 결과는 Table 5와 같으며, 예비시험의 결과에 근

거하여 최저농도에서는 물벼룩의 유영에 대한 영향이 관찰되지 않고, 최고농도에서는 거의 100%의 물벼룩에 유영저해가 관찰되도록 본시험 농도를 설정하였다.

2. pH 및 DO의 변화

Cu에 대한 급성유영저해시험 및 번식저해시험에서의 pH 및 DO의 변화는 각각 Table 6 및 Table 7과 같다.

Table 5. Results of pre-test in immobilization of *D. magna* by various toxic metals

Metals	24h-Immobilization rate(%)					Test concentration by pre-test (㎎/ℓ)
	100 (㎎/ℓ)	10 (㎎/ℓ)	1.0 (㎎/ℓ)	0.1 (㎎/ℓ)	control	
Cu	100	100	100	100	0	0.01～ 0.1
Cd	100	100	100	85	0	0.01～ 0.1
Cr	100	100	100	20	0	0.01～ 1.0
Pb	100	100	40	0	0	0.1～10.0
As	100	100	0	0	0	1.0～10.0

급성유영저해시험에서는 초기 pH 8.0에서, 시험시작 48시간후에는 8.0± 0.1～0.2 정도의 변화가 있었으며, 이러한 약간의 pH 변화는 물벼룩 생육에 아무런 영향을 미치지 않았다. 또 DO의 변화는 시험 48시간후에 초기 DO로부터 약 0.2～0.3 정도 낮아지는데, 이도 또한 시험 결과에 영향을 미치지 않았다.

Table 6. Variations of pH and DO at Cu-acute immobilization test

		Cu conc. (㎎/ℓ)					
		0	0.010	0.018	0.032	0.058	0.100
pH	before test	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
	48h-after	8.1	8.1	8.1	8.0	8.0	8.0
DO (㎎/ℓ)	before test	8.8	8.8	8.8	8.7	8.7	8.7
	48h-after	8.5	8.6	8.6	8.5	8.5	8.4

번식시험에서는 환수 직후의 pH값보다 환수 직전에 0.3~1.4 정도 높아졌는데, 이는 먹이로 공급한 클로렐라의 광합성 때문인 것으로 사료된다. DO값 또한 시험 9~10일째까지는 클로렐라의 광합성으로 계속 높아지다, 물벼룩이 번식하여 그 수가 많아지면서 감소하였다. 번식시험에서는 pH 및 DO의 변화가 다소 큰 폭으로 나타나지만 이틀마다 사육수를 교환해줌으로 시험결과에는 영향을 미치지 않으리라 보여진다.

이러한 pH 및 DO의 변화 패턴이 5가지 중금속시험 모두에서 비슷하였으므로, 각각의 설명은 생략하였다.

Table 7. Variations of pH and DO at Cu-chronic reproduction test

		Experiment time (days)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
pH	before test	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
	21dy-after	8.4	8.5	8.5	8.4	8.3	8.3	8.2	8.2
DO (㎎/ℓ)	before test	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8
	21dy-after	9.4	9.5	9.5	9.6	9.3	9.2	8.6	7.8

3. 독성 시험

1) 급성유영저해시험(Acute Immobilization Test)

각 중금속에 대한 급성유영저해시험의 결과에 따른 농도-반응관계의 직선식은 Fig. 1과 같으며, 대조구의 결과치와 각 시험에서 유영저해가 거의 일어나지 않은 농도구에서의 t-test 결과는 Table 8과 같다.

Fig. 1의 직선 그래프에 의하여 E_iC_{50}치 및 95% 신뢰구간을 구하고, t-test하여 유의차가 없을 경우에 그 농도를 $NOEC_i$라고 결정하였으며, 각 중금속에서의 E_iC_{50}치 및 $NOEC_i$값은 Table 9와 같다.

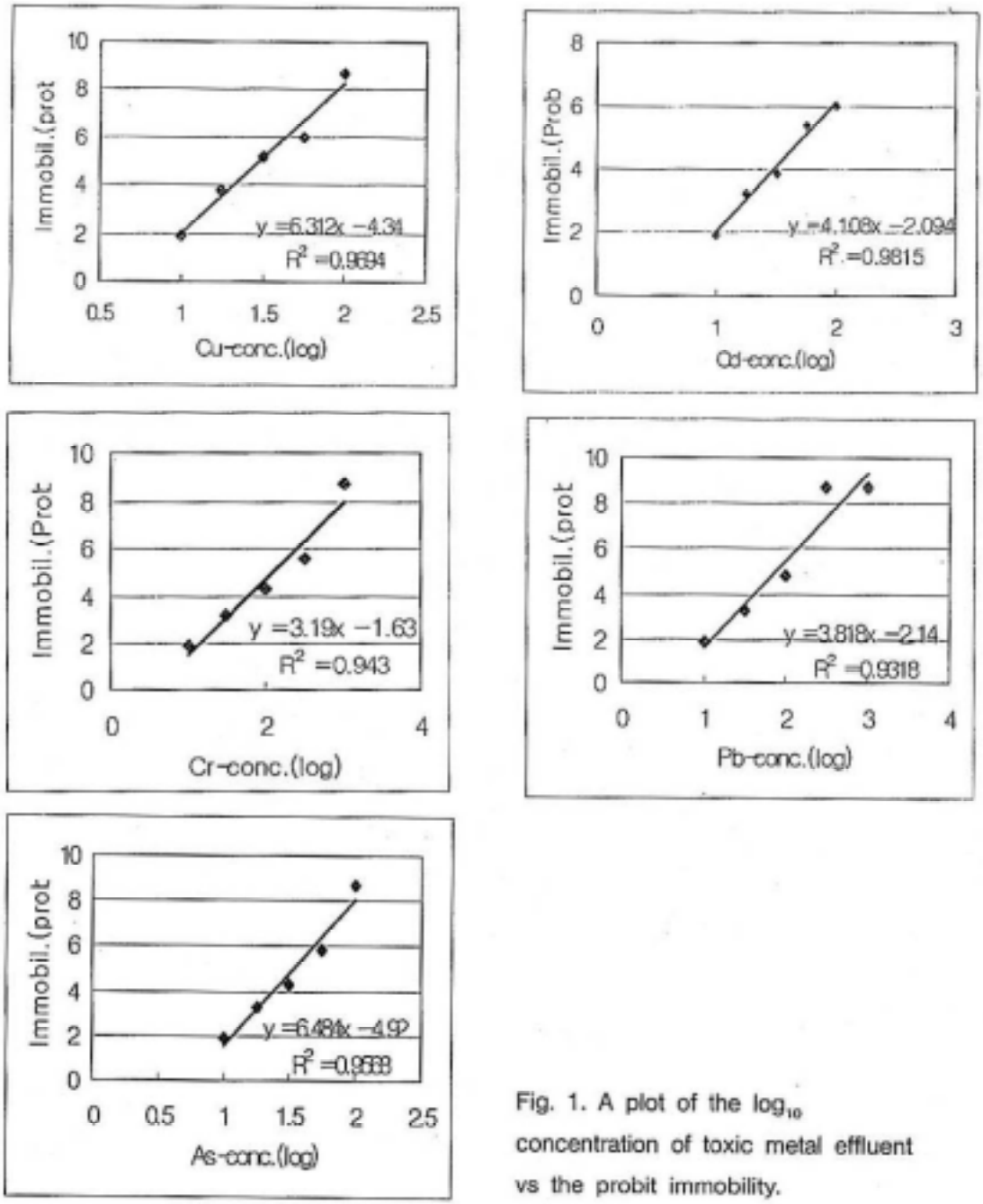


Fig. 1. A plot of the $\log_{10}$ concentration of toxic metal effluent vs the probit immobility.

Table 8. Results of *t*-test for NOEC of acute immobilization test

a) Cu

t-Test	Control	0.010 mg/ℓ
Mean	25	24.6
Variance	0	0.3
Experimental unit	5	5
DF	8	
t Value	1.0	
P(T<=t) Value	0.346593507	
t Critical Value	2.306005626	

Not significant
so NOEC : 0.01mg/ℓ

b) Cd

t-Test	Control	0.018 mg/ℓ
Mean	25	24.4
Variance	0	0.3
Experimental unit	5	5
DF	8	
t Value	1.632993162	
P(T<=t) Value	0.14111328	
t Critical Value	2.306005626	

Not significant
so NOEC : 0.018mg/ℓ

c) Cr

t-Test	Control	0.032 mg/ℓ
Mean	25	24.0
Variance	0	0
Experimental unit	5	5
DF	8	
t Value	65535	
P(T<=t) Value	–	
t Critical Value	2.306005626	

Significantly different
so NOEC : 0.01mg/ℓ

d) Pb

t-Test	Control	0.32 mg/ℓ
Mean	25	24.0
Variance	0	0
Experimental unit	5	5
DF	8	
t Value	65535	
P(T<=t) Value	–	
t Critical Value	2.306005626	

Significantly different
so NOEC : 0.10mg/ℓ

e) As

t-Test	Control	1.8 mg/ℓ
Mean	25	24.4
Variance	0	0.3
Experimental unit	5	5
DF	8	
t Value	1.632993162	
P(T<=t) Value	0.14111328	
t Critical Value	2.306005626	

Not significant
so NOEC : 1.8mg/ℓ

Table 9. E_iC_{50} value and 95% confidence limit and $NOEC_i$ of 24h-acute immobilization test in various toxic metal of *D. magna*

	Cu	Cd	Cr	Pb	As
24h-E_iC_{50}	0.030	0.054	0.12	0.74	3.4
Confidence Limit (95%)	0.026~0.036	0.048~0.060	0.08~0.19	0.46~1.20	2.8~4.1
$NOEC_i$	0.010	0.018	0.010	0.10	1.8

(unit : mg/ℓ)

2) 번식저해시험(Chronic Reproduction Test)

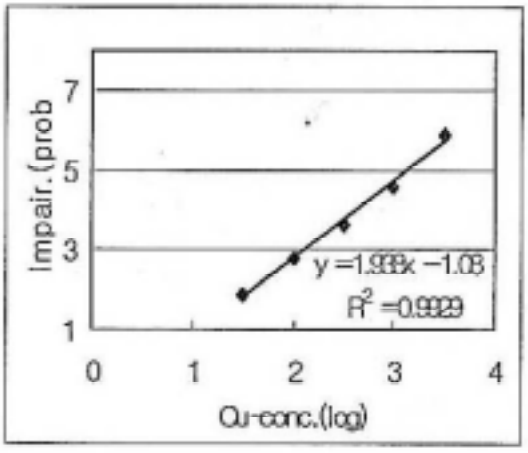
각 중금속에 대한 번식저해시험의 결과에 따른 농도-반응관계의 직선식은 Fig. 2와 같으며, 대조구의 결과치와 각 시험에서 유영저해가 거의 일어나지 않은 농도구에서의 *t*-test 결과는 Table 11과 같다.

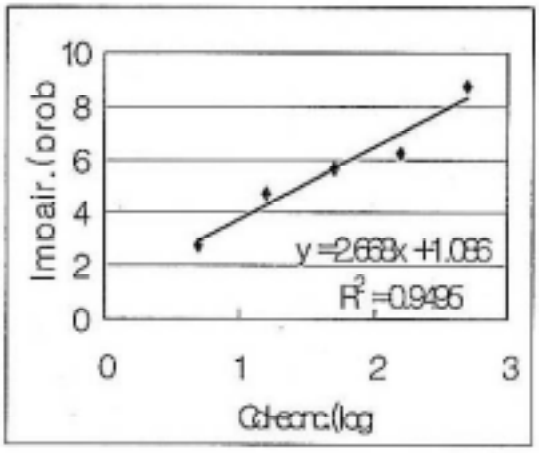
Fig. 2의 직선 그래프에 의하여 E_iC_{50}치 및 95% 신뢰구간을 구하고, *t*-test하여 유의차가 없을 경우에 그 농도를 $NOEC_i$라고 결정하였으며, 각 중금속에서의 E_iC_{50}치 및 $NOEC_i$값은 Table 10과 같다.

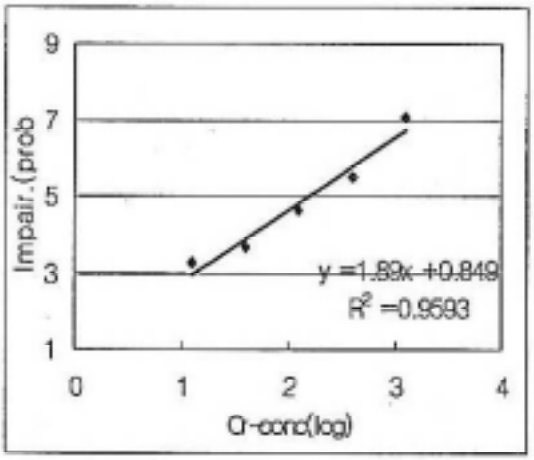
Table 10. E_rC_{50} value and 95% confidence limit and $NOEC_r$ value of 21d-chronic reproduction test in various toxic metal of *D. magna*

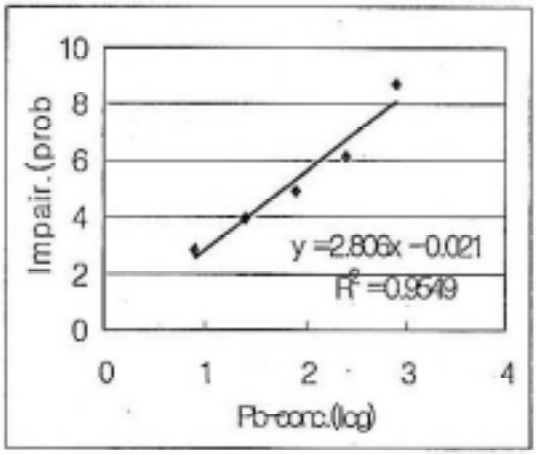
	Cu	Cd	Cr	Pb	As
21d-E_rC_{50}	13.8	2.9	15.5	61.7	759
Confidence Limit (95%)	11.8~16.2	2.0~4.5	10.7~22.4	41.7~91.2	562~1023
$NOEC_r$	0.95	0.54	1.2	7.4	110

(unit : mg/ℓ)









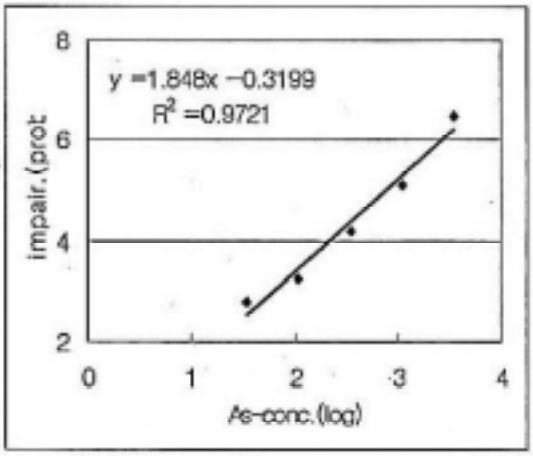


Fig. 2. A plot of the $\log_{10}$ concentration of toxic metal effluent vs the probit impairment.

Table 11. Results of *t*-test for NOEC of chronic reproduction test

a) Cu

t-Test	Control	0.95 μg/ℓ
Mean	146.3	144.3
Variance	238.4	104.011
Experimental unit	10	10
DF	18	
t Value	0.341871	
P(T<=t) Value	0.736407	
t Critical Value	2.100924	

Not significant
so NOEC : 0.95μg/ℓ

b) Cd

t-Test	Control	0.54 μg/ℓ
Mean	146.3	144.3
Variance	238.4	104.011
Experimental unit	10	10
DF	18	
t Value	0.341871	
P(T<=t) Value	0.736407	
t Critical Value	2.100924	

Not significant
so NOEC : 0.54μg/ℓ

c) Cr

t-Test	Control	1.2 μg/ℓ
Mean	146.3	139.9
Variance	238.4	69.344
Experimental unit	10	10
DF	18	
t Value	1.262178	
P(T<=t) Value	0.222994	
t Critical Value	2.100924	

Not significant
so NOEC : 1.2μg/ℓ

d) Pb

t-Test	Control	7.4 μg/ℓ
Mean	146.3	144.3
Variance	238.4	104.011
Experimental unit	10	10
DF	18	
t Value	0.341871	
P(T<=t) Value	0.736407	
t Critical Value	2.100924	

Not significant
so NOEC : 7.4μg/ℓ

e) As

t-Test	Control	110 μg/ℓ
Mean	146.3	138.6
Variance	238.4	46.266
Experimental unit	10	10
DF	18	
t Value	1.443609	
P(T<=t) Value	0.166029	
t Critical Value	2.100924	

Not significant
so NOEC : 110μg/ℓ

Ⅳ. 고 찰

Table 9의 결과로 볼 때, *D. magna*의 유영저해에 대한 독성은 Cu 〉 Cd 〉 Cr 〉 Pb 〉 As의 순으로 나타났으며, 이 결과는 S. L. Warnick 등에 의한 독성 test 결과와도 일치하였다[19]. S. L. Warnick *et al.*(1969)은 수생생물에 관한 그 이전까지의 독성 시험결과를 정리하여 발표하였는데, *D. magna*의 유영저해에 있어서 독성발현농도인 threshold concentration을 Cd 0.1㎎/ℓ, Cr 0.7㎎/ℓ, Pb는 5㎎/ℓ라고 발표하였으며, Cu는 0.027㎎/ℓ에서 100%의 유영저해를 보였다고 하였다[19].

또 Biesinger K. E. *et al.*(1972)은 미국 Superior 호수물을 시험수로 사용하고 말린 건초가루와 말린 송어가루를 먹이로 공급하면서 각종 중금속의 독성시험을 하였는데, 급성치사시험의 48h-LC_{50}이 Cd는 0.065㎎/ℓ, Cu는 0.001㎎/ℓ, As는 7.4㎎/ℓ로 본 실험의 결과와는 다소 차이를 보였다(Table 12).

Table 12. 48hr-Acute and 21dy-chronic toxicities of various metal ions to *D. magna* in Lake Superior water

	Cu	Cd	Cr	Pb	As
48hr-LC_{50}	0.0098	0.065	–	–	7.4
21dy-EC_{50}	0.0035	0.0007	0.60	0.10	1.4

(unit : ㎎/ℓ)

3회 이상의 대조구 시험에서 21일까지 물벼룩의 평균 초산일수는 8.2일, 평균 산란회수는 6.5회, 평균 누적산자수는 146개체로서, 각 중금속마다 번식저해시험의 대조구 값을 공통적으로 대입하였다.

번식에 있어서 대조구와 비교하여 50%의 저해를 보인 독성 농도는 Cu 13.8㎍/ℓ, Cd 2.9㎍/ℓ, Cr 15.5㎍/ℓ, Pb 61.7㎍/ℓ, As 759㎍/ℓ였다. 이 값은 Biesinger K. E. *et al.*(1972)이 Superior 호수물을 이용하여 chronic test를 실시한 결과[20]와 비교해 볼 때, Cu 3.5㎍/ℓ, Cd 0.7㎍/ℓ, Cr 600㎍/ℓ, Pb 100㎍/ℓ, As 1400㎍/ℓ로서 Cu와 Cd을 제외하고는 인공담수에서 중금속에 대해 민감하게 나타났다(Table 12).

또 Anderson.(1950)은 미국 Erie 호수물을 사용하여 64hr후의 독성발현농도(threshold concentration)를 Cu 13μg/ℓ, Cd 1.6μg/ℓ, Cr 1200μg/ℓ, Pb 930μg/ℓ로 발표하였다.(Table 13)

Table 13. 64hr-Apparent threshold concentrations of various metal ions to *D. magna* in Lake Erie water

	Cu	Cd	Cr	Pb	As
64hr-TC	0.013	0.0016	〈 1.2	0.93	−

(unit : mg/ℓ)

이러한 결과에서 알 수 있듯이 생물을 이용한 독성시험의 결과는 사육수의 성분, 먹이의 종류, 실험실 내·외의 환경에 따라 전부 상이하기 때문에 다양한 조건에서의 실험들이 수행되고 고찰되어져야 하며, 한편으로는 신뢰성있는 독성 등급 및 평가기준을 세우기 위해 보편적인 실험방법을 결정하고 활성화시켜야 하겠다.

V. 요 약

공장폐수 등으로부터 유입되기 쉬운 유해 중금속의 생물에 대한 독성을 평가하기 위해 물벼룩(*Daphnia magna*)을 이용하여 실험실내 생물검정을 실시하였다. 급성유영저해시험으로 먹이를 주지 않고 24시간 이후의 유영저해상태를 살펴 보았으며, 번식저해시험으로는 사육수의 교환 및 먹이를 공급하면서 21일까지의 번식상황을 관찰하였다. 각 농도구에서의 시험결과를 probit 분석법과 t-검정법을 통해 독성도로 나타낸 결과는 다음과 같다.

1. 급성유영저해시험에서의 pH 및 DO의 변화는 미미하였으며, 번식저해시험에서는 먹이인 chlorella에 의해 pH가 0.3~1.4정도 높아졌고 DO값도 높아지는 경향을 보였다.

2. 급성유영저해시험에서 E_iC_{50}은 Cu 0.030㎎/ℓ, Cd 0.054㎎/ℓ, Cr 0.12㎎/ℓ, Pb 0.74㎎/ℓ, As 3.4㎎/ℓ였으며, NOE_iC는 Cu 0.010㎎/ℓ, Cd 0.018㎎/ℓ, Cr 0.010㎎/ℓ, Pb 0.10㎎/ℓ, As 1.8㎎/ℓ였다.

3. 번식저해시험에서는 E_rC_{50}은 Cu 13.8μg/ℓ, Cd 2.9μg/ℓ, Cr 15.5μg/ℓ, Pb 61.7μg/ℓ, As 759μg/ℓ였으며, NOE_rC는 Cu 0.95μg/ℓ, Cd 0.54μg/ℓ, Cr 1.2μg/ℓ, Pb 7.4μg/ℓ, As 110μg/ℓ였다.

References

1. Muller, H.G., 1979, Experiences with Test System Using *Daphnia magna*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol 4 : 21-25

2. Anderson, B.G., 1944, The Toxicity Thresholds of Various Substances Found in Industrial Wastes as Determined by the Use of *D. magna*, *Sewage Works Journal*, (6) : 1156-1165

3. Weber, C.I. *et al.*, 1989, Short-term Method for Estimating the Chronic Toxicity of Effluent and receiving water to freshwater organism, U. S. EPA-600/4-89-001.

4. EPA, 1978, Criteria and Rationale for Decision making in Aquatic Hazard Evaluation, Aquatic Hazard of Pesticides Task Group, American Inst. of Biological Science, Arlinton, Virginia, pp46.

5. Leblanc, G.A., 1982, Laboratory Investigation into the Development of resistance of *Daphnia magna* to environmental pollutants, *Environ. Poll.* (Series A)27 : 309-322.

6. Holm-Jensen, I., 1948, Osmotic Regulation in *D. magna* under Physiological Conditions and in the Presence of Heavy metals, *Biologiske Meddeleser* 20(11) : pp.64.

7. Anderson, B.G., 1948, The Apparent Thresholds of Toxicity to *Daphnia magna* for Chlorides of Various Metals when added to Lake Erie water, *Trans. of the American Fisheries Soci.* vol 78 : 96-113

8. Maki, A.W. 1979, Correlations between *Daphnia magna* and Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) Chronic Toxicity values for Several Classes of Test sudstances, *J. Fish. Res. Board Can.* 36 : 411-421

9. 임병진 외, 1995, 물벼룩을 이용한 조기경보체계 연구, 국립환경연구원, Nier No. 95-19-463 : 2-4

10. APHA-AWWA-WPCF, 1985, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, *16th ed.* 804 B : 715-719, 739-742

11. OECD, 1982, Guidelines for Testing of Chemicals, No 202 : 261-276

12. Seller, K.E. and N.M. Ram, 1985, Toxicity Assessment of Binary Metal Mixtures using Bioluminous Bacteria, *Microbics Referance* #55

13. 하헌중 외, 1995, 물벼룩과 형광성 박테리아를 이용한 중금속의 급성독성 평가, *Korean Journal of Limnology*, vol. 28, No. 3 : 369-376

14. Carvalho, G.R. and Crisp, D.J., 1987, The Clonal Ecology of *Daphnia Magna, Jour. of Ani. Ecol.* 56 : 453-468

15. Stephenson, R.R. and Watts, S.A., Chronic Toxicity Tests with *Daphnia magna* ; the Effects of Different Food and Temperature Regimes on Survival, Reproduction and Growth, *Environmental Pollution* (*Series A*) 36 : 95-107

16. DIN, 1989, DIN 38412 Tail 30, 31, Deutsche Einheitzverfahren Zur Wasser-, Abwasser- und Schlamuntersuchung.

17. Buikema Jr, A.L. *et al.*, 1982, Biological Monitoring Part Ⅳ-Toxicity Testing, *Water Research* : 239-262

18. Maki, A.W., 1979, Correlations between *Daphnia magna* and Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) chronic toxicity values for several classes of test substances, *J. Fish. Res. Board Can.* 36 : 411-421

19. Warnick, S.L. and Bell, H.L., 1969, The acute toxicity of some heavy metals to different species of aquatic insects, *J. Water Poll. Contr. Fed. vol* 41 : 280-284

20. Biesinger K.E. and Christensen G.M., 1972, Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna, J. Fish. Res. Bd. Canada* 29 : 1691-1700