

물벼룩을 이용한 급성 독성 시험법

2023

(Acute Toxicity Test Method using *Daphnia magna*)

1.0 개요

1.1 목적

이 시험기준은 수서 무척추동물인 물벼룩을 이용하여 시료의 급성독성을 평가하는 것을 목적으로 한다.

1.2 적용범위

이 시험기준은 산업폐수, 하수, 하천수, 호소수 등에 적용할 수 있다.

2.0 용어정의

2.1 치사(Mortality)

일정 희석 비율로 준비된 시료에 물벼룩을 투입하여 24시간 경과 후 시험용기를 손으로 살짝 두드리고 15초 후 관찰했을 때 독성물질에 영향을 받아 움직임이 명백하게 없는 상태를 ‘치사’로 판정한다.

2.2 유영저해(Immobilization)

일정 희석 비율로 준비된 시료에 물벼룩을 투입하여 24시간 경과 후 시험용기를 손으로 살짝 두드리고 15초 후 관찰했을 때 독성물질에 영향을 받아 움직임이 없으면 ‘유영저해’로 판정한다. 이때 안테나나 다리 등 부속지를 움직이더라도 유영하지 못한다면 ‘유영저해’로 판정한다.

2.3 반수영향농도(EC_{50} 값, Median effective concentration)

투입 시험생물의 50 %가 치사 혹은 유영저해를 나타낸 농도이다.

2.4 생태독성값(TU, Toxic unit)

통계적 방법으로 반수영향농도 EC_{50} 값을 구한 후 100에서 EC_{50} 값을 나눈 값을 말한다.

[주 1] 이때 EC_{50} 값의 단위는 %이다.

2.5 지수식 시험방법(Static non-renewal test)

시험기간 중 시험용액을 교환하지 않는 시험을 말한다.

2.6 표준독성물질(Reference substance)

독성시험이 정상 조건에서 수행되는지를 주기적으로 확인하고자 사용하며 다이크롬산 칼륨(potassium dichromate, $K_2Cr_2O_7$, 분자량: 294.18)을 사용한다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 항온장치(배양기, 항온수조)

항온장치 설치 시 주변 공기가 깨끗하지 않다면 여과장치를 갖추어야 하고, 배양실과 실험실의 온도와 조도는 각각 $(20 \pm 2) ^\circ C$ 와 (500 ~ 1 000) Lux로 유지해야 한다.

3.2 시험용기 및 배양용기

시험용기와 배양용기는 배양기간동안 물벼룩 유영에 영향이 없다고 입증된 재질(유리, PE)을 사용한다.

[주 2] 시험용기와 배양용기를 자주 사용하면 내벽에 석회성분이 침적되므로 주기적

으로 묶은 염산 용액에 담가 제거한 후 세척하여 사용한다. 농약, 휘발성 유기화합물, 기름 성분이 시험수에 포함된 경우에는 시험 후 시험용기 세척 시 ‘뜨거운 비눗물 세척-헹굼-아세톤 세척-헹굼’ 과정을 추가한다. 시험수의 유해성이 금속 성분 때문이라고 판단되면 시험 후 시험용기 세척 시 ‘묶은 염산(10 %) 세척 혹은 질산용액 세척-헹굼’ 과정을 추가한다.

4.0 시약

4.1 배양액 및 희석수

4.1.1 시험생물을 배양하기 위해 제조된 용액을 ‘배양액’이라 하고, 독성시험을 할 때 원수를 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.25 %로 희석하는 데 쓰는용액을 ‘희석수’라 한다.

4.1.2 독성시험에 사용하는 희석수는 배양액과 동일한 것을 사용하고 표 1과 같은 조성으로 제조한다.

표 1. 배양액의 구성

시약	첨가량(mg/L)
염화칼륨(KCl)	8
황산마그네슘(MgSO ₄)	120
황산칼슘 이수화물(CaSO ₄ · 2H ₂ O)	120
탄산수소나트륨(NaHCO ₃)	192

4.1.3 배양액 또는 희석수의 pH는 7.6 ~ 8.0, 경도는 (160 ~ 180) mg CaCO₃/L, 알칼리도는 (110 ~ 120) mg CaCO₃/L, 용존산소는 3.0 mg/L 이상 유지하며, 사용하기 전 24시간 정도 폭기한다.

4.2 시험생물

4.2.1 시험생물은 물벼룩인 *Daphnia magna* Straus를 사용하며, 출처가 명확하고 건강한 개체를 사용한다. 시험생물인 물벼룩은 내구란 형태로 특정 회사에서 구입, 부화시켜 사용할 수 있다. 이 경우 같은 내구란 사용 여부를 기록지에 표기해야 한다.

4.2.2 시험을 할 때는 계대배양(여러 세대를 거쳐 배양)한 생후 2주 이상 물벼룩 암컷 성체를 시험 전날에 새롭게 준비한 배양액이 담긴 용기에 옮기고, 그다음 날까지 생산한 생후 24시간 미만인 어린 개체를 사용한다. 물벼룩은 배양 상태가 좋을 때 7일 ~ 10일 사이에 첫 새끼를 부화하는데 이때 부화한 새끼는 시험에 사용하지 않고 같은 어미가 약 네 번째 부화한 새끼부터 시험에 사용해야 한다. 군집배양일 때 부화 횟수를 정확히 알기 어려우므로 생후 약 2주 이상 어미에서 생산된 새끼를 사용하면 된다.

4.2.3 외부기관에서 새로 분양받았다면 4.2.2와 동일한 방법으로 계대배양 하여 2번 이상 세대교체 후 물벼룩을 시험에 사용해야 한다.

4.2.4 시험 2시간 전에 먹이를 충분히 공급하여 시험 중 먹이가 주는 영향을 최소화 한다.

4.2.5 먹이는 *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* 등과 같은 녹조류와 yeast, Cerophyll(R), trout chow의 혼합액인 YCT를 사용한다.

4.2.6 물벼룩을 폐기할 때는 망으로 걸러서 살아 있는 상태로 하수구에 유입되지 않도록 주의해야 한다.

4.2.7 배양액을 교체하거나 정해진 희석배율의 시험수에 시험생물을 옮겨 주입할 때는 시험생물이 공기 중에 노출되는 시간을 가능한 한 짧게 한다.

4.2.8 태어난 지 24시간 이내인 시험생물일지라도 가능한 한 크기가 동일한 시험생물을 사용한다.

4.2.9 평상시 물벼룩 배양에서 하루에 배양용기 내 전체 물벼룩 수의 10 % 이상이 치사하면 어미 개체를 폐기하고 이에서 생산된 어린 물벼룩은 시험생물로 사용하지 않는다.

4.2.10 배양 시 물벼룩이 표면에 뜨지 않아야 하고, 표면에 뜨면 시험에 사용하지 않는다.

4.2.11 물벼룩을 옮길 때 사용하는 스포이드로 교차 오염이 발생하지 않도록 주의한다.

5.0 시료채취 및 관리

ES 04130.1 시료의 채취 및 보존 방법에 따른다.

6.0 정도보증/정도관리(QA/QC)

6.1 표준독성물질 시험

6.1.1 표준독성물질 시험은 배양액에 24시간-EC₅₀ 값이 (0.9 ~ 2.1) mg/L 범위가 되도록 다이크롬산칼륨을 첨가한 표준독성물질 용액을 사용하여 7.0 분석절차와 동일하게 시험한다.

[주 3] 24시간-EC₅₀ 값이 (0.9 ~ 2.1) mg/L 범위 밖으로 나오면 재시험하고, 재시험 결과에서도 24시간-EC₅₀ 값이 (0.9 ~ 2.1) mg/L 범위 밖으로 나오면 시험을 중지하고 물벼룩을 전량 폐기 후 새로운 개체를 재분양받아야 한다.

6.1.2 표준독성물질 시험은 월 1회 이상 수행해야 하며, 이를 내부정도관리차트(control chart)에 작성해야 한다.

7.0 분석절차

7.1 시료 희석비는 원수 100 %를 기준으로, 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.25 %로 하여 시험한다.

7.2 한 농도당 시험생물 5마리씩 반복구를 4개 둔다. 이때 시험용액의 양은 50 mL로 한다.

7.3 시험기간 조명은 명 : 암 = 16 : 8시간을 유지하고 물 교환, 먹이공급, 폭기를 하지 않는다.

7.4 시험 온도는 $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ 범위로 유지한다.

7.5 24시간 후의 유영저해와 치사 여부를 관찰하여 그 결과로 원수와 각 희석수의 EC_{50} 값을 구한다.

7.6 시험 후 시료의 EC_{50} 값과 95 % 신뢰구간은 시험성적의 분포특성을 고려하여 프로빗(Probit)과 트림드 스피어만-카버(Trimmed Spearman-Kärber) 등과 같은 통계 프로그램 중에서 적절한 방법을 택하여 산출한다.

또한 시험결과가 100 %와 0 % 치사 및 유영저해 데이터만 있어 95 % 신뢰구간을 산출할 수 없을 때는 시험농도에 상용로그를 취한 값과 치사 및 유영저해 사이의 관계 그래프를 작성하여 EC_{50} 값을 산출한다.

[주 4] 프로빗 방법은 (1 ~ 99) % 사이에 유영저해와 사망 데이터가 2개 이상이면 이용할 수 있고, 트림드 스피어만-카버는 유영저해와 사망률 자료가 1개 이상이면 이용할 수 있다.

8.0 결과보고

8.1 생태독성값 계산

8.1.1 통계적 방법으로 EC_{50} 값을 구할 수 있는 경우

$$\text{생태독성값}(TU) = 100/EC_{50} \quad (\text{식 1})$$

8.1.2 통계적 방법으로 EC_{50} 값을 구할 수 없는 경우

8.1.2.1 100 % 시료에서 투입 물벼룩의 (0 ~ 10) %가 영향을 받으면[예: 원수인 100 % 시료에서 투입 물벼룩 20마리 중 (0 ~ 2)마리가 유영저해와 치사를 보일 때] TU를 0으로 한다.

8.1.2.2 원수 100 % 시료에서 투입 물벼룩의 (10 ~ 49) %가 영향을 받으면 $0.02 \times$ (유영저해율 또는 치사율)로 TU를 계산한다.

[주 5] 원수인 100 % 시료에서 투입 물벼룩 20마리 중 5마리가 유영저해와 치사가

관찰되었을 때 $0.02 \times 25 = \text{TU } 0.5$ 가 된다.

8.1.2.3 원수 100 % 시료에서 투입 물벼룩의 (51 ~ 99) %가 영향을 받으면 필요에 따라 100 %와 50 % 사이에 시료 희석비를 추가하여(예: 75 %) 다시 시험할 수 있다.

8.1.2.4 시료 6.25 %에서 투입 물벼룩의 50 %를 초과한 개체가 영향을 받아 EC_{50} 값을 구할 수 없는 때는 $\text{TU} > 16$ 으로 표기할 수 있다.

8.2 시험 결과 보고

8.2.1 시험결과는 소수점 첫째 자리까지 표기하고 수치의 뱃음법은 ES 04000 총칙 5.0 시험결과의 표시검토에 따른다.

[주 6] 원수와 방류수 결과기록부는 10.0 부록의 별지 1과 별지 2의 서식에 따라 작성해야 한다.

8.2.2 시험결과 보고 시 시료농도별 물벼룩 개체수와 누적유영저해 개체수, 대조군 치사율, 기타 시험과정에서 관찰된 이상 현상과 내부정도관리차트를 반드시 함께 보고해야 한다.

9.0 참고자료

9.1 Environment Canada, Reference method for determining acute lethality of effluents to *Daphnia magna*, EPA1/RM/14, (2000)

9.2 KS I ISO 6341, 수질-물벼룩 운동성 억제 특성 측정 방법(급성 독성 시험 방법), (2003)

9.3 JIS K 02291, 화학물질 등의 물벼룩류 유영저해 시험방법, (2000)

9.4 US EPA, Method guidance and recommendations for Whole Effluent Toxicity(WET) testing(40 CFR Part 136), EPA 821-B-00-004, (2000)

9.5 US EPA, Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, EPA-821-R-02-012, (2002)

9.6 US EPA, Technical support document for water quality-based toxics control, (1991)

9.7 US Wisconsin, Aquatic life toxicity testing methods manual, (2004)

10.0 부록

<별지 1>

원수 시료 결과 기록부					
배출시설:		시료채취장소:		시료 번호:	
채취일자:					
채취방법: ☐ Grab ☐ Composite					
채취시간					
시작: 일 시 분		종료: 일 시 분			
시료채취 1일 전의 폐수 특성: ☐ 정상 ☐ 비정상(내용:)					
시료 운반 조건: ☐ 냉장 ☐ 실온					
시료채취량(L):			시료유효기간:		
현장 측정항목					
온도(℃):		pH:		시료색깔: ☐ 유 ☐ 무()	
용존산소(mg/L):			유입수량(m ³ /일):		
전기전도도(μS/cm):			염분(‰):		
수질 측정항목					
잔류염소(mg/L):		암모니아(NH ₃ , mg/L):		경도(mg/L):	
독성시험결과					
반복횟수 농도(%)	유영저해 마리수				유영저해율 (%)
	1	2	3	4	
Control					
6.25					
12.5					
25					
50					
100					
독성시험항목					
물벼룩: 24시간 급성독성		EC ₅₀ 값:		TU(100/EC ₅₀ 값):	
사용한 통계분석법:					
최종 작성일:			년	월	일

기업자 성명: _____ (서명)

<별지 2>

방류수 시료 결과 기록부					
배출시설:		시료채취장소:		시료 번호:	
채취일자:					
채취방법: ☐ Grab ☐ Composite					
채취시간					
시작: 일 시 분		종료: 일 시 분			
시료채취 1일 전의 폐수 특성: ☐ 정상 ☐ 비정상(내용:)					
시료 운반 조건: ☐ 냉장 ☐ 실온					
시료채취량(L):			시료유효기간:		
현장 측정항목					
온도(℃):		pH:		시료색깔: ☐ 유 ☐ 무()	
용존산소(mg/L):			유입수량(m ³ /일):		
전기전도도(μS/cm):			염분(‰):		
수질 측정항목					
잔류염소(mg/L):		암모니아(NH ₃ , mg/L):		경도(mg/L):	
독성시험결과					
반복횟수 농도(%)	유영저해 마리수				유영저해율 (%)
	1	2	3	4	
Control					
6.25					
12.5					
25					
50					
100					
독성시험항목					
물벼룩: 24시간 급성독성		EC ₅₀ 값:		TU(100/EC ₅₀ 값):	
사용한 통계분석법:					
최종 작성일:		년		월 일	

기입자 성명: _____