

발광박테리아를 이용한 급성 독성 시험법

2023

(Acute Toxicity Test Method using *Aliivibrio*
fischeri (*Vibrio Fischeri*))

1.0 개요

1.1 목적

이 시험기준은 해양 기원의 발광박테리아인 *Aliivibrio fischeri* (*Vibrio fischeri*)를 이용하여 시료의 급성독성을 평가하는 방법이며, 여러 비율로 희석한 시험수에 발광박테리아를 투입하고 30분 후 변화하는 발광도를 측정하여 생태독성값(TU_B)을 산출하는 방법이다.

1.2 적용범위

이 시험기준은 한국산업표준의 시험방법(KS I ISO 11348:2014) 중 냉동 건조 세균 이용방법에 제시된 세부사항을 준용했으며, KS 시험방법의 결과보고와 오·탈자를 수정하여 작성했다. 이 시험기준은 산업폐수, 하수, 하천수, 호소수, 지하수, 해수 등에 적용할 수 있다.

1.3 간섭물질

1.3.1 불용성, 난용성, 휘발성 물질, 희석수나 시험 현탁액과 반응하는 물질 또는 시험 기간 동안 그 상태가 바뀌는 물질은 결과에 영향을 미치거나 시험결과의 재현성을 손상할 수 있다.

1.3.2 시료 중 색이 진하거나 탁한 물은 빛을 흡수하거나 산란시킴으로써 발광 손실을 가져올 수 있다. 이러한 간섭은 시료의 탁도 처리 또는 이중 챔버 흡수 보정 시험관(KS I ISO 11348:2014의 부속서 A 참조)을 사용하여 보정할 수 있다.

1.3.3 생물 발광에 산소가 필요하므로 시료가 많은 산소를 소모하거나 산소 농도가 낮으면 산소 결핍을 일으켜 발광을 저해할 수 있다.

1.3.4 시료에 포함된, 쉽게 생분해되는 영양염은 오염물질과 무관하게 생물 발광을 감소시킬 수 있다.

1.3.5 pH 범위가 6.0에서 8.5를 벗어나는 시료는 세균 발광에 영향을 주므로 pH 독성 효과를 없애도록 시료의 pH를 조절해야 한다. 단, 배출수의 생태독성을 분석할 때는 pH를 조절하지 않는다.

1.3.6 발광박테리아(*Aliivibrio fischeri*)는 해양 세균이므로 소금물 시료로 표준 절차에 따라 시험할 때 때때로 저해 효과를 방해할 수 있는 생물 발광 효과와 유사한 현상이 나타날 수 있다(KS I ISO 11348:2014의 부속서 D 참조).

1.3.7 염화나트륨 30 g/L를 초과하는 초기 시료의 염 농도 또는 같은 삼투압을 내는 다른 화합물의 함유량은 시험에 필요한 염 첨가물과 함께 고삼투압 효과를 일으킬 수 있다. 시험 시료의 최종 염 농도는 35 g/L 염화나트륨 용액에 해당하는 삼투압을 초과하지 않아야 한다.

2.0 용어정의

2.1 반수영향농도(EC₅₀, effective concentration of 50 %)

투입 시험생물의 발광도가 바탕용액 대비 50 %의 저해를 나타낸 농도이다.

2.2 생태독성값(TU_B, toxic unit by *Aliivibrio fischeri*)

발광박테리아(*Aliivibrio fischeri*)에 따른 생태독성값(TU_B)은 100을 EC₅₀으로 나눈 값이다(TU_B = 100/EC₅₀).

[주 1] 이때 EC₅₀의 단위는 %이다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 냉동고

보존세균을 저장하는 용도이다.

3.2 배양기 또는 냉장고

“냉동 건조 세균용 용액”을 $(4 \pm 3)^\circ\text{C}$ 로 유지하는 것이다.

3.3 자동 온도 조절되는 열 블록

시험 시료를 $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ 온도로 유지하는 것이며, 한 번 시험에서 온도 편차는 $\pm 0.3^\circ\text{C}$ 이내이어야 한다.

3.4 발광측정계(luminometer)

적당한 시험관을 갖추고 측정부의 온도를 $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ 로 유지하는 것이다.

3.5 시험관

사용하는 발광측정계에 적당하고 가능한 한 최대 표면적을 쉽게 읽을 수 있는 용량이며, 열 블록 내부에 설치할 수 있는 것으로서 화학적으로 비활성 물질로 만든 것이다.

3.6 pH 미터

3.7 크로노미터(chronometer)

3.8 피스톤 피펫 또는 플라스틱 주사기

100 μL , 500 μL , 1 000 μL 인 것이다.

3.9 피스톤 피펫

10 μL ~ 200 μL 와 200 μL ~ 5 000 μL 사이의 다양한 부피를 가진 것이다.

3.10 냉각 원심 분리기

3.11 자석 교반기와 자석 교반봉

3.12 고압 증기 멸균기

3.13 스펙트럼 또는 필터 광도계 및 시험관

광로 1 cm인 것이다.

3.14 전도계

3.15 냉장고

용액과 현탁물을 저장을 위한 것이다.

3.16 용존산소 측정기

폴라로그래프 혹은 갈바니 전극, 이와 동등한 전극을 사용하여 용존 산소를 측정하고, 소수점 첫째 자리까지 표시할 수 있어야 한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 냉동 건조 세균용 용액

20.0 g 염화나트륨(NaCl)

2.035 g 염화마그네슘(6수화물)($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

0.30 g 염화칼륨(KCl)

물로 용해 후 물로 1 L까지 채운다. 이 용액은 일시적으로 (-18 ~ -20) °C에 저장할 수 있다.

4.1.2 염산

$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$

pH를 조절하는 데 필요하다.

4.1.3 염화나트륨 용액(희석용)

염화나트륨 20 g을 물에 녹이고 물로 1 L까지 채운다.

4.1.4 수산화나트륨 용액

$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$

pH를 조절하는 데 필요하다.

4.2 표준물질

pH 조절 없이 개별적인 희석액으로 염화나트륨 용액을 사용하여 다음 표준물질 저장용액을 조제한다.

19.34 mg/L 황산아연·7수화물($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

6.8 mg/L 3,5-디클로로페놀($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$)(순도 $\geq 99\%$)

105.8 mg/L 다이크롬산칼륨($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

이 농도는 각각의 표준물질 예상 EC_{50} 값의 약 두 배 정도 된다. 필요한 부피는 시험 계획에 따른다.

[주 2] 표준물질 저장용액을 준비하도록 규정 농도로 조제된 ZnSO_4 와 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 은 상업적으로 구매할 수 있다.

5.0 시료 채취 및 관리

KS I ISO 5667-16에 규정된 것과 같은 화학적으로 비활성이고 깨끗한 용기(유리, PE 재질 등)에 시료를 채취한다. 용기를 완전히 채운 다음 밀봉한다. 시료 채취 후 가능한 빨리 시료를 시험한다. 필요하면 시료를 유리병에 넣어 2 °C ~ 5 °C인 어두운 곳에 최장 48시간까지 저장할 수 있다. -18 °C 이하에서는 최장 2개월까지 저장할 수 있다. 시료를 보존하려면 화학약품을 사용하지 않아야 한다. 시험 직전에 필요한 염을 첨가한다.

6.0 정도보증/정도관리(QA/QC)

6.1 대조군 시험

6.1.1 30분 배양 보정계수(f_{kt})값이 0.6 ~ 1.3 사이에 있어야 하며, 대조 시료의 반복 시험 편차가 평균의 3 %를 넘지 않아야 한다.

6.1.2 EC_{50} 값을 측정하는 시험 시료를 백분율로 표시한 평균의 편차는 3 %를 초과하지 않아야 한다.

6.2 표준독성물질 시험

6.2.1 냉동 건조 세균 이용방법의 이송된 세균 배치에 대해서, 3가지 표준물질 중 다음의 최종 시험 현탁액 농도에서 30분 접촉한 후 20 % ~ 80 % 저해를 일으켜야 한다.

3.4 mg/L	3,5-디클로로페놀
2.2 mg/L	Zn(II)[황산아연(7수화물) 9.67 mg/L와 동등]
18.7 mg/L	Cr(VI)(다이크롬산칼륨 52.9 mg/L와 동등)

7.0 분석절차

7.1 전처리

7.1.1 모든 시료의 산소 농도를 측정해야 하며, 산소 농도는 3 mg/L를 초과해야 한

다. 만약 회석하지 않은 시료의 산소 농도가 3 mg/L를 초과하지 않는다면, 시료에 적절한 방법(예: 폭기 또는 교반)으로 산소를 주입한다.

7.1.2 모든 시료의 pH를 측정한다. pH가 6.0 ~ 8.5 사이에 있으면 일반적으로 pH를 조절할 필요가 없다. pH를 조절하면 시료의 성질을 바꿀 수 있다. 또한 시료의 pH와 시료군(test batch)의 pH는 시험 배지의 완충능력 때문에 다를 수 있다. 따라서 pH 조절 시료와 pH 비조절 시료 모두 시험을 수행할 필요가 있다. 필요하면 염산(1 mol/L)이나 수산화나트륨(1 mol/L)을 가하여 시료의 pH를 조절한다. 시험 목적에 따라 시료의 pH를 7.0 ± 0.2 , 상한 8.5 ± 0.2 , 하한 6.0 ± 0.2 로 조절한다. 첨가량이 총 부피의 5 %를 넘지 않도록 염산 또는 수산화나트륨의 농도를 선택한다.

[주 3] 산업폐수의 생태독성 측정 시에는 pH를 조절하지 않는다.

7.1.3 시험시료의 염도는 35 g/L NaCl을 초과하지 않아야 한다. 염도가 20 g/L NaCl 이하이면 NaCl을 첨가하여 20 g/L로 조절해야 한다. 염수 시료에 관한 상세한 사항은 KS I ISO 11348:2014의 부속서 D를 참조한다.

7.1.4 너무 탁한 시료는 1시간 침전하거나 원심분리(예: 5 000 g으로 10분)하거나 여과해야 한다. 상청액 또는 여과액을 시험한다.

7.2 분석방법

7.2.1 초기 준비

7.2.1.1 표준물질을 조제하여 표준물질 3개를 각각의 세균 배치로 시험한다. 시험을 위해 해동한 각 저장 현탁액이 들어 있는 시험관과 동시에 최소 표준물질 3개 중 하나를 시험한다.

7.2.1.2 전처리한 시료를 첫 번째 세트의 시험관에서 시료 회석 계열, 표준물질시료와 필요한 대조시료(염화나트륨 용액)를 조제한다.

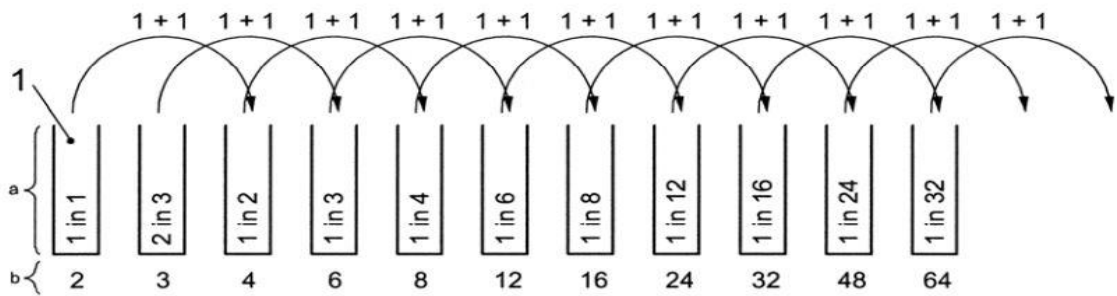
7.2.1.3 회석 계열을 조제하는 일반적인 방법은 첫 번째 세트의 시험관에서 필요한 회석 계열을 조제하며 표 1을 따르는 회석 계열이 권장된다. 순차적인 회석과 기하학적 회석 계열($D = 2, 4, 8, 16$ 등, 그리고 $D = 3, 6, 12, 24$ 등) 2개를 결합해서 조제한

다. 2회 반복 측정하며, 시료 또는 희석시료 또는 대조시료(염화나트륨 용액)의 부피가 1 500 μL 이면 충분하다.

표 1. 희석 계열의 조제

	희석 수준 D	시료 희석 계열의 조합 (2번 측정에 필요한 총 부피: 1 500 μL)	
		시료(7.1) μL	희석 수(4.1.3) μL
대조 배치	D = 1	0	1 500
시험 배치	1	1 500	0
대조 배치	D $\geq$ 2	0	1 500
실험 배치	2	1 500	0
	3	1 000	500
	4	750	750
	6	500	1 000
	8	375	1 125
	12	250	1 250
	16	187.5	1 312.5
	24	125	1 375
	32	93.75	1 406.25
표준물질 배치 (농도는 4.2 참조)		1 500	0

7.2.1.4 이 희석 계열을 제조하는 가장 쉬운 방법은 먼저 분리된 시험관에 저장용액 희석액 2개를 조제하는 것이다(그림 1 참조).



- 1: 시료
- a: 첫 번째 시험관 세트를 조제할 시료의 희석
- b: 시험 현탁액의 추가 후 최종 희석 수준 D

그림 1. 희석 개략도

7.2.1.5 시험 목적과 시험 결과와 관련된 통계 요구사항에 따라서 기하학적 또는 대수적 계열로 농도를 달리한 다른 희석 시료가 적절할 수 있다. 시료/희석된 시료와 시험 현탁액을 동일한 부피로 혼합하기 때문에 시험액에서 가장 높은 시료 농도는 일반적으로 50 %이다. 거의 희석하지 않은 물 시료(80 % 시료)를 시험할 때 여분의 대조군(control batch)이 필요하다.

7.2.1.6 대조 시료, 표준물질 시료, 시료와 희석 계열의 시료(표 1)를 위한 염화나트륨 용액이 들어 있는 시험관을 (15 ± 1) °C로 유지한다. 하나의 시험액당 최대 ± 0.3 °C 내로 유지할 수 있고, 열 블록의 최대 온도 범위로 시험 조건을 선택한다.

7.2.2 저장 현탁액 준비

7.2.2.1 물로 해동하기 바로 직전에 냉동기에서 냉동 건조된 배양 병(100번을 측정할 수 있는 충분한 양)을 제거한다. 해동은 (4 ± 3) °C 유리 시험관에 증류수 1 mL로 차게 한다.

7.2.2.2 차가운 물의 모든 양을 한 번에 동결 건조된 세균 안에 부어서 수분 보충 과정의 세포 손상을 최소화한다. 응집과 활동 손실을 피하도록 물과 세균이 한 번에 접촉하도록 물을 빠르게 붓는 것이 중요하다. 따라서 피펫을 사용하지 않는다. 정확한 물의 양은 중요하지 않다.

7.2.2.3 해동된 발광 세균 현탁액(mL당 약 10^8 개 세포 밀도)은 저장 현탁액을 사용한다. (4 ± 3) °C에서 저장하며, 저장 현탁액은 6.0 정도보증/정도관리에서 언급한 유효 기준을 만족하는 한 시험 목적으로 사용할 수 있다. 다시 냉동시킨, 수분 흡수된 세균은 예비 시험용으로만 사용할 수 있다.

7.2.3 시험 현탁액 준비

7.2.3.1 초기 단계 최소 10분간 기다린 후 (15 ± 1) °C로 유지된 두 번째 세트의 시험관에 저장 현탁액으로 2개 변형 중 하나에 따라 시험 현탁액을 조제한다.

7.2.3.2 변형 A 시험관에서 직접 시험 현탁액을 조제한다. 나중의 강도를 측정하려고 동일한 시간 간격(5초 ~ 20초)과 (15 ± 1) °C로 유지된 시험관 안의 냉동 건조 세균

용 용액 500 μL 에 저장현탁액 10 μL 를 첨가한다. 손으로 혼합물을 진탕한다.

7.2.3.3 변형 B 삼각 플라스크(예: 250 mL)의 시험관 외부에서 시험 현탁액을 조제한다. $(4 \pm 3)^\circ\text{C}$ 로 유지된 냉동 건조 세균용 용액 50에 저장 현탁액을 1 비율로 첨가하고 현탁액을 완전히 혼합한다. 나중에 강도를 측정하도록 동일한 시간 간격(5초 ~ 20초)으로 배양기에서 $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ 로 유지된 시험관에 시험 현탁액 500 μL 를 피펫으로 첨가한다.

[주 4] 냉동 건조 세균이 적게 들어 있는 병(예: 병당 10회 또는 20회 측정하기에 충분한 양) 또한 상업적으로 구매할 수 있다. 이러한 병의 동결 건조된 세균은 “냉동 건조 세균용 용액”을 적당량 첨가해서 직접 해동한다. 배양기에서 $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ 로 유지된 시험관 안의 이 용액 500 μL 를 피펫으로 첨가하여 시험 현탁액 결과를 변형 B로 취급한다.

7.2.4 시험 절차

7.2.4.1 $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ 의 시험 온도에서 희석 수준마다 중복 측정한다.

7.2.4.2 발광측정계를 사용하기 좋은 최댓값 근처 설정으로 조정한다.

7.2.4.3 최소 15분간 전처리한 후 발광측정계로 시험 현탁액의 발광 강도 I_0 를 측정하고 기록한다.

7.2.4.4 모든 시험 시료의 접촉 시간이 동일해야 하므로 발광 강도를 측정할 때 시간 간격을 같게 유지하도록 크로노미터를 이용한다. 5초 ~ 20초 간격이 편리하다고 알려져 있다.

7.2.4.5 시험 현탁액의 비균질성 때문에 서로 다른 발광값이 측정될 수 있으므로 모든 샘플을 분석한다.

7.2.4.6 시험 현탁액의 초기 발광 측정 후 즉시 이 용액을 필요한 만큼의 시료, 희석 시료, 표준독성 시료 또는 염화나트륨 용액으로 전체 부피를 1 mL로 만든다. 첫 번째 시험관 세트에서 준비된 각 시료, 희석 시료, 표준독성 시료 또는 염화나트륨 용액 500 μL 를 피펫으로 취하여 동등한 두 번째 시험관 세트의 각 시험관의 시험 현탁액에 넣어서 만든다. 손으로 혼합하고 크로노미터를 작동한 다음 시험관을 다시 $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ 열 블

록 안에 넣는다.

7.2.4.7 시간 간격을 유지하면서 모든 시험관을 되풀이한다.

7.2.4.8 대조 시료를 함유한 두 번째 세트의 모든 시험관에서 5초 ~ 20초 간격으로 30분 후(I_{30})에 발광 강도를 측정하고 기록한다. 기기의 조정값을 기록한다.

8.0 결과보고

8.1 발광 세균 억제 효과

8.1.1 (식 1)에 따라 측정된 발광 강도로 보정 계수(f_{kt} 값)를 계산한다. 이 보정 계수는 모든 시험 시료의 초기값 I_0 를 물 시료에 따른 발광 감소를 계산하는 기준값으로 사용하려고 보정하는 데 이용된다.

$$f_{kt} = I_{kt} / I_0(t = 30\text{분}) \quad (\text{식 1})$$

여기서 f_{kt} : 30분 접촉 시간에 대한 보정 계수

I_{kt} : 30분 접촉 시간 후 대조 시료의 발광 강도(상대적 발광 단위)

I_0 : 희석액 첨가 직전 대조 시험 현탁액의 발광 강도(상대적 발광 단위)

8.1.2 평균 보정 인자 f_{kt} 와 백분율(소수점 첫째 자리)로 평균의 편차를 계산한다.

$$[(f_{kt} \pm f_{kti}) / f_{kt}] \times 100 \quad (\text{식 2})$$

여기서 f_{kti} : 2개의 보정 인자 값 중 하나

f_{kt} : 평균

8.1.3 (식 3)에 따라 I_{ct} 를 계산한다.

$$I_{ct} = I_0 \times f_{kt} \quad (\text{식 3})$$

여기서 f_{kt} : f_{kt} 의 평균

I_0 : 시료 또는 희석 시료 첨가 직전의 시험 시료 현탁액의 발광 강도(상대적 발광단위)

l_{ct} : 시험 시료 첨가 직전 시험 시료 시험관의 l_0 보정값

8.1.4 (식 4)에 따라 시험 시료의 저해 효과를 계산한다.

$$H_t = \frac{l_{ct} - l_t}{l_{ct}} \times 100 \quad (\text{식 4})$$

여기서 H_t : 30분 접촉 시간 후 시험 시료의 저해효과(%)

l_{ct} : (식 3) 참조

l_t : 30분 접촉 시간 후 시험 시료의 발광 강도(상대적 발광 단위)

8.1.5 각각의 회석 수준에서 저해 효과 H_t 의 평균을 백분율로 계산한다. 백분율(소수 점 첫째 자리)로 개별 평균 H_t 에서 H_{ti} 의 측정값의 산출 차이를 계산한다.

$$H_t(\%) - H_{ti}(\%) \quad (\text{식 5})$$

여기서 H_{ti} : 시험 시료 저해 효과의 2개 값 중 하나

H_t : 평균

8.2 EC값의 결정

8.2.1 표준 선형 회귀 분석 또는 비선형 회귀 분석을 이용하여 각각의 노출 시간과 독성의 영향 관계를 계산한다. 선형 회귀 분석을 이용한 독성 영향 관계 평가에서, 각 회석 수준을 (식 6)에 따라 감마값(시간 t 에 잔류하는 빛의 총 양에서 빛의 손실 비율)을 평가한다.

$$\Gamma_t = H_t / (100 - H_t) \quad (\text{식 6})$$

여기서 Γ_t : 30분 접촉 시간 후 시험 시료의 감마값

H_t : H_t 의 평균, (식 4) 참조

[주 5] 어떤 시험 농도가 0 % 또는 100 % 생체 발광 저해를 일으키면 감마값을 계산할 수 없다. 그러므로 정상적으로 10 % ~ 90 % 사이의 H_t 값만 독성 영향 관계의 계산에 사용된다.

8.2.2 주어진 노출 시간의 독성 영향 관계는 가끔 다음 선형 방정식에 따라 기술될 수 있다.

$$\lg C_t = b \lg \Gamma_t + \lg a \quad (\text{식 7})$$

여기서 C_t : 시험 시료 안의 물 시료의 양(%)

Γ_t : (식 6) 참조

b : 그려진 직선의 기울기 값

$\lg a$: 그려진 직선의 절편 값

8.2.3 표준 최소 제곱법으로 대응하는 신뢰 한계를 갖는 EC_{50} 값을 계산한다.

$$\Gamma_t = 1.00 \text{에서 } C_t = EC_{50,t}$$

8.2.4 비선형 회귀 분석에서 표준 그래프 또는 통계 소프트웨어로 다양한 모델을 이용할 수 있다. 정규분포(즉, 프로빗 분석), 대수분포(즉, 로짓분석) 또는 와이블 분포(즉, 와이블 분석)를 기초로 한다. 계산된 저해 효과(H_t)는 비선형 독성 영향 관계의 파라미터를 평가하는 데 바로 사용될 수 있고, 그다음 어떤 수준의 EC 값을 도출할 수 있다.

8.2.5 한 쌍의 값 범위가 곡선에 맞지 않으면 EC 값을 양대수 좌표 시스템을 이용하여 도식적으로 추정할 수 있다.

8.3 생태독성값 계산

8.3.1 EC_{50} 값을 구한 이후 다음 식으로 생태독성값(TU_B)을 구한다.

$$\text{생태독성값}(TU_B) = 100 / EC_{50} \quad (\text{식 8})$$

8.3.2 첫 번째 희석 단계의 발광저해율이 0 % ~ 10 % 사이에 있으면 TU 를 0으로 한다.

9.0 참고자료

9.1 Grabert, E., Kössler, F., "About the effect of nutrients on the luminescent bacteria test. In: Hastings J.W., Kricka L.J., Stanley P.E., editors. *Bioluminescence*

and Chemiluminescence”, *Molecular Reporting with Photons*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1996, 291-294.

9.2 Postma, J.F. et al(2002). “Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms”, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, Vol 53, No 2, 226-237.

9.3 Krebs, F., “Toxizitätstest mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien”, *Gewässerschutz, Wasser, Abwasser*, 63, 173-230, (1983).

9.4 KS I ISO 11348, “수질-물 시료의 비브리오 피셔리 발광에 대한 저해 효과 측정 방법-발광 세균 시험”, 국가기술표준원, (2014).

9.5 ISO 11348-3, “Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri*(Luminescent bacteria test)-Part 3: Method using freeze-dried bacteria”, EPA, Environmental Monitoring Systems Laboratory/Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio 45268, (2007).

10.0 “내용 없음”