

해산 윤충류를 이용한 급성 독성 시험법

(Acute Toxicity Test Method using *Brachionus plicatilis*)

2025

1.0 개요

1.1 목적

이 시험기준은 해양생태계의 1차 소비자인 해산 윤충류 *Brachionus plicatilis*(이하 ‘윤충류’라 한다.)의 내구란 (cysts)을 이용하여 시료의 급성 독성을 평가하는 목적으로 한다.

1.2 적용범위

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

2.0 용어 정의

2.1 치사 (Mortality)

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

2.2 반수치사농도 (LC₅₀, Lethal concentration of 50 %)

통계적으로 일정 기간 동안 시료에 노출된 시험생물 집단의 50 %가 치사하는 것으로 나타낸 시험물질의 농도를 말한다.

2.3 생태독성값 (TU_R, Toxic unit)

통계적 방법으로 반수치사농도 LC_{50} 값을 구한 후 100에서 LC_{50} 값을 나눈 값을 말한다.
[주 1] 이때 LC_{50} 값의 단위는 %이다.

2.4 지수식 시험방법 (static test)

시험기간 중 시험용액을 교환하지 않는 시험을 말한다.

2.5 표준독성물질 (reference substance)

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

3.0 분석기기 및 기구

3.1 항온장치(배양기)

독성시험 과정 동안 일정한 온도를 유지할 수 있는 배양기를 사용하며, 온도는 (25 ± 1) °C를 유지해야 한다.

3.2 광원

윤충류 내구란 (cysts)의 부화 과정에 필요한 충분한 조명 세기 3 000 Lux ~ 4 000 Lux를 유지해야 한다.

3.3 시험용기

비활성 재질의 24 웰 플레이트 (24 well plate)를 사용한다.

3.4 실체현미경

가급적이면 입사 (bottom) 조명이 포함된 최소 8배 확대 가능한 실체현미경을 이용하며,

시험생물 투입 및 시험종료 시 시험생물 관찰을 위해 사용한다.

3.5 수질 및 조도 측정기

수온, 염분 및 조도 측정에 사용한다.

3.6 윤충류 샘플링용 피펫

윤충류를 담을 수 있는 지름이 충분하며, 소량의 배지를 샘플링할 수 있는 피펫 (또는 스포이드)를 이용한다.

4.0 시약

4.1 희석수

4.1.1 독성시험을 할 때 원수를 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.25 %로 희석하는 데 쓰는 용액을 ‘희석수’라 하며, ‘인공해수’를 사용한다.

4.1.2 인공해수는 표 1과 같은 조성으로 제조하고, 이때 염분농도는 33 psu ~ 35 psu이다. 독성시험 시 사용하는 희석수는 제조한 인공해수를 증류수로 희석하여 염분을 조절한다.

표 1. 인공해수의 구성

시약	첨가량 (g/L)
염화소듐 (NaCl)	26.40
염화포타슘 (KCl)	0.84
염화칼슘 이수화물 (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	1.67
염화마그네슘 육수화물 (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	4.60
황산마그네슘 칠수화물 (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	5.58
탄산수소소듐 (NaHCO ₃)	0.17
붕산 (H ₃ BO ₃)	0.03

4.1.2 제조된 인공해수를 즉시 사용하지 않는 경우에는 (4 ± 1) °C 냉암소에 보관하고 사용하기 전에 미리 꺼내어 온도보정을 (25 ± 1) °C로 한다. 인공해수는 최대 7일 동안

보관·사용할 수 있으며, 그 이후에는 폐기한다.

4.2 시험생물

4.2.1 시험생물은 윤충류인 *Brachionus plicatilis*를 사용하며, 출처가 명확하고 건강한 개체를 사용한다. 시험생물인 윤충류는 내구란 (cysts)을 부화시켜 사용한다. 이 경우 내구란 (cysts) 사용 여부를 기록지에 표기해야 한다.

4.2.2 내구란 (cysts)은 염분 20 psu로 조정된 희석수(2.5 mL 이상)로 온도 (25 ± 1) °C, 조도 3 000 Lux ~ 4 000 Lux 의 연속조명 아래에서 24 시간 ~ 28 시간 동안 부화시킨다.

[주 2] 만약 부화된 유생 (neonates)의 수가 너무 적어 시험에 필요한 개체수를 확보하기 어려운 경우, 추가로 2시간 더 부화를 지속할 수 있다.

5.0 시료채취 및 관리

ES 04130.1f 시료의 채취 및 보존 방법(물벼룩 급성 독성)에 따른다.

6.0 정도보증/정도관리(QA/QC)

6.1 표준독성물질 시험

6.1.1 시험의 재현성과 신뢰성을 확인하기 위해 월 1회 이상 표준독성물질을 이용한 시험을 수행해야 하며, 이를 바탕으로 내부정도관리차트 (control chart)를 작성해야 한다. 단, 1개월 이상 시험을 하지 않을 경우에는 표준독성물질 시험을 생략할 수 있으며 시험 재개 시 표준독성물질 시험을 병행하여 실시한다.

6.1.2 표준독성물질 시험은 희석수에 24시간-LC₅₀ 값이 186 mg/L ~ 368 mg/L 범위가 되도록 다이크롬산포타슘을 첨가한 표준독성물질 용액을 사용하여 7.0 분석절차와 동일하게 시험한다. 단, 희석수의 염분농도는 20 psu로 한다.

[주 3] 24시간-LC₅₀ 값이 186 mg/L ~ 368 mg/L 범위를 벗어나면 재시험하고, 재시험 결과에서도 24시간-LC₅₀ 값이 186 mg/L ~ 368 mg/L 범위를 벗어나면 시험을 중지하고

해당 배치 (batch)를 전량 폐기 후 새로운 배치를 구입하여 사용해야 한다.

7.0 분석절차

7.1 시료를 잘 흔들어 균질화하고, 시험생물종 이외의 생물종이 확인된 경우, 0.7 μm 필터로 여과한다. 단 여과한 경우, 생물종 사진 등을 10.0 부록의 별지2에 첨부한다.

7.2 시료는 원수 100 %를 포함하여, 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.25 %로 5개 농도로 희석하여 시험한다. 이때 시료의 염분농도가 5 psu ~ 35 psu인 경우 증류수를 이용하여 희석수의 염분을 시료의 염분에 맞춰 조절 후 시험한다.[예 : 시료의 염분이 10 psu일 경우 시료는 염분 보정하지 않고, 희석수의 염분만 10 psu로 맞춰 시험한다.]

[주 4] 시료의 염분이 35 psu 초과인 경우 시료의 염분은 별도로 보정하지 않으며, 희석수는 인공해수 33 psu ~ 35 psu를 사용한다. 시료의 염분이 5 psu 미만일 경우, 시료의 염분을 염화소듐 (NaCl)을 이용하여 5 psu으로 보정 후 5 psu 희석수를 이용하여 시험한다.

7.3 웰 플레이트 (well plate)의 한 웰 (well)의 시험용액량은 1 mL로 하고 6개의 반복구를 둔다. 한 웰 (well) 당 시험생물종 5마리씩 저농도(대조구)부터 넣는다(그림 1 참조).

[주 5] 필요시, 시험시료 및 희석수의 염분이 20 psu가 아닐 경우 시험생물이 10분 ~ 1시간 정도 염분변화에 적응시킬 수 있다.

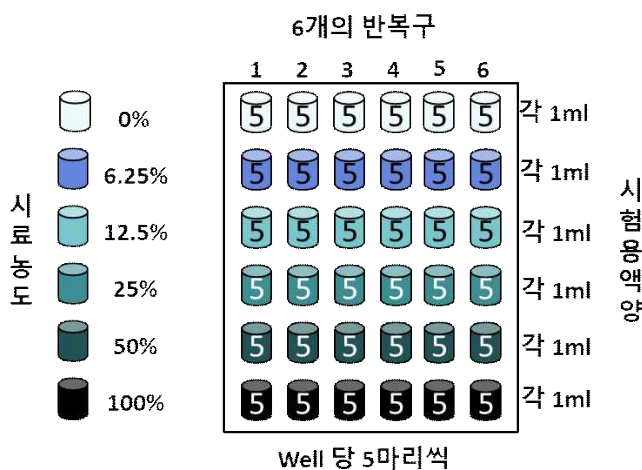


그림 1. 시료의 희석 및 반복구

7.4 시료에 시험생물을 옮겨 넣을 때는 희석수가 각 웰 (well) 시험용액량의 10 % 이상 들어가지 않도록 하고, 시험생물이 공기 중에 노출되는 시간을 가능한 한 짧게 한다. 또한,

옮길 때 사용하는 스포이드로 교차 오염이 발생하지 않도록 주의한다.

7.5 시험기간 조명은 암조건을 유지하고 시험용기의 뚜껑을 닫고 노출시킨다. 시험용액 교환, 먹이공급, 폭기를 하지 않는다.

7.6 시험 온도는 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 범위로 유지한다.

7.7 24시간 후의 치사 여부를 관찰하여 그 결과로 시료의 LC_{50} 값을 구한다.

7.8 시험 후 시료의 LC_{50} 값과 95 % 신뢰구간은 시험성적의 분포특성을 고려하여 프로빗 (Probit)과 트림드 스피어만-카버 (Trimmed Spearman-Kärber)와 같은 통계프로그램을 사용하여 산출한다.

또한 시험결과가 100 %와 0 % 치사데이터만 있어 95 % 신뢰구간을 산출할 수 없을 때는 시험농도에 상용로그를 취한 값과 치사율 사이의 관계 그래프를 작성하여 LC_{50} 값을 산출한다.

[주 6] 프로빗 방법은 1 % ~ 99 % 사이에 치사데이터가 2개 이상일 경우에 이용할 수 있고, 트림드 스피어만-카버는 치사율(1 % ~ 100 %) 자료가 1개 이상이면 이용할 수 있다.

8.0 결과보고

8.1 생태독성값 계산

8.1.1 통계적 방법으로 LC_{50} 값을 구할 수 있는 경우

$$\text{생태독성값 } (TU_R) = 100/LC_{50} \quad (\text{식 1})$$

8.1.2 통계적 방법으로 LC_{50} 값을 구할 수 없는 경우

8.1.2.1 100 % 시료에서 투입 윤충류의 0 % ~ 10 % 가 치사를 보일 경우[예: 원수인 100 % 시료에서 투입 윤충류 30마리 중 0 마리 ~ 3마리가 치사를 보일 때] TU_R 를 0으로 하고, 이는 독성이 없음을 뜻한다.

[주 7] 시험의 적합도 판정은 대조구의 생존율이 90 % 이상이어야 하고, 90 % 미만일 경우

그 데이터는 사용할 수 없다.

8.1.2.2 원수 100 % 시료에서 투입 윤충류의 11 % ~ 49 %가 치사했을 경우 ($0.02 \times$ 치사율)로 TU_R 를 계산한다.

[주 8] 원수인 100 % 시료에서 투입 윤충류 30마리 중 5마리의 치사가 관찰되었을 때 $0.02 \times 16.67 \% = TU_R 0.3$ 이 된다.

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

8.1.2.4 시료 6.25 %에서 투입 윤충류의 50 %를 초과한 개체가 치사하여 LC_{50} 값을 구할 수 없는 때는 $TU_R > 16$ 으로 표기할 수 있다.

8.2 시험 결과 보고

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

[주 9] 결과기록부는 10.0 부록의 별지1 서식에 따라 작성해야 한다.

8.2.2 시험결과 보고 시 윤충류의 웰 (well) 당 투입 개체수와 치사 개체수, 기타 시험과정에서 관찰된 이상 현상과 내부정도관리차트 (control chart)를 반드시 함께 보고해야 한다.

9.0 참고자료

9.1 ISO 19820 “Water quality — Determination of the acute toxicity to the marine rotifer *Brachionus plicatilis*”, ISO, (2016)

9.2 ASTM E1440-91, “Standard guide for acute toxicity test with the rotifer *Brachionus*”, American Society for Testing and Materials, (2012)

9.3 해양수산부, 해양환경공정시험기준 [별표3], 제23항 해산 로티퍼 (*Brachionus plicatilis*)를 이용한 해양생태독성 시험방법, (2023)

10.0 부록

<별지 1> 결과 기록부

1. 채취조건								
시료유형 : ☐ 산업폐수 ☐ 하수 ☐ 하천수 ☐ 해수 ☐ 기타()								
업체명 :		시료채취장소:			시료 번호:			
채취일자:		채취방법: ☐ Grab ☐ Composite						
채취시간		시작: 일 시 분			종료: 일 시 분			
시료 운반 조건: ☐ 냉장 ☐ 실온						시료유효기간:		
시료채취 1일 전의 폐수 특성: ☐ 정상 ☐ 비정상(내용:)								
2. 수질 측정								
온도(℃) :		pH :			시료색깔 : ☐ 유 ☐ 무()			
용존산소(mg/L) :		염분(psu) :			전기전도도($\mu\text{S}/\text{cm}$)			
3. 시험조건								
시험종 및 입수처 :		부화시작시간:			실험시작시간:			
시험용액 부피 : 1 mL				반복구 : 6 반복				
4. 관찰 기록								
실험 일시 및 시간 :								
반복횟수 농도(%)		치사 개체수/투입 개체수						치사율 (%)
		1	2	3	4	5	6	
Control								
6.25								
12.5								
25								
50								
100								
5. 시험 결과								
시험기준 :		LC ₅₀ :			TU _R :			
사용한 통계분석법 : ☐ Graphic Method ☐ Probit Method ☐ 계산법(TU = 0.02 x 치사율) ☐ Trimmed Spearman-Kärber Method								
최종 작성일 : 년 월 일								
시험자 성명 : (서명)								

[illegible]