

*Daphnia magna*에 의한 水質汚染物質의 毒性
評價方法에 관한 研究

南 相 虎

建國大學校 環境工學科

A Study on Evaluation Technique of Biototoxicity by
Daphnia magna to Heavy Metal in Wastewater

Sang Ho Nam

Dept. of Environmental Sanitary Engineering,
Kon-Kuk University

Abstract

This study was performed to develop an acute toxicity evaluation model, by *Daphnia magna*, named as "Equitox" that imply how many times of pollutant's toxicity equivalent to reference chemical ($K_2Cr_2O_7$).

The method presented in this paper may be applied for control of toxic industrial wastewaters.

The experimental results in crude data obtained from *D. magna* toxicity tests at a given conditions are as follows.

1. In cases of a single toxicant, mobility of *D. magna* tended to be linearly proportional to the extent of toxic element concentration.
2. In case of a metal surface treatment wastewater, mobility of *D. magna* showed a curved relation to applied concentrations of wastewater.
3. An acute toxicity evaluation model developed by *D. magna*, Equitox, is presented, but needed of a standardization in practice.
4. Further studies should be carried out in relation to evaluation of reference chemical toxicity at an optimum condition and to a long term or chronic toxicity evaluation methods.

I. 結 論

放流水域으로 流入되는 下廢水 農業下水 成分中에는 水棲生物 및 人體健康에 有害한 毒性, 發癌性 또는 變異原성을 지닌 農藥, 有機溶劑, 合成有機化合物, 重金屬 등이 含有되어 있다.

現在 우리나라에서 採擇하고 있는 水質評價는 主로 理化學的 方法에 依存하고 있다. 그 方法은 比較的 分析 또는 測定이 容易하나 水環境에 影響을 미치는 汚染物質의 種類가 多樣하고 그들이 作用하는 濃度の 範圍도 넓으며 繼續的인 環境變化가 일고 있기 때문에 調査當時의 狀態만을 나타내는 缺點이 있다. 指標生物에 의한 水質評價方法은 有害物質에 대한 敏感性을 把握하여 安全濃度を 決定할 수 있으므로 理化學的인 水質評價方法을 補充해 준다.

美國, 프랑스 등 區美諸國은 *Daphnia Magna*를 利用한 水質毒性評價가 일찍부터 研究되어져 왔고 毒性評價方法에 대한 基準이 設定되어 있다.^{1,2)}

本 研究는 指標生物 중 國際的인 實驗種으로 使用되고 있는 底棲性 淡水 無脊椎動物(動物性 플랑크톤)인 *D. magna*를 選定하여 環境保全法에서 有害物質로 定하고 있는 重金屬 項目가운데 카드뮴(Cd), 크롬(Cr), 동(Cu) 및 아연(Zn)을 例로 毒性濃度(EC₅₀)을 測定 하므로써 水質汚染物質의 毒性에 대한 排出賦課金 算定의 基礎資料로 活用할 수 있는 水質 毒性評價方法을 模索하는데 目的이 있다.

II. 實驗方法

1. 實驗裝置 및 分析機器

本 研究目的으로 使用된 實驗裝置는 아크릴제 長方形(가로 70 cm × 세로 120 cm × 높이 30 cm)으로 製作된 水槽, 槽內 水溫維持를 위한 混合機恒溫調節器(주 전흥전기공업), 螢光燈 4個(40 w), 1.5l 容량의 비커 16個 등

으로 構成된 *D. magna* 培養裝置와 培養液을 準備하여 溶存酸素를 注入시키기 위한 10l 容량의 유리병 1個, 먹이 藻類培養을 위한 震盪用 恒溫水槽(International Scientific, Model SH-WA) 등이다.

使用된 分析機器는 Table 1 과 같고 分析方法은 環境汚染公定試驗法(環境廳, 1987) 및 美國 標準水質分析法(APHA, 1985)에 따랐다.

2. 實驗生物

本 實驗에 使用된 指標生物은 韓國化學研究所가 英國의 Institute of Terrestrial Ecology 로 부터 分讓받은 *D. magna*이다. 文獻에 의하면 *D. magna*의 生存과 繁殖에 適合한 溫度는 18~22℃, pH 값 7.0~8.6, 硬度 160~180 mg/l CaCO₃, 溶存酸素의 濃度 2.0 mg/l 以上으로 報告되었다. 어미의 크기는 5.6~6.0 mm 정도 갖 태어난 새끼는 0.8~1.0 mm

Table 1. Analytical materials

Items	Manufacturers
• Water bath	INTERNATIONAL SCIENTIFIC CO., LTD(SR-WA)
• Drying oven	Dong Yang Scientific Machinery CO. (0445)
• Centrifuge	Du Pont Compony (RT 6000)
• Balance	SARTORIUS GMBH GOTTINGEN (2434)
• Dissolved oxygen meter	Bionics Instrument CO, Ltd. (DO-715D)
• PH meter	Orion SA 520
• Autoclave	INTERNATIONAL ENGINEERING CO. (GE-114)
• Automic adsorption	Scientific Equipment Pty. Ltd. (GBC 901)
• Spectrophotometer	Bausch & Lomb Model ; Spectronic 20

로서 肉眼觀察이 가능하다. 成長段階는 egg, juvenile, adolescent 및 adult 4 段階로 區分된다.^{1,3,4,5)}

3. 實驗條件

D. magna 는 有害汚染物質에 대해 感受성이 敏感하기 때문에 毒性測定에 널리 利用되고 있다. 毒性發現에 미치는 影響因子는 毒性物質의 種類, 實驗對象生物의 種類와 生育段階, 培養液의 이온組成, pH, 溶存酸素量, 水溫, 硬度, 照度 등이다. 實驗에 使用된 重金屬 試藥은 <Table 2> 와 같으며 品質은 모두 特級(Junsei Chemical Co.)으로 標準溶液은 環境汚染公定試驗法(環境廳, 1987) 및 U. S. Standard Methods (APHA, 1985)를 參考하였다.

D. magna 培養液의 이온組成은 <Table 3> 과 같이 APHA(1985) 및 U. S. EPA(1975) 標準方法에 따라 造製한 合成液을 利用하였다.

培養液의 水溫, pH값은 각각 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 8 로 一定하게 維持시켰다. 照明은 16 L/ 8 D (明暗比)가 되도록 自動時間 調節스위치(Matsushita Electric Works Ltd., TB 318)에 의하여 調整하였다. 培養液의 溶存酸素濃度は 飽和濃度の 80% 以上을 維持하기 위하여 散氣器로 24시간동안 曝氣시켰다. 毒性實驗時 溶存酸素濃度は 最小 2mg/l 以上이 되도록 하였다.

培養液은 使用後 35日이 되면 廢棄시켰다. *D. magna* 의 먹이인 藻類(*Selenastrum carpicornutum*)는 國立環境研究院으로 부터 確保한 후 APHA(1985) 및 U. S. EPA(1975) 標準方法에 따라 培養하여 1×10^6 cell/ml 를 每日 供給해 주었다. 實驗은 實驗期間동안 培養液의 交換이나 먹이의 供給이 없는 靜的方法(static test)을 擇하였다.

4. 實驗方法

D. magna 는 1.5l 容量의 유리水槽에서 培

Table 2. Applied concentration of heavy metals

Compound	Element	Concentration (mg/l)
K ₂ Cr ₂ O ₇	Cr	0.23 ~ 1.40
CuSO ₄	Cu	0.201 ~ 0.114
CdCl ₂	Cd	0.042 ~ 0.055
ZnCl ₂	Zn	0.89 ~ 1.40
pH		3.5 ~ 11.0

Table 3. Composite ingredients for *D. magna* Culture medium

Reagent	Concentration (mg/l)
NaHCO ₃	192
CaSO ₄ · 2H ₂ O	120
Mg SO ₄	120
Kcl	8
pH	8
Hardness	169
Alkalinity	110

養液 1l 에 20 個體式 태어난지 24시간 以下의 동일한 크기로 培養을 始作하여 最小限 2 個月동안 馴化시킨 후 實驗을 行하였다.

毒性實驗은 태어난지 24시간 以下の 어린 個體를 5마리씩 重金屬 試藥의 處理濃度<Table 2>에 따라 4 反復으로 暴露시켰다.

EC₅₀ 값을 얻기 위한 毒性評價는 容器속의 實驗水를 約 5秒間 유리막대로 저어준 후 움직이지 않는 個體數를 基準으로 하였다.

D. magna 에 대한 重金屬의 毒性實驗期間은 24時間 또는 48時間으로 하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

D. magna 의 生存率에 影響을 미치는 汚染物質의 毒性은 主로 生物因子는 물론 毒性物質의 種類와 特性, 水素이온濃度, 硬度和 같은 無生物的 要素 그리고 暴露時間에 左右된다.

水素이온濃度, 즉 pH는 實驗條件에서 *D.*

*magna*가 생존하고 繁殖하는데 適合한 中性範圍로 定하였으나 水素이온의 特性이 指標生物에 毒性을 나타내며 産業廢水는 生活下水와 달리 業種에 따라 pH의 變動幅이 크다는 點을 勘案할 때 그것이 비록 有害性 重金屬이 아니지만 檢討의 價値가 있는 것으로 判斷되어 <Fig. 1>과 같은 結果를 얻어다. 溫度, 硬度 등을 一定하게 維持시키면서 pH값을 10個 等級으로 變化시켰을 때 *D. magna*는 pH 3.5와 pH 11

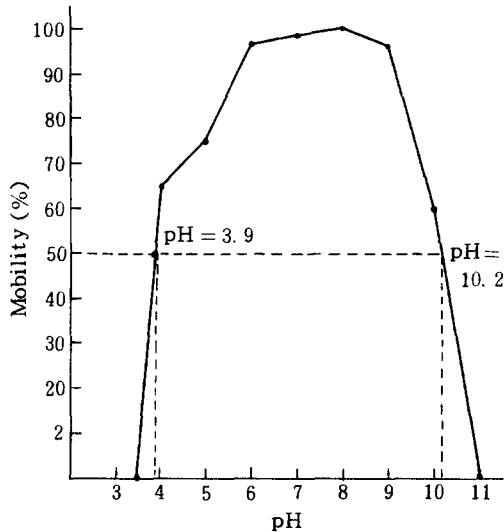


Fig. 1. 48hr-EC₅₀ of [H⁺]

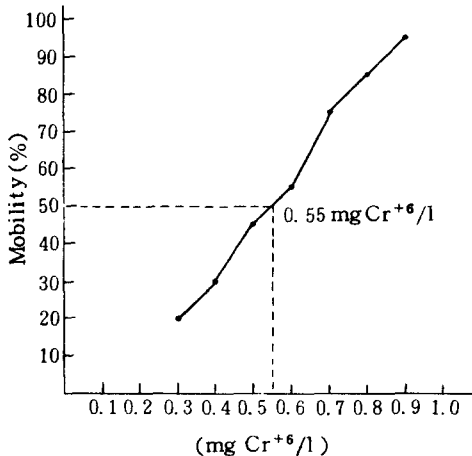


Fig. 2. 48 hr EC₅₀ of K₂Cr₂O₇

에서 한 個體도 生存할 수 없었고 中性附近인 6~8에서는 生存率에 큰 差異가 없었다.

48 hr-EC₅₀ 값은 pH 3.9 및 10.2로서 pH 7.0을 基準으로 한다면 酸性과 알카리성 共히 pH 3.0程度의 增減에서 EC₅₀ 값이 얻어짐을 觀察할 수 있었다.

毒性評價 基準藥劑로 OECD가 選定한 K₂Cr₂O₇ (OECD reference chemical)에 대한 報告된 實驗結果를 보면 48 hr EC₅₀ 값은 1.3~1.7mg/l 이고 24 hr EC₅₀ 값은 0.9~1.5mg/l 이다.^{2,6,7)} 本 實驗에 있어서 7個濃度에 대한 48 hr EC₅₀ 값은 0.55 mg/l 로 <Fig. 2>와 같다. 文獻에 나타난 數値는 約 3倍程度가 높으나 最近 朴(1989)⁸⁾이 行한 研究結果는 48 hr EC₅₀ 값이 0.53~0.76mg/l 로 本 實驗結果와 거의 같은 水準을 나타내고 있다.

同一한 方法으로 遂行된 카드뮴(Cd²⁺), 동(Cu²⁺) 및 아연(Zn²⁺)에 대한 實驗結果는 각각 <Fig. 3>, <Fig. 4> 및 <Fig. 5>와 같고 48 hr EC₅₀ 값은 0.033mgCd²⁺/l, 0.17 mgCu²⁺/l 및 1.10mg Zn²⁺/l 이다.

얻어진 EC₅₀ 값을 文獻에 나타난 數値와 比較할 때 크름은 標準藥劑에 比하여 낮은 結果

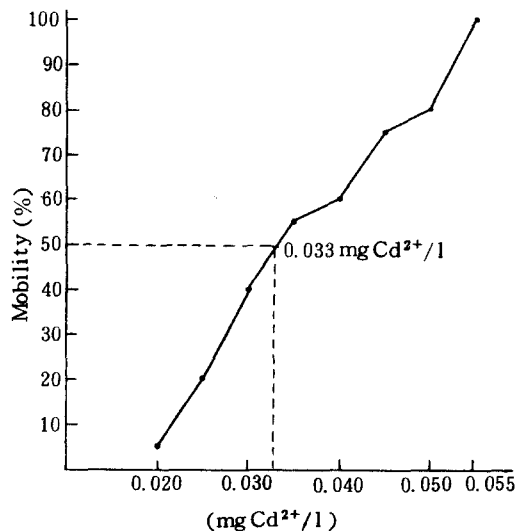


Fig. 3. 48 hr EC₅₀ of CdCl₂

를 얻었고, 카드뮴은 正常範圍에 있으며 동 및 아연의 경우는 다른 平均値에 比하여 約 40% 정도 높게 나타났다.⁹⁾ 일부 실험치가 약간 높게 나타난 이유는 實驗生物의 特性, 물의 이온 組成, 硬度 등의 差에서 基因된 것으로 사료 된다.

産業廢水의 實驗 毒性評價를 위하여 경기도

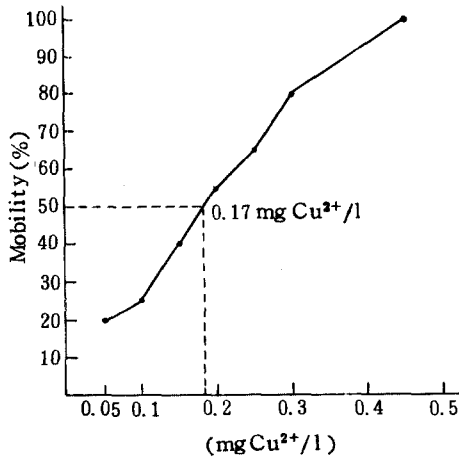


Fig. 4. 48 hr E C₅₀ of CuSO₄

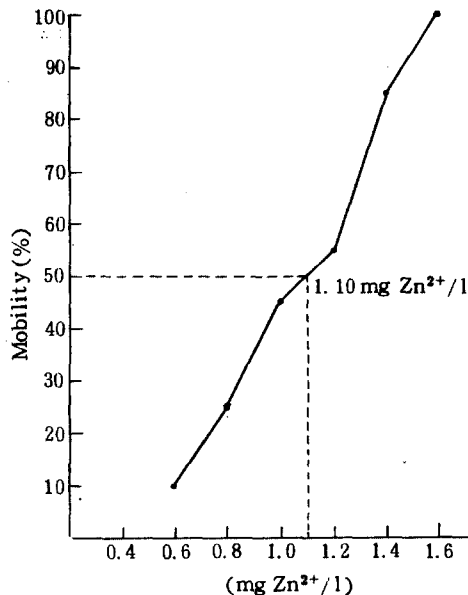


Fig. 5. 48 hr EC₅₀ of ZnCl₂

양주군에 所在한 “I” 鑛金業體의 原廢水를 採水하여 24 hr EC₅₀ 값을 測定하고 그로부터 排出賦課金 算定의 基礎資料로 活用할 수 있는 等價毒性値(Equitox)를 求하였다. 原廢水 試料 中에는 鑛金原料로 부터 發生되는 구리, 아연, 시안, 鑛金處理液으로 부터의 6가 크롬, N-hexane 抽出物, COD誘發物質 등이 含有되어 있었다.

例와 같이 産業廢水는 單種의 有害汚染物質만이 存在하는 것이 아니라 複合汚染을 이루고 있기 때문에 汚染物質間의 相乘作用(synergism)과 拮抗作用(antagonism)이 있을 수 있다. 또한 使用水質과 重金屬 以外의 有機汚染物質에 의해서 影響을 받을 수 있다. 原廢水 試料에 대한 毒性評價 事例는 <Table 4> 및 <Fig. 6>와 같다.

<Fig. 6>로 부터의 24 hr EC₅₀ 값은 約 4.3%이다. 구한 값을 K₂Cr₂O₇ 標準試藥에 대한

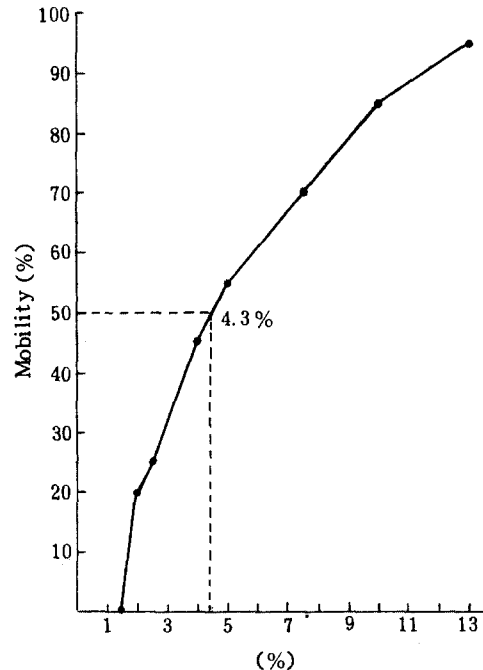


Fig. 6. 24 hr EC₅₀ of a metal surface treatment wastewater

Table 4. Acute toxicity test for a metal surface treatment wastewater

Sample concentration(%)	Daphnies mobiles Per beaker				T	P
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄		
1.5	5	5	5	5	20	0
2.0	4	4	5	5	18	20
2.5	3	3	4	5	15	25
3.5	2	3	3	3	11	45
5.0	3	2	2	2	9	55
7.5	2	1	2	1	6	70
8.5	2	1	1	—	4	80
10	1	1	1	—	3	85
13	—	1	—	—	1	95
15	—	—	—	—	—	100

T : mobiles (EA)

P : imbnobili (%)

24 hr EC₅₀ 값 1.2 mg/l 로 補正하면 다음과 같은 計算에 의하여 9.38% 를 얻는다.

補正 24 hr EC₅₀

$$= 24 \text{ hr EC}_{50} \times \frac{C_0}{C_1}$$

여기서 C₀ : K₂Cr₂O₇ 標準 24 hr EC₅₀ (1.2 mg/l)

C₁ : K₂Cr₂O₇ 24 hr EC₅₀

C₁ = 0.55 mg/l 이면

補正 24 hr EC₅₀

$$= 4.3\% \times \frac{1.2 \text{ mg/l}}{0.55 \text{ mg/l}} = 9.38\%$$

따라서 等價毒性 (Equitox)

$$= \frac{100}{9.38} = 10.66 \text{ equitox/m}^3$$

즉, K₂Cr₂O₇ 標準藥劑의 24 hr EC₅₀ 값의 10 배 이상 單位容積 m³ 당 毒性이 있는 廢水이다. 排出賦課金 算定은 單位等價毒性當의 單價를 乘하므로서 가능하다.

IV. 結 論

産業廢水에 대한 毒性評價가 全無한 實情에서 本研究은 毒性物質에 대하여 感受성이 크

고 生週期가 짧으며 魚類의 먹이인 *D. magna* 를 利用하여 有害汚染物質 중 몇가지 重金屬에 대한 EC₅₀ 및 한 鑛金廢水의 複合的인 EC₅₀ 값을 求하고 排出賦課金 算定의 基礎資料로 活用할 수 있는 等價毒性 (Equitox) 值의 算出方法을 例示하였다. 여기에 發表된 實驗結果는 얻어진 그대로 나타낸 것이며, 統計學的으로 Probit, Logit, Litchfield-Wilcoxon, 回歸分析 등의 調整方法을 活用하여 實驗值의 解釋을 도울 수 있을 것이라 本 研究實驗으로부터 얻어진 結果는 다음과 같다.

1. 單一毒性項目에 대한 *D. magna* 의 生存率은 毒性物質의 濃度와 거의 線型으로 比例하였다.

2. 複合的인 汚染物質을 含有한 鑛金工場廢水에 대한 指標生物의 生存率은 廢水濃度와의 關係에서 曲線變化를 나타내어 單一項目의 경우와 큰 差異를 보여 주었다.

3. 標準藥劑(K₂Cr₂O₇)의 品質을 統一하고 合理的인 方法으로 EC₅₀ 값을 求할 수 있다면 等價毒性 (Equitox) 值의 算出方法은 水質管理에 매우 有用할 것으로 判斷되었다.

4. 複合廢水의 경우 廢水의 性狀別 相乘作用

및 吉抗作用을 究明하므로서 毒性評價의 科學的인 分析的 기틀을 마련해 줄 수 있을 것으로 생각된다.

5. *D. magna* 는 國內에 分布되어 있지 않으므로 尙금가는 國內指標生物의 研究開發이 要求된다.

6. 慢性毒性에 관한 等價毒性의 開發 研究가 要求된다.

參 考 文 獻

1. APHA (1985): Standard Methods for the examination of water and wastewater, 16. ed.
2. Afnor, eaux methodes d'essai, 1986.
3. Anonymous (1975), Methods for Acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. EPA-600/3-75-009.
4. Anonymous(1980), *Daphnia magna* Stock maintenance procedures. Shell Co., SBT SOP No. 36.
5. Anonymous (1981), OECD Guideline for testing of chemicals. OECD, Paris.
6. Adema, D.M.M. (1978), *Daphnia* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 59(2): 125-134.
7. Muller, H.G. (1980), Acute toxicity of potassium dichromate to *D. magna* as a function of the water quality. *Environ. Contam. Toxicol.* 25: 113-117.
8. 朴貞圭, *Moina retrostris* 와 *Daphnia magna*의 農藥感受性과 그 研究를 위한 實驗方法의 標準化 確立, 서울大學校 碩士學位論文, 1989
9. Mance, G., (1987), Pollution threat of Heavy metal in aquatic environments, E/Sevier Applied Science.