

*Ceriodaphnia dubia*의 온도조절에 근거한 단기급성독성 조사법

박종호* · 이상일¹ · 조영욱¹ · 이원호² · 연익준³ · 조규석
 충청북도내수면연구소, ¹충북대학교 환경공학과, ²충주대학교 도시공학과, ³충주대학교 환경공학과

Rapid Bioassay Technique Based on Temperature Control of *Ceriodaphnia dubia*

Jong Ho PARK*, Sang Ill LEE¹, Young Oak CHO¹, Won Ho LEE²,
 Ik Jun YEON³ and Kyu Seok CHO

Department of Inland Fisheries Research Institute, Chung Cheong Buk-Do, Chung-ju 380-250, Korea

¹Department of Environmental Engineering, Chung Buk National University, Cheong-ju 361-763, Korea

²Department of Construction & Urban Engineering, Chung Ju National University, Chung-ju 380-702, Korea

³Department of Environmental Engineering, Chung Ju National University, Chung-ju 380-702, Korea

A method for rapid acute toxicity test based on temperature control of *Ceriodaphnia dubia* has been developed and evaluated. A new toxicity test based on temperature control (TTBTC) which are based on temperature control, was developed and compared for the adsorption of the better methodology for short-term toxicity screening. Initially, daphnid larval are exposed to toxicants and at the same time the temperature of the water bath containing media is increased to high temperature (35.5°C). After 1.25 hrs of contact time, the number of the daphnids, either living (no toxic effect) or dead (toxic effect), is counted by the naked eyes. Effect of exposure time on test sensitivity was not significantly different between 1 to 1.5 hr. Comparison of the rapid 1.25 hr acute toxicity test developed in this study and the standard 48 hr acute toxicity test using heavy metals, cyanide and pentachlorophenol indicated that the 1.25 hour test provides an acceptable level of sensitivity in toxicity test for *C. dubia*.

Key words: *Ceriodaphnia dubia*, Acute toxicity test, Toxicants, TTBTC, Heavy metal

서론

산업 기술의 발달로 인하여 자연계에 존재하지 않았던 많은 새로운 물질 (xenobiotics)들이 자연생태계 내로 유입되고 또한 수중 생태계로 다수의 유해화학물질이 유입됨에 따라 상수원으로 이용되는 수자원이 심각하게 오염의 영향을 받고 있다. 특히 수질오염사고는 불특정 다수에게 큰 피해를 줄 수 있다는 특성 때문에 무엇보다도 사전 예방이 중요하다. 기존의 물리, 화학적 기기분석을 통하여 수질의 변화를 파악하기 위해서는 최소한 몇 시간이 소요되므로 오염물질이나 독성화학물질을 파악하여 예방하는 데에는 그 시간적 적절성이 부족하였다. 또한 기기분석에 따른 단일 화학물질의 종류와 양을 밝히는 것은 종합적인 수중독성의 파악에는 큰 효과가 없다. 이런 경우는 유독물질에 대하여 반응을 빨리 나타낼 수 있는 수중생물을 이용하는 것이 바람직하다.

최근에는 물벼룩의 생육특성을 응용하여 상수원수의 수질 오염에 의한 피해를 사전에 방지할 목적으로 수질감시 장치에 물고기나 물벼룩을 이용하고 있다 (Giesy et al., 1988; Lee et al., 1993; Lee and Lee, 1996; Lee et al., 2002; Park, 2003). 독성을 측정하는 방법은 간편하고, 경제적이며, 신속하고, 결과의 반복성이 있어야 하며, 또한 유기 및 무기물질, 소수성 및 친수성 기질 등 독성물질의 성상에 관계없이 정확하고

신뢰도가 높아야 한다. 일반적으로 미생물 (박테리아, 균류, 조류 및 동물성플랑크톤)을 이용한 독성조사방법들이 어류를 이용한 방법보다 신속하고 경제적이다. 짧은 시간에 독성을 알기 위해서는 신물질에 노출된 무척추동물의 EC₅₀, 미생물의 효소활동 (enzyme activity), ATP량의 변화로 측정하거나, 호흡률 (respiration rate) 혹은 세포의 생존율 (viability)을 측정하는 방법들이 있다 (Bitton, 1983; Bitton and Dutka, 1986; Liu and Dutka, 1984; Bitton and Koopman, 1992; Bitton et al., 1992). United State Environmental Protection Agency에서는 유기 및 무기 독성물질에 모두 민감한 방법으로 물벼룩 (*Daphnia*)에 의한 bioassay법을 권장하고 있다 (USEPA, 1989). 이는 물벼룩 자체가 독성물질에 노출되고나서 일정 기간 후의 생사 여부로 독성을 측정하는 방법으로 독성 측정 시에 장시간 (48시간)이 요구되는 점이 단점이다. 특히 폐수 중에 들어있을지 모르는 독성물질이나 유해폐기물의 독성을 측정하여 신속하고 효과적인 관리를 하기 위해서는 상기 방법으로는 어려움이 많다. 따라서 최근들어 Bitton 등 (1986)이 무척추 동물인 *Ceriodaphnia dubia*을 이용하여 독성물질에 40-60분간 접촉시 *C. dubia*에게 이들의 자연적인 먹이로 이용되는 yeast cell에 독성이 없는 fluorochrom인 5-(4,6-dichlorotriazin-2-yl) amino floorescein (DTAF)로 염색시킨 먹이를 공급하여 20분간 섭취시킨 후, 형광현미경 (epifluorescent

*Corresponding author: jhpark@cb21.net

microscope)을 이용하여 장내의 먹이를 관찰하여 섭생여부를 측정하는 방법으로서 독성조사에 대해 좋은 결과를 보이고 있으나 형광현미경을 사용하는 등 측정에 필요한 장비가 비싸다는 단점이 있어 대중화하는 데는 문제가 있다.

화학물질의 독성은 온도와 같은 비생물적인 변수에 의해 영향을 많이 받는다 (Lydy et al., 1990). 온도가 증가함에 따라 독성은 증가할 수 있으며, 반대로 온도가 증가할수록 독성이 감소할 수도 있다. 수중 생물은 수온이 10°C 변함에 따라서 유기화학물질에 의한 독성을 2-4배 정도 달리 받는다고 한다 (Mayer and Eilersieck, 1988). 고등동물인 어류 (Lester et al., 1970)나 rotifer (Liu and Dutka, 1984)도 노출온도에 따라 독성물질에 의한 피해가 달라진다. Shcherban (1979)은 여러 온도 조건에서 *Daphnia magna*의 증금속에 대한 독성평가를 수행하여 온도에 따른 *D. magna*의 독성영향 결과를 제시하였다.

본 연구는 인체 및 여러 생물체에 유해하게 작용하는 몇 가지 유해 증금속 및 독성물질에 대해 USEPA (USEPA, 1989)에서 권장하는 *C. dubia*를 이용하여 독성물질에 *C. dubia* 유생을 노출시킬 적에 물리적인 환경요인 중 온도를 기존 조건 (20-25°C)보다 높혀 측정시간을 단축시키는 새로운 독성조사법을 정립하고자 하여 Toxicity Test Based on Temperature Control (TTBTC) 조사법을 처음으로 시도하였으며, 아울러 기존의 48시간 독성조사법과 독성에 대한 민감도를 상호 비교하였다.

재료 및 방법

*C. dubia*의 배양

본 실험에서는 증금속과 유기화합물에 민감한 *C. dubia*를 독성실험대상물로 사용하였다. 배양액은 Park (2003)에 의거하여 중수 (moderate hardwater)를 사용하였고, 그 조성은 Table 1과 같다. 배양온도는 항온조를 이용하여 25°C로 유지하였고, 충분히 공기를 주입하기 위해 폭기장치로 수표면을 폭기시키고, 조명은 형광등으로 하였으며, 빛의 강도는 약 10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (50 to 100 ft-c)로 유지하였고, 명암주기 16:8(L:D)의 광주기로 조절하였다. 배양액의 교환은 주 1회로 하고, 배양액 교환에 의한 상기 생물이 받을 충격을 줄이기 위해 배양액 교환은 2/3 이하로 하였다. *C. dubia*를 새 사육 용기로 옮길 때는, 개구부의 끝을 잘라 크게 하고 날카롭지 않게 미리 손질하여 둔 피펫을 사용하였다. 사육수를 교환할 때 어미 물벼룩과 새끼 물벼룩을 따로 나누고, 항상 새끼를 낳을 수 있는 상태의 어미 물벼룩이 들어있도록 준비하였다. *C. dubia*의 먹이는 YTCA (Yeast, Trout Chow, Alfalfa)를 일주일에 세

Table 1. Composition of moderate hardwater (Park, 2003)

Composition	Concentration, mg/L
NaHCO ₃	96.0
CaSO ₄ ·2H ₂ O	60.0
MgSO ₄	60.0
KCl	4.0

번씩 먹였다. YTCA의 조성은 다음과 같다. Trout chow 9.45 g, dried yeast 3.9 g 및 dried alfalfa 0.75 g을 혼합하고 증류수를 750 mL 더한 후 5분간 mixer로 갈았다. 그 후, 1시간 동안 냉장고에 넣어 입자를 가라앉히고 상부 300 mL를 따라서 50 mL plastic cup에 나누어 넣어 냉동보관시키고, 실험에 사용하였다.

시약제조

모든 시약의 제조에는 2차 증류수를 사용하였으며, 독성을 조사하기 위한 독성물질은 CdCl₂·²/₃H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, KCN, PCP (pentachlorophenol), phenol 등으로 모두 Junsei Chemical Co. (日本)의 특급시약을 사용하였다.

증금속류인 Cd, Zn, Cu 등은 100 ppm의 모액을 만들었고, 음이온인 CN의 경우는 1,000 ppm, 유기독성인 PCP는 1,000 ppm, phenol의 경우는 2,000 ppp의 모액을 만들어 사용하였다. 각 독성물질의 실험시 사용농도는 Table 2와 같이 조절하여 사용하였다.

Table 2. Composition of each toxicant used for toxicity testing

Toxicants	Concentration tested (ppb)
Cadmium	40, 60, 80, 100, 120
Zinc	40, 60, 80, 100, 120
Cyanide	10, 20, 30, 40, 50, 60
PCP	40, 60, 80, 100, 200, 500, 800
Phenol	40, 60, 80, 100, 120, 400, 600

온도 및 접촉시간에 따른 *C. dubia*의 생존율 조사

25±1°C로 배양하던 *C. dubia*를 온도를 올린 상태에서 독성물질에 접촉하였을 적에 생존에 미치는 영향을 알아보았다. 즉, 50 mL 비이커에 19 mL의 배양액을 채우고 water bath를 이용하여 배지의 온도를 소정의 온도로 올린 후, 각각의 비이커에 *C. dubia*를 각각 10마리씩 넣고 독성물질에 노출시켰다. 대조군이 생존에 영향을 받지 않는 온도범위와 접촉시간을 알아보려고 온도를 35.5, 36.0, 36.5, 37.0°C로 조정하고 접촉시간을 200분까지 관찰하여 생존개체를 헤아렸다. 이러한 실험은 10회 반복하여 관찰하였다.

독성 평가시험

표준 48시간 독성조사법 (USEPA, 1989; OECD, 2000)과 TTBTC 독성조사법 두 가지를 행하였다. 실험에 사용하는 대상 생물이 어릴수록 독성물질에 민감함으로 태어난지 24시간 이내인 *C. dubia*의 유생 (young juvenile)을 이용하여 독성실험을 행하였고, 실험기간 중에 먹이는 제공하지 않았다. 표준 48시간 독성조사법은 *C. dubia*배양액에 *C. dubia*의 유생을 각각 10마리씩 넣고 독성실험을 행하였다. 정적인 독성실험에서 실험생물을 각 비이커에 넣어 48시간 유지시켰다. *C. dubia*의 실험온도는 25°C이었다. 48시간 LC₅₀값은 각각의 독성농도와 공시료에서 살아있는 *C. dubia*의 수를 세어 결정하였다. TTBTC 독성조사법은 25±1°C에서 배양되던 *C. dubia*를 온도

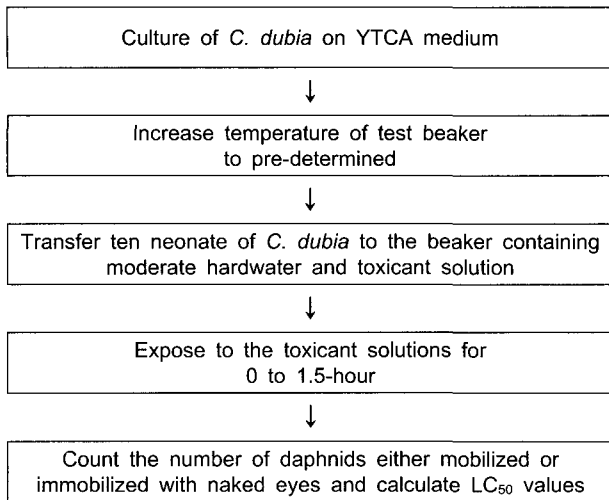


Fig. 1. Experimental protocol for toxicity test based on temperature control (TTBTC).

를 올린 상태에서 독성물질에 접촉시켜 독성조사를 실시하였다. 실험절차는 Fig. 1과 같다.

위의 실험에서 대조군의 생존에 영향을 미치지 않는 적정 온도 범위와 접촉시간의 결과를 바탕으로 *C. dubia*를 각각 10마리씩 20 mL의 같은 배양액과 함께 50 mL의 비이커에 옮긴 후 소정의 독성물질을 첨가하여 0-1.5시간 접촉 후 물벼룩의 유영저해도를 살펴보고 움직이는 것과 움직이지 않는 개체의 *C. dubia*의 개체수를 세었다. 여기서 생존여부의 기준은 시료가 든 비이커를 약하게 2-3회 회전시킨 다음 움직이는 것은 생존한 것으로 간주하며 그렇지 않은 것은 치사한 것으로 간주하였다. 실험 개체의 50%에 영향을 미치는 독성농도인 LC₅₀은 실험자료를 이용하여 USEPA (1994)에 의해 개발된 컴퓨터 통계프로그램 (toxnal)을 사용하여 1 hr, 1.25 hr, 1.5시간 및 48시간 독성실험에서 각각의 LC₅₀값을 구하였다.

통계 분석

본 실험에서는 통계분석을 위해 Probit method를 사용하였다. Probit method는 적어도 두가지 농도에서 mortality가 실험에서 구해졌을 때 사용한다. Probit analysis에서 영향받은 생물의 농도는 Probit (probability units)로 전환되고, 독성농도는 logarithm으로 전환된다. Probit과 logarithm value사이의 관계는 대략적으로 직선을 나타낸다. Data point로 이루어진 Probit regression line draw는 EC₅₀값과 그것의 정확도를 측정하기 위해 사용된다. 본 프로그램을 사용하기 위해서는 대조군을 제외한 독성물질 노출농도의 수가 3개 이상 20개 이하이어야 하며, 적어도 두가지 농도에서 0%보다 크고 100%보다 mortality 반응을 보여야 한다.

결과 및 고찰

온도 및 접촉시간에 따른 생존율

온도를 올린 상태에서 독성물질에 노출시킨 *C. dubia*가 치

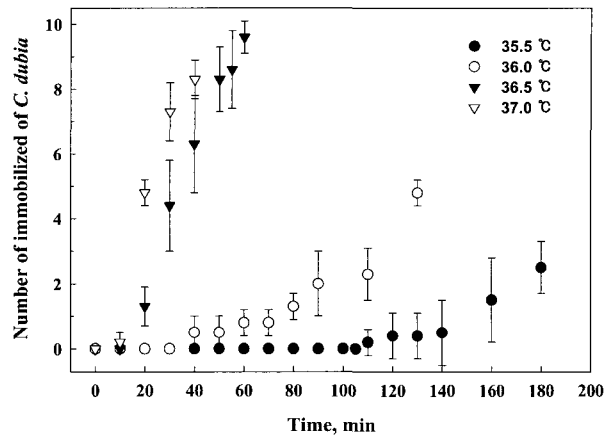


Fig. 2. Effect of exposure time and temperature on survival of *Ceriodaphnia dubia*.

사되었다면 이것이 온도의 영향인지 독성물질의 영향인지 구별하기는 매우 곤란하다. 따라서 *C. dubia*가 온도변화에 따라 치사하는 정도를 조사한 결과 (Fig. 2), 35.5°C에서는 초기 100분까지는 사망한 개체가 없다가 110분이 경과하면서 서서히 사멸하기 시작하였으며, 36.0°C에서는 사멸시간이 조금 빨라져 40분부터 사멸하는 것을 관찰하였다. 온도를 더욱 올리면 사멸하기 시작하는 시간이 더욱 빨라져 36.5°C의 경우에는 20분부터, 그리고 37.0°C에서는 10분부터 사멸하기 시작하였으며, 이 온도에서는 약 40분이 경과하자 대부분 사멸하였다. 따라서 *C. dubia*가 온도에 대한 영향을 최대한 받으면서 대조군이 사멸하지 않는 온도 및 접촉시간 범위는 35.5°C에서 100분 이내로 결정하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

중금속 독성실험

*C. dubia*의 유생을 카드뮴, 구리, 아연 등의 중금속에 노출시키고 표준 48시간 독성조사법 및 TTBTC법으로 독성을 각각 측정하였다. 온도 35.5°C에서 1, 1.25 및 1.5 hr을 접촉시켰을 경우에 각 독성물질의 영향은 Fig. 3과 같다.

독성물질은 모두 노출시간이 증가함에 따라 LC₅₀이 감소하였으며, 1.5 hr의 노출시간에서는 표준 48시간 독성조사법의 결과와 비교하여 LC₅₀값이 유사하거나 약간 낮았다.

카드뮴의 경우 1.25, 1.5 및 48 hr에서 평균 LC₅₀값은 각각 46.0, 34.2 및 40.1 ppb이었다. 표준 48시간 독성조사법의 결과 (40.1 ppb)와 비교해 보면 1.5 hr에서와 비슷하였다. 구리의 경우, 접촉시간에 따른 LC₅₀값은 24.9(1 hr), 19.2(1.25 hr), 14.3(1.5 hr), 14.6(48 hr) ppb 이었으며, 카드뮴과 마찬가지로 노출시간이 길어지면서 독성이 커졌다. 95% 신뢰구간을 비교하면 1.5 hr의 결과가 48 hr보다 민감하게 나타났으며, 1.25 hr의 결과와도 많은 차이가 나지 않음을 알 수 있었다. 아연은 1.25 hr와 1.5 hr에서 유사한 값을 보였다.

중금속 물질에 대한 전체적인 경향은 노출시간이 증가할수록 LC₅₀이 감소하였고 노출시간이 1.5 hr일 때 표준 48시간 독성조사법의 결과값과 유사하게 나타났다.

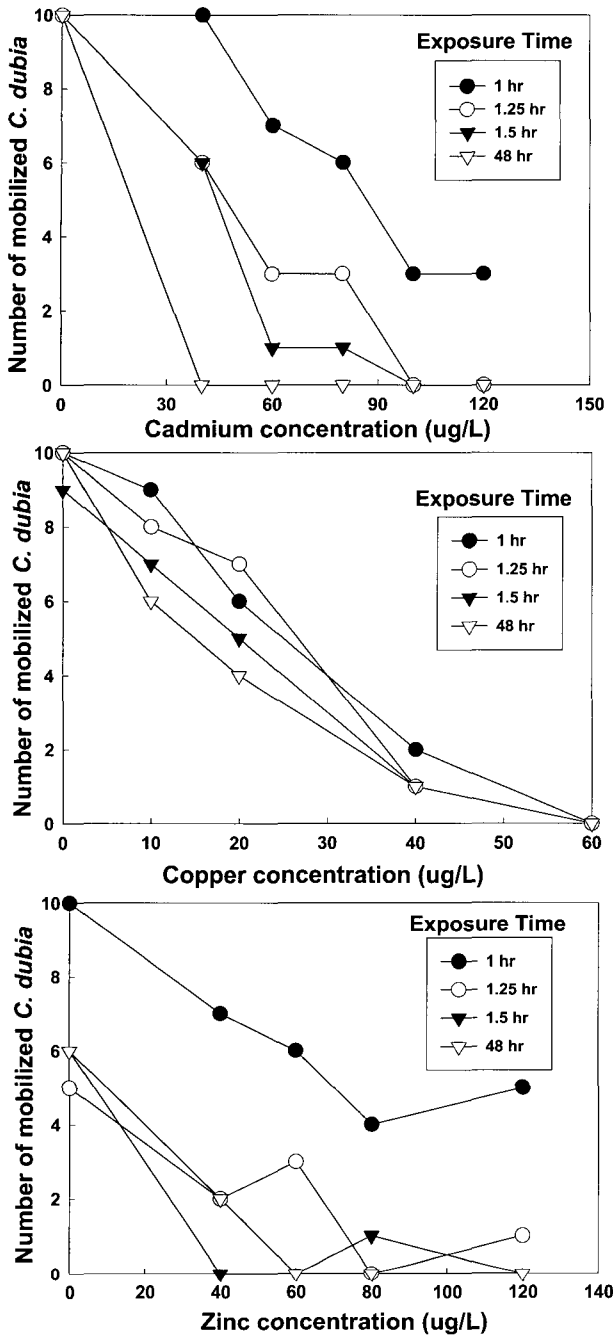


Fig. 3. Effect of toxicant exposure time and toxicant concentration on mobilized of *Ceriodaphnia dubia*.

유기독성 및 음이온 독성실험

음이온 독성인 시안도 중금속의 경우와 유사하게 온도가 증가함에 따라 LC₅₀이 감소하였으며, 1.5 hr 노출시켰을 때 48 hr 독성조사법의 LC₅₀인 0.290 ppm보다도 낮은 0.208 ppm이 측정되었다 (Fig. 5). 유기독성인 PCP와 Phenol도 중금속 독성 및 시안 독성과 마찬가지로 온도가 증가하면서 LC₅₀이 감소하였다 (Fig. 5). 48시간 독성조사법과 비교하여 Phenol은

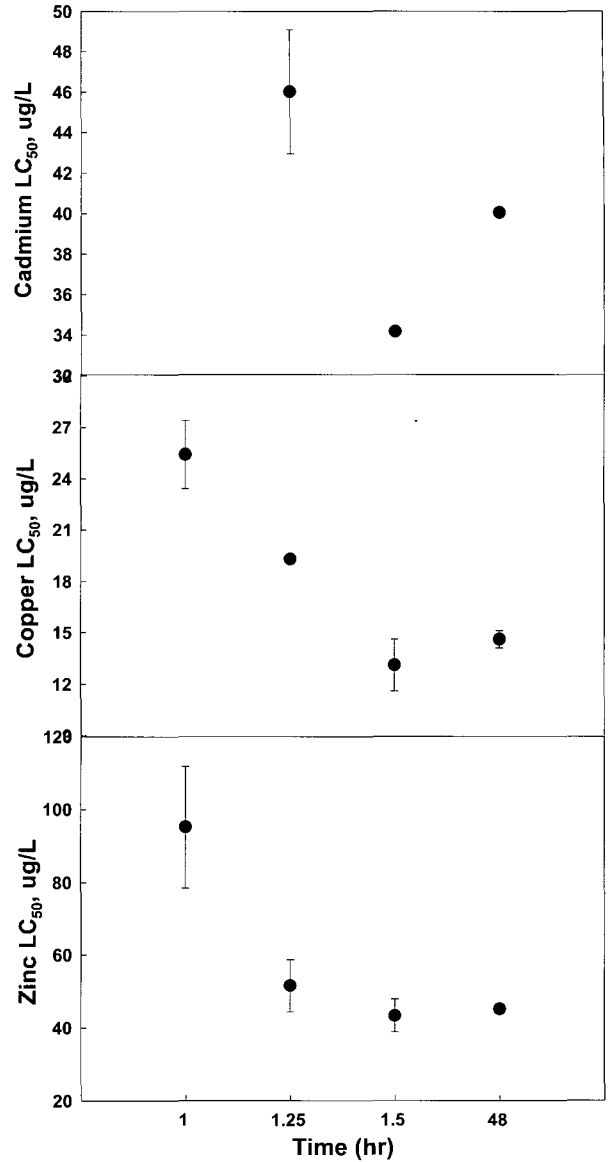


Fig. 4. Effect of toxicant exposure time on LC₅₀ values. Bar indicates 95% confidence interval.

1.2배 (1.25 hr), 0.7배 (1.5 hr)였다. 즉, 노출시간이 길어질수록 48시간 독성조사법의 결과와 유사하거나 더 민감하게 관찰되었다. 이때 48시간 독성조사법 및 TTBTC조사법에서 시험 초기 및 종료 후 독성물질의 농도 차이는 20% 범위를 넘지 않았다.

타 독성조사법 결과와의 비교

TTBTC독성조사법과 기타 단기독성조사법인 표준 48시간 독성조사법, 1시간 CerioFAST™법, 1시간 I.Q.법, 30분 Microtox법, 96시간 무지개송어 노출실험에 대한 카드뮴, 구리, 아연 등 중금속과 음이온인 CN 및 유기독성물질인 pentachlorophenol (PCP)의 독성을 기보고된 결과와 비교한

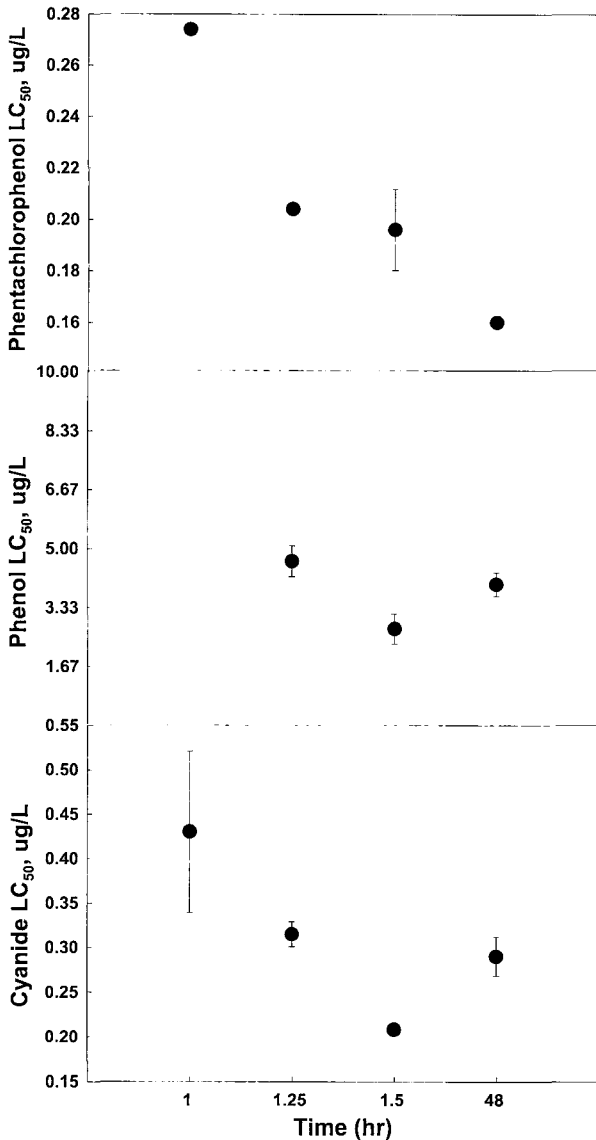


Fig. 5. Effect of toxicant exposure time on LC₅₀ values. Bar indicates 95% confidence interval.

것이 Table 3이다. TTBTC독성조사법, 1시간 CerioFAST™법은 측정된 독성물질에 대해 상당히 유사한 독성을 보였으며, 특히 음이온성 CN류에 매우 민감한 것으로 독성을 신속히 측정할 수 있어 최근 독성조사법으로 많이 이용되고 있는 Microtox법의 결과와 본 연구에서 수행한 TTBTC법의 결과를 비교하면, 온도증가를 이용한 TTBTC 독성조사법이 중금속인 경우 10-300배 민감함을 알 수 있으며, 음이온인 CN인 경우는 16배 민감하고, 유기독성 Phenol의 경우는 약 2배 가량 민감하게 나타났다.

본 실험으로 얻은 결론은 표준 48시간 조사법으로 실험시 얻은 결과와 크게 차이가 없으며, 또한 기보고된 값의 범위에 포함됨을 알 수 있었다 (Cd=40.1 μg/L, Cu=14.6 μg/L, Zn=45.2 μg/L, PCP=0.2 mg/L). 또한, TTBTC 독성조사법은 별도

의 고가 장비나 비싼 시약을 요구치 않아 타 독성조사법에 비해 보다 경제적인 독성조사법으로 사료된다.

TTBTC법의 서로 다른 접촉시간 특히, 1.25-hr에서 표준 48시간 급성독성조사법과 좋은 상관관계가 있음이 관찰되었으며, 이것은 화학적인 발광을 이용한 Microtox법, *Daphnia magna*의 β-galactosidase의 inhibition을 이용한 I.Q. test, 무지개송어를 이용한 96 시간 노출시험 범위에 포함됨을 알 수 있었다. 1.25-hr TTBTC법과 CerioFast™은 적어도 중금속 테스트에서는 거의 유사한 민감도를 가짐을 알 수 있었다.

따라서 TTBTC독성조사법이 새로운 독성물질 스크리닝 방법으로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다. 또한 독성조사법으로써 사용되기 위해서는 보다 다양한 종류의 독성물에 대한 시험이 이루어져야 할 것이며, 독성조사법에 가장 민감한 외부조건인 온도의 정확한 제어가 이루어질 수 있도록 후속된 연구가 필요한 것으로 사료된다.

참고 문헌

Aqua Survey, Inc. 1991. Aqua Survey Newsletter, Publication 800. Flemington, NJ, pp. 654-684.

Bitton, G. 1983. Bacterial and biochemical tests for assessing chemical toxicity in aquatic environment, a review. *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, 13, 51-67.

Bitton, G. and B.J. Dutka. 1986. Toxicity Testing Using Microorganism (Vol 1 and 2). CRC Press, Boca Ranton, FL, pp. 27-55.

Bitton, G. and B. Koopman. 1992. Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in the environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 125, 1-22.

Bitton, G., B. Koopman and O. Agami. 1992. MetPAD™: A bioassay for rapid assessment of heavy metal toxicity in wastewater. *Water Environ. Res.*, 64, 834-846.

Bitton, G., K. Rhodes and B. Koopman. 1996. CerioFAST: an acute toxicity test based on *Ceriodaphnia dubia* feeding behavior. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 123-131.

Dutka, B.J., N. Nyholm and J. Petersen. 1983. Comparison of several microbiological toxicity screening tests. *Water Res.*, 17, 1363-1368.

Giesy, J.D., R.L. Graney, C.J. Rousiu and A. Benda. 1988. Comparison of three sediment bioassay methods using Detroit river sediment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7, 486-498.

Janssen, C.R. and G. Personne. 1993. Rapid toxicity screening tests for aquatic biota. 1. Methodology and experiments with *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, pp. 711.

Khargarot, B.S. and P.K. Ray. 1987. Correlation between heavy metal acute toxicity values *Daphnia magna*

Table 3. Values of LC₅₀ of the selected inorganic and organic chemicals as determined by TTBTC and 48-hr acute bioassay

Chemicals	The present study		The previous studies			
	75-min (TTBTC)	48-hr acute bioassay	1-hr CerioFAST ^a	1-hr I.Q. test ^{b,c}	30-min Microtox	96-hr Rainbow trout
Copper (μg/L)	19.3±0.73	14.6±0.54	14	230	130-3,800 ^c	250 ^{h,i}
Zinc (μg/L)	51.6±7.18	45.2±1.0	59	4,300	680-3,400 ^d	0.55-2.2 ^{g,h}
Cadmium (μg/L)	46.0±19.3	40.1±0.17	54	410	5,400-60,000 ^d	550-2,200 ^{g,h}
Cyanide (mg/L)	0.32 ^f ±0.014	0.289±0.022	-	-	4.8 ^g	-
Pentachlorophenol (mg/L)	0.204±0.004	0.160±0.006	0.53	0.33-1.0	0.99 ^e	0.2-0.6 ^{g,h}
Phenol (mg/L)	13.9±1.315	11.9±0.99	-	-	21-34 ^e	9.9 ^g

^aBitton et al. (1996).^bAqua Survey, Inc. (1991).^cJanssen and Persoone (1993).^dKong et al. (1995).^eDutka et al. (1983).^fRibo and Kasier (1987).^gKhargarot and Ray (1987).^hMunkittrick et al. (1991).ⁱSignificantly different from 48-hr EC₅₀ at P<0.05.

- and fish. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 38, 722-726.
- Kong, I.C., G. Bitton, B. Koopman and K. Jung. 1995. Heavy metal toxicity testing in environmental samples. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 142, 119-147.
- Lee, C.W., Y.T. Kwon, J.S. Yun and S.W. Moon. 2002. Toxicity test of wetland sediments by *Simocephalus mixtus*. J. Environ. Sci., 851-855.
- Lee, S.E and S.K. Lee. 1996. Biological sensors for detecting aquatic toxicity of hazardous chemicals using respiratory and movement responses of carp, *Cyprinus capio*. J. Kor. Soc. Water Qual., 12, 119-126. (in Korean)
- Lee, S.K., D. Freitag, C. Steinberg, A. Kettrup and Y.H. Kim. 1993. Effects of dissolved humic materials on acute toxicity of some organic chemicals to aquatic organism. Water Res., 27, 199-204.
- Liu, D. and B.J. Dutka. 1984. Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems. Marcel Dekker, New York, pp. 476.
- Lester, J.N., R. Perry and A.H. Dadd. 1970. The influence of heavy metals on a mixed bacterial population of sewage origin in the chemostat. Water Res., 13, 1053-1055.
- Lydy, M.J., K.A. Burner., D.M. Fry and S.W. Fisher. 1990. Effect of sediment and the route of exposure on the toxicity and accumulation of natural lipophilic and moderately water soluble metabolizable compounds in the midge, *Chironomus riparius*. In: Aquatic Toxicology and Risk assessment Vol. 13. Landis, W.G., van der Schalie W.H. eds. ASTM STP 1096. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 140-164.
- Mayer, F.L and M.R. Ellersieck. 1988. Experience with single-species tests for acute toxic effects in freshwater animals. Ambio, 17, 367-375.
- Munkittrick, K.R., E.A. Power and G.A. Sergy. 1991. The relative sensitivity of Microtox, daphnids, rainbow trout, and fathead minnow acute lethality tests. Environ. Toxicol. Water Qual., 6, 35-62.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2000. OECD guidelines for testing of chemicals: Revised proposal for updating guideline 202: *Daphnia* sp., acute immobilisation test.
- Park, J.H. 2003. Development and applications of short-term acute toxicity test using *Ceriodaphnia dubia*. Ph.D. Thesis, Chungbuk Natl. Univ., pp. 190. (in Korean)
- Ribo, J.M. and K.L.E. Kaiser. 1987. Photobacterium phosphoreum toxicity bioassay. I. test procedures and application. Tox. Assess., 2, 305-323.
- Shcherban, P.E. 1979. Toxicity of some heavy metals for *D. magna* strus, as a function of temperature. J. Hydrobiol., 13, 75-80.
- USEPA (US Environmental Protection Agency). 1989. Short-term method for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater programs 2nd ed. EPA/600/4-89/00.
- USEPA (US Environmental Protection Agency). 1994. US EPA toxicity data analysis software. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, OH.

2004년 2월 20일 접수

2004년 6월 10일 수리