

Ceriodaphnia dubia의 먹이섭생 기작과 온도조절에 근거한 급성독성조사법의 비교

박종호[†] · 이상일^{*} · 조영옥^{*}

충청북도내수면연구소
^{*}충북대학교 환경공학과

Comparison of Short-Term Toxicity Tests Based on Feeding Behavior and Temperature Control by *Ceriodaphnia dubia*

Jong-Ho Park[†] · Sang-Il Lee^{*} · Young-Oak Cho^{*}

Department of Inland Fisheries Research Institute, Chung Cheong Buk-Do

^{*}Department of Environmental Engineering, Chung Buk National University

Abstract : Two methods, a *Ceriodaphnia* algal uptake suppression test (CAUST) and a new toxicity test based on temperature control (TTBTC) which are based on feeding behaviour and temperature control, respectively, were developed and compared for the adoption as the better methodology for short-term toxicity screening. As previously published by Lee et al., (1997), the CAUST method is based on the feeding behaviour of *C. dubia* and requires as little as 1 hour of contact time between *C. dubia* neonates and toxicant. However, even though CAUST requires only 1 hour of contact time, this method still take many hours for the preparation and measurement. Before the test starts, neonate digestive tracts were cleared by feeding yeast to the daphnids. Neonates were then exposed to toxicant, followed by addition of *Scenedesmus subspiciatus* into the bioassay vessels. Daphnids were examined under the bright-field microscope with the presence of algae (indicated by a green colored digestive tract) or the absence of algae. Uptake indicated no toxic effect, whereas, absence of uptake indicated toxic inhibition. Unlike CAUST, the newly developed method (TTBTC) is based on just temperature control for the toxicity test of *C. dubia*. Initially, neonates are exposed to toxicants while the temperature of water bath containing media increased to 35.5 °C. After 1.25 hour of contact time, the number of the daphnids, either live (no toxic effect) or dead (toxic effect), is counted without the aid of any instrument. In both methods, median effective concentrations (EC₅₀ values) were computed based on the results over a range of dosed toxicant concentrations. It showed that TTBTC was as sensitive as the standard 48-hour acute bioassay and CAUST. TTBTC and CAUST were much more sensitive than the 1-hour I.Q. test and 30-minute Microtox. This study indicates that TTBTC is an easier and more rapid toxicity test than the standard 48-hour acute bioassay and even CAUST.

keywords : Acute toxicity test, *Ceriodaphnia dubia*, Algae, Bioassay, Temperature control, Feeding behavior

1. 서 론

오염되지 않은 깨끗한 물은 인간뿐만 아니라 동식물을 포함한 전체 지구환경에 없어서는 안될 필수요소이다. 특히, 산업화와 더불어 새로이 합성된 화학물질은 날로 증가하고 있으며, 이것과 비례하여 그 심각성도 크게 증가하고 있다. 하지만 이런 화학물질들에서 나오는 일부 미량의 유해물질들은 발암성과 만성독성을 지니고 있어 생태계 및 인간에게 악영향을 미치게 되었다. 특히 미량유해물질 및 각종오염물질에 의한 상수원의 오염은 인간의 건강과 직결되어 있으므로 음용수의 안정성 확보가 시급하게되었다.^{1,3)}

폐수처리 유출수의 독성도를 모니터링하는 생물검정으로 어류와 무척추동물이 이용되어왔다. 최근에 독성조사법으로 *Ceriodaphnia dubia* 물벼룩을 이용한 방법이 널리 이용되

고 있다. 그 이유는 수중생태계의 중요한 역할을 하고, 유·무기독성물질에 민감하며, life cycle이 짧고, 실험실에서 쉽게 배양할 수 있어, 독성테스트 실험매체로 적절하기 때문이다.

*C. dubia*를 이용한 급성독성조사법은 물벼룩의 움직임을 관찰하여 물벼룩이 움직이지 않는 endpoint를 찾는 방법으로 48시간을 요한다. 반면에 만성독성의 경우에는 7일 정도를 요구한다. 이런 단기독성조사법에 근거를 둔 방법들은 독성물질을 스크리닝하는 연구에 널리 이용되어 왔다.

Bitton은 *C. dubia*의 먹이섭생에 근거를 둔 단기독성조사법에 대한 연구를 소개하였다. CerioFast^{4,5)}로 명명된 이 방법은 독성물질 접촉시간을 40분 이내로 하며, 1시간내에 독성조사를 마칠수 있는 방법이다. 이것은 물벼룩의 먹이인 yeast의 소모량을 이용하여 측정하는 방법으로서 독성물질에 접한 *C. dubia*를 배양할 때 자연적으로 먹는 yeast cell에 독성이 없는 형광물질, 5-(4,6-dichlorotriazin-2-yl)aminofl-

[†] To whom correspondence should be addressed.
jhpark@cb21.net

uorescein로 코팅하여 섭생케 한 다음 그 여부를 형광현미경을 이용하여 관찰하는 방법이다. 물벼룩의 장내에 형광을 발하지 않는 것은 yeast를 섭취하지 않은 것이며, 이것은 연속적인 독성물질의 저해에 의한 결과라고 보고하였다.^{4,5)} 이 방법은 표준 48시간 독성조사법과 거의 유사한 민감도를 나타냈다.

최근에는 Lee 등⁶⁾에 의해 *Ceriodaphnia dubia* Algal Uptake Suppression Test (CAUST)법으로 명명된 새로운 독성조사법이 개발되었다. 이 방법은 물벼룩의 녹조류 먹이섭생기작에 근거를 둔 방법으로서 태어난지 24시간이내인 물벼룩 유생을 이용하여 독성물질에 접촉시켜 녹조류인 *Scenedesmus* sp.를 먹이로 할 경우, 그 섭생 여부를 광학현미경으로 관찰하여 독성도를 측정하는 방법이다. 이 방법은 독성물질 접촉시간을 1시간 이내로 행할 수 있는 독성조사법으로 Bitton에 의해 수행된 CerioFast의 경우 고가의 형광현미경을 이용하는 반면에 CAUST법의 경우 일반 광학현미경을 이용하는 경제적인 방법이다.

화학물질의 독성도는 온도와 같은 비생물적인 변수에 의해 많은 영향을 받는다.⁷⁾ 온도가 증가함에 따라 독성도도 증가할 수 있으며, 반대로 온도가 증가할수록 독성도가 감소할 수도 있다. 수중 생물은 수온이 10°C변함에 따라서 유기화학물질의 독성이 2~4배 정도 변한다고 하였다.⁸⁾

Toxicity test based on Temperature Control(TTBTC) 조사법은 독성물질에 물벼룩 유생이 접촉할 때 물리적인 환경요인 중 온도를 기존 조건(20~25°C)보다 증가시킴으로 인해서 단시간내 치사케 하여 측정시간을 단축시키려는 방법이다.⁹⁾

본 연구에서는 CAUST법과 온도조절을 이용한 독성조사법인 Toxicity Test Based on Temperature Control (TTBTC)법의 잠재적인 가능성과 응용을 상호비교하는 것을 목적으로 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 독성 모액의 제조

모든 시약의 제조에는 2차 증류수를 사용하였고, 독성도를 조사하기 위하여 독성물질로 사용한 화학약품은 다음과 같다. $CdCl_2 \cdot \frac{2}{3}H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, KCN, PCP(pentachlorophenol), phenol, 농약류 등이다.

중금속류인 Cd, Zn, Cu 등은 100 ppm의 모액을 만들었고, 음이온인 CN의 경우는 1,000 ppm, 유기성 독성물질인 PCP는 1,000 ppm, phenol의 경우는 2,000 ppm으로 모액을 만들어 사용하였다.

농약류는 neosozin, methomyl, pyridaphenthion을 사용하였다. Neosozin은 유기비소계로써 잎집무늬마름병약으로 살균제로 사용되고, methomyl은 카바메이트계 살충제로써 진딧물약이며, pyridaphenthion은 유기인계살충제로써 흑명나방약이다.

2.2. *C. dubia*와 *Scenedesmus* sp.의 배양

*C. dubia*의 배양액은 중수(moderately hard water)로 조성된다.¹⁰⁾ *C. dubia*의 먹이는 YTCA(Yeast, Trout Chow, Alfalfa)를 일주일간 세 번씩 먹였다. YTCA의 조성은 다음과 같다.¹¹⁾ 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.

CAUST법에 사용된 *Scenedesmus* sp.의 무균 배양은 250 mL 삼각플라스크에 media 100 mL을 넣고 면전으로 마개한 후, 호일로 싸서 멸균기에서 15분간 멸균시킨 후 clean bench에서 식혔다. Shaker에서 일주일간 자란 algae를 clean bench로 가져와서 algae 5 mL를 disposable pipette으로 2 mL씩 채취해서 액상배양에 접촉한 후 shaker에서 키웠다. *Scenedesmus* sp.의 배양은 항온 진탕장치로 하고 조명은 형광등으로 하였다. 배양액은 8개의 모액 5 mL와 미량원소액 1 mL를 959 mL의 증류수에 첨가하여 1 L로 제조하여 사용하였다. Chlorophyll a의 농도는 Sandard Methods에 의거 분석하였다.¹²⁾

2.3. 녹조류 최적주입시간

50 mL의 비이커에 배양액과 algae를 25 mL 주입한 후 30마리의 *C. dubia*를 주입하였다. Algae의 농도(이때 algae의 농도는 chlorophyll a의 양으로 측정한다)는 10분 간격으로 측정하였고, 이 결과를 이용하여 섭취시간과 섭취한 algae와의 관계를 그래프로 그려 섭취시간을 구하였다.

2.4. 독성실험

CAUST법은 우선, 배양액으로 여러 가지의 *Scenedesmus* sp. 농도를 만들고, 각각의 농도의 배양액을 비이커에 25 mL에 넣어두고, 여기에 30마리의 *C. dubia*를 주입하고, 주입 즉시 각각의 비이커에서 5 mL의 배양액을 빼내어, blank는 배양액으로 하여 665 nm에서 초기 흡광도를 측정하였다. 실험 2.3에서 구한 시간동안 *Scenedesmus* sp.를 섭취시킨 후, 각각의 비이커에서 적당량씩을 빼내어, 배양액을 blank로 하여 665 nm에서 흡광도를 측정하였다. 주입한 *Scenedesmus* sp. 농도와 섭취한 chlorophyll a의 농도의 그래프를 그려 적절한 주입농도를 구하였다. 50 mL의 비이커에 배양액과 algae를 25 mL 주입한 후 30마리의 *C. dubia*를 주입하였다.

TTBTC법은 25±1°C에서 배양되던 *C. dubia*를 온도가 증가된 상태에서 독성물질과 접촉시의 사멸 유, 무를 알아보고자, 50 mL 비이커에 19 mL의 배양액을 채우고 water bath를 이용하여 배지의 온도를 일정온도로 증가시킨 후, 각각의 비이커에 *C. dubia*를 각각 10마리씩(1 mL) 넣고 독성물질에 노출시켰다. 일정시간 경과 후 물벼룩의 움직임을 육안으로 관찰하여 사멸 유, 무를 헤아렸다.

표준48시간 독성조사법은 한 개 또는 여러개의 공시료와 다섯가지의 독성 농도로 구성되는데, 독성농도가 다른 *C. dubia*배양액에 *C. dubia*의 juvenile(24시간 이내)을 각각 10

마리씩 넣고 독성실험을 행하였다. 정적인 독성실험에서 실험생물을 각 비이커에 넣어 48시간 유지시켰다. *C. dubia*의 실험온도는 25°C이었다.^{10,13)}

2.5. 통계적 분석

USEPA¹⁴⁾에 의해 개발된 컴퓨터 프로그램(Toxanal)은 실험생물의 50%에 영향을 미치는 농도인 EC50값과 95%의 신뢰구간을 결정하는 데 사용한다.

본 실험에서는 통계분석을 위해 probit method를 사용하였다. Probit method는 적어도 두가지 농도에서 mortality가 실험에서 구해졌을 때 사용한다. Probit analysis에서 영향 받은 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.

3. 결과 및 고찰

3.1. CAUST법에서 녹조류 주입농도 및 섭생시간의 영향

*C. dubia*의 유생이 녹조류인 *Scenedesmus* sp.를 먹이로 할 경우 섭생시간의 변화에 따른 이들의 섭취량의 변화는 Fig. 1과 같다. 섭생시간이 35분에서는 약 60%정도 녹조류를 섭취하였고, 그 이상에서는 *C. dubia*의 young juvenile 내장내 녹조류 농도의 증가가 둔화되는 경향을 보였다. 또한, 이들이 완전 소화하여 배출하는 시간을 측정한 결과 소화시간이 30~40분 요구됨이 관찰되었다. 따라서 본 실험에서는 독성물질 접촉 후 녹조류를 주입하여 충분한 섭생을 할 수 있도록 하기 위해 섭생시간을 30~40분으로 하는 것이 좋은 것으로 판단된다.

10마리의 *C. dubia*의 young juvenile이 30~40분 동안 섭취한 *Scenedesmus* sp.의 농도는 대략 0.1 mg/L (chlorophyll *a*의 농도로) 가량이다.

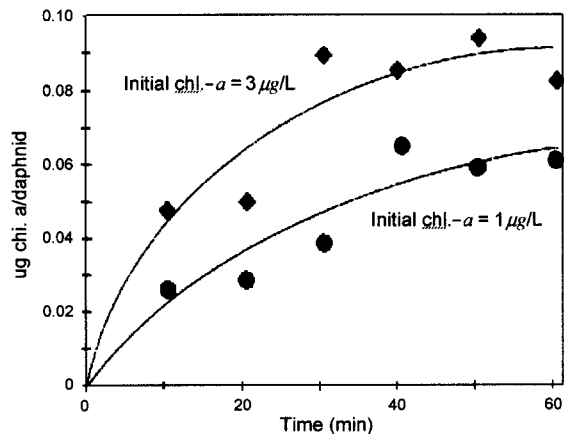


Fig. 1. Temporal variation of *Scenedesmus subspicatus* uptake by *Ceriodaphnia dubia* in relation to chlorophyll *a* concentration.

따라서 본 실험에서는 *C. dubia*의 young juvenile이 섭취하기에 충분하도록 주입하는 *Scenedesmus* sp.의 농도를 약 5~6 mg · chl. a/L 정도로 사용하는 것이 적당하다고 판단된다.

3.2. 독성물질이 녹조류 섭취에 미치는 영향(CAUST)

독성물질인 Cu를 주입하여 주입농도에 따른 *C. dubia*의 녹조류 섭취 개체수의 변화를 관찰한 결과 Cu 주입농도가 높아짐에 따라 조류를 섭취하지 않는 *C. dubia*의 개체수가 급격히 증가하는 것을 알 수 있었고(Fig. 2), 광학현미경을 이용하여 배울 100배에서 관찰한 결과 조류를 섭취한 *C. dubia*의 경우 장내에 조류의 섭취의 흔적이 있었으나 이와는 반대로 조류를 섭취하지 않은 *C. dubia*의 장내에는 조류 섭취의 흔적이 보이지 않음을 알 수 있었다.

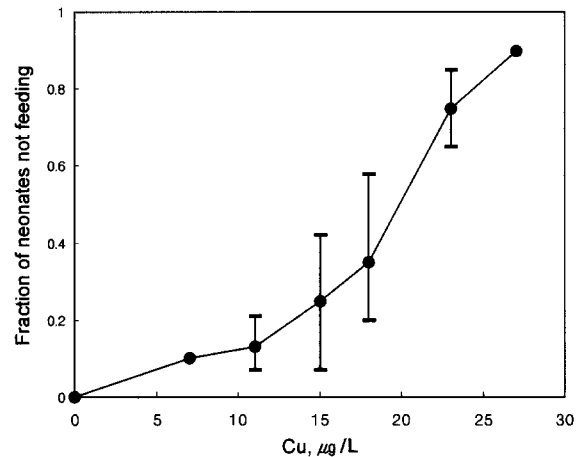


Fig. 2. Dose-response curve for copper obtained from CAUST. Error bars represent ± 1.0 standard deviation (S.D.).

3.3. Cu 주입농도에 따른 TTBTC법과 표준 48시간 독성조사법의 비교

*C. dubia*를 독성물질 Cu에 노출시켜 물벼룩의 움직임을 관찰한 결과를 TTBTC법과 표준 48시간 독성조사법을 비교한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 그림에서 알 수 있듯이 표준 48시간 조사법과 TTBTC법에 의해 관찰된 결과가 유사한 형태의 곡선을 가졌다. TTBTC법의 경우 35.5°C의 높은 온도에서 짧은 기간(1.25시간) 동안에 얻어진 결과이고 반면에 표준 48시간 독성조사법은 48시간의 긴시간과 상대적으로 낮은 온도에서 얻은 결과값이다. 두 독성조사법에서 독성물질의 노출시간이 1.25시간과 48시간으로 차이가 있지만 독성물질의 영향에 대한 결과는 매우 유사한 것으로 관찰되었다.

따라서 온도 증가를 이용해 독성물질을 측정하는 TTBTC법의 경우 짧은 시간에 독성물질을 스크리닝할 수 있을 것으로 사료된다.

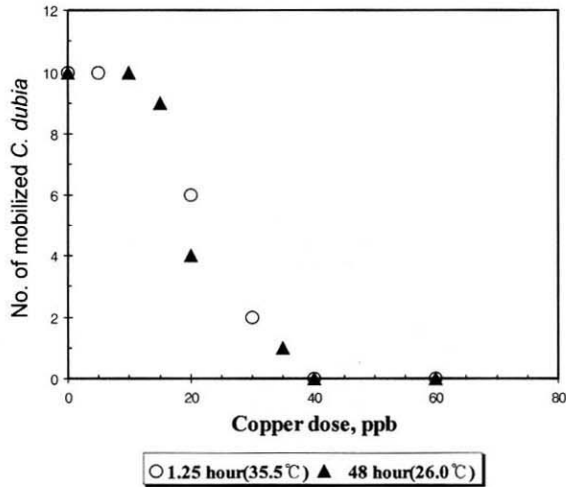


Fig. 3. Comparison of dose-response curves for copper obtained from TTBTC and the standard 48-hour acute bioassay.

3.4. 독성물질 접촉시간에 따른 CAUST법과 TTBTC 법의 민감도 비교

*C. dubia*의 유생을 유기 및 무기 독성물질로 하여 실험시 접촉시간에 따른 독성실험을 두 방법 공히 3회 반복하여 실험을 수행하였다. 독성물질에 1시간, 3시간, 6시간동안 접촉시켰을 경우 접촉시간별 EC₅₀값에 약간의 차이는 있었으나 어느 정도 유사한 값을 가지는 것으로 나타났다. 접촉시간별 독성물질에 대한 영향은 95% 신뢰구간에서 1시간 접촉시 Cd, CN, Neosozin의 EC₅₀값은 표준 48시간 조사법의 LC₅₀값과 약간의 차이를 보였고, Cu, Zn, PCP, phenol의 경우에는 CAUST법에 의해 계산된 값과 표준 48시간 독성조사법에 의해 계산된 EC₅₀값에는 차이가 없었다 (Fig. 4). 이것은 Bitton 등이 CerioFast로 Cu와 PCP를 가지고 EC₅₀값을 산출할 때, 독성물질 접촉시간 1~6시간 범위 내에서는 EC₅₀값의 영향을 받지 않는다는 결과와 일치함을 알 수 있었다.⁵⁾ 따라서 CAUST법으로 독성물질을 스크리닝할 경우 접촉시간 1시간에서 표준 48시간 독성조사법과 비교하여 민감도에 큰 영향이 없는 것으로 보아 독성물질 접촉시간을 1시간으로 하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

TTBTC법으로 *C. dubia*의 young juvenile을 유기 및 무기 독성물질로 하여 실험시, 독성물질에 1-hr, 1.25-hr, 1.5-hr 동안 접촉시켰을 경우 접촉시간별 LC₅₀값에 차이는 없어 접촉시간에 따른 민감도에 일정한 경향을 보였다(Fig. 5).

Cu, Zn, Cd, CN, PCP, Phenol의 LC₅₀값은 표준 48시간 독성조사법과 비교하였을 경우 95% 신뢰구간에서 거의 유사하게 나타났다.

3.5. CAUST법, TTBTC법과 표준 48시간 독성조사의 비교

CAUST법은 물벼룩의 먹이섭생기작을 근거로 개발된 방법으로서 이 방법에 의해 수행된 독성물질별 접촉시간에

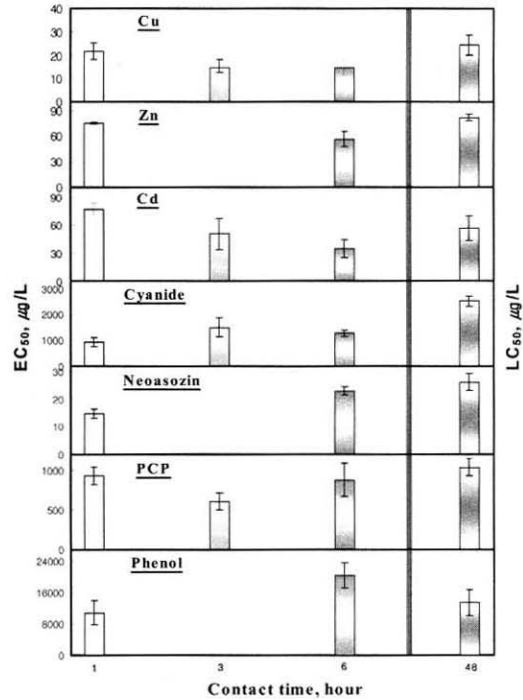


Fig. 4. Effect of contact time on the sensitivity of CAUST. Error bars±1.0 S.D. EC₅₀ values of CAUST conducted at 1-hour of contact time were not significantly different from those of the standard 48-hour acute bioassay (P<0.05, two-tailed t test).

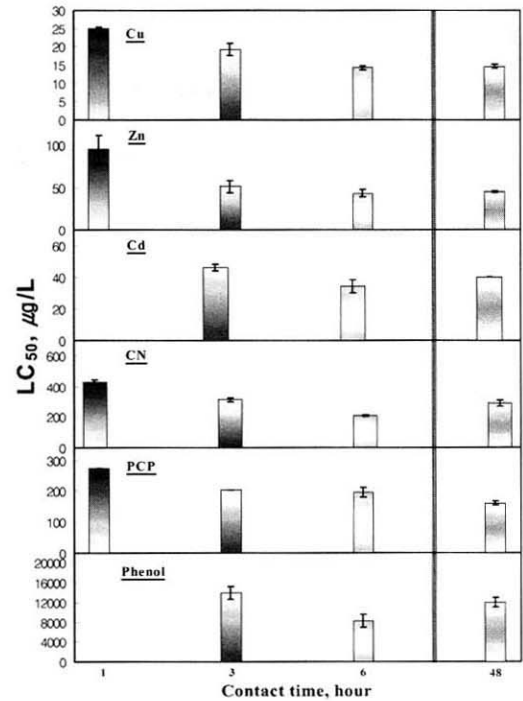


Fig. 5. Effect of contact time on the sensitivity of TTBTC. Error bars±1.0 S.D. EC₅₀ values of TTBTC conducted at 1-hour of contact time were not significantly different from those of the standard 48-hour acute bioassay (P<0.05, two-tailed t test).

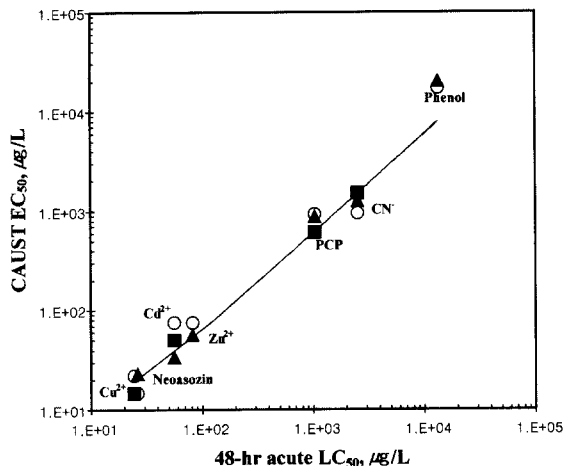


Fig. 6. Correlation of EC₅₀ values obtained from CAUST and the standard 48-hour acute bioassay (○ : 1 hr, ■ : 1.25 hr, ▲ : 1.5 hr).

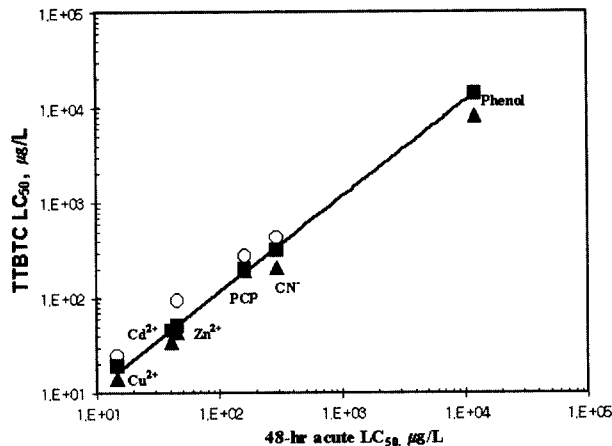


Fig. 7. Correlation of LC₅₀ values obtained from TTBTC and the standard 48-hour acute bioassay (○ : 1 hr, ■ : 1.25 hr, ▲ : 1.5 hr).

따른 EC₅₀값과 표준 48시간 독성조사법에 의해 구한 LC₅₀값의 차이에는 95% 신뢰구간에서 차이가 거의 없는 것으로 나타나 민감도의 차이는 없는 것으로 사료된다(Fig. 6).

온도증가를 이용한 독성조사법인 TTBTC법은 온도 증가 시 독성물질에 의해 피해를 입는 정도가 크다는 가정하에 수행된 방법으로서 온도를 35.5℃로 하여 접촉시간 1.25시간으로 할 경우, 독성에 대한 민감도가 표준 48시간 조사

법과 비교하여 거의 유사함을 알 수 있었다(Fig. 7).

Cd, Cu, Zn 등 중금속과 음이온이 CN 및 유기독성물질인 PCP, 농약류인 neosozin, methomyl, pyridaphenthion의 독성도를 *C. dubia*의 녹조류 섭생을 이용한 독성조사법인 CAUST법과 온도증가를 이용한 TTBTC법으로 조사한 LC₅₀값과 기보고된 결과를 Table 1에 요약하였다.

CAUST법과 TTBTC법을 기보고된 CerioFast™으로 구한

Table 1. Values of EC₅₀ of selected inorganic and organic chemicals as determined by CAUST, TTBTC, and 48-hour acute bioassay

Chemicals	In this Research			Reported		
	75-min (TTBTC)	48-hr acute bioassay	1-hr CAUST	1-hr CerioFAST ^a	1-hr I.Q. test ^{b,c}	30-min Microtox
Copper (µg/L)	19.3 ±0.73	14.6 ±0.54	21.8 ±3.5	14	230	130-3,800 ^e
Zinc (µg/L)	51.6 ±7.18	45.2 ±1.0	75.0 ±1.37	59	4,300	680-3,400 ^e
Cadmium (µg/L)	46.0 ±19.3	40.1 ±0.17	76.2 ^d ±7.0	54	410	5,400-60,000 ^e
Cyanide (mg/L)	0.32 ±0.014	0.289 ±0.022	0.94 ^e ±0.17	-	-	4.8 ^h
Neosozin (µg/L)	-	-	0.023 ^e ±0.002	-	-	-
Pentachlorophenol (mg/L)	0.204 ±0.004	0.160 ±0.006	0.93 ±0.11	0.53	0.33-1.0	0.99 ^f
Phenol (m/L)	13.9 ±1.315	11.9 ±0.99	17.1 ±3.1	-	-	21-42 ^f
Methomyl (µg/L)	-	-	<10 ⁻¹⁰	-	-	-
Pyridaphenthion (µg/L)	-	-	<10 ⁻¹⁰	-	-	-

^aFrom Bitton *et al.* (1996).

^bFrom Bulich *et al.* (1982).

^cFrom Janssen and Persoone (1993).

^dValues are means of three replicates±1.0 S.D

^eFrom Kong *et al.* (1995).

^fFrom Kasier and Palabrica (1991).

^gSignificantly different from 48-hr EC₅₀ at P<0.05.

^hFrom Kasier and Ribo (1988) (5-minute contact time).

EC₅₀값과 비교했을 때 민감도가 약간 약하였지만 어느 정도 일정한 값을 얻을 수 있었다.

본 실험으로 얻은 결론은 표준 48시간조사법으로 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).

실험기간과 난이도는 배양온도를 35.5℃에서 독성물질에 노출시키는 TTBTC법이 배양온도 25.5℃에서 수행하는 CAUST법 보다 매우 신속하고 용이하였다. 또한, 본 실험에서 개발한 독성조사법은 별도의 고가 장비나 비싼 시약을 요구치 않아 타 독성조사법에 비해 보다 경제적인 독성조사법으로 사료된다.

또한 TTBTC법의 서로 다른 접촉시간 특히, 1.25-hr에서 표준 48시간 급성독성조사법과 좋은 상관관계가 있음이 관찰되었으며, 이것은 화학적인 발광을 이용한 Microtox법⁹⁾, *Daphnia magna*의 β-galactosidase의 inhibition을 이용한 I.Q. test¹⁰⁾의 범위에 포함됨을 알 수 있었다. 1.25-hr TTBTC법과 CerioFast™은 적어도 중급속 테스트에서는 거의 유사한 민감도를 가짐을 알 수 있었다.

특히 본 연구방법은 광학현미경을 사용하지 않고 물벼룩의 사멸여부만을 눈으로 관찰하는 방법으로서, 초보자가 쉽게 사용할 수 있고 시간과 인건비를 절약할 수 있는 방법이라 사료된다.

4. 결론

CAUST법과 TTBTC법에 의해 독성물질의 농도, 접촉시간의 변화에 따른 영향을 알아보고 표준 48시간 급성독성조사법과 비교하여 민감도를 연구한 실험에서 얻은 결론은 다음과 같다.

1. *C. dubia*의 녹조류 섭생을 이용한 독성조사에서는, 충분한 섭생을 위해 녹조류인 *Scenedesmus* sp.를 약 5~6 mg · chl. a/L 농도로 주입하고 섭생시간을 35분 유지하며, 섭생시간을 그 이상으로 하여도 섭생량의 증가는 없었다.
2. *C. dubia*의 먹이섭생기작을 근거로 개발된 CAUST법의 경우 기존 이용되고 있는 독성조사법의 결과에 비해 비교적 민감하였고, 독성도 측정이 2시간내에 행할 수 있어 널리 이용될 수 있는 독성조사법으로 판단된다. 하지만 end point를 찾는 준비과정에 표준 48시간 독성조사법 보다 상대적으로 시간이 오래 걸리는 것으로 나타났다.
3. TTBTC법의 경우 현미경을 이용하지 않고 단순히 물벼룩의 사멸여부만을 계산함으로써 독성도를 측정할 수 있는 것으로 관찰되었고, 표준 48시간 조사법과 비교하여 95%신뢰구간에서 LC₅₀값의 차이는 없는 것으로 나타났다.
4. TTBTC법으로 얻은 결론은 표준 48시간조사법으로 실험시 얻은 결과와 큰 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). 최근 독성조사법으로 많이 이용되고 있는 Microtox법의 결과와 본 연구에서 수행한 TTBTC법의 결과를 비교하면, 온도증가를 이용한 TTBTC 독성조사법이 중급속인 경우 10~300배 민감함을 알 수 있으며, 음이온인 CN인 경우는 16배 민감하고, 유기독성 Phenol의 경우는 약 2배 가량 민감하게 나타났다.

참고문헌

1. 박훈수, 강준원, 상수원수중 오염 농약류 및 미량 유기물 분석, *한국물환경학회지*, **14**(3), pp. 355-366 (1998).
2. 박훈수, 강준원, 오존산화에 의한 상수원수중 농약류 및 오염유기물 제거, *대한환경공학회지*, **21**(5), pp. 907-920 (1999).
3. 김경숙, 오병수, 주철, 정봉철, 안규홍, 강준원, 경안천 내 미량유해물질의 모니터링 및 고도산화처리에 의한 제거효율 평가, *한국물환경학회지*, **19**(5), pp. 567-574 (2003).
4. Bitton, G., Rhodes, K., Koopman, B., and Cornejo, M., Short-Term Toxicity Assay Based on Daphnid Feeding Behaviour, *Water Environ. Res.*, **67**, pp. 290 (1995).
5. Bitton, G., Rhodes, K., and Koopman, B., CerioFast, an Acute Toxicity Test Based on *Ceriodaphnia dubia* Feeding Behaviour, *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, pp. 123 (1996).
6. Lee, S. I., Na, E. J., Choi, Y. O., Koopman, B., and Bitton, G., Short-term toxicity test based on algal uptake by *Ceriodaphnia dubia*, *Water Environ. Res.*, **69**, pp. 1207-1210 (1997).
7. Mayer F. L. and M. R. Ellersieck. Experience with single-species tests for acute toxic effects in freshwater animals, *Ambio.*, **17**, pp. 367-375 (1988).
8. Lydy M. J., Burner, K. A., Fry, D. M., and Fisher, S. W. 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 : Landis W. G., van der Schalie W. H. (eds) Aquatic toxicology and risk assessment. Vol.13. ASTM STP 1096. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 140-164 (1990).
9. 박종호, *Ceriodaphnia dubia*를 이용한 단기급성독성조사법 개발 및 응용, 충북대학교 박사학위논문, (2003).
10. U.S. Environmental Protection Agency., Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms. 3rd., EPA-600/4-85-013, Cincinnati, Ohio, (1985).
11. Rhodes, K., *A Rapid Acute Toxicity Test*, M.S. Thesis, University of Florida, Gainesville, FL., U.S.A., (1992).
12. APHA, AWWA and WPCF, Standard Methods for the examination of water and wastewater, 18th. Ed., (1992).
13. ASTM Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E-729-88, Philadelphia, Pa., U.S.A., (1988).
14. U.S. Environmental Protection Agency, User's Guide, Probit Program Version 1.5, Ecol. Monit. Res. div.,

- Cincinnati, Ohio, (1994).
15. Bulich, A. A., Greene, M. W., and Isenberg, D. L., A Practical and Reliable Method for Monitoring the Toxicity of Aquatic Samples, *Process Biochem.*, **17**, pp. 45 (1982).
 16. Janssen, C. R., and Personne, G., Rapid Toxicity Screening Tests for Aquatic Biota. 1. Methodology and Experiments with *Daphnia magna*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**, pp. 711 (1993).