

독성 반응곡선을 이용한 수계 주요 오염물질의 혼합독성평가

나진성 · 김기태 · 김상돈[†] · 한상국* · 장남익** · 김용석**

광주과학기술원 환경공학과 · *목포해양대학교 해양시스템 공학부 · **영산강 물환경연구소

(2004년 7월 28일 접수, 2004년 12월 22일 채택)

Mixture Toxicity Test of Ten Major Chemicals Using *Daphnia magna* by Response Curve Method

Jin Sung Ra · Ki Tae Kim · Sang Don Kim[†] · Sang Guk Han* · Nam Ik Chang* · Yong Seok Kim**

Gwangju Institute of Science and Technology, Department of Environmental Science and Engineering

*Division of Ocean System Engineering, Mokpo National Maritime University · **Yeongsan-river Environmental Research Laboratory

ABSTRACT : Toxicity tests were performed to evaluate the feasibility of application with prediction models to 10 mixture chemicals (chloroneb, butylbenzylphthalate, pendimethaline, di-n-butylphthalate, di-iso-butylphthalate, diazinon, isofenphos, 2-chlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol and p-octylphenol) detected in effluents from wastewater treatment plants (WWTPs). Ten chemicals were selected in the basis of their toxicities to *Daphnia magna* and the concentrations in effluents measured by GC/MS. Three models including concentration addition (CA), independent action (IA) and effect summation (ES) were employed for the comparison of the predicted and the observed mortality of *D. magna* exposed to 10 mixture chemicals for 48 hours. With a comparative study it was ineffective to predict the mortality through the CA and the ES prediction model, while the IA prediction model showed a high correlation ($r^2 = 0.85$). Moreover, the ES model over-estimated the toxicity observed by bioassay experiments about five-fold. Consequently, IA model is a reasonable tool to predict the mixture toxicity of the discharging water from WWTPs.

Key Words : Mixture Toxicity, *Daphnia Magna*, Toxicity Prediction Model

요약 : 기존의 방류수 모니터링에서는 개별 오염물질들의 농도를 기준으로 독성을 평가하였다. 그러나 많은 연구자들에 의해서 오염물질들이 공존하는 상황에서 나타나는 독성은 그들 간의 상호작용을 통해서 혼합독성의 형태로 나타난다고 보고되고 있다. 본 연구에서는 GC/MS 분석을 통해 방류수 중에 존재하는 주요 독성 기여 오염 물질들을 분석하고, Independent Action(IA), Concentration Addition(CA), Effect Summation(ES) 모델을 사용하여 방류수의 혼합독성을 상호 비교 평가하였다.

GC/MS로 분석된 오염물질을 대상으로 *D. magna* 기준 독성 평가를 실시하였고, 10가지의 주요 독성 기여 오염물질을 선별하였다. Chloroneb, butylbenzylphthalate, pendimethaline, di-n-butylphthalate, di-iso-butylphthalate, diazinon, isofenphos, 2-chlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol 과 p-octylphenol을 주요 오염물질로 선정하여 혼합독성 평가를 실시하였다. 혼합독성 평가 결과는 IA 예측모델과 매우 높은 상관성 ($r^2 = 0.8475$)을 나타내었다. ES와 CA 모델은 IA 모델과 비교하여 혼합독성 결과와 매우 낮은 상관성을 나타내었으며, 특히 ES는 실측값을 5배나 과도하게 예측하였다. 이러한 결과를 통해서 전남지역 방류수에 존재하는 주요 오염물질들의 혼합독성은 IA 모델을 통해 예측이 가능할 것으로 판단된다.

주제어 : 독성예측모델, 혼합독성, 주요 독성물질

1. 서론

수계에 존재하는 독성물질은 개별적으로 독성을 나타내기 보다는 여러 오염원들이 혼합되어 복합적인 독성을 나타낸다.^{1,2)} 따라서 독성 평가는 수계에 존재하는 개별 오염물질의 분석과 독성 평가도 중요하지만 복합적인 오염원에 대한 혼합 독성평가를 통해 오염물질들의 수계독성을 평가하는 것이 필요하다.³⁾ 이러한 혼합 독성평가를 통해 독성물질 상호간의 독성이 독립적인 기작에 의한 것인지 혹은 같은 독성 기작에 의한 것인지를 판별할 수 있는 기준이 될 수

있다. 따라서 선진국 등에서는 혼합독성을 통한 수계독성 평가가 활발히 진행되고 있다. 독성물질 상호간에 나타나는 독립적인 독성 기작은 동일한 생물학적 독성 종말점을 갖는 화학물질이 서로 다른 위치에 독성을 나타내는 경우에 생각할 수 있다. 이와는 반대로 같은 독성 기작에 의한 혼합독성은 동일한 생물학적 독성 종말점을 갖는 화학물질이 서로 다른 화학물질이 같은 위치에 작용하여 서로의 영향이 감소하는 경우에 대해서 생각할 수 있는 경우이다. 이와 같이 방류수 중에 존재하는 화학물질의 종류에 따라 생물체에 나타나는 독성치는 다르게 나타날 수 있다.⁴⁻⁶⁾

현재까지 국내에서는 혼합독성에 관한 연구가 수행되지 않았고, 국외에서는 방류수에 실제 존재하는 오염원에 대한 혼합독성 연구가 수행되지 않았다. 하지만, 본 연구에서는

[†] Corresponding author
E-mail: sdkim@gist.ac.kr
Tel: 062-970-2455

Fax: 062-970-2434

전남지역 9개 생활하수 및 농공단지 처리장 방류수내에 존재하는 오염물질을 GC-MS를 통해 분석을 실시하였고, 분석과정에서 검출된 독성물질 중 독성기여도가 큰 10개의 오염물질(유기 오염물질)을 선정하여 혼합독성 평가를 실시하였다. 독성 기여도가 큰 오염물질의 선정은 기준 독성 평가와 방류수 중에 검출된 농도를 기준으로 하여 선정하였다. 혼합독성평가를 수행하기 위해 각 오염물질들에 대한 기준 독성 평가를 수행하였으며, 이 결과에 기초하여 반응곡선(Response curve)을 작성하였다. 이 그래프를 근거로 노출 toxic unit(TU)을 산정하여 혼합 독성 평가를 수행하였다. 반응곡선을 사용한 독성 값의 산출은 기존의 TU 산정방법과 함께 광범위하게 사용되고 있으며 본 연구에서는 두 방법에 대한 독성 값 예측의 정확성을 비교하였다.^{7,8)} 뿐만 아니라, 본 연구에서는 방류수의 독성을 예측할 수 있는 방법을 모델을 적용하여 제시하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 오염물질의 선정

오염물질을 선정하기위해 사용된 방류수는 영산강유역의 9개 생활하수 및 농공단지 처리장 방류수를 대상으로 하였다. 방류수의 계절적인 특성 변화를 살펴보기 위해 시료채취 기간을 봄, 여름, 가을, 겨울로 나누어 실시하였다. 채취된 시료는 각 처리장별로 2차 생물학적 처리를 거쳐 하천으로 배출되는 2차 처리 최종 방류수를 포함하였다. 시료채취를 위하여 2L 갈색 유리병을 산세척, 에탄올 세척을 실시한 후 최종적으로 3차 증류수로 세척하여 사용하였다. 채취한 시료는 ice box로 수송하여 4℃에서 차광상태로 보관하였으며, 오염물질 분석을 위한 시료는 1주일 이내에 액액 추출방법 방법을 사용하여 추출을 실시하였다. 추출과정에서 시료는 인산염 완충용액을 사용하여 pH를 7로 유지하였으며 추출액은 dichloromethane을 사용하였다. 농축

은 KD 농축기를 사용하였으며 분석에 사용된 GC/MS의 분석조건은 Table 1에 나타내었다. 독성물질의 분석은 수중에서 주로 검출되고 독성이 높은 phenol류와 pesticide류 phthalate류를 대상으로 하여 수행하였다.

2.2. *D. magna* 배양방법

담수 수서 무척추 동물인 물벼룩에 의한 방류수 독성 시험방법은 국제적으로 잘 확립되어 있다. 물벼룩은 그 배양이 매우 간편하고, 시험에 요구되는 시간이 짧으며, 자연수계에 존재하는 대부분의 유해 오염물질에 대한 민감도가 매우 우수하기 때문에 전 세계적으로 독성시험에 사용되어 왔다. 대표적으로 사용되는 시험방법으로는 US-EPA 급성/만성 독성평가 방법과 OECD 평가 지침이 주로 사용되고 있다. 본 연구에서는 US-EPA 방법을 사용하여 시험을 수행하였다.⁹⁾

*D. magna*는 3 mL/L의 먹이(*Selenastrum capricornutum* + YTC)가 주어진 배양액에 20~30마리/L의 밀도로 군집 배양을 실시하였다. 배양에 사용한 배양액은 제조방법이 쉽고, 확실한 수질, 재현성 있는 결과를 얻기 위하여 3차 증류수를 사용하여 제조하였다. 제조한 배양액은 pH가 7.6~8.0으로 유지되고 경도(hardness)가 160~180, 알칼리도(alkalinity)가 110~120으로 유지되는 경수를 사용하였다. 기준 독성 평가 및 혼합독성 평가에 사용하기 위한 물벼룩의 세대 배양은 온도가 25±1℃로 유지되고 습도가 50%로 유지되는 배양실에서 배양을 실시하였다. 조명은 10~20 μE/m²/sec의 광도를 유지하고 광주기는 16 hr light, 8 hr dark 상태를 유지하며 배양하였다.

2.3. 기준 독성평가

기준 독성평가는 급성 독성 평가 방법을 사용하였다. 사용된 시험방법은 US-EPA 평가 지침에 따라 수행하였다.⁹⁾ 시험에 사용된 *Daphnia magna*는 clean room에서 세대배양을 실시하여 증식이 우수한 것들을 선정하여 3세대 이후의 것을 사용하였다. 실험의 정확성을 높이기 위해 각각의 시험은 태어난 지 24시간 이내의 새끼들을 사용하였다. 물벼룩 시험은 48 hr 배양액의 교환이 없는 정지식 급성독성 평가 방법으로 농도별로 4개의 반복을 두고 각 반복별 5마리의 개체를 사용하였다. 실험기간 중 조명조건은 16시간-light 8시간-dark 조건을 유지하였으며, 먹이는 실험실시 2시간 전에 충분히 공급하고 실험기간 중에는 먹이는 공급하지 않았다. 실험 기간 중 온도 및 광도, 광주기는 개체배양과 동일하게 유지하였다. 기준 독성평가는 GC-MS 분석을 통해 검출된 유기오염물질에 대하여 실시하였다. 기준 독성 평가 결과는 LC₅₀(시험개체의 50%가 치사하는 농도) 값으로 나타내었다. LC₅₀ 값을 산정하기위해 사용된 통계적 처리방법은 US-EPA에서 제시하는(US-EPA/600/4-91/002, July, 1994) probit method, spearman-karber method, trimmed spearman-karber method를 사용하여 분석하였다.⁹⁾ 각 오염물질의 치사 특성에 따라 적절한 방법을 사용하였다.

Table 1. GC/MS operating condition

GC Model	Varian GC 3400 CX
Carrier gas	He (99.999%)
Column	J&W DB-5MS (5% phenyl-95% methylsilicone) fused silica capillary column, 30 m×0.25 mm i.d., 0.25 μm film)
Detector	Saturn 2000 MS
Injector temp.	250℃
Transfer line	280℃
Column temp	temperature programmed 1 min at 50℃, 8℃/min to 300℃, 8 min at 300℃
Injection method	splitless, 2 min for purge off time
Ionization mode	Electron Impact (EI mode)
Scan rate (m/z)	45-500 amu
Background mass	44
Mass defect	0-50/100 amu

2.4. 반응곡선(Response curve) 작성

기준 독성평가 결과와 방류수에서 검출된 농도를 기준으로 하여 10가지 주요 독성오염물질을 선정하였고, 이 독성물질들에 대한 반응곡선을 작성하였다. 본 실험에 사용된 독성물질은 Sigma 제품과 Chem-service®에서 구입하여 사용하였으며, 액체 크로마토그래피 등급 에탄올에 1000 ppm 농축용액을 제조하여 사용하였다. 반응곡선은 기준 독성 평가 방법과 동일한 시험조건 및 실험 방법을 사용하였다. 시그모이드 곡선을 만들기 위한 기준 독성평가에 앞서 에탄올에 대한 물벼룩의 독성 영향 평가를 실시한 결과 1% 이하로 들어간 경우에 대하여는 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며, 안전율을 고려하여 실험용액에 0.5% 이하의 농도로 하여 실험하였다. 에탄올의 *D. magna* LC₅₀ 값은 454 mg/L로 매우 높게 보고되고 있다.¹⁰⁾ 농약류 등은 분해가 급격하게 일어나기 때문에 시약은 사용 시 직접 제조하였다. 반응곡선은 sigma plot program® ver. 8.0을 사용하여 작성하였다.

2.5. 혼합독성평가

혼합독성평가에 사용된 시약은 각 화합물별로 산출된 LC₅₀ 값을 근거로 하여 각각 1000TU이 되도록 에탄올을 용매로 하여 표준용액을 제조하였다. 표준용액의 제조는 에탄올을 사용하였다. 시험에 적용된 Toxic Unit의 범위는 총 Toxic Unit 기준으로 0.2TU~9TU까지 20개의 범위에서 실시하였다. 시험은 48시간 급성독성 평가방법을 용하였으며, 농도별로 4개의 반복을 두었다. 기타 실험 조건은 기준 독성평가방법에서 사용한 방법과 동일하게 하였다. 이 혼합 독성 결과를 통해 독성물질들이 유사한 독성작용(Concentration Addition ; CA)을 보이는지와 독립적인 독성작용(Independent Action ; IA)을 나타내는지를 평가하였다.^{7,8,11)} IA와 CA의 각 경우에 대한 % 치사율 예측은 반응곡선 방법을 사용하였으며, LC₅₀에 기초한 산술적 계산인 단순 effect summation 방법과 비교하였다. 이들 3가지 방법의 개략적인 내용을 살펴보면 다음과 같다.

2.5.1. Effect Summation

Effect summation 방법은 먼저 대상 오염물질의 기준 독성을 평가하고 probit 방법이나 graphical 방법 등을 사용하여 오염물질의 LC₅₀ 값을 산정하게 된다. 이렇게 계산된 LC₅₀ 값을 1 toxic unit으로 하고, 이 값들로부터 산술적으로 toxic unit(TU) = conc./LC₅₀을 계산하여 농도별 toxic unit을 산정한다. 이 방법을 통해 실시되는 혼합독성 평가는 대상으로 하는 toxic unit을 얻기 위해

$$\text{total toxic unit} = \sum \text{individual toxic unit}(\text{conc./LC}_{50}) \quad (1)$$

으로 정의하여 수행한다.

2.5.2. Concentration Addition

Concentration addition 방법은 effect summation 방법과

매우 동일한 개념을 가지고 있다. 일반적으로 2개의 혼합물질 1, 2에 대하여 다음과 같은 식이 성립한다.

$$\frac{C_1}{ECx_1} + \frac{C_2}{ECx_2} = 1 \quad (2)$$

이와 같은 2가지 물질의 혼합독성에 관한 concentration addition 식을 n 가지의 물질에 대하여 확장하게 되면

$$\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{ECx_i} = 1 \quad (3)$$

의 식이 성립하게 된다. 이 식으로부터 concentration addition 방법이 성립되기 위해서는 반드시 1이 되어야 한다. 또한 1 이상의 값을 갖게 되면 일반적으로 Loewe 독성 감소작용 영향을 나타내고, 1 이하의 값을 갖게 되면 Loewe 독성상승작용의 영향을 갖는 것으로 알려져 있다. C_i는 혼합된 상태에서 정해진 effect x%를 얻기 위한 n가지 화학물질의 개별 농도를 나타내며, ECx_i는 x%의 영향을 얻기 위한 개별 화학물질의 농도를 나타낸다. C_i/ECx_i 항은 동일한 독성 영향을 나타내는 농도 분율을 의미하며 일반적으로 toxic unit(TU)으로 정의된다.

Concentration addition 방법에서는 개별 toxic unit(C_i/ECx_i) 또는 C_i를 얻기 위해 산술적인 conc./LC₅₀의 값을 사용하지 않고 반응곡선 방법을 사용한다. 다시 말하면 화학물질 i의 독성은 단순히 conc./LC₅₀과 같이 농도에 따라 직선적으로 변한다고 판단할 수는 없기 때문에 독성 거동을 가장 잘 모델링하는 반응곡선을 사용한다.

이러한 CA 방법은 대상 화학물질의 유사한 작용기작에 따라 영향을 미칠 것으로 가정하여 독성을 산정한다. 즉, 유사한 기작을 보이는 독성물질이 같은 위치에 영향을 미치기 때문에 독성 값이 산술적으로 계산될 수 있다.

CA 모델에서 영향 %가 정해지면 그 영향을 미치는 농도를 구하는 것은 양함수의 형태로 얻을 수 있다. 이러한 경우는 실험에서 매 혼합독성 %(ex; 1%~99%)마다 대상으로 하는 화학물질의 혼합비 또는 농도를 구하기가 쉽다. 그러나 실제 수계에 나타나는 농도는 미지의 혼합비를 갖고 있을 것이고 이를 구하는 방법은

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{F_i^{-1}(x_i)} = 1 \quad (4)$$

와 같은 형태의 식을 만족시키는 x%를 반복적인 계산을 통해서 1에 가까운 적절한 값을 구해야 한다. 식 (4)에서 F_i⁻¹는 농도-반응곡선에서 반응(독성영향)으로부터 해당 농도를 산출하는 함수이다(함수 F는 반응곡선에서 농도로부터 독성영향을 구하는 함수를 나타내며, F⁻¹은 함수 F의 역함수를 의미한다)

2.5.3. Independent Action

Independent action method는 concentration addition 방법과 마찬가지로 반응곡선을 적용하여 독성을 나타내는 농도를 산출한다. 이 방법에서는 서로 다른 작용기작을 가진 화학물질들이 혼합된 상태로 존재할 경우에 나타나는 독성은 CA 방법과 ES 방법에서처럼 단순히 산술적으로 계산될 수 없다고 가정한다. 즉 개별 화학물질들의 독성이 서로 다른 작용 기작을 갖고 있기 때문에 독성도 서로 다른 위치에 영향을 미친다고 가정한다. 그러나 서로 다른 작용기작을 통해서 독성이 나타나더라도 동일한 생물학적 독성 종말점을 갖아야 하며, 이러한 가정이 성립되었을 경우에 independent action 방법은 성립하게 된다. Independent action 방법을 두 가지 독성물질에 대해 적용시킬 경우에는 다음과 같은 식이 성립하게 된다.

$$E(C_{mix}) = E(C_1) + E(C_2) - E(C_1)E(C_2) \quad (5)$$

$$\text{또는, } E(C_{mix}) = E(C_1) + E(C_2)(1 - E(C_1)) \quad (6)$$

여기에서, $E(C_1) = 1 - (1 - E(C_1))$ 을 식 (5)의 왼쪽 첫 번째 항에 대입해주면

$$E(C_{mix}) = 1 - (1 - E(C_1))(1 - E(C_2)) \quad (7)$$

의 식이 얻어지게 된다. 이 경우를 일반적인 혼합물질에 대해 적용시키게 되면

$$E(C_{mix}) = 1 - (1 - E(C_1))(1 - E(C_2)) \cdots (1 - E(C_n)) \quad (8)$$

$$E(C_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(C_i)) \quad (9)$$

로 나타낼 수 있다. $E(C_i)$ 는 개별 화학물질들의 독성영향을 나타내며 C_i 는 IA 혼합독성 $E(C_{mix})$ 를 나타내기 위한 개별 오염물질의 농도를 나타낸다. 식 (9)는 $E(C_i)$ 나 C_i 에 대해 양함수의 형태로 쉽게 구해질 수 있다. 그러나 주어진 X%의 혼합독성을 나타내는데 필요한 C_{mix} 또는 C_i 는 음함수의 형태이므로 반복계산을 통해서만 구해질 수 있다.

3. 결과 및 고찰

3.1. GC-MS 분석결과

Table 2에 GC-MS 분석결과를 나타내었다. 분석은 각 계절별 특성을 고려하기 위하여 계절별로 6회에 걸쳐 시행하였다. Table에서 알 수 있듯이 전 기간에 걸쳐 pesticide류가 다량 검출되고 있으며, phthalate류는 5차까지는 거의 일정한 수로 검출되었다. 그러나 6차 분석 결과에서는 phthalate류 뿐만 아니라 phenol류 까지도 적은 수가 검출되었다. pesticide류는 검출 시기에 따라 그 검출되는 chemical이 변화하고 있으나 독성이 높은 diazinon, fenobucarb, isofenphos 등은 지속적으로 검출되었다. 검출된 pesticide류 중에는 내분비계 장애물질로 예상되는 isofenphos, aldrin, diazinon,

Table 2. Major chemicals detected from effluents at 9 WWTPs including sewage and agro-industrial wastewater in Gwangju, Jeollanamdo area

sampling chemicals		1	2	3	4	5	6
phenols		2,6-di-tert-butyl phenol p-octylphenol 2,4-dichlorophenol	2,6-di-tert-butyl phenol p-octylphenol	2-chlorophenol 2,3,6-trichlorophenol	2,3,6-trichlorophenol 2,6-di-tert-butyl phenol p-octylphenol	o-methoxyphenol 2,6-di-tert-butyl phenol p-octylphenol 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol	o-methoxyphenol
pesticides	Herbicides	1-chloronaphthalen 2-chloronaphthalen pendimethalin methyl dymron tris-phosphate	1-chloronaphthalen methyl dymron	propyzamide perilachlor mefenacet	propyzamide perilachlor mefenacet	pretilachlor	simetryn pendimethalin propyzamide
	Fungicides	mepconil chloroneb		chlornob chlorothalonil iprodione	chlorothalonil iprodione	fthalide tricyclazole chloroneb	tolcophomethylo tolclofos-methyl
	Insecticides	isofenphos r-HCH fenobucarb	fenobucarb	diazinon aldrin	diazinon isofenphos aldrin malathion	fenobucarb	dichofenthion EPN
phthalates		diethyl phthalate dimethyl phthalate dimethylte phthalate diisobutyl phthalate di-n-butyl phthalate diheptyl phthalate	diethyl phthalate dimethyl phthalate dimethylte phthalate diisobutyl phthalate di-n-butyl phthalate diheptyl phthalate	dimethylte phthalate butyl benzyl phthalate diheptyl phthalate dioctyl phthalate	diethyl phthalate di-n-butyl phthalate butyl benzyl phthalate diheptyl phthalate dioctyl phthalate	diethyl phthalate diisobutyl phthalate 2-ethylhexyl phthalate di-n-butyl phthalate	diethyl phthalate di-n-butyl phthalate

malathion, iprodione등이 포함되어 있다. phenol류의 경우는 검출되는 물질의 수가 다른 항목들에 비하여 적게 나타나고 있으나 독성이 강하고 내분비계 장애물질로 예상되는 p-octylphenol이 검출되었다. phthalate류는 계절에 관계없이 다수가 검출되었으며, 검출되는 항목도 계절에 따라 크게 영향을 받고 있지 않은 것으로 판단되었다.

Table 3. The result of reference toxicity tests that were conducted using *D. magna*

Priority pollutant	LC ₅₀	Group
★ 2-Chlorophenol	5.17 mg/L	phenol
2,4-Dichlorophenol	3.68 mg/L	"
2,4-Dimethylphenol	9.66 mg/L	"
2,4-Dinitrophenol	18.30 mg/L	"
2-Nitrophenol	13.71 mg/L	"
4-Nitrophenol	11.79 mg/L	"
Pentachlorophenol	0.86 mg/L	"
Phenol	13 mg/L	"
4-Chlorophenol	4.41 mg/L	"
2,4,5-Trichlorophenol	2.08 mg/L	"
★ 2,4,6-Trichlorophenol	6.64 mg/L	"
2,3,4,6-Tetrachlorophenol	2.48 mg/L	"
Nonylphenol	87.9 μg/L	"
★ p-octyl phenol	20.8 μg/L	"
2,6-di-tert-butyl phenol	2.82 mg/L	"
Dimethyl phthalate	33 mg/L	phthalate
★ Butyl benzyl phthalate	3.7 mg/L	"
★ Diisobutyl phthalate	2.23 mg/L	"
★ Di-n-butyl phthalate	3.863 mg/L	"
Diethyl phthalate	52 mg/L	"
Dimethylterephthalate	49 mg/L	"
Diheptyl phthalate	37.9 mg/L	"
Dioctyl phthalate	>10 mg/L ¹¹	"
2-Ethylhexyl phthalate	1.1 mg/L	"
Chloropyrifos	1 μg/L	pesticide
★ Pendimethline	0.283 mg/L	"
★ Isufenphos	1.351 μg/L	"
Mepronil	2.38 mg/L	"
Chloroneb	>8 mg/L	"
★ Fenobucarb	3.3 μg/L	"
★ Diazinon	0.96 μg/L	"
1-chloronaphthalen	1.2 mg/L	"
2-chloronaphthalen	3.27 mg/L	"
2-tris-phosphate	27 mg/L	"
Propyzamide	>5.6 mg/L ¹¹	"
Thiobencarb	>1.0~<10 mg/L ¹¹	"
Iprodione	0.43 mg/L	"
Methyl dymron	>0.04 mg/L ¹¹	"
Malathion	33 μg/L ¹¹	"

★ 10 major toxic chemicals selected from the reference toxicity tests with *D. magna*

3.2. 기준 독성 평가결과

Table 3에 *D. magna*를 사용한 기준 독성 평가결과를 나타내었다. Table 3에 나타난 오염물질들은 방류수의 GC-MS 분석 결과를 통해 얻어진 것들과 미국 EPA에서 규정하는 수질기준(WQC)에서 제시하는 120가지 오염물질 중에서 선정하였다. GC-MS를 통한 분석결과로부터 검출된 모든 화합물에 대하여 기준 독성 평가 결과를 실시하였고, 그 결과로부터 방류수의 대부분의 독성을 나타내는 독성 물질로 선정된 것이다. 선정과정에서 독성이 다른 오염물질보다 낮은 경우라 할지라도 방류수 중에 다량 존재하여 높은 독성 기여도를 나타내는 물질을 선정하였으며, 낮은 농도로 존재 하더라도 역시 높은 독성 기여도를 나타내는 오염물질을 선정하였다. 이들 주요 독성 기여 오염물질들은 방류수중의 유기오염물질 독성의 99.9% 이상을 차지하였다. *D. magna*에 주로 높은 독성을 나타내는 물질들은 pesticide와 같은 농약류들이었으며, phthalate등은 상대적인 독성이 높지는 않았으나 고농도로 존재하여 시험 중에 높은 독성영향을 나타내었다. 기준 독성 결과를 근거로 하여 방류수 중에 존재하는 10가지의 주요 독성 기여물질을 선정하였다. Table 3에 위에서 선정된 오염물질들에 대한 기준 독성 평가 결과로부터 선정된 10개의 오염물질들을 나타내었다. 방류수 중에 검출된 유기오염물질 중에서는 diazinon이 0.96 μg/L로 가장 높은 독성을 나타내었고, dimethylterephthalate가 49,000 μg/L로 가장 낮은 독성을 나타내었다.

3.3. 반응곡선(Response curve) 작성

기준 독성평가 결과로부터 반응곡선을 작성하였으며(sigmoidal, SPSS), 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Diazinon과 같은 농약류는 높은 독성을 나타냈으며, 나머지 오염물질들은 대부분 1~10 mg/L 사이에서 LC₅₀이 형성되고 있으며, 0% 치사율을 보이는 농도와 100%의 치사율을 보이는 농도가 매우 작은 농도범위인 1~10 mg/L 사이에서 나타났다. Diazinon을 포함한 대부분의 오염물질들은 좁은 농도범위에서 독성 값이 급격하게 변화하였으나, pendimethalin은 상대적으로 완만한 독성변화를 나타내었다.

Fig. 1에 나타난 반응곡선의 함수 값을 Table 4에 나타내었다. Isufenphos가 가장 높은 r² 값인 0.9996을 나타내었으며, p-octylphenol을 제외한 모든 오염물질들은 r² > 0.9의 값을 나타내 높은 상관율을 보였다. 가장 낮은 r² 값을 갖는 p-octylphenol은 0.8333을 나타내었다. 이들 식을 얻기 위해 사용된 값은 mg/L 단위로 하여 계산하였다. 이 반응곡선 식은 SigmaPlot® program에서 제공하는 계산식을 사용하였으며, 시그모이드 3개의 매개변수 식에 의해

$$Y = \frac{a}{1 + \exp\left(\frac{-(X - X_0)}{b}\right)} \quad (10)$$

식 (10)과 같이 표현되었다.

Table 4. The Equation and Variables of Each Response Curve

	p-octylphenol	butyl benzyl phthalate	di iso butyl phthalate	isofenphos	di n butyl phthalate	pendimethalin	2,4,6-TCP	2-CP	diazinon	fenobucarb
a	111.107	99.870	92.968	100.646	96.692	101.897	96.727	95.119	96.3712	119.051
b	0.0029	0.3486	0.7053	0.00035	0.7960	0.1250	1.555	1.477	5.579*10 ⁻⁵	0.00091
X ₀	0.0230	2.5427	4.5180	0.0025	3.5213	0.4918	6.600	5.709	8.363*10 ⁻⁴	0.003469
r ²	0.8333	0.9838	0.9831	0.9996	0.9803	0.9355	0.9493	0.9721	0.9287	0.9694

Y = a/(1+exp(-(X-X₀)/b))*

* calculation was performed on mg/L concentration unit

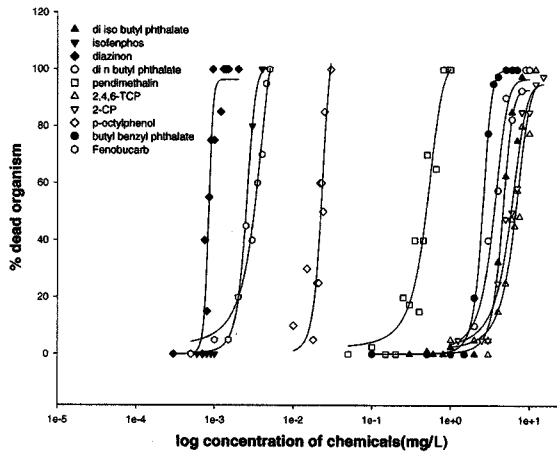


Fig. 1. Response curve of 10 chemicals.

3.4. 10가지 오염물질에 대한 혼합독성평가 결과

방류수에서 선정된 10가지 주요 오염물질들의 혼합독성 평가결과와 모델을 통해 예측된 결과를 Fig. 2에서 Fig. 4 까지 나타내었다. 이들 주요 오염물질들은 GC/MS 분석 결과와 *D. magna* 기준 독성 평가 결과를 고려하여 방류수 중에 높은 농도로 존재하거나, 또는 낮은 농도로 존재한다 하더라도 높은 독성 값을 나타내는 것을 대상으로 하였다. 모델을 통한 % 치사율의 예측은 effect summation의 경우 LC₅₀을 기준으로 conc./LC₅₀의 산술적인 계산을 통해 얻어지는 % 치사율 값을 사용하였다. Concentration addition과 independent action 모델의 경우에는 Fig. 1과 Table 4에서 나타낸 반응곡선에 실험에 사용된 농도 값을 적용하여 각각의 모델식 (4)와 (9)를 통해 % 치사율 값을 얻었다.

Effect summation 모델을 통한 10가지 주요 오염물질의 독성 예측 결과와 실제 독성과의 상호비교 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그래프에서 알 수 있듯이 실제 나타난 독성 값(TU)은 모델을 통해 예측된 독성 값(TU)보다 매우 작은 값을 보여주고 있다. 이 결과로부터 effect summation 모델은 10가지 주요 오염물질의 독성을 과도하게 평가하였다. 실험에 사용된 10가지 오염물질은 전남지역 하수처리장에 존재하는 주요 독성 기여 물질들이다. 결론적으로 ES 모델은 실제 방류수 독성을 과도하게 책정하는 결과를 가져올 것으로 판단된다.

Concentration addition 방법과 independent action 방법을 통해 예측된 % 치사율 값을 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3은

실측 결과(관측 % 치사율)가 모델을 통해 예측된 결과(계산된 % 치사율)와 얼마나 잘 맞는지를 알아보기 위한 결과 그래프이다. 그래프의 x축은 혼합된 오염물질의 총 농도를 나타내고 있으며, y축에 농도에 따른 치사율 값을 나타내었다. 실제로 나타난 예측 결과는 concentration addition 모델을 통해 예측된 결과이며, 점선으로 나타난 결과는 independent action 모델을 통해 예측된 결과를 나타낸다. 그래프에서 알 수 있듯이 independent action 방법을 통해 예측된 결과가 혼합독성 평가를 통해 얻어진 실제 결과와 잘 일치하였다. Fig. 3에 나타난 independent action 모델 결과와 실측 결과와의 일치 정도를 판단하기 위해 관찰 치사율과 IA 모델을 사용하여 계산된 값의 상관성 평가를 수행하였고, Fig. 4에 나타내었다. 그래프에 나타난 바와 같이 매우 높은 r² 값(0.8475)을 보여주었다. 따라서 방류수와 같이 다양한 오염물질들이 존재하는 시료의 생물독성은 independent action(IA) 방법에 의한 독성 예측이 적용 가능하다. Concentration addition이나 effect summation 방법은 화학물질별로 서로 다른 반응기작을 나타내는 것을 고려하지 않은 모델이므로 방류수의 독성 예측에는 적절하지 않은 것으로 판단된다. 결론적으로, 본 연구에서 검증된 이들 10개의 독성물질들은 독립적(서로 다른 위치에 독성 영향을 나타냄)인 생물학적 독성 영향(endpoint)을 갖는 혼합물로 판단되었으며, IA 방법에 의해 성공적으로 혼합독성이 예측될 수 있었다.

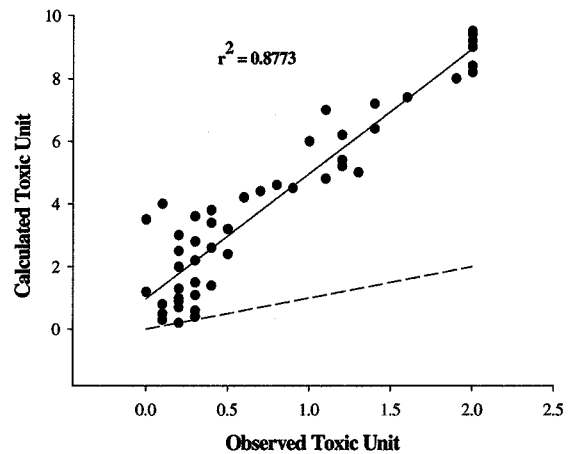


Fig. 2. Comparison of effect summation toxic unit vs. observed toxic unit. The dotted line represents equality line.

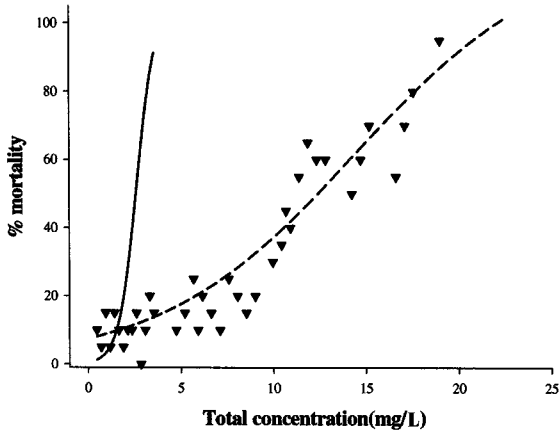


Fig. 3. Observed and predicted *D. magna* toxicity of mixtures of 10 major chemicals. The dashed line represent independent action % mortality and the solid line represent concentration addition % mortality.

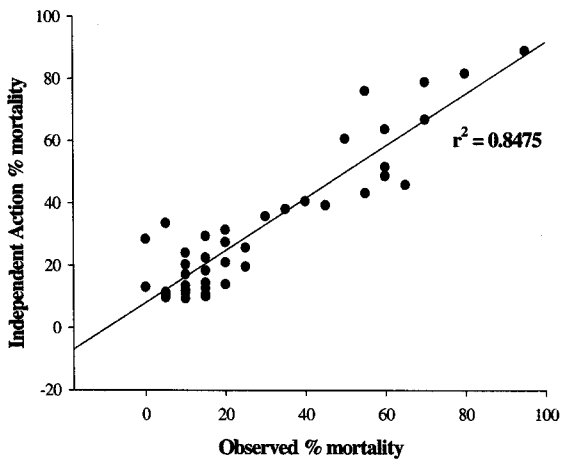


Fig. 4. Comparison of independent action % mortality vs. observed % mortality.

4. 결론

방류수 중에 존재하는 독성물질 분석결과 대부분의 독성이 본문에서 언급한 10개의 유기오염물질들에서 기인하는 것으로 판단되었으며, 이들에 대한 독성평가결과 주로 농약류가 높은 독성 값을 나타내었다. 또한, 본 연구 결과에서 나타났듯이 방류수 중에 존재하는 주요 독성물질의 독성 예측은 기존의 LC₅₀ 값에 기초한 TU 방법(effect summation method)나 시그모이드 곡선을 사용하더라도 CA와 같은 독성의 단순 합에 의한 예측보다는, 공통적으로 나타나는 동일한 생물학적 독성 종말점을 고려한 IA 예측방법이 더욱 바람직할 것으로 나타났다. 결과적으로, 영산강 유역에서 가장 높은 독성 기여도를 가진 10가지 독성물질들은 IA 방법을 통한 치사율 예측을 통해서 서로 독립적인 독성 경향을 나타내고 있는 것으로 나타났다. 이들 10 가지 오염물질들이 모두 다른 작용기작을 갖고 있다고 볼 수는 없으나 향후, 수계의 독성 예측을 위해서 각 개별 오염물질의 시

그모이드 곡선에 기초한 IA 예측 방법은 광범위하게 다양한 오염물질의 독성 예측에 적용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 2002년도 차세대 핵심환경 기술개발 사업의 일환으로 환경부의 지원 하에 수행되었습니다.

참고문헌

- Victor, D. V., Vallerie, C., Carol, D., Howard, C. B., Linda, A. D., David, E. H., "Application of Whole Effluent Toxicity Test Procedures to Ambient Water Quality Assessment," *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**(1), 42~62(2000).
- Steven, W. G., Kari, L. F., Eric, T. K., Greg, S., Lou, R., and Dawn, A. K., "Modification to the Algal Growth Inhibition Test for Use As a regulatory Assay," *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**(1), 36~41(2000).
- Howard, C. B., Rick, K., James, R. E., Ann-Maree, M., Peta, H., Louise, T., and Adam, L., Whole Effluent Toxicity of Sewage Treatment Plants in the HAWKESBURY-NEPEAN WATERSHED, NEW SOUTH WALES, AUSTRALIA, to *Ceriodaphnia dubia* and *Selenastrum Capricornutum*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**(1), 72~81(2000).
- Kenneth, E. B., Sylvia, H. W., Cathy, M., and Kevin, A. T., "Joint Acute toxicity of diazinon and copper to *ceriodaphnia dubia*," *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**(7), 1562~1567(2003).
- Michael, C., "Mixtrue toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid," *Ecotox. Environ. Safe.*, in press.
- Roberta, G., "Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents," *Chemosphere*, **44**, 1737~1747(2001).
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L. H., Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants, *Aquat. Toxicol.*, **56**, 13~32(2001).
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L. H., Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action, *Aquat. Toxicol.*, **63**, pp. 43~63(2003).
- Method for measuring the acute toxicity of effluents

- and receiving waters to freshwater and marine organism, EPA/600/4-90/027F(1993).
10. Cowgill, U. M. and Milazzo, D. P., The Sensitivity of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* to Seven Chemicals Utilizing the Three-Brood Test, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **20**(2), 211~217(1991).
 11. Backhaus, T., Scholze, M., Grimme, L. H., The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*, *Aquat. Toxicol.*, **49**, 49~61(2000).
 12. U.S. Environmental Protection Agency, ECOTOX database, <http://www.epa.gov/ecotox>.