

Pentachlorophenol Sodium Salt, Potassium Dichromate, Sodium Azide에 대한 새뱅이(*Neocaridina denticulata*) 급성독성

이재우, 문예련, 윤준현, 최경희, 한진석, 류지성*

국립환경과학원 위해성평가연구과

Acute Toxicity of Pentachlorophenol Sodium Salt, Potassium Dichromate, Sodium Azide to *Neocaridina denticulata*

Jaewoo Lee, Ye Ryeon Moon, Junheon Yoon, Kyunghee Choi,
Jin Seok Han and Jisung Ryu*

Risk Assessment Division, National Institute of Environmental Research

ABSTRACT

Neocaridina denticulata is a small freshwater shrimp indigenous to Korea. As an indigenous species has long-adapted to particular water environments, the species can be a suitable indicator to assess environmental risks caused by hazard chemicals in the particular site. Thus *Neocaridina denticulata*, a small freshwater shrimp indigenous to Korea, is worth considering for a test species for such purpose.

N. denticulata were exposed to pentachlorophenol sodium salt, sodium azide and potassium dichromate using automatic flow-through system for 96 hours. The 96 hr lethal concentrations (LC₅₀) of these chemicals were calculated as 0.53 ± 0.09 mg/L, 2.40 ± 0.61 mg/L and 1.21 ± 0.09 mg/L respectively and showed relatively small deviation from repetitive test results. When compared with the toxicity values of other species for each chemical, *N. denticulata* had moderate or high sensitivity to the toxicity of these chemicals. It can be concluded that *N. denticulata* is a good test species to evaluate acute toxicity of various hazardous chemicals.

Key words : *Neocaridina denticulata*, Freshwater shrimp, Acute toxicity

서 론

유해화학물질에 대한 생태위해성평가를 수행하

기 위해서는 어류, 무척추동물 및 식물 등을 이용한 생태독성자료가 필요하다. 그러나 생태독성은 수백만 종의 생물이 평가의 대상이 될 수 있기 때문에 적합한 생태독성 시험 종을 선정하는 것이 무엇보다 중요하다.

특히 한 나라에서 사용되는 화학물질로부터 자국의 환경을 보호하려는 목적으로 위해성평가를 수행하는 경우에는 그 나라의 환경에 적합한 독성시험

접수일: 2009년 12월 9일, 채택일: 2010년 9월 9일

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-32-560-7179, Fax: +82-32-568-2037

E-mail: jsgood4u@korea.kr

법 및 독성시험생물종을 이용하여 평가하는 것이 보다 바람직하다고 할 수 있다. 그러나 우리나라에서는 아직까지 국내에 서식하고 있는 고유생물종을 이용한 체계적인 생태독성연구가 진행되지 못해왔다. 따라서 국가차원에서 생태독성시험에 사용할 수 있는 적절한 고유생물종을 발굴하고 이들 생물종에 적합한 생태독성평가방법을 제시할 필요성이 있다.

국내에서는 2006년에 생태독성평가에 활용이 가능한 고유생물종으로 대륙송사리(*Oryzias sinensis*), 새뱅이(*Neocaridina denticulata*) 및 꽃체다슬기(*Semismulcospira gottschei*)를 대상으로, 독성시험의 가능성을 알아보기 위한 급성독성시험이 수행된 바 있다(국립환경과학원, 2006). 이중 새뱅이는 중금속에 대한 급성독성시험에 유용한 시험 종이 될 수 있을 것으로 알려져 있다(국립환경과학원, 2007).

새뱅이는 절지동물문, 갑각강, 십각목, 새뱅이과에 속하는 종으로서, 담수 수계에 널리 퍼져 있다. 일반적으로 한국과 일본 등 동아시아 지역 등의 하천, 연못, 습지 그리고 강 등에 서식하고 있다. 따라서 새뱅이는 환경적으로 수생생물을 이용한 수계의 연구와 연관된 가장 일반적인 종 중 하나가 될 수 있다. 아울러 생태계 먹이사슬 내에서 상위 포식자들의 먹이가 되고 하위 포식자를 섭이하는 중간 연결단계의 생태적 지위를 차지하고 있다는 점에서 생태적 중요성을 지니고 있다(Englund and Cai, 1999; Huang *et al.*, 2004). 또한 새뱅이는 시험개체 확보가 쉽고 실험실 조건에서 사육 및 번식이 용이하며, 한 세대의 기간이 약 3개월로 짧아 OECD 권장 독성시험 종으로 사용되는 송사리(*Oryzias latipes*)처럼 독성시험 생물종으로서의 여러 장점을 가지고 있다(국립환경과학원, 2006). 기존의 연구결과 새뱅이는 독성시험에서 대조군의 치사율이 거의 나타나지 않았으며, 농도 의존적 독성결과를 나타내는 등 독성시험 종으로서의 여러 장점을 갖는 것으로 나타났다(류지성 등, 2007).

한편 pentachlorophenol (PCP)는 나무보호제, 살충제, 살균제, 제초제 등 광범위한 분야에 사용되어지고 있으며(Zha *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2007), sodium azide (NaN₃)는 자동차 에어백을 팽창시키는 성분과 실험용 시약의 방습제, 소독제, 살충제와 의료 산업에서는 조직 보호제, 자동혈구 계산기의 희석액 등 다양한 곳에 사용되고 있다(Trout *et al.*, 1996; Faqi *et al.*, 2008). 그리고 potassium dichromate는

염색 산업, 표면처리제 그리고 나무 보호제 등에 사용되고 있으며, 수생생물에 대한 표준독성물질로 제안되어 널리 사용되고 있다(Kranz and Gercken, 1987; Svobodova and Vykusova, 1991; Krejci and Palikova, 2006). 특히 PCP와 potassium dichromate는 생태독성실험에서 표준독성물질로 많이 사용되고 있다.

따라서 본 연구는 새뱅이를 이용하여 세 가지 독성물질에 대한 급성독성시험을 실시함으로써 독성시험 종으로서의 활용가능성을 알아보고자 하였으며, 추후 새뱅이를 이용한 급성독성방법을 도출하고 표준화하는데 필요한 기초 자료를 제공하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

1. 시험종

전주시 전주천에서 채집한 새뱅이(*Neocaridina denticulata*)를, 국립환경과학원 환경독성시험동내 사육실에서 수온 24±1°C, pH 7~8, 용존산소 7~9 mg/L, 경도 47~51 mg/L CaCO₃ 및 광주기 16시간/8시간(명/암)의 조건으로 순화시켰다. 시험 개체는 사육실에서 계대배양하여 부화 후 3개월 이상된 외관상 이상이 없는 건강한 개체로서 사육기간 동안 먹이는 인공사료(Top meal, Tabia[®])를 공급하였으며, 시험 개시 2일전에 절식하였다. 평균 크기는 전장 1.5±0.5 cm이었다(Fig. 1).

2. 시험물질

Pentachlorophenol sodium salt (Sigma-Aldrich Inc., USA), potassium dichromate (Sigma-Aldrich Inc., USA)와 sodium azide (Sigma Chemical Co., USA)를 각각 증류수에 용해시켜 시험원액 1,000 mg/L를 만든 후, 희석수에 일정비율로 재 희석하여 시험에 적합한 농도로 제조하였다. 희석수는 수생생물 사육용 정수처리시스템(Hanssem Watertech. Co., Korea)으로 처리된 수돗물을 사용하였으며, pH 범위는 7~8이었다.

3. 급성독성시험

급성독성시험은 시약공급조, 희석수공급조 및 혼

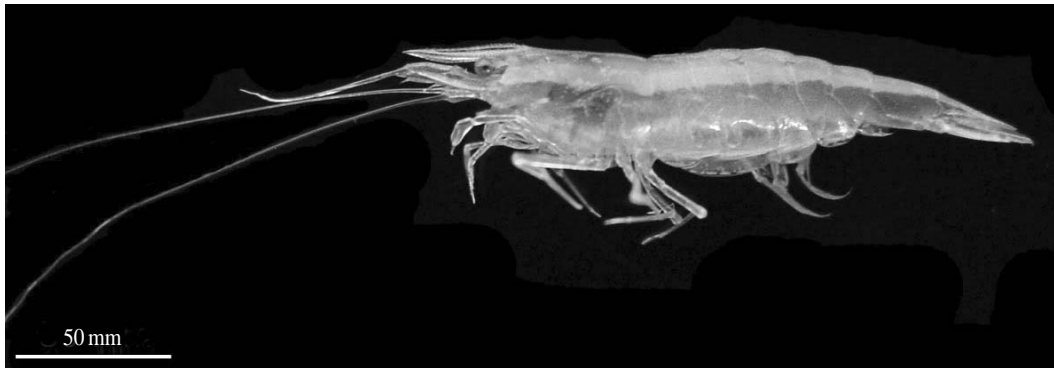


Fig. 1. A Korean freshwater shrimp, *Neocaridina denticulata*.

합조로 구성된 자동유수식 노출장치(Sibata Scientific Technology Ltd., Japan)를 이용하였으며, 혼합조에 시험용액과 희석수가 1:9 비율로 공급되도록 조절하였다. 시험수조(2L)의 최종시험용액 농도는 pentachlorophenol sodium salt의 경우 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/L이었으며, potassium dichromate는 0.256, 0.64, 1.6, 4.0, 10.0 mg/L로 조절하였다. 그리고 sodium azide는 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 mg/L가 되도록 하였다. 시험물질의 농도는 예비실험을 통해 결정하였으며, 급성독성시험 기간 동안의 환경조건은 사육조건과 동일하도록 24±1°C의 수온과 16 h/day의 광주기를 유지하였다. 시험농도 별로 각각 30마리의 개체를 노출시켰으며, 10마리씩 세 개의 군으로 나누어 반복노출시험을 실시하였다. 96시간 동안 노출하고 시험기간 동안 치사개체는 즉시 제거하였으며, 움직임이 없이 옆으로 누워있는 상태를 치사의 기준으로 하였다. 자동유수식 노출장치의 2L 노출수조 시험용액 교체주기는 24시간 동안 시험용액 전체가 일회 환수되도록 하였다. 시험기간 동안 먹이는 공급하지 않았으며, 치사율에 따른 반수치사농도(LC₅₀)는 미국 EPA에서 제공한 TRIMMED SPEARMAN-KARBER (TSK) PROGRAM VERSION 1.5을 이용하여 산출하였다.

결과 및 고찰

수생생물에 대한 생태독성자료가 많이 축적되어 있고 생태독성시험에서 표준독성시험물질로 많이

Table 1. Lethal concentrations of pentachlorophenol sodium salt, sodium azide and potassium dichromate to *Neocaridina denticulata*

| | Pentachlorophenol sodium salt | Potassium dichromate | Sodium azide |
|------------------------------|--|------------------------------|------------------------------|
| 96 h-LC ₅₀ (mg/L) | 0.53 ± 0.09 ¹⁾ (0.44 ~ 0.62) | 1.21 ± 0.09 (1.11 ~ 1.27) | 2.40 ± 0.61 (1.89 ~ 3.09) |
| CV (%) ²⁾ | 17.0 | 7.44 | 25.4 |

¹⁾Data were presented as mean ± SD (n=3)

²⁾Coefficient of variation

Table 2. Lethal concentrations of cadmium chloride, copper chloride and zinc chloride to *Neocaridina denticulata*

| | Cadmium chloride | Copper chloride | Zinc chloride |
|------------------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|
| 96 h-LC ₅₀ (mg/L) | 0.043 ± 0.002 ¹⁾ (0.042 ~ 0.045) | 0.104 ± 0.008 (0.098 ~ 0.113) | 2.021 ± 0.507 (1.633 ~ 2.594) |
| CV (%) ²⁾ | 4.65 | 7.7 | 25.1 |

Data were quoted from 류 등, 2007

¹⁾Data were presented as mean ± SD (n=3)

²⁾Coefficient of variation

이용되는 pentachlorophenol sodium salt, potassium dichromate 그리고 대표적 유해물질 중 하나인 sodium azide에 96시간 동안 담수산 새우류인 새뱅이를 노출시켰다. 노출된 새뱅이의 경우 독성시험 중 대조군에서의 이상증상은 발견되지 않았으며, 반복 시험에 따른 96 h-LC₅₀값의 차이도 비교적 크지 않았다(Table 1). 또한 농도가 증가함에 따라 치사율이 증가하는 농도 의존적 결과가 도출되어, 새뱅이

Table 3. Lethal concentrations of pentachlorophenol sodium salt to several species

| | Species | LC ₅₀ (mg/L) | Exposure duration (hour) | Note (size) | Reference |
|------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|------------------|-----------------------------|
| | <i>Neocaridina denticulata</i> | 0.53 | 96 | | |
| Water flea | <i>Daphnia magna</i> | 0.28 ¹⁾ | 48 | EC ₅₀ | Devillers and Chambon, 1986 |
| | <i>Daphnia magna</i> | 0.76 | 24 | IC ₅₀ | |
| Shrimp | <i>Palaemonetes pugio</i> | 0.436 ¹⁾ (0.361 ~ 0.498) | 96 | adult (25 mm) | |
| | <i>Palaemonetes varians</i> | 5.09 ¹⁾ (4.72 ~ 5.50) | 96 | adult | |
| Fish | <i>Danio rerio</i> | 1.13 ¹⁾ | 96 | 0.2 ~ 0.6 g | Little <i>et al.</i> , 1990 |
| | <i>Lepomis macrochirus</i> | 0.39 ¹⁾ (0.366 ~ 0.415) | 96 | 1.7 g | |
| | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | 0.52 | 96 | 0.5 ~ 1.0 g | |
| | <i>Oryzias latipes</i> | 0.24 ¹⁾ | 96 | | |
| | <i>Pimephales promelas</i> | 0.427 ¹⁾ (0.388 ~ 0.47) | 96 | 2d larvae | |
| | <i>Tilapia zilli</i> | 0.645 | 96 | 2 ~ 6 cm | |

¹⁾Data were quoted from ECOTOX database (URL: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>)

Table 4. Lethal concentrations of potassium dichromate to several species

| | Species | LC ₅₀ (mg/L) | Exposure duration (hour) | Note (size) | Reference |
|------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------|------------------|----------------------------------|
| | <i>Neocaridina denticulata</i> | 1.21 | 96 | | |
| Water flea | <i>Daphnia magna</i> | 0.25 ¹⁾ | 48 | EC ₅₀ | Largerspetz <i>et al.</i> , 1993 |
| | <i>Daphnia magna</i> | 0.5 | 48 | LC ₅₀ | |
| Shrimp | <i>Macrobrachium lamarrei</i> | 1.84 | 96 | 1.5 ± 0.1 g | Murti <i>et al.</i> , 1983 |
| | <i>Penaeus penicillatus</i> | 3.70 ¹⁾ | 96 | post larvae | |
| | <i>Praunus flexuosus</i> | 8 ~ 22 ¹⁾ | 96 | 0.2 ~ 0.6 g | |
| Snail | <i>Lymnaea acuminata</i> | 5.97 | 96 | 2.1 cm | Khangarot <i>et al.</i> , 1982 |
| | <i>Lymnaea luteola</i> | 3.88 (3.49 ~ 4.33) | 96 | 2.1 cm | |
| Fish | <i>Brachydanio rerio</i> | 58.5 (50.8 ~ 67.4) | 96 | 3.5 ± 0.5 cm | Bellavere and Gorbi, 1981 |
| | <i>Carassius auratus</i> | 90 ¹⁾ | 96 | 1.6 g | |
| | <i>Cyprinus carpio</i> | > 139 ¹⁾ | 96 | 1.5 g | |
| | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | 12.3 ¹⁾ | 96 | larvae | |
| | <i>Oryzias latipes</i> | 24.7 ¹⁾ (21.2 ~ 30.0) | 96 | 1 ~ 2d larvae | |
| | <i>Pimephales promelas</i> | 48 | 96 | 0.12 ~ 0.38 g | Adelman and Smith, 1976 |

¹⁾Data were quoted from ECOTOX database (URL: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>)

를 이용한 급성독성시험은 안정적이며 신뢰성 있는 독성시험방법이 될 수 있음을 확인할 수 있었다.

그리고 반복시험간의 편차 정도를 알아보기 위해 각 급성독성시험값에 대한 변동계수(coefficient of variation, CV)를 산출하여 보았다. 일반적으로 생물학적 자료의 경우 20 ~ 50%의 CV를 갖는 것으로 보고되고 있다(Sanford, 1990). 따라서 Table 1

에서 보는 바와 같이 본 연구에서 세 가지 물질에 대한 새뱅이의 급성독성시험 반복수행 결과 값의 편차는 크지 않은 것으로 사료된다.

이러한 일관성 있는 급성독성시험의 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 중금속에 대한 새뱅이의 96 시간 급성독성시험 결과에서도 동일하게 나타났다 (류지성 등, 2007). 따라서 새뱅이를 이용한 급성독

Table 5. Lethal concentrations of sodium azide to several species

| Species | LC ₅₀ ¹⁾ (mg/L) | Exposure duration (hour) | Note (size) |
|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|-------------|
| <i>Neocaridina denticulata</i> | 2.40 | 96 | |
| Fish | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | 2.75 | 96 |
| | <i>Pimephales promelas</i> | 5.46 (5.09~5.87) | 96 |
| | <i>Lepomis macrochirus</i> | 0.68 | 96 |
| | | | |

¹⁾Data were quoted from ECOTOX database (URL: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>)

성시험은 일관성 있는 독성 값을 도출할 수 있는 시험방법이 될 수 있을 것으로 판단된다.

급성독성시험에 사용한 세 가지 물질에 대한 새뱅이의 독성 값을 다른 생물종의 독성값과 비교하여 보았다(Tables 3~5). 미국 EPA에서 제공하고 있는 ECOTOX database를 통해 조사한 자료의 범위 내에서 pentachlorophenol, sodium salt에 대한 물벼룩, 새우류 및 어류의 급성독성값의 범위는 0.24~5.50 mg/L로 조사되었으며(Table 3), 그 외에 물벼룩(*Daphnia magna*)의 독성값(24 h-IC₅₀)은 0.76 mg/L이며(Devillers and Chambon, 1986), 틸라피아(*Tilapia zilli*)의 독성값(96 h-LC₅₀)은 0.645 mg/L로 조사되었다(Yen *et al.*, 2002). 따라서 pentachlorophenol sodium salt에 대한 다른 시험 종들의 독성값들과 비교할 때 96 h-LC₅₀값이 0.53 mg/L인 새뱅이는 중간정도의 독성값을 갖는 것으로 보여진다. Potassium dichromate에 대한 96 h-LC₅₀값(1.21 mg/L)은 물벼룩, 새우류, 복족류 및 어류의 급성독성값의 범위인 0.25~>139 mg/L과 비교하여 볼 때 비교적 낮은 독성값으로 나타났다(Table 4). 물벼룩(*Daphnia magna*)을 제외하고는 potassium dichromate에 대한 다른 생물종의 급성독성값은 대부분 새뱅이보다 높게 나타났다. 이전 연구결과에 따르면 중금속화합물인 CdCl₂, CuCl₂ 및 ZnCl₂에 대한 새뱅이의 독성 민감도가 다른 어류 종보다 더 높은 것으로 나타났다(류지성 등, 2007). 따라서, 중금속인 크롬이 포함된 potassium dichromate에 대한 새뱅이의 급성독성값 역시 낮게 나타난 것으로 판단된다. 한편 새뱅이에 대한 sodium azide의 경우 다른 수생생물종에 대한 급성독성값이 많지는 않았으나, 조사한 자료의 범위 내에서 어류는 0.68~5.87 mg/L의 독성값을 찾을 수 있었으며, 96 h-LC₅₀값이 2.40 mg/L인 새뱅이의 급성독성값을 고려할 때 sodium azide에 대한 새뱅이의 독성값은

중간정도인 것으로 보여진다(Table 5).

결 론

새뱅이를 이용한 급성독성시험을 실시함으로써 독성 시험 중으로서의 활용가능성을 알아보고, 추후 새뱅이를 이용한 급성독성방법을 도출하고 표준화하는데 필요한 기초 자료를 제공하고자 실험을 실시하였다. 대표적인 독성시험물질인 pentachlorophenol sodium salt, sodium azide 및 potassium dichromate에 대한 새뱅이 급성독성시험을 96시간 동안 3회 반복실험 하였고 결과 값의 일관성을 조사한 결과, 비교적 일관성 있게 도출되는 것을 확인할 수 있었다. 아울러 동일한 물질에 대한 다른 생물종의 독성 값과 비교한 결과, 새뱅이는 중간정도 또는 그보다 높은 독성에 반응하는 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

국립환경과학원. 환경독성평가를 위한 국내 고유생물종 개발 연구사업 보고서, 2006.
 국립환경과학원. 고유생물종을 이용한 생태독성평가방법 개발 및 표준화(I) 연구사업 보고서, 2007.
 류지성, 김은경, 문예련, 김현미, 김학주, 최경희. 국내 담수 새우인 새뱅이(*Neocaridina denticulata*)를 이용한 중금속의 급성독성시험, 한국환경독성학회지 2007; 22(2): 171-175.
 Adelman IR and Smith Jr LL. Fathead minnows(*Pimephales promelas*) and goldfish(*Carassius auratus*) as standard fish in bioassays and their reaction to potential reference toxicants, J Fish Res Board Canada 1976; 33(2): 209-214.
 Bellavere C and Gorbi J. A comparative analysis of acute

- toxicity of chromium, copper and cadmium to *Daphnia magna*, *biomphalaria glabrata*, and *brachydanio rerio*, Environ Technol Lett 1981; 2(3): 119-128.
- Devillers J and Chambon P. Acute toxicity and QSAR of chlorophenols on *Daphnia magna*, Bull Environ Contam Toxicol 1986; 37(4): 599-605.
- Englund RA and Cai Y. The occurrence and description of *Neocaridina denticulata sinensis* (Kemp, 1918) (Crustacea: Decapoda: Atyidae), a new introduction to the Hawaiian Islands, Bishop Mus Occas Pap 1999; 58: 58-65.
- Faqi AS, Richards D, Hauswirth JW and Schroeder R. Maternal and developmental toxicity study of sodium azide in rats, Regul Toxicol Pharmacol 2008; 52(2): 158-162.
- Ge J, Pan J, Fei Z, Wu G and Giesy JP. Concentrations of pentachlorophenol (PCP) in fish and shrimp in Jiangsu province, China, Chemosphere 2007; 69(1): 164-169.
- Huang DJ, Wang SY and Chen HC. Effects of the endocrine disrupter chemicals chlordane and lindane on the male green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*), Chemosphere 2004; 57(11): 1621-1627.
- Khargarot BS, Mathur S and Durve VS. Comparative toxicity of heavy metals and interaction of metals on a freshwater pulmonate snail (*Lymnaea acuminata* Lamarck), Acta Hydrochim Hydrobiol 1982; 10(4): 367-375.
- Khargarot BS and Ray PK. Sensitivity of freshwater pulmonate snail (*Lymnaea luteola* L.), to heavy metals, Bull Environ Contam Toxicol 1988; 41(2): 208-213.
- Kranz H and Gercken J. Effects of sublethal concentrations of potassium dichromate on the occurrence of splenic melano-macrophage centres in juvenile plaice (*Pleuronectes platessa* L.), J Fish Biol 1987; 31: 75-80.
- Krejčí R and Palíková M. Potassium dichromate as a reference substance for embryonic tests of toxicity in the common carp (*Cyprinus carpio* L.), Acta Vet Brno 2006; 75: 259-263.
- Lagerspetz KYH, Tiiska A and Senius KEO. Low sensitivity of ciliary activity in the gills of *Anodonta cygnea* to some ecotoxicals, Comp Biochem Physiol 1993; 105(3): 393-395.
- Little EE, Archeski RD, Flerov BA and Kozlovskaya VI. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout, Arch Environ Contam Toxicol 1990; 19(3): 380-385.
- Murti RO, Omkar and Skukla GS. Chromium toxicity to a freshwater prawn *Macrobrachium lamarrei* (H.M. Edwards), Toxicol Lett 1983; 18(3): 257-261.
- Sanford B. Pharmaceutical statistics: Practical and clinical applications, 2nd ed., New York: Marcel Dekker, Inc, 1990; p. 22.
- Svobodova Z and Vykusova B. Comparing the sensitivity of *Poecilia reticulata* and *Brachydanio rerio* to contaminants, Bul VURH Vodnany 1991; 27(1): 12-18.
- Trout D, Esswein EJ, Hales T, Brown K, Solomon G and Miller M. Exposures and health effects: an evaluation of workers at a sodium azide production plant, Am J Ind Med. 1996; 30(3): 343-350.
- Yen JH, Lin KH and Wang YS. Acute lethal toxicity of environmental pollutants to aquatic organisms, Ecotoxicol Environ Saf 2002; 52(2): 113-116.
- Zha J, Wang Z and Schlenk D. Effects of pentachlorophenol on the reproduction of japanese medaka (*Oryzias latipes*), Chem Biol Interact 2006; 161(1): 26-36.
- URL: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>.