

# 실시간 생태독성 평가를 위한 물벼룩 감시장치 적용성 검토

이장훈<sup>1</sup>, 고태웅<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>호서대학교 건축토목환경공학부 교수, <sup>2</sup>호서대학교 벤처대학원 융합과학기술학과 전임연구원

## Application of *Daphnia magna* Monitoring System for Real-time Ecotoxicity Assessment

Jang-Hoon Lee<sup>1</sup>, Woong-Tae Ko<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Professor, Division of Architecture, Civil and Environmental Engineering, Hoseo University

<sup>2</sup>Associate Research, Engineer Department of Convergence Science Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University

요 약 본 연구에서는 물벼룩 감시장치를 이용하여 생태독성 기준 1 TU(Toxic Unit)에 해당하는 물벼룩 감시장치의 TI(Toxic Index)값을 설정하고 NOEC와 EC50에서 물벼룩 감시장치를 운영하였을 때 적절히 경보가 발령되어 실시간 생태독성 평가가 가능한 지 타진하였다. 연구목적에 의해 국·내외 관련 자료를 조사하여 선행연구를 하였고 인공 하천수를 대상으로 먹는물 수질감시항목에서 권고하는 59개 유해물질 중 6개(As, Hg, Cr, Diazinon, Dioxane, Phenol) 물질을 채택하여 지수식과 유수식 그리고 정도관리 시험을 실시하였다. 시험결과 NOEC 유수식 시험에서 Diazinon을 제외한 다른 물질들은 TI가 양호단계로 나타났고 EC50 Spiking test에서 1 TU 이상과 1 TU 이하를 구분하여 TI는 TU에 상응하게 경보를 발령했다. 본 연구결과는 생태독성관리제도의 보완점을 생각하고 효율적인 관리체계로의 전환을 요구하는 하나의 메시지가 된다.

주제어 : 생물 모니터링, 물벼룩, 다프니아, 물벼룩 감시장치, 생태독성

Abstract In this study, TI(Toxic Index) of *Daphnia* toximeter corresponded to ecological toxicity standard 1 TU(Toxic Unit) was set up using *Daphnia* toximeter and when operating NOEC(water quality standards for drinking water) and EC<sub>50</sub> *Daphnia* toximeter alarm was issued appropriately, which enables real time ecological toxicity evaluation. I studied to get a good shot and the research was conducted by investigating domestic and international related data and conducting a preliminary study. 6 of 59 hazardous substances (As, Hg, Cr, Diazinon, Dioxane, and Phenol) recommended by the water quality monitoring items for artificial river water were selected and static, dynamic and quality management test, TI was shown to be good in other materials except Diazinon, and as a result of EC<sub>50</sub> spiking test, TI was matched to TU by distinguishing between 1 TU and 1 TU. in suggesting the complementary point of ecological toxicity management system and the future of research on water *Daphnia* toximeter.

Key Words : Bio-monitoring, Water flea, *Daphnia*, *Daphnia* Toximeter, Ecotoxin management

\*Corresponding Author : Tae-Woong Ko([swimko@hanmail.net](mailto:swimko@hanmail.net))

Received January 8, 2019

Accepted October 20, 2019

Revised September 18, 2019

Published October 28, 2019

## 1. 서론

과거의 수질오염사고가 그러했듯이 오염 여부는 사람이 직접 물을 사용할 때까지는 몰랐으며 뒤늦은 사고의 발생으로 말미암아 국민의 물에 대한 불안감이 가중되고 때늦은 후회와 사회적 물의를 초래하곤 했다. 화학물질의 다양화로 말미암아 일부 항목에 국한된 수질자동측정기는 모든 유해화학물질을 측정할 수 없다. 온라인 수질 모니터링 장치는 pH, DO, EC, 탁도, 영양염류 등을 측정하며 수질의 변화양상을 파악하는 것이 목적이다. 2018년 11월 환경부는 5년간 수질 원격감시장치(Tele Monitoring System, TMS)의 기록을 상습적으로 조작한 00시 A하수처리장 등 전국 8곳의 공공 하·폐수처리장을 적발하고 관계자 26명을 검찰에 송치했다[1]. TMS의 영점 전압 값을 낮추면 측정 값이 실제농도보다 낮게 측정되기 때문에 방류수 오염도가 실제보다 낮은 것처럼 조작할 수 있다. 기존에 실시하고 있는 수질분석의 결과만으로 방류되는 폐수의 오염도를 예측하는 방법은 독성을 예측하는데 문제점이 있음을 확인할 수 있었다. 화학 독성물질들은 단일물질만으로 매우 강한 독성을 나타내며 여러 가지 화학물질들이 통합될 경우에는 각 물질들의 상승 및 반대작용 그리고 누적된 부가작용에 의한 영향으로 새로운 독성 반응을 보인다.

기존 개별물질에 의한 수질평가의 한계를 극복하고 산업폐수의 수질을 통합적으로 관리하기 위해 2011년 1월 1일부터 물벼룩을 이용한 생태독성 관리제도를 도입하였다. 이는 월 1회 물벼룩을 직접 방류수에 노출시키고 24시간 후, 그에 따른 생태적·행동적 변화를 관찰하여 수질을 평가하는 것을 말한다. 생물체를 이용하기 때문에 목적수가 지니고 있는 유해성 여부를 전반적으로 평가할 수 있으나 실시간 평가가 불가능하며 시료의 이송과 분석시간 등을 고려하면 최소 3일이 소요된다. 따라서 이러한 생태독성관리제도의 비연속성을 보완하기 위해 실시간 모니터링이 가능한 생태독성평가 시스템에 대한 연구가 필요하다. 본 연구는 물벼룩과 생물 감시장치 관련 기술 동향 및 선행연구 자료를 수집하여 정리하였고 기존 연구에서 수행되지 않은 물벼룩 감시장치 독성평가지수 TI(Toxic Index)를 수질오염공정시험기준에 근거한 생태독성평가 TU (Toxic Unit)와 비교하는 연구를 실시하였다.

## 2. 이론적 배경

물벼룩을 이용한 독성 시험은 여러 분야에서 오랜 기간 동안 시행되고 있다. K. Sanna.(1995)에 의하면 *Daphnia magna*는 1940년경부터 독성시험에 사용되었고 지금까지 각 나라에서 중요한 독성시험법으로 자리 잡고 있으며 특히, 산업폐수에서 발생할 수 있는 유기물질 및 여러 종류의 중금속류에 대한 독성발현농도(Thresholds Concentration)를 발표한 이후 이에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다[4-6].

생물 감시장치의 종류로는 미생물(*Vibrio Fischeri*, *Shewanella*, Sulfur bacteria, 발광광, 전기전도도 변화)물벼룩(*Daphnia magna*, 운동성), 어류(*Zebra fish*, 운동성), 조류(*Chlorella vulgaris*, *Closterium ehourenb ergii*, 광합성 저해도) 등이 있다. 국내 4대강과 주요 취·정수장에는 대부분 물벼룩 감시장치가 설치되어 운영 중에 있으며 물벼룩 감시장치는 Dr. Knie에 의하여 1978년 독일에서 개발되었다[3]. 국내에 도입된 물벼룩 감시장치는 독일 Elektron사와 독일 Bbe사 장치가 있으며 측정원리로 Elektron사 장치는 물벼룩의 움직임에 대한 적외선 센서를 차단하는 빛수를 전기적 신호 값인 임펄스(Impulse)값을 측정하여 독성경보를 발령한다. Bbe사 장치는 물벼룩의 속도, 평균고도, 거리, 인지울 등 8개 파라미터(parameter)를 이용하여 독성경보를 발령한다. 현재 Elektron사 장비는 단종 되어 국내에서 운영되는 곳이 없기 때문에 본 연구에서 활용한 장치는 Bbe사 장치이다.

Buikema 외(1972)은 물고기를 이용한 시험에 비해 물벼룩이 보다 민감하게 반응하며 표준화 기술의 적용이 가능하고 시험기간이 짧고 경제적이라고 밝혔다[7].

Biesinger 외(1972)은 중금속들이 *Daphnia magna*의 생존, 성장, 번식과 신진대사에 미치는 영향과 중금속이 *Daphnia magna*에 대해 급성과 만성독성에 깊은 관계를 가지고 있음을 밝혔다[8].

윤종철 외(2004)는 *Daphnia magna*를 이용한 생물경보장치 연구에서 Cd과 Permethourin을 독일 공업규격 38412 L 30에 따라 지수식 시험을 하였고 독일 Bbe사 물벼룩 감시장치를 이용하여 유수식 시험결과 지수식 시험결과와 유사한 결과가 나타났다[9].

최성현 외(1996)는 금호강 성서공단 내 방류수질 기준을 대상으로 Elektron사 물벼룩 감시장치를 이용하여 유수식 시험결과 공장폐수 감시에 사용될 수 있음을 알 수 있었다[10].

Tollrian 외(1997)에 의하면 물벼룩의 주요 행동을 4가지로 설명했다. 첫째, 수직 또는 수평 이동 둘째, 포식

자와의 먹이 관계로 나타나는 유영행동 셋째, 먹이공급에 따른 유영행동 넷째, 독성물질에 따른 유영행동(자연적 : cyanobacterium toxin, 인공적 : 농약, 가스제 등)이다[11].

Buchanan 외(1982)는 유영행동의 대표적인 것으로 물벼룩이나 요각류(copepod) 유행동물(rotifer)등이 있으며 물벼룩의 2차원에서 유영행동의 정량적인 기술을 개발하였고 Young, S and Getty C. 는 3차원에서 유영행동의 정량적인 기술을 발전시켰으며 물벼룩의 운동속도에 영향을 주는 것은 빛, 빛의 세기, 빛의 종류, 먹이농도, 포식자, 살충제가 있고 요각류는 앞서 기술한 물벼룩의 영향 인자 외에 추가적으로 먹이의 덩어리, 물의 흔들림, 잠재적인 요인이 있다고 한다[12,13].

Gorski, P. R.(1995)는 물벼룩의 유영형태를 6가지 (① hop rate, ② speed, ③ turning angle, ④ vertical variance, ⑤ up and down angles, ⑥ sinking rate during swimming)로 분류하였다[14].

Brewer, M. C.(1996)는 물벼룩의 유영을 스케일(Scale)에 의존하여 카메라의 초당 프레임(Frame)의 변화에 따라 물벼룩의 속도를 관찰하였다[15].

신동훈(2010)은 Bbe와 Elektron사 장치의 성능을 비교 하였다[16].

임병진 외(1995)는 중금속(Pb, Cd, As, Cu) 4종과 CN에 대해 독일공업규격 38412 L 30을 변형하여 물벼룩 생태독성 시험결과 가장 큰 독성은 Cu와 CN 이었으며 Elektron사 물벼룩 감시장치를 이용하여 하천수를 대상으로 시험한 결과 단일 물질보다 중금속 및 VOCs를 비롯한 복합유해화학물질에 크게 영향을 받는다고 결론을 내렸다[17].

이혜진 외(2003)는 Elektron사 물벼룩 감시장치를 이용하여 물벼룩을 6종의 중금속에 노출시켜 시험한 결과 Hg에서 가장 독성이 강한 것으로 나타났고 Cu > Cr > Cd > As > Pb 순으로 높은 독성반응이 나타났다[18].

한지선(2016)은 Bbe사 물벼룩 감시장치에서 사용하는 물벼룩은 생후 9일차이하(20 pixel이하) 물벼룩을 사용하는 것이 운영의 최적화를 유지할 수 있다고 하였다[19].

임연택 외(2001)는 유해물질에 대한 유해성 반응평가에서 OECD에서 추천하는 M4 배양액이 EPA 배양액에 비해 생육기간이 길다고 결론을 내렸다[20].

### 3. 연구 방법 및 재료

#### 3.1 시험생물

생물독성평가 시험생물의 기본적인 조건에는 첫째, 먹이사슬 단계를 대표하는 생물종이어야 하며 둘째, 시험생물에 대한 민감성이 있어야 한다. 셋째, 기존 연구결과가 많아서 비교할 수 있는 자료가 많아야 하고 넷째, 실험실에서 여러 세대를 통하여 인위적으로 번식 및 사육이 어렵지 않아야 한다. 물벼룩, 어류, 조류, 미생물(박테리아)을 대상으로 시험생물종 선택기준을 6개 인자로 지수화한 결과 미생물(25점) > 물벼룩(24점) > 조류(21점) > 어류(12점)순으로 나타났다[2].

본 연구에서는 미국 환경청과 국립환경과학원에서 공식 시험 종으로 선정한 *Daphnia. magna*로 시험했다.

물벼룩은 국립환경과학원에서 어린개체(Neonate) 200마리를 분양 받아 3세대를 계대 배양하였고 물벼룩 급성독성시험법에 따라 생후 24시간 이내의 것으로 크기가 비슷한 것을 이용했으며 물벼룩 감시장치에서 사용하는 물벼룩은 서울시 물연구원에서 제시한 생후 24시간에서 72시간 이내의 새끼 물벼룩을 사용했다[19].

#### 3.2 배양 및 먹이

물벼룩의 배양 온도는  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 이고 조도는 800 Lux로 유지하여 낮과 밤의 구분을 16 : 8 h로 했다. 먹이는 단세포 녹조류(*Chlorella vulgaris*)를  $(3 \sim 3.5) \times 10^8$  cells/mL로 농축한 후 배양액 1 L당 1 mL/day 주었고 추가적인 영양성분으로 Yeast, Cerophyll, Trout chow를 혼합한 YCT를 제조하여 1 mL/2day 공급했다. 배양액은 ISO 배지를 사용했다[22].

#### 3.3 바탕 시료

지수식과 유수식 시험의 바탕 시료로써 인공 하천수를 EPA Methods에 근거하여 제조하였다. 증류수 19 L를 증류수 통에 담는다.  $\text{MgSO}_4$  2.4g,  $\text{NaHCO}_3$  3.84g, KCl 0.16g을 첨가하여 8시간 폭기시켰다.  $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 를 1 L의 증류수에 넣고 완전히 녹을 때까지 저어준 다음 준비된 19 L 증류수에 첨가하여 완전히 섞이도록 24시간 폭기한 후 사용했다. 인공 하천수의 성상은 pH, DO, Conductivity meter와 분광광도계 DR 6000을 이용하여 수시로 측정하였고 측정 결과 치는 pH 7.7 ~ 8.3, Conductivity 553 ~ 569  $\mu\text{s}/\text{cm}$ , DO 6.9 ~ 7.3 ppm, 수온 23.3 ~ 25.3  $^{\circ}\text{C}$ , Alkalinity 110 ~ 120 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ 이다.

#### 3.4 오염원의 종류와 농도

먹는물 수질기준 59개 유해물질 중 6종을 선정하였고

최저농도와 표준농도로 구분하였다. 최저농도의 기준은 먹는물 수질기준에 명시된 농도이고 표준농도는 MSDS 자료를 검토하여 Table 1.과 같이 제조하였다.

Table 1. NOEC and standard concentration

Material	NOEC(ppb)	Standard concentration(ppb)
As	10	2,000
Hg	1	10
Cr	50	4,000
Phenol	5	5,000
Diazinon	20	30
Dioxane	50	100,000

### 3.5 독성 평가 시험방법

시험방법은 지수식 시험(Static test)과 유수식 시험(Dynamic test), 정도관리 시험(Quality management test)으로 구분된다. 지수식 시험은 물벼룩 감시장치를 평가하기 위한 기준이 되는 시험으로 수질오염공정시험 기준에 명시된 물벼룩을 이용한 급성독성시험(ES 04704. 1b)을 수행했고 유수식 시험은 연속흐름 방식으로 수질을 실시간 모니터링 하며 인위적으로 독성물질을 투입 후 반응을 관찰하는 Spiking test를 실시했다. 정도관리 시험은 정상적인 조건에서 시험이 수행되었는가를 검증하기 위해 생물과 기기에 대해 실시하였다.

#### 3.5.1 지수식 TU 값 산정

TU는 Fig. 1.과 같이 지수식 시험을 통해 물벼룩이 50% 영향을 받는 EC<sub>50</sub> 농도를 Probit method로 구하고 계산식 1과 같이 TU를 산출하였다.

$$TU = 100EC_{50} \text{ ----- 계산식 1}$$

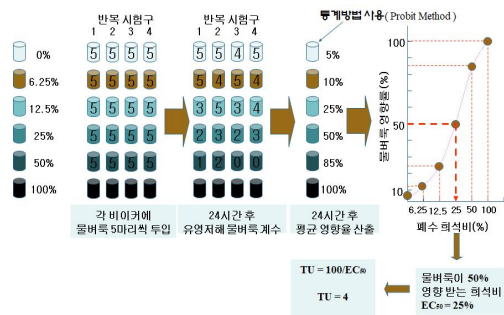


Fig. 1. Static test (ES 04704. 1b)

#### 3.5.2 유수식 TI 값 산정

TI는 오염원 검출을 위한 지표로서 평균속도, 속도분포, 평균 유영고도, 거리, 살아있는 물벼룩 수, 불규칙 운동계수, 물벼룩의 크기, 인지율 등을 가중치를 달리하여 점수화해서 단순히 물벼룩이 사망 시에만 경보가 발령되는 오류를 배제하였다. Table 2.는 Fig. 2. 장치의 8개의 파라미터를 나타낸 것이다. 물벼룩의 유영저해와 사망에 따라 점수가 어떻게 반영되는지 확인이 가능하다.

Table 2. Dynamic test behavioural evaluation

Behavioural parameter	Point	Sum
① Average speed	2	Toxic Index
② Speed class distribution	1	
③ Average swimming height	2	
④ Distance	1	
⑤ Number of swimming Daphnia	2	
⑥ Fractal	1	
⑦ Average size	1	
⑧ Recognition rate	3	

첫째, 평균 속도는 물벼룩들이 1분 동안 유영한 평균 속도이며 1마리당 1초에 평균 cm를 이동 하였는지를 계산한다. 둘째, 속도 분포 지수는 물벼룩들의 속도를 여러 개로 세분화 한 다음 각각의 속도가 전체 평균 속도와 비교하여 얼마나 다양하게 펼쳐져 있는가를 조사한다. 정상적인 경우 물벼룩은 대체로 일정한 속도로 움직이게 된다. 독성물질이 유입될 경우에는 일부 물벼룩은 건디기 힘들어서 미치듯이 돌아다닐 것이고 또 일부의 물벼룩은 서서히 죽어가고 있으므로 유영 속도가 굉장히 느릴 것이다. 이때 속도분포지수는 크게 표현된다. 셋째, 평균 유영 고도는 물벼룩들이 측정실 내에서 평균 어느 정도 높에서 유영하는지를 나타낸다. 정상적인 경우, 물벼룩들은 상하 골고루 분포되어 유영을 하게 된다. 그러나 독성물질 유입 시 물벼룩들은 수면 가까이에서 유영을 하고 나중에는 바닥에 가라앉아서 유영을 하게 된다. 넷째, 거리는 물벼룩들이 서로 상호간 일정한 거리를 두면서 유영을 하며 이것에 대한 평균을 나타낸다. 예를 들면, 중금속 독성 물질이 유입되면 보다 밀착되어 유영을 하게 되고 신경계 독성물질이 유입되면 떨어져서 운동을 하게 되며 나중에는 서로 밀착되어 유영을 하게 된다. 다섯째, 살아있는 물벼룩의 수는 독성물질의 유입에 따라 물벼룩이 몇 마리가 죽었는지를 관찰하여 이를 경보수치에 더하게 된다. 여섯째, 불규칙 운동계수는 물벼룩들의 불규칙적인 유영형태를 측정한다. 정상적인 경우 물벼룩은 일정한 방향으로 직선 운동 후 가끔씩 방향을 바꾸게 된다.

그러나 독성물질이 유입되면 보다 직선운동을 많이 하게 되어 불규칙 운동계수가 줄어들고 신경계 독성물질이 유입되면 회전 운동을 많이 해서 불규칙 운동계수가 커진다. 일곱째, 물벼룩의 평균크기를 나타내며 설정된 값 이하의 크기는 제외하고 측정한다. 여덟째, 인지율은 1분 동안 물벼룩의 경로를 추적하여 인지한 비율을 나타낸다. 독성물질이 유입된 후 시간이 지나면 물벼룩들이 바닥에서 모여 있게 되는데 이 때 물벼룩을 서로 구별하여 인지하기 힘들다. 인지율이 30% 이하로 떨어지게 되면 이를 감지하여 독성지수 점수에 반영한다.

### 3.6 경보발령 과정

경보발령에 대한 기준은 TI 반응도가 10점 이상 일 경우, 빨강색으로 표시하며 경보단계를 의미하고 8점과 9점은 노란색, 관심단계이며 7점 이하는 초록색으로 양호 단계를 의미한다. 안정화가 된 단계는 2점 이하이다. 이 수치들은 시간에 따른 그래프로 나타내어 물벼룩의 행동이 변화되는 정도 및 절대 값의 변화를 감지한다. Fig. 2. 는 물벼룩 1 마리가 수영하는 궤적을 나타낸 것이며 1초당 25개 frame을 생성하고 1분 동안 1,500개 frame이 만들어져서 물벼룩이 수영한 경로를 추적한다. 1개의 데이터 (Fit point)는 10개 frame이 모이면 생성되고 이 데이터 1개가 생성되기까지 걸리는 시간은 0.04초가 소요된다.

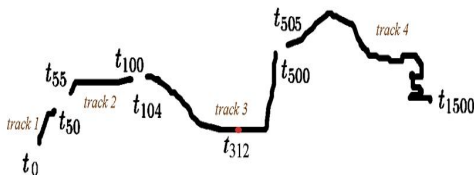


Fig. 2. Path tracking in *Daphnia* toximeter

장치 구성도는 Fig. 3.과 같다. 측정실(Chamber)에 물벼룩을 10마리를 넣어서 행동을 관찰하는 곳이다. 맞은편에는 감시용 카메라가 달려있다. 시료를 펌프가 샘플링을 하면 물벼룩에게 최적의 조건을 유지해 주기 위하여 히터가 장착되어 온도를 25 °C 까지 올린다. 일정 온도가 된 시료는 펌프를 통해 측정실 안으로 유입되며 안정적인 영양분을 제공하기 위해 엽록체 배양기가 자동으로 먹이를 공급하고 데이터 연산 컴퓨터는 행동을 수치화하여 Hinkely method에 의해 TI를 계산한 후 양호, 관심 경보단계 중 해당하는 단계를 화면에 표시한다.

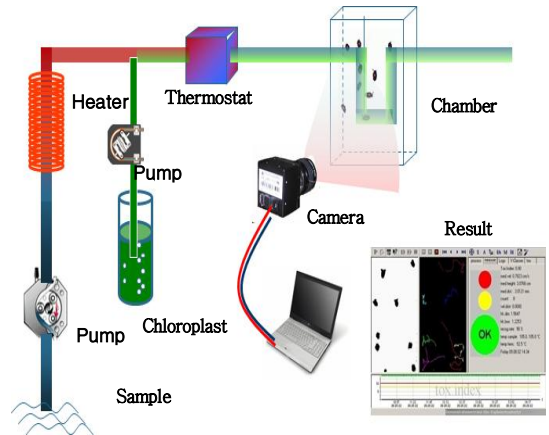


Fig. 3. Toxicity Index Evaluation of *Daphnia* Toximeter

## 4. 연구 결과

### 4.1 지수식 시험 결과

Table 5. ~ 9.는 Probit method에 의해 EC<sub>50</sub> 결과를 분석하여 산정하였고 Table 10.은 유영저해 물벼룩이 3 ~ 9 마리일 경우에는 Probit method가 적용되지 않기 때문에 계산식에 의해 산출하였다.

Table 4.의 데이터를 해석하면 TU는 계산식 1에 따라 100/EC<sub>50</sub>으로 Table 3.의 Probit에서 얻은 66.53%으로 나누어 TU 1.50 결과를 구하였다.

Table 3. Estimated LC/EC Values

Exposure	
Point	Concentration(%)
LC/EC 1.00	19.422
LC/EC 5.00	27.856
LC/EC 10.00	33.763
LC/EC 15.00	38.442
LC/EC 50.00	66.533
LC/EC 85.00	115.153
LC/EC 90.00	131.111
LC/EC 95.00	158.909
LC/EC 99.00	227.920

Table 4는 As의 시험결과이다. EC<sub>50</sub>은 1,330 ppb이고 2,000 ppb의 66.53%에 해당하며 1.50 TU로 산출하였다. 정재원 외(2000)는 As에 대한 24h EC<sub>50</sub>이 3,400 ppb로 나타났[23].

Table 4. As 2,000 ppb

Exposure Conc.(%)	Number of test					Mortalities (%)
	1	2	3	4	Total	
0	0	0	0	0	0	0
6.25	0	0	0	0	0	0
12.5	0	0	0	0	0	0
25	0	0	1	0	1	5
50	1	2	1	1	5	25
100	4	3	5	4	16	80
Result	EC <sub>50</sub> = 66.53%, 1,330 ppb TU = 1.50					

Table 5. ~ 8. 까지는 Table 4와 동일한 방식으로 해석하여 TU를 계산하였다.

Table 5.는 Hg의 시험결과이다. EC<sub>50</sub>은 6.54 ppb이고 10 ppb의 65.39%에서 해당하며 1.53 TU로 산출하였다. Khangarot, B. S. (1987)가 시험한 결과는 48h EC<sub>50</sub> 0.0052 ppb이고 Lucia Guilhermino(1997)는 1.5 ppm으로 나타났다[24,25].

Table 5. Hg 10ppb

Exposure Conc.(%)	Number of test					Mortalities (%)
	1	2	3	4	Total	
0	0	0	0	0	0	0
6.25	0	0	0	0	0	0
12.5	0	0	0	0	0	0
25	1	0	1	1	3	15
50	2	3	4	1	10	50
100	2	3	4	3	12	60
Result	EC <sub>50</sub> = 65.39%, 6.54 ppb TU = 1.53					

Table 6.는 Cr의 시험결과이다. EC<sub>50</sub>은 1,225 ppb이며 4,000 ppb의 30.63%에서 해당하고 TU는 3.26이다. Mount, D. I는 48h EC<sub>50</sub> 0.050 ppm 결과가 나왔다[26].

Table 6. Cr 4,000 ppb

Exposure Conc.(%)	Number of test					Mortalities (%)
	1	2	3	4	Total	
0	0	0	0	0	0	0
6.25	0	0	0	0	0	0
12.5	0	0	0	0	0	0
25	2	0	1	2	5	25
50	5	4	5	5	19	95
100	5	5	5	5	20	100
Result	EC <sub>50</sub> = 30.63%, 1,225 ppb TU = 3.26					

Table 7.은 Diazinon의 시험결과이다. EC<sub>50</sub>은 2.62 ppb이며 30 ppb의 8.73%에서 해당하고 TU는 11.45이다. EPA 시험결과는 48h EC<sub>50</sub> 0.21 ppb이다[27].

Table 7. Diazinon 30 ppb

Exposure Conc.(%)	Number of test					Mortalities (%)
	1	2	3	4	Total	
0%	0	0	0	0	0	0
6.25%	0	1	2	2	5	25
12.5%	3	2	5	5	15	75
25%	5	5	5	5	20	100
50%	5	5	5	5	20	100
100%	5	5	5	5	20	100
Result	EC <sub>50</sub> = 8.73%, 2.62 ppb TU = 11.45					

Table 8.은 Dioxane 100,000 ppb의 시험결과이다. EC<sub>50</sub>은 59,100 ppb이고 59.1%에 해당하며 1.69 TU로 산출하였다. MSDS는 48h EC<sub>50</sub>은 163 ppm이다[28].

Table 8. Dioxane 100,000 ppb

Exposure Conc.(%)	Number of test					Mortalities (%)
	1	2	3	4	Total	
0	0	0	0	0	0	0
6.25	0	0	0	0	0	0
12.5	0	0	0	0	0	0
25	0	1	0	0	1	5
50	2	3	3	2	10	50
100	3	4	5	3	15	75
Result	EC <sub>50</sub> = 59.1%, 59,100 ppb TU = 1.69					

Table 9.는 Phenol의 시험결과이다. 5,000 ppb의 EC<sub>50</sub>은 13,750 ppb이며 EC<sub>50</sub> 농도에 해당하는 %는 100%이상(275%)이며 0.4 TU로 산출하였다. MSDS는 48h EC<sub>50</sub>은 10.2 ~ 15.5 ppb이다[28].

Table 9. Phenol 5,000 ppb

Exposure Conc.(%)	Number of test					Mortalities (%)
	1	2	3	4	Total	
0	0	0	0	0	0	0
6.25	0	0	0	0	0	0
12.5	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
100	1	2	1	0	4	20
Result	EC <sub>50</sub> > 100%, 13,750 ppb TU = 0.4					

원수 100% 농도에서 유영저해 물벼룩이 11 ~ 20마리일 경우 Probit method 사용이 가능하며 유영저해 물벼룩이 3 ~ 9 마리일 경우에는 계산식을 적용해야한다. Phenol은 100%에서 4마리가 치사 및 유영저해가 나타났으므로 계산식 2로 TU를 산출하였고 Fig. 4. 와 같이 계산식 3을 적용하여 EC<sub>50</sub>에 해당하는 %를 산정했고 계산식 4에 의해 EC<sub>50</sub> 을 산출했다.

- 0.02 × 치사, 유영저해(20%) = TU 0.4 -계산식 2
- $y = 0.1917x - 2.8571 = 275\%$ -----계산식 3
- 5,000 ppb × 2.75 = 13,750 ppb-----계산식 4

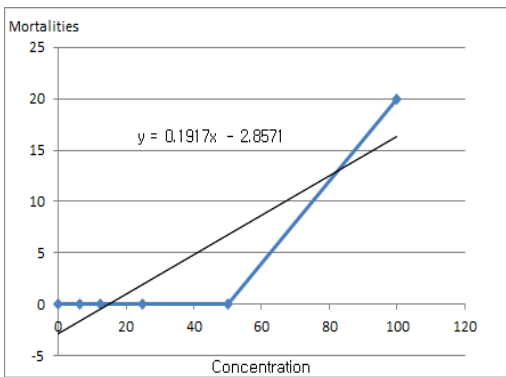


Fig. 4. EC<sub>50</sub> yield formula

### 4.2 유수식 시험 결과

Spiking test 하여 물벼룩의 고유한 유영성 변화를 평가하였다. 연구의 목적상 생태독성평가 24시간에 비해 상대적으로 단 시간 내 유입되는 오염물질을 감지해서 TU에 상응하는 신뢰성 있는 경보를 발령하는지 여부를 평가하는 것이므로 독성물질 투입 후 2시간 동안 일어나는 물벼룩의 반응성을 평가기준으로 하였다.

#### 4.2.1 NOEC 독성 영향

Diazinon을 제외한 As, Hg, Cr, Phenol, Dioxane 은 양호단계인 TI 7점 이하에서 반응이 관찰되었다.

Fig. 5.는 Diazinon 시험결과이다. 독성 물질 투입 후 38분 후에 TI는 10점으로 반응하여 경보단계가 발령되었다. 기존 선행연구에서 물벼룩 감시장치를 이용한 Diazinon에 대한 유수식 시험 결과는 없다.

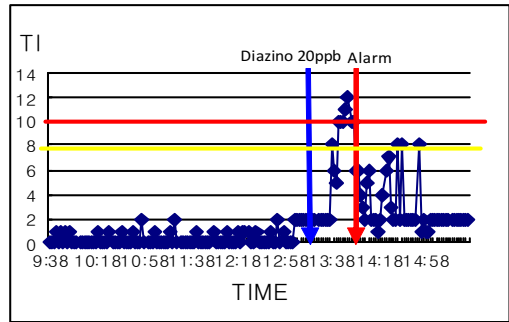


Fig. 5. Diazinon 20 ppb, 38 min alarm, TI : 10

#### 4.2.2 EC<sub>50</sub> 독성 영향

유수식 시험 결과는 8가지 행동 파라미터에 의해 Fig. 6. ~ 11.과 같이 분석되었다. 지수식 시험을 통해 조사된 각 독성물질의 EC<sub>50</sub> 농도를 투입하여 TU와 TI간의 연관성을 확인하였다. Fig. 6.은 As의 유수식 시험결과로써 독성물질 투입 후 107분 후에 TI 11점, 경보단계가 발령되어 지수식 시험 1.5 TU와 상응하는 결과가 나타났다. 최성현 외 (1996)는 Elektron사 물벼룩 감시장치를 이용하여 As에 대한 유수식 시험결과에서 0.5 ppm에서 경보가 발령되었다[10].

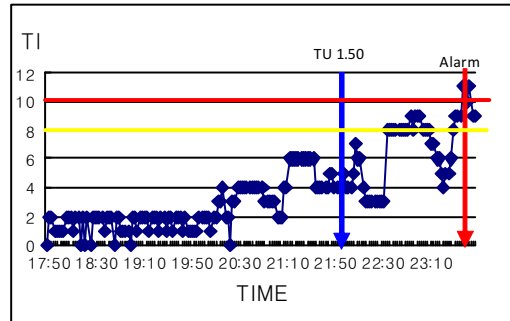


Fig. 6. TU 1.5(As 1,330 ppb), 107 min alarm, TI : 11

Fig. 7.은 Hg의 유수식 시험결과이다. 27분 후 TI 12 점, 경보단계가 발령되었고 지수식 시험 1.53 TU에 상응하는 반응이다. 선행연구에서 물벼룩 감시장치를 이용한 Hg에 대한 유수식 시험 결과는 없다.

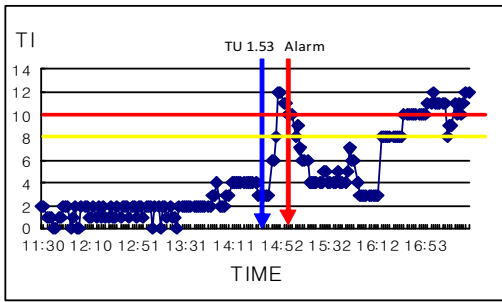


Fig. 7. TU 1.53(Hg 6.54 ppb), 27 min alarm. TI : 12

Fig. 8.은 Cr의 유수식 시험결과이다. 독성 물질 투입 후, 31분 만에 TI는 14점으로 반응하여 경보단계가 발령했다. 3.26 TU와 상응하는 반응이며 최성현 외 (1996)는 Elektron사 물벼룩 감시장치를 이용하여 Cr<sup>6+</sup>에 대한 유수식 시험결과에서 0.5 ppm에서 경보가 발령되었다[10].

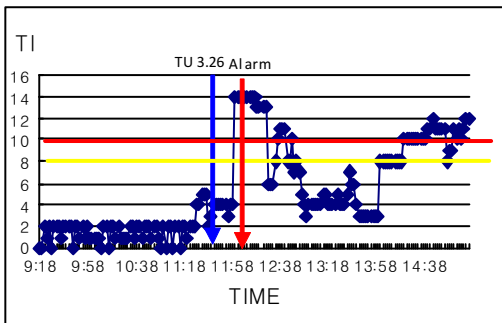


Fig. 8. TU 3.26(Cr 1,225 ppb), 31 min. TI : 14

Fig. 9.는 Diazinon의 유수식 시험결과이다. 독성 물질 투입 후 50분이 지나서 TI 11점, 경보 단계가 발령되었고 지수식 시험 11.45 TU에 상응하는 반응이다. 선행연구에서 물벼룩 감시장치를 이용한 Diazinon에 대한 유수식 시험 결과는 없다.

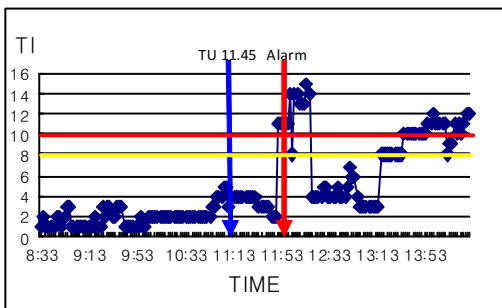


Fig. 9. TU 11.45(Diazinon 2.62 ppb) 50 min. TI : 11

Fig. 10.은 Dioxane의 유수식 시험결과이다. 독성 물질 투입 후 32분 만에 TI 11점으로 경보단계가 발령되었고 지수식 시험 1.69 TU에 상응하는 반응이다. 선행연구에서 물벼룩 감시장치를 이용한 Dioxane에 대한 유수식 시험 결과는 없다.

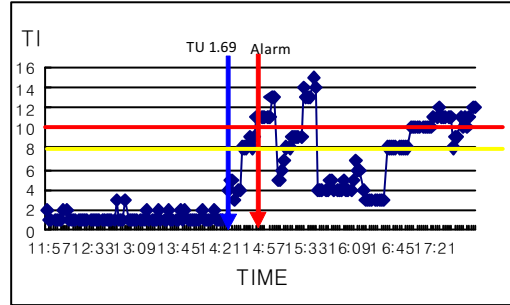


Fig. 10. TU 1.69(Dioxane 59.100 ppb) 32 min. TI : 11

Fig. 11.은 Phenol의 유수식 시험결과이다. 독성 물질을 투입 후 2시간이상 경보가 발령되지 않았다. 일시적으로 2분 동안 TI 8점, 관심단계가 나타났고 곧이어 양호 단계를 유지하며 반응하였다. 지수식 시험 0.4 TU에 상응하는 반응이다. 선행연구에서 물벼룩 감시장치를 이용한 Phenol에 대한 유수식 시험 결과는 없다.

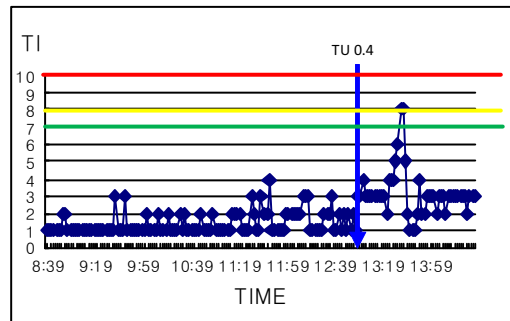


Fig. 11. TU 0.4(Phenol 13,750 ppb) good stage. TI : 8

### 4.3 정도관리(QA/QC) 결과

#### 4.3.1 생물

물벼룩에 대한 정도관리를 위해 국립환경과학원에서 제시하는 표준물질은 중크롬산칼륨(K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 4 ppm 이다. EC<sub>50</sub> 값이 0.9 ~ 2.1 ppm/L 범위 이내로 시험 결과 값이 들어와야 한다.



Table 10.과 같이 Probit method를 이용한 결과가 나왔다. EC<sub>50</sub>에 대한 95% 신뢰구간을 한정하였고 1.055 ppm/L로 결과가 평가되어 지수식 시험의 신뢰도가 검증되었으며 시험에 사용한 물벼룩들의 건강성과 반응성, 민감도 등은 문제없는 것으로 확인하였다[22].

Table 10. Quality management test

Point	Exposure Conc.(ppm/L)	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
EC50	1.055	0.874	1.274

Fig. 12.는 물벼룩에 대한 정도관리 결과를 나타낸 회귀곡선이다.

검은색 선은 EC<sub>01</sub>부터 EC<sub>99</sub>까지 영향농도를 나타낸 추세선이고 파랑색 선은 ± 5 % 오차범위 구간을 표시한 것이다. X축 빨간색 점들은 중크롬산칼륨(K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 4 ppm을 100 %, 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.25 % 로 희석한 Dose point를 의미하고 Y축은 물벼룩들이 반응한 %이다. 기울기(slope)값은 5.605022이다. 기울기 값에 대한 95% 신뢰구간은 3.462208 ~ 7.747836이고 표준오차(standard error)는 1.093272이다.

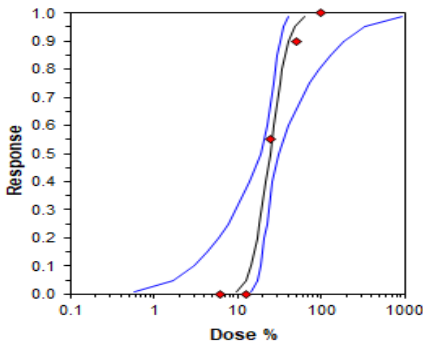


Fig. 12. Plot of probits and predicted regression line

### 4.3.2 기기

서울시 물연구원에서 제시한 Cu 1 ppm/L으로 시험 하였다. 시험에 들어가기 전 장비안정화를 위해 오염원이 전혀 없는 인공 하천수를 장치에 유입시키고 1시간 이상 운영하여 TI 안정화 단계 2점 이하로 유지한 후 실시했다. 평가기준은 독성물질을 투입하여 2시간 이내에 물벼룩의 행동이 변화하여 TI 10점 이상, 경보 단계를 발령해야 한다. Fig. 13은 시간대별로 독성에 대한 물벼룩들

의 TI의 변화를 그래프로 나타낸 것이다. 11시 01분 독성을 투입하고 32분이 지나서 11시 33분 경보단계 한계점 TI 10점을 순식간에 넘어 15점에서 경보를 발령하였다. 최대 TI는 18점까지 올라갔다. 장치의 안정성과 유수식 시험의 신뢰도를 검증하였고 시험기간 동안 사용한 물벼룩 감시장치는 오경보가 없는 것으로 확인하였다[19].

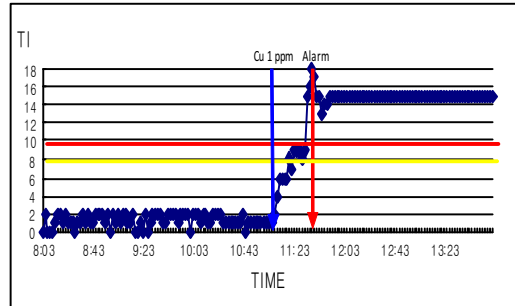


Fig. 13. Cu 1 ppm 32 min. TI : 15

Table 11.은 물벼룩 감시장치의 Raw data이다. 평균 속도(Average speed)를 보면 11시 1분 안정화된 단계에서는 초당 물벼룩의 속도가 0.203 cm/s이다. TI 관심 단계인 11시 19분부터 11시 31분까지 추세를 살펴보면, 0.181 cm/s, 0.186 cm/s, 0.163 cm/s, 0.186 cm/s, 0.166 cm/s, 0.159 cm/s 가 측정 되었다. 물벼룩들은 독성을 벗어나려고 빠르게 속도를 내다가 점차 느려졌으며 다시 속도를 내려다가 서서히 속도가 느려지며 사망에 이르렀다. 불규칙운동계수(Fractal)도 1.368에서 1.102로 회전운동보다 직선운동을 많이 하며 물벼룩들이 독성물질을 빠르게 벗어나려는 움직임이 관찰되었다.

Table 11. Measurement raw data

TIME	Toxic Index	Average speed	Average distance	Speed class distributio	Average height	Average distance	Number of	Fractal	Average size	Recogniti on rate
11:01	1	0.203	36.44	0.115	1.064	8	1.435	0.812	97	
11:03	1	0.213	41.29	0.116	0.889	8	1.463	0.768	98	
- An ellipsis -										
11:19	8	0.181	36.57	0.095	0.857	5	1.368	0.905	63	
11:21	7	0.186	36.83	0.112	0.738	3	1.267	0.913	63	
11:23	9	0.163	32.34	0.111	0.769	3	1.172	0.715	38	
11:25	9	0.186	36.83	0.112	0.823	3	1.169	0.668	37	
11:27	9	0.172	33.72	0.109	0.751	3	1.166	0.776	38	
11:29	8	0.166	32.53	0.107	0.635	3	1.102	1.156	37	
11:31	9	0.159	31.22	0.109	0.470	3	UNDEF	0.75	36	
11:33	15	0	0	0	0	0	0	0	0	
11:35	16	0	0	0	0	0	0	0	0	
11:37	18	0	0	0	0	0	UNDEF	0	0	

## 5. 고찰

노출농도에 대한 TI 지표의 반응성측면을 고려해 보면 NOEC 시험결과에서 Diazinon 20 ppb는 먹는 물 수질 기준 농도임에도 불구하고 독성물질 투입 후 38분 만에 경보단계가 발령되었는데 이것은 먹는물 수질 기준 농도의 역치 내에 있는 6개 유해물질 중 Diazinon은 파리, 벼룩, 바퀴벌레와 같은 해충을 제거하기 위해 사용하는 유기인계의 대표적인 살충제이기 때문이다. 사람이 음용하기에 알맞은 물에 대한 기준의 한계점인 20 ppb에서도 생태학적으로 1차 소비자인 물벼룩에게는 반응이 치명적으로 나타났다.

## 6. 결론

먹는물 수질감시항목에서 권고하는 유해영향 유·무기 물질을 6종을 대상으로 인공 하천수를 제조하여 지수식과 유수식 시험을 수행하였다.

지수식 물벼룩을 이용한 급성독성(ES 04704.1b)시험 TU를 기준으로 유수식 시험 TI가 신뢰성 있게 반응하는 지를 조사하여 연구한 결과 NOEC에서 Diazinon을 제외한 다른 물질들은 TI가 양호단계로 나타났고 EC<sub>50</sub>에서 1 TU 이상과 1 TU 이하를 구분하여 경보를 발령했다. 선행연구와 본 연구결과를 전제로 물벼룩 감시장치는 실시간 생태독성 평가에 적용할 수 있을 것으로 나타났다.

실무적 시사점, 현행 생태독성관리제도는 월 1회 하, 폐수처리장의 방류수를 평가하기 때문에 남은 29일 동안 방류되는 수질에 대해서는 생태독성 평가가 이루어지고 있지 않는 실정이다. 실시간 방류수의 수질 감시와 위해도 평가를 할 수 있는 물벼룩 감시장치를 오염사고 다발 지역, 수질 원격감시체계의 오작동과 조작이 자주 일어나는 지역에 조기경보 기능으로 활용할 수 있을 것이다. 아울러 경보발령 시 행동요령 등이 포함된 운영지침의 확립이 필요하다.

학문적 시사점, 선행연구는 물벼룩의 행동변화를 유발하는 다양한 요인들을 밝혀냈고 독일 공업규격을 기준으로 물벼룩 감시장치를 이용한 Cu 위주의 중금속 독성시험이 대부분이다. 본 연구는 국내 수질오염공정시험기준을 근거로 유·무기물질을 시험한 결과 TI 경보 발령시간은 Hg(27분) > Cr(31분) > Dioxane(32분) > Diazinon(50분) > As(107분) > Phenol(양호) 순으로 나타났고 TU는 Diazinon(11.45) > Cr(3.26) >

Dioxane(1.69) > Hg(1.53) > As(1.50) > Phenol(0.4) 순으로 결과가 나왔다. TU가 높다고 TI가 반드시 빠른 측정이 이루어지지는 않았다. 시험 유기체인 물벼룩은 용량과 물질에 대한 반응이 이화학 측정 기계처럼 일정한 범위나 수량에 한정되어 반응하지 않는 사실을 확인 하였다.

연구의 한계점은 실험실에서 실시한 결과로써 향후 연구는 실제 하·폐수처리장에서 현장 수계의 성상에 따른 파일럿 테스트(Pilot test)가 필요하다.

본 연구결과는 물벼룩과 생물 감시장치의 후속 연구방향을 제시하는데 그 의의가 있다.

## REFERENCES

- [1] G. P. Cheon. (2018. 11. 29). Water Quality Operation is Life Waste... A survey of sewage treatment plants across the country. *korea joongang daily*, p. 8.
- [2] S. G. Lee. (2002). *A Study on the Introduction of Integrated Toxicity Management System for Water Quality Hazardous Substances*. Daejeon : Korea Institute of Toxicology.
- [3] J. Botterweg, C. Van de Guchte & L. W. C. A. Van Breemen. (1989). Bioalarm Systems: a Supplement to traditional monitoring of water quality. *H20*, 22, 778-794.
- [4] K. Sanna. (1995). Is *Daphnia magna* an ecologic ally representative zooplankton species in toxicity tests? *Environ Pollut*, 90(2), 263-267. DOI : 10.1016/0269-7491(95)00029-q
- [5] B. G. Anderson. (1944). The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. *Sewage Works Journal*, 1156-1165.
- [6] B. G. Anderson. (1950). The apparent Thresholds of toxicity to *Daphnia magna* for chlorides of various metals when added to Lake Erie water. *Transactions of the American Fisheries Society*, 78(1), 96-113. DOI : 10.1577/1548-8659(1948)78[96:tatott]2.0.co;2
- [7] A. L. Buikema, D. R. Lee & J. Cairns. (1976). A screening bioassay using *Daphnia pulex* for refinery wastes discharged into freshwater. *Journal of Testing and Evaluation*, 4(2), 119-125. DOI : 10.1520/jte10185j
- [8] K. E. Biesinger & G. M. Chouristensen. (1972). Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 29(12), 1691-1700. DOI : 10.1139/f72-269
- [9] J. C. Yoon et al. (2004). *Study on the Application of Daphnia Biomonitoring System*, Seoul : Seoul Water Institute Seoul Metropolitan.

- [10] S. H. Choe & J. T. Kim. (1996). Early-Warning Monitoring System for Water Resources management. *Korean Society for Health Education and Promotion*, 217-240
- [11] S. I. Dodson, S. Ryan, R. Tollrian & W. Lampert. (1997). Individual swimming behavior of *Daphnia*: effects of food, light and container size in four clones. *Journal of Plankton Research*, 19(10), 1537-1552. DOI : 10.1093/plankt/19.10.1537
- [12] C. Buchanan, B. Goldberg & R. McCartney. (1982). A laboratory method for studying zooplankton swimming behaviors. *Hydrobiologia*, 94(1), 77-89. DOI : 10.1007/bf00008635
- [13] S. Young & C. Getty. (1987). Visually guided feeding behaviour in the filter feeding cladoceran, *Daphnia magna*. *Animal behaviour*, 35(2), 541-548. DOI : 10.1016/s0003-3472(87)80279-8
- [14] S. I. Dodson, T. Hanazato & P. R. Gorski. (1995). Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carbaryl and Chaoborus kairomone. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(1), 43-50. DOI : 10.1897/1552-8618(1995)14[43:brodpe]2.0.
- [15] M. C. Brewer & J. N. Coughlin. (1996). Virtual plankton: a novel approach to the investigation of aquatic predator-prey interactions. *Zooplankton: sensory ecology and physiology*, 1, 425-434. DOI : 10.1080/10236249509378931
- [16] H. D. Shin. (2010). *A Study on The Factors in the Survival of Daphnia*. Master thesis. Yeung nam University, Gyeongsan.
- [17] B. J. Lim, S. Y. Park, M. S. Byeon, C. W. Lee, E. S. Lim, H. I. Rhu, S. H. Choi & S. M. Yun. (1995). *Studies on the Early Warning Systems with Waterflea*, Incheon : Nakdong River Water Resource Inspection Center National Institute of Environmental Reserch.
- [18] H. J. Lee et al. (2003). Ecotoxicological Studies on the Effect of Heavy Metals Using *Daphnia* Toximeter. *Korean Society on Water Quality. Korean Society on Water Quality*, 11, 209-212.
- [19] J. S. Han. (2016). *A Study on the Effective Operation of Biological Monitoring System*. Seoul : Waterworks research institute of seoul metropolitan.
- [20] Y. T. Kim et al. (2001). *Behavior Estimation of Water flea on Toxicants*. Report of NIER, 23, 639-649.
- [21] S. H. Kim. (2009). *Water pollution process test standard(ecological toxicity)*. *Industrial water quality ecological toxicity management conference*. (p. 8). Jecheon : Ministry of Environment.
- [22] National Institute of Environmental Research. (2015). *Ecology Toxicity Testing Method and Operation Guidelines*. Incheon : National Institute of Environmental Research.
- [23] J. W. Jeong, M. S. Cha, S. J. Jo & S. J. Lee. (2001). Acute and chouronic toxicity of heavy metals to *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Science International*, 10(4), 293-298.
- [24] B. S. Khangarot & P. K. Ray. (1987). Correlation between heavy metal acute toxicity values in *Daphnia magna* and fish. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 38(4), 722-726. DOI : 10.1007/bf01608609
- [25] L. Guilhermino, T. C. Diamantino, R. Ribeiro, F. Gonçalves & A. M. Soares. (1997). Suitability of Test Media Containing EDTA for the Evaluation of Acute Metal Toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and environmental safety*, 38(3), 292-295. DOI : 10.1006/eesa.1997.1599
- [26] D. I. Mount & U. T. Norberg. (1984). A seven day life cycle cladoceran toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 3(3), 425-434. DOI : 10.1897/1552-8618(1984)3[425:aslct]2.0.co:2
- [27] M. Corbin. (2009). *Problem formulation for the environmental fate and ecological risk, endangered species and drinking water assessments in support of the registered review of chlorpyrifos*. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, US EPA.
- [28] Fisher Scientific. (2009). *Material Safety Data Sheet*. Fair Lawn : Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com>
- [29] Y. R. Lee, O. H. Kim, C. H. Kim. (2017). Consideration of Evo-Devo in the Morphogenesis of Fractal Structures in Ammonites. *Journal of the Korea Convergence Society*, 8(8), 185-190.
- [30] J. K. Lee, Y. K. Lee, Y. S. Yuk, G. Y. Kim. (2017). Convergence Study of Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Cheonho Reservoir in Cheonan. *Journal of the Korea Convergence Society*, 8(11), 141-149.
- [31] B. Y. Choi, S. C. Cho. (2017). Screening of Natural Compounds for Cancer Prevention by Cytotoxicities and AP-1 Reporter Gene Activities. *Journal of Convergence for Information Technology*, 7(6), 89-95.
- [32] T. S. Ki, S. H. Lee. (2017). A Prediction Scheme for Power Apparatus using Artificial Neural Networks. *Journal of Convergence for Information Technology*, 7(6), 201-207.

이 장 훈(Jang-Hoon Lee)

[장학원]



- 1988년 3월 ~ 현재 : 호서대학교 건축  
토목환경공학부 교수
- 관심분야 : 환경보건, 보건위생, 환경약  
학
- E-Mail : jhlee@hoseo.edu

고 태 응(Tae-Woong Ko)

[장학원]



- 2017년 2월 : 호서대학교 벤처대학원  
융합공학과 석사(보건환경 전공)
- 2017년 3월 ~ 현재 : 호서대학교 벤  
처대학원 융합과학기술학과 박사 과정  
(바이오융합기술공학)
- 관심분야 : 환경보건, BT융합기술
- E-Mail : swimko@hanmail.net