

어류 자어의 사망률을 이용한 해양생태독성시험 방법에 관한 연구

박경수* · 강주찬¹ · 윤성진² · 이승민³ · 황운기³

*인양대학교 해양생명공학과

¹부경대학교 수산생명의학과

²안전성평가연구소

³국립수산과학원 서해수산연구소

Establishment of Marine Ecotoxicological Standard Method for Larval Fish Survival Test

GYUNG SOO PARK*, JU-CHAN KANG¹, SUNG JIN YOON², SEUNG MIN LEE³ AND UN KI HWANG³

*Department of Marine Biotechnology, Anyang University, Incheon 417-833, Korea

¹Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

²Korea Institute of Toxicology, Yuseong-gu, Daejeon 305-600, Korea

³Marine Environment Division of West Sea Fisheries Research Institute, Incheon 400-421, Korea

해양생태독성평가를 위한 표준시험방법 개발을 위하여 해양생태계의 대표 소비자인 어류를 이용한 시험방법을 정립하였다. 표준시험생물은 송사리(*Oryzias latipes*)와 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 선정하였으며, endpoint는 7일 자어 사망률(7 day-LC₅₀)로 설정하였다. 표준시험방법은 미환경보호국(USEPA, 1994)의 어류독성시험법을 참고하였으나, 시험생물은 생태적 대표성 및 종의 유용성 등을 고려하여 재설정하였다. 송사리는 실험실 사육이 가능하고 광염성이며, 넙치는 국내 연안 생태계의 대표 어류이자 상업용 종묘 생산 시설을 통하여 연중 시험생물 확보가 가능한 점을 고려하여 선정하였다. 염분 내성 및 표준물질독성실험결과, 송사리는 0~35 psu 구간에서 전개체가 생존하였으며, 넙치는 염분이 20 psu 이상에서만 실험이 가능하였다. 독성시험기간은 7일이며, 시험구내의 용존산소가 4 mg/L 이상을 유지하는 한 시험용액의 교환없이 수행하는 비교환정수방식을 택하였다. 시험생물의 연령은 부화 후 초기 사망률과 시험시 취급이 용이한 크기로 선정하였으며, 송사리의 경우 부화 후 7일(전장 약 5 mm), 넙치의 경우 25일(전장 약 10 mm)로 선정하였다. 시험적합도 기준은 대조구에서의 생존율이 80% 이상으로 설정하였으며, 표준독성물질에 의한 민감도를 어류 독성 시험시 동일한 방법을 이용한 결과를 제시하도록 하였다.

Marine ecotoxicological standard method using fish larvae was established with the standard test species of *Oryzias latipes*(Japanese Medaka) and *Paralichthys olivaceus*(flounder) and with the 7 day LC₅₀ as endpoint. Test method referred to the USEPA(1994) with the replacement of test species found in the Korean water. Standard test species were selected in terms of the species supply and ecological importance in Korean waters. Japanese medaka can be reared with small tanks in the lab and has wide tolerance on salinity, and flounder eggs can be easily obtained from commercial fish hatcheries. General conditions for larval fish toxicity test are as follows. The possible salinity ranges for toxicity test were 0~35 psu for medaka and >20 psu for flounder. Test type was designated as static non-renewal test if the dissolved oxygen in the test chamber does not fall below 4.0 mg/L. Ages of test species were selected as 7 days after hatched for medaka(about 5 mm TL) and 25 days for flounder(about 10 mm TL) because of the low natural mortality after these periods. Test can be accepted when the survival rates are over 80% in control. Also, species sensitivity on standard reference materials(copper, cadmium or zinc) must be provided with the toxicity test results.

Keywords: Standard Method, Toxicity, *Oryzias latipes*, *Paralichthys olivaceus*, LC₅₀

서론

소형어류는 해양생태계의 2차 소비자를 대표하는 실험생물로서 일반적으로 수서독성시험의 최종소비자를 대표하는 실험생물이다.

*Corresponding author: gspark@anyang.ac.kr

따라서 본 연구에서는 어류를 이용한 생태독성평가 체계를 구축하기 위하여 국내에 서식하는 어류중 종의 유용성과 생태적 대표성 등을 고려하여 표준시험생물을 선정하고 각각의 시험생물에 적합한 표준시험방법을 정립하였다. 일반적으로 어류를 이용한 독성시험방법은 수정란의 부화율 및 자어 사망률을 주로 endpoint로 이용

하며, 표준시험생물은 실험실 사육이 가능한 소형 어종을 선호한다(USEPA, 1994; NIWA, 1998). 본 연구에서는 망둑어류 및 광염성 어종 등을 비롯한 다양한 후보 시험생물을 선정하여 실험실 사육이 가능하도록 다양한 실험을 수행하였다.

본 연구의 실험 생물인 송사리는 한국을 비롯한 일본, 중국 및 타이완 등지의 담수계에 주로 서식하나 기수 및 염전에도 서식하는 광염성 어종이며(Yanagishima and Mori 1975; Miyamoto *et al.*, 1986; Haruta *et al.*, 1991), 수질오염의 생물학적 지표종(Hiraoka and Okuda, 1983; 1984)일 뿐만 아니라, 생물검정용 시험생물(Shima and Shimada, 1994; Rao *et al.*, 1997; Chen and Cooper, 1999)로서 널리 활용되고 있다. 또한 사육이 용이하고 생활사(generation time)가 짧아서 분자생물학을 포함한 다양한 생물학적 연구의 시험 생물로서도 널리 이용되고 있는 종이다(Ozato *et al.*, 1989; Ozato and Wakamatsu, 1994; Sakamoto *et al.*, 2001). 그러나 상기 어류는 광염성 어종임에도 불구하고 주로 담수에 분포하므로 해양생태 독성시험보다는(Tachikawa and Sawamura, 1994; Schlenk and El-Alfy, 1998; El-Alfy *et al.*, 2001; El-Alfy *et al.*, 2002) 주로 담수계 독성시험으로 제한되어 왔으며(Marty *et al.*, 1991; Skinner *et al.*, 1999; Metcalfe *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Gerhardt *et al.*, 2002; Bhattacharyya *et al.*, 2003), 국내에서도 담수계 독성 시험에 많이 이용되어 왔다(신 등, 1985; 이 등, 1985, 1987, 1988; 엄 등, 1987; 김 등, 1988, 2003; 최 등, 1992; 박 등, 1996).

반면 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 우리나라의 대표적인 양식 어종으로서 저서성이므로 다른 어종에 비하여 이동범위가 좁기 때문에 독성시험에 광범위하게 이용되고 있다(김 등, 1999, 2004; 탁과 김, 2001; 강 등, 2002, 2003; 문 등, 2002; 박 등, 2002).

본 연구에서는 어류의 초기 생활사를 이용한 급성독성 시험 방법을 개발하기 위하여 다양한 후보 생물을 이용한 독성 시험을 수행하였으며, 그 중 독성 시험에 가장 적합한 생물을 선정하고 해당 생물에 가장 적합한 독성 시험 방법을 정립하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 어류중 송사리는 국립환경과학원 및 한국화학연구원 안전성평가연구소에서 생태독성 실험용으로 사육중인 일부 개체를 분양받아 실험실에서 6개월 이상 사육하여, 산란, 부화 및 성장에 이르는 전 과정을 확립한 후, 실험실내에서 자체 생산이 가능하도록 하였다. 따라서 본 연구에 사용된 송사리는 분양받은 후 실험실에서 생산된 개체를 이용하였다.

넙치는 성체의 크기가 실험실 사육에 부적합하여, 상업용 종묘 생산 시설로부터 수정난을 분양받아 실험실에서 부화시킨 후 실험에 이용하였다. 종묘생산시설별 수정난의 민감도 차이를 검증하기 위하여 제주도, 전남 및 충남에 위치한 다양한 종묘생산시설로부터 수정난을 공급받아 실험실에서 부화시킨 후 일정크기까지 사육한 후 독성시험에 이용하였다. 부화 수온은 평균 15.0 ± 1.0 °C를 유지하였으며, 빛은 자연광도 및 주기를 유지하였다. 부화에 필요한 해수는 클로렐라를 사전 배양하여 물 만들기를 하였으며, 부화후에는 윤충류(*Brachionus plicatilis*)를 공급하였고, 후기 자어기 이후에는 *Artemia nauplius*를 먹이로 공급하였다.

송사리의 사육 환경은 수온 22~25 °C를 유지하였으며, 광도는 일

반 실험실 환경에서 약 500 lux, 광주기는 18시간 조명, 6시간 무조명을 유지하였다. 먹이는 상업용 관상어 사료인 TetraMin flake(Tetra Werke, Germany)와 알테미아 유생(OSI PRO80™, USA)을 투여하였고, 사육수는 수돗물을 일반 필터로 1차 여과하고, 카본 필터로 2차 여과한 후 폭기하여 사용하였다. 실험에 사용된 해수는 인천광역시 중구 을왕동 부근 해역에서 채수된 해수를 모래 여과기를 거쳐 고압 여과한 후, 카본 필터를 이용하여 재여과 하였다. 상기 해수는 실험에 사용하기전 GF/F(Whatman)로 여과하고, 다시 0.45µm membrane filter(Advantec MFS Inc)로 여과한 후 멸균하여 사용하였다. 염분 조절을 위한 희석수는 역삼투 방식을 이용한 초순수를 이용하였다.

독성시험은 항온실내 항온수조를 설치하고 수조내에 시험용 비이커(500 ml)를 시험농도에 무관하게 무작위로 배열하여 독성시험을 수행하였다. 실험기간동안 수온, 염분, 용존산소 및 pH는 수질 측정기(YSI 556MPS, USA)를 이용하여 매일 측정하였으며, 증발에 의한 실험구내의 염분 증가를 방지하기 위하여 유리 덮개를 이용하였다.

염분내성 실험을 위한 해수는 가장 높은 염분인 35 psu를 평균 해수에 천일염을 추가하여 제조한 후 초순수를 이용하여 30, 25, 20, 15, 10, 및 5 psu로 조절하였고, 0 psu는 희석수로 사용된 초순수를 이용하였다. 표준독성물질인 송사리 자어의 민감도 실험을 위한 표준용액은 copper sulfate pentahydrate($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, first grade, Sinyo Pure Chemicals Co. LTd), cadmium chloride(CdCl_2 , ACS reagent, Sigma-Aldrich), zinc chloride(ZnCl_2 , ACS reagent, Sigma-Aldrich)를 초순수에 용해하여 제조하였다. 농도별 표준용액은 최고 농도의 표준 용액을 제조한 후 이를 순차적으로 희석하여 제조하였으며, 실험방법은 염분 내성 실험과 동일하다.

염분에 따른 부화율 및 사망률의 유의성 검증을 위해서 분산분석(ANOVA)을 실시하였으며, 다중비교(multiple comparison)를 위하여 REGWQ test를 실시하였고, 상기 분석은 PC SAS를 이용하였다. 또한 각각의 표준물질에 대한 LC50, NOEC(no observed effective concentration), LOEC(lowest observed effective concentration)는 USEPA(1993)에서 제공하는 안내서에 따라 graphic method, probit analysis 또는 trimmed Spearman-Kärber method로 계산하였으며, 프로그램은 TOXCAL 5.0(Tidepool Scientific Software, USA)을 이용하였다.

결 과

시험생물의 선정

독성시험용 표준시험생물은 생태적 대표성, 종의 유용성, 독성물질에 대한 민감도 등을 우선적으로 고려하여 선정하였다. 따라서 대부분의 국외 시험어류는 실험실 사육이 가능한 소형어류를 선정하여 사육 방법과 시험과정 등을 제공하고 있다(USEPA, 1994; NIWA, 1998). 소형어류를 이용한 실험실 사육 가능성을 검증하기 위하여 해산어류인 날개망둑(*Favonigobius gymnauchen*)과 두줄망둑(*Tridentiger trionocephalus*), 그리고 주로 담수에 분포하는 물개(*Gnathopogon coreanus*), 피라미(*Zacco platypus*) 및 버들치(*Phoxinus oxycephalus*)를 이용한 실험실 사육의 가능성을 검증하였으나 모두 불가능하였다. 따라서 광염성이며 실험실 사육이 가능

하고, 또한 국제적으로 많은 독성시험자료가 확보된 송사리(*Oryzias latipes*)와 실험실 사육은 불가능하나 상업용 종묘 생산 시설로부터 연중 수정란을 구할 수 있는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 표준시험생물로 선정하였다.

해양생태독성시험의 시험생물은 광범위한 염분에서 생존이 가능해야 하므로 우선적으로 염분내성에 대한 실험을 실시하였다. 송사리는 염분에 대하여 매우 광범위한 내성을 보였다. 염분별 부화율은 모든 구간에서 83.3~100.0%였으며, 대조구(담수)의 평균 부화율(100.0%)과 유의적 차이를 보이지 않았다($F=1.38, p=0.24$). 반면 담수에서 부화된 자어를(연령 7~10일) 다양한 염분에 노출시킨 결과, 25 psu 이상의 염분에서 사망률이 급증하여, 대조구와 유의한 차이를 보였다($F=76.34, p<0.0001, Fig. 1$). 특히 30 psu 이상의 염분에서는 전 개체가 사망하여 담수에서 산란, 수정 및 부화가 이루어진 자어는 30 psu 이상의 해수에 대한 염분 내성이 매우 적었다. 그러나 담수에서 산란 및 수정된 난중에서 13.8 psu와 14.2 psu에서 부화시킨 자어는 전 염분 구간에서 87.5~100.0%의 생존율을 보였다. 염분에 따른 평균 생존율에 대한 유의성 검증을 위하여 분산분석을 실시한 결과, 13.8 psu 처리그룹은 $F=9.89, p<0.0001$, 14.2 psu 처리그룹은 $F=10.20, p<0.0001$ 로 염분 구간별로 평균 생존율에 유의한 차이가 있었다. 그러나 전 염분 구간에 약 90% 이상의 생존율을 보였으므로, 독성 실험에 대한 대조구 최소 조건인 생존율 80% 이상을 만족하여 독성 실험에는 문제가 없는 것으로 판단된다. 또한 상기 개체를 이용한 성장률 실험(체장) 결과 역시 염분에 따른 체장 증가율에 뚜렷한 차이가 없었다. 13.8 psu 처리 그룹의 경우, 일일 평균 체장 증가율에 대한 분산분석 결과, $F=0.74, p=0.64$ 이며, 14.2 psu 처리그룹의 경우 $F=1.20, p=0.32$ 로 두 그룹 모두 노출된 염분에 따른 성장률의 차이는 없었다.

따라서 담수에서 산란 및 수정된 송사리의 수정란을 이용한 해양생태독성 시험시 수정란을 해당 염분에서 부화시키거나, 또는 기수역 염분 범위에서 부화하여 실험에 이용할 경우, 염분 변화에 따른 문제는 없을 것으로 생각된다.

반면 넙치의 염분에 대한 내성은 송사리에 비하여 낮았으나 일반적인 해수 및 기수의 염분 범위에서는 대조구(사육수의 염분)와 유의한 생존율의 차이를 보이지 않았다. 염분에 따른 넙치 수정란의 부화율은 종묘생산시설별 차이는 없었으며, 13.4 psu 이상에서 대조구와 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2). 염분에 따른 자어

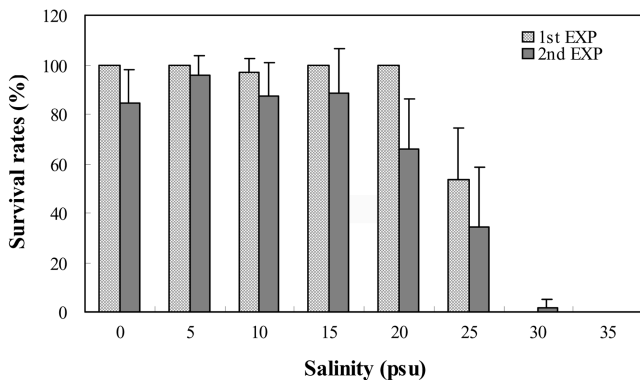


Fig. 1. Survival rates of Japanese medaka larvae hatched in freshwater and exposed to various salinities.

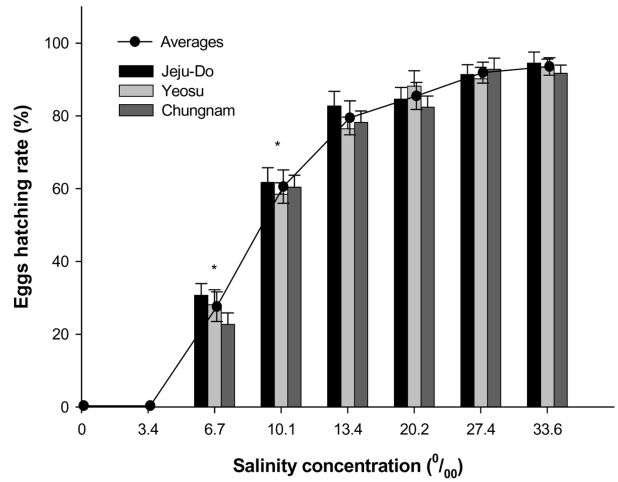


Fig. 2. Hatching rate of *Paralichthys olivaceus* eggs exposed to various salinities. The asterisks represent the significant difference ($P<0.05$) from the control(33.6 psu). Fertilized eggs were supplied from three different hatcheries located in Jeju-Do, Yeosu and Chungnam.

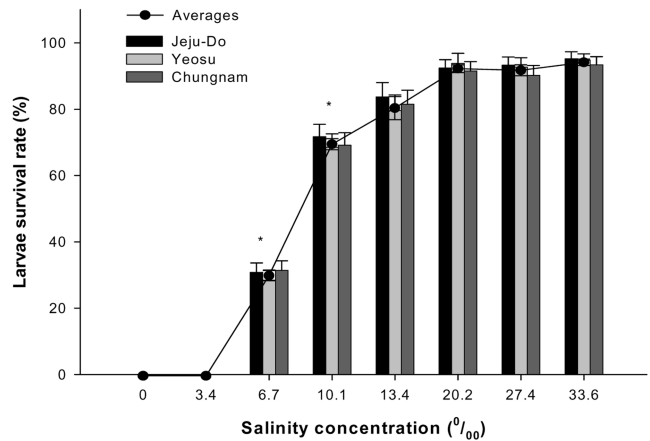


Fig. 3. Survival rate of *P. olivaceus* larvae exposed to various salinities. The asterisks represent the significant difference ($P<0.05$) from the control(33.6 psu). Fertilized eggs were supplied from three different hatcheries located in Jeju-Do, Yeosu and Chungnam.

의 생존율 역시 13.4 psu 이상에서 대조구와 유의한 차이를 보이지 않았으며, 종묘생산 시설별 차이는 없었다(Fig. 3). 상기 실험 결과, 저염분(13.4 psu)에서 대조구와 유의한 차이를 보이지 않았다 할지라도 저염분에 의한 대사장애 및 기형 유발 등을 고려하고, 또한 상기 생물과 유사한 체장에서 염분에 대한 내성 실험결과(김 등, 2004)를 고려하여 넙치의 시험대상 염분을 20 psu 이상으로 설정하였다.

따라서 송사리를 이용할 경우에는 염분에 무관하게 독성시험이 가능하며, 넙치를 이용할 경우에는 약 20 psu 이상에서 독성시험이 가능할 것으로 판단된다. 또한 넙치 수정란의 부화율 및 자어 생존율이 종묘생산시설별로 차이가 없으므로 생산 지역 및 시설에 무관하게 상업용 종묘를 이용한 독성시험이 가능할 것으로 판단된다. 그러나 송사리의 경우 독성시험기관에서 자체 사육하는 시험생물이 없을 경우, 독성시험 전에 수정란을 공급받아 해당 실험실에서

부화시킨 후 시험 크기(부화후 7일)까지 사육하여 이용하여야 한다. 넙치 역시 수정란을 공급받아 실험실에서 독성시험조건과 동일한 환경에서 부화시킨 후 25일 동안 사육하여 시험용 크기가 되었을 때 독성시험에 이용할 수 있다. 만약 공급받은 수정란을 부화시킬 때 초기 사망이 60% 이상이면 수정란을 재공급 받아야 한다.

시험방법의 선정

표준독성시험방법은 시험의 용이성과 해당 생물의 생활사를 고려하여 선정하였다. 어류를 이용한 가장 일반적인 시험방법은 수정란의 부화율과 자어의 사망률이다(USEPA, 1994; NIWA, 1998). 그러나 외국의 시험법은 주로 담수산 소형어류를 이용한 실험실내 사육을 통하여 실험생물을 상시 공급받을 수 있으므로 수정란의 부화율을 이용한 독성시험이 가능하나, 본 시험법의 경우 시험생물을 외부에서 공급받는 경우를 가정한 것이므로 수정란의 부화율을 이용한 독성 시험이 불가능하여 우선적으로 자어 사망률을 최종 endpoint로 설정하였다.

독성시험에 이용되는 시험생물의 나이는 시험방법중 주요 요소이다. 그러나 부화 직후의 자어를 이용할 경우, 독성물질에 대한 민감도는 우수하나, 초기 사망률이 넙치의 경우 최대 60~70%에 달하여, 시험적합도기준(test acceptability criteria, 어류의 경우 대조구 생존율이 80% 이상)에 부합하지 못했다. 따라서 비교적 초기 사망이 최소화되고 또한 독성 시험시 취급이 용이한 시기로 정하였다. 따라서 송사리는 부화 후 7일(전장 약 5 mm), 넙치는 부화 후 25일(전장 약 10 mm이며, 오른쪽 눈이 등쪽으로 이동하는 시기, 한과 김, 1998)로 정하였다. 특히 넙치의 경우에는 전장이 약 10 mm에 이른 경우에도 착제에 들어간 상태의 개체만을 선별하여 시험에 이용하여야 한다. 시험방법 및 절차의 요약은 다음과 같다(Table 1).

가. 시험생물 준비: 표준시험생물의 수정란을 확보하여 미수정란, 사멸란 및 불순물 등을 제거하고, 멸균해수로 세척한 후 각 시험생물에 적합한 온도에서 부화시킨다(부화온도는 송사리의 경우 25 °C,

넙치의 경우 20 °C 권장). 부화된 개체는 윤충류 및 알테미아유생(*Artemia nauplius*) 등을 이용하여 시험 연령까지 사육한 후 건강한 개체만을 선별한다. 이때 독성시험에 필요한 개체수의 약 1.5~2배 정도의 개체를 확보하여야 한다(어류 시험의 경우 약 500개체가 필요함).

나. 시험용액 준비: 1L 유리비이커에 시험용액을 농도별로 800ml 씩 분주한다. 시험농도는 대조구를 제외하고 5구간으로 설정한다. 희석 시험의 경우, 시험대상물질 용액의 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%와 대조구로 설정한다. 시험용액은 시험 시작 24시간 전에 준비하여 항온실내의 항온수조에 장치하여 폭기한다.

다. 시험생물의 노출: 시험생물을 시험구에 10개체씩 노출한다. 이때 각 시험구별로 한번 2개체씩 5번으로 나누어 투입한다. 그 이유는 통계적 임의의 분배 방식을 따르기 위함이다.

라. 독성시험: 시험 시작시 각 시험구 별로 염분, 수온, 용존산소 및 pH를 측정한다. 24시간 간격으로 수질을 측정하고, 사망 개체를 확인하여 제거한다. 만약 시험구내의 용존산소가 4.0 mg/L 이하일 경우 전 시험구를 폭기하거나 새로운 용액으로 교환하여야 한다.

마. 시험의 종료: 시험시작 7일후 시험을 종료한다. 수질 및 사망 개체수를 24시간마다 확인하여 독성시험지에 기록한다. 이때 시험대상물질, 수질, 실험조건, 일시, 실험실명, 실험자 및 책임자 등을 명확히 기입하여 한다.

바. 자료분석: 시험결과를 이용하여 최저영향농도(LOEC), 무영향농도(NOEC) 및 반수치사농도(LC₅₀)와 신뢰구간을 계산한다. 무영향농도 및 최저영향농도는 Dunnett 검정을 이용하며, 반수치사농도는 자료의 특성을 고려하여 Graphic method, Probit method, Spearman-Karber method 또는 Trimmed spearman-Karber method를 이용한다.

사. 비교: 최저농도에서 전 개체가 사망할 경우에는 시험구의 농도를 재조절하여, 그리고 대조구에서의 생존율이 80% 미만일 경우 또는 동일농도의 반복구간의 변동계수(coefficient of variation,

Table 1. Summary of test conditions and test acceptability criteria for fish larvae survival test.

Parameters	Test condition
Test type	static non-renewal
Salinity	0 to 35psu for medaka, >20 psu for flounder
Temperature	2±1 °C for medaka and 20.0±1.0 °C for flounder
End point	larval mortality(LC ₅₀)
Test organism	<i>Oryzias latipes</i> or <i>Paralichthys olivaceus</i>
Age of test organism	7 days for medaka and 25 days for flounder
Test duration	7 days
Light quality	“cool white” fluorescent lighting
Light intensity	ambient laboratory level
Photoperiod	16 h light, 8 h darkness
Test chamber size	1 L glass beaker
Test solution volume	800 ml
Dilution water	natural or artificial seawater
Renewal of test solution	none
Aeration	none, unless DO falls below 4.0 mg/L
Initial density	10 individuals/beaker
Feeding regime	<i>Artemia nauplii</i>
Cleaning of test chamber	none
Test concentrations	five+control
Number of replicates per concentration	3~4(4 recommended)
Sample volume required	4~6 L depending on test volume
Test acceptability criterion	80% or greater survival in controls

Table 2. Comparison of LC₅₀ by the test species of fish and reference materials. Data are sited at USEPA ECOTOX database system (www.epa.gov/ecotox).(SW=seawater/FW=freshwater).

Test materials	Test species	Effect measurement	Media type	Duration	Exposure type	Concentration(ppm)	Reference
Zinc Chloride	<i>Cyprinodon variegatus</i> (Sheepshead minnow)	Mortality	SW	96 h	renewal	1-10	USEPA
						11.3(9.1-14.3)	
	<i>Menidia beryllina</i> (Inland silverside)	Hatching	FW	15d	static	5.8-10	this study
						11.7	
						8.84(7.19-10.87)	
Cadmium chloride	<i>Cyprinodon dearborni</i> (Killifish)	Mortality	SW	48h	static	20	USEPA
						27	
	<i>Oryzias latipes</i> (Medaka)	Mortality	FW	96h	renewal	560	this study
						25	
						10.8	
<i>Cyprinodon variegatus</i> (Sheepshead minnow)	Mortality	SW	96h	static	15.9	USEPA	
					1.23		
					0.18		
<i>Menidia beryllina</i> (Inland silverside)	Mortality	SW	96h	static	0.31	USEPA	
					0.50		
					50		
Copper chloride	<i>Paralichthys olivaceus</i> (Flounder)	Hatching Deformity Larval mortality	SW		static	44.47 ppb 36.77 ppb 36.33 ppb	this study

CV(%)=표준편차/평균*100)가 20% 이상일 경우에는 재실험 한다.

시험결과의 타당성 및 일관성 검증

독성시험의 정확도는 동일 농도구의 반복실험을 통하여 검증할 수 있다. 반면 독성실험의 정확도는 화학분석 결과와 달리 입증하기가 매우 어렵다. 따라서 표준독성시험물질을 이용하여 많은 실험을 수행하고 그 결과에 대한 인정 범위를 산출하여, 시험결과 인정 범위 안에 있을 경우 유효하다고 판정한다. 어류 독성시험의 표준물질로는 주로 카드뮴, 아연 및 구리 등을 이용한다(USEPA, 1994). 본 연구에서는 주로 zinc chloride, copper sulfate, cadmium chloride 를 이용하였으며, 각 실험 결과는 Table 2와 같다. 일반적으로 생태독성 DB에 등록된 독성자료는 다양한 실험조건에서 수행된 결과를 등록하므로 조건에 따라 매우 상이한 결과를 보인다. 따라서 독성실험결과를 직접 비교하는 것은 어려우며, 각 시험자가 시험대상물질과 동일한 조건에서 상기 표준독성물질을 이용한 실험 결과를 독성 자료와 함께 제시하여야 한다.

고 찰

본 시험방법의 개발은 미환경보호국(USEPA, 1993; 1994)이나 뉴질랜드 NIWA(National Institute of Water & Atmospheric Research, NIWA, 1998) 등의 어류 시험법을 참고하였으나, 표준시험생물은 국내 서식 생물로 대체하여 별도로 개발된 시험방법이다. 따라서 시험생물의 전환에 따른 시험방법의 변화와 그에 합당한 시험 적합도 기준 등을 제시하였다.

본 시험방법에 포함된 표준시험생물종 송사리는 해양생태계를 대표하는 어종으로 볼 수 없다. 그러나 송사리는 수서생물중에서는

가장 보편적으로 이용되고 있는 독성시험생물이다(Naruse *et al.*, 1993; Naruse, 1996; Roberts, 1998). 특히 송사리는 실험실 사육에 관한 전 과정이 확립되어 있고(Kirchen and West, 1976; USEPA, 1991; Iwamatsu, 1994), 이에 따른 사육의 용이성과 풍부한 실험 자료를 바탕으로 전 세계적으로 이용되고 있는 실험생물이나 그동안 주로 담수계의 독성평가에 국한되어 이용되어 왔다. 특히 송사리의 염분 적응력은 이미 많은 연구를 통하여 입증되었으며, 특히 염분에 노출될 경우 아가미에 염세포가 급증하는 것으로 밝혀졌다(박 등, 2005; Pisam *et al.*, 1987; Uchida *et al.*, 1996, Evans *et al.*, 1999; Inoue and Takei, 2002).

일반적으로 해수를 이용한 독성실험시, 염분에 대한 실험 오차를 줄이기 위하여, 광염성 생물을 이용하거나 또는 대상 물질의 염분을 인위적으로 조절하는 방법이 있다. 그러나 이와 같은 방법은 독성평가 대상물질이 갖고 있던 본래의 성질이 해수중 염의 증감으로 인하여 독성이 변하는 경향을 보인다(Hall *et al.*, 1995; Hall and Anderson, 1995). 따라서 실험대상물질의 인위적 염분 조절보다는 광염성 생물을 이용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. 본 연구 결과, 송사리 자어를 이용한 사망률 실험의 경우, 담수에서 부화된 자어를 해수 범위의 염분에서 직접 노출 실험을 수행하는 것은 염분 충격에 의한 사망률 급증으로 불가능하므로, 이 경우에는 실험대상 염분에서 수정난을 부화시켜 얻은 자어를 사망률 실험에 이용하면 송사리를 이용한 해수독성시험이 가능할 것으로 판단된다.

넙치의 경우에는 그 크기 때문에 실험실에서 전 과정을 사육할 수 없는 단점이 있다. 따라서 망둑어류와 같은 소형 해산어류를 이용한 실험실 사육 가능성을 연구하였으나, 전 과정 사육에는 이르지 못했다. 실제로 어류의 크기에 무관하게 전 생활사를 연구하여 수정에서부터 친어에 이르는 전 사육 과정을 정립하기에는 본 연

구 기간이 부족했던 점이 있다. 따라서 어류 독성시험에 필요한 수정년의 확보가 연구 가능하고, 연안 생태계의 대표적 어류이며, 독성시험자료가 가장 많이 축적된 점을 감안하여 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 실험생물로 선정하였다.

그러나 본 연구에서 제시한 어류독성시험방법의 표준생물은 상기 어종 이외에도 다른 생물을 이용할 수 있다. 그러나 독성시험시 표준독성물질에 이용한 민감도 자료와 실험의 재현성에 대한 결과를 반드시 제공하여야 하며, 또한 실험조건은 Table 1의 항목을 참고하여 제공하기를 권장한다.

상기 두 생물의 표준독성물질에 대한 민감도 자료는 참고용으로만 제시하였다. 그 이유는 어류독성시험이 국내에서 아직 보편화되지 않았고, 본 연구를 통해서만 제시된 표준독성자료를 해당 생물에 대한 보편적 표준독성자료로 인정하기에는 아직 보충해야할 점이 많으므로 Table 2에 참고용으로만 제시하였다. 추후 어류 독성 시험에 대한 보편적 자료가 축적되면 상기 어종에 대한 표준독성물질의 민감도 자료를 추가 제시할 예정이다.

또한 어류는 척추동물에 해당되므로 실험동물 및 동물실험의 관리에 대해서는 “실험동물에 관한 법률”(교육과학기술부)에 따라야 한다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원(RP-2008-ME-029)의 지원에 의해 이루어졌습니다. 본 연구를 위해 실험생물을 제공해주신 국립환경과학원의 허인애, 박응노 박사님께 감사드립니다. 또한 송사리의 사육 및 실험에 많은 조언을 해주신 안전성평가연구소의 이성규 박사님과 구피팜의 최영민 사장님께 감사드립니다. 또한 부족한 논문을 심사하여 주신 심사위원 여러분께 감사를 포함합니다. 본 논문은 박 등(2005)에 의해 발표된 내용의 일부를 포함한다.

참고문헌

강주찬, 황운기, 지정훈, 김성길, 김재원, 2002. 넙치, *Paralichthys olivaceus* 치어의 생존, 성장 및 산소소비에 미치는 수은의 만성적 독성. 한국어병학회지, **15**: 37-42.

강주찬, 김재원, 김성길, 황운기, 2003. 구리의 노출에 따른 넙치, *Paralichthys olivaceus* 치어의 만성독성. 환경생물학회지, **21**: 36-41.

김맹진, 정상철, 송춘복, 2004. 염분에 따른 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 성장과 생존. 한국어류학회지, **16**: 100-106.

김영배, 이성규, 김용화, 노정구, 1988. Diazinon과 Carbofuran의 송사리(*Oryzias latipes*)와 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)에 대한 선택적 독성과 Acetylcholinesterase 저해. 한국환경농학회지, **7**: 117-123.

김철기, 김광백, 차의영, 2003. 다층 퍼셉트론을 이용한 유해물질 유입에 따른 송사리의 행동 반응 분석 및 인식. 멀티미디어학회, **6**: 1062-1069.

김홍운, 오명주, 정성주, 1999. 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 생존과 생리상태에 미치는 오존의 급성독성. 한국어병학회지, **12**: 32-41.

문순주, 김진완, 나오수, 김병호, 이영돈, 김형배, 최영찬, 2002.

Nonylphenol이 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 초기 발생에 미치는 영향. 환경독성학회지, **17**: 1-6.

박경수, 윤성진, 이승민, 김애향, 박승윤, 강덕영, 2005. 해양생태 독성평가를 위한 표준시험생물로서의 송사리(*Oryzias latipes*)에 관한 연구. 환경생물학회지, **23**: 293-303.

박배경, 박석순, 캐린 어스트필드, 키이스 쿠우퍼, 1996. 송사리 알의 초기 발생과정을 이용한 매립지 침출수 독성도 평가. 환경생물학회지, **14**: 55-61.

박창범, 나오수, 이치훈, 김병호, 이영돈, 허문수, 이정재, 정상철, 이기완, 노섬, 송춘복, 최광식, 이제혁, 여연규, 전유진, 2002. Formalin이 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 난 발생 및 부화장애에 미치는 영향. 환경독성학회지, **17**: 13-19.

신천철, 이성규, 노정구, 1985. 제초제 Butachlor의 송사리에 대한 아급성 독성. 한국환경농학회지, **4**: 118-125.

엄경숙, 송민영, 정재춘, 정용, 1987. 수은, 납, 카드뮴, 크롬 이온이 송사리(*Apiochilus latipes*)에 미치는 독성에 관한 연구. 한국물환경학회지, **3**: 53-62.

이성규, 노정구, 신천철, 1985. 제초제 Butachlor의 송사리에 대한 아급성(亞急性)독성. 한국환경농학회지, **4**(2): 118-125.

이성규, 신천철, 노정구, 1987. 농약에 대한 담수산 어류(잉어: *Cyprinus carpio*, 송사리: *Oryzias latipes*, 일본산 송사리: *Oryzias latipes*)의 약제 감수성 비교. 한국환경농학회지, **6**: 66-72.

이성규, 노정구, 신천철, 1988. 농약의 노출시간에 따른 급성어독성의 변화. 한국환경농학회지, **7**(2): 124-129.

최충길, 황영진, 위인선, 1992. 송사리 수정란에 미치는 중금속의 영향. 한국물환경학회지, **8**: 135-140.

탁건태, 김중균, 2001. 넙치 생존과 성장에 미치는 TBT 독성. 한국수산학회지, **34**: 103-108.

한경호, 김용여, 1998. 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 초기 생활사, II. 자치어의 골격발달. 여수대학교 논문집, **13**(2): 1047-1056.

Bhattacharyya, S., P.L. Klerks, and J.A. Nyman, 2003. Toxicity to freshwater organisms from oil and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms. Environ. Pollut., **122**: 205-215.

Chen, C.M. and K.R. Cooper, 1999. Developmental toxicity and EROD induction in the Japanese medaka(*Oryzias latipes*) treated with dioxin congeners. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **63**: 423-429.

Chen, C.M., S.C. Yu, and M.C. Liu, 2001. Use of Japanese medaka(*Oryzias latipes*) and tilapia(*Oreochromis mossambicus*) in toxicity tests on different industrial effluents in Taiwan. Arch. Environ. Contam. Toxicol., **40**: 363-370.

EL-Alfy, A.T., S. Grisle, and D. Schlenk, 2001. Characterization of salinity-enhanced toxicity of aldicarb to Japanese medaka: Sexual and developmental differences. Environ. Toxicol. Chem., **20**: 2093-2098.

EL-Alfy, A.T., E. Bernache, and D. Schlenk, 2002. Gender differences in the effect of salinity on aldicarb uptake, elimination, and in vitro metabolism in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. Aquatic Toxicology., **61**: 225-232.

Evans, D.H., P.M. Permarini and W.T.W. Potts, 1999. Ionic transport in fish gill epithelium. J. Exp. Zool., **283**: 641-652.

Gerhardt, A., L.J. De Bisthoven, Z. Mo, C. Wang, M. Yang, and Z.

- Wang, 2002. Short-term response of *Oryzias latipes*(Pisces: Adrianichthyidae) and *Macrobrachium nipponense*(Crustacea: Palaemonidae) to municipal and pharmaceutical waste water in Beijing, China: survival, behaviour, biochemical biomarkers. *Chemosphere*, **47**: 35–47.
- Hall, L.W., M.C. Ziegenfuss, R.D. Anderson and B.L. Lewis, 1995. The effect of salinity on the acute toxicity of total and free cadmium to a Chesapeake Bay copepod and fish. *Mar. Pollut. Bull.*, **30**: 376–384.
- Hall, L.W. and R.D. Anderson, 1995. The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. *Crit. Rev. Toxicol.*, **25**: 281–346.
- Haruta, K., T. Yamashita, and S. Kawashima, 1991. Changes in arginine vasotocin content in the pituitary of the medaka(*Oryzias latipes*) during osmotic stress. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **83**: 327–336.
- Hiraoka, Y. and H. Okuda, 1983. Characteristics of vertebral abnormalities of medaka as a water pollution indicator. *Hiroshima J. Med. Sci.*, **32**: 261–266.
- Hiraoka, Y. and H. Okuda, 1984. A tentative assessment of water pollution by the medaka egg stationing method: aerial application of fenitrothion emulsion. *Environ. Res.*, **34**: 262–267.
- Inoue, K. and Y. Takei, 2002. Diverse adaptability in *Oryzias* species to high environmental salinity. *Zool. Sci.*, **19**: 727–734.
- Iwamatsu, T., 1994. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.*, **11**: 825–839.
- Kirchen, R.V. and W.R. West, 1976. The Japanese Medaka. Its Care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina.
- Marty, G.D., S. Wetzlich, J.M. Nunez, A. Craigmill, and D.E. Hinton, 1991. Fish-based biomonitoring to determine toxic characteristics of complex chemical mixture: Documentation of bioremediation at a pesticide disposal site. *Aquatic Toxicology*, **19**: 329–340.
- Metcalfe, T.L., C.D. Metcalfe, E.R. Bennett, and G.D. Haffner, 2000. Distribution of toxic organic contaminants in water and sediments in the Detroit River. *J. Great Lakes Res.*, **26**: 55–64.
- Miyamoto, T., T. Machida, and S. Kawashima, 1986. Influence of environmental salinity on the development of chloride cells of freshwater and brackish-water medaka, *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.*, **3**: 859–865.
- Naruse, K., 1996. Classification and phylogeny of fishes of the genus *Oryzias* and its relatives. *Fish Biol. J. Medaka*, **8**: 1–9.
- Naruse, K., A. Shima, M. Matsuda, M. Sakaizumi, T. Iwamatsu, T. Soeroto, and B. Uwa, 1993. Description and phylogeny of rice fish and their relatives belonging to the suborder Adrianichthyoidei in Sulawesi, Indonesia. *Fish Biol. J. Medaka*, **5**: 11–15.
- NIWA, 1998. Standard Methods for Whole Effluent Toxicity Testing: Development and Application, NIWA Client Report.
- Ozato, K. and Y. Wakamatsu, 1994. Developmental genetics of medaka. *Development Growth and Differentiation*, **36**: 437–443.
- Ozato, K., K. Inoue, and Y. Wakamatsu, 1989. Transgenic fish: biological and technical problems. *Zool. Sci.*, **6**: 445–457.
- Pisam, M., A. Caroff, and A. Rambourg, 1987. Two types of chloride cells in the gill epithelium of a freshwater-adapted euryhaline fish: *Lebistes reticulatus*; their modifications during adaptation to saltwater. *Am. J. Anat.*, **179**: 40–50.
- Rao, S.S., C.D. Metcalfe, T.A. Neheli, and B. Schmidt, 1997. Assessing the toxicity of environmental contaminants with early stages of Japanese medaka(*Oryzias latipes*). Environment Canada National Water Research Institute, Burlington, Ontario, NWRI Contribution no., 97–02.
- Roberts, T.R., 1998. Systematic observations on tropical Asian medaka or ricefishes of the genus *Oryzias* with descriptions of four new species. *Ichthyological Research*, **45**: 213–224.
- Sakamoto, T., T. Kozaka, A. Takahashi, H. Kawauchi, and M. Ando, 2001. Medaka(*Oryzias latipes*) as a model for hypoosmoregulation of euryhaline fishes. *Aquaculture*, **193**: 347–354.
- Schlenk, D. and A.T. EL-Alfy, 1998. Expression of brachial flavin-containing monooxygenase is directly correlated with salinity-induced aldcarb toxicity in the euryhaline fish(*Oryzias latipes*). *Mar. Environ. Res.*, **46**: 103–106.
- Shima, A. and A. Shimada, 1994. The Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, as a new model organism for studying environmental germ-cell mutagenesis. *Environ. Health Persp.*, 102. Suppl. 12.
- Skinner, L., A. de Peyster, and K. Schiff, 1999. Developmental effects of urban storm water in medaka(*Oryzias latipes*) and inland silverside(*Menidia beryllina*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **37**: 227–235.
- Tachikawa, M. and R. Sawamura, 1994. The effect of salinity on pentachlorophenol accumulation and elimination by killifish (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**: 304–308.
- Uchida, K., T. Kaneko, K. Yamauchi, and T. Hirano, 1996. Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamella and changes in Na⁺, K⁺-ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. *J. Exp. Zool.*, **276**: 193–200.
- USEPA, 1991. Guidelines for Culturing the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. EPA/600/3-91/064. United States Environmental Protection Agency.
- USEPA, 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-90/022F. United States Environmental Protection Agency.
- USEPA, 1994. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms. United States environmental Protection Agency EPA/600/4-91/003, 436 pp.
- Yanagishima, S., and S. Mori, 1975. Studies on the variation and adaptation of fishes. I. Adaptation of killifish(*Oryzias latipes* T&S.) to saline water. 1. Field study. *Zool. Mag.*, **66**: 351–358.

2008년 5월 2일 원고접수

2008년 5월 13일 수정본 채택

담당편집위원: 이창훈