Pseudokirchneriella subcapitata, *Daphnia magna* and *Danio rerio* Embryos를 이용한 유기염소계 농약 알드린의 생태독성평가

Ecotoxicity Assessment of Aldrin, an Organic Chlorine Pesticide, Using *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio* Embryos

이슬기 · 김성준*

Seul-Gi Lee · Seong-Jun Kim*

전남대학교 환경에너지공학과

Department of Environment and Energy Engineering, Chonnam National University

(Received March 6, 2018; Revised April 2, 2018; Accepted May 30, 2018)

Abstract : Aldrin is an organic chlorinated pesticide widely used as a broad pesticide in the cultivation of vegetables, fruit, and cotton. It is still harmful to aquatic organisms at very low concentrations and is still being detected due to food chain enrichment. This study was performed based on the OECD Guideline using *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio* embryos to evaluate the ecotoxicity of the residual pesticide, Aldrin. As a result, median effective concentration (EC₅₀), no observed effect concentration (NOEC) and lowest observed effect concentration (LOEC) of *P. subcapitata* were 132, 0.8, 2.4 μ M, respectively. Also EC₅₀, NOEC and LOEC of *D. magna* were 0.13, 0.04, 0.08 μ M, respectively. And median lethal concentration (LC₅₀), NOEC and LOEC of *D. rerio* embryos were 750, 300, 600 μ M, respectively. In *D. rerio*, as the concentration of Aldrin increased, the development of the embryo was delayed and the hatching rate decreased. In addition, morphological abnormalities such as pericardiac edema (PE), yolk sac edema (YSE), bent spine (BS), bent tail (BT), no heart beat (NHB), collapsed phenomenon of fertilized egg (CPFE) were observed. The predicted no effect concentration (PNEC) value 1.3×10^{-3} μ M was calculated by applying the evaluation factor 100 to the EC₅₀ value of the most sensitive species *D. magna*.

Key Words : Aldrin, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, *Danio rerio* embryos, Ecotoxicity

요약 : 알드린은 채소나 과일, 목화 등의 재배 시 광범위 살충제로 널리 쓰이고 있는 유기염소계 농약이다. 매우 낮은 농도에서 수생생물에 유해하며 먹이사슬 농축으로 인해 여전히 검출되고 있다. 본 연구에서는 잔류농약 알드린의 수생태독성을 평가하기 위하여 *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* 및 *Danio rerio* 배아를 대상으로 OECD Guideline에 근거하여 연구를 수행하였다. 그 결과, *P. subcapitata*에 대한 반수영향농도(EC₅₀)와 무영향관찰농도(NOEC) 및 최소영향관찰농도(LOEC)는 각각 132, 0.8, 2.4 μ M이었으며 *D. magna*의 EC₅₀, NOEC 및 LOEC는 각각 0.13, 0.04, 0.08 μ M이었다. 또한 *D. rerio* 배아의 반수치사농도(LC₅₀), NOEC 및 LOEC는 각각 750, 300, 600 μ M로 나타났다. *D. rerio*의 경우 알드린의 농도가 증가함에 따라 배아의 발달이 지연되고 부화율이 감소했다. 또한 심장 부종(PE), 난황 부종(YSE), 척추 굽음(BS), 꼬리 굽음(BT), 심정지(NHB), 수정란 와해 현상(CPFE)과 같은 형태학적 이상현상이 관찰되었다. 예측무영향농도(PNEC) 값은 가장 예민 종인 *D. magna*의 EC₅₀ 값에 평가계수 100을 적용하여 1.3×10^{-3} μ M로 도출되었다.

주제어 : 알드린, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, *Danio rerio* 배아, 생태독성

1. 서론

유기염소계 농약은 일반적으로 지용성이 매우 크기 때문에 수분 용해도가 낮고 화학적으로 매우 안정되어 있어 환경 중에 잘 분해되지 않는 특성이 있다. 이러한 특성으로 인해 먹이사슬 농축으로 생태계에 유해한 영향을 끼쳐 전 세계적으로 주목을 받고 있으며, 유기농약 초창기에 농약의 효과를 과신하여 과용, 남용한 결과 유기염소계 농약과 그 분해산물이 이러한 농약을 전혀 사용한 적이 없는 곳에서도 여전히 검출되고 있는 실정이다.¹⁾

유기염소계 농약 중 Aldrin(1,2,3,4,10,10-hexachloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-endo-1,4-exo-5,8-dimethanonaphthalene)은 매우 낮은 농도에서 수생생물에 유해하며, 대부분의 환경 조건에서 생물학적 및 비 생물학적 기작을 통해 dieldrin으로

변환되어 증발되고, 서서히 생분해된다.²⁾ 식물에 살포할 경우에는 잔류성이 적으나 토양에 강하게 결합하는 경향이 있어 토양을 통해 또는 지표와 지하수로 매우 천천히 이동한다. 이러한 유해성 때문에 Aldrin은 1974년 이래 국내에서 제조 및 사용이 금지되었고 그 후 일부 수입이 시작되었지만 1985년 이후로 중단되었다. 이후로는 사용하지 않았기 때문에 환경으로의 새로운 배출이 발생하지 않아야 하지만 잔류성이 있기 때문에 유해 폐기물 처리 시설에서 여전히 검출되고 있다.²⁻⁴⁾ 하지만 국내 및 국외의 수생태계에 대한 잔류농약 aldrin의 검출수준은 극히 희박하고 수계에 대한 검출농도를 확인하기 어려운 점이 있기 때문에 수계에 대한 국내 및 국외의 환경중 예측농도(PEC, Predicted Environment Concentration)를 알 수 없고 위해지수 HQ 값을 도출하기는 쉽지 않다. 또한 우리나라의 경우 환경 내 잔류하는 유기오

* Corresponding author E-mail: seongjun@jnu.ac.kr Tel: 062-530-1864 Fax: 062-530-1859

염물질에 대한 환경권고치 및 기준치가 마련되지 못한 실정이다.⁴⁾ 그러므로 대표적인 수계 생물종을 이용하여 생태독성 영향을 모니터링 해보고 예측무영향농도를 도출해봄으로써 향후 잔류농약 aldrin에 대한 추가적인 연구에 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

Aldrin은 경구(39 mg/kg, LD₅₀, rat)독성에서 매우 높은 독성을 보였으며 마우스를 대상으로 장기 발암성 연구를 실시한 결과, 양성 및 악성 간 세포 종양이 관찰되었다.⁵⁾ 또한 피부 및 호흡기에 자극적이고 피부 흡수를 통해 전신독성을 나타낼 수 있으며, 발암가능성이 있기 때문에 먹이사슬 가장 낮은 단계에서 높은 독성을 보인다면 점차 농축되어 수년의 기간이 지나고 인체에도 위해성을 나타낼 수 있다.^{6,7)} 그러므로 이러한 잔류농약은 노출의 첫 단계인 수생태계의 가장 낮은 영양단계부터 평가할 필요가 있다고 판단된다.

일반적으로 수생태계에 대한 위해성 평가 항목으로는 미세조류, 무척추동물, 그리고 어류로 구성되어 있다. 현재 수생태계에 대한 Aldrin의 독성에 관한 기존 연구에서는 무척추동물과 어류를 이용한 평가가 이루어졌다. 각 문헌에서 도출된 무척추동물(*Daphnia magna*)에 대한 반수영향농도(48 hr EC₅₀)는 0.028 mg/L (0.08 µM),⁵⁾ 어류[*Lepomis macrochirus* (Bluegill), *Salmo gairdneri* (rainbow trout)]에 대한 반수치사농도(96 hr LC₅₀)는 각각 6.2 µg/L (0.02 µM), 2.6 µg/L (0.007 µM)로 평가되었다.⁸⁾ 하지만 일차 생산자인 조류에 대한 평가와 본 연구에서 어류 시험 중으로 선정된 *D. rerio* (Zebrafish)에 대한 독성평가는 이루어지지 않았다는 점에서 수생태계에 대한 Aldrin의 독성자료는 미비하다고 보며, 기존의 독성 시험 결과를 추가적으로 더 보완하기 위해서 검토할 필요가 있다고 판단된다. 따라서 본 연구에서는 이러한 Aldrin의 수생태계에 대한 독성을 좀 더 구체적으로 파악하기 위해 일차 생산자인 조류(*P. subcapitata*), 일차 소비자인 물벼룩(*D. magna*), 이차 소비자인 어류(*D. rerio*) embryos를 이용한 급성 노출 평가를 실시하여 이전의 평가와 비교 검토하고자 한다. 각 영양단계별 시험 기준은 OECD guideline에 근거하여 급성독성시험을 수행하였다.⁹⁻¹¹⁾ 이 중 가장 민감한 종의 독성 값에 평가계수(AF)를 적용하여 수생태계의 예측무영향농도(PNEC)값을 도출하여,¹²⁻¹⁴⁾ 향후 aldrin의 환경권고치 및 기준치 마련에 도움이 될 수 있리라 사료된다.

2. 재료 및 방법

2.1. 독성물질 및 기타 시약

본 연구의 독성 시험 물질로 선정된 농약 Aldrin은 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입하였으며 CAS Number는 309-00-2이다. Aldrin의 화학식은 C₁₂H₈Cl₆, 분자량 364.91, 순도 99.5%, 끓는점 145℃, 녹는점 104℃, 옥탄올/물 분배계수 6.50이며, 순도 99.8% 용매 Dimethyl sulfoxide (Junsei chemicals, Japan)에 잘 용해된다. 분말 형태인 시험 물질 100

Fig. 1. Chemical structure of Aldrin.

mg을 DMSO에 녹여 1% stock solution을 제조하였으며, 생태독성시험은 각 생물 종의 설정 농도에 충분히 희석하여 실시하였다. Aldrin의 구조는 다음 Fig. 1에 나타났다.

그 외 사용된 기타 시약들은 생물을 배양하기 위한 목적으로 사용되었다. 일차 생산자인 조류(*P. subcapitata*)의 사육수는 BG-11배지를 사용하였고 모두 일급(Extra pure grade) 이상 품질의 시약을 사용하였으며, 주로 99% 순도의 NaNO₃ (YAKURI pure chemicals, Osaka Japan, Extra pure)로 제조되었다. 일차 소비자인 물벼룩(*D. magna*)의 사육수 또한 모두 일급 이상 품질의 시약을 사용하였으며, 주로 CaCl₂·2H₂O (Duksan pure chemicals, Korea, Extra pure)와 MgSO₄·7H₂O (DC chemicals, Korea, Extra pure)를 사용하여 M4 배지 제조에 사용되었다. 이차 소비자인 어류(*D. rerio* embryos)의 경우에는 증류수에 0.065 g/L의 Sodium bicarbonate (Daejung chemicals, Korea, Extra pure grade)와 0.16 g/L의 Sea salt (Aquarium systems, France)를 용해시켰으며 pH를 조정하기 위하여 추가적으로 Sodium phosphate monobasic anhydrous (Daejung chemicals, Korea, Extra pure grade)을 사용하였다.

2.2. 각 생물 종의 사육조건 및 급성독성평가

2.2.1. 미세조류 급성독성평가

미세조류 *P. subcapitata*는 (주)NLP에서 분양 받아 OECD Guideline 201 방법에 근거하여 배양하였다.⁹⁾ 배양액은 BG-11배지를 제조하여 사용하였으며, 제조된 각각의 stock solution에서 가장 많이 사용되는 NaNO₃ 10 mL와 그 외 시약 K₂HPO₄·3H₂O, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, Citric acid, Na₂EDTA·2H₂O, Na₂CO₃, Trace Metal solution, F/2 Vitamins 을 각각 1 mL 씩 취하여 증류수 1 L에 충분히 용해시켰다. Trace Metal solution은 H₃BO₃, MnCl₂·4H₂O, ZnSO₄·7H₂O, Na₂MoO₄·2H₂O, CuSO₄·5H₂O, Co(NO₃)₂·6H₂O 성분들로 이루어져있으며 F/2 Vitamins solution은 Vitamin B₁₂, Biotin, Thiamine HCl 성분들로 구성된다.¹⁵⁾ 이러한 stock solution은 모두 냉장(4℃)보관하여 사용하였다. 계대배양은 4일 간격으로 조류가 정체가 상태일 때 수행하였다. 사육조건은 pH 7.5±0.1, 온도 20±1℃, 6,000-8,000 lux의 연속 광주기로 일정하게 유지하여 배양하였다.

이러한 사육조건에서 배양된 조류를 독성시험 시작 3일 전 전배양하여 지수 성장기의 조류를 이용하였다. 원활한 실험 진행을 위하여 시험 기간 동안에는 조류가 침강하지 않도록 2시간에 한 번씩 교반 시켜주었고 몇 차례 예비 시험을

거친 후 최종적으로 농도를 설정한 뒤 본 급성독성평가를 수행하였다. 본 실험에서는 8.1×10^5 cells/mL 농도의 조류를 사용하여 초기접종량을 모두 5×10^4 cells/mL로 조정하였다. 각 농도당 200 mL의 시험 용액에 공비 3을 적용한 0.8, 2.4, 7.2, 21.6, 64.8, 194.4, 583.2 μ M의 총 7개 노출 농도를 설정하였고, 추가적으로 최고농도(583.2 μ M)에 포함되는 0.295 M의 용매독성 실험도 수행하였다. 각 농도에서 노출 실험은 오차율을 감소시키기 위하여 3반복 실험을 실시하였다. 72시간 동안 노출시켜 24시간 간격으로 조류 성장을 관찰하였으며, 터진 것과 비어있는 것은 죽은 것으로 간주하였다. 세포수는 수질오염공정시험기준의 식물성플랑크톤 현미경계수법에 의거하여 혈구계수판(Hemocytometer)을 이용한 계수법에 따라 산출하였다.¹⁶⁾ 커버글라스를 덮은 혈구계수판의 상판과 하판에 각각 100 μ L의 시료용액을 주입하고 현미경(Nikon ECLIPSE E200, Japan)을 사용하여 400배율로 관찰하였으며, 이때 시료용액은 미세조류와 루골용액을 1:1 비율로 희석시킨 것을 사용하였다. 각 농도에 노출된 조류의 성장률은 대조군의 성장율을 기준으로 백분율하여 산출하였다. 통계 분석은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었으며, Sigma-plot 12.5을 사용하여 반수영향농도(72 hr EC₅₀), NOEC 및 LOEC 값을 산출하였고 Graphpad Prism 5.0을 사용하여 bonferroni posttests에 의해 two-way ANOVA를 사용하여 유의성을 나타내었다.

2.2.2. 물벼룩 급성독성평가

물벼룩 *D. magna*는 생태독성분석 GLP 기관인 한국화학융합시험연구원 헬스케어본부에서 분양받아 OECD Guideline 202 방법에 근거하여 배양하였다.¹⁰⁾ 사육수는 M4배지를 제조하여 사용하였고, 제조된 각각의 stock solution에서 주로 사용되는 CaCl₂·2H₂O 1 mL, MgSO₄·7H₂O 0.5 mL와 그 외 시약 KCl 0.1 mL, NaHCO₃ 1 mL, Na₂SiO₃·9H₂O 0.2 mL, NaNO₃ 0.1 mL, KH₂PO₄ 0.1 mL, K₂HPO₄ 0.1 mL, Combined traced elements stock solutionII 50 mL, Combine vitamin stock 0.1 mL를 각각 취하여 증류수 1 L에 충분히 용해시켰다. Combined traced elements stock solutionII은 H₃BO₃, MnCl₂·4H₂O, LiCl, RbCl, SrCl₂·6H₂O, NaBr, Na₂MoO₄·2H₂O, CuCl₂·2H₂O, ZnCl₂, CoCl₂·6H₂O, KI, NaSeO₃, NH₄VO₃, Fe-EDTA solution 성분으로 이루어져있다. 또한 Combine vitamin stock은 조류 배양액의 vitamin 성분과 동일하며 Vitamin B₁₂, Biotin, Thiamine HCl 성분으로 구성된다.¹⁰⁾ 이렇게 제조된 사육수는 3일 간격으로 새로 교체해주었다. 물벼룩 특성상 번식기간이 짧고 사육 조건에 의한 높은 민감성을 나타내기 때문에 주 1회 계대배양을 실시하여 건강한 물벼룩만을 사육하였다. 먹이는 *Chlorella vulgaris*를 1일 1회 공급하였고 추가적으로 보조먹이 YCT를 주 3회 공급하였으며 모두 냉장(4℃)보관하여 10일 이내로 사용하였다. 사육조건은 pH 7.5 $\pm$ 0.2, 온도 20 $\pm$ 1℃, 광주기 16시간/8시간(명/암)으로 일정하게 유지하여 배양하였다.

독성 시험에 사용될 물벼룩은 3세대 이상, 생후 24시간

미만의 건강한 개체들을 이용하여 진행하였다. 또한 실험 기간 동안에는 산소와 먹이 공급을 중단하였다. 각 농도당 100 mL의 시험 용액에 독성물질과 사육수를 희석하여 공비2를 적용한 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.31 μ M의 총 5개 노출 농도를 설정하였고, 추가적으로 최고농도(0.31 μ M)에 포함되는 0.000157 M의 용매독성 실험도 수행하였다. 각 농도에서 노출 실험은 10마리씩 3반복으로 총 30개체를 사용하였다. 시험 시작 후 48시간 동안 노출시켰으며 24시간 간격으로 치사 및 유영저해를 관찰하였다. 물벼룩은 상·하 움직임을 보이는데, 상층부에서 1/3 ~ 2/3 지점에서 주로 움직이는 물벼룩이 가장 상태가 좋다고 판단하였으며, 움직임이 미비한 개체들은 스포이드를 사용하여 조심스럽게 휘저어주고 15초가 지난 후 가라앉아서 움직이는 개체들은 유영저해로 간주하였다. 통계 분석은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었으며, Sigma-plot 12.5을 사용하여 반수영향농도(48 hr EC₅₀), NOEC 및 LOEC 값을 산출하였고 Graphpad Prism 5.0을 사용하여 bonferroni posttests에 의해 two-way ANOVA를 사용하여 유의성을 나타내었다.

2.2.3. 어류 급성독성평가

어류 *D. rerio*는 경북대학교에 소재하는 제브라피쉬은행에서 분양받아 세대를 번식하여 사육하였다. 제브라피쉬는 인간의 유전질환과 유사한 특징을 지니고 있고 제브라피쉬 배아는 체내가 투명하여 형태학적 이상현상을 관찰하는데 수월하기에 급성독성시험종으로 선정하였으며, OECD Guideline 236 방법에 근거하여 어류의 초기성장단계에 미치는 급성독성영향을 평가하였다.¹¹⁾ 사육수는 경북대학교 제브라피쉬은행에서 제조·사용하는 방법을 토대로 하여, 0.065 g/L의 Sodium bicarbonate와 0.16 g/L의 Sea salt를 증류수 1 L에 충분히 용해시켰다. 또한 사육수의 pH를 조정하기 위하여 추가적으로 12% Sodium phosphate monobasic anhydrous (NaH₂PO₄)를 사용하였고 사육수는 주 2회 교체해주었다. 먹이는 Small tropical fish feed (Guppy BOB, Chunhajeil feed, Korea)를 1일 3회, OSI Brine Shrimp (Ocean Star International, USA)를 주 1회 급여하여 사육하였다. 사육조건은 pH 7.5 $\pm$ 0.2, 온도 26 $\pm$ 1℃, 전기전도도 0.39-0.43 mS/cm, 광주기 16시간/8시간(명/암)으로 일정하게 유지하여 배양하였다.

독성 시험에 사용될 어류 배아를 생산하기 위하여 시험 전날 밤 제작된 Mating cage에 암수 비율을 1:2로 하여 하루 동안 어둠에 유지시켜준 후, 시험 당일 오전 생산된 배아를 Methylene Blue 용액에 담금 염색시키고 건강한 배아만을 골라내어 분리하였다. 몇 차례의 예비 시험을 거친 후 본 실험에서는 독성물질과 사육수를 희석하여 공비2를 적용한 75, 150, 300, 600, 1200 μ M의 총 5개 노출 농도를 설정하였고, 추가적으로 최고농도(1200 μ M)에 포함되는 0.6 M의 용매독성 실험도 수행하였다. 각 농도에서 노출 실험은 10개씩 3반복으로 총 30개체를 사용하였다. 조제된 시험물질은 24-well plates에 각각 2 mL씩 넣고 분리해놓은 배아를

1알씩 투입시켰다. 시험기간 동안 온도, 광주기는 각각 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 16시간/8시간(명/암)으로 유지하였다. 시험 시작 후 96시간 동안 노출시켰으며 24시간 간격으로 현미경(Nikon ECLIPSE E200, Japan)을 사용하여 4배율로 치사 및 형태학적 이상현상을 관찰하였다. 대조군과 비교하여 배아 및 치어의 성장과 형태에 이상이 있는 것을 기형으로 판단하였으며, 수정란이 와해되거나 심장이 뛰지 않는 것을 치사로 간주하였다. 노출시간과 Aldrin의 농도에 따른 배아 및 치어의 특정 현상을 모두 기록하여 백분율로 표현하였으며 통계 분석은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. Sigma-plot 12.5을 사용하여 반수치사농도(96 hr LC_{50}), NOEC 및 LOEC 값을 산출하였고 Graphpad Prism 5.0을 사용하여 bonferroni posttests에 의해 two-way ANOVA를 사용하여 유의성을 나타내었다.

2.3. 예측무영향농도(PNEC) 도출

PNEC (predicted no effect concentration)값은 인체 이외 생태계에 서식하는 생물에게 유해한 영향이 나타나지 않는다고 예측되는 환경 중의 농도를 말하며, 가장 민감한 생물 종의 $\text{EC}_{50}(\text{LC}_{50})$ 및 NOEC값에 평가인자(AF)를 적용하여 결정한다. 본 연구에서는 OECD지침에 따라 수생태계의 대표적 영양단계 미세조류, 물벼룩, 어류를 포함하는 일련의 시험결과에서 구한 최소 급성 EC_{50} 또는 LC_{50} 에 있어서 가장 민감한 종의 독성 값에 일정평가인자 100을 나누어 PNEC를 예측하였다. 적용된 평가인자는 국립환경과학원이 규정한 바에 의거하였으며, 급성독성값 3개 영양단계를 산출하였으므로 100을 적용하였다.^[12-14]

3. 결과 및 고찰

3.1. 미세조류 급성독성평가

미세조류 *P. subcapitata*에 대한 Aldrin의 농도는 총 7개의 노출농도를 설정하여 72시간 급성독성시험을 수행하였다. 72시간 관찰 결과, 최저농도인 $0.08 \mu\text{M}$ 에서는 100%의 성장율을 보여 독성영향이 없는 NOEC(무영향관찰농도)로 결정하였으며, $2.4 \mu\text{M}$ 에서는 조류 성장율 5% 이상을 저해시켜 LOEC(최저영향관찰농도)로 결정하였다. 도출된 NOEC 및 LOEC 값은 two-way ANOVA 통계 분석 결과 대조군과 유의한 차이를 보이지 않은 것으로 확인되었으며 21.6 , $64.8 \mu\text{M}$ 농도에서는 대조군과 비교하여 약간의 유의한 차이($^*P < 0.05$)를 보이는 것으로 나타났다. 각 노출농도의 표준편차를 보면, 약간의 차이가 있음을 알 수 있는데 이는 현미경계수 시 혈구계수판에 시료용액을 주입하고 정치한 5분이 길게 설정되어 많은 세포가 가라앉아 좀 더 많은 세포가 계수되어 오차가 나타난 것으로 사료된다. 중간농도인 $64.8 \mu\text{M}$ 에서는 64%의 성장율을 보였고 $194.4 \mu\text{M}$ 에서는 37%로 성장율이 상당히 억제함을 알 수 있었다. two-way ANOVA 통계 분석 결과 $194.4 \mu\text{M}$ 이상의 농도에서는 대조군과 유

Fig. 2. Acute toxicity test of Aldrin to *P. subcapitata* (Two-way ANOVA followed Bonferroni posttests, $F_7=54.84$, $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$).

의한 차이($^{***}P < 0.001$)를 보여 그래프에 나타내었다. 최고 농도 $583.2 \mu\text{M}$ 에서 용매독성을 수행한 결과 대조군과 비교하여 영향을 보이지 않았으며 현미경계수법에서 23%의 성장율을 보여 OECD guideline에 따라 조류 성장율 75% 이상을 저해시키는 범위에 해당하였다. 결과적으로 *P. subcapitata*에 대해서 Aldrin의 세포수에 대한 72시간 EC_{50} 을 도출한 결과 $132 \mu\text{M}$ 으로 나타났다(Fig. 2).

3.2. 물벼룩 급성독성평가

물벼룩 *D. magna*에 대한 Aldrin의 농도는 총 5개의 노출 농도를 설정하여 48시간 급성독성시험을 수행하였다. 48시간 관찰 결과, 최고농도 $0.31 \mu\text{M}$ 에서의 용매 DMSO의 독성 영향은 나타나지 않았다. 또한 시험 농도 $0.04 \mu\text{M}$ 에서 100%의 생존율을 보여 Aldrin에 대한 독성영향이 없음을 알 수 있었고 더 높은 농도인 $0.08 \mu\text{M}$ 에서 93.3%의 생존율을 보여 독성영향이 나타난 최소영향관찰농도(LOEC)로 판단하였다. 도출된 NOEC 및 LOEC 값은 two-way ANOVA 통

Fig. 3. Acute toxicity test of Aldrin to *D. magna* (Two-way ANOVA followed Bonferroni posttests, $F_5=150.33$, $^{***}P < 0.001$).

계 분석 결과 대조군과의 유의한 차이를 보이지 않았고, 본 실험은 10마리씩 3반복 실험을 수행한 결과로 0.08, 0.16 μM 농도에서의 표준편차는 1.15로 계산되어졌기 때문에 반복 구간에 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 농도 0.08~0.16 μM 에서 생존율이 급격하게 저하되는 것을 알 수 있었다. 결론적으로 *D. magna*의 48시간 EC_{50} 은 0.13 μM 을 나타내었다 (Fig. 3). 이는 본 연구에서 도출되었던 조류 *P. subcapitata*에 대한 EC_{50} 값(132 μM) 보다 낮게 나타났기에 Aldrin 독성에 대해 상당히 약함을 알 수 있다. 또한 국립환경과학원 화학물질안전관리정보시스템에서 제공하는 물질안전보건자료(Material Safety Data Sheet, MSDS)에 따르면 무척추동물(*D. magna*)에 대한 반수염양농도(48 hr EC_{50})는 0.028 mg/L (0.08 μM)로 본 연구에서의 EC_{50} 값과 유사하였다.⁵⁾ 노출농도 0.16 μM 이상에서는 two-way ANOVA 통계 분석으로부터 대조군과의 유의한 차이(** $P < 0.001$)를 보여 그 래프에 나타내었다.

3.3. 어류 급성독성평가

어류 *D. rerio*에 대한 Aldrin의 농도는 총 5개의 노출농도를 설정하여 96시간 급성독성시험을 수행하였다. 노출 시간과 Aldrin의 농도에 따른 배아 및 치어의 특정 현상과 부화율을 파악하기 위해 현미경을 사용하여 24시간 간격으로 지속적으로 관찰하였다. 시험 결과, Aldrin의 농도가 증가함에 따라 배아의 발달이 지연되고 부화율이 감소했다(Fig. 4). 72시간 경과 후 대조군은 100% 부화하였으며 그 외 모든 노출 농도에서는 50% 이하의 부화율을 보였다. 또한 96시간 경과 후 300 μM 이하의 농도에서는 100% 부화율을 보였고 600 μM 에서는 50% 그리고 최고농도인 1200 μM 에서는 모두 치사하여 부화를 관찰할 수 없었다.

Fig. 4. The variation of hatching ratio of *D. rerio* embryo in various concentrations of Aldrin (Two-way ANOVA followed Bonferroni posttests, $F_{10}=10386.42$, *** $P < 0.001$), 5 data symbol at 72 hr and 2 data at 96 hr showed *** $P < 0.001$.

통계 분석 결과 어류의 부화율은 대조군과의 유의한 차이(** $P < 0.001$)를 확인하였으며 각 농도 구간에 표시하였다. 또한 응고(C, Congelation), 심장 부종(PE, Pericardiac Edema), 난황 부종(YSE, Yolk Sac Edema), 난황 밑 부종(YSEE, Yolk Sac Extension Edema), 척추 굽음(BS, Bent Spine), 꼬리 굽음(BT, Bent Tail), 심정지(NHB, No Heart Beat), 수정란 와해 현상(CPFE, Collapse Phenomenon of the Fertilized Egg)과 같은 형태학적 이상현상이 관찰되었다. 24시간이 경과하였을 때 대조군(Fig. 5(A))을 포함한 300 μM 이하의 농도에서는 정상적인 형태를 유지하였다. 또한 600 μM 농도에서 3.3%의 응고(Fig. 5(E))가 발생되기 시작했고, 최고농도인 1200

Table 1. Summary of morphological abnormalities symptoms occurred in various concentrations of Aldrin

Symptoms		Morphological abnormality symptoms (%)															
		C ^{a)}				YSE ^{b)}				YSEE ^{c)}				PE ^{d)}			
over time		24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
75 μM		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	26.7	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	16.7	50.0
150 μM		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	53.3	0.0	0.0	3.3	23.3	0.0	0.0	13.3	66.7
300 μM		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	90.0	0.0	0.0	0.0	16.7	0.0	0.0	20.0	100.0
600 μM		3.3	3.3	3.3	3.3	0.0	0.0	36.7	46.7	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	36.7	46.7
1200 μM		10.0	10.0	10.0	10.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0

Symptoms		Morphological abnormality symptoms (%)															
		BS ^{e)}				BT ^{f)}				NHB ^{g)}				CPFE ^{h)}			
over time		24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
75 μM		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
150 μM		0.0	0.0	0.0	6.7	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
300 μM		0.0	0.0	0.0	6.7	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
600 μM		0.0	0.0	0.0	23.3	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	20.0	26.7	0.0	0.0	3.3	3.3
1200 μM		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	26.7	30.0	0.0	0.0	50.0	60.0

^{a)}Congelation, ^{b)}Yolk Sac Edema, ^{c)}Yolk Sac Extension Edema, ^{d)}Pericardiac Edema, ^{e)}Bent Spine, ^{f)}Bent Tail, ^{g)}No Heart Beat, ^{h)}Collapse Phenomenon of the Fertilized Egg

Fig. 5. Image summary of morphological abnormalities of *D. rerio* embryo caused by Aldrin.

* C, Congelation; YSE, Yolk Sac Edema; YSEE, Yolk Sac Extension Edema; PE, Pericardiac Edema; BS, Bent Spine; BT, Bent Tail; NHB, No Heart Beat; CPFE, Collapse Phenomenon of the Fertilized Egg;

μM에서는 응고율이 10%로 상승하였다. 48시간 경과 후 대조군(Fig. 5(B))의 형태로 보아 부화 직전 단계임을 알 수 있고, 최고농도인 1200 μM에서 6.7%의 심장이 뛰지 않는 현상(Fig. 5(F))을 관찰할 수 있었다. 이는 고농도의 Aldrin이 시간이 경과함에 따라 부화 직전의 배아에 독성이 강하게 작용한 것으로 사료된다. 72시간 경과 후 대조군(Fig. 5(C))에서는 모두 부화하였으며, 최저농도인 75 μM에서 난황 부종 및 심장 부종이 각각 3.3%, 16.7%로 관찰되기 시작했고, 150 μM 농도에서 3.3%의 난황 밑 부종이 발견되었다(Table 1). 또한 최고농도 1200 μM에서 심정지 및 수정란이 와해되는 현상(Fig. 5(G))이 각각 26.7%, 50.0%로 높게 나타났다. 이러한 결과로 보아 저농도에서는 난황 부종, 심장 부종 뿐만 아니라 추가적으로 난황이 연장되는 부분에서 부종이 관찰되었음을 알 수 있다. 과거 문헌에 의하면, 치어에서 나타난 부종의 경우는 독성물질이 축적되어 혈류의 흐름이 정상적으로 작동하지 않게 되어 혈관부근이 과다하게 부어 오르는 현상이 발생된 것이라 하였다.¹⁷⁾ 본 연구에서도 독성물질 Aldrin의 축적으로 인해 부종이 발생된 것으로 사료된다. 또한 농도가 높아질수록 부종이 심해지면서 수정란이 와해되는 현상(CPFE)이 발생된 것으로 판단하였다. 96시간이 경과하였을 때 다양한 형태학적 이상현상을 관찰할 수 있었다. 600 μM 농도에서 46.7%의 난황 부종, 3.3%의 난황 밑 부종, 46.7%의 심장 부종, 10.0%의 꼬리 굽음, 23.3%의 척추 굽음을 보였으며, 최고농도인 1200 μM 농도에서 웅매 DMSO의 독성 영향은 나타나지 않았고 30%, 60%의 심정지 및 수정란이 와해되는 현상을 나타냈다(Fig. 5(H))과 Table 1). 또한 본 연구에서 도출된 LOEC 값인 600 μM 농도에서 표준편차는 0.58로 계산되어져 반복구간에 큰 차이를 보이지 않았으며, LOEC 이상의 농도에서는 대조군과의 유의한 차이(**P < 0.001)를 보여 그래프에 표시하였다. 결

Fig. 6. Acute toxicity test of Aldrin to *D. rerio* embryo (Two-way ANOVA followed Bonferroni posttests, $F_5=880.00$, ***P < 0.001).

론적으로, *D. rerio* 배아에 대한 Aldrin의 반수치사농도 (LC_{50}), NOEC 및 LOEC는 각각 750, 300, 600 μM로 나타났다(Fig. 6). 과거 문헌에서의 어류 [*Lepomis macrochirus* (Bluegill), *Salmo gairdneri* (rainbow trout)]에 대한 반수치사농도(96 hr LC_{50})는 각각 6.2 μg/L (0.02 μM), 2.6 μg/L (0.007 μM)로 평가되었다.⁸⁾ 본 연구에서 산출된 *D. rerio* 배아의 LC_{50} 값과 상당히 차이가 있음을 알 수 있다. Macova 문헌에 따르면 *D. rerio*의 배아 및 성어 단계에 대한 2-phenoxyethanol의 급성 독성을 비교한 결과 성어 단계에서 독성이 더 민감하였다. 이는 어류의 배아 및 성어에서 흡수와 신진대사의 차이라고 판단하였으며 어류의 나이가 증가함에 따라 안전 농도가 감소한다고 보고하였다.¹⁸⁾ 따라서 본 연구에서도 *D. rerio* 배아 단계가 독성에 더 강할 수 있다고 사료된다.

Table 2. The values of EC₅₀ or LC₅₀, LOEC, NOEC and PNEC of Aldrin obtained from the acute toxic assessment using *P. subcapitata*, *D. magna* and *D. rerio* embryo

Species	EC ₅₀ or LC ₅₀ (μM)	LOEC (μM)	NOEC (μM)	PNEC (μM)
<i>P. subcapitata</i>	132	2.4	0.8	1.3×10^{-3}
<i>D. magna</i>	0.13	0.08	0.04	
<i>D. rerio</i> embryo	750	600	300	

3.4. PNEC 및 종합적 독성평가

본 연구에서의 대표적인 수서생물 3종에 대한 급성독성평가 결과로부터, *D. magna*에 대한 독성이 가장 민감하게 나타나 *D. magna*의 EC₅₀ 값에 평가인자 100을 적용하여 PNEC (예측무영향농도)를 도출한 결과, $1.3 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ($0.47 \times 10^{-3} \text{ mg/L}$)로 예측되었다(Table 2).

환경에서의 위해성이 우려되는지 결정하기 위해서는 유해지수(Hazard Quotient:HQ)가 사용된다. 이렇게 산출된 유해지수 HQ 값을 1과 비교하여 1보다 큰 경우에는 위해 우려가 있고 1보다 작은 경우에는 위해 우려가 낮다고 판정한다. 유해지수는 환경 매체 중 예측농도(PEC)를 용량 반응 평가로부터 도출된 PNEC로 나누어 계산할 수 있다.¹⁹⁾

과거 문헌에서는 새만금의 해양환경에서 유기염소농약의 오염 상태를 평가하기 위해 표층 해수 및 퇴적물을 수집하고 분석하였다. 해수와 퇴적물에서 검출한계 값은 각각 $0.01 - 0.06 \times 10^{-6} \text{ mg/L}$, $0.005 - 0.04 \times 10^{-3} \text{ mg/L}$ 로, 새만금에서 채집된 해수와 표층퇴적물에 잔류하는 Aldrin 및 기타 유기염소계 농약은 저서생물에 미치는 위해성이 비교적 적은 것으로 나타났다.⁴⁾ 검출한계 값을 예측영향농도로 가정하면 해수 및 퇴적물에서의 유해지수 HQ 값은 각각 0.21×10^{-4} , 0.01로 산출되며 모두 1보다 작으므로 위해 우려가 낮다고 판단할 수 있다. 본 연구의 PNEC에 의하면 새만금에서의 Aldrin의 환경 위해성은 없다고 판단되지만, aldrin이 잔류성이 강하기 때문에 채집 횟수, 측정 시기 및 측정 범위를 넓혀 더 포괄적으로 조사할 필요가 있다.

본 연구에서 도출된 PNEC 값은 향후 잔류성이 강한 유기염소계 농약에 대한 추가적인 연구에 참고자료로 활용할 수 있을 것이라 판단된다. 또한 국외의 환경권고의 기준은 제시되어 있지만 우리나라의 경우 환경 내 잔류하는 유기오염물질에 대한 환경권고치 및 기준치가 마련되지 못한 실정이므로 향후 국내 생물종을 이용한 독성영향이 반영된 데이터베이스가 구축되어야 할 것이며 잔류유기물질에 대한 환경권고기준이 마련되어야 할 것이다.⁴⁾

4. 결론

본 연구에서는 잔류성이 강하여 여전히 검출되고 있는 유기염소계농약인 Aldrin이 수생태계에 미치는 독성 영향을 평가하기 위해 OECD Guideline에 근거하여 대표적인 수서

생물 3종: 일차 생산자인 조류 *P. subcapitata*, 일차 소비자인 물벼룩 *D. magna*, 이차 소비자인 어류 *D. rerio* embryos를 대상으로 생태위해성을 평가하였다.

*P. subcapitata*에 대한 72시간 EC₅₀, NOEC 및 LOEC는 각각 132, 0.8, 2.4 μM이며, *D. magna*의 48시간 EC₅₀, NOEC 및 LOEC는 각각 0.13, 0.04, 0.08 μM로 도출되었다. 또한 *D. rerio* embryo의 96시간 LC₅₀, NOEC 및 LOEC는 각각 750, 300, 600 μM이었다. *D. rerio*의 경우 Aldrin의 농도가 증가함에 따라 배아의 발달이 지연되고 부화율이 감소했다. 또한 96시간까지의 배아 및 치어의 형태학적 이상현상을 관찰한 결과, 응고(C), 심장 부종(PE), 난황 부종(YSE), 난황 밑 부종(YSEE), 척추 굽음(BS), 꼬리 굽음(BT), 심정지(NHB), 수정란 와해 현상(CPFE)이 나타났다. 저농도에서는 난황 부종, 난황 밑 부종, 심장 부종, 꼬리 굽음이 관찰되기 시작했고 고농도에서는 주로 심정지 및 수정란이 와해되는 현상이 관찰되었다.

본 연구의 실험 결과 3종 가운데 가장 민감한 반응을 보인 *D. magna*에 대한 결과로부터 도출한 EC₅₀ 값에 평가계수 100을 적용하여 PNEC $1.3 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ 이 예측되었다. 예측된 PNEC 값은 향후 국내 환경권고치 및 기준치 설정에 큰 도움이 될 것이라 사료되며, 앞으로 잔류기간이 긴 유기염소계 농약에 대한 지속적인 관찰과 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 한국 환경부의 「2018년 화학물질 유·위해성 정보관리 전문인력 양성사업」에서 지원받아 수행하였기에 이에 깊은 감사 드립니다.

KSEE

References

1. Tolerance limit for pesticide residue, Rural Development Administration(RDA), pp. 1~7(2007).
2. Health Effects Support Document for Aldrin/dieldrin, United States Environmental Protection Agency (US EPA) pp. 42~59(2003).
3. Julie Louise Gerberding, M. D., Toxicological Profile for Aldrin/Dieldrin, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, pp. 1~10(2002).
4. Hong, S. H., Shim, W. J., Li, D. h., Yim, U. H., Oh, J. R. and Kim, E. S., "Contamination Status and Characteristics of Persistent Organochlorine Pesticides in the Saemangeum Environment," *Ocean and Polar Res.*, **28**(3), 317~329(2006).
5. National Institute of Environmental Research (NIER) Home page, <http://kischem.nier.go.kr/kischem2/wsp/main>.
6. Hooker, E. P., Fulcher, K. G. and Gibb, H. J., "Aldrin and Dieldrin: A Reevaluation of the Cancer and Noncancer Dose-

- Response Assessments,” *Risk Anal.*, **34**(5), 865~878(2014).
7. National Institute of Environmental Research (NIER) Home page, <http://ncis.nier.go.kr/main.do>, (2011).
 8. Johnson, W. W. and Finley, M. T., Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates, United States department of the interior fish and wildlife service, Washington D.C., pp. 9~10(1980).
 9. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “TG No. 201. Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test,” pp. 1~25(2011).
 10. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “TG No. 202. *Daphnia* sp. acute immobilisation test,” pp. 1~12(2004).
 11. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), “TG No. 236. Fish embryo acute toxicity (FET) test,” pp. 1~22(2013).
 12. Leeuwen, C. J. and Vermeire, T. G., Risk Assessment of Chemicals: An introduction, 2nd ed., Springer pp. 337~338 (2007).
 13. Yim, E. C., Shun, J. J., Park, I. T., Han, H. K., Kim, S. W., Cho, H. and Kim, S. J., “Acute Toxicity Assessment of New Algicides, Thiazolidinedione Derivative (TD49) to Marine Ecosystem,” *KSBB J.*, **25**(6), 527~532(2010).
 14. National Institute of Environmental Research (NIER), “Regulation on the Specific Methods of Chemical Risk Assessment,” The Act on the Registration and Evaluation of Chemicals (Korea REACH), pp. 1~21(2014).
 15. Andersen, R. A., Algal Culturing Techniques, Elsevier Academic Press pp. 433~434(2005).
 16. Ministry of Environment, “Chlorophyll-a,” Water pollution process test standard, pp. 227~231(2017).
 17. Hong, S. H., Song, H. G., Jeong, K. J., Ko, K. I. and Yeo, M. K., “Effects of silver nanoparticles exposed in somite stage on zebrafish development,” *J. Environ. Toxicol.*, **24**(1), 17~23(1986).
 18. Macova, S., Dolezelova, P., Pistekova, V., Svobodova, Z., Bedanova, I. and Voslarova, E., “Comparison of acute toxicity of 2-phenoxyethanol and clove oil to juvenile and embryonic stages of *Danio rerio*,” *Neuroendocrinol. Lett.*, **29**(5), 680 (2008).
 19. Initial risk assessment using chemical emissions information, Ministry of Environment, pp. 13(2010).