

제3장 생태영향 시험분야

제1항 담수조류 성장저해시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 수서생물에 대한 영향을 평가하기 위한 방법으로 수서생물 중 담수성 미세조류 및 남조류의 성장에 대한 화학물질의 영향을 평가하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 영향농도(EC_x , Effective concentration)

시험 조류의 성장 또는 생장률이 대조군에 비하여 X % 만큼 감소될 때 시험물질 농도이며, 일반적으로 노출시간 제시(예 : 72 h- EC_{50}). 생장률(Growth rate) 또는 수율(Yield)로부터 나온 EC값을 명확히 나타내기 위해, " E_rC "는 생장률에 대해서 사용하며, " E_yC "는 수율에 대해서 사용

2.2 표준물질(Reference substance)

독성시험이 정상적인 조건에서 수행되었는가를 확인하기 위하여 사용하는 물질이며, 표준물질로 병행시험을 한 경우에는 그 결과 보고

2.3 생물량(Biomass)

일반적으로 주어진 부피 내에서 살아있는 생물체의 건조 중량(예, mg 조류/L 시험용액). 본 시험에서는 일정 부피 당 조류의 세포수 또는 형광 방출량(Fluorescence)으로 표시할 수 있음

2.4 생장률

시험기간 중 생물량의 대수학적(Logarithmic) 증가. 즉, 단위시간 당 세포농도의 증가를 말함. 특히, 단위시간 당 자연 대수학적 생물량의 변화율을 비생장률(Specific growth rate)이라 함

2.5 수율

시험이 끝났을 때 조류의 생물량에서 시험을 시작할 때 조류의 생물량을 뺀 값

2.6 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

평균 비생장률 및 수율에 대해, 대조군의 값과 처리군의 값을 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는 처리군 농도 중 가장 낮은 농도

2.7 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

평균 비생장률 및 수율에 대해, 대조군의 값과 처리군의 값을 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없는 처리군 농도 중 가장 높은 농도

2.8 단위

농도는 중량/용량(mg/L)으로 표기

2.9 변동계수(Coefficient of variation)

여러 값의 표준편차를 그 평균으로 나눈 값으로 단위는 없으나 백분율로 표기하기도 함

II. 시험

1. 원리

지수생장기에 있는 조류를 여러 농도의 시험물질에 노출시킨 후 일정조건에서 배양을 하면서 조류의 성장 또는 성장률에 미치는 시험물질의 영향을 보는 것으로 노출시간은 일반적으로 72 시간이다. 성장률 및 성장률 저해는 시간에 따른

생물량(조류) 측정값의 변화로서 나타낸다. 시험 결과는 여러 농도의 시험용액에 대해서 기록된 평균 비생장률로부터 x %의 생장률 저해를 나타내는 농도를 결정하고 $E_r C_x$ 로 표시한다. 추가적으로 수율저해($E_y C_x$)와 최소영향관찰농도, 무영향관찰농도를 결과에 포함시킬 수 있다. 시험물질의 적절한 농도범위를 알기 위해 농도설정시험을 실시하고 그 결과에 기초하여 본시험을 실시한다. 이 시험방법은 물에 잘 녹는 화학물질을 기준으로 하였기 때문에 시험하기 어려운 물질(용해도가 낮은 물질 등)은 별도의 적절한 절차를 적용할 필요가 있다(주 1). 원칙적으로 시험조건에서 시험물질의 수용해도 자료 및 적절한 정량분석 방법을 확보해야 한다. 또한 물질의 구조식, 순도, 물과 빛에서의 안정성, 해리상수(pK_a), 옥탄올/물 분배계수(P_{ow}), 증기압 및 생분해성시험 결과 등은 본 시험에 있어서 매우 중요한 정보이다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 시험용기 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기를 사용하는데, 일반적으로 유리로 된 것을 사용하며, 잘 세척된 충분히 큰 것을 사용한다.

2.1.2 배양장치 : $21\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도범위에서 온도편차가 $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지되고 일정 광도를 유지할 수 있는 조명장치를 보유하며, 아울러 시험용 용기를 기계적으로 진탕 또는 교반을 할 수 있어야 한다.

2.1.3 pH 측정기

2.1.4 생물량 측정 장치 : 전자입자계수장치(Coulter counter), 흐름세포분석기(Flow cytometer), 혈구계수기(Hemocytometer)가 있는 현미경, 형광광도계, 분광광도계, 비색계 등

2.1.5 조도 측정장치

2.1.6 고압증기멸균기

2.1.7 기타 일반적인 실험실 장치 및 기구

2.2 배지

2.2.1 조류의 배양은 경제협력개발기구(OECD) 시험지침에서 추천하는 배지 또는 미국환경청(EPA)에서 제시하는 배지 중 필요에 따라 선택해서 사용할 것을 권장한다(주 2, 주 3). 두 가지 배지의 초기 pH 값과 완충능력이 다르다는 점에 유의해야 한다. 이온성 물질을 시험할 때, 시험 결과가 다를 수 있으며 만일 배지 조성을 변경해서 사용할 경우에는 변경에 관한 상세한 내용과 명확한 타당성을 보고서에 포함시켜야 한다.

2.2.2 독성시험에서 시험물질 표준원액을 희석하는데 사용하는 희석수는 배지와 동일한 것을 사용한다.

2.3 시험종

시험에 적절한 조류는 아래와 같으며 한 종을 선택하여 시험하고 다른 종을 사용하는 경우에는 사용 균주와 출처를 보고해야 한다(주 4).

- (1) *Pseudokirchneriella subcapitata*(다른 이름으로 *Selenastrum capricornutum*)
ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG 등
- (2) *Desmodesmus subspicatus*(다른 이름으로 *Scenedesmus subspicatus*)
86.81 SAG 등
- (3) *Navicula pelliculosa* UTEX 664 등
- (4) *Anabaena flos-aquae* UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A 등
- (5) *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625, CCAP 1405/1 등

2.3.1 조류의 계대(繼代)배양

시험에 사용하는 조류는 활성유지를 위하여 적어도 2 개월에 1 회는 보존용 고체배지에 이식하여 단세포를 만들고, 이 단세포를 이용하여 액체배양을 시작하며 액체배양은 매주 계대배양 한다.

2.3.2 전(前)배양

시험에 사용할 조류를 얻기 위해 시험 시작 전에 배양하는 것을 말한다.

전배양은 시험조건과 동일한 조건에서 배양하며, 지수생장기에 이른 조류를 시험에 사용한다. 대개 시험시작 2 일 ~ 4 일 전에 전배양을 시작하는데 조류의 성장속도에 따라 전배양 기간은 적절하게 조정한다. 시험용 조류를 관찰하여 비정상적인 모양이 관찰될 때는 시험에 사용해서는 안된다.

2.3.3 초기 생물량 농도

시험을 위한 배양에서 조류의 초기 생물량은 시험군 간에 동일하게 접종되도록 주의하며, 생물량이 건조중량으로 0.5 mg/L를 넘지 않도록 한다. 배지 당 초기 접종량은 조류의 종류마다 다른데 시험기간 동안 조류가 지수적으로 증식할 수 있도록 생물량을 조절하여 접종한다. 시험 조류의 초기 접종량은 다음의 사항을 참조한다.

- | | |
|--|---|
| (1) <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 5×10^3 cells/mL ~ 10^4 cells/mL |
| (2) <i>Desmodesmus subspicatus</i> | 2×10^3 cells/mL ~ 5×10^3 cells/mL |
| (3) <i>Navicula pelliculosa</i> | 10^4 cells/mL |
| (4) <i>Anabaena flos-aquae</i> | 10^4 cells/mL |
| (5) <i>Synechococcus leopoliensis</i> | 5×10^4 cells/mL ~ 10^5 cells/mL |

3. 시험방법

3.1 한계시험

농도설정시험 등의 예비시험에서 시험물질의 농도가 최대 100 mg/L 또는 배지에 대한 시험물질 최대용해도에 이르기까지 어떠한 독성 영향도 나타나지 않는다면, 이 농도(100 mg/L 또는 이보다 낮은 최대용해도)에서 한계시험을 실시하며 대조군을 둔다. 처리하는 반복구 수가 최소 6 개이어야 한다는 점을 제외하고 모든 시험 조건과 타당성 기준(3.3.1항)을 한계시험에도 적용한다.

3.2 본시험

3.2.1 본시험 농도는 농도설정시험을 통해 결정할 수 있다. 농도설정시험은 100 mg/L 이내의 시험물질 농도에서 진행한다.

3.2.2 본시험은 적어도 5 개 농도 이상으로 하며 대수등간격으로 설정한다.

이때 공비는 3.2를 초과하지 않도록 하되, 그 이상 적용시에는 근거를 제시해야 한다.

3.2.3 노출농도설정 시에는 대조군과 비교하여 5 % ~ 75 % 범위의 생장저해가 관찰되도록 최저농도와 최고농도를 결정하는 것이 바람직하다.

3.2.4 각 농도의 시험용액은 시험물질 표준원액을 배지로 희석하여 조제한다.

3.2.5 시험물질 표준원액은 시험물질을 배지에 녹여 조제하고 유기용매 등의 보조제는 원칙적으로 사용해서는 안 된다. 수용해도가 낮은 물질의 경우 적절한 물리적 방법을 이용하여 시험물질 표준원액을 조제할 수 있다. 보조제 사용이 불가피한 경우, 독성이 낮은 것을 선택하고 필요한 최소한의 양을 사용하며 보조제 사용의 타당성을 제시하여야 한다. 보조제 농도는 시험용액에서 100 mg/L를 초과하지 않도록 하며 모든 농도군에서 동일 농도의 보조제가 첨가되어야 한다(주 1).

3.2.6 시험물질 표준원액을 조제할 때 보조제를 사용하는 경우는 이들 물질이 포함된 대조군을 추가로 두어야 한다.

3.2.7 배양온도는 21 °C ~ 24 °C의 온도범위에서 진탕 또는 교반하며 온도편차는 설정온도의 ± 2 °C를 유지한다.

3.2.8 백색의 연속조명에서 배양하며 조도조건은 일반적으로 $60 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s} \sim 120 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 범위로 한다(이와 같은 광량은 조도계로 측정하면 약 4,440 럭스 ~ 8,880 럭스 가량이 된다). 일부 종(예, *Anabaena flos-aquae*)의 경우 조도 조건은 $40 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s} \sim 60 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 범위로 한다. 플라스크를 배양장치의 임의 위치에 두고 매일 위치를 바꿀 것을 권장한다. 그리고, 배양 영역 전체에 걸쳐 평균조도로부터 ± 15 % 이내로 조도를 유지한다.

3.2.9 시험기간은 72 시간으로 하며, 생장이 느린 조류의 경우 필요하면 시험기간을 늘릴 수 있다. 최소한 24 시간, 48 시간, 72 시간 후에 세포수를 계수한다.

3.2.10 처리군 및 대조군에 대해 각각 3 개 이상의 반복구를 두도록 한다.

대조군에 대해 이상적인 반복구는 처리군에 사용하는 반복구 수의 두 배라야 한다.

3.2.11 각 플라스크의 생물량은 24 시간 마다 측정하며, 생물량은 일반적으로 세포

수로 측정한다. 전자입자계수장치와 비색계를 사용하여 세포수를 측정하는 경우, 바탕시료는 배지를 여과한 용액을 사용한다.

3.2.12 pH는 시험 시작 전과 시험 종료 후에 측정하며, 원칙적으로 시험기간 동안 대조군의 pH가 1.5 이상 변화해서는 안 된다.

3.2.13 형태학적 변화 등 처리군에서 나타나는 조류의 상태를 관찰한다.

3.3 유의사항

3.3.1. 시험의 타당성 기준

시험이 적합하게 수행된 것을 입증하기 위해 다음의 타당성 기준을 만족해야 한다.

- 대조군의 생물량이 시험기간 내에 최소 16 배 이상 증가해야 한다. 시험기간은 일반적으로 72 시간이며, 조류의 종류에 따라 위 조건을 만족하기 위해 시험기간을 증감(최소 48 시간 이상)할 수 있다.
- 대조군 각 반복구 구간별(0 일 ~ 1 일, 1 일 ~ 2 일, 2 일 ~ 3 일) 비생장률의 변동계수 평균이 35 %를 초과하지 않아야 한다.
- 시험기간 동안 대조군 반복구의 평균 비생장률의 변동계수가 *Pseudokirchneriella subcapitata* 또는 *Desmodesmus subspicatus*의 경우 7 %, 그 외 시험종은 10 %를 초과하지 않아야 한다.

3.3.2 육안으로 관찰하여 조류 이외의 미생물 증식이 확인되지 않아야 한다.

3.3.3 시험기간 중 시험용액 내 시험물질 초기 농도와 시험기간 동안 농도 유지를 확인하기 위해 적절한 분석방법을 이용하여 아래와 같이 농도를 측정한다.

- 시험기간 동안 시험물질 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 것으로 예상되는 경우, 최소한 최고 시험농도와 최저 시험농도 그리고 예상되는 EC₅₀에 가까운 농도에 대해서 노출 시작과 종료 시점에 시험물질의 농도를 측정한다.
- 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 가능성이 없는 경우, 노출 시작과 종료 시점에 모든 시험 농도를 측정한다.
- 휘발성 물질, 불안정한 물질, 흡착성이 강한 물질 등에 대해서 시험물질 농도 변화를 파악하기 위해서 노출 기간 동안 24 시간 간격으로 분석을 실시한다.

- 농도분석에 다량의 시료가 필요한 경우, 반복구를 추가하고 시험과 같은 양의 조류를 접종하여 본시험과 동일한 시험조건으로 배양한 것을 이용한다.

3.3.4 시험기간 동안 시험물질 농도가 설정농도나 측정된 초기농도의 $\pm 20\%$ 이내 일 경우, 시험결과는 시험물질 설정농도 또는 초기 측정농도를 근거로 산출할 수 있다. 그러나 농도 편차가 $\pm 20\%$ 범위를 벗어나는 경우 시험기간 동안 측정된 농도의 평균값(기하평균)을 바탕으로 결과를 산출하거나 농도감소를 평가할 수 있는 적절한 모델을 이용하여 산출한다. 시험과정 중 시험물질이 조류에 흡착되어 시험물질 농도측정이 어렵거나 적절한 평가모델을 사용하지 못하는 경우 초기 설정농도 또는 초기 측정농도를 바탕으로 결과를 산출할 수 있다.

3.3.5 표준물질을 이용한 시험은 최소한 1 년에 2 회 이상 수행한다.

시험 표준물질로는 3,5-다이클로로페놀($C_6H_4Cl_2O$, 3,5-dichlorophenol) 또는 중크롬산 칼륨($K_2Cr_2O_7$, Potassium dichromate)을 주로 사용한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 각 처리군과 대조군의 생물량(세포 농도 등)을 측정시간과 시험물질 농도별로 표로 정리한다.

1.2 농도별 처리군과 대조군의 평균 세포농도(Y축)를 측정시간(X축) 별로 그림표에 표시하여 생장곡선을 그린다.

1.3 반수영향농도(EC_{50})는 아래의 계산식을 사용하여 적당한 통계적 방법을 사용하여 구한다(주 5). 시험결과는 평균생장률과 수율에 대해 산출한다.

1.3.1 평균 생장률

시험기간 동안 일정기간의 평균 비생장률은 다음 식에 의하여 구할 수 있다.

$$u_{ij} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \quad (\text{day}^{-1})$$

u_{i-j} : 평균 비생장률(i에서 j까지의 시간)

x_i : i 시간에서의 생물량

x_j : j 시간에서의 생물량

평균 비생장률에 대한 저해율(% I_r)은 다음 식에 의하여 구할 수 있다.

$$\%I_r = \frac{u_c - u_T}{u_c} \times 100$$

% I_r : 평균 비생장률에 대한 저해율

u_c : 대조군에서의 평균 비생장률(u)의 평균값

u_T : 각 처리군에서의 평균 비생장률

각 농도별 처리군의 성장률을 구한 후, 대조군 성장률과 비교하여 각 농도별 상대적 성장저해율로 영양농도(EC_x)를 계산한다.

용매대조군이 사용되는 경우, % I_r 을 구할 때 용매대조군에 대한 u_c 를 이용한다.

1.3.2 수율에 대한 저해율(% I_y)은 다음의 식에 의하여 구할 수 있다. 수율은 시험이 끝났을 때 생물량에서 시험을 시작할 때 생물량을 뺀 값을 나타낸다.

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100$$

% I_y : 수율에 대한 저해율

Y_c : 대조군의 평균 수율

Y_T : 각 처리군의 수율

1.4 무영향관찰농도 및 최소영향관찰농도

통계적 계산이 가능한 경우, 적절한 통계방법을 사용하여 구할 수 있다. 분산분석(ANOVA), 던넛(Dunnett) 또는 윌리엄스(Williams)의 검정, 르빈(Levene)이나 바틀릿(Bartlett) 검정 등을 활용할 수 있다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명 등)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 물리화학적 특성(안정성, 용해도 정보 등)

2.4 시험종 : (1) 학명 및 균주번호

(2) 입수처

(3) 배양조건

2.5 시험조건 : (1) 시험시작일 및 종료일, 시험기간

(2) 시험절차 및 관련 세부사항(시험용기 및 용량, 시험종 배양, 초기 생물량, 온도, 광원의 종류 및 광도, 사용기기 등)

(3) 배지조성

(4) 배양장치

(5) 시험물질 노출농도(설정농도, 측정농도)와 반복구, 시험물질 농도 분석에 대한 사항

(6) 시험용액 조제방법

(7) 생물량 측정 방법

2.6 시험결과 : (1) 최소 24 시간마다 측정한 각 시험농도별 생물량 및 측정방법

(2) 각 처리군에 대해 계산된 평균생장률 및 수율, 반복구에 대한 평균값과 변동계수

(3) 생장곡선

(4) 영향농도(EC_x)와 계산방법 (EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} 등)

(5) 최소영향관찰농도(가능한 경우)

(6) 무영향관찰농도(가능한 경우)

(7) 조류의 형태학적 변화

(8) 데이터의 통계처리 분석방법

(9) 시험 시작과 시험 종료시점의 pH값

(10) 보조제 사용의 타당성(해당 보조제의 사용, 선정 및 농도 설정의 이유 등)

2.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) 참고문헌

- 1) International Organization for Standardization (1998). ISO/DIS 14442. Water quality - Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.
- 2) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment. No. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

주 2) 조류 배양용 배지[OECD 배지]

배지원액 No.	시 약	농도
1	NH ₄ Cl MgCl ₂ ·6H ₂ O CaCl ₂ ·2H ₂ O MgSO ₄ ·7H ₂ O KH ₂ PO ₄	1.5 g/L 1.2 g/L 1.8 g/L 1.5 g/L 0.16 g/L
2	FeCl ₃ ·6H ₂ O Na ₂ EDTA·2H ₂ O	64 mg/L 100 mg/L
3	H ₃ BO ₃ MnCl ₂ ·4H ₂ O ZnCl ₂ CoCl ₂ ·6H ₂ O CuCl ₂ ·2H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	185 mg/L 415 mg/L 3 mg/L 1.5 mg/L 0.01 mg/L 7 mg/L
4	NaHCO ₃ (Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O)	50 g/L

- 1) 각각의 배지원액은 멸균증류수 또는 탈이온수에 녹인다.
- 2) 배지원액 2와 4는 여과막(평균 공극크기 : 0.2 μm)를 사용하여 여과하고, 배지원액 1과 3은 여과막으로 여과하거나 121 °C에서 15 분간 고압증기멸균한다. 각 배지원액의 보관은 저온(4 °C)의 암 조건에서 보관한다.
- 3) 멸균증류수 500 mL에 각각의 배지원액을 다음의 양으로 첨가한다.
- 원액 1 : 10 mL, 원액 2 : 1 mL, 원액 3 : 1 mL, 원액 4 : 1 mL
상기 용액에 멸균증류수를 첨가하여 최종 1000 mL를 맞추어 배지를 조제한다.
- 4) 조제된 배지의 pH는 일반적으로 8.1을 나타낸다.
- 5) 시험용 조류로 *Navicular pelliculosa*를 사용할 경우, 배지원액 4에 Na₂SiO₃·9H₂O를 첨가한다(최종배지에서의 농도가 1.4 mg Si/L 가 되도록 함).
- 6) 보존 배양용 고체배지는 상기 배지에 0.8 % 한천을 첨가한다.

주 3) 조류 배양용 배지 [EPA AAP(Algal Assay Procedure) 배지]

배지원액 No.	시 약	농도	
1	NaNO ₃	12.750 g/500 mL	
2	MgCl ₃ ·6H ₂ O	6.082 g/500 mL	
3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.205 g/500 mL	
4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.350 g/500 mL	
5	K ₂ HPO ₄	0.522 g/500 mL	
6	NaHCO ₃	7.500 g/500 mL	
7	1) H ₃ BO ₃ 2) MnCl ₂ ·4H ₂ O 3) ZnCl ₂ 4) FeCl ₃ ·6H ₂ O 5) CoCl ₂ ·6H ₂ O 6) Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 7) CuCl ₂ ·2H ₂ O 8) Na ₂ EDTA·2H ₂ O 9) Na ₂ SeO ₄ ·5H ₂ O	97.760 mg 207.690 mg 1.635 mg 79.880 mg 0.714 mg 3.630 mg 0.006 mg 150.000 mg 0.005 mg	1) ~ 9)의 시약을 멸균증류수에 제시된 양으로 녹여 500 mL로 맞춘다. *시약 9)의 경우는 규조류(diatom)를 배양하는 경우에만 추가로 넣는다.

1) 1 ~ 7의 배지원액 각각 1 mL씩을 900 mL의 멸균증류수 또는 탈이온수에 첨가하고 최종적으로 1 L로 맞춘다.

* 규조류를 배양할 경우에는 Na₂SiO₃ · 9H₂O 202.4 mg을 최종 조제된 1 L 배지에 첨가한다(최종배지에서의 농도가 20 mg Si/L가 되도록 함).

2) 0.1 N 또는 1.0 N의 NaOH 또는 HCl을 사용하여 pH 7.5 ± 0.1로 맞춘다.

3) 여과막(membrane filter, 0.22 µm 또는 0.45 µm)을 사용하여 멸균한다.

4) 배지의 보관은 저온(4 °C)의 암 조건에서 보관한다.

주 4) OECD(2011), Test Guideline 201. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. ANNEX 2. STRAINS SHOWN TO BE SUITABLE FOR THE TEST

주 5) OECD(2011), Test Guideline 201. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. ANNEX 5. DATA ANALYSIS BY NONLINEAR REGRESSION

제2항 물벼룩 급성독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 수서 무척추 동물군에 대한 영향을 평가하는 방법으로 수서 무척추 동물 중 물벼룩류를 선정하여 유영능력에 대한 영향을 평가하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 반수영향농도(EC₅₀, Median effective concentration)

일정 시험기간 동안 시험생물의 50 %가 유영저해를 일으키는 농도. 만일 다른 기준을 적용할 경우에는 근거와 함께 보고

2.2 지수식 시험(Static test)

시험기간 중 시험용액을 교환하지 않는 시험

2.3 반지수식 시험(Semi-static test)

시험기간 중 시험용액을 일정기간마다 전량을 교환하는 시험

2.4 유수식 시험(Flow-through test)

시험기간 중 시험용액을 연속적으로 교환하는 시험

2.5 유영저해(Immobilisation)

시험용기를 용기 내 용액이 교반되도록 가볍게 흔든 후 15 초 이내에 물벼룩 촉각(Antennae)의 움직임에 상관없이 물벼룩이 유영하지 못하는 것을 말함. 만일 다른 기준을 적용할 경우는 보고서에 명시하여야 함

2.6 단위

농도는 중량/용량(mg/L)으로 표시

II. 시험

1. 원리

물벼룩에 시험물질을 처리한 후 48 시간 동안 관찰하여 물벼룩의 50 %가 유영저해를 받는 농도(48 시간 EC₅₀)를 산출한다. 이때 시험물질의 적절한 농도범위를 알기 위해 농도설정시험을 실시하고 그 결과에 기초하여 본시험을 실시한다. 또한 물질의 구조식, 순도, 물과 빛에서의 안정성, 해리상수(pKa), 옥탄올/물 분배계수(P_{ow}), 증기압 및 생분해성시험 결과 등은 본 시험에 있어서 매우 중요한 정보이다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 시험용기 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기를 사용하는데 일반적으로 유리로 된 것을 사용한다.

2.1.2 항온장치 : 18 °C ~ 22 °C의 온도범위를 유지할 수 있는 장치

2.1.3 pH 측정기

2.1.4 용존산소 측정기

2.1.5 경도를 측정할 수 있는 장치 및 기구

2.1.6 온도 측정기

2.1.7 자동점멸장치

2.1.8 총유기탄소(TOC) 또는 화학적산소요구량(COD)을 측정할 수 있는 장치 및 기구

2.1.9 조도측정장치

2.1.10 기타 일반 실험실 장치 및 기구

2.2 회석수 및 배지

2.2.1 물벼룩 배지는 일반적으로 경제협력개발기구(OECD) 시험지침에서 사용 권장되고 있는 배지(M4 또는 M7 배지)(주 1)을 사용하거나, 국제표준화기구(ISO) 배지(주 2)를 사용한다. 또한 탈염소 처리된 수돗물, 천연수 또는 조제수를 사용할 수 있으나 반드시 검증된 것을 사용한다(주 3).

2.2.2 금속을 포함하는 시험물질의 경우, 킬레이팅 물질을 포함하는 배지(예, M4 또는 M7 배지)는 사용하지 않는 것이 좋다.

2.2.3 배지 또는 회석수의 pH는 6 ~ 9, 경도는 140 mg/L ~ 250 mg/L (CaCO₃로서), 용존산소는 3.0 mg/L 이상 유지하도록 하며 사용하기 전에 24 시간 정도 공기를 공급한다.

2.2.4 독성시험에 사용하는 회석수는 배지와 동일한 것을 사용한다.

2.3 시험종 및 먹이

2.3.1 *Daphnia magna*를 사용하나 다른 종(예, *Daphnia pulex*)을 사용하는 경우는 근거를 제시하여야 한다.

2.3.2 출처가 명확하고 건강한 개체를 사용한다.

2.3.3 독성시험에는 생후 24 시간미만의 어린개체를 사용한다.

2.3.4 먹이는 *Chlorella*, *Pseudokirchneriella* (= *Selenastrum*) 등과 같은 녹조류를 배양하여 공급한다. M4 또는 M7 이외의 물벼룩 배지를 사용하는 경우(예, ISO 배지), 조류 외에 효모 등의 보조 먹이를 공급할 수 있다.

3. 시험방법

3.1 한계시험

3.1.1 시험물질의 농도를 100 mg/L 또는 배지에 대한 시험물질의 최대용해도 중 낮은 농도에서 한계시험을 실시한다. 한계시험에는 20 개체의 물벼룩을 사용하는데(가능한 한 5 마리씩 4 반복구 사용) 동일한 개체수의 대조군을 동시에 둔다.

3.1.2 한계시험에서 유영저해율이 10 % 이하일 경우, EC_{50} 은 한계시험 농도 이상으로 하며 10 %를 초과하는 경우 본 시험을 진행한다.

3.1.3 시험기간, 보조제 사용 등 기타 조건은 농도설정시험 또는 본시험과 동일하게 한다.

3.1.4 이상 증상이 관찰될 경우 기록한다.

3.2 농도설정시험

3.2.1 본 시험에 들어가기 전 농도설정시험을 실시하여 본 시험 농도 범위를 결정한다. 농도설정시험의 농도 범위는 시험자가 적절하게 선정한다.

3.2.2 농도설정시험에서는 각 농도 당 5 개체의 물벼룩을 사용하며 반복구는 두지 않아도 된다. 시험시간은 48 시간 또는 그 이내로 한다.

3.2.3 시험물질 표준원액은 시험물질을 희석수에 녹여 조제하고 유기용매, 계면활성제, 분산제 등의 보조제는 원칙적으로 사용해서는 안 된다. 수용해도가 낮은 물질의 경우 적절한 물리적 방법을 이용하여 시험물질 표준원액을 조제할 수 있다. 보조제 사용이 불가피한 경우, 독성이 낮은 것을 선택하고 필요한 최소한의 양을 사용하며 보조제 사용의 타당성을 제시하여야 한다. 보조제 농도는 시험용액에서 100 mg/L를 초과하지 않도록 하며 모든 농도군에서 동일 농도의 보조제가 첨가되어야 한다(주 4).

3.2.4 각 농도의 시험용액은 시험물질 표준원액을 희석수로 희석하여 조제한다. 시험용액 내 시험물질 농도는 희석수에서 최대용해도를 넘지 않도록 한다.

3.2.5 시험물질이 휘발성인 경우에는 밀폐된 용기에서 시험해야 하는데 이 경우 용존산소가 3.0 mg/L 미만이 되지 않도록 주의한다.

3.2.6 pH는 조정하지 않는다. 단, 시험용액의 pH가 6 ~ 9를 벗어나는 경우, 시험물질 표준원액의 pH를 시험물질을 첨가하기 전 희석수 pH에 맞게 조정 후 시험을 다시 수행한다. pH 조정은 시험물질의 농도가 변하지 않는 조건에서 물벼룩을 노출시키기 전에 염산(HCl, hydrochloric acid)과 수산화나트륨(NaOH,

sodium hydroxide)을 이용하여 조정할 수 있다.

3.3 본시험

3.3.1 농도설정시험 결과에 기초하여 농도 범위를 설정하며 적어도 5 개 이상 농도(대조군 제외)의 처리군을 대수 등간격으로 정하는데, 가능한 한 공비가 2.2를 초과하지 않도록 한다. 가능한 한 최고농도에서의 유영저해율은 100 %, 최저농도에서는 유영저해가 관찰되지 않도록 한다.

3.3.2 시험물질 표준원액을 조제할 때 보조제를 사용하는 경우는 이들 물질이 포함된 대조군을 추가로 두어야 한다. 보조제 사용과 pH 조정은 농도설정시험에서와 동일한 방법으로 한다.

3.3.3 한 농도 당 20 개체 이상의 물벼룩을 사용하며 이때 가능한 한 4 개 이상의 반복구를 둔다(예, 20 개체의 경우 5 마리씩 4 개의 반복구를 사용). 시험용액의 양은 1 개체 당 2 mL 이상으로 한다(예, 한 용기에 5 개체의 경우 시험용액을 10 mL 이상으로 함).

3.3.4 시험 시작과 종료 시점에 대조군과 처리군에서의 수온, pH, 용존산소를 측정한다. 처리군의 경우, 최소한 최저농도군과 최고농도군에서는 상기 항목을 측정하도록 한다. 시험기간 동안 pH 변화폭은 1.5를 넘지 않도록 한다.

3.3.5 시험기간은 48 시간이며 24 시간 마다 물벼룩의 유영저해, 기타의 상태를 관찰하여 기록한다. 유영저해의 기준은 앞의 정의에서 명시된 방법에 따른다.

3.3.6 48 시간 후의 반수영향농도(EC₅₀)을 산출한다.

3.3.7 시험기간 동안 조명은 명암조건(명 : 암 = 16 시간 : 8 시간)을 유지하도록 한다. 시험물질이 빛에 불안정한 경우 암조건에서도 시험을 수행할 수 있다.

3.3.8 18 °C ~ 22 °C 온도 범위 내에서 시험을 실시하며 온도의 변화는 최저온도와 최고온도 사이가 2 °C 이내를 유지하도록 한다(예, 18 °C ~ 20 °C, 19 °C ~ 21 °C, 20 °C ~ 22 °C).

3.3.9 시험기간 동안에는 먹이와 공기를 공급하지 않는다.

3.3.10 시험은 일반적으로 지수식 방법을 사용하나 시험물질의 안정도가 낮은 경우, 반지수식 또는 유수식시험 방법을 사용할 수 있다.

3.3.11 시험용기는 물의 증발 및 시험용액에 먼지 등이 들어가는 것을 막기 위해 덮도록 한다. 휘발성 시험물질의 경우 시험기간 동안 용존산소는 3.4.4의 조건에 맞도록 수행한다.

3.4 유의사항

3.4.1. 시험의 타당성 기준

시험이 적합하게 수행된 것을 입증하기 위해 다음의 타당성 기준을 만족해야 한다.

- 대조군(보조제 대조군 포함)에서 물벼룩의 유영저해율 및 기타 이상증상은 시험 종료 시까지 10 %를 초과하지 않아야 한다.
- 시험기간 동안 대조군 및 처리군에서 용존산소의 농도는 3 mg/L 이상이어야 한다.

3.4.2 시험기간 중 시험용액 내 시험물질 농도를 확인하기 위해 적절한 분석방법을 이용하여 아래와 같이 농도를 측정한다.

- 시험기간 동안 시험물질 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 것으로 예상되는 경우, 최소한 최고 시험농도와 최저 시험농도 그리고 예상되는 EC₅₀에 가까운 농도에 대해서 노출 시작과 종료 시점에 시험물질의 농도를 측정한다.

- 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 가능성이 없는 경우, 노출 시작과 종료 시점에 모든 시험 농도를 측정한다.

3.4.3 원칙적으로 시험결과는 측정농도로 산출한다. 시험기간 동안 시험물질 농도가 설정농도나 측정한 초기농도의 $\pm 20\%$ 이내일 경우, 시험결과는 시험물질 설정농도 또는 초기 측정농도를 근거로 산출할 수 있다. 그 외의 경우 결과 산출에 대한 타당한 근거를 제시해야 한다.

3.4.4 대조군에서 물벼룩이 표면에 뜨지 않도록 한다.

3.4.5 표준물질시험은 시험조건 및 EC₅₀ 결과에 대한 신뢰성을 확인하기

위해 되도록 매월 실행하고 최소한 1 년에 2 회 이상 수행한다. 표준물질로는 중 크롬산칼륨($K_2Cr_2O_7$)을 사용하며 24 시간 EC_{50} 이 0.6 mg/L ~ 2.1 mg/L 범위를 권장한다.

Ⅲ. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

본시험 종료 후 적당한 통계적 방법(예, 프로빗 분석 등)을 사용하여 24 시간 및 48 시간의 EC_{50} 값과 95 %에서의 신뢰 구간을 각각 구하며 보고서에는 통계적 방법이 명시되어야 한다. 얻어진 시험결과가 표준방법을 이용하여 EC_{50} 을 구하기 적절하지 않은 경우, 유영저해를 나타내지 않은 최고농도와 100 % 유영저해를 나타낸 농도의 기하평균을 구하여 EC_{50} 을 기록한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명 등)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 물리화학적 특성(안정성, 용해도 정보 등)

2.4 시험종 : (1) 학명

(2) 입수처

(3) 배양조건(먹이 출처, 먹이 종류, 먹이 공급량 및 빈도 포함)

2.5 시험조건 : (1) 시험시작일 및 종료일, 시험기간

(2) 시험절차 및 관련 세부사항(노출방법, 사용 개체수, 반복수, 시험 용액량, 시험용기의 형태 및 용량 등)

- (3) 회석수의 상세 정보 : 수원과 수질 특성(pH, 경도, Ca/Mg 비율, Na/K 비율, 알칼리도, 전도성 등); 배지를 사용했다면 그 성분
- (4) 시험기간 동안의 수질 측정값
- (5) 시험물질 노출농도(설정농도, 측정농도)와 반복구, 시험물질 농도 분석에 대한 사항
- (6) 시험용액 조제방법
- (7) 시험용액에서 시험물질의 상태
- (8) 배양 조건(온도, 조도 및 광주기, 용존산소, pH 등)

2.6 시험결과 : (1) 대조군 및 각 시험물질 처리군에서 유영저해 또는 이상증상을 나타낸 개체수 및 그 비율

- (2) 시험과정에서 관찰된 이상증상의 내용
- (3) 24 시간 마다 반수영향농도(EC₅₀)와 신뢰구간(예; 95 %), 통계적 과정과 통계 방법
- (4) 농도-반응 그래프
- (5) 시험농도(설정농도 및 측정농도)와 시험물질 농도 분석에 대한 세부내용
- (6) 표준물질의 시험 결과
- (7) 시험기간 동안 물리화학적 측정값(pH, 온도, 용존산소)
- (8) 보조제 사용의 타당성(해당 보조제의 사용, 선정 및 농도 설정의 이유 등)

2.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) 물벼룩 배지(M4 및 M7) 조성

1) 배지원액 I 조제

각 배지원액 I (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 용액*)	농축도(배) - M4 기준	배지원액 II을 조제하기 위한 각 배지원액 I의 첨가량(mL/L, 용액*)	
			M4 배지 경우	M7 배지 경우
H ₃ BO ₃	57,190	20,000	1.0	0.25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7,210	20,000	1.0	0.25
LiCl	6,120	20,000	1.0	0.25
RbCl	1,420	20,000	1.0	0.25
SrCl ₂ ·6H ₂ O	3,040	20,000	1.0	0.25
NaBr	320	20,000	1.0	0.25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,230	20,000	1.0	0.25
CuCl ₂ ·2H ₂ O	335	20,000	1.0	0.25
ZnCl ₂	260	20,000	1.0	1.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200	20,000	1.0	1.0
KI	65	20,000	1.0	1.0
Na ₂ SeO ₃	43.8	20,000	1.0	1.0
NH ₄ VO ₃	11.5	20,000	1.0	1.0
21 Fe-EDTA 용액		1,000	20.0	5.0
Na ₂ EDTA·2H ₂ O FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,000 1,991	2,000 2,000	Na ₂ EDTA와 FeSO ₄ 두가지 용액을 각각 준비하여 1:1로 혼합한 후 즉시 고압 증기 멸균하여 21 Fe-EDTA 용액을 조제한다.	

*용액은 탈이온, 증류, 역삼투를 이용하여 얻은 순수한 물을 사용한다.

2) M4 또는 M7 배지 조제

각 배지원액 (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 용액*)	농축도(배) - M4 기준	M4 또는 M7 배지**를 조제하기 위한 각 배지원액의 첨가량 (mL/L, 용액*)	
			M4 배지 경우	M7 배지 경우
1) 배지원액 II	-	20	50	50
2) CaCl ₂ · 2H ₂ O	293,800	1,000	1.0	1.0
3) MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,600	2,000	0.5	0.5
4) KCl	58,000	10,000	0.1	0.1
5) NaHCO ₃	64,800	1,000	1.0	1.0
6) Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	50,000	5,000	0.2	0.2
7) NaNO ₃	2,740	10,000	0.1	0.1
8) KH ₂ PO ₄	1,430	10,000	0.1	0.1
9) K ₂ HPO ₄	1,840	10,000	0.1	0.1
10) 혼합 비타민 원액***	-	10,000	0.1	0.1
Thiamine hydrochloride	750	10,000	혼합 비타민 원액은 증류수 1 L에 3가지 비타민을 용해시켜 조제한다.	
Cyanocobalamine (B ₁₂)	10	10,000		
Biotine	7.5	10,000		

* 용액은 탈이온, 증류, 역삼투를 이용하여 얻은 순수한 물을 사용한다.

** 각 배지원액을 일정 비율로 섞은 후 M4 또는 M7 배지를 조제한다.

*** 혼합 비타민 원액은 사용할 양만큼 작은 용기에 나눠 냉동상태로 보관하며, 사용하기 직전에 첨가하여 배지를 조제한다.

주의) 배지를 조제할 때 염(Salts)의 침전을 피하기 위해 약 500 mL ~ 800 mL 탈이온수에 각각의 배지원액을 첨가하고 1 L로 맞춘다.

주 2) 물벼룩 배지(ISO 배지)의 조성

물질명	배지원액 농도 (g/L, 용액*)	배지 조제를 위한 배지원액의 첨가량 (mL/L, 용액*)
1) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11.76	25
2) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.93	25
3) NaHCO_3	2.59	25
4) KCl	0.23	25

* 용액은 탈이온, 증류, 역삼투를 이용하여 얻은 순수한 물(전도도 $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ 이하)을 사용한다.

주 3) 회석수 허용 조건

항 목	농 도
미세입자 양(Particulate matter)	< 20 mg/L
총유기탄소(Total organic carbon)	< 2 mg/L
암모니아(Unionised ammonia)	< 1 $\mu\text{g}/\text{L}$
잔류염소(Residual chlorine)	< 10 $\mu\text{g}/\text{L}$
총유기인계살충제(Total organophosphorus pesticides)	< 50 ng/L
총유기염소계살충제 및 폴리클로리네이티드바이페닐 (Total organochlorine pesticides plus polychlorinated biphenyls)	< 50 ng/L
총유기염소(Total organic chlorine)	< 25 ng/L

주 4) OECD(2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment. No. 23.

제3항 어류 급성독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 수서생물에 대한 영향을 평가하는 방법으로 수서생물 중 어류에 대한 화학물질의 급성 영향을 평가하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 반수치사 농도(LC₅₀, Median lethal concentration)

시험 생물의 50 %를 치사시키는 수용액상의 시험물질 농도이며 이때 시험기간 명기(예, 96 h-LC₅₀)

2.2. 지수식 시험(Static test)

시험 기간 중 시험용액을 교환하지 않는 시험

2.3. 반지수식 시험(Semi-static test)

시험 기간 중 일정기간(예, 24 시간)마다 시험용액을 새로 교환하는 시험

2.4. 유수식 시험(Flow-through test)

시험 기간 중 시험용액을 연속적으로 흘려주면서 새로 교환하는 시험

2.5. 단위

농도는 중량/용량(mg/L)으로 표시

II. 시험

1. 원리

어류를 일정 조건에서 시험물질에 노출시킨 후 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96

시간 경과 시점의 치사율을 기록하여 어류의 50 %를 치사시키는 농도(LC₅₀)를 구하는 것이다. 96 시간 동안 먹이를 주지 않는다. 이때 시험물질의 적절한 농도범위를 알기 위하여 예비시험(농도설정시험)을 실시하고, 그 결과에 기초하여 본시험을 실시한다. 원칙적으로 시험조건에서 시험물질의 수용해도 자료 및 적절한 정량분석 방법을 확보하는 것이 필요하다. 또한 물질의 구조식, 순도, 물과 빛에서의 안정성, 해리상수(pKa), 옥탄올/물 분배계수(P_{OW}), 증기압 및 생분해성시험 결과 등은 본 시험에 있어서 매우 중요한 정보이다.

2. 시험의 준비

2.1. 장치 및 기구

2.1.1. 시험용 수조 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기(예 : 유리, 스테인리스 등)를 사용한다.

2.1.2. 온도제어 장치 : 온도 편차를 ± 1 °C로 유지 한다.

2.1.3. pH 측정기

2.1.4. 용존산소 측정기

2.1.5. 경도측정장치

2.1.6. 온도 측정기

2.1.7. 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

2.2. 희석수

2.2.1. 양질의 천연수나 조제수를 사용하는 것이 좋으나, 탈염소 처리한 수돗물도 사용할 수 있다. 수질의 경도는 10 mg/L ~ 250 mg/L (CaCO₃로서), pH는 6.0 ~ 8.5 사이가 적합하다.

2.2.2. 조제수는 다음과 같이 만든다.

(1) 염화칼슘(Calcium chloride) 용액

CaCl₂ · 2H₂O 11.76 g을 탈이온수에 녹이고 1 L로 맞춘다.

(2) 황산마그네슘(Magnesium sulphate) 용액

MgSO₄ · 7H₂O 4.93 g을 탈이온수에 녹이고 1 L로 맞춘다.

(3) 탄산수소나트륨(Sodium bicarbonate) 용액

NaHCO₃ 2.59 g을 탈이온수에 녹이고 1 L에 맞춘다.

(4) 염화칼륨(Potassium chloride) 용액

KCl 0.23 g을 탈이온수에 녹이고 1 L에 맞춘다.

모든 시약은 분석급시약을 사용하며 증류수 또는 탈이온수의 전도도는 10 μScm^{-1} 이하여야 한다. (1) ~ (4)까지의 용액을 25 mL씩 취하여 섞고 탈이온수로 1 L에 맞춘다. 조제 후 공기를 공급하여 산소를 포화되게 한 후 사용 전 공기공급 없이 약 이틀 동안 보관한다.

2.2.3. 독성시험에 사용하는 회석수는 동일한 것을 사용한다.

2.3. 시험종

독성시험에 사용하는 어류는 담수에 서식하는 어종 중에서 쉽게 구할 수 있으며 그 외에 경제적, 생태적 요인을 고려하여 결정한다. 시험종은 다음에 추천된 종 가운데 1 종 또는 그 이상을 선정하여 시험에 사용한다. 시험에 사용하는 개체는 건강상태가 양호하며 외견상 기형이 없는 것을 사용한다.

2.3.1. 추천어종

추천어종	시험어 전장 (cm)	시험온도 범위 (℃)
잉어(<i>Cyprinus carpio</i> , common carp)	3.0 ± 1.0	20 ~ 24
송사리(<i>Oryzias latipes</i> , ricefish)	2.0 ± 1.0	21 ~ 25
구피(<i>Poecilia reticulata</i> , guppy)	2.0 ± 1.0	21 ~ 25
제브라피시(<i>Danio rerio</i> , zebrafish)	2.0 ± 1.0	21 ~ 25
복미산 잉어(<i>Pimephales promelas</i> , Fathead Minnow)	2.0 ± 1.0	21 ~ 25
블루길(<i>Lepomis macrochirus</i> , Bluegill)	2.0 ± 1.0	21 ~ 25
무지개송어(<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Rainbow trout)	5.0 ± 1.0	13 ~ 17

2.3.2. 시험개체의 순화

시험에 사용하는 개체는 시험 전에 12 일 이상 실험실의 환경에서 순화시켜야 하

며, 적어도 시험시작 7 일 전에는 아래의 조건에서 독성시험에 사용할 희석수와 같은 수질의 물에서 순화시켜야 한다.

- (1) 조명 : 하루 12 시간 ~ 16 시간 조명
- (2) 온도 : 사용종의 적정 생육온도(2.3.1항 참고)
- (3) 용존산소 : 포화산소농도의 80 % 이상
- (4) 먹이 : 시험시작 24 시간 전까지 주 3 회 또는 1 일 1 회
- (5) 시험개체 : 시험개체는 48 시간의 안정화 기간 이후 치사어를 관찰하여 기록하고 다음의 기준에 따라 처리한다.
 - ① 7 일 안에 치사율이 10 %를 초과하면 사용군 전부를 폐기한다.
 - ② 치사율이 5 % ~ 10 %이면 다시 7 일간 더 사육한 후 판정한다.
 - ③ 치사율이 5 % 미만이면 시험에 사용한다.

단, 독성시험에 사용할 희석수와 같은 수질의 물에서 위의 조건[(1) ~ (4)]으로 지속적으로 계대사육하며 기록이 유지되는 경우에는 시험시작 직전 최근 7 일 동안 치사율이 5 % 미만인 사육군을 시험개체로 사용한다.

3. 시험방법

3.1. 한계시험

3.1.1. 한계시험은 시험물질 유효성분으로 100 mg/L의 농도 또는 희석수에 대한 시험물질의 최대용해도에서 실시하는데 이때 대조군을 두도록 한다. 한계시험은 시험물질의 LC_{50} 이 한계시험 농도보다 크다는 것을 증명하기 위한 시험이다.

3.1.2. 96 시간 동안 관찰한다.

3.1.3. 대조군과 처리군 각 10 마리를 원칙으로 처리하되 최소 7 마리 이상을 사용한다.

3.1.4. 한계시험 농도에서 96 시간 동안 치사어가 한 마리도 관찰되지 않을 경우 시험물질의 LC_{50} 은 한계시험 농도 이상으로 한다. 단, 한 마리라도 치사어가 관찰될 경우 본시험을 한다.

3.1.5. 다른 독성증상이 나타나면 이를 기록한다.

3.2. 본시험

3.2.1. 본시험에서는 적어도 5 개 이상의 농도(대조군 제외)를 대수등간격으로 정하는데 공비는 가능한 한 2.2를 초과하지 않도록 한다. 본시험에서 가능한 경우 0 % ~ 100 % 치사율을 나타내도록 예비시험(농도결정시험)을 통해 시험물질 농도를 결정하도록 한다. 이때 예비시험은 시험자가 시험물질 농도설정과 시험방법을 적절하게 판단하여 수행한다.

3.2.2. 각 농도의 시험용액은 시험물질 표준원액을 희석수로 희석하여 조제한다.

3.2.3. 시험물질 표준원액은 희석수에 녹여 조제하고 유기용매, 계면활성제, 분산제 등의 보조제는 원칙적으로 사용해서는 안 된다. 수용해도가 낮은 물질의 경우 적절한 물리적 방법을 이용하여 시험물질 표준원액을 조제할 수 있다. 보조제 사용이 불가피한 경우, 독성이 낮은 것을 선택하고 필요한 최소한의 양을 사용하며 보조제 사용의 타당성을 제시하여야 한다. 보조제 농도는 시험용액에서 100 mg/L를 초과하지 않도록 하며 모든 농도군에서 동일 농도의 보조제가 첨가되어야 한다(주 1).

3.2.4. 시험물질 표준원액을 조제할 때 보조제를 사용하는 경우는 이들 물질이 포함된 대조군을 추가로 두어야 한다.

3.2.5. 시험개체는 대조군과 각 시험 농도군당 7 마리 이상을 처리한다.

3.2.6. 96 시간 동안 매일 관찰하여 치사어와 독성증상을 기록하고 치사어는 기록 후 곧 제거한다. 치사의 판정은 시험개체를 건드려도 움직이지 않거나 아가미 호흡이 중단된 경우 사망으로 판정한다.

3.2.7. 시험시작 후 최초 3 시간과 6 시간째에 관찰하는 것이 바람직하다.

3.2.8. 평형상실, 유영이상, 비정상적 호흡, 색소침착 등 가시적 이상증상을 기록해 둔다.

3.2.9. 독성시험기간 동안 24 시간마다 대조군과 시험 농도군에서 수온, pH, 용존 산소를 측정한다.

3.3. 유의사항

3.3.1. 시험의 타당성 기준

시험이 적합하게 수행된 것을 입증하기 위해 다음의 타당성 기준을 만족해야 한다.

- 대조군에서 시험개체 사망률은 시험 종료 시점에 10 %를 넘지 않아야 한다.
- 시험기간 중 시험조건 및 시험농도를 일정하게 유지시키도록 하며, 필요시 반지수식 또는 유수식 시험을 수행한다.
- 용존산소농도는 포화농도의 60 % 이상이 되도록 한다.

3.3.2. 시험개체 무게와 시험수의 비율은 지수식과 반지수식의 경우, 시험수 1 L 당 시험개체 최대투입량이 1.0 g을 넘지 않도록 한다. 유수식의 경우는 그 이상도 가능하다.

3.3.3. 용존산소농도를 유지하기 위해 필요시 시험물질의 손실과 시험생물에 대한 영향을 최소화하는 조건으로 공기 공급을 통해 산소를 제공할 수 있다. 특히 시험물질이 휘발성인 경우 밀폐된 용기를 사용하며 공기 공급에 주의한다.

3.3.4. 시험은 pH를 조절하지 않고 수행하되 만일 시험물질 표준원액을 가한 후 희석수의 pH가 현저히 변화하는 경우 시험물질 표준원액의 pH를 시험물질을 가하기 전의 희석수 pH와 같도록 조절하여 다시 시험한다. 이때 시험물질 표준원액 농도의 변화는 최소화해야 하며 화학반응이나 시험물질의 침전 등이 일어나지 않도록 한다. pH의 조절은 염산(HCl, Hydrochloric acid)과 수산화나트륨(NaOH, Sodium hydroxide)을 사용하는 것이 바람직하다.

3.3.5. 광주기는 12 시간 ~ 16 시간(명) : 8 시간 ~ 12 시간(암)으로 한다.

3.3.6. 시험기간 동안 먹이는 공급하지 않는다.

3.3.7. 시험종의 적정온도 범위 내(2.3.1항)에서 ± 1 °C로 온도를 유지한다.

3.3.8. 시험도중 시험개체의 행동에 영향을 미칠 수 있는 방해요소를 피하도록 한다.

3.3.9. 시험 종료 후 대조군의 개체는 무게와 길이를 측정한다.

3.3.10. 시험기간 중 시험용액 내 시험물질 농도를 확인하기 위해 적절한 분석방

법을 이용하여 아래와 같이 농도를 측정한다.

- 지수식 시험에서 시험기간 동안 시험물질 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 것으로 예상되는 경우, 최소한 최고 시험농도와 최저 시험농도, 그리고 예상되는 LC₅₀에 가까운 농도에 대해서 노출 시작과 종료 시점에 시험물질의 농도를 측정한다.
- 반지수식 시험에서 시험용액의 주기적 교체(24 시간 또는 48 시간 간격)로 노출 농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 수 있는 경우, 최소한 최고 시험농도와 최저 시험농도, 그리고 예상되는 LC₅₀에 가까운 농도에 대해서 노출 시작과 종료, 최소한 첫 번째 교체주기 시작과 종료 시점에 시험물질의 농도를 측정한다.
- 유수식 시험에서 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 수 있는 경우, 최소한 최고 시험농도와 최저 시험농도, 그리고 예상되는 LC₅₀에 가까운 농도에 대해서 노출 시작, 중간 및 종료 시점에 시험물질의 농도를 측정한다.
- 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 가능성이 없는 경우, 지수식, 반지수식 및 유수식 시험에 대해 상기 정한 시점에 모든 시험 농도를 측정한다.

3.3.11 원칙적으로 시험결과는 측정농도로 산출한다. 시험기간 동안 시험물질 농도가 설정농도나 측정한 초기농도의 $\pm 20\%$ 이내일 경우, 시험결과는 시험물질 설정농도 또는 초기 측정농도를 근거로 산출할 수 있다. 그 외의 경우 결과 산출에 대한 타당한 근거를 제시해야 한다.

3.3.12 시험 실시 기관은 시험의 신뢰성을 확인하기 위해서 정기적으로 표준물질을 가지고 시험을 실시하도록 한다. 표준물질로는 중크롬산칼륨(K₂Cr₂O₇), 펜타클로로페놀 나트륨염(C₆Cl₅OHNa, pentachlorophenol sodium salt) 등을 사용한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

본시험이 종료되면 적당한 통계적 방법을 사용하여 급성독성값(LC₅₀)과 95 %에서의 신뢰구간을 구하며 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다. 얻어진 시험 결과가 표준방법을 이용하여 LC₅₀를 구하기에 적절하지 않은 경우, 치사를 나타내지 않은 최고농도와 100 % 치사를 나타낸 농도의 기하평균을 구하여 LC₅₀를 기록한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3. 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 물리화학적 특성(안정성, 용해도 정보 등)

2.4. 시험종 : (1) 학명 및 계통

(2) 입수처

(3) 길이, 무게

(4) 순화방법, 순화기간의 관찰결과, 사육방법(먹이 종류, 먹이량, 먹이 공급 빈도 등)

2.5. 시험조건 : (1) 시험시작일 및 종료일, 시험기간

(2) 시험절차 및 관련 세부사항(노출방법, 사용 개체수, 반복수, 시험 용액량 등)

(3) 희석수의 수질특성(pH, 경도, 수온 등)

(4) 시험기간 동안 24 시간마다 시험용액의 용존산소농도, pH, 수온 측정값(반지수식의 경우 시험용액 교환 전후 모든 항목을 측정)

(5) 시험물질 노출농도(설정농도, 측정농도)와 반복구, 시험물질 농도 분석에 대한 사항

(6) 시험용액 조제방법

(7) 시험용액에서 시험물질의 상태

2.6. 시험결과 : (1) 시험기간 동안 0 % 치사율이 나타난 최고농도와 100 % 치사율이 나타난 최저 농도

(2) 각 노출농도별 누적치사 개체수 및 누적치사율

(3) LC₅₀ 값과 95 % 신뢰구간

(4) LC₅₀ 값을 구하는 통계적 과정

(5) 농도-반응 그림표

(6) 대조군에서의 치사율

(7) 시험과정에서 나타난 이상증상

(8) 시험과정에서 시험 결과에 영향을 줄 수 있는 요인의 발생

(9) 기타 예비시험 결과

(10) 보조제 사용의 타당성(해당 보조제의 사용, 선정 및 농도 설정의 이유 등)

2.7. 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD(2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment. No. 23.

제4항 조류 번식독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 조류(鳥類)의 번식에 미치는 영향을 평가하는데 목적이 있다. 화학물질에 노출된 조류의 생존능력, 산란능력, 부화된 새끼에 대한 영향을 관찰함으로써 번식독성을 평가한다.

2. 정의

2.1. 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

시험기간 중 대조군과 비교하여 시험물질이 유의한 정도($p < 0.05$)의 영향을 나타내는 것으로 관찰되는 농도 중 가장 낮은 시험물질의 농도

2.2. 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

시험 기간 중 영향을 나타내지 않는 시험물질의 최대 농도로서 LOEC의 바로 아래 값

2.3. 기본사료(Basal diet)

번식에 필요한 공급량(성체조류에 해당) 또는 초기공급량(새끼조류에 해당)으로 조류의 영양을 충족

2.4. 알 세트(Egg set)

깍질두께를 측정하기 위해 사용하거나 금이 가 있는 알을 제외하고 인큐베이터 안에 있는 알 또는 산란한 모든 알

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험에 대한 정보

시험물질에 대한 조류 섭취독성 값은 번식독성을 위한 유용한 정보가 될 수 있다. 특히 섭취독성 값이 본 시험에서와 동일종인 경우는 시험물질의 농도설정에 도움이 된다. 이밖에 물질의 구조식, 순도, 물에 대한 용해도, 안정성 등도 시험에 유용한 정보이다.

2.2. 시험동물

2.2.1. 종의 선택

하나 이상의 시험 종을 사용할 수 있다. 시험의 목적에 따라 종을 선택하는데 일반적으로 권장하는 종은 청둥오리(Mallard duck; *Anas platyrhynchos*), 북미산 메추라기(Bobwhite quail; *Colinus virginianus*), 일본산 메추라기(Japanese quail; *Coturnix coturnix japonica*)이다. 시험 종은 사육하기 쉽고, 공급이 용이해야 한다. 상기 종과 다른 종을 사용하는 경우에는 사용에 대한 타당한 이유를 제시하도록 한다. 시험조류는 구입 또는 실험실에서 사육한 것을 사용할 수 있으며 질병이나 부상이 없어야 한다. 모든 시험조류는 혈통을 명확히 알고 있는 동일 모 집단에서 얻어진 것을 사용한다. 시험용 청둥오리 및 북미산 메추라기는 같은 종의 야생 조류와 생김새가 유사해야 한다.

표 1. 권장하는 성체 조류의 조건

조류 종	시험개시기의 연령	시험기간 동안 나이 범위	한쌍*당 우리의 최소 바닥면적
청둥오리	9 개월 ~ 12 개월	± 2 주	1 m ²
북미산 메추라기	20 주 ~ 24 주	± 1 주	0.25 m ²
일본산 메추라기	**	± 1/2 주	0.15 m ²

* 크기가 더 큰 군을 사용하는 경우, 바닥공간도 보다 넓도록 한다.

** 시험에 사용하기 전, 종의 변이성을 줄이기 위해, 메추라기는 증명된 번식가능 조류(breeder)를 사용하도록 한다(표 3 참조).

2.2.2. 거주 및 사육 조건

실내에서 조류를 사육할 적절한 시설이 필요하다. 사육 시설에는 통풍, 온도, 습

도 및 빛 조절을 위한 장치들이 포함되어야 한다. 인공조명은 가시광선과 유사해야 하고, 자동으로 조절되도록 한다. 새벽 및 해질 무렵에 15 분 ~ 30 분 동안 전환기간(Transition period)을 갖는 것이 좋다. 성체 조류는 $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 및 상대습도가 50 %에서 75 %인 통풍이 좋은 시설에서 사육하도록 한다. 표 1은 각 실험동물의 종류에 따른 특별한 사육 조건을 제시하고 있다.

시험물질이 사료에 함유되지 않는다는 점을 제외하고는 순화기간 및 시험기간 동안의 환경조건은 동일해야 한다. 화학물질 사용 혹은 약물치료는 가능한 한 피해야 하지만, 사용했을 경우에는 보고하도록 한다. 조류의 행동변화에 영향을 줄 수 있는 방해요인은 제거한다. 알과 어린 조류를 위한 환경조건은 표 2에 제시되어 있다. 사육우리의 온도는 바닥에서 2.5 cm ~ 4 cm 높은 곳에서 측정한다.

표 2. 알과 새끼조류를 위한 권장 환경조건

	온도(℃)	상대습도(%)	방향전환 여부
청둥오리			
저장	14 ~ 16	60 ~ 85	선택
배양	37.5	60 ~ 75	예
부화	37.5	75 ~ 85	아니오
새끼(1 주)	32 ~ 35	60 ~ 85	-
새끼(2 주)	28 ~ 32	60 ~ 85	-
북미산 메추라기			
저장	15 ~ 16	55 ~ 75	선택
배양	37.5	50 ~ 65	예
부화	37.5	70 ~ 75	아니오
새끼(1 주)	35 ~ 38	50 ~ 75	-
새끼(2 주)	30 ~ 32	50 ~ 75	-
일본산 메추라기			
저장	15 ~ 16	55 ~ 75	선택
배양	37.5	50 ~ 70	예
부화	37.5	70 ~ 75	아니오
새끼(1 주)	35 ~ 38	50 ~ 75	-
새끼(2 주)	30 ~ 32	50 ~ 75	-

2. 시험방법

2.1. 원리

조류는 적어도 20 주 동안 다양한 농도의 시험물질이 함유된 사료를 먹는다. 광 주기 조절을 통해 조류가 알을 낳도록 한다. 10 주 동안 산란한 알을 수거해 인공 배양시킨 후, 새끼 조류에게 14 일 동안 사료를 준다. 성체 조류의 사망, 산란능력, 금이 간 알, 알 껍질의 두께, 생존능력, 부하능력 및 새끼 조류에 대한 영향을 대조군과 비교한다.

2.2. 시험

2.2.1. 대조군 및 시험물질 처리군에 사용되는 조류는 무작위로 분배한다. 대조군 및

처리군의 조류는 최소한 2 주 동안 시설물과 기본섭식에 순화시킨다. 순화기간 동안 성(암·수)에 관계없이 3 % 이상 사망하거나, 쇠약해진 경우, 시험 조류의 모집단은 사용하지 않도록 한다.

2.2.2. 시험기간 동안, 적어도 3 개 이상 농도의 시험물질을 함유하는 사료를 조제하도록 한다. 시험물질의 농도는 조류섭식독성에서의 독성값을 토대로 하는 것이 좋다. 최고농도는 섭식독성에서 10 % 사망농도의 1/2에 가깝도록 선정한다. 농도간격은 최고농도에서 등비급수로 낮게 정한다(예, 최고농도의 1/6, 1/36). 최대 농도는 1,000 mg/L 이하가 되도록 한다.

2.2.3. 시험물질을 함유하는 사료는 일정농도의 시험물질과 조류 사육용 기본 섭식 사료를 균일하게 혼합하여 만든다. 균일한 혼합을 위해 조류에 독성이 낮은 용매를 사용할 수 있다. 용매는 사료무게의 2 %를 초과하지 않도록 한다. 대조군의 사료에도 동일한 용매를 사료에 첨가해야 한다. 일반적으로 물, 옥수수기름 또는 시험에 널리 사용되는 다른 용매들을 사용할 수 있다. 새끼조류 사료에는 시험물질 혹은 용매를 첨가하지 않는다.

2.2.4. 시험조류는 암·수 한 쌍으로 시험하거나, 수컷 1 마리당 암컷 2 마리(메추라기의 경우) 또는 3 마리(청둥오리의 경우)를 배치하는 그룹으로 시험을 할 수 있다. 타당한 사유를 제시하면 다른 성비의 배치도 가능하다.

2.2.5. 대조군 및 처리군 조류는 동일한 환경조건으로 배치된다. 쌍으로 하는 시험에서는 대조군 및 처리군당 최소한 12 개의 조류용 우리를 사용하도록 한다. 그룹으로 시험하는 경우, 대조군 및 처리군당 최소한 8 개(청둥오리의 경우) 및 12 개(메추라기의 경우)의 조류용 우리를 각각 사용한다.

2.2.6. 시험조류가 시험물질을 함유한 사료에 노출되면서 시험이 시작된다. 시험기간 동안, 성체 조류는 시험물질에 계속 노출되도록 한다. 시험기간 동안 태어난 새끼 조류의 사료에는 어떠한 시험물질도 첨가하지 않도록 하며, 항상 깨끗한 물을 공급하도록 한다.

2.2.7. 시험이 인공적으로 만든 실내 환경에서 이루어지는 경우, 시험 시작 후 8주 동안 동일한 조명조건(예, 매일 7 시간 ~ 8 시간의 조명)으로 유지한다. 이때,

암조건을 중단하지 않도록 한다. 그 후, 조류가 알을 낳기 적합한 조건을 만들어 주기 위해 매일 16 시간 ~ 18 시간을 광주기로 조명한다. 보통 광주기가 시작된 지 2 주 ~ 4 주 후, 알을 낳기 시작한다.

2.2.8. 시험이 실외환경에서 이루어지는 경우, 시험 종과 동일한 야생종이 부화하는 시기와 동일한 기간에 맞춰 시험을 시작하도록 한다. 시험 조류는 정상적으로 알을 낳기 시작하기 전, 최소한 10 주 동안 시험물질을 함유한 사료에 노출되도록 한다.

2.2.9. 위의 두 환경 조건으로 최소한 8 주 동안 시험을 지속한다(보통 알을 낳기 시작한 후 10 주 동안의 기간을 권장한다).

2.2.10. 사료에 함유된 시험물질 농도가 시험시작부터 첫째 주에 설정농도의 80 % 이하로 떨어지지 않도록 한다. 사료에 함유된 시험물질의 안정도를 적절하게 설명할 수 없는 경우(시험물질이 불안정하다고 판단되는 경우), 시험 첫째 주 동안, 최초 사료와 시험물질을 혼합한 직후와 4 시간 이내에 최고농도 및 최저농도의 시험물질을 함유한 사료를 분석한다. 이때 사료에 함유된 시험물질 농도가 설정농도의 80 % 이내인 경우, 더 이상의 분석은 실시하지 않고, 설정 농도가 유지될 수 있도록 시험용 사료를 자주 새로 조제하도록 한다.

2.2.11. 사료에 함유된 시험물질 농도가 분석 후 설정농도의 80 % 이하인 경우, 초기 농도를 증가시키거나, 시험용 사료를 자주 바꾸면서 실제 농도가 유지 되도록 한다. 이때 시험시작 둘째 주에는 목표치인 80 %에 도달했는지를 알아보기 위해 추가분석을 실시한다.

2.2.12. 사료에 함유된 시험물질의 안정도와 관계없이 우리 내의 사료는 최소한 1 주일에 1 회는 교환하는 것이 바람직하다. 사료를 매일 새롭게 바꿔줄 필요가 있을 정도로 시험물질이 불안정하면, 본 시험에는 적절하지 않다.

2.2.13. 알을 낳기 시작하면, 매일 알을 수거하여 시험용 우리에 넣어 표시를 한다. 알을 저장한 후, 매주 혹은 2 주에 한 번씩 배양 및 분화를 위해 분리한다. 배양하기 전에는 알에 금이 갔는지를 확인하도록 한다. 깨진 알은 배양해서는 안 된다. 6 일 ~ 11 일 후에 생존능력을 확인하고자, 배양을 위한 알들을 촛불로 비

추어 재차 관찰한다.

2.2.14. 최소한 우리 당 2 개의 알을 지정해서 껍질 두께를 측정하도록 한다. 금이 생긴 알은 측정할 필요는 없지만, 그 수는 기록한다. 알을 꺼내서 세척하고 건조시킨 후, 알을 세워 허리둘레의 넓은 부위(횡단)에서 일정한 3 ~ 4 개의 점을 표시하고 껍질 두께를 각각 측정한다.

2.2.15. 청둥오리, 북미산 메추라기, 일본산 메추라기 알을 각각 시험 23 일째, 21 일째, 16 일째에 배양조건에서 부화조건으로 이동시키도록 한다. 청둥오리, 북미산 메추라기, 일본산메추라기 알의 부화는 보통 각각 25 일 ~ 27 일째, 23 일 ~ 24 일째, 17 일 ~ 18 일째에 종료된다.

2.2.16. 부화한 새끼는 각 부화된 우리에 넣거나, 혹은 개별로 표시한 후 동일한 우리에 함께 넣는다. 부화한 새끼는 14 일 동안 시험물질이 함유되지 않은 사료를 공급하도록 한다. 조명은 낮을 기준으로, 새벽 및 해질 무렵에 15 분 ~ 30 분 동안 전환기를 갖는 것이 좋다. 타당한 사유가 있는 경우, 다른 조명 방식도 사용할 수 있다.

2.3. 시험환경

2.3.1. 시험 종료 시 대조군의 사망률은 10 %를 초과하지 않도록 한다.

2.3.2. 청둥오리, 북미산 메추라기, 일본산메추라기 대조군이 우리에서 14 일간 생존한 조류의 평균수는 최소한 각각 14 마리, 12 마리 , 24 마리어야 한다.

2.3.3. 청둥오리, 북미산 메추라기, 일본산메추라기 대조군 알 껍질의 평균 두께는 최소한 각각 0.34 mm, 0.19 mm, 0.19 mm이어야 한다.

2.3.4. 권장한 농도범위에서 최대농도에서 번식에 대해 어떤 영향도 발견되지 않은 경우, 무영향관찰농도(NOEC)는 최대농도 이상으로 보고할 수 있다.

2.3.5. 시험기간 동안, 사료에 함유된 시험물질의 농도가 유지되고 있다는 것을 증명할 수 있어야 한다. 설정농도가 최소한 80 % 이상 유지되도록 한다.

2.4. 관찰항목

시험기간 동안, 다음 관찰을 해야 한다.

2.4.1. 사망 및 중독 증상을 매일 관찰한다.

2.4.2. 성체조류의 체중을 측정한다(시험시작 및 시험 종료 시).

2.4.3. 새끼 조류 몸무게를 측정한다(부화 14 일 후).

2.4.4. 시험기간 동안 1 주 또는 2 주 간격으로 성체 조류의 사료소비량을 측정한다.

2.4.5. 부화한 후 1 주 및 2 주 후에 새끼 조류의 사료소비량을 측정한다.

2.4.6. 모든 성체 조류에 대해 조직병리학적 관찰을 실시한다.

선택한 조직에 대한 잔류물 분석은 $\log P_{OW}$ 의 값이 3.0을 넘는 시험물질에 대해서 특히 유용할 수 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 결과를 산출하도록 하며, 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3. 시험물질

(1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.4. 시험동물 : 종의 학명, 조류의 계통, 시험시작의 조류의 연령(주 또는 달), 시험조류의 공급처, 기타 시험동물에 관한 사항

2.5. 시험조건

(1) 사육조건 : 시험기간 동안 우리의 형태, 크기, 재질, 온도 및 상대습도, 광주기, 통

풍, 기타 모든 변화

- (2) 기본섭식 사료의 공급원, 성분 및 성분분석 자료(단백질, 탄수화물, 지방, 칼슘, 인 등), 사용된 모든 첨가물 및 용매에 대한 설명
- (3) 시험용 사료 : 조제방법, 사용된 설정농도 및 농도 개수, 시험물질과 사료의 혼합방법, 사료에서의 시험물질 실측을 위해 사용한 분석방법, 시험용 사료 의 공급횟수 및 조제 주기, 용매(사용된 경우), 사료 저장조건 등
- (4) 시험 조류의 순화방법, 우리에서의 시험 조류의 성비 및 배치방법
- (5) 우리 당 조류 수, 처리군 및 대조군당 반복군 수
- (6) 알 및 조류에 대한 확인 방법
- (7) 온도, 습도 및 방향전환 빈도를 포함한 알 저장, 배양 및 부화 조건
- (8) 대조물질로 사용된 살충제 이름, 시험용 농도조제 방법(사용한 경우)

2.6 시험결과

- (1) 독성증상, 영향을 받은 개체 수, 발생빈도, 독성이 나타난 기간
- (2) 성체 및 새끼 조류의 사료소비량 및 체중
- (3) 조직병리학적 증상에 대한 설명
- (4) 조직 내 잔류물질 분석결과(수행한 경우)
- (5) 알 생산, 생존능력, 부화능력(정상적인 부화 포함), 생존한 새끼 조류, 알 껍질 두께(시험기간 동안 매주 각 농도 및 우리 별 결과를 표로 작성)
- (6) 통계 분석방법 및 결과 해석
- (7) 무영향관찰농도 및 통계적으로 유효한 모든 영향수준
- (8) 시험결과에 영향을 줄 수 있는 관련 사항
- (9) 결과에 대한 고찰 및 결론

표 3. 번식과 관련된 요인들에 대한 표준 값*

번식관련 요인	청둥오리	북미산 메추라기	일본산 메추라기
알 생산 - 우리 당 낳은 알 수(10 주)	28 ~ 38	28 ~ 38	40 ~ 65
금이 간 알의 %	0.6 ~ 6	0.6 ~ 2	-
생존능력 (알 세트 당 생존한 배아 %)	85 ~ 98	75 ~ 90	80 ~ 92
부화능력(알 세트 당 부화율 %)	50 ~ 90	50 ~ 90	65 ~ 80
14 일간 생존한 부화된 새끼 (%)	94 ~ 99	75 ~ 90	93
우리 당 14 일간 생존한 새끼 조류의 수	16 ~ 30	14 ~ 25	28 ~ 38
알 껍질 두께(mm)	0.35 ~ 0.39	0.19 ~ 0.24	0.19 ~ 0.23

* 상기 값들은 전형적인 값들이나, 반드시 모든 시설을 대표하지는 않는다.

대조군 조류의 값들이 상기 수치들과 일치하지 않거나, 유사하지 않은 경우, 시험에 대해 잠재적 문제점이 발생할 수 있으므로 시험절차에 대한 조사가 필요하다.

제5항 지렁이 급성독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 토양을 수송매체로 하는 육생생물에 의한 기초단계시험으로서 토양을 이용한 지렁이의 단기간 노출을 통하여 화학물질의 유해성을 스크리닝하는데 목적이 있다.

(가) 시험용 지렁이를 사용한다.

(나) 난용성 물질도 가능하나 수용성인 물질에 가장 용이하게 적용된다.

(다) 본 시험법의 적용대상은 주로 화학물질이며 공장폐수, 표면수 및 지하수 등에도 확대 적용될 수 있다.

(라) 본 시험법에는 '필터페이퍼를 이용한 독성시험'과 '인공토양을 이용한 독성시험'을 수록함에 따라 선택하여 시험할 수 있으나 전자는 화학물질의 스크리닝을 위한 시험이며, 화학물질의 유해성심사, 위해성평가 등 평가를 목적으로 하는 경우는 후자의 시험에서 얻어진 독성값을 사용하여야 한다.

2. 정의

2.1 반수치사농도(LC₅₀)

시험생물의 50 %를 사망하게 할 것으로 추정되는 시험물질의 치사농도(Lethal concentration)를 말하며, 시험기간을 명기(예 : 14 d-LC₅₀)

2.2 대조 물질

시험에 사용하는 생물의 화학물질에 대한 반응이 일정한가를 확인할 목적으로 사용하는 화학물질로 염화아세트아미드($\text{CH}_2\text{ClCONH}_2$)를 주로 사용

2.3 농도단위

농도는 토양 건조중량에 대한 시험물질의 무게(예, mg/kg)로 표기

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

1.1.1 시험용기 : 화학적으로 불활성인 재질로 수용량에 따라 적절한 크기의 용기 (1 L 비이커 등)

1.1.2 온도제어 가능한 배양장치 : $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도범위에서 설정한 온도를 $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지하고 조도 400 렉스 ~ 800 렉스로 조정 가능한 배양기 또는 실험실

1.1.3 pH측정기

1.1.4 수분측정기

1.1.5 소형 믹서

1.1.6 필터페이퍼 : $80\text{ g/m}^2 \sim 85\text{ g/m}^2$, 두께 약 0.2 mm의 중급 이상의 재질

1.1.7 소형 바이알 : 바닥이 납작한 원형으로서 높이 8 cm, 지름 3 cm가량 되는 것

1.2 인공토양의 준비

지령이 생육에 적당한 토양을 사용하며 다음과 같은 인공토양을 사용할 수 있다.

1.2.1 10 % Sphagnum으로 만든 진흙(pH 5.5 ~ pH 6.0에 가까울 것. 식물이 남아 있어서는 안 되며, 분말상이고 건조시킨 것)

1.2.2 20 % 카올린 점토(카올린 함량은 가능한 30 % 이상 일 것)

1.2.3 70 % 공업사(잔모래인 경우 $50\text{ }\mu\text{m} \sim 200\text{ }\mu\text{m}$ 의 입자경인 것이 50 % 이상 점유할 것)

1.2.4 pH는 탄산칼슘을 가하여 6.0 ± 0.5 로 조정한다.

위의 건조 성분을 정확한 비율로 혼합하여 대형 실험용믹서 또는 소형 전기시멘트믹서로 완전히 혼합한다. 소량의 시료를 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 건조하여 재 칭량하고 수분함량을 측정한다. 전체의 수분함량이 건조중량의 약 35 %가 되도록 이온교환수를 가해 완전히 혼합한다. 제조한 인공토양에 압력을 가해도 물이 나와서는

안 된다. 실제 시험에 사용하는 인공토양은 상기 조건을 만족하는 토양으로 적절하게 제조하여 사용하면 된다.

1.3 필터페이퍼의 준비

인공토양 대신에 필터페이퍼를 사용하여 독성시험을 할 수 있다.

1.3.1 필터페이퍼를 이용한 시험은 수용성이 높은 물질, 유기용매 등을 시험물질로 할 때 적당하다

1.3.2 필터페이퍼를 바이알의 바닥 크기로 잘라 바이알 안 바닥에 깔아준다.

1.4 시험용 지렁이

장려하는 시험 종은 *Eisenia foetida* (Michaelsen)이다. 이 종은 유기물이 풍부한 토양에 살며, 화학물질에 대한 감수성은 실제 토양에 살고 있는 종과 비슷하다. 3 주 ~ 4 주 안에 부화하고 20 °C에서 7 주 ~ 8 주 지나면 성숙한다. 다산하며 성숙한 지렁이는 1 주일에 2 개 ~ 5 개의 난포(cocoon)를 낳고 각 난포에서 몇 마리씩의 지렁이가 태어난다. 이 지렁이는 시판되며 각종 유기 폐기물로 쉽게 번식시킬 수 있다. 동일계통의 지렁이를 사육장으로부터 보급 받아야 한다. *Eisenia foetida*에는 두 아종 있으며 *E. foetida foetida*는 환절부위에 특징적인 선(Stripping)모양이 있으나, *E. foetida andrei*는 선모양이 없고 붉은 색을 띤 얼룩무늬가 있다. 시험에는 가능한 한 *E. foetida foetida*를 사용하는 것이 좋다.

시험에 사용하는 지렁이는 다음 조건을 만족해야 한다.

- (1) 지렁이는 생후 2 개월 이상 된 성숙한 것으로 체중이 300 mg ~ 600 mg이 되어야 한다.
- (2) 시험개시 전 1 일 이상 인공토양에서 사육하되 먹이는 주지 않는다. 필터페이퍼로 시험을 할 경우, 시험 전 3 시간 동안 증류수로 적신 필터페이퍼에 지렁이를 두어 장 안의 내용물이 스며 나오게 하고, 지렁이를 물로 씻은 후 물기를 말

려 시험에 사용한다.

2. 시험방법

2.1 원리

지렁이를 시험조건 하에서 여러 농도의 시험물질에 일정기간 노출하여 그 사망수를 시험기간 동안 측정하여 반수치사농도를 산출하며, 그 외의 독성영향도 관찰한다. 인공토양을 이용한 시험이 주로 사용되며 필터페이퍼를 이용한 시험은 화학물질의 독성을 스크리닝하는데 적용할 수 있다. 시험물질의 적당한 농도범위를 설정하기 위해 농도설정시험을 실시하고 그 결과에 기초하여 농도단계를 설정하여 본시험을 한다.

2.2 농도설정시험

2.2.1 인공토양을 이용한 독성시험

2.2.1.1 농도설정시험을 위한 시험물질의 농도는 1,000 mg/kg, 100 mg/kg, 10 mg/kg, 1 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.01 mg/kg을 기본으로 하여 단계적으로 정한다.

2.2.1.2 시험용 지렁이는 1 개의 시험용기에 10 마리를 사용한다.

2.2.1.3 각 농도 당 처리군 및 대조군마다 1 개의 시험용기를 사용한다.

2.2.1.4 시험물질이 수용성인 경우, 증류수에 녹이고 인공토양과 잘 혼화한다.

2.2.1.5 시험물질이 난수용성인 경우, 시험용액은 시험용 지렁이에 대해 독성이 낮은 유기용매, 계면활성제, 분산제 등의 보조제를 사용하여 조제해도 무방하다. 이 경우 각 처리군은 일정농도의 보조제를 포함하도록 하며 동일한 농도의 보조제 대조군을 설정한다. 또한 보조제의 농도가 100 mg/kg을 넘지 않도록 한다.

2.2.1.6 pH는 조정하지 않고 시험을 한다.

2.2.1.7 시험용기마다 습중량 750 g의 시험토양(시험물질 + 인공토양)을 유리용기에 넣고, 인공토양에 1 일 이상 순화시킨 지렁이를 빠른 속도로 증류수에 씻은 후 시험 농도 당 10 마리 이상을 토양표면에 놓는다. 용기는 통풍구멍이 뚫린 플라스틱 필름으로 덮어 건조를 막는다.

2.2.1.8 20 °C ± 2 °C범위로 온도를 설정하고, 각 처리군 및 대조군의 온도를 설정온도의 ± 2 °C 이내로 유지한다.

2.2.1.9 조명은 시험기간 중 점등한다.

2.2.1.10 그 밖에 노출기간 및 관찰 방법은 본시험에서의 방법과 동일하게 한다.

2.2.2 필터페이퍼를 이용한 독성시험

2.2.2.1 필터페이퍼가 깔려 있는 각각의 바이알에 농도별로 1 mL의 시험용액을 첨가한다. 시험용액의 pH는 사전에 측정해 기록해둔다.

2.2.2.2 대조군의 경우 1 mL의 증류수를 첨가하거나 보조제를 일정량 첨가한다 (처리군의 최고농도에 첨가된 유기용매, 분산제 등의 양과 동일량).

2.2.2.3 바이알을 수평으로 천천히 회전시키면서 시험용액이 첨가된 필터페이퍼를 건조시킨다.

2.2.2.4 바이알 내의 필터페이퍼가 건조된 후, 1 mL의 증류수를 첨가하여 적신다.

2.2.2.5 0.001 mg/cm² ~ 1.0 mg/cm²의 범위에서 농도를 선택하여 지령이를 투입(1 개체/1 바이알)하여 농도설정시험을 한다. 반복구의 유무 또는 그 수는 적절히 판단하여 정한다.

2.2.2.6 각각의 바이알은 캡 또는 플라스틱 필름을 이용하여 밀봉한다.

2.2.2.7 그 밖에 노출기간 및 관찰방법은 본시험에서의 방법과 동일하게 한다.

2.3 본시험

2.3.1 인공토양을 이용한 독성시험

2.3.1.1 농도설정시험 결과, 즉 14 일간 대부분의 지령이가 생존한 최고농도 및 14 일간 대부분의 지령이가 사망한 최저농도를 고려하여 5 단계 이상의 농도를 대수등간격으로 설정한다.

2.3.1.2 각 시험농도군 및 대조군마다 시험용기 4 개, 즉 4 개 이상의 반복구를 둔다. 시험기간은 14 일로 한다.

2.3.1.3 시험지령이의 생사 및 그 상태(토양 속으로 들어가는 상태, 건드렸을 때의

반응, 채색 등)를 시험개시 후 7 일째 및 14 일째에 관찰하여 기록한다. 시험지렁이의 머리부분에 기계적 자극을 주어도 반응이 없을 때를 사망으로 간주한다. 사망한 지렁이는 즉시 제거한다.

2.3.1.4 시험개시 전과 시험종료 후에 시험농도군 및 대조군의 토양의 pH와 수분을 측정한다.

2.3.1.5 시험개시 및 시험종료 시 생존한 지렁이의 체중을 측정한다.

2.3.1.6 기타 사항은 농도설정시험과 동일한 방법으로 한다.

2.3.2 필터페이퍼를 이용한 독성시험

2.3.2.1 농도설정시험 결과를 바탕으로 5 개 이상의 농도를 대수등 간격으로 정한다.

2.3.2.2 농도 당 10 반복구 이상을 두며, 20 반복구 까지 둘 수 있다.

2.3.2.3 한 바이알에 1 개체 이상을 넘지 않도록 한다.

2.3.2.4 시험기간은 48 시간이며, 필요한 경우 72 시간까지 연장할 수 있다.

2.3.2.5 시험기간 동안 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 범위로 온도를 설정하고, 각 처리군 및 대조군의 온도를 설정온도의 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 이내로 유지한다.

2.3.2.6 시험은 조명을 두지 않고 어둠 속에서 진행한다.

2.3.2.7 시험지렁이의 머리부분에 기계적 자극을 주어도 반응이 없을 때를 사망으로 간주한다.

2.3.2.8 기타 사항은 농도설정시험과 동일한 방법으로 한다.

2.4 시험상의 유의 사항

대조군의 사망률은 시험종료 시 10 %를 넘지 않아야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

본시험 종료 후 사용한 지렁이의 사망률(시험물질 농도 당)을 계산하여 얻은 값을 적당한 통계적 방법(*pribit*법 등)을 이용하여 반수치사농도(LC₅₀)와 이의 95 %

신뢰한계를 산출한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭 (일반명, 상품명 등 명기)

(2) 구조식 (시정식, 분자식 명기)

(3) 입수경위, 제조년월일

(4) 순도 또는 불순물

(5) 물에 대한 용해도

(6) 휘발성 또는 증기압

(7) 기타 물성에 관한 자료

2.4 시험지령이 : (1) 시험용 지령이의 증명, 계통 및 입수경위

(2) 적응결과, 사육방법 (먹이종류, 섭식량, 급식빈도 등)

(3) 평균길이, 평균체중

2.5 시험조건 : (1) 시험개시일, 시험 종료일 및 시험기간

(2) 시험온도, 조도 및 광원의 종류

(3) 바이알의 규격 및 재질

(4) 필터페이퍼의 규격, 재질

(5) 인공토양의 성상 (공급원 또는 강열감량, 유기탄소, 총 질소, 등)

(6) 시험토양의 상태, 보관방법, 인공토양에 대한 시험물질 첨가방법

(7) 시험용기 당 시험토양의 양, 시험지령이 수

(8) 시험농도군 설정근거 및 각 시험농도군 시험물질의

농도(설정치 및 실측치)

(9) 시험용액의 pH

2.6 시험결과 : (1) 각 시험농도군 및 대조군의 각 관찰기간에 있어서의 사망개체수

와 누적사망률

- (2) 시험기간 중의 각 시험농도군 및 대조군의 pH, 수분의 측정치 (인공토양 시험의 경우)
- (3) 시험개시 및 종료 시 생존한 지렁이의 체중
- (4) 시험 종료시 농도-사망곡선그래프
- (5) 각 관측시의 LC₅₀값과 그 산출방법 및 95 % 신뢰구간
- (6) 사망률 0 %의 최고농도 및 사망률 100 %의 최저농도
- (7) 기타 관찰된 영향 및 그 영향이 인정된 농도

제6항 육생식물 생장시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 토양에 1 회 처리한 고형 또는 액상의 시험물질이 여러 종의 육상식물의 발아 및 초기 성장에 대한 영향을 평가하는데 목적이 있다.

(1) 많은 육생식물에 대해 적용된다.

(2) 본시험법의 적용대상은 주로 화학물질이나 공장폐수, 표면수 및 지하수 등에 확대 적용할 수 있다.

2. 정의

2.1 EC₅₀

시험생물의 성장변화가 대조군의 성장에 비하여 50 %가 되는 시험물질의 농도

2.2 LC₅₀

시험생물의 발아율 변화가 대조군의 발아율에 비하여 50 %가 되는 시험물질의 농도

2.3 발아

토양표면에 싹이 출현하는 것

2.4 대조물질

시험에 사용이 장려되는 대조물질은 없으나 대조물질을 사용하여 시험하였을 경우에는 그 결과를 표시하여야 함

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

1.1.1 온실 또는 식물육성 상자와 같은 적절한 설비

1.1.2 식물 용기 : 구멍이 없는 플라스틱제 또는 유리제를 사용한다.

1.2 토양

무균토양을 사용할 필요는 없다. 토양은 굵은 파편을 제거하기 위해 체(0.5 cm)로 쳐야한다. 탄소함량은 1.5 % (유기물로서 3 %)를 넘어서는 안 된다. 세립자 (20 μm 이하) 함유율은 10 % ~ 20 % 범위여야 하며 pH는 5.0 ~ 7.5 범위여야 한다. 시험물질을 토양전체에 균일하게 분산할 수 있다면 어떤 방법을 사용하더라도 관계없다. 계면활성제는 사용하지 않도록 한다.

1.3 시험식물

시험에는 다음의 3 부문 중 적어도 하나씩 선택하여 최저 3 종을 사용하여야 한다. 시험종 선택에 있어 이론적 근거가 정당화되면 다른 종을 사용해도 좋다.

부문		시험종
호밀풀	ryegrass	<i>Lolium perenne</i>
벼	rice	<i>Oryza sativa</i>
귀리	oat	<i>Avena sativa</i>
밀	wheat	<i>Triticum aestivum</i>
옥수수	sorghum	<i>Sorghum bicolor</i>
겨자	mustard	<i>Brassica alba</i>
서양유채	rape	<i>Brassica napus</i>
무우	radish	<i>Raphanus sativus</i>
순무우	turnip	<i>Brassica rapa</i>
중국배추	chinense cabbage	<i>Brassica campestris var.chinensis</i>
살갈퀴	vetch	<i>Vicia sativa</i>
녹두	mung bean	<i>Phaseolus aureus</i>
붉은토끼풀	red clover	<i>Trifolium pratense</i>
호로파	fenugreek	<i>Trifolium ornithopodioides</i>
레타스(양상치)	lettuce	<i>Lactuca sativa</i>
갯	cress	<i>Lepidium sativum</i>

2. 시험방법

2.1 원리

여러 농도의 시험물질을 혼입한 토양에 종자를 심는다. 발아한 싹의 수를 기록하고 대조군의 싹이 50 %가 발아하고 나서 적어도 2 주 후에 식물을 잘라 중량을 측정한다.

2.2 시험

2.2.1 온도, 습도, 광조건은 시험기간 중 각 식물종의 정상생육을 유지하는데 적절하여야 한다.

2.2.2 무작위로 불럭을 나눠 1 개의 대조군과 3 개의 농도군으로 시험한다. 시험물질을 토양에 혼입하고 24 시간 내에 각 군당 적어도 5 개의 종자를 뿌린다. 각 시험에 사용하는 종자는 동일한 크기여야하며 종자를 물을 담가 팽윤화시켜서는 안된다.

시험물질은 다음의 방법으로 토양에 혼입한다.

- (1) 시험물질을 휘발성 용매에 용해한다.
- (2) 용액을 모래와 섞는다.
- (3) 용매를 증발시키는 동안 모래슬러지 상태로 방치한다.
- (4) 모래를 토양과 섞는다.
- (5) 대조군을 포함한 모든 시험농도군을 일정한 토양 모래 비율로 한다.

2.2.3 처리농도는 건조토양 1 kg에 대해 시험물질을 0.0(대조군) mg, 1.0 mg, 10.0 mg, 100.0 mg으로 한다. 그 후 종자를 뿌린다.

2.2.4 시험에 사용하는 포트나 용기는 선택한 종의 생장을 억제하지 않도록 충분히 클 필요가 있다.

2.2.5 필요에 따라 식물에 물을 주며 시험은 대조군의 싹이 50 % 발아할 때 부터 14 일 후에 종료한다.

2.3 시험상의 유의사항

2.3.1 대조군의 최저 80 %의 종자가 정상적으로 싹이 발아하여야 한다.

2.3.2 대조군의 싹은 시험기간 동안 정상적으로 성장해야한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1 군당 발아한 식물의 수를 기록하고, 1 군당 평균중량을 측정(수확직후의 습중량 또는 70 °C에서 건조한 후의 건중량)하여 식물당 평균중량을 표기한다. 시험물질의 발아에 대한 영향을 LC₅₀로 나타내고 생장에 대한 영향은 EC₅₀으로 표시한다.

2. 시험결과의 보고

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭 (일반명, 상품명등 명기)

(2) 구조식 (시성식, 분자식 명기)

(3) 입수경위, 제조년월일

(4) 순도 또는 불순물

(5) 물에 대한 용해도

(6) 휘발성 또는 증기압

(7) 기타 물성에 관한 자료

2.4 시험생물 : (1) 시험에 사용한 식물의 종/아종 명

(2) 종자의 입수경위

(3) 종자의 중량과 발아능력

2.5 시험조건 : (1) 시험개시일, 시험종료일 및 시험기간

(2) 포트나 용기의 크기 및 토양의 양

(3) 시험물질의 토양혼입방법

(4) 성장조건(조도, 광주기, 주야의 온도, 산수기록)

(5) 시험설비의 타입(화이트트론, 온실, 육성상자)

(6) 토양의 성질(pH, 유기물함량, 20 μm 이하의 입자비율, 멸균여부)

2.6 시험결과 : (1) 농도-영향 상관관계 그래프로 표기

(2) 발아에 대한 LC_{50} 값

(3) 생장에 대한 EC_{50} 값

(4) 시험종료 후 대조군 및 시험군의 사진등

(5) 시험지침에 이탈한 사항

제7항 식물에 대한 만성독성시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 시험물질이나 토양이 일정 시험조건에서 고등식물의 발아, 생장 및 번식능력에 영향을 미치는지 평가하기 위해 실시한다. 토양의 품질, 특히 식물의 서식지로서 토양의 기능과 토양 내 화학물질의 만성독성을 평가하는데 목적이 있다. 본 시험은 고등식물에 대해 적용하며 휘발성물질의 경우 헨리상수나 공기/물 분배계수가 1 이상인 경우 혹은 증기압이 25 °C에서 0.0133 pa 초과되는 경우에는 본 시험을 적용 할 수 없다.

2. 정의

2.1 인공토양(Artificial soil)

모래(Sand mixture), 고령토(Kaolinite), 이탄(Peat) 및 탄산칼슘의 혼합물로 조성한 토양. 석영사, 암면(Mineral wool), 질석 또는 다른 합성물질은 사용 할 수 없음

2.2 생물중량(Biomass)

어린 싹, 꽃, 종실협의 총 중량. 생물량은 식물당 건조중량 또는 용기 당 건조중량으로 표현

2.3 대조토양(Control soil)

대조물 및 배지로 사용되는 오염되지 않는 토양. 인공 또는 자연, 표준 또는 기준토양 중 한 가지가 사용되며 시험토양과 대조토양 사이 영양수준에 차이를 보이면 용량-반응 패턴에 영향을 미침. 대조토양이 시험토양보다 영양이 풍부하면 위양성이 초래되고, 대조토양이 시험토양보다 영양이 부족하다면 낮은 토양-혼합비에서 호메시스(Hormesis)가 예상되거나 역 용량-반응관계가 보일 수 있음

2.4 영향농도(ECx)

대조군에 비하여 x %만큼 감소될 때, 주어진 종말점에서 시험용 화학물질의 농도(질량비) 또는 시험토양의 백분율(질량비)이며, mg/kg 로 나타냄

2.5 발아(Emergence)

종자로부터 어린 식물이 출현하는 것. 대조군 용기와 시험군 용기에서 출현하는 유식물의 백분율로 나타냄

2.6 호메시스(Hormesis)

높은 농도에서 독성을 보이는 화학물질이나 토양혼합물이 저농도에서는 유의한 영향을 나타내는 현상이며 본 시험의 경우 발아율, 생상, 생존 등이 개선되는 현상을 말함

2.7 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

대조군에서 관측된 값과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는 토양 내 시험물질의 가장 낮은 농도

2.8 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

대조군과 처리군의 값을 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없는 처리군 농도 중 가장 높은 농도(질량비) 또는 토양 혼합비

2.9 기준토양(Reference soil)

시험 토양과 유사한 특성(영양분의 농도, pH, 유기물함량 및 토성 등)을 가진 오염되지 않은 토양. 일반적으로 토양이 채취된 장소 인근에서 채취된 오염되지 않은 토양

2.10 토양혼합비(Soil mixture ratio)

기준토양 또는 대조토양에 대한 시험 토양의 건조무게와 기준토양의 건조무게의 비율

2.11 표준토양(Standard soil)

그 주요 특성(pH, 토성, 유기물함량 등)이 알려진 범위 내에 있는 야외에서 수집된 토양이나 인공토양

2.12 유식물(Seedling)

종자식물의 종자에서 발아한 어린식물. 대부분은 자엽 또는 제 1엽이 잔존하는 기간을 지칭

2.13 어린 싹(Shoot)

식물의 줄기와 그것에 달린 잎의 총체로, 뿌리를 제외한 식물체

2.14 종실험

주로 콩과 작물에서 종실을 포함하거나 싸고 있는 꼬투리

2.15 보수력

토양입자의 흡착력, 물 분자간 응집력 등의 흡인력에 따른 토양 수분함량을 질량 백분율 또는 용량 백분율 등으로 표시한 것으로, 토양 수분장력 또는 매트릭 퍼텐셜(Metric potential)에 따라 그 값이 다름

2.16 심지

흡인도구로 사용되며, 침투작용이나 모세관 현상으로 수분을 빨아들이는 기구

2.17 속아내기

발아 후, 조밀한 곳이나 불필요하거나 세력에 비하여 많은 열매의 일부 개체를 제거해 주는 것을 의미

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험식물

1 종의 단자엽식물과 1 종의 쌍자엽식물종들을 동시에 시험한다. 단자엽 식물 종으로 귀리(*Avena sativa*), 쌍자엽식물종으로 순무(*Brassica rapa*)가 추천된다. 특정지역에서 생태적 또는 경제적으로 중요한 의미가 있는 식물 등 다른 종들이 선택 될 수도 있는데 이런 종 선택 시에는 시험보고서에 그 근거를 제시해야 한다.

1.2 토양

1.2.1 일반사항

시험토양은 망의 크기가 4 mm ~ 5 mm 인 체(sieve) 로 체질을 하여 굵은 입자를 제거한 후, 전체적으로 혼합 시켜준다. 토양은 시험식물에 독성을 일으키지 않을 범위의 pH를 가져야 하며, 순무와 귀리의 경우 pH 5.0 ~ pH 7.5 이어야 한다. 필요 시 토양은 체질하기 전에 열을 가하지 않고, 공기로 건조시킨다. 시험토양은 약 4 °C에서 용기에 되도록 단기간 보관한다.

1.2.2 시험토양

시험에 사용된 모든 토양에 대해 보수력을 측정하여 심지를 통해 충분히 물을 빨아 올리는지 확인한다. 파악해야 하는 시험토양의 특성은 다음과 같다.

- (1) 토성
- (2) pH
- (3) 염분함유도
- (4) 유기탄소 함량
- (5) 칼륨, 질소, 인의 총함량 및 용해도

1.2.3 대조토양

무균토양을 사용할 필요는 없다. 인공의 기준토양이나 표준토양이 대조 물질로 사용된다. 기준토양은 오염된 지역 근처의 오염되지 않은 곳에서 얻고, 오염물에 대한 화학적 분석을 수행한다. 독성 오염물이 함유되었거나 비정상적 토양 특성을 배제할 수 없다면 표준토양을 우선적으로 사용한다. 표준토양은 오염되지 않은, 영양분이 과도하지 않은 천연 또는 인공토양으로 한다. 천연토양의 유기물 함량은 5 % 이하, 20 μm 이하 미세입자는 20 %는 초과하지 않도록 한다. 인공토양의 성분은 건조중량에 기초하여 물이끼 이탄 10 % 고령토 20 %, 공기로 건조한 산업용 석영사 69 %로 구성된다. 시험시작 1 주일 전, 인공토양을 혼합하여 실온에서 2 일간 보관해 산도평형을 맞춘다. pH와 최대 보수력을 결정하기 위해 시험시작 1 일 ~ 2 일 전 탈이온수로 수분을 공급하여 최대 보수력의 40 % ~ 60 %의 수분함유량을 얻는다. pH는 토양에 1 mol/L의 염화칼륨을 1 : 5로 혼합하여 측정한다. pH 6.0 \pm pH 0.5 범위 유지를 위해 탄산칼슘을 사용한다.

시험시작과 종료 시, 인공토양 표본을 105 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하루 동안 (12 시간 이상) 건조하고, 그 무게를 측정하여 수분함유량을 측정한다. 대조토양이 시험토양보다 영양이 풍부하면 생장저해는 용량-반응곡선에서 더욱 분명해지는 것에 유의하여 위양성(False positive)을 피하도록 한다.

1.3 표준물질(Reference substance)

시험환경의 균일성과 시험식물의 민감도를 입증하기 위해 대조토양 (양성 대조군)에 표준물질을 추가한다. 표준물질로 황산아연, 붕산, 트리클로로아세트산 나트륨이 추천된다. 적합한 표준물질의 선정은 추후 시험 및 검증과정에서 수행된다.

1.4 장치 및 기구

1.4.1 식물생장 조절실(Phytotron)

식물생장실, 온실 또는 특정 조건을 유지하기에 적합하여야 한다.

1.4.2 저울

정확도 ± 0.1 mg로 무게를 측정할 수 있는 것과, 10 kg 가량의 더 큰 하중을 수용할 수 있는 저울을 사용한다.

1.4.3 체(Sieve)

망의 크기가 4 mm ~ 5 mm 인 것을 사용한다.

1.4.4 시험용기(Test vessels)

400 g의 질량과 73.5 mm²의 표면적의 토양을 담기에 적절한 플라스틱 용기로, 지름 10 mm \pm 2 mm의 섬유유리 심지가 장치되어있는 것을 사용한다.

1.5 종자의 준비

동일하게 가공하지 않은 10 개의 종자를 준비 한다. 구멍을 만들어 종자 1 개를 각 구멍에 넣고 토양을 덮거나, 핀셋으로 종자를 집어 원하는 깊이에 바로 심는다. 구멍의 깊이는 각각 순무는 5 mm ~ 10 mm, 귀리는 10 mm ~ 15 mm로 하여 구멍마다 종자 하나씩을 넣고 토양표면을 고르게 만든다. 귀리종자는 중량단위로 선택하는데 너무 가볍거나 무거운 종자는 제외한다. 순무종자는 중량 기준으로 선택할 수 없으므로, 모양이 고르지 못한 종자를 제외한다. 기타 식물종을 선택 시, 종자 선택에 대한 별도의 기준을 제시해야 한다.

2. 시험 방법

2.1 원리

2 종의 육상식물의 발아, 초기생장 및 생식을 측정한다. 시험은 시험토 양과 대조토양의 일련의 회석물의 반응을 비교한다. 다양한 농도의 시험 물질을 표준대조토양에 적용해 화학물질을 시험하는데 사용한다.

각 처리마다 보통 4 회 이상 반복하는데 시험식물을 포함한 4 개의 시험 용기를

이용하게 된다. 식물의 종자를 용기당 10 개씩 토양혼합물을 포함한 용기와 기준토양이나 표준토양을 포함한 대조용기에 심는다. 용기는 온도와 빛이 조절되는 곳에서 심지를 통해 물을 준다.

식물의 발아 후, 발아율을 결정하고, 정해진 수로 숙아준다. 2 주 후, 일부 식물들은 생물량 측정을 위해 수확하고, 마지막에 남은 식물을 생식능력 측정을 위해 수확한다. 마지막 수확은 보통 시험 시작 후 순무는 3 주 ~ 4 주, 귀리는 5 주 ~ 6 주에 실시한다.

식물은 용기당 8 개로 숙고 14 일째와 시험 마지막에 각 4 개씩 수확한다. 8 개 이하의 식물이 발아한다면 14 일에 4 개를 남긴 채 수확하고 마지막 재배 시 4 개를 수확한다.

식물에 대한 토양의 적합성 평가를 위해 희석하지 않는 시험토양에서 상대적인 억제율을 측정한다. 일련의 희석물을 기초로 얻은 용량-반응 곡선으로부터 NOEC, LOEC, EC_x 값을 계산한다.

2.2 시험

2.2.1 예비시험

시험용기에 심지를 통해 급수 적용가능성을 평가한다. 두 개의 시험용기에 각각 시험토양과 대조토양을 채질하여 담고, 수분공급용기위에 설치한다. 24 시간 후 물이 심지를 통해 토양의 표면에 닿으면 심지를 통한 급수가 가능하도록 한다.

2.2.2 사전시험(범위설정)

토양에 적용하는 화학물질의 독성 시험 시 의무적으로 실시하고, 식물생장에 영향을 미치는 혼합비의 범위 결정 시에는 선택적으로 실시할 수 있다.

2.2.3 최종시험

토양 혼합물이나 시험물질의 농도는 예비시험에 기초하여 최소 5

가지를 준비한다. 각 처리농도 당 최소 4 개 반복구가 준비되어야한다.

3. 시험실시

3.1 시험환경

온도, 습도 및 광 조건은 시험식물의 정상생장에 적합해야 한다. 시험은 식물생장 조절실(Phytotron)이나 온실에서 진행한다. 추가로 햇빛, 발광튜브, 기체 방출기, 금속할로젠, 고압수은 및 고압 나트륨 램프를 사용 할 수 있다. 귀리와 순무의 경우 16 시간(명): 8 시간 (암)으로 하고, 광도는 13,000 렉스 \pm 2,000 렉스(lx)로 한다. 두 식물중에 대해 온도는 23 $^{\circ}\text{C}$ \pm 3 $^{\circ}\text{C}$ 가 적합하고, 그 외 종 역시 정상적인 발아와 생장이 일어나는 범위의 온도를 선택한다. 오염된 토양의 시험 시, 휘발성 독성물질에 의한 건강상 위해와 교차오염을 막기 위해서는 환기가 필요하다.

실내 온도 및 습도는 1 시간 이내의 짧은 주기로 연속적으로 측정, 기록하도록 한다.

3.2 식물의 개체 수 및 솟아내기

미발아 종자 수를 고려하여 필요한 식물의 수인 8 개보다 많은 수인 10 개를 보통 심는다. 식물의 발아 직후, 용기 당 식물은 무작위로 선택하여 8 개로 줄이고, 골고루 분포시킨다. 8 개는 순무와 귀리에 대해 적용하는 것이고, 용기는 같은 방식으로, 다른 종이나 다른 크기의 용기가 사용 된 경우에는 조정 될 수 있다. 식물을 제거 할 때는 당겨서 뽑 수 있고, 토양이 너무 엉겨 있거나 식물끼리 가까이 붙어서 자란다면 자른다. 귀리를 자르면 가끔 2 차 어린 싹이 자라는데 나중에 이것도 다시 잘라준다.

3.3 수분공급

필요시마다 저수기에 탈이온수를 채워 토양 내 수분을 유지한다. 육안이나 토양의 표면을 만져서 젖었는지 확인하고 용기의 무게를 달아 필요한 수분을

보충할 수 있다. 심지를 이용한 급수 실패 시, 정기적으로 토양표면에 물을 붓거나 뿌려준다. 심지를 사용하지 않는 경우, 토양이 젖을 때까지 수동적인 방법으로 수분을 공급한다.

3.4 시험용기의 재배치

온도, 습도, 광 및 환기의 영향을 고르게 하기 위해 최소 주 2 회 정기적으로 용기들을 재배치한다.

3.5 수분작용(Pollination)

이형 순무(*Brassica rapa*)의 급속 성장형 품종인 CrGC, Syn. Rbr 경우 종자와 종실협(Seed pod)을 생산하기 위해, 개화가 시작 되면 (약 2 주 후) 인위적으로 수분작용이 일어나도록 한다. 면봉이나 파이프 청소기구, 부드러운 붓, 벌침 등을 사용하여 개화가 성공적으로 일어나면, 일주일에 2 번 이 과정을 반복한다.

4. 관찰

4.1 유식물의 발아

발아 한 유식물의 수를 용기별로 세고 평균 발아량을 백분율로 표현한다. 시기는 대조용기 내 유식물의 50 %가 발아했을 때로 한다.

4.2 14 일째의 수확

대조용기 내 유식물의 50 %가 발아하고 14 일째, 용기 당 4 개의 식물을 남기고 무작위로 토양의 표면에서 자른 후, 다음 종말점을 측정한다.

- (1) 식물 당 눈에 보이는 꽃봉오리의 존재/부재 확인(순무만 해당);
- (2) 식물 당 꽃의 개수(순무만 해당);
- (3) 식물 당 생중량(식물 절단 직 후 측정);
- (4) 생존 식물의 비율(숙은 후 수와 비교 한 식물의 백분율);

(5) 손상된 식물의 수(노랗게 되거나 시드는 등 식물의 질적인 수)

4.3 최종수확

남아있는 식물체의 정확한 수확날짜는 사전에 정하기 어렵다. 귀리는 대조처리에서 개화 후 수확하고 보통 7 주에서 8 주 후이다. 순무는 대조처리에서 종신허이 발아할 때 수확하고 보통 5 주에서 6 주 후이다.

식물은 토양표면에서 절단하고, 다음 종말점을 측정한다.

- (1) BBCH(Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt und Chemische Industrie) 분류체계에 따른 성장 단계(Growth stadium)(주 1);
- (2) 식물당 개화한 총 수(귀리만 해당);
- (3) 생식력 있는 종자를 가지는 종신허의 수(눈에 띄게 부푼 것)-(순무만 해당);
- (4) 식물 절단 직 후 어린 싹의 생중량 (귀리: 개화 없이, 순무:종신허 없이);
- (5) 식물 절단 직 후 개화한 꽃(귀리) 또는 종신허(순무)의 생중량;
- (6) 어린 싹의 수분 함유량, 용기 당 개화 및 종신허, BBCH 성장단계와 명백한 차이가 대조식물과 시험식물 사이에서 발견 되는지 여부;
- (7) 어린 싹의 건조중량
- (8) 개화한 꽃(귀리) 또는 종신허(순무)의 건조중량;
- (9) 죽은 식물의 비율(숙은 후 숫자와 비교 시 식물의 백분율);

4.4 시험일정표

기간 ^a	활동 (정의 된 시험)
예비시험 활동 1 단계	시험토양 준비 (공기-건조, 체질, 토양특성 결정) 토양이 심지를 통해 급수 시 확인하기 위한 예비시험 시험용기 준비(라벨링, 심지 설치)
예비시험 활동 2 단계	시험토양 혼합물 준비 및 시험 항목 적용 - 화학물질 시험 - 저장액 또는 유상액(에멀전) 준비 및 토양으로 혼합 또는 석영사 코팅 - 유기용매를 증발시킨 후 코팅 된 규사를 토양에 혼합 - 토양 시험: 시험토양을 대조토양과 혼합 - 시험토양이나 토양 혼합물로 시험용기를 채움 - 종자의 파종 - 시험용기를 시험장소에 배치함(무작위 기법) - 초기 토양 수분공급
예비시험 활동 3 단계	필요시 위와 동일하게 저수기를 물을 채우거나 시험용기에 수분공급 발아한 유식물의 수를 세고, 숙아내기 시험장소에서 시험용기 재배치(주 2 회)
1 일째	대조 용기 내 50 % 발아
14 일째	시험 식물의 1차 수확 수확 된 식물의 육안 검사 및 생물량 측정
15 일 ~ 35 일째	필요시 위와 동일하게 저수기를 물을 채우거나 시험용기에 수분공급 시험장소에서 시험용기 재배치(주 2 회) 성장주기가 빠른 순무의 꽃의 수분활동(주 2 회)
35 일째 ^b	성장주기가 빠른 순무의 최종 수확 수확 된 어린 싹과 종실험의 육안적 관찰 및 생물량 측정
35 일 ~ 49 일째	필요시 위와 동일하게 저수기를 물을 채우거나 시험용기에 급수 시험장소에서 시험용기 재배치(주 2 회)
49 일째 ^b	귀리의 최종 수확 수확된 어린 싹과 개화한 꽃의 육안 검사 및 생물량 측정
<p>a : 주어진 일정표는 귀리 및 성장주기가 빠른 순무를 이용한 시험에 적용하기 위한 것이다. 만약 다른 종을 시험한다면 다른 생장 기간에 수확될 것이다.</p> <p>b : 제시 된 자료들은 시험조건에 따라 번식 종말점(순무의 종실험 또는 귀리의 개화)까지의 기간은 달라질 수 있다.</p>	

5. 유효성 기준

유효성을 확인하기 위해서는 다음기준이 만족되어야 한다.

- (1) 대조식물의 발아율이 최소 75 %이다 (모든 반복시험구의 평균값).
- (2) 건강한 식물의 발달 : 식물은 누렇게 되지 않고, 꽃은 첫 3 주(순무) 또는 8 주(귀리)에 나타난다.
- (3) 시험 도중 용기 당 발아한 식물 중 1 개 이상은 죽지 않는다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

측정 된 결과는 표로 나타낸다.

표는 다음 정보들을 포함하여야 한다.

- 1.1 용기 당 종자의 수
- 1.2 용기 당 발아한 유식물의 수
- 1.3 14 일 째 용기 당 생존한 식물의 수
- 1.4 14 일 째 절단 후, 용기 당 남아있는 식물의 수
- 1.5 14 일 째 수확된 식물의 어린 싹 길이
- 1.6 14 일 째 꽃봉오리의 발아 (순무)
- 1.7 14 일 째 꽃의 수 (순무)
- 1.8 14 일 째 각 수확된 식물의 생중량
- 1.9 용기 당 시험 마지막에 생존한 식물의 수
- 1.10 시험 마지막에 수확된 식물의 어린 싹 길이
- 1.11 시험 마지막에 식물 당 꽃의 수 (귀리)
- 1.12 시험 마지막에 식물 당 종실험의 수 (순무)
- 1.13 식물 당 어린 싹의 생중량 (귀리 : 꽃 제외, 순무: 종실험 제외)
- 1.14 식물 당 개화한 꽃의 생중량 (귀리)
- 1.15 종실험의 생중량 (순무)
- 1.16 각 처리에 대한 어린 싹, 개화, 종실험의 수분 함유량

1.17 어린 싹, 개화, 종신허의 계산된 건조중량 (수분함유량이 처리군 사이에 차이가 큰 경우)

평균값은 그래프로 나타내고, 시험물질의 농도 및 토양 혼합물의 비율과 비교한 값의 표준편차를 포함한다. 그래프에서 표현된 곡선은 시험물질로 야기되는 영향의 규모 및 발생양상을 보여준다. 농도나 혼합비는 토양의 건조중량에 기초하여 나타낸다.

2. 통계적 분석

2.1 사전시험

명확한 용량-반응관계가 보이는 경우, EC_x 값은 로지스틱 회귀함수나 프로빗분석과 같은 회귀 분석법을 이용하여 산출한다. 그렇지 않은 경우 EC_x 범위는 전문지식에 의해 결정되어야 한다.

2.2 최종시험

시험자료는 2 가지 방식으로 분석된다. NOEC의 접근법에서 동변량성(변이의 균질성)의 통계적 분석은 코크란검증법을 통해 만들어 진다. 균질성에 대한 필요조건을 만족하지 못하면, 시험자료의 변화로 문제를 해결할 수 있는지 평가한다. 그렇지 않으면 비모수적 방법을 사용한다. 한계시험이 수행되고, 모수적 시험절차의 전제조건이 만족되면 Student t-test 나 Mann-Whitney U-test를 이용한다. EC_x접근법은 명확한 용량-반응 관계가 성립되었을 때만 사용한다. 가능하면 R²은 0.7이상으로 하고, 사용하는 시험 농도는 20 % ~ 80 % 범위를 포함하도록 한다.

필요조건을 만족하지 못하면 시험결과의 해석을 위한 별도의 전문 지식이 필요하다. EC_x 값을 산출하기 위해서, 적절한 용량-반응 함수를 만든 후(예 : 프로빗함수 또는 로지스틱함수), 회귀분석에 사용할 처리에 대한 평균값이 필요하다. 대조 평균값의 x %에 부합하는 값을 회귀분석법으로 만든 방정식에 대입하면, 원하는 EC_x 값이 얻어진다. EC₅₀ 값과 비교했을 때 더 작은 효과농도(예:

EC₂₀)는 신뢰한계가 더 작으므로, EC₅₀ 값을 사용할 것을 권장한다. EC₅₀보다 작은 효과농도를 사용하였을 경우에는 이유를 제시한다. 어떤 경우에도, 통계적 평가의 결과들은 생물학적으로 해석되어야 한다. 제시된 통계적 방법들은 호메시스 효과의 경우 적합하지 않다.

3. 결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

- 3.1 국제표준에 대한 참고문헌. (ISO 22030:2005)
- 3.2 실험설계 및 과정에 대한 전체적인 설명
- 3.3 시험식물의 종 (품종, 출처)
- 3.4 시험토양
- 3.5 대조토양 (종류, 출처)
- 3.6 용기의 크기 및 재료
- 3.7 토양의 전처리, 혼합 및 시험물질의 첨가 방법들 (해당 시)
- 3.8 용기 당 토양의 중량
- 3.9 배양 조건 및 다음을 포함
 - (1) 환경의 형태 (식물생장 조절실, 실험실, 온실 등)
 - (2) 온도
 - (3) 습도
 - (4) 광조건
- 3.10 파종 깊이
- 3.11 수분공급방법
- 3.12 수분작용, 수확 등을 포함한 시험조작에 대한 세부사항
- 3.13 사용된 통계적 방법을 포함한 종말점
- 3.14 육안으로 관찰되는 손상의 정량적인 설명
- 3.15 결과에 대한 고찰

- 주 1) Lancashire, P.D., Bleiholder, H., Boom, T.V.D., Langelüddeke, P., Strauss, R., and Witzemberger, E.W.A.(1991) A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. Ann. Appl. Biol., 119, pp. 561~601

제8항 활성슬러지 호흡저해 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 호기성 미생물을 이용한 하수 또는 폐수처리장 기능을 억제할 수 있는 물질들을 신속하게 검색하고 미생물분해시험에서 미생물 활성을 저해하지 않는 시험물질의 적절한 농도를 설정하는 것을 목적으로 한다.

2. 정의

2.1 호흡률(Respiration rate)

호기성 슬러지 혹은 폐수 미생물의 산소 소비량을 의미하며 시간당 $\text{mg O}_2/\text{L}$ 로 표시

2.2 50 % 영향농도(EC_{50})

본 시험에서 시험물질을 처리하였을 때 대조군 호흡률의 50 % 수준을 나타내는 시험물질의 농도

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험에 대한 정보

시험물질에 대한 수용해도, 증기압, 구조식 및 순도 등은 시험에 유용한 정보로 사용될 수 있다.

1.2. 장치 및 기구

1.2.1 측정장치(<그림>)

1.2.2 공기공급장치

1.2.3 pH 전극 및 pH 측정기

1.2.4 O_2 전극

1.2.5 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

1.3 시험물질 용액

시험용액은 시험시작 시에 시험물질 농축용액(Stock solution)을 조제한 후 희석하여 사용한다. 시험원액의 농도는 1.4.항의 절차를 따르는 경우 0.5 g/L가 적절하다.

1.4 대조물질 용액

3,5-dichlorophenol 0.5 g을 1N NaOH 10 mL에 용해시키고 증류수를 이용하여 약 30 mL로 희석시킨 후, 침전이 생기기 시작할 때까지 1N H₂SO₄ (약 8 mL)을 첨가하고, 마지막으로 이 혼합액에 증류수를 넣어 1 L로 희석한다. 이 용액의 pH 범위는 7 ~ 8이어야 한다.

1.5 합성 오수 조제

물 1 L에 다음 양의 물질을 용해시켜 합성 오수를 만든다. (주 1, 주 2)

1.5.1 Peptone 16 g

1.5.2 고기 추출물 (Meat extract) 11 g

1.5.3 요소 (Urea) 3 g

1.5.4 NaCl 0.7 g

1.5.5 CaCl₂ · 2H₂O 0.4 g

1.5.6 MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g

1.5.7 K₂HPO₄ 2.8 g

1.6 미생물 접종물

1.6.1 일반적으로 하수처리장에서 얻은 활성 슬러지를 시험용 미생물 접종물로 사용한다. 가급적 생활하수 처리장에서 얻은 활성 슬러지를 사용해야 하나 이것이 불가능한 경우, 산업폐수 처리장의 슬러지 중 적응 후 미생물활성이 회복된 슬

러지를 사용할 수 있다. 그러나 산업폐수 처리장의 활성 슬러지를 이용한 시험 결과는 불규칙할 수 있다.

1.6.2 활성 슬러지를 실험실로 가지고 온 후, 필요한 경우에 슬러지를 수돗물이나 등장액으로 세척한다. 원심분리한 후 상등액을 따라 버리는 과정을 3 회 반복 수행한다. 세척한 슬러지를 조금 덜어 무게를 달고 건조시킨다. 이 결과로부터 $4 \text{ g/L} (\pm 10 \%)$ 수준의 부유물 상태의 슬러지를 얻기 위해 물에 현탁되어야 하는 젖은 상태의 슬러지 양을 계산할 수 있다. 아래 항의 절차를 따르는 경우, 시험 매체 내에서 슬러지의 농도는 1.6 g/L 가 된다.

1.6.3 슬러지를 채취한 날 슬러지를 사용할 수 없는 경우, 위 항에 따라 만든 각 활성 슬러지 1 L에 합성 오수 50 mL를 첨가하고 $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 조건에서 하룻밤 동안 공기를 공급하여 준다. 공기는 사용하기 전까지 낮에도 공급하여 준다. 사용 전 pH를 확인하고 필요한 경우 중탄산나트륨 용액을 이용하여 pH를 6.0 ~ 8.0로 조절한다.

1.6.4 며칠 동안(최대 4일) 계속 사용하기 위해 동일 배치(Batch)의 슬러지가 필요한 경우, 하루 일정이 끝나기 전에 합성 오수 50 mL를 추가로 첨가한다.

2. 시험방법

2.1 원리

표준량의 합성 오수를 첨가한 활성 슬러지의 호흡률을 접촉 30 분 후 및/또는 3 시간 후에 측정한다. 다른 조건은 동일하게 한 조건에서 여러 농도의 시험물질이 있는 상태에서 동일한 활성 슬러지의 호흡률을 측정한다. 특정 농도에서 시험물질의 억제 효과를 두 대조군의 평균 호흡률로 표시한다. 서로 다른 농도에서의 측정값들로부터 EC_{50} 값을 계산한다.

2.2 시험절차

2.2.1 본시험에는 적어도 5 개 이상의 농도를 대등수 간격으로 정하는데 공비는 3.2를 초과하지 않도록 한다. 농도결정시험을 통해 본시험의 시험물질에 대한 농

도를 결정할 수 있다.

2.2.2 시험물질이 없는 대조군을 시험의 처음과 끝에 각각 두어 시험한다. 각 배치의 활성 슬러지도 대조물질을 이용하여 점검해야 한다.

2.2.3 대조물질은 알려져 있는 호흡 억제물질인 3,5-dichlorophenol을 사용하여 슬러지의 민감도가 정상적이라는 것을 확인하는 방법으로 각 배치의 활성 슬러지에 대해 EC₅₀을 측정하는 것이 바람직하다.

2.2.4 3 시간의 접촉 시간 동안 시험물질과 대조물질에 대한 실험 절차는 아래와 같다.

- (1) 몇 개의 용기(예, 1 L 비이커)를 사용한다.
- (2) 시간 “0”에서 물을 첨가하여 합성 오수 16 mL를 300 mL로 만든다. 200 mL의 미생물 접종물을 첨가한 후 이 혼합액(500 mL)을 첫 번째 용기(첫 번째 대조군 C₁)에 붓는다. 파스퇴르 피펫을 이용하여 분당 0.5 L ~ 1 L의 공기가 공급되도록 한다.
- (3) 시간 “15 분”(15 분은 임의적으로 정한 간격이지만, 편의상 15 분을 사용한다.)에서 시험물질 농축용액(Stock solution) 100 mL를 합성 오수 16 mL에 첨가하고 물을 넣어 300 mL로 만든 후 미생물 접종물을 넣어 500 mL가 되도록 한다. 이 혼합액을 두 번째 용기에 붓고 (2)에서처럼 공기를 공급한다. 부피가 다른 시험물질 원액을 이용하여 15 분 간격으로 이 과정을 반복하면 서로 다른 농도의 시험물질이 들어있는 일련의 시험용기들이 생기게 되며, 마지막으로 두 번째 대조군(C₂)을 만든다.
- (4) 3 시간 후에 첫 번째 시험용기에 들어있는 내용물을 측정 장치에 붓고 10 분 동안 호흡률을 측정한다. 호흡률 측정은 시험용기 내에서 직접 측정할 수도 있다.
- (5) 각 시험용기에 대해 (4)와 같이 15 분 간격으로 호흡률을 측정한다.
- (6) 위와 같이 동일한 방법으로 각 배치의 미생물 접종물에 대해 대조물질을 이용하여 시험한다.
- (7) 접촉 시간 30 분 후 호흡률을 측정하는 경우, 하나 이상의 산소 측정기를 사용

하는 등의 다른 시험체계를 갖추어야 한다. 화학적 산소 소비량(COD)값이 필요한 경우, 활성 슬러지를 제외한 시험물질, 합성 오수 및 물이 포함된 시험용기를 추가적으로 두어야 한다.

- (8) 30 분 및/또는 3 시간의 접촉기간 동안 공기를 공급한 후, 산소 소비량을 측정하고 기록한다.

2.3 시험환경 및 시험상 유의사항

2.3.1 본 시험은 수용성이며 휘발성이 낮은 대부분의 물질에 대해 적용될 수 있으나, 시험 용매에 제한적 용해도를 갖는 시험물질에 대해서는 EC_{50} 값을 산출하지 못할 수도 있다.

2.3.2 시험수행에 적절한 조건은 아래와 같다

- (1) 기간/접촉 시간 : 30 분 및/또는 3 시간, 이 기간 동안 공기를 공급하여 준다.
- (2) 용기 : 비이커가 적절하다.
- (3) 물 : 식용수 (필요한 경우 염소 제거)
- (4) 공기 공급 : 깨끗하고 유분이 없는 공기로 분당 0.5 L ~ 1 L의 유속이 적절하다. 시험용기는 지속적으로 산소가 공급되어야 하며 용존 산소농도가 2.5 mg/L 이하가 되지 않도록 한다. 또한 호흡률 측정 직전에 산소 농도는 약 6.5 mg/L이어야 한다.
- (5) 측정 장치 : BOD 플라스크 같은 바닥이 평평한 플라스크 (그림 1)
- (6) 산소 측정기 : 전위차 기록장치 (200 mV 범위)에 연결할 수 있는 Polarograph 방식의 산소 전극
- (7) 영양분 용액 : 합성 오수
- (8) 시험물질 : 시험용액은 시험 시작시에 조제한다.
- (9) 대조물질 : 예 : 3,5-dichlorophenol (적어도 3 개 농도)
- (10) 대조군 : 시험물질이 없는 접종 샘플
- (11) 온도 : $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

2.3.3 두 대조군의 호흡률은 각각 15 % 이내이어야 하며, 3,5- dichlorophenol의 3

시간 EC₅₀ 범위가 5 mg/L ~ 30 mg/L에 들어야 한다.

2.3.4 활성 슬러지가 병원균을 가지고 있을 수 있으므로 주의해서 취급하여야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 호흡률은 약 6.5 mg O₂/L와 2.5 mg O₂/L 사이의 값으로 기록 장치로부터 시간 단위로 계산되나, 호흡률이 낮은 경우에는 10 분 동안의 기록을 이용하여 계산한다. 호흡률이 측정되는 동안의 호흡률 그래프 부분은 직선이어야 한다.

1.2 특정 농도에서 시험물질의 억제 효과를 계산하기 위해서 호흡률은 두 대조군 호흡률의 평균 %로 표시된다.

$$\{1 - [2R_s / (R_{d1} + R_{d2})]\} \cdot 100 = \% \text{ 억제}$$

R_s = 시험물질 농도에서 산소 소비량

R_{d1} = 대조군 1의 산소 소비량

R_{d2} = 대조군 2의 산소 소비량

1.3 두 대조군의 호흡량 차이가 서로 15 % 이내에 들지 않거나, 대조물질의 3시간 EC₅₀이 허용범위 (3,5-dichlorophenol에 대해 5 mg/L ~ 30 mg/L)에 들지 않는 경우, 해당 시험은 부적절한 것으로 판단하여 재시험해야 한다.

1.4 각 시험농도에서, % 억제를 계산한다. % 억제는 log-normal (혹은 Log-probability) 용지에 각 농도에 대해 그래프를 그려서 EC₅₀ 값을 구할 수 있다.

1.5 표준 절차를 사용하여 95 % 신뢰한계에서의 EC₅₀ 값을 결정할 수 있다. 결과는 1 이하, 1 ~ 10, 10 ~ 100 (단위 : mg/L) 등 크기의 순으로 놓는 게 바람직하다.

2. 결과의 해석

환경에서 일어나는 복잡한 상호작용을 실험실에서 정확히 반영할 수 없기 때문

에, EC_{50} 값은 활성슬러지 처리 또는 폐수 미생물에 대해 예상되는 시험물질의 독성에 대한 추정할 수 있는 참고자료로 이용한다.

3. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

3.3 시험물질

(1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

3.4 시험계 : 활성 슬러지의 출처, 농도, 전처리.

3.5 시험조건

(1) 시험 온도

(2) 시험 기간

(3) 대조물질과 대조물질의 EC_{50} 값

(4) 비생물적 산소 소모 (있는 경우)

3.6 시험결과

(1) 모든 측정 자료

(2) 억제 그래프 및 EC_{50} 계산 방법

(3) EC_{50} 값, 가능하다면 95 % 신뢰 한계에서의 EC_{20} 값 및 EC_{80} 값

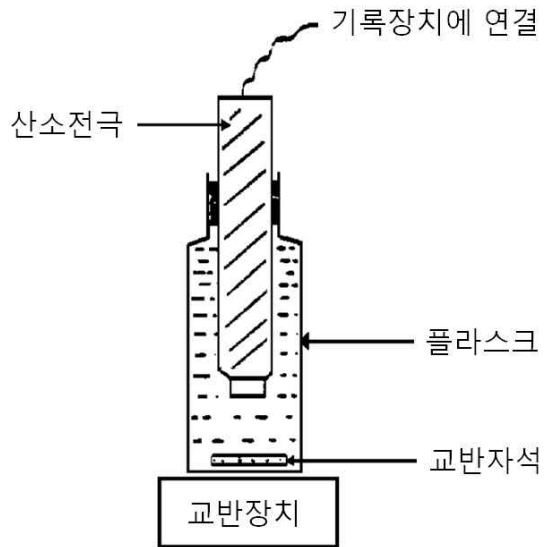
(4) 결과에 영향을 줄 수 있는 모든 관찰사항과 시험방법으로부터의 이탈 사항

주 1) 이 합성 하수 조제물의 농도는, OECD 기술 보고서인 “합성 세제용 계면활성제의 미생물분해도 결정을 위해 제시된 방법(1976.6.11)”에 기술된 농도보다 100 배가 높다. 여기에서는 K_2HPO_4 가 첨가되어 있다.

주 2) 합성 하수 조제물을 바로 사용하지 않는 경우, 성분의 변화가 없는 한 일주일 정

도 0 °C ~ 4 °C 암조건에서 보관할 수 있다. 조제물은 보관 이전에 멸균하거나 Peptone과 고기 추출물을 시험 직전에 첨가하여 사용할 수 있다. 사용 전에 완전히 혼합하고 pH를 조정한다.

별 첨



※ 상부의 공간이 없어야 하며, 탐침은 측정 플라스크의 목에 틈이 없도록 고정되어야 한다.

<그림> 측정장치도

제9항 어류 초기생장단계독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험방법은 화학물질에 대한 수서생물의 생장단계에 따른 독성영향을 평가하기 위해 어류의 생장 초기단계에 미치는 화학물질의 영향을 측정하는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

시험기간 중 대조군과 비교하여 시험물질이 유의한 정도($p < 0.05$)의 영향을 나타내는 것으로 관찰되는 농도 중 가장 낮은 시험물질의 농도

2.2 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

시험 기간 중 영향을 나타내지 않는 시험물질의 농도로서 LOEC의 바로 아래 값

2.3 유수식 시험(Flow-through test)

시험 기간 중 시험용액을 연속적으로 흘려주면서 새로 교환하는 시험

2.4 반지수식 시험(Semistatic test)

시험 기간 중 일정기간마다 시험용액을 새로 교환하는 시험

2.5 단위

농도는 중량/용량(mg/L)로 표시

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험에 대한 정보

시험물질에 대한 어류 급성독성값은 생육초기독성시험을 위한 유용한 정보가 될 수 있다. 특히 급성독성값이 본 시험에서와 동일 어종인 경우는 시험물질의 농도 설정에 도움이 된다. 이밖에 물질의 구조식, 순도, 물에 대한 용해도, 안정성, pK_a , P_{ow} 등도 시험에 유용한 정보이다.

1.2 장치 및 기구

1.2.1 시험용 수조 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기를 사용하는데 일반적으로 유리로 된 것을 사용한다.

1.2.2 온도제어 장치 : 시험에서의 설정 온도 범위에서 온도 편차를 $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 이내로 유지 한다.

1.2.3 pH 측정기

1.2.4 용존산소 측정기

1.2.5 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

1.3 희석수

1.3.1 양질의 천연수나 탈염소 처리한 수도수를 사용할 수 있다.

1.3.2 희석수의 수질은 다음의 기준을 넘지 않은 것을 사용한다.

총 유기탄소(Total organic carbon) 2 mg/L 이하, 비이온성 암모니아(Unionized ammonia) $1\text{ }\mu\text{g/L}$ 이하, 잔류염소 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ 이하

1.4 시험 어류

독성시험에 사용하는 어류는 담수 및 염수에 서식하는 어종 중에서 쉽게 구할 수 있고 경제적, 생태적 요인을 고려하여 결정한다. 시험어종은 다음에 추천된 종중에서 선택한다.

1.4.1 사용어종 및 시험(사육)온도

- (1) 송사리(*Oryzias latipes*, ricefish) : 담수, 24 °C ± 1 °C (수정란), 23 °C ± 1 °C (부화 후)
- (2) 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*, rainbow trout) : 담수, 10 °C ± 2 °C (수정란), 12 °C ± 2 °C (부화 후)
- (3) 북미산 잉어(*Pimephales promelas*, fathead minnow) : 담수, 25 °C ± 2 °C
- (4) 제브라피쉬(*Danio rerio*, zebra fish) : 담수, 25 °C ± 2 °C
- (5) 미노우(*Cyprinodon variegatus*, sheepshead minnow) : 염수, 25 °C ± 2 °C
- (6) 잉어(*Cyprinus carpio*, common carp) : 담수, 21 °C ~ 25 °C
- (7) 연어류(*Oncorhynchus kisutch*, coho salmon) : 담수, 10 °C (수정란), 12 °C (부화 후)
- (8) 연어류(*Oncorhynchus tshawytscha*, chinook salmon) :
담수, 10 °C (수정란), 12 °C (부화 후)
- (9) 연어류(*Salmo salar*, atlantic salmon) : 담수, 10 °C
- (10) 송어류(*Salmo trutta*, brown trout) : 담수 10 °C
- (11) 송어류(*Salvelinus fontinalis*, brook trout) : 담수, 10 °C
- (12) 송어류(*Salvelinus namaycush*, lake trout) : 담수, 12 °C ~ 18 °C
- (13) 블루길(*Lepomis macrochirus*, bluegill) : 담수, 21 °C ~ 25 °C
- (14) 얼룩메기(*Ictalurus punctatus*, channel catfish) : 담수, 26 °C
- (15) 대서양 실버사이드(*Menidia menidia*, atlantic silverside) : 염수 22 °C ~ 25 °C
- (16) 조수 실버사이드(*Menidia peninsulae*, tidewater silverside) : 염수 22 °C ~ 25 °C

1.4.2 수정란 채취

시험어류로부터 채란한 수정란은 비이커나 유리 페트리디쉬에 옮기고, 미수정란을 제거한 후 수조로 옮겨 시험에 사용한다.

2. 시험방법

2.1 원리

어류의 초기단계(수정란 단계)에서 일정농도의 시험물질에 노출시킨 후, 일정시간 동안의 치사영향, 발생장애, 기형 등을 관찰하고 대조군과 비교하여 시험물질에 대한 최소영향관찰농도, 무영향관찰농도 등을 평가한다.

2.2 시험

2.2.1 적어도 5 개 이상의 농도(대조군 제외)를 대수등 간격으로 정하는데 공비는 3.2를 초과하지 않도록 한다. 필요한 경우 예비시험 단계를 거쳐 농도범위를 보다 좁게 설정하여 시험할 수 있다. 농도범위는 급성독성시험 등의 자료를 토대로 처리군의 최고 농도가 LC₅₀ 값을 넘지 않도록 한다.

2.2.2 만일 시험물질 조제 시 유기용매나 분산제를 사용하는 경우는 원래의 대조군 외에 이들 물질이 포함된 유기용매 대조군(최고농도로 들어간 농도 기준)을 추가로 두어야 하며 유기용매 농도는 0.1 mL/L 이하가 되도록 한다.

2.2.3 한 농도 당 처리한 수정란의 수는 통계적으로 유의성을 나타낼 수 있도록 충분해야 하며, 처리군 당 수정란의 수는 동일하게 한다. 처리군 당 수정란의 수는 최소한 60 개 이상으로 하며, 동일 농도에서 2 개 이상의 반복수를 두도록 한다.

2.2.4 시험의 방법은 유수식 또는 일정시간에 용액을 갈아주는 반지수식 방법을 사용한다.

2.2.5 시험의 시작은 수정된 직 후부터 실시한다. 수정란의 배반구가 분할되기 직전 또는 바로 직후의 것들을 시험용액에 노출시킨다.

2.2.6 독성시험 기간은 수정란이 부화하고 대조군의 치어가 먹이를 공급하지 않아도 생존할 수 있는 정도의 기간을 최소 기간으로 한다. 따라서 시험기간은 시험어중에 따라 다를 수 있다. 노출 기간을 연장할 경우 먹이를 공급한다.

2.2.7 시험기간 동안 용존산소와 수온은 매일 측정하며, 경도와 pH는 시험시작과 종료 시 측정한다. 수온은 대조군의 한 수조에서 연속적으로 측정하는 것이 필

요하다. 한편 수정란 및 부화어의 상태는 매일 관찰하고 기록하며, 만일 치사 개체가 발견되면 즉시 제거한다.

2.2.8 수정란의 경우 알의 색깔이 불투명해지거나 배아 단계에서 심장박동이 정지하였을 경우 사망한 것으로 간주한다. 부화한 개체의 경우 호흡이 정지하거나 외부 자극에 대해 전혀 반응이 없는 것을 사망개체로 판정한다.

2.3 시험환경

2.3.1 수정란의 무게와 시험수의 비율은 0.5 g/L를 넘지 않도록 한다. 용존산소농도는 포화농도의 60 % 이하가 되지 않도록 유지한다.

2.3.2 시험물질을 처리한 후, 시험용액의 pH가 현저하게 변화할 시 시험목적에 따라 시험물질 용액의 pH를 염산 또는 수산화나트륨으로 조절할 수도 있다. 이때 대조군에도 동일한량을 첨가하여야 하며, pH를 조정할 때 시험물질의 농도가 변화한다거나 화학반응이 일어나서는 안된다.

2.3.3 광주기는 12 시간 ~ 16 시간(명) : 8 시간 ~ 12 시간(암) 으로 한다.

2.3.4 시험기간 동안 필요한 경우 먹이는 공급하되 시험어종의 발육단계에서 가장 적절한 먹이(예 : 송사리의 경우 알테미아)와 횡수로 공급한다.

2.3.5 시험온도는 시험어종의 적정 온도를 유지하도록 한다.

2.4. 조사항목

2.4.1. 수정란 발생단계

시험 시작 시 노출시킨 수정란의 배(Embryo) 발생단계를 가능한 한 정확하게 파악하도록 한다.

2.4.2. 부화와 생존율

24 시간 마다 생존개체와 부화여부를 관찰하여 정확히 기록하도록 한다. 사망한 수정란 및 치어는 즉시 제거함으로써 다른 개체에 영향을 주지 않도록 한다. 각 단계별 사망 기준은 다음과 같다.

- 수정란 : 탁해지고, 색깔의 변화가 있는 것

- 배 : 배 안에서 심장박동과 같은 움직임이 없는 것
- 치어 : 호흡 및 심장박동이 없거나 자극에 대해 반응이 없는 것

2.4.3. 비정상적 외형

외부 형태가 기형적인 개체를 기록하며 사망한 경우에만 수조에서 제거한다.

2.4.4. 비정상적 행동

시험기간 동안 비정상적 행동을 보이는 개체는 기록한다.

2.4.5. 무게

시험이 종료되면 모든 생존개체는 무게를 측정하는데 개체별로 측정하는 것이 바람직하나 무게 측정이 어려운 경우는 군별(시험용기별)로 측정할 수 있다. 무게는 건 중량으로 표시한다.

2.4.6. 길이

시험이 종료되면 각각의 생존 개체에 대해 전장(머리부터 꼬리지느러미까지)을 측정하는데, 만일 꼬리지느러미의 부식 또는 손상에 따른 이상이 발생할 경우 체장(머리부터 꼬리지느러미를 제외한 몸체길이)을 측정한다.

2.5 시험상의 유의사항

2.5.1 시험기간 중 시험물질 농도는 주기적으로 측정하여야 하는데 적어도 주 1 회의 분석치가 있어야 하고, 시험기간 동안 시험농도가 설정농도의 $\pm 20\%$ 이내로 유지되도록 한다(측정시의 수치가 설정 수치와 다를 경우 시험농도는 측정 수치를 적용한다).

2.5.2 시험 기간 중 대조군의 부화율은 최소 66 % 이상이 되도록 하고, 부화 개체의 경우 시험 종료 시까지 생존율이 가능한 한 70 %를 넘도록 한다.

2.5.3 유기용매 대조군에서의 영향이 대조군과 비교하여 유의한 차이가 있어서는 안 된다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 결과를 산출하도록 하며, 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질

(1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.4 시험종

(1) 학명

(2) 입수처

(3) 먹이 종류, 공급량, 공급 빈도 등

(4) 시험어류의 무게, 길이

(5) 시험시작시의 수정란 발달단계, 수집 및 수정란 취급방법

2.5 시험조건

(1) 시험과정(노출방법, 투여수정란 수, 반복수, 시험용액의 양 등)

(2) 희석수의 수질특성

(3) 시험기간 동안의 수질측정치

(4) 시험농도 및 시험물질 조제방법

(5) 시험용액의 상태(pH, 온도, 용존산소, 경도 등)

(6) 먹이 종류, 공급량, 공급방법 및 횟수

2.6 시험결과

(1) 시험과정에서 나타난 증상 및 관찰 사항

: 기형상태, 유영상태, 최초 부화시작 시기, 부화종료 시기

- (2) 대조군에서의 부화율 및 부화개체의 생존율
- (3) 각 노출 농도별 누적치사 개체수 및 누적치사율
- (4) 각 노출 농도별 부화율 및 부화 후 치어의 생존율
- (5) 시험 종료 후 생존개체의 체중 및 체장
- (6) 데이터의 통계분석 처리방법
- (7) 농도-반응 자료 및 그래프
- (8) 관찰무영향농도(NOEC)와 최소영향관찰농도(LOEC)
- (9) 시험과정에서 시험결과에 영향을 줄 수 있는 요인의 발생 여부

제10항 물벼룩류 생식능시험

I . 개요

1. 목적

본 시험의 목적은 물벼룩의 생식능력에 미치는 시험물질의 영향을 파악하는데 있다. 노출 기간 동안 시험군 모체에서 태어난 자손의 개체 수를 조사함으로써 해당 물질의 생식능에 대한 영향 여부를 파악할 수 있다. 이외에도 치사율, 최초 부화시기, 기타 독성 증상들을 대조군과 비교한다.

2. 정의

2.1 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

시험기간 동안 물벼룩 모체(Parent)의 사망 또는 생식능에 영향을 나타낼 수 있는 최소 농도. 즉, 최소영향관찰농도는 대조군과 비교해 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 처리군의 농도 중 최소값

2.2 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

최소영향관찰농도 바로 아래의 농도로서 물벼룩의 생식능에 영향을 주지 않는 최대값

2.3 영향농도(EC_x)

용량반응 관계에서 시험물질을 처리한 물벼룩의 생식능이 대조군에 비해 X %의 감소를 일으킬 수 있는 시험물질의 농도(예, EC₅₀ : 반수(50 %)영향농도)

2.4 검출한계(Limit of determination)

화학적 분석을 통해 검출은 가능하나 정량되지 않는 최저농도 수준

2.5 치사(Mortality)

시험기간 동안 관찰한 물벼룩이 수영능력이 없거나 움직임이 없는 상태를 말하며 물벼룩이 들어 있는 시험용기를 가볍게 움직인 후 15 초 이내에 움직임이 없을 경우 치사로 간주

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

1.1.1 시험용기 : 유리제 용기

1.1.2 항온장치 : 18 °C ~ 22 °C의 온도범위에서 유지될 것

1.1.3 pH 측정기

1.1.4 용존산소 측정기

1.1.5 경도를 측정할 수 있는 장치 및 기구

1.1.6 자동점멸장치

1.1.7 총유기탄소(TOC) 또는 화학적산소요구량(COD)를 측정할 수 있는 장치 및 기구

1.1.8 조도 측정 장치

1.1.9 기타 일반 실험실 장치 및 기구

1.2 희석수 및 배양액

1.2.1 생식능 시험에 사용하는 희석수는 배양액과 동일한 것을 사용한다.

1.2.2 물벼룩 배양액은 조성을 반드시 기재해야 하며, 반드시 검증된 것을 사용한다. 일반적으로 OECD 시험지침에서 사용이 권장되고 있는 M4 또는 M7 배양액을 사용한다(주 1). 한편 배양액의 총유기탄소(TOC) 값은 2 mg/L를 넘지 않게(먹이인 조류를 첨가하기 전 상태) 하는 것을 권장한다.

1.2.3 배양액 또는 희석수의 pH는 6.0 ~ 9.0, 경도는 80 mg/L(CaCO_3 로서) 이상, 용존산소는 3.0 mg/L를 유지하도록 하며, 사용하기 전에 24 시간 정도 폭기시킨다.

1.3 시험종 및 먹이

1.3.1 물벼룩 가운데 *Daphnia magna* 종을 사용한다.

1.3.2 출처가 명확하고 건강한 개체를 사용한다.

1.3.3 생후 24시간 미만의 어린 개체를 사용한다.

1.3.4 먹이는 *Selenastrum*, *Chlorella* 등과 같은 대수기의 녹조류를 배양하여 공급한다. M4 또는 M7 이외의 배양액을 사용하는 경우, 조류 외에 효모(Yeast) 등의 보조 먹이를 공급할 수 있다.

1.4 시험용액의 조제

1.4.1 시험물질은 배양액에 용해 또는 분산시켜 사용한다.

1.4.2 시험물질이 비수용성이거나 수용해도가 낮은 경우는 농축액(stock solution) 제조 시 유기용매 또는 분산제를 사용할 수 있다. 유기용매(acetone, ethanol, methanol, triethylene glycol, dimethylformamide, DMSO) 등을 사용할 수 있으며, 분산제의 경우는 cremophor RH40, methylcellulose 0.01 % 또는 HCO-40 등을 사용할 수 있다. 용매나 분산제는 가능한 한 시험용액의 0.01 %(v/v)를 넘지 않도록 한다.

2. 시험방법

2.1 원리

시험물질에 물벼룩을 21 일 동안 노출하여 물벼룩의 생식능에 영향을 나타내는 농도(예 EC₁₀, EC₅₀ 등)를 산출하며, 아울러 생식능에 영향을 나타내지 않는 무영향관찰농도(NOEC) 또는 영향을 나타내는 농도 가운데 최소영향관찰농도(LOEC)를 구한다.

2.2 시험

2.2.1 총 시험기간은 21 일로 하며, 시험물질의 노출은 반지수식 또는 유수식 방법을 사용한다.

2.2.2 반지수식 시험의 경우, 대조군 또는 처리군 당 10 마리의 물벼룩을 사용하는데 시험용액이 담긴 각 수조 당 1 개체씩 투여한다(대조군 및 시험물질 농도 당 10 개의 반복구). 유수식 시험의 경우는 대조군 또는 처리군당 20 마리 ~ 40 마리를 사용하며, 4 개의 반복구를 둔다(예, 40 마리의 경우 10 마리씩 4 개의 반복구, 20 마리의 경우 5 마리씩 4 개의 반복구를 설정).

2.2.3 수조 내 시험용액의 양은 일반적으로 30 mL ~ 100 mL 범위를 두도록 하며, 시험용액의 화학적 분석 등을 고려하여 용액의 양을 보다 증가시킬 수 있다.

2.2.4 시험농도의 범위는 물벼룩 급성독성시험 결과 등 사전 독성정보를 참조하여 설정한다. 농도는 최소한 5 개 이상의 농도(대조군 제외)를 대수등간격으로 설정하며, 이때 공비가 3.2를 초과하지 않도록 한다.

2.2.5 시험용액 조제 시 용매 또는 분산제를 사용한 경우, 대조군 외에 용매 또는 분산제 대조군을 추가로 두도록 한다. 이때 첨가되는 용매 또는 분산제의 양은 시험군 중 최고 농도군에 첨가되는 용매 또는 분산제의 양과 동일하게 처리한다.

2.2.6 무영향관찰농도(NOEC) 또는 최소영향관찰농도(LOEC)를 도출하기 위해서는 최저농도에서의 산란능이 대조군 보다 유의하게 낮지 않도록 최저농도를 설정하며, 반면 최고농도는 산란능이 대조군 보다 유의하게 낮은 수준으로 관찰될 수 있는 농도가 되도록 설정한다.

2.2.7 생식능에 대한 영향농도(EC_x) 값을 산출하기 위해서 최고농도는 예측되는 영향농도 보다 충분히 높도록 설정한다.

2.2.8 반지수식 시험의 경우, 시험용액의 교환은 시험물질의 안정도(Stability)에 따라 교환주기를 달리할 수 있으나, 일주일에 최소한 3 회 이상을 교환하도록 한다. 한편 시험물질의 안정도가 낮다고 판단되는 경우, 시험용액은 매일 갈아주도록 하며, 가능한 경우 반지수식 보다는 유수식 시험을 실시하는 것이 바람직하다.

2.2.9 시험용액의 교환 시에는 새로 교환할 시험용액을 미리 준비한 후 유리피펫을 사용하여 갈아주려는 새로운 시험용액이 담긴 수조로 물벼룩을 조심스럽게

옮겨준다. 이때 피펫을 통해 물벼룩과 함께 옮겨지는 시험용액의 양은 최소화한다.

2.2.10 관찰은 매일 실시하는데 모체로부터 태어난 자손 개체수를 반드시 측정하고, 그 후 시험용액으로부터 제거한다. 측정되는 자손 개체수는 살아있는 것을 기준으로 하며, 부화되지 않은 알 또는 죽은 개체의 숫자도 별도로 기록해 둔다. 관찰 결과는 빠짐없이 기록한다.

2.2.11 최초로 생산된 자손 수와 출생 시기를 기록한다.

2.2.12 사망한 모체 물벼룩의 수도 매일 관찰하고 기록한다.

2.2.13 생식능 외에 필요한 경우 기타 항목들을 측정할 수 있다. 예를 들어 시험 종료 후에 모체의 체장(Anal spine을 제외한 몸통 길이)을 측정하여 기록한다. 그 밖에 포낭 속 알의 존재, 수컷 혹은 내구란(Ephippia)을 출현 여부 및 이들 숫자를 파악하여 기록한다.

2.2.14 시험물질이 불안정하다고 판단되는 경우, 시험용액내의 농도를 일정 간격을 두고 측정한다. 이때 시험기간 동안 시험물질의 농도는 초기농도의 80 % 이상을 유지하도록 한다.

2.3 시험환경

2.3.1 시험용액의 pH, 용존산소, 수온, 경도 등을 주기적으로 측정하며, 최소한 1 주일에 1 회 정도 실시한다.

2.3.2 시험기간 동안 조명은 명 : 암 = 16 시간 : 8 시간을 유지하도록 하며, 광도는 $15 \text{ uE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \sim 20 \text{ uE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 범위를 유지하도록 한다.

2.3.3 시험용액의 노출은 $18^\circ\text{C} \sim 22^\circ\text{C}$ 온도 범위 내에서 실시하며, 온도의 변화는 2°C 이내를 유지하도록 한다(예, $18^\circ\text{C} \sim 20^\circ\text{C}$, $19^\circ\text{C} \sim 21^\circ\text{C}$, $20^\circ\text{C} \sim 22^\circ\text{C}$).

2.3.4 시험 도중에는 폭기하지 않는다.

2.3.5 먹이는 매일 공급하는 것을 원칙으로 하되, 일주일에 최소한 3회 이상 공급한다. 먹이는 대수기의 녹조류(*Selenastrum* 또는 *Chlorella*)를 충분히 공급한다.

2.4 시험상의 유의사항

2.4.1 대조군에서 물벼룩 모체의 사망율은 시험종료시까지 20 %를 초과하지 않아야 한다.

2.4.2 대조군에서 시험종료 시까지 물벼룩 각 모체에서 생산되는 자손의 평균 개체수는 60 마리 이상을 유지하여야 한다.

2.4.3 시험물질을 흡착할 가능성이 있으므로 물벼룩의 먹이를 지나치게 과량으로 공급하지 않아야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

본시험 종료 후 적당한 통계적 방법을 사용하여, 무영향관찰농도 또는 최소영향관찰농도 및 영향농도를 95 %에서의 신뢰구간에서 구하며, 보고서에는 통계적 방법이 명시되어야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질

(1) 명칭 (일반명, 상품명 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 화학물질의 특성 자료

2.4 시험종

(1) 학명

(2) 입수처

(3) 사육방법 (먹이의 종류, 공급횟수 등)

2.5 시험조건

(1) 시험과정 (노출방법, 사용마리 수, 반복 수, 시험용액의 양 등)

(2) 첨가물의 사용여부와 농도

(3) 배양액 및 희석수의 수질특성(경도, pH, 알칼리도 등)

(4) 시험온도

(5) 광도, 광의 종류 및 광주기

(6) 시험기간 동안의 수온, pH 및 용존산소농도 (가능하면 표로 만들 것)

(7) 시험용액에서 시험물질의 농도와 측정날짜

(8) 먹이의 종류, 공급량 및 공급 빈도

2.6 시험결과

(1) 시험물질의 영향을 받은 물벼룩의 수와 퍼센트

(2) 적용한 통계적 과정의 설명 및 근거

(3) 기타 시험과정에서 관찰된 이상 현상

(4) 유영저해와 생식능 감소에 대한 각각의 EC_x(최소 7 일에 1 회 및 시험종료시기), 95 % 신뢰구간, 통계적 과정

(5) 각각의 농도에서 첫 번째 자손 생산이 이루어진 시간

(6) 24 시간 마다 생산된 살아있는 자손 개체 수

(7) 부화하지 못한 알의 수, 출생하였으나 사망한 자손 개체의 수
(매일 측정)

(8) 시험기간 동안 사망한 모체 물벼룩의 수

(9) 시험기간 동안 나타난 생식능에 대한 무영향관찰농도 또는 최소영향관찰농도

(10) 농도-반응 그래프

주1) 물벼룩 배양액(M4 및 M7)의 조성

1) M4 또는 M7 배양액 조제

각 농축액 (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 증류수*)	농축도(배)	M4 또는 M7 배양액**을 조제하기 위한 각 농축액의 첨가량 (mL/L, 증류수*)	
			M4 배지 경우	M7 배지 경우
1) 농축액 I	-	20	50	50
2) CaCl ₂ ·2H ₂ O	293,800	1,000	1.0	1.0
3) MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,600	2,000	0.5	0.5
4) KCl	58,000	10,000	0.1	0.1
5) NaHCO ₃	64,800	1,000	1.0	1.0
6) Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	50,000	5,000	0.2	0.2
7) NaNO ₃	2,740	10,000	0.1	0.1
8) KH ₂ PO ₄	1,430	10,000	0.1	0.1
9) K ₂ HPO ₄	1,840	10,000	0.1	0.1
10) Vitamin 농축액	-	10,000	0.1	0.1
Thiamine hydrochloride	750	10,000	3가지 vitamin을 하나의 증류수에 용해시켜 “Vitamin 농축액”을 제 조한다.	
Cyanocobalamine (B ₁₂)	10	10,000		
Biotin	7.5	10,000		

* 증류수는 멸균 증류수를 사용한다.

** 각 농축액을 일정 비율로 섞은 후 M4 또는 M7 배양액을 제조한다.

2) 농축액 I 조제

각 농축액 (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 증류수*)	농축도(배) - M4 기준 -	농축액 I을 조제하기 위한 각 농축액의 첨가량(mL/L, 증류수*)	
			M4 배지 경우	M7 배지 경우
H ₃ BO ₃	57,190	20,000	1.0	0.25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7,210	20,000	1.0	0.25
LiCl	6,120	20,000	1.0	0.25
RbCl	1,420	20,000	1.0	0.25
SrCl ₂ ·6H ₂ O	3,040	20,000	1.0	0.25
NaBr	320	20,000	1.0	0.25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,230	20,000	1.0	0.25
CuCl ₂ ·2H ₂ O	335	20,000	1.0	0.25
ZnCl ₂	260	20,000	1.0	1.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200	20,000	1.0	1.0
KI	65	20,000	1.0	1.0
Na ₂ SeO ₃	43.8	20,000	1.0	1.0
NH ₄ VO ₃	11.5	20,000	1.0	1.0
Fe-EDTA 용액		1,000	20.0	5.0
Na ₂ EDTA ₂ H ₂ O FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,000 1,991	2,000 2,000	2 가지 농축액을 1 : 1의 비율로 혼합하여 멸균하여 Fe-EDTA 용 액을 제조한다	

*증류수는 멸균 증류수를 사용한다.

제11항 어류배아 및 난황단계 치어 독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 수서생물의 초기 성장단계에 대한 영향을 단기간에 평가하기 위해 어류의 수정란부터 부화 직후까지 기간 동안 화학물질의 영향을 평가하는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1. 배아(Embryo)

수정란이 분열하여 발생이 진행된 후부터 부화 직전까지 단계의 개체

2.2. 난황단계 치어(Sac fry)

부화가 된 후 난황이 흡수되기 전까지 단계의 어류 개체

2.3. 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

시험기간 중 대조군과 비교하여 시험물질이 유의한 정도($p < 0.05$)의 영향을 나타내는 것으로 관찰되는 농도 중 가장 낮은 시험물질의 농도

2.4. 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

시험 기간 중 영향을 나타내지 않는 시험물질의 농도로서 LOEC의 바로 아래 단계의 농도

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험에 대한 정보

시험물질에 대한 어류 급성독성 값은 배아독성시험을 위한 유용한 정보가 될 수 있다. 특히 급성독성 값이 본 시험에서와 동일 어종에서 얻어진 경우는 시험물질의 농도설정에 도움이 된다. 이밖에 물질의 구조식, 순도, 물에 대한 용해도, 증기압, 안정성, pK_a , P_{ow} 및 생분해성 등도 시험에 유용한 정보이다.

1.2. 장치 및 기구

1.2.1. 시험용 수조 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기를 사용하는데 일반적으로 유리로 된 것을 사용한다.

1.2.2. pH 측정기

1.2.3. 용존산소 측정기

1.2.4. 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

1.3. 시험 어류

시험에 사용하는 어류는 아래의 어종 중에서 선택하는 것을 원칙으로 한다. 그 외의 어종을 시험어류로 사용할 수도 있으나, 선택사유 및 시험에 사용하는데 적절한 어종임을 증명할 수 있는 자료를 제시하도록 한다.

1.3.1. 사용어종, 시험(사육)온도 및 광주기

추천어종	시험수	시험온도 범위(℃)	광주기(hr)
송사리 (<i>Oryzias latipes</i> , ricefish)	담수	24 ± 1(수정란), 23 ± 1(부화후)	12 ~ 16(명) : 12 ~ 8(암)
잉어 (<i>Cyprinus carpio</i> , common carp)	담수	21 ~ 25	12 ~ 16(명) : 12 ~ 8(암)
무지개송어 (<i>Oncorhynchus mykiss</i> , rainbow trout)	담수	10 ± 2(수정란), 12 ± 2(부화후)	수정란, 배아시기 및 부화 후 일주일 동안은 암조건 유지
복미산 잉어 (<i>Pimephales promelas</i> , fathead minnow)	담수	25 ± 2	16(명) : 8(암)
제브라피쉬 (<i>Danio rerio</i> , zebra fish)	담수	25 ± 2	12 ~ 16(명) : 12 ~ 8(암)
금붕어 (<i>Carrassius auratus</i> , goldfish)	담수	24 ± 1	12 ~ 16(명) : 12 ~ 8(암)
블루길 (<i>Lepomis macrochirus</i> , bluegill)	담수	21 ± 1	16(명) : 8(암)
조수실버사이드 (<i>Menidia peninsulae</i> , tidewater silverside)	염수(15 ‰ ~ 22 ‰)	22 ~ 25	12(명) : 12(암)
청어 (<i>Clupea harengus</i> , herring)	염수(8 ‰ ~ 15 ‰)	10 ± 1	12(명) : 12(암)
대구 (<i>Gadus morhua</i> , cod)	염수(5 ‰ ~ 30 ‰)	5 ± 1	12(명) : 12(암)
양두모치 (<i>Cyprinodon variegatus</i> , sheepshead minnow)	염수(15 ‰ ~ 30 ‰)	25 ± 2	12(명) : 12(암)

1.3.2. 수정란 채취

시험어류로부터 채취한 수정란은 비이커나 유리 페트리디쉬에 옮기고, 미수정란을 제거한 후 수조로 옮겨 시험에 사용한다.

1.4. 사육수 및 희석수

1.4.1. 사육수와 시험용액 조제에 사용하는 희석수는 동일한 것을 사용한다. 양질의 천연수나 탈염소 처리한 수도수를 사용할 수 있다.

1.4.2. pH 변화는 ± 0.5 범위 이내가 되어야 한다.

1.4.3. 중금속(예: Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), 주요 음이온 및 양이온 (예 : Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), 살충제 (예. 유기인계 또는 유기염소계 살충제), 총유기탄소(TOC) 및 부유물질(SS)에 대한 측정을 주기적으로 실시하여 사육수의 수질이 일정하게 유지되고 있음을 확인한다.

1.4.4. 수질은 다음의 기준을 넘지 않은 것을 사용한다.

부유물질 20 mg/L 이하, 총유기탄소(Total organic carbon) 2 mg/L 이하, 비이온성 암모니아(Unionized ammonia) 1 µg/L 이하, 잔류염소 10 µg/L 이하, 총 유기인계 살충제 50 ng/L 이하, 총 유기염소계 살충제(PCB 포함) 50 ng/L 이하, 총 유기염소 25 ng/L 이하

2. 시험방법

2.1. 원리

어류의 초기단계(수정란 단계)에서 일정농도의 시험물질에 노출시킨 후, 배아(Embryo) 시기와 부화 직후의 난황단계 치어(Sac fry)에서의 치사영향, 발생장애, 기형 등을 관찰하고, 대조군과 비교하여 시험물질에 대한 최소영향관찰농도(LOEC) 및 무영향관찰농도(NOEC) 등을 산출한다. 시험물질의 노출은 시험군 수정란부터 부화한 치어 개체의 난황이 완전히 흡수되기 직전 또는 대조군의 치어가 먹이 공급없이 생존 가능한 기간 동안 실시한다.

2.2. 시험

2.2.1. 시험에 사용되는 수정란은 수정된지 30 분 이내의 것을 사용하는 것이 가장 적합하다. 가능한 한 시험의 시작은 포배기 분할시점(Blastodisc cleavage stage) 전 또는 직후의 수정란을 사용하도록 하며, 적어도 낭배기(Gastrula stage) 직전의 수정란을 시험에 사용하도록 한다. 시험물질의 감도에 영향을 줄 있으므로 수정 후 최대 8 시간 이내의 것을 사용해야 한다.

2.2.2. 시험기간은 대조군 또는 처리군에서 부화한 Larvae 개체의 난황이 완전히 흡수된 것이 최초로 관찰되었을 때 종료시기를 그 직전까지로 한다. 또는 대조군의

치어가 먹이 공급 없이 생존할 수 있는 최대기간 동안 시험을 실시한다.

2.2.3. 시험물질의 한 농도 당 수정란 수는 통계적으로 유의성을 나타낼 수 있도록 충분해야 하며, 대조군 및 농도 당 수정란의 수는 동일하게 한다. 농도 당 수정란의 수는 최소한 30 개 이상으로 하며, 동일 농도에서 3 개 이상의 반복군을 두도록 한다.

2.2.4. 시험용액은 시험물질 농축용액(Stock solution)을 조제한 후, 희석수로 재차 희석하여 조제한다. 가능한 한 시험물질은 용해도 이내에서 조제하며, 용매나 분산제 등 보조제의 사용은 자제하도록 한다. 만일 시험물질 조제시 유기용매(Ethanol, Methanol, Acetone, Dimethylformamide, Triethyleneglycol) 또는 분산제(Cremophor RH40, Tween80, 0.01 % Methylcellulose, HCO-40)를 사용하는 경우는 원래의 대조군 외에 이들 물질이 포함된 용매대조군(최고농도로 들어간 농도 기준)을 추가로 두어야 한다. 보조제는 대조군 또는 처리군에서 0.1 mL/L 이하의 농도가 되도록 한다.

2.2.5. 적어도 5 개 이상의 농도(대조군 제외)를 대수 등간격으로 정하는데 공비는 3.2를 초과하지 않도록 한다. 필요한 경우 예비시험 단계를 거쳐 농도범위를 보다 좁게 설정하여 시험할 수 있다. 농도범위는 급성독성시험 등의 자료를 토대로 가능한 한 처리군의 최고 농도가 반수치사농도(LC₅₀)값을 넘지 않도록 한다.

2.2.6. 시험물질의 노출방법은 유수식 또는 일정시간에 용액을 교환하는 반지수식 방법을 사용한다. 유수식의 경우, 시험물질 농축액과 희석수의 유속을 주기적으로 점검하여 유속의 변동범위가 10 %를 넘지 않도록 한다. 반지수식의 경우, 24 시간마다 교환하는 것을 원칙으로 하되 시험물질의 안정성에 따라 교환주기를 조절할 수 있다. 교환량은 적절하게 조절할 수 있는데 일반적으로 시험용액의 3/4을 교환한다.

2.2.7. 시험기간 동안 용존산소와 수온은 매일 측정하며, 경도와 pH는 시험시작과 종료 시 측정한다. 수온은 대조군의 한 수조에서 연속적으로 측정하는 것이 필요하다. 한편 수정란 및 부화어의 상태는 매일 관찰하고 기록하며, 만일 치사 개체가 발견되면 즉시 제거한다.

2.2.8. 수정란의 경우 알의 색깔이 불투명해지거나 배아 단계에서 심장박동이 정지하였을 경우 사망한 것으로 간주한다. 부화한 개체의 경우 호흡이 정지하거나 외부 자극에 대해 전혀 반응이 없는 것을 사망개체로 판정한다.

2.3. 시험환경

2.3.1. 수정란의 무게와 시험수의 비율은 0.5 g/L를 넘지 않도록 한다. 용존산소농도는 포화농도의 60 % 이하가 되지 않도록 유지한다.

2.3.3. 광주기는 12 시간 ~ 16 시간(명) : 8 시간 ~ 12 시간(암) 범위로 시험어종에 적절한 주기를 유지하도록 한다.

2.3.4. 시험기간 동안 먹이는 공급하지 않는다.

2.3.5. 시험온도는 시험어종의 적정 온도를 유지하도록 하되 시험 수조 사이의 온도 차이와 매일 측정되는 온도차이가 각각 $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 를 넘지 않도록 한다.

2.4. 조사항목

2.4.1. 수정란 발생단계

시험 시작 시 노출시킨 수정란의 배아 발생단계를 가능한 한 정확하게 파악하도록 한다.

2.4.2. 부화와 생존율

24 시간 마다 생존개체와 부화여부를 관찰하여 정확히 기록하도록 한다. 사망한 수정란 및 치어는 즉시 제거함으로써 다른 개체에 영향을 주지 않도록 한다. 각 단계별 사망 기준은 다음과 같다.

- 수정란 : 탁해지고, 색깔의 변화가 있는 것
- 배아 : 배아 안에서 심장박동과 같은 움직임이 없는 것
- 치어 : 호흡 및 심장박동이 없거나 자극에 대해 반응이 없는 것

2.4.3. 비정상적 외형

외부 형태가 기형적인 개체를 기록하며 사망한 경우에만 수조에서 제거한다.

2.4.4. 비정상적 행동

시험기간 동안 비정상적 행동을 보이는 개체는 기록한다. 예로 과호흡, 비정상적 유평 또는 운동정지 등은 시험기간에 따라 일정 기간을 두고 계속해서 기록하도록 한다.

2.4.5. 무게

시험이 종료되면 모든 생존개체는 무게를 측정하는데 개체별로 측정하는 것이 바람직하나 무게 측정이 어려운 경우는 군별(시험용기별)로 측정할 수 있다. 무게는 건당 중량으로 표시한다.

2.4.6. 길이

시험이 종료되면 각각의 생존 개체에 대해 전장(머리부터 꼬리지느러미까지)를 측정하는데, 만일 꼬리지느러미의 부식 또는 손상에 따른 이상이 발생할 경우 체장(머리부터 꼬리지느러미를 제외한 몸체길이)를 측정한다.

2.4.7. 기타 다음 사항들을 관찰하도록 한다.

- (1) 누적 치사율
- (2) 시험 종료 시 건강한 치어의 수
- (3) 최초 부화시작 시기 및 부화종료 시기
- (4) 각 시험군의 24 시간 마다 부화 개체수

2.5. 시험상의 유의사항

2.5.1. 시험기간 중 시험물질 농도를 측정하는 경우, 반지수식시험에서는 교환 직전과 직후에 시험용액으로부터 분석하며, 유수식시험에 대해서는 최소한 주 1 회 분석한다. 시험물질의 측정은 적어도 최저, 최고농도 및 중간농도의 시험용액에 대해 분석한다. 시험기간 동안 시험농도가 설정농도의 $\pm 20\%$ 이내로 유지될 경우, 시험농도는 최초 설정농도 또는 측정농도를 사용한다. 반면 $\pm 20\%$ 를 벗어나는 경우, 시험농도는 측정 수치를 적용한다.

2.5.2. 시험 기간 중 대조군의 부화율은 시험어중에 따라 다르나 최소 60 % ~ 80 % 이상이 되도록 하고, 부화 개체의 경우 시험 종료 시까지 생존율이 60 % ~ 90 % 이상 되도록 한다.

- (1) 송사리(*Oryzias latipes*) : 부화율 80 %, 부화 후 생존율 80 %

- (2) 잉어(*Cyprinus carpio*) : 부화율 80 %, 부화 후 생존율 75 %
 - (3) 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) : 부화율 66 %, 부화 후 생존율 70 %
 - (4) 북미산 잉어(*Pimephales promelas*) : 부화율 60 %, 부화 후 생존율 70 %
 - (5) 제브라피쉬(*Danio rerio*) : 부화율 80 %, 부화 후 생존율 90 %
 - (6) 금붕어(*Carrassius auratus*) : 부화율 60 %, 부화 후 생존율 80 %
 - (7) 블루길(*Lepomis macrochirus*) : 부화율 60 %, 부화 후 생존율 75 %
 - (8) 조수 실버사이드(*Menidia peninsulae*) : 부화율 80 %, 부화 후 생존율 60 %
 - (9) 청어(*Clupea harengus*) : 부화율 60 %, 부화 후 생존율 80 %
 - (10) 대구 (*Gadus morhua*) : 부화율 60 %, 부화 후 생존율 80 %
 - (11) 양두모치(*Cyprinodon variegatus*) : 부화율 75 %, 부화 후 생존율 80 %
- 2.5.3. 유기용매 대조군에서의 영향이 희석수만 첨가한 대조군과 비교해 유의한 차이가 있어서는 안 된다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 결과를 산출하도록 하며, 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3. 시험물질

- (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)
- (2) 입수처, 입수일
- (3) 순도 또는 불순물

2.4. 시험종

- (1) 학명
- (2) 입수처
- (3) 먹이 종류, 공급량, 공급 빈도 등
- (4) 시험어류의 무게, 길이
- (5) 시험시작시의 수정란 발달단계, 수집 및 수정란 취급방법

2.5. 시험조건

- (1) 시험과정(노출방법, 투여수정란 수, 반복수, 시험용액의 양 등)
- (2) 희석수의 수질특성(pH, 온도, 용존산소, 경도 등)
- (3) 시험물질 농도 및 시험물질 조제방법
- (4) 시험용액의 상태(pH, 온도, 용존산소, 경도 등)
- (5) 먹이 종류, 공급량, 공급방법 및 횟수

2.6. 시험결과

- (1) 시험과정에서 나타난 증상 및 관찰 사항
: 기형상태, 유영상태, 최초 부화시작 시기, 부화종료 시기
- (2) 대조군에서의 부화율 및 부화개체의 생존율
- (3) 각 노출 농도별 누적치사 개체수 및 누적치사율
- (4) 각 노출 농도별 부화율 및 부화 후 치어의 생존율
- (5) 시험종료 후 생존개체의 체중 및 체장
- (6) 데이터의 통계분석 처리방법
- (7) 농도-반응 자료 및 그래프
- (8) 무영향관찰농도(NOEC)와 최소영향관찰농도(LOEC)
- (9) 회기 방법을 사용하는 시험 분석의 경우, LC/ECx 및 신뢰구간(confidence interval) 및 계산에 사용된 적합한 모델의 그래프

애보트의 식(Abbott's formula)을 이용하여 수정란 또는 부화 개체의 생존율(%)을 계산하고, 이를 대조군과 비교하여 보정한다.

$$P=100-\left[\frac{C-P'}{C} \times 100\right]$$

P = 보정된 생존율(%)

P' = 시험 농도군에서 생존율(%)

C = 대조군에서의 생존율(%)

생존율을 토대로 치사농도(LC)를 적절한 통계방법을 사용해 산출하며, 부화율, 기형발생 등의 영향에 대한 영향농도(EC)를 산출한다.

(10) 시험과정에서 시험결과에 영향을 줄 수 있는 요인의 발생 여부

제12항 어류 유생성장시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 장기간 노출이 어류 유생에 미치는 독성영향을 평가하는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1. 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

시험기간 중 대조군과 비교하여 시험물질이 유의한 정도 ($p < 0.05$)의 영향을 나타내는 것으로 관찰되는 농도 중 가장 낮은 시험물질의 농도

2.2. 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

시험 기간 중 영향을 나타내지 않는 시험물질의 농도로서 LOEC의 바로 아래 값

2.3. 영향농도(EC_x)

조군과 비교하여 어류성장에 있어서 x %의 변화를 일으키는 시험물질의 농도

2.4 어류 개체별 성장률(Individual fish specific growth rate)

개별 개체의 초기무게에 기초한 성장률

2.5 수조에서의 평균성장률(Tank-average specific growth rate)

각 농도의 수조 당 전체 개체의 평균 성장률

2.6 가성장률(Pseudo specific growth rate)

수조 내 개체군의 초기 무게 평균값에 기초한 각 개체별 성장률

2.7 유생 (Juvenile)

본 시험에 사용되는 유생은 부화후 지수성장기에 있는 개체들로 1.4.1항의 무게 조건에 맞는 개체 사용

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험에 대한 정보

해당 시험물질에 대해 동일 어종으로 시험한 급성독성시험 결과는 유생성장시험을 위한 유용한 정보가 될 수 있다. 이밖에 물질의 구조식, 순도, 수용해도, 증기압, 광안정성, pK_a , P_{ow} 및 생분해성 등도 시험에 유용한 정보이다.

1.2. 장치 및 기구

- 1.2.1. 시험용 수조 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기를 사용하며 시험조건에 적합한 충분한 크기의 수조를 사용한다.
- 1.2.2. 용존산소 및 pH 측정기
- 1.2.3. 경도 및 알칼리도 측정기
- 1.2.4. 온도 조절 및 지속적인 모니터링을 위한 장치
- 1.2.5. 정확도를 갖춘 정밀저울
- 1.2.6. 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

1.3. 사육수 및 희석수

- 1.3.1. 사육수와 시험용액 조제에 사용하는 희석수는 어류의 장기간 생존과 생장이 가능한 것을 사용해야 하며, 시험기간 동안 균일한 수질을 유지해야 한다.
- 1.3.2. pH는 6.5에서 8.5 사이로 유지되어야 하며, pH 변화는 ± 0.5 pH 범위 이내가 되어야 한다. 경도는 140 mg/L (CaCO_3)이상이 적합하다.
- 1.3.3. 중금속 (예 : Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), 주요 음이온 및 양이온 (예 : Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), 살충제 (예. 유기인계 또는 유기염소계 살충제), 총유기탄소 (TOC) 및 부유물

질 (SS)에 대한 측정을 주기적으로 실시하여 사육수의 수질이 일정하게 유지되고 있음을 확인한다.

1.3.4. 사육수 및 희석수의 수질은 아래 표에서 제시된 기준을 넘지 않는 것을 사용한다.

항목	기 준 치
입자물질	< 20 mg/L
총유기탄소 (Total organic carbon)	< 2 mg/L
비이온성 암모니아 (Unionized ammonia)	< 1 μ g/L
잔류염소	< 10 μ g/L
총 유기인계 살충제	< 50 ng/L
총 유기염소계 살충제 (PCB 포함)	< 50 ng/L
총 유기염소	< 25 ng/L

1.4. 시험 어류 및 조건

1.4.1. 시험에 사용하는 어종은 무지개송어를 사용하는 것이 권장되나 아래 표에 제시된 다른 종을 사용할 수 있다. 이처럼 다른 종을 사용하는 경우 합당한 근거를 제시하도록 한다.

종	시험 온도범위 (°C)	광주기 (hr)	^a 초기 개체 무게 (g)	적정 개체량 (g/L)	적정 개체수 (마리/L)
송사리 (<i>Oryzias latipes</i> , ricefish)	21 ~ 25	12 ~ 16	0.050 ~ 0.100	0.2 ~ 1.0	5 ~ 20
무지개송어 (<i>Oncorhynchus mykiss</i> , rainbow trout)	12.5 ~ 16.0	12 ~ 16	1 ~ 5	1.2 ~ 2.0	4
제브라피시 (<i>Danio rerio</i> , zebrafish)	21 ~ 25	12 ~ 16	0.050 ~ 0.100	0.2 ~ 1.0	5 ~ 10

^a 시험물질 노출시에 사용되는 시험개체의 권장무게 범위

1.4.2. 어류의 순화

시험에 사용하는 어류는 동일 모체에서 산란된 개체군에서 선택하여 사용하는 것이 바람직하다. 시험 전에 최소 2 주간 시험조건과 유사한 수질과 조도 환경에

서 순화시켜야 한다. 사육 기간 및 시험 기간 중 하루에 공급하는 먹이의 최소 공급량은 어류 무게의 2 %가 되도록 하며, 가급적 4 %를 공급하는 것이 바람직하다. 순화를 시작한지 48 시간 후부터 치사어를 관찰 및 기록하여 다음의 기준에 따라 처리한다.

- ① 7 일 안에 치사율이 10 % 이상이면 사용군 전부를 폐기한다.
- ② 치사율이 5 % ~ 10 % 이면 다시 7 일간 더 사육한 후 판정한다. 이때 치사율이 5 % 이상이면 사용군 전부를 폐기한다.
- ③ 치사율이 5 % 이하이면 시험에 사용한다.

시험전 2 주 동안과 시험 기간 동안 시험 개체의 질병을 치료해서는 안 된다.

2. 시험방법

2.1. 원리

지수 성장기의 치어 무게를 측정된 후 아치사 (Sublethal) 농도 범위의 시험용액에 시험개체를 28 일간 노출시킨다. 이때 유수식 시험계를 사용하는 것이 바람직하나 그렇지 못한 경우 반지수식 시험계를 사용하여 노출한다. 먹이는 매일 공급하며, 먹이량은 시험개체의 초기 무게를 기준으로 결정하고, 14 일후에 재산정하여 공급한다. 시험이 종료된 후에는 시험개체 무게를 다시 측정한다. 성장률에 x %의 변화 (즉, EC_x : EC₁₀, EC₂₀ 또는 EC₃₀)를 가져오는 농도를 평가하기 위해 회귀 모형을 사용하여 성장률에 대한 영향을 분석한다. 다른 방법으로는 대조군과 비교하여 LOEC와 NOEC를 산출할 수도 있다.

2.2. 시험

2.2.1. 본 시험에 사용되는 시험어 각 개체의 무게는 평균 무게의 $\pm 10\%$ 를 넘지 않는 것이 이상적이며, 어떤 경우에도 개체간 차이가 25 %보다 크면 안 된다. 시험개체의 크기는 각 중별 권장되는 범위를 참고하여 선택한다.

2.2.2. 시험 24 시간 전에는 먹이를 공급하지 않는다. 시험에 사용하고자 하는 단일 군체에서 개체들을 임의로 선택하여, 일반 마취액 (예, 100 mg/L의 Tricaine

methane sulphonate (MS 222) 희석액에 두 배량의 Sodium bicarbonate를 첨가하여 중화시킨 것)으로 마취시킨 후, 표면의 물기를 제거하고 무게를 측정한다. 선택된 생물종에 제시되어 있는 적정 무게범위 내에 해당하는 개체들을 선별하여 각 시험수조에 일정 수로 분배하고, 각 수조에 들어가는 전체 개체 무게를 기록한다. 이 과정에서 시험개체에 스트레스나 상처를 최소화하기 위한 각별한 주의가 요구된다.

2.2.3. 시험 개시 28 일째에 시험어의 무게를 재 측정한다. 다만 먹이 공급량을 조절하기 위하여 시험 개시 14 일째에 무게를 측정할 수 있다.

2.2.4. 일반적으로 5개의 농도(대조군 제외)를 설정하고 공비는 3.2를 초과하지 않도록 한다. 최고 농도의 경우는 시험물질의 수용해도를 넘지 않도록 한다. 급성독성시험자료나 농도결정 시험자료가 적절한 농도를 설정하는데 도움이 될 수 있으며, 5 개 보다 적은 수의 농도를 설정하여 시험하는 경우 타당한 사유를 제시해야 한다.

대조군과 시험군에 대해 동일수의 반복군을 두는 것을 권장한다.

2.2.5. 시험용액의 농축용액 (stock solution) 조제 시 용매나 분산제 등 보조제를 사용하는 경우 보조제의 농도는 대조군 또는 처리군에서 0.1 mL/L 이하가 되도록 하고, 희석수 대조군 외에 보조제가 포함된 용매대조군(최고농도로 들어간 농도 기준)을 추가로 두어야 한다. 그러나 가능한 보조제의 사용은 자제하도록 한다.

2.2.6. 시험용액은 농축용액을 조제한 후, 희석수로 재차 희석하여 조제한다. 수용해도가 낮은 물질의 경우 초주파 분쇄나 다른 적절한 물리적 방법을 이용하여 농축용액을 조제한다. 필요시 시험용액을 용해하기 위하여 유기용매(Ethanol, Methanol, Acetone, Dimethylformamide, Triethyleneglycol), 유화제, 분산제 (Cremophor RH40, Tween 80, 0.01 % Methylcellulose, HCO-40) 등이 사용가능 하나, 어류에 독성이 낮은 것을 우선적으로 사용한다. 아세톤과 같이 분해가 빠른 물질 또는 휘발성이 강한 물질을 사용하는 경우, 유수식 시험 시 박테리아 누적과 같은 문제가 발생할 가능성이 있으므로 특별한 주의한다.

2.2.7. 시험물질의 노출방법은 유수식 또는 일정시간에 용액을 갈아주는 반지수식 방법을 사용한다. 유수식의 경우, 시험물질 농축액과 희석수의 유속을 주기적으로 점검하여 유속의 변동범위가 10 %를 넘지 않도록 한다. 무지개송어의 경우 유수식 시험계를

이용한 시험시 물 교환 빈도는 물고기 g 당 매일 6 L의 물이 교환되도록 한다. 반지수식 시험에서는 시험액을 매일 교환하는 것이 바람직하다.

2.2.8. 시험기간 동안 모든 수조에 대하여 용존산소, pH 및 수온을 측정하여야 한다. 경도 및 알칼리도 등은 대조군 및 최고 농도의 수조에서 측정하도록 하고, 용존 산소량은 최소한 세 번(시험의 시작, 중간, 종료 시) 측정한다. 필요한 경우 염도도 동일한 방식으로 측정한다. 반지수식 시험의 경우, 용존 산소량을 최소한 일주일에 한 번 이상 또는 물 교환 전후에 측정하도록 한다. pH의 경우 반지수식 시험에서는 물교환 전후에 측정하고, 유수식 시험에서는 일주일에 한 번 이상 측정한다. 물의 경도와 알칼리도는 각 시험 시 최소 한 번 이상 측정한다. 온도는 최소 한 개의 수조에서 지속적으로 모니터링 되도록 한다.

2.3. 시험환경

2.3.1. 시험어의 적정 개체량 (g/L) 및 적정 개체 수 (마리/L)는 1.4.1항의 권고치를 참고한다. 어떤 경우든 용존산소농도는 포화농도의 60 % 이하가 되지 않도록 유지한다.

2.3.2. 광주기는 12 시간 ~ 16 시간(명) : 8 시간 ~ 12 시간(암) 범위로 시험어종에 적절한 주기를 유지하도록 한다.

2.3.3. 시험온도는 시험어종의 적정 온도를 유지하도록 하되 1.4.1항의 각 시험종별 시험 온도 범위 내에서 시험기간 동안 온도변화는 2 °C 범위 내에 있어야 한다. 또한 시험기간 중 시험수조간의 수온의 차이는 ± 1 °C를 넘지 않아야 한다.

2.3.4 시험기간 동안 먹이는 아래 표와 같이 각 시험종별로 권장되는 먹이를 매일 2 회 일일 섭취량을 두 번으로 나누어 최소한 5 시간 간격을 두고 공급한다. 무지개 송어의 경우 일일섭취량은 체중의 4 % 정도가 적당하다. 단 시험개체의 무게를 측정하기 24 시간 전에는 먹이를 주지 않는다.

시험종	권장먹이
송사리 (<i>Oryzias latipes</i> , ricefish)	살아있는 먹이 (Brachionus, Artemia)
무지개송어 (<i>Oncorhynchus mykiss</i> , rainbow trout)	건조된 연어치어 먹이
제브라피시 (<i>Danio rerio</i> , zebrafish)	살아있는 먹이 (Brachionus, Artemia)

2.4. 조사항목

2.4.1. 무게

시험이 종료되면 모든 생존개체는 물기를 제거하고 무게를 측정하는데 개체별로 측정하거나 군별(시험용기별) 전체 무게를 측정할 수 있다. 무게는 습중량(시험 개체 표면의 물을 흡수제거한 중량)으로 표시한다. 각 개체의 특정 성장률을 확인 하기 위하여 개별적으로 무게를 측정하는 경우, 실험개체의 스트레스를 최소화 할 수 있는 방법을 사용한다.

2.4.2. 비정상적 외형 및 비정상적 행동

시험기간 동안 비정상적인 외형(출혈 또는 변색 등) 또는 비정상적 행동이 나타나는 지 매일 확인하여 기록한다.

2.4.3. 치사율

시험기간 동안 매일 관찰하여 치사율을 기록하고, 치사어는 기록 후 곧 제거한다.

2.5. 시험상의 유의사항

2.5.1. 시험 종료시 대조군에서의 치사율은 10 %를 넘지 않아야 한다.

2.5.2. 대조군에서의 평균무게의 변화는 유의성을 나타내기에 충분해야 한다. 무지개 송어의 경우 28 일후 대조군 개체의 평균 무게는 초기 평균 무게의 50 %이상 증가되어야 한다.

2.5.3. 시험기간 중 시험물질 농도를 주기적으로 측정하는 경우 적어도 최저 및 최고농도에 대해 주 1 회의 분석치가 있어야 한다. 시험물질의 농도는 원칙적으로

설정농도의 80 % ~ 120 %를 유지하도록 한다. 시험물질의 측정농도와 설정농도의 차이가 20 %보다 큰 경우 시험결과는 측정농도를 기준으로 기록한다.

2.5.4. 시험결과는 측정농도를 기초로 하여 산출하는 것이 바람직하나, 설정농도나 초기 측정농도가 시험기간 동안 $\pm 20\%$ 이내로 유지됨을 증명할 수 있는 증거가 있는 경우, 설정농도나 초기 측정농도를 바탕으로 결과를 낼 수 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- 1.1 시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 결과를 산출하도록 하며, 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다.
- 1.2. 치사율이 10 % 이상인 수조에 대해서는 성장률을 계산하지 않는다.
- 1.3. 결과산출의 주요 개념은 시간 t_1 과 t_2 사이의 특정 성장률 r 이며, 산출식은 아래와 같다.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\overline{\log_e W_2} - \overline{\log_e W_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \overline{\log_e W_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

r_1 = 어류 개체별 성장률(Individual fish specific growth rate)

r_2 = 수조에서의 평균성장률(Tank-average specific growth rate)

r_3 = 가성장률(Pseudo specific growth rate)

w_1, w_2 = t_1 및 t_2 각각에서의 시험개체 무게

$\log_e w_1$ = 시험 시작 시의 시험개체별 무게 로그 값

$\log_e w_2$ = 시험 종료 시의 시험개체별 무게 로그 값

$\overline{\log_e w_1}$ = 시험 시작 시 수조 내 전체 개체에 대한 $\log_e w_1$ 의 평균

$\overline{\log_e w_2}$ = 시험 종료 시 수조 내 전체 개체에 대한 $\log_e w_2$ 의 평균

t_1, t_2 = 시험 시작 및 종료 시점 (시간 또는 날짜)

r_1, r_2, r_3 : 0 일 ~ 28 일 사이에 계산되는 값이며, 14 일째에 측정이 이루어진 경우, 0 일 ~ 14 일 및 14 일 ~ 28 일에 대한 값이다.

1.4. 회귀모형(농도-반응 모형)을 이용한 결과의 분석

1.4.1. 본 분석방법은 시험농도와 성장률 사이의 관계를 수학적으로 계산하여 분석하는 방법으로, 이 모형을 통하여 'ECx'를 계산할 수 있다. 본 방법을 사용하는 경우, 어류 각 개체 성장률(r_1)을 구할 필요는 없으나 대신 수조에서의 평균성장률(r_2)에 근거하여 분석할 수 있다. 특히 이 방법은 크기가 상대적으로 작은 종을 시험에 사용할 때 더욱 적합한 방법이다.

1.4.2. 농도에 따른 반응 관계를 확인하기 위하여, 수조에서의 평균성장률(r_2)을 농도에 따라 그래프로 작성한다.

1.4.3. r_2 와 농도간의 관계를 표현하기 위하여 가장 적합한 모형을 선정해야 하며, 모형 선정에 대한 합당한 근거를 제시하도록 한다.

1.4.4. 각 수조에 생존하고 있는 시험개체의 수가 동일하지 않다면 단순선형 또는 비선형모형 적용 시 동일하지 않은 집단의 크기를 허용할 수 있도록 가중치를 주어야 한다.

1.4.5. 모형적용방법은 예를 들어 EC_{20} 과 그 산포도(표준오차나 신뢰구간)에 대한 평가가 가능하도록 하여야 한다.

1.5. LOEC 산출을 위한 결과의 분석

1.5.1. 만일 시험 시, 각 농도 그룹에 대하여 반복 수조군을 사용한 경우, 수조에서의 평균 성장률(r_2)에 대한 분산분석 (ANOVA)을 통하여 LOEC을 산출할 수 있으며 0.05의 확률수준에서 유의한 차이가 있는 가장 낮은 농도를 구하기 위해 각 농도 노출군에서의 평균 r 값과 대조군에서의 평균 r 값을 비교하는 Dunnett's test나 William's test와 같은 적절한 분석방법을 이용한다. 모수적 방법을 위하여 요구되는 가정이 성립하지 않는다면 비정규분포인 경우 Shapiro-Wilk's test나 이분산

인 경우 Barlett's test 등의 분석을 이용하며 분산분석을 실시하기 전에 데이터를 등분산의 형태로 전환시키거나 가중치를 부여하여 분산분석을 수행하는 것을 고려한다.

1.5.2. 시험 과정에서 각 농도에 대하여 반복 수조군을 두지 않은 경우, 수조들에 대한 분산분석은 의미가 없거나 불가능하므로 이때는 가성장률(r_3)에 기초하여 분산분석을 실시한다.

1.5.3. 각 농도 시험농도군의 평균 r_3 를 대조군의 평균 r_3 와 비교할 수 있다. 그렇다면 LOEC은 이전과 동일하게 볼 수 있다. 이 방법은 각 어류 개체 간의 편차로 설명할 수 있는 것 외에는 수조 간의 편차를 용인하지도 배제하지도 않는다. 그러나 경험을 통하여 수조간의 차이는 각 개체간의 편차인 수조 내의 편차와 비교할 때 매우 작다는 것을 보여 주었다. 만약 각 어류의 개체가 분석에 포함되지 않는다면 이상치를 확인하거나 그 개체의 사용에 대한 정당성을 제공하여야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3. 시험물질

(1) 화학물질의 명칭 (CAS 번호, 일반명, 상품명)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

(4) 물리화학적 성질

2.4. 시험중

(1) 학명

(2) 입수처

(3) 순화방법, 순화기간의 관찰결과, 사육방법 (먹이 종류, 먹이량, 먹이공급 빈도 등)

(4) 길이, 무게

2.5. 시험조건

- (1) 시험과정 (노출방법, 시험어의 개체 량 및 개체 수, 시험농도, 반복수 등)
- (2) 희석수 및 시험용액의 수질특성 (pH, 온도, 용존산소, 경도 등)
- (3) 시험물질 농도 및 시험물질 조제방법
- (4) 시험용액에서 시험물질의 상태 및 농도에 관한 정보
- (5) 먹이 종류, 공급량, 공급방법 및 횟수

2.6. 시험결과

- (1) 시험과정에서 나타난 증상 및 관찰 사항
- (2) 대조군, 시험군에서의 치사율 및 대조군의 생존율 기준 만족 여부
- (3) 시험기간 동안 시험개체 및 개체평균 무게자료, 성장률 자료
- (4) 사용된 통계분석 방법 및 타당성, 시험반복군 또는 시험개체에 근거한 통계자료, 통계분석 결과
- (5) LOEC 및 NOEC 또는 EC_x

제13항 지렁이 번식독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 지렁이 번식능력에 미치는 영향을 파악하는데 그 목적이 있다. 노출 시간 동안 태어난 유충(Offspring, Juvenile)의 개체수를 조사함으로써 시험 물질의 생식능에 대한 영향 여부를 파악할 수 있다. 이외에도 성체의 사망 및 성장에 미치는 영향 등을 평가한다.

2. 정의 및 단위

2.1 치사농도(LCx, Lethal concentration for x % lethal)

대조군과 비교하여 시험을 수행한 농도 범위 안에서 x %의 치사를 나타낸 농도 (예, LC₅₀ : 반수(50 %) 치사농도).

2.2 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이($p < 0.05$)가 있는 처리군 농도 중 가장 낮은 농도

2.3 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이($p < 0.05$)가 없는 처리군 농도 중 가장 높은 농도로 최소영향관찰농도(LOEC) 바로 아래 농도

2.4 표준물질(Reference substance)

독성시험이 정상적인 조건에서 수행되었는지를 확인하고 시험 생물종의 반응성에 변화가 없음을 입증하기 위해 사용하는 물질. 시험대조물질로는 주로 Carbendazim 또는 Benomyl을 사용하며 시험대조물질을 사용하여 병행 시험을 수행하는 경우에는 대조군과 동일한 반복구로 한 농도에서 시험을 수행

2.5 영향농도(ECx, Effect concentration for x % effect)

대조군과 비교하여 시험을 수행한 농도 범위 안에서 x % 의 영향을 나타낸 농도
(예, EC₅₀ : 반수(50 %) 영향농도)

2.6 생식률(Reproduction rate)

시험기간 동안 성체 한 마리당 생산된 유충수의 평균값

2.7 농도 단위

농도는 토양 건조중량에 대한 시험물질의 무게(mg/kg)로 표시

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험에 대한 정보

시험물질에 대한 지령이 급성 독성 값은 생식독성시험을 위한 유용한 정보가 될 수 있다. 이밖에 시험물질의 수용해도, P_{ow}, 증기압, 환경 중 거동(예, 광분해, 주된 사용 조건에서의 가수분해율 등) 등도 시험에 유용한 정보이다.

1.2 장치 및 기구

1.2.1 시험용기

유리 또는 화학적으로 불활성 재질로 된 단면적 200 cm², 1 L ~ 2 L 용량의 용기를 사용하며 공기 및 빛은 투과할 수 있으면서 지령이의 탈출은 막을 수 있는 구조의 덮개를 갖추어야 한다.

1.1.2 건조기

105 °C 이상으로 유지 가능한 것

1.1.3 입체 현미경

1.1.4 pH 측정기 및 조도 측정 장치

1.1.5 정밀저울

1.1.6 항온장치

20 °C ± 2 °C의 온도범위로 조절 및 유지 가능한 것

1.1.7 습도조절장치

덮개가 있는 시험용기를 사용할 경우 필수장치는 아님

1.1.8 배양기 또는 냉난방 장치가 설치된 사육 공간

1.1.9 핀셋 또는 고리

1.1.10 항온조

1.1.11 기타 일반 실험실 장치 및 기구

1.3 인공토양의 준비

1.3.1 본 시험에 사용되는 인공 토양의 조성은 다음과 같다. 이때, 105 °C에서 함량에 도달했을 때의 건조 무게를 기준으로 한다.

(1) 10 % 스페그넘 피트

풍건하여 곱게 갈아 식물 잔재를 볼 수 없는 것으로 pH 5.5 ~ pH 6.0에 가까울 것

(2) 20 % 고령토(Kaolin clay)

고령석(Kolinite) 함량 30 % 이상일 것

(3) 70 % 석영사(Quartz sand)

입자크기 50 μm ~ 200 μm의 고운 모래를 50 %이상 함유할 것

(4) 0.3 % ~ 1.0 % 탄산칼슘(CaCO₃, 분말상, 분석급)

탄산칼슘을 가하여 초기 pH를 6.0 ± 0.5로 조정하며 필요한 탄산칼슘 양은 토양의 구성 성분에 따라 달라질 수 있다. 시험 직전에 토양 샘플을 채취하여 1 M KCl 또는 0.01 M CaCl₂ 용액과 혼합하여 토양의 pH를 측정한다(부록 1).

1.3.2 위의 건조 성분을 정확한 비율로 넣고 완전히 혼합한 뒤 통기가 잘되는 곳에 보관한다. 시험 시작 전에 건조된 인공토양에 최종 수분함량의 절반 정도, 즉 최대 함수량의 40 % ~ 60 %(건조중량의 50 % ± 10 %)에 해당하는 탈이온수를

가한다. 제조한 인공토양은 손으로 눌렀을 때 정치수(Standing water)나 자유수(Free water)가 있어서는 안 된다. 인공토양의 최대 함수량은 부록 2 또는 ISO 11274(주 1) 방법에 따라 측정한다.

1.3.3 시험물질을 토양 표면에 직접 적용하거나 물 없이 혼합하는 경우, 토양을 준비할 때 최종 수분함량 전량에 해당하는 탈이온수를 추가한다. 시험물질을 탈이온수에 녹여서 토양과 혼합하는 경우에는 추가 분량의 탈이온수를 시험물질과 함께 가할 수 있다.

1.3.4 대조군 및 처리군의 토양 중 수분함량은 시험 시작 및 종료 시점에 ISO 11465 방법에 따라 측정한다. 시험 기간 동안 주기적으로 시험용기의 무게를 측정하여 토양 중 수분 함량을 측정한다.

1.3.5 대조군 및 처리군 토양의 pH는 ISO 10390 방법에 따라 측정한다(부록 1). 시험물질이 산성 혹은 염기성 물질인 경우 토양의 pH는 조절하지 않는다.

1.4 시험종 및 먹이

1.4.1 시험에 사용하는 지렁이는 *Eisenia fetida* 또는 *Eisenia andrei*이며 생태학적 정보 및 생태독성시험에 관한 자세한 정보는 주 2 ~ 주 6과 같다.

1.4.2 시험에 사용하는 지렁이는 생후 2 개월에서 1 년생으로 습중량 250 mg ~ 600 mg 정도의 성숙한 개체를 사용하며 환대(Clitellum)를 가지고 있어야 한다. 지렁이를 탈이온수 등으로 세척한 뒤 여과지로 여분의 수분을 제거하고 무게를 측정한다. 유사한 연령 분포를 갖도록 동일한 환경에서 사육한 개체 가운데에서 시험 개체를 선정하며 개체간의 연령 차이가 4 주를 넘지 않아야 한다(부록 3).

1.4.3 시험에 사용하는 지렁이는 시험 개시 전에 시험에 사용되는 종류의 인공 토양에서 하루 이상 순화시키며 시험에 사용되는 것과 동일한 먹이를 공급한다.

1.4.4 먹이로는 주로 �트밀, 우분 또는 마분 등이 이용된다. 퇴비는 사용 전에 풍건하여 분쇄한 뒤 멸균하여 공급하며 약물이나 성장 촉진제, 살선충제 등 시험생물에 유해한 영향을 미칠 수 있는 물질에 오염되지 않았는지 확인하여야 한다. 새로운 배치의 먹이를 사용할 경우에는 시험에 사용하지 않는 지렁이를 이용하

여 성장 및 난낭(Cocoon) 생산을 감소시키지 않는지 확인하여야 한다.

1.5 토양과 시험물질의 혼합

1.5.1 시험물질의 종류에 따라 적절한 방법으로 시험물질을 준비한다.

(1) 수용성 물질

시험 시작 직전에 시험물질을 탈이온수에 녹여 시험용액을 준비한다. 이때 한 농도에 해당되는 모든 반복구를 처리할 수 있도록 충분한 양을 준비한다. 시험용액의 조제를 용이하게 하기 위해 보조용제를 사용할 수 있다. 시험용액은 최종 수분함량(즉, 최대 함수량의 40 % ~ 60 %)에 도달하도록 조제하는 것이 편리하다. 제조한 시험용액을 토양 기질과 함께 섞고 시험용기에 넣는다.

(2) 유기용매에 녹는 비수용성 물질

시험물질을 소량의 적당한 유기용매(예, 아세톤)에 녹인 뒤 소량의 공업용 모래에 스프레이로 뿌리거나 섞어준 다음 흡 후드에서 최소 수 분 이상 건조시켜 용매를 제거한다. 시험물질을 처리한 모래를 미리 수분을 가해 둔 인공토양과 섞어준다. 적당량의 탈이온수를 더해 최종 수분 함량이 최대 함수량의 40 % ~ 60 %가 되도록 한 후 전체적으로 혼합한다.

(3) 물과 유기용매에 녹지 않는 물질

물과 유기용매 모두에 녹지 않는 시험물질의 경우, 시험용기 하나 당 10 g에 해당하는 미세한 입자의 석영사와 시험물질을 혼합한 뒤 미리 수분을 가해 둔 인공토양과 섞어준다. 적당량의 탈이온수를 더해 최종 수분 함량이 최대 함수량의 40 % ~ 60 %가 되도록 한 후 전체적으로 혼합한다.

1.5.2 농약류와 같이 토양 표면에 뿌려지는 물질의 경우, 동일한 조건으로 시험을 수행하기 위해 다음과 같은 과정으로 토양표면에 시험물질을 노출시킨다.

먼저 시험용기에 수분을 포함한 토양을 채운 뒤, 무게를 측정한 지렁이들을 넣는다. 15 분 이후에도 토양을 뚫지 않고 남아 있는 지렁이는 건강하지 않는 것으로 여겨지며, 이러한 지렁이는 제거하고 새로운 지렁이로 교환한다. 교체한 개체가 있는 경우, 지렁이의 총 무게 및 지렁이를 포함하는 시험 용기의 총 무게를 확인하기 위하여 다시 무게를 측정해 둔다.

지렁이 피부에 시험물질이 직접 노출되는 것을 막기 위하여 지렁이를 추가한 후 30 분 이상 경과한 후에 시험물질을 노출시킨다. 시험물질이 토양 표면에 골고루 뿌려지도록 적절한 스프레이 장치를 이용하여 토양 표면에 적용하며 벽 표면에 닿지 않도록 주의한다.

시험물질은 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 노출하며 수용액, 유화제, 확산제의 경우 $600\text{ }\mu\text{L}/\text{m}^2 \sim 800\text{ }\mu\text{L}/\text{m}^2$ 비율로 노출시킨다. 난알이나 종자와 같은 특수한 물질의 경우에는 농사에 사용되는 방식과 동일하게 적용한다.

시험물질을 노출하기 위해 사용한 휘발성 용매가 증발될 수 있도록 1 시간 정도 시험 용기의 뚜껑을 덮지 않는다. 이때 시험개체가 탈출하지 않도록 각별한 주의를 기울인다.

2. 시험방법

2.1. 원리

일정농도의 시험물질을 함유한 인공토양에 넣은 지렁이의 생식, 성장 및 사망에 미치는 영향을 측정한다. 시험물질에 4 주간 노출시킨 뒤 성체의 사망과 성장에 미치는 영향을 관찰하여 반수치사농도(LC_{50})를 산출한다. 생식에 대한 영향은 성체를 제거하고 4 주간 더 노출시킨 다음 난낭에서 부화한 유충의 수를 계수하여 측정한다. 대조군과 비교하여 시험물질에 대한 무영향농도(NOEC) 및 영향농도(ECx)를 산출한다.

2.2 농도설정 시험

2.2.1 본시험에 사용할 시험물질의 농도 범위를 설정할 필요가 있는 경우 농도설정 시험을 실시하여 본시험에서의 농도 범위를 결정한다.

2.2.2 농도설정시험을 위한 시험물질의 농도는 1000 mg/kg , 100 mg/kg , 10 mg/kg , 1 mg/kg , 0.1 mg/kg 을 기본으로 하여 단계적으로 정한다.

2.2.3 대조군 및 처리군 각 농도 당 10 마리의 지렁이를 사용하며 반복구는 두지 않아도 된다. 시험물질에 따라 토양이 더 필요할 경우, 개체 당 인공토양 $50\text{ g} \sim$

60 g의 비율로 토양 및 개체를 추가 한다.

2.2.4 시험용기에 시험개체를 분배할 때 계통오차를 줄이기 위해 시험에 사용할 개체 가운데 20 마리의 무게를 무작위로 선정하여 각각의 무게를 측정하여 집단의 균질성을 확인한다. 균질성이 확인되면 지렁이 배치를 선택하고 무게를 잰 뒤 시험용기에 넣는다. 지렁이를 넣은 다음 시험용기(덮개 제외)의 무게를 측정하여 시험기간 동안 토양의 수분 함량을 체크하기 위한 기초 자료로 사용한다. 무게를 측정한 뒤 시험용기의 덮개를 덮어둔다.

2.2.5 보조용제를 사용하여 시험용액을 조제한 경우 동일한 농도의 보조용제 대조군을 설정하여 보조용제가 시험결과에 영향을 미치지 않음을 입증하여야 한다.

2.2.5 시험용기마다 시험토양을 집어넣고, 인공토양에 1 일 이상 순화시킨 지렁이를 빠른 속도로 증류수에 씻은 후 시험 농도 당 10 마리 이상을 토양표면에 놓는다. 용기는 통풍구멍이 뚫린 플라스틱 필름으로 덮어 건조를 막는다.

2.2.6 지렁이를 인공토양에 넣고 시험물질을 가한 뒤 하루 뒤부터 먹이를 공급한다. 먹이가 남아있는 경우에는 곰팡이 번식을 막기 위해 먹이 공급량을 줄인다.

2.2.7 시험온도는 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하도록 한다.

2.2.8 시험기간 중 명암주기는 16 시간(명) : 8 시간(암)으로 하며 조도는 400 렉스 ~ 800 렉스를 유지하도록 한다.

2.2.9 토양의 수분 함량을 확인하기 위해 시험기간 동안 주기적으로 시험용기의 무게(덮개 제외)를 측정하고 무게 감소가 일어난 경우 탈이온수를 공급하여 시험기간 중 수분 함량이 시험 시작 시점의 수분 함량과 비교하여 10 % 이상 차이나지 않도록 한다.

2.2.10 노출기간은 2 주로 하며, 시험 종료 후 성체의 치사율을 평가한다.

2.3 본시험

2.3.1 농도설정시험의 결과에 기초하여 농도 범위 및 반복수를 설정하되, 도출하고자하는 종말점에 따라 달리 설정한다. 가능한 한 8 주 동안의 시험기간에 걸쳐 아치사 및 치사 영향이 관찰되도록 농도를 설정한다.

(1) 무영향농도(NOEC)를 구하고자 하는 경우

최소 5 개 이상의 농도를 대수등간격으로 정하며 공비가 2.0을 넘지 않도록 한다. 처리군 및 대조군에 대해 각각 4 개와 8 개의 반복구를 둔다.

(2) 영향농도(ECx)를 구하고자 하는 경우

최소 5 개 이상의 농도를 대수등간격으로 정하며 처리군 및 대조군에 대해 각각 2 개와 6 개의 반복구를 두도록 한다. 시험농도의 공비는 구간별로 달리 정할 수 있다. 즉, 예상 영향 농도 범위에서는 1.8을 넘지 않도록 하고 그 이상 또는 이하 농도에서는 1.8을 넘을 수 있다.

(3) 무영향농도(NOEC)와 영향농도(ECx)를 동시에 구하고자 하는 경우

8 개의 농도를 대수등간격으로 정하며 공비가 1.8을 초과하지 않도록 한다. 처리군 및 대조군에 대해 각각 4 개와 8 개의 반복구를 둔다.

2.3.2 시험개시 28 일째에 살아있는 성체의 개수, 이상 행동(토양 속으로 파고들어가는 능력상실, 즉 운동능력 상실), 형태학적 변화(상처 등)를 기록한다. 지렁이를 포함하고 있는 토양을 깨끗한 용기에 옮긴 뒤 성체를 골라내고 탈이온수로 씻고 여과지로 여분의 물기를 닦아낸 뒤 무게를 측정한다. 이때 발견되지 않은 지렁이는 측정 전에 죽어서 분해된 것으로 간주한다.

2.3.3 성체를 제거하고 난 토양은 다시 시험용기에 넣고 동일한 조건에서 추가적으로 4 주간 더 노출시킨 뒤 부화된 새끼 및 알의 개수를 확인한다(부록 4).

2.3.4 먹이는 시험물질을 토양에 처리한 다음 하루 뒤부터 4 주간 시험용기 당 5 g 정도씩 주 1 회 공급하며, 28 일 이후에는 시험용기 당 5 g 정도의 먹이를 1 회 공급한 뒤 시험 종료 시까지 먹이를 공급하지 않는다.

2.3.5 시험 전 기간에 걸쳐 관찰된 모든 유해징후 및 손상을 기록한다.

2.3.6 기타 사항은 농도설정시험과 동일한 방법으로 한다.

2.4 한계시험

농도설정시험에서 최고농도(즉, 1,000 mg/kg)에서 영향이 나타나지 않을 경우, 1,000 mg/kg 농도 처리군 및 대조군으로 한계시험을 수행하며 8 개의 반복구를

둔다.

2.5 시험상의 유의사항

2.5.1 대조군이 아래의 기준에 부합되어야 시험이 성공적으로 수행된 것으로 본다.

- (1) 대조군에서 시험 종료 시 각각의 반복구(성체 지렁이 10 마리)에서 30 마리 이상의 유충이 생산되어야 한다.
- (2) 대조군에서 생식에 대한 변동계수는 30 %를 초과하지 않아야 한다.
- (3) 대조군에서 초기 4 주 노출기간 동안 성체의 치사율은 10 %를 넘지 않아야 한다.

2.5.2 시험조건 및 시험 생물종에 대한 신뢰성을 확인하기 위해 시험대조물질에 대한 무영향농도(NOEC) 및 영향농도(ECx) 값을 제시해야 하며 시험대조물질을 이용하여 최소 1 년에 1 회 이상 확인시험을 수행한다.

2.5.3 본 시험은 시험물질의 수용해도와 관계없이 적용 가능하나 휘발성 물질(헨리 상수 또는 공기/물 분배계수가 1 이상이거나 25 °C에서 증기압이 0.0133 Pa 이상인 물질)에 대해서는 적용할 수 없다.

2.5.4 본 시험에서는 시험기간 동안 시험물질의 분해는 고려하지 않는다. 시험기간 동안 시험물질의 노출농도가 초기 농도로 유지되지 않을 수 있으므로 시험 시작 및 종료 시점에서 화학분석을 수행할 것을 권장한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 치사율

본시험 종료 후 지렁이(성체)의 치사율을 계산하고 적절한 통계적 방법(Probit법 등)을 이용하여 반수치사농도(LC₅₀)와 95 %에서의 신뢰구간을 산출한다. 얻어진 시험결과가 표준방법을 이용하여 LC₅₀을 구하기 적절하지 않은 경우(예, 치사개체가 나타난 농도가 3 개 미만인 경우), 이동평균, Trimmed Spearman-Kärber법 또는 LC₀과 LC₁₀₀의 기하평균 등 다른 방법을 이용하여 LC₅₀을 산출한다. 이와

더불어 성체 및 유충의 행동학적, 형태학적 이상을 보고서에 기록한다.

1.2 생식능

본시험 종료 후 부화한 유충의 수를 계수하여 산술평균 및 표준편차를 구한다. 적절한 통계적 방법을 이용하여 무영향관찰농도(NOEC) 및 영향농도(ECx)를 산출한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질

(1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)

(2) 순도 및 불순물

(3) 화학물질의 특성 : 옥탄올/물 분배계수, 수용해도, 증기압, 헨리상수, 거동에 관한 정보 등

2.4 시험생물

(1) 종명, 학명 및 입수경위

(2) 번식 조건

(3) 연령, 크기

2.5 시험조건

(1) 시험에 사용된 토양의 조성

(2) 토양의 최대 수분함유 능력

(3) 시험물질을 토양에 적용한 방법

(4) 시험물질의 적용에 사용된 보조 용제

(5) 시험물질 살포에 이용한 장치의 보정에 관한 내용

(6) 시험용기의 크기 및 시험토양의 양

(7) 시험조건 : 조도, 명암주기, 온도

(8) 먹이 공급 일정, 시험에 사용된 먹이의 유형 및 양, 먹이 공급 날짜

(9) 시험 개시일 및 종료일의 pH 및 수분함량

2.6 시험결과

(1) 시험개시 4 주 뒤 처리군에서 성체 치사율(%)

(2) 시험 시작 시 각 시험용기에 들어있는 성체의 총 무게

(3) 시험개시 4 주 뒤 각 시험 용기에서 살아있는 성체 무게의 변화(최초 무게에 대한 % 변화율)

(4) 시험 종료 시 각 용기 당 유충의 수

(5) 육안적, 병리학적 이상증상 및 행동학적 변화

(6) 대조물질을 이용한 시험결과

(7) LC₅₀, 생식능에 대한 NOEC 및/또는 ECx

(8) 용량-반응 곡선

주1) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality -Determination of water retention characteristics -Laboratory methods, No. 11274. ISO, Genev

주2) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.

주3) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

주4) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

주5) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

주6) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

부록 1. 토양의 pH 측정

ISO DIS 10390¹⁾ (Soil Quality-Determination of pH)에 제시된 방법에 따라 토양의 pH를 측정한다.

일정량의 토양을 실온에서 약 12 시간 건조시킨다. 건조된 토양(최소 5 g)에 5 배 부피의 1 M KCl 용액 또는 0.01 M CaCl₂를 넣고 현탁액을 만든다. 현탁액을 5 분간 진탕하고 최소 2 시간 이상(24 시간 이내) 정치한다. 적당한 완충용액(예, pH 4.0, pH 7.0)을 이용하여 보정한 pH 측정기로 액층의 pH를 측정한다.

참고문헌

- (1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality - Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

부록 2. 토양의 최대 함수량 측정

ISO DIS 11268-2¹⁾의 Annex C에 제시된 방법에 따라 토양의 최대 함수량을 측정한다.

적절한 시험용기에 일정량의 토양을 넣고 바닥을 물에 적신 필터페이퍼로 막은 다음 항온조에 장착된 선반에 놓는다. 물 높이가 토양의 꼭대기보다 높을 때까지 천천히 물속에 넣은 다음 3 시간 동안 방치한다. 곱게 간 석영사위에 토양이 담긴 용기를 올려놓아 2 시간 동안 배수시킨다. 이때 건조되는 것을 막기 위해 덮개가 있는 시험용기 내에서 배수시킨다. 시료의 무게를 측정한 뒤 105 ℃에서 함량에 도달할 때까지 건조시킨 뒤 다시 무게를 잰다. 함수량은 다음의 식에 따라 계산한다.

$$WHC(\% \text{ of drymass}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

여기에서, S = 물로 포화된 시험물질 + 시험용기 무게 + 필터페이퍼 무게

T = 용기 무게(시험용기 무게 + 필터페이퍼 무게)

D = 건조된 시험물질 무게

참고문헌

- (1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

부록 3. *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* 배양 방법

가급적이면 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 인공기후실에서 번식시킨다. 이 온도에서 지렁이는 2 개월 ~ 3 개월 후면 성숙하게 된다.

두 종의 지렁이 모두 다양한 종류의 축산 폐기물에서 번식이 가능하다. 권장되는 배지는 우분 또는 마분과 토탄의 50 : 50 혼합물이다. 우분이나 마분이 의약품이나 성장 촉진제, 살충제 또는 이와 유사하게 시험생물에 영향을 줄 수 있는 물질에 오염되지 않았는지 확인하여야 한다. 배지의 pH는 약 6 ~ 7(탄산칼슘으로 조정)이어야 하며 이온 전도도는 낮아야 한다(염분 농도 6 mg 또는 0.5 % 이내). 또한 과량의 암모니아나 동물의 소변으로 오염되어서는 안 된다. 기질은 적절한 수분을 함유해야 하며 사육 상자의 크기는 10 L ~ 15 L가 적당하다.

표준 연령 및 체중의 지렁이를 얻기 위해서는 난낭으로부터 배양을 시작하는 것이 좋다. 난낭을 생산하기 위해 새로운 배지에 성충을 넣고 14 일 ~ 28 일간 배양하여 난낭을 생산하도록 한다. 성체는 제거하고 난낭으로부터 부화한 유충은 다음 번식을 위해 사용한다. 난낭으로부터 부화한 유충은 2 개월 ~ 12 개월 후면 성체로 성숙하며 시험에 사용된다.

기질 내에서 움직이고 기질에서 탈출하려고 하지 않으며 지속적으로 번식을 하는 지렁이는 건강한 개체로 볼 수 있다. 지렁이의 움직임이 둔화되고 말단부가 노란색으로 변하면 기질이 부족함을 의미한다. 이러한 경우 새로 기질을 공급하거나 사육 밀도를 줄이는 것이 좋다.

부록 4. 난낭으로부터 부화된 유충 계수 방법

어린 유충을 수작업으로 토양 기질로부터 선별하는 작업은 시간이 걸리므로 다음 두 가지 방법을 사용할 것이 권장된다.

- (1) 시험 용기를 항온조에 넣는다(40 °C에서 시작하여 60 °C로 가온한다.). 20 분 후면 기질 표면으로 유충들이 나타나 쉽게 선별하여 계수할 수 있다.
- (2) 토탄 및 퇴비 또는 오토밀을 곱게 갈아서 토양에 첨가한 경우 Van 등이 고안한 방법에 따라 시험용 토양을 체를 이용하여 세척하는 방법을 사용한다. 직경 30 cm의 0.5 mm 체 2 개를 포개 놓는다. 시험용기의 내용물을 체에 넣고 수돗물을 강하게 틀어 세척하면 어린 유충 및 난낭은 주로 위쪽 체에 남게 된다. 이 조작을 하는 동안 유충이 수막 위에 떠 있도록 하여 유충이 체의 구멍을 통해 기어나오는 것을 막기 위해 위쪽 체의 모든 표면을 젖은 상태로 유지하는 것이 중요하다. 토양 기질을 체를 통해 세척한 뒤, 위쪽 체에 남아있는 유충 및 난낭을 씻어서 사발에 옮기고 정치한다. 속이 비어있는 난낭은 수면에 뜨고 어린 개체 및 속이 차 있는 난낭은 가라앉게 된다. 위쪽 물을 따라 버리고 어린 개체 및 난낭을 소량의 물이 있는 페트리 접시에 옮긴다. 바늘이나 핀셋을 이용하여 지렁이를 선별하여 계수한다.

경험적으로 (1)번 방법은 0.5 mm 체를 이용하여 세척한 유충을 골라내는데 적합하다.

수작업으로 유충을 선별하는 경우 모든 시료에 대해서 2 회 반복하여 측정하는 것이 좋다.

참고문헌

- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.