

환경독성 평가를 위한 좀개구리밥 (*Lemna gibba*)의 성장저해시험법에 관한 연구

김은주*, 이성규

한국화학연구원 안전성연구부 환경독성팀

Use of Duckweed (*Lemna gibba*) Growth-Inhibition Test to Evaluate the Toxicity of Chromate in Korea

Eun Joo Kim* and Sung-Kyu Lee

Environmental Toxicology Team, Korea Research Institute of Chemical Technology,
100 Jang-dong, Yusong-gu, Taejeon

ABSTRACT

Lemna gibba was newly cultured and provided for toxicity tests. In this study, the chromate toxicity tests for *Lemna gibba* were performed according to the OECD *Lemna* growth inhibition test guideline. The test species was *Lemna gibba*, and the tests were repeated 5 times. To evaluate the toxicity test results, the average specific growth rate, EC50, 95% confidential limit, and variances were calculated. The test performance was analyzed by the doubling time and test statistics. The average values of EC50 data determined by logistic and linear interpolation curves were 25.9 ppm and 35.4 ppm respectively (by chromate concentration). The doubling time of all controls were below 2.5 day, so all tests passed the criteria for the test performance.

This study introduced a new test method, *Lemna* growth inhibition test, which is provided for the hazard assessment of aquatic environment.

Key words : *Lemna gibba*, Growth inhibition test, Ecotoxicity, Chromate

서론

수서 생태계는 물질의 이동과 변환이 가장 급속하게 일어나는 매체로서, 오염물질들에 의한 수서 생태계 위해성을 바르게 평가하기 위해서는 가능한 다양한 종류의 생물들에 대한 유해성이 분석되어야 한다. 현재, 유해물질의 생태계 영향 평가는 대부분의 경우 수서 척추동물 또는 수서 무척추동

물에 대한 독성 측면에 비중을 두고 있다. 하지만, 최근 들어 수생식물의 오염 물질 정화 기능이 환경 오염의 자연적 해결방법 가운데 하나로 중요시되면서(임재명 등, 2001), 수서 생태계 내의 수생식물의 역할이 부각되고 있어 수서 동물 뿐 아니라 수생식물 독성에 대한 관심과 고려가 요망된다.

수생식물은 광합성을 하여 물 속에 사는 곤충과 물고기에게 산소를 공급해 주고 오염된 물의 수질을 정화시켜주는 역할을 하고 있다. 이와 같이 수생식물이 수서 생태계에 미치는 영향은 다음과 같다 (Tripathi *et al.*, 1991; 김하송 등, 1998).

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: 054-279-8322, E-mail: ejkimi@postech.ac.kr

1) 동식물 플랑크톤, 무척추동물 및 어류의 서식처를 제공한다.

2) 유기물질을 흡수, 정화하여 BOD를 감소시킨다.

3) 인, 질소, 중금속, 무기염류 등 오염물질을 흡수하여 수계의 오염물질 농도를 효율적으로 감소시킨다.

4) 유수가 줄기와 접촉하는 순간 오염물질이 침전 퇴적하여 수생식물의 밀집지대에서는 침전의 효율도가 높아지고 오염물질 제거에 효과가 있다.

5) 수생식물의 줄기 등에 부착, 번식하는 미생물은 유기물을 분해하여 무기화 하는 작용을 가진 생물막을 형성하여 수질 정화에 기여한다.

미국 환경청 지침서와 OECD 지침서에 제시된 수서식물 중은 개구리밥(Lemnaceae)과 (Family) 가운데 좁개구리밥(Lemna) 속(Species)에 포함되는 *Lemna minor*와 *Lemna gibba*이다. Lemna는 우리나라에서 좁개구리밥으로 불리우며 Rim (1961)에서 경기도 주안에 있는 염전부근의 논에서 *Lemna minor*를 발견, 보고하여 한국산 Lemnaceae의 검색을 시도한 바 있다. 좁개구리밥은 논이나 연못의 물위에 떠서 사는 부수식물에 속한다.

이와 같이 수서 생태계 중요한 구성원 가운데 하나인 수생식물의 보호를 위해서는 이들에 관한 유해성이 적절히 평가되어야 할 것이다. 이를 위해서 미국(U.S. EPA, 1996)과 OECD(OECD, 2000)에서는 화학물질에 의한 담수 수생식물의 독성 평가 지침서를 이미 발표한 바 있다. 우리나라도 수생식물 독성 평가 기술을 확립할 필요가 있으며, 이러한 기술은 수생식물의 보호가 환경관리 목표에 포함되도록 하기 위한 기초적인 근거 자료제공에 필수적인 것이다.

본 연구는 OECD가 제안한 *Lemna* sp. 성장저해 시험법(OECD, 2000)에 따라 *Lemna gibba*를 실험실내에서 배양하여 크롬에 대한 독성시험을 수행하였고, 통계분석을 통하여 시험법 및 결과의 적절성을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질

시험물질은 potassium dichromate로 선정하였으

며, Showha Chemical Inc.에서 구입한 것으로, 주황색 결정체 분말로서 순도는 99.5%이다.

2. *Lemna gibba* 배양

본 연구에서는 *Lemna gibba*를 시험 생물로 사용하였으며, 이 종은 미국 환경청의 OPPTS Test Guideline 850.4400과 OECD Lemna Growth Inhibition Test Guideline에서 추천된 시험종이다.

*Lemna gibba*는 한국 화학 연구원 스크리닝 안전성 연구센터 농약 스크리닝 팀으로부터 분양받아서 본 연구실 내 Lemna 배양 인큐베이터에서 7일간 순화시킨 후 계대배양하여 독성 시험에 사용하였다. 계대배양은 5~10 colony를 새로운 배지에 옮겨 주고 2주일간 배양한 후 다시 5~10 colony를 새로운 배지에 옮겨주는 과정을 반복하면서 배양하였다.

배지 조성 및 저장용액 농도는 Table 1과 같다. 1번 저장용액(Macronutrient)에 포함된 7 종류의 물질들은 각각 따로 제조하여 냉장보관하여 사용하였으며 2번 저장용액(Micronutrient)은 표에 제시된 조성물질들을 모두 포함한 1개의 저장용액으로 제조하여 냉장보관하여 사용하였다. 2차 증류수에 각 저장용액들을 5 ml/l로 가하고 pH를 7.5 ± 0.1 로 맞춘 후 0.2 μm filter에 통과시켜 멸균하였다. 멸균된 배지는 미리 멸균하여둔 250 ml 삼각 플라스크에 100 ml 씩 분주하여 계대배양에 사용하였다. 계대배양을 비롯한 모든 조작은 무균조건에서 하였다. 배양조건은 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하도록 하였고 조도는 6,000~7,000 lux가 되도록 하였다.

3. 독성시험

먼저, 시험시작 7일 전에 2개의 플라스크에 배양액 100 ml을 넣고 10~12개의 콜로니를 넣고 전배양 하였다. 배양은 항은 incubator 내에서 온도 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 조도 6,000~7,000 lux 조건에서 배양하였다. 전배양 한 Lemna 플라스크 중에서 4개 잎으로 구성된, 엷은 녹색의 건강한 콜로니를 골라 각 농도별로 2개(8 fronds) 또는 3개(12 fronds)를 넣었다. 이때 같은 반복시험의 각 시험용액에는 같은 수의 잎과 콜로니가 포함되도록 하였다.

본시험 가운데 1차 시험은 100% 성장저해 농도를 구하기 위하여 대조군 및 3.5, 10.6, 31.8, 95.4,

Table 1. Composition of *Lemna gibba* culture media

Stock solution No.	Substance	Concentration in stock solution (g/250 ml)	Prepared medium	
			Element	Concentration (mg/l)
I (macronutrients)	NaHCO ₃	15.0	Na, C	220.2, 42.86
	K ₂ HPO ₄	1.044	K	9.38
	MgSO ₄ 7H ₂ O	14.7	P	3.72
	NaNO ₃	25.5	S	38.22
	MgCl ₂ 6H ₂ O	12.164	N	84.0
	CaCl ₂ 2H ₂ O	4.41	Mg	58.08
			Ca	24.04
II (micronutrients)	H ₃ BO ₃	0.1855	B	0.649
	MnCl ₂ 4H ₂ O	0.4154	Mn	2.3075
	ZnCl ₂	0.0033	Zn	0.0314
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.0014	Co	0.0071
	CuCl ₂ 6H ₂ O	1.2 × 10 ⁻⁵	Cu	0.08 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.0073	Mo	0.0576
	FeCl ₃ 6H ₂ O	0.1598	Fe	0.661
	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	0.3000	-	

286.3, 859.0 ppm (크롬기준)의 농도에서 7일 동안 시험하였다. 시험물질용액은 50 ml 용량 플라스크에 potassium dichromate 12.15 g (유효성분 기준)을 달아 넣은 후, 배양액을 표선까지 채워 85,900 ppm (크롬기준)이 되도록 조제한 후 배양액으로 희석하여 각 노출 농도별 시험물질 용액을 조제하였다. 2차부터 5차 시험은 대조군 및 3.1, 7.7, 19.2, 48.0, 120.0, 300 ppm (크롬기준)의 농도에서 1차와 같이 7일간 시험하였다. 시험물질용액은 50 ml 용량 플라스크에 potassium dichromate 4.24 g (유효성분 기준)을 달아 넣은 후, 배양액을 표선까지 채워 30,000 ppm (크롬기준)이 되도록 조제한 후 배양액으로 희석하여 각 노출 농도별 시험물질 용액을 조제하였다. 각 노출농도별 시험 물질 용액은 0.2 µm syringe filter에 통과시켜 멸균 시킨 후, 배양액에 투여하여 시험용액 100 ml을 만들었다.

시험의 환경조건은 항온 incubator 내에서 온도 24 ± 1°C, 조도 6,000 ~ 7,000 lux (형광등으로 계속 조명)이었다.

Lemna의 관찰 및 측정은 Lemna를 접종한 후 24, 48, 72, 96, 120, 144 및 168시간에 각 삼각 플라스크의 Lemna 잎의 수를 계수하였다.

4. 시험물질 저장용액 분석

시험 물질 저장용액은 기초과학 지원연구소 대

전 본소에 의뢰하여 ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer)로 분석하였다.

5. 결과 처리 및 통계 분석

시험 종료 후 2배수 성장시간, 성장률, 성장저해율, 그리고 EC50 값을 산출하였다. 각 처리 농도별 성장저해는 성장률 (specific growth rate)을 이용한 계산법에 따라 계산하였고, 결과 분석 및 EC50 값의 산출은 Toxcalc 5.0 (Tidepool Scientific Software 사)을 이용하였다. 2배수 성장 시간 (doubling time), 성장률 (average specific growth rate) 및 성장 저해율 (percent inhibition of growth rate) 계산법은 다음과 같다.

1) 2배수 성장시간

$$Td = \ln 2 / \mu$$

µ : 성장률 (average specific growth rate)

2) 성장률

$$\mu = \frac{\ln (No) - \ln (Nt)}{t} \tag{1}$$

Nt : t시간 후의 fronds 수

No : 처음 fronds 수

t : 측정 시간

μ : 성장률 (average specific growth rate)

3) 성장 저해율

$$\%Ir = \frac{(C\mu - T\mu) \times 100}{C\mu} \quad (2)$$

%Ir : 성장저해율 %

C μ : 대조군의 평균 μ 값

T μ : 처리군의 평균 μ 값

EC50을 구하기 전 시험결과와 통계적 분석을 수행하였다. 먼저, 각 처리농도별 성장률 평균을 구하기 위해 ANOVA를 수행하였고, Dunnett's test로 처리군과 대조군의 성장률 차이를 비교하였다. 시험 결과 자료가 정규분포를 하는지 보기 위해 Shapiro-Wilk's test를 수행하고, 각 농도별로 반복 간 변화폭의 유사성 여부를 보기 위해 Bartlett's test를 수행하였다. 이 결과 homogeneous하지 않을 경우 자료의 변형(예, log transformation 또는 square root transformation)을 하도록 하였다.

EC50은 농도와 fronds 수에 대한 비선형 회귀분석을 통하여 산출하였다. 이때 사용된 함수는 지수 함수(logistic curve) 또는 선형 내삽함수(linear interpolation with bootstrapping)가 이용되었다.

결과 및 고찰

1. 저장 용액 농도 분석

저장 용액 및 시험물질 용액의 농도분석 결과 300 ppm, 30,000 ppm으로 제조된 용액이 분석 결과 각각 288 ppm과 27,900 ppm으로 nominal concentration의 93.8%, 93.0%이었다.

2. 성장률 및 성장저해율

Table 2와 같이 대조군의 2배수 성장시간이 1.8일에서 2.4일로 총 5회 시험에서 모두 시험조건(2.5일 이하)을 만족하였다. 이것은 *Lemna gibba*를 생육하는 실험실 환경이 시험 생물의 보존 및 유지에 적절한 환경을 유지하고 있음을 보여주는 것이다.

또한, 식(1)과 식(2)에 따라 계산한 성장률과 성장저해율 그래프는 각각 Figs. 1, 2와 같았다. Figs.

Table 2. Doubling time of control samples in each tests

	Doubling time (days)		
	Repetition 1	Repetition 2	Repetition 3
Test 1	1.99	2.02	2.03
Test 2	1.94	1.76	1.89
Test 3	2.03	2.07	2.03
Test 4	2.03	2.12	2.07
Test 5	2.02	2.36	1.82

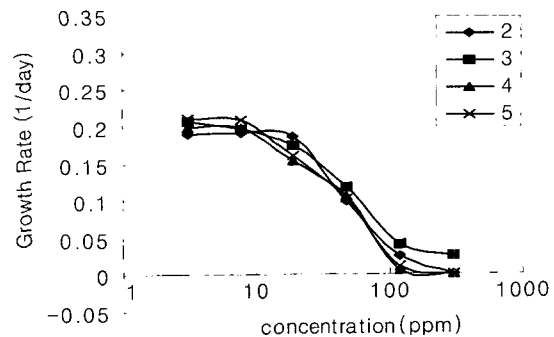


Fig. 1. Growth rate curves of each tests.

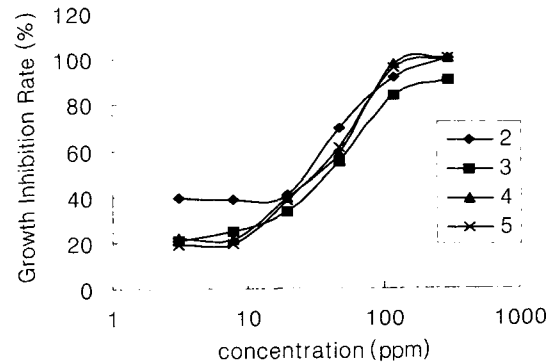


Fig. 2. Growth inhibition rate curves of each tests.

1, 2에서 보듯이, 농도에 로그함수를 취하여 표시한 용량-반응 곡선은 완만한 sigmoid 함수로 나타났다.

이러한 용량-반응 관계를 토대로 Toxcalc 5.0 (Tidepool Scientific Software) 프로그램을 사용하여 성장 저해율에 대한 비선형 회귀분석 결과, EC50 및 95% 신뢰한계는 Table 3과 같이 나타났다. Table 3에서 보듯이, *Lemna gibba*를 이용한 potas-

Table 3. EC50 and 95% confidential limit

	EC50			
	Logistic curve		Linear interpolation	
	EC50	95% confidential limit	EC50	95% confidential limit
Test 1	36.0	16.3~78.7	37.0	24.2~62.5
Test 2	13.2	1.5~44.1	28.6	15.3~37.4
Test 3	30.4	10.1~92.0	41.7	34.8~51.1
Test 4	24.4	10.6~55.3	35.4	13.3~49.1
Test 5	25.4	11.6~55.0	34.3	0~66.3
Average	25.9		35.4	
±	±		±	
SD	8.46		4.73	

sium dichromate의 5회 평균 EC50 값이 지수 함수(logistic)로 계산했을 때 25.88 ppm (크롬농도), 선형 내삽함수(linear interpolation)로 계산했을 때 35.4 ppm (크롬농도)이었다.

또한, 두 분석에서 표준편차(Standard Deviation, SD)는 각각 8.46, 4.74로서 선형내삽함수로 EC50을 산출하였을 경우의 반복간 표준편차가 훨씬 적었으며, 95% 신뢰한계의 변이폭 역시 선형 내삽함수로 계산한 경우 더 작았다. 이것으로 본 시험에서는 지수함수보다는 선형내삽함수로 분석한 결과가 통계적으로 더 유의성이 있으며, 이 때의 EC50 값을 chromate에 대한 *Lemna gibba*의 성장저해 독성 값으로 채택하는 것이 바람직할 것으로 보인다.

각 시험 자료의 통계분석 내용 및 결과 각 시험 자료가 모두 정규분포 하였으며 반복간에 동질성을 보여주어 EC50 값을 구하기 전 자료의 변형을 하지 않았다.

본 연구 결과 *Lemna gibba*를 이용한 독성 시험은 정상적인 조건에서 수행되었다고 판단되며 이러한 방법으로 추후 다른 물질에 대한 시험에도 원만히 적용될 수 있을 것으로 보인다.

결 론

본 연구에서는 수생식물에 대한 독성 시험법을

확립하기 위해 OECD Lemna Growth Inhibition Test 지침서 초안에 따라 시험을 실시하였다. 시험에 사용한 수생 식물은 *Lemna gibba*이며, 시험물질은 potassium dichromate로서 5회 반복 시험 한 결과 5회 평균 EC50 값이 지수 함수로 계산했을 때 25.88 ppm (크롬농도), 선형 내삽함수로 계산했을 때 35.4 ppm (크롬농도)이었다. 대조군의 2배수 성장시간은 모두 2.5일 이하로서 시험 기준에 적합하였다. 자료의 정규분포 여부와 variance의 homogeneity를 분석하기 위하여 수행한 통계분석 결과 각 시험 자료가 모두 정규분포였으며 homogeneous 하였다.

*Lemna*는 수생 식물에 대한 환경독성을 평가하는 대표적인 시험종으로서 본 연구에서는 국내에서 처음으로 국제적인 시험법에 따라 *Lemna*의 독성시험을 수행하였다. 이와 같이 새로운 시험법의 확립은 향후 우리나라 화학물질 관리를 보다 과학적이고 세밀하게 구성할 수 있도록 하는 실질적인 기초작업이 될 것이다.

참 고 문 헌

- OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, proposal for a new guideline 221, *Lemna* sp. Growth Inhibition Test, 2000.
- Rim KH. 1961. On the medicinal plants of Korea. (III). Kor. J. Bot. 2: 41-42.
- Tripathi BD, Srivastava J and Misra K. Nitrogen and phosphorus removal capacity of four chosen aquatic macrophytes in tropical freshwater ponds. Environmental Conservation 1991; 14: 3-7.
- U.S. EPA. Ecological Effects Test Guidelines, Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., Tiers I and II. OPPTS 850.4400, EPA 712-C-96-156 April 1996.
- 김하승, 임병선. 농경지 배출수의 수질개선을 위한 수생식물의 정화능과 활용방안에 관한 연구. 환경관리학회지 1998; 4(2): 1-8.
- 임재명, 김병욱. 혐기성 소화와 수생식물을 이용한 고농도 돈사폐수 처리. 대한환경공학회지 2001; 23(6): 911-920.