

국내 서식 담수새우 새뱅이(*Neocaridina denticulata*)를 이용한 3,4-Dichloroaniline의 급성독성 교차시험(Ring test)

신유진 · 이재우* · 김지은 · 조재구** · 김자현*** · 강민호**** · 김경태 · 김필제 · 박경화†
국립환경과학원 위해성평가연구과, *국립환경과학원 화학물질연구과, **호서대학교 안전성평가센터,
안전성평가연구소 환경독성연구센터, *네오엔비즈

Ring Test as Acute Toxicity Test with Korean Freshwater Shrimp, *Neocaridina denticulata* using 3,4-Dichloroaniline

Yu-jin Shin, Jae-woo Lee*, Jieun Kim, Jaegu Cho**, Ja-Hyun Kim***,
Minho Kang****, Kyungtae Kim, Pil-je Kim, and Kyunghwa Park†

Risk Assessment Division, National Institute of Environmental Research
*Chemical Research Division, National Institute of Environmental Research
**Toxicological Research Center, Hoseo University
***Korean Institute of Toxicology
****Neo Environmental Business Co.

ABSTRACT

Objectives: For suitable risk management of the domestic aquatic environment, it is necessary to conduct toxicity tests using species native to Korea. In the present study, we performed toxicity ring tests using endemic freshwater arthropoda *Neocaridina denticulata* and evaluated its validity and reproducibility as an international standard test species.

Methods: To evaluate the sensitivity levels of *N. denticulata* to hazardous chemicals, toxicity values for several chemicals were compared with other standard test species. Intra- and inter-laboratory acute toxicity tests were performed both within a single laboratory and among four laboratories respectively using 3,4-Dichloroaniline, which is generally used as a reference test substance in fish toxicity tests. In addition, intra- and inter-laboratory coefficient of variations (CVs) were calculated to evaluate reproducibility based on the estimated toxicity values.

Results: The sensitivity of *N. denticulata* to several chemicals was found to be similar with *D. magna*, indicating that the species is valid as a test species. The CVs of the intra- and inter-laboratory tests were 22.946% with four qualified runs and 8.828% among the four laboratories, respectively.

Conclusions: *N. denticulata* serves in an important role in the food chain of Korean aquatic ecosystems and also inhabits several other Asian countries. Since the validity and reproducibility of the species were confirmed as a toxicity test species in this study, further efforts are needed to establish *N. denticulata* as the international standard test species for the appropriate risk assessment of aquatic ecosystems at home and abroad.

Key words: Aquatic toxicity, Korean dominant species, *Neocaridina denticulata*, Ring test

†Corresponding author: National Institute of Environmental Research, Hwangyong-ro 42, Seogu, Incheon 22689, Republic of Korea, Tel: +82-32-560-7166, Fax: +82-32-568-2037, E-mail: mirrorpark@korea.kr
Received: 8 June 2019, Revised: 11 June 2019, Accepted: 20 June 2019

I. 서 론

화학물질의 생태계에 미칠 수 있는 잠재적 위해성을 규명하기 위해 사용되는 생태독성자료는 경제협력개발기구(OECD), 국제표준화기구(ISO), 미국재료시험협회(ASTM), 미국 환경청(US EPA) 등 국제적으로 공신력 있는 기구에서 제공하는 표준시험법에 따라 수행된 시험자료의 활용을 권고하고 있다.^{1,2)} 국내에서 사용되는 표준시험법(한국표준협회,³⁾ 국립환경과학원 고시,⁴⁾ 농촌진흥청 고시⁵⁾ 역시 상기 국제 표준시험법을 바탕으로 마련된 것이다. 결과적으로 많은 국외 시험종이 국내에서 사용되고 있으며 그에 따른 여러 가지 문제점이 지속적으로 제기되어 왔다. 생태독성 및 위해성 연구를 위해 외래종을 도입할 경우, 먹이사슬로 연관된 국내 생물 간 상호관련성이 배제되며,⁶⁾ 외래종 수입비용 발생 및 비의도적 유출에 의한 생태계 교란이 야기될 수 있다.⁷⁾ 이러한 문제점을 해결하기 위해 미국을 비롯한 선진국 뿐만 아니라 중국 등 전 세계적으로 자국의 고유생물종을 이용한 국내화 연구가 활발히 진행되고 있다.⁸⁾ 현재 국내에서 사용되는 수서생태독성 표준시험법에서 권고된 시험생물은 세균, 원생생물부터 동·식물계까지 총 120종, 이 중 국내 자생종은 31종으로 25.8%에 불과한 것으로 파악되고 있다.^{9,10)} 이에 따라 국내에서도 우리나라 환경에 적합한 생태위해 관리를 위해 국내 수서 서식종을 이용한 표준시험법 개발 및 표준화와 함께 OECD 가입 국가로서 국내 자생종을 국제 표준시험종으로 진출시키기 위한 활발한 노력이 이루어지고 있다.⁶⁻³³⁾

한편, OECD Test guideline 개발안내서에 따르면 시험지침의 개발 또는 갱신을 위해서는 제안된 시험방법(또는 기존 시험지침의 변형)이 시험방법의 유효성을 기술하는 연구실 간 비교연구(e.g. 교차시험(ring test) 또는 그에 상응하는)를 포함하여, 그 유효성 확인 및 규제 수용과 관련하여 중요한 평가를 받은 경우에만 가능하다고 언급하고 있다.³⁴⁾ 따라서 국제 표준시험법으로의 국내 서식종의 진출을 위해서는 시험물질별 정량적 생태독성자료 구축도 중요하지만^{9,10)} 시험실 간 교차연구를 통해 해당 생물종을 이용한 시험결과의 재현성을 확인하는 절차가 반드시 필요할 것이다.

새뱅이(*Neocaridina denticulata*)는 절지동물문

(Phylum Arthropoda), 연갑강(Class Malacostraca), 십각목(Order Decapoda), 새뱅이과(Family Atyidae)에 속하는 국내 서식 난생 무척추동물로써, 하천이나 연못 및 호수의 수초 주변에 서식한다³⁵⁾. 우리나라 경기도, 전라북도, 충청북도, 경상남도 및 제주도 등에 널리 서식하며, 일본, 중국, 대만 등지의 온대 또는 열대 지역에서도 찾아볼 수 있다.^{35,36)}

주로 하상의 유기물 또는 동물 사체 등을 섭식하며 또한 상위 포식자의 먹이가 됨으로써 국내 수계 먹이사슬 내에서 중간단계에 위치하여 생태적으로 중요한 위치를 차지하는 생물종이다.^{37,38)} 개체 확보가 쉽고 일정한 수온과 빛 조건에서 연중 산란하여 실험실내 계대배양의 용이하다. 성체가 되기까지 약 3개월로 비교적 짧은 생활사를 가져 OECD TG 권장 시험종으로써의 장점을 지니고 있다. 새뱅이의 형태, 발달과정, 사육조건 등은 국립환경과학원에서 발표한 연구보고서에 자세히 기록되어 있다.⁸⁾

본 연구에서는 새뱅이의 화학물질에 대한 독성값을 타 시험종과 비교하여 유해물질에 대한 민감도 수준을 파악하고, 어류의 reference 시험물질로써 널리 쓰이는 3,4-Dichloroaniline (3,4-DCA)³⁹⁻⁴¹⁾에 대한 급성독성시험을 시험실 내 반복시험 및 타 연구기관과의 교차시험을 통한 재현성을 검증하여 궁극적으로 국내 자생종 새뱅이의 국제 표준 생태독성 시험종으로의 진출 가능성을 평가하였다.

II. 실험 방법

1. 시험생물

본 연구에 사용된 새뱅이는 전북 전주와 충북 영동에서 채집하여, 국립환경과학원 환경독성연구동 고유종 사육실에서 2주 이상 순화되었다. 순화환경은 기존 연구결과에 따라 수온 20~25°C, pH 7~8, 용존산소(DO) 60% (6 mg/L) 이상, 경도(hardness) 0~150 mg CaCO₃/L (변동폭 50 mg/L 이하), 광주기 16시간/8시간(명/암)으로 유지하였다¹⁵⁾. 순화기간 동안 사육밀도는 사육용수(탈염소수) 1 L당 시험개체 체적이 1.5 g 이상이 되지 않도록 하고 먹이로써 새우 전용사료(Novo Prawn, JBL, Germany)를 1일 1회 공급하였으며 시험개시 2일 전에 절식하였다. 또한, 교차시험을 위해 본원에서 순화한 새뱅이를 각 시험기관에 이송하여 위 조건과 동일하게 최소 한 달 이

상 각 기관의 연구실에서 순화하도록 하였다. 총 체장이 25.0±5 mm 인(부화 후 3개월 이상) 외관상 건강상태가 양호한 개체를 선별하여 시험 전 시험조건에서의 순화 48시간 이후의 치사율이 5% 이내일 경우 시험에 사용하였다. 암컷의 경우 포란한(brooding) 개체는 시험에 사용하지 않았다. 생이하목 새우류는 검은색 알을 배다리에 가지고 있어 포란 여부가 육안으로 확인 가능하다.

2. 새뱅이와 국제 시험종과의 화학물질에 대한 민감도 비교

새뱅이의 화학물질에 대한 민감도 수준을 확인하기 위해 중금속 및 기타 유기화합물에 대한 96시간 반수치사농도(96h-LC50, Lethal concentration 50%)를 타 연감각 시험종과 수생태 독성시험종으로 널리 사용되는 물벼룩(*Daphnia magna*) 및 어류(*Oryzias latipes*, *Danio rerio*)와 비교하였다. 새뱅이의 화학물질에 대한 독성값은 본 기관에서 이전에 수행하였던 연구보고서 및 문헌을 참고하였으며, 다른 시험종의 독성값은 US EPA ECOTOX Knowledgebase (<http://cfpub.epa.gov/ecotox>)⁴²⁾와 기타 문헌에서 수집하였다.

3. 시험물질

시험물질은 OECD 생태독성시험방법 검증 보고서를 참고하여 3,4-Dichloroaniline (3,4-DCA, CAC No. 95-76-1, Sigma-Aldrich Inc. USA)을 선정하였다³⁹⁻⁴¹⁾. 표준용액 (Stock solution)은 사육용수 1 L에 500 mg의 시험물질을 넣고 교반기에서 72°C로 24시간 동안 교반하여 완전히 용해된 상태로 준비하였다.⁴³⁾

4. 시험방법

교차시험 전 재현성 확인을 위해 본 연구의 주관 기관인 국립환경과학원에서 예비시험 및 4회의 본시험을 반복 수행하였다. 시험법의 표준화를 위한 교차시험은 시험물질 및 시험용액의 조제방법, 시험농도, 노출방식 등 모든 항목을 재현성 시험과 동일하게 각 시험기관에 적용하여 1회 수행하도록 하였다.

4.1. 노출농도

시험농도는 본 기관에서 실시한 예비시험 결과를

바탕으로 공비를 2로 하여 대조군과 5개의 시험군 (0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mg/L)으로 설정하였다.

4.2. 노출방법

2 L의 시험용액을 넣은 유리 비커에 10마리의 시험 개체를 96시간 동안 노출하였으며, 48시간에 시험용액 전량을 환수하는 반 지수식(semi-static)으로 진행하였다. 대조군을 포함한 모든 농도를 3반복으로 1회(본 기관에서는 4회) 실시하였으며, 시험 시작부터 24시간마다 치사 및 이상 개체를 관찰하여 기록하였다. 치사 개체는 수질의 급격한 오염을 방지하기 위해 발견 즉시 시험용기에서 제거하였다. 수온, pH, 용존산소(DO), 경도(hardness), 전도도(conductivity)를 시험개시, 24시간, 48시간 환수 전·후, 72시간, 시험 종료 시점에 측정하여 기록하였다.

4.3. 노출농도 분석

시험용액 내 물질의 농도분석을 위해 모든 농도의 시험용액을 시험개시 직후, 환수 전·후 및 시험 종료 시점 등 총 4회 적정량의 시험용액을 채수하여 고성능액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC) YL9100 (YOUNG LIN, Korea)로 분석하였다. 고농도인 5와 10 mg/L의 시료는 3차 증류수로 희석하였으며, 모든 시료는 0.45 µm syringe filter로 여과 후 HPLC로 분석하였다. 기기분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. HPLC conditions for analysis of 3,4-Dichloroaniline

Test institution	Specification
Column	Sunfire C18 (4.6×150 mm, 3.5 µm, Waters, UK)
Injection volume	20 µL
Mobile phase	Acetonitrile/D.W.=80/20
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	UV (248 nm)
Run time	2.05~2.20 min
LOD*	0.006 mg/L
LOQ†	0.019 mg/L
R ² ‡	1.000

*LOD: Limit of detection

†LOQ: Limit of quantitation

‡R²: Coefficient of correlation

4.4. 교차시험기관

교차시험 참여 기관으로 국내 화학물질시험기관 중 환경부 국립환경과학원에서 우수시험실운영기준 (Good Laboratory Practice, GLP)으로 지정받은 2기관과 산업폐수에 대한 생태독성시험을 수행하는 분석시험기관 한 곳을 선정하였으며, 본 기관을 Lab. A로, 참여 기관 각각을 Lab. B~D로 표기하였다.

5. 통계처리

48시간 및 96시간 반수치사농도(48h-LC50, 96h-LC50)를 산출하기 위해 미국 환경보호청 (United States Environmental Protection Agency, US EPA)에서 제공하는 TSK(Trimmed Spearman-Kärber, Version 1.5)를 이용하였다. 시험의 재현성 확인을 위해 각 시험에서 산출된 48h-LC50와 96h-LC50에 대한 변이계수(Coefficient of variations, CVs)를 산출하였다. 변이계수는 서로 다른 집단평균의 변이정도 나타내는 값으로 집단의 산술평균에 대한 표준편차의 비로서 다음 식에 따라 구할 수 있다.

$$CVs(\%) = \frac{S}{M} \times 100$$

CVs: 변이계수

S: STDEV(표준편차)

M: 집단의 산술평균

III. 결과 및 고찰

새뱅이의 화학물질에 대한 민감도 수준을 확인하기 위해 타 시험종의 독성값과 비교하였다(Table 2, Fig. 1, Fig. 2). 연갑강 시험종의 독성정보가 매우 미비한 수준이었으나 이 중 *Gammarus pseudolimnaeus*의 중금속 Cadmium chloride, Copper chloride와 Zinc chloride에 대한 민감도가 새뱅이와 가장 유사한 수준을 보였다. 그 외 유기화학물질에 대한 타 연갑강 시험종의 독성 민감도 자료가 매우 부족하였다. 시험종으로 널리 쓰이는 물벼룩 *D. magna*와 두어종 *O. latipes*와 *D. rerio*와의 민감도 차이를 비교한 결과 화학물질마다 차이는 있지만 같은 절지동물문에 속하는 *D. magna*와 유사하거나 크게 다르지 않은 수준을 보이는 것으로 확인되었다.

국내 고유생물종인 새뱅이를 이용한 급성독성시험

의 결과는 모두 분석농도값으로 산출하였다. 재현성 확인을 위해 수행한 4회 반복시험의 결과 평균 96h-LC50 값은 4.08 mg/L, 표준편차는 0.94 mg/L로 확인되어 변이계수가 22.96%로 확인되었다. 각 기관의 교차시험 수행결과와 평균 96h-LC50 값은 4.12 mg/L, 표준편차는 0.36 mg/L로 확인되어 변이계수가 8.83%로 산출되었다(Table 3). 대부분의 교차시험에서 실험실내 반복시험보다 실험실간 교차시험의 변이계수가 더 큰 값이 산출되는데, 본 연구에서는 실험실내 반복시험 중 2차 시험에서 다른 세 번의 시험과 상이한 독성영향이 나타나 오히려 타 기관과의 교차시험보다 큰 변이계수가 산출되었다.

생물은 다양한 조건에 의해 쉽게 영향을 받기 때문에, 넓은 범위의 변동폭 (20~50%)을 나타내는 것으로 알려져 있다.⁴⁶⁾ 또한, OECD에서 발행한 교차시험 검증 보고서 및 관련 문헌들에 따르면 생물을 이용한 교차시험에서의 실험실간 변동계수가 30% 미만일 때 유효성을 인정하고 있다.^{40,41,47-49)} 따라서 본 연구에서 수행한 시험실 내 반복시험(22.96%) 및 실험실간 교차시험의 변동계수(8.83%)는 모두 유효한 수준인 것으로 확인되었다. 특히, 교차시험에서의 변동계수가 비교적 작게 산출되어 새뱅이를 이용한 독성시험의 재현성이 높은 것으로 확인되었다.

시험실에서 시험 기간 동안 분석한 노출 용액의 수질 측정결과는 Table 4와 같으며, 환수 전 치사개체가 많았던 고농도 시험군에서의 DO 값을 제외하면 대부분의 조건이 시험지침에서 벗어나지 않는 수준을 유지하여 모든 시험이 유효한 것으로 확인되었다.

IV. 결론

국내 수생태의 환경에 적합한 위해관리를 위해 국내 자생생물종 담수 새우인 새뱅이를 이용하여 화학물질에 대한 reference 물질로 널리 사용되는 3,4-Dichloroaniline 독성영향 평가 시험을 수행하였으며, 타 기관과의 교차시험을 통해 재현성을 검증하였다. 또한, 기존 문헌값을 이용하여 다양한 유해화학물질에 대한 민감도를 타 시험종과 비교함으로써 독성시험 생물종으로써의 유효성을 확인하였다. 국내 수생태계에서 1차 소비자이자 어류 등의 먹이인 피식자이기도 한 새뱅이는 국내 수계에서 중요한 위치를 가지는 동시에 아시아 국가에서 널리 서식하는 생물

Table 2. Comparison of sensitivity (96h-LC50, Lethal concentration 50%) to chemicals of freshwater malacostraca with *Neocaridina denticulata* (based on US EPA ECOTOX Knowledgebase and the previous research)

Chemical name	Metal					Other chemicals					
	Cadmium chloride	Copper chloride	Copper sulfate	Zinc chloride	Zinc sulfate	Pentachloro phenol	Pentachloro phenol sodium salt	Potassium dichromate	Sodium azide	Sodium hypochlorite	3,4-Dichloro aniline
CAS No.	10108-64-2	7447-39-4	7758-98-7	7646-85-7	7733-02-0	87-86-5	131-52-2	7778-50-9	26628-22-8	7681-52-9	95-76-1
<i>Neocaridina denticulata</i>	0.018 ⁽⁸⁾ , 0.028 ⁽²⁰⁾ , 0.043 ⁽²¹⁾	0.104 ⁽²¹⁾	0.15 ⁽¹⁸⁾	2.021 ⁽²¹⁾	15.96 ⁽¹⁸⁾	0.24 ⁽⁸⁾	0.297 ⁽²⁰⁾ , 0.53 ⁽²⁸⁾	0.62 ⁽²⁹⁾ , 1.21 ^(18,28) , 1.601 ⁽²⁰⁾	2.4 ⁽²⁸⁾	5.58 ⁽¹⁸⁾	4.8 ⁽²⁰⁾ (This study) 4.42~4.37
<i>Cambarus</i> sp.	5, 18.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gammarus fasciatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-
<i>Gammarus lacustris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-
<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>	0.022~ 0.068	0.025, 0.23	-	0.28, 0.33	-	-	-	-	-	-	-
<i>Daphnia magna</i> (48h-LC50)	0.003~ 0.77	0.012~ 0.077	0.044~ 0.34	0.21 ~ 8.4	0.022~ 4.028	0.145~ 1.38	0.28~ 0.84	0.15~ 7.6	0.032, 0.055	-	0.1~ 4.5
<i>Oryzias latipes</i>	0.016, 2.2 ⁽⁴³⁾	-	-	-	-	0.024	0.23~ 0.39	24.746, 28.281	-	-	-
<i>Danio rerio</i>	3.3, 30.33	-	0.038~0.63	25, 44.48	1.75, 7.48	0.13~ 0.45	1.13	21.209~ 89.1	-	-	0.85 ⁽⁴⁴⁾ ~ 12.05 ⁽²⁰⁾

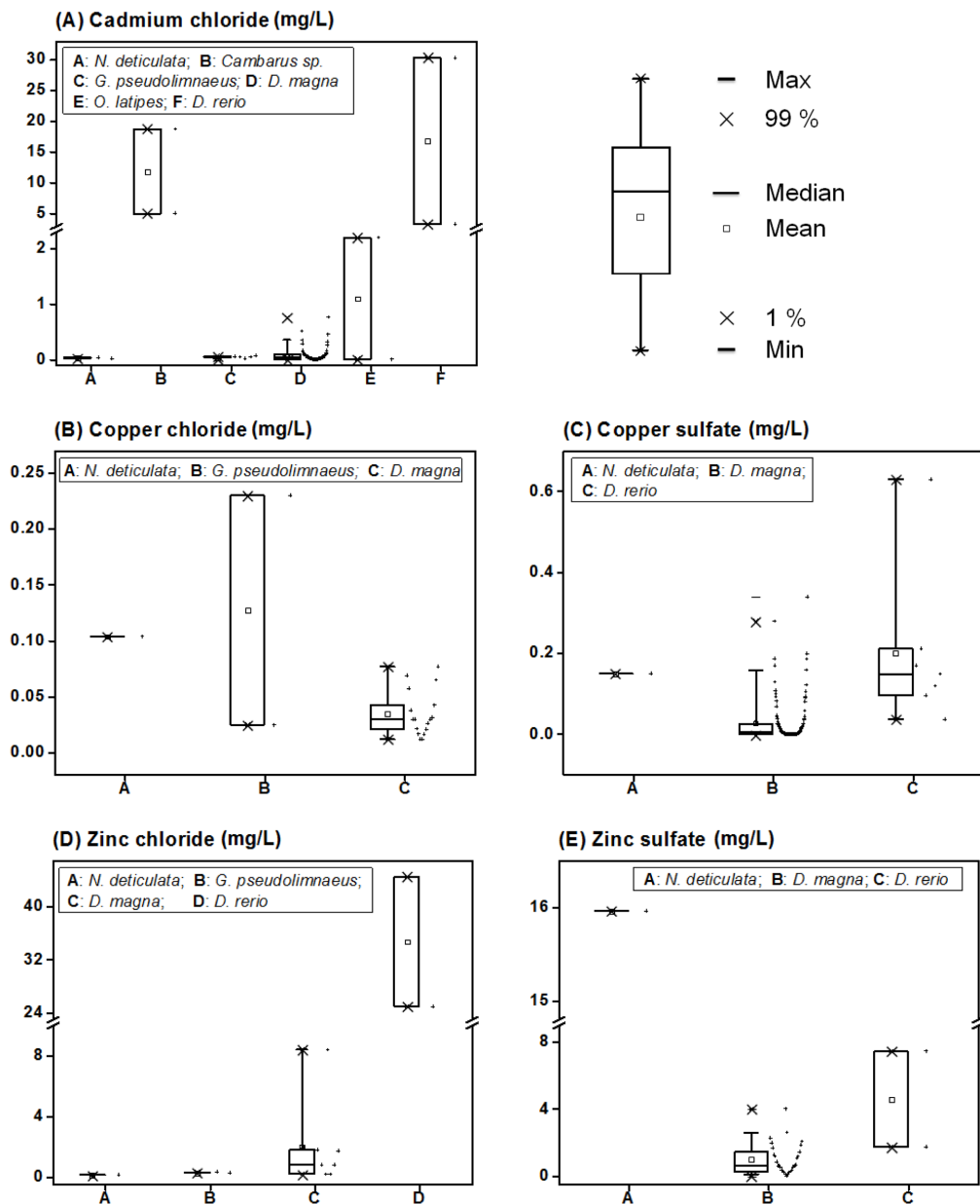


Fig. 1. Comparison of sensitivity (96h-LC50) to heavy metals of freshwater test species with *Neocaridina denticulata* (48h-LC50 was used as toxicity value for *Daphnia magna*)

중이다. 또한, 본 연구에서 화학물질 독성시험 생물 종으로써의 유효성과 3,4-DCA에 대한 교차시험의 재현성 검증되었기에 국제 표준시험종으로써 가치가 있을 것으로 판단된다. 따라서 새뱅이를 국제 표준

시험종으로 진출시키기 위해서는 차후 다양한 화학 물질에 대한 확실한 재현성을 확보할 수 있도록 여러 차례의 교차시험을 수행하고 이들을 이용한 표준 시험법 개발 등의 노력이 필요할 것이다.

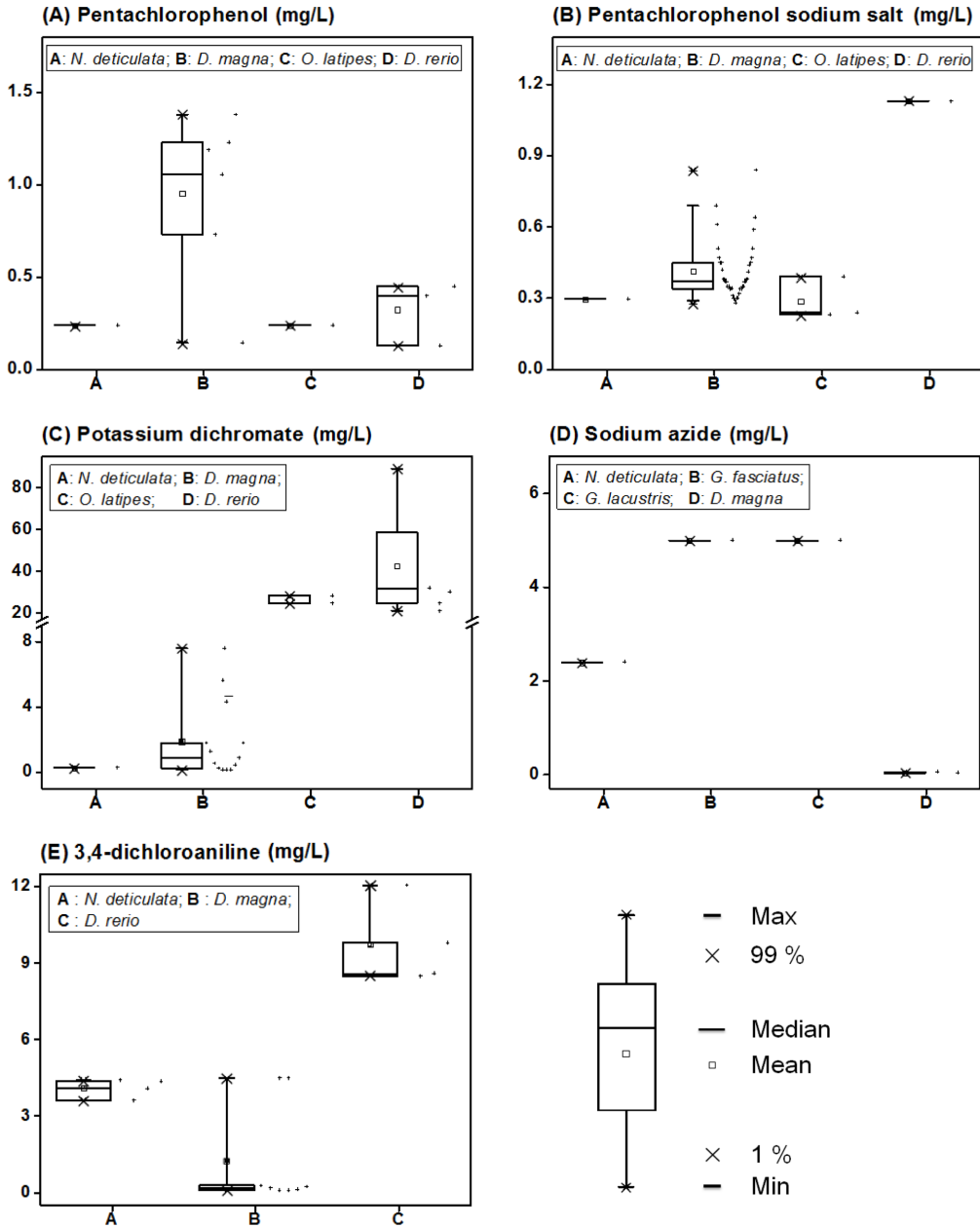


Fig. 2. Comparison of sensitivity (96h-LC50) to chemical compounds of freshwater test species with *Neocaridina denticulata* (48h-LC50 for *Daphnia magna*)

감사의 글

본 연구는 국립환경과학원의 『국내 담수생물의 유해물질 독성감수성 및 현장 적용성 평가 연구』 연구사업의 지원(과제번호: 2015-01-01-089)에 의해

수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Klimisch HJ, Andreae M, Tillmann U, A system-

Table 3. Result of ring test of 3,4-Dichloroaniline on *Neocaridina denticulata*

Test institution		48h-LC50 (mg/L)	SD*	96h-LC50 (mg/L)	SD
NIER (Lab. A)	Test 1	7.820	1.086	4.340	0.867
	Test 2	5.120	0.552	2.700	1.570
	Test 3	5.907	0.906	4.503	0.880
	Test 4	6.823	0.821	4.770	0.824
	Mean	6.418	1.166	4.078	0.936
Intra-Laboratory CVs[†] (%)		18.163		22.946	
Lab. B		5.597	0.685	3.627	0.036
Lab. C		7.450	0.139	4.370	0.314
Lab. D		-	-	4.420	1.131
Mean (A~D)		6.488		4.124	
SD		0.929		0.364	
Inter-Laboratory CVs (%)		14.314		8.828	

*SD; standard deviation

†CVs; coefficient of variations

Table 4. Analysis of water quality in test duration

Test institution		Temperature (°C)	pH	DO (mg/L)	Hardness (mg/L)	Conductivity (μS/cm)	Total Length (cm)/ WW* (g)
NIER (Lab. A)	Test 1	22.3-25.1	7.2-7.9	2.2-7.9	44-73	141-241	
	Test 2	23.7-24.4	7.0-7.8	1.0-8.4	38-54	183-214	2.1-3.1/
	Test 3	22.0-25.3	7.0-7.9	1.3-7.0	33-55	182-206	0.12-0.37
	Test 4	24.5-25.0	7.0-7.8	2.5-7.1	20-50	183-212	
Lab. B		22.8-23.4	7.2-7.8	2.6-8.4	-	-	-
Lab. C		24.8-25.1	7.3-7.7	7.6-8.0	31-61	81-88	2.2-2.7/ 0.17-0.30
Lab. D		23.3-24.7	7.0-7.9	7.1-9.6	58-80	212-228	2.5-3.4/ 0.21-0.29

*wet weight

atic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regul Toxicol Pharm.* 1997; 25: 1-5.

- European Communities (EC), Common implementation strategy for the water frame work directive (2000/60/EC). Guidance document No. 27. Technical guidance for deriving environmental quality standard. European Communities (EC); 2011. p. 132-134.
- Korean Standards Service Network (KSSN), ISO/TC 147/SC 5: Biological methods, Seoul: Korean Satandars Association (KSA).
- National Institute of Environmental Research (NIER) announcement 2019-23, Regulation for des-

ignation of research institute for testing chemical hazards, Incheon: NIER; 2019.

- Rural Development Administration announcement 2019-14. Standard for registration of agricultural pesticides and technical, Jeonjo-si: RDA; 2019.
- Park YS, Lee, SG, Lee, SJ, Moon, SK, Choi, EJ. and Rhie, K-T, Heavy metal toxicity test in *Moina macrocopa* with Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *J. Environ. Toxicol.*, 18(4), 305-310, (2003)
- Lee CW, Culture method of *Simocephalus mixtus* (*S. mixtus*) to evaluate environment toxicity and measurement method of environment toxicity by *S. mixtus*. Daejeon: Korean Intellectual Property

- Office; 2003.
8. Ryu JS, Nam KC, Kim EK, Yang CY, Choi KH, Study on the Korean native organism for ecological toxicity evaluation. Incheon: National Institute of Environmental Research (NIER); 2006. p. 15-18.
 9. Nam SH, An YJ, Investigation of Korean native organisms for development of ecotoxicity test: (1) Aquatic test species. *J Korean Soc Environ Eng.* 2018; 40(1): 34-47.
 10. Nam SH, Kim MJ, An YJ, Deriving candidate list of Korean native organisms for ecotoxicity testing: (1) Aquatic test species. *J Korean Soc Environ Eng.* 2018; 41(1): 10-23.
 11. Korea research institute of chemical technology. Establishment toxicity assessment system and management of hazardous chemicals. Gwacheon: Ministry of Environment; 1999.
 12. Ryu JS, Lee CW, Park ER, Kim HM, Kim EK, Kim KT, *et al.* Development and standardization of ecotoxicity tests using species indigenous to Korea (?). Incheon: National Institute of Environmental Research (NIER); 2007.
 13. Ryu JS, Wang SJ, Park ER, Jo EH, Kim HM, Lee CW, *et al.* Development and standardization of ecotoxicity tests using species indigenous to Korea (?). Incheon: National Institute of Environmental Research (NIER); 2008.
 14. Ryu JS, Yoon JH, Joung KE, Nam KC, Lee JW, Yang CY, *et al.* Development and standardization of ecotoxicity tests using species indigenous to Korea (III). Incheon: National Institute of Environmental Research (NIER); 2009.
 15. Byeon MS, Noh SY, Lee JY, Yang HJ, Development of biological criteria for water quality assessment using aquatic organisms (II). Incheon: National Institute of Environmental Research (NIER); 2009.
 16. Ryu JK, National Institute of Environmental Research (NIER), Development of environmental criteria for aquatic life. Incheon: National Institute of Environmental Research (NIER); 2010.
 17. Ryu JS, Lee JA, Eom IC, Nam KC, Ryu TK, Lee JW, *et al.* Development and standardization of ecotoxicity tests using *Neocardina denticulata* (I). Incheon: National Institute of Environmental Research (NIER); 2010.
 18. Ryu JS, Lee JA, Lee JW, Kim JE, Ryu TK, Kim KT, *et al.* Studies on biological test system for environmental hazard assessment using indigenous species. Incheon: National Institute of Environmental Research (NIER); 2011.
 19. Neo Environmental Business Co., Studies on plan for diversification of test species in ecotoxicity assessment. Incheon: National Institute of Environmental Research (NIER); 2013.
 20. Par KH, Lee JW, Kim KT, Shin YJ, Kim JE, Kim HJ, *et al.* Validation and application of acute toxicity test using Korean native freshwater species. Incheon: National Institute of Environmental Research (NIER); 2015.
 21. Ryu J, Kim EK, Moon YR, Kim HM, Kim HJ, Choi K. Acute toxicity test of heavy metals using Korean freshwater shrimp, *Neocardina denticulata*. *J Environ Toxicol.* 2007; 22(2): 171-175.
 22. An YJ, Nam SH, Lee JK. Domestic test species for aquatic toxicity assessment in Korea. *Korean J Limnol.* 2007; 40(1): 1-13.
 23. Nam SH, Yang CY, Ha YJ, Lee JK. Fundamentals of ecotoxicity evaluation methods using domestic aquatic organisms in Korea: (I) Fish. *Korean J Limnol.* 2007; 40(2): 173-183.
 24. An YJ, Nam SH, Lee WM. Fundamentals of ecotoxicity evaluation methods using domestic aquatic organisms in Korea: (II) Water flea. *Korean J Limnol.* 2007; 40(3): 387-369.
 25. An YJ, Nam SH, Baek YW. Fundamentals of ecotoxicity evaluation methods using domestic aquatic organisms in Korea: (III) Green algae. *Korean J Limnol.* 2008; 41(2): 117-127.
 26. Lee JS, Lee SM, Park GS. Development of sediment toxicity test protocols using Korean indigenous marine benthic amphipods. *Journal of the Korean Society of Oceanography* 2008; 13(2): 147-155(2008).
 27. Park YS, Jung SJ, Oh NR, Choi EJ, Rhie KT. Heavy metal toxicity test in *Moina macrocopa* with enzyme activity. *J Environ Toxicol.* 2008; 23(1): 17-22.
 28. Lee JW, Moon YR, Yoon J, Choi K, Han JS, Ryu J. Acute toxicity of Pentachlorophenol sodium salt, Potassium dichromate, Sodium azide to *Neocardina denticulata*. *EHT.* 2010; 25(3): 223-228.
 29. Lee JW, Kim KT, Cho JG, Kim JE, Lee JA, Kim PJ, Ryu JS. Comparison of acute toxicity sensitivity of Potassium dichromate to the larva *Neocardina denticulata*, *Daphnia magna* and the juvenile *Oryzias latipes*. *Korean J Environ Biol.* 2012; 30(4): 314-318.
 30. Gwangju Institute of Science and Technology (GIST) Development of toxicity data and recommended water quality guideline for protection of aquatic species in national freshwater (Dissemination). Gwangju: GIST; 2015.

31. Kim EJ, Lee JW, Jo EH, Sung HK, Yoo SK, Kim KT. *et al.* Fate and Bioaccumulation of Zinc Oxide Nanoparticles in a Microcosm. *J Environ Health Sci.* 2017; 43(3): 194-201.
32. Cui R, Kwak JI, An YJ. Characteristics and Toxicity Sensitivity of Korean Dominant Species *Daphnia galeata* for Ecotoxicity Testing: Comparative Study with *Daphnia magna*. *J Korean Soc Environ Eng.* 2016; 38(4): 193-200.
33. Cui R, Kwak JI, An YJ. Comparative study of the sensitivity of *Daphnia galeata* and *Daphnia magna* to heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018; 162: 63-70.
34. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Series on testing and assessment No. 1. Guidance document for the development of OECD guidelines for testing of chemicals (as revised in 2009), Paris: OECD; 2009. p. 27-28.
35. National Institute of Biological Resources Home Page, https://species.nibr.go.kr/home/mainHome.do?cont_link=009&subMenu=009002&contCd=009002&ktsn=120000211463 [accessed 18 March 2019]
36. Kim HS, Illustrated Flora and Fauna of Korea. Ministry of education, p. 1-414 (1997).
37. Englund RA, Cai Y. The occurrence and description of *Neocaridina denticulata sinensis* (Kemp, 1918) (Crustacea: Decapoda: Atyidae), a new introduction to the Hawaiian Island. *Bishop Mus Occas Pap.* 1999; 58: 58-65.
38. Huang DJ, Wang SY, Che HD. Effects of the endocrine disrupter chemicals chlordane and lindane on the male green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*). *Chemosphere* 2004; 57(11): 1621-1627.
39. German Standardization Organization, German standard methods for the examination of water, waste water and sludge-Subanimal testing (group T)-Part 6: Toxicity to fish. Determination of the non-acute poisonous effect of waste water to fish eggs by dilution limits (T 6), Deutsches Institut für Normung E. V. (DIN); 38415-6, 2003.
40. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Series on testing and assessment No. 157. Validation report (Phase 1) for the zebrafish embryo toxicity test Part I. Paris: OECD; 2011.
41. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Series on testing and assessment No. 179. Validation report (Phase 2) for the zebrafish embryo toxicity test. Paris: OECD; 2012.
42. United State Environmental Protection Agency (US EPA), ECOTOX Knowledgebase” <http://cfpub.epa.gov/ecotox> [accessed 27 March 2019].
43. Schafer C, Nagel R. Effects fo 3,4-dichloroaniline on fish populations. Comparison between R- and K-strategists; A complete life cycle test with the guppy (*Poecilia reticulata*). *Arch Environ Contam Toxicol.* 1991; 21: 297-302.
44. Chen CM, Yu SC, Liu MC. Use of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in toxicity tests on different industrial effluents in Taiwan, *Arch. Environ Contam Toxicol.* 2001; 40(3): 363-370.
45. European chemicals bureau, European union risk assessment report: 3,4-dichloroaniline(3,4-DCA). European commision; 65; 2006.
46. Bolton S. Pharmaceutical Statistics: Practical and clinical applications, Second Ed., New York: Marcel Dekker Inc; 1990. p. 21-22.
47. Wang N, Augspurger T, Barnhart MC, Bidwell JR, Cope WG, Dwyer FJ. *et al.* Intra- and interlaboratory in acute toxicity tests with glochidia and juveniles of freshwater mussels (unionidae), *Environ Toxicol Chem.* 2007; 26(10): 2029-2035.
48. Perssone G, Baudo R, Cotman M, Blaise C, Thompson KCI, Moreira-Santos M. *et al.* Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test-Evaluation of th sensitivity and the precision fo assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knwl Managt Aquatic Eosyst.* 2009; 393(01).
49. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Series on testing and assessment No. 205. Myriophyllum spicatum toxicity test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system-ring test report. Paris: OECD; 2014.

<저자정보>

신유진(전문위원), 이재우(공업연구사), 김지은(전문위원)
조재구(연구원), 김자현(연구원), 강민호(대리),
김경태(공업연구사), 김필제(과장), 박경화(환경연구관)