

## 1,4-dioxane이 물벼룩에 미치는 독성에 대한 평가

윤나나<sup>†</sup>·김봉기·정재은·유은희·이경심  
수질분석과

### Toxicity Evaluation of 1,4-Dioxane on Waterflea(*Daphnia magna*)

Yoon Na-na<sup>†</sup>, Kim Bong-gi, Jung Jae-eun, Yu Eun-hee and Lee Kyeong-sim

Water Analysis Division

#### Abstracts

To assess the effect of 1,4-dioxane on freshwater aquatic organisms, acute, chronic and multi-generational toxicity studies for waterflea(*daphnia magna*) were conducted. Acute toxicity was assessed on the basis of immobility, while chronic and multi-generational toxicity were assessed on the basis of reproduction and growth. In acute toxicity test, the 24h, 48h-EC<sub>50</sub> values were 8516.74 and 7405.67 mg/L respectively. 1,4-dioxane has very low acute toxicity to *daphnia magna*. In chronic toxicity test, the NOEC, LOEC values for the reproduction of *daphnia magna* were 500 and 1000 mg/L respectively, and the NOEC, LOEC values for the growth of *daphnia magna* were 2000 and 3000 mg/L respectively. These results indicated that *daphnia magna* was susceptible to the reproduction than the growth. In multi-generational toxicity test, the NOEC, LOEC values for the reproduction of 3-generation *daphnia magna* were 250 and 500 mg/L respectively, and the NOEC, LOEC values for the growth of 3-generation *daphnia magna* were more than 10 mg/L, which is the highest concentration in the range of test concentrations. Like the chronic toxicity, 3-generation *daphnia magna* was susceptible to the reproduction than the growth. When the 1 and 3-generation *daphnia magna* exposed to 1,4-dioxane was compared, there was no significant difference in the growth, but the 3-generation *daphnia magna* was less reproductive. The NOEC values of the 1 and 3-generation *daphnia magna* were 500 and 250 mg/L respectively. The 3-generation *daphnia magna* was more sensitive than the 1-generation *daphnia magna*.

As the results of the toxicity test, 1,4-dioxane has very low acute and chronic toxicity to *daphnia magna*. Therefore, 1,4-dioxane has a minimal risk to waterfleas in river.

**Key words** : 1,4-dioxane, *daphnia magna*, acute, chronic, multi-generational toxicity test

## 서 론

1,4-dioxane은 자연계로부터의 산물이 아니라 여러 산업활동의 결과로 발생하는 인위적인 산물로 세정제, 염소계 유기용매의 안정제 등으로 다양한

산업분야에서 널리 사용되고 있는 유기합성화학물질이다<sup>1)</sup>. 우리나라 경우 폴리에스테르(polyester) 실을 제조하는 공장이 1,4-dioxane의 주 배출원이며, 특히 4대강 유역 중 섬유산업이 밀집되어 있는 낙동강 수계에서 주로 검출되는 경향을 보인다<sup>2)</sup>.

<sup>†</sup> Corresponding author. E-mail : nana2@koreakr  
Tel : +82-51-309-2951, Fax : 82-51-309-2739

지난 2004년, 2009년 낙동강에서 누출사고로 문제가 된 바 있는 1,4-dioxane은 그 이후 2011년 폐수 배출허용기준이 지정되어 청정지역 0.05 mg/L, 기타지역 4 mg/L 이하로 규제되고 있으며, 먹는 물의 경우 2004년 먹는물 수질감시항목으로 설정되었다가 2009년 먹는물 수질기준으로 개정되어 2011년부터 0.05 mg/L 이하로 규제되고 있다.

1,4-dioxane은 rat의 LC<sub>50</sub> 값이 5200 mg/kg, bluegill의 경우 10,000 mg/L 농도에서 LC<sub>50</sub> 94시간을 나타내는 등 급성독성이 그다지 강하지 않는 것으로 알려져 있으나<sup>3)</sup>, 인간과 동물에게 눈의 염증과 호흡기질환을 유발하고, 고농도 환경에 수 시간 노출시 신장과 간에 심각한 손상을 입히는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. US EPA에서는 1,4-dioxane을 인간에게 발암가능성(probable human carcinogen)이 있는 Group B2로 분류하였고<sup>5)</sup>, WHO 산하 국제 암 연구기관(IARC)에서는 쥐의 비강암과 간암, 기니 돼지의 담낭암의 증가사례에 기초하여 1,4-dioxane을 인간에 대한 발암가능성이 있는 물질인 Group 2B로 분류하고 있다<sup>6)</sup>. 이처럼 1,4-dioxane은 여러 생물종을 이용해서 독성시험이 이루어지고 있지만 지난 낙동강 누출사고처럼 수계에 누출되었을 때 1,4-dioxane이 수서생물에 미치는 영향에 관한 자료가 미흡하여 본 연구에서는 수서생태계에 서식하는 생물에 대한 영향을 규명하고자 생물검정을 수행하고자 한다.

생물검정(bioassay)은 어떤 물질이 시험 유기체의 신진대사, 번식의 감소, 생체기능의 상실이나 치사 등에 미치는 영향을 조사 분석함으로써 오염물질의 유해성을 결정하는 방법이다<sup>7)</sup>. 일반적으로 생물검정에는 발광박테리아, 조류, 물벼룩, 어류, 수서 곤충 등의 수생생물이 많이 이용되고 있는데 물벼룩은 높은 번식력, 짧은 생활사, 시험의 용이성, 독성물질에 대한 높은 민감도로 인해 여러 가지 독

성물질을 평가하는데 유용하게 사용되어져 왔다<sup>8)</sup>.

이에 본 연구에서는 1,4-dioxane이 수서생태계에 서식하는 생물 중 대표적인 담수 무척추동물인 물벼룩, 그 중에서도 OECD의 공시 시험종인 *Daphnia magna*를 사용하여 급성, 만성 및 다세대 노출독성시험을 수행하고 그 독성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 대상 화학물질

1,4-dioxane은 탄소사슬에 산소가 존재하는 에테르 결합을 가지고 있는 고리구조의 물질로 Fig. 1과 같다. 상온에서 무색의 투명한 액체로 물과 용매, 기름에 잘 녹는 특성이 있으며, 녹는점(11.8 °C)과 끓는점(101.1 °C)이 물과 비슷하며 물에 용해가 잘 되므로 물에 혼입된 경우 거의 분리 제거가 곤란하다<sup>9)</sup>. 1,4-dioxane은 물과 완전히 섞이기 때문에 빠르게 지하수를 이동할 수 있고 거의 완전히 녹을 수 있으며, 일단 지하수에 녹으면 토양흡착계수가 낮아서 토양 및 부유물질에 잘 흡착되지 않아 지하수에 고농도로 존재할 수 있다. 게다가 낮은 Henry's Law constant 때문에 증발이 잘 일어나지 않는다<sup>10)</sup>. 1,4-dioxane에 대한 물리·화학적 특성은 Table 1과 같다.

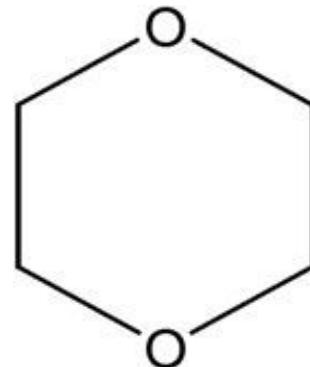


Fig. 1. Chemical structure of 1,4-dioxane.

**Table 1.** Physical/Chemical properties of 1,4-dioxane<sup>1)</sup>

Physical/Chemical property	Value
Molecular formula	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Common synonyms	1,4-diethylene oxide
Molecular weight	88.1
Melting point	11.8 °C
Boiling point	101.1 °C at 760 mmHg
Density	1.0329 g/mL at 20 °C
K <sub>oc</sub>	1.23
Log K <sub>ow</sub>	-0.27
Vapor pressure	30 mmHg at 20 °C
Henry's Law constant	4.88×10 <sup>-6</sup> atm m <sup>3</sup> /mol

## 물벼룩

### 1) 시험 물벼룩(*Daphnia magna*)의 특성

물벼룩은 전세계적으로 11과 52속 450여 종이 있으며 시험에 사용한 *Daphnia magna*는 담수 무척추 동물로 아래와 같은 분류에 속한다<sup>7)</sup>.

Phylum : Arthropoda

Class : Crustacea

Order : Cladocera

Family : Daphniidae

Genus : *Daphnia magna*

*Daphnia magna*는 수계에서는 식물 플랑크톤이나 세균류를 직접 섭식하는 1차 소비자로 생태계의 중요한 역할을 하며, 최대크기는 5 - 6 mm 정도로 국내에서 흔히 발견되는 물벼룩보다 크기가 커 큰물벼룩이라고 불리기도 하는 담홍색을 띤 난형의 생물이다<sup>11)</sup>.

환경조건이 양호할 경우 2 - 3일 간격으로 탈피와 포란을 반복하면서 개체를 증식하고 체장(體長)도 증가한다. 생식은 주로 무성생식을 하면서 암컷만 생산하는데 수온저하, 먹이부족, 과밀생육 등 환경조건이 나빠지면 수컷이 생겨나 유성 생식을 통해 내구성이 강한 검은색의 수정란(ephippium)을 2개 정도 만든다. 이러한 수정란은 단단한 각에

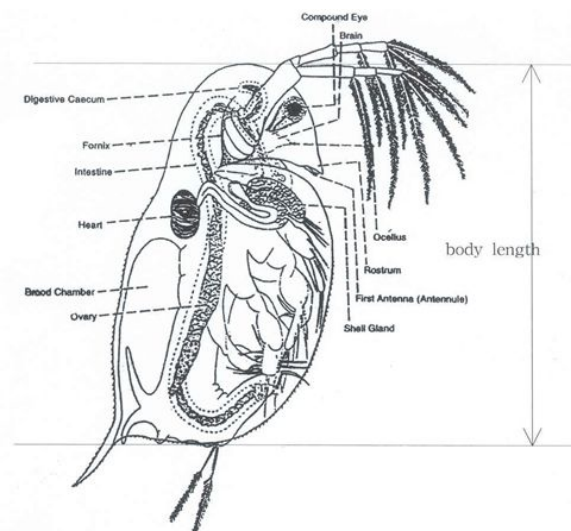
의해 쌓여 있다가 환경조건이 양호해지고 적절한 온도가 유지되면 부화하여 다시 무성생식을 되풀이한다<sup>12)</sup>.

구조적으로 등편이 막혀있고 배편이 열려져 있으며 여기에 4 - 6쌍의 유영강모가 달려있다. 특히 *Daphnia magna*는 두부와 몸통과의 구별은 뚜렷하지 않고 주둥이가 잘 발달하여 있다. 일반적으로 홑눈을 가지며 소화기관도 대단히 간단하여 입에서부터의 짧은 식도가 작은 위를 거쳐서 완만한 S자형으로 배 밑에 직장이 연결되어 있고 등에는 꼬리돌기가 1개 달려있다. *Daphnia magna*의 구조는 Fig. 2와 같다<sup>11)</sup>.

본 시험에 사용한 *Daphnia magna*는 2012년 7월 국립환경과학원에서 분양받아 우리원 생태독성실험실에서 계대배양한 것이다.

### 2) 물벼룩(*Daphnia magna*)의 사육조건

*Daphnia magna* 사육의 최적 온도는 20 ± 2 °C이며, 세대기간(lifetime)은 온도가 감소함에 따라 길어지는데 25 °C에서는 약 40일, 20 °C에서는 약 56일이며 부화 후 첫 새끼를 낳기까지는 6 - 10일이 소요된다.



**Fig. 2.** Structure of *Daphnia magna*.

먹이는 주로 *Chlorella*, *Selenastrum* 등과 같은 녹조류가 사용되고 보조먹이로 YCT(yeast, chlorophyll, tetramine)를 첨가하여 사용할 수 있다. 본 시험에서는 *Chlorella*와 보조먹이 YCT를 각각 30 - 100  $\mu\text{L}/\text{individual}$ , 8 - 25  $\mu\text{L}/\text{individual}$  하루에 한번 공급하였으며, 어린 물벼룩 사육에는 먹이의 농도를 낮게 하고 점차적으로 증가시켰다. 조명은 500 - 1000 Lux로 16시간은 light, 8시간은 dark로 유지하였다.

본 시험에서는 배양액으로 US EPA에서 제시한 Hard water를 사용하였는데 물벼룩은 그 종에 따른 경도, 알칼리도 조건이 각기 다르며 일반적으로 *Daphnia magna*는 경도 160 - 180 mg/L as  $\text{CaCO}_3$ 인 Hard water에서 배양한다(Table 2). 이 배양액은 만든 후 24시간 강하게 폭기시킨 뒤에 사용하였으며, 사용 전에 pH와 경도, 용존산소량을 측정하였다. 배양액을 주기적으로 교환하지 않으면 배설물이나 탈피한 표피가 축적되어 물벼룩에 악영향을 주거나 수컷 또는 교배란이 발생되므로 1주일에 2회 이상 배양액을 교체하였다.

## 생물독성평가

### 1) 물벼룩 급성독성시험

US EPA의 표준 독성시험법<sup>13)</sup>에 따라 물벼룩을 이용하여 24시간, 48시간 급성독성시험을 실시하였으며, 시험을 실시할 때는 시험 시작 하루 전에 생

후 2주 이상의 물벼룩 암컷 성체를 따로 추출하고 그 다음날까지 생산한 생후 24시간 미만의 어린개체(neonates)를 사용하였다. 시험 시작 2시간 전 먹이를 공급하고 시험 기간 동안은 먹이를 공급하지 않으며, 배양액의 교환도 없는 지수식으로 시험하였다. 이때 시험조건은 배양조건과 같은 수온  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 조명은 500 - 1000 Lux로 16시간은 light, 8시간은 dark로 유지하였다.

시험농도는 예비시험 결과를 기초로 하여 최저농도는 물벼룩의 유영저해 영향이 관찰되지 않고, 최고농도는 대조군과 비교하여 100%이상 유영저해가 관찰되도록 선정하였다. 그 결과 시험농도는 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 mg/L로 선정하였다. 각 농도별로 준비된 시험용액 50 mL를 비이커에 넣고, 비이커마다 *Daphnia magna* 5마리씩 투입하고 4개의 반복구를 두어 시험농도 당 총 20마리의 물벼룩을 사용하였다. 시험시간은 총 48시간이었으며, 최종관찰점(endpoint)은 유영저해(immobilization)로서 24시간과 48시간 후에 노출중인 개체를 관찰하여 유영저해 여부를 관찰하였다. 유영저해 판정은 물벼룩이 담긴 시험용기를 조용히 움직였을 때 물벼룩이 15초간 헤엄치지 못하는 경우를 말하며 일부기관(촉각, 후복부 등)은 움직이나 헤엄치지 못하면 유영저해를 받은 것으로 간주하였다<sup>14)</sup>. 24시간, 48시간 동안 관찰하여 물벼룩의 50%가 유영저해를 받는 반수영향농도( $\text{EC}_{50}$ )

**Table 2.** Preparation of Synthetic Freshwater Using Reagent Grade Chemicals<sup>13)</sup>

Water type	Reagent added(mg/L)				Final water quality		
	$\text{NaHCO}_3$	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{MgSO}_4$	KCl	pH	Hardness	Alkalinity
Very soft	12.0	7.5	7.5	0.5	6.4 - 6.8	10 - 13	10 - 13
Soft	48.0	30.0	30.0	2.0	7.2 - 7.6	40 - 48	30 - 35
Moderately Hard	96.0	60.0	60.0	4.0	7.4 - 7.8	80 - 100	57 - 64
Hard	192.0	120.0	120.0	8.0	7.6 - 8.0	160 - 180	110 - 120
Very hard	384.0	240.0	240.0	16.0	8.0 - 8.4	280 - 320	225 - 245

를 구하였다. EC<sub>50</sub>값의 산출은 독성시험 결과에 따라 Graphical, Trimmed Spearman-Kärber, Probit method를 이용하였다.

## 2) 물벼룩 만성독성시험

만성독성시험은 OECD의 화학물질 시험가이드<sup>15)</sup>에 따라 수행하였으며, 물벼룩을 이용하여 21일간 만성독성시험을 수행하였다.

만성독성시험의 시험농도는 사전에 수행한 급성독성시험에서 얻은 EC<sub>50</sub>과 예비 만성독성시험을 통해 얻어진 결과를 바탕으로 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 mg/L로 선정하였다. 이때 배양액만을 담은 대조군도 동시에 시험을 수행하였다. 각 농도별로 준비된 시험용액 50 mL를 비이커에 넣고, 비이커마다 24시간 미만의 건강한 *Daphnia magna*를 한 마리씩 투입하고 10개의 반복구를 두어 시험농도 당 총 10마리가 되도록 하였다. 시험농도를 일정하게 유지시키기 위해 시험용액은 이틀에 한번 교환하는 반지수식으로 시험하였으며, 먹이는 매일 공급하였으며, 나머지 시험조건은 배양조건과 동일하게 실시하였다. 시험이 진행되는 동안 매일 일정한 시간에 생존 여부, 출산수, 탈피 여부, 이상 여부 등을 관찰하였으며, 시험 중 태어난 어린 물벼룩은 계수 후 시험용기에서 제외시켰으며, 시험 최종일에는 어미 물벼룩의 체장을 현미경

(올림푸스 SZX16)을 이용하여 측정하였다. 시험기간 동안 관찰한 물벼룩의 생존, 생산능력, 성장 등을 t-test를 통해 대조군과 비교하여 무영향농도(NOEC)와 최소영향농도(LOEC)를 산출하였다.

## 3) 물벼룩 다세대노출독성시험

만성독성시험에서 나아가 물벼룩이 시험용액에 여러 세대를 거쳐 노출되었을 때 미치는 영향을 알아보기 위하여 다세대노출독성시험을 Fig. 3과 같이 실시하였다. 1세대와 3세대는 만성독성시험을 그대로 따랐으며 2세대는 시험용액에 노출시키지 않고 배양액에서 14 ± 1day를 배양하고 태어난지 24시간 이내의 새끼물벼룩을 받아 3세대 만성독성시험에 사용하였다<sup>16)</sup>. 다세대노출독성시험농도는 만성독성시험과 동일한 농도로 시험하려고 하였으나 만성독성시험에 적용된 시험농도에서 물벼룩의 생존율이나 번식에 영향이 컸던 고농도는 다세대노출독성의 의미가 없어 제외하고 250, 500, 1000 mg/L으로 선정하였다. 다른 배양조건은 급성·만성독성시험과 동일하였다.

## 4) 표준지표독성시험(Standard Reference Toxicity Test)

독성시험에 사용되는 시험동물은 독성물질에 대한 민감도가 일정하게 유지되어야 하며, 잘 통제된

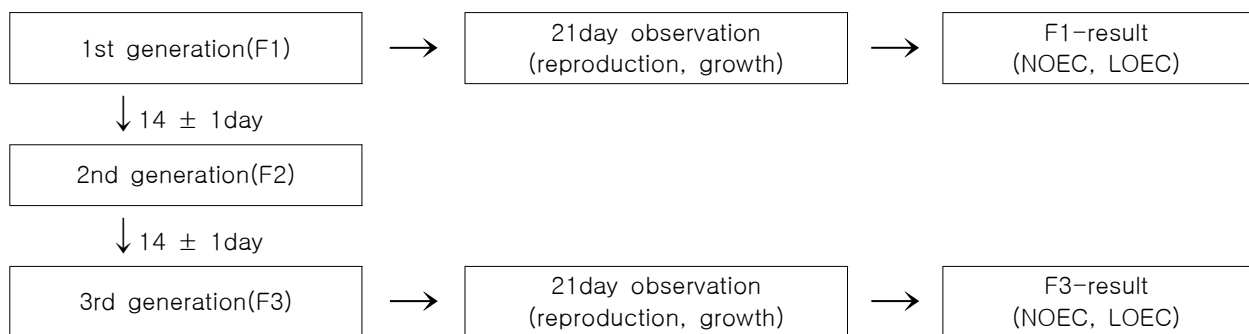


Fig. 3. Experimental design of the multi-generation toxicity test.

환경에서 정해진 시험절차를 따라야 한다. 따라서 시료의 유해오염물질에 대한 시험동물의 상대적인 민감도가 일정하게 유지되는지를 확인하기 위하여 표준지표독성시험을 수행하였으며 본 연구에서는  $K_2Cr_2O_7$ 를 지표독성물질로 사용하였고 물벼룩 급성독성시험과 동일한 방법으로 수행하였다. ISO에서는 용존산소농도가 2 mg/L 이상, 대조구의 유영 저해율이 10 %이하이며 표준지표독성물질인  $K_2Cr_2O_7$ 의 24시간  $EC_{50}$ 값이 0.9 - 2.0 mg/L의 범위 내에 있으면 시험이 정당하게 이루어졌음을 인정한다고 하였다<sup>17)</sup>.  $K_2Cr_2O_7$ 를 이용한 표준지표독성시험 결과, 24시간  $EC_{50}$ 값이 1.16 - 1.33 mg/L로 ISO에서 정한 범위 내에 있는 것으로 확인되었으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 1,4-dioxane의 물벼룩에 대한 급성독성

*Daphnia magna*를 이용하여 1,4-dioxane의 급성독성시험을 수행한 결과 Table 4와 같으며 급성

독성시험에 투입되는 물벼룩의 수는 각 농도 당 총 20마리로, 총 세 번의 반복시험으로 각 농도 당 투입된 전체 물벼룩 수는 60마리였다. Table 4를 보면 24시간 후 7000 mg/L 이하의 농도에서는 물벼룩의 유영저해가 관찰되지 않았으나 8000 mg/L 13.3 %, 9000 mg/L 81.7 %, 10,000 mg/L 100 % 유영저해가 나타났다. 48시간 후 유영저해를 관찰한 결과 6000 mg/L에서 3.3 % 유영저해가 나타나기 시작해 9000 mg/L 이상에서는 100 % 유영저해가 나타났다. Fig. 4는 1,4-dioxane에 노출된 *Daphnia magna*의 24시간, 48시간 유영저해를 나타낸 농도반응곡선으로 전형적인 S자 형태를 보이고 있다.

Table 5는 1,4-dioxane의 *Daphnia magna*에 대한 급성독성시험 결과로 반수영향농도( $EC_{50}$ )값과 무영향관찰농도(NOEC) 값으로 산출하였다. 1,4-dioxane의 24시간과 48시간의  $EC_{50}$ 값과 95 % 신뢰구간은 각각 8516.74(8384.24 - 8651.34) mg/L, 48시간 7405.67(7266.81 - 7547.19) mg/L이었고, NOEC 값은 24시간 7000 mg/L, 48시간 5000 mg/L로

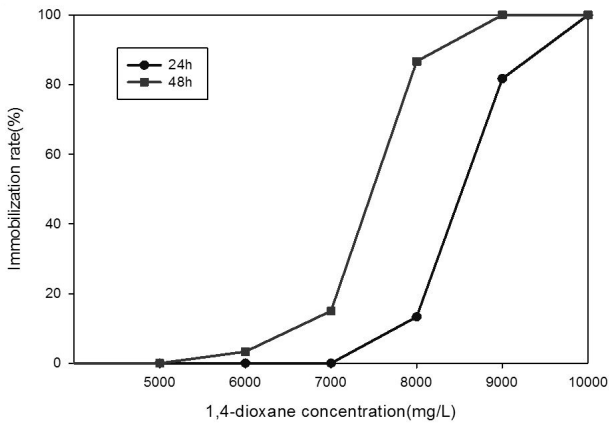
**Table 3.** Acute responses( $EC_{50}$ ) of test organisms to a standard toxicant,  $K_2Cr_2O_7$ , demonstrating the inherent variability of the toxicity test

	$K_2Cr_2O_7$ $EC_{50}$ (mg/L)			Mean	SD	CV(%)
	1	2	3			
24 hr	1.21	1.16	1.33	1.23	0.087	8.7

**Table 4.** Acute immobilization test of 1,4-dioxane to *Daphnia magna*

contents	Exposure period	Concentration(mg/L)						
		0	5000	6000	7000	8000	9000	10000
Immobilized average individuals*	24 hr	0	0	0	0	8	49	60
Rate of immobilization(%)		0	0	0	0	13.3	81.7	100.0
Immobilized average individuals*	48 hr	0	0	2	9	52	60	60
Rate of immobilization(%)		0	0	3.3	15.0	86.7	100.0	100.0

\*Total tested individuals per concentration was 60



**Fig. 4.** The concentration-response curve of *Daphnia magna* toxicity test on 1,4-dioxane.

나타나 1,4-dioxane의 물벼룩에 대한 급성독성은 매우 낮은 편으로 나타났다. 본 연구결과는 1,4-dioxane의 기존의 독성연구<sup>3)</sup>와 유사하게 급성독성은 낮음을 알 수 있었다. 하지만 노출기간에 따른 EC<sub>50</sub>값을 비교하면 48시간 독성이 24시간보다 1.15 배 높은 것으로 보아 장기간에 걸쳐 노출될 경우에 물벼룩에 영향을 줄 가능성이 있어 만성독성시험에 영향을 미칠 것으로 판단된다.

1,4-dioxane의 물벼룩에 대한 만성독성

1) 1,4-dioxane이 물벼룩의 생존에 미치는 영향

Table 6은 *Daphnia magna*를 21일간 1,4-dioxane

에 노출시켰을 때 생존에 미치는 영향을 나타낸 것으로, 대조군과 같이 250 mg/L에서부터 2000 mg/L까지는 사망한 물벼룩은 관찰되지 않아 생존율 100 %로 관찰되었으며, 3000 mg/L에서 30 %의 물벼룩이 사망하기 시작하여 4000 mg/L에서는 물벼룩 전체가 사망하였다. 평균수명을 보면 3000 mg/L에서 관찰기간 마지막 날인 21일째 3 마리 사망으로 20.7일, 4000 mg/L에서 관찰기간 12일 - 17일 동안 총 10 마리 모두 사망하여 평균수명 14.6일로 나타났으며, 평균수명에 있어서는 3000 mg/L까지는 대조군의 21일과 유의한 차이를 보이지 않았으나, 4000 mg/L에서는 14.6일로 유의한 감소를 보여주었다(Table 6).

2) 1,4-dioxane이 물벼룩의 생산에 미치는 영향

1,4-dioxane이 물벼룩의 생산에 미치는 영향의 경우 첫 출산까지 걸리는 시간, 출산횟수, 21일간 출산한 새끼물벼룩의 수로서 살펴보았다.

Table 7에서 첫 출산까지 걸리는 시간을 보면 대조군 7.6일로 관찰농도 중 가장 낮은 250 mg/L에서 7.5일, 500 mg/L 8.0일로 유의한 차이를 보이지 않았으나, 1000 mg/L 이상에서는 농도가 높아 질수록 첫 출산까지 걸리는 시간이 점차 늦어져

**Table 5.** Results of acute toxicity test with *Daphnia magna* exposed to 1,4-dioxane

Chemical	Exposure period	EC <sub>50</sub> (mg/L) (95 % Confidence interval)	NOEC(mg/L)
1,4-dioxane	24 hr	8516.74 (8384.24 - 8651.34)	7000
	48 hr	7405.67 (7266.81 - 7547.19)	5000

**Table 6.** Survival rate of *Daphnia magna* exposed to 1,4-dioxane for 21days

Parameter	Concentration(mg/L)						
	0	250	500	1000	2000	3000	4000
Survival rate(%)	100	100	100	100	100	70	0
Longevity(day)	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	20.7	14.6*

\*Significantly different from control(P<0.05, T-test)

**Table 7.** Reproduction of *Daphnia magna* exposed to 1,4-dioxane for 21days

Parameter	Concentration(mg/L)						
	0	250	500	1000	2000	3000	4000
Day to first brood	7.6 ± 0.52 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.53	8.0 ± 0.47	9.8 ± 0.63*	13.8 ± 1.03*	19.8 ± 1.87*	-
No. produced brood	6.3 ± 0.48	6.4 ± 0.52	6.1 ± 0.32	4.9 ± 0.57*	2.6 ± 0.52*	0.4 ± 0.52*	-
Total offspring/adult	74.2 ± 4.21	74.4 ± 4.27	73.8 ± 3.49	43.5 ± 5.48*	21.8 ± 5.14*	0.6 ± 0.84*	-

\*Significantly different from control(P&lt;0.05, T-test)

<sup>a</sup>Mean ± standard deviation

1000, 2000, 3000 mg/L에서 각각 9.8일, 13.8일, 19.8일로 대조군 7.6일과 유의한 차이를 보였다. 21일간 물벼룩의 출산횟수를 보면 250, 500 mg/L에서 각각 6.4회, 6.1회로 대조군 6.3회와 유의한 차이를 보이지 않았으나, 1000 mg/L에서 4.9회, 2000 mg/L 2.6회, 3000 mg/L 0.4회로 유의한 감소를 보여주었다(Table 7). 21일간 태어난 평균 총 새끼 물벼룩의 수를 보면 대조군에서 74.2마리로 250 mg/L 74.4마리, 500 mg/L 73.8마리와는 유의한 차이를 보이지 않았으나, 1000 mg/L 이상부터 급격하게 신생개체수가 감소하여 1000, 2000, 3000 mg/L에서 각각 43.5, 21.8, 0.6마리로 대조군과 유의한 차이를 보였다(Table 7). 3000 mg/L에서는 10일부터 대부분의 물벼룩이 알을 가지기 시작하였으나 출산까지 대부분 이루어지지 못해 21일간 총 6마리 출산하였으며, 시험 최고농도인 4000 mg/L에 노출된 어미물벼룩에서 생산된 새끼물벼룩은 전혀 없었다.

Fig. 5를 보면 500 mg/L 이상의 농도에서부터는 첫 출산일은 급격하게 증가하고, 출산횟수와 21일간 출산한 새끼물벼룩의 수는 급격하게 감소하는 것을 알 수 있다. 물벼룩의 생산에 미치는 인자 3가지를 종합하여 살펴본 결과 250 mg/L에서 500 mg/L 까지는 대조군과 비교해서 유의한 차이를 보이지 않았으나, 1000 mg/L 이상부터 대조군과 유의한 차이로 물벼룩의 생산능력이 급격히 감소함을 알 수 있었다.

### 3) 1,4-dioxane이 물벼룩의 성장에 미치는 영향

21일간 만성독성시험이 끝난 후 각 시험농도별 투입된 어미물벼룩의 체장을 현미경(올림푸스 SZX16)을 이용하여 측정된 결과 Table 8과 같이 250 mg/L에서 2000 mg/L까지 3.24 - 3.37 mm로 대조군 3.39 mm와 유의한 차이를 보이지 않았으나 3000 mg/L에서는 3.09 mm로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 4000 mg/L에서는 21일간 생존한 물벼룩이 없어 체장을 측정할 수 없었다.

문헌에 따르면 물벼룩은 2 - 3일 간격으로 탈피와 포란을 반복한다고 되어있는데<sup>13)</sup>, 21일간 1,4-dioxane에 노출된 물벼룩의 탈피횟수를 살펴보면 시험농도가 증가하여도 큰 변화없이 약 이틀 간격으로 탈피를 반복하여 21일 동안 9.4 - 9.6회 정도 탈피를 하였으며, 21일이 되기 전 모두 사멸한 4000 mg/L에서도 Table 8에는 나타나지 않았지만 사망하기 전까지 약 이틀 간격으로 탈피를 반복하였다. 이로서 1,4-dioxane이 물벼룩의 탈피에는 영향을 주지 않으나, 물벼룩의 성장 및 생산능력은 저해하는 것을 알 수 있었다.

### 4) 만성독성시험의 NOEC 및 LOEC 값 결정

Table 9는 만성독성시험에서 구한 NOEC, LOEC 값이다. 물벼룩 생산과 관련된 첫 출산일, 출산횟수, 출산한 총 새끼물벼룩 수의 NOEC, LOEC 값은 각각 모두 NOEC 500 mg/L, LOEC 1000 mg/L으로 나타났으며, 성장과 관련된 체장에서는



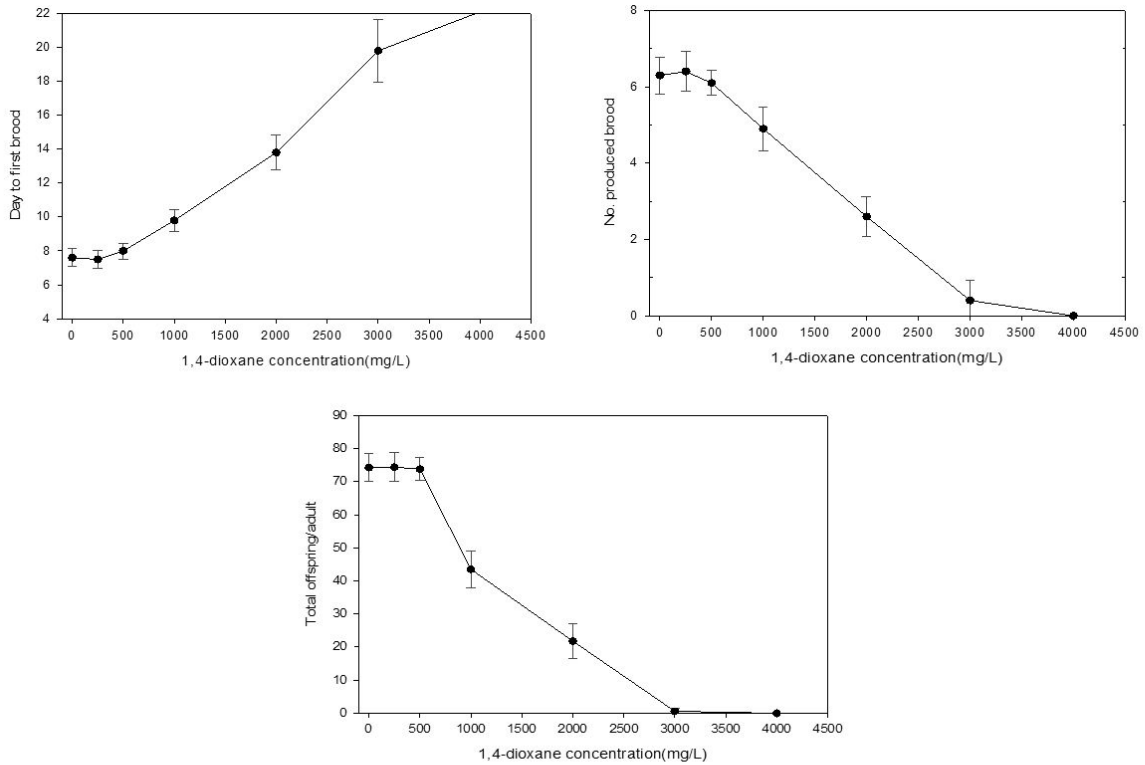


Fig. 5. Reproduction of *Daphnia magna* exposed to 1,4-dioxane for 21days.

Table 8. Growth of *Daphnia magna* exposed to 1,4-dioxane for 21days

Parameter	Concentration(mg/L)						
	0	250	500	1000	2000	3000	4000
Length, mm	3.39 ± 0.25 <sup>a</sup>	3.37 ± 0.18	3.36 ± 0.14	3.28 ± 0.10	3.24 ± 0.11	3.09 ± 0.11*	-
Molting time	9.5 ± 0.53	9.6 ± 0.52	9.6 ± 0.52	9.5 ± 0.53	9.6 ± 0.52	9.4 ± 0.52	-

\*Significantly different from control(P<0.05, T-test)

<sup>a</sup>Mean ± standard deviation

Table 9. Results of chronic toxicity test with *Daphnia magna* exposed to 1,4-dioxane

Parameter	Exposure period	NOEC(mg/L)	LOEC(mg/L)
Day to first brood	21day	500	1000
No. produced brood		500	1000
Total offspring/adult		500	1000
Length		2000	3000
<b>Total</b>		<b>500</b>	<b>1000</b>

NOEC 2000 mg/L, LOEC 3000 mg/L으로 나타나 1,4-dioxane의 경우 물벼룩의 성장보다 생식능력에 더 민감한 것으로 나타났다.

최종적으로 전체 Parameter 값으로 1,4-dioxane에 노출된 물벼룩의 만성독성시험 결과 무영향농도인 NOEC 500 mg/L, 최소영향농도인 LOEC 1000

mg/L인 것으로 나타났다.

### 1,4-dioxane의 물벼룩에 대한 다세대노출독성 시험

다세대노출독성시험 농도는 만성독성시험에 적용된 시험농도에서 물벼룩의 생존율이나 번식에 영향이 컸던 고농도를 제외하고 250, 500, 1000 mg/L으로 선정하였다. Table 10은 3세대 물벼룩을 21일간 1,4-dioxane에 노출시켰을 때 물벼룩 (*Daphnia magna*)의 생존, 생산, 성장을 나타내고 있다.

먼저 3세대의 생존율은 모두 100%로 나타났으며, 물벼룩 생산능력을 판단하는 첫 출산일은 대조군 7.8일로 250 mg/L 8.2일, 500 mg/L 8.3일과는 유의한 차이를 보이지 않았으나, 1000 mg/L에서 11.5일로 대조군과 유의한 차이를 보였다. 출산횟수는 대조군 6.1회로 250 mg/L 6.0회와는 유의한 차이가 없었으나, 500 mg/L와 1000 mg/L에서 각각 5.7회와 4.2회로 유의한 차이를 보였으며, 21

일간 태어난 평균 총 새끼물벼룩의 수를 보면 대조군에서 74.2마리로 250 mg/L의 70.4마리와는 유의한 차이를 보이지 않았으나, 500 mg/L와 1000 mg/L에서 각각 67마리, 33.7마리로 유의한 차이를 보였다. 1,4-dioxane에 노출된 3세대 물벼룩의 성장을 살펴보면 체장의 경우 250 mg/L부터 1000 mg/L에 노출된 물벼룩이 3.26 - 3.35 mm로 대조군 3.41 mm와 모두 유의한 차이가 없었으며, 탈피 횟수 또한 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.

이로서 세대를 거쳐 1,4-dioxane에 노출된 3세대 물벼룩은 1세대 물벼룩과 마찬가지로 대조군과 비교시 성장에는 큰 영향이 없으나, 생식능력에 미치는 영향이 큼을 알 수 있었다.

Table 11은 3세대 물벼룩의 만성독성시험에서 구한 NOEC, LOEC 값이다. 첫 출산일의 NOEC는 500 mg/L, LOEC는 1000 mg/L이며, 출산횟수와 출산한 총 새끼물벼룩의 수의 NOEC, LOEC 값은 모두 NOEC 250 mg/L, LOEC 500 mg/L으로 나타났다. 성장과 관련된 체장을 보면 관찰농도

**Table 10.** Survival, reproduction, and growth of 3-generation *Daphnia magna* exposed to 1,4-dioxane in multi-generational toxicity test

parameter	Concentration(mg/L)			
	0	250	500	1000
Survival rate(%)	100	100	100	100
Day to first brood	7.8 ± 0.42	8.2 ± 0.63	8.3 ± 0.67	11.5 ± 1.43*
No. produced brood	6.1 ± 0.32	6.0 ± 0.47	5.7 ± 0.48*	4.2 ± 0.63*
Total offspring/adult	72.4 ± 4.01	70.4 ± 3.78	67.0 ± 4.06*	33.7 ± 5.23*
Length, mm	3.41 ± 0.16	3.35 ± 0.17	3.35 ± 0.23	3.26 ± 0.18
Molting time	9.5 ± 0.53	9.6 ± 0.52	9.4 ± 0.52	9.5 ± 0.53

**Table 11.** Results of chronic toxicity test with 3-generation *Daphnia magna* exposed to 1,4-dioxane

Parameter	Exposure period	NOEC(mg/L)	LOEC(mg/L)
Day to first brood	21day	500	1000
No. produced brood		250	500
Total offspring/adult		250	500
Length		1000	1000
<b>Total</b>		<b>250</b>	<b>500</b>

범위에서는 대조군과 차이가 없어 NOEC와 LOEC 모두 관찰 최고농도인 1000 mg/L 이상인 것으로 나타났다.

최종적으로 1,4-dioxane에 노출된 3세대 물벼룩의 만성독성시험 결과 전체 Parameter 값으로 살펴본 바 무영향농도인 NOEC 250 mg/L, 최소영향농도인 LOEC는 500 mg/L인 것으로 나타났다.

1세대와 3세대 물벼룩의 만성독성시험 비교

1,4-dioxane에 21일간 노출시킨 1세대와 3세대 물벼룩의 만성독성시험 결과 Fig. 6은 물벼룩의 생산능력에 관련된 것으로 첫 출산일은 3세대가 1세대보다 전체적으로 늦어지고, 출산횟수와 출산한 총 물벼룩의 수는 3세대가 1세대보다 전체적으로 낮은 것을 알 수 있다. 이는 세대를 걸쳐 1,4-dioxane에 노출될 경우 1세대보다 3세대에서 민감성이 더 증가하여 물벼룩의 생산능력이 떨어짐을

알 수 있다.

Fig. 7은 물벼룩의 성장에 관련된 것으로 왼쪽은 물벼룩의 체장을 나타낸 것이고, 오른쪽은 물벼룩의 탈피횟수를 나타낸 그림으로 1세대와 3세대 물벼룩의 차이가 크게 없는 것을 알 수 있다. 이로서 물벼룩은 1,4-dioxane에 여러 세대를 걸쳐 노출되더라도 성장에는 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

1세대와 3세대의 물벼룩의 만성독성시험결과를 최종적으로 NOEC와 LOEC로 비교하면 아래 Fig. 8과 같이 NOEC 값은 1세대 물벼룩 500 mg/L, 3세대 물벼룩 250 mg/L로 나타났으며, LOEC 값은 1세대 물벼룩 1000 mg/L, 3세대 물벼룩 500 mg/L으로 나타나 세대를 지날수록 물벼룩의 민감성이 증가되어 1,4-dioxane에 더 영향을 받는 것으로 나타났다.

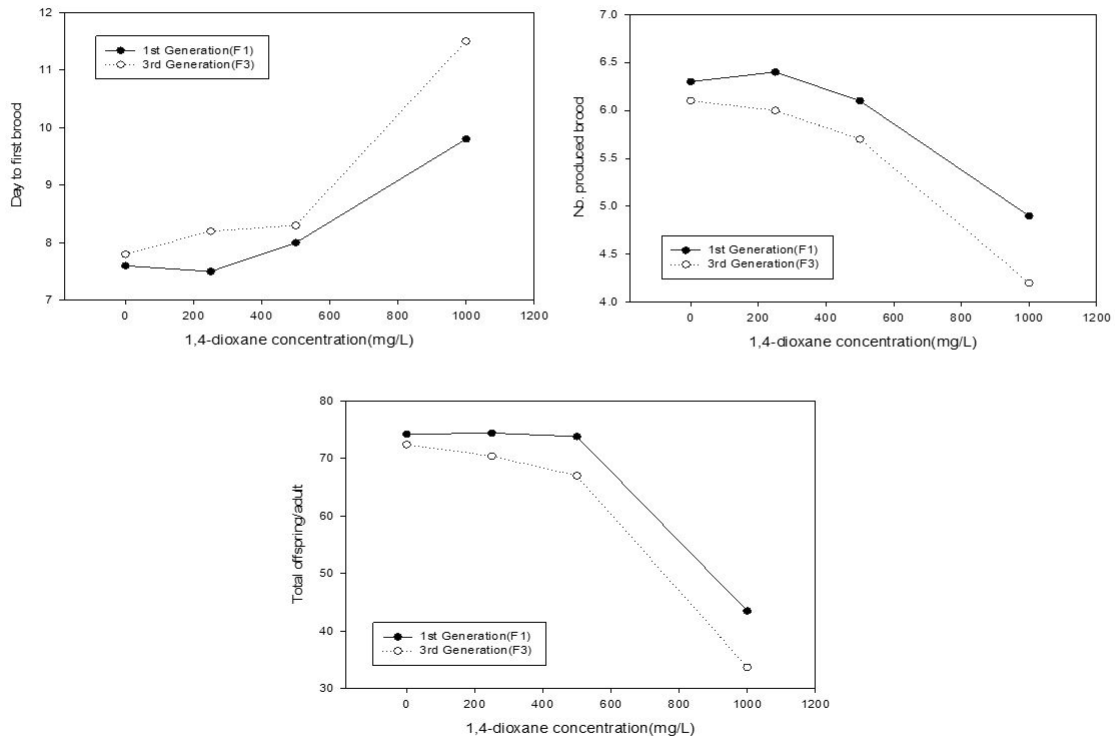


Fig. 6. Comparisons of reproduction between first and third generations of *Daphnia magna* exposed to 1,4-dioxane.

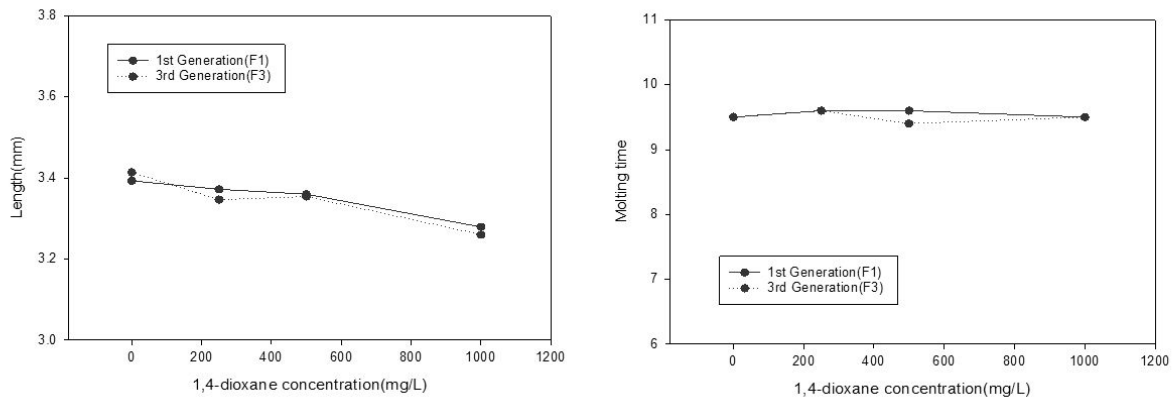


Fig. 7. Comparisons of growth between first and third generations of *Daphnia magna* exposed to 1,4-dioxane.

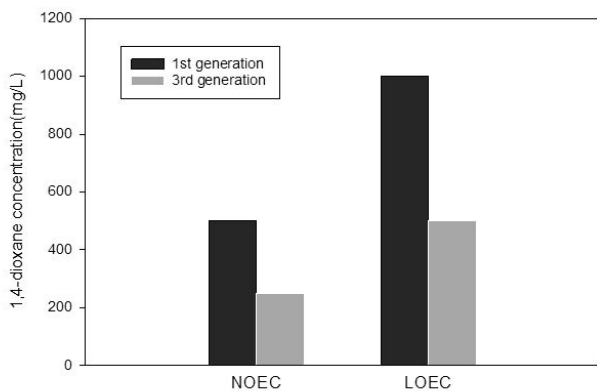


Fig. 8. Comparisons of NOEC and LOEC between first and third generations of *Daphnia magna* exposed to 1,4-dioxane.

## 결론

미량유해물질인 1,4-dioxane이 수서생물에 미치는 영향을 규명하고자 대표적인 담수 무척추동물인 물벼룩 *Daphnia magna*를 이용하여 급성·만성독성 및 다세대노출독성을 평가하였다.

1. 1,4-dioxane의 급성독성시험 결과 24시간과 48시간의 EC<sub>50</sub>값과 95 % 신뢰구간은 각각 8516.74 (8384.24 - 8651.34) mg/L, 48시간 7405.67(726 6.81 - 7547.19) mg/L 이었고, NOEC 값은 24 시간 7000 mg/L, 48시간 5000 mg/L로 나타나 1,4-dioxane의 물벼룩에 대한 급성독성은 매우

낮은 편으로 나타났다.

- 만성독성시험 결과 물벼룩의 출산과 관련된 생산에 관한 영향에서는 1000 mg/L 이상의 농도에서 대조군과 유의적인 생식능 감소가 나타났으며, 그 결과 생산에 관련된 NOEC 500 mg/L, LOEC 1000 mg/L로 산출되었으며, 성장에 관련된 인자를 관찰한 결과 NOEC 2000 mg/L, LOEC 3000 mg/L로 나타나 1,4-dioxane에 노출된 물벼룩은 성장보다 생산에 더 민감한 것으로 나타났다.
- 다세대노출독성시험인 1,4-dioxane에 노출된 3세대 물벼룩의 만성독성시험 결과 생산능력에 관련된 NOEC 250 mg/L, LOEC 500 mg/L로 나타났으며, 성장에 관련된 인자의 경우 관찰농도 범위에서는 대조군과 차이가 없어 NOEC와 LOEC 모두 관찰 최고농도인 1000 mg/L 이상인 것으로 나타나 1세대 물벼룩과 마찬가지로 3세대 물벼룩도 성장보다 생산에 더 민감한 것으로 나타났다.
- 1세대와 3세대 물벼룩의 만성독성시험 결과 세대가 거듭될수록 물벼룩의 성장에는 큰 영향이 없었으나, 생산능력에서는 3세대 물벼룩의 출산 횟수와 출산한 총 물벼룩수가 감소한 것으로

보아 민감성이 갈수록 증가하여 생산능력이 떨어짐을 알 수 있었다. NOEC 값도 1세대 500 mg/L, 3세대 250 mg/L로 나타나 1세대보다 3세대 물벼룩이 1,4-dioxane에 더 민감함을 할 수 있었다.

5. 물벼룩을 이용한 1,4-dioxane의 독성시험 결과 EC<sub>50</sub>, NOEC, LOEC 값이 우리나라 하천에서 검출되는 1,4-dioxane 농도에 비해 매우 높아 1,4-dioxane이 수계에 존재하는 물벼룩에 미치는 위해가능성은 극히 낮은 것으로 판단된다.
6. 하지만 어떤 독성물질에 대한 생물검정에 있어서 1종의 생물검정만으로 독성을 평가하기에는 제한적이며, 앞으로 다양한 수서생물을 이용한 생물검정을 통하여 정확한 독성이 평가되어야 하며, 이번 연구로 앞으로 수행될 생태위해성 평가에서 먹이사슬 1차 소비자 단계의 중요 독성 자료로 활용될 것으로 기대된다.

### 참고문헌

1. U. S. EPA, OPPT Chemical Fact Sheets for 1,4-Dioxane(CAS No.123-91-1), EPA 749-F-95-010(1995)
2. S. K. Park, T. H. Kim and H. S. Pyo, "Perspective of management and review of analytical methods for 1,4-Dioxane in water sample", *Analytical Science & Technology*, 18, 173 - 187(2005)
3. U. S. EPA, Methods 8260(1992)
4. Stefan, M. I., Bolton, J. R., "Mechanism of the degradation of 1,4-dioxane in dilute aqueous solution using the UV/hydrogen peroxide process", *Environmental Science & Technology*, 32(11), 1588 - 1595(1998)
5. U. S. EPA, 2006 Edition of the drinking water standards and health advisories, EPA 822-R-06-013(2006)
6. International Agency for Research on Cancer(IARC), "IARC Monographs on the Evaluation of 1Carcinogenic Risks to human. Reevaluation of some Chemicals, Hydrazine, and Hydrogen Peroxide", Vol. 71, 589 - 602(1999)
7. 류성민, 환경시료의 생태독성 평가를 위한 Microtox-물벼룩 Tandem Bioassay, 인제대학교 대학원 석사학위논문(2002)
8. Wong, P. T. S., Dixon, D. G., "Bioassessment of Water Quality", *Envo. Toxicity & Water Quality*, 10. 9 - 17(1995)
9. "산업폐수의 미량 유해물질 최적관리 방안에 관한 연구, 최종보고서", 낙동강수계관리위원회 국립환경과학원 낙동강물환경연구소(2005)
10. Howard, P. H. and Beethling, R. S., *Handbook of environmental degradation rates*, Michigan, USA, Lewis Publishers (1991)
11. 조순자, 물벼룩(*Daphnia magna*)을 이용한 살충제의 급성 및 만성독성에 관한 연구, 부산대학교 대학원 석사학위논문(1999)
12. 小島貞男 외 編, 環境微生物圖鑑, 講談社, 690 - 692.
13. U. S. EPA, Methods for measuring the acute toxicity of effluent and receiving waters to freshwater and marine organisms, EPA-821-R-02-021(2002)
14. Versteeg, D. J., Stalmans, M., Dyer, S. D.,

- janssen, C., "*Ceriodaphnia* and *Daphnia*, A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species", *Chemosphere*, 34(4). 869 - 892(1997)
15. OECD, "*Daphnia magna* Reproduction Test." OECD guidelines for testing of chemicals, Guideline 211(1998)
16. 김보배, Carbaryl에 대한 물벼룩의 만성독성, 한서대학교 대학원 석사학위논문(2012)
17. 김상훈, 물벼룩과 발광박테리아를 이용한 산업 폐수의 생물독성평가에 관한 연구, 한양대학교 대학원 박사학위논문(2006)