

Soil Enzyme Assay에 의한 MTBE오염 토양 평가 Evaluation of MTBE-Contaminated Soil by Soil Enzyme Assay

이은정, 안윤주*

서울대학교 지구환경과학부, *건국대학교 환경과학과 (anyjoo@konkuk.ac.kr)

<요약문>

MTBE로 오염된 토양에서 생태독성학적 접근 방법으로 3가지 토양 효소의 활성도를 측정해 보았다. MTBE의 잠재적 위험성으로 인한 논란은 계속되고 있으나 토양 오염에 대한 지표로써 토양 효소 활성도의 사용타당성 여부에 대한 실험은 이전에 행해지지 않았다. 따라서 중금속 오염 토양에 대해 좋은 지표로 사용되고 있는 토양 미생물 효소의 활성도를 MTBE에 적용하여 실험해 보았다. 사용한 토양 효소는 Acid Phosphatase, β -Glucosidase 그리고 Arylsulfatase였다. 그러나 실험 결과 MTBE로 오염된 토양의 경우 중금속으로 오염된 토양에 비해 토양 미생물 활성도의 감소가 매우 적었다. 따라서 MTBE의 오염 토양의 경우 본 연구에서 측정된 효소의 활성도는 좋은 지표로 적합하지 않다는 것을 확인했다.

key word : MTBE, Acid Phosphatase, β -Glucosidase, Arylsulfatase, soil toxicity, soil enzyme activity

1. Introduction

유류는 중금속과 함께 대표적인 토양오염물질로서 그 예로는 다방향족화합물, BTEX화합물, 가솔린첨가제인 methyl tert-butyl ether (MTBE) 등이 있다. 이 중 MTBE는 가솔린성분 중 다량 (10-15% v/v)으로 첨가되어 있는 옥탄가 향상제로서 대기오염저감을 위해 사용되기 시작하였으나 90년대 중반 미국 캘리포니아 주의 지하수에서 검출된 것을 계기로 잠재적 위험성에 대한 논란이 계속되고 있다. 국내에서는 1993년 무연휘발유 공급이 의무화되면서 연료에 MTBE가 첨가되기 시작하여 2001년도에는 휘발류에 6.6-11.6% (v/v)의 비율로 혼합되어 있는 것으로 추정되었다. 최근 국내에서도 MTBE의 수질오염에 의한 인체 유해성의 문제점이 일부에서 나타나 이에 대한 본격적인 논의가 예상되고 있으나 현재까지 MTBE의 위험성에 대한 확실한 결론이 내려지지 않았고, 전반적인 국내의 토양 및 지하수에서의 MTBE 확산 정도 및 그 영향은 아직 파악되지 않은 상태로 MTBE에 대한 인식과 연구가 미흡한 실정이다.

미생물 효소활성은 중금속과 같은 토양오염물질의 독성을 평가하는 하나의 수단으로 사용되어 왔다. 인산의 에스터의 가수분해를 촉매하는 효소로서 Acid Phosphatase(EC 3.1.3.2)는 산성토양에 널리 존재하며 토양유기인산의 무기화와 식물 영양적 측면에서 중요하다. 무수물과 β -Glucosidase(EC 3.2.1.31)는 glucoside류 화합물의 가수분해를 촉매하는 효소인데, 토양에서는 β -Glucosidase가 α -Glucosidase, α -Galactosidase 또는 β -Galactosidase보다 우세하다. Arylsulfatase(EC 3.1.6.1)는 arylsulfatase의 황산

ester 결합을 비가역적으로 가수분해 되도록 촉매하는 효소로서 처음으로 토양에서 발견된 이래 동식물 및 미생물에서 검출되어졌으며, 주로 토양환경에서 황화합물의 순환에 관여한다.

본 연구에서는 오염된 토양의 제어를 위한 선행 작업인 토양 오염 정도를 평가하는 방법으로 생물학적(생태독성학적) 방법을 선택하였다. 생물을 이용한 여러 측정방법 중 미생물에 의한 방법으로 토양 미생물이 에너지를 얻기 위해 촉매로 작용하는 미생물의 효소의 활성도는 오염물질이 존재 시 변하므로 토양오염에 대한 지표가 될 수 있다는 점을 착안했다. 따라서 이러한 특성을 근거로 미생물의 효소활성을 측정함으로써 간접적으로 미생물에 대한 오염물질의 adverse effect를 정량적으로 평가하였다.

2. Experimental Section

2.1 Test chemicals

이 실험에서 사용한 토양오염물질로 미생물의 활성에 영향을 주는 유류를 선택하였다. 실험대상 유류로는 methyl tert-butyl ether(MTBE, $\text{CH}_3\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, 99% purity, ACROS Organics)를 사용하였다. 기질로서는 각 효소 당 disodium p-nitrophenyl phosphate hexahydrate(PNP, $\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OPO}(\text{ONa})_6\text{H}_2\text{O}$, 동경화성공업주식회사), p-nitrophenyl- β -d-glucopyranoside(PNG, $\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OC}_6\text{H}_{11}\text{O}_5\text{H}_2\text{O}$, 동경화성공업주식회사), potassium p-nitrophenyl sulfate(PNS, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3\text{SK}$, Sigma)을 사용하였다. 또한 흡광도 측정에서 비색 정량을 위해 사용된 시약은 p-nitrophenol($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$, ACROS Organics)이었다.

2.2 Test soil

실험에 사용된 토양은 서울 서대문구에 위치한 아산의 표층에서 직접 채취하여 시험용채(2mm mesh)를 이용해 토양을 채취 후 상온에서 3일 이상 건조시켜 실험에 사용했다. 실험 토양의 물리화학적 특성은 Table 1과 같다.

Table 1. Characteristics of soil used in the study

Parameter	Value
SOM (Soil Organic Matter)	15.2 %
WHC (Water Holding Capacity)	712.4 mg/g dry soil
Soil Texture	loam (sand:46.9%, silt:35.5%, clay:17.6%)
pH	6.43 (1:2 slurry)

2.3 Method

이 실험은 MTBE의 농도에 따른 미생물 효소의 활성도를 비교하는 것으로서 다른 환경조건의 영향을 최소로 보고 미생물 효소 활성도에 영향을 미치는 인자를 MTBE 농도에 의한 것으로 보았다. 건조시킨 토양 10g을 triplicate로 평판병에 넣은 후 일정농도 구배로 준비된 MTBE 용액 3.5mL를 토양에 골고루 스미도록 첨가한 후 증발하지 않도록 마개를 재빨리 닫았다. Blank 토양에는 formaldehyde를 3.5mL 넣었다. 이 후 인큐베이터에서 암조건 상태로 일정온도를 유지시키며 배양시켰다.

실험단위는 미생물 효소 당 농도별로 triplicate로 준비하여 test tube에 취하고 0.2ml(단 β -Glucosidase의 경우 0.25ml)의 toluene, 4ml의 pH 6.5 MUB 완충용액(단 arylsulfatase의 경우 4ml의 초산염완충용액), 1ml의 PNP(단 β -Glucosidase의 경우 PNG, Arylsulfatase의 경우 PNS)용액을 가했다. 수 초간 흔들

어서 내용물을 혼합했다. 마개를 닫고 암조건에서 흔들면서 37°C의 항온조에서 1시간 배양했다. 이 후 1ml의 0.5M CaCl₂용액과 4ml의 0.5M NaOH(단 β-Glucosidase의 경우 pH 12의 THAM완충용액)용액을 가하여 혼합한 후, 토양현탁액을 Whatman No.2여지로 여과했다. 황색 여액의 흡광도를 420nm에서 분광광도계로 측정했다. 또한 각 효소 활성에 의한 p-nitrophenol로부터 유래되지 않은 색을 분석하기 위해 각 토양에 대하여 공실험을 행했다.

3. Results and Discussion

이 토양에서 효소 활성은 흡광도의 절대값 비교 시 β-Glucosidase의 활성도가 Acid Phosphatase와 Arylsulfatase의 활성도에 비해 2배 정도 높은 결과로 나타났다. 각 농도를 Control에 대한 백분율로 나타낸 Figure 1을 보면 약간의 변화는 있으나 급성적 독성이나 만성적 독성의 측면에서 이 세 가지 효소의 활성도는 큰 변화를 보이지 않았다. 또한 농도의 증가에 대해서도 뚜렷한 감소의 변화를 보이지 않았다.

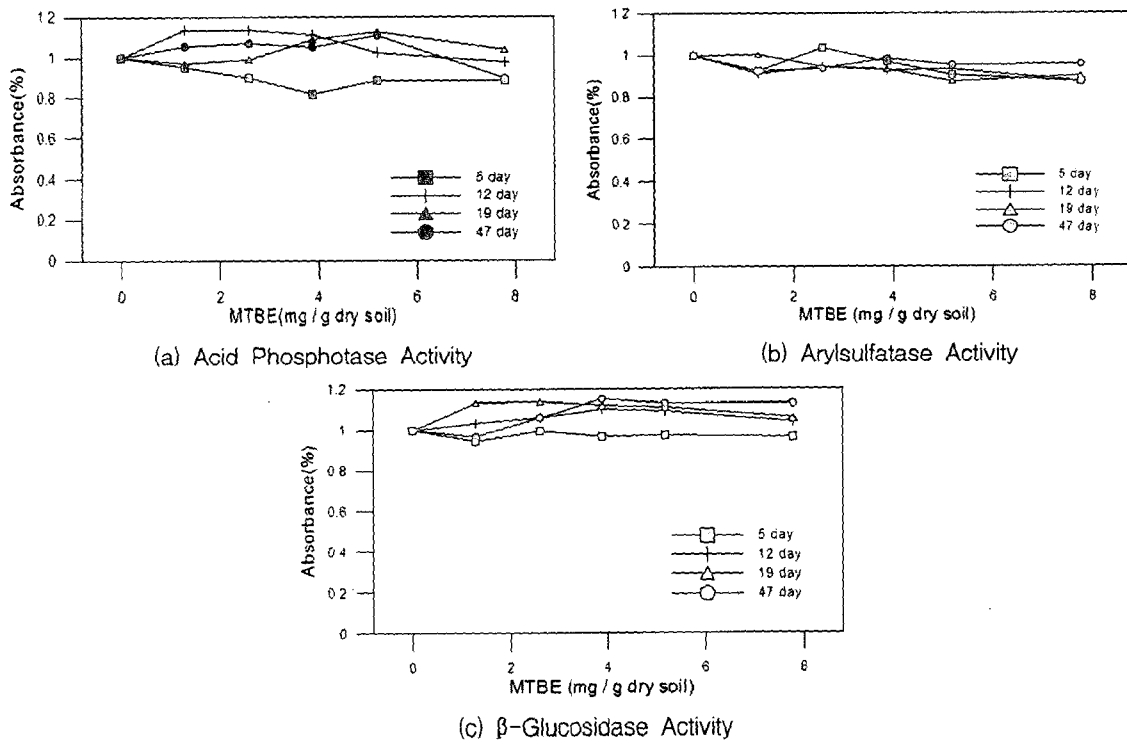


Figure 1. MTBE concentration-response curves for the Absorbance(%) for a period of 47 days.

중금속의 오염 토양에 대한 Acid Phosphatase, β-Glucosidase과 Arylsulfatase의 활성도에 대한 기존 연구는 많이 행해져 왔으며 중금속의 많은 실험 결과, 중금속의 오염 정도에 따라 효소의 확인한 활성의 감소가 나타나는 것으로 보고되고 있다. MTBE 오염물질은 연구가 제대로 되어 있지 않은 실정이며 새롭게 환경 문제로 논의가 되고 있기에 영양적 측면에서 중요한 이 세 가지 효소의 활성도가 MTBE 오염에 대한 지표가 될 수 있을지 확인하려 하였다. 연구 결과 수용해도가 4~5%정도인 MTBE를 3%의 높은 고농도에서 노출 시켰음에도 불구하고 효소활성의 정도는 큰 감소가 없었다. 또한 6~7주의 기간이 지남에 따라서도 큰 감소가 없으므로 이 세 가지 미생물 효소 활성변화는 중금속 오염 토양과 달리 MTBE 오염 토양의 지표로 적합하지 않은 것으로 고려된다.

4. References

- (1) Q. Huang and H. Shindo, Effects of copper on the activity and kinetics of free and immobilized acid phosphatase, *Soil Biology & Biochemistry*, 32, pp.1885-1892, 2000.
- (2) Speir, T.W. and Ross, D.J., Soil phosphatase and sulphatase. In: Burns, R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*. Academic Press, 1978.
- (3) Benjamin L. Turner, David W. Hopkins, Philip M. Haygarth and Nick Ostle, Short communication β -Glucosidase activity in pasture soils, *Applied Soil Ecology*, 20, pp.157-162, 2002.
- (4) Yoon-Joo An, Donald H. Kampbell and Guy W. Sewell, Water quality at five marinas in Lake Texoma as related to methyl tert-butyl ether(MTBE), *Environmental pollution*, 118, pp.331-336, 2002.
- (5) R. W. Weaver, J. S. Angle and P. S. Bottomley, *Methods of Soil Analysis-part 2*, Soil Science Society of America Inc, pp.807-826, 1994.
- (6) 박용하 외, 연료첨가제 MTBE의 위해성 및 관리필요성에 관한 연구, 정책과제 연구 보고서, 한국 환경정책·평가 연구원, 2002.