

생물학적 검정법을 이용한 소규모 수계내 수질 오염물질의 환경독성 평가 – 상추씨 발아시험과 Microtox 시험 비교 –

이 지 나, 황 인 영

인제대학교 환경학과

Evaluation of Environmental Toxicities for Priority Water Pollutants in a Small Watershed by Bioassays – Comparision between Lettuce Seed Germination Test and Microtox Bioassay –

Ji-Na Lee and In Young Hwang

Dept. of Environmental Science, Inje University

ABSTRACT

Environmental toxicities of priority water pollutants were evaluated by two selected bioassays, Lettuce seed germination/elongation test and Microtox acute toxicity test. Toxic chemicals (heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, and phenolic compounds) inhibited the germination rate and root elongation of Lettuce seed, as well as the bioluminescence of Microtox bacteria. When test biota were exposed to target chemicals, the sensitivity of Lettuce bioassay was relatively lower than that of Microtox bioassay. However, Lettuce bioassay may be a good candidate for prescreening the environmental toxicities of priority water pollutants, since the testing method with Lettuce seed was relatively easier and more economic than with Microtox bacteria.

Toxicity tests were conducted to compare the validity and sensitivity of both bioassays for sediment from a small stream passed through urban area as well as leachate from a municipal solid waste landfill. From experimental results, we found that Lettuce test and Microtox test are compensated each other as a battery of bioassay for evaluating the environmental toxicities of field samples obtained from a small stream contaminated by pollutants.

서 론

지금까지 수질오염 수준에 대한 판단은 수환경내에 어떠한 물질이 어느 수준으로 존재하는가를 확인하는 분석화학적 기법에 의해 이루어져 왔다. 그러나, 분석화학적 기법은 예상되는 다양한

수질오염 물질들 가운데 미리 분석대상으로 선정된 일부 화학물질들만을 조사하게 된다. 그러므로 이 기법은 유해 화학 물질들이 혼재되어 있는 상태와 자연에 존재하고 있는 물질의 화학적 형태에 따라서 생태계에 미치는 영향이 달라지게 되는 것을 반영할 수 없는 한계성을 갖는다.^{1,2)} 이러한 이유에 의해서, 수 생태계에 대한 화학물질들

의 영향을 예측하기 위해서는 수질오염의 원인 물질들에 대한 환경독성을 정확히 평가하는 방법의 필요성이 대두되며, 수질오염 상황에 알맞는 환경독성 평가 방법의 선택이 이루어져야 할 필요가 있게 된다.

분석화학적 기법의 한계를 극복하는 한편, 빠르고 간편하게 화학물질의 생태영향을 평가하는 방안으로는 생물학적 지시자(Biomarker)를 이용한 생물학적 검정법(Bioassay)이 있다.³⁾ 생물학적 검정법에 이용되는 생물체는 어느 특정 화학물질군에 대하여 특히 예민한 반응을 나타내는 수가 있다.⁴⁾ 수환경 내에는 수 많은 화학 물질들에 의해 오염되어 있는 경우가 많으므로, 생물검정법을 사용하여 환경오염수준을 평가하기 위해서는 단일 생물종보다 다양한 생물종들을 이용하는 것이 바람직하다.

수 환경을 오염시키는 유해화학물질에 대한 생물학적 독성 평가는 주로 물벼룩, 물고기, 조류(Algae) 등을 이용하여 행해지고 있는데,⁵⁾ 이들 중 물벼룩(*Daphnia magna*)시험법은 낮은 농도의 화학물질 오염상태에서도 매우 민감하게 반응하기 때문에 그의 기법이 이미 잘 확립되어 있다.⁶⁾ 한편, 식물을 이용한 독성표준시험법으로 Duckweed나 식물성 플랑크톤의 성장저해, 또는 *Lettuce seed* (*Latuca sativa*)를 이용한 발아율 및 뿌리 성장 저해 시험등을 들 수 있다.⁷⁾ 식물체를 사용하여 환경독성을 평가하는 기법의 장점으로는 결과의 반복성이나 객관성을 위하여 시험체인 생물들을 늘 유지 보관하여야 하는 어려움을 동물체에 비해 크게 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라, 수환경 생태계에서의 식물의 중요성이 계속 증대되고 있다는 점이다. 그러므로, 식물체를 사용하여 환경독성을 평가하는 생물검정기법을 개발해야 하는 요구가 급증하고 있다.^{8),9)}

한편, Microtox bioassay기법은 해양 발광성 미생물인 *Photobacterium phosphoreum*의 발광성 저해도를 측정하는 생물학적 독성평가 기법의 일종이다. 이 기법은 유해화학물질의 상대적 독성을 단시간내 검색할 수 있는 수단으로, 유해화학물질에 노출시 즉시 반응을 나타내는 신속성이 장점이며, 시험 kit로 상용화되어 사용하기 매우 편리한 기법이다.¹⁰⁾ 발광성 미생물이 체내에서 생성하는 ATP의 일부를 자체효소인 luciferase에 의해서

빛에너지로 전환시키는데, 유해화학물질에 의해서 미생물내 ATP 생성량 또는 에너지 전달체계가 달라지게 되면 빛에너지의 발생량이 변화하게 된다. Microtox bioassay 기법은 바로 이러한 발광저해원리를 이용하여 물질의 독성을 검색하는 수단이 된다.¹¹⁾

수계별 하천 수질관리를 위해서는 먼저 각 하천으로 유입되는 지천의 건강상태를 정확히 평가할 필요가 있다. 지천의 건강 수준은 해당 지천의 하상 퇴적물의 오염 상태 그리고 지천으로 방류되는 각종 오폐수의 종류와 양등에 의해 좌우된다. 본 연구에서는 앞서 언급한 생물학적 방법들 가운데, 상추씨 발아 및 뿌리 성장 저해 시험과 Microtox 시험기법을 이용하여 소규모 수계내 지하천의 환경독성을 평가하고자 하였다. 실험 목적상 유해성 물질들의 독성을 검색하기 위하여 자주 언급되고 있는 중금속류와 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), 그리고 Phenolic compounds에 대한 독성을 Microtox bioassay기법으로 측정한 것과 상추종자의 24 hr 발아율 및 120 hr 뿌리 성장 저해 결과를 상호 비교하였다. 한편, 주거 및 도시공단을 포함하는 소규모 수계내 하천의 저질토 및 하천 유입수를 대상으로 상추씨 발아율 및 뿌리성장 저해도와 Microtox 발광량 저해도를 측정함으로써 이들 시료에 대한 환경독성 수준을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 기구

실험에 사용한 상추종자(*Lettuce A*, 홍농종묘, 만추대청치마상추, 품종등록 No.VL-Tv-11; *Lettuce B*, 농우종묘, 적치마상추; *Lettuce C*, 홍농종묘, 삼선적축면 상추, 품종등록 No. VL-Tv-10), 배추종자(홍농종묘, 속성얼갈이배추, 품종등록 No.VCh-Hy-311), 무종자(홍농교배, 도령알타리무, 품종등록 No.VR-Hy-200), 시금치종자(홍농종묘, 한월시금치, 품종등록 No. VSp-Tv-4) 등은 국내 시중 종묘상에서 구입하였다.

시험에 사용된 중금속류는 Junsei Chem.사와 Aldrich Chem.에서 구입한 것으로 사용하였으며, Tetrachloroquinone (TCQ)와 Tetrachlorohydroquinone (TCHQ) 및 PAHs류는 Sigma Chem.사 (Sigma

Chem Co. St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 기타 유기용매류(DMSO 및 Acetone 등)은 시중에서 구입할 수 있는 가장 순도가 높은 제품들을 사용하였다.

BOD Incubator (Dong Won Scientific Co.)는 국내에서 제작된 것을 사용하였으며, 발광성 미생물에 의한 독성도 평가를 위하여 Microtox M500와 Microtox reagent를 Microbics사 (Microbics Inc., Calsbad, California, USA)로부터 구입하였다.

2. 실험방법

1) Lettuce Seed Germination and Root Elongation Test

종자의 발아율은 직경 9cm Petri dish 속에 filter paper (Whatman No. 2) 2매를 놓고 그 위에 20립의 종자를 흘어 놓은 후, 5ml 중류수를 첨가하여 25°C 암조건에서 발아시켰다. 24시간 후 종자의 표피가 터지고 유근이 출현된 것을 발아된 종자로 보고 총 시험종자수와 발아된 수를 비교하여 발아율을 구하였다 (Fig. 1). 뿌리길이 성장 시험은 위의 방법과 동일한 조건에서 시간에 따른 뿌리길이의 변화를 조사하여 측정에 적정한 시간을 정하여 실험하였다. 대조구에서 발아율이 가장 높았던 상추씨 (Lettuce A)를 향후 실험대상 시험종자로 선정하였고, 5일간 성장된 뿌리길이를 측정인자로 하였다(결과부분 참조).

시험대상물질(중금속류, PAHs, Phenolic compounds)들의 상추씨 발아 저해도 시험은 Lettuce A 20립을 담은 Petri dish에 시험물질 용액을 각각 0, 4, 10, 20, 40, 80 ppm의 농도수준으로 5ml씩 첨가하고, 25°C 암조건에서 발아 생육시켜 1일 후에

는 발아율을, 5일 후는 뿌리길이를 측정하였다. 이 때 사용된 시험물질 용액은 중금속의 경우 중류수에 용해시켰고, 기타 물질류는 소량의 DMSO 또는 acetone에 녹인 후 중류수로 회석하였다. 저해도 시험 결과는 대조구에 비하여 발아율 및 뿌리성장 저해가 50% 또는 20%가 되는 농도를 EC₅₀와 EC₂₀로 하여 상호 비교하였다. 한편, 뿌리성장 저해 시험중에 NOEC (No observable effect level)와 LOEC (Lowest observable effect level)를 함께 구하여 ECxx값과 비교하였다.

2) 현장시료 채취 및 전처리

현장시료는 매립지 침출원수와 방류수, 신어천(경남 김해시소재 신어산에서 발원하여 부산시 강서구의 서낙동강으로 유입되는 약 3km 정도의 도시관통 하천) 저질토(sediment)를 대상으로 하였다. 매립지 침출수 및 방류수는 김해시 인근 생활쓰레기 매립지에서 직접 채취하여 갈색 유리병에 넣어, 실험시점까지 냉장 보관하였다.

신어천의 퇴적물 시료는 1997년 6월에 모종삽을 이용하여 표층 20cm 이내의 퇴적물을 채취하였다. 채집된 퇴적물은 즉시 Zipperlock bag에 넣어 저온실(4°C)에서 실험을 수행할 때까지(채취 후 1주일이내) 보관하였다. 채집된 퇴적물 시료를 취하여 centrifuge tube에 옮기고 1500 rpm에서 20분간 원심분리하여 공극수를 제거하였다. 공극수가 제거된 고형물(50g)에 50g Sodium sulfate, 150 ml Methylene chloride, 그리고 25 mg Metallic copper를 넣은 후, 200 rpm에서 4시간동안 교반하고, 다시 원심분리하여 유기용매 추출물을 취하였다.

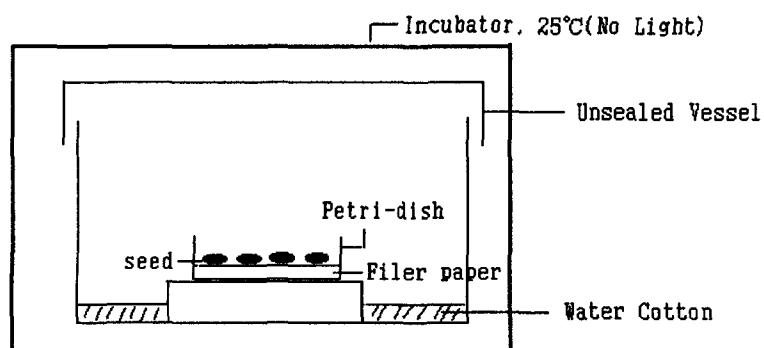


Fig. 1. Scheme for Lettuce Seed Germination and Root Elongation Testing Chamber.

Methylene chloride로 추출시킨 추출물을 후드내에서 자연 건조시킨 후, 1ml DMSO로 재용해하고 DMSO의 최종농도가 2%되도록 종류수로 재희석하였다.

3) Microtox toxicity test system

Microtox bioassay는 45% Basic Test를 실시하였다(Microtox Manual, 1994). 준비된 cuvette에 0.5 ml Microtox diluent를 넣고, 미리 잘 혼합하여 4°C에서 보관하고 있는 미생물 배양액을 10 µl 넣은 후, 15분만에 초기 발광량(I₀)을 측정하였다. 독성을 측정할 시험용액을 Microtox diluent로 2, 4, 8, 16, 32배수 희석한 후, 희석된 용액들을 미생물 배양액이 들어간 cuvettes에 0.5 ml씩 분주하고, 5, 15, 30분만에 저해된 발광량(I_t)을 구하였다. 발광량이 50% 감소되는 때의 해당 물질의 농도를 EC₅₀으로 하였다. Quality Assurance를 위한 표준 시험 용액으로는 Phenol과 Zinc Sulfate를 사용하였으며, 표준시험 물질들의 EC₅₀값을 문헌상의 값과 비교하였다.

결 과

1. 시험 종자 및 시험조건 선택

대조구에서 가장 발아율이 높은 종을 선정하고자 여러 가지 식물종자를 대상으로 발아시험을 실시한 결과(Table 1), 대청치마 상추(Lettuce A)가 가장 발아율이 높은 것으로 나타났다. 이 결과를 바탕으로 향후 진행된 종자 발아시험은 Lettuce A를 대상으로 25°C에서 수행하였다. 한편, ASTM

Table 1. Relative Seed Germination Rate as Various Incubation Temperature and Time

	Germination Rate, %					
	15°C		20°C		25°C	
	24 hr	30 hr	24 hr	30 hr	24 hr	30 hr
Lettuce A (Daechungchima)	60	100	95	95	95	100
Lettuce B (Chuckchima)	0	0	0	0	45	50
Lettuce C (Juckchuckmyon)	0	0	35	85	70	100
Chinese cabbage (Ulgari)	0	0	0	0	0	25
Spinach (Hanwol)	0	0	0	0	15	15
Radish (Altari)	0	0	0	5	15	30

draft guidelines에서는 National Contaminated Sites Remediation Program (NCSRP) 수행시 필요한 시험종자로서 상추(Lettuce)와 무(Radish)를 추천하고 있으며,^{12,13)} 특히 상추씨는 시험대상 물질의 범위가 넓고 낮은 농도에서 예민하게 반응하는 것으로 알려져 있는 것도 시험종자 선정시 고려 요인이 되었다.⁴⁾ 뿌리길이 측정을 위한 상추종자의 뿌리길이 성장정도를 조사한 결과, 5일 이후에는 성장속도가 급감함을 알 수 있었다(Fig. 2). 따라서, 뿌리길이 성장저해 시험기간을 초기 120 hr으로 결정하였는데, 이는 Greene 등⁷⁾이 제안한 시험조건과도 일치하고 있다.

2. 화학물질에 의한 상추씨 발아 및 뿌리 성장 저해

화학물질의 종류에 따라서 상추씨 발아저해도가 현저히 달랐다(Fig. 3). 시험대상 물질류 가운데 발아저해도가 가장 높았던 물질은 페놀류의 하나인 TCQ나 TCHQ 이었다. 반면에 Phenol의 저해효과는 미미하게 나타났다. 시험에 사용되었던 중금속류는 상추씨 발아에는 거의 영향을 나타내지 못하였으나, PAHs는 물질농도가 높아질수록 많은 저해가 일어났다.

한편, 동일물질류에 대한 상추씨 뿌리성장 저해 시험결과는 Fig. 4와 같았다. 중금속류의 경우, 발

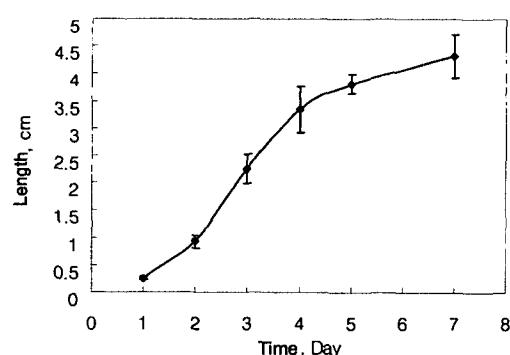


Fig. 2. Time Course for Root Elongation of Lettuce A at 25°C. All experiments were done at least triplicate.

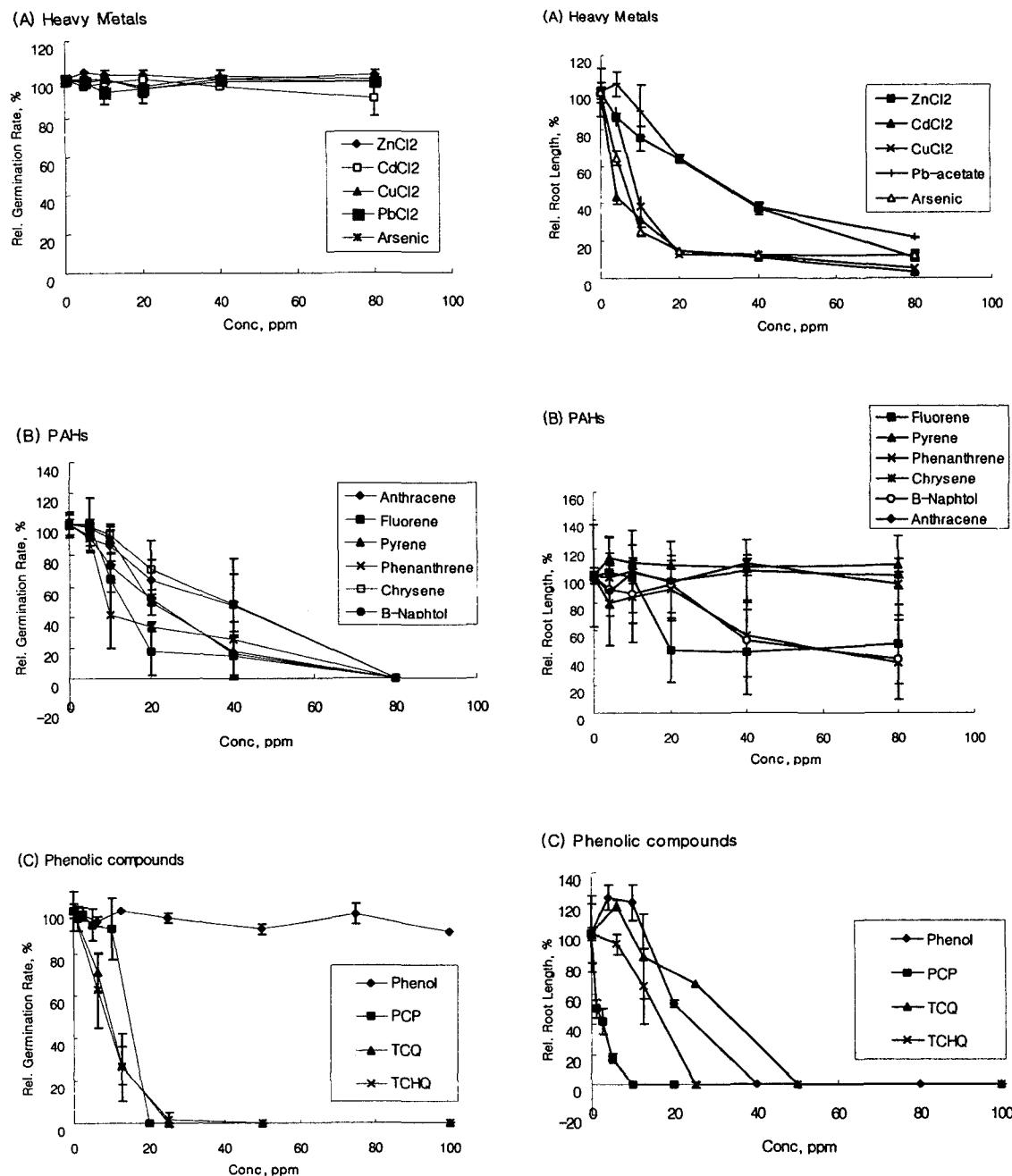


Fig. 3. Relative Rate of Lettuce Seed exposed to Chemicals for First 24hr at 25°C.
 Data means at least the average of triplicate experiments and vertical bar the standard deviation. Each experiment was conducted with 20 grains per chemical concentration. Deionized distilled Water was used for control.

Fig. 4. Effect of Chemicals on Lettuce Seed Root Elongation at 25°C during 120 hr after Chemical Treatment. Data means at least the average of triplicate experiments and vertical bar the standard deviation. Each experiment was conducted with 20 grains per chemical concentration. Deionized distilled Water was used for control.

아저해도는 미미하였으나 뿌리성장은 크게 억제하는 것으로 관측되었다. 낮은 농도범위에서도 큰 저해를 나타내는 것들로는 Cd, Cu, As 등이었다. 이와 반면, PAHs는 일부 물질을 제외하고는 대부분 뿌리성장 저해 효과는 그다지 크게 감지되지 않았다. 페놀류 물질 가운데, PCP와 Phenol은 발아 저해 효과보다 뿌리성장 저해효과가 더욱 큰 것으로 나타났다. Greene 등⁷⁾에 의한 오염된 토양의 평가방법에서 seedling emergence tests는 토양 속의 총체적인 독성성분에 씨앗을 노출시킨 반면, root elongation test는 토양으로부터 용출되어 나오

는 수용성 물질에 씨앗을 노출시켰다. 따라서, 토양내 비수용성 독성물질이 존재한다면, 뿌리길이 시험보다 발아율시험이 훨씬 더 민감하게 반응할 것이라는 결과와, PAHs가 발아율에 보다 현저한 저해를 보인 위의 결과가 동일하였다.

3. 상추씨 발아 및 뿌리성장 저해시험과 Microtox 독성시험의 비교

화학물질에 의한 상추씨의 발아와 뿌리성장 저해효과와 동일물질에 의한 Microtox 독성간의 차이를 비교하기 위하여 Fig. 3과 4에서 사용되었던

Table 2. Inhibitory Effect of Chemicals on Lettuce Seed Root Elongation and Microtox Bioluminescence. ECXX means the chemical concentration at which xx% of the test biota were observed the effective response. NOEC and LOEC means indicates the no-observable effect level and the lowest observable effect level, respectively (unit: ppm)

Chemical	Root Elongation				Microtox EC ₅₀ @30 min	
	EC ₅₀	EC ₂₀	NOEC	LOEC		
Heavy Metal	Zinc sulfate	30	11	10	20	1.90
	Zinc chloride	29	7	4	10	0.41
	Cadmium chloride	3.6	1.2	0	4	5.36
	Copper chloride	8	5	0	4	0.76
	Barium chloride	>80	>80	>80	>80	7691.67
	Ferric chloride ^a	68	33	0b	4b	35.03
	Lead acetate	28	14	10	20	0.18
	Magnesium chloride ^c	>80b	>80b	20b	40b	—
	Mercury chloride	19	7.9	4	10	—
	Nickel chloride	6	2	0	4	34.06
	Chromium chloride	62	35	20	40	—
	Arsenic oxide	6	2	0	4	73.06
PAH	Anthracene	NE	NE	40	80	2.49
	Fluorene	18	13	5	10	2.31
	Pyrene ^a	>80	>80	5b	10b	2.44
	Phenanthrene	62	17	0	5	0.26
	Acenaphthene	—	—	—	—	1.29
	Chrysene	NE	NE	20	40	—
	β-Naphthol	53	13	0	5	0.36
Phenolic Compound	Phenol	20	8	10	20	18.60
	PCP	1.1	0.5	0	1.25	0.60
	TCQ	15	9	0	6.25	0.58
	TCHQ	27	9.5	12.5	25	0.25
Organic Solvent	DMSO	23000	18200	10000	20000	98000
	Acetone	NE	NE	NE	NE	15000
	Ethyl Alcohol	NE	NE	NE	NE	35000

NE: no-effect; PCP: Pentachlorophenol; TCQ: Tetrachloroquinone; TCHQ: Tetrachlorohydroquinone

a: There was the induced effect on root elongation in the range of 0~20 ppm while the inhibitory effect above 20 ppm.

b: The induced effect of chemical was observed at a given concentration range.

c: There was the induced effect on root elongation as increasing concentration of chemical.

화학물질들을 대상으로 Microtox 급성독성 시험을 수행하였고, 그 결과를 Table 2와 3에 정리하였다. 밭아저해 효과와 Microtox 독성을 비교할 때, Zn, Cu, Pb 등의 중금속은 Microtox 독성이 강하게 나타난 반면, 밭아 저해효과는 미미하였다(Table 3). PAHs와 폐놀류의 경우, Microtox 독성이 밭아저해나 뿌리성장 저해효과보다 큰 것으로 관측되었으나(Table 2, 3), Phenol, PCP 등 일부 물질들은 Microtox 독성과 유사한 뿌리성장 저해효과가 있었다.

상추씨 밭아 및 뿌리성장 저해 시험 기법을 Microtox 독성시험과 비교할 때, 화학물질에 대한 민감성이 전반적으로 비록 낮게 나타났으나 일부 물질들에 대해서는 오히려 높거나 유사하였으며, 이러한 결과들은 Microtox 독성시험과 함께 상추씨 밭아 및 뿌리성장 저해시험은 상호 보완적인 생물학적 독성 측정기법이 될 수 있음을 의미하고 있다. 한편, 시험 경제성이나 용이성 등의 요인을 고려할 때(자료 생략), 상추씨 시험기법은 Microtox 시험에 앞서 행하는 사전 검색 수단으로

서도 유용하리라 사료된다.

4. 현장시료의 생물학적 독성

신어천에서 채취된 저질토를 Methylene chloride로 추출한 추출물의 독성을 상추씨 밭아 및 뿌리 저해시험과 Microtox 독성시험을 행하고, 그 결과를 상호 비교하였다(Table 4). 추출용매의 생물학적 독성을 배제하기 위하여 추출용매를 DMSO로 치환하였고, 이를 종류수로 충분히 희석한 후 독성 시험하였다. 실험조건이었던 2% 이하의 DMSO 용액은 양시험기법으로 독성이 나타나지 않았다(자료 생략).

저질토에 대한 Microtox 독성(EC₅₀)이 크게 나타난 반면, 상추씨 시험(EC₅₀)은 Microtox 시험기법에 비해 약 1/10의 민감도를 나타내었다. 그러나, 상추씨 시험에서 얻은 EC₂₀값은 Microtox EC₅₀의 약 1/3수준으로 관측되었다. 상추씨 시험의 EC₅₀나 EC₂₀값이 Microtox EC₅₀에 비하여 큰 값, 즉 낮은 독성이 나타난 것은 저질토를 유기용매로 추출하였던 것이 일부 원인이 된 것으로 사료된다. 도시 생활 쓰레기 매립지에서 발생하는 침출수와 이를 환경기준에 맞도록 각종 처리하여 방류하는 방류수의 생물학적 독성을 앞서 언급한 두 가지의 기법으로 평가하였다(Table 4). 이때 침출수나 방류수는 채수된 상태를 그대로 시험에 사용하였다. 매립지 침출수의 경우 상추씨 시험에 비해 더욱 민감한 반응을 나타내었다.

Table 3. Inhibitory Effect of Chemical on Germination Rate of Lettuce Seed and Microtox Bioluminescence. ECXX means the chemical concentration at which xx% of the test biota were observed the effective response (unit : ppm)

Chemical	Seed Germination		Microtox	
	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀ @30 min	
Heavy Metal	Zinc chloride	NE	NE	0.41
	Cadmium chloride	NE	NE	5.36
	Copper chloride	NE	NE	0.76
	Lead acetate	NE	NE	0.18
	Arsenic oxide	NE	NE	73.06
PAH	Anthracene	37	15	2.49
	Fluorene	11	7	2.31
	Pyrene	20	12	2.44
	Phenanthrene	9	4	0.26
	Chrysene	40	16	—
	β-Naphthol	21	8	0.36
Phenolic Compound	Phenol	NE	NE	18.6
	PCP	14.9	11.5	0.60
	TCQ	9	3	0.58
	TCHQ	9	5	0.25

NE: no-effect; PCP: Pentachlorophenol; TCQ: Tetrachloroquinone; TCHQ: Tetrachlorohydroquinone

Table 4. Comparison of Lettuce Seed Test and Microtox Bioassay with Field Samples, Sediment in a small stream and Leachate from a municipal solid waste landfill

Sample	Germination Rate					Root Elongation	Microtox
	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀ @30 min		
Sediment	Site 1 (g _{sed.} /ml)		0.275	0.188	0.688	0.2	0.0246
	Site 2 (g _{sed.} /ml)		0.388	0.175	0.825	0.15	0.0547
Leachate	Leachate before treatment (%)		5.9	5.4	3.7	1.2	10.8
	Effluent after treatment (%)		24.5	2.1	5.0	2.0	45.0

이상과 같은 결과들은, 발아 및 뿌리성장저해도 측정을 통한 상추씨 시험기법은 Microtox 독성시험 기법과 함께 하천 저질토나 매립지 침출수 또는 방류수 등의 환경독성을 평가할 수 있고 기법이 될 수 있음을 의미하고 있다.

토 론

산업 하폐수의 불완전한 처리, 유해 폐기물의 방치, 농약의 지속적 사용, 등은 토양을 오염시킴과 동시에 지하수와 지표수의 수질을 악화시킨다.^{14,15)} 특히 폐기물 매립지에서 발생하는 침출수에는 유독성 물질들이 고농도로 존재하기 때문에 이러한 침출수가 인근 하천등으로 유입되게 되면 하천 생태계에 심각한 악영향을 끼치게 된다.¹⁰⁾ 또한 독성물질에 의해 오염된 수자원을 음용수나 농업용수등으로 사용하게 되면 국민의 보건과 건강에 치명적이라는 사실이 이미 많은 연구사례로부터 잘 알려져 있다.¹⁶⁾ 그러므로 하천 수질 관리를 위해서는 수질오염원으로부터의 유입이 예상되는 독성 물질들을 관리하고 배출 규제를 하여서 독성물질들에 의한 수질오염을 방지하는¹⁷⁾ 한편, 현재의 하천 오염과 그의 환경독성 수준을 평가해야만 한다.

그러나, 현재의 수질(또는 수 환경) 평가 항목¹⁸⁾ 들, 즉, 생화학적 산소요구량(BOD), 화학적 산소요구량(COD), 부유물질의 총량(TSS), 총질소의 양(TN), 그리고 몇몇 종류의 독성화학물질의 농도 등 제한된 항목의 측정만으로는 완전한, 또는 근접한 수준의 환경독성을 평가하기가 매우 어렵다.¹⁹⁾ 그 이유는 첫째, 수질오염을 야기시킬 수 있는 화학물질의 종류가 다양하며, 둘째, 미지의 유독성 물질들이 포함되어 있는 경우, 앞서 언급한 기준의 수질평가항목들에 의해서는 환경독성을 평가하기가 어려우며, 셋째, 물질들이 혼재되어 있는 경우 물질들간 독성효과의 상승 또는 길항작용을 피하기에 불가능하기 때문이다.^{1,2)} 그렇기 때문에 환경오염의 원인물질들에 대한 환경독성을 정확히 평가하는 방법이 필요하며, 수질오염 상황에 알맞는 환경독성 평가 방법의 선택이 요구되고 있다.

생물학적 기법에 의한 환경독성 평가 방법은 물질의 독성(원하지 않는 효과)이 생물체에 직접 나타날 때 그의 강도를 측정하는 것이다. 이때, 독

성물질에 의해 생물체가 발현하는 각종 독성 효과들 중, 관측이 가능하며 계량적 측정을 할 수 있는 효과를 생물학적 지표(biomarkers)라 한다.³⁾ 독성 물질에 대한 환경독성 평가는 바로 이러한 biomarkers를 측정하고 계량함으로써 가능하다. 예를 들면, 물질의 수중 농도에 따른 조류(algae)의 성장저해율이나 어란(fish eggs)의 부화율(hatching rate) 등을 측정함으로써 해당물질의 환경독성을 평가할 수 있다.⁶⁾

그러나 생물학적 환경독성 평가방법은 물질의 독성을 비교적 정확히 판단할 수 있는 장점에도 불구하고 결과의 반복성이나 객관성을 위하여 시험체인 생물들을 늘 유지·보관하여야 하는 단점이 있다. 또한 생물체의 개체간 차이나 세대간의 차이를 극복하기 위해서는 여러세대에 걸친 철저한 계대배양등이 필요하며, 이러한 점은 기존의 생물학적 환경독성 평가 기법들이 갖고 있는 커다란 한계성이 된다.²⁰⁾ 더우기 이미 4만여종에 이르며 또한 매년 수천종씩 새로이 합성되는 화학물질 전부를 기존의 생물학적 방법으로 독성을 평가하기란 불가능한 일이다.²¹⁾ 그렇기 때문에 간편하고 신속하게 생물학적으로 환경독성을 평가할 수 있는 대체 방법을 확보하거나, 환경독성의 정량적 측정이 가능한 biomarkers를 개발하는 것이 매우 중요하다.

Microtox (MTX) toxicity test는 발광성 미생물인 *Photobacterium phosphoreum*이 발생하는 광량(light intensity)이 외부의 스트레스에 의하여 감소되는 것을 측정함으로써 스트레스의 강도를 판단하는 방법이다.²²⁾ 이때, 외부의 스트레스가 환경독성물질인 경우, 해당물질의 환경독성도를 표현할 수 있다. 물질의 독성이 강할 수록, 또는 물질의 농도가 높을 수록 미생물로부터 발생하는 광량이 감소하는 원리를 이용하여 양(독성도 또는 농도)-반응(발광량의 감소량)의 관계(dose-response relationship)를 측정한다.

발광성 미생물인 *Photobacterium phosphoreum*의 발광성 저해도를 측정하는 Microtox bioassay²³⁾는 이와같은 생물학적 기법의 하나로 포함된다. 이 방법의 장점으로는 간편하고 신속한 결과를 얻을 수 있는 점과 기존의 몇가지 생물종의 환경독성 반응과 매우 상관성이 높다는 점이다.²⁴⁾ 특히, Microtox bioassay는 *Daphnia magna* bioassay²⁵⁾

와 유사한 민감도를 나타내며, 24~96시간이 소요되는 수생물 검정법에 비해 1시간 이내에 급성독성의 결과를 얻을 수 있는 신속함이 큰 강점이다.²⁴⁾ 또한 Microtox bioassay법은 실험결과들간의 상호 호환성이 매우 높다. 이것은 일반 생물체를 이용한 독성검사시 예상되는 systemic error의 문제, 즉, 시험생물체의 strain에 따른 결과의 차이, 시험생물체의 유지 및 배양법에 따른 결과의 차이, 그리고 시험관측자의 숙련도와 시험 당시의 외부조건에 따른 결과의 차이 등을 극복할 수 있는 장점이 된다. 그러므로, Microtox를 이용한 환경독성 평가기법은 여러가지의 독성화학물질들이 혼재된 상태로 오염되어 있는 국내의 각 수계나 공업폐수 또한 위생매립지의 침출수등의 독성을 검색하는데 매우 유용하리라 판단되며, 발광 저해도는 이들의 독성을 표현하는 biomarker가 될 수 있다.

이와 함께 식물체를 사용하여⁹⁾ 환경독성을 평가하는 일은 점차 그의 중요성이 증대되고 있다. 식물의 종자는 습도와 온도를 적정선으로 유지하면 외부의 영양분 공급 없이 발아하며 뿌리가 자라게 된다. 발아기간에는 종자 내부에서 발아에 필요한 에너지를 생산하기 위하여 생화학 반응이 활발히 진행된다. 외부에서 종자의 표피를 통하여 화학물질이 침투해 들어가면, 에너지 생산에 필요한 여러가지의 반응들 가운데 어느 부분이 저해를 받게 되며, 결과적으로 발아력이 저하 된다. 화학물질의 독성은 종자 표피를 통과하는 투과성과 투과량, 그리고 에너지 생산 반응의 해당 효소 저해성에 좌우 될 수 있다. 화학물질의 식물 종자 표피 투과성은 동물 실험시 물질의 bioavailability와 상관성이 높을 수 있다. 따라서 식물종자의 발아 저해도나 뿌리 성장 저해도는 유해화학물질류의 환경독성을 평가할 수 있는 biomarkers가 된다.⁹⁾

본 연구의 주 목적은 산업폐수 또는 폐기물 침출수 속에 다량 함유될 가능성이 큰 우선 관리대상 물질들 가운데 일부를 선정하여 이들의 환경 독성을 비교 평가하고, 이들에 의한 수질오염이 발생하였을 때에 정확한 위해성 평가를 하도록 하기 위한 자료로 제공하고자 하는 데 있었다.²⁶⁾ 이러한 연구 목적을 위하여 발광성 미생물과 식물종자의 발아도 및 뿌리길이 성장 저해도를 이

용한 환경독성 평가 방법의 확립하였고(Figs. 1-4, Table 2, 3), 이를 이용하여 산업폐수 등으로 오염된 하천 저질토나 폐기물 매립지의 침출수와 같이 복합물질로 오염된 환경시료의 생물학적 독성을 평가하는 데 응용하고자 하였다(Table 4).

결론적으로, 본 연구를 수행하면서 하천 저질토나 매립지 침출수와 같이 복합적인 유해물질로 오염된 환경시료들의 생물학적 독성을 간편하고, 신속하며, 경제적인 환경독성 평가할 수 있는 기법을 확보할 수 있었다. 또한 본 연구에서 확립한 환경독성 평가 방법은, 평가 수행시 소요되는 소모품이나 재료들이 기존의 생물학적 방법들에 비해 월등하게 저렴하고, 특별한 시설이 필요치 않아 많은 분야 특히 환경오염도를 측정하거나 관측해야 하는 곳에서 손쉽게 응용되리라 사료된다.

결 론

수계에 유입되어 수 생태계를 교란시킬 수 있는 우선 관리대상 물질들의 환경독성을 평가하고자 상추씨 발아 및 뿌리 성장 저해 시험 기법을 확립하였다. 또한, Microtox 시험 기법으로 기 확립된 상추씨 시험 기법의 독성물질에 대한 민감성과 현장 시료의 독성평가에 대한 유용성을 검증하였다. 본 실험을 통하여 획득한 주요 결과들로부터 결론을 요약하면 다음과 같다.

1. 상추씨 발아 및 뿌리 성장 저해 시험의 시험 생물로는 대청치마 품종이 가장 양호하였다.
2. 일부 화학물질류에 대한 상추씨 발아 저해 시험 결과와 뿌리 성장 저해 시험 결과는 상호 보완성이 있었다.
3. 상추씨 시험과 Microtox 발광도 저해 시험은 시험 대상 화학물질류의 범위를 확장시킬 수 있는 the battery of bioassay 관계가 있음을 확인하였다.
4. Microtox bioassay 뿐만 아니라, 상추씨 시험 기법은 유해화학물질로 오염된 하천의 저질토 및 하천으로 유입되는 산업폐수 또는 매립지 침출수의 환경독성을 검색하는 유용한 방법임을 검증하였다.
5. 생물학적 환경독성 평가시, 경제성, 용이성, 그리고 민감성 등을 고려할 때, Microtox bioassay에 앞서서 상추씨 시험 기법을 현장 시료에 대한 사

전 독성 검색 기법으로 활용할 수 있다고 판단되었다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모 과제(과제번호 : 04E039) 연구비에 의해 연구되었음.

IYH thanks to AZUR Environmental (Microbics Co.)~

참 고 문 헌

1. Roberts, S., Vasseur, P. and Dive, D., Combined effects between atrazine, copper and pH on target and nontarget species, *Water Res.* 24, 485–491(1990).
2. Wong, W.H., Toxicity test of landfill leachate using *Sarotherodon mossambicus* (Freshwater fish), *Ecotox. Environ. Safe.*, 17, 149–156(1989).
3. 황인영, 생물학적 지시자에 의한 수질 오염 평가, *인체환경연구소 제6회 심포지움 논문집*, 37–50(1997).
4. Keddy, C.J., Greene, J.C., Bonnell, M.A., Review of whole-Organism Bioassays: Soil, Freshwater Sediment, and Freshwater Assessment in Canada, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30, 221–251(1995).
5. ASTM, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. In 1997 Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05(1997).
6. U.S. EPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms (1993).
7. Greene, J.C., Bartels, C.J., Warren-Hicks, W.J., Parkhurst, B.R., Linder, G.L., Peterson, S. A., and Miller, W. E., Protocol for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites, EPA/3-88-029(1989).
8. Lewis, A.M., Use of Freshwater Plants for Phytotoxicity Testing: A Review, *Environmental Pollution*, 87, 319–336(1995).
9. Wang, W., Freemark, K., The use of plants for environmental monitoring and assessment, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30, 289–301(1995).
10. 황인영, 생물학적 방법에 의한 도시생활 쓰레기 매립지의 침출수 독성특성 평가, *한국환경독성학회지*, 11(1–2), 31–39(1996).
11. 황인영, Microtox를 이용한 펜타클로로벤젠과 펜타클로로페놀의 환경독성 평가, *인체 논총*, 11(2)(1995).
12. ASTM, Standard Guide for Conducting Seedling Emergence Toxicity Tests in Soils or Sediments from Hazardous Waste Sites[Draft]. Subcommittee E47.11.05, ASTM, Philadelphia, PA(1990c).
13. ASTM, Standard Guide for Conducting Seed Germination and Root Elongation Soil Elutriate Chronic Toxicity Bioassay [Draft]. Subcommittee E47.11.01, ASTM, Philadelphia, PA(1990d).
14. Same-Fort, R., Ground water contamination by anthropogenic organic compounds from waste disposal sites: Transformations and behaviour, *J. Environ. Sci. Health-Environ Sci. Eng.*, A26, 13–62(1991).
15. Rule, J.H., Municipal landfill leachate in the ground and surface water, Chesapeake, Virginia: heavy metals, *J. Environ. Health*, 42, 60–63(1979).
16. Clayton, GD., Clayton, FE., Patty's industrial hygiene and toxicology, 4th Edition, V.II, Part B, 1605–1616 (1994).
17. Loisidou, M., Vithoulkas, GN., and Kapetanois, E., Physical chemical treatment of leachate from landfill, *J. Environ. Sci. Health-Environ. Sci. Eng.*, A27, 1059–1073 (1992).
18. 환경부, 수질환경보전법(1992).
19. Forst, C., Simon, H. and L. Stieglitz, Determination of chlorophenols and chlorobenzenes in leachate by head-space analysis, *Chemosphere*, 26, 1355–1364(1993).
20. 정금희, 산업 폐수의 환경 독성 평가 기법, *인체환경 연구소 제6회 심포지움 논문집*, 19–36(1997).
21. 이성규, 수계관리를 위한 환경독성분야의 필요성, *인체환경연구소 제6회 심포지움 논문집*, 1–18(1997).
22. Richardson, M., *Ecological monitoring*, VHC Publishers, 384(1994).
23. Microtox Manual, Microtox M500 Manual: a toxicity testing handbook, Microbics Co., Calsbad, CA, USA (1994).
24. Kaiser, KLE., Qualitative and quantitative relationships of Microtox data with toxicity data for other aquatic species. In: *Ecological monitoring*, ed. by M. Richardson, 197–211, VHC Publishers, USA (1993).
25. Winner, RW, Evaluation of the relative sensitivities of 7-d *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubio* toxicity tests for cadmium and sodium pentachlorophenate, *Environ. Toxicol. Chem.*, 7, 153–159(1989).
26. Janssen, CR and Persoone, G., Rapid toxicity screening tests for aquatic biota I. methodology and experiments with *Daphnia magna*, *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 711–717(1993).