

유전자 재조합 생물 발광 균주를 이용한 순수 오염물과 토양시료의 독성도 평가 Application of the Recombinant Bioluminescence Bacterium on the Toxicity Assessment of the Sole Chemicals and Soil Samples

공인철 · 김진영 · 이선희 · 고경석*[†]

In Chul Kong · Jin Yeong Kim · Sun hee Lee · Kyung-Seok Ko*[†]

영남대학교 환경공학과 · *한국지질자원연구원 지구환경연구본부

Department of Environmental Engineering, Yeungnam University

*Geologic Environment Division, Korea Institute of Geoscience & Mineral Resources

(2011년 3월 31일 접수, 2012년 2월 24일 채택)

Abstract : Various factors affecting on the bioassay were investigated. Experiments with a low mixture ratio (cell to toxicant solution) of 0.5 : 9.5 (v/v) produced observable bioluminescence intensity for assay. Both sodium lactate and potassium nitrate stimulate bioluminescence activity; 2.6~4.0 times of control. Distilled water and MSM, which gave non significant effects on the bioluminescence activity, were determined as proper diluent or extract solutions. A wide range of toxic responses of metals and organics were observed. In general, organics were much less sensitive than metals. Samples collected from eleven sites showed the bioluminescence activity ranging from 29 to 111% of the control. Significant correlation between toxicity and total metal contents was not observed, but the toxicity of two groups, sorted based on the contaminated arsenic concentration in soils, was 44% and 20%, showing considerable differences.

Key Words : Bioassessment, Bioluminescence, Heavy Metals, Soils, Toxicity

요약 : 본 연구에서는 중금속 오염물 생물 검정 수행에 영향을 미치는 조건들에 대해서 조사하였다. 오염 시료의 희석 최소화의 필요 조건인 낮은 균주와 시료의 비율(0.5 : 9.5)에서도 실험을 수행할 정도의 발광 활성이 관찰되었다. Sodium lactate와 KNO₃를 첨가한 조건에서 대조군에 대해 약 2.6~4.0배의 발광이 관찰되었다. 시료 희석(추출)용액으로는 발광 영향에 중요한 끼치지 않는 증류수와 MSM이 적절하였다. 본 방법은 중금속에 대해서는 매우 민감하였지만 유기오염물에 대해서는 민감하지 않은 것으로 나타났다. 11지역의 토양 시료추출액은 대조군의 29~111% 발광활성을 나타내었다. 각 시료별 총중금속 농도와 독성 영향 간의 상관성을 예측하기는 어려웠지만 시료의 중요 오염물(비소)에 기준한 두 그룹 간에 통계적 차이의 가능성이 있음을 확인하였다(높은 비소와 낮은 비소 그룹은 각 44%와 20%의 독성도).

주제어 : 생물평가, 생물발광, 중금속, 토양, 독성도

1. 서론

생태계 오염 여부 및 오염물에 의한 영향을 규명하는 것은 환경의 위해성 평가, 복원 및 관리 등을 위해 매우 중요하다.¹⁾ 특히 독성이 높은 오염물에 대한 평가는 더욱 중요하다. 예를 들면 중금속 중에서 높은 인체 독성을 미치는 비소는 국제적 문제로 인식되고 있으며 인도와 같은 특정 국가에서는 지하수 비소 오염이 매우 심각한 문제로 부각되고 있다.²⁾ 변이원성 및 발암성 특성 때문에 인체에 위해성이 높은 것으로 알려져 있는 Cr(VI)은 피혁산업, 부식방지, 도금, 염료 생산 등의 다양한 산업체에서 사용하며 심각한 환경 오염을 유발한다. 연구결과에 의하면 중금속 오염은 예상하는 것보다는 더욱 위험한 영향을 주는 것으로 알려져 있다.³⁾ 또한 다양한 유기오염물들에 대한 영향도 중금속과 더불어 지하수계 등의 생태계에 주요 오염원들로 알려져 있으며, 미국, 캐나다 및 여러 국가들에서는 석유계탄화수소 화합물을 주요 오염물로 간주하고 있다.^{4,5)}

오염물의 화학적 분석은 환경에서의 오염성분과 정도에 대

한 정보를 제공하지만 생태계 영향에 대한 직접적 정보는 제공하지 않는다. 따라서 오염물의 화학적 이동 및 경로에 대한 정보와 더불어 생물학적 독성에 대한 정보 도출도 매우 중요하다. 이러한 목적들을 달성하기 위해 생물검정법(bioassay)은 다양한 물리, 화학적 방법들과 더불어 중요한 수단이다.⁶⁾ 독성시험법은 시험기간에 따라 급성(acute) 및 만성(chronic) 독성으로 대개 나뉘며, 진핵생물 이용법(어류, 무척추 동물 조류 및 원생동물 등)과 원핵생물이나 효소 이용법으로 크게 분류할 수 있다. 일반적으로 진핵생물인 어류, 물벼룩 등을 이용할 경우에는 시험에 소요되는 시간 및 경비가 높고 부가적인 시험조작을 요하는 경우가 많기 때문에, 경제적, 시간적, 사용 측면에서 오염 환경 평가가 용이한 박테리아의 특성을 이용한 독성시험법 이용이 증가하고 있다.⁷⁾ 박테리아를 이용한 독성방법으로는 효소활성도(enzyme activity) 및 생합성, ATP, 호흡률(respiration), 효소 혹은 세포 생존률(viability), 발열량 등을 측정하는 방법들이 있으며, 측정에 소요되는 시간이 수십 분에서 수 시간 내로 타 시험법보다 상대적으로 신속하게 결과를 얻을 수 있는 장점이 있다.⁸⁾ 박테

[†] Corresponding author E-mail: kyungsok@kigam.re.kr Tel: 042-868-3162 Fax: 042-868-3414

리아의 다양한 특성 중에서 생물발광(bioluminescence)은 특정 유기화합물이 효소 작용으로 산화되면서 방출되는 에너지가 빛에너지의 형태로 체외로 나오는 일종의 광화학반응 현상이다. 생물발광 이용 검정법은 높은 민감도, 낮은 배경 영향, 빠른 반응, 쉬운 측정 등의 특성 때문에 환경독성 평가에 효율적인 수단으로 이용되고 있다.^{9,10)} 생태계에서 분리 혹은 유전자 재조합 균주 등을 이용할 수 있으며 국제적으로 가장 잘 알려지고 공인된 방법은 미국 Microbics사에서 해양 균주 *Vibrio fischeri*를 상용화한 “Microtox” 검정법이다.^{11,12)} 동일한 측정종말점을 이용한 생물 검정법에서도 조건을 변화하여 효율적 방법을 수행할 수 있다. 예를 들면 시료와 균주 비율, 노출시간, 희석액, 세포막 투과도, 발광 강도 등을 조절할 수 있을 것이다.¹³⁾ 특히 환경 시료에 대한 평가를 위해서는 적절한 조건들을 이용하여 수행하는 것이 매우 중요하다.

박테리아의 발광 특성을 이용한 독성법의 신속, 간편, 민감성 등의 장점에 근거하여 본 연구에서는 지하수계에 영향을 줄 수 있는 토양시료에 대한 독성 평가를 수행하였다. 또한 토양 시료에 적용하기 전에 순수 오염물에 대한 민감도 및 오염물별 차이와 검정법 개선을 위한 조건들에 대해 조사하였다.

2. 실험방법

2.1. 균주 특성과 시험 오염원

오염물 독성 측정을 위해 생물발광 변이균주인 *Escherichia coli* DH5α RB1436 (Dr. Burlage, Univ. Wisconsin, USA)을 사용하였으며, RB1436은 pUCD615 플라즈미드 내의 염기 제거(deletion)에 의해 *lux-gene*이 충분히 발현될 수 있도록 구성된 promoter가 *lux-gene*에 근접하게 위치한 균주이다. 균주는 20% glycerol 용액으로 -70℃ 초저온고(Ishin Lab Tech. Co., Model DF9007)에 보관하였으며, 필요시 Luria-Bertani^{ka} (LB^{ka}) 고형(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, 2N NaOH 0.5 mL kanamycin 50 mg per 1 L, pH 7.2)배지에 계대 배양하여 사용하였다. 실험을 위해 27℃, 130 rpm 조건에서 12시간 이상 배양 후 다시 1:30 희석하여 OD₆₀₀ = 0.6이 될 때까지 계대 배양하고, Minimum Salt Medium (MSM; MgSO₄·7H₂O 0.2 g, CaCl₂ 0.1 g, FeSO₄·7H₂O 0.05 mg, NaMoO₄·2H₂O 0.05 mg, K₂HPO₄ 0.43 g, KH₂PO₄ 0.23 g)으로 OD₆₀₀ = 0.2로 희석하여 사용하였다. 오염물에 의한 영향은 빛 감소에 근거하여 측정하였으며 발광은 일반적으로 0.5 시간 단위로 시료 400 μL을 채취한 후 Luminometer (TD 20/20, Turner Designs, USA)를 이용하여 측정하였다. 발광 강도 단위는 Relative Light Unit (RLU)로 나타내었고 최대 한계치는 9,999 RLU이다.

순수 오염물에 대한 독성은 Trimmed Spearman Karber method을 이용하여 EC_{50s}으로 나타내었다.¹⁴⁾ US. EPA's Center for Exposure Assessment Modeling (CEAM)에서 제공하는 컴

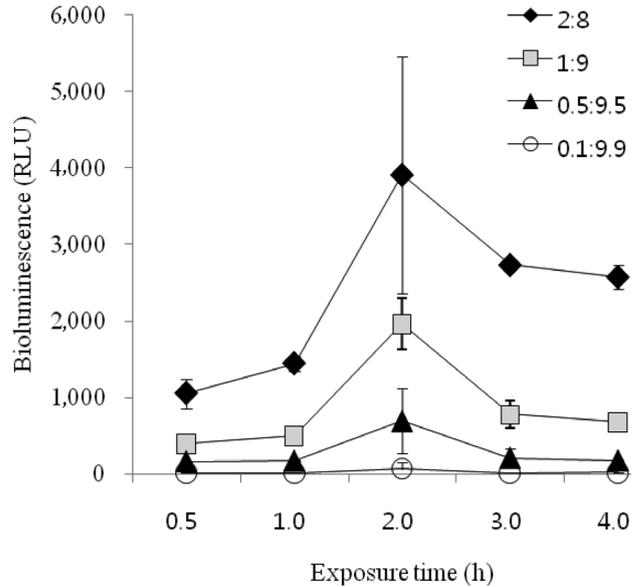


Fig. 1. The effects of the cell to solution ratio on the bioluminescence activity of the tested strain.

퓨터 SPEARMAN 프로그램을 사용하여 EC₅₀과 95% confidence level values을 추정하였다.

사용한 중금속과 유기오염물은 다음과 같다: arsenate (Na₂ HAsO₄), arsenite (NaAsO₂), cadmium (as CdCl₂), copper (as CuCl₂), chromium (VI, as K₂Cr₂O₇), mercury (as HgCl₂), methyl tertiary butyl ether (MTBE), toluene, xylene isomers, 2-chlorophenol (CP), 2,4-dichlorophenol (diCP), phenol.

2.2. 검정법 영향 인자 조사

검정법에 영향을 줄 수 있는 다음 3가지 조건 인자들에 대해 조사하였다: (i) 시료와 균주의 비율, (ii) 희석 혹은 추출 용액이 발광 활성에 미치는 영향, (iii) 생물발광 촉진 조건.

균주와 시료의 비율은 균주 0.1~2 mL 사이의 4 조건 비율 (0.1:9.9, 0.5:9.5, 1:9, 2:8)에 대해 조사하였다. 시료의 희석과 추출에 사용하는 용액이 발광 활성에 미칠 수 있는 영향을 다음 용액에 대해서 조사하였다(균주와 시료 1:9 조건): 증류수, 인산염 완충액(p-buffer), MSM, 배양액(LB). 특정 조건에서의 낮은 발광에 의한 문제점 해결을 위해 발광 촉진제에 대해 조사하였다. 상이한 발광균주에 대해서 적당한 촉진인자로 알려진 sodium lactate (2 g C/L, C₃H₅NaO₃)와 KNO₃ (20 g KNO₃/L)가 발광 촉진에 미치는 영향을 조사하였다.¹⁵⁾

2.3. 토양 시료 채취 및 토양 평가

토양은 지하수 개발 후보지로 선정된 강 유역 대표 토양 11 곳(선감브리아기의 편암, 편마암, 옥천층군에 해당하는 번성 퇴적암, 석회암, 충남탄전의 쥐라기 화강암, 퇴적암, 백악기 퇴적암)을 채취 조사하였다. 일부 토양에서 수 백 mg/kg의

비소함유 토양이 조사되었으며, 우라늄계열의 ^{226}Ra 이 485 Bq/kg이 함유된 지점도 나타났다. 토양시료의 총 중금속 농도 전처리 및 분석 방법은 다음과 같다. 토양시료의 전처리 분해를 위하여 0.5 g의 시료를 테프론 용기에 넣고 혼합산 (HNO_3 5 mL + HClO_4 2 mL + HF 10 mL)을 가한다. 이후 실온 상태에서 시료의 분해를 유도한 후 핫플레이트 200°C에서 약 3시간 동안 증발 건조시킨다. 이후 다시 7 mL의 HCl을 가하여 시료를 완전히 분해시킨다. 용해된 시료는 2~5% HNO_3 을 이용하여 희석한 후 중금속 농도를 유도결합플라즈마 분광분석기(ICP-AES)를 이용하여 분석하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1. 검정법 조건에 의한 영향

사용 균주 RB1436은 pUCD615 *lux*-유전자에 계속발현 promoter가 근접하게 존재하도록 재조합된 플라즈미드를 보유하고 있는 균주이므로 성장 과정 중 발광을 생산하는 균주이다. 균주와 용액(시료 혹은 대조군)의 다양한 비율(2:8~0.1:0.9 v/v)이 생물발광 강도에 미치는 영향을 관찰하여 본 검정법에 적절한 비율을 결정하였다. 여러 연구 결과에 의하면 균주에 대한 용액의 비율은 1:1에서 1:9 사이의 범위가 보편적으로 이용되고 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾

최대 강도는 배양 2시간대에 나타난 후 초기 균주 농도에 따라 약 4시간 이상까지 발광이 지속되었다. 예상한 바와 같이 균주 비율이 높은 조건(높은 균주 대 용액비율)에서 높은 발광이 관찰되었다. 균주량 2, 1, 0.5, and 0.1 mL 조건에서 최대 발광은 각 3913 ± 1550.0 , 1963 ± 340.5 , 692 ± 426.4 와 68 ± 89.6 RLU로 조사되었다. 따라서 검정법 수행에 적절한 빛의 강도는 균주 0.5 mL 이상의 조건에서 관찰되었으므로 최소한 0.5:9.5(균주:용액)의 조건에서 검정법이 시행 가능함을 알 수 있었다. 적은 균주량을 사용하는 조건의 장점은 시료 희석효과를 최소화할 수 있으며 시료용액내의 독성물질의 화학적 변화를 최소화할 수 있다는 점이다.¹⁹⁾ 조사 결과를 바탕으로 독성측정이 1시간과 1.5시간의 발광 활성 평균치를 이용한다는 점들을 고려하여 1:9 (v/v) 비율을 향후 조사에 사용하였다.

검정법 수행 과정에서는 오염물 외의 성분이나 조건들이 균주 발광활성에 미칠 수 있는 영향을 최소화하여야 한다. 과정 중 시료용액, 추출액, 희석액 등이 발광에 영향을 줄 수 있으며 성분들의 다양한 특성 때문에 영향을 파악하기는 쉽지 않다. 본 조사에서는 희석 및 추출 용액으로 사용할 수 있는 인산염 용액(p-buffer), 증류수, LB와 MSM용액들이 발광에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2). 인산염 용액은 다른 조건들에 비해 뚜렷한 발광 촉진 영향을 나타내는 반면에 증류수와 탄소를 함유하지 않은 MSM은 시간에 따라 뚜렷한 영향을 나타내지 않았다. 검정법은 보편적으로 1시간과 1.5시간 동안 시료에 균주를 노출하였을 때의 발광을 평균으로 나타내며 각 조건에서 발광은 다음과 같다: p-buffer

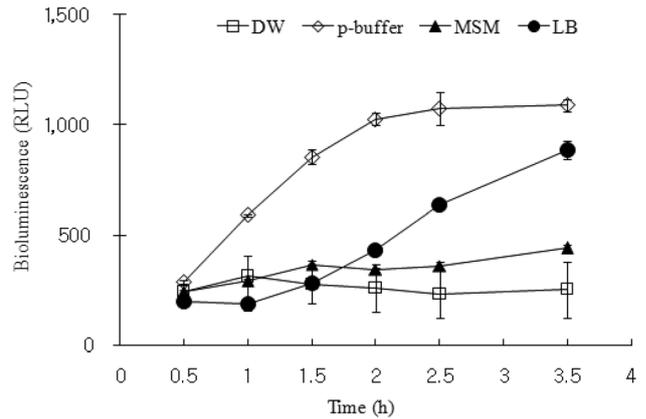


Fig. 2. Comparison of bioluminescence activity of cells incubated with different diluent solutions.

(721 ± 20.2 RLU), MSM (329 ± 12.9 RLU), LB (236 ± 16.2 RLU), 증류수 (295 ± 90.2 RLU). 검정법에서 측정 시간인 1과 1.5시간대에서는 p-buffer 용액과 혼합한 균주가 매우 높은 발광 촉진을 나타낸 반면에 다른 조건들에서는 뚜렷한 영향을 나타내지 않았다. 최대 3.5시간 노출에서의 발광은 p-buffer와 LB 조건에서 높게 관찰되었지만 증류수와 MSM 첨가 조건에서는 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구 결과에서 나타난 바와 같이 동일한 검정법에서 상이한 용액(희석 혹은 추출) 선택이 검정 결과에 중요한 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다.

환경 시료나 균주의 혼합이나 희석에 사용하는 용액은 오염물의 생물이용 가능도와 화학이온종(speciation)의 변화를 수반할 것이다.¹²⁾ 특히 용액에 의한 pH 변화는 많은 유기 및 중금속의 화학종 형태에 영향을 미쳐 상이한 독성 결과를 나타내기도 한다. 특히 인산염 완충액의 경우에는 pH변화를 최소화하여 결과 유사성 도출에 용이하지만, 본 검정법의 경우에는 발광활성에 영향을 미치기 때문에 부적절한 용액 선택으로 조사되었으며, 또한 인 성분은 시료의 금속과 결합하여 침전현상을 나타낼 수도 있다. 따라서 환경시료 검정을 위해서 대조군에 첨가하는 용액에 의한 발광 영향이 중요함을 알 수 있었다. 본 조사에 의하면 용액을 첨가함으로써 최소의 영향을 주는 증류수와 MSM이 적당한 것으로 조사되었다. 그러나 모든 실험군에 대해서 동일 용액을 첨가할 경우에는 다른 용액도 필요에 따라 사용 가능할 것이다. 본 검정법에서는 발광 활성에 높은 영향을 주지 않는 MSM용액을 사용하여 균주를 희석한 후에, 검정법의 토양 추출 및 대조군에는 증류수를 사용하였다.

생물 발광 활성에 근거한 생물 검정법에서 적절한 세기의 발광 유지는 매우 중요하다. 매우 낮은 발광상태에서는 발광촉진제를 사용하여 검정법을 효율적으로 수행할 수 있다. 상이한 유전자 재조합(*xyl-lux*) 발광균주에 대해서 발광 활성 촉진제로 조사된 화합물(sodium lactate, KNO_3)이 본 검정법 사용 균주 RB1436의 발광 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 균주와 시료의 비율 0.5:9.5와 1:9에서 두 화합물 모두 대조군에 비해 매우 높은 촉진을 나타내었다(Fig. 3).

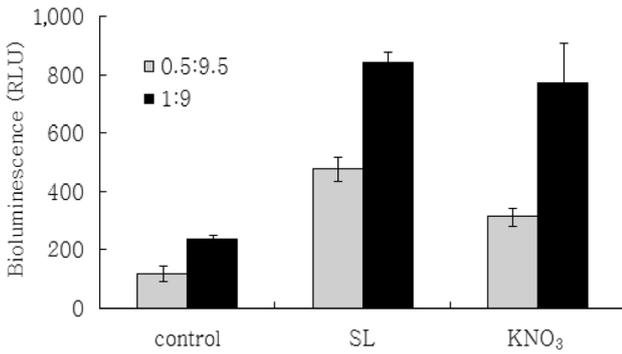


Fig. 3. Stimulation effect of sodium lactate and KNO₃ on the bioluminescence activity of strain RB1436.

xyl-lux 재조합 균주에서는 KNO₃가 SL보다 높은 발광 촉진제로 조사되었다.^{15,20)} 특정한 유도제 없이 성장 과정 중에 발광을 생산하는 RB1436은 *xyl-lux* 균주와는 상이하게 SL(대조군의 4~3.6배)가 KNO₃(대조군의 2.6~3.3배)보다 약간 높은 촉진 효과를 나타내었기 때문에 두 화합물 모두 사용 가능하다고 사료된다. 특히 SL에 의한 높은 촉진은 탄소원에 의한 물질대사 활성화에 근거한 것으로 사료된다.

3.2. 단일 오염물질 별 독성 평가

다양한 중금속과 유기오염물의 생물발광에 대한 민감도를 조사하였다(Table 1). 선행 조사에 근거하여 특정 농도 범위를 결정하였으며 오염물에 따라 매우 다양한 범위의 독성을 나타내었다(Table 1). 일반적으로 중금속은 높은 민감도(낮은 EC₅₀)를 보인 반면에 유기오염물은 낮은 민감도를 나타내었다. 중금속에 대한 독성 순서는 다음과 같이 조사되었다: As(III), Hg, Cd > As(V) > Cu > Zn > Cr(VI), Pb(Table 1). Cr(VI)의 경우에는 조사 최대 농도인 50 mg/L에서 EC₅₀이 관찰되지 않았다. As(III)는 As(V)에 비해 독성이 상당히 높은 것으로 보편적으로 알려져 있으나 본 검정법에서는 EC₅₀에 근거하여 약 2배 정도 높은 독성이 관찰되었다. 예를 들면 씨앗 *Lactuca* 발아 검정법에서 As(III)와 As(V)의 EC₅₀는 각 0.63과 3.01 mg/L이었다.²¹⁾

중금속에 비해 유기오염물(석유계탄화수소 함유성분 및 염

소페놀 계열 화합물)들은 생물발광 활성화에 매우 낮은 영향을 나타내었다. 특히 xylene 이성질체 화합물들은 다른 화합물들에 비하여 낮은 민감도(낮은 독성; 126~176 mg/L 범위의 높은 EC₅₀)를 나타내었다. 발광생산 균주 Shk 1을 이용한 연구에 의하면 다양한 염소계 페놀계열 화합물의 EC₅₀은 대략 10~200 mg/L 범위로 조사되었다.¹⁹⁾ 따라서 발광활성에 근거한 본 검정법은 민감도 관점에서 중금속 오염시료에 대한 독성 평가에 적정함을 알 수 있었다. 다른 유기 오염물과는 상이하게 MTBE와 톨루엔은 균주의 발광 활성화에 높은 억제 영향(낮은 EC₅₀)을 나타내었다. 특히 톨루엔의 높은 억제 영향은 화합물의 외막의 세포투과도 증가가 가능한 원인인 것으로 사료된다. 다른 연구결과에 의하면 톨루엔과 같은 다양한 유기용제가 투과도를 증가시킴으로 인하여 효소이용 검정법의 민감도를 매우 증가하였다.²²⁾ 오염원에 대한 독성 민감도 및 민감도 순서는 생물종과 측정 종말점 등에 따라 매우 다양한 특성을 나타낼 수 있기 때문에 시료 특성에 적합한 방법이나 다양한 방법들의 결과를 통합한 해석을 통하여 더욱 적절한 평가가 이루어질 수 있을 것이다.

3.3. 발광에 근거한 토양시료 독성 평가

다양한 환경 요인에 의한 토양 오염물 이동은 주변 지표수 및 지하수 생태계에 영향을 줄 수 있다. 지하수 확보 가능 예정지 주변의 지하수계에 영향을 줄 수 있는 11 지역의 표층토를 채취하여 발광 활성화에 미치는 영향에 근거하여 독성을 조사하였다. 강우에 의한 오염물 이동을 모방하기 위해 증류수를 이용한 토양 추출액에 대하여 검정 시험하였다. 토양이 발광활성에 미치는 영향과 토양 중금속 농도와 관계 분석을 위해 시료토양의 총중금속 농도 결과를 Table 2에 나타내었다. 지하수 이용 예정지 주변 토양은 대체적으로 심각한 중금속 오염은 관찰되지 않았지만, 비소의 경우에는 매우 상반된 그룹 특성이 관찰되었다. 총중금속 농도에 근거할 때 그룹 #1~#6에서는 매우 높은 비소 농도(381~627 mg/kg)가 오염된 반면에, #7~#11에서는 매우 낮은 농도(< 1 mg/kg)가 조사되었다. 또한 코발트의 경우에도 높은 비소 그룹에서는 낮은 농도(< 1 mg/kg), 낮은 비소 그룹에서는 다른 그룹보다는 높은 농도(9~27 mg/kg)가 관찰되었다. 이외에도 측정하지는 않았지만 토양의 복합적 특성에 비추어 불 대 양한 무기 및 유기성분들이 존재할 것이다.²³⁾

유전자 재조합 발광 균주 RB1436을 이용하여 토양 추출 용액에 대한 영향을 평가(균주: 추출액 = 1:9)한 결과 전체 시료의 대조군(100%)에 대한 발광활성 범위는 29~111% (평균 66 ± 20.9%)로서 시료별 매우 상이한 영향을 나타내었다. 높은 표준편차값에 근거할 때 시료 집단간의 흐트러짐 정도, 즉 시료 간 뚜렷한 활성 영향 차이가 있다고 판단할 수 있다. 가장 높은 억제는 시료 #6에 의해 29% 발광 활성(71% 독성)을 나타낸 반면에, 시료 #11의 경우에는 오히려 발광이 촉진되었으며 111% 발광 활성(무독성)을 나타내었다. 매우 상이한 영향(높은 독성과 낮은 독성)을 나타낸 대표적 두 시료(#6, #11)에 대해서 노출시간에 따른 발광 영향을 대

Table 1. EC₅₀s of various pollutants based on the bioluminescence inhibition (95% confidence level)

Metals	EC ₅₀ (mg/L)	Organics	EC ₅₀ (mg/L)
As(III)	1.1 (0.84~1.54) ^{a)}	MTBE	17.1 (12.58~23.37)
As(V)	2.1 (1.47~2.86)	toluene	1.3 (0.95~1.65)
Cr(VI)	> 50	m-xylene	126 (120.1~133.0)
Cu	6.0 (5.21~6.78)	o-xylene	152 (148.7~154.9)
Cd	1.34 (1.03~1.75)	p-xylene	176 (171.5~181.5)
Hg	1.1 ± 0.26b	2-CP	54 ± 3.1
Zn	39 ± 0.5	2,4-diCP	45 ± 5.5
Pb	146 ± 12.5	phenol	202 ± 6.5

^{a)} Value is the range of the 95% confidence level (low limit-high limit);
^{b)} Value is the standard deviation.

Table 2. Total heavy metal content of the collected soils (mg/kg)

Metal	High As contaminated group						Low As contaminated group				
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11
As	627	566	381	433	169	401	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Cu	58	45	32	83	54	47	20	18	95	12	13
Cr	66	59	54	57	56	265	65	45	106	40	102
Pb	55	52	45	48	36	59	37	44	42	32	44
Zn	113	99	79	117	100	54	92	98	77	41	60
Cd	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Co	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	19	10	9	27	15
Total	921	823	593	740	417	828	235	217	331	154	236

조군과 함께 Fig. 4에 나타내었다. 보편적으로 발광 균주는 초기 노출 30분 정도에 높은 영향을 받는 후, 최대 노출시간 1.5 h까지는 완만한 영향을 받았다. 따라서 1시간과 1.5시간 노출의 결과를 평균하여 영향 정도를 나타내는 검정법의 결과가 적절하다고 할 수 있다. 시료 #6(총중금속 828 mg/kg, 비소 401 mg/kg)과 #11(총중금속 236 mg/kg, 비소 < 1 mg/kg) 간의 뚜렷한 영향 차이를 관찰할 수 있었으며, 각 대조군에 대해서 발광 활성 억제와 촉진 현상을 관찰할 수 있었다.

전체 시료에 대해서 살펴보면 중금속 오염 농도가 높은 #6 (828 mg/kg) 시료는 71% 독성도(29% 발광활성)를 나타낸 반면에 비슷한 중금속 농도가 관찰된 #1 (921 mg/kg)과 #2 (823 mg/kg)는 각 48%와 31%의 독성을 나타내었다. 또한 매우 낮은 중금속 오염이 관찰된 시료 #7 (235 mg/kg)과 #10 (154 mg/kg)의 경우에는 시료 #1과 #3에 의한 영향과 비슷한 41%와 30%의 독성을 각각 나타내었다(Fig. 5). 따라서 복잡한 특성의 토양 시료에 대해서 시료별 오염물 총농도, 특히 중금속의 경우에는 총중금속 농도만으로 생태계에 미칠 수 있는 영향을 예측하기는 용이하지 않음을 확인할 수 있었으며, 그 결과로 총중금속 농도와 생물발광 활성 간에는 매우 낮은 상관관계($R^2 = 0.301$)가 조사되었다. 자료를 나타 내지는 않았지만 약산 추출 중금속 농도와 독성간의 상관성도 역시 매우 낮게 조사되었다. 또한 여러 연구자들의 보

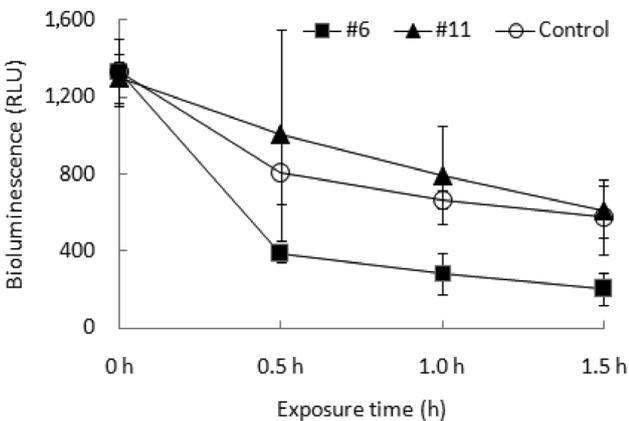


Fig. 4. Different effects of representative soil extractants on the bioluminescence activity of the RB1436.

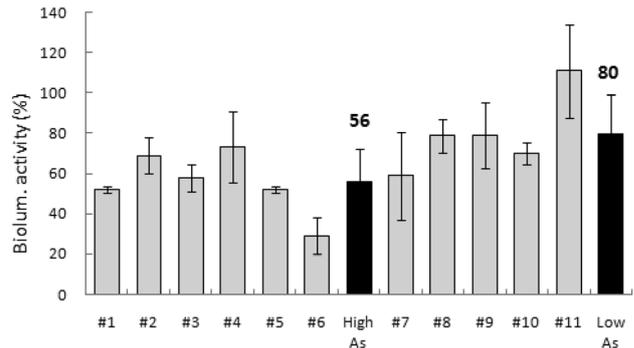


Fig. 5. Effects of the soil extractants on the relative bioluminescence activity (%) of the strain RB1436. Each bar is the average of the results of the four experimental sets (each set was performed with triplicate), ■ bar is the average of the bioluminescence activity of each group.

고에서도 중금속 오염 특성에 영향을 미치는 다양한 요인 들 때문에 총중금속 농도로 위해성 평가하는 것은 올바른 접근이 아니라는 결론들을 제시하고 있다.²⁴⁾ 따라서 오염 토양이 주변 생태계에 미치는 영향에 대한 원인 해석은 매우 다양하고 복합적 요인들에 기인한다고 할 수 있다. 예를 들 면 오염 화학물 뿐 아니라 토양 자체의 물리·화학적 특성 (입자크기, 유기물 함량, 조성, pH, CEC 등), 혼합 오염물에 의한 토양 오염, 오염물의 생물에 대한 상이한 민감도, 생물 이용 가능량(bioavailability), 상이한 결합능(binding ability) 등의 다양한 원인에 영향을 받을 것이다.²³⁾ 본 토양의 경우에는 중금속 오염을 제외하고는 토양 특성 차이가 없었으므로 뚜렷한 오염 특성 차이가 있는 “비소”에 대해 초점을 맞추었다.

Table 2에서 토양시료를 독성이 높은 비소 오염농도에 근거하여 높은 비소오염과 낮은 비소 오염 그룹으로 분류할 수 있는 특성이 있음을 알 수 있다. 높은 비소 농도 그룹은 국내 토양오염 대책기준(70~600 mg/kg)에 해당되는 농도 분포를 나타내었다. 높은 비소농도 그룹(#1~#6)과 낮은 비소 농도 그룹(#7~#11)에 의한 평균발광 활성은 각 56% ± 15.6% (44% 독성)와 80% ± 19.4% (20% 독성)였으며 약 2배의 독성도 차이가 있는 것으로 조사되었다. 또한 t-test 결과에 의 하면 p(probability)값이 0.048로 조사되어 두 그룹 간에 통계적으로 뚜렷한 차이가 있음을 알 수 있었다. 따라서 각 토

양 시료별 총중금속 농도와는 상관성은 예측하기가 어려웠지만 독성이 높고 뚜렷한 오염현상을 보인 중금속인 비소 오염물에 기준하여 시료를 분류하였을 경우에 비소 오염물과 독성이 상관성의 가능성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 향후 토양 오염물에 의한 주변 생태계 영향 파악에서 본 조사시료의 경우에는 비소가 주요 영향인자임을 알 수 있으며 이에 대한 정보가 영향 평가에 중요함을 알 수 있었다.

본 연구에서는 단일 검정법을 이용하였지만 다양한 연구 결과에 의하여 검정법에서 이용하는 생물의 종류에 따라 오염물에 대해서 상이한 민감도와 민감도 패턴을 나타내는 것으로 알려져 있다.²⁴⁾ 따라서 더욱 적절한 영향 평가를 위해서는 단일 검정법을 이용하기 보다는 다양한 검정법에 의한 통합 결과를 이용하는 것이 더욱 적절한 평가법으로 제시되고 있다.²⁵⁾ 예를 들면 다양한 방법의 결과를 통합하는 방법과 상이한 먹이단계의 생물(예를 들면 하폐수에 대해서는 발광균주, 갑각류, 조류와 물고기)을 이용하여 통합 검정할 수 있다.^{26,27)} 따라서 토양 오염 평가에 있어서도 다양한 검정법의 통합 결과를 이용한 평가가 필요하다고 사료된다.

4. 결론

본 연구에서는 토양 오염물이 주변 지하수계에 영향을 줄 수 있는 가능성에 대한 기초 평가를 균주의 발광활성에 미치는 영향에 근거하여 평가하였다. 또한 검정법에 영향을 미칠 수 있는 기본 조건들에 대해서도 조사하였으며 다음과 같은 결론을 도출할 수 있었다.

- 1) 균주와 시료 용액의 비율은 최소 0.5 : 9.5부터 사용 가능하였으며, 검정 과정에 사용하는 용액은 인위적 발광 활성에 영향을 적게 미치는 증류수와 MSM이 적당한 것으로 조사되었다. 또한 검정법 수행을 위해 발광 측진이 필요할 경우 SL와 KNO₃ 화합물을 사용 할 수 있음을 확인하였다.
- 2) 일반적으로 생물 발광활성은 유기오염물보다는 중금속에 높은 민감도를 나타내었다.
- 3) 개별 토양 시료의 총중금속 농도(혹은 약산추출농도)와 독성정도의 관계에서 상관성(R² = 0.301)을 찾기는 어려웠지만, 뚜렷한 오염 특성을 보인 비소에 근거한 그룹 간에는 통계적으로 가능한 독성차이가 조사되었다.

따라서 토양오염 평가과정에서 각 지역의 총중금속 농도에 근거하여 주변 생태계에 미칠 수 있는 영향에 대한 상관성을 평가하는 것은 적절하지 않음을 알 수 있었다. 그러나 독성이 높은 특정 오염물의 오염 정도 차이가 뚜렷한 지역, 혹은 시료들을 그룹화하여 영향을 평가하는 것도 하나의 접근 방향임을 확인하였다. 하지만 단일 검정법에 근거한 평가가 내포하고 있는 제약점들 때문에, 실제적인 평가는 단일 평가의 결과를 기초로 하여 다양한 검정법들의 통합 결과에 대한 해석을 통하여 접근해야 할 것이다. 따라서 본 검정법

의 결과를 기초자료로 하여 향후 다양한 통합 검정법을 이용한 평가가 필요하다고 사료한다.

사 사

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2011-C-000-425). 또한 본 연구는 한국지질자원연구원 기본사업인 '대수층 인공함양 지하수 확보 융복합 핵심기술 개발' 과제의 일환으로 수행되었습니다.

KSEE

참고문헌

1. Hsieh, C. Y., Tsai, M. H., Ryan, D. K. and Pancorbo, O. C., "Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox chronic toxicity test," *Sci. Tot. Environ.*, **320** (1), 37~50(2004).
2. Brammer, H. and Ravenscroft, P., "Arsenic in groundwater: A threat to sustainable agriculture in South and South-east Asia," *Environ. Int.*, **35**, 647~654(2009).
3. Bolt, H. M. and Hengstler, J. G., "The past and the future of toxicology," *Arch. Toxicol.*, **82**, 1~3(2008).
4. West, O. R., Siegrist, R. L., Mitchell, T. J. and Jenkins, R. A., "Measurement error and spatial variability effects on characterization of volatile organics in the subsurface," *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 647~656(1995).
5. Zhou, E. and Crawford, R., "Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil," *Biodegradation*, **6**, 127~140(1995).
6. Toussaint, M. W., Shedd, T. R., Schailie, W. H. and Leather, G. R., "A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests," *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**, 907~915(1995).
7. Ptityn, L. R., Horneck, G., Bpmer, M. and Rettberg, P., "A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS lux assay in recombinant *E. coli* cells," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4377~4384(1997).
8. Bitton, G., Garland, E., Kong, I. C., Morel, J. L. and Koopman, B., "A direct solid-phase assay specific for heavy metal toxicity," *I. Methodol. Soil Contam.*, **5**(4), 385~394(1996).
9. Gupta, G. and Karuppiyah, M., "Toxicity study of a Chesapeake bay tributary-Wicomico river," *Chemosphere*, **32**, 1193~1215(1996).
10. Kim, B. C. and Gu, M. B., "A bioluminescent sensor for high throughput toxicity classification," *Biosen. Bioelectro.*, **18**, 1015~1021(2003).
11. Goicolea, A., Barrio, R. J., Balugera, S. G., Goroztiza, I., Vicente, A. S. and Diaz, A. I., "Study of the toxicity in industrial soils by the bioluminescence assay," *J. Environ. Sci. Health A*, **33**(5), 863~875(1998).

12. Ghirardini, A. V., Girardini, M., Marchetto, D. and Pantani, C., "Microtox solid phase test: Effect of diluents used in toxicity test," *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, **72**, 851~861 (2009).
13. Mariscal, A., Peinado, M. T., Camero-Varo, M. and Fernandez-Crehuet, J., "Influence of organic solvents on the sensitivity of a bioluminescence toxicity test with *Vibrio harveyi*," *Chemosphere*, **50**, 349~354(2003).
14. U. S. EPA., "Using toxicity tests in ecological risk assessment," Publication 9345.0-051(1994).
15. Ko, K. S. and Kong, I. C., "Conditions required for the stimulation of bioluminescence activity of the genetically engineered bacteria, *P. putida* mt-2 KG1206, preserved by deep-freezing," *Sci. Tot. Environ.*, **407**, 2427~2430(2009).
16. Cooper, C., "Use of Microtox for assessing heavy metal complex formation with the organic solvents acetonitrile and dimethyl sulphoxide: a preliminary study," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **67**, 526~534(2001).
17. Lajoie, C. A., Lin, S.-C., Nguyen, H. and Kelly, C. J., "A toxicity testing protocol using a bioluminescence reporter bacterium from activated sludge," *J. Microbiol. Meth.*, **50**, 273~282(2002).
18. Scheers, E. M., van der Wielen, C. and Dierickx, P. J., "Toxicological evaluation of waste water samples to appropriately sensitized culture fathead minnow cells compared with the Microtox assay," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **68**, 253~260(2002).
19. Ren, S. and Frymier, P. D., "Toxicity estimation of phenolic compounds by bioluminescent bacterium," *J. Environ. Eng.*, **129**(4), 328~335(2003).
20. Holtel, A., Marques, S., Mohler, I., Jakubzik, U. and Timmis, K. N., "Carbon source-dependent inhibition of xyl operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL Plasmid," *J. Bacteriol.*, **176**(6), 1773~1776(1994).
21. 공인철, 권효정, 고경석, "다양한 생물 검정법에 근거한 비소의 위해성 평가 비교," *대한환경공학회지*, **32**(8), 795~801 (2010).
22. van Poucke, S. O. and Nelis, H. J., "Development of a sensitive chemiluminometric assay for the detection of beta-galactosidase in permeabilized coliform bacteria and comparison with fluorometry and colorimetry," *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4505~4509(1995).
23. Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K. and Wood, W., "Framework for metals risk assessment," *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, **68**, 145~227(2007).
24. Mankiewicz-Boczek, J., Nalecz-Jawecki, G., Drobniewska, A., Kaza, M., Sumorok, B., Izydorczyk, K., Zalewski, M. and Sawicki, J., "Application of a microbiotests battery for complete toxicity assessment of rivers," *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, **71**, 830~836(2008).
25. Kungolos, A., Emmanuil, C., Tsiridis, V. and Tsiropoulos, N., "Evaluation of toxic interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests," *Sci. Tot. Environ.*, **407**, 4610~4613(2009).
26. Castillo, G. C., Vila, I. C. and Neild, E., "Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays," *Environ. Toxicol.*, **15**, 370~375(2000).
27. Ren, S. and Frymier, P., "Toxicity of metals and organic chemicals evaluated with bioluminescence assays," *Chemosphere*, **58**, 543~550(2005).