

발광박테리아(*Vibrio fischeri*)에 대한 중금속 및 디젤의 혼합 독성 영향

정 현 · 박숙현 · 황유식[†]

안전성평가연구소 미래환경연구센터

Interactive Toxic Effects of Heavy Metals and Diesel on *Vibrio fischeri*

Hyun Jung · Sookhyun Park · Yu Sik Hwang[†]

Future Environmental Research Center, Korea Institute of Toxicology, Jinju 660-844, Korea

(Received 8 April 2014, Revised 16 July 2014, Accepted 16 July 2014)

Abstract

The toxicity of heavy metals (Zn, Pb) and diesel, in single and binary solution was investigated using the photobacterium *Vibrio fischeri* (Microtox test) as a test organism. In this experiment, the concentration of water soluble fraction of diesel was based on the total petroleum hydrocarbon (TPH). The toxicity of each single compound showed the following EC₅₀ (15min): Zn 1.90 mg/L, Pb 0.31 mg/L, TPH 2.09 mg/L. The observed toxicity of binary mixtures increased, depending on the concentration of the mixed substance. The effects were defined as synergistic, antagonistic, or additive, in accordance with the sign of difference between the predicted and observed toxicity at binary mixtures. The interactive effects between zinc and lead were synergistic, on the other hand, antagonistic and additive effects were found in each metal and TPH mixtures on the bioluminescence of *V. fischeri*.

Key words : Diesel, Heavy metal, Interactive effect, Lead, *Vibrio fischeri*, Zinc

1. Introduction

최근 산업·경제 발전과 인구증가로 인한 산업화와 도시화에 따라 다양한 오염물질(중금속, 유류 등)이 환경으로 유입되고 있으며 이로 인하여 생태계 오염이 증가되고 있다. 중금속은 환경적인 요인에 의해 다양한 형태로 수계 및 토양에 존재하며, 생태학적인 진화, 영양 및 환경에 악영향을 끼치기 때문에 중금속 독성은 세계적으로 중요한 문제로 인식되고 있다. 일반적으로 중금속의 독성, 용해도 및 생체이용률은 pH, 경도, 상호작용효과 및 천연 유기물의 존재와 같은 다양한 물리화학적 변수에 의해 변화된다(Nagajyoti et al., 2010; Tsiridis et al., 2006). 또한, 중금속은 수계나 토양에 노출되어 생물체에 높은 농도로 존재하여 생분해되지 않기 때문에 생태계 내에 잔류하여 독성 영향을 미칠 수 있다. 중금속뿐만 아니라 자동차 및 항공기 연료, 난방유, 폐유 등에 기인하는 총석유계탄화수소(Total Petroleum Hydrocarbons, TPH)는 환경을 오염시키는 중요한 물질 중의 하나로 환경에 유입되면 분해되지 않고 오랫동안 여러 가지 환경매체에 잔류 축적되며 인간과 생태계에 악영향을 끼친다. TPH는 휘발유, 등유, 디젤유 및 중유 등으로 분류 할 수 있으며, 그 중 디젤의 독성은 방향족화합물의 함량에 따라 다르게 나타날 수 있으나 rat를 이용한 급성독성평가에서 치사뿐만 아니라 탈모, 무기력, 설사, 피

부자극 등의 아치사(sublethal) 현상도 함께 관찰된 바 있다(Moon, 2012; Stelljes and Watkin, 1993). 다양한 독성 영향이 관찰되는 TPH의 제거에 관련된 연구도 활발히 진행되고 있다(Lee and Park, 2007).

이러한 중금속 및 유류의 생태독성 영향에 대해서는 개별 물질의 독성영향에 연구 초점이 맞춰져 있다. 하지만 이러한 오염물질들이 환경에서는 서로 혼합되어 상호작용을 일으킬 수 있기 때문에 기존의 개별 물질의 독성 영향 평가만으로는 정확한 평가가 힘들며, 오염물질의 혼합에 의한 독성영향이 상승효과(synergistic effect) 또는 길항효과(antagonistic effect)를 나타내는지에 대한 연구가 필요하다(Kungolos et al., 2004). Tsiridis et al. (2006)에 의하면, 중금속간의 혼합 독성의 결과에서, Cu와 Zn 및 Pb와 Zn의 혼합에서는 상승효과, Cu와 Pb의 혼합에서는 첨가 효과를 보인다고 보고하였다. 오염물질간의 혼합 생태독성 영향 평가는 중금속물질간의 연구는 활발한 편이나 중금속과 유류의 복합적인 독성 효과에 대한 연구는 미진한 실정이다. 따라서 환경에서 중금속 및 유류가 복합적으로 오염될 경우 생태계에 미치는 독성영향에 대한 연구가 필요하다.

오염물질이 생태계에 미치는 독성영향은 박테리아, 물벼룩, 조류, 어류, 식물종, 수서 곤충, 토양무척추동물 등 다양한 생물체의 효소 활성, 성장, 호흡량, 이동성, 치사율, 발아율 등의 평가에 근거한 생물학적 독성평가기법들이 사용되고 있으며(Oh et al., 2010; Woo et al., 2012), 그 중에서 발광박테리아인 *Vibrio fischeri* 를 이용하는 Microtox 분

[†] To whom correspondence should be addressed.

yshwang@kitox.re.kr

석법은 다른 독성평가 기법에 비해 신속하고 저렴하게 평가할 수 있는 방법으로 오염물질을 평가하는데 많이 사용되고 있다. 또한, 어독성 시험이나 포유동물을 사용한 독성 시험결과와도 상관관계가 매우 높은 것으로 알려져 있다 (Jennings et al., 2001; Toussaint et al., 1995).

이 연구에서는 중금속 2종(Zn, Pb)과 유류(디젤)의 단일 및 혼합 독성 영향에 대하여 Microtox 생물검정법을 이용하여 평가하였다. 특히, 혼합 독성 영향은 확률 이론에 근거한 수학적 모델을 사용하여 두 물질의 혼합에 따른 상승 작용, 길항작용, 첨가작용에 대한 연구를 수행하였다.

2. Materials and Methods

2.1. 실험재료

중금속 간의 혼합 독성 및 유류와 중금속 독성 평가는 Microtox M500(Azur Environmental, USA)를 사용하였다. Microtox 독성 평가에 사용된 발광박테리아(*Vibrio fischeri*), 재활성화 용액(reconstitution solution), 희석액(diluent)은 Azur 사로부터 구입하였다. 재활성화 용액 1 mL을 발광박테리아 1병에 넣어 발광박테리아를 재활성화 시켰다. 실험에 사용된 중금속은 Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, Sigma), Lead(II) chloride($PbCl_2$, Sigma)를 사용하였다. 유류는 주유소(H사)에서 디젤을 구입하여 사용하였으며, Dede and Kaglo (2001)의 방법을 참고하여 디젤의 WSF(water soluble fraction)을 분리하였다. 디젤의 WSF분리는 디젤:중류수=1:4 비율로 혼합하여 24시간 교반하고 이를 분액깔때기에서 24시간 방치 후 분리된 유막층 아래의 수용액을 분리하여 실험하였다. 분리한 실험용액의 TPH(total petroleum hydrocarbons)농도는 경상대학교 농업생명과학연구원에 분석 의뢰하였으며, 시험방법은 수질오염공정시험기준 ES04502.1(석유계총탄화수소 용매추출/기체크로마토그래피법)의 기준에 따랐다. WSF에 존재하는 TPH의 분석 결과는 7.29 mg/L였으며 디젤의 실험농도는 분석된 TPH 농도를 바탕으로 희석하여 사용하였다.

2.2. 단일 물질 독성평가

단일 물질(Zn, Pb, TPH)의 Microtox 발광저해도 영향은 제조사 매뉴얼인 Microtox 45% basic test 방법에 따라 분석하였다. 단일 물질 독성평가 농도는 예비실험을 통하여 최적의 농도를 설정하였으며, Zn의 경우 1.28, 2.56, 5.12, 10.23 mg/L, Pb의 경우 0.10, 0.21, 0.42, 0.84 mg/L, TPH 농도가 0.21, 0.41, 0.82, 1.64, 3.28 mg/L로 실험하였다. 모든 실험은 세 번 반복하여 수행하였다. 독성평가 방법은 Microtox용 cuvette에 희석액 0.5 mL 넣고 발광박테리아 배양액 10 μ L를 넣어 초기 발광량(I_0)을 측정 후, 희석한 실험용액을 0.5 mL씩 넣고 5분과 15분 후에 농도별 발광량(I_t)을 측정하여 발광 저해 영향(%)을 산출하였다. Microtox 실험 전 Zinc sulfate 표준용액을 사용하여 *Vibrio fischeri*의 활성이 적정 범위에 있는지 확인하였다. 실험 결과 분석은 CETIS 프로그램(Version 1.8.7.15, Tidepool Scientific

Software)의 Spearman-Käber method를 사용하여 EC_{50} 값과 95% 신뢰한계를 계산하였다.

2.3. 혼합 물질 독성평가

단일 물질 독성평가에서 사용한 물질들로 각각 두 종류씩의 물질을 혼합하여 Microtox 발광저해도 영향 평가를 실시하였다. 혼합 물질 독성평가에서의 Zn와 Pb의 농도를 단일 물질 독성평가와 동일한 농도를 사용하였으며, TPH 농도는 0.21, 0.82, 3.28 mg/L를 사용하였다. 혼합 조건으로는 중금속 간의 혼합과 중금속과 유류의 혼합으로 2가지 조건으로 나눌 수 있으며, (1) Zn/Pb, (2) Zn/TPH, Pb/TPH의 조합으로 혼합 독성 영향을 관찰하였다. 각각의 실험은 모두 세 번 반복하여 수행하였다. 혼합 물질 독성평가는 Microtox 45% screening test 방법에 따라 각각의 물질을 혼합하여 준비하였다. 준비된 혼합물질의 독성평가 방법은 Microtox 45% basic test 방법과 동일하게 수행하였다. 통계적 분석은 SPSS(Statistical Package for the Social Science for windows Version 20.0, Inc)프로그램을 이용하였고 p-value가 0.05 미만인 경우를 통계학적 유의성이 있다고 정하였다.

혼합 물질의 독성평가는 이론적으로 예상되는 복합 독성 영향은 확률 이론에 근거한 간단한 수학적 모델을 사용하여 예측하였다(Kungolos et al., 1999; Tsiroidis et al., 2006). 이 모델에 따르면, P_1 과 P_2 는 단일 물질 A_1 과 A_2 의 특정 농도에 따른 개별 독성 영향을 나타내며, $P(E)$ 는 이 두 물질이 혼합하였을 때 예상되는 독성 영향을 나타내는 것으로 다음의 계산식에 의해 정의된다.

$$P(E) = P_1 + P_2 - (P_1 \times P_2)/100 \quad (1)$$

혼합 물질의 독성평가에 의하여 실제 관찰된 $P(O)$ 값과 수학적 모델에 의해 예측된 $P(E)$ 값을 비교하여, $P(O) > P(E)$ 는 혼합 물질 독성 영향이 상승효과(synergistic effect)를 나타내며, $P(O) < P(E)$ 는 혼합물질 독성 영향이 길항효과(antagonistic effect)를 보이는 것으로 분석하였다. 또한, $P(O)$ 와 $P(E)$ 값의 차이가 유의하지 않으면 첨가효과(additive effect)로 보았다.

3. Results and Discussion

3.1. 단일 물질 독성평가

Fig. 1은 Zn, Pb, TPH 각각에 대한 발광박테리아인 *Vibrio fischeri*의 독성 영향을 나타내었다. 중금속의 경우에는 노출시간 5분과 15분에서 시간에 따라 독성 영향이 높아지는 결과를 보였다. 15분 노출시간에서 발광저해율의 EC_{50} 은 각각 Zn 1.90 mg/L (1.67~2.14 mg/L)와 Pb 0.31 mg/L (0.30~0.31 mg/L)로 Pb가 더 높은 독성을 보였다. Mowat and bundy (2002)의 연구결과에서 Zn와 Pb에 15분 노출된 발광박테리아의 발광저해도가 각각 2.62, 0.43 mg/L로 본 연구에서 측정된 독성 값과 비슷한 결과를 보이고 있다. 유

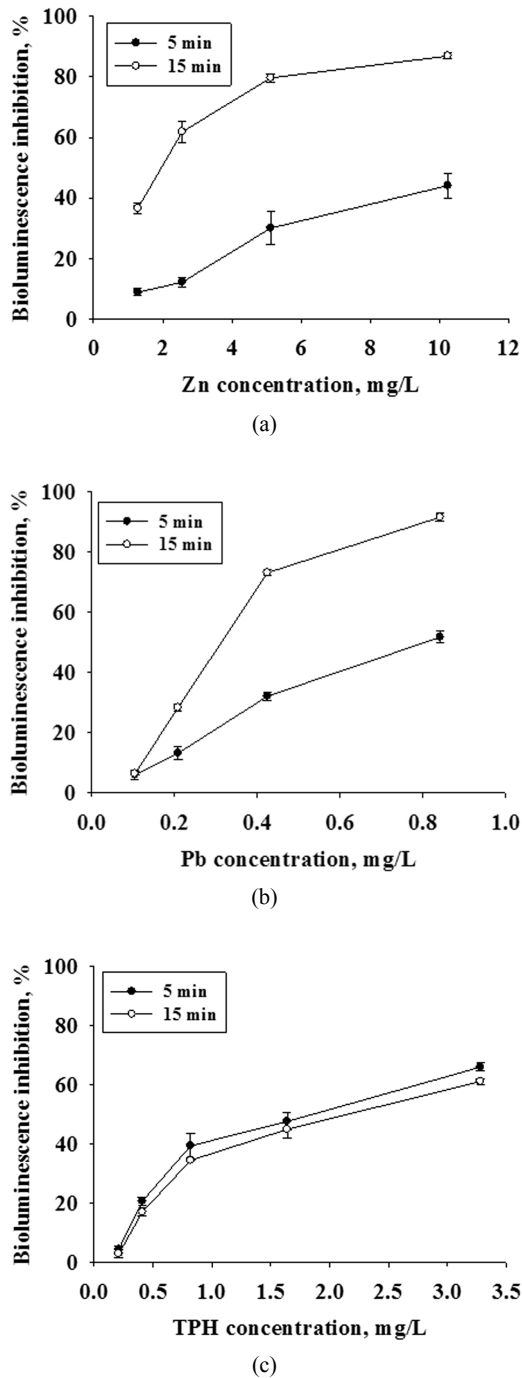


Fig. 1. Dose-response curves for bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri* after 5 min and 15 min exposure to a dilution series of Zn (a), Pb (b), and TPH (c). Error bars indicate the 95% confidence intervals.

류오염에 대한 발광박테리아에 대한 독성 영향을 평가하기 위하여 TPH에 농도에 따른 발광저해도를 분석한 결과, TPH에 5분 노출되었을 경우 EC₅₀ 값은 1.81 mg/L였으며, 노출시간이 15분으로 늘어날 경우 EC₅₀ 값이 2.09로 독성이 조금 낮아 졌으나 큰 차이를 보이지 않았으며, *Vibrio fischeri*에 대한 TPH의 독성 영향은 중금속에 비해서는 상당히 빠르게 나타나는 것으로 보여진다. 이는 TPH에 다량으로 포함되어 있는 화학물질들이 높은 소수성과 친유성을

가지고 있어 생물체를 구성하고 있는 지질에 높은 친화도를 가지는 것으로 알려져 있으므로 생물체 내에 흡수가 잘 되는 것에 의하여 독성영향이 빨리 일어나는 것으로 판단되어 질 수 있다(Kelly et al., 2007; Sikkema et al., 1995).

3.2. 혼합 물질 독성평가

2종류 물질의 혼합 (Zn+Pb, Zn+TPH, Pb+TPH)에 의한 독성영향을 평가하기 위하여 발광박테리아의 발광저해도를 단일물질의 결과와 함께 용량 반응 곡선으로 나타내었다 (Fig. 2-4). Fig. 2에서 Zn에 대하여 Pb의 농도를 변화시키면서 독성영향을 관찰하였다. 노출시간 5분의 결과에서는 Zn이 단일 노출되었을 때보다 Pb의 농도 증가에 따라 독성 영향이 유의성 있게($P < 0.05$) 높아지는 경향을 보였으며, 노출시간 15분에서는 혼합 독성의 Pb 최소 농도인 0.10 mg/L에서도 80% 이상의 발광저해도가 나타나는 높은 독성 영향이 관찰되었다. Tsiridis et al., (2006)의 연구결과에서 Zn와 Pb의 혼합 독성평가에서도 Zn의 농도를 0.43 mg/L로 고정하고 Pb의 농도를 0.27과 0.67 mg/L으로 증가시키면서 독성영향을 평가한 결과, 발광저해도가 각각 41%에서 87%로 Pb의 농도 증가에 따라 독성 영향이 높아지는 것을 보고하였다. Fig. 3, 4는 중금속(Zn, Pb)과 디젤(TPH)의 혼합에 의한 독성 영향을 관찰하였다. Zn과 TPH의 혼합과 Pb와 TPH의 혼합 독성 영향에서 모두 노출시간 5분에서는 TPH의 첨가 농도에 따라 독성 영향이 증가하는 것을 볼 수

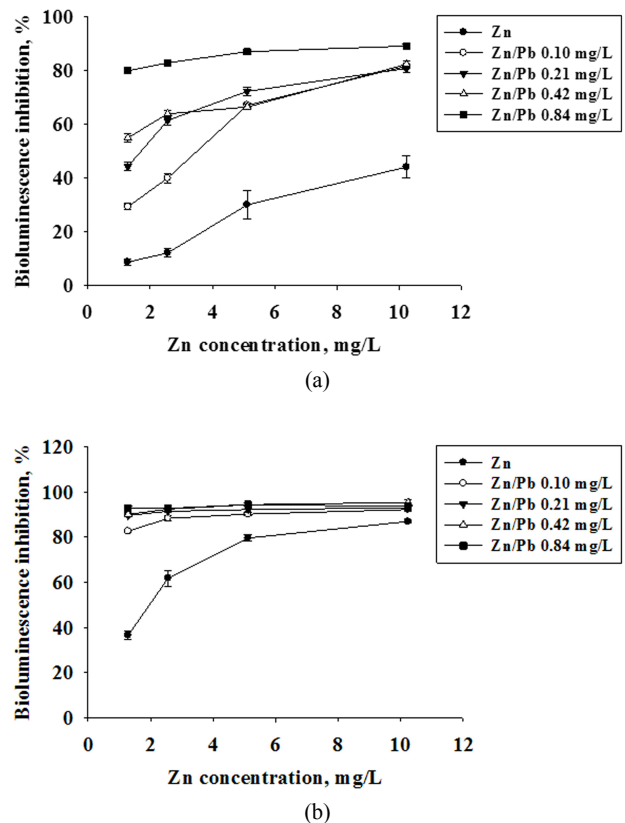


Fig. 2. Comparison of dose response curves for Zn and Zn/Pb mixture solutions after (a) 5 min and (b) 15 min. Error bars indicate the 95% confidence intervals.

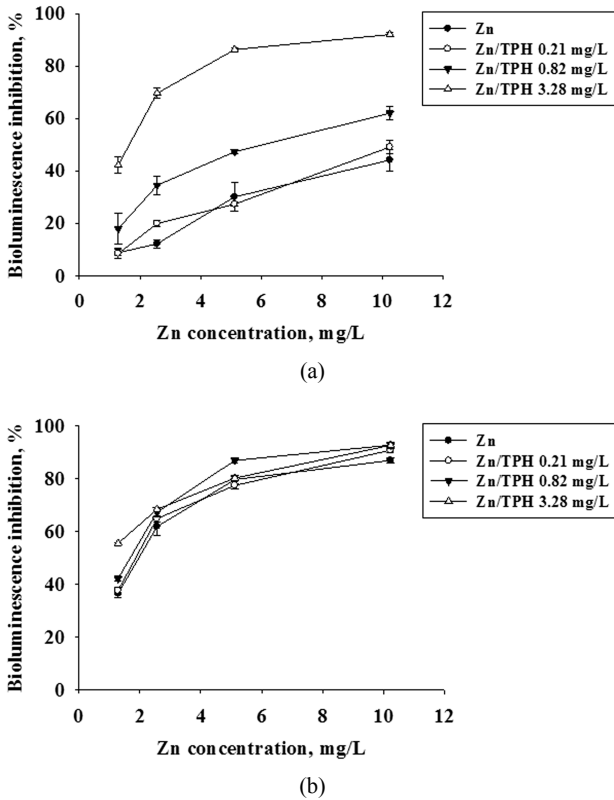


Fig. 3. Comparison of dose response curves for Zn and Zn/TPH solutions after (a) 5 min and (b) 15 min. Error bars indicate the 95% confidence intervals.

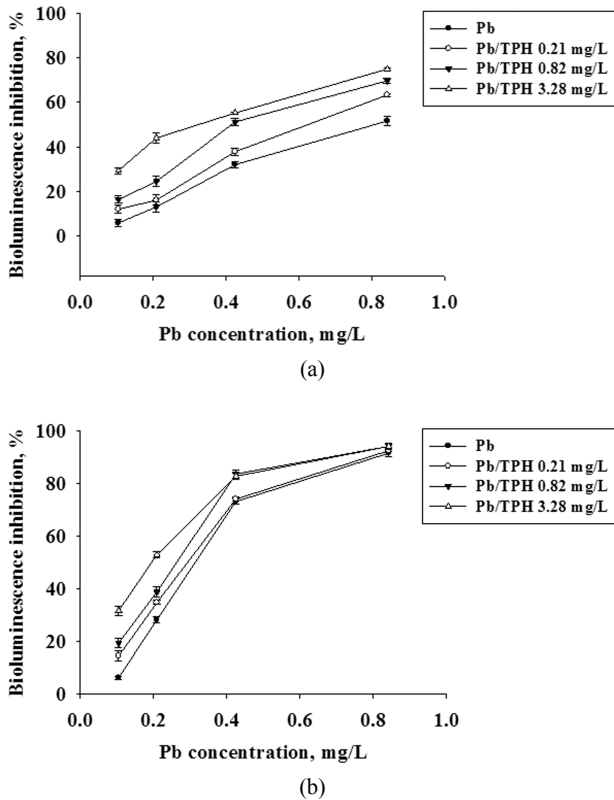


Fig. 4. Comparison of dose response curves for Pb and Pb/TPH solutions after (a) 5 min and (b) 15 min. Error bars indicate the 95% confidence intervals.

있었으며, 특히 TPH를 3.28 mg/L 농도로 첨가한 실험군에서는 TPH를 첨가하지 않은 것과 비교하여 유의성 있게 독성이 증가하는 것을 관찰하였다. 그리고 15분 노출되었을 때에는 TPH의 농도에 따른 독성 영향 증가 경향은 보이나 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났다($P < 0.05$). 이러한 결과는 앞서 관찰한 단일 물질의 독성 영향 결과에서 나타나듯이 증금속과 TPH의 시간에 따른 독성 영향이 다르기 때문으로 판단된다.

3.3. 혼합 독성의 효과 평가

혼합 물질의 독성 효과 평가는 단일 물질의 독성 값을 이용하여 수식 1을 통하여 계산된 예측된 값(P(E))과 두 물질을 실제 혼합하여 실험한 혼합 독성 값(P(O))의 상관 관계에 따라 3가지 형태로 나눌 수 있다. P(O)값이 P(E)값보다 크다면 상승효과(synergistic effect), P(O)값이 P(E)값보다 작다면 길항효과(antagonistic effect)를 나타내며, P(O)와 P(E) 사이의 차이가 없을 경우에는 두 물질의 혼합에 의한 단순한 첨가효과(additive effect)를 보이는 것으로 판단하였다.

Fig. 5(a)에서 보이듯이 Zn과 Pb의 혼합 물질 독성영향에서는 대부분이 실제 실험에서 나온 독성(P(O))이 예측한 독성(P(E))보다 높게 나타나며 이는 두 물질간의 상승효과가 있었다고 볼 수 있다. 이러한 결과는 *Vibrio fischeri*를 이용하여 증금속 혼합 독성영향을 평가한 다른 문헌에서도 비슷한 결과를 나타내는 것으로 조사되었다(Tsiridis et al., 2006; Utgikar et al., 2004). 이와는 다르게 *Lepidium sativum*과 *Spirodela polyrrhiza* 식물을 이용한 Cu, Ni, Zn, Cr의 증금속간의 혼합 독성은 길항효과를 보이는 것으로 나타났다(Montvydiene and Marciulioniene, 2007). 이러한 결과들은 증금속간의 혼합 오염 영향을 평가하기 위해서는 다양한 생물종을 이용한 연구가 필요하다는 것을 나타낸다. 증금속 물질 간의 혼합과는 다르게 증금속과 유류의 혼합에서는 첨가 또는 길항효과를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 5(b), (c)). 이러한 디젤과 증금속간의 혼합 독성 영향은 각각의 개별적인 독성 영향에 비하여 연구가 거의 이루어져 있지 않았다. 증금속과 유류 사이의 혼합에서 길항 및 첨가효과를 보이는 것은 두 물질의 물리화학적 특성(예, 소수성)에 따른 독성 메커니즘이 다르기 때문인 것으로 보이나, 세부적인 원인에 대한 추후 연구가 필요하고 판단된다.

4. Conclusion

본 연구에서는 증금속(Zn, Pb) 및 유류(디젤)가 생태계에 미치는 단일 및 복합 독성영향을 발광박테리아인 *Vibrio fischeri*를 사용하여 평가하였다. 실험에 사용된 유류는 디젤의 WSF를 분리하여 실험하였으며, 디젤의 실험농도는 분석된 TPH 농도를 바탕으로 희석하여 사용하였다. 단일 물질 독성평가에서 50% 발광 저해율을 보여주는 EC₅₀ 값은 각각 Zn 1.90 mg/L, Pb 0.31 mg/L, TPH 2.09 mg/L로 나타났다. 혼합 물질 독성평가에서는 첨가되는 물질의

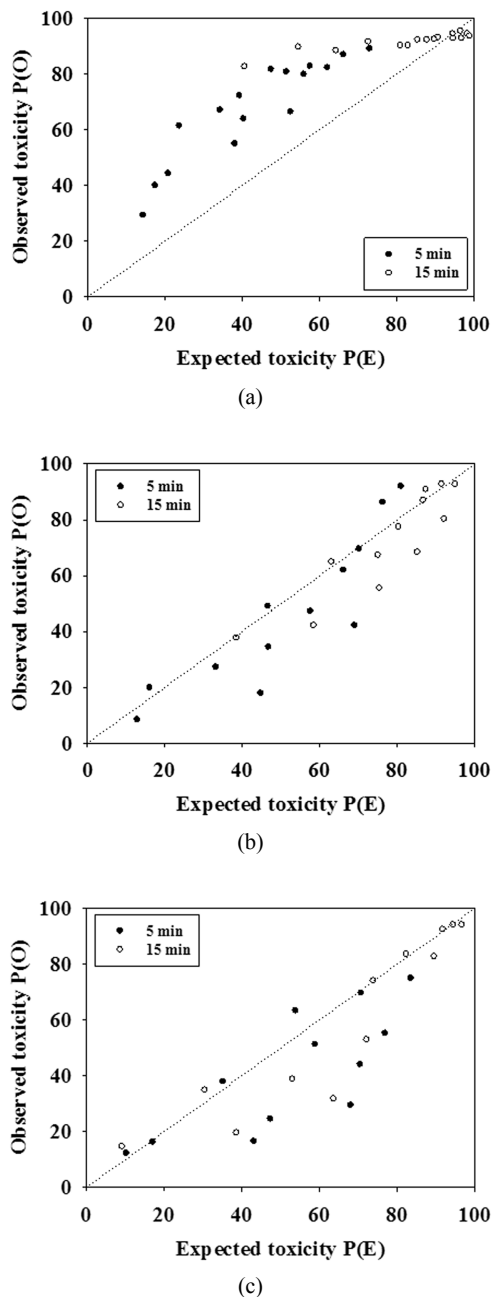


Fig. 5. The correlation between theoretically expected and observed effects of binary mixtures of Zn+Pb (a), Zn+TPH (b) and Pb+TPH (c) on the bioluminescence of *Vibrio fischeri*.

농도에 따라 독성 영향이 증가하는 것을 볼 수 있었다. Zn과 Pb의 혼합물의 경우에는 상승효과를 보였으나, 중금속(Zn, Pb)과 TPH 혼합물의 경우에는 모두 길항 또는 첨가 효과가 나타났다. 또한, 단일 및 복합에서 중금속과 TPH가 시간에 따른 독성반응이 상당히 차이가 나는 것으로 밝혀졌다. 이러한 복합오염 물질들의 상호작용으로 인한 복합 독성영향을 정확하게 예측하기 위해서는 추가 메커니즘 연구가 필요할 것이다.

Acknowledgement

본 연구는 환경부 “토양지하수오염방지기술개발사업(The GAIA Project, (2012000550001)) 복합오염녹색연구단 과제”로 지원받았습니다.

References

- Dede, E. B. and Kaglo, H. D. (2001). Aqua-Toxicological of Water Soluble Fractions (WSF) of Diesel Fuel on *O. Niloticus* Fingerlings, *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 5(1), pp. 93-96.
- Jennings, V. L. K., Rayner-Brandes, M. H., and Bird, D. J. (2001). Assessing Chemical Toxicity with the Bioluminescent Photobacterium (*Vibrio fischeri*): a Comparison of Three Commercial Systems, *Water Research*, 35(14), pp. 3448-3456.
- Kelly, B. C., Ikonomou, M. G., Blair, J. D., Morin, A. E., and Gobas, F. A. P. C. (2007). Food Web-Specific Biomagnification of Persistent Organic Pollutants, *Science*, 317, pp. 236-239.
- Kungolos, A., Hadjispyrou, S., Petala, M., Tsiridis, V., Samaras, P., and Sakellariopoulos, G. P. (2004). Toxic Properties of Metals and Organotin Compounds and Their Interactions on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*, *Water, Air and Soil Pollution: Focus*, 4, pp. 101-110.
- Kungolos, A., Samaras, P., Kipopoulou, A. M., Zouboulis, A., and Skellariopoulos, G. P. (1999). Interactive Toxic Effects of Agrochemicals on Aquatic Organisms, *Water Science and Technology*, 40(1), pp. 357-364.
- Lee, J. H. and Park, K. S. (2007). TPH Removal of Oil-Contaminated Soil by Hot Air Sparging Process, *Journal of Korean Society on Water Environment*, 23(5), pp. 786-795. [Korean Literature]
- Montvydiene, D., Marciulioniene, D. (2007). Assessment of Toxic Interaction of Metals in Binary Mixtures using *lepidium sativum* and *Spirodela polyrrhiza*, *Polish Journal of Environmental Studies*, 16, pp. 777-783.
- Moon, Y. (2012) *Toxicity Test and Risk Assessment of Contaminated Soils with Different Petroleum Using Eisenia fetida*, Master's Thesis, Pusan University, pp. 3-11.
- Mowat, F. S. and Bundy, K. J. (2002). Experimental and Mathematical/Computational Assessment of the Acute Toxicity of Chemical Mixtures from the Microtox Assay, *Advances in Environmental Research*, 6, pp. 547-558.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., and Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy Metals, Occurrence and Toxicity for Plants: a Review, *Environmental Chemistry Letters*, 8, pp. 199-216.
- Oh, K. H., Han, A. H., and Cho, Y. C. (2010). Standardization of Ecotoxicity Assay Method for Heavy Metals using Inhibition of Dehydrogenase Activity, *Journal of Korean Society on Water Environment*, 26(4), pp. 574-579. [Korean Literature]
- Sikkema, J., DE Bont, J. A. M., and Poolman, B. (1995). Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons, *Microbiological Reviews*, 59(2), pp. 201-222.
- Stelljes, M. E., and Watkin, G. E. (1993). *Comparison of Environmental Impacts Posed by Different Hydrocarbon*

- Mixtures: A Need for Site-Specific Composition Analyses, Hydrocarbon contaminated soils and groundwater Vol. 3*, Kostecki, P. T. and Calabrese, E. J. (Eds.), Lewis Publishers, Chelsea, pp. 549-569.
- Toussaint, M. W., Shedd, T. R., Schalie, W. H. V. D., and Leather, G. R. (1995). A Comparison of Standard Acute Toxicity Tests with Rapid-Screening Toxicity Tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(5), pp. 907-915.
- Tsiridis, V., Petala, M., Samaras, P., Hadjispyrou, S., Sakellaropoulos, G., and Kungolose, A. (2006). Interactive Toxic Effects of Heavy Metals and Humic Acids on *Vibrio fischeri*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63, pp. 158-167.
- Utgikar, V. P., Chaudhary, N., Koeniger, A., Tabak, H. H., Haines, J. R., and Govnd, R. (2004). Toxicity of Metals and Metal Mixures: Analysis of Concentration and Time Dependence for Zinc and Copper, *Water Research*, 38, pp. 3651-3658.
- Woo, M., Lee, G., Kim, J. Lim, J., and Lee, Y. W. (2012). Toxicity Assessment of Heavy Metals in Shihwa Lake and its Tributaries using the Algae, *Journal of Korean Society on Water Environment*, 28(2), pp. 171-177. [Korean Literature]