

비소 오염기간이 토양 내 비소의 존재형태와 식물독성에 미치는 영향

양우진¹ · 조은혜^{2*} · 임진우¹ · 정슬기³ · 남경필¹

¹서울대학교 건설환경공학부

²한국외국어대학교 환경학과

³한국기초과학지원연구원

Effect of Aging on the Chemical Forms and Phytotoxicity of Arsenic in Soil

Woojin Yang¹ · Eun Hea Jho^{2*} · Jinwoo Im¹ · Seulki Jeong³ · Kyoungphile Nam¹

¹Department of Civil and Environmental Engineering, Seoul National University

²Department of Environmental Science, Hankuk University of Foreign Studies

³Korea Basic Science Institute

ABSTRACT

This study investigates effects of an aging period on arsenic (As) chemical forms in soils and phytotoxicity using artificially As-contaminated soils with a range of As concentrations (0-300 mg/kg) and aging periods (0 and 3 months). A sequential extraction procedure showed that the increasing As concentration in soils increased the ratio of non-specifically and specifically bound As, which are known to be bioavailable. This resulted in increasing As uptake by tomatoes with increasing As concentration ($R^2=0.87$ for exponential fitting); however, the seed germination was not sensitive to the As concentrations of the soil samples. The seed germination was also statistically similar in the soils with 75 and 150 mg-As/kg regardless of the aging period. The time taken until the seed germination (i.e., lag phase), on the other hand, decreased from 10 d to 3 d with aging for 3 months. This can be attributed to the decreased amount of bioavailable As with aging. Overall, this study shows that when the toxic effects of the As-contaminated soils are assessed using tomato plants, it is better to use more sensitive methods than seed germination such as the As accumulation or the lag phase for seed germination.

Key words : Arsenic, Aging, Bioavailability, Chemical forms, Phytotoxicity

1. 서 론

비소로 인한 토양오염은 폐광산 및 제련소 주변 지역을 중심으로 광범위하게 발생하고 있다. 이는 비소에 의한 토양 및 지하수 오염으로 인한 생태계 수용체 내 비소의 축적 및 독성 영향에 대한 우려를 증가시키고 있다 (Carrizales et al., 2006). 인간을 비롯하여 다양한 생태계 수용체들에 미치는 토양 내 비소의 잠재적인 위해도는 비소의 생물학적 이용성에 의해 결정된다. 이러한 비소의 생물학적 이용성은 수용체, 노출경로뿐만 아니라 토양의 오염특성, 토양 내 비소의 존재형태 등 다양한 요소들의 영향을 받는다(van Gestel, 2008).

토양 내 비소는 일반적으로 철산화물과 결합한 형태로 주로 존재한다고 알려져 있으며(Fayiga et al., 2007), Wenzel et al.(2001)에 의해 제안된 연속추출법에 따라 비특이적 결합 비소, 특이적 결합 비소, 비결정질 철산화물 결합 비소, 결정질 철산화물 결합 비소, 잔류성 비소의 5단계로 구분된다. 5단계 연속추출법에 따른 비소의 존재 형태는 비소 결합 매질의 종류와 강도에 따라 구분된 것으로, 비특이적 결합 비소가 가장 생물학적 이용성이 높고, 잔류성 비소에 가까울수록 생물학적 이용성이 낮아진다(Kertulis-Tartar, 2005). 식물의 경우 비특이적 및 특이적으로 결합된 비소에 의해 독성 영향이 나타난다고 알려져 있다(Niazi et al., 2011).

*Corresponding author : ehjho@hufs.ac.kr

Received : 2016. 4. 19 Reviewed : 2016. 5. 2 Accepted : 2016. 5. 13

Discussion until : 2016. 8. 31

한편, 토양 내 비소의 존재형태 및 이에 따른 생물학적 이용성은 오염기간의 영향을 받는다. 토양으로 비소가 유입된 후 시간이 지남에 따라 비소가 토양 내 매질과 결합하고, 토양 입자 사이의 미세공극을 따라서 내부로 확산되어 격리현상(sequestration)이 발생하게 된다(Turpeinen et al., 2003). 이러한 현상에 따라 토양 내 비소는 오염기간이 경과하면서 점차 생물학적 이용성이 낮은 형태의 비율이 높아지게 되며, 독성 영향도 감소하게 된다(Song et al., 2006; Quazi et al., 2010).

이처럼 토양 내 비소의 존재형태에 따른 생물학적 이용성을 바탕으로 한 독성 영향 연구는 비소 오염토양의 잠재적 위해성을 평가하고 이를 바탕으로 합리적인 정화 수준과 방법을 결정하기 위해 필수적이다. 본 연구는 토양 내 비소의 존재형태가 식물독성에 미치는 영향을 알아보기 위해 오염기간에 따른 토양 내 비소의 존재형태를 확인하고 그에 따른 실험종(토마토)의 발아율을 비교, 평가하였다. 또한 토양 내 비소의 생물학적 이용성과 식물체 내 비소 축적과의 상관관계 분석도 수행하였다. 이러한 결과를 바탕으로 토마토를 이용한 비소 오염 토양의 식물 독성 평가에 더 민감한 평가 방법을 제시하였다.

2. 실험방법 및 분석방법

2.1. 토양시료 준비

본 연구에서는 오염되지 않은 토양시료를 채취하여 상온에서 5일간 자연 건조시킨 뒤 2 mm 체로 걸러 사용하였다. 토성은 사양토(sandy loam)로 토양 내 As, Cd, Cu, Pb, Zn의 농도는 각각 6.6, 0.13, 9.4, 22, 33 mg/kg 이었고, pH와 유기물 함량은 각각 4.6과 3.4%였다. 채취한 토양 시료(원토양)를 인공오염시켜 다양한 농도의 비소로 오염된 토양 시료를 준비하였다. 인공오염농도는 토양환경보전법의 2 지역에 대한 비소의 토양오염우려기준(50 mg-As/kg-soil)과 토양오염대책기준(150 mg-As/kg-soil)을 바탕으로 5가지 조건(6.6(원토양), 25, 75, 150, 300 mg/kg)으로 선정하였다. 원토양 용수량(water holding capacity)인 18%에 해당하는 3차 증류수(54 mL)에 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 0(원토양), 0.104, 0.312, 0.625, 1.249 g씩 녹인 비소 용액을 준비한 후 토양 300 g과 골고루 섞어주고, 일주일간 건조시켰다. 건조된 토양은 밀폐용기에 담아 실온에서 정해진 오염기간(aging period) 동안 보관하였다(Juhasz et al., 2008). 기존 연구에서 비소의 생물학적 이용성이, 오염기간이 3개월 이상일 때 비슷하였기 때문에(Juhasz et al., 2008), 본 연구에서는 오염기간으로 인공

오염 후 0개월(오염 즉시)과 인공오염 후 3개월의 두 가지 기간을 사용하였다.

2.2. 식물 발아 실험 방법

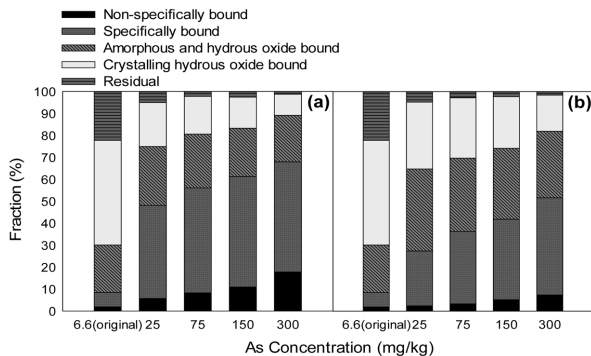
비소 인공오염 토양의 오염농도와 오염기간을 다르게 하여 식물발아실험을 수행하였다. 식물 종자는 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill.)를 사용하였고, 발아실험은 ISO 11269-2 방법(ISO, 2012)을 참고하여 수행하였다. 원토양과 인공오염 토양시료 300 g을 각각 500 mL 비커에 담고, 토마토 종자를 10개씩 파종하였다. 각 종자들은 약 2 cm 간격으로 임의 배치하여 5 mm 이상의 깊이로 파종하였다. 파종 후 각 비커에 용수량만큼의 3차 증류수를 첨가하고 Growth Chamber(HK-GC80, 한국종합기기제작소, Korea)에서 발아실험을 수행하였다. 생장조건은 온도 $24 \pm 3^\circ\text{C}$, 습도 80%, 광주기 16시간이었고, 각 인공오염농도와 오염기간 별로 4번 반복실험을 수행하였다. 실험기간 동안 수분 함량은 용수량을 유지하였고, 발아를 시작한 시기와 날짜별 발아한 식물의 개수를 기록하였다. 발아율은 원토양(대조군)의 발아율이 70% 이상인 후 발아율에 더 이상 변화가 없을 때까지 7-9일간 측정하여, 0개월 오염토양은 총 18일, 3개월 오염토양은 총 14일간 실험을 진행하였다. 발아율에 대한 통계 분석은 SigmaPlot(Systat Software, Inc., Version 12.5)을 이용하여 수행하였다.

2.3. 비소 농도 및 존재형태 분석 방법

토양 또는 식물체 내 비소의 총 농도는 미국 EPA 3052 방법(USEPA, 1996)에 따라 분석하였다. 이는 건조된 토양 또는 식물체 0.5 g에 60% 질산 9 mL, 49% 불산 3 mL, 30% 과산화수소 1 mL, 증류수 1 mL를 넣고 마이크로파 시료용해장치(MARS 6, CEM Corporation, USA)를 사용하여 용해시키는 방법이다(USEPA, 1996). 용해된 시료는 0.45 μm GHP syringe filter로 여과한 뒤 ICP(iCAP7400 duo, Thermo Scientific, Korea)를 사용해 여과한 추출액의 비소 함량을 분석하였다. 토양 내 비소의 존재형태는 Wenzel et al.(2001)의 연속추출법에 따라 분석하였다. 이는 점차적으로 비소 추출력이 강한 용매를 사용하여 비특이적으로 결합한 비소, 특이적으로 결합한 비소, 비결정질 철산화물과 결합한 비소, 결정질 철산화물과 결합한 비소, 잔류 비소의 5단계로 나누어 추출하는 방법이다. 각 단계별 추출용매(extractant)와 추출방법은 Table 1과 같고 추출액(extract)은 0.45 μm GHP syringe filter를 사용해 여과한 뒤 비소 함량을 ICP로 분석하였다.

Table 1. Wenzel's sequential extraction method

Fraction	Extractant	Extraction conditions	Soil:solution ratio
Non-specifically bound	(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.05M)	4 h shaking, 20°C	1:25
Specifically bound	(NH ₄)H ₂ PO ₄ (0.05M)	16 h shaking, 20°C	1:25
Amorphous and hydrous oxide bound	NH ₄ -oxalate buffer (0.2M)	4 h shaking in the dark, 20°C	1:25
Crystallizing hydrous oxide bound	NH ₄ -oxalate buffer (0.5M) + ascorbic acid (0.1M)	30 min in a water bath at 96 ± 3°C in the light	1:25
The residual	HNO ₃ , HF, H ₂ O ₂	Microwave digestion (USEPA 3052)	1:50

**Fig. 1.** Fractionation of arsenic (As) in artificially As-contaminated soils: (a) 0 month aging, (b) 3 months aging.

비소 농도에 대한 통계 분석은 SigmaPlot(Systat Software, Inc., Version 12.5)을 이용하여 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 비소의 오염기간이 비소의 존재형태에 미치는 영향

오염기간이 각각 0, 3개월인 두 인공오염 토양 모두 비소의 오염농도가 증가할수록 토양에 비특이적으로 결합한 비소와 특이적으로 결합한 비소의 함량비가 늘어났다(Fig. 1(a)). 예를 들어, 오염기간이 0개월인 경우, 비소 오염농도가 25에서 150 mg/kg으로 증가하면서 생물학적으로 이용 가능한 비소(비특이적 및 특이적으로 결합한 비소의 합)의 함량비가 48%에서 61%로 증가하였다(Fig. 1(a)). 오염기간이 0개월에서 3개월로 증가하면서 인공오염 토양 내 생물학적으로 이용 가능한, 즉 비특이적 및 특이적으로 결합한 비소의 비율이 감소하였다(Fig. 1(b)). 예를 들어, 비소 오염농도가 75 mg/kg인 경우, 오염기간이 0개월일 때 비특이적으로 결합한 비소와 특이적으로 결합한 비소의 비율이 각각 8, 48%에서 오염기간이 3개월일 때 각각 3, 33%로 감소하였다. 이러한 생물학적으로 이용 가능한 비소의 감소는 비결정질 철산화물과 결정질 철산화물에 결합한 비소의 증가 때문이라고 볼 수 있다. 비소 오염농도가 75 mg/kg일 때, 비결정질 철산화물과 결정질 철

산화물에 결합한 비소의 비율은 오염기간이 0개월일 때 각각 25, 17%에서 오염기간이 3개월일 때 33, 27%로 증가하였다. 이러한 결과는 오염기간의 증가와 함께 토양 내 비소의 생물학적 이용성이 감소하였음을 보여준다. 마찬가지로 Juhasz et al.(2008)의 연구에서도 토양의 비소 오염기간이 0개월에서 3개월로 늘어나면서 비소의 생물학적 이용성이 100%에서 22 ± 5%로 감소하였음을 보여주었다. 이러한 결과는 오염기간이 길어질수록 비소에 의한 독성 영향이 감소할 수 있음을 의미한다.

3.2. 비소 오염농도가 식물발아와 비소 축적에 미치는 영향

Table 2는 비소로 인공오염된 토양에서 비소 농도 및 오염기간이 토마토 발아율에 미치는 영향을 보여준다. 비소로 인공오염된 토양에서의 토마토 평균 발아율은 전반적으로 원토양(6.6 mg/kg)에서의 발아율에 비해 낮았고, 오염기간이 0, 3개월일 때 원토양에 비해 각각 23, 18% 낮았다(Table 2). 오염기간이 0개월인 경우, 원토양과 인공오염 토양에서의 발아율은 95% 신뢰구간 내에서 통계적으로 유의한 차이를 보였고(p -value = 0.006 - 0.017), 이는 비소 오염이 식물발아에 독성 영향을 미쳤다고 볼 수 있다. 하지만 토마토 발아율은 인공오염 토양 내 비소 농도의 유의한 영향을 받지 않았고(p -value: 0.838-1.000), 비슷한 발아율을 가졌다. 이는 토마토 발아율이 비소 오염에 민감하지 않음을 의미한다고 볼 수 있다. 오염기간이 3개월인 경우에는 원토양과 인공오염 토양에서의 발아율은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p -value = 0.094 - 0.505) (Table 2).

토마토 발아율은 토양 내 비소 농도의 영향을 크게 받지 않은 반면, 식물체 내에 축적된 비소의 농도는 토양 내 비소 농도의 영향을 받았다. 오염기간이 3개월인 토양 내 비소 농도가 25 mg/kg일 때 식물체 내 축적된 비소 농도는 0.77 ± 1.5 mg/kg이었고, 토양 내 비소 농도가 증가함에 따라 식물체 내 평균 비소 축적량도 증가하였다(Fig. 2). 토양 내 비소 농도가 300 mg/kg으로 증가했을 때 식물체 내에 축적된 비소 농도는 33 ± 18 mg/kg로 크

Table 2. Effect of arsenic (As) concentrations and aging periods on germination rate of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds

As concentration (mg/kg)	Germination rate (%)		Comparison between 0 and 3 months
	0 month	3 months	
6.6 (Original)	78 ± 13	93 ± 9.6	0.215
25	55 ± 5.8 (0.017)	85 ± 13 (0.505)	0.014
75	58 ± 9.6 (0.017)	78 ± 15 (0.348)	0.116
150	50 ± 14 (0.008)	65 ± 24 (0.094)	0.117
300	55 ± 13 (0.006)	73 ± 13 (0.244)	0.018
Average for artificially contaminated soils (25-300)	55 ± 11	75 ± 17	

Note: The values in brackets are *p*-values for the comparison with the original soil sample with 95% confidence. The germination rates for the aging period of 0 month were compared by carrying out ANOVA and post-hoc test. The same procedure was repeated to compare the germination rates for the aging period of 3 months. The comparison between 0 and 3 months was done by carrying out a paired *t*-test. The statistical significance shows the *p*-values (95% confidence) obtained from the *t*-test between the germination rates with 0 and 3 months aging.

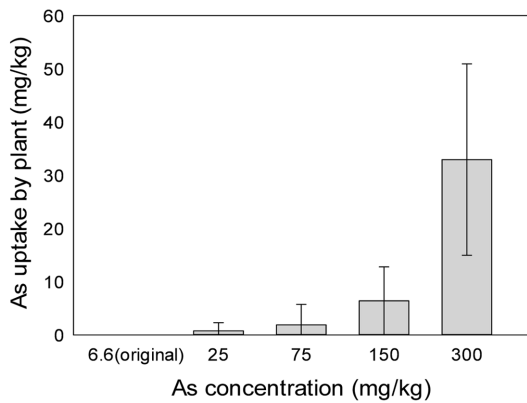


Fig. 2. Arsenic (As) uptake by tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants from aged (3 months) artificially As-contaminated soils.

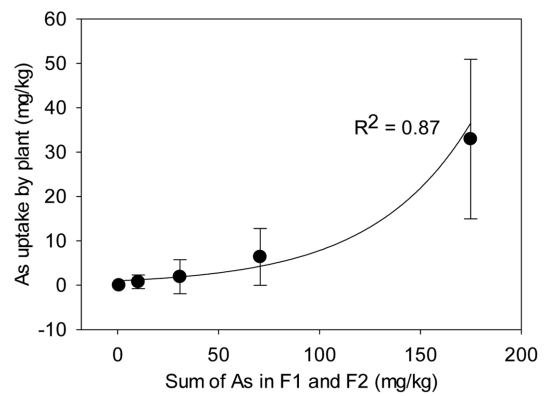


Fig. 3. Relationship between arsenic (As) uptake by tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants and the sum of non-specifically (F1) and specifically (F2) bound As (3 months aging).

게 증가하였다. 하지만 토양 내 비소 농도가 300 mg/kg 일 때 식물체 내 비소 축적량과 다른 인공오염 토양 시료에서의 식물체 내 비소 축적량을 비교할 때(*p*-value = <0.001 -0.004)를 제외하고는 토양 내 비소 농도에 따른 식물체 내 비소 축적량은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한, 식물체 내 축적된 비소 농도와, 생물학적 이용성이 높은 비특이적 및 특이적으로 결합한 비소의 함과의 관계는 exponential growth($R^2=0.87$)로 설명할 수 있었다(Fig. 3). 이는 인공오염된 토양 내 비소 농도가 증가함에 따라 생물학적으로 이용 가능한 비소가 증가하여 (Fig. 1) 식물체에 흡수된 비소의 양이 늘어난 것으로 볼 수 있다(Schultz and Joutti, 2007). 이는 저농도보다 고농도의 비소로 오염된 토양에서 장기적으로 비소 축적에 의한 식물 성장 저해 가능성이 큼을 의미한다. 따라서 비소 오염 토양에서는 식물의 발아보다는 비소의 축적과 이로 인해 영향을 받을 수 있는 지상부 길이 등과 같이 발아한 식물의 성장에 미치는 영향을 장기간 평가하는 것이 바람직할 것으로 보인다(Salvatore et al., 2008).

3.3. 비소 오염 기간이 식물발아에 미치는 영향

비소로 인공오염된 토양에서 평균 발아율은, 오염기간이 0개월에서 3개월로 증가함에 따라 각 농도에서 작게는 15%, 크게는 30% 증가하였다(Table 2). 하지만 비소 오염 농도가 25와 300 mg/kg일 때만 95% 신뢰 구간 내에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Table 2). 이는 오염기간의 증가에 따라 토양 내 비소의 존재 형태가 변하고 (Fig. 1), 이에 따라 비소의 식물 독성이 감소한 것으로 볼 수 있다. Song et al.(2006)은 오염기간이 7일인 토양에 비해 오염기간이 3개월인 토양에서 비특이적 및 특이적으로 결합된 비소의 추출률(extractability)이 감소하였고, 이에 따라 EC10과 EC50 값이 현저하게 증가하여 독성이 저감되었음을 보여주었다.

비소 오염기간은 토마토의 발아율보다 인공오염 토양에서 식물 발아 시작 전의 lag phase(발아까지 걸리는 시간)에 더 민감한 영향을 주었다(Fig. 4). 토마토 종자의 발아율은 비소 오염 농도와 상관없이 일정 기간의 lag phase

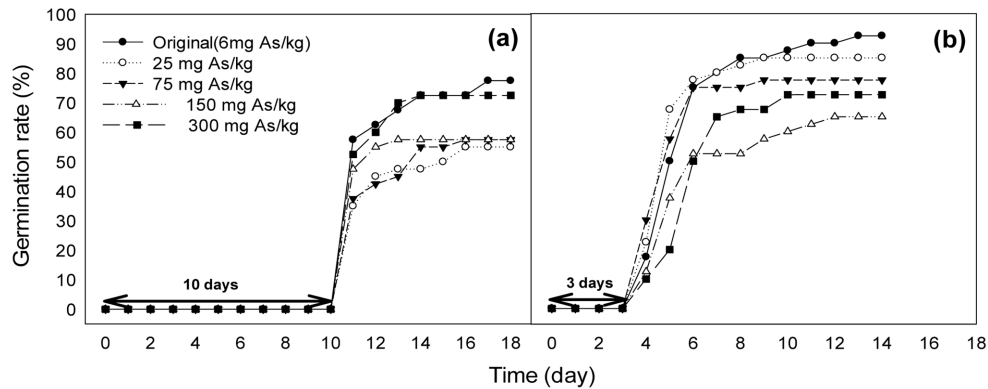


Fig. 4. Effect of As concentrations on changes in seed germination with time during seed germination tests using tomato seeds (*Lycopersicon esculentum* Mill.): (a) 0 month aging, (b) 3 months aging. The germination rates are the average values of four replicate samples.

후 급격히 증가하는 양상을 보였고, 그 뒤에는 서서히 증가하는 추세를 보였다. 인공오염 후 오염기간이 0개월인 경우 10일 후에 토마토 종자가 발아하였으나(Fig. 4(a)), 오염기간이 3개월 경과 후에는 발아가 3일 후에 발아하였다(Fig. 4(b)). 오염기간의 증가에 따른 발아 전 lag phase의 감소는 오염기간이 증가하면서 비특이적 및 특이적으로 결합한 비소(생물학적으로 이용 가능한 비소)의 비율이 감소하여 종자의 발아를 저해하는 영향이 감소하였기 때문이다(Fig. 1).

4. 결 론

인공오염은 비소 오염농도의 증가에 따라 토양에 비특이적으로 결합한 비소와 특이적으로 결합한 비소의 함량비를 크게 증가시킨 반면 토양 내 철산화물과 결합한 비소와 잔류성 비소의 함량비를 감소시켰다. 비소 오염농도는 토마토 발아율에 민감한 영향을 주지 않은 반면, 토마토 식물체 내 흡수된 비소의 양에는 민감한 영향을 주었고, 특히, 비특이적 및 특이적으로 결합한 비소의 함과 양의 상관관계를 보였다. 따라서 토마토를 이용한 비소 오염 토양 독성 평가 시 식물의 발아보다는 비소의 축적 또는 이로 인해 영향을 받을 수 있는 식물의 성장을 장기적으로 평가하는 것이 바람직할 것으로 보인다. 또한 오염기간의 증가는 발아율에 통계적으로 유의한 차이를 주지 않았지만, 발아가 시작하기 전까지 걸리는 시간, 즉 lag phase에 영향을 주었다. 결론적으로 본 연구는 비소 오염 토양에 대한 식물 독성 영향을 평가할 때 흔히 사용하는 발아율 보다는 생물학적으로 이용 가능한 비소에 더 민감하게 반응할 수 있는 평가 방법을 사용할 필요가 있음을 보여준다.

사 사

본 연구는 2015년도 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단 기초연구사업(NRF-2014R1A1A1003762)의 지원을 받아 수행되었습니다. 본 연구는 환경부 토양·지하수 오염방지기술개발사업인 GAIA(GeoAdvanced Innovative Action) Project의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Carrizales, L., Razo, I., Téllez-Hernández, J.I., Torres-Nerio, R., Torres, A., Batres, L.E., Cubillas, A.-C., and Díaz-Barriga, F., 2006, Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosi, Mexico: Importance of soil contamination for exposure of children, *Environ. Res.*, **101**(1), 1-10.
- Fayiga, A.O., Ma, L.Q., and Zhou, Q., 2007, Effects of plant arsenic uptake and heavy metals on arsenic distribution in an arsenic-contaminated soil, *Environ. Pollut.*, **147**(3), 737-742.
- ISO, 2012, ISO 11269-2 Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants.
- Juhasz, A.L., Smith, E., Weber, J., Naidu, R., Rees, M., Rofe, A., Kuchel, K., and Sansom, L., 2008, Effect of soil ageing on in vivo arsenic bioavailability in two dissimilar soils, *Chemosphere.*, **71**(11), 2180-2186.
- Kertulis-Tartar, G.M., 2005, Arsenic hyperaccumulation by *Pteris vittata* L. and its potential for phytoremediation of arsenic-contaminated soils, Ph.D Thesis, University of Florida, Florida, USA.
- Niazi, N.K., Singh, B., and Shah, P., 2011, Arsenic Speciation and Phytoavailability in contaminated soils using a sequential extraction procedure and XANES Spectroscopy, *Environ. Sci.*

Technol., **45**(17), 7135-7142.

Quazi, S., Sarkar, D., and Datta, R., 2010, Effect of soil aging on arsenic fractionation and bioaccessibility in inorganic arsenical pesticide contaminated soils, *Appl. Geochem.*, **25**(9), 1422-1430.

Salvatore, M. Di, Carafa, A.M., and Carratù, G., 2008, Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates, *Chemosphere*, **73**, 1461-1464.

Schultz, E. and Joutti, A., 2007, Arsenic ecotoxicity in soils, *Geol. S. Finl.*, Espoo, Finland.

Song, J., Zhao, F.-J., McGrath, S.P., and Luo, Y.-M., 2006, Influence of soil properties and aging on arsenic phytotoxicity, *Environ. Toxicol. Chem.*, **25**(6), 1663-1670.

Turpeinen, R., Virta, M., and Häggblom, M.M., 2003, Analysis of arsenic bioavailability in contaminated soils, *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**(1), 1-6.

USEPA, 1996, USEPA 3052 Method: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices.

van Gestel, C.A.M., 2008, Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils, *Sci. Total Environ.*, **406**(3), 385-395.

Wenzel, W.W., Kirchbaumer, N., Prohaska, T., Stingeder, G., Lombi, E., and Adriano, D.C., 2001, Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure, *Anal. Chim. Acta*, **436**(2), 309-323.