

종자 발아율 지표 및 초기 묘조 성장에 의한 다환방향족탄화수소의 식물 독성 측정

김 용 범*, 정 용¹

버클리 캘리포니아주립대학 식물 및 미생물학과
¹연세대학교 의과대학 환경공해연구소

Phyto-toxicological Effects of PAHs on the Germination and Growth of Alfalfa, Barley, and Tall Fescue

Yong-Bum Kim* and Yong Chung¹

Department of Plant and Microbial Biology, U.C. Berkeley CA U.S.A.

¹Institute of Environmental Research, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

The test of germination has been used as a good indicator to assess the toxicity of chemicals to plant. This study was carried out to investigate the effect of PAHs, anthracene and phenanthrene, on germination ratio, germination index and germination time of barley, tall fescue and alfalfa.

Anthracene and phenanthrene induced to decrease the seedling length and increase the germination time of the experimental plants. But they did not affect the maximum germination ratio. While it was not correlated between seedling length and final germination ratio, it was shown a close relationship between seedling length and mean germination time of the plants. These results suggested that the mean of germination time and seedling growth could be useful to examine the phyto-toxicological effect of PAHs.

The mixture of anthracene and phenanthrene was examined to investigate the combined effect on seedling length; the mixture induced the reduction of seedling.

This was meant that the mixture toxicity of PAHs might be not shown in the sum of each chemical toxicity.

Key words : Phyto-toxicity, Germination, PAHs, Tall fescue, Barley, Alfalfa

서 론

다환방향족탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)는 둘 또는 그 이상의 벤젠고리 구조를 이루고 있는 것으로 환경을 오염시키는 오염물질로 이미 환경 중에 폭 넓게 존재한다. 이 물질

은 공명구조를 이루고 있고 물에 대한 용해도가 매우 낮아 분해가 어려운 것으로 알려져 있다 (Heitkamp and Cerniglia, 1988). PAHs의 일차적인 오염원은 화석연료의 이용과 화학산업이지만 인공적 또는 자연적인 숲의 화재에 의해서도 생성될 수 있다 (Guerin, 1978; Evans *et al.*, 1990; Christensen *et al.*, 1993).

PAHs가 발암가능성이 있는 물질로 알려져 이 물질에 대한 관심이 높아지고 있다 (U.S. EPA,

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: 1-510-559-1833, E-mail: yongbkim@uclink4.berkeley.edu

1993; Shuttleworth and Cernigli, 1995). 또한 환경에 존재하는 PAHs는 사람의 건강에 부정적으로 작용할 뿐만 아니라 생태계에 아주 심각한 영향을 초래할 수 있다 (Shuttleworth and Cernigli, 1995). 따라서 PAHs의 독성을 평가하는 것은 오염된 지역에 대한 복원 시행의 결정, 그리고 복원의 지속 및 중단을 결정하는데 필수적인 요소가 되고 있다.

오염물질의 독성을 확인하는 방법으로는 여러 가지가 있는데, 이러한 방법 중에는 Solid-phase Microtox test, SOS-chromotest, seed germination, earthworm survival 그리고 적혈구 haemolysis assays 등이 있다 (Konke *et al.*, 1999). 이러한 방법들 중에서 PAHs의 독성을 확인하는 방법으로 많이 이용되는 방법중의 하나가 seed germination (종자 발아율)을 측정하는 것이다. 생태독성을 측정하기 위하여 Brassica napus, 밀, 무우 그리고 겨자 등의 종자발아율이 이용되었다 (Jameson and Rana, 1995; Cho and Han 1996; Ren *et al.*, 1996; Juvonen *et al.*, 2000).

그러나 발아를 측정하는 여러 가지 측정 지표 중에서 대부분 총 발아율과 묘조 성장을 조사하여 왔다. 그러나 발아율 측정지표에는 발아율 뿐 아니라 germination index, germination homogeneity 그리고 평균발아시간 등 다양하다. 이러한 여러 가지 지표 중 오염물질 독성측정에 효과적인 발아지표가 어느 것인지에 대한 연구는 아직 없다. 따라서 PAHs 오염지역의 모니터링을 위한 기초 연구로 PAHs 중에서 anthracene과 phenanthrene을 대상으로 여러 가지 식물의 발아 및 묘조 성장에 미치는 영향을 조사하고, PAHs의 독성을 파악하는데, 어떠한 측정지표가 효과적인지 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시약

독성 실험을 하기 위한 실험재료로 Golden promis 품종의 보리, Tall fescue와 alfalfa를 이용하였다. 다환방향족탄화수소로는 anthracene과 phenanthrene을 사용하였으며, 화학물질은 Sigma로부터

구입하여 사용하였다.

2. 발아율 및 성장 측정

오염물질에 대한 종자의 영향을 측정하기 위하여 오염물질이 존재할 때 발아율, 평균발아시간은 아래에 제시한 방법에 따라 측정하였다. 뿌리와 줄기의 길이를 측정하였다. 단자엽식물의 경우 뿌리와 shoot의 길이를 대조군과 비교 측정하였고, 쌍자엽식물은 뿌리와 hypocotyl의 길이를 측정하였다. 종자의 발아실험은 Cho 등 (1999)의 방법에 따라 수행하였다. 모든 종자는 10% Chlorox로 멸균한 후 3장의 Whatman No. 1의 여과지를 포함하고 있는 직경 9 cm의 Petri dishes에 5 ml의 탈이온수를 첨가하여 24°C 실온에서 종자에 따라 7일에서 13일간 배양하였다. 실험에 사용한 종자의 수는 총 50개로 하나의 Petri dishes에 10개 또는 12개의 종자를 발아시켰다. 발아율을 발아된 종자수와 총종자수의 비율로 계산하였다. 평균발아시간은 실험에 사용한 종자가 모두 발아되는 시간을 통계적으로 계산한 것으로 Kotowski coefficient를 이용하여 다음과 같이 계산하였다.

Germination ratio (발아율) : Ni/실험에 사용한 총 종자 수

Germination Index = Ni/최종일까지 발아된 총 종자 수

$$\text{Kotowski coefficient} = \frac{\sum Ni \cdot I}{\sum Ni}$$

평균 발아시간 = 1/Kotowski coefficient

I : 발아 후 측정까지 날짜 수

Ni : i번째 날짜에 발아된 종자의 수

각 식물의 묘조의 길이는 발아된 종자가 증가하지 않는 상태를 확인한 후 보리와 알팔파는 Tall fescue는 9일째에 각각 측정하였다. 보리는 수염뿌리로 초기 묘조에 뿌리가 여러개로 가장 긴 뿌리의 길이를 측정하였다.

3. PAHs의 처리

실험에 사용한 anthracene과 phenanthrene은 물에 용해되지 않기 때문에 이들을 처리하기 위하

여 각 물질을 methylene chloride : acetone = 1 : 1의 용액에 녹인 후 이 용액의 일정량을 여과지에 골고루 살포한 후 건조하는 방법으로 여과지에 anthracene과 phenanthrene을 처리하였다. 실험에 사용한 anthracene과 phenanthrene의 양은 1 mg/filter paper와 5 mg/filter paper이며, 각각 처리하거나 혼합하여 처리하였다.

결과 및 고찰

PAHs는 식물의 발아 및 성장을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 특히 빛이 있는 경우에 그 독성이 증가한다(Lisha *et al.*, 1999). 이러한 것은 광에 의해서 PAHs의 화학적 특성이 변화되기 때문이다. 그러나 토양의 생태독성을 조사하기 위해서 종자는 토양내에 식재되어야 하기 때문에 토양내부는 빛이 도달할 수 없는 암상태로 존재한다. 따라서 빛에 의해 분해된 PAHs 산물은 종자 발아에 직접 영향을 줄 수 없다. 따라서 본 실험에서는 광이 없는 암상태에서 PAHs의 독성을 조사하였다.

오염물질의 식물독성을 파악하기 위하여 사용하는 주요 발아율 관련 지표는 발아율과 germination index이다. 발아율은 실험에 사용된 모든 종자 수 중 발아된 종자 수의 비율이며 germination index는 최종 발아된 종자수에 대한 특정일까지 발아된 종자수의 비율이다. 발아율은 종자의 발아 능력 비교 그리고 germination index는 종자의 발아 속도를 비교에 효과적이다. 따라서 본 실험에서 보리 종자의 발아율과 germination index를 조사하였다.

Fig. 1은 phenanthrene이 보리 발아에 미치는 영향을 조사한 것이다. 7일이 지난 후 보리의 최대 발아율은 처리된 phenanthrene의 양이 증가할 지라도 뚜렷한 변화를 보이지 않았다. 그러나 종자가 최대 발아율에 도달되는 속도는 다소 늦어지는 경향을 보였다. 이러한 특성은 germination index에서 보다 분명하였다. Fig. 1로부터 phenanthrene의 양이 증가함에 따라 최대 발아율에 도달하는 시간이 길어진다는 것을 알 수 있다. 발아시간이 길어진다는 결과는 Ren 등(1996)의 실험과 일치하지만 발아율 감소한다는 결과와는 일치하

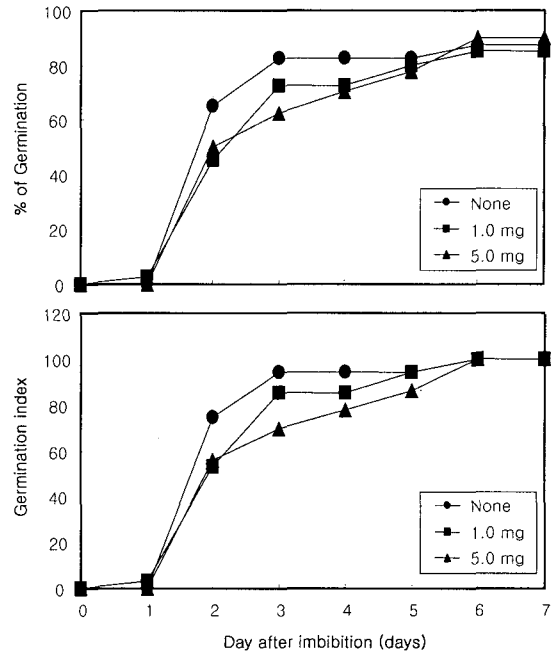


Fig. 1. The germination of barley grain with phenanthrene. Barley grain which was sterilized with 10% of chlorox, were incubated on the filter pater treated with/without phenanthrene in the 9 cm of Petri Dish for the each incubation period.

지 않았다. 이러한 것은 실험에 사용된 종의 차이에 의해서 비롯되는 것으로 여겨진다.

발아율이나 germination index 모두 발아 속도의 증감을 정성적으로 확인할 수 있었을 뿐 정량적 계산은 불가능하였다. 이러한 정성적 평가는 독성의 유무를 확인은 가능하지만 오염물질 독성의 상대적 비교는 불가능하다. 따라서 발아의 속도를 정량적으로 측정할 수 있는 지표로서 발아한 종자의 평균발아속도를 통계적 방법으로 계산하였다. Fig. 2는 phenanthrene의 처리하였을 때 통계적 방법으로 계산된 평균 발아속도이다. 대조군의 평균 발아시간은 약 2.2일이었고, 1 mg의 phenanthrene을 처리한 경우 평균 발아시간은 약 3.5일이었으며, 5 mg의 phenanthrene의 경우는 약 4.5일이었다. 즉 5 mg의 phenanthrene을 처리한 경우 대조군에 비하여 약 2배 정도 평균발아시간이 길어진 것을 알 수 있었으며, 처리된 phenanthrene의 양과 평균발아시간이 비례적으로 증가하는 것을

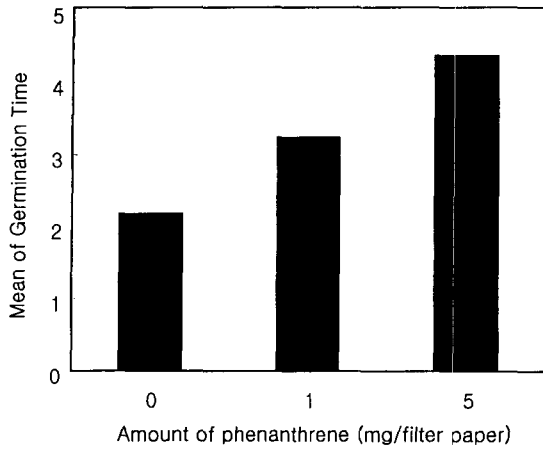


Fig. 2. Effect of phenanthrene on the day of average germination of barley grain after 7 day growth in the 9 cm of Petri Dish.

보여주고 있다.

PAHs의 의한 보리 발아시간 지연이 보리 묘조 성장에도 영향을 주는지 파악하기 위하여 묘조의 shoot과 뿌리 길이를 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 처리된 phenanthrene의 양이 증가함에 따라서 묘조 길이가 감소하는 경향을 보였다. 즉, 묘조 길이는 평균발아시간과 역상관계에 있었다. 그러나 길이 감소의 정도는 뿌리가 약 30% 정도 shoot이 약 20% 정도로 뿌리가 더 phenanthrene에 민감한 것으로 나타났다. 이것은 뿌리가 물질을 흡수하는 기관이기 때문에 phenanthrene의 영향이

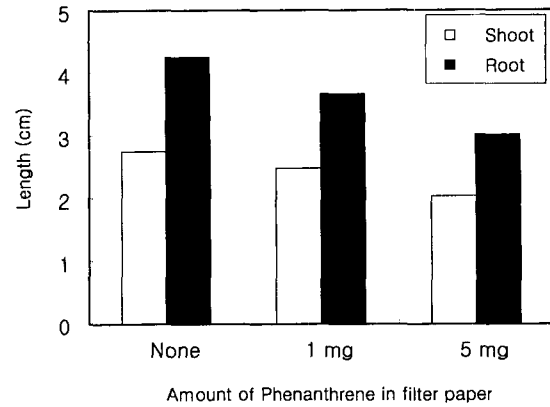


Fig. 3. Effect of phenanthrene on the seedling length (shoot and root length) of barley after 7 day growth in the 9 cm of Petri Dish.

더 클 것으로 추측된다 (Figs. 2, 3). 이러한 결과는 PAHs의 식물 독성을 평가하기 위해서는 식물의 지하부가 지상부 보다 효과적이라는 것을 의미한다. 이와 같은 결과는 PAHs가 뿌리의 중량 감소 유도하였다는 Ren 등 (1996)의 결과와도 일치한다.

PAHs의 식물 독성 확인에 평균발아속도의 적용 가능성, 그리고 서로 다른 PAHs가 혼합된 경우 독성변화를 쌍자엽 식물인 alfalfa와 단자엽 식물인 tall fescue을 대상으로 조사하였다. PAHs는 anthracene과 phenanthrene을 이용하였는데, 이들은 세 개의 벤젠고리를 가지고 있는 것으로 특히 phenanthrene은 그 구조적 특징과 대표성 때문에 PAHs 연구에 자주 이용되는 물질이다. 따라서 구

Table 1. Effect of anthracene and phenanthrene on the growth of alfalfa and tall fescue seedling

Treatments (mg/filter paper)	Alfalfa			Tall fescue		
	Root	Hypocotyl	Total	Root	Shoot	Total
None	3.15 ± 1.22	2.99 ± 0.64	6.15 ± 1.53	3.32 ± 1.38	4.35 ± 1.36	7.67 ± 2.20
Anthracene						
0.1	3.58 ± 1.06	2.37 ± 0.64	5.95 ± 1.26	3.38 ± 1.40	4.44 ± 1.64	7.82 ± 2.44
0.5	3.48 ± 1.07	2.51 ± 0.55	5.99 ± 1.50	3.27 ± 1.04	5.00 ± 1.41	8.27 ± 2.13
Phenanthrene						
0.1	3.50 ± 1.54	2.27 ± 0.62	5.77 ± 1.78	3.34 ± 1.26	3.83 ± 1.47	7.18 ± 2.45
0.5	3.52 ± 1.14	2.07 ± 0.45	5.74 ± 1.32	2.50 ± 1.13	2.11 ± 1.24	4.61 ± 1.77
Anthracene + Phenanthrene						
0.1	3.53 ± 0.94	2.47 ± 0.48	6.00 ± 1.14	2.90 ± 0.91	3.67 ± 1.41	6.57 ± 1.89
0.5	3.70 ± 1.29	2.17 ± 0.53	5.87 ± 1.54	2.96 ± 0.93	2.70 ± 0.99	5.65 ± 1.62

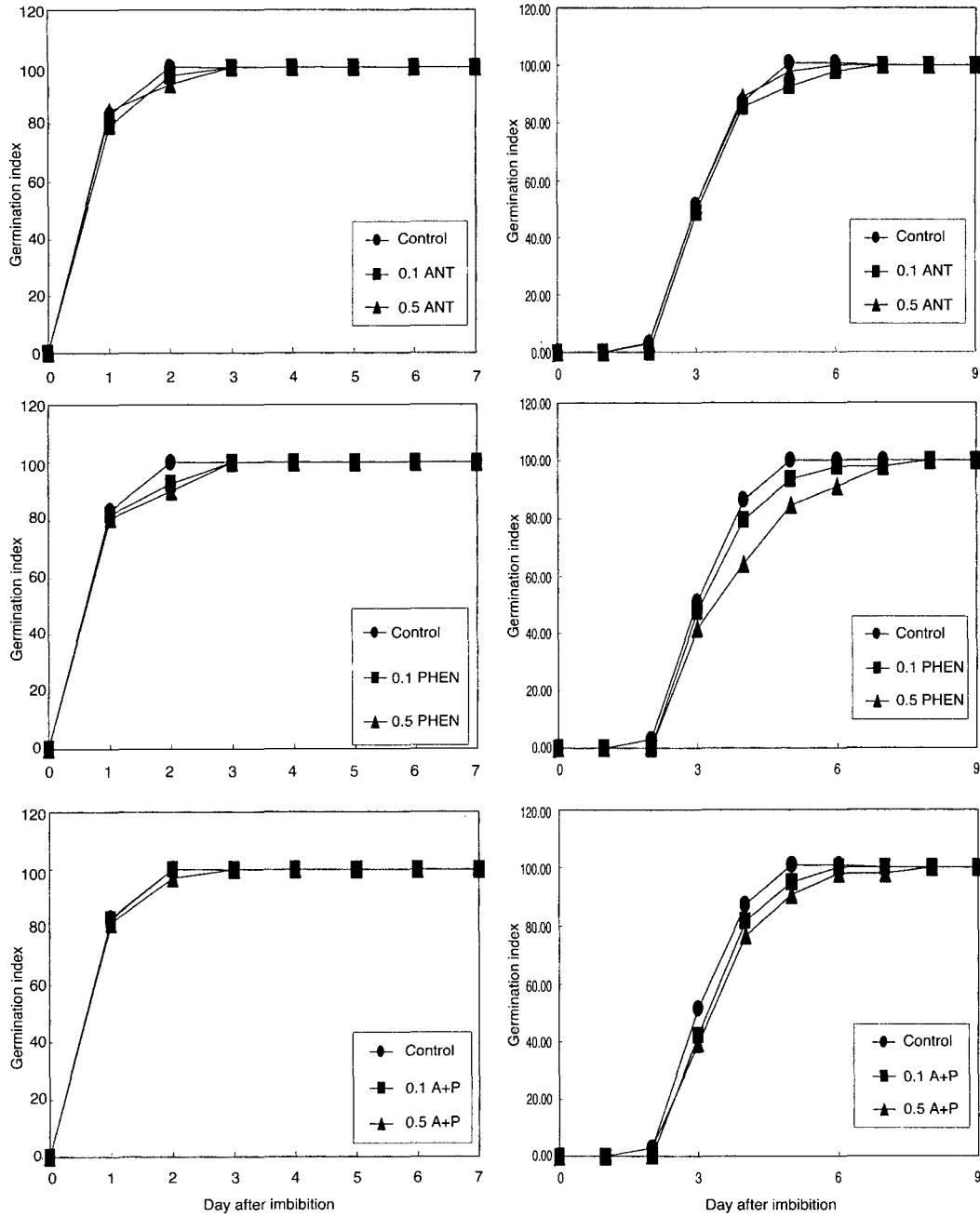


Fig. 4. Effect of anthracene and phenanthrene on the germination index of alfalfa and tall fescue. Ant and phe means anthracene and phenanthrene. A+P is the mixture of anthracene and phenanthrene.

조적으로 이성질체이지만 용해도 차이가 큰 물질을 이용하여 anthracene과 phenanthrene을 이용하여

PAHs 혼합물의 식물 독성을 파악하고자 하였다. Anthracene과 phenanthrene을 각각 또는 함께

처리한 후 alfalfa와 tall fescue의 성장, 발아율 그리고 평균발아시간을 측정하였다. Table 1은 alfalfa와 tall fescue 두 식물의 묘조 성장에 미치는 phenanthrene과 anthracene의 영향을 나타낸 것이다. 처리한 anthracene과 phenanthrene은 alfalfa와 tall fescue 모두 묘조의 길이를 감소시키는 경향을 보였다. Anthracene과 phenanthrene의 성장 저해효과는 tall fescue에서 높았다. Tall fescue에 5 mg의 phenanthrene을 처리한 경우 묘조 길이는 7.67에서 4.61로 약 40% 정도 감소하였다.

Anthracene을 처리한 경우 phenanthrene에 비하여 묘조 성장 감소가 나타나지 않았다. 5 mg/filter paper의 anthracene과 phenanthrene을 함께 처리한 경우에 alfalfa와 tall fescue 묘조의 크기는 5.87 cm, 5.65 cm로 5 mg/filter paper의 phenanthrene만을 처리하였을 때 5.74 cm, 4.61 cm보다 증가하였다. 즉, 이것은 anthracene과 phenanthrene이 함께 처리된 경우 phenanthrene의 독성이 감소하였다는 것을 의미한다. 즉, 혼합된 PAHs의 식물 독성은 두 물질에서 보여지는 독성의 단순 합이 아니라는 것을 의미한다. 따라서 개개물질의 독성 합으로 독성을 추정하는 방법은 적어도 PAHs의 식물 독성을 평가하는 데는 효과적이지 않을 수 있다는 것을 암시한다.

Fig. 4는 anthracene과 phenanthrene이 각각 존재하거나 함께 존재할 경우 각 식물의 germination index를 나타낸 것이다. Phenanthrene의 경우 germination의 속도 저하효과가 anthracene에 비하여 높았다. 그러나 alfalfa에서는 발아시간증가효과를 확인하기 어려웠다. 그러나 tall fescue에서 보리와 같이 발아시간증가를 확인할 수 있었다. 한편, 각 식물의 묘조 성장과 평균발아속도와의 상관관계를 조사하여 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 묘조 성장과 평균발아속도 간의 역상관 관계가 있음을 알 수 있었다. 즉, 종자의 발아속도가 증가하면 묘조의 성장이 감소한다는 것으로 종자의 발아속도를 측정함으로써 PAHs의 독성영향을 파악할 수 있음을 의미한다.

본 실험에서는 보리, alfalfa, 그리고 tall fescue 간에 발아율 및 평균발아시간과 묘조 성장정도를 이용하여 PAHs의 독성을 평가하고자 하였다. 본 실험에 사용한 모든 식물에서 PAHs는 발아속도에 저해하였다. 그러나 그 저해정도는 보리가 가

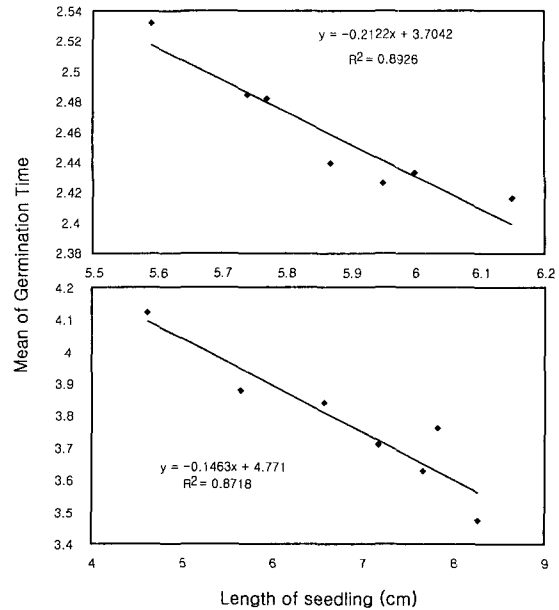


Fig. 5. Correlation between the length of seedling and the day of average germination. Upper panel is for alfalfa and lower panel for tall fescue.

장 것이며, alfalfa에서 가장 낮았다. 이것은 식물 종에 따라서 PAHs 독성영향이 다르다는 것을 의미한다. 즉, 환경 중에서 PAHs의 독성을 조사하고자 할 때 그 목적에 맞는 식물을 선발하여야 한다는 것을 의미한다. 그러나 PAHs의 독성은 암상태보다는 빛이 있는 상태에서 그 독성이 증가하는 것으로 보고된 바 있다 (Ren *et al.*, 1996). 따라서 PAHs의 생태 독성을 측정하기 위해서는 빛이 있는 조건에서 그 독성을 파악하여야 할 것이다.

PAHs의 독성연구는 대부분 동물을 중심으로 연구되어 왔는데, PAHs는 antiestrogen 활성을 가지면 그것이 발암성과 연관되어 있다 (Santodonato, 1997). 그러나 최근 식물을 이용한 토양오염저감 기술 즉 phytoremediation이 경제적인 방법으로 새로운 기술로 발전함에 따라 식물에 대한 PAHs의 생태독성을 조사할 필요성이 커져가고 있다. 따라서 PAHs의 식물독성 파악은 phytoremediation에 적합한 식물종 파악에 효과적인 방법으로 이용될 수 있을 것이다.

결 론

Anthracene과 phenanthrene과 같은 PAHs는 이 미 환경중에 다량 존재하는 오염물질로서 오염지역의 복원 등을 위하여 그 생태독성의 조사는 필수적이다. 이러한 PAHs의 생태독성을 조사하기 위한 방법으로 활용하기 위한 식물 독성을 조사하기 위하여 발아율과 germination index, 평균발아시간 그리고 초기 묘조성장을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PAHs의 식물 독성을 조사하기 위해서 발아율보다는 평균발아시간이나 묘조성장이 효과적인 것으로 나타나 평균발아시간을 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

2. PAHs의 독성 정도는 식물의 종류에 따라 다르기 때문에 PAHs의 독성을 측정하기 위해서 적당한 식물을 선택이 필요하다. 조사된 식물중에서는 보리가 가장 PAHs에 민감한 것으로 나타났다.

3. PAHs의 종류에 따라 식물 독성이 달랐으며, anthracene과 phenanthrene의 혼합물의 경우 phenanthrene만 처리한 경우보다 독성이 감소하였다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 해외 Post-doc 지원 프로그램의 일부 지원에 의하여 수행되었습니다. 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Cho, Jae-Young; Han, Kang-Wan. Comparison of growth and physiological responses in radish for assay of nickel toxicity. II. Effect of Ni on physiological responses in

radish. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*; 1996; 39 (4) : 293-296.
Cho, Myeong-Je, Joshua H. Wong, Corina Marx, Wen Jiang, Peggy G. Lemaux and Bob B. Buchanan, Over-expression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. *PNAS* 96 : 14641-14646.
Christensen E., R. Zhang, and X. Environ. Sci. Technol. 1993; 27 : 139.
Heitkamp M.A. and C.E. Cerniglia. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 54 : 2549-2555.
Jameson J. Rana B.C. Seed germination and seedling growth of certain plants in industrially K hari river water.; 1995 : *Geobios (Jodhpur)* 22(1) : 39-41.
Juvonen, R., Martikaniemi E. Schultz, E. Joutti, A, Ahtiainen J. Lehtokari M A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2000; 47(2) : 156-166.
Konke, K.L, Marwood, T.M., Cassidy, M.B., Liu D., Seech A.G., Lee H. Trevors, J.T. A comparison of five bioassays to monitor toxicity during bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil *Water Air and Soil Pollution.* 1999; 110 (1-2) : 157-169.
Ren, L., Zeiler, L.F. Dixon, D. George, G. Bruce M. Photo-induced effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on *Brassica napus (Canola)* during germination and early seedling development *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1996; 33(1) : 73-80.
Shuttleworth K.L. and Cerniglia C.E. Environmental Aspects of PAH Biodegradation. *App. Biochem. Biotech.* 1995; 54 : 291-302.
Snatodonato, Joseph, Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: Relationship to carcinogenicity. *Chemosphere* 34:835-848.
U.S. EPA. Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons EPA/600/R-93/089, 1993; U.S. EPA; Washington, DC.