

국내 개발된 N-tox[®] 생물검정 시스템을 이용한 시안과 3, 5-이염화페놀의 발광박테리아 (*Vibrio fischeri*)에 대한 혼합 독성 영향 연구

이정석, 이규태*, 김찬국, 김혜진, 이창훈, 이종현

(주)네오엔비즈 부설환경안전연구소

Toxicity of Binary Mixture of Cyanide and 3, 5-dichlorophenol to *Vibrio fischeri* Determined by Newly Developed N-tox[®] Bioassay System

Jung-Suk Lee, Kyu-Tae Lee*, Chan-Kook Kim, Hye-Jin Kim, Chang-Hoon Lee and Jong-Hyeon Lee

Institute of Environmental Protection and Safety, NeoEnBiz Co. Rm 904/913, Byeoksan Digital Valley II, Gasandong 481-10, Geumcheongu, Seoul 153-783, Korea

ABSTRACT

Cyanides and dichlorophenols were important pollutants in industrial effluents of steel, petroleum, plastics, pesticides, synthetic dye and/or fiber manufacturing. The toxic effects of cyanide and 3, 5-dichlorophenol in the unary and binary solutions to *Vibrio fischeri* were determined using the newly developed N-tox[®] bioassay system. This bioassay system relies upon the attenuation of light intensity emitted by *Vibrio fischeri* exposed to various pollutants including metals and organic compounds. Most of studies dealing with toxicity of pollutants concerned single chemical species, while the organisms were typically exposed to pollutant mixtures. The present study showed that the toxicity of some binary combinations of cyanide and 3, 5-dichlorophenol significantly was lower than the predicted toxicity from the additive model. This antagonistic interaction was well explained by chemical interaction model presented in this study.

Key words : *Vibrio fischeri*, bioassay, toxicity of pollutant mixture

서 론

시안화물(cyanide)은 광산, 제련, 정유, 화공 등의 산업이나 농약 등에 광범위하게 이용되는 화학물질로서 산업배출수나 도시하수 등에서 흔하게 검

출되는 대표적인 오염물질의 하나이다. 시안은 이차대전 당시에는 대량학살의 목적으로 독일군이 사용하였던 물질로서 역사상 자살, 살인, 학살 및 사형집행 등을 통해 가장 많은 인간을 죽음으로 몰아간 대단히 강한 독성물질로 알려져 있다(Irwin et al., 1998).

시안화물은 크게 시안이온(CN⁻)이나 시안화수소(hydrogen cyanide, HCN)와 같은 자유시안화물

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-863-4744, E-mail: ktlee@ncoenbiz.com

(free cyanide)과 시안화나트륨(NaCN)과 같이 물에 녹아 쉽게 시안이온으로 해리되는 단순시안화물(simple cyanide) 그리고 시안화철(FeCN)과 같은 시안화금속이 대부분인 시안화화합물(complex cyanide) 등 세 가지로 구분할 수 있다. 상기 세 가지의 시안화물을 모두 합친 총시안화물(total cyanide)의 독성 영향에서 자유시안화물의 독성 영향이 차지하는 비중은 매우 높아 시안화화합물 자체의 독성도는 거의 무시할 수 있다. 하지만 실제 수계에서는 조건에 따라 시안화화합물에서 자유시안화물이 형성될 수 있으므로 시안화화합물 역시 자유시안화물과 함께 중요한 유해오염물질로서 관리될 필요가 있다(Brix *et al.*, 2000).

염화페놀류(chlorinated phenols)는 페놀의 수소가 하나(monochlorophenol)에서 다섯 개(pentachlorophenol)까지 염소로 치환된 화합물을 총칭한다. 염소가 치환될 수 있는 위치는 수산화기가 붙은 1번을 제외한 2~6번에 한하며 치환된 수와 위치에 따라서 12종류의 서로 다른 성질의 화합물이 생성된다(Kishino and Kobayashi, 1996). 염화페놀류는 다양한 산업적인 목적을 위해 생산되는 화학물질로서 주로 염료, 색소, 페놀수지, 살충제 또는 제초제 등의 합성에 이용되거나 살균제, 목재방부제, 항생제 등으로 직접 이용되기도 한다(Irwin *et al.*, 1998). 3, 5-이염화페놀(3, 5-dichlorophenol)은 페놀의 3번과 5번위치의 수소가 염소로 치환된 염화페놀류의 하나로서 5종의 이염화페놀 중에서 가장 독성이 강하며, ISO(International Standard Organization)에서 발간한 발광박테리아 표준 프로토콜에서는 세 종류의 참조독성물질(reference toxicant)의 하나로 제시되어 있다(ISO, 1998).

발광박테리아를 이용한 생물검정법은 전 세계적으로 화학물질에 오염된 환경시료의 생물학적 독성을 평가하기 위한 목적으로 널리 활용되고 있다(이, 2002; Onorati and Mecozzi, 2004). 시험생물로서는 *Vibrio fischeri*라는 발광박테리아가 주로 이용되고 있으며, 이러한 독성평가의 목적으로 박테리아 발광도 측정을 위한 기기로는 미국 SDI사의 Microtox[®]가 국내외에서 가장 많이 이용되고 있다(Zwart and Slooff, 1983). 하지만 Microtox[®]는 1970년대에 개발된 모델이 지금까지 큰 변화 없이 그대로 이용되고 있어, 그 동안의 기술적인 진보를 반영하지 못해 효율성이 떨어진다는 지적이 있어

왔다. 많은 양의 발광박테리아 시약을 필요로 하며 한 번에 한 시료의 발광도를 측정하는 single cell type의 Microtox[®]와 달리, 최근 국내 자체 기술로 개발된 N-tox[®](NeoEnBiz Co.)는 96-well type 모델로서 상대적으로 적은 양의 발광박테리아와 시료를 이용하여 한 번에 96개씩 발광도를 측정할 수 있을 뿐만 아니라, 연속측정이 가능하기 때문에 시간과 비용적인 효율성을 극대화할 수 있다.

단일 화학물질에 의한 발광박테리아의 발광도 저해 영향은 수은, 구리, 아연 등 중금속과 농약, 페놀류 등 유기오염물질 등 다양한 물질에 대해 평가되어왔다(Zwart and Slooff, 1983; Salizzato *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 2004). 하지만 환경에 존재하는 유해물질은 대부분 여러 종류가 함께 존재하는 것이 일반적이고, 여러 물질이 혼재하는 경우에는 개별 물질의 독성영향의 단순 합보다 증가하거나(synergism), 감소하게 되는(antagonism) 물질간의 상호작용이 존재할 수 있다(Rider and LeBlanc, 2005). 따라서 혼합독성에 대한 아무런 사전 정보없이 단일 화학물질을 이용한 독성시험의 결과를 이용하여 혼합물질의 독성영향을 부가적으로 예측하는 것은 부정확할 수 있다.

전술한 바와 같이 다양한 산업적 용도로 이용되어 산업적 활동의 부산물로서 환경으로 방출되는 시안과 이염화페놀은 산업폐수, 도시하수 등에 흔히 존재하는 대표적인 오염물질의 하나이다. 이들의 독성은 모두 물의 pH와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 시안의 경우 pH가 증가할수록 자유시안화물의 독성영향은 감소하게 되는데, 이는 자유시안화물 중에서 독성이 강한 시안화수소의 비율이 감소하기 때문이다(USEPA, 1985). 또한 염화페놀류 역시 물의 pH가 증가할수록 독성이 감소하게 된다. 염화페놀의 생체 전이는 이온화 되지 않은 경우에 주로 일어나는 것으로 알려져 있다. 이때, 염화페놀이 이온화 되는 비율은 pH가 증가할수록 감소하므로 생체전이속도는 pH가 증가할수록 느려지게 된다(Kishino and Kobayashi, 1996).

본 연구는 수서환경의 대표적인 오염물질의 하나인 시안(CN⁻)과 3, 5-이염화페놀(3, 5-Dichlorophenol)이 각각 개별적으로 존재하거나 혼재하는 조건에서의 발광박테리아 *Vibrio fischeri*에 대한 독성영향을 평가하였다. 이러한 실험결과를 통해 시안과 이염화페놀이 혼재하는 조건하의 독성영향을

예측하기위한 정량적인 모델을 작성하는 것이 가능하며, 실제 현장 시료에서 측정된 독성영향의 발현량과 이들 오염물질의 농도간의 관계에 대한 이해를 높이고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험미생물과 시약의 준비

발광박테리아 *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177)은 (주)네오엔비즈 환경안전연구소에서 배양하여 동결건조시킨 발광박테리아 시약(VF100[®], NeoEnBiz CO.)을 이용하였다. 본 연구에서는 발광박테리아 독성시험을 위하여 적당량의 시안화칼륨(KCN; CAS No. 151-50-8; Aldrich[®])과 3,5-이염화페놀(3,5-Dichlorophenol; CAS No. 591-35-5; Aldrich[®])을 시험물질로 이용하였다.

본 연구에서 실시한 시험생물과 시험방법의 적절성을 평가하기위한 양성대조구로는 시험물질인 3,5-이염화페놀과 별도로 6가 크롬과 아연을 추가하였다. 이들 세 물질은 ISO의 발광미생물 독성시험 표준규격인 ISO 11348에서 추천하는 물질로서 농도별 발광저해시험결과 EC20과 EC80의 범위 안에 3,5-이염화페놀은 3.4 mg/L, 6가 크롬은 18.7 mg/L, 그리고 아연은 2.2 mg/L 농도가 포함되어야만 시험적합도를 인정받을 수 있다(ISO, 1998). 양성대조구 실험을 위해서 시험적합도 기준 농도를 포함하여 각 물질별로 6개의 농도구간을, 그리고 각 농도별로는 4개의 반복구를 설정하였다.

2. 독성시험 방법

본 연구에서는 시안과 이염화페놀에 각각 노출시킨 발광박테리아의 발광저해영향시험(1차, 2차 실험: Exp-1 & Exp-2)과 시안과 이염화페놀의 혼합물에 대한 발광저해영향시험(3차 실험: Exp-3)을 수행하였다.

시안 단일물질에 대한 독성시험은 2회에 걸쳐 실시되었는데 1차 시험에서는 시안농도(CN⁻)를 0.5~28 mg/L 범위에서 일정간격으로 7 농도를, 2차 시험에서는 시안농도를 0.9~9.2 mg/L 범위에서 일정간격으로 6 농도를 제조하여 발광박테리아에 노출하였다. 3,5-이염화페놀 단일물질에 대한 독성시

험 역시 2회에 걸쳐 실시되었는데 1차 시험에서는 0.7~11.1 mg/L 범위에서 5 농도를, 2차 시험에서는 0.9~11 mg/L 범위에서 7 농도를 설정하여 노출하였다. 각 오염물질의 농도는 표준용액이 희석용액과 박테리아 주입에 의해 희석되는 비율을 조절하여 설정되었다.

단일물질에 대한 독성시험 결과를 이용하여 혼합독성시험을 위한 시안과 3,5-이염화페놀의 농도 조합을 설정하였다. 혼합독성시험(3차 실험)에서는 시안의 농도 0, 2, 4, 8 mg/L과 3,5-이염화페놀의 농도 0, 2, 4, 6, 8 mg/L을 4×5 조합으로 만들어 시험에 이용하였다.

발광박테리아 독성시험은 기본적으로 국제표준기구에서 작성한 국제표준 프로토콜을 따라 수행하였다(ISO, 1998). 실험과정을 간략하게 설명하면, 발광박테리아 시약에 재활성화용액 1 mL을 넣고 안정화시킨 후 100 μL를 약 40 mL의 희석시약에 넣고 잘 섞은 다음 독성실험을 실시하였다. 발광박테리아를 노출시킬 여러 농도의 시안과 3,5-이염화페놀의 검액은 폴리에틸렌재질의 96-well plate에 준비하였다. 각 농도별 반복수는 4개였고, 대조구의 경우 반복수는 8개였다. 발광박테리아 시약주입 및 발광도의 측정(주)네오엔비즈에서 자체 개발한 N-tox[®] system을 이용하였다. 이 시스템은 96-well plate 방식으로, 이를 이용하여 각 well에 담겨진 300 μL의 시료에 발광박테리아를 일정량(10 μL) 자동 주입하면서 노출이 시작되었다. 노출 시작 직후부터 발광도의 측정을 시작하여 총 60분 동안 3~5분 간격으로 측정하여 각 실험구별로 발광도의 변화를 추적하였다.

시험용액의 pH, 염분, 용존산소 등의 측정을 위해서 시험용액 제조에 이용한 것과 동일한 표준용액과 희석액 및 재활성화용액을 혼합하여 50 mL의 용액을 만들어 이용하였다.

3. 자료분석 방법

본 연구에서 상대발광도(relative luminescence; RL)는 대조구에 대한 실험구의 상대적인 발광도로서 아래와 같이 계산하였다.

$$RL = \frac{\text{실험구의 발광량}}{\text{대조구의 발광량}} \times 100 (\%)$$

모든 측정 결과는 평균만을 이용하였고, 평균과 함께 항상 표준편차를 계산하여 제시하였다. 시안과 이염화페놀에 각각 노출시킨 발광박테리아의 상대 발광율에 대한 시안과 3,5-이염화페놀의 반수영향 농도(EC₅₀)를 Probit method를 이용하여 각각 산출하였다(ISO, 1998).

각 유해물질의 농도를 독성치로 보정하여 나타낸 지수를 Toxic Unit(TU)이라고 한다. 따라서 여러 물질이 혼재하는 경우 각 물질의 TU를 계산하여 합한 값은 혼합물의 독성을 부가적으로 예측하는 방법의 하나로 이용된다. 본 연구에서는 TU를 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Toxic Unit(TU)} = \frac{\text{시험물질의 농도}}{\text{시험물질의 EC}_{50}}$$

따라서 어떤 시료내 모든 유해물질의 TU의 합이 1 이고 모든 물질의 영향이 부가적(additive)이라면, 그 시료에 노출된 시험생물의 영향정도는 50%가 된다.

결과 및 고찰

1. 시안의 발광저해 영향

다양한 농도의 시안에 노출한 직후 발광박테리아의 발광도는 1~3차 실험(Exp-1~3)에서 모두 노출 농도와 시간이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다(Figs. 1, 2). 노출 시간이 30분 경과한 시점에 시안의 각 농도별 발광도는 최저값에 도달하였고, 그 이후에는 일부 농도에서 발광도가 회복되는 경향이 관찰되었다(Figs. 1, 2).

일부 농도구간에서의 발광도 회복현상에 의해 발광박테리아에 대한 시안의 반수영향농도의 변화 곡선은 1~3차 실험에서 모두 노출 직후에서 30분까지는 감소하다가 30분 경과 후 60분까지는 다시 증가하는 U자형 패턴을 보였다(Fig. 2). 반수영향농도(EC₅₀)는 1차 실험에서 10분과 30분 노출 시 2, 3차 실험과 비교해 다소 높았으나 60분 노출시에는 2차 실험결과와 유사한 수준을 보였다(Table 1).

이처럼 시안에 노출된 발광박테리아의 상대발광도가 30분 노출시간을 전후로 회복되는 것은 시안

화수소(HCN)가 매우 휘발성이 크다는 화학적 특성과 관계가 있을 것으로 추정된다(USEPA, 1985). 실제로 시안의 독성은 대부분 시안화수소에 의해서 좌우되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서처럼 KCN을 수용액에 용해하는 경우에, KCN은 이온화되고 가수분해되어 CN⁻와 수산화기(OH⁻) 그리고 시안화수소를 형성하게 된다. 이때 시안화이온과 시안화수소의 비율은 pH나 온도와 같은 물리적 조건에 의해 결정된다. 예를 들어 물의 pH가 8 이하고 온도가 25도 이하면 대부분의 자유시안화물은 HCN으로 존재하게 된다. 하지만 pH와 온도가 증가함에 따라 HCN의 비율은 감소하게 된다.

본 연구에서 비록 HCN을 물에 용해하지는 않았지만 KCN이 가수분해되어 형성된 HCN이 공기중으로 휘발되어 시안의 농도는 노출시간이 경과함에 따라 감소하였고, 낮은 농도의 시안에 노출되어 생리적 저해가 일어났으나 저해의 정도가 치사에 이를 정도는 아니었던 발광박테리아는 시안이 휘발된 이후 발광도의 회복을 보인 것으로 추정된다. 하지만 일정 수준 이상의 시안에 노출된 발광박테리아는 1차 실험에서 14, 28 mg/L에 노출된 경우처럼 완전히 사망하거나, 2차 실험에서 9.2 mg/L에 노출된 경우처럼 세포의 회복되기 힘든 정도의 기능적 손상을 입은 것으로 보인다.

2. 염화페놀의 발광저해 영향

3,5-이염화페놀에 노출된 발광박테리아의 상대적인 발광도 저해영향은 1, 2차 실험의 경우 가장 낮은 농도인 0.7과 0.9 mg/L에서도 유의하게 나타난 반면(Fig. 3), 3차 실험에서 2 mg/L에 노출된 박테리아는 노출 30분 경과시까지 10% 내외의 발광저해도를 보이다가 이후 회복되어 대조구와 유의한 차이를 보이지 않아 1, 2차 실험결과와 다소 차이를 보였다(Fig. 4). 하지만 그 이상의 농도 범위에서는 모든 실험에서 일정한 농도-반응의 관계를 보여 실험간의 반수영향농도의 차이가 시안에 비해 다소 적었다(Table 1).

고농도(>4 mg/L)의 3,5-이염화페놀에 노출된 발광박테리아의 상대발광도는 노출시간에 따라서 지속적으로 감소하는 특징을 보여 반수영향농도 역시 모든 실험에서 노출시간에 따라 감소하였다. 하지만 시간별 반수영향농도의 변이폭은 시안과

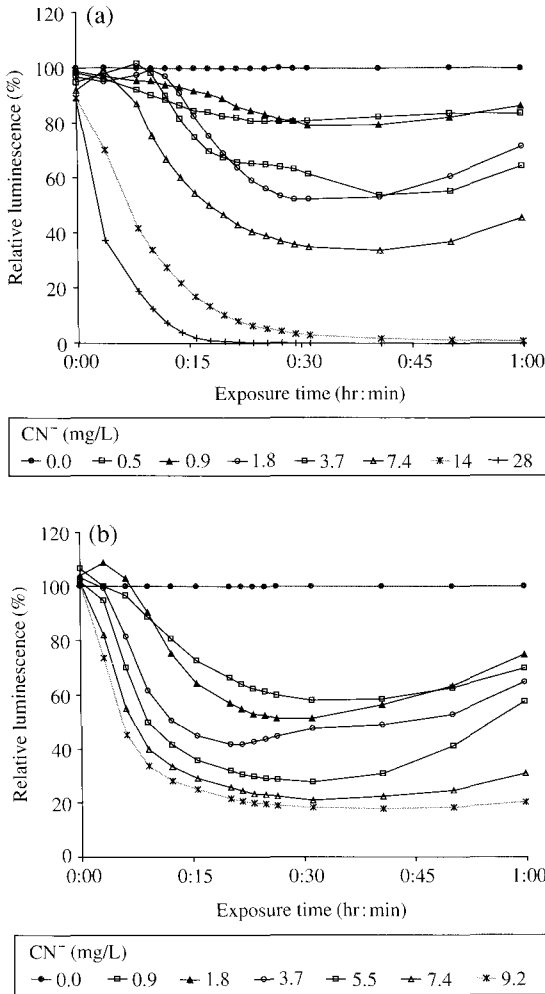


Fig. 1. Temporal variation of relative luminescence of *Vibrio fischeri* exposed to various concentrations of cyanide (in KCN) from (a) 1st and (b) 2nd experiment (Exp-1 and Exp-2).

비교해 크지 않았다(Table 1).

3. 시안과 염화페놀의 혼합독성

발광박테리아가 시안과 3,5-이염화페놀(DCP)의 혼합물에 10분 또는 30분 노출된 경우 상대발광도는, DCP의 농도가 0 mg/L인 경우 시안농도가 증가함에 따라 감소하는 경향이 뚜렷하게 나타났다(Fig. 5). 3,5-이염화페놀의 농도가 2 mg/L인 경우에는 시안농도가 0인 경우에 비해 시안이 2 mg/L인

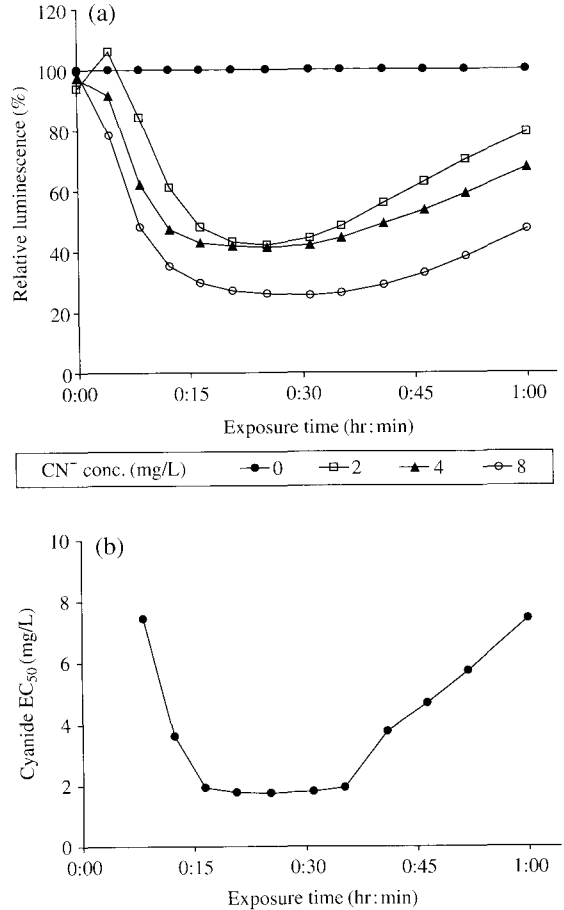


Fig. 2. Temporal variation of (a) relative luminescence of *Vibrio fischeri* exposed to various concentrations of cyanide (in KCN) and (b) median effect concentration (EC_{50}) of cyanide for *V. fischeri* from 3rd experiment (Exp-3)

Table 1. Median effect concentration (EC_{50}) of cyanide (CN) and 3,5-dichlorophenol (DCP) when test microbes (*Vibrio fischeri*) were exposed to single chemicals, respectively, for 10, 30 and 60 min

		EC_{50}		
		10 min	30 min	60 min
CN	Exp-1	11.3	3.1	4.4
	Exp-2	5.6	1.8	4.5
	Exp-3	3.6	1.8	7.4
DCP	Exp-1	8.4	5.0	4.3
	Exp-2	5.4	4.2	3.4
	Exp-3	4.7	4.1	4.0

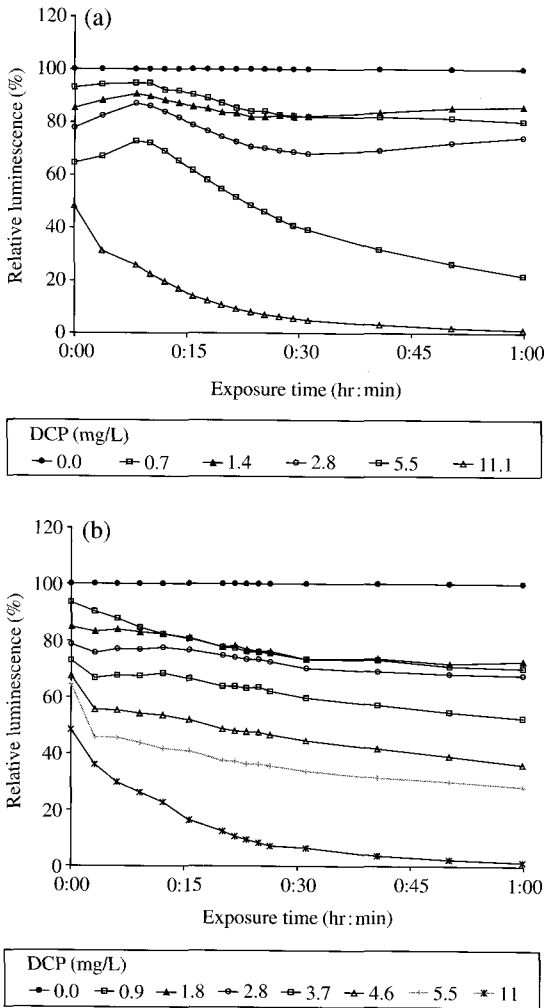


Fig. 3. Temporal variation of relative luminescence of *Vibrio fischeri* exposed to various concentrations of 3,5-dichlorophenol (DCP) from (a) 1st and (b) 2nd experiment (Exp-1 and Exp-2).

경우에 발광도가 급격하게 감소하였다가 4 mg/L 이상에서는 큰 변화가 없었다. 하지만 DCP가 4 mg/L 이상인 경우에는 시안이 없는 경우 상대발광도가 50%로 크게 떨어졌고, 시안이 2 mg/L으로 증가했을 때 다시 급격한 발광도 감소를 보인 반면, 시안이 4와 8 mg/L으로 증가하였을 때는 오히려 발광도가 다소 증가하는 역전 현상을 보였다(Fig. 5). 이와 같은 역전현상은 DCP가 6과 8 mg/L일 때 더욱 뚜렷하게 나타났다(Fig. 5).

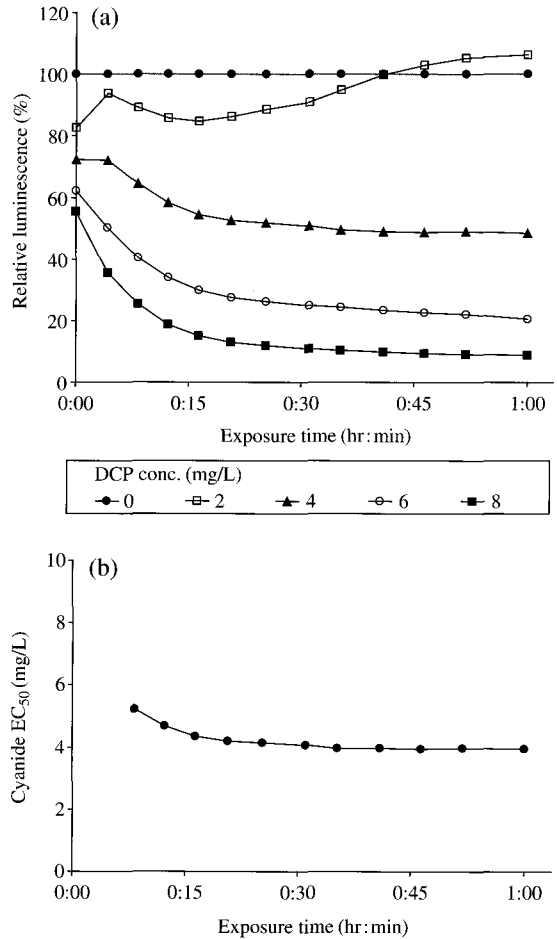


Fig. 4. Temporal variation of (a) relative luminescence of *Vibrio fischeri* exposed to various concentrations of 3,5-dichlorophenol (DCP) and (b) median effect concentration (EC₅₀) of 3,5-Dichlorophenol for *V. fischeri* from 3rd experiment (Exp-3).

보다 정량적으로 두 물질간의 독성상호작용을 규명하기 위하여 각 물질의 농도를 Toxic Unit (TU)으로 환산한 다음 각각의 TU를 합하여 발광박테리아의 상대발광 저해도와 비교하였다(Fig. 6). 발광 박테리아가 10분간 노출된 경우 시안이 0 또는 2 mg/L인 경우 DCP의 농도가 0에서 8 mg/L으로 증가하는 경우에는 TU 합의 증가에 따라 발광저해도가 일정하게 비례하였으나 시안 농도가 4 또는 8 mg/L으로 증가한 이후에는 TU의 변화와 발광저해도는 유의한 관계성이 나타나지 않았다(Fig. 6).

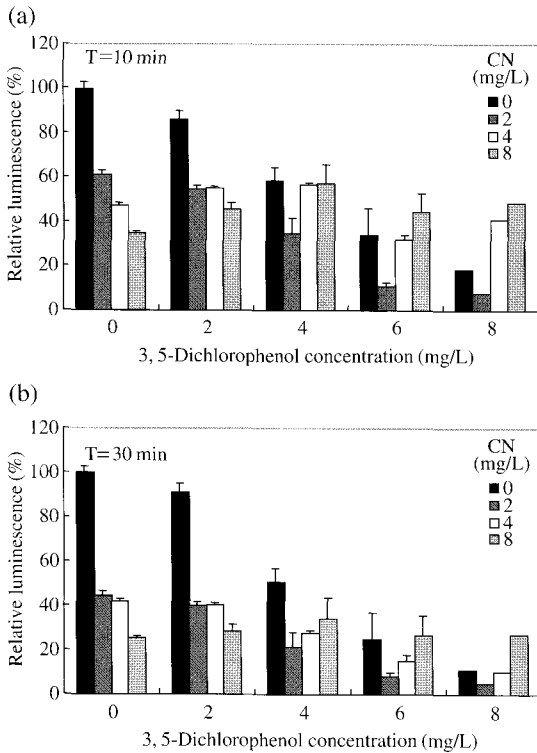


Fig. 5. The relative luminescence (%: RL) of *Vibrio fischeri* exposed to 0, 2, 4 and 8 mg/L of cyanide simultaneously with 0, 2, 4, 6 and 8 mg/L of 3, 5-dichlorophenol (DCP), respectively for (a) 10 min and (b) 30 min from 3rd experiment (Exp-3).

발광박테리아가 30분간 노출된 경우에는 시안이 2 mg/L인 경우 동일한 TU에서 관찰되는 발광저해도가 시안이 0인 경우와 비교해 다소 낮았지만, TU와 저해영향 간의 유의한 관계성은 10분 노출 시와 마찬가지로 유의하게 나타났다(Fig. 6). 시안이 4 mg/L으로 증가한 경우에는 동일한 TU에서 나타나는 저해영향은 매우 낮아졌지만, TU의 증가에 따라 저해도가 증가하는 유의한 관계성은 나타났다. 하지만 시안이 8 mg/L으로 증가한 이후에는 유의한 관계성이 사라지는 특징을 보였다.

이처럼 시안과 3,5-이염화페놀이 혼재하는 경우 특히 시안의 농도가 4 mg/L 이상인 경우 뚜렷한 독성영향의 길항작용(antagonism)이 나타나는 이유로 추정되는 것은 시안에 의한 시료의 pH 변화를 들 수 있다. 본 연구에서 희석액을 이용한 발광박테리아 대조구의 pH는 7.0이었다. 하지만 시안 농

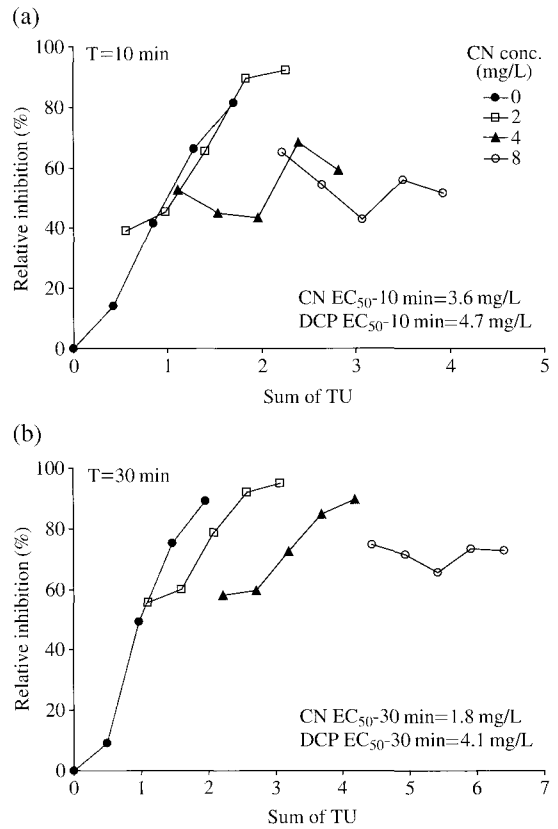


Fig. 6. between relative inhibition of luminescence by *Vibrio fischeri* and sum of toxic unit (TU) for the mixture of cyanide and 3, 5-dichlorophenol incubated for (a) 10 min and (b) 30 min. Toxic unit is defined here as a ratio of chemical concentration to EC₅₀ from 3rd experiment (Exp-3).

도가 2, 4, 8 mg/L인 경우 시료의 pH가 8.0, 8.5, 9.1로 각각 크게 증가함을 관찰할 수 있었다. 이처럼 시안이 첨가된 시료에서 pH가 증가하는 것은 아래와 같은 반응으로 용액내에 OH⁻ 이온이 생성되기 때문이다.



물에 용해된 KCN은 모두 해리되어 시안이온이 생성되는데, 시안이온은 가수분해되어 시안화수소와 함께 수산화기를 생성하게 된다. 본 연구에서 실측된 pH 값은 순수한 용액에서 예상되는 pH 값과 차이를 보였다. 다른 영향이 없다면 pH는 시안 농도가 2, 4, 8 mg/L인 경우 각각 9.5, 9.7, 9.8로 계

산된다. 이와 같은 차이는 실험에 이용한 시료에는 발광박테리아시약, 재활성화 용액, 회석용액에 함유되어있는 NaCl 등의 화합물이 혼합되어 완충효과가 나타났기 때문으로 판단된다. 특히 발광박테리아 시약에는 효모추출액, 글리세롤, Caso-peptone 외에도 5종류의 화합물이 고농도로 포함되어있어 400배 정도 회석됨에도 불구하고 이온균형에 어느 정도 영향을 미칠 것으로 판단된다.

일반적으로 3,5-이염화페놀의 독성영향은 pH 변화에 따라 달라질 수 있다. 3,5-이염화페놀은 수용액에서 이온화 될 수 있는 화합물로서, pH에 따라서 이온화되는 정도가 달라지게 된다. 시료의 pH가 낮아지면 이온화되지 않은 형태의 비율이 늘어나고, pH가 높아지면 이온화된 형태의 비율이 늘어나게 된다. 이온화된 3,5-이염화페놀은 그렇지 않은 경우와 비교해서 생체전이 속도가 매우 느리므로 3,5-이염화페놀의 생물이용도는 pH가 낮을수록 커지게 된다(Kishino and Kobayashi, 1995). 생물이 받는 독성영향은 생체축적된 3,5-이염화페놀의 양에 비례하므로 3,5-이염화페놀의 독성영향 역시 pH에 따라 변하게 된다. 이온화되지 않은 3,5-이염화페놀의 비율(R)은 아래의 식으로 계산할 수 있다.

$$R(\%) = \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} \times 100$$

3,5-이염화페놀의 산해리상수 K_a 값은 문헌에서 $10^{-8.1} \sim 10^{-8.26}$ 으로 보고하고 있다(Escher and Schwawzenbach, 1996; Kishino and Kobayashi, 1996; Lee *et al.*, 2006). 상기 관계식에서 알 수 있듯이, 시료의 pH에 따른 R 값의 변화는 pH가 pK_a 값과 유사해지는 구간, 즉 3,5-이염화페놀의 경우 pH가 7~9인 구간에서 급격한 변화를 보인다(Fig. 7). 이러한 pH 범위는 본 연구에서 시안 첨가에 따른 시료 pH 변화 범위와 거의 일치하고 있어 시안 첨가에 따른 pH 변화가 이염화페놀의 독성발현에 매우 큰 영향을 미쳤음을 예상할 수 있다.

염화페놀류는 대부분 pH 변화에 따라 생물이용도와 독성영향이 변화할 수 있지만 치환된 염소의 개수에 따라서 pK_a 값이 다르므로 이온화 되지 않은 형태의 비율이 변화하는 구간 역시 차이가 있다(Fig. 7). 즉, pK_a 값이 4.7인 Pentachlorophenol의 경우에는 pH가 3에서 6까지 증가하는 과정에서 R

값이 크게 감소하고, pK_a 값이 5.2~6.9의 범위를 보이는 Tetrachlorophenol과 Trichlorophenol류는 pH가 5~8 범위에서, Dichlorophenol류는 pH가 7~9 범위에서 급격한 감소가 일어남을 알 수 있다.

실측된 pH 값과 문헌상의 평균 K_a 값($10^{-8.2}$)을 이용하여 시안농도별로 R 값을 계산해보면, 시안농도가 0일 때는 94%로 3,5-이염화페놀의 대부분이 이온화되지 않은 형태로 존재하지만 시안농도가 2 mg/L인 경우에는 61%, 4 mg/L인 경우에는 33%, 8 mg/L인 경우에는 11%로 이온화되지 않은 형태의

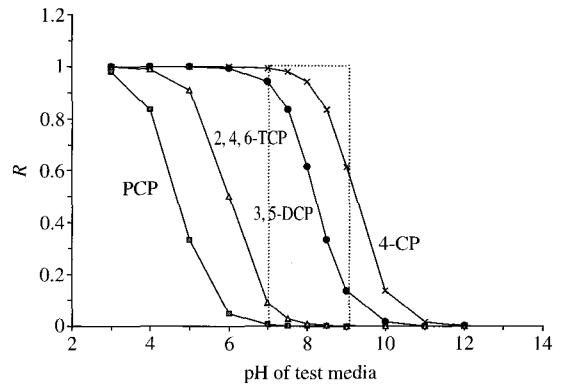


Fig. 7. Change of the fraction of unionized form of 3,5-dichlorophenol (R) according to the change of pH in test media. Dotted rectangular box shows the range of pH change due to cyanide spiking in this study.

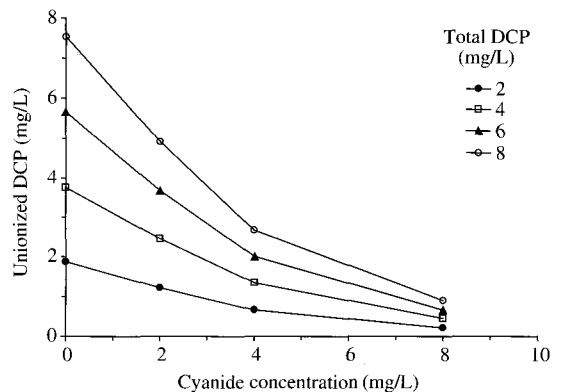


Fig. 8. Change of unionized concentrations of 3,5-dichlorophenol (DCP) along the increase of cyanide concentration in test media from 3rd experiment (Exp-3).

비율이 급격하게 감소함을 알 수 있다. 따라서 3, 5-이염화폐놀의 총농도가 모두 8 mg/L인 경우라 하더라도 시안농도가 0, 2, 4, 8 mg/L으로 증가함에 따라 이산화되지 않은 3, 5-이염화폐놀의 농도는 각각 7.5, 4.9, 2.7, 0.9 mg/L으로 큰 차이를 보이게 됨을 알 수 있다. 이에 따라 시안 농도가 8 mg/L인 경우에는 이산화되지 않은 3, 5-이염화폐놀의 농도가 각 실험구별로 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다(Fig. 8).

본 연구에서는 시안 농도 증가에 따라 이염화폐놀 독성이 크게 감소할 수 있고 그 원인이 시안에 의한 pH 증가에 있음을 설명하였다. 이와 같은 상호작용에 대한 연구결과는 실제 현장 시료에서 나타날 수 있는 유해물질 오염과 독성발현 정도를 이해하는 데에 도움을 줄 수 있다. 특히 본 연구를 통해 이염화폐놀과 같이 pH 변화에 민감한 유해물질의 경우에는 반드시 이산화정도를 고려하여 그 물질의 독성영향을 파악하고, pH에 영향을 미칠 수 있는 다른 요인에 대한 고려가 필요함을 알 수 있었다.

염화폐놀류와 같이 시료의 pH 변화에 따라서 생물이용도가 변화할 수 있는 유해물질은 금속류, 암모니아, 시안 등 매우 다양하다. 시안과 같이 약염기로서 pH를 상승시킬 수 있는 물질이 다량 함유된 시료에서는 염화폐놀류의 독성영향은 감소할 수 있지만, 암모니아의 독성영향은 오히려 증가될 수 있으므로 혼합물의 독성영향을 예측하는 것은 그리 간단한 일은 아니다. 또한 금속류와 시안이 혼재하는 경우에는 시안에 의한 pH 변화와 더불어 시안화금속 화합물의 형성이 시안과 금속류의 생물이용도에 모두 영향을 미칠 수 있으므로 더욱 복잡하다. 따라서 현장 시료의 독성영향은 시료내에 존재하는 유해물질의 농도를 모두 분석한다 하여도 정확하게 예측하는 것은 매우 어렵다. 물론 생물학적 위해를 가할 수 있는 모든 유해물질의 농도를 분석하는 것 자체도 가능하지 않다. 개별 유해물질 및 혼합물의 독성영향에 대한 실험실적 연구는 유해물질의 잠재적인 영향농도범위를 산출하고 수질 기준을 작성하기 위한 기초자료로서 반드시 수행되어야 할 필요가 있지만, 산업폐수와 같은 현장 시료에 대한 독성모니터링은 수서생태계 보호를 위한 최소한의 안전장치로서 유해물질 농도분석과 더불어 반드시 수행될 필요가 있다.

4. 새로 개발된 발광미생물 독성평가기기의 활용 검증

혼합독성을 정량적으로 평가하기 위해서는 단순히 두 가지 독성물질의 경우만 보더라도 각각 5개 농도구간에서 혼합독성을 평가하기 위해서는 총 25개의 농도에서 각각 독성영향을 평가해야만 한다. 따라서 n 개의 물질에 대한 혼합독성을 m 개의 농도구간에서 평가하기 위해서는 m^n 개의 농도에서 독성시험을 수행해야 한다. 따라서 혼합독성을 평가하기 위한 시험부담을 감당하기 위해서는 보다 효율적인 시험방법이 개발될 필요가 있다. 본 연구에 활용된 N-tox[®] 독성평가 시스템은 현재 개발된 독성시험법중에서 가장 효율적인 시험방법이라고 할 수 있기 때문에 혼합독성에 대한 정량적인 평가를 위해서 손쉽게 활용할 수 있었다.

본 연구에서 활용한 N-tox[®] 독성평가 시스템의 독성검출 성능을 평가하기 위해서 실시한 양성대조구 시험결과 3, 5-이염화폐놀(mg/L)의 EC20은 2.6, EC80은 11.5이었고, 6가 크롬(mg/L)의 경우 EC20은 3.2, EC80은 27.3이었으며, 아연(mg/L)의 경우 EC20은 1.1, EC80은 7.2로 나타났다. 따라서 각각의 물질은 ISO (1998)에서 제시하는 기준치인 3.4, 18.7, 그리고 2.2 mg/L를 범위 안에 포함하고 있어, N-tox[®] 시스템을 이용한 발광미생물 독성시험은 유해물질 민감도 및 반응성의 측면에서 문제가 없는 것으로 판단할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부의 '해양수산 중소·벤처 기업 기술개발지원사업'의 지원을 받았으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

이규태, 마이크로톡스 생물검정법의 실험방법 개량과 현장 적용에 관한 연구, 서울대학교 대학원 박사학위논문 2002; 161.
 Brix KV, Cardwell RD, Henderson DG and Marsden AR. Site-specific marine water-quality criterion for cyanide, Environ Toxicol Chem 2000; 19: 2323-2327.
 Irwin RJ, VanMouwerik M, Stevens L, Seese MD and Ba-

- sham W. Environmental Contaminants Encyclopedia. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado, 1998.
- International Standard Organization. 1998, Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test), ISO standard 11348.
- Kishino T and Kobayashi K. Relationship between toxicity and accumulation of chlorophenols at various pH, and their absorption mechanism in fish, *Wat Res* 1995; 29: 431-442.
- Kishino T and Kobayashi K. Studies on the mechanism of toxicity of chlorophenols found in fish through quantitative structure-activity relationships, *Wat Res* 1996; 30: 393-399.
- Escher BI and Schwarzenbach RP. Partitioning of substituted phenols in liposome-water, biomembrane-water, and octanol-water systems, *Environ Sci Technol* 1996; 30: 260-270.
- Lee YG, Hwang SH and Kim SD. Prediction the toxicity of substituted phenols to aquatic species and its changes in the stream and effluent waters, *Arch Environ Contam Toxicol* 2006; 50: 213-219.
- Hsieh CY, Tsai MH, Ryan DK and Pancorbo OC. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox[®] chronic toxicity test, *Sci Total Environ* 2004; 320(1-5): 37-50.
- Salizzato M, Pavoni B, Ghirardini AV and Ghetti PF. Sediment toxicity measured using *Vibrio fischeri* as related to the concentrations of organic (PCBs, PAHs) and inorganic (metals, sulphur) pollutants, *Chemosphere* 1998; 36(14): 2949-2968.
- Onorati F and Mecozzi M. Effects of two diluents in the Microtox[®] toxicity bioassay with marine sediments, *Chemosphere* 2004; 54(5): 679-687.
- Rider CV and LeBlanc GA. An Integrated Addition and Interaction Model for Assessing Toxicity of Chemical Mixtures, *Toxicol Sci* 2005; 87(2): 520-528.
- USEPA. Ambient water quality criteria for Cyanide, U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development. Duluth, Minnesota Narragansett, RI, USA, 1985.
- Zwart DD and Slooff W. The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants, *Aqua Toxicol* 1983; 4(2): 129-138.