

다양한 생물 검정법에 근거한 비소의 위해성 평가 비교

Bioassessment and Comparison of Toxicity of Arsenics based on the Results of Various Bioassays

공인철 · 권효정 · 고경석*[†]

In Chul Kong · Hyojung Kwon · Kyung-Seok Ko*[†]

영남대학교 환경공학과 · *한국지질자원연구원 지구환경연구본부

Department of Environmental Engineering, Yeungnam University

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

(2010년 10월 28일 접수, 2010년 8월 30일 채택)

Abstract : The acute toxicity of arsenic compounds was assessed and compared using following four bioassays; bioluminescence activity of the recombinant strain RB1436, germination of four different seeds, α -glucosidase activity produced by *Bacillus lichemiformis*, acute genetic revertant mutation using mutant strain *Salmonella typhimurium*. Different sensitivities were observed among tested bioassays, but generally the toxicity by arsenite was greater than that of arsenate. Among tested four seeds, sensitivities of *Lactucus* and *Raphanus* were greater than others, and these two seed types were appeared as proper type for bioassay. High revertant mutation ratio (5.1) was observed with 1 mg/L arsenite, indicating high mutagenicity. The sensitivity of α -glucosidase activity on arsenic compounds was much lower than other methods. The evaluation of interactive toxic effects using various bioassays may comprise a useful tool for the bioassessment of environmental pollutants.

Key Words : Bioassay, Bioluminescence, Revertant Mutation, Enzyme Activity, Seed Germination

요약 : 본 연구에서는 4종류의 상이한 생물 검정법(유전자 재조합 균주 RB1436 발광 활성, 4종 씨앗 발아, *Bacillus lichemiformis*의 α -glucosidase 효소 활성, *Salmonella typhimurium*이용한 Ames test)을 이용하여 비소 화합물의 독성을 평가하였다. 검정법에 따라 상이한 민감도를 보였지만, 전체적으로 As(III)가 As(V)보다 높은 독성을 나타내었다. 씨앗 4종의 발아에 대한 민감도는 씨앗에 따라 상이하게 조사되었다. 상추(*Lactucus*)와 알타리무(*Raphanus*) 씨앗종이 대체적으로 높은 민감도를 보였으며 검정법에 적절한 씨앗종으로 조사되었다. 유전자 변이 검정법에서는 As(III)에 대해서는 1 mg/L 농도에서 TA 98 균주는 높은 복귀돌연변이 현상(MR = 5.1)이 조사되어, 높은 발암 가능성을 나타내었다. 비소화합물에 대해서 방법별 민감도는 일반적으로 효소 이외에는 높은 민감도를 나타내었다. 다양한 급성 독성 생물 검정법에 대한 통합 자료는 향후 오염원에 대한 독성 생물 평가에 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

주제어 : 생물검정법, 생물발광, 복귀 돌연변이, 효소활성, 씨앗 발아

1. 서론

현대사회의 산업 발달과 도시화는 다양한 중금속들에 의한 인위적 환경 오염을 증가시키고, 이러한 오염은 일부 지역에 심각한 위험성 문제를 유발한다. 많은 중금속 중에서 As, Cd, Cu, Cr, Co, Hg, Pb, Se, Zn 등은 물, 대기, 토양 환경 등의 다양한 이동 매체를 통해서 생태계에 축적되어 잠재적으로 인간을 비롯한 유기 생명체에 치명적인 피해를 입힐 수 있다.^{1,2)} 이러한 중금속 오염원들 중에서 특히 비소는 인체 및 생태계에 매우 유해한 금속으로 알려져 있으며, 높은 독성으로 인해서 세계보건기구(WHO)에서는 음용수에서의 비소농도 권고치를 10 ppb로 정하였고,³⁾ 우리나라는 50 ppb로 기준이 정하여져 있다. 또한 많은 국가들이 음용수에서의 비소의 기준농도를 강화하고 있는 추세이며, 최근에는 유럽연합, 미국, 일본, 베트남 등의 국가가 10 ppb로 비소 기준농도를 수정하고 있다. 지하수 비소 오염은 중국과 인도 등을 포함한 다양한 국가에서 큰 문제로 부각되고

있다.⁴⁾ 환경에서 산화환원력에 따라 무기비소는 일반적으로 +3가(arsenite)와 +5가(arsenate)로 존재하며, 호기성과 혐기성 조건에서는 각각 As(V)와 As(III)가 주된 형태이다.⁵⁾ As(III)가 As(V)보다 독성이 높고, 유기비소의 경우는 무기 비소보다 독성이 적은 것으로 알려져 있다.⁶⁾ As(III)의 높은 독성은 효소를 포함한 생화학물질(e.g., glutathione, lipoic acid)의 -SH 그룹과의 친화도에 기인하는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ As(III)은 As(V)보다 이동성이 높고, 오염된 지하수에서 비소를 제거함에 있어서도 As(III)은 As(V)보다 처리 효율이 낮다.⁸⁾

오염 토양이나 지하수 생태계의 독성 물질들이 미치는 오염 정도 및 영향을 규명하는 것은 오염으로 인한 위해성, 생태계 복원 및 관리를 위한 필수적 과정이다. 생물검정법(bioassay)은 오염원이 생태계에 미치는 위해성을 결정하기 위한 중요한 정보를 제공하며, 독성 물질에 대한 생물의 반응 및 변화를 통해 오염도를 나타내는 것으로 화학적 방법에 비해 측정 및 분석의 편리성, 시간 단축 및 비용의 저렴

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

성, 무엇보다도 생물이용성(bioavailability)을 측정한다는 장점을 가진다. 오염원에 대한 급성독성법으로는 척추 및 무척추 동물, 식물, 어류, 조류, 박테리아 등 다양한 생물체와 상이한 측정종말점(씨앗 발아 및 성장, 치사율, 출산율, 먹이 섭취, 이동성, 호흡량, 생장, 유전자 변이, 효소 활성 등)에 근거하여 오염원의 환경독성 정도를 평가한다.⁹⁾ 환경 급성독성법을 이용하여 오염원에 대한 위해 정도를 조사할 때의 중요한 문제점은 생물종에 따라 일반적으로 오염원에 대한 민감도가 상이할 수 있다는 점이다.¹⁰⁾ 따라서 단일방법에 의한 평가보다는 다양한 방법에 근거한 오염원 독성 평가 접근법이 필요하며, 생물종에 따라 상이한 민감도에 의한 생물 검정법 결과의 통합은 오염원 혹은 오염 환경의 모니터링에 더욱 적절한 정보를 제공해 줄 것이다.¹¹⁾

본 연구에서는 비소 화합물의 독성을 4종류의 상이한 독성법을 이용하여 조사하였다. 사용한 방법은 (1) 유전자 재조합 발광 균주인 RB1436의 발광 활성, (2) 상이한 4종류(genera)의 씨앗 발아, (3) *Bacillus licheniformis*에 의해 생성된 α -glucosidase의 효소 활성, (4) 단기간 유전자 생물검정법인 *Salmonella typhimurium* 변이 균주 유전자 복귀 돌연변이원성에 근거한 Ames test이며, 동일한 비소 화합물에 대해 상이한 생물 검정법에 의한 위해성을 통합적으로 평가하고자 하였다.

2. 실험방법 및 재료

2.1. 생물발광 생물검정법

물질대사 과정 중 발광을 생산하는 유전자 재조합 균주 *E. coli* RB1436을 사용하여 독성을 평가하였다. RB1436은 pUCD615 플라스미드 내의 염기 제거(deletion)에 의해 *lux-gene*이 충분히 발현될 수 있도록 constitutive promoter가 *lux-gene*에 근접하게 위치한 균주이다. 20% glycerol 용액으로 -70°C 초저온고(model DF9007, Ilshin Lab Tech. Co.)에 보관한 균주를 Luria-Bertani (LB) 배지(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, 2 N NaOH 0.5 mL per 1 L, pH 7.2)에 계대 배양하여 사용하였다. 실험을 위해 27°C, 130 rpm 조건에서 LB배지에 overnight 배양 후 다시 LB배지에 1:20 희석하여 O.D₆₀₀=0.6이 될 때까지 재배양하였다. 균주를 MSM (minimum salt medium: MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, CaCl₂ 0.1 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.05 mg, NaMoO₄ · 2H₂O 0.25 mg, K₂HPO₄ 0.43 g, KH₂PO₄ 0.23 g per 1 L)으로 O.D₆₀₀=0.1~0.2로 희석하여 27°C에서 1시간 동안 활성화 한 후 사용하였다. RB1436은 kanamycin 저항유전자(Km^r)를 보유하고 있으므로 LB배지에 kanamycin을 50 mg/L 첨가하였다.

독성 측정은 발광 활성영향에 근거하여 측정하였으며, 균주(1 mL)에 시료(9 mL)를 노출 시킨 후 배양 1시간과 1시간 30분의 발광강도를 측정하여 평균값을 이용하였다. 발광

은 시료 400 μ L을 채취한 후 Luminometer (TD 20/20, Turner Designs, USA)를 이용하여 측정하였으며, 발광 강도 단위는 relative light unite (RLU)이며, 최대 측정 한계치는 9,999 RLU이다.

2.2. 씨앗 발아 생물검정법

씨앗 발아 검정법에 사용한 씨앗은 일반 경작용 식물 중에서 US. EPA¹²⁾ 및 OECD 등의 공인 기관에서 추천하는 4종류의 식물 씨앗을 선택하였다: *Lactuca sativa* L.(상추), *Raphanus sativus* L.(알타리무), *Cucumis sativus* L.(오이), *Cardamine yezoensis* Maxim.(춘채). 씨앗은 실험 전에 3% 과산화수소로 표면을 소독하고 증류수로 한 번 더 세척하였다. 펠트리 접시(90×15 mm)에 필터(advantec filter paper No. 2)를 깔아 상이한 농도의 시료 용액(시료군) 5.0 mL를 주입하고, 세척한 20개의 씨앗을 정렬해 놓은 후 파라필름으로 밀봉하여 23°C, 암소에서 배양하였다. 대조군으로는 5 mL의 멸균수를 사용하였으며, 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다. 결과는 배양한 시점으로부터 3일이 경과하여 뿌리가 2 cm 이상 나온 것을 발아한 것으로 간주하였으며, 대조군에 대한 실험군의 발아개체수를 백분율로 환산하여 나타내었다.

2.3. 효소활성 생물 검정법

*Bacillus licheniformis*에 의해 생산된 α -glucosidase의 효소 활성에 대한 영향을 측정 종말점으로 이용하였다. 균주는 20% glycerol 용액으로 -70°C 초저온고에 보관하였다. 계대 배양을 위해 35°C, 100 rpm 조건에서 생장 배지(trypticase soy-broth without dextrose 27.5 g, yeast extract 5 g, polyoxyethylene sorbitan monooleate/Tween 80 10 g per 1 L)에 overnight 배양 후 다시 1:20 희석하여 O.D₅₅₀=0.6~0.8이 될 때까지 재 배양하여 maltose(최종농도 2% w/v)를 주입하여 3시간 동안 배양하였다. 재배양 균주를 3,000 rpm에서 15분간 1차 원심분리하고 상등액을 제거한 뒤, 0.85% NaCl로 세척 및 2차 원심분리하고 상등액을 제거한 침전물을 1% trehalose 용액으로 O.D₅₅₀=0.5 정도까지 희석하여 용기에 소량씩 분배하여 초저온고에 보관하고 필요시마다 실온에서 해동하여 사용하였다.

시험관에 효소함유 현탁액 0.1 mL, 오염원 함유 시료 0.9 mL를 혼합 후, 35°C, 100 rpm조건에서 1시간 동안 노출하였다. 96-well microplate의 각 well에 혼합액 0.2 mL와 Z-buffer 용액(Na₂HPO₄ · 7H₂O 16.1 g, NaH₂PO₄ · H₂O 5.5 g, KCl 0.75 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.25 g) 60 μ L, 발색제 PN α G 용액(*p*-nitrophenyl-or-D-glucoside chromogen 0.5 g/Z-buffer 100 mL) 40 μ L를 주입하여 35°C에서 배양하였다. 대조군이 무색(PN α G)에서 효소활성에 의해 노란색으로 변하면 405 nm에서 microplate reader (MB Plate Reader; ELISA Reader)를 이용하여 흡광도를 측정하여, 대조군과 비교한 흡광도 백분율로 나타내었다.

2.4. 유전자 복귀돌연변이 생물검정법

본 연구에서는 돌연변이원성 시험의 스크리닝 시험으로 가장 많이 이용되고 있는 단시간 변이 측정법 Ames test을 이용하였다. *Salmonella typhimurium* 야생형 균주(wild type)는 아미노산 히스티딘이 없는 조건에서도 생장할 수 있는 히스티딘 비요구성(his⁺)이다. 본 연구에서 사용한 *Salmonella* 변종들(TA 98, TA 100)은 인위적 변이(pre-existing mutations)에 의해 히스티딘을 합성할 수 없어 생장을 위해서는 히스티딘을 요구하는 히스티딘 요구성(his⁻) 균주로 ampicillin 저항 유전자를 보유하고 있다.

TA98 균주와 TA100 균주에 대한 유전 특성이 정상적으로 발현되는지를 확인하기 위해서는 양성 대조군 실험을 수행할 필요가 있다. 양성대조군 물질로 사용할 2-nitrofluorene (TA98 : 2.5 µg/plate)와 sodium azide (TA100 : 5 µg/plate)의 적정 농도를 확인하였다. 양성대조물질 용매로 dimethyl sulfoxide (DMSO)와 증류수를 사용하였고, 1~100 µg/plate의 농도로 실험을 수행하였다.

본 실험에서는 초저온고에 보관되어 있는 *Salmonella typhimurium* 균주를 nutrient agar plate에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 배양된 균주는 nutrient broth No. 2 (Oxoid nutrient broth #2 25 g per 1 L) 20 mL에 접종하여 37°C, 110 rpm의 조건에서 overnight 배양한 후, 1:100의 비율로 희석(O.D₅₄₀=0.1~0.2)하여 실험에 사용하였다. 균주 0.1 mL, 양성대조물질 0.05 mL와 buffer 0.5 mL를 top agar (NaCl 6 g, agar 6 g, 0.5 mM histidine/biotin solution 100 mL, water 900 mL)에 완전히 혼합 후, GM agar plate (minimal glucose agar plate: VB salts (Bogel-Bonner) medium (50x) (MgSO₄ · H₂O 10 g, citric acid monohydrate 100 g, K₂HPO₄ 500 g, Na₂NH₂PO₄ · 4H₂O 175 g per water 650 mL) 20 mL, glucose solution (10% v/v) solution 50 mL, agar 15 g water 900 mL)에 분주하여 37°C에서 48시간 동안 배양하여 평판 계수법으로 측정하였다. 본 연구에 사용된 TA98과 TA100 균주는 ampicillin 저항 유전자를 보유하고 있으므로 GM agar plate에 ampicillin 24 µg/mL를 주입하여 사용하였다 (Fig. 1).

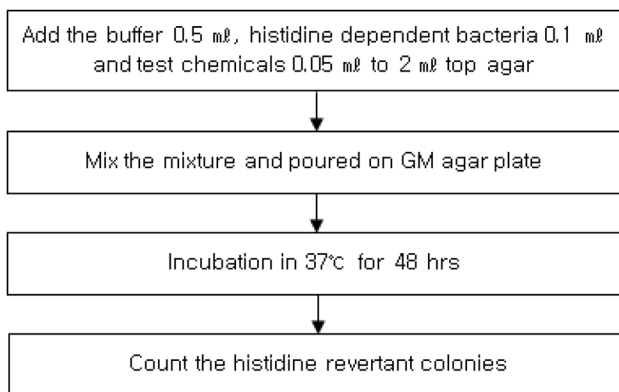


Fig. 1. Diagram depicts the steps involved in the plate incorporation for Ames assay.

중금속에 대한 복귀돌연변이원성 시험은 Ames test¹³⁾에 준하여 수행하였고, 시험물질의 농도 범위는 1~500 mg/L이다. 모든 실험마다 양성대조물질을 대상으로 복귀돌연변이 집락수를 측정하고, 각 균주에 해당하는 양성대조물질의 참고치와 비교, 확인하여 균주의 유전 특성이 정상적으로 발현되는지를 확인하였다. 시험에 사용한 양성대조물질 용매로 DMSO와 증류수를 사용하고, 시험물질의 용매로는 증류수를 사용하였다. 조사 대상 오염원이 중금속이기 때문에 분석과정 중 대사활성화 혼합물(S9 mix)은 첨가하지 않았다.

무처리 혹은 화학물질을 용해한 용매만을 처리한 경우에도 자연 돌연변이에 의한 집락의 발현도 나타나므로, 실험 결과는 음성대조군과의 비를 의미하는 MR (mutation ratio)로 나타내었다. 일반적으로 자연 돌연변이에 의한 집락수 발현도의 2배(MR=2) 이상이면 오염원에 변이원성 활성도가 있다고 판정한다.¹⁴⁾ MR의 계산 방법은 다음과 같다.

$$MR = \frac{\text{Real revertants in tested sample plate}}{\text{Revertants in negative control plate}}$$

2.5. 시약 및 분석법

실험 대상 중금속인 비소화합물(Sigma, USA)은 As(III) (arsenite: NaAsO₂)와 As(V) (arsenate: Na₂HAsO₄, Wako, Japan)를 사용하였다. 효소 활성을 측정하기 위해서는 무색인 발색시약(chromogen) PNαG 용액(p-nitrophenyl-α-D-glucoside, Sigma, U.S.A.)을 사용하였다.

생물 검정법의 결과는 일반적으로 대조군에 대비한 EC₅₀ 값으로 나타내었으며, 노출평가모델링(CEAM: Exposure Assessment Modeling)을 수행하기 위해 미국 EPA에서 제공하는 프로그램(Trimmed Spearman-Kärber method)을 이용하였다.^{15,16)}

3. 결과 및 고찰

3.1. 생물발광 활성에 근거한 비소 독성 평가

균주 RB1436 발광활성에 As(III)와 As(IV)의 비소화합물 (농도 0~10 mg/L; 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 10 mg/L)이 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2). As(III)와 As(V)의 노출 농도가 증가할수록 균주의 생물발광 활성은 저하하였으며, 일반적으로 비소 노출에 대해서는 두단계의 발광 감소를 관찰할 수 있었다: 낮은 농도 (0~1 mg/L) 노출에 대한 급격한 발광활성 억제와 농도 증가(1~10 mg/L)에 따른 완만한 발광활성 억제. As(III)와 As(V)의 1 mg/L 노출 조건에서 균주의 발광활성은 각 대조군의 49.8±6.66%(높은 독성)와 62.4±14.06%(낮은 독성)을 나타내었고, 최대 농도인 10 mg/L 노출 조건에서는 활성이 억제되어 각 대조군의 6.5±0.87%와 15.9±0.63% 발광 활성이 관찰되었다. US. EPA 제공 프

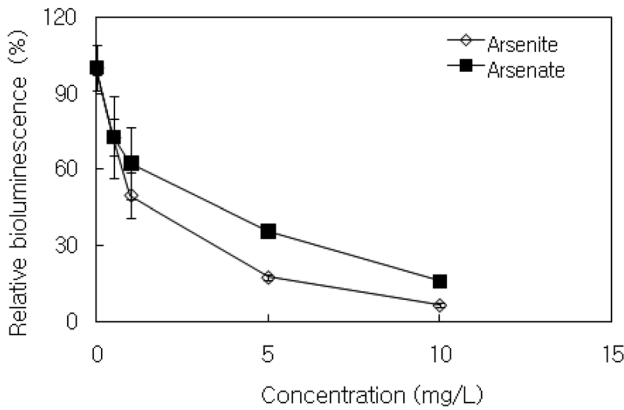


Fig. 2. Effects of arsenics on the bioluminescence activity of RB1436 strain.

그램(Trimmed Spearman-Kärber 방법)을 이용하여 생물발광 억제에 근거한 비소 화합물의 50% 발광 억제를 나타내는 농도인 EC₅₀를 계산한 결과, As(III)는 1.14(0.84~1.54) mg/L, As(V)는 2.05(1.47~2.86) mg/L로 조사되었다(괄호안의 값은 95% confidence level range). 많은 연구 결과들에 의하면 보편적으로 As(III)가 As(V)보다 높은 독성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 생물 발광활성 억제에 근거한 본 연구에서도 일치하는 결과가 조사되었다. As(III)의 독성은 glutathione과 lipoic산과 같은 생분자(biomolecules)와 많은 효소의 시스테인 성분의 -SH기에 대한 친화도 때문인 것으로 알려져 있다(Aposhian and Aposhian, 2006). As(III)와 황 결합은 glutathione reductase, glutathione peroxidases 등의 다양한 효소의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ As(V)의 경우에는 황화수소그룹에 직접 결합하지 않는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾

3.2. 효소(α-glucosidase) 활성에 근거한 비소 독성 평가

*Bacillus licheniformis*에 의해 생산된 효소인 α-glucosidase의 활성에 비소 화합물이 미치는 영향에 근거하여 오염원 독성을 결정하였다. 효소는 이당류인 maltose의 1,4-α-glycoside 결합에 작용하여 단당류 glucose를 생산하는 역할을 한다. 효소작용 확인을 위하여 동일한 결합을 가진 무색의 발색 화합물 PNαG (p-nitrophenyl-α-D-glucoside)가 효소에 의해 가수분해 될 경우 분해산물인 노란색 p-nitrophenol로 전환되는 정도를 흡광도(405 nm)로 측정하였다. 효소와 비소 화합물 0, 1, 5, 10, 20, 50 mg/L을 혼합 후 대조군 색깔이 노란색으로 변할 때(2시간, 흡광도 1.2~1.8) 까지 배양 후 대조군에 대한 실험군의 상대적 흡광도를 백분율로 환산하여 Fig. 3에 나타내었다. 생물발광에 근거한 검정법보다는 매우 민감도가 낮은 것으로 나타났으나, 생물발광을 이용한 검정법과 일반적으로 알려진 바와 같이 As(III)가 As(V) 보다 높은 독성을 나타내었다. As(V) 5.0 mg/L에서는 오히려 대조군(1.05±0.046)의 2배에 가까운 흡광도(2.04±0.313; 효소 활성 증가)가 관찰되었고, 조사 최대 농도인 50 mg/L에서도 흡광도 1.47±0.135로 조사되어 As(V)

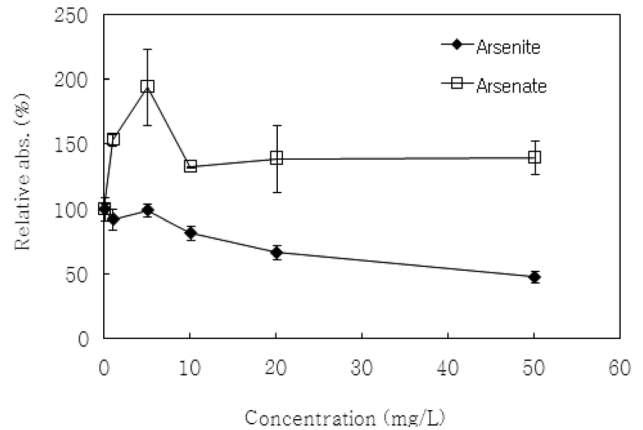


Fig. 3. Effects of arsenite and arsenate compounds on the activity of the enzyme α-glucosidase, produced by *Bacillus licheniformis*.

를 첨가하지 않는 대조군보다 효소 활성이 촉진된 것으로 나타났다. 촉진에 대한 정확한 기작은 알 수 없지만, As(V)가 특정 효소 조절계를 활성화한다는 보고에서 처럼 일부 효소 조절계가 영향을 받았기 때문일 것이다.¹⁹⁾ As(V)와는 상이하게 As(III) 화합물 노출 조건에서는 낮은 기율기의 일차식에 가까운 흡광도 감소를 나타내었다(기율기 = -0.0137, R²=0.91). 최대 조사 농도인 50 mg/L As(III) 노출에 대한 흡광도(0.63±0.054)는 대조군 흡광도(1.32±0.119)의 약 50% 정도 활성 감소를 나타내었다. As(III)와 As(V)의 EC₅₀은 각각 45.40 mg/L와 >> 50 mg/L로 조사되었으며, 본 효소는 비소 독성 검정에 민감하지 않은 것으로 나타났다. 보고에 의하면 동일한 효소에 대해 Cd, Cu와 Hg의 EC₅₀은 각 1.4, 0.90과 1.08 mg/L로 조사되었기 때문에 효소에 대한 중금속 민감도는 오염원 종류에 따라 상이할 것이다.^{20,21)} 이러한 결과는 상이한 검정법, 즉 대상 생물들이 중금속 종류에 따라 상이한 민감도를 나타낼 수 있음을 나타낸다.

3.3. 씨앗 발아에 근거한 비소 독성 평가

지역의 주요 농작물 재배종이면서 US, EPA 및 OECD의 공정법에서 권장하는 식물 씨앗에 해당하는 오이(*Cucumis*), 알타리무(*Raphanus*), 춘채(*Cardamine*), 상추(*Lactuca*)를 사용하여 씨앗 발아에 근거한 비소의 독성을 결정하였다. 각 씨앗에 대한 중금속 농도는 넓은 범위의 선행 조사를 근거로 결정하였으며, 각 조건에서의 발아수 및 대조군에 대한 각 농도별 발아수 백분율을 나타내었다(Table 1). 예상한 바와 같이 동일한 오염원에 대해서 각 씨앗종의 내성 정도와 민감도는 상이하였으며, 대조군의 경우에 3일 배양 시점(2 cm 기준)에서 평균 92.5% 발아하였다. 비소에 노출된 씨앗들 대부분은 초기 일정 농도까지는 발아 영향에 내성을 나타내다가, 일정 농도 노출 이후 부터 급격히 영향을 받는 형태로 관찰되었다. 조사한 씨앗 중에서 *Lactuca*, *Raphanus*와 *Cardamines*는 As(III)가 As(V)보다 더욱 높은 독성 영향을 나타내었으며, *Cucumis*는 비슷한 민감도를 나타내었다. 금속 오염원 종류에 대해 상이한 민감도를 나타내었지만,

As(III)에 대한 씨앗의 민감도(EC₅₀ mg/L)는 *Lactuca* (0.63) > *Raphanus* (1.73) > *Cardamine* (3.74), *Cucumis* (3.95), 그리고 As(V)에 대한 민감도는 *Lactuca* (3.01), *Cucumis* (3.70), *Raphanus* (3.94) >> *Cardamine* (10.96)으로 조사되었다 (Table 1). 중금속 오염원에 대해 씨앗별 민감도 정도는 다르게 조사되었으며, 앞서 행한 검정법에서 처럼 As(III)가 As(V)에 비해 독성이 높았다. 또한 As(III)와 달리 As(V)는 씨앗별 비슷한 결과가 조사되었으며 대체적으로 *Cardamine* 씨앗이 비소 화합물에 대해 민감도가 낮은 씨앗 종으로 조사되었다. 따라서 *Cardamine*은 낮은 민감도를 나타내었기에 부적절한 씨앗종으로 판단할 수 있다. 본 조사에서 높은 민감도를 나타내었고, 비소 화합물에 대해 상이한 영향을 나타내었으며, 또한 다른 검정법과 비슷한 경향을 보인 *Lactuca*와 *Raphanus* 2종의 씨앗이 생물 검정법을 위해 적절한 종류로 사료된다.

다양한 밀(wheat) 씨앗종을 대상으로 한 보고에서도 As(III)가 As(V) 보다 높은 독성을 나타내는 것으로 조사되었다. 또한 씨앗 발아는 호흡에 필요한 대사물(metabolites)을 공급하는 씨앗 탄소원(starch 등) 분해에 의존하기 때문에 아밀라제 효소의 활성화에 대한 비소 화합물 영향과 상관성이 높은 것으로 보고되었다.⁴⁾ 씨앗발아 외에도 줄기, 뿌리 성장, 생체량 및 대사물 생산 효소 활성 등에 대해서도 중금속이 독성을 미칠 수 있을 것이다.²²⁾

Table 1. Seed germination and germination percentage (%) compared to the control at different arsenic concentration (n=3)

Metals	<i>Lactuca</i>		<i>Raphanus</i>	
	mg/L	germination (%)	mg/L	germination (%)
Arsenite	0	*19±0.6** (100)	0	19±1.0 (100)
	0.05	18±1.1 (95)	0.1	18±0.6 (100)
	0.1	19±0.6 (100)	0.5	20±0.6 (109)
	0.5	16±1.1 (84)	1	20±0.6 (109)
	1.0	1±1.0 (5)	2	7±1.5 (37)
Arsenate	0	19±0.6 (100)	0	19±1.8 (100)
	1	15±2.1 (86)	0.5	20±0.6 (104)
	5	6±0.6 (33)	1	19±1.5 (98)
	10	2±1.0 (12)	2	18±1.2 (96)
	20	0±0.0 (0)	4	9±1.2 (49)

Metals	<i>Cucumis</i>		<i>Cardamine</i>	
	mg/L	germination (%)	mg/L	germination (%)
Arsenite	0	18±1.1 (100)	0	19±0.8 (100)
	0.55	19±1.1 (106)	1	19±1.1 (100)
	3	17±2.0 (94)	5	8±1.2 (42)
	6	0±0.0 (0)	10	1±0.5 (1)
	11	0±0.0 (0)	15	0±0.0 (0)
Arsenate	0	18±1.3 (100)	0	20±0.0 (100)
	0.5	15±0.6 (85)	5	19±1.0 (95)
	1	17±1.7 (94)	10	14±1.0 (70)
	2	15±2.1 (81)	15	2±0.6 (12)
	4	8±2.5 (46)	20	2±1.0 (10)

Values represent the number of germinated seeds and standard deviation of triplicate; ** Values in parenthesis represent germination percentage of samples.

3.4. 복귀 돌연변이원성에 근거한 비소 독성 평가

비소 화합물이 *Salmonella* 균주 복귀 돌연변이원성에 미치는 영향을 As(III)와 As(V) 농도 0~500 mg/L 조건에서 조사하였다. 음성대조군에서 21~36 (TA98), 107~133 (TA100)의 집락이 생성되었기 때문에, 보고된 연구 결과와 비교하여 양성이라 판단할 수 있어 시험은 적절하다고 판단되었다.¹³⁾ TA98 균주는 비소 농도 증가에 따라 복귀 돌연변이에 의한 집락수도 증가하였고, 모두 용량 의존적으로 양성 반응을 보였다. MR(대조군에 대한 실험군의 복귀 집락수의 비) 값이 2를 초과하기 시작하는 농도는 As(III) 1 mg/L (MR=5.1)와 As(V) 500 mg/L (MR=2.0)로 나타났다(Table 2). 따라서 As(III)는 1 mg/L 이하, As(V)는 500 mg/L 이상의 농도에서 양성, 즉 유전자 변이 영향 농도로 판정할 수 있었다. 특히 As(III)의 경우 조사 범위 최대 농도인 500 mg/L의 MR 값이 10.4로 돌연변이원성 물질로서의 가능성이 매우 높은 것으로 나타났다. 비소에 노출된 TA100 균주는 오염원의 증가에 따른 복귀 집락수의 증가를 확인할 수 없었기 때문에 비소에 대한 염기쌍 치환형인 TA100 균주의 변이원성 확인 결과는 음성으로 판정하였다. 오히려 As(III)

Table 2. Reverse mutation from *Salmonella* tester strains TA 98 and TA 100 on arsenic compounds without metabolic activation

Heavy metals	Positive control		Con. (mg/L)	MR	
	TA98	TA100		TA98	TA100
Arsenite	268 colonies	742 colonies	1	5.1*	1.1
			5	4.5*	1.2
			10	6.8*	1.1
			50	6.5*	1.2
			100	8.1*	0.9
Arsenate	25 colonies	572 colonies	1	1.4	0.9
			5	1.3	1.0
			10	1.5	1.1
			50	1.4	1.1
			100	1.6	1.3
			500	2.0*	1.6

*Ratio greater than 2.0, indicates mutagenicity.

Table 3. Summary of the effects of arsenic compounds on various test organisms

Methods	EC50 or mutation level (mg/L)		
	As(III)	As(V)	
RB1436 bioluminescence	1.14 (0.84~1.54)	2.05 (1.47~2.86)	
α-glucosidase activity	45.40 (29.42~70.06)	>> 50	
Seed germination	<i>Lactuca</i>	0.63 (0.57~0.69)	3.01 (2.53~3.57)
	<i>Raphanus</i>	1.73 (n.d.)	3.94 (3.41~4.55)
	<i>Cucumis</i>	3.95 (3.73~4.18)	3.70 (3.10~4.41)
	<i>Cardamine</i>	3.74 (2.88~4.85)	10.96 (10.22~11.74)
Revertant mutation	TA98	< 1 mg/L	< 500 mg/L
	TA100	> 500 mg/L	> 500 mg/L

Values in parenthesis represent 95% confidence level

에 노출된 TA100은 화합물의 농도가 증가함에도 불구하고 형성되는 집락의 수는 감소하였다.

TA98과 TA100 균주에 대한 MR값을 비교했을 때 TA98 균주에 대한 복귀 돌연변이원성이 뚜렷하게 나타나므로 구조 이동형(frame shift type)의 변이원성 물질에 의한 돌연변이원성 효과가 더 크게 발현되었음을 예상할 수 있었다. 본 연구 결과는 침출수 처리공정수 및 폐수슬러지에 의한 돌연변이원성 평가에서도 구조이동형 돌연변이가 더욱 크게 발현된다는 보고들과 일치하였다.^{23,24)}

4. 결론

환경에 노출된 중금속 비소 화합물이 미치는 위해성을 파악하기 위해 다양한 생물 검정법을 이용하여 비교 분석하였다. 다양한 생물 및 측정 종말점(생물발광, 효소활성, 씨앗발아, 복귀 돌연변이)을 이용하였으며, 방법과 화학종에 따라 상이한 민감도 및 영향이 관찰되었다. 연구 결과를 통하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1) 검정법에 따라 상이한 민감도를 보였지만, 일반적으로 As(III)가 As(V)보다 높은 독성을 나타내었다.

2) 효소 및 *Salmonella* TA100(염기쌍 치환형)는 민감하지 않은 반응을 보여, 비소 화합물의 독성에 대한 조사로는 적절하지 않은 방법으로 조사되었다.

3) 사용한 씨앗의 민감도는 비소화합물 형태에 따라 상이한 민감도를 나타내었다. *Lactucus*와 *Raphanus* 씨앗종이 대체적으로 높은 민감도를 보였으며, 모두 As(III)가 As(V)보다 높은 독성을 나타내었다. 특히 *Cardamine* 씨앗은 적절하지 않은 것으로 조사되었다.

4) 복귀 돌연변이 실험 결과에 의하면 TA 98 균주는 조사 최저 농도인 As(III) 1 mg/L에서도 유전자 변이를 나타내었다.

조사한 방법 중에서 생물발광, 씨앗 2종 및 TA98을 이용한 생물 검정법들이 비소 화합물 위해성 평가에 적절한 것으로 조사되었다. 생물검정법은 생물종에 따라 민감도 및 오염원에 따른 영향 순서가 상이하게 나타날 수 있다. 따라서 오염매체가 미칠 수 있는 위해 영향을 평가하기 위해서는 단일법에 대한 정보를 사용하기 보다는, 오염원에 적절한 다양한 방법들을 선택하여 그 결과들을 통합 평가는 접근법이 적절하다고 사료된다.

사사

본 연구는 한국지질자원연구원 기본사업인 ‘지구환경변화 대응 지하수 확보 통합솔루션 개발(10-3414)’과제의 일환으로 수행되었습니다. 또한 본 연구에 도움을 준 정홍경

양에게 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 이진수, Klinck, B., 전효택, “비소 및 독성중금속들의 인체위해성 평가 모델링,” 한국자원공학회지, **38**(2), 136~145 (2001).
2. 황은하, 위수민, 이평구, 최상훈, “서성 연-아연광산주변 농경지 토양의 중금속 오염연구,” 한국토양환경학회지, **5**, 67~85(2000).
3. The World Health Organization, Guidelines for drinking water quality, vol 1, WHO, Geneva(1993).
4. Liu, X., Zhang, S., Shan, X. and Zhu, Y.G., “Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat,” *Chemosphere*, **61**, 293~301 (2005).
5. Smith, E., Naidu, R. and Alston, A. M., “Arsenic in the soil environment: a review,” *Adv. Agronom.*, **64**, 149~195 (1998).
6. Sharma, V.K. and Sohn, M., “Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation,” *Environ. Int.*, **35**, 743~759(1009).
7. Aposhian, H. V. and Aposhian, M. M., “Arsenic toxicology: five questions,” *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 1~15(2006).
8. 방선백, 김세영, 김경웅, 배일주, “수용액에서의 비소종의 분리와 결정,” 환경공동학술대회(2007).
9. Bitton, G., Wasterwater Microbiology, 2nd ed., Wiley-Liss, Inc.(1999).
10. 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).
11. Kungolos, A., Emmanuil, C., Tsiroidis, 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).
12. US. EPA 1996. Ecological Effects Test Guidelines - seed germination/root elongation toxicity test. EPA 712-C-96-154.
13. Mortelmans, K. and Zeiger, E., “The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay,” *Mut. Res.*, **455**, 29~60(2000).
14. 정현옥, 강명규, 나춘기, 이성희, 독성학 개론, 동화기술 (1996).
15. An, Y.-J., “Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants,” *Environ. Pollut.*, **127**, 21~26(2004).
16. US. EPA. 1994. Using toxicity tests in ecological risk assessment. No 9345.0-051.
17. Chang, K. N., Lee, T. C., Tam, M. F. and Chen, Y. C., “Identification of falectine I and thioredoxin peroxidase II as two arsenic-binding proteins in Chinese hamster ovary cells,” *Biochem.*, **371**, 495~503(2003).
18. Suzuki, N., Naranmandura, H., Hirano, S. and Suzuki, L. T., “Theoretical calculations and reaction analysis on the

- interaction of pentavalent thioarsenicals with biorelevant thiol compounds,” *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 550~553(2008).
19. Cheng, Y., Chang, L. W. and Tsou, T. C., “Mirogen-activated protein kinases mediate arsenic-induced down regulation of survivin in human lung adenocarcinoma cells,” *Arch. Toxicol.*, **80**, 310~318(2006).
 20. Dutton, R. L., Bitton, G., Koopman, B. and Agami, O., “Effect of environmental toxicants on enzyme biosynthesis: A comparison of β -galactosidase, α -glucosidase and tryptophanase,” *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**, 395~398 (1990).
 21. Kong, I. C., Bitton, G., Koopman, B. and Jung, K. H., “Heavy metal toxicity testing in environmental samples,” *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **142**, 119~147(1995).
 22. Abedin, M. D. J. and Meharg, A. A., “Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.),” *Plant Soil.*, **243**, 57~66(2002).
 23. 이종삼, 김용진, 한상국, “Ames test를 이용한 소각잔사 혼입 매립지 침출수 처리공정수의 돌연변이원성 평가,” *한국폐기물학회지*, **24**(3), 211~218(2007).
 24. Mathur, M., Bhatnagar, P., Mohan, K., Bakre P., Nagar and Bijarnia, M., “Mutagenicity evaluation of industrial sludge from common effluent treatment plant,” *Chemosphere*, **67**, 1229~1235(2007).