

토양효소활성 측정법을 이용한 화약류 오염토양 독성평가

김문경¹ · 정재웅² · 남경필^{1*}

¹서울대학교 공과대학 건설환경공학부

²서울대학교 농생명과학대학 농생명과학공동기기원

The Toxicity Assessment of Explosives Contaminated Soil using Soil Microbial Activity Tests

Moonkyung Kim¹ · Jae-Woong Jung² · Kyoungphile Nam^{1*}

¹Dept. of Civil and Environmental Engineering, College of Engineering, Seoul National University

²National Instrumentation Center for Environmental Management, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University

ABSTRACT

This study was conducted to determine the toxic effect of TNT and RDX on indigenous soil microbes by measuring enzymatic activity. Denitrification activity, dehydrogenase activity, phosphatase activity, and fluorescein diacetate hydrolytic activity were determined for military firing range, field, and paddy soils exposed to TNT, and RDX from 0 to 1,000 mg/kg and 0 to 4,000 mg/kg, respectively, for 2, 4, and 8 weeks. Soil microbial enzymatic activities decreased with higher TNT and RDX concentration and longer exposure time. Microbial enzymatic activities of firing range soil were higher than field and paddy soils, indicating that indigenous microbes in firing range might have been adapted to TNT and RDX due to pre-exposure of the explosives. In addition, the toxicity of TNT and RDX decreased with higher organic matter because TNT and RDX tend to absorb to soil organic matter. No Observable Effect Concentration (NOEC) values of each microbial enzymatic activity were derived by the geometric mean of NOECs from exposure times (2, 4, and 8 weeks) and soil types (firing range, field, paddy soil). The derived NOECs ranged from 45.3 to 55.2 mg/kg for TNT and 286 to 309 mg/kg for RDX.

Key words : Soil microbial activity, TNT, RDX, Toxicity, NOEC

1. 서 론

2,4,6-trinitrotoluene(TNT)와 hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine(RDX)는 강한 폭발성을 가진 난분해성 물질로 Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)에서 유해물질로 규정하고 있다(ATSDR, 1995; ATSDR, 2012). TNT와 RDX와 같은 화약류는 군사 훈련장에서 사용되거나 탄약 생산 활동 등에 의해 주변 환경으로 배출되어 오염을 일으킬 수 있으며(KMOE, 2009), 주변 토양 생태계에 영향을 미칠 수 있다. 토양의 생태독성은 식물의 경우 씨앗의 발아율과 식물의 뿌리와 줄기의 성장을 통해 평가할 수 있으며, 토양 내 서식하는 무척추동물

(예: 지렁이)은 사망률과 증식률로 판단한다(OECD, 1993; ASTM, 1997; ISO, 2012). 또한, 생태계의 가장 하부에 위치하며 생산자로서 중요한 역할과 기능을 하고 있는 토양미생물의 경우에는 효소의 활성 측정을 통해서 오염물질에 의한 생태 영향을 평가할 수 있다.

토양에서 오염물질의 독성을 평가하기 위해서 denitrification activity, dehydrogenase activity, phosphatase activity, fluorescein diacetate hydrolytic activity, β -glucosidase activity, arylsulfatase activity 등과 같은 미생물 효소 활성을 측정하는 방법이 사용된다. TNT와 같은 nitroaromatic compounds는 denitrification activity에 독성 영향을 강하게 미치는 것으로 알려져 있어, denitrification

*Corresponding author : kpnam@snu.ac.kr

Received : 2015. 10. 2 Reviewed : 2015. 11. 10 Accepted : 2015. 11. 28

Discussion until : 2016. 1. 31

activity 측정을 통한 독성평가 연구가 가장 빈번하게 진행되었다. Siciliano et al.(2010)은 탈질 과정에 참여하는 nitrate reductase(예: nitrate to nitrite), nitrite reductase(예: nitrite to NO), nitric oxide reductase(예: NO to N₂O), nitrous oxide reductase(예: N₂O to N₂) 등 네 가지의 효소작용을 통해 TNT에 대한 토양 미생물 독성을 평가하였고, 낮은 농도의 TNT(예: 26 mg/kg soil)에서도 종속영양 미생물 군집의 denitrification activity가 50% 저해되는 것을 확인하였다. Fuller and Manning (1998)의 연구에서는 TNT 농도가 각각 7.8 ± 0.4, 12.1 ± 4.5 µg/mL일 때, denitrification이 각각 50, 100% 저해되는 것을 관찰하였다. 그러나 denitrification activity 이외의 다른 효소 활성에 대한 TNT의 독성을 평가한 연구는 부족하며, RDX의 독성을 미생물 효소 활성을 이용하여 평가한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. Gong et al. (2002)의 연구에서는 RDX와 같은 nitramine 화합물질인 octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine(HMX)가 미생물 효소 활성에 미치는 독성을 평가하였다. 12,500 mg HMX/kg soil의 농도로 오염시킨 토양에서 4주 동안 dehydrogenase activity와 denitrification activity의 변화를 측정했으나 유의미한 수준의 독성 영향을 확인하지 못하였다.

본 연구에서는 TNT와 RDX의 토양 독성 영향을 평가하기 위해 denitrification activity, phosphatase activity, dehydrogenase activity, fluorescein diacetate hydrolysis activity(Schnurer and Rosswall, 1982; Skujins, 1973) 등 다양한 미생물 효소 활성 실험을 수행하였다. 이를 위해 사격장 피탄지 주변 및 임야, 논 토양을 채취 및 분석하였으며, 2, 4, 8주 동안 각각의 토양에서 토양 미생물의 효소 반응을 확인하여 TNT와 RDX의 독성영향을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. TNT와 RDX

TNT와 RDX는 각각 nitroaromatic과 nitramine 계열의 화합물질을 대표하는 오염물질로(Tan et al., 1992; Li et al., 1997; Sunahara et al., 1998) (주)한화에서 공급받아 사용하였다. TNT와 RDX의 화학식 및 주요 물리화학적 특성을 Table 1에 나타내었다. 본 연구에서는 TNT와 RDX를 아세트나이트릴을 사용하여 각각 60 g TNT/L, 100 g RDX/L 저장용액(stock solution)을 만들어 갈색병에 담아 4°C에서 냉장보관하여 사용하였다.

Table 1. Physicochemical properties of TNT and RDX

| | TNT | RDX |
|--|---|---|
| CAS number | 118967 | 121824 |
| Chemical Formula | C ₇ H ₅ N ₃ O ₆ | C ₃ H ₆ N ₆ O ₆ |
| Molecular weight | 227.13 | 222.26 |
| Physical state and color | Yellow solid | White or grey powder |
| Water solubility at 20°C (mg/L) | 130 | 60 |
| Octanol-water partition coefficient (K _{OW}) | 1.6 | 0.87 |
| Soil organic carbon-water coefficient (K _{OC}) | 300 | 1.80 |

Table 2. Physicochemical properties of soil used in this study

| | Firing range soil | Field soil | Paddy soil |
|-----------------------------------|-------------------|------------|------------|
| Soil texture | sandy loam | loamy sand | silt loam |
| Bulk density (g/cm ³) | 2.6 | 2.6 | 1.3 |
| Water content (%) | 35 | 47 | 40 |
| Organic matter (%) | 2.0 | 1.6 | 4.0 |
| pH | 5.5 | 5.7 | 4.3 |

2.2. 토양 특성

TNT와 RDX의 독성영향을 파악하기 위해 화합물질에 가장 빈번하게 노출되는 국내 사격장 피탄지 부근의 토양을 채취하여 사용하였고, 대조군으로 화합물질에 노출이 되지 않은 서울시 관악구 부근 임야 토양과 충청남도 서천군 부근의 논 토양을 채취하여 사용하였다. 채취된 토양시료는 일주일 간 풍건한 뒤 10 번 체(<2 mm)를 사용하여 큰 입자와 기타물질을 제거한 후 균일하게 혼합하여 보관하였다. 각 토양의 물리화학적 특성은 Table 2에 나타내었다. 사격장 피탄지 주변, 임야, 논 토양의 토성은 입도분석을 통하여 각각 사양토, 양질사토, 미사토로 나타났다. 밀도는 사격장 피탄지 주변 토양과 임야 토양의 경우 2.6 Mg/m³, 논 토양의 경우 1.3 Mg/m³, 수분함량은 임야 토양 47%, 논 토양 40%, 사격장 피탄지 주변 토양 35%로 임야 토양이 가장 높았으며 세 토양 모두 효소 활성 실험 시 초기 수분 함량이 유지되도록 수분을 공급하였다. 토양 유기물 함량의 경우 논 토양 4.0%, 사격장 피탄지 주변 토양 2.0%, 임야 토양이 1.6%로 논 토양이 가장 높은 것으로 나타났다. pH는 임야 토양 5.7, 사격장 피탄지 주변 토양 5.5, 논 토양 4.3으로 세 토양 모두 약 산성을 띠었다(Table 2).

Table 3. Experimental conditions for soil microbial enzymatic activity determination

| | Denitrification activity | Dehydrogenase activity | Phosphatase activity | Fluorescein diacetate hydrolytic activity |
|-----------------------------|---|------------------------|----------------------|---|
| Soil (< 2 mm), (g) | 5.0 | 2.5 | 1.0 | 1.0 |
| Incubation temperature (°C) | 25 | 37 | 37 | 37 |
| Incubation duration (hrs) | 10 | 24 | 1 | 3 |
| Filter | SmartPor® GHP Syringe Filter (25 mm, 0.45 µm) | | | |
| Measurement | UV/Vis Spectrophotometer (OPTIZEN 2120UV, Mecasys, Republic of Korea) | | | |
| Wavelength (nm) | 630 | 436 | 630 | 490 |
| References | Gong et al., 1999 | | Weaver et al., 1965 | |

2.3. 토양 미생물 효소 활성 실험

사격장 피탄지 주변, 임야, 논 토양에 TNT와 RDX를 인공오염시킨 후 2, 4, 8주가 지난 후 토양 미생물의 효소 활성 변화를 확인하였다. 토양 50 g 당 각각의 water holding capacity(사격장 피탄지 주변 토양 16%, 임야 토양 12%, 논 토양 19%)의 약 33%에 상응하는 아세트나이트릴 용액을 사용하여 TNT와 RDX를 토양에 인공오염시켰다. 실험 농도는 TNT와 RDX의 토양 생태 독성(예: 식물, 무척추동물, 미생물)에 대한 문헌 연구를 통하여 TNT와 RDX의 토양 독성을 평가할 때 가장 빈번하게 사용되는 농도 범위로 결정하였다(Li et al., 1997; Mark and John, 1998; Gong et al., 1999; Frische, 2002). 각 시험은 3회 반복하여 수행하였으며 각 미생물 효소 활성 결과는 TNT와 RDX가 오염되지 않은 토양을 사용하여 보정하였다. 토양 내 TNT와 RDX 농도는 각각 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 mg-TNT/kg soil와 500, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000 mg-RDX/kg soil이었다.

TNT와 RDX의 미생물 독성영향을 파악하기 위한 미생물 효소 활성 평가 방법 및 실험조건은 Table 3에 정리하였다. Denitrification activity 실험은 Gong et al. (1999)의 방법을 따라 수행하였다. Teflon tube에 토양 5 g 과 실험 배지 10 mL(4 mM(NH₄)₂SO₄ (Sigma-Aldrich), 15 mM NaClO₃(Sigma-Aldrich), 1mM potassium phosphate buffer(Sigma-Aldrich), pH 7.2)를 첨가 한 후, 25°C, 175 rpm 조건에서 10시간 동안 교반하였다. 실험 과정에서 발생하는 암모니아의 산화는 denitrification 과정에서 발생하는 암모니아, nitrate, nitrite의 농도에 영향을 주기 때문에 이를 멈추기 위하여 2시간과 10시간 후 시료에서 각각 2 mL를 제거하고 같은 부피(2 mL)의 4 M KCl (Sigma-Aldrich)을 넣어주었다. 교반 시작 10시간 후 630 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

Dehydrogenase activity를 측정하기 위하여 2-(p-

Table 4. NOECs of TNT and RDX using microbial activity tests

| | TNT (mg-TNT/kg soil) | RDX (mg-RDX/kg soil) |
|---|----------------------|----------------------|
| Denitrification activity | 51.3 | 295 |
| Dehydrogenase activity | 55.2 | 309 |
| Phosphatase activity | 47.8 | 286 |
| Fluorescein diacetate hydrolytic activity | 45.3 | 302 |

iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium(INT) assay 를 사용하였다(Weaver et al., 1965). Teflon tube에 토양 2.5 g, 0.1%(w/v) INT solution(0.5 M Tris buffer, pH 7.6, Sigma-Aldrich) 2.5 mL를 넣어 37°C 조건에서 24시간 배양시킨 후 tetrahydrofuran(HPLC grade, Sigma-Aldrich) 10 mL를 넣고 436 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

Phosphatase activity는 50 mL teflon tube에 토양 1 g, toluene(Sigma-Aldrich) 0.2 mL, tris(hydroxymethyl) amino-methane(Sigma-Aldrich) 12.1 g, maleic acid(Sigma-Aldrich) 11.6 g, citric acid(Sigma-Aldrich) 14.0 g, 그리고 boric acid (Sigma-Aldrich) 6.3 g을 1 N sodium hydroxide(Sigma-Aldrich) 488 mL에 넣고 증류수를 사용하여 1 L까지 희석한 후 p-nitrophenyl phosphate solution(Sigma-Aldrich) 1 mL를 넣어 0.5 M CaCl₂(Sigma-Aldrich) 1 mL와 0.5 M NaOH(Sigma-Aldrich) 4 mL를 넣어 630 nm에서의 흡광도를 측정하였다(Weaver et al., 1965).

Fluorescein diacetate hydrolytic activity 측정을 위하여 토양 1 g과 60 mM sodium phosphate buffer(pH 7.6, Sigma-Aldrich) 50 mL, 4.9 mM 3,6-diacetylfluorescein 용액(20 mg 3,6-diacetylfluorescein lipase substrate(Sigma-Aldrich) in 10 mL acetone) 0.5 mL를 50 mL teflon tube에 넣어 교반하였으며, 교반이 끝난 후 acetone (Sigma-Aldrich) 2 mL를 넣고 490 nm에서의 흡광도를 측정하였다(Weaver et al., 1965).

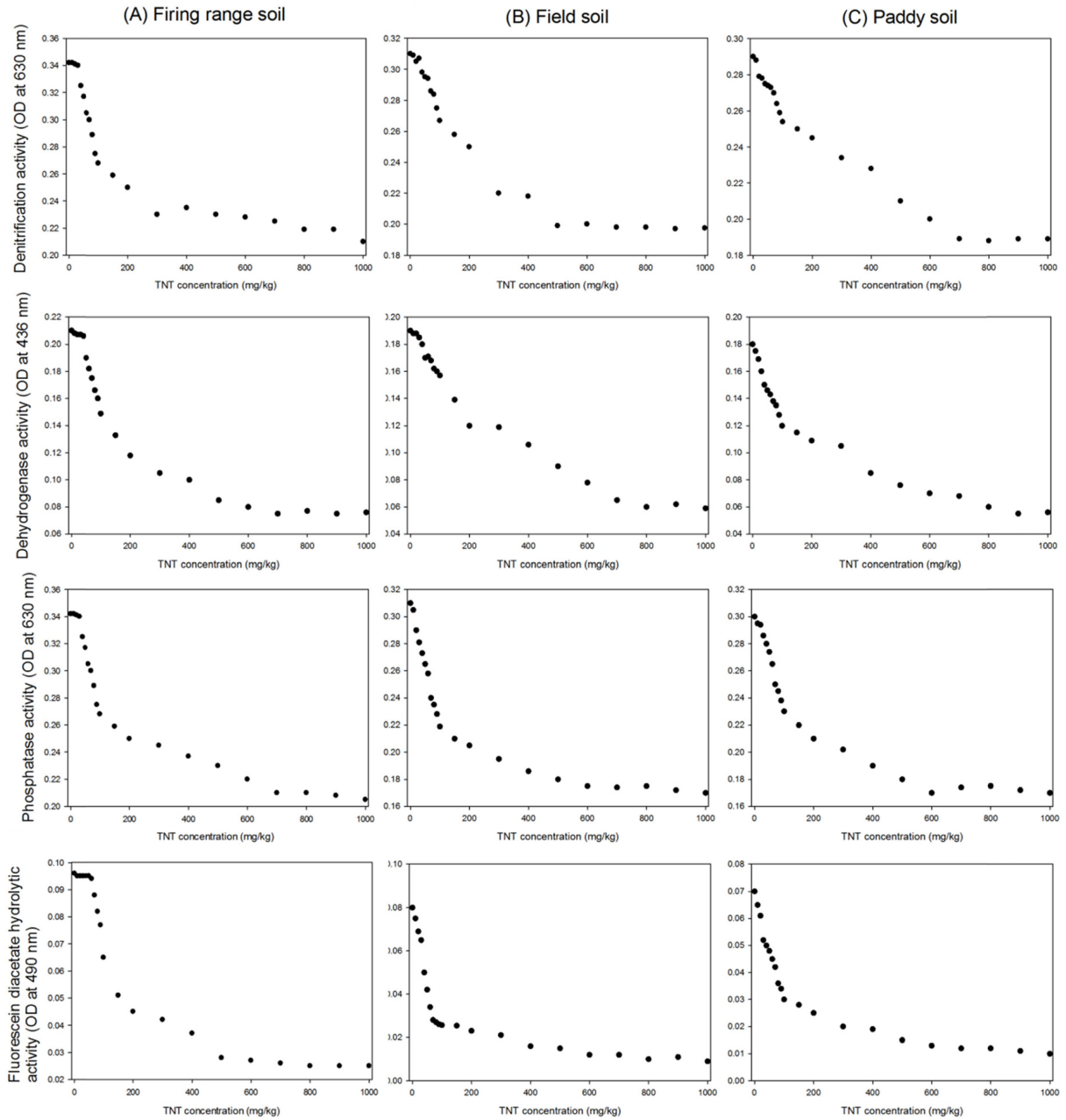


Fig. 1. Soil microbial activity of TNT-spiked (A) firing range, (B) field and (C) paddy soil after 8 weeks exposure.

3. 결과 및 고찰

3.1. 토양 특성 및 오염기간에 따른 미생물 효소 활성 변화
 사격장 피탄지 주변 토양, 임야 및 논 토양을 8주 동안 TNT(0-1,000 mg-TNT/kg soil)와 RDX(0-4,000 mg-RDX/kg soil)에 노출시켰을 때 각각의 효소 활성 변화를 Figure 1과 2에 나타내었다. 본 연구에서는 TNT와 RDX가 미생물 효소 활성에 미치는 독성을 인공오염 시키지 않은 토

양과 인공오염 토양의 효소 활성의 차이로 나타내었다. 세 종류의 토양에서(사격장 피탄지 주변, 임야, 논 토양) 모든 미생물 효소 활성이 TNT와 RDX의 농도가 증가할수록 감소하였다. 또한, 모든 농도 조건에서 사격장 피탄지 주변 토양의 미생물보다 임야, 논 토양의 미생물에 TNT와 RDX의 독성 영향이 강하게 발현되었다.

실험에 사용한 농도 조건 중 중간값인 500 mg-TNT/kg soil 조건에서 사격장 피탄지 주변 토양의 경우 효소 활성

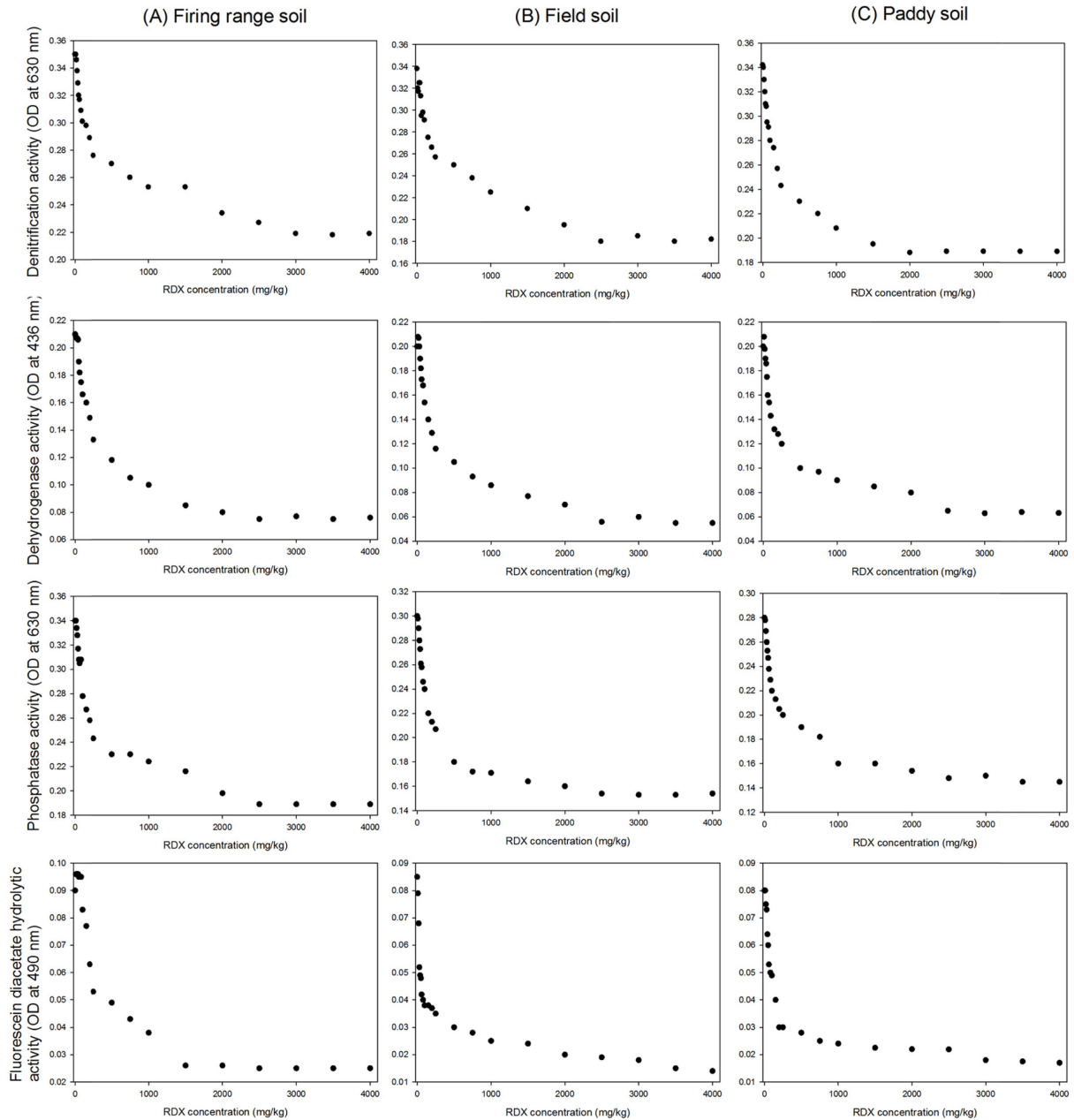


Fig. 2. Soil microbial activity of RDX-spiked (A) firing range, (B) field and (C) paddy soil after 8 weeks exposure.

이 74.6-82.8%로 나타나, 49.0-53.2%인 임야 토양, 그리고 57.0-70.2%인 논 토양보다 높았다(Fig. 3A). RDX의 경우도 중간값인 2,000 mg/kg soil 조건에서 사격장 피탄지 주변 토양의 효소 활성(77.9-82.5%)이 임야 토양(59.0-65.0%)과 논 토양(51.8-65.1%)보다 높았다. 이는 사격장 피탄지 주변 토양의 경우 사격 훈련 등으로 TNT와 RDX에 오랜 기간 노출되었기 때문에 토양 미생물이 TNT와 RDX에 대해 적응되어 TNT와 RDX에 노출이력이 없는 임야와 논 토양의 미생물에 비해 TNT의 독성

영향을 적게 받은 것으로 판단된다. Mark and John (1998)의 연구에서는 토양 미생물 군집 실험을 통해 화약 물질에 지속적으로 노출된 사격장 피탄지 주변 토양에서 TNT에 저항성을 가진 미생물을 많이 발견하여 본 연구의 결과와 유사한 경향을 보였다.

TNT의 독성을 평가하기 위해 사용된 네 가지의 효소 활성 중 phosphatase activity가 사격장 피탄지 주변 토양(74.6%), 임야 토양(49.0%), 논 토양(57.0%) 모두에서 가장 낮은 활성을 보였다. 사격장 피탄지 주변 토양과 임야

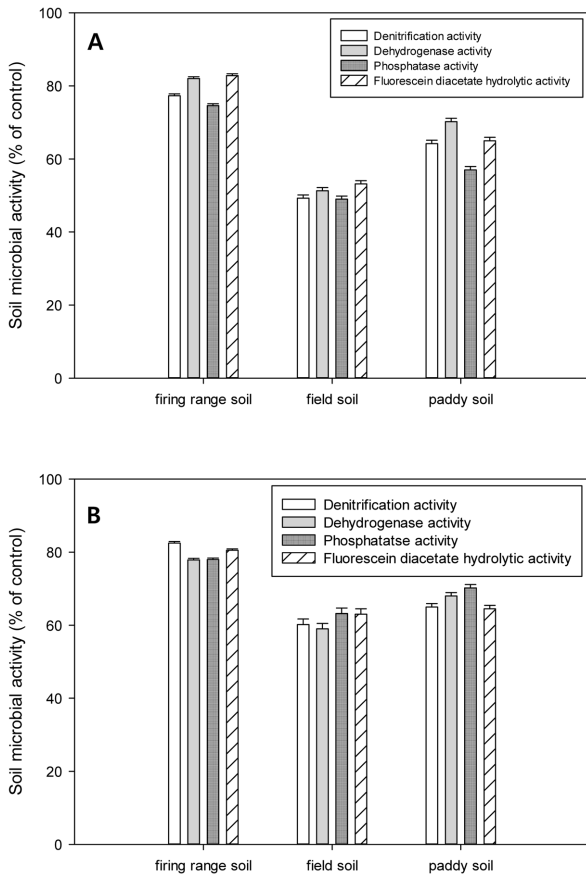


Fig. 3. Soil microbial activity of (A) TNT-spiked firing range soil, field soil, paddy soil (500 mg/kg) and (B) RDX-spiked firing range soil, field soil, paddy soil (2000 mg/kg soil) after 8-weeks exposure. Non-spiked firing range soil, field soil and paddy soil were used as control.

토양에서 fluorescein diacetate hydrolytic activity는 각각 82.8, 53.2%로 나타났고, 논 토양에서 dehydrogenase activity가 70.2%로 가장 높은 효소 활성이 측정되었다. 이러한 미생물 효소 활성 측정법에 따른 차이는 측정 효소 활성에 참여하는 미생물 수의 차이에 의한 것이다(Skujins, 1973). Dehydrogenase activity와 fluorescein diacetate hydrolytic activity는 denitrification activity와 phosphatase activity에 비해 다양한 미생물이 참여하는 효소 반응이기 때문에(Skujins, 1973; Schnurer and Rosswall, 1982) 가장 높은 활성이 측정된 것으로 판단된다. RDX를 인공 오염시킨 사격장 피탄지 주변 토양의 효소 활성은 denitrification activity가 82.5%로 가장 높았고, dehydrogenase activity가 77.9%로 가장 낮았다. 임야 토양의 경우 fluorescein diacetate hydrolytic activity(65.0%), dehydrogenase activity(59.0%), 논 토양의 경우 phosphatase activity(65.1%), fluorescein diacetate hydrolytic

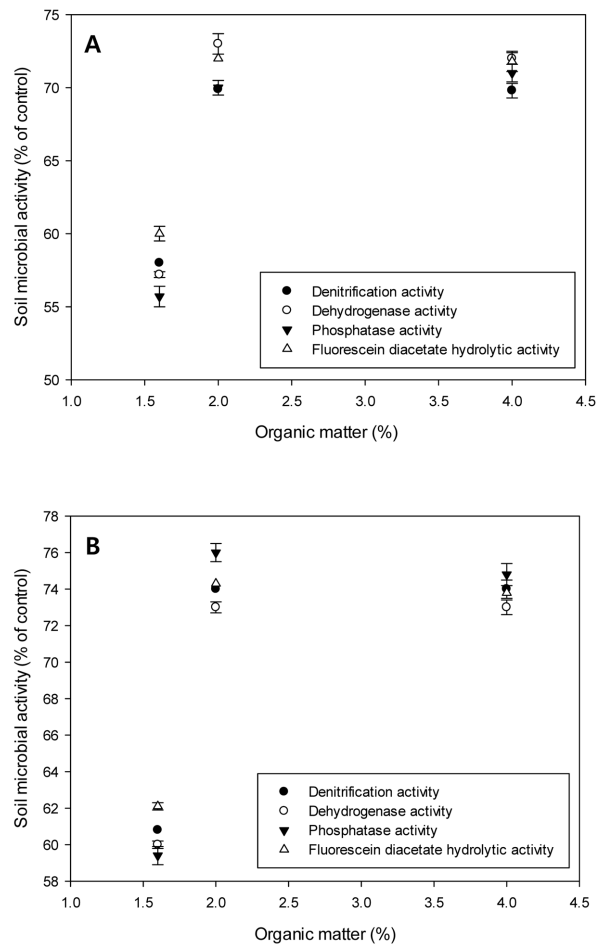


Fig. 4. Effect of organic matter on soil microbial activity of firing range soil (organic matter 2.0%), field soil (organic matter 1.6%), and paddy soil (organic matter 4.0%) spiked with (A) 700 mg-TNT/kg and (B) 2000 mg-RDX/kg after 8-weeks exposure. Non-spiked firing range soil, field soil and paddy soil were used as control.

activity(51.8%)가 각각 최대, 최소값의 효소 활성을 나타내어, RDX가 효소 활성에 미치는 영향과 각 효소 활성에 따른 유의한 경향을 확인할 수 없었다.

3.2. 토양 유기물 함량에 따른 미생물 효소 활성 변화 및 독성발현

실험 농도 중 일정 농도 이하의 조건에서는 논 토양과 임야 토양의 효소 활성에 큰 차이가 없었으나, 700 mg-TNT/kg soil, 3,000 mg-RDX/kg soil 이상의 조건에서는 논 토양의 효소 활성이 임야 토양의 효소 활성보다 높게 관찰되었다(Fig. 1). 논 토양은 유기물 함량이 4.0%로 사격장 피탄지 주변 토양(2.0%), 임야 토양(1.6%)과 비교하여 높았다. Figure 4는 700 mg-TNT/kg soil과 3,000 mg-RDX/kg soil을 오염시켰을 때 사격장 피탄지 주변, 임야,

는 토양의 효소 활성을 나타낸 것이다. TNT의 경우 논 토양의 효소 활성은 인공오염 시키지 않은 토양의 효소 활성보다 28.2-30.2%, 사격장 피탄지 주변 토양은 27.0-30.1% 감소된 반면, 임야 토양은 40.0-44.3%로 더 큰 폭으로 감소하였다. RDX로 오염된 논 토양의 효소 활성은 25.2-27.0% 감소하였으며, 사격장 피탄지 주변 토양은 24.0-27.0% 감소, 임야 토양은 37.9-40.6% 감소하였다. TNT와 RDX는 토양 유기물에 흡착되는 특성이 있어 유기물 함량이 높은 토양에서 독성 영향이 적기 때문에 판단되며(ATSDR, 1995; Mark and John, 1998), 논 토양과 임야 토양 간 미생물 효소 활성의 차이는 이러한 토양 내 유기물 함량의 차이로 사료된다. 사격장 피탄지 주변 토양의 경우는 앞서 기술한 바와 같이 토양 미생물들이 사전에 유사한 물질에 노출되어 적응한 결과라 생각된다.

TNT 독성에 대한 효소 활성은 사격장 피탄지 주변 토양 내 미생물의 dehydrogenase activity(73.0%), 임야와 논 토양의 경우 fluorescein diacetate hydrolytic activity가 각각 60.0, 71.8%로 가장 높게 나타나, dehydrogenase activity와 fluorescein diacetate hydrolytic activity가 TNT의 독성에 적게 영향을 받았다. Fluorescein diacetate hydrolytic activity는 RDX가 오염된 임야 토양에서는 62.1%로 가장 높은 활성을 보였으나, 사격장 피탄지 주변 토양(74.3%)과 논 토양(73.8%)에서는 낮았다. Phosphatase activity는 임야 토양(59.4%)에서 가장 낮은 활성을, 사격장 피탄지 주변 토양(76.0%)과 논 토양(74.8%)에서는 가장 높은 활성을 보였다.

3.3. 노출 기간에 따른 독성 발현

TNT와 RDX의 2, 4, 8주 동안 노출 기간에 따른 독성영향을 평가한 결과, 노출 기간이 길어질수록 모든 효소 활성이 감소하였고, 그 효소 활성 감소 정도는 작아졌다. TNT와 RDX에 4주 노출된 토양의 미생물 효소 활성은 2주 노출된 경우에 비해 각각 22.7-26.4, 20.1-24.5% 감소하였다. 그리고 8주 노출 후 미생물 효소 활성은 4주 후에 측정된 미생물 효소 활성에 비해 2.2-5.1%(TNT), 5.5-14.9%(RDX) 감소하였다. 즉, TNT와 RDX가 2-4주 동안 노출되었을 경우 독성이 급격하게 발현되나, 4주 이상 노출된 경우 독성에 의한 미생물 효소 활성 감소 정도가 줄어들었다. Figure 3에 나타난 임야 토양(500 mg-TNT/kg soil, 2,000 mg-RDX/kg soil)뿐 아니라 다른 농도 조건과 사격장 피탄지 주변 및 논 토양에서도 노출 기간이 2주에서 8주로 길어질수록 독성이 증가하는 경향을 보였으며, 역시 4주 이상 노출된 경우 노

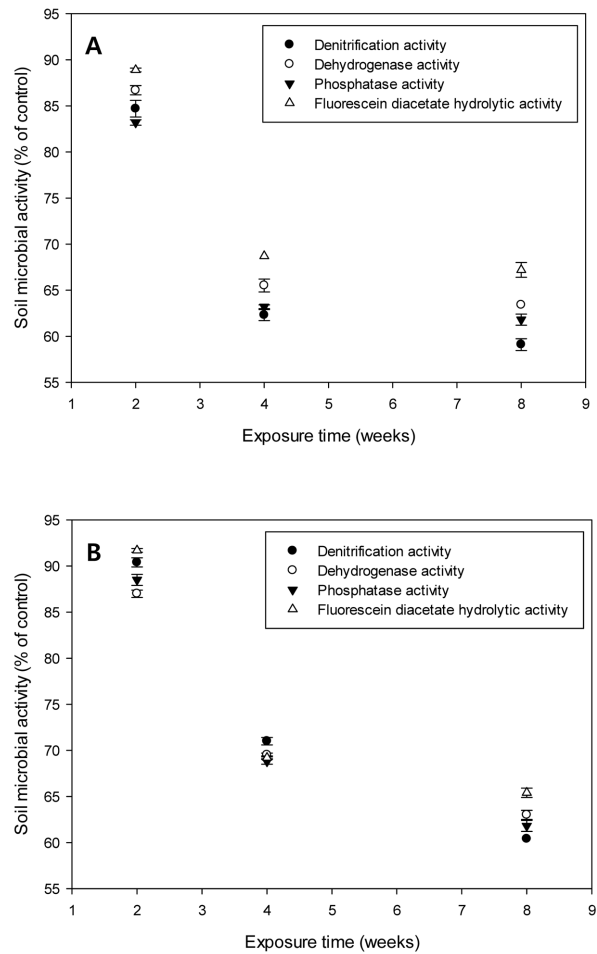


Fig. 5. Effect of exposure time (2, 4, 8 weeks) on soil microbial activity of field soil spiked with (A) 500 mg-TNT/kg and (B) 2000 mg-RDX/kg. Non-spiked field soil was used as control.

출 기간의 차이에 따른 독성 발현의 변화는 크지 않음을 확인하였다(Fig. 1, 2).

TNT에 의해 fluorescein diacetate hydrolytic activity는 4주 후 22.7%, 8주 후 2.2%로 TNT의 독성에 의해 가장 작게 감소하였으며, denitrification activity는 4주 노출 후 26.4%, 8주 후 5.1% 감소하여 가장 낮은 활성 즉, 가장 큰 독성 효과를 나타내었다. RDX에 4주 동안 노출된 경우 dehydrogenase activity의 감소폭이 가장 낮았으며(20.1%), fluorescein diacetate hydrolytic activity가 가장 큰 폭으로 감소하였다(24.5%). 8주가 지난 후 효소 활성은 fluorescein diacetate hydrolytic activity에서 가장 높게 나타났으며(5.5%), denitrification activity는 14.9% 감소되어 가장 낮은 활성을 보였다. TNT와 RDX 모두 각각 효소 활성에 대한 독성영향의 일정한 경향은 확인할 수 없었다(Fig. 3).

3.4. Screening-level 생태위해성평가를 위한 독성종말점 도출

미생물 효소 활성 실험에 사용된 2, 4, 8주의 노출 기간과 토양 종류(사격장 피탄지 주변, 논, 임야 토양)를 포함하여 TNT와 RDX에 대한 NOEC(No Observable Effect Concentration) 값을 도출하였다(Van Straalen, 2002; Swartjes et al., 2012). 각 TNT와 RDX의 오염농도에 따른 미생물 효소 활성을 *t*-test를 통해 대조군과 비교하여 효소 활성이 유의미하게 감소하지 않는 최대 농도를 NOEC으로 산출하였고, 각각의 노출 기간과 토양 종류의 NOEC 값을 기하평균한 값을 최종 독성종말점으로 결정하였다. 토양 미생물의 효소 활성에 대한 NOEC 값은 denitrification activity가 51.3 mg-TNT/kg soil, 295 mg-RDX/kg soil, dehydrogenase activity는 55.2 mg-TNT/kg soil, 309 mg-RDX/kg soil, phosphatase activity가 47.8 mg-TNT/kg soil, 286 mg-RDX/kg soil, fluorescein diacetate hydrolytic activity가 45.3 mg-TNT/kg soil, 302 mg-RDX/kg soil로 도출되었다. Gong et al.(1999)에서 TNT의 미생물 효소 활성에 대한 NOEC은 0.4-29 mg/kg으로 제시하였으나 본 실험 결과로 도출된 NOEC 값인 45.3-55.2 mg/kg보다 낮은 값으로 나타났다. 효소 활성에 대한 NOEC 값은 토양의 물리화학적 특성과 효소 활성 지표에 따라 달라질 수 있으므로 추가적인 연구를 통해 다양한 토양에서 TNT의 효소 활성에 대한 다수의 독성종말점을 도출하는 것이 필요하다.

4. 결 론

토양 미생물의 효소 활성(denitrification activity, dehydrogenase activity, phosphatase activity, fluorescein diacetate hydrolytic activity)을 측정하여 TNT와 RDX 오염토양의 생태독성을 평가해보았다. TNT(0-1,000 mg/kg)와 RDX(0-4,000 mg/kg)의 오염 조건에서 8주 동안 노출시켰을 때, 사격장 피탄지 주변 토양의 미생물의 효소 활성은 TNT와 RDX 각각 74.6-82.8%, 77.9-82.5%로 임야 토양의 효소 활성인 49.0-53.2%, 59.0-65.0%와 논 토양의 효소 활성 57.0-70.2%, 51.8-65.1%보다 높게 측정되었다. 또한, 700 mg-TNT/kg soil, 3,000 mg-RDX/kg soil 이상의 조건에서는 논 토양의 효소 활성이 임야 토양의 효소 활성보다 높게 관찰되었으며, 이는 토양의 유기물 함량 차이 때문으로 생각된다. TNT와 RDX 오염에 의한 사격장 피탄지 주변 토양에서의 미생물 효소 활성이

TNT, RDX 오염 이력이 없는 논, 임야 토양에서의 활성보다 높은 이유는 토양 미생물이 오염물질에 장시간 노출된 경우, 미생물의 오염물질에의 적응을 통해 독성 영향이 줄어들 수 있기 때문이다. 미생물 효소 활성평가의 결과를 통해 미생물 효소 활성에 대한 NOEC을 도출하였으며 이는 denitrification activity가 51.3 mg-TNT/kg soil, 295.3 mg-RDX/kg soil, dehydrogenase activity는 55.2 mg-TNT/kg soil, 308.9 mg-RDX/kg soil, phosphatase activity가 47.8 mg-TNT/kg soil, 285.9 mg-RDX/kg soil, fluorescein diacetate hydrolytic activity가 45.3 mg-TNT/kg soil, 301.8 mg-RDX/kg soil로 나타났다.

사 사

본 연구는 환경부의 토양·지하수 오염방지기술개발사업인 GAIA(Geo-Advanced Innovative Action) Project의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- ASTM, 1997, Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida*. Method E1676-97; West Conshohocken, PA.
- ATSDR, 1995, Toxicological profile for 2,4,6-trinitrotoluene, US department of health and human services, Atlanta, Georgia.
- ATSDR, 2012, Toxicological profile for RDX, US department of health and human services, Atlanta, Georgia.
- Frische, M.E., 2002, Screening for soil toxicity and mutagenicity using luminescent bacteria-a case study of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **51**, 133-144.
- Gong, P, Siciliano, S.D., Greer, C.W., Paquet, L., Hawari, J., and Sunahara, G.I., 1999, Effects and bioavailability of 2, 4, 6trinitrotoluene in spiked and fieldcontaminated soils to indigenous microorganisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**(12), 2681-2688.
- Gong, P, Hawari, J., Thiboutot, S., Ampleman, G., and Sunahara, G.I., 2002, Toxicity of Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) to soil microbes, *Environ. Contam. Toxicol.*, **69**, 97-103
- ISO, 2012, Soil Quality-Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida fetida*, *E. fetida Andrei*), ISO DIS 11268, Geneva, Switzerland.
- KMOE, 2009, Research on military environment management and its development.

- Li, A.Z., Marx, K.A., Walter, J., and Kaplan, D.L., 1997, Trinitro-toluene and metabolites binding to humic acid, *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 584-589.
- Mark, E. and John, Manning, Jr. F., 1998, Evidence for differential effects of 2,4,6-trinitrotoluene and other munitions compounds on specific subpopulations of soil microbial communities, *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**(11), 2185-2195.
- OECD, 1993, Earthworm, acute toxicity tests. In Guideline of the OECD for Testing Chemical Products, Paris, France.
- Schnurer, J. and Rosswall, T., 1982, Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter, *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**(6), 1256-1261.
- Siciliano, R. Steven D. Roy, C.W. Greer., 2000, Reduction in denitrification activity in field soils exposed to long term contamination by 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), *FEMS Microbiol. Ecol.*, **32**, 61-68.
- Skujins, J., 1973, Dehydrogenase: an indicator of biological activities in arid soils, *Bull. Ecol. Res. Comm., NFR*, **17**, 235-241.
- Sunahara, G.I., Dodard, S., Sarrazin, M., Paquet, L., Ampleman, G., Thiboutot, S., Hawari, J., and Renoux, A.Y., 1998, Development of a soil extraction procedure for ecotoxicity characterization of energetic compounds, *Ecotox. Environ. Saf.* **39**, 185-194.
- Swartjes, F.A., Rutgers, M., Lijzen, J.P.A., Janssen, P.J.C.M., Otte, P.F., Wintersen, A., Brand, E., and Posthuma, L., 2012, State of the art of contaminated site management in The Netherlands: Policy framework and risk assessment tools, *Sci. Total Environ.*, 427-428, 1-10.
- Tan, E.L., Ho, C.H., Griest, W.H., and Tyndall, R.L., 1992, Mutagenicity of trinitrotoluene and its metabolites formed during composting, *J. Toxicol. Environ. Health*, **36**:3, 165-175.
- Van Straalen, N.M., 2002, Theory of ecological risk assessment based on species sensitivity distributions. In: Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology, Posthuma, L., Suter G. W. & Traas, T. P., Lewis Publishers, CRC Press.
- Weaver, R.W., Angle, J.S., and Bottonley, P.S., 1965, Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties, SSSA Book Series Series 5, Eds. A.L. Page and R.H. Miller., American Society of Agronomy, Madison, WI.