

씨앗 발아와 박테리아 발광을 이용한 국내 벤토나이트 독성 평가를 위한 사전 연구결과

공인철¹· 이문희¹· 장현진¹· 이은진¹· 고경석²· 강일모^{2*}

¹영남대학교 환경공학과, ²한국지질자원연구원

Preliminary Study on Seed Germination and Bacterial Bioluminescence for Assessing the Toxicity of Domestic Bentonites

In Chul Kong¹, Mun Hee Lee¹, Hyun Jin Jang¹, Eun Jin Lee¹, Kyung Seok Ko² and Il Mo Kang^{2*}

¹Department of Environmental Engineering, Yeungnam University, Gyeongsan 38541, Korea

²Korea Institute of Geoscience & Mineral Resources (KIGAM), Daejeon, Korea

(Received: 4 October 2016 / Revised: 1 November 2016 / Accepted: 1 November 2016)

In this preliminary study, we assessed the toxicity of domestic bentonites using environmental toxicity testings of seed germination and bacterial bioluminescence. In cases of tested bulk bentonite samples, following ranges of toxicity were observed: -3 ~ 95% bioluminescence, 7.1 ~ 92.1% *Lactuca* germination. Similar results were also observed among tested other seeds, except seed *Raphanus*. No significant correlations between toxicity and metals contents of bentonite extractants were observed throughout this investigation. Interestingly, distinct different effects were observed according to bentonite colors (blue 67±8.7%, pink 27±10.4%, brown 58±14.5%).

Key words : bentonite, toxicity, bioluminescence, seed germination, food and drug

환경독성법 (세균발광, 씨앗발아)을 이용하여 국내 벤토나이트 독성에 관한 기초 연구를 수행하였다. 생물발광과 상추를 이용한 씨앗발아에서의 독성범위는 각 -3 ~ 95%와 7.1 ~ 92.1%로 나타났다. 씨앗발아의 경우 상추 이외에 조사한 알타리무, 아욱의 씨앗 실험에서도 비슷한 결과를 나타내었다. 다양한 약산농도에서 추출한 점토광물이 함유하고 있는 중금속 함량과 독성의 상관관계는 거의 나타나지 않았다($R^2 < 0.1$). 특이한 사항은 점토광물의 색깔별 그룹에 따라 미치는 영향에 차이가 있음을 관찰할 수 있었다(청색 67±8.7%, 분홍 27±10.4%, 갈색 58±14.5%).

주요어 : 벤토나이트, 독성, 생물발광, 씨 발아, 식품의약품

1. 서 론

벤토나이트는 높은 팽윤성, 비표면적, 양이온교환능 및 콜로이드 특성을 갖는 광물자원으로 위장 질병과 만성 설사, 피부병 등 여러 의약품에 활성성분 및 첨가제로 사용되며, 식품이나 화장품, 건축, 방화제, 환경

오염 처리 등 다양한 분야에서 활용 범위가 더욱 넓어지고 있는 추세이다(Tang *et al.*, 2005). 그러나 정작 벤토나이트의 생물학적 영향력이나 독성 등에 관한 연구결과는 매우 제한적인 상황이다.

국내 벤토나이트를 고부가 식품의약품 원료로 활용하기 위해서는 해당 산업 분야에서 요구되는 안전성

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided original work is properly cited.

*Corresponding author: imkang@kigam.re.kr

평가 기준에 대한 분석결과가 필요하며 이에 따라 기초 독성평가 모델을 수립할 필요가 있다. 기초 독성평가 모델을 수립하는데 있어 기초 검사를 진행하기 위해 생물 검정법을 이용할 수 있을 것이다. 생물 검정법은 독성물질에 대한 생물 반응 및 변화를 통해 오염도를 나타내는 것으로 화학적 방법에 비해 측정 및 분석의 편리성, 시간 단축 및 비용의 저렴성, 무엇보다도 생물이용성(bioavailability)에 대한 정보를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 벤토나이트는 독성물질이 아니지만 생물에게 노출되었을 경우 미치는 영향을 조사함으로써 기초 독성평가 모델을 수립하는데 기초 자료로 이용할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 다양한 환경독성 생물 검정법 중에서 유전자 재조합 균주의 발광형성과 씨앗발아에 근거하여 벤토나이트가 생물에게 미칠 수 있는 영향을 조사하였다. 연구결과는 벤토나이트의 영향성을 검사·확인하고 실질적으로 활용되는데 있어 안정성을 확인하는데 기초적 정보를 제시할 수 있을 것이다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 벤토나이트 시료정보

연구시료로는 경주 지역에서 채취한 벤토나이트 12종을 사용하였다(35b, 35p, 40b, 40p, 40br, 40-2br, 40p, 40w, 46b, 46p, 50b, 50p). 해당시료 명칭에서 숫자는 광업지적을 의미하며 숫자 뒤의 소문자는 색상을 표시한다(b, blue; br, brown; p, pink; y, yellow; w, white). 예를 들어, 35b 시료의 경우에는 갑포35호 청광을 의미한다. 시료는 원시료를 상온건조 후, 아게이트 막자사발로 분말화하여 분석에 사용하였다.

2.2. 벤토나이트 중금속 분석

벤토나이트에 포함되어 있는 중금속 성분의 함량 및 독성과의 상관성을 조사하기 위하여 0.1, 1, 5 N HCl을 이용하여 중금속 추출을 진행하였다. 벤토나이트와 산용액을 1:5 비율로 혼합 한 후 1시간동안 추출(150 rpm)한다. 20분간 원심분리(2000 rpm)후 필터(0.45 µm)하여 분석하였다. 분석장비로는 ICP-OES(Optima 7300 DV, Perkin Elmer)를 활용하였으며, 환경의 주요 오염물로 분류되는 As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn에 대한 분석을 실시하였다.

2.3. 씨앗발아에 근거한 벤토나이트 영향

오염물에 대해 비교적 민감성이 높은 씨앗종인

Lactuca sativa L. (Ls, 상추), *Raphanus sativus* L. (Rs, 알타리무), *Malva verticillata* L. (Mv, 치마아욱), *Brassica campestris* L. (Bc, 배추) (농우바이오, Korea)를 사용하여 실험을 수행하였다. 씨앗은 실험 전에 3% H₂O₂로 씨앗 표면을 소독하고 증류수로 세 번 세척 후 사용하였다. 벤토나이트의 농도는 현재 시중 위장약에 함유되어있는 스펙타이트 농도(3 g/20 mL)에 근거하였다. 시료 5 mL를 Petri dish의 여과지에 주입하고, 각각의 Petri dish에 소독한 20개의 씨앗을 정렬 후 parafilm으로 밀봉하여 23°C 암소에서 3일간 배양하였다. 대조군으로는 5 mL의 멸균수를 사용하였으며 모든 실험은 3회 반복 수행하였다. 결과는 배양한 시점으로부터 3일이 경과하여 뿌리 길이가 2 cm 이상 자란 것을 발아한 것으로 간주하였으며 대조군에 대한 실험군의 발아개체수를 백분율로 환산하여 나타내었다.

2.4. 생물 발광에 근거한 벤토나이트 영향

오염물 독성측정을 위해 물질대사 과정 중 발광을 생산하는 유전자가 재조합된 생물발광 변이균주인 *Escherichia coli* DH5⁺RB1436을 사용하였다. 생장 과정 중에 발광을 생성하며 오염물질이 존재할 경우 발광 활성이 저해되는 특성을 가지고 있다. 초저온고에 보관한 균주는 필요시 Luria-Bertanika 고형배지에 계대 배양하여 사용하였다. 실험을 위해 27°C, 130 rpm 조건에서 액체배지에 overnight 배양 후 다시 액체배지에 1:30의 비율로 희석한 후 OD₆₀₀=0.6이 될 때까지 재배양하였다. 균주를 minimum salt medium (MSM)으로 OD₆₀₀=0.2로 희석하여 실험에 사용하였다. 독성측정은 발광 활성영향에 근거하여 측정하였으며 균주 1 mL에 시료 9 mL를 노출시킨 후 27°C, 130 rpm 조건에서 배양하여 0.5시간 간격으로 발광도를 측정하였다. 발광은 시료 0.4 mL을 채취하여 luminometer를 이용하여 측정하였으며 배양 후 1시간과 1.5시간의 발광활성 평균값을 이용하였다. 발광강도 단위는 relative light unit (RLU)이며 최대 한계치는 9,999 RLU이다.

3. 연구 결과 및 고찰

3.1. 벤토나이트 중금속 농도 조사

비정제 14종 벤토나이트에 함유되어 있는 중금속에 대한 농도를 0.1, 1과 5 N HCl 추출액에 근거하여 조사하였다. 환경오염에서 보편적으로 오염과 밀접한 관련이 있는 중금속으로 분류되는 7가지 항목(As, Cd,

Table 1. Ranges of each metals in 0.1, 1, and 5 N HCl bentonite extractants

Extractant	As	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Total _{max} ^a
0.1 N	<0.05 ~ 0.13 ^a	<0.05 ~ 0.54	<0.05 ~ 0.04	<0.05 ~ 0.75	<0.05 ~ 2.96	0.13 ~ 2.58	0.91 ~ 4.34	8.67
1 N	<0.05 ~ 2.75	<0.05 ~ 2.40	<0.05 ~ 12.65	<0.05 ~ 3.05	<0.05 ~ 6.20	1.85 ~ 18.40	1.51 ~ 10.00	31.60
5 N	<0.05 ~ 3.49	<0.05 ~ 3.51	<0.05 ~ 3.42	<0.05 ~ 4.17	<0.05 ~ 2.43	2.43 ~ 18.83	4.41 ~ 30.58	48.86

^aTotal_{max} presents the maximum concentration of seven metals in extractants.

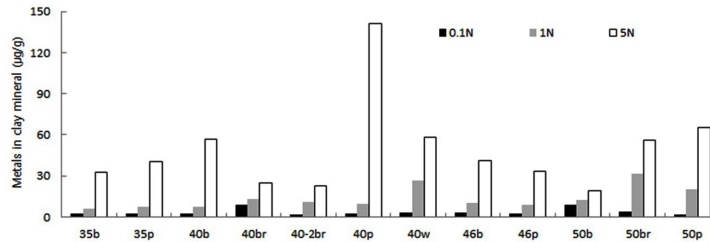


Fig. 1. Total concentrations of seven metals on 0.1, 1, and 5 N HCl bentonite extractants.

Cr, Cu, Ni, Pb, Zn)에 대한 총량은 벤토나이트 1g 당 0.1, 1과 5N에서 1.57 ~ 8.67 µg, 5.9 ~ 31.6 µg 그리고 19.17 ~ 141.3 µg 범위로 각각 조사되었다. 7개 항목 중 일반적으로 Zn (0.1 N 1.87 µg/g, 1 N 4.99 µg/g, 5 N 12.31 µg/g)이 가장 많이 함유되어 있는 것으로 조사되었으며 약산추출액의 농도별 평균 중금속 함량에 근거한 대략적 함량 순서는 다음과 같다: Zn (6.39 µg/g) > Pb (5.16 µg/g) > Cu (1.16 µg/g) > Cr (0.95 µg/g) > Ni (0.93 µg/g) > As (0.52 µg/g) > Cd (0.35 µg/g).

시료 및 항목별 염산 농도에 따라 다양한 용출량이 관찰되었으며, 추출 용액의 산도에 따라 용출되는 금속의 농도가 차이가 있음을 알 수 있었다(Table 1). 예를 들면 0.1 N추출에서 40br와 50b시료의 총함량은 8.53과 8.67 µg/g로 조사되었으나, 5 N추출에서는 40p 시료가 매우 높은 총함량(141.31 µg/g) 농도를 나타내

었다(Fig. 1). 이러한 변화는 벤토나이트의 물리 화학적 특성에 기인할 것으로 판단된다. 또한 HCl의 각 농도에 따른 총함량은 0.1 N을 기준으로 1 N의 경우 1.5 ~ 12.8배의 추출량을 5 N의 경우 6.6 ~ 66.3배의 추출량을 나타내었다. 그리고 5 N은 1 N의 총함량에 비해 1.2 ~ 14.5배의 총함량을 나타내었다. 이들 간의 상관관계에 대해서 비교분석한 결과 상관관계(R²)값은 모두 0.2 미만으로 매우 낮은 상관관계를 나타내었다.

3.2. 벤토나이트가 생물발광 및 씨앗 발아에 미치는 영향

벤토나이트가 미칠 수 있는 영향을 파악하기 위해 환경독성법의 일종인 생물발광과 씨앗발아를 이용하여 기초 독성여부를 조사하였다. 벤토나이트 농도는 기초 실험 과정을 거친 후, 현재 시중 위장약에 함유되어 있는 스펙타이트 농도(스펙타이트 3 g/용액 20 mL 함유

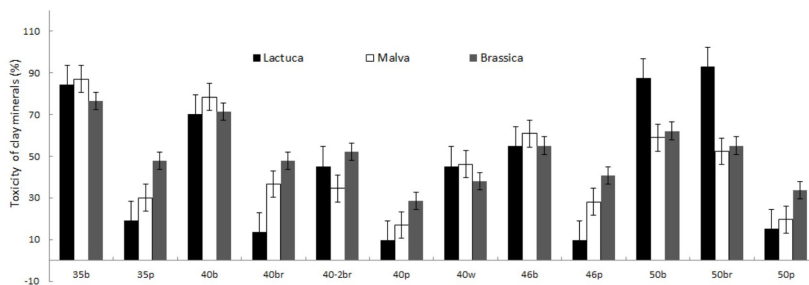


Fig. 2. Toxicity of bentonites on seed germination of three seeds type.

Table 2. Summary of the effects of bentonite on the activity of bacterial bioluminescence and seed germination

Clay minerals	Toxicity (%)		
	bioluminescence	seed germination	total average
35b	16±6.8	83±5.5	66±33.6
35p	25±19.3	32±14.5	31±12.4
40b	62±5.7	73±4.5	70±7.1
40br	86±1.5	33±17.5	46±30.2
40-2br	88±2.0	77±8.8	55±23.2
40p	-3±12.9	18±9.6	13±13.1
40w	22±12.1	43±4.5	38±11.2
46b	50±6.8	57±3.4	55±4.4
46p	29±5.0	26±15.6	27±12.8
50b	96±1.0	69±15.6	76±18.1
50br	98±0.5	67±22.7	74±23.9
50p	83±1.4	23±9.6	38±31.1

에 대하여 조사하였다. 환경독성조사를 위해 유전자 재조합균주의 발광활성과 상추(*Lactuca*), 알타리무(*Raphanus*), 치마아욱(*Malva*), 배추(*Brassica*)의 씨앗발아에 근거하여 평가하였으며 각 씨앗별 독성결과를 Fig. 2에 표시하였다. 알타리무의 경우 다른 씨앗과 독성이 상이하게 나타나(-20.4 ~ 47.1%) 해당 그래프에서 제외하였다. 씨앗발아 및 발광활성의 평균과 전체 평균을 Table 2에 요약하였다. 일반적인 환경오염 시료에 대한 결과와 동일하게 생물 종별 상이한 민감도가 조사되었다. 일부 활성 촉진도 관찰되었으나 대부분 활성 억제 영향을 나타내었다. 생물발광은 최저 0%에서 98%(50br)까지 독성을 나타내었다. 씨앗 중 알타리무는 다른 3종의 씨앗과는 달리 발아 촉진 현상이 4종류(40br, 40-2br, 40p, 40w) 벤토나이트에서 관찰되는데 이는 알타리무 씨앗의 크기가 실험에 사용된 다른 씨앗에 비해 약 4 ~ 5배의 부피를 가지고 있어 비교적 큰 씨앗으로 씨앗 크기가 미치는 영향 때문인 것으로 사료된다. 씨앗에 대한 독성으로는 알타리무 씨앗을 제외한 평균독성은 최저 5%에서 최고 93%(50br)로 생물발광과 비슷한 수치를 나타내었다.

씨앗 중 가장 높은 독성영향을 보인 것은 44.34%로 배추였으며 씨앗별 각 벤토나이트에 대한 독성차이는 상이하게 나타났으나 평균독성은 통계학적으로 차이가 없는 것으로 나타났다 (p -value > 0.65). 벤토나이트에 대한 평균독성은 씨앗발아(41.8%)보다 생물발광(48.4%)이 높게 나타났으나 통계학적으로는 차이가 없

Table 3. Comparisons of toxicity of bentonites, grouped with same color

Bentonites	Color	Toxicity (%)
35b, 40b, 46b, 50b	blue	67±8.7
35p, 40p, 46p, 50p	pink	27±10.4
40br, 40-2br, 50br	brown	58±14.5
40w	white	38

는 것으로 나타났다(p -value > 0.60).

3.3. 벤토나이트 독성 영향분석

약산(0.1, 1, 5 N HCl)으로 추출된 벤토나이트의 중금속 함량(7항목)과 독성 간의 상관관계를 조사하였다. 모든 독성결과와 중금속 함량과는 뚜렷한 상관성을 관찰할 수 없었다. 0.1 N HCl 추출 결과에서 씨앗의 독성영향과 벤토나이트 내 중금속 함량의 R^2 은 0.045 이하로 생물발광($R^2=0.0652$)보다 낮은 상관성을 나타내었다. 따라서 중금속 함량과 생물발광 및 씨앗 발아 독성과의 상관성은 관찰할 수 없었다. 하지만 5 N HCl 추출 함량 비교 관계에서 중금속 함량이 높아짐에 따라 대부분 독성정도가 감소하는 경향이 조사되었다. 특히 상추씨앗에서 이러한 경향성이 조사되었는데, 예를 들면 중금속함량 22.4 $\mu\text{g/g}$ 과 141.3 $\mu\text{g/g}$ 에서 각각 45.2%와 9.6%의 독성을 나타내었다. 따라서 현 단계의 연구결과에서는 벤토나이트 내 중금속 함량과 독성 사이의 뚜렷한 상관관계를 파악할 수 없었다. 또한, 독성영향의 원인이 벤토나이트 내 중금속 함량인지 아니면 점토입자 자체에 의한 영향인지 구분할 수 없었다. 따라서 벤토나이트가 미칠 수 있는 위해성은 벤토나이트 내 함유되어있는 화합물의 조성뿐만 아니라 입자 자체의 성질 등 여러 복잡한 요인들에 의해 발생할 수 있을 것이다.

본 연구에서 벤토나이트별 경향을 파악하기 위해 색깔별 통합 독성결과를 나타내었다(Table 3). 벤토나이트의 색깔별 독성비교 결과 뚜렷한 독성차이(p -value > 0.35)를 관찰할 수 있었으며 제올라이트보다는 벤토나이트가 높은 독성을 나타내었고, 벤토나이트 종류에서는 독성이 청색(67%) > 갈색(58%) > 흰색(38%) > 핑크색(27%) > 노란색(12%)의 순서로 조사되었다. 높은 독성을 보인 청색 벤토나이트가 낮은 독성을 보인 노란색 벤토나이트에 비해 약 5배 높은 독성을 나타내었다. 이러한 결과는 벤토나이트의 색상을 구성하는 물질이나 또는 색상을 형성하는 과정이 독성에 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있음을 시사한다. 하지만

현재로서는 벤토나이트가 갖는 색상의 원인이 정확하게 밝혀져 있지 않고, 조사한 시료의 수가 적고 또한 벤토나이트의 특성 파악이 부족하기 때문에 색상이 독성에 영향을 미치는 정확한 원인을 설명할 수는 없다. 향후 정확한 원인 규명을 위해서는 벤토나이트의 색상이 갖는 특성 및 원인 등의 조사와 다양한 시료에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

4. 결 론

식의약품의 첨가물로 사용가능한 벤토나이트가 미칠 수 있는 영향에 대한 기초 실험을 통해서 다음과 같은 결론들을 도출할 수 있었다. 먼저 벤토나이트의 약산추출 중금속 함량과 벤토나이트가 미칠 수 있는 영향(독성)과는 상관성이 매우 낮은 것으로 나타났다. 또한 푸른색의 벤토나이트의 평균독성이 다른 광물에 비해 높게 조사되었으며 벤토나이트의 색깔과 독성사이에 상관관계가 있을 가능성을 확인하였다.

따라서 기초 조사에 대한 연구결과는 향후 벤토나이트의 식의약품 적용을 위해 필요한 다양한 기초 독성 자료로 활용될 수 있을 것이다. 적절한 영향인자를 파악하기 위해서는 추가적으로 정제 시료에 대한 조사,

벤토나이트의 색상에 대한 분석, 다양한 종류의 시료 및 생물 검정법 적용, 입자와 점토함유물에 의한 영향 구분 등에 대한 조사가 진행되어야 할 것이며, 특별히 시료 특성에 대한 광범위한 조사도 필요하다고 사료된다.

사 사

본 연구는 한국지질자원연구원의 주요사업인 “국내 식품의약품용 점토광물 개발을 위한 융합연구”과제의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Lafi, S.A. and Al-Dulaimy, M.R. (2011) Antibacterial effect of some mineral clays in vitro. *Egypt Academic Journal of Biology Science*. 3(1), 75-81.
- Tang, Y.J., Jia, J.Y. and Xie, X.D. (2002) Environment significance of clay minerals. *Earth Science Frontiers*. 9(2), p.578.
- Tang, Q., Shen, S.Y., Liang, J.S., Liang, G.C., Ou, X.Q., Wang, L.J. and Ding, Y. (2005) Pharmacological effects and pharmaceutical application of clay minerals. *Journal of the Chinese Ceramic Society*. 33(8), 1036-1040.
- Zhu, H. and Njuguna, J. (2013) Current trend of clay mineral application in advanced materials. *Nanoproduct Review Journal*. 1(1), 1-21.