

*Chlorella vulgaris*의 흡광도, 클로로필 및 개체수 통합 영향에 근거한 중금속 및 나노입자 독성 조사

장현진, 이문희, 이은진, 양신, 공인철*

영남대학교 환경공학과
38541 경북 경산시 대학로 280

(2016년 9월 27일 접수; 2016년 10월 27일 수정본 접수; 2016년 10월 28일 채택)

Toxicity Evaluation of Metals and Metal-oxide Nanoparticles based on the Absorbance, Chlorophyll Content, and Cell Count of *Chlorella vulgaris*

Hyun Jin Jang, Mun Hee Lee, Eun Jin Lee, Xin Yang, and In Chul Kong*

Department of Environmental Engineering, Yeungnam University
280 Daehak-ro, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 38541, Korea

(Received for review September 27, 2016; Revision received October 27, 2016; Accepted October 28, 2016)

요 약

본 연구에서는 중금속 7종(Cu, Cd, Cr, As(III), As(V), Zn, Ni) 및 나노입자 5종(CuO, ZnO, NiO, TiO₂, Fe₂O₃)에 대한 독성을 수계 대표 생물종인 녹조류 *Chlorella vulgaris*를 이용한 생물검정법으로 평가하였다. 조류에 미치는 영향은 흡광도, 클로로필 및 개체수 측정에 대한 결과를 통합하여 평가하였다. 중금속의 통합결과독성(TEC₅₀) 순서는 Cr (0.7 mg L⁻¹) > Cu (1.7 mg L⁻¹) > Cd (3.2 mg L⁻¹) > Zn (3.9 mg L⁻¹) > Ni (13.2 mg L⁻¹) > As(III) (17.8 mg L⁻¹) ≫ As(V) (> 1000 mg L⁻¹)로 나타났다. 중금속은 측정종말점에 따라 일부 상이한 민감도와 독성이 조사되었다. 나노입자의 독성(TEC₅₀) 순서는 ZnO (2.4 mg L⁻¹) > NiO (21.1 mg L⁻¹) > CuO (36.6 mg L⁻¹) > TiO₂ (62.5 mg L⁻¹) > Fe₂O₃ (82.7 mg L⁻¹)로 나타났다. 나노입자는 측정종말점간에 비슷한 민감도와 독성을 보였다. 따라서 오염물의 독성을 평가하기 위해서 단일 방법에 의한 결과보다는 다양한 측정종말점의 통합결과에 근거한 접근이 적절할 것이다.

주제어 : 나노입자, 생물검정법, 조류, 중금속, 통합결과

Abstract : In this study, toxicities of seven metals (Cu, Cd, Cr, As(III), As(V), Zn, Ni) and five metal oxide nanoparticles (NPs: CuO, ZnO, NiO, TiO₂, Fe₂O₃) were evaluated based on the growth of *Chlorella vulgaris*. Effect on algae growth was evaluated by integrating the results of absorption, chlorophyll content, and cell count. The toxicity rankings of metals was observed as Cr (0.7 mg L⁻¹) > Cu (1.7 mg L⁻¹) > Cd (3.2 mg L⁻¹) > Zn (3.9 mg L⁻¹) > Ni (13.2 mg L⁻¹) > As(III) (17.8 mg L⁻¹) ≫ As(V) (> 1000 mg L⁻¹). Slightly different orders and sensitivities of metal toxicity were examined depending on endpoints of algal growth. In case of NPs, regardless of endpoints, similar toxicity rankings of NPs (TEC₅₀) were observed, showing ZnO (2.4 mg L⁻¹) > NiO (21.1 mg L⁻¹) > CuO (36.6 mg L⁻¹) > TiO₂ (62.5 mg L⁻¹) > Fe₂O₃ (82.7 mg L⁻¹). These results indicate that an integrating results of endpoints might be an effective strategy for the assessment of contaminants.

Keywords : Algae, Bioassay, Integrating results, Metal, Nanoparticle

1. 서 론

산업 발달과 더불어 다양한 화학물질의 생산 및 사용이 증가함에 따라 오염물에 대한 안정성 확인이 중요한 환경 문제

로 부각되고 있다. 다양한 오염물 중에서 중금속은 무기오염물의 주된 종류이며 화학물질 합성 및 다양한 생산품 제조 등에 사용되고 있다[1]. 중금속은 생물체의 활성에 중요한 요소이며 환경, 특히 토양 중에 일정량 배경농도로 존재한다.

* To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ickong@ynu.ac.kr; Tel: +82-53-810-2546; Fax: +82-53-810-4624

doi: 10.7464/ksct.2017.23.1.027 pISSN 1598-9712 eISSN 2288-0690

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 the original work is properly cited.

배경농도보다 높은 농도로 노출될 경우 생태계에 부정적 영향을 나타낼 수 있는 주요 환경오염물로 인식되고 있다. 또한 중금속은 생분해되지 않기 때문에 생태계 내에 반영구적으로 잔류할 수 있으며, 생물체 내 고농도로 축적되어 독성 영향을 미칠 수 있다. 따라서 인체 및 생태계에 미치는 잠재적인 독성 영향에 대한 평가는 매우 필요하다[2]. 사람의 생활이나 산업 활동에 기인한 유기물, 지속성 유기오염물질(persistent organic pollutants, POPs), 중금속을 포함한 각종 오염물질은 하천, 대기 등 다양한 경로를 통하여 유입된다[3]. 산업현장으로부터 대량으로 배출되는 중금속은 토양입자에 쉽게 흡착되어 토양 내 중금속 축적을 유발할 뿐 아니라, 수질 오염 및 식생 파괴와 같은 2, 3차의 오염을 유발할 수 있다.

나노입자는 천만분의 1미터($100\text{ nm} = 100 \times 10^{-9}\text{ m}$) 이하인 입자를 말하며 일반적으로 동일한 화학적 구성의 물질이라도 나노크기에 따라 영향이 상이한 것으로 알려져 있다. 나노과학이 발전하면서 다양한 종류의 나노물질이 생산, 이용되며 점차 나노물질의 이용분야는 전자공학, 바이오의약, 화학, 생물학, 에너지생산 공정, 환경 등 매우 다양해지고 있다[4]. 나노입자는 빠른 확산속도, 단위 부피당 넓은 반응 표면적, 액체 혹은 기체상에서의 탁월한 반응성, 생물분자와의 비슷한 크기 등의 매우 흥미로운 특징들을 가지고 있다. 그러나 다양한 활용분야에서의 무분별한 사용과 사용량 및 환경 누출에 대한 통제가 이루어지고 있지 않는 실정이다. 또한 환경에 노출된 나노물질은 특성에 따라 다양한 노출 경로, 물리화학적 특성변화와 그 거동 예측이 쉽지 않으며 인체 및 환경에서의 거동 또한 기존의 화학물질과는 다른 특성을 나타낸다[5].

나노입자의 대기노출은 인체의 호흡과 직접 관련되며, 수계노출은 음용수의 잠재오염을 야기할 수 있게 된다. 토양환경은 나노입자의 축적가능성이 높고, 육상생태계와 직접적으로 관련되어[6] 나노물질의 환경노출을 증가시키고, 노출된 나노물질들이 물 혹은 공기를 매체로 인간의 몸속으로 이동하는 과정을 통해 환경이나 사람의 건강에 미칠 독성 영향이 매우 클 것으로 생각된다[7].

위해성 평가의 일환으로 사용되는 생물검정법(bioassay)은 오염물이 생태계에 미치는 위해성을 결정하기 위한 중요한 정보를 제공한다. 생물검정법은 독성물질에 대한 생물 반응 및 다양한 변화를 관찰하고 그 결과에 근거하여 오염정도를 평가하는 것으로 화학적 방법에 비해 측정 및 분석의 편리성, 분석 시간의 단축 및 비용의 저렴성, 무엇보다도 생물이용성

(bioavailability)에 대한 정보 제공의 장점을 가진다[8]. 오염물에 대한 생물검정법에서는 척추 및 무척추 동물, 식물, 어류, 박테리아, 조류(algae) 등 다양한 생물체를 사용할 수 있다. 특히 미세조류(micro algae)는 광범위한 서식지 분포, 실험의 용이성, 신속성, 저비용 등의 측면에서 우수하여 수생태독성 평가에 광범위하게 사용되는 생물종이다[9]. 생물검정법은 다양한 생물종의 상이한 측정종말점(치사율, 출산율, 먹이 섭취, 이동성, 호흡량, 성장, 유전자 변이, 효소 활성 등)에 근거하여 오염물의 환경독성 정도를 평가한다[10]. 환경 생물검정법을 이용한 오염물의 위해 정도 평가 및 결과 해석에서 일반적으로 생물종 및 측정종말점에 따라 오염물에 대한 상이한 민감도를 보인다[11]. 따라서 단일방법에 의한 평가보다는 다양한 방법에 근거한 오염물 독성 평가 접근법이 필요하며, 생물종에 따라 상이한 민감도에 의한 생물검정법 결과의 통합은 오염물 혹은 오염 환경의 모니터링에 더욱 적절한 정보를 제공해 줄 것이다[12].

따라서 본 연구에서는 미세조류인 *Chlorella vulgaris*를 이용하여 중금속 7종(Cu, Cd, Cr, As(III), As(V), Zn, Ni) 및 나노입자 5종(CuO, ZnO, NiO, TiO₂, Fe₂O₃)에 대한 생태독성평가를 수행하였다. 독성평가는 흡광도, 클로로필, 개체수에 대한 측정종말점 측정결과를 비교하고 통합하여 평가하였다.

2. 실험방법

2.1. 조류 배양 및 평가

본 실험에서는 녹조류의 일종인 *Chlorella vulgaris*를 한국생명연구원(KCTC, No AG10002)에서 분양받아 사용하였다. 배지는 조류 배양액으로 상용화 되어있는 BG-11 액체배지를 사용하였으며 배지의 조성은 다음과 같다(Table 1). 미세조류를 배양액과 1 : 10 (v/v)으로 혼합하여 조류를 충분히 활성화시킨 후($OD_{730} = 0.6 \sim 0.7$) (optical density, 흡광도) BG-11 액체배지로 $OD_{730} = 0.3$ 으로 희석하고 오염물을 노출시켜 영향을 관찰하였다. 영향 평가를 위해 활성 조류 19 mL에 오염물 1 mL (총량 20 mL)를 혼합하고, 30 °C, 150 rpm, 5,000 lux에서 72 h 노출 후 평가하였다.

2.2. 조사대상 중금속 및 나노입자와 분석법

실험에 사용한 중금속 및 나노입자는 다음과 같다: CuCl₂·2H₂O (Yakuri Chemical Co., Ltd., Japan), CdCl₂·H₂O (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan), Na₂HAsO₂ (Sigma, USA), Na₂HAsO₄

Table 1. Compositions of the media used for algal growth

| Trace minerals (1 L) | BG-FPC (1 L) | BG11-broth (1 L) |
|--|---|--|
| H ₃ BO ₃ 2.86 g | CaCl ₂ · 2H ₂ O 0.36 g | BG-FPC 10 mL |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O 1.81 g | NaNO ₃ 14.958 g | Ferric ammonium citrate 0.006 g |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O 0.222 g | MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.749 g | Na ₂ CO ₃ 0.02 g |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O 0.39 g | Citric acid 0.06 g | K ₂ HPO ₄ 0.0305 g |
| CuSO ₄ 0.079 g | 0.25 M Na-EDTA (pH 3.0) 0.112 mL | 1 M Tes-KOH (pH 8.2) 2.8 g |
| Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O 0.0494 g | Trace minerals 10 mL | |

(Wako, Japan), K_2CrO_4 (Kanto Chemical Co. Inc., Japan), $ZnCl_2$, $NiCl_2$ (Daejung chemical Co., Ltd., Korea), CuO (30-50 nm), NiO (30 nm), TiO_2 (30-50 nm), ZnO (40-100 nm) (Alfa Aesar, USA), Fe_2O_3 (20-40 nm) (Nanostructured & Amorphous Materials Inc., USA).

독성 결과는 US. EPA's Center for Exposure Assessment Modeling (CEAM)에서 제공하는 Trimmed Spearman Karber method을 이용하여 EC_{50} 으로 나타내었다. EC_{50} 은 오염물이 조류 활성영향에 미치는 영향을 대조군과 비교한 백분율로써 컴퓨터 SPEARMAN 프로그램을 사용하여 추정하였다[13]. 오염물 영향측정은 3회 반복 수행하였다.

2.3. 측정종말점 분석 방법

조류 활성에 중금속이 미치는 영향은 (1) 흡광도 (2) 클로로필 함량 (3) 개체수에 근거하여 비교하였다. 측정은 UV/Vis 분광기(SHIMADZU 1240 UV Mini, Korea)를 이용하여 730 nm 파장에서 측정하였다. 클로로필 함량 측정은 수질오염공정시험방법을 변형하여 사용하였으며, 개략적 방법은 다음과 같다. 시료 적당량을 유리섬유여지(GF/C, 0.45 μm)로 여과한 다음 여지를 마쇄기에 넣고 아세톤(9+1) 10 mL을 넣어 마쇄하였다. 마쇄한 시료를 마개 있는 원심분리관에 넣고 밀봉하여 4 $^{\circ}C$ 에서 암소 보관한 다음, 20 min 동안 원심분리(500 g)하여 상등액을 분리하였다. 분리한 상등액은 UV/Vis 분광기를 이용해 630 nm, 645 nm, 663 nm, 750 nm 파장에서 흡광도를 측정한 후 클로로필의 함량은 아래에 근거하여 계산하였다.

$$\text{Chlorophyll (mg m}^{-3}\text{)} = Y \times \text{상등액량(mL)} / \text{여과 시료량(L)} \quad (1)$$

$$Y = 11.64(OD_{663} - OD_{750}) - 2.16(OD_{645} - OD_{750}) + 0.010(OD_{630} - OD_{750}) \quad (2)$$

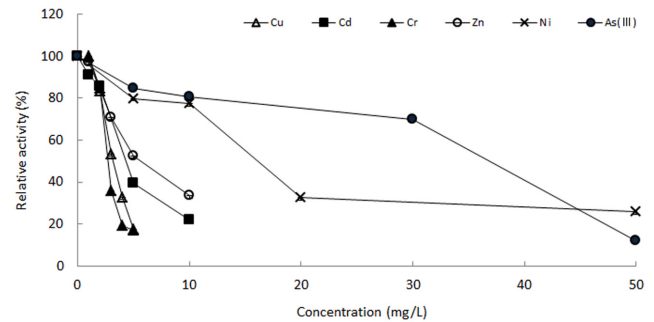
개체수 측정은 카운팅챔버(counting chamber)인 유리 기판에 시료를 주입하고 현미경을 통하여 계수하였다. 카운팅챔버는 유리 기판 위에 폭 2 μm 의 금속선으로 미세 격자(micro lattice, 50 $\mu m \times 50 \mu m$)가 표시되어 있으며 세포 주입을 위해 0.1 μm 의 공간이 형성되어 있다. 본 실험에서는 시료를 마이크로피펫(pipette)으로 카운팅챔버에 10 μL 주입 후 격자를 보면서 계수하였다. 이 과정에서 밀도(개체수/10 μL)를 계산하여 배양액의 개체수를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

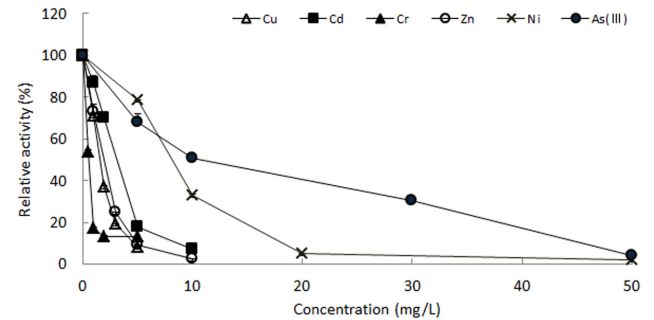
3.1. 단일 중금속 영향 평가

중금속 7종에 대한 민감도(독성)를 상이한 측정종말점인 흡광도, 클로로필 함량, 개체수 측정에 근거하여 조사하였다. 중금속을 첨가하지 않은 대조군의 경우 평균 클로로필 함량, 개체수 및 흡광도(OD_{730})는 $24,010 \text{ mg m}^{-3}$, $2.39 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 와

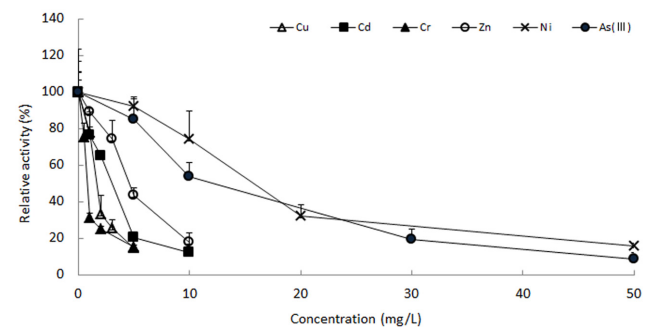
1.50으로 관찰되었다. 중금속에 대한 독성은 측정종말점에 따라 일부 상이하게 조사되었으나, 일반적으로 모든 측정종말점에 대한 독성 영향을 다음과 같이 관찰할 수 있었다 (Figure 1): (1) As(V) (낮은 독성), (2) As(III), Ni (중간 독성), (3) Cr, Cu, Cd, Zn (높은 독성). 금속별 일부 농도에서의 세가지 측정종말점에 대한 독성 영향을 살펴보면, 2 mg $Cu \text{ L}^{-1}$ 에서 46.8 ~ 67.0%, 1 mg $Cr \text{ L}^{-1}$ 에서 64.3 ~ 82.7%, Cd, Zn의 경우 5 mg L^{-1} 에서 독성이 각 60.4 ~ 82.4%, 47.6 ~ 90.8%로 조사되었다. 이들에 비해 Ni, As(III)는 상대적으로 낮은 독성을 나타내었으며, 20 mg $Ni \text{ L}^{-1}$ 에서 67.5 ~ 94.8%, 30 mg $As(III) \text{ L}^{-1}$ 에서 30.1 ~ 80.6%의 독성이 조사되었다. 조사한 다른 금속에 비해 낮은 독성을 보인 As(V)는 측정종말점에 따라 다음 범위의 독성을 나타내었다: 200 mg L^{-1} 에서 9.7 ~ 33.0%, 800 mg L^{-1} 에서 56.5 ~ 86.0%. 본 연구에서 As(III)는 As(V)에



(a) absorbances



(b) chlorophyll content



(c) cell count

Figure 1. Effects of heavy metals on algal growth: (a) absorbances, (b) chlorophyll content, (c) cell count.

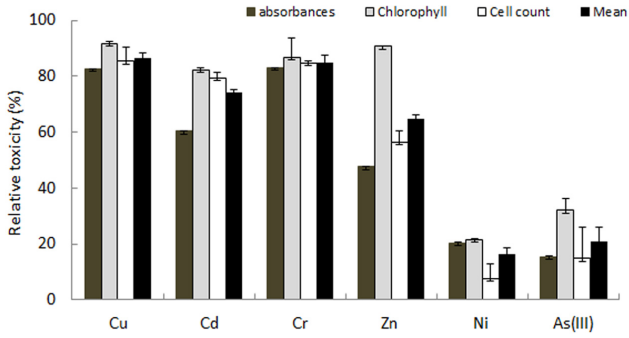


Figure 2. Comparisons of the effects of metals on absorbances, chlorophyll content, and cell count of algal growth at 5 mg L⁻¹ (no effect with As(V) at this concentration).

비해 약 40배 정도 높은 독성이 관찰되어 As(III)는 As(V)에 비해 보편적으로 독성이 상당히 높다는 연구 결과[14]와 동일한 결과를 보였다.

금속 오염물간의 영향을 비교하기 위해 노출 농도 5 mg L⁻¹에 대한 결과를 Figure 2에 나타내었다. 전체적으로 모든 조사 대상 금속에 대해 클로로필 함량(21.6~91.8% 독성)이 민감한 결과를 나타내었다. 흡광도(15.4~83.2% 독성) 및 계수(7.6~85.4% 독성) 측정종말점 조사는 오염물에 따라 상이한 결과를 나타내었다. As(V) (EC₅₀ > 1000 mg L⁻¹)를 제외한 금속별 EC₅₀범위는 다음과 같이 조사되었다(Table 2): Cu 1.5~2.1 mg L⁻¹, Cd 2.6~4.3 mg L⁻¹, Cr 0.5~0.9 mg L⁻¹, As(III) 10.8~30.7 mg L⁻¹, Zn 1.7~5.6 mg L⁻¹, Ni는 7.8~16.0 mg L⁻¹. 조사한 금속 중에서 Cr이 가장 높은 독성을 나타내었으며, As(III)와 비교하여 대략 20~30배 정도 높은 독성을 나타내었다. 또한 측정종말점별 EC₅₀범위는 흡광도 0.9~30.7 mg L⁻¹, 클로로필 0.5~10.8 mg L⁻¹, 개체수 0.8~15.8 mg L⁻¹로 조사되었으며, 클로로필 함량에 대한 민감도가 흡광도보다 높게 조사되었다. 또한 클로로필 함량과 흡광도 간의 통계학적 유의도(차이)인 *p*(probability) value를 조사한 결과 As(V)를 제외한 모든 중금속에서 *p*-value가 통계적으로 유의하게 조사되었다(*p*-value < 0.0106). 따라서 금속 오염물 종류 및 측정종말점에 따라 상이한 조류생장 억제 영향(독성)을 나타

냄을 확인할 수 있었다.

Kong and Lee [15]의 씨앗 발아와 생물발광 독성 평가의 중금속별 EC₅₀에 근거한 조사에서 중금속별 평균 독성은 아래와 같은 결과를 보였다: As(III) 1.05 mg L⁻¹, As(V) 2.55 mg L⁻¹, Cr(VI) 25.7 mg L⁻¹, Cu 4.2 mg L⁻¹, Cd 2.0 mg L⁻¹. As(III)는 1.05 mg L⁻¹로 가장 높은 독성을 보여 조류를 이용한 독성 평가와 매우 상이한 결과를 나타내었다. 조류를 이용한 독성 평가에서 비교적 낮은 독성을 보이는 As(III) (EC₅₀ 10.8~30.7 mg L⁻¹)는 씨앗 발아 1.02 mg L⁻¹, 생물발광 1.10 mg L⁻¹에서 50% 영향(EC₅₀)을 나타내었다. 씨앗 발아에서 As(V)의 경우 EC₅₀이 3.0 mg L⁻¹인 반면 조류를 이용한 평가에서는 EC₅₀ > 1000으로 230배 이상 높은 민감도를 나타내었다.

3.2. 단일 나노입자 영향 평가

나노입자 5종에 대한 민감도(독성)를 두 가지의 측정종말점인 클로로필 함량(대조군 평균 24,010 mg m⁻³)과 개체수(대조군 평균 2.39 × 10⁷ mL⁻¹) 측정에 근거하여 조사하였다. 흡광도에 대한 관찰은 나노물질의 색깔이 흡광도에 미치는 영향 때문에 제외하였다. 나노입자에 대한 독성은 클로로필과 개체수 측정 모두에서 공통적으로 나노입자의 농도가 높을수록 조류 활성이 감소하였다(Figure 3). Fe₂O₃, TiO₂가 가장 낮은 독성을 보였으며 ZnO, NiO, CuO 순으로 높은 독성을 보인다. 나노입자별 일부농도에서의 독성 영향을 살펴보면, ZnO의 경우 3 mg L⁻¹에서 53.7~54.9%로 가장 높은 독성을 보였지만 CuO는 50 mg L⁻¹에서 52.5~60.0%, NiO는 30 mg L⁻¹에서 54.1~69.8%의 독성을 나타냈다. TiO₂와 Fe₂O₃는 비교적 낮은 독성을 나타내었으며 90 mg L⁻¹에서 각 56.7~63.7%, 45.5~59.2%의 독성을 나타내었다.

측정종말점별 나노입자에 대한 EC₅₀범위는 클로로필(2.6~89.5 mg L⁻¹), 개체수(2.1~75.9 mg L⁻¹)로 조사되었으며, 금속 오염물에 대한 결과와는 상이하게 측정종말점에 따라 유사한 조류생장 억제 영향(독성)을 나타냄을 확인할 수 있었다. 나노입자별 측정종말점에 대한 각 EC₅₀을 보면 CuO, NiO의 경우 개체수에 민감하고, TiO₂, ZnO, Fe₂O₃는 클로로필에 더 민감하다는 것을 알 수 있다. 두 측정종말점에 대한 EC₅₀에 근

Table 2. Effects of heavy metals on the absorbances, chlorophyll content, and cell count of algal growth

| End points | EC ₅₀ (mg L ⁻¹) | | | | | | |
|---------------------------------|--|--------------------|--------------------|---------------------|----------|--------------------|---------------------|
| | Cu | Cd | Cr | As(III) | As(V) | Zn | Ni |
| Absorbances | 2.1 (1.90~2.40) ^{a)} | 4.3 (3.70~5.06) | 0.9 (0.78~1.05) | 30.7 (26.4~35.7) | > 1000 | 5.6 (4.51~6.84) | 16.0 (13.3~19.2) |
| Chlorophyll contents | 1.5 (1.34~1.76) | 2.7 (2.41~3.12) | 0.5 (0.44~0.63) | 10.8 (8.08~14.3) | > 1000 | 1.7 (1.47~1.95) | 7.8 (6.98~8.66) |
| Cell counts | 1.6 (1.43~1.81) | 2.6 (2.20~3.08) | 0.8 (0.66~1.90) | 12.1 (10.4~14.1) | > 1000 | 4.6 (3.95~5.26) | 15.8 (13.7~18.3) |
| TEC ₅₀ ^{b)} | 1.7 ± 0.32 | 3.2 ± 0.95 | 0.7 ± 0.21 | 17.8 ± 11.13 | 1000 ± 0 | 3.9 ± 2.03 | 13.2 ± 4.68 |

^{a)}Value is the range of the 95% confidence level (low limit~high limit)

^{b)}TEC₅₀ (total EC₅₀) is the average of three EC₅₀s

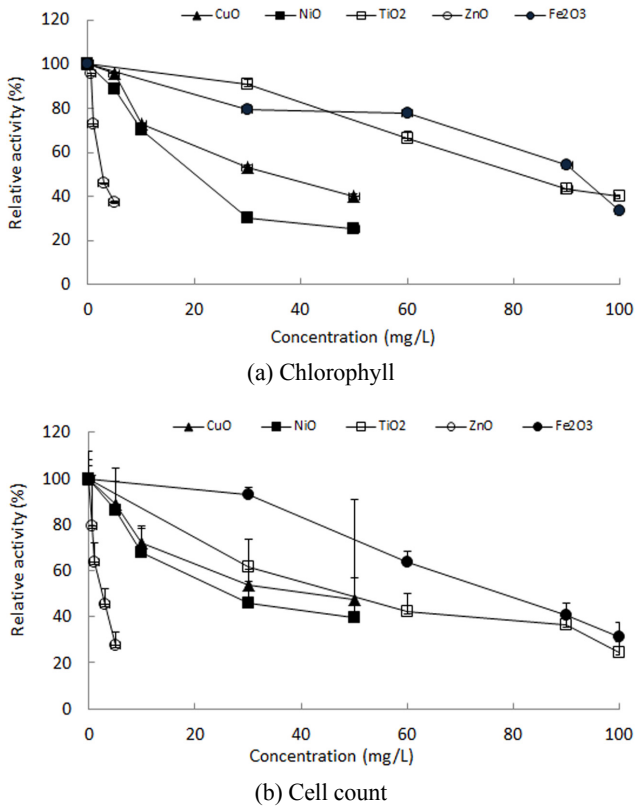


Figure 3. Effect of the NPs on algal growth: (a) chlorophyll content and (b) cell count.

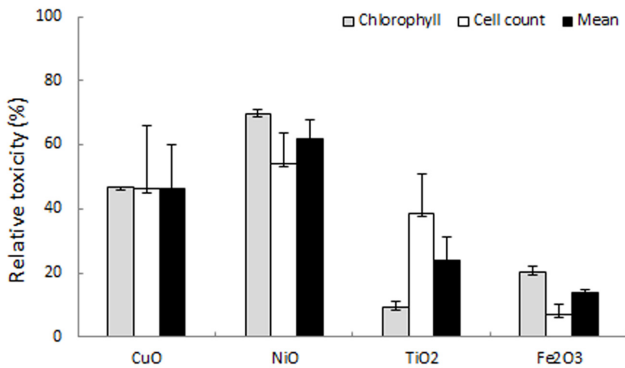


Figure 4. Comparisons of the effects of NPs on chlorophyll content and cell count of algal growth at 30 mg L⁻¹.

거하여 나타난 독성 순서는 다음과 같다: ZnO (2.1 ~ 2.6 mg L⁻¹) > NiO (17.6 ~ 25.2 mg L⁻¹) > CuO (33.1 ~ 40.2 mg L⁻¹) > TiO₂ (45.1 ~ 79.9 mg L⁻¹) > Fe₂O₃ (75.9 ~ 89.5 mg L⁻¹) (Table 3). Gu and Kong [16]의 *Lactuca* 씨앗 발아에 대한 나노입자의 평가에서는 CuO (0.46 mg L⁻¹) > ZnO (10.8 mg L⁻¹) > NiO (17.2 mg L⁻¹) > TiO₂, Fe₂O₃ (> 1000 mg L⁻¹)의 순서로 상이한 독성 순서 및 민감도를 나타내었다. 조류에서는 CuO는 약 36 mg L⁻¹, 상추 씨앗 발아에서는 0.46 mg L⁻¹에서 50%의 영향 (EC₅₀)을 나타내었다. 또한 씨앗 발아 조사에서 1000 mg L⁻¹ TiO₂와 Fe₂O₃ 최대조사농도에서 영향이 관찰되지 않았으나, 조류에 대해서는 민감한 결과를 나타내었다. 따라서 씨앗

Table 3. Effects of NPs on the chlorophyll content and cell count of algal growth

| NP | EC ₅₀ (mg L ⁻¹) | | TEC ₅₀ ^{b)} (mg L ⁻¹) |
|--------------------------------|--|------------------|---|
| | Chlorophyll | Cell count | |
| CuO | 33.1 (19.4~56.4) ^{a)} | 40.2 (23.9~67.6) | 36.6 |
| NiO | 17.6 (14.3~21.6) | 25.2 (16.6~38.4) | 21.1 |
| TiO ₂ | 79.9 (69.1~92.4) | 45.1 (34.4~59.2) | 62.5 |
| ZnO | 2.6 (1.78~3.89) | 2.1 (1.59~2.69) | 2.4 |
| Fe ₂ O ₃ | 89.5 (81.2~98.7) | 75.9 (68.5~84.2) | 82.7 |

^{a)}Value is the range of the 95% confidence level (low limit~high limit)

^{b)}TEC₅₀ (total EC₅₀) is the average of two EC₅₀s

발아가 대체적으로 나노입자에 대해 민감한 영향을 받지만, 나노입자 종류에 따라 조류가 민감한 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

나노입자 오염물간의 영향을 비교하기 위해 노출 농도 30 mg L⁻¹에 대한 결과를 Figure 4에 나타내었다. ZnO는 다른 나노입자 보다 높은 독성을 나타내었기 때문에 그림에 나타내지 않았다. ZnO를 제외한 나노입자의 모든 측정종말점 영향에 대한 평균값에 근거할 때 독성 순서는 다음과 같이 조사되었다: NiO (62.0 ± 5.95%) > CuO (46.5 ± 13.82%) > TiO₂ (23.9 ± 7.18%) > Fe₂O₃ (13.8 ± 0.99%). 전체노출농도에서 측정종말점의 결과는 클로로필 함량(9.2 ~ 69.8%), 개체수(7.2 ~ 54.1%)로 오염물질별 상이한 민감도 결과를 보인다. ZnO의 독성은 0.5 mg L⁻¹에서 12.7 ± 15.67%로 30 mg L⁻¹에서 가장 낮은 독성을 보인 Fe₂O₃보다 약 60배 높은 민감도를 보인다. ZnO의 경우 클로로필(4.4 ~ 62.4%)보다 개체수(20.9 ~ 72.4%)에서 더 민감하다는 것을 알 수 있었다.

3.3. 통합결과에 근거한 중금속 및 나노입자 영향 평가

금속별 측정종말점에 따른 조류활성에 미치는 영향을 통합 결과인 TEC₅₀에 근거하여 비교하였다(Table 2). 금속별 측정종말점의 통합 TEC₅₀에 근거한 금속별 독성 순서로는 다음과 같이 조사되었다: Cr (0.7 mg L⁻¹) > Cu (1.7 mg L⁻¹) > Cd (3.2 mg L⁻¹) > Zn (3.9 mg L⁻¹) > Ni (13.2 mg L⁻¹) > As(III) (17.8 mg L⁻¹) > As(V) (>1000 mg L⁻¹). 독성이 가장 낮은 금속 As(V) (> 1000 mg L⁻¹)는 독성이 가장 높은 금속인 Cr (0.7 ± 0.21 mg L⁻¹)과 약 1000배 이상의 독성 차이가 나고, As(III) (17.8 ± 11.13 mg L⁻¹)와는 약 56배 이상의 독성 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 비소(Arsenic)는 강한 독성을 가지고 있는 주요 환경오염물질로 알려져 있으나[17] 본 연구에서는 다른 중금속에 비해 가장 낮은 독성으로 관찰되었다. 이는 *C. vulgaris*를 이용하여 금속별 민감도 평가를 하였을 때 As의 EC₅₀범위 43.5 ~ 50.0 mg L⁻¹로 10종의 중금속 중 가장 낮은 독성을 띤 결과와 일치하다는 것을 알 수 있다[18]. 이러한 결과에 따르면 조류(algae)는 자연적으로 발생하는 비소를 화학적으로 변형시켜 독성이 적은 형태로 비소의 농도를 낮추는 능력이 있어 앞으로 조류(algae)가 생물학적 정화(bioremediation)

에 응용될 가능성이 있다는 연구와 관련이 있음을 알 수 있었다[19].

또한 각 중금속 독성도간의 p -value를 조사하였다. 흡광도와 개체수의 경우 Cr과 Ni, 클로로필과 개체수에서 Cu, Cd의 경우를 제외한 전체의 p -value가 통계적으로 유의(p -value < 0.0424)한 것으로 조사되었다. 따라서 본 연구에서 금속별 측정종말점에 따라 독성도와 민감도가 다르다는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 근거로 하여 오염물이 미칠 수 있는 영향을 평가하기 위해서는 단일방법보다는 다양한 방법들을 사용한 결과를 통합하여 사용하는 것이 적절한 것을 알 수 있었다.

나노입자별 측정종말점에 따른 조류활성에 미치는 영향을 통합결과인 TEC_{50} 에 근거하여 비교하였다(Table 3). 나노입자별 측정종말점에 대한 각 TEC_{50} 에 근거한 나노입자별 독성 순서로는 다음과 같이 조사되었다: ZnO (2.4 mg L⁻¹) > NiO (21.1 mg L⁻¹) > CuO (36.6 mg L⁻¹) > TiO₂ (62.5 mg L⁻¹) > Fe₂O₃ (82.7 mg L⁻¹). 독성이 가장 높은 나노입자는 ZnO (2.4 ± 0.83 mg L⁻¹), 독성이 가장 낮은 나노입자는 Fe₂O₃ (82.7 ± 8.30 mg L⁻¹)로 이 둘의 독성은 약 34배 이상의 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 또한 조류활성에 대한 나노입자 영향 평가 결과는 측정법(클로로필 함량과 개체수)에 따라 통계적으로 차이가 없는 것으로 조사되었다(p -value > 0.05). 그러므로 나노입자의 영향평가에서 어떠한 방법(측정종말점)을 사용하여도 적절한 평가가 이루어질 수 있을 것이다.

4. 결론

본 연구는 수계 대표종인 *Chlorella vulgaris* 조류를 이용하여 환경에 노출된 중금속 및 나노입자가 미치는 위해성을 다양한 측정법을 이용하여 비교 분석하였다. 동일한 생물종 생장을 다양한 측정법(흡광도, 클로로필, 개체수)으로 평가하였으며, 측정 방법과 오염물 종류에 따라 상이한 민감도 및 영향이 관찰되었다. 본 연구 결과를 통하여 다음과 같은 결론을 도출하였다. 중금속 7종에 대한 독성을 평가한 결과, 금속의 조사 농도 범위에서 농도가 증가할수록 조류의 활성이 저해되었다. 금속별로는 As 및 Ni은 상대적으로 고농도에서 활성 저해가 나타난 반면, Cu, Cr, Cd 및 Zn 등은 낮은 농도에서 저해되어 민감한 것으로 나타났다. Cr의 경우 가장 낮은 EC_{50} 을 보여 조사한 중금속 중 가장 높은 독성을 띠는 금속인 것을 알 수 있었다. 금속별 측정종말점에 따른 TEC_{50} 을 근거로 한 독성 순서는 Cr > Cu > Cd > Zn > Ni > As(III) >> As(V) 순으로 나타났다. 나노입자 5종에 대한 독성을 평가한 결과, 나노입자의 조사 농도 범위에서 증가할수록 조류의 활성이 저해되는 결과를 나타냈다. 나노입자별로는 TiO₂ 및 Fe₂O₃은 상대적으로 고농도에서 활성 저해가 나타난 반면, CuO, NiO은 낮은 농도에서 반응을 보여 독성이 높은 것으로 나타났다. 특히 ZnO의 경우 가장 낮은 EC_{50} 을 보여 본 실험에 이용한 나노입자 중 가장 높은 독성을 띠는 금속인 것을 알 수 있었다. 나노입자별 측정종말점에 따른 TEC_{50} 을 근거로 한 독성

순서는 ZnO > NiO > CuO > TiO₂ > Fe₂O₃ 순으로, ZnO에 대한 독성 정도가 가장 높은 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 오염물에 대해 조류 활성, 즉 세 가지의 측정종말점인 흡광도, 클로로필, 개체수 측정을 사용하여 실험한 결과 일부 오염물(중금속)에 대해서는 측정종말점에 따라 독성 정도와 민감도가 다르다는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 오염물이 미칠 수 있는 영향을 평가하기 위해서 단일 방법 혹은 단일 측정종말점을 이용하기 보다는 다양한 측정종말점의 통합결과에 근거한 접근이 적절할 것이라고 사료된다.

References

- Mahnaz, C., Mohamad, A. S., Joseph, S., and William, L. M., "The Mechanisms of Removal," *Radiat. Phys. Chem.*, **53**(2), 145-150 (1998).
- Katnoria, J. K., Arora, S., and Nagpal, A., "Genotoxic Potential," *Asian J. Sci. Res.*, **1**(2), 122-129 (2008).
- Kim, K. R., Choi, K. Y., Kim, S. H., and Hong, G. H., "Feasibility of Present Soil Remediation Technologies," *J. Kor. Soc. Environ. Eng.*, **32**(12), 1076-1086 (2010).
- Hwang, E. T., Lee, J. I., Sang, B. I., and Gu, M. B., "Toxicity Monitoring and Assessment of Nanoparticles," *KSBB J.*, **22**(6), 414-420 (2007).
- Alvarez, P. J., Colvin, V., Lead, J., and Stone, V., "Research Priorities to Advance," *ACS Nano*, **3**(7), 1616-1625 (2009).
- Umh, H. N., Roh, J. K., Lee, B. C., Park, S. M., Yi, J. H., and Kim, Y. H., "Case Studies for Nanomaterials' Exposure," *Kor. Chem. Eng. Res.*, **50**(6), 1056-1063 (2012).
- Biswas, P., and Wub, C. Y., "Nanoparticles and the Environment," *J. Air Waste Manage.*, **55**(6), 708-746 (2005).
- Kong, I. C., Kwon, H. J., and Ko, K. S., "Bioassessment and Comparison of Toxicity of Arsenics," *J. Kor. Soc. Environ. Eng.*, **32**(8), 795-801 (2010).
- Olguin, H. F., Salibian, A., and Puig, A., "Comparative Sensitivity of *Scenedesmus Acutus*," *Inc. Environ. Toxicol.*, **15**(1), 14-22 (2000).
- Bitton, G., *Wastewater Microbiology*, 2nd ed., Wiley-Liss, Inc. (1999).
- Mankiewicz-Boczek, J., Nalecz-Jawecki, G., Drobniewska, A., Kaza, M., Sumorok, B., Izydorczyk, K., Zalewski, M., and Sawicki, J., "Application of a Microbiotests Battery," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **71**(3), 830-836 (2008).
- Kungolos, A., Emmanouil, C., Tsiroidis, V., and Thiropoulos, N., "Evaluation of Toxic and Interactive Toxic Effects," *Sci. Total Environ.*, **407**(16), 4610-4615 (2009).
- An, Y. J., "Soil Ecotoxicity Assessment, using Cadmium Sensitive Plants," *Environ. Pollut.*, **127**(1), 21-26 (2004).
- Sharma, V. K., and Sohn, M., "Aquatic Arsenic," *Environ. Int.*, **35**(4), 743-759 (2009).
- Kong, I. C., and Lee, S. R., "Toxicity Assessment of Sole or Mixture Heavy Metals," *J. Kor. Society Waste Manage.*,

- 29(6), 527-533 (2012).
16. Gu, B. W., and Kong, I. C., "Toxicity Assessment of Nanoparticles," *J. Kor. Soc. Environ. Eng.*, **36**(6), 396-401 (2014).
 17. Choi, B. S., Kang, D. W., Lee, J. Y., Park, E. S., Hong, Y. P., Yang, J. S., Lee, H. M., and Pak, J. D., "Acute Toxicity of Arsenic in Rats and Mice," *Kor. J. Occup. Environ. Med.*, **15**(4), 323-334 (2003).
 18. Kwon, M. J., "A Study on the Ecological Toxicity Test of Water Quality using Algae," M.S. Thesis, Hoseo Univ., Asan (2013).
 19. Qin, J., Lehr, C. R., Yuan, C. G., Le, X. C., McDermott, T. R., and Rosen, B. P., "Biotransformation of Arsenic by a Yellowstone," *PNAS*, **106**(13), 5213-5217 (2009).