

<Note>

주요 사고 화학물질 6종의 줄지렁이에 대한 급성독성

남태훈 · 윤정현 · 최재일 · 이성은*

경북대학교 응용생명과학부

Acute Toxicity on *Eisenia fetida* of Six Major Chemicals Accidentally Spilled into the Environment

Tae-Hoon Nam, Jeonghyeon Yun, Jaeil Choi and Sung-Eun Lee*

School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

Abstract - To determine their acute toxicities on the earthworm (*Eisenia fetida*), six toxic chemicals were evaluated, according to the OECD guideline 207: sulfuric acid, methanol, methylethylketone, nitric acid, formic acid, and toluene. Sulfuric acid exhibited the maximum toxicity. The LC₅₀ values of sulfuric acid, nitric acid, formic acid, and toluene were 20.5, 49.1, 55.5, and 534.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$, respectively. Toluene showed 26-fold lower toxicity than sulfuric acid. In this study, methanol and methylethylketone did not exhibit any toxicity to the earthworm. Further evaluation revealed that nitric acid, formic acid, and toluene exerted a change in the body weight of the chemically treated earthworms, whereas the other chemicals were ineffective. These results can be used for environmental risk assessment, when the chemicals are accidentally discharged into the environment.

Key words : *Eisenia fetida*, sulfuric acid, nitric acid, mortality, weight loss

서 론

화학 누출 사고는 세계 각국에서 예상치 못하게 일어나는 재난이다. 화학 누출 사고 중 강산을 이송하다가 발생하는 경우, 배관 이송 중 발생하는 경우, 원료를 혼합하는 과정 중에서 발생하는 경우, 유기용제 이송 중 폭발에 의한 누출 등 누출의 경우가 다양하다(Shin *et al.* 2014). 이러한 누출 사고는 발생 시 주위의 환경을 오염시키며 사람의 생명을 앗아가는 심각한 현상을 유발한다. 지금까지 발생한 국내 누출 사고의 경우 대부분이 강산에 의한 것이었으며 단일 산에 의한 화학사고 발생은 전체 발생 건수의 37%에 이르렀고, 혼합 산을 포함한 사고의 건수는 전체 중 40%을 넘었

다(National Institute of Environmental Research 2013). 외국의 사례에서도 황산 농축 탱크에 인근 습지의 물이 유입되어 이로 인한 엄청난 발열반응이 일어났고 인근 배의 내부 구조물의 급속과 산의 반응으로 인한 수소의 생성은 잠재적 폭발 및 인근 지역의 어류에게 급성독성을 나타내었다(Mirlean *et al.* 2001).

이러한 강산 물질 등과 여러 물질에 대한 국내 환경 규제는 대기환경보전법 및 먹는물 관리법 등에 의해 실시하고 있다. 예를 들어 염산의 경우 대기환경보전법에 근거하여 제조 및 저장 시설 배출 기준이 6 mg L^{-1} 수준이며 먹는 물 수준에서는 직접적인 규제보다는 pH가 5.8에서 8.5 이하여야 한다는 규제가 설정되어 있다(Ministry of Environment 2014).

그러나, 강산 등을 포함한 화학물질의 누출 시 환경영향 평가를 적절히 수행하기 위해서는 누출 화학물질의 환경생물에 대한 독성을 정확하게 파악해야 하는데 강산을 포함한

* Corresponding author: Sung-Eun Lee, Tel. 053-950-7768,
Fax. 053-953-7233, E-mail. selpest@knu.ac.kr

화학물질의 육상생태계 지표생물에 대한 독성 평가가 국내에서 활발히 실시되지 않았다. 따라서 이번 연구를 통하여 강산을 포함한 누출 가능한 물질들의 급성독성을 줄지렁이를 이용하여 측정하였고 지렁이를 이용한 급성독성 시험법 중 OECD guideline 207을 사용하였으며 이 시험법은 시험물질과 줄지렁이를 직접적으로 접촉하게 하기 위하여 여과지에 시험물질을 도말하여 독성을 평가한다. 측정된 값은 여과지의 넓이당 투여된 화학물질의 질량으로 환산하여 나타냈으며 두 가지의 종말점, 치사율과 체중감소율로 독성을 측정하였다. 시험에 사용된 화학물질로 황산(sulfuric acid), 질산(nitric acid), 포름산(formic acid), 메틸에틸케톤(methyl ethyl ketone), 톨루엔(toluene), 메탄올(methanol) 등을 사용하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질

시험에 사용된 물질들은 화학사고대비물질 중 6개를 선정하여 5개의 수용성 물질과 1개의 비수용성 물질을 사용하였다. 황산은 대정화금사(시흥시, 경기도, 한국), 질산은 덕산과학사(서울시, 한국), 메탄올과 톨루엔은 J. T. Baker사(Phillipsburg, NJ, USA), 개미산과 메틸에틸케톤은 Sigma-Aldrich사(St. Louise, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 시험동물

시험에 사용한 줄지렁이(*Eisenia fetida*)는 세경팜(김해, 경남)으로부터 주기적으로 구입하여 실험실 내에서 계대 사육 및 순화시켜 부화 후 최소 8주 이상 성장하여 환대를 지닌 건강한 성체들을 선별하였다. 정확한 체중 측정을 위해 시험 2시간 전에 체외 이물질을 증류수로 제거하였으며 체내 이물질 존재 유무에 따라 독성반응이 달라질 수 있으므로 체외 이물질 제거 후 여과지 위에서 체내 이물질을 배출하도록 하였다. 체외 이물질 및 체내 이물질 제거 후 체중을 측정하여 300 mg 이상 600 mg 이하의 지렁이들을 재선별하여 시험에 사용하였다.

3. 줄지렁이 대한 급성독성 평가

줄지렁이에 대한 시험물질들의 급성독성 실험은 OECD guideline 207 (OECD 1984)을 참고하여 시험하였으며 음성 대조군과 5개 이상의 농도구간(1430 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 이하)을 선정하여 시험하였다. 지름 3 cm, 높이 8 cm 유리용기에 여과지를 넣어 일정농도의 사고대비물질 수용액을 100 μL 처리하여 각 유리용기에 줄지렁이 1마리의 무게를 측정하여 처리

하였다. 비수용성 물질의 경우 사고물질만을 처리한 후 증류수를 넣어 조건을 동일하게 유지하였다. 일정농도당 총 20개의 줄지렁이를 처리하였으며, 20~22°C, 50% 이상의 습도 및 암조건을 유지하여 48시간 후 치사율과 생존개체의 무게를 측정하여 기록하였다.

4. 통계 분석

사고물질 농도에 따른 치사율을 통해 SPSS software 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 Probit Analysis를 통해 95% 신뢰구간의 Lethal Concentration을 산출하였으며, 처리한 사고물질의 용량에 따른 무게 변화율을 Prism software 6(Graphpad Inc., San Diego, CA, USA)을 통해 One-way ANOVA를 사용하여 통계적으로 유의미한 차이가 있는 경우는 Turkey's HSD의 사후검정을 사용하여 집단 간 차이를 규명하고 그래프로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 치사율

치사개체 측정은 지렁이가 절단 혹은 체액 유출 등이 있더라도 물리적 자극에 반응하며 이동이 가능한 개체는 생존한 것으로 판단하여 치사율을 측정하였다. 48시간 급성독성 실험을 통한 각 화학물질의 줄지렁이에 대한 치사율은 Fig. 1과 같다. 황산의 경우 70 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 의 농도 수준에서 줄지렁이를 모두 죽였으며 이는 농도 의존적으로 농도가 낮아질수록 치사율 또한 감소하였다. 황산을 7.1, 14.3, 21.4, 35.7, 71.4 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 로 처리하였을 때 48시간 노출 후 20, 30, 35, 75, 100% 치사율이 나타났다. Table 1에 나타낸 바와 같이 황산의 LC₅₀ 값은 20.46 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 였으며 실험에 사용한 화학물질 중 가장 강한 독성을 나타내었다.

질산은 7.1, 14.3, 35.7, 71.4, 107 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 로 처리하였으며 48시간 노출 후 10, 15, 15, 35, 50, 100% 치사율이 나타났다. 개미산은 7.1, 14.3, 35.7, 71.4, 107, 114, 143 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 로 처리하였으며 48시간 노출 후 5, 25, 35, 45, 55, 75, 100% 치사율이 나타났다. 이와 같이 질산과 개미산은 비슷한 줄지렁이에 대하여 유사한 독성을 나타내었다. 톨루엔은 각각 143, 357, 571, 714, 1430 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 로 처리하였으며 48시간 노출 후 10, 20, 35, 65, 100% 치사율이 나타났다. 그 결과 질산, 개미산, 톨루엔의 LC₅₀ 값은 각각 49.1, 55.5, 534.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 이었고(Table 1) 낮게 독성이 나타난 톨루엔의 LC₅₀ 값 534.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 는 가장 독성이 강하게 나타난 황산의 LC₅₀ 값 20.5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ 에 비해 약 26배에 달하였다. 톨루엔의 경우 보고된

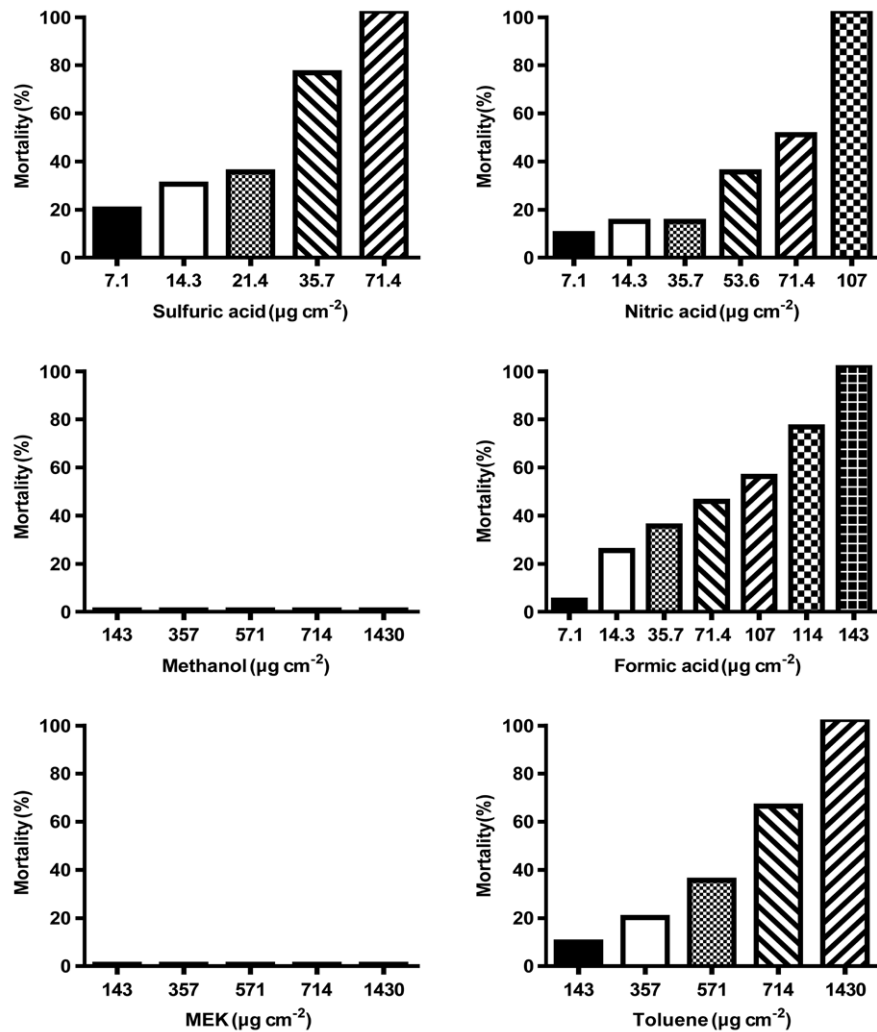


Fig. 1. Mortality rates of *Eisenia fetida* after exposure to various concentrations of sulfuric acid, nitric acid, methanol, formic acid, methyl ethyl ketone and toluene.

Table 1. Acute toxicity test using a filter-impregnated paper: LC values of sulfuric acid, nitric acid, methanol, formic acid, methyl ethyl ketone, and toluene, against *Eisenia fetida*.

Substance	LC ₁₀ (µg cm ⁻²)	LC ₂₀ (µg cm ⁻²)	LC ₅₀ (µg cm ⁻²)
Sulfuric acid	6.94	10.06	20.46
Nitric acid	14.81	22.36	49.14
Methanol	— ^a	—	—
Formic acid	10.37	18.43	55.45
Methyl ethyl ketone	—	—	—
Toluene	220.89	299.17	534.51

^aLC₅₀ values were greater than 1430 µg cm⁻².

LC₅₀ 값 75 µg cm⁻² (Neuhauser *et al.* 1985)와 약 7배 가량의 차이를 보이는데 이는 위 논문에서는 톨루엔의 처리방식의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

시험에 사용된 물질들 중 메탄올과 메틸에틸케톤은 각각 143, 357, 571, 714, 1430 µg cm⁻²로 처리하였으며 48시간 노출 후 모든 농도에서 치사개체가 관찰되지 않았다. 위의 메탄올의 독성 평가 결과는 미국 US EPA Database에 보고된 바 (Robert *et al.* 1984)와 같이 LC₅₀ 값이 1000 µg cm⁻² 이상인 것으로 나타났다.

2. 무게 변화율

무게 변화율에 대하여 각 물질별 지렁이의 급성독성실험의 결과는 Fig. 2와 같다. 무게 변화율은 절단 혹은 체액 유출 등이 있더라도 물리적 자극에 반응하며 이동이 가능한 개체를 생존한 개체로 판단하여 무게 변화율을 측정하였다. 시험에 사용된 물질들 중 황산, 메탄올, 메틸에틸케톤은 물

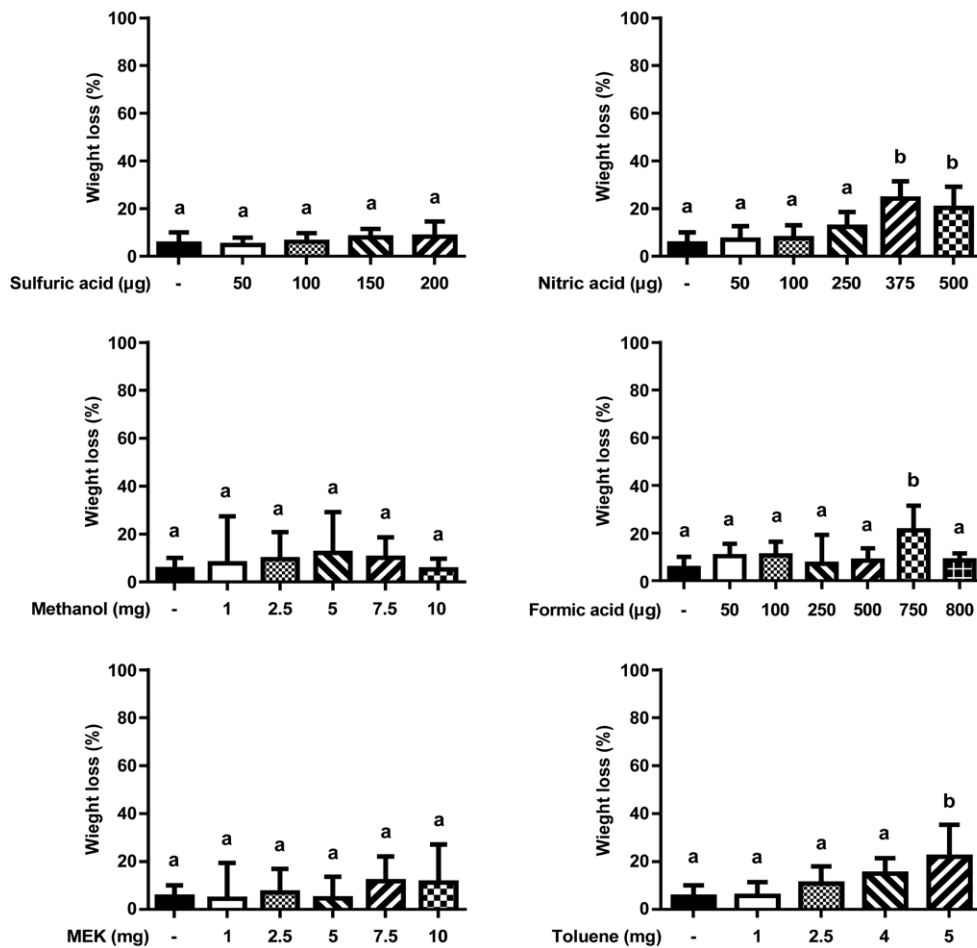


Fig. 2. Weight loss (%) of *Eisenia fetida* after exposure to sulfuric acid, nitric acid, methanol, formic acid, methyl ethyl ketone, and toluene. Different letters indicate significant differences between the tested groups ($p < 0.05$).

질 처리 후에도 대조군에 비하여 무게 변화가 통계적으로 유의성 있게 나타나지 않았다. 질산은 용량 375 μg , 500 μg 에서 변화율 25%, 21%를 나타내어 나머지 처리량에서의 무게 변화율과 비교하여 통계적으로 유의성 있는 차이를 나타내었다. 포름산은 750 μg 에서 무게 변화율 20%를 나타내어 나머지 처리량에서의 무게 변화율과 비교하여 통계적으로 유의미한 차이를 나타내었다. 그러나 이 변화는 통계적으로 나타나는 차이로 보일 정도로 750 μg 에서 무게 변화율의 표준 편차가 컸다. 톨루엔은 5 mg에서 무게 변화율 26%를 나타내어 나머지 처리량에서의 무게 변화율과 비교하여 통계적으로 유의미한 차이를 나타내었다.

결 론

화학 누출 사고로 인하여 육상생태계에 미칠 영향을 평가

하기 위하여 OECD guideline 207을 이용하여 6가지 화학물질(황산, 메탄올, 메틸에틸케톤, 질산, 포름산, 톨루엔)의 급성독성을 측정하였고 독성의 강도는 황산, 질산, 개미산, 톨루엔, 메탄올 및 메틸에틸케톤 순이었다. 무게의 변화에서는 황산, 메탄올, 메틸에틸케톤은 의미 있는 변화를 유발하지 않은 반면 질산, 포름산, 톨루엔 등은 물질에 대하여 줄지렁이의 무게가 변화를 나타내었다.

적 요

주요 사고 화학물질로 알려진 3종의 강산과 3종의 휘발성 용매 포함한 총 6종의 화학물질(황산, 메탄올, 메틸에틸케톤, 질산, 포름산, 톨루엔)의 예상치 않은 환경누출 시 발생할 환경의 영향을 정확히 평가하기 위하여 육상생태계의 대표적 시험동물인 줄지렁이를 이용하여 이들 6종의 화학물질의 급

성독성을 측정하였다.

시험에 사용한 급성독성 방법으로는 OECD guideline 207을 사용하였고 이 방법은 여과지에 물질을 도달한 후 출지렁이를 직접 노출하여 치사율을 측정하는 방법이다. 이 방법을 이용하여, 황산의 LC₅₀ 값 20.5 µg cm⁻², 질산, 포름산, 톨루엔의 LC₅₀ 값은 각각 49.1, 55.5, 534.5 µg cm⁻²이었다. 톨루엔의 LC₅₀ 값은 가장 독성이 강하게 나타난 황산의 LC₅₀ 값에 비해 약 26배 약하게 측정되었다. 시험에 사용된 물질들 중 메탄올과 메틸에틸케톤은 지렁이에 대하여 독성을 나타내지 않았다. 무게의 변화를 일으킨 물질로는 질산, 개미산, 톨루엔 등이 있었다. 이번 연구 결과는 시험물질의 환경 중 누출 시 육상생태계에 대한 영향 평가 수행에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 환경부의 “화학사고 대응 환경기술개발사업”(2016001970003)에서 지원받았습니다.

REFERENCES

Ministry of Environment. 2014. White Paper of Environment.

- Mirlean N, B Baraj, LF Niencheski, P Baisch and D Robinson. 2001. The effect of accidental sulphuric acid leaking on metal distributions in estuarine sediment of Patos Lagoon. Mar. Pollut. Bull. 42:1114-1117.
- National Institute of Environmental Research (NIER). 2013. A study on the method of environmental impact investigation by accident of acidic chemicals (#11-1480523-001642-01).
- Neuhauser EF, RC Loehr, MR Malecki, DL Milligan and PR Durkin. 1985. The Toxicity of Selected Organic Chemicals to the Earthworm *Eisenia fetida*. J. Environ. Qual. 14:383-388.
- OECD. 1984. OECD guidelines for the testing of chemicals 207, Earthworm, acute toxicity tests (4 April 1984).
- Roberts BL and HW Dorough. 1984. Relative toxicities of chemicals to the earthworm *Eisenia foetida*. J. Environ. Toxicol. Chem. 3:67-78.
- Shin D, HS Moon, YY Yoon, U Yun, Y Lee, K Ha and SP Hyun. 2014. The current status of strong acids production, consumption, and spill cases in Korea. J. Soil Groundw. Environ. 19:6-12.

Received: 15 April 2017
 Revised: 22 April 2017
 Revision accepted: 24 April 2017