

해양성 발광박테리아를 이용한 해양환경 독성평가 시험법 개발: N-Tox test

이규태* · 박경수¹ · 김평중²

(주) 네오엔비즈

¹인양대학교 해양생명공학과

²국립수산과학원 서해수산연구소

Development of Marine Toxicity Standard Method for Marine Luminescent Bacteria: Introduction of N-Tox test

KYU TAE LEE*, GYUNG SOO PARK¹ AND PYOUNG JOONG KIM²

NeoEnBiz Co., 1306 Daewoo Technopark, Dodangdong, Bucheon, Kyeonggido 420-806, Korea

¹Department of Marine Biotechnology, Anyang University, Incheon 417-833, Korea

²Environment Research Division, West Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Incheon 400-420, Korea

해양 기원의 발광박테리아 *Vibrio fischeri*를 이용한 발광박테리아 독성시험법은 1980년대 초반에 소개된 이후 많은 연구자들에 의해 이용되어오다 1998년 국제공인시험법으로 등재되어 지금은 전 세계적으로 이용되고 있다. 이 시험법은 테스트하고자하는 화학물질이나 환경시료에 발광박테리아를 30분간 노출시킨 후 나타나는 발광량 감소의 정도로서 독성 유무나 강도를 평가하는 방법으로서 신속성, 정밀성, 민감성, 경제성이 뛰어나다는 평가를 받고 있으며, 시험생물의 유지/배양없이 상용화된 키트 제품을 이용하여 독성 시험을 수행할 수 있다. 본 연구에서는 해양성 발광 박테리아 독성평가 키트로 판매되는 상용화제품(N-Tox)을 이용하여 수행된 결과를 제시하였다. 시험법 개발 및 표준화를 위한 시험항목으로는 시료 주입량, 발광량과 같은 기본 항목 테스트와 표준독성물질을 이용한 정도관리 테스트, 화학물질 및 현장시료에 대한 테스트가 포함되었다. 이 시험법은 자동화되어 누구나 쉽게 수행이 가능하면서도, 시험 결과 독성물질에 대한 용량-반응 관계가 확실하게 평가되고, 정밀도가 뛰어나며, 현장시료 독성평가에 이용할 수 있을 정도의 민감성을 지닌 것으로 입증되었다. 따라서 아직 생물검정이 보편화되지 않은 국내에서 편리하게 이용할 수 있는 표준독성시험방법의 하나로서 활용 가능하다고 사료된다.

Luminescent bacterial toxicity test was first introduced in the early 1980s, registered as international standard method in 1998 and now widely used as a common toxicity test method. This toxicity test uses luminescent bacterium, *Vibrio fischeri*, originated from marine environment as a test organism. The degree of toxicity can be evaluated from the comparison of luminescent emission intensity between control and treatment groups to toxicants and materials from various environmental matrix for 30 min. This test can be carried out by using commercial products and its results are sensitive and precise. This research is on the feasibility of adopting luminescent bacterial test as a domestic standard test protocol. Using commercial products, a series of experiments were conducted to identify the precision and accuracy of injection volume and light emission, and to evaluate concentration-response relationship between chemical concentrations and light emissions. Also, the feasibility of the application to environmental media and quality assurance/quality control were checked. The results of serial toxicity tests revealed that the preliminary luminescent bacterial toxicity test was robust and suitable as a standard method.

Keywords: Luminescent Bacteria, *Vibrio fischeri*, Toxicity Test, Bioassay, Standard Method

서 론

우리나라 육상과 해양의 물환경 정책목표와 관리 기준은 과거 BOD, COD 등 일반 환경 지표에 의거하여 설정되고 관리되어 왔

*Corresponding author: ktlee@neoenbiz.com

으나 현재는 위해성, 생태성 개념이 새로운 환경 관리의 패러다임 이며(환경부, 2006), 이러한 정책목표 달성을 위해서는 향후 10년 간 생태독성평가기술(생물검정기술)이 수계 생태 위해성평가와 환경관리기준설정을 위한 가장 기본적인 자료 생산 구조 역할을 담당하게 될 것으로 예상된다.

지난 30년간 국내에서는 해양과 하천, 호소 등을 포함한 환경 오염을 평가하기 위한 과학적 방법론으로 COD, BOD, 온도, 염분, pH, 일부 오염물질 등 20여 가지의 일반수질항목을 조사하는 이화학적 분석 기술만을 사용하여 왔다. 그러나 이러한 이화학적 분석 결과는 중금속이나 유기화합물 등 다양한 유해물질이 생물에 미치는 영향을 평가하는데 한계가 있다. 그 이유는 분석되고 관리되는 항목은 20여개에 그치는 반면, 국내에 약 36,000 종의 유해화학물질이 유통되고 있고, 매년 새롭게 만들어지는 유해화학물질이 수백종에 달하여 모두 분석하여 관리하는 것이 불가능하기 때문이다(환경부, 2002).

이러한 문제점 때문에 선진국에서는 이화학적 분석기술의 상호 보완적인 기술로서 생물을 이용하여 환경내 유해물질의 위해성을 평가할 수 있는 다양한 생물검정기술(생물독성평가기술)을 개발하여 널리 이용하고 있다(ISO, 1995; ASTM, 1996; NIWA, 1998; USEPA, 2002; OECD; <http://oberon.sourceoecd.org>). 생물검정기술은 실험 생물을 이용하여 오염물질 유입에 의해 생물이 받게되는 독성의 영향을 상대적인 강도로 비교하는 기법이다(USEPA, 1985). 생물검정기법은 기존의 화학분석법보다 노동 절감, 비용 절감 효과가 크며, 오염물질에 대한 생물의 반응을 지표로 삼고 있기 때문에 오염물질의 독성영향 정도를 객관적으로 진단할 수 있는 수단으로 인정받고 있다.

생물검정기술은 세포 이하의 수준에서 생물영향을 평가하는 방법(DNA손상, 효소활성 등), 세포 수준의 생물영향을 평가하는 방법(유전자 재조합 세포 어세이 등), 알과 정자를 이용하는 방법(성계 등), 개체에 대한 영향을 측정하는 방법(발광미생물, 식물플랑크톤, 동물플랑크톤, 단각류, 갑각류, 이매패류, 어류 등), 생태계 영향을 조사하는 방법(군집 조사 등) 등 다양하다. 생물영향평가 방법은 세포 수준으로 내려갈수록 오염 영향을 빠르고, 정확하고, 민감해지나 현실성이 감소하며, 생태계 수준으로 갈수록 오래 걸리고, 둔감하고, 비용과 시간이 많이 소모되나 현실성이 높아진다. 현재 외국에는 수많은 생물영향평가 방법론이 개발되어 사용되고 있고 이중 일부는 환경영향평가시에 의무적으로 수행하도록 법제화되어 있기도 하다.

국내의 생물검정기술은 2000년대 초반 본격적으로 연구되고 도입되기 시작하였다(이, 2000; 이, 2002; 박 등, 2005; 윤 등, 2006; Park *et al.*, 2005). 아직 관련 기술을 보유한 기관의 수는 많지 않으나 생물검정기술이 국가 환경평가의 표준으로 자리잡아가고 있어 가까운 미래에 생물독성평가 연구가 활발해질 전망이다. 그 예로, 환경부에서는 2007년 물벼룩을 이용한 생물검정법을 공정시험법에 등재하였고(환경부, 2007), 해양수산부에서는 2002년부터 2006년까지 5개년 연구사업을 통해 해양환경공정시험법 등재를 위한 생물검정기술개발 사업을 실시하여 발광박테리아, 식물플랑크톤, 동물플랑크톤, 저서성 단각류, 어류 등 6개의 시험법을 개발

한 바 있다. 이중 물벼룩 생물검정법은 산업폐수 방류수에 대한 생태독성 배출허용기준 검사 항목으로 지정하는 방안이 2007년 입법되어 2011년부터 본격 적용될 예정이며, 발광박테리아 독성 시험법, 단각류 독성시험법, 성계 독성시험법은 오염퇴적물 독성 평가를 위한 사후모니터링 항목으로 지정되어 있으며, 해양배출물질의 생태독성기준 항목으로도 활용될 예정이다.

본 연구에서 소개하고자 하는 발광박테리아 독성평가기법은 자연적으로 해양에 서식하며 발광하는 발광박테리아(*Vibrio fischeri*)에게 오염물질이 유입될 경우 독성 영향에 의해 미생물의 발광도가 줄어들며 줄어드는 정도는 오염물질의 강도와 비례한다는 원리를 이용하여 독성을 측정한다. 이 방법은 외국의 Microtox나 국내의 N-Tox 같이 상업화된 독성키트의 형태로 판매되고 있으며 상대적으로 짧은 시간에 많은 시료의 독성을 검색할 수 있고, 반복성이 좋으며, 오염물질에 대한 용량-반응 관계가 뚜렷하고, 비용 절감효과가 뛰어나 국제적으로도 좋은 평가기술로 인정받고 있어 국내 연구자들에게도 잘 알려진 방법이다(Giesy and Hoke, 1990; 이 등, 2007). 또한 다른 생물검정법과는 달리 응용될 수 있는 분야가 넓어, 중금속, 유기금속 및 유기화합물 등과 같은 유해물질의 독성, 하천수, 기수 및 해수와 같은 표층수의 독성, 하수, 폐수, 오수 및 방류수와 같은 배출수의 독성, 지하수 및 공극수에 대한 독성, 슬러지, 폐기물 및 해양배출물질 등의 독성, 퇴적물 및 준설물질의 독성, 토양의 독성 평가에 이용될 수 있다.

우리나라에서도 발광박테리아를 이용한 생물검정법을 해양환경 공정시험법에 도입하는 등의 노력이 전개된 바 있으나(해양수산부, 1998) 관련 기술과 전문 인력 부족, 외국제품 사용에 대한 재정적 어려움으로 활용된 사례가 드물었다. 이에 본 연구에서는 전문인력이 부족한 국내 실정에 맞게 누구나 쉽게 수행할 수 있는 자동화 방식의 발광박테리아 생물검정법을 자체적으로 개발하여 국내 현장 해양오염 평가에 이용할 수 있도록 하였다. 여기에서는 국내에서 개발된 발광박테리아 독성평가키트(N-Tox)를 이용하여 실시된 발광박테리아 시험법의 적합성 테스트 결과 및 실험정도 관리(QA/QC)와 현장 적용 테스트 결과 및 실험정도관리(QA/QC), 발광박테리아 독성평가 공정시험법(안)의 내용을 소개하고자 한다.

재료 및 방법

본 연구의 시험종인 발광박테리아(*Vibrio fischeri*)는 에너지 대사과정에서 빛을 발산하는 해양 기원의 박테리아로서, 현재까지 발광체계가 가장 잘 파악된 생물로 간주되고 있어 발광을 이용하는 여러 연구는 물론 생물검정시험의 시험종으로도 널리 이용되고 있다(Nelson, 1977). 시험생물에 대한 일반적인 특성은 Table 1에 요약하였다. 자연적으로 발광하는 특성을 가진 박테리아는 주로 해양 환경에서 발견되어 왔다. 이 중 대부분이 *Vibrio* 속이나

Table 1. General description of test species, *Vibrio fischeri*.

Species	Characteristics
<i>Vibrio fischeri</i> Beijerinck (1889)	- Distribution: cosmopolitan species found in world wide
	- Morphology: Cylindrical type with polar flagellates, 2~4 μm long, and 0.5~1 μm wide
	- Characteristics: symbiont with luminous organisms, especially deep sea animals, quorum sensing through autoinducer production
	- Toxicity test kit supplier: NeoEnBiz (Korea), SDI (USA)
	- Phylogeny: Bacteria - Proteobacteria - Gammaproteobacteria - Vibrionales - Vibrionaceae - <i>Vibrio - fischeri</i>

Photobacterium 속에 속하며 대표적인 것으로 *V. fischeri* 가 있다. 세 부적인 strain까지 덧붙이면 시험생물은 *Vibrio fischeri*(NRRL B-11177) 이다. 다른 균주로 *V. fischeri*(ES114)와 같은 것이 있으나 박테리아는 같은 종명을 가지고 있더라도 균주에 따라 특성이 달라질 수 있으므로 시험전에 시험생물을 잘 확인해야 할 필요가 있다.

*Vibrio*속에 속하는 박테리아는 일반적으로 끈거나 휘어진 하나의 막대기 형태를 가지고 있다. 액체 배지에서 자랄 때는 칼집에 넣어진 것 같은 형태의 극성 편모(sheathed polar flagella)로 움직이며 편모가 하나이거나 여러 개를 가지는 반면 고체 배지에서 자랄 때는 이외에도 칼집을 가지지 않은 편모(unsheathed flagella)를 가진 혼합형이 된다. 이들은 그람 음성(Gram negative)이고 내포(endospore)를 형성하거나 미세포낭(microcyst)을 형성하지 않는다. 여기에 속하는 종들은 DNA상의 G + C contents가 38~51 mol%이다. 대부분이 해양종 또는 기수종으로 해양 동물의 표면이나 장내에서 발견된다. 이 중 *V. fischeri*는 경골어류나 오징어의 발광기관내에 공생자(symbiont)로 살 수 있는 능력이 있다(McFall-Nagi and Ruby, 1991).

본 시험생물은 원래 발광현상 기작을 설명하거나 공생관계를 규명하는 연구에 많이 이용되었으나 Bulich *et al.*(1981)에 의해 발광박테리아의 발광량 저하 현상이 독성의 지표로 이용될 수 있는 가능성이 밝혀진 후부터 발광박테리아 공정시험법의 시험생물로 널리 이용되고 있다. 본 연구에서 사용한 시험생물 및 관련 시약은 네오엔비즈(Korea)에서 제공되는 N-Tox 제품을 이용하였다. 이 제품의 구성은 시험생물(*V. fischeri*; NRRL B-11177)을 동결건조형 분말로 제공하는 발광박테리아시약(VF 100), 휴면상태의 발광박테리아를 깨우는 재활성화시약(RS 100), 시료 및 시약 희석에 이용되는 무독성시약(DW 100 & DW 200), 삼투압 조절 목적의 염분조절시약(SA 100) 등으로 구성되어 있으며 평상시에 상온 또는 -20 °C 상태로 보관하다가 시험이 필요할 때 발광박테리아시약에 재활성화시약을 넣어주면 휴면상태의 박테리아가 깨어나 발광하기 시작하게 되어있어 즉시 독성시험에 이용할 수 있다. 시험용

기는 간편화 및 대량시료처리화를 위해 96웰플레이트를 이용하였으며 발광박테리아 시약 주입 및 발광량 측정은 자동화기기인 N-Tox Model 300(네오엔비즈)을 이용하였다. 정도관리를 위하여 국제표준화기구에서 추천한 표준독성물질 $K_2Cr_2O_7$, 3,5-Dichlorophenol, $ZnSO_4 \cdot 7(H_2O)$ 를 사용하였다.

본 연구에서는 발광박테리아 독성 테스트 시스템으로의 적합성을 평가하기 위해 기본 항목 평가와 화학물질 및 현장시료평가, 정도관리평가를 수행하였다. 기본 항목 평가에서는 시약 분주의 정확도 및 정밀도 평가, 발광박테리아 시약의 시간에 따른 발광안정성 평가를 실시하였다. 모든 시료는 테스트 전에 염분을 보정하였다. 15 psu 이하의 시료는 염분조절액을 이용하여 20 psu로 조절하였고 15 psu에서 35 psu사이의 시료는 염분 보정을 하지 않았다. 화학물질 및 현장시료 평가에서는 potassium dichromate 나 3,5-dichlorophenol과 같은 물질의 EC₅₀ 값을 테스트하였고 육상-기수역-해양에 대한 현장시료의 독성 검출 능력을 테스트하였다. 정도관리평가 실험에서는 표준독성물질을 이용하여 주기적으로 EC₅₀을 측정하고 이를 국제표준규격 범위에 부합되는지 살펴 보았다(ISO, 1998c).

발광박테리아 독성 시험은 기본적으로 Table 2에 따라 실시하였다. 화학물질에 대한 테스트는 희석수 DW100을 이용하였고 해양기원의 표준수나 고체상 테스트에는 희석수 DW200을 이용하였다. 시약 자동 주입량 테스트는 N-Tox 기기와 NTI 100 소프트웨어를 이용하여 증류수 25 µl, 50 µl, 75 µl, 100 µl에 해당하는 양을 자동주입하게 한 후 해당되는 각각의 무게를 소수 4째자리까지 표시되는 저울(AX200, Shimazu)로 측정하여 총 10회 반복하였다. 발광량 측정 테스트는 N-Tox 기기에 96웰플레이트를 장착시키고 발광박테리아 시약을 96well 각각에 100 µl씩 자동분주시키면서 즉시 발광량을 자동 측정하게 하는 방식으로 수행하였고 발광량 자료는 각 행의 값중 첫 번째 열개 값을 100으로 표준화하여 나머지 각 행의 값을 상대적으로 전환시켜 표현하였다.

N-Tox를 이용한 표준독성물질 민감도 측정 시험은 96웰플레

Table 2. Summary of test conditions and test acceptability criteria for luminescent bacteria test.

Parameters	Test conditions
Test type	luminescent bacteria test for liquid phase sample
Sample type	fresh water, salt water, pore water, ground water, any other aqueous liquid phase samples
Test species	freeze-dried <i>Vibrio fischeri</i> ; NRRL B-11177 (N-Tox VF100)
Diluent	DW100 for fresh water / DW200 for salt water
Test chamber	96 well plate
Test volume	250 µl (max)
Temperature	15 °C
Salinity	20 psu for fresh water / 35 psu for salt water
Test duration	30 min
Dilution series	more than 6
Number of replicates	4
Instrument	N-Tox Model 300
Endpoint	inhibitory effect after 30 min exposure
Test acceptability criteria	1) Variation of natural light emission rate between 0 and 30 min must be 0.6 ~ 1.8 2) The following reference toxicants cause 20% - 80% inhibition by 30min exposure (a) 3.4 mg/L of 3,5-dichlorophenol (b) 2.2 mg/L of Zn ²⁺ (as zinc sulfate heptahydrate) (c) 18.7 mg/L of Cr ⁶⁺ (as potassium dichromate)

트에 최고 농도 200 mg/L부터 연속 2배씩 희석된 10개의 농도 구배를 4반복 실험으로 실시하였고 대조구는 물질당 8개를 두었다. 현장 시료 독성 실험은 250 µl에 발광박테리아 시약 25 µl를 분주하게 한 것을 4반복으로 처리하였다. 표준독성물질 노출시간은 국제표준시험법(ISO, 1998c)에 의거 발광박테리아 시약 주입후 30분을 주었고 30분후 발광량은 N-Tox 기기에 의해 자동 측정되었다.

발광박테리아 독성 시험 결과 비교가 필요한 경우 반수영향농도(EC₅₀, Median Effective Concentration)를 산출하였다.

결 과

시료 자동 주입 정밀도 평가

N-Tox 기기 운용 소프트웨어인 NTI 100에서는 시료의 주입량을 25 µl~250 µl까지 사용자가 조절 가능하도록 프로그램되어 있다. 발광박테리아 시약은 N-Tox기에서 자동 주입되는데 그 정밀도를 알아보기 위하여 증류수로 프로그램에 입력된 주입량 수치와 분주되었을 때 실제 무게를 비교하여 정확도 및 정밀도 측정을 실시하였다. 실험은 증류수를 이용하여 지정된 양을 자동 주입 방식으로 주입하고 주입된 양을 소수 넷째자리 전자저울을 이용하여 매번 측정하는 방식으로 각 주입량에 대해 총 10회씩 진행되었다(Table 3).

실험결과 전체적으로는 지정된 양보다 약간 적은 양이 들어가는 것으로 측정되었다. 자동시료주입 장치는 시약 분주 속도 분주량 등을 보정하는 일이 가능하여 오차가 너무 많이 발생하는 경우에는 보정해주어야 할 필요가 있으나 본 실험의 경우 참값과의 차이는 매우 작아 특별히 보정하지는 않았다. 측정시기 온도와 습도는 각각 25 °C와 80% 이상으로 온도 습도는 보정되지 않은 수치였다. 또한 발광박테리아 독성시험에서 발광량은 상대적으로 측정되기 때문에 발광박테리아 시약이 절대량으로 얼마가 주입되었느냐보다는 시험구마다 얼마나 정밀하게 주입되었느냐가 더 중요할 수 있는데, 본 기기의 시약주입 정밀도는 25 µl 주입시 상대표준오차 4.8%, 50 µl 주입시 상대표준오차 1.2%, 100 µl 주입시 상대표준오차 0.6%, 250 µl 주입시 상대표준오차 0.2%로 수동으로 피펫팅하는 결과보다도 더 정밀한 편이었다. 주입량이 많을수록

편차는 더욱 작아지는 것으로 분석되었는데 이러한 결과는 일반 수동 피펫 사용의 경우에서도 유사하다. 발광박테리아 독성 시험에서는 주로 100 µl 주입을 사용하는데 100 µl를 자동 분주하는 경우 실제 분주되는 양은 98.9±0.6 µl 정도로 매우 정확하고 정밀하여 사용자가 수동방식으로 직접 분주하는 경우보다 더 좋은 시험 결과가 산출될 수 있을 것으로 기대되었다.

시험생물의 상대 발광도 평가

N-Tox 발광박테리아 독성 시험에 이용되는 발광박테리아 시약은 동결건조 상태로 제공되며 시험시 개봉하여 재활성화 시약을 넣어 발광박테리아가 발광을 시작하도록 만드는데 약 15분 정도 후에는 발광도가 안정화되었다가 시간이 지나면서 자연 감소한다. 발광박테리아의 발광도는 상대적으로 표현되기 때문에 대조구와 같이 오염물질이 존재하지 않을 때의 발광도는 일정하게 유지되거나 일정한 비율로 감소하여야 하며 오염물질이 존재할 때는 오염물질의 농도가 증가함에 따라 발광도는 감소하여야 한다.

N-Tox 발광박테리아 시약의 발광 안정도를 평가하기 위해 실험생물을 100 µl씩 자동분주하여 10분 간격으로 발광도를 측정하였다(Table 4). N-Tox 발광박테리아 독성 시험에서는 시험용기로 불투명하고 웰 바닥이 평평한 흰색 96웰 플레이트를 이용한다. 주입과 동시에 측정하였을 때 96웰 평균 상대 발광도는 100±2.7로 웰의 위치와 주입된 시간에 관계없이 일정한 것으로 나타났다. 주입 후 10분 경과시 평균 상대 발광도는 101±3.3으로 주입 초기와 거의 유사한 것으로 나타났으며 웰의 위치에 관계없이 일정하였다. 20분이 경과하였을 때도 평균 상대 발광도는 101±3.3을 보여 큰 차이없이 96개 각각의 웰에서 발광도가 유지되는 것으로 분석되었다. 상대표준편차(RSD)도 3%대로 다른 생물검정의 반복 결과보다 매우 뛰어난 것으로 관측되었다.

시험생물 적합성 평가(유해물질에 대한 민감도)

본 시험생물을 독성시험종으로 이용하기 위해서는 유해물질에 대한 용량-반응 관계가 명확해야 한다. 이를 증명하기 위해 중금속인 potassium dichromate와 유기독성물질인 3,5-dichlorophenol에 대한 용량-반응 평가를 수행하였다(Fig. 1). 발광박테리아는 potassium dichromate에 30분간 노출될 때 3.125 mg/L 이상의 농도에서 발광저해현상이 일어나기 시작하며 농도가 증가됨에 따라 발광저해는 계속 증가하여 6.8 mg/L 수준에서 20% 발광저해, 18.6 mg/L에서 50% 발광저해, 40.3 mg/L에서 80% 발광저해를 보이는 것으로 나타났다. 또한 3,5-dichlorophenol에 30분간 노출될 때 1.8 mg/L에서 20% 발광저해, 3.2 mg/L에서 50% 발광저해, 5.4 mg/L에서 80% 발광저해를 보이는 것으로 분석되었다. 이 두 물질은 노출시간 증가에 따라 독성영향이 다른 패턴을 보이는데 중금속인 potassium dichromate는 노출시간이 증가할수록 발광저해도는 증가하는 유형이 나타나고 유기독성물질인 3,5-dichlorophenol은에 대해서는 노출시간이 증가하여도 발광저해도는 초기에 발생했던 발광저해도 값과 유사하여 변동이 없는 형태를 보였다.

Potassium dichromate와 3,5-dichlorophenol은 국제표준화기구(ISO)에서 발광박테리아 독성 시험에서 민감도 시험을 위한 표준독성물질로 추천하였으며, EC₅₀ 값은 각각 18.7 mg/L와 3.4 mg/L로 제시하였는데 본 연구에서 개발된 N-Tox 발광박테리아 독성 실험

Table 3. Results of auto-injection volume test with N-Tox system.

	Auto injection volume (µl)			
	25.0	50.0	100.0	250.0
Set value	25.0	50.0	100.0	250.0
Measured value 1	27.5	50.1	98.1	247.2
Measured value 2	24.7	48.8	99.1	247.2
Measured value 3	25.3	48.8	98.7	247.3
Measured value 4	24.0	49.5	98.1	247.5
Measured value 5	23.7	48.8	100.2	247.1
Measured value 6	24.1	48.6	98.5	248.3
Measured value 7	24.6	48.8	99.4	246.6
Measured value 8	24.0	49.7	99.2	246.1
Measured value 9	25.4	48.6	98.7	246.8
Measured value 10	23.5	50.0	98.9	246.6
Average	24.7	49.2	98.9	247.1
SD	1.2	0.59	0.63	0.60
RSD(%)	4.8	1.2	0.6	0.2

Table 4. Comparison of relative light emission values when 100 µl of bacterial reagent is auto-injected in each 96 well.

T = 0min															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	AVG	SD	RSD (%)
A	100	103	104	101	103	99	100	100	100	100	98	100	101	1.6	1.60
B	100	96	100	95	97	98	96	98	95	99	96	96	97	1.8	1.88
C	100	97	99	96	94	97	94	96	92	95	98	95	96	2.2	2.29
D	100	99	99	100	98	98	103	103	105	103	102	103	101	2.3	2.25
E	100	102	98	97	99	102	99	97	97	100	103	101	99	2.1	2.07
F	100	97	97	97	100	99	96	100	99	101	99	100	99	1.7	1.71
G	100	103	101	102	101	100	102	100	99	100	103	104	101	1.6	1.55
H	100	103	100	103	102	101	104	102	102	103	105	105	103	1.7	1.63
Total													100	2.7	2.7
T = 10min															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	AVG	SD	RSD (%)
A	100	110	107	107	106	104	105	103	104	103	101	105	104	2.9	2.73
B	100	88	101	86	97	98	98	99	97	98	97	97	96	4.5	4.67
C	100	104	103	103	101	101	103	101	98	100	102	100	101	1.7	1.65
D	100	100	98	97	100	97	99	102	101	103	100	102	100	2.0	1.98
E	100	104	101	100	102	104	100	102	103	103	100	100	101	1.7	1.64
F	100	104	101	99	101	98	100	103	100	101	98	99	101	1.9	1.89
G	100	103	99	101	102	103	105	102	105	99	101	103	102	2.0	2.00
H	100	101	104	104	102	104	106	103	105	104	105	103	103	1.6	1.58
Total													101	3.3	3.3
T = 20min															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	AVG	SD	RSD (%)
A	100	108	111	112	108	105	106	106	105	106	105	104	106	3.1	2.91
B	100	89	103	91	98	98	99	99	100	100	99	99	98	3.9	3.96
C	100	106	103	102	101	100	102	104	100	104	102	99	102	2.0	1.97
D	100	100	100	99	100	96	100	98	100	102	101	98	99	1.5	1.48
E	100	102	102	97	101	102	100	100	102	102	102	101	101	1.4	1.43
F	100	101	99	98	97	99	98	99	98	100	96	96	98	1.6	1.58
G	100	102	98	101	100	103	101	102	101	98	101	101	101	1.5	1.47
H	100	98	99	100	99	100	100	99	100	98	99	99	99	0.7	0.68
Total													101	3.3	3.3

결과는 ISO에서 제시된 값과 거의 일치함을 보여 국제표준프로토콜 기준에 만족하였다.

시험생물 적합성 평가(현장 육수-기수-해수 독성 평가 적용)

본 시험 방법이 유해물질에 대한 평가에 적합함이 위의 결과로 입증되었으나 현장 시료에 대해 적용 가능할 정도의 민감도를 보유하고 있는지 증명하기 위해 현장에서 채취한 육수(D1, D2, D3), 기수(D4), 해수(D5) 시료에 대하여 N-Tox 발광박테리아 독성 평가를 실시하였다(Fig. 2). 채취된 육수 시료의 염분이 없어(0 psu) 미리 20 psu로 염분을 보정하여 독성 시험을 실시하였으며, 기수 시료의 염분은 17 psu로 염분 보정을 하지 않았으며, 해수 시료 역시 염분이 32 psu에 달해 염분 보정없이 독성 시험을 실시하였다. 시험결과, 육수인 D1, D2, D3 시료에서는 노출 5분만에 40% 이상의 발광저해가 발생하였고 D4 시료에서는 노출 5분에 약 17% 발광저해가 야기되었으나 해수시료인 D5에서는 노출 5분 경과시 발광도가 대조구보다 증가하는 현상을 보였다. 노출 15분 자료의 경우 노출 5분 자료에 비해 모든 시료에서 독성이 증가하여 D1,

D2, D3에서는 발광저해도가 50% 내외에 이르렀고 D4에서도 발광저해도가 25% 수준으로 증가하였으며 D5도 초기에 나타났던 발광 증가분이 상쇄되어 대조구 수준으로 떨어졌다. 30분 노출되었을 때 D1-D3 시료는 60-70%의 발광저해를 보였고 D4에서는 30% 수준의 발광저해를 보였으며 D5에서도 미약한 수준이지만 대조구와 통계적 유의성을 보이는 수준까지 발광저해도가 증가하였다. 이 결과는 이 시료들 내에 발광박테리아에 지속적으로 영향을 미치는 물질이 존재함을 암시하고 있으며 본 독성 시험 방법이 현장 시료에 대해 적용가능한 수준의 민감도를 확보하고 있음을 증명해준다.

표준독성물질 민감도 측정 시험에 의한 정도관리

본 연구에서 개발된 N-Tox 시스템이 문제없이 잘 작동되고 있는 지 점검하고 생산된 자료에 대하여 신뢰성을 확보하기 위해 표준독성물질을 이용하여 정도관리하였다(Fig. 3). 표준독성물질로는 국제표준화기구에서 추천한 3,5-dichlorophenol을 이용하였다. 표준독성물질 민감도 측정 자료는 2007년 3월부터 2008년 4월까지

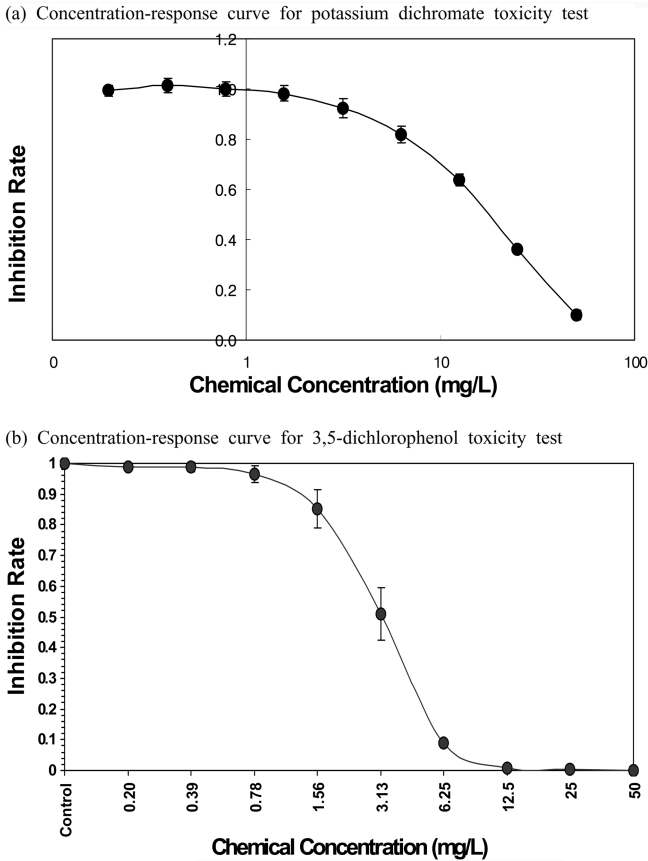


Fig. 1. Concentration-response curve of luminescent bacteria to reference toxicants. (a) potassium dichromate. (b) 3,5-dichlorophenol. The certified EC₅₀ values of potassium dichromate and 3,5-dichlorophenol are 18.7 mg/L and 3.4 mg/L, respectively. EC₅₀ values of these tests were 18.6 mg/L and 3.2 mg/L, respectively, with the 4 replicate tests.

지 약 1년의 기간동안 N-Tox test를 수행할 일이 있을 때마다 표준독성물질에 대한 민감도 측정 시험을 실시하여 생산되었다. 국제표준화기구에서 제시한 3,5-dichlorophenol의 EC₅₀ 값은 3.4 mg/L 수준임을 앞서 밝힌 바 있는데, 총 8번의 시험 결과 3,5-dichlorophenol의 EC₅₀ 값은 최소 2.7 mg/L에서 4.5 mg/L 까지 변동하는 것으로 측정되었는데 각 시기에 사용된 발광박테리아 시약의 제조일이 동일하지 않고, 보관 기간도 다른데다, 시기적으로 정해지지 않은 불특정 시기에 독성 시험 이루어졌음에도 불구하고 표준독성물질 EC₅₀ 값의 최소 최대 변동 범위가 평균 ± 30% 수준이어서 정도관리가 잘 되고 있는 것으로 판단되었다.

고찰

발광박테리아 독성 테스트의 기본 원리 및 장단점

발광박테리아를 이용한 환경독성평가 방법은 자연 발광하는 특성을 가진 박테리아가 주변에 오염물질이 유입되면 발광도가 떨어지고 발광도가 감소하는 정도는 오염물질의 독성의 강도와 농도에 비례한다는 사실에 근거하여 개발되었다(Bulich and Isenberg, 1981). 시험생물인 발광박테리아는 동결건조된 분말 형태로 일정

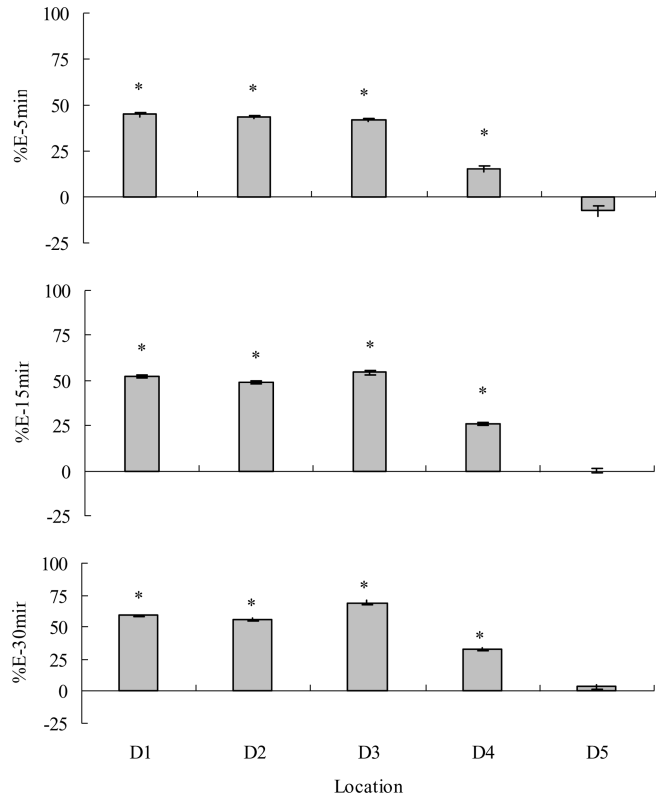


Fig. 2. Luminescent bacteria test results with field samples. D1, D2, and D3 represent freshwater samples, D4 brackish, and D5 salt water, respectively. Light inhibitory effects were measured in 5 min, 15 min, and 30 min exposure. Asterisk means significant difference from the control.

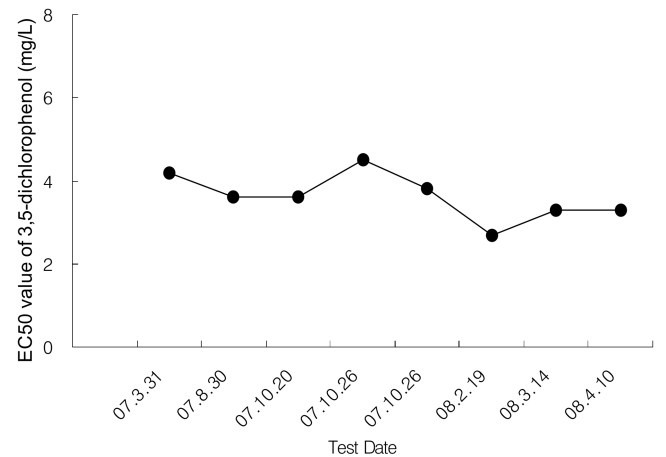


Fig. 3. Reproducibility of N-Tox test results using reference toxicant, 3,5-dichlorophenol.

량이 시약병에 날개로 포장되어 있어 보관이 용이하고 원할 때면 언제든지 활성 용액을 첨가하여 테스트에 사용할 수 있는 장점이 있다.

본 시험법을 이용하여 유해화학물질의 독성을 간단하게 판단할 수 있음은 물론이고, 해수, 공극수, 퇴적물, 유기추출액 등의 환경 시료에 대해서도 생물영향을 평가할 수 있다. 기본적으로 오염물

질에 의한 발광저해도는 시료를 일정시간동안 노출시킨 발광박테리아의 발광도와 시료를 노출시키지 않은 채로 일정시간 동안 놓아둔 대조구의 발광도를 비교하여 평가한다. 발광도는 상대적인 값으로 표현되기 때문에 시료에 의한 발광도 저해를 평가하기 위해서는 대조구 테스트와 시료 테스트가 동시에 수행된다. 발광도는 테스트 샘플의 생물활동 외의 원인에 의해서도 시간에 따라 변할 수 있다. 그러나 테스트 과정에서 나타날 수 있는 모든 변이는 대조구 테스트 반응을 고려함으로써 상쇄시킬 수 있다고 가정하여 대조구와 샘플 사이의 발광도 차이를 시료 독성에 의한 영향이라고 간주한다.

발광박테리아 독성 테스트 방법은 여러 가지 장점을 가지고 있다. 대표적인 장점으로서 신속성, 반복성, 단순성, 응용성 등이 있다. 외국의 연구 보고에서도 발광박테리아 생물검정법은 다른 생물검정법에 비해 신속성, 단순성, 반복성, 비용성, 표준성, 분별성, 민감도 등에서 매우 우수한 것으로 평가되었다(Giesy and Hoke, 1990). 발광박테리아의 독성 측정 방법은 매우 신속하게 이루어진다. 물벼룩, 어류 등의 독성 테스트 방법이 24시간, 48시간, 96시간 등을 요구하는 반면(ASM, 1996; USEPA, 2002), 본 시험방법은 5분, 15분, 혹은 30분 만에 생물에 대한 영향 유무를 점검해 낼 수 있다. 또한 본 시험법은 반복성이 매우 우수하여 반복구간의 상대표준오차는 10% 이내이다. 다른 생물 독성 테스트에서 흔히 발생하는 상대표준오차 20-30% 정도와 비교하면 매우 정밀하다 할 수 있다. 또한 실험 조작이 매우 간편하여 단순한 피펫팅 정도의 기술만 있으면 무난하게 실험을 수행할 수 있으며, 결과의 획득은 발광측정기를 이용하여 발광량만을 읽어내면 마무리 된다. 발광박테리아 독성 테스트 방법은 응용성이 뛰어나서 유해화학물질의 독성평가는 물론 수질, 공극수, 유기추출액, 퇴적물, 토양 등 다양한 매질을 평가할 수 있는 범용적인 기법으로 사용되며 배출수, 폐수 등 특정 오염원의 오염을 평가할 때 사용되기도 한다(Chen et al., 1997; Ringwood et al., 1997; Kaiser, 1998; Dorn et al., 1998; Munawar et al., 2000; 이 등, 2007). 이는 다른 독성 테스트 기법이 수질 테스트에 국한되거나 퇴적물 테스트에 국한되는 제한적 성격을 갖는 것과 크게 다르다.

발광박테리아 생물검정법의 단점은 다른 생물검정법이 갖는 한계점에서 크게 벗어나지 않는다. 예를 들면, 발광박테리아 독성 테스트로 독성의 유무를 판별할 수 있지만 독성의 유발 물질이 무엇인지 알아내는 것은 어려우며, 실험 반복성이 매우 뛰어나서 독성이 없는 시료를 독성이 있다고 판정할 오류를 범할 가능성이 존재하기 때문에 이러한 문제점들을 해결하기 위해서는 화학분석에서 얻어지는 정보나 통계적 처리에 대한 전문가적인 판단 등이 요구된다. 그러나 이것은 발광박테리아 테스트만이 가지는 고유한 단점이 아니라 모든 생물검정법이 가지는 방법론상의 한계이기도 하다.

국내 공정시험법 등재의 필요성

국내의 경우, 과거 30년 동안은 환경오염평가에 BOD, COD, 오염물질분석 등 이화학적 화학분석기술에 의존하였으나 미래에는 이화학적인 분석과 생물독성 분석이 함께 어우러져 오염을 평가하고 진단하는 상호보완적 방식 도입에 대한 고찰이 필요하며 그 근간에는 생물검정법의 공정시험법화 및 제도화 방안이 대한 논의가 있어야 할 것이다.

선진국에서는 이미 여러가지 실험 생물을 이용하여 개발된 생물검정기법을 공정시험법화하여 방류수 독성 테스트, 수질환경기준, 퇴적물환경기준, 오염진단과 생태계 위해도 평가, 오염정화와 환경복원 등에 활용하고 있다. 상수원 지역이나 특별관리구역에서 오염 모니터링 방법으로도 활용되고 있다.

본 연구에서는 국내에서 이용할 수 있는 생물검정법의 하나로 발광박테리아를 이용한 독성 테스트 방법을 소개하였다. 발광박테리아 독성 테스트 방법은 이미 선진국에서 많은 검증을 통해 신속성, 정밀성, 경제성 등에서 우수하다고 평가받아 왔다. 이 방법은 국내 연구진에 의해 자동화, 대량시료처리가 가능한 96웰플레이트 방식의 생물독성평가 방법으로 개발되어 누구나 쉽게 사용할 수 있으면서도 신속하고 정확하며 민감한 측정 자료를 산출해 줄 수 있는 것으로 평가되어, 국내 공정시험법의 하나로 도입하여 활용하면 비용 절감 등의 효과가 뛰어날 것으로 사료된다.

최근 국내 시험종을 이용하여 생물검정시험법을 공정시험법화하는 방안이 대한 연구가 지난 6년간 이루어져 왔고 공청회도 수차례 열어 의견 수렴 과정을 거쳤기에 생물검정시험법을 공정시험법화하기에 충분한 여건이 조성되어 있다고 여겨진다.

현재 국내 해양환경공정시험법상에 등재된 생물검정법은 마이크로톡스 생물검정법이라는 것이 유일하다. 그러나 마이크로톡스라는 것은 발광박테리아 키트를 판매하는 미국회사의 상표명으로 특정 상표명을 국내공정시험법 제목에 사용하는 것은 적절치 않아 보인다. ISO와 같은 국제공인시험법에는 luminescent bacteria test라고 명명되어 있는데 이를 해석하면 발광박테리아 시험법이라는 말로 해석되는 것이 적절하므로 향후 공정시험법 개정안에서는 그 제목을 발광박테리아 독성 시험법이라 명명하는 것이 바람직해 보인다(ISO, 1998a; 1998c). 또한 국내에 서식하는 다양하고 민감한 생물들을 보다 안전하게 보호하고 생태계를 지속가능하게 유지하기 위해서는 한 종류의 생물검정법에만 의존할 것이 아니라 그동안 국내 시험종으로 개발되어 그 타당성이 입증된 시험법들을 공정시험법화하고 다른 국내 시험종 개발도 지속적으로 추진하는 정책방향 설정이 필요해 보인다.

참고문헌

- 박경수, 이상희, 이승민, 윤성진, 박승윤, 2005. 해양생태독성평가를 위한 표준시험생물로서의 식물플랑크톤에 관한 연구. 한국환경과학회지, 14: 1129-1139.
- 윤성진, 박경수, 오정환, 박승윤, 2006. 저서성 해산 요각류 harpacticoid *Tigriopus japonicus* 유생을 이용한 해양생태독성평가. 한국해양환경공학회지, 9: 160-167.
- 이규태, 2002. 마이크로톡스 생물검정법의 실험방법 개량과 현장 적용에 관한 연구. 서울대학교 대학원 이학박사 학위논문.
- 이정석, 이규태, 김천국, 김혜진, 이창훈, 이종현, 2007. 국내 개발된 N-tox생물검정 시스템을 이용한 시안과 3, 5-이염화페놀의 발광박테리아(*Vibrio fischeri*)에 대한 혼합 독성 영향 연구. 환경독성학회지, 22: 27-36.
- 이창훈, 2000. 한국산 둥근성게(*Strongylocentrotus nudus*)의 정자와 수정란 생물검정법에 관한 연구. 서울대학교 대학원 이학박사 학위논문.
- 해양수산부. 1998. 해양환경공정시험방법. 해양수산부. 317 pp.

- 환경부, 2002. 수질유해물질의 통합독성 관리제도 도입방안 연구. 193 pp.
- 환경부, 2006. 물환경관리 기본계획.
- 환경부, 2007. 환경부 고시 제 2007-147호: 제 51항 물벼룩을 이용한 급성 독성 시험법.
- ASTM, 1996. Standard Guide for Acute Toxicity Test with the Rotifer *Brachionus*. ASTM (American Society for Testing and Materials) 11.05, E1440-91. ASTM, W. Conshohocken, PA.
- Bulich, A.A. and Isenberg, D.L., 1981. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity, *ISA Trans.* **20**: 29-33.
- Chen, C.Y., Huang, J.B., Chen, S.D., 1997. Assessment of the microbial toxicity test and its application for industrial wastewaters. *Wat. Sci. Tech.*, **36**: 375-382.
- Dorn, P.N., Vipond, T.E., Salanitro, J.P., Wisniewski, H.L., 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox, and plants. *Chemosphere*, **37**: 845-860.
- Giesy, J.P. and Hoke, R.A., 1990. Freshwater sediment quality criteria: Toxicity bioassessment. In R. Baudo, J.P., Giesy, and H. Muntau, Eds. *Sediments: Chemistry and toxicity of In-place pollutants.*, Lewis Pub., Inc., Chelsea, MI, 265-348.
- ISO, 1995. Water quality- marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornerutum*. the International Organization for Standardization. ISO 10253. 7pp.
- ISO, 1998a. Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)- Part 1: Method using freshly prepared bacteria.
- ISO, 1998b. Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)- Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
- ISO, 1998c. Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)- Part 2: Method using liquid-dried bacteria.
- Kaiser, K.L.E., 1998. Correlations of *Vibrio fischeri* Bacteria Test Data with Bioassay Data for Other Organisms. *Environ. Health Perspect.*, **106**: 583-591.
- McFall-Nagi, M.G., Ruby, E.G., 1991. Symbiont recognition and subsequent morphogenesis as early events in an animal-bacterial mutualism. *Science*, **254**: 1491-1494.
- Munawar, M., I.F. Munawar, D. Sergeant, C. Wenghofer, 2000. A preliminary bioassessment of Lake Baikal sediment toxicity in the vicinity of a pulp and paper mill. *Aquat. Eco. Health & Manag.* **3**: 249-257.
- Nealson, K.H., 1977. Autoinduction of bacterial luciferase: Occurrence, mechanism and significance. *Arch. Microbiol.*, **112**: 73-79.
- NIWA. 1998. Marine Algae (*Dunaliella tertiolecta*) Chronic Toxicity Test Protocol. National Institute of Water and Atmospheric Research, New Zealand. 30 pp.
- Park, G.S., Chung, C.S., Lee, S.H., Hong, G.H., Kim, S.H., Park, S.Y., Yoon, S.J., Lee, S.M., 2005. Ecotoxicological evaluation of sewage sludge using bioluminescent marine bacteria and rotifer. *Ocean Science Journal*, **40**: 91-100.
- Ringwood, A.H., Delorenzo, M.E., Ross, P.E., Holland, A.F., 1997. Interpretation of microtox solid-phase toxicity tests: The effects of sediment composition.
- USEPA, 1985. Terms of the environment: Glossary, abbreviations, and acronyms, 65 pp.
- USEPA, 2002. "Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marine organisms", United States Environmental Protection Agency, 1-122.

2008년 5월 9일 원고접수

2008년 5월 13일 수정본 채택

담당편집위원: 이창훈