

《原著》

유전자재조합균주를 이용한 생물모니터링에 중금속 오염물이 미치는 영향 평가

공인철¹ · 김진영¹ · 고경석^{2*}

¹영남대학교 환경공학과

²한국지질자원연구원

Effects of Heavy Metals on Biomonitoring using Recombinant Bioluminescence Bacteria

In Chul Kong¹ · Jin Young Kim¹ · Kyung-Seok Ko^{2*}

¹Department of Environmental Engineering, Yeungnam University

²Geologic Environment Division, Korea Institute of Geoscience & Mineral Resources

ABSTRACT

This research focused on the effects of heavy metals on the biomonitoring activity of genetically engineered bioluminescent bacteria, *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206. KG1206 was exposed to single or binary mixtures of different heavy metals as well as soils contaminated with heavy metals. In case of single exposure with different inducer pollutant, the toxicity order was as followings: As(III) > Cd, As(V) >> Cu, Cr(VI). The toxic effects of the binary mixtures was compared to the expected effect based on a simple theory of probabilities. The interactive effects were mostly additive, while in few cases antagonistic and synergistic mode of action was observed for some concentration combinations. No considerable correlation was found between the total metal contents in soils and the bioluminescence activity of each sample. However, statistically significant differences ($p = 0.0102$) were observed between two groups, classified based on arsenite contamination. These results demonstrate the usage of recombinant bioluminescent microorganism in biomonitoring and the complex interactive effects of metals.

Key words : Genetically engineered microorganism (GEM), Bioluminescence, Toluene analogs, Heavy metal

1. 서 론

미국 환경보호청 자료에 의하면 1990년대 초 미국에서 약 137,000개의 지하저장시설(underground storage tank, UST)에서 다양한 화학물질 누출이 발생하였으며 현재 지하 저장시설의 약 20% 정도가 누출 상태인 것으로 알려져 있다(Lee and Jun, 2006). 국내에서도 저장탱크의 누수 및 급증하는 자동차 수요에 대한 휘발유 및 디젤유 사용의 증가와 산업발전 등으로 인하여 석유계 탄화수소(petroleum hydrocarbons; PHCs) 오염물에 의한 토양 및 지하수의 오염은 꾸준히 증가할 것으로 예상된다(Kong et al., 2009). 다양한 환경 오염물질 중에서 PHCs는 발생량

및 위해성 측면에서 생태계 및 인간 건강에 영향을 유발하는 중요 오염물이다. PHCs로 오염된 환경을 복원 및 관리하기 위한 다양한 방법 중에서 생물을 이용한 기술은 환경 친화적인 장점이 있다. 특히 미생물을 이용하여 오염물질을 정화하는 생물학적 복원기술은 석유계 탄화수소 화합물을 포함한 환경에 잔존하고 있는 오염물질 제거에 용이한 것으로 알려져 있다(Hong et al., 2010). 이러한 접근은 이차 오염을 방지하고 또한 경제적인 면에서 저렴하게 수용될 수 있는 장점이 있다. 다양한 미생물 공정(균주 자체 활동도, 특정한 효소 활성, 유전자 발현, 재조합 유전자 발현 등)은 화학적 방법과 비교하여 보편적으로 단순, 신속하며, 경제적으로 저렴한 장점이 있기 때문

*Corresponding author : kyungsok@kigam.re.kr

원고접수일 : 2013. 5. 8 심사일 : 2013. 6. 18 게재승인일 : 2013. 6. 20
질의 및 토의 : 2013. 8. 31 까지

에 오염 지역의 기초평가 및 탐지 과정에 효과적으로 사용할 수 있다(Ko and Kong, 2008).

다양한 미생물 공정 중에서 박테리아의 발광특성을 이용한 방법은 화학물질로 오염된 환경시료의 생물학적 영향을 평가하기 위한 목적으로 널리 활용되고 있다(Lee, 2002; Onorati and Mecozzi, 2004; Hong et al., 2010). 오염물을 생분해함과 동시에 오염물 노출에 대해 생물발광을 나타내는 재조합 박테리아를 이용하는 기술은 환경 친화적이며 오염된 토양이나 지하수의 관리, 감시 및 생물학적 복원을 위해 미래 가치 있는 수단이 될 것으로 예상된다. 발광박테리아의 생물발광에 대한 물질 대사 및 유전자에 대한 구조는 대체적으로 잘 알려져 있으며 빠른 반응, 적은비용, 신속한 재생산으로 인해 생물 감지기로도 각광받고 있다(Gu and Choi, 2003). 단일 화학물질에 의한 발광도 저해 영향을 주는 다양한 중금속과 농약, 페놀류 등의 유기오염물질에 대한 연구 보고가 있다(Salizzato et al., 1998; Hsieh et al., 2004). 하지만 환경에 다양한 중금속 오염물질이 혼재하는 경우에는 개별 물질의 독성영향의 단순 합, 증가(synergism) 혹은 감소(antagonism)하게 되는 물질간의 상호작용이 존재할 수 있기 때문에 복원 및 관리를 위해 다양한 복합 오염물이 미치는 영향에 대한 연구와 정보 구축이 필요하다(Rider and Le Blanc, 2005; Lee et al., 2007).

본 연구에서는 석유계 탄화수소의 구성분인 톨루엔계열 화합물에 발광 활성을 나타내는 *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206을 생물학적 모니터링에 이용할 경우에 단일 및 혼합 중금속(Cu, Cd, As(III), As(V), Cr(VI)) 오염물이 균주의 발광에 미칠 수 있는 영향에 대해 조사한 후, 복합 중금속 오염지 토양 시료에 대한 생물학적 모니터링에서 유도제 오염물에 의한 영향을 분석하였다.

2. 실험 방법

2.1. 유전자 재조합균주 특성 및 배양

본 연구에 사용된 유전자재조합균주는 *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206(이하 KG1206)으로 균주 내에 TOL-plasmid와 재조합 플라스미드를 동시에 보유하고 있다. 재조합 플라스미드는 TOL-plasmid *xyI*-gene 하부 promoter인 P_m 가 벡터 pUCD615 플라스미드의 *lux*-gene 상부에 조합된 플라스미드로 유도제(inducer)로 작용하는 화합물에 의해 생성되는 조절 인자(regulatory factor)가 P_m 을 양성적으로 조절하여 발광유전자가 활동하는 특징을 지닌다(Kong et al., 2007). KG1206은 톨루엔계열 화합

물의 중간산물인 benzoate, toluate 등에 노출될 경우 분해와 동시에 생물발광활성을 가진다(Assinder and Williams, 1990).

본 연구에서는 초저온고(-70°C; Ilshin Lab Tech. Co., Model DF9007)에 보관된 KG1206을 필요시 Luria Broth-kanamycin (LB^{ka})고형배지에 계대 배양하여 사용하였다. 계대 배양한 균주는 LB^{ka} 액체배지에 27°C, 130 rpm 조건으로 12 hr 이상 배양 후 1:40로 희석 배양하고(O.D₆₀₀=0.6), minimal salt medium(MSM)로 1:1 희석하여 O.D₆₀₀=0.3으로 조정하여 실험에 사용하였다. KG1206은 kanamycin저항 유전자(Km^r)를 보유하고 있으므로 LB배지에 kanamycin을 50 mg/L로 첨가하여 사용하였다(Ko and Kong, 2008). KG1206의 발광활성은 Luminometer 20/20(Turner Design, USA)를 이용하여 400 µL씩 채취하여 0.5 hr 간격으로 측정하고 단위는 relative light unit(RLU)로 나타내었다. 측정 가능한 기기 최대 한계치는 9,999 RLU이고, Factory standard reading은 110.3 RLU, sensitivity는 51.6%이다.

2.2. 단일 중금속에 대한 발광 균주 영향(EC₅₀)

KG1206의 생물발광에 대한 단일 중금속의 영향을 알아보기 위하여 발광유도제 별 각 중금속에 대한 EC₅₀을 구하였다. 균주 9.8 mL, 시료(중금속 용액 혹은 멸균수) 0.1 mL와 각 발광유도제 화합물(toluene, *m*-toluate, xylenes) 0.1 mL(최종농도 0.5 mM)를 혼합하여 조사하였다. 최종 중금속 농도는 1~100 mg/L 범위에서 조사하였으며 0.5 hr 간격으로 2.5 hr 동안 400 µL씩 분취하여 Luminometer로 발광 활성을 측정하였다. 노출평가모델링에 사용하기 위해 미국 환경청에서 제공하는 SPEARMAN 프로그램을 이용하여 half maximal effective concentration (EC₅₀)을 계산하였다(Hadjispyrou and Kungolos, 2001). 실험에 사용한 중금속은 다음과 같다: CuCl₂·2H₂O (Yakuri Chemical Co., Ltd., Japan), CdCl₂·H₂O(Junsei Chemical Co., Ltd., Japan), Na₂HAsO₂(Sigma, USA), Na₂HAsO₄(Wako, Japan), K₂CrO₄(Kanto Chemical Co. Inc).

2.3. 혼합 중금속에 대한 발광균주 영향

혼합(binary mixture) 중금속 오염이 생물발광 활성을 이용한 모니터링에 미치는 영향을 조사하였다. 금속의 혼합은 단일 금속(Cu, Cd, As(III), As(V), Cr(VI))의 EC₅₀ 실험 결과를 1 TU(toxic unit)로 기준하여 각 중금속 0.25(1/4 EC₅₀), 0.5(1/2 EC₅₀), 1.0(EC₅₀) TU 농도의

Table 1. Conditions of the combinations of binary metal mixtures

Binary metal mixtures (mg/L)									
Cu + Cd		Cu + As(III)		Cu + As(V)		Cu + Cr(VI)		Cd + As(III)	
^a 12.5	^a 5	12.5	1	12.5	5	12.5	30	2.5	1
	10		2		10		60		2
25	5	25	1	25	5	25	30	5	1
	10		2		10		60		2
50	5	50	1	50	5	50	30	10	1
	10		2		10		60		2

Binary metal mixtures (mg/L)									
Cd + As(V)		Cd + Cr(VI)		As(III) + As(V)		As(III) + Cr(VI)		As(V) + Cr(VI)	
2.5	5	2.5	30	0.5	5	0.5	30	2.5	30
	10		60		10		60		60
5	5	5	30	1	5	1	30	5	30
	10		60		10		60		60
10	5	10	30	2	5	2	30	10	30
	10		60		10		60		60

^abinary mixture of 12.5 mg/L of Cu and 5 mg/L of Cd

혼합에 대한 영향을 관찰하였다(Table 1). 실험은 단일 중금속 방법과 동일하게 3회 반복 실시하였다.

혼합 중금속의 영향평가는 확률(probability; P) 이론을 기반으로 하는 간단한 수학적 모델을 이용하였다(Hadjispyrou and Kungolos., 2001; Kungolos et al., 1999). 이론적으로 예상되는 독성, P(E)(E = expected)와 실제 관찰 독성, P(O)(O = observed)을 식(1)에 근거하여 예상 독성 P(E)를 구하고 혼합 중금속 노출 결과, P(O)와 비교하였다.

$$P(E) = P_1 + P_2 - (P_1 * P_2) / 100 \quad (1)$$

P₁: 단일 중금속 a의 독성도

P₂: 단일 중금속 b의 독성도

P(E): 이론적 혼합 중금속(a + b) 독성도

2.4. 토양 오염 중금속에 의한 영향

중금속 함유 토양 생물모니터링에 대한 발광 균주 활성 영향을 평가하였다. 유도제 오염물은 임의로 첨가하였으며 토양 추출액이 발광 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 토양시료는 대용량 지하수 확보 가능 예정지 주변의 지하수계에 영향을 줄 수 있는 11 지역의 표층토를 이용하였다. 지역별로 10 m 반경의 구간에서 5~6개의 토양시료 채취지점을 결정하였다. 낙엽이나 뿌리와 같은 이물질이 있을 경우 이들을 제거하고 표층토양을 채취하여 2 mm 미만의 토양입자를 현장에서 채취 하였다. 모든 토양은 공

기 건조 후 저온실에 밀봉 보관하였다. 중금속 오염 토양이 균주의 발광에 미치는 영향을 조사하기 위하여 토양 추출액에 대한 균주의 발광활성을 조사하였다. 추출액은 토양 10 g과 멸균수 30 mL를 250 rpm, 6 hr 동안 노출 후 상등액을 원심분리 하여 실험에 사용하였다. 균주는 MSM으로 희석(O.D₆₀₀ = 0.3) 후 균주 4.9 mL에 시료(대조군은 MSM용액) 5 mL와 0.1 mL 톨루엔(최종농도 0.5 mM)을 노출 후 일정 시간 간격으로 발광을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 단일중금속에 대한 민감도 조사

선행 연구에 의하면 균주 발광활성 특성이 오염물 종류와 초기 농도 등에 따라서 차이가 있지만, 일반적으로 최대 발광은 오염물에 노출 후 1~2 hr에 발생하며, 특히 KG1206은 톨루엔 계열 화합물뿐만 아니라 중간 분해산물인 *m*-toluate 등에도 높은 발광을 생산한다(Ko and Kong., 2008). 생물 발광의 유도제 역할을 하는 오염물에 대한 생물모니터링에서 단일 중금속이 발광 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 상이한 5종의 유도제(0.5 mM) 노출 조건에서 단일 중금속(1~50 mg/L)이 미치는 영향을 조사하였다. 단일 중금속 영향 중에서 톨루엔과 *m*-toluate 유도제 오염물 노출 조건에서 As(III)가 발광 활성에 미치는 영향을 대표적으로 나타내었다(Fig. 1). Fig. 1에 의하면 As(III)는 톨루엔 보다 *m*-toluate 존재 조건에서 약간

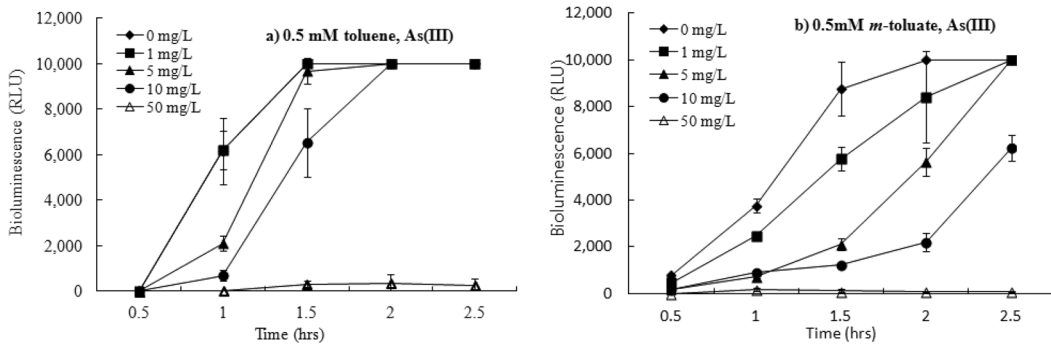


Fig. 1. Effects of arsenite on the bioluminescence activity of KG1206 in the presence of different inducers : a) 0.5 mM toluene, b) 0.5 mM *m*-toluate.

Table 2. Comparison of EC₅₀s of metal in the presence of different inducer (0.5 mM)

	EC ₅₀ (95% confidence level) (mg/L)				
	Cu	Cd	As(III)	As(V)	Cr(VI)
toluene	57.1 (58.9~55.4)	9.4 (10.9~8.2)	3.8 (4.3~3.3)	10.7 (12.1~9.4)	59.7 (69.8~51.0)
<i>m</i> -toluate	50.5 (53.7~47.4)	10.2 (11.8~8.8)	1.78 (2.3~1.4)	12.0 (15.1~9.5)	54.4 (69.0~42.8)
<i>m</i> -xylene	56.9 (63.2~51.3)	11.0 (15.8~7.6)	2.2 (2.6~1.9)	12.0 (11.5~9.9)	40.6 (50.2~32.8)
<i>o</i> -xylene	48.9 (51.0~46.9)	8.3 (9.5~7.2)	2.2 (2.4~2.1)	7.8 (12.5~4.9)	52.2 (57.1~47.8)
<i>p</i> -xylene	54.3 (56.3~52.3)	10.6 (11.8~9.5)	1.2 (1.7~0.9)	15.0 (17.3~11.3)	92.4 (127.2~67.1)
total avg.	53.5 ± 3.72	9.9 ± 1.0	2.2 ± 0.97	11.5 ± 2.60	59.9 ± 19.48

높은 발광 억제 영향을 나타내었지만, As(III) 50 mg/L 노출에서 두 경우 모두 발광 활성이 억제되었다. 1~10 mg/L 노출에서는 억제 후 발광 활성 회복을 보였으며 대체적으로 1.5~2.5 hr 부터는 대조군과 동일한 발광(> 9,999 RLU)을 나타내었다. 하부 경로 유도제인 *m*-toluate 에 의한 기작이 상부 경로 유도제 톨루엔 발광 기작보다 높은 억제 영향을 받는 것으로 조사되었다. 따라서 유도제 오염물과 중금속이 복합적으로 오염된 지역의 모니터링을 위해 혼합 중금속이 발광 활성에 미치는 영향에 대한 정보가 필요함을 확인하였다.

단일 중금속이 유도제 오염물에 의한 발광 활성에 미치는 영향을 EC₅₀(50% 영향을 주는 오염원 농도)에 근거하여 비교 분석하였다(Table 2). 상이한 유도제에 의한 발광 활성은 동일한 중금속에 대해서 비슷한 EC₅₀을 나타내었다. 정확한 원인 규명은 어렵지만 동일한 *xyI*-유전자 발광 기작을 이용하기 때문일 것이다. 균주의 중금속에 대한 총 평균 민감도는 다음 순서로 조사되었다: As(III) 2.2 ± 0.97 mg/L > Cd 9.9 ± 1.07 mg/L, As(V) 11.5 ± 2.60 mg/L

L >> Cu 53.5 ± 3.72 mg/L, Cr(VI) 59.9 ± 19.48 mg/L. 보편적으로 알려진 바와 같이 As(III)가 가장 높은 영향(독성)을 나타내었으며, 반면에 Cu와 Cr(VI)는 As(III)의 25~30배 높은 EC₅₀값의 낮은 영향(독성)을 나타내었다. 선행 연구결과들에 의하면 중금속의 독성은 다소 넓은 변동 폭을 가지고 있었으며 동일한 종류에 대해 상이한 EC₅₀와 민감도 순서들이 보고되어 있다(Hsieh et al., 2004). Hsieh et al.(2004)가 사용한 Microtox 방법에 의하면 민감도는 Cu > Cr(VI) > Cd > As로 매우 상이한 보고를 하고 있다. 따라서 중금속에 의한 영향은 생물 종류, 실험 조건(pH, 온도, 생리적 활성도 등), 측정 종말점에 따라 독성도 및 민감도가 달라질 수 있기 때문에 평가는 매우 신중하게 이루어져야 할 것이다(Milani et al., 2003; Lee and Bae., 2005).

3.2. 혼합 중금속에 대한 민감도 조사

오염물에 의한 영향은 단일 오염물과 더불어 혼합 오염물에 대한 정보를 이용함으로써 더욱 적절한 평가를 할 수

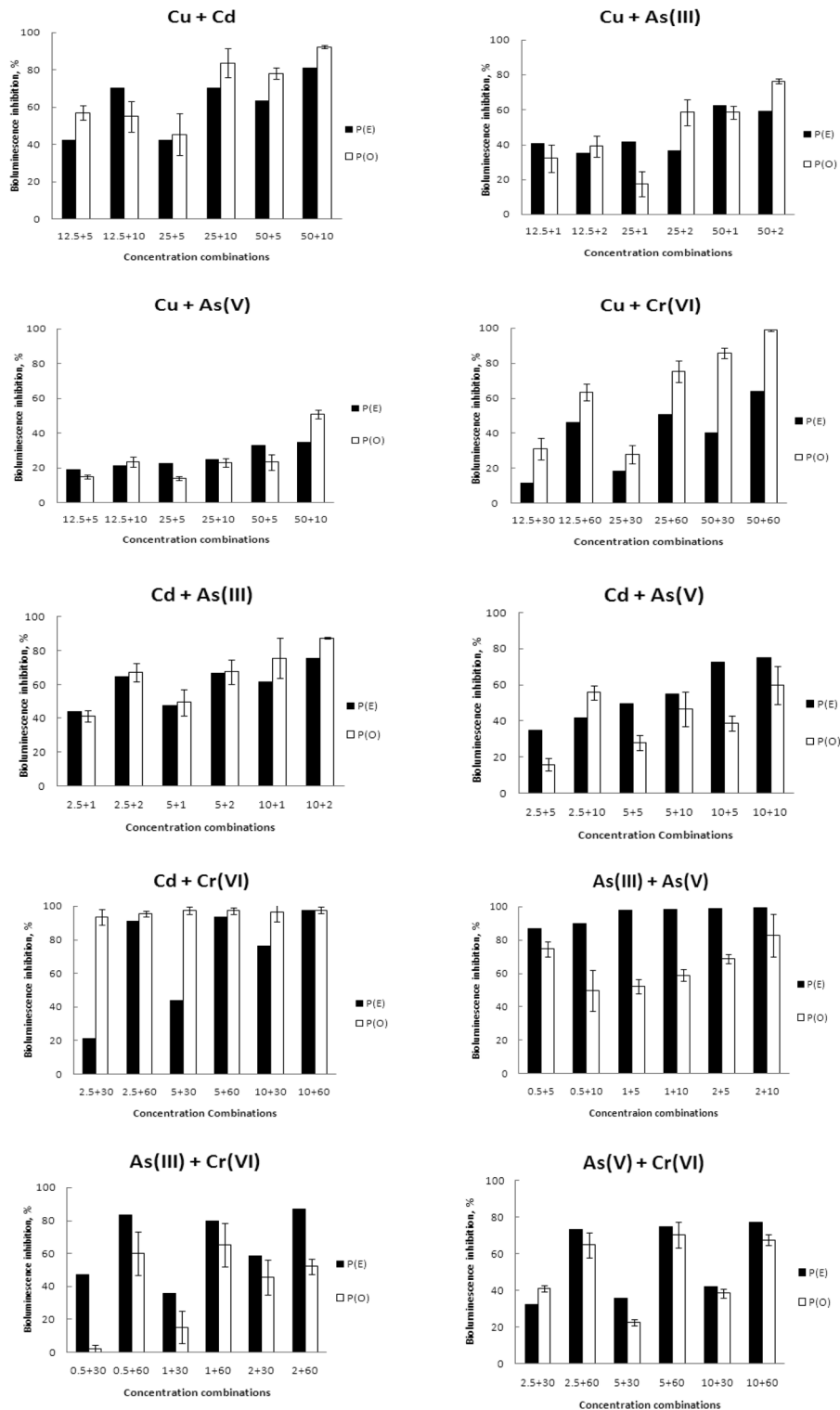


Fig. 2. Comparisons between theoretically expected and observed bioluminescence activities of KG1206 (mg/L) in the presence of the binary mixtures of copper, cadmium, arsenite, arsenate and chromate. Error bar indicates the standard deviation.

있을 것이다(Lee et al., 2007). 본 실험에서는 2종의 중금속을 각 3 조합 농도 비율로 혼합하여 영향을 평가하였

다(Table 1). 평가 결과에 대한 분석은 많은 가정 및 이론들에 근거하고 있지만, 본 실험에서는 확률이론을 기반

으로 한 단순한 수학적 모델을 평가하는 방식을 사용하였다(Kungolos et al., 2009; Hadjispyrou and Kungolos, 2001). 혼합 2종 중금속에 의해 이론적 영향 P(E)와 실제 관찰 영향 P(O)을 비교, 분석 하였다. 언급한 바와 같이 단일 금속 a₁과 a₂의 각각의 영향 정도가 P₁과 P₂라고 할 때 이론적으로 예상 영향 정도는 $P(E) = P_1 + P_2 - (P_1 * P_2) / 100$ 방정식으로 정의된 이론에 근거하여 분석하였다. 이 모델에서는 두 가지 화학물질이 독립적으로 행동한다는 가정과 혼합 오염원이 동시에 영향을 준다는 가정에 근거하고 있으며 결과에 따라 세가지 형태의 영향을 관찰할 수 있다: 혼합 오염 독성 영향이 증가하는 상승작용 (synergistic additive) P(O) > P(E), 독성 영향이 감소하는 길항작용 (antagonistic additive) P(O) < P(E), 단일 오염원 독성의 합과 비슷한 첨가작용 (additive) P(O) ≈ P(E).

중금속 혼합 농도와 중금속 종류에 따라 매우 다양한 관계가 나타났으며 특이한 패턴을 관찰하기는 용이하지 않았다(Fig. 2). P(E)와 P(O)의 전체 조합 평균은 각 57 ± 24.2%와 56 ± 25.7%(p value 0.711)로 조사되었으며 각 조건별 뚜렷한 차이를 보인 경우가 일부 관찰되었지만 전체적으로는 중금속 조합에 의한 영향이 ‘첨가’ 작용에 의한 영향이라고 사료된다. 하지만 As(III)의 조합의 경우에는 뚜렷하게 P(E)(65.9%)가 P(O)(54.5%)보다 높아 길항작용과 함께 혼합의 경우에 독성이 감소함을 나타내었다. 또한 반대로 Cu 혼합 실험조건에서는 24 조건 중 16 조건에서 P(O) > P(E)로 나타나 상승작용을 유발하였다. 따라서 혼합 중금속에 의한 영향은 매우 복잡한 경향을 나

타내고 있음을 확인하였다. 상호작용은 생물 종과 오염물 종류 뿐 아니라 상대적인 농도에 따라 다양한 결과를 나타낼 수 있음이 다양한 연구 결과에 의해 보고되어 있다 (Koutsaftis and Aoyama., 2006).

3.3. 중금속 함유 토양 모니터링

생물 발광을 이용한 토양 시료 생물모니터링에 중금속이 미칠 수 있는 영향을 토양 추출 용액을 이용하여 조사하였다. 임의 노출한 오염물(= 유도제)의 동일한 농도(0.5 mM)에 대한 대조군의 발광은 1800~173 RLU로 유도제별 매우 상이한 발광 활성이 다음과 같이 조사되었다: toluene(1800) > m-toluene(1257) > m-xylene(902) > p-xylene(191), o-xylene(173). 또한 대조군(100%)에 대한 전체 토양 시료의 상대적 생물발광 범위는 18~162%(평균 98 ± 29.8)로서 시료별 매우 상이한 영향을 나타내었다(Fig. 3). 높은 표준편차 값에 근거할 때 시료 집단 간의 흐트러짐 정도, 즉 발광 활성 영향에 시료 간 뚜렷한 차이가 있다고 판단할 수 있었다. 대조군에 대한 오염원, 즉 유도제별 상대 발광 범위는 가장 높은 toluene 102 ± 13.4%부터 가장 낮은 o-xylene 80 ± 30.7%(두 그룹 간 통계치 p = 0.0543)으로 조사되어 오염물 별 영향에 통계적 유의성이 있음을 확인하였다. 일부 높은 총중금속 함유 시료와 낮은 총중금속(As, Cu, Cr, Pb, Zn, Cd) 함유 일부 시료 간에 뚜렷한 생물발광 차이를 관찰할 수 있었다. 예를 들면 시료 #1(총중금속 920 mg/kg, 비소 627 mg/kg)과 #2(총중금속 822 mg/kg, 비소 566 mg/kg)

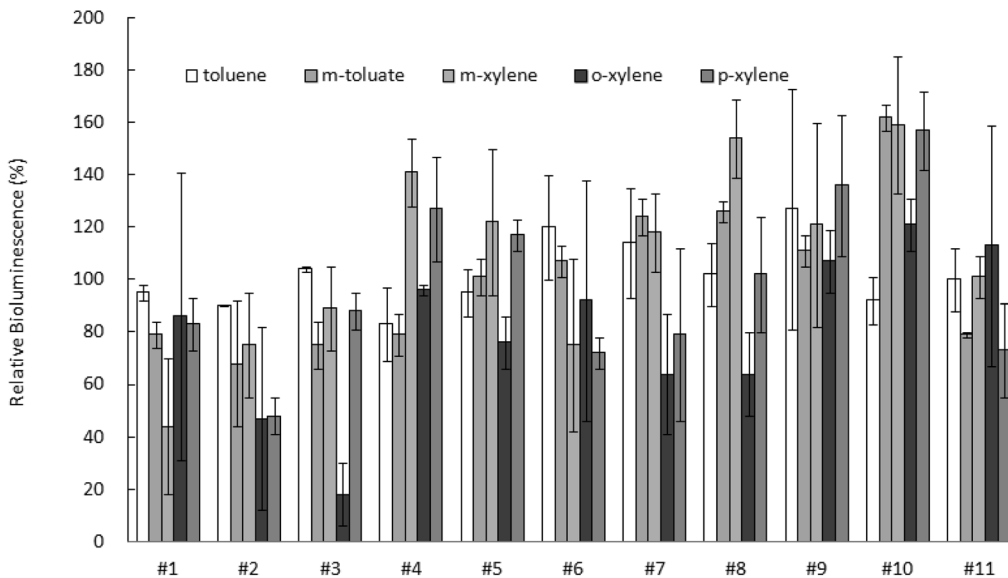


Fig. 3. Effects of soil extractants on the bioluminescence activities of KG1206, amended with different inducer pollutants. Numbers on X-axis indicate samples collected from different sites.

Table 3. Comparison of the relative bioluminescence activities between groups with high and low arsenite

Group	Relative Bioluminescence (%)					
	toluene	<i>m</i> -toluate	<i>m</i> -xylene	<i>o</i> -xylene	<i>p</i> -xylene	Avg.
High As	98 ± 13	85 ± 18	91 ± 35	69 ± 44	90 ± 33	87 ± 10.9
Low As	107 ± 13	121 ± 25	131 ± 19	94 ± 30	109 ± 33	112 ± 14.1

Probability between two groups (p) = 0.0102

는 각 44%(*m*-xylene) 및 48%(*p*-xylene)독성을 나타내었다. 또한 #10(총중금속 127 mg/kg, 비소 < 1 mg/kg)의 *m*-xylene와 *p*-xylene 노출에 대해 157%과 159% 높은 발광 활성을 나타내었다. 그러나 반대로 일부 시료는 중금속 오염 농도와는 상관성이 없이 높은 오염에 높은 발광(낮은 독성)(시료 #4 총중금속 739 mg/kg, 비소 433 mg/kg, *m*-xylene 발광 141%, *p*-xylene 발광 127%), 낮은 오염에 낮은 발광(높은 독성)(시료 #7과 8, 총중금속 각 206, 210 mg/kg, 비소 < 1 mg/kg, *o*-xylene 64%) 현상을 나타내었다. 따라서 토양 시료의 경우에는 각 시료별 총 오염원 농도와 활성 간의 상관성 평가가 복합적 오염 특성으로 인하여 용이하지 않았으며 총중금속 농도와 각 시료 용출액에 대한 생물발광 강도 간에는 거의 상관성이 없는 것으로 조사되었다.

개별 시료 특성에 근거한 평가의 한계성때문에 그룹별(높은 비소 오염과 낮은 비소 오염 그룹) 영향에 대해 평가를 조사하였다. 높은 비소농도 그룹(#1~#6)에서는 모든 유도제에 대해서 발광 활성이 69~98%(평균 87 ± 10.7%)로 나타난 반면에, 낮은 비소농도 그룹(#7~#11)에서는 94~131%(평균 112 ± 14.1%)로 나타났다. 또한 두 그룹 간에는 뚜렷한 통계적 유의성($p=0.0102$)을 관찰하였다(Table 3). 따라서 비소 농도 외에 시료 토양 #4에는 구리, 아연 #6에는 크롬, 납의 농도가 높긴 하지만 다른 토양 시료와 비슷한 수준이어서 두 그룹 간의 영향 평가에 주요 영향인자는 비소라고 예측할 수 있을 것이다. 연구자들도 중금속 오염 특성에 영향을 미치는 다양한 물리, 화학적 요인들 때문에 총중금속 농도에 근거하여 위해성을 평가하는 것은 적절하지 않은 것으로 보고하고 있다(Harayama and Rekik., 1990). 따라서 오염 토양이 주변 생태계에 미치는 영향에 대한 원인 해석은 매우 다양하고 복합적 요인들에 기인한다고 할 수 있다. 예를 들면 오염 화합물 뿐 아니라 토양 자체의 물리·화학적 특성(입자크기, 유기물 함량, pH, CEC 등), 혼합 오염물 복합적 영향, 오염물의 생물에 대한 민감도, 생물이용 가능성, 결합능(binding ability) 등의 다양한 원인을 들 수 있다(Gu and Choi., 2003). 본 연구에서는 발광활성을 이용하였지

만 다양한 연구결과에 의하여 생물 종류 및 측정 종말점(endpoint)에 따라 상이한 경향을 나타내는 것으로 알려져 있다(Harayama and Rekik., 1990). 따라서 향후 적절한 영향 평가를 위해서는 다양한 생물 및 측정 종말점과 혼합 오염물에 의한 영향을 고려한 통합 결과를 이용하는 것이 더욱 적절한 평가법이 될 것이다.

4. 결 론

유전자 재조합 발광 균주를 이용하여 석유계탄화수소에 오염된 토양을 모니터링할 경우에 중금속 오염이 생물 발광에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 유도하였다.

(1) 다양한 발광유도제(toluene, *m*-toluate, *m*-xylene, *o*-xylene, *p*-xylene)노출 조건에서 동일한 단일 중금속에 대해 비슷한 EC₅₀을 나타내었다.

(2) 발광유도제 오염물에 대한 중금속 독성(EC₅₀에 근거)은 As(III) > Cd, As(V) > Cu, Cr(VI) 순서로 조사되었으며 As(III)가 가장 높은 독성 영향을 나타내었다.

(3) 혼합 중금속의 영향에 대한 일정한 경향은 관찰할 수 없었지만, 대부분 첨가 작용을 나타내었으나 일부 상승과 길항 현상을 관찰할 수 있었다.

(4) 토양 시료의 총중금속 농도와 생물발광간의 상관성을 평가하기는 어려웠으나, 특정 오염원에 근거한 그룹에 대한 상관성 평가는 매우 통계적 유의한 결과를 나타내었다.

따라서 유전자 재조합균주를 이용하여 석유계탄화수소와 중금속으로 오염된 토양을 모니터링 할 경우에는 단일 및 혼합 중금속이 미칠 수 있는 정확한 영향에 대한 고려와 단일 시료 특성에 대한 평가보다 특성별 그룹화에 대한 접근 평가가 효율적인 방법임을 확인하였다.

사 사

본 연구는 한국지질자원연구원 기본사업인 '대수층 지하수 확보 융복합 핵심기술 개발'과제의 일환으로 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Assinder, S.J. and Williams, P.A., 1990, The TOL Plasmid: Determinants of the catabolism of toluene and the xylenes, *Adv. Microbiol. Physiol.*, **31**, 2-69.
- Gu, M.B. and Choi, S.H., 2003, Toxicity biomonitoring of degradation byproducts using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria, *Anal. Chim. Acta*, **481**, 229-238.
- Hadjispyrou, S. and Kungolos, A., 2001, Toxicity, bioaccumulation and interactive effects of organation, cadmium and chromium on *Artemia franciscana*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **49**, 179-186.
- Harayama, S. and Rekić, M., 1990, The meta cleavage operon of TOL degradative plasmid pWVO comprises 13 genes, *Mol. Gen. Genet.*, **221**, 113-120.
- Hong, S., Kim, J.-Y., and Cho, K.-S., 2010, Isolation and characterization of a diesel-degrading bacterium, *Gordonia* sp. SD8, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **38**(3), 335-339.
- Hsieh C.Y., Tsai M.H., Ryan D.K., and Pancorbo O.C., 2004, Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox[®] chronic toxicity test, *Sci Total Environ.*, **320**(1), 37-50.
- Ko, K.S. and Kong, I.C., 2008, Effect of bioluminescence stimulating agent of the genetically engineered strain KG1206 on the monitoring of the petroleum hydrocarbon contaminated groundwater samples, *J. Kor. Soc. Env. Eng.*, **30**(1), 79-84.
- Kong, I.C., Jung, H.K., and Ko, K.S., 2009, Bioluminescence activity of toluene analogs by alginate-immobilized *pseudomonas putida* mt-2 KG1206, *J. Kor. Soc. Env. Eng.*, **31**(2), 147-152.
- Kong, I.C., Kim, M.H., Ko, K.S., Kim, J.G., Jeon, C.W., and Bhandari, A., 2007, Use of recombinant bioluminescence bacteria for on-site monitoring of toluene analogs at petroleum contaminated sites, *J. Environ. Eng.*, **133**(7), 772-776.
- Koutsafitis, A. and Aoyama, I., 2006, The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*, *Environ. Toxicol.*, **21**, 432-39.
- Kungolos, A., Emmanouil, C., Tsiroidis, V., and Tsiropoulos, N., 2009, Evaluation of toxic and interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests, *Sci. Environ.*, **407**, 4610-4615.
- Kungolos, A., Samaras, P., Kipopoulou, A.M., Zoumboulis, A., and Sakellaropoulos, G.P., 1999, Interactive toxic effects of agrochemicals on aquatic organisms, *Water Sci. Technol.*, **40**(1), 357-364.
- Lee, J.-H. and Jun, K.-S., 2006, Effects of compost amendment on petroleum hydrocarbon removal and ATP concentration in bioremediation of diesel contaminated soil, *J. Kor. Soc. Env. Eng.*, **28**(7), 721-730.
- Lee, J.-S., Lee, K.-T., Kim, C.-K., Kim, H.-J., Lee, C.-H., and Lee, J.-H., 2007, Toxicity of binary mixture of cyanide and 3, 5-dichlorophenol to *Vibrio fischeri* determined by newly developed N-tox[®] bioassay system, *J. Environ. Toxicol.*, **22**(1), 27-36.
- Lee, K.-T., 2002, A study on the method modification and field application of Microtox bioassay, Unpublished doctoral dissertation, Seoul National University, 161.
- Lee, S.M. and Bae, H.K., 2005, Comparison of marine luminescence bacteria and genetically modified luminescence *E. coli* for acute toxicity of heavy metals, *J. Kor. Soc. Env. Eng.*, **27**(8), 900-906.
- Milani D., Reynoldson, T.B., Borgamann, U., and Kolasa, J., 2003, The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment, *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**, 845-854.
- Onorati, F. and Mecozzi M., 2004, Effects of two diluents in the Microtox toxicity bioassay with marine sediments, *Chemosphere*, **54**(5), 679-687.
- Rider, C.V. and Le Blanc, G.A., 2005, An integrated addition and interaction model for assessing toxicity of chemical mixtures, *Toxicol Sci.*, **87**(2), 520-528.
- Salizzato, M., Pavoni, B., Ghirardini, A.V., and Ghetti, P.F., 1998, Sediment toxicity measured using *Vibrio fischeri* as related to the concentrations of organic (PCBs, PAHs) and inorganic (metals, sulphur) pollutants, *Chemosphere*, **36**(14), 2949-2968.