자원환경지질, 제48권, 제3호, 261-271, 2015
Econ. Environ. Geol., 48(3), 261-271, 2015
http://dx.doi.org/10.9719/EEG.2015.48.3.261

pISSN 1225-7281
eISSN 2288-7962

다양한 독성법을 이용한 중금속, 나노입자 및 금속오염 토양 평가

공인철[1*] · 석우도[1] · 이민경[1] · 강일모[2]
[1]영남대학교 환경공학과, [2]한국지질자원연구원 광물 자원연구본부

Bioassessment of Heavy Metals, Nanoparticles, and Soils Contaminated with Metals using Various Bioassays

In Chul Kong[1*], Yu Tal Shi[1], Min Kyung Lee[1] and Il Mo Kang[2]
[1]Department of Environmental Engineerting, Yeungnam University
[2]Mineral Resources Division, Korea Institute of Geoscience & Mineral Resources (KIGAM)
(Received: 23 June 2015 / Revised: 1 July 2015 / Accepted: 1 July 2015)

Toxicity results of metals, nanoparticles (NPs), and soils contaminated with metals were introduced on this review. Following methods were used: seed germination, bioluminescence, enzyme activity, and mutation. In general, different sensitivities were observed, depending on types of bioassays and pollutants. Among tested seeds, sensitivities of *Lactucus* and *Raphanus* were greater than others. Of single metal exposure, effect by As(III) was greater than others, and high revertant mutation ratio (5.1) was observed at 1 mg/L arsenite, indicating high mutagenicity. No general pattern was observed on the effect of metal mixture, but synergistic effect was observed with seeds. In case of soils, no correlation was observed between total metal contents and toxicity. Toxicity of NPs was observed as follows: CuO > ZnO > NiO > TiO_2, Fe_2O_3, Co_3O_4. Especially, no considerable effects were observed by TiO_2, Fe_2O_3, and Co_3O_4 under tested concentration (max. 1,000 mg/L). The evaluation results of interactive toxic effects using various bioassays may comprise a useful tool for the bioassessment of various environmental pollutants.

Key words : bioassay, bioluminescence, mutation, seed germination

본 총설 논문에서는 다양한 급성독성법을 이용하여 중금속, 나노입자, 중금속 오염 토양에 의한 영향 평가 결과를 소개하였다. 평가는 씨앗발아, 생물발광, 효소활성 및 유전자 변이 평가법을 이용하였으며, 오염물 종류 및 방법에 따라 상이한 민감도를 보였다. 씨앗의 경우에는 상추(*Lactucus*)와 알타리무(*Raphanus*)가 대체적으로 높은 민감도를 보였다. 단일 금속 노출에서는 일반적으로 As(III)가 높은 독성을 나타내었다. As(III) 1 mg/L 조건에서 높은 유전자변이(MR=5.1)가 관찰되었다. 혼합 중금속에 대한 영향은 명확한 경향을 찾기 어려웠지만, 씨앗 발아의 경우에는 상승효과가 보편적으로 관찰되었다. 중금속 오염 토양에 대한 평가에서는 시료별 총중금속 농도와 독성 영향 간의 상관성을 예측하기는 어려웠다. 일반적으로 나노입자의 씨앗발아에 근거한 영향은 다음의 순서로 조사되었다: CuO > ZnO > NiO > TiO_2, Fe_2O_3, Co_3O_4. 특히 TiO_2, Fe_2O_3와 Co_3O_4는 최대 노출 농도 1,000 mg/L 농도에서도 뚜렷한 영향을 나타내지 않았다. 다양한 독성 생물검정법에 대한 통합 자료는 향후 다양한 오염물 기초 독성평가에 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

주제어 : 환경독성법, 생물발광, 씨앗 발아, 유전자 변이

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:

1. 서 론

현대사회의 산업 발달과 도시화는 중금속, 나노입자 등과 같은 다양한 인위적 환경 오염을 증가시키고, 이러한 오염은 일부 지역에 심각한 위험성 문제를 유발한다. 많은 중금속 중에서 As, Cd, Cu, Cr, Co, Hg, Pb, Se, Zn 등은 물, 대기, 토양 환경 등의 다양한 이동 매체를 통해서 생태계에 축적되어 잠재적으로 인간을 비롯한 유기 생명체에 치명적인 피해를 입힐 수 있다(이진수 등, 2001). 이러한 중금속 오염물들 중에서 특히 비소는 인체 및 생태계에 매우 유해한 금속으로 알려져 있다. 음용수에 대한 비소농도 권고치는 대부분 ppb 수준을 요구한다. 또한 최근에는 유럽연합, 미국, 일본, 한국 등의 국가가 10 ppb로 비소 기준농도를 강화하고 있다. 또한 지하수 비소 오염은 중국과 인도 등을 포함한 다양한 국가에서 큰 문제로 부각되고 있다 (Liu, *et al.*, 2005). As(III)의 높은 독성은 효소를 포함한 생화학물질(e.g., glutathione, lipoic acid)의 -SH 그룹과의 친화도에 기인하는 것으로 알려져 있다(Aposhian and Aposhian, 2006).

나노(nano)입자는 10억분의 1을 나타내는 단위로 1 nm에 해당되는 원자규모의 크기이며, 원자들의 배열 간격이 약 0.2 nm이고 원자 중 가장 작은 수소 원자의 직경이 0.1 nm이므로 나노세계는 원자세계라 말할 수 있다(Lowry *et al.*, 2012). 국내에서도 세계적 추세와 같이 오래전부터 나노 기술이 도입, 개발 및 다양한 상업 목적으로 사용되고 있다. 나노입자는 보편적으로 다음과 같이 분류된다 : (1) 탄소 기반(대부분 탄소로 구성) (2) 금속 기반(양자입자, 나노골드, 나노실버, 금속산화물 등) (3) 덴드리머(가지구조 나노크기의 고분자) (4) 복합물(나노입자 혹은 거대물들을 혼합) (Lin and Xing, 2007; Klaine *et al.*, 2008). 나노입자는 촉매, 반도체, 화장품, 전자제품, 의약 등 다양한 분야에 사용되고 있으며, 나노입자를 이용한 기술은 앞으로도 계속 개발되어 우리 생활과 밀접한 연관성을 유지할 것이다(Biswas and Wu, 2005). 따라서 나노입자는 유익성과 함께 미칠 수 있는 유해한 영향에 대한 관심도 증가하고 있으며, 보편적으로 탄소기반과 금속기반 입자에 대한 연구가 많이 되어있다. 다양한 유전적 변이에 미치는 영향에 관한 보고도 있다(Singh *et al.*, 2009; Landsiedel *et al.*, 2009). 다양한 종류 및 조건에서 나노입자가 생물계에 미칠 수 있는 영향에 대한 연구는 계속적으로 조사되어야 할 것이다.

오염 토양이나 지하수 생태계의 독성 물질들이 미치는 오염 정도 및 영향을 규명하는 것은 오염으로 인한 위해성, 생태계 복원 및 관리를 위한 필수적 과정이다. 생물검정법(bioassay)은 오염물이 생태계에 미치는 위해성을 결정하기 위한 중요한 정보를 제공하며, 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)을 측정한다는 장점을 가진다. 오염물에 대한 급성독성법으로는 척추 및 무척추 동물, 식물, 어류, 조류, 박테리아 등 다양한 생물체와 상이한 측정 종말점(씨앗 발아 및 성장, 치사율, 출산율, 먹이 섭취, 이동성, 호흡량, 생장, 유전자 변이, 효소 활성 등)에 근거하여 오염물의 환경독성 정도를 평가한다(Bitton 1999). 환경 급성독성법을 이용하여 오염물에 대한 위해 정도를 조사할 때의 중요한 문제점은 생물종에 따라 일반적으로 오염물에 대한 민감도가 상이할 수 있다는 점이다(Mankiewicz-Boczek *et al.*, 2008). 따라서 단일방법에 의한 평가보다는 다양한 방법에 근거한 오염물 독성 평가 접근법이 필요하며, 생물종에 따라 상이한 민감도에 의한 생물 검정법 결과의 통합은 오염물 혹은 오염 환경의 모니터링에 더욱 적절한 정보를 제공해 줄 것이다(Kungolos 2009).

본 연구에서는 다양한 화합물의 독성을 상이한 독성법을 이용하여 조사한 결과를 평가하였다. 사용한 방법은 (1) 유전자 재조합 발광 균주인 RB1436의 발광 활성, (2) 상이한 4종류(genera)의 씨앗 발아, (3) 단기간 유전자 생물검정법인 *Salmonella typhimurium*변이 균주 유전자 복귀 돌연변이원성에 근거한 Ames test이다.

2. 실험방법 및 재료

2.1. 생물발광을 이용한 생물검정법

발광 유전자 재조합 균주 *E. coli* RB1436은 pUCD615 플라즈미드 내의 염기 제거(deletion)에 의해 *lux*-gene이 충분히 발현될 수 있도록 constitutive promoter가 *lux*-gene에 근접하게 위치한 균주이다. 20% glycerol 용액으로 -70°C 초저온고(model DF9007, Ilshin Lab Tech. Co.)에 보관한 균주를 Luria-Bertani (LB) 배지(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, 2 N NaOH 0.5 mL per 1 L, pH 7.2)에 계대 배양하여 사용하였다. 실험을 위해 27°C, 130 rpm 조건에서 LB배지에 하룻 밤 동안 배양 후 다시 LB배지에 1:20 희석하여 $O.D_{600}$=0.6이 될 때까지 재배양

하였다. 독성 측정은 발광 활성영향에 근거하여 측정하였으며, 균주(1 mL)에 시료(9 mL)를 노출 시킨 후 배양 1시간과 1시간 30분의 발광강도를 측정한 평균값을 이용하였다. 발광은 시료 400 μL을 채취한 후 Luminometer (TD 20/20, Turner Designs, USA)를 이용하여 측정하였으며, 발광 강도 단위는 relative light unit (RLU)이며 최대 측정 한계치는 9,999 RLU이다.

2.2. 씨앗 발아 생물검정법

씨앗 발아 검정법에 사용한 씨앗은 일반 경작용 식물 중에서 US. EPA (1996) 및 OECD 등의 공인 기관에서 추천하는 4 종류의 식물 씨앗을 선택하였다: *Lactuca sativa L.*(상추), *Raphanus sativus L.*(알타리무), *Cucumis sativus L.*(오이), *Cardamine yezoensis Maxim.*(춘채). 씨앗은 실험 전에 3% 과산화수소로 표면을 소독하고 증류수로 한 번 더 세척하였다. 페트리 접시(90×15 mm)에 필터(advantec filter paper No. 2)를 깔아 상이한 농도의 시료 용액(시료군) 5.0 mL를 주입하고, 세척한 20개의 씨앗을 정렬해 놓은 후 파라필름으로 밀봉하여 23°C, 암소에서 배양하였다. 대조군으로는 5 mL의 멸균수를 사용하였으며, 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였다. 결과는 배양한 시점으로부터 3일이 경과하여 뿌리가 2 cm 이상 나온 것을 발아한 것으로 간주하였으며, 대조군에 대한 실험군의 발아개체수를 백분율로 환산하여 나타내었다. Fig. 1은 씨앗 발아 실험 페트리 접시와 발아 씨앗 사진이다.

2.3. 유전자 복귀돌연변이 생물검정법

본 연구에서는 돌연변이원성 시험의 스크리닝 시험으로 가장 많이 이용되고 있는 단시간 변이 측정법 Ames test를 이용하였다. *Salmonella typhimurium* 야생형 균주(wild type)는 아미노산 히스티딘이 없는 조건에서도 생장할 수 있는 히스티딘 비요구성(his^+)이다. 본 연구에서 사용한 *Salmonella* 변종들은 인위적 변이(pre-existing mutations)에 의해 히스티딘을 합성할 수 없어 생장을 위해서는 히스티딘을 요구하는 히스티딘 요구성(his^-) 균주로 ampicillin 저항 유전자를 보유하고 있는 TA98을 사용하였다. 중금속에 대한 복귀돌연변이원성 시험은 Ames test (Mortelmans and Zeiger, 2000)에 준하여 수행하였고, 시험물질의 농도 범위는 1~500 mg/L이다. 모든 실험마다 양성대조물질을 대상으로 복귀돌연변이 집락수를 측정하고, 각 균주에 해당하는 양성대조물질의 참고치와 비교, 확인하여 균주의 유전 특성이 정상적으로 발현되는지를 확인하였다(공인철 외 2인, 2010).

생물 검정법의 결과는 일반적으로 대조군에 대비한 EC_{50}값으로 나타내었으며, 노출평가모델링(CEAM: Exposure Assessment Modeling)을 수행하기 위해 미국 EPA에서 제공하는 프로그램(Trimmed Spearman-Karber method)을 이용하였다(An 2004). 실험 결과값들에 대해 graphpad software의 t-test 프로그램을 이용하여 통계 유의치(*p*-value)를 평가하였다 (http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm).

2.4. 씨앗 활성에 근거한 나노입자 독성 평가

나노입자에 대한 독성 영향을 씨앗발아 활성에 근거하며 평가하였다. 실험은 중금속에 대한 방법과 동일하게 수행하였다. 본 연구에서는 금속산화물인 나노입자 6종에 대한 독성평가를 실시하였다: CuO (30~50 nm), NiO (30 nm), Fe_2O_3 (20~40nm), Co_3O_4 (30 nm), TiO_2 (30~50 nm) (Nanostructured & Amorphous Materials Inc., USA), ZnO (40~100 nm) (Alfa Aesar, USA). 제조한 나노시료 용액내의 나노입자 분산

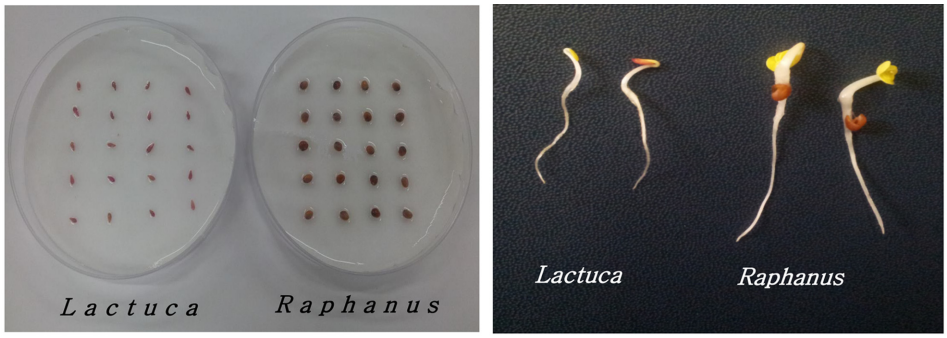

Fig. 1. Pictures of orignal seeds arrayed on Petri-dish and germinated seeds.

(disperson) 향상을 위해 제조 후 초음파 세척기 (Daihan, Korea)를 이용하여 30분간 초음파(sonication) 후 실험에 사용하였다.

2.5. 토양시료 독성평가법

토양 시료는 대용량 지하수 확보 가능 예정지 주변의 지하수계에 영향을 줄 수 있는 11 지역의 표층토를 채취하여 씨앗발아에 미치는 영향에 근거하여 독성을 조사하였다. 지역별로 10 m 반경의 구간에서 채취의 편리성과 토양 상태 등을 고려하여 토양오염공정시험법에 따라서 5~6개의 토양시료 채취지점을 결정하였다. 낙엽이나 뿌리와 같은 이물질이 있을 경우 이들을 제거하고 표층토양을 체걸음 한 후 2 mm미만의 토양 입자를 현장에서 채취 하였다. 모든 토양은 공기건조 후 사용할 때까지 저온실에 밀봉 보관하였다. 토양평가를 위해 토양과 증류수를 1:3의 비율로 혼합 후 250 rpm 조건에서 6시간 추출 후 원심분리 슬러리의 상등액에 대한 영향을 관찰, 비교하였다. 실험 방법은 단일 중금속 독성평가와 동일한 방법으로 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 단일 중금속 독성평가

다양한 중금속에 대해 생물발광과 씨앗 발아 활성에 근거하여 민감도를 조사하였다. 선행 조사에 근거하여 특정 농도 범위를 결정하였으며 오염물에 따라 매우 다양한 범위의 독성을 나타내었다(Table 1). 발광 활성과 씨앗에 대한 중금속의 영향 순서는 상이하였으며 다음과 같이 조사되었다: 발광활성 As(III), Cd > As(V) > Cu >> Cr(VI), 씨앗활성 As(III) > Cr(VI) > Cu > Cd > As(V) (Table 1). 특히 Cr(VI)의 경우에는 생물발광 조사 최대 농도인 50 mg/L에서 EC_{50}이 관찰되지 않았지만 씨앗발아는 1.33 mg/L에서 50% 영향을 나타내었다. 높은 독성 오염물로 알려진 As(III)는 모두 독성이 높게 조사되었다. As(III)는 As(V)에 비해 독성이 상당히 높은 것으로 보편적으로 알려져 있으나 (Sharma and Sohn, 2009) 본 검정법에서는 EC_{50}에 근거하여 약 2~3배 정도 높은 독성이 관찰되었다. 오염물에 대한 독성 민감도 및 민감도 순서는 생물종과 측정 종말점(end points) 등에 따라 매우 다양한 특성을 나타낼 수 있기 때문에 시료 특성에 적합한 방법이나 다양한 방법들의 결과를 통합한 해석을 통하여 더욱 적절한 평가가 이루어질 수 있을 것이다.

독성이 높게 나타난 비소 화합물(As(III)와 As(IV))에 대해서 다른 생물검정법을 이용하여 영향을 비교하였다(Table 2). As(III)와 As(V)의 1 mg/L 노출 조건에서 균주의 발광활성은 각 대조군의 49.8±6.66%(높은 독성)와 62.4±14.06%(낮은 독성)을 나타내었고, 최대 농도인 10 mg/L 노출 조건에서는 활성이 억제되어 각 대조군의 6.5±0.87%와 15.9±0.63% 발광 활성이 각각 관찰되었다. As(III)와 As(V)의 EC_{50}는 1.14(0.84~1.54) mg/L와 2.05(1.47~2.86) mg/L로 각각 조사되었다. 많은 연구 결과들에 의하면 보편적으로 As(III)가 As(V)보다 높은 독성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 생물 발광활성 억제에 근거한 본 연구에서도 일치하는 결과가 조사되었다. As(III)의 독성은 glutathione과 lipoic산과 같은 생분자(biomolecules)와 많은 효소의 시스테인 성분의 -SH기에 대한 친화도 때문인 것으로 알려져 있다(Aposhian and Aposhian, 2006). As(III)와 황 결합은 glutathione reductase, glutathione peroxidases 등의 다양한 효소의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Chang *et al.*, 2003). As(V)의 경우에는 황화수소그룹에 직접 결합하지 않는 것으로 알려져 있다(Suzuki *et al.*, 2008).

3.2. 씨앗종에 따른 민감도 조사

지역의 주요 농작물 재배종이면서 US. EPA 및 OECD의 공정법에서 권장하는 식물 씨앗에 해당하는 오이(*Cucumis*), 알타리무(*Raphanus*), 춘채(*Cardamine*), 상추(*Lactuca*)를 사용하여 씨앗 발아에 근거한 비소의

Table 1. EC_{50}s of various pollutants based on bioluminescence and seed germination (*Lactuca*) activity (95% confidence level) (공인철, 이소라, 2012)

Metals	Bioluminescence (EC_{50} mg/L)	Seed germination (EC_{50} mg/L)
As(III)	1.1 (0.84~1.54)[a]	1.02 (0.87 ~ 1.20)[a]
As(V)	2.1 (1.47~2.86)	3.00 (2.53 ~ 3.56)
Cr(VI)	>□50	1.33 (1.19 ~ 1.49)
Cu	6.0 (5.21~6.78)	2.26 (1.88 ~ 2.73)
Cd	1.34 (1.03~1.75)	2.61 (2.23 ~ 3.04)

[a]Value is the range of the 95% confidence level (low limit~high limit)

Table 2. Summary of the effects of arsenic compounds on various test organisms (공인철 외 2, 2010)

Methods		EC_{50} or mutation level (mg/L)	
		As(III)	As(V)
α-glucosidase activity		45.4 (29.42~70.06)	>> 50
Seed germination	*Lactuca*	0.63 (0.57~0.69)	3.01 (2.53~3.57)
	Raphanus	1.73 (n.d.)	3.94 (3.41~4.55)
	Cucumis	3.95 (3.73~4.18)	3.70 (3.10~4.41)
	Cardamine	3.74 (2.88~4.85)	10.96 (10.22~11.74)
Revertant mutation	TA98	< 1 mg/L	< 500 mg/L
	TA100	> 500 mg/L	> 500 mg/L

Values in parenthesis represent 95% confidence level

독성을 결정하였다(Table 2). 동일한 오염물에 대해서 각 씨앗종의 내성 정도와 민감도는 상이하였으며, 대조군의 경우에 3일 배양 시점에서 평균 92.5% 발아(2 cm 기준)하였다. 비소 노출 씨앗들 대부분은 초기 일정 농도까지는 발아 영향에 내성을 나타내다가, 일정 농도 노출 이후 부터 급격히 영향을 받는 형태로 관찰되었다. 조사한 씨앗 중에서 *Lactuca, Raphanus*와 *Cardamines*는 As(III)가 As(V)보다 더욱 높은 독성 영향을 나타내었으며, *Cucumis*는 비슷한 민감도를 나타내었다. 금속 오염물 종류에 대해 상이한 민감도를 나타내었지만, As(III)에 대한 씨앗의 민감도(EC_{50} mg/L)는 *Lactuca* (0.63) > *Raphanus* (1.73) > *Cardamine* (3.74), *Cucumis* (3.95), 그리고 As(V)에 대한 민감도는 *Lactuca* (3.01), *Cucumis* (3.70), *Raphanus* (3.94) >> *Cardamine* (10.96)으로 조사되었다(Table 2). 대체적으로 *Cardamine* 씨앗이 비소 화합물에 대해 민감도가 낮은 씨앗 종으로 조사되었었으므로, 환경독성평가에 부적절한 씨앗종으로 판단할 수 있다. 본 조사에서 높은 민감도를 나타내었고, 비소 화합물에 대해 상이한 영향을 나타내었으며, 또한 다른 검정법과 비슷한 경향을 보인 *Lactuca*와 *Raphanus* 2종의 씨앗이 생물 검정법을 위해 적절한 종류로 사료된다.

다양한 밀(wheat) 씨앗종을 대상으로 한 보고에서도 As(III)가 As(V) 보다 높은 독성을 나타내는 것으로 조사되었다. 또한 씨앗 발아는 호흡에 필요한 대사물(metabolites)을 공급하는 씨앗 탄소원(starch 등) 분해에 의존하기 때문에 아밀라제 효소의 활성에 대한 비소 화합물 영향과 상관성이 높은 것으로 보고되었다(Liu *et al.*, 2005). 씨앗발아 외에도 줄기, 뿌리 성장, 생체량 및 대사물 생산 효소 활성 등에 대해서도 중금속이 독성을 미칠 수 있을 것이다(Abedin and Meharg, 2003).

3.3. 복귀 돌연변이원성에 근거한 비소 독성 평가

비소 화합물이 *Salmonella* 균주 복귀 돌연변이원성에 미치는 영향을 As(III)와 As(V) 농도 0~500 mg/L 조건에서 조사하였다. 음성대조군에서 21~36 (TA98), 107~133 (TA100)의 집락이 생성되었기 때문에, 보고된 연구 결과와 비교하여 양성이라 판단할 수 있어 시험은 적절하다고 판단되었다(Mortelmans and Zeiger, 2000). TA98 균주는 비소 농도 증가에 따라 복귀 돌연변이에 의한 집락수도 증가하였고, 모두 용량 의존적으로 양성 반응을 보였다. MR (대조군에 대한 실험군의 복귀 집락수의 비) 값이 2를 초과하기 시작하는 농도는 As(III) 1 mg/L (MR=5.1)와 As(V) 500 mg/L (MR=2.0)로 나타났다(Table 2). 따라서 As(III)는 1 mg/L 이하, As(V)는 500 mg/L 이상의 농도에서 양성, 즉 유전자 변이 영향 농도로 판정할 수 있었다. 특히 As(III)의 경우 조사 범위 최대 농도인 500 mg/L의 MR 값이 10.4로 돌연변이원성 물질로서의 가능성이 매우 높은 것으로 나타났다. 비소에 노출된 TA100 균주는 오염원의 증가에 따른 복귀 집락수의 증가를 확인할 수 없었기 때문에 비소에 대한 염기쌍 치환형인 TA100 균주의 변이원성 확인 결과는 음성으로 판정하였다. 오히려 As(III)에 노출된 TA100은 화합물의 농도가 증가함에도 불구하고 형성되는 집락의 수는 감소하였다.

TA98과 TA100 균주에 대한 MR값을 비교했을 때 TA98 균주에 대한 복귀 돌연변이원성이 뚜렷하게 나타나므로 구조 이동형(frame shift type)의 변이원성 물질에 의한 돌연변이원성 효과가 더 크게 발현되었음을 예상할 수 있었다. 본 연구 결과는 침출수 처리공정수 및 폐수슬러지에 의한 돌연변이원성 평가에서도 구조이동형 돌연변이가 더욱 크게 발현된다는 보고들과 일치하였다(이종삼 외 2인, 2007; Mathur *et al.*, 2007).

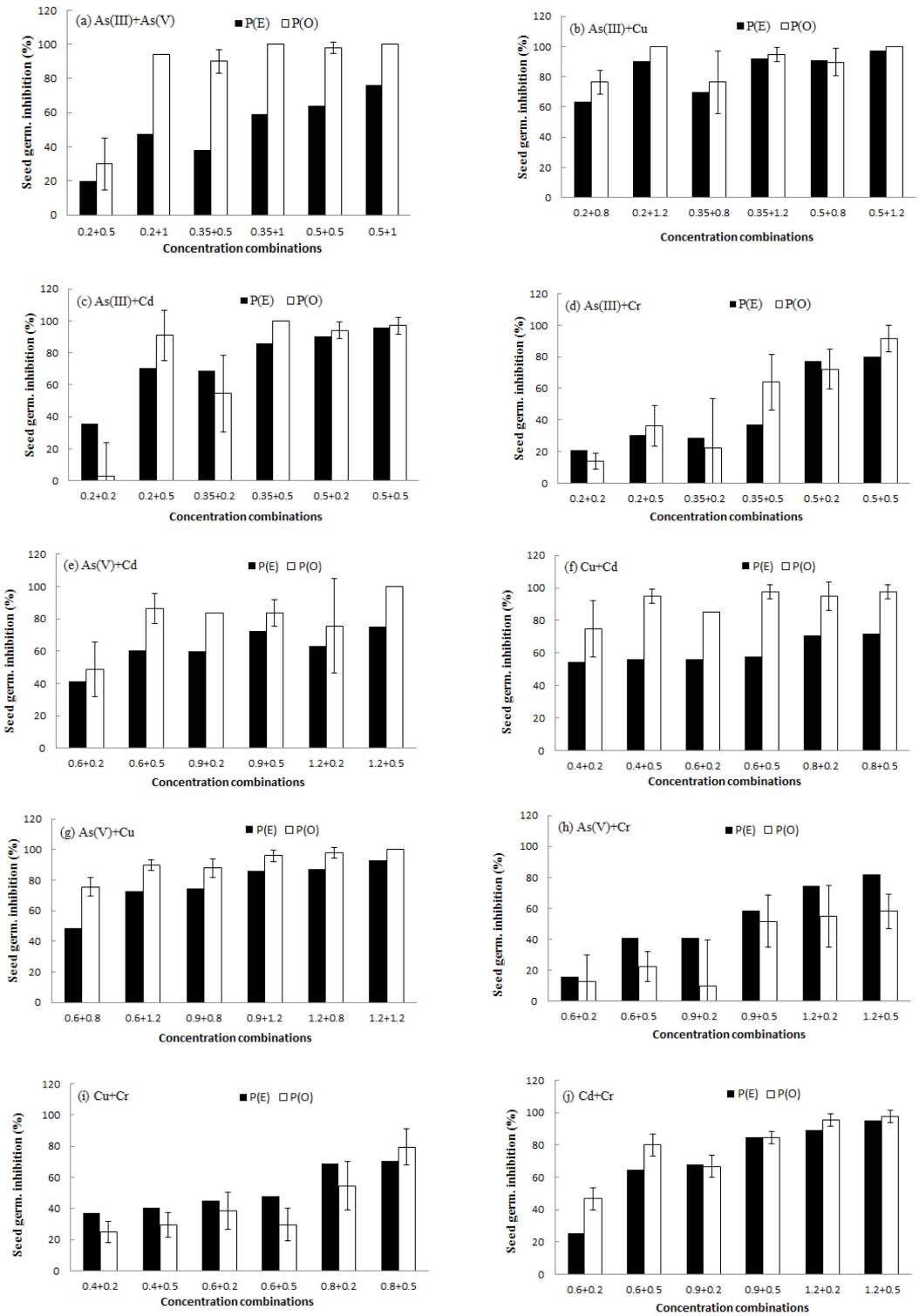

Fig. 2. Comparison between theoretically expected and observed effects of the binary mixtures. Error bars indicate the 95% confidence intervals (공인철, 이소라, 2012).

3.4. 혼합 중금속 독성 평가

혼합 2종 중금속에 의해 이론적으로 예상되는 영향(P(E))과 실제 관찰 영향(P(O))을 비교, 분석 하였다. 언급한 바와 같이 단일 금속 a_1과 a_2의 각각의 영향 정도가 P_1과 P_2라고 할 때 이론적으로 예상 영향 정도는 $P(E) = P_1 + P_2 - (P_1P_2)/100$ 방정식으로 정의된 이론에 근거하여 해석하였다(Kungolos *et al.*, 2009).

5가지 단일 중금속 혼합의 농도 조합 별 상호작용 효과를 Fig. 2에 나타내었다. 뚜렷한 경향을 찾기는 어려운 부분이 있으나, As(III)와 혼합된 중금속의 경우에는 통계적 유의성이 크지는 않았지만(p 값 범위 0.03~0.95) 보편적으로 P(O)가 P(E)보다 높은 상승효과를 나타내었다(P(O) 50~90%, P(E) 46~84%). 또한 Cr(VI)+As(V)와 Cr(VI)+Cu (Fig. 2h, i)의 혼합물의 경우에는 P(O) (각 35%와 45%)가 P(E) (각 52%와 52%) 보다 적어 독성이 감소하는 길항작용을 나타내었다. 단일 금속으로 독성이 높은 As(III)과 Cr(VI)의 혼합에서는 P(O) (50%)와 P(E) (43%)가 비슷하게 조사되었다. 전체 평균 독성은 P(O) = 72±28.8%, P(E) = 63±21.5% (p 값 0.0093)로 통계적 유의성 관찰과 함께 이론적 예상 독성보다 높은 독성, 즉 상승작용이 관찰되었다. 또한 통계적 유의성이 크지는 않지만 Cr(VI)과의 혼합 조건 외는 모두 상승 작용이 나타났다. 뚜렷한 경향은 관찰할 수 없었지만 중금속의 혼합에 의해 길항, 상승, 첨가의 3가지 작용들이 나타나기 때문에 혼합 오염원 영향에 의한 정확한 평가를 위해서는 좀 더 세부적인 연구와 관심이 필요하다.

3.5. 씨앗 발아에 근거한 나노입자 독성 평가

선행 연구에 근거하여 결정한 다양한 농도의 범위에서 나노입자가 씨앗발아에 미치는 영향을 조사하였다(Ko *et al.*, 2013). 각 나노입자 별 조사 농도 범위는 다음과 같다: CuO (0~15 mg/L), NiO (0~30 mg/L), ZnO (0~30 mg/L), Fe_2O_3, Co_3O_4, TiO_2 (1,000 mg/L). 기초 조사에서 Fe_2O_3, Co_3O_4, TiO_2 나노입자에 의한 영향은 미미하였기에 1,000 mg/L에 대해서만 조사하였다. *Lactuca, Raphanus* 씨앗 모두 공통적으로 나노입자 CuO, ZnO, NiO에 대해서는 뚜렷한 발아 억제 영향을 나타내었다. 대조적으로 Fe_2O_3와 TiO_2는 씨앗 두 종 모두에 대해 조사 최대 농도 1,000 mg/L 조건에서 발아에 대한 영향을 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 그러나 씨앗 *Raphanus*와는 달리 *Lactuca*는 1,000 mg/L Co_3O_4 농도 노출에 약 63% (37% 억제)의 발아율을 나타내었고, CuO, ZnO, NiO에 대해서도 상대적으로 높은 발아 억제 영향을 나타내었다. 따라서 씨앗 종류에 따라 상이한 영향이 관찰될 수 있음을 확인하였다. 나노입자 종류에 따라 다양한 범위의 영향을 나타내었지만, CuO, ZnO, NiO 입자의 씨앗 *Lactuca*에 대한 EC_{50}의 범위는 0.4~20 mg/L였으며 *Raphanus* 씨앗의 경우 EC_{50}이 25~115 mg/L 범위 영향을 나타내었다. *Lactuca*에 비해 *Raphanus*의 나노입자에 대한 EC_{50} 값은 CuO 58배, ZnO 4배, 그리고 NiO 7배 높은 값, 즉 낮은 씨앗 발아 영향이 관찰되었다. 따라서 나노입자 오염에 대해 *Lactuca* 씨앗이 *Raphanus* 씨앗보다 매우 높은 민감도(영향)와 오염물에 상이한 민감도 차이를 나타냄을 알 수 있었다. 씨앗 종류별 동일 오염

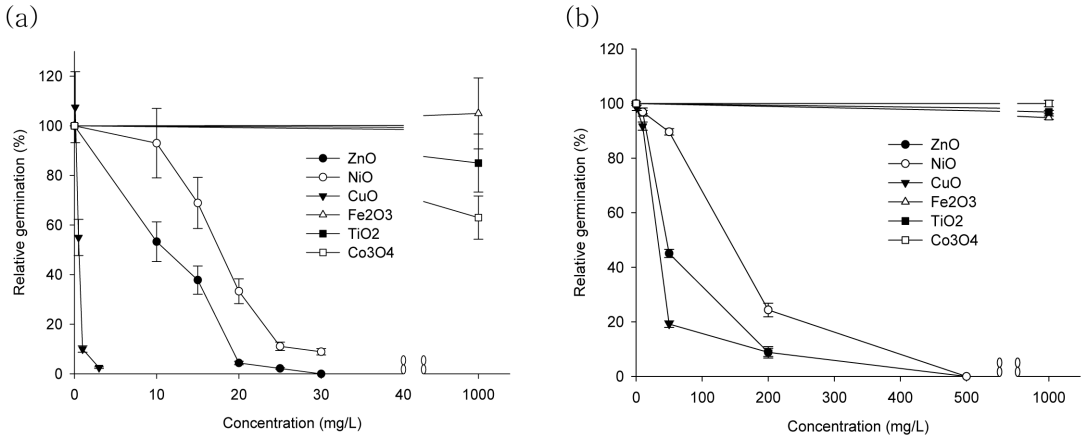

Fig. 3. Effects of NPs on the relative germination (%) of (a) *Lactuca* and (b) *Raphanus*. (구본우, 공인철, 2014).

Table 3. Effects of NPs on the seeds (*Lactuca, Raphanus*) germination (구본우, 공인철, 2014)

NP	EC_{50} (mg/L)	
	Lactuca	*Raphanus*
CuO	0.46 (0.40~0.53)[a]	26.8 (22.84~31.54)
ZnO	10.8 (8.68~13.54)	46.5 (39.08~55.42)
NiO	17.2 (16.29~18.10)	114.2 (98.87~131.93)
Fe_2O_3		
Co_3O_4	> 1000	> 1000
TiO_2		

[a]Value is the range of the 95% confidence level (low limit~high limit).

물에 대한 민감도 차이는 다양한 요인들이 관여할 수 있지만, 특히 씨앗 크기(표면적 차이)도 주요 원인 중의 하나일 것이다. 또한 CuO가 다른 나노입자에 비해 매우 높은 발아 억제 영향을 나타내었으며, 예를 들면 조사 나노입자 중에서 두번째로 높은 독성을 나타낸 ZnO에 비해 CuO 영향은 *Lactuca* 씨앗은 23배, *Raphanus*는 1.7배 낮은 EC_{50} (높은 발아 억제 영향) 값을 나타내었다(Table 3). 그러나 나노입자에 대한 독성(mg/L EC_{50})은 두 씨앗 종 모두 비슷한 순서로 관찰되었다. 독성도는 *Lactuca*은 CuO (0.46) >> ZnO (10.84) > NiO (17.17) > Co_3O_4 > TiO_2 > Fe_2O_3, *Raphanus*는 CuO (26.84) > ZnO (46.54) > NiO (114.2) > Co_3O_4, Fe_2O_3, TiO_2 으로 조사되었다. 따라서 두 씨앗종에 대한 결과에 근거할 때, 적절한 평가를 위해서는 씨앗 종에 따라 상이한 민감도 및 영향 정도 등에 대한 해석 및 분석이 필요함을 알 수 있었다.

*Lactuca*와 *Raphanus*의 씨앗 발아 활성에 대한 CuO, ZnO, NiO 나노입자의 영향 차이 여부를 EC_{50} 간 통계적 유의치(probability value)에 근거하여 평가하였다. *Lactuca*에 대한 CuO, NiO, ZnO의 EC_{50} 값들은 나노입자 간 차이가 통계적으로 매우 유의(상이한 영향) 것으로 조사되었다 ($p < 0.009$). *Raphanus* 역시 나노입자 간 통계적으로 유의한 차이($p < 0.03$)를 나타내었다. 따라서 영향이 크지 않는 Ti, Co, Fe 금속산화물을 제외한 나노입자들은 두 씨앗 종 모두에 대해 나노입자 간 씨앗 발아에 뚜렷한 차이의 영향을 나타냄을 알 수 있었다. Lin and Xing (2007)의 연구 결과에 의하면 ZnO 나노입자의 씨앗 발아 EC_{50}은 radish 50 mg/L, 그리고 rape과 ryegrass는 20 mg/L로 조사되었다. 본 연구에서 사용한 두 씨앗종과 비슷한 결과를 나타내었다. Wu *et al.* (2012)에 의하면 Co_3O_4, Fe_2O_3, TiO_2의 *Lettuce* 씨앗 발아에 대한 EC_{50} 값은 5000 mg/L 이상으로 매우 높게 조사되었다.

생물을 이용한 오염물 영향 평가에서 오염물에 대한 독성 정도 및 민감도 순서는 식물종과 측정 종말점 등에 따라 매우 다양한 특성을 나타낼 수 있기 때문에 시료 특성에 적합한 방법이나 다양한 방법들의 결과를 통합한 해석을 통하여 더욱 적절한 평가가 이루어질 수 있을 것이다. 특히 나노입자에 의한 유전자 변이에 대한 영향 여부는 인간 건강 및 생태계 위해성 평가에 매우 중요한 과정이다(Singh *et al.*, 2009). 유전독성에 대해서도 통합 독성(battery of assay)과 상이한 측정 종말점의 결과를 통하여 적절한 평가를 할 수 있다고 연구자들은 보고하고 있다(Gonzalez *et al.*, 2008; Landsiedel *et al.*, 2009).

3.6. 토양시료 독성 평가

토양이 씨앗발아에 미치는 영향과 토양 중금속 농도와의 관계를 분석하기 위해 시료 토양의 총중금속 농도 결과를 Table 4에 나타내었다. 조사 주변 토양은 대체적으로 심각한 중금속 오염은 관찰되지 않았지만, 일부 토양에서 수 백 mg/kg의 높은 비소 농도가 검출되었다. 총중금속 농도에 근거할 때 그룹 #1~6에서는 매우 높은 비소 농도(381~627 mg/kg)에 오염된 반면

Table 4. Total heavy metal content of the collected soils (mg/kg) (공인철, 이소라, 2012)

Metal	High As contaminated group						Low As contaminated group				
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11
As	627	566	381	433	169	401	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Cu	58	45	32	83	54	47	20	18	95	12	13
Cr	66	59	54	57	56	265	65	45	106	40	102
Pb	55	52	45	48	36	59	37	44	42	32	44
Zn	113	99	79	117	100	54	92	98	77	41	60
Cd	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Co	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	19	10	9	27	15
Sum	921	823	593	740	417	828	235	217	331	154	236

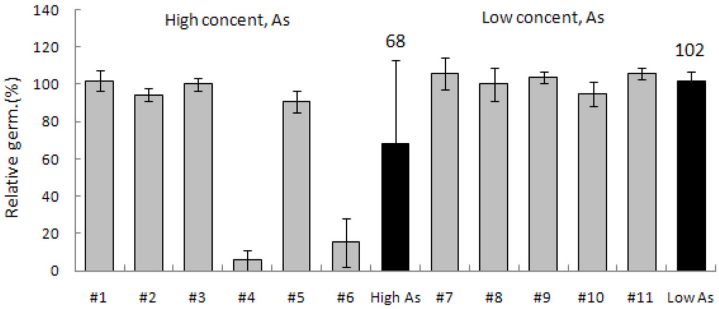

Fig. 4. Effects of the soil extractants on the relative germination(%) of the *Lactuca*. Each value is the average of the results of the four experimental sets (each set was performed with triplicate). bar is the average of each group (공인철, 이소라, 2012).

에, #7~11에서는 매우 낮은 농도(< 1 mg/kg)가 조사되었다. 또한 코발트의 경우에도 높은 비소그룹에서는 낮은 농도(< 1 mg/kg)가 나타났으나 이와 반대로 낮은 비소그룹에서는 다른 그룹보다는 높은 농도(9~27 mg/kg)가 관찰되어 대조를 이루었다. 토양의 복합적 특성에 비추어 볼 때 다양한 무기 및 유기성분들이 존재할 것으로 판단된다(Fairbrother *et al.*, 2007).

Lactuca (상추)씨앗을 이용하여 토양 추출용액에 대한 영향을 평가한 결과, 대조군(100%)에 대한 전체 시료의 발아율의 범위는 6~106% (평균 83±36.5%)로서 시료별 매우 상이한 영향을 나타내었다(Fig. 4). 표준편차 값이 높은 것에 근거할 때 시료 집단 간의 흐트러짐 정도, 즉 시료 간에 뚜렷한 발아 영향 차이가 있다고 판단할 수 있었다. 일부에서는 높은 총중금속 함유 시료와 낮은 총중금속 함유 시료 간에 뚜렷한 발아율 차이를 관찰할 수 있었다. 예를 들면 시료 #4(총중금속 740 mg/kg, 비소 433 mg/kg)와 #6(총중금속 828 mg/kg, 비소 421 mg/kg)은 각 94% 및 85% 독성을 나타내었다. #7(총중금속 235 mg/kg, 비소 < 1 mg/kg)과 #11(총중금속 236 mg/kg, 비소 < 1 mg/kg)은 무독성 (발아율 106%)을 나타내었다. 그러나 낮은 발아율을 보인 #4와 비슷한 농도의 중금속으로 오염된 #1(921 mg/kg), #2(921 mg/kg) 시료가 각각 102%(무독성), 94%(6% 독성)로 높은 발아율을 나타내기도 하였다. 따라서 토양 시료의 복합적 특성때문에 각 시료별 오염원 총 농도와 영향 간의 상관성으로 생태계에 미칠 수 있는 영향을 평가하기는 용이하지 않음을 확인하였으며 총중금속 농도와 각 시료 용출액에 대한 씨앗의 발아 간에는 매우 낮은 상관관계(R^2 = 0.239)가 나타났다.

중금속 오염 특성에 근거하여 그룹 별(높은 비소 오염과 낮은 비소 오염 그룹) 영향을 평가하였다(Fig. 4). 높은 비소농도 그룹(#1~#6)과 낮은 비소농도 그룹(#7~#11)의 씨앗발아는 각 68±44.9% (평균 32% 독성)와 102±4.7% (무독성)였으며 독성도 차이가 큰 것으로 조사되었다. 독성이 높은 비소의 뚜렷한 오염 차이를 보인 두 그룹의 평균 독성은 큰 차이를 보였지만 특정 두 시료 토양 #4와 #6의 독성이 매우 높아 그룹의 평균 발아율을 현저하게 떨어뜨렸으며 통계적으로도 유의성(p값 0.13)이 크지 않았다. 비소 농도 외에 시료 토양 #4에는 구리, 아연 #6에는 크롬, 납의 농도가 높긴 하지만 다른 토양 시료와 비슷한 수준이여서 주요 영향인자를 예측하기는 어려웠다. 다른 연구자들도 중금속 오염 특성에 영향을 미치는 다양한 물리, 화학적 요인들 때문에 총중금속 농도로 위해성 평가하기에는 어려움이 있다고 보고 하고 있다(Mankiewicz-Boczek *et al.*, 2008). 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 오염원 복합적 영향, 오염원의 생물에 대한 민감도, 생물이용 가능량(bioavailability), 결합능(binding ability) 등의 다양한 원인을 들 수 있다(Fairbrother *et al.*, 2007). 본 연구에서는 단일 검정법을 이용하였지만 다양한 연구결과에 의하여 생물 종류 및 측정 종말점(endpoint)에 따라 상이한 민감도와 경향을 나타내는 것으로 알려져 있다(Mankiewicz-Boczek *et al.*, 2008). 따라서 향후 적절한 영향 평가를 위해서는 단일 검정법을 이용하기 보다는 다양한 검정법에 의한 통합 결과를 이용하는 것이 더욱 적절한 평가법이 될 것이다(Kungolos *et al.*, 2009).

4. 결 론

환경 오염물이 미치는 위해성을 다양한 생물 검정법을 이용하여 비교 분석하였다. 다양한 생물 및 측정 종말점(생물발광, 효소활성, 씨앗발아, 복귀 돌연변이)을 이용하였으며, 방법과 화학종에 따라 상이한 민감도 및 영향이 관찰되었다. 연구 결과를 통하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

(1) 검정법에 따라 상이한 민감도를 보였지만, 일반적으로 조사 중금속 중에서는 As(III)가 As(V)보다 높은 독성을 나타내었다.

(2) 씨앗발아는 중금속에 따라 상이한 민감도를 나타내었다. 조사 씨앗 중에서 *Lactucus*와 *Raphanus* 종이 대체적으로 높은 민감도를 보였으며, 민감도 관점에서 중금속 오염에 대한 적절한 독성 평가 결과를 나타내었다.

(3) 혼합 금속에 대한 영향은 뚜렷한 경향을 나타내지 않았지만, 일부 혼합 중금속은 상승 혹은 길항작용에 대한 선호 현상이 나타났다. 또한 높은 영향(> 50%)에서는 상승작용에 대한 경향이 뚜렷하였다.

(4) 개별 토양 시료의 총중금속 농도와 독성 간에 상관성을 찾기는 어려웠지만, 뚜렷한 오염 특성을 보인 비소 농도에 근거한 두 그룹 간의 평균 독성에는 뚜렷한 차이(32% 독성과 무독성)를 관찰하였다. 하지만 소수 시료의 높은 독성으로 두 그룹은 통계적으로 유의성(p = 0.13)은 높지 않았다.

(5) 나노입자 CuO, ZnO, NiO에 대해 씨앗은 뚜렷한 활성 억제 영향을 나타내었으나, Fe_2O_3, Co_3O_4, TiO_2는 최대 시험 농도(1,000 mg/L)에서도 씨앗 활성에 거의 영향을 나타내지 않았다.

환경오염 평가과정에서 각 지역의 총중금속 농도에 근거하여 주변 생태계에 미칠 수 있는 영향에 대한 상관성을 평가하는 것은 매우 복합적인 해석을 요구함을 알 수 있었다. 그러나 독성이 높은 특정 오염물의 오염 정도 차이가 뚜렷한 지역, 혹은 시료들을 그룹화하여 영향을 평가하는 것도 하나의 접근 방향임을 확인하였다. 또한 단일 검정법에 근거한 평가가 내포하고 있는 제약점들은 다양한 검정법들의 통합 결과로 일부 해결할 수 있을 것이다. 또한 씨앗 활성을 이용한 검정법은 과정이 간편하고, 오염물에 대한 민감성 및 측정에 소요되는 시간 등의 관점에서 타 시험법보다 상대적으로 용이한 생물검정 평가 수단이다. 하지만 평가 결과를 해석하는 과정에서 씨앗별 상이한 민감도와 측정 종말점에 따른 영향 차이 등에 대한 이해 및 해석이 필요하다. 또한 단일 검정법에 근거한 평가가 내포하고 있는 제약점들이 있기 때문에, 실제적인 평가는 다양한 검정법과 측정 종말점의 통합 결과에 대한 해석을 통하여 접근해야 할 것이다. 본 검정법의 결과를 기초자료로 하여 향후 다양한 통합 검정법을 이용한 평가와 복합 오염물 같은 시료에 의한 영향 기작에 대한 더욱 상세한 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

사 사

본 연구는 한국지질자원연구원 기본사업인 '국내 식·의약품용 점토광물 활용 기술개발'과제의 일환으로 수행되었습니다.

References

공인철, 권효정, 고경석 (2010) 다양한 생물 검정법에 근거한 비소의 위해성 평가 비교. 대한환경공학회지. 32(8), 795-801.

공인철, 이소라 (2012) 씨앗발아 시험에 근거한 단일 및 혼합 중금속과 오염토양의 독성평가. 한국폐기물자원환경학회지. 29(6), 527-533.

구본우, 공인철 (2014) 씨앗발아 및 발아지수에 근거한 나노입자 독성평가. 대한환 경공학회지. 36(6), 396-401.

이진수, Klinck, B., 전효택 (2001) 비소 및 독성중금속들의 인체위해성 평가 모델 링. 한국자원공학회지, 38(2), 136-145.

이종삼, 김용진, 한상국 (2007) Ames test를 이용한 소각잔사 혼입 매립지 침출수 처리공정수의 돌연변이원성 평가. 한국폐기물학회지. 24(3), 211-218.

Abedin, M.D.J. and Meharg, A.A. (2002) Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (Oryza sativa L.). Plant Soil, v.243, p.57-66.

An, Y.J. (2004) Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. Environmental Pollution, v.127, p.21-26.

Aposhian, H.V. and Aposhian, M.M. (2006) Arsenic toxicology: five questions. Chemistry Research Toxicology, v.19, p.1-15.

Bitton, G. (1999) Wasterwater Microbiology, 2nd ed., Wiley-Liss, Inc.

Biswas, P. and Wu, C.Y. (2005) Critical review: nanoparticles and the environment. J. Air Waste Management Association, v.55, p.708-746.

Chang, K.N., Lee, T. C., Tam, M.F. and Chen, Y.C. (2003) Identification of falectine and thioredoxin peroxidase II as two arsenic-binding proteins in Chinese hamster ovary cells. Biochemistry, v.371, p.495-503.

Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K. and Wood, W. (2007) Framework for metals risk assessment. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.68, p.145-227.

Gonzalez, L., Lison, D. and Kirsch-Volders, M. (2008) Genotoxicity of engineered nanomaterials: a critical

review. Nanotoxicology, v.2, p.252-273.
Gupta, G. and Karuppiah, M. (1996) Toxicity study of a Chesapeake bay tributary - Wicomico river. Chemosphere, v.32, p.1193-1215.
Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J. and Lead, J.R. (2008) Nanomaterials in the environment; behaviour, fate, bioavailability, and effects. Environment Toxicology Chemistry, v.27, p.185-1851.
Ko, K-S., Han, J. and Kong, I.C. (2013) Assessment of arsenite, arsenate, and chromate phytotoxicity based on the activity of seed germination and growth (root & shoot) of various plant seeds. Human Ecology Risk Ass., v.19, p.742-753.
Kungolos, A., Emmanouil, C., Tsiridis, V. and Tsiropoulos, N. (2009) Evaluation of toxic and interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests. Science of the Total Environment, v.407, p.4610-4615.
Landsiedel, R., Kapp, M.D., Schulz, M., Wiench, K. and Oesch, F. (2009) Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterilization of test material, potential artifacts and limitations-Many questions, some answers. Mutation Reserch, v.681, p.241-258.
Lin, D. and Xing, B. (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. Environment Pollution, v.150, p.243-250.
Liu, X., Zhang, S., Shan, X. and Zhu, Y-G. (2005) Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat. Chemosphere, v.61, p.293-301.
Lowry, G.L., Gregory, K.B., Apte, S.C. and Lead, J.R. (2012) Transformations of nanomaterials in the environment. Environ. Science Technology, v.46, p.6893-6899.
Mankiewicz-Boczek, J., Nalecz-Jawecki, G., Drobniewska, A., Kaza, M., Sumorok, B., Izydorczyk, K., Zalewski, M. and Sawicki, J. (2008) Application of a microbiotests battery for complete toxicity assessment of rivers. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.71, p.830-836.
Mathur, N., Bhatnagara, P., Mohanb, K., Bakrea, P., Nagarc, P. and Bijarniac, M. (2007) Mutagenicity evaluation of industrial sludge from common effluent treatment plant. Chemisphere, v.67, p.1229-1235.
Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000) The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutation Reserch, v.455, p.29-60.
Sharma, V.K. and Sohn, M. (2009) Aqautic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. Environment Internationl, v.35, p.743-759.
Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffeis, T.G.G., Wright, C.J. and Doak, S.H. (2009) NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials, v.30, p.3891-3914.
Suzuki, N., Naranmandura, H., Hirano, S. and Suzuki, L.T. (2008) Theoretical calculations and reaction analysis on the interaction of pentavelent thioarsenicals with biorelevant thiol compounds. Chemistry Resarch Toxicology, v.21, p.550-553.
US. EPA. (1996) Ecological Effects Test Guidelines - seed germination/root elongation toxicity test, EPA 712-C-96-154.
Wu, S.G., Huang, L., Head, J., Chen, D-R., Kong, I.C. and Tang, Y. (2012) Phytotoxicity of metal oxide nanoparticles in related to both dissolved and metal ions and adsorption of particles on seed surfaces. J. Petroleum Environ. Biotechnol., v.3, n.4, p.2-5.