

## 토양내 오염된 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)의 *Eisenia fetida*에 대한 독성 및 생물흡수

Nurofik · 최지연 · 오상화 · 신원식\*

경북대학교 환경공학과

## Toxicity and Uptake of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) in Contaminated Soils to *Eisenia fetida*

Nurofik · Jiyeon Choi · Sanghwa Oh · Won Sik Shin\*

Department of Environmental Engineering, Kyungpook National University

### ABSTRACT

Toxicity and uptake of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in three different soils (OECD soil, natural soil and loess) to earthworm (*Eisenia fetida*) were investigated at several different spiked concentrations of TNT (0 to 200 mg/kg for OECD and natural soils, and 0 to 35 mg/kg for loess) and for different exposure periods (7, 14, 21, and 28 d). The LC<sub>50</sub> values for 7 d exposure were 160.1, 159.4, and 28.81 mg/kg for OECD soil, natural soil, and loess, respectively. The LC<sub>50</sub> values for 14, 21, and 28 d exposure were almost the same as those for 7 d exposure, showing that 7 d exposure time was enough to decide the toxicity (LC<sub>50</sub>) of TNT to *Eisenia fetida*, because the highest concentration of TNT in earthworm body was observed within around 5 d. The LC<sub>50</sub> and uptake of TNT in loess were higher than those in OECD and natural soil. The uptake of TNT to the earthworm were correlated well with the initial concentration of TNT in the soil and TNT porewater concentration (R<sup>2</sup> > 0.9 in OECD, natural, and loess). The concentration of TNT in earthworm body decreased after 5 d, possibly caused by natural degradation of TNT by soil bacteria as well as earthworm.

**Key words :** 2,4,6-trinitrotoluene, *Eisenia fetida*, Soil, Toxicity, Uptake

### 1. 서 론

TNT는 국내 주요 사격 훈련장과 건설현장에서 많이 사용되는 화약류로 이로 인한 토양오염이 심화되고 있으나 위험 및 보안시설이라는 특수성과 화약류 오염에 대한 규제기준의 부재로 인하여 이들에 대한 평가 및 복원은 거의 이루어지지 않고 있다. TNT는 토양과 물에 오염될 경우 분해가 잘 안되는 안정한 물질로써(Bae et al., 2001), 토양 생물에 대하여 치명적이거나 장기적인 독성을 가지며(Kuperman et al., 2009), 0.08에서 87,000 mg/kg의 매우 높은 농도 편차를 보인다(Best et al., 2008). 또한 TNT는 토양내 장기간 잔존하며, 지표수 및 지하수를 따라 확산이 쉽게 이루어지므로 인근 토양, 지하수, 하천 등에 서식하는 생태계 뿐만 아니라 인체에도 직, 간접적인

영향을 미칠 수 있다(Gong et al., 1999; Lachance et al., 2004). 그러나, 국내의 경우 이러한 TNT의 거동에 대한 이해와 연구실적이 매우 부족한 실정이며, TNT 오염을 평가하기 위한 정량화된 기술도 마련되어 있지 않다.

독성평가 자료는 오염 기준치 설정, 환경관리 기준치 참조값, 위해성 평가수행에 대한 해당오염물질의 영향을 예측하는데 이용될 수 있다(Best et al., 2008). 지렁이는 환경오염물질에 대하여 빠르고 민감하게 반응하므로 토양 오염을 평가할 수 있는 훌륭한 지표생물로 사용되어져 왔다(Best et al., 2008; Kuperman et al., 2009; Lachance et al., 2004; Renoux et al., 2000). 지렁이는 토양내 TNT 오염에 대하여 민감성을 가지는 것으로 알려져 있는데, Renoux et al.(2000)은 TNT의 LC<sub>50</sub>이 약 143 mg/kg 이상, LOEC가 약 140 mg/kg으로 보고하였으며,

\*Corresponding author : wshin@mail.knu.ac.kr

Received : 2015. 10. 6 Reviewed : 2015. 11. 3 Accepted : 2015. 11. 19

Discussion until : 2016. 1. 31

Lachance et al.(2004)는 TNT의 14-d LC<sub>50</sub>이 약 132 mg/kg으로 보고하였다.

TNT는 토양 오염후 생분해 및 화학적 분해과정을 거치면서 점차 농도가 감소하게 된다(Sims et al., 2008). 이는 토양내 TNT에 의한 독성이 시간이 경과함에 따라 약해짐을 의미한다. 그러나, 지렁이 체내 축적량의 경우 TNT 오염이 진행된 후 일정기간 후 최대치에 도달하였다가 서서히 낮아지는 경향을 나타낸다고 하였다(Widianarko and Straalen, 1996). 이러한 경향은 독성분석에 있어서 노출기간을 결정할 수 있는 중요한 단서가 될 수 있다. 즉, TNT를 대상으로 한 지렁이를 이용한 독성실험에서 노출기간을 결정하기 위해서는 지렁이 체내 생이용성 또는 생체축적에 대한 해석이 반드시 필요한데, 여기에 대한 유용한 자료가 많지 않은 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 지렁이 체내 흡수농도에 따른 TNT의 독성평가를 연계시키고자, 노출기간에 따른 TNT의 지렁이에 대한 독성(LC<sub>50</sub>)과 생체흡수 농도를 측정하여 상관관계를 해석하였다. 또한, TNT의 지렁이 생체흡수 농도에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 생체축적량과 토양내 농도 및 공극수내 농도와의 상관관계를 분석하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험재료

#### 2.1.1. 토양시료

본 연구는 비오염토양에 인위적으로 TNT를 오염시킨 인공오염토양을 제조하여 사용하였다. 비오염토양은 OECD 토양, 자연토양 및 황토(Loess)를 이용하였다. OECD 토양의 제조는 OECD guideline(2008)에 따라 제조하였으며, 산업용 모래(주)동호산업), 카올린클레이((주)서경CMT), 피트모스(Premier Horticulture Inc., USA), CaCO<sub>3</sub>(덕산화학, >96.5%)를 각각 무게비 70:20:10:0.1 비율로 혼합하여 제조하였다. 피트모스는 pH 약 6.0으로 분말상으로 건조된 제품을 구매하였으며, kaolin clay는 kaolin 함량이 30% 이상인 제품을 이용하였다. Industrial sand는 입경이 50~200 μm이며 모래가 50% 이상 함유된 것을 사용하였다. 제조한 OECD 토양은 CaCO<sub>3</sub>를 이용하여 pH를 6.0±0.5로 조정하였다.

자연토양은 경상남도 창원군에 위치하고 있는 한 야산에서 채취하였고, 황토는 신원황토증기에서 구매하였다. 준비한 자연토양과 황토는 60°C에서 48시간 동안 건조한 다음 표준 200 mesh로 체거름한 후 텀블러를 이용하여 24시간 동안 균일하게 혼합하여 플라스틱 밀폐용기에 보

관하여 실험에 사용하였다.

본 연구에서 사용된 인공오염토양은 오염에 필요한 적당량의 TNT를 25 mL의 acetonitrile(ACN, Merck, HPLC grade)에 녹여 비오염토양에 주입한 후, 24시간 동안 10 rpm으로 텀블러(tumbler)에서 잘 섞어주고, 16시간 동안 암실에서 ACN을 휘발시켜서 stock 인공오염토양을 제조하였다(Brinch et al., 2002). Control 토양도 화약류가 들어있지 않은 ACN 용액을 이용하여 동일한 과정을 거쳐서 준비한다. 실험에 사용한 토양은 stock 인공오염토양과 비오염토양(OECD 토양, 자연토양, 황토)을 각각 섞어서 원하는 농도로 조절하여 제조하였다.

#### 2.1.2. 지렁이(earthworm)

실험에 사용한 지렁이인 *Eisenia fetida*(redworm, AA-14-1650)는 OECD guideline(1984)에서 표준화된 독성평가에 사용되는 종으로서 Carolina Biological Supply Co.(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 지렁이는 실험에 사용하기 전 Growth Chamber(고려기) 내에서 배양(20°C, dark)하였으며, 2개월 이상 성숙하여 체중이 300~600 mg 정도로 건강하고 균일한 개체를 사용하였다. 배양기간 동안 지렁이의 성장상태를 관찰하며 수분과 먹이를 공급하여 실험 전에 최적의 성장상태가 유지되도록 하였다.

### 2.2. 실험방법

#### 2.2.1. 토양시료의 물리화학적 특성

토양의 pH는 시료 5 g과 증류수 25 mL를 교반한 다음 1시간동안 방치 후, 상등액의 pH를 pH meter(Thermo Electron Corp., Orion 3 STAR)를 이용해 측정하였다(KMOE, 2013). 토양내 유기탄소(organic carbon) 함량은 토양내 무기태(carbonate)를 제거하고(Nelson and Sommers, 1996), 한국기초과학지원연구원(부산센터)의 원소분석기(Elemental analyzer; Elementa, vario Micro cube)로 분석하였다. 토양의 양이온 교환능(Cation Exchange Capacity, CEC)은 sodium acetate 방법(SW-846 Method USEPA, 1986)으로 분석하였으며, 비표면적(surface area)과 공극도(pore size)는 건조시료를 준비하여 비표면적 및 기공도 분석기(Surface Area & Pore size analyzer(BET); Quantachrome, Autosorb-iQ & Quadrasorb SI)를 이용하여 분석하였다. 수분보유능(Water holding capacity, WHC)은 ISO(2012)의 ISO 11268-2에 따라 분석하였으며, 측정방법을 간략하게 요약하면 다음과 같다. 밀바닥에 작은 구멍이 여러 개 뚫려 있는 PP재질의 용기에 filter paper(Advantec, 5B, 110 mm)를 바닥에 깔고 5 g의 토양

을 담았다. 토양이 완전히 잠기도록 50 mL의 증류수를 넣고, 3시간 동안 바닥이 평평한 곳에 보관하고 무게를 측정 후, 105°C 오븐에서 하루 동안 수분을 완전히 제거한 뒤에 무게를 측정하여 무게차로 인한 토양 시료의 수분보유능을 측정하였다.

### 2.2.2. 토양내 TNT에 대한 지렁이 독성(LC<sub>50</sub>) 및 생물 흡수시험

생체축적 실험을 통하여 시간에 따른 지렁이 체내에 축적되는 TNT의 양을 측정하였으며 생체축적 실험을 수행하기 전 전처리로서 무게가 300~600 mg 정도 되는 지렁이(성체)를 오염되지 않는 자연토양에서 10일 이상 배양하여 환경변화에 대한 충격을 완화시키고, 20°C의 암소내에서 적당한 수분이 공급된 filter paper에 24시간 이상 접촉시켜 장내 토양을 모두 배설하는 단계를 거쳤다(Dalby et al., 1996). 토양 배설이 이루어진 지렁이들 중 일부를 선정하여 TNT 농도를 측정하여 초기 축적량으로 하였으며, TNT 생체축적실험은 수분보유능 60%의 오염 토양 100 g이 함유된 유리용기에 지렁이 10마리를 투입한 후, Growth Chamber(낮/밤 주기=16시간/8시간, 온도 25°C, 습도 40±5%)에서 7, 14, 21, 28일 동안 수행하였다(모든 실험은 triplicate로 수행). 실험기간동안 지렁이의 생육 상태를 관찰하였으며, 죽은 지렁이는 즉시 제거하였으며, 물 이외의 어떤 먹이도 공급하지 않았다. 실험 종료 후 다시 filter paper상에서 24시간 접촉시켜 체내 배설물을 제거한 후 세척하여 무게를 측정하고, 저온냉동고(Ilwon Freezer co. Ltd., CLN-30U)를 이용해 -80°C에서 24시간동안 동결시킨 지렁이를 동결건조기(Freeze dryer; EYELA, FDU-2100)를 이용하여 동결건조시킨 후 무게를 측정하고 체내 잔류 TNT 농도를 분석하였다. LC<sub>50</sub>은 SPSS(Version 19.0, IBM SPSS statistics for Windows)를 사용하여 결정하였다.

## 2.3. 분석방법

### 2.3.1. TNT 분석방법

HPLC를 이용한 화약류의 분석은 USEPA method 8330A(SW-846, US EPA, 2007)을 이용하여 분석하였다. 내부표준물질로 nitrobenzene(Sigma-Aldrich, ≥99.0%)을 주입하여 TNT (2,4,6-trinitrotoluene solution, F2486S, 1,000 µg/mL in ACN, Chem Service, Inc)로 검량선을 작성하였으며, 이동상으로 사용된 methanol과 water는 Merck사로부터 HPLC grade를 구매하여 사용하였다. 분석에 사용된 HPLC는 Agilent사(USA)의 Agilent 1200

series, G1329A auto sampler, G1311A Quaternary pump, G1315B DAD 검출기로 구성된 것으로 컬럼은 18C column (Acclaim™Explosives E1, 4.6×250 mm×5 µm, Thermo Scientific, USA)를 이용하였다. 분석조건 중 유속은 1.0 mL/min, 컬럼온도는 32°C, 시료 주입량을 5 µL로 제한하여 사용하고, UV 파장은 254 nm로 하였다. 이동상 조건은 2상(two phase) 농도구배 조건으로 methanol과 water의 비율을 50:50으로 하였다.

### 2.3.2. 토양내 TNT 농도 추출방법

토양내 TNT 농도를 분석하기 위하여 시료 2 g과 ACN 10 mL를 테프론 재질의 실리콘 septa가 부착된 40 mL 암갈색 바이알(Fisher Scientific)에 넣고, 초음파 수욕조(Ultrasonic Waterbath; Branson Ultrasonic Corporation, Branson 8510E-DTH)에서 18시간 초음파를 이용하여 추출하고, 1500 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 분리한 상등액에 5 g/L 농도의 CaCl<sub>2</sub> 용액을 넣어 1:1(v/v) 비율로 희석하여 입자를 침전시켜 분리가 깨끗하게 이루어지도록 하였다(Robidoux et al., 2002; Sarrazin et al., 2009). 0.45 µm PTFE syringe filter (Whatman, φ=13 mm, #6784-1304)로 여과하여 HPLC로 분석하였다.

### 2.3.3. 토양 공극수내 TNT 농도 추출방법

공극수(pore water)내 TNT 농도를 측정하기 위하여 5 g의 건조토양과 5 mL의 10 mM sodium azide(대정화학, >98%) 용액을 50 mL Oak Ridge Centrifuge Tube (Teflon flourinated ethylene propylene, TFEF, Nalgene)에 넣고, 5 mL의 증류수를 넣었다(토양 : 증류수=1:1, w/v). 슬러리를 24시간 동안 진탕배양기(Shaking incubator; JS Research Inc., JSSI-100C)에서 150 rpm으로 교반한 후 5,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 토양에서 공극수를 분리한 다음 상등액을 HPLC로 분석한다. 필요시 0.45 µm PTFE syringe filter로 여과한 후 분석하였다(Liu et al., 2012; Ter laak et al., 2006).

### 2.3.4. 지렁이체내 TNT 농도 추출방법

지렁이 체내 TNT를 분석하기 위하여 지렁이를 동결건조기를 이용하여 80°C에서 24시간 동안 동결건조시킨 후 10 mL의 ACN을 넣고 15분간 상온에서 용해시켰다. 용해 후 1분간 tissue homogenizer(Ultra Turrax Disperser; IKA, T10 Basic)를 이용하여 균질화하고, vortex mixer를 이용하여 1분간 교반한 뒤 18시간 동안 초음파 수욕

조에서 초음파 처리하였다. 1500 rpm으로 30분간 원심분리한다. 처리한 시료 중 5 mL를 분취하여 5 mL의 CaCl<sub>2</sub> (10 g/L)를 주입하여 작은 입자들을 침전시키고(Renoux et al., 2000), 4°C 냉장고에서 2시간 동안 정치하여 지질(lipid)를 제거하고(Belden et al., 2011), Clean florisisil SPE tube(Bond Elut FL, 1g, 6mL, Varian)을 이용하여 0.45 μm PTFE syringe filter로 여과한 용액을 HPLC로 분석하였다.

**2.4. 지렁이 생체축적 예측 모델**

One-compartment model을 이용한 생물흡수 예측(Widianarko and straalen, 1996)에 대한 식은 아래와 같다.

$$\frac{dC_w}{dt} = k_1 C_s(t) - k_2 C_w(t) \tag{1}$$

여기서 C<sub>w</sub>(t)는 시간 t에서의 지렁이 내 TNT 농도(mg/kg), C<sub>s</sub>(t)는 시간 t에서의 토양 내 TNT 농도(mg/kg), k<sub>1</sub>은 지렁이 내 TNT 흡수 속도상수(d<sup>-1</sup>), k<sub>2</sub>는 지렁이 몸체로 부터의 손실기작(부산물 생성 등)에 따른 TNT 감소 속도상수(d<sup>-1</sup>)이다. 식 (1)을 C<sub>w</sub>(0)=0 임을 이용하여 적분하면, 아래와 같은 식을 얻을 수 있으며, 자연상태에서 TNT 분해 역시 1차속도로 일어난다고 가정한다면, 아래 식 (2)와 같이 표현할 수 있다.

$$C_w(t) = \frac{k_1 C_0}{k_2 - k_0} (e^{-k_0 t} - e^{-k_2 t}) \tag{2}$$

여기서 k<sub>0</sub>는 토양내 TNT의 1차 분해 속도상수이다.

식 (2)는 체내농도 곡선식이며, 오염물질의 노출시간의 시작부근에서 급격한 증가로 출발해서 이후 지속적으로 감소하는 형태를 가지며, 감소부분은 두 부분의 지수함수에 의해 결정되는데, 하나는 metabolism과 elimination이고, 다른 하나는 자연분해에 의해 결정된다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. 인공오염토양 특성**

본 연구에서는 비오염토양(OECD 토양, 자연토양, 황토)

에 인위적으로 TNT를 오염시킨 인공오염토양을 제조하여 사용하였다. Table 1에는 본 연구에 사용된 비오염토양의 특성을 나타내었다. pH는 자연토양과 황토가 각각 4.0과 4.8로 산성이었으며, OECD 토양이 6.4로 약산성이었다. 유기탄소 함량은 자연토양(1.55%), OECD 토양(0.67%), 황토(0.20%) 순으로 나타났다. 표면적은 황토(15.4 m<sup>2</sup>/g) > 자연토양(9.40 m<sup>2</sup>/g) > OECD 토양(2.85 m<sup>2</sup>/g) 순으로 나타났다.

**3.2. 토양 TNT 농도와 지렁이 생물흡수와의 관계**

**3.2.1. 토양내 TNT 분해속도**

TNT는 박테리아나 광분해에 의하여 토양내에서 자연분해가 가능한 것으로 알려져 있으며, 빠른 분해속도를 가진다고 보고된 바 있다(Conder et al., 2004). Fig. 1에는 TNT로 인공오염시킨 토양으로부터 자연분해에 의한 TNT 농도변화를 나타낸 결과이다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 실제 생체가 존재하지 않은 상태에서도 시간에 따라 TNT는 지속적으로 분해가 되는 것으로 나타났다. 특히 초기 오염농도가 높은 OECD 토양과 자연토양에서 TNT가 빠르게 분해되는 경향이 더 두드러지게 나타났다. 이러한 경향을 1차분해 속도 모델(first-order degradation kinetic model)로 나타내었으며, 사용된 모델식은 식 (3)과 같다(OECD, 2010).

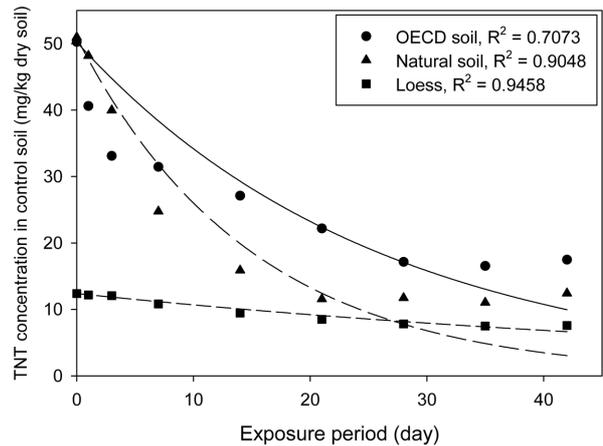


Fig. 1. TNT concentration in soil via exposure period.

Table 1. Physicochemical characteristics of the non-contaminated soils used

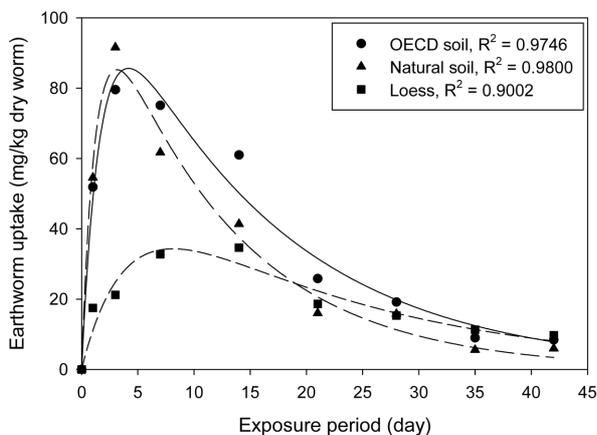
Soil	Water Holding Capacity (WHC, %(v/w))	pH	Water content (%)	Organic carbon content (wt%)	CEC (cmol/kg)	BET surface area (m <sup>2</sup> /g)	Pore volume (cc/g)	Pore size (Å)
OECD soil	42.9	6.37	0.64	0.67	14.0	2.85	0.02	20.7
Natural soil	51.7	3.98	12.5	1.55	16.7	9.40	0.03	18.7
Loess	34.6	4.82	10.2	0.20	10.8	15.4	0.05	18.7

**Table 2.** The first-order degradation kinetic model parameters for natural degradation data of TNT in soil

Soil	$C_0$ (mg/kg)	$k$ (day <sup>-1</sup> )	$R^2$	SSE
OECD soil	50.26	$0.0385 \pm 0.0060$	0.7073	317.5
Natural soil	50.97	$0.0672 \pm 0.0093$	0.9055	212.3
Loess	12.37	$0.0148 \pm 0.0009$	0.9104	1.873

**Table 3.** Parameter estimates for one-compartment first-order kinetic model applied to TNT accumulation in earthworm body

Soil	$C_0$ (mg/kg)	$k_1$ (d <sup>-1</sup> )	$k_2$ (d <sup>-1</sup> )	$k_0$ (d <sup>-1</sup> )	$R^2$	SSE
OECD soil	50.26	$1.327 \pm 0.186$	$0.591 \pm 0.117$	$0.066 \pm 0.009$	0.9746	189.9
Natural soil	50.97	$1.732 \pm 0.240$	$0.790 \pm 0.152$	$0.086 \pm 0.011$	0.9800	158.9
Loess	12.37	$1.031 \pm 0.217$	$0.249 \pm 0.093$	$0.049 \pm 0.015$	0.9002	94.73

**Fig. 2.** Kinetics for accumulated concentration of TNT into earthworm body.

$$C_s(t) = C_0 e^{-k_0 t} \quad (3)$$

여기서  $C_s(t)$ 는 시간  $t$ 에서의 토양내 TNT 농도(mg/kg),  $C_0$ 는 토양에 대한 TNT 오염농도(mg/kg)이며,  $k_0$ 는 TNT의 1차분해 속도상수(d<sup>-1</sup>)이다. 모델분석한 결과는 Table 2에 나타내었는데, 3종류의 토양 모두 매우 높은  $R^2$ (>0.9) 값을 나타내었다. 1차분해 속도상수는 자연토양( $0.0672 \text{ d}^{-1}$ ) > OECD 토양( $0.0385 \text{ d}^{-1}$ ) > 황토( $0.0148 \text{ d}^{-1}$ ) 순으로 나타났다. 따라서, 황토보다는 자연토양과 OECD 토양에서 TNT의 자연분해가 원활하게 일어났다.

### 3.2.2. 노출기간에 대한 토양내 TNT에 대한 지렁이 체내 축적 농도의 변화

노출기간에 따른 지렁이 체내의 TNT 축적농도의 변화를 조사하기 위하여, OECD 토양과 자연토양은 50 mg/kg으로 황토는 10 mg/kg으로 각각 오염시킨 후 1일에서 42일까지 총 8회에 걸쳐서 분석하였으며, 그 결과를 Fig. 2에 도시하였다.

OECD 토양과 자연토양의 경우 지렁이 생체내 축적되는 TNT 농도가 5일 이내에서 급격하게 증가하였으며, 약 5일에서 가장 높은 농도를 나타내었고, 5일 이후에는 지속적으로 감소하였다. 황토의 경우에도 동일한 경향을 나타내었으나, OECD 토양과 자연토양에 비하여 상대적으로 긴 노출기간(약 7일)에서 최대 축적농도를 나타내었다. 이러한 결과는 지렁이가 TNT 오염토양에 노출된 후 약 5~7일이 TNT 독성에 가장 적합하게 반응(사멸)할 수 있는 시기가 되며, 이 후 시간이 흐름에 따라 점차 TNT 독성에 따른 영향이 약해지는 경향을 가지는 것으로 나타났다.

시간에 따라 지렁이 체내 축적되는 TNT 농도를 one-compartment first-order kinetic model에 적용한 결과 (Table 3),  $k_1$ 는 자연토양( $1.73 \text{ d}^{-1}$ ) > OECD 토양( $1.33 \text{ d}^{-1}$ ) > 황토( $1.03 \text{ d}^{-1}$ ) 순으로 나타났으며,  $k_2$ 도 자연토양( $0.79 \text{ d}^{-1}$ ) > OECD 토양( $0.59 \text{ d}^{-1}$ ) > 황토( $0.25 \text{ d}^{-1}$ )로 동일 순서로 나타났다.

### 3.2.3. 토양내 TNT 농도에 따른 지렁이 체내 축적농도의 변화

Fig. 3에는 노출기간 7, 14, 21, 28일에서 지렁이 체내 TNT 축적농도에 대한 토양내 TNT 농도의 영향을 나타내었다. 모든 토양에 대하여 토양내 TNT 농도와 지렁이 체내 TNT 농도는 매우 높은 상관관계( $R^2 > 0.97$ )를 나타내어, 지렁이의 TNT 체내축적 경로가 토양입자를 섭취, TNT를 토양입자로부터 용출시킨 후 이를 소화기관을 통하여 섭취하여 체내에 축적하는 경로를 가질 수 있는 것으로 사료된다. OECD 토양(Fig. 3a), 자연토양(Fig. 3b), 황토(Fig. 3c) 모두 동일한 과정을 통하여 섭취되므로 토양내 TNT 농도가 증가할수록 생물축적 농도가 선형적으로 증가하는 것을 알 수 있었다.

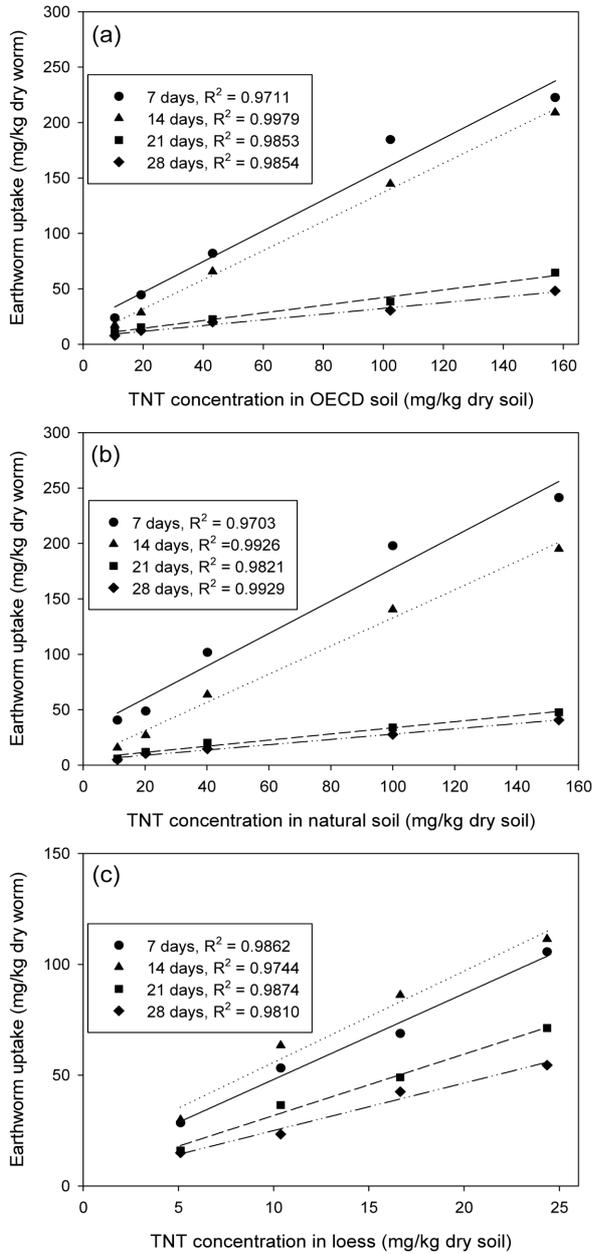


Fig. 3. The correlation between earthworm uptake and TNT concentration in soil: a) OECD soil, b) natural soil, and c) loess.

황토를 제외한 OECD 토양과 자연토양에서 노출기간이 7일인 경우가 14, 21, 28일에 비하여 TNT 생물축적 농도가 높은 것으로 나타났다. 다만 7일과 14일에서 TNT의 체내축적농도가 크게 차이하지 않았으며, 14일 이후에는 체내 TNT 농도가 매우 낮아지는 것으로 나타났다. 이러한 형태는 Fig. 2에 나타난 것과 같이 약 5일 이후에 체내 농도가 급격하게 감소하는 경향은 아니었으나, 일정기간에서 최대 축적농도를 나타낸 후 시간에 따라 감소하는

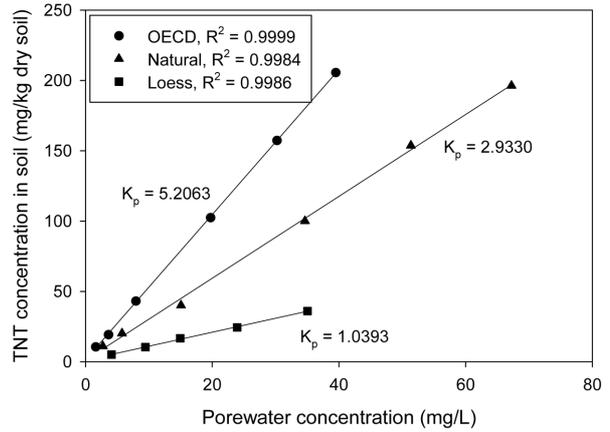


Fig. 4. Relationship between TNT concentrations in soils and porewater.

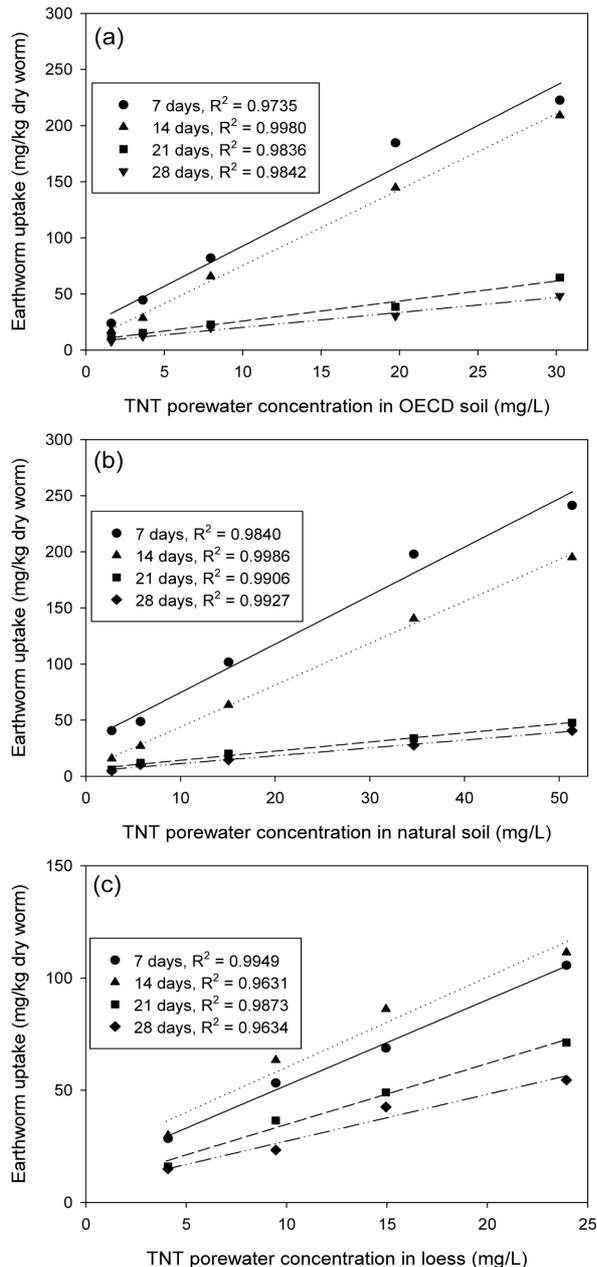
전체적인 곡선 형태는 유사한 것으로 나타났으며, 실험이 수행된 여러 가지 환경적 요인의 변화(온도, 수분상태, 낮/밤 길이 등)에 따라 곡선의 기울기는 달라질 수 있는 것으로 사료된다.

한편, 황토의 경우에는 토양내 TNT 농도가 증가함에 따라 지렁이 체내 축적농도도 증가하였으나, 최대 TNT 체내 축적농도는 노출기간 14일에서 나타났으며, 14일 이후에는 농도가 감소하였다. 증가 및 감소 경향도 전체적으로 OECD 토양과 자연토양에 비하여 완만하게 증가하고 감소하는 것으로 나타났다. Dodard et al.(2004)은 *Enchytraeus albidus*(white worm) 체내에 TNT를 흡수시킨 다음 시간에 따른 체내 TNT 농도를 분석하였는데, 약 30~35시간 이후에 TNT가 완전히 사라지는 것을 관찰하였다. 따라서 본 연구에서 지렁이 체내의 TNT 농도가 상대적으로 느리게 감소하는 것으로 미루어보아 토양으로부터 섭취되는 토양내 TNT 농도 변화와 밀접한 관련을 가지는 것으로 사료된다.

모든 토양에 대하여 노출기간 21일과 28일에서의 TNT 체내농도는 매우 낮은 수준으로 나타났으며, 이는 토양내 TNT가 대부분 분해되었기 때문으로 사료된다. 따라서 TNT 독성평가지 14일의 노출기간이 적당한 것으로 사료되며, 체내흡수 농도와와의 관계와의 유기적인 해석을 위해서는 7일 또는 14일을 기준으로 하는 것이 적합한 것으로 나타났다.

### 3.3. 공극수내 TNT 농도와 지렁이 생물흡수와의 관계

Fig. 4에는 공극수내 TNT 농도와 토양내 TNT 농도와의 관계를 나타내었는데, 모든 토양과 공극수에 대하여 매우 높은 상관관계를 나타내었다( $R^2 > 0.99$ ). 토양내 TNT



**Fig. 5.** Relationship between earthworm uptake and porewater concentrations of TNT. (a) OECD soil, (b) Natural soil, and (c) Loess.

농도와 공극수내 TNT 농도의 비(즉, 분배계수,  $K_p$ )를 계산하여 분석한 결과 황토 > 자연토양 > OECD 토양 순으로 나타났는데, 이는 각 토양의 비표면적 크기와 순서가 일치하였다(Table 1 참조). 따라서, 비표면적이 큰 황토의 경우 토양내 TNT 농도에 비하여 상대적으로 많은 농도의 TNT가 용출되었던 것으로 사료된다.

Fig. 5에는 공극수내 TNT 농도와 지렁이 체내 TNT

**Table 4.** LC<sub>50</sub> of TNT in OECD soil, natural soil and loess for *Eisenia fetida*

Soil	LC <sub>50</sub>			
	7-d	14-d	21-d	28-d
OECD soil	159.4	154.0	154.0	154.0
Natural soil	160.1	158.2	158.2	158.2
Loess	28.81	28.81	28.81	28.81

축적농도와의 관계를 나타내었다. 모든 토양에 대하여 전체적으로 높은 상관관계를 나타내었는데( $R^2 > 0.97$ ), 이는 지렁이가 공극수를 섭취하거나 피부로 흡수하여 체내에 축적하는 경로 역시 가능한 것으로 사료된다. 결론적으로 지렁이가 토양내 TNT를 섭취하는 경로로써 1) 토양을 직접 섭취하여 소화시켜서 섭취하는 경로와 2) 토양으로부터 공극수로 용출된 TNT를 섭취하거나 피부로 흡수하여 체내 축적하는 경로 모두 가능한 것으로 나타났다. 따라서 Fig. 3과 Fig. 5는 매우 유사한 결과를 가지는데, 공극수내 TNT 농도에 따라 지렁이 체내 축적되는 TNT 농도도 증가하였다.

#### 3.4. 지렁이 생물흡수량과 LC<sub>50</sub>과의 관계

Table 4에는 자연토양, OECD 토양, 황토에 TNT를 인공적으로 오염시킨 토양에 대한 *Eisenia fetida*의 LC<sub>50</sub>을 분석한 결과를 나타내었다. 자연토양과 OECD 토양의 경우 100 mg/kg 이상의 TNT 농도에서 지렁이의 사멸이 관찰되었으며, 황토의 경우 36.06 mg/kg TNT 농도에서 지렁이의 사멸이 관찰되었다.

LC<sub>50</sub>은 각 노출기간에 따른 차이는 나타나지 않았으나, 토양의 종류에 따라 다르게 측정되었는데, 독성은 자연토양(LC<sub>50</sub>=158.2~160.1 mg/kg) > OECD 토양(LC<sub>50</sub>=154~159 mg/kg) > 황토(LC<sub>50</sub>=28.8 mg/kg) 순으로 나타났다. 노출기간에 따른 독성차이가 거의 나타나지 않은 이유는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 지렁이 체내 TNT 농도가 5~7일 사이에 최고치에 도달하였기 때문으로 사료된다. 황토가 다른 두 종류의 토양에 비하여 높은 독성을 나타낸 이유는 여러 가지 원인이 있을 수 있으나, 토양과 공극수에 대한 TNT 높은 분배계수(Fig. 2 참조)와 관련이 있는 것으로 판단된다. 즉, 분배계수가 가장 높았던 황토의 경우 OECD 토양과 자연토양에 비하여 높은 독성을 나타내었다. 그 외에도 환경적인 요인으로는 해당 토양의 특성(pH, CEC, 원소조성, 입도 등)에 대한 차이에 따라 다르게 나타나는 것이라 판단된다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 토양내 TNT 오염에 대한 생태위해성 평가에 기초한 국내 기준을 마련하기 위하여, 지렁이 (*Eisenia fetida*)를 이용한 독성평가와 생체축적농도와와의 상관관계, 생체축적 농도와 토양 및 공극수내 TNT 농도와의 관계에 대하여 조사하였다. 결론은 아래와 같다.

1) 지렁이 체내 TNT 축적 농도는 노출기간에 따라 달라지는데, 노출 초반에는 급격하게 체내 TNT 농도가 증가하였다가 이후 서서히 농도가 낮아지는 경향을 나타내었다. 이는 토양내 자연분해에 의한 영향이 가장 큰 것으로 나타났다.

2) 지렁이 체내 TNT 축적 농도는 토양내 TNT 오염농도, 공극수내 TNT 농도와 높은 선형관계를 나타내었으며, 이는 지렁이의 TNT 섭취시 토양입자의 소화경로를 통한 체내축적뿐만 아니라 공극수내 TNT의 피부흡수를 통한 체내 축적도 가능성을 의미한다.

3) 각 토양에 대한 독성분석(LC<sub>50</sub>)시 노출기간은 약 7~14일이 적당한 것으로 나타났으며, 노출기간을 길게 유지하여도 독성치는 거의 변동이 없었으며, 이는 노출 초기 지렁이의 빠른 생체축적 속도와 관련이 있는 것으로 나타났다. 또한, 황토의 경우 토양내 TNT 농도는 낮았지만 토양과 공극수와의 TNT 분배계수가 가장 높았으므로 지렁이에 대한 독성이 높게 나타난 것으로 판단된다.

#### 사 사

본 연구는 환경부의 토양·지하수 오염방지기술개발사업인 GAIA(Geo-Advanced Innovative Action) Project의 지원을 받아 수행되었습니다.

#### References

Bae, B., Kim, S.-Y., Lee, I.-S., and Chang, Y.-Y., 2001, A study on the screening of 2,4,6-trinitrotoluene tolerant indigenous herbaceous plants, *Journal of KoSSGE*, **6**, 3-11.

Belden, J.B., Lotufo, G.R., Chambliss, C.K., Fisher, J.C., Johnson, D.R., and Boyd, R.E., Sims, J.G. 2011, Accumulation of 14C-trinitrotoluene and related nonextractable (bound) residues in *Eisenia fetida*, *Environ. Pollut.*, **159**, 1363-1368.

Best, E.P.H., Tatem, H.E., Geter, K.N., Wells, M.L., and Lane, B.K., 2008, Effects, uptake, and fate of 2,4,6-trinitrotoluene aged in soil in plants and worms, *Environ. Toxicol. Chem.*, **27**, 2539-2547.

Brinch, U.C., Ekelund, F., and Jacobsen, C.S., 2002, Method for spiking soil samples with organic compounds, *Appl. Environ. Microb.*, **68**, 1808-1816.

Conder, J.M., La Point, T.W., Steevens, J.A., and Lotufo, G.R., 2004, Recommendations for the assessment of TNT toxicity in sediment, *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, 141-149.

Dalby, P.R., Baker, G.H., and Smith, S.E., 1996, Filter paper method to remove soil from earthworm intestines and to standardize the water content of earthworm tissue, *Soil Biol. Biochem.*, **28**, 685-687.

Dodard, S.G., Powlowski, J., and Sunahara, G.I., 2004, Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by enchytraeids (*Enchytraeus albidus*) in vivo and in vitro, *Environ. Pollut.*, **131**, 263-273.

Gong, P., Siciliano, S.D., Greer, C.W., Paquet, L., Hawari, J., and Sunahara, G.I., 1999, Effects and bioavailability of 2,4,6-trinitrotoluene in spiked and field-contaminated soils to indigenous microorganisms, *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**, 2681-2688.

IBM, 2010, SPSS Statistics for Windows, Version 19.0, Armonk, NY: IBM Corp., USA.

ISO (International Standard Organization), 2012, Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*, ISO 11268-2:2012, Geneva.

KMOE 2013, ES.07302.1a, pH-glass electrode method, Korean Ministry of Environment standard, Sejong, Korea.

Kuperman, R.G., Simini, M., Siciliano, S., and Gong, P., Effects of energetic materials on soil organisms, In:Sunahara, G.I., Hawari, J., Lotufo, G., Kuperman, R.G., editors, *Ecotoxicology of Explosives*, Boca Raton: FL, CRC Press; 2009. p.35-76.

Lachance, B., Renoux, A.Y., Sarrazin, M., Hawari, J., and Sunahara, G.I., 2004, Toxicity and bioaccumulation of reduced TNT metabolites in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to amended forest soil. *Chemosphere*, **55**, 1339-1348.

Liu, K., Pan, X., Han, Y., Tang, F., and Yu, Y., 2012, Estimating the toxicity of the weak base carbendazim to the earthworm (*Eisenia fetida*) using in situ pore water concentrations in different soils, *Sci. Total Environ.*, **438**, 26-32.

OECD, 1984, OECD Guideline for testing of chemicals: Earthworm, acute toxicity test, OECD Publishing: Paris, p. 1-9.

OECD, 2008, OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 2: Effects on biotic systems, test no. 226: Predatory mite (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) reproduction test in soil, OECD Publishing: Paris, p. 4-5.

OECD, 2010, OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 3: Degradation and accumulation, test no. 317: Bioaccumulation in terrestrial *oligochaetes*, OECD Publishing: Paris, p. 21.

- Nelson, D.W. and Sommers, L.E., Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: Black, C.A., editors, *Methods of soil analysis; Part 3. Chemical methods*, Madison:WI, Soil Science of America and American Society of Agronomy; 1996, p. 961-1010.
- Renoux, A.Y., Sarrazin, M., Hawari, J., and Sunahara, G.I., 2000, Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene in soil in the earthworm *Eisenia andrei*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**, 1473-1480.
- Robidoux, P.Y., Hawari, J., Bardai, G., Paquet, L., Ampleman, G., Thiboutot, S., and Sunahara, G.I., 2002, TNT, RDX, and HMX decrease earthworm (*Eisenia andrei*) life-cycle responses in a spiked natural forest soil, *Environ. Contam. Toxicol.*, **43**, 379-388.
- Sarrazin, M., Dodard, S.G., Savard, K., and Lachance, B., 2009, Accumulation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine by the earthworm *Eisenia Andrei* in a sandy loam soil, *Environ. Toxicol. Chem.*, **28**, 2125-2133.
- Sims, J.G. and Steevens, J.A., 2008, The role of metabolism in the toxicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its degradation products to the aquatic amphipod *Hyalella azteca*, *Ecotoxicol. Environ. Safety* **70**, 38-46.
- Ter laak, T.L., Agbo, S.O., Barendregt, A., and Hermens, J.L.M., 2006, Freely dissolved concentration of PAHs in soil pore water: measurements via solid-phase extraction and consequences for soil tests, *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 1307-1313.
- USEPA, 1986, Method 9081: Cation-Exchange Capacity of Soils (Sodium Acetate), Test Methods for the Evaluation of Solid Waste: Laboratory Manual Physical Chemical Methods. SW 846, Washington, DC, USA, Office of Solid Waste.
- USEPA, 2007, Method 8330A: Nitroaromatics and nitroamines by high performance liquid chromatography (HPLC), Test Methods for the Evaluation of Solid Waste: Laboratory Manual Physical Chemical Methods. SW 846, Washington, DC, USA, Office of Solid Waste.
- Widianarko, B. and Straalen, N.V., 1996, Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 402-406.