Research Paper

Study on the Mechanism of Manifestation of Ecological Toxicity in Heavy Metal Contaminated Soil Using the Sensing System of Earthworm Movement

Woo-Chun Lee, Sang-Hun Lee, Ji-Hun Jeon, Sang-Woo Lee, Soon-Oh Kim*

Department of Geology and Research Institute of Natural Science (RINS), Gyeongsang National University (GNU)

*Corresponding author : sokim@gnu.ac.kr

ARTICLE INFORMATION

Manuscript received 12 June 2021

Manuscript accepted 22 June 2021

Available online 28 June 2021

DOI : <http://dx.doi.org/10.9719/EEG.2021.54.3.399>

Research Highlights

- The vibration sensor system was newly introduced to detect earthworm movement responding to the toxicity of heavy metal contaminants in soil.
- The manifestation mechanism of ecotoxicity of heavy metals was interpreted based on the results of real-time monitoring of earthworm movement.
- The study confirmed that the combination of conventional indices of earthworm behavior and the results of newly-proposed method was effective to elucidate the ecological toxicity of heavy metal contaminants.

ABSTRACT

Natural soil was artificially contaminated with heavy metals (Cd, Pb, and Zn), and the movement of earthworm was characterized in real time using the *ViSSET* system composed of vibration sensor and the other components. The manifestation mechanism of ecological toxicity of heavy metals was interpreted based on the accumulative frequency of earthworm movement obtained from the real-time monitoring as well as the conventional indices of earthworm behavior, such as the change in body weight before and after tests and biocumulative concentrations of each contaminant. The results showed the difference in the earthworm movement according to the species of heavy metal contaminants. In the case of Cd, the earthworm movement was decreased with increasing its concentration and then tended to be increased. The activity of earthworm was severely increased with increasing Pb concentration, but the movement of earthworm was gradually decreased with increasing Zn concentration. The body weight of earthworm was proved to be greatly decreased in the Zn-contaminated soil, but it was similarly decreased in Cd- and Pb-contaminated soils. The bioaccumulation factor (BAF) was higher in the sequence of Cd > Zn > Pb, and particularly the biocumulative concentration of Pb did not show a clear tendency according to the Pb concentrations in soil. It was speculated that Cd is accumulated as a metallothionein-bound form in the interior of earthworm for a long time. In particular, Cd has a bad influence on the earthworm through the critical effect at its higher concentrations. Pb was likely to reveal its ecotoxicity via skin irritation or injury of sensory organs rather than ingestion pathway. The ecotoxicity of Zn seemed to be manifested by damaging the cell membranes of digestive organs or inordinately activating metabolism. Based on the results of real-time monitoring of earthworm movement, the half maximal effective concentration (EC50) of Pb was estimated to be 751.2 mg/kg, and it was similar to previously-reported ones. The study confirmed that if the conventional indices of earthworm behavior are combined with the results of newly-proposed method, the mechanism of toxicity manifestation of heavy metal contaminants in soils is more clearly interpreted.

Keywords : heavy metal contaminated soil, earthworm movement, vibration sensor, manifestation mechanism of ecotoxicity, bioaccumulation factor (BAF)

Citation: Lee, W.-C., Lee, S.-H., Jeon, J.-H., Lee, S.-W., Kim, S.-O. (2021) Study on the Mechanism of Manifestation of Ecological Toxicity in Heavy Metal Contaminated Soil Using the Sensing System of Earthworm Movement. *Korea Economic and Environmental Geology*, v.54, p.399-408, doi:10.9719/EEG2021.54.3.399.

✂ Journal homepage: <http://www.kseeg.org/main.html>

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.
pISSN 1225-7281; eISSN 2288-7962/©2021 The KSEEG. Printed by Hanrimwon Publishing Company. All rights reserved.

연구논문

지렁이 움직임 감지 시스템을 이용한 중금속 오염 토양의 생태독성 발현 메커니즘에 대한 연구

이우춘 · 이상훈 · 전지훈 · 이상우 · 김순오*

경상국립대학교 지질학과 및 기초과학연구소(RINS)

*책임저자 : sokim@gnu.ac.kr

요 약

배경토양에 카드뮴(Cd), 납(Pb), 아연(Zn) 등의 중금속 오염물질을 인위적으로 오염시킨 후 진동센서 등으로 구성된 시스템(VISSET)을 이용하여 지렁이 움직임 특성을 실시간으로 모니터링하였다. 이로부터 얻어진 지렁이 움직임의 누적 횟수와 전통적인 지렁이 행태지표(실험 전후의 체중 변화, 생체축적농도) 등을 이용하여 중금속 오염물질의 토양 내 생태독성 발현 기작을 규명하였다. 중금속별 농도 증가에 따른 지렁이 움직임을 살펴보면, Cd는 농도가 증가함에 따라 지렁이 움직임은 감소하다가 증가하는 경향을 보였고, Pb는 농도 증가에 따라 지렁이 움직임이 급증하였으며, Zn의 경우는 농도가 증가함에 따라 지렁이 움직임은 지속적으로 감소하는 것으로 나타났다. 지렁이의 체중은 Zn 오염 토양에서 가장 크게 감소하였으며, Cd와 Pb에서는 지렁이 체중 변화가 유사한 것으로 조사되었다. 생체축적농도는 Cd, Zn, Pb의 순으로 높게 조사되었고, 특히 Pb의 경우에는 토양 내 농도에 따른 생체축적농도의 변화가 뚜렷하게 나타나지 않았다. Cd는 metallothionein-bound 형태로 결합되어 지렁이 생체 내에 장기간 축적되며, 특히 고농도에서는 임계효과(critical effect)에 의해 지렁이 움직임에 악영향을 주는 것으로 판단된다. Pb는 섭취에 의하여 생태독성이 발현되는 것이 아니고 피부를 자극시키거나 감각기관을 손상시킴으로써 독성을 발현시키는 것으로 생각된다. Zn은 소화기관의 세포막을 손상시키거나 물질대사를 과도하게 증가시킴으로써 지렁이 움직임과 체중이 감소하는 것과 같은 생태독성을 발현시킨다. 지렁이 움직임에 대한 실시간 모니터링 결과를 분석하여 도출한 Pb의 50% 최대 영향농도(half maximal effective concentration, EC50)는 751.2 mg/kg로 기존 연구와 유사한 것으로 나타났다. 본 연구를 통하여 기존에 이용되어온 지렁이 행태 지표와 새롭게 제시한 지렁이의 움직임을 실시간으로 모니터링하여 얻어진 결과를 통합적으로 해석함으로써 중금속 오염물질의 생태독성 발현 기작을 규명하는 것이 효과적임을 확인할 수 있었다.

주요어 : 중금속 오염 토양, 지렁이 움직임, 진동센서, 독성 발현 기작, 생체축적농도

1. 서 론

토양 내 중금속 오염은 지질 내 중금속을 함유하고 있는 암석 및 광물의 풍화로 인해 배경적으로 발생되거나, 광산 활동, 사격장 부지, 산업 및 공업 부지에서 인위적으로 초래될 수 있다(Davies, 1983; Alloway, 1990; Choi, 2004). 국내 중금속 오염 토양에 대한 규제 기준은 화학적 농도에 의한 총 함량으로 설정되어 있다(MOE, 2007). 하지만, 토양 내 중금속의 존재 형태에 따른 거동 특성이 생물 및 인체의 독성에 큰 영향을 미치기 때문에 최근 들어 토양 내 오염물질의 위해성은 기존의 화학적 평가방법에서 탈피하여 생태학적 독성을 평가하는 방법으로 전환되어 가고 있다(Park *et al.*, 2013; Zahran *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2015; Wcislo *et al.*, 2016). 토양 생태독성 평가 방법은 OECD, ISO, EPA 등 여러 기관에서 제안하는 가이드라인에 따라 수행되고 있으며, 일반적으로 OECD TG 207이 가장 널리 이용되고 있다(OECD, 1984;

ISO, 2008; ISO, 2012a; EPA, 2012). OECD TG 207은 1984년에 처음으로 제안되었고, 인공토를 이용한 오염물질 및 독성물질에 초점을 맞추어 개발되었다. 하지만 이 방법은 인공토를 이용한다는 점, 많은 양의 토양이 필요하다는 점, 많은 수의 생물체가 요구된다는 점, 평가 기간이 길다는 점(14일), 실시간 치사여부를 확인할 수 없다는 점 등과 같은 단점들이 있다(Owojori *et al.*, 2009). 이러한 문제점을 보완하고 개선하기 위해 주요 선진국 및 기관에서는 다양한 오염물질과 실제 오염 토양을 대상으로 할 수 있는 생태독성 평가방법을 개발하기 위한 연구가 꾸준히 진행되어 오고 있다(Frankenbach *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Uwizeyimana *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). 또한, 오염토 내 오염물질 종류 및 특성, 토양의 물리화학적 특성, 토양 생태계, 생물 분자구조를 고려한 독성 발현의 메커니즘을 규명하는 연구들이 진행되고 있다(Roman and Lanno, 2010, Sanchez- Hernandez *et al.*, 2019).

본 연구에서 이용한 실시간 토양 생태독성 모니터링 시스템(Vibration Sensor for monitoring of Soil Ecological Toxicity, *ViSSET*)은 지렁이의 움직임을 감지할 수 있는 진동센서를 이용하여 실시간으로 지렁이의 움직임을 모니터링할 수 있다(Lee *et al.*, 2019). 토양 생태독성을 평가하기 위하여 기존에 이용된 지렁이 행태 특성 지표로는 치사율, 회피율, 체중 변화량 등이 있으며, 이러한 지표는 시험 전후의 변화양상을 기반으로 하여 산정되기 때문에 실시간으로 획득될 수 없다. 따라서 이러한 기존 방법의 단점을 극복하기 위하여 실시간으로 토양 생태독성을 모니터링할 수 있는 기법이 필요하여 본 연구에서는 *ViSSET* 시스템을 이용하였으며, 이 방법은 기존의 방법과 비교하여 시험 대상 생물 개체 수와 토양량을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 평가 기간을 7일로 대폭 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 새롭게 제안된 방법을 이용하여 각 오염물질의 독성값까지 도출할 수 있다.

중금속 오염물질은 종류에 따라서 토양 내 거동 특성이 상이하며, 특히 토양 내 함유된 점토광물, 유기물(부식질), 산화물 등과 같은 다양한 교질물과의 반응으로 인하여 토양 내에서 각 중금속의 이동도는 다르다(Wuana and Okieimen, 2011). Ogundiran and Osibanjo (2009)의 연구에서는 토양에서의 중금속별 이동도를 평가하였는데, Cd, Ni, Cr, Zn, Pb 순으로 이동도가 높은 것으로 보고되었다. Cd는 비료, 살충제 및 하수 슬러지로부터 기인하여 토양 오염을 야기하는 것으로 알려져 있으며, 식물에 섭취된 Cd는 수년 동안 잔류하지만 독성학적으로 큰 영향이 없는 것으로 알려져 있다(McLaughlin *et al.*, 2000; Weggler *et al.*, 2004). Pb는 사격장이나 제련소에서 발생하는 비산 먼지에 함유되어 토양을 오염시킬 수 있으며, 식물 및 생물체에 쉽게 축적되지 않는 것으로 알려져 있다(Rosen, 2002). 그리고 이러한 특성으로 인해 다른 중금속에 비해 법적 규제 기준의 농도가 상대적으로 높다. Zn은 배경 기원으로 토양오염을 발생하기도 하며, 광산, 석탄, 폐기물 연소 등과 같은 산업 활동에 의한 인위적 요인에 의해서도 토양을 오염시킨다(Davies and Jones, 1988). Zn은 식수나 식품에 일정한 양으로 존재하는 인체 건강에 필수적인 미량 원소이며, 생물체 내 농축이 잘 되는 원소이다. 이로 인해 먹이 사슬을 통해 다른 생물체로 전이가 많이 되며, 토양 내 Zn은 미생물과 지렁이의 활동에 악영향을 끼쳐 토양 내 유기물의 분해를 지연시키는 것으로 알려져 있다(Greany, 2005).

본 연구에서는 Cd, Pb, Zn을 배경토양에 인위적으로 오염시킨 후, 중금속의 종류 및 농도에 따른 지렁이 움직임 특성을 모니터링하여 이들 중금속의 생태독성에 의한 영향을 파악하였다. 새롭게 제안된 진동센서를 이용

하여 지렁이 움직임을 실시간으로 모니터링하여 얻은 결과와 기존에 이용되어 온 대표적인 지렁이 행태 지표(체중 변화, 생물축적농도(bioaccumulation factor, BAF))를 통합하여 각 중금속별 생태독성 발현 기작을 규명하고, 50% 최대 영향농도(half maximal effective concentration, EC50)와 같은 중금속별 독성값을 도출하였다.

2. 연구 재료 및 방법

2.1. 연구 재료 및 생물종

본 연구에 이용된 배경토양은 3년간 휴경한 오염되지 않은 밭 토양으로 Cd, Pb, Zn 등의 중금속을 인위적으로 오염시켰다. 배경토양에 대해 pH, 전기전도도(EC), 유기물 함량(organic matter content, OM), 공극률, 토성, 총질소(TN), 총인(TP) 등과 같은 물리화학적 특성을 조사하였고, 배경토양 및 오염시킨 토양 내 중금속의 함량은 토양오염공정시험방법을 이용하여 분석하였다.

토양 생태독성을 평가하는데 이용된 지렁이는 지표종으로 알려진 *Eisenia fetida*로 OECD TG 207에서 제안하는 종이며, USA Illinois farm으로부터 구입하여 OECD TG 207에서 제공하는 조건(3개월 이상, 20±1°C, 16h/8h의 light/dark, 습도 80±10%)에 맞춰서 growth chamber에서 배양하였다. 실험에 이용된 지렁이는 환대(clitellum)가 잘 발달되고 체중이 300~500 mg 정도로 건강하고 균일한 개체를 사용하였다.

2.2. 실험 장치

본 연구에 이용된 실험 장치는 Lee *et al.* (2019)의 연구에서 이용된 것과 동일하며, 장치는 투명 아크릴 재질의 토양 챔버 내 자체 제작한 알루미늄 재질의 긴 막대형 진동센서로 구성되어 있다(Fig. 1). 그리고 센서와 연결된 진동 미터기(LUTRON, BVB-8207SD)는 4채널으로 진동센서의 민감도는 0.001 mm/sec이며, data는 1초마다 기록되어 엑셀 파일에 저장된다. 4개 채널 중 3개는 시험용으로 각 챔버당 지렁이 5마리가 들어가며, 1개는 지렁이가 없는 대조군(control)이다. 진동센서를 보정하기 위해 ISO 2954에서 제시한 방법에 따라 진동발생장치(Vibration Generator 1000701, 3B Scientific)로 10Hz의 진동을 발생시켜 실험 전 모든 채널의 민감도를 동일한 조건으로 표준화시켰다(ISO, 2012b). 이러한 장치는 주변에서 발생하는 진동이 바닥을 통해 전달되는 것을 차단하기 위하여 무진동 테이블에 설치되었고, 외부에서의 바람을 완전히 차단하기 위해 stabilization chamber 내에 설치하였다. 지렁이 움직임과 외부에 의한 진동 구분은 외부에서의 진동 발생 시 2개 이상으로 진동센서에 감지되

Fig. 1. Schematic diagram showing the ViSSET system.

기 때문에 2개 이상 감지된 실험 결과를 모두 배제시켰고, 하나의 센서에서만 감지된 실험 결과를 본 연구에 이용하였다.

2.3. 연구 방법

본 연구에 이용되는 중금속은 Cd, Pb, Zn로 Lu *et al.* (2005)가 제시한 방법을 참조하여 배경 토양에 인위적으로 오염시켰으며, 오염농도의 설정 기준은 국내 중금속 우려 및 대책 기준을 참조하였다. 배경 토양의 최대수분보유량(max. water holding capacity, MWHC)은 29.05%로 조사되었으며, 각 중금속별로 다양한 농도로 오염시킬 때 MWHC 80%의 수분함량을 유지하였다. 오염물질이 충분히 토양에 흡착될 수 있도록 7일간 숙성시킨 후 건조하여 실험에 이용하였다. 오염시킨 Cd의 농도는 6.3, 15.3, 38.5, 118.0, 224.2, 484.1 mg/kg이며, Pb는 93.2, 206.8, 410.8, 940.3, 1605.8, 6016.2 mg/kg이며, Zn는 120.8, 272.8, 434.0, 577.1 mg/kg이다. 실험에 사용된 중금속의 시약은 reagent grade로 Sigma-Aldrich사의 제품을 이용하였다.

실험에 이용된 토양 챔버의 반경은 94 mm이고 높이는 54 mm으로 원기둥 모형이며, 토양의 수분함량은 MWHC 50%, 용적밀도는 0.95 g/cm³ 그리고 토양 챔버당 지렁이 5마리를 넣어 7일 동안 실험을 진행하였다. 이러한 조건은 Lee *et al.* (2019)의 연구에서 최적화된 실험 조건으로 이를 바탕으로 실험이 수행되었다. 이 실험을 통해 획득되는 결과들로는 중금속 오염 토양 내 지렁이 움직임을 실시간 감지한 결과, 실험 전후의 지렁이 체중 변화, 그리고 지렁이 생체 내 중금속 축적농도이다. 지렁이 움직임을 모니터링 결과는 1개 채널에서만 감지되는 자료를 구분하여 시간에 따라 누적되는 움직임을 횡수로 표기하였다. 지렁이 체중은 실험 전과 후에 지렁이를 증류수로 세척한 후 하루 동안 growth chamber에서 방치하여

체내의 이물질 및 기생충을 제거한 후 체중을 측정하였으며, 실험 전의 체중을 기준으로 실험 후의 체중 변화를 계산하였다. 지렁이의 생물축적농도(BAF)는 지렁이 내 중금속 농도를 토양 내 중금속 농도로 나누어 계산하였고, 지렁이 체내 및 토양 내 중금속 농도의 분석방법은 토양오염공정시험법 상의 왕수법을 이용하여 추출한 후 용액을 여과시켜 ICP-OES (iCAP PRO X, Thermo Scientific[™], USA)로 분석하였다. 중금속의 농도별 지렁이 움직임을 누적 횡수를 통해 EC50을 도출하였으며, EC50 값은 50% 독성 영향을 받을 때의 농도이다. EC50의 계산 방법은 AAT Bioquest에서 제공하는 EC50 calculator를 이용하였다(Sarmah *et al.*, 2020; de la Vega *et al.*, 2021; https://www.aatbio.com/tools/ec50_calculator). Lee *et al.* (2019)의 연구에서 Zn에 대한 지렁이 움직임, 체중 변화 그리고 EC50 값에 대한 연구결과를 제안하였기에 이를 참조하여 다른 중금속과 비교 평가하였다.

3. 연구 결과 및 토의

3.1. 배경 토양의 특성

본 연구에 이용된 배경 토양의 특성 분석 결과를 Table 1에 요약하였다. 분석 결과, 전형적인 밭 토양의 특성을 보였으며, Yoon *et al.* (2009)의 연구에서 이용된 밭 토양의 특성과 유사하였으며, 본 연구대상 중금속의 농도는 매우 낮거나 검출되지 않았다. 또한, 배경 토양 내 유기물 함량은 본 연구에서 사용된 지표종인 *Eisenia fetida*가 성장하는데 충분할 정도로 나타났다(Irizar *et al.* 2015).

3.2. 지렁이 움직임에 대한 실시간 모니터링 결과

중금속의 농도에 따라 지렁이 움직임을 실시간으로 모니터링한 결과를 Fig. 2에 도시화하였다. Cd의 경우, 농도가 증가할수록 배경 토양보다 지렁이 움직임을 횡수가

Table 1. Physicochemical properties and heavy metal concentrations of control soil

Property		Concentration of heavy metals (mg/kg)	
pH	6.06	As	n.d.
EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	122	Cd	n.d.
Content of soil organic matter (LOI) (%)	5.72	Cr	23.56
CEC (cmol/kg)	10.56	Cu	22.54
MWHC (%)	29.05	Ni	27.38
Porosity (%)	39.22	Pb	11.70
Texture (%)	Sand	Zn	76.45
	Silt		
	Clay		
TN (%)	0.14		
TP (mg/kg)	1,673		

감소되었으며, Cd 15 mg/kg 이상의 농도부터는 반대로 지렁이 움직임의 횟수가 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 2a). 또한 2일 내에서는 농도에 따른 움직임이 뚜렷하지 않은 경향성을 보이다가 2일 이후에 뚜렷한 움직임이 나타났다. 고농도인 484 mg/kg에서 초기에 움직임이 급증하다가 6일까지 움직임이 거의 없었으나, 6일 이후 다시 급격히 증가하였다. 이러한 현상은 고농도의 Cd에 대한 노출로 인한 쇼크 현상으로 추정되며, 이와 같은 현상은 본 연구에서 지렁이 움직임을 통해 처음으로 관찰하였기 때문에 명확한 근거를 제시할 없지만 다른 생물체에서 이와 같은 유사한 현상이 나타나는 것으로 조사되었다(Brulle *et al.*, 2007). Pb의 경우, 농도가 증가할수록 배경 토양 내 지렁이 움직임보다 증가되는 것을 확인하였으며, 지렁이 움직임의 경향성이 5일 이후에 나타나 Cd보다 늦게 나타난 것을 확인할 수 있다(Fig. 2b). Pb의 고농도인 6,016 mg/kg에서는 초기에 격렬하게 움직이다가 갑자기 움직임이 둔화되면서 3일 이후에 움직임이 없는 것으로 조사되었으며, 실험 후 모든 지렁이가 치사된 것으로 나

Fig. 2. Real-time monitoring results on cumulative frequency of the signals detected in heavy metal contaminated soil. (a) Cd, (b) Pb, (c) Zn.

Fig. 3. Results on relative frequency estimated by total frequency of signals in each concentration divided by the largest total frequency of signals. The values given above each bar represent total frequency of signals. (a) Cd, (b) Pb, (c) Zn.

타나 3일 이후에 치사된 것을 확인할 수 있었다. Zn의 경우, 농도가 증가할수록 배경 토양 내 지렁이 움직임보다 감소하는 경향을 확인하였으며, Cd와 Pb에 비해 초기부터 농도에 따른 움직임의 영향을 확인하였다(Fig. 2c). Zn의 고농도인 577 mg/kg에서는 다른 중금속과는 달리 움직임이 초기부터 7일까지 거의 없는 것으로 조사되었다. 중금속 종류별 지렁이 움직임의 경향성이 다르게 나타났는데, 이는 중금속의 종류에 따라 지렁이에 미치는 독성 발현 메커니즘이 다른 것을 시사한다.

7일 동안 감지된 지렁이 움직임의 최종 누적 신호 빈도수의 상대적인 비율을 각 중금속의 농도에 따라 Fig. 3에 나타내었다. 각 중금속의 농도별 최종 빈도수를 가장 큰 빈도수로 나누어서 상대적인 비율을 계산하였다. Cd는 농도가 증가할수록 움직임이 감소하다가 다시 증가되는 양상으로 나타났다(Fig. 3a). Pb의 경우, 농도가 증가

할수록 배경 토양 내 지렁이 움직임보다 증가된 반면, Zn은 농도가 증가할수록 움직임이 감소하는 경향성을 확인하였다(Fig. 3b and 3c). Pb로 오염된 토양에서의 지렁이 움직임이 다른 중금속보다 월등히 많은 것은 지렁이의 감각기관을 자극하거나 피부 독성을 유발시키기 때문인 것으로 판단된다(Wijayawardena *et al.*, 2016). 반면, Zn의 낮은 농도에서 지렁이에게 악영향은 없는 것으로 나타나지만, Zn의 농도가 증가하면 지렁이의 기본적인 움직임인 먹이 및 채굴 활동을 방해하는 것으로 판단된다. 마지막으로 Cd는 Pb와 Zn의 독성 발현 메커니즘이 복합적으로 영향을 미친 것으로 판단된다.

3.3. 지렁이의 체중 변화

오염된 토양에서 7일간 노출시킨 지렁이의 체중 변화를 중금속의 농도에 따라서 나타내었다(Fig. 4). 체중 감

Fig. 4. Change in the body weight of earthworm computed by the body weight after tests subtracted by that before tests. (a) Cd, (b) Pb, (c) Zn.

소는 Zn에서 가장 크며, Cd와 Pb에서는 유사한 것으로 확인되었다. Cd의 경우, 독성물질의 증가에 따른 전형적인 체중 감소 경향이 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 4a). Pb의 경우, 가장 낮은 농도인 12.93 mg/kg에서는 체중 변화가 거의 없지만, Pb의 농도가 207 mg/kg부터 감소하는 경향을 확인하였다(Fig. 4b). Zn에서의 체중 감소는 다른 중금속에 비해 배경 토양보다 감소율이 가장 큰 것으로 확인되었다(Fig. 4c). 또한, 다른 중금속에 비해 지렁이 움직임이 매우 작았으며, 이는 기본적으로 지렁이가 활동하는데 있어 토양 내 Zn의 존재가 장애가 되는 것으로 지렁이의 외부 영향보다는 소화기관이나 감각기관에 영향을 미친 것으로 판단된다. Saxe *et al.* (2001)과 Vijver *et al.* (2005)의 연구에서 중금속의 독성은 소화기관을 통해 발현되는 것으로 연구되었으며, Hirano and Tamae (2011)의 연구에서는 중금속이 ROS (reactive oxygen species)를 발생시킴으로써 소화기관의 세포막이 손상되어 독성이 나타난 것으로 조사되었다. 소화기관에 큰 영향을 미치는 중금속을 비교 평가한 연구는 없지만, 본 연구에서의 체중 감소와 움직임에 대한 연구 결과를 통해 3종의 중금속 중 Zn이 가장 큰 영향을 미친 것으로 판단된다.

3.4. 생물축적농도(BAF)

중금속 오염 토양 내 지렁이의 활동으로 인한 생체 내 축적되는 농도를 7일간 노출시간 후 농도별 BAF의 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 배경 토양 내 Cd가 검출되지 않아서 BAF 결과를 도출할 수 없었으며(Fig. 5a), Pb의 경우 최고농도 토양에서 치사율이 100%가 되어 지렁이 내 농도를 얻을 수 없었다(Fig. 5b). Cd, Pb, Zn 중 BAF가 가장 높은 중금속은 Cd, Zn, Pb의 순으로 높은 것으로 나타났고, Pb는 농도 증가에 따른 변화는 거의 없는 것으로 확인되었다. Wang *et al.* (2018)의 연구에서도 Cd,

Zn, Pb의 순으로 BAF가 높은 것으로 연구되었다. Cd의 BAF는 지렁이의 움직임과 유사한 경향성을 띠는 것으로 조사되었는데, 초기에 BAF가 가장 높고 농도가 증가할수록 감소하다가 고농도에서는 다시 BAF가 증가하는 양상을 확인하였다(Fig. 5a). 이는 Cd가 토양에서의 이동도가 크고 생물 체내에 흡수가 잘되는 특징이 있기 때문이다. 일반적으로 Cd는 체내에 축적이 될 경우 metallothionein-bound 형태로 결합이 되며, 이 형태는 저농도에는 체내 축적 시간에 크게 영향을 주지 않지만 농도가 높아지게 된다면 체내 축적 시간을 지연시키는 특성이 있다(Klaassen *et al.*, 2009). 이로 인해 Cd의 저농도에서는 BAF가 감소하는 경향이 나타나지만, 고농도에서는 metallothionein-bound Cd 형태로 결합이 되지 않고 임계효과(critical effect)와 BAF가 급증되는 양상이 나타난 것으로 판단된다(Conder and Lanno, 2002). Pb는 일반적으로 토양에 강하게 흡착되며, 특히 점토광물이나 유기물의 작용기와 반응하여 토양 내 이동도가 매우 낮다. 지렁이의 먹이 활동을 통해 섭취되는 토양 내 Pb는 강한 결합으로 이루어져 있기 때문에 약산성의 소화기관 (pH 4.8-6.1) 내에서 용출되지 않고 대부분 그대로 배출되는 것으로 판단된다(Räty and Huhta, 2003). 이러한 이유로 Pb의 농도가 증가하여도 체내의 Pb 농도가 변화 없는 것이다(Fig. 5b). Zn의 경우, 토양 내 농도가 증가함에 따라 BAF가 감소하는 것으로 확인되었다(Fig. 5c). Zn은 Pb와 Cd와는 달리 생물체 내 필수 원소로 체내 흡수가 잘되는 원소이며, 이러한 필수 원소는 낮은 농도에서는 생물체에 큰 장애를 발생시키지 않는다. 하지만 과도한 Zn의 섭취로 인해 독성물질로 인지되어 이를 길항하기 위해 물질대사 활동이 활발히 일어나 배설물 양이 증가되어 BAF가 낮아지는 것으로 판단된다(Gao *et al.*, 2015).

Fig. 5. Bioaccumulation factor (BAF) computed by the concentrations measured in the earthworm body divided by those in soil. (a) Cd, (b) Pb, (c) Zn.

Fig. 6. The half maximal effective concentration (EC50) of Pb estimated by the results of real-time monitoring of earthworm movement.

3.5. EC50의 독성 값

지렁이 움직임은 토양 생태 독성에 대해 평가할 수 있는 지표로 지렁이 움직임의 누적 횟수를 통해 투여량-반응(dose-response) 관계와 EC50의 독성 값을 도출할 수 있다. Pb에 대한 EC50 값을 도출하였지만, Cd의 경우에는 EC50 값을 구하지 못하였다. Cd로 오염된 토양 내 지렁이 움직임은 앞서 언급한 바와 같이 Cd의 농도 변화에 따라 증가와 감소가 동시에 발생되었기 때문에 투여량(dose)인 지렁이 움직임의 누적 횟수를 y축으로 이용할 수가 없기 때문에 독성 값이 도출되지 않았다. Pb로 오염된 토양에서의 지렁이 움직임 감지 결과로부터 EC50 값은 751.2 mg/kg로 산정되었다(Fig. 6). 지렁이 움직임의 지표의 EC50 값은 본 연구에서 처음으로 제안하기 때문에 비교할 수 없지만 유사한 토양 생태독성 평가 방법인 지렁이 회피 테스트를 통해 도출된 EC50 값과 비교 가능하다. Syed *et al.* (2016)의 연구에서는 *Eisenia fetida*의 중을 이용하여 회피 테스트를 통해 EC50 값을 831 mg/kg으로 도출하였으며, 본 연구와 다른 평가 방법으로 EC50 값을 도출하였지만 유사한 결과가 나타난 것으로 확인되었다. Lee *et al.* (2019)의 연구에서도 *ViSSET*을 이용하여 Zn의 EC50 값을 340.97 mg/kg로 도출하였고, Lukkari and Haimi (2005)의 EC50 값인 439 mg/kg와 유사한 결과를 확인하였다. *ViSSET*을 통해 도출된 Zn과 Pb의 EC50 값이 기존의 연구 결과들과의 유사성을 가지는 의미는 지렁이 움직임의 토양 생태 독성을 평가할 수 지표임을 시사하는 것이다.

4. 결 론

본 연구는 중금속의 종류에 따라 지렁이 움직임 특성에 어떻게 독성이 발현되는지 규명하기 위해 *ViSSET*을 이용하였다. 그리고 보다 명확한 독성 발현 메커니즘을 규명하기 위해 지렁이 움직임의 누적 횟수, 실험 전후의 체중 변화, 생물축적농도를 구하였다. 실시간으로 지렁이 움직임을 모니터링한 결과, 농도가 증가할수록 Cd은 복합적 양상(감소 후 증가), Pb은 증가 양상, Zn은 감소하는 양상을 확인할 수 있었다. 특히 Pb로 오염되는 토양에서의 지렁이 움직임의 횟수가 다른 중금속에 비해 매우 높게 나타났고, Zn은 지렁이 움직임이 거의 없는 것으로 나타났다. 실험 전후의 체중 변화는 Zn이 가장 감소율이 높고, Cd와 Pb는 유사한 것으로 조사되었다. 그리고 BAF은 Cd, Zn, Pb의 순으로 높게 나타났으며, Pb는 농도 증가에 따라 BAF의 변화가 거의 없는 것으로 조사되었다.

세 종의 중금속에 대한 지렁이의 독성 발현 메커니즘을 정리하면, Cd는 생체 내 축적이 잘되는 물질이며, metallothionein-bound 형태로 결합하고 장기간 축적된다. 또한 고농도에서는 임계효과(critical effect)에 의한 쇼크가 발생되어 지렁이 움직임에 악영향을 주는 것으로 나타났다. Pb는 생물축적농도가 매우 낮은 것으로 조사되었는데, 이는 섭취로 인한 독성이 아닌 피부 자극이나 감각기관의 손상으로 인한 독성 영향으로 인해 지렁이 움직임의 횟수가 급증하는 것으로 판단된다. Zn은 생물체 내 필수 원소로 생체 내 축적되면서 소화기관의 세포막 손상과 물질대사 활동을 활발히 일으켜 배설물의 양이 증가되며, 이로 인해 지렁이 움직임의 최소화 및 체중이 크게 감소하는 것을 확인하였다. 지렁이 움직임을 통해 Pb의 EC50 값은 751.2 mg/kg로 기존 연구와 유사하게 나타났으며, EC50 값을 도출하는데 있어 지렁이 움직임의 경향성이 유효하게 이용될 수 있음을 확인하였다. 본 연구에서 제안한 지렁이 움직임에 대한 실시간 모니터링 결과와 기존에 이용되어 온 지렁이 행태 특성 지표를 통합하여 해석하면 중금속 오염물질의 생태독성 발현 메커니즘을 보다 더 효과적으로 규명할 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 2018년도 교육부 국립대학육성사업 기초·보호 학문분야 학문후속세대 양성사업 연구비 지원에 의하여 수행되었다(2018-0970).

References

- Alloway, B.J. (1995) Heavy Metals in Soils, Blackie, Wiley, New York, p.38-57.
- Brulle, F., Mita, G., Leroux, R., Lemire, S., Leprtre, A. and Vandebulcke, F. (2007) The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism?. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, v.144, p.334-341. doi: 10.1016/j.cbpc.2006.10.007.
- Chen, C., Wang, Y., Qian, Y., Zhao, X. and Wang, Q. (2015) The synergistic toxicity of the multiple pollutant mixtures: implications for risk assessment in the terrestrial environment. *Environ. Int.*, v.77, p.95-105. doi: 10.1016/j.envint.2015.01.014.
- Choi, S., Pak, S.J., Lee, P. and Kim, C.S. (2004) An overview of geoenvironmental implications of mineral deposits in Korea. *Econ. environ. geol.*, v.37, p.1-19.
- Conder, J.M., Seals, L.D. and Lanno, R.P. (2002) Method for determining toxicologically relevant cadmium residues in the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, v.49, p.1-7. doi: 10.1016/s0045-6535(02)00192-3.
- Davies, B.E. (1983) Heavy metal contamination from base metal mining and smelting: implications for man and his environment. In I. Thornton (Ed.), *Applied environmental geochemistry*, pp.425-460. London: Academic.
- Davies, B.E. and Jones, L.H.P. (1988) Micronutrients and toxic elements in Russell's Soil Conditions and Plant Growth. A. Wild, Ed., pp.781-814, JohnWiley & Sons; Interscience, New York, NY, USA, 11th edition.
- EPA (Environmental Protection Agency) (2012) Ecological Effects Test Guidelines, OCSPP 850.3100: Earthworm Subchronic Toxicity Test. Washington, D.C., USA.
- Frankenbach, S., Scheffczyk, A., Jnsch, S. and Rmbke, J. (2014) Duration of the standard earthworm avoidance test: Are 48 h necessary?. *Appl. Soil Ecol.*, v.83, p.238-246. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.04.006.
- Gao, M., Qi, Y., Song, W. and Zhou, Q. (2015) Biomarker analysis of combined oxytetracycline and zinc pollution in earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, v.139, p.229-234. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.06.059.
- Greany, K.M. (2005) An assessment of heavy metal contamination in the marine sediments of Las Perlas Archipelago, Gulf of Panama. M.S. thesis, School of Life Sciences Heriot-Watt University, Edinburgh, Scotland, 2005.
- Hirano, T. and Tamae, K. (2011) Earthworms and Soil Pollutants. *Sensors*, v.11, p.11157-11167. doi: 10.3390/s111211157.
- Irizar, A., Rodrguez, M.P., Izquierdo, A., Cancio, I., Marigmez, I. and Soto, M. (2015) Effects of soil organic matter content on cadmium toxicity in *Eisenia fetida*: implications for the use of biomarkers and standard toxicity tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.68, p.181-192. doi: 10.1007/s00244-014-0060-4.
- ISO (International Organization for Standardization) (2008) Soil Quality—Avoidance Test for Evaluating the Quality of Soils and the Toxicity of Chemicals. Test with Earthworms (*Eisenia fetida*/andrei). ISO 17512-1, Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization) (2012a) Soil Quality—Effects of Pollutants on Earthworms. Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. ISO 11268-1, Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization) (2012b) Mechanical vibration of rotating and reciprocating machinery — Requirements for instruments for measuring vibration severity. ISO 2954, Geneva, Switzerland.
- Klaassen, C.D., Liu, J. and Diwan, B.A. (2009) Metallothionein Protection of Cadmium Toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.238, p.215-220. doi: 10.1016/j.taap.2009.03.026.
- Lee, W., Lee, S., Jeon, J., Jung, H. and Kim, S. (2019) A novel method for real-time monitoring of soil ecological toxicity—Detection of earthworm motion using a vibration sensor. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.185, p.109677. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109677.
- Lu, A., Zhang, S. and Shan, X. (2005) Time effect on the fractionation of heavy metals in soils. *Geoderma*, v.125, p.225-234. doi: 10.1016/j.geoderma.2004.08.002.
- Lu, Y., Song, S., Wang, R., Liu, Z., Meng, J. Sweetman, A.J., Jenkins, A., Ferrier, R.C., Li, H., Luo, W. and Wang, T. (2015) Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. *Environ. Int.*, v.77, p.5-15. doi: 10.1016/j.envint.2014.12.010.
- Lukkari, T. and Haimi, J. (2005) Avoidance of Cu- and Zn-contaminated soil by three ecologically different earthworm species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.62, p.35-41. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.11.012.
- McLaughlin, M.J., Hamon, R.E., McLaren, R.G., Speir, T.W. and Rogers, S.L. (2000) Review: a bioavailability-based rationale for controlling metal and metalloid contamination of agricultural land in Australia and New Zealand. *Australian J. Soil Res.*, v.38, p.1037-1086. doi: 10.1071/SR99128.
- MOE (2007) The Korean Standard Test (KST) Methods for Soils. Korean Ministry of Environment, Gwachun, South Korea.
- OECD (1984) OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 207, Earthworm Acute Toxicity. OECD, Paris, France.
- Ogundiran, M.B. and Osibanjo, O. (2009) Mobility and speciation of heavy metals in soils impacted by hazardous waste. *Chem. Speciat. Bioavailab.*, v.21, p.59-69. doi: 10.3184/095422909X449481.
- Owojori, O.J. and Reinecke, A.J. (2009) Avoidance behaviour of two eco-physiologically different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) in natural and artificial saline soils. *Chemosphere*, v.75, p.279-283. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.051.
- Park, J. and Choi, K. (2013) Risk assessment of soil, water and crops in abandoned Geumryeong mine in South Korea. *J. Geochem. Explor.*, v.128, p.117-123. doi: 10.1016/j.gexplo.2013.02.004.
- Rty, M. and Huhta, V. (2003) Earthworms and pH affect communities of nematodes and enchytraeids in forest soil. *Biol. Fertil. Soils*, v.38, p.52-58. doi: 10.1007/s00374-003-0614-5.
- Rosen, C.J. (2002) Lead in the home garden and urban soil environment. Communication and Educational Technology Services, University of Minnesota Extension, 2002.

- Sanchez-Hernandez, J.C., Ríos, J.M., Attademo, A.M., Malcevski, A. and Caresa, X.A. (2019) Assessing biochar impact on earthworms: Implications for soil quality promotion. *J. Hazard. Mater.*, v.366, p582-591. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.12.032.
- Sarmah, R., Kanta, S., hagabati, B., Dutta, R., Nath, D., Pokhrel, H., Mudoi, L.P., Sarmah, N., Sarma, J., Ahmed, A.M., Nath, R.J., Ingtipi, L. and Kuotsu, K. (2020) Toxicity of a synthetic phenolic antioxidant, butyl hydroxytoluene (BHT), in vertebrate model zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Aquaculture Research*, v.51, p.3839-3846. doi: 10.1111/are.14732.
- Saxe, J.K., Impellitteri, C.A., Peijnenburg, W.J. and Allen, H.E. (2001) Novel model describing trace metal concentrations in the earthworm *Eisenia andrei*. *Environ. Sci. Technol.*, v.35, p.4522-4529. doi: 10.1021/es0109038.
- Syed, Z., Alexander, D., Ali, J., Unrine, J. and Shoults-Wilson, W.A. (2017) Chemosensory cues alter earthworm (*Eisenia fetida*) avoidance of lead-contaminated soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.36, p.999-1004. doi: 10.1002/etc.3619.
- Uwizeyimana, H., Wang, M., Chen, W. and Khan, K. (2017) The eco-toxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.55, p.20-29. doi: 10.1016/j.etap.2017.08.001.
- de la Vega, A.C.S., Cruz-Alcalde, A., Mazón, C.S., Martí, C.B. and Diaz-Cruz, M.S. (2021) Nano-TiO₂ Phototoxicity in Fresh and Seawater: *Daphnia magna* and *Artemia sp.* as Proxies. *Water*, v.13, p.55. doi: 10.3390/w13010055.
- Vijver, M.G., Wolterbeek, H.T., Vink, J.P. and van Gestel, C.A. (2005) Surface adsorption of metals onto the earthworm *Lumbricus rubellus* and the isopod *Porcellio scaber* is negligible compared to absorption in the body. *Sci. Total Environ.*, v.340, p.271-280. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.12.018.
- Wang, Y., Wu, Y., Cavanagh, J., Yiming, A., Wang, X., Gao, W., Matthew, C., Qiu, J. and Li, Y. (2018) Toxicity of arsenite to earthworms and subsequent effects on soil properties. *Soil Biol. Biochem.*, v.117, p.36-47. doi: 10.1016/j.soilbio.2017.11.007.
- Wcislo, E., Bronder, J., Bubak, A., Rodríguez-Valdés, E. and Gallego, J.L.R. (2016) Human health risk assessment in restoring safe and productive use of abandoned contaminated sites. *Environ. Int.*, v.94, p.436-448. doi: 10.1016/j.envint.2016.05.028.
- Wegglar, K., McLaughlin, M.J. and Graham, R.D. (2004) Effect of Chloride in Soil Solution on the Plant Availability of Biosolid-Borne Cadmium. *J. Environ. Qual.*, v.33, p.496-504. doi: 10.2134/jeq2004.4960.
- Wijayawardena, M.A.A., Megharaj, M. and Naidu, R. (2017) Bioaccumulation and toxicity of lead, influenced by edaphic factors: using earthworms to study the effect of Pb on ecological health. *J. Soils and Sediment.*, v.17, p.1064-1072. doi: 10.1007/s11368-016-1605-0.
- Wuana, R.A. and Okieimen, F.E. (2011) Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *International Scholarly Research Network*, v.2011, p.1-20. doi: 10.5402/2011/402647.
- Yang, G., Chen, C., Yu, Y., Zhao, H., Wang, W., Wang, Y., Cai, L., He, Y. and Wang, X. (2018) Combined effects of four pesticides and heavy metal chromium (VI) on the earthworm using avoidance behavior as an endpoint. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.157, p.191-200. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.067.
- Yoon, J.K., Kim, D.H., Kim, T.S., Park, J.G., Chung, I.R., Kim, J.H. and Kim, H. (2009) Evaluation on natural background of the soil heavy metals in Korea. *J. Soil Groundwater Env.*, v.14, p.32-39.
- Yu, S. and Lanno, R.P. (2010) Uptake kinetics and subcellular compartmentalization of cadmium in acclimated and unacclimated earthworms (*Eisenia andrei*). *Environ. Toxicol. Chem.*, v.29, p.1568-1574. doi: 10.1002/etc.183.
- Zahran, S., Mielke, H.W., McElmurry, S.P., Filippelli, G.M., Laidlaw, M.A.S. and Taylor, M.P. (2013) Determining the relative importance of soil sample locations to predict risk of child lead exposure. *Environ. Int.*, v.60, p.7-14. doi: 10.1016/j.envint.2013.07.004.