한국환경과학회 가을 학술발표회지 제14권(제2호), 185~188, 2005
Proceedings of the Korean Environmental Sciences Society Conference, Nov, 18~19, 2005

OF1) 전남지역 생활하수처리장과 농공단지폐수처리장 방류수에 대한 세포독성 평가
- XTT, SRB *in vitro* bio-assay를 이용한 -

이문희, 한상국
목포해양대학교 해양시스템공학과 해양환경공학전공

1. 서 론

산업의 발달과 농업의 생산력 증대, 인구 증가 등으로 과거에 사용하지 않았던 화학물질들의 사용 증가와 제품생산 과정이나 처리공정 중 생성되는 2차 생성물들에 의해 처리장에 유입되는 하·폐수들의 성상이 더욱 다양해지면서 미처리물질들에 의한 오염가능성이 제시되어지고 있다(오승민 등, 2004). 그러나 현재 국내 각 하수처리장과 농공단지 폐수처리장에서는 표준 활성오니법 등의 일반적인 처리공정을 이용하여 BOD, COD, SS, 페놀류 등 오염물질 25종에 대해서는 법적기준치 이하로 처리하여 방류하고 있는 실정이나 난분해성 오염물질 등에 대한 처리효율은 미비한 실정이다. 또한 이들 난분해성 오염물질들은 지용성, 생물농축 특성을 가지고 있어 미량으로도 인체나 생태계에 악영향을 미칠 수 있는 물질들이나 현재 이런 오염원들에 대한 생물학적 독성 평가 연구가 부족하다.

따라서, 본 연구에서는 전남지역 하수처리장 및 농공단지폐수처리장 9곳을 선정하여 방류수의 화학적 분석 결과(이문희 등, 2004)를 바탕으로 XTT, SRB *in vitro* bio assay를 이용하여 영산강유역 방류수의 독성평가를 하였다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. 시료와 추출농축

본 실험에 사용된 시료는 광주하수(표준활성오니법, 600,000㎥/d), 광주 송대하수(표준활성오니법, 120,000㎥/d), 나주하수(표준활성오니법, 22,500㎥/d), 장성하수(회전원판접촉법, 11,000㎥/d), 화순하수(회전원판접촉법, 11,000㎥/d)의 생활하수처리장의 방류수, 광주소촌농공(장기폭기법, 600㎥/d), 영암신북(표준활성오니법, 1,200㎥/d), 담양금성(표준활성오니법, 1,300㎥/d), 화순동면(표준활성오니법, 750㎥/d)의 농공단지폐수처리장의 방류수를 sep-pak C18 columnn에 2ℓ 통수 시키고 메탄올, 헥산, 디클로메탄 20㎖로 추출한 후 5㎖로 감압 농축한다. 그 후 질소 pugging하여 DMSO 2㎖로 농축하고 실험 이용 전까지 -20℃에 보관한다.

2.2. Hep 3B 및 L929 cell culture

세포의 배지를 흡입 제거하고 PBS(-) 완충액을 5~6㎖를 분주하여 세척하고, 0.25% 트립신용액을 500㎕/flask로 주입한다. 세포가 flask바닥에서 떨어져 나오면 배지 5㎖를 넣어 피펫팅하여 15㎖ 원심튜브에 주입하여 원심분리한다. 세포가 침전되어 있는 원심튜브에 배지

를 넣고 피펫팅하여 세포를 단일화하여 세포수를 계측한다. 세포수가 5×10^4 cell/flask가 되도록 seeding한 후 5% CO_2 37℃ incubator에서 2~3일 배양한다.

2.3. XTT assay

세포수가 10^4 cell/well가 되게 하여 96well plate에 seeding한다. Well에 세포 주입 24시간 후 배지를 교환하고 sample을 주입한다. 24시간 동안 5% CO_2 37℃ incubator에서 배양하고 XTT reagent를 well당 50㎕씩 주입한다. 2시간 동안 5% CO_2 37℃ incubator에서 배양하고 ELISA(490nm-690nm)로 측정한다.

2.4. SRB assay

세포수가 10^4 cell/well가 되게 하여 96well plate에 seeding한다. Well에 세포 주입 24시간 후 배지를 교환하고 sample을 주입한다. 세포 고정을 위해 10% TCA를 well당 100㎕씩 주입하여 고정시키고 수돗물로 5회 이상 세척한다. 완전건조 후 0.4% SRB를 well당 100㎕씩 주입하고 실온에서 30분간 염색시킨다. 염색 후 1% acetic acid로 세척하고 완전건조 시킨다. 건조 후 well당 100㎕씩 10mM Tris buffer를 주입하여 세포를 용출시키고 ELISA 565nm-690nm)로 측정한다.

3. 결과 및 고찰

5지점의 생활하수와 4곳의 농공단지 폐수처리장 방류수의 화학분석 결과 생활하수는 광주와 광주송대하수처리장, 농공단지폐수처리장 방류수는 영암신북과 광주소촌농공단지폐수처리장 방류수에서 오염도가 가장 심각하게 나타났다. 이 네 지점의 세포독성 결과를 Fig. 1.와Fig. 2.에 나타났다. 세포독성 실험법에 상관없이 각 시료에 대한 세포독성 발현이 비슷한 양상을 나타내었다. 특히, 사람 간암세포인 Hep3B 세포에서는 시료 원액에서는 50%이상의 세포독성이 나타났으며 시료 원액을 1/100로 희석했을 경우에도 20% 이상의 세포독성

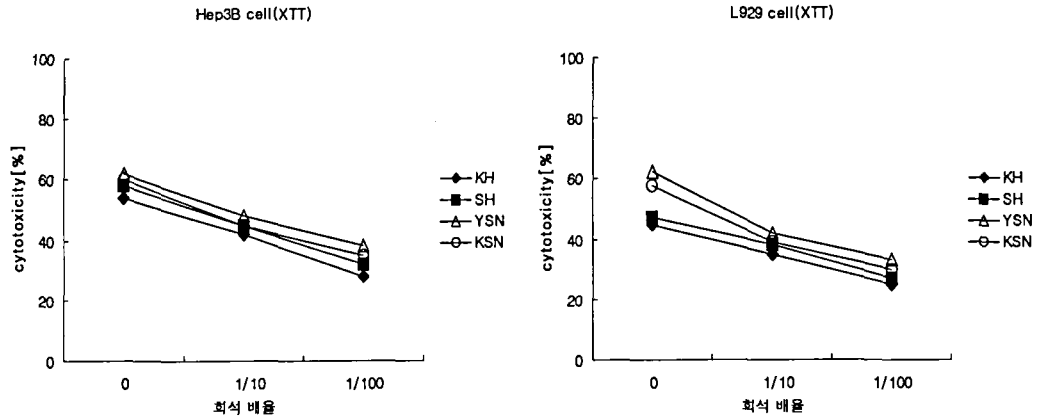

Fig. 1. 4지점의 방류수를 XTT assay를 이용하여 Hep3B와 L929 cell에서의 세포독성(n=2) (KH: 광주하수처리장 방류수, SH: 광주송대하수처리장 방류수, YSN: 영암신북 농공단지폐수처리장, KSN: 광주소촌농공단지폐수처리장 방류수)

결과가 나타났다. 생쥐 섬유모세포인 L929 세포에서는 농공단지 폐수처리장에서의 세포독성이 생활하수처리장에서의 세포독성보다 높게 나타났다. 또한 화학분석 결과와 세포독성 결과가 일치함을 알 수 있었다.

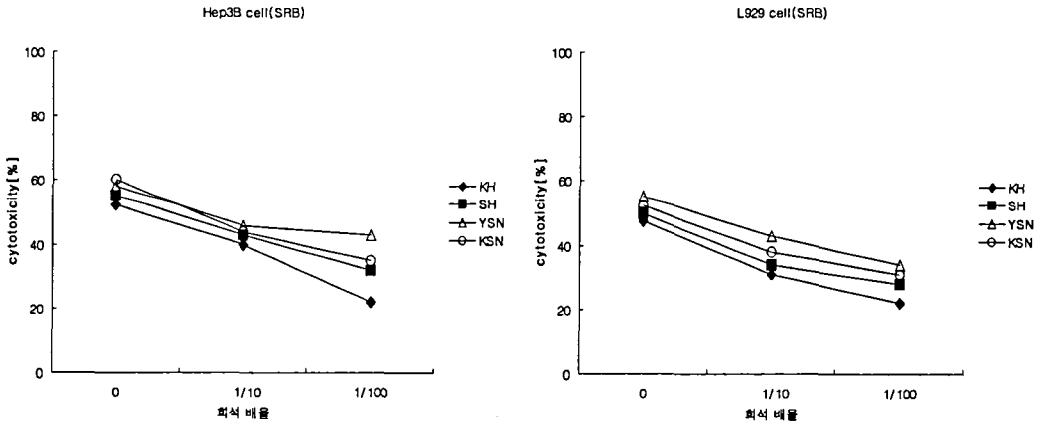

Fig. 2. 4지점의 방류수를 SRB assay를 이용하여 Hep3B와 L929 cell에서의 세포독성(n=2) (KH: 광주하수처리장 방류수, SH: 광주송대하수처리장 방류수, YSN: 영암신북 농공단지폐수처리장, KSN: 광주소촌농공단지폐수처리장 방류수)

4. 요 약

XTT assay와 SRB assay를 이용하여 Hep3B와 L929 세포에서 생활하수처리장과 농공단지폐수처리장 방류수의 세포독성을 알아본 결과 다음과 같은 결론를 얻었다.

1) XTT, SRB 실험법에 적용하여 대표적인 발암성 물질인 Benzo(a)Pyrene의 세포독성을 평가 할 수 있었다. Benzo(a)Pyrene 30uM농도는 Hep 3B와 L929 세포에서 약 50%의 세포독성을 나타내었다.
2) 단백질합성과 세포호흡의 활성도로 세포독성을 평가할 수 있는 실험법인 XTT와 SRB 실험법에 적용하여 방류수를 추출 농축한 실제 시료에 대한 세포독성을 평가할 수 있었다.
3) 생활하수처리장의 방류수에 비해 다종 고농도의 화학물질로 오염되어있는 농공단지폐수처리장 방류수에서의 독성발현이 더 높았다.
4) 생활하수처리장 방류수와 농공단지폐수처리장 방류수 중 오염도가 가장 심각한 4지점의 화학물질 분석 결과와 *in vitro* bio-assay에 의한 세포독성 결과가 일치하였다.

참 고 문 헌

오승민, 김기서, 유병택, 장형석, 이희성, 정규혁, 2004, 산업폐수처리장 방류수의 내분비계 장애작용 평가, 한국환경독성학회, 19(4), 375~382

이문희, 한상국, 2004, 영산강 유역 방류수의 유기오염물질의 특성 규명, 한국환경과학회, 춘계학술발표회 발표논문집, 274~275

나진성, 김상돈, 안광국, 장남익, 2005, 폐수처리장의 전 방류수 독성 평가 및 방류수 배출하천의 생지표도 영향분석, 대한환경공학회, 27(4), pp.353~361.

K.P. Putnam, D.W. Bombick, D.J. Doolittle, 2002, Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate, Toxicology in vitro, 16, 599~607

강병수, 이갑득, 2002, 합환근의 항산화효과와 간암세포에 대한 세포독성, 응용약물학회지, 10, 287~292.