

미생물의 비성장속도와 지연기의 측정을 통한 유해오염물질의 독성검사

양진우 · † 장덕진

명지대학교 화학공학과

(접수 : 1998. 5. 4., 게재승인 : 1998. 6. 29.)

Toxicity Evaluation of Hazardous Contaminants by Measuring Lag Periods and Specific Growth Rates of a Test Microorganism

Jinwoo Yang and Deokjin Jahng†

Department of Chemical Engineering, Myongji University, Yongin, Kyonggi 449-728, Korea

(Received : 1998. 5. 4., Accepted : 1998. 6. 29.)

Among 31 water-born microbial strains isolated from various sites in Korea, strain DJ-4 was selected as a test organism for toxicity measurements in that its growth was completely inhibited by the presence of 688.4 mg/L of chloroform and 297.5 mg/L of toluene in the liquid LB medium whereas others did not. It was observed that lag periods and specific growth rates of DJ-4 batch vial cultures were prolonged and decreased, respectively, by phenol, benzene, toluene, ethylbenzene, *p*-xylene, perchloroethylene, trichloroethylene, and chloroform at the concentrations between 3.6 and 417.8 mg/L. These changes were found to be linear with respect to the concentrations of the toxic compounds. From the first-order regression equations, 50% effective concentrations (EC_{50} , for concentrations of toxic compounds causing 50% decrease of specific growth rates and EC_{50lag} for 50% increase of length of lag periods) were calculated for each compounds. By comparing DJ-4 EC_{50} values with *Daphnia* LC50's from a literature for benzene, ethylbenzene, toluene, and trichloroethylene, it was concluded that microbial specific growth rates could be a new, fast, and reliable parameter for toxicity tests.

Key Words: toxicity test, microorganism, growth curve, specific growth rate, lag period

서론

환경오염, 특히 수질오염에 대한 관심은 생물학적 산소요구량(biological oxygen demand; BOD), 화학적 산소요구량(chemical oxygen demand; COD), 현탁고형물(suspended solid, SS) 등의 수질기준에서 알 수 있는 바와 같이, 유기물이나 수계의 부유물에 초점이 맞추어져 있었다. 그러나 최근에 이르러서는 수질오염 정도를 평가할 때 기존의 검사항목과 더불어 독성의 측정이 점차 더 요구되고 있는데, 그것은 물리, 화학적 측정만으로는 오염물질이 수생생태계에 미치는 잠재적 영향을 완전하게 평가할 수 없기 때문이다. 특히 공업의 확산과 이에 따른 화학물질의 사용량이 증대됨에 따라, 유해물질, 특히 공장이나 기타 시설의 폐수처리과정에서 방류되는 처리수에 함유된 독성물질의 관리에 대한 관심이 확대되어 왔으며, 유해한 화학물질의 사용이 계속 증대되고 있을 뿐 아니라 앞으로도 그러한 추세가 계속

될 것으로 예상되기 때문에 독성의 측정과 관리는 수자원과 인간 건강 관리 측면에서 매우 중요하다고 할 수 있다. World-watch Institute에 따르면, 전세계적으로 매일 70,000여 가지의 합성화학물질이 사용되고 있으며, 매년 500-1,000 가지의 새로운 합성물질이 탄생한다고 한다(1) 우리 나라의 경우에도 약 30,000 종의 화학물질이 사용되고 있다고 알려져 있어(2), 수계에 포함된 독성물질의 검출 및 관리는 국민 건강보호 측면에서 매우 긴요한 문제이다.

수계에 포함된 독성물질의 검출 시에 화학적 분석장비인 GC나 HPLC를 사용하는 것은 정량적인 면에서 정확성을 기할 수 있겠으나, 미지의 다양한 물질이 함유되어 있는 경우에는 물질의 농도와 농도의 산출에 막대한 시간이 필요하게 되어, 하천이나 공장의 폐수와 같이 연속적인 흐름이 유지되는 경우에는 검출의 신속성 면에서 적합한 방법이 되기 어렵다. 따라서 현재 전세계적으로 하·폐수, 처리수에 함유된 독성을 측정할 때에는 독성물질에 대해 측정 가능한 예민한 반응을 보이는 생물체를 사용하고 있다(3).

생물체를 폐수의 독성검사에 사용하는 bioassay 방법은, 독성 검사 결과를 얻기까지 지표생물이 거치게 되는 성장주기(life cycle)의 수에 따라 크게 준만성 독성(subchronic toxicity) 측정법과 급성독성(acute toxicity) 측정법으로 나눌 수 있다. 준만성

† Corresponding author : Department of Chemical Engineering, Myongji University, San38-2, Nam-dong, Yongin, Kyonggi 449-728, Korea.

Tel . 0335-30-6340, Fax . 0335-37-1920

e-mail: djahng@wh.myongji.ac.kr

독성 측정 시에는 대개 4-8일 동안의 배양을 통하여 시료에 함유된 독성이 지표생물의 생존, 성장, 증식에 미치는 영향을 조사하며, 지표생물로는 *Selenastrum capricornutum*와 같은 조류나 *Pimephales promelas* 등의 물고기가 흔히 사용되는데, 시료내 독성의 정도는 측정변수의 50% 감소를 야기시키는 유효농도(50% effective concentration, EC50)나 생존율(mortality)의 50% 감소를 유발하는 치명농도(50% lethal concentration, LC50)로 표시하며, 급성독성측정법에서는 대개 24-96 시간 동안 이류, 새우(예, *Mysidopsis bahia* 등), 동물성플랑크톤(예, *Daphnia magna* 등) 등의 지표생물을 독성이 포함된 시료에 노출시킨 후 배양중점에서의 LC50를 측정한다(4). 이들 방법에서 사용하는 지표종은 모두 인간과 마찬가지로 진핵생물들로서, 효과적인 독성시험법이 되기 위해서는 이들 지표종이 독성에 노출되었을 때 나타나는 특정한 생체반응을 쉽게 측정할 수 있어야 하고 빠른 시간 내에 독성의 영향이 나타나야 한다는 특징을 만족해야 하나, 측정에 소요되는 시간이 미생물에 비하여 길다는 문제점을 지니고 있다.

이런 문제를 해결하기 위하여 개발되어 1980년부터 폐수의 독성 측정에 광범위하게 이용되고 있는 Microtox 측정법은 해양 발광세균인 *Vibrio fischeri*(*Photobacterium phosphoreum*)을 지표종으로 사용하여 독성에 의해 발광강도의 세기를 측정함으로써 상대적인 독성을 산출하는 방법으로서, 발광강도의 50% 감소를 유발하는 농도인 EC50의 측정을 통하여 독성의 정도를 추정하고 있다(5) Microtox는 수분 이내에 EC50를 구할 수 있어 그 사용이 점차 확대되는 추세에 있으나 지표종인 *Vibrio fischeri*를 시료 내에서 배양하면서 지표생물의 성장이나 증식과정에 독성이 미치는 영향을 파악하는 것이 아니기 때문에 앞서 언급한 준만성 또는 급성독성 측정법과는 다른 결과를 나타낼 가능성이 있다(3)

본 연구에서는 여러 가지 독성물질에 민감한 미생물 균주를 지표종으로 선정하고 이 지표미생물이 독성에 노출되었을 때 비성장속도와 성장곡선의 지연기에 어떤 영향을 미치는지 조사하여, 그 결과를 표준 방법 중 하나인 *Daphnia*를 지표종으로 사용했을 때 얻어진 결과와 비교함으로써, 이 방법이 새롭고 신속하며 간편한 독성시험법이 될 수 있는지 판단하고자 하였다. 미생물은 성장속도가 현재 사용중인 진핵지표생물에 비하여 월등히 높아 하루 정도의 배양만으로도 준만성 내지는 만성 독성측정법에서 요구하는 증식주기(life cycle)수를 만족시킬 수 있으므로 Microtox 측정법에서 발생할 수 있는 오류를 감소시킬 수 있고, 다른 독성측정법에 비하여 짧은 시간 내에 측정결과를 얻을 수 있으므로 신속성 면에서도 유리한 점이 있다고 기대된다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

유해물질의 독성에 대해 민감한 반응을 보이는 미생물 균주를 선택하기 위하여, 한강, 낙동강, 영산강 및 폐수처리장의 sludge 등으로부터 분리된 31 종의 미생물을 대전대학교 환경공학과 김명운 교수로부터 입수하였으며(Table 1), 이들 균주를 LB 배지에서 (Bacto trypton 10g/L, Bacto yeast extract 5g/L, NaCl 10g/L) 배양하였다. 배양시 용기는 43 mL 갈색 vial (Fisher Scientific)을 사용하였고, 여기에 10mL의 LB배지를 분

Table 1 Microorganisms isolated from different sites in Korea and concentrations of chloroform, methylene chloride and toluene for complete inhibition of cell growth.

Strain No.	Source	Growth Inhibition Conc. (mg/L)		
		CHCl ₃	CH ₂ Cl ₂	Toluene
1	Nakdong river	>835.5	>386.0	>495.9
2	Pochun	>835.5	>386.0	>495.9
3	Nakdong river	835.5	>386.0	297.5
4	Youngsan river	668.4	>386.0	297.5
5	Nakdong river	>835.5	>386.0	>495.9
6	Youngsan river	>835.5	>386.0	>495.9
7	Nakdong river	>835.5	>386.0	>495.9
8	Youngsan river	>835.5	>386.0	>495.9
9	Youngsan river	>835.5	>386.0	>495.9
10	Han river	>835.5	>386.0	>495.9
11	Han river	>835.5	>386.0	>495.9
12	Waste water	>835.5	>386.0	>495.9
13	Waste water	>835.5	>386.0	>495.9
14	Waste water	>835.5	>386.0	>495.9
15	Waste water	>835.5	>386.0	>495.9
16	Sludge	>835.5	>386.0	>495.9
17	Sludge	>835.5	>386.0	>495.9
18	Sludge	>835.5	>386.0	>495.9
19	Sludge	>835.5	>386.0	>495.9
20	Sludge	>835.5	>386.0	>495.9
21	Nakdong river	>835.5	>386.0	>495.9
22	Han river	>835.5	>386.0	>495.9
23	Pochun	>835.5	>386.0	>495.9
24	Nakdong river	835.5	>386.0	396.7
25	Han river	>835.5	>386.0	>495.9
26	Han river	>835.5	>386.0	>495.9
27	Han river	>835.5	>386.0	>495.9
28	Nakdong river	>835.5	>386.0	>495.9
29	Nakdong river	>835.5	>386.0	>495.9
30	Youngsan river	>835.5	>386.0	>495.9
31	Youngsan river	>835.5	>386.0	>495.9

주하였다. 균주의 접종 시에는 -30℃에서 보관된 glycerol(15%, v/v) stock culture를 사용하였고, 접종 후에는 vial을 Teflon으로 코팅된 silicone septum이 부착된 screw cap(Fisher Scientific)으로 밀봉하여 vial내로 주입될 유해물질이 휘발에 의해 소실되지 않도록 하였다. 균체 호흡에 필요한 산소는 vial내의 head space에 존재하는 공기로 충분하다고 간주하였다. 배양온도는 30℃를 유지하였고 250 rpm에서 진탕하였다 (HK-S125C shaking incubator, 한국종합기기).

지표균주 선정

입수된 31종의 미생물 균주의 배양시, vial내로 toluene (Ma-

tsunoene Chemicals), methylene chloride(Showa Chemicals), chloroform(Acros Organics)을 Teflon septum을 통하여 gas-tight-syringe(Hamilton)로 주입하여 배지내 액상의 최종 농도가 각각 495.9, 386.0, 835.5 mg/L 이하의 여러 농도가 되도록 한 후 배양하여 균체 성장이 전혀 일어나지 않는 각 물질의 농도가 가장 낮은 미생물을 지표균주로 선정하였다.

액상내 독성물질의 농도 계산

본 연구에서 사용한 독성오염물질들은 phenol을 제외하고는 모두 휘발성이 강한 VOC(volatile organic compounds)들이므로 Teflon으로 밀봉된 vial을 배양용기로 사용하여 휘발과 흡착에 의한 소실을 막는다 하더라도 vial내로 주입된 물질들은 액상(배지)과 head space의 기상으로 분배하게 된다 지표미생물의 성장과 대사에 영향을 주는 농도는 액상내의 농도이므로 vial내로 주입된 물질의 총량으로부터 식(1)[6]과 Henry상수(K_H)를 이용하여 변형 Henry상수(K_H')를 계산하고(Table 2) 이 식으로부터 액상내 농도를 구하였다.

Table 2 Henry's constants of organic compounds used in this study

Compounds	LogK _H (L atm/g·mole) ^a	K _H '(dimensionless)
Phenol	-3.39	1.64 × 10 ⁻⁵
Benzene	0.74	0.22
Toluene	0.83	0.26
Ethylbenzene	0.90	0.32
p-Xylene	0.84	0.28
Perchloroethylene	1.44	1.11
Trichloroethylene	1.03	0.43
Chloroform	1.19	0.13
Methylene chloride	0.41	0.38

^a Henry's constants, K_H, were obtained from the reference 7.

$$K_{H}' = K_{H}/RT \tag{1}$$

- 단, K_H' : modified Henry's constant (= C_g/C_l: dimensionless)
- K_H : Henry's constant (L atm/g·mole)
- C_g : concentration in the gas phase (headspace) (mg/L)
- C_l : concentration in the liquid phase (culture broth) (mg/L)
- R : gas constant (0.082067 L·atm/g·mole·K)
- T : temperature (K)

DJ-4 성장곡선의 작성

유해오염물질의 독성은 지표균주의 회분배양시 대수증식기에서의 비성장속도(specific growth rate)가 감소하는 정도와 회분 성장곡선의 지연기(lag phase)가 연장되는 정도로부터 파악하였다. 비성장속도의 측정을 위해서는 배양중인 vial을 열고 배양액의 흡광도를 600nm에서 측정한 후(Smart Plus 3255, 영우기기) 폐기하였다. 이를 위하여 동일조건의 vial을 복수로 배양했으며 각 vial내의 균체성장을 균일하게 하기 위하여 삼각 플라스크를 이용한 seed culture 후 대수증식기의 배양액을 0.1%(v/v) 되게

vial에 접종함으로써 각 vial의 초기 균체농도가 일정하게 되도록 하였다. 독성 측정 시에는 음용수기준에 포함된 물질 중, phenol(Showa Chemicals), benzene(Matsunoene Chemicals), toluene, ethylbenzene(Junsei Chemicals), p-xylene(Junsei Chemicals), perchloroethylene(Showa Chemicals), trichloroethylene(Showa Chemicals), chloroform를 사용하였으며 각각의 배지내 농도는 3.6-417.8 mg/L이 되도록 하였다. 각 조건마다 지표균주의 성장곡선을 작성한 후, 대수증식기에서의 비성장속도를 아래와 같이 계산하되, 대수증식기에 포함된 3-9 개의 측정치를 일차 회귀분석하였다 지연기는 산출기준이 명확히 정해진 바 없어 성장곡선으로부터 임의로 선정하였다.

$$\text{Specific growth rate, } \mu \text{ (hr}^{-1}\text{)} = \ln(x_2/x_1)/(t_2-t_1) \tag{2}$$

단, x₁, x₂ : cell concentration (absorbance at 600 nm)
 t₁, t₂ : culture age (hr)

50% 유효농도(EC50)

배지내 각 독성물질의 농도별로 얻어진 DJ-4 비성장속도를 대조군(control, 독성물질이 첨가되지 않은 경우)의 비성장속도로 정규화한 후, 일차회귀 분석하여 상대 비성장속도와 농도에 대한 직선식을 얻었다. 이 식으로부터 상대적 비성장속도가 50%가 되는 독성물질의 배지내 농도를 EC50_μ라 정의하였고, 각 물질의 EC50_μ를 비교하여 상대적 독성의 정도를 판정하였다. 이와 유사하게 대조군의 지연기를 독성물질이 포함된 배지에서 관찰된 지연기로 나누고 계산된 값으로부터 회귀직선식을 얻은 후 여기로부터 대조군의 지연기가 50% 상승되는 독성물질의 농도를 구하여 이를 EC50_{lag}로 정의하였다.

결과 및 고찰

지표균주의 선정

Table 1의 31가지 미생물 중, strain 3, 4, 24 들이 chloroform과 toluene의 존재시 성장이 정지됨이 확인되었으며 methylene chloride의 경우에는 386 mg/L의 농도에서도 모든 균주가 성장하였다. 성장이 정지된 3가지 균주 중, 성장을 정지시킨 chloroform과 toluene의 농도가 각각 668.4, 297.5 mg/L로서 상대적으로 가장 낮은 strain no. 4를 DJ-4로 명명하고 본 연구의 지표균주로 선정하였다. 이들 3가지 균주는 완전히 다른 화학물질인 chloroform과 toluene에 대해 성장이 정지됨으로써, 다양한 종류의 유해물질에 대해 공통적인 검출 가능한 반응(예, 성장속도)을 보이는 지표균주의 선정이 미생물에서도 가능함을 추측할 수 있었고, 동일한 독성물질에 대한 반응이 다르게 나타난 사실로부터 (성장을 정지시킨 농도가 균주별로 다름) 독성에 매우 민감하게 반응하는 미생물 균주의 분리가 가능할 것임을 추측할 수 있었다.

독성물질 존재시 DJ-4의 성장거동

독성물질이 DJ-4의 대사과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 먼저 phenol, benzene, toluene, ethylbenzene, p-xylene, perchloroethylene, trichloroethylene, chloroform이 포함된 배지와 밀봉된 vial을 사용하여 회분배양하여 DJ-4의 성장

곡선(growth curve)을 작성하였다. 그 결과, 독성물질이 배지에 포함되었을 때 대조군과 대비되어 뚜렷하게 구분되는 DJ-4의 성장의 가장 큰 특징 두 가지는 성장곡선상의 지연기의 연장과 대수증식기에서의 비성장속도의 감소로 요약할 수 있었다. 예를 들어(Figure 1), chloroform 417.8 mg/L이 배지에 포함된 우의 DJ-4의 지연기는 약 9시간으로서, 이것은 chloroform이 전혀 포함되지 않은 대조군의 지연기 4.5 시간의 2배에 달하였다. 대수증식기에서의 비성장속도에도 급격한 감소가 야기되어 chloroform 417.8 mg/L의 경우 비성장속도는 0.531 hr⁻¹로서 대조군의 비성장속도 1.04 hr⁻¹의 약 1/2에 불과하였다. 표준방법에서는 독성을 측정하기 위하여 흔히 지표종의 호흡속도나 특정효소의 활성도를 측정하는 방법이 있으나, Figure 1에서 보는 바와 같이 미생물의 성장 거동을 관찰하고 지연기의 증가나 비성장속도의 감소를 측정함으로써 유해물질의 독성을 짧은 시간 내에 경량화할 수 있음을 확인하였다.

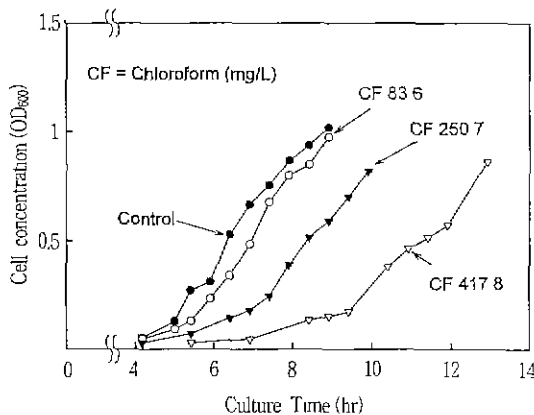


Figure 1. Growth retardation of strain DJ-4 by chloroform added to the LB medium.

독성물질의 농도가 지연기에 미치는 영향

Figure 1에서 chloroform의 농도가 증가됨에 따라 지연기가 연장되었는데 이러한 현상은 다른 7가지의 물질에 대해서도 동일하게 관찰되었다(Figure 2). 독성물질이 포함된 배지에서 성장한 경우의 지연기 연장을 대조군과 대비시켜 정량화하기 위하여, 각 지연기(시간)를 대조군의 지연기(4.5시간)로 정규화하여 ($lag_{toxic}/lag_{control} \times 100\%$) 도시하였을 때 그 감소 경향은 독성물질의 농도에 대해서 직선적이었으며 (Figure 3), 일차회귀에 의해 구해진 각 직선식으로부터 종속변수($lag_{toxic}/lag_{control} \times 100\%$)의 값이 50%가 되는 농도를 EC50_{lag}로 정의하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 perchloroethylene과 p-xylene의 EC50_{lag}가 가장 낮아 이들 물질이 지연기의 연장에 미치는 영향이 가장 심하였고 chloroform은 그 영향의 정도가 상대적으로 가장 약하였다.

생물체가 어떤 환경에 접했을 때 곧바로 대수적으로 증식하지 못하고, 성장이 일어나지 않는 지연기가 수반되는 원인으로서는 영양물질의 변화, 물리적 환경조건의 변화, 성장저해물질의 존재, 포자생물체의 경우 포자의 발아, 종균(inoculum)의 상태 등 여러 가지를 들 수 있다(8). 전자의 3가지 경우에는 이를 극복하기 위한 발현형질(expressed phenotype) 또는 대사과정의 변화가 요구되며 이를 위한 시간이 성장곡선상의 지연기라고 할 수 있다. 독성물질을 성장저해물질로 가정했을 때, 지연기의 증가는

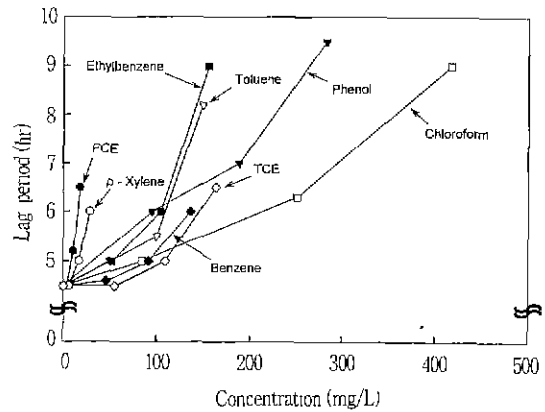


Figure 2. Prolongation of lag periods of DJ-4 vial batch cultures by the toxic effects of various organic pollutants added into the medium. TCE: trichloroethylene, PCE: perchloroethylene.

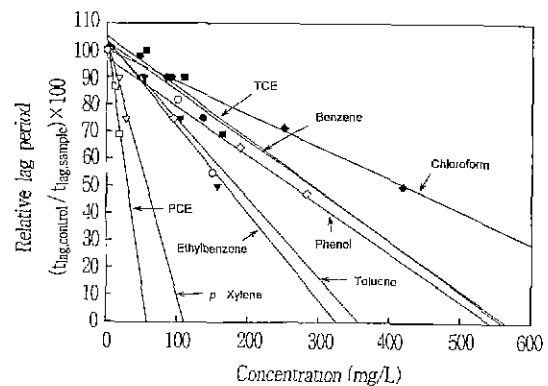


Figure 3. Linear regression of relative lag periods with respect to concentrations of toxic compounds. TCE: trichloroethylene, PCE: perchloroethylene.

Table 3. Concentrations of hazardous organic compounds at which specific growth rates of DJ4 were 50% decreased (EC50_g) and lag periods were 50% increased (EC50_{lag}).

Compounds	EC50 _{lag} (mg/L)	EC50 _g (mg/L)
Phenol	270.8	452.8
Benzene	286.1	119.7
Toluene	177.6	124.4
Ethylbenzene	161.7	98.1
p-Xylene	54.7	2.8
Perchloroethylene	28.7	4.4
Trichloroethylene	279.7	153.5
Chloroform	421.0	427.9
Methylene chloride	>386.0	>386.0

이 성장저해물질을 불활성화 또는 분해시키는데 소요되는 시간이 더 필요하기 때문이라고 해석할 수 있으나 본 연구의 경우 모든 독성물질의 vial내 농도는 성장이 완료되어 휴지기(stationary phase)에 이르기까지 변화가 없음이 확인된 바 있

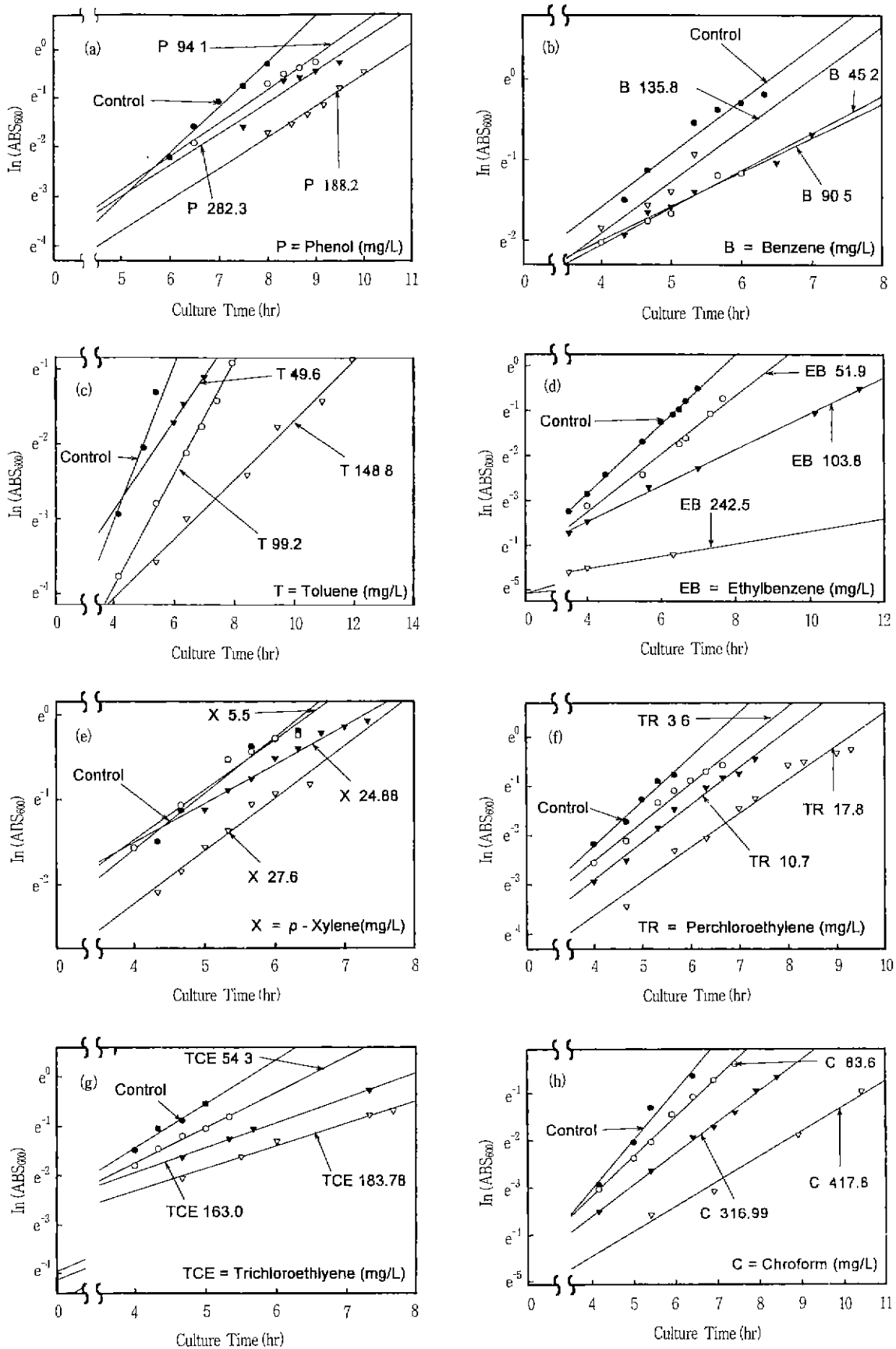


Figure 4 Specific growth rates of strain DJ-4 in exponential phases in the presence of phenol (a), benzene (b), toluene (c), ethylbenzene (d), *p*-xylene (e), perchloroethylene (f), trichloroethylene (g), and chloroform (h) at various concentrations.

이(data not shown) 이러한 해석은 적당한 것이 아닌 것으로 판단된다.

유해오염물질의 독성을 언급할 때에는 흔히 실험용 동물에서의 결과로부터 독성의 강약, 유무를 논하게 되나 그 독성의 기작에 대해서는 불확실한 점이 많다. 일례로 대표적 독성물질의 하나인 trichloroethylene의 경우, 실험용 쥐(rat)의 간세포에 존재하는 cytochrome P450에 의해 epoxidation 되고 이후의 산물인 trichloroacetic acid나 dichloroacetic acid, 1,2-dichlorovinyl-N-acetyl cysteine 등이 암(cancer)을 유발한다고 알려져 있다(9) 그러나 이러한 연구결과는 TCE에 만성적으로 노출되었을 때 발생하는 결과로서, 미생물의 성장시 지연기가 연장되거나 대수증식기에서의 비성장속도가 감소하는 원인으로 설명하기에는 무리가 따른다. 더구나 주입된 독성물질이 감소하지 않는 즉, 대사되지 않은 상태에서 성장속도가 감소하고 지연기가 연장되는 현상이 다양한 물질에 대해 공통적으로 나타나는 것은 단일 기작에 의한 결과로 해석하기 어렵다. 그러나 그 기작에 관한 상세한 설명에 관계없이 본 연구에서와 같이 지연기의 측정으로부터 그 독성을 유추할 수 있음은 의미 있는 일이라 하겠다. 다만, 지연기에 대해서는 정량적 정의를 확실히 내려진 바 없어 그 길이를 정확히 산출하기가 어려우므로 독성측정시의 변수로 사용할 때 명료하지 않은 단점이 있을 수 있다.

독성물질에 의한 비성장속도의 감소

본 실험에 사용된 9가지의 물질 중, DJ-4의 성장에 미치는 영향이 미미하였던 methylene chloride를 제외한 8가지 유해물질이 여러 농도로 함유된 배지에서 Figure 1과 같은 DJ-4의 성장곡선을 모두 작성한 후, 각각의 대수증식기에서의 비성장속도를 구하였다. Figure 4에서 보는 바와 같이, 실험에 사용된 8가지 독성물질 모두에 대해서, 각각의 농도가 증가함에 따라 DJ-4의 비성장속도가 감소함을 알 수 있었고, 각각의 비성장속도를 대조군의 비성장속도로 정규화하여 구한 상대적 비성장속도와 배지내 독성물질의 농도를 도시했을 때, 그 감소 경향은 농도에 대해 직선적이었다(Figure 5).

독성물질의 농도와 비성장속도를 간단한 일차함수로 표현할 수 있다는 것은, 동일한 지표군주를 사용했을 때 그 비성장속도가 특정치까지 감소되는 유해 물질의 농도를 비교함으로써 각각의 독성을 상대적으로 비교할 수 있음을 의미한다. 본 연구에서는, 표준 독성시험법에서 LC50나 EC50을 구하는 것과 유사하게, Figure 5의 결과를 일차 회귀분석하여 얻은 직선식으로부터 대조군의 비성장속도를 50% 감소시키는 농도를 구하여 이를 EC50_r(mg/L)로 나타내었으며, Microtox나 기타의 방법에서 EC50나 LC50가 낮을수록 독성이 약한 것으로 해석하는 바와 (10) 마찬가지로 EC50_r가 낮을수록 독성은 높은 것으로 판단하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 각 독성물질들은 서로 다른 EC50_r를 보였으며, 8가지의 물질 중 p-xylene과 perchloroethylene의 EC50_r가 2.8과 4.4로 가장 낮아 이 물질이 DJ-4에 미치는 독성이 가장 크다는 것을 알 수 있었고 phenol과 chloroform은 DJ-4에 대한 상대적 독성이 유사한 수준으로 낮음을 알 수 있었다. Methylene chloride는 배지내 농도가 386 mg/L일 때에도 균체의 성장이 중지되지 않았으므로(Table 1) EC50_r도 이보다 높을 것으로 유추하였다.

Table 3의 EC50_r는 일반적인 표준방법에 의해 얻어진 LC50

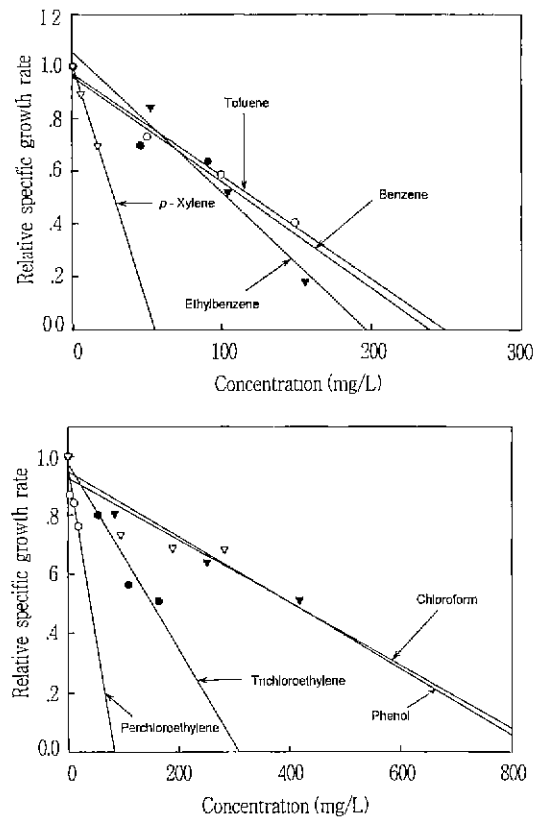


Figure 5 Reduction of specific growth rates of strain DJ-4 by toxic compounds. Solid lines represent linear regressions of specific growth rates calculated from data in the Figure 4.

보다 높아 민감도(sensitivity) 측면에서는 불량하다고 판단된다. 예를 들면, 물벼룩 *Daphnia magna*를 96시간 배양하여 얻은 96hr-LC50는 phenol, benzene, toluene, ethylbenzene, trichloroethylene에 대해 각각 33, 35.2, 26, 9.97, 46.2 ppm(mg/L)으로서(3), EC50_r의 452.8, 119.7, 124.4, 98.1, 153.5 mg/L보다 월등히 낮았다. 그러나 또 다른 표준방법의 하나인 Polytox의 EC50보다는 예민한 것으로 판단된다. Polytox는 지표 미생물의 호흡속도의 측정을 통하여 시료의 독성을 측정하는 방법으로서, phenol의 경우 EC50가 1,410 mg/L로서(11) EC50_r의 452.8 mg/L보다 월등히 높았다. 이와 같은 민감도 상의 차이는 Zwart와 Slooff이 밝힌 바와 같이(12), 물질에 따라 예민한 지표생물이 다르기 때문인 것으로 사료된다.

EC50_{lag}와 EC50_r의 관계

Table 3의 EC50_r와 EC50_{lag}는 한가지 값이 높을 때 다른 값도 높아 정성적으로 비례관계를 보였으나 직선회귀분석시 상관계수(r)가 낮아(r=0.831) 높은 수준의 유의성은 볼 수 없었다(Figure 6). Galli 등에 의하면 EC50이 유사한 수준을 보이더라도, 즉, 어느 특정한 생물학적 반응의 감소가 비슷한 정도로 나타나다더라도 각 물질이 독성을 발휘하는 기작은 다를 것이라는 것이 밝혀졌는데(13), 이것은 동일한 지표생물을 사용했다 하더라도 측정방법(측정 가능한 생물학적 반응)이 다르면 독성측정의 결과도 다를 수 있음을 의미한다고 할 수 있다. 따라서 EC50_r과 EC50_{lag} 사이에 높은 유의수준의 상관관계가 발생하지

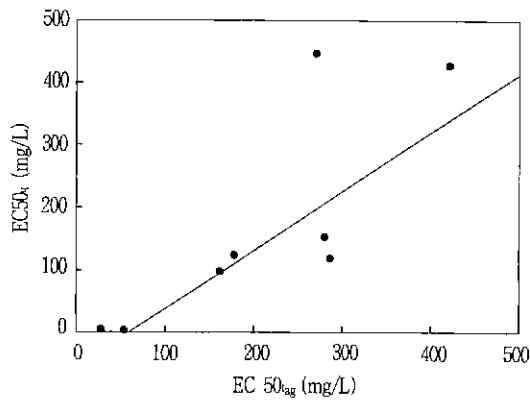


Figure 6. Relationship between EC50_{ag} and EC50_p.

않는다고 해서 비정상적이거나 측정치에 오류가 심하다고 판단할 수는 없다고 사료된다 이것은 또한 독성검사에 사용되는 표준 측정법이 지표생물이나 측정변수 면에서 매우 다양하게 개발되어 있으며 신뢰도 높은 독성검사를 위해서는 서로 다른 다양한 방법을 사용할 것을 추천하고 있는 사실에(4) 대한 부분적인 설명이 된다고 판단된다.

EC50_p와 Daphnia LC50의 상관관계

본 실험에서 측정된 DJ-4의 EC50_p를 표준방법에 의해 측정된 LC50와 비교하기 위하여 실험에 사용된 9가지의 물질 중 문헌에 발표되어 비교가 가능한 benzene, ethylbenzene, trichloroethylene, toluene에 대한 EC50_p와 *Daphnia*를 이용하여 측정된 LC50(3)의 상관관계를 조사하였다. Figure 7에서 보는 바와 같이 이들 4가지 물질에 대한 DJ-4 EC50_p와 *Daphnia* LC50는 직선적인 관계를 보였으며 Figure 7에 표시되지 못한 methylene chloride의 경우에도 DJ-4 EC50_p가 386 mg/L 이상으로 매우 높았는데 *Daphnia*의 경우에도 LC50를 나타내는 농도가 249 mg/L로서(3) Figure 4의 다른 물질의 *Daphnia* LC50가 50 mg/L 이하였던 사실과 비교했을 때 매우 높음을 알 수 있어 DJ-4의 결과와 정성적으로 일치하였다. Figure 7의 DJ-4 EC50_p와 *Daphnia* LC50 사이의 선형회귀 결과는 상관계수(r)가 0.860으로서 회귀분석을 통하여 얻어진 직선의 식이 지극히 높은 유의수준을 보인다고 할 수는 없겠으나, 이런 수준의 불일치는 표준방법들 사이에서도 항상 발견되는 것이다. 예를 들어 *Daphnia magna*를 지표종으로 사용하는 경우와 물고기 (*Pimephales promelas*)를 사용하여 중급속, 유기용매, 농약을 포함하는 11가지 물질에 대한 LC50를(14) 비교했을 때 (Figure 7) 그 상관 계수(r)는 0.240으로서 DJ-4 EC50_p와 *Daphnia* LC50 사이의 상관관계 보다 오히려 불량하였다. 즉, 표준 방법사이에서도 LC50 또는 EC50 사이에 완벽에 가까운 일치성은 기대할 수 없다고 사료되며, Figure 7의 결과로부터 DJ-4를 사용하여 측정된 EC50_p에 의해 유해물질이 지닌 독성이 적절히 반영되었다고 판단하였다.

독성시험이란 기본적으로 유해독성물질에 노출된 지표생물이 대조군이 보이지 않는 반응을 나타낼 때 이를 측정하는 시험법을 말한다. 서론에서 언급한 진핵고등생물을 이용하는 많은 종류의 독성시험법은 숙련된 기술과 장비가 필요할 뿐 아니라 결과를 얻기까지 장시간이 소요되는 단점이 있다. 이러한 단점을

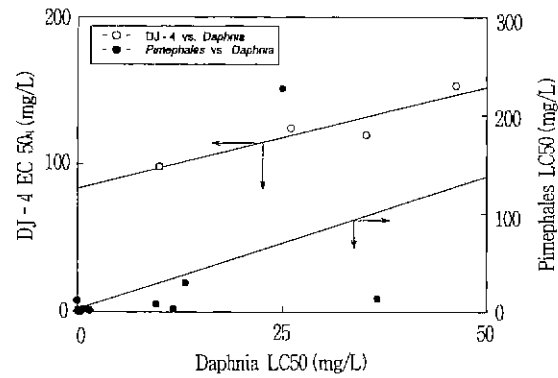


Figure 7. Comparisons of 50% effective concentrations (EC50) of standard toxicity tests using a water plea *Daphnia magna*, fish *Pimephales promelas*, and the strain DJ-4 For comparing EC50's of *D. magna* and DJ-4 against benzene, toluene, ethylbenzene, and trichloroethylene, data were obtained from the reference 3 and this study. EC50's of two standard tests for 11 different compounds were extracted from the reference 14.

보완하기 위하여 근래에 이르러 신속하고 측정이 용이하며 경제적으로 저렴한 독성측정법을 개발할 필요성이 대두되었으며, 최근 몇 년 동안에 미생물을 이용한 독성시험법에 대한 관심이 증대되어왔다(1). 이러한 방법들은 독성에 노출된 미생물의 기능이나 활성에 변화가 야기되었을 때 이를 측정하는 여러 가지 방법을 포함하며, 여기에는 탄소, 질소, 또는 황화합물의 전환을 모니터링하는 법, dehydrogenase와 같은 특정효소의 활성을 측정하는 법, 성장, 사멸을 등을 측정하는 법, 광합성 작용을 측정하는 법, 포도당이나 산소의 소모속도를 측정하는 법, 발광정도를 측정하는 방법 등이 포함된다(1).

미생물을 독성시험의 지표생물로 사용하면, 표면적/부피의 비가 크므로 독성에 대한 반응이 빠름을 기대할 수 있고, 배양이 용이할 뿐 아니라 신속하고, 경제적이며, 체현성이 높은 장점이 있다 더구나 미생물은 작은 부피 내에도 동조 배양된 막대한 수의 단위 개체가 존재하므로 이보다 훨씬 적은 수의 개체가 사용되는 표준검사법들에 비하여 그 결과의 해석시 통계학적으로 유리하다(10). 표준시험법에서 사용하는 지표생물의 경우에는 미생물과 달리 동조배양이 어렵기 때문에 크기에 의한 분류 등을 통하여 건강한 개체를 인위적으로 골라내어야 하는 번거로움이 따른다(15). 또한 고등생물을 사용하는 표준 독성측정법들의 경우에는 본 연구에서 사용한 물질처럼 휘발성이 강한 경우에는 지표생물들의 배양시 폭기와 진탕을 통한 산소공급에 어려움이 따르게 된다. 생물체의 생존 및 증식을 위하여 공기를 주입하면 용존되어 있던 휘발성 독성물질이 탈기하게 되므로 이를 피하기 위해서는 공기의 주입 없이 밀봉된 용기를 사용해야 하는데 승어 등과 같은 지표생물을 사용하려면 배양용기가 커야하므로 이를 밀봉해야 하는 등 현실적으로 매우 번거롭고 시험결과 해석시 어려움이 따르게 된다. 그러나 미생물을 이용할 때에는 본 연구에서 행한 바와 같이 Teflon으로 밀봉된 소규모의 배양용기 만으로도 가능하므로 상대적으로 간편한 이점이 있다.

본 연구에서는 이와 같은 여러 가지 장점을 지닌 미생물의 비

성장속도를 측정하고 이를 대조군의 비성장속도와 비교함으로써 시료내의 독성을 측정하는 방법의 가능성을 타진하였다. 기존의 독성시험법 중에서 비성장속도를 측정하여 독성을 판정하는 방법에는 *Selenastrum capricornutum*, *Microcystis aeruginosa*와 같은 조류를 이용하는 경우와 *Monochrysis lutheri* 등의 식물성프랑크톤을 지표생물로 사용하는 경우가 있으나(4), 이 방법들은 4-5일이 소요되어 신속한 측정에는 적합치 않다고 사료된다. 본 연구 결과의 문제점으로는 기존의 표준방법에 의해 얻어진 LC50나 EC50와 비교했을 때 DJ-4의 EC50가 높게 나타나 독성물질의 오염이 심한 상태에서만 신뢰성 있는 측정이 가능하다는 것인데, 이 문제는 향후 다양한 서식지에서의 균주 분리를 통하여 독성물질에 더욱 예민한 지표균주를 선발함으로써 개선될 수 있다고 기대된다. 또한 향후 더욱 많은 종류의 독성물질과 폐수 내에 복수의 독성물질이 혼합되어 있을 경우에 대해서도 독성을 측정하고 기존의 표준방법과의 비교를 강화함으로써 본 연구에서 제안한 방법이 새로운 독성측정방법으로서 사용될 수 있음을 증명하고자 한다.

요 약

전국의 수계로부터 분리한 31종의 미생물 중 668.4 mg/L의 chloroform과 297.5 mg/L의 toluene에 의해 성장이 금지된 미생물을 분리하고 이 중 하나를 DJ-4라 명명하였다. DJ-4의 회분배양시 phenol, benzene, toluene, ethylbenzene, *p*-xylene, perchloroethylene, trichloroethylene, chloroform 등을 3.6-417.8 mg/L의 농도로 배지에 포함시켰을 때, 성장곡선의 지연기가 증가되었으며, 대수증식기에서의 비성장속도도 감소되어 이들 물질의 독성이 DJ-4의 회분성장곡선을 관찰함으로써 확인될 수 있음을 알 수 있었다. 지연기의 증가와 비성장속도의 감소는 모두 배지에 함유된 독성물질의 농도에 대해 선형화할 수 있었으며 구해진 직선식으로부터 대조군의 비성장속도를 50% 감소시키는 농도(EC50)와 대조군의 지연기가 50% 증가되는 독성물질의 농도(EC50_{lag})를 결정하였으며, EC50와 EC50_{lag}는 각각 2.8-452.8 mg/L, 28.7-421.0 mg/L의 범위에 있었다. 이 두 가지 측정치 사이에는 정성적인 비례관계가 있어 지연기와 비성장속도에 독성물질의 영향이 공통적으로 미침을 알 수 있었다. 또한 DJ-4 EC50와 기존의 표준 방법중 물벼룩(*Daphnia magna*)에 의해 측정된 *Daphnia* LC50를 동일한 물질(benzene, toluene, ethylbenzene, trichloroethylene)에 대해 비교했을 때 높은 상관성을 보여 미생물의 비성장속도의 측정을 통하여 유해물질의 독성을 파악할 수 있음을 확인하였다. 미생물을 이용한 독성시험법은 기존의 표준시험법에 비하여 지표종의 배양이 쉽고 경제적이며 신속한 장점이 있어 향후 독성물질에 대해 더욱 예민한 균주를 선발한다면 새로운 시험법이 될 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 환경부 G7 선도기술 개발사업(9-2-4)에 의해 지원된 바, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Tothill, I. E. and A. P. F. Turner (1996), Developments in Bioassay Methods for Toxicity Testing in Water Treatment, *Trend Anal. Chem.*, 15, 178-188.
- 환경부 (1997), 선도기술개발사업 제2단계 2차년도 연차보고서. 수계에서의 유해물질 조기 검출기법 개발, p. 33.
- Ford, D. L (1992), Toxicity Reduction: Evaluation and Control, pp. 1-16, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster.
- Watson, A. D., L. S. Clesceri, and A. E. Greenberg (1995), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed, p8-4, APHA, AWWA, and WEF, Washington, DC.
- Nalecz-Jawacki, G., B. Rudz, and J. Sawicki (1997), Evaluation of Toxicity of Medical Devices Using Spirotox and Microtox Tests: I. Toxicity of Selected Toxicants in Various Diluents, *J. Biomed. Mater. Res.*, 35, 101-105.
- 문승수 (1995), 하폐수처리의 이론과 실제, *철단환경기술*, 6월호, 90-95
- Schwarzenbach, R. P., P. M. Gschwend, and D. M. Imboden (1993), Environmental Organic Chemistry, pp. 617-625, John Wiley & Sons, New York.
- Pirt, S. J. (1975), Principles of Microbe and Cell Cultivation, p195, Wiley, New York.
- Brukner, J. V., B. D. Davis, and J. N. Blancato (1989), Metabolism, Toxicity, and Carcinogenicity of Trichloroethylene, *Crit. Rev. Toxicol.*, 20, 31-50.
- Sherrard, K. B., P. J. Marriott, M. J. McCormick, and K. Millington (1996), A Limitation of the Microtox for Toxicity Measurements of Nonionic Surfactants, *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 1034-1037
- Elnabarawy, M. T., R. R. Robideau, and S. A. Beach (1988), Comparison of Three Rapid Toxicity Test Procedures: Microtox, Polytox, and Activated Sludge Respiration, *Toxicol. Assess.*, 3, 361-370
- De Zwart, D. and W. Slooff (1983), The Microtox as an Alternative Assay in the Acute Toxicity Assessment of Water Pollutants, *Aqua. Toxicol.*, 4, 129-138.
- Galli, R., C. D. Munz, and R. Scholtz (1994), Evaluation and Application of Aquatic Toxicity Tests: Use of the Microtox Test for the Prediction of Toxicity Based upon Concentrations of Contaminants in Soil, *Hydrobiologia*, 273, 179-189.
- Toussaint, M. W., T. R. Shedd, W. H. van der Shalie, and G. R. Leather (1995), A Comparison of Standard Acute Toxicity Tests with Rapid-Screening Toxicity Tests, *Environ. Toxicol., Chem.*, 14, 907-915.
- Qureshi, A. A., K. W. Flood, S. R. Thompson, S. M. Janhurst, C. S. Inmiss, and D. A. Rokosh (1982), Comparison of a Luminescent Bacterial Test with Other Bioassays for Determining Toxicity of Pure Compounds and Complex Effluents, Proc. Aquatic Toxicology: 5th Conference 1992, pp. 179-195, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.