

박테리아 (*E. Coli*)의 AGB (alpha-glucosidase biosynthesis)를 이용한 중금속의 독성시험과 풀빅산에 의한 독성 억제효과

김재현*, 김명길*, 엄애선**

동덕여자대학교 자연과학대학 보건관리학과, *경기도 보건환경연구원,
**한양대학교 생활과학대학 식품영양학과

Verification of AGB (alpha-glucosidase biosynthesis) Bacterial Bioassay of Metal Toxicity and Inhibition Effect of Fulvic Acid (FA)

Jae Hyoun Kim *, Myung Gill Kim * and Ae Son Om **

Department of Health Science, School of Natural Science, Dongduk Women's University, Seoul, Korea

*Gyeonggido institute of Health & Environment, Suwon 440-290, Seoul, Korea

**Department of Food and Nutrition, School of Human Ecology, Hanyang University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Aim of the present study was the development of a bioassay which enables the detection of toxic effects of heavy metal ions to a bacterium, *Escherichia coli*. Inhibition effects of the metals on growth rates of the bacterium were studied in the absence or presence of fulvic acid. This method does not clearly differentiate among metals, but does detect overall AGB inhibition rate (toxicity) for 5 different heavy metals. The toxicity of the metals in the absence of fulvic acid in the same testing conditions was significantly increased in following order: Hg < Pb, Zn < Cd < Cu, whereas the inhibition rate (toxicity) in the presence of FA was shown to be increased in following order: Cd < Pb, Hg < Cu < Zn. The results of the present study indicate that this simple and fast biomonitoring assay with direct exposure of *E. coli*. might be a valuable supplement to analytical methods of contaminated media.

Key words : Heavy metal, AGB (alpha-glucosidase biosynthesis), Bioassay, Fulvic acid (FA)

서론

환경에 존재하는 화학적 독성을 측정하기 위하여 많은 박테리아나 효소들을 이용하는 미세 생물 시험법들이 이용되고 있다. 이 시험법들의 특징은

시험가격이 싸고, 독성물질에 잘 반응하며 많은 시료들을 처리할 수 있고, 일반적인 장비로도 충분하며, 시료의 양이 적어도 가능하며, 휴대할 수 있으며, 재현성이 좋다는 장점이 있다. 효소시험법은 효소합성 혹은 효소활동도의 증감으로 측정한다.

Algae의 생태독성을 측정하기 위하여 탈수소효소(Dehydrogenases)가 가장 많이 쓰이며 그 밖의 다른 효소활동도 측정효소로 ATPases (Rai *et al.*,

※ To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-940-4484, E-mail: kjhyon@dongduk.ac.kr

1994), esterases (Franklin *et al.*, 2001), phosphatases (Durrieu and Tran-Minh, 2002), urease (Mallick *et al.*, 1990), luciferase, beta-galactosidase (Peterson and Stauber, 1996), protease (Bitton and Koopman, 1992), amylase (Yan *et al.*, 1996), 혹은 beta-glucosidase (Montuelle *et al.*, 1994)들을 이용하였다. 최근에는 독성화합물에 대장균의 beta-galactosidase (Dutton *et al.*, 1990) 그리고 다른 균들의 tryptophanase (Dutton *et al.*, 1990) 혹은 alpha-glucosidase (Bitton and Koopman, 1992)과 같은 효소의 합성억제현상을 독성시험방법의 기초로 많이 연구되고 있다. 효소합성은 효소활동도보다 유기화합물에 보다 더 민감한 것으로 나타났다. 반면에 효모의 beta-galactosidase에 대한 중금속의 독성은 유기화합물에 대한 독성보다 민감도가 더 좋은 것으로 나타났다 (Apartin and Ronco, 2001).

박테리아를 이용한 독성테스트는 생물발광, 운동성, 성장, 생존성, ATP, 산소섭취, 질화, 및 열생산등에 근거한다. 박테리아시험법의 가장 중요한 점은 소수성 성질을 가지고 있는 유기화합물같은 환경독성물질의 세포에 대한 투과성이다. 대장균의 외세포벽에 대한 물리적, 화학적 그리고 유전적 변화는 유기화합물에 대한 시험방법의 민감도에 영향을 주는 것으로 알려졌다. 여러 가지의 생물독성 시험법들이 이미 시중에 상용화가 되어있으며 Microtox (bioluminescence) (Nalecz-Jawecki *et al.*, 1997), Polytox (respiration) (Arulgnanendran, Nirmalakhandan, 1998), ECHA Biocide Monitor (dehydrogenase activity), Toxi-Chromotest (enzyme biosynthesis) (Hempel *et al.*, 1995), 그리고 MetPAD/MetPLATE (enzyme activity) (Boularbah *et al.*, 1999) 등의 방법들이 유기화합물 혹은 중금속의 독성시험에 사용되었다.

그러나 금속 혹은 중금속에 대한 생물독성을 시험하는 데에는 기존의 시험방법들이 한계점을 가지고 있으며 유기화합물과는 다르게 민감도가 작다는 연구결과가 발표되고 있다. MetPAD방법은 박테리아시험법으로 아연의 농도가 클수록 독성이 비례하는 것을 발표하였다 (Boularbah *et al.*, 1999). Microtox 시험은 수은(Hg)의 독성을 예측하기에는 매우 감도가 좋으나 카드뮴의 독성을 예측하는 데에는 실패하였다 (Kong *et al.*, 1995). 그러나 중금속([Cu, Zn, Cd, Pb, Hg, Cr(VI)])에 대한 MetPAD/

MetPLATE 테스트의 민감도는 일반적으로 Microtox방법의 결과보다 더 좋았으며 물벼룩 혹은 어류 생물시험을 이용한 실험결과보다 좋은 것으로 나타났다. 그러나 유기화합물에 대한 MetPAD/MetPLATE 실험은 환경에서 검출되는 농도보다 클 경우에는 민감도가 저하되었다 (Bitton *et al.*, 1994).

AGB (alpha-glucosidase biosynthesis) 생물시험은 시료에 대한 독성가능성을 시험하는데에 비용효과적인 독성검색을 위한 일차적인 표현자이다. AGB는 원형질의 효소인 알파-아밀라제가 전분을 말토스로 수화될 때 생성이 된다. 말토스가 세포외액에 존재할 때에 AGB를 유도생성시키며 그리고 나서 AGB는 말토스를 수화시켜 글루코스를 생성시킨다. 성장단계에서의 AGB는 세포막이 결합된 효소이다. 배양액이 정체단계로 들어서면서 AGB는 세포외액속으로 들어간다 (Thirunavukkarasu and Ptiest, 1983). 정체단계가 형성되면서 지시약을 넣어주면 색원체인 *p*-nitrophenyl-alpha-*D*-glucoside에서 alpha 1-4 결합이 끊어지면서 노란색으로 변화하며 *p*-nitrophenol이 방출되면서 생성되는 노란색의 흡광도 차이를 흡광도계를 이용하여 측정한다.

풀빅산 (fulvic acid)은 물에 녹아있는 유기물로서 수계에 녹아있는 미량의 중금속 이온들과 착화합 반응을 하여 중금속을 제거하거나 운송하는 물리 화학적 성질을 갖고 있다 (Christi *et al.*, 2001). 따라서 리간드에 의하여 중금속이온 혹은 이온성 화합물의 독성을 제거하는 성질을 나타낸다 (Campbell *et al.*, 2000). 또한 이들의 결합력은 안정화 상수 (stability constant)와 착화능력 (complexation capacity)에 의해 달라진다 (Dora G *et al.*, 2000).

본 연구에서는 금속들의 서로 다른 독성을 시험하기 위하여 대장균의 AGB를 이용하여 농도에 따른 독성을 시험하여 금속의 독성을 정도를 비교하고자 하였으며 다양한 금속에 대한 금속독성을 시험하고자 하였다. 또한 이들의 독성에 대한 풀빅산의 영향을 알아보기로 한다.

재료 및 방법

1. Chemicals

각 금속원소에 대한 표준용액은 Aldrich Chemical Co. (USA)으로부터 구입하였으며 필요에 따라

표준용액을 희석시켜 사용하였다. FA (fulvic acid)는 MycSA AG Company (Tlalnepantla, Mex. Mexico 54050)의 제품을 사용하였으며 buffer 및 나머지 모든 시약들은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MD, USA)에서 구입하였다.

2. Cell culture

냉동의 *Bacillus licheniformis* stock 용액에서 50 μ L를 텍스트로스가 들어있지 않은 TSB(trypicase soy broth)를 넣은 5-mL 시험관에 옮긴 다음 교반기속(30°C)에서 24시간 동안 배양하였으며 24시간 후에 Ryan 배양 플라스크속에 넣은 새로 만든 45 mL의 TSB 배양물에 넣은 다음 24시간 동안 같은 조건하에서 배양을 하였다. 배양후의 배양물은 흡광도계를 사용하여 550 nm에서 OD (optical density)를 측정하였다. 그리고 나서 fresh media를 사용하여 배양물의 흡광도를 다시 0.3~0.4정도로 맞추고 0.7~0.8사이로 올라가도록 배양을 시켰다. 흡광도는 30분마다 측정하여 배양물이 지수적 변화상(exponential phase)을 만드는지를 확인하였다. 이 배양물은 멸균된 원심분리 튜브속에 옮겨져 4°C에서 20분 동안 8000 rpm의 속도로 원심분리하였다. 그리고 나서 세포 펠리트를 꺼내어 100 mL의 증류수에 띄워서 시험에 사용하도록 하였다.

3. AGB inhibition

Control, cell blank 및 금속시료를 3개 이상 시험하였으며 cell blank를 제외하고 각각의 시험관속에 0.1 mL의 resuspended cell을 첨가하였다. 또한 각각의 control 시험관에는 0.9 mL의 증류수를 넣었으며 cell blank와 sample tube에는 0.9 mL의 표준시료를 넣었다. 각 시료를 넣은 다음 모든 시험관은 vortex mixer위에서 흔들어 주었다. 그리고 모든 시험관을 30°C에서 60분간 배양시켰다. FA의 효과를 관찰하기 위하여 같은 방법으로 만든 시료에 0.5 mg/L의 폴빅산 용액 1 mL를 넣고 같은 방법으로 시험하였다.

4. Enzyme induction

효소를 유도하기 위하여 말토스 0.1 mL를 시험관에 넣은 다음, 0.4 mL의 z-buffer (pH7)와 0.5 mL

의 fresh medium을 넣고 30°C에서 60분 동안 배양시켰다.

5. Color development

효소가 유도된 후에 효소가 방출이 되도록 7%의 sodium dodecyl sulfate용액 0.1 mL을 넣었다. 그리고 나서 *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside의 0.4% substrate용액을 각각의 시험관에 첨가하였으며 30°C에서 60분간 배양을 한 후에 냉각된 1 M sodium carbonate용액의 1 mL를 넣고 반응을 종결시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

주입된 중금속의 농도변화에 따른 AGB의 활성도 측정은 중금속을 주입하지 않은 경우를 대조군으로 하여 식(1)에 의하여 저해율을 구하였다. 50%에 해당하는 농도를 IC50로 환산하였다.

$$\text{저해율} = (\text{Con} - \text{Tox}) / \text{Con} \times 100\% \quad (1)$$

6. Statistical analysis

실험결과와 통계처리는 각 농도지점에서 측정된 3개의 값을 이용하였으며 control에 대한 각각의 중금속의 저해율의 유의성 정도를 구하기 위하여 ANCOVA test를 수행하였다. 통계분석을 위한 프로그램은 SPSS 소프트웨어(version 9.0)를 사용하였다.

결과 및 고찰

실험결과는 표 1에 나타나 있으며 위의 실험 데이터를 이용하여 금속의 농도에 대한 AGB의 저해율을 선형회귀방정식으로 나타내었으며 IC50 값을 계산하였다.

각 그래프에서는 AGB에 대하여 금속을 투여하지 않았을 때, 즉 금속의 독성이 작용하지 않았을 때의 수치를 100%로 계산하였다.

아래의 그림 1, 2, 3, 4 및 5에서는 각각 Pb, Hg, Cu, Zn 및 Cd에 의한 FA 첨가 시 혹은 비첨가 시, AGB의 합성억제효율을 직선의 식으로 나타내었다. 금속의 독성효과를 그래프로 나타내었으며(Δ) 금속과 폴빅산을 동시에 투여했을 때 폴빅산에 의한 독성의 감소영향을 동시에 나타내었다(\bullet). FA

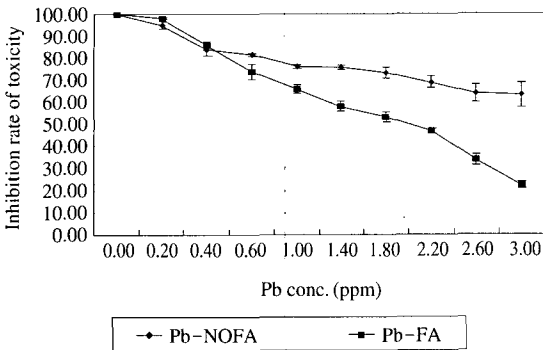


Fig. 1. AGB (alpha-glucosidase biosynthesis) inhibition rate by Pb and effect of Fulvic Acid (FA).

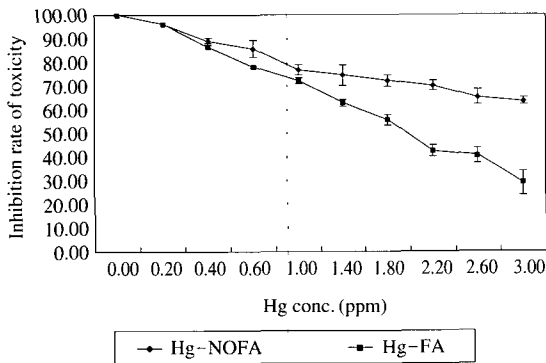


Fig. 2. AGB (alpha-glucosidase biosynthesis) inhibition rate by Hg and effect of Fulvic Acid (FA).

는 fulvic acid 투여를 의미하고 NOFA는 투여하지 않았을 때를 의미한다. 통계분석(ANCOVA test) 결과에 의하면 각 중금속의 control에 대한 저해율, 및 FA의 첨가 시와 비첨가시의 저해율에 대한 그래프들은 모두 $P < 0.01$ 범위에서 통계학적으로 유의적인 차이가 있었다.

위의 그래프에서는 HA에 의한 억제효과가 뚜렷이 나타나고 있다(그림 1). FA를 첨가하였을 경우 직선의 방정식은 $Y = 92.7 - 11.0X$ ($r = 0.85$)이며 IC50값은 3.9로 나타났다. 또한 첨가하지 않은 경우에는 $Y = 96.1 - 24.5X$ 의 직선을 나타내며 r 값은 0.97로 IC50 값은 1.9로 계산되어 IC50 값은 FA를 첨가 시에는 Pb에 의한 AGB 생합성의 저해율이 4 배 정도 감소된 것을 알 수 있다.

FA에 의한 Hg의 AGB 독성에 대한 감소현상이

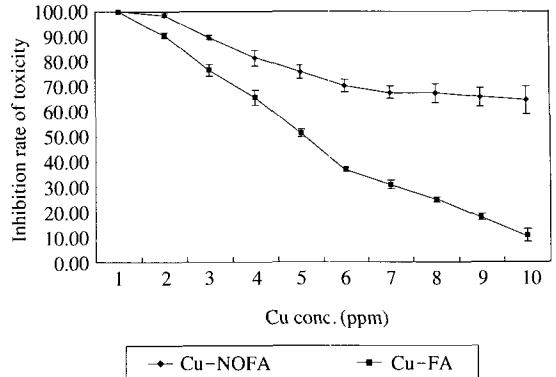


Fig. 3. AGB (alpha-glucosidase biosynthesis) inhibition rate by Cu and effect of Fulvic Acid (FA).

1.4 ppm의 투여농도까지는 뚜렷하지 않았으나 1.8 ppm의 농도이상에서 투여했을 때 AGB감소 현상이 점진적으로 증가하였다. Hg는 Pb의 경우와 비슷한 저해율의 패턴을 나타내고 있는 것으로 관찰되었다(그림 2).

FA를 첨가하였을 경우 직선의 방정식은 $Y = 94.6 - 11.5X$ ($r = 0.94$)이며 IC50값은 3.9로 나타났다. 또한 비첨가 시에는 $Y = 96.8 - 23.1X$ 의 방정식으로 나타났으며 r 값은 0.99로 직선에 매우 가까운 것으로 나타났다. IC50 값은 첨가 시와 비첨가 시에 각각 3.9와 2.0으로 FA를 첨가 시에는 Pb에 의한 AGB 생합성의 저해율이 2배 정도 감소되어 독성이 급격히 감소되었다.

Cu에 의한 AGB의 억제율은 초기농도로부터 모든 농도에 이르기까지 FA에 의하여 구리의 독성이 감소되고 있다(그림 3). HA의 첨가 시에 첨가하지 않은 실험결과와 비교할 때 Cu(구리)에 의한 억제효과는 농도가 1 ppm 이후부터 두 직선의 저해율의 차이가 크게 증가하였다.

FA를 첨가하였을 경우 직선의 방정식은 $Y = 93.4 - 11.9X$ ($r = 0.89$)이며 IC50값은 3.7로 나타났다. 또한 비첨가 시에는 $Y = 88.5 - 28.9X$ 의 일차방정식으로 나타났으며 r 값은 0.97로 상관성이 매우 높은 것으로 나타났다. IC50 값은 첨가 시와 비첨가 시에 각각 3.7과 1.3으로 FA를 첨가 시에는 Pb에 의한 AGB 생합성의 저해율(독성)이 약 3배 정도 감소되었다.

Zn의 경우, FA의 첨가 시 0.6 ppm의 농도까지는

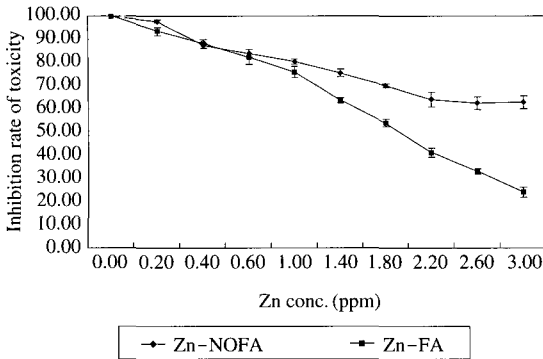


Fig. 4. AGB (alpha-glucosidase biosynthesis) inhibition rate by Zn and effect of Fulvic Acid (FA).

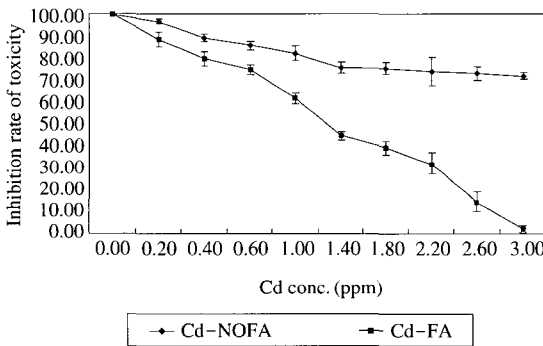


Fig. 5. AGB (alpha-glucosidase biosynthesis) inhibition rate by Cd and effect of Fulvic Acid (FA).

FA에 의한 억제율의 감소경향이 뚜렷하지 않았으나 1 ppm을 투여한 이후에 뚜렷한 감소현상이 관찰되었으며 농도가 증가함에 따라 점차적으로 저해율의 차이가 크게 증가하였다(그림 4). 이는 그림 1 및 2에 나타난 Pb 및 Hg의 저해율과 매우 비슷한 패턴으로 감소하고 있다.

FA를 첨가하였을 경우 직선의 방정식은 $Y = 95.3 - 12.8X$ ($r = 0.96$)이며 IC50값은 3.5로 나타났다. 또한 비첨가 시에는 $Y = 99 - 25.4X$ 의 일차방정식으로 나타났으며 r값은 1.0으로 직선에 매우 가까운 것으로 나타났다. IC50 값은 첨가 시와 비첨가 시에 각각 3.5와 1.9로 FA를 첨가 시에는 Pb에 의한 AGB 생합성의 저해율(독성)이 약 1.9배 정도 감소되었다.

시험된 농도 범위에서 카드뮴의 농도가 증가함

에 따라 점차적으로 저해율의 차이가 크게 증가하여 저해율의 차이가 매우 크게 나타났으며, 이는 그림 3에 나타난 Cu의 저해율과 비슷한 양상을 보이고 있다(그림 5). FA를 첨가 시에 3.0 ppm의 농도에서는 독성에 대한 저해율이 0%에 가깝게 감소되는 현상을 보이고 있다.

FA를 첨가하였을 경우 직선의 방정식은 $Y = 93.4 - 11.9X$ ($r = 0.83$)이며 IC50값은 5.2로 나타났다. 또한 비첨가 시에는 $Y = 88.5 - 28.9X$ 의 일차방정식으로 나타났으며 r값은 0.99로 직선에 매우 가까운 것으로 나타났다. IC50 값은 첨가 시와 비첨가 시에 각각 5.2과 1.4로 FA를 첨가 시에는 Pb에 의한 AGB 생합성의 저해율(독성)이 약 3.7배 정도 감소되었다.

위의 실험 결과에서 FA를 첨가하지 않았을 경우에는 Cu의 독성이 다른 중금속보다 뚜렷하게 커짐을 알 수 있다(표 1). 이 때의 각 중금속의 IC50는 $Hg(2.0) > Pb(1.9), Zn(1.9) > Cd(1.4) > Cu(1.3)$ 의 순서로 감소되어 독성의 세기는 $Hg < Pb < Zn < Cd < Cu$ 의 순서로 증가된 것으로 나타났다. Hg, Pb 및 Zn 등의 IC50 순위를 정할 정도로 값들의 차이가 크지 않았다. FA의 첨가 후에 각 중금속의 IC50는 $Cd(5.2) > Pb(3.9), Hg(3.9) > Cu(3.7) > Zn(3.5)$ 의 순서로 감소하였으며 독성의 세기는 $Zn > Cu > Hg > Pb > Cd$ 의 순서로 감소함을 알 수 있다. FA의 적용 시에 Cd의 IC50 값이 다른 중금속의 값보다 훨씬 높았으나 나머지 중금속간의 IC50 값은 큰 차이가 없었다.

Table 1. Correlation coefficients (r), linear regression equations and IC50 values in AGB inhibition by metals and Fulvic Acid

금 속	상관계수(r)	회귀방정식	IC50(ppm)
Pb-FA	0.85	$Y = 92.7 - 11.0X$	3.9
Pb-NOFA	0.97	$Y = 96.1 - 24.5X$	1.9
Hg-FA	0.94	$Y = 94.6 - 11.5X$	3.9
Hg-NOFA	0.99	$Y = 96.8 - 23.1X$	2.0
Cu-FA	0.89	$Y = 93.4 - 11.9X$	3.7
Cu-NOFA	0.97	$Y = 88.5 - 28.9X$	1.3
Zn-FA	0.96	$Y = 95.3 - 12.8X$	3.5
Zn-NOFA	1.00	$Y = 99.0 - 25.4X$	1.9
Cd-FA	0.83	$Y = 93.3 - 8.30X$	5.2
Cd-NOFA	0.99	$Y = 94.3 - 30.8X$	1.4

*FA: fulvic acid added, NOFA: no fulvic acid added.

표 1에서는 FA를 첨가 시에는 비첨가 시를 기준으로 중금속에 의한 IC50 값이 현저하게 증가한 것을 알 수 있다. Hg, Pb 및 Zn에 FA를 적용했을 경우에 IC50이 약 2배 정도로 증가하였으며 Cu는 약 3배, Cd의 경우에는 3.7배 정도 감소하였다. FA의 첨가에 의한 금속의 독성억제효과의 크기는 Zn > Cu > Hg > Pb > Cd 등의 순서로 증가되었다. 이론적으로는 용액에서 중금속의 활동도는 Mg > Al > Mn > Zn > Cr > Fe > Pb > Cu > Hg의 순서로 감소한다고 알려져 있지만 실험적인 조건에 따라 달라지는 결과를 나타내고 있다. 즉, Spirotox 및 Microtox에서의 중금속(II가)들의 독성의 순서는 Hg > Cd > Zn > Pb의 순서로 감소하였으며(Nalecz-Jawecki *et al.*, 1997), 효모의 beta-galactosidase에 대한 중금속의 독성 감응도는 Cd(II) < Ni(II) < Cr(VI) = Pb(II) < Cu(II) < Hg(II) 다음과 같은 순서로 증가하였다(Apartin and Ronco, 2001). 이러한 서로 다른 실험 결과들은 중금속에 의한 독성 실험들은 농도와 독성의 관계가 항상 단순한 것만은 아니며 살아있는 세포와 리간드 사이의 경쟁적인 상호작용과 유기물의 생리적인 상태가 잘 설명이 되어야 한다(Campbell *et al.*, 2000). 수계에서 Fulvic acid와 중금속과 강한 결합효과에 의한 차이는 중금속의 크기, 친화력, 전기음성도의 차이에 기인하며 pH에 의하여 달라진다(Kogut and Voelker, 2001).

IC50 값이 작음은 독성도가 높은 것을 의미한다. FA의 비첨가 시를 기준으로 FA의 첨가 효과를 계산한 [IC50(FA) - IC50(NOFA)]의 값은 Cd(3.8) > Cu(2.4) > Pb(2.0) > Hg(1.9) > Zn(1.6)의 순서로 감소하였으므로 FA 첨가 후, IC50 값의 차이에 의한 FA에 의한 독성의 증감효과는 Cd < Cu < Pb < Hg < Zn의 순서로 증가하는 것을 알 수 있다. FA를 적용한 후와 적용하기 전에 나타나는 차이는 각 중금속 이온들이 FA와의 친화력(결합)에 의하여 나타나는 차이에 기인된 것으로 예측된다. 저해율에 대한 그래프에서 FA의 첨가한 경우에도 비첨가 시와는 다르게 Cd의 저해율이 다른 금속들의 저해율과 다르게 현저하게 감소되지 않은 현상이 관찰되었으며 이는 Cd은 FA와의 결합력이 떨어지거나 혹은 FA에 의한 독성이 줄어들지 않는다고 설명할 수 있다.

FA를 첨가하지 않았을 경우에는 방정식들이 상관계수(r) 값이 매우 크게 나타나 일차 직선에 가

까웠으나 FA를 첨가했을 경우에는 상대적으로 r값이 작아지는 현상을 관찰하였다. 이는 FA에 의한 착화반응의 결과로 나타나는 분석오차, 중금속과 FA와의 결합 등의 물리화학적이 인자들의 반응으로 인하여 나타나는 반응성의 결과로 예측된다.

위의 결과들을 바탕으로 결과 및 그에 대한 문제점을 살펴보면 다음과 같다.

(1) 박테리아(*E. coli*)의 AGB(alpha-glucosidase biosynthesis)에 대한 구리, 납, 카드뮴, 알루미늄 및 수은에 의한 억제효과를 관찰하였으며 본 실험에서는 금속과 FA의 결합에 의한 금속의 독성을 제거하는 작용임을 증명하고 있다. 또한 각각의 FA의 적용 시 및 비적용 시에 독성의 감소 효과는 중금속의 농도가 증가함에 따라 크게 나타나고 있다.

(2) FA를 첨가하지 않았을 때의 각 중금속의 IC50은 Hg(2.0) > Pb(1.9), Zn(1.9) > Cd(1.4) > Cu(1.3)의 순서로 감소되어 독성의 세기는 Hg < Pb < Zn < Cd < Cu의 순서로 증가된 것으로 나타났다. FA의 첨가에 의한 금속의 독성억제효과의 크기는 Zn > Cu > Hg > Pb > Cd 등의 순서로 증가되었다. 서로 다른 실험 결과들은 중금속에 의한 독성 실험들은 농도와 독성의 관계가 항상 단순한 것만은 아니며 살아있는 세포와 리간드 사이의 경쟁적인 상호작용과 유기물의 생리적인 상태가 잘 설명이 되어야 한다(Campbell *et al.*, 2000). 수계에서 Fulvic acid와 중금속과 강한 결합효과에 의한 차이는 중금속의 크기, 친화력, 전기음성도의 차이에 기인하며 pH에 의하여 달라진다고 설명하였다(Kogut and Voelker, 2001).

(3) FA를 첨가하여 나타난 IC50 값의 차이는 Cd(3.8) > Cu(2.4) > Pb(2.0) > Hg(1.9) > Zn(1.6)의 순서로 감소하였으므로 FA 첨가 후, IC50 값의 차이에 의한 FA에 의한 독성의 증감효과는 Cd < Cu < Pb < Hg < Zn의 순서로 증가하는 것을 알 수 있다.

(4) *In vitro* 실험에서는 FA를 실험의 초기에 첨가하였으나 실험의 중간단계에서 첨가할 수도 있으므로 FA를 첨가한 시점에 따라서 IC50 값이 달라질 수도 있다. 이에 대한 후의 연구가 필요한 것으로 사료된다.

(5) FA를 적용했을 경우에 독성의 저해율은 특정한 중금속에 관계없이 전체적으로 현저히 줄어들었으나 IC50의 값이 차이가 없어 독성에 대한 순서를 정하기가 어려웠다. 이는 중금속들 사이에 독

성이 원래 차이가 없거나, 혹은 본 실험에서 적용된 중금속의 농도가 상대적으로 작거나 혹은 큰 것으로 판단되며 또한 미래의 실험에서는 효모나 다른 생물들을 이용하여 수행하는 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구를 위하여 많은 자료와 폴빅산을 제공하여 주신 Mycsa AG. Company의 Federico Casillas 회장님께 감사드립니다.

참고 문헌

- Apartin C and Ronco A. Development of a free beta-galactosidase *in vitro* test for the assessment of heavy metal toxicity, *Environ. Toxicol.* 2001; 16(2): 117-120.
- Arulgnanendran VR and Nirmalakhandan N. Microbial toxicity in soil medium, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1998; 39(1): 48-56.
- Bitton G and Koopman B. Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in the environment, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1992; 125: 1-22.
- Bitton G, Jung K and Koopman B. Evaluation of a microplate assay specific for heavy metal toxicity, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1994; 27(1): 25-28.
- Boularbah A, Bitton G and Morel JL. Assessment of metal content and toxicity of leachates from teapots, *Sci. Total Environ.* 1999; 16; 227(1): 69-72.
- Campbell CD, Hird M, Lumsdon DG and Meeussen JC. The effect of EDTA and fulvic acid on Cd, Zn, and Cu toxicity to a bioluminescent construct (pUCD607) of *Escherichia coli*, *Chemosphere* 2000; 40(3): 319-325.
- Christi I, Milne CJ, Kinniburgh DG and Kretzschmar R. Relating ion binding by fulvic and humic acids to chemical composition and molecular size. 2. Metal binding, *Environ. Sci. Technol.* 2001; 15; 35(12): 2512-2517.
- Durrieu C and Tran-Minh C. Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2002; 51(3): 206-209.
- Dutton RJ, Bitton G, Koopman B and Agami O. Effect of environmental toxicants on enzyme biosynthesis: a comparison of beta-galactosidase, alpha-glucosidase and tryptophanase, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1990; 19(3): 395-398.
- Franklin NM, Adams MS, Stauber JL and Lim RP. Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2001; 40(4): 469-480.
- Gamila HA and Naglaa FA. Estimation of the hazard concentration of industrial wastewaters using algal bioassay, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1999; 63(3): 407-414.
- Gondar D, Fiol S, López R, María A, Ramos A, Antelo JM and Arce F. Determination of intrinsic complexation parameters for Cu²⁺ and a soil fulvic acid by ion selective electrode, *Chem. Spec. Bioavail.* 2000; 12(3): 89-96.
- Kogut MB and Voelker BM. Strong copper-binding behavior of terrestrial humic substances in seawater, *Environ. Sci. Technol.* 2001; 15; 35(6): 1149-1156.
- Kong IC, Bitton G, Koopman B and Jung KH. Heavy metal toxicity testing in environmental samples, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1995; 142: 119-147.
- Long D, Campbell MG and Graham L. Toxicity screening of environmental samples utilizing a bacterial bioassay, *Proceedings of the 2001 Conference on Environmental Research.* 2001; 129-135.
- Mallik N, Singh AK and Rai LC. Impact of bimetallic combinations of Cu, Ni and Fe on growth rate, uptake of nitrate and ammonium, ¹⁴CO₂ fixation, nitrate reductase and urease activity of *Chlorella vulgaris*, *Biol. Met.* 1990; 2(4): 223-228.
- Montuelle B, Latour X, Volat B and Gounot AM. Toxicity of heavy metals to bacteria in sediments, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1994; 53(5): 753-758.
- Nalecz-Jawecki G, Rudz B and Sawicki J. Evaluation of toxicity of medical devices using Spirotox and Microtox tests: I. Toxicity of selected toxicants in various diluents, *J. Biomed. Mater Res.* 1997; 35(1): 101-105.
- Peterson SM and Stauber JL. New algal enzyme bioassay for the rapid assessment of aquatic toxicity, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1996; 56(5): 750-757.
- Rai PK, Mallik N and Rai LC. Effect of Cu and Ni on growth, mineral uptake, photosynthesis and enzyme activities of *Chlorella vulgaris* at different pH values,

- Biomed. Environ. Sci. 1994; 7(1): 56-67.
- Yan T, Teo LH and Sin YM. Effects of metals on alpha-amylase activity in the digestive gland of the green mussel, *Perna viridis* L., Bull. Environ. Contam. Toxicol 1996; 56(4): 677-682.