

## 파일럿 규모의 하수 처리 공정별 E-screen Assay에 의한 에스트로겐 활성과 내분비계 장애물질의 농도 평가

이지호 · 박종열 · 나진성 · Cuong N. Duong · 이병천<sup>†</sup> · 김상돈

광주과학기술원 환경공학과

(2006년 4월 12일 접수, 2006년 7월 2일 채택)

### Estimation of Estrogenic Activity by E-screen Assay and Stepwise Analysis of Endocrine Disruptors in Pilot Sewage Treatment Plant

Ji Ho Lee · Jong Yol Park · Jin Sung Ra · Cuong N. Duong · Byoung Cheun Lee<sup>†</sup> · Sang Don Kim

Gwangju Institute of Science and Technology, Department of Environmental Science and Engineering

**ABSTRACT** : Endocrine disruptors were measured with GC/MS in effluents discharged from sewage treatment processes in pilot scale for the purpose of water reuse. From that analysis, we compared the removal rate of them by treatment processes. Nonylphenol was mainly detected in effluents and high concentration from 0.36 to 0.94  $\mu\text{g/L}$ .  $17\beta$ -estradiol(E2) and  $17\alpha$ -ethynylestradiol(EE2) were detected as below the limit of detection in effluent. Endocrine disruptors were removed effectively in the range from 50 to 100% by treatment process. EC50 value( $9.0 \times 10^{-3}$  M) of  $17\beta$ -estradiol(E2) by dose response curve of E-screen assay has higher than that of bisphenol A( $2.736 \times 10^{-5}$  M) and p-octylphenol( $9.760 \times 10^{-6}$  M). These results showed that alkylphenols have lower relative estrogen potency than other estrogens such as  $17\beta$ -estradiol(E2). Calculated estrogenic activity(ng-EEQ/L) was 2 times higher than measured total estrogenic activity which estimated by E-screen assay. Moreover estrogenic activity of effluent by treatment process showed very low as below 1 ng-EEQ/L.

**Key Words** : Endocrine Disruptors, Pilot Sewage Treatment Plant, E-screen Assay, Estrogenic Activity

**요약** : 물 재이용 목적으로 설계한 pilot scale의 하수 처리공정에서 배출되는 방류수 중 내분비계 장애물질을 GC/MS로 분석하였고, 처리 공정별로 제거율을 비교하였다. 각 처리 공정별 방류수에서 nonylphenol이 주로 검출되었고, 평균 0.36~0.94  $\mu\text{g/L}$ 으로 높게 검출되었으나, E2와 EE2는 처리수에서 정량 이하로 검출되었다. 내분비계 장애물질은 처리 공정별로 50~100%의 제거율을 보여주었다. E-screen assay에 의해 얻어진 양-반응 곡선에서 E2의 EC50값은  $9.0 \times 10^{-3}$  M로 bisphenol A와 p-octylphenol의 EC50값인  $2.736 \times 10^{-5}$  M,  $9.760 \times 10^{-6}$  M에 비해 매우 높았다. 이는 알킬페놀류가 E2에 대한 상대적인 에스트로겐 활성도가 매우 낮음을 보여주었다. 환경 호르몬 농도와 이 물질의 상대적인 에스트로겐 활성도에 근거하여 계산된 에스트로겐 활성도(ng-EEQ/L)는 E-screen assay에 의해 실측한 총 에스트로겐 활성도(ng-EEQ/L)에 비해 평균 2배의 높은 활성도를 보여 주었다. 각 처리 공정별 방류수의 에스트로겐 활성도는 1 ng-EEQ/L 이하의 매우 낮은 활성도를 보여주었다.

**주제어** : 내분비계 장애물질, 하수 처리, E-screen Assay, 에스트로겐 활성도

## 1. 서론

하 · 폐수 처리장의 방류수는 내분비계 장애물질의 주요한 발생원이다. 내분비계 장애물질은 수계의 다양한 생물 종에 대하여 성 교란, 수컷 어류의 vitellogenin(VTG) 증가에 따른 생식 기능 이상, 인간의 일시적인 정자 수 감소, 여성 유방암 발생률 증가 및 면역계 손상 등의 악영향을 유발한다.<sup>1~3)</sup> 이러한 문제점은 주로 자연적 및 합성 호르몬인 estrone(E1),  $17\beta$ -estradiol(E2), estriol(E3),  $17\alpha$ -ethynylestradiol (EE2), bisphenol A, nonylphenol, 4-octylphenol 등과 같은 천연 또는 합성 호

르몬이 호르몬 기능을 모방하여 교란시키는 기작을 통해 영향을 나타낸다.<sup>1,4)</sup>

수계에 존재하는 수많은 내분비계 장애물질 물질은 분석 방법의 한계로 인해 화학적 분석만으로는 에스트로겐 활성의 정확한 예측이 불가능하다. 이에 다양한 생물검정을 병행하여 총 에스트로겐의 활성도를 평가하기 위한 접근법이 시도되어 왔다. 화학적 분석방법으로는 GC-MS, LC-MS, ELISA Kit 등이 주로 사용되고 있으며, bioassay는 Yeast Estrogen Screening(YES), Yeast Estrogen Screening with Lyticase(LYES), E-screening assay를 이용하여 에스트로겐 활성을 정량화하고 있다. 정량 방법은 E2의 양-반응 곡선에 근거하여 각 물질들의 에스트로겐 활성도를 E2 당량값(EEQ; E2 equivalents concentration)으로 나타낸다.

하 · 폐수 처리장 방류수의 내분비계 장애물질 물질 중 E1,

<sup>†</sup> Corresponding author  
E-mail: leebc@gist.ac.kr  
Tel: 062-970-3281

Fax: 062-970-2434

E2, EE2는 nonylphenol, 4-octylphenol, bisphenol A에 비해 낮은 농도로 검출되지만, 상대적인 에스트로젠 활성도는 98% 이상 높게 나타나는 것으로 보고되고 있다.<sup>4,5)</sup> 따라서, 하 · 폐수 처리장에서 E1, E2, EE2 등의 내분비계 장애물질 물질의 제거에 대한 관심이 증가되고 있다. 특히, 활성슬러지법, Membrane Bioreactor(MBR), filtration 공정 (Ultrafiltration; UF, Nanofiltration; NF)에서 배출되는 방류수에서 환경 호르몬 물질의 제거와 최적화된 제거 공정 조합에 대한 많은 연구가 진행 중에 있으나,<sup>6)</sup> 처리 공정별 내분비계 장애물질의 제거율에 대한 실질적인 data는 부족한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 유입하수, MBR, MBR-NF, MBR-RO의 처리수를 채취하여 시료 중 E1, E2, EE2, nonylphenol, p-octylphenol, bisphenol A, genistein을 GC/MS로 검출수준을 조사하여 각 처리 공정별로 제거율을 비교하였다. 또한, 화학적 분석을 통해 검출된 내분비계 장애물질 물질의 농도와 E2에 대한 relative potency에 근거하여 계산된 에스트로젠 활성도와 MCF-7 BUS cell을 이용한 E-screen assay에 의해 실측한 총 에스트로젠 활성도를 비교 · 평가하여 수생 생물의 내분비계 장애 영향을 예측하는 데 유용한 정보로 활용하고자 한다.

## 2. 재료 및 실험방법

### 2.1. 대상 오염물질

내분비계 장애물질은 실제 수계에서 빈번히 검출되고 있으며, 산업용 세제로 널리 사용되는 알킬페놀류인 nonylphenol(97%), p-octylphenol(99%), bisphenol A(99%)와 높은 에스트로젠 활성도를 나타내 17β-estradiol(E2; 98%), estrone(E1; 99%), 17α-ethynylestradiol(EE2; 98%), 그리고 식물성 에스트로젠으로 잘 알려진 genistein(98%) 등 총 7종으로 Sigma-aldrich(St. Loise, Mo, USA)에서 구입하였다. 시료의 정제과정에서 florisil(Supelco, Bellefonte, PA, USA)과 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(Sigma-aldrich; St. Loise, Mo, USA; > 99.0%)를 1 : 2의 비율로 사용하였다. 유도체화를 위해서 N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide(MSTFA; Sigma-aldrich, USA; > 99.0%), 내부표준물질로서는 bisphenol A-d<sub>16</sub>(Isotec, > 98%), 외부표준물질은 pyrene-d<sub>10</sub>(Isotec, > 98%)을 사용하였다. 본 연구에서 선정된 오염물질의 물리 · 화학적 특성인 화학적 구조와 분자량, 용해도, 옥탄올/물 분배계수(Log K<sub>ow</sub>), 산

해리상수(pKa)는 Table 1에 나타내었다.

E-screen assay로 사용되는 MCF-7 BUS cell은 미국 Tufts 대학의 A. Soto에게 분양받아서 시험을 수행하였다. Phenol red가 없는 10% charcoal-dextran으로 처리된 Fetal Bovine Serum(FBS)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배지, 10% trichloroacetic acid(TCA; Merck, USA), 0.4% sulforhodamine B(SRB; Sigma, USA), 트립신은 GIBCO-BRL life technologies (Basel, Switzerland)에서 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 시료 채취 및 전처리

유입수와 MBR, MBR-NF, MBR-RO에서 배출되는 방류수는 2005년 5월~11월 동안 composite 방법으로 2 L씩 채취하였다(Fig. 1). 채수병은 증류수와 메탄올로 세척하여 사용하였으며 시료를 채취한 후 바로 4°C에서 냉장보관 하였고, 3일 이내에 GC-MS 분석을 수행하였다.

채취한 시료 1 L를 24시간 이내에 GF/C(0.45μm Whatman, UK)로 여과한 후, pH 2로 조정하고 외부 표준물질인 pyrene-d<sub>10</sub>을 주입하여 추출 전까지 4°C에서 시료를 냉장 보관하였다. 전처리는 500 mg C<sup>18</sup>을 포함하는 6 mL sep-pak cartridge(Waters, Milford, MA, USA)를 사용하여 고상추출법(Solid Phase Extraction; SPE)으로 추출하였다. 시료 추출 전에 8 mL/min의 유속으로 증류수와 dichloromethane을 사용하여 미리 흘려준 후, 동일한 유속으로 3 mL dichloromethane을 사용하여 두 번 반복하여 추출하였다. 추출된 시료는 질소 가스로 500 μL까지 농축하여 column(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : florisil : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 1 : 2 : 1)을 사용하여 clean up 과정을 거친 후, 15 mL hexane으로 추출하여 완전히 건조시킨 후, acetone을 100 μL 주입하였다. 내부표준물질인 bisphenol A-d<sub>16</sub>과 오염물질의 휘발성을 증가시켜 분석의 민감도를 높이기 위해서 MSTFA 유도체 시약을 주입하여 최종 200 μL까지 농축하여 GC/MS분석을 수행하였다.

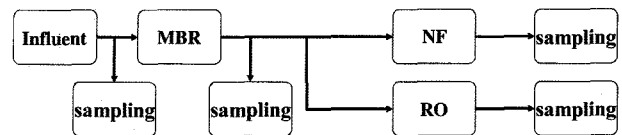


Fig. 1. Sampling from sewage treatment processes in pilot scale.

Table 1. Characteristics of target compounds

Parameters	Nonylphenol	p-octylphenol	Bisphenol A	Estrone	17β-estradiol	17α-ethynyl-estradiol	Genistein
Chemical structure							
Molecular weight (g/mol)	220.2	206.3	228.1	270.4	272.4	296.4	270.2
Solubility(mg/L)	7	-	120	0.8 ~ 12.4	3.9 ~ 13.3	4.8	-
Log K <sub>ow</sub>	5.71	-	3.32	3.43	3.94	4.15	-
pKa	10.25	-	1 × 10 <sup>-10</sup> (atm-cum/mole)	10.3 ~ 10.8	10.5 ~ 10.7	10.21	-

2.3. 분석방법

시료분석에 사용된 가스크로마토그래피는 Shimadzu GC-17A, 검출기는 Shimadzu QP-5050 시리즈를 사용하였다. Column은 Restek®, XTI-5 fused silica capillary를 사용하였고, 운반가스로는 He(99.9999%) 가스, column 유속은 1.0 mL/min, sampling time 2분, 시료 주입량 3 µL, 시료 주입부 온도 280°C, mass와 interface 온도는 290°C로 유지하여 splitless mode로 분석하였다. Column 온도 프로그램은 2분 동안 100°C를 유지하고, 10°C/min 비율로 300°C까지 온도를 증가시킨 후 10분 동안 300°C 온도를 유지하여 총 32분을 운영하여 분석하였다. 시료는 70 eV에서 이온화되었으며, 검출에너지는 1.6 kV로 설정하였다. 각 오염물질은 column 온도 프로그램에 따른 retention time으로 정성분석 하였고, m/z값은 Table 2에 나타내었다. 실제 수계의 검출 농도를 고려하여 저농도(1 ppb~50 ppb)와 고농도(50 ppb~1000 ppb)로 검량선을 작성하여 내부표준물질에 의해 보정하여 정량분석을 수행하였다. 각 오염물질의 정량 한계는 nonylphenol은 10 ng/L, E1은 0.5 ng/L, E2는 0.5 ng/L, EE2는 5 ng/L으로 나타냈다(Table 2).

2.4. E-screen assay

A. Soto 방법<sup>7)</sup>을 수정하여 E-screen assay를 수행하였다. MCF-7 BUS cell은 10% Fetal Bovine Serum(FBS; cat No. 26140, GIBCO, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배지(GIBCO, cat No. 11885, USA)를 사용하여 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 세포를 배양하였다. Phenol red가 첨가되지 않은 DMEM(GIBCO, New-York, USA)에 5% charcoal(Sigma, USA)과 0.5% dextran(Sigma, USA)으로 처리한 현탁액을 10% FBS를 첨가하여 반응시킨 후, 25분간 원심분리 하여 상층액을 분리한 후, 0.45 µm와 0.2 µm 필터에 여과하여 사용 전에 -20°C에서 보관하였다. 계대증식 중인 세포를 0.25% 트립신(GIBCO, NewYork, USA)을 이용하여, 부착면에서 탈리시킨 후, 10% CD-FBS가 첨가된 DMEM을 24 well plate의 각 well당 1×10<sup>4</sup>개의 cell이 되도록 분주하였다. 분주한 24 well plate는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양 후 세포가 바닥에 부착될 수 있도록 하였다. 세포부착 후, 시험용액이 첨가된 DMEM 배지로 교환하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 6일 동안 배양하였다. 세포의 성장은 SRB assay를 이용하여 간접적으로 측

정하였다. SRB assay는 기존의 배양액을 제거하고, 10% trichloroacetic acid(TCA; Merck, cat No. 100807, Germany)를 가하여 4°C에서 40분간 방치하여 세포를 고정시킨 후, 증류수를 이용하여 5회 세척하여 남아있는 TCA 용액을 제거하고 실온에서 완전히 건조하였다. 이 well plate에 0.4% sulforhodamine B(SRB, Sigma, cat No. S1402, USA) 염색 용액을 가하여, 1시간 동안 세포를 염색하였고, 과량의 SRB 용액을 제거하기 위해서 1% 초산을 이용하여 5회 세척한 후 실온에서 건조하였다. 건조된 well plate에 pH 10.5의 10 mM tris buffer(AMRESCO, USA)를 가하여 SRB를 용출시킨 후, ELISA reader(BIO-TEK INSTRUMENTS INC, USA)를 사용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. E-screen에 의한 정량적인 평가

각 처리수 시료의 E-screen assay에 의한 실측 에스트로겐 활성도를 정량적으로 평가하기 위해 측정된 흡광도를 이용하여 다음과 같은 식으로 변환하여 ng-EEQ(E2 Equivalent Quantification)/L값으로 나타내었다.<sup>8)</sup>

$$Normalized\ proliferation = \frac{OD_{test} - average\ OD_{neg}}{average\ OD_{pos} - average\ OD_{neg}}$$

Negative control(NP)의 평균 세포 증식상태의 세포 성장 반응값과 E2의 평균 최대 세포증식 상태의 세포성장 반응값을 고려한 normalized 세포 성장 반응값으로 에스트로겐 활성도를 나타내었다. 이는 E-screen assay에서 다양한 실험적인 변수들이 동일하게 영향을 받는 것을 가정하지만, 한 실험에서도 다른 well plate 간 또는 well plate 내에서 많은 변화들이 발생할 수 있기 때문에 실험적인 변수들의 영향을 최소화하기 위해서 에스트로겐 활성도를 나타내는 흡광도값(O.D.)을 normalization하여 정량적으로 평가하였다.

각 오염물질의 주입농도(M)에 대한 normalized 세포 성장 반응값으로 에스트로겐 활성도를 나타내는 양-반응 곡선을 Sigma plot 8.0 version 프로그램을 이용하여 나타내었다(Fig. 2).

오염물질별 EC50값을 결정하기 위해 10<sup>-13</sup> M~10<sup>-5</sup> M의 주입 농도에서 sigmoidal 형태의 가장 적절한 양-반응곡선 회귀식을 얻었다. 각 오염물질별 양-반응 곡선의 회귀식은 0.95~0.99의 높은 상관도를 나타내었다. E1과 E2는 Y=

Table 2. Quantitative analysis of target compounds

Parameters	Nonylphenol	p-octylphenol	Bisphenol A	Estrone	17β-estradiol	17α-ethynyl-estradiol	Genistein
Retention time (min)	12.88~13.60	13.775	17.858	21.750	22.025	23.017	24.183
Ionization channel (m/z)	193, 221, 207, 235, 295	179, 278	357, 372	218, 257, 342	285, 416	196, 232	228, 472
Detection Limit (ng/L)	10	0.5	1.0	0.5	0.5	5.0	1.0
Quantification limit (ng/L)	1	0.1	0.5	0.1	0.1	1.0	0.5

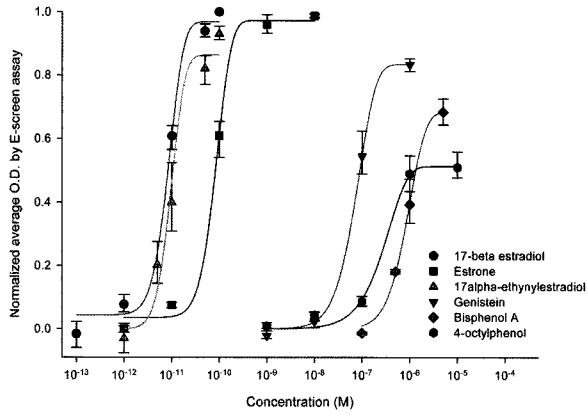


Fig. 2. Dose-response curve by E-screen assay for target compounds.

$Y_0 + a \times (1 - \exp^{-b \times Conc.})^c$ , p-octylphenol, bisphenol A, EE2, genistein은  $Y = a \times (1 - \exp^{-b \times Conc.})^c$ 의 적절한 회귀식으로부터 최소값  $Y_0$ , 최대값  $a$ , 기울기  $b$ , 절편  $c$ 의 상수값이 결정되었다(Table 3).

양-반응 곡선에 근거한 회귀식을 사용하여, 각 오염물질별로 최소 반응값과 최대 반응값의 중간 반응값을 적용한 EC50 값을 산출하였다(Table 4).

실측한 에스트로겐 활성도와 비교하기 위해 화학적 분석에 의해 계산된 에스트로겐 활성도를 조사하여 ng-EEQ/L로 나타내었다. 각 오염물질의 relative potency와 GC-MS분석에 의해 검출된 농도를 곱하여 오염물질별 에스트로겐 활성도를 ng-EEQ/L로 정량하였고, 이 값을 합하여 시료 내 EEQ값을 산출하여 총 에스트로겐 활성도를 예측할 수 있었다.<sup>9)</sup> Relative potency는 다음과 같은 식에 의해 E2의 EC50값에서 각 오염물질의 EC50값으로 나누어서 산출하였다.<sup>9)</sup>

$$RP = \frac{EC50_{E2}}{EC50}$$

$$EEQ = \sum_i RP \times C_i = \sum_i EEQ_i$$

Table 3. Regression equation and variables of response curve of target compounds

Parameters	p-octylphenol <sup>1</sup>	Bisphenol A <sup>1</sup>	Estrone <sup>2</sup>	17β-estradiol <sup>2</sup>	17α-ethynyl-estradiol <sup>1</sup>	Genistein <sup>1</sup>
a	0.5140	0.6839	0.9370	0.9250	0.8636	0.8340
b	3.15×106	1.50×106	2.00×1010	2.00×1011	2.00×1011	1.67×107
c	1.3024	2.1350	3.3480	3.3689	4.2513	1.8742
Y <sub>0</sub>	-	-	0.0356	0.0434	-	-
r <sup>2</sup>	0.98	0.98	0.99	0.99	0.95	0.99

\* Equation : <sup>1</sup>  $Y = a \times (1 - \exp^{-b \times Conc.})^c$  <sup>2</sup>  $Y = Y_0 + a \times (1 - \exp^{-b \times Conc.})^c$

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. E-screen assay에 의한 양-반응 곡선

각 오염 물질별로 10<sup>-13</sup> ~ 10<sup>-5</sup> M의 주입 농도를 증가시킴에 따라 normalized 세포 성장 반응값으로 에스트로겐 활성도를 나타내는 양-반응 곡선을 얻었다(Fig. 2). 이 반응값은 각 오염물질별로 세 번의 반복 실험을 수행하였으며, 각 실험별로 3번의 반복을 두어서 수행하여 평균값 ± 표준편차로 나타내었다.

동일한 노출 농도에 대해 E1, E2, EE2가 bisphenol A와 p-octylphenol에 비해 세포 성장 반응값이 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 수계에서 빈번히 높은 농도로 검출되는 알킬페놀류에 비해 천연 및 합성 호르몬 물질이 에스트로겐 활성도의 주 기여요인임을 알 수 있었다.

양-반응 곡선에 의해 얻어진 오염 물질의 EC50값과 E2에 대한 relative potency는 Table 4와 같다. 양-반응곡선식에 의해 얻어진 EC50값을 오염 물질별로 살펴보면 E2의 EC50값이 약 0.009 nM로 가장 높은 에스트로겐 활성도를 나타내었다. EE2의 EC50값은 0.01 nM로서 E2와 가장 유사한 값을 보여주었고, E1의 EC50값은 0.082 nM로 나타났다. Bisphenol A와 p-octylphenol의 relative potency는 각각 2.736×10<sup>-5</sup> M, 9.760×10<sup>-6</sup> M로서 E2에 비해 매우 낮은 에스트로겐 활성도를 보여주었다. EE2의 relative potency가 0.893으로 가장 높았고, E1은 EE2에 비해 약 9배 낮은 활성도를 보여주었다(Table 4).

#### 3.2. 각 처리공정별 오염물질의 정량 분석 결과

처리 공정별 방류수에서 주로 검출되고 µg/L수준으로 높게 검출되는 오염 물질은 nonylphenol이었다. Nonylphenol은 유입수에서 2.11 (0.41 ~ 4.6) µg/L, 방류수에서 평균 0.36 ~ 0.94 µg/L로 검출되었으며, 처리공정별로 상이한 제거율(MBR; 56%, MBR-NF; 74%, MBR-RO; 83%)을 보여주었다. Bisphenol A와 genistein은 유입수에서 각각 평균 90.16 ng/L, 94.98 ng/L로 높게 검출되었지만, 방류수에서 93% 이상의 높은 제거율을 보여주었다. Estrone은 유입수에서 약 20 ng/L로

Table 4. Relative potency and EC50 value by dose-response curves of E-screen assay for target compounds

Parameters	p-octylphenol	Bisphenol A	Estrone	17β-estradiol	17α-ethynyl-estradiol	Genistein
EC50(nM)	313.4	878.5	0.082	8.574×10 <sup>-3</sup>	9.597×10 <sup>-3</sup>	72.33
Relative potency	2.736×10 <sup>-5</sup>	9.760×10 <sup>-6</sup>	0.105	1.000	0.893	1.185×10 <sup>-4</sup>

검출되었고, MBR 처리수에서 85%, MBR-NF처리수에서 88%, MBR-RO 처리수에서 92%의 제거율을 보여주었다. 높은 에스트로겐 활성도를 보이는 E2와 EE2는 유입수에서 매우 낮은 농도로 나타났고, 처리 공정별 방류수에서 정량 한계 이하로 검출되었다. 구체적으로 처리공정별 오염물질의 제거율을 살펴보면, MBR 처리수가 MBR-NF, MBR-RO 처리수 보다 더 낮은 제거율을 보여주었고, 더 높은 농도로 검출되었다. MBR 처리수에서의 제거율은 nonylphenol과 p-octylphenol은 약 50~55%, bisphenol A는 93%, estrone는 85%, genistein은 99% 이하, E2, EE2는 100% 이하의 제거율을 보여주었다. MBR과 조합된 NF 처리공정의 방류수에서는 nonylphenol과 p-octylphenol이 74~85%, bisphenol A가 97%, estrone은 88%로 나타났고, MBR과 조합된 RO 처리공정의 방류수에서는 nonylphenol과 p-octylphenol이 83~90%, bisphenol A가 98%, estrone은 92%이고, E2, EE2, gesnistein은 MBR-NF, MBR-RO 처리수에서 검출되지 않아 완전히 제거된 것으로 사료된다(Table 5). 활성슬러지법으로 처리된 배출수에서 E1, E2, EE2, alkylphenols의 제거율은 각각 60~75%, 85% 이상, 65~85%으로 나타났다.<sup>6)</sup> Muriel A et al의 연구결과에 의하면 MBR 공정은 생물 분해와 멤브레인 여과가 통합된 처리 방법으로 생물학적 처리공정에 비해 내분비계 장애물질을 효과적으로 제거할 수 있으며 특히, 여과공정(UF, MF, NF)에서는 최대 100%까지 높은 제거율이 보고되었다.<sup>6)</sup>

**3.3. E-screen assay에 의한 에스트로겐 활성도 비교**

E-screen assay에 의해 실측한 에스트로겐 활성도와 처리 공정별 검출된 오염물질의 농도 및 relative potency에 근거하여 계산된 에스트로겐 활성도를 ng-EEQ/L로 정량하여 상호 비교해 보았다. Fig. 2와 같이 계산된 에스트로겐 활성도는 E-screen assay에 의해 실측한 에스트로겐 활성도에

비해 평균적으로 약 2배 높은 값을 나타내었고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 실측한 값과 계산된 값간(처리 공정별 방류수에 대한 t test, p=0.72). E-screen assay는 에스트로겐 물질에 의한 세포 성장반응 시험이므로 시료 전처리 및 정제 과정에서 에스트로겐 수용체와의 결합을 방해하는 물질로 인해 세포 성장이 억제 되어 세포성장 반응을 과소평가 할 가능성이 있다.<sup>10)</sup> MVLN 세포를 사용하여 실측한 에스트로겐 활성도와 계산된 에스트로겐 활성도(ng-EEQ/L)의 비교연구에서는 유사하거나 또는 낮은 값을 나타내는 것으로 보고되고 있다.<sup>5)</sup> 계산된 에스트로겐 활성도(ng-EEQ/L)가 E-screen assay에 의해 실측한 에스트로겐 활성도(ng-EEQ/L)에 비해 1~4배 높게 나타나는 것은 시료 내 환경 호르몬과 유사한 물질 및 에스트로겐 수용체에 antagonistic 영향을 유발할 수 있는 오염 물질이 존재함에 기인한다.<sup>11)</sup> Humic acid와 용존성 유기물(dissolved organic matter)은 내분비계 장애물질과 complexation을 형성하여 내분비계 장애물질 물질이 에스트로겐 수용체와 결합하는 것을 방해하고 이로 인해 에스트로겐 활성도를 감소시킨다고 보고되고 있다.<sup>12-14)</sup>

알킬 페놀류는 방류수에서 검출 빈도도 높고, 비교적 높은 농도로 검출되지만, 총 에스트로겐 활성의 최대 5%의 기여도만을 보여 주었고, E1, E2, EE2는 정량 한계 이하 또는 낮은 수준으로 검출되었지만, E-screen assay에 의한 에스트로겐 활성도는 높게 나타나 총 에스트로겐 활성도의 주 기여요인으로 조사되었다. 알킬 페놀류를 포함하는 시료는 총 추출 시료의 에스트로겐 활성도의 1% 이하를 나타내었고, E2와 EE2를 포함하는 시료는 총 추출 시료의 에스트로겐 활성도 중 대부분을 차지하였다. 이는 시료 내 내분비계 장애물질 물질이 에스트로겐 수용체와의 결합을 간섭하는 물질과 antagonistic 영향을 유발하는 물질이 존재하여 총 추출 시료의 에스트로겐 활성도를 감소시키는 것으로 보고되고 있다.<sup>5)</sup>

**Table 5.** Detection level of target compounds by sewage treatment process

Samples		Nonylphenol(µg/L)	p-octylphenol	Bisphenol A	Estrone	17β-estradiol	17α-ethynyl-estradiol	Genistein
Influent (n=9)	Avg.	2.11	0.98	90.16	20.13	0.42	4.29	94.98
	Min.	0.41	ND	23.96	2.05	ND	ND	ND
	Max.	4.60	2.30	159.52	55.57	3.82	38.60	693.25
MBR effluent (n=9)	Avg.	0.94	0.47	6.06	3.01	ND	ND	0.91
	Min.	0.22	ND	2.51	ND	-	-	ND
	Max.	1.68	1.23	10.12	27.12	-	-	8.23
	removal rate	55%	52%	93%	85%	<100%	<100%	99%
NF effluent (n=9)	Avg.	0.54	0.15	2.69	2.38	ND	ND	ND
	Min.	ND	ND	ND	ND	-	-	-
	Max.	1.00	0.54	9.01	21.38	-	-	-
	removal rate	74%	85%	97%	88%	<100%	<100%	<100%
RO effluent (n=9)	Avg.	0.36	0.10	1.88	1.58	ND	ND	ND
	Min.	ND	ND	ND	ND	-	-	-
	Max.	0.84	0.59	7.27	14.23	-	-	-
	removal rate	83%	90%	98%	92%	<100%	<100%	<100%

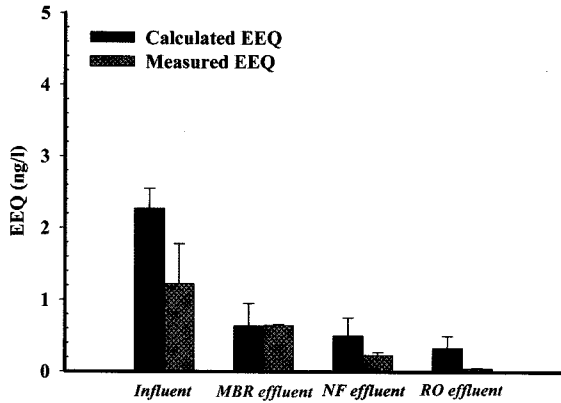


Fig. 3. Comparison between calculated and measured EEQ by treatment processes.

MBR-NF와 MBR-RO 방류수의 E-screen assay에 의해 실측한 에스트로겐 활성도는 각각 0.1, 0.2 ng-EEQ/L로 매우 낮은 에스트로겐 활성도를 보여주었다(Fig. 3). 연구결과는 생물학적 처리방법을 거쳐 NF와 RO 공정에서 처리된 배출수에서  $0.21 \pm 0.05$  ng-EEQ/L으로 본 실험결과와 동일하게 매우 낮은 에스트로겐 활성도를 보여주는 것으로 조사되었다.

#### 4. 결론

처리 공정별로 배출되는 방류수에서 GC/MS에 의한 내분비계 장애물질의 정량 분석과 이에 따른 제거율을 조사하였다. 화학적 분석에 의한 검출농도와 relative potency에 근거하여 계산된 에스트로겐 활성도와 E-screen assay에 의해 실측한 에스트로겐 활성도를 처리공정별로 상호 비교·평가하였다. MBR 단일 처리공정의 방류수에 비해 MBR을 거쳐 NF와 RO로 연속 처리된 조합공정의 방류수에서 오염물질의 높은 제거율과 1 ng-EEQ/L의 매우 낮은 에스트로겐 활성도를 보여주었다. 알킬 페놀류에 비해 천연 및 합성 호르몬은 수계에서 정량 한계 이하 또는 낮은 농도로 검출되지만, 높은 relative potency로 인해 만성적으로 수생물의 내분비계 장애 영향을 유발할 가능성이 있다. 따라서, 이러한 물질들을 제거할 수 있는 처리 공정을 효과적으로 조합·설계한다면, 하천 수생태의 내분비계 장애 영향을 최소화할 수 있을 것으로 판단된다.

시료 내 오염물질 농도와 E2에 대한 relative potency에 근거하여 계산된 에스트로겐 활성도는 E-screen assay에 의해 실측된 에스트로겐 활성도에 비해 평균 약 2배 높은 값을 보여주었다. 이러한 이유는 내분비계 장애물질이 에스트로겐 수용체와의 결합을 간섭하는 물질에 의한 영향으로 에스트로겐 활성도가 저평가 되는 것으로 판단된다.

#### 사 사

본 연구는 2003년도 프런티어 수자원 확보 기술 사업단의 미량오염물질의 위해성 평가 세부과제의 일환으로 과기부의

지원 하에 수행 되었습니다.

#### 참고문헌

- Mocarelli, P., Brambilla, P., Gerhoux, P. M., Patterson, D. G., and Needham, L. L., "Change in sex ratio with exposure to dioxin" *Lancet*, **348**, 409(1996).
- Wolff, M. S., Toniolo, P. G., Lee, E. W., Rivera, M., and Dublin, N., *Journal of National Cancer Institute*, **85**, 648(1993).
- Ervine, S., et al., *British Medical Journal*, **312**, 467 (1996).
- Nakada Norihide, Nyunoya Hiroshi, Nakamura Masaru, Hara Akihiki, Iguchi Taisen, and Takada Hideshige, "Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent," *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**(12), 2807~2815(2004).
- Snyder, A. S., Villeneuve, D. L., Snyder, E. M., and Giesy, J. P., "dentification and quantification of estrogen receptor agonists in wastewater effluents," *Environ Sci Technol.*, **35**, 3620~3625(2001).
- Muriel, A., Youssef, F. M., Rajeshwar, D. T., Adams, C. D., Surampalli, R. Y., "Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge," *Process Biochemistry*, **41**(3), 525~539(2006).
- Soto, A. M., et al., "The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants," *Environmental Health Perspectives*, **103**, 113~122(1995).
- Nissanka, R., Silva, E., Scholze, M., Kortenkamp, A., et al., "Deviation from additivity with estrogenic mixture containing p-octylphenol and p-tert-octylphenol detected in the E-screen assay," *Environ Sci Technol.*, **38**, 6343~6352(2004).
- Rutishauser, B. V., Maija, P., Escher, B. I., Ackerman, G. E., Aerni, H. R., Suter, J. F., and Eggen, I. L., "Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assay and chemical analysis of steroids," *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**(4), 857~864(2004).
- Albertinka, J. M., Juliette, L., Marola, M. H., van Lipzig, John H. N. Meerman, Belfroid, A. C., Albertus, S., Bart van der Burg, Gerard, B. J., and Dick, V., "Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays," *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**(1), 16~23(2002).
- Wolfgang, K., Peter, S., Ulirike, B., Winfried, S., Volker, H., and Metzger, J. W., "Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany/Biological analysis," *Environmental*

- Toxicology and Chemistry*, **20**(10), 2142~2151(2001).
12. Tanghe, T., et al., "Nonylphenol and estrogenic activity in aquatic environmental samples," *Journal of Environmental Quality*, **28**, 702~709(1999).
  13. Yanamoto, H., Liljestrand, H. M., Shinizu, Y., Morita, M., "Effects of physical-chemical characteristics on the sorption of selected endocrine disruptors by dissolved organic matter surrogates," *Environ Sci Technol.*, **37**, 2646~2657(2003).
  14. Kim, S. D., Huizhong, M., Allen, H. E., and Cha, D. K., "Influence of dissolved organic matter on the toxicity of *Ceriodaphnia dubia*; Effects of complexation kinetics," *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 2433~2437(1999).
  15. Tanaka, H., Yakou, Y., Takahashi, A., Higashitani, T., and Komori, K., et al., "Comparison between estrogenicities estimated from DNA recombinant yeast assay and from chemical analysis of endocrine disruptors during sewage treatment," *Water Sci Technol.*, **43**(2), 125~132 (2001).