

하수처리장의 내분비계장애물질에 대한 Yeast Two-hybrid Assay와 Enzyme-linked Immunosorbent Assay에 의한 에스트로겐활성도 평가

이병천 · 나진성 · 김상돈 · Kawai Hukiko* · 이철희†,**

광주과학기술원 환경공학과 · *Huji Electric Advanced Technology Co., Ltd. · **영남대학교 건설환경공학부

(2007년 5월 17일 접수, 2007년 6월 25일 채택)

Evaluation of the Estrogenic Activity by Yeast Two-hybrid Assay and Enzyme-linked Immunosorbent Assay in Sewage Treatment Plant

Byoungcheun Lee · Jinsung Ra · Sangdon Kim · Hukiko Kawai* · Chulhee Lee†,**

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

*Huji Electric Advanced Technology Co., Ltd. · **Department of Environmental Engineering, Yeungnam University

ABSTRACT : Several endocrine disrupting chemicals(EDCs) were monitored to evaluate the estrogenic activities and the concentrations by yeast two-hybrid assay and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) in sewage treatment plant(STP) which consist of industrial and domestic line. In the influent of domestic line, estrone, 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol and alkylphenolethoxylate(APE) were detected up to 167.1, 39.7, 7.3 and 145.4 ng/L, respectively. The average removal efficiency of 17 β -estradiol after the activated sludge process was 77.5% and further removed to 80.8% after the sand filtration-ozonation step. These results suggests that the activated sludge process has limited potential to remove the estrogenic activity effectively. The contributions of the estrogenic chemicals to the estrogenic activities were 70.7, 23.3, 3.7 and 2.3% for estrone, 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol and APE, respectively, in the domestic line effluents. Therefore, 17 β -estradiol and estrone contributed most of the estrogenic activity in the domestic line effluents.

Key Words : Yeast Two-hybrid Assay, ELISA, Sewage Treatment Plant, EDCs, 17 β -estradiol, Estrone

요약 : 가정계열과 공단계열로 분리하여 처리되는 하수처리장에서 에스트로겐 활성을 평가하기 위하여 yeast two-hybrid assay와 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 내분비계장애물질의 농도와 활성도를 측정하였다. 그 결과 가정계열 유입수 중에서 estrone (E1), 17 β -estradiol(E2), 17 α -ethinylestradiol(EE2) 그리고 APE의 농도는 각각 최대 167.1, 39.7, 7.3, 145.4 ng/L까지 검출되었다. 활성슬러지법에 의한 처리로, 17 β -estradiol의 평균제거율은 77.5%, 고도처리 공정인 모래여과와 오존산화를 거친 후에는 80.8%까지 제거되는 것으로 나타났다. 동시에 Yeast two-hybrid assay로 각 내분비계장애물질의 농도-반응곡선으로부터 반응식을 구하여, 에스트로겐 활성에 미치는 각 물질의 기여도를 분석한 결과, 가정계의 활성슬러지법에 의한 처리수에서 estrone, 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol, APE가 각각 70.7, 23.3, 3.7, 2.32%로 나타났다. 즉, 생물학적 처리공정을 통해 배출된 처리수의 에스트로겐 활성에 영향을 미치는 주된 기여물질은 estrone과 17 β -estradiol인 것으로 나타났다.

주제어 : Yeast Two-hybrid Assay, ELISA, 하수처리장, 내분비계장애물질, 17 β -estradiol, Estrone

1. 서론

현대 산업사회에서는 매우 다양한 화학물질이 다양한 용도로 우리 주위에서 이용되고, 사용 후 불필요하게 된 화학물질은 환경 중으로 방출되고 있다. 이러한 화학물질 중에서 내분비계장애물질은 생물의 내분비계에 작용하여 생체의 항상성을 저해하여 암, 세대유지의 혼란 등 다양한 형태의 영향을 끼친다고 보고되고 있다.^{1,2)} 내분비계장애물질에 의한 인체 및 생태계에 미치는 영향은 지금까지 환경 RISK관리의 대상으로 되어온 독성물질과는 달리 극미량으로도 그 작

용이 발현하는 것으로 보고되고 있다.¹⁻³⁾ 그러나 아직 내분비계장애 작용에 관한 연구는 각각의 화학물질에 대한 스크리닝이 실시되고 있는 단계에 불과하다. 이러한 배경으로부터 화학물질 개개의 호르몬 활성도의 screening기법 개발이나 환경중의 오염실태를 조사하기 위한 모니터링이 시도되고 있다.

Ternes 등은 독일 및 캐나다에 있는 하수처리장에서 천연 호르몬과 피임약으로 사용되는 인공합성호르몬을 검출하여 17 β -estradiol(E2) 및 estrone(E1)이 각각 0.015와 0.027 μ g/L 농도 수준으로 검출되는 것으로 보고하였다.⁴⁾ 또한 하수처리장 방류수 중에서 식물성에스트로젠(phytoestrogens), 노닐페놀(nonylphenol), 비스페놀A(bisphenol-A)가 각각 3~83 ng/L, 1 μ g/L, 0.013~0.036 μ g/L범위로 검출되는 것으로 보고하고 있다.⁵⁾ 이와 같이 대부분의 내분비계장애물질이 μ g/L농

† Corresponding author
E-mail: chlee@ynu.ac.kr
Tel: 053-810-2542

Fax: 053-810-4624

도 수준에서 생물학적으로 에스트로겐 활성을 가지지만, 이러한 천연 또는 인공합성 에스트로겐은 생태계에서 ng/L농도 수준에서도 호르몬 시스템에 영향을 미칠 수 있다. 몇몇 연구자들은 오염된 지역에 서식하는 조류, 파충류, 포유류의 내분비계 재생산시스템에 대한 변화를 보고하고 있다. 내분비계장애물질의 주요 오염원인 하폐수처리장 방류수는 하천으로 유입되어, 암컷 어류의 난황 단백질 전구체 물질로서 내분비계장애물질에 의한 영향의 좋은 판단기준이 되는 vitellogenin (VTG) 합성과 분비를 수컷 어류에서도 일으킬 수 있는 충분한 농도수준으로 오염되어 있다고 밝히고 있다.^{6,7)}

내분비계장애물질의 대표적인 작용 중의 하나는 에스트로겐성 화학물질이 여성호르몬으로서 활성을 나타내는 것이다. 에스트로겐성 화학물질에 노출되어 체내에 흡수되는 경로는 에스트로겐 활성을 가지는 음식물이나 물의 섭취 또는 접촉을 통하여 이루어지고 있으나, 사람과의 인과관계는 확실히 증명되지 않은 상태이다. 호르몬작용 메커니즘은 세포막의 에스트로겐 수용체(Estrogen Receptor, ER)를 통하여 작용을 발현하는 경로와 핵 내의 수용체와 결합하여 작용을 발현하는 경로가 알려져 있다. 작용의 발현은 특정 유전자에 작용하여 전사를 활성화하여 목적 단백질을 특이적으로 생산하도록 한다. 현재, 환경 중에서 이러한 내분비계장애물질의 잠재적 위험성을 screening하기 위해 생물학적 방법을 이용하여 영향을 정량화하는 방법이 널리 사용되고 있다. 에스트로겐 영향을 screening하기 위해서 in vivo 및 in vitro assay가 도입되고 있으며, 환경수나 화학물질중의 에스트로겐 활성을 일차적으로 하는 screening하는 in vitro assay가 저비용, 짧은 시간에 측정 가능, 대량의 시료에 용이한 특징을 바탕으로 널리 이용되고 있다.⁸⁻¹⁰⁾

가정하수나 공장폐수에 포함되어 있을 가능성이 높은 물질인 페놀류, 사람과 동물에서 유래하는 호르몬인 17 β -estradiol, estrone, 그리고 피임약으로 사용되는 여성호르몬인 ethinylestradiol (EE2) 등 유사물질의 에스트로겐 활성을 포괄적으로 측정할 수 있는 방법으로서, in vitro assay인 유전자 변형시킨 효모를 이용하는 yeast two-hybrid assay가 보고되고 있다. Yeast two-hybrid assay는 효모에 포유류의 estrogen receptor(ER)를 도입시켜 형질변환 시켜 에스트로겐 활성을 측정하는 방법으로서 내분비계장애물질의 총괄지표중 하나로 사용되어 화학물질의 기기분석과 같이 중요하다. 그러나 yeast two-hybrid assay는 환경수 중의 에스트로겐 활성을 측정하는데 있어서 수중에서 다양한 형태로 존재하는 NOM,^{11,12)} 독성유기오염물질 등에 의해 측정에 저해를 받는다.

따라서 본 연구에서는 우선 수환경 중에서 내분비계교란물질에 의한 에스트로겐 활성을 보다 민감하고 효과적으로 검출하기 위하여, 보다 효과적인 yeast two-hybrid assay를 위한 방법을 제시한다. 이를 바탕으로 수환경의 주요한 오염원이 되고 있는 하수처리장 방류수에 대하여 yeast two-hybrid assay의 개선된 방법으로 측정된 에스트로겐 활성도를 평가하여 국내 하수처리장에서의 내분비계장애물질과 그 영향에 대한 연구가 부족한 시점에서 기초자료로 이용하고자 한다.

2. 실험방법

2.1. 시료의 전처리

수환경 중에 존재하는 내분비교란물질은 매우 저농도로 존재하므로 채수 및 농축과정에 많은 주의가 요구된다. 채수병은 광분해 및 목적물질의 흡착을 방지하기위해 암갈색 유리병을 사용하였으며, 비이온계면활성제, 메탄올/아세톤 그리고 증류수로 각각 충분히 세척한 후에 사용하였다. 전처리 과정으로서 시료의 농축은 채수한 시료를 유리섬유여지(GF/B, Whatman)로 흡입여과 시킨 후, 메탄올과 초순수로 conditioning한 고상카트리지 Sep Pak[®] C18(Waters)에 통과시켰다. 디클로로메탄으로 목적물질을 용출시켜 rotary evaporator(Waters)로 감용, 질소가스로 건조시켰다. 에스트로겐활성 측정용 시료는 DMSO(dimethylsulfoxide)에 재용해시켜 농축하였고, 에스트로겐성물질의 농도 측정용 시료는 10% 메탄올에 재용해시켜 시료에 따라 100배까지 농축시켜 측정하였다.

2.2. Yeast two-hybrid assay

본 연구에서 에스트로겐 활성 측정을 위해 도입한 yeast two-hybrid assay는 포유류의 estrogen receptor(ER)를 도입시켜 형질변환 시킨 효모를 이용하였다.^{9,10)} 이 방법은 in vitro assay의 하나로써 정도와 감도가 매우 우수하며 간단하고 단시간에 측정할 수 있는 장점이 있다. 수용체에 호르몬물질이 결합하여 수용체의 구조변화 정보를 기본전사인자에 전해주는 역할을 하는 단백질은 coactivator로 불리며, 이 부분은 YES(Yeast Estrogen Screening)계에는 없는 것이다. 포유동물의 호르몬의 작용 메커니즘을 모방함으로써 오차를 가능한 한 적게 하였다. 즉, 이 효모에 coactivator와 hormone receptor 두개의 단백질을 발현유전자가 도입되어 있다. Reporter유전자로서는 galactosidase계를 이용하였다. 따라서 효모의 세포핵 내의 estrogen receptor에 에스트로겐 또는 에스트로겐성 물질이 결합하여 활성화 하면, DNA상에서 에스트로겐 응답성 element에 결합하여 β -galactosidase를 분비시키는 reporter유전자인 LacZ가 전사를 개시한다. 분비된 β -galactosidase 발색효소를 ONPG(*o*-nitrophenyl- β -D-galactoside) 발색기질과 결합하면 발색되어 흡광도를 측정하여 에스트로겐 활성을 측정한다. 구체적인 실험방법으로서, 냉동보존되어 있는 유전자 조작된 효모 균주를 SD배지에 식균하여, 30 $^{\circ}$ C에서 16시간 배양한다(이하 전배양액이라 함). 이 전배양액에 SD배지를 추가하고 측정시료를 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 4시간 배양한 후, 배양액을 595 nm(OD₅₉₅)에서 흡광도를 측정하여 효모의 균체량을 측정한다. 남은 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 침전물에 1 mg/mL Zymolyase 20T를 포함하는 Z-Buffer를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 정치하여 효모의 세포벽을 파괴한다. 여기에 4 mg/mL ONPG용액을 추가하여 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 정치시켜 발색반응 시키고, 1 M의 Na₂CO₃를 첨가하여 발색반응을 정지시킨다. 원심분리 하여 상등액을 420 nm(OD₄₂₀: ONPG의 발색량)와 570 nm(OD₅₇₀: 불순물에 의한 산란흡수량)에서 흡광도를 측정하여 다음과

같은 식으로부터 에스트로겐 활성도를 구한다. 각 시료의 에스트로겐 활성도는 양성대조로서 17β-estradiol(E2)의 최대 활성도를 100%로 하여 이것에 대한 상대적인 비활성도(Relative estrogenic activity)로 환산하여 나타냈다.

$$Estrogenic\ Activity(EA) = \frac{OD_{420} - 1.7 \times OD_{570}}{OD_{595} \times t \times v} \times 1,000$$

t : 발색반응 시간(min) v : 전배양액의 량(mL)

$$Relative\ Estrogenic\ Activity = \frac{EA_{sample}}{EA_{Maximum, E2}} \times 100$$

2.3. ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

에스트로겐성물질의 농도측정에 이용한 ELISA는 항원항체 반응을 이용하여 항체 또는 항원을 효소에 표식화 하여 대상 물질을 고감도로 측정하는 효소면역법(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, 이하 ELISA, Takeda Pharmaceutical Co. Ltd.)이다. 이것을 이용하여 에스트로겐 활성의 대부분을 차지하는 천연여성호르몬 17β-Estradiol(E2), Estrone(E1) 및 이와 동등한 에스트로겐 활성을 가지는 의약품 유래의 17α-ethinylestradiol(EE2)과 공업용 세제로 많이 사용되는 alkyl-phenolethoxylates(APE)의 농도를 측정하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1. S9mix 및 buffer 첨가에 의한 yeast two-hybrid assay의 개선

내분비계장애물질이 체내에서 대사될 때, 대개 수산기가 붙어서 음성의 화합물로 되지만, 약물대사효소를 포함하고 있는 동물의 간장으로 내분비계장애물질을 전처리하게 되면 대사 활성화하게 된다. 따라서 본 연구에서는 종래의 Nishikawa⁹⁾로부터 제안된 yeast two-hybrid assay방법에서 대사활성화를 고려하여 S9mix(Oriental Yeast Co. Ltd., Japan)의 구성물질의 조성을 변화시키면서 세 가지 계열로 연구하였다. 즉, Nishikawa⁹⁾로부터 제안된 종래의 yeast two-hybrid assay와 동일하게 아무것도 첨가하지 않은 -S9mix 계열, rat의 간장으로부터 추출하는 S9mix를 첨가하는 계열을 +S9mix, 그리고 인산완충용액(phosphate buffer solution, 0.1 M KH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄ · 12H₂O)을 첨가하는 계열을 +Buffer로 한다. 여기에서 S9mix는 S9, coenzyme, 인산완충용액(phosphate buffer solution), 그리고 nutrient salts로 구성되어 buffer 용액을 포함한다. +S9mix와 +Buffer 계열에서는 SD배지 200 μL를 175 μL로 감소시키고 S9mix와 buffer용액을 각각 25 μL씩 첨가하였으며, 나머지 실험방법은 -S9mix와 동일하게 수행되었다.

이러한 세 가지 계열로 환경시료에 대한 비활성도를 측정하여 그 결과를 Fig. 1에 나타냈다. Fig. 1은 시료를 -S9mix, +S9mix 그리고 +Buffer계의 세 가지 계열로 17β-estradiol(E2)의 농도와 비활성도를 분석하여 S9mix 및 buffer가 비

활성도에 미치는 영향 및 E2와 비활성도의 관계를 비교해 본 결과이다. 기존의 yeast two-hybrid assay와 비교하였을 때, +S9mix계열의 비활성도가 약간 증가하는 경향을 보이고 있으나, +Buffer계열에서는 크게 증가하는 것을 알 수 있었다. 즉, S9mix의 구성성분의 하나인 인산완충용액의 첨가로 환경시료중의 비활성도를 더욱 민감하게 측정할 수 있는 결과를 얻어 에스트로겐 활성의 평가를 개선할 수 있는 것으로 나타났다.

이 결과로부터 +Buffer계의 에스트로겐 활성의 증가에도 불구하고 아직 시료 중의 E2농도가 가지는 에스트로겐 활성도에 비하여 낮은 활성도를 나타내고 있다. 본 연구에서 선정한 E1, E2, EE2와 같은 내분비계장애물질은 수환경중에 널리 존재할 수 있는 DOM(dissolved organic matter)인 tannic acid, humic acid, fulvic acid와 같은 소수성물질과의 흡착이 일어나며,¹³⁾ 이로 인하여 내분비계장애물질의 에스트로겐 활성에 영향을 미칠 수 있다.¹⁴⁾ 또한 수환경중에 존재하는 다양한 종류의 중금속에 의하여 내분비계장애물질과 같은 유기물과 상호 작용하여 독성이나 bioavailability에 영향을 준다.¹⁵⁾ 이와 같이 여전히 시료 중에 존재하는 소수성 유기물질이나 착물을 형성하는 중금속 등과의 영향으로 인하여 부터 본래 가지는 농도에 비하여 낮은 활성을 가지는 것을 알 수 있다. 그러나 모든 시료에 있어서 +buffer계가 -S9mix, +S9mix계보다 높은 에스트로겐 활성을 나타내고 있으므로 본래 가지는 에스트로겐활성 발현의 증가에 효과적인 것을 알 수 있었다.

여기서 Table 1과 같이 buffer의 pH를 다양하게 변화시켜 가며 에스트로겐 활성을 측정하여 본 결과, SD배지의 pH가 에스트로겐 활성에 미치는 영향이 큰 것을 확인할 수 있었다. 즉, buffer의 pH를 4.48~9.29까지 변화시켰을 때, 주입하는 buffer의 pH가 7.21이상에서, SD배지의 pH는 배양 전(6.26~6.52)보다 배양 후에는 약간 감소하여 5.99~6.32로 나타났다. Buffer의 pH가 5.75이하의 산성 조건에서는 비활성도는 5% 이하로서 활성이 매우 낮게 나타났으나, buffer의 pH를 7.21에서 9.29까지 증가시켰을 때 SD배지의 pH는 5.99~6.32의 약산성을 나타내어 비활성도는 23.5~34.8까지 크게 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 이 상과 같이 중성의 인산완충용액을 첨가함으로써 에스트로겐

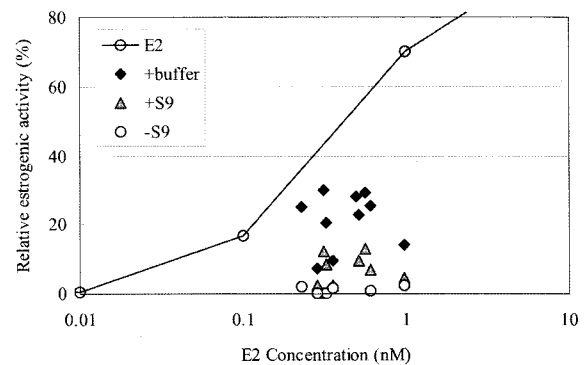


Fig. 1. Relationship between relative estrogenic activities and 17β-estradiol(E2) concentration for water environment.

Table 1. Effect of buffer pH on estrogenic activities in effluent of sewage treatment plants

pH of buffer solution	pH of before incubation of SD medium	pH of after incubation of SD medium	relative estrogenic activities, % (S.D.*)
4.48	3.74	3.43	4.7(0.5)
5.75	4.19	3.66	4.8(0.5)
7.21	6.26	5.99	23.5(4.2)
7.98	6.42	6.24	31.2(2.5)
9.29	6.52	6.32	34.8(3.0)

* S.D.; standard deviation

활성도를 더 정확하게 검출하고 있으므로 pH 7.21인 중성의 인산완충용액을 첨가하여 +Buffer계의 yeast two-hybrid assay를 수행하였다.

3.2. 하수처리장의 내분비계장애물질 농도

내분비계장애물질을 분석하는 대상 하수처리장은 대도시의 생활하수가 주로 유입되는 가정계열(Dom.)과 염색폐수, 기계, 금속, 제지공장으로부터 유입되는 공단폐수처리수가 함유된 공단계열(Ind.)로 분리되어 처리되고 있다. 하수처리장은 일차침전과 활성슬러지법에 의한 생물학적 처리과정을 거쳐 처리되고 있으나, 방류수 중에 잔존하는 잔류색도를 제거하기 위하여 모래여과(S/F)-오존산화(Oz.) 공정이 부가되어 운영되고 있다. 하수처리장의 유입수 및 처리수에 대한 물리화학적 특성을 파악하기 위하여 4회에 걸쳐서 조사를 수행하였다. 가정계열 및 공단계열에 유입되는 유입수의 pH는 7.4~7.5 범위이며, BOD 농도는 각각 44.3~140.9, 126.9~170.2 mg/L로 나타났다. COD_{Mn} 농도는 각각 25.5~155.5, 50~218.7 mg/L로 나타나 공단계열이 높은 실정이다.

하수처리장의 각 처리공정별 ELISA로 분석된 17 α -ethynylestradiol, 17 β -estradiol, estrone, APE의 농도결과는 Table 2에 나타났다. 피임약의 주성분인 인공합성호르몬인 17 α -ethynylestradiol 농도는 가정계 유입수에서 <LOD(limit of detection)~7.3 ng/L의 범위로 검출되었으며 활성슬러지법으로 처리된 후에는 <LOD~1.2 ng/L 범위로 감소되는 것으로 나타났다. 독일과 캐나다의 하수처리장 방류수에서 1.0~9.0 ng/L로 검출되는 것으로 보고하고 있으며 영국에서는 ND~7.0 ng/L 범위로 검출되는 것으로 보고되고 있으므로, 본 하수처리장에서 검출된 17 α -ethynylestradiol의 농도가 외국보다 다소 낮게 검출되는 것으로 나타났다. 에스트로겐 활성이 가장 강한 17 β -estradiol의 경우 가정계에서 <LOD~39.7 ng/L의 농도로 유입되어 생물학적 처리공정을 거치면서 최대 2.3 ng/L로 감소하였다. 모래여과와 오존산화 공정으로 점차 감소하고 있으나 생물학적 처리로 17 β -estradiol가 충분히 제거되지 않는 것으로 나타났다. Estrone은 가정계열 유입수에서 3.5~167.1 ng/L로 유입되어 생물학적 처리과정을 거치면서 2.5~10.2 ng/L 범위로 검출되어 상대적으로 17 β -estradiol보다 높은 농도로 존재하는 것을 알 수 있다. 오존처리 후에는 1.3~7.0 ng/L로 저감되는 것을 알 수 있으며, 이러한

Table 2. Concentration of estrogenic substances measured by ELISA in sewage treatment plants

Site ^a	Date	Concentration(ng/L) ^b			
		EE2	E2	E1	APE
Dom. Inf.	1st sample	7.3 ± 2.1	< LOD ^c	167.1 ± 9.1	145.4 ± 5.2
	2nd sample	< LOD	3.2 ± 0.5	13.4 ± 5.3	38.0 ± 3.9
	3rd sample	1.1 ± 0.1	3.5 ± 0.6	64.0 ± 2.0	81.5 ± 1.5
	4th sample	0.9 ± 0.1	39.7 ± 0.5	3.5 ± 0.9	116.6 ± 12.9
Dom. Eff.	1st sample	0.8 ± 0.1	< LOD	10.2 ± 0.3	10.5 ± 0.6
	2nd sample	< LOD	< LOD	3.9 ± 1.9	12.0 ± 0.5
	3rd sample	1.2 ± 0.2	0.83 ± 0.1	6.5 ± 1.4	26.7 ± 0.6
	4th sample	0.8 ± 0.1	2.31 ± 0.1	2.5 ± 0.2	6.3 ± 0.9
Dom. S/F	2nd sample	< LOD	0.7 ± 0.1	5.7 ± 0.8	12.5 ± 0.7
	3rd sample	1.5 ± 0.1	2.1 ± 0.4	4.4 ± 0.1	12.6 ± 0.1
Dom. Oz.	2nd sample	< LOD	< LOD	7.0 ± 2.5	5.6 ± 0.3
	3rd sample	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.2	0.6 ± 0.1
Ind. Inf.	1st sample	3.8 ± 2.2	< LOD	16.6 ± 5.9	247.1 ± 10.9
	2nd sample	< LOD	< LOD	10.1 ± 16.9	102.4 ± 8.9
	3rd sample	1.5 ± 0.1	6.2 ± 0.7	46.0 ± 0.5	119.2 ± 14.3
	4th sample	< LOD	16.3 ± 0.4	8.6 ± 0.6	242.8 ± 42.4
Ind. Eff.	1st sample	< LOD	< LOD	6.2 ± 0.9	23.0 ± 1.8
	2nd sample	< LOD	< LOD	1.5 ± 1.7	17.2 ± 2.4
	3rd sample	1.3 ± 0.1	2.6 ± 0.5	8.2 ± 4.2	39.2 ± 0.5
	4th sample	< LOD	9.5 ± 0.4	3.2 ± 2.3	14.6 ± 0.5
Ind. S/F	2nd sample	< LOD	1.0 ± 1.0	1.5 ± 1.8	21.8 ± 2.6
	3rd sample	1.2 ± 0.1	3.4 ± 0.1	7.4 ± 1.3	14.1 ± 0.9
Ind. Oz.	2nd sample	< LOD	< LOD	4.0 ± 2.9	10.1 ± 2.3
	3rd sample	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1

^a Dom. = domestic line; Ind. = Industrial line; Inf. = Influent; Eff. = Effluent; S/F = Sand Filtration; Oz. = Ozonation^b Mean±S.D.(Standard Deviation), n = 4^c LOD: limit of detection for EE2: <0.8 ng/L E2: <0.7 ng/L E1: <0.8 ng/L APE: <0.3 ng/L

결과는 영국 하수처리장 방류수내 estrone 검출결과인 1.4~76.0 ng/L보다 낮은 농도로 검출되고 있었다.⁴⁾

섬유, 기계 등의 세척공정으로부터 유래하는 계면활성제의 분해생성물인 APE는 공장계열에서 102.4~242.8 ng/L로 유입되어 생물학적 처리 후에는 14.6~39.2 ng/L로 크게 감소되었으며, 오존처리 후에는 더욱 감소하여 94.3%까지 제거되는 것으로 나타났다. 생물학적 처리를 거친 후의 APE 농도가 estrone이나 17 β -estradiol보다 다소 높은 농도로 검출되고 있으나 Fig. 5의 농도-반응 곡선에 나타낸바와 같이 APE의 에스트로겐활성도가 100배 정도 낮은 활성도를 가지므로 에스트로겐활성도 측면에서는 estrone이나 17 β -estradiol보다 영향이 적을 것으로 판단된다.

3.3. 하수처리장에서의 에스트로겐 활성도

표준활성슬러지법으로 처리되는 하수처리장의 처리수 및 오존처리수의 내분비계장애물질의 농도는 Table 2에서 보듯이와 같이 큰 폭으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 에스트로겐성물질의 농도 감소에도 불구하고 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 가정계 및 공단계의 유출수(Dom. Eff.

및 Ind. Eff.)의 에스트로겐 활성도가 유입수보다 오히려 증가하는 경우가 많았다. 즉, 가정계열의 유입수의 에스트로겐 비활성도가 10% 이하를 나타내고 있으나 유출수의 경우에는 에스트로겐 비활성도가 25%까지 증가하고 있었다. 공장계열의 유출수는 최대 20%까지 검출되고 있었다. 추가적인 공정인 모래여과와 오존산화공정이 도입되었을 때, 에스트로겐 비활성도가 다시 크게 감소하여 최종방류수 중의 에스트로겐 비활성도가 거의 검출되지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 현행의 표준활성슬러지법에 의한 하수처리로는 내분비계장애물질 농도는 큰 폭으로 감소하지만, 에스트로겐활성도는 충분히 제거되지 않는 경우가 많은 것을 알 수 있었다.

Fig. 2의 결과와 같이 유출수의 에스트로겐 활성도가 유입수보다 높게 검출되는 것을 검증하기 위하여, 3차 시료를 50,000배까지 농축된 시료를 농축배수 1배까지 단계적으로 희석하여 에스트로겐활성도를 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과, 유출수는 농축배수를 낮게 할수록 에스트로겐활성도가 감소하고 있으나, 유입수의 경우에는 농축배수 10,000배에서 오히려 에스트로겐활성도가 증가하다가 다시 감소하는 현상을 확인할 수 있었다. 이러한 경향은 다른 시기에 채수한 시료에서도 유사한 것을 확인할 수 있었는데, 유출수보다 유입수중에 보다 많이 존재하는 다양한 휴민물질, 중금속, 고분자유기물질 등에 의한 저해작용으로 에스트로겐

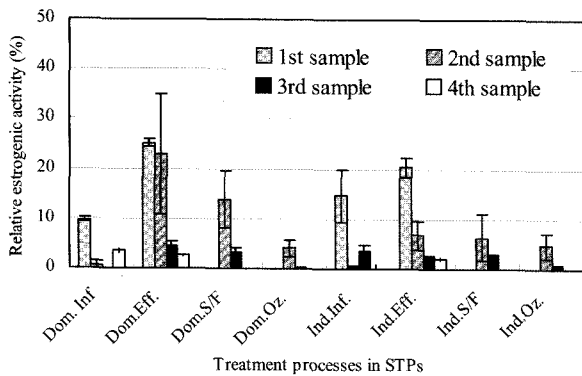


Fig. 2. Relative estrogenic activities of each process of domestic and industrial lines in STP. All samples were concentrated 50,000 fold.

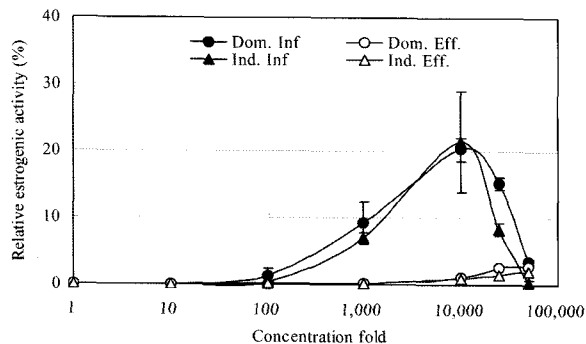


Fig. 3. Relative estrogenic activities of each concentration fold in STP.

활성도가 낮게 나타나는 것으로 판단된다. 이와 같이 yeast two-hybrid assay를 이용해서 환경수의 에스트로겐활성도를 측정할 경우, 공존 물질에 의한 저해작용으로 인해 본래 나타내야 할 활성도보다 낮게 나타나는 것으로 판단되므로, 향후 bioassay의 시료전처리 단계에서 목적물질 이외의 공존물질을 효과적으로 배제하는 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

3.4. 에스트로겐 활성도에 대한 기여도

하수처리장에서 검출되는 에스트로겐활성을 일으키는 각 내분비계장애물질 중에서 본 연구에서 선정된 4개의 내분비계장애물질 17β-estradiol, estrone, 17α-ethynylestradiol, alkylphenol-ethoxylates의 기여도를 분석하였다. Yeast two-hybrid assay에 의한 4개의 내분비계장애물질의 농도-반응 곡선 그래프는 Fig. 4와 Table 3에서 보는 바와 같이 매우 상관성이 높은 sigmoid curve로 나타났다. 농도-반응 곡선식 $y = a / (1 + (x/x_0)^b)$ 에서 각 물질별로 최대값 a, 최소값 b, 중간값 x_0 및 비활성도(relative activity)를 나타냈다(Table 3). 여기서 x_0 은 최대 활성도와 최소 활성도의 중간 값으로서 EC₅₀(50% effective concentration)에 해당하게 되며, E2의 EC₅₀을 1.0으로 했을 때 상대적인 EC₅₀ 값을 relative potency로 나타냈다. E1의 relative potency는 0.882로서 E2보다 약간 낮게 나타났으며, EE2는 E2와 유사하게 나타난 반면, APE는 E2보다 100배 정도 낮은 것을 알 수 있다.

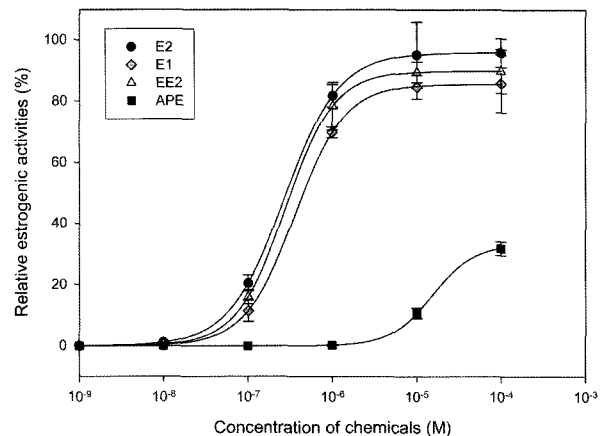


Fig. 4. Concentration-response curve of 4 chemicals by yeast two-hybrid assay(Error bar value: Standard Deviation).

Table 3. Parameters and regression equation for 4 target chemicals using yeast two-hybrid assay

Parameters	a	b	x_0 (EC ₅₀ , M)	r ²	Relative potency
E2	95.899	-1.329	2.67×10^{-7}	0.997	1.000
E1	85.809	-1.203	3.02×10^{-7}	0.998	0.882
EE2	90.217	-1.488	2.80×10^{-7}	0.999	0.951
APE	33.089	-1.752	1.53×10^{-5}	0.999	0.017

* Equation: $y = a / (1 + (x/x_0)^b)$

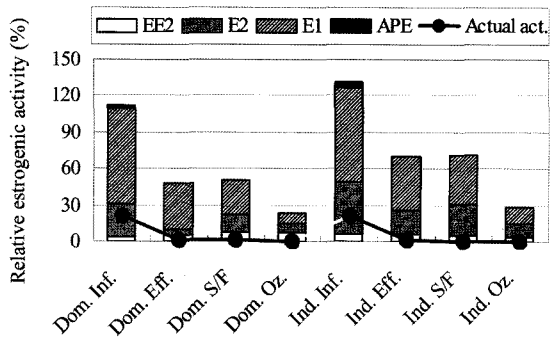


Fig. 5. Contribution rates of 4 chemicals for estrogenic activity. All samples were concentrated 10,000 fold.

Fig. 5는 위의 농도-반응 곡선식을 근거로 하여 각 처리공정별로 검출된 내분비계장애물질의 농도로부터 이론적인 에스트로겐활성도를 환산하여, 실제 측정된 비활성도와 비교하였다. 또한 이론적인 에스트로겐활성도를 각 물질별로 나타냄으로서 전체 활성도에 대한 각 내분비계장애물질들의 기여도를 나타냈다. 이 결과는 3차 시료에 대한 평균값이다. Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 가정계유입수에서 농도로부터 계산된 에스트로겐 활성도는 112.3%로서 실제 측정된 활성도인 20.3보다 5배 이상 높게 검출되었으며, 공장계 유입수의 경우에는 계산된 활성도가 131.0%로서 실제 측정된 활성도보다 6배가량 높게 분석되어 전체적으로 농도로부터 계산된 활성도가 실제 측정된 에스트로겐 활성도보다 훨씬 높게 나타났다. 이러한 결과는 유입수 중에 상대적으로 많이 존재하는 DOM(dissolved organic matter), humic acid 또는 tamoxifen 등과 같은 물질에 의한 antagonistic 영향으로 에스트로겐활성도가 다소 저평가되는 것으로 보고하고 있다.¹³⁻¹⁶⁾ 또한 가정계 유입수의 이론적 에스트로겐 활성도인 112.3%에서, 이 값을 100으로 환산했을 때 이 활성도에 대한 기여도를 산정한 결과, E1 70.7%, E2 23.3%, EE2 3.7%, APE 2.3%로 각각 나타났다. 가정계 유출수에서는 이론적 에스트로겐 활성도는 48.1%를 나타내었고, 위와 같은 방법으로 기여도를 산정했을 때 E1 55.4%, E2 10.6%, EE2 10.4%, APE 0.8%로 나타났다. 공장계의 유입수 및 유출수에서도 E1이 58.5%, 62.5%를 각각 냈고, E2는 28.2%, 35.4%를 각각 나타내어 다른 시료에서도 마찬가지로 E1과 E2가 차지하는 기여도가 높음을 알 수 있었다. 이들 결과로부터 하수처리장의 유입수 및 유출수 중에 나타나는 에스트로겐활성도의 대부분은 사람이나 동물의 체내에서 유래하는 천연호르몬인 E1과 E2로부터 기인되는 것을 알 수 있었으며 이들 물질에 대한 보다 효과적인 제거가 고려되어야 할 것으로 판단된다. 또한 APE의 경우에는 다른 내분비계장애물질에 비하여 상대적으로 고농도로 검출되고 있으나 실질적으로 에스트로겐활성도에 대한 기여도는 5% 이내로 매우 낮았으며 인공합성호르몬인 EE2도 8%이내의 매우 낮은 기여도를 나타내었다.

4. 결론

1) Yeast two-hybrid assay로 환경시료를 -S9mix, +S9mix,

+Buffer계의 세 가지 계열로 17β-estradiol의 농도와 에스트로겐활성도를 분석한 결과, +S9mix계열의 에스트로겐활성도가 약간 증가하는 경향을 보이고 있으나, +Buffer계열이 에스트로겐 물질농도에 대한 에스트로겐활성도가 가장 높은 값을 나타내는 것으로 나타났는데 이것은 SD배지의 pH가 중성을 유지하게 될 때 에스트로겐활성도가 증가하는 것을 확인하였다. 반면에, buffer의 pH가 산성일 때는 에스트로겐활성도가 낮게 나타났다.

2) 하수처리장의 각 처리공정별로 ELISA에 의한 농도분석 결과, 피임약의 주성분인 인공합성호르몬인 17α-ethynylestradiol 농도는 가정계 유입수에서 <LOD~7.3 ng/L의 범위로 검출되었으며 활성슬러지법으로 처리된 후에는 <LOD~1.2 ng/L 범위로 감소되는 것으로 나타나 외국의 하수처리장 방류수 중의 농도보다 낮게 나타났다. 17β-estradiol의 경우, 가정계에서 생물학적 처리 후 2.3 ng/L로 유출되고, 오존산화 공정으로 점차 감소하였으나 생물학적 처리만으로는 충분히 제거되지 않는 것으로 나타났다.

3) 하수처리장 가정계, 공장계 유출수의 에스트로겐활성도가 유입수보다 높게 나타났으나 humic acid와 같은 공존 물질에 의한 영향으로 인하여 실제로는 낮게 나타났으나 이러한 영향을 저감하기 위해 단계회색 한 결과, 유출수의 에스트로겐활성도가 약간 낮은 것으로 나타나 생물학적 처리만으로는 충분히 감소되지 않은 것으로 나타났다. 고도처리공정인 오존산화에 의해 에스트로겐 활성은 큰 폭으로 감소하여 최종 방류수의 에스트로겐 활성은 거의 없는 것으로 나타났다. 또한 수환경 중에서 검출되는 에스트로겐 활성은 실제 존재하는 내분비계장애물질이 가지는 에스트로겐 활성도보다 낮게 평가될 수 있는 것으로 나타났다.

4) 농도-반응 곡선으로부터 환산된 에스트로겐 활성도가 실제 측정되는 값보다 훨씬 높은 것으로 나타났으며, 이로부터 각 내분비계장애물질들이 에스트로겐활성도에 미치는 기여도를 산정한 결과, 가정계의 유입수의 경우 E1이 79.5%, E2 26.1%, EE2 4.2%, APE 2.5%를 나타내어 전체적으로 하수처리장에 나타나는 에스트로겐활성도의 대부분은 사람이나 동물의 체내에서 유래되는 천연호르몬인 E1과 E2로부터 기인되는 것으로 나타났다. APE는 다른 내분비계장애물질에 비하여 상대적으로 고농도로 검출되고 있으나 실질적으로 에스트로겐활성도에 대한 기여도는 매우 낮은 것을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Fry, D. M., "Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals," *Environ. Health Perspect.*, **31**, 165~71(1995).
2. Toppari, J., Larsen, C. J., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L. J., Jégou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Müller, J., Meyts, E. R., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., and Skakkebaek, N.E., "Male

- reproductive health and environmental xenoestrogens,” *Environ. Health Perspect.*, **104**, 741~803(1996).
3. Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D. A., Enblom, J., Marcino, J., and Guillette, L. J. Jr., “Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp(*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant,” *Environ. Health Perspect.*, **104**, 1096~101(1996).
 4. Ternes, T. A., Kreckel, P., and Mueller, J., “Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-II. Aerobic batch experiments with activated sludge,” *The Science of the total Environment*, **225**, pp. 91~99(1999).
 5. Lagana, A., Bacaloni, A., Leva, I. D., Faberi, A., Fago, G., and Marino, A., “Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters,” *Analytica Chimica Acta*, **501**, pp. 79~88(2004).
 6. Rogers-Gray, T. P., Jobling, S., Morris, S., Kelly, C., Kirby, S., Janbakhsh, A., Harries, J. E., Waldock, M. J., Sumpter, J. P., and Tyler, C. R., “Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish,” *Environ. Sci. Technol.*, **34**(8), 1521~1528(2000).
 7. Jobling, J. S. and Sumpter, J. P., “Detergent component in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes,” *Aquat. Toxicol.*, **27**, 361~37(1993).
 8. Zacharewski, T., “In Vitro bioassays for assessing estrogenic substances,” *Environ. Sci. Technol.*, **31**(3), 613~624(1997).
 9. Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M., and Nishihara, T., “New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **154**, 76~83(1999).
 10. Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F., Saito, K., Imagawa, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Hori, S., and Utsumi, H., “Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay,” *Journal of Health Science*, **46**(4), 282~298(2000).
 11. Kamata, M., “Evaluation of estrogenic activity of natural water by Yeast two-hybrid system,” Doctoral dissertation, Hokkaido University, Japan(2001).
 12. Kawai, H., “The examination of inhibition for the estimation of environmental estrogen by using yeast two-hybrid assay,” Master dissertation, Hokkaido University, Japan(2004).
 13. Yamamoto, H., Liljestrand, H. M., Shimizu, Y., and Morita, M., “Effect of physical-chemical characteristics on the sorption of selected endocrine disruptors by dissolved organic matter surrogates,” *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 2646~2657(2003).
 14. Holbrook, R. D., Novak, J. T., and Love, N. G., “Impact of activated sludge-derived colloidal organic carbon on behavior of estrogenic agonist recombinant yeast bioassay,” *Environ. Toxicol. Chem.*, **24**, 2717~27214(2005).
 15. Kim, K. T., Kim, I. S., Hwang, S. H., and Kim, S. D., “Estimating combined effects of copper and phenol to nitroifying bacteria in wastewater treatment plant,” *Water Res.*, **40**, 561~568(2006).
 16. Janosek, J., Bittner, M., Hilscherova, K., Blaha, L., Giesy, J.P., and Holoubek, I., “AhR-mediated and anti-estrogenic activity of humic substances,” *Chemosphere*, **67**, 1096~1101(2007).