

탈수소효소 활성도 저해를 이용한 중금속 생태독성 평가법의 표준화

오경희 · 한아원 · 조영철[†]

충북대학교 공과대학 환경공학과

Standardization of Ecotoxicity Assay Method for Heavy Metals using Inhibition of Dehydrogenase Activity

Kyoung-Hee Oh · Ah-Won Han · Young-Cheol Cho[†]

Department of Environmental Engineering, Chungbuk National University

(Received 14 July 2009, Revised 29 May 2010, Accepted 3 June 2010)

Abstract

In this study the enzyme inhibition method using dehydrogenase which has been popularly used to estimate ecotoxicity was optimized. When three bacterial strains, *Escherichia coli* HB101, *Enterobacter asburiae* KCAD-4, and *Aeromonas media* KCAD-13, were compared, KCAD-4 was considered as the adequate strain to estimate toxicity because of its sensitivity and reproducibility. The optimal bacterial density was estimated as 5.4×10^9 CFU/mL, at which the maximum sensitivity was observed. The phosphate buffer was suitable for the reaction solution. When the reaction times required for inhibition of enzyme activity by contact of toxicants and for reaction of damaged bacteria and substrate were tested, the optimal value was estimated as 20 min and 2 hrs, respectively. It is expected that the optimized conditions can be used to develop the standardized kits to estimate ecotoxicity of heavy metals in effluent from the industrial wastewater treatment facilities.

keywords : Dehydrogenase, Ecotoxicity, Enzyme inhibition assay, Standardization

1. 서론

산업화로 인하여 생태계의 건전성에 영향을 미치는 독성 물질의 종류와 양이 지속적으로 증가하고 있다. 현재 국내에서 상업적으로 유통되고 있는 화학물질의 수는 4만종 이상이며, 매년 400여종이 새로이 국내 시장으로 유입되는 등 화학물질의 사용이 꾸준히 증가하고 있다(환경부, 2009). 화학물질들은 다양한 경로를 통하여 환경으로 유입되며, 산업폐수를 통하여 수생태계로 유입된 독성물질은 생물체 내에 축적되어 생태계를 파괴하고 수질 악화를 초래한다(오경택 등, 2006; Rodriguez et al., 2004). 따라서 산업폐수 처리 시설의 방류수에 포함된 독성물질의 양을 상시적으로 측정하여 처리 효율을 평가하고 유해성을 저감시키는 적절한 조치를 취해야 한다.

환경시료에서 특정 독성 물질의 농도를 측정하기 위하여 널리 사용되는 방법은 분석기기를 사용하는 것이다. 중금속의 분석은 주로 유도결합 플라즈마 질량분석기(ICP-MS)를 이용하며, 기체크로마토그래피 또는 액체크로마토그래피는 휘발성 및 용존성 독성물질의 분석에 널리 사용되고 있다. 하지만, 분석기기는 미지의 독성물질을 검출할 수 없으며, 두 종류 이상 독성물질의 협동작용 또는 길항 작용에 의한

유해성의 증가나 감소를 측정할 수 없는 단점이 있다(안윤주 등, 2008; 환경부, 2005; Kong et al., 1995; Rodriguez et al., 2004). 특히 산업 폐수에는 다양한 종류의 생태독성 물질이 포함되어 있으며, 포함된 성분을 예측하기 힘들기 때문에 분석 기기를 이용한 독성물질의 정량은 매우 어렵다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 생물의 사멸도 또는 효소의 저해도를 평가하여 대상 시료에 생태독성 물질의 존재 여부 및 농도를 평가하는 방법이 개발되어 활용되고 있다(환경부, 2005; Caravelli et al., 2004; Moore et al., 2000).

효소를 이용하는 방법은 독성물질에 의한 효소 활성이 저해되는 정도를 측정하여 생태독성 정도를 간접적으로 평가하는 것으로, 수시료, 토양 시료 및 폐수에서 생태 독성을 평가하기 위하여 널리 사용되고 있다(김금용 등, 2007; Gong, 1996; Guerra et al., 2002; Mosher et al., 2003; Yin et al., 2005). 사용되는 효소의 종류는 탈수소효소(dehydrogenase), acetylcholine esterase, urease, phosphatase 등이 있다(Caravelli et al., 2004; Chouteau et al., 2005; Hamers et al., 2000; Kim et al., 2005; Rodriguez et al., 2004). 효소 저해법은 측정 방법에 따라 크게 두 종류로 나뉜다. 첫 번째 방법은 정제된 효소를 사용하는 것으로 독성물질이 효소에 직접적으로 작용하여 효소 활성이 저해되는 정도를 측정하는 것이며(Hamers et al., 2000), 두 번째 방법은 생물체를 사용하는 것으로 독성물질에 의해 손상된 생물체 내에 포함된 특정 효소의 활성 저해도를 측정하는 것이다

[†] To whom correspondence should be addressed.
choy@chungbuk.ac.kr

(Caravelli et al., 2004).

탈수소효소는 기질에 hydrides (H-)를 첨가하는 산화효소로서, 세포의 물질 및 에너지 대사에 중요한 역할을 담당한다. 대표적인 탈수소효소는 전자전달계를 구성하는 효소로, 이는 세포의 호흡률과 상관관계를 가진다(Caravelli et al., 2004). 따라서, 탈수소효소의 활성도 변화를 측정하여 세포의 손상 여부를 확인할 수 있으며, 이를 통하여 시료 중 독성물질의 존재 여부를 확인할 수 있다. 탈수소효소의 활성도는 tetrazolium 염이 환원되는 정도로 측정할 수 있으며, 기질로는 INT(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazolium chloride)와 TTC (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride)가 가장 널리 사용된다(Gong et al., 1996; Kumar and Tarafdar, 2003). 탈수소효소 활성도 저해법은 주로 토양이나 활성슬러지 시료에서 미생물의 활성도 변화를 측정하는 방법으로 널리 사용되었으며(김금용 등, 2007; Caravelli et al., 2004; Kumar and Tarafdar, 2003; Lopez et al., 1986), 하폐수 방류수에 포함된 독성물질의 생태독성을 평가하기 위한 목적으로 사용된 예는 없다.

탈수소효소를 이용한 기존의 연구는 시료에 존재하는 미생물을 사용하기 때문에, 효소 활성도 변화를 측정하기 위하여 매우 오랜 시간이 걸린다(Gong, 1996; Kumar and Tarafdar 2003; Mariscal et al., 1994). 또한 시료에 존재하는 미생물의 종류에 따라 결과가 달라지기 때문에, 실험의 재현성이 떨어지고, 표준화시키기 어려운 단점이 있어, 산업폐수 처리 방류수의 생태독성 측정법으로 적합하지 않았다. 따라서 본 연구에서는 탈수소효소를 이용한 생태 독성 평가법의 단점을 보완하고 이를 폐수시설 방류수의 독성 평가에 사용하기 위하여, 처리 시간, 완충용액의 조성 등 독성 평가에 필요한 조건을 최적화시켜 표준화된 평가법을 만들고자 하였다.

2. 연구 방법

2.1. 세균의 배양 및 정량

탈수소효소 활성이 뛰어나고 중금속에 대해 민감하게 반응하는 세균을 선정하기 위하여, *Escherichia coli* HB101, *Enterobacter asburiae* KCAD-4와 *Aeromonas media* KCAD-13를 사용하였다. KCAD-4와 KCAD-13은 산업 폐수 처리 시설의 생물반응조에서 분리된 것이다(오경희 등, 2008). 세균의 배양은 습윤 멸균시킨 Luria Broth 배지에 접종한 후, 37°C에서 150 rpm으로 교반 배양하였으며, 24시간 주기로 계대하여 최적 상태를 유지시켜 실험에 사용하였다.

세균을 정량하기 위하여 배양액을 5분간 원심분리(4°C, 15,000×g)한 후, phosphate buffer(0.1M, pH 7.0)로 2회 반복 세척하였다. 이를 증류수로 희석한 후, 분광광도계를 이용하여 600 nm에서 흡광도(optical density at 600 nm, OD₆₀₀)를 측정하여 세균을 정량하였다. 흡광도가 1.5를 초과할 경우에는 증류수로 재희석하여 흡광도를 측정 후, 희석배수와 흡광도를 이용하여 계산된 값을 세균의 농도로 표시하였다.

2.2. 시약 및 독성물질

탈수소효소의 활성도를 측정하는데 사용한 기질(INT와 TTC)은 Sigma-Aldrich Co. (USA)에서 구매하였으며, 중금속이 포함된 화합물(Table 1)은 Wako Chemical Co. (Japan)에서 순도 99% 이상인 것을 구매하여 사용하였다. 실험에 사용한 중금속은 먹는 물 수질환경기준의 “건강상 유해영향 무기물질”에 규정된 11종을 선정하였다(Table 1). 중금속 용액은 중금속이 포함된 화합물을 증류수에 녹여 제조하였으며, 중금속의 농도는 0.001~500 mg/L의 범위를 사용하였다.

Table 1. Information of heavy metals used in this study

Heavy metals	Compounds	Drinking water quality guideline (mg/L)
Selenium (Se)	H ₂ SeO ₃	< 0.01
Mercury (Hg)	HgCl ₂	not detect
Chromium (Cr ⁶⁺)	CrO ₃	< 0.05
Lead (Pb)	PbNO ₃	< 0.05
Arsenic (As)	As	< 0.05
Zinc (Zn)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	< 1
Manganese (Mn)	MnCl ₂ ·4H ₂ O	< 0.3
Aluminium (Al)	AlCl ₃	< 0.2
Copper (Cu)	CuCl ₂ ·2H ₂ O	< 1
Iron (Fe)	FeCl ₂	< 0.3
Cadmium (Cd)	CdCl ₂ ·5H ₂ O	< 0.01

2.3. 반응 조건의 최적화

탈수소효소를 이용한 독성 평가법을 최적화시키기 위하여 기질의 종류, 완충용액의 종류, 접종 세균의 농도, 독성물질과 세균의 접촉시간 및 세균과 기질의 반응시간을 변화시켰다. 기질은 INT(0.1%, w/v)와 TTC (1%, w/v)를 사용하였으며, 각각을 증류수에 녹여 제조하였다. 접종 세균의 농도는 OD₆₀₀을 기준으로 최종농도 1~10의 범위로 사용하였다. 세균과 독성물질의 반응시간은 10~60분의 범위에서 평가하였으며, 손상된 세균과 기질의 접촉시간은 0~240분의 범위로 변화시켰다. 효소의 활성도를 유지하는데 적합한 완충용액을 선정하기 위해 증류수, phosphate buffer(0.1 M, pH 7.0)와 Tris-buffer(0.01 M, pH 7.0)를 각각 사용하였다.

2.4. 탈수소효소의 활성도 및 저해도 측정

원심 분리관에 완충용액(0.4 mL)과 세균 용액(0.1 mL)을 넣고 섞어준 후, 독성물질이 포함된 용액(0.5 mL)을 넣고 항온 교반 수조(37°C, 150rpm)에서 일정시간(10~60분) 동안 접촉하였다. 반응 후, 기질 용액(0.2 mL, INT 또는 TTC)을 첨가하여 다시 항온 교반 수조에서 일정시간(0~240분) 동안 반응을 시켰다. 탈수소효소의 활성에 의해 생성된 불용성 formazan을 수확하기 위해 시료를 5분간 원심분리(15,000×g)한 후, 상등액을 완전히 제거하였다. 회수된 formazan의 용해를 위해 2 mL의 메탄올(100%)을 첨가한 후, 초음파세척기(150 W, Daihan Scientific Co.)로 5분

간 처리하였다. Formazan의 양은 분광광도계(Optizen 2120UV, Mecasys Co.)를 이용하여 465 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하여 정량하였다. 독성물질에 의한 탈수소효소의 대사 저해율(R_e)은 식 (1)을 이용하여 계산하였다(김금용 등, 2007).

$$R_e(\%) = \frac{C_i - C_x}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

식 (1)에서 C_i 는 독성물질을 첨가하지 않은 대조시료의 흡광도이며, C_x 는 독성물질을 처리한 시료의 흡광도이다. 각 조건에서 대사 저해율과 독성물질의 농도의 관계를 구한 후, 효소의 활성이 50% 저해되는 농도(Half maximal effective concentration, EC_{50})를 구하여, 각 조건에서 독성물질에 대한 탈수소효소의 민감도를 평가하였다. EC_{50} 이 작을수록 독성물질에 대한 민감도가 높음을 의미한다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 기질에 따른 효소 활성도의 변화

탈수소효소의 기질로 INT와 TTC를 사용하여 효소의 활성도를 비교하였다. *E. coli* HB101의 경우, INT를 기질로 사용하여 formazan을 생성하였으나, TTC를 기질로 사용할 경우 6시간의 배양 후에도 TTC-formazan이 생성되지 않았다. KCAD-4는 *E. coli*와 달리 TTC를 기질로 사용할 수 있었으나, 시간당 기질의 전환율이 INT를 사용했을 때에 비해 매우 낮은 것으로 나타났다(Fig. 1). 또한, 기질로 사용한 TTC의 농도는 1.0%(w/v)로 INT(0.1%, w/v)에 비해 10배가 높았으나 기질 전환율은 매우 낮았다. 이러한 결과는 INT가 탈수소효소의 기질로 적합함을 의미한다.

TTC는 산화환원전위가 높고 전자에 대한 친화도가 작아 최종전자수용체로 산소와 경쟁하기 어렵기 때문에 TTC를 이용하여 탈수소효소의 활성도를 측정할 때에는 산소에 의한 영향을 배제하기 위하여 탈산소화(deoxygenation)를 거쳐야 하는 것으로 알려져 있다(Lopez et al., 1986). 또한

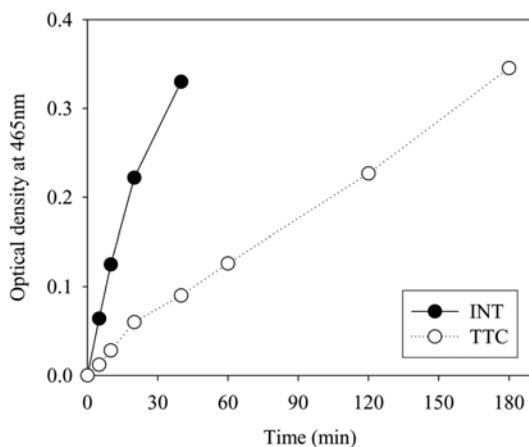


Fig. 1. Comparison of dehydrogenase activities with INT and TTC as substrates. *Enterobacter asburiae* KCAD-4 was used as the source of enzyme.

중금속 독성을 측정함에 있어 TTC를 기질로 사용하는 것은 적합하지 않다는 보고도 있다(Klapwijk et al., 1974). 하지만, 활성슬러지에서 중금속 독성을 측정하기 위하여 INT와 TTC를 비교하였을 때, TTC가 INT에 비해 민감하다는 보고도 있다(Yin et al., 2005). 이러한 차이는 본 연구의 결과와 같이 미생물의 종류에 따라 INT와 TTC에 대한 기질 친화도가 다르기 때문에 일어나는 것으로 사료된다. 본 연구에 사용한 세균의 경우, TTC에 비해 INT의 기질 전환율이 높으며, INT를 사용할 경우 탈산소화와 같은 전처리가 필요 없기 때문에 이를 기질로 사용하는 것이 적합한 것으로 판단된다.

3.2. 세균의 종류에 따른 탈수소효소 민감도 평가

세균의 종류에 따른 독성물질에 대한 민감도를 평가하기 위하여, *E. coli* HB101과 KCAD-4, KCAD-13을 사용하였고, 독성물질은 구리를 0~500 mg/L의 범위로 사용하였다. 탈수소효소의 활성이 완전히 저해되는 구리의 농도는 *E. coli*의 경우 10 mg/L로 다른 세균에 비해 높게 나타났으며, KCAD-4와 KCAD-13은 1 mg/L이었다(Fig. 2). 효소 활성이 50% 저해되는데 필요한 구리의 농도(EC_{50})는 KCAD-13이 0.023 mg/L이었으며, KCAD-4와 *E. coli*는 각각 0.042, 0.78 mg/L이었다. 이러한 결과는 KCAD-13과 KCAD-4가 구리에 대한 민감도가 크며, *E. coli*의 민감도가 가장 떨어짐을 의미한다. KCAD-13이 KCAD-4에 비해 독성물질에 대한 민감도가 약간 높았으나, 독성물질을 첨가하지 않은 시료에서 두 세균에 대한 측정 조건이 동일할 때, KCAD-4가 KCAD-13에 비해 formazan의 생성량이 약 1.4배 높았다(Fig. 2). 독성물질을 첨가하지 않았을 때 formazan 생성량이 많은 것은 탈수소효소 활성이 높음을 의미하며, 독성물질을 첨가할 때와 첨가하지 않았을 때 결과의 차이가 확실하게 나타나기 때문에, 독성물질에 의한 효소 활성 저해 정도를 쉽게 측정할 수 있다. 또한 KCAD-4와 KCAD-13을 대상으로 세균의 성장 단계에 따른 독성물질에 대한 민감도를 측정된 결과, KCAD-13은 성장 단계에 따라 민감도의

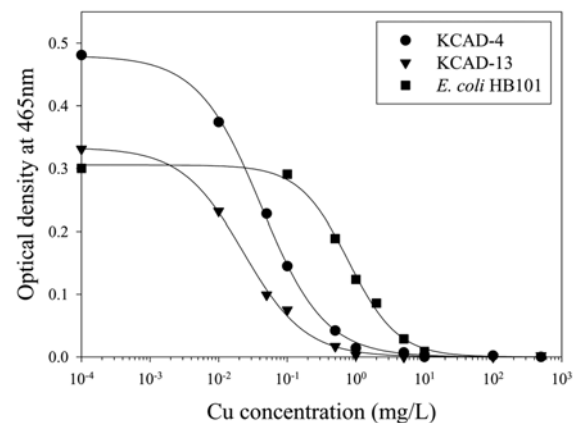


Fig. 2. Response of INT dehydrogenase in three bacterial strains, *Escherichia coli* HB101, *Enterobacter asburiae* KCAD-4, and *Aeromonas media* KCAD-13 to addition of copper in range of 0~500 mg/L.

변이가 큰 반면, KCAD-4는 거의 유사한 민감도를 나타내었다(결과 미제시). 따라서 탈수소효소를 이용한 독성 평가에 KCAD-4가 가장 적합한 것으로 판단되었다.

3.3. 탈수소효소를 이용한 생태독성 측정 조건의 최적화

탈수소효소 활성 저해도를 이용하여 중금속의 생태독성을 측정하는 방법을 표준화하기 위해 독성 측정을 위한 조건을 최적화하기 위한 실험을 수행하였다. 조건은 세균의 접종 농도, 반응 완충용액의 종류, 독성물질과 효소의 반응 시간 및 효소와 기질의 반응시간이다.

접종 세균의 농도(OD₆₀₀)를 1~10 범위로 변화시켰으며, 각 농도에서 독성물질에 대한 탈수소효소 활성 저해도를 측정하였다. 독성물질을 첨가하지 않았을 때, 세균의 농도와 formazan의 생성 정도는 양의 상관관계를 나타내었다(Fig. 3; 회귀분석, R²=0.955, p<0.001). 초기 세균 농도가 OD₆₀₀=10 또는 8이었을 때, Cu에 대한 세균의 EC₅₀은 각각 0.11, 또는 0.14 mg/L로 높은 값이 측정되었으며, OD₆₀₀=6인 경우에도 EC₅₀이 0.055 mg/L로 비교적 높게 측정되었다(Fig. 3). EC₅₀ 값이 높은 것은 세균의 민감도가 떨어짐을 나타내므로 OD₆₀₀=6 이상의 농도를 사용하는 것은 독성 평가시 적합하지 않은 것으로 판단된다. 반면, 세균의 초기 농도를 OD₆₀₀=1을 사용할 경우, EC₅₀가 0.020 mg/L로 매우 낮게 나타나 높은 민감도를 보였다. 하지만, 독성물질의 생태 독성도는 formazan의 생성 정도의 변화량을 측정하여 평가하는데, 세균의 농도가 너무 낮을 시 발색도가 매우 낮아서 독성물질에 대한 탈수소효소의 활성 저해도를 파악하는 것이 쉽지 않다. 따라서, OD₆₀₀=1 이하의 세균 농도는 독성을 평가하는데 적합하지 않은 것으로 판단된다. OD₆₀₀=2 또는 4일 때 EC₅₀은 각각 0.044, 0.041 mg/L로 비슷한 값을 나타내었으며, 독성물질에 대한 민감도가 높았다(Fig. 3). 하지만, 독성물질을 첨가하지 않았을 때, formazan의 생성 정도는 OD₆₀₀=2일 때 보다 OD₆₀₀=4일 때 1.5배가 높아 OD₆₀₀=4가 적합한 것으로 판단된다. 따라서 후속 실험에서

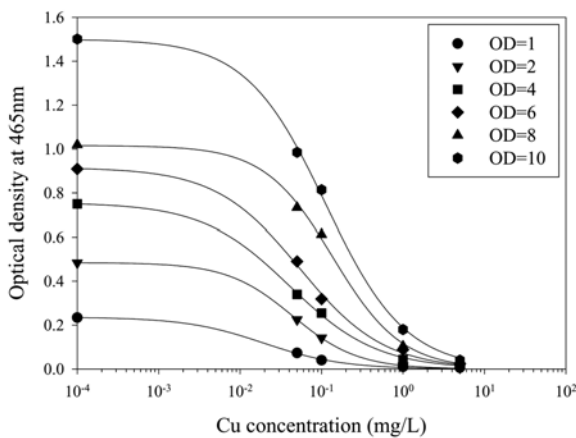


Fig. 3. Variation of dehydrogenase activity in reaction solutions with 0~5 mg/L of copper according to initial bacterial concentrations, which were indicated as optical density (OD) at 600 nm. Six bacterial concentrations from OD=1 to OD=10 were employed.

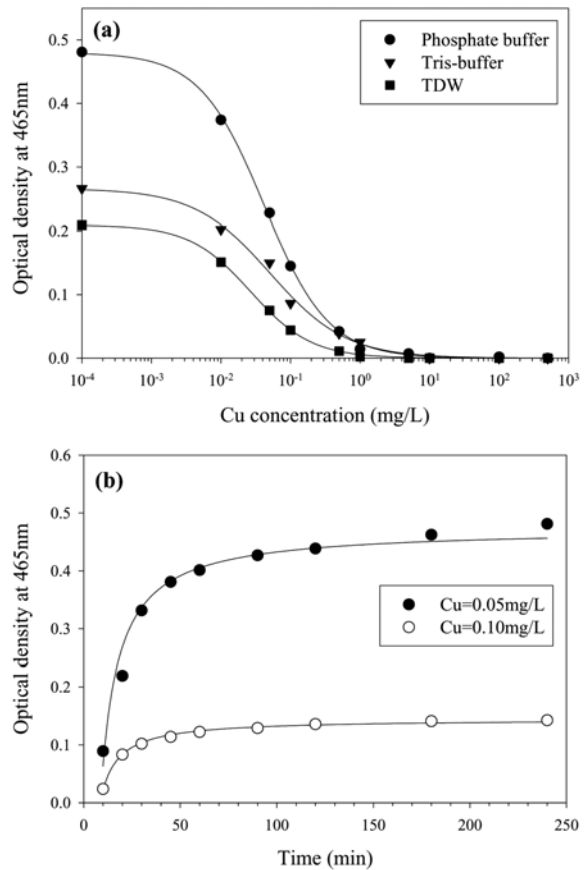


Fig. 4. Variation of dehydrogenase activity according to reaction buffer (a) and contact time between damaged bacterial cells and substrate (b).

는 세균의 초기 농도를 OD₆₀₀=4를 사용하였으며, OD₆₀₀=4일 때 세균의 농도를 측정 한 결과 5.4×10⁹ CFU/mL이었다.

중류수와 Tris-buffer 또는 phosphate buffer를 사용하여 탈수소효소의 반응 정도를 비교한 결과, 중류수를 사용하거나 Tris-buffer를 사용하였을 때 효소의 활성도가 매우 낮았다(Fig. 4(a)). Phosphate buffer의 경우에는 높은 효소 활성에 의해 발색되는 정도가 매우 높았다. 이러한 결과로부터 탈수소효소를 이용한 독성 평가시 phosphate buffer가 가장 적합한 것으로 판단되었다.

탈수소효소를 이용하여 독성을 평가할 때 필요한 반응시간은 독성 물질이 세균을 손상시켜 효소의 활성을 저해시키는 데 필요한 것과 활성이 저해된 효소가 기질과 반응하여 formazan을 생성하는데 필요한 것으로 구성된다. 독성물질과 세균의 접촉시간을 10~60분까지 10분 단위로 조절하여 독성물질에 대한 반응도를 측정 한 결과, 접촉 시간이 길어질수록 효소 활성도가 약간씩 감소하는 것으로 나타났다. 하지만 20분 이상을 처리한 시료에서는 효소 활성 저해도가 거의 변화가 없었으며, 20분 처리한 시료와 60분 처리한 시료의 활성도의 차이는 4.3%에 불과하였다(결과 미제시). 따라서 독성 물질에 의한 효소 활성의 저해 정도를 유지시키고 독성 측정에 필요한 시간을 단축시키기 위해, 독성물질과 세균의 접촉 시간은 20분이 적합한 것으로 판단되었다.

독성물질에 의해 활성이 저해된 효소와 기질의 반응 시간을 최적화하기 위해 20분 동안 독성물질과 접촉시킨 후, 기질인 INT를 첨가하여 10~240분까지 반응을 시켜 효소 활성도 변화를 측정하였다(Fig. 4(b)). 구리의 농도를 0.10 mg/L로 하였을 때, 60분까지는 시간이 증가함에 따라 생성되는 INT-formazan의 양이 서서히 증가하였으나, 이후 큰 변화가 없었다. 구리의 농도가 0.05 mg/L일 경우에는 더 큰 폭으로 INT-formazan의 양이 증가하였으며 90분까지 농도가 증가하며 그 이후 안정화되었다. 이러한 결과는 독성물질의 농도가 높을 때에는 효소의 활성이 빠른 시간에 정점에 도달하는 반면, 독성물질의 농도가 낮을 때에는 효소의 활성을 평가하기 위해 긴 시간이 필요함을 의미한다. 따라서 독성물질에 의한 효소의 저해도를 판단할 때, 손상된 효소와 기질의 반응 시간은 120분이 적합한 것으로 보인다. 본 연구에서는 이상의 결과로부터 세균과 독성물질의 반응 시간은 20분으로 설정하였으며, 손상된 효소와 기질의 반응시간은 120분으로 설정하였다.

3.4. 중금속의 종류에 따른 탈수소효소의 민감도 평가

먹는 물 수질환경기준에서 규정하고 있는 11종의 중금속에 대하여, 본 연구에서 개발된 방법을 사용하여 탈수소효소의 활성에 대한 저해도를 평가하였다. 평가 결과, 중금속의 종류에 따라 효소에 대한 반응 양상이 달랐으며, 크게 세 가지 양상으로 나눌 수 있었다(Fig. 5(a)). 구리(Cu), 수은(Hg), 아연(Zn), 카드뮴(Cd), 셀레늄(Se) 및 망간(Mn)의 경우에는 민감도의 차이는 있으나, 중금속의 농도가 증가함에 따라 효소 활성도가 감소하는 경향이 나타났다. 반면 철(Fe)의 경우에는 농도가 증가함에 따라 효소 활성도가 증가하여, Fe가 효소를 저해하는 것이 아니라 오히려 효소 기능을 촉진시키는 것으로 보인다. 이는 일부 중금속의 경우 효소의 기능에 필요한 조효소로 사용되고 있으며, 특히 Fe는 전자전달계에 관여하는 cytochrome을 구성하는 성분이기 때문에 나타나는 결과로 판단된다(Takai et al., 1999). 크롬(Cr), 납(Pb), 비소(As) 및 알루미늄(Al)의 경우에는 독성물질의 농도가 증가함에 따라 뚜렷한 활성도 변화가 관찰되지 않았다. KCAD-4의 탈수소효소 활성을 저해하는 6종의 중금속의 EC₅₀을 비교한 결과, 구리와 망간을 제외하고, 나머지 중금속의 경우 EC₅₀이 6.3~73 mg/L의 범위로 매우 높았다(Fig. 5(b)). Hg, Zn, Cd, Se에 대한 먹는 물 수질 기준은 0~1 mg/L로 매우 낮기 때문에, KCAD-4를 이용할 경우 생태독성을 평가하기는 적합하지 않은 것으로 사료된다. 망간의 경우에도 EC₅₀은 1.9 mg/L이며, 이는 먹는 물 수질 기준인 <0.3 mg/L보다 큰 값이기 때문에 KCAD-4를 이용하여 생태독성을 평가하기 적합하지 않다. 본 연구에서 사용한 KCAD-4는 구리에 대하여 민감한 세균을 screening하는 과정에서 선택한 것이기 때문에, 구리에 특이적으로 민감하며 다른 종류의 중금속에 의한 손상이 적은 것으로 보인다. 본 실험실에서 행한 후속 연구에서 하수처리시설의 생물 반응조로부터 분리된 세균이 수은(Hg)에 대해 특이적으로 손상을 받는 것을 확인하였다(결과 미

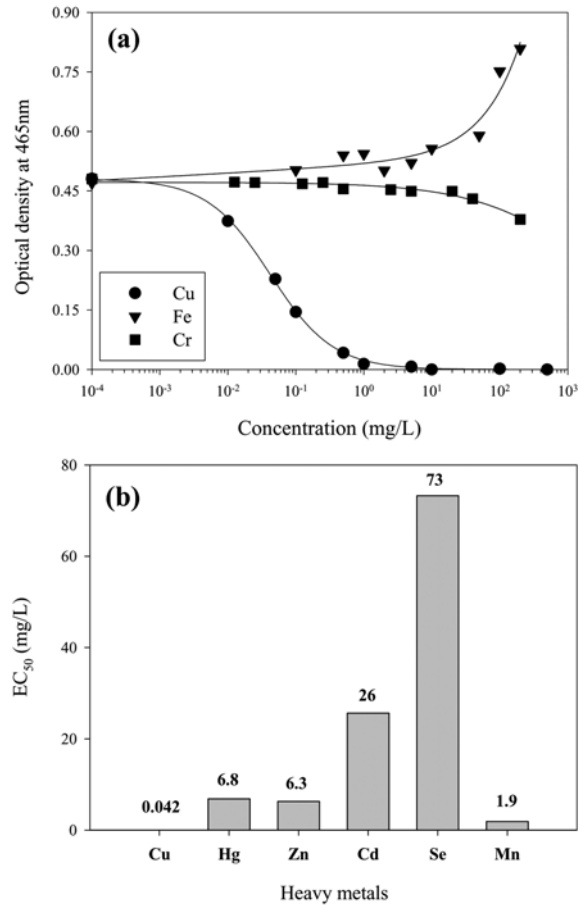


Fig. 5. Inhibition patterns of dehydrogenase activities by addition of Cu, Fe, or Cr (a), and half maximal effective concentrations of heavy metals for dehydrogenase (b).

제시). 따라서 각각의 중금속에 의하여 특이적으로 손상되는 세균을 분리한 후, 본 연구에서 표준화한 독성 평가법을 활용한다면 중금속에 의한 생태독성 평가가 가능할 것으로 판단된다.

4. 결론

탈수소효소의 활성도 저해를 통해 환경 시료에 존재하는 중금속의 생태독성을 평가하는 방법을 최적화시킨 본 연구의 결론은 다음과 같다.

- 1) 독성물질에 의해 손상된 세균의 탈수소효소 활성 저해도를 이용하여 생태독성을 평가할 때, INT를 기질로 사용하는 것이 가장 적합하였다. 본 연구에서 탈수소효소의 활성 저해도를 평가하기 위한 반응 조건을 최적화한 결과, 접종 세균의 농도는 5.4×10^9 CFU/mL (OD₆₀₀=4)이 적합하였으며, 반응 완충용액으로 phosphate buffer를 사용하였을 때 효소의 활성이 가장 뛰어났다. 세균과 독성물질의 접촉시간은 20분이 가장 적합하였으며, 저해된 효소가 기질과 반응하는 시간은 120분이 적절한 것으로 판단되었다.
- 2) 산업폐수 처리시설의 생물 반응조에서 분리된 KCAD-4

균주의 구리에 대한 EC₅₀은 ~0.04 mg/L로 구리에 대해 매우 민감하게 반응하는 것으로 나타나, 구리를 포함한 산업 폐수 방류수의 생태독성 측정에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

- 3) 11종의 중금속에 대하여 KCAD-4 세균의 민감도를 평가한 결과, 중금속에 종류에 따라 민감도가 달랐으며, 구리 이외의 중금속에 대해서는 민감하게 반응하지 않아 이들 물질에 의한 생태독성을 평가하기에는 적합하지 않은 것으로 판단된다. 하지만, 각각의 중금속에 민감한 세균을 분리한 후, 본 연구에서 표준화된 생태독성 측정법을 적용한다면, 산업폐수 방류수에 포함된 환경오염물질의 생태독성을 평가할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2009년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 김금용, 조영철, 이상일(2007). 연속회분식반응조 공정에서 슬러지 체류시간과 중금속 독성의 관계. *대한환경공학회지*, **29**(3), pp. 283-288.
- 안윤주, 남선화, 백용욱(2008). 국내 생물종을 이용한 생태독성평가 기반연구:(III) 녹조류. *한국하천호수학회지*, **41**(2), pp. 117-127.
- 오경택, 김지원, 김우근, 이순애, 윤홍길, 이성규(2006). 산업폐수 방류수의 생태독성 평가. *수질보전 한국물환경학회지*, **22**(1), pp. 37-44.
- 오경희, 최인학, 조영철(2008). 식품 폐수 처리 시설에서 압모니아성 약취제거 세균의 분리 및 특성 분석. *대한환경공학회지*, **30**(6), pp. 653-658.
- 환경부(2005). 방류수 독성평가를 위한 화학적/생물학적 기법 개발.
- 환경부(2009). 2009년도 환경보전시책 추진상황 보고서.
- Caravelli, A., Giannuzzi, L., and Zarizky, N. (2004). Effect of chlorine on filamentous microorganisms present in activated sludge as evaluated by respirometry and INT-dehydrogenase activity. *Wat. Res.*, **38**(9), pp. 2395-2405.
- Chouteau, C., Dzyadych, S., Durrieu, C., and Chovelon, J. M. (2005). A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples. *Biosens. Bioelectron.*, **21**, pp. 273-281.
- Gong, P. (1996). Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the TTC and INT assay under their optimum conditions. *Soil Biol. Biochem.*, **29**(2), pp. 211-214.
- Guerra, R., Iacondini, A., Abbondanzi, F., Matteucci, C., and Bruzzi, L. (2002). A new microbial assay for the toxicity detection of contaminated soils. *Annali di Chimica*, **92**(9), pp. 847-854.
- Hamers, T., Molin, K. R. J., Koeman, J. H., and Murk, A. J. (2000). A small-volume bioassay for quantification of the esterase inhibiting potency of mixtures of organophosphate and carbamate insecticides in rainwater: development and optimization. *Toxicol. Sci.*, **58**, pp. 60-67.
- Kim, Y. H., Ahn, J. Y., Moon, S. H., and Lee, J. W. (2005). Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi cutinase*. *Chemosphere*, **20**, pp. 1349-1355.
- Klapwijk, A., Drent, J., and Steenvoorden, J. H. A. M. (1974). A modified procedure for the TTC-dehydrogenase test in activated sludge. *Wat. Res.*, **8**, pp. 121-125.
- Kong, I. C., Bitton, G., Koopman, B., and Jung, K. H. (1995). Heavy metal toxicity testing in environmental samples. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **14**, pp. 119-147.
- Kumar, P. and Tarafdar, J. C. (2003). 2,3,4-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. *Biol. Fertil. Soils*, **38**, pp. 186-189.
- Lopez, J. M., Koopman, B., and Bitton, G. (1986). INT-dehydrogenase test for activated sludge process control. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, pp. 1080-1085.
- Mariscal, A., Garcia, A., Carnero, M., Gomez, E., and Fernandez-Crehuet, J. (1994). New toxicity determination method that uses fluorescent assay of *Escherichia coli*. *Biotechniques*, **16**(5), pp. 888-893.
- Moore, T. F., Canton, S. P., and Grimes, M. (2000). Investigating the incidence of type I errors for chronic whole effluent toxicity testing using *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**, pp. 118-122.
- Mosher, J. J., Levison, B. S., and Johnston, C. G. (2003). A simplified dehydrogenase enzyme assay in contaminated sediment using 2-(p-iodophenyl)-3(p-nitrophenyl)-5phenyl tetrazolium chloride. *J. Microbiol. Methods*, **53**, pp. 411-415.
- Rodriguez, B. B., Bolbot, J. A., and Tothill, I. E. (2004). Development of urease and glutamic dehydrogenase amperometric assay for heavy metals screening in polluted samples. *Biosens. Bioelectron.*, **19**, pp. 1157-1167.
- Takai, M., Kamimura, K., and Sugio, T. (1999). Involvement of cytochrome a in iron oxidation of a moderately thermophilic iron-oxidizing bacterium, strain TI-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**(9), pp. 1541-1547.
- Yin, J., Tan, X. J., Ren, N. Q., Cui, Y. B., and Tang, L. (2005). Evaluation of heavy metal inhibition of activated sludge by TTC and INT-electron transport system activity tests. *Water Sci. Technol.*, **52**(8), pp. 231-239.