

Research Article

Open Access

## 하천수의 생태독성을 파악하기 위한 황산화미생물의 이용가능성 평가

강우창, 오상은\*

강원대학교 바이오자원환경학과

### Assessment of Biological Toxicity Monitoring in Water Using Sulfur Oxidizing Bacteria

Woo-Chang Kang and Sang-Eun Oh\* (Department of Biological Environment, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

Received: 11 April 2012 / Accepted: 21 June 2012

© 2012 The Korean Society of Environmental Agriculture

#### Abstract

**BACKGROUND:** Inappropriate discharge of wastewaters and industrial effluents are becoming detrimental to the aquatic environment. The presence of toxic substances on wastewaters can be detected by physicochemical and biological methods. However, physicochemical methods do not give any information about biological toxicity. Therefore, in this study we tried to detect the presence of toxic substance on waters using sulfur-oxidizing bacteria (SOB) as a bioassay.

**MATERIALS AND RESULTS:** The SOB biosensor was first stabilized using synthetic stream water and operated in both continuous and semi-continuous mode. When the SOB biosensor was operated in continuous mode, the effluent electrical conductivity (EC) stabilized at ~1.72 dS/m. While in the case of semi-continuous, the EC stabilized at ~0.6 dS/m. The SOB system was also operated at different reaction times to ascertain the shortest reaction time for monitoring the toxicity. Finally, the SOB biosensor was fed with nitrite as toxic substance. When 5 mg/L of nitrite was added to the SOB system, the EC decreased immediately. However, the EC recovered after few cycle.

**CONCLUSION:** This study shows that the SOB biosensor can be used as warning system to protect aquatic environment from hazardous materials. Although SOB

biosensor can not give specific information about the toxic substances, it can assess whether the water is toxic or not.

**Key Words:** Biosensor, Electrical conductivity, Temperature, Toxicity assesment, Sulfur oxidizing bacteria

#### 서 론

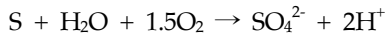
산업화와 도시화가 진행됨에 따라 인간의 삶은 보다 나아졌지만 이와 더불어 각종 화학물질이 증가하고 이에 따른 환경오염은 인간 및 생태계를 위협하고 있다(Kim et al., 2010). 특히, 하천수계는 인간에게 생활용수를 공급하므로 독성 등에 의한 환경오염을 정확하고 신속하게 탐지해서 문제가 발생하지 않도록 해야 한다. 환경독성을 탐지하는 방법으로 물리화학적, 생물학적 방법이 있다. 물리화학적 방법은 GC, AAS, HPLC 등의 기기를 이용하여 물질을 분석하는 것으로 개별적인 독성물질의 탐색은 가능하나 빠른 시간 내에 분석은 불가능하고 분석비용이 고가이다(van Wezel et al; 2010). 생물학적 방법은 이에 반해 정량, 정성적으로 탐지할 수는 없으나 독성물질이 생물체에 미치는 영향으로 독성유무를 판별하므로 신속한 측정이 가능하다. 하천수계는 다양한 오염원에 노출되기 때문에 환경위해성을 평가하기 위해 물리화학적 방법보다는 생물학적 방법을 이용한 생태독성 탐지 장치가 많이 이용되고 있다(Hernando et al., 2005).

현재 생물학적 독성탐지장치는 물고기, 물벼룩, 조류, 발광미생물, 질산화미생물 등을 이용하며 각각의 방법들은 실험에 따른 장단점이 존재한다(Woutersen et al., 2011; Kim et al., 2010; Strigui et al., 2010; Yoon et al., 2008; Gu and Gil, 2001). 물고기를 이용한 독성모니터링 방법의 경우 시험종의 구매 및 생육에 많은 운영비가 지출되어야 하며 물고기

\*교신저자(Corresponding author),  
Phone: +82-33-250-6449; Fax: +82-33-243-6449;  
E-mail: ohsangeun@kangwon.ac.kr

의 크기에 따라 독성발현 정도의 차가 발생할 수 있다. 물벼룩의 경우 주로 외래종인 *Daphnia magna*를 사용하며 모니터링 실험을 하기 위해 실험수의 경도를 조절해야 하고 칼슘, 마그네슘이 과량으로 투입된 고도의 경도수에서는 국내산 물벼룩의 성장과 번식이 저해된다(Kim et al., 2006). 미생물을 이용한 독성탐지방법은 독성물질에 의해 미생물의 대사작용이 저해되고 이에 따라 미생물 활성이 감소하는 것을 이용하여 물고기, 물벼룩 등을 이용한 방법에 비해 더 민감하며 빠른 시간 내에 반응하는 특징이 있다.

본 연구는 황산화미생물을 이용한 독성모니터링 방법을 구현하기 위해 실시되었다. 황산화미생물은 호기적 조건에서 산소를 최종전자수용체로 이용하여 황을 산화시키고 황산염이온을 생성한다. 따라서 황산화미생물의 활성이 좋은 경우 생성되는 황산염이온의 양은 증가하며 독성물질의 유입에 의해 황산화미생물의 활성이 감소한 경우 생성되는 황산염이온의 양은 감소한다. 황산염이온의 농도는 일반적으로 이온크로마토그래피 등을 이용해 측정하나 존재유무 및 농도를 알기 위해 추가적으로 샘플을 채취하여야 하고 분석에 어느 정도의 시간이 소요되므로 빠른 탐색을 위한 독성모니터링개발에는 사용하기 어렵다. 따라서, 독성모니터링 개발을 위해 빠른 시간내에 측정 가능한 전기전도도(EC)가 이용되었으며 독성물질 포함 여부는 전기전도도의 변화를 통해 판별할 수 있다. 황산화미생물의 황산화 반응식은 아래와 같다(Oh et al., 2011; Van Ginkel et al., 2010).



일반적으로 전기전도도는 수중에 녹아있는 총 염 및 총 이온의 양을 예측 할 수 있지만, 위의 식에서와 같이 생성물로 황산염이온과 수소이온의 변화만이 있기 때문에 EC의 변화는 황산염이온 농도의 변화라고 할 수 있다(Oh, 2010). 전기전도도는 수치의 오차가 적고 값의 범위가 아주 크기 때문에 황산염이온의 생성을 정확하게 탐지하는 것이 가능하다.

본 연구는 황산화미생물을 이용한 독성모니터링 방법의 이용가능성을 평가하기 위하여 실제하천수의 EC와 pH변화를 측정하고 인공하천수를 유입수로 일정 운전조건에서 연속식과 반연속식으로 운전하여 정상상태를 확인하였다. 정상상태의 반응조에 하천수에서 존재 가능한 독성물질인 NO<sub>2</sub>를 넣어 독성물질의 탐지 가능성을 파악하였다. 또한 반연속식 운전에서 반응시간을 달리하여 반연속식 운전에서의 반응시간을 결정하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 황산화미생물을 이용한 독성모니터링 장치

황산화미생물을 이용한 독성모니터링 장치는 정상적인 상태의 하천수 EC변화에서 독성물질이 유입되었을 경우 나타나는 EC의 변화를 평가하여 독성을 탐지하는 장치로 반응조, 항온조, EC전극, EC 미터 등의 반응측정부와 data logger, 컴

퓨터 등의 제어부로 구성되어 있다(Van Ginkel et al., 2010). 유입수는 인공하천수로 수돗물에 MFC 미디어를 200 배 희석하여 제조하였다. MFC 미디어의 구성은 다음과 같다: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.33 g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 2.69 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 0.31 g/L, KCl 0.13 g/L, Minerals 12.5 mL. 미네랄 용액의 조성은 MgSO<sub>4</sub> 3 g/L, NTA 1.5 g/L, NaCl 1 g/L, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, ZnCl<sub>2</sub> 0.13 g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01 g/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.025 g/L, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.025 g/L, NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.024 g/L로 하였다(Lovley and Phillips, 1988). 독성모니터링 반응조는 반응부(4.0 cm ϕ × 7.1 cm H, 89.18 mL)와 측정부(4.0 cm ϕ × 4.3 cm H, 54.01 mL)로 설계되었으며 황입자는 2~4 mm 크기를 사용하였으며 충전된 황입자의 양은 50 g 이다. 반응부 하단으로부터 인공하천수가 유입되며 산소 공급을 위한 공기폭기기도 설치되어 있다. 측정부에서 EC가 측정되며 Data logger 등을 통해 EC값이 컴퓨터에 기록, 저장된다(Fig. 1).

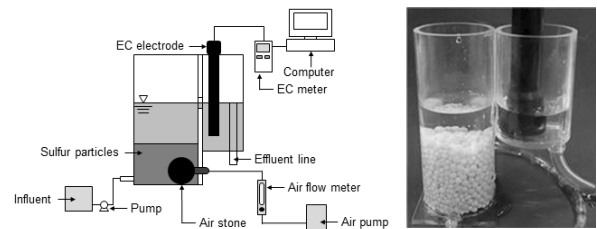


Fig. 1. Schematics of sulfur toxicity monitoring system and SOB reactor

#### 독성모니터링 운전 방법

독성모니터링장치의 운전은 연속(continuous mode)과 반연속(semi-continuous mode)으로 진행이 되었다. 연속운전의 경우 HRT 30분으로 설정하고 실험을 진행하였으며 반연속식운전은 유입수가 1분 동안 70 mL 유입되고 30분 동안 미생물에 의한 반응이 일어나도록 설정하였다. 유입수의 온도는 제조 후 30°C가 되도록 맞추어 항온조(35°C) 안에 두고 유입시켰으며 공기유량은 60 mL/min으로 일정하게 유지하였다. 측정부에 설치된 EC 전극을 이용하여 EC값이 측정되고 측정된 EC 값은 CIMON 프로그램을 통해 컴퓨터에 매 2분마다 기록, 저장된다.

#### MCR (Master Culture Reactor) 운전

MCR은 활성이 좋은 황산화미생물의 원활한 공급을 위해 제작, 운전되었다. 황입자는 2~4 mm 체를 이용하여 선별하였고 황입자 500 g과 공기로 탈염소한 수돗물을 이용하여 MFC 미디어를 200배 희석되도록 한 희석수 500 mL를 1 L 비커에 넣었다. 공기폭기기를 설치하여 공기가 계속적으로 폭기되도록 하였고 35°C가 유지되는 항온조 안에 보관하였으며 EC와 pH를 2분 간격으로 측정하여 Data logger를 통해 컴퓨터에 기록, 저장되도록 구성하였다.

### 미생물 반응시간

반연속 운전에서 미생물 반응시간이 변화할 때의 EC의 변화를 관찰하고자 하였다. CIMON 프로그램에서 유입수 펌프의 작동시간을 변경하여 실험을 진행하였다. 미생물 반응시간은 15분, 30분, 60분으로 설정하였고 60분의 미생물 반응시간 실험 이후 미생물 반응시간을 기본조건인 30분으로 변경하여 정상적으로 EC 값이 다시 회복되는지 알아보았다.

### 독성실험

반응조 내의 미생물이 충분히 안정되었다고 판단된 이후 독성물질 주입 및 회복 실험을 실시하였다. 독성물질로는  $\text{NO}_2\text{-N}$ 을 선정하여 주입하였으며 황산화미생물을 이용하여 독성물질을 탐지할 수 있는지 가능성을 파악하고자 하였다. 아질산성질소는 하천에서 암모니아성질소가 산화되면서 일부 발생되며 산화력이 강해 미생물에 대해 독성을 보이므로 표준물질로 선정하였다. 독성여부를 쉽게 파악하기 위하여 하천수에서 일반적으로 검출되는 농도보다 고농도인  $5 \text{ mg/L NO}_2\text{-N}$  주입하였다.  $\text{NO}_2\text{-N}$  독성에 대한 변화를 파악하기 위해  $\text{NO}_2\text{-N}$   $5 \text{ mg/L}$ 를 각각 1회(1 cycle), 2회(2 cycle) 주입하였고 주입 후 바로 독성이 없는 유입수가 유입되도록 하여 황산화미생물이 회복하는데 소요되는 시간을 알아보려고 하였다.

## 결과 및 고찰

### 실제하천수의 pH 및 EC 변화

K강하류 L하천 수계측정소에서 실제하천수의 pH 및 EC를 측정하였다. 측정주기는 30분으로 3일 연속 측정하였다. EC는 평균  $0.310 \pm 0.014 \text{ dS/m}$ 로 큰 변화폭이 관찰되지 않았다, 다만, 상류의 하수종말처리장에서 처리수를 방류할 경우 EC가 약간 증가되는 것으로 나타났다. 알칼리도가  $75 \text{ mg/L as CaCO}_3$ 로 낮아 pH는 낮에 조류의 광합성 영향으로 pH 9까지 상승하고 밤에는 조류의 호흡으로 pH 7로 감소하였다(Fig. 2). 황산화미생물은 Acidophiles로 최적 pH는 2~3이다(Van Ginkel et al., 2010; Sorokin and Kuenen, 2005). 실제하천수의 pH가 9까지 상승할 수 있으나 알칼리도가 일반적으로  $75 \text{ mg/L as CaCO}_3$ 로 아주 낮기 때문에 황산화미생물을 이용한 독성모니터링 장치에 pH가 높은 하천수가 유입되더라도 황산화미생물에는 영향이 없을 것으로 판단되며 반응조 내의 pH는 2~4의 산성조건을 유지할 것으로 판단된다.

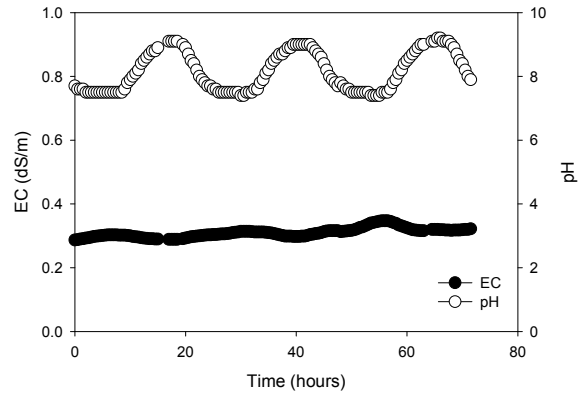


Fig. 2. Changes of pH and EC in L stream water in K river downstream

### 새 황입자를 이용한 반응조 운전

새 황입자  $50 \text{ g}$ 에 MCR로부터 활성이 있는 미생물이 붙어있는 황입자  $0.5 \text{ g}$ 을 넣어 회분식 형태로 EC 변화를 관찰하였다. MCR에서 공급된 황입자에 붙어있는 미생물들의 활성은 매우 좋으며 이에 따라 lag phase가 약 10시간 정도 관찰되었고 그 후 EC는 증가하다가 약 20시간에서 보다 급격하게 EC가 증가되었다. 실험시작 10시간 뒤 EC는 약  $0.42 \text{ dS/m}$ 였고 40시간 뒤 EC 약  $7.43 \text{ dS/m}$ 로 EC가 증가하였다(Fig. 3). MCR의 활성여부 및 접종량은 lag phase에 영향을 주며 빠른 시간 내에 새 황입자를 활성이 있는 황산화미생물을 가지는 황입자로 배양할 수 있음을 확인하였다.

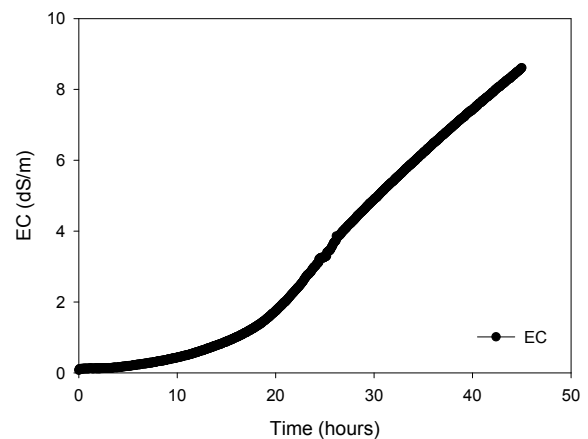


Fig. 3. EC value changes over time in a new SOB reactor with new sulfur particles ( $50 \text{ g}$ ) inoculated with sulfur ( $0.5 \text{ g}$ ) in the MCR

### 연속식 운전과 반연속식 운전의 비교

황을 이용한 독성모니터링 장치는 연속식 운전과 반연속식 운전으로 작동하도록 실험하였다. 연속식 운전은 HRT 30분으로 설정하였고 독성물질을 함유하고 있지 않은 유입수를 10일 이상 주입하였다. 연속식 운전의 경우 유입 EC는  $0.5 \text{ dS/m}$ 이나 유출 EC는 약  $1.7 \text{ dS/m}$ 로 10일 이상 운전에도 안정적으로 측정되었다. 반연속식 운전은 독성이 없는 유입수

가 활성이 높은 황입자 함유 반응조에 유입됨에 따라 lag phase가 관찰되지 않고 EC가 증가하는 것이 관찰되었다. 미생물 반응시간 30분(반응 전 EC 0.12 dS/m에서 반응 후 30분) 후 EC는 약 0.6 dS/m의 값이 측정되었으며 12시간 이상 운전에도 반응 전 EC값들과 반응 후 EC 값들은 각각 거의 유사한 EC값이 측정되었다(Fig. 4).

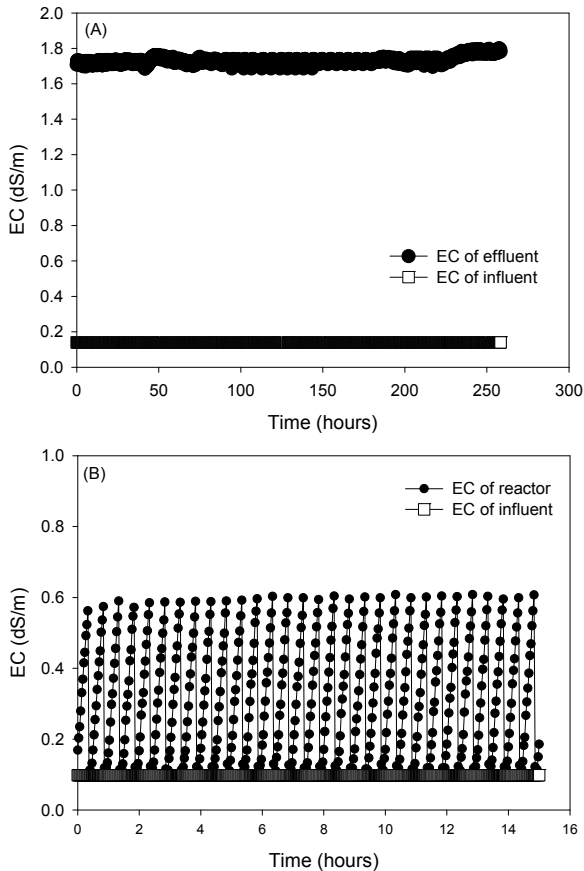


Fig. 4. Comparison between (A) continuous and (B) semi-continuous operation in a steady state condition

미생물 반응시간에 따른 EC 변화

반연속식 독성모니터링 실험조건에서 유입수 주입 시간을 1분(70 mL/min)으로 하고 미생물 반응시간을 변화시켰을 때 EC의 변화를 관찰하였다. 미생물반응시간(batch mode)은 15분, 30분, 60분으로 설정하여 실험을 진행하였다. 반응시간 15분 조건의 경우 미생물 반응에 의해 황산염이온이 생성되어 0.1 dS/m에서 0.5 dS/m 까지 EC의 값이 증가하는 것을 확인하였다. 반응시간이 30분일 때는 반응시간 15분 보다 미생물이 반응할 수 있는 시간이 2배 정도 더 주어지므로 EC는 약 0.2 dS/m에서 1.0 dS/m 까지 증가하였다. 이 후 반응시간을 60분으로 바꾸었을 때 미생물의 반응시간이 충분히 주어졌기 때문에 EC는 약 0.5 dS/m에서 2.0 dS/m까지 증가하였다(Fig. 5). 미생물 반응시간이 짧을수록 생태독성은 빨리 파악될 수 있다. 하지만 반응 전후의 EC 변화의 폭이 크지 않으므로 EC값의 오차 혹은 독성물질에 대한 영향인지를 파악하

기 어렵다. 반면 미생물 반응시간이 길면 오차에 대한 영향을 줄여들지만 생태독성을 파악하기 까지 긴 시간이 걸리므로 문제발생 시 효과적으로 대처할 수 없다. 또한 반응시간이 짧아지면(10-15분) 황입자에 붙어 있는 미생물들이 빠져나가 lag phase를 보인다. 따라서 최적의 황산화미생물의 반응시간은 30분으로 판단하였으며 물벼룩을 이용한 독성모니터링 실험에서 약제 노출 후 약 7시간이 지나 독성반응이 관찰된 것에 비해 황산화미생물을 이용한 독성모니터링은 빠른 독성 탐색이 가능하다(Yoon et al., 2008).

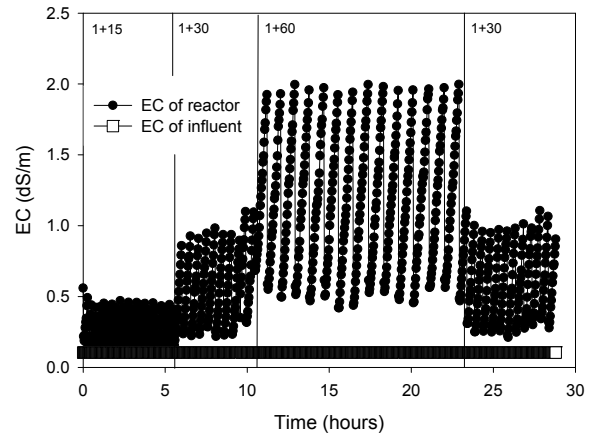


Fig. 5. Changes of steady state ECs with different reaction times (15, 30, and 60 minutes)

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 주입회수에 따른 독성평가와 회복실험

5 mg/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N이 1회, 즉 1 cycle 동안만 주입된 경우 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N에 의한 미생물 성장 저해로 인해 EC값은 0.15 dS/m에서 0.2 dS/m로 독성물질이 없는 경우에 비해 90% 감소하였다. 그 후 Fig. 6에서 보는 바와 같이 독성물질이 없는 물을 유입시키면 점차 황산화미생물이 회복되면서 EC도 또한 점차 증가하기 시작하였고 독성물질이 없는 물이 유입된 시점으로부터 약 4시간 후 EC는 약 0.45 dS/m로 회복됨을 알 수 있었다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N이 2회 주입된 경우 또한 EC는 약 0.2 dS/m로 감소하였고 주입완료 후 독성물질이 없는 물을 유입시키면 약 5~6시간 후 주입 전 EC값으로 회복되었다. 황산화미생물은 빠른 시간 내에 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N의 저해가 관찰되었고 이것으로 보아 황을 이용한 독성모니터링 장치는 효과적으로 독성물질을 탐지할 수 있으며 NO<sub>2</sub>로 저해를 받은 후 독성이 없는 물을 유입시켰을 때 회복이 빠르므로 독성 물질 탐지 후 바로 황입자의 교체를 해주지도 않아도 됨을 알 수 있었다. 그러나 수는 5 mg/L를 주입한 경우 독성이 없는 유입수를 주입했음에도 회복이 되지 않았다(data not shown).

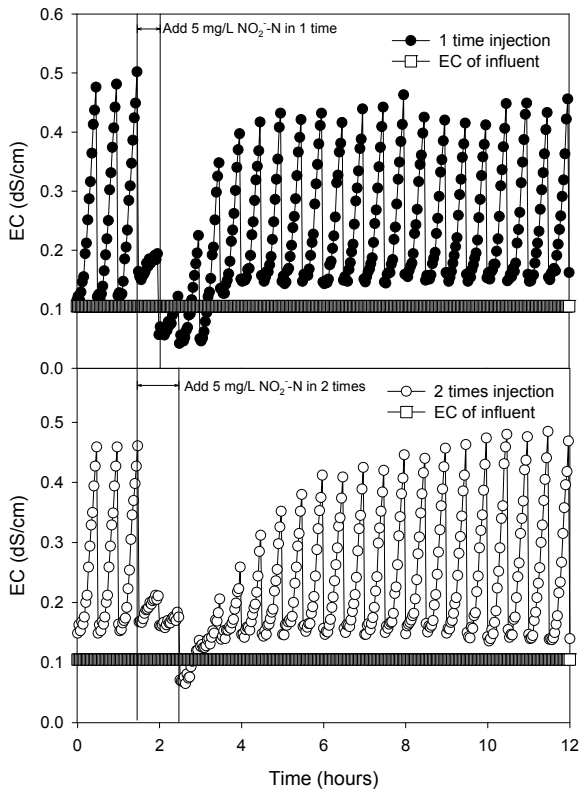


Fig. 6. EC changes with nitrite addition and recovery of SOB in the reactors

## 요약

일반적으로 실제 하천의 EC 값은 일정하게 유지가 된다. 연속식, 반연속식 운전으로 실험한 결과 정상상태(steady state)를 보였다. 연속운전의 경우 유출수의 EC 값은 1.7 dS/m로 일정하게 유지되었으며(유입 EC = 0.1 dS/m) 반연속식운전의 경우 새로운 유입수가 유입됨으로 인해 초기 EC는 약 0.1 dS/m이고 미생물이 황을 산화함에 따라 황산염 이온이 생성되고 EC가 증가하여 30분 후 EC는 약 0.6 dS/m로 측정되었고 장시간 운전하여도 일정한 트렌드의 안정적인 값이 측정되었다. NO<sub>2</sub>-N가 주입되면서 미생물이 저해를 받아 EC가 감소하는 경향을 보였으며 이를 통해 독성물질 주입여부를 판별할 수 있었다. 독성이 없는 유입수를 다시 유입시켰을 경우 약 4~5시간 후 반응조 내의 미생물이 원상태를 회복하여 유입 전 EC의 값이 다시 측정되었다. 황을 이용한 독성모니터링방법은 다른 여러 조건의 실험을 통해 문제점 파악 및 보완이 필요하지만 연속식 운전, 반연속식 운전 2가지 방법을 통해 독성물질을 신속하게 탐지할 수 있을 것으로 판단된다.

## 참고문헌

Kim, B.S., Park, Y.K., Park, K.H., Kim, J.K., Shin, J.S., Kim, J.H., Yoon, S.M., Ahn, Y.J., 2006. Selection of optimal culture media for developing standard ecological toxicity test methods using korean

- freshwater cladocera, *The Korean J. Pesticide Sci.* 10, 189-195.
- Bozeman, J., Koopman, B., Bitton, G., 1989. Toxicity testing using immobilized algae, *Aquatic Toxicol.* 14, 345-352.
- Gu, M.B., Gil, G.C., 2001. A multi-channel continuous toxicity monitoring system using recombinant bioluminescent bacteria for classification of toxicity, *Biosens. Bioelectron.* 16, 661-666.
- Hernando, M.D., Fernandez-alba, A.R., Tauler, R., Barcelo, D., 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment, *Talanta.* 65, 358-366.
- Kim, K.Y., Kim, K.R., Lee, S.I., 2010. Acute toxicity test for heavy metals using water fleas, *J. of Korean Society of Water Science and Technology.* 18, 37-47.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese, *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1472-1480.
- Oh, S.E., 2010. A new methodology of measuring water toxicity using sulfur oxidizing bacteria, *J. of KSEE,* 32, 555-562.
- Oh, S.E., Hassan, S.H.A., VanGinkel, S.W., 2011. A novel biosensor for detecting toxicity in water using sulfur-oxidizing bacteria, *Sensor Actuat B-Chemical.* 154, 17-21.
- Sorokin, D.Y., Kuenen, J.G., 2005. Haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes, *FEMS Microbiol. Reviews.* 29, 685-702.
- Strigui, N., Koutsospyros, A., Christodoulatos, C., 2010. Tungsten speciation and toxicity: Acute toxicity of mono- and poly-tungstates to fish, *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 164-171.
- Van Ginkel, S.W., Hassan, S.H.A., Oh, S.E., 2010. Detecting endocrine disrupting compounds in water using sulfur oxidizing bacteria, *Chemosphere.* 81, 294-297.
- Van Wezel, A., Mons, M., Van Delft, W., 2010. New methods to monitor emerging chemicals in the drinking water production chain, *J. Environ. Monitor.* 12, 80-89.
- Woutersen, M., Belkin, S., Brouwer, B., van Wezel, A., Heringa, M., 2011. Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources?, *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 915-929.
- Yoon, S.J., Lee, S.K., Park, H.O., 2008. Development of continuous water quality monitoring system using the daphnid *Daphnia* sp., *J. Korean Society On Water Quality.* 24, 36-43.