

ORIGINAL ARTICLE

Bacillus sp.의 생장과 인 제거능에 대한 단일 및 2종 혼합 중금속의 독성 평가

김덕원 · 박지수¹⁾ · 오은지²⁾ · 유진³⁾ · 김덕현⁴⁾ · 정근욱*

충북대학교 환경생명화학학과, ¹⁾두산전자 Field Quality Control 김천part, ²⁾한국환경연구원 자연환경연구실, ³⁾인천광역시 보건환경연구원 생활환경과, ⁴⁾국립환경과학원 토양지하수과

Toxicity Evaluation of Single and Binary Mixture of Heavy Metals on the Growth and Phosphorus Removal Ability of *Bacillus* sp.

Deok-Won Kim, Ji-Su Park¹⁾, Eun-Ji Oh²⁾, Jin Yoo³⁾, Deok-Hyeon Kim⁴⁾,
Keun-Yook Chung*

Department of Environmental and Biological Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

¹⁾Field Quality Control Gimcheon part, Doosan Corporation Electro-Materials, Gimcheon 39541, Korea

²⁾Water and Land Research Group/Division for Natural Environment, Korea Environment Institute, Sejong 30147, Korea

³⁾Indoor Environment Division, Incheon Research Institute of Public Health and Environment, Incheon, 22320, Korea

⁴⁾National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Korea

Abstract

In this study, the effects of single and binary heavy metals toxicity on the growth and phosphorus removal ability of *Bacillus* sp., known as be a phosphorus-removing microorganism, were quantitatively evaluated. Cd, Cu, Zn, Pb, Ni were used as heavy metals. As a result of analysis of variance of the half of inhibition concentration and half of effective concentration for each single heavy metal treatment group, the inhibitory effect on the growth of *Bacillus* sp. was Ni < Pb < Zn < Cu < Cd. And the inhibitory effect on phosphorus removal by *Bacillus* sp. was Ni < Pb < Zn < Cu < Cd. When analyzing the correlation between growth inhibition and phosphorus removal efficiency of a single heavy metal treatment group, a negative correlation was found ($R^2 = 0.815$), and a positive correlation was found when the correlation between IC_{50} and EC_{50} was analyzed ($R^2 = 0.959$). In all binary heavy metal treatment groups, the interaction was an antagonistic effect when evaluated using the additive toxicity index method. This paper is considered to be basic data on the toxic effects of heavy metals when phosphorus is removed using phosphorus removal microorganisms in wastewater.

Key words : Toxicity assessment, Additive toxicity index, Phosphorus removal, Heavy metal, *Bacillus* sp.

Received 30 September, 2021; Revised 15 November, 2021;

Accepted 19 November, 2021

*Corresponding author: Keun-Yook Chung, Department of Environmental and Biological Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea
Phone : +82-43-261-3383
E-mail : kychung@cbnu.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

하천이나 호소에서 화학비료, 생활하수, 축산 및 산업 폐수 등의 오염원 유입으로 식물플랑크톤 같은 수중생물의 증식에 사용되는 영양물질이 과도하게 유입되면서 부영양화가 발생한다(Yun et al., 2020). 이 현상은 수생태계 및 수질 변화에 악영향을 미치게 된다(Jiang et al., 2020). 그 예로 수중 조류 및 병원성 세균이 과도하게 번식하고, 악취가 나며, 수중 산소 고갈을 발생시킨다(Newell et al., 2019). 그리고 담수에서 부영양화는 온실 가스를 배출해 지구의 기후에 영향을 끼친다(Shang et al., 2021). 부영양화를 막기 위해서 질소와 인과 같은 영양물질이 수계로 유입되는 것을 막거나 수계 내에 영양물질을 효율적으로 제거할 수 있어야 한다. 특히 수질에서 인의 제거는 질소 제거와 다르게 공기 중에 미생물이 이용할 수 있는 공급원이 없기 때문에 부영양화에 대해 가장 큰 영향을 미친다. 따라서 인을 부영양화에 대한 제한적 오염물질이라 하며, 폐수 중 질소가 존재하더라도 인을 제거하면 부영양화가 일어나지 않기 때문에 인을 우선적으로 제거하고자 한다(Kim et al., 2015).

인을 제거하는 방법은 크게 물리화학적 방법과 생물학적 방법의 2가지로 구분할 수 있다(Comeau et al., 1986; Drizo et al., 1999). 최근에는 인 제거 시 2차 오염을 발생시키지 않는 생물학적 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Mustafa et al., 2021). 특히 Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR)은 폐수에서 인을 제거하기 위한 효율적이고 지속 가능한 방법이다(Roy et al., 2021). EBPR 공정은 Phosphorus Accumulating Organisms (PAOs)의 성장을 최적화하는 인공적인 환경을 제공한다(Zuthi et al., 2013). PAOs는 산소 외에 질소산화물을 전자수용체로 활용할 수 있으며(Roy et al., 2021), 이 능력을 이용하여 EBPR은 혐기-호기조건을 교차시켜 PAOs의 luxury uptake를 통해 폐수 중 인을 제거한다(Khoshmanesk et al., 2002). EBPR을 최적화하기 위해 새로운 PAOs 분리 및 동정(Song et al., 2019), PAOs의 대사과정(Saia et al., 2021), PAOs에 영향을 미치는 환경 인자(Izadi et al., 2021; Poh et al., 2021) 등을 연구하고 있다. 그리고 이를 통해 기존 공정의 공정변수 변화, 새로운 공정의 개발 등의 연구가 진행되고 있다.

혐기성 대사는 중금속에 의해 크게 영향을 받는 것으로 연구되었기 때문에 혐기-호기조건을 교차시켜 인 제거 효율을 증가시키는 EBPR에서 중금속의 영향은 더욱 크게 작용한다(Mrafkova et al., 2003; van Hullebusch et al., 2004). 그러나 중금속 독성의 영향으로 PAOs에 의한 인 제거 감소에 대한 연구는 부족한 실정이다. 그리고 미생물 생장에 대한 중금속 독성과 미생물을 이용한 중금속 제거 연구(George et al., 2021)는 진행되고 있지만 단일 중금속에 대한 독성 연구가 주로 진행되고 있다. 중금속으로 인한 환경오염은 대부분 여러 종류의 중금속이 혼합되어 나타나며(Kong, 2013), 최근에는 두 종류 이상의 중금속이 혼합되었을 때 antagonism 및 synergism과 같은 상호작용에 대한 연구가 수행되고 있다(Meynard et al., 2021). 그러나 혼합 중금속에 대한 상호작용 연구는 미생물에 대한 연구가 부족하기 때문에 다양한 미생물 종에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 PAOs로 알려진 *Bacillus* sp.를 이용하였다. 선행연구에서는 다른 PAOs로 알려진 *Pseudomonas* sp.(Kim et al., 2016)와 *Alcaligenes* sp.(Yoo et al., 2018)를 사용하였다. *Pseudomonas* sp.와 *Alcaligenes* sp.는 gram-negative bacteria이며(Haktanir et al., 2021; Wang et al., 2021), *Bacillus* sp.는 gram-positive bacteria이다(Rajashekhar et al., 2017). gram-negative bacteria와 gram-positive bacteria의 가장 큰 차이는 펩티도글리칸 함량으로 인한 세포벽 두께이다(Mai-Prochnow et al., 2016). 최근까지 gram-negative bacteria와 gram-positive bacteria의 여러 가지 차이로 인한 많은 비교 연구가 진행되고 있다(Andini et al., 2021). gram-positive bacteria와 gram-negative bacteria에 대하여 중금속 독성이 생장과 인 제거에 미치는 영향을 비교하기 위해 *Bacillus* sp.에 대한 연구 결과와 *Pseudomonas* sp. 및 *Alcaligenes* sp.의 연구 결과를 비교하였다.

따라서 본 연구의 목적은 단일 및 혼합 중금속의 독성이 생장과 인 제거 등 미생물에 미치는 영향에 대한 정량적 평가를 하였다. 그리고 미생물에 대한 단일 및 2종 중금속의 독성을 비교하여 중금속을 혼합할 때 상호작용을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 미생물 배양 조건

본 연구에 사용된 미생물은 *Bacillus* sp.이다. 미생물 배양에 사용된 배지의 조성은 증류수 1 L 내에 NH_4Cl 1.91 g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 이스트 추출물 0.02 g, 펩톤 0.2 g이 용해되어 있고, trace metal solution 5ml가 첨가되었다. trace metal solution은 증류수 100 mL에 H_3BO_3 0.03 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g이 용해되어 있다 (Zafiri et al., 1999). 100 mL 삼각 플라스크 안에 배양액 50 mL가 되도록 혼합 균주와 배지의 조성을 1.0% (v/v)로 하였다. shaking incubator에서 pH 7, 30°C, 150 rpm 조건으로 24시간 배양하였다.

2.2. 합성 폐수

중금속 독성 평가를 위한 중금속 농도에 따른 *Bacillus* sp.의 성장 억제와 *Bacillus* sp.에 의한 인 제거 효율을 확인하였다. 중금속의 종류는 Cd, Cu, Zn, Pb, Ni로 설정하였다. 단일 중금속 처리 시 배지 내 중금속별 처리 농도는 다음과 같다. 중금속별 처리 농도는 Cd 0, 0.2, 0.4, 0.6, 1 mg/L, Cu 0, 4, 8, 12, 20 mg/L, Zn 0, 3, 6, 9, 15 mg/L, Pb 0, 4, 8, 12, 20 mg/L, Ni 0, 6, 12, 18, 30 mg/L이었다. 2종 중금속 혼합 처리 시 배지 내 중금속 농도는 혼합 전 중금속별 처리 농도를 각각 합한 것과 동일한 농도가 되도록 하였다. 예를 들어 Pb과 Cd의 혼합 처리구 농도는 0 (0+0), 4.2 (4+0.2), 8.4 (8+0.4), 12.6 (12+0.6), 21 (20+1) mg/L이다. 선행 연구의 half of inhibition concentration (IC_{50}) 및 half of effective concentration (EC_{50})의 결과를 확인하여 *Bacillus* sp.에 대한 중금속의 IC_{50} 및 EC_{50} 을 추정 가능한 농도로 설정하였다 (Sin et al., 2013; Kim et al., 2016; Yoo et al., 2018). 인 농도는 모든 중금속 처리구에서 20 mg/L로 설정하였다.

2.3. 성장 측정 및 인산 정량

Bacillus sp.의 생장은 배양액의 Optical Density (OD)를 통해 측정하였다. 채취한 시료는 UV-VIS spectrophotometer (Model UV Mini 1240 Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 600 nm의 파장에서 3시간마다 흡광도를 측정하였으며, 24시간 후에 대조구 및 중금속 처리구의 성장 비교를 통해 중금속 처리구 간 growth

inhibition (GI)을 비교 분석하였다.

배지 내 총 인 농도는 ascorbic acid에 의한 molybden blue법을 이용하여 측정하였다 (Kim et al., 2012). UV-VIS spectrophotometer (Model UV Mini 1240 Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 880 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 초기 및 최종 인 농도의 비교를 통해 중금속 처리구 간 인 제거 효율을 비교 분석하였다.

2.4. IC_{50} 및 EC_{50} 추정

IC_{50} of bacterial growth 및 EC_{50} of phosphorus removal efficiencies의 계산은 각각 GI 및 인 제거 효율 값에 비선형 회귀식을 이용하였다. IC_{50} 은 중금속 처리에 따른 GI가 대조구의 절반이 되는 지점으로 추정하였고 (Asami, 1996), EC_{50} 은 중금속 처리에 따른 인 제거가 대조구의 절반이 되는 지점으로 추정하였다 (Chen, 1997).

2.5. 중금속 간 상호작용 평가

중금속 2종 처리 시, 중금속 간 상호작용을 확인하기 위해 additive toxicity index method를 이용하였다. Additive toxicity index method는 혼합물질의 독성에 대한 각각 화학물질의 기여도를 평가하는 방법으로 계산식은 아래와 같다.

$$S = \frac{A_m}{A_i} + \frac{B_m}{B_i}$$

S : 독성 반응의 총 합

A_m : 혼합 시 나타나는 A 물질의 독성

B_m : 혼합 시 나타나는 B 물질의 독성

A_i : 단일로 존재할 때 나타나는 A 물질의 독성

B_i : 단일로 존재할 시 나타나는 B 물질의 독성

위의 식에서 계산한 S값을 변형한 AI (Additive Index value)값을 기준으로 2종의 중금속 간 상호작용을 평가할 수 있다. AI값은 S 값이 1 보다 작다면 1/S-1.0, S 값이 1보다 크다면 -S+1.0, S 값이 1일 경우 S-1로 계산한다. AI값 계산결과가 0보다 크면 synergistic interaction, 0보다 작으면 antagonistic interaction으로, AI값이 0일 경우 additive interaction으로 추정할 수

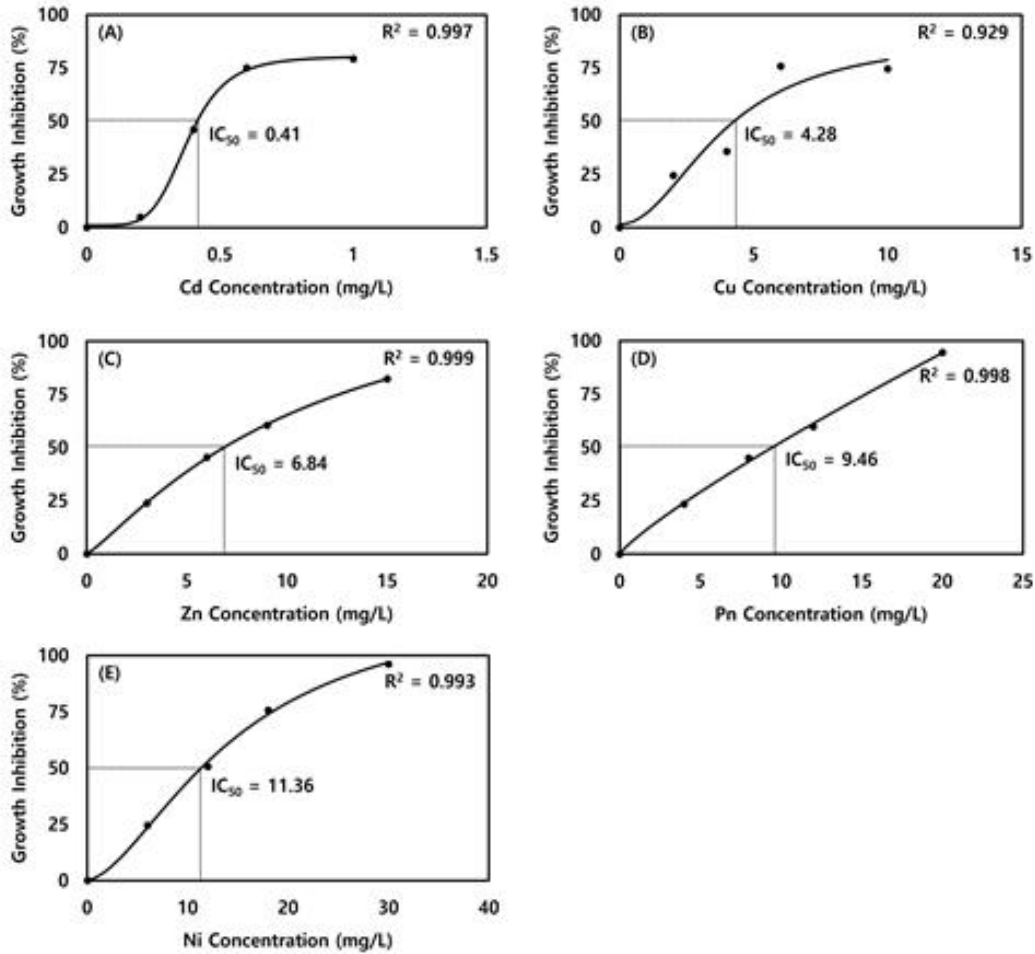


Fig. 1. IC₅₀ of single heavy metals against *Bacillus* sp. in each medium containing the respective single heavy metals; (A) Cd, (B) Cu, (C) Zn, (D) Pb, (E) Ni.

있다(Lange and Thomulka, 1997).

2.6. 통계분석

SAS software package version 9.4 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 선형 회귀분석과 신뢰 구간은 95% 수준으로 설정하여 ANOVA (analysis of variance) 분석을 실시하였다. SigmaPlot 14.5의 Sigmoidal 함수 형태의 회귀 모형인 $y = a/(1+e^{-(x-x_0)/b})$ (Sigmoidal, Sigmoid, 3 Parameter)을 이용하여(Kwon et al., 2014) 비선형 회귀 분석하였다(Brown, 2001). 모든 실험은 3반복하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 단일 중금속

GI를 이용하여 계산된 단일 중금속 처리구 별 IC₅₀은 다음과 같다(Fig. 1). 중금속의 종류에 상관없이 단일 중금속의 농도가 증가할수록 *Bacillus* sp.의 생장이 감소하는 것을 확인하였다. Bacteria에 대한 독성 실험의 경우 IC₅₀은 독성물질이 bacteria의 성장을 50% 저해하는 농도로서 값이 낮을수록 bacteria의 성장을 더 크게 저해하는 것을 의미한다(Sebaugh, 2011). 각 단일 중금속 처리

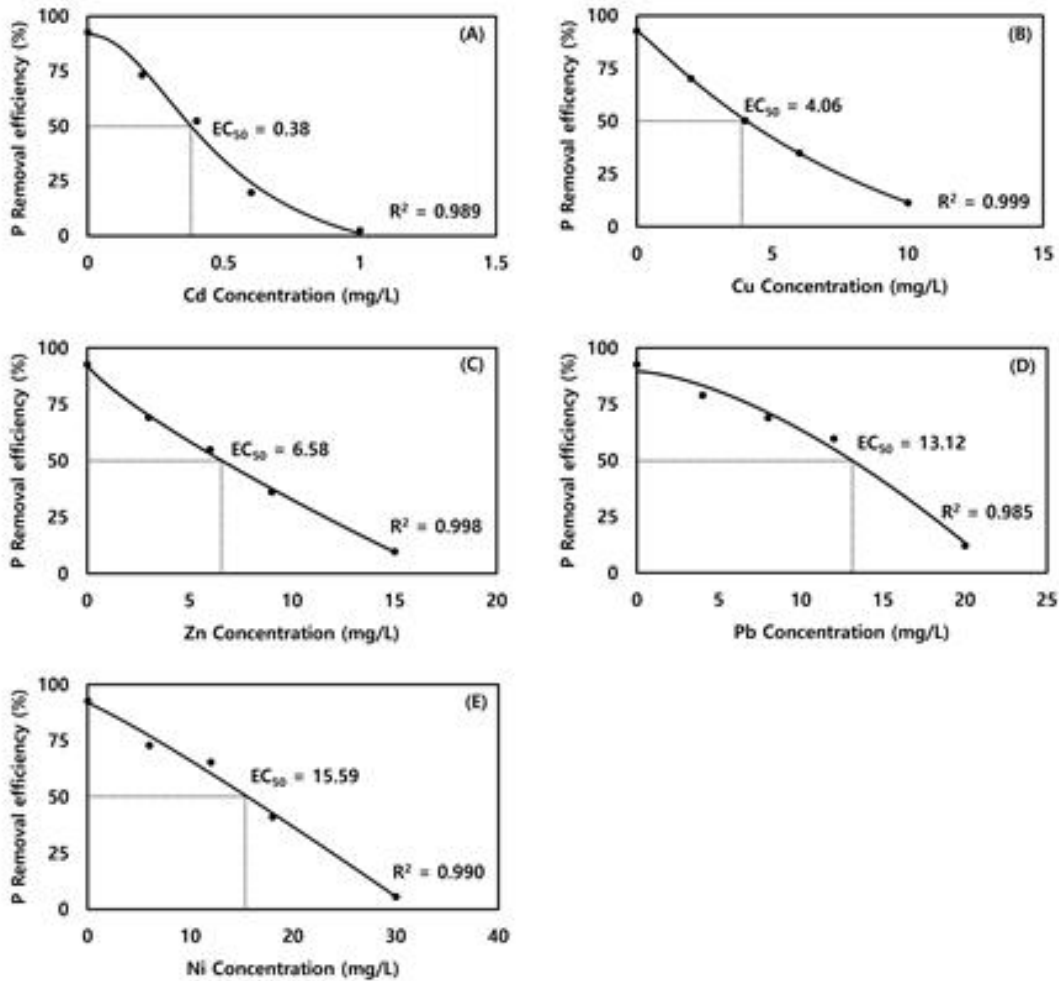


Fig. 2. EC₅₀ of single heavy metals against *Bacillus sp.* in each medium containing the respective single heavy metals; (A) Cd, (B) Cu, (C) Zn, (D) Pb, (E) Ni.

구 별 IC₅₀을 ANOVA 분석한 결과, 중금속이 *Bacillus sp.*의 생장에 미치는 저해효과는 다음과 같다; Ni < Pb < Zn < Cu < Cd (p < 0.05).

3.1.2. *Bacillus sp.*에 의한 인 제거에 대한 중금속 독성

인 제거 효율을 이용하여 계산된 단일 중금속 처리구 별 EC₅₀은 다음과 같다(Fig. 2). 모든 단일 중금속 처리구에서 중금속의 농도가 증가할수록 인 제거 효율은 감소하였다. Bacteria에 대한독성 실험의 경우 EC₅₀

은 독성물질이 bacteria에 의한 반응을 50% 저해하는 농도로서 값이 낮을수록 bacteria에 의한 반응을 더 크게 저해하는 것을 의미한다(Sebaugh, 2011). 각 단일 중금속 처리구 별 EC₅₀을 ANOVA 분석한 결과, 중금속이 *Bacillus sp.*에 의한 인 제거에 미치는 저해효과는 다음과 같다; Ni < Pb < Zn < Cu < Cd (p < 0.05).

3.1.3. *Bacillus sp.*에 대한 단일 중금속 독성 평가
단일 중금속 처리구의 GI와 인 제거 효율의 상관성을 분석하였을 때 음의 상관관계를 보였으며, R²값은 0.815

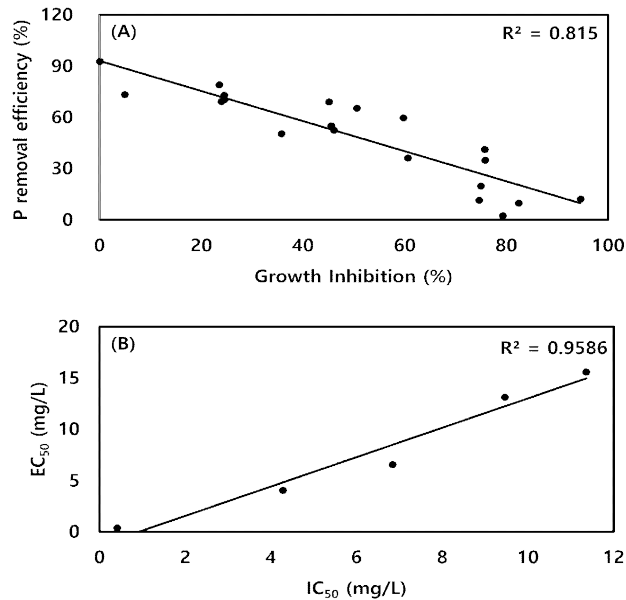


Fig. 3. (A) Correlation between the growth inhibition of *Bacillus* sp. and the phosphorus removal efficiency by *Bacillus* sp. in medium containing single heavy metals. (B) Correlation between the IC₅₀ and the EC₅₀ against *Bacillus* sp. in medium containing single heavy metals.

였다(Fig. 3A). 이 결과로부터 미생물 성장 억제제가 증가할수록 인 제거 효율이 감소되는 것을 확인하였다. 그리고 단일 중금속 처리구의 IC₅₀과 EC₅₀의 상관성을 분석하였을 때 양의 상관관계를 보였으며, R²값은 0.959였다(Fig. 3B). 이 결과로부터 미생물 성장에 대한 중금속 독성이 강할수록 인 제거 효율을 감소시키는 독성이 강한 것을 확인하였다.

Pseudomonas sp.(Kim et al., 2016)와 *Alcaligenes* sp.(Yoo et al., 2018)에 대한 연구 결과에서도 GI와 인 제거 효율은 음의 상관 관계를 보였으며, IC₅₀과 EC₅₀은 양의 상관 관계를 보였다. 그러나 gram-positive bacteria와 gram-negative bacteria의 차이에 의한 중금속의 독성 차이는 확인할 수 없었다. 이러한 결과는 중금속의 독성 작용이 세포벽에 미치는 영향보다는 단백질의 기능 장애를 일으키고 질산화와 같은 미생물 활동을 억제하는 영향이 더 강하기 때문으로 사료된다(Lin et al., 2021).

Bacillus sp.에 대한 단일 중금속의 독성은 Ni < Pb < Zn < Cu < Cd인 것으로 확인됐다. 이 연구 결과는 46종의 박테리아에 대하여 중금속 독성 실험을 한 결과와 일

치하였다(Abou-Shanab et al., 2007). 혐기-호기조건을 교차시켜 인 제거 효율을 증가시키는 EBPR에서 혐기성 대사는 중금속에 의해 크게 영향을 받는 것으로 연구되었기 때문에 미생물에 의한 인 제거에 대하여 중금속의 영향은 더욱 크게 작용할 것으로 사료된다(Mrafkova et al., 2003; van Hullebusch et al., 2004).

3.2. 2종 혼합 중금속

3.2.1. *Bacillus* sp.의 성장에 대한 중금속 독성

GI를 이용하여 계산된 2종 중금속 처리구 별 IC₅₀은 다음과 같다(Fig. 4). 중금속의 종류에 상관없이 2종 혼합 중금속의 농도가 증가할수록 *Bacillus* sp.의 생장이 감소하는 것을 확인하였다. 2종 중금속 처리구 별 IC₅₀을 ANOVA 분석한 결과, 중금속이 *Bacillus* sp.의 성장에 미치는 저해효과는 다음과 같다; Pb + Ni < Zn + Pb < Zn + Ni < Cu + Pb < Cu + Ni < Cu + Zn < Cd + Ni < Cd + Cu < Cd + Pb < Cd + Zn (p < 0.05).

3.2.2. *Bacillus* sp.에 의한 인 제거에 대한 중금속 독성

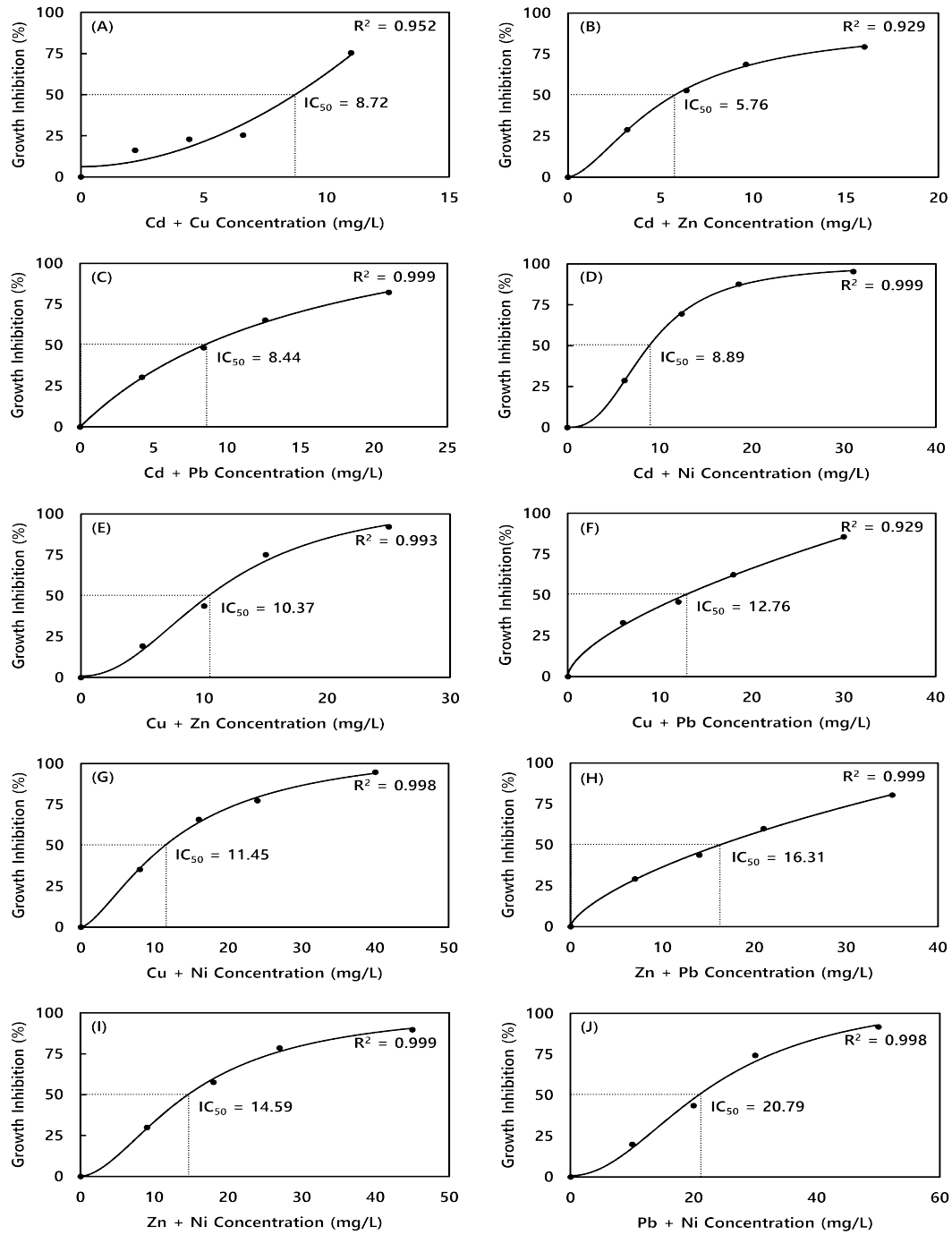


Fig. 4. IC₅₀ of binary heavy metals against *Bacillus* sp. in each medium containing the respective binary heavy metals; (A) Cd + Cu, (B) Cd + Zn, (C) Cd + Pb, (D) Cd + Ni, (E) Cu + Zn, (F) Cu + Pb, (G) Cu + Ni, (H) Zn + Pb, (I) Zn + Ni, (J) Pb + Ni.

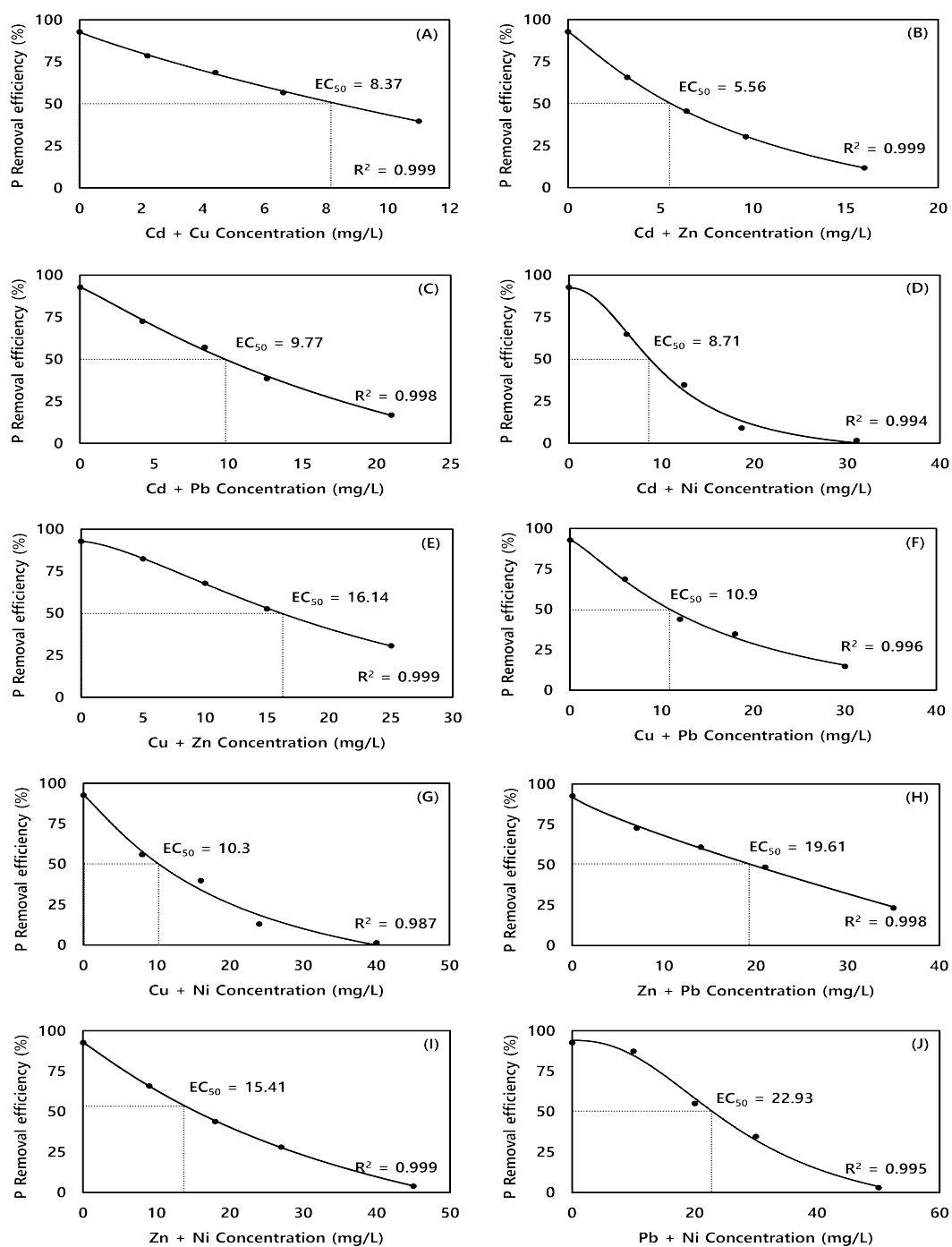


Fig. 5. EC_{50} of binary heavy metal against *Bacillus* sp. in each medium containing the respective binary heavy metals; (A) Cd + Cu, (B) Cd + Zn, (C) Cd + Pb, (D) Cd + Ni, (E) Cu + Zn, (F) Cu + Pb, (G) Cu + Ni, (H) Zn + Pb, (I) Zn + Ni,

(J) Pb + N

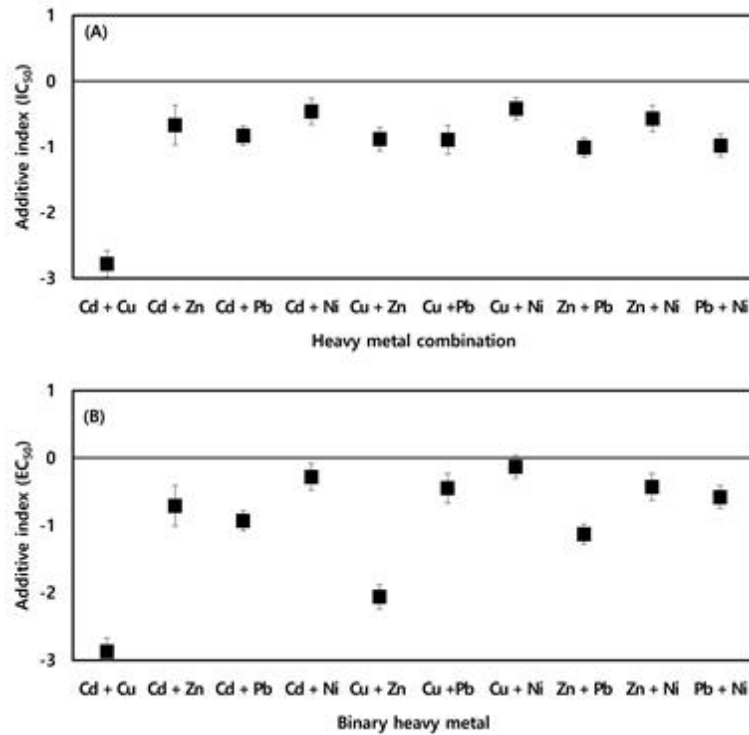


Fig. 6. Additive index of heavy metals combination (Cd + Cu, Cd + Zn, Cd + Pb, Cd + Ni, Cu + Zn, Cu + Pb, Cu + Ni, Zn + Pb, Zn + Ni, Pb + Ni); (A) IC₅₀, (B) EC₅₀. An antagonistic interaction is less than 0, a synergistic interaction is more than 0, and an additive interaction is 0.

인 제거 효율을 이용하여 계산된 2종 중금속 처리구 별 EC₅₀은 다음과 같다(Fig. 5). 모든 2종 중금속 처리구에서 중금속의 농도가 증가할수록 인 제거 효율은 감소하였다. 2종 중금속 처리구 별 EC₅₀을 ANOVA 분석한 결과, 중금속이 *Bacillus* sp.에 의한 인 제거에 미치는 저해효과는 다음과 같다; Pb + Ni < Zn + Pb < Cu + Zn < Zn + Ni < Cu + Pb < Cu + Ni < Cd + Pb < Cd + Ni < Cd + Cu < Cd + Zn (p < 0.05).

3.2.3. *Bacillus* sp.에 대한 중금속 간 독성 상호작용 평가

2종 혼합 시 중금속의 IC₅₀에 대한 AI는 다음과 같다(Fig. 6A). Cd + Cu 처리구에서 -2.78, Cd + Zn 처리구에서 -0.67, Cd + Pb 처리구에서 -0.83, Cd + Ni 처리구에서 -0.46, Cu + Zn 처리구에서 -0.88, Cu + Pb 처리구에서 -0.89, Cu + Ni 처리구에서 -0.42, Zn + Pb 처리구에서 -1.01, Zn + Ni 처리구에서 -0.7, Zn + Ni 처리구에

서 -0.98였다. 2종 혼합 시 중금속의 EC₅₀에 대한 AI는 다음과 같다(Fig. 6B). Cd + Cu 처리구에서 -2.87, Cd + Zn 처리구에서 -0.71, Cd + Pb 처리구에서 -0.93, Cd + Ni 처리구에서 -0.28, Cu + Zn 처리구에서 -2.06, Cu + Pb 처리구에서 -0.45, Cu + Ni 처리구에서 -0.13, Zn + Pb 처리구에서 -1.13, Zn + Ni 처리구에서 -0.43, Zn + Ni 처리구에서 -0.58였다. 모든 2종 중금속 처리구에서 AI 값이 0보다 낮았기 때문에 antagonistic effect를 확인하였다.

Pseudomonas sp.(Kim et al., 2016)와 *Alcaligenes* sp.(Yoo et al., 2018)에 대한 연구 결과에서도 2종 중금속 혼합 시 대부분 antagonistic effect를 보였다. 이러한 결과는 중금속 흡수와 관련이 있는 확산 및 세포벽 구성, 중금속과 반응하는 효소 및 allosteric effector와 같은 독성 반응 경로(Zeb et al., 2017)와 중금속 배출과 관련이 있는 이온 선택성 ATPase 펌프, 중금속을 흡착하는

EPS와 같은 방어 메커니즘이(Prabhakaran et al., 2016) 이 비슷하여 중금속 간 경쟁하기 때문에 사료된다.

4. 결론

본 연구는 IC₅₀ 및 EC₅₀을 이용하여 Cd, Cu, Zn, Pb, Ni의 중금속이 *Bacillus* sp. 의 성장과 인 제거에 미치는 독성효과에 대한 정량적 평가를 하였다. 그리고 AI를 이용하여 2종 중금속을 혼합할 때 상호작용을 평가하였다. IC₅₀과 EC₅₀ 분석 결과, 박테리아 성장과 인 제거 능력에 대한 독성은 Ni < Pb < Zn < Cu < Cd인 것을 확인하였다. *Bacillus* sp.에 대한 단일 중금속 처리구의 GI와 인 제거 효율에 대한 상관 분석하였을 때 미생물 성장에 대한 중금속 독성이 강할수록 인 제거 효율이 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *Pseudomonas* sp.와 *Alcaligenes* sp.에 대한 연구 결과와 일치하였다. 그러나 gram-positive bacteria와 gram-negative bacteria의 차이에 의한 중금속의 독성 차이는 확인할 수 없었다. 모든 2종 혼합 중금속 처리구에서 antagonistic effect를 확인하였다. IC₅₀과 EC₅₀를 이용하여 *Bacillus* sp.에 대한 2종 혼합 중금속의 독성을 정량적으로 분석한 결과 Cd와 혼합된 중금속 처리구들에서 독성효과가 가장 크게 나타났다. 나머지 혼합 중금속 처리구들 간에 독성 비교에서 단일 중금속들 간에 독성 비교와 차이를 보이는 것은 antagonistic effect의 차이로 인한 것으로 사료된다. 추후에 미생물에 대하여 중금속 독성 반응 경로와 방어 메커니즘 연구를 통해 미생물에 대한 중금속 간 경쟁 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 이공분야기초연구사업 연구비지원 (과제번호2019R1F1A1063252)에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Abou-Shanab, R. A. I., Van Berkum, P., Angle, J. S., 2007, Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Abyssum murale*, *Chemosphere.*, 68, 360-367.
- Andini, S., Araya-Cloutier, C., Lay, B., Vreeke, G., Hageman, J., Vincken, J. P., 2021, QSAR-based physicochemical properties of isothiocyanate antimicrobials against gram-negative and gram-positive bacteria, *LWT.*, 144, 111222.
- Asami, A., Suzuki, N., Nakanishi, J., 1996, Aquatic toxicity emission from Tokyo: Wastewater measured using marine luminescent bacterium, *Photobacterium phosphoreum*, *Wat. Sci. Tech.*, 33, 121-128.
- Brown, A. M., 2001, A Step-by-step guide to non-linear regression analysis of experimental data using a Microsoft Excel spreadsheet, *Computer methods and programs in biomedicine.*, 65, 191-200.
- Chen, C. Y., Huang, J. B., Chen, S. D., 1997, Assessment of the Microtox toxicity test and its application for industrial wastewater, *Wat. Sci. Tech.*, 36, 375-382.
- Comeau, Y., Hall, K. J., Hancock, R. E. W., Oldham, W. K., 1986, Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal, *Water research.*, 20, 1511-1521.
- Drizo, A., Frost, C. A., Grace, J., Smith, K. A., 1999, Physico-chemical screening of phosphate-removing substrates for use in constructed wetland systems, *Water Research.*, 33, 3595-3602.
- George, F., Mahieux, S., Daniel, C., Titécat, M., Beauval, N., Houcke, I., Neut, C., Allorge, D., Borges, F., Jan, G., Foligne, B., Garat, A., 2021, Assessment of Pb (II), Cd (II), and Al (III) removal capacity of bacteria from food and gut ecological niches: Insights into biodiversity to limit Intestinal biodisponibility of toxic metals, *Microorganisms.*, 9, 456.
- Izadi, P., Izadi, P., Eldyasti, A., 2021, Understanding microbial shift of enhanced biological phosphorus removal process (EBPR) under different dissolved oxygen (DO) concentrations and hydraulic retention time (HRTs), *Biochemical Engineering Journal*, 166, 107833.
- Jiang, X., Pan, B., Sun, Z., Cao, L., Lu, Y., 2020, Application of taxonomic distinctness indices of fish assemblages for assessing effects of river-lake disconnection and eutrophication in floodplain lakes, *Ecological Indicators.*, 110, 105955.
- Khosmanesh, A., Hart, B. T., Duncan, A., Beckett, R., 2002, Luxury uptake of phosphorus by sediment bacteria, *Water Res.*, 36, 774-778.

- Kim, D. H., Yoo, J., Chung, K. Y., 2016, Toxic effects of binary mixtures of heavy metals on the growth and P removal efficiencies of *Alcaligenes* sp., Korean Journal of Environmental Agriculture., 35(1), 79-86.
- Kim, H. J., Lee, S. E., Hong, H. K., Kim, D. H., An, J. W., Choi, J. S., Nam, J. H., Lee, M. S., Woo, S. H., Chung, K. Y., 2012, Phosphorus removal characteristics by bacteria isolated from industrial wastewater, Korean Journal of Environmental Agriculture, 31, 185-191.
- Kim, T. K., Kim, J. H., Song, J. Y., 2015, A Study on the removal of phosphorus from wastewater by redox reaction of Cu-Zn metal alloy, Journal of the Korean Applied Science and Technology, 32, 78-84.
- Kong, I. C., 2013, Joint effects of heavy metal binary mixtures on seed germination, root and shoot growth, bacterial bioluminescence, and gene mutation, Journal of Environmental Science, 25, 889-894.
- Kristiansen, R., Nguyen, H. T. T., Saunders, A. M., Nielsen, J. L., Wimmer, R., Le, V. Q., Nielsen, P. H., 2013, A Metabolic model for members of the genus *Tetrasphaera* involved in enhanced biological phosphorus removal, The ISME journal, 7, 543-554.
- Kwon, S., Choi, G. J., Kim, K. S., Kwon, H. J., 2014, Control of Botrytis cinerea and postharvest quality of cut roses by electron beam irradiation, Horticultural Science & Technology, 32, 507-516.
- Lange, J. H., Thomulka, K. W., Use of the Vibrio harveyi toxicity test for evaluating mixture interactions of nitrobenzene and dinitrobenzene, Ecotoxicol. Environ. Scf., 38, 2-12.
- Li, Y., Shang, J., Zhang, C., Zhang, W., Niu, L., Wang, L., Zhang, H., 2021, The role of freshwater eutrophication in greenhouse gas emissions: A review, Science of The Total Environment, 144582.
- Lin, Y., Wang, L., Xu, K., Li, K., Ren, H., 2021, Revealing taxon-specific heavy metal-resistance mechanisms in denitrifying phosphorus removal sludge using genome-centric metaproteomics, Microbiome, 9, 1-17.
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., Murphy, A. B., 2016, Gram positive and gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma, Scientific reports, 6, 1-11.
- Meynard, A., Espinoza-González, C., Núñez, A., Castañeda, F., Contreras-Porcia, L., 2021, Synergistic, antagonistic, and additive effects of heavy metals (copper and cadmium) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) under binary and tertiary combinations in key habitat-forming kelp species of Chile, Environmental Science and Pollution Research, 28, 18300-18307.
- Mrafkova, L., Goi, D., Gallo, V., Colussi, I., 2003, Preliminary evaluation of inhibitory effects of some substances on aerobic and anaerobic treatment plant biomasses, Chemical and biochemical engineering quarterly, 17, 243-248.
- Mustafa, H. M., Hayder, G., 2021, Recent studies on applications of aquatic weed plants in phytoremediation of wastewater: A review article, Ain Shams Engineering Journal, 12, 355-365.
- Newell, S. E., Davis, T. W., Johengen, T. H., Gossiaux, D., Burtner, A., Palladino, D., McCarthy, M. J., 2019, Reduced forms of nitrogen are a driver of non-nitrogen-fixing harmful cyanobacterial blooms and toxicity in Lake Erie, Harmful algae, 81, 86-93.
- Poh, P. K., Ong, Y. H., Arumugam, K., Nittami, T., Yeoh, H. K., Bessarab, I., William, R., Chua, A. S. M., 2021, Tropical based EBPR process: The long term stability, microbial community and its response towards temperature stress, Water Environment Research.
- Prabhakaran, P., Ashraf, M. A., Aqma, W. S., 2016, Microbial stress response to heavy metals in the environment, Rsc. Advances, 6, 109862-109877.
- Rajashekhar, M., Shahanaz, E., Vinay, K., 2017, Biochemical and molecular characterization of *Bacillus* spp. isolated from insects, J. Entomol. Zool. Stud., 5, 581-588.
- Roy, S., Guanglei, Q., Zuniga-Montanez, R., Williams, R. B., Wuertz, S., 2021, Recent advances in understanding the ecophysiology of enhanced biological phosphorus removal, Current Opinion in Biotechnology, 67, 166-174.
- Roy, S., Nirakar, P., Yong, N. H., Stefan, W., 2021, Denitrification kinetics indicates nitrous oxide uptake is unaffected by electron competition in accumulibacter, Water Research, 189, 116557.
- Sebaugh, J. L., 2011, Guidelines for accurate EC₅₀/IC₅₀ estimation, Pharmaceutical statistics, 10, 128-134.
- Sin, D. H., Kim, D. H., Kim, J. I., Lee, M. S., Chung, K. Y., 2013, Toxic effects of heavy metals on the growth and phosphorus removal efficiency of phosphorus accumulating microorganisms (PAOs), Korean Journal

- of Soil Science and Fertilizer, 46, 673-680.
- Song, W., Zheng, M. J., Li, H., Zheng, W., Guo, F., 2019, Profiling population-level diversity and dynamics of accumilibacter via high throughput sequencing of ppk1, Applied microbiology and biotechnology, 103, 9711-9722.
- van Hullebusch, E. D., Zandvoort, M. H., Lens, P. N., 2004, Nickel and cobalt sorption on anaerobic granular sludges: Kinetic and equilibrium studies, Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 79, 1219-1227.
- Wang, Y., Hosomi, K., Shimoyama, A., Yoshii, K., Nagatake, T., Fujimoto, Y., Kiyono, H., Fukase, K., Kunisawa, J., 2021, Lipopolysaccharide derived from the lymphoid-resident commensal bacteria *Alcaligenes faecalis* functions as an effective nasal adjuvant to augment IgA antibody and Th17 cell responses, Frontiers in Immunology, 12, 2580.
- Yoo, J., Kim, D. H., Oh, E. J., Chung, K. Y., 2018, Quantifying the interactive inhibitory effect of heavy metals on the growth and phosphorus removal of *pseudomonas taeanensis*, Korean Journal of Soil Science and Fertilizer, 51, 35-49.
- Yun, J. J., Kang, S. W., Park, J. H., Seo, D. C., Kim, H. W., Cho, J. S., 2020, Assessment of seasonal variation in water quality in Daedong Lake, Korean Journal of Environmental Agriculture, 39, 197-203.
- Zafiri, C., Kornaros, M., and Lyberatos, G., 1999, Kinetic modeling of biological phosphorus removal with a pure culture of *Acinetobacter* sp. under aerobic, anaerobic, and transient operating conditions, Water Res., 33, 2769-2788.
- Zeb, B., Ping, Z., Mahmood, Q., Lin, Q., Pervez, A., Irshad, M., Bilal, M., Bhatti, Z. A., Shaheen, S., 2017, Assessment of combined toxicity of heavy metals from industrial wastewaters on *Photobacterium phosphoreum* T3S. Applied Water Science, 7, 2043-2050.
- Zuthi, M. F. R., Guo, W. S., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., 2013, Enhanced biological phosphorus removal and its modeling for the activated sludge and membrane bioreactor processes. Bioresource Technology, 139, 363-374.
-
- Graduate student. Deok-Won Kim
Department of Environmental and Biological Chemistry,
Chungbuk National University
kghkgkr1@naver.com
 - Staff, M.Sc. Ji-Su Park
Field Quality Control Gimcheon part, Doosan Corporation
Electro-Materials
jisu2.park@doosan
 - Researcher, M.Sc. Eun-Ji Oh
Water and Land Research Group/Division for National
Environment, Korea Environment Institute
ejoh@kei.re.kr
 - Researcher, M.Sc. Jin Yoo
Indoor Environment Division, Incheon Metropolitan City
Institute of Public Health and Environment
yoojin529@korea.kr
 - Expert committee, M.Sc. Deok-Hyeon Kim
National Institute of Environmental Research
foseja1324@korea.com
 - Professor. Keun-Yook Chung
Department of Environmental and Biological Chemistry,
Chungbuk National University
kychung@cbnu.ac.kr