Research Paper

Patterns of Heavy Metals in a Continuous Toxicity Monitoring System using Bioluminescent Bacteria

Kil-Soo Lee^{1,*} · Seung-Joo Lee¹ · Chang-Keun Wang² · Young-Gyun Choi² · Keum-Yong Hong³

¹Korea Environment Corporation

²Department of Environmental Engineering, Chung-Nam National University

³BLprocess CO.

(Received September 19, 2019; Revised January 28, 2020; Accepted February 7, 2020)

Objectives : The purpose of this study is to evaluate the effects of heavy metals (Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+}) toxicity in a real-time biosensor which is based on measuring the attenuation of light intensity emitted by *Vibrio fischeri*.

Methods : The inhibition test included four heavy metals and the spiked effluent wastewater. The toxicity of the test samples was assessed by freeze-dried bacteria (*Vibrio fischeri* NRRL-B-11177). The pH of the samples was adjusted to 7 ± 0.2 before conducting the toxicity tests in order to eliminate potential pH effects. The results obtained from the real-time biosensor that can be measuring the toxicity of the samples as a function of the emitted light, within a short period time (2 min). And then EC_{20} and EC_{50} values was estimated from inhibition curves.

Results and Discussion : In case of the inhibition test for diluents of heavy metals, EC_{20} values were estimated as < 0.2 mg/L for Zn(II), 0.45 mg/L for Hg(II), 0.58 mg/L for Cd(II) and 1.95 mg/L for Pb(II) and EC_{50} values were estimated as 0.25 mg/L for Zn(II), 0.5~1.0 mg/L for Hg(II), 1.38 mg/L for Cd(II) and 3.76 mg/L for Pb(II). The sensitivity ranking of heavy metals was in order as Zn(II) > Hg(II), > Cd(II) > Pb(II). In case of the inhibition test for the spiked effluent wastewater, EC_{20} values were estimated as 0.38 mg/L for Hg(II), 0.58 mg/L for Zn(II), 1.45 mg/L for Pb(II) and 1.95 mg/L for Cd(II) and EC_{50} values were estimated as 0.53 mg/L for Hg(II), 1.13 mg/L for Zn(II), 6.44 mg/L for Pb(II) and 7.82 mg/L for Cd(II). The sensitivity ranking of the spiked effluent wastewater was in order as Hg(II) > Zn(II) > Pb(II) > Cd(II). Compared to the Emission Limit Value (ELV) in Korea, the EC_{20} value of Zn(II) was found to be lower than ELV so that it was suitable for screening of Zn(II) as to meet the criteria of effluent wastewater. However, the other EC_{20} value of heavy metals can be used to control the unit processes and avoid accidental discharge.

Conclusions : The assessment of the toxicity of four heavy metals and spiked samples with them was performed in this study, by real-time biosensor using bioluminescent bacteria. The EC_{20} value of the spiked sample with Zn(II) has been found to be 0.58 mg/L lower than its ELV so that it was considered as a suitable screening for determining whether or not to exceed the permissible limit value. The use of real-time biosensor is required in combination with physicochemical analyses for an integrated screening of the industrial effluent properties.

Key Words : Bioassay, Bioluminescent Bacteria, *Vibrio fischeri*, Biosensor, Heavy Metals

* Corresponding author E-mail: ks_lee@keco.or.kr Tel: 042-939-2494 Fax: 042-939-2469

연구논문

발광박테리아를 이용한 생물감시장치의 중금속에 대한 독성반응

이길수^{1,*} · 이승주¹ · 왕창근² · 최영균² · 홍금용³

¹한국환경공단

²충남대학교 환경공학과

³비엘프로세스

목적: 본 연구에서는 발광박테리아(*Vibrio fischeri*)가 방출한 빛의 강도가 약화되는 것을 측정하는 실시간 생물감시장치에서의 중금속(Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+})에 대한 독성반응을 평가하였다.

방법: 발광저해도 시험은 4가지 중금속과 중금속이 첨가된 폐수 방류수를 포함하고 있다. 시험 시료에 대한 독성도는 동결 건조된 박테리아(*Vibrio fischeri* NRRL-B-11177)를 이용하여 생물검정을 수행하였다. 시료의 pH가 나타낼 수 있는 잠재적인 영향을 제거하기 위하여 시험 전에 pH를 7 ± 0.2 로 조절하였다. 생물감시장치는 발광된 빛으로부터 2분의 단시간 내에 시료의 독성도를 측정하여 결과를 산출한다. 그 후에 발광저해도 곡선으로부터 EC_{20} 과 EC_{50} 을 추정하였다.

결과 및 토의: 중금속 희석액을 대상으로 한 발광저해도 시험의 경우, 각 중금속의 EC_{20} 은 $Zn(II) < 0.2$ mg/L, $Hg(II)$ 0.45 mg/L, $Cd(II)$ 0.58 mg/L 및 $Pb(II)$ 1.95 mg/L로 추정되었고, EC_{50} 은 $Zn(II)$ 0.25 mg/L, $Hg(II)$ 0.5~1.0 mg/L, $Cd(II)$ 1.38 mg/L 및 $Pb(II)$ 3.76 mg/L로 추정되었다. 중금속의 민감도는 $Zn(II) > Hg(II), > Cd(II) > Pb(II)$ 순서로 나타났다. 중금속이 첨가한 폐수 방류수를 대상으로 한 발광저해도 시험의 경우, 각 중금속을 첨가한 시료의 EC_{20} 은 $Hg(II)$ 0.38 mg/L, $Zn(II)$ 0.58 mg/L, $Pb(II)$ 1.45 mg/L 및 $Cd(II)$ 1.95 mg/L로 추정되었고, EC_{50} 은 $Hg(II)$ 0.53 mg/L, $Zn(II)$ 1.13 mg/L, $Pb(II)$ 6.44 mg/L 및 $Cd(II)$ 7.82 mg/L로 추정되었다. 중금속이 첨가한 폐수에 대한 민감도는 $Hg(II) > Zn(II) > Pb(II) > Cd(II)$ 순서로 나타났다. 우리나라의 수질오염물질 배출허용기준과 비교해서 $Zn(II)$ 의 EC_{20} 은 낮은 농도이기 때문에 방류수의 배출허용기준을 만족하는지를 감시하는 것은 적합하다고 판단된다. 그러나 그 외의 중금속의 EC_{20} 수준으로는 단위공정의 제어나 사고로 인한 방류를 감시하는 목적으로 적용하는 것이 바람직하다.

결론: 본 연구에서는 발광박테리아를 이용한 실시간 생물감시장치로 4가지 중금속과 중금속을 첨가한 시료에 대하여 독성도를 평가하였다. $Zn(II)$ 가 첨가된 폐수의 EC_{20} 은 0.58 mg/L로 배출허용기준보다 낮은 것으로 나타나 배출허용기준 초과 유무를 판별하는데 적절하다고 판단된다. 실시간 생물감시장치의 운영과 더불어 산업폐수처리시설에 대한 통합적 감시를 위해 물리화학적 분석을 병행할 필요가 있다.

주제어: 생물검정법, 발광박테리아, *Vibrio fischeri*, 생물감시장치, 중금속

1. 서론

산업화, 도시화와 같은 인류의 발달과정은 생태계의 건강성을 위협하는 다양한 수질오염물질을 생산하고 배출하는 양상을 띠고 있어 신속한 측정 및 적절한 대응조치가 반드시 요구된다. 우리나라는 1990년대 낙동강 폐놀 및 유기용제 유출사고를 겪으면서 신속하고 체계적인 사고 대응을 위해 수질측정망 운영계획을 수립하여 하천 및 호소의 주요지점의 수질을 현장에서 직접 채취하여 분석하는 수동 측정망과 수질자동측정소에서 상시 측정된 자료를 활용하

는 자동측정망을 운영하여 체계적인 수질관리 및 신속한 사고 대응에 노력해 오고 있다.¹⁾

수계로 유입되는 다양한 오염물질을 전통적인 분석방법에 의해 정량적, 정성적으로 측정하는 것은 시간과 비용적인 측면에서 한계가 있어, 수생태계 건강성을 쉽게 모니터링하기 위한 방법으로 생물을 이용한 독성관리가 합리적인 대안 기술로 대두되고 있다.^{2,3)} 이 기술들은 수생태계를 구성하는 생물을 이용함으로써 수용체(Receptor) 중심의 수질 감시를 목적으로 한다. 우리나라에서 보편화된 생물감시종은 *Daphnia magna*로 생물종의 유형저해로부터 생태독성

여부를 판별하고 있으며, 그 외 생물감시장치(Biosensor)에 조류(Algae), 황산화미생물(Sulfur Oxidizing Bacteria, SOB), 발광박테리아(Bioluminescent Bacteria, BLB) 등이 보급되어 실시간 생태독성 모니터링 시스템(Biological Early Warning System, BEWS)에 활용되고 있다.⁴⁾ 본 연구에 사용된 생물은 *V. fischeri*로 동결건조(freeze-dried)된 키트(kit)를 이용하여 재활성화 용액으로 쉽게 생물독성시험에 적용이 가능하다. 동결건조된 발광박테리아를 이용한 생태독성시험법은 1998년 국제표준시험법(ISO 11348-3)으로 채택되어 국외에서는 상수원수, 하천수, 폐수 등 다양한 현장에서 사용되고 있으며,⁵⁾ 국내의 경우 2010년에 해양환경오염공정시험법에 생태독성 시험종으로 채택되어 사용되고 있다.⁶⁾

발광박테리아는 발광효소라고 불리는 luciferase에 의한 효소촉매반응으로 발광 대사가 나타난다. 이는 luciferin이 산소를 이용하여 luciferase를 촉매로 하는 산화·환원 반응이 일어나고 들뜬상태인 flavin mono oxygenase oxidoreductase가 서서히 안정한 상태로 변화면서 열은 청록색의 빛을 발한다. 이때 빛에너지는 약 475 nm에서 최대 파장을 나타낸다.⁷⁾ 그러므로, 발광박테리아의 발광반응은 기질의 산화와 환원에 의한 전자전달 과정으로 이해할 수 있다. 또한, 발광박테리아는 동종 개체의 밀도를 감지할 수 있어 정족수 인식(Quorum sensing)이라 일컬어지며, 개체간 신호전달 호르몬에 의해 최종 생성물인 빛에너지의 발현이 조절된다.⁸⁾ 발광박테리아는 정상적인 생물환경에서는 발광 대사가 온전한 상태로 진행되지만 중금속과 같은 독성물질에 노출되는 경우에는 발광 대사가 저해되어 발생하는 빛에너지는 감소한다. 이러한 발광박테리아의 독특한 발광특성을 이용하여 빛에너지 변화를 Photomultiplier Tube (PMT)로 실시간 측정을 통해 수중의 독성물질의 영향 여부를 감지할 수 있다. 일반적으로 독성도는 반수영향농도(EC₅₀)로 나타내며, 50%의 발광량이 감소할 때의 농도를 의미한다. 또한, EC₂₀은 20%의 발광량이 감소할 때의 농도로 민감한 독성도 검출에 많이 고려되고 있다.

한편, 중금속 이온이 수계로 유입되는 경로는 지리적 환경 및 기후에 의한 자연적 발생과 더불어 인간의 산업활동(예를 들면, 광산, 금속의 제련 및 정련, 화학약품 생산, 염료 및 염색 공업, 화석 연료의 연소, 석유정제, 시멘트 및 세라믹 제품 생산, 농화학 제품 생산 등)에 의해 촉진되고 있다.⁹⁾ 또한 수계로 유입된 중금속은 생분해성이 없어 수생태계에 축적되고 그로 인해 생태계 교란을 야기할 수 있어 중요한 환경문제로 대두되고 있다.

본 연구에서는 중금속 4종(Zn(II), Pb(II), Hg(II), Cd(II))에 대한 발광박테리아(*V. fischeri*)의 독성반응 특성을 실시간 생물감시장치를 이용하여 평가하였다. 발광박테리아가 중금속 독성에 의해 나타나는 발광저해도를 계산하여 EC₂₀과 EC₅₀을 추정하고 실제 폐수처리장 방류수에 중금속을 첨가하여 독성반응을 모의하는 실험을 수행하여 도출된 각 중금속의 EC₂₀과 EC₅₀을 수질오염물질 배출허용기준과 비교하여 현장 적용성을 검토하였다.

2. 연구방법

2.1. 실험재료 및 폐수 성상

동결건조된 발광박테리아 생물시료(*Vibrio fischeri* NRRL-B-11177, Microtox[®] Reagent)는 사용 전에 상온에서 녹인 후 멸균된 배양기에 무균 상태로 주입시키고 15~25℃로 24시간 유지하여 발광박테리아를 활성화시킨다. 영양염(Nutrient)은 1L 당 NaCl 30.0 g, NaH₂PO₄ · H₂O 6.1 g, K₂HPO₄ · 3H₂O 2.75 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.204 g, (NH₄)₂HPO₄ 0.5 g, Glycerol 3 mL, Case peptone 5.0 g, Yeast extract 0.5 g이 첨가되어 있다. 또한 독성반응 실험에 사용된 Zn(II), Pb(II), Hg(II), Cd(II) 표준용액은 1000 µg/ml의 Accustandard사 제품을 사용하였다. 농도별로 제조된 표준용액에 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH를 첨가하여 pH를 7.0 ± 0.2로 조절하여 실험하였다. 독성 모의실험에 사용된 폐수는 실제 운영중인 폐수처리장의 방류수로, 수질분석은 수소이온농도(pH), 전기전도도(EC) 및 용존산소농도(DO)에 대하여 portable sensor (600XL, YSI, USA), 총유기탄소(TOC)는 온라인 분석장비(StarTOC[®], BLprocess, Korea), 총질소(TN)와 총인(TP)은 온라인 분석장비(TNTP-300, Horiba, Japan)로 각각 측정하였고, 염소이온(Cl⁻)은 수질오염공정시험기준에 따라 분석하였으며, 측정분석 결과는 Table 1에 나타내었다.

2.2. 실험장치

본 연구에 사용된 생물감시장치는 MicroTox[®] CTM (MODERNWATER, UK)으로 실험장치의 흐름도와 운전조건을 각각 Fig. 1과 Table 2에 나타내었으며, 도입된 시료는 염분이 첨가되는 전처리 과정을 거친 후 항온장치 내부의 배양기로부터 공급된 생물시료와 만나 타이밍 코일을 지나면서 혼합된 후 PMT를 지날 때 10초 간격으로 발광량이 측정된다. 한편 배양기로 영양염과 공기가 연속적으로 공급되며 일부는 생물시료로 사용되고 나머지는 상단

Table 1. Water qualities of effluent wastewater.

pH	EC (mS/cm)	DO (mg/L)	TOC (mg/L)	TN (mg/L)	TP (mg/L)	Cl ⁻ (mg/L)
6.7	4.3	6.2	4.4	11.1	0.069	86

Fig. 1. Schematic diagram of bioluminescent biosensor.

Table 2. Operating condition of MicroTox[®] CTM.

Fermentor Temp.	Flow Rate (mL/min)			
	Sample	Brine (NaCl 25%)	Bioreagent	Nutrient
22°C±1	2.94	0.16	0.08	0.10

으로 배출된다. 이 과정에서 배양기 내부에서는 발광박테리아가 증식과 사멸이 공존하는 상태로 유지되며 세대를 거치면서 서서히 돌연변이체(mutant)가 증가하여 3~4주가 지나면 발광도가 현저히 감소하게 된다.¹⁰⁾ 배양하고 있는 발광박테리아의 활성도를 포토다이오드(Photodiode, PD)로 5분 간격으로 측정하여 배양상태를 연속적으로 관찰할 수 있다. Fig. 2는 배양기의 운전시작 초기부터 약 4주간 연속적으로 측정된 배양기 내부의 발광량(fermentor light)의 변화를 나타낸 것으로 배양단계를 진행한 후 10시간이 경과된 시점에서 발광량은 약 1,400~1,800 LU를 나타냈고 약 2주간 유지된 후 1,000 LU 이하로 낮아지고 이후 10일간 300~400 LU 범위를 유지하였으며 약 4주가 경과된 시점에서 발광량이 100 LU 이하로 나타났다. 독성반응 실험은 혼합시료의 PMT가 일정하게 유지되는 1,000 LU 이상일 때 수행하였다.

2.3. 발광저해도 산출

발광저해도 산출은 독성물질에 의해 발광박테리아의 발광이 감소하는 특성을 이용하여 대조구의 발광량(Reference PMT value)과 실험구의 발광량(Sample PMT value)의 차이로 나타나는 발광량의 변화로부터 발광저해도(Inhibition)를 산출하였다.^{11,12)} 시료가 도입되어 발광박테리아와 혼합된 후 발광이 측정되기까지는 약 2분이 소요되고 PMT는 10초 간격으로 측정된다. 실험구와 대조구를 약 10분 간격으로 교대로 노출시켰다. 중금속류 표준용액의 농도별 독성반응 실험은 증류수와 샘플을 교대로 3회 반복하여 노출시키고, 현장수에 중금속을 첨가한 모의 독성반응 실험은 현

Fig. 2. Variations of the light unit in the fermentor.

장수와 중금속을 첨가한 샘플을 교대로 2회 반복하여 노출시켜 발광량(PMT value)을 10초 간격으로 연속 측정하였다. 독성도 계산은 대조구에서 실험구로 시료가 전환되어 발광량이 변화하는 구간의 측정자료는 제외하고 전후 5분간의 발광량을 평균값으로 계산하여 주입농도별 발광저해도를 산출하였다. 식 (1)에 발광저해도식을 나타내었다.

$$I = \frac{I_r - I_s}{I_r} \times 100 \quad (1)$$

I : Inhibition (%)

I_r : mean PMT value for reference

I_s : mean PMT value for sample

위 식 (1)의 발광저해도식으로부터 농도별 평균값을 계산하여 발광저해도 곡선(Inhibition curve)을 작성하였고, EC₂₀과 EC₅₀은 해당 구간의 농도값을 최소제곱법(least-squares statistics)으로 엑셀의 함수를 사용하여 추정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 대상 중금속류에 대한 독성평가

Zn(II), Pb(II), Hg(II), Cd(II)의 4가지 중금속을 대상으로 표준용액 농도별 발광저해도를 산출하였으며 각 중금속에 대한 발광저해도 곡선(Inhibition curve)을 Fig. 3에 나타내었다. 아연에 대한 독성반응은 초기 0.1 mg/L에서는 발광저해도의 변화가 나타나지 않았지만, 이후 농도를 높여 실험한 결과에서는 발광저해도의 변화가 나타났다. 첨가된 농도별(0.2, 0.3, 0.5, 0.7 mg/L) 발광저해도가 0.2 mg/L에서 35.2%로 급격하게 증가하였다. 0.3 mg/L에서는 66.2%, 0.5 mg/L에서는 84.5%로 발광저해도가 증가하는 경향을 나타낸 후 0.7 mg/L에서 88.9%의 발광저해도를 나타내어 증가폭이 감소하는 경향을 나타내었다. 아연의 발광저해도 곡선은 로그함수와 매우 유사한 형태의 반응패턴을 보여주고 있다. 납에 대한 독성반응은 첨가된 농도별(1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L) 발광저해도가 1.0 mg/L에서 9.7%, 2.0과 3.0 mg/L에서는 각각 20.6%, 33.4%로 나타나 직선적으로 상승

Fig. 3. Inhibition curve for heavy metals ((a) Zn(II), (b) Pb(II), (c) Hg(II), (d) Cd(II)) diluent.

Table 3. Inhibition exposed to heavy metals for MicroTox[®] CTM.

Chemicals	Dose (mg/L)	Inhibition (%) (min-max)	SD ^{a)} (n=3)	SE ^{b)} (n=3)	EC ₂₀	EC ₅₀
Zn(II)	0.2	35.2 (31.5-37.2)	3.2	1.9	< 0.2	0.25
	0.3	66.2 (64.3-67.7)	1.7	1.0		
	0.5	84.5 (84.0-85.3)	0.7	0.4		
	0.7	88.9 (88.8-89.2)	0.2	0.1		
Pb(II)	1.0	9.7 (8.9-10.5)	0.8	0.5	1.95	3.76
	2.0	20.6 (18.9-22.2)	1.7	1.0		
	3.0	33.4 (31.6-35.6)	2.0	1.2		
	4.0	55.1 (50.8-57.4)	3.7	2.2		
	5.0	81.2 (78.7-84.0)	2.7	1.5		
Hg(II)	0.2	5.4 (4.2-7.2)	1.6	0.9	0.45	> 0.5 < 1.0
	0.3	6.4 (6.1-6.7)	0.3	0.2		
	0.5	24.1 (22.6-25.2)	1.4	0.8		
	1.0	99.7 (99.7-99.7)	0.0	0.0		
Cd(II)	0.3	3.6 (1.8-5.6)	1.9	1.1	0.58	1.38
	0.5	16.6 (14.1-18.0)	2.2	1.3		
	1.0	37.7 (35.3-40.2)	2.5	1.4		
	2.0	70.5 (66.7-73.9)	3.6	2.1		

^{a)} Standard deviation, ^{b)} Standard error

하는 경향을 나타낸 후 4.0 mg/L와 5.0 mg/L에서는 각각 55.1%, 82.1%로 나타나 초기보다 상승폭이 증가하는 경향을 나타내었다. 납의 발광저해도 곡선은 완만한 상승곡선의 반응패턴을 보여주고 있다. 수은에 대한 독성반응은 첨가된 농도별(0.2, 0.3, 0.5, 1.0 mg/L) 발광저해도가 0.2, 0.3 mg/L에서 각각 5.4%, 6.4%로 나타나 초기 낮은 반응성을 보이나, 0.5 mg/L에서 24.1%로 증가하고 1.0 mg/L에서는 99.7%로 급격히 상승하는 경향을 나타내었다. 수은의 발광저해도 곡선은 지수함수와 유사한 형태의 반응패턴을 보여주고 있다. 카드뮴에 대한 독성반응은 첨가된 농도별(0.3, 0.5,

1.0, 2.0 mg/L) 발광저해도가 농도별로 각각 3.6%, 16.6%, 37.7%, 70.5%로 나타나 선형적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 카드뮴의 발광저해도 곡선은 직선형과 유사한 형태의 반응패턴을 보여주고 있다. 각 중금속의 발광저해도 곡선은 상이한 형태를 나타내었고 중금속별로 발광박테리아는 독특한 독성반응 패턴을 보여주고 있다.

각 중금속에 대해 20%와 50%에 해당하는 발광저해 영향농도(EC₂₀, EC₅₀)를 해당 농도구간의 직선식으로부터 산출하여 **Table 3**에 나타내었다. 중금속 4종에 대한 EC₂₀은 Zn(II) > Hg(II) > Cd(II) > Pb(II) 순으로 민감한 반응성을

Table 4. EC₅₀ (or EC₂₀) of *Vibrio fischeri* exposed to heavy metals in the literature.

Chemicals	Pre-culture	Test medium	Test temperature (°C)	Test pH	Test duration (min)	EC ₅₀ or EC ₂₀ (mg/L)	Reference
Zn(II) Hg(II) Pb(II) Cd(II)	freeze-dried bacteria (reconstitution solution)	Reference water	15	NR ^{a)}	30	2.61 0.36 0.63 3.88	Kim et al. ¹³⁾
Zn(II) Pb(II)	freeze-dried bacteria (reconstituted solution)	Reference water	NR ^{a)}	7.0	15	1.49 0.50	Tsiridis et al. ¹⁴⁾
Zn(II) Pb(II) Hg(II)	freeze-dried bacteria (reconstituted solution)	Reference water	15	7.0	15	0.46 ^{b)} 0.18 ^{b)} 0.06 ^{b)}	Fulladosa et al. ¹⁵⁾

a) Not Reported, b) EC₂₀

나타내었다. 아연의 경우에는 시작점인 0.2 mg/L에서의 발광저해도가 20%를 초과하여 EC₂₀ 농도를 0.2 mg/L 미만으로 추정하였고 수은, 카드뮴, 납의 EC₂₀은 각각 0.45, 0.58, 1.95 mg/L로 산출되었다. 또한 중금속 4종에 대한 EC₅₀은 EC₂₀과 동일하게 Zn(II) > Hg(II) > Cd(II) > Pb(II) 순으로 민감한 반응성을 나타내었으며, 수은의 EC₅₀은 해당농도 구간에서 종말점(1.0 mg/L)의 발광저해도가 99.7%로 최대치에 도달하여 0.5 mg/L와 1.0 mg/L 사이의 값으로 추정하였다. 아연, 카드뮴, 납의 EC₅₀은 각각 0.25, 1.38, 3.76 mg/L로 나타났다.

본 논문에서 사용된 생물감시장치는 동결건조된 발광박테리아를 이용한 수분석 방법 중 microtox 검정법과 환경조건이 유사하지만 반응시간은 약 2분으로 수분석의 반응시간(15, 30 min)보다는 신속한 측정이 가능한 장점을 갖는다. 본 연구에서 추정된 EC₂₀, EC₅₀을 문헌¹³⁻¹⁵⁾에서 보고된 측정 결과(Table 4)와 비교하였을 때 아연과 카드뮴의 경우에는 더 낮은 농도에서도 민감한 반응성을 보여주고 있으나, 수은과 납은 다소 높은 농도에서 반응성이 나타났다.

3.2. 현장수 모의 독성반응

중금속 모의 독성반응에 사용된 현장수의 기본적인 수질 특성은 Table 1에 나타내었으나 현장수가 발광박테리아에 미치는 독성영향을 확인하기 위하여 증류수와 현장수와의 발광량을 비교하여 Fig. 4에 증류수와 현장수의 발광량 변화를 나타내었다. Fig. 4와 같이 증류수와 현장수의 발광량의 차이는 미미한 것으로 나타나 현장수를 대조구로 하여 모의 독성반응을 수행하였다. 한편, 중금속과 배경물질의 상호작용으로 인한 독성영향은 일반적으로 중금속 이온의 직접적 영향과 중금속과 결합된 착화합물의 영향으로 크게 구분할 수 있는데, 본 연구에서 수행한 현장수의 모의 독성반응을 통해서는 독성반응의 경향성 확인을 주목적으로 하여 시험생물의 생물이용성(Bioavailability) 측면에서 독성영향을 구별할 수 없는 한계점이 있다.

Fig. 4. Variations of the PMT value in response to deionized water and effluent wastewater for reference (DI: Deionized Water, EWW: Effluent Wastewater).

Zn(II), Pb(II), Hg(II), Cd(II)의 4가지 중금속을 각각 현장수에 첨가하여 농도별로 발광저해도를 산출하였으며 개별 중금속에 대한 발광저해도 곡선(Inhibition curve)을 Fig. 5에 나타내었다. 아연을 첨가한 현장수의 독성반응은 첨가된 농도별(0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L) 발광저해도가 초기 0.2 mg/L와 0.5 mg/L에서는 각각 7.2%, 15.4%로 1.0 mg/L와 2.0 mg/L에서는 각각 45.5%, 80.9%로 직선적으로 상승하는 경향을 나타낸 후, 4.0 mg/L에서는 94.1%의 발광저해도를 나타내어 증가폭이 감소하는 경향을 나타내었다. 아연을 첨가한 현장수의 발광저해도 곡선은 로그함수와 유사한 형태의 반응패턴을 보여주고 있다. 납을 첨가한 현장수의 독성반응은 첨가된 농도별(1.0, 2.0, 4.0, 7.0, 10.0 mg/L) 발광저해도가 1.0 mg/L에서 13.9%, 2.0 mg/L와 4.0 mg/L에서는 각각 27.5%, 36.0%로 나타나 직선적으로 상승하는 경향을 나타낸 후 7.0 mg/L와 10.0 mg/L에서는 각각 53.2%, 96.1%로 나타나 초기보다 상승폭이 증가하는 경향을 나타내었다. 납을 첨가한 현장수의 발광저해도 곡선은 완만한 상승곡선의 반응패턴을 보여주고 있다. 수은을 첨가한 현장수의 독성반응은 첨가된 농도별(0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mg/L) 발광저해도가 초기 0.3 mg/L에서 6.1%로, 0.5 mg/L와 0.7 mg/L에서는 각각 41.3%, 98.2%로 급격히 상승하는 경향을

Fig. 5. Inhibition curve for the spiked effluent wastewater with (a) Zn(II), (b) Pb(II), (c) Hg(II), (d) Cd(II) diluent.

나타내었다. 이후 1.0 mg/L에서는 발광저해도가 99.6%로 나타났다. 수은을 첨가한 현장수의 발광저해도 곡선은 지수함수와 유사한 형태의 반응패턴을 보여주고 있다. 카드뮴을 첨가한 현장수의 독성반응은 첨가된 농도별 (3.0, 5.0, 7.0, 10.0, 13.0 mg/L) 발광저해도가 농도별로 각각 약 16.2%, 30.4%, 41.5%, 72.4%, 99.2%로 나타나 선형적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 카드뮴을 첨가한 현장수의 발광저해도 곡선은 직선형과 유사한 형태의 반응패턴을 보여주고 있다. 각 중금속을 첨가한 현장수의 발광저해도 곡선은 표준용액으로 실험한 결과와 유사한 곡선 형태를 나타냈다.

각 중금속이 첨가된 현장수에 대해 20%와 50%에 해당하는 발광저해 영향농도(EC_{20} , EC_{50})를 해당 농도구간의 직선식으로부터 산출하여 Table 5에 나타내었다. 중금속 4종을 첨가한 현장수에 대한 EC_{20} 은 $Hg(II) > Zn(II) > Pb(II) > Cd(II)$ 순으로 민감한 반응성을 나타내었다. 수은, 아연, 납, 카드뮴을 첨가한 현장수의 EC_{20} 은 각각 0.38, 0.58, 1.45, 3.53 mg/L로 산출되었다. 또한 중금속 4종을 첨가한 현장수에 대한 EC_{50} 은 EC_{20} 과 동일하게 $Hg(II) > Zn(II) > Pb(II) > Cd(II)$ 순으로 민감한 반응성을 나타내었으며, 수은, 아연, 납, 카드뮴을 첨가한 현장수의 EC_{50} 은 각각 0.53, 1.13, 6.44, 7.82 mg/L로 나타났다. 한편, 수은의 EC_{20} 의 경우에는 중금속 표준용액과 중금속을 첨가한 현장수와의 민감도에는 큰 차이를 보이지 않았으나 그 외의 중금속은 현장수에서의 EC_{20} 이 높게 나타났으며 이는 현장수에 포함된 배경물질과 중금속의 반응으로 발광박테리아에 직접적으로 작용하는 독성물질의 영향이 감소된 것으로 사료된다.

Table 5. Inhibition exposed to the spiked effluent wastewater with heavy metals for MicroTox[®] CTM.

Chemicals	Dose (mg/L)	Inhibition (%) (min-max)	EC_{20}	EC_{50}
Zn(II) + EWW ^{a)}	0.2	7.2 (6.5-7.8)	0.58	1.13
	0.5	15.4 (14.6-16.3)		
	1.0	45.5 (45.5-45.6)		
	2.0	80.9 (80.6-81.2)		
	4.0	94.1 (94.0-94.2)		
Pb(II) + EWW ^{a)}	1.0	13.9 (12.4-15.3)	1.45	6.44
	2.0	27.5 (27.2-27.9)		
	4.0	36.0 (36.0-36.0)		
	7.0	53.2 (52.6-53.8)		
	10.0	96.1 (96.1-96.1)		
Hg(II) + EWW ^{a)}	0.3	6.1 (5.4-6.8)	0.38	0.53
	0.5	41.3 (40.5-42.0)		
	0.7	98.2 (98.0-98.5)		
	1.0	99.6 (99.5-99.6)		
Cd(II) + EWW ^{a)}	3.0	16.2 (1.8-5.6)	3.53	7.82
	5.0	30.4 (30.3-30.6)		
	7.0	41.5 (40.8-42.2)		
	10.0	72.4 (71.7-73.2)		
	13.0	99.2 (99.2-99.2)		

a) Effluent wastewater

3.3. 배출허용기준과 비교 및 적용성 검토

수질오염물질의 배출허용기준은 사업장에서 환경으로 배출할 수 있는 최대 허용농도를 의미하고 우리나라의 경우 지역구분에 따라 허용 농도가 달리 적용되고 있다. 또한 개별 물질에 대한 배출허용기준이 달라 현장에 적용된 생물 감시장치가 개별물질에 대한 배출허용기준을 준수하는지를 판별하는 것은 불가능하다. 따라서 배출허용기준과 생

Table 6. Estimated EC₂₀ values as compared to emission limit values (ELV) for four heavy metals.

Sample	EC ₂₀ (mg/L)	ELV1 ^{a)} /EC ₂₀	ELV2 ^{b)} /EC ₂₀	ELV (mg/L)			
				I	II	III	IV
Zn(II) + EWW ^{c)}	0.58	1.72	8.62	1	5	5	5
Pb(II) + EWW ^{c)}	1.45	0.07	0.34	0.1	0.5	0.5	0.5
Hg(II) + EWW ^{c)}	0.38	0.003	0.013	0.001	0.005	0.005	0.005
Cd(II) + EWW ^{c)}	3.53	0.006	0.028	0.02	0.1	0.1	0.1

ELV1^{a)} : Emission limit values in level I area, ELV2^{b)} : Emission limit values in level II, III and IV area, ^{c)} Effluent waste water

물영양농도를 비교하여 감시 가능한 농도 수준을 평가하고 감시수준에 적합한 지점에 설치하여 감시도구로 활용하는 것이 타당하다고 사료된다. EC₂₀은 생물의 독성영향을 신뢰할 수 있는 수준에서 충분한 민감성을 나타낼 수 있는 지표로 인식되고 있어 EC₂₀과 대상 중금속의 배출허용기준을 비교하여 Table 6에 나타내었다. ELV/EC₂₀ 값은 배출허용기준과 EC₂₀의 비율로 그 비율에 따라 배출허용기준과 EC₂₀의 농도의 상관관계를 나타낸다. 따라서 ELV/EC₂₀이 1보다 작은 경우에는 대상 중금속에서의 EC₂₀이 배출허용기준 농도보다 높은 값에서 반응성을 나타내고 1보다 큰 경우에는 배출허용기준 농도보다 낮은 값에서 반응성을 나타내는 것으로 해석할 수 있다. 앞서 결과로 도출된 중금속을 첨가한 폐수에서 EC₂₀은 Hg(II) > Zn(II) > Pb(II) > Cd(II) 순으로 민감한 것으로 나타났고, ELV/EC₂₀은 Zn(II) > Pb(II) > Cd(II) > Hg(II) 순으로 나타났다. 중금속을 첨가한 폐수에서 EC₂₀은 수은이 가장 민감한 것으로 나타났으나 ELV/EC₂₀은 수은이 가장 낮은 것으로 나타났다. 이는 수은의 EC₂₀이 다른 중금속의 EC₂₀보다 저농도에서 민감한 반응성을 나타내지만, 배출허용기준은 다른 중금속에 비하여 현저히 낮기 때문에 ELV/EC₂₀에서는 상대적으로 민감성이 낮은 것으로 나타났다. 본 논문에서 검토한 생물감시장치에서 배출허용기준 준수 여부를 직접적으로 모니터링할 수 있는 중금속종은 아연만 가능하며, 그 외 중금속은 공정제어나 오염사고 감시 목적으로 모니터링하는 것이 적합하고 추가적으로 물리화학적 분석도 병행하는 것이 바람직하다. 또한, 엄격한 배출허용기준의 감시 목적을 위한 적용을 위해서는 발광박테리아의 민감도를 높일 수 있는 배양액 조절, 시료와 생물의 접촉시간 및 혼합방법 조정 등 운전조건의 최적화 실험에 관한 후속 연구가 필요하다. 한편, 현장에 설치된 대부분의 실시간 생물감시장치는 시료와 생물이 반응하는 챔버(chamber)가 직렬 또는 병렬로 연결된 형태로 일단 독성물질에 의해 시험생물이 사멸되면 사멸된 이후의 독성도를 지속적으로 감시할 수 없는 문제점이 있으며 시료가 일정한 시간 간격으로 도입되는 생물감시장치의 경우에는 단시간에 통과하는 시료를 연속적으로 감시할 수 없어 순간적인 독성도의 감시에 한계가 있다. 반면, 본 연구에서 사용된 발광박테리아를 이용한 생물감시장치는 배양기로부터 생물시료가 연속적으로 주입되기 때문에 시험

생물의 사멸로 인한 감시 공백이 없고 수분정도의 짧은 반응기작에 기인하여 순간적인 독성영향을 감시하기에 적합한 장치로 사료된다.

4. 결론

본 연구에서는 중금속 4종(Zn(II), Pb(II), Hg(II), Cd(II))에 대한 발광박테리아(*V. fischeri*)의 독성반응 특성을 실시간 생물감시장치를 이용하여 평가하였다. 발광박테리아가 중금속 독성에 의해 나타나는 발광저해도를 계산하여 EC₂₀과 EC₅₀을 추정하고 실제 폐수처리장 방류수에 중금속을 첨가하여 독성반응을 모의하는 실험을 수행한 결과는 다음과 같다.

- 1) 중금속 4종에 대한 EC₂₀과 EC₅₀은 Zn(II) > Hg(II) > Cd(II) > Pb(II) 순으로 민감한 반응성을 나타내었다. 각 중금속에 대한 EC₂₀은 Zn(II) < 0.2 mg/L, Hg(II) 0.45 mg/L, Cd(II) 0.58 mg/L, Pb(II) 1.95 mg/L로 EC₅₀은 Zn(II) 0.25 mg/L, Hg(II) 0.5~1.0 mg/L, Cd(II) 1.38 mg/L, Pb(II) 3.76 mg/L로 산출되었다.
- 2) 중금속 4종을 첨가한 현장수에 대한 EC₂₀과 EC₅₀은 Hg(II) > Zn(II) > Pb(II) > Cd(II) 순으로 민감한 반응성을 나타내었다. 수은, 아연, 납, 카드뮴을 첨가한 현장수의 EC₂₀은 각각 0.38, 0.58, 1.45, 3.53 mg/L로 EC₅₀은 각각 0.53, 1.13, 6.44, 7.82 mg/L로 산출되었다.
- 3) 모의 실험을 통해 도출된 각 중금속의 EC₂₀을 수질오염물질 배출허용기준과 비교하여 현장 적용성을 검토한 결과, ELV/EC₂₀은 Zn(II) > Pb(II) > Cd(II) > Hg(II) 순으로 나타났다. 아연의 경우 지역의 구분 없이 배출허용기준 농도보다 EC₂₀ 농도가 낮아 배출허용기준 준수 여부를 직접적으로 모니터링이 가능하나 그 외 중금속은 EC₂₀ 농도 수준이 배출허용기준보다 높아 공정제어나 오염사고 감시 목적으로 적용하고 추가적으로 물리화학적 분석을 병행하는 것이 바람직하다고 사료된다.
- 4) 발광박테리아를 이용한 생물감시장치는 기존의 물고기나 물벼룩 생물감시장치와 달리 시험생물의 사멸로 인한 감시 공백이 없고 수분정도의 짧은 반응에 대한 독성 모니터링이 가능하여 현장 적용성이 높으나, 엄

적한 배출허용기준의 감시 목적을 위한 적용을 위해서는 발광박테리아의 민감도를 높일 수 있는 배양액 조절, 시료와 생물의 접촉시간 및 혼합방법 조정 등 운전 조건의 최적화 실험에 관한 후속 연구가 필요하다.

References

1. Ministry of Environment, Notification No. 2017-074 of the Ministry of Environment(2017).
2. I. C. Kong, H. Kwon, K.-S. Ko, Bioassessment and comparison toxicity of arsenics based on the results of various bioassays, J. Korean Soc. Environ. Eng., 32(8), 795-801(2010).
3. B. W. Gu, I. C. Kong, Toxicity assessment of nanoparticles based on seed germination and germination index, J. Korean Soc. Environ. Eng., 36(6), 396-401(2014).
4. Ministry of Environment, Notification No. 2019-099 of the Ministry of Environment(2019).
5. ISO, Water quality-determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test)-part3 : method using freeze-dried bacteria, ISO 11348:3(1998).
6. Ministry of Oceans and Fisheries, Notification No. 2018-143 of the Ministry of Oceans and Fisheries(2018).
7. E. Bolelli, E. N. Ferri, S. Girotti, The management and exploitation of naturally light-emitting bacteria as a flexible analytical tool: A tutorial, Anal. Chim. Acta., 934, 22-35(2016).
8. C. M. Miyamoto, Y. H. Lin, E. A. Meighen, Control of bioluminescence in *Vibrio fischeri* by the LuxO signal response regulator, Mol. Microbiol., 36(3), 594-607(2000).
9. S. K. Kumar, H. U. Dahms, E. J. Won, J. S. Lee, K. H. Shin, Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation, Ecotoxicol. Environ. Saf., 113, 329-352(2015).
10. S. Scheerer, F. Gomez, D. Lloyd, Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission, J. Microbiol. Meth., 67, 321-329(2006).
11. V. P. Utgikar, N. Chaudhary, A. Koeniger, H. H. Tabak, J. R. Haines, R. Govind, Toxicity of metal and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper, Water Res., 38, 3651-3658(2004).
12. A. Soupilas, C. A. Papadimitriou, P. Samaras, K. Gudulas, D. Petridis, Monitoring of industrial effluent ecotoxicity in the greater Thessaloniki area, Desalination, 224, 261-270(2008).
13. I. H. Kim, J. S. Kim, Y. H. Yoon, H. J. Ban, S. G. Kim, Basic performance evaluation of the ecotoxicity detection device for heavy metals, J. Korean Soc. Environ. Eng., 34(12), 828-834(2012).
14. V. Tsiridis, M. Petala, P. Samaras, S. Hadjispyrou, G. Sakellaropoulos, A. Kungolos, Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*, Ecotoxicol. Environ. Saf., 63, 158-167(2006).
15. E. Fulladosa, J. C. Murat, M. Martinez, I. Villaescusa, Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria, Chemosphere, 60, 43-48(2015).

Authors

Kil-Soo Lee

Korea Environment Corporation, Manager, ORCID[®] 0000-0001-7390-3428

Seung-Joo Lee

Korea Environment Corporation, Director

Chang-Keun Wang

Department of Environmental Engineering, Chung-Nam National University, Professor

Young-Gyun Choi

Department of Environmental Engineering, Chung-Nam National University, Professor, ORCID[®] 0000-0002-0028-2090

Keum-Yong Hong

BLprocess CO., Representative