

Research Article



CrossMark

Open Access

Alcaligenes sp.의 생장과 인 제거에 미치는 이종 중금속 혼합의 독성 효과

김덕현, 유 진, 정근욱*

충북대학교 농업생명환경대학 환경생명화학과

Toxic Effects of Binary Mixtures of Heavy Metals on the Growth and P Removal Efficiencies of *Alcaligenes* sp.

Deok Hyun Kim, Jin Yoo and Keun Yook Chung* (Department of Environmental Biology and Chemistry, College of Agriculture, Life & Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea)

Received: 7 March 2016 / Revised: 21 March 2016 / Accepted: 24 March 2016
Copyright © 2016 The Korean Society of Environmental Agriculture

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.

ORCID

Deok Hyun Kim

<http://orcid.org/0000-0002-6964-4280>

Keun Yook Chung

<http://orcid.org/0000-0002-2725-7733>

Abstract

BACKGROUND: This study was initiated to quantitatively evaluate the effects of five heavy metals on the growth and P removal efficiencies of *Alcaligenes* sp., known as the Phosphorus Accumulating Organisms (PAOs). It was cultivated in the batch system with five heavy metals, such as Cd, Cu, Zn, Pb and Ni, added in single and binary mixtures, respectively.

METHODS AND RESULTS: IC₅₀ (half of inhibition concentration of bacterial growth) and EC₅₀ (half of effective concentration of phosphorus removal Efficiencies) were used to quantitatively evaluate the effects of heavy metals on the growth and phosphorus removal Efficiencies of *Alcaligenes* sp. In addition, Additive Index Value (A.I.V.) method was used to evaluate the interactive effects between *Alcaligenes* sp. and heavy metals. As a result, as the five heavy metals were singly added to *Alcaligenes* sp., the greatest inhibitory effects on the growth and P removal efficiencies of each bacteria was observed in the cadmium (Cd). In the binary mixture treatments of heavy metals, the

treatments of lowest IC₅₀ and EC₅₀ were the Cd + Cu treatment. Based on the IC₅₀ and EC₅₀ of the binary mixtures of heavy metals treatments, most interactive effects between the heavy metals were found to be antagonistic.

CONCLUSION: Based on the results obtained from this study, it appears that they could provide the basic information about the toxic effects of the respective treatments of single and binary mixtures of heavy metals on the growth and P removal efficiencies of *Alcaligenes* sp. through further study about the characterization of functional proteins involved in toxic effects of heavy metals.

Key words: *Alcaligenes* sp., Binary Mixture, EC₅₀, Heavy Metals, IC₅₀

서론

생활하수, 축산 및 산업 폐수를 비롯한 기타 오염원 내의 다량의 영양염류가 하천 및 호소로 유입되는 경우, 수중 조류의 과다번식이 발생하게 된다. 이로 인해 수질은 악취가 나고 병원성 세균이 번식하게 될 뿐 아니라 수중 용존산소(DO) 또한 고갈된다. 이러한 현상을 부영양화라 하고, 이는 결과적으로 수생태계에 악영향을 주며 수질오염을 발생시킨다(Grady *et al.*, 1999). 이러한 현상을 방지하기 위해서는 질소와 인이

*Corresponding author: Keun Yook Chung
Phone: +82-43-261-3383; Fax: +82-43-271-5921;
E-mail: kychung@cbnu.ac.kr

수계로 유입되는 것을 막거나 유입되더라도 신속히 제거할 수 있어야 한다. 질소와 인은 모두 부영양화의 주요인자로 작용하고 있으나, 질소의 경우 공기 중 질소가 질소고정 미생물에 의해 수계로 유입되는 경우도 존재한다. 따라서 효율적인 부영양화의 방지를 위해서는 인을 확실히 제거해야 한다 (Correll, 1998). 최근에는 환경오염문제가 심각한 이슈로 떠오름에 따라 2차 오염을 거의 발생시키지 않는 생물학적 방법을 이용한 인 제거에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

생물학적 인 제거 공정은 세포 내에 다중 인산염의 형태로 다량의 인을 저장할 수 있는 것으로 알려진 인염 축적균 (Phosphorus Accumulating Organisms, PAOs)(Sedlak, 1991; Zuthi et al., 2008)에 혐기 조건과 호기조건을 교차시킴으로써 인의 과잉흡수(Luxury uptake)를 유발하여 폐수 중 인을 제거하는 방법이다(Levin and Sharpiro, 1965; Khoshmanesh et al., 2002). 현재, 인 제거를 위해 제시된 방법 중 가장 널리 인정받고 있는 모델은 Comeau-Wentzel 모델(Comeau et al., 1987; Wentzel, 1989)과 Mino 모델(Mino et al., 1998)이다. 생물학적 인 제거에 대한 연구는 단일 미생물을 이용한 효율적인 인 제거가 가능한 새로운 공정의 개발, 기존 공정의 공정 변수 변화를 통한 공정의 최적화에 대한 연구가 주를 이루고 있었다(Barnard, 1973). 그러나 현재 단일 미생물을 이용한 부영양화 제한인자로 오염된 수질 정화의 효과를 실제 현장에 적용시키는 데 있어서는 오염원이 단일물질로 존재하는 경우는 거의 없고 대부분 중금속, 유기물 등과 함께 복합적으로 존재하기 때문에 기존의 단일 오염원 제거에 관한 연구는 한계가 있다는 보고가 있다. 특히, 카드뮴, 구리, 아연, 납, 니켈 등을 포함하는 중금속은 인간을 비롯한 자연계에 존재하는 대다수 생물의 생명을 위협하는 위해성 물질로, 이들의 채광량 및 사용량은 문명이 발달함에 따라 꾸준히 증가하고 있다(Jung et al., 2004). 이러한 중금속들이 환경에 미치는 생태독성에 대한 기존 연구들은 대부분 단일 중금속 저해를 정량 및 정성적으로 평가하는 방법이다. 중금속 생태독성에 대한 연구는 미생물을 이용한 중금속 오염정화 시 기초자료로 활용될 수 있다고 제안하고 있으나(Yilmaz, 2003), 중금속으로 인한 환경오염은 단일 중금속이 아닌 여러 종류의 중금속 혼합에 의한 경우가 대부분이며(An et al., 2004; Kong, 2013), 이에 대한 연구는 부족한 실정이다. 이러한 한계를 극복하기 위해 최근에는 두 종류 이상의 중금속이 혼재시 일어나는 효과에 대한 연구가 진행되고 있다(Liu et al., 2007; Xu et al., 2011). 이와 유사한 연구로써 여러 농약들이나 유기물질들 간의 혼합에 의한 독성영향이 상승효과(synergistic effect) 또는 길항효과(antagonistic effect)를 나타내는지에 대한 연구가 수행되었다(Lister et al., 2011; Hernandez et al., 2013). 중금속 간 상호작용에 대한 연구는 대부분이 혼합 중금속이 식물(Horvat et al., 2007)이나 어패류(Phillips and Hickey, 2010)에 작용하였을 때 미치는 영향에 관한 내용으로, 중금속을 미생물에 적용시켰을 경우에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 인을 축적하는 능력을 가진 미생물(Phosphate Accumulating Organisms, PAOs)로 알려진

Alcaligenes sp.에 5가지 중금속들(Cd, Cu, Zn, Pb, Zn)을 단일, 2중 처리 시 미생물의 성장 및 인 제거에 미치는 영향을 비교분석함으로써 중금속들이 인 제거 미생물의 성장과 인 제거에 미치는 상승효과(synergistic effect) 또는 길항효과(antagonistic effect) 효과에 관한 연구를 수행하는 것을 목적으로 한다.

재료 및 방법

미생물 배양

본 연구에 사용된 미생물은 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양받은 *Alcaligenes* sp. KCTC 12036 이다. 미생물 배양에 사용된 배지는 basic medium solution, phosphate solution 1000 mg.L⁻¹, 1 M tris buffer solution (pH 7.0±0.2), trace metal solution (D.W. H₂O 100 mL에 H₃BO₃ 0.03 g, CuSO₄·5H₂O 0.1 g, ZnSO₄·7H₂O 0.2 g, MnSO₄·H₂O 0.2 g, Na₂Mo₄·2H₂O 0.04 g 용해), glucose solution 200,000 mg.L⁻¹을 적절히 혼합하여 제조하였다(Zafiri et al., 1999). 배지는 100mL 삼각플라스크에 50 mL가 되도록 하였고, 실험배지에 접종되는 균주의 양은 배지의 2% (v/v)를 차지하도록 하여 배양을 실시하였다. 초기 인 농도를 20 mg/L 으로 조정된 최소배지에서 30°C, 150 rpm 조건의 shaking incubator에서 24 시간 실시하였다. 균주의 활성화를 위하여 실험 시작 3주 전부터 LB배지와 실험배지를 이용하여 계대배양을 실시하였다.

중금속 처리

처리구의 설정은 실험배지에 균주를 처리하지 않은 blank, 배지에 균주만 처리한 대조구, 단일 및 2중 중금속을 중금속 별로 4개의 농도로 처리한 중금속 처리구로 하였다. 실험에 사용된 중금속 표준용액은 Cd standard solution, Cu

Table 1. Treatments of single heavy metals and concentrations

Heavy metal treatments	Concentration (mg/L)
Cadmium (Cd)	0, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0
Copper (Cu)	0, 4, 8, 12, 20
Zinc (Zn)	0, 3, 6, 9, 15
Lead (Pb)	0, 4, 8, 12, 20
Nickel (Ni)	0, 6, 12, 18, 30
Cd + Cu	0, 4.2, 8.4, 12.6, 21
Cd + Zn	0, 3.2, 6.4, 9.6, 16
Cd + Pb	0, 4.2, 8.4, 12.6, 21
Cd + Ni	0, 6.2, 12.4, 18.6, 31
Cu + Zn	0, 7, 14, 21, 35
Cu + Pb	0, 8, 16, 24, 40
Cu + Ni	0, 10, 20, 30, 50
Zn + Pb	0, 7, 14, 21, 35
Zn + Ni	0, 9, 18, 27, 45
Pb + Ni	0, 10, 20, 30, 50

standard solution, Zn standard solution, Pb standard solution, Ni standard solution (1,000mg/kg, Kanto chemical Co., Japan)을 사용하였으며, 처리한 중금속 별 처리농도는 Table 1 과 같다. 실험배지에 포함된 2종 중금속은 단일 중금속 처리 시 포함된 양과 동일하게 하였다. Table 1 의 농도는 중금속 2종의 합으로 표기하였다.

균의 생육도 측정 및 인산의 정량

실험 배지에서 균의 생육도 측정은 균주가 포함된 배지의 Optical Density (OD) 를 이용하여 실시하였다. OD 측정을 위한 배양액은 멸균 syringe 를 이용하여 채취하였다. 채취한 시료는 분광광도계(Model UV Mini 1240 Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 600 nm 의 파장에서 3 시간마다 1회 흡광도를 측정하였으며, 배지 내 총 인 농도는 ascorbic acid에 의한 몰리브덴 청법을 변형하여 측정하였다(Kim, 2012). 분광광도계(Model UV Mini 1240 Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 880 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 초기 및 최종 인 농도의 비교를 통해 단일 미생물 및 혼합 미생물 처리구 간 인 제거 효율을 비교 분석하였다.

IC₅₀ 및 EC₅₀ 추정

반수 성장 저해 농도(half of inhibition concentration of bacterial growth, IC₅₀) 및 반수 인 제거 효율 저해 농도(half of effective concentration of phosphorus removal efficiencies, EC₅₀)의 계산은 흡광도 값에 자연로그를 취한 값을 시간별로 최소 제곱 추정치에 의해 나타나는 선형 회귀식을 이용하였다. 반수치사농도인 IC₅₀를 추정하기 위한 Log gamma 분포는 성장저해 결과를 회귀 분석하여 결정하였고(Asami *et al.*, 1996), EC₅₀은 중금속 처리에 따른 인 제거가 대조구의 절반이 되는 지점으로 추정하였다(Chen *et al.*, 1997).

중금속 간 교호작용 평가

중금속 혼합 처리 시, 중금속 간 교호작용을 확인하기 위해 additive toxicity index method(Marking and Mauck, 1975)를 이용하였다. Additive toxicity index method는 각각의 화학물질의 IC₅₀ 및 EC₅₀ 값과 혼합되었을 때의 IC₅₀ 및 EC₅₀ 값을 구해 이를 이용하여 혼합물질의 독성에 대한 각각 화학물질의 기여도를 평가하는 방법으로 계산식은 아래와 같다.

$$S = \frac{Am}{Ai} + \frac{Bm}{Bi}$$

S : 독성 반응의 총 합

Am : 혼합 시 나타나는 A 물질의 IC₅₀

Bm : 혼합 시 나타나는 B 물질의 IC₅₀

Ai : 단일로 존재할 때 나타나는 A 물질의 IC₅₀

Bi : 단일로 존재할 시 나타나는 B 물질의 IC₅₀

위의 식에서 계산한 S값을 이용하여 2종의 중금속 간 상관관계를 AI(Additive Index value)값을 기준으로 하여 평가할 수 있다. S 값이 1 보다 작을 경우, AI 계산은 1/S-1.0으로, S 값이 1보다 큰 경우, -S+1.0, S 값이 1일 경우 S-1(=0)으로 계산한다. AI값 계산결과가 0보다 크면 중금속 간 상승적 상호작용(synergistic interaction), 0보다 작으면 길항적 상호작용(antagonistic interaction)으로, AI값이 0일 경우 상가적 상호작용(additive interaction)으로 판단할 수 있다(Lange and Thomulka, 1997).

통계분석

실험 결과의 통계분석은 SAS software package version

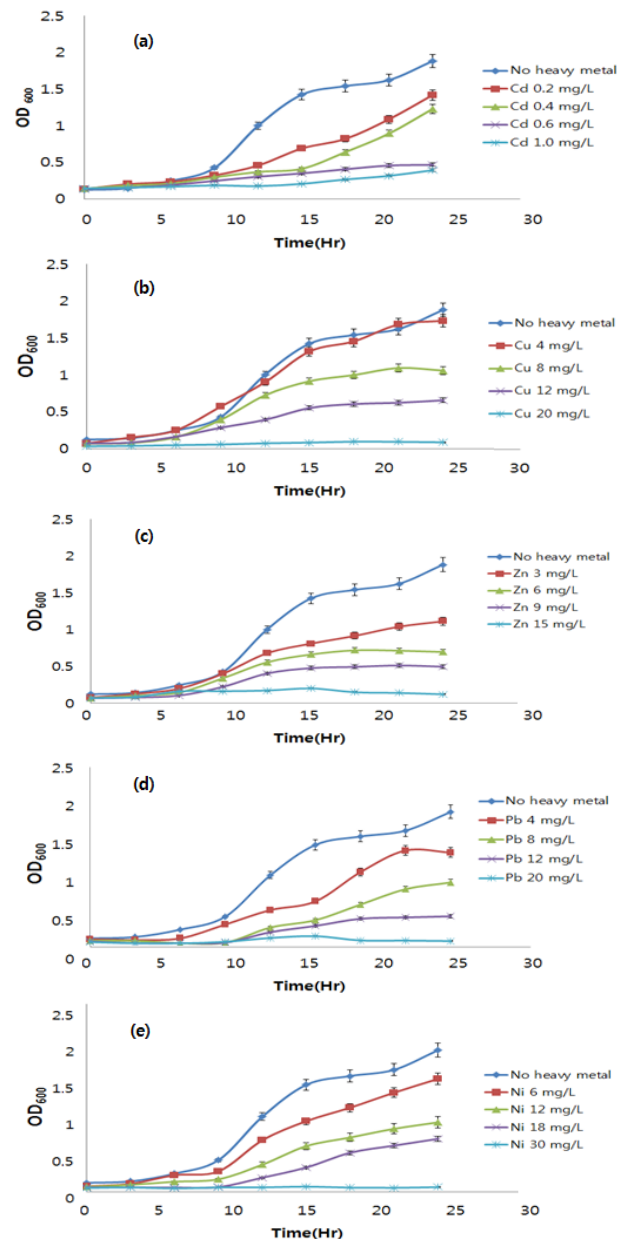


Fig. 1. Growth of *Alcaligenes* sp. in medium containing single heavy metal; (a) Cd, (b) Cu, (c) Zn, (d) Pb and (e) Ni. Error bar means standard error (n=3).

Table 2. IC₅₀ of *Alcaligenes* sp. with single heavy metal treatments

Heavy metal treatments	IC ₅₀ (mg/L)
Cadmium (Cd)	0.38±0.03d
Copper (Cu)	16.43±1.11a
Zinc (Zn)	12.17±0.60c
Lead (Pb)	11.68±0.69c
Nickel (Ni)	15.35±0.61b

Table 3. EC₅₀ of *Alcaligenes* sp. with single heavy metal treatments

Heavy metal treatments	EC ₅₀ (mg/L)
Cadmium (Cd)	0.31±0.02e
Copper (Cu)	10.37±0.52b
Zinc (Zn)	5.57±0.28d
Lead (Pb)	6.74±0.34c
Nickel (Ni)	12.04±0.60a

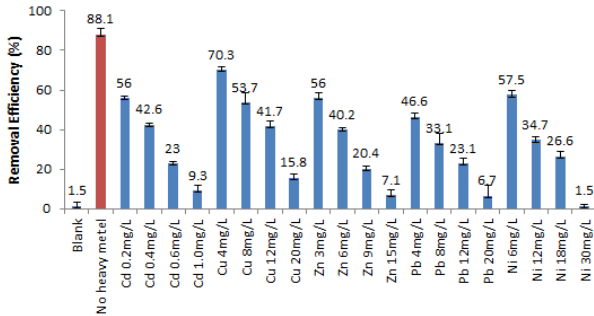


Fig. 2. Removal efficiencies of P by *Alcaligenes* sp. in relation to single heavy metals concentrations. Error bar means standard error (n=3).

9.1 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 실시하였다. 실험결과 유의한 차이를 조사하기 위해 ANOVA(analysis of variance) 분석과 Tukey’s HSD (honest significant difference) test를 실시하였으며, 신뢰구간은 95% 수준으로 설정하였다. 모든 실험은 3반복 실시되었다.

결과 및 고찰

단일중금속 처리

Alcaligenes sp.에 대한 단일 중금속 처리에 따른 저해효과를 확인하기 위해 각 미생물에 처리한 중금속과 그 농도에 따른 균주의 성장, IC₅₀, 인 제거율, EC₅₀을 측정하였다. 생장의 경우, 처리한 중금속의 농도가 증가할수록 미생물의 OD₆₀₀ 값이 감소하는 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 균주의 중금속 처리 별 성장곡선을 이용하여 중금속 처리구에 따른 균주의 Growth Inhibition (GI, %)를 계산하였으며, 결과 값을 선형회귀 분석하여 중금속 처리 시 균주의 생장이 절반이 되는 농도인 IC₅₀ (mg.L⁻¹)에 해당하는 농도를 추정하였다. *Alcaigenes* sp.에 대한 중금속의 성장저해효과에 대해 알아본 결과, 카드뮴 처리구의 GI (%)는 각각 40.7%, 57.4%, 62.4%, 87.6% 이었고, 구리 처리구 별 GI (%)는 1.9%, 2.2%, 26.8%, 67.4% 였으며, 아연의 경우, GI (%)는 17.3%, 18.6%, 26.9%, 65.0% 이었다. 납 처리구에서 GI (%)는 23.7%, 44.8%, 44.6%, 64.5% 였으며, 니켈 처리구 별 GI (%)는 3.4%, 30.1%, 58.2%, 95.0% 였다. 중금속의

종류에 상관없이 모든 처리구에서 중금속의 농도가 증가할수록 미생물의 성장에 미치는 저해효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 중금속의 성장저해효과를 이용하여 각 중금속 처리에 따른 IC₅₀에 해당하는 농도를 추정하였으며, 그 결과는 Table 2 와 같다. IC₅₀에 해당하는 농도를 기준으로 중금속 저해효과를 비교한 결과, 균주에 대한 중금속의 성장저해효과는 Cd>Pb≥Zn>Ni>Cu 의 순으로 강하였다. 이는 Cho 등(2004)이 실시한 중금속에 의한 대장균 성장저해의 정량적 평가 연구 결과 중, 카드뮴에 대한 내성이 다른 중금속에 비해 낮다는 연구결과와 유사하였다.

중금속이 균주의 인 제거에 미치는 영향을 확인하기 위해 초기 인 농도와 최종 인 농도를 측정하였으며, 각각의 중금속 처리구 별 인 제거율은 Fig. 2 와 같다. 인 제거효율 또한 처리한 중금속의 종류에 관계없이 중금속 처리 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 인 제거효율은 미생물만을 처리한 대조구에서 가장 높았으며, 처리구별 인 제거 효율을 이용하여 중금속 처리농도에 따른 인 제거 저해효과를 평가하였다. 평가 결과, 카드뮴 처리구의 인 제거효율은 대조구에 비해 각각 37.4%, 51.6%, 73.8%, 89.4% 감소한 것을 확인할 수 있었다. 구리 처리구는 대조구에 비해 인 제거효율이 각각 20.3%, 39.1%, 52.6%, 82.1% 감소하였고, 아연 처리구의 경우, 대조구에 비해 인 제거효율이 36.4%, 54.4%, 76.8%, 92.0% 감소한 것을 확인할 수 있었다. 납 처리구에서는 대조구에 비해 인 제거효율이 47.1%, 62.4%, 73.8%, 92.4% 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 니켈 처리구는 대조구에 비해 인 제거효율이 각각 34.6%, 60.6%, 69.7%, 98.3% 감소한 것을 확인할 수 있었다. 중금속 처리에 따른 인 제거효율의 저해효과를 기초로 하여 *Alcaligenes* sp. 의 인 제거효과가 절반이 되는 농도인 EC₅₀을 추정하였으며, 그 결과는 Table 3 과 같다. 중금속 처리에 따른 인 제거 저해효과는 Cd>Zn>Pb>Cu>Ni 순으로 강한 것을 확인할 수 있었다.

중금속 2종 혼합 처리

2종류의 중금속을 처리하였을 때의 저해효과 확인을 위해 *Alcaligenes* sp. 에 처리한 중금속과 그 농도에 따른 균주의 성장, IC₅₀, 인 제거율 및 EC₅₀을 측정하였다. 중금속 동시 처리에 따른 미생물 성장저해 효과의 비교를 통해 중금속을 단일물질로 처리할 경우와 2종으로 처리할 경우 생기는 교호작용의 판단은 additive index value를 이용하였다. 2

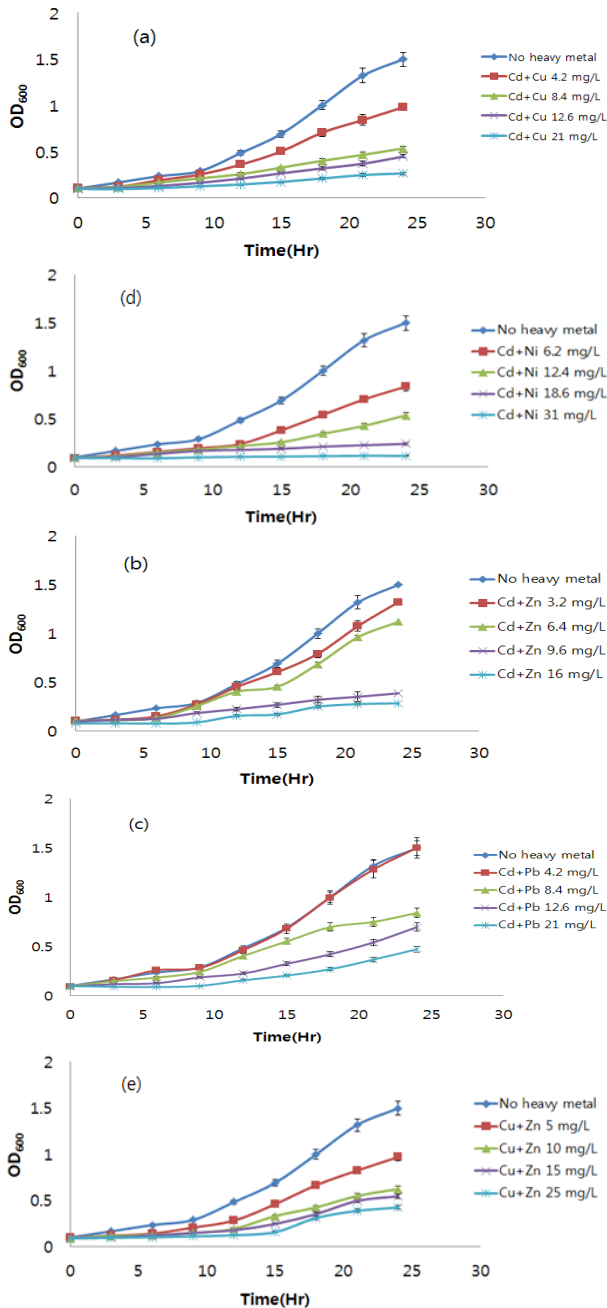


Fig. 3. Growth of *Alcaligenes* sp. in medium containing binary heavy metals; (a) Cd + Cu, (b) Cd + Zn, (c) Cu + Zn, (d) Cd+Ni and (e) Cu+Zn. Error bar means standard error ($n=3$).

중의 중금속 처리 시 *Alcaligenes* sp. 의 생장은 중금속 처리농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며, 미생물의 활성이 급격히 증가하기 시작하는 log phase에 도달하는 시간이 지연되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-4). 각 중금속 처리구의 처리 농도에 따른 *Alcaligenes* sp.의 생장저해정도 (GI, %) 를 계산 후, 결과 값을 선형회귀 분석하여 2중 중금속 처리 시 중금속 별 IC₅₀에 해당하는 농도를 추정하였다. 또한, 2중 중금속을 균주에 적용시킬 경우 중금속 간 교호작용을 판단하기 위해 상호작용을 평가하였으며, 그 결과는

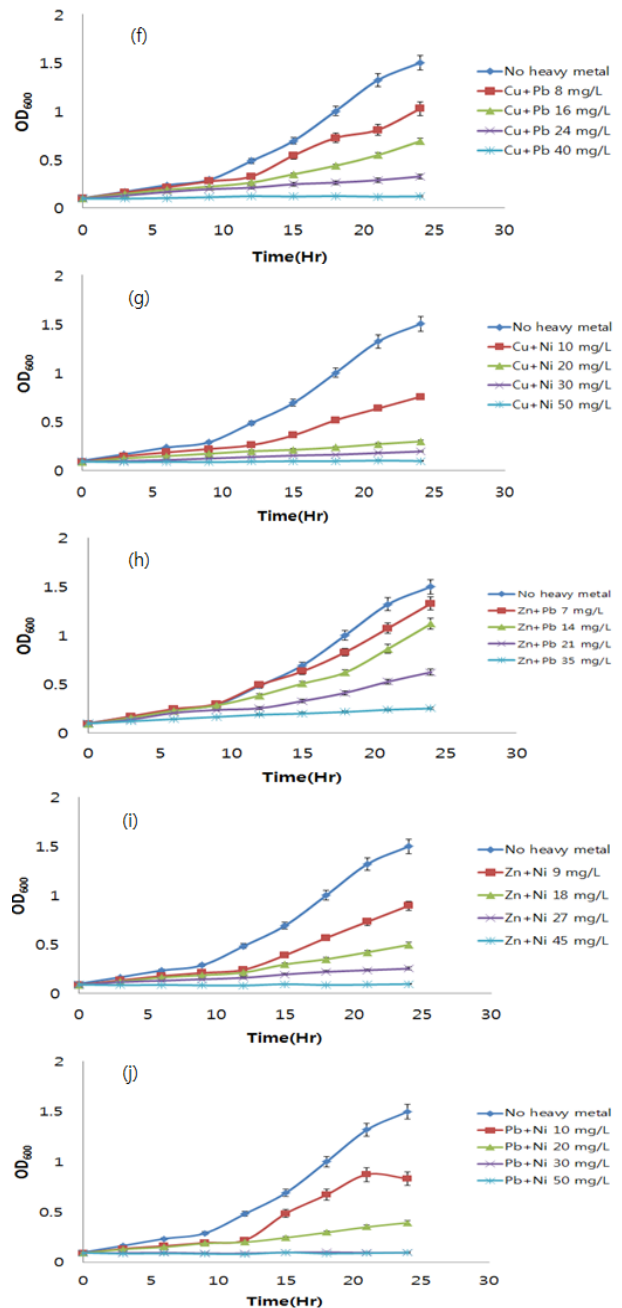


Fig. 4. Growth of *Alcaligenes* sp. in medium containing binary heavy metals; (f) Cu + Pb, (g) Cu + Ni, (h) Zn + Pb, (i) Zn + Ni and (j) Pb + Ni. Error bar means standard error ($n=3$).

Table 4 와 같다. 균주의 생장에 미치는 저해효과가 가장 강한 처리구는 Cd + Cu 처리구로, IC₅₀에 해당하는 농도가 9.55 mg/L 임을 확인할 수 있었다. 반면, 균주 생장 저해효과가 가장 약한 중금속 처리구는 Zn + Pb 처리구였으며, IC₅₀에 해당하는 농도가 27.64 mg/L 인 것을 확인할 수 있었다. 중금속 혼합 처리에 따른 교호작용을 additive index value를 이용하여 평가한 결과, 상승효과(synergistic effect)를 보인 처리구는 Cu + Zn, Cu + Pb, Cu + Ni, Pb + Ni 처리구인 것을 확인할 수 있었다.

Table 4. IC₅₀ and interactions of *Alcaligenes* sp. with binary heavy metal treatments

Heavy metal treatments	IC ₅₀ (mg/L)	Interaction
Cd + Cu	9.55±0.47h	Antagonism
Cd + Zn	13.35±0.65f	Antagonism
Cd + Pb	17.75±0.87b	Antagonism
Cd + Ni	11.66±0.57g	Antagonism
Cu + Zn	14.14±0.69e	Synergism
Cu + Pb	14.47±0.71de	Synergism
Cu + Ni	16.01±0.78c	Synergism
Zn + Pb	27.64±1.35a	Antagonism
Zn + Ni	14.95±0.73d	Antagonism
Pb + Ni	14.28±0.70de	Synergism

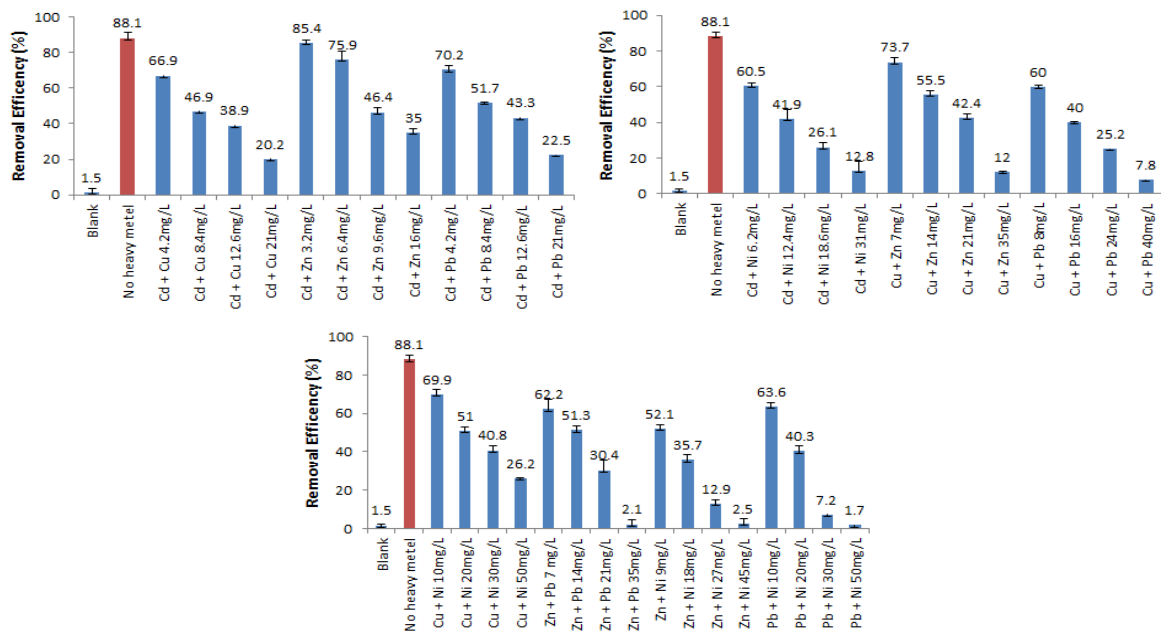


Fig. 5. Removal efficiencies of P by *Alcaligenes* sp. in relation to binary heavy metals. Error bar means standard error (n=3).

Table 5. EC₅₀ and interactions of *Alcaligenes* sp. with binary heavy metal treatments

Heavy metal treatments	EC ₅₀ (mg/L)	Interaction
Cd + Cu	6.90±0.27f	Antagonism
Cd + Zn	12.29±0.36cd	Antagonism
Cd + Pb	11.12±0.44de	Antagonism
Cd + Ni	10.68±0.32e	Antagonism
Cu + Zn	12.04±0.59cd	Additive
Cu + Pb	13.14±0.77c	Antagonism
Cu + Ni	26.41±1.79a	Synergism
Zn + Pb	12.28±0.48cd	Antagonism
Zn + Ni	12.21±0.36cd	Antagonism
Pb + Ni	15.05±0.59b	Additive

다음으로, 중금속 혼합 처리가 균주의 인 제거에 미치는 영향을 확인하기 위해 초기 인 농도와 최종 인 농도를 측정하

였으며, 각각의 중금속 처리구 별 인 제거율은 Fig. 5 와 같다. 측정 결과, 인 제거효율은 중금속의 종류에 관계없이 처

리한 중금속의 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 인 제거효율은 중금속을 처리하지 않은 대조구에서 가장 높았으며, 처리구별 인 제거 저해효과를 계산 후, 결과 값을 선형회귀 분석하여 인 제거반응이 절반이 되는 지점인 EC_{50} 을 추정하였다. 중금속 혼합 시, 교호작용의 판단은 위해 additive index value를 이용하였다(Table 5). EC_{50} 에 해당하는 농도가 가장 낮은 처리구는 Cd + Cu 처리구였으며, 그 농도는 6.90 mg/L 이었다. 반면, EC_{50} 이 가장 높은 처리구는 Cu + Ni 처리구로, 그 농도는 26.41 mg/L 이었다. 중금속 간 교호작용 평가 결과, Cu + Ni 처리구는 상승효과(synergistic effect)를 보였으며, Cu + Zn, Pb + Ni 처리구에서는 상승효과(additive effect)를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 2 종의 중금속 혼합 처리 시 중금속 간 교호작용은 대부분 상승적(additive) 또는 상승적 상호작용(synergistic interaction) 이라고 보고하였던 Buhl과 Hamilton(1997), Tao 등(1999) 의 연구보고와 상이하였다. 그러나, 독성의 연구에 활용된 bioassay의 method에 따라 혼합독성의 양상이 다르게 나타날 수 있으며, 실험 결과 중금속 간 상호작용이 길항효과(antagonistic effect) 로 나타난 결과가 더 많은 것은 생물학적 독성평가에서 일반적으로 사용하는 미생물(*E. coli*, *Vibrio Fischeri*)이 아닌 인 축적능을 갖는 미생물을 선별하였기 때문인 것으로 사료된다. 또한, 인 제거 반응이 절반이 되는 농도인 EC_{50} 이 미생물의 생장이 절반이 되는 농도인 IC_{50} 에 비해 전체적으로 낮은 경향을 보이는 것으로 나타났다(Tables 2-5). 이는 Diamantino 등(2001) 이 *Daphnia magna*의 lactate 가수분해효소의 활성화에 아연이 미치는 독성에 대한 연구 결과 중 IC_{50} 와 EC_{50} 의 농도를 비교한 내용과 일치하였다.

요 약

본 연구는 인 축적능을 갖는 것으로 알려진 미생물인 *Alcaligenes* sp.의 성장 및 인 축적에 중금속이 미치는 영향을 정량적으로 평가하고자 실시되었다. 미생물의 성장 및 인 제거에 미치는 저해효과를 정량적 평가를 위해 성장저해 정도와 인 제거반응저해 정도를 IC_{50} 와 EC_{50} 를 이용하여 표현하였고, 중금속 간 교호작용의 평가를 위해 Additive Index Value method (A.I.V) 를 이용하여 중금속 간 혼합효과를 판단하였다. 실험 결과를 통해 *Alcaligenes* sp.의 성장 및 인 제거에 미치는 저해효과가 가장 큰 중금속은 카드뮴(Cd)이었다. 반면, 상대적으로 저해효과가 약한 중금속은 니켈(Ni)이었다. 모든 중금속은 처리 농도가 증가할수록 미생물의 성장과 인 제거율을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 단일 중금속 처리시 IC_{50} 에 해당하는 농도는 Cd 0.38, Cu 16.43, Zn 12.17, Pb 11.68, Ni 15.35 mg/L 이다. 연구에 사용된 균주 *Alcaligenes* sp. 의 인 제거율은 88.1%였고, EC_{50} 에 해당하는 농도는 Cd 0.31, Cu 10.37, Zn 5.57, Pb 6.74, Ni 12.04 mg/L 이다. 두 종의 중금속을 혼합 처리하였을 때 IC_{50} 에 해당하는 농도가 가장 낮은 중금속 처리구는 Cd + Cu 처리구였으며, 가장 높은 처리구는 Zn + Pb 처리구였다.

EC_{50} 의 농도는 Cd + Cu 처리구에서 가장 낮은 농도를, Cu + Ni 처리구에서 가장 높은 농도를 보였다. 중금속 간 교호작용은 대부분 길항효과(antagonistic effect)를 보였으나, IC_{50} 의 경우, Cu + Zn, Cu + Pb, Cu + Ni, Pb + Ni 처리구에서 상승효과(synergistic effect)를 보이는 것을 확인할 수 있었고, EC_{50} 에서는 Cu + Zn, Pb + Ni 처리구에서 상승효과(additive effect)를, Cu + Ni 처리구에서 상승효과(synergistic effect)를 보였다. 연구 결과는 중금속을 단일 및 2종 혼합 처리하였을 때 중금속이 인 제거 미생물의 성장 및 기능에 미치는 독성효과에 대한 기초자료를 제공함으로써 추후 진행될 미생물 단백질 동정, 중금속 독성평가에 관한 연구에 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

Acknowledgment

This work was supported by the research grant of Chungbuk National University in 2013.

References

- An, Y. J., Kim, Y. M., Kwon, T. I. & Jeong, S. W. (2004). Combined effect of copper, cadmium and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. *Science of the Total Environment*, 326(1-3), 85-93.
- Asami, M., Suzuki, N. & Nakanishi, J. (1996). Aquatic toxicity emission from Tokyo : Wastewater measured using marine luminescent bacterium, *Photobacterium phosphoreum*. *Water Science and Technology*, 33(6), 121-128.
- Barnard, J. L. (1973). Biological denitrification. *Water Pollution Control Federation*, 72, 705-719.
- Buhl, K. J. & Hamilton, S. J. (1997). Hazard evaluation of inorganics, singly and in mixtures, to flannelmouth sucker *Catostomus latipinnis* in the San Juan River, New Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38, 296-308.
- Chen, C. Y., Huang, J. B. & Chen, S. D. (1997). Assessment of the Microtox toxicity test and its application for industrial wastewater. *Water Science and Technology*, 36, 375-382.
- Cho, K. S., Ryu, H. W., Lee, I. S. & Kim, J. Y. (2004). Quantification of inhibitory impact of heavy metals on the growth of *Escherichia coli*. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(4), 341-346.
- 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.
- Correll, D. L. (1998). The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: a review. *Journal of Environmental Quality*, 27, 261-266.

- Diamantino, T. C., Almeida, E., Soares, A. M. V. M., Guilhermino, L. (2001). Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* strauss. *Chemosphere*, 45, 553-560.
- Grady Jr, C. L., Daigger, G. T., Love, N. G., & Filipe, C. D. (2011). *Biological Wastewater Treatment*. CRC press.
- Hernandez, A. F., Parron, T., Tsatsakis, A. M., Requena, M., Alarcon, R. & Lopez-Guarnido, O. (2013). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level : Their relevance to human health. *Toxicology*, 307, 136-145.
- Horvat, T., Vidakovic-Cifrek, Z., Orescinn, V., Tkalec, M. & Pevalek-Kozlina, B. (2007). Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L. *Science of the Total Environment*, 384(1-3), 229-238.
- Jung, M. C., Jung, M. Y. & Choi, Y. W. (2004). Environmental assessment of heavy metals around abandoned metalliferous mine in Korea. *Korea Society of Economic and Environmental Geology*, 37(1), 21-33.
- Khoshmanesh, A., Hart, B. T., Duncan, A. & Beckett, R. (2002). Luxury uptake of phosphorus by sediment bacteria. *Water Research*, 36, 774-778.
- 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(2), 185-191.
- 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(5), 889-894.
- Lange, J. H. & Thomulka, K. W. (1997). Use of the *Vibrio harveyi* toxicity test for evaluating mixture interactions of nitrobenzene and dinitrobenzene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38(1), 2-12.
- Levin, G. & Sharp, J. (1965). Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organics. *Water Pollution Control Federation*, 37(6), 800.
- Lister, L. J., Svensen, C., Wright, J., Hooper, H. L. & Spurgeon, D. J. (2011). Modelling the joint effects of a metal and a pesticide on reproduction and toxicokinetics in lumbricid earthworms. *Environment International*, 37(4), 663-670.
- Liu, X., Zhang, S. Shan, X. & Christie, P. (2007). Combined toxicity of cadmium and arsenate to wheat seedlings and plant uptake and antioxidative enzyme responses to cadmium and arsenate co-contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(2), 305-313.
- Marking, L. L., & Mauck, W. L. (1975). Toxicity of paired mixtures of candidate forest insecticides to rainbow trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 13(5), 518-523.
- Mino, T., Van Loosdrecht, M. C. M. & Heijnen, J. J. (1998). Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphorus removal process. *Water Research*, 32(11), 3193-3207.
- Philips, N. R., & Hickey, C. W. (2010). Genotype-dependent recovery from acute exposure to heavy metal contamination in the freshwater clam *Sphaerium novaezelandiae*. *Aquatic Toxicology*, 99(4), 507-513.
- Sedlak, R. I. (1991). *Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater: principles and practice*. CRC press.
- Tao, S., Liang, T., Cao, J., Dawson R. W. & Liu C. (1999). Synergistic effect of copper and lead uptake by fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44(2), 190-195.
- Wang, J. & Yu, J. (2000). Kinetic analysis on inhibited growth and poly(3-hydroxybutyrate) formation of *Alcaligenes eutrophus* on acetate under nutrient-rich conditions, *Process Biochemistry*, 36(3), 201-207.
- Wang, Y., Geng, J., Ren, Z., He, W., Xing, M. & Wu, M. (2011). Effect of anaerobic reaction time on denitrifying phosphorus removal and N₂O production. *Bioresource Technology*, 102(10), 5674-5684.
- Wentzel, M. C., Dold, P. L., Ekama, G. A. & Marais, G. v. R. (1989). Enhanced polyphosphate organism cultures in activated sludge systems, Part III: Kinetic model. *Water SA*, 15(2), 89-102.
- Xu, X., Li, Y., Wang, Y. & Wang, Y. (2011). Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. *Toxicology in Vitro*, 25(1), 295-300.
- Yilmaz, E. I. (2003). Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1, *Research in Microbiology*, 154(6), 409-415.
- Zafiri, C., Kornaros, M. & Lyberatos, G. (1999). Kinetic modeling of biological phosphorus removal with a pure culture of *Acinetobacter* sp. under aerobic, anaerobic, and transient operating conditions. *Water Research*, 33(12), 2769-2788.
- 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.