

EROD-microbioassay에 의한 원천천 상류지역 수질 조사

고성룡* · 정규혁†

*성균관대학교 산업과학대학원 산업보건학과
성균관대학교 약학부

Water Quality Monitoring of the upper region of Wonchun stream using EROD-microbioassay

S. Y. Gho* and K. H. Chung†

**Department of Industrial Health, SungKyunKwan University
College of Pharmacy, SungKyunKwan University, Suwon, Kyunggido 440-746, Korea
(Received 17 November 2000 ; Accepted 18 December 2000)*

ABSTRACT

The purpose of this study is to investigate on the water quality of the upper region of Wonchun stream located in Suwon city by chemical analysis and EROD-microbioassay methods using rat hepatoma cell line H4IIE. The water samples were collected at 6 sampling sites from Sept. to Nov. 1999 and determined the quantitative toxic effects. Higher levels of BOD₅, COD_{Cr} and COD_{Mn} were determined at M6 site where the influent contains domestic and industrial wastewater. EROD activity of water samples was ranged from 3.43 ± 0.08 to 9.05 ± 0.10 pmol/mg protein/min. High correlation with EROD activities and COD values was observed. From the results, the upper region of Wonchun stream water area was presumed to be highly polluted with various persistent organic chemicals.

Keywords : Wonchun stream, EROD-microbioassay, H4IIE, BOD₅, COD

I. 서 론

급격한 도시화와 산업화의 결과 생활 근거리 내 하천은 각종 오염물질의 배출로 방류 수역이 오염되어 각종 용수원의 기능을 상실하고, 주민의 보건위생과 자연 환경에 큰 위협 요인이 되기에 이르렀다. 하천은 지역 주민 생활의 중심이 되므로 하천의 안정성과 쾌적성을 확보하는 것이 중요하다. 우리나라 대도시의 중·소 하천의 경우 대부분 오염이 심화되면서 본래 기능을 상실하여 오히려 불편하고 더러운 존재로 인식하여 복개 시키고자 하는 논의까지 이루어지고 있는 실정이다. 하천수는 대체로 그 근원을 비 주거지역에 두고 있기 때문에 상류지역에서는 보통 오염도가 낮다. 그러나 도시의 팽창으로 상류지역까지도 공단이 들어서거나 아파트 등 대규모 주거지가 생기면서 상류에서부터 오염이 유발되는 경우가 많아지고 있다. 비교적 수량이 적은

상류에서의 오염의 시작은 매우 신속하고 심각한 양상을 나타내게 된다. 특히 최근 새로운 화학물질의 합성과 사용량이 급증함에 따라 근년에 오염이 진행된 하천수, 호소수 등 수자원의 오염으로 인한 생활환경의 피해 문제가 제기되고 있으며 이에 따라 미량 화학물질의 측정과 독성학적 평가 및 오염방지에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 오염원의 주관심 대상도 과거 유기물질 중심에서 최근에는 유해화학물질 중심으로 전환되었고, 음용수 중 미량유기오염물질에 의한 유해성 문제가 제기되면서 이들 유해물질에 대한 측정법 및 독성에 대한 평가와 오염방지방안에 대한 연구가 선진국뿐만 아니라 우리나라에서도 활발히 진행 중에 있다.¹⁾ 이와 더불어 분석기술의 급격한 향상은 미량으로 존재하는 물질까지도 검출이 가능하게 하였으나, 이들의 생물체에 대한 영향이 논란이 되게 되었다. 이에 따라 수환경 오염 측정법도 주로 이화학적 분석법에 의존하던 종래의 방법에서 원인이 되는 유해 화학물질을 검출하기 위한 분자수준의 생물학적 방법으로 발전되고 있다. 생화학적 biomonitoring의 장점은 첫째 환경 오염으로 인하여 나타나는 각종 반응 가운데에서 분자수준의 생화학적 변화를 가장 먼저 감지하여 정량화 할

†Corresponding author : College of Pharmacy,
SungKyunKwan University, Suwon, Kyunggido
440-746, Korea
Tel: 031-290-7714, Fax: 031-292-8800
E-mail: khchung@skku.ac.kr

수 있으며, 둘째 생화학적 변화는 오염물질의 종류와 노출량 뿐 아니라 그 독성효과도 알려준다는 것이다.¹⁾

최근에는 조기탐색 및 예방적 의미에서의 질병이 유발되기 전 단계인 해독기능의 효소 유도를 biomarker로 이용하는 환경 monitoring에 대한 연구 경향이 집중되고 있다.²⁻⁷⁾ 이중 cytochrome P4501A 효소 유도단계를 보는 방법은 PCDD, PCDF, PCB 및 PAH 등이 Ah receptor와 결합함으로써 효소유도를 일으키는 특성을 이용한 것이다. 포유류 세포배양에 있어서 CYP1A의 유도는 Ah receptor activation을 볼 수 있는 parameter로 쓰인다.

Rat hepatoma cell line인 H4IIE cell line은 민감성과 안정성으로 인하여 일반적으로 사용되고 있는 세포주이다. 포유류 세포와 어류세포에서의 간 대사능에 대한 상관성이 매우 유사하여 포유류세포를 생태계 영향 조사에 활용할 수도 있다고 보고된 바 있다.⁸⁾ 측정 방법으로는 CYP관련 효소인 AHH(arylhydrocarbon hydroxylase), EROD(7-ethoxyresorufin-O-deethylase) 및 ECOD(ethoxycoumarine-O-deethylase) 등을 측정하는 것이 주로 이용되고 있다.

원천천은 경기도 용인시와 수원시에 인접해 있으며 도시근교의 주변 농가와 공장에서 사용하는 물을 공급하는 역할을 담당하고 인근 주민들을 위한 위락공간으로 이용되어 왔으나 현재는 각종 오염원으로부터 미 처리된 도시하수, 공장폐수, 축산폐수 등의 유입이 증가하여 오염 부하량이 많아지면서 하천의 자정능력을 초과하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 상류의 복합적인 오염의 전형적인 양상을 보여 주고 있는 원천천 상류지역을 대상으로 하천시료에 대한 이화학적 분석법으로 수질을 조사함과 아울러 H4IIE cell line을 이용한 EROD 효소 활성을 측정하여 비교 분석함으로써 이화학적 및 독성학적 수질 오염도를 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료채취 지역 현황 및 시료채취

원천천은 용인시 수지면 상현리 신대 저수지에서 발원하여 유로연장 10.23 km, 유역면적 36.70 km²의 규모로 안성천을 본류로 하는 하천 중 제 3지류에 해당한다. 원천천의 지류로는 수원시 팔달구 의의동 일대의 여러 지천이 합쳐져서 저수지를 이루고 있는 원천저수지에서 발원한 여천이 있으며, 여천의 유로연장은 4.33 km이고 유역면적은 6.15 km²이며 직할 하천의 제 4류에 속하는 하천이다. 북동방향에서 남으로 유하하는 원천천 지류인 여천과 합류하여 황구지천으로 흐르고

있으며 다시 안성천의 제 1류인 진위천으로 유입되어 계속해서 남류하는 하천이며 수원시를 관통하여 유하하고 있는 수원시 준용하천은 광고산에서 발원한 또 다른 수계인 수원천, 서호천, 황구지천 등이 있다.

원천천 유역 총면적은 40.121 km²중 경지 33%, 임야 27%, 주거 지역을 포함한 나머지 면적이 40%로 구성되어 있다. 이 지역의 경우 BOD 부하량을 산정기준으로 이용하여 오·폐수 부하량을 추정하면 생활하수는 72.99%, 공장폐수는 24.90%, 축산폐수는 2.11%로 나타났다. 본 조사에서는 원천천 상류지역의 수질을 조사하기 위해 Fig. 1에서 보는바와 같이 원천교를 기준으로 오염원 유입지점을 고려하여 6개 지점(본류 4개 지점, 지류 2개 지점)을 선정하여 각 지점별 시료를 1회 채취하여 수질을 분석하였다.

2. 이화학적 실험방법

분석항목 중 pH와 DO는 채수 즉시 측정하였으며, COD_{Cr}은 Standard Method⁹⁾에 의해 산화제로 K₂Cr₂O₇을 사용하여 측정하였고, COD_{Mn}은 수질오염공정시험법¹⁰⁾에 의해 산성 100°C에서 산화제로 과망간산칼륨을 사용하여 측정하였으며, BOD₅는 5-day BOD를 측정하였다. 기타 중금속류는 원자흡광광도법(AAS)로 측정하였다.

3. EROD-microbioassay

1) 시료의 전처리

시료수는 채취하여 실험실로 운반 즉시 1/씩을 취하여 농황산으로 pH 3으로 조정후 실험하였다. 산성화된 시료수 1당 0.5 g의 Amberlite XAD-4 resin을 넣고 24시간동안 흡착시키는 static adsorption mode에 의한 combined solid-phase extraction 방법으로 유효성분을 흡착시켰다. 유효성분이 흡착된 resin은 Soxhlet 장치에 넣은 후 methylene chloride와 ethyl acetate (9:1) 혼합용매를 이용하여 유기성분을 추출하여 감압 증발 건조시켰다. 건조시키고 남은 잔사는 최종적으로 100% DMSO에 녹여 사용하였다. 공시험의 경우에는 증류수를 이용하여 시료 전처리법과 동일한 방법으로 준비하였다.

2) EROD 활성 측정

Ethoxyresorufin-O-deethylase의 활성을 측정하는 Drenth 등의 방법¹¹⁾에 따라 효소활성을 측정하였다. 우선 24 well plate에 10⁵ cell/ml을 seeding한 후, 24시간 배양하여 시료를 처리하였다. 48시간 배양 후 PBS로 2회 세척한 후, 배양액에 5 μM dicumarol, 4 μM ethoxyresorufin을 첨가하였다. 37°C에서 30분간 배양한

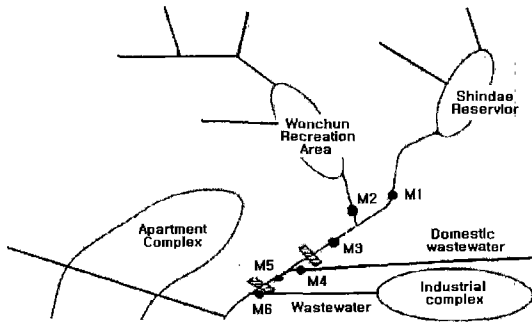


Fig. 1. Sampling sites of Wonchun up-stream.

후 배양액을 분리하여 530/588 nm에서 형광을 측정하였다. EROD의 활성값은 양성 대조군으로 사용된 3-MC의 최대 EROD 활성농도인 10⁻⁶M의 EROD 활성 유도값을 기준으로 하여 상대적인 값을 구하였다.

3) 단백질 정량

상위의 실험과정 중 각 well에서 상층의 배양액을 취하고 남은 세포는 PBS 및 증류수로 각각 2회 세척하여 NaOH 500μl를 가한 후, 37°C에서 3시간 정도 단백질을 용해시켰다. 이 액을 500μl 취해 Lowry 법¹²⁾에 의해 단백질 정량을 하였다. 측정된 단백질은 세포독성 자료로 이용하였다. 세포독성 값은 대조군의 단백질 양의 값을 100으로 한 상대적 비교를 통하여 산정하였다.

4) 통계처리

각 데이터는 1회 시험에서 각 농도당 4개 well로 3회 단독 시험한 결과이다. EROD 활성 및 세포독성 값에 대한 본 실험의 유의성 검정은 Student-t-test로 실시하였으며, p<0.05일 때 유의적인 차이를 인정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 이화학적 분석결과

1999년 11월에 원천천 상류지역의 6개 지점에서 하천수 시료를 채취하여 수질을 측정하였다. 각 지점별 수소이온농도(pH)는 7.5~9.0으로 M1지점을 제외하고는 생활환경 1등급의 하천수 수질기준인 6.6~8.5의 범위를 벗어나지 않았다. 부유물질(SS)은 6.8~166.7 mg/l로 하천수 수질기준인 생활환경 1~3등급 부유물질 기준치인 25 mg/l와 비교해 볼 때 M2, M4 두 지점을 제외한 모든 지점에서 기준치를 초과하고 있으며, M3, M5 지점의 경우에는 기준치보다 6~7배 정도로 부유물질이 많은 것으로 나타났다. 하천의 자정능력을 평가하는데 중요한 요소인 용존산소(DO)는 생물의 호흡과 유기물의 분해에 절대적으로 필요한데 원천천의 경우

에는 지점별로 하류 쪽으로 내려 갈수록 오염물질의 유입에 따라 점차적으로 감소하는 것으로 나타났다. 생물학적 산소 요구량 (BOD5)은 3.9~31.5 mg/l로 하천의 생활환경기준치인 10 mg/l와 비교하였을 때 M1, M4 및 M6 지점이 기준치를 초과한 것으로 나타났으며 이중 M6 지점의 경우에는 31.5 mg/l로 가장 높게 나타났는데 이는 시료채취 지점 상부에서 유입되는 공장폐수 및 생활하수에 의한 것으로 추정되었다. COD_{Mn}은 7.8~82.2 mg/l로 하천의 생활환경기준인 10 mg/l에 비해 M2 지점을 제외하고 모든 지점에서 기준치를 초과한 것으로 나타났으며 M6 지점이 82.2 mg/l로 가장 높게 나타났다. COD_{Cr}은 17.0~180.0 mg/l로써 COD_{Mn}에 비해 높았으며 하류쪽으로 내려 갈수록 점점 높아져 특히 공장 폐수배출구 유입점 이후인 M6에서는 다른 지점보다 약 10배정도 높게 나타나고 있다. ABS는 0.078~1.666 mg/l로 나타났으며 전 지점에서 하천수 수질기준치인 0.05 mg/l를 초과하였으며 M6 지점은 1.67 mg/l로 기준치에 비해 약 33배정도 높게 나타났다. 중금속의 오염도를 측정한 결과 Pb, As등은 전 지점에서 하천수 수질기준인 0.05 mg/l 이하로 나타났으며, Cr⁶⁺, CN, Cd, PCB 등은 검출되지 않았다.

2. EROD 활성 및 세포독성

하천수 시료의 EROD 활성을 측정된 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 모든 지점에서 대조군(0.1% DMSO군)에 비해 p<0.01로 유의하게 증가하였다. EROD 활성 측정값을 양성 대조물질인 10⁻⁶M의 3-MC와의 상대 비교한 결과 5개 지점(M1, M2, M3, M4

Table 1. Water quality of Wonchun up-stream in November, 1999

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
pH	9.0	7.9	7.8	7.6	7.6	7.5
Temp.(°C)	15.2	14.8	12.2	14.3	14.7	18.7
SS(mg/l)	28.0	6.8	166.7	20.0	191.3	50.0
DO(mg/l)	14.8	14.4	13.8	6.4	10.7	6.1
BOD(mg/l)	15.7	3.9	4.2	13.1	9.3	31.5
COD _{Mn} (mg/l)	24.3	7.8	18.8	12.4	14.3	82.2
COD _{Cr} (mg/l)	49.0	17.0	67.0	47.3	48.7	180.0
ABS(mg/l)	0.078	0.078	0.118	0.152	0.269	1.666
As(mg/l)	0.001	0.001	0.019	0.002	0.018	0.004
Pb(mg/l)	n.d.*	n.d.	0.018	0.006	0.017	0.007
Cr ⁶⁺ (mg/l)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CN(mg/l)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cd(mg/l)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PCB(mg/l)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*n.d. = not detected.

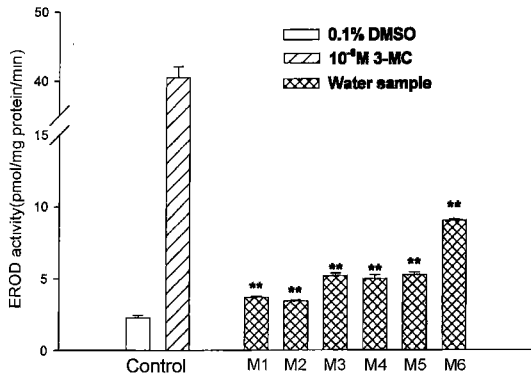


Fig. 2. EROD activity in H4IIE cells grown in 24-well plates after 48 hrs incubation with Wonchun up-stream water samples in MEM with 5% FBS. Control wells were incubated with 0.1%(v/v) DMSO only. Each point represents the mean and standard deviation of three measurements. Values are significantly different from the control at **p<0.01.

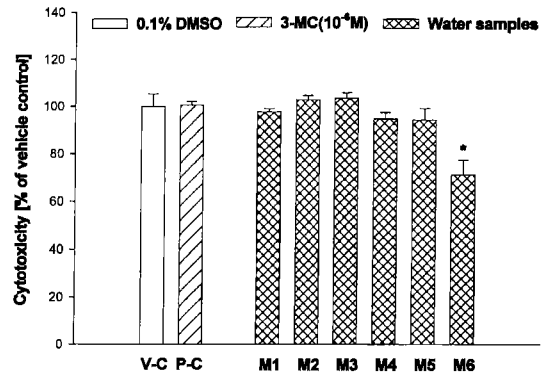


Fig. 3. Cytotoxicity in H4IIE cells grown in 24-well plates after 48 hrs incubation with Wonchun up-stream water samples in MEM with 5% FBS. Control wells were incubated with 0.1%(v/v) DMSO only. Each point represents the mean and standard deviation of three measurements. Values are significantly different from the control at *p<0.05. V-C: Vehicle control, P-C: Positive control.

Table 2. MIR and MEQ of the Wonchun up-stream water compared with 10⁻⁶M 3-MC in November, 1999

Periods Groups	MIR*(%)	MEQ*(ng/l)
M1	6.83 ± 0.15	6.03 ± 0.13
M2	6.15 ± 0.14	5.75 ± 0.13
M3	10.67 ± 0.33	7.94 ± 0.24
M4	10.04 ± 0.59	7.59 ± 0.44
M5	10.80 ± 0.37	7.94 ± 0.27
M6	20.36 ± 0.22	30.20 ± 0.33

Values represent mean ± Standard deviation of triplicate experiments.

*MIR : Maximum induction response.

#MEQ : 3-MC equivalent concentration.

및 M5)에서는 6.15 ± 0.14%에서 10.08 ± 0.37%로 그 오염정도가 비슷하게 나타났으나, M6지점의 경우에는 20.36 ± 0.22%로 EROD활성이 다른 지점에 비해 매우 높게 나타났으며(Table 2), 세포독성이 유의하게 높게 나타났다(Fig 3). M6지점에서 EROD값 및 세포독성이 높게 측정되는 것으로 보아 이미 원천천 상류에서부터 생활오수 및 공장 폐수로 인한 오염이 심각해지고 있는 것으로 판단되었다.

EROD활성을 정량적으로 평가하기 위해 양성 대조물질인 10⁻⁶M의 3-MC와의 상대적 비교값인 MEQ(3-MC equivalent concentration)를 산정한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 5.75 ± 0.13에서부터 30.20 ± 0.33 ng-MEQ/l 농도의 EROD 활성 물질에 의해 오염되어 있는 것으로 나타났다.

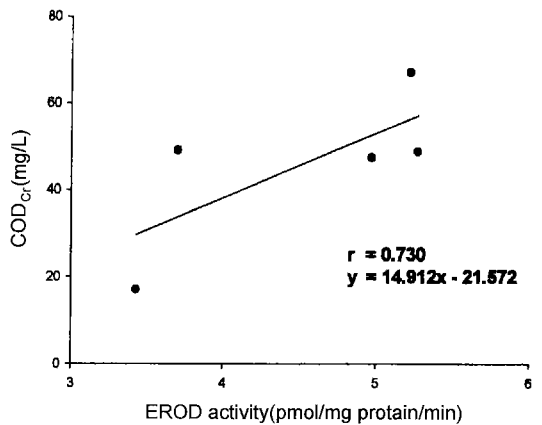
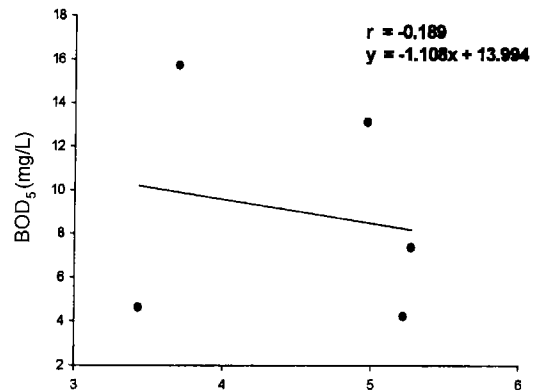


Fig. 4. Correlation between EROD activity and BOD₅, COD_{Cr} of Wonchun up-stream water.

3. BOD, COD와 EROD 활성과의 상관성

원천천 6개 지역 시료 중 다른 지점에 비해 측정치가 매우 높은 M6지점의 값을 제외한 시료들을 대상으로 BOD₅ 및 COD_{Cr}과 EROD활성 측정값을 비교하여 상관성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 BOD₅값과 EROD측정값의 상관계수(r)는 -0.189이고 COD_{Cr}값과 EROD측정값의 상관계수는 0.730으로 나타나 EROD활성값이 수중의 생물학적으로 분해되는 물질의 양보다는 화학적으로 분해되는 물질의 양과 상관성이 더 높음을 알 수 있었다. 이는 일반적으로 EROD활성은 PAH류와 같은 생물학적으로 분해가 어려운 난분해성 물질에 의해 유도되기 때문에 판단된다. 원천천 상류지점의 상부와 하부시료채취지점에 대한 EROD 활성 및 세포독성을 비교하였을 때 대체적으로 하부시료채취지점으로 갈수록 그 값들이 증가하였다. 따라서 원천천 상류지역의 상부에서부터 하부시료채취지점까지 점차적으로 난분해성 물질에 의한 오염이 심화되고 있음을 알 수 있었다. 또한 EROD 활성을 유도하는 물질은 대부분 공장폐수의 유입에 기인하므로 상류지역에 위치한 공장 등에서 방출되는 미처리된 난분해성 물질로 인하여 하천수가 오염되었음을 추정할 수 있었다.

IV. 결 론

1999년 11월에 경기도 수원시에 위치한 도시하천인 원천천 상류 6개 지점에서 하천수를 채취하여 BOD, COD 등 이화학적 분석법과 CYP1A 효소 유도를 측정하는 EROD-microbioassay 및 세포독성 측정법을 이용하여 하천 오염도를 종합적으로 분석하였다. 이화학적 분석결과 대부분의 지점에서 하천의 생활환경기준치를 초과하였으며 EROD활성을 정량적으로 평가하기 위해 양성 대조물질인 10⁻⁶M의 3-MC와의 상대적 비교값인 MEQ(3-MC equivalent concentration)를 산정한 결과 5.75±0.13에서부터 30.20±0.33 ng-MEQ/l 농도의 EROD 활성 물질에 의해 오염되어 있는 것으로 나타났다. 따라서 원천천 상류지역 주변에 위치한 공장 및 주거지역으로부터 유입되는 생활하수 및 공장폐수로 인하여 상류수질이 오염되어 있는 것으로 나타났다. BOD₅ 및 COD_{Cr}과 EROD활성 측정값의 상관성을 조사한 결과 BOD₅값과 EROD측정값의 상관계수(r)는 -0.189이고 COD_{Cr}값과 EROD측정값의 상관계수는 0.730으로 나타나 EROD 활성값이 화학적으로 분해되는 물질의 양과 상관성이 더 높음을 알 수 있었다. 원

천천 상류지점의 상부와 하부시료채취지점에 대한 EROD 활성 및 세포독성을 비교하였을 때 하부시료채취지점으로 갈수록 그 값이 증가하였다. 이로 보아 원천천 상류지역에서부터 이미 난분해성 물질에 의한 오염이 심화되고 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

- 1) Haux, C and Forlin, L.: Biochemical methods for detecting effects of contaminants on Fish. *Ambio*, **17**, 376-380, 1988.
- 2) Dubois M., Plaisance H., Thome J. P., and Kremers P.: Hierarchical clusteranalysis of environmental pollutants through P450 induction in cultured hepatic cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **34**, 205-215, 1996.
- 3) Kosmala A., Migeon B., Flammarion P., and Garric J.: Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using the fish biomarker ethoxy-resorufin-O-deethylase : field and on-site experiments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **41**, 19-28, 1998.
- 4) Fenet H., Casellas C., and Bontoux J.: Laboratory and field-caging studies on hepatic enzymatic activities in European eel and rainbow trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **40**, 137-143, 1998.
- 5) Ham K. D., Adams S. M., and Peterson M. J.: Application of multiplebioindicator to differentiate spatial and temporal variability from the effects of contaminant exposure on fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **37**, 53-61, 1997.
- 6) Hodson P. V., Efler S., Wilson J. Y., El-Sharrawi A., Maj M., and Williams T. G.: Measuring the potency of pulp mill effluents for induction of hepatic mixed-function oxygenase activity in fish. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **49**, 83-110, 1996.
- 7) Rice C. D., and Roszell L. E.: Tributyltin modulates 3,3',4,4',5-pentachloro-biphenyl(PCB-126)-induced hepatic CYP1A activity in channel catfish, *ictalurus punctatus*. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **55**, 197-212, 1998.
- 8) Andersson T. and Forlin L.: Many of the Features of Xenobiotic Metabolism in Fish Appear to Be Qualitatively Similarly to the Better Known Systems in Mammals. *Biochemical pharmacology*, **34**(9), 1407-1413, 1985.
- 9) SPHA-AWWA-WPCF: Standard method for the examination of water and wastewater, 15th. Ed, 1981.
- 10) 환경부 : 수질오염공정시험법, 1999.
- 11) Drenth H. J., Bouwman C. A., Seinen W., and Van den Berg M.: Effects of some persistent halogenated environmental contaminants on aromatase (CYP19) activity in the human choriocarcinoma cell line JEG-3. *Toxicology and applied pharmacology.*, **148**, 50-55, 1998.
- 12) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.