

*Nitrobacter*를 이용한 有機化學物質의 毒性試驗

機器分析科

崔晉澤 · 襄基哲

Toxicity test of organic chemicals using *nitrobacter*

Department of Instrumental Analysis

J. T. Choi, K. C. Bae

Abstracts

Concern for the effects of toxic chemicals on the environment leads the search for better bioassay test organisms and simpler test procedures. *Nitrobacter* was good for the test organism. Using the serum bottle technique, we were determined 50% inhibition concentration(IC_{50}) and research correlation with IC_{50} and quantitative structure activity relationship parameters.

The results could be summarized as follows,

1. *Nitrobacter* was used usefully as a test organism in the toxicity bioassay.
2. The serum bottle technique is an effective, simple method for determining the IC_{50} of chemicals.
3. Among the 28 toxicants, 2, 4, 6-trichlorophenol was the most effected the *nitrobacter* by serum bottle. Among the pesticides(13 toxicants), fenitrothion was the most.
4. Nonphenolic toxicants have high correlation with LogP QSAR and LogS QSAR. But volatile phenolic toxicants have high correaltion with LogP QSAR only.
5. The solvatochromic parameter QSAR and the molecular connectivity indexes QSAR correaltates well with all toxicants and is free from a collinearity problem.

I. 緒 論

새로운 化學物質의 增加는 現代의 産業化, 工業化에 많은 發展을 가져온 반면 이들 物質이 多様한 經路를 통해 排出됨으로 인하여 環境汚染問題는 더욱 深刻化되고 있다.

만일 水系中에 毒性物質이 投入되어 存在시 그들이 水系 微生物에 미치는 影響은 至大하다고 생각되며 이들이 미치는 毒性을 正確히 아는 것이 重要하다. 微生物을 利用하는 方法으로 發光 Bacteria인 *Photobacterium Phosphoreum* 세포에 化學物質이 影響을 주는 것을 公試驗과 比較하여 50% 螢光이 妨害될 때의 濃度인 EC_{50} (Estimated Chemical Concentrations)을 구하는 Microtox™ Test가 外國에서 活潑히 進行中이며 이것 외에 *Nitrosomonas*와 *Nitrobacter*가 많이 利用되어 왔는데 이것 중 *Nitrobacter*가 모든 毒性物에 대해 敏感度가 크고 毒性試驗시 除去된 아질산의 定量만 하면 되는 잇점이 있으며 Batch實驗이 可能하여 試驗微生物로 適當하다. 따라서 試料내 *Nitrobacter*의 生物學的 活動度가 毒性物質에 의해 50% 妨害 받을 때의 濃度인 IC_{50} (Inhibition Concentration) 값을 알아보고 이들 값들과 聯關이 있는 物理化學的 要素와의 相關關係를 回歸分析 技法 중의 하나인 QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship)로써 比較해 보 고자 한다.

有毒物質이 大量으로 流出시 水系存在 自營微生物에 그 影響이 클 것이므로 IC_{50} 값으로 각 有毒物質이 어느 정도 이상까지에서 深刻한 沮害를 주는지 間接的으로 알 수가 있으며 *Nitrobacter*가 받는 毒性物質의 沮害정도를 把握함으로써 産業場 毒性廢水 制御過程에 이 試驗法 利用을 增進할 수도 있으며 차후 下水處理場 高度處理시 탈질제거 微生物인 *Nitrobacter*의 圓滑한 管理側面에서도 도움이 될 것이라고 생각한다.

II. 材料 및 方法

2.1 實驗物質

최근 우리나라에 많이 問題시 되었던 Benzene, Phenol 등의 揮發性 汚染物質과 유기인계, 유기염소계농약 등 아래와 같이 총 28가지의 毒性物質을 試驗對象으로 選擇하였으며 Table 1과 같다.

Table 1. List of Toxicants

Toxicants	分子式	區 分		EPA Priority pollutants
Benzene	C ₆ H ₆	방향족 탄화수소류	비페놀계	○
Toluene	C ₇ H ₈	◇	◇	○
Xylene	C ₈ H ₁₀	◇	◇	
Ethyl Benzene	C ₈ H ₁₀	◇	◇	○
1, 4-Dichlorobenzene	C ₆ H ₄ Cl ₂	◇	◇	○
Dichloromethane	CH ₂ Cl ₂	지방족 탄화수소류	◇	○
TCE	C ₂ HCl ₃	◇	◇	○
PCE	C ₂ Cl ₄	◇	◇	○
Cyclohexane	C ₆ H ₁₂	◇	◇	
Methanol	CH ₃ O	알콜류	◇	
Phenol	C ₆ H ₅ O	염소계 페놀류	페놀계	○
m-Cresol	C ₇ H ₈ O	◇	◇	
2-Chlorophenol	C ₆ H ₄ ClO	◇	◇	○
2, 4-Dichlorophenol	C ₆ H ₃ Cl ₂ O	◇	◇	○
2, 4, 6-Trichlorophenol	C ₆ H ₂ Cl ₃ O	◇	◇	○
DEP	C ₈ H ₈ Cl ₂ O ₂ P	유기인계 농약	농약류	
DDVP	C ₈ H ₈ Cl ₂ O ₂ P	◇	◇	
Dimethoate	C ₅ H ₁₀ NO ₂ PS ₂	◇	◇	
Diazinone	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂ PS	◇	◇	
MEP	C ₉ H ₁₀ NO ₂ PS	◇	◇	
Chloropyrifos	C ₈ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂ PS	◇	◇	
Parathion	C ₁₀ H ₁₄ NO ₂ PS	◇	◇	
PAP	C ₁₇ H ₁₇ O ₄ PS ₂	◇	◇	
Methidathione	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₄ PS ₂	◇	◇	
EPN	C ₁₀ H ₁₁ NO ₂ PS	◇	◇	
Captan	C ₁₅ H ₈ CLNO ₂ S	유기염소계 농약	◇	
Captafol	C ₁₅ H ₈ CL ₂ NO ₂ S	◇	◇	
Dicofol	C ₁₇ H ₈ Cl ₂ O	◇	◇	

2.2 實驗方法

2.2.1 *Nitrobacter*培養

본 實驗에 앞서 *Nitrobacter*를 풍부하게 培養하기 위해 20ℓ 반응조 3개에 각각 4ℓ의 下水處理場 暴氣槽의 슬러지(MLVSS 1895mg/ℓ)를 Molecular Sieve NO 115(0.125mm)로 微細하게 걸러 다음 매일 기질로써 NaNO₂와 KNO₃를, 炭素供給과 Buffer로써 NH₄HCO₃와 NaHCO₃를, 그 외 比有機物을 供給한다. 反應槽내 NO₂ 농도를 30mg/ℓ로 調整하고 每日 일정한 시간에 폭기를 잠시 중단하여 5분 정지 후 상등액 200mℓ를 빼낸 다음 감소된 NO₂와 물을 보충하였다.

2.2.2 *Nitrobacter*確認 試驗

광학현미경과 전자현미경으로 확인함.

2.2.3 Serum Bottle 實驗 및 IC₅₀ 算定

SB裝置는 아래 Fig.1와 같으며

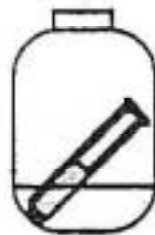


Fig 1. Apparatus of serum bottle.

125mℓ SB내에 초기 NO₂ 濃도가 30mg/ℓ인 試料 25mℓ를 넣고 SB내의 CO₂吸收를 위해 Cap Tube에 4% NaOH 3mℓ를 넣은 후 여지를 집어 넣어 吸着 表面積을 增加 시킨다.

酸素로 충전 시킨 후 병을 Teflon마개로 密封한 뒤 毒性物質을 5~95% 妨害받도록 넓은 範圍내에서 選擇한 후 μℓ범위로 注入한다(동상 30~40mℓ의 酸素가 Control試料로 消費된다). 平均 25℃ 室溫에서 분당 100의 振動비로 Shaker한 뒤 각 병안의 試料를 24시간 경과 후 殘存 NO₂를 測定하여 消耗된 NO₂를 計算한다. Control용을 包含하여 한가지 毒性物 當 9개의 SB병을 5회 反復實驗하여 平均 毒性妨害 %를 구한다. 毒性妨害%는 $(1 - C_1/C_2) \times 100$ 으로 구하는데 C₁은 試料에서의 NO₂ 平均 消費量(mg/ℓ)이고, C₂는 Control용에서의 NO₂ 平均 消費量(mg/ℓ)이다.

2.2.4 QSAR分析 및 檢證

IC₅₀ 값을 구한 뒤 毒性物質의 이온화상수, 헨리상수가 보정된 IC₅₀ 값인 Measured IC₅₀(log mM/L)을 QSAR(Quantitative Structure Activity Relationship) 分析에 利用한다. QSAR와 IC₅₀ 값에 關聯이 있는 다음과 같은 變數들의 相關關係를 알아 본다.

즉 옥타놀-물 分配係數(log P), 溶解度(log S), 物質의 分子부피와 關聯되는 Solvatochromic parameter, 物質의 分子構造成分과 關聯있는 Molecular connectivity indexes 등이다.

QSAR는 Computer를 利用한 複合回歸分析을 反復한다. 毒性物質 全部와 各各分類別로 測定한 Measured IC₅₀ 값 對 豫상 IC₅₀ 값을 比較해 봄으로써 서로의 相關關係를 도출 할 수 있다. QSAR식은 確證할 必要가 있으며 그 方法중의 하나가 data points를 20%정도 없애는 것이다. 이렇게 하여 남아있는 data points로써 새로운 相關關係式을 만든다. 이 새로운 相關關係式에서 除去된 특성물질의 IC₅₀ 값을 豫想할 수 있다. 만일 이 豫想값이 95% 信賴度안에 들면 원래 相關關係式은 確實한 것이다.

III. 結果 및 考察

3.1 *Nitrobacter* 確證

*Nitrobacter*를 Gram염색법에 의하여 광학현미경으로 確證한 결과 Gram 음성 간균을 볼 수 있었으며 전자현미경으로도 確證할 수 있었으며 Fig2와 같다.



Fig 2. Identification of *Nitrobacter* from TEM.($\times 50,000$)

3.2 IC₅₀ 決定

Control용을 포함하여 1개 毒性物 당 9개의 SB를 5회 反復實驗하여 평균IC₅₀ 값을 구한 결과 방해%는 m-Cresol 경우 Fig.3에 나와 있다.

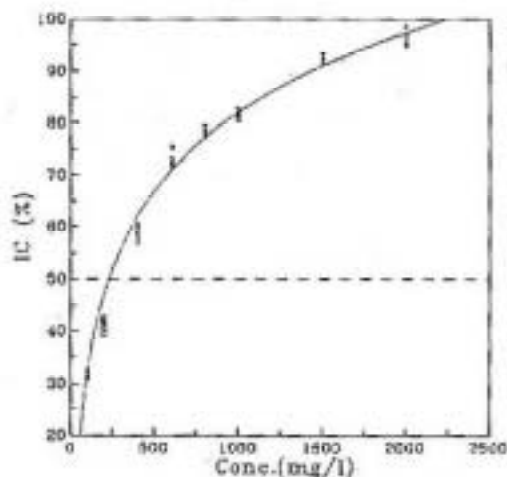


Fig 3. IC Results of m-Cresol.

위의 같은 방법으로 28개 毒性物質의 IC₅₀을 구하였으며, 液狀에 남아있는 毒性物이 生物學的活動度에 妨害를 일으키는 것을 알아보는 液狀IC₅₀을 구한다. 즉 $IC_{50,liq} = (1/(H(V_g/V_l) + 1)) \times IC_{50}$ 여기서 IC_{50,liq}은 液狀에서 毒性物의 IC₅₀(mg/l), H는 헨리상수, V_g, V_l은 SB내의 가스상, 액상의 부피로써 각각 117ml, 25ml이었다. 그리고 農藥類들의 H값은 무시할 정도로 낮아 IC₅₀ 값이 곧 IC_{50,liq}값이다.

각 毒性物質의 헨리상수(logH)와 이온화 상수(pka), 분자량(MW)과 독성들의 비이온화된 IC₅₀ 값이 Table 2에 나와 있는데 이것이 QSAR에 이용된다.

Table 2. Toxicity data

Toxicants	Ob. IC ₅₀ (mg/l)	Final PH	H	Co.for H IC ₅₀ (mg/l)	pka	Co.for H&pka IC ₅₀ (mg/l)	MW	Me.IC ₅₀ (logmM/l)
Benzene	1341	7.5	0.224	655	-	655	78	0.92
Toluene	382	7.6	0.263	171	-	171	77	0.35
Xylene	315	7.5	0.355	117	-	118	76	0.19

Ethyl Benzene	324	7.8	0.316	131	-	131	106	0.09
1, 4-Dichlorobenzene	83	7.7	0.111	55	-	55	147	-0.43
Dichloromethane	2668	7.8	0.302	1105	-	1105	85	1.11
TCE	842	7.7	0.977	151	-	151	131	0.06
PCE	248	7.8	0.039	210	-	210	169	0.09
Cyclohexane	920	7.8	6.310	30	-	30	86	-0.46
Methanol	65120	7.5	0.0002	65059	-	65059	32	3.31
Phenol	243	7.7	0.0001	243	9.99	242	94	0.41
m-Cresol	241	7.7	0.0004	241	10.1	240	108	0.35
2-Chlorophenol	182	7.8	0.0003	182	8.60	157	128	0.09
2, 4-Dichlorophenol	8	7.7	0	8	7.80	4	163	-1.61
2, 4, 6-Trichlorophenol	79	7.7	0	79	6.23	3	197	-1.82
DEP	168	7.8	0	168	-	168	256	-0.18
DDVP	81	7.9	0	81	-	81	220	-0.43
Dimethoate	85	7.9	0	85	-	85	229	-0.43
Diazinone	86	8.0	0	86	-	86	304	-0.55
MEP	4	7.8	0	4	-	4	277	-1.84
Chloropyrifos	27	8.0	0	27	-	27	345	-1.11
Parathion	8	8.0	0	8	-	8	291	-1.56
PAP	72	7.8	0	72	-	72	320	-0.65
Methidathione	25	8.0	0	25	-	25	323	-1.11
EPN	25	8.0	0	25	-	25	323	-1.11
Captan	2160	8.0	0	2160	-	2160	298	0.86
Captafol	1153	8.0	0	1153	-	1153	345	0.52
Dicofol	46	7.8	0	46	-	46	368	-0.09

여기서 Measured IC₅₀ 값을 比較시 試驗 毒物物質 중 비페놀계에서는 1, 4-Dichlorobenzene(55 mg/l), Cyclohexane(30mg/l)이 값이 낮고 페놀계에서는 2, 4-Dichlorophenol(4mg/l), 2, 4, 6-Trichlorophenol(3mg/l), 농약류에서는 Parathion(55mg/l)과 MEP(Fenitrothion)가 4mg/l로써 낮은 값을 나타내며 전체적으로는 2, 4, 6-Trichlorophenol(3mg/l)이 가장 낮은 수치를 보여 *Nitrobacte*이 제일 큰 影響을 끼치는 것으로 나타났다.

3.3 QSAR이용 相關關係 確認

QSAR Parameter와 옥타놀-물 분배계수(logP), 용해도(logS), Solvatochromic Parameters, Molecular connectivity indexes와의 관계를 확인할 시

○ logP

28가지 독성물질의 Measured IC_{50} 대 logP와의 相關關係를 확인한 結果 $\log IC_{50} = 1.016 - 0.489 \log P$ ($n=28$, $r=0.58$, $r^2=0.33$, $SE=0.89$)이었으며 비페놀계와 페놀계를 각각 分類하여 關係를 보았을 시 $\log IC_{50} = 2.634 - 0.960 \log P$ ($n=10$, $r=0.97$, $r^2=0.94$, $SE=0.29$), $\log IC_{50} = 2.543 - 2.173 \log P$ ($n=5$, $r=0.94$, $r^2=0.88$, $SE=0.45$)로 아주 높은 相關關係를 나타내는 것을 알 수 있었다. 農藥類 전체(13종)에 關한 關係는 $r=0.36$ 으로 비교적 낮았으며 개개로 분류할 시 유기인계(10종)는 $r=0.65$, 유기염소계(3종)는 $r=0.75$ 로 나타났다.

$\log IC_{50}$ 대 logP와의 식에서 logP값이 增加할수록 $\log IC_{50}$ 값은 減少함을 알 수 있으며 이는 곧 毒性物質의 옥타놀-물 분배계수 값이 增加할수록 毒性도 增加한다는 의미가 된다.

○ logS

logS와 相關關係가 잘맞는 毒性物質은 logS와도 높은 相關關係를 가질 것이다. 毒性物質 전체와의 有關係는 $\log IC_{50} = 0.936 + 0.371 \log S$ ($n=23$, $r=0.62$, $r^2=0.38$, $SE=0.87$)이었고, 비페놀계는 $n=10$, $r=0.97$, $r^2=0.95$, $SE=0.26$, $\log IC_{50} = 1.982 + 0.724 \log S$ 로 높은 相關關係를 띠고 있었으며 페놀계의 logS값은 매우 낮아 이용하기가 곤란하였다. 農약류 또한 logS값이 매우 낮아 상관관계(關係)가 아주 낮았다.

$\log IC_{50}$ 대 logS와의 關係式에서 logS값이 減少할수록 $\log IC_{50}$ 값도 減少한다. 즉 毒性物質의 溶解度 값이 작을 수록 毒性이 增加한다.

○ Solvatochromic Parameters

15개 페놀류, 비페놀류의 相關關係는 $\log IC_{50} = 2.962 - 4.88V_d/100 + 4.38\beta_n - 2.03\alpha_n$ ($n=15$, $r=0.96$, $r^2=0.93$, $SE=0.33$)이었다.

○ Molecular connectivity indexes

15개 페놀류, 비페놀류의 相關關係는 $\log IC_{50} = 4.16 - 0.84^*x' - 3.08(^3\chi_c - ^3\chi_c')$ ($n=15$, $r=0.93$, $r^2=0.86$, $SE=0.46$)이었다. 비페놀계 중 벤젠류는 $\log IC_{50} = 3.1 - 0.57^*x'$ ($n=5$, $r=0.98$, $r^2=0.96$, $SE=0.12$), 지방족 탄화수소류는 $\log IC_{50} = 2.25 - 0.75^*x'$ ($n=4$, $r=0.92$, $r^2=0.86$, $SE=0.31$) 페놀류는 $\log IC_{50} = 4.71 - 2.37^*x'$ ($n=5$, $r=0.92$, $r^2=0.84$, $SE=0.51$)로 아주 높은 相關關係를 나타내었다.

3.4 檢證

QSAR식은 確認할 필요가 있다. 確認하는 方法中의 하나가 data points의 20% 정도를 없애는 것이며 이렇게 하여 남아 있는 data points로써 새로운 相關關係식을 만들시 이 豫想置가 95% 信賴度 안에 들었다.

IV. 結 論

*Nitrobacter*를 利用하여 28개 毒性物質을 Serum Bottle 법으로 實驗한 후 이에 關聯되는 物理, 化學的 要素와의 相關性을 QSAR로 살펴 보았을 시 다음과 같은 結論을 얻을 수 있었다.

- (1) 毒性 實驗微生物로 *Nitrobacter*가 有用하게 利用되었다.
- (2) Serum Bottle Technique는 毒性物質의 IC_{50} 값을 決定하는데 効果的이고 簡單한 方法이다.
- (3) Serum Bottle Technique 方法으로 28개 毒性物質의 IC_{50} 값을 구한 結果 試驗物質 중 2, 4, 6-Trichlorophenol이 가장 *Nitrobacter*에 큰 影響을 미치며 農藥類 중에서는 MEP(Fenitrothion)가 우선순위 이었다.
- (4) *Nitrobacter* 實驗시 비례롭게 毒性物質은 LogP QSAR, LogS QSAR와 높은 相關性을 지니며 揮發性이 강한 계능계물질은 LogP QSAR와 높은 相關性을 나타낸다.
- (5) Solvatochromic Parameters QSAR, Molecular connectivity indexes QSAR는 모두 毒性物質과 相關關係가 잘 맞고 Collinearity 문제가 없었다.

V. 參考 文獻

1. Barn, D. and Bliss, P. J.(1983) : Biological control of nitrogen in wastewater treatment. London. New York : 50.
2. Blum, D. J. W.(1989) : Chemical toxicity to environmental bacteria : Quantitative structure activity relationships and interspecies correlations and comparisons. thesis presented to Drexel Univ at Philadelphia. Pa.
3. Chiou,et al.,(1977) : Partition coefficient abd bioaccumulation of selected organic chemicals. Envir. Sci and Technol(5).
4. Dawning, A. L., Painter, H. A. and Knowles, G.(1964) : Nitrification in the activated sludge

- process. J. Inst. Sew. Purif. Partz : 130.
5. Dearden(1985) : Partitioning and lipophilicity in quantitative structure activity relationships. *Envir. Health perspectives*.61 : 203-228.
 6. Nimalakhandan(1988) : CONEX computer software. Civil and environmental engineering. Vanderbilt Univ. Nashville. Tenn.
 7. OECD(1984) : Guideline for testin of chemicals : Activated sludge, respiration inhibition test. OECD. Paries. France.
 8. OECD(1987) : The use of biological test for water pollution assessment and control. *Envir. monographs*. No.11.OECD. Paries. France.
 9. Tang, N. H., Blum, D.J.W. and Speece, R. E.(1990) : Comparison of serum toxicity test with OECD method. *J. Envir. Engi.* Vol.116. No.6 : 1076-1084.
 10. Tang, N. H., Blum, D.J.W., Nirmalakhandan, N. and Speece, R. E.(1992) : QSAR parameter for toxicity of organic chemicals to nitrobacter. *J. Envir. Engi.* Vol. 118. No.1 : 17-37.
 11. 김장원 · 윤태일(1990) : 환경미생물학. 동화기술 : 174.
 12. 이석근(1992) : priority pollutants 분석법 연구(3차). 한국화학연구소 : 1.
 13. 최의소(1994) : 하수처리장으로부터의 질소제거. 부산수산대 환경문제연구소. 낙동강 맑은 물 관리기술에 관한 세미나 : 85.
 14. 최병기(1989) : 화학물질의 유해성 심사기준 및 방법에 관한 연구. 한국환경독심학회.