

## 산업폐수처리장 방류수의 내분비계 장애작용 평가

오승민, 김기서, 유병택, 장형석, 이희성<sup>1</sup>, 정규혁\*

성균관대학교 약학대학, <sup>1</sup>식품의약품 안전청

### Endocrine Disrupting Effects of the Industrial Wastewater Effluents Discharged from the Treatment Plant

Seung-Min Oh, Gi-Suh Kim, Byung Taek Ryu, Hyung Seog Jang,  
Hee-Sung Lee<sup>1</sup> and Kyu-Hyuck Chung\*

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, #300, Chunchundong, Jangan-Gu, Suwon,  
Gyeonggi-do, 440-746, Korea

<sup>1</sup>Korea Food & Drug Administration, #5, Nokbun-dong Eunpyung-Gu, Seoul, Korea

#### ABSTRACT

This study was designed to investigate potential endocrine disrupting effects of several industrial wastewater effluents discharged from cosmetic, plaiting, paint, textile industry using EROD bioassay and E-Screen assay. The results of E-screen assay showed that textile industrial wastewater could act as a full agonist and cosmetics and plaiting industrial wastewater could act as a partial agonist. On the contrary, the wastewater discharged from paint industry did not show any estrogenic effect. Estrogenic activity in the effluents of cosmetic and paint industrial wastewater was lower than that in the influents indicating that the wastewater treatment process minimized the effects of discharges on water quality. Despite of these results, it was recognized that wastewater treatment was not always minimize toxic impact. In this study, increased estrogenic effect was observed in the effluents of plating and textile wastewater, and EROD activity was increased in the effluents of cosmetic and plating wastewater.

**Key words :** endocrine disrupting effects, industrial wastewater effluents, EROD bioassay, E-Screen assay

#### 서 론

산업 활동으로 인하여 의도하지 않은 부산물의 발생량이 증가하고 있으며 인간 및 생태계에 심각한 영향을 초래하게 되었다. 이에 따라 산업체에서 발생하는 부산물의 환경영향을 저감하기 위해 오

염배출량의 양적인 규제를 시도함으로써 외견상의 환경개선 등의 가시적인 효과가 거두어지고 있다. 그러나 미량이라도 생태계에서 축적성이 있는 물질의 경우 생태계에 잔류 축적되어 인체 및 생태계에 영향을 미치는 것이 알려지면서 특히 내분비계 장애물질에 비롯한 난분해성 유기오염물질(Persistent Organic Pollutants : POPs)에 대해 많은 관심이 기울여지게 되었다. 이들 물질은 환경 중에서 매우 안정하여 광화학적·생물학적 분해가 쉽지 않은

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-31-290-7714, E-mail: khchung@skku.edu

물질로 먹이연쇄를 통해 동식물의 생물농축 폐해 발생 우려가 있으므로 이에 대한 적절한 조사 및 체계적인 관리대책의 수립이 요구되고 있다.

산업폐수는 대표적 점오염원(Point source)으로서 산업체의 종류에 따라 다종다양한 유해물질이 함유되어 수계로 배출될 수 있다. 폐수처리의 목적은 폐수 중에 함유된 오염물질을 분리 및 분해시켜 안정화시키거나 무해물질로 전환시켜 폐수가 하천 등의 자연환경을 오염시키지 않도록 처리하는데 있다. 그러나 산업폐수의 처리는 수질환경기준에 적합한 방류수의 배출을 전제로 하고 있으므로 생물학적으로 잘 분해되지 않는 미량의 난분해성물질이 처리과정을 거쳐 하천에 방류되어질 가능성이 있게 된다.

본 연구에서는 화장품, 도금, 페인트 및 섬유업체의 산업폐수에 대하여 1차로 자체적인 폐수처리 후 지천 또는 하수관을 통해 하수종말처리장까지 흘러가는 방류수 중에 함유될 우려가 있는 난분해성물질의 독성영향을 분석하였다. 유해물질을 검출하기 위한 분석화학적 방법은 방류수 중에 존재하는 유기 및 무기 오염물질을 검출하고 확인할 수 있는 유용한 방법으로써 이들에 대한 다양한 자료는 얻을 수 있으나 독성영향 등 생물학적인 해석에는 한계가 있다. 이에 반해 생물학적 반응성을 근거로 환경시료를 분석하는 바이오평가기법은 오염물질의 종류와 노출량 및 그 독성효과를 파악하는데 매우 유용한 기술로 알려져 있다(Haux *et al.*, 1988; Peakall *et al.*, 1994). 대체로 이 방법은 배양된 세포를 이용하여 세포 또는 분자수준의 biomarker를 측정하게 되며 유해물질에 의해 영향이 나타나는 각 단계 중에서 세포의 방어기전이 활발해지는 stressed stage에서 해독기능을 가진 효소의 유도를 이용하는 것으로, 이는 병리적인 반응이 나타나기 전에 감지하여 조치를 취할 수 있는 예방적인 의미가 있는 유용한 방법으로 이용되고 있다. 이들 방법의 장점은 환경오염으로 인하여 생물체에서 나타나는 각종 반응 가운데 분자수준의 생화학적 변화를 감지하여 정량화함으로써 환경오염의 영향을 민감하고 조기에 파악할 수 있다.

발암성 및 변이원성 물질을 검출하기 위한 *in vitro* 시험법 중 Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 방법은 세포내에서 호흡의 촉매작용을 하는 물질, 특히 외인성 물질의 약물대사에 관여하는 효

소인 Cytochrome P450 (CYP)의 생성량 증가를 유도하는 작용기전이 있다는 점을 이용하여 이를 biomarker로 하여 환경시료 중 유해물질의 정량적 평가에 사용할 수 있다(Thomas, 1990; Dubois *et al.*, 1996; David, 1998; Braunbeck, 1998). 내분비계 장애 물질 검색법으로는 독성발현기전을 근거로 하여 최근 다양한 시험법이 소개되고 있다(Soto *et al.*, 1995; Nagel *et al.*, 1997; Zacharewski, 1998). 이중 E-screen assay 방법은 내분비계 장애물질이 세포내로 들어와 핵내에 존재하고 있는 Estrogen Receptor (ER)에 결합하게 되면 DNA의 Estrogen Responsive Element (ERE)와의 반응성에 의해 mRNA 발현을 유도함으로써 세포증식이 일어나게 되는 원리를 이용한 방법이다(Zacharewski, 1997).

본 연구에서는 경인지역에 소재하는 화장품, 도금, 페인트 및 섬유업체의 산업체를 대상으로 이들 업체에서 발생하는 산업폐수의 처리장 방류수와 유입수를 채취하여 세포독성시험, EROD-microbioassay 및 E-screen assay에 의해 독성영향을 분석하였다.

## 실험 방법

### 1. 시료채취

산업폐수는 업종별로 사용되는 화학물질과 제조 특성에 따라 부산물로서 다양한 성상으로 발생하게 된다. 본 연구에서는 발생되며 경인지역에 소재하는 화장품, 도금, 페인트 및 섬유업체의 산업체를 대상으로 2001년 1월부터 4월까지 배출된 폐수의 화학적 및 물리적 방법 등의 처리공정을 거친 방류수를 채취하여 갈색 시료 채취병(4L)을 이용하여 실험실로 운반하여 4°C 냉장고에 보관하였다. 조사대상 업체의 폐수처리 시설로는 화장품, 페인트 및 섬유업체에서는 화학적 처리 및 생물학적 처리공정에 의해 폐수를 처리하고 있었으며 도금업체에서는 화학적 처리공정만을 운영하고 있었다. 채취한 시료수의 이화학적 수질을 측정된 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 한편 유입수의 독성작용이 폐수처리공정에 의해 저감되는지를 관찰하기 위해 처리공정을 거쳐 방류수에 도달하는 시간을 고려하여 방류수를 채취하기 이전에 유입수를 채

**Table 1.** Water quality of the industrial wastewater effluents

| Type of industry | pH   | BOD   | COD   | SS    | Major raw materials                                                                                                                                                      |
|------------------|------|-------|-------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cosmetic         | 7.17 | 6.17  | 15.06 | 2.46  | Glyceryl monostearate, SE, Lipophilic glyceryl stearate, Cetostearyl alcohol, Mineral oil 2-Octyl-1-dodecanol cetyl octanonate, Isopropyl myristate, 1,3-Butylene glycol |
| Plating          | 8.47 | -     | 68.00 | 26.00 | Ni, Cr, Al, Ti, W, Zn, Sn, Cu, CN, Sulfuric acid, n-Hexane                                                                                                               |
| Paint            | 7.00 | 2.10  | 4.80  |       | Acyllic resin, Alkyl resin, n-Hexane, ABS, TCE, PCE, BTX                                                                                                                 |
| Textile          | 7.00 | 20.00 | 25.00 | 35.00 | Caprolactam, 1,2-Phosphoric acid Ammonium + polyoxyethyl alkyl ether, Dimethyl acetamide                                                                                 |

취하여 유입수와 방류수간의 독성작용의 차이를 비교 분석하였다.

## 2. 시료의 전처리

채집한 시료수는 Oasis@ HLB Plus Cartridge를 사용하여 유효성분을 추출하였다. 먼저 에스트로겐 활성 물질을 추출하기 위해 각 시료를 여과지로 여과한 후 그중 500 mL를 취하여 1N HCl로 pH를 3으로 조정하였다. Cartridge를 vacuum manifold에 장착하고 5" Hg의 압력을 걸어 준 후 cartridge에 5 mL의 methyl tert-butyl ether (MTBE)와 5 mL methanol을 흘려주어 활성화시키고 5 mL 증류수를 흘려 보내 증류수와 cartridge의 평형을 유지시켰다. 산성화된 시료를 활성화된 cartridge에 흘려보내 유효성분을 cartridge에 흡착시킨 후 추출용매 (MTBE)로 추출하고 N<sub>2</sub>가스로 증발 건조시킨 후 100% DMSO 500 µL에 녹여 사용하였다. 다이옥신활성물질의 추출은 시료의 pH를 조정하지 않았으며 dichloromethane (DCM)을 추출용매로 사용하여 에스트로겐 활성물질 추출과정과 동일한 방법으로 유효성분 추출하였다. 공시험의 경우에는 증류수를 이용하여 시료 전처리법과 동일한 방법으로 준비하였다.

## 3. 세포독성

세포독성을 측정하기 위하여 Rainbow trout의 gonad세포인 RTG-2 cell을 사용하였다. 이 세포는 10% Fetal Bovine Serum (FBS)가 포함되어 있는

Minimum Essential Medium (MEM)으로 20°C, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하였다. 세포독성 실험을 위해 세포를 well당 5 × 10<sup>4</sup> cell씩 96-well plate에 분주한 후 24시간 동안 배양한다. 각각의 시료는 5 mL/mL를 최종농도로 하여 단계적으로 희석한 후 각 세포에 72 시간동안 처리하였고 최종적으로 Sulforhodamin B (SRB) assay를 수행하여 세포독성을 측정하였다. SRB assay는 먼저 배양액을 제거하고, PBS로 2번 씻은 후 10% trichloroacetic acid (TCA)를 가하여 4°C에서 30분간 방치하여 세포들을 plate의 바닥면에 고정시켰다. 세포고정이 끝난 후에 plate를 증류수로 5~6회 세척하여 남아있는 TCA 용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 1% 초산 용액에 0.4% SRB용액을 녹인 염색액을 가하여 15분간 세포를 염색한 후, 다시 1% 초산으로 5~6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 과량의 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 cell plate들을 다시 실온에서 건조한 후, 10 mM tris base (pH 10.5) 용액을 가하여 염색액을 용출시켜 microplate reader (Molecular Device, Versa Max, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료에 대한 세포독성효과를 계산하기 위하여, 시료를 가하는 시점에서 세포수 (Tz, zero time)와 시료 대신 과량의 배지만을 가하여 72시간 배양했을 때의 세포수 (C, control) 및 각 농도의 시료를 함께 넣고 72시간 배양했을 때의 세포수 (T, test)를 각각 측정하여 다음의 수식에 따라 세포독성을 측정하였다.

$T_z > T$  인 경우 :  $[(T - T_z) / (C - T_z)] \times 100$

$T_z < T$  인 경우 :  $[(T - T_z) / T_z] \times 100$

위와 같이 계산된 값들을 Sigma-plot 프로그램의 자료회귀방법 (data regression tool)을 이용하여 시료가 암세포의 성장을 50% 억제하는 농도인  $EC_{50}$  (50% effective concentration)을 계산하였으며, 이  $EC_{50}$ 값으로 각 시료의 세포독성강도를 결정하는 parameter로 사용하였다.

#### 4. EROD-microbioassay

EROD 활성 및 세포독성을 측정하기 위하여 표준세포주로 일반적으로 사용되고 있는 H4 II E (rat hepatoma cell)를 사용하였다. 이 세포는 5% Fetal Bovine Serum (FBS)이 포함되어 있는 Minimum Essential Medium (MEM)으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. EROD활성은 ethoxyresorufin이 CYP1A에 의해 resorufin으로 대사되는 성질을 이용하는 방법에 따라 효소활성을 측정하였다 (Gelardi *et al.*, 1996). 배양된 세포를 trypsin으로 처리한 후, 96-well plate에  $2 \times 10^4$  cell/well로 분주한 후 48시간 동안 배양하여 시료를 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후 PBS (phosphate buffered saline)로 2회 세척한 다음 배양액에 5µm dicumarol, 4µm ethoxyresorufin을 첨가하였다. 37°C에서 30분 동안 배양한 후 배양액을 분리하여 530/588 nm에서 형광을 측정하였다. 또한 각 well에서 상층을 취하고 남은 세포는 PBS 및 증류수로 각각 2회 세척하고 NaOH 200 µL를 가한 후, 37°C로 30분 정도 유지시켜 단백질을 용해시켜 Bradford법에 의해 단백질을 정량하였다. EROD 활성을 정량적으로 평가하기 위해 양성대조군인 3-MC (3-methylcholanthrene)의 EROD 활성치를 이용하여 3-MC equivalent concentration (MEQ)을 계산하였다. MEQ는 시료 중의 EROD활성 물질량을 3-MC량으로 환산하여 정량하는 방법으로서 표준물질인 3-MC의 용량반응 곡선의 1차 함수로부터 산정하여 µg(3-MC)/L-시료의 단위로 나타내었다.

#### 5. E-screen assay

MCF-7 BUS cell (Human breast cancer estrogen-sensitive MCF-7 cell)은 미국 Tufts대학의 Dr. Soto에게서 분양받아 사용하였다. 배양은 5% Fetal bo-

vine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT)이 첨가된 Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco)으로 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기 (Forma scientific, U.S.A.)에서 배양하였다. 에스트로겐 효과를 최대화하기 위해 시험에 쓰이는 FBS는 charcoal-dextran (5%~0.5%)으로 처리하여 steroid를 제거하여 사용하였다 (Olea *et al.*, 1996). 먼저 charcoal (Acid washed; Sigma)을 차가운 멸균 증류수로 활성화시킨 후 dextran (Pharmacia)을 첨가하여 5% charcoal-0.5% dextran T70 현탁액을 만들었다. 이 현탁액에 동일량의 FBS를 넣어 37°C에서 1시간 정도 6 cycles/min으로 회전하여 반응시켰다. 이 현탁액의 반응이 끝난 후 2,000 g로 20분간 원심분리하여 그 상층액을 분리시켜 0.45 µm와 0.20 µm filter (Nalgene)로 여과하여 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

MCF7-BUS cell을 이용한 E-screen assay는 Pilar Perez 등의 방법 (Perez *et al.*, 1998)에 의해 계대중인 세포를 0.05% 트립신-0.53mM EDTA · 4Na 용액 (Gibco.)으로 기부착면으로부터 탈리시킨 후에 5% FBS가 함유되어 있는 DMEM으로 현탁시켜 48-well plate에 각 well 당 세포수가 5,000 cell이 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 바닥에 부착시켰다. 48시간 정도 세포를 부착시킨 후 배양액은 phenol-red가 없는 DMEM으로 2번 씻고 10% CDFBS가 함유되어 있는 phenol red가 없는 DMEM으로 교체시켜 시험용액을 처리하였다. 144시간 동안 시험물질에 노출시킨 후 SRB방법에 의해 세포성장을 측정하였다. SRB assay는 먼저 배양액을 제거하고, PBS로 2번 씻은 후 10% trichloroacetic acid (TCA)를 가하여 4°C에서 30분간 방치하여 세포들을 plate의 바닥면에 고정시켰다. 세포 고정이 끝난 후에 plate를 증류수로 5~6회 세척하여 남아있는 TCA용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 1% 초산용액에 0.4% SRB용액을 녹인 염색액을 가하여 15분간 세포를 염색한 후, 다시 1% 초산으로 5~6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 과량의 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 cell plate들을 다시 실온에서 건조한 후, 10 mM trisma base (pH 10.5) 용액을 가하여 염색액을 용출시켜 microplate reader (Molecular Device, Versa Max, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도

를 측정하였다.

E-screen assay에 의한 에스트로겐 효과를 정량적으로 평가하기 위해 양성대조군인 17β-estradiol (E<sub>2</sub>)과 상대비교를 하였다. 이 방법은 E<sub>2</sub>에 의한 최대 세포증식상태의 세포수에 대한 시험물질에 의한 최대 세포증식상태의 세포수를 백분율로 환산한 세포증식 효과 상대비 (relative proliferative effect, RPE)를 구하여 비교하는 방법이다. 이 data는 E<sub>2</sub>에 대한 RPE값과의 student t-test결과 p<0.05 이하의 유의적인 차이가 보이는 부분을 기준으로 partial과 full agonist로 구분하였으며 RPE값 8 이하를 no effect level로 정하였다(Oh<sup>b</sup> *et al.*, 2000). E<sub>2</sub> equivalent concentration (bio-EEQ)는 시료 중의 에스트로겐활성 물질량을 E<sub>2</sub>량으로 환산하여 정량하는 방법으로서 표준물질인 E<sub>2</sub>의 용량반응 곡선의 1차 함수로부터 산정하여 ng (E<sub>2</sub>)/L-시료의 단위로 나타내었다.

6. 데이터 분석 및 통계처리

EROD 활성 및 E-screen 등의 모든 값은 모두 평균과 표준편차를 구하여 표시하였다. 본 실험 결과의 유의성 검정은 Student-t-test로 실시하였으며, p<0.05일 때 유의적인 차이를 인정하였다.

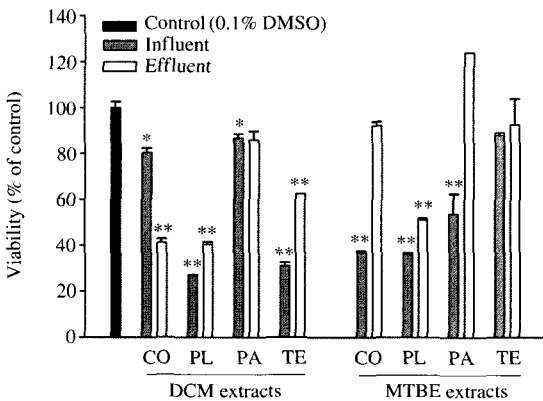


Fig. 1. Cytotoxicity in RTG-2 cells grown in 96-well plates with 72 hrs incubation with industrial wastewater influents and effluents in culture medium with 10% fetal bovine serum (FBS). Results are expressed as means ± S.D. from separate determinations for each data. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 significantly different from 0.1% DMSO. CO : cosmetic, PL : Plating, PA : painting, TE : textile

결과 및 고찰

1. 세포독성

본 연구에서 채집한 산업폐수의 처리장 방류수를 전처리한 시료에 대하여 세포독성시험을 수행하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 페인트업체 방류수의 경우 세포독성이 거의 없는 것으로 나타났으나 이를 제외한 모든 시료에서 세포독성이 유발되었다. 도금업체 방류수의 경우에는 DCM 및 MTBE 추출물 모두 시료의 세포독성 정도가 약 40%정도로 높아 중금속, 유기물질 등 세포독성을 유발시키는 물질이 가장 많이 존재하는 것으로 판단되었으며 처리공정에 의해서도 세포독성물질이 효과적으로 제거되지 않는 것으로 추정되었다. 한편 화장품업체 방류수와 유입수의 경우 용매 추출법에 따라 세포독성작용 양상이 서로 상반되게 나타났다. 즉 다이옥신성 추출물질 (DCM 추출물)과 에스트로겐성 추출물질 (MTBE 추출물)의 처리 전후의 시료의 독성양상이 서로 반대로 나타났는데 이는 고분자화합물질을 다양하게 사용하는 화장품

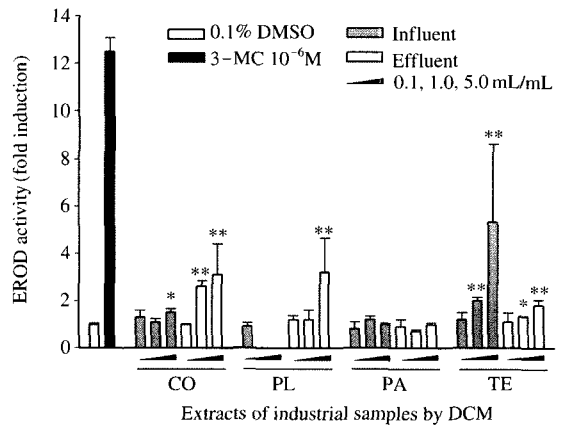


Fig. 2. Induction of EROD activity by industrial wastewater influents and effluents on H4IIE cell. Cells were incubated in DMEM supplemented with 5% FBS with various concentration of samples for 48 hrs. Extracts of industrial wastewater samples were eluted by methylene chloride. Results are expressed as means ± S.D. from separate determinations for each data. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 significantly different from 0.1% DMSO. CO : cosmetic, PL : Plating, PA : painting, TE : textile

업체의 특성상 두 가지 용매에 의해 추출되는 성분의 차이가 많기 때문으로 추정된다.

## 2. 다이옥신 유사활성

산업폐수의 처리장 방류수에서 CYP 효소계를 유도할 수 있는 오염물질의 존재여부와 그 효과를 알아보기 위하여 시료를 OASIS HLB extraction cartridge (WATERS, WAT106202)에 통과시켜 유효성분을 흡착시킨 후 PAH (polyaromatic hydrocarbons) 류를 주로 용출하는 DCM을 용매로 하여 유효성분을 추출하여 EROD-microbioassay를 수행하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 화장품업체, 도금업체 및 섬유업체의 방류수에서 EROD활성이 유도되어 폐수처리 공정을 거친 후에도 다이옥신성 물질이 잔류하는 것으로 추정되었으며 특히 화장품업체의 방류수에 다이옥신 유사활성을 나타낼 수 있는 물질이 가장 많이 존재하는 것으로 판단되었다. 페인트업체의 방류수에서는 EROD활성의 유의한 증가가 나타나지 않아 다이옥신성 물질이 상대적으로 저농도로 잔류하는 것으로 추정되었다.

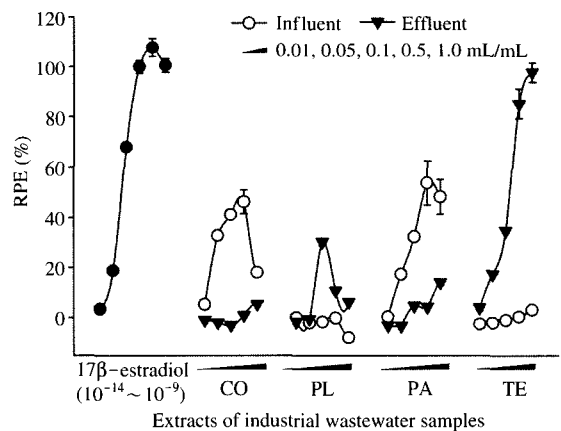
유입수의 다이옥신 유사작용이 폐수처리공정에 의해 저감되는지를 관찰하기 위해 처리공정을 거쳐 방류수에 도달하는 시간을 고려하여 방류수를 채취하기 이전에 유입수를 채취하여 유입수와 방류수간의 EROD 활성도의 차이를 비교 분석하였다. 그 결과 섬유업체의 방류수는 유입수에 비해 EROD 활성이 낮게 나타나 처리과정에 의한 다이옥신 유사작용의 저감이 예상되었으나 화장품업체와 도금업체의 경우 유입수에 비해 방류수에서 오히려 EROD 활성이 높게 나타나 독성이 오히려 증가되는 것으로 나타났다. 이는 처리과정에서 세포 독성물질이 제거됨으로써 활성저해 요인이 저감되고 다이옥신성 물질들은 대부분 그대로 잔류하여 활성을 나타내기 때문인 것으로 추정되었다.

## 3. 에스트로겐 유사활성

산업폐수의 처리장 방류수에서 에스트로겐 활성 물질에 의한 오염도를 평가하기 위해 시료를 OASIS HLB extraction cartridge (WATERS, WAT106202)에 통과시켜 유효성분을 흡착시킨 후 에스트로겐 류를 주로 용출하는 MTBE를 용매로 하여 유효성분을 추출하여 E-screen assay를 수행하고 추출물

에 의해 나타난 세포증식효과를 상대비 (relative proliferative effect, RPE)로 구하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 모두 시료농도와 용량 의존적인 반응성을 나타냈다. 시료별로 보면 섬유업체 방류수의 RPE값이  $97.87 \pm 3.85\%$ 로서 에스트라디올 ( $E_2$ )  $10^{-10}M$ 의 RPE값에 비해 유의적인 차이가 나타나지 않는 강한 에스트로겐 작용을 나타내어 full agonist로서의 작용이 있음이 확인되었으며, 화장품업체, 도금업체 및 페인트업체의 유입수 및 방류수의 경우에는 partial agonist로서의 작용을 보였다.

유입수의 에스트로겐 유사작용이 폐수처리공정에 의해 저감되는지를 관찰하기 위해 처리공정을 거쳐 방류수에 도달하는 시간을 고려하여 방류수를 채취하기 이전에 유입수를 채취하여 유입수와 방류수간의 에스트로겐 활성도의 차이를 비교 분석하였다. 그 결과 화장품 및 페인트업체 방류수의 경우에는 유입수보다 에스트로겐활성이 낮게 나타나 처리과정에서 에스트로겐 유사작용이 저감되는 것으로 추정되었다. 그러나 도금 및 섬유업체 방류



**Fig. 3.** Influence of industrial wastewater influents and effluents on MCF7-BUS cell proliferation. Cells were incubated in DMEM supplemented with free steroid 10% CDFBS with various concentration of  $E_2$  or samples for 6 days. The proliferative effect of compounds relative to  $E_2$  ( $10^{-10}M$ , 100%) represent as RPE (Relative Proliferative Effect). Extracts of industrial wastewater samples were eluted by methyl tert-butyl ether. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. from separate determinations for each data. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  significantly different from 0.1% ethanol (RPE: 0%). CO : cosmetic, PL : Plating, PA : painting, TE : textile

**Table 2.** Quantitative assessment of endocrine disrupting effects in industrial wastewater influent and effluents

| Type of industry | Sample   | MEQ ( $\mu\text{g/L}$ )<br>DCM extracts | EEQ ( $\text{ng/L}$ )<br>MTBE extracts |
|------------------|----------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| Cosmetic         | Influent | 0.93                                    | 4.73                                   |
|                  | Effluent | 4.30                                    | 0.05                                   |
| Plating          | Influent | n.c.                                    | n.c.                                   |
|                  | Effluent | 1.72                                    | 2.76                                   |
| Paint            | Influent | n.c.                                    | 2.27                                   |
|                  | Effluent | n.c.                                    | 0.23                                   |
| Textile          | Influent | 4.63                                    | n.c.                                   |
|                  | Effluent | 2.68                                    | 11.89                                  |

n.c. : not calculated

수의 경우에는 유입수보다 에스트로겐 활성이 오히려 더 높게 나타났다. 특히 섬유업체 유입수에서는 에스트로겐활성이 매우 낮았으나 방류수에서는 full agonist로서의 작용이 나타나 처리과정 이후 에스트로겐 활성이 더욱 증가하는 것으로 나타났다. 이는 처리과정에서 MCF7-BUS cell에 대한 세포독성물질이 제거되어 세포증식저해 요인이 저감되었거나 또는 처리과정에서 에스트로겐 활성물질이 부가적으로 생성되어 작용이 증가하는 것으로 추정되었다.

#### 4. 내분비계 장애작용의 정량적 평가

산업폐수 처리장의 시료수에 의한 에스트로겐 유사작용 및 다이옥신 유사작용을 정량적 농도개념으로 평가하기 위해 에스트로겐 유사작용은 에스트라디올을 표준물질로 하여 상대비교 농도(bio-EEQ)로 정량하였고 다이옥신 유사작용은 3-methylchoranthrene을 표준물질로 하여 상대비교 농도(bio-MEQ)로 정량하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 화장품업체 방류수의 다이옥신 유사활성농도가 11.01 ng-MEQ/L로서 가장 높게 나타났고 페인트업체 및 섬유업체 방류수에서도 3.32 및 4.71 ng-MEQ/L 농도로 측정되었다. 에스트로겐 활성농도는 섬유업체 방류수 시료가 11.89 ng-EEQ/L로서 가장 높았고 도금업체 및 페인트업체 방류수에서도 각각 2.76 및 0.23 ng-EEQ/L 농도의 에스트로겐 활성이 측정되었다. 화장품업체 방류수에서는 0.05 ng-EEQ/L로서 비교적 낮은 농도의 에스트

로겐 활성이 측정되었으나 유입수에서는 4.73 ng-EEQ/L로서 오히려 높게 나타났다. 국내에서는 환경시료의 에스트로겐 유사활성을 독성농도로써 측정된 보고는 그다지 많지 않다. 오 등(2000)<sup>a</sup>이 국내 하천수의 에스트로겐 활성농도를 측정된 결과와 비교해 보면 산업폐수 방류수의 에스트로겐 활성이 오염상태가 심한 금호강 하류 하천수의 에스트로겐활성 농도(7.2 ng-EEQ/L)와 유사한 수준인 것으로 나타났다. 한편 도금업체의 유입수의 경우에는 bio-MEQ 및 bio-EEQ 농도가 측정되지 않았는데 이는 세포독성이 매우 강한 것으로 보아 세포독성에 의해 반응성이 나타나지 않았기 때문인 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구에서는 경인지역 소재 업체를 업종별로 4개를 선정하고 산업폐수처리시설에 유입되는 유입수와 배출되는 방류수를 채취하여 *in vitro*상에서 생물학적 독성평가 방법인 세포독성시험, EROD-microbioassay 및 E-screen assay를 통하여 세포독성 및 내분비계 장애작용을 평가하였다.

세포독성 시험결과 도금업체의 방류수에서 매우 높은 세포독성이 나타나 도금업체의 폐수의 특성상 함유되는 중금속 등에 의해 독성이 강하게 유발됨을 알 수 있었다. 또한 유입수에 비해 방류수에서의 독성저감이 크게 나타나지 않는 것으로 보아 처리과정에서 이들 물질은 용이하게 제거되는 않는 것으로 추정되었다. 한편 고분자 화학물질을 많이 사용하는 화장품업체의 폐수에서는 함유되는 성분에 따라 처리 전후의 독성영향의 차이가 큰 것으로 나타났다.

화장품업체 방류수에서 다이옥신 유사활성이 가장 높았으며 유입수보다도 증가되어 처리과정에서 EROD 활성억제 요인이 저감되기 때문인 것으로 추정되었고, 도금업체에서도 유사한 경향을 나타내었다. 페인트업체의 유입수 및 방류수에서는 다이옥신 유사작용이 나타나지 않았다. 에스트로겐 작용성을 평가한 결과 섬유업체 방류수는 강한 에스트로겐 작용을 나타내어 full agonist로서의 작용이 있음이 확인되었으며, 화장품업체, 도금업체 및 페인트업체의 유입수 및 방류수의 경우에는 partial

agonist로서의 작용을 보였다.

이상의 결과로 미루어 보아 업종별로 다소의 차이는 있으나 산업폐수의 처리 방류수에 내분비계 장애작용을 유발할 수 있는 유기물질이 함유되어 있어 배출된 후 환경에 영향을 미칠 가능성이 추정되었다. 한편 처리 후 더욱 독성작용이 높아지는 경우가 있는 것으로 보아 물리적 및 화학적 분해 과정에서 부차적 독성물질의 생성이 의심되었으며 또한 비교적 산화되기 쉬운 세포독성물질은 처리 과정에서 제거되는데 비해 난분해성물질은 잔류함으로써 작용이 강하게 나타날 가능성도 추정되었다. 이러한 결과는 4군데에서 각각 1번씩 시료를 채취하여 얻은 결과이기 때문에 각 업체에 대한 산업 폐수의 대표성을 나타낼 수는 없을지라도 배출수 관리에 bioassay system을 적용시킬 수 있는 좋은 연구가 되었다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Braunbeck T, Hilton DE and Streit B. Fish Ecotoxicology; Birkhauser Verlag Basel/Switzerland, 1998.
- David E. Kime, Endocrine Disruption in Fish; University of sheffield, Kluwer Academic Publishers: 1998; 214-219.
- Dubois M, Plaisance H, Thome JP and Kremers P. Hierarchical cluster analysis of environmental pollutants through P450 induction in cultured hepatic cells; Ecotoxicol. Environ. Saf. 1996; 34: 205-215.
- Gelardi A, Federa R, Ferro M, Rindone B, Vigano L and Arllo A. An "In vitro" Approach to Water Pollution Monitoring; J. Biol. Res: 1996; 125-132.
- Haux C and Forlin L. Biochemical methods for detecting effects of contaminants on Fish; Ambio, 1988; 17: 376-380.
- Nagel SC, Saa FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M and Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. Environ Health Perspect. 1997; 105: 70.
- Oh<sup>a</sup> SM, Cheong SY, Sheen YY and Chung KH. Quantitative assessment of estrogenic activity in the water environment of Korea by the E-SCREEN assay. The Science of the Total Environment 2000; 263: 161-169.
- Oh<sup>b</sup> SM, Lee SK and Chung KH. Quantitative assessment of xenoestrogenic environmental pollutants using E-screen assay. Yakhak Hoeji, 2000; 44(5): 416-425.
- Olea N, Pulgar R, Pérez P, Serrano FO, Rivas A, Fertrell AN, Pedraza V, Soto AM and Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry, Environ Health Perspect. 1996; 104(3): 298.
- Peakall DB and Walker CH. The role of biomarkers in environmental risk assessment; Vertebrates, Ecotoxicology 1994; (3): 173-179.
- Perez P, Pulgar R, Serrano FO, Villalobos M, Rivas A, Metzler M, Pedraza V and Olea N. The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups; Environ Health Perspect. 1998; 106(3): 167.
- Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N and Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. Environ Health Perspect. 103(Suppl 7): 1995; 113.
- Thomas P. Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function; J. Eep. Zool. Suppl. 1990; 4: 126-128.
- Zacharewski T. In Vitro Bioassays for assessing estrogenic substances; Environmental Science & Technology, 1997; 31 (3): 613-623.
- Zacharewski T. Identification and assessment of endocrine disruptors, Limitations of in vivo and in vitro assays; Environ Health Perspect. 1998; 106(2): 577.