

## 중금속에 의한 대장균 성장 저해의 정량적 평가

조경숙 · 구소연 · 김지영 · 류희욱<sup>1\*</sup>

이화여자대학교 환경학과, <sup>1</sup>송실대학교 화학 · 환경공학과

**Quantification of Inhibitory Impact of Heavy Metals on the Growth of *Escherichia coli*.** Cho, Kyung-Suk, So Yeun Koo, Ji Young Kim, and Hee Wook Ryu<sup>1\*</sup>. Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea, <sup>1</sup>Department of Chemical and Environmental Engineering, Soongsil University, Seoul 156-743, Korea – The quantification of the toxicological effects of the heavy metals such as Cu, Cd, Cr, Hg, and Zn on the growth of *Escherichia coli* was performed, and the variations of toxicities with exposure time were evaluated in adaptation procedure. The characteristics of growth inhibition on *Escherichia coli* by heavy metals were different with metal species, and critical concentration of each metal, which inhibited cell growth completely, were Cu of 3.5 mM, Zn of 2.5 mM, Cd of 1.5 mM, Cr of 1.2 mM, and Hg of 0.12 mM, respectively. The tolerance of *E. coli* against heavy metals, based on EC<sub>50</sub> values, increased in order of Cu > Zn > Cr > Cd > Hg. The slopes obtained from the relationship between EC<sub>50</sub> values and expose time corresponds to adaptability of test organisms to the toxicants. The adaptability of test organisms to the toxicants was much higher at higher slope values. Adaptability of *E. coli* on heavy metals increased in order to Zn > Cd > Cu >> Cr > Hg.

**Key words:** Heavy metal, toxicity, *Escherichia coli*, growth inhibition, EC<sub>50</sub>

아연, 구리, 크롬, 카드뮴과 같은 중금속은 인간을 비롯하여 모든 생물을 위협하는 위해성 물질이다. 인구증가, 대량 생산기술의 발전, 및 산업구조의 다양화로 인해 이들 중금속의 채광량과 사용량이 급증함에 따라 많은 양의 중금속이 생태계로 유입되어 유해한 영향을 미치고 있다[1, 8]. 중금속은 단백질, 핵산과 같은 많은 주요 세포성분이 결합하여 효소 활성을 저해하고 단백질을 변성 시키며 세포분열을 저해하여 성장을 저해한다[5]. 또한, 필수금속 대신 중금속이 결합하여 생화학적 대사과정을 저해시키며, DNA를 손상시키거나 전사와 번역과정을 저해하는 등 유전독성을 야기하기도 한다[5].

중금속의 생태독성(ecotoxicity)을 평가하기 위한 간접적인 방법으로 미생물의 성장에 미치는 중금속 저해를 정성적 및 정량적으로 평가하는 방법이 많이 이용되고 있다. 이는 미생물을 이용한 독성 평가방법이 다른 방법에 비해 간단하여 경비와 시간이 비교적 적게 소요되고, 결과 해석이 비교적 용이하기 때문이다. 가장 많이 이용되고 있는 방법 중의 하나가 해양성 발광세균인 *Vibrio fischeri*를 이용한 microplate 방법이다[9].

미생물은 중금속 독성에 대한 어느 정도 내성을 가지거나 무독화시키기 위한 독특한 기작을 가지고 있다. 예를 들면, extracellular polysaccharide에 중금속을 결합시켜 고정화하여 체내로 중금속이 들어오는 것을 방지하거나, methallothionein

등과 같은 단백질에 중금속을 고정화 시킨다. 미생물이 중금속을 환원시켜 독성을 저하하기도 하고 기화 혹은 침전시켜 제거하기도 한다. 또한, 체내에 유입된 중금속을 적극적으로 체외로 pumping하여 체내에 중금속이 축적되지 않도록 하기도 한다[5].

이와 같이 미생물 종류에 따라 중금속 독성에 대한 내성 및 무독화 기작이 상이하므로 중금속에 의한 독성효과도 미생물 종류에 따라 상이하게 나타난다. 또한, 동일 종의 미생물에서도 pH, 온도, 중금속과 ligand를 형성할 수 있는 무기물 및 유기물 농도, 타 독성물질의 유무 등 환경조건에 따라 중금속 독성효과는 차이를 보이는 것으로 알려져 있다[4, 10]. 따라서 독성을 평가하는 방법에 따라 동일 종에 대한 중금속 민감도 및 EC<sub>50</sub>값은 많은 차이를 보이게 된다.

본 연구에서는 *Escherichia coli*의 성장을 저해하는 중금속(Cu, Cd, Cr, Hg, Zn) 영향을 정량적으로 조사하였다. 특히, 배양시간대별로 각각의 중금속에 대한 성장저해(Growth Inhibition)과 EC<sub>50</sub>값의 변화를 조사함으로써 *E. coli*의 중금속 독성에 대한 적응과정에서의 독성변화를 평가하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배지조성

본 연구에서 사용한 균주는 *E. coli*이고, LB(Luria-Bertani) 배지를 사용하여 37°C에서 교반하여(180 rpm) 배양하였다. LB 배지의 조성은 bacto-tryptone 10 g/L, bacto-yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L이다.

\*Corresponding author

Tel: 82-2-820-0611, Fax: 82-2-821-4192

E-mail: hwryu@ssu.ac.kr

**중금속 stock 용액**

독성 실험에 사용한 중금속의 종류는 5종으로 다음의 특급시약을 이용하여 stock solution을 제조하여 사용하였다: Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. 1-100 mM의 각 중금속 stock solution은 여과하여(0.2 μm filter) 제균 처리한 다음, 중금속 종류별로 설정한 농도가 되도록 멸균한 LB배지에 첨가하였다.

**중금속에 의한 성장 저해 실험**

지수생장기까지 배양한 *E. coli* 배양액을 각 농도별로 중금속이 첨가된 LB 배지에 접종(1%, v/v)한 후 잘 혼합하였다. 균주를 접종한 배지를 microplate에 400 μl씩 분주한 다음, 37°C에서 교반하여(180 rpm) 배양하였다. 배양동안 30분 간격으로 배양액의 흡광도값(600 nm)을 microplate reader (Bioscreen C, Transgalactic Ltd, USA)를 이용하여 측정하였다. 중금속이 첨가되지 않은 LB배지에서 *E. coli*의 성장을 측정하여 대조군(control)값으로 하였다. 모든 실험은 3반복 수행되었으며, 오차는 5%이내이다.

*E. coli* 성장에 미치는 중금속 저해를 정량적으로 평가하기 위해, 배양 시간별로 균체 성장량으로부터 성장저해(growth inhibition, GI)를 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

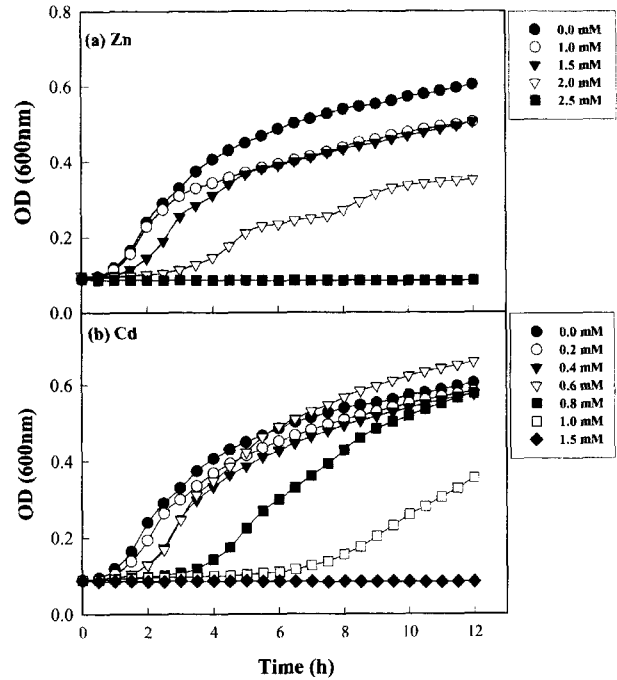
$$GI = \frac{G_c - G_T}{G_T} \quad (1)$$

식 (1)에서 G<sub>c</sub>=대조군 OD<sub>600</sub>- 초기 대조군 OD<sub>600</sub>이고, G<sub>T</sub>=실험군 OD<sub>600</sub>- 초기 실험군 OD<sub>600</sub>이다. *E. coli* 성장을 50% 저해하는 EC<sub>50</sub>값은 내삽법(interpolation regression analysis)을 이용하여 구하였다.

**결과 및 고찰**

**단일 중금속의 저해특성**

5종류의 중금속(Zn, Cu, Cd, Cr, Hg)이 *E. coli*의 성장에 미치는 저해 특성을 각각의 중금속 농도변화에 따라 조사하였다(Fig. 1와 Fig. 2). 5종류의 중금속에 의한 *E. coli* 성장에 미치는 저해작용은 중금속의 종류에 따라 저해현상들이 상이하게 나타나는 것을 알 수 있었다. 각 중금속별 저해작용의 특징들은 다음과 같다. 중금속을 함유하지 않는 LB배지(대조군)에서 성장하는 *E. coli*의 OD<sub>600 nm</sub>는 약 6시간 배양 후 초기 0.08에서 0.48까지 증가하였고, 12시간 배양 후에는 약 0.6까지 증가하였다(Fig. 1a). Zn을 함유한 LB 배지에서는 Zn의 농도가 증가함에 따라 *E. coli*의 성장 감소와 지연기의 증가 현상이 나타나며, 2.5 mM 첨가되면 생장이 전혀 일어나지 않았다(Fig. 1a). Cd를 함유한 LB 배지에서 *E. coli* 성장의 특징은 Cd의 농도가 증가할수록 lag phase가 길어지나 배양 후에 얻어지는 최종 성장농도에는 큰 차이가 없음을 알 수 있었다(Fig. 1b). *E. coli*의 성장을 완전 저해



**Fig. 1. Time profiles of OD in LB medium containing a heavy metal. (a) Zn and (b) Cd.**

하는 Cd 농도는 1.5 mM 이었다. 0-2.5 mM의 Cu 농도 영역에서는 초기에는 Cu의 농도 증가함에 따라 *E. coli* 생장이 다소 느려졌으나 일정 OD에 도달 한 후에는 생장이 거의 정지되는 현상이 관찰되었고, 3.5 mM 이상의 Cu 농도에서는 생장이 불가능 하였다(Fig. 2a). Fig. 2a에서 일정 OD에 도달 한 후에는 생장이 거의 정지되기 시작하는 지점(변곡점)에서 Cu 농도가 각각 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mM 일 때 *E. coli*의 성장량(OD<sub>600 nm</sub>)은 각각 0.305, 0.275, 0.248, 0.24, 0.20으로 Cu 농도와 변곡점에서의 OD와의 기울기는 0.069 이었다. 즉, 변곡점까지 생장이 가능한 생체량이 Cu 농도에 비례하여 감소한다는 것을 알 수 있다. Cr에 의한 *E. coli*의 성장 저해 특징은 초기의 성장율이 Cr의 농도에 큰 영향을 받지 않는다는 것이다(Fig. 2b). 0.0-1.0 mM Cr 농도에서 *E. coli*의 생장은 초기에는 저해작용 없이 대조군의 성장과 거의 유사한 성장율을 유지하였으며 12시간 배양 후에 얻은 최종 *E. coli*의 성장량이 Cr 농도 증가함에 따라 감소하긴 하지만 큰 차이는 보이지 않고 있다. 반면에 1.2 mM 이상의 Cr 농도에서는 *E. coli*의 생장은 초기 약 2시간 동안에는 대조군과 동일한 성장 곡선을 따라 저해 현상없이 증식하지만 2시간 경과 후(OD<sub>600 nm</sub>=0.2)에는 오히려 증식한 *E. coli*의 양이 감소하고 더 이상의 생장이 진행되지 못하고 완전저해 받는 것이 관찰되었다. Hg에 의한 *E. coli* 성장 저해 특성은 0.0-0.10 mM의 Hg 농도 범위에서는 Hg의 영향은 미미하며, 0.12 mM 이상에서 부터 Hg에 의한 저해 작용이 나타나기 시작하여 다른 4종류의 중금속들과는 달리

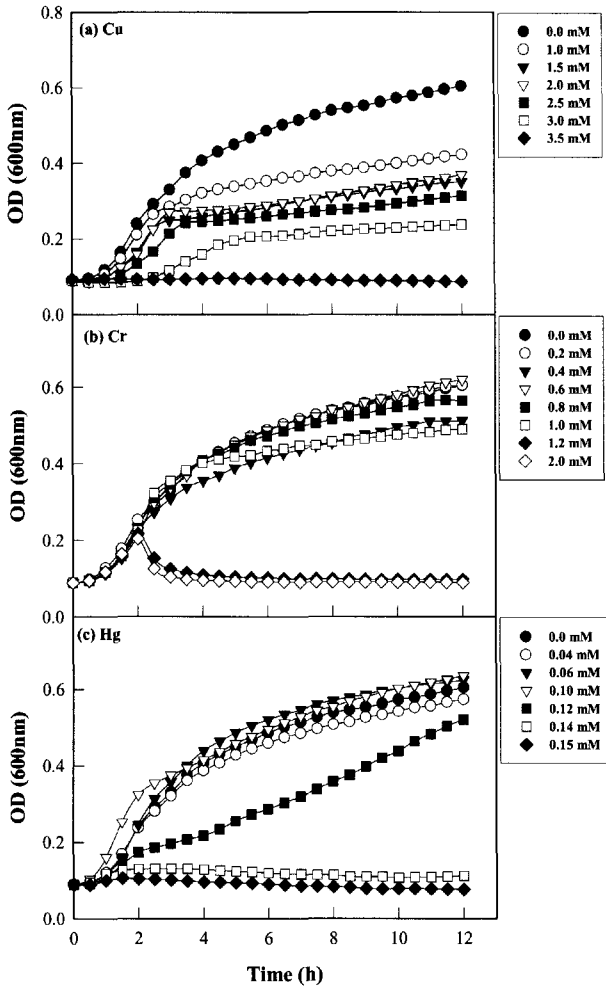


Fig. 2. Time profiles of OD in LB medium containing a heavy metal. (a) Cu, (b) Cr, and (c) Hg.

0.14 mM의 상대적으로 낮은 농도에서 *E. coli* 성장을 완전 저해 하였다(Fig. 2c). Hg의 *E. coli* 성장에 대한 저해작용은 lag phase에 영향을 미치지 보다는 초기 성장율에 영향을 미치는 것으로 보인다.

노출 시간별 GI의 변화

Fig. 1과 2의 *E. coli* 성장에 대한 data를 사용하여 *E. coli* 성장에 미치는 중금속 저해를 정량적으로 평가하기 위해 배양 시간별로 균체 성장량으로부터 성장저해(growth inhibition, GI)를 구하였다(Fig. 3와 Fig. 4).

Zn의 경우 전체적으로 1.0 mM 이하에서는 GI가 0.2 미만이었으며, 1.5 mM 이상에서는 GI가 급격하게 증가하기 시작하였으며 2.5 mM에서는 *E. coli*의 성장이 완전히 저해 받는 것으로 평가되었다(Fig. 3a). Zn 농도 1.0~2.0 mM 영역에서는 노출시간이 증가함에 따라 GI가 낮아지는 경향을 보였다. 그러나 노출시간 5h 이상에서는 노출시간에 따른 차이는 미미한 것으로 평가되었다. 마찬가지로 Cd의 경우 배양초기에는 낮은 농도에서도 성장저해(높은 GI)가 심한 것

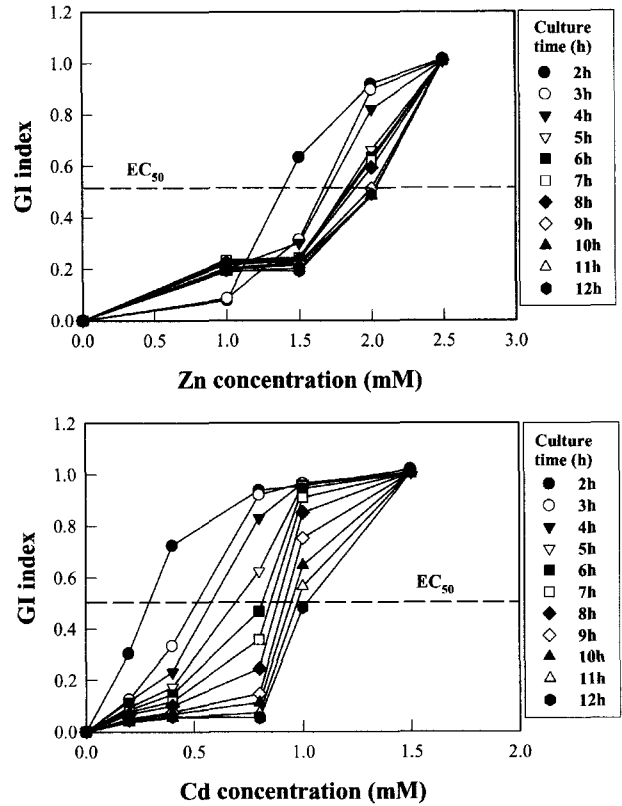


Fig. 3. GI with metal concentrations. (a) Zn and (b) Cd.

으로 평가되었으나 시간이 경과함에 따라 성장저해가 점점 둔화 되는 pattern을 보였다(Fig. 3b). Fig 3과 같은 유형의 거동 특성은 독성물질에 대한 *E. coli*의 적응현상에 의해 성장저해가 약화되고 독성물질에 대한 내성농도가 증가하는 것을 잘 설명하고 있다.

Cu의 경우 노출시간에 따른 GI의 영향은 큰 차이가 없는 것으로 평가되고 있다(Fig. 4a). 다만, Cu의 농도가 낮은 경우에는 노출시간이 경과함에 따라 GI가 오히려 증가하는 경향이 있으며, 농도가 높을수록 노출시간이 경과함에 따라 GI가 낮아지는 현상이 관찰되었다. 다른 중금속들과는 달리 Cu의 농도가 증가함에 따라 GI가 비례하여 증가하는 경향을 보이며 Cu 농도가 3.5 mM에 이르러 GI가 거의 1에 가깝다. Cr의 경우 노출시간에 따른 GI의 영향은 초기 2h 시간을 제외하고는 노출시간에 따른 영향은 거의 없는 것으로 평가되었다(Fig. 4b). Cr의 농도가 1.0 mM 이하에서는 GI가 0.2이하로 유지되었으나 1.2 mM 농도 이상에서 GI가 1에 가까워 완전저해 받는 임계농도인 것을 알 수 있다. 마찬가지로, Hg의 경우에도 노출시간에 따른 GI의 영향은 없는 것으로 평가되었으며, Hg의 농도가 0.1 mM 이상에서 부터 독성이 급격하게 증가하여 0.14 mM 이상에서는 GI가 1에 가까웠다(Fig. 4c).

노출 시간에 따른 EC50의 변화

본 연구에서는 배양시간(노출시간)대별 EC50의 변화를 Fig.

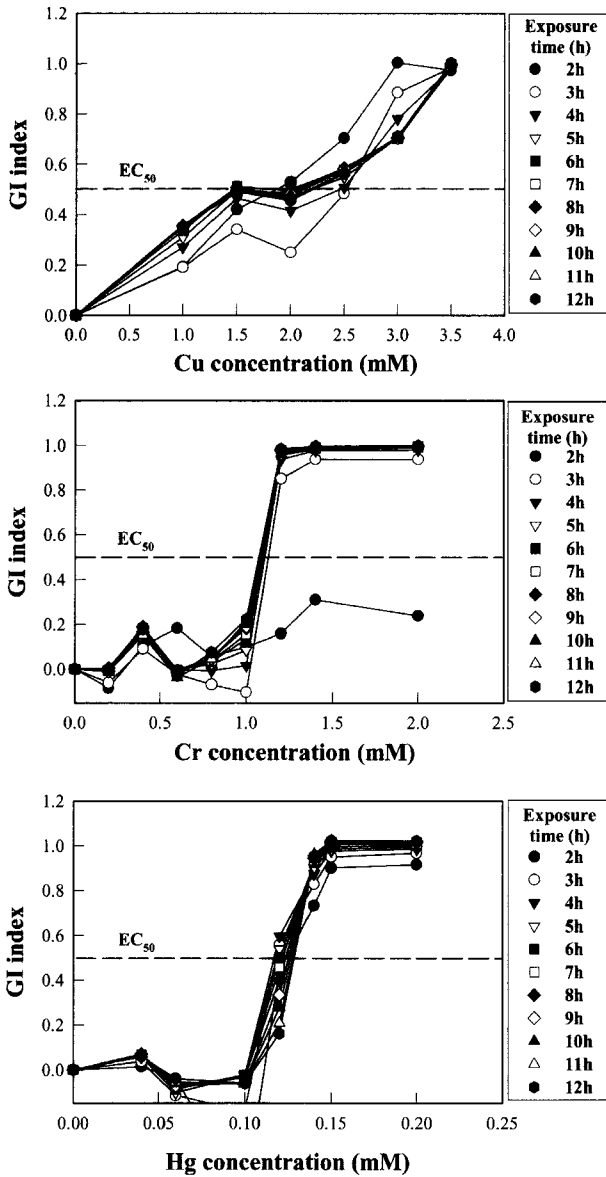


Fig. 4. GI with metal concentrations. (a) Cu, (b) Cr, and (c) Hg.

3과 4로 부터 얻은 결과를 Fig. 5에 도시하였다. Zn과 Cd는 노출초기에는 시간 변화에 따른 EC<sub>50</sub>의 증가율(기울기)이 각각 0.133과 0.107로 급격하게 증가하였고, 5-7시간 경과 후에는 각각의 기울기가 급격하게 감소하여 0.037과 0.037으로 변화하였다. Cr과 Hg의 경우 노출시간이 경과함에도 불구하고 EC<sub>50</sub>의 증가율은 미미 하였다. 반면에, Cu의 경우에는 다른 중금속들의 반응과는 달리 노출초기에는 노출시간이 경과됨에 따라 EC<sub>50</sub>이 오히려 감소(기울기: -0.176)하였고, 6시간 경과 후 부터는 반대로 증가(기울기: 0.037)하는 경향을 보였다. 한편, EC<sub>50</sub>을 기준으로한 *E. coli*의 중금속에 대한 내성은 Cu>Zn>Cr>Cd>Hg 순이다.

여러 종류의 단세포 미생물들에 대한 중금속의 독성 평가

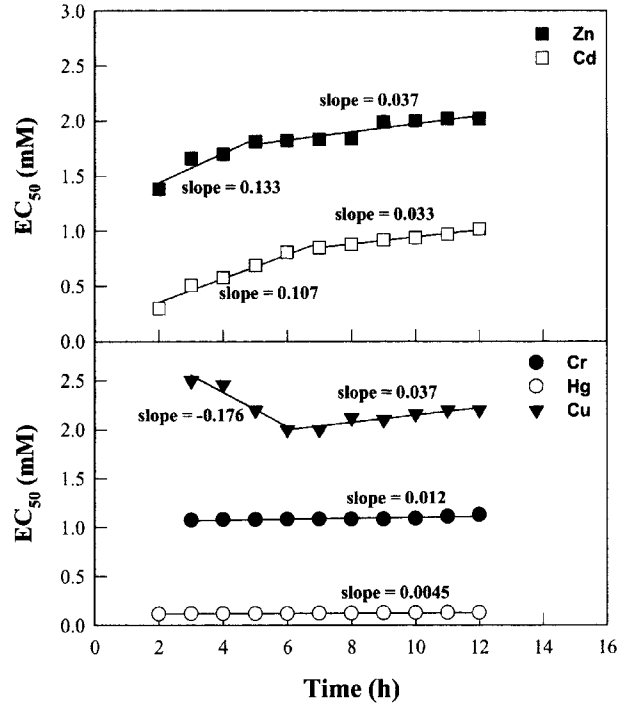


Fig. 5. EC<sub>50</sub> with the time of exposure to heavy metals.

로 부터 구한 EC<sub>50</sub> 값을 Table 1에 비교 하였다. *E. coli*의 Zn에 대한 EC<sub>50</sub> 값은 1.38-2.02 mM (End point=2.02 mM)으로 *Pseudomonas putida* (0.03-0.26 mM)와 *Vibrio fischeri* 0.29-0.41 mM 보다는 약 30-70배 높고, *Pseudomonas fluorescens* (0.06-5.51 mM)와 *Tetrahymens pyriformis* (1.45 mM)와는 유사하였다. Cu의 경우 *E. coli*의 EC<sub>50</sub> 값은 2.00-2.50 mM (End point=2.20 mM)으로 *P. putida*, *V. fischeri*, *P. fluorescens*, *T. pyriformis* 보다 약 2-250배 가량 높다. 즉, *E. coli*의 Cu에 대한 내성은 다른 세균들에 비해 내성이 강하다는 것을 의미한다. Zn과 Cu에 대해 상대적으로 저해작용이 약한 것으로 보고된 효모균인 *Saccharomyces cerevisiae* 보다는 내성이 약한 것으로 평가되었다. *E. coli*의 EC<sub>50</sub> 값은 Cd의 경우에는 1.08-1.23 mM로 효모균을 포함한 다른 세균들 보다 약 2-240 배가량 높고, Cr의 경우에는 1.08-1.13 mM로 *T. pyriformis* (1.44 mM)를 제외하고 약 3-30배 가량 높았으며 *T. pyriformis*의 EC<sub>50</sub> 값 보다는 다소 낮았다. 이상에서 살펴 본바와 같이 중금속에 대한 독성은 피검사체의 특성과 독성 시험조건, 중금속의 종류에 따라 상이하게 나타난다. 예를 들면 유기물의 농도가 높을수록 피검사체의 중금속에 대한 내성이 높게 과대평가 되며, 미생물의 종류에 따라 각각의 중금속의 성장저해 기작(경쟁적 또는 비경쟁적 저해) 또한 다르다. 따라서 다른 종의 미생물들에 대한 독성을 직접 비교한다는 것은 어려운 일이며, 다만 상대적인 참고자료로 활용할 수 있다.

Fig. 3-5로 부터 제시한 바와 같이 노출 시간 변화에 따라

Table 1. Comparison of toxicity of heavy metals to unicellular organisms

Heavy metal	Growth inhibition (EC <sub>50</sub> , mM)					
	<i>E. coli</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>T. pyriformis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Zn <sup>2+</sup>	1.38-2.02 <sup>a</sup> (2.02)*	0.03 <sup>b</sup> -0.26 <sup>c</sup>	0.06 <sup>d</sup> -5.51 <sup>e</sup>	0.29 <sup>f</sup> -0.41 <sup>c</sup>	1.45 <sup>g</sup>	16.35 <sup>h</sup> -non toxic <sup>h</sup>
Cu <sup>2+</sup>	2.00-2.50 <sup>a</sup> (2.20)*	0.01 <sup>b</sup> -0.02 <sup>i</sup>	0.20 <sup>j</sup> -0.27 <sup>e</sup>	0.58 <sup>f</sup> -0.61 <sup>c</sup>	0.83 <sup>g</sup>	0.03 <sup>h</sup> -35.09 <sup>h</sup>
Cd <sup>2+</sup>	0.51-1.02 (1.02)*	0.003 <sup>b</sup> -0.014 <sup>c</sup>	0.073 <sup>d</sup>	0.161 <sup>g</sup> -0.206 <sup>f</sup>	0.036 <sup>g</sup>	0.004 <sup>h</sup> -0.025 <sup>h</sup>
Cr <sup>6+</sup>	1.08-1.13 <sup>a</sup> (1.13)*	0.05 <sup>c</sup> -0.09 <sup>c</sup>	0.04 <sup>d</sup>	0.06 <sup>g</sup> -0.31 <sup>k</sup>	1.44 <sup>g</sup>	0.03 <sup>h</sup> -0.09 <sup>h</sup>
Hg <sup>2+</sup>	0.12-0.13 <sup>a</sup> (0.13)*	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Present study; <sup>b</sup>Reinke et al. [7]; <sup>c</sup>Slabbert [12]; <sup>d</sup>Paran et al. [6]; <sup>e</sup>Duttka and Kwan [2]; <sup>f</sup>Gellert et al. [4]; <sup>g</sup>Sauvant et al. [9]; <sup>h</sup>Schmitt et al. [10]; <sup>i</sup>Schmitz et al. [11]; <sup>j</sup>Torsloy [13]; <sup>k</sup>Gellert [3]

\*After exposure for 12 h (fully adaptation).

독성평가 지수인 EC<sub>50</sub> 또는 GI의 값은 중금속(또는 독성물질)에 따라 다양한 유형을 보이기 때문에 독성 평가를 위한 피시험체의 노출 시간이 매우 중요하다는 것을 알 수 있다. 피검사체를 독성물질에 단시간(수분내지 수시간) 노출시켜 평가하는 기존 방법들은 피검사체의 독성물질에 대한 적응성이 배제되어 있기 때문에 독성평가에 있어서 많은 오류를 범할 수 있다. 피검사체의 적응성을 고려한다면 *E. coli*의 경우 최소 5-7시간 이상은 독성물질에 노출시켜야 된다는 것을 알 수 있다(Fig. 5). 또한 1-2시간 이내로 독성물질에 피폭시킨 경우에는 독성을 과대 또는 과소평가될 가능성이 매우 높다. 예를 들면, Fig. 4b의 Cr의 경우 피폭시간 2시간에서는 Cr의 농도가 2.0 mM까지도 GI가 0.3 미만으로 EC<sub>50</sub> 값을 평가되지 못할 정도로 독성이 적은 것으로 해석되지만 3시간 경과 후에는 EC<sub>50</sub> 값이 약 1.075 mM이다. 이러한 현상은 초기에는 *E. coli*의 증식량이 상대적으로 적기 때문에 평가과정에서 오차 유발가능성이 매우 높다.

이러한 문제점들을 해소하고, 독성물질에 대한 적응성(adaptation)을 독성평가에 반영할 수 있는 방안으로 노출 시간변화에 따른 EC<sub>50</sub>의 변화량을 평가하는 방법을 고려할 수 있다. Fig. 5의 각각의 중금속들에 대한 기울기를 이용하여 노출 시간에 따른 EC<sub>50</sub>의 변화를 평가할 수 있으며, 노출 시간 변화에 따른 EC<sub>50</sub>의 기울기는 다음과 같은 물리적 의미를 갖는다. 기울기 값이 작은 경우에는 피검사체가 독성물질에 대한 적응성이 약하고, 기울기 값이 크면 클수록 피시험체가 독성물질에 대한 적응성이 우수하다는 것을 의미한다. 즉, Fig. 5의 기울기를 기준으로 *E. coli*의 독성물질인 중금속에 대한 적응성은 Zn>Cd>Cu>>Cr>Hg 순임을 알 수 있다. 또 다른 측면으로는 어떤 독성물질에 대한 노출 시간에 따른 EC<sub>50</sub>의 기울기 값이 작은 경우에는 피시험체의 독성물질에 대한 노출시간과 무관하게 유사한 값의 EC<sub>50</sub>를 얻을 수 있으며 타 연구자들의 결과와 비교검토가 용이하고, 기울기 값이 큰 경우에는 노출시간에 따라 EC<sub>50</sub> 값의 변화가 크기 때문에 기울기로 부터 노출 시간 변화에 따른 EC<sub>50</sub> 값을 평가하여 타 연구 결과들과 비교가 가능하다.

## 요 약

*Escherichia coli*의 성장을 저해하는 중금속(Cu, Cd, Cr, Hg, Zn) 영향을 정량적으로 조사하였고, 중금속 독성에 대한 적응과정에서의 독성변화를 노출시간대별로 평가하였다. 중금속에 의한 *E. coli*의 성장저해 작용은 중금속의 종류에 따라 다른 동향을 보였고, 성장을 완전 저해하는 중금속의 농도는 각각 Cu 3.5 mM, Zn 2.5 mM, Cd 1.5 mM, Cr 1.2 mM, Hg 0.12 mM 이었다. EC<sub>50</sub>을 기준으로 한 *E. coli*의 중금속에 대한 내성은 Cu > Zn > Cr > Cd > Hg 순이다. 노출 시간에 따른 EC<sub>50</sub>의 변화를 plotting하여 그 기울기에 따라 피시험체의 독성물질에 대한 적응성 평가가 가능함을 보였다. 기울기 값이 작은 경우에는 피검사체가 독성물질에 대한 적응성이 약하고, 기울기 값이 크면 클수록 피시험체가 독성물질에 대한 적응성이 우수하다는 것을 의미한다. *E. coli*의 독성물질인 중금속에 대한 적응성은 Zn > Cd > Cu >> Cr > Hg 순 이었다.

## 감사의 글

이 연구는 2003년도 숭실대학교 교내연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Cho, K. S., H. W. Ryu, I. S. Lee, and H. M. Choi. 2002. Effect of solids concentration on bacterial leaching of heavy metals from sewage sludge. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* **52**: 237-243.
2. Duttka, J. and K. Kwan. 1981. Comparison of three microbial toxicity screening tests with the microtox test. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **27**: 753-757.
3. Gellert, G. 2000. Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**: 87-91.
4. Gellert, G., A. Stommel, and A. Trujillano. 1999. Develop-

- ment of an optimal bacterial medium based on the growth inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere* **39**: 467-476.
5. Hoffman, D. J., B. A. Rattner, G. A. Burton, and J. Cairns. 1995. *Handbook of Ecotoxicology*, Lewis publishers, London.
  6. Paran, J. H., S. Sharma, and A. A. Quershi. 1990. A rapid and simple toxicity assay based on growth rate inhibition of *Pseudomonas fluorescens*. *Toxic. Assess.* **5**: 351-365.
  7. Reinke, M., G. Kalnowski, and W. Dott. 1995. Evaluation of an automated, miniaturized *Pseudomonas putida* growth inhibition assay. *Vom Wasser* **85**: 199-213.
  8. Ryu, H. W., H. S. Moon, E. Y. Lee, K. S. Cho, and H. Choi. 2003. Leaching characteristics of heavy metals from sewage sludge by *Acidithiobacillus thiooxidans* MET. *J. Environ. Qual.* **32**: 751-759.
  9. Sauvant, M. P., D. Pepin, J. Bohatier, and C. A. Groliere. 1995. Microplate technique for screening and assessing cytotoxicity of xenobiotics with *Tetrahymena pyriformis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **32**: 159-165.
  10. Schmitt, M., G. Gellert, J. Ludwig, and H. Lichtenberg-Frate. 2004. Phenotypic yeast growth analysis for chronic toxicity testing. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **59**: 142-150.
  11. Schmitz, R., A. Eisenträger, and W. Dott. 1998. Miniaturized kinetic growth inhibition assays with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida*. *J. Microbiol. Methods* **31**: 159-166.
  12. Slabbert, J. L. 1986. Improved bacterial growth test for rapid water toxicity screening. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **37**: 565-569.
  13. Torslov, J. 1993. Comparison of bacterial toxicity tests based on growth, dehydrogenase activity and esterase activity of *Pseudomonas fluorescens*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **25**: 33-40.

(Received Nov. 22, 2004/Accepted Dec. 15, 2004)