

Toxicity Monitoring and Classification of Endocrine Disruptors using Bioluminescent Bacteria.

민지호, 구만복

광주과학기술원 환경공학과

전화 (062) 970-2454, Fax (062) 970-2434

Abstract

For detecting toxicity of endocrine disruptors (EDs), rapid, sensitive, and simple methods are needed. Therefore, in this study, a new method in which the different toxic effect of EDs can be monitored using 4 different recombinant bacteria was designed and evaluated. It was found that the recombinant bacteria could monitor the toxic effect, not estrogenic effect, due to EDCs through the measurement of bioluminescence and cell growth rate, which were shown to depend upon a form of cellular toxicity, such as DNA damage, protein damage, oxidative damage, and membrane damage. In addition, it was found that the damage done by EDCs can be divided into several groups based upon the toxic mechanisms of the EDCs

서 론

현재 날로 심해지는 환경오염으로 생태계의 파괴가 가중되고 있다. 또한 계속적인 산업기술의 발달로 새로운 형태의 환경오염물질들이 속출하고 있는데, 그 중 한가지가 내분비계 장애물질로 인간이 전혀 상상치 못했던 면역기능과 생식기능의 저하라는 새로운 형태의 유해성을 나타내고 있다. 그러나 아직까지 많은 문제가 되고 있는 내분비계 장애물질들의 신체 유해작용 및 정확한 물리·화학적인 성질 조차 파악되지 못하고 있고 이들의 독성 정도를 분석할 수 있는 모니터링 시스템의 개발 역시 미비한 실정이다. 따라서 내분비계 장애물질의 유해성 형태를 분석할 수 있는 새로운 형태의 모니터링 방법이 요구된다.

최근에 환경유해물질에 특이적으로 반응할 수 있는 스트레스 프로모터 유전자와 이들의 반응 여부를 빛으로서 확인할 수 있는 *lux* 유전자를 유전공학적으로 결합시켜 생성된 발광성 미생물을 이용한 유해물질 탐지 연구가 활발히 진행중에 있다¹⁾. 이러한 미생물들은 스트레스에 대해 특이적인 반응을 나타낼 뿐만 아니라, 동일한 형태의 유해물질이라도 물리·화학적 성상의 차이나 스트레스를 입히는 형태에 따라서도 서로 다른 반응 형태를 나타낸다²⁾. 따라서 본 연구에서는 특정한 스트레스에

특이적으로 반응할 수 있는 유전공학적으로 변형된 발광성 미생물 4가지 종류를 가지고 정확하게 유해성 형태를 알 수 없는 내분비계 장애물질의 반응성을 분석하여 유해성 형태를 구분하고 이들이 미치는 독성 정도가 어느 정도인지를 분석하고자 한다.

재료 및 방법

본 실험에서는 *E. coli* 내에 있는 *recA* (유전자 손상에 민감하게 반응), *grpE* (단백질 손상에 민감하게 반응), *fabA* (생물막 손상에 민감하게 반응), *katG* (산화적 손상에 민감하게 반응)와 같은 스트레스 반응 프로모터 유전자에 *Vibrio fischeri*의 *lux* 유전자를 결합시킨 플라스미드를 포함하여 재조합된 *E. coli* DPD2794 (*recA::luxCDABE*), TV1061 (*grpE::luxCDABE*), DPD2511 (*katG::luxCDABE*), DPD2540 (*fabA::luxCDABE*)를 사용하였다.

이 균주는 25 μ g/mL의 kanamycin (Sigma Co.)이 첨가된 Luria-Bertani (LB) 배지에서 30 $^{\circ}$ C, pH7.0, 250rpm의 조건으로 진탕배양하였다. 100mL의 LB배지에서 12시간 정도 자란 균주를 2mL씩 새로이 접종하여 지수 성장기 초기 시점에서 독성 물질을 첨가하여 Bioluminescence (생물학적 빛)의 반응을 측정하였다. 이때 방출되는 빛의 세기는 luminometer (Tuner TD-20e)로 측정하였으며 균주의 성장 정도는 UV/vis spectrometer (Perkin Elmer)를 이용해 600nm에서 측정하였다¹⁾. 실험에 사용된 화학물질은 bisphenol A, nonyl-phenol, butyl phtalate 등으로 모두 Sigma 사에서 구입하였다.

결과 및 고찰

여러 가지 내분비계 장애물질에 대한 4가지 발광성 미생물의 반응 특이성 확인

대부분의 내분비계 장애물질은 현재까지 그 정확한 독성 형태가 규정되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 서로 다른 4가지 스트레스에 민감하게 반응하는 발광성 미생물을 이용하여 내분비계 장애물질의 독성 형태를 확인하여 보았다. 아래의 table 1을 보면 캔 내부 코팅제로 알려져 있는 bisphenol A의 경우에는 유전자 손상만을 나타내는 것을 확인할 수 있으며, 또한 공업용 세제로 문제시 되는 nonyl-phenol은 산화적 손상, 단백질 손상, 생물막 손상 등으로 세포에 독성을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서 최근까지 호르몬작용으로 인한 손상만을 일으킨다고 알려진 환경호르몬들에서 cellular toxicity와 관련한 독성 효과가 발생한다는 것을 확인하였다. 그러나 styrene과 butyl phtalate에서는 아무런 반응성도 나타내지 않아, 이들은 독성 효과보다는 호르몬교란으로 인한 유해성이 더 크다는 것을 확인할 수 있었다.

Table 1. 여러 가지 내분비계 장애물질에 대한 4가지 균주의 반응성 비교

Categories	Chemicals	DPD2794		DPD2540		DPD2511		TV1061	
		Response	Growth rate Inhibition	Response	Growth rate Inhibition	Response	Growth rate Inhibition	Response	Growth rate Inhibition
Pesticides	Methyl Bromide	H	1-0.4	H	1-0.7	M	1-0.7	H	-0.7
	DDT	H	1-0.5	-	-	-	-	-	-
	Paraquat	H	1-0.8	L	-	H	-	-	-
	Methoxychlor	L	N.A.	-	-	M	N.A.	-	-
	Isodrin	L	1-0.7	-	-	H	1	-	-
	Benomyl	M	0.9-0.3	-	-	-	-	-	-
	Ziram	M	0.84-0.3	-	-	-	-	-	-
PAHs	Phenanthrene	L	N.A.	-	-	-	-	-	-
	Naphthalene	H	0.9-0.4	-	-	-	-	-	-
	Benzo[a]pyrene	H	0.9-0.31	-	-	-	-	-	-
EDCs	Styrene	M	N.A.	L	N.A.	L	N.A.	L	N.A.
	Nonyl-phenol	L	0.94-0.4	H	1-0.68	H	1-0.68	H	1-0.68
	Phthalate	L	1	L	1	L	1	L	1
	PCP	L	1-0.9	M	1	L	1	L	1
	β-oestradiol	L	N.A.	L	N.A.	L	N.A.	L	N.A.
	Bisphenol A	M	1-0.6	L	1-0.8	L	1-0.8	L	1-0.8
Etc.	Phenolics	L	1	H	1	L	1	H	1
	Mutagens	H	1-0.5	L	1-0.8	M	1-0.8	L	1-0.8

H : High Response (Response ratio > 10) - : Not detected
M : Middle Response (Response ratio 5 - 10) Growth rate inhibition : Growth rate of Control/
L : Low Response (Response ratio 2.5 - 5) Growth rate of Induced cell
* Range of EDCs concentration : 10ppb - 50ppm N.A. : Not Available

내분비계 장애물질중 유전자 손상물질에 반응하는 DPD2794의 반응 특이성

유전자 손상을 일으키는 물질의 경우 DPD2794에 의한 민감하게 모니터링이 가능하였는데, 내분비계 장애물질중 유전자 손상을 일으키는 물질에 대하여도 민감한 반응성을 나타내었다. 비록 그 탐지 가능한 농도는 비교적 높은 편이지만, 내분비계 장애물질이 생체내에 오랫동안 축적되어 피해를 유발하는 것으로 보아 미생물을 이용하여 탐지 가능한 농도 범위도 그다지 높은 편이라고 할 수 없다. 또한 여러 가지 농도 범위에서 발생하는 빛과 상관관계가 뚜렷한 것으로 보아 어느 정도까지 정량적인 분석도 가능하였다. 또한 DPD2794는 유전자 손상을 일으키는 메타니즘의 차이에 따라 두가지 다른 반응을 나타내는데 유전자에 직접 손상을 일으키는 DDD (Direct DNA Damage) 그룹과 유해물질 침입후, 세포내에서 증가된 활성산소족으로 인한 산화적 유전자 손상을 일으키는 IDD (Indirect DNA Damage) 그룹의 두가지로 나눌 수 있다. Table 2를 보면, 내분비계 장애물질들 대부분은 IDD 그룹으로 이들의 특징인 최적 탐지가능 농도가 100 ppb 이상으로 비교적 높고, 초기 반응이 미진하다가 반응 시작후 100분 정도가 지나면 다량의 빛이 발생하게 된다. 또한 농도와 빛간의 상관관계가 뚜렷하지 않은 특징을 가지게 된다. 따라서 유전자에 손상을 나타내는 내분비계 장애물질의 경우, 나타나는 반응 형태를 두가지로 분류하면, 이들이 유전자에 미치는 피해 양상까지 보다 세분화가 가능해 진다.

Table 2. 유전자 손상을 일으키는 피해 양상에 따라 두 그룹으로 분리된 내분비계 장애물질.

		EDCs	Minimum detectable Concentration ; Response ratio = 2.5	The concentration for SBLmax
DNA Damage	Direct DNA Damaging Agents	Benzo[a]pyrene	0.013 ppb	0.5 ppb
		DDT	23 ppb	10,000 ppb
		Naphthalene	0.05 ppb	1 ppb
		Benomyl	10 ppb	15,000 ppb
		Ziram	5 ppb	1,000 ppb
	Indirect DNA Damaging Agents	Methyl Bromide	150 ppb	50,000 ppb
		Paraquat	100 ppb	1,300 ppb
		Bisphenol A	500 ppb	20,000 ppb
Cadmium Chloride		183 ppb	20,000 ppb	

요약

본 연구는 4가지 종류의 재조합 발광성 미생물을 이용하여 내분비계 장애물질로 알려진 여러 가지 물질에 대한 cellular toxicity를 유전자 손상, 단백질 손상, 산화적 손상, 생물막 손상으로 구별하여 확인하였다. 4가지 발광성 미생물의 반응성에 따라 내분비계 장애물질의 독성 형태를 규명할 수 있었고, 생명체에 미치는 독성 정도를 확인할 수 있었다. 또한 유전자 손상을 탐지할 수 있는 DPD2794의 경우 유전자 손상을 일으키는 형태에 따라 두 그룹으로 보다 세분화가 가능하였다. 따라서 본 연구결과를 바탕으로 내분비계 장애물질이 호르몬 교란으로 인한 피해뿐만 아니라 cellular toxicity로 인한 피해 역시 입힐 수 있는 것으로 확인하였고, 이들 발광성 박테리아를 이용하여 그 독성 형태를 정확하게 파악할 수 없었던, 유해 물질들의 분류를 위한 screening method로의 개발 역시 가능할 것이다.

감사의 글

본 연구는 98년도 G7 환경기술 연구개발사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

1. S. P. Rupani, M. B. Gu, K. B. Konstantinov, P. S. Dhurjati, T. K. Van Dyk and R. A. LaRossa, "Characterization of the Stress Response of a Bioluminescent Biological Sensor in Batch and Continuous Cultures" (1996), *Biotechnol. Prog.* 12, 387-392
2. J. Min, E.J. Kim, R. A. LaRossa, and M.B. Gu, "Distinct responses of a *recA::luxCDABE Escherichia coli* strain to direct and indirect DNA damaging agents" (1999), *Mutation Res.* 442, 61-68