

## 자성 박테리아 *Magnetospirillum* sp. AMB-1 의 1 차원적, 2 차원적 운동성을 이용한 새로운 수질 독성 측정 방법

성시명, 박태현

서울대학교 응용화학부, 세포 및 미생물공학연구소

전화 (02) 887-6162, FAX (02) 875-9348

### Abstract

In order to develop a novel toxicity measurement system using the persistent swimming property of magnetic bacteria along an externally applied magnetic field, certain characteristics of *Magnetospirillum* sp. AMB-1 cells were examined including their growth pattern, motility, magnetosensitivity, swimming speed. Plus, the effect of toxic compounds on the swimming speed was assessed relative to application as a toxicity sensor. The relative sensitivity of the proposed system was comparable to Microtox<sup>®</sup>, which is commercially available. And the aerotactic behavior of AMB-1 cells was also examined with a viewpoint of another method of toxicity measurement.

### 서론

일반적으로 자성 박테리아는 세포 내에 마그네토솜(magnetosome)이라 불리는 세포막에 둘러싸인 작은 자석 알갱이들( $Fe_3O_4$  또는  $Fe_3S_4$ )을 가지고 있으며, 세포의 편모에 의해 지구 자기장 또는 외부 자기장의 방향을 따라 세포의 이동이 이루어진다<sup>1)</sup>. 자성 박테리아의 응용 가능성은 자기장을 이용하여 특정 방향으로 세포들을 이동하게 할 수 있는 주자성(magnetotaxis)에 있으며, 따라서 세포들의 이동도(motility)와 자기장 방향으로의 유영 속력은 자성 박테리아의 독특한 생물학적 활성이라 할 수 있다. 본 연구의 목적은 자성 박테리아의 가능한 응용으로서 수계 시료에 존재하는 독성 물질들이 세포들의 이동도 및 유영 속력에 미치는 독성 효과를 분석함으로써 수질을 정량적으로 평가하는 방법을 개발하는 것이다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양 방법

본 실험에는 *Magnetospirillum* sp. AMB-1 (ATCC 700264)이 사용되었으며, 성장 배지로는 MSGM (magnetic spirillum growth medium)을 사용하였다. 10 mL의 배지가 들어있는 시험관에 혐기적으로 배양한 세포들을 접종하여 교반배양기에서 26°C, 60 rpm으로 호기적 또는 혐기적 조건에서 배양하였다. 혐기적 조건은 질소가 채워진 glove bag에서 접종함으로써 만들어 주었다. 세포 농도는 Petroff-Hausser counting chamber를

사용하여 현미경에서 결정하였다.

#### 이동도와 자기민감도의 측정

호기적 또는 혐기적으로 성장하는 동안 이동도 및 자기민감도(magneto-sensitivity)의 변화를 측정하기 위하여, 초기 농도  $1.0 \times 10^8$  cells/mL로 접종하여 위에서와 같은 조건으로 배양하면서 매 4 시간마다 측정하였다. 세포들의 이동도는 전체 세포 수에서 이동도가 없는 세포 수를 확인함으로써 결정하였고, 자기민감도는 5% 포름알데하이드 용액으로 처리하여 세포들의 이동도를 없앤 후에 재물대 주위로 자석(표면 자기장 세기 약 0.4 tesla)을 돌릴 때 따라서 회전되는 세포들의 비율을 의미하며, 자기민감도 또한 자석에 따라 회전하지 않는 세포 수를 확인함으로써 결정하였다.

#### 유영 속력의 측정 및 독성 시험

혐기적 조건에서 배양한 AMB-1 세포들의 유영 속력을 측정하기 위하여 현미경 재물대 위에 자석을 위치시켜 외부 자기장을 만들어 주었으며, counting chamber의 너비  $50 \mu\text{m}$ 의 두 이웃한 grid line 사이를 통과하는 데에 걸리는 시간을 측정함으로써 각 세포들의 유영 속력을 결정하였다. 세포들의 이동도와 유영 속력에 미치는 독성 효과를 평가하기 위한 독성 물질로 1-propanol과 acetone이 사용되었으며, 다양한 농도의 독성 물질이 녹아있는 용액에 5 분 동안 노출된 세포들의 이동도와 유영 속력을 측정하였다.

#### 주기성의 관찰

혐기적 조건에서 배양한 AMB-1 시료 1 mL을 취하여 Ependorf 튜브에 넣고  $4^\circ\text{C}$ , 7500 rpm에서 10 분 동안 원심분리하여 20 배 농축한 시료( $8.0 \times 10^9$  cells/mL)를 얻은 후, Ependorf 튜브의 head space를 glove bag에서 질소로 채웠다. 현미경에서 시료  $0.7 \mu\text{L}$ 를 올려놓고 주기성(aerotaxis)을 관찰하였다.

### 결과 및 고찰

#### 세포 성장과 이동도 및 자기민감도

호기적 조건과 혐기적 조건에서 초기 농도  $1.0 \times 10^8$  cells/mL로 접종하여 약 20 시간 동안 배양하여 성장 정지기에 이른 각 세포 농도는 약  $5.0 \times 10^8$  cells/mL로서 비슷하였으며, 성장 패턴에 있어서 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 이동도는 혐기적 조건에서는 성장기 동안 약 90%를 유지하지만, 호기적 조건에서는 전반적으로 혐기적 조건에서보다 이동도가 작았으며(data not shown), 자기민감도 또한 이동도와 마찬가지로 혐기적 조건의 세포들이 호기적 조건의 세포들보다 전반적으로 자기민감도가 더 큰 것을 확인할 수 있었다(data not shown). 따라서 혐기적 조건에서 성장하는 세포들이 자기장의 방향으로의 운동성이 더 좋은 것으로 판단하여 이후의 실험에서는 혐기적인 조건에서 성장한 세포들을 시료로 사용하였다.

### 유영 속력과 독성 시험

혐기적 조건에서 성장한 70 마리의 세포에 대한 유영 속력은 20 ~ 110  $\mu\text{m}/\text{sec}$  로서 다소 넓은 분포를 보이는 것으로 확인되었으며, 이 분포에 대한 평균 유영 속력은 49  $\mu\text{m}/\text{sec}$  이며 표준 편차는 20  $\mu\text{m}/\text{sec}$  이다.

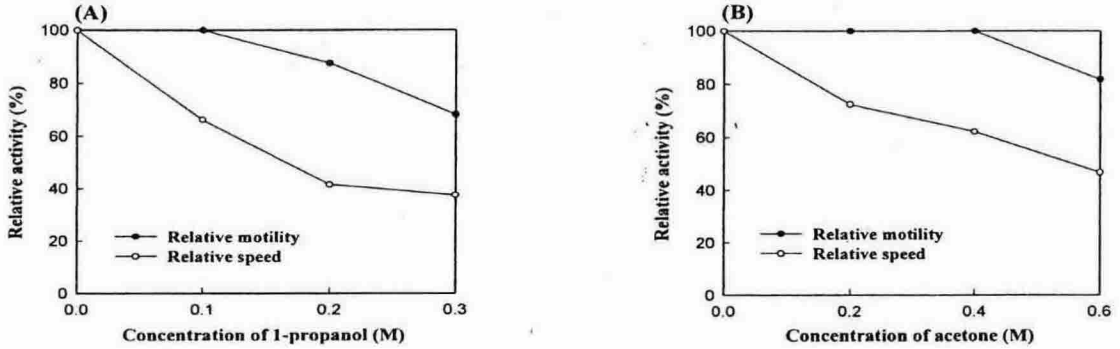


Figure 1. (A) Effect of 1-propanol on motility and swimming speed. (B) Effect of acetone on motility and swimming speed.

Figure 1 은 1-propanol 과 acetone 을 대상으로 AMB-1 세포들의 이동도와 평균 유영 속력에 미치는 영향을 농도에 따라서 보여주고 있다. 이동도에 있어서는 1-propanol 의 경우에 0.1 M 농도까지 그리고 acetone 의 경우에는 0.4 M 농도까지 콘트롤에 비해 줄어들지 않았다. 그러나, 평균 유영 속력에 있어서는 각 독성 물질의 농도 증가에 따라 평균 유영 속력이 선형적으로 감소하였다. 이는 독성을 평가하는 파라미터로서 평균 유영 속력을 사용할 수 있는 가능성을 보여준다고 할 수 있다.

Table I. Comparison of the relative sensitivity of AMB-1, Microtox<sup>®</sup>, *Daphnia magna*, and rainbow trout toxicity testing methods.

Chemical	AMB-1 SC <sub>50</sub> (M)	Microtox <sup>®</sup> EC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (M)		<i>Daphnia magna</i> 48-hr LC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (M)	Rainbow trout 96-hr LC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (M)
		5 min	15 min		
1-Propanol	0.20	0.295	0.306	0.105	0.053
Acetone	0.54	0.383	0.498	0.272	0.127

<sup>a</sup>50% inhibition of the bioluminescence

<sup>b</sup>50% live-death point

Table I 은 1-propanol 과 acetone 에 대하여 기존에 개발된 Microtox<sup>®</sup> 및, *Daphnia magna* 와 Rainbow trout 를 이용한 독성 시험의 결과<sup>2)</sup>와 본 연구에서 수행한 독성

시험의 결과를 보여주고 있다. 자성 박테리아 AMB-1 세포들의 평균 유영 속력이 50%로 감소하는 농도를  $SC_{50}$ 으로 정의하였으며, 이 값들은 Microtox<sup>®</sup>의  $EC_{50}$  값들과 비슷한 것을 알 수 있다.

#### 주기성의 관찰

자성 박테리아는 대부분 미세호기성(microaerophilic)이며, 각 균주마다 선호하는 용존산소 레벨에서 band 나 veil 을 형성한다. Fig. 2 는 용존산소가 거의 없는 AMB-1 시료를 슬라이드 글라스와 커버글라스로 위와 아래가 막혀있는 상황에서 water disc (두께 70  $\mu$ m)의 주위로 대기의 산소가 녹아 들어가게끔 장치를 꾸며 시간에 따른 band 의 이동을 관찰한 것이다.

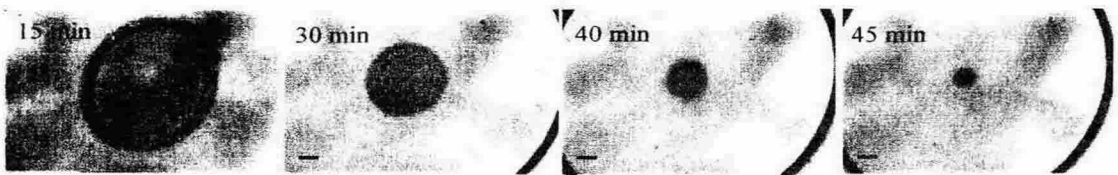


Figure 2. Aerotactic band formations of AMB-1 cells. The bar is equivalent to 100  $\mu$ m.

시료를 올려놓고 나서 15 분 후에 처음으로 band 가 형성되었으며, 시간이 지나면서 산소가 녹아 들어오면서 band 가 disc 의 중심으로 이동하였다. 만약 독성 물질이 녹아있는 water disc 라면 세포들의 이동성과 유영 속력의 감소로 인해 중심으로 이동하는 band 의 농도는 독성 물질이 녹아 있지 않은 disc 에 비해 작아질 것이다. 따라서 microphotometry 를 이용한 water disc 의 2 차원적인 농도 분포를 확인한다면 새로운 독성 측정 방법이 가능하리라 생각된다.

#### 요약

미생물을 이용한 새로운 독성 측정 방법으로서, 본 연구에서는 자성 박테리아 *Magnetospirillum* sp. AMB-1 세포들의 유영 속력 측정을 통한 독성 측정의 가능성과, 발광 박테리아를 이용한 기존의 Microtox<sup>®</sup> 시스템에 견줄 수 있는 새로운 독성 측정 방법이라는 사실을 확인하였다. 또한, AMB-1 세포들의 주기성 관찰을 통해 또 다른 독성 측정 방법의 가능성을 확인하였다.

#### 참고문헌

1. Matsunaga, T. 1991. Applications of bacterial magnets. Trends Biotechnol. **9**: 91-95.
2. Munkittrick, K. R., Power, E. A., Sergy, G. A. 1991. The relative sensitivity of Microtox<sup>®</sup>, daphnid, rainbow trout, and fathead minnow acute lethality tests. Environ. Toxicol. Water Qual. **3**: 35-62.