

제조합 발광 박테리아를 이용한 환경독성탐지 및 휴대용 바이오 센서의 개발

최 수 형* · 구 만 복

광주과학기술원 환경공학과

전화 (062) 970-2440. FAX (062) 970-2434

* current address: 서울대학교 응용화학부

Abstract

Bioluminescent bacteria fusing the stress promoter and *lux* gene have been developed as a toxicity biosensor. The light emitting bioluminescent bacteria have been used to measure the toxicity of many different chemicals. In this study, specially, DPD2540 (*fabA::luxCDABE*) was used to detect and classify phenolic toxicity to the cells membrane fatty acids, and then the relationship between phenolic toxicity and the distribution of various phenols in the cell was determined, with a model and equations provided. In addition, to show the possibility of detecting and classifying the toxicity of a chemical mixture, which may be present in wastewater, various bioluminescent bacteria having different stress promoters were used and their distinct response to the sample mixture was measured. To extend the applicable area of these bioluminescent bacteria to field, the portable biosensor using freeze-drying methods was developed and confirmed successfully.

서론

각종 오염사고로부터 환경 생태계로 유입되는 유해성 물질은 인류의 건강과 복지를 위협하고 있다. 따라서 환경 내에 존재하는 유해성 물질의 신속한 탐지가 환경관리에 있어서 무엇보다 중요하게 대두되고 있다. 지금까지 환경오염 정도를 측정하기 위하여 사용되던 방법은 주로 물리화학적 기기 분석 방법으로, 많은 시간을 요할 뿐 아니라 고가의 장비를 필요로 한다는 단점이 있다. 또한 이들 분석방법은 오염물질의 정량정성 분석은 가능하지만, 오염물질이 생물체에 미치는 독성 정도를 탐지하기는 불가능하다는 한계를 가지고 있다. 따라서, 보다 신속하고 경제적으로 생물체에 미치는 독성까지도 탐지할 수 있는 생물학적 경보체계의 필요성이 대두되었다. 이러한 점에 기초하여 *E. coli*의 stress promoter에 *V. fischeri*의 bioluminescence(*lux*) 유전자를 연결한 제조합 plasmid를 개발하였다¹⁾. 이는 stress 정도를 *lux* 유전자의 발현을 통한 빛의 방출정도로 신속 정확하게 측정할 수 있으

며 또한 다양한 종류의 stress promoter를 이용한다면 측정하고자 하는 유해성 물질이 가지는 독성의 정보까지도 제공할 수 있으므로 매우 효율적인 biosensor로 각광받고 있다.

본 연구에서는 이러한 재조합 발광박테리아를 이용하여 환경독성을 분류하고 신속히 탐지하기 위한 휴대용 바이오 센서를 개발하였다^{2) 1)}.

실험방법

본 실험에서 사용된 균주를 표 1에 나타내었다. 각 균주는 100 mL의 배지에서 지수성장기동안 성장시킨 후 다시 새로운 배지에 나누어 접종하였다. 또한 새로운 배양이 지수성장기에 이르렀을 때 서로 다른 농도의 독성물질을 주입하였다. 동결건조 세포를 얻기 위해서는 지수성장기까지 배양된 균주를 4000 rpm에서 40분간 centrifuge 한 후 pellet에 LB 배지 10 mL와 동결보존액 10 mL을 1 : 1 비율로 혼합하여 동결건조를 실시하였다. 성장의 정도는 OD600에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였으며, 독성의 정도에 따른 빛의 세기는 luminometer (TUNER TD-20e)로 측정하였다. 모든 실험은 3개의 sample을 사용하여 평균하였다. 각 chemical에 대한 독성탐지 정도는 relative bioluminescence (RBL, 독성물질에 대한 bioluminescence / 대조군에 대한 bioluminescence)로 나타내었다.

표 1. 실험에 사용된 발광성 미생물의 종류

균주	플라스미드/숙주	Phenotype
TV 1061	pGrpELux/RFM443	KanR, AmpR, Membrane-damage sensitive
DPD 2794	pRecALux/RFM443	KanR, AmpR, DNA-damage sensitive
DPD 2511	pKatGLux/RFM443	KanR, AmpR, Oxidative-damage sensitive
DPD 2540	pFabALux/RFM443	KanR, AmpR, Fatty acid-damage sensitive
pLITE201 photobacteria	pLacLux/RFM443 Wild type	AmpR, General cellular toxicity sensitive General cellular toxicity sensitive

결과 및 고찰

다양한 페놀에 대한 DPD2540의 독성탐지 반응

Phenol은 membrane을 손상시키는 물질로 알려져 있으며⁵⁾, 이러한 손상은 membrane fatty acid 손상을 탐지하는 DPD2540(*fabA::lux*)에 의해 탐지될 수 있을 것으로 기대되었다. 하지만 모든 phenol 류가 membrane fatty acid를 손상시키리라는 기대와는 달리 DPD2540의 phenol에 대한 반응은 크게 두 부류로 분류됨을 확인할 수 있었다. 표2에서 보는바와 같이 pKa>7이면서 주로 [HA] 형태로 존재하고 있는 phenol 류의 경우는 membrane fatty acid손상에 따른 dose-dependent bioluminescent response(DDBR)을 보임과 동시에 성장저해가 함께 일어나는 반면, pKa<7인 주로 [A] 형태로 존재하는 phenol 류의 경우는 심각한 성장저해를 보이

나 membrane fatty acid 손상에 따른 DPD2540의 생물학적 빛의 발생 (DDBR)은 나타나지 않았다.

표 2. 여러가지 phenol 류에 대한 DPD2540의 반응성 비교

	Phenolic Compounds	Pka ^a	[HA] [%]	C.C. ^b [mM]	DDBR ^c	EC20 [raM] ^d	LogK _{ow} ^a
Group I (pKa > 7, DDBR)	o-cresol	10.28	99.9	1.84	Yes	2.38	1.95
	p-cresol	10.26	99.9	1.84	Yes	2.00	1.74
	m-cresol	10.09	99.9	0.46	Yes	0.44	1.96
	Phenol	9.99	99.9	7.5	Yes	6.00	0.46
	2-chlorophenol	8.56	97.3	0.77	Yes	1.50	2.15
	4-chlorophenol	9.41	99.6	0.77	Yes	0.96	2.39
	2,4-dichlorophenol	7.89	88.6	0.25	Yes	0.19	3.06
	4-nitrophenol	7.08	54.6	0.38	Yes	0.27	1.91
Group II (pKa < 7, No BL response)	2,4,5-trichlorophenol	6.94	46.6	No	No	0.03	3.72
	Pentachlorophenol	4.70	0.5	No	No	0.16	4.7
	2,4-dinitrophenol	4.09	0.12	No	No	0.25	1.67
	2,6-dinitrophenol	3.97	0.09	No	No	0.31	1.3

^a Handbook of physical properties of organic chemistry, edited by CRC, 1997

^b Concentrations showing the maximum specific bioluminescence response

^c Dose dependent bioluminescent response

^d Concentrations in the media showing 20 % growth inhibitions.

따라서 [HA] 형태가 membrane fatty acid 손상과 밀접한 관계가 있을 것이라 사료 되었으며, membrane fatty acid 손상과 phenol류의 transport사이의 연관성을 규명하기 위하여 model equation 을 제시하였다 (data not shown). 그 식을 이용하여 얼마만큼의 [HA] 형태의 phenol이 membrane과 접촉되는지를 수식으로 계산하였으며 이를 실험 data와 비교하여 좋은 연관성이 있음을 확인하였다.(data not shown) 이러한 결과로부터 membrane fatty acid 손상은 주로 phenol 류의 [HA] 형태에 의해 일어날 것이 예측되었으며 이러한 손상은 membrane fatty acid 손상을 특이적으로 탐지하는 DPD2540에 의해 분류가 가능함을 확인하였다.

다양한 제조합 발광박테리아를 이용한 독성혼합물질의 탐지 및 비교

수질에는 다양한 종류의 독성물질이 오염될 가능성이 있다. 본 연구에서는 이러한 수질에 오염된 다양한 독성물질이 생물체에 어느 정도의 독성을 미치고 어떤 특정부위에 유독하게 작용하는지를 알아보기 위해서 독성물질을 인위적으로 혼합시키고 이들의 독성여부를 여러 가지 제조합 균주를 이용하여 확인하였다. 그 결과 이들 제조합 발광박테리아는 여러 가지 혼합독성물질 중에서 자신의 stress promoter를 자극하는 물질이 들어있는 혼합독성물질의 경우에만 특이적인 생물학적 발광반응을 나타냄을 확인하였다 (data not shown).

현장적용을 위한 휴대용 바이오 센서의 개발

재조합 박테리아를 현장에서도 손쉽게 적용하기 위하여 균주의 수송과 보관이 용이한 동결건조기법을 도입하여 동결건조 방법을 최적화 하였다 (data not shown). 동결 건조된 독성탐지 균주의 현장적용을 위해서는 이동이 용이하고 취급이 간편한 소형 탐지장치가 필요하다. 따라서 그림 3과 같은 휴대용 소형 독성탐지 시스템을 개발하고 여러 가지 독성물질에 대한 독성탐지를 수행한 결과 30분내에 효율적으로 독성의 판별이 가능함을 확인하였다.

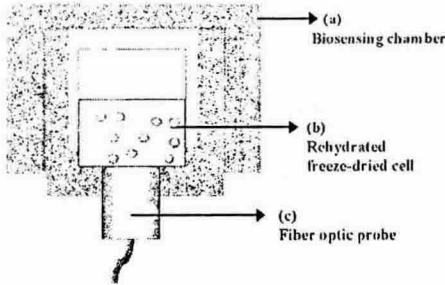


그림 2 휴대용 바이오 센서의 모형도

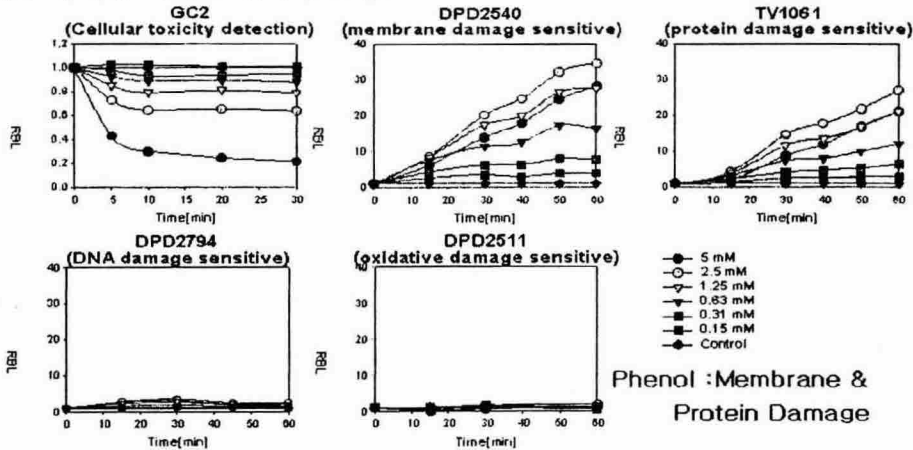


그림 4 휴대용 바이오 센서를 이용한 phenol의 독성탐지

감사의 글

본 연구는 환경모니터링 신기술 연구센터(ADEMRC)를 통한 한국과학재단 우수연구센터의 지원에 의해 수행되었다.

참고문헌

1. Belkin, S. *et al.* (1997) A panel of stress-responsive luminous bacteria for toxicity detection. *Water Res.*, 31, 3009-3016.1.
2. Choi, S. H. and Gu, M. B. (2001) Phenolic toxicity; detection and classification through the use of a recombinant bioluminescent *Escherichia coli*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 248-255.
3. Gu, M. B. and Choi, S. H. (2001) Monitoring and classification of toxicity using recombinant bioluminescent bacteria. *Water Science and Technology*, 43, 147-154.3.
4. Gu, M. B., Choi, S. H., and Kim, S. W. (2001) Some observations in freeze-drying of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* for toxicity monitoring. *J. Biotechnol.*, 88, 95-105.
5. Paulus, W. (1993) Substance classes : Properties - Effectiveness - Applications (1st ed.) Microbicides for the protection of materials, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, LK. p141-146.