

재조합 발광대장균과 해양 발광 미생물을 이용한 중금속 급성독성평가

이상민* · 배희경†

*공주대학교 공과대학 환경공학과 · 국립환경연구원 위해성평가과

(2005년 7월 25일 접수, 2005년 8월 31일 채택)

Comparison of Marine Luminescence Bacteria and Genetically Modified Luminescence *E. coli* for Acute Toxicity of Heavy Metals

Sangmin Lee* · Heekyung Bae†

*Department of Environmental Engineering, Kongju National University

Environmental Risk Assessment Division, National Institute of Environmental Research

ABSTRACT : The responses of two luminescence-based biosensors were studied on various heavy metals in aqueous solutions. One was recombinant *E. coli* (DH5 α /pSB311), genetically modified luminescence-based bacteria, and the other was *Vibrio fischeri* used for the LumisTox system. The recombinant *E. coli* was marked with the lux CDABE gene from multicopy plasmid, pACYC184, originally isolated from *Photobacterium luminescens*. The DH5 α /pSB311 had a characteristic of no organic substrate for its luminescence reaction. Among the tested heavy metals, Zinc and cadmium were less toxic than copper and mercury. The recombinant *E. coli* was more sensitive to toxicity of heavy metals than the LumisTox. The order of toxicity of the heavy metals to the recombinant *E. coli* was Hg²⁺ > Cu²⁺ > Zn²⁺ > Cd²⁺. In case of the LumisTox, the order of the toxicity of heavy metals was Hg²⁺ > Cu²⁺ > Cd²⁺ > Zn²⁺. The genetically modified luminescence-based biosensor offers a range of sensitive, rapid, and easy to use methods for assessing the potential toxicity of heavy metals in aqueous samples.

Key Words : Acute Toxicity, Luminescence, Heavy Metals, Recombinant *E. coli*

요약 : 수계에 존재하는 중금속의 급성독성을 평가하기 위해 발광유전자를 대장균에 삽입한 재조합 대장균(DH5 α /pSB311)과 해양성 발광세균인 *Vibrio fischeri*를 바이오센서로 사용하는 LumisTox를 비교 평가하였다. 재조합 발광대장균인 DH5 α /pSB311는 *Photobacterium luminescens*로부터 발광유전자인 lux CDABE를 분리하여 multicopy plasmid pACYC184에 재조합한 것이다. DH5 α /pSB311는 기존의 재조합 발광세균과 달리 발광반응 시 별도의 기질이 소모되지 않는 특성이 있다. 중금속의 급성독성을 평가한 결과 수은과 구리가 아연과 카드뮴에 비해 상대적으로 강한 독성을 나타냈고 DH5 α /pSB311의 중금속에 대한 민감도는 *Vibrio fischeri*를 이용한 LumisTox에 비해 같거나 민감한 반응을 나타냈다. 측정된 중금속 급성독성의 강도는 DH5 α /pSB311의 경우 Hg²⁺ > Cu²⁺ > Zn²⁺ > Cd²⁺의 순이고 LumisTox는 Hg²⁺ > Cu²⁺ > Cd²⁺ > Zn²⁺ 순으로 나타났다. 재조합 발광세균을 이용한 바이오센서는 검출민감도, 신속한 측정 및 조작의 간편성을 충족시킬 수 있는 기술이며 또한 재조합 기술의 진보에 따라 계속적으로 기능이 향상될 수 있다는 특징이 있다.

주제어 : 급성독성, 발광, 중금속, 재조합, 대장균

1. 서론

중금속을 포함한 오염물질들이 환경에 미치는 영향을 평가하기 위해 여러 독성 측정방법들이 연구되고 있다. 기본적으로 화학적 분석을 통한 해당 중금속의 독성을 평가하는 방법이 있는데 폐수 내에는 다양한 독성물질이 함께 존재하며 이러한 혼합물은 개개의 독성물질 농도에 선형적으로 비례하는 독성으로 표현되지 않고 생체의 종류나 특성 및 상호작용으로 인해 독성으로 표현된다.¹⁾ 현존하는 급성독성 평가법은 호흡률 측정, 현미경 관찰, 화학적 분석 그리고 발광 측정방법들이 있다.²⁾ 가장 이상적인 급성독성 평가법은

경제적이고 측정이 쉽고 검출능이 높아야 하는 특성을 모두 만족시키는 방법이어야 한다.

수중에 존재하는 중금속 독성 평가기술로 대표적인 예는 물고기와 같은 척추동물과 *Daphnia magna*와 같은 무척추 수생생물들을 독성물질에 일정시간 노출시킨 후 그 운동 상태나 사멸정도를 파악하거나 *Vibrio fischeri*의 발광저해, *E. coli*나 *Bacillus*균의 생합성 저해등과 같은 미생물 시험방법들이 있다.³⁾ 물고기나 무척추 수생생물을 이용한 독성측정방법은 대상 개체들을 균일한 활성을 유지하도록 배양하는 것이 번거롭고 개체수의 한계로 인한 시험결과의 재현성이 상대적으로 떨어지는 단점이 있다.^{4,5)} 그러나 발광 미생물이나 세포내 효소를 이용한 급성독성측정방법은 시험과정이 간편하고 비용이 절감되고 많은 개체를 대상으로 평가하므로 재현성이 높은 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다.

† Corresponding author

E-mail: hkybae1113@hanmail.net

Tel: 032-560-7221

Fax: 032-560-7256

MicroTox와 LumisTox법은 환경오염물질이나 유해물질의 독성검출을 위해 개발된 것으로 LumisTox법은 MicroTox법과 유사한 방법으로서 해양발광세균인 *Vibrio fischeri*를 독성물질에 노출했을 때 발광량의 감소를 측정한다.⁶⁾ Microtox법은 *photobacterium*의 발광량 감소를 측정하는데 이 방법은 몇가지 단점이 있다. 예를 들어 독성물질에 대한 검출 민감도가 해양성 발광세균이 요구하는 저온과 고염농도 조건의 변화가 발생하면 감소하곤 한다. 이러한 한계를 극복하기 위해서 재조합 발광대장균(*E. coli*)을 바이오센서로 사용하는 방법이 연구되고 있다. 대장균을 재조합 발광미생물의 매개체로 사용되는 이유는 대장균에 대한 유전정보가 가장 많이 연구되어 왔기 때문이다. 그러나 선행 연구된 대부분의 재조합 대장균은 lux AB를 발광유전자로 사용하였고 lux AB가 재조합 된 대장균은 n-decanal이라는 고가의 기질이 발광반응에 필요하다.^{7,8)} 이러한 단점은 재조합 발광대장균을 바이오센서로 사용할 때 n-decanal이라는 기질투여라는 단계가 첨가되어 분석과정이 복잡해지고 기질구입에 따른 비용도 증가하게 된다.^{9,10)}

살아있는 대장균에 lux AB 발광 유전자를 재조합하여 바이오센서로 사용하려는 시도는 최근 여러 연구자들에 의해 시도되고 있으며 유해물질로 인한 스트레스나 독성평가를 위해 사용되고 있다.^{11~13)} 그러므로 본 연구에서는 급성 독성 평가시 발광세균이 외부 기질을 요구치 않도록 lux CDABE operon을 재조합한 발광대장균(DH5α/pSB311)을 제작하였고 이를 해양성 발광세균인 *Vibrio fischeri*를 사용하는 LumisTox법을 비교하여 중금속 급성독성에 대한 평가를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 배지 및 배양방법

실험에 사용된 균주의 배양에는 LB 배지(Luria-Bertani; trytone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, sodium chloride 5 g/L)를 사용하였으며 항생제 내성균주의 배양을 위해 Ampicilline을 첨가하였고, *E. coli*는 호기적 조건하에서 37°C, 180 rpm의 교반배양기에서 배양하였다. 독성실험에 사용할 발광미생물의 농도를 일정하게 유지하기 위해서 세균시료 1 mL를 cuvette에 취한 후 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서 측정 후 사용하였다.

2.2. 재조합 발광대장균 제조

Plasmid pSB311을 transformation 하기 위해서 competent cell제조는 CaCl₂ method에 따라 *E. coli* DH5α를 하루전 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 50 mL LB 액체 배지에 배양액 0.5 mL을 접종시킨 후 37°C 교반배양기에서 OD(660 nm) 0.4 정도로 배양 후 얼음에 10분간 둔다. 4°C, 5000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 버리고 멸균된 CaCl₂의 차가운 용액을 10 mL 첨가 후 혼탁시켜 얼음에 30분간 두었다가 튜브에 0.1 mL씩 나누어 놓는다. Competent cell 0.1 mL에 plasmid 5 μL를 섞은 다음 얼

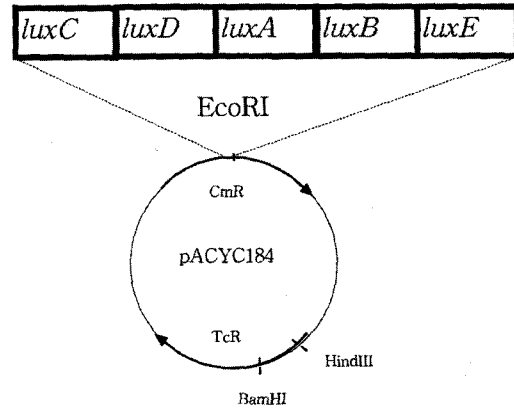


Fig. 1. Cloning the lux gene from *Photorhabdus luminescens* in pACYC184.

음에 30분간 방치 후 42°C에서 2분간 열처리한 후 0°C에서 15분간 정지한다. LB액체배지 1 mL를 tube에 첨가하여 37°C에서 1시간 배양하고 0.1 mL을 선택배지(Tc 10 μg/mL)에 도말하여 37°C에서 12시간 배양한다. Fig. 1은 multi-copy 플라스미드 pACYC184로부터 발광유전자 lux CDABE를 복제하는 모식도를 나타낸다.

2.3. 재조합 대장균의 발광량 측정

재조합된 대장균 10%를 접종한 후 적정시간이 지난 균주를 생리 식염수에 10, 100배 희석한 후 발광량 측정용 cuvette에 1 mL을 취하여 Luminometer(Berthold Lumate LB 9501)로 측정하였다. 모든 시료는 상온에서 측정하였다. Luminescence의 단위는 RLU(Relative Luminescence Unit)로 1분당 1 mL 시료에서 발생하는 빛의 양을 mV로 나타낸 것이다.

2.4. LumisTox 발광미생물의 활성화

2% NaCl 용액을 준비하고, 냉동 상태의 배양용액을 상온의 물에 녹이고 incubator에 넣어 15분간 정지해 둔다. 냉동된 발광미생물을 꺼내 물이 담긴 비이커에 담구어 2분간 해동하고 배양용액을 0.5 mL 첨가 후 약하게 흔들어주고 incubator에 놓아둔 후 발광미생물을 배양액이 담긴 cuvette으로 모두 이동시킨다.

2.5. 중금속 이온에 대한 독성

중금속시료는 2차 증류수를 이용하여 9가지 희석배수로 준비하여 duplicate로 독성실험을 수행하여 effective concentration (EC₅₀)을 각 시료 공히 조사하였으며 실험한 사용한 중금속의 종류는 CuSO₄, CdCl₂, HgCl₂, ZnSO₄를 증류수에 용해시켜 stock용액을 만들고 실험 시 희석하여 사용하였다. 재조합 대장균인 *E. coli* DH5α/pSB311는 12시간 배양하여 이것을 접종원으로 하여 4시간 배양한 배양액과 활성화된 LumisTox를 15°C와 실온(25°C)에서 중금속에 30분간 노출 후 발광량의 감소율을 측정하였다.

생물독성은 일반적으로 effective concentration으로 표현되며 EC₅₀값은 발광미생물의 발광량이 50% 감소하였을 때 농

도를 나타낸다. 관찰시간은 30분으로 하였으며 이때 측정된 빛의 감소는 독성의 측정을 정량적으로 할 수 있게 한다. 발광미생물을 이용하여 독성을 측정할 때 발광미생물은 시간이 지남에 따라 발광량이 자연적으로 감소하므로 이에 대한 보정계수를 고려하여 EC₅₀을 산정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 온도가 발광특성에 미치는 영향

폐수를 포함한 수질조건에서 독성물질의 영향을 확인하기 위한 생물학적 경보장치인 MicroTox와 LumisTox의 경우, 해양미생물을 사용하기 때문에 발광이라는 생리적 특징을 발현하기 위해서는 검사하려는 시료에 해수 염분농도에 근사한 NaCl을 첨가해 주어야 하고 15°C라는 낮은 온도가 적정 생육온도이기 때문에 상온에서 독성검사 시 온도에 대한 영향을 많이 받고 운전 시 냉동 건조된 발광미생물을 rehydration 시킨 후 시료와 혼합해야 하는 번거로움이 있다. 이전 연구에서 *V. harveyi*의 luxAB 유전자만을 가진 재조합 대장균을 가지고 수행한 발광실험은 있었으나⁷⁾ 이는 발광미생물의 발광특성을 대장균으로 재조합했다는 의미는 있으나 lux operon 특성상 발광실험 시 고가의 특정기질이 필요하다는 단점이 있고 기존의 연구들이 재조합된 발광미생물의 기본적인 발광특성에 대한 조사가 간과된 채 중금속이나 유기독성물질에 대한 독성반응에 대해서만 연구가 진행되었다.^{11,12)}

Fig. 2는 15°C와 상온(25°C)에서 재조합 발광 대장균인 DH5α/pSB311과 LumisTox의 발광특성을 비교한 것이다. 15°C에서는 DH5α/pSB311가 LumisTox보다 발광량 감소가 크게 나타났으나 25°C에서는 DH5α/pSB311는 10⁶ RLU의 발광량을 나타내었으나 LumisTox는 시간이 지남에 따라 발광이 감소하여 4시간 후 발광량이 5×10³ RLU로 감소하는 특성을 나타냈으며 이는 재조합 발광 대장균인 DH5α/pSB311의 발광특성은 온도변화에 큰 영향을 받지 않는 것에 비해 LumisTox는 15°C와 25°C조건에서 발광특성이 최소 6배(2시간 노출)에서 최대 60배(4시간 노출)까지 변화하였다.

일반적 반응속도론에 의하면 온도에 따른 반응속도의 변화는 Vant hoff arrhenius식을 따른다. 단 생물반응의 경우는 대부분이 효소반응에 기인하므로 효소의 변성이 일어나는 45°C 이하에 대해서만 arrhenius식을 적용한다.

$$\frac{k_2}{k_1} = \theta^{(T_2 - T_1)} \quad (1)$$

k₁: T₁에서의 반응속도

k₂: T₂에서의 반응속도

θ: 온도반응계수(1.04~1.08)¹⁴⁾

식 (1)에 따르면 25°C의 반응속도는 k₂₅ = k₁₅*(1.48~2.25)를 나타낸다. 그러나 Fig. 2의 *Vibrio fischeri*를 사용한 LumisTox의 경우 온도가 15°C에서 25°C로 상승함에 따라 발광반응

이 감소하였고 감소 비율도 2시간에서 5배 감소, 4시간에서 60배 감소하는 특이한 결과를 나타내었다. 이러한 결과에 대한 원인으로서는 우선 *Vibrio fischeri*는 심층 해양성 세균으로 저온에서 활성을 나타내는 psychrophiles의 특징으로 판단되며 일반적 중속영양세균과 같이 25°C에서 활성의 증가를 보이지 못하고 반대로 감소하는 결과를 나타낸 것이다. 재조합 발광세균과는 다르게 25°C에서는 발광량 감소가 매우 크게 나타난 것도 psychrophiles의 생리적 한계온도를 벗어났기 때문에 생물활성도(여기서는 발광량)가 크게 감소함에 기인한 것이다. 재조합 발광세균의 경우는 온도가 15°C에서 25°C로 변화함에 따라 약 5배 정도 발광량의 증가를 나타내었다. 이는 일반적인 온도영향에 부합되는 방향이기는 하나 그 정도에 있어서는 arrhenius식을 통한 반응속도 계산값과 차이를 나타내고 있다. 즉 식 (1)에 의하면 온도가 10°C 변화함에 따라 1.48~2.25정도의 반응속도 차이를 나타내야 하는데 실험에 의한 발광량의 변화는 약 5배 정도를 나타내었다. 온도변화가 발광미생물의 발광량 변화에 미치는 영향은 화학반응식에 기초로 하여 만들어진 arrhenius 식으로는 정량적인 발광량 변화를 설명하기 어려웠다. 그러므로 추후 발광량을 이용하기 위해 다른 종류의 세균이나 유전자 도입 시 해당 경우의 온도 영향이 충분히 검토되어야 할 것이다.

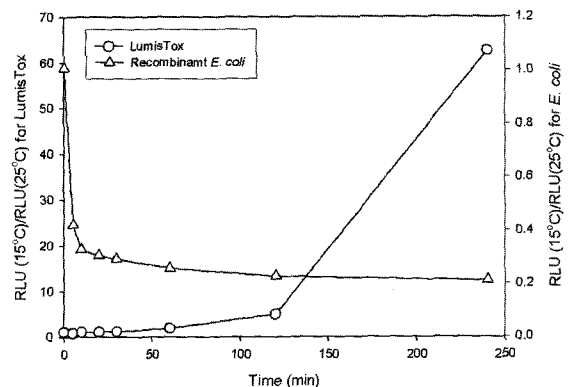


Fig. 2. Behavior of light emission curve of LumisTox and recombinant *E. coli*(DH5α/pSB311) with temperature.

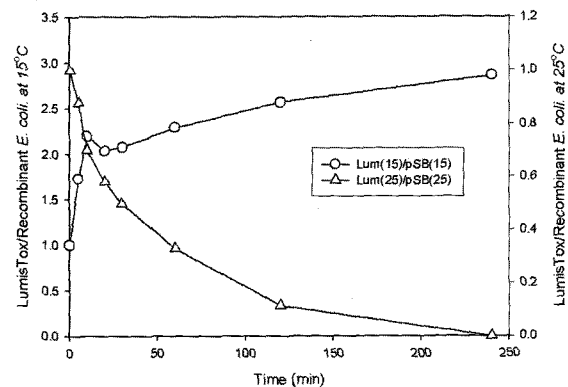


Fig. 3. Comparison of light emission intensity of LumisTox and recombinant *E. coli*(DH5α/pSB311) at specific temperatures.

Table 1. Bioluminescence assay of the *E. coli* DH5 α (pSB311 : lux operon)

Strains of <i>E. coli</i>	OD(660 nm)	Light Output(RLU)*
DH5 α	1.26	6.7×10^2
DH5 α /pSB311	1.19	5.4×10^7

* RLU (relative luminescence unit) * background : 1.2×10^2

Fig. 3은 15°C와 25°C에서 LumisTox의 발광량의 비와 재조합 발광 대장균인 DH5 α /pSB311의 발광량의 비를 비교한 것이다. 해양 박테리아를 발광미생물로 사용하는 LumisTox는 15°C에서 DH5 α /pSB311에 비해서 4시간 노출조건에서 약 2.5배의 발광량을 나타냈으나 25°C에서는 온도를 제외한 동일 조건에서 1/10이하의 발광량을 나타냈다. 이는 Fig. 2에서 설명했듯이 LumisTox는 심층해양성 세균으로 psychrophiles 특성을 나타내고 대장균을 이용한 재조합 발광세균은 중속영양세균의 온도특성을 유지하므로 15°C에서는 LumisTox가 발광량이 크고 25°C에서는 재조합 발광세균이 큰 발광량을 나타낸 것이다.

LumisTox와 같은 해양성 발광세균의 온도에 따른 절대 발광량 및 온도 변화에 따른 발광량의 안정성 두 가지 모두 재조합 발광세균이 우수한 것으로 나타내었다.

Table 1은 일반 대장균(DH5 α)과 재조합 대장균(DH5 α /pSB311)에서 측정된 발광량을 보여주고 있다. 실험에 사용된 대장균의 농도는 660 nm에서 흡광도로 측정하였고 최대한 동일한 농도에서 발광량을 측정하였다. 측정결과 재조합 대장균의 발광량은 5.4×10^7 RLU로 나타났고 발광반응이 나타나지 않는 일반대장균인 DH5 α 는 background RLU를 나타내었다.

3.2. 재조합 발광미생물과 LumisTox의 중금속 급성독성 평가

카드뮴(Cd²⁺)은 “이따이 이따이” 병으로 잘 알려진 중금속으로 Cd²⁺에 의한 독성은 sulfhydryl기에 대한 강한 친화성에 기인하며 인체에 중독 시 신장장애와 골연화증을 유발시킨다. Fig. 4은 Cd²⁺에 대한 DH5 α /pSB311과 LumisTox를 이용한 독성평가 결과이다. 독성평가는 중금속 용액을 투여 후 30분간 정지한 후 발광량 감소를 평가하였다. Cd²⁺의 농도는 2 mg/L에서 25 mg/L까지 9가지 Cd²⁺농도에 대한 독성을 발광량의 감소를 통해 평가한 것이다. Cd²⁺은 LumisTox와 DH5 α /pSB311 모두에게 독성을 나타냈으며 EC₅₀의 경우 LumisTox와 DH5 α /pSB311가 각각 22 mg/L와 20 mg/L를 나타내어 저농도 범위에서 Cd²⁺에 대한 급성독성은 DH5 α /pSB311가 더 민감함을 보여주고 있다(Fig. 3). 저농도의 독성을 의미하는 EC₂₀의 경우 LumisTox는 14.5 mg/L이고 DH5 α /pSB311는 5.2 mg/L를 나타내고 있다. 이는 Cd²⁺에 대해서 DH5 α /pSB311와 LumisTox는 비슷한 민감도를 나타내지만 Cd²⁺ 농도가 저농도 일때는 DH5 α /pSB311가 보다 민감한 경향을 나타내고 있다는 의미이다.

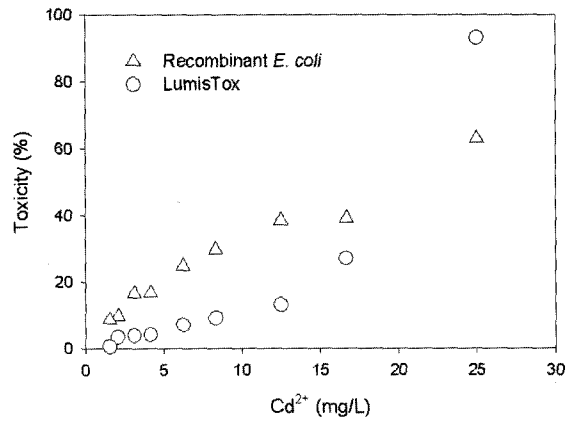


Fig. 4. Comparison of the two luminescence based bacteria for the toxicity of Cd.

Fig. 5는 Zn²⁺ 이온에 대한 독성을 DH5 α /pSB311과 LumisTox를 이용하여 비교 실험한 것이다. Zn²⁺에 대한 독성은 DH5 α /pSB311의 경우가 LumisTox보다 민감한 발광량 감소 특성을 나타내었고 EC₅₀의 경우 DH5 α /pSB311는 6.3 mg Zn²⁺/L이고 LumisTox는 25.7 mg Zn²⁺/L를 나타내어 DH5 α /pSB311이 Zn²⁺에 대해서 LumisTox보다 감지능력이 민감함을 알 수 있다.

Fig. 6는 Hg²⁺이온에 대한 독성을 dose-reponse곡선으로 표현한 것이다. Hg²⁺는 DH5 α /pSB311와 LumisTox 모두 비슷한 발광량의 감소를 나타냈다. Hg²⁺에 대한 두 바이오센서의 EC₅₀을 살펴보면 DH5 α /pSB311는 0.6 mg Hg²⁺/L이고 LumisTox는 0.4 mg Hg²⁺/L를 나타냈다. Hg²⁺은 독성을 평가한 중금속 중 가장 높은 생물 독성을 나타냈으며 Table 2에 나타난 선행연구결과의 비교와 일치되는 경향을 보여준다. 본 결과는 무기수은에 대한 급성독성이고 이러한 무기수은이 혐기조건을 거치면 생물학적 메틸화가 일어나 메틸수은으로 변하게 된다. 메틸수은은 수은의 생체내로 이동성을 크게 증가시키며 생체내의 축적 농도를 증가시켜 결과적으로 위해성이 증가하게 되므로 감시 및 관리에 더욱 주의가 필요한 중금속 항목이다.

Fig. 7은 Cu²⁺에 대한 독성평가비교로서 DH5 α /pSB311이 LumisTox보다 민감한 독성을 나타내고 있으며 EC₅₀의 경우 DH5 α /pSB311는 3.1 mg Cu²⁺/L이고 LumisTox의 경우 7.0 mg Cu²⁺/L를 보여주고 있다. 구리의 생체에 대한 영향은 흡수된 구리가 대부분 간에서 대사가 이루어지므로 간 질환을 유발하고, 설사, 구토 및 황달등을 일으킨다고 보고되고 있다.

Fig. 8은 DH5 α /pSB311과 LumisTox 발광미생물에 대해서 실험한 중금속의 EC₅₀값을 비교한 것이다. 동일한 중금속에 대한 두 독성평가생물의 민감도와 여러 가지 중금속의 급성독성을 함께 보여주고 있다. Hg²⁺과 Cu²⁺는 낮은 EC₅₀값을 나타내어 Cd²⁺이나 Zn²⁺에 비해 생물독성이 강함을 나타내고 있다. 본 연구에서 측정된 중금속들의 생물독성의 크기는 Hg²⁺ > Cu²⁺ > Cd²⁺ > Zn²⁺ 순으로 나타났고 *Vibrio fisheri*를 사용한 LumisTox의 경우 Zn²⁺보다 Cd²⁺의 독성이 조금 높게 나타났으나 의미 있는 수준은 아니라고 판단된다. 선행연구결과들과 비교해 보면 Cho et al.(2004)¹⁷⁾와 Lampinen

et al.(1990)⁷⁾의 경우는 Cu²⁺의 독성이 상기 4가지 중금속중 가장 낮은 것으로 나타났고 Mowat(2002)와 Ren(2003b)의 경우는 Cu²⁺가 Hg²⁺ 다음으로 높은 생물독성을 나타내었고 본 연구 결과와 일치하는 결과를 나타내었다. 이처럼 중금속의 생물독성을 비교하는 연구결과는 다소 상이한 보고들이 많이 존재하지만 생물독성의 순으로는 Hg²⁺과 Cu²⁺가 높은 독성을 보고하는 사례가 일반적이다.

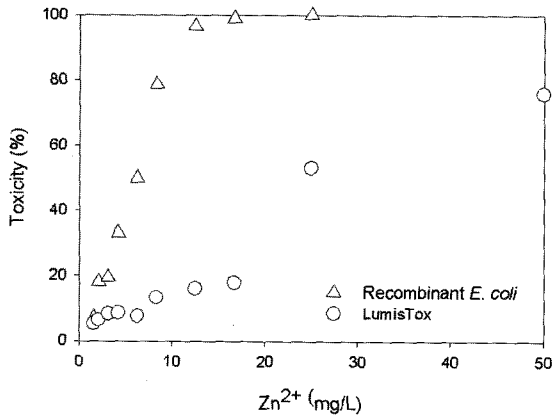


Fig. 5. Comparison of the dose-response curve of zinc for both DH5α/pSB311 and LumisTox.

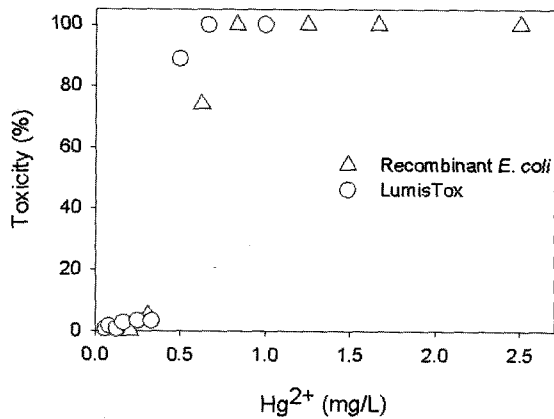


Fig. 6. Comparison of the dose-response curve of mercury for both DH5α/pSB311 and LumisTox.

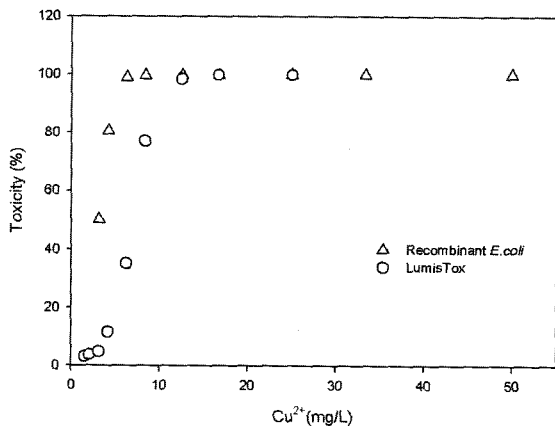


Fig. 7. Comparison of dose-response curve of copper for both DH5α/pSB311 and LumisTox.

Table 2는 DH5α/pSB311와 LumisTox 미생물의 EC₅₀ 값들을 Cu²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺에 대해서 비교하였으며 최근 유사 연구자들의 중금속 독성을 재조합 발광세균과 MicroTox를 이용하여 실험한 선행연구 결과를 비교한 것이다. 상기 기술한바와 같이 유효농도는 발광박테리아의 발광량이 50%로 감소하였을 때 해당 물질의 유효농도로서 일반적인 생물검정의 독성을 대표하는 값이다. EC₅₀의 경우는 Cu²⁺, Cd²⁺ 그리고 Zn²⁺의 경우는 DH5α/pSB311가 LumisTox보다 민감한 독성경향을 나타내었고 Hg²⁺은 비슷한 민감도를 나타내었다. MicroTox를 이용한 EC₅₀값은 연구자들의 결과에 따라 다소 넓은 범위의 값들을 나타내고 있다. Hg²⁺을 제외하고 MicroTox를 이용한 EC₅₀값의 최대치는 본 실험에서 사용된 DH5α/pSB311과 LumisTox보다 높은 값들을 나타내고 있으며 유사 재조합 발광미생물인 BW322/pCSS108인 경우도 해양성 발광미생물인 LumisTox나 MicroTox보다 민감한 독성을 나타내고 있다. 이는 일반적으로 고농도 NaCl 용액에서는 중금속과 염이 안정성있는 화합물을 형성하여 독성을 경감하는 경향이 있다. 따라서 2.5% NaCl 조건에서 실험을 수행해야하는 LumisTox나 MicroTox는 실제 중금속 독성보다 작게 표현될 가능성이 크다.

많은 선행 연구결과에 의한 중금속의 독성 정도는 다소 넓은 변동폭을 가지고 있었으며 동일한 종류의 중금속이라 해도 EC₅₀ 값들이 연구자에 따라 유의할 정도로 다르게 보고되고 있었다. 중금속의 생물독성은 독성 시험에 사용된 대상 시험체의 종류(무척추 동물, 조류, 해양성 발광세균, 재조합 발광세균 등), 독성 실험의 조건(pH, 온도, 시험생체의 생리적 활성도 등)에 따라 독성도가 달라질 수 있기 때문에 대표성을 가지는 EC₅₀값을 정하기에 어려움이 많다. 더욱이 인간을 대체하여 중금속의 독성을 평가하는 이러한 대체 생물과 인간이 가지는 독성 수용정도가 다르다는 점까지 고려한다면 대체 생물과 인간 사이에는 많은 괴리가 존재하며 이러한 괴리를 극복하기 위해서는 독성평가방법에 있어서 유용한 생물체를 개발하는 것과 아울러 평가 방법과 결과의 해석방법에 대해서도 심도 있는 연구가 동반되어야 할 것이다.

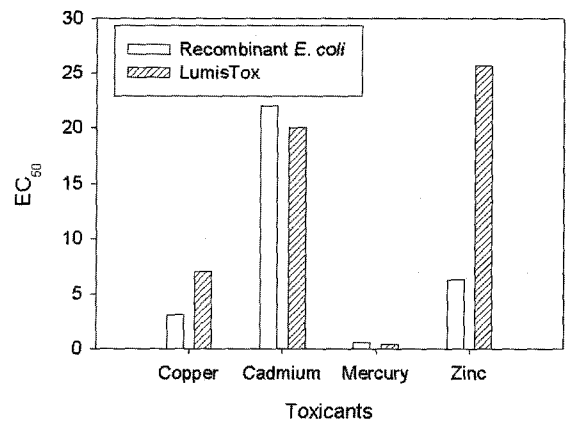


Fig. 8. Comparison of EC₅₀ of tested heavy metals.

Table 2. Comparison of toxicity of the construction *E. coli* DH5 α /pSB311 and LumisTox for several heavy metals

Heavy metals	EC ₅₀ (mg/L)					
	<i>V. fishery</i>			Recombinant <i>E. coli</i>		
Luminescence bacteria	LumisTox	MicroTox ¹⁵	MicroTox ¹⁶	DH5 α /pSB311	DH5 α /pSB311 (BW322/pCSS108) ⁷	YH9-RC ¹⁷
Exposure time (minute)	30	15	15	30	10	30
Cu ²⁺	7.0	0.72-2.46	2.7	3.1	4.7	10.5±1.9
Cd ²⁺	20.0	-	59.3	22.0	0.5	1.1±0.3
Hg ²⁺	0.4	0.06	0.1	0.6	0.2	0.2±0.1
Zn ²⁺	25.7	13.80-55.50	2.62	6.3	0.8	1.3±0.3

¹⁵: Ren & Frymier, 2003b, ¹⁶: Mowat et al, 2002, ⁷: Lampinen et al., 1990, ¹⁷: Cho et. al. 2004

4. 결론

제조합 발광미생물의 발광량은 5.4×10^7 RLU로 나타났다. 특히 상온조건에서는 DH5 α /pSB311는 10^6 RLU이상의 발광량을 나타낸 것에 비해 LumisTox는 시간이 지남에 따라 발광이 감소하여 4시간 후 발광량이 5×10^3 RLU로 감소하였다. 발광유전자인 Lux CDABE를 일반 대장균에 제조합 한 발광미생물 DH5 α /pSB311는 중금속 급성독성에 민감하게 반응을 나타내었고 대부분 LumisTox보다 민감한 특성을 보여주었다. 본 실험에서 사용된 제조합 발광미생물은 초기형태의 제조합 발광미생물이나 LumisTox에서 사용되는 발광미생물과 같이 고가의 기질이나 고염조건이 없이 사용할 수 있었고 배양도 LB와 같은 저렴한 배지를 사용할 수 있다는 장점이 있다.

급성독성에 사용된 중금속의 독성의 크기는 제조합 발광미생물과 LumisTox가 비슷한 경향을 나타내었으며 제조합 발광미생물은 Hg²⁺ > Cu²⁺ > Zn²⁺ > Cd²⁺의 순이고 LumisTox는 Hg²⁺ > Cu²⁺ > Cd²⁺ > Zn²⁺순으로 나타났다. 제조합 발광미생물이 가지고 있는 다른 특성은 발광유전자의 제조합 기술을 계속 향상시킬 수 있기 때문에 현재의 검출한계나 단점들이 계속 개선될 수 있다는 점이다.

참고문헌

- 하현중, 김성태, 최종욱, 민선홍, 장태연, 김건홍, “물벼룩과 형광성 박테리아를 이용한 중금속의 급성독성평가,” *Korean Journal of Limnology*, **28**(3), 369~376(1995).
- 공인철, 최규형, “급성독성법을 이용한 수계의 중금속 결합 능력 비교,” *대한환경공학회지*, **19**(10), 1269~1278(1997).
- Kelly, C. J., Lajoie, C. A., Layton, A. C., and Sayler, G. S. “Bioluminescent Reporter Bacterium for Toxicity Monitoring in Biological Wastewater Treatment Systems,” *Water Environ. Res.*, **71**, 31~35(1999).
- Mowat, A., “Measurement of metal toxicity by bioche-

- mical oxygen demand,” *J. WPCF*, **48**(5), 853~866(1976).
- Ribo, J. M. and Kaiser, K. L. E., “Photobacterium phosphoreum, Toxicity bioassay. I. Test procedures and applications,” *Toxic. Assess.*, **2**, 305~323(1987).
- Brohon, B. and Gorudon, R., “Influence of soil microbial activity level on the determination of contaminated soil toxicity using Lumistox and MetPlate bioassays,” *Soil Biology & Biochemistry*, **32**, 853~857(2000).
- Lampinen, J., Korpela, M., Saviranta, P., Kroneld, R., and Karp, M., “Use of Escherichia coli cloned with genes encoding bacterial luciferase for evaluation of chemical toxicity,” *Toxic. Assess.*, **5**, 337~350(1990).
- Paton, G. I., Palmer, G., Kindness, A., Campbell, C., Glover, L. A., and Killham, K. “Use of Luminescence Bacteria to Assess Copper Bioavailability in Malt Whisky Distillery Effluent,” *Chemosphere*, **31**(5), 3217~3224(1995).
- Preston, S., Coad, N., Towend, J., Killham, K., and Paton, G. I., “Biosensing the Acute Toxicity of Metal Interactions: Are They Additive, Synergistic, or Antagonistic,” *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**(3), 775~780(2000).
- Geiselhart, L., Osgood, M., and Holmes, D., “Construction and evaluation of a self-luminescent biosensor,” *Ann. NY Acad. Sci.*, **646**, 53~60(1992).
- Corbisier, P. G. J., Nuyts, G., Mergeay, M., and Silver, S., “Lux AB gene fusions with the arsenic and cadmium resistance operons of Staphylococcus aureus plasmid pI258,” *FEMS Microbiol. Lett.*, **110**, 231~238(1993).
- Collard, J. M., Corbisier, P., Diels, L., Dong, Q., Jeanthon, C., Mergeay, M., Taghavi, S., Van der Lelie, D., Wilmotte, A., and Wuertz, S., “Plasmids of heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34. mechanisms and applications,” *FEMS Microbiol. Rev.*, **14**, 405~414(1994).
- Ofra Bechor, Dana R. Smulski, Tina K. Van Dyk, Robert A. LaRossa, Shimshon Belkin, “Recombinant microorganisms as environmental biosensors: pollutants

- detection by *Escherichia coli* bearing *fabA*::*lux* fusions," *Journal of Biotechnology*, **94**, 125~132(2002).
14. Mecal, E., *Wastewater Engineering Treatment Disposal Reuse* 3rd ed., McGraw-Hill, New York(1991).
 15. Shijin, R. and Paul, D. F., "Toxicity of metals and organic chemicals evaluated with bioluminescence assays," *Chemosphere*, **58**, 543~550(2005).
 16. Mowat, F. S. and Bundy, K. J. "Experimental and mathematical/computational assessment of the acute toxicity of chemical mixtures from the Microtox assay," *Adv. Environ. Res.*, **6**, 547~558(2002).
 17. Cho, J. C., Park, K. J., Ihm, H. S., Park, J. E., Kim, S. Y., Kang, I. N., Lee, K. H., Jahng, D. J., Lee, D. H., Kim, S. J., "A novel continuous toxicity test system using a luminously modified freshwater bacterium," *Biosensors & Bioelectronics*, **20**, 338~344(2004).