

## 박테리아 발광 특성을 이용한 고형시료 급성 독성법 연구 및 적용

고경석<sup>1</sup> · 공인철<sup>2\*</sup> · 정홍경<sup>2</sup> · 노 열<sup>3</sup>

<sup>1</sup>한국지질자원연구원 지하수지열연구부, <sup>2</sup>영남대학교 건설환경공학부, <sup>3</sup>전남대학교 지구환경과학부

### Development and Application of Acute Bioassay Method on Solid Samples using Bioluminescence Producing Bacteria

Kyung-Seok Ko<sup>1</sup> · In Chul Kong<sup>2\*</sup> · Honggyung Jung<sup>2</sup> · Yul Ro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Groundwater & Geothermal Resources Division, Korea Institute of Geoscience & Mineral Resources

<sup>2</sup>School of Construction and Environmental Engineering, Yeungnam University

<sup>3</sup>Faculty of Earth Systems and Environmental Sciences, Chonnam National University

#### ABSTRACT

A toxicity method using bioluminescence producing bacteria, *Escherichia coli* DH5 RB1436, was developed and applied on solid environmental samples. In the assay, 1 g soil sample was mixed with 4 ml RB1436 strain. Sets amended with p-buffer were employed for control in soil test, showing approximately 108% of sets amended with combusted soils. Measurable differences were observed between relatively more polluted groups (HP) and less polluted groups (LP) of soil samples, showing average toxicity 43 and 26%, respectively, in direct soil toxicity test. EC<sub>50</sub>'s for all soil groups appeared in the range of 1.8~4.6 g, but those of sediments from dam reservoir and refuses were below 0.22 g. This developed bioassay should prove useful as a screening test for toxicity in various types of environmental solid samples.

**Key words :** Bioluminescence, Solid environmental samples, Toxicity, Bioassay

#### 요 약 문

생물 발광 생산 균주, *Escherichia coli* DH5 RB1436를 이용하여 고형환경 시료에 대한 독성 방법을 개발하고 적용하였다. 토양과 균주의 비율은 1 : 4(w/v) 정도가 적절하였으며, 측정 방법의 간편성을 고려하여 가열 감량된 토양 첨가군 대신에 동일한 부피의 인산염 완충액 첨가군을 고형시료 독성의 대조군으로 정하였다. 토양측정망 시료중 대체적으로 오염원 농도가 상대적으로 높은 그룹과 낮은 그룹의 독성은 각 43과 26%로 뚜렷한 차이를 나타내었다. 토양 그룹들의 EC<sub>50</sub>는 범위가 1.8~4.6 g으로 조사된 반면에, 댐저수지 퇴적물과 매립물들은 모두 0.22 g 보다 낮게 조사되었다. 상이한 고형환경 시료에 대해 뚜렷한 독성 차이를 나타낸 본 생물검정법은 다양한 환경 시료의 독성을 평가하는 유용한 방법으로 사용할 수 있을 것이다.

**주제어 :** 생물발광, 고형환경시료, 독성, 생물검정법

#### 1. 서 론

토양, 매립지 및 퇴적물 등의 고형물(solid) 생태계의 오염 여부 및 영향을 규명하는 것은 고형물 환경의 위해성 평가, 복원 및 관리 등을 위한 필수적 과정이다. 이러

한 목적들을 달성하기 위해 생물검정법(bioassay)은 다양한 물리, 화학적 방법들과 더불어 중요한 방법이다 (Toussaint et al, 1995). 생물검정 방법 중의 하나인 독성시험법은 시험기간에 따라 급성(acute) 및 만성(chronic) 독성으로 대개 나뉘며, 진행생물 이용법(어류, 무척추 동

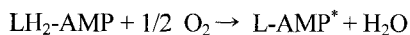
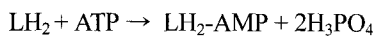
\*Corresponding author : ickong@ynu.ac.kr

원고접수일 : 2007. 8. 1 게재승인일 : 2007. 12. 26

질의 및 토의 : 2008. 2. 29 까지

물 조류 및 원생동물 등)과 원핵생물이나 효소 이용법으로 크게 분류할 수 있다. 일반적으로 진핵생물인 어류, 물벼룩 등을 이용할 경우에는 시험에 소요되는 시간 및 경비가 높고 부가적인 시험조작을 요하는 경우가 많기 때문에, 경제적, 시간적, 사용 측면에서 오염 환경 평가가 용이한 박테리아의 특성을 이용한 독성시험법 이용이 증가하고 있다(Ptitsyn et al, 1997). 박테리아를 이용한 독성 방법으로는 효소활성도(enzyme activity) 및 생합성, ATP, 호흡률(respiration), 효소 혹은 세포 생존률(viability), 발열량 등을 측정하는 방법들이 있으며, 측정에 소요되는 시간이 수십 분에서 수 시간 내로 타 시험법보다 상대적으로 신속하게 결과를 얻을 수 있는 장점이 있다 (Bitton et al, 1996; Dutton et al, 1990).

박테리아의 다양한 특성 중에서 생물발광(bioluminescence)을 이용한 생물 검정법을 이용할 수 있으며(Kim and Gu, 2003; Gupta and Karupiah, 1996), 생물발광은 특정 유기화합물이 효소의 작용으로 산화되면서 방출되는 에너지가 빛에너지의 형태로 체외로 나오는 일종의 광화학반응 현상이다. 생물발광을 발생하는 생물로 흔히 주변에서 볼 수 있는 생물체로는 반딧불 발광을 들 수 있으며, 이 외에도 식물에서는 버섯 등 균류에서 50여 종의 발광생물이 알려져 있으며, 쌍편모 조류에서도 약간 발견되고 있다. 발광 기작에서 발광물질은 luciferin이며, 물질의 분자구조는 발광생물의 종류에 따라 다르지만 산화되면서 빛을 발생하는 기본적 기작은 생물의 종류에 관계없이 공통적이며, 대표적 발광 기작은 다음과 같다.



L: 산화 luciferin, LH<sub>2</sub>: 환원 luciferin,

L-AMP: luciferin-AMP 복합물

LH<sub>2</sub>-AMP가 산소와 반응하여 산화되는 과정은 효소 luciferase 촉매작용에 의하여 이루어지기 때문에, 생물발광은 luciferin, ATP, luciferase 및 산소의 존재 하에서 일어난다. 이 밖에도 2가 양이온 중에서 Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> 등이 있어야 한다는 것도 알려져 있다(Humphrey et al., 1995).

어류와 원생동물, 조류(algae), 그리고 담수 및 해양생물 등의 생물발광 특성을 이용한 생물검정 평가방법이 채택되어 있지만, 경제적이면서도 간단하고, 신속한 방법으로는 해양 발광세균인 *Vibrio fischeri*를 이용하여 미국 Microbics사에서 상용화한 Microtox Assay System이 전세계적으로

유용하게 이용되고 있다(이규호, 1999; Munkittrick et al, 1991). 그러나 Microtox는 해양 발광 박테리아를 사용하기 때문에 독성측정을 위해 추가적인 염분(NaCl)의 공급이 필수적이며, 분석 결과에 대한 재현성 문제가 발생할 수도 있다.

박테리아의 발광 특성을 이용한 독성법의 신속, 간편, 민감성 등의 장점은 Microtox 법을 통해서 이미 알려져 있기 때문에, 본 연구에서는 유전자 재조합된 변이 발광 대장균을 이용하여 고형시료(solid samples)에 대한 독성 평가에 필요한 프로토콜을 완성 후 다양한 고형시료에 적용하였다. 사용한 균주는 *Escherichia coli* 균주가 생장 과정 중 발광을 생산하도록 유전자 재조합된 균주 *E. coli* DH5RB1436(이하 RB1436)이다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### 2.1. 발광균주 배양 및 특성

RB1436은 pUCD615 플라스미드 내의 염기 제거(deletion)에 의해 *lux-gene*이 충분히 발현될 수 있도록 constitutive promoter가 *lux-gene*에 근접하게 위치한 균주이다(Dr. Burlage, Univ. Wisconsin, USA로부터 분양). 균주는 20% glycerol 용액으로 -70°C 초저온고(Ishin Lab Tech. Co., Model DF9007)에 보관하였으며, 필요시 LB고형(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, 2N NaOH 0.5 ml per 1 L, pH 7.2) 배지에 계대 배양하여 사용하였다. 실험을 위해 27°C, 130 rpm 조건에서 LB배지에 12시간 이상 배양 후 다시 LB배지에 1:30 희석하여 OD<sub>600</sub>=0.6이 될 때까지 계대 배양하고, MSM(minimum salt medium)으로 OD<sub>600</sub>=0.1~0.15로 희석하여 사용하였다.

배양 시간에 따른 발광 특성과 온도(10, 20, 27, 35°C) 및 초기 pH(5, 6, 7, 8, 9) 변화에 따른 균주의 특성을 조사하였다. 발광은 일반적으로 0.5시간 단위로 시료 400 µl을 채취한 후 Luminometer(TD 20/20, Turner Designs, USA)를 이용하여 측정하였으며, 발광 강도 단위는 relative light unit(RLU)로 나타내었고, 최대 한계치는 9999 RLU이다.

### 2.2. 발광 균주 독성 민감도 조사

고형 시료에 오염 가능한 일부 중금속과 유기화합물에 대한 RB1436 균주의 독성정도를 조사하였다. 조사한 오염원 종류는 다음과 같다: 중금속 Cd, Cu, Hg, Pb, Ni, Zn, Cr<sup>+6</sup>, 유기물 2,4-dichlorophenoxy acetic acid(2,4-

DCP), formaldehyde, phenol, sodium dodecyl sulfate 및 2-, 3-, 4-chlorophenols(CPs), 2,3-, 3,4-, 3,5-dichlorophenols(diCPs), 2,3,5-trichlorophenol(triCP) 및 pentachlorophenols(PCP). 다양한 농도 범위의 오염원을 함유한 수시로 9 ml에 균주 1 ml을 혼합 후 27°C, 130 rpm 조건에서 30분 간격으로 발광 활성을 측정하였다. 오염원이 미치는 영향은 시간대별 EC<sub>50</sub>(effective concentration; 50% 발광활성 영향을 주는 농도) 농도를 평균하여 최종 EC<sub>50</sub>로 나타내었다.

### 2.3. 고형시료 독성 방법 결정 및 적용

토양을 포함한 다양한 고형시료의 독성 측정법 완성을 위해 고형시료와 균주의 혼합 비율과 적절한 대조군에 대한 조건을 결정하였다. 토양과 균주의 상이한 혼합 비율 조건을 결정하기 위해 토양 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 g을 균주와 혼합(총 부피 5 ml)한 후 발광정도에 근거하여 적절한 비율을 조사하였다. 또한 적절한 대조군 설정을 위해 균주(4.5 ml)에 550°C에서 30분간 산화(ESJ-1300, Jisco) 시킨 가열토양 0.5 g과 p-buffer 0.5 ml를 첨가한 그룹을 비교하였으며, 또한 p-buffer 첨가군과 다양한 용액(MSM, LB, 멸균수) 첨가군의 발광활성을 비교하였다. 모든 고형시료는 자연 건조 후 <2 mm 체로 걸러서 사용하였다.

실험을 통하여 정립한 독성 방법을 다양한 고형시료에 대해 적용하였다. 사용한 고형물 시료는 토양, 실험실에서 생분해 조사 중인 매립물(매립 1~2년 경과한 일반폐기물 매립장에서 채취) 및 댐저수지 퇴적물(댐저수지 퇴적토)들이다. 독성은 균주 4 ml에 고형물 1 g을 직접(direct) 노출 시킨 후, 30분 간격으로 대조군과 함께 발광 활성 측정 후 대조군 활성에 대한 독성 정도를 백분율로 나타내었다. 고형시료 1 g에 대한 독성도(발광 억제 %)에 근거하여 다양한 범위의 시료양에 대한 독성도를 구하였다. 결과에 근거하여 서로 상이한 고형 환경간의 독성비교는 EC<sub>50</sub>(발광 활성의 50% 영향을 주는 고형시료 량-g)으로 나타내었다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 발광 균주 특성

배양 시간에 따른 균주 성장과 발광 활성 변화를 1, 2 회 계대 배양과정에서 관찰하였다(Fig. 1). 계대배양 초기 3시간 까지는 시간당 약 3,000 RLU의 높은 발광 활성을 나타내었다. 2시간(OD<sub>600</sub> 0.102) 및 3시간(OD<sub>600</sub> 0.133) 배양에 발광은 각 6903 RLU 및 최대 한계치(>9,999)보다 높은 활성을 나타내었다. 최대 한계치 이상의 발광활성은 약 15시간 이상까지 유지되었으며, 배양 15시간(OD<sub>600</sub> 2.157)에 균주를 1:30 희석배양 한 후에도, 역시 활발한 발광 활성을 관찰할 수 있었다. 희석배양 초기(OD<sub>600</sub> 0.124)에는 1151 RLU 정도의 발광을 나타내었고, 희석배양 1시간 및 2시간 후에는 각각 7519 RLU 및 9052 RLU를 나타내었다. 3시간 후에는 최대 한계치를 넘는 발광이 관찰되었다. 따라서 균주 RB1436은 급성 독성 측정에 필요한 특성 중의 하나인 높은 발광 활성과 적절한 발광 지속시간을 보유하고 있는 것으로 조사되었다.

균주 활성에 중요한 환경 조건인 온도 10, 20, 27 및 35°C 조건에서 발광 활성 변화를 관찰하였다(Fig. 2a). 온도 20 및 27°C에서는 뚜렷한 차이 없이 높은 발광활성이 나타났다. 35°C에서는 노출 0.5시간 후에 급격한 발광 활성 저해 현상이 급격히 관찰되었고, 10°C 조건에서는 6415~8295 RLU의 활성이 관찰되었다. 따라서 RB1436은 중온성균의 일반적 배양 온도(20~27°C)에서 높은 발광활성을 나타내고, 일반적 *E. coli* 균주 배양 온도인 35°C에서는 발광이 저해되는 것으로 보아, 발광기작에 관여하는 효소가 영향을 받기 때문이라 사료된다. 따라서 독성시험은 27°C에서 수행하였다.

생물 검정법에서 시료의 pH 또한 발광 활성의 중요 영향인자로 작용할 것이다. 발광 활성은 전체적으로 pH 7 > 6, 8 > 9 >> 5의 순서로 나타났다(Fig. 2b). 가장 활성이 높은 pH 7의 발광 활성을 대조군(배양 2시간)으로 할 때,

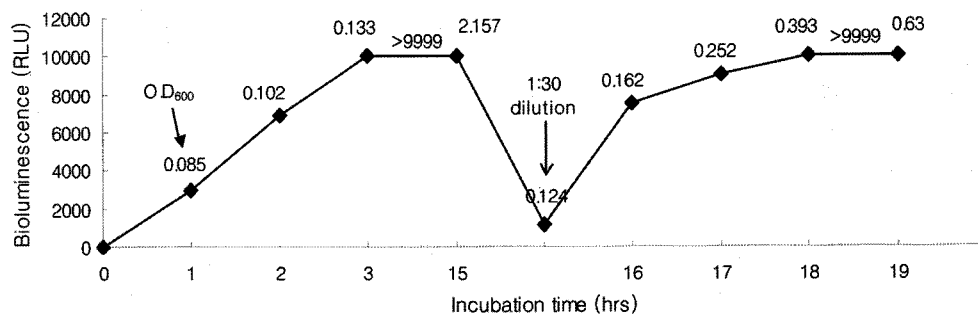


Fig. 1. Profiles of bioluminescence intensity of RB 1436 with time.

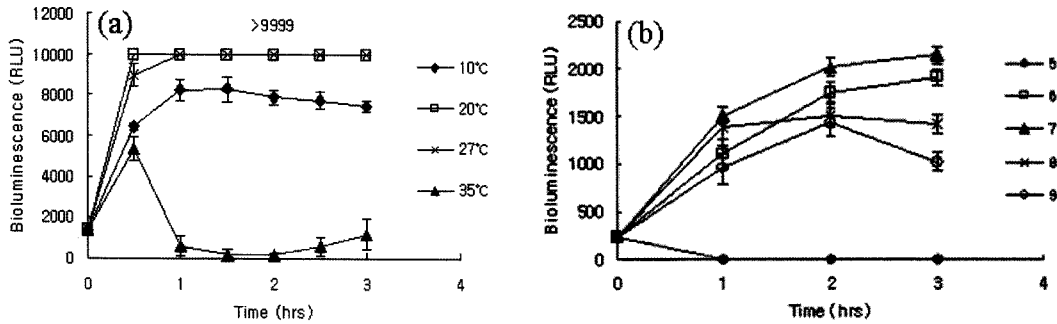


Fig. 2. Effects of (a) temperature and (b) pH on the bioluminescence intensity of strain RB 1436.

Table 1. Sensitivity of bioassay to toxicants

| Toxicants                | EC <sub>50</sub> (mg/L) | β-galactosidase (mg) | Microtox 15-min | <i>Daphnia magna</i> (48-h) | Rainbow trout 96-h | <i>E. coli</i> DH5 RB1436 (1-h) |
|--------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------|-----------------------------|--------------------|---------------------------------|
| <b>Heavy metals</b>      |                         |                      |                 |                             |                    |                                 |
| Cd                       |                         | 0.03                 | 10-220          | 0.02-4.7                    | 0.15-2.5           | 8.3                             |
| Cu                       |                         | 0.2                  | 0.25-220        | 0.02-0.54                   | 0.25               | 43                              |
| Hg                       |                         | 0.04                 | 0.02-0.05       | 0.0052-0.21                 | 0.033-0.65         | 1.1                             |
| Ni                       |                         | 1                    | 4.4-250         | 7.6-11                      | 36                 | 61                              |
| Zn                       |                         | 0.1                  | 1.4-8.0         | 0.54-5.1                    | 0.41-2.2           | 39                              |
| <b>Organic toxicants</b> |                         |                      |                 |                             |                    |                                 |
| 2,4-DCP                  |                         | > 200                | 31-107          | > 240                       | -                  | 915                             |
| Formaldehyde             |                         | > 1000               | 7.4-8.5         | -                           | 185                | 3.2                             |
| Phenol                   |                         | > 5000               | 21-34           | 7.0-88                      | 9.9                | 202                             |
| SDS                      |                         | > 5000               | 1.6-1.8         | 7.3-13                      | 46                 | 3315                            |

pH 6과 8에서는 대조군에 비해 각각 81%(1430 RLU)와 82%(1457 RLU)의 발광활성이 관찰되었다. pH = 9에서는 67%(1193 RLU)로 저해 현상이 관찰되었고, pH = 5에서는 발광을 거의 관찰할 수 없었다(0.051~0.172 RLU). pH = 5를 제외한 pH = 6~9 범위에서는 측정 가능한 정도의 발광 활성을 관찰할 수 있었으며, 환경시료 독성 측정치 비교를 위해서는 시료별 pH에 대한 고려가 있어야 할 것이다.

### 3.2. 단일 오염원에 대한 독성도 조사

다양한 중금속과 유기화합물에 대한 균주의 민감도 (EC<sub>50</sub>)를 조사하였다(Table 1). 중금속에 대한 독성은 Hg > Cd > Zn, Cu > Ni의 순서로 조사되었으며, 중금속에 민감한 것으로 알려진 β-galactosidase 이용 독성 측정법과 비교하여 중금속 독성 순서는 동일하게 나타났으나, 대체적으로 EC<sub>50</sub>는 높게 조사되었다(Bitton et al., 1992, 1994). 다양한 독성법의 결과에 의하면 일반적으로 Hg는 독성이 높고, Ni은 독성이 낮은 것으로 알려져 있으나, 측정 생물종이나 측정 종말점(end point)에 따라 상이한 순서를 보이는 것으로 알려져 있다(Kong et al., 1995).

다양한 유기오염원들에 대한 민감도(EC<sub>50</sub>)를 측정하였다. 다른 유기오염물에 대한 독성과 비교해보면, 본 방법에서는 formaldehyde EC<sub>50</sub>은 3.2 mg/L로 Microtox (7.4~8.5 mg/L)나 Rainbow trout (185 mg/L) 등 다른 독성 측정법보다 민감하게 나타났으나, 반대로 SDS > phenol > 2,4-DCP의 독성 순서인 Microtox나 *Daphnia magna*를 이용한 독성 측정법과는 달리, 본 방법에서는 phenol > 2,4-DCP > SDS 순서로 나타났다(Bitton, 1994). 발광생산 균주 Shk1을 이용한 연구에 의하면, 다양한 염소계페놀계열 화합물의 EC<sub>50</sub> 값은 대략적으로 10~200 mg/L 범위로 조사되었다(Ren et al., 2003). 따라서 언급한 바와 같이 화합물에 대한 독성 민감도 및 순서는 생물종과 측정 종말점에 따라 상이한 특성을 나타낼 수 있기 때문에, 오염원 위해 영향 평가를 위해서는 다양한 독성 방법들의 결과에 대한 적절한 통합적 해석과 시료 특성에 적합한 방법 적용이 필요할 것이다.

### 3.3. 고형 시료 독성 방법

고형시료 독성법에서 균주와 토양의 적절한 비율을 결

정하기 위해, 토양 2.0, 1.0, 0.5 및 0.1 g에 총 용적이 5 ml 되도록 균주를 첨가하여 발광에 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 3). 대조군과 비슷한 발광 활성(> 9999)을 보인 토양 0.1 g 첨가군과 높은 발광억제 (3.8 RLU)가 관찰된 2 g 첨가량 조건은 토양 독성을 측정하기에는 부적절한 조건으로 나타났다. 토양 0.5 g과 1 g 첨가군에서는 적절한 발광억제 영향을 관찰할 수 있었으며, 또한 여러 그룹의 토양에 대한 추후 실험을 거쳐, 균주 4 ml에 토양 1 g을 첨가한 조건을 고형시료 독성 방법으로 이용하였다. 그러나 고형물의 종류에 따라서 0.5~1.0 g의 범위에서 적절한 양을 이용할 수 있을 것이다.

고형시료 독성 측정법의 대조군 결정을 위해 균주 4 ml에 1 ml의 p-buffer 첨가군과 가열 토양(550°C, 30분) 1 g 첨가군에 대한 발광을 비교하였다(Fig. 4). p-buffer 완충용액과 다른 희석용액(MSM, LB, 멸균수)을 첨가하였을 경우의 발광을 비교하였을 때, 모두 p-buffer 첨가군에 비해 낮은 발광도를 나타내었으며, MSM, LB 및 멸균수 첨가군들은 p-buffer 첨가군과 비교하여 각 75, 45 및 72%의 낮은 발광활성을 나타내었다(자료 나타내지 않

음). 따라서 p-buffer를 대조군 비교에 사용하였다. 토양 유기물 성분이 제거된 가열시료 첨가 대조군은 완충용액을 균주에 첨가한 대조군의  $93 \pm 5.4(86\sim 103\%)$ (n = 16 시료) 발광 활성을 나타내어, 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다. 따라서 대조군 조건 설정을 위해 p-buffer와 가열시료 모두가 사용 가능한 것으로 사료되며, 실험의 간편성을 위해 용액(p-buffer)을 첨가하여 향후 사용하였다. 따라서 측정방법의 용이성을 고려하여 토양 혹은 고형물 독성 측정에서 균주 4 ml에 p-buffer 1 ml을 첨가한 조건을 토양 독성 방법의 대조군으로 사용하였다.

**3.4. 고형물 시료 독성 조사**

상이한 고형물 환경매체에서 채취한 시료(토양 측정망 시료, 생분해 과정 중의 매립물 및 댐저수지 퇴적물)에 대해 고형물 직접독성(direct-solid toxicity) 정도를 측정하였다(Table 2, Fig. 5). 고형물 독성 정도는 50% 영향을 주는 고형물 농도인 EC<sub>50</sub>값으로 나타내었으며, 초기 고형물 0.5~1.0 g에 대한 독성정도에 바탕으로 하여, 다양한 농도의 고형물에 대한 독성도에 근거하여 구하였다.

토양 측정망 시료는 대체적으로 국내토양오염기준 항목에 근거하여 오염정도가 높은 그룹과 낮은 그룹으로 나누어 조사하였다. 대부분의 토양 EC<sub>50</sub>값은 1~6 g의 범위로 조사되었고, 그룹(그룹별 9지역 시료)별로는 오염 정도가 높은 그룹인 HP와 낮은 그룹인 LP는 각  $1.8 \pm 0.16$  g과  $4.3 \pm 0.27$  g으로 조사되었다. 따라서 토양 EC<sub>50</sub> 값에 근거하면 HP 그룹은 LP 그룹에 비해 약 2.4배 정도 독성이 높은 것으로 나타났다(낮은 EC<sub>50</sub>는 높은 독성을 나타냄). 따라서 HP는 LP보다 뚜렷하게 높은 독성을 나타내었으며, 토양 기준항목 오염 농도 차이가 있는 HP와 LP 그룹 간에는 뚜렷한 발광 활성 저해 차이를 관찰할 수 있

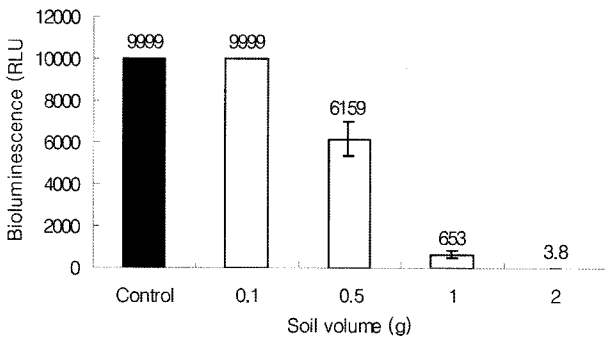


Fig. 3. Effects of soil amount on the soil toxicity.

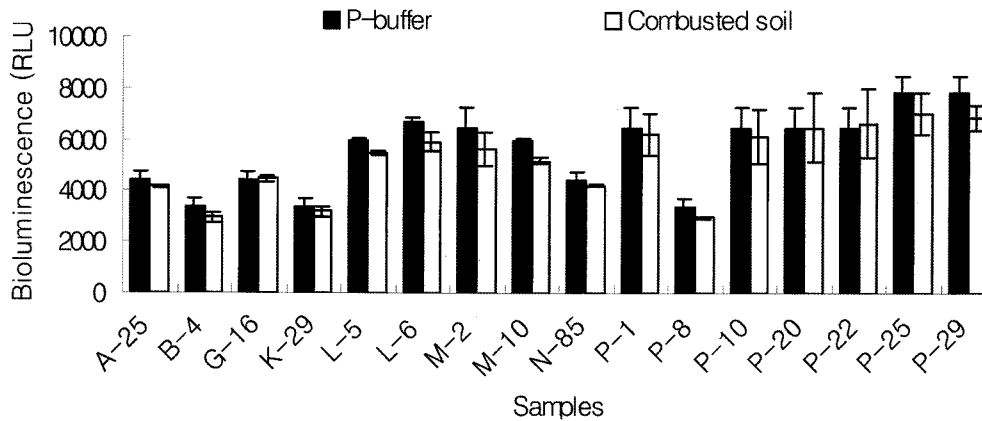


Fig. 4. Comparison of the effects of the amount of soil for direct soil toxicity test.

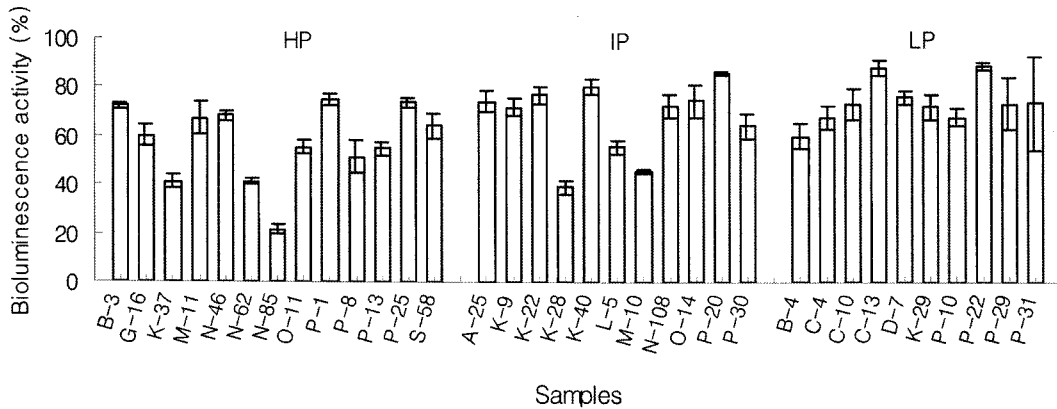


Fig. 5. Direct effects of soils on bioluminescence activities of strain RB1436.

Table 2. Toxicity of various solid samples

| Solid samples   |         | EC <sub>50</sub> (g) |
|-----------------|---------|----------------------|
| Soils           | HP      | 1.8 ± 0.16           |
|                 | LP      | 4.3 ± 0.27           |
| D-dam reservoir | dam     | 0.1 ± 0.02           |
|                 | middle  | 0.2 ± 0.01           |
|                 | upper   | 0.3 ± 0.03           |
| J-dam reservoir | dam     | 0.3 ± 0.04           |
|                 | middle  | 0.4 ± 0.01           |
|                 | upper   | 0.3 ± 0.01           |
| Refuse          | initial | 0.04 ± 0.021         |
|                 | control | 0.10 ± 0.008         |
|                 | biodeg. | 0.22 ± 0.012         |

HP, relatively high polluted; LP, relatively low polluted

었기 때문에 본 발광균주를 이용한 고형물 독성 평가가 적절한 방법의 하나임을 알 수 있었다.

또한 다른 고형 환경매체인 댐 저수지 퇴적물과 생분해 과정 중의 매립물에 대해 독성을 평가하였다(Table 2). 토양 EC<sub>50</sub>가 1~6 g의 범위인 것에 비해, 중요한 상수원으로 이용되고 있는 댐저수지의 퇴적물은 0.1~0.4 g으로 앞서 조사한 토양에 비해 약 10배 정도의 낮은 EC<sub>50</sub>(즉 높은 독성)을 나타내었다. 상이한 댐저수지 퇴적물 및 동일한 댐저수지 퇴적물의 위치(상류, 중류, 댐 수문 하류)에 따라 뚜렷한 고형물 독성 차이를 관찰할 수 없었다. 상이한 환경매체의 고형시료의 독성 정도는 오염정도에 주된 영향을 받을 것이지만, 오염 정도 외에도 고형 시료의 다양한 특성, 예를 들면 입자분포, pH, 오염원 종류, 유기물 함량(혹은 휴믹) 등의 조건들에 영향을 받을 것이다. 따라서 상이한 생태계에서 채취한 시료에 대해 위해성 여부를 비교하기 위해서는 독성자료와 다양한 물리, 화학적 자료

가 병행되어야 할 것이다.

매립과정에 있는 위생매립지에서 시료를 채취하여 회분식 생분해 실험 중인 매립물에 대해 고형물 독성 정도 및 변화(초기 및 238일 생분해)를 측정하였다(Table 2). 위생매립장에서 채취한 초기매립물의 EC<sub>50</sub> 0.04 g으로 토양의 약 40~100배, 담퇴적물의 약 2.5~10배 정도 낮게 조사되었다. 따라서 EC<sub>50</sub> 자체만으로는 앞서 조사한 상이한 고형환경의 시료보다 매우 독성이 높은 것으로 조사되었다. 매립물 생분해 238일 지난 후의 대조군 및 생분해 조건 첨가한 실험군(biodge., pH 및 수분 첨가)에서의 EC<sub>50</sub>는 각 0.10 g과 0.22 g으로 나타났다. 따라서 생분해가 발생한 후에는 EC<sub>50</sub>에 근거한 독성이 초기 매립물에 비해 약 50배 정도 감소함을 알 수 있었으며, 이는 오염원의 생분해 현상 때문일 것이다. 조사한 자료에 의하면 EC<sub>50</sub>에 근거한 고형시료의 독성은 매립물 > 담퇴적물 > 토양의 순서로 조사되었다.

연구 결과를 통해서 조사한 방법은 고형물 위해성 평가를 위한 하나의 방법으로 사용할 수 있을 것이다. 그렇지만 앞서 언급한 바와 같이 고형시료의 위해성은 다양한 과정과 평가법의 결과를 이용하여 평가되어야 할 것이다.

#### 4. 결 론

유전자 재조합 발광 균주를 이용하여 고형물 시료의 독성 여부를 측정하기 위한 방법을 개발하고 적용하여 아래와 같은 결론을 도출하였다.

- (1) RB1436 발광균주는 높은 발광 활성과 장시간의 발광 지속성을 보유하고 있어 고형시료의 급성 독성 측정을 위한 생물종으로 적합한 특성을 나타내었다.
- (2) 고형시료와 균주의 비율은 고형물 1 g에 균주 4 ml 을 첨가하여 측정하는 것이 적절한 것으로 조사되었지만,

고형시료의 특성에 따라 균주와 시료의 비율은 적절하게 조정할 수 있을 것이다.

(3) 독성 측정 과정에 필요한 대조군은 가열 감량한 시료나 p-buffer 모두가 사용 가능한 것으로 조사되었으며, 방법의 간단성과 신속성 측면에서 p-buffer 첨가균을 대조균으로 사용하였다.

(4) 다양한 고형환경 매체의 EC<sub>50</sub>에 근거한 독성 여부는 매우 뚜렷한 차이를 나타내었다. 독성 정도는 매립물, 댐저수지 퇴적물, 토양의 순서로 나타났지만, 고형 시료의 위해성 여부는 오염물 외에 고형시료의 다양한 특성에 근거하기 때문에 독성시험 결과와 더불어 고형 시료의 다양한 물리, 화학적 자료 및 다른 방법의 결과와 함께 위해성 여부가 판단되어야 할 것이다.

결론적으로 본 연구에서는 다양한 고형 환경매체에 대해 유전자 재조합 발광균주를 이용한 고형 시료 급성 독성법의 이용 가능성을 확인할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 한국지질자원연구원 기본사업인 '청정 대용량 지하수자원 확보 기술개발(07-3211)' 과제의 일환으로 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- 이규호, 1999, 발광세균을 이용한 독성검사방법, 기초과학연구, 7(1), 121-141.
- Bitton, G, Koopman, B., and Agami, O., 1992, MetPAD™: A bioassay for rapid assessment of heavy metal toxicity in wastewater, *Water Environ. Res.*, **64**, 834-836.
- Bitton, G., 1994, *Wastewater Microbiology*, Wiley-Liss, New York.
- Bitton, G., Garland, E., Kong, I.C., Morel, J.L., and Koopman, B., 1996, A direct solid-phase assay specific for heavy metal toxicity. I. Methodology, *Soil Contam.*, **5**(4), 385-394.
- Dutton, R.-J., Bitton, G., Koopman, B., and Agami, O., 1990, Inhibition of  $\beta$ -galactosidase biosynthesis in *Escherichia coli*, *Tox. Ass.*, **5**, 253-264.
- Gupta, G and Karuppiah, M., 1996, Toxicity study of a Chesapeake bay tributary-Wicomico river, *Chemosphere* **32**, 1193-1215.
- Humphery, I., Mager, X., and Tu, S.-C., 1995, Chemical aspects of bioluminescence, *Photochem. Photobiol.*, **62**(4), 607-614.
- Kim, B.C. and Gu, M.B., 2003, A bioluminescent sensor for high throughput toxicity classification, *Biosen. Bioelectro.*, **18**, 1015-1021.
- Kong, I.C., Bitton, G., Koopman, B., and Jung, K.H., 1995, Heavy metal toxicity testing in environmental samples, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **142**, 119-147.
- Munkittrick, K.R., Power, E.A., and Sergy, G.A., 1991, The relative sensitivity of Microtox, Daphnia, rainbow trout, and fat-head minnow acute lethality tests, *Environ. Toxicol. Water Qual.*, **6**, 35-52.
- Ptitsyn, L.R., Horneck, G., Bpmer, M., and Rettberg, P., 1997, A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS lux assay in recombinant *E. coli* cells, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4377-4384.
- Ren, S. and Frymier, P.D., 2003, Toxicity estimation of phenolic compounds by bioluminescent bacterium, *J. Environ. Eng.*, **129**(4), 328-335.
- Toussaint, M.W., Shedd, T.R., van der Schailie, W.H., and Leather, G.R., 1995, A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**, 907-915.