

토양 오염물질의 독성 탐지를 위해 유전자 재조합 발광 박테리아를 이용한 환경 바이오 센서의 개발과 응용

장석태, 이현주, 구만복

광주과학기술원 환경공학과 환경생물공학연구소

전화 (062) 970-2454, FAX (062) 970-2434

Abstract

Recombinant bioluminescent bacterial strains that use specific promoters fused to the bioluminescence genes (*lux* genes) have been applied in environmental monitoring. Advantages of using recombinant bioluminescent bacteria as biosensing cells include rapid responses, low costs, and improved reproducibility. In this study, a recombinant *Escherichia coli*, GC2, containing a *lac::luxCDABE* fusion immobilized with solid agar media and glass beads was used to estimate the effect of this soil flushing technique. This bacterium constitutively emits light under normal conditions (no toxic chemicals). When growth and metabolism of these bioluminescent bacteria is inhibited by their exposure to toxic chemicals, the bioluminescence (BL) is reduced. A biosurfactant, rhamnolipids, was used to extract phenanthrene from the soil after flushing.

서론

석유류 및 유독물 저장시설, 쓰레기 매립지, 각종 산업시설, 군사시설 지역, 폐광산, 농약사용이 빈번한 농경지 등에서 잘 분해되지 않는 잔류성이 강한 오염물질이 토양 내로 유출되고 있어 이러한 토양 내 오염물질의 탐지가 매우 중요하다¹⁾. 또한, 오염된 토양의 복원처리 시에 오염원 제거의 효율을 빠르게 측정하고, 오염원 처리 시에 발생할 수 있는 이차오염의 탐지 또한 중요하다. 본 실험에서는 오염된 토양의 처리전후의 효율을 신속히 탐지하기 위한 방법으로 유리비드와 함께 고정화한 재조합 발광박테리아를 이용한 바이오센서를 통하여 오염처리정도를 측정하였다²⁾.

실험에 사용된 균주, GC2(*lac::luxCDABE*), 는 독성물질에 노출되었을 때 세포 내 대사작용에 저해를 포함하는 cellular toxicity에 의해서 생물학적 빛의 감소를 가져오는 constitutive promoter에 의해 발현하는 균주이다³⁾. 현장에서 간편하게 오염물질을 탐지하기 위해 위 균주는 solid matrix에 고정화하여 biosensor kit를 제작하여 장기간 보관해서 사용할 수 있게 하였으며, 고정화된 미생물의 생물학적 발광량의 stability와 biosensor kit내로 오염물질의 이동을 향상시키기 위해 glass beads와 함께 박테리아를 고정화하였다.

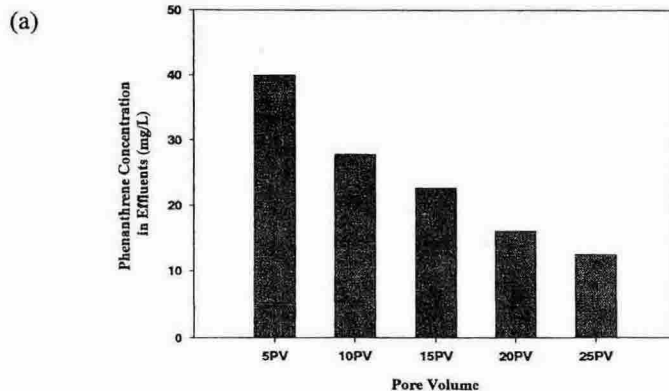
실험 방법

재조합 발광박테리아, GC2,를 초기 stationary phase까지 성장시킨 후 6000rpm에서 10분간 원심 분리하여 agar medium과 혼합하였다. 이 혼합액을 glass beads가 들어있는 polypropylene tube에 100 μ l씩 주입하여 biosensor kit를 제작하였고, 이를 4 $^{\circ}$ C에서 냉장 보관하였다. 오염물질의 독성을 탐지하기 위해 4 $^{\circ}$ C에서 냉장 보관중인 biosensor kit는 luminometer(TURNER, TD-20e)에 연결된 fiber optic probe의 한 끝에 연결하여 LB media가 들어 있는 소형생물반응기에 장착하였다. 고정화된 발광박테리아의 발광량이 일정한 수준에 이르면 soil flushing후에 얻어진 effluents용액을 주사기를 이용하여 반응기에 주입하였으며, 1분 간격으로 발광량을 측정하였다. 또한 같은 조건의 다른 반응기에는 flushing에 사용한 농도의 생물계면활성제용액을 주입하여 발광량을 측정하였으며, 두 반응기로부터 측정된 발광량을 비교함으로써 phenanthrene의 독성 정도를 탐지하였다. 또한 토양 속에 남아 있는 phenanthrene의 독성은 생물계면활성제를 사용하여 추출한 후 측정하였다.

결과 및 고찰

Soil flushing에 사용된 생물계면활성제용액의 pore volume이 증가함에 따라 effluent속의 phenanthrene의 농도는 증가하였으며, 이에 대한 고정화한 발광박테리아 GC2의 발광량은 effluents내의 phenanthrene의 농도에 비례하여 감소하였다 (Fig.1). 토양오염 처리 후 남은 토양의 독성 측정을 통하여 처리 전후의 토양 내 오염물질의 독성을 측정할 수 있었다 (Fig.2). 또한, 토양오염처리와 추출에 사용된 생물계면활성제는 고정화 박테리아의 발광량에 거의 영향을 주지 않았다.

본 실험을 통하여 소수성의 성질을 띤 PAHs 물질을 생물계면활성제로 추출하여 독성을 탐지할 수 있음을 확인하였고, 기존의 토양오염 측정 방법으로 많은 시간과 고가의 측정기계를 이용해야하는 단점을 가진 물리화학적 분석 방법에 비하여 적은 비용으로 신속하게 독성을 측정하여 오염정도를 파악할 수 있음을 확인하였다. 또한 소형의 크기로 오염지역 현장에서 *in-situ* 바이오 센서로 활용이 가능하며, 오염된 토양의 정화처리 전후에 오염물질의 독성을 측정하여 처리효율을 신속히 판단할 수 있는데 사용할 수 있을 것으로 생각된다.



(b)

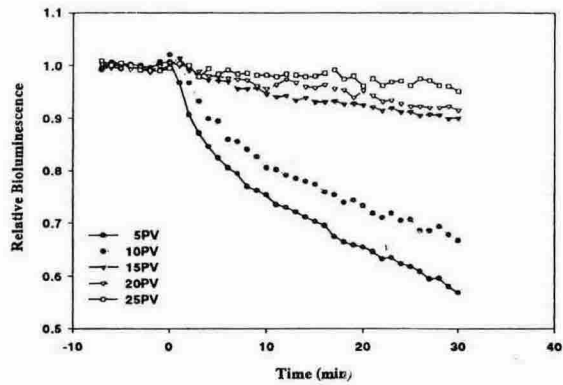


Figure 1. (a) Concentrations of phenanthrene in effluents (b) Response to effluents after soil flushing

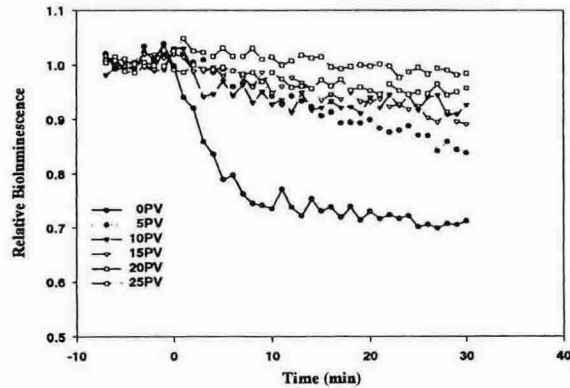


Figure 2. Response to extracted solution from remained soil after soil flushing

요약

토양오염의 독성을 탐지하기 위해 재조합 발광 박테리아의 고정화를 이용하여 바이오 센서를 제작하였으며 이를 이용하여 대표적 토양오염물질인 PAHs의 독성을 측정할 수 있었다. 또한, 이 바이오 센서를 이용하여 토양오염처리 전후의 처리 효율을 신속히 탐지할 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 환경모니터링 신기술 연구센터(ADEMRC)를 통한 한국과학재단 우수연구센터와 교육부(BK21)의 지원에 의해 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Shonall Laha and Richard G. Luthy (1991) Inhibition of Phenanthrene Mineralization by Nonionic Surfactants in Soil-Water Systems. Environ. Sci. Technol. Vol. 25, No. 11
2. Gil, Geun Cheol, Robert J. Mitchell, Chang, Suk Tai, and Gu, Man Bock, "A Biosensor for the Detection of Gas Toxicity Using a Recombinant Bioluminescent Bacterium" (2000), Biosensors & Bioelectronics, 15, 23-30.
3. Marincs, Ferenc and Derek W. R. White (1994) Immobilization of *Escherichia coli* Expressing the *lux* Genes of *Xenorhabdus luminescens*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3862-3863.
4. 구만복, 장석태, 특허출원 (2000), 출원번호 제 2000-1320호
5. Biosensors 2000 conference, Presentation