

## 독성물질 농도에 따른 *Photobacterium phosphoreum*의 bioluminescence 변화

정계훈 · 정성제 · 이용제 · 허문석 · 전억한\*  
경희대학교 생명과학부 식품가공학과

**Responses of *Photobacterium phosphoreum* to toxic substances.** Chung, Kye-Hun, Sung-Je Jung, Yong-Je Lee, Moon-Suck Her, and Uck-Han Chun\*. Department of Food Technology and Science, Faculty of Life Science, Kyung Hee University, Suwon, Kyungki, 449-701, Korea - *Photobacterium phosphoreum* was used for the study of bioluminescence response to toxic substances including phenol, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SeO<sub>2</sub>, and CrO<sub>3</sub> in view of developing monitoring system. Measurement of inhibition of bioluminescence in *P. phosphoreum* has been proposed as a sensitive and rapid procedure to monitor toxic substances. The concentration of toxic substance causing 50% light reduction(EC<sub>50</sub>) in bioluminescence intensity was determined with free and immobilized *P. phosphoreum*. The minimum inhibitory concentrations(MICs) for bioluminescence emission were found to be 400 ppm for As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 800 ppm for phenol, 60 ppm for SeO<sub>2</sub> and 60 ppm for CrO<sub>3</sub>, respectively. The linear correlation between Gamma value and the concentration of toxic substances was obtained and EC<sub>50</sub> was calculated from the linear correlation. The free cells were shown to be more sensitive to toxic substances than cells immobilized on Sr-alginate and Ca-alginate. However, the linear regression curves were derived from the Sr-alginate immobilized cells indicating the immobilization method is a useful tool for monitoring of toxic substances under the more stable condition of bioluminescence.

**Key words:** bioluminescence, *Photobacterium phosphoreum*, immobilization, EC<sub>50</sub>, toxic substance

최근에 독성물질에 의한 환경오염이 심각하며 이러한 독성물질의 수질오염을 차단하기 위해서 감시체계의 개발 및 경보장치가 필요하다. 독성물질의 모니터링 방법으로 화학적인 분석방법과 물고기나 물벼룩을 이용한 생물학적 방법이 수행되고 있으나 시간이 많이 걸려서 경보기능을 발휘할 수 없으며 생물학적인 경우 민감도가 떨어져서 극소량의 독성물질을 모니터링하기가 용이하지 않다. 최근에 독성측정 및 모니터링을 위해서 발광 세균의 이용에 관한 연구가 진행되고 있으며 특히, *P. phosphoreum* 과 같은 발광 세균을 이용한 생물학적 모니터링 방법이 주목받고 있다[1, 7]. 이들 발광 세균 이용시 장점은 bioluminescence의 변화를 측정하기 때문에 민감도가 우수할 뿐 아니라 저장성이 좋아서 제재의 개발이 용이하다. 동결건조된 *P. phosphoreum*을 이용한 Microtox system이 독성물질 모니터링에 이용되고 있다[9]. 발광 세균의 발광 기작은 *LuxA*, *LuxB* gene의 luciferase에 의한 긴 사슬의 aldehyde 산화에 의해서 일어난다[2]. 발광 세균이 독성물질에 노출되면 대사과정에 저해가 일어나고 따라서 발광 대사과정에 지장을 초래하여 결국 발광량이 감소한다. 즉 독성물질에 의한 대사 활성도 감소와 더불어 발광량의

감소정도를 측정하는 방법인데 이러한 반응은 짧은 시간 내에 소량의 독성물질에 의해서도 민감하게 일어난다는 장점이 있다. 본 연구에서는 *P. phosphoreum*의 bioluminescence의 안정성 및 저장성을 높이고 독성물질의 모니터링에 사용하기 위해서 세포를 고정화하여 독성물질에 대한 반응성을 조사하였다. 고정화 물질은 발광기작에 영향을 끼치지 않을 뿐만 아니라 빛의 투과성이 용이한 alginate [4, 8]를 이용하였으며 일차적으로 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, phenol, SeO<sub>2</sub>, CrO<sub>3</sub>에 대한 bioluminescence의 반응성을 조사하고 Gamma value와의 직선의 관계식을 얻었다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양방법

본 실험에 사용한 발광미생물 *Photobacterium phosphoreum* KCTC2852는 생명공학연구소의 유전자은행으로부터 분양받아 NaCl 배지에서 배양하였다. NaCl 배지의 조성은 nutrient broth No.2(meat peptone 4.3 g/L, casein peptone 4.3 g/L, sodium chloride 6.4 g/L) 12.5 g/L, yeast nitrogen base(without amino acid) 5 g/L, glycerol 3 ml/L, sodium chloride 25 g/L 이다. pH는 100 mM potassium phosphate buffer를 이용하여 7.0으로 조절하였다. 액체 배지에서 12~14시간 배양한 접종균의 세포농도가 O.D<sub>660</sub> 0.7~0.9 정도 되었을 때 이를 10%(v/v) 접종하여 교반배양기

\*Corresponding author  
Tel. 82-331-201-2626, Fax. 82-331-204-8116  
E-mail: uhchun@nms.kyunghee.ac.kr

(Vision Scientific Co., K.M.C.-8480SF, Korea)에서 20°C, 100 rpm의 조건으로 배양하였다.

### 세포 농도 측정

배양한 균을 2.5% 식염수와 1:2 비율로 섞은 다음, UV-visible spectrophotometer (Shimadzu Co., UV-1201, Japan) 로 660 nm에서 측정하였다.

### Minimum inhibitory concentration(MIC) 측정

MIC를 측정하는 방법은 검사할 독성물질을 각각 다른 농도로 첨가한 배지를 함유하는 일련의 시험관을 준비한 후에 생장하지 않은 시험관(탁도의 변화가 없는)을 찾아서 MIC를 구한다. 독성물질의 농도별로 시험관을 준비한 다음 1%의 균을 접종한 다음 24시간동안 배양한다. 다른 방법은 환천평판배지를 이용한 세포균수 측정법을 이용하였다.

### 세포 고정화

세포 고정화 물질로는 sodium alginate를 사용하였다. 10% 접종균을 사용하여 12시간 배양한 후 O.D<sub>660</sub> 0.7~0.9 농도의 세포를 2.5%(w/v) 식염수에 100배로 희석한 후 2.4%(w/v) sodium alginate와 1:8의 비율로 혼합하였다. 본 실험에서는 sodium alginate에 단단한 견고성을 부여하기 위하여 0.3M CaCl<sub>2</sub>와 0.3M SrCl<sub>2</sub> (Sigma)를 동량 첨가한 후, 반투명한 반구형의 gel이 형성되도록 15분간 상온에 방치한 후 이용하였다. 고정화 세포는 4°C 냉장고에 저장하여 사용하였다.

### Bioluminescence 측정

접종한 후 12시간이 지난 균주를 2.5%의 식염수에 100배로 희석한 후 cuvette(Sarstedt Rohren-Tubes No. 55.476, Germany)에 0.18 mL 취하여 Luminometer (Berthold Lumate LB 9507)로 측정하였다. 고정화 세포는 고정화를 완료한 후 측정하였으며 모든 시료는 22°C~24°C에서 측정하였으며 측정시간은 0.1초로 하였다. Luminescence의 단위는 RLU(Relative Light Units)로 10초당 1ml의 시료에서 발생하는 빛의 양을 mV로 나타낸 것이다. 여러 가지 농도의 독성물질들을 이용하여 bioluminescence의 감소율을 측정하기 위하여 초기 intensity를 100%로 보정하였다.

### 반응성 조사

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, phenol, SeO<sub>2</sub>, CrO<sub>3</sub> (Sigma)를 증류수에 용해시켜 만든 stock 용액을 4°C 냉장고에 저장한 후 실험하기 직전에 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>와 phenol은 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, 1000 ppm, SeO<sub>2</sub>와 CrO<sub>3</sub>는 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm의 농도로 용액을 만들어 실험하였다. *P. phosphoreum*의 bioluminescence에 대한 반응성을 조사하기

위해서 고정화 세포를 4°C에 하루 저장한 후 25°C에서 15분간 활성화시킨 다음 독성물질을 세포부피의 10%로 투입하여 발광량의 변화를 30분간 측정하였다.

### 결과 분석

독성물질에 대한 독성정도의 test는 *P. phosphoreum*에 독성물질을 노출시킨 후 시간에 따른 bioluminescence의 감소를 측정하였다[3]. EC<sub>50</sub>은 일정한 시간 내에 발광량이 50%로 감소하는데 필요한 독성물질의 농도를 나타내는 값으로 발광현상의 감소를 측정하는 방법인 Gamma(γ) value으로부터 구하였다[10]. Gamma(γ) value는 잔류하는 bioluminescence에 대하여 감소한 bioluminescence의 비로서 다음 식에 의하여 계산할 수 있다.

$$\gamma(t, T) = \frac{\text{Light Lost}}{\text{Light Remaining}} = \frac{R(t)L(0) - L(t)}{L(t)} \\ = \frac{R(t)L(0)}{L(t)} - 1$$

$\gamma(t, T)$ 는 T°C에서의 t 시간 동안의 Gamma value이고 R(t)은 t시간 동안 blank의 bioluminescence의 비로 t시간 후의 blank의 bioluminescence intensity를 0시간일 때의 값으로 나누어서 구한다. L(0)는 0시간에서 sample의 bioluminescence, 즉 독성물질에 의해 영향을 받지 않았을 때의 bioluminescence intensity이고, L(t)는 t시간 후의 bioluminescence, 즉 독성물질에 t시간 동안 노출된 후의 bioluminescence intensity이다. 각 농도에서의  $\gamma$ 값을 구하여 독성물질의 농도와  $\gamma$ 값을 log-log graph에 나타내면 직선으로 나타나고  $\gamma=1$ 이 되는 독성물질의 농도가 EC<sub>50</sub> 값이다[6].

## 결과 및 고찰

### 세포농도

*Photobacterium phosphoreum* KCTC2852의 bioluminescence와 세포농도 사이의 상관관계를 조사하기 위하여 세포의 생장 그래프를 Fig. 1에 나타내었다. O.D<sub>660</sub> 값이 0.7~0.9인 세포 배양액을 10% 접종한 후 8시간 경과하였을 때 bioluminescence가 최고값에 도달하였고 이때 O.D<sub>660</sub> 값은 1.33이었다. 8시간 이후에도 세포의 성장은 계속되었지만 bioluminescence는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이는 세포 농도에 따라 bioluminescence가 비례하게 증가하지만 세포 농도가 너무 높으면 오히려 bioluminescence가 감소하는 것을 의미한다. 따라서, 세포 농도와 bioluminescence의 관계를 여러 농도의 세포 희석액을 만들어 실험하였다. Fig. 1에서 보듯이 세포의 농도가 일정한 수준에 도달할 때까지는 bioluminescence intensity도 증가하지만 그 이상이 되면 오히려 감소하는 현상을 볼 수

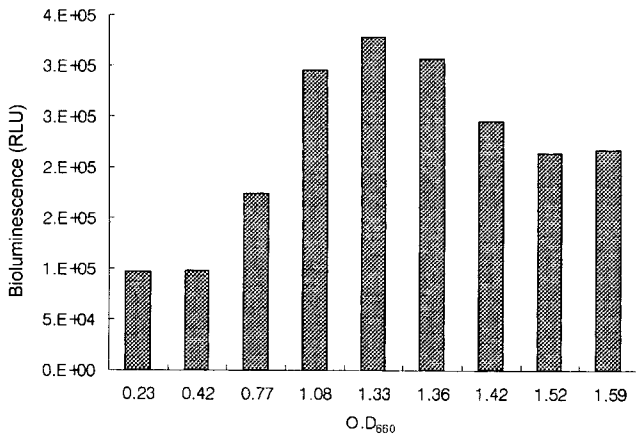


Fig. 1. The relationship between cell concentrations of *P. phosphoreum* and a bioluminescence intensity. A various cell concentrations were prepared from the cells harvested after 15hr growth.

있다. 발광 세균이 빛을 발생하는데 관여하는 luciferase는 유도 효소로서 초기에는 세포가 성장함에 따라 효소 생산량이 증가하지만 발광이 어느 수준에 도달하면 자가유도에 의하여 오히려 감소하는데 이 자가 유도 현상에 의한 효소 생산의 감소도 일정농도 이상에서 bioluminescence가 감소하는 원인이 되는 것으로 사료된다[5].

세포 재활성

Free cell과 고정화 세포를 4°C 냉장고에 보관한 후 25°C에서 재활성에 걸리는 시간을 조사하였다. Fig. 2에 20분 동안의 발광량의 변화를 나타내었다. 재활성은 25°C에서 2.5%의 NaCl 용액을 첨가한 후 1분 후부터 진행되

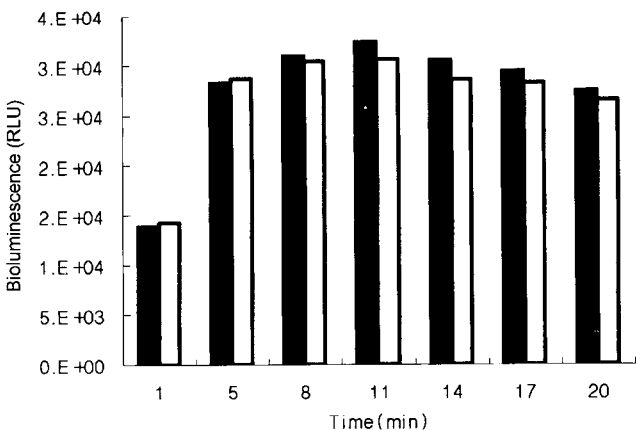


Fig. 2. The effect of reactivation time on the bioluminescence intensity of both free and immobilized *P. phosphoreum* stored at 4°C Bioluminescence showed maximum value at 11min and stable condition for 20min. (■) free cell, (□) immobilized cell.

었다. 재활성의 지표로서 발광량의 증가를 볼 수 있다. 11분 경과 후 free cell과 고정화 세포 모두 bioluminescence의 최대값을 보였다. 11분 경과 후 조금 감소하였으나 20분까지 비교적 안정하게 bioluminescence가 유지되었다. 따라서 본 연구에서는 4°C 저장된 세포를 15분 동안 재활성시킨 후 독성물질에 따른 반응성을 조사하였다.

Minimum inhibitory concentration(MIC) 측정

본 연구에서는 각 독성물질에 대한 *P. phosphoreum*의 최소저해농도를 측정하였다. 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 생장을 저해하는 최소의 독성 농도를 측정하여 표시한다. MIC값은 사용하는 균주, 접종량, 배지의 조성, 배양시간, 온도, pH, 통기 등 배양조건에 따라 달라지므로 MIC값은 절대적일 수는 없다. 본 연구에서는 한천 평판배지를 이용한 solid method와 시험관 희석법을 이용한 liquid method를 이용하였다. MIC를 측정하는 방법은 검사할 독성물질을 각각 다른 농도로 첨가한 배지를 함유하는 일련의 시험관을 준비한 후에 성장하지 않은 시험관(탁도의 변화가 없는)을 찾아서 MIC를 구한다. 각 독성물질의 MIC값을 Table 1, 2, 3, 4에 나타내었다. Table 1, 2는 phenol과 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>를 200ppm에서 1000ppm의 농도로 노출시켰을 때의 세포수와 세포농도 그리고 발광량의 변화를 조사하였다. Phenol의 MIC값은 세포농도와 발광량이 0.021과 67로 세포생장에 저해를

Table 1. Minimum inhibitory concentration(MIC) of phenol measured at 24 hr

Toxic concentration (ppm)	Solid method	Liquid method	
	Colony 수 (CFU/ml)	O.D <sub>660</sub>	Bioluminescence intensity
0	1.22×10 <sup>9</sup>	0.571	242491
200	8.45×10 <sup>8</sup>	0.510	131635
400	1.13×10 <sup>8</sup>	0.472	55372
600	1.07×10 <sup>7</sup>	0.455	47113
800	-	0.021	67
1000	-	0.011	20

Table 2. Minimum inhibitory concentration(MIC) of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> measured at 24 hr

Toxic concentration (ppm)	Solid method	Liquid method	
	Colony 수 (CFU/ml)	O.D <sub>660</sub>	Bioluminescence intensity
0	9.95×10 <sup>8</sup>	0.527	66,540
200	1.65×10 <sup>7</sup>	0.475	39,647
400	-	0.038	68
600	-	0.017	97
800	-	0.019	78
1,000	-	0.011	26

**Table 3. Minimum inhibitory concentration(MIC) of SeO<sub>2</sub> measured at 24 hr**

Toxic concentration (ppm)	Solid method		Liquid method	
	Colony 수 (CFU/ml)	O.D <sub>660</sub>	Bioluminescence intensity	
0	1.09×10 <sup>9</sup>	0.447	115395	
20	7.5×10 <sup>8</sup>	0.415	104942	
40	5.8×10 <sup>6</sup>	0.334	81310	
60	-	0.020	85	
80	-	0.015	65	
100	-	0.016	20	

**Table 4. Minimum inhibitory concentration(MIC) of CrO<sub>3</sub> measured at 24 hr**

Toxic concentration (ppm)	Solid method		Liquid method	
	Colony 수 (CFU/ml)	O.D <sub>660</sub>	Bioluminescence intensity	
0	9.95×10 <sup>8</sup>	0.435	382784	
20	7.5×10 <sup>7</sup>	0.353	335767	
40	1.1×10 <sup>6</sup>	0.308	203448	
60	-	0.018	52	
80	-	0.012	53	
100	-	0.010	26	

나타낸 800 ppm임을 알 수 있다(Table 1). Table 2에서 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>의 MIC값을 보면 Colony수가 없고 세포농도가 0.038인 400 ppm임을 알 수 있다. Table 3, 4는 SeO<sub>2</sub>와 CrO<sub>3</sub>를 20 ppm에서 100 ppm의 농도로 노출시켰을 때의 세포수와 세포농도 그리고 발광량의 변화를 조사하였다. SeO<sub>2</sub>와 CrO<sub>3</sub>는 40 ppm까지는 세포가 성장하다가 60ppm에서 colony가 자라지 않고 발광량이 85와 52로 거의 나타나지 않았으므로 MIC값은 60ppm이다 (Table 3, 4).

#### 독성물질 농도에 대한 bioluminescence의 변화

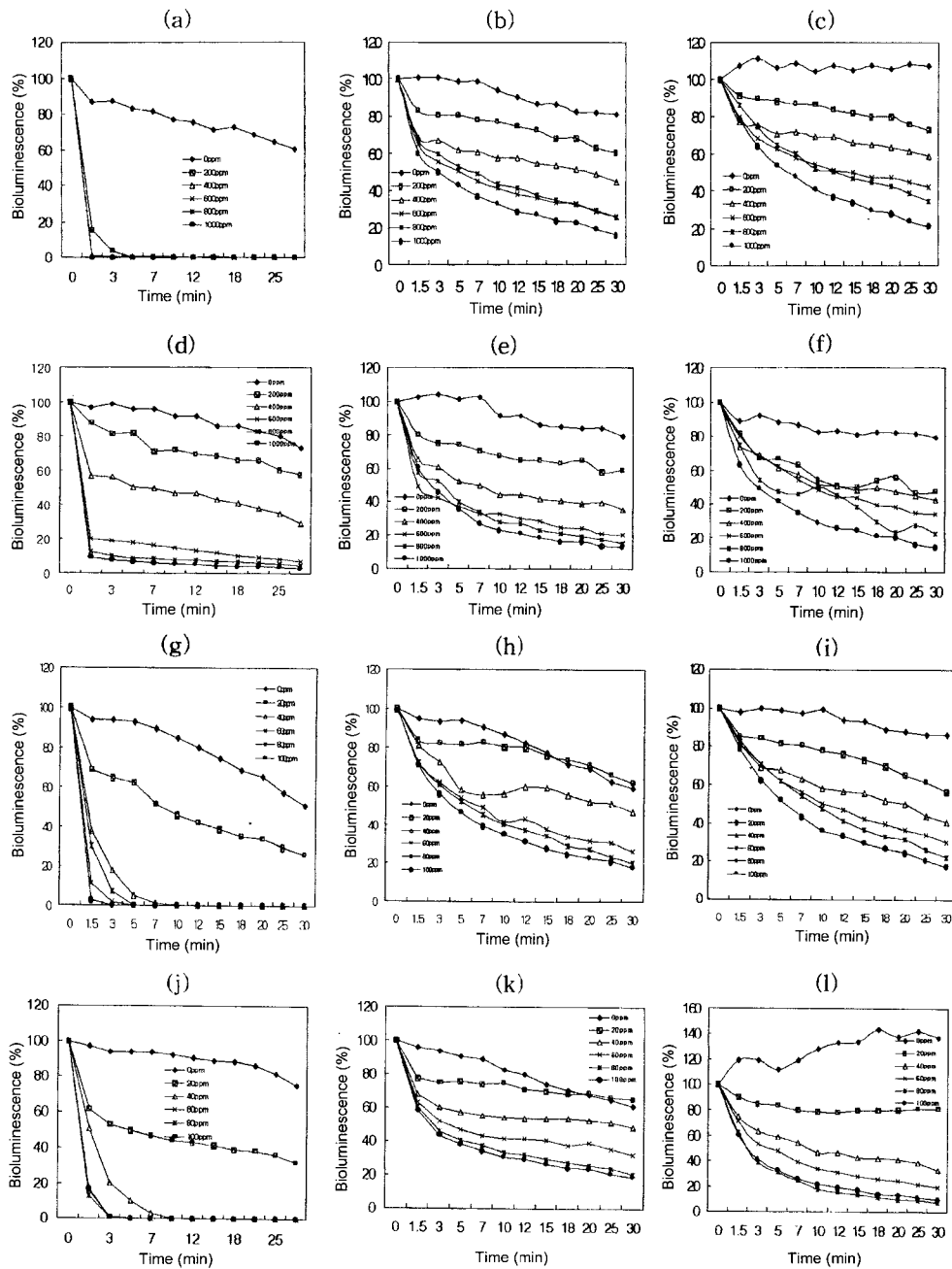
As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, phenol, SeO<sub>2</sub>, CrO<sub>3</sub>의 농도에 대한 bioluminescence 변화를 조사하기 위하여 세포를 이들 독성물질에 노출시킨 후 30분 동안 bioluminescence 변화를 측정하였다. Bioluminescence intensity는 RLU 값으로 maximum value를 100%로 보정하여 나타내었다. 독성물질의 농도가 높을수록 bioluminescence의 감소율이 증가하였으며 감소하는 정도는 독성물질의 종류에 따라 달랐다. 독성물질을 free cell, Sr-alginate 및 Ca-alginate에 고정화 한 다음 세포에 투여하여 bioluminescence의 반응을 조사하였다. Fig. 3에 독성물질의 농도에 따른 bioluminescence 반응에 관한 결과를 나타내었다. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>의 농도는 200ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, 1000 ppm을 투여하였으며, free cell은 200 ppm에서 3분 동안에 완전히 bioluminescence가 떨어졌다. Sr-alginate 및 Ca-alginate 고정화 세포에서는 200

ppm에서 control과 뚜렷이 구별이 되었다. Phenol 역시 200 ppm에서 1000 ppm까지의 농도로 세포에 노출시켜서 각 type의 세포에 대한 반응을 조사하였다. Free cell에서 민감한 반응을 보였으며 600 ppm에서 bioluminescence가 완전히 감소하였다. 고정화 세포에서 Ca-alginate 보다 Sr-alginate가 농도에 비례하여 bioluminescence가 감소하였다. SeO<sub>2</sub>는 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>나 phenol보다 강한 독성반응을 보였으며, 20 ppm에서 어느 정도의 bioluminescence의 감소를 보이다가 농도가 증가함에 따라 감소율은 더욱 크게 나타났다. 각 독성물질의 농도에 대한 bioluminescence의 변화가 뚜렷이 구별이 되었다. 전반적으로 free cell이 고정화 세포에 비해 더 민감한 반응을 보였다. SeO<sub>2</sub>는 40 ppm에 노출된 지 5분이 경과하여 거의 bioluminescence가 나타나지 않았다. Free cell과 고정화 gel에 CrO<sub>3</sub>를 20 ppm에서 100 ppm의 농도로 노출시킨 다음 bioluminescence의 변화를 조사하였다. 다른 독성물질에 비해 CrO<sub>3</sub>가 민감한 반응을 보였으며, 특히, 40 ppm에서는 노출된 지 5분 경과 후에 거의 bioluminescence가 나타나지 않았다. CrO<sub>3</sub>는 고정화 세포 중에서 Sr-alginate보다 Ca-alginate 고정화 세포에서 bioluminescence의 감소가 약간 높게 나타났다. 전반적으로 고정화 세포 보다 free cell이 독성물질에 대한 bioluminescence 변화가 더 민감하게 나타났다. 고정화 세포에서는 Sr-alginate와 Ca-alginate가 비슷한 양상을 보였다. Free cell이 독성물질에 대하여 민감한 반응을 보이는 것은 독성검사를 하였을 때 독성물질이 세포에 직접 노출되기 때문에 세포속으로 침투가 용이하기 때문이라고 사료되어진다.

#### 독성물질 농도의 상관관계 및 EC<sub>50</sub> value 산출

독성물질 중에서도 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, phenol, SeO<sub>2</sub>, CrO<sub>3</sub>를 선택하여 독성에 대한 bioluminescence 반응을 조사한 결과를 이용하여 EC<sub>50</sub>을 계산하였다. 이들 독성물질에 대하여 세포에 노출시켜 30분 동안의 bioluminescence의 변화를 조사하였으며 이미 전술하였듯이 독성물질이 농도가 높을수록 bioluminescence intensity의 감소율이 증가하였으며 각 독성물질 마다 독성정도가 다르게 나타났다. 독성물질 중에서도 SeO<sub>2</sub>, CrO<sub>3</sub>가 *P. phosphoreum*에 민감하게 반응한 반면에 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>와 phenol에는 민감하게 반응하지 않았다. 이는 SeO<sub>2</sub>, CrO<sub>3</sub>가 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>나 phenol보다 독성이 강하다는 것을 의미한다. 독성물질에 대한 발광현상의 감소는 여러 가지 방법에 의해 분석할 수 있지만, 본 연구에서는 Gamma value를 이용하였으며 Gamma value는 잔유하는 발광량에 대하여 감소하는 빛의 양의 비로 나타낸다. 독성물질 각 농도에 대한 Gamma value를 구하여 log-log 그래프에 나타내어 직선의 관계식을 얻었다(Fig. 4).

독성 test에 이용된 4가지의 독성물질로부터 Gamma



**Fig. 3. Kinetic response of bioluminescence in various toxic substances.**

The effect of  $As_2O_3$ ; (a) free cell, (b) strontium alginate immobilized cells, (c) calcium alginate immobilized cells, the effect of phenol; (d) free cell, (e) strontium alginate immobilized cells, (f) calcium alginate immobilized cells, the effect of  $SeO_2$ ; (g) free cell, (h) strontium alginate immobilized cells, (i) calcium alginate immobilized cells, the effect of  $CrO_3$ ; (j) free cell, (k) strontium alginate immobilized cells, (l) calcium alginate immobilized cells.

value를 구하여 이 값으로부터  $EC_{50}$ 을 구한 값을 Table 5, 6에 정리하였다. Table 5는 Sr-alginate 고정화 세포에서 10분, 20분, 30분 동안 독성물질에 대한  $EC_{50}$ 값을 나타내었으며,  $As_2O_3$ 가 257 ppm으로  $EC_{50}$ 값이 가장 크게 나타난 반면,  $SeO_2$ 가 24.5 ppm으로 가장 작게

나타났고, 상관계수는 0.97로  $SeO_2$ 가 가장 크게 나타났다 (Table 5). Table 6은 Ca-alginate에 고정화한 세포에서 10분, 20분, 30분 동안 독성물질에 대한  $EC_{50}$ 값을 나타내었으며,  $SeO_2$ 가 18.6 ppm으로 가장 작게 나타났고, 상관계수는 0.88로 나타났다 (Table 6).

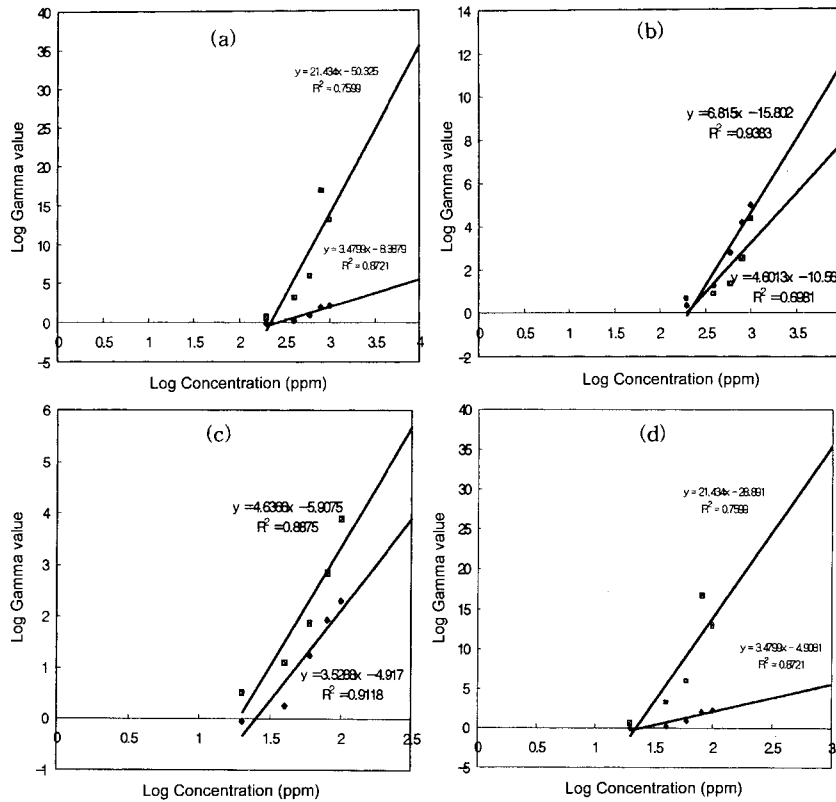


Fig. 4. The Gamma value of each toxic substances.

(a)  $As_2O_3$ , (b) phenol, (c)  $SeO_2$ , (d)  $CrO_3$  : (◆) strontium alginate immobilized cell, (■) calcium alginate immobilized cell.

Table 5.  $EC_{50}$  of immobilized cells on strontium alginate at 10min, 20min, 30min

Toxic substances	$EC_{50}$					
	10min		20min		30min	
	( $\times 10^2$ ppm)	$R^2$	( $\times 10^2$ ppm)	$R^2$	( $\times 10^2$ ppm)	$R^2$
$As_2O_3$	2.570	0.87	1.995	0.87	2.57	0.87
phenol	1.778	0.95	1.995	0.95	2.041	0.93
$SeO_2$	0.186	0.97	0.234	0.93	0.245	0.91
$CrO_3$	0.199	0.95	0.245	0.87	0.257	0.87

Table 6.  $EC_{50}$  of immobilized cells on calcium alginate at 10min, 20min, 30min

Toxic substances	$EC_{50}$					
	10min		20min		30min	
	( $\times 10^2$ ppm)	$R^2$	( $\times 10^2$ ppm)	$R^2$	( $\times 10^2$ ppm)	$R^2$
$As_2O_3$	2.187	0.76	1.949	0.79	2.187	0.76
phenol	1.148	0.83	1.905	0.80	1.949	0.79
$SeO_2$	0.154	0.88	0.181	0.89	0.186	0.88
$CrO_3$	0.186	0.79	0.213	0.72	0.218	0.75

요 약

본 연구에서는 발광미생물인 *P. phosphoreum*을 이용하여 수질 측정용 바이오센서를 개발하고자 free cell과 고정화 세포의 독성물질에 대한 반응성을 조사하였다. 고정화 물질로는 절차가 비교적 간단한 sodium alginate를 사용하였다. Alginate는 발광미생물의 빛 발생 대사를 저해하지 않을 뿐만 아니라 bioluminescence의 투과성이 탁월하였다. 독성물질의 MIC값을 보면  $As_2O_3$ 가 400 ppm, phenol이 800 ppm,  $SeO_2$ 와  $CrO_3$ 가 60 ppm으로 나타났다. 독성물질  $As_2O_3$ , phenol,  $SeO_2$ ,  $CrO_3$ 를 3가지의 조건 free cell과 Sr-alginate 및 Ca-alginate에 고정화한 세포에 투여하여

반응성을 조사하였다. Free cell이 가장 민감한 반응을 보였으며 free cell과 고정화 세포 모두 독성물질에 대하여 발광량이 농도에 비례하여 감소하였다. 특히, 고정화 세포인 경우 free cell보다 독성물질의 mass transfer에 미치는 영향 때문에 민감성은 떨어지지만 직선의 관계식을 나타내었다. Sr-alginate고정화 세포와 Ca-alginate고정화 세포의 독성물질에 대한 반응 양상은 비슷하게 나타났다. 독성물질에 대한 반응분석은 Gamma value로부터  $EC_{50}$ 을 구하여 각 독성물질의 농도와 *P. phosphoreum*의 발광량과의 상관관계 및 각 독성물질의 독성정도를 산출하였다.

감사의 말

본 연구는 1998년도 학술진흥재단 자유공모과제(학진 300-1138)의 지원으로 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Chun, U. H., N. Simonov, Y. Chen, and M. L. Britz. 1996. Continuous pollution monitoring using *Photobacterium phosphoreum*. *Resour. Conser. Recy.* **18**: 25-40.
2. Heitzer, A., K. Malachowsky, J. E. Thonnard, P. R. Bienkowski, D. C. White, and G. S. Saylor. 1994. Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1487-1494.
3. Lambolez, L., P. Vasseur, J. F. Ferard, and T. Gisbert. 1994. The environmental risk of industrial waste disposal : An experimental approach including acute and chronic toxicity studies. *Ecotoxi. Environ. Safe.* **28**: 317-327.
4. Lee, G. M. and B. O. Palsson. 1993. Stability of antibody productivity is improved when hybridoma cells are entrapped in calcium alginate beads. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 1131-1135.
5. Lee, J. H. and U. H. Chun. 1996. Monitoring of environmental pollutants with *Photobacterium phosphoreum* immobilized on strontium alginate(II). *The Kyung Hee J. Genet. Mol. Biol.* **8**: 56-63.
6. Mallak, F. P. and R. L. Brunker. 1984. Determination of the toxicity of selected metalworking fluid preservatives by use of the Microtox system and an *in vitro* enzyme assay, pp. 65-76. In B. J. Dutka (ed.), *Toxicity screening procedures using bacterial systems*, Marcel Dekker Inc., New York.
7. Meighen, E. A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. rev.* **55**: 123-142.
8. Overgaard, S., J. M. Schrer, M. M. Young, and N. C. Bols. 1991. Immobilization of hybridoma cells in chitosan alginate bead. *J. Chem. Eng.* **69**: 439-443.
9. Qureshi, A. A., R. N. Coleman, and J. H. Paran. 1984. Evaluation and refinement of the Microtox test for use in toxicity screening, pp.1-22. In B. J. Dutka (ed.), *Toxicity screening procedures using bacterial systems*, Marcel Dekker Inc., New York.
10. Yates, I. E. and J. K. Porter. 1982. Bacterial bioluminescence as a bioassay for mycotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1072-1075.

(Received October 4, 1999)