大韓環境工學會誌 · 논문 · pp. 507~512. 2005.

유전자 재조합 발광균주를 이용한 토양 오염원 *m*-toluate 탐지

공인철† · 김명희 · 정윤호 · 고경석* · 김재곤* · 신성천*

영남대학교 건설환경공학부 환경공학전공 · *한국지질자원연구원

(2005년 1월 25일 접수, 2005년 5월 17일 채택)

Detection of *m*-toluate in Soils using Bioluminescence Producing Recombinant Bacteria

In Chul Kong† · Myunghee Kim · Yunho Jung · Kyung-Seok Ko* · Jae Gon Kim* · Sungchun Shin*

School of Civil, Urban and Environmental Engineering. Yeungnam University
**Geo-Environmental Division, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources*

ABSTRACT : This research focuses on the development and application of a method for the detection of *m*-toluate in soils using a genetically engineered bioluminescent bacteria, *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206. KG1206 produces light by direct (*m*-toluate and benzoate) and indirect (toluene analogs) inducers. For detection of *m*-toluate in soil system, 9.9 mL strain was amended with 0.1 mL soil ethanol extractant. A high correlation ($r^2 > 0.97$) was observed between bioluminescence and *m*-toluate concentration. The unknown concentrations of *m*-toluate in soil samples were pre-determined using a method developed based on bioluminescence activity of strain with extracted inducers. Values between by LC analysis and bioluminescence activity show moderate statistical results.
These results demonstrate the feasibility of recombinant bioluminescent microorganism, engineered to generate a quantifiable bioluminescence signal in response to specific pollutants, may serve as combined sensing and reporting tools in environmental monitoring.

Key Words : *Genetically Engineered Microorganism(GEM), Bioluminescence, Toluene Analogs, TOL Plasmid*

요약 : 본 연구에서는 유전자 재조합 발광균주, *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206을 이용하여 토양에 오염된 *m*-toluate 탐지 방법 및 적용 가능성에 대해 조사하였다. KG1206은 톨루엔 계열 화합물의 중요 중간 분해물질인 *m*-toluate 및 benzoate가 직접 생물 발광 유도제로 작용하며, 또한 톨루엔 계열 화합물들이 간접 유도제로서 발광 활성을 나타내었다. 토양에 오염된 유도제 오염원 검출을 위해 발광 균주 9.9 mL에 에탄올 추출물 0.1 mL을 첨가하여 조사하였다. 생물발광에 근거하여 작성된 *m*-toluate 검량선은 대략 $R^2 > 0.97$ 이상의 상관관계가 관찰되었다. 토양에 임의 오염된 *m*-toluate (직접 발광유도제)는 정립한 방법에 따라 발광활성에 근거하여 추측하였고, 기기분석치와 통계적으로 유의한 것으로 조사되었다.
본 연구 결과를 통해서 특정 화합물에 대해 발광을 생산하는 유전자 재조합 균주가 특정 오염원에 오염된 지역의 관리를 위한 수단으로 사용할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

주제어 : 유전자 재조합 균주, 생물발광, 톨루엔 계열화합물, TOL-플라즈미드

1. 서 론

산업화 및 생활수준 향상은 화석연료 및 합성화합물질 (유기용매, 농약 등) 사용 증가를 유발하며, 이러한 결과로 배출되는 오염원들은 생태계의 불균형을 유발한다. 다양한 유발 오염원들 중에서 자동차, 저유소, 인쇄 · 잉크시설, 주유소 등에서 주로 배출되는 휘발성 유기화합물들은 발생량 및 위해도 관점에서 주요 대상 물질그룹 화합물중의 하나이며 이들의 오염량도 상당량 인 것으로 알려져 있다.[1)]

오염된 생태계 복원 (remediation) 및 관리 (monitoring)를 위해 다양한 물리 화학적 방법들이 주로 사용되고 있으나, 미생물의 특성을 이용한 생물학적 복원 (bioremediation) 및 생물학적 관리 (biomonitoring) 기술에 대한 연구와 적용이 일반적으로 2차 오염을 유발하지 않는 친환경적인 방법이면서, 경제적인 면에서도 저렴하게 수용될 수 있다는 장점 때문에 다양하게 연구되고 있다.[2,3)]

미생물 특성을 이용한 다양한 접근법들 중에서, 유전자 재조합 균주 (genetically engineered microorganism) 를 이용하는 기술은 필요 목적에 맞게 유전자를 재조합할 수 있는 가능성 때문에, 생태계 복원 및 감시를 위한 유용한 대체 기술 중의 하나로 고려되고 있다. 이러한 재조합 균주 중 생물발광 (bioluminescence) 이나 형광단백질 (green fluorescence protein) 을 생산하는 균주를 이용한 새로운 기술이 환경문제 해결을 위한 적절한 수단으로 다양하게 개발되고 있다.[4)] 생물발광은 자연현상으로 생물내의 화학반응에 의해 생물로부터 발광하는 빛을 일컬으며 (무)척추동물 (firefly *Photinuspyralis*), 박테리아 (*Vibrio*) 등의 다양한 생물에서

† Corresponding author
E-mail: ickong@yu.ac.kr
Tel: 053-810-2546 Fax: 053-810-4624

관찰할 수 있다.[5~7] 생물발광은 특정생물의 유일한 특성이므로 발광생물 외의 다른 생물에 의한 배경 오차를 방지할 수 있고, 화학적 분석에 의한 관리 및 감시와 비교해 볼 때 생태계에 오염된 총량보다는 생물이용 (bioavailable) 가능한 양, 즉 생태계에 영향을 미치는 양을 가늠할 수 있다. 또한 현장에서 직접 이용이 가능하며, 환경 친화적인 기술이므로 특정 화합물에 오염된 생태계의 관리 및 감시에 적절하게 이용할 수 있을 것이며, 발광 유전자 재조합 균주를 이용하여 현장 적용을 위한 연구들이 이루어지고 있다.[8] 발광박테리아는 빠른 반응, 적은 비용, 신속한 재생산으로 인해 biosensor로서 각광받고 있다.[9] Gu and Chang (2001)은 *lac*::*lux* 유전자 재조합 균주을 이용하여 polycyclic 방향족 탄화수소의 biosensor로 이용하였다.[10]

본 연구에서는 유전자 재조합 발광 균주를 이용하여 특정 화합물로 오염된 토양을 신속히 관리할 수 있는 방법을 임의 오염된 토양에 적용하였다. 재조합된 *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206 (이하 KG1206) 발광균주는 TOL-plasmid의 lower operon promoter인 P_m과 *lux*-gene이 재조합된 P_m-*lux* reporter 플라즈미드와 TOL-plasmid를 보유하고 있으며, 톨루엔 계열 화합물 (parent compounds) 뿐 만 아니라, 이러한 화합물의 분해산물인 *m*-toluate 혹은 benzoate 등에 노출시 발광을 생성하는 특성을 보유하고 있다.[11] 주요 연구 내용으로는 (1) 발광 균주 특성, 토양 함유물이 미치는 영향 등의 기초 조사와 함께, 토양에 임의 오염된 *m*-toluate를 발광균주로 신속히 추정할 수 방법 (protocol)을 정립하였고, 오염 토양 중 *m*-toluate를 발광에 근거하여 추정하고, 추정치를 실제값 (기기분석)과 비교하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 발광 균주 배양 및 특성

초저온고 (-70℃; Ilshin Lab Tech. Co., Model DF9007)에 보관된 균주 KG1206은 필요시 LB고형배지 (tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, 2N NaOH 0.5 mL per 1 L, pH 7.2)에 계대 배양 (27℃, 130 rpm) 하여 사용하였다. 균주를 LB배지에 약 12시간 이상 배양 후 1 : 20 희석하여 OD_{600} = 0.6이 될 때까지 배양하였다. 실험을 위해서 균주를 MSM (minimal salt medium; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $CaCl_2$ 0.1 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 mg, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.25 mg, K_2HPO_4 0.43 g, KH_2PO_4 0.23 g per 초순수 1 L)을 이용하여 OD_{600} = 0.3으로 조정하였다. KG1206은 kanamycin 저항유전자(Kmr)를 보유하고 있으므로 LB배지에 kanamycin을 50 mg/L 첨가하였다. 또한 균주 특성 조사를 위해 다양한 중금속 (10 mg/L)과 염소페놀계열 화합물 (10 mg/L)들을 임의로 첨가하여 발광 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 조사대상 화합물은 다음과 같다: Pb, Cd, Cu, Zn, 페놀, 2-CP (chlorophenol), 3-CP, 2,4-DCP (di-CP), 3,5-DCP, pentachlorophenol.

2.2. 토양 함유물 및 단일 오염원이 발광에 미치는 영향

토양 오염원 정량화를 위해 토양 에탄올 추출물을 발광균주에 첨가하는 방법을 사용하였으므로, 에탄올 추출물에 포함된 토양 함유물들이 발광활성에 미치는 영향을 조사하였다. 오염되지 않은 토양의 에탄올 추출물에 함유된 물질들이 발광활성에 미치는 영향을 순수 에탄올 용액과 다양한 *m*-toluate 농도 (10~150 mg/L) 조건에서 비교하였다. 또한 국내 환경청 토양 측정망 시료 중에서 기준 항목에 대해 높은 농도로 오염된 시료군과 낮은 시료군 (각 5개 지역) 토양을 에탄올로 추출한 후, 추출물에 포함된 다양한 오염원들이 균주 발광활성에 미칠 수 있는 영향을 비교하였다.

2.3. 발광에 근거한 검량선 작성 방법 조사

다양한 임의 농도의 *m*-toluate에 오염된 토양 2 g을 4 mL의 에탄올 용매로 추출한 후, 농도를 HPLC (액체크로마토그래피; Model SCL-10AV Shimadzu Co. Japan) 로 분석하였다. 확인된 추출액의 농도를 기준으로 하여 다양한 농도의 *m*-toluate을 균주에 노출시킨 후 발광 활성 검량선을 작성하였다. 동일한 발광 균주에 토양 오염 추출액 (1% v/v ; 총용량 10 mL)을 첨가한 후 발광활성을 측정하였으며, 토양 오염 추출물에 용해되어 있는 *m*-toluate 농도는 발광 표준 검량선에 기준하여 추정 후 실제값 (HPLC분석값)과 비교하였다. HPLC의 분석 조건은 다음과 같다: 254 nm UV-detector, RP-18 column, 이동상 methanol 100%, 이동상 유속 1 mL/min. 발광은 시료 400 μL를 채취한 후, Luminometer (Turner Design Model 20/20, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.4. 발광에 근거한 반정량화

토양을 *m*-toluate로 임의 오염시킨 후, 토양 2 g을 매번 채취하여 15 mL 혈청병에 넣고 오염원을 에탄올로 추출하여 KG1206 균주 9.9 mL에 0.1 mL 추출액을 주입한 후 발광 활성을 30분 간격으로 조사하였다. 발광 검량선 작성

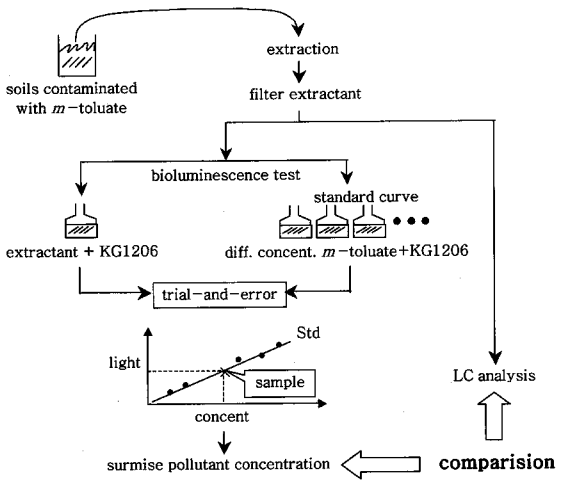

Fig. 1. Schematic diagram of semi-quantitation of *m*-toluate in soil.

을 위해, 검량선의 적절한 농도 범위는 초기에 넓은 범위의 검량선을 이용하여 대략적 농도를 추정한 후 좁은 범위의 발광 검량선을 이용하여 오염원 농도를 측정하였다. 발광 검량선을 이용하여 추정한 오염원 농도와 실제 농도를 비교하기 위해 추출물을 HPLC로 기기 분석하였다. 실험은 3회 반복 수행하였으며, 실험 수행 모식도를 Fig. 1에 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. KG1206의 발광활성 특성

KG1206 균주의 TOL-plasmid는 톨루엔계열 화합물을 크렙스 회로까지 산화하는 두개의 operon을 포함하고 있으며 첫째 operon은 toluene, xylene을 benzoate, toluate으로 전환하는 상부경로 유전자이고, 하부경로 유전자는 benzoate, toluate을 pyruvate 등으로 전환하는 유전자이다.[12,13] P_m은 TOL 분해성 플라즈미드인 pWWO의 lower (*meta*) operon (13 genes)을 조절하는 기능을 가지고 있다.[14] 균주 발광활성은 유도제로 작용하는 오염 화합물이 xyl-gene 하부 분해경로 P_m promoter를 조절하는 XylS protein을 양성적으로 활성화 시켜 P_m-*lux* 조합유전자에 작용하여 나타나는 것으로 알려져 있다.[15] 재조합된 균주 KG1206은 톨루엔 계열 모화합물 (parent compounds; toluene, *o*-, *m*-, *p*-xylene, *m*-MBA)들에 대해서만 발광 활성을 나타내는 균주 RB1401[13]와는 달리, 모 화합물 뿐 만 아니라 주요 중간부산물인 *m*-toluate, benzoate 등에 대해서도 발광을 생산하는 특성을 보유하고 있다.

균주 발광특성을 xylene의 중간 분해산물인 *m*-toluate의 다양한 농도에 대해 조사하였다 (Table 1). P_m의 직접유도제인 *m*-toluate 1.5 mg/L 이하의 농도에서는 매우 약한 발광을 관찰할 수 있었고 (16 RLU 이하), 7~14 mg/L 농도 범위에서는 백단위 (<275 RLU) 의 발광 활성이 3.5 hrs 정도까지 지속되었다. 68 mg/L에서 136 mg/L 정도의 농도 범위에서는 최대 한계치를 넘지 않는 수천 RLU (<3,675 RLU) 수준의 발광활성이 4.5 hrs 정도까지 지속되었다. 발광 활성을 억제하지 않으며 최대한계치를 넘는 발광활성이 400 mg/L 정도의 농도에서 관찰되었다. 발광 활성이 초기에 약간 억제되었으나, 곧 회복되는 *m*-toluate 농도의 범위는 700~1,100 mg/L로 조사되었으며, 이 농도 범위에서는 배양 6시간까지 높은 발광활성이 관찰되었다. 조사한 최대 농도 1,400 mg/L에서는 발광 활성이 완전히 억제되었다. 또한 발광 활성이 억제되지 않는 농도인 70 mg/L에서 발광 활성이 완전히 소멸된 후 (배양 20 hr) 에 *m*-toluate 70 mg/L를 첨가했을 때, 초기 최대 발광활성의 약 70% 활성이 되었다.

TOL plasmid의 두 개 operon에 대해서 간접 유도제들인 톨루엔 및 xylene 이성질체 등은 알려진 바와 같이 TOL plasmid xylR 유전자로부터 생성된 xylR 단백질을 활성화하며, 활성화된 단백질은 P_s와 P_u의 전사 (transcription)와 함께 P_m의 전사를 유도하기 때문에 발광활성을 관찰할 수 있었다.[16] 따라서 발광균주 KG1206은 간접 유도제와 직접 유도제 (간접 유도제의 중간 분해산물) 화합물로 오염된 지역의 감시 및 복원에 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

또한 임의의 단일 오염원들, 10 mg/L 농도의 중금속 (Pb, Cd, Cu, Zn)과 (염소)페놀화합물들 (phenol, 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP, 3,5-DCP, PCP), 이 균주의 발광 활성에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 2). 중금속류의 경우 발광활성은 대조군과 비교하여 Pb은 60%, Cd 69%, Cu 95%, Zn 100%를 나타내었다. 일반적으로 자연환경에서 Pb는 침전성이 높은 특성으로 인해 수중 존재량이 적으며, 또한 독성영향이 적은 것으로 알려져 있으나, 본 발광균주에 대해서는 다른 조사대상 금속에 비해 억제현상이 높게 나타났다. 일반적으로 독성이 높은 것으로 알려진 Cd은 Cu와 Zn에 비해 높은 발광 저해 현상을 나타내었다. 유기오염원인 경우 phenol과 PCP는 100%에 근접하는 발광활성을 나타낸 반면, 그 외 기타 페놀계열 화합물들은 55~100%의 발광저해를 나타내었다. 특히 2,4-, 3,5-DCP 및 3-CP는 높은 발광 저해를 유발하였다. 따라서 발광 유도제 오염원들의 검출을 위해서는, 환경 시료에 존재하는 다양한 오염원들이 발광활성에 미칠 수 있는 영향을 고려해야 할 것이다.

Table 1. Characteristics of bioluminescence activity of KG1206 at different levels of *m*-toluate

m-toluate (mg/L)	Maximum bioluminescence (times for max. bioluminescence)		Activity	Duration for measurable bioluminescence activity
0.1	< 10 RLU	-	NH	-
1.5	16 RLU	(3.0 hr)	NH	2.5~3.0 hrs
7.0	127 RLU	(2.5 hr)	NH	0.5~ 3.5 hrs
14	275 RLU	(1.5 hr)	NH	0.5~2 hrs
70	1669 RLU	(1.5 hr)	NH	0.5~3.5 hrs
140	3675 RLU	(1.5 hr)	NH	0.5~4.5 hrs
400	> 9999 RLU	(2.5~3.0 hr)	NH	0.5~5.0 hrs
700	> 9999 RLU	(2.0~5.0 hr)	IHR	0.5~8 hrs
1100	> 9999 RLU	(2.5~6 hrs)	IHR	0.5~< 8 hrs
1400	< 1 RLU	-	CH	-

NH; no inhibition, IHR; initial inhibition, but recovered, CH; complete inhibition

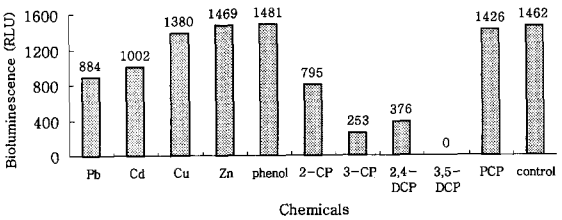

Fig. 2. Effects of various pollutants (10 mg/L) on the bioluminescence activities of KG1206.

3.2. 토양 함유물이 발광 활성에 미치는 영향

에탄올 추출물을 발광균주에 첨가하여 토양 오염원 농도를 추정할 경우, 추출물에 함유되어 있는 유도제이외의 오염원들이 균주 발광활성에 미칠 수 있는 영향 가능성에 대해 조사하였다. 먼저 기초 실험으로 오염되지 않은 토양을 추출한 에탄올과 순수 에탄올 용액의 *m*-toluate 농도를 10~150 mg/L 되도록 조정 후, 발광 활성을 관찰하였다. 토양 추출 에탄올에 용해된 *m*-toluate 첨가군의 발광활성은 순수 에탄올 첨가군에 대해 102±7% 발광 활성을 나타내었다. 따라서 비오염 토양 함유물이 균주 발광 활성에 미치는 영향은 무시할 정도임을 확인하였다.

발광 유도물질 외의 토양 오염원들이 발광 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위해서, 지방 환경청에서 채취한 토양 측정망 시료 중에서 기준 항목의 오염정도가 높은 시료와 낮은 시료 각 5개 지역 토양을 에탄올로 추출한 후, 균주의 발광 활성에 미치는 영향을 비교하였다 (Table 2). 토양 오염기준 항목중에서 페놀, BTEX, TPH, Cr^{6+} 등은 무시할 정도의 미량 혹은 검출되지 않았으며, 주로 중금속 항목들이 주된 오염원으로 관찰되었다 (Table 2). 약염산법으로 추출된 중금속 중에서 아연이 다른 중금속에 비해 많이 (13.11~607.1 mg/L) 검출되었고, 비소는 매우 소량 (<0.076 mg/L)의 농도가 검출되었다. 오염 정도가 상이한 두 그룹의 평균 발광 활성은 각각 1485±181 RLU와 1455±288 RLU로 거의 동일한 발광 활성이 관찰되었다. 따라서 토양 오염원의 종류 및 오염 정도에 따라 영향을 줄 수 있는 가능성도 간과할 수 없으나, 오염원 탐지를 위해 균주 전체 부피에 비해 에탄올 추출물이 소량 (1% v/v) 첨가되기 때문에 희석효과에 의해 발광 유도제 이외의 오염원이 발광 활성에 미치는 영향은 미미할 것으로 사료된다.

3.3. 발광 활성을 이용한 표준 검량선 이용 가능성 조사

오염원의 (반)정량화를 위하여 발광 표준 검량선 이용 가능성 여부를 조사하였다. 균주의 발광 활성은 동일한 균주 농도 (OD 기준) 에서도 상태에 따라 일부 상이한 발광 활성이 관찰되었으므로, 발광에 근거한 토양오염원 농도 조사는 매번 동일 활성의 균주를 표준 검량선 및 토양 추출물 노출에 사용하였다.

Table 2. Effects of pollutants on bioluminescence activity of strain KG1206

	Concentration (mg/kg soil)	
	High level sites (n=5)	Low level sites (n=5)
Cd	0.15~1.975	0.06~0.385
Cu	1.445~44.125	0.115~5.095
As	0~0.076	0.007~0.054
Hg	0.0076~0.054	0.006~0.0407
Pb	3.2~52.5	0.25~5.45
Zn	110.6~607.1	13.22~150.97
Ni	6.67~69.47	3.27~15.57
F	132.1~586.6	ND~386.7
Biolum. activity	1485±181 RLU	1455±288 RLU

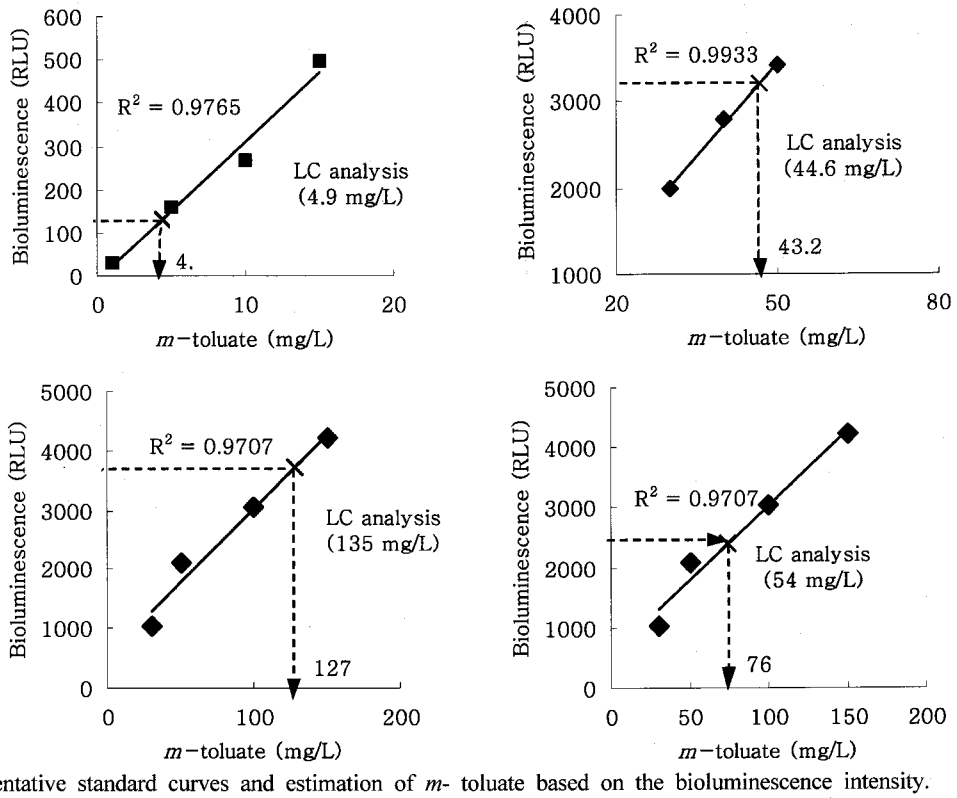

Fig. 3. Representative standard curves and estimation of *m*- toluate based on the bioluminescence intensity.

발광에 근거한 검량선 이용 여부를 파악하기 위해, 먼저 토양 추출물의 *m*-toluate 농도를 HPLC로 분석하였다. 분석 농도를 기준으로 하여, 다양한 *m*-toluate 농도 범위의 에탄올 용액을 발광 균주에 노출 후, 발광활성에 근거한 검량선을 작성하였다. *m*-toluate 함유 토양 추출물을 동일한 활성의 발광 균주에 노출 후, 생성되는 발광을 이미 작성된 검량선에 기준해서 *m*-toluate 농도를 추정하고, HPLC 분석치와 비교하였다. 농도 별 대표적 발광 검량선을 Fig. 3에 나타내었다. 발광 검량선의 상관관계 (R^2)는 0.97 이상으로 조사되어, 발광활성과 오염원 농도간에 높은 상관관계가 관찰되었다. Fig. 3에 의하면 실제농도가 4.9, 44.6, 54 및 135 mg/L *m*-toluate 토양 추출액의 발광에 근거한 추정농도는 각각 4.4, 43.2, 76 및 127 mg/L로, 실제 기기분석치의 90~141%의 범위로 조사되었다. 따라서 발광균주의 활성에 기준한 검량선을 이용에 대한 가능성을 확인할 수 있었다.

3.4. 발광에 근거한 *m*-toluate 반정량화

임의 농도의 *m*-toluate에 오염된 토양으로부터 간헐적으로 시료를 채취하여 사용하였다. 채취 토양 시료의 *m*-toluate 농도를 에탄올 추출액 발광 활성에 근거한 검량선을 이용하여 추정하고, 또한 발광 추정값을 HPLC 분석값과 비교하여, 추정치에 대한 실제값의 비 (%)를 나타내었다 (Fig. 4). 토양 오염원 농도 추정을 위해서 두 번의 검량선을 작성하였다. 초기에는 넓은 농도 범위의 표준농도로 작성된 발광 검량선을 이용하여 토양 추출물의 대략적인 농도를 추정하였다. 연이어서 추정 농도에 근접한 범위의 다양한 농도 *m*-toluate로 검량선을 다시 작성하여 농도를 정밀하게 추정하였다.

총 30개의 시료 중 *m*-toluate 추정값은 HPLC 기기 분석치에 비교하여 최저 75%, 최대 158%로 농도가 추정되었으며, 이중 ±10, 20 및 25%의 범위 내에는 각 10, 15과 19개의 시료가 해당되었다. 발광추정 실험 결과의 유의성을 살펴보기 위하여 HPLC 분석값과 발광 추정농도에 대한 통계비교를 실시하였다. 실험결과의 유의성은 평균비교 분석에 의해 평가되어졌다. 두 분석 방법 (HPLC와 발광추정농도)에 의해 측정된 값의 평균이 동일하다는 가정 하에, 분산이 동일한 경우와 그렇지 않은 경우를 가정하여 Student's t검정을 실시하였다. 검정 결과 관측된 t값이 모두 기각값보다 작으며, 또한 유의확률이 모두 0.05보다 큰 값을 보여줌을 알 수 있었다 (Table 3). 이는 두 집단사이의 평균이 차가 있다는 것은 유효하지 않다는 것을 의미한다. 따라서 본 조사에서의 발광에 근거한 추정 농도값은 오염된 토양의 농도를 측정할 수 있는 (반)정량적 자료로 사용 가능함을 보여주는 결과라 할 수 있을 것이다.

Table 3. Results of Student's t tests

Variances	Observed t	Method	DF	Critical t	Pr>|t|
Unequal	0.430	Satterthwaite	67.804	1.996	0.668
	0.430	Cochran-Cox	35	2.030	0.670
Equal	0.430		70	1.994	0.668

4. 결 론

유전자 재조합 발광 균주를 이용하여 특정 오염원 정량화를 시도한 결과 다음과 같은 결론을 도출할 수 있었다.

1) Xyl-gene의 하부 promoter (P_m)와 lux-gene을 재조합한 플라즈미드 보유 균주 KG1206은 톨루엔 계열 화합물뿐 만 아니라, 중간 분해산물들인 *m*-toluate에 대해서도 높은 발광을 나타내었다.

2) 발광 균주를 다양한 중금속및 페놀 계열 유기물 오염원 10 mg/L의 농도로 조절하였을 경우, 대조군에 비해 약 55~100% 발광활성을 나타내었다. 그러나 토양오염원 정량화를 위해 다양한 오염원을 함유한 에탄올 추출물을 균주에 1% (v/v) 으로 노출하였을 경우에는 영향이 미미함을 알 수 있었다.

3) *m*-toluate 반정량화를 위해 균주 발광에 근거한 검량선 이용 가능성을 확인하였다.

4) 발광에 근거하여 *m*-toluate 농도를 추정하기 위해 임의로 30개의 시료를 채취한 결과, HPLC 기기 분석값의 75~158% 범위로 농도가 조사되었으며, 통계적으로 유의한 것으로 나타났다.

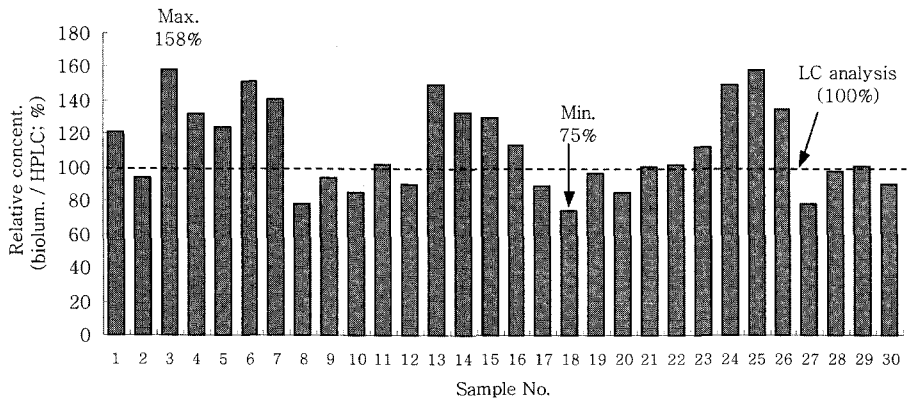

Fig. 4. Comparison of *m*-toluate values measured by LC analysis with those by bioluminescence intensity.

실내 실험에서는 높은 적용 가능성을 확인할 수 있었으나, 환경 적용을 위해서는 복잡한 환경 오염의 특성에 대한 계속적인 연구가 있어야 한다. 예를 들면 다양한 발광 유도 오염원들의 존재에 대한 문제 및 또한 다양한 토양 함유물들에 대한 연구가 향후 진행되어야 할 것이다.

사 사

이 논문은 환경부 토양오염 방지 연구 사업인 "지질 환경별 부지오염 탐지기술 개발" 에 의하여 수행되었습니다. 귀 재단에 감사드립니다.

참고문헌

1. 신창섭, 김기환, 원정일, "PCB 제조공정에서 발생하는 VOC를 처리하기 위한 흡착제의 흡착특성," 한국대기환경학회지, **17**(1), 67~74(2001).
2. Thouand, G., Horry, H., Durand, M. J., Picart, P., Bendriaa, L., Daniel, P., and Dubow, M. S., "Detection of bacteria in the food industry with bioluminescence sensors," *Recent Res. Develop. Microbiol.*, **5**, 79~93(2001).
3. Kohler, S., Belkin, S., and Schmid, R. D., "Reporter gene bioassays in environmental analysis." *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366**, 769~779(2000).
4. Chatterjee, J. and Meighen, E. A., "Biotechnological application of bacterial bioluminescenec (*lux*) genes," *Photochem. Photobiol.*, **62**(4), 641~650(1995).
5. Steinberg, S. M. and Poziomek, E. J., "A review of environmental application of bioluminescence measurements," *Chemosphere*, **30**(11), 2155~2197(1995).
6. Nealson, K. H. and Hastings, J. W., "Bacterial bioluminescence: Its control and ecological significance," *Microbiol. Rev.*, December, 496~518(1979).
7. King, J. M. H., Digrazia, P. M., Burlage, B., Sanseverino, J., Dunbar, P., Larimer, F., and Sayler, G. S., "Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation," *Science*, **249**, 778~781(1990).
8. Willardson, B. M., Wilkins, J. F., Rand, T. A., Schupp, J. M., Hill, K. K., Keim, P., and Jackson, P. J., "Development and testing of a bacterial biosensor for toluene - based environmental contaminants," *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(3), 1006~1012(1998).
9. Gu, M. B. and Choi, S. H., "Toxicity biomonitoring of degradation byproducts using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria," *Anal. Chim. Acta*, **481**, 229~238(2003).
10. Gu, M. B. and Chang, S. T., "Soil biosensor for the detection of PAH toxicity using an immobilized recombinant bacterium and a biosurfactant," *Biosens. Biotechnol.*, **16**, 667~674(2001).
11. Kong, I, C., Suh, H., Yang, Z., and Burlage, R. S., "A bioluminescence reporter strain utilizing the lower pathway promoter (P_m) of the *xyl* operon of *Pseudomonas*; optimization of a bioassay for *m*-toluate," *Adv. Environ. Res.*, **8**, 647~654(2004).
12. Holtel, A., Marques, S., Mohler, I., Jakubzik, U., and Timmis, K. N., "Carbon source - dependent inhibition of *xyl* operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL Plasmid," *J. Bacteriol.*, **176**(6), 1773~1776(1994).
13. Burlage. R. S., Palumbo, A. V., Heitzer, A., and Sayler, G. S., "Bioluminescent reporter bacteria detect contaminants in soil samples," *Appl. Biochem. Biotech.*, **45**, 731~740(1994).
14. Harayama, S. and Rekik, M., "The meta cleavage operon of TOL degradative plasmid pWWO comprises 13 genes," *Mol. Gen. Genet.*, **221**, 113~120(1990).
15. Assinder, S. J. and Willams, P. A., "The TOL Plasmid : Determinants of the catabolism of toluene and the xylenes," *Adv. Microbiol. Phys.*, **31**, 2~69(1990).
16. Inouye, S., Nakazawa, A., and Nakazawa T., "Overproduction of the *xylS* gene product and activation of the *xyl*DLEGF operon on the TOL Plasmid," *J. Bacteriol.*, **169**, 3587~3592(1987).