

Multi-Channel Two-Stage 시스템을 이용한 수질 독성 모니터링의 지표 확립 및 모사

김병찬, 구만복*

광주과학기술원 환경공학과, 환경 모니터링 신기술 연구센터
전화 (062)970-2440, *E-mail : mbgu@kjist.ac.kr

Abstract

The character of a recombinant bioluminescent bacteria's light emission enables us to monitor toxicity in water, soil and air. In this study, various bioluminescent responses to water samples containing toxic chemicals, such as phenol and mitomycin C, were obtained and analysed through the use of a multi-channel two-stage minibioreactor system. The bioluminescent pattern from each channel can be used as a standard for identifying the degree of toxicity in field samples. When various concentrations of toxic chemicals were injected in a step manner, different bioluminescent patterns were obtained. Also this system showed variation in its bioluminescent pattern as the injection manner was changed, i.e. using a modified version of the bell-curve type injection. In conclusion, the toxicity was shown to be related with the bioluminescent response when using these standard bioluminescent patterns. Comparing this standard with a bioluminescent response from a field sample, we can estimate the degree of which the sample is toxic.

서론

유전자 재조합 발광 박테리아는 수질, 대기, 토양의 독성을 모니터링 하기 위해 다양하게 응용되고 있다. 특히 수질의 독성을 모니터링 하기 위해 이단계 연속 반응기를 이용하는 방법은 빠른 시간 안에 연속적으로 독성을 모니터링 할 수 있도록 한다. 이를 multi-channel 시스템으로 응용하여 각 채널에 서로 다른 독성의 종류를 감지 할 수 있는 유전자 재조합 발광 미생물을 연속 배양하면 수질의 독성을 종류별, 농도별 판단이 가능하다. 본 연구에서는 수질 샘플에 인위적으로 페놀, MitomycinC (MMC)를 농도 별로 주입하여 각 채널에서 나타나는 발광 반응 및 비율을 분석하여 본 시스템이 실제 현장에서 운영될 때 독성으로 인하여 나타나는 발광 패턴에 따른 독성의 정도를 어떻게 해석할 것인가에 관한 기준을 확립하였다. 또한 독성 측정이 진행되는 두 번째 반응기로의 샘플 주입 방식을 step 주입과 변형된 bell-curve 주입을 통하여 발광 패턴을 비교하여 보았다.

재료 및 방법

재조합 발광 박테리아 DPD2540, DPD2794, TV1061 과 GC2를 초기 stationary phase 까지 성장시킨 후 각 채널의 이 단계 반응기의 첫 번째 반응기에 주입하여 연속 배양을 실시하였

다. DPD2540은 생물막 손상에 영향을 주는 독성물질, DPD2794는 유전자 손상에 영향을 주는 독성물질, TV1061은 단백질 손상에 영향을 주는 독성물질과 반응하여 발광의 정도가 증가하는 균주이며, GC2는 세포에 전반적으로 독성을 주는 물질에 반응하여 발광이 감소하게 되는 균주이다. 첫 번째 반응기로는 각 재조합 균주의 플라스미드 특성에 따른 antibiotics 가 포함된 영양배지(Luria-Bertani medium)가 주입이 되며 두 번째 반응기로는 첫 번째 반응기에서 배양된 박테리아와 독성물질이 포함된 수질 샘플이 지속적으로 들어가게 된다. DPD2540, DPD2794, TV1061 채널은 30°C로 유지되며 GC2 채널은 37°C로 유지된다. 첫 번째 반응기의 dilution rate은 0.8/h, 두 번째 반응기의 dilution rate 은 3.0/h로 고정하여 운전하였다(그림1.). DPD2540, TV1061, GC2 채널에는 각각 100ppm, 300ppm, 600ppm, 1000ppm의 페놀이 감지되도록 하였으며 DPD2794 채널에는 10ppb, 50ppb, 100ppb, 500ppb의 MMC가 감지되도록 수질 샘플을 준비하여 두 번째 반응기로 step 주입 형식으로 독성 모니터링을 실시하였다. 또한 주입 방식을 변형된 bell-curve 형식으로 하여 각 채널에서의 발광 패턴 변화를 살펴보았다. 모든 데이터의 형식은 RBL(Relative Bioluminescence Level - Bioluminescence Level /Control Bioluminescence Level)값으로 나타내었다.

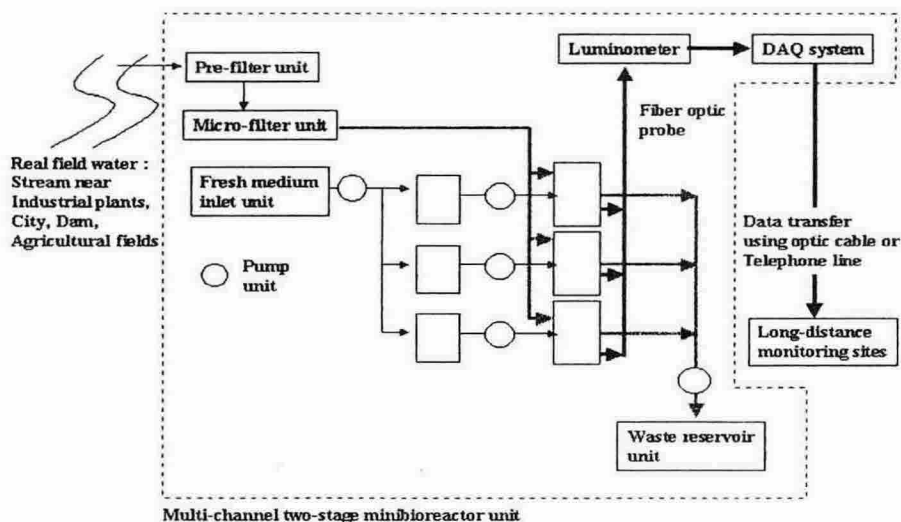


그림 1. 필드 샘플 독성 모니터링을 위한 Multi-channel Two-stage minibioreactor 구성도

결과 및 고찰

독성 샘플을 Step 형식으로 주입하여 실험한 경우 모든 채널에서 각 독성 물질의 농도에 따라 발광 패턴이 특이적으로 나타남을 알 수 있었다. 페놀에 대한 DPD2540(그림1.)과 TV1061(data not shown)채널에서 각 농도에 따른 발광 패턴을 살펴보면 100ppm에서는 control에 비해 두 배 이상의 발광이 나타난다. 하지만 300ppm 이상에서는 100ppm에서 유지되었던 발광의 정도보다는 낮은 RBL을 유지하는데 이는 페놀의 독성으로 인해 세포들이 사멸되는 것으로 판단되며 샘플 주입 중단 후 100ppm에서 유지되었던 RBL 이상까지 발광이

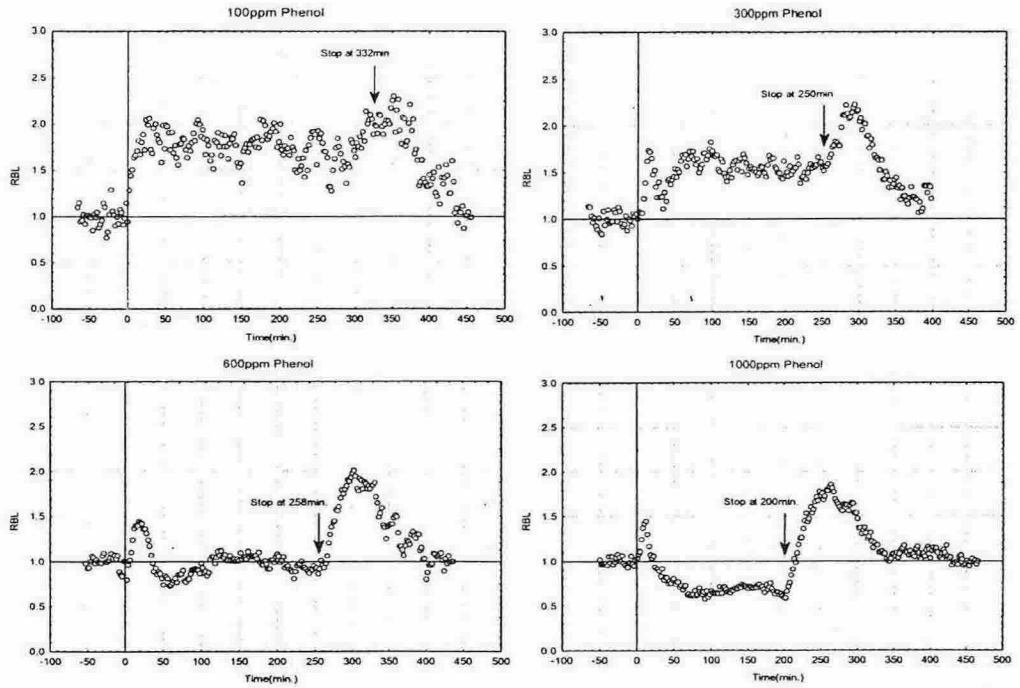


그림 2. 페놀의 농도에 따른 DPD2540 채널에서의 발광 변화 패턴 (Injection type - Step)

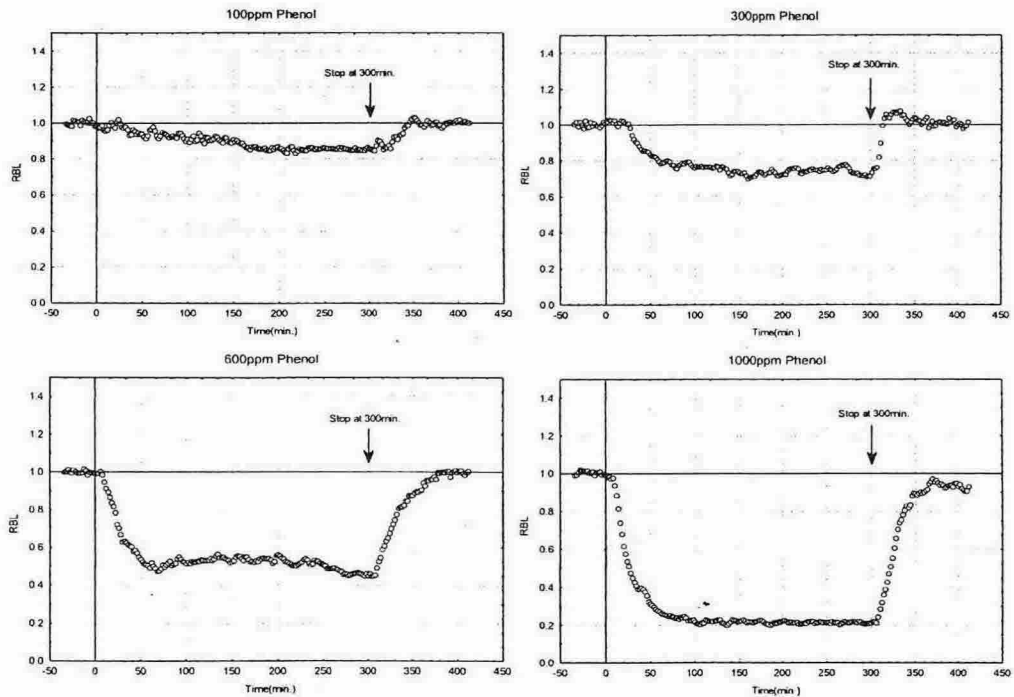


그림 3. 페놀의 농도에 따른 GC2 채널에서의 발광 변화 패턴 (Injection type - Step)

나타나다가 감소한다.

GC2의 경우 페놀의 농도가 증가할수록 발광의 감소 정도가 증가하였으며 농도별로 발광이 감소하는 수준을 결정할 수 있었다. MMC의 농도에 따른 DPD2794 채널에서의 발광 변화도 뚜렷한 차이를 볼 수 있었다(data not shown).

한편 실제 모니터링 지점에서의 독성 물질 유입은 Step 형식 뿐만아니라 bell-curve 형식을 띌 수도 있고 pulse 형식을 띌 수도 있다. 수질샘플의 주입방식을 step에서 변형된 bell-curve 형식으로 바꾼 경우에는 step 주입 형식과는 다른 발광 패턴을 얻을 수 있었다(data not shown).

실제 이 시스템이 현장에 적용되면 모니터링 지점에 어떤 종류의 독성물질이 있는지는 판단하기 어려우나 각 채널에서의 발광 패턴이 위에서 보인 결과를 기준삼아 비교하여 유사하게 나타난다면 모니터링되고 있는 샘플의 독성 정도를 예측할 수 있다. 즉, DPD2540 채널이나 GC2 채널에서의 발광 패턴이 본 실험에서 나타난 기준과 유사하게 나타난다면 탐지하는 샘플의 독성이 어떤 농도의 페놀 독성에 해당하는지 비교 분석 할 수 있는 것이다.

요약

본 실험을 통하여 각 채널에서의 독성 농도에 따른 다양한 발광 패턴을 확보 할 수 있었으며 이를 바탕으로 본 시스템의 실제 현장 적용 시 나타나는 발광 패턴과 비교하여 독성을 분석하고 정성, 정량화 하는데 지표로 사용될 수 있다.

감사의 글

본 연구는 과학재단에서 지원하는 광주과학기술원 환경모니터링 신기술 연구센터(ERC)의 지원으로 수행 되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Man Bock Gu, Geun Cheol Gil, and Joong Hyun Kim. (1999). "A two-stage minibioreactor system for continuous toxicity monitoring." *Biosensors & Bioelectronics* 14: 355-3611.
2. Man Bock Gu, Robert Mitchell, and Joong Hyun Kim. (2000). "Continuous monitoring of protein damaging toxicity using a recombinant bioluminescent *Escherichia coli*." *ACS Symposium Series : Recent Advances in Chemical sensors and Biosensors for Environmental monitoring*. 762:185-196