

톨루엔 계열 화합물 오염 환경에 대한 발광 유전자 재조합 균주 적용 연구

공인철^{1)*} · 정홍경¹⁾ · 고경석²⁾

1. 서론

다양한 주요 오염원들 중 휘발성 유기화합물(volatile organic compounds; VOCs)을 포함한 석유탄화수소(petroleum hydrocarbons; PHCs)는 발생량 및 위해성 측면에서 주요 오염원이다. 오염원에 노출된 토양 및 수환경 관리를 위한 다양한 방법 중의 하나인 생물학적 모니터링(biomonitoring)은 환경 내 오염물질의 존재 여부 및 오염 정도, 환경에서의 변화와 물리, 화학적 그리고 생물학적 인자에 의한 영향을 결정하기 위해 생물체를 이용하는 방법으로 정의할 수 있다. 특히 오염된 지역의 생물학적 복원 가능성이나 효율적인 관리, 감시를 위해 다양한 특성을 가진 bioreporter인 유전자 재조합균주는 매우 이용 가능한 방법이며, 이러한 재조합 균주 중 생물발광(bioluminescence)이나 형광단백질(green fluorescence protein)을 생산하는 균주를 이용한 새로운 기술이 환경문제 해결을 위한 적절한 수단의 한 방법으로 다양하게 개발되고 있다(Chatterjee and Meighen, 1995). 특히 생물발광은 자연현상으로 생물내의 화학반응에 의해 생물로부터 발광하는 빛을 일컬으며 (무)척추동물(firefly *Photinuspyralis*), 박테리아(*Vibrio*) 등의 다양한 생물에서 관찰되고 있다(Steinberg and Poziomek, 1995). 이는 특정생물의 유일한 특성이므로 발광생물 외의 다른 생물에 의한 결과분석 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.

본 연구를 위해 발광 유전자 재조합 균주인 *Pseudomonas putida* mt-2 KG1206를 이용하였다. KG1206 균주는 톨루엔 계열 화합물(톨루엔, 자일렌, MBA) 및 중요분해 산물(*m*-toluate, benzoate)에 노출되었을 경우, 생분해와 함께 발광을 생산하는 특성을 가지고 있다(그림 1; 공인철 등, 2003). 본 연구에서는 재조합 균주를 이용하기 위해 필요한 다양한 조건들(균주조건, 활성회복, 발광 정도, 오염 농도 반정량화)에 대해 조사하였다.

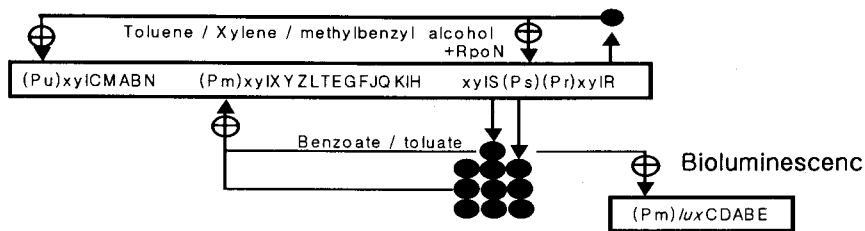


그림 1. TOL 분해와 *P_m-lux* 유전자 조절 과정도(⊕: positive control, ●: regulatory protein) (공인철 등, 2003)

2. 실험방법

초저온고(-70°C)에 보관된 KG1206은 필요시 LB고형배지에 계대 배양하여 사용하였다. 균주를 LB배지에 27°C, 130 rpm 조건으로 overnight 배양 후 LB배지에 OD₆₀₀ = 0.6이 될 때까지 1:20 희석 배양하여 MSM(minimal salt medium)으로 OD₆₀₀ = 0.3으로 조정하여 실험에 이

1) 영남대학교 건설환경공학부 (ickong@yumail.ac.kr)

2) 한국지질자원연구원 지하수지열연구부

용하였다. 토양 임의 오염원(*m*-toluate)에 대해 반정량화를 조사하였다. 토양 2 g을 매번 채취하여 오염원을 에탄올로 추출하여 KG1206 균주 9.9 ml에 0.1 ml 추출액을 주입한 후 발광 활성을 30분 간격으로 조사하였다. 발광 검량선 작성을 위해, 검량선의 적절한 농도 범위는 초기에 넓은 범위의 검량선을 이용하여 대략적 농도를 추정한 후 좁은 범위의 발광 검량선을 이용하여 오염원 농도를 측정하였다. 환경 적용을 위해 동결 및 동결건조 균주 방법 및 활성회복 조건을 다양한 조건(동결보호시약, 동결건조 시간, 균주 농도, 회복 조건)에 대하여 조사한 후, 최적조건에 대한 프로토콜을 작성하였다.

3. 연구결과 및 토의

대상 오염원 *m*-toluate, benzoate, toluene, *o*-, *m*-, *p*-xylene, *m*-MBA에 노출된 재조합 균주 KG1206의 발광활성 특성을 조사하였다. 유도제 중의 하나인 *m*-xylene의 시간에 따른 발광활성 결과를 그림 x에 나타내었으며, 또한 조사한 모든 오염원별 농도의 최대 발광활성을 그림 2에 나타내었다. KG1206의 *m*-xylene의 노출에 의한 3.5시간의 배양기간동안, 초기 주입 농도가 0.001, 0.1, 0.5, 1mM로 증가할수록 발광활성도 증가하였으며 1mM 노출에 의해서는 1.5시간 경과 후 최대발광활성인 3737 RLU_{max}가 관찰되었고 3mM 이상에서는 발광활성이 억제되었다. 최대 생물발광은 노출 후 1.5~2시간에 발생하였으며 발광은 노출 3.5시간 동안 계속되었다.

7종의 오염원에 대해 발광활성을 조사한 결과 최대 생물발광은 일반적으로 1.5~3시간 배양 후에 발생하였으며 발광활성은 거의 5시간의 배양시간동안 계속되었고 일반적으로 발광 지속시간은 각 화합물의 초기농도와 관련이 있었다. 발광활성 저해 농도는 다음과 같다: *m*-xylene 3mM; toluene, *o*-, *p*-xylene 5mM; benzoate 8mM; *m*-toluate 10mM. 오염원의 첨가에 의한 최대발광활성은 농도의 변화에 따라 차이가 있기는 하지만 대체적으로 *m*-MBA >> *m*-toluate > toluene > *m*-xylene > benzoate > *p*-xylene ≥ *o*-xylene 의 순서로 조사되었다(그림 3).

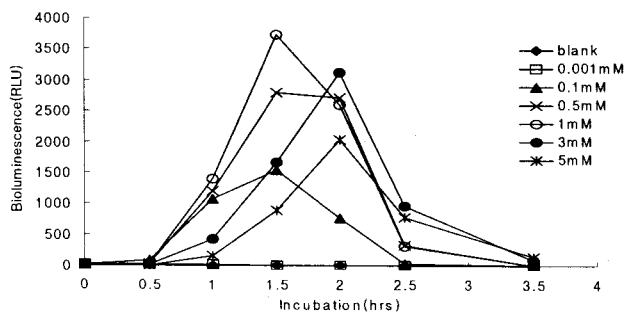


그림 2. 상이한 농도(*m*-xylene)에서 시간에 따른 발광 활성 경향.

임의 농도의 *m*-toluate 오염 토양에서 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 (그림).

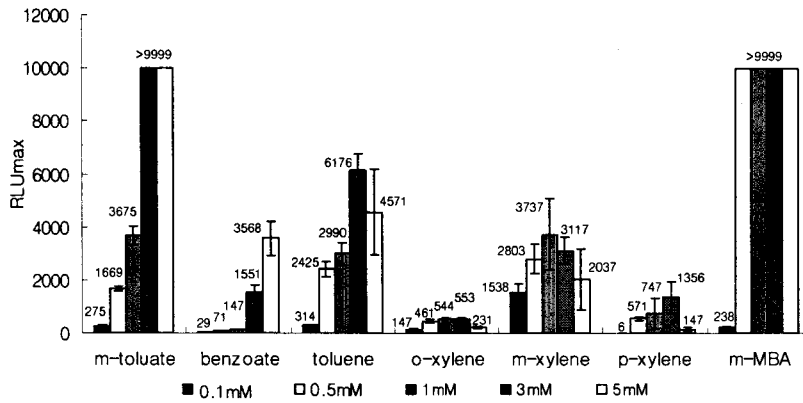


그림 3. 톨루엔계열 화합물과 중간분해산물에 의한 KG1206균주의 최대 발광활성

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(그림 4). 발광추정 실험 결과의 유의성을 살펴보기 위하여 HPLC 분석값과 발광 추정농도에 대한 통계비교를 실시하였다. 실험결과 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 *t*검정을 실시하였다. 검정 결과 관측된 *t*값이 모두 기각값보다 작으며, 또한 유의확률이 모두 0.05보다 큰 값을 보여줌을 알 수 있었다. 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.

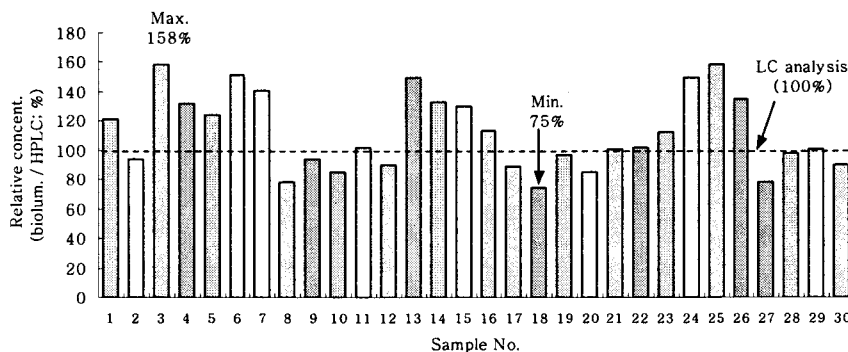


그림 4. 발광과 HPLC분석에 의한 *m*-toluate 농도 비교.

오염 환경 적용을 위해서는 다양한 균주 준비 및 적용에 대한 최적 프로토콜이 필요하다. 동결보호시약, 동결건조시간, 균주 농도, 활성회복 조건 등에 대한 다양한 조건에서 그림 5의 프로토콜을 완성하였다.

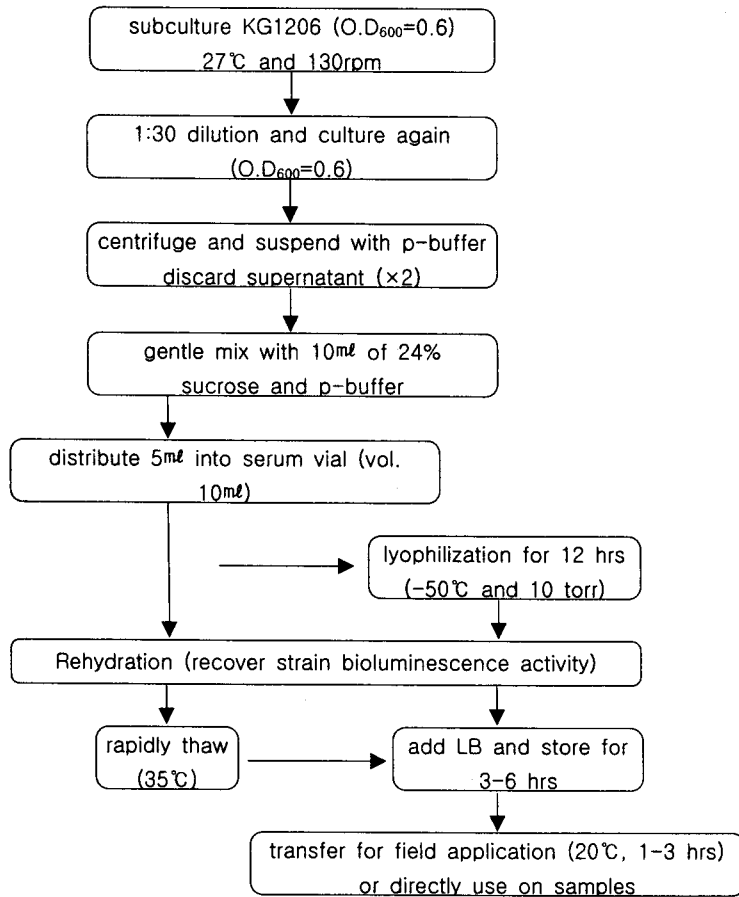


그림 5. 동결 및 동결 건조 균주 이용을 위한 프로토콜

4. 결론

본 연구에서는 유전자 재조합 발광균주를 오염원 탐지 및 관리하기 위해 필요한 다양한 과정들에 대해 조사하였다. 실험 결과를 바탕으로 하여 세부적인 조사를 실시하기 전에 특정오염원으로 오염된 토양 및 지하수의 생물학적 모니터링에 유전자 재조합 균주의 발광특성을 이용할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

5. 참고문헌

- Chatterjee, J. and Meighen, E.A., 1995, Biotechnological application of bacterial bioluminescence (*lux*) genes, *Photochem. Photobiol.*, **62**(4), 641~650.
- Steinberg, S.M. and Poziomek, E.J., 1995, A review of environmental application of bioluminescence measurements, *Chemosphere*, **30**(11), 2155~2197.
- 공인철, 서혜영, 이진우, 김승현, 백성욱, 2003, 토양에 오염된 휘발성 유기화합물의 모니터링을 위한 발광 유전자 재조합 균주 이용 가능성, *대한환경공학회지*, **25**(4), 440~445.

사사

본 연구는 환경부 토양오염 확산방지사업인 “탐사식 조사기법을 이용한 오염탐지 프로토콜 개발” 연구과제에 의해 수행되었습니다.