

## Photobacterium phosphoreum의 중금속에 대한 반응성

정계훈·김현숙·이은수·정성제·이정건·김은기·†전역한  
경희대학교 생명과학부 식품가공학과, <sup>1</sup>LG산전(주)연구소, <sup>2</sup>인하대학교 화공·교분자·생물공학부  
(접수 : 1999. 4. 1., 게재승인 : 1999. 6. 3.)

### Response of *Photobacterium phosphoreum* to Heavy Metal

Kye-Hun Chung, Hyun-Suk Kim, Eun-Su Lee, Sung-Je Jung, Jeong-Gun Lee<sup>1</sup>, Eun-Ki Kim<sup>2</sup>, and Uck-Han Chun<sup>†</sup>  
Dept. of Food Technology and Science, Faculty of Life Science, Kyung Hee University, Suwan, Kyungki, 449-701, Korea  
<sup>1</sup>R&D Center, LG Industrial System Co., Ltd., Anyang, Kyungki, 431-080, Korea  
<sup>2</sup>School of Chemical Engineering and Science, Inha University, Incheon, 402-751, Korea  
(Received : 1999. 4. 1., Accepted : 1999. 6. 3.)

*Photobacterium phosphoreum* was used in order to study response to heavy metal including HgCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub> and ZnSO<sub>4</sub> in view of developing monitoring system for toxic substances. The concentrations of heavy metal causing 50% reduction(EC<sub>50</sub>) in bioluminescence intensity were determined with both free and immobilized *P. phosphoreum*. The bioluminescence responses were examined at various concentrations of heavy metal after 10, 20 and 30 min of exposure. The linear correlation between Gamma values and concentrations of heavy metal was obtained and EC<sub>50</sub> was calculated from the linear correlation. The significant inhibitory concentrations for bioluminescence emission were found to be 0.05mg/L for HgCl<sub>2</sub>, 25mg/L for CdCl<sub>2</sub>, 50mg/L for MnSO<sub>4</sub> and 12.5mg/L for ZnSO<sub>4</sub>, respectively. The free cell and disc type were shown to be more sensitive to heavy metal than cells mixed with Na-alginate or immobilized on Sr-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 heavy metal under more stable condition of bioluminescence.

Key Words: heavy metal, bioluminescence, *Photobacterium phosphoreum*, immobilization

### 서론

산업발전에 따라서 중금속 물질에 의한 환경오염이 심각하다. 특히, 수질오염을 조기에 차단하기 위해서는 신속한 경보장치와 이에 따른 차단 방법이 모색되어야 된다. 신속한 경보장치를 위해서는 수계에서의 중금속 물질을 빠른 시간 내에 정확히 측정하는 것이 중요하다. 이를 위해서 그 동안 생물체를 이용한 직접적인 방법과 화학적 분석에 의한 간접적인 방법이 수행되고 있으나 민감도가 떨어지고 시간이 많이 걸리는 단점이 있다. 따라서 독성반응이 민감하게 일어나고 재현성이 좋으며 신속 정확한 모니터링 방법의 개발이 요구된다. 근래에 들어서 독성측정 및 모니터링을 위해서 발광미생물의 이용이 시도되고 있으며 이들 미생물은 주로 *Photobacterium*, *Vibrio*, *Altenomonas*, *Xenorhabdus* 등이 있다(1). 이들 발광미생물 이용의 특징은 빛의 변화를 측정하기 때문에 민감도가 우수할 뿐 아니라 저장성이 좋아서 제재의 개발이 용이하다. 이미 Microtox system이

개발되어서 독성물질 모니터링에 이용되고 있다. 그러나 연속 모니터링이 불가능하고 제재의 저장성이 좋지 않으므로 시료 측정시 제재의 reactivation이 요구된다(2).

발광미생물의 발광반응은 *LuxA*, *LuxB* gene의 luciferase에 의해서 긴 사슬의 aldehyde의 산화에 의해서 일어난다(3). 발광미생물이 독성물질에 노출되면 발광 대사에 저해를 미쳐 발광량이 감소한다. 아주 미량의 독성물질에도 민감하게 반응하기 때문에 독성물질의 유무 및 독성정도를 아주 정밀하게 측정할 수 있는 장점이 있다. 특히, *P. photobacterium*은 4°C의 낮은 온도에서도 생장이 가능하기 때문에 비교적 저온의 수질에서도 독성검사가 가능하다.

본 연구에서는 수질 monitoring system을 개발하고 세포의 저장성을 증대시키기 위해서 *P. phosphoreum*의 고정화 방법을 이용하였고, 일차적으로 중금속 물질에 대한 bioluminescence의 반응성을 조사하였다. 고정화 물질은 고정화가 비교적 간단하고 발광 mechanism에 영향을 끼치지 않을 뿐만 아니라 빛의 투과성이 용이한 alginate(4,5)를 이용하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양방법

본 실험에 사용한 발광미생물 *Photobacterium phosphoreum*

† Corresponding Author · Department of Food Technology and science, Faculty of Life Science, Kyung Hee University, Suwan, 449-701, Korea  
Tel · 0331-201-2626, Fax: 0331-204-8116  
e-mail. uhchun@nms.kyunghee.ac.kr

KCTC2852는 생명공학연구소의 유전자은행으로부터 분양 받아 NaCl 배지에서 배양하였다. NaCl 배지의 조성은 nutrient broth No.2(meat peptone 4.3g/L, casein peptone 4.3g/L, sodium chloride 6.4g/L) 12.5g/L, yeast nitrogen base (without amino acid) 5g/L, glycerol 3ml/L, sodium chloride 25g/L 이다 pH는 100mM potassium phosphate buffer를 이용하여 7.0으로 조절하였다. 액체 배지에서 12~14시간 배양한 집중균의 세포농도는 OD<sub>660</sub> 0.7~0.9이며 이를 10%(v/v) 접종하여 20°C, 100rpm의 교반배양기(Vision Scientific Co., K.M.C-8480SF, Korea)에서 배양하였다.

**세포 농도 측정**

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

**세포 고정화**

세포 고정화 물질로는 sodium alginate를 사용하였다 10% 접종 균을 사용하여 12시간 배양한 후 OD<sub>660</sub> 0.7~0.9농도의 세포를 2.5%(w/v) 식염수에 10<sup>2</sup>으로 희석한 후 2.4%(w/v) sodium alginate와 1 : 8의 비율로 혼합하였다. Strontium alginate의 경우, sodium alginate에 단단한 견고성을 주기 위하여 CaCl<sub>2</sub> 대신 0.31M strontium chloride(Sigma Co., U.S.A.)를 동량 첨가한 후, 반투명한 반구형의 gel이 형성되도록 15분간 상온에 방치해 두었다(6). 또한 strontium alginate와 동일한 방법으로 여러 개의 구멍 뚫린 플라스틱 판으로 disc type의 bead(지름8mm×높이3mm)를 만들어 사용하였다 고정화 세포는 cuvette을 밀봉한 다음 4°C냉장고에 저장하여 사용하였다

**Bioluminescence의 측정**

10%접종한 후 12시간이 지난 균주를 2.5%의 식염수에 10<sup>2</sup>으로 희석한 후 cuvette(Sarstedt Rohren-Tubes No.55.476, Germany)에 180μl 취하여 Luminometer (Berthold Lumate LB 9507)로 측정하였다 고정화 세포는 고정화를 완료한 후 측정하였으며 모든 시료는 상온에서 측정하였으며 시간은 0.1초로 하였다. Luminescence의 단위는 RLU(Relative Light Units)로 10초당 1ml의 시료에서 발생하는 빛의 양을 mV로 나타낸 것이다 여러 가지 농도의 다른 물질들을 이용하여 bioluminescence의 감소를 측정하기 위하여 초기 intensity를 100%로 보정하였다.

**반응성 조사**

Sigma사에서 구입한 HgCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>를 증류수에 용해시켜 stock 용액을 만들어서 4°C 냉장고에 저장한 후 실험하기 직전에 적당한 농도로 희석하여 사용하였다 HgCl<sub>2</sub>는 0.001mg/L, 0.05mg/L, 0.1mg/L, 1mg/L, CdCl<sub>2</sub>는 12.5mg/L, 25mg/L, 50mg/L, 100mg/L, MnSO<sub>4</sub>는 50mg/L, 100mg/L, 500mg/L, 1000mg/L, ZnSO<sub>4</sub>는 12.5mg/L, 25mg/L, 50mg/L, 100mg/L의 용액을 만들어 실험하였다. *P. phosphoreum*에 대한 반응성을 조사하기 위해서 고정화세포를 4°C 냉장고에 하루 저장한 후 25°C에서 세포를 15분간 활성화시킨 다음 중금속 물질을 9 : 1비율로 투입하여 발광량의 변화를 30분간 측정하였다.

**결과 분석**

중금속에 대해 독성정도의 test는 *P. phosphoreum*에 중금속 물질을 노출시킨 후 시간에 따른 bioluminescence의 감소를 측정하였다(7). EC<sub>50</sub>은 일정한 시간 내에 발광량이 50%로 감소하는데 필요한 독성물질의 농도를 나타내는 값으로 발광현상의 감소를 측정하는 방법인 Gamma(γ) value으로부터 구한다(8) Gamma(γ) value는 잔류하는 bioluminescence에 대하여 감소한 bioluminescence의 비로서 다음 식에 의하여 계산할 수 있다.

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

γ(t, T)는 T°C에서의 t시간동안의 Gamma value이고 R(t)은 t시간 동안 blank의 bioluminescence의 비로 t시간 후의 blank의 bioluminescence intensity를 0시간일 때의 값으로 나누어서 구한다. L(0)은 0시간에서 sample의 bioluminescence, 즉 독성 물질에 의해 영향을 받지 않았을 때의 bioluminescence intensity이고, L(t)는 t시간 후의 bioluminescence, 즉 독성 물질에 t시간 동안 노출된 후의 bioluminescence intensity이다. 각 농도에서의 γ 값을 구하여 독성물질의 농도가 γ 값을 log-log graph에 나타내면 직선으로 나타나고 γ=1이 되는 독성물질의 농도가 EC<sub>50</sub> 값이다(9).

**결과 및 고찰**

**세포농도**

세포농도에 따라서 초기 bioluminescence intensity가 변화한다. 즉, 세포농도가 높으면 초기 bioluminescence intensity는 높고 세포농도가 낮으면 초기 bioluminescence intensity도 낮아진다 따라서, 초기 bioluminescence intensity의 범위를 구하기 위하여 *P. phosphoreum* 세포농도를 달리하여 initial intensity와 ZnSO<sub>4</sub>에 대한 intensity의 감소를 조사하였다. Figure 1에 나타내었듯이 세포농도가 OD<sub>660</sub> 0.49에서 0.9로 증가함에 따라서 initial bioluminescence intensity도 18,600에서

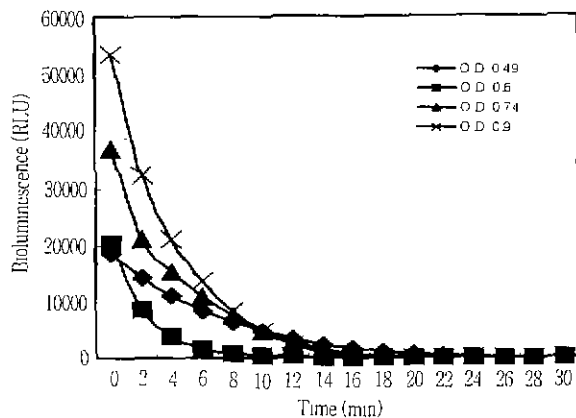


Figure 1. The time course curve for bioluminescence intensity and toxic substance(100mg/L ZnSO<sub>4</sub>) at various cell concentrations. Cell concentrations are represented as OD<sub>660</sub>

53,300으로 증가하였다 이때 initial intensity는 RLU값이다. 각각의 bioluminescence intensity는  $ZnSO_4(100mg/L)$ 에 의해서 감소하였으며 노출시킨 후 15분 후에는 bioluminescence intensity가 거의 없었다. 이는 첫째로  $ZnSO_4$ 에 의하여 bioluminescence 생성 mechanism에 영향을 미쳐 bioluminescence 발생을 저해시키고, 둘째는 15분 동안에 반응이 민감하게 일어났다는 것을 의미한다 본 실험에서는 specific bioluminescence reduction rate와  $EC_{50}$ 를 산출하기 위해서  $OD_{680}$  0.7에서  $OD_{680}$  0.9사이의 세포를 사용하기로 결정하였다

중금속에 대한 bioluminescence의 변화

$HgCl_2$ ,  $CdCl_2$ ,  $MnSO_4$ ,  $ZnSO_4$  대한 bioluminescence 변화를 조사하기 위하여 세포를 이들 물질에 노출시킨 후 30분 동안 bioluminescence 변화를 조사하였다. Bioluminescence intensity는 RLU값으로 maximum value를 100%로 보정하여 나타

내었다. 중금속 물질의 농도가 높을수록 bioluminescence의 감소율이 증가하였으며 감소하는 정도는 중금속 물질에 따라 차이가 있었다. 4가지 물질을 free cell과 alginate 혼합 세포 및 strontium alginate에 고정화한 세포에 투입하여 반응을 조사하였다.  $HgCl_2$ 의 경우 strontium alginate에 고정화한 세포에서 가장 민감한 bioluminescence 반응을 보였을 뿐만 아니라 free cell과 alginate에 혼합한 세포 그리고 strontium alginate에 고정화한 gel을 disc type으로 제조한 세포도 민감한 반응을 나타내었다(Figure 2) 또한  $HgCl_2$ 는 0.05mg/L에서도 독성반응이 일어났으며 독성정도가 높다는 것을 의미한다.

$CdCl_2$  역시  $HgCl_2$ 와 같이 4가지 type의 *P. phosphoreum*에 125mg/L에서 100mg/L까지의 농도로 노출시켜서 각 type의 반응정도를 측정하였다. Strontium alginate에 고정화하여 disc type으로 제조한 세포에서 다소 민감한 bioluminescence 반응을 보였으며 나머지 free cell과 alginate에 혼합한 세포 그리고,

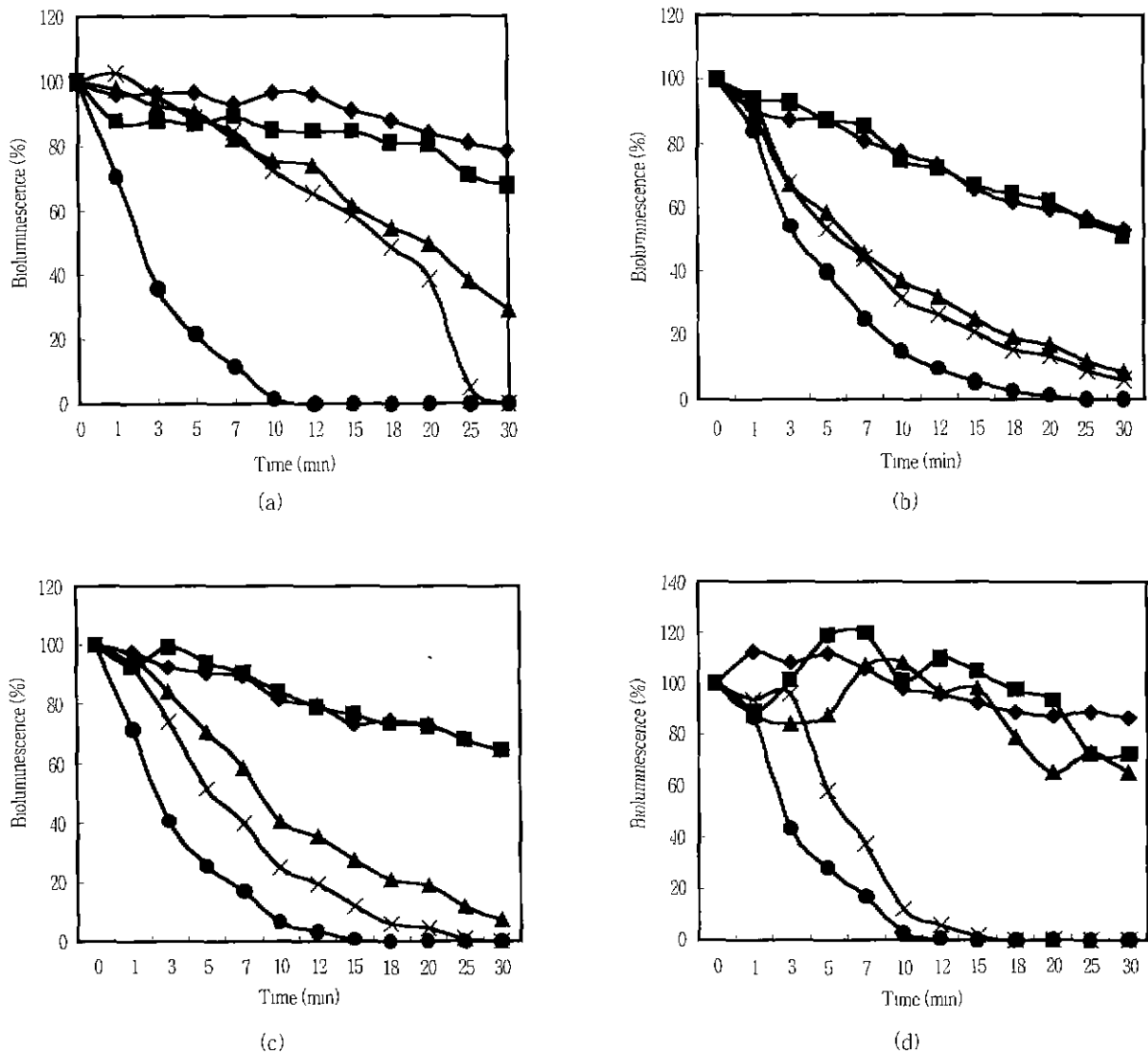


Figure 2. Kinetic bioluminescence response to  $HgCl_2$  on (a) free cell, (b) alginate mixed cell, (c) strontium alginate immobilized cell, (d) strontium alginate immobilized cell (disc type) . (◆) control, (■) 0.001mg/L, (▲) 0.05mg/L, (×) 0.1mg/L, (●) 1mg/L

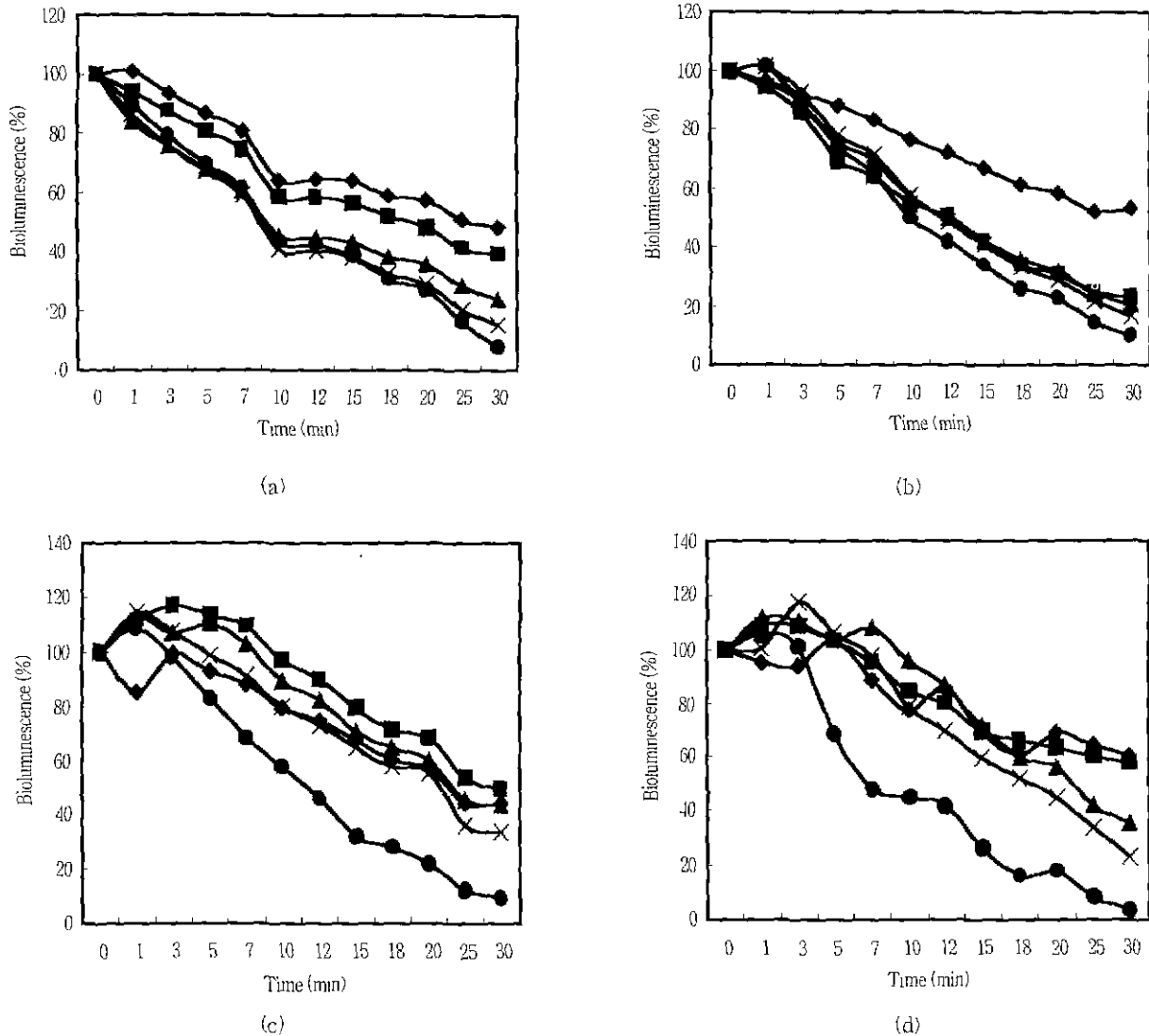


Figure 3. Kinetic bioluminescence response to CdCl<sub>2</sub> on (a) free cell, (b) alginate mixed cell, (c) strontium alginate immobilized cell, (d) strontium alginate immobilized cell (disc type) : (◆) control, (■) 12.5mg/L, (▲) 25mg/L, (×) 50mg/L, (●) 100mg/L.

strontium alginate에 고정화된 세포에서도 비슷한 반응을 보였다(Figure 3). Control보다는 CdCl<sub>2</sub> 25mg/L에 노출시켰을 때 bioluminescence의 감소가 빨랐으며 농도를 100mg/L까지 증가 시킴에 따라 감소율은 더욱 증가하였으며 농도에 비례하여 독성 반응이 일어났다. 이들 반응은 free cell과 비교해서 민감도의 차이가 거의 나지 않았으며 이는 alginate가 중금속의 투과 및 bioluminescence의 투과에 거의 영향을 미치지 않음을 의미한다.

MnSO<sub>4</sub>는 CdCl<sub>2</sub>나 HgCl<sub>2</sub>에 비해서 독성반응은 크게 일어나지 않았지만 strontium alginate에 고정화된 gel을 disc type으로 제조한 세포에서 어느 정도 bioluminescence의 감소를 보였으며, 그 외의 free cell이나 alginate와 혼합한 세포에서는 반응이 크게 일어나지 않았다. 다만 1000mg/L을 적용하였을 때 bioluminescence intensity에 영향을 주었다. 따라서 독성정도는 HgCl<sub>2</sub>나 CdCl<sub>2</sub>보다 훨씬 낮음을 알 수 있다. 4가지 type의

세포 모두 30분이 경과하여도 bioluminescence intensity가 완전히 소멸되지 않았으며 HgCl<sub>2</sub>와 CdCl<sub>2</sub>의 반응과 비교하여 감소율이 아주 완만하였다.

Figure 3, 4와 같이 free cell, alginate에 혼합한 세포, strontium alginate 고정화 세포 및 disc type 고정화 gel에 ZnSO<sub>4</sub>를 12.5mg/L, 25mg/L, 50mg/L, 100mg/L의 농도로 노출시켰다 Figure 5에서 보는바와 같이 역시 독성 정도는 HgCl<sub>2</sub>에 비해서 크게 나타나지 않았지만 각각의 경우 100mg/L에서는 bioluminescence intensity의 변화가 뚜렷하게 control과 비교되었다. 그리고 농도에 따라서 반응효과가 비례하여 나타났다. 특히, free cell인 경우 100mg/L에서 아주 민감한 반응을 보였다. 대체로 free cell과 strontium alginate에 고정화한 gel을 disc type으로 제조한 세포는 중금속 물질에 대한 민감한 bioluminescence 반응을 나타내었다. Alginate에 혼합한 세포와

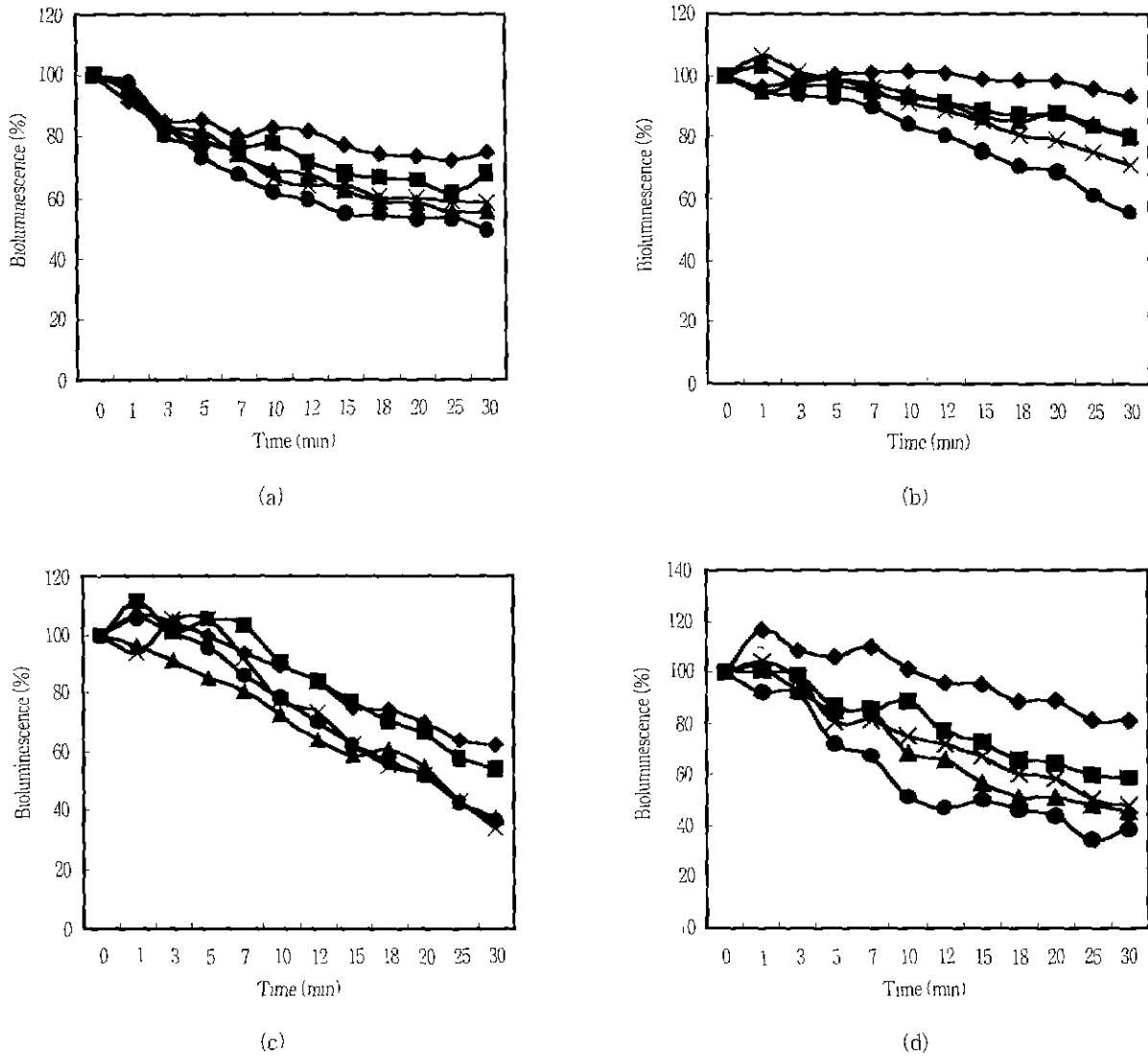


Figure 4 Kinetic bioluminescence response to  $MnSO_4$  on (a) free cell, (b) alginate mixed cell, (c) strontium alginate immobilized cell, (d) strontium alginate immobilized cell (disc type) (◆) control, (■) 50mg/L, (▲) 100mg/L, (×) 500mg/L, (●) 1000mg/L.

strontium alginate에 고정화한 세포는 중금속 물질에 대하여 민감성이 약간 떨어졌다. Free cell이 중금속 물질에 대하여 민감한 반응을 보이는 것은 독성 검사를 하였을 때 고정화 세포보다 중금속 물질이 세포에 침투하는 속도가 더 빨라서 민감한 반응을 보인 것이라고 사료된다. 또한 고정화 세포 중에서도 disc type이 표면적이 넓어서 중금속 물질이 접촉하는 면이 넓으므로 더 민감한 반응을 나타낸 것으로 사료되어진다.

**EC50값 산출**

중금속 중에서도  $HgCl_2$ ,  $CdCl_2$ ,  $MnSO_4$ ,  $ZnSO_4$ 를 선택하여 독성에 대한 bioluminescence 반응을 조사한 결과를 이용하여 EC<sub>50</sub>값을 산출하였다. 이들 중금속 물질에 대하여 세포에 노출시켜 30분 동안의 bioluminescence의 변화를 조사하였으며 이미 전술하였듯이 중금속 물질의 농도가 높을수록 biolumi-

nescence intensity의 감소율이 증가하였으며 각 중금속 물질마다 독성정도가 다르게 나타났다. 중금속 중에서도  $HgCl_2$ 와  $CdCl_2$ 는 *P. phosphoreum*에 민감하게 반응하였다 반면  $MnSO_4$ 와  $ZnSO_4$ 는 *P. phosphoreum*에 민감하게 반응하지 않았다 이는  $CdCl_2$ 와  $HgCl_2$ 가  $ZnSO_4$ 와  $MnSO_4$ 보다 독성 정도가 높다는 것을 의미한다.

독성물질에 대한 발광 현상의 감소는 여러 가지 방법에 의해 분석할 수 있지만 본 실험에서의 독성반응에 대한 분석은 Gamma value를 이용하였으며 Gamma value는 잔류하는 발광량에 대하여 감소하는 빛의 양의 비로 나타낸다. 중금속 물질의 각 농도에 대한 Gamma value를 log-log 그래프에 나타내어 straight curve를 얻었다(Figure 6).

Log 그래프에서 Gamma value가 1이 되는 점에서의 독성물질의 농도가 1시간 동안의 EC<sub>50</sub>값이다. 독성시험에 이용된 4가

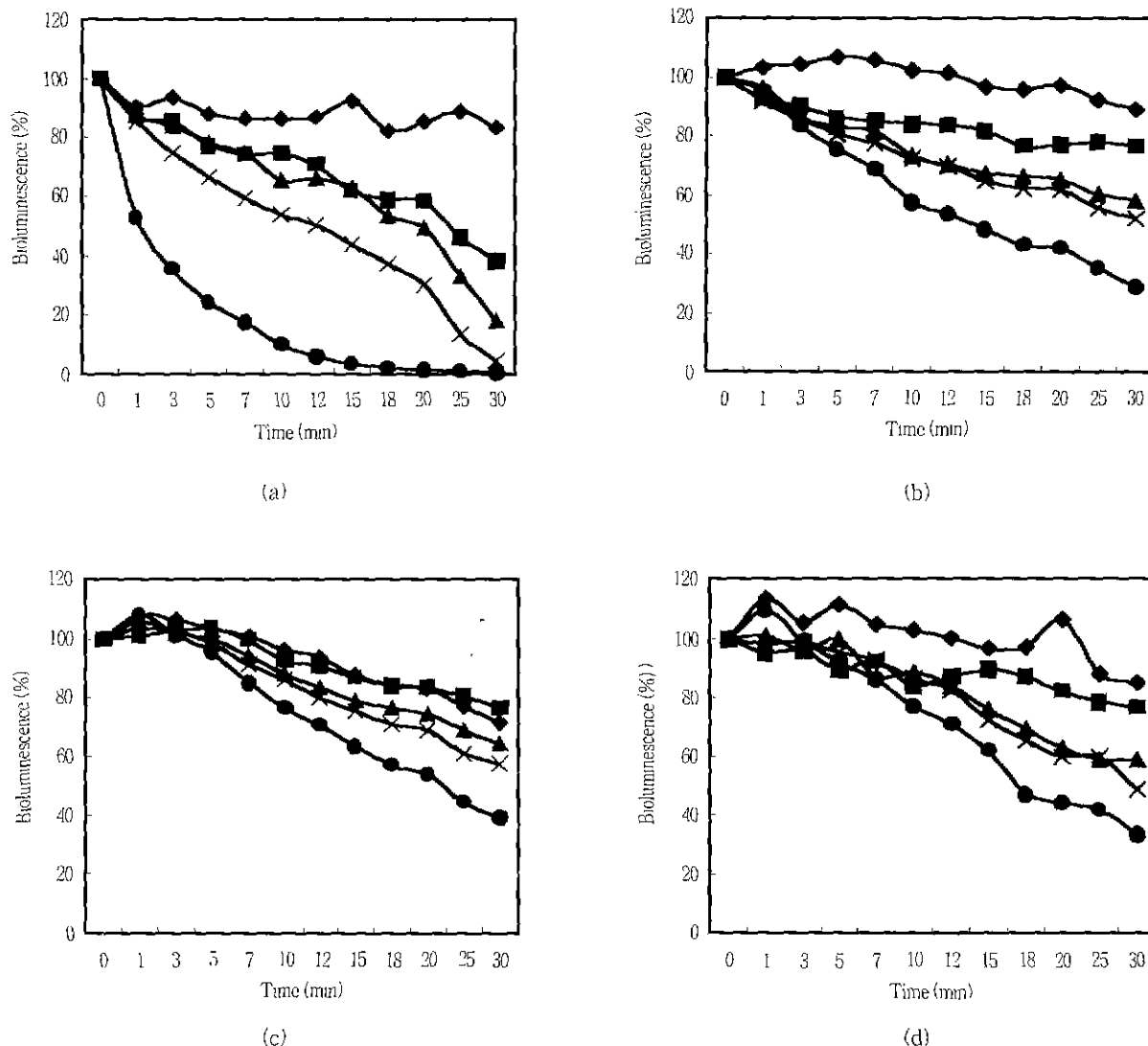


Figure 5. Kinetic bioluminescence response to  $ZnSO_4$  on (a) free cell, (b) alginate mixed cell, (c) strontium alginate immobilized cell, (d) strontium alginate immobilized cell (disc type) : (◆) control, (■) 125mg/L, (▲) 25mg/L, (×) 50mg/L, (●) 100mg/L.

지의 증금속으로부터 Gamma value를 구하여 이 값으로부터  $EC_{30}(10min)$ ,  $EC_{30}(20min)$ ,  $EC_{30}(30min)$ 을 각각 구한 값을 Table 1, 2, 3, 4에 정리하였다 Table 1은 free cell에 10분, 20분, 30분 동안에 증금속 물질에 대한  $EC_{30}$ 값을 나타낸 것이다.  $HgCl_2$ 가 10분, 20분, 30분에서 각각 0.05mg/L, 0.01mg/L, 0.005mg/L으로  $CdCl_2$ ,  $MnSO_4$ ,  $ZnSO_4$ 보다 현저히 낮은  $EC_{30}$ 값을 나타내었다 또한 correlation coefficient와 slope도 다른 세 가지 증금속 물질들과 비교된다. 10분 동안 독성 test한 경우  $CdCl_2$ 의 correlation coefficient가 0.661,  $ZnSO_4$ 는 0.879인 반면에  $HgCl_2$ 는 0.637로 가장 낮았으며 slope 역시  $HgCl_2$ 는 0.78인 반면  $ZnSO_4$ 는 1.77을 나타냈다.

Table 2에는 alginate로 고정화한 세포에서 10분, 20분, 30분에서의 증금속 물질에 대한  $EC_{30}$ 값을 나타내었다.  $HgCl_2$ 의 경우 10분, 20분, 30분에서  $EC_{30}$ 값이 각각 0.08mg/L, 0.01mg/L,

0.01mg/L으로 가장 민감한 반응을 보였다  $CdCl_2$ 는 120mg/L, 30mg/L, 9mg/L,  $ZnSO_4$ 는 182mg/L, 79mg/L, 55mg/L의 값을 각각 나타냈다.  $MnSO_4$ 가 30분에서  $EC_{30}$ 값이 3690mg/L으로서 가장 낮은 값을 나타내었으며 독성정도가 가장 낮음을 의미한다

Strontium alginate로 고정화한 세포의 bioluminescence 반응 그래프로부터 10분, 20분, 30분에서의 증금속 물질에 대한  $EC_{30}$ 값을 Table 3에 정리하였다  $HgCl_2$ 가 0.02mg/L, 0.02mg/L, 0.01mg/L의  $EC_{30}$ 값을 보였으며 이는 역시 strontium alginate에 고정화한 세포에서도 독성반응이 가장 민감하게 나타났음을 의미한다. 또한 Table 3에서 보듯이  $CdCl_2$ ,  $ZnSO_4$ ,  $MnSO_4$  순으로 독성 정도가 약하게 나타난 것으로 분석된다 가장 낮은 민감성을 보인  $MnSO_4$ 는 30분에서 2032mg/L의 값을 나타내었으며 free cell이나 alginate에 혼합한 세포에서보다 더 낮은  $EC_{30}$ 값을 나타내었다.

Table 1. EC<sub>50</sub> of free cells at 10min, 20min, 30min.

Substances	EC <sub>50</sub>			Correlation coefficient			Slope		
	10min	20min	30min	10min	20min	30min	10min	20min	30min
HgCl <sub>2</sub>	0.05	0.01	0.005	0.637	0.732	0.834	0.78	1.88	1.83
CdCl <sub>2</sub>	160	67	30	0.661	0.854	0.974	0.75	0.84	1.43
MnSO <sub>4</sub>	-	-	5961	-	-	0.597	-	-	0.4
ZnSO <sub>4</sub>	43	24	12	0.879	0.835	0.970	1.77	2.14	2.33

Table 2. EC<sub>50</sub> of cells mixed with alginate at 10min, 20min, 30min.

Substances	EC <sub>50</sub>			Correlation coefficient			Slope		
	10min	20min	30min	10min	20min	30min	10min	20min	30min
HgCl <sub>2</sub>	0.08	0.01	0.01	0.961	0.992	0.940	0.76	0.93	1.7
CdCl <sub>2</sub>	120	30	9	0.725	0.739	0.933	0.11	0.27	0.56
MnSO <sub>4</sub>	-	-	3690	-	-	0.872	-	-	0.46
ZnSO <sub>4</sub>	182	79	55	0.913	0.947	0.956	0.55	0.72	1.1

Table 3. EC<sub>50</sub> of immobilized cells on strontium alginate at 10min, 20min, 30min.

Substances	EC <sub>50</sub>			Correlation coefficient			Slope		
	10min	20min	30min	10min	20min	30min	10min	20min	30min
HgCl <sub>2</sub>	0.02	0.02	0.01	0.818	0.984	0.974	0.85	1.9	1.9
CdCl <sub>2</sub>	234	148	79	0.910	0.587	0.590	1.2	1.5	2
MnSO <sub>4</sub>	-	4821	2032	-	0.618	0.797	-	0.5	0.1
ZnSO <sub>4</sub>	476	160	115	0.955	0.983	0.994	0.87	1.2	1.0

Table 4. EC<sub>50</sub> of immobilized cells on strontium alginate (disc type) at 10min, 20min, 30min.

Substances	EC <sub>50</sub>			Correlation coefficient			Slope		
	10min	20min	30min	10min	20min	30min	10min	20min	30min
HgCl <sub>2</sub>	0.1	0.009	0.004	0.802	0.777	0.635	1.7	2.0	1.7
CdCl <sub>2</sub>	100	60	36	0.715	0.976	0.964	2.2	1.6	2.6
MnSO <sub>4</sub>	1779	2148	976	0.713	0.857	0.636	0.44	0.20	0.24
ZnSO <sub>4</sub>	5924	61	63	0.756	0.927	0.955	0.21	0.69	1.2

Strontium alginate에 고정화한 gel을 disc type으로 만들어 독성 정도를 test하였으며 각 중금속 물질에 대한 EC<sub>50</sub>값(Table 4)을 보면 HgCl<sub>2</sub>가 10분, 20분, 30분에서 0.1mg/L, 0.009mg/L, 0.004mg/L으로 가장 민감한 반응을 역시 보였으며 가장 낮은

민감성을 보인 MnSO<sub>4</sub>는 1779mg/L, 2148mg/L, 976mg/L을 나타내었다. CdCl<sub>2</sub>는 100mg/L, 60mg/L, 36mg/L, ZnSO<sub>4</sub>는 5924mg/L, 61mg/L, 63mg/L을 각각 나타냈다. 역시 disc type에서도 HgCl<sub>2</sub>와 CdCl<sub>2</sub>의 독성이 높게 나타났으며 free cell과

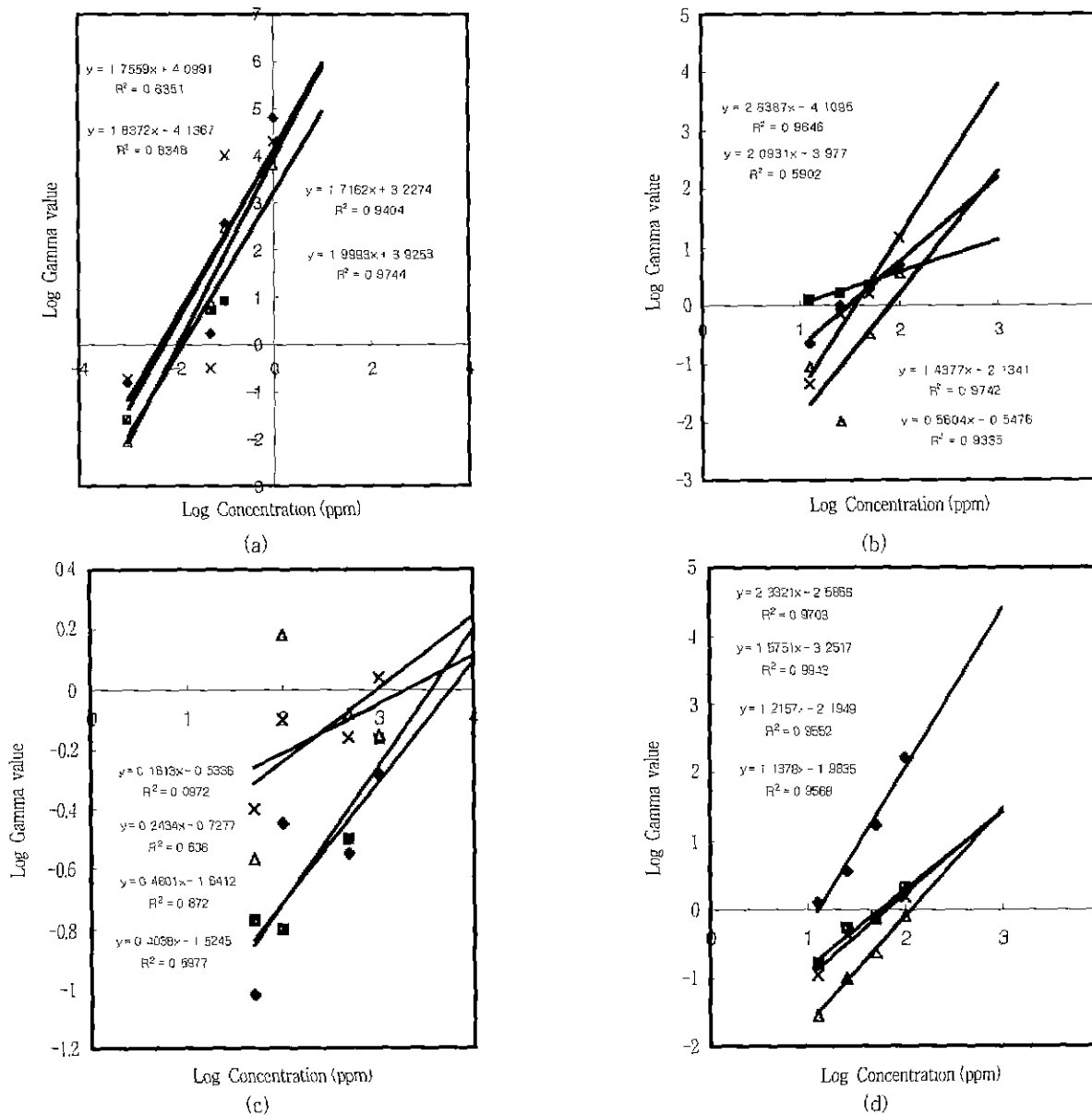


Figure 6. The Gamma value of each heavy metal : (a)  $HgCl_2$ , (b)  $CdCl_2$ , (c)  $MnSO_4$ , (d)  $ZnSO_4$  : (◆) free cell, (■) mixed cell on alginate, (▲) immobilized cell on strontium alginate, (×) immobilized cell on strontium alginate (disc type)

비슷한 정도의 민감성을 보였다.

대체로 4가지의 중금속 물질에서는 free cell과 strontium alginate에 고정화한 gel을 disc type으로 만든 세포가 중금속 물질에 대한 민감한 반응을 보였다. Free cell은 중금속 물질에 대하여 민감한 반응을 보였으나, bioluminescence의 안정성이 좋지 않았다. Strontium alginate에 고정화한 gel을 disc type으로 만든 것은 중금속 물질에 민감한 반응을 보이면서도 bioluminescence의 안정성 및 세포의 저장성도 좋았다. 그리고 4가지 type의 세포 모두 동일한 독성 정도의 pattern을 보였지만, 특히 disc type의 고정화 세포를 제조하여 저장성도 제공할 수 있을 뿐만 아니라 bioluminescence의 투과성이나 중금속의 침투성에도 영향을 미치지 않기 때문에 수질 모니터링에 사용 가능하리라 사료된다.

요 약

*P. phosphoreum*을 이용하여 연속 모니터링 시스템을 개발하고자 free cell과 고정화 세포의 중금속 물질에 대한 반응을 일차로 조사하였다. 고정화 물질로는 절차가 비교적 간단하고 bioluminescence 투과성에 영향을 주지 않는 sodium alginate를 사용하였다. Alginate는 발광미생물의 빛 발생 대사를 저해하지 않을 뿐만 아니라 bioluminescence의 투과성이 탁월하였다. 중금속 물질 중에서  $HgCl_2$ ,  $CdCl_2$ ,  $MnSO_4$ ,  $ZnSO_4$ 를 선택하여 free cell과 alginate 혼합 세포 및 strontium alginate에 고정화한 세포에 노출시켜 반응을 조사하였으며, 또한 독성 및 strontium alginate에 고정화한 gel을 disc type으로 제조하여 중금속 물질에 대한 bioluminescence의 변화를 조사하였다.



Free cell과 disc type의 세포가 alginate 혼합 세포 및 strontium alginate로 고정화한 세포에 비해서 비교적 민감한 반응을 보였으며 증금속 물질의 농도에 대하여 bioluminescence intensity의 감소율이 비례하여 나타났다. 특히, 고정화 세포인 경우 free cell보다 증금속의 mass transfer에 미치는 영향 때문에 민감성은 떨어지지만 모두 linear regression curve를 나타내었다. Disc type의 경우 alginate에 혼합한 세포와 strontium alginate로 고정화한 세포보다 민감한 반응을 보인 것은 증금속에 노출된 면적이 넓기 때문으로 사료된다. 독성물질에 대한 반응분석을 위하여 Gamma value로부터  $EC_{50}$ 을 계산하였으며 이를 이용하여 각 증금속 물질의 농도와 *P. phosphoreum*의 bioluminescence intensity와의 상관 관계 및 각 증금속 물질의 독성정도를 산출하였다.  $EC_{50}$ 값을 이용하여 독성정도를 볼 때 4가지 type 모두  $HgCl_2$ 가 가장 독성이 강한 것으로 나타났다. 본 연구결과를 종합해 볼때 *P. phosphoreum*을 고정화 할 경우 bioluminescence에 거의 영향을 미치지 않을 뿐만 아니라 bioluminescence의 안정성에도 기여하기 때문에 모니터링 시스템에 적용할 수 있다. 특히 disc type의 고정화 제재는 free cell과 동등한 민감도를 나타내었기 때문에 빛 안정성을 유지하면서 수질 모니터링을 위한 bioluminescence 제재로 이용이 가능하다.

### 감 사

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

### 참 고 문 헌

1. Meighen, E. A., (1991), Molecular biology of bacterial bioluminescence, *Microbiol. reviews*, 55, 123-142
2. Qureshi A. A., R N Coleman and J. H. Paran (1984), Evaluation and refinement of the Microtox test for use in toxicity screening, *In Toxicity screening procedures using bacterial systems*(Dickson Liu, B. J. Dutka eds.), pp. 65-76, Marcel Dekker Inc., New York
3. 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, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1487-1494.
4. Lee G. M. and B. O. Palsson (1993), Stability of antibody productivity is improved when hybridoma cells are entrapped in calcium alginate beads, *J. Biotechnol. and Bioeng.*, 42, 1131-1135.
5. 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
6. Lee J. H. and U. H. Chun (1996), Monitoring of environmental pollutants with *Photobacterium phosphoreum* immobilized on strontium alginate(II), *유전공학논문집*, 8, 56-63.
7. 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, *J. Ecotoxi and Environ. Safety*, 28, 317-327.
8. Yates I. E. and J. K. Porter (1982), Bacterial bioluminescence as a bioassay for mycotoxin, *J. Environ. Microbio* 44, 1072-1075.
9. 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. *In Toxicity screening procedures using bacterial systems*(Dickson Liu, B. J. Dutka eds.), pp. 65-76, Marcel Dekker Inc., New York