

Candida sp. LSY2 중금속 내성주를 이용한 BOD 분석

김 말 남 · 이 선 영

(상명대학교 자연과학대학 생물학과)

적 요 - 용존 유기물의 농도를 BOD로 신속히 측정하여 폐수 처리 공정에 feed back할 수 있는 *Candida* BOD sensor를 이용하여 BOD를 측정하였다. Glucose, acetic acid, aspartic acid 및 glutamic acid에 대한 sensitivity는 lactose, sucrose 및 lactic acid의 sensitivity보다 더 높게 나타나서 오염물질의 종류에 따라 BOD sensor의 출력 신호가 다르게 제시되었다. Zn²⁺ 내성주가 충전된 BOD sensor는 중금속 비내성주의 경우와 유사한 정도의 감응도를 나타내었으나 Cd²⁺ 내성주를 사용하였을 때는 매우 낮은 sensitivity를 보였다. 수용액의 Cd²⁺의 농도가 증가함에 따라 중금속 비내성주와 Zn²⁺ 내성주의 sensor의 sensitivity는 거의 일정하였으나 Cd²⁺ 내성주의 BOD sensor의 경우에는 sensitivity가 오히려 감소하였다. 반면 수용액 중의 Zn²⁺의 농도가 증가함에 따라서는 중금속 비내성주, Zn²⁺ 내성주 및 Cd²⁺ 내성주 모두 거의 동일한 감응도를 나타내었다.

서 론

최근 환경 오염이 증대되면서 자연 생태계의 평형 유지가 문제시되고 있는 가운데 환경을 오염시키는 원인 물질과 오염의 정도를 정확하고 신속하게 분석하고 측정하는 것이 매우 중요한 일로 대두되고 있다. 이와 같은 폐기 유기 화합물에 의한 오염의 정도를 통제하기 위해 오염물질의 양을 정량적으로 측정하는 것이 필요하며, 이를 위하여 생물학적 산소 요구량(BOD)을 측정하는 방법이 널리 사용되고 있다. BOD₅는 미생물을 접균하고 폐수를 포화시킨 상태에서 용기를 밀폐한 후 5일이 경과한 다음 폐수 속에 잔존하는 용존산소의 양을 측정함으로써 폐수 속의 유기물 농도를 분석하는 방법이다.

그러나, 이와 같은 BOD₅는 여러 수처리 공정을 조절하기에는 너무 긴 분석 시간이 소요되기 때문에 오염 배출된 상태를 바로 점검하여 feed back할 수 없는 문제점이 있다. 또한, BOD₅의 측정은 숙련된 기능인이라도 측정 오차가 10% 이상으로 나타날 수 있으므로(Karube et al. 1977b) 미생물과 산소 전극을 이용한 sensor로써 BOD를 더욱 간편하고 신속하게 정량할 수 있는 BOD sensor에 관한 연구가 진행되어 왔다(Karube & Suzuki 1990).

BOD sensor는 특정한 기질에 대하여만 감응하는 다

른 biosensor와는 달리 여러 종류의 오염원을 감지할 수 있어야 한다. Karube 등(1977a) 및 Strand와 Carlson(1984)은 하수처리장으로부터 채취한 활성 슬러지를 BOD sensor에 사용하였다. 그러나, 활성 슬러지의 혼합 균주로써 재현성 있는 BOD 측정 결과를 나타내는 sensor를 제작하기는 매우 어렵다고 Hikuma 등(1979)은 보고하였다.

이와 같은 관점에서 단일 균주를 BOD sensor에 이용하는 것이 더 적합하다고 할 수 있다. 단일 균주를 BOD sensor에 응용한 연구로는 *Clostridium butyricum* (Karube et al. 1977a), *Trichosporon cutaneum* (Marty et al. 1997), *Hansenula anomala* (Ihn et al. 1992), *Escherichia coli* (Kawabata & Nakamura 1986), *Bacillus subtilis* (Tan & Qian 1997), *Bacillus polymyxa* D-21 (Su et al. 1986), *Citrobater* sp. (Galindo et al. 1992) 및 *Bacillus licheniformis* (Li & Tan, 1994a, b, c) 등이 있다.

보고된 대부분의 BOD sensor들은 미생물을 고분자막 속에 고정화 하거나(Ihn et al. 1992) 균일한 크기의 기공을 가지고 있는 막 사이에 미생물을 가두는 방법을 사용하였다. 미생물을 고분자막 속에 고정화하면 고정화 과정 중에 고정화 재료에 의해 미생물의 활성이 크게 감소하며, 고정화 조건을 균일하게 조절하지 않으면 기공의 크기와 수가 다르기 때문에 오염물질의 확산 속도가 다를 수 있으므로 측정시 감응도가 낮아지거나 재현성이 떨어질 수 있다. 또한, 미생물 BOD sensor가 측정

하고자 하는 수용액은 여러 가지 유기물과 금속 이온 등으로 오염되어 있으므로 미생물 BOD sensor는 수용액 속에 존재하는 중금속과 같은 유해물질로 인해 크게 영향을 받으며 오염 물질의 종류에 따라 서로 다른 결과를 나타낼 수 있다. 이와 같은 현상은 기존의 BOD₅ 방법에서도 나타난다. 또한, 오염 물질의 종류에 따라 가장 높은 감응도를 나타내는 미생물의 종류가 다를 수 있으므로 그 오염원이 발생하는 곳에서 미생물을 분리하여 사용하는 것이 필요하다.

중금속은 미생물의 생육·포자형성·형태 및 생화학적 활성에 큰 영향을 미친다(Collins & Stotzky 1989). 10 µg/ml의 카드뮴에 의하여 효모 세포는 호흡 결핍과 미토콘드리아의 형태적 변화가 일어나며(Lindegren & Lindegren 1973), 담수규조 *Tabellaria flocculosa*는 카드뮴 1 ng/ml 존재하에서 세포변이가 일어났다(Adshead-Simonsen *et al.* 1981). 아연(1 µg/ml)과 5~100 µg/ml의 카드뮴이 함유된 배지에서 배양된 *Euglena glacilis*는 비정상적인 세포분열에 의하여 기형 세포로 형태적 변화가 일어났으며(Nakano *et al.* 1980), *Hansenula anomala* B-7은 카드뮴 400 µg/ml 이상 함유된 배지에서 배양했을 때 효모 세포의 일부가 구형 또는 타원형에서 균사상으로 형태적 변화가 일어난다는 보고(Song & Yu 1991)가 있다.

본 연구에서는 서울 중랑구 하수 처리장의 반송오니로부터 분리한 *Candida sp.* LSY2를 sensor에 충전하여 오염물질의 종류에 따른 BOD sensor의 감응도를 조사하고 기존의 BOD₅ 방법으로 측정된 결과와 상호 비교하였다. 또한, 수용액 속의 중금속에도 안정한 BOD sensor를 설계하기 위하여 중금속에 대한 내성이 유도된 *Candida sp.* LSY2 중금속 내성주를 충전하였을 때의 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 활성오니로부터 미생물의 분리동정 및 배양

본 실험에 사용된 균주는 1995년 11월 서울시 중랑 하수 처리장의 활성오니로부터 분리한 것이다. 채취한 활성오니를 glucose 10 g, glutamic acid 10 g, distilled water q.s.p 1 l (pH 7.0)로 조성된 최소배지에 접종하고 30°C 항온 진탕 배양기(Jeiotech, SI-20R)에서 2일간 배양하였다. 최소배지에 agar (Difco 2%)를 넣은 평판배지에 배양액을 접종하여 순수분리하였다. 순수분리한 균주는 사면배지에 접종하여 4°C에서 보관하면서 계대배양하였으며, Microbe Identification System인 Vitec systems (McDonald, Vitec Junior)에 의하여 *Candida sp.*

LSY2로 동정되었다.

2. 중금속 내성주의 분리

Candida sp. LSY2의 중금속에 대한 내성주는 glucose 10 g, glutamic acid 10 g, agar 2%, distilled water q.s.p 1 l로 조성된 평판 최소배지에 400~2,400 µg/ml 농도의 Zn²⁺(ZnSO₄) 용액과 50~60 µg/ml 농도의 Cd²⁺(Cd(NO₃)₂) 용액을 첨가한 뒤 균을 접종하고 30°C 항온 배양기(Jeio-tech, IB-22)에서 3일간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

중금속을 첨가하지 않은 액체 배지(glucose 10 g, glutamic acid 10 g, distilled water q.s.p 1 l)에서 배양한 *Candida sp.* LSY2의 형태와 Zn²⁺(800 µg/ml)을 첨가한 배지 및 Cd²⁺(200 µg/ml)을 첨가한 배지에서 배양한 *Candida sp.* LSY2의 형태는 광학현미경(Olympus VANOX AH-2)을 사용하여 비교 관찰하였다.

3. BOD sensor에 의한 BOD 측정

활성오니 분리주를 0.45 µm의 기공을 가지는 teflon 막(Millipore, JHWP04700)에 고정시킨 후 산소 전극에 부착하여 BOD 센서를 제작하였다. 그 결과 15~20분 이내에 BOD 값을 측정할 수 있었다. 중금속 내성주를 이용한 중금속 용액의 BOD 측정 실험에서는 glucose와 glutamic acid를 10 g/l씩 혼합한 표준 오염물질 용액 속에 Zn²⁺ 용액과 Cd²⁺ 용액을 농도별(1, 4 및 10 mM)로 첨가하고, 중금속 비내성주, Zn²⁺(800 µg/ml) 내성주 또는 Cd²⁺(200 µg/ml) 내성주를 각각 biosensor에 loading하여 이들 중금속 용액 속의 BOD를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 중금속 내성주의 분리 및 특성

서울시 중랑 하수 처리장의 활성오니로부터 분리한 *Candida sp.* LSY2의 생육에 미치는 중금속의 영향을 알아보기 위해, Zn²⁺의 농도를 400~2,400 µg/ml, Cd²⁺의 농도를 50~600 µg/ml로 변화시키면서 배양 배지에 각각 첨가하고, 이들 중금속에 대한 *Candida sp.* LSY2의 내성 정도를 균체의 성장 여부로써 확인하였다. 그 결과 Table 1에 제시한 바와 같이 *Candida sp.* LSY2는 2,400 µg/ml의 Zn²⁺이 포함된 배지에서는 생존하지 못하는 것이 확인되었으며, Fig. 1-B를 보면 800 µg/ml의 농도에서 이미 균체의 형태 변화가 일어나는 것을 알 수 있었다.

한편, Cd²⁺ 농도가 300 µg/ml 일 때 생존하지 못하였으며(Table 2), Fig. 1-C에 나타난 바와 같이 200 µg/ml의

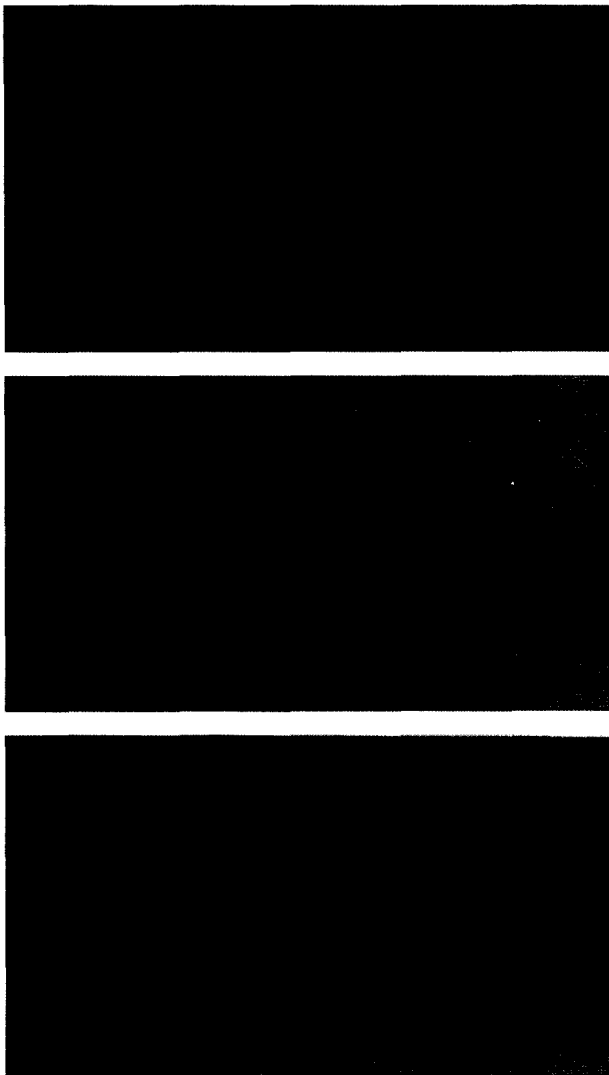


Fig. 1. Photographs (2,500×) of *Candida* sp. LSY2 cultured in the different liquid media. A, medium in the absence of metal ions; B, medium in the presence of Zn²⁺ (800 µg/ml); C, medium in the presence of Cd²⁺ (200 µg/ml).

Table 1. Cell number of *Candida* sp. LSY2 cultured in the media containing different concentration of Zn²⁺

Cell number (cells/ml)	Concentration of Zn ²⁺ (µg/ml)					
	0	400	600	800	1,200	2,400
	4.7×10 ⁷	4.0×10 ⁷	2.6×10 ⁷	1.1×10 ⁷	4.4×10 ³	0

Cd²⁺ 농도가 포함된 배지에서는 균의 형태가 변하는 것을 관찰할 수 있었다.

Table 2. Cell number of *Candida* sp. LSY2 cultured in the media containing different concentration of Cd²⁺.

Cell number (cells/ml)	Concentration of Cd ²⁺ (µg/ml)					
	0	50	100	200	300	600
	4.7×10 ⁷	1.6×10 ⁶	2.9×10 ⁴	2.3×10 ³	0	0

2. Candida BOD sensor와 BOD₅ 법에 의한 유기 물질의 BOD 비교

폐수 속에는 다양한 종류의 오염 물질이 혼합되어 있으며 혼합 비율도 일정하지 않다.

BOD₅ 법은 혼합 균주들의 다양한 물질 대사에 의해 BOD 값이 측정되지만 BOD sensor는 충전된 균주의 호흡 대사에 의해 BOD 값이 측정되므로 단일 오염물질에 대한 감응도는 다를 수 있다(Hikuma *et al.* 1979). Chee 등(1999)은 BOD₅ 법에 의한 BOD 값이 BOD sensor에 의해 측정된 값보다 더 높다고 보고하였다.

Candida BOD sensor와 BOD₅ 법을 이용하여 측정된 유기 물질의 BOD 값을 측정하였으며 최소 3회 측정값의 평균을 Table 3에 제시하였다. 오염물질의 종류에 따라 BOD sensor의 출력신호가 다르게 나타났으며, glucose, acetic acid, aspartic acid 및 glutamic acid에 대한 *Candida* BOD sensor의 감응도가 lactose, sucrose 및 lactic acid에 대한 감응도보다 더 높게 제시되었다.

Lactose, sucrose, lactic acid에 대한 BOD 값은 *Candida* BOD sensor를 이용한 BOD 값이 BOD₅ 법에 의한 것보다 낮았다. 이것은 BOD sensor에 충전된 *Candida* sp. LSY2가 이들 유기 물질에 대한 생분해능이 낮기 때문으로 보인다. 반면, aspartic acid는 *Candida* sensor에 의한 BOD 값이 BOD₅ 법에 의해 측정된 BOD 값보다 높게 나타났다. 이것은 *Candida* sp. LSY2의 aspartic acid에 대한 호흡율이 높다는 것을 의미하며, 특히 glucose와 glutamic acid 같은 표준 오염 물질보다도 aspartic acid에 대한 호흡율이 더 높게 나타난 것이 주목할 만한 결과로 나타났다.

3. 중금속 내성주를 이용한 중금속 용액의 BOD 측정

BOD를 측정하고자 하는 용액 속에 중금속이 존재하면, 중금속은 미생물의 호흡 대사 활성화에 영향을 미칠 수 있으므로 중금속에 의해 BOD sensor의 출력 신호가 용존하고 있는 오염물질의 실제 농도에 해당하는 값보다 높거나 낮게 나타날 수 있다.

Riedel 등(1990)의 보고에 따르면 *Trichosporon cuta-*

Table 3. Comparison of the biodegradation capacity of a *Candida* sp. with that of the microbial system used on the conventional method

Organic solute	g BOD / g solute	
	<i>Candida</i> sensor	Conventional BOD ₅ method (Bond and Straub, 1980)
Glucose	0.73	0.50~0.78
Lactose	0.31	0.45~0.72
Sucrose	0.25	0.49~0.76
Acetic acid	0.70	0.34~0.88
Aspartic acid	0.69	0.58
Glutamic acid	0.64	0.42~0.64
Lactic acid	0.47	0.63~0.88

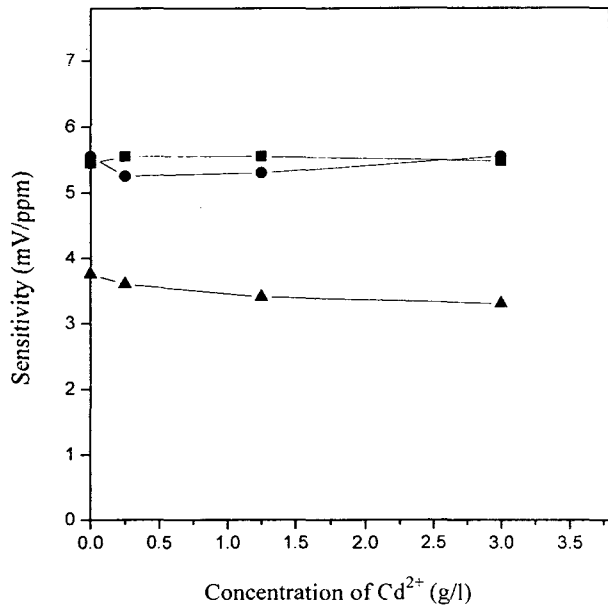


Fig. 2. Determination of BOD by biosensors in the solution containing Cd²⁺. ■, Biosensor with intact *Candida* sp.; ●, Biosensor with Zn²⁺ tolerant *Candida* sp.; ▲, Biosensor with Cd²⁺ tolerant *Candida* sp.

neum E4를 이용한 BOD sensor는 Cu²⁺, Zn²⁺ 및 Pb²⁺에 안정하며, Hg²⁺과 Cd²⁺에 의해 활성이 저해된다고 하였고, Li와 Chu (1991)는 *Pseudomonas* sp.와 *Hansenula* sp.를 이용한 BOD sensor는 각각 50 mg/l의 Fe³⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ 및 Zn²⁺에 안정하며, 50 mg/l의 Hg²⁺, Ag⁺와 100 mg/l의 Cu²⁺에 의해 활성이 저해된다고 보고하였다.

Fig. 2와 3은 중금속 내성을 유도하지 않은 비내성주, 800 µg/ml의 Zn²⁺를 포함한 배지에서 Zn²⁺ 내성을 유도한 Zn²⁺ 내성주와 200 µg/ml Cd²⁺을 포함한 배지에서

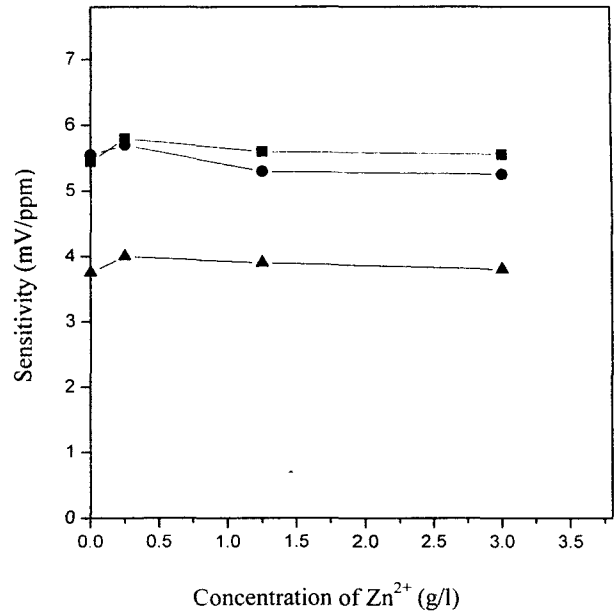


Fig. 3. Determination of BOD by biosensors in the solution containing Zn²⁺. ■, Biosensor with intact *Candida* sp.; ●, Biosensor with Zn²⁺ tolerant *Candida* sp.; ▲, Biosensor with Cd²⁺ tolerant *Candida* sp.

Cd²⁺ 내성을 유도한 Cd²⁺ 내성주에 의한 BOD 측정에 용액 속의 Cd²⁺과 Zn²⁺가 미치는 영향을 나타낸 것이다. 비내성주와 Zn²⁺ 내성주의 감응도는 BOD를 측정하고자 하는 용액 속에 포함된 Zn²⁺와 Cd²⁺의 농도가 3.0 g/l에 이를 때까지 BOD 값은 비교적 안정하였으나, Cd²⁺ 내성주를 사용한 sensor는 실제 BOD 값보다 더 낮은 BOD 값을 제시하였다. 이는 소량의 Cd²⁺에 의하여도 *Candida* sp. LSY2의 생육이 급격히 저하되며, 이렇게 유도된 Cd²⁺ 내성주가 호흡 대사작용을 원활하게 하지 못해 (Lindegren & Lindegren 1973) 실제 BOD 값보다 더 낮은 BOD 값을 제시하였다고 사료된다. 본 실험의 결과에서 중금속 내성주를 사용하면 중금속 이온에 의한 BOD 분석의 영향이 적게 나타날 것으로 기대하였으나 중금속 내성주의 효과는 거의 없는 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 1999년도 상명대학교 자연과학연구소 연구비에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

Adshead-Simonsen PC, GE Murray & DJ Kushner (1981)

- Morphological changes in the diatom, *Tabellaria flocculosa*, induced by very low concentrations of cadmium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **26** : 745–748.
- Bond RG & CP Straub (1980) CRC Handbook of Environmental Control Vol. III. pp. 671–686. In *Water Supply and Treatment*. CRC Press.
- Chee GJ, Y Nomura & I Karube (1999) Biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand. *Analytica Chimica Acta* **379** : 185–191.
- Collins YE & G Stotzky (1989) Factors affecting the toxicity of heavy metals to microbes. pp. 31–90. In *Metal ions and bacteria* (Beveridge TJ & RJ Doyle eds). Wiley, New York.
- Galindo E, JL Garcia, LG Torres & R Quintero (1992) Characterization of Microbial membranes used for the estimation of biochemical oxygen demand with a biosensor. *Biotechnology Techniques*. **6** : 399–404.
- Hikuma M, H Suzuki, T Yasuda, I Karube & S Suzuki (1979) Amperometric estimation of BOD by using living immobilized yeasts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **9** : 289–297.
- Ihn GS, KH Park, UH Pek & MJ Sohn (1992) Microbial BOD sensor using *Hansenula anomala*. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **13** : 145–148.
- Karube I, T Matsunaga, S Mitsuda & S Suzuki (1977a) Microbial electrode BOD sensors. *Biotechnol. Bioeng.* **19** : 1535–1547.
- Karube I, S Mitsuda, T Matsunaga & S Suzuki (1977b) A rapid method for estimation of BOD by using immobilized microbial cell. *J. Ferment. Technol.* **55** : 243–248.
- Karube I & M Suzuki (1990) Microbial Biosensors. In *Biosensors. A Practical Approach*. A.E. G. Cass (ed.), Oxford University Press. pp. 155–170.
- Kawabata N & N Nakamura (1986) New BOD sensor utilizing a functional polymer which captures microorganism alive. Abstract of the International Symposium on New Sensors and Methods for Environmental Characterization, Kyoto, Japan.
- Kim MN (1995) Yeast Loading BOD Biosensor. *Kor. J. Mycol.* **23** : 354–358.
- Li F & TC Tan (1994a) Effects of preconditioning and microbial composition on the sensing efficacy of a BOD biosensor. *Biosensors Bioelectron.* **9** : 197–295.
- Li F & TC Tan (1994b) Effect of heavy metal ions on the efficacy of a mixed Bacilli BOD sensor. *Biosensors Bioelectron.* **9** : 315–324.
- Li F & TC Tan (1994c) Monitoring BOD in the presence of heavy metal ions using a poly(4-vinylpyridine)-coated microbial sensor. *Biosensors Bioelectron.* **9** : 445–455.
- Lindgren CC & G Lindgren (1973) Mitochondrial modification and respiratory deficiency in the yeast cell caused by cadmium poisoning. *Mut. Res.* **21** : 315–322.
- Marty JL, D Olive & Y Asano (1997) Measurement of BOD: Correlation between 5-day BOD and commercial BOD biosensor values. *Environ. Technol.* **18** : 333–337.
- Nakano Y, K Abe & S Toda (1980) Morphological observation on *Euglena gracilis* grown in zinc-sufficient media containing cadmium ions. *Agric. Biol. Chem.* **44** : 2305–2316.
- Riedel K, KP Lange, HJ Stein, M Kuhn, P Ott & F Scheller (1990) A microbial sensor for BOD. *Wat. Res.* **24** : 883–887.
- Song HI & TS Yu (1991) Morphological changes of *Hansenula anomala* B-7 by cadmium ion. *Kor. J. Microbiol.* **29** : 397–401.
- Strand SE & DA Carlson (1984) Rapid BOD measurement for municipal wastewater sample using a biofilm electrode. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* **56** : 464–467.
- Su YC, JH Huang & ML Liu (1986) A new biosensor for rapid BOD estimation by using immobilized growing cell beads. *Proc. Nat. Sci. Counc. B, Roc.* **10** : 105–112.
- Tan TC & Z Qian (1997) Dead *Bacillus subtilis* cells for sensing biochemical oxygen demand of wastewaters and wastewaters. *Sensors and Actuators B.* **40** : 65–70.

BOD Determination by Heavy Metal Tolerant *Candida* sp. LSY2

Mal-Nam Kim and Sun-Young Lee

(Department of Biology, College of Natural Sciences, Sangmyung University,
Seoul, 110-743, Korea)

Abstract - A biochemical oxygen demand (BOD) sensor loaded with *Candida* sp. was designed and constructed for the quick measurement of the concentrations of biologically assimilable organic substances dissolved in water. The sensitivity of the sensor was higher for glucose, acetic acid, aspartic acid and glutamic acid than that for lactose, sucrose and lactic acid. The sensitivities of BOD sensors loaded with Zn²⁺ tolerant and intact strains were almost identical while the sensitivity of sensor loaded with Cd²⁺ tolerant strain was considerably lower. The sensitivities of the sensors loaded with intact or Zn²⁺ tolerant strains did not change with the concentration of Cd²⁺ in the aqueous solution while the sensitivity of the sensor loaded with Cd²⁺ tolerant strain decreased slightly. The sensitivities of the sensors loaded with intact strain, Zn²⁺ or Cd²⁺ tolerant strains were not affected by the concentration of Zn²⁺ in the aqueous solution. [BOD biosensor, *Candida* sp., Zn²⁺ tolerant strain, Cd²⁺ tolerant strain].