

Serratia marcescens LSY4 중금속 내성주를 이용한 BOD센서의 감응도

김 말 남* · 이 선 영

상명대학교 자연과학부

Sensitivity of BOD Sensor with Heavy Metal Tolerant *Serratia marcescens* LSY4

Mal-Nam Kim*, Sun-Young Lee

Division of Natural Sciences, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

Abstract - A BOD sensor was prepared with *S. marcescens* LSY4 and was applied for measurement of BOD values of a solution containing the standard organic pollutants. The sensor sensitivity was nearly independent of the culture time in the range of 9-16 hours. It was also affected little by the cell mass in the range of 0.22-0.75 mg cm⁻². A cyclic change in the solution pH in the range of 4-9 was accompanied by a reversible variation in the sensor sensitivity. However, the reversibility was lost when the solution pH became more acidic or more basic. Heavy metal ions lowered the sensor sensitivity, which took place more precipitously in the presence of Cu²⁺ and Ag⁺ rather than in the presence of Zn²⁺ and Cd²⁺. The reduction of the sensor sensitivity was significantly attenuated by loading heavy metal ion tolerance induced strain. The Cu²⁺ tolerance induced strain was more efficient for the attenuation than Zn²⁺ and Cd²⁺ tolerance induced strain.

Key words : Microbial BOD sensor, heavy metal ion tolerance, *Serratia marcescens* LSY4

서 론

생물학적 산소요구량(BOD)은 유기물에 의한 수용액의 오염정도를 나타내는 중요한 지수로 널리 사용되고 있다. 지금까지 BOD값은 수용액의 BOD₅ (JIS 1974)를 측정하는 것이 일반적이지만, BOD₅를 분석하는데 소요시간이 너무 길기 때문에 BOD값을 보다 신속하게 측정하

여 이 정보를 feed back함으로써 수처리 공정을 원활히 제어할 수 있게 하는 필요성이 제기되어왔다. 이에 더하여 BOD₅의 측정은 숙련된 기능이라든가 측정오차가 10% 이상으로 나타난다(Karube 등 1977a). 이와 같은 단점을 개선하기 위하여 flow microcalorimetry (Beaubien and Jalicoeur 1985)와 microprocessor (Raviv and Ben-Yaakov 1984)를 이용하여 BOD₅를 간접적으로 측정하는 방법이 소개되었으나 이 방법들은 측정을 위한 조작이 복잡하고 분석기기가 고가인 것이 단점이다.

미생물 BOD센서를 이용하면 BOD값을 10~30분 이

* Corresponding author: Mal-Nam Kim, Tel. 02-2287-5150, Fax. 02-394-9585, E-mail. mnkim@smu.ac.kr

내에 측정할 수 있기 때문에 Karube 등(1977a)이 미생물 BOD센서를 처음 개발한 후 다양한 종류의 미생물 BOD센서가 소개되었다. 대부분의 미생물 BOD센서는 고정화된 미생물과 산소전극으로 이루어져있다(Karube et al. 1977a,b; Hyun et al. 1993; Sangeetha et al. 1996; Yang et al. 1996; Brookman et al. 1997; Marty et al. 1997; Tan and Qian 1997; Kim and Kwon 1998). BOD를 빠르게 측정하는 다른 한 방법은 고정화된 미생물이 충전된 column속을 통과하는 수용액의 용존산소를 column 입구와 출구에서 측정하여 그 차이를 이용하는 것이다. 미생물 BOD센서의 원리는 유기물질이 확산됨에 따라 산소전극에 부착된 미생물의 호흡대사 활성이 증가되어 산소전극 부근의 산소농도 감소를 측정하는 것이므로 미생물 BOD센서의 감응도는 온도, pH, 유기물질의 종류와 중금속이온과 같은 독성물질의 농도에도 의존한다. Li와 Tan(1994a,b)은 poly(4-vinyl pyridine)을 1 μm 의 두께로 coating한 투석막을 사용하였을 때 중금속 이온이 배척되는 효과가 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 서울시 중랑하수처리장의 활성오니로부터 *S. marcescens* LSY4를 분리한 후 이를 기체 투과막과 기공의 크기가 0.45 μm 인 teflon membrane 사이에 고정화시킨 미생물 BOD센서를 제작하였다. 포도당과 글루탐산으로 이루어진 표준오염물질을 이용하여 이 미생물 BOD센서의 감응도를 조사하였으며, 균체의 성장시기와 균체량이 미생물 BOD센서의 감응도에 미치는 영향을 분석하였다. 미생물 BOD센서를 이용하여 폐수의 유기물질에 의한 오염 정도를 on-line으로 측정할 때 폐수 속에 중금속이온과 같은 유해물질이 포함되어 있을 경우 미생물의 호흡대사 활성이 영향을 받아 유기물질의 BOD 측정값이 실제와 다르게 나타날 수 있다. 본 연구에서는 중금속이온의 농도가 증가함에 따라 BOD센서의 감응도가 감소하는 현상을 완화하기 위하여 중금속에 대한 내성이 유도된 *S. marcescens* LSY를 사용하였을 때의 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 미생물

서울시 중랑하수처리장의 활성오니로부터 세균을 분리하고 Microbe Identification System (ViteK Jr.)에 의하여 *Serratia marcescens* LSY4로 동정하였다. 동정 결과의 신뢰도는 99%이었다. 균체는 Nutrient broth (Difco)에서 30°C, 16시간 배양하고 지수기의 후반에 원심분리(4,000 g, 60분)하여 회수한 후 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0)으로

세척하였다.

2. BOD의 측정

균체를 기공 0.45 μm 인 teflon membrane (Millipore JHWP04700)에서 여과하고 약 0.36 mg cm⁻² (건중량)의 균체를 teflon membrane상에 충전하였다. 이를 기체 투과막으로 덮고 산소전극(YSI 58, Yellow Springs, USA)에 부착시켜 BOD센서를 제작하였다. 인산완충용액 150 mL를 30±1°C로 유지하면서 공기를 폭기하여 산소로 포화시킨 후 BOD센서를 장착하였다. 산소전극으로부터 나오는 전류신호를 0~0.5 V로 변환하여 기록하고 산소전극 표면의 용존산소 농도가 센서에 충전된 세균의 호흡대사로 인한 산소의 소모 속도와 평형을 이루었을 때 오염물질을 주입하였다. 오염물질의 농도가 증가함에 따라 세균의 호흡활성이 증가하여 산소전극 표면의 용존산소는 약 15분 이내에 또 다른 평형농도에 도달하므로 이 두 용존산소의 평형농도 차이를 센서의 출력신호로 측정하여 BOD값을 측정하였다.

3. *S. marcescens* LSY4의 중금속이온에 대한 내성 유도

균체를 포도당(10 g L⁻¹), 글루탐산(10 g L⁻¹) 및 한천(15 g L⁻¹)이 포함된 사면배지에서 37°C로 1일간 사면배양하고 세포현탁액을 10⁻⁶으로 희석시킨 후 최종현탁액 0.1 mL를 포도당(10 g L⁻¹), 글루탐산(10 g L⁻¹) 및 한천(15 g L⁻¹)과 중금속의 염(1.2 g)이 포함된 평판배지 37°C에서 36시간동안 배양시켰다. 이 중금속 내성주를 계대배양하여 안정화시킨 후 동일 조성의 액체배지에서 5일간 37°C에서 배양시켰다. 배양된 균체는 원심분리(4,000 g, 60분)하여 회수하였으며 인산완충용액으로 세척하였다.

결과 및 고찰

1. BOD센서의 감응도

동일한 농도의 포도당과 글루탐산 혼합물로 이루어진 표준오염물질을 주입하였을 때 표준오염물질의 농도와 BOD센서의 출력신호가 직선관계를 나타내는 영역에서 직선의 기울기로 센서의 감응도를 측정하였다. 성장시기가 다른 균체를 충전하였을 때 센서의 감응도는 Fig. 1과 같았다. 지수기인 배양시간 9시간일 때와 16시간일 때는 센서의 감응도에 큰 차이가 없었으나 배양 22시간에서는 센서의 감응도가 약간 감소하는 거동을 나타내었다. 충전된 균체량에 따른 센서의 감응도는(Fig. 2) 균체량 증가에 따

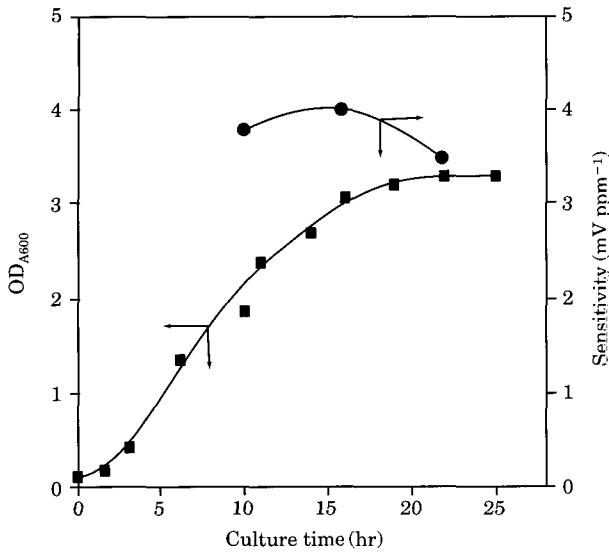


Fig. 1. Growth curve of *Serratia marcescens* LSY4 and the effect of growth phase on the sensor sensitivity. (■) Growth curve; (●) Effect of growth phase.

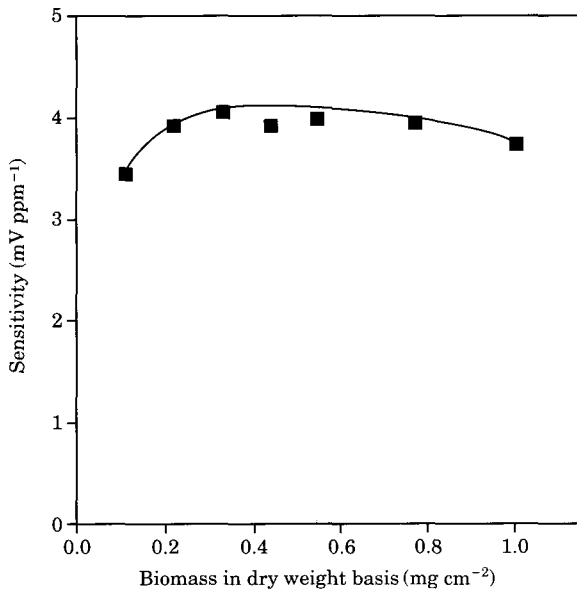


Fig. 2. Sensitivity of the BOD sensor as a function of biomass loaded.

라 센서의 감응도가 향상되었으나 균체량 0.22~0.75 mg cm⁻²의 범위에서는 센서의 감응도가 거의 동일하게 나타났다.

2. pH 변화에 따른 BOD센서의 감응도

폐수의 BOD를 on-line으로 측정할 때 폐수의 pH가 변화할 수 있어 미생물 BOD 센서가 비가역적으로 손상

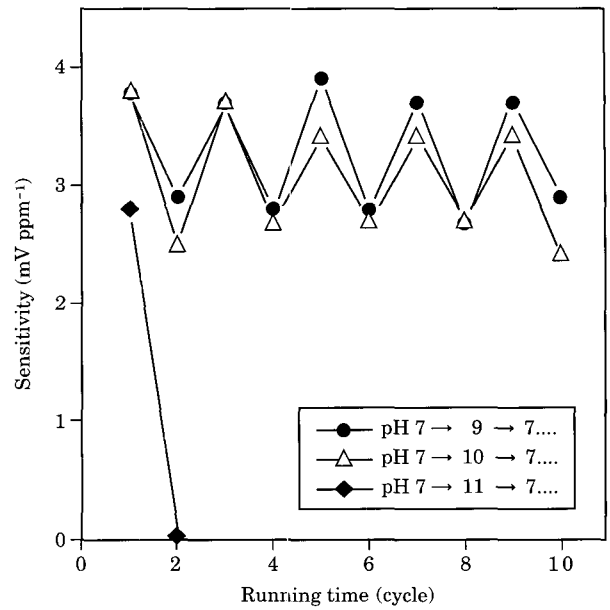


Fig. 3. Effect of cyclic variation of pH in alkaline range on the sensor sensitivity.

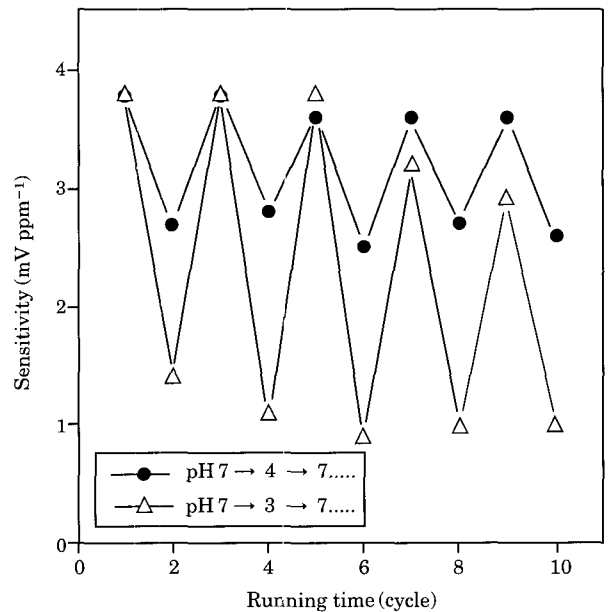


Fig. 4. Effect of cyclic variation of pH in acidic range on the sensor sensitivity.

을 받을 수 있다. Fig. 3은 수용액의 pH를 주기적으로 변화시켰을 때 센서의 감응도가 비가역적으로 감소하는지를 조사한 결과이다. 수용액의 pH를 7에서 9까지 주기적으로 변화시켰을 때는 센서의 감응도가 가역적으로 회복된 반면, 수용액의 pH를 7에서 10으로 순환시킬 경우 센서의 감응도가 점차 감소하며, 수용액의 pH가 7에서 11

까지 변화하였을 때는 센서의 감응도가 비가역적으로 완전히 소멸됨을 나타내고 있다. pH를 7에서 4로 산성 쪽으로 변화시켰을 때 센서의 감응도는 가역적으로 회복되었으나(Fig. 4) pH가 7에서 3으로 순환되었을 때는 센서의 감응도가 점차 감소 하였다. pH 4~9의 범위에서는 균체의 호흡대사 활성이 비가역적으로 손상되지 않는다고 할 수 있다.

3. 중금속이온의 농도가 BOD센서의 감응도에 미치는 영향

Fig. 5는 수용액 중에 Zn^{2+} 이 미량 첨가되더라도 센서의 감응도가 급격히 감소함을 보여주고 있다. 따라서 균체의 호흡대사 활성은 Zn^{2+} 의 농도에 크게 의존한다고 할 수 있다. Cd^{2+} 또는 Cu^{2+} 에 내성이 유도된 균체를 충전하였을 때는 Zn^{2+} 의 농도에 따라 센서의 감응도가 감소하는 현상이 현저히 억제되었다. Cd^{2+} 내성주가 Cu^{2+} 내성주에 비하여 Zn^{2+} 의 첨가에 따라 센서의 감응도가 더 많이 감소하였다. Fig. 6은 Cd^{2+} 의 첨가에 따른 센서의 감응도의 변화 추이를 나타낸다. Cd^{2+} 은 Zn^{2+} 와 유사한 정도로 센서의 감응도를 감소시킴을 알 수 있다. 비내성주 혹은 Cd^{2+} 내성주보다 Cu^{2+} 내성주를 센서에 충전하였을 때 Cd^{2+} 의 첨가에 따른 센서의 감응도가 가장 적게 일어났다. Fig. 7은 Cu^{2+} 가 센서의 감응도를 Zn^{2+}

(Fig. 5) 혹은 Cd^{2+} (Fig. 6)에 비하여 더 급격히 감소시키고 Cu^{2+} 내성주에서 센서의 감응도 감소가 가장 적게 일

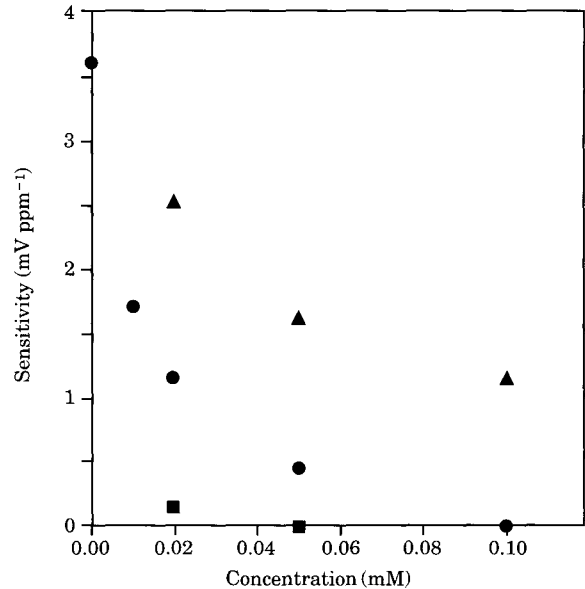


Fig. 6. Effect of Cu^{2+} concentration in unbuffered aqueous solution at pH 7.0, 30°C on the response of the *Serratia* BOD sensor. (■) Control strain; (●) Cd^{2+} tolerance induced strain; (▲) Cu^{2+} tolerance induced strain.

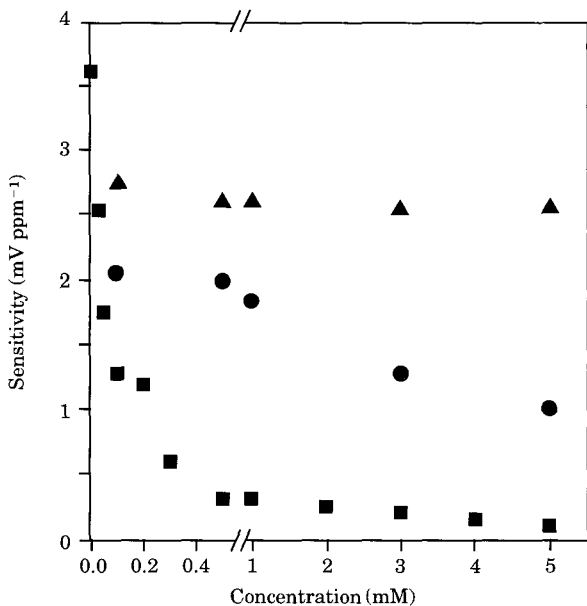


Fig. 5. Effect of Cd^{2+} concentration in unbuffered aqueous solution at pH 7.0, 30°C on the response of the *Serratia* BOD sensor. (■) Control strain; (●) Cd^{2+} tolerance induced strain; (▲) Cu^{2+} tolerance induced strain.

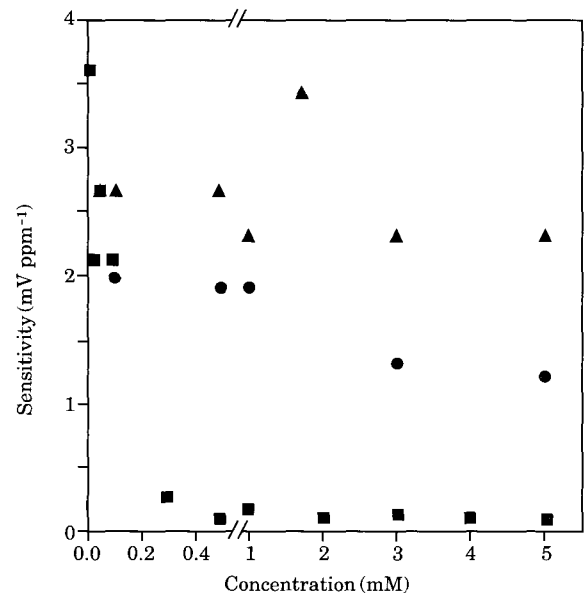


Fig. 7. Effect of Zn^{2+} concentration in unbuffered aqueous solution at pH 7.0, 30°C on the response of the *Serratia* BOD sensor. (■) Control strain; (●) Cd^{2+} tolerance induced strain; (▲) Cu^{2+} tolerance induced strain.

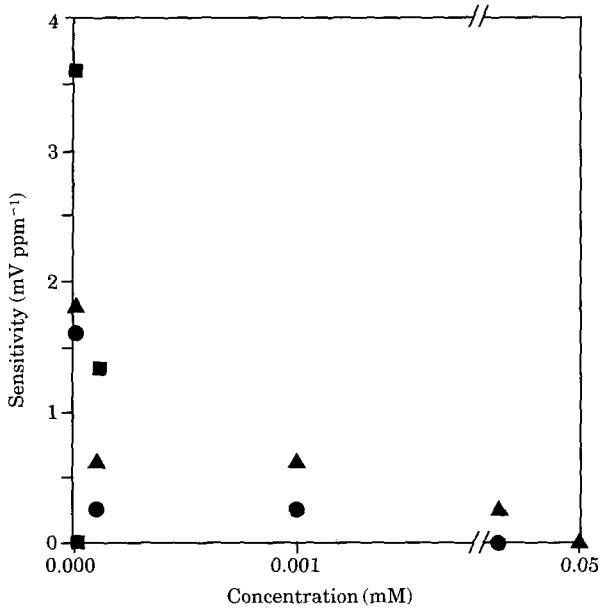


Fig. 8. Effect of Ag^+ concentration in unbuffered aqueous solution at pH 7.0, 30°C on the response of the *Serratia* BOD sensor. (■) Control strain; (●) Cd^{2+} tolerance induced strain; (▲) Cu^{2+} tolerance induced strain.

어남을 보여주고 있다. Figs. 5~7의 결과에 의하면 Zn^{2+} , Cd^{2+} 및 Cu^{2+} 모두 이온의 농도가 증가함에 따라 센서의 감응도가 감소하는 현상이 Cd^{2+} 내성주에 비하여 Cu^{2+} 내성주에서 더 크게 일어나고 있다. 이는 Cu^{2+} 가 Cd^{2+} 보다 *S. marcescens*의 호흡대사 활성에 더 큰 영향을 미치며 따라서 Cu^{2+} 에 의하여 내성이 유도될 경우 Cd^{2+} 에 의하여 내성이 유도되었을 때 보다 *S. marcescens*의 호흡대사 활성이 중금속이온에 의하여 저하되는 폭이 더 적게 나타나는 것에 기인한다고 할 수 있다.

Ag^+ 는 Fig. 8이 나타내는 바와 같이 Cd^{2+} 및 Zn^{2+} 와 Cu^{2+} 가 첨가될 때 보다 훨씬 더 급격하게 센서의 감응도를 감소시켰다. Cd^{2+} 및 Zn^{2+} 에 대한 내성이 유도된 균체를 사용하였을 때도 센서의 감응도 감소가 거의 완화되지 않았다. 따라서 Ag^+ 이 Cd^{2+} 및 Zn^{2+} 와 Cu^{2+} 보다 세균의 호흡대사 활성을 가장 큰 폭으로 저하시킨다고 할 수 있다. 인산완충용액은 중금속이온을 인산염 형태로 석출시키므로 (Kim과 Kwon 1998), Figs. 5~8의 실험은 탈이온수를 사용하여 행하였다. 중금속이온이 전혀 첨가되지 않은 탈이온수에서의 센서의 감응도 (Figs. 5~8)가 인산완충용액에서 측정된 값 (Fig. 2)보다 더 낮은 값을 보이고 있다. Li와 Chu (1991)도 BOD센서의 감응도가 인산완충용액의 농도가 낮아짐에 따라 점차 감소한다고 보고하였다.

적 요

S. marcescens LSY4가 충전된 BOD센서를 제작하여 표준오염물질을 포함한 수용액의 BOD를 측정하였다. 배양시간이 9~16시간일 때에는 배양시간에 따른 BOD센서의 감응도에 큰 차이를 나타내지 않았으며, 균체량도 $0.22 \sim 0.75 \text{ mg cm}^{-2}$ 의 범위에서는 거의 동일한 센서의 감응도를 나타내었다. 수용액의 pH가 4~9 사이로 변화할 경우 센서의 감응도가 가역적으로 변화하였으나 수용액이 더 산성이거나 더 염기성이 되면 센서의 감응도가 비가역적으로 저하되었다. 수용액에 중금속이온이 첨가되면 센서의 감응도가 감소하였으며, Zn^{2+} 나 Cd^{2+} 보다 Cu^{2+} 혹은 Ag^+ 가 첨가되었을 때 센서의 감응도가 더 급격히 감소하였다. 중금속에 대한 내성이 유도된 균체를 충전하였을 때 중금속이온의 첨가에 따른 센서의 감응도 감소가 크게 완화되었으며, 이런 효과는 Cd^{2+} 내성주보다 Cu^{2+} 내성주에서 더 현저하였다.

사 사

본 연구는 2004년 상명대학교 자연과학연구소 연구비에 의하여 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Beaubien A and C Jolicoeur. 1985. Applications of film micrometry to process control in biological treatment of industrial wastewater. *J. Water. Pollut. Control Fed.* 57:95-100.
- Brookmon SKE. 1997. Estimation of Biochemical oxygen demand in slueey and effluents using ultra-violet spectrophotometry. *Wat. Res.* 31:372-374.
- Hyun CK, E Tamiya, T Takeuchi, I Karube and N Inoue. 1993. A novel BOD sensor based on bacterial luminescence. *Biotechnol. Bioeng.* 41:1107-1111.
- JIS. 1974. Testing methods for industrial wastewater. Japanese Industrial Standards Committee JIS K0102. Tokyo, Japan. pp.33.
- Karube I, T Matsunaga, S Mitsuda and S Suzuki. 1997a. Microbial electrode BOD sensor. *Biotechnol. Bioeng.* 19:1535-1547.
- Karube I, T Matsunaga, S Tsuru and S Suzuki. 1977b. Biochemical fuel cell utilizing immobilized cells of *Clostridium butyricum*. *Biotechnol. Bioeng.* 19:1727-

- 1733.
- Kim MN and HS Kwon. 1994. Biochemical oxygen demand sensor using *Serratia marcescens* LSY 4. *Biosens. Bioelectron.* 14:1-7.
- Li F and TC Tan. 1994a. Effect of heavy metal ions on the efficacy of a mixed Bacilli BOD sensor. *Biosens. Bioelectron.* 9:315-324.
- Li F and TC Tan. 1994b. Monitoring BOD in the presence of heavy metal ions using a poly (4-vinylpyridine)-coated microbial sensor. *Biosens. Bioelectron.* 9:445-455.
- Li YR and J Che. 1991. Study of BOD microbial sensors for wastewater stream control. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28:855-863.
- Marty JL, D Olive, Y Asano and 1997. Measurement of BOD: correlation between 5-day BOD and commercial BOD biosensor values. *Environ. Technol.* 18:333-337.
- Raviv R and S Ben-Yaakov. 1984. A simple algorithm for on-line prediction of BOD₅ by a microprocessor-based system. *Biotech. Bioeng.* 26:1239-1244.
- Sangeetha. S, G Sugandhi, M Murugesan, V Murali Madhav, S Berchmans, R Rajasekar, S Rajasekar, D Jeyakumar and G Prabhakara Rao. 1996. *Torulopsis candida* based sensor for the estimation of biochemical oxygen demand and its evaluation. *Electroanalysis* 8:698-707.
- Tan TC and Z Qian. 1997. Dead *Bacillus subtilis* cells for sensing biochemical oxygen demand of waters and wastewaters. *Sensor Actuat. B* 40:65-70.
- Tanaka H, E Nakamura, Y Minamiyama and T Toyoda. 1994. BOD biosensor for secondary effluent from wastewater treatment plants. *Wat. Sci. Tech.* 30:215-227.
- Yang Z, H Suzuki, S Sasaki and I Karube. 1996. Disposable sensor for biochemical oxygen demand. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:10-14.

Manuscript Received: April 23, 2004
Revision Accepted: August 13, 2004
Responsible Editorial Member: Kap Joo Park
(Konkuk Univ.)