

미생물 검침을 위한 고체 배지 임피던스 센서

최아미[†] · 박재성* · 정효일^{†, *}

Solid medium integrated impedimetric biosensor for detection of microorganisms

Ahmi Choi, Jae-Sung Park, Hyo-Il Jung

Key Words : biosensor, impedance microbiology, real-time detection, solid medium

Abstract

Rapid, real-time detection of pathogenic microorganisms is an emerging and quickly evolving field of research, especially with regard to microorganisms that pose a major threat to public health. Herein, a new method that uses bioimpedance and solid culture medium for the real-time detection of microorganisms is introduced. We fabricated a new impedimetric biosensor by integrating solid media and two plane electrodes attached on two facing sides of an acryl well. During bioelectrical impedance analysis, the solid medium showed the characteristics of a homogenous conductive material. In a real-time impedance measurement, our solid-medium biosensor could monitor bacterial growth *in situ* with a detection time of ~4 hrs. Our data indicate that the solid-medium biosensor is useful for detecting airborne microorganisms, thereby providing a new analytical tool for impedance microbiology.

1. 서 론

우리 환경에는 수많은 미생물들이 존재하며 그 중 병원성 미생물의 존재 유무와 증식을 검침하는 것은 공중 보건에서 매우 중요한 문제이다. 병원성 미생물 검침의 전형적인 방법은 배지에서 미생물을 배양하면서 생성되는 콜로니(미생물의 군집)를 관찰하는 방법이 주를 이루어 왔으나 이는 시간이 많이 걸릴 뿐 아니라 (24-48 시간) 많은 노동력을 필요로 한다는 단점을 가지고 있다 (1). 최근에는 다양한 분야에서 병원성 미생물 검침을 빠르고 효과적으로 수행하고자 하는 많은 연구들이 수행 및 발표되고 있으며 본 연구실에서는 선행 연구로써 광학적 방법을 통한 미생물 내의

측정함으로써 병원성 미생물 검침을 보고한바 있다 (2). 이러한 방법들 외에 신호가 정확하고 빠르다는 장점을 가지고 있는 전기적 신호 검출 방법이 미생물 검침 연구에 많이 응용되고 있다. 전기적 신호를 이용한 미생물 검침 방법은 배지에 전극을 삽입하고 배지에서 미생물을 배양하면서 배지의 전기적 신호 예를 들면 전도도 (conductivity), 전기 용량 (capacitance), 직류 저항 (resistance) 및 교류 저항 (impedance) 같은 것을 측정하여 미생물의 성장을 감지하는 것을 기본으로 한다. 배지의 전기적 신호의 변화는 미생물의 대사 활동을 통해 생성되는 이온 물질과 전극에 부착하는 세포에 의해 주로 기인된다 (3). 이러한 많은 연구들은 미생물 배양이 액체 및 고체 배지 모두에서 가능함에도 불구하고 액체 배지 상에서만 이루어져 왔다. 고체 배지는 액체 배지와 비교해서 미생물 배양능력에서 전혀 차이가 없을 뿐 아니라 사용과 운반성이 용이하다는 장점을 가지고 있어 추후 병원성 미생물 검침을 위한 바이오센서에 훨씬 더 효과적으로 응용될 수 있을 것이다. 따라서 본

[†] 연세대학교 나노메디컬 협동과정
E-mail : uridle7@yonsei.ac.kr
TEL : (02)2123-5814 FAX : (02)312-2159

* 연세대학교 기계공학부

에너지원인 ATP 농도를

연구진에서는 고체 배지의 생체 전기학적 특성 연구와 미생물 배양 시간 동안의 고체 배지의 임피던스 변화 관찰을 통해 미생물 검침용 고체 배지 바이오센서를 개발하였다.

2. 연구 방법

본 연구에서는 *Bacillus subtilis* (ATCC 11774)를 사용하였으며 배양을 위해 Nutrient broth (NB)와 15% agar (w/v)를 첨가하여 고체 배지, Nutrient agar (NA)를 만들었다. 액체 배지에서 미생물을 먼저 배양한 뒤 600nm 에서 optical density(OD₆₀₀)를 측정하여 농도를 결정하고 이 후 실험에 알맞은 농도로 희석하여 사용하였다. 임피던스를 측정하는 장치는 고체 배지를 담기 위한 용기 부분과 용기 양쪽 벽면에 부착된 금 전극으로 이루어져 있다 (Fig. 1). 전극에 뚫은 구멍을 통해 전선을 감아 연결하였으며 이를 임피던스 측정 및 분석 장비와 연결하였다.

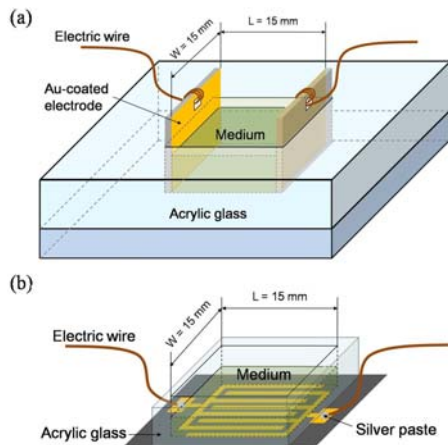


Fig. 1 Illustration of solid medium biosensors. The solid medium biosensor appears a quadratic well with a width of 15mm and a length of 15mm which was filled with solid medium. (a) Two gold-coated silicon electrodes were placed at two facing sides of the well. (b) Interdigitated microelectrodes (IMEs) were placed at bottom of the well.

고체 배지의 생체 전기적 특성은 전극간 거리와 배지의 용량에 따른 고체 배지의 임피던스 변화를 측정하여 조사하였다. 미생물 증식에 따른 임피던

스 측정은 매 두 시간마다 이루어 졌으며 미생물이 없을 때의 임피던스 값에 대한 비교 변화량으로 성장 곡선을 나타내었다. 고체 배지 바이오센서에 의해 얻은 성장 곡선은 OD₆₀₀ 값에 의해 얻은 성장 곡선과 비교하여 그 효율성을 조사하였으며 미생물 농도에 따른 고체 배지 센서의 검침 시간도 조사하였다.

3. 연구 결과 및 고찰

3.1 고체 배지의 전기적 특성 분석

생체 임피던스에 대한 이론은 인체의 수분이나, 지방질, 세포 밀도와 관련하여 정립되어 있으며 (Eq. 1) 이 이론에 따르면 균질의 전도성 생체 물질에서 임피던스의 크기는 전극간의 거리에 비례하고 전도성 생체 물질의 양에 반비례한다. 이번 연구에서는 고체 배지의 생체 임피던스에 대한 특성을 알아보기 위해 다음의 이론을 적용하였다.

$$Z = \frac{\rho L}{A} = \frac{\rho L^2}{V} \quad (1)$$

전극 간 거리별, 고체 배지 용량별로 임피던스를 측정한 결과, Fig. 2 에서 보듯이 전극간 거리에 비례하고 고체 배지 용량에 반비례하여 임피던스 크기가 변화하였다. 이는 고체 배지가 균질한 전도성 생체 물질의 특성을 가지고 있으며 생체 임피던스 측정에 적용될 수 있음을 의미한다.

3.2 고체 배지의 임피던스 측정을 통한 미생물 증식 검침

고체 배지 바이오센서를 이용해 얻은 임피던스 값을 이용하여 미생물 성장 곡선을 도식화하였다 (Fig. 2). 미생물은 새로 접종되면 새로운 환경에 적응하는 시간이 필요하며 이때에는 증식이 일어나지 않는다. 이 시기가 lag phase 에 속하며 초반의 임피던스 변화가 거의 없는 2 시간 동안이 이를 나타내고 있다. 그 이후에는 미생물의 증식이 급속도로 일어나고 따라서 대사활동 또한 활발하여 많은 이온성 대사 물질들이 생성된다. 이 시기를 exponential phase 라고 부르며 많은 이온성 대사 물질에 의해 고체 배지의 임피던스가 급격히 감소하는 것을 볼 수 있다. 임피던스 감소가 줄어드는 8 시간 이후는 미생물이 더 이상 증식하지 않으며 대사활동 또한 일어나지 않는 stationary phase 를

나타낸다. 이러한 임피던스 성장 곡선은 OD₆₀₀ 값에 의해 얻어진 성장 곡선과도 잘 부합되어 나타난다.

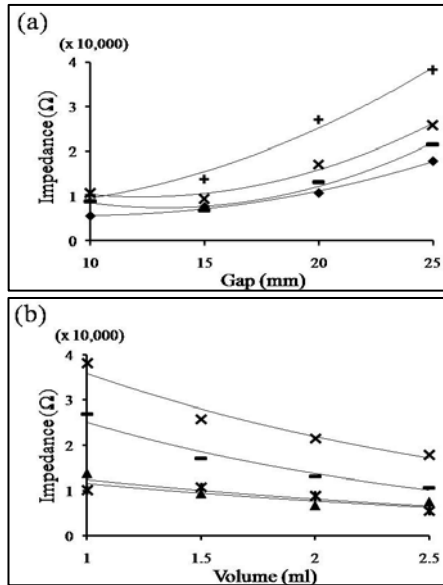


Fig. 2 Effects of different gaps between electrodes (a) and volumes of solid medium (b) to impedance change. Legends for panel (a): 1.0 ml (+), 1.5 ml (x), 2.0ml (■), and 2.5 ml (◆). Legends for panel (b): 10mm (▲), 15mm (x), 20mm (■), and 25mm (x). Solid lines showed the trend of impedance change as increase of gap and volume. All the experiments were conducted without bacteria.

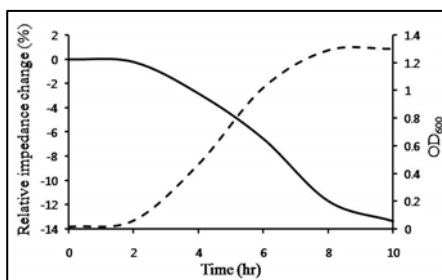


Fig. 3 Comparison of bacterial growth curves determined by impedimetric and optical methods. These growth curves were determined from 10³ cells of initial *B. subtilis* number. Legends for panel: the relative impedance change (ΔZ) (—) and the optical density change based on OD₆₀₀ values (---).

3.3 고체 배지 센서의 효율

본 고체 배지 바이오센서는 비교적 단순한 형태의 전극으로 이루어져있다. 전극은 측정 웰의 양 측면에 위치하며 가로 15mm, 세로 15mm의 정사각형의 금이 입혀진 실리콘 웨이퍼이다. 본 연구진은 측면에 위치하는 전극과 바닥에 위치하는 interdigitated microelectrode (IMEs) 를 이용하여 세균 성장에 따른 고체 배지의 임피던스 변화를 측정, 비교하여 두 가지 전극의 효율을 조사하였다. IMEs 는 기존 액체 배지의 임피던스 변화를 효율적으로 측정하는 것으로 알려져 있다 (4).

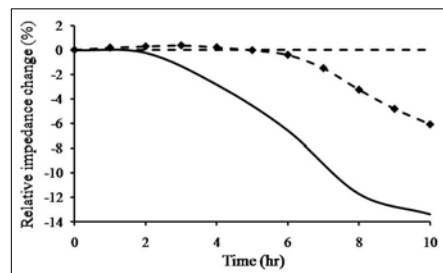


Fig. 4 Comparison between side plane electrodes and bottom interdigitated microelectrodes in impedance changes. Legends for panel: solid medium with bottom interdigitated microelectrodes (---), liquid medium with side plane electrodes (-•-), and solid medium with side plane electrodes (—).

Fig. 4 에서 보는 바와 같이 고체 배지의 임피던스 변화 측정에 있어서 바닥에 위치하는 IMEs (---) 는 어떤 변화도 측정하지 못했으며 측정웰의 양측면에 위치하는 전극 (—) 은 배양 후 2 시간 이후부터 배지의 임피던스가 감소하는 것을 감지하였다. 액체 배지에 적용된 양측면의 전극은 6 시간 이후에 배지의 임피던스 변화를 감지하였다 (-•-). 이는 세균의 증식이 일어나는 위치적인 이유에 의한 것으로 보인다. 고체 배지에서는 세균 증식이 배지 표면에서만 일어나 세균에 의해 생성된 대사산물이 고체 배지의 다공 구조를 통해 아래 방향으로 확산된다. 반면 액체 배지에서는 세균이 가라앉아 증식이 거의 바닥에서만 이루어지며 대사산물이 바닥에 축적되며 위쪽 방향으로 확산이 이루어진다. 따라서 고체 배지에서의 확산이 더 쉽게 이루어질 것이며 표면에서부터의 확산에 의한 임피던스 변화는 IMEs 보다는 양측면에 위치하는 전극이 더 효율적으로 감지할 수 있음을 확인하였다.

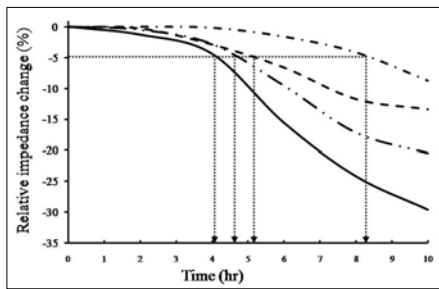


Fig. 5 Detection time of the solid medium biosensor according to various initial bacterial numbers. *B. subtilis* were grown on the solid medium surface with 10^2 (· · ·), 10^3 (— —), 10^4 (— · ·), and 10^5 (—) cells of initial number. The arrows represent the detection time (t_d).

3.4 초기 배양 농도에 따른 고체 배지 센서의 검출 시간

임피던스 측정법에 의한 검출 시간은 초기 배양 농도에 비례하며 다음과 같은 식에 의해 정의된다.

$$\log(C_0) = -\alpha t_d + \beta \quad (2)$$

여기서 C_0 는 초기 배양 농도, t_d 는 검출 시간, α 와 β 는 배양 조건에 따라 정해지는 상수이다. 고체 배지 센서를 이용하여 초기 세균 농도 $10^5, 10^4, 10^3, 10^2$ 에 대해 4.05h, 4.6h, 5.2h, 8.35h 이라는 검출 시간을 얻어내었다 (Fig. 5). 이 수치를 Eq. 2에 적용하여 $\alpha=1.347$, $\beta=10.267$ ($R=0.9047$) 값을 얻어내었다. 실험을 통하여 얻은 검출 시간을 이용하여 α , β 값을 얻어낸 몇몇 연구 결과들이 있다 (5). Eden group은 $\alpha = 0.96$, $\beta = 7.75$ 을 Dupont group은 $\alpha = 1.08$, $\beta = 11.33$ 을 얻어냈다. 이 수치에 의해 각각의 검출 시간을 살펴 보면 초기 농도 10^2 - 10^5 에서 5.98h과 2.86h, 8.63h과 5.86h 범위가 된다. 고체 배지 센서의 결과를 이와 비교하면 Eden group보다는 다소 느리지만 Dupont group에 비해 빠르다는 것을 알 수 있다. 따라서 고체 배지 센서의 초기 배양 농도에 따른 검출 시간은 기존 방법의 검출 시간 범위 내에서 얼마든지 검출이 가능하며 좀 더 발전시킨다면 기존의 방법보다 더 빠른 검출도 가능할 것이다.

4. 결론

본 연구팀은 임피던스 측정을 통한 미생물 검출에 처음으로 고체 배지를 이용하였다. 고체 배지 센서에 의해 얻어진 세균 성장 곡선은 광학적으로 세균수를 측정하여 얻은 결과와 같은 양상을 보여

주면서 세균 검출 센서로서의 가능성을 나타내었다. 본 실험에 적용된 단순한 형태의 센서가 고체 배지의 임피던스 변화 측정에 효과적이라는 것도 알 수 있었으며 초기 세균 농도에 따른 검출 시간도 정립된 식에 잘 부합하는 것을 알 수 있었다. 본 연구팀은 고체 배지 센서의 민감도와 세균에 따른 선택성을 향상시키기 위해 고체 배지와 전도성 물질 혹은 나노 물질이 복합된 새로운 물질 개발에 연구 방향을 맞추고 있다.

후기

본 연구는 한국과학재단 나노메디컬 국가핵심 연구센터 (R15-2004-024-00000-0)와 서울시 산학연 협력사업(10816), 환경부 차세대 환경핵심 과제 (101-082-035)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- (1) Fiegel, J., Clarke, R., Edwards, D.A., 2006, "Airborne infectious disease and the suppression of pulmonary bioaerosols" *Drug Discovery Today*, Vol. 11, pp. 51~57.
- (2) Lee, S.J., Park, J.S., Lim, H.T., Jung, H.I., 2008, "Microfluidic ATP-bioluminescence sensor for detection of airborne microbe" *Sensors & Actuators: B chemical*, Vol. 132, pp. 443~448.
- (3) Muñoz-Berbel, X., García-Aljaro, Cristina, Muñoz, F.J., 2008, "Impedimetric approach for monitoring the formation of biofilms on metallic surfaces and the subsequent application to the detection of bacteriophages" *Electrochimica Acta*, Vol. 53, pp. 5739~5744.
- (4) Yang, L., Li, Y., Erf, G.F., 2004, Interdigitated Array microelectrode based electrochemical impedance immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7", *Anal. Chem.*, Vol. 76, pp. 1107-1113
- (5) Yang, L., Bashir, R., 2008, "Electrical/ electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria", *Biotechnology Advances*, Vol. 26, pp. 135-150