

## 저장 온도에 따른 *Photobacterium phosphoreum*의 Viability와 Bioluminescence

김 현 숙·정 성 제·정 계 훈·\*전 억 한  
경희대학교 생명과학부 식품가공학과  
(접수 : 1999. 6. 15., 게재승인 : 1999. 9. 18.)

### The Effect of Storage Temperature on the Viability and Bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum*

Hyun-Suk Kim, Sung-Je Jung, Kye-Hun Chung, and Uck-Han Chun\*

Department of Food Technology and Science, Institute of Life Science, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea  
(Received : 1999. 6. 15., Accepted : 1999. 9. 18.)

A naturally luminescent bacterium, *Photobacterium phosphoreum* was stored in 2.5% NaCl solution at 20°C, 4°C, -20°C and -70°C for 30 days. In vivo luminescence and concentrations of total and culturable cells were determined by luminometer, spectrophotometer and dilution plate counting, respectively. When stored at 4°C and 20°C, concentrations of cells were rapidly decreased as a result of cell lysis, leading to a drop in turbidity and culturable counts. The bioluminescence of cells stored at 4°C was maintained until 12 days while those of cells starved at other temperatures decreased to background level within 3 days. Following incubation of stored cells in fresh liquid medium, activities of viable cells increased throughout storage period excepting cells stored at 20°C. Changes in bioluminescence intensity following addition of 2.5% NaCl solution markedly showed in cells stored at -20°C and -70°C and increased to maximum 8 fold.

**Key Words :** *Photobacterium phosphoreum*, storage temperature, viability, bioluminescence

#### 서 론

최근 발광 미생물을 이용한 수계의 독성 물질 측정에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이는 독성 물질에 대한 반응이 신속, 정확할 뿐 아니라 재생산성이 좋아 연속적으로 이용 가능하기 때문이다(1). *Photobacterium phosphoreum*은 다른 발광 미생물들과 달리 4°C의 낮은 온도에서도 생장과 저장이 가능해 저온의 수질도 측정할 수 있다는 장점이 있어 많은 연구가 이루어지고 있다(2). 이때 *P. phosphoreum*을 독성 물질 연속 측정에 이용하기 위해서는 생체 발광(bioluminescence)의 안정성을 높여 독성 물질에 대한 반응성을 향상시키는 일이 선행되어야 한다. 해양 미생물의 생장(growth)과 생존(viability)은 온도, 영양 수준, 이온 세기, 산소, 증감속 등 다양한 요소에 의해 영향을 받는다. 온도는 가장 큰 영향을 주는 환경 인자로서, 세포 내 물질 대사에 관여한다. 온도가 상승할수록 세포의 화학 및 효소 반응은 점차 높은 속도로 이루어져 성장 속도가 빨라지며, 생육 최적

온도에 도달 시 세포의 최대 생장이 이루어지는 반면, 저온 환경에 노출된 대부분의 미생물은 원형질막의 젤화 즉, 물질의 막 투과 속도가 낮아져 생장이 이루어지지 않는다(3). 발광 미생물의 경우 이러한 외부 환경은 생체 발광 메커니즘과 밀접한 관련이 있다. *P. phosphoreum*의 생체 발광 반응에는 luciferase 효소가 관여하고 있으며, 긴 사슬의 aldehyde와 환원형 riboflavin mononucleotide(FMNH<sub>2</sub>)의 산화가 이루어져, 반응 결과 청록색(blue-green)의 빛을 발하게 된다. 이때 생체 발광도(bioluminescence intensity)는 세포 활성도 즉, 생체 발광 효소인 luciferase의 활성에 따라 좌우되며, luciferase는 온도에 따라 그 활성을 달리한다(4-6). 따라서 본 연구에서는 세포 농도와 생균수 및 생체 발광도 측정을 통해 저장 온도에 따른 *P. phosphoreum*의 생장과 생존 및 생체 발광 유지도를 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 균주 및 보존

본 연구에서 사용한 생체 발광 미생물은 *Photobacterium phosphoreum*(KCTC 2852)이며, -20°C에서 25%(V/V) glycerol stock으로 보관하여 균주 배양시마다 새로운 stock을 사용하였다.

\* Department of Food Technology and Science, Institute of Life Science, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea  
Tel : 0331-201-2626, Fax : 0331-204-8116,  
E-mail : uhchun@nms.kyunghee.ac.kr

Table 1. Composition of Culture medium containing NaCl.

Components	Concentration
Nutrient broth No.2 (meat peptone 4.3 g/l, casein peptone 4.3 g/l, sodium chloride 6.4 g/l)	15 g
Sodium chloride	25 g
Yeast nitrogen base(without amino acid)	5 g
Glycerol	3 mL
	Distilled water to 1 L

### 배지 조성

*P. phosphoreum*의 성장 배지는 NaCl이 함유된 배지를 사용하였으며, 배지의 조성은 Table 1과 같다. pH는 0.1 M potassium phosphate buffer를 사용하여 7.0으로 조절하였으며, 한천 배지의 경우 agar 1.5%(W/V)를 첨가하였다. 각 시약은 Fluka, Duksan, Difco, Sigma Co.를 사용하였다.

### 배양 방법

10 mL 액체 배지가 들어있는 100 mL 삼각플라스크에 균주 1 colony를 접종하여 20°C, 100 rpm의 회전식 진탕기(Vision Scientific Co., K. M. C.-8480SF, Korea)에서 12~14시간 동안 배양한 접종원(0.5~0.8A<sub>660</sub>)을 플라스크 배지에 10%(V/V) 접종한 후, 동일한 조건으로 진탕 배양하였다(10). 12~15시간 동안 배양하여 세포 농도가 1.0~1.5A<sub>660</sub>(8×10<sup>7</sup> CFU/mL)인 대수기(late-log-phase)의 세포 배양액을 측정에 사용하였다(7).

### 저장

2.5%(W/V) NaCl 용액 100 mL가 들어있는 250 mL 삼각플라스크에 대수기의 세포 배양액을 10%(V/V) 접종하여 면전습으로 봉한 후, 20°C, 4°C, -20°C, -70°C에 저장하였으며, 3일 간격으로 저장된 시료 일정량을 취하여 측정에 사용하였다. 이때 냉동 저장(-20°C, -70°C)의 경우 2.5% NaCl 용액 제조 시 동결 보호제(cryoprotectant)인 glycerol을 25%(V/V) 첨가하였다(8, 9).

### 세포 재활성

각 온도에 저장된 시료 일정량(1 mL)을 NaCl이 함유된 액체 배지 10 mL가 들어있는 100 mL 삼각플라스크에 접종하여 20°C, 100 rpm의 회전식 진탕기에서 15시간 동안 진탕 배양한 후 세포 재활성에 따른 세포 성장률과 생체 발광도를 측정하였다. 염이온을 이용한 세포 재활성의 경우 세포 활성제로서 2.5%(W/V) NaCl 용액을 사용하였으며, 저장된 시료를 상온에 꺼낸 즉시 측정 시료와 동일 부피의 NaCl 용액을 첨가한 후 생체 발광도를 측정하였다(9).

### 세포 농도 측정

측정 시료 1 mL를 cuvette에 취한 후, UV-visible spectrophotometer(Shimadzu Co., UV-1201, Japan)를 이용하여 660 nm에서 실온(20~25°C) 측정하였다.

### 생균수 측정

평판세기 방법(plate count)으로서 표면 평판법(spread plate)을 이용하였으며, 적절한 수의 집락을 얻기 위해 각 시료를 10배율로 희석하였다. 2.5%(W/V) NaCl 용액으로 연속 희석한 시료 일정

량(< 0.1 mL)을 NaCl이 함유된 한천 평판 배지에 도말하여 20°C에서 48~96시간 동안 배양한 후 형성된 집락을 계수하였다. 측정상 오차를 줄이기 위해 한 시료당 세 개의 샘플을 준비하였으며, 형성된 집락의 평균치를 구하였다(7).

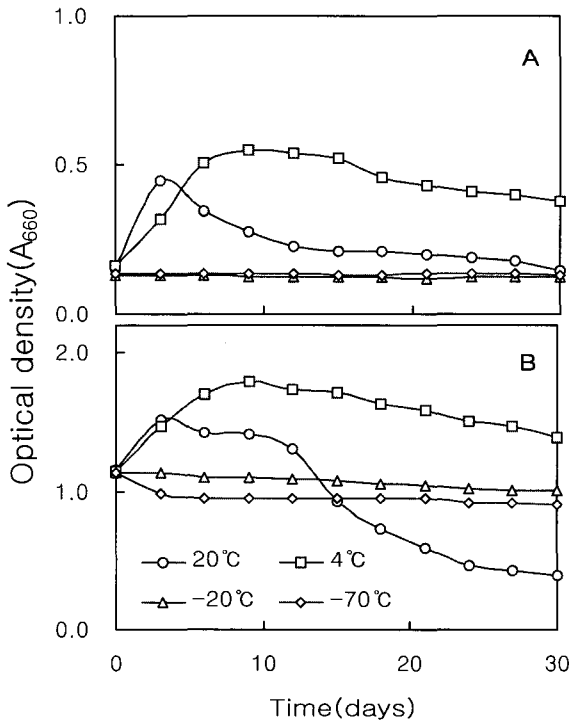
### Bioluminescence 측정

측정 시료를 2.5%(W/V) NaCl 용액으로 10<sup>3</sup>배 희석하여 luminometer tube(Sarstedt Rohren-Tubes No. 55476, Germany) (75×12 mm, 5 mL)에 0.2mL를 취한 후, Berthold(Germany)로부터 구입한 luminometer(Lumat. LB, 9507)를 사용하여 0.1초간 실온(20~25°C)에서 측정하였다. Bioluminescence의 단위는 RLU(Relative Light Unit)로서 일정 시간 시료에서 발생하는 빛의 양을 mV로 표현한 것이다(8).

### 결과 및 고찰

#### 세포 농도 측정

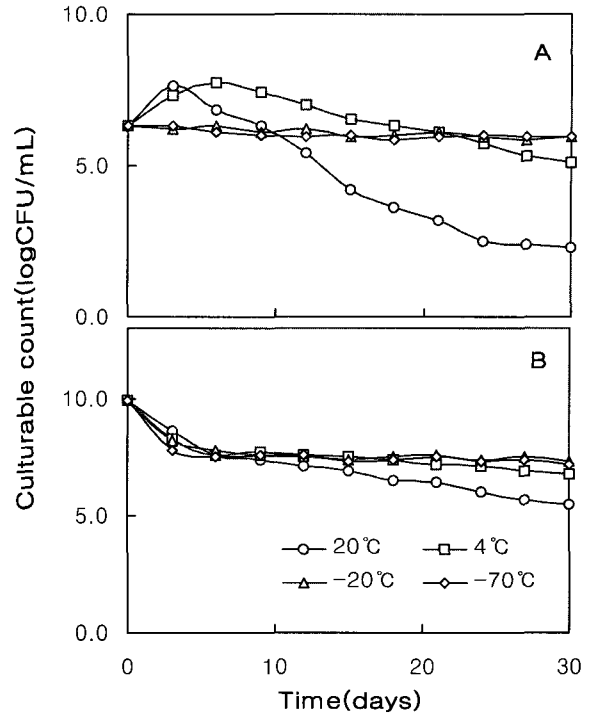
미생물의 생장은 세포 질량의 변화로부터 측정할 수 있다. 세포 질량의 상대적 측정법인 흡광도 측정법을 이용하여 저장 온도에 따른 세포 농도의 변화를 측정하였다. 일반적으로 미생물은 -30°C 부근에서 세포 생장이 이루어지지 않는다(3). 이와 일치하게 냉동 저장(-20°C, -70°C)한 세포의 농도는 측정 기간 동안 일정 값(0.12~0.13 A<sub>660</sub>)을 유지하였다(Figure 1A). 이와는 대조적으로 20°C에 저장한 세포의 농도는 세포가 성장함에 따라 저장 3일 최고 0.45까지 증가하여 가장 빠른 성장을 나타내었으며, 4°C의 경우 세포 농도의 증가 속도는 느려 저장 6일째 최고 값에 도달하였으나, 그 값은 20°C보다 높아 초기 값(≈0.16)의 3배 이상의 증가를 나타내었다. 시간이 지남에 따라 세포 농도는 오히려 감소하여 4°C에 저장한 세포의 최종 농도는 0.40을 기록하였으며, 20°C의 경우 최고 값(≈0.45)의 약 1/3 수준으로 감소하여 4°C에 비해 약 3배 빠른 감소를 나타내었다. 이는 세포 분해(cell lysis) 현상으로서 제한된 환경에 처한 미생물은 필수 영양소가 소진되거나 유해 물질이 축적되면 세포의 생장이 정지되고, 사멸기(death phase)에 이른다. 이때 세포의 사멸과 함께 세포 분해가 일어나며, 그 결과 세포 농도는 감소하게 된다(10). 각 온도에 저장한 세포를 새 액체 배지에 접종하여 20°C, 100 rpm에서 15시간 진탕 배양한 후, 세포 농도 변화를 측정하였다. 이때 20°C를 제외한 모든 세포(-20°C, -70°C, 4°C)에서 세포 응집(cell clump) 현상이 일어났으며, 시간이 지남에 따라 응집 정도가 강하게 나타났다. *P. phosphoreum*은 산소 농도에 민감하여 빠른 속도로 진탕 배양 시 세포 응집 현상이 일어나며, 이때 교반 속도를 낮추면 응집된 세포가 다시 완화되는 것으로 보고된 바 있다(11). 이에 따라 진탕 배양의 속도를 100 rpm 이하로 낮춰 배양하였으나, 응집 현상은 계속되어 인위적으로 교반기(vortex)를 이용하여 응집된 세포를 완화시킨 후 흡광도를 측정하였다. 세포의 재활성 시 냉동 저장한 세포의 농도는 0.90~1.13으로 증가하여 -20°C의 경우 최고 8.8배의 증가를 보였으며, 저장 기간 동안 일정한 성장을 나타내었다(Figure 1B). 반면 20°C의 경우 저장 12일 동안 3~6배(1.30~1.52)의 증가를 나타내 높은 성장을 보였으나, 12일 이후 0.30~0.90 수준으로 급격히 감소하여 4°C에 비해 불규칙한 세포 활성도를 나타내었다.



**Figure 1.** Changes in concentrations of total cells following storage temperature (A) and reactivation of stored cells in fresh liquid medium (B). Cell density was determined at 660 nm, 25°C.

**생균수 측정**

생균이란 증식할 수 있고 자세포를 형성할 수 있는 세포로서, 생균수의 변화를 통해 세포의 성장과 생존을 조사할 수 있다. 표면 평판법을 이용한 생균수 측정을 통해 저장 온도에 따른 세포의 생존과 재활성에 따른 세포의 성장을 측정하였으며, 상용대수로 표현하였다(3). 적정 농도로 희석된 세포 일정량을 도말하여 24시간 배양 후 세포 집락이 형성되기 시작하였으며, 48시간 이후 모든 집락이 형성되었다. 세포 집락의 형성 시기는 저장 온도와 기간에 따라 다소 차이를 나타내 냉동 저장한 세포 특히 -70°C의 경우 72시간 배양 이후 세포 집락이 형성되었으며, 저장 기간이 길어질수록 집락 형성 시기가 늦춰져 최고 96시간까지 소요되었다. -20°C와 -70°C에 저장한 세포의 생균수는  $9 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  CFU/mL로서 저장 기간 동안 비교적 초기 생균수 ( $2 \times 10^6$ )의 범위를 유지하였다(Figure 2A). 냉동 저장된 미생물은 생장이 억제되지만 사멸하지는 않는다. 이는 동결 보호제인 glycerol의 효과로서 세포 안으로 침투된 glycerol은 냉동에 의한 심한 탈수 현상을 방지하여 세포를 보호하며, 냉동에 대한 세포의 감수성에 영향을 미치지 때문이다(8, 9). 세포의 성장 속도는 생육 온도에 따라 달라진다. *P. phosphoreum*의 경우 생육 최적 온도인 18~20°C에서 최대 성장이 이루어지는 반면, 4°C의 낮은 온도에서는 느린 성장 속도를 나타낸다(2). 세포 성장에 따른 생균수의 증가로 20°C와 4°C에서 각각 저장 3일과 6일 최고 생균수 ( $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ )에 도달하였으며, 20°C에서 보다 빠른 세포 성장을 나타내었다. 저장에 따른 생균수의 감소는 특히 20°C에서 두드러져  $2 \times 10^2$ 의 최종 생균수를 기록하였으며, 4°C에 비해 빠른 속도로 사멸기에 접어들었다. 결과적으로 온도에 따른 세포의 성장 속도는 4°C의 경우 생육 최적 온도인 20°C의 1/2 수준으로 느린 반면, 저장 기간 동안 높은 생존을 나타내  $1 \times 10^5$

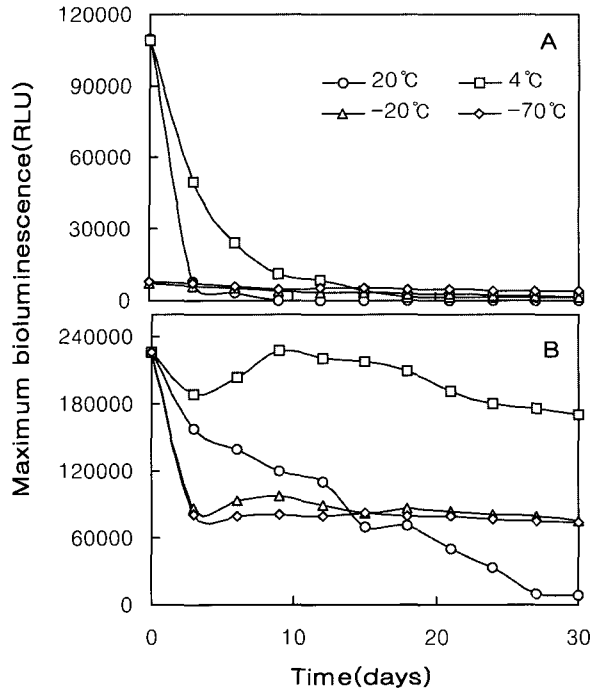


**Figure 2.** Changes in concentrations of culturable cells following storage temperature (A) and reactivation of stored cells in fresh liquid medium (B). Culturable cell enumeration was achieved by construction of a decimal dilution series of samples in the appropriate basal medium and spread plating 0.01-0.1 mL samples on triplicate plates.

의 최종 생균수를 나타내었다. 세포를 재활성함에 따라 냉동 저장한 세포의 경우  $4 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 까지 증가하여 가장 높은 세포 활성도를 나타내었으며, 저장 기간 동안 일정 수준을 유지하였다(Figure 2B). 20°C와 4°C의 경우 저장 초기 냉동 저장한 것에 비해 높은 증가를 보여 최고  $4 \times 10^8$  수준에 도달하였으나, 시간이 지남에 따라 감소하여 20°C의 경우  $3 \times 10^5$ 의 최종 생균수를 기록하여 가장 낮은 세포 활성도를 나타내었다.

**Bioluminescence 측정**

발광 미생물의 생체 발광은 세포 활성도에 따라 그 정도에 차이를 나타낸다. Luminometer 측정법은 단일 세포의 활성도를 반영하는 생균수 측정법과는 달리 총 세포의 활성을 나타낸다는 단점이 있으나, 민감성이 뛰어나고 비교적 간편하여 발광 미생물의 세포 활성도 측정에 유용하다(7). 각 온도에 저장된 세포를 꺼내어 2.5%(W/V) NaCl 용액으로  $10^3$ 배 희석한 후, 10시간 동안 bioluminescence를 측정하였으며, 최고 값에 이르는 시간을 기록하였다. 희석 직후 bioluminescence 측정 시 모든 세포의 생체 발광도는  $5 \times 10^3$  RLU 이하의 수준으로 낮은 세포 활성도를 나타내었으나, 시간이 지남에 따라 점차 증가하여 일정 시간 이후 최고 값에 도달하였으며, 저장 온도에 따라 세포 활성 시간에 다소 차이를 나타내었다. 4°C에 저장한 세포의 경우 측정 10분만에 최고 20배의 증가를 기록하여 가장 빠른 세포 활성도를 보였으나, 냉동 저장한 경우 세포가 활성화되기까지 30분 이상이 소요되어 4°C에 비해 낮은 세포 활성도를 나타내었으며, 저장 기간이 길어질수록 세포 활성 시간은 연장되어 4°C와 냉동 저장한 세포 각각 최고 20, 50분이 소요되었다. 이는 생체 발광 효소인 luciferase의 활성화와 관련된 것으로서 *P. phosphoreum*의

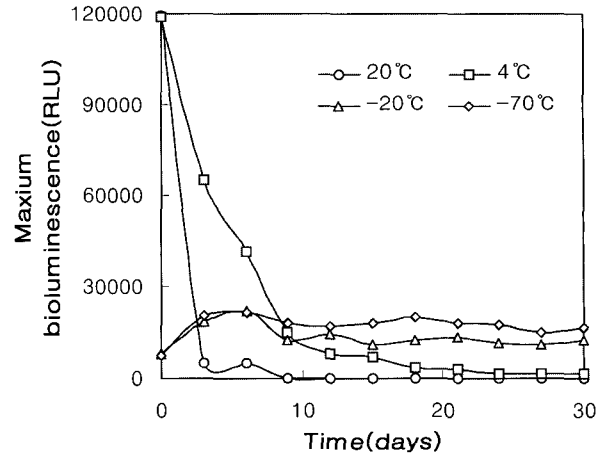


**Figure 3.** Changes in bioluminescence intensity of cells following storage temperature (A) and reactivation of stored cells in fresh liquid medium (B). The bioluminescence was measured in 0.2 mL samples diluted to  $10^3$  with 2.5%(W/V) NaCl solution and expressed as relative light units (RLU).

luciferase는 실온 즉, 20~25°C에서 최대 활성이 이루어진다. 따라서 저온 저장된 세포가 활성화되기 위해서는 일정 시간이 요구되며, 냉동 저장된 세포일수록 오랜 시간이 소요된다(5, 8). 냉동 저장한 세포의 경우 glycerol 첨가 시 생체 발광도는 초기 값 ( $1 \times 10^5$ )의 약 1/16 수준으로 급격히 감소하였으며, 저장 이후에도  $1 \times 10^3$  수준으로 유지되었다(Figure 3A). 저장 15일 동안 가장 높은 생체 발광 유지도를 보인 것은 4°C에 저장한 세포로서 3일 간격으로 약 1/2 정도의 낮은 감소를 보였으나, 이후 냉동 저장한 세포와 동일한 수준으로 감소하였다. 생체 발광 감소는 20°C에서 가장 두드러져 저장 3일 초기 값의 1/15 수준인  $7 \times 10^4$ 을 나타내었으며, 3일 이후 세포의 생체 발광은 거의 소멸되었다. 새 액체 배지를 이용한 세포의 재활성 시 냉동 저장한 세포의 생체 발광도는 시간이 지남에 따라 약간의 감소를 나타내었으나, 저장 기간 비교적 일정한 값( $7 \sim 9 \times 10^4$ )을 유지하였다(Figure 3B). 20°C의 경우 세포 활성도의 감소는 저장 기간과 비례하여 최종  $8 \times 10^3$ 의 생체 발광도를 나타내었으나, 4°C에 저장한 세포는 저장 12일 동안 생체 발광도의 일정한 증가를 나타내 최고  $2 \times 10^5$  수준에 도달하였으며, 이후에도 높은 생체 발광 유지도를 보여 최종  $2 \times 10^5$ 의 낮은 감소를 나타내었다.

#### 염 이온 첨가에 따른 세포의 활성도 측정

해양 발광 미생물의 성장과 생체 발광은 이온 세기와 밀접한 관련이 있으며, 발광 미생물에 따라 요구되는 최적 이온 농도는 다르지만, 일반적으로 1~4%의 염 이온에서 최대 성장과 생체 발광이 이루어진다. *P. phosphoreum*의 성장과 생체 발광은 염 이온의 농도에 의해 독립적으로 영향을 받아 3% NaCl 이상의 고농도에서 최고 생체 발광도를 나타내는 반면, 세포의 최대 생



**Figure 4.** Changes in bioluminescence intensity of stored cells following addition of NaCl solution. 2.5%(W/V) NaCl solution was added to stored cells and luminescence was measured for 10 hrs.

장은 그 이하의 낮은 농도에서 이루어는 것으로 보고된 바 있다(4, 6). 예비 실험으로 1~4% NaCl 용액을 사용하여 세포 배양액을 희석한 후 생체 발광도를 측정된 결과 2.5%와 3%로 희석한 경우 세포의 생체 발광 유지도가 높았으며, 그 정도에는 큰 차이를 나타내지 않았다. 이에 따라 세포 저장 시와 동일한 농도인 2.5%(W/V) NaCl 용액을 세포 활성제로 사용하여 각 온도에 저장된 세포의 bioluminescence를 측정하였으며, 최고 생체 발광도에 도달한 시간을 기록하였다. 염 이온의 첨가에 따른 가장 큰 효과는 세포 활성 시간의 단축으로서, 4°C에 비해 냉동 저장한 세포에서 그 효과는 더욱 두드러져 약 20분 정도 활성 시간이 단축되었으나, 장기간 저장함에 따라 염 이온에 의한 효과는 감소되었다. 생체 발광도의 증가와 관련하여 냉동 저장한 세포 특히 -70°C의 경우 최고 4.3배의 증가를 나타내 가장 높은 세포 활성도를 나타내었으며, 측정 기간  $1 \sim 2 \times 10^4$  RLU 수준의 일정한 세포 활성도를 유지하였다(Figure 4). 4°C의 경우 최종  $1 \times 10^3$  수준으로 감소하여 냉동 저장한 세포에 비해 다소 낮은 세포 활성도를 보였으나, 저장 기간 1~2배의 일정한 증가를 나타내었다. 이와는 대조적으로 20°C에 저장한 세포의 경우 세포 활성 시간의 단축은 물론 생체 발광도의 증가를 보이지 않고 경우에 따라 오히려 감소하는 현상을 나타내었으며, 저장 기간 동안  $1 \times 10^2$ 의 가장 낮은 세포 활성도를 유지하였다.

#### 요 약

*P. phosphoreum*의 성장과 생존률은 저장 온도에 따라 그 정도를 달리하였다. 흡광도와 표면 평판법을 이용하여 측정된 세포 농도와 생균수는 냉동 저장한 세포의 경우 glycerol의 보호 작용으로 측정 기간 동안 비교적 일정한 값을 유지하였다. 이와는 달리 4°C와 20°C에 저장한 세포는 뚜렷한 변화를 나타내, 저장 초기 세포가 성장함에 따라 세포 농도와 생균수의 높은 증가를 보였으나, 일정 시간 이후 세포 분해에 따른 감소를 나타내었다. 이때 생육 최적 온도인 20°C에서 약 2배 빠른 성장 속도를 나타내었으며, 사멸기에 이르는 속도 역시 4°C에 비해 높게 나타났다. 세포의 생체 발광도와 관련하여 가장 높은 유지도를 나타낸 것은 4°C에 저장한 세포로서 저

장 12일 동안  $1 \times 10^4 \sim 10^5$  RLU의 값을 유지한 반면, 20°C의 경우 저장 3일 만에 생체 발광이 거의 소멸되었다. 각 온도에 저장된 세포를 새 액체 배지에 배양함에 따라 세포는 빠른 속도로 활성화되었으며, 세포 활성화도는 저장 기간 동안 비교적 일정하였으나, 20°C에 저장한 세포의 활성화도는 시간이 지남에 따라 급격히 감소하였다. 세포의 생체 발광에 미치는 염이온의 효과는 세포 활성 시간의 단축과 생체 발광도 증가로서 4°C와 냉동 저장한 세포 특히 -70°C에서 두드러져 최고 8배의 증가율을 나타내었다.

### 참 고 문 헌

1. Lee, J. H. and Chun, U. H., (1996), Monitoring of Environmental Pollutants With *Photobacterium phosphoreum* Immobilized on Strontium Alginate(I), *유전 공학 논문집* **8**, 48-55
2. Baumann, P. and L. Baumann (1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **1**, 539-545.
3. Brock, D. T. and M. T. Madigan (1994), *Biology of microorganism*, 7th ed., pp. 321-360, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
4. Hastings, J. W., C. J. Potrikus, S. C. Gupta, M. Kurfurst, and J. C. Makemson (1985), Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria, *Adv. Microbial Physiol.* **26**, 235-291.
5. Reeve, C. A. and T. O. Baldwin (1981), Luciferase inactivation in the luminous marine bacterium *Vibrio harveyi*, *J. Bacteriol.* **146**, 1038-1045.
6. Hastings, J. W., J. Makemson, and P. V. Dunlap (1987), How are growth and luminescence regulated independently in light organ symbionts?, *Symbiosis.* **4**, 3-24.
7. Duncan, S., L. A. Glover., K. Killham, and J. Prosser (1994), Luminescence-based detection of activity of starved and viable but nonculturable bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1308-1316.
8. Lee, J. H. and U. H. Chun (1996), Monitoring of environmental pollutants with *Photobacterium phosphoreum* immobilized on strontium alginate(II), *유전 공학 논문집* **8**, 56-63.
9. Chang, H. H., E. Tamiya., T. Takeuchi, and I. Karube (1993), A novel BOD sensor based on bacterial luminescence, *Bio-technol. Bioeng.* **41**, 1107-1111.
10. Roszak, D. B. and R. R. Colwell (1987), Survival strategies in the natural environment, *Microbiol. Rev.* **51**, 365-379.
11. Nealson, K. H. (1978), Isolation, identification, and manipulation of luminous bacteria, *Meth. Enzymol.* **57**, 153-166.