

환경오염과 식품공업 측정용 미생물 바이오센서

*김 의 락

계명대학교 자연과학부 화학과
(접수 : 2002. 6. 3., 게재승인 : 2002. 6. 25.)

Microbial Biosensors for Environmental and Food Industrial Applications

Ui Rak Kim*

Department of Chemistry, Keimyung University, 1000-Shyndang-Dong, Dalshyu-Ku, Daegu 704-701, Korea
(Received : 2002. 6. 3., Accepted : 2002. 6. 25.)

To date, the majority of biosensor technologic use binding components such as enzymes antibodies, nucleic acids and protein ligands. In contrast, the goal underlying the use of cells and tissues of animals and plants for a sensor system is to obtain systems capable of extracting information based on the biological activity, mechanisms of action and consequences of exposure to a chemical or biological agent of interest. These systems enable the interrogation of more complex biological response and offer the potential to gather higher information content from measuring physiologic and metabolic response. In these articles, some of the recent trends and applications of microbial biosensors in environmental monitoring and for use in food and fermentations have been reviewed. This endeavor presents many technological challenges to fabricate new microbial biosensors for other scientific field.

Key Words : microbial biosensors, immobilization, permeabilisation, DNA technology, metabolic engineering food biosensors, environmental biosensors.

서 론

바이오센서는 생물체 내에 존재하는 물질 중 특정한 화학 물질을 인식하여 검지하는 포착기능(receptor)부분과 검지된 물질의 농도에 비례하여, 측정 가능한 신호를 발생하게 하는 신호변환기능(transducer)부분으로 구성되어 있다. 포착 기능 물질로써 특정화학물질을 선택적으로 식별할 수 있는 기질선택성과 반응특이성의 기능을 가진 효소와 이들 효소를 포함하고 있는 미생물, 세포내 소기관(organelles), 동물이나 식물의 세포나 조직 그리고 항원, 항체, DNA, receptor등을 고분자 담체(carrier)로 고정화하던가 또는 그대로 사용하여 기능성 막을 만들고 이 기능성 막에서 특정물질을 선택적으로 포착한다. 이와 같이 포착된 물질의 농도는 전기활성물질인 경우에는 전극 또는 반도체소자로, 또 막에서 일어난 반응이 발광반응과 연결시킬 수 있는 경우에는 photon counter로, 반응열의 변화인 경우에는 thermistor로, 그리고 진동자의 진동 변화는 음파검출기를 통하여 전기신호로 변환시킬 수 있다.

여러 가지 화학 변화를 전기신호로 변환하여 검출하는 바이오센서의 종류로는 첫째 효소의 기능을 이용한 효소 바이오센서, 미생물 바이오센서, 조직 바이오센서, 오르가넬 바이오센서 등과 같은 biocatalytic biosensor와 면역 바이오센서, receptor 바이오센서, DNA 바이오센서와 같은 bioaffinity biosensor로 나눌 수 있다. 신호 변환기능의 종류에 따라 전극성 바이오센서, thermistor형 바이오센서, 생물화학발광형 바이오센서, 광학형 바이오센서, 질량변화 측정형 바이오센서 그리고 반도체형 바이오센서 등으로 구별된다. 그러나 이들의 구별이 명확한 것이 아니라 바이오센서의 종류에 따라 포착기능 부분과 신호변환기능 부분 중 어느 한쪽 기능부분에 중점을 두어 바이오센서의 종류가 분류된다(1-3). 바이오센서의 선택성과 수명은 생체물질의 특이성과 안정성에 의존하므로 생물활성표면(bioactive surface)의 제조와 활성분자의 인식 기능의 보존은 바이오센서 개발에서 가장 중요한 문제이다. 센서가 갖추어야할 요건은 감도(sensitivity)가 높고, 선택성(selectivity)이 좋고, 안정도(stability)가 커야하는 3S와 복귀도(reversibility), 신뢰도(reliability), 재생산성(reproducibility)이 좋은 3R이 요구되며, 그 외 부대요건으로서의 사용의 간편성, 기능성, 적응성, 규격성, 보존성, 정확성이 좋아야 한다.

이 중 미생물 바이오 센서는 효소나 항체와 같은 생 감지 물질(biological sensing elements)을 사용하지 않고 세포(cell)를 직접 고정화한 감지막을 산소전극과 같은 적절한 측정 디

† Corresponding Author : Department of Chemistry, Keimyung University, 1000-Shyndang-Dong, Dalshyu-Ku, Daegu 704-701, Korea

Tel : +82-53-580-5181, Fax : +82-53-580-5164

E-mail : kur@kmu.ac.kr

바이스와 결합하여, 측정 물질에 대응한 세포 내 대사물질의 활동도 변화를 측정하여, 시료의 양을 검출하는 기구이다. 세포 내에서는 whole cell에서와 같이 여러 가지 효소들이 존재하며, 이들 중 한 효소의 전환(turn over)에 영향을 미치는 모든 기질들이, 측정하려고 하는 세포의 대사 활동도에 영향을 미친다. 그러므로 미생물 센서는 물의 수질, 토양이나 하수 내 유독성 오염 물질을 측정하는데 유용하게 사용된다(4). 대부분 미생물 바이오 센서는 세포를 막 위에 고정하던가(5) 고분자 물질로 봉합하여 전극에 직접 부착하여 사용한다(6). 그러나 whole cell을 전극에 직접 고정화하는데는 여러 가지 문제점이 있다(7).

- Whole cell은 전극표면에 직접 공유결합 (covalent)으로 흡착이나 부착시킬 수 없기 때문에 막이나 고분자 화합물 속에 고정화하지 않으면 안 된다.
- 사용한 고분자 화합물은 세포에 독성이 없어야 하고, 시료용액을 계속 흘러 보낼 동안 전극에 붙어 있어야 하고, 또 측정하려는 물질에 대한 투과성이 항상 유지되지 않으면 안 된다.
- 일반적으로 세포고정화를 screen-인쇄 구조와 같이 평면으로 하기 때문에 전극 윗면에 올려놓기가 어렵다.

그러나 미생물 바이오 센서가 가지는 장점은 미생물이 도처에 존재하고, 넓은 범위의 화학물질에 작용하며, 여러 가지 조건에 적응하는 능력을 가지고 있다. 또 미생물(microbes)들은 DNA 재결합 기술이나 변이(mutation)에 의하여 유전적 변형(genetic modification)이 쉽게 일어나므로, 이를 이용하여 세포 내 효소의 기능을, 변형시켜 활성도를 증가 또는 감소시킬 수 있다.

오늘날까지 알려진 효소의 90% 이상이 세포 내에 존재하기 때문에 세포 이용도는 여러 가지 공정과정에서 정제 효소의 대체 물질로 사용되며, 연속적으로 많은 종류의 효소를 필요로 하는 공정에서는 다목적 촉매로 작용한다(8,9). 일반적으로 세포로부터 정제된 효소는 높은 분석적 특이성 (specificity)과 특이활성(activity) 때문에 바이오 센서 제작에 가장 널리 사용되어지지만 정제 시간이 많이 걸리고, 비용이 비싸고, 중금속과 같은 외부 독성 물질과 주위 환경에 의한 비활성화를 막을 수 없고, 불안정하기 때문에 적용 한계성이 좁다.

Whole cell은 생활력(viable form)이 있는 것과 없는 것(non viable form)이 있고, 생활력이 있는 세포만이 바이오 센서 제작이 가능하다(10-12). 생활력이 있는 미생물은 혐기적(anaerobically) 또는 호기적(aerobically)으로 여러 가지 유기화합물을 대사시켜 변환기를 이용하여 측정 가능한 산(acids)이나 암모니아, 이산화탄소 같은 여러 가지 최종물질을 생성시킨다. 생활력을 이용한 미생물 바이오 센서는 BOD측정 경우와 같이 미생물의 모든 기질 동화(assimilation)능력이 호흡대사 활성력(respiratory metabolic activity)을 지표로써 사용하는 경우(10)와 환경오염 물질과 같이 분석하려고 하는 물질에 의하여 미생물의 호흡억제 작용력을 지표(11)로 사용하는 두 가지 경우가 있다.

Whole cell을 사용할 경우에는 세포막을 통하여 기질과 생성물의 확산이 일어나므로, 효소를 이용할 경우에 비하여 응다이 니리크(13) 세포를 무리져(여러다가 노이는 바변) 하

학적(유기용매/계면활성제 사용) 또는 효소(lysozyme, papain)를 처리하여 침투성이 좋은 세포(permeabilised cell)로 만들어 사용한다(9,14).

화학적으로 가장 널리 사용하는 방법은 toluene, chloroform, ethanol 그리고 butanol과 N-cetyl-N,N,N-trimethyl ammonium bromide(CTAB), Na-deoxycholate 그리고 digitonin 같은 계면 활성제를 이용하여(14) 세포막으로부터 지방질의 제거에 의하여 기공을 생성시킨다. 이것을 통하여 세포 안에 있는 효소와 같은 대부분의 거대분자들은 세포 내에 그대로 잔존하지만, 저 분자량인 기질(substrates)은 세포막 안으로 들어가고, 대사 생성물은 밖으로 자유로이 확산된다. 그러나 침투과정(permeabilisation process)법은 세포를 비활성(nonviable)으로 만들 수도 있으므로 glucose oxidase, β -galactosidase, amino acid oxidase, invertase와 같이 대사호흡(metabolic respiration)이나 보조인자(cofactor) 재생이 필요하지 않는 바이오 센서 제작에 응용되어진다(9,15-17).

박테리아 안에 urease나 phosphatase(18,19), 효모 안의 invertase나 catalase(16) 같은 주변 세포질 효소(periplasmic enzymes)인 경우에는 whole cell을 침투과정을 거치지 않고 사용한다.

최근 개선된 방법 중 하나는 세포 내 효소(intracellular enzyme)를 수송하기 위하여 세포를 교묘히 처리하던가 또는 효소가 떨어지지 않게 주변 세포질 내(periplasmic space)에 붙인다. 즉, 유기인 가수분해 효소(organophosphorus hydrolase, OPH) 표면을 가진 재 조합된 *E. coli* 세포를 얻기 위하여 사용되었다. 이들 세포들은 세포질 내의 유기인 분해효소(OPH)로 조작된 세포는 확산 한계(13) 등이 없이 더 능률적으로 유기인 물질을 떼어낼 수 있다(20,21). 이는 미생물 바이오 센서 제작에 있어서 세포구조와 활동도에 영향을 주지 않고, 확산할 때 막이 가지는 문제점을 줄이는 중요한 방법들이다. 그리고 세포의 생 활성력(cell viability)의 소실을 가져오는 화학적 방법으로 만든 침투세포(permeabilised cell)와는 차이가 있다.

유전적 연구 방법은 단백질, 녹말, 지방과 같은 고분자 물질이 대사 되기 전에 단위분자(monomer)로 분해되는 물질을 측정하는 센서 즉, BOD센서 같은 센서 제작을 위하여 아주 유망한 방법이 된다.

Whole cell을 사용하면 정제된 효소로 제작된 바이오 센서에 비하여 특이성이 낮다. 이와 같은 현상은 주로 세포 안에 있는 다른 효소들에 의하여 원하지 않는 부반응(side reaction)이 일어나기 때문이다.

비특이성 반응을 최소로 하기 위하여 몇 가지 방법들이 연구되었다. 즉, 세포의 침투성(permeabilisation)으로 대부분 저 분자량인 보조인자(cofactor)들을 줄임으로써 원하지 않는 부반응을 최소화 할 수 있다(22).

세포 내 β -galactosidase를 포함하는 효모 whole cell은 lactose를 ethanol과 CO₂로만 변화시킨다. 그러나 침투성 세포는 세포 내에서 보조인자(cofactor)의 상실로 lactose를 단지 glucose와 galactose로만 변화시킨다(23,24).

세포 내 다른 효소의 존재로 일어나는 부반응을, 물리나 화학적 수단에 의하여, 효소를 비활성화 하여, 작용을 억제시킨 것으로 침투성 할 수도 있다(10).

일반적으로 생 활성 세포로 만들어진 바이오 센서에 있어서, 특히 중요한 것으로 원하지 않는 대사 과정이나 또는 수송계를 차단시키는 방법이다. 즉 *Bacillus subtilis*에 의하여 glucose 존재 하에서 glutamic acid를 정량할 때 glucose 흡입 운반체(uptake carrier)로 chloromercuribenzoate와 같은 thiol 방해제(thiol inhibitor)를 사용하거나, NaF에 의하여 glycolysis를 가역적으로 방해시켜 glucose의 영향을 차단시킨다(25).

r-DNA 기술 개발은 가까운 장래에 필요한 효소를 대량 포함하는 세포의 생산과 부반응을 촉진시키는 효소의 양을 줄이는 데 도움을 줄 것이다.

바이오 센서 제작에 사용되어지는 특이 미생물 종(specific microbial species)의 특성 기질(characteristic substrate) spectrum이 시료 안에 존재하는 화합물의 spectrum과 일치할 수도 있고, 같지 않을 수도 있으므로 적당한 배양법의 선택은 대단히 중요하다. 적당한 기질을 포함하는 배양액에 의하여, 필요한 대사 과정을 유도하는 미생물의 변형기술이 종종 필요하다(26,27).

Phenols의 혼합물 같은 복합기질의 생화학적 분해(biochemical degradation)를 위하여 폐수처리공장(waste treatment plants)에서 얻은 활성 sludge를 이용하면, 순수 배양에 의한 미생물보다 새 환경에 길들여진 여러 가지 종류의 미생물이 들어 있는 미생물 혼합물으로써 작용한다(28).

활성 sludge를 이용한 BOD측정용 바이오 센서가 최근 발표되었다(29). 폐기물 속 특정 화합물을 대사 시킬 수 있도록 적응된 미생물들이 여러 종류의 폐수처리공장에서부터 얻어진 활성 sludge에서 분리하였다.

한두 가지 예를 들면, 할로젠화 탄수화물의 넓은 spectrum을 생 감지(biosensing)할 능력이 있는 actinomycetes같은 미생물(30) 그리고 음이온 계면 활성제 측정용 바이오 센서 제작 시 필요한 선형 알킬 벤젠 설펜화 분해 미생물(31) 등이 그것이다. 대부분의 호기성 미생물 바이오 센서는 계속 산소를 공급하지 않으면 안 된다. Perfluorodecaline 같은 합성 산소 운반체가 미생물 바이오 센서에 공급될 산소의 증가화(hyperoxygenation) 물질로 연구되어 졌다(32).

단일세포는 연속적인 반응에 필요한 모든 효소를 다 포함하지 않으므로 혼합 미생물의 배양이 더 유익함을 보였다. 예를 들면 sucrose와 lactose 바이오 센서 제작 시 glucose oxidase를 포함하는 *Gluconobacter oxydans*과 주변 세포질 내(periplastic) invertase를 포함하는 *Saccharomyces cerevisiae* 세포, 또는 세포 내(intracellular) β -galactosidase을 포함하는 침투성 *Kluyveromyces marxianus* 세포들과 결합하여 사용한다(16). Invertase와 β -galactosidase를 포함한 미생물 세포에 polyethylenimine(PEI)이나 lectins(concanavaline-A)를 사용하여 glucose oxidase를 접합시킨 것과 같이 부족한 효소를 세포벽 표면에 직접 결합시키는 방법도 가능성이 있음을 밝혀졌다(33).

발광 박테리아로부터 빛 발생을 이용한 미생물 바이오 센서는 여러 가지 생물계(biological system)에서 높은 감도와 빠르고 비침해성 분석법으로 응용되어진다(34,35). 생 발광 박테리아는 자연 중 해상(*vibrio fischeri*)으로부터 육상(*Photorhabdus luminescens*)까지 넓은 서식 범위를 가진다. 유전공학적으로 변형시킨 미생물(genetically engineered microorganism, GEM)을

이용한 생 발광 whole cell 바이오 센서들은 중금속 오염, 살충제, 유기물 검출을 위하여 개발되었다. 이들 바이오 센서는 분석하려는 물질을 인식하는 프로모터 인자(promotor)의 조절 하에 있는 luciferase를 붙이기 위하여 암호화(code)한 유전자 안에, 염색체와는 별도로 존재하고, 복제 증식이 가능한, 유전 인자인 구조 플라스미드(plasmid)를 가진 미생물을 사용한다. 그러한 미생물이 유기오염물질(organic pollutants)을 대사 할 때 유전조절기구는 발광 측정기(luminometer)에 의하여 측정될 수 있는 광을 발생하는 luciferase을 생산 한다.

전사 활성화(transcriptional activation)의 측정은 프로모터 요소(promotor element)의 융합(fusion)으로 리포터 유전인자(reporter gene)에 의하여 이루어진다. 광 발생에 대응되는 유용한 리포터 계(reporter system)는 해양 박테리아 *V. fischeri*로부터 추출한 유전자의 형질 발현 유전단위인, 생 발광 오페론(bioluminescence operon)의 다섯 가지 구조의 유전인자, luxCDABE로 만들어진다. luxCDE 유전인자는 지방산 사이클(fatty acid cycle)로부터 전구체(precursors)들을 사용하여 luciferase의 기질(지방산 알데히드)을 합성하는 효소 복합체(지방산 환원효소, 합성효소 그리고 전달효소)에 암호화(encode)하고 luxAB 유전인자는 luciferase 효소에 암호화(encode)한다(36).

환경오염 측정을 위한 또 한가지 방법은 나쁜 조건(adverse condition)으로부터 유도된 유전자 발현 방식(gene expression patterns)의 변화를 검출하는 것이다. 특정한 화학물질의 존재 하에서 광 발생을 증가시키는 박테리균주들(bacterial strains)은 전사 응답(transcriptional responses)의 리포터(reporter)로써 생발광 유전인자(lux)를 사용하여 생산한다. 그 예로서는 naphthalene, salicylate 그리고 다른 치환 유도체에 대하여 광을 발생하는 *Pseudomonas fluorescens* HK44는 lux로 된 생발광 생리포터(bioluminescent bioreporter)이다(37,38).

상보적 방법(complementary approach)으로는 예상되는 오염 물질에 대한 사전지식 없이 유해조건에 일반적인 지표로써 낮은 특이 스트레스 응답(specific stress responses)을 사용한다. 예로써 많은 종류의 대기오염 스트레스는 열충격응답(heat shock response)을 일으킨다(39). lux 리포터(reporter)에 융합된 열충격 프로모터(heat shock promoter) grpE. dnaK 또는 lon을 포함하는 *E. coli* 균주는 여러 가지 화학물질에 대응하여 발광을 증가시킨다(40). 세포 내 소기관인 오르가넬리(organelles)는 whole cell과 정제된 효소의 중간으로 다기능성 생촉매를 포함하고 있으며 바이오 센서 제작에 이용되고 있다.

염록소(chloroplasts) 내의 일차 광 유도 전하 분리단계에서 생성된 전하는 전극에 이동될 수 있다. 체초제, 중금속 등과 같은 화학물질들은 일반적으로 광계II 의존 전자흐름(photo-system II-dependent flow)을 방해한다. 이러한 성질을 이용하여 염록소(chloroplasts)나 thylakoid 막 같은 세포 내 소기관을 바이오 센서 제작에 사용한다.

세포나 세포 내 소기관(organelles)이외에 식물조직도 바이오 센서 제작에서 생인식 부분(biological recognition elements)으로 사용 가능성이 높다. 예를 들면 Tyrosine 측정을 위한 사탕무의 얇은 조각, glutamate 측정을 위한 호박의 중과피 얇은 조각(squash mesocarp slice), malate 측정을 위한 옥수수 잎의 유관속초 세포(41), L-arginine 측정을 위

한 무궁화 꽃받침 조직(42), L-glutamine 측정을 위한 wistar 쥐의 간조직(43), L-ascorbate 나 phenol 측정을 위한 오이나 호박껍질을 이용한 조직 바이오 센서(tissue-biosensor)가 연구 발표되었다. Polyphenol oxidase를 많이 포함하고 있는 감자(*solanum tuberosum*)의 얇은 조각을 산소전극과 연결하여 atrazine과 같은 다 phenol(polyphenol) 또는 단 phenol(monophenol) 측정에 사용하였다(44).

역제제 측정을 위하여 버섯조직을 이용한 바이오 센서연구 결과가 보고되고, 최근에는 환경오염수(environmental waters)를 현장(on-site)측정을 위하여 배양된 사람 hepatoblastoma Hep G2 세포를 이용하여 빠르고, 감도가 높은 생분석 디바이스(bioassay device)의 연구가 보고되었다(45).

생체물질의 고정화(Immobilization of biomaterials)

바이오 센서의 원리는 변환기 아주 가까운 데에서 일어나는 생체 물질(biological materials)의 물리화학적 변화를 측정하는 것이다. 그러므로 생체물질의 고정화 기술은 대단히 중요하다(17). 고정화는 생체물질과 변환기 사이를 아주 가깝게 할 뿐만 아니라 재 사용하기 위하여 생체물질을 안정화하는데도 사용되어진다. 생체물질을 변환기 위에 직접 고정화하거나 대부분은 막(membrane) 안에 고정화하여 변환기 위에 사용한다. 고정화 방법은 교차결합(cross linking), 공유결합, 봉합(entrapment), 흡착(adsorption)을 통하여 또는 이들 방법을 서로 혼용하여 고정화한다(8).

고정화 방법과 사용되어지는 생체물질은 기질의 성질과 사용되는 변환기의 종류에 따라 결정된다. 막 제조의 기술과 지지물질의 선택은 낮은 확산저항(diffusional resistance)을 가지는 물질을 이용한다(46).

일반적으로 흡착이나 봉합법은 생활력(viability)이 있는 세포를 고정할 때 사용되어지고, 공유결합법은 효소나 항체를 고정할 때 사용되어 지지만 고정화 재료물질이 가지는 강력한 반응기(potent reactive group)에 노출된다든가 또는 생활력(viability)에 영향을 주는 나쁜 반응조건으로의 노출로 활성도가 감소 될 수도 있다. 또 계속 사용되는 동안 세포구조가 원상 그대로의 보존이 어렵고, 이로 인하여 세포 내 효소의 소실을 일으키게 한다. 이 방법은 봉합이나 다른 방법에 비하여 변환기 위에 올려놓을 수 있는 세포의 양이 적다.

Glutaraldehyde 같은 이작용기성(bifunctional reagents)시약을 사용한 교차 결합은 gelatine(16), albumine(47), 계란흰자(48) 같은 재료물질 속에 세포를 고정화하는데 널리 이용된다. 비록 이 기술이 공유결합성의 단점을 보완하기는 하지만 화학적 교차결합시약은 종종 세포의 생활력(cell viability)에 영향을 미친다.

안정한 미생물이 여러 가지 조건 하에서 사용하기에 적합하도록 제조되어야 한다. 그렇게 함으로써 세포질내 소기관(organelles)의 삼투 충격(osmotic shock)(49), 저염(low salt) 또는 염(salt)이 없는 환경 하에서 호염성 세포들(halophilic cells)의 분해(50), 공정과정에 존재하는 용해성 효소에 의하여 미생물의 분해 등을 막을 수 있다(51). 봉합과 흡착기술은 생활력 있는 세포를 고정화 할 때 투석막(dialysis membrane) 같은 막을 사용하는데, 구멍크기가 0.1~1.0 μm , 두께가 10~15 μm 를 가지는 원형으로 큰 기계적으로 안정한 막(outer

membrane)을 사용한다. 특히 polycarbonate나 polyphthalate (10)로 만든 막이 적합하며, 공정과정에서 사용하기 위하여 여러 가지 합성 또는 천연 고분자 젤(gels)들로 봉합하여 고정화한다(8,9,52). 이들 봉합기술 중 미생물 바이오 센서에는 polyacrylamide(53), polyurethane으로 만든 젤(gel)(54), 광교차 결합이 가능한 수지(resin)(55) 그리고 polyvinyl alcohol(PVA) (56) 등이 널리 사용된다. 그러나 고분자 물질들은 세포의 생활력을 잃게 할 가능성이 크다. 광교차 결합이 가능한 styrylpyridinium기를 가진 PVA는 보통조건(mild condition)하에서 소기관이나 세포를 봉합하여 센서제작에 사용되었다(57).

효소고정화의 가능성이 큰 polyacrylonitrile막(58)과 albumin-PEG(polyethylene glycol)수화겔(59)은 미생물센서제작의 가능성이 크고, 또 생체적합성이 좋은 albumin-PEG 수화겔은 체내 삽입용 바이오센서 제작에 유용하다(59). 세포봉합을 위하여 사용되어지는 천연고분자로는 alginate(60), carrageenan (53), 저용점 agarose(21), chitosan(61) 등이 생활성 세포고정화 시스템을 얻는데 대단히 유용하게 사용되어지는 것으로 알려져 있다. alginate는 2가나 3가 양이온(cation)을 사용하여 이온 이동성 겔을 만들어 그안에 세포를 봉합하는 방법은 세포고정화 기술에서 널리 사용되어진다(62). 그러나 Ca-alginate 겔은 공정과정액(processing solution)이나 폐수중에 존재하는 Ca-chelators로 인하여 막이나 비드(bead)가 불안정하여지든가 용해되는 것이 문제가 된다. 그러므로 Ca-alginate 안정화에 관한 연구보고가 많이 발표되었다. 그 예로써 gamma선으로 중합한 polyacrylamide로 보강하여 Ca-chelators에 대하여 안정화 시키기도한다(63). 봉합기술에서의 문제점은 기공봉합(open pore entrapment)을 이용하여 매트릭스의 다공성(porosity of matrix)을 증가시키므로, 봉합물질에 의하여 주어지는 추가 확산장벽(additional diffusional barrier)(64)을 감소시킬 수 있다. 그리하여 결합된 효소까지 모든 박테리아 세포들을 확산시키는 높은 다공성 스폰지형 단백질 매트릭스를 개발하였다(48). 효소센서의 감도는 효소와 여러종류의 매개물질과 결합시키므로서 증가시킬 수 있다(15). Whole cell에서는 매개물질이 전극 표면과 세포내 효소의 산화-환원을 일으키는 부위와 사이에 전자를 운반한다. 예를 들면 glucose oxidase을 포함하는 *Aspergillus niger*의 whole cell과 carbon paste속에 봉합한 ferrocene같은 매개물질을 이용하여 sensor를 제작하였다(65). Cellulose나 합성막의 표면위에 세포들을 부착시키거나 작은 구멍(pores)속에 세포들을 가두는가하는 방법도 보고되고 있다(15). 부착을 통한 세포고정화의 장점은 기질을 포함하는 액체상과 직접 작용시킬 수 있는 장점이 있다. 비록 세포와 액체상과 분리되어, 젤(gel)봉합법에서 볼 수 있는 물질전달문제(mass transfer problems)를 제거하거나 줄이지만, 봉합이나 부착법에서 나타나는 문제점은 연속 사용할 경우 세척에 의하여 세포가 씻겨져 나갈 가능성이 크다. 이러한 점을 개선하기 위하여 PEI(polyethylenimine)을 사용하여 유리나 면직물(cotton fabric)그리고 여러 가지 합성고분자 막 위에 고정화하는 방법들이 개발되었다(66). Urease 등 여러 가지 효소를 포함하는 많은 종류의 세포들이 이러한 방법으로 고정화 하고, 또 미생물 바이오센서용 생필름(biofilm) 제작을 위하여 연구되고 있다(17). 최근에는 이러한 방법을 이용하여 phenol유 오일이 모니터링(on-line monitoring)과

glucose oxidase을 PEI로 cheesecloth물질 위에 결합시켜 glucose sensor 제작에 이용하였다(67). Lectin을 이용하여 생특이 가역 고정화법(biospecific reversible immobilization)이 분석 system에 생촉매를 도입시킨다(68). 가장 이상적인 것은 효소활성이 실제 유용한계(practical limits)이하로 떨어졌을 때 결합된 효소가 쉽게 용리(eluted)될 수 있고, 그리고 변환기나 막 특성에 크게 영향을 미치지 않고, 재활용하기 위하여 새로운 효소를 변환기 표면이나 막에 고정화하는 것이다. 소수성 상호작용에 의하여 가역적 고정화법의 가능성이 있음이 보여진다(69). 미생물세포 표면에는 많은 생특이 친화성(biospecific affinity) 결합이나 소수성 자리(hydrophobic sites)를 포함하고 있으므로 미생물 센서는 변환기 표면에 미생물 세포를 가역적으로 도입하여 사용할 수 있을 것이다(9).

환경오염 측정용 미생물센서

미생물 바이오센서는 폐수중에 유기물질(organic compounds)의 총량에 관계되는 BOD 등 주로 환경오염 측정에 이용된다(70-73). BOD 센서는 산소감소량의 측정을 전극표면에서 미생물이 가지는 빠른 반응속도를 이용한 것이다. 다시 말하면 일반적인 BOD 측정은 5일이나 소요되지만 바이오센서를 이용한 분석은 15분내에 측정이 가능하다(74). Karube와 그의 동료들(75)에 의하여 미생물 바이오센서에 관한 연구가 처음 발표된 이래 많은 논문들이 발표되었다. Table 1은 최근 발표된 환경오염 측정용 미생물 바이오센서들이다.

여러 종류의 미생물들이 순수한 배양으로써 또는 여러 방법을 병용하여 개발되고 있다(29). 이들 미생물 중 바이오 센서 제작용으로 선택되기 위해서는 넓은 영역의 기질에 이용될 수 있고, 증식속 독성과 같은 환경오염물질에 대하여 안정하지 않으면 안된다.

최근 연구에 의하면 염(salt)수용액 안에 BOD측정을 위하여 염(salt)에 내성이 큰 이형성(출아형(budding)과 균사형(mycelial))효모인 *Arxula adenivorans* LS3가 가능성이 큼을 보였다(10,76,77). 이 효모를 이용한 센서가 해면과 섬에서 채취한 실제 시료의 BOD측정에 응용되어 졌다(78). 출아형(budding) 효모를 포함하는 센서는 10% 염용액까지 BOD측정에 사용할 수 있었던 것에 비하여 mycelial 센서는 30% 용액까지에 영향을 받지 않았다(79).

BOD센서는 1983년 일본의 Nisshin Electric Co.에 의하여 처음으로 상품화 한 이래 Aucoteam, GmbH, Berlin; Prufgerafewrk, Medingen GmbH Dresden; 그리고 Dr. Lange GmbH, Berlin에서 미생물을 이용한 BOD 바이오 센서가 상품화되어 시판되고 있다.

토양 박테리아 *Pseudomonas putida*로 제작된 다른 종류의 BOD센서는 하천수, 이차폐수 속의 낮은 BOD 측정과 그리고 염소나 중금속에 의한 방해(inhibition)에 의하여, 미소 응답을 나타내는 오수에서의 측정이 가능함을 보였다(80), 상품화되어 시중에 판매되고 있다. 일회용 BOD센서가 개발되었고(81), 더 나아가서 일회용 전극과 결합시킨 휴대용 BOD센서까지 개발되었다. 소형 Clark-형 산소전극의 집합(array)은 박막기술을 이용하여 정교하게 대량생산하게 되었다(55). 이로써 PVA안에 미생물을 고정시키고, 산소 마이크로 전극(micro electrode)과 결합한 센서가 산화 침전물(oxic sedi-

ments)속의 생 유효 유기탄소(bioavailable organic carbon)의 측정을 위하여 제작되었다. 또 침전물 속에 유효 가용성 유기탄소(available dissolved organic carbon)을 미량단위(micro-scale)로 측정하게 되었다(82). 광섬유(83)나 열량계(84) 같은 변환기로 BOD 바이오 센서 제작에 이용되었다. 또 미생물 바이오 센서는 살충제, 발포제, 방화염기, 의약품 등에 사용되어진 할로겐화 탄소와 같은 다른 환경 오염물질의 측정에도 이용되었다. alkyl-halidohydrolase를 포함하고 있는 *Rhodococcus* 계열의 세포를 고정화하여 미생물 생분석(bioassay)이 Hutter (85)와 그의 동료들에 의하여 연구되어졌다. 이는 세포 안에 존재하는 효소가 할로겐화 탄화수소로부터 할로겐 이온을 유리시키므로 미생물 센서 제작으로 확대되었다(86). 그러나 센서는 일주일 동안 277K에서 건조형으로 보관 할 수 있지만, 전극 기능이 안정화 될 때까지 약 30분간 항온조에서 보관해야 하는 것이 불편하다(86).

더욱 최근에는 할로겐화 탄화수소로부터 탈 할로겐화의 넓은 spectrum을 보이는 actinomycete 같은 gram-양성 미생물이, 할로겐화 탄화수소 측정을 위한 더 넓은 특이성을 가지는 바이오 센서 제작 가능성이 크게 나타난다(30). 질소고정화 미생물, *Xantrobacter autotrophicus* GJ 10 계열은 탄소와 에너지의 유일한 재원으로 1,2-dichloroethane을 이용한다.

박테리아 내에는 두 종류의 halogenase 효소가 있음이 밝혀졌다. 그 중 하나는 할로겐화 알칸의 탈 할로겐화성 특이를 가지는 것과 다른 하나는 할로겐화 카아복실산을 가수분해에 의하여 대응되는 알콜과 할로겐 이온으로 분해시키는 효소이다.

세포를 키토산 비드(chitosan beads) 속에 고정화하여 수질 검사 시료 안에 할로겐화 짧은 사슬 탄화수소의 검출을 위하여 반영속적 시스템 제작에 사용된다(61).

발암 물질로 알려진 다환 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)는 특히 조업 정지된 가스(gas)공장이나 조리공장의 오염된 곳이나, 그 외 도처에서 발견된다. 물에 대단히 잘 녹는 naphthalene은 오염된 토양에서 발견된다. Polyurethane hydrogel에 고정화한 *Sphingomonas* sp. B1 또는 *Ps. fluorescens* WW4 세포를 이용하여 Naphthalene 측정용 전류형 바이오 센서를 개발하였다. 이 센서를 흐름계(flow-through system)와 진탕 세포법(batch법) 속에서 검증하였는데, 수용액 속 naphthalene의 양을 측정하는데도 같은 효과가 나타남을 볼 수 있었고, 작동 수명은 20일까지 쓸 수가 있다(87).

Sphingomonas yanoikuyae B1을 이용한 바이오 센서로서는 naphthalene과 phenanthrene을 측정할 수 있다. Phenol, 염소화 Phenol, 다염소화 biphenyl을, benzene 그리고 3-chlorobenzoate를 포함하는 xenobiotics 측정을 위한 미생물 센서도 있다(67). Acrylamide, acrylic acid 그리고 acrylonitrile은 여러 가지 고분자 화합물, 섬유 그리고 수지(resin) 생산을 위하여 화학공업에서 널리 사용되어 진다. *Brevibacterium* sp의 총 호흡 활성도(total respiratory activity)를 이용하여 오피수 중에서 acrylamide와 acrylic acid가 공존하였을 때 그들의 양을 측정하는 센서제작에 이용하였다. Acrylamide가 없을 때는 acrylic acid에만 호흡 활성도를 나타낸다(88). 그리고 acrylonitrile에 대해서는 호흡활성을 가지지 않고, 방해(interfere)도 하지 않

Table 1. 환경오염 물질^a 측정을 위한 미생물센서의 종류

Analyte	Microorganism	Transducer immobilisation	Detection limit	Reference
BOD	<i>Trichosporum cutaneum</i>	Miniature oxygen electrode(UV cross-linking resin (ENT-3400))	0.2-18 mg/L	Yang et al. (1996)(81)
BOD	<i>T. cutaneum</i>	Miniature oxygen electrode array(photo cross-linkable resin)	<32 mg/L	Yang et al. (1997)(55)
BOD	<i>T. cutaneum</i>	Oxygen electrode(entrapment)	10-70 mg/L	Marty et al. (1997)(74)
BOD	<i>Ps. putida</i>	Oxygen electrode (adsorption on porous nitro cellulose membrane)	>0.5 mg/L	Chee et al. (1999)(80)
BOD	Activated sludge (mixed microbial consortium)	Oxygen electrode flow injection system (entrapped in dialysis membrane)	>3.5 mg/L	Liu et al. (2000)(28)
BOD	Salt tolerant mycelial yeast <i>A. adeninicornans</i> LS3	Oxygen electrode(PVA)	2.61-524 mg/L	Tag et al. (2000)(79)
Bioavailable organic carbon in oxic sediments	Yeast cells	Oxygen electrode(PVA)	Microscale	Neudoerfer and Meyer (1997)(145)
Anionic surfactants (linear alky benzene sulfonates(LAS))	LAS degrading bacteria isolated from activated sludge	Oxygen electrode (reactor type sensor. ca-alginate)	<6 mg/L	Nomura et al. (1994)(31)
Acrylamide; acrylic acid	<i>Brevibacterium sp.</i>	Oxygen electrode (free cells)	0.01-0.075 and 0.01-0.1 g/L	Ignatov et al. (1997)(88)
Phenolic compounds	<i>Ps. putids</i>	Oxygen electrode (reactor with cells adsorbed on PEI glass)	100 μ M	Nandakumar and Mattiasson (1999)(67)
Nitrite	<i>Nitrobacter vulgaris</i> DSM10236	Oxygen electrode(adsorption on Whatman paper)	>10 μ M	Reshetilov et al. (2000)(93)
Cyanide	<i>S. cerevisiae</i>	Oxygen electrode(PVA)	0.15-15 nM	Ikebukuro et al. (1996)(94)
Chlorophenols	<i>Rhodococcus sp.</i> ; <i>Trichosporon beigeli</i>	Oxygen electrode(PVA)	0.004-0.04 and 0.002-0.04 mM	Riedel et al. (1991)(146)
3-Chloro-benzoate	<i>Ps. putida</i>	Oxygen electrode(PVA)	40-200 μ M	Riedel et al. (1991)
Chlorinated and brominated hydrocarbons (1-chlorobutane and ethylenebromide)	<i>Rhodococcus sp.</i> DSM 6344	Ion selective electrodes (alginate)	0.22 and 0.04 mg/L	Peter et al. (1996)(53)
Polycyclic aromatic hydrocarbons (Naphthalene)	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> B1 or <i>Ps. fluorescens</i> WW4	Oxygen electrode (polyurethane based hydrogel)	0.01-3.0 mg/L	Koenig et al. (1996, 1997)(87,54)
Organophosphate nerve agents (paraxon, methyl parathion, diazinon)	GEM ^b <i>E. coli</i> (organophosphorous hydrolase)	Potentiometric (adsorption on electrode surface)	0.055-1.8, 0.06-0.91 and 0.46-8.5 mM	Mulchandani et al. (1998)(20)
Organophosphate nerve agents (paraxon, parathion, coumaphos)	GEM ^b <i>E. coli</i> (organophosphorous hydrolase)	Fiber-optic (agarose)	0.0-0.6, 0.0-0.03 and 0.0-0.075 mM	Mulchandani et al. (1998)(21)
Pollutants such as diuron and mercuric chloride	<i>Synechococcus sp.</i> PCC 7942	photoelectrochemical(photo cross linkable PVA bearing styrylpyridium group)	0.2 and 0.06 μ M	Rouillon et al. (1999)(96)
Herbicides ^c (diuron and atrazine)	Chloroplast/thylakoid membranes	Pt-electrode in microelectrochemical cell (photo cross linkable PVA bearing styrylpyridium group)	2×10^{-3} and 2×10^{-4} mM	Rouillon et al. (1995)(57)
Mono and polyphenols ^c (atrazine)	Potato (<i>S. tuberosum</i>) slices (polyphenol oxidase inhibition)	Oxygen electrode (tissue slice sandwiched between membranes)	20-130 μ M	Mazzei et al. (1995)(44)

는다. 그러나 acrylonitrile을 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 이용하여 별도로 측정 가능하다(88,89).

제초제, 살충제 그리고 화학방 약제(chemical warfare agents)로써 사용되어지는 유기인 화합물은 널리 보급되어 사용되어지고, 독성물질이므로, 환경오염 물질로써 많은 관심의 대상이 된다. Acetyl choline esterase(90)와 유기인 가수분해 효소(organophosphorous hydrolase, OPH)(91)를 이용한 여러 가지 효소센서가 보고되어 있다. 특별 기능의 OPH 표면을 가진 유전적 변형 미생물 세포로 구성된 바이오 센서는 광섬유 미생물 바이오 센서와 같이(20) 최근에는 전위차 형 바이오 센서 제작에 사용되었다(21).

공업용 염료제조공장, 화학무기공장(chemical armament plants), 제초제 또는 그와 유사한 화학제조공장의 오폐수 속에 존재하는 xenobiotics group으로 nitroaromatic 화합물(nitrophenols, picric acid, trinitrotoluene 그리고 유사한 화합물)이 있다. Nitroaromatic 화합물의 미생물 주 분해생물 중의 하나는 nitrile 인데 이는 오염물질의 농도를 모니터링하는데 사용되어진다. *Nitrobacter sp.*는 많은 nitrite oxidoreductase를 포함하고 있는 것으로 알려져 있다(92). 그들 중 혼합영양형(mixotrophic) 배양을 하는 동안 nitrite oxidoreductase가 생성되는 혼합영양형 생물(mixotroph)들은 nitrite에 대하여 높은 선택성과 감도를 가진다.

어떤 특정 환경에서만 살수 있는 독립영양생물(obligate autotrops)과는 달리 혼합영양형 박테리아(mixotrophic bacteria)는 폐수 시료 중에 들어있는 유기화합물에 의하여 방해작용을 받지 않는다. 이러한 점에서 볼 때 *N. vulgaris*의 혼합영양형(mixotropic) 계열은 10 μ M의 낮은 검출 한계를 가지고, 높은 선택성을 가진 nitrite 측정용 미생물 바이오 센서 개발의 가능성을 보였다(93). *S. cerevisiae* 호흡작용을 억제하는 cyanide는 호흡형 cyanide 센서 개발에 이용되어, 수명이 16일 동안 안정한 센서를 제작하였다(94). 오폐수 안에서 일어나는 질소화의 억제제나 기질을 측정하는 미생물 센서가 발표되었다(95).

식물독성(phytotoxicity)의 측정을 위하여, 유리 chloroplasts(isolated chloroplasts)나 광합성 막(photosynthetic membrane)이 이용된다. 그러나 이 방법에서 chloroplast를 유리하기가 어렵다. 이러한 문제점은 *Synechococcus sp.*와 같은 광합성을 하는 cyanobacterium의 사용에 의하여 해결되었다(96). Styrylpyridinium group을 가지고 있는 PVA로 고정된 cyanobacterium의 활동도에 영향을 검출하기 위하여 광전기 화학 cell을 이용하여 미생물 센서제작의 가능성을 보였다. Diuron과 염화수은의 측정은 광합성 전자 흐름(photosynthetic electron flow)을 방해하는 오염물질 검출에 바이오 분석(bioassay) 가능성을 예시하였다(96).

식품공업용 미생물 바이오 센서

최근에는 식품과 발효 분석(fermentation analysis)을 위하여 빠른, 특이 분석법의 필요가 증가되고 있다.

공장과 정부 산하 건강관리기관에서는 식품재료 물질의 품질보증을 위하여 영양상의 여러 가지 파라미터, 식품첨가제 분석 및 정량, 식품 오염물질들, 미생물 수(microbial counts), 포장식품의 보존기간, 나쁜 냄새나 향기와 같은 후각 적 특

성 등 여러 가지 서로 다른 성분 분석법이 동시에 모니터 할 수 있는 방법이 필요하게 되었다.

전자코(electronic noses)들(97,98)과 같이 효소나 항체를 이용한 여러 가지 센서가 보고되고 있다(15).

미생물 바이오 센서가 식품 분석에 있어서도 환경오염 측정과 같이 대단히 중요한 위치를 차지하고 있음이 보고되고 있다(15). 몇 가지 예를 Table 2에 수록하였다.

현재 우유들은 대량 수집하고, 오래 저장하기 때문에, 우유 품질의 모니터는 대단히 중요하다.

우유와 우유 제품들의 부패(rancidity)와 신선도의 떨어짐은 짧은 사슬 지방산(C₄-C₁₂)의 유리에 의하여 일어난다. 다른 미생물과 같지 않게, *Arthrobacter nicotianae*은 짧은 사슬 지방산에 대하여 높은 특이성을 가진 β -산화 경로(β -oxidation pathway)에 작용하는 효소를 포함하고 있음이 밝혀졌다. 우유 속에 짧은 사슬 유리 지방산의 흐름 주입 분석에 이들 세포들을 산소전극과 결합하여 미생물 전극 제작에 사용되었다(99-101). *A. nicotianae*를 후막기술(thick film thchnology)로 Ca-alginate 속에 고정화한 막을 직접 산소전극 표면 위에 장착하여 미생물 센서를 제작하였다(102). 이 센서는 우유 속에 유리 지방산의 측정을 위하여 batch system에 사용되었고, 시료의 전처리(pretreatment)가 필요 없고, 단지 3분 내에 응답 시간을 보였다.

*Aeromonas phenologenes*을 이용한 tyrosine, *Ps. fluorescens*을 이용한 tryptophan 그리고 *B. subtilis*을 이용한 glutamic acid와 같은 아미노산 측정을 위한 미생물 센서에 관한 연구 보고가 많이 발표되었다(10,12). Phenylalanine의 측정은 phenylalanine 발효의 진행조절 뿐만 아니라 과페닐알라닌 혈증(hyperphenylalaninemia)의 식이관리(dietary management)와 신생아 진단(neonatal diagnosis)을 위하여 필요하다. 산소전극 위에 Ca-alginate로 *proteus vulgaris* 세포를 고정화하여 제작한 phenylalanine 측정용 미생물 센서에 관한 연구결과를 발표하였다(103). 세포 안에 존재하는 phenylalanine deaminase는 phenylalanine을 phenylacetic acid로 *E. coli* L15 이용하여 Vitamin B-12 같은 비타민과 *Enterobacter agglomerans*을 이용하여 ascorbic acid 측정용 미생물 센서가 개발되었다(10). 고정화 한 *Saccharomyces uvarum* 효모와 산소전극과 결합하여 호흡 활성도를 측정하여 해산물 속에 Vitamine B-6 함량을 ng/mL의 미량까지 빠르고, 신속하게 측정 할 수 있었고, 이들 측정값은 기존의 미생물 분석값과 잘 일치하였다(104).

식품공업에서 미생물 바이오 센서의 다른 용도는 *Thiobacillus thiooxidans*을 이용하여 건조된 채소 등을 포함하여 40가지 식품 속에 총 sulphite 양을 측정하였다(105,106). Glucose, sucrose, lactose 그리고 *T. ferrooxidans*을 이용한 철 정량, *B. subtilis*를 이용한 ammonia, *Trichosporon brassicae*를 이용한 acetic acid 측정용 그리고 pyruvate, phosphate, peptide, 감미료인 aspartame, 알콜 측정용 미생물 바이오 센서에 대한 연구 결과 보고가 있다(10).

약학과 의학에서는 *Nocardia erythropolis*를 이용한 cholesterol 측정용, *N. erythropolis*를 이용한 androstendione, *N. erythropolis*를 이용한 testosterone 같은 steroids 측정용 미생물 센서와 *S. cerevisiae*을 이용한 nystatin 같은 항생물질 측정용, *B. subtilis*를 이용하여 Hormone을 방출시키는 생식선 자극 Hormone인

Table 2. 식품, 발효 및 그와 연관된 분야에 응용된 미생물 센서의 종류

Analyte	Microorganism	Transducer immobilisation	Detection limit	Reference
Alcohol	<i>Candida vini</i>	Oxygen electrode (porous acetyl cellulose filter)	2×10^{-2} -2×10^{-1} mM	Mascini et al. (1989) (73)
Glucose	<i>A. niger</i> (glucose oxidase)	Oxygen electrode (entrapment in dialysis membrane)	>1.75 mM	Katrik et al. (1996) (64)
Glucose, sucrose, lactose	<i>G. oxydans</i> (D-glucose dehydrogenase), <i>S. corevisiae</i> (invertase), <i>K. marxianus</i> (β -galactosidase)	Oxygen electrode (gelatine)	up to 0-0.8 mM	Svitel et al. (1998)(16)
Sugars (glucose)	Psychrophilic <i>D. radiodurans</i>	Oxygen electrode (agarose)	0.03-0.55 mM	Nandakumar and Mattiasson (1999)(136)
Short chain fatty acids in milk (butyric acid)	<i>A. nicotianae</i> (acyl-CoA oxidase)	Oxygen electrode (Polyvinly alcohol)	0.11-1.7 mM	Ukeda et al. (1992) (99,100)
Short chain fatty acids in milk (butyric acid)	<i>A. nicotianae</i> (acyl-CoA oxidase)	Oxygen electrode (Ca-alginate)	9.5-165.5 μ M	Schmidt et al. (1996) (60)
Phosphate	<i>Chlorella vulgaris</i>	Oxygen electrode (polycarbonate membrane)	8-70 mM	Matsunaga et al. (1984) (147)
CO ₂	CO ₂ utilizing autotrophic bacteria (<i>Pseudomonas</i>)	Oxygen electrode (bound on cellulose nitrate membrane)	0.2-5 mM	Suzuki and Karube (1987)(148)
Vitamin B-6	<i>S. uvarum</i>	Oxygen electrode (adsorption on cellulose nitrate membrane)	0.5-2.5 ng/mL	Endo et al. (1995)(104)
Vitamin B-12	<i>E. coli</i>	Oxygen electrode (trapped in Porous acetyl cellulose membrane)	$5-25 \times 10^{-9}$ mM	Karube et al. (1987) (149)
Peptides (aspartame)	<i>B. subtilis</i>	Oxygen electrode (filter paper strip and dialysis membrane)	0.07-0.6 mM	Renneberg et al. (1985)(150)
Phenylalanine	<i>P. vulgaris</i> (Phenylalanine deaminase)	Amperometric oxygen electrode (Ca-alginate)	2.5×10^{-2} -2.5 mM	Liu et al. (1996)(103)
Pyruvate	<i>Streptococcus faecium</i> (Pyruvate dehydrogenase complex)	CO ₂ gas sensing electrode (direct immobilisation on sensor membrane)	0.22-32 mM	Di Paolantonio and Rechnitz (1983)(152)
Tyrosine	<i>A. phenologenes</i> (Tyrosine-phenol lyase)	NH ₃ gas sensing electrode (direct immobilisation on sensor membrane)	8.2×10^{-2} -1.0 mM	Di paolantonio and Rechnitz (1982)(151)
Enalapril maleate (angiotensin)	<i>B. subtilis</i>	Oxygen electrode	-	Fleschin et al. (1998) (27)

gonadotropin 같은 물질 측정용, 질소 고정형 박테리아를 이용한 노소측정, *Altenaria tennis*를 이용한 노산(uric acid) 측정용, *Nitrobacter sp.*을 이용한 creatinine 측정, *T. ferrooxidans*을 이용한 2가와 3가 철(iron) 측정용 미생물 센서가 연구되었다(10).

Enalapril maleate(EMa)는 acetylcholine esterase 효소 방해를 변화시키는 angiotensin으로 알려진 새로운 계열의 항고혈압제에 속한다. 유도 *B. subtilis* 세포를 이용하여 EMa 측정용 미생물 센서가 개발되었다(27). 이 센서는 이 약품의 특이 대사과정동안 호흡작용의 축전력을 측정한다.

바이오 센서의 중요한 기능은 실시간 공정 모니터링을 할 수 있다는 점이다. 오폐수 생처리 공장(wastewater biotreatment plants, WWBP) 와 발효조(fermentors)들의 모니터링에 바이오 센서는 필요하다(107). 오폐수 생처리 공장에서 뜻밖에도 생긴 사고에 대한 신속한 경고는 공장을 폐쇄한 후, 재 가동시키던가, 재 개시시킬 때 시간적으로나 비용의 절감을 시킬 수 있기 때문에 대단히 중요하다.

종종 생기는 사고는 생물계에 독성을 나타내는 유기화학 물질이나 중금속을 포함한 높은 독성물질들의 유입(inflow)이다. 조기 경고 시스템의 개발은 이러한 문제들을 해결 할 수가 있다. 생체 발광 리포터(bioluminescent reporter)를 센서에 사용하면 응답이 빠르고, 감도가 높으며, 적은 노력을 드려 자동적으로 자료수집을 연속적으로 얻을 수 있고, 큰 활동영역 등과 같은 장점을 가지고 있다.

해양 미생물, *Photobacterium phosphoreum*이 생체 발광의 소실로 대사정지(metabolic death)를 모니터링하는 미생물 분석법을 이용한 "Microtox system"이 상품화되었다(108). 열충격 유전 생체 발광 유전자융합(heat shock gene- bioluminescence gene fusion)을 이용한 생체 발광 미생물 바이오 센서를 이용하면 앞에서 언급한 여러 가지 이점에 가장 적합한 센서 제작이 가능할 것이라는 보고가 있다(109-111). *lux* 유전 리포터는 식물들의 발병원인(pathogenesis), 식물뿌리의 토양 박테리아 번식지(rhizosphere bacterial colonisation), 유전자 유도 및 반적인 역할, 그리고 독여변이(antagonism)를 이해하는데도

Table 3. 발광현상을 이용한 유전공학적인 미생물센서의 종류

Application	Microorganism	Reference
Monitoring toxicity of compounds to eukaryotes	<i>S. cerevisiae</i> was genetically modified to express firefly luciferase	Hollis et al. (2000)(126)
On-line monitoring of microbial growth	<i>E. coli</i> engineered for constitutive bioluminescence	Marincs (2000)(128)
Toxicity of Zn, Cu and Cd, alone or in combination	<i>E. coli</i> HB101 and <i>Ps. fluorescens</i> 10586 genetically modified with <i>luxCDABE</i>	Preston et al. (2000)(120)
Polycyclic aromatic hydrocarbons	<i>Ps. fluorescens</i> HK44 genetically modified with <i>luxCDABE</i>	Webb et al. (1997)(153), Sayler et al. (1999)(154), Ripp et al. (2000)(38)
Ecotoxicity assessment of organotins and their initial breakdown products (tributyltin, dibutyltin, triphenyltin and diphenyltin)	Microtox and <i>luxCDABE</i> modified <i>Ps. fluorescens</i>	Bundy et al. (1997)(122)
Ethanol as a model toxicant	<i>E. coli</i> TV1061, harboring the plasmid pGrpELux5	Gu et al. (1996)(110), Rupani et al. (1996)(111)
Monitoring of biocides	Bioluminescent strain of <i>E. coli</i> produced by recombinant DNA technology	Fabricant et al. (1995)(123)
Metals, solvents, crop protection chemicals etc	<i>E. coli</i> heat shock promoters, <i>dnaK</i> and <i>grpE</i> were fused with <i>lux</i> genes of <i>V. fischeri</i>	Van Dyk et al. (1994)(109)
Identifying constraints to bioremediation of BTEX-contaminated sites ^a	<i>luxCDABE</i> modified <i>Ps. fluorescens</i>	Sousa et al. (1998)(143)
Assessment of the toxicity of metals in soils amended with sewage sludge	<i>luxCDABE</i> modified <i>Ps. fluorescens</i>	McGrath et al. (1999)(144)

^aBenzene, toluene, ethylbenzene, xylene.

움이 된다고 보고되었다(34,35).

최근 개발된 유전공학적으로 변형시킨 미생물 센서를 Table 3에 나타내었다. 유전공학적으로 변형시킨 *Ps. fluorescens* HK44를 이용하여 naphthalene과 salicylate 같은 PAH의 모니터를 위하여 많은 연구가 되었다. 이 균주는 salicylate 유도성 오페론(operon) 안에 *nahG-lux CDABE* 융합(fusion)을 함유한 생체 발광 리포터 플라스미드(plasmid) pUTK21가 들어 있다. 생체 발광 미생물 바이오 센서는 Hg^{+2} (112), Zn^{+2} (113), chromate-copper-arsenate(114), Ni^{+2} 그리고 chromate(115), antimonite와 arsenite(116) 그리고 Cd^{+2} 와 Pb^{+2} (117) 같은 중금속(heavy metals)을 검출하기 위하여 널리 연구되고 있다.

최근에는 다른 생태적 지위(ecological niches)에 있는 *Escherichia coli* HB101 pUCD607과 *Ps. fluorescens* 10586 pUCD607과 같은 두 종류의 생체 발광 미생물 바이오 센서를 이용하여 Zn, Cu 그리고 Cd 같은 중금속을 각각 또는 조합(combination)하여 그들의 독성을 측정 하였다(118-120). Zn과 Cu, Cu와 Zn, Zn과 Cd의 독성간에 주목할만한 상승 상호작용(synergistic interaction)이 일어났다(120). Cd 같은 중금속과 pentachlorophenol 같은 유기독성물을 포함하고 있는 제지 공장 유출물의 독성을 호흡법(respirometry)과 생체 발광 박테리아 분석법으로 측정하여 본 결과 유전적 변형(luminescence marked) 육상 박테리아는 호흡 분석법(respirometric analysis) 보다 감도와 재현성이 더 높았다(121).

추출한 토양 용액 속에 존재하는 2종류의 유기주석 오염물질(organotin pollutants)과 그들의 초기 분해산물 tributyltin, dibutyltin, triphenyltin 그리고 diphenyltin들의 독성을 Microtox와 *lux*로 변환된 센서를 이용하여 측정한 결과 서로 다른 응답 모양이 나타났고 Microtox는 triorganotins에 대하여, *P.*

*fluorescens*는 diorganotins에 대하여 더 감도가 높았다(122). Cutting fluids나 냉각탑 속에 미생물 번식을 억제하기 위하여 공장에서는 생물독 물질(biocides)을 사용하며, 그들의 농도를 정확히 모니터링으로써 유효량을 유지할 수 있다.

몇 가지 생물독 물질에 대하여 생체 발광 계열 *E. coli*의 응답을 연구한 결과 백만분의 1의 미량 생물독 물질이 농도에 대해서도 빠르고, 감도가 높음을 발견하였다(123). 생체 발광법을 이용하여 밖으로 방출된 유전공학적으로 변형시킨 미생물의 양을 검출하였다(124). 용매들이나, 곡물저장용 화학물질을 *lux* 유전자로 융합된 *E. coli* 열충격 프로모터(promoters)를 이용하여 검출하였다(109,110,111,125).

최근에 세포독성 분석(cytotoxicity analysis)을 위한 진핵(eukaryotic microbial) 미생물 센서에 대하여 보고되었다. 효모 *S. cerevisiae*는 생체 발광 효모균주(bioluminescent yeast strain)를 생산하기 위하여 개뿔벌레(firefly)의 luciferase를 나타내기 위하여 유전적 변형을 하였다. 시료 안에 진핵(eukaryotes)에 독성을 나타내는 물질로 알려진 이 계열의 감성 화학물질(strain senses chemicals)을 원핵(prokaryotic) 바이오 센서에 의하여 비독성(non-toxic)물질로 측정되어진다(126).

문헌에는 박테리아 배양 시세포 대사물(cellular metabolism)을 측정하는 방법이 많이 발표되었지만(107) 복잡하고 어려우므로 종종 미생물 배양시 대사물이나 발육력(growth)이나 생육력(viability)을 측정한다. 그런 까닭에 생체 발광 물질로 표지하여 특히 박테리아가 가지는 오염물질의 대사 활동도를 측정할 수 있으므로 대단히 중요하다(127,128).

지표(indicator)로써 *lux* phenotype을 이용하여 *E. coli*의 발육정도를 측정할 때 발육이 끝날 때까지 광 발생(light emission)이 빠르게 증가하는 것을 볼 수 있다. 그러나 배양의 종

료 부근에서는 광발생이 측정할 수 없을 정도로 감소되어진다. 그러나 균체(colony) 형성 단위에는 영향을 받지 않았다. 이것은 세포대사 활성도가 없어도 세포들은 배양되어질 수 있는 능력을 유지한다는 것이다(128).

미생물 바이오센서 기술은 오염물질 측정 현장에서 실험초기로부터 실제실험(field test) 까지 이루어짐으로 안정한 생체물질을 유지한다는 것은 대단히 중요하다. 독성물질에 대한 면역성과 같이 주위온도의 높고, 낮음, 산화, 염농도(saline), 높은 산, 염기 하에서 생체물질이 안정하고, 기능을 공정과정 중에서 그대로 유지한다는 것은 대단히 중요하다(17,129). 그러므로 호열성 미생물(thermophiles), 호알칼리성 미생물(alkalophiles), 호염성 미생물(halophiles), 호저온성 미생물(psychrophiles), 호금속성 미생물(metallophiles), 호삼투성(osmophiles) 미생물 등 여러 집단의 미생물을 실제 측정 상황에 적절히 선택하는 것은 미생물 센서 응용에서 중요하다. 분석에 유용한 효소를 포함하는 새로운 미생물의 종과 희귀한 유전자 발견을 위한 선택적 screen법과 최근에 급속도로 발전된 생물공학(biotechnology)기술과 고전적 미생물학을 접목시키는 기술이 미생물 바이오센서 개발 및 발전에 필요하다(130,131). 발효조(fermentors)내의 반응물을 모니터 할 때나 그 외 높은 온도에서 수행되는 공정과정에서는 극히 높은 호열성 생물이 요구된다(132-134).

또 낮은 온도에서 높은 활동도를 보이는 호저온성 생물로부터 추출한 저온 활성효소가 관심을 가지게 되었다(135). 그러한 효소나 생물체는 식품공업이나 그에 관련 업종에서 저온저장조건하에서의 공정을 모니터 할 수 있는 이점을 가지고 있다. 그 예로써 *Deinococcus*의 초저온성 균주를 이용한 바이오센서가 설당양의 측정에 이용한 보고가 있다(136). 특히 오페수 모니터에서 미생물 바이오센서 응용의 문제점 중 하나는 중금속 독성이다. 금속저항성 생물은 중금속 오염 측정용 센서제작과 응용을 위하여 중요하다. *Alcaligenes eutrophus*와 같이 gram-음성 박테리아인 *Ralstonia sp* CH34는 독성 중금속이온으로 크게 오염된 환경에서 생존하므로 이들을 이용하여, 금속으로 오염된 환경에서 유기오염물질과 생물학적 중요 중금속의 농도를 측정하는 미생물 바이오센서 개발에 이용될 수 있다(137). 세포벽을 변형시켜 미생물의 중금속 생흡착(biosorption)을 증가시키기 위하여, 유전공학기술을 이용하여 미생물 표면에 금속들에 대하여 높은 친화성을 가지는 단백질(metallothioneins)(138) 또는 OmpC(139)와 같은 외막 단백질(outer membrane proteins)에 금속결합 에피토프(metal binding epitope)을 도입시킨다. 근본적으로 그렇게 변형시킨 미생물은 세포표면에 금속들을 흡착하여 독성 중금속이 들어오는 것을 막아준다. *Deinococcus radiodurans* 균주는 방사선에 대하여 높은 저항을 가지는 것으로 보고되었다. 최근에는 혼합된 방사성 오염물질(mixed radioactive wastes)의 처리나 toluene이나 수은의 제독성(detoxity)을 위하여 *Deinococcus radiodurans*의 변형을 위하여 틀리는 유전군(gene cluster)을 사용하였다(140). 이렇게 함으로써 방사선 오염 쓰레기 속에 유기오염물질(organic pollutants)을 측정할 수 있고, 큰 호염성을 가진 생물(141)과 균주(142)는 염의 환경오염의 모니터를 위하여 이용되고 또 많은 생물공학 공정에서 유기물질을 많이 사용하므로 유기물매출전용 미생물 바이오세

서의 개발도 요구된다. lux 바이오센서는 공정 중 전과정의 독성량(overall toxicity)을 모니터 하는데 이용되었다(143,144).

결론

미생물은 해상으로부터 육상까지 넓은 서식 범위를 가지고, 많은 화학물질에 작용할 수 있으며, 여러 가지 조건에 적응하는 능력을 가지고 있다. 미생물 센서는 고정화한 미생물과 변환기를 결합하여 그들의 호흡기능(respiratory function)과 대사기능(metabolic function)을 이용하여 기질(substrate)이나 억제제(inhibitor)의 양을 측정하는 기구이다. 효소바이오센서에 비하여 낮은 응답(low response), 낮은 감도(low sensitivity) 그리고 검출한계(detection limits)가 크지 않다는 단점을 가지고 있다. 이와같은 현상은 세포막의 확산능력이 낮기 때문이다. 이에 대한 개선방법으로는 세포막을 물리적, 화학적 또는 효소를 처리하여 침투성이 좋은 세포로 만드는 방법과 유전공학적 기법을 이용하는 방법이 있다. DNA 재결합 기술이나 변이로 필요한 효소의 양을 세포내에 증식시킨다든가, 대사공학(metabolic engineering)기술로 어떤 대사과정을 활성화하여 미생물의 특이성을 증가시키고, 불필요한 물질의 생성이나 부반응을 억제하여 높은 감도와 넓은 검출한계를 가질 수 있도록 미생물의 변형이 가능하다. 그러므로 미생물을 이용한 센서는 효소센서보다 더 다양하게 이용할 가능성이 크다. 생물학과 여러 가지 관련과학기술과 공학을 접목시킴으로써 미생물바이오센서는 환경오염이나 식품공업 측정용 센서로서의 적용범위를 더 크게 넓힐 수 있고, 이 외 분야에서도 다양하게 응용될 가능성이 큰 분야이다.

감사

본 논문 작성에 많은 조언을 해주신 본 대학 미생물학과 의 유대식 교수와 워드작업을 해준 박성수 대학원생 이하 모든 교실원들에게 감사드립니다.

REFERENCES

1. Janata J, Josowicz M, Vanysek P, and DeVaney DM. (1998) Chemical sensors, *Anal Chem.* **70**: 179R-208R.
2. Rogers, K R (1998), Biosensor technology for environmental measurement. In: Meyers RA, editor, *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*, p755-768. John Wiley & Sons, New York.
3. Ursula E, and Keller, S (1998), *Chemical Sensors and Biosensors of Medical and Biological Applications*. Wiley-VCH, Weinheim. New York.
4. Riedel, K (1994), Microbial sensors and their application in environment. *Exp. Techn. Phys.* **40**(1), 63-76.
5. Karube, I., T. Matsunaga, S. Mitsuda, and S. Suzuki (1977), Microbial electrode BOD sensor. *Biotechn. Bioeng.* **19**, 1535-1547.
6. Riedel, K., R. Renneberg, M. Kühn, and F. Scheller (1988), A fast estimation of BOD with microbial sensors. *Appl. Microbiol. biotechnol.* **28**, 316-318.
7. Schmidt, A., C. Standfu β -Gabisch, and U. Bilitewski (1996). Microbial biosensor for free fatty acids using an

- oxygen electrode based on thick film technology. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 1139-1145.
8. Bickerstaff, G. F. (Eds.) (1997), Immobilization of Enzymes and Cells. Humanae Press. Totowa. NJ.
 9. D'Souza, S. F (1999), Immobilized enzymes in bioprocess. *Curr. Sci.* **77**, 69-79.
 10. Riedel, K (1998), Microbial biosensors based on oxygen electrodes. In: Mulchandani, A., and K. R. Roger. (Eds.), Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols. pp. 199-223. Humanae Press. Totowa. NJ.
 11. Arikawa, Y., K. Ikebukuro, and I. Karube (1998), Microbial biosensors based on respiratory inhibition. In: Mulchandani, A. and K. R. Roger. (Eds.), Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols. pp. 225-235. Humanae Press. Totowa. NJ.
 12. Simonian, A. L., E. I. Rainina, and J. R. Wild (1998), Microbial biosensors based on potentiometric detection. In: Mulchandani, A. and K. R. Roger (Eds.). Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols. pp. 237-248. Humanae Press. Totowa. NJ.
 13. Rainina, E., E. Efremenco, S. Varfolomeyev, A. L. Simonian, and J. Wild (1996), The Development of a new biosensor based on recombinant *E. coli* for the detection of organophosphorous neurotoxins. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 991-1000.
 14. Patil, A. and S. F. D'Souza (1997), Measurement of in situ halophilic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity from the permeabilised cells of archaeobacterium *Haloarcula vallismortis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**, 163-167.
 15. Mulchandani, A. and K. R. Rogers (Eds.) (1998), Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols. Humanae Press. Totowa. NJ.
 16. Svitel, J., O. Curilla, and J. Tkac (1998), Microbial cell-based biosensor for sensing glucose, sucrose or lactose. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **27**, 153-158.
 17. D'Souza, S. F (2001), Immobilization of biomaterials for biosensor applications. *Appl. Biochem. Biotech. (in press)*.
 18. Kamath, N. and S. F. D'Souza (1992), Immobilization of ureolytic cells through flocculation and adhesion on cotton cloth using polyethylenimine. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 935-938.
 19. Macaskie, L. E., R. M. Empson, A. K. Cheetham, C. P. Grey, and A. J. Skarnulis (1992), Uranium bioaccumulation by a *Citrobacter sp.* as a result of enzymatically mediated growth of polycrystalline HUO_2PO_4 . *Science* **257**, 782-785.
 20. Mulchandani, A., P. Mulchandani, I. Kaneva, and W. Chen (1998), Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents using recombinant *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorous hydrolase. 1. Potentiometric microbial electrode. *Anal. Chem.* **70**, 4140-4145.
 21. Mulchandani, A., I. Kaneva, and W. Chen (1998), Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents using recombinant *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorous hydrolase. 2. Fiber-optic microbial biosensor. *Anal. Chem.* **70**, 5042-5046.
 22. D'Souza, S. F (1989), Immobilized cells: techniques and applications. *Indian. J. Microbiol.* **29**, 83-117.
 23. Rao, B. Y. K., S. S. Godbole, and S. F. D'Souza (1988), Preparation of lactose free milk by fermentation using immobilized *Saccharomyces fragilis*. *Biotechnol. Lett.* **10**, 427-430.
 24. Joshi, M. S., L. R. Gowda, L. C. Katwa, and S. G. Bhat (1989), Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by digitonin. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 439-449.
 25. Riedel, K. and F. Scheller (1987), Inhibitor-treated microbial sensor for the selective determination of glutamic acid. *Analyst* **112**, 341-342.
 26. Riedel, K., R. Renneberg, and F. Scheller (1990), Adaptable microbial sensor. *Anal. Lett.* **23**, 757-770.
 27. Fleschin, S., C. Bala., A. A. Bunaciu., A. Panait., and H. Y. Aboul-Enein (1998), Enalapril microbial biosensor. *Prep. Biochem. biotechnol.* **28**, 261-269.
 28. Noshi, N. T. and S. F. D'Souza (1999), Immobilization of activated sludge for the degradation of phenol. *J. Environ. Sci. Health Part A Environ. Sci. Engng* **34**, 1689-1700.
 29. Liu, J., L. Bjornsson, and B. Mattiasson (2000), Immobilised activated sludge based biosensor for biochemical oxygen demand measurement. *Biosens. Bioelectron.* **14**, 883-893.
 30. Peter, J., W. Buchinger, F. Karner, and W. Hampel (1997), Characteristics of a microbial assay for the detection of halogenated hydrocarbons using cells of an actinomycetes-like organism as a biological component. *Acta Biotechnol.* **17**, 123-130.
 31. Nomura, Y., K. Ikebukuro, K. Yokoyama, T. Takeuchi, Y. Arikawa, S. Ohno, and I. Karube (1994), A novel microbial sensor for anionic surfactant determination. *Anal. Lett.* **27**, 3095-3108.
 32. Reshetilov, A. N., D. A. Efremov, P. V. Iliassov, N. I. Kukushkin, R. Greene, T. Leathers, and A. M. Boronin (1998), Effects of high oxygen concentrations on microbial biosensor signals. Hyperoxygenation by means of perfluorodecaline. *Doklady Akademii Nauk* **358**, 833-835.
 33. D'Souza, S. F. and J. S. Melo (1991), A method for the preparation of co-immobilizates by adhesion using polyethylenimine. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 508-511.
 34. Burlage, R., and C. T. Kuo (1994), Living biosensors for the management and manipulation of microbial consortia. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 291-309.
 35. Matrubutham, U. and G. S. Sayler (1998), Microbial biosensor based on optical detection. In: Mulchandani, A. and K. R. Roger (Eds.), Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols. pp. 249-256. Humanae press. Totowa. NJ.
 36. Meighen, E. A (1994), Genetics of bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Genet.* **28**, 117-139.
 37. Heitzer, A., K. Malachowsky, J. Thonnard, P. Bienkowski, D. White, and G. Sayler (1994), Optical biosensor for the environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilised bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1487-1494.
 38. Ripp, S., D. E. Nivens, C. Werner, and G. S. Sayler (2000), Bioluminescent most-probable-number monitoring of a genetically engineered bacterium during a long-term contained field release. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 736-741.
 39. Georgopoulos, C., K. Liberek, M. Zyliez, and D. Ang (1994), Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the autoregulation of the heat shock response. In: Mortimoto, R. L., A. Tissieres, C. Georgopoulos (Eds.), The Biology of Heat Shock Proteins

- and Molecular Chaperons. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, pp. 209-250.
40. Benlsrael, O., H. Benlsrael, and S. Ulitzer (1998), Identification and quantification of toxic chemicals by use of *Escherichia coli* carrying *lux* genes fused to stress promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4346-4352.
 41. Kim, U. R., K. S. Roh, Y. D. Ha, Y. S. Seuk, and Y. S. Park (1994), The studies for the malate tissue biosensor using malate dehydrogenase (decarboxylating) in the bundle sheath cell of the corn leaf. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **9**, 319-324.
 42. Kim, U. R., K. J. Nam, and S. M. Choi (1992), The development of arginine-selective membrane electrode using tissue slices of the rose of Sharon. *J. Kor. Chem. Soc.* **36**, 117-139.
 43. Bae, J. H., S. M. Choi, D. J. Lim, and U. R. Kim (1993), The biosensor for L-glutamin using tissue slices of wistar rat. *J. Kor. Chem. Soc.* **38**, 736-741.
 44. Mazzei, F., F. Botre, G. Lorenti, G. Simonetti, F. Porcelli, G. Scibona, and C. Botre (1995), Plant tissue electrode for the determination of atrazine. *Anal. Chim. Acta* **316**, 79-82.
 45. Shoji, R., Y. Sakai, A. Sakoda, and M. Suzuki (2000), Development of a rapid and sensitive bioassay device using human cells immobilized in macroporous micro-carriers for the on-site evaluation of environmental water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 432-438.
 46. Kumar, S. D., A. V. Kulkarni, R. G. Dhaneshwar, and S. F. D'Souza (1992), Cyclic voltametric studies at the glucose oxidase enzyme electrode. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **27**, 153-160.
 47. Loranger, C. and R. Carpentier (1994), A fast assay for phytotoxicity measurements using immobilized photosynthetic membranes. *Biotechnol. Bioengng* **44**, 178-183.
 48. Marolia, K. Z. and S. F. D'Souza (1999), Enhancement of the lysozyme activity of the hen egg white foam matrix by cross-linking in the presence of N-acetyl glucosamine. *J. Biochem. Biophys. Methods* **39**, 115-117.
 49. D'Souza, S. F. (1983), Osmotic stabilisation of mitochondria using chemical cross-linkers. *Biotechnol. Bioengng.* **25**, 1661-1664.
 50. D'Souza, S. E., W. Altekar, and S. F. D'souza (1992), A novel technique for the preparation of osmotically stabilised and permeabilised cells of extremely halophilic bacteria. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **24**, 239-247.
 51. D'Souza, S. F. and K. Z. Marolia (1999), Stabilization of *Micrococcus lysodeikticus* cells towards lysis by lysozyme using glutaraldehyde: application as a novel biospecific ligand for the purification of lysozyme. *Biotechnol. Tech.* **13**, 375-378.
 52. Ramakrishna, S. V. and R. S. Prakasham (1999), Microbial fermentation with immobilized cells. *Curr. Sci.* **77**, 87-100.
 53. Peter, J., W. Hutter, W. Stollnberger, and W. Hampel (1996), Detection of chlorinated and brominated hydrocarbons by an ion sensitive whole cell biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 1215-1219.
 54. Koenig, A., C. Zaborosch, and F. Spener (1997), Microbial sensors for PAH in aqueous solution using solubilizers. In: Gottlieb, J., H. Hotzl, K. Huck, and R. Niessner (Eds.), pp. 203-206. Field Screening Europe Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
 55. Fabrication of oxygen electrode arrays and their incorporation into sensors for measuring biochemical oxygen demand. *Anal. Chem. Acta* **357**, 41-49.
 56. Tag, K., M. Lehmann, C. Chan, R. Renneberg, K. Riedel, and G. Kunze (2000), Measurement of biodegradable substances with a mycelia-sensor based on the salt tolerant yeast *Arxula adenivorans* LS3. *Sens. Actuators B* **67**, 142-148.
 57. Rouillon, R., M. Sole, R. Carpentier, and J. L. Marty (1995), Immobilization of thylakoids in polyvinyl alcohol for the detection of herbicides. *Sens. Actuators.* **27**, 477-479.
 58. Ulbricht, M. and A. Papra (1997), Polyacrylonitrile enzyme ultrafiltration membranes prepared by adsorption, cross-linking, and covalent binding. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 61-68.
 59. D'Urso, E. M. and G. Fortier (1996), Albumin-poly (ethylene glycol) hydrogel as matrix for enzyme immobilization: biochemical characterization of crosslinked acid phosphatase. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 482-488.
 60. Schmidt, A., G. C. Standfuss, and U. Bilitewski (1996), Microbial biosensor for free fatty acids using an oxygen electrode based on thick film technology. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 1139-1145.
 61. Peter, J., W. Hutter, W. Stollnberger, F. Karner, and W. Hampel (1997), Semicontinuous detection of 1,2-dichloroethane in water samples using *Xanthobacter autrophicus* GJ 10 encapsulated in chitosan beads. *Anal. Chem.* **69**, 2077-2079.
 62. Smidsord, O. and G. Skjac-Break (1990), Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* **8**, 71-78.
 63. Gupte, A. and S. F. D'Souza (1999), Stabilization of alginate beads using radiation polymerized polyacrylamide. *J. Biochem. Biophys. Methods* **40**, 39-44.
 64. Miranda, C. and S. F. D'Souza (1988), Clarification of pectin using pectinolytic fungi immobilized in open pore gelatin block. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 60-65.
 65. Katrlik, J., R. Brandsteter, J. Svore, M. Rosenberg, and S. Miertus (1997), Mediator type of glucose microbial biosensor based on *Aspergillus niger*. *Anal. Chim. Acta.* **356**, 217-224.
 66. Melo, J. S. and S. F. D'Souza (1999), Simultaneous filtration and immobilization of cells from a flowing suspension using a bioreactor containing polyethylenimine coated cotton threads: application in the continuous inversion of sucrose syrups. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 25-27.
 67. Nandakumar, R., and B. Mattiasson (1999), A microbial biosensor using *Pseudomonas putida* cells immobilized in an expanded bed reactors for the on-line monitoring of phenolic compounds. *Anal. Lett.* **32**, 2379-2393.
 68. Mattiasson, B. (1982), Biospecific reversible immobilization. A method for introducing labile structures into analytical systems. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **7**, 121-125.
 69. D'Souza, S. F. and A. Deshpande (2001), Simultaneous purification and reversible immobilization of D amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (in press).
 70. Nikolelis, D., U. Krull, J. Wang, and M. Mascini (Eds.) (1998), Biosensors for direct monitoring of environmental pollutants in Field. Kluwer Academic, London.
 71. Rogers, K. R. and C. L. Gerlach (1999), Update on envi-

- 506A.
72. Rogers, K. R. (1998), Biosensor technology for environmental measurement. In: Meyers, R. A. (Ed.). *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*, 755-768. Wiley. Chichester. UK.
73. Bilitewski, U. and A. P. F. Turner (Eds.) (2000), *Biosensors for Environmental Monitoring*. Harwood Academic, Amsterdam.
74. Marty, J. L., D. Olive, and Y. Asano (1997), Measurement of BOD-correlation between 5-day BOD and commercial BOD biosensor values. *Environ. Technol.* **18**, 333-337.
75. Karube, I., T. Matsunaga, S. Mitsuda, and S. Suzuki (1977), Microbial electrode BOD sensors. *Biotechnol. Bioengng.* **19**, 1535-1545.
76. Tag, K., M. Lehmann, C. Chan, R. Renneberg, K. Riedel, and G. Kunze (1999), *Arxula adenivorans* LS3 as suitable biosensor for measurement of biodegradable substances in salt water. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **73**, 385-388.
77. Chan, C., M. Lehmann, K. Tag, M. Lung, G. Kunze, K. Riedel, R. Grundig, and R. Renneberg (1999), Measurement of biodegradable substances using the salt tolerant yeast *Arxula adenivorans* for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl) sulfonate(PCS). Part I. Construction and characterization of the microbial sensor. *Biosens. Bioelectron.* **14**, 131-138.
78. Lehmann, M., C. Chan, A. Lo, M. Lung, K. Tag, G. Kunze, K. Riedel, B. Grundig, and R. Renneberg (1999), Measurement of biodegradable substances using the salt tolerant yeast *Arxula adenivorans* for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl) sulfonate(PCS). Part II. Application of the novel biosensor to real samples of coastal and island regions. *Biosens. Bioelectron.* **14**, 295-302.
79. Tag, K., M. Lehmann, C. Chan, R. Renneberg, K. Riedel, and G. Kunze (2000), Measurement of biodegradable substances with a mycelia-sensor based on the salt tolerant yeast *Arxula adenivorans* LS3. *Sens. Actuators.* **B 69**, 142-148.
80. Chee, G. I., Y. Nomura, and I. Karube (1999), Biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand. *Anal. Chim. Acta.* **379**, 185-191.
81. Yang, Z., H. Suzuki, S. Sasaki, and I. Kurube (1996), Disposable sensor for biochemical oxygen demand. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 10-14.
82. Neudoerfer, F. and R. L. A. Meyer (1997), A microbial biosensor for the microscale measurement of bioavailable organic carbon in oxic sediments. *Marine Ecol. Prog. Ser.* **147**, 295-300.
83. Preininger, C., I. Klimant, and O. S. Wolfbeis (1994), Optical fiber sensor for biological oxygen demand. *Anal. Chem.* **66**, 1841-1846.
84. Weppen, P., J. Ebens, B. G. Muller, and D. Schuller (1991), On-line estimation of biological oxygen demand using direct calorimetry on surface attached microbial cultures. *Thermochim. Acta.* **193**, 135-143.
85. Hutter, W., J. Peter, H. Swoboda, W. Hampel, E. Rosenberg, D. Kramer, and R. Kellner (1995), Development of microbial assay for chlorinated and brominated hydrocarbons. *Anal. Chim. Acta.* **306**, 237-241.
86. Peter, J., W. Hutter, W. Stollnberger, and W. Hampel (1996), Detection of chlorinated and brominated hydrocarbons by an ion sensitive whole cell biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 1215-1219.
87. Koenig, A., C. Zaborosch, A. Muscat, K. D. Vorlop, and F. Spener (1996), Microbial sensors for naphthalene using *Sphingomonas* sp. B1 or *Pseudomonas fluorescens* WW4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 844-850.
88. Ignatov, O. V., S. M. Rogatcheva, S. V. Kozulin, and N. A. Khorkina (1997), Acrylamide and acrylic acid determination using respiratory activity of microbial cells. *Biosens. Bioelectron.* **12**, 105-111.
89. Ignatov, O. V., S. M. Rogatcheva, O. V. Vasileva, and V. V. Ignatov (1996), Selective determination of acrylonitrile, acrylamide and acrylic acid in waste water using microbial cells. *Resources Conserv. Recycl.* **18**, 69-78.
90. Palchetti, I., A. Cagnini, M. Del Carlo, C. Coppi, M. Mascini, A. P. F. Turner (1997), Determination of acetylcholinesterase pesticides in real samples using a disposable biosensor. *Anal. Chim. Acta.* **337**, 315-321.
91. Mulchandani, A., P. Mulchandani, W. Chen, J. Wang, and L. Chen (1999), Amperometric thick-film strip electrodes for monitoring organophosphate nerve agents based on immobilized organophosphorous hydrolase. *Anal. Chem.* **71**, 2246-2249.
92. Sundenmeyer-Klinger, H., W. Meyer, B. Warninghoff, and E. Bock (1984), Membrane bound nitrite oxidoreductase of nitrobacter: evidence for a nitrate reductase system. *Arch. Microbiol.* **140**, 153-158.
93. Reshetilov, A. N., P. V. Iliasov, H. J. Knackmuss, and A. M. Boronin (2000), The nitrite oxidising activity of *Nitribacter* strains as a base of microbial biosensor for nitrite detection. *Anal. Lett.* **33**, 29-41.
94. Ikebukuro, K., M. Honda, K. Nakanishi, Y. Nomura, Y. Masuda, K. Yokoyama, Y. Yamauchi, and I. Karube (1996), Flow-type cyanide sensor using an immobilized microorganism. *Electroanalysis.* **8**, 876-879.
95. Koenig, A., J. Secker, K. Riedel, and A. Metzger (1997), A microbial sensor for measuring inhibitors and substrates for nitrification in wastewater. *Am. Lab.* 12-21.
96. Rouillon, R., M. Tocabens, and R. Carpentier (1999), A photochemical cell for detecting pollutant-induced effects on the activity of immobilized cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 230-235.
97. Pavlou, A. K. and A. P. F. Turner (2000), Sniffing out the truth: clinical diagnosis using the electronic nose. *Clin. Chem. Lab. Med.* **38**, 99-112.
98. Magan, N. and P. Evans (2000), Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *J. Stored Prod. Res.* **36**, 319-340.
99. Ukeda, H., G. Wagner, U. Bilitewski, and R. D. Schmid (1992), Flow injection analysis of short-chain fatty acids in milk based on a microbial electrode. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2324-2327.
100. Ukeda, H., G. Wagner, G. Weis, M. Miller, H. Klostermeyer, and R. D. Schmid (1992), Application of a microbial sensor for determination of short-chain fatty acids in raw milk samples. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **195**, 1-2.
101. Ukeda, H., Y. Fujita, M. Sawamura, and H. Kusunose (1994), Determination of short-chain fatty acids in raw milk using a microbial sensor and the relationship with

- milk quality. *Anal. Sci.* **10**, 683-685.
102. Schmidt, A., G. C. Standfuss, and U. Bilitewski (1996), Microbial biosensor for free fatty acids using an oxygen electrode based on thick film technology. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 1139-1145.
 103. Liu, B., Y. Cui, and J. Deng (1996), Studies on microbial biosensor for DL-phenylalanine and its dynamic response process. *Anal. Lett.* **29**, 1497-1515.
 104. Endo, H., A. Kamata, M. Hoshi, T. Hayashi, and E. Watanabe (1995), Microbial biosensor system for rapid determination of vitamin B-6. *J. Food Sci.* **60**, 554-557.
 105. Matsumoto, T., M. Fukaya, S. Akita, Y. Kawamura, and Y. Ito (1996), Determination of sulfite in various foods by the microbial biosensor method. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* **43**, 731-734.
 106. Matsumoto, T., M. Fukaya, Y. Kanegae, S. Akita, Y. Kawamura, and Y. Ito (1996), Comparison of the microbial biosensor method with the modified Rankine's method for determination of sulfite in fresh and dried vegetables including sulfur compounds. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* **43**, 716-718.
 107. Scheper, T. H. and F. Lammers (1994), Fermentation monitoring and process control. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 187-191.
 108. Munkittrick, K. R., E. A. Power, and G. A. Sergy (1991), The relative sensitivity of Microtox. Daphnid. Rainbow trout, fat-head Minnow acute lethality tests. *Environ. Toxicol. Water Qual. Int. J.* **6**, 35-62.
 109. Van Dyk, T. K., W. R. Majarian, K. B. Konstantinov, R. M. Young, P. S. Dhurjati, and R. La Rossa (1994), Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1414-1420.
 110. Gu, M. B., P. S. Dhurjati, T. K. Van Dyk, and A. LaRossa (1996), A miniature bioreactor for sensing toxicity using recombinant bioluminescent *Escherichia coli* cells. *Biotechnol. Prog.* **12**, 393-397.
 111. Rupani, S. P., M. B. Gu, K. B. Konstantinov, P. S. Dhurjati, T. K. Van Dyk, and R. A. LaRossa (1996), Characterization of the stress response of a bioluminescent biological biosensor in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Prog.* **12**, 387-392.
 112. Selifonova, O., R. Bulgare, and T. Barkay (1993), Bioluminescent sensor for the detection of Hg(II) in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3083-3090.
 113. Erbe, J. L., A. C. Adams, K. B. Raylor, and L. M. Hall (1996), Cyanobacteria carrying an smt: lux transcriptional fusion as biosensors for detection of heavy metal cations. *J. Ind. Microbiol.* **17**, 80-83.
 114. Cai, J. and M. S. DuBow (1997), Use of luminescent bacterial biosensor for biomonitoring and characterization of arsenic toxicity of chromated copper arsenate (CCA). *Biodegradation* **8**, 105-111.
 115. Peitzsch, N., G. Eberz, and D. H. Nies (1998), *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 453-458.
 116. Ramanathan, S., W. Shi, B. P. Rosen, and S. Daunert (1997), Sensing antimonite and arsenite at the subattomole level with genetically engineered bioluminescent bacteria. *Anal. Chem.* **69**, 3380-3384.
 117. Tauriainen, S., M. Karp, W. Chang, and M. Virta (1998), Luminescent bacterial sensor for cadmium and
 118. Ben-Israel, O., H. Ben-Israel, and S. Ulitzer (1998), Identification and quantification of toxic chemicals by use of *Escherichia coli* carrying lux genes fused to stress promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4346-4352.
 119. Paton, G. I., E. A. S. Rattray, C. D. Campbell, M. S. Cresser, L. A. Glover, J. C. L. Meeussen, and K. Killham (1997), Use of genetically modified microbial biosensors for soil ecotoxicity testing. In: Pankhurst, C., B. Doube, and V. Gupta (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health and Sustainable Productivity*. CAB international. pp. 397-418. Wellesbourne. UK.
 120. Preston, S., N. Coad, J. Townend, K. Killham, and G. I. Paton (2000), Biosensing the acute toxicity of metal interaction: are they additive, synergistic, or antagonistic? *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 775-780.
 121. Brown, J. S., E. A. S. Rattray, G. I. Paton, G. Reid, I. Caffoor, and K. Killham (1996), Comparative assessment of the toxicity of a papermill effluent by respirometry and luminescence-based bacterial assay. *Chemosphere.* **32**, 1553-1561.
 122. Bundy, J. G., J. L. Wardell, C. D. Campbell, K. Killham, and G. I. Paton (1997), Application of bioluminescence-based microbial biosensors to the ecotoxicity assessment of organotins. *Let. Appl. Microbiol.* **25**, 353-358.
 123. Fabricant, J. D., Jr. J. H. Chalmer, and M. W. Bhadbury (1995), Bioluminescent strain of *E. coli* for the assay of biocides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **54**, 90-95.
 124. Shaw, J., F. Dane, D. Geiger and J. Kloepper (1992), Use of bioluminescence for the detection of genetically engineered microorganisms released in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 267-273.
 125. Kobatake, E., T. Niimi, T. Haruyama, Y. Ikariyama, and M. Aizawa (1995), Biosensing of benzene derivatives in the environment by luminescent *Escherichia coli*. *Biosens. Bioelectron.* **10**, 601-605.
 126. Hollis, R. P., K. Killham, and L. A. Glover (2000), Design and application of a biosensor for monitoring toxicity of compounds to eukaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1676-1679.
 127. Unger, A., R. Tombolini, L. Molbak, and J. K. Jansson (1999), Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual grp-luxAB marker system. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 813-821.
 128. Marines, F. (2000), On-line monitoring of growth of *Escherichia coli* in batch cultures by bioluminescence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 536-541.
 129. Gibson, T. D. (1999), Biosensors: the stability problem. *Analysis* **27**, 630-638.
 130. Ogawa, J., S. Shimizu (1999), Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Trends Biotechnol.* **17**, 13-21.
 131. Srinivasan, M. C. (1994), Microbial biodiversity and its relevance to screening for novel industrially useful enzymes. *Curr. Sci.* **66**, 137-140.
 132. Rella, R., D. Ferrara, G. Barison, L. Doretti, and S. Lora (1996), High temperature operating biosensor for the determination of phenol and related compounds. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **24**, 83-88.
 133. Jeffries, C., N. Pasco, K. Baronian, and L. Gorton

- paste amperometric biosensor L-glutamate dehydrogenase. *Biosens. Bioelectron.* **12**, 225-232.
134. Arnold, F. H. (1998), Enzyme engineering reaches the boiling point. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 2035-2036.
 135. Gerday, C., M. Aittaleb, M. Bentahir, J. P. Chessa, P. Claverie, T. Collins, T. Lonhienne, M. A. Meuwis, and G. Feller (2000), Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* **18**, 103-107.
 136. Nandakumar, R., and B. Mattiasson (1999), A low temperature microbial biosensor using immobilized psychrophilic bacteria. *Biotechnol. Tech.* **13**, 689-693.
 137. Nies, D. H. (2000), Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles* **4**, 77-82.
 138. Pazirandeh, M., L. A. Chrisey, J. M. Mauro, J. R. Campbell, and B. P. Gaber (1995), Expression of the *Neurospora crassa* metallothionein gene in *Escherichia coli* and its effect on heavy-metal uptake. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 1112-1117.
 139. Cruz, N., S. L. LeBorgne, G. Ghavez-Hernandez, G. Gosset, F. Valle, and F. Bolivar (2000), Engineering the *Escherichia coli* outer membrane protein OmpC for metal bioadsorption. *Biotechnol. Lett.* **22**, 623-629.
 140. Brim, H., S. C. McFarlan, J. K. Fredrickson, K. W. Minton, M. Zhai, L. P. Wackett, and M. J. Daly (2000), Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nat. Biotechnol.* **18**, 85-90.
 141. D'Souza, S. E., W. Altekar, and S. F. D'Souza (1997), Adaptive response of *Haloflex mediterranei* to low concentration of NaCl (<20%) in the growth medium. *Arch. Microbiol.* **168**, 68-71.
 142. Tag, K., M. Lghmann, C. Chan, R. Renneberg, K. Riedel, and G. Kunze (2000), Measurement of biodegradable substances with a mycelia-sensor based on the salt tolerant yeast *Arxula adenivorans* LS3. *Sens. Actuators B* **67**, 142-148.
 143. Sousa, S., C. Duffy, H. Weitz, A. L. Glover, E. Bar, R. Henkler, and K. Killham (1998), Use of a *lux*-modified bacterial biosensor to identify constraints to bioremediation of btx-contaminated sites. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1039-1045.
 144. McGrath, S. P., B. Knight, K. Killham, S. Preston, and G. I. Paton (1999), Assessment of the toxicity of metals in soils amended with sewage sludge using a chemical speciation technique and a *lux*-based biosensor. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 659-663.
 145. Neudoerfer, F., and R. L. A. Meyer (1997), A microbial biosensor for the microscale measurement of bioavailable organic carbon in oxic sediments. *Marine Ecol. Prog. Ser.* **147**, 295-300.
 146. Riedel, K., A. V. Naumov, A. M. Boronin, L. A. Golovleva, H. J. Stein, and F. Scheller (1991), Microbial sensors for determination of aromatics and their chloroderivatives: determination of 3-chlorobenzoate using a pseudomonas-containing biosensor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 559-562.
 147. Matsunaga, T., S. Suzuki, and R. Tomoda (1984), Photomicrobial sensor for selective determination of phosphate. *Enzyme Microb. Technol.* **6**, 355-357.
 148. Suzuki, S., and I. Karube (1987), An amperometric sensor for carbondioxide based on immobilised bacteria utilising carbondioxide. *Anal. chim. Acta* **199**, 85-91.
 149. Karube, I., Y. Wang, E. Tamiya, and M. Kawarai (1987), Microbial electrode sensor for vitamin-B12. *Anal. Chim. Acta* **199**, 93-97.
 150. Renneberg, R., K. Riedel, and F. Scheller (1985), Microbial sensor for aspartame. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 180-181.
 151. Di Paolantonio, C. L., and G. A. Rechnitz (1982), Induced bacterial electrode for the potentiometric measurement of tyrosine. *Anal. Chim. Acta* **141**, 1-13.
 152. Di Paolantonio, C. L., and G. A. Rechnitz (1983), Stabilized bacteria-based potentiometric electrode for pyruvate. *Anal. Chim. Acta* **148**, 1-12.
 153. Webb, O. F., P. R. Bienkowski, U. Matrubutham, F. A. Evans, A. Heitzer, and G. S. Saylor (1997), Kinetics and response of a *Pseudomonas fluorescence* HK44 biosensor. *Biotechnol. Bioengng* **54**, 491-502.
 154. Saylor, G. S., C. D. Cox, R. Burlage, S. Ripp, D. E. Nivens, C. Werner, Y. Ahn, and U. Matrubutham (1999), Field application of a genetically engineered microorganism for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation process monitoring and control. In: Fass, R., Y. Flashner, S. Reuveny (Eds), Novel Approaches for Bioremediation of Organic Pollution. Kluwer Academic Plenum Press. New York. pp. 241-254.