

순환전압전류법을 이용한 수중 생물막 측정 전기화학센서

황병준^{1,2} · 이성호^{1,+}

Electrochemical Sensor for Detecting Underwater Biofilm Using Cyclicvoltammetry

Byeong Jun Hwang^{1,2}, and Sung Ho Lee^{1,+}

Abstract

Biofouling causes many problem in industrial processes, medical health industries, water utilities and our daily life. So detecting formation of biofilm on the surface of medical appliance, water pipe and industrial utility is highly important to prevent the problem caused by biofouling. In this study, we suggest an electrochemical sensor for detecting biofilm. We fabricated the electrochemical sensor in MEMS process and cultivated two different kinds of *Pseudomonas aeruginosa* RpoN type and Wild type on the surface of electrochemical sensor. Each group of *Pseudomonas aeruginosa* was cultivated according to the hours of 2, 4, 6, 8, 12 and 24. Then we investigated changes in degree of biofilm cultivation using cyclic voltammetry. As a result, it was observed that peak of the cyclic voltammetry curve is increased according as the biofilm growth on the surface of electrochemical sensor. Also we can discern between *Pseudomonas aeruginosa* RpoN type and Wild type.

Keywords : MEMS, Electrochemical sensor, Biofilm, Biofouling, Cyclicvoltammetry

1. 서론

생물막(biofilm)은 세균이나 조류와 같은 미생물이 물체표면이나 관내에 부착되어 분비하는 세포외고분자 물질로 형성한 3차원 군집체로 얇은 점액질의 형태를 띤다. 형성된 생물막은 산업용 배관, 상하수도 시설 및 일상 생활용품 등 미생물이 접근할 수 있는 모든 인공시설물 표면 및 삽입 보형물, 인공장기 및 의료, 치과장비 등의 표면에 형성되 각종 수인성 질병의 원인이 된다. 또한, 치과용 보형물, 치아표면 그리고 잇몸의 생물막은 치주염, 치은염, 충치와 같은 구강질환의 원인이 되며 생체삽입 보형물에 형성된 생물막의 경우 만성염증의 주원인으로 60% 이상의 감염성질환이 생물막에 의한 것으로 추산된다[1,2]. 생물막은 표면에 강하게 부착되어 제거가 어렵고 내부의 세균들을 보호하여 소독제나 항생제의 효과를 감소시키며 미생물은 일반적으로 부유생활을 하기 때문에 물리적인 제거가

힘든 수도관망의 내부, 작음 틈새와 구석등에 형성되어 효과적으로 제거하기가 어렵고 지속적으로 미생물 방출 및 생물막 탈리에 의한 2차 오염 또한 발생시킨다[3].

생물막 형성을 초기에 감지하는 것은 생물막을 손쉽게 제거할 수 있도록 도움을 주고, 수도관망내부, 의료/보건 장비에 형성되는 생물막에 의한 생물오손피해를 방지할 수 있기 때문에 다양한 각도에서 생물막에 감지에 대한 연구가 이루어졌다. 탁도와 광섬유 장치를 이용한 광학적인 변화를 측정하는 방법, 열전달이나 압력강하, 생물막의 두께를 직접측정하는 방법, 적외선이미지, 광음향분광법 그리고 생물막의 대사산물을 측정하는 간접적인 측정법, 등이 있지만 생물막 측정을 위해 관내부의 시료측정을 위해 관망을 분해해야 하거나 측정방법에 있어서 많은 시간 및 전문적인 기술을 필요로 하며 측정장비의 크기 및 설치에 어려움으로 인하여 실제 산업, 상하수도 그리고 의료현장에서의 적용은 미비한 것이 현실이다[4-9]. 전기화학적 측정방법은 장비의 운용면에서 용이하며 측정장비를 소형화하기에 유리하여 수도관망 내부나 의료, 치과장비 등 다양한 분야에 적용하기 쉽다[10].

본 연구는 전기화학 스트립센서 표면에 생물막을 형성시킨 후, 순환 전압전류법을 이용하여 센서에 형성된 생물막의 정량적 측정 가능여부에 관한 것이다. 먼저 전기화학센서는 MEMS공정을 이용하여 간단한 구조의 전기화학 스트립센서를 제작하였다. 비선택적

¹한국생산기술연구원(Korea Institute of Industrial Technology)
1271-18, Sa-3-dong, Sangnok-gu, Ansan-si, Gyeonggi-do, 426-910, Korea

²부산대학교 기계공학부(Graduated School of Mechanical Engineering, Pusan National University)
Busandaehak-ro, 63beon-gil, Geumjeong-gu, Busan, 609-735, Korea

⁺Corresponding author: memslee@kitech.re.kr

(Received : Jul. 23, 2012, Revised : Sep. 12, 2012, Accepted : Sep. 13, 2012)

으로 표면에 형성되는 생물막의 특징을 이용하여 센서의 전극표면에 각각 두 종류의 *Pseudomonas aeruginosa*를 배양하였다. Wild type과 rpoN type 두 종류의 *Pseudomonas aeruginosa*를 배양하였으며 wild type은 rpoN type에 비하여 생물막을 빠르고 많이 형성하지만 rpoN type의 경우 생물막 형성량은 상대적으로 적지만 더욱 끈적한 성질의 생물막을 형성하는 특징이 있다[11]. 각각 2, 4, 6, 8, 12, 24 시간으로 순차적으로 배양하여 생물막을 형성하도록 한 뒤, 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색을 하고 현미경 관찰을 통하여 시간대에 따른 배양 및 생물막 형성 정도를 관찰하였다. 다음으로 생물막이 형성된 센서들을 전위차계를 사용해 순환 전압전류법으로 측정하여 생물막 형성 정도를 확인하고, wild type과 rpoN type의 생물막형성 특성을 비교하여 생물막형성 데이터를 수집하여 분석하였다.

2. 연구 방법

2.1 전기화학 스트립센서의 제작

본 연구에서 제작된 전기화학센서의 제작과정은 Fig. 1과 같다. 6 인치 실리콘 웨이퍼표면에 절연층으로써 질화막을 성장시킨 후 질화막 표면과 금과의 접착력을 개선하기 위해서 크롬층을 증착 한 뒤 금을 증착하고 사진공정을 이용해서 금 전극을 제작하였다. 이후 단자부(socket)와 전극(electrode)을 제외한 영역에 SU-8 을 이용하여 절연층을 형성하였다. 센서의 금 전극은 후에 Flow cell 을 이용한 실험이 가능하게 원형패턴으로 제작하고, 단자부는 범용직렬버스 단자규격에 대응하게 제작하여 전위차계(potentiometer)를 이용한 측정에 용이하도록 하였다. 수중에서 센서의 작동을 고려하여 생물막이 형성될 작업전극(working electrode)에는 부식에 의한 영향이 적은 금을 전극으로 사용했으며, 상대전극(counter electrode)으로는 백금을 기준전극(reference electrode)은 은/염화은 전극을 사용 하였다.

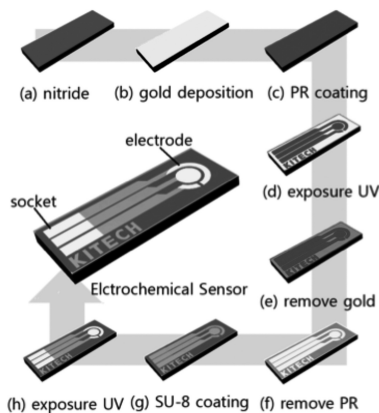


Fig. 1. Fabrication of electrochemical sensor.

2.2 *Pseudomonas aeruginosa* 배양 및 생물막 형성

영하 70℃에 냉동보관중인 *Pseudomonas aeruginosa* wild type과 rpoN type의 균주를 각각 상온에서 해동하여 최종농도가 1%(v/v)가 되게 접종한 뒤 LB broth with 100 ug/ml carbenicillin 미디어에 37℃로 설정해둔 진탕배양기에서 200 rpm으로 16~17시간 과배양하였다. 진탕배양이 된 균주를 10 ul 채취하여 슬라이드 글라스에 올려놓고 커버 글라스로 덮은 뒤 형광현미경으로 GFP가 잘 발현되었는지 확인하였다. 제작해 둔 전기화학 스트립센서를 이소프로필 알코올로 세정하고 페트리디쉬에 전기화학 스트립센서를 넣고 10 um의 미디어와 진탕배양한 *Pseudomonas aeruginosa* 균주를 최종농도 1%(v/v)가 되도록 접종하였다. 배양 시간을 각각 2, 4, 6, 8, 12, 24 시간으로 순차적으로 생물막을 형성 하였다.

2.3 생물막 염색 및 현미경 관찰

전기화학 스트립센서의 전극표면에 형성된 생물막의 이미지를 얻기 위해서 광학현미경을 이용하였다. 전극표면의 생물막 및 배양된 *Pseudomonas aeruginosa*를 관찰하기 용이하도록 배양 시간 별로 센서를 수거하여 distilled water로 세정하고 1% 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. 크리스탈 바이올렛은 음전하를 띠고있는 세포막 염색에 사용되는 시약으로 생물막을 염색해 보라색을 띄게 하여 현미경을 이용하여 생물막이 형성된 부분을 관찰하기 용이하도록 한 뒤 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

2.4 전위차계를 이용한 순환 전압전류측정

전극표면에 형성된 생물막과 *Pseudomonas aeruginosa*를 전기화학적 방법인 순환전압전류법으로 측정하였다. 순환 전압전류법은 전위차계(versa stat II, Princeton Applied Research, USA)를 사용하여 측정하였으며, 전극표면이 생물막으로 덮인 전기화학 스트립센서를 범용직렬버스 단자를 이용하여 전위차계에 연결한 뒤, 센서의 전극부분을 1 mol 농도의 염화포타슘 수용액에 잠기도록 하였다. 전기화학 신호 분석 프로그램(Versa studio, Princeton Applied Research, USA)을 이용하여 vertex는 각각 0.8, -0.8 v, step height를 1, step time은 0.01 sec, cycle count 그리고 전극의 재질을 선택하여 데이터 수집 및 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 전극 표면의 부착 미생물 및 생물막 이미지

양전하를 띠고있는 크리스탈 바이올렛으로 염색을 하면 음전하

를 가지는 표면에만 염색이 되어 생물막이 형성된 부분만 보라색을 띄게 된다. Fig. 2는 작업전극 표면에 형성된 생물막을 크리스탈 바이올렛으로 염색한 뒤 형성시간에 따른 생물막의 형성 정도를 광학 현미경을 이용해 관찰한 이미지이다. wild type과 rpoN type 시간이 경과함에 따라 미생물 및 생물막이 점차 증가하는 것을 확인할 수 있으며, wild type이 rpoN에 비하여 미생물 및 생물막의 형성이 빠르게 진행되는 것을 관찰할 수 있다.

time	wild tipe (X20)	rpoN (X20)
2 hour		
4 hour		
6 hour		
8 hour		
12 hour		
24 hour		

Fig. 2. Microscopic image of biofilm on surface of electrochemical sensor.

3.2 미생물 부착에 따른 순환전압전류 곡선

본 실험에서 사용한 전해액은 염화포타슘 수용액으로 은/염화은 전극과의 산화, 환원종이 존재하지 않기 때문에 순환 전압전류곡선의 특정전위에서 봉우리값(peak)를 갖지 않는다. 따라서 전극표면에 형성된 미생물 및 생물막에 의한 산화, 환원에 의해 순환 전압전류곡선의 변화가 생기게 된다. Fig. 3의 배양시간에 따른 순환 전압전류곡선이다. 이를 관찰해보면 전위 400 mV 부근에서 완만한 환원 봉우리 값이 나타나는 것을 확인할 수 있으며, 이 봉우리 값을 측정해 시간에 대한 곡선으로 나타내면 Fig. 4와 같이 배양시간이 증가함에 따라 순환전압전류곡선에서의 봉우리 값이 비례하여 증가하는 것을 관찰할 수 있다. 이는 전극표면에 형성된 미생물 및 생물막이 많이 형성될수록 전극표면에서 환원이 활발하게 이루어져 순환전압전류곡선에서의 전류 봉우리 값 또한 증가하는 것으로 생각된다.

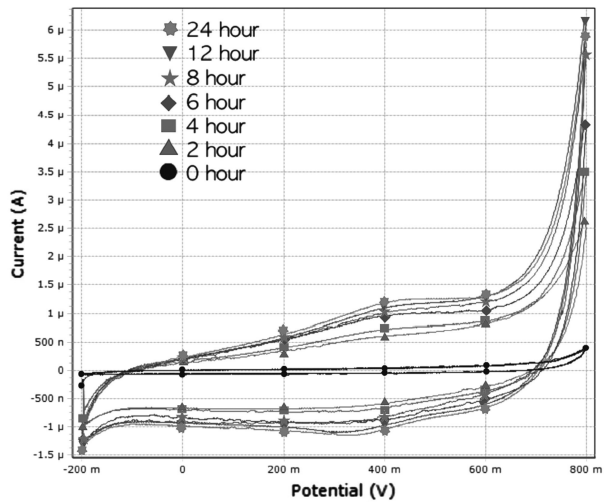


Fig. 3. Cyclic-voltammogram of cultivated *Pseudomonas aeruginosa*.

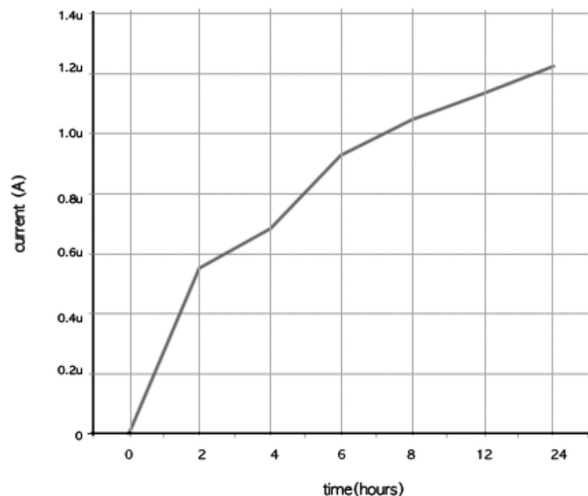


Fig. 4. Peak current at 400 mV potential.

3.3 Wild과 rpoN type의 생물막 형성에 따른 순환전압전류 곡선

Fig. 2의 현미경 분석을 통하여 wild type이 rpoN에 비하여 같은 배양시간에서 더 많은 생물막을 형성하는 것을 확인하였다. 같은 시간 동안 배양된 두 시편을 순환전압전류법을 이용하여 측정해보면 아래 Fig. 5과 같이 wild type의 400 mV에서 전류 봉우리값이 rpoN의 전류 봉우리값에 비하여 더 높은 것을 확인할 수 있다. 이는 wild type이 생물막 형성량이 더 많아서 생물막표면에서 전해액으로 환원이 더 활발하게 이루어져서 상대적으로 생물막 형성이 적은 rpoN에 비하여 높은 전류 봉우리값을 갖는 것으로 판단된다. 미생물 및 생물막 형성초기인 Fig. 5에서는 곡선에서 보다 어느 정도 형성이 진행된 Fig. 6에서 두 곡선의 차이가 크게 보이는 결과로부터 wild type이 더 빠르게 성장 및 생물막 형성을 하는 것으로 볼

수 있다. Fig. 2의 미생물, 생물막 형성도와 비교하면 미생물, 생물막 형성도에 따른 봉우리 값의 높이 차이가 나타나는 이유는 생물막이 전극표면에 많이 형성 될수록 환원이 활발히 일어나 더 높은 봉우리 값을 갖는 것으로 판단된다.

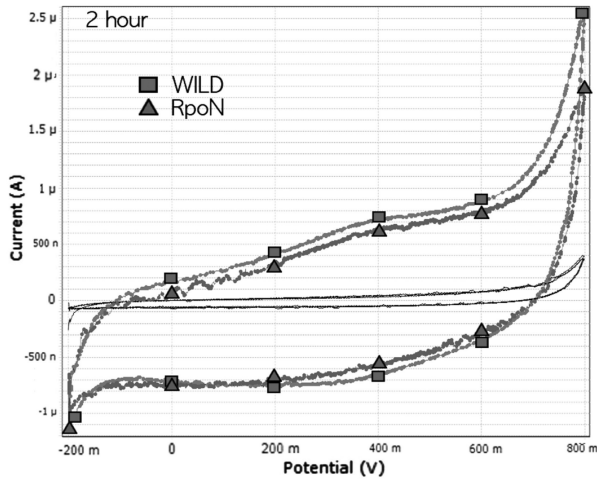


Fig. 5. Comparing cyclic-voltammogram of cultivated *Pseudomonas aeruginosa* wild type and rpoN at 2 hours.

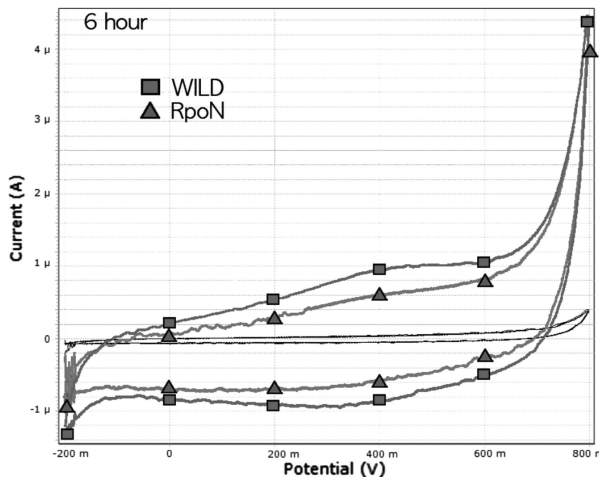


Fig. 6. Comparing cyclic-voltammogram of cultivated *Pseudomonas aeruginosa* wild type and rpoN at 6 hours.

4. 결론

본 연구에서는 전기화학적 측정방법인 순환 전압전류법을 이용하여 미생물 및 생물막의 부착과 형성에 의한 변화를 측정하였다. 같은 종의 균주의 경우 같은 전압영역에서 전류 봉우리 값을 갖고, 미생물 및 생물막의 형성도에 따라 전류 봉우리값에 차이가 나타나는 것을 확인하였다. 또한 이 전류 봉우리값의 차이를 이용하여 미생물 및 생물막의 형성정도의 측정을 시도하였다.

미생물 및 생물막의 형성도를 관찰하기 위하여 전극표면에 배양된 생물막을 크리스탈 바이올렛을 이용하여 염색한 뒤 광학현미경을 통하여 관찰하였으며 염화포타슘 수용액을 전해질로 사용한 순환전압전류법으로 형성된 미생물 및 생물막을 측정하였다. 순환전압전류곡선의 전류봉우리 값의 변화는 미생물 및 생물막 형성도에 따라 전류 봉우리값의 변화가 나타나는 것으로 관찰 되었으며, 전류 봉우리 값의 변화를 광학현미경 이미지와 비교하여 미생물 및 생물막의 형성량이 순환전압전류 곡선의 전류 봉우리 값에 비례하여 증가하였다. 이는 전극표면에 형성된 미생물 및 생물막의 산화환원에 기인한 것이며, wild type과 rpoN의 비교를 통해 미생물 및 생물막의 형성도가 많을수록 전류봉우리 값이 높게 나타나는 것을 확인하였다. 또한, 형성초기에 전류봉우리 값의 변화폭이 큰 것을 이용하여 형성초기단계에 미생물 및 생물막 생성을 효과적으로 감지할 수 있을 것으로 판단된다. 추후 지속적인 실험을 통해서 전류 봉우리 값을 생물막 형성 두께나 정량적인 측정 결과와 비교 분석이 가능할 것으로 기대되며, 생물막 모니터링 센서로서의 적용 가능성을 확인하였다. 정량적인 측정을 위하여 추가적인 실험과 해석을 통해 보다 간편하고 손쉬운 미생물 및 생물막 형성 센서로서의 가능성을 기대한다.

감사의 글

본 연구는 IT기반 생활 센서 기술 개발과제의 일환으로 진행되었습니다.(No.UR110011)

미생물 균주 배양 및 생물막 형성에 도움을 준 이화여대 화학나노공학부 바이오매트릭스 실험실에게 감사를 드립니다.

REFERENCES

- [1] M. W. LeChevallier, N. J. Welch, and D. B. Smith, "Full scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water", *Applied and Environmental Microbiology.*, Vol. 62, No. 7, pp. 2201-2211, 1996.
- [2] Y.-L. Patrick and J. M. Ross, "Erosion from *Staphylococcus aureus* biofilms grown under physiologically relevant fluid shear forces yields bacterial cells with reduced avidity to collagen", *Applied and Environmental Microbiology.*, Vol. 73, No. 6, pp. 1834-1841, 2007.
- [3] R. M. Landry, D. An, J. T. Hupp, M. R. Parsek, and R. P. Metthew, "Mucin *Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic

- resistance”, *Molecular Microbiology*, Vol. 59, No. 1, pp. 142-151, 2006.
- [4] J. G. Knudsen, “Apparatus and techniques for measurement of fouling of heat transfer surfaces”, *Somerscales EFC & Knudsen JG fouling of heat transfer equipment*, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 1981.
- [5] T. Schmid, U. Panne, C. Haisch, and R. Niessner, “Photoacoustic absorption spectra of biofilm”, *Review of Scientific Instruments*, Vol. 74, pp. 755-757, 2003.
- [6] J. Klahre and H. C. Flemming, “Monitoring of bio-fouling in papermill process waters”, *Water research*, Vol. 34, No. 14, pp. 3657-3665, 2000.
- [7] D. E. Niven, R. J. Palmer, and D. C. White, “Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 15, pp. 263-276, 1995.
- [8] A. Tamachkiarow and H. C. Flemming, “On-line monitoring of biofilm formation in a brewery water pipeline system with a fiber optical device”, *Water Science and Technology*, Vol. 47, No. 5, pp. 39-43, 2003.
- [9] P. Tintah and T. R. Bott, “Biofouling assessment using an infrared monitor”, *Water Science and Technology*, Vol. 47, No. 5, pp. 39-43, 2003.
- [10] I. Kleps, M. Mihaela, C. Florea, and S. Monica, “Development of the micro and nanoelectrodes for cell investigation”, *Microelectronic Engineering*, Vol. 84, pp. 1744-1748, 2007.
- [11] J. S. Lim, Y. D. Chui, Y. J. Oh, J. R. Park, W. Jo, Y. H. Cho, and S. S. Park “Studying the effect of alginate overproduction on aeruginosa Biofilm by atomic force microscopy”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 11, pp. 1-6, 2011.
- [12] S. C. Chang, “Alizarin Red S modified electrochemical sensors for the detection of aluminum ion”, *J. Kor. Sensors Soc.*, Vol. 19, No. 6, PP. 421-427, 2010.
- [13] J. S. Park, “Trends in recent sensor technology using nano materials-Review”, *J. Kor. Sensors Soc.*, Vol. 18, No. 5, pp. 327-336, 2009



황 병 준 (Byeong Jun Hwang)

- 2010년 한라대학교 의료기계공학과 졸업(공학사)
- 2011년 ~ 현재 부산대학교 정밀기계공학과 재학 중
- 2011년 ~ 현재 한국생산기술연구원 학생연구원
- 관심분야 : MEMS sensor, Surface treatment



이 성 호 (Sung Ho Lee)

- 1992년 부산대학교 무기재료공과 졸업(공학사)
- 1995년 부산대학교 무기재료공과 졸업(공학사)
- 2001년 Tohoku대학교 기계전자공학과 졸업(공학박사)
- 1994년 ~ 1997년 포항산업과학연구원 선임연구원
- 2001년 ~ 2005년 일본 산업기술종합연구소 연구원
- 2005년 ~ 2008년 나노종합팹센터 바이오멤스팀장
- 2008년 ~ 현재 한국생산기술연구원 수석연구원
- 관심분야 : MEMS, Biomimetic System, Nanofabrication