

저농도 측정용 BOD Meter의 개발과 응용

손 무 정

신성대학 환경공업과

The Development and Application of BOD Meter for Low Concentration

Moo Jeong Sohn

Department of Environmental Industry, Shinsung College

Dangjin-gun Jungmi-myun Duckma-ri San-49, Chungnam 343-860, Korea

A bioreactor system consisting of microorganisms immobilized in ca-alginate beads and capsules and columns divided by nylon nets for the estimation of biochemical oxygen demand(BOD). When a sample solution was pumped into the bioreactor, the dissolved oxygen(DO) in the sample was decreased with the concentration of organic compounds. A good linear relationship was observed between the DO decrease and the concentration of standard solution. When this BOD meter was applied to river water, good comparative results were obtained between BOD monitored by this bioreactor system and that determined by the conventional method.

Key words : Bioreactor system, BOD meter 수질오염물질 시안, 폐놀의 정도관리 향상에 관한 연구

1. 서 론

생물화학적산소요구량(Biochemical Oxygen Demand; BOD)는 일반적으로 배양 전후의 DO값의 차이로 나타내며, 시료의 DO량 감소는 시료 중에 존재하는 미생물의 대사활성도(metabolic activity)에 의하여 일어난다. 1936년 미국의 American Public Health Association Standard Methods Committee는 BOD₅를 제안하였다.

기존의 BOD 측정은 5일 동안의 긴 시간과 큰 개인 오차를 수반하는 문제점이 있었으므로 1977년 Karube 등¹이 짧은 시간 내에 정확하게 BOD를 측정하려는 시도를 하였다. 그들은 *Clostridium butyricum*을 collagen 막에 고정화하고 그것을 다시 산소 전극에 부착하여 최초의 BOD 센서를 개발하였다. 1979년 Hikuma 등²도 *Trichosporon cutaneum*을 다공성 acetylcellulose 막 사이에 고정하여 BOD를 측정하였을 때 18분의 감응시간이 소요되었으나 재측정을 위한 전류 회복시간이 50분이 소

요되었다. 1991년 Li 등³은 *Hansenula anomala*를 cellulose 막 사이에 고정하여 BOD를 측정하였으며, 이 때 감응시간은 20분이 소요되었다. 이외에도 *Pseudomonas* sp.,⁴ *E. Coli*,⁵ *Bacillus subtilis*⁶ 및 고온성 박테리아⁷ 등을 이용한 BOD 센서가 보고되어 있으며, 최근에도 계속하여 BOD 센서에 대한 연구가 이루어지고 있다. 한편, 국내에서는 Sohn 등이 *Hansenula anomala*,⁸ *Trichosporon cutaneum*^{9,10} 등을 이용하여 BOD 센서와 생물반응기를 이용한 BOD 측정장치를 보고한 바 있다.

지금까지 개발되거나 보고된 BOD 측정장치는 주로 고농도에 적합한 것이므로 저농도에서는 정확한 값을 측정하지 못하는 단점이 있었다.

따라서 본 연구에서는 *Trichosporon cutaneum*과 *Wine yeast*를 이용하여 연속적으로 측정이 가능하고 감응시간이 짧은 저농도에 적합한 BOD meter를 제작하여 감응특성을 조사하여 실제 폐수에 적용하였다.

2. 실험

2.1. 실험기기 및 기구

BOD 미터의 조립을 위한 산소 전극은 YSI O₂ 전극을 사용하였으며, 측정장치는 개인용 컴퓨터에서 시간별로 신호를 저장할 수 있도록 직접 제작하여 사용하였다. Peristaltic 펌프는 EYELA의 Micro tube pump MP-3N를 사용하였으며, 용액의 pH는 Orion Research의 digital pH/mV meter 611을 사용하였다. 미생물의 배양을 위한 배양기와 진탕 배양기는 JEIO Tech의 IB-450M과 SI-900R을 각각 사용하였다. BOD₅를 측정하기 위해서는 SANYO MIR-253 incubator에서 시료를 배양시켰다. Hanil Science HA-1000-3 원심분리기를 이용하여 배양된 미생물을 집균하였다.

2.2. 시약 및 재료

표준용액은 JIS¹¹에 따라 glucose(Sigma) 150 mg/l 와 glutamic acid(Sigma) 150 mg/l 의 혼합용액(GGA)을 사용하였으며, 이 용액의 BOD는 220±22이다. 실험균주는 *Trichosporon cutaneum*(ATCC 22164)과 *Wine yeast*(KCCM 12650)이었으며, 균주를 배양하기 위한 yeast extract는 Sigma, MacConkey agar, malt extract와 peptone은 Difco 제품을 각각 사용하였다. 미생물을 고정화하기 위한 sodium alginate와 CaCl₂는 Junsei, xanthan gum은 Sigma 제품을 각각 사용하였다.

2.3. 미생물의 배양

*W. yeast*는 glucose 2%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3% 및 peptone 0.3%를 포함하는 배지에서 배양하였으며, 고정화 미생물의 성장배지도 같은 배지를 사용하였다. 한편, *T. cutaneum*은 Macconkey를 사용하여 배양하였으며, 성장배지는 *W. yeast*의 배지와 같은 것을 사용하였다.

Capsule을 제조하기 위해서 *W. yeast*를 배지 100 ml에 접종하여 28°C의 진탕배양기에서 200 rpm으로 8시간 동안 2회에 걸쳐 계대배양 하였다. 배

양액 10 ml를 취하여 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 집균하고 이를 1.3 g CaCl₂와 0.26 g xanthan gum이 혼합된 용액 100 ml에 현탁하였다. 이 현탁 용액에 [nonoxynol(polyethyleneglycols mono(nonyl-phenyl)ether)] 용액 250 ml에 적가하여 캡슐을 제조하고 5분 동안 증류수로 세척한 다음 0.5% CaCl₂가 포함된 0.1M Tris-HCl 완충용액(pH 6.9)에서 1시간 동안 담그어 저어 줌으로써 capsule 막을 강화하였다. 강화된 캡슐을 0.5% CaCl₂를 포함하는 성장배지에서 배양조건과 같은 조건으로 48시간 성장시켜 실험에 이용하였다.

Bead를 제조하기 위해서는 *T. cutaneum*을 배지 100 ml에 접종하고 28°C의 진탕배양기에서 24시간 배양한 다음 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 집균하고 증류수로 3회 세척하였다. 세척된 미생물 5 g을 2.5% sodium alginate 용액 100 ml에 완전히 현탁하여 2% CaCl₂ 용액에 적가하여 bead를 제조하였다. 이 bead를 0.5% CaCl₂를 포함하는 성장배지에서 24시간 동안 성장시켜 실험에 이용하였다.

2.4. 미생물 반응기의 제작

고정화된 미생물로 충전된 미생물 반응기를 항온조 내에 담그어 온도 조절이 가능하게 하고, 여기에 peristaltic 펌프와 실험실에서 개발한 DO 미터 및 폭기장치(aerator)를 연결함으로써 BOD 미터를 조립하였다.

여기에서 사용된 미생물 반응기의 각 단(stage)은 내경이 15 mm이고 높이는 17 mm인 나일론 재질로 된 원통형이며, 상부에는 암사산을 만들고 하단부는 수나사산을 내어 서로 연결할 수 있도록 제작하였다. 각 단의 하단부에 나일론 그물을 부착하고 그 내부에 고정화 미생물을 충전하여 서로 연결함으로써 미생물 반응기를 조립하였다.

2.5. 측정방법

미생물 반응기는 항온조(JEIO TECH, RBC-10)를 이용하여 일정한 온도를 유지하였다. 미생물 반응기에 시료, 표준용액, 완충용액 및 수돗물이 들어가기 전에 이들이 순간적으로 충분히 폭기되도록

록 특별히 고안된 폭기장치를 이용하였다. 먼저 수돗물이나 완충용액을 미생물 반응기에 공급하여 용존산소 농도가 정류상태에 도달하면 공급을 중단하고 표준용액을 완충용액이나 수돗물과 같은 조건으로 공급하여 정류상태에 도달했을 때 용존산소 농도를 측정한다. 시료도 같은 방법으로 용존산소의 농도를 측정하여 그 자료로부터 BOD값을 계산하였다. 비교 자료로서는 BOD₅를 JIS법¹¹으로 측정하여 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 폭기장치의 영향

일반 폐수처리장의 폭기조 내 용존산소의 양은 항상 2 ppm 이상을 유지하여야 하므로 BOD 미터에서도 용존산소의 양은 매우 중요한 인자이다. 미생물 반응기에서 반응전 용존산소의 양이 가능하면 높아야 미생물의 대사가 활성을 갖게 되어 저농도에서도 반응이 일어나게 될 것이다. 또한, 초기의 용존산소의 양이 항상 일정하게 유지되어야 오차를 줄일 수 있으므로 저농도 시료의 BOD 측정이 가능하게 된다.

따라서 초기 용존산소의 양을 일정하게 유지시키고 용존산소의 양을 증가시키기 위하여 Fig. 1과 같이 장치하고 공기가 나오는 부분의 높이를 다르게 함으로써 시료와 공기의 접촉시간을 다르게 하였다. 공기가 나오는 부분의 높이(Fig. 1의 C)에 따라 산소가 순간적으로 얼마나 용해되는지를 실험한 결과 그 높이가 3 cm까지는 거의 차이가 없었으나(ΔDO 1.59~1.70 mg/l) 6.5 cm일 때가 비교적 높은 용존산소값을 유지하였으며(ΔDO 2.37 mg/l), 그 이상에서는 높이에 다른 효과가 거의 없었다.

3.2. 감응특성

온도, pH, 여러 가지 유기물에 의한 영향 및 고정화 미생물의 수명은 Sohn 등의 결과를 참고하였으며, pH 7.0인 0.1M Tris-HCl 완충용액에서 30°C의 조건을 이용하였다.

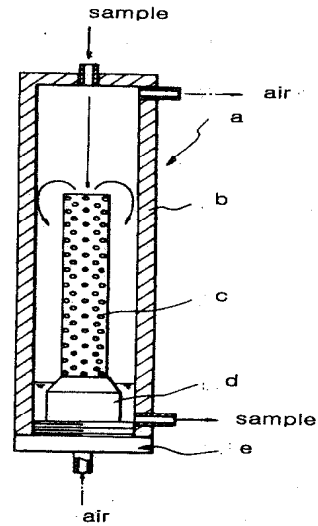


Fig. 1. Schematic diagram of aerator for the aeration of sample: a. aerator; b. nylon tube; c. air spreader; d. air spreader supporter; e. sealed bottom.

Fig. 2는 5 mg/l의 GGA용액을 3분간 흘려주었을 때 bead와 캡슐의 반응성을 비교한 것이며, *T. cutaneum*의 경우는 특성상 캡슐의 안쪽 공간에서 성장하지 않고 캡슐 막에서 성장하므로 캡슐의 제조가 불가능하여 캡슐은 *W. yeast*를 이용하여 제조하였다. 일반적으로 미생물의 세대기간이 약 20분 정도이므로 캡슐내 미생물의 양은 시간에 따라 변화하므로 정류상태의 값이 매우 불안정하였으나 최대값과 최소값을 이용하면 검정선을 작성할 수는 있었다. *W. yeast*를 이용하여 bead를 제조하였을 때는 *W. yeast*의 크기가 작으므로 용액을 흘려주었을 때의 마찰에 의하여 bead로부터 떨어져 나가므로 bead의 수명이 짧았다.

Fig. 2에서 처음 용존산소의 농도는 완충용액만을 흘려주었을 때 얻어지며, 이 값은 bead에 고정화된 미생물의 내생호흡 상태를 나타낸다. 시료 용액이 미생물 반응기에 도달하면 미생물에 의하여 용존산소의 소모가 시작되고 점차적으로 용존산소의 감소가 일어나 정류상태에 도달하게 된다. 정류상태의 값은 시료 용액의 BOD에 의존하며 10분 내에 최저점에 도달하였으며, 다시 완충용액을 흘려주면 30분 내에 원래의 용존산소 농도로 회복되었다.

결과에 따라 *T. cutaneum*을 이용한 bead의 경우는 매우 안정한 정류상태의 값을 얻었으므로 모든 실험은 *T. cutaneum*이 고정화된 bead를 사용하여 실시하였다.

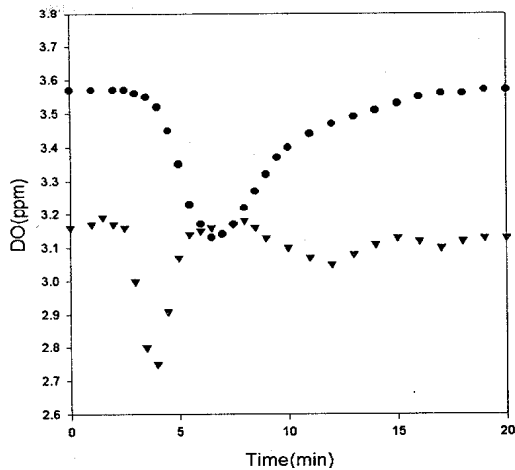


Fig. 2. Typical response curves of the bioreactor system for BOD estimation by capsule (▼) and bead(●).

3.3. 완충용액과 수돗물의 영향

Fig. 3은 완충용액과 수돗물을 사용한 경우를 비교한 것이며, 두 경우 모두 bead의 강화를 위하여 0.5%의 CaCl_2 를 혼합하여 사용하였다. 0.1M tris-HCl 완충용액을 사용하였을 때가 매우 안정된 값을 얻었으나 수돗물의 경우도 비교적 안정된 값을 나타내어 BOD의 측정에 사용할 수 있었다.

실험실 규모로 BOD 미터를 이용할 경우에는 측정값의 신뢰도를 높일 수 있도록 완충용액을 사용하는 것이 효율적이며, 현장에서 계속적으로 가동할 경우에는 완충용액의 양이 과다하게 사용되므로 경제적이지 못하다. 따라서 폐수처리장 등의 현장에서는 수돗물을 그대로 사용하더라도 비교적 재현성이 좋은 측정을 수행할 수 있으므로 수돗물을 사용하여 모든 실험을 수행하였다.

한편, sodium alginate를 이용하여 bead나 캡슐을 제조하면 bead나 캡슐의 주성분은 calcium alginate가 되므로 다른 완충용액의 경우는 Ca^{2+} 와의 용해

도움을 반드시 고려하여야 한다. 그러므로 완충용액을 사용하거나 수돗물을 사용할 때 bead나 캡슐에서 Ca^{2+} 의 용해를 방지하기 위하여 CaCl_2 를 사용하였다.

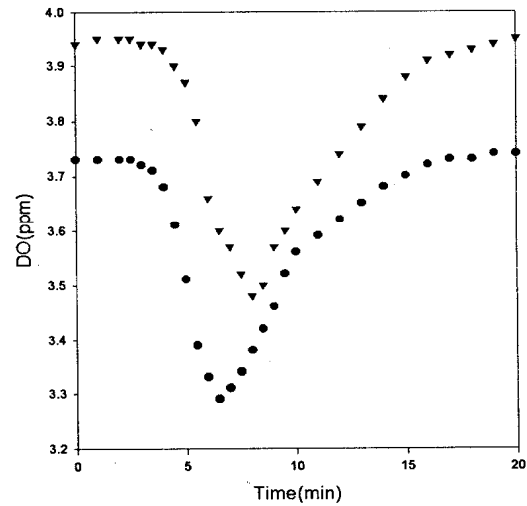


Fig. 3. Comparison of the response of the bioreactor system in 0.1M tris-HCl buffer solution(●) and tap water(▼).

3.4. 검정선

BOD를 측정하기 위한 이 BOD 미터의 검정곡선을 작성하기 위하여 표준용액의 ΔDO 를 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 실제 Sohn 등의 결과에 의하면 미생물 반응기를 사용할 경우 GGA의 농도 130 mg/l 까지 직선성을 나타내지만 순간적으로 산소의 용해도를 높여 초기 용존산소의 농도를 일정하게 해 줌으로써 Fig. 4에 표시된 바와 같이 pH 7.0, 30°C에서 GGA 표준용액 10 ppm 이하에서도 좋은 직선 관계를 나타내었으며, 이 검정선의 상관계수는 0.998이었다.

또한, 미생물막을 사용하는 biosensor 형태의 BOD 측정기에서 미생물막에는 소량의 미생물을 사용하므로 외부 조건의 영향을 많이 받기 때문에 사용하지 않을 때는 미생물막을 냉장보관하여야 오랫동안 사용할 수 있는 단점이 있으나 미생물 반응기는 실온에 방치하여도 계속하여 사용할 수 있다.⁵

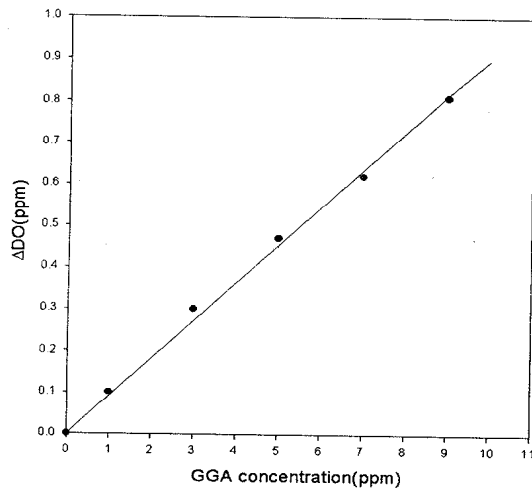


Fig. 4. Calibration curve for BOD estimation on the optimum conditions.

3.5. 실제 시료에 대한 응용

기존의 biosensor 형태의 BOD 센서는 주로 완충용액을 사용하기 때문에 시료의 농도가 묽은 하천수의 경우는 완충용액으로 희석하여 사용하여야 한다. 그러므로 농도가 낮은 시료는 측정시에 더욱 더 농도가 낮게 되어 측정이 불가능하게 된다. 따라서 수돗물을 그대로 이용할 경우에는 시료가 희석되지 않으므로 비교적 높은 농도에서 측정할 수 있게 된다.

Table 1은 여러 가지 하천수의 BOD를 BOD 미터로 측정하고 그 결과를 BOD₅와 비교한 것이다. BOD₅ 값이 10% 오차를 수반하므로 이 결과의 신뢰도는 높은 것으로 간주된다.

따라서 하천수나 폐수처리장 방류수와 같은 농도가 묽은 시료의 BOD 측정에 이 미생물반응기를 이용할 경우 BOD₅법은 물론 미생물막을 이용하는 biosensor에 비하여 빠르고 연속적으로 정확히 BOD의 측정이 가능할 것이다.

감사의 글

이 연구는 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사 드린다.

Table 1. Applications of the bioreactor system.

sample No.	Bioreactor	BOD ₅ method	difference(%)
1	5.7	6.0	5.3
2	4.2	4.5	7.1
3	6.8	7.4	8.8
4	5.8	5.3	9.4
5	9.2	8.6	7.0
6	3.6	3.8	5.6

참 고 문 헌

1. I. Karube, T. Matsunaga, S. Mitsuda and S. Suzuki, *Biotechnol. Bioeng.*, **1977**, 19, 1535-1547.
2. M. Hikuma, H. Suzuki, T. Yasuda, I. Karube and S. Suzuki, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1979**, 8, 289-297.
3. Y. R. Li and J. Chu, *Appl. Biochem. Biotech.*, **1991**, 28/29, 855-863.
4. X. Zang, Z. Wang and H. Jian, *Huanjing Kexue Xuebao*, **1986**, 6, 184; C.A.(1986)105, 158286.
5. N. Kawabata and N. Nakamura, **1986**, *Abstracts of the International Symposium on new Sensors and Methods for Environmental Characterization*, Kyoto.
6. K. Riedel, R. Renneberg, M. Khn and F. Scheller, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1988**, 28, 316-321.
7. I. Karube, K. Yokoyama, K. Sode and E. Tamiya, *Anal. Lett.*, **1990**, 22, 791-801.
8. G. S. Ihn, K. H. Park, U. H. Pek and M. J. Sohn, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **1992**, 13, 145-148.
9. M. J. Sohn, E. J. Kim, S. Y. Jang and D. Hong, *Anal. Sci. & Tech.*, **1994**, 7(3), 285-291.
10. M. J. Sohn, J. W. Lee, C. Chung, G. S. Ihn and D. Hong, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 313, 221-227.
11. Japanese Industrial Standard Committee, **1986**, *Testing Methods for Industrial Waste Water*, JIS K 0102, Tokyo, pp 47-51.