ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
(*Journal of the Korean Society of Analytical Sciences*)
Vol. 7, No. 3, 1994
Printed in the Republic of Korea

신속한 BOD 측정장치의 개발과 응용

손무정† · 김은정 · 장세용 · 홍대일
계명대학교 자연과학대학 화학과

(1994. 7. 4. 접수)

Development of Assembly for Fast BOD Estimation and Its Applications

Moo-Jeong Sohn†, Eun-Jeong Kim, Seh-Yong Jang and Daeil Hong
Department of Chemistry, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

(Received Jul. 4, 1994)

요약 : *Trichosporon cutaneum*을 투석막과 기체투과막 사이에 고정화시켜 산소전극에 부착함으로써 연속적으로 측정할 수 있는 BOD 센서를 개발하였다. 이 센서의 최적 조건은 pH 7.0, 32~33℃의 온도, 2~3ml/min의 flow rate 및 0.1M phosphate 완충용액이었다. ⊿DO에 대하여 GGA 표준용액의 농도를 도시하였을 때 GGA 60mg/*l* 이하에서 직선성을 나타내었으며, 30mg/L의 GGA를 사용하였을 때 재현성은 3%의 오차범위를 나타내었다. DO값은 30일 동안 거의 일정하였으며, 감응시간과 회복시간은 각각 약 5분과 10분이었다. 이 센서를 이용하여 실제 폐수의 BOD를 측정하여 BOD_5법과 비교하였다.

Abstrcat : A microbial BOD sensor for the continuous estimation of BOD was been developed by immobilizing *Trichosporon cutaneum*, which was immobilized between a dialysis and a gas-permeable membrane, on an oxygen electrode. The optimum pH and temperature for BOD measurement using this sensor were pH 7.0 and 32~33℃, respectively. The best result was obtained at 2~3ml/min flow rate in 0.1M phosphate buffer solution. A linear relationship was observed between ⊿DO and the concentration of standard GGA solution below 60mg/*l*(90ppm BOD_5). The reproducibility was found to be within 3% for the standard solution containing glucose 30mg/*l* and glutamic acid 30mg/*l*. The output DO value of this sensor was almost constant for 30 dalys. The response time and the recovery time were about 5 and 10 min, respectively. This sensor was employed for the BOD measurement of waste pollutants and was compared with BOD_5 method.

Key words : Microbial BOD sensor.

1. 서 론

생물화학적 산소요구량(Biochemical Oxygen Demand ; BOD)은 수중의 유기화합물이 미생물에 의해 분해되어 안정화되는 과정에서 소모되는 산소량이다. BOD의 초기개념은 1884년 Dupre[1]에 의해서 제안되었으며, 배양된 시료의 DO량의 감소는 시료 중에 존재하는 미생물의 대사활성도(metabolic activity)에 의하여 일어난다는 것이다. 반면 BOD의 현대적인 개념은 1936년 American Public Health Association

Standard Methods Committee의 "Standard Methods(제8판)"에 제안되었으며, 통상적으로 BOD_5법으로 측정한다(5일 BOD).

그러나 이러한 BOD 측정방법은 너무 오랜 시간(5일)이 소요되며, 실험자의 숙련도에 따라서 오차가 크기 때문에, 보다 빠른 시간내에 간편하게 BOD를 측정하는 방법에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다.

그 중에서 미생물을 이용한 BOD 센서가 최초로 1977년 I. Karube 등[3]에 의해서 보고되었다. 그들은 *Trichosporon cutaneum*이 고정화된 collagen막을 산소전극에 부착하여 BOD 센서를 조립하였으며, 이 때 감응시간은 15분 정도였다. 1979년 Hikuma 등[4]도 *Trichosporon cutaneum*을 porous acetylcellulose막 사이에 고정시켜서 BOD를 측정하였는데 감응시간은 18분이었고, 측정 후 전류값이 초기상태로 회복되는 데는 50분 정도 걸렸다. 1991년 Li 등[5]은 *Hansenula anomala*를 nitrocellulose막 사이에 고정시켜 BOD 센서를 개발하였으며, 이 때의 감응시간은 20분 정도였다. 이 외에도 여러 가지의 미생물, 곧 *Pseudomonas* sp.[6], *Escherichia coli*[7], *Bacillus subtilis*[8] 및 고온성 박테리아(thermophilic bacteria)[9] 등을 이용한 BOD 센서가 연구되었다. 그러나 이들의 BOD 센서는 여러 가지의 유기화합물에 대한 감응도가 낮으므로 폐수 중의 유기화합물의 종류에 크게 제약을 받을 뿐만 아니라 감응시간이 대부분 15분 이상으로 비교적 오랜 시간이 소요되었다.

본 연구에서는 *Trichosphoron cutaneum*을 acetylcellulose막 사이에 고정화하여 산소전극에 부착함으로써 재현성 있는 BOD 센서를 개발하여, 이것을 DO meter, 항온조 및 peristaltic pump에 연결함으로써 아주 간편하게 연속적으로 측정 가능한 고속 BOD 측정장치를 고안하였다. 이 BOD 측정장치에 대한 측정용액의 pH, 온도, flow rate의 영향 등과 같은 최적 조건을 찾고, 다른 유기화합물의 영향에 대해서도 조사하여 실제 폐수의 BOD를 측정하고 BOD_5법과 비교하였다.

2. 실 험

2.1. 실험기기 및 기구

BOD sensor의 조립을 위해 DO meter와 산소전극은 각각 YSI model 58과 YSI O_2 전극을 사용하였다. BOD 측정장치의 peristaltic pump와 head는 각각 Cole Parmer 07524-00와 G-07518-10이었다. 용액의 pH는 Orion Research digital pH/mV meter 611로 측정하였으며, 항온조는 Eyela UA-106을 이용하여 온도를 일정하게 조절하였다. 균을 멸균하고 배양시키는 autoclave, BOD incubator와 shaking incubator는 한백과학 제품을 사용하였다. 또 배양한 미생물을 Hettich D-7200의 centrifuge를 이용하여 집균하였다.

2.2. 시약 및 재료

본 실험에서 표준용액은 BOD_5법에 따라 glucose (Sigma) 150mg/*l*와 glutamic acid(Sigma) 150mg/*l*의 혼합용액(GGA solution)을 사용하였으며, 이 용액의 BOD는 220±22이다. 표준용액은 인산염 또는 tris-HCl 완충용액에 녹여서 제조하였다. 실험균주는 *Trichosporon cutaneum*(ATCC 22164)을 사용하였고, 균주를 배양하기 위한 yeast extract는 Sigma 제품이었고 malt extract는 Difco 제품을, peptone은 Kyokuto제 시약이었다. 배양된 균주를 고정시키기 위한 투석막은 Millipore제 cellulose nitrate(pore size 0.45μm를 사용하였다. Tris-(hydroxymethyl) aminomethane은 Sigma제 특급시약을, sodium phosphate monobasic 및 dibasic은 Shinyo제 특급시약을 사용하였다. 실험에 사용한 용액은 모두 탈염된 3차 증류수를 사용하였다.

2.3. 균주의 배양

Glucose 1%, peptone 0.3%와 yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%를 넣은 삼각플라스크에 200m*l*가 되도록 증류수를 채워서 121℃, 15 lb에서 15분간 멸균하였다. 여기에 *Trichosporon cutaneum*을 1 loop씩 접종하여 28℃의 shaking incubator에서 36시간 동안 배양시키고 5000rpm에서 원심분리하여 집균하였다.

2.4. 미생물 BOD 센서의 조립

Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 배양된 미생물을 filter holder(Millipore, SX 1300)를 이용하여 투석막에 골고루 바른 다음 nylon으로 만든 bottom cap과 O-ring으로 산소전극에 부착시켜 BOD 센서를 제작하였다.

2.5. BOD 측정장치의 구조 및 측정방법

제작한 BOD 센서를 flow cell 속에 담가서 그것을

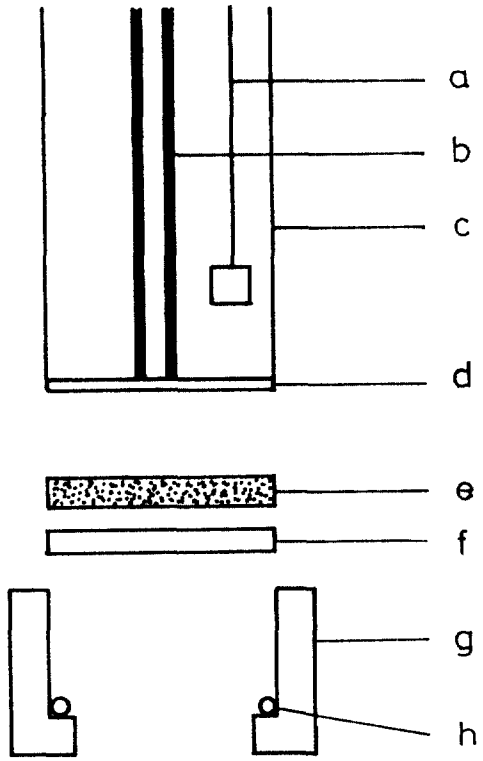

Fig. 1. The microbial sensor for the estimation of BOD. a. anode, b. cathode, c. outer body, d. gas-permeable membrane, e. microbial layer, f. dialysis membrane, g. nylon bottom cap, h. O-ring.

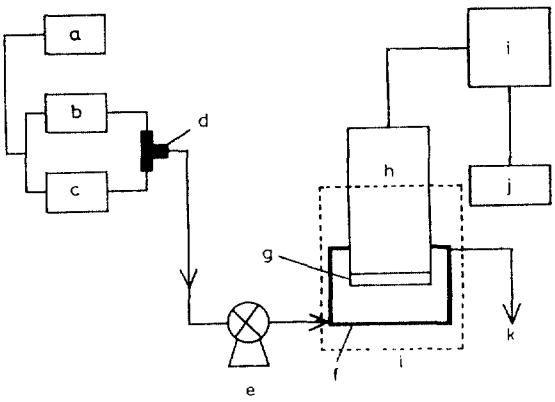

Fig. 2. Schematic diagram of BOD measuring system. a. air pump, b. buffer solution container, c. sample container, d. 3-way valve, e. peristaltic pump, f. flow cell, g. microbial membrane, h. oxygen electrode, i. DO meter, j. recorder, 1. thermostat, k. drain.

다시 항온조 내에 넣고 기포발생기로 완충용액과 표준용액을 폭기할 수 있도록 *Fig.* 2와 같이 장치하였다.

측정할 때는 먼저 기포발생기로 완충용액과 표준용액에 공기를 포화시키고 DO meter에 나타나는 DO값이 정류상태에 도달할 때까지 완충용액을 흘려 준다. DO값이 정류상태에 도달했을 때 밸브를 이용하여 완충용액의 흐름을 중지시키고 표준용액을 3분간 흘려 준다. 3분 후 표준 용액의 흐름을 중지시키고 DO값이 원상태로 돌아올 때까지 완충용액을 흘려 주었다. 이렇게 하여 3분간 흘러들어간 표준용액이 미생물에 의해 분해되면서 소모되는 DO값이 DO meter에 의해 나타나며, 계속하여 흘려 준 완충용액에 의해서 떨어진 DO값이 다시 원상태로 회복된다.

한편, BOD 측정장치에 의한 결과와 비교하기 위하여 표준용액과 폐수의 BOD_5를 JIS에 따라 측정하였다.[2]

3. 결과 및 고찰

3.1. BOD 센서의 감응 특성

BOD 측정장치의 조립 후 BOD 센서의 감응특성을 알아보기 위해 표준용액을 흘려 주어 시간에 따른 DO를 측정하여 *Fig.* 3에 나타내었다. 그림에서 보는 바와

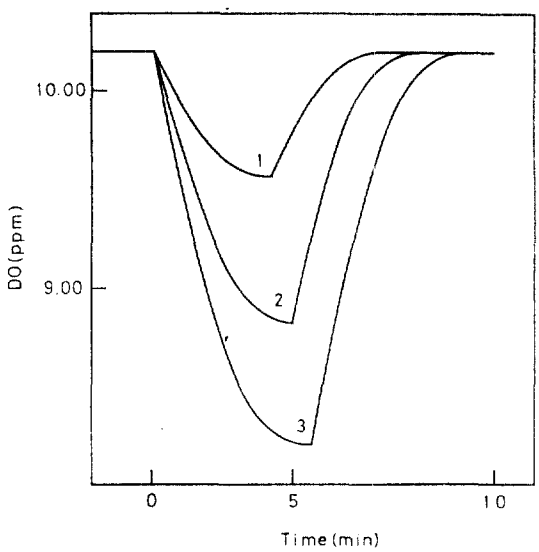

Fig. 3. Response curves of the microbial BOD sensor. (1) 20mg/L, (2) 40mg/L, (3) 60mg/L of the GGA solution were injected.

같이 glucose와 glutamic acid의 혼합 표준용액을 흘려 주었을 때 DO meter의 DO값이 떨어지다가 계속해서 흘려 주는 완충용액에 의해서 다시 회복되는 것을 알 수 있다. GGA 표준용액의 농도를 20mg/*l*, 40mg/*l*, 60mg/*l*으로 하였을 때, 농도가 진해짐에 따라 DO값도 일정하게 떨어지는 것을 알 수 있다. 또 GGA의 농도가 진해질수록 감응시간과 회복되는 시간도 조금씩 길어졌다.

Karube 등의 BOD 실험에서는 감응시간이 15분이고 전류값이 원상태로 회복되기까지는 50분 정도 걸렸으며[3], 1979년 M. Hikuma의 보고에서는 감응시간이 18분이며, 회복되기까지 시간은 50분 정도 소요되었다.[4] Li 등의 실험에서는 *Hansenulla anomala*로 BOD를 측정한 결과 감응시간이 20분 정도였다.[5]

그러나 본 실험에서는 결과에서 보는 바와 같이 감응시간이 다른 문헌에서보다 아주 짧은 5분 정도였으며, 회복되는 시간도 10분 이내로 매우 짧았다.

3.2. Flow rate의 영향

GGA 표준용액 30mg/*l*로 이 BOD 측정장치에 대한 flow rate의 영향을 조사하여 *Fig.* 4에 도시하였다. 완충용액은 0.1M phosphate를 사용하여 32℃에서 3분 동안 시료를 주입하였다. 이 때 flow rate를 1~6m*l*/min으로 변화시켜 시료가 없을 때의 DO와 각각의 농도에서의 DO값의 차이(⊿DO)를 비교하였다. Flow rate 2m*l*/min과 3m*l*/min 사이에 ⊿DO가 가장 크게 나타났고, 그것보다 낮은 범위에서는 flow rate가 너무 느려서 흘러들어간 표준용액의 양이 적어 감응이 나빴다. 그리고 3m*l*/min보다 높은 범위에서는 flow rate가 너무 빨라서 반응이 잘 일어나지 않았다.

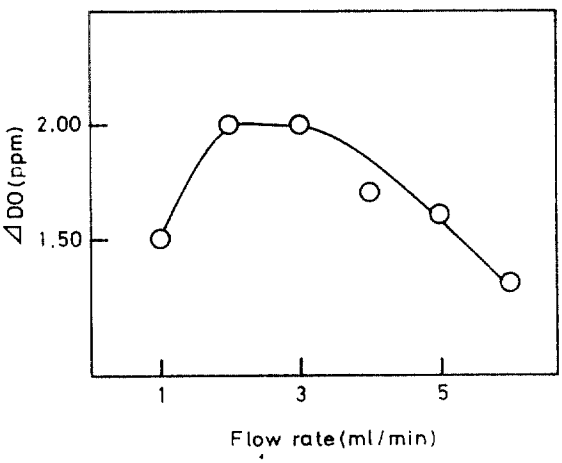

Fig. 4. Influence of flow rates when the same conditions with *Fig.* 5 were employed.

3.3. pH의 영향

Fig. 5는 미생물 센서에 대한 pH의 영향을 알아보기 위해 32℃의 항온조에서 0.1M phosphate의 pH를 6.0에서 8.0까지 변화시켜 가면서 측정한 것이다. 이 때 glucose와 glutamic acid를 각각 30mg/*l*씩 혼합한 용액으로 ⊿DO를 측정하였다. *Fig.* 5에서 보는 바와 같이 pH 6.8~7.2에서 ⊿DO값의 차이가 크게 나타나 미생물센서의 감응이 가장 좋았다. 따라서 모든 실험은 pH 7.0으로 고정시켰다.

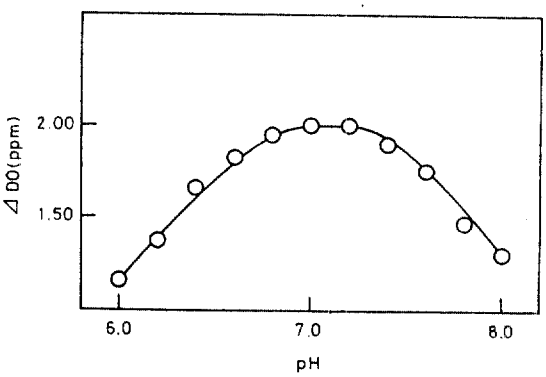

Fig. 5. Relationship between the DO difference and pH of the buffer solution when a standard solution (GGA 30mg/L) was employed.

3.4. 온도의 영향

Fig. 6은 pH 7.0의 0.1M phosphate 완충용액에서 온도에 따른 이 미생물센서의 감응 특성을 조사한 것으로서, 온도를 28℃~35℃로 변화시켜 가면서 이 BOD 센서에 대한 온도의 영향을 알아보았다. 이 그림에서 보는 바와 같이 항온조의 온도를 32℃~33℃로 고정하였을 때 ⊿DO가 가장 크게 나타났다. 그리고 이 온도를 기준으로 하여 높은 온도 범위에서 더 반응이 잘 일어나는 것도 알 수 있다. 본 실험에서는 flow cell과 바이오센서만을 항온조 안에 담가 주었기 때문에, 항온조의 온도가 32℃~33℃일 때 fell cell 내의 실제

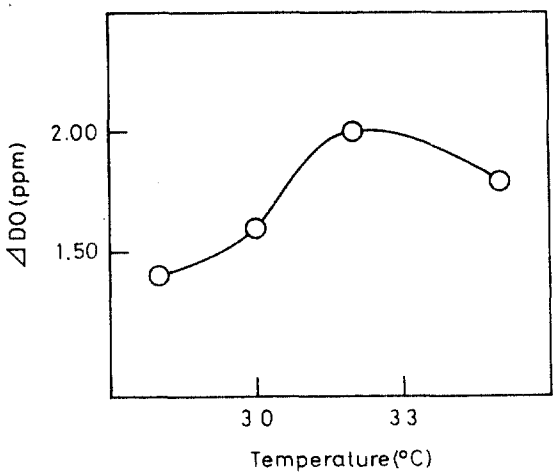

Fig. 6. Effect of temperature on the microbial BOD sensor. The experimental conditions were the same as those described in *Fig.* 5.

온도는 대략 30℃ 정도였다. 따라서 모든 실험은 32℃의 온도에서 실시하였다.

3.5. Buffer의 영향

미생물 센서로 BOD를 측정할 때 최적 감응특성을 나타내는 완충용액을 찾기 위하여 완충용액의 종류를 바꾸어서 검정선을 구하여 *Fig.* 7에 나타내었다. 이 때의 실험조건은 pH 7.0, 항온조의 온도는 32℃였으며,

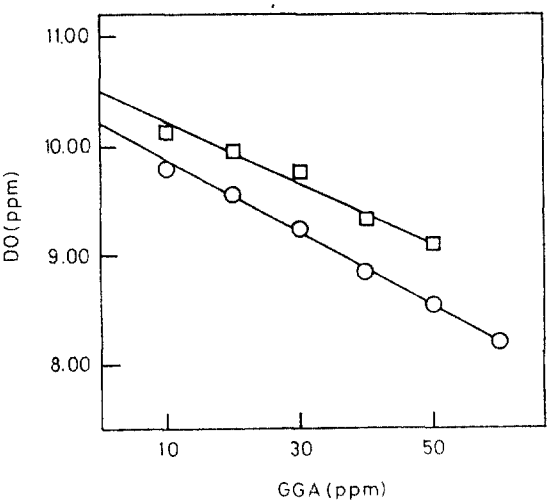

Fig. 7. Comparison of the response of the microbial BOD sensor in 0.1M phosphate(○) and 0.1M tris-HCl buffer solution(□).

완충용액의 농도는 0.1M이었다. *Fig.* 7에서 보는 것과 같이 0.1M tris-HCl로 측정했을 때는 GGA 표준용액 50ppm까지만 직선의 범위를 나타내었고, 0.1M phosphate 완충용액의 경우에는 60ppm까지 좋은 직선성을 보여 주었다. 또 GGA 표준용액의 각 농도에 따른 DO의 차이도 0.1M tris-HCl 완충용액에서보다 0.1M phosphate 완충용액에서 더 큰 것을 알 수 있다. 따라서 0.1M phosphate 완충용액이 Tris-HCl 완충용액보다 비교적 넓은 직선범위와 ΔDO값의 큰 차이를 보여주었으므로 0.1M phosphate 완충용액을 사용하여 모든 실험을 실시하였다.

3.6. 여러 가지 유기화합물의 영향

미생물 센서 중의 미생물에 의하여 여러 가지 유기화합물이 얼마나 분해되는지를 조사하기 위하여 각 물질의 농도가 30mg/*l*일 때, 최적 조건에서의 DO를 측정하여 *Table* 1에 나타내었다.

Table 1. Sensor response to various substrates. The measurements were attemped at pH 7.0 in the presence of 30ppm of each substrate.

substrates	sensor response
glucose	100.0
glutamic acid	105.1
fructose	78.9
galactose	98.0
maltose	82.6
sucrose	37.0
lactose	7.8
glycerin	96.2
alanine	43.7
glycine	21.1

Glucose에 대한 이 BOD 센서의 감응도를 100으로 하였을 때 glutamic acid와 galactose, glycerin 등은 glucose와 비슷하였고, lactose와 glycine 등에 대한 감응은 매우 적은 것을 알 수 있다.

3.7. 검정선

BOD를 측정하기 위한 이 센서의 검정곡선을 작성하기 위하여 이제까지 얻어진 최적 조건으로 표준용액

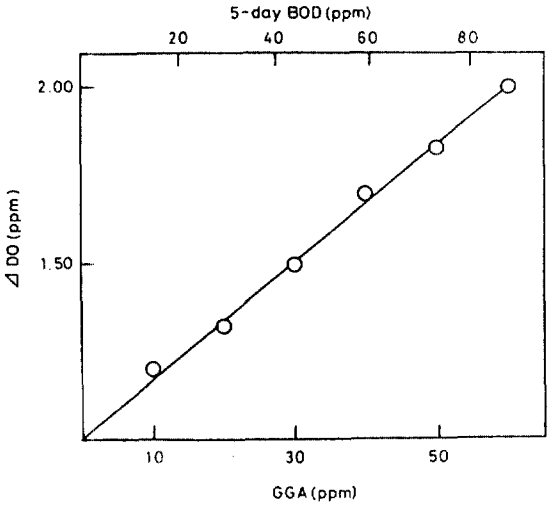

Fig. 8. Calibration curve of the BOD sensor. The experiments were carried out under the optimum conditions.

의 ⊿DO를 측정하여 *Fig.* 8에 나타내었다. *Fig.* 8에서 보는 바와 같이 이 센서는 pH 7.0, 항온조의 온도는 32℃에서 GGA 표준용액 60ppm까지 좋은 직선의 범위를 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이 GGA의 농도가 거의 0에 가까운 아주 묽은 용액(BOD_5=0ppm)에서부터 약 BOD_5 90ppm까지 좋은 직선관계가 나타났으며, 그 직선의 상관계수는 0.998이었다. 이 때 30mg/*l*씩의 GGA 용액을 사용하였을 때 나타나는 DO값은 약 3% 내외에서 좋은 재현성을 보였다. 또한, 이 BOD 센서를 사용하지 않을 때는 4℃에서 보관하면서 측정하였을 경우에는 약 30일까지 사용할 수 있었다.

한편, Karube 등은 *Clostridium butyricum*을 BOD 센서에 사용하였을 때, 0~250ppm BOD의 측정이 가능하다고 보고하였으며[3,10], 토양에서 추출한 미생물의 경우에는 0~350ppm BOD 내에서 직선범위를 얻었다.[11] 또 Kulys 등[12]은 *Hansenulla anomala*를 사용하였을 때 160mg/*l* glucose 이하의 범위내에서 직선영역을 얻었다. Riede 등[8]이 *Trichosoporon cutaneum*을 사용하였을 때 직선범위는 0~100ppm BOD에서 나타났다. 고온성 박테리아의 경우는 0~10ppm BOD의 직선 범위를 나타내었다[9]. 그러나 저농도의 BOD에 감응하는 BOD 센서의 경우는 시료를 희석하여 사용하면 직선 범위의 크기에는 상관없이 그들의 BOD 측정이 가능하게 된다.

3.8. 센서의 응용

본 대학의 각 건물에서 배출되는 생활폐수 및 식당 폐수를 폭기조에서 처리하면서 그 폐수의 BOD를 측정하기 위하여 이 실험에서 개발한 BOD 측정장치를 이용하고, 그 결과를 JIS법[2]의 결과와 비교하였다.

Table 2. Applications of the BOD sensor

Sample No.	BOD sensor	BOD_5 method
E-1	17.8	21.2
E-2	22.0	18.4
F-1	48.2	51.4
F-2	42.0	49.0
F-3	54.0	53.8
F-4	40.5	43.2
R-1	70.9	76.3
R-2	55.2	64.2
R-3	98.2	103.3
R-4	90.1	81.6

Table 2에서 보는 바와 같이 BOD 센서에 의한 결과는 JIS법에 비하여 약간의 차이는 있지만 JIS법 자체가 10% 정도의 오차를 가지므로 이 결과의 신뢰도는 높은 것으로 사료된다. 따라서 JIS법 뿐만 아니라 기존의 BOD 센서에 비하여 매우 빠른 시간 내에 연속적으로 정확히 BOD를 측정할 수 있다.

5. 참고문헌

1. E. B. Phelps, *Stream Sanitation*, John Wiley and Sons, New York, N.Y.(1944).
2. Japanese Industrial Standard Committee, *Testing Methods for Industrial Waste Water*, JIS K0102, p. 47, Tokyo, Japan, 1986.
3. I. Karube, T. Matsunaga, S. Mitsuda, and S. Suzuki, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1935(1977).
4. M. Hikuma, H. Suzuki, T. Yasuda, I. Karube, and S. Suzuki, *European J. Appl. Microbial. Biotechnol*, **8**, 289(1979).

5. Y. R. Li and J. Chu, *Appl. Biochem. Biotech,* **28/29,** 855(1991).
6. X. Zang, Z. Wang, and H. Jian, *Huanjing Kexue Xuebao,* **6,** 184(1986): cited on *Chem. Abstr.,* **105,** 158286(1986).
7. N. Kuwabata and N. Nakamura, *Abstracts of the international Symposium on New Sensors and Methods for Enwironmental Characterization,* Kyoto, Japen(1986).
8. K. Riedel, R. Renneberg, M. Kühn, and F. Scheller, *Appl. Microbial. Biotechnoll.,* **28,** 316 (1988)./ K. Riedel, K. P. Lange, H. J. Stein, M. Kühn, P. Ott and F. Scheller, *Wat. Res.,* **24,** 883 (1990).
9. I. Karube, K. Yokoyama, K. Sode, and E. Tamiya, *Anal. Lett.,* **22.** 791(1989).
10. I. Karube, T. Matsunaga and S. Suzuki, *J. Solid-Phase Biochem.,* **2,** 97(1977).
11. I. Karube, T. Matsunaga and S. Suzuki, *J. Ferment Technol.,* **55**(3), 243(1977).
12. J. Kulys and K. Kadziauskiene, *Biotechnol. Bioeng.,* **22,** 221(1980).