

## 신속 BOD 측정장치의 개발 및 시험

오 혁 · 최돈수 · 정 혁\* · 최주환\*\* · 김해동 †

\*숙명여자대학교 이과대학 화학과

\*\*고려대학교 이과대학 화학과

† 경희대학교 기초과학연구소, 문리과대학 화학과

(1996. 12. 20. 접수)

## Development and Evaluation of a Rapid BOD Measurement System

Hyuk Oh, Don-Soo Choi, Hyuk Jeong\*, Ju-Hwan Choi\*\*, Hai-Dong Kim †

\*Department of Chemistry, Sookmyung Woman's University, Seoul 140-742, Korea

\*\*Department of Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea

† Research Institute of Basic Sciences and Department of Chemistry, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

(Received Dec. 20, 1996)

**요약**: 미생물막 전극을 이용하여 신속하게 생화학적 산소요구량(BOD)을 측정할 수 있는 신속 BOD 측정장치를 개발하였다. 미생물의 배양과 미생물막의 제조방법, BOD 측정시 시료 용액의 흐름속도의 영향, 용액의 pH의 영향, 그리고 미생물막의 감응특성 등에 관하여 연구하였다. 본 연구에서 개발한 신속 BOD 측정장치는 개인용 컴퓨터에 연결되어 BOD 측정의 전 과정이 자동으로 진행되도록 제작되었으며, 시료 용액의 유속이 7.8mL/min일 때 시료 주입 5분 후의 측정시에 좋은 결과를 나타내었다.

**Abstract**: A rapid BOD measurement system using a microbial membrane electrode has been developed. Culture of microorganism and the preparation of microbial membrane, the effect of sample flow rate on the BOD measurement, the effect of solution pH and response characteristics of the microbial membrane electrode were investigated. The rapid BOD measurement system developed by us was connected to a personal computer and the whole BOD measurement procedures were carried out automatically. The best results were obtained when the solution flow rate was 7.8mL/min and the data were obtained 5 minutes after sample injection.

**Key words**: BOD, microbial membrane

### 1. 서론

폐수 중에 포함된 유기물의 정도는 흔히 어느 특정 조건에서 생화학적 산소요구량(BOD) 혹은 유기 오염

물의 생화학적인 분해과정 또는 무기 환원제들의 산화에 필요한 산소량을 측정함으로써 판단한다.<sup>1</sup> 보편적으로 사용되고 있는 BOD 측정법은 시료에 미생물을

식종한지 5일 후에 용존산소 변화량을 측정하는 과정을 거친다. 이러한 생화학적 산화과정은 매우 느린 과정이므로 좋은 결과를 얻기 위해서는 최소한 5일을 기다려야 하므로 폐수의 오염 정도를 수시로 검사해야 하는 폐수처리 공정 등에서는 보다 신속한 BOD 측정법이 요구되고 있다.

최근에 미생물을 이용하여 신속하게 BOD를 측정할 수 있는 여러 가지 BOD 센서가 개발되었다.<sup>2-5</sup> 이러한 BOD 센서들은 보통 수 분에서부터 수십 분만에 팔목할만한 신호 변화를 나타내었다. 최초의 미생물막을 이용한 BOD 센서는 Karube 등에 의하여 연구되었으며, 그 후 미생물들의 종류, 미생물막을 만드는 방법 및 측정법 등에 관한 추가적인 많은 연구가 진행되었다.<sup>6-10</sup> 기본적으로, 이러한 미생물막을 이용한 BOD 센서는 폐수 중 오염물을 산화시키는 미생물이 고정된 미생물막과 시료용액 속에 녹아 있는 용존 산소량을 전기화학적으로 측정하는 산소전극으로 구성되어 있다. 미생물막을 만드는 데 사용된 미생물들은 *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum*, *Trichosporon cutaneum*, *Hansenula anomala* 등이 단독 혹은 두 가지 이상이 섞인 상태로 사용되었다. 이러한 미생물막을 이용하여 BOD 측정시 가장 많이 사용되는 방법은 정지된 상태에서 측정하는 방법이다. 이 측정법에서는 유기 오염물이 존재하지 않는 완충 용액을 공기로 포화시킨 상태에서 측정된 미생물막 전극의 신호(바탕신호)와 완충된 상태의 시료 용액으로부터 측정된 미생물막 전극의 신호차이로부터 시료 용액의 BOD를 계산한다. 이때 소요되는 시간은 측정법, 미생물의 종류, 시료의 오염 정도, 미생물막의 두께 등에 따라 다르며, 보통 3분에서부터 60분 정도가 소요된다. 미생물막 전극의 감응속도는 상이한 여러 가지 인자들에 영향을 받고 있으며, 이러한 실험적인 인자들이 정확하게 알려져 있지 않는 상태에서는 BOD 측정시 많은 오차를 유발시킬 수 있다. 미생물막 전극의 직선적 감응범위는 주로 사용되는 미생물에 따라 영향을 받지만 미생물막 전극을 만들 때 사용되는 지지체의 종류 및 구조와 측정방법 등에 영향을 받는다. 따라서 미생물막을 이용하여 신뢰성 있는 BOD 결과를 얻기 위해서는 미생물막 전극의 감응특성에 영향을 주는 여러 가지 인자들의 영향을 규명하기 위한 조직적이고도 심도 있는 연구가 요구되고 있다.

본 연구에서는 BOD를 신속하게 측정하는 데 사용하기 위하여 미생물로서 *Bacillus subtilis*와 미생물 지지체로서 PVA(polyvinyl alcohol)를 이용하여 미생물막을 제조하였으며, 이 미생물막을 산소전극에 고정하여 미생물막 전극을 제조하였다. 또한 BOD 측정장치를 개인용 컴퓨터에 연결하여 BOD 측정의 전 과정을 자동으로 수행할 수 있도록 하여 시료의 BOD 측정시 실험자의 오류에 의한 영향을 최소화하였으며, 실험자가 없는 상태에서 원거리 시료의 BOD를 자동으로 측정하는 데 응용이 가능하도록 하였다. 본 연구에서 개발된 BOD 자동화 측정장치는 60ppm까지 직선성을 나타내었으며, 시료의 BOD는 시료 주입 후 10분 내에 측정할 수 있었다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 기기

*Bacillus subtilis*의 배양에는 DIFCO사의 Nutrient broth(dehydrated, yeast extract 3g, malt extract 3g, peptone 5g, dextrose 10g/L)와 Nutrient agar (dehydrated, beef extract 3g, peptone 5g, agar 15g/L)를 사용하였다. 실험에 사용한 완충 용액은 phosphate buffer로서 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (monobasic) 195mL와  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (dibasic) 305mL 1급 시약을 혼합하고, 전체 용액이 1L가 되도록 증류수로 묽혀 pH 7.0으로 제조하였다. 표준 시료 용액은 glucose 150mg/L와 glutamic acid 150mg/L의 혼합 용액이 BOD값으로 220mg/L를 나타내는 JIS(Japanese Industrial Standard)<sup>11</sup>를 기준으로 제조하였다. 미생물 지지체로서 PVA(polyvinyl alcohol) polymer를 사용하였으며, polymer cross-linking agent로는 4% glutaraldehyde를 사용하였다. 또한 산소 전극의 전해질로는 YSI사에서 제공하는 half saturated KCl을 사용하였다.

실험에 사용한 기기 및 장치는 DO meter(YSI, Yellow Springs Instrument, Ohio, U. S. A, model 58), oxygen probe(YSI, model 5718), shaking incubator (Vision Scientific Co., Ltd, K. M. C-8480 S), centrifuge(Digisystem Laboratory Instruments, Inc. 3500 RPM), vortex mixer (Vision Co., Ltd, KMC-1300V), petri-dish(FALCON, disposable),

cap tube(Cornig, autoclavable), Pt-loop(자체 제작)였다. 또한, 측정 장치의 자동화를 위해 386DX PC와 peristaltic pump(ismaTec), solenoid valve를 이용하였고, pump와 valve의 제어를 위해 DAC/ADC card를 사용하여 PC와 interface하였으며, 시료 용액과 완충 용액의 이송을 위해서는 silicon tube(안지름 1.5mm)를 사용하였다. 시료 용액과 완충 용액의 aeration을 위해서는 민성전기의 air pump를 사용하였고, 막의 고정을 위한 dialysis membrane은 Millipore사의 pore size 0.45 $\mu$ m, HA type membrane을 사용하였다. 미생물막 전극을 고정하고 실제로 반응이 일어나는 flow cell은 aluminium rod를 선반에서 가공하여 제작하였다.

## 2.2. 미생물막 전극을 이용한 BOD sensor의 제작

미생물의 배양, 미생물막의 제조과정 및 미생물막 전극을 이용한 수질오염 측정장치의 구성은 이미 발표한 논문<sup>1</sup>과 동일하다. 산소 전극 내부에 포화 KCl 용액

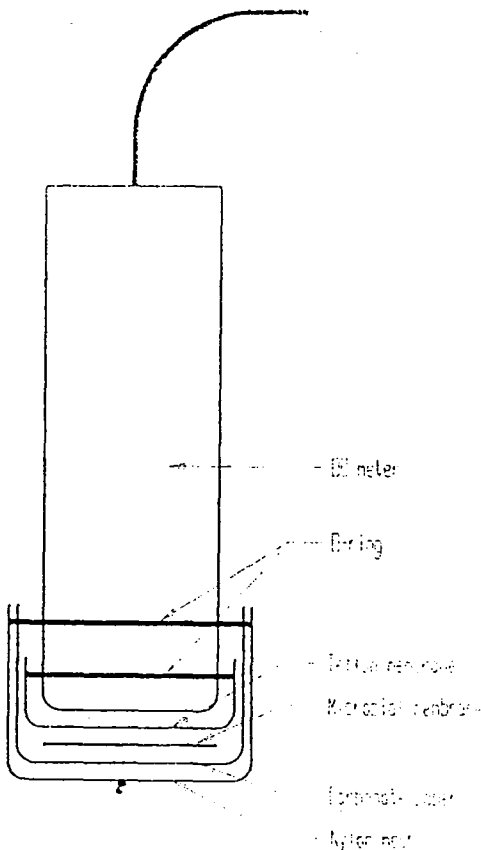


Fig. 1. Schematic diagram of the microbial membrane electrode.

을 채우고 standard FEP teflon film으로 기포가 생기지 않도록 감싼 후 O-ring으로 고정하였다. 이 teflon film 위에 준비된 미생물막을 동그랗게 잘라서 놓고 그 위를 polycarbonate(pore size 0.45 $\mu$ m) dialysis membrane으로 감싸 주었다. 이렇게 만든 막을 보호하기 위하여 nylon mesh로 주름이 생기지 않도록 사방으로 누르면서 고무 밴드로 감싸 고정하였다. Fig. 1과 같이 제작된 미생물막 BOD 전극은 곧바로 감응하지 못하므로 24시간 정도 phosphate buffer(pH=7.0)에 담가 폭기하면서 방치하였다

## 2.3. Valve 제어장치 및 flow cell 제작

본 실험에서는 3-way solenoid valve 2개를 사용하여 용액의 흐름을 조절하였다. Valve의 개폐를 조절하기 위한 회로는 valve box 내부에 내장하였으며, 대략적인 구성도는 Fig. 2와 같다. 전극으로부터 나오는 analog 신호는 ADC(analog-to-digital converter)에 의하여 digital(12-bit resolution) 신호로 바뀌어 PC에 입력되며, BOD 측정 시스템의 valve는 PC interface card로부터 나오는 digital 신호 P0~P1으로 제어하였다. Flow cell은 microbial sensor가 시료 용액이나 완충 용액과 접하게 되는 반응 장소를 제공하며 또한 전극 holder로서의 역할을 하게 된다. 시료 용액 및 완충 용액은 cell 아래쪽의 주입구로 들어가서 위쪽 출구쪽으로 나오게 되는데, 여기에 connector를 이용하여 silicon tube를 연결하였다. 또한, cell 뚜껑에 O-ring을 고정하여 용액의 누수를 막았으며, flow cell에 probe를 삽입시킨 상태에서의 flow cell의 내부용적은 2.5mL였다.

## 2.4. 실험 방법

Flow system에서는 시료를 flow cell에 계속적으로 흘려 주면서 BOD값을 측정하였다. 전극 신호를 읽지 않을 때는 완충 용액을 계속 순환시키면서 일정한 전극 신호를 유지하였고, 시료 용액의 BOD값을 측정할 때에는 시료 용액을 5분간 flow cell로 흘려 주고 그때의 전극 신호를 측정하여 초기 완충 용액에 의한 전극 신호와의 차이를 PC가 자동으로 계산하도록 하였다. 시료 용액에 의한 전극 신호의 감소량을 측정한 후 valve를 조작하여 완충 용액이 flow cell로 흐르게 하여 전극이 원래의 상태로 회복되도록 하였다.

Static system에서는 flow system과 달리 전극 신

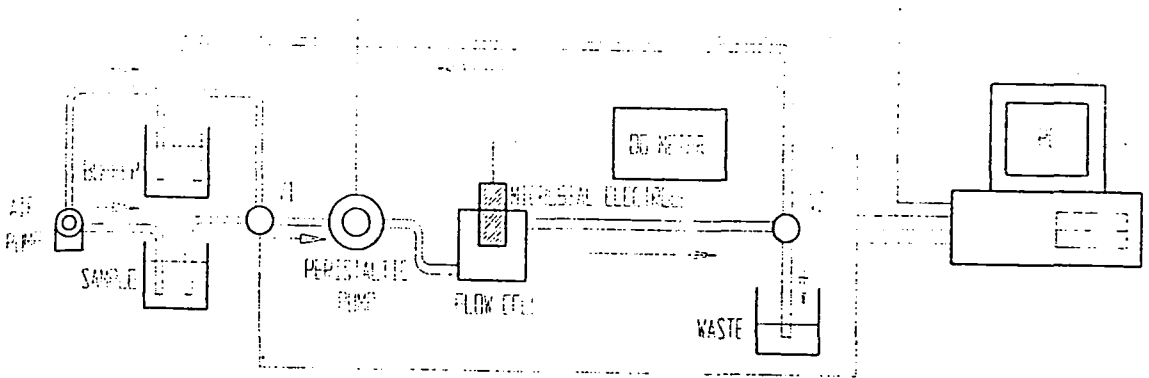


Fig. 2. Automatic rapid BOD measurement system using a microbial membrane electrode.

흐름 측정하는 동안 용액의 흐름을 멈추게 하였다. 용액의 이송 과정은 위의 방법과 동일하며, 시료 용액을 flow cell에 채운 후 전극 신호를 측정하는 동안 용액의 흐름을 멈추게 하는 방법과, 완충 용액이 담긴 비커에 시료 용액을 주입하면서 시료 주입 전의 전극 신호 및 시료 주입 후의 전극 신호 차이를 계산하는 방법을 모두 시도하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 미생물막 전극의 감응 시간

제조된 미생물막 전극의 감응 시간을 알아보기 위하여 표준 시료 용액의 검정곡선을 우선 작성하고, 직선적인 감응을 하는 최대 범위의 농도를 찾아 내어 이 농도에서의 감응 시간을 결정하였다. 표준 시료 용액의 감응 시간과 신호 회복 시간은 표준 시료 용액의 농도가 진행수록 길어지기 때문에 직선적 감응을 하는 가장 진한 농도에서의 감응 시간을 미지 시료의 감응에 필요한 시간으로 결정하였다.

Static system에서 측정한 전극 신호는 1시간까지 계속적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 30분 이후에는 신호 감소량이 상대적으로 적어서 전극 신호가 안정화되었다. 바로 이 시점이 미생물막 속의 미생물이 시료 용액 속의 유기물을 분해하면서 산소를 소모하는 속도와 전극으로 확산되는 용존 산소(DO)의 속도가 평형을 이루는 시점으로 보인다.<sup>9</sup> Fig. 3은 표준 시료 용액의 농도가 진행될수록 DO(%)가 많이 감소하는 것을 보여 주고 있다. 시료 표준 용액의 농도가 진행되면 용액 속의 유기물의 양이 많아지게 되고, 따

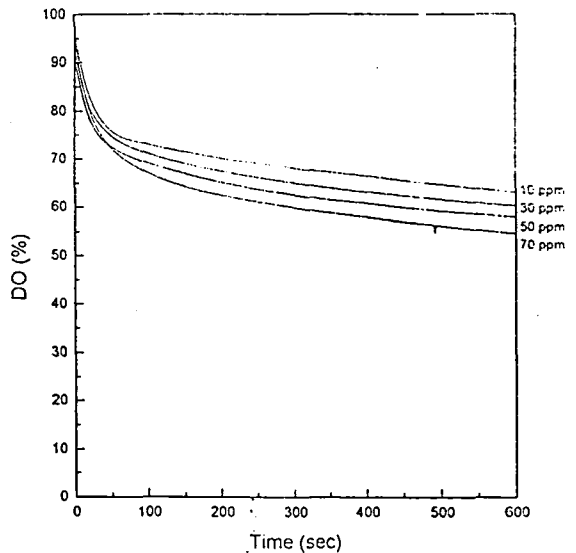


Fig. 3. Response curve of the microbial membrane electrode in static measurement system.

라서 미생물이 활발하게 활동하여 산소 소모량이 증가하므로 용액의 용존 산소량은 감소하게 된다. 시료를 BOD cell에 주입 후 약 50초 이후부터 농도에 따른 DO(%) 감소량을 구분할 수 있으며, 시료 농도에 따라 직선적인 변화를 나타내었다.

#### 3.2. Flowing system에서 미생물막 전극의 감응 특성

표준 시료 용액을 flow cell에 흘려 주는 시간을 결정하기 위해서 미생물막 전극의 초기 DO(%)값과 반응이 평형상태에 도달되었다고 가정 한 지점에서의 DO(%)값을 읽어서 그들의 차이인 ΔDO(%) (초기 DO

Table 1. Data reading time variation with various flow rates.

flow rate mL/min	$\Delta DO(\%) = DO(0=sec) - DO(each\ sec)$				
	300 sec	350 sec	399 sec	440 sec	599 sec
5.7	12.8	15.7	17.8	18.8	8.9
6.4	14.6	17.1	19.0	19.6	6.6
7.1	17.2	19.3	20.8	21.0	5.7
7.8	18.0	19.5	21.3	12.6	4.0
8.5	18.2	19.7	21.6	21.5	2.7
9.2	19.4	21.8	23.7	21.6	1.5
9.9	16.7	15.1	12.5	10.0	4.9

Table 2. Effect of flow rate on  $\Delta DO(\%)$ 

flow rate(mL/min)	$\Delta DO(\%)$
5.7	17
6.4	19
7.1	20
7.8	21
8.5	21
9.2	23
9.9	12

(%) - 평균 DO(%))를 계산하였다. 계산된  $\Delta DO(\%)$  중에서 data의 선별성을 높이기 위하여 큰 값을 선택 하는데, 바로 이 시점까지 표준 시료 용액을 흘려 주고 여기서 data를 읽었다. 동시에 실제로 흘려 주는 용액의 속도에 따른 DO(%)를 측정하여 flowing system의 실제 flow rate를 결정하였다.

Table 1은 각 flow rate에서 용액이 cell을 통과할 때 시간대별로 DO(%)값을 측정된 것이다. 계산된  $\Delta DO(\%)$ 를 보면 399초에서의 data가 가장 클 뿐만 아니라 측정 시간이 짧으므로 이 시점에서 data를 읽는 것이 가장 타당한 것으로 보이며, 여기서 얻은 data로부터 검정곡선을 그리고 BOD값으로 환산하였다. 399초에서 flow rate를 5.7~9.9mL/min으로 변화시키면서 data를 측정할 때 적당한 flow rate를 결정할 수 있었다. 이러한 결과는 미생물이 시료 용액과 반응하는 데 필요한 최소한의 시간을 결정하는 실험으로서 미생물과 시료의 최소 접촉시간을 결정시켜 주는 근거를 보여 주었다.

Table 2에서 flow rate가 빨라질수록  $\Delta DO(\%)$ 값이 커지는 현상이 나타나는데, 7.8mL/min보다 느린

flow rate에서는 용액의 이송속도가 느려서 flow cell속에서 완충 용액이 표준 시료 용액으로 일시에 교체되지 못하고 표준 시료 용액이 완충 용액으로 묶여지므로 낮은  $\Delta DO(\%)$ 값을 나타낸다고 생각할 수 있다. 또한 8.5mL/min보다 빠른 이송속도에서는 시료 용액의 이송속도 또한 빨라서 미생물막 속의 미생물이 미처 시료 용액 속의 유기물을 분해하기도 전에 flow cell을 벗어나므로  $\Delta DO(\%)$ 값이 작아지는 것으로 생각되며, 용액의 이송속도가 빠를 때는 상대적으로 용액 속의 DO값이 높아  $\Delta DO(\%)$ 가 작아진다고 볼 수 있다. 따라서 flowing system에서의 flow rate는 7.8mL/min으로 결정하였다( $\Delta DO(\%)$ 값이 같다면 pump가 과열되어 용액의 온도가 높아지기 때문에 낮은 flow rate가 유리하다).

### 3.3. Static system에서 미생물막 전극의 감응 특성

미생물과 PVA를 1:1로 혼합하여 막을 만들고 이를 이용하여 제조한 전극을 이용하여 여러 표준 용액 농도에 따라 측정된 전극의 감응곡선을 Fig. 4에 나타내었다. 표준 용액을 사용하여 static system에서 측정된 용존산소 변화량은 약 40ppm까지 비교적 훌륭한 직선성을 나타내었다. 직선성은 2~9.8ppm에서는 99.9%이고 2~50ppm까지는 96.6%로 나타나는데, 이것으로부터 *Bacillus subtilis*를 이용한 미생물막은 낮은 농도 범위에서는 농도와  $\Delta DO(\%)$ 간에 직선적 비례관계가 성립되지만 농도가 진행될수록 이 직선에서 벗어남을 확인할 수 있었다. 미생물 지지체로서 PVA를 사용하지 않았을 경우와 미생물과 PVA를 1:1로 혼합하여 만든 막을 비교하였을 경우 표준 시료 용액 50ppm에서의  $\Delta DO(\%)$ 가 각각 12.6%와 10.7%로 PVA막이 어느 정도 산소 투과를 방해하고 있음을 알 수 있었다.

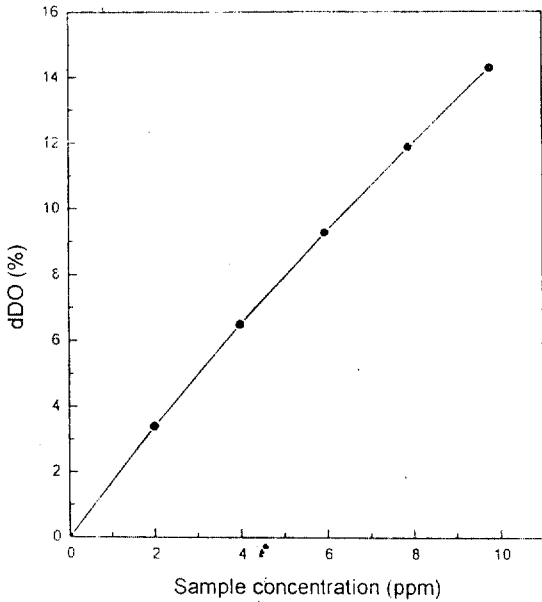


Fig. 4. Calibration curve of the microbial membrane electrode with GGA standard solution.

### 3.4. Flowing system과 static system에서 미생물막 전극의 재현성

미생물막 전극의 재현성을 시험하기 위하여 표준시료 10ppm 용액으로 aeration, 온도, 시간 등 동일한 조건에서 5회에 걸쳐 flowing system에서 반복실험을 하였다. Flowing system에서는 전극신호의 변화폭이 일정하게 나타나지 않았으며, 약 2.5%의 오차를 나타내었다. 또한 static system에서 측정된 재현성 실험은 완충용액에 미생물막 전극을 담가 초기 DO(%)가 산소로 포화되도록 폭기하고 표준 시료 용액(5~50ppm)을 5ppm씩 증가시키면서 주입한 후 15분 후에 전극 신호를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 5에 나타낸 바와 같다. 미생물막 전극은 시간이 오래 될수록  $\Delta DO(\%)$  값이 증가하는 것을 볼 수 있는데, 이것은 미생물이 표준 시료 용액의 유기물을 분해하면서 발생하는 에너지가 미생물의 활동에 필요한 에너지로 쓰였을 뿐만 아니라 미생물의 증식에 쓰여 전체 미생물 개체수가 늘어난 것으로 생각된다. 또한 표준 시료 용액의 농도가 진해질수록  $\Delta DO(\%)$  차이가 커짐을 알 수 있다. 이것은 시료 용액의 농도가 진해질수록 미생물막 전극 속의 미생물이 많은 양의 유기물을 분해하므로 이에 따라 미생물에 의해 발생하는 에너지가 많아지기 때문이라고 생각할 수 있다. 미생물막 전극을 제조한

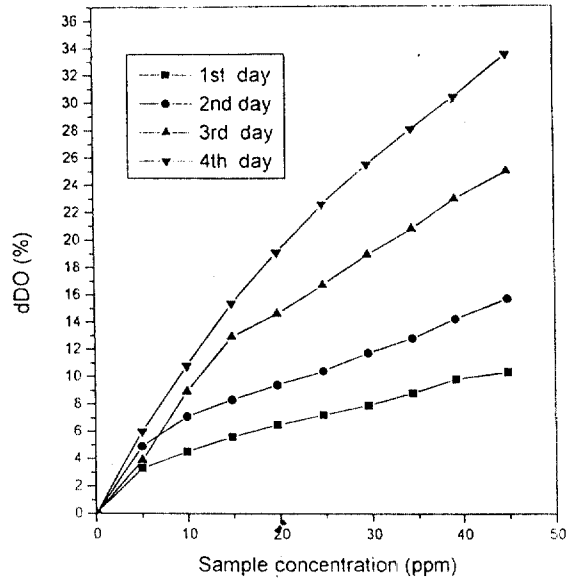


Fig. 5. Variation of the microbial membrane electrode response curve for 4 days with GGA standard solution.

후 5일간은  $\Delta DO(\%)$ 가 증가하는 경향이 나타나는데, 이 때는 미생물막 전극을 분석 목적에 이용할 수 없다. 그러나 5~6일 이후에는  $\Delta DO(\%)$ 가 안정화되었고<sup>8,9</sup> 미생물 개체수가 포화되는 이 시점부터 실제 시료를 분석할 수 있었다.

### 4. 결론

미생물막 전극을 이용하여 수질의 오염상태를 10분 이내에 신속하게 자동으로 측정할 수 있는 신속 BOD 자동화 측정장치를 개발하였다. 미생물로서 *Bacillus subtilis*를 사용하였으며, 미생물 지지체로서 PVA를 사용하였다. 제작된 미생물막 전극은 개인용 컴퓨터에 연결되어 시료의 주입, 미생물막 전극신호의 측정, BOD의 계산 등 BOD 측정 전 과정이 자동으로 수행 되도록 하였다. 측정된 시료의 BOD값은 2.5%의 정밀도를 나타내었으며, 사용 가능한 시료 농도 범위는 약 60ppm 이하의 시료 용액으로서 이 농도 범위에서 좋은 직선성을 나타내었다. 개발된 신속 BOD 자동화 측정장치는 신속한 수질오염의 측정결과를 요구하는 폐수처리 공정 혹은 원거리 자동 수질오염 측정망 등에 응용이 가능할 것으로 판단된다.

### 감사의 글

이 연구는 1995년 교육부 기초과학육성연구비 (BSRI-953-439)와 1994년도 경희대학교 교비연구비의 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. "Standard methods for examination of water and waste water", 15th Ed., American Public Health Association Inc., Washington, D. C., 1981.
2. I. Karube, T. Matsunaga, S. Mitsuda and S. Suzuki, *Biotechnol. Bioengng.*, **19**, 1535(1977).
3. I. Karube, T. Matsunaga, S. Tsuru and S. Suzuki, *Biotechnol. Bioengng.*, **19**, 1727(1977).
4. J. Kulys and K. Kasziauskiene, *Biotechnol. Bioengng.*, **22**, 221(1980).
5. K. Riedel, R. Renneberg and P. Liebs, *J. Basic Microbiol.*, **25**, 51(1985).
6. K. Riedel, R. Renneberg M. Kuehn and F. Scheller, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 316(1988).
7. S. E. Strand and D. A. Carlson, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **56**, 464(1984).
8. G. S. Inh, K. H. Park, U. H. Pek and M. J. Sohn, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **13**(2), 145(1992).
9. M. J. Sohn, E. J. Kim, S. Y. Jang and D. Hong, *Anal. Sci. Tech.*, **7**(3), 285(1994).
10. H. Oh and H. D. Kim, *Anal. Sci. Tech.*, **8**(3), 335 (1994).
11. I. Karube, *J. Biotechnol.*, **15**, 255(1990).
12. *Japanese Industrial Standard Committee, Testing methods for Industrial Waste Water, JIS K0102*, Tokyo Japan, 1986.