

## 혼합 *Bacillus* sp. BOD 센서

강태영 · 박현주 · 박경량<sup>1</sup> · 김진두<sup>2</sup> · 차근식 · 남학현★

광운대학교 자연과학대학 화학과, <sup>1</sup>한남대학교 생명나노과학대학 생명공학과

<sup>2</sup>대진대학교 자연과학대학 화학과

(2006. 11. 14. 접수; 2006. 12. 8. 승인)

## Mixed *Bacillus* sp. BOD sensor

Tae Young Kang, Hyun Joo Park, Kyeong Ryang Park<sup>1</sup>, Jin Doo Kim<sup>2</sup>,  
Geun Sig Cha and Hakhyun Nam★

Department of Chemistry, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Daejin University, Pocheon 487-711, Korea

(Received November 14, 2006; Accepted December 8, 2006)

**요 약:** 용존산소(dissolved oxygen; DO) 전극에 미생물 막과 보호막을 장착하여 BOD(biochemical oxygen demand) 센서를 제작하였다. 토양과 물 그리고 활성슬러지에서 분리한 다양한 미생물들을 BOD 센서에 적용하여 그 감응특성을 조사하여 빠른 산소 호흡력과 회복력을 나타내는 미생물로 *Bacillus* 종인 HN24와 HN93을 선별하였다. 최종적으로 최적화된 BOD 센서는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. HN24 그리고 *Bacillus* sp. HN93을 혼합한 미생물 막과 DO 전극의 기체투과막을 silicon rubber(SR) 막으로 사용한 것이며, 측정조건으로 완충용액에 50% 산소(질소와의 비율)를 주입하여 감응특성을 향상시켰다. 본 실험에서 제작된 BOD 센서는 100 mg/L BOD 농도 이상까지 우수한 직선감응성( $r^2=0.9986$ )을 나타냈다.

**Abstract:** The BOD (biochemical oxygen demand) sensor was fabricated by covering a dissolved oxygen (DO) probe with a microbe-impregnated membrane and a dialysis membrane. Various microorganisms isolated from the soils, water and activated sludge have been evaluated for measuring biochemical oxygen demand (BOD); *Bacillus* species HN24 and HN93 were selected as they exhibited rapid oxygen consumption and fast recovery. Improved BOD sensor could be prepared by using mixed microbes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. HN24 and *Bacillus* sp. NH93) and silicon rubber gas-permeable membrane for DO probe, and by bubbling 50% O<sub>2</sub> (N<sub>2</sub> valence) through background buffer solution. This system exhibited excellent analytical performance resulting in good linearity ( $r^2=0.9986$ ) from 0 to 100 mg/L level of BOD.

**Key words :** BOD sensor, microbial membrane, dissolved oxygen, *Bacillus* sp.

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-940-5246 Fax : +82-(0)2-911-8584

E-mail: namh@kw.ac.kr

## 1. 서 론

생화학적 산소요구량(biochemical oxygen demand; BOD) 측정은 수질 시료 중에 포함된 유기화합물과 일부 무기화합물을 미생물이 분해시킬 때 필요로 하는 산소의 양을 측정하는 것으로서, 유기물에 의한 오염 파악에 가장 보편적으로 사용된다. BOD 측정은 가정하수 및 산업 폐수 등의 비교에 좋은 척도를 제공하며, 또한 하·폐수 방류에 있어 일정 기준의 BOD 부하량을 유지하도록 함으로써 수질관리 및 감시에 유용하게 사용되고 있다.

일반적인 BOD 측정법으로는 BOD<sub>5</sub> 법이 사용되고 있다. BOD<sub>5</sub> 법은 5일 동안 미생물이 분해시킬 때 필요로 하는 산소의 양을 측정하는 방법이다.<sup>1,2</sup> 그러나 BOD<sub>5</sub> 법은 매우 느린 생화학적 산화과정을 이용한 것으로 시료수집에서 분석까지 최소한 5일이 소요되므로, 수질 시료 내에서 빠르게 변화하는 BOD 부하량에 적절히 대응할 수 없는 단점이 있다. 또 실험하는 사람의 숙련도에 따라 실험결과도 달라지므로 항상 정확한 결과를 신속하고 일관되게 얻을 수 없다. 이에 BOD를 신속하게 측정하기 위한 새로운 측정방법 개발에 관한 연구가 이미 오래 전부터 진행되어 왔으며, 그 중에서도 1977년 Karube와 공동연구자들은 미생물을 용존산소(dissolved oxygen; DO) 전극 앞에 부착시킨 미생물 BOD 센서를 이용하여 수분에서 30분 내에 BOD 측정을 완료할 수 있는 센서에 대해 보고하였다.<sup>3</sup> 이후 다양한 미생물을 이용한 BOD 센서가 개발되었고 상업화된 제품 또한 출시되고 있다. 현재까지도 미생물을 고정화하여 시료내의 DO 변화를 BOD로 환산하는 근본원리를 바탕으로 고정화에 사용되는 미생물 균을 다양하게 변화시켜 빠른 시간내에 더 좋은 감응 특성을 갖는 BOD 센서의 개발이 꾸준히 연구되어오고 있다.<sup>4,6</sup>

BOD 센서의 고정화된 미생물은 어떠한 균주를 사용하는가에 따라 센서의 반응시간과 감응성이 크게 달라지므로 다양한 균주들이 센서에 적용되어 왔다. BOD 센서에 사용되어온 미생물 균주들로는 *Trichosporum cutaneum*,<sup>7-13</sup> *Hansenula anomala*,<sup>14,15</sup> *Pseudomonas putida*,<sup>16,17</sup> *Bacillus subtilis*,<sup>9,18,19</sup> *Torulopsis candida*,<sup>20</sup> *Photobacterium phosphoreum*<sup>21</sup> 등이 있으며, 또한 *B. subtilis*와 *Bacillus licheniformis*의 혼합균,<sup>22</sup> *Rhodococcus erythropolis*와 *Issatchenkia orientalis*의 혼합균<sup>23,24</sup> 및 여러 미생물들의 혼합체<sup>25,26</sup> 또는 활성슬러지<sup>27</sup> 자체를 BOD 센서에 적용하기도 하였다. 현

재 상업적으로 *Trichosporum cutaneum*, *Rhodococcus erythropolis*와 *Issatchenkia orientalis*의 혼합균, 하폐수에서 분리한 미생물 등이 BOD 측정 센서에 사용되고 있으며 활성슬러지(active sludge) 자체가 사용되기도 한다.<sup>4-6,28</sup>

본 연구에서는 자연환경에서 분리한 미생물 균주들 중에서 유류 등 난분해성 물질의 분해능이 우수한 미생물(*Bacillus* sp.)을 선별하였으며, 선별된 미생물들을 단독 또는 혼합으로 BOD 센서에 고정화하여 최적의 감응특성을 가지는 조건을 조사하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 장치

#### 2.1.1. 시 약

BOD 표준용액 제조를 위한 D-(+)-glucose는 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였고, L-glutamic acid는 Junsei 사(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. BOD 표준용액(GGA standard solution)은 150 mg D-(+)-glucose와 150 mg L-glutamic acid를 탈이온수 또는 0.1 M phosphate, pH 7.0의 완충용액 1 L에 녹여 220±22 mg/L BOD 표준용액으로 사용하였다.<sup>3,6-11,18,19</sup> 완충용액 조제에 사용한 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O(sodium phosphate monobasic dodecahydrate)과 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O(sodium phosphatemonobasic dihydrate)는 Yakuri 사(Kyoto, Japan)의 제품을 사용하였다. 산소 기체투과막으로는 Dow Corning 사(Midland, MI, USA)의 silicone rubber(RTV 3140) 그리고 Thermedics 사(Woburn, MA, USA)의 tecoflex polyurethane(SG-80A)을 사용하였다. Silicone rubber(SR) 막과 tecoflex polyurethane(teco-PU) 막의 제조 시 사용되는 용매인 tetrahydrofuran(THF)은 (주)덕산화학(Ansan, Kyung-gido, Korea) 제품을 사용하였다.

그 밖의 사용된 시약 등은 특급 또는 분석등급에 준하는 것을 사용하였으며, 모든 용액의 제조에는 탈이온수(저항 18 MΩcm; Yamato Millipore WQ 500)를 사용하였다. 또한 기체 시료는 초고순도(순도 99.9999%) 질소/산소 혼합 기체를 사용하였다.

#### 2.1.2. 장 치

미생물 접종 장치인 무균작업대(clean bench)와 진탕배양기(shaking incubator)는 (주)비존과학(Incheon, Korea) 제품을 사용하였고, 원심분리기는 범창 의요기공업사(Eumsung, Chungcheongdo, Korea) 제품을, 그

리고 UV/VIS recording spectro-photometer(UV-240)은 Shimadzu 사(Kyoto, Japan) 제품을 사용하였다. 전류법(amperometry) 측정은 EG&G 사(Princeton, NJ, USA)의 Potentiostat/Galvanostat(EG&G PARC 273A)을 사용하여 PC에 데이터를 저장하고 저장된 자료의 도식화 및 해석은 Wavematrix 사(Lake Oswego, OR, USA)의 Igor 프로그램을 사용하여 처리하였다.

**2.2. 미생물 분리, 선별 및 동정**

대전과 인천 그리고 군산지역의 유류에 오염된 토양과 물, 그리고 폐수처리에 사용되는 활성슬러지 등을 채취하여, 토양과 슬러지의 경우 1 g을 멸균 생리 식염수 100 mL가 들어 있는 250 mL 삼각 플라스크에 넣고 30°C에서 1시간 진탕한 후, 그 현탁액 일부를, 또한 물시료의 경우 1 mL를 단일 탄소원으로 1% Kuwait산 원유가 첨가된 bushnell-hass(0.02% magnesium sulfate, 0.002% calcium chloride, 0.1% monopotassium phosphate, 0.1% ammonium phosphate dibasic, 0.1% potassium nitrate, 0.005% ferric chloride, pH 7.0) 최소평판배지에 접종하고 2~3일 배양한 다음 유류를 단일 탄소원으로 이용하여 성장하는 총 200여 세균 집락(colony)들을 순수분리 하였다. 분리된 200여 균주는 다시 단일 탄소원으로 1% Kuwait산 원유가 첨가된 bushnell-hass 액체배지에 접종하여 30°C에서 배양하며 성장능이 우수한 70 균주를 육안으로 일차 선별하였고, 일차 선별된 70 균주들은 각각 3 mL의 최소배지에서 배양한 후, 각 상등액 0.5 mL를

OD(optical density) 610 nm에서 유화능을 측정하여 유화능이 우수한 25 균주를 이차 선별하였다. 이차 선별된 25 균주들은 다시 유화능과 성장정도를 시간별로 측정하여 가장 빠른 시간내에 유화능과 성장능이 우수한 14 균주를 최종 선별하여 본 실험에 사용하였다. 최종선별균주들을 동정하기 위해 실시한 생리, 생화학 적 특성조사에서, 당 이용능 조사는 busnell-hass 최소배지에 여러 종류의 당을 단일 탄소원으로 첨가하여 사용하였고 영양배지로는 LB(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chlorid, pH 7.0) 배지를, 그리고 선별균주의 기질 이용능은 2xYT(1.6% bacto-tryptone, 1% yeast-extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) 배지를 사용하여 조사하였다. 이렇게 조사된 균주 특성들은 Bergey's manual of systematic bacteriology<sup>29</sup>와 LWW's organism central<sup>30</sup> 및 Biochemical tests for identification of medial bacteria<sup>31</sup>에 의거 동정하였다. 또 최종 선별 균주의 정확한 동정을 위해 최종 선별 균주의 genomic DNA를 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)방법<sup>32</sup>으로 추출하고, 이 DNA를 주형으로 중합연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 수행하여 16S rRNA 유전자 염기 서열을 조사하였다. 이때 선별 균주의 16S rDNA를 증폭하기 위해 BIONEX 사(Seoul, Korea)의 forward primer 5'-AGAGTT TGA TCM TGG CTC AG-3'(27F)와 reverse primer 5'-GGT TAC CTT TGT TAC GAC TT-3'(1492R)를 사용하였고, 염기서열은 Applied Biosystems 사(Foster City, CA, USA)의 ABI model 310을 사용하여

Table 1. Response time, magnitude of response current and recovery rate of the microbial BOD sensors prepared with various microorganisms to 50 mg/L of BOD standard

Strain	Identification	Response time <sup>a</sup> , min.	$\Delta I$ , $\mu A$	Recovery proportion <sup>b</sup> , %
HN3	<i>Pseudomonas</i> sp.	17.1	1.49	34.1
HN10	<i>Corynebacterium</i> sp.	22.8	1.70	62.1
HN20	<i>Pseudomonas</i> sp.	18.8	0.320	18.8
HN21	<i>Corynebacterium</i> sp.	30.0	1.28	61.7
HN22	<i>Corynebacterium</i> sp.	64.8	2.63	<20
HN23	<i>Corynebacterium</i> sp.	22.3	1.31	<20
HN24	<i>Bacillus</i> sp.	12.2	2.40	86.5
HN42	<i>Corynebacterium</i> sp.	32.7	1.49	73.9
HN43	<i>Corynebacterium</i> sp.	43.9	1.51	54.3
HN63	<i>Corynebacterium</i> sp.	46.4	0.83	51.2
HN72	<i>Corynebacterium</i> sp.	43.4	0.94	28.1
HN73	<i>Bacillus</i> sp.	17.1	1.28	32.2
HN75	<i>Bacillus</i> sp.	28.4	1.41	<20
HN93	<i>Bacillus</i> sp.	25.2	2.77	53.9

<sup>a</sup>t<sub>90</sub>, <sup>b</sup>( $\Delta I_R/\Delta I$ ) $\times$ 100% in t<sub>90</sub> period

분석하였다. 이렇게 분석된 rDNA 염기서열은 BLAST search([www.ncbi.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nih.gov/blast/))를 사용하여 비교, 분석 하였다.

이상의 결과 최종적으로 선별, 동정된 균주들은 Table 1에 표시하였다.

### 2.3. 미생물 BOD 센서의 제작

배양된 미생물 균을 일정량 취하기 위해서 UV/VIS 분광기로 파장이 600 nm일 때 흡광도가 0.16이 되도록 LB 배양액으로 희석한 후, 90 mL를 취해 1800 rpm에서 원심분리하여 균을 수확하였다. 미생물 막 (microbial membrane)은 젤상태의 균액을 미세 동공이 0.45  $\mu\text{m}$ 인 고정막 위에 고르게 발라 미생물을 고정시킨 다음 식염수로 적신 여과종이(filter paper) 위에 놓고, 약 12시간 동안 냉장 보관(2~4°C) 하였다. 미생물 막은 Millipore 사(Billerica, MA, USA)의 mixed cellulose ester membrane(HA type, pore size: 0.45  $\mu\text{m}$ )을 사용하였다.

미생물 BOD 센서는 미생물 막을 Clark-type DO 전극에 Fig. 1과 같이 장착하여 제작하였다. DO 전극은 음극(cathode)을 금(Au)으로, 양극(anode)을 은(Ag)으로 제작하였으며, 은 양극은 30% FeCl<sub>3</sub> 용액에 30분 정도 담가 표면을 난용성금속염인 염화은(AgCl)으로 처리 하였다. 내부용액은 0.1 M KCl 용액을 사용했

며, 산소 기체투과막(gas-permeable membrane)은 YSI 사(Yellow Springs, OH, USA)의 상용화된 Teflon membrane을 사용하였다. DO 전극의 산소 기체투과막 바깥쪽에는 미생물 막의 미생물이 외부로 빠져 나오지 않도록 보호해주는 반투막(dialysis membrane)을 장착하여 캡으로 고정하였다. 미생물 보호를 위한 반투막은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)의 dialysis membrane을 사용하였다.

기체투과막은 상용화된 Teflon 막 외에 SR과 teco-PU 막을 제작하여 비교하였다. SR 막은 150 mg SR을 THF 800 mL에 녹여 반지름이 22 mm인 링에 부어 48시간 건조시켜 제작하였으며, teco-PU 막은 teco-PU 66 mg을 THF 600 mL에 녹여 반지름이 22 mm인 링에 부어 24시간 건조시켜 제작하였다.

### 2.4. 전류법 측정

제작된 미생물 BOD 센서는 Potentiostat/Galvanostat을 통해 DO 전극의 음극과 양극 사이에 -0.800 V의 인가전위(applied potential)를 주사하여 산소량 변화에 따른 전류량 변화를 측정하였다. 측정 전, 미생물 BOD 센서를 0.1 M phosphate, pH 7.0 완충용액에 약 12시간 정도 담가 미생물 활동도를 최적화시켰고, 측정 은 0.1 M phosphate, pH 7.0 완충용액에 BOD 표준용액을 주입하여 BOD 증가에 따른 감응성을 알아보았으며, 용존산소량 조절은 산소/질소 혼합기체를 용액에 불어 넣어 수행하였다. 또한 측정시료의 항온(26°C) 유지를 위해서 JEIO TECH 사(Kimpo, Kyunggido, Korea)의 항온순환장치(RBC-10)를 사용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 미생물 막 최적화

Fig. 2는 BOD 측정에 따른 미생물 BOD 센서의 전형적인 감응곡선과 회복곡선을 보여준다. 이러한 곡선은 이미 여러 논문에 보고된 바가 있으며,<sup>6,9,18,19,22,33</sup> 미생물 BOD 센서의 감응시간(response time)과 회복시간(recovery time)을 측정하여 가역적으로 활성이 최적인 미생물을 조사해왔다. Fig. 2는 본 연구에서 사용한 미생물(HN24)을 이용한 미생물 BOD 센서의 감응과 회복을 나타낸 것으로, 0.1 M phosphate, pH 7.0 완충용액 조건하에 최초 안정화 상태(steady state)에서 BOD 농도가 50 mg/L가 되도록 BOD 표준용액을 주입함으로써 HN24 미생물이 유기물을 섭취와 함께 산소 호흡을 활발히 시작하여 용존 산소량이 감소하는

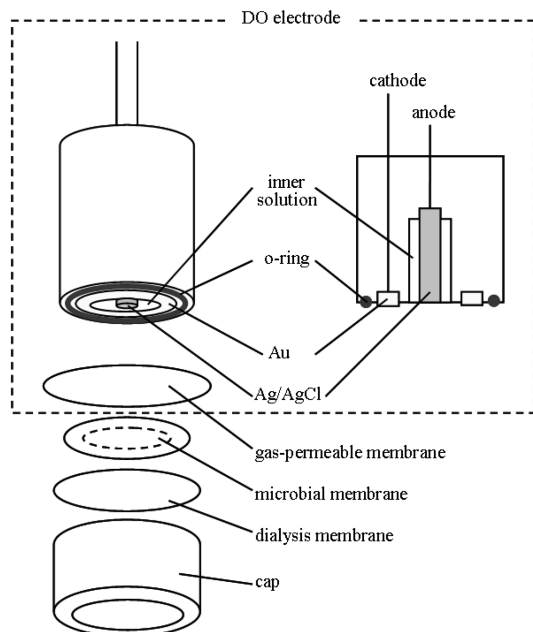


Fig. 1. Structure of a microbial BOD sensor.

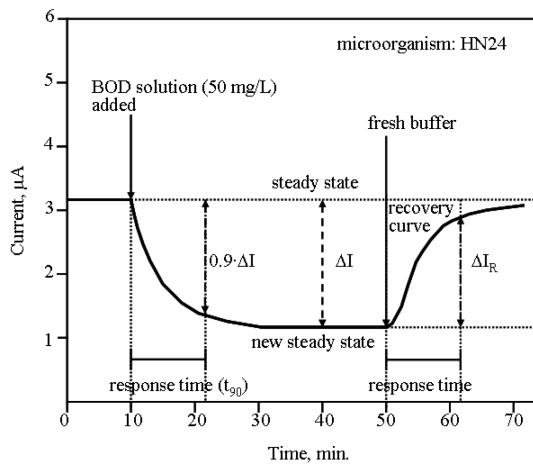


Fig. 2. Typical response curve of a microbial BOD sensor.

것을 보여준다. 산소량의 감소는 DO 전극의 전류신호 감소를 통하여 알 수 있다. HN24 미생물의 BOD 농도 증가에 따라 새로운 안정화 상태(new steady state)에 도달하기까지의 감응시간은 20분 소요되었고, 새로운 완충용액(fresh buffer)으로 교체하여 초기 안정화 상태로 다시 회복되는 시간(전류값의 96% 회복되는 시간)은 25분이었다.

생균(living cell)을 장착한 BOD 센서의 감응은 미생물의 종류, 미생물 막의 두께 및 종류, 온도, 시료용액의 pH, 시료의 종류, 전처리 등의 여러 가지 인자에 제한적으로 영향을 받으며, 특히 미생물의 종류는 가장 중요한 인자이다.<sup>6</sup> 본 연구에서는 모든 실험을 항온 및 phosphate 완충용액 조건하에서 수행하였고, 선별된 14종의 미생물 모두 Fig. 2와 같은 측정을 반복하였다. Table 1은 선별된 14종의 미생물에 대한 감응시간, 전류 변화량 그리고 회복도를 정리한 것이다. 미생물들은 대진, 인천 그리고 균산의 토양, 물과 활성슬러지에서 분리된 것으로 주로 *Pseudomonas* sp., *Corynebacterium* sp. 그리고 *Bacillus* sp.로 동정되었다. Table 1에서의 감응시간( $t_{90}$ )은 초기 안정화 상태에서 감응 후 안정화 상태까지의 전류 변화량( $\Delta I$ ) 90%에

이르는 지점까지 시간으로, 감응 회복도는 새로운 완충용액으로 교체한 후, 감응시간( $t_{90}$ ) 동안 회복된 전류 변화량( $\Delta I_R$ )을 측정하여  $\Delta I$ 에 대한 비율( $\Delta I_R/\Delta I$ ) 퍼센트로 나타냈다(Fig. 2 참조). 회복시간은 감응시간에 비해 오랜 시간이 소요되었으며, 대체적으로 오랜 감응시간을 나타내는 미생물은 매우 긴 회복시간을 나타냈기 때문에 미생물 개별의 감응시간을 기준으로 그 시간 동안의 회복된 비율로 평가하였다. HN24 미생물은 감응시간( $t_{90}$ )이 12.2분, 회복도가 86.5%로 호흡대사 활성이 가역적이고, BOD 농도변화(0→50 mg/L)에 큰 전류변화량(2.40  $\mu A$ )을 나타낸다. HN24는 *Bacillus* sp.로 동정된 미생물이다. 또 하나 주목할 만한 미생물은 HN93로 감응시간과 감응회복률이 HN24보다 다소 떨어지지만 가장 큰 전류 변화량을 나타냈다. 이 또한 *Bacillus* sp.로 동정된 미생물이었다. 따라서 *Bacillus* sp. HN24과 *Bacillus* sp. HN93을 선택하였고 각각을 *B. subtilis*(ATCC130170)와 혼합한 막을 제작하여 감응시간, 감응성 그리고 회복도를 조사해보았다.

*Bacillus* sp. HN24와 HN93 미생물 각각을 *B. subtilis*와 1:1로 혼합한 막과 *B. subtilis*, *Bacillus* sp. HN24와 HN93을 1:1:1로 혼합한 막을 측정 한 결과, 세 가지 모두를 혼합한 막이 감응시간(10.7분)과 감응성( $\Delta I=2.50 \mu A$ ) 면에서 현저한 향상을 보였다(Table 2). 회복도 또한 86%로 미생물 호흡대사 활성이 가역적으로 우수하였다. 이는 균들의 혼합이 경쟁에 의한 먹이사슬 관계를 형성하는 것이 아니라 오히려 서로의 신진대사 및 호흡활성에 상승작용을 일으키는 것으로 보인다. 또한 동일 균종(*Bacillus* sp.)의 혼합이 미생물 간에 기생이나 포식과 같은 먹이사슬 관계 형성을 최소화한 것으로 예상된다. 따라서 이러한 현상을 단독 배양과 혼합배양의 비교를 통하여 확인하고자 하였다. Fig. 3은 원유에서 단독 또는 혼합한 *Bacillus* sp.의 성장상태를 미생물수의 변화를 통해 알아본 것이다. 배양된 미생물들은 시간이 지남에 따라 증식하였다가 일정 시간 후에 사멸되는 것을 볼 수 있다. *Bacillus*

Table 2. Response time, magnitude of response current and recovery rate of the microbial BOD sensors prepared with mixed microorganisms to 50 mg/L of BOD standard

Strain	Response time <sup>a</sup> , min.	$\Delta I$ , $\mu A$	Recovery proportion <sup>b</sup> , %
<i>B. subtilis</i> + <i>Bacillus</i> sp. HN24	12.6	1.38	92.8
<i>B. subtilis</i> + <i>Bacillus</i> sp. HN93	18.8	1.55	24.3
<i>B. subtilis</i> + <i>Bacillus</i> sp. HN24 + <i>Bacillus</i> sp. HN93	10.7	2.50	86.0

<sup>a</sup> $t_{90}$ , <sup>b</sup> $(\Delta I_R/\Delta I) \times 100\%$  in  $t_{90}$  period

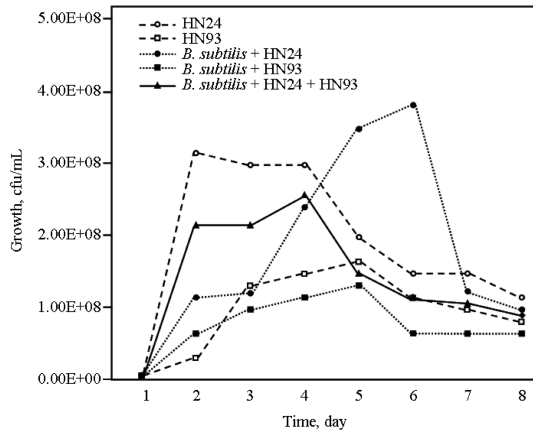


Fig. 3. Growth curves of mixed cultures for selected microorganisms in crude oil.

sp. NH24 만을 배양한 것과 세 가지 미생물(*B. subtilis*, *Bacillus* sp. HN24와 HN93) 모두를 혼합하여 배양한 것은 1일 만에 충분한 양으로 증식하여 약 3일간 일정하게 그 수를 유지하는 것으로 다른 미생물 배양에 비해 빠르고 안정적인 성장곡선을 보인다. 따라서 *Bacillus* sp. HN24는 단독으로도 BOD 센서 적용에 우수한 미생물로 선별된다. 그러나 무엇보다도 *Bacillus* sp. HN24에 *B. subtilis*와 *Bacillus* sp. HN93을 1:1:1로 혼합한 것은 안정한 성장곡선과 함께 Table 2에서와 같이 호흡활성이 서로 보강되어 감응성이 더 향상됨을 볼 수 있으며, 본 연구에서는 BOD 센서 제작에 있어 혼합 미생물 막의 사용에 더 큰 의미를 둔바, 이후 산소 기체투과막 최적화, 측정 조건의 최적화 및 현장시료 측정 등의 실험을 혼합 미생물 막을 사용하여 수행하기로 하였다.

### 3.2. 산소 기체투과막 최적화

Fig. 4는 *B. subtilis*와 *Bacillus* sp. HN24 그리고 HN93이 혼합된 BOD 센서의 BOD 농도(20, 40, 50, 60, 80 그리고 100 mg/L)에 따른 감응곡선과 검정곡선을 나타낸다. BOD 센서에 사용한 산소 기체투과막은 Teflon 막을 사용하였다. BOD 농도 60 mg/L까지 빠른 감응시간을 보이며 선형의 감응성을 가지고 있다. 그러나 60 mg/L 이상의 고농도에서는 검출한계를 나타낸다. 이러한 고농도 검출한계는 이미 *B. subtilis* 사용<sup>8,18,19</sup>과 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 혼합균 사용<sup>22</sup>에서도 보고된바있다.

본 연구에서는 고농도에서의 검출한계 문제를 해결하고자 먼저 기체투과막을 기존의 Teflon 대신 SR과

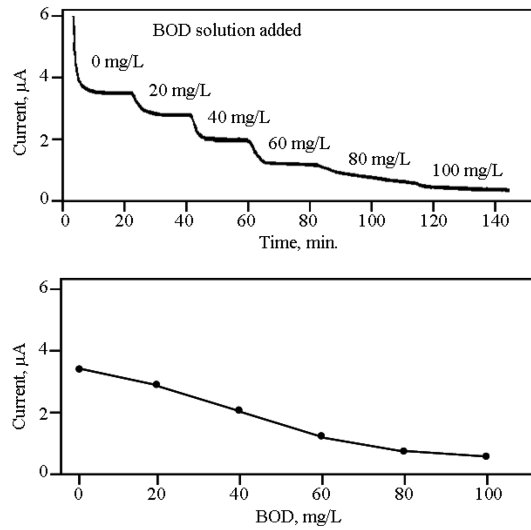


Fig. 4. Dynamic response and calibration curves of the mixed *Bacillus* sp. (*B. subtilis* : *Bacillus* sp. HN24 : *Bacillus* sp. HN93 = 1 : 1 : 1) BOD sensor with Teflon oxygen gas-permeable membrane to BOD concentration.

teco-PU를 사용해 보았다. SR과 teco-PU 산소 기체투과막은 산소투과성과 접착성이 뛰어나 평면형 소형 산소센서 제작에 용이하다.<sup>34</sup> SR과 teco-PU의 사용은 다음의 3가지 효과가 기대되었다. 첫째로 산소투과성 향상은 혼합 *Bacillus* sp. 들의 호흡에 필요한 산소가 충분히 공급되어 전류신호 ( $\Delta I$ )의 증가와 함께 직선성 범위(측정범위)를 증가시키며, 둘째로 우수한 접착성은 기체투과막과 미생물 막 사이의 간격을 최소화함으로써 산소 투과의 물리적 비평형을 최소화하는 것이다. 마지막으로 SR과 teco-PU 막의 도입은 BOD 센서를 고체상 평면형 소형 센서로 설계할 수 있는 기초를 제공할 것으로 기대하였다.

먼저 Teflon, SR 그리고 teco-PU 기체투과막을 사용한 DO 전극의 0, 10, 20 그리고 30% 산소(질소와의 비율) 농도에 대한 감응성을 비교해 보았다(Fig. 5). 자체 제작한 SR와 teco-PU 기체투과막 중에 SR 막이 Teflon 막보다 산소 투과성이 크게 향상되는 것을 볼 수 있다. 따라서 SR 막을 기체투과막으로 선택하여 혼합 미생물 BOD 센서를 제작하고 이를 BOD 농도(20, 40, 50, 60, 80 그리고 100 mg/L BOD) 변화에 따른 감응성을 알아보았다(Fig. 6). 그 결과 Teflon 막을 사용한(Fig. 4) BOD 센서보다 전류신호의 현저한 증가를 볼 수 있었다. 그러나 직선감응 범위는 큰 향상되지 못했다. 100 mg/L BOD 농도를 기준으로 Teflon 산소 기체투과막을 사용한 BOD 센서와 SR 산소 기

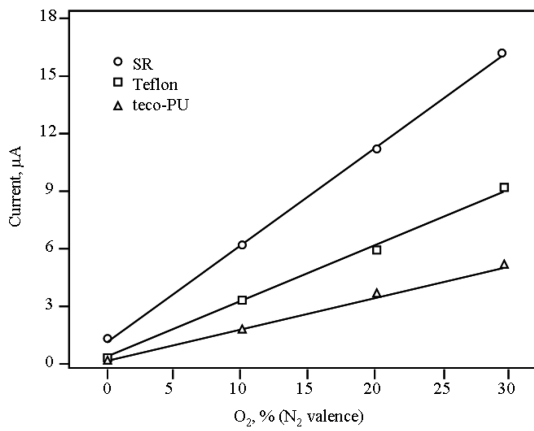


Fig. 5. Calibration curves of the DO electrodes with Teflon, SR and teco-PU gas-permeable membrane to oxygen concentrations.

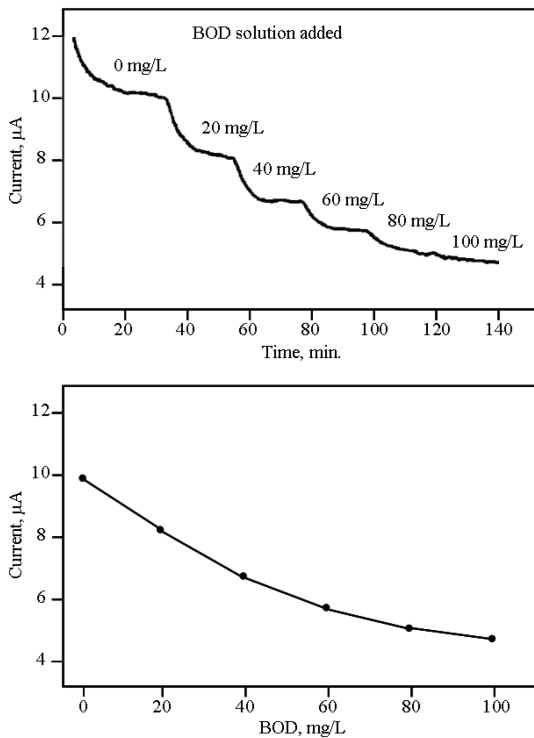


Fig. 6. Dynamic response and calibration curves of the mixed *Bacillus* sp. (*B. subtilis* : *Bacillus* sp. HN24 : *Bacillus* sp. HN93 = 1 : 1 : 1) BOD sensor with SR oxygen gas-permeable membrane to BOD concentrations.

체투과막을 사용한 BOD 센서의 전류값은 각각 0.521  $\mu\text{A}$ (Fig. 4 참조)와 4.71  $\mu\text{A}$ (Fig. 6 참조)이다. Fig. 5의 검정곡선을 통하여 각각의 전류값을 산소 농도로

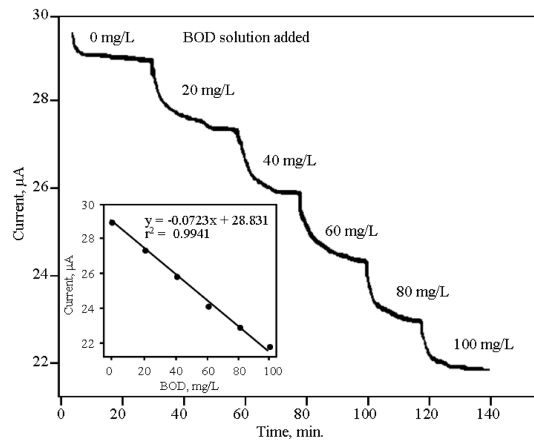


Fig. 7. Dynamic response and calibration curves of the mixed *Bacillus* sp. (*B. subtilis* : *Bacillus* sp. HN24 : *Bacillus* sp. HN93 = 1 : 1 : 1) BOD sensor obtained while bubbling 50% oxygen to nitrogen gas in the 0.1 M phosphate buffer solution, pH 7.0.

환산하였을 때, DO 전극으로 검출되는 산소 농도는 각각 1.50%(Teflon 기체투과막 사용)와 7.28%(SR 기체투과막 사용)로 계산된다. 여전히 60 mg/L BOD 이상의 농도에서 미생물들이 호흡하기 위해 공급되는 산소량이 부족한 것으로 판단된다.

### 3.3. 측정 조건 최적화

*Bacillus* sp.는 *T. cutaneum* 등과 같은 다른 미생물 에 비해 호흡활동이 왕성한 호기성 미생물 종으로 BOD 센서로 적용했을 때 다른 미생물 센서에 비해 큰 전류 변화량( $\Delta I$ )을 보이는 반면 측정범위가 넓지 못하다.<sup>8,9,18,19</sup> 이에 Tan과 Qian은 열처리한 사균(heat killed) *B. subtilis*를 사용하여 약 80 mg/L BOD 농도 범위까지 직선성을 개선하기도 하였다.<sup>33,35,36</sup> 본 연구에서는 이러한 원인을 시료내에 용존산소량이 미생물들의 호흡량에 비해 부족한 것으로 판단하고 이를 해결하고자 시료에 일정량의 산소를 공급해보았다. Fig. 7이 시료에 50% 산소(질소와의 비율) 기체를 공급하면서 측정된 BOD 센서의 감응곡선과 검정곡선을 나타낸다. 100 mg/L BOD 농도까지 감응성(1 mg/L BOD에 대해 0.10723  $\mu\text{A}$ 의 감응기울기)과 직선성( $r^2=0.9986$ )이 현저하게 향상되었다. 혼합 *Bacillus* sp. 미생물 BOD 센서에서 나타나는 고농도 검출한계를 산소 과포화 조건으로 개선할 수 있었다.

### 3.4. 현장시료 측정

본 연구를 통해 제작된 혼합 *Bacillus* sp. BOD 센

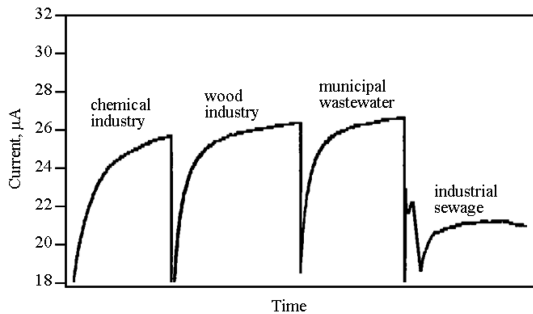


Fig. 8. Response curve for measurements of BOD levels in various waste waters with the mixed *Bacillus* sp. (*B. subtilis* : *Bacillus* sp. HN24 : *Bacillus* sp. HN93 = 1 : 1 : 1) BOD sensor.

서와 50% 산소 (질소와의 비율) 공급 조건을 이용하여 현장시료를 측정하였다(Fig. 8). 5개의 고농도의 BOD 값을 가지는 현장 폐수를 각각 phosphate, pH 7.0 완충용액으로 10배 희석하여 측정하였다. 그 결과 화학공장(chemical industry, 290.2 mg/L), 목재공장(wood industry, 333.3 mg/L), 도시하수(municipal wastewater, 433.3 mg/L) 그리고 공업용 폐수(industrial sewage, 1090.4 mg/L) 시료의 BOD 값을 측정하였다. 공업용 폐수의 희석시료(10배 희석)가 109.04 mg/L로 가장 높은 BOD 값을 나타냈으며, 100 mg/L BOD 이상의 시료를 추가적인 희석과정 없이 비교할 수 있었다.

#### 4. 결 론

14종의 미생물들 중에서, 빠른 감응시간을 가지고 신뢰성과 안정성이 우수한 미생물 *Bacillus* sp. HN24와 *Bacillus* sp. HN93을 선별하였다. 특히 *Bacillus* sp. HN24와 *Bacillus* sp. HN93, 그리고 *B. subtilis*를 1 : 1로 혼합한 미생물 막은 각각의 미생물들 특성을 유지하면서 우수한 미생물 활성 및 호흡능력으로 우수한 감응특성(감응시간, 전류 변화량, 감응 회복도 등)을 나타냈다. 혼합 *Bacillus* sp.의 왕성한 호흡력으로 인한 고농도 검출한계는 DO 전극의 기체투과막을 SR 막으로 사용하고 시료에 일정한 산소 과포화 조건을 적용함으로써 100 mg/L 이상의 BOD 농도 범위까지 우수한 직선( $r^2=0.9986$ ) 감응성을 나타내는 결과를 얻을 수 있었으며, 현장시료의 BOD 부하량 비교측정에 성공적으로 적용할 수 있었다. 이러한 연구결과는 미생물 막의 제작과 이를 이용한 BOD 센서 개발에 관한 기초자료로 축적되어 추후 현장 적용 용도에 따

라 휴대용기기 개발을 위한 소형 센서 및 환경수질시료 on-line 자동모니터링 장치 개발을 위한 센서 등으로 적용이 가능할 것으로 예상된다.

#### 감사의 글

본 연구는 산업자원부 나노핵심기반기술개발사업(과제번호: 10022933)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. L. S. Clescerl, A. E. Greenberg and A. D. Eaton, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 20th Ed., American Public Health Association Water Works Association, American Water Environment Federation, Washington D.C., 1998.
2. 대한민국 환경부, 환경부고시 제 2004-188호, 수질오염공정시험방법, 117-119(2004).
3. I. Karube, T. Matsunaga, S. Mitsuda and S. Suzuki, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1535(1977).
4. J. L. Marty, D. Olive and Y. Asano, *Environ. Technol.*, **18**, 333(1997).
5. K. Riedel, "Application of Biosensors to Environmental Samples", 267-294, G. Ramsay Ed., Wiley, New York, 1998.
6. J. Liu, and B. Mattiasson, *Water Res.*, **36**, 3786(2002).
7. M. Hikuma, H. Suzuki, T. Yasuda, I. Karube and S. Suzuki, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 289 (1979).
8. K. Riedel, R. Renneberg, M. Kuhn and F. Scheller, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 316(1988).
9. 손무정, 김은정, 장세용, 홍대일, *한국분석과학회지*, **7**(3), 285(1994).
10. C. Preininger, I. Klimant and O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.*, **66**, 1841(1994).
11. K. Harita, Y. Otani, M. Hikuma and T. Yasuda, *Instrumentation and Control of Water and Wastewater Treatment and Transport Systems: Proceedings of the 4th IAWPRC Workshop*, 529-532(1985).
12. E. Praet, V. Reuter, T. Gaillard and J.-L. Vassel, *Trends. Anal. Chem.*, **14**, 371(1995).
13. Z. Yang, H. Suzuki, S. Sasaki and I. Karube, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 10(1996).

14. J. Kulys and K. Kadziauskiene, *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 221(1980).
15. Y.-R. Li and J. Chu, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **28**, 855(1991).
16. C.-J. Chee, Y. Nomura, K. Ikebukuro and I. Karube, *Anal. Chim. Acta.*, **394**, 65(1999).
17. G.-J. Chee, Y. Nomura and I. Karube, *Anal. Chim. Acta.*, **379**, 185(1999).
18. 오 혁, 김해동, *한국분석과학회지*, **8**(3), 285(1995).
19. 오 혁, 최돈수, 정혁, 최주환, 김해동, *한국분석과학회지*, **10**(2), 285(1997).
20. S. Sangeetha, G. Sugandhi, M. Murugesan, V. M. Madhav, S. Berchmans, R. Rajasekar, S. Rajasekar, D. Jeyakumar and G. P. Rao, *Electroanalysis*, **8**, 698(1996).
21. C.-K. Hyun, E. Tamiya, T. Takeuchi and I. Karube, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 1107(1993).
22. T. C. Tan, F. Li, K. G. Neoh and Y. K. Lee, *Sens. Actuators B*, **8**, 167(1992).
23. K. Riedel and R. Uthemann, "Sensor BOD: A New Cumulative Parameter", Wasserwirtsch Wassertech, German, 1994.
24. S. Heim, I. Schnieder, D. Binz, A. Vogel and U. Bilitewski, *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 187(1999).
25. S. E. Strand and D. A. Carlson, *J. Water Pollut. Control Fed.*, **56**, 464(1984).
26. T. C. Tan and C. Wu, *Sens. Actuators B*, **54**, 252(1999).
27. Y. Sakai, N. Abe, S. Takeuchi and F. Takahashi, *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 300(1995).
28. R. Iranpour, B. Straub and T. Jugo, *J. Environ. Eng.*, **123**, 154(1997).
29. N. R. Krieg and J. G. Holt, "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
30. D. A. Sutton, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi, T. Sun, E. W. Koneman and S. E. Straus, "LWW's Organism Central", Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2001.
31. J. F. MacFaddin, "Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria", 2nd Ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
32. D. B. Wagner, G. R. Furnier, M. A. Saghai-Marooof, S. M. Williams, B. P. Dancik and R. W. Allard, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **84**, 2097(1987).
33. T.C. Tan and Z. Qian, *Sens. Actuators B*, **40**, 65(1997).
34. S. H. Choi, J. Ha, J. H. Shin, Y. S. Choi, S. H. Han, H. Nam and G. S. Cha, *Anal. Chim. Acta*, **431**, 261(2001).
35. Z. Qian and T. C. Tan, *Water Res.*, **33**, 2923(1999).
36. Z. Qian and T. C. Tan, *Water Res.*, **32**, 801(1998).