

# 生物學的水處理에 있어서 微生物 脫水素酵素 活性度 測定에 관한 研究

魚慶海 · 南相虎

建國大學校 環境工學科

## A Study on the Measurement of Microbial Dehydrogenase Activity in Biological Treatment

Gyung Hae Aoh · Sang Ho Nam

*Dept. of Environmental Sanitary  
Engineering, Kon-Kuk University*

### Abstract

The assay on microbial dehydrogenase activity by using TTC was investigated. The experimental results are summarized as follows:

1. The TF production was affected by dissolved oxygen. Dissolved oxygen in samples could be effectively removed by adding  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  as reductant prior to incubation.
2. The toxic effect on TF formation was observed at up to 0.1% of final TTC concentration when VSS concentration was 2.7g/l. As the VSS concentration increased the effect decreased.
3. It was clearly revealed that the TF generation rate decreased with increasing VSS concentration. The dilution of sludge could be applicable when VSS level is below 3.5g/l.
4. The TF production of endogenous phase (De) could be used as a measure for the viable fraction of sludge over various sludge ages. The additional TF production (Ds) due to extracellular substrate responded to De, not to VSS concentration.

### I. 緒 論

生物學的水處理工程의 設計 및 運轉에 관한 諸

般因子는 반응조의 微生物量 評價를 기초로 결정된다. 현재 널리 이용되고 있는 固形物測定 (MLSS 또는 MLVSS)은 유입수의 無生物的 有·無機物이 포함되며 固形物 중 活性微生物

량의 비率變化로 微生物量評價에 불확실한 결과를 가져온다.<sup>1)</sup> 이러한 결점을 보완하기 위하여 유기질소, 단백질 DNA, ATP 등 細胞構成物質의 含量 또는 代謝活動 測定이 활발히 연구되고 있다.

本 研究의 對象物質인 TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride)는 有機物分解時 脫水素酵素의 反應에 의해 TF (2,3,5-triphenyl formazan)로 환원되는 특성을 가지고 있다.<sup>2,3)</sup> TF는 붉은색을 띄게 되므로 吸光度計에 의해 쉽게 定量이 가능하다. 微生物의 活性度를 評價하는 TTC 測定은 保存性이 없고 分析이 간편하여 實理的인 評價方法으로 인식되고 있다. 그간 여러 研究者<sup>4-6)</sup>에 의해 分析法이 개선되어 왔으나 提案者마다 方法이 相異하고 단편적이어서 結果值간의 상호비교가 어렵고 보편타당성이 결여되어 있다는 短點을 지니고 있다.<sup>7-10)</sup> 本 研究는 TTC 測定의 既提案된 分析方法을 토대로 체계적인 실험을 통하여 分析方法을 개선하고 運轉條件에 따른 TTC 測定의 적용가능성을 검토하는데 목적을 두었다.

## II. 研究方法

### 1. 實驗裝置

本 研究를 위한 實驗裝置는 실험실 규모의 培養슬러지 裝置로 Fig. 1 과 같다. 동일한 규격으로 제작된 3 槽를 有機物負荷를 달리하여 동시에 운전하였다. 實驗은 1년 2개월(1987.9. ~ 1988. 10) 동안 실시하였다. 曝氣槽는 유효용량 5l의 아크릴제 장방형水槽이며 槽內水溫은  $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 각 槽의 運轉條件은 Table 1 과 같다.

### 2. 基質

基質은 流入濃度의 변동에 따른 實驗誤差를 없애기 위하여 人工製造하였으며 有機物濃度는 일반都市下水의 濃度範圍로 하였다. 人工基質

의 pH는 7.4, Alkalinity는  $\text{CaCO}_3$ 로 180mg/l이며 COD/BOD는 1.21, COD/TKN은 6.6 이었다.

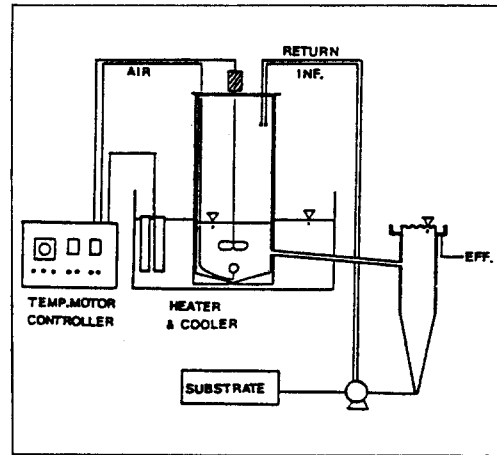


Fig. 1. Schematic diagram of experimental apparatus

Table 1. Operating condition

	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3
MCRT (d)	27.0	12.3	5.2
F/M (1/d)	0.1	0.3	0.65
HRT (hr)	18	8	4

Table 2. Composition of synthetic substrate

Composition	Concentration (g/20l)
Peptone	2
Yeast extract	1
Glucose	1.33
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.46
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.16
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.44
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.66
$\text{MgSO}_4$	0.46
$\text{CaCl}_2$	0.56
$\text{FeCl}_3$	0.05

### 3. 實驗方法

TTC測定의 反應條件決定은 일차적으로 既存의 研究結果를 참고로 하고, 다음 TTC選元과 關係되는 反應因子에 대하여 最適化를 기하였다. 실험순서는 우선 TF의 定量方法을 결정한 후 주어진 실험조건에 따라 微生物의 活性에 의한 TF生成率을 파악하였다. TF 定量時 固液分離는 Sorvall RT-6000(Du Pont社) 遠心分離器를 이용, 3,000rpm(1,200g)에서 10분간 分離하였으며 吸光度測定은 UV-240(Shimazu社) 吸光度計를 이용하였다.

## III. 實驗結果 및 討議

### 1. TF의 定量

TF 抽出劑는 ethyl alcohol, methyl alcohol, 1-butanol 등이 사용되어 왔으나 본 실험에서는 抽出效果가 확인된 ethyl alcohol을 擇하여 濃도에 따른 抽出效果를 검토하였다(Fig. 2). Ethyl alcohol 농도 80% 이상에서 좋은 效果를 보였으며 95% ethyl alcohol을 사용하여 1次抽出(吸光度 0.8~1.0)한 슬릿지에 대한 2次抽出結果 吸光度는 0.02 이하로서 만족할 效果를 보였다. TF 檢量線作成時 95% ethyl alcohol을 사용, 0.1, 0.5, 1.0 TFmole/10ml의 標準溶液으로 吸光度를 測定한 결과 最適吸光波長은 485nm 이었다(Fig. 3). TF 檢量線은 吸光度 1.4(0.91  $\mu$  mole TF/10ml)까지 거의 比例적으로 나타났으나 실험에는 0.0~1.0의 吸光度 값만 이용하였다.

### 2. TTC 反應條件決定

#### 1) 培養時間

微生物試料에 TTC를 주입한 후 15분 간격으로 측정된 TF 생성량은 1시간 이내에서 시간에 比例적으로 나타났으며 (Fig. 4) 이후 완만한 增加를 보였다. 48시간까지의 反應에서

Fig. 5의 같이 TF생성이 制限되었다.

TTC의 反應停止劑로는 一般적으로 황산과

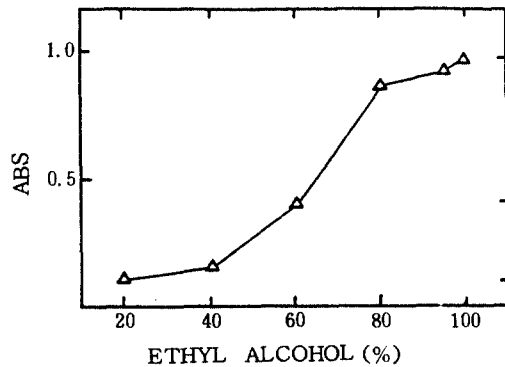


Fig. 2. Effect of extraction of ethylalcohol (35%) at various concentration.

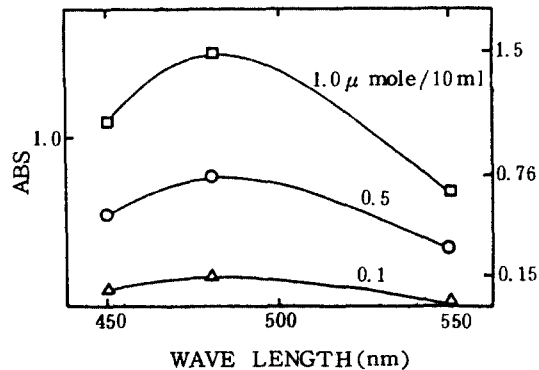


Fig. 3. The maximum absorption wavelength range of TF standard solution

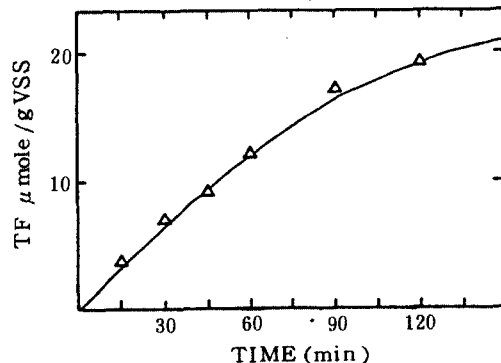


Fig. 4. TF production of various incubation time (1)

ethyl alcohol이 이용되어 왔으나 黃酸이 效果的인 것으로 보고되고 있다.<sup>10)</sup> 본 실험에서는 황산과 포르말린을 擇하여 比較하였으며 Fig. 6과 같이 거의 동일한 效果를 보였다. 다만 TF 抽出時 遠心分離과정에서 포르말린을 사용한 試料의 分離가 황산사용에 비해 良好한 것으로 나타났다. 포르말린은 衛生上의 觀點에서 取扱이 용이하지 않은 단점이 있다.

### 2) 反應溫度

溫度的 영향은 親溫性微生物의 特性을 보였다. 20~37℃까지의 TF 생성변화를 Arrhenius 式으로 표현하면 다음과 같다.

$$\frac{K_T}{K_{37}} = 1.057^{(T-37)}$$

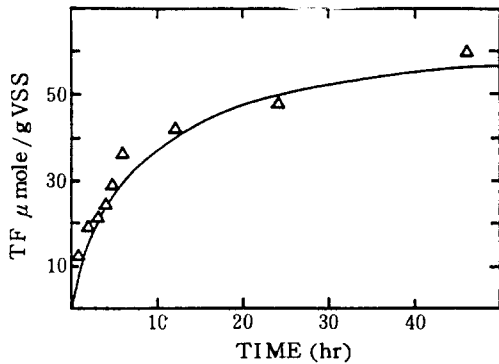


Fig. 5. TF production of various incubation time (2)

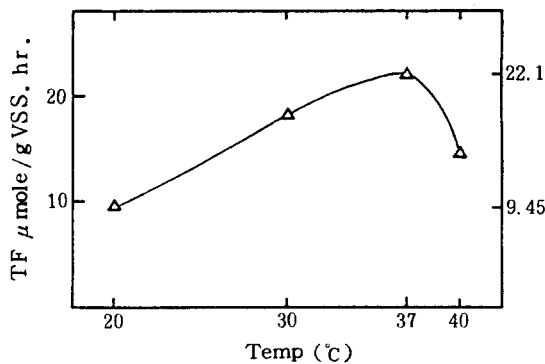


Fig. 7. Effect of temperature on the TF production

20℃를 기준으로 하여 溫度別 TF 생성량을 他研究와 比較한 결과, 본 실험의 결과가 평균 값에 근사함을 보였다(Fig. 8).

### 3) pH

실험에 이용된 試料의 평균 pH값은 6.4 이었으며 TTC용액은 4.3 이었다 Fig. 9는 0.1 M-수산화칼륨용액으로 反應試料의 pH를 조정하여 TF 생성량을 측정 한 결과이며 pH 8.6에서 最大값을 보였다. 그러나 試料의 pH를 각각 4.0, 7.0, 11.0으로 조정 한 후 時間別로 관찰한 결과 微生物에 대한 衝擊으로 인하여 TF 생성이 90分이후에 비로소 안정되어졌으며 생성량은 中性, 酸性, 알칼리성의 순이었다.

### 4) 溶存酸素

TTC는 水素電子를 收容함에 있어 溶存酸素

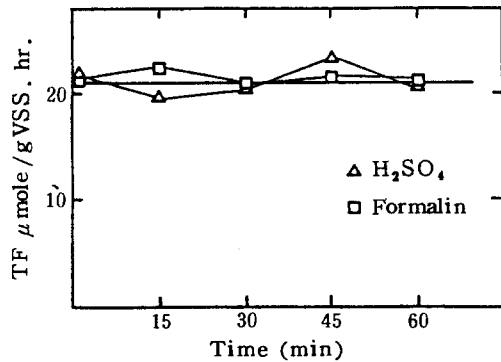


Fig. 6. Effect of stoppers on TF production

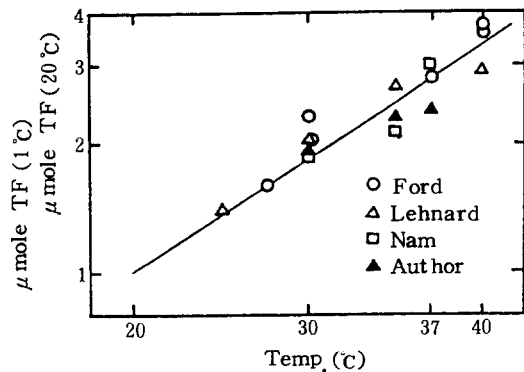


Fig. 8. Ratio of the TF production at various temperature to at 20°C

Table 3. Comparison of oxygen removal methods on TF production

Oxygen removal	Respiration	Chemical adding	Centrifuging
$\mu\text{mole TF/g VSS hr}$	16.4	21.2	25.2

와 경쟁관계에 있다. 따라서 好氣性 微生物인 경우 酸素를 除去함으로써 TTC 測定의 不確實性을 最小化시킬 수 있다.

溶存酸素의 除去方法은 微生物呼吸에 의한 방법(豫溫), 還元劑添加방법 및 遠心分離 후 상등액을 熱處理한 증류수와 치환하는 방법이 있다. 豫溫은 酸素를 제거함과 동시에 微生物의 溫度적응력을 높일 수 있는 이점이 있다. DO 3.4mg/l 인 試料에 대하여 세 방법으로 산소 제거 후 측정된 결과는 Table 3 과 같다. 원심분리 방법과 환원제 첨가방법은 거의 같은 결과를 보였으나 환원제 첨가가 조작이 간편하여 사용상 有利하였다.

還元劑( $\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{CoCl}_2$ )를 이용, DO를 제거한 시료를 曝氣하여 DO濃度別로 채취한 試料을 대상으로한 TF 생성변화는 Fig. 10 과 같다. 각 試料에 다시 還元劑( $\text{Na}_2\text{SO}_3$  1.4 g/l +  $\text{CoCl}_2$  0.2 g/l) 0.5ml 를 가한 결과 TF 생성은 거의 일정하였으나(A線) 還元劑의 주입이 없는 試料은 DO의 증가에 따라 TF생성이 현저히 감소하였다(B線). 각 농도에서의 A線과 B線의 差異는 DO에 의해 TF 생성이 억제된 부분을 나타내고 있다.

### 5) 注入濃度 및 稀釋

微生物에 의한 TTC 還元率은 아주 낮으며 TTC濃度는 일반적으로 0.02~0.1% (最終濃度)로 주입하고 있다. 본실험에서는 0.0~0.015%, 0.0~0.2%로 나누어 실시하였다.

TTC 0.0015% (시료내 0.224  $\mu\text{mole}$ ) 에서 0.18  $\mu\text{mole}$  TF가 생성되어 생성 mole 수/주입 mole 수로 표현되는 還元率이 80%이나 TTC 0.01%에서의 還元率은 21%로 감소하였다. 또한 Fig. 12 에서나 같이 0.04% 까지 거의 직선형태의 생성변화를 보였으나 0.1

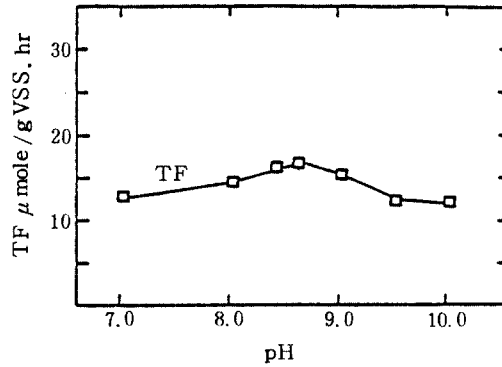


Fig. 9. Effect of pH on the TF production

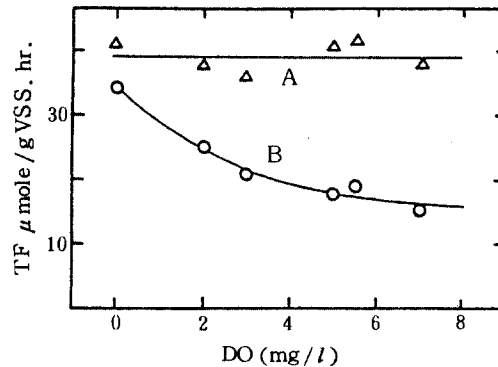


Fig. 10. Effect of DO concentration on the TF production

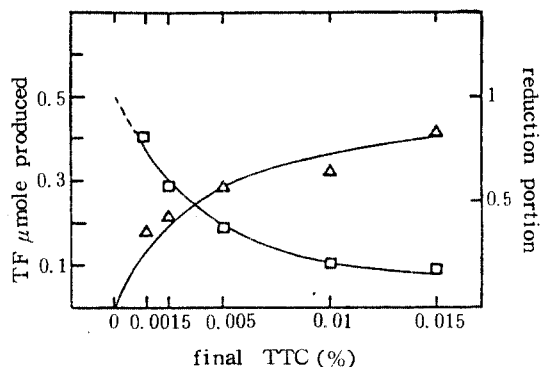


Fig. 11. Effect of TTC concentration (1)

%이상에서는 생성이 저하되어 TTC에 의한 毒性 영향이 있는 것으로 판단된다. Fig. 13는 TTC 농도와 微生物濃도의 관계를 나타내고 있다.

동일한 시료를 이용, VSS 농도 1.8g/l와 15 g/l로 농축하여 TTC농도별로 비교한 결과 微生物濃도가 높은 B線은 毒性 영향이 감소하지만 TF 생성량은 A의 절반수준이었다. TF 생성의 감소원인은 單位微生物量당 TTC 및 基質의 공급이 상대적으로 작아지며 특히 反應시 슬릿지가 沈澱, 壓縮되는 原因으로 판단된다. 그 영향을 최소화시키기 위해서는 試料를 適當한 濃度로 稀釋할 必要가 있다. VSS 7.5 g/l인 建國大學校 牛乳公場폐수 처리시설, 曝

氣式 酸化池의 활성슬릿지를 이용하여 稀釋 效果를 검토하였다.

試料를 1/10~4/10까지 희석하였을 때 TF 생성율은 比例的이었으나 6/10 이상(4.5g/l)에서는 TF생성이 감소되었다. 試料의 微生物濃도는 VSS기준 3.5g/l 이하에서 좋은 稀釋 效果를 보였다.

#### 6) 基質除去

試料내 基質을 除去하고 2시간 폭기후 측정된 TF 값은 內生呼吸狀態의 微生物 자체에 의한 TF 생성을 의미하며, 酵素가 적용된 基質을 공급하는 경우 微生物活性에 의한 TF가 생성된다.<sup>11)</sup> Fig. 15는 F/M比에 따른 內生呼吸 도달시간을 나타내고 있다.

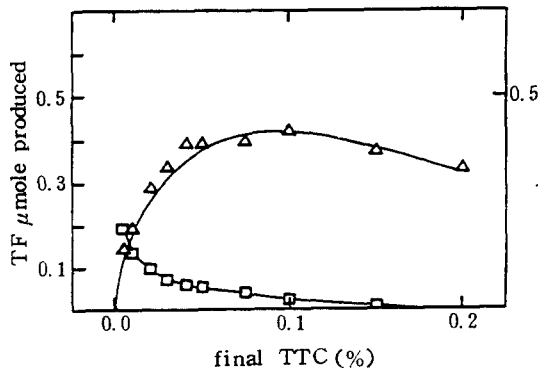


Fig. 12. Effect of TTC concentration (2)

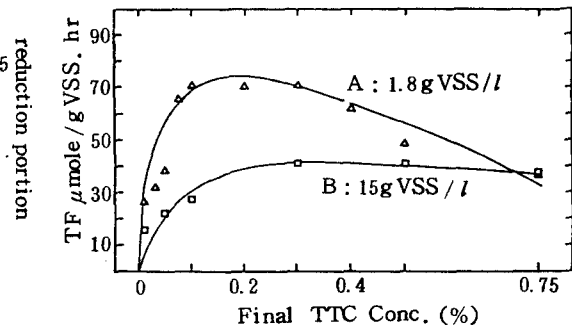


Fig. 13. Effect of TTC concentration (3)

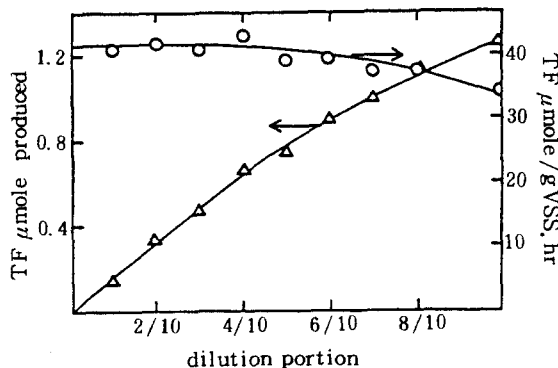


Fig. 14. Effect of ditution on the TF production

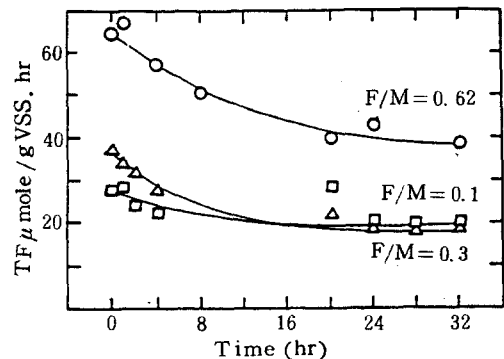


Fig. 15. TF production of different F/M ratio at various incubation time

Table 4. Reaction condition of TTC-dehydrogenase activity test

Parameter	Condition
Sample volume	5 ~ 10 ml
VSS concentration	< 3.5 g/l
Oxygen removal	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> + CoCl <sub>2</sub>
Substrate removal	Aeration
Final TTC concentration	0.1 %
Incubation time	60 min
Incubation temperature	37 °C
Stopper	Formalin
Solid-Liquid separation	Centrifuger (1,200 g, 10 min)
Extraction reagent	Ethyl alcohol (95 %) 10 ml
Absorption wavelength	485 nm

基質除去時間은 운전 조건등에 따른 微生物活性에 관계된다. F/M比 0.62인 시료는 曝氣 12時間이후 거의 안정된 값을 보였고 F/M比 0.3 이하의 경우 24時間 曝氣후 충분히 內生呼吸狀態에 도달된 것으로 볼 수 있다.

7) 表現方法

TTC測定은 微生物代謝活動을 간접적으로 表現하므로 實驗結果간 比較가 가능하도록 單位의 일괄성이 요구된다. TTC反應에 의한 TF 생성은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$TF (\mu\text{mole/g VSS} \cdot \text{hr}) = \frac{TF (\mu\text{mole}/10\text{ml}) \times 10^3}{\text{試料量}(\text{ml}) \times \text{VSS濃度}(\text{g/l}) \times \text{培養時間}(\text{hr})}$$

윗식은 培養時間 1시간 이내에서 적용이 가능하다. 본 연구결과로부터 얻은 TTC-脫水素酵素反應의 測定條件은 Table 4와 같다.

3. 運轉條件에 따른 TF 生成變化

生物學的 水處理工程의 微生物單圈重量당 活性部分은 F/M比, 運轉條件등과 관계되며 TF 生成량으로 나타낼 수 있다.<sup>5)</sup> 微生物滯留時間 ( $\theta_c$ )이 각각 5.2, 12.3, 27.3일로 운전된 試料에 대하여 內生呼吸狀態의 TF生成量(De)를 측정 한 결과, Fig. 16과 같이  $\theta_c$ 가 길수

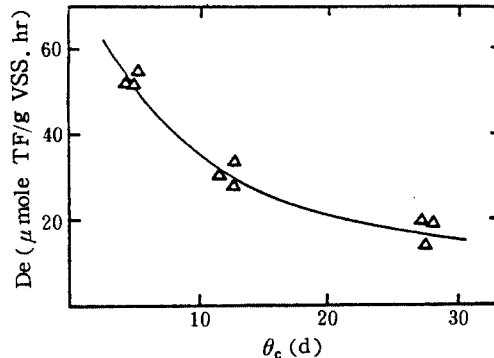


Fig. 16. TF production of endogenous phase on various  $\theta_c$

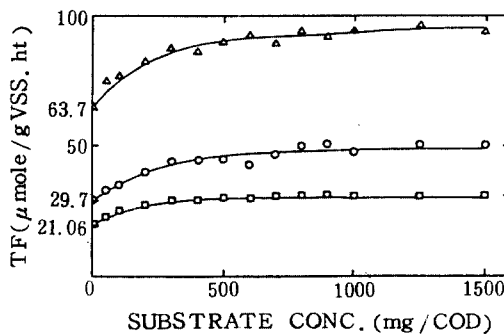


Fig. 17. TF production at various substrate concentration  
:  $\theta_c = 5.2$  days :  $\theta_c = 12.3$  days  
:  $\theta_c = 27.3$  days

복 De는 낮은 것으로 나타났다.

동일한 試料를 취하여 基質을 除去한 후 人工基質의 有機物濃度を COD로써 0~1,500 mg/l까지 조정, 주입한 결과, TF생성은 Fig. 17과 같았다.

各 基質濃度에서 전체 TF생성을 Pt라 할 때 基質에 의한 TF생성량(Ds)는  $D_t - D_e$ 이며 De는 基質濃度 0 mg/l의 TF생성량이다.  $D_t$ 는  $\theta c$ 에 따라 差異가 있으나 De에 따른 Ds값( $D_s/D_e$ )은 Fig. 18과 같았다. 즉 De를 VSS중 活性部分에 의한 TF생성으로 볼때, 微生物중 活性部分당 Ds는 運轉條件과 상관없는 것을 시사하고 있다.

#### IV. 結 論

生物學的 水處理에 있어서 微生物活性度 評價를 위한 TTC-脫水素酵素反應을 본 實驗結果는 다음과 같다.

1. TF생성은 溶存酸素( $\Delta \longrightarrow \Delta$ )에 의해 영향을 받으며 酸素除去는 培養전 還元劑의 添加가 효과적이었다.
2. VSS 2.7g/l에서 TTC의 毒性은 最終注入濃度 0.1%이상에서 관찰할 수 있었으며 VSS농도가 높을수록 毒性影響은 감소하였다.
3. VSS를 기준으로 한 單位微生物量당 TF생성은 VSS가 증가할수록 감소하였다. 슬릿 試料의 稀釋은 VSS 3.5g/l 이하에서 가능하였다.
4. 內生呼吸狀態의 TF생성(De)는 微生物 滯留時間別 活性部分으로 평가될 수 있으며 基質에 의한 TF생성(Ds)은 VSS보다는 De와 關係를 갖는 것으로 나타났다.

#### 參 考 文 獻

1. C.L. Weddle et al., The viability and activity of activated sludge, Water Res. 5

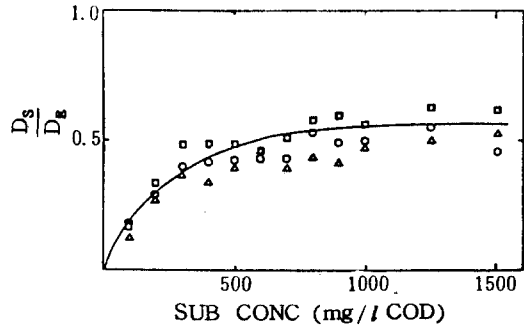


Fig. 18. Ratio of substrate TF production to endogenous TF production and substrate concentration.

- 1971.
2. A.W. Nineham, The chemistry of formazolium salts, Chem. Rev. 55, 1955.
3. H. Mollering et al, Visualization of NAD(P)-dependent reactions, In Methods of Enzymatic analysis, Academic press, 1970.
4. G. Lehnard et al., The measurement of dehydrogenase activity of activated sludge, Proc. 2nd Ind. Wat. Poll. Res. Conf., Tokyo, 1964.
5. D.L. Ford, Dehydrogenase enzyme as parameter of activated sludge activities, Proc. 21st Ind. Waste. Conf. Purdue Univ., 1966.
6. P.H. Jones et al, The use of tetrazolium salts as a measure of sludge activity, JWPCF 41,11, 1969.
7. A. Klapwijk et al., A modified procedure for the TTC-dehydrogenase test in activated sludge, Water Res. 8, 1974.
8. H. Rissov-Nielsen, Measurement of inhibition of respiration in activated sludge by a modified determination of the TTC-dehydrogenase activity, Water Res. 9 1975.
9. 橋本 裝, 巖屈 惠祐, 活性汚泥法 制御における微生物の濃度評價, 用水と廢水, p.



28, 1986.

10. 南相虎, 生物學的水處理에 있어서 好氣性 微生物의 活性度 評價를 위한 TTC 測定 方法에 관한 研究, 建大 産業技術研究所

研究報告 第 21 輯, 1987.

11. 須藤 隆一, 廢水處理の生物學 産業用水調査會, 1977.