

*Saccharomyces cerevisiae*에 의한 Pb 생체흡착

†안 갑 환 · *서 근 학

지산전문대학 환경관리과 · *수산대학교 화학공학과

Pb Biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*

Kab-Hwan Ahn[†] and Kuen-Hack Suh^{*}

Dept. of Environmental Science & Technology, Jisan Junior College, Pusan 609-323, Korea
^{*}Dept. of Chemical Engineering, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT

The contamination of the environment by heavy metals results in a serious public health problem due to the toxicity of those pollutants even at low concentrations. Microorganisms may be used to remediate wastewaters contaminated with heavy metals. The waste *S. cerevisiae* is an inexpensive readily available source of biomass for bioremediation of wastewater. *S. cerevisiae* was investigated for their ability to absorb Pb. The crushed biomass of *S. cerevisiae* exhibited higher Pb uptake capacity than the living *S. cerevisiae* and the sterilized *S. cerevisiae*. At the same metal concentration, metal uptake per unit concentration of adsorbent decreased when the biomass concentration rises. The order of the biosorption capacity of the living *S. cerevisiae* was Pb > Cu > Cd = Co > Cr. When *S. cerevisiae* was pre-treated with 0.1 M NaOH, Pb uptake was increased by 150 percent and 0.1 M HCl, 0.1 M H₂SO₄ solutions were efficient in the desorption of Pb. The sorption equilibrium of Pb ions can be described by the Freundlich and Langmuir models.

서 론

각종 화학공업의 발달로 인하여 산업체로부터 중금속 사용의 증가 및 다양화로 인하여 오염부하량이 갈수록 높아지고 있다. 각종 산업 분야로부터 중금속을 배출하는 업소는 전기도금업, 피혁제조업, 염색공업, 석유정제공업, 석유화학공업, 금속제련, 농약제조 등이 있다(1-2). 이들로부터 배출된 중금속은 체내에 축적이 쉽게 일어나는 오염물질로서 매우 위해성이 높은 물질이다. 중금속에 의한 생체축적은 어떤 중금속이 한 생물체에 섭취되어 동화되거나 배출되지 않을 때 일어나므로 먹이연쇄의 여러 단계를

거치는 동안 더욱 많은 양이 축적된다(3). 중금속이 생체에 축적되는 이유는 중금속들이 효소인 단백질 분자와 강하게 결합하는 성질을 가지고 있으며, 단백질과 결합된 금속원자는 배설이 원활하지 않아 소량이라도 일정 기간 몸속에 계속 축적이 된다. 특히 수은이나 납은 중추신경계에 관여하는 효소들과 강하게 결합하는 경향이 있어 이들에게 심하게 노출되면 정신이상, 정신박약, 혼수 등의 신경계에 치명적인 영향을 미칠 수 있다(4). 따라서 중금속은 소량이라도 생태단계농축(biomagnification)이 되므로 자연 생태계에 큰 피해를 줄 수 있기 때문에 중금속 배출원에서부터 완벽히 처리하여야 한다.

중금속이 함유된 폐수처리법으로는 화학 침전법,

† Corresponding Author

이온교환법 및 생물학적 처리법 등이 있다. 화학 응집제를 사용하는 침전법은 중금속을 수산화물, 탄산염, 황화물 등으로 만들어 처리하고 있으나 침전된 슬러지가 2차적인 공해를 유발 할 수 있어 문제점을 가지고 있다(5, 6). 이온교환법은 이온교환수지에 농축된 중금속을 탈리 재생하여 여러번 재사용 가능하나 수지의 가격이 고가여서 다른 처리법보다 비경제적이다. 생물학적 처리법은 최근 활성슬러지법과 생물막 공법 등을 이용하여 중금속을 축적 제거하는 경우가 있으나 중금속 자체의 독성 때문에 농도에 많은 제한을 받아 일정 농도 이상에서는 미생물의 활성이 저하되거나 사멸되어 실제 현장에 적용하기에는 많은 어려움이 있다(7, 8).

미생물이 중금속을 흡착 혹은 결합(binding)한다는 것은 오래전부터 잘 알려져 있다. 이는 proteins, nucleic acids 및 polysaccharides 같은 생체고분자(biopolymer)는 중금속을 결합할 수 있는 부위(sites)를 가지고 있으며, carboxylate, sulphate, hydroxyl 및 phosphate와 같은 리간드기는 음으로 하전된 기를 가지고 있기 때문에 세포벽으로의 흡착이 가능하다. 이처럼 금속류가 미생물과 같은 생물체에 물리, 화학 및 생물학적 상호작용에 기인하여 흡착되는 것을 생체흡착(biosorption)이라 한다(9). 생체흡착 현상은 활성탄 및 이온교환과 유사하며 미생물 및 중금속의 종류에 따라 흡착능력이 다르다. 생체흡착용으로서의 biomass 선택 기준은 저렴한 가격이 손쉽게 구할 수 있어야 하고, 빠른 시간내에 효과적인 중금속 제거, 특정 중금속에 대한 선택성, 흡착된 중금속과의 분리 용이 및 미생물의 재활용이 가능해야 한다.

최근 국내외적으로 미생물을 이용한 중금속 흡착제 개발에 많은 연구가 이루어지고 있다(10-13). 본 연구에서는 에탄올 발효에 많이 사용되는 *S. cerevisiae*를 이용하여 Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb 및 Zn이온의 흡착능력을 규명하고, 특히 인체에 치명적인 영향을 미치는 Pb이온의 흡착특성을 중점적으로 고찰하고자 하였다.

실험내용 및 방법

미생물 및 중금속

중금속 생체흡착에 사용된 미생물은 에탄올 발효에 이용되는 *S. cerevisiae*를 일산실업(부산 문현동

소재)으로부터 사면배지 형태로 제공받았다. 중금속은 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 및 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 로 중금속 표준원액 농도를 1000mg/l로 제조하여 실험시 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

미생물 접종, 배양 및 회수

*S. cerevisiae*의 배양에 사용된 배지는 glucose (100g/l), yeast extract(8.5g/l), NH_4Cl (32g/l), MgSO_4 (0.11g/l), CaCl_2 (0.06g/l)로 조제하여 121°C에서 20분간 멸균한 후 종균을 접종하여 진탕 배양기에서 32°C, 150r.p.m.으로 20시간에서 24시간 배양하였다. 진탕 배양한 균주 배양액을 원심분리로(5000g, 15분) 농축한 후 증류수로 3, 4회 세척한 후 여과로 *S. cerevisiae*을 농축, 회수하여 4°C에 보관하였다. *S. cerevisiae* 농도는 분광광도계(Shimadzu 1200)를 이용하여 660nm에서 optical density(O.D)가 0.1에서 0.4 범위에 들도록 하여 검량선을 작성하여 구하였다. *S. cerevisiae*의 건조밀도는 시료를 원심분리하고 상등액이 제거된 효모를 증류수로 3번 세척한 다음 105°C로 유지된 건조로에서 24시간 건조 함량하여 측정하였다.

생체흡착 실험

단일 중금속 흡착실험은 Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb 및 Zn이온의 표준원액을 각각 3차 증류수로 필요한 농도의 2배 농도로 희석하여 500ml의 삼각 플라스크에 각각 75ml씩 채워 진탕 배양기에 넣어 30°C로 되게 하였다. 일정량의 *S. cerevisiae*을 건조 무게로 정량하여 3차 증류수로 충분히 혼합하여 온도가 30°C가 되도록 하였다. 30°C로 조절된 중금속 이온과 *S. cerevisiae*을 1:1 혼합하여 진탕 배양기에 넣어 150r.p.m.으로 회전 운전하였다. 일정 시간마다 2ml의 시료를 채취하여 원심분리기(HANIL Mega 17R)에 20분간 10,000r.p.m.으로 원심분리하여 상등액을 중금속 농도 분석에 사용하였다.

혼합 용액중의 선택적 중금속 흡착실험은 단일 중금속 흡착 실험과 같은 방법으로 수행하였으며, 혼합 중금속 용액의 농도는 Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb 및 Zn을 각각 50mg/l씩 혼합하여 사용하였다.

모든 중금속의 농도 분석은 원자흡수 분광계(Shimadzu AA-670)로써 분석하였으며, 분석조건

Table 1. Metal sorption by *S. cerevisiae* from mixed metal ions.

metals	Living	Dead
	q (mg/g Dry Wt.)	q (mg/g Dry Wt.)
Cd	6.5	0
Co	6.37	0
Cu	12.13	3.45
Cr	3.73	0
Ni	0	0
Pb	16.57	38.51
Zn	0	0

Initial metal concentration: 50 mg/l
 Biomass concentration: 1 g/l
 Temperature: 30°C

은 Standard methods(14)에 의해 행하였다.

결과 및 고찰

*S. cerevisiae*의 선택적 중금속 흡착

Cd, Co, Cu, Cr, Ni, Pb 및 Zn 이온이 혼합된 중금속 용액으로부터 생체흡착제에 의한 흡착량을 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보여지는 바와 같이 건조분쇄된 *S. cerevisiae*가 살아있는 *S. cerevisiae* 보다 선택성이 더 우수하였다. 이와 같은 선택성에 대하여 Kuyucak 등(15)은 죽은 미생물들의 활성 이온 이동(active ion transport)이 순수롭지 못하여 일부 중금속에 선택성을 가질 수 있다고 가정하고 있으나 이들 미생물들의 물리, 화학, 생물학적인 상관관계가 너무 복잡하여 메커니즘을 정확히 규명하지 못하고 있는 실정이다. *S. cerevisiae*의 중금속 흡착량은 Pb>Cu>Cd=Co>Cr>Zn=Ni의 순으로 이루어 졌으며 Ni와 Zn은 흡착이 이루어 지지 않았다. 그러나 건조분쇄된 *S. cerevisiae*는 Pb와 Cu 이외는 흡착되지 않아 *S. cerevisiae*가 다른 중금속에 비해 Pb 이온을 선택적으로 흡착을 잘하는 것으로 나타났다. Pighi 등(16)도 여러가지 혼합 중금속 흡착실험에서 선택성은 미생물의 종(species)에 따라 달라진다고 하였고, Beate 등(12)은 *treptomyces noursei*를 이용한 중금속흡착에서 Ag>Cr>Pb>Cu>>Zn>Cd>Co=Ni 순으로 흡착이 이루어 졌다고 하였다. 이와같은 선택적 흡착 현상은 대부분 혼합된 중금속 이온 사이에 흡착이 서

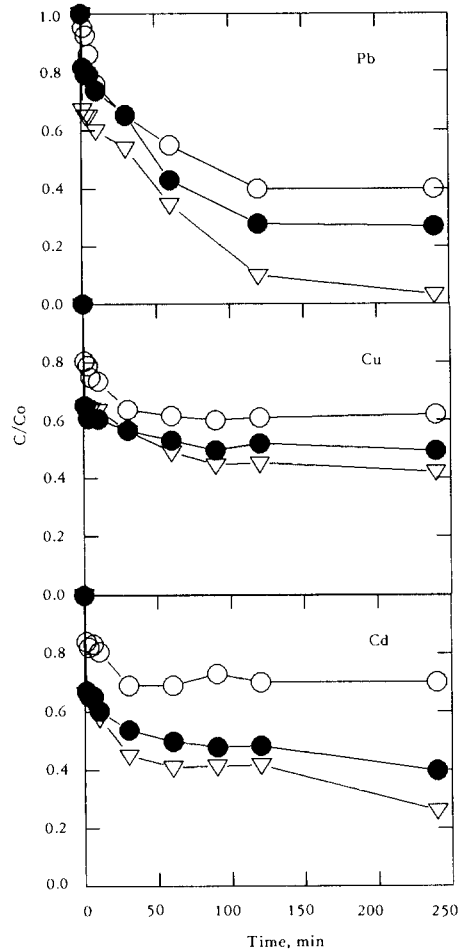


Fig. 1. Bioremoval kinetics of heavy metals by *S. cerevisiae*.

Initial metal concentration: 100 mg/l
 Biomass concentration: 1 g/l
 ●, 3 g/l, ▽, 5 g/l at 30°C.

로 경쟁적으로 일어났거나 흡착 부위가 포화에 도달되었기 때문으로 사료되었다.

생체흡착제의 농도 변화에 따른 중금속 흡착

살아있는 *S. cerevisiae* 농도 증가(1, 2 및 3g/l)에 따른 중금속 흡착현상을 고찰하기 위해 각각 100mg/l의 Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb 및 Zn이온용액으로부터 흡착 시간에 따른 잔류 평형농도 변화를 고찰하였다. Fig. 1에 보여주는 바와 같이 Cd, Cu 및 Pb이온은 *S. cerevisiae*의 농도 증가에 따라 잔류

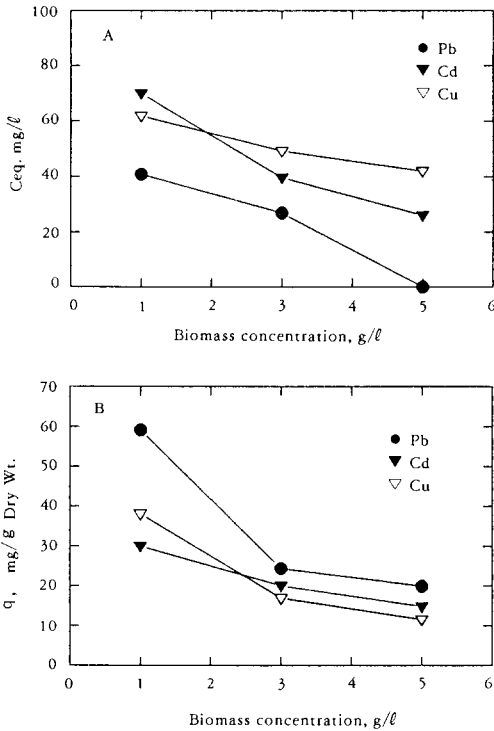


Fig. 2. Residual metal solution(A) and metal uptake(B) by increasing biomass of *S. cerevisiae* during 4 hour.
Initial metal concentration : 100 mg/l
Biomass concentration : 1g/l, 3g/l and 5g/l

평형농도는 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 Co, Cr, Ni 및 Zn이온의 흡착량은 여기서서는 제시하지 않았지만 단위 흡착체당(g Dry Wt.) 5mg 이하로 거의 흡착이 이루어지지 않았다. 모든 중금속의 흡착시간은 1시간 내에 이루어 졌으며, 중금속 이온의 종류에 따라 흡착평형에 도달되는 시간과 흡착량은 달랐는데, 7개의 중금속 중에서 Pb 이온이 가장 많이 흡착되었다. Fig. 2는 생체흡착제의 농도 증가에 따른 중금속 흡착량을 나타낸 것으로 *S. cerevisiae*의 농도가 증가하면 단위생체 흡착체당 중금속의 흡착량은 감소함을 보여준다. 이러한 현상에 대하여 Eric은 용액내의 생체흡착제가 많아짐에 따라 중금속이 대부분 흡착되어 미 흡착된 부위가 남아 있기 때문으로 보고하고 있다. 본 실험에서 Pb이온의 경우 1g/l의 생체흡착제로 240분이 경과하였을 때 잔류 평형농도는 40mg/l 가 되어 60mg Pb/g Dry Wt.의 흡착량을 보였으나, 5g/l 에서 잔류

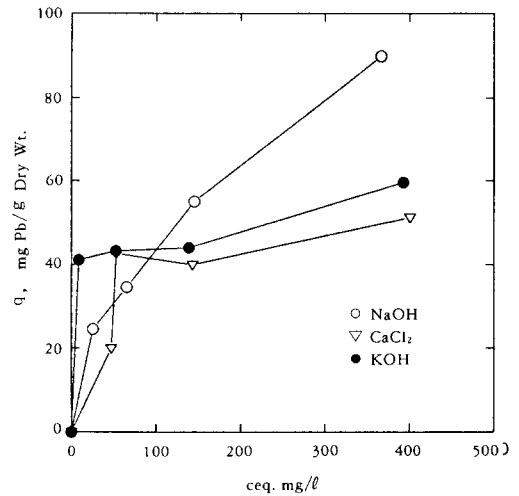


Fig. 3. Effect of CaCl₂, KOH and NaOH pretreatment upon Pb biosorption by *S. cerevisiae*.
Initial Pb concentration : 100 mg/l
Biomass concentration : 1 g/l

평형농도는 0.3mg/l로 흡착량은 19.9mg/g Dry Wt.로 되어 Eric 등(17)의 주장과 일치할 하였다. 그러나 Cu이온은 1g/l의 생체흡착제로 잔류 평형농도가 61.8mg/l으로써 38.2mg Cu/g Dry Wt.의 흡착량을 보였으나 생체흡착제 5g/l에서는 잔류 평형농도가 41.1mg/l, 흡착량은 11.58mg Cu/g Dry Wt.가 되어 Cu이온의 흡착을 위해 충분한 양의 생체흡착제가 투입되었음에도 불구하고 Cu이온의 잔류 평형농도가 41.1mg/l에 이르는 것은 비록 흡착할 수 있는 부위가 남아 있더라도 세포벽과의 정전기적 인력, 흡착 강도, 중금속의 이온 반경, 흡착제 과다로 인한 충돌 등과 같은 여러가지 요인 때문에 미 흡착 부위가 남아 있는 것으로 사료되었다.

CaCl₂, KOH 및 NaOH 전처리에 따른 Pb이온 흡착 Pb이온의 흡착성능을 높이기 위하여 흡착실험 전에 *S. cerevisiae*를 0.1M CaCl₂, 0.1M KOH 및 0.1M NaOH 용액에 각각 넣어 24시간 동안 교반하여 전처리하였다. Fig. 3을 보면 0.1M KOH로 전처리된 *S. cerevisiae*의 흡착량은 전처리하지 않은 경우와 같은 흡착량을 나타내었으나 0.1M CaCl₂로 전처리하면 Pb이온 흡착량은 10mg Pb/g Dry Wt. 감소하였다. 이는 전처리하는 과정에서 Ca이온이 부위에 흡착되었기 때문으로 생각되었다. 그러나 0.1M NaOH로 전처리하였을 때 흡착량은 1.5배 증가

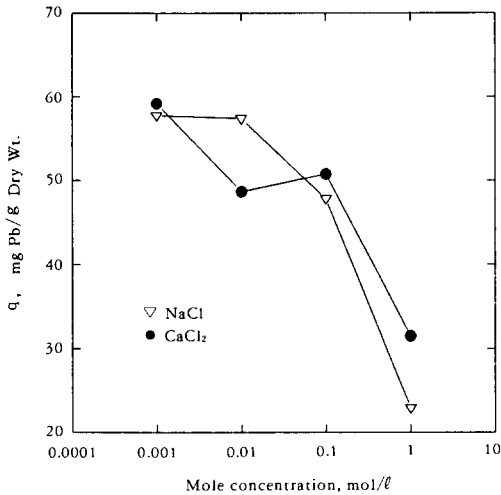


Fig. 4. Effect of CaCl₂ and NaCl on Pb biosorption by *S. cerevisiae*.
Initial Pb concentration : 100 mg/l
Biomass concentration : 1 g/l

(90mg Pb/g Dry Wt.)를 하였는데 Eric 등(18)도 NaOH로 전처리하였을때 OH이온의 영향으로 흡착량이 증가하였다고 보고하였다. Fig. 4는 Ca이온과 Na이온의 존재에 따른 Pb이온의 흡착에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Ca이온과 Na이온의 농도변화는 Pb이온 흡착량에 많은 영향을 미쳤으며, Ca, Na이온의 농도가 증가할수록 Pb이온 흡착량은 감소하였다. 이는 양이온인 Ca, Na이온이 Pb이온과 같이 흡착되어 Pb이온의 흡착량이 감소한 것으로 사료되었다.

생체흡착제의 형태에 따른 Pb이온 흡착

중금속 생체흡착에서 *S. cerevisiae*의 물리적, 생물학적 변화에 따른 흡착성능을 알아보기 위하여 살아있는 *S. cerevisiae*, 121°C에서 30분간 멸균처리된 죽어있는 *S. cerevisiae* 및 멸균된 *S. cerevisiae*를 80°C에서 24시간 건조하여 분쇄기로 분쇄한 건조분쇄된 *S. cerevisiae*를 이용하여 Pb이온 50mg/l에서 500mg/l의 범위에서 생체흡착 실험을 하였다. Fig. 5에서 초기 Pb 이온, 50mg/l에서 100mg/l의 범위에서는 건조분쇄된 *S. cerevisiae*와 살아있는 *S. cerevisiae*의 흡착량은 거의 같이 나타났으나, 멸균된 *S. cerevisiae*는 약 1.5배 정도 흡착량이 많았다. 그러나 초기 Pb이온, 500mg/l에서는 건조분쇄

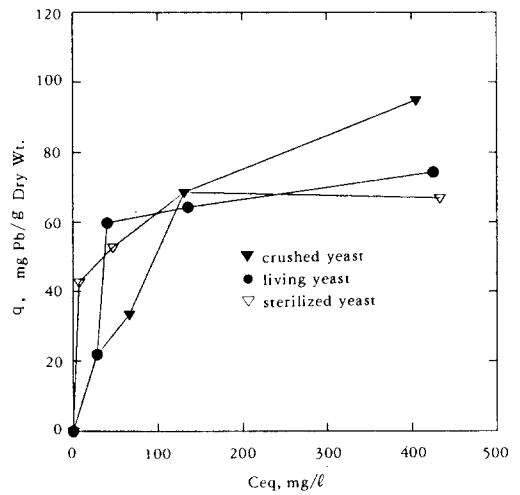


Fig. 5. Biosorption isotherms of living, dry crushed and sterilized *S. cerevisiae*.
Initial Pb concentration : 100 mg/l
Biomass concentration : 1 g/l

된 *S. cerevisiae*이 95mg Pb/g Dry Wt.로 가장 많이 흡착을 하였다. 이는 건조분쇄된 *S. cerevisiae*의 비표면적이 살아있는 *S. cerevisiae*와 멸균된 *S. cerevisiae* 보다 크기 때문으로 사료되었다. 따라서 *S. cerevisiae*에 의한 중금속 흡착 현상은 미생물의 대사활동에 의한 생체축척을 하는 생물학적 영향보다는 세포벽 외부의 음하전에 의한 물리적 흡착에 더 많은 영향을 받는 것으로 보여진다.

흡착등온식

중금속 이온이 흡착평형에 도달하면 흡착제 단위 무게당 흡착량은 잔류 중금속 이온의 평형농도 함수로서 Freundlich 또는 Langmuir 흡착등온식을 따르는 것이 보통이다.

Freundlich 흡착등온식은 실험식으로 다음과 같이 표현된다.

$$q = K \cdot Ceq^{1/n}$$

여기서 q는 흡착제 무게당 흡착된 중금속 이온의 질량(mg/g Dry Wt.), Ceq는 잔류 중금속 이온의 평형농도(mg/l), K와 1/n은 Freundlich 상수로서 흡착제의 특성에 따라 결정되는 매개변수이다.

Langmuir 흡착등온식은 단분자 흡착의 가정하에 얻어진 식으로 다음과 같이 나타낼 수가 있다.

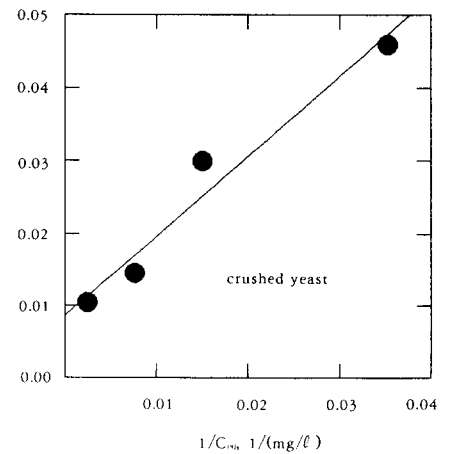
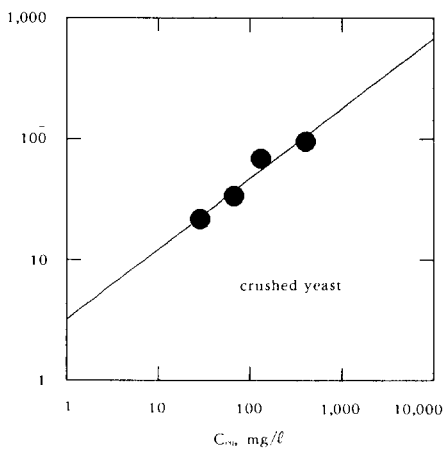
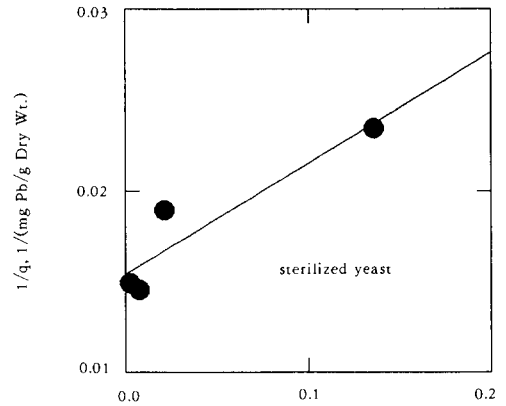
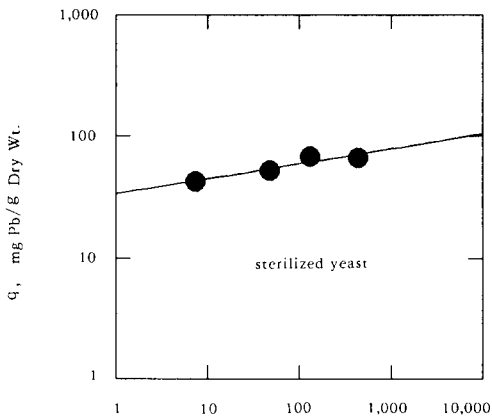
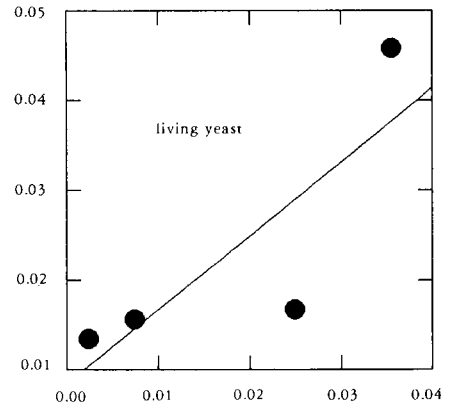
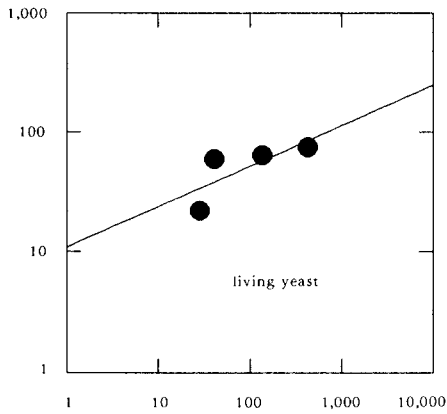


Fig. 6. Freundlich isotherms of biosorption by *S. cerevisiae*.

Fig. 7. Langmuir isotherms of biosorption by *S. cerevisiae*.

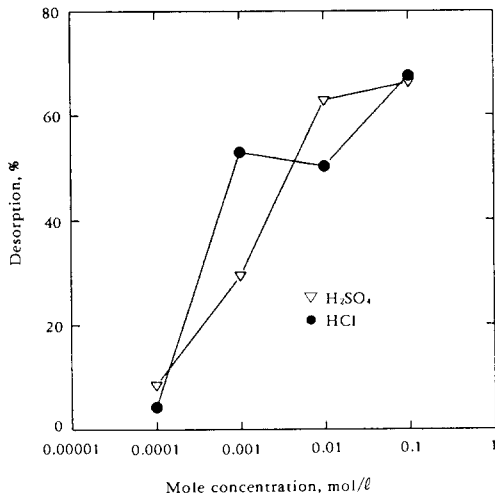


Fig. 8. Desorption of Pb from *S. cerevisiae* by different reagents.

Table 2. Freundlich and Langmuir constants for Pb biosorption by *S. cerevisiae*.

Biosorbents	Freundlich			Langmuir		
	1/n	K	r ²	1/Q	1/(Qb)	r ²
Living yeast	0.339	1.036	0.74	0.008	0.823	0.825
Sterilized yeast	0.123	1.53	0.94	0.015	0.061	0.927
Crushed yeast	0.581	0.506	0.97	0.009	1.096	0.98

r²: correlation coefficient

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{(Qb)} \frac{1}{C_{eq}} + \frac{1}{Q}$$

여기서 Q, b는 Langmuir 상수이다.

살아있는 *S. cerevisiae*, 멸균된 *S. cerevisiae* 및 건조분쇄된 *S. cerevisiae*의 Pb이온 흡착으로부터 Freundlich 및 Langmuir 흡착등온식에 적용하여 구한 상수 값을 Table 2에 나타내었으며, 그 결과를 Fig. 6 및 Fig. 7에 나타내었다. 그림으로부터 Freundlich 흡착등온식과 Langmuir 흡착등온식 둘다 비슷한 직선관계가 얻어졌다.

Freundlich 상수 1/n의 값이 0.1에서 0.5 범위에서는 흡착제의 성능이 좋다고 보고되고 있다(19). 본 실험으로부터 1/n의 값들이 0.12에서 0.58의 범위에 있어 중금속 흡착제로 사용은 가능하나 경제성 문제에 관해서는 더 많은 고찰이 필요한 것으로 사

료되었다.

Pb이온의 탈착

흡착된 중금속의 회수를 위해 HCl과 H₂SO₄를 0.0001M에서 0.1M의 농도 범위에서 탈착 실험하여 Fig. 8에 나타내었다. 그림에서와 같이 산의 농도가 높을수록 탈착율이 좋았으나, 산의 농도가 1 M 이상으로 높아지면 미생물 형태에 변화가 있어 화학적 stress를 주는 것으로 나타났다. 실험을 통해 HCl과 H₂SO₄의 탈착율은 비슷하게 나타났으며 0.1M에서 가장 많은 양이 탈착되었다.

요 약

*S. cerevisiae*를 이용하여 Pb 이온의 흡착 능력을 조사하였다. 살아있는 *S. cerevisiae* 및 멸균된 *S. cerevisiae* 보다 건조분쇄된 *S. cerevisiae*가 Pb 흡착 능력이 가장 좋았다. 동일한 중금속 농도에서 중금속 단위 흡착량은 미생물 농도가 높아짐에 감소하였다. 살아있는 *S. cerevisiae*의 흡착 능력 순서는 Pb > Cu > Cd = Co > Cr > Zn = Ni 순이었다. 중금속 흡착에서 0.1 M NaOH로 24시간 전처리하여 흡착량을 1.5배 증가시킬 수 있었다. 0.1 M HCl 및 0.1 M H₂SO₄로 Pb이온을 효과적으로 탈착시킬 수 있었다. Pb 이온의 흡착평형은 Freundlich 흡착등온식과 Langmuir 흡착등온식으로 설명할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. D. Jenkins and L. L. Russell(1994), *Wat. Environ. Res.*, **66**(6), 805.
2. D. Couillard and G. Mercier(1994), *Wat. Environ. Res.*, **66**(1), 32.
3. M. N. Hughes and R. K. Poole(1989), *Metals and Micro-organisms*, p.10, Chapman and Hall, N.Y.
4. 이영환, 정문호(1993), *금속과 사람*, p. 25, 신광출판사, 서울.
5. N. S. Wei(1980), *Removal of heavy metals from wastewaters*, p.4, B & L Information Services, Toronto.
6. E. H. Thomas and P. D. Drew(1989), *J. of WPCF*, **61**(6), 897.

7. S. Y. Chang, J. C. Huang, and Y. C. Liu (1986), *J. of Environ. Eng.* **112**(1), 94.
8. H. Holger, E. Ralf, and R. D. Wilken(1993), *Wat. Res.*, **27**(2), 237.
9. B. Volesky(1990), *Biosorption of Heavy Metals*, p.20, CRC, Boca Raton.
10. Y. H. Kim, Y. J. Yoo, and H. Y. Lee(1995), *Biotechnol. Lett.*, **17**(3), 345.
11. 안갑환, 서근학(1995), *한국환경과학회지*, **4** (5).
12. M. Beate and S. Gunhild(1993), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **58**, 57.
13. D. Brady and J. R. Duncan(1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 149.
14. L. S. Clesceri, A. E. Greenberg, and R. R. Trussell(1989), *Standard methods*, 17th ed, p3-16, APHA, Washington.
15. N. Kuyucak and B. Volesky(1988), *Biotechnol. Lett.*, **10**(2), 137.
16. L. Pighi, T. Pumpel, and F. Schinner(1989), *Biotechnol. Lett.*, **11**(4), 275.
17. F. Eric, C. Catherine, and J. C. Roux(1994), *FEMS Microbiol.*, **14**, 325.
18. F. Eric and J. C. Roux(1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 399.
19. C. Namasivayam and K. Ranganathan (1995), *Wat. Res.*, **29**(7), 1737.