

수질내 초미립자와 미생물의 동시 검출을 위한 광학센서기술

손옥재**** · 형기우** · 김병섭** · 이종일*****,*****†

Optical sensing techniques for simultaneous detection of nanoparticles and microorganisms in water

Ok-Jae Sohn*****, Gi Woo Hyung**, Byung Seb Kim**, and Jong Il Rhee*****,*****†

Abstract

An optical sensor was developed to detect nanoparticles, turbid materials and microorganisms in water simultaneously. Three different light sources like UV-LED, NIR-LED and laser diode have been employed to develop the optical sensor based on the scattering light and fluorescence light. The sensor system has high selectivity and sensitivity, that it can be used to monitor the quality of drinking water.

Key Words : Optical sensor, nanoparticles, microorganism, LED, laser diode

1. 서 론

오늘날 심각한 환경오염으로 인해 수질이나 대기 오염원에 대한 측정과 적절한 제거 노력이 요구된다. 특히, 인간과 모든 생명체에 매우 중요한 물의 오염정도를 측정하고 수질을 개선하는 것이 무엇보다 중요하다. 각종 수질의 오염 여부를 판단하기 위해서는 수질환경의 생물학적 특성, 부유물 내의 미량원소와 같은 화학적 특성 그리고 물의 색깔, 냄새, 및 탁도등의 물리적 특성이 조사되어야 한다.^[1-3] 특히, 탁도는 물의 흐린 정도를 정량적으로 나타낸 지표로서 수질 내 부유하는 입자들의 빛에 의한 산란과 흡수정도를 표현한 것이다.^[4,5] 나노입자, 콜로이드성 입자 또는 굵은 분산 물질등 각종 부유물질에 의해 발생하는 탁도는 부유 입자의 크기에 따라 다르다. 수중 침전물 또는 부유물질을 이루는 미립자는 정수장, 수원지나 호수와 같은 환경에 영향을 주는 주

요 오염원이며 정수장내 수도 공급관 내부로 흘러들어 갈 경우 파이프 내부를 침식시키거나 내부에 퇴적되는 등의 문제를 유발한다.^[6,7]

한편, 금속 파이프로 이루어진 수도관의 표면이 부식할 경우 금속 미립자가 생성되어 파이프 내부의 부식과 동시에 침식을 유발하여 파이프를 손상시킨다. 또한, 파이프 안의 미립자는 파이프 내부 표면에 스케일을 형성하여 파이프 내부의 유체의 흐름을 방해한다. 그리고 64 μm 이하의 미립자는 직접적으로 생물학적 활성(biological activity)에 손상을 입히거나 유해한 화학제의 전달수단이 되기도 한다.^[8,9] 그러나 크기가 수십 나노미터인 나노입자는 수질 내에 분산되어 있을 경우 콜로이드성 물질이나 분산 물질에 비해 수질의 오염정도를 쉽게 판단하기 어렵다. 따라서, 중금속등의 금속원소로 이루어진 나노입자를 비롯하여 각종 유기물질, 바이러스, 조류 및 곰팡이 등 미생물이 정수장내 수질 관리에 매우 중요한 모니터링 대상물이다. 즉, 유기물질이 정수장 또는 수도관 내로 유입되어 미생물의 개체수가 증가하면 수질의 생물학적 오염을 일으킬 수 있으며 음용수 관리에는 중요한 문제를 야기할 수 있다.

한편, 수용액 중 미생물의 농도를 모니터링하기 위해 van Benthem 등은 LED(light emitting diode)기반의 탁도 센서를 개발하였으나, 미생물을 선택적으로 검출하지 못하고 미생물에 의한 용액의 탁도변화만을 측

*전남대학교 물질생물화학공학과(Department of Material and Biochemical Engineering, Chonnam National University)

**동양하이텍산업(주)(Dong-Yang HiTech Co.)

***전남대학교 응용화학공학과(School of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University)

****전남대학교 바이오광기반기술개발사업단(Research Center for Biophotonics, Chonnam National University)

*****전남대학교 촉매연구소(Research Institute for Catalysis, Chonnam National University)

†Corresponding author: jirhee@chonnam.ac.kr

(Received : January 21, 2008, Accepted : February 1, 2008)

정하였다.^[6] 또한, 기존의 미생물 농도 모니터링 시스템은 기준 측정(reference measurement)을 필요로 하고 미생물의 농도가 낮을 경우에는 매우 낮은 검출신호를 보임으로써 상수도에 존재하는 미생물의 검출에 있어서는 제한적이며, PCR 또는 ELISA법 등을 이용한 미생물 검출기법들이 개발되어져오고 있지만 이들 방법은 현장적용성이 낮은 단점을 지니고 있다.^[10,11]

수질을 평가하기 위해 많은 탁도 측정방법들이 개발되고 있는데 대개의 탁도 측정 기술은 90도 산란광 측정방식(nephelometric)이며, 텅스텐 필라멘트 램프 또는 적외선 LED를 광원으로 사용하거나 또는 다수의 광학검출기로 구성되어 있다. 그러나 텅스텐램프의 경우 360 nm~850 nm의 광대역의 파장의 빛을 발산하지만 램프의 수명이 2000시간 정도로 매우 짧다. 최근, LED는 저렴하고 소형이므로 각종 광학장치/기기등에 많이 사용되고 있다. 따라서 적절한 파장의 빛을 방출하는 LED를 선택하여 미립자를 측정하는 광학 센서를 개발할 수 있으나 적외선 LED와 같이 낮은 에너지의 빛으로는 미립자의 검출이 용이하지 않다. 그러므로 본 연구에서는 수질 내 미립자 및 미생물을 검출 할 수 있는 광학 센서를 개발하기 위해 UV(ultra-violet)-LED, NIR(near infra-red)-LED 및 레이저다이오드를 이용한 나노입자등 초미립자와 미생물을 동시에 검출하는 광학센서를 개발하였다.

2. 실험 방법

2.1. 시약 및 재료

미국, 유럽등에서 수질내 탁도를 측정하기위해 사용하는 표준 포르마진용액(4000 NTU, HACH Co., USA)을 구입하여 사용하였으며, 직경 10-20 nm의 분포를 가지는 철(Fe_3O_4) 나노입자는 실험실에서 합성하였다.^[12,13] 형광 검출 실험을 위해 사용하는 β -nicotinamide adenine dinucleotide(NADH)는 시그마 회사로부터 구입하였다. 그리고 미생물 검출 실험을 위해 수질 미생물, *Escherichia coli* 와 *Bacillus subtilis*을 배양하여 사용하였으며, 그 외 모든 시약은 분석등급을 사용하였다.

2.2. 광학검출 방법

수질내의 초미립자와 미생물을 검출하기위해 개발하고자 하는 광학센서는 미립자의 검출을 위해 산란광 측정방식을 채택하였다. 즉, 광원으로부터 전달되어진 입사광(340 nm, 830 nm, 860 nm)을 주사하여 용액 중의 입자에서 산란되는 산란광을 90° 각도에서 측정하도록

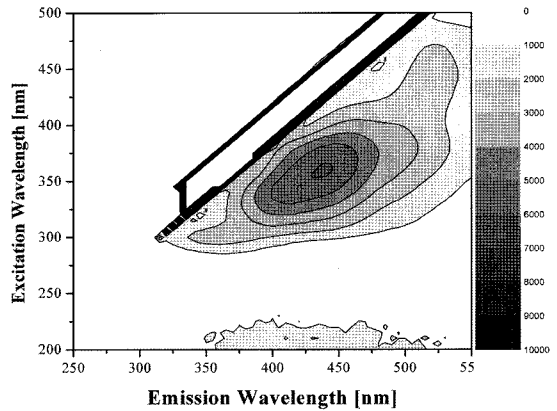


그림 1. NAD(P)H의 2차원 형광스펙트럼
Fig. 1. 2D-fluorescence spectrum of NAD(P)H.

하였다. 그리고 미생물은 대사과정에서 NAD(P)H를 생산하거나 소비하는데, NAD(P)H는 340 nm의 빛에 의해 여기되어 440 nm에서 형광을 방출하는 특성을 지니고 있다(그림 1). 따라서 미생물의 검출을 위해 340 nm의 빛이 조사되어 미생물 내부 또는 외부로 방출한 NAD(P)H에 전달될 때 450 nm에서 방출되는 형광을 측정하는 방법을 적용하였다.

2.3. 광학센서 시스템

개발하고자 하는 광학센서의 광원으로 미생물 검출을 위해 UV-LED(340 nm, S8D28, SEOUL OPTO DEVICE Co., Korea)와 나노입자 검출을 위해 레이저

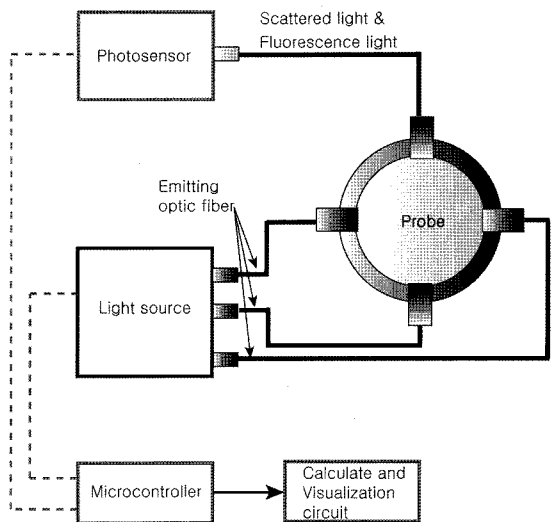


그림 2. 광학센서의 개략도
Fig. 2. Basic block diagram of an optical sensor.

다이오드(830 nm, L8414-41, Hamamatsu Co., Japan)를 사용하였다. 또한, 통상적인 탁도의 검출을 위해 근적외선 LED(860 nm, W13311-H, Won Semiconductor Co., Korea)를 사용하였는데 광원으로부터의 빛을 센서 프로브 말단의 시료에 전달하기 위해 직경 2 mm의 플라스틱 광섬유(SH-8001, Mitsubishi Co., Japan)를 사용하였다. 광 검출기로는 광증배관(PMT, H5783, Hamamatsu Co., Japan)을 사용하였으며 그림 2는 광학 센서 시스템의 실험 구성도를 보여주고 있다. 광원으로부터 조사되어진 빛은 광섬유를 통하여 프로브 말단부의 시료접촉면에 입사되고, 수질 내 초미립자등에 의해 산란된 빛과 미생물에 의해 발생되어진 형광은 다시 광섬유에 의해 광증배관으로 전달되도록 하였다. 광증배관에서는 전달된 산란광 및 형광을 증폭하여 전압으로 표시하도록 하였다.

3. 결과 및 고찰

수질 내에 존재하는 나노입자와 같은 초미립자, 마이크로 입자 및 미생물의 검출을 위해 UV-LED, NIR-LED, 레이저다이오드와 같은 광원을 사용하여 광학센서 시스템을 구성하였다. 우선, 초미립자의 검출을 위해 10~20 nm의 입자크기 분포를 가지는 철 나노입자를 제조하여 검출실험을 수행하였다. 제조된 철 나노입자를 0.45 μm 의 공극을 가진 셀룰로오스 필터를 사용하여 여과한 증류수에 희석하여 시료로 사용하였다. 그림 3은 0에서 0.5 ppm까지 입자의 농도를 달리하여 레이저다이오드에 의한 산란광으로 측정된 결과이다. 그림에서 보이는바와 같이 레이저 광원을 이용하여 초미립자를 검출할 경우 0.05 ppm 이하의 매우 낮은 농도

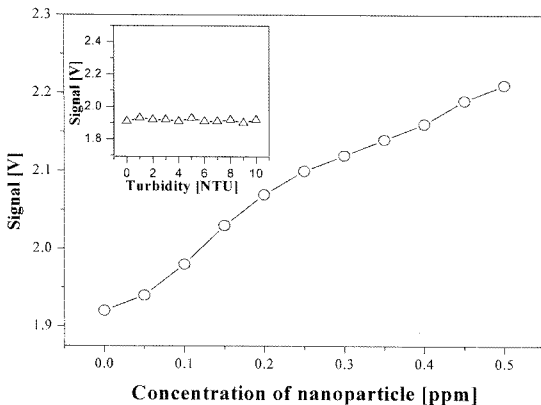


그림 3. Fe₃O₄ 나노입자의 검출성능
Fig. 3. Performance curve for the detection of nanoparticles.

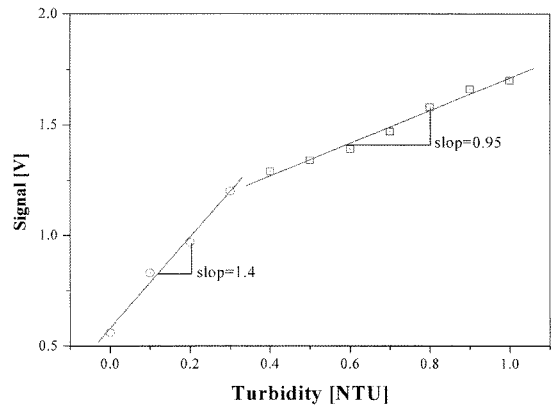


그림 4. 근적외선 LED에 의한 탁도검출 성능
Fig. 4. Performance test for the detection of turbid materials based on NIR-LED.

에서도 검출되며 0-0.5 ppm의 범위에서도 좋은 선형성을 가지는 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 포르마진 표준용액을 3차 증류수에 희석시킨 후 레이저 광원에 의해 탁도를 측정하였다. 즉, 포르마진 용액을 0에서 10 NTU의 농도로 변화시켜 탁도를 측정하였으나 그림 3의 안쪽 그림에서 보인바와 같이 산란광의 신호 변화가 없었다. 즉, 레이저 광원을 사용하여 나노입자를 측정할 때 수질내 탁도가 0에서 10 NTU 범위일 때는 나노입자 검출에 영향을 끼치지 않음을 알 수 있다.

따라서 나노 입자보다 큰 입자와 수질의 혼탁한 정도를 나타내는 탁도를 측정하기 위해 본 연구에서는 860 nm의 파장대역을 가지는 근적외선 LED를 사용하였다. 포르마진 표준용액의 농도를 0에서 1.0 NTU로 변화시켰을 때 탁도를 측정된 결과 그림 4와 같이 낮은 농도에서도 신호 변화를 측정할 수 있었다. 특히, 포르마진의 농도를 0-0.3 NTU와 0.3-1.0 NTU로 구분하여 선형성을 조사하였을 때 99% 이상의 선형도를 보였으나 0.3 NTU 이상에서는 검출 감도가 낮아졌다. 이것은 포르마진의 농도가 증가함에 따라 용액 중 탁도가 높아져 광원으로부터 조사되어진 입사광이 현탁 물질에 부딪쳐 산란된 후 다시 광검출기로 도달하는 과정에서 현탁 물질에 의해 방해를 받아 검출 감도가 낮아지는 것으로 생각된다.

한편, 수질 내 미생물을 검출하기 위해 우선 미생물의 대사과정에서 생산되는 NADH를 본 연구에서 개발되어진 광학센서 시스템을 이용하여 검출실험을 수행하였다. 또한, NADH 검출 성능을 상업용 형광분광광도계(F-4500, Hitachi Co., Japan)를 사용하여 비교하였다. 그림 5에서 용액 중 NADH의 농도가 0에서 0.5 mM로 높아짐에 따라 형광 방출량도 함께 증가하였

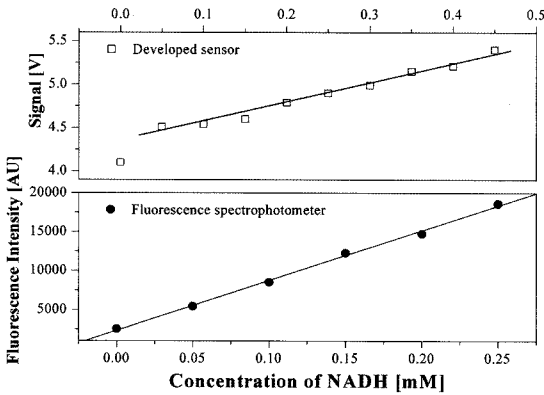


그림 5. 광학센서와 형광분광계에 의한 NADH 검출
Fig. 5. Detection of NADH by a developed sensor and commercial fluorescence spectrophotometer.

며 검출 신호의 차이는 약 2 V로 매우 높은 감도를 보였다. 그러나 선형성에서는 형광분광광도계에 의해 측정된 결과와 비교하여 낮은 선형성을 나타냈다. 수질내 실제 미생물 검출 실험을 위해 *E.coli* 와 *Bacillus subtilis*를 진탕 배양기를 이용하여 24시간 동안 배양하여 미생물을 획득한 후 3차 증류수에 미생물을 적절히 희석하여 미생물 검출실험에 사용하였다. 그림 6에는 *E.coli* 와 *Bacillus subtilis*를 $0\sim 2.5 \times 10^3$ 개/mL로 개체수를 달리하여 광학 센서 시스템에 의한 검출실험을 하였으며, 그림에서 미생물 개체수가 증가함에 따라 센서에 감지되는 신호도 함께 선형적으로 증가하였다. 미생물 검출에 있어서 *E.coli*의 경우보다 *Bacillus subtilis*의 경우가 높은 감도를 나타내었는데 이는 *Bacillus subtilis*가 많은 양의 NADH 또는 NADPH를 생산하였기 때문인 것으로 보인다.

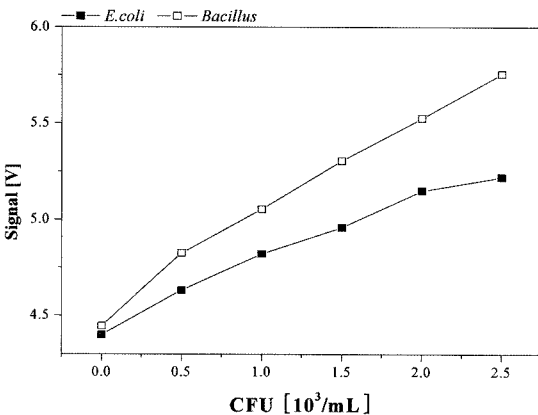


그림 6. 수질 내 미생물 검출
Fig. 6. Detection of microorganisms in the water.

4. 결 론

본 연구에서는 수질 내 초미립자, 탁도 및 미생물의 동시검출을 위해 UV-LED, NIR-LED 및 레이저 다이오드 기반의 광학센서 시스템을 제작하였다. 초미립자 및 수질의 혼탁정도를 측정하기 위해 산란광을 일으키는 NIR-LED와 레이저 다이오드를 채택하여 높은 선택성을 가진 고감도의 탁도용 광학센서를 개발하였다. 수질내 존재할 수 있는 살아있는 미생물의 검출을 위해 UV-LED를 이용한 형광 센서 시스템을 구성하여 미생물 검출을 가능하게 하였다. 즉, 본 연구에서 개발된 광학센서는 0.5 ppm 이하의 낮은 초미립자 농도에서도 높은 감도를 보였으며, 1 NTU 이하 범위의 포르마진 용액에서 좋은 검출성능을 나타내어 상수도용 탁도 센서로의 적용 가능성을 보였다. 또한, 수질내 초미립자(철 나노입자), 포르마진 용액 뿐만아니라 대장균 및 바실러스 등의 미생물을 동시에 검출할 수 있음을 보였다.

감사의 글

본 연구는 환경부 환경 기술개발 사업(2007-0580)과 Post-BK21 사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- [1] F.D. Wilde and J. Gibs, "Turbidity", *U.S. Geological Survey TWRI Book 9*, no. 4., chapter 6, 7, 1998.
- [2] J.M. Dela Cruz, I. Pastirk, V.V. Lozovoy, L.A. Walowicz, and M. Dantus, "Multiphoton Interference 3: Probing microscopic chemical environments", *J. Phys. Chem. A*, vol. 108, pp. 53-58, 2004.
- [3] R.C. van Benthem, D. van D. Assem, and J. Krooneman, "Compact optical sensor for real-time monitoring of bacterial growth for space applications", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 974, pp. 541-555, 2002.
- [4] L. Lewis, "Turbidity-controlled suspended sediment sampling for runoff-event load estimation", *Water Resources Research*, vol. 32, no. 7, pp. 2299-2310, 1996.
- [5] L. Lewis, "Estimation of suspended sediment flux in streams using continuous turbidity and flow data coupled with laboratory concentrations", *Turbidity and other sediment surrogates workshop*, Reno, Nevada, 2002.
- [6] J.R. Gray, G.D. Glysson, L.M. Turcios, G.E.

- Schwarz, "Comparability of suspended-sediment concentration and total suspended solids data", *Water Resources Investigation Report 00-4191*, Reston, Virginia, 2000.
- [7] J.R. Gray, "The need for surrogate technologies to monitor fluvial-sediment transport", *Proc. Turbidity and other Sediment Surrogates Workshop*, Reno, Nevada, 2002.
- [8] R.E. Faye, W.P. Carey, J.K. Stamer, R.L. Kleckner, "Erosion, sediment discharge, and channel morphology in the upper Chattahoochee river basin, Georgia", *Geological Survey Professional Paper 1107*, U.S. Govt. Printing Office, Washington, D.C., 1980.
- [9] R.B. Grayson, B.L. Finlayson, C.J. Gippel, and B.T. Hart, "The potential of field turbidity measurement for the computation of total phosphorous and suspended solids loads", *J. Environmental Management*, vol. 47, pp. 257-267, 1996.
- [10] A.D. Van Den, "Development of a biomass sensor. Dual ratio versus transmission trade-off", NLR-TR-99444, 1999.
- [11] S.H. Yeom, C.S. Park, D.E. Kim, K.J. Kim, B.H. Kang, and S.W. Kang, "Fiber-optic fluoroimmunosensor for foodborn pathogens using an optical evanescent field", *J. Korean Sensors Society*, vol. 16, pp. 441-448, 2007.
- [12] M.H. Liao and D.H. Chen, "Characteristics of magneticnanoparticles-bound YADH in water/AOT/isooctane microemulsions", *J. Molecular Catalysis*, vol. 18, pp. 81-87, 2002.
- [13] M.H. Liao and D.H. Chen, "Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability", *Biotechnology Letters*, vol. 23, pp. 1723-1727, 2001.



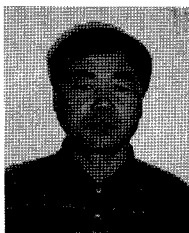
손 옥 재

- 1976년 4월 12일생
- 2002년 전남대학교 생물화학공학과 졸업 (공학사)
- 2004년 전남대학교 물질생물화학공학과 졸업(공학석사)
- 현 전남대학교 물질생물화학공학과 박사과정



형 기 우

- 1955년 9월 21일생
- 1981년 전남대학교 화학공학과 졸업 (공학사)
- 1998년 전남대학교 물질화학공학과 졸업 (공학석사)
- 2006년 전남대학교 물질생물화학공학과 졸업(공학박사)
- 현 동양하이텍산업(주) 대표이사 및 조선이공대학교 겸임교수



김 병 섭

- 1962년 1월 7일생
- 1988년 전남대학교 화학공학과 졸업 (공학사)
- 2003년 전남대학교 산업공학과 생물공학 전공(공학석사)
- 현 동양하이텍산업(주) 책임연구원



이 종 일

- 1959년 9월 15일생
- 1983년 전남대학교 화학공학과 졸업 (공학사)
- 1985년 한국과학기술원 화학공학과 졸업 (공학석사)
- 1996년 독일, University of Hannover 화학과 졸업(이학박사)
- 현 전남대학교 응용화학공학부 부교수