

활성 탈질미생물 Bio-bead의 특성

박경주, 조경숙¹, 이민규¹, 이병현², 김중균

부경대학교 식품생명공학부 생물공학전공, ¹화학공학부 화학공학 전공,

²환경시스템 공학부 환경공학 전공

전화 (051) 620-6186, FAX (051) 620-6180 (김중균)

Abstract

The characteristics of bio-beads made of various supports, in which denitrifying bacteria were entrapped after those cells were isolated from sludge in wastewater treatment plants, were studied in order to develop a novel BNR system. Four species were isolated, and the bead made of 12% PVA showed the highest denitrification rate. The best concentration of cell loading was 200 mg/ml, and there was no significant difference in performance by bead sizes. The bead reached the maximum denitrification rate after 4 batch experiments, and with cell leaking of 10^3 CFU/ml its capacity retained until 25 batches.

Introduction

우리나라 오폐수 처리공정에 있어서 질소, 인 등의 영양소 제거를 위한 미생물을 고정화시킨 bio-bead를 이용한 새로운 BNR 시스템 개발의 필요성이 대두되고 있다¹⁾. 이는 질산, 탈질 그리고 인 제거에 중추적으로 관여하는 미생물을 순수 분리하여 특정적으로 bead속에 많이 고정화시킨 다음 오폐수 처리반응 동안 계속적으로 우점화 시킴으로써, 영양소 제거를 위한 최대 효율을 나타낼 수 있는 새로운 BNR 시스템을 개발하고자 함이다. 외국의 경우를 살펴보면, 하수처리장의 유기물 및 영양소 제거를 위한 고도공법이 1960년대부터 남아프리카공화국 및 유럽을 중심으로 지속적으로 개발되어 왔으며, 반응조 내의 미생물농도를 증대시키고 반응시간을 단축시키기 위한 방안으로서 미생물의 고정화 기법도 활발히 진행중이다^{2),3)}. 최근에는 활성효소를 고정화시키는 기법도 시도되고 있으나, 아직은 뚜렷한 성과가 없으며, 최근 국내에서도 오폐수 처리를 위하여 많은 연구가 진행되고 있으나, 영양염류의 제거를 위한 미생물의 확보가 용이하지 않는 실정에 있다. 따라서, 본 연구에서는 활성 고정화 bead를 이용한 새로운 BNR 공정시스템을 개발하고자 하며, 국내 오폐수처리장에 실제적으로 적용할 수 있는 개발에 성공한다면, 그 수요는 엄청날 것으로 보며, 국내 환경 산업화도 충분히 가능하리라 판단된다.

재료 및 방법

활성 비-드 고정화 방법

포괄고정화 방법을 이용하여 균을 고정화시켰으며, 담체로는 k-carrageenan, agar, alginate, polyvinyl alcohol 등을 이용하였다. 미생물을 고정화 담체용 액과 혼합할 때, 그 양들을 달리하여 bead의 강도 및 bead내의 내부 구조, 미생물 충전량을 달리하였다. Syringe pump에 의한 적하시, 적하 속도 및 syringe의 needle크기에 따라 bead의 크기 및 pore size 등을 달리 하였고, carrageenan, alginate 및 agar는 2% CaCl₂ 용액에 PVA는 saturated boric acid + 1% CaCl₂ 용액에 적하시키고, 완전한 crosslinking을 위하여 생성된 bead는 carrageenan 및 agar 경우 2% KCl용액에 PVA 경우는 0.5M phosphate solution 용액에 방치하였다.

담체 선정 방법

고정화 담체 선정은 기존에 알려진 담체 중에서 비-드 강도, 내구성, 가격 등을 통해 질산, 탈질 및 인 제거에 뛰어난 미생물의 고정화에 알맞는 담체를 선택하였다. 고정화할 균주는 탈질반응을 잘 일으키는 heterotrophs를 순수분리하여 사용하였다. 이때, bead 내부에서 발생한 가스로 인한 비-드의 수면위 상승을 막기 위하여 비-드 내부의 공간을 확보할 수 있게 1% sodium alginate를 첨가하여 사용하였다. Bead 내부의 구조는 bead를 잘라 SEM사진으로 내부 구조의 모습을 촬영하였다.

담체 특성실험

살균된 100ml 실린지에 미생물을 고정화한 bead를 20%로 채우고 영양배지 (1L당: Glucose, 2g; (NH₄)₂SO₄, 1.25g; Yeast extract, 1g; KNO₃, 2g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.2g; CaCl₂ · 2H₂O, 0.07g; FeSO₄ · 7H₂O, 0.01g; EDTA, 0.02g; KH₂PO₄, 0.6g; K₂HPO₄, 0.9g; Trace element, 1ml)를 20ml 부피만큼 채운 뒤 항온(30°C) shaker(100 rpm)속에 넣고 배양하였다. 이때, 사용될 bead는 NH₄Cl, NaHCO₃, Na₂HPO₄ 배지에서 미리 adaptation을 시킨 후 사용하였고, 반응 후 NO₂⁻와 NO₃⁻는 IC로 분석하여 질산, 탈질 반응의 정도를 분석하였고, 발생된 N₂ gas는 GC로 분석하였다.

결과 및 고찰

균고정화 기술 확보를 위한 비-드 제조과정에서 carrageenan, alginate, agar는 2%, PVA의 경우 12% 이상의 농도에서는 점도가 너무 높아 비-드를 형성하기가 어려웠고, PVA를 제외한 담체인 경우 비-드를 만드는 전과정에서 섭씨 50도 이상에서 유지되지 않으면 gel화가 일어났다. Pumping line을 따라 균일한 비-드가 형성되었고, 생성된 비-드는 각 용액속에서 방치할수록 비-드의 강도가 높아졌으나 1시간을 넘기지 않아야 균의 활성이 거의 손상되지 않았다. Bead가 가져야 할 조건 등을 고려해 비-드 강도

면에서 alginate 등에 뒤지지 않는 PVA를 담체로 선정하였다.

Syringe technique을 이용하여 NO_3^- 에서 N_2 gas로 변환시키는 4종의 탈질균을 순수분리 하였는데, colony color, size 및 type, cell type 및 size, Gram 반응, chain 형성여부, 운동성을 측정한 결과 그 특징이 다름을 알 수 있었다. 발생한 가스를 GC로 분석한 결과 4균주 모두 N_2O 를 생성하지 않는 것으로 나타났다. 순수 분리된 탈질미생물을 다른 농도로 bead내에 충전하여 탈질 실험을 한 결과 200 mg/ml에서 최대 탈질율을 얻을 수 있었다. 비드의 정상상태는 비드 제조 후 4-5 batch 이후에 이르는 것으로 보이며, 이 실험을 batch 형태로 계속적으로 실시하여 바이오 비드의 내구성을 관찰할 수 있었으며, 25-26 batch 반응 후에 bead의 활성이 떨어짐을 알 수 있었다. 이때, bead 내부에서 leaking되는 정도는 10^3 CFU/ml 이었고, batch 반응이 진행될수록 구형 bead의 형태가 변하면서 leaking 되는 cell 수가 조금씩 증가되었다.

요 약

질소, 인 등의 영양소 제거를 위한 고정화 미생물을 이용한 새로운 BNR 시스템 개발을 위해 탈질능력이 뛰어난 균주를 순수분리하고 여러 담체를 사용하여 제조된 활성 bio-bead의 특성을 알아보았다. 4종류의 탈질 능력이 뛰어난 균주를 순수분리 하였고, 12% PVA 담체로 만든 bead가 가장 좋은 탈질능력을 보였다. Cell loading 농도는 200 mg/ml일 때 bead의 활성이 최적을 나타내었으며, bead의 size에 의한 탈질효율에는 유의적 차이가 없었다. 제조된 bead는 약 4 batch 실험 후 최대 탈질율을 나타내었으며, 약 25번의 batch 실험까지는 탈질능력을 그대로 유지하고 cell leaking 양도 약 10^3 CFU/ml 정도 였으나, 그 이후로는 bead 형태도 변하면서 cell leaking이 증가하고 탈질능력도 감소되었다.

사 사

이 연구는 한국과학재단 지정 부산대학교 환경기술산업연구센터를 통한 연구비(No. R12-1996-009203-0)로 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Choi, E., Rhu, D., Yun, Z. and Lee, E. Temperature effects on biological nutrient removal system with weak municipal wastewater. (1998) *Water Science and Technology*, 37(9), 219-226.
2. Tam, N.F.Y. and Wong, Y.S., Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. (2000) *Environmental Pollution*, 107(1), 145-151.
3. Zhou, G.-M. and Fang, H.H.P., Anoxic treatment of low-strength wastewater by immobilized sludge. (1997) *Water Science & Technology*, 36(12), 135-141.

분리 균주 특성

특성	MK1	MK2	KJ1	KJ2
Colony	Ivory, Small, circle	Ivory, Medium, circle	yellowish, Small, circle	Transparent, small, circle
Cell	Rod, L: 0.4-0.7 W: 0.12	Rod, L: 0.4-0.7 W: 0.1	Coccus, D: 0.1	Short rod, L: 0.3-0.4 W: 0.1
Gram	-	-	-	-
Chain	several	1-2	-	-
Motility	++++	+++	+	+++

Cell loading에 의한 영향

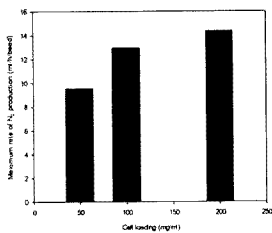


Fig. The effect of cell loading on the maximum rate of N_2 production. MK2 was used.

Bead size에 따른 gas production

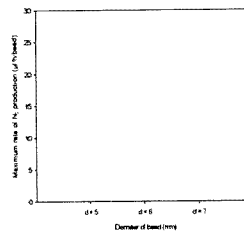


Fig. Effect of bead diameter on the rate of N_2 production. Error bars: standard deviation.

Cell leaking during repeated operation

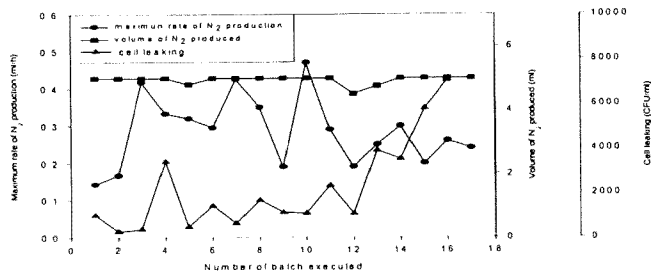


Fig. Changes of maximum rate of N_2 production and cell leaking during repeated batchwise operation of immobilized KJ2.