

## Decolorization of methyl red by selected bacteria in industrial waste sludge

Dae-Woo Yim, Kang-Min Lee

Department of Molecular Biology, Lab, Enzyme Technology, Chonbuk National University  
Jeonju 561-756, Korea.

TEL: +82-63-270-3342, FAX: +82-63-270-3345

### Abstract

Azo dyes are aromatic compounds characterized by one or more azo bonds ( $R_1-N=N-R_2$ ). More than 800,000 tons of dyes are produced annually worldwide, of which 60-70% are azo dyes. During manufacturing, an estimated 10-15% is released into the environment. Aside from their negative aesthetic effects, certain azo dyes have been shown to be toxic and, in some cases, these compounds are carcinogenic and mutagenic. To establish biological wastewater treatment of azo dye, it is essential to discover azo dye-degrading microorganisms. In this report, sludge-contaminated with dyes were gathered through wastewater outlets from the industrial regions. The following to separation of bacteria within them, bacteria which decolorize methyl red, a azo dye, were selected and destined.

### 서 론

물 오염 컨트롤은 현재 주된 과학활동 영역의 하나이다. 비록 색깔 있는 유기 화합물의 적은 양이 폐수에 유입되지만 폐수의 색깔은 매우 탁하게 된다. 섬유 공장과 염료 공장에서의 화학 물질이 하천으로의 방출과 폐수 관리 시스템은 건강과 관련된 많은 걱정을 유발을 시키고 있다. 최근 많은 관련 논문의 발표에서 알 수 있듯이 특히, 탈색 과정은 요즘 주된 관심거리가 되어가고 있다. 지난 20년 동안 몇몇의 탈색 기술 관련 논문이 발표되었지만 높은 비용, 낮은 효율성, 광범위한 적용성의 부재 등의 이유로 이들 회사들에 의해 받아들여진 것들이 그리 많지 않다.

화학적이거나 물리, 화학적 처리들은 일반적으로 고비용, 저 효율적이며 적용의 많은 한계를 갖는다. 실행 가능한 대안으로서, 생물학적인 처리는 고효율, 낮은

슬러지의 발생, 환경 친화적 측면 등에서 주목을 받고 있다. 그러므로, 염료를 담고 있는 폐수 처리에서 실용적인 생물학적 처리 공정의 개발이 절실히 필요하다.

이와 같이 염료를 탈색하는 미생물의 능력은 많은 주목을 받고 있다. 미생물적 탈색과 염료의 분해는 환경에서 이들 오염 물질을 제거하는 비용 효율이 높은 방법으로써 나타나고 있다. 최근의 중요한 기본적인 연구들은 광범위한 염료에 대하여 탈색 기능을 가지고 있는 많은 미생물이 존재함을 나타내고 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 염료분해 박테리아의 분리.

염료로 오염된 sludge를 산업지역의 오염된 물로부터 모은다. Sludge의 약 1g을 멸균된 sodium chloride solution 0.85%(w/v)의 10ml 안에 떨어뜨리고, 충분히 혼합시킨다. 이 혼합물을 0.85% 멸균된 sodium chloride solution으로 여러 차례 희석한다.  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  로 희석된 0.1ml의 Aliquots를 염료 100mg/l를 함유하는 agar의 15g/l와  $K_2HPO_4$ 의 1,360g/l,  $MgSO_4$ 의 0.100g/l  $SO_4(NH_4)_2$ 의 0.600g/l,  $CaCl_2$ 의 0.020g/l  $NaCl$ 의 0.580,  $MnSO_4$ 의 1.1mg/l  $ZnSO_4$ 의 0.2mg/l,  $CuSO_4$ 의 0.2mg/l,  $FeSO_4$ 의 0.14mg/l를 (배양 용액의 PH는 1M의 HCl을 가지고서 7에 맞춘다.) 함유하는 minimum medium(MM)plates에 펼친다. 모든 plates를 3일 동안 37°C에서 배양한다. 탈색된 지역에 의해서 둘러싸인 colonies를 채집하고, 염료 100mg/l를 포함하는 MM plates에 계속한다. Plates는 염료 탈색을 위한 그룹의 능력을 확실히 하기 위해서 똑같은 상황에서 배양한다.

### 2. 액체배지에서 선택된 박테리아에 의한 methyl red 의 탈색.

높은 MR 탈색 능력을 가진 bacterial isolate를 선택한다. 이 bacteria의 조기 배양은 18시간 동안 100rpm의 rotary shaker, 37°C에서 glucose 1%을 함유한 MM의 10 ml에서 단일 colony 성장에 의해서 준비한다. 조기 배양액 1ml은 glucose1%와 MR 100mg/l을 가진 MM 100ml에 접종한다. 이 배양은 동일 컨디션에서 24시간 동안 배양한다. 배양 후에 이 배양액의 10ml을 추출했고 cells은 Sigma 3K15 refrigerated centrifuge에서 15분 동안 15000 x g로 원심분리해서 pellet을 얻는다. Culture supernatant의 흡광도는 430nm에서 Jenway 6405 UV/Visible spectrometer에 의해서 결정한다.

## 결과 및 고찰

실험 결과 오염된 생산물로부터 선별된 7개의 strain, *aspergillus fumigatus*, *enterobacter agglomerans*, *klebsiella pneumonea*, *yersinia enterocolitica 138 A14*, *conioscypha sp*, *pseudomonas putida*, *staphylococcus sp* 중에서 *yersinia enterocolitica 138 A14*가 95.8%로 가장 좋은 분해율을 나타내었다. 그리고 *enterobacter agglomerans*는 85.2%, *klebsiella pneumonea*는 82.4%의 분해율을 보였다. 또한 glucose가 제외된 상태에서 *yersinia enterocolitica 138 A14*의 세포 성장은 약 25% 정도에 미치지 않았으며, 농도에 따른 분해율을 보면 72시간째 되었을 때 200mg/L에서 90.1%의 분해율을 보였다.

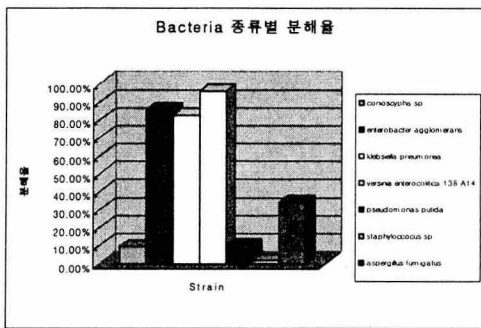


Figure 1. Cell growth of *yersinia enterocolitica 138 A14* in glucose-excluded condition.

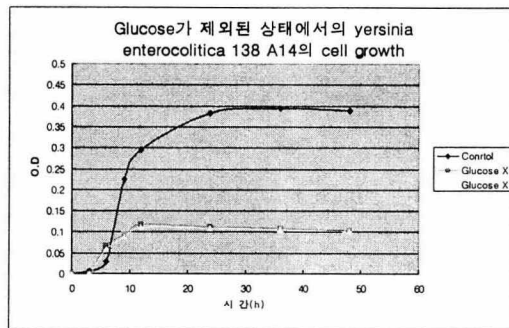


Figure 2. Degradation rate by the kind of bacteria.

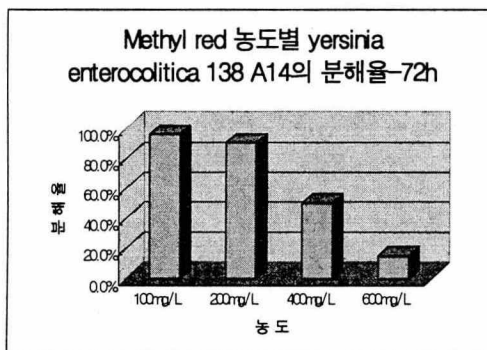


Figure 3. Degradation rate of *yersinia enterocolitica 138 A14* by elapsed time.

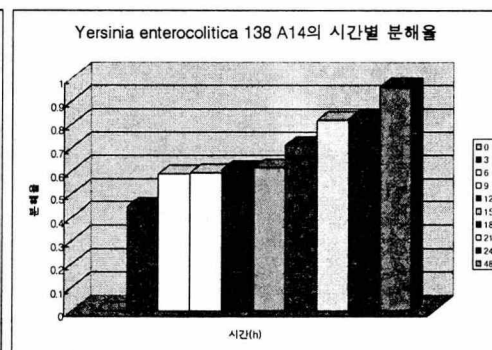


Figure 4. Degradation rate of *yersinia enterocolitica 138 A14* by methyl red concentration.

그리고 다음 실험에서는 Solvent orange, solvent red, solvent blue, solvent green 계열의 지용성 염료를 분해를 하고자 한다. Solvent orange, solvent red, solvent

blue, solvent green 계열의 염료는 지용성이지만 methyl red 와 같이 아조 염료이다. methyl red를 분해를 할 수 있는 박테리아를 이용을 하면 동일한 아조 염료로 구성이 되어있는 지용성 염료를 분해를 할 수 있다고 본다. 지용성 염료를 CTAB, SDS와 같은 이온 계면활성제(surfactant)와 Triton X-100, Tween 80과 같은 비 이온 계면활성제(surfactant)를 이용해서 용해를 시키고, methyl red를 분해할 수 있는 박테리아를 이용을 해서 염료를 효과적으로 분해를 하고자 한다.

### 참고문헌

1. Knapp, J. S., Newby, P. S. (1995), The microbiological decolorization of an industrial effluent containing a diazo-linked chromophore, *Water Res.* **7**, 1807-1809.
2. Nigam, P., Banat, I. M., Singh, D., Marchant, R. (1996), Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes, *Process Biochem.* **31**, 435-442.
3. Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P. (2001), Remediation of dyes in textile effluent : a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative, *Bioresour. Technol.* **77**, 247-255.
4. S. Melchionna, M. Barteri, G. Ciccotti (1996), Molecular dynamics of microperoxidases in aqueous and nonaqueous solution, *J. Phys. Chem.* **100**, 19241-19250.
5. Y. L. Khmel'nitsky, A. V. Kananov, N. L. Klyachko, A. V. Levashov, K. Martinek (1989), Enzymatic catalysis in reversed micelles, in: M.P. Pileni(Ed), Structure and Reactivity in Reverse Micelles, *Elsevier, Amsterdam.* 230-261.
6. Ibrahim M. Banat, Poonam Nigam, Datel Singh & Roger Marchant (1996), Microbial decolorization of textile-dye containing effluents : A review, *Bioresource Technology* **58**, 217-227.