

生物學的 脫窒工程에 관한 動力學的 研究*

I. 煉製品工場 廢水處理時의 細菌Flora의 變動

申 錫 雨
麗水水産專門大學 加工科

Dynamic Studies on the Process of the Biological Denitrification

1. Variation of Bacterial Flora in the Waste Water Treatment of Fish Meat Paste Plant

Suk U SHIN

Department of Food Science, National Fisheries Technical College
Yeosu, Korea

This study was attempted to investigate variation of the bacterial flora in waste water treatment of fish meat paste plant by batch and continuous culture.

The results of the experiment are as follows:

1. The removal rate of BOD in waste water treatment by activated sludge of continuous culture was above 90%.
2. In the process of nitric acidification of protein waste water, NH_4-N and NO_2-N increased until the lapse of 48 hours from culture, but NO_3-N showed little change.
3. In activated sludge obtained from acclimation by batch culture for 10 days, bacteria good in capacity of nitric acidification were not appeared.
4. Among 120 strains of isolated bacteria, the most predominantly appeared bacterial flora were *Enterobacteriaceae* (28%) and *Pseudomonas* spp. (25%). In the latter term of aeration during which ammonia originates in abundance, *Pseudomonas* spp. was decreased but *Enterobacteriaceae* was increased.
5. Fifty percent of the isolated strains were able to grow in 0%, 3% NaCl and 75% artificial sea water, Therefore, it is suggested that sea water can be used as dilution water instead of tap water during the treatment of waste water.

結 論

水産物 加工工場에서 排出되는 廢水는 水溶性 蛋白質이 流出되어 沿岸海域의 汚染은 물론 最近 問題 되고 있는 赤潮現象 또는 淺海化 등을 유발하여 沿岸 養殖業에 莫大한 지장을 초래하고 있는 實情이다. 現在 利用되고 있는 水産物 處理工場の 活性汚泥法에 依한 廢水處理는 주로 BOD 및 COD의 除去를 目的으로 하는 것이므로 最終放流水中에 窒素成分이 過量으로 存在하여 海水에 流入됨으로서 海域에서의

富營養化現象인 赤潮 등의 發生要因으로 지적되고 있다.

따라서 煉製品工場 排水中에 溶存하고 있는 各種의 窒素化合物을 最終으로 不活性의 窒素 gas 나 酸化窒素 gas 로 變換시켜 大氣中으로 放出시키기 위해 基本的인 窒化工程 및 脫窒工程에 따른 微生物의 生態系를 調査하여 最適條件을 갖추어 蛋白質 廢水處理에 대처하는 것이 理想的인 廢水處理라 思料된다.

水産物 加工工場으로부터 排出되는 廢水處理를 위

* 本 研究는 1983年度 文敎部 學術研究助成費의 支援으로 이루어졌음.

한 活性汚泥法에 대해서 太宰 等¹⁾, 橋永 等²⁾, 小野 等³⁾, 長田 等⁴⁾, 高尾 等⁵⁾의 論文이 報告되었으나 窒酸化에 관한 細菌學的 研究가 미비한 實情이다.

本 研究는 廢水處理에 있어서의 生物學的인 脫窒 工程의 mechanism을 究明할 것을 目的으로 하여 일 차적으로 蛋白質 含量이 높은 煉製品 加工工場 廢水에 對해 長時間 馴化시킨 微生物群에 依한 BOD 除去와 同時에 窒酸化過程을 調査하고 특히 窒酸化에 따른 細菌學的인 相關關係를 檢討하기 위해 實驗한 것이다.

材料 및 方法

1. 材料廢水 및 實驗裝置

實驗에 使用한 廢水는 煉製品加工 原料魚의 一次

處理後의 機械的인 洗淨水를 Fig. 1에 依한 曝氣槽 (가로 350 mm, 세로 200 mm, 높이 350 mm의 아크릴 板)를 利用하여 溫度 20°C에서 air pump로 攪拌하여 曝氣槽 混合液의 DO를 2 mg/l로 維持하였다.

2. 廢水의 成分分析

一般成分中 蛋白質은 킬달법, 脂肪은 Rose-Gottlieb 法을 利用 測定했고 환원당은 dinitrosalicylic acid에 의한 비색법으로 測定했다.

公害工程試驗은 Jis K 0102의 方法⁶⁾中 溶存酸素는 Winkler 法, 鹽素量은 AgNO₃ 적정법, 全硬度는 EDTA 적정법, NH₄-N은 Nessler 法, NO₂-N은 Griess-Romijn 法, NO₃-N은 Brucin 法, n-hexan은 溶出法으로 測定했다.

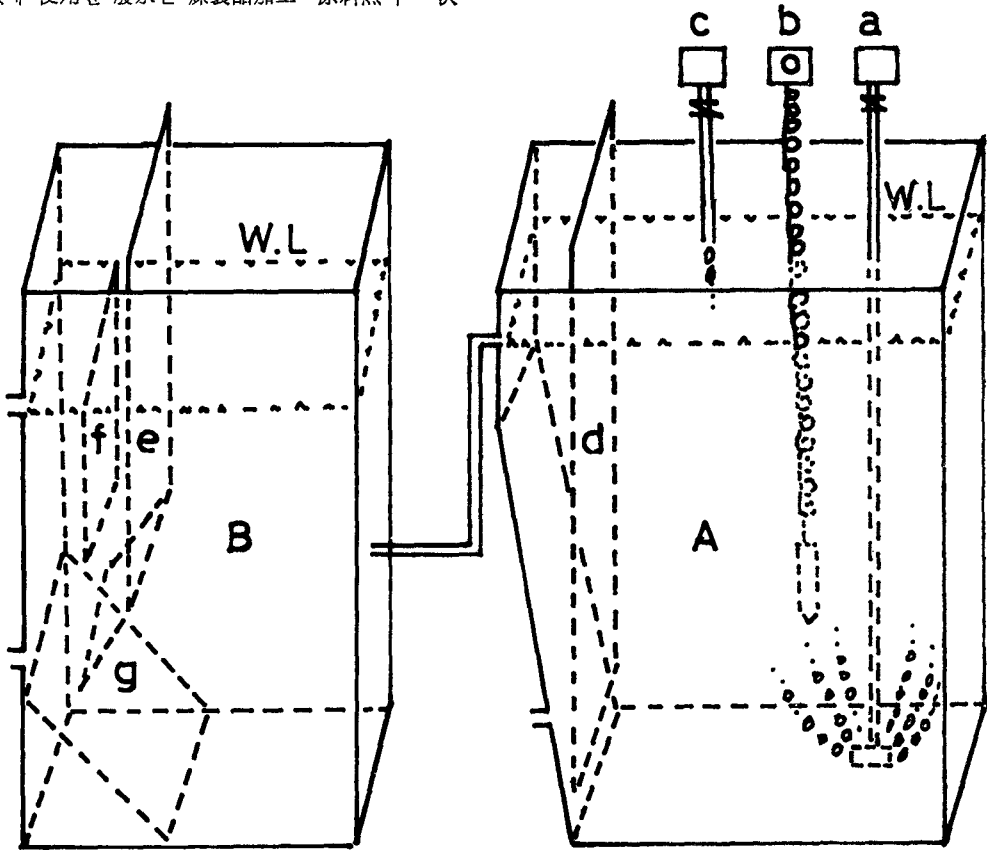


Fig. 1. Diagram of aeration tank (A) and sediment tank (B) used for experiment

- a: aeration equipment
- b: water temperature gauge
- c: chemical pump
- d, e, f and g: acril plates for precipitating effectively or preventing over flow blowhole

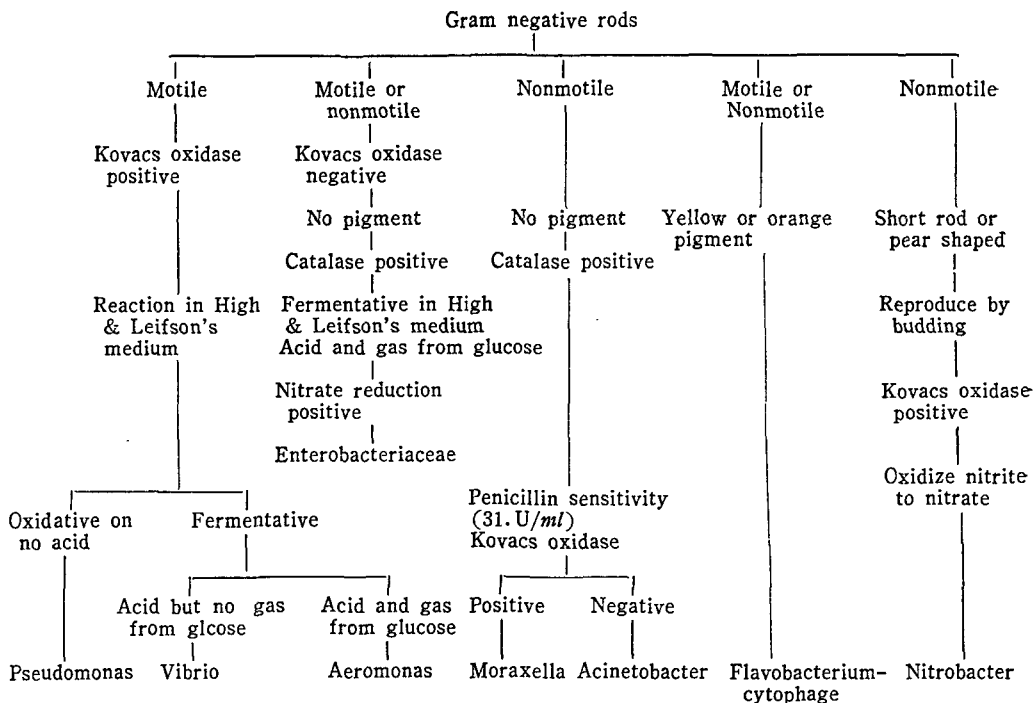


Fig. 2. A scheme for the identification of gram negative rod bacteria isolated from waste water treatment of fish meat paste

3. 細菌數의 測定分離 및 同定

生菌數 測定은 標準寒天平板培地(polypeptone 5g, yeast extract(Difco) 2.5 g, glucose 1 g, agar 20 g, meat extract 2.5 g, NaCl 5 g, distilled water 1000 ml, pH 7.0)에 供試水를 原液으로 하여 10 倍 段階 稀釋하여 그 0.1 ml를 塗沫해서 25°C에서 5日間 培養해서 菌數測定을 行했고, 大腸菌群數는 desoxycholate 培地를 利用하여 35°C에서 24~48 시간 培養하여 測定했다.

分離菌의 生化學的 試驗은 生菌數 測定用 各 平板의 集落으로부터 菌株를 分離해서 鹽分非要永性 菌株에 대해서 3%, 鹽分非要永性 菌株는 0.5%, 試驗培地에 加해서 行했고 運動性은 SIM 배지, cytochrom oxidase는 Kovacs 法⁷⁾, glucose 分解能은 非好鹽性 菌株에 對해서는 Hugh and Leifson 法⁸⁾, 好鹽性 菌株에 對해서는 Leifson⁹⁾의 MOF 培地를 利用하여 調査했다.

penicillin 感受性 試驗은 Corlet 等¹⁰⁾이 採用한 培地(peptone 0.5%, tryptone (Difco) 0.25%, yeast extract 0.5%, glucose 1%, agar 2%, DW 1000 ml, pH 7.0)를 基礎培地로 하여 여기에 penicillin GK 鹽

31. U/ml 加한 것을 利用했고 非水溶性 黃色色素 試驗은 0.5%, 食鹽加 milk 寒天平板培地(polypeptone 10 g, meat extract 5 g, skim milk (Difco) 30 g, distilled water 1,000 ml, pH 7.0)에 培養하여 관찰했다. catalase 및 질산, 아질산 生成 試驗은 manual of microbiological method¹¹⁾의 記載한 方法에 依해 試驗했다.

分離菌中 *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium-cytophaga*에 대해서는 Swan 等¹²⁾, *Moraxella*와 *Acinetobacter*는 Baumann 等^{13), 14)}, 그 外의 菌株에 對해서는 Bergey 法¹⁵⁾에 基礎를 둔 Fig. 2에 表示한 順序에 따라 同定했다.

結果 및 考察

1. 回分培養

Table 1과 같은 特性을 갖는 二種類(File fish, Hair tail)의 煉製品 加工工場廢水를 20°C에서 48 시간 回分培養했을 때의 BOD, COD, N-compounds (NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N) 및 一般成分의 經時變化를 Fig. 3 (hairtail), Fig. 4 (filefish)에 각각 나타냈다.

Table 1. Analytical values of fish meat paste waste water (unit: ppm)

Assay	Analytical values	
	Hairtail	Filefish
COD	540	1,600
BOD	1,380	3,840
SS	1,528	24,216
NH ₄ -N	24	56
NO ₂ -N	1.4	16.0
NO ₃ -N	1.2	7.5
n-Hexane	147	1,985
Cl ⁻	60	620
Protein	1,100	14,100
Fat	147	7
Reducing sugar	67	85
Alkalinity	60	198

原廢水成分은 쥐치에 있어서 BOD가 3,840 ppm, SS가 24,216 ppm, 蛋白質이 14,000 ppm으로 칼치廢水の BOD 1,380 ppm, SS 1,528 ppm, 蛋白質 1,100 ppm보다 高濃度의 有機物이 含有되어 있어 魚種에 따른 차이가 많은 것을 알 수 있었고, 林¹⁰⁾이 練製品 加工工場의 總合排水를 測定한 結果 보다 全般的으로 높은 傾向을 나타내었는데 이는 煉製品原料 洗滌工程中的 機械的인 洗淨廢水때문일 것으로 생각된다.

칼치를 原料로 한 煉製品 廢水의 경우 Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼 BOD 및 COD 除去率은 各各 76%, 48%로 나타났고, Fig. 4에서와 같이 쥐치를 原料로 한 煉製品 廢水의 경우는 BOD 및 COD 除去率이 各各 89%, 73%로 저조한 傾向을 나타내었고 pH는 칼치廢水에 있어서 6.9에서 7.8, 쥐치廢水에 있어서는 7.2에서 8.0이었다.

한편 蛋白質로부터의 NH₄-N의 生成은 현저한 增加를 나타내고 있으나 生成된 NH₄-N로부터 NO₂-N 및 NO₃-N으로의 窒酸化 過程에 대해서는 別變動이 보이지 않았다.

이들 結果는 高尾等⁵⁾이 市販고래 및 다랑어肉을 原料로 한 蛋白質 廢水를 處理하기 위해 原料廢水中에 含有되어 있는 細菌을 長時間 馴養하여 回分實驗한 것에 비해 比較的 낮은 處理效率를 보여주고 있다. 이러한 현상은 煉製品 加工廢水와 같은 蛋白質이 풍부한 廢水의 處理效率를 높이기 위해서는 脫窒되기까지의 各過程에 對하여 分解能力이 우수한 細菌이 存在해야 된다는 것을 意味한 것이지만, 本實驗에서는 原廢水에 含有되어 있는 細菌을 數日間 曝氣培養해서 얻은 活性汚泥 가운데는 NH₄-N로부터 窒酸

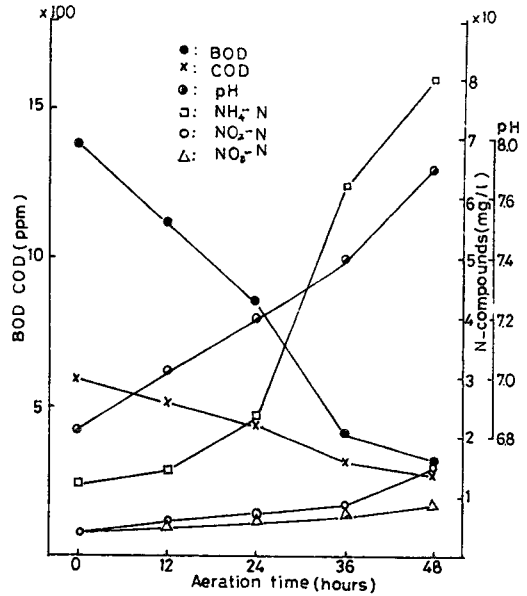


Fig. 3. Time course of BOD, COD and nitrogen compounds according to waste water treatment of fish meat paste used hairtail in batch culture

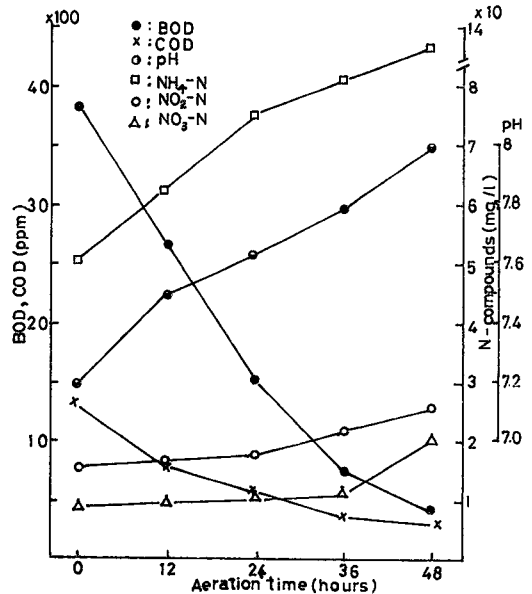


Fig. 4. Time course of BOD, COD and nitrogen compounds according to waste water treatment of fish meat paste used filefish in batch culture

化過程에 이르는 分解能力이 優秀한 菌은 없는 것으로 생각된다.

2. 連續培養

原廢水の 流入水量 8,640 ml/day, BOD 2,638 ppm. COD 1,600 ppm 下에서 回分培養에서 10日 馴養하여 얻은 活性스렛지를 이용하여 溫度 20°C에서 72時間 曝氣하면서 1日 1回 測定한 廢水處理 結果를 Fig. 5에 表示하였다.

曝氣 24시간 후 流入水の BOD 2,638 ppm에서 流出水の BOD 137 ppm으로 95%의 除去率을 나타냈고 72시간까지 公히 비슷한 傾向을 보여 주었다.

COD는 流入水 1,600 ppm에서 24시간 후 370 ppm으로 除去率 76%로 時間이 경과함에 따라 상승하여 72시간째에는 90% 除去되었다.

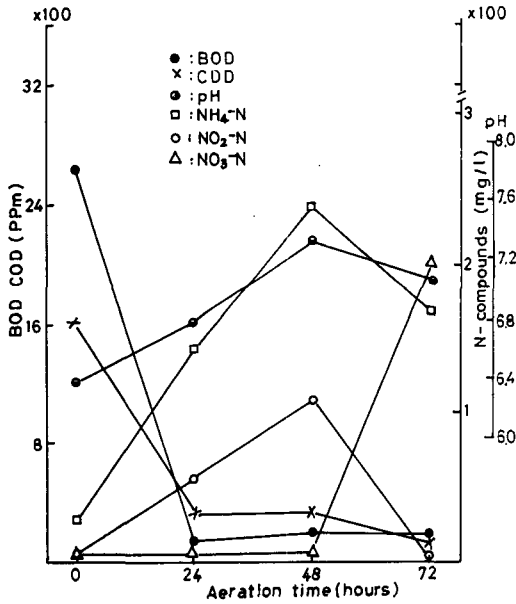


Fig. 5. Time course of BOD, COD and nitrogen compounds according to waste water treatment of fish meat paste used file fish in continuous culture

NH₄-N와 NO₂-N는 原廢水中에 各各 24 mg/l, 1.4 mg/l 였던 것이 48 시간 후에는 NH₄-N가 240 mg/l, NO₂-N은 110 mg/l로 급격히 상승하였으나 NO₃-N은 別 變動이 없는 것으로 나타났다. 이는 原廢水中에 回分培養에서와 같이 NO₂-N에서 NO₃-N로 轉換하는 微生物의 能力은 미약한 것으로 생각된다.

따라서 위와 같은 事實을 밝히기 위하여 豆科植物根, 土壤, 下水로부터 수집한 試料를 液體培地에서 增菌시켜 48時間째에 첨가하였던 結果 NO₃-N가 接種 24시간(Fig. 5에서 72시간) 후에는 급격히 上升한 반면에 NH₄-N와 NO₂-N은 감소하는 傾向을 나타내었다. 이는 接種한 細菌가운데 窒酸化에 영향을 미치는 細菌이 존재한 것으로 생각되며, 原廢水中에는 窒酸化 能力이 優秀한 菌은 없는 것으로 確認되며, 적어도 蛋白質 廢水處理에 關한 限 優秀한 脫窒菌의 人爲的인 첨가가 重要한 過程임을 알 수 있었다.

3. 廢水中의 細菌數의 變動

煉製品廢水の 曝氣時間에 따른 細菌數의 變動을 Table 2에 나타내었다.

一般細菌數는 原料廢水에서 試料에 關係없이 7.2 × 10⁴~1.9 × 10⁵ 이었고, 曝氣時間의 경과에 따라 上升하여 48시간에는 2.4 × 10⁷~3.8 × 10⁷으로 最高菌數에 달했고, 曝氣 72시간째에는 4.2 × 10⁶~4.4 × 10⁶으로 감소하였으나 連續培養系에서는 變化가 없었다.

大腸菌群數는 原廢水에서 1.2 × 10²~1.9 × 10⁵으로 回分培養에서는 24시간 經過했을 때 7.9 × 10⁵~8.2 × 10⁵으로 最高菌數에 달했고 連續培養에서는 曝氣時間에 따라 增加하여 35시간째에 3.8 × 10⁵으로 그 이후에는 別變動이 없었다.

回分培養이나 連續培養時 BOD는 24시간내에 除去率이 良好한 것으로 보아 細菌數가 10⁴~10⁷ 정도로 BOD 除去能기 있다는 것을 알 수 있고, 回分培養

Table 2. Bacterial and coliform counts according to aeration time in waste water treatment of fish meat paste plant by activated sludge

Fermentation type	Bacterial sp.	Aeration time (hour)						
		0	12	24	36	48	72	
Batch culture	Hairtail	bacterial count/ml	7.2 × 10 ⁴	6.0 × 10 ⁵	2.4 × 10 ⁷	2.0 × 10 ⁷	2.7 × 10 ⁷	4.4 × 10 ⁶
		coliform count/ml	1.2 × 10 ²	1.0 × 10 ⁴	7.9 × 10 ⁵	1.2 × 10 ⁵	1.8 × 10 ⁴	2.4 × 10 ³
	Filefish	bacterial count/ml	8.0 × 10 ⁵	3.2 × 10 ⁵	1.1 × 10 ⁷	3.0 × 10 ⁷	2.4 × 10 ⁷	4.2 × 10 ⁶
		coliform count/ml	1.5 × 10 ²	2.1 × 10 ⁴	8.2 × 10 ⁵	2.0 × 10 ⁵	1.6 × 10 ⁵	3.5 × 10 ⁵
Continuous culture	Filefish	bacterial count/ml	1.9 × 10 ⁵	2.2 × 10 ⁶	2.5 × 10 ⁷	3.6 × 10 ⁷	3.8 × 10 ⁷	1.3 × 10 ⁷
		coliform count/ml	2.0 × 10 ²	4.3 × 10 ⁴	3.8 × 10 ⁵	2.7 × 10 ⁵	2.8 × 10 ⁵	4.4 × 10 ⁵

에서는 曝氣時間의 經過에 따라서 營養素의 減少 및 新陳代謝物의 蓄積 等으로 淘汰되고 그 環境에 適合한 菌이 選擇되어 細菌 flora를 形成하는 것으로 蛋白質廢水에서는 암모니아 分解菌에서 아질산 分解菌으로, 아질산 分解菌에서 질산 分解菌으로 移行해 간다는 것을 推定할 수 있고 回分培養을 通해서 物質分解 過程中的의 目的菌을 찾는 方法을 提供해 주는 것으로 廢水處理 實驗이나 實際에 있어서 先行되어야 할 工程이라 생각된다.

3. 分離菌의 同定 및 曝氣時間에 따른 細菌의 變動

煉製品廢水로부터 分離한 120 菌株에 對해 Fig. 2에 依해 同定한 結果를 Table. 3에 나타내었다.

同定菌은 *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium cytophaga*, *Nitrobacter* 등으로 回分 및 連續培養에서 *Pseudomonas*가 34 菌株로 28%로 曝氣初期에 出現率에 높다가 曝氣後期에는 減少하는 경향을 나타내었다.

*Enterobacteriaceae*는 25%를 차지하여 *Aeromonas*와 함께 曝氣後期에 많이 나타나 이 두 菌種이 主體

菌이 되었다.

*Enterobacteriaceae*와 *Aeromonas*는 다같이 glucose를 好氣, 嫌氣狀態下에서 왕성하게 分解하여 gas를 發生하는 菌으로 이들이 有機物分解가 활발하게 일어나는 즉 아질산, 질산 등이 多量生産되는 曝氣後期에 出現率이 特別히 높은 것으로 보아 廢水處理에 있어서 그 環境이 微生物의 選擇性을 決定하는 重要한 要因으로 可能的 限 廢水特性에 따라 여러 區劃으로 나누어 培養하는 것이 效率的인 廢水處理라 考된다.

*Nitrobacter*가 曝氣 72時間째에 갑자기 出現한 것은 앞에서든 普及한 바와 같이 脫窒酸이 不良하여 豆科植物, 土壤, 下水 등을 試料로 하여 이 一定量을 液體培地에 培菌시켜 添加한 것으로 同定時 *Nitrobacter*로 確認되었고 이 菌으로 하여 連續培養 72시간째에 窒酸이 급격히 增加한 것으로 생각된다.

4. 分離菌의 好鹽性 實驗

分離한 120 菌株에 對한 好鹽性을 實驗한 結果를 Table 4에 表示하였다.

分離한 120 菌株中 食鹽濃度 0%에서 生育할 수 있는 菌은 91 菌株로 75%를 차지하였고, 0%, 3%

Table 3. Distribution of organisms isolated from waste water treatment of fish meat paste plant by activated sludge

Fermentation type	Batch culture									Continuous culture		Total	Percentage	
	Sample	Hairtail				Filefish				Filefish				
Genus		Aeration time	0	24	36	48	0	24	160	240	0	72		
<i>Pseudomonas</i>		6	7	1	4	8	4	0	0	3	1	34	28	
<i>Vibrio</i>		0	0	1	2	0	1	0	0	0	1	5	4	
<i>Acinetobacter</i>		1	2	1	0	0	0	0	2	3	0	9	7	
<i>Moraxella</i>		2	1	2	0	0	0	0	0	1	0	6	5	
<i>Aeromonas</i>		0	0	0	1	0	0	0	0	1	9	11	9	
<i>Enterobacteriaceae</i>		1	0	3	3	0	4	7	5	1	6	30	25	
<i>Flavobacterium cytophage</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	6	2	8	8	
<i>Nitrobacter</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	5	
Not determined		0	0	2	0	2	1	0	3	3	0	11	9	
No. of strains			40				37				43		120	100

Table 4. Salt tolerance of 120 strains isolated from waste water treatment of fish meat paste plant

Concentration of NaCl(%)	0	3	75*	grown at 0 & 3, not at 75	grown at 0 & 75, not at 3	grown at 3 & 75, not at 0	grown at 0, 3 & 75
No. of strains	91	74	82	2	4	8	60
Ratio to 120 strains(%)	75	62	68	0.2	0.3	0.6	50

*concentration (%) of artificial sea water

NaCl, 75% ASW 全濃度에서 同時に 生育할 수 있는 菌은 60 株로 分離菌의 50% 로 나타났고 75% ASW 에서만 生育할 수 있는 海水由來菌은 68% 로 나타났다.

3% NaCl, 75% ASW 에서 生育할 수 있는 好鹽性 菌은 각각 62, 68% 로 나타난 것으로 보아 魚類를 利用한 飼料廢水와 같은 濃厚한 蛋白質廢水에 稀釋 水로서 海水의 利用이 可能함을 알 수 있었다.

특히 脫氨酸菌인 *Nitrobacter* 는 0%, 3% NaCl, 75% ASW 全濃度에서 生育可能한 것으로 나타났다.

要 約

蛋白質 廢水處理時의 細菌學的 變動을 調査하기 爲해 煉製品 加工工場 廢水中 機械的인 洗淨水를 試料로 하여 回分 및 連續培養을 行하여 얻은 結果는 다음과 같다.

1. 活性슬러지에 依한 練製品 廢水處理에서의 BOD 및 COD 除去率은 모두 90% 이상으로 良好한 結果를 얻었다.

2. 蛋白質廢水の 窒酸化過程에서 NH_4-N 와 NO_2-N 은 48 시간까지 계속 增加하는 傾向을 나타냈으나 NO_3-N 는 별 변동이 없었다.

3. 原料廢水中的 細菌을 回分培養에서 10日間 馴養해서 얻은 活性슬러지 가운데는 窒酸化能이 優秀한 菌은 나타나지 않았다.

4. 分離菌 120 菌株 가운데서 *Enterobacteriaceae* 가 25%, *Pseudomonas* 가 23% 로 이 二屬이 優占種이었고 압모니아가 多量生産되는 曝氣後期에는 *Pseudomonas* 는 감소하는 傾向을 보였고 *Enterobacteriaceae* 와 *Aeromonas* 가 出現率이 높았다.

5. 鹽分要求性은 120 菌株中 50% 가 0%, 3% NaCl, 75% ASW 의 食鹽濃度下에서 生育可能한 菌이었으므로 濃厚한 蛋白質廢水の 희석수로 海水를 利用할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

文 獻

1. 太宰宙郎・小川誠・御園光信. 1968. 活性슬러지による産業廢水の處理に関する研究(第18報). 魚肉ねり製品廢水の處理について. 工業技術院發研報 34, 11-18.
2. 橋永忠志・太宰宙郎・御園光信. 1970. 活性슬러지による産業廢水の處理に関する研究(第20報).

蒲ぼこ加工廢水の處理について. 工業技術院微工研究報 38, 61-70.

3. 小野英男. 1972. 水産加工廢水の處理, 用水と廢水 14, 669-676.
4. 長田美治・島谷部憲男・大島浩. 1976. 水産加工排水處理の試験. (第2報) 生物學處理について. 北水試月報 33(8), 1-13.
5. 高尾彰一・佐々木博・森田壯平・秋田谷宣之. 1978. 低溫下における廢水處理の微生物學的研究. (第3報) 蛋白質廢水處理のための低溫馴養活性汚泥について. 北大農邦文紀 11, 102-109.
6. 日本工業標準調査會. 1978. 日本工業規格工業排水試驗方法 JIS K0102 1-47.
7. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas Pyocyanea* by the oxidase reation. Nature 178-703.
8. Hugh, R., and Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. J. Bact 66, 24-26.
9. Leitson, E. 1963. ibid. 85, 1183.
10. Corlett, D. A., T. S. Lee, and R. O. Sinnhuber. 1965. Application of replica plating and computer analysis for rapid identification of bacteria in some foods. 1. Identification scheme. Appl. Microbiol. 13, 808-817.
11. Manual of Microbiological Methods. 1957. Mc Graw-Hill. London 26.
12. T. M. Shewan, G. Hobbs and W. Hodgkiss. 1960. A determinative sheme for the identification of certain genera of gram negative bacteria with special reference to the *Pseudomonadaceae*, J. appl. Bact. 23, 379-390.
13. P. Baumann, M. doudoroff and R. Y. stanier. 1968. A study of the moraxella group. 1. genus moraxella and neissera catarrhalis group, J. Bact. 95, 58.
14. P. Baumann, M. doudoroff and R. Y. Stanier. 1968. A study of the Moraxella group, II. oxidative negative species (genus: *Acinetobacter*). J. Bact. 95, 1520.
15. 林一將. 1974. 蒲ぼこ工場の廢水處理. 食品と科學 16(2), 116-120.