

## 회전원판반응조에 의한 *Pseudomonas putida* H-5의 포름알데히드의 연속적 분해

류 병 호 · 임 복 규\* · 김 동 석\*\* · 원 용 돈\*\*\* · 정 수 자  
경성대학교 식품공학과, \*국립부산검역소,  
\*\*부산공업대학 고분자공학과, \*\*\*부산여자전문대학 식품영양학과

### Continuous Degradation of Formaldehyde by *Pseudomonas putida* H-5 Using Rotating Disc Contactor

Beung Ho Ryu, \* Bok Gyu Lim, \*\*Dong Seuk Kim, \*\*\*Yong Don Weon and Soo Ja Jung

Department of Food Science and Technology, Kyungsung University  
\*National Pusan Quarantine Station

\*\*Department of Polymer Engineering, Pusan National University of Technology

\*\*\*Department of Food and Nutrition, Pusan Women's Junior College

#### ABSTRACT

Continuous degradation of formaldehyde by using a rotating disc contactor was investigated in this study. *Pseudomonas putida* H-5K was selected as a mutant using N-methyl N'-nitro N-nitrosoguanidine (250 $\mu$ g/ml), which showed 1.5 times higher ability of formaldehyde degradation than that of the parent strain. Enzyme activity for formaldehyde degradation released from *Pseudomonas putida* H-5K showed the highest level of 6.2mol/min/mg protein in the 2% glucose mineral medium containing 0.02% formaldehyde. Degradation of formaldehyde from the first stage in rotating disc contactor was 95% and 5% from the 4th stage when the reactor was fed with 0.02% or 0.04% formaldehyde solution at a rate of 20 ml per hour. Continuous degradation of formaldehyde using rotating disc contactor was above 95% in the medium containing 0.04% formaldehyde, at the medium feed rate of 20ml per hour.

#### 서 론

폐수의 생물학적 처리는 미생물의 기능을 최대로 살려 오염물질을 제거하는 것이다. 미생물의 기능을 최대한으로 활용하려면 유리 상태보다는 미생물을 매체에 부착시켜 오염물질을 연속적으로 제거할 수 있을 것이다. 미생물의 막을 이용한 폐수 처리법으로는 살수여상법, 생물막 여과법 및 유동층 생물막법 등이 있으나, 오염원이 화학약품인 경우에는 활성오니법과 살수여상법의 장점을 최대로 활용한 회

전원판법(Rotating Biological Contactor, RBC)이 있다(1-3). 회전원판법은 원판상에 미생물을 부착하여 생물막을 형성시키고 그 원판을 회전시켜 오염물질을 연속적으로 처리할 수 있는 폐수처리 공정이다(3-5). 그 적용 범위는 소규모의 하폐수장뿐만 아니라 대규모의 도시 하수 처리장에서도 처리할 수 있다. 회전원판법은 활성오니법에 비하여 많은 장점(6-8)을 가지고 있는데 첫째 반응조에 산소 공급을 위한 동력이 필요 없으므로 에너지 소비가 적게 들고 둘째로는 각 단마다 체류시간에 따라 미생물의 생육

속도가 다르며 셋째로는 미생물의 순환장치가 필요 없고, 미생물의 침전상태도 양호하며 슬러지 생산량도 적어 처리비용이 절약된다. 특히 폐수중의 유기물의 제거효율이 좋은 것으로 알려져 있다(9, 11, 12). 저자 등(12)은 폐수에서 포름알데히드를 분해하는 *Pseudomonas putida* H-5를 분리 동정하여 균주의 특성을 조사한바 있다. 본 연구는 포름알데히드를 분해하는 *Pseudomonas putida* H-5를 회전 원판 반응조에 부착시켜 포름알데히드의 연속적인 분해를 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 실험에서는 *Pseudomonas putida* H-5를 사용하였다.

### 배지

포름알데히드의 분해 세균을 분리하기 위한 배지는 10g pepton, 5g beef extract, 1g  $K_2HPO_4$ , 5g NaCl 1ml trace element를 물 1ℓ에 녹여 사용하였다.

Trace element로는 0.5g  $B(OH)_3$ , 0.04g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.2g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.4g  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2g  $(NH_4)_2Mo_7O_{24} \cdot H_2O$  및 0.4g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 물 1ℓ에 녹여 사용하였다. 포름알데히드의 연속적 분해를 하기 위한 배지로는 1g glucose와 1ml trace element를 물 1ℓ에 녹이고 포름알데히드를 0.02% 및 0.04%의 포름알데히드를 각각 첨가한 배지를 사용하였다. 이때 사용된 포름알데히드는 적정농도를 만들어 막여과지(0.45 $\mu$ m)로 여과멸균한 후 멸균한 배지에 첨가하였다.

### MNNG의 처리에 의한 돌연변이주의 선별

*Pseudomonas putida* H-5를 30°C에서 24시간 배양후 배양액을 원심분리(4,000rpm, 10min.)하여 얻어진 균체를 0.05M Tris-malate buffer(pH 7.0)로 2회 세척한 다음 동일한 buffer로  $2 \times 10^8$  cell/ml의 현탁액을 만든 후, 200~2,500 $\mu$ g/ml 농도의 N-methyl N'-nitrosoguanidine(MNNG)용액을 동량 가하여 30°C에서 30분간 처리하였다. 이를 원심분리(4,000rpm, 10min.)하여 균체를 0.05M tris-malate buffer(pH 7.0)로 2회 세척한 후 MNNG를 제거한 다음 냉 최소배지로 희석한 후, 이 희석액 0.1ml를 완전 고체배지에 도말하여 30°C에서 2일간 배양하였을 때 생긴 colony를 최소 고체배지에 rep-

lica시켰다(13).

### 변이주의 농축과 선별

변이주의 농축법은 *Pseudomonas putida* H-5을 4시간동안 배양하여 균수가  $1.0 \times 10^8$  cells/ml에 도달했을 때 Kaneko와 Sakaguchi는 (13)의 방법에 따라 실시하였다. 즉 0.3 unit/ml의 Penicillin-G로 약 1.5시간 처리를 한 후 원심분리(4,000rpm, 10min.)하여 생긴 균체를 Tris-malate buffer로 2회 세척한 후, 300 $\mu$ g/ml의 lysozyme를 함유한 재생용 완전배지에 변이된 균의 현탁액 0.2ml의 완전 배지에 접종하여 30°C에서 3시간동안 배양시킨 후 원심분리(4,000rpm, 10min.)하였다. 이때 얻어진 균체를 Tris-malate buffer로 2회 세척하여 질소원을 제거하고 0.1%-yeast extract를 첨가한 최소 액체배지에서 6시간동안 N-starvation시킨 다음 2시간동안 Penicillin 처리를 행하였다(14). Penicillin으로 처리된 변이주를 원심분리(4,000rpm, 10min.)하고, Tris-malate buffer로 2회 세척하여 Penicillin을 제거한 후 동일 buffer로 희석하여 완전 배지에 도말하여 생긴 colony를 최소 고체배지에 replica하여 변이주를 구하였다.

### 효소활성의 측정

효소활성은 포름알데히드의 분당 분해되는 포름알데히드의 mole수로서 나타내었다. Specific activity의 배양액의 총균체량에 대한 단백질의 milligram으로서 계산하였다(15).

### 균체에 의한 포름알데히드의 분해

균주를 30°C에서 3일간 배양한 후 40°C 10분간 원심분리(6,000 $\times$ g)하여 얻은 균체를 멸균된 생리 식염수로 씻은 후 인산염 완충액(0.1M- $K_2HPO_4$ , 0.1M-NaOH, pH8.0)으로 현탁시켰다. 이 용액 200ml에 glucose와 무기질이 함유된 포름알데히드 용액(250~500mg/l)이 되게 첨가하였다.

### 회전원판 반응조(Rotating Disc Contactor, RDC)의 상자

회전원판 반응조는 Fig. 1에 나타낸 바와 같다. 반응조는 5mm 두께의 투명한 아크릴판으로 제작하였으며 disc는 베크라이트를 사용하였고 각 반응조는 4단으로 구분하였으며 각 단의 구분은 2mm 아크릴판으로 baffle를 설치하여서 분리하였다(2).

RDC의 설계(5, 6)는 단위면적당 용적비(G 값)는

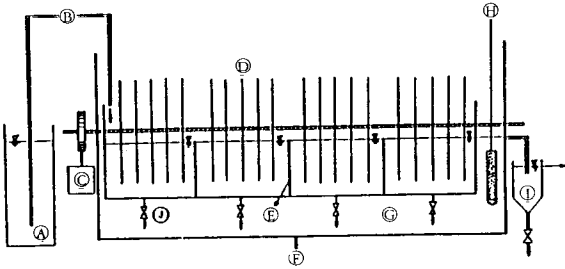


Fig. 1. Schematic diagram of rotating disc contactor.

- Ⓐ Storage tank
- Ⓑ Peristaltic Pump
- Ⓒ Reduction Motor
- Ⓓ Disc
- Ⓔ Raffle
- Ⓕ Contactor
- Ⓖ Water Bath
- Ⓗ Heater
- Ⓘ Clarifier
- Ⓩ Drain Valve

1~2단에서 5.0, 3~4단에서 3.0을 유지하였으며 회전원판 상호간격은 1~2단에서 1.5cm, 3~4단에서 1.0cm가 되도록 하였다. 반응조의 벽 및 기저부는 회전원판과의 간격을 원판지름의 10%로 유지하도록 설계하였으며 반응조의 바닥은 원판에서 탈리된 미생물이 축적되지 않도록 하기 위해 반원형으로 하였고 잉여균체를 제거할 수 있도록 drain valve를 설치하였다. 반응조내의 온도를 일정하게 유지하기 위하여 온도 자동조절장치를 사용하였으며 수욕조 옆면에 순환펌프를 사용하여 수욕조내의 물이 잘 순환되도록 하였다. 포름알데히드를 함유하는 기질의 주입은 peristaltic pump로 유량을 조절하였다.

**회전원판 반응조에 의한 연속적 분해**

회전원판 반응조에 의한 포름알데히드의 연속적인 분해는 먼저 균주를 3L Jar fermentor (Model, HDF-300, Marubishi)에서 배양시킨 후 이 배양액을 미리 멸균된 회전원판 반응조에 넣어 30°C에서 25일동안 균체가 원판에 균체막을 형성하도록 원판을 회전시켰다. 이때 균체막이 steady state로 형성된 후 포름알데히드가 함유된 배양액을 peristaltic pump로 일정량씩 연속적으로 공급하면서 포름알데히드를 분해시켰다.

**균체막의 두께 측정**

1.5×2cm의 균체막 채취기구를 사용하여 원판 표면에서 대표가 될만한 곳을 택하여 일정 면적의 biomass을 긁어내어, 미리 5ml의 증류수를 채운 10ml 눈금 실린더에 넣고 부피를 측정한 후 증가한 부피를

면적으로 나누어 균체막의 두께를 측정하였다(16).

**포름알데히드 및 분해물의 분석**

배양액의 시료용액은 분석하기 전에 0.45μm 여과막으로 여과하여 gas-chromatography의 방법에 따라 분석하였다(12).

**생균수의 측정**

생균수의 측정은 Hemacytometer로 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**변이주의 선별**

*P. putida* H-5를 변이원인 N-methyl N'-nitro N-nitrosoguanidine(MNNG)을 30°C에서 30분간 처리하여 변이시켰을때 변이원인 MNNG 농도에 따른 변이율과 생존율을 Fig. 2에 나타내었다. *P. putida* H-5는 500μg/ml의 MNNG로 처리했을때 60% 정도의 변이율을 나타내었고, 700μg/ml일 때는 40%의 생존율을 나타내었다. 한편 500μg/ml의 MNNG로 30°C에서 30분간 변이시켜 Penicillin G의 처리하여 처리농도에 따른 변화의 증가는 Fig. 3에 나타내었다. 일반적으로 Penicillin G의 농도가 증가함에 따라 변이율도 증가하였고, 300μg/ml의 Penicillin 농도에서 약 70%의 변이율을 나타내었으나, 그 이상의 농도에서는 별다른 증거가 없었다. 이러한 결과는 식촌과 상전의 결과(11)와 비교하면 비슷한 경향이었다. *P. putida* H-5에서 유래된 변이주중

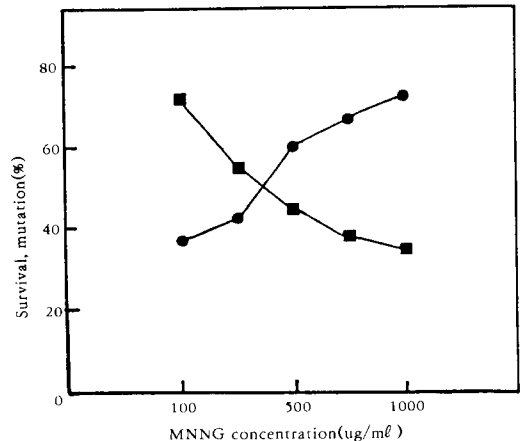


Fig. 2. MNNG concentration on the survival and mutation rates of *P. putida* H-5.

Survival rate: ■, Mutation rate: ●

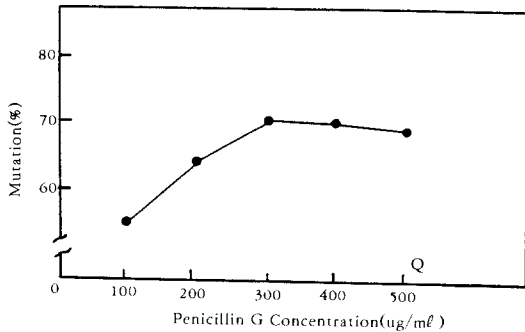


Fig. 3. Effects of penicillin G treatment of *P. putida* H-5K on the mutation.

30°C에서 24시간 배양하여 포름알데히드의 분해능이 우수하고 또 균체 증식이 우수한 *P. putida* H-5K로 명명하고 이후의 실험에 사용하였다.

#### Resting Cells에 의한 포름알데히드의 분해

*P. putida* H-5K가 분비하는 효소의 특성을 조사하기 위하여 본 실험에서는 4종류의 배지에 *P. putida* H-5K를 접종하여 실험하였다. 즉 0.1% glucose와 무기염류 배지(GM 배지), 0.1% glucose와 무기질 염류(GM 배지)에 0.02 포름알데히드가 함유된 배지(GMG 배지) 및 무기염류와 0.04% 포름알데히드의 단독배지(MF 배지) 및 tryptone-yeast배지(CM배지, 포름알데히드 무첨가 배지) 등 4종 배지에서 분해를 시도하였다. 배양액을 원심분리하여 모든 균체를 생리적 식염수로 씻은 후 인산 완충액(pH 8.0)으로 현탁시킨 다음 포름알데히드를 넣은 후 포름알데히드의 dismutase의 활성을 측정

Table 1. Specific activities of formaldehyde degrading enzyme in resting cells of *P. putida* H-5K grown in different media.

Medium	Specific activity(mol/min/mg protein)
GM	3.8
GMF	6.2
MF	5.4
CM	1.6

GM; mineral salts medium with 0.1% glucose, GMF; mineral salts medium with 0.1% glucose and 0.02% formaldehyde, MF; mineral salts medium with 0.04% formaldehyde, CM; complex medium with 5g/l tryptone and 2.5g/l yeast extract(without glucose or formaldehyde).

한 결과는 Table 1에 나타내었다. 각각 다른 배양에서의 포름알데히드의 분해효소의 specific activity와 GMF배지에서 6.2mol/mg.protein으로 가장 높은 활성을 나타내었고, CM배지에서는 1.6mol/mg.protein으로 활성이 낮았다. 이러한 결과는 *P. putida* H-5K에서 분비하는 분해효소는 GMF배지에서 활성이 높은 것으로 생각된다. 포름알데히드 내성이 있는 세균은 포름알데히드 산화효소의 생산을 유도하는 특이한 기질인 포름알데히드의 존재하에서 많은 양의 효소를 준비하고 활성이 높다고 알려져 있다(17, 18).

#### *P. putida* H-5K 균체의 회전원판에 부착 및 균체막의 두께

회전 원판 반응조의 원판에 *Pseudomonas putida* H-5K를 액체 배지에 배양하여 배양액을 시간당 20 ml씩 공급하면서 회전원판 반응조의 원판에 균체를 부착시켜 포름알데히드의 연속적인 분해를 시도하였다. 회전원판 반응조에서 포름알데히드가 분해가 잘 되기 위하여는 원판에 균체가 일정하게 부착되어야 한다. 즉 기질(포름알데히드)의 분해율은 미생물막의 두께가 정상상태(active thickness)에 도달하게 되면 일정 수준을 유지하게 된다. 이 active thickness는 기질농도가 증가함에 따라 증가한다. 일단 미생물막의 두께가 기질이 확산되는 정상상태보다 두꺼워지게 되면 기질의 확산에 미치지 못하는 곳에 미생물은 기질 제거에 관여할 수 없게 되므로 두께가 증가하더라도 분해율에는 영향을 주지 않게 된다(4, 16, 17, 19). 본 실험에서 균체가 회전원판에 부착된 상태의 정상여부를 알아보기 위하여 *P. putida* H-5K의 균체를 회전원판에 부착시키면서 부착 20일부터 25일 경과 이후 형성된 균체막을 측정 한 결과 5일간 평균적으로 150 $\mu$ m이었다. Hoehn과 Ray(14)는 미생물막은 기질의 부하율, 미생물의 증식단계, 기질의 유속에 따라 달라지며, 또한 미생물막의 두께가 400 $\mu$ m 이상일때 준정상상태(quasi-steady state)로 기질 제거가 안정상태를 유지한다고 하였다. Mair(15)는 미생물막의 두께는 약 300 $\mu$ m에서는 기질 제거율에 변화가 없고, 이는 고속유속과 고농도의 기질에도 적당하다고 하였다. 이러한 보고는 본 연구와 차이가 있으나, 이는 미생물의 종류와 기질에 따라 큰 차이가 있는 것으로 사료된다. 그러므로 본 실험에서는 미생물막의 두께가 정상상태에 도달한 25일까지 균체를 원판에 고정시킨 후 포름알데히드의 분해를 실시하였다.

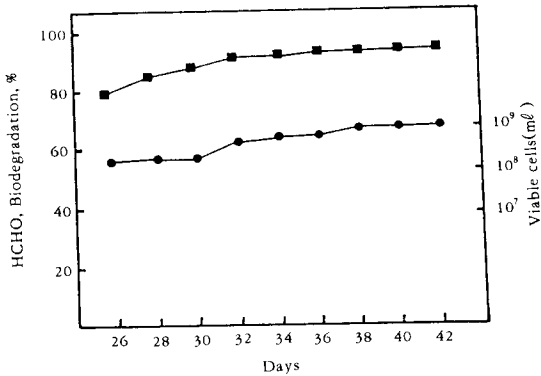


Fig. 4. Biodegradation of formaldehyde after 25 days of immobilized cells *P. putida* H-5K using the rotating disc contactor.  
HCHO; ■, Viable cells; ●

정상상태에서의 포름알데히드의 분해율

원판에 부착된 미생물막의 두께에 따라 포름알데히드의 분해율에 영향을 미치게 된다(14, 15). 본 실험에서는 포름알데히드가 들어 있는 배양액의 농도를 일정하게 유입시킬 때 정상상태까지의 경과 일수와 유출액중의 포름알데히드 분해율을 알아본 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

균체를 25일간 부착시킨 후 계속하여 40일간 배양 했을때 26일부터 28일까지는 포름알데히드의 분해율이 약간의 증가를 보였으나 30일부터 40일까지는 95% 정도 분해되었고 그 후에는 거의 변화가 없었다. 한편 유출액의 균체의 농도는 25일부터 30일 경과시까지 2.0 × 10<sup>8</sup> cells/ml 이었으나, 32일부터는 1.0 × 10<sup>9</sup> cells/ml 으로 40일까지 일정농도를 유지 하였다.

반응조의 각 단계에서의 분해율

포름알데히드를 연속적으로 분해하기 위하여 포름알데히드의 농도와 유량을 변화시키면서 각 stage에 따른 포름알데히드의 분해율의 측정이 필요하다. 본 실험에서는 포름알데히드의 농도는 0.02, 0.04, 0.06 및 0.08%로 조절하고, 배양액은 각각 10ml, 20ml 및 30ml로 주입하였을 때의 결과를 정상상태가 되는 6일째에 포름알데히드의 분해율을 측정 한 결과 Fig. 5, 6 및 7에 나타내었다. 포름알데히드 함유배지를 시간당 10ml씩 공급하였을 때 0.02%와 0.04%의 농도에서는 1단에서는 95%, 4단에서는 5% 정도의 분해되었고, 시간당 20ml씩 주입하였을 경우에

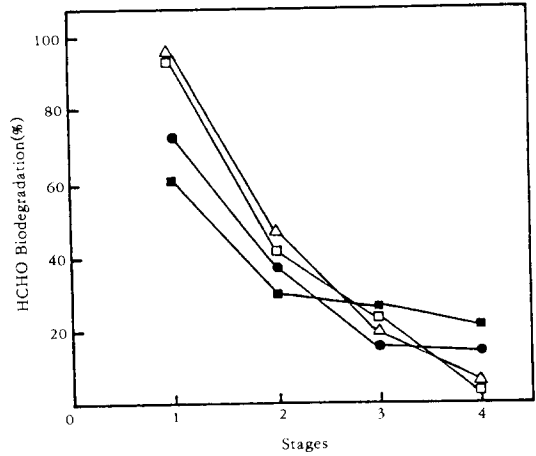


Fig. 5. Formaldehyde biodegradation on the feeding rate of 10ml/h by *P. putida* H-5K using the rotating disc contactor.  
Formaldehyde concentration; 0.02%; -△, 0.04%; -□, 0.06%; ●, 0.08%; -■

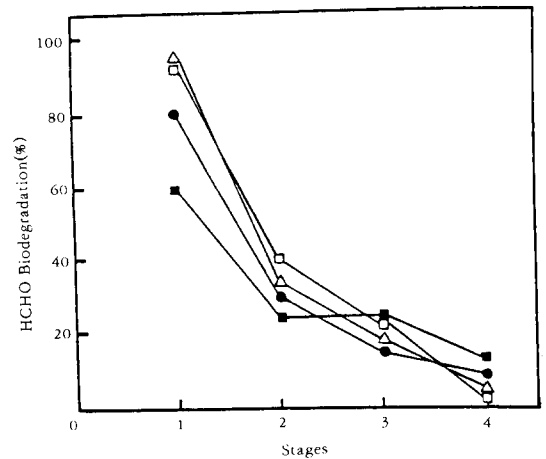


Fig. 6. Formaldehyde biodegradation on the feeding rate of 20ml/h by *P. putida* H-5K using the rotating disc contactor.  
Formaldehyde concentration; 0.02%; -△, 0.04%; -□, 0.06%; ●, 0.08%; -■

도 이와 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 시간당 1단에서 30ml 주입시 포름알데히드가 0.02% 농도에서는 80%, 0.04%에서는 76%의 분해되었고, 0.02% 및 0.04% 모두가 4단에서는 8% 정도의 분해율을 나타내었다. 그리고 포름알데히드 농도가

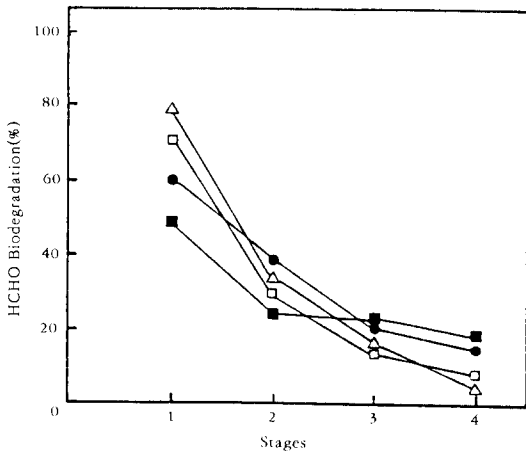


Fig. 7. Formaldehyde biodegradation on the feeding rate of 30ml/h by *P. putida* H-5K using the rotating disc contactor.

Formaldehyde concentration; 0.02%; -△-, 0.04%; -□-, 0.06%; -●-, 0.08%; -■-

0.06% 및 0.08%에서는 전반적으로 분해율이 낮았다.

포름알데히드 농도가 낮을수록 분해율이 높은 것은 부착 균체에 의한 분해작용이 원활이 일어나는 것으로 간주되며 농도가 높을수록 분해율이 낮은 것은 포름알데히드의 농도에 의하여 균체의 분해작용이 억제되는 것으로 생각된다. 그러므로 본 실험에서는 회전원판반응조에 의한 연속적인 분해는 0.04%의 포름알데히드 농도의 배지를 시간당 20ml을 주입하는 것이 가장 효과가 있는 것으로 판단된다.

#### 회전원판 반응조에 의한 연속적 분해

회전원판 반응조에 의한 포름알데히드의 연속적 분해의 조건은 앞으로 실험결과에서 얻은 0.04% 포름알데히드의 농도로 조절하고 기질의 주입량은 시간당 20ml씩 공급하면서 1단에서 4단을 통과하여 분해되어 나오는 유출액을 조사한 결과는 Fig. 8과 같다. 0.04%의 포름알데히드를 함유한 용액을 시간당 20ml씩 공급하였을 때 포름알데히드의 분해율은 분해 2일에서는 약 80%의 분해율을 보였으나 6일부터는 95%로 거의 분해되었다. 이때 생성된 개미산과 메탄올은 분해 2일에서 6일 때는 약간 생성되었으나 8일부터는 생성이 거의 없었다(4).

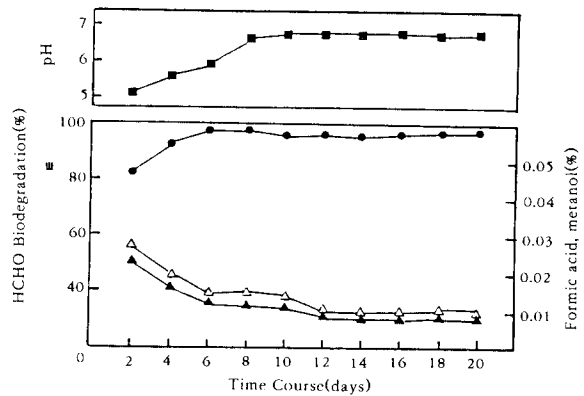


Fig. 8. Continuous biodegradation of formaldehyde by using rotating disc contactor with immobilized cells of *P. putida* H-5K Biodegradation ratio; ●-, Formic acid: -△-, Methanol: -▲-

#### 요 약

포름알데히드를 연속적으로 분해하기 위하여 *Pseudomonas putida* H-5균주를 회전판 반응조에 부착시켜 분해를 시도하였다. 포름알데히드의 분해능을 높이기 위하여 *Pseudomonas putida* H-5을 N-methyl N'-nitro-N'-nitrosoguanidine(MNNG)로 변이시킨 결과 친주보다 분해능이 1.5배 높은 변이 균주를 얻었으며 이를 *P. putida* H-5K라고 명명하였다. *P. putida* H-5K에서 분비되는 효소를 0.02% 포름알데히드를 함유하는 2% 포도당, 무기질의 배지에서 6.2mol/mg.protein/min이었다. 포름알데히드의 연속적 분해를 하기 위하여 회전원판 반응조에서 포름알데히드를 0.02% 및 0.04%의 농도로 시간당 20ml을 주입하였을 때 회전 원판의 1단에서는 95% 분해되었으며, 4단에서는 5% 분해되었다. 회전원판 반응조를 이용하여 0.04%의 포름알데히드를 시간당 20ml로 주입하였을 때 20일간 연속적으로 분해시킨 결과 정상상태가 유지되는 6일째부터는 95% 이상의 분해율을 나타내었다.

#### 참고문헌

1. 沆勝降一(1988), 微生物固定化法による 排水處理, 日本産業用水 調査會, vol 6.
2. R.L. Antonie(1976), Rotating Biological contactors for secondary wastewater, treatment, CUIP/Wesner. Seminar, South Lake Tahoe

- Stateline, Nevada. pp 27-48.
3. 石墨政義(1976), 環境技術, **5**, 33.
  4. W. G. Shieb(1982), *Biotech. Bioeng.*, **23**, 1923.
  5. W. K. Shieb(1982), *Water Res.*, **16**, 1071.
  - 6 S. Sekin, Y. Yammada, and Y. Sano. (1988) 環境技術, **9**, 6.
  7. C. P. Leslie, Jr. Grady and C. Henry(1980), *Biological Wastewater treatment*, Marcel, Dekker Int, New York, 755.
  8. R. S. Ramalho(1983), "Introduction to Waste-water treatment process." *Academic-press*, 411.
  9. 김동윤, 이상봉(1988), 부산대학교 환경 연구소 보, **6**, 1.
  10. 이무진(1989), 부산대학교 산업대학원 공학석사 논문.
  11. 김영철(1991), 경성대학교 산업대학원 공학석사 논문.
  12. 류병호, 김동석, 임복규, 원용돈, 정수자(1993), 한국생물공학회지, **8**, 1.
  13. H. Kaneko and K. Sakaguchi(1979), *Agric Biol. Chem.*, **43**, 1007.
  14. J. Lederberg and N. Zinder(1948), *J. A. C. S.* **70**, 4267.
  15. N. Kato, H. Kobayashi, M. Shimao and C. Sakazawa(1984), *Agric, Biol, Chem.*, **48**, 2017.
  16. K. Williamson and P. L. Mccarty(1976), *J. WPCF*, **48**, 1.
  17. 植村定治郎, 相田 浩(1971), 醱酵 微生物 I. 朝倉書店, 東京, 初版.
  18. N. Kato, K. Shirakawa, H. Kobayashi and C. Sakagawa(1983), *Agric. Biol. Chem*, **47**, 39.
  19. W. G. Charaddis(1981), "Fouling biofilm development : process analysis" *Biotech Bioeng.* **23**, 1923.
  21. R. C. Hoehn and A. D. Ray(1973), "Effect of thockness on bacterial film" *J. Water pollutant control Fedration.* **45**, 2302.
  22. W. J. Maier, V. C, Behn, C. D. Gates(1967), "Simulation of the trickling Filter process" *J. sanitary Eng. ASCE*, Vol, **93**, August, pp. 91-112.