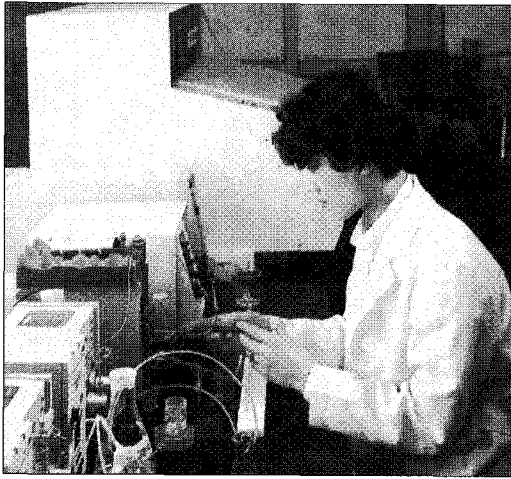


색소분해균주의 선별



목차

I. 서론

II. 재료 및 방법

1. 대상 색소
2. 균 분리 시료
3. 균주 분리방법
4. 분리 균주의 선별
5. 색소 분해 활성 실험

III. 실험결과 및 고찰

1. 균주 1차 분리
2. 분리 균주의 선별 결과
3. 산성 염료 분해 선발균주의 색도분해능
4. 분산염료 분해 선발균주의 색도분해능

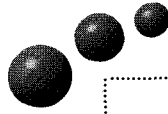
IV. 결론

I. 서론

화학공업의 발전에 수반하여 천연적으로는 존재하지 않던 화합물이나, 화학적 안정성을 목적으로 많은 유기화합물들이 합성되고 다방면에서 이용되고 있다. 이들 화합물들은 이제까지의 '자연생태계에서는 낯선(xenobiotic)' 또는 '인공적으로 합성되거나 생성된(anthropogenic)' 화합물들로 분류되고 있다. 따라서 자연환경에 존재하는 미생물들에는 이들 화합물을 분해·이용할 수 있는 효소계나 대사계가 빈약하여, 자연환경 하에서 분해되기 어려울 뿐만 아니라, 활성슬러지 등의 생물학적 처리과정에서도 분해되기 어려운 난분해성 물질들이나, 자연생태계 또는 생물학적 처리시스템 내의 생물에 독성을 주는 생물학적 독성물질들도 있다. 또한 이들 난분해성 유기화합물질들 중에서는 자연계에 방출되어 생물농축을 일으키는 물질도 있다.

이러한 화합물들은 자연계에 직접적 투여로 사용되거나 밀폐된 계 안에서 사용되거나 모두 언젠가는 지구환경에 노출된다는 점에서, 이들 물질의 분해·처리기술의 개발이 수질 및 환경보전 측면에서 요구되고 있는 실정이다.

이들 난분해성 유기화합물질의 처리에는 국내외적으로 크게 물리화화적인 처리기술과 생물학적인 처리기술이 연구·개발되고 있고, 실용화가 모색되고 있다. 최근 주목되고 있는 물리화화적인 처리기술은 막분리 기술과 고급산화기술로 대표된다. 막분리는 환경오염을 치유하는 콜린텍으로서 중요성이 더해지고 있으나, 아직까지는 막 자체가 고가이기 때문에 범용성은 뒤떨어진다(이, 1990). 고급산화법은 오존이 분해되면서 생성되는 높은 반응성을 가지는 OH radical의 반응성을 이용하는 것으로 자외선이나 과산화수소 등과 오존을 같이 반응시키는 방법들이 개



발되고 있다(신, 1993). 이 방법은 높은 처리효율을 가지고 있지만 고가의 처리시설이 필요하고 지속적인 화학물질의 투여가 요구되는 시설 및 운전비용이 문제가 된다.

한편, 생물학적 처리는 다시 크게 두 가지로 실용화 연구가 진행되고 있다. 그 하나는 생물학적인 처리에 가장 중요한 역할을 하는 새로운 미생물자원을 개발하는 것, 즉 특정 미생물을 분리 선발

하여 처리에 응용하는 방법이다. 이 방법은 야생균주를 검색하여 분리해내는 방법과 분리된 균의 활성을 유전공학적인 방법 등을 이용하여 활성을 증진시키는 방법으로 다시 세분할 수 있다. 다른 하나는 난분해성 물질이 함유된 폐수의 처리공정을 개선 또는 발전시키는 방법으로 포기법의 개량이라든지, 담체를 투입시켜 미생물상의 다양화를 꾀하는 방법 등을 이용하는 방법이다. (일본 미생물학회, 1991)

생물학적 처리방법 중에서 고효성 미생물 균주를 폐수처리장에 적용할 경우 재래식 생물학적 처리공정에서 나타날 수 있는 몇 가지 문제점들을 어느 정도 효과적으로 극복할 수 있으며, 다음과 같은 성과를 얻을 수 있을 것으로 평가되고 있다(송, 1992). 즉, ① 오염물질이 과부하된 상태에서도 양호한 방류수 수질을 달성하고 전반적으로 폐수처리 공정상의 효율을 증대시키며, ② 분해균주는 산업폐수 내 함유되어 있는 각종 유독성 난분해성 유기화합물질을 우선적으로 처리하여 효과적으로 오염물질을 제거하고, ③ 여러 가지 처리조건의 변화나 난분해성 물질로 인하여 발생하는 슬러지 미생물의 억제인자를 사

본 연구의 2차년도에는 특정균주를 이용한 방법에서 염색폐수의 처리효율을 증진시킬 생물학적 도구(biological tools)를 확보할 목적으로 색소 분해활성이 뛰어난 야생균을 분리 선별하였던 1차년도 연구에 이어서 계속적인 작업을 수행하였다. 분리된 균은 3차년도 연구에서 처리공정에서의 적용이 시도될 것이다.

전에 제거하여 미생물의 성장을 원활히 해주며, ④ 활성슬러지 공법의 운전시 가장 많이 발생하는 팽화(Bulking)현상의 발생을 억제하거나 효과적으로 제어하고, 큰 변화없이 일정하게 폐수처리 공정을 유지하므로 운전관리 상의 문제점을 해결 할 수 있을 것으로 평가되고 있다.

그러므로 분리-선택-적응-활성화된 미생물 균주를 사용함으로써 생물학적 처리공정

상의 활성슬러지 미생물군의 자연적 형성 기전을 인위적으로 향상시켜 처리효율을 증진시키고 운전관리 기술 측면에서도 긍정적인 역할을 할 것으로 판단된다.

폐수처리 효율을 저해하는 독성 난분해성 오염물질을 분해하는 균주는 대부분 슬러지미생물의 우점종에 속하는 그람 음성 간균에 속하는 것들이다. 특히 Cytophaga 속, Pseudomonas 속, Arthrobacter 속 및 Klebsiella 속의 세균은 floc형성균으로 활성슬러지 공법 중에서 슬러지 원생동물인 Vorticella, Carchesium, Epistylis, Opercularia 등의 좋은 먹이가 될 수 있다. 또한 이들 세균은 산업폐수 내에서 독성을 나타내거나 분해되기 어려운 오염물질인 phenol, benzen, aniline, toluen, xylene, naphthylene 등의 화학물질이나 염색공정에서 많이 사용되는 색소화합물 및 PVA(polyvinyl alcohol) 등과 제지공업폐수 등에 다량으로 들어 있는 셀룰로오스 성분을 분해할 수 있는 능력을 가지고 있다.

따라서 본연구의 2차년도에는 특정균주를 이용한 방법에서 염색폐수의 처리효율을 증진시킬 생물학

적 도구 (bioloical tools)를 확보할 목적으로 색소 분해 활성이 뛰어난 야생주를 분리 선별하였던 1차년도 연구에 이어서 계속적인 작업을 수행하였다. 분리된 균은 3차년도 연구에서 처리공정의 적용이 시도될 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 색소

본 연구에서는 1차년도 연구에서 이미 언급한 바와 같이, 산성염료와 분산성염료의 소비나 생산이 많은 국내의 색소 사용현황(한국염료안료공업협동조합, 1991)과 관련하여 표 3-1에서 보는 바와 같은 산성염료와 분산성염료를 대상으로 이들을 분해하는 균주를 선별하고자 하였다. 즉, 분산성염료는 2종(Foron Red SPGL, Foron Blue SR), 산성염료는 3종(Nylosan Blue NBLN, Nylosan Rubin NOBL, Nylosan Yellow N7GL)으로 도합 5종의 색소화합물을 대상색소로 하였다.

[표 3-1 Dye Material used in this Study.

| Kinds of dye | Name of the color material |
|---------------------------|---|
| Dispersed dye Acid dye | Foron Red SPGL, Foron Blue SR, Nylosan Blue NBLN, Nylosan Rubin NOBL, Nylosan Yellow N7GL |

2. 균분리 시료

본 실험에서는 균분리 및 선별의 과정을 서 등(1986)의 방법을 기본으로 약간의 변형을 시도하여 실시하였다. 색소분해균 분리를 위한 시료는 표3-2에 나타낸 바와 같이 원폐수 및 폭기조내 폐수, 반송슬러지, 염색폐수가 방류되는 하천의 저질, 폐수처리장의 주변 토양,

일반 하천의 저질, 일반 토양 등 총 31점으로부터 균을 1차 분리하였다.

[표 3-2. Samples from which Color Material Utilizing Microorganisms Were

| Sample | Total | Sludge | ReturnSludge | Soil | Sediment |
|---------------|-------|--------|--------------|------|----------|
| No.of samples | 31 | 10 | 8 | 10 | 3 |

3. 균주 분리 방법

가. 배지

색소분해균의 분리 및 선별에 이용된 배지는 다음의

[표 3-3. Composition of the Basal Salt Medium.]

| | |
|--|---------|
| Dipotassium Hydrogen Phosphate, K_2HPO_4 | 5.8 g |
| SPotassium Dihydrogen Phosphate, KH_2PO_4 | 4.5 g |
| Ammonium Sulfate, $(NH_4)_2SO_4$ | 2.0 g |
| Magnesium Sulfate, $MgSO_4$ | 0.16 g |
| Calcium Chloride, $CaCl_2$ | 0.02 g |
| Sodium Molybdate, Na_2MoO_4 | 0.002 g |
| Iron(II) Sulfate, $FeSO_4$ | 0.001 g |
| Manganese(II) Chloride, $MnCl_2$ | 0.001 g |
| Distilled Water | 1.0 L |
| Adjusted to pH 7.0 ± 0.2 at $25^\circ C$ | |
| Agar(for Solid medium) | 15.0 g |

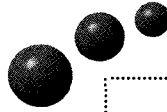
표 3-3 및 표 3-4와 같다. 즉 선택 및 증균 배지는 색소화합물 이외의 탄소원이 포함되지 않도록 조제하였으며, 균주 보관 및 전배양 배지는 완전배지로 조제하여 사용하였다.

[표 3-4. The Composition of Nutrient Broth and Nutrient Agar.]

| | |
|--|--------|
| Beef Extract | 3.0 g |
| Peptone | 5.0 g |
| Agar(for Nutrient Agar Medium) | 15.0 g |
| Distilled Water | 1.0 L |
| Adjusted to pH 6.8 ± 0.2 at $25^\circ C$ | |

나. 색소 분해균주의 분리방법

우선, 적응배양을 위하여 균분리 시료를 토양인 경우에는 10g, 슬러지나 반송슬러지 및 폐수의 경우에는 30ml를 색소를 200mg/l포함하고 있는 최소배지



300ml에 현탁하여 40℃에서 3일간 150rpm으로 진탕 배양한 다음, 배양액을 원심분리한 후, 인산완충액으로 균체를 2회 세척하고 균체를 전량 증균배양을 위하여 사용하였다. 증균배양은 위에서 얻은 균체를 각 색소가 300mg/l 함유되어 있는 최소배지 300ml에 접종하고 다시 150rpm, 40℃로 3일간 배양하였다.

이 상등액을 적당한 배율(10⁶)로 희석하여 한 방울을 Agar Plate위에 떨어뜨려 유리봉으로 고루 퍼서 40℃에서 7~10일간 배양하고 독립 집락의 색, 크기, 외형상의 유사성을 살피고 왕성하게 성장한 집락들을 분리하였다.(그림 3-1)

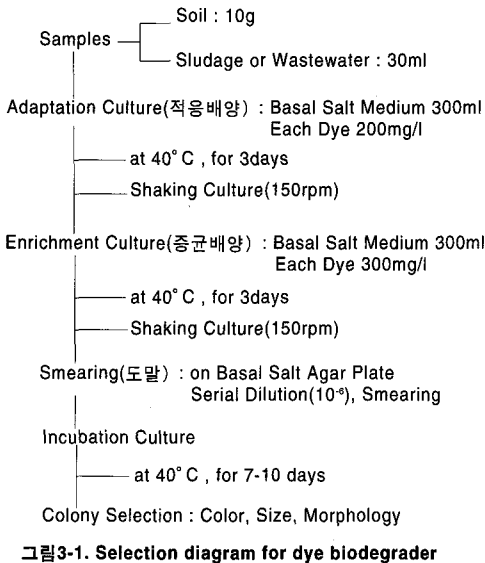


그림3-1. Selection diagram for dye biodegrader

4. 분리 균주의 선별

분리된 균 중에서 색소를 분해하는 균을 2차 선별하였다. 색소의 1차 및 2차 선별에는 균분리용의 배지를 사용하였다. 먼저 분리된 균을 색소 200mg/l가 함유된 Basal Salt Agar Plate에 스트리킹하고 40℃에서 7~

Isolated Strains

Streak : Basal Salt Agar Plate
Each Dye 200mg/l

Incubation Culture : at 40° C , for 7-10 days

1st Selection : Better growth strains

Enrichment Culture :Nutrient Agar Plate
at 40° C , for 3days

Streak Culture : Basal Salt Agar Plate
Each Dye 300mg/l
at 40° C , for 7-10 days
Incubation

2nd Selection : The best growth strains

Storage : Nutrient Agar Slant
at 5° C , in refrigerator

그림3-2. Screening diagram for dye biodegrader

10일간 배양한 후 성장이 양호한 집락을 육안으로 1차 선별하였다.

1차 선별된 균을 각 색소를 300mg/l 포함하고 있는 Nutrient Agar Plate상에 스트리킹하여 40℃에서 7~10일간 배양하여 좋은 성장을 보이는 집락을 선별하였고, 이들은 Nutrient Agar Slant에 접종하여 5℃ 냉장고에 보관하여 실험에 사용하였다. 본 선별과정을 요약하면 그림 3-2와 같다.

5. 색소 분해 활성 실험

선별된 균들의 색소분해 활성의 시험은 다음의 그림 3-3과 같이 실시하였다. 즉 선별된 균들을 Nutrient Broth에 접종하고 40℃, 150rpm으로 4~5일간 증균 배양한 후, 원심분리하고 균체를 완충액으로 2회 세척한 후 균체 전량을 500~600mg/l의 색소를 함유한 10% Basal Salt Medium에 접종하여 150rpm, 40℃로 진탕배양하면서 1, 3, 6, 9일 간격으로 색도의 변화를 측정하였다. 색도의 측정은 수질오염공정시험법(환

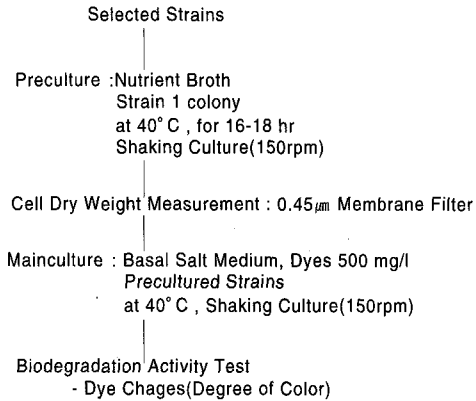


그림3-3. Activity testing flow chart for dye biodegrader

경부, 1991)에 준하여 실시하였다.

III. 실험 결과 및 고찰

1. 균주 1차 분리

국내에서 소비량이 가장 많은 분산염료와 산성염료 중에서 각각 2종, 3종의 염료를 선정하여, 이들을 단일 탄소원으로 하는 미생물을 분리할 목적으로 주로 염색 공장과 관련하여 염색폐수, 반송슬러지, 폐수가 방류되는 하천의 저질, 주변 토양 등을 채취하고 균을 분리한 결과 다음 표 3-5와 같이 총 99주의 분해균을 분리할 수 있었다.

2. 분리 균주의 선별 결과

[표 3-5. Number of Microorganism Strains Isolated as Color Degrader

| Habitat | Kinds of dye | Dispersed dye | Acid dye |
|--------------|--------------|---------------|----------|
| Total(99) | | 47 | 52 |
| Sludge | | 15 | 16 |
| Returnsludge | | 12 | 13 |
| Soil | | 15 | 18 |
| Sediment | | 5 | 5 |

분리된 균주를 10% Basal Salt Agar Plate(각 색소 200mg/l)에 스트리킹해서 40℃로 7~10일간 배양하여 성장이 양호한 23종의 균주를 1차선별하고 선별된 균주를 Nutrient Agar Plate 상에서 40℃로 3일간 증균배양하여 10% Basal Salt Agar Plate(각 색소

[표 3-6. The Results of 1st and 2nd Screening for Dye Biodegrader]

| No. of Selected strains | Dispersed dye | Acid dye |
|-------------------------|---------------|----------|
| 1st Selection | 10 | 13 |
| 2nd Selection | 6 | 10 |

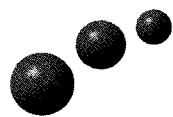
300mg/l)에 스트리킹해서 40℃로 7~10일간 배양하여 성장이 양호한 16종의 콜로니를 따서(2차 선별), Nutrient Agar Slant에 접종하여 보관하였다. 2차 선별된 16종의 균주는 표 3-6과 같이 분산염료 분해균 6종 및 산성염료 분해균이 10종이었다.

3. 산성염료 분해 선발균주의 색도분해능

2차 선별된 10종의 산성염료 분해균의 색도분해능을 평가하기 위한 지표로 색도변화를 살펴보면 표 3-7과 같은 결과를 나타냈다. 표 3-7에서 알 수 있는 바와 같이 S-9-3번 분해균주가 가장 높은 색도 제거효율을 나타냈고, S-20-2, S-26-1 및 S-28-1 균주도 좋은 색도 제거효율을 나타내, 앞으로 분해능 제고연구를 위한 연구에 좋은 재료가 될 것으로 판단된다. 특히, 색소분해균들이 일반적으로 느린 제거효율을 보이는 점에 비추어 볼 때, S-9-3균주는 3일째에도 높은 활성을 보여 우수한 분해균이라고 판단된다.

4. 분산염료 분해 선발균주의 색도분해능

2차 선별된 6종의 분산염료 분해균의 색도분해능을 평가하기 위한 지표로 색도변화를 살펴보면 표 3-8과



[표 3-7 Color Removal Efficiency by the Selected Acid Dye Biodegrader]

| Strain | Day 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 |
|--------|-------|------|------|------|------|------|
| S-9-2 | 2069 | 1876 | 1707 | 1702 | 1385 | 1789 |
| 3 | 1922 | 1293 | 1344 | 1337 | 1000 | 937 |
| 11-1 | 2169 | 2077 | 1918 | 1736 | 1436 | 1498 |
| 15-2 | 1958 | 1604 | 1740 | 1935 | 1512 | 1492 |
| 20-2 | 1848 | 1315 | 1269 | 1244 | 1005 | 1101 |
| 26-1 | 2061 | 1339 | 1399 | 1398 | 1204 | 1203 |
| 27-2 | 2122 | 1478 | 1363 | 1402 | 1150 | 1317 |
| 28-1 | 2095 | 1436 | 1461 | 1384 | 1122 | 1204 |
| 2-3 | 2106 | 1540 | 1392 | 1243 | 1215 | 1238 |
| 31-1 | 2085 | 1454 | 1379 | 1295 | 1280 | 1394 |
| Blank | 1907 | 1519 | 1646 | 1497 | 1476 | 1564 |

[표 3-8. Color Removal Efficiency of the Selected Dispersed Dye Degrader]

| Strain | Day 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 |
|--------|-------|------|-----|-----|-----|-----|
| B-20-2 | 1027 | 998 | 961 | 860 | 836 | 825 |
| 21 | 1008 | 936 | 886 | 854 | 807 | 866 |
| 22 | 768 | 736 | 740 | 679 | 608 | 626 |
| 24 | 998 | 1042 | 979 | 957 | 866 | 825 |
| 27 | 892 | 849 | 808 | 822 | 799 | 784 |
| 31 | 889 | 896 | 899 | 807 | 796 | 769 |

같은 결과를 나타냈다. 전체 6종의 선발균주 중에서는 B-20-2 균주가 20% 정도의 색도제거율을 나타내 가장 효율이 좋은 것으로 나타났고, B-22균주가 18% 정도의 색도제거를 보여 그 다음으로 높은 제거율을 보였다. 이들 균주들은 1차 년 도에 선발 분리한 2종의 우수 분산 염료 분해균주들과 함께, 특정 균주에 의한 색소분해능 개선 연구의 미생물 자원으로써 이용할 예정이다.

IV. 결론

국내의 색소사용량과 관련하여 주요한 염색색소인 고압분산염료 2종(Foron Brilliant Red SRGL <CI Disperse Red 202>, Foron Blue SR), 산성염료 3종(Nylosan Lubin N5BL<CI Acid Red 299>, Nylosan Blue NBLN <CI Acid Blue 350>, Nylosan Falvine

E8GZ <CI Acid Yellow 184>)등 5종의 염색색소를 단일 탄소원으로 하는 미생물을 분리하기 위하여 주로 염색공장과 관련하여 염색폐수, 반송슬러지, 폐수방류 하천의 저질, 주변 토양 등에서 균을 분리한 결과 총 99주의 균을 1차 분리하였다.

분리된 균주를 10% Basal Salt Agar Plate(각 색소 200mg/l)에 스트리킹하고 40℃로 7~10일간 배양하여 성장이 양호한 23종의 균주를 1차 선별하고, 선별된 균주를 Nutrient Agar Plate 상에서 40℃로 3일간 증균배양하여 10% Basal Salt Agar Plate(각 색소 300mg/l)에 스트리킹하여 40℃로 7~10일간 배양하여 성장이 양호한 16종의 균을 선별하여, Nutrient Agar Slant에 접종하여 보관하였다.

2차로 선별된 16종의 균주들을 액체배양하여 색소 분해활성을 지표로 이 중에서 산성염료 분해균주 4종과 분산염료 분해균주 2종을 3차 선별하였다. 이들 균주는 3차년도에 그 특성을 규명하고 활

성증진 연구에 이용될 것이다. ◀