

論 文

連續回分式 處理工程에 의한 2,4-Dinitrophenol 分解時 pH의 影響

Effect of pH on the Degradation of 2,4-Dinitrophenol in Sequencing Batch Reactor Process

趙 官 衡\*

Jo, Kwan-Hyung

Abstract

Substrate inhibition of 2,4-dinitrophenol (DNP) degradation was investigated using activated sludge which had been adapted to mineralize DNP. DNP is a metabolic uncoupler, preventing cells from making energy for growth and it has been suggested that pH may be important in mitigating effects of uncouplers. After acclimation of the activated sludge, the effect of pH on toxicity of DNP at high concentration (75 mg/L) was investigated, over a pH range of 5 to 9. DNP inhibition was found to be strongly dependent on mixed liquor pH. The DNP degradation rate was highest in the pH range of 6.95 to 7.84; at pH 5.94 degradation of 75 mg/L DNP was significantly inhibited; at pH < 5.77, DNP degradation was completely inhibited after approximately 30% of the DNP was degraded. By comparison, no significant effect of pH variation in the same range was seen on glucose uptake by the activated sludge culture.

1. 序 論

니트로페놀類(예를들어, 2,4-dinitrophenol과 4-nitrophenol)는 産業廢水 中에 廣範圍하게 包含되며 都市下水나 農業廢水에서도 檢出되기도 한다. 니트로페놀類는 農藥과 染料合成 工程中에 中間物質로써, 그리고 除草劑와 殺蟲劑에도 應用되며 알킬벤젠의 大氣圈內 變換(tropospheric transformation)의 結果로 都市下水에서

도 檢出된다.<sup>1)</sup>

DNP化合物은 몇몇 박테리아와 下水나 活性 슬러지內의 混合微生物群에 의해서 分解되기 때문에 窒素芳香族 化合物중에서도 특별히 관심을 끌고있으나,<sup>2),3)</sup> 代謝過程중에 細胞에너지 生産을 妨害하는 작플림제(uncoupler)로 作用하여 微生物에 치명적인 毒性을 주는것으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 이러한 影響을 설명할수 있는 하나의 機構(mechanism)로는, 이온화되지 않은(protonated form) 페놀類는 細胞膜을 통하여 쉽게 細胞內로 移動되어 水素이온을 提供하게 되고 이것들은 過剩의 OH<sup>-</sup>와 反應하여 細胞膜內外의 水素이온 구배를 없애 결국은 酸化

\*美國 콜로라도州立大學校 土木·環境工學科 博士後 課程

性 磷酸化(phosphorylation)를 妨害하여 ATP(Adenosine triphosphate)生産이 中斷된다. 즉, 이온화된 DNP는 짝풀림 活性(uncoupling activity)이 적고 毒性도 적다고 볼 수 있다. 그러므로 溶液內 pH를 人爲적으로 上昇시키면 沮害를 減少시킬수 있다고 假定할 수 있다.

Mayer와 Ellersiek(1988)<sup>5)</sup>의 報告에 의하면 溶液의 pH를 낮출 境遇 弱酸性 物質의 毒性이 增加하였고, 또한 이온化 物質과 非이온化 物質의 比를 變化시킴으로써 弱鹽基性 物質의 毒性을 減少시켰다. Sprague(1985)<sup>6)</sup>의 研究에 의하면, 非이온化 有機性 分子化合物이 이온化 된것보다 毒性이 더 强하였는데, 그 이유는 비 이온화된 물질이 細胞膜을 보다 쉽게 透過하였기 때문이며, pH가 이온화 정도와 계속되는 細胞膜 浸透의 정도를 결정하는 主要한 因子로 보았다. 니트로基의 아미노基로의 還元에 의한 DNP의 細胞分解는 酸化性 脫아미노化로 계속 되었으며, pH값이 中性 부근일때 最良상태를 나타내었다.<sup>7)</sup> *Corynebacterium simplex*에 의한 DNP로부터의 NO<sub>2</sub>의 分離에 따른 分解는 pH 8.0에서 最大를 나타내었다.<sup>8)</sup>

### 2. 接近方法

窒素芳香族 化合物의 好氣性 生分解는 잘 證明된 現象이지만, 廢水處理시스템의 運轉因子들중 pH의 影響에 대한 研究는 生物學的 工程에 의한 짝풀림 化合物의 分解에 潛在的인 影響을 끼칠 수 있음에도 불구하고 관심을 적게 받아온것이 事實이다. DNP 分解 微生物의 존재는 잘알려져 있지만, 본 研究의 초점은 미리 順應시킨 活性슬러지 微生物에 의한 DNP의 生分解를 增加시키는데 있어서 環境인자중 pH의 影響을 조사하는데 있다. pH가 中性일때에는 毒性領域에 있던 高濃도의 DNP분해는 높은 pH값에서 증가될 수 있다고 假定하였다. 조사 대상 pH의 영역은 活性슬러지 微生物 成長에 適合하다고 提示된 限界範圍를 超過하지 않는 5 < pH < 9 사이에서 實驗하였다. 沮害는 遲

滯(lag), 分解率의 減少, 그리고 順應된 活性슬러지에 의한 DNP 分解度의 完全한 喪失 등으로 보았다. 活性슬러지 微生物의 DNP 毒性에 대한 pH 影響은 DNP 濃度 75mg/L에서 調査되었다. 다른 研究者들은 純粹培養 微生物을 이용하여 DNP를 90mg/L까지 分解할 수 있다고 觀察하였으나<sup>2)</sup> 活性슬러지와 같은 混合微生物群에 의해서는 75mg/L의 높은 DNP 농도에서 미리 順應된 微生物 조차도 빠르게 沮害를 일으킬 수 있다.

### 3. 實驗材料 및 實驗方法

Fig. 1에 나타낸 바와같이 4L 容量의 Bench-scale 連續回分式 反應槽(Sequencing Batch Reactor, SBR)를 사용하여 活性슬러지를 10mg/L의 DNP分解에 順應시켰고, 별도의 窒素源으로서 KNO<sub>3</sub>를 注入하였다. 連續回分式 反應槽內 活性슬러지 微生物은 高濃度 DNP分解時 pH의 影響을 조사하기 위한 플라스크 反應槽 實驗의 接種源으로 사용되었다.

250mL 容量의 플라스크 反應槽는 200mL의 活性슬러지 混合液, DNP溶液과 無機鹽類 營養源을 含有하고 있다. 플라스크 反應槽內 微生物濃度는 MLSS(Mixed Liquor Suspended

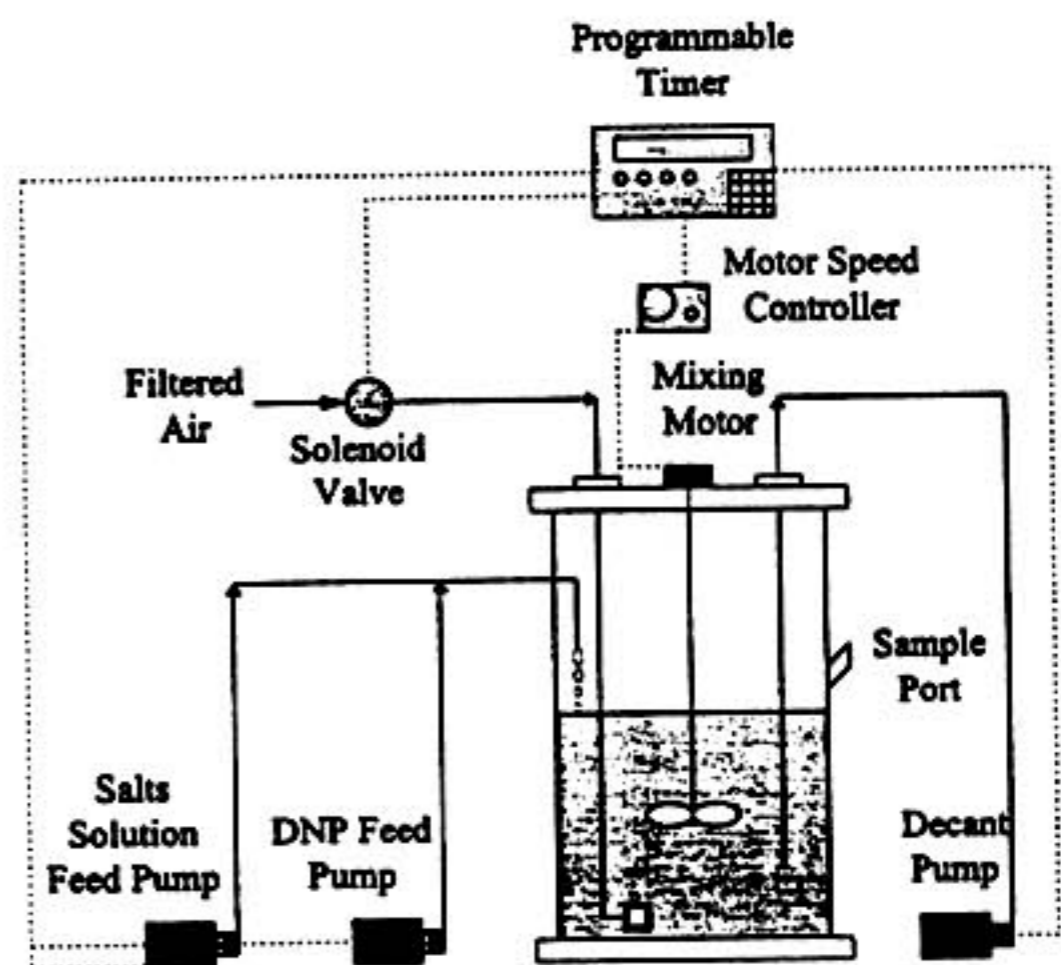


Fig. 1. 자동화된 연속회분식 반응조(SBR) 시스템.

**Table 1.** 활성슬러지를 이용한 플라스크 반응조의 pH 영향 실험조건.

Variable	pH Effect
DNP (mM)	0* and 0.41
(mg/L)	0* and 75
MLSS (mg/L)	1,269 - 1,603
C:N ratio (g/g)	6
pH	5.0 - 9.0
Reaction period (hr)	66

\*glucose control

Solids)로 1,200mg/L부터 1,600mg/L 까지 증가시켰다. Table 1에 플라스크 반응조의 실험 조건을 요약하였다. 무기염류는 활성슬러지 미생물의 균형된 성장을 위하여 활성슬러지 접종원과 고농도(75mg/L)의 DNP와 함께注入하였고, 플라스크 반응조내 용액은 Gyrotory Model G2 혼합기(New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ)를 사용하여 폭기와 더불어 혼합시켰으며, 회전속도는 200rpm이었으며 실험은 상온(22 ± 2°C)에서 하였다.

활성슬러지에 의한 DNP沮害의 pH에 대한 영향을 조사하기 위하여, pH를 5부터 9까지 변화시켰다. pH 범위를 5에서 9까지 선택한 이유로는, pH를 5이하로 낮출 경우에는 다른 내성影響들이 DNP分解微生物의 활동을 제한할 수 있고, pH를 9이상으로 높일 경우에는 마그네슘이나 칼슘과 같은 무기營養物質에 포함된 것들이沈澱물을 형성하여利用不可能하게 되기 때문이다. 혼합액의 pH는緩衝溶液(0.4M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 酸(0.2M citric acid, 0.4M HCl), 鹽基(0.4M tris) 등을注入하여實驗前에調節하였다. 각緩衝物質의解離常數를 Table 2에 나타내었다. 본 실험에 사용된 磷酸緩衝溶液은 pH를 6이하나 8이상으로調節할때에는適切치 못하였다. Citric acid와 磷酸緩衝液으로 pH 5를 맞추었고, pH 9를 얻기 위해 tris와 HCl을注入하였다. DNP가 없는 활성슬러지의 pH影響을 조사하기 위하여, 葡萄糖을單一基質로 사용한 각 pH 범위에서의 활성슬러지의活動度を對照標準(con-

**Table 2.** pH 변화에 사용된 완충용액들의 pK<sub>a</sub> 값 (25°C)과 농도 pH 8.6으로 맞추기 위해 플라스크 반응조내 농도가 각각 0.2M인 Tris와 HCl을 사용하였다.

Buffering agent	pK <sub>a</sub>	Concentration in medium (M)
Citrate	3.14, 4.77, 6.39	0.1
Monobasic phosphate	7.21	0.2
Dibasic phosphate	12.30	0.2
Tris	8.08	0.2

trol)으로 사용하였다. 葡萄糖은 Shimadzu Model TOC-5000 總有機炭素分析機(Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)를 사용하여 溶存性有機炭素(DOC)로서測定하였다. 실험전의 측정 DOC값은 플라스크反應조內 葡萄糖濃도에 대한理論計算値와 거의一致하였다. 각 pH 범위에서의 葡萄糖分解曲線을 얻기위해 5mL의試料를 매 10분 간격으로注射器를 사용하여 葡萄糖이 완전分解될 때까지採取하였다. DOC試料는 0.2m polycarbonate membrane filter disc를注射器에 부착하여濾過시켰고, DOC 분석전에 2N HCl 2방울을 가하여酸性化시켰다.

DNP 농도를 측정하기 위해試料를 플라스크反應조로부터注射器를 사용하여 일정 시간간격으로採取하였다.試料는採取即時 0.2m polycarbonate filter(Nucleopore Corp., Pleasanton, CA)로眞空濾過시켜微生物活動を抑制시키기 위해 4°C를 유지하고 있는冷藏庫에서保管하였다. 分光光度計(Model UV 160V, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)의紫外線吸收波長 260nm에서試料內 DNP量을測定하였고, 微生物濃度は 유리섬유여과지를 사용하여 MLSS로測定하였다.<sup>9)</sup> 플라스크反應조內 용액의 pH는 Orion Research Expandable Ionalyzer(Model EA 920, Orion Corp., Boston, MA)와 Orion pH probe(Model 910600)을 사용하여 각試料採取時間에測定하였다.

4. 實驗結果 및 考察

Fig. 2와 Fig. 3는 重複實驗한 DNP 分解曲線이며, 各各의 重複된 活性슬러지 플라스크 反應槽는 實驗直前に 緩衝溶液을 使用하여 아래의 pH값으로 固定시켰다: 5.16-5.24, 5.77, 5.92-5.94, 6.95, 7.84-7.86, 8.62-8.68. 모든 플라스크 反應槽의 初期 DNP 濃도는 약 75mg/L로 하였다. 위의 實驗에 있어서, 最大 DNP分解率을 pH 領域 6.95-7.84에서 구하였다. 여러가지 微生物 反應速度모델을 實驗結果에 適用하여 보았으나, 0次 反應速度모델의 適用이 가장 優秀하였고 이를 pH 6.95-7.86 範圍에 있는 4개의 分解曲線에 대해 適用시킨 結果를 Table 3에 나타내었다. DNP分解에 있어서 深刻한 沮害는 pH 5.16-5.94의 範圍에서 觀察되었고, pH 8.62-8.68의 範圍에서는 DNP 分解가 多少 느렸다. Fig. 4는 pH 5.75, 6.95, 7.94에서 葡萄糖을 炭素/에너지 基質로 含有하고 있는 플라스크 反應槽에서의 對照標

準 溶存性 有機炭素(control DOC) 分解曲線을 보여주고 있다. Fig. 4에서 볼 수 있는바와 같이, 葡萄糖의 分解는 pH의 變化에 전혀 影響을 받지 않고 있음을 나타내고 있다.

本 pH 實驗結果로 부터 알 수 있듯이, DNP는 높은 pH 領域(7-8)보다 낮은 pH 領域(5-6)에서 毒性이 더욱 컸다. 그 理由는, DNP는 pKa값이 4.09인 弱酸性 物質로서 pH가 증가함에 따라 이온화가 더욱 증대되었기 때문으로 볼 수 있다. 앞에서도 언급한바와 같이, 이온화 되지않은(protonated form) 페놀類는 細胞膜을 통하여 쉽게 擴散되어 細胞內에서 水素이온을 提供하게 되고 이것들은 過剩의 OH<sup>-</sup>와 反應하여 細胞膜內外의 수소이온 구배를 없애 결국은 酸化性 磷酸化(phosphorylation)를 방해하여 ATP(Adenosine triphosphate)생산이 중단된다는 이론을 뒷받침하고 있다. 즉, 이온화된 DNP는 작플림 活性(uncoupling activity)이 적고 毒性도 적다는것을 證明하고 있다. Sprague<sup>6)</sup>가 主張한 바에 의하면, 非이온化 有機分子들은 보다 쉽게 細胞膜을 通過할 수 있기 때문에 더욱 毒性을 띄게 된다고 하였으며, 이러한 主張은 DNP毒性은 pH가 增加할수록

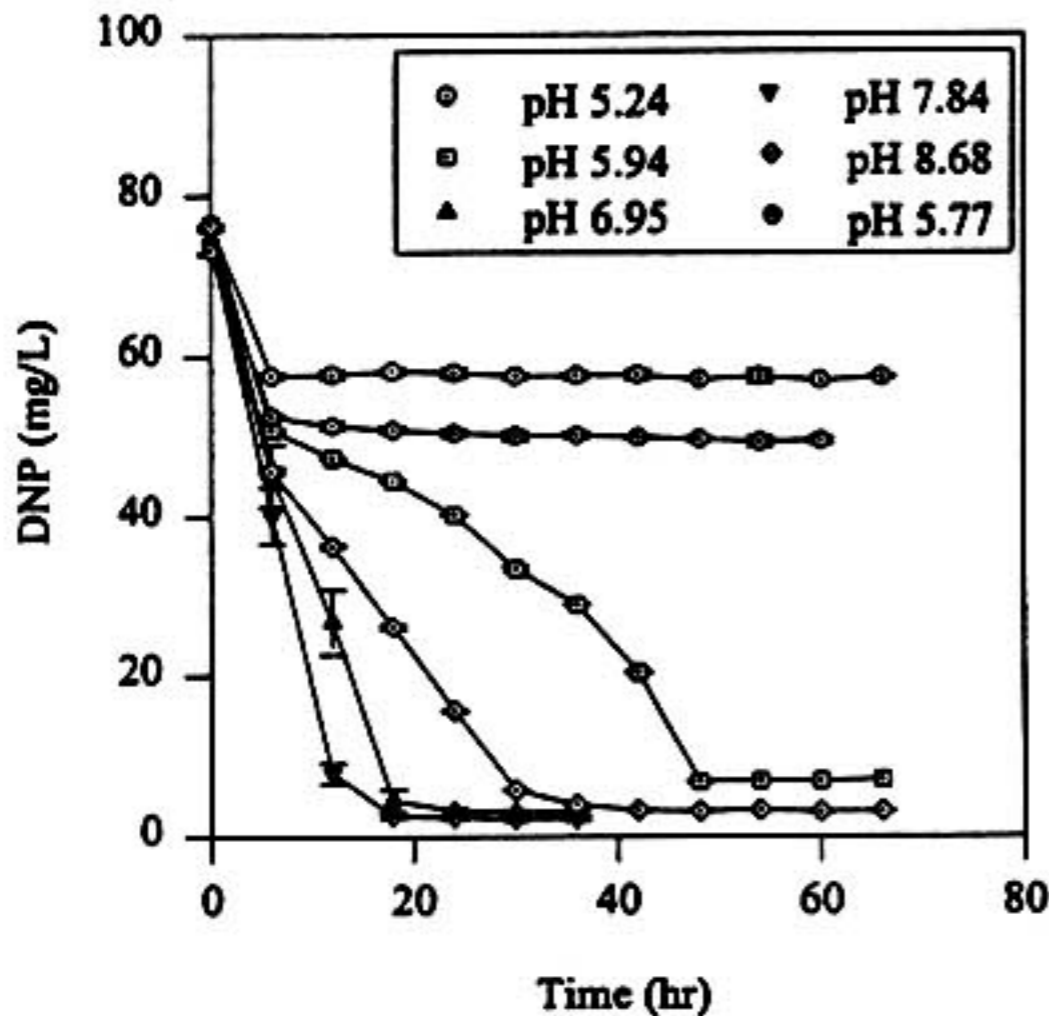


Fig. 2. 서로 다른 pH에서 활성슬러지에 의한 DNP의 분해곡선. 초기 DNP 농도는 75mg/L, MLSS 농도는 1,292mg/L 이었다. Error bars는 중복실험의 평균치로부터 구한 ± 1 standard deviation 이다.

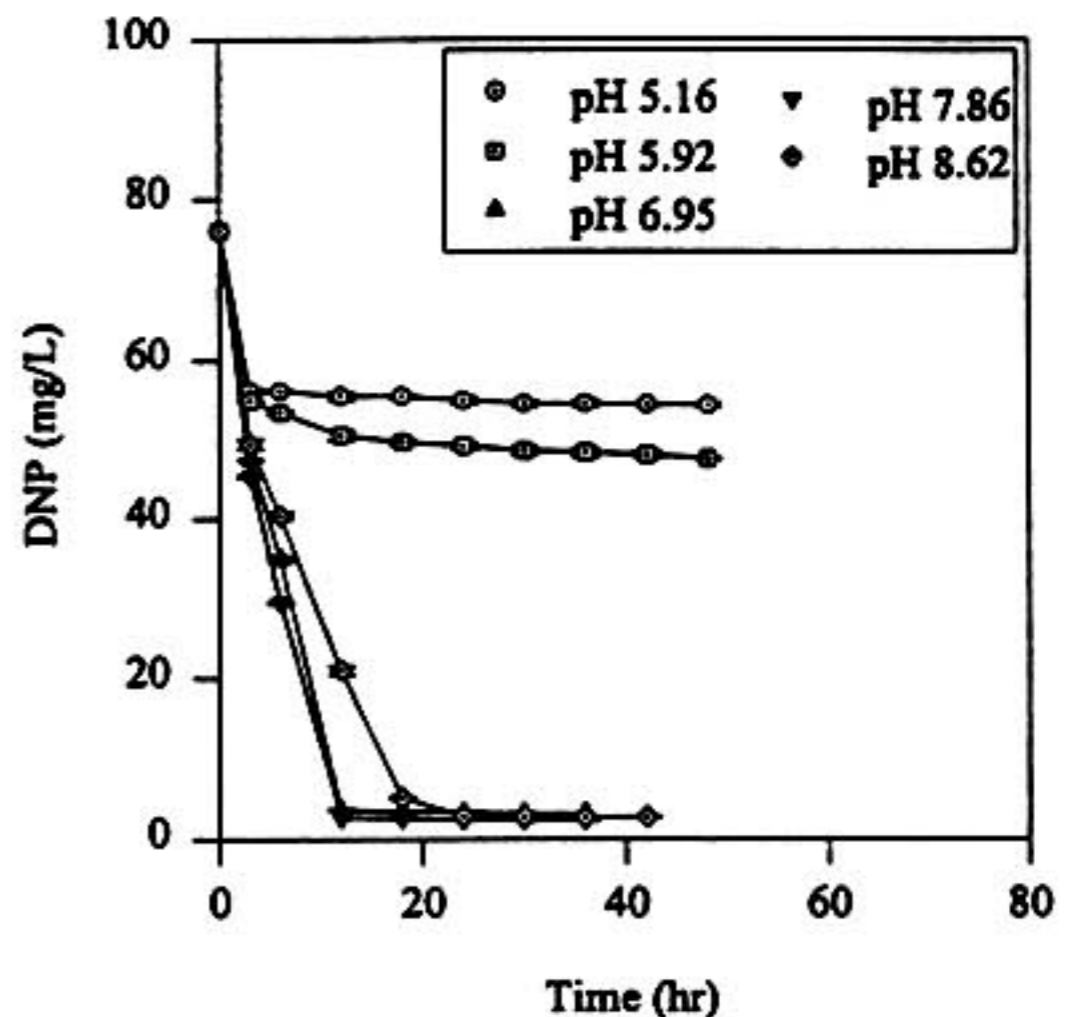


Fig. 3. Fig. 2와 유사한 조건에서 중복실험한 DNP 분해곡선. Error bars는 중복실험의 평균치로부터 구한 ± 1 standard deviation 이다.

Table 3. Fig 2와 Fig 3의 pH 6.95, pH 7.84, pH 7.86 분해곡선의 0차 반응속도상수.

Test#	pH	Rate Constant (mg-DNP/L/hr)	Maximum specific degradation rate coefficient (mg-DNP/mg-MLSS/hr)
Test 1	pH 6.95	7.57 ± 0.16	0.0058 ± 1.23E-04
(Fig.1)	pH 7.84	8.03 ± 0.04	0.0062 ± 3.09E-05
Test 2	pH 6.95	7.52 ± 0.05	0.0059 ± 3.94E-05
(Fig.2)	pH 7.86	8.94 ± 0.10	0.0070 ± 7.88E-05

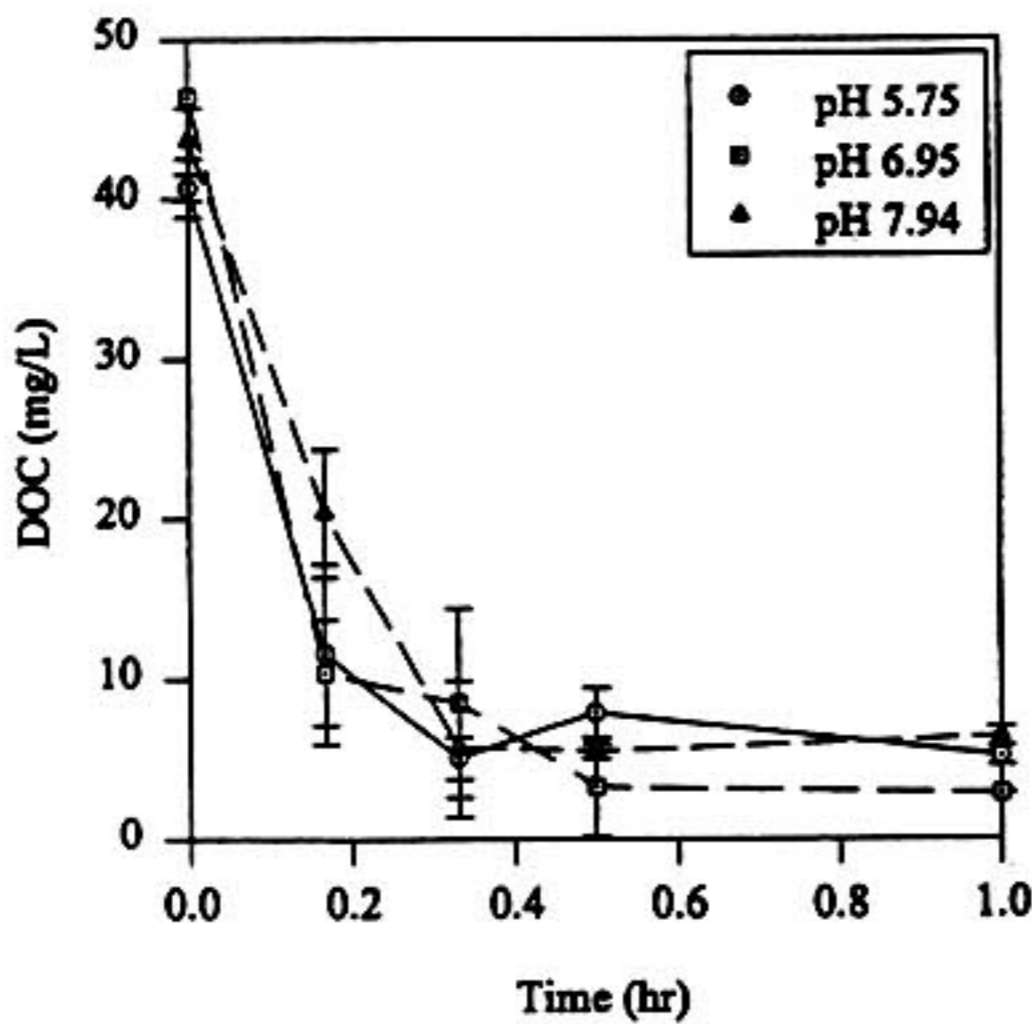


Fig. 4. 서로 다른 pH에서 대조표준(control) 활성슬러지 플라스크 반응조의 용존성 유기탄소 분해곡선. 초기 포도당 농도는 40mg/L (as DOC), MLSS농도는 1,603mg/L 이었다. Error bars는 중복실험의 평균치로부터 구한 ± 1 standard deviation 이다.

減少된다는 본 실험결과를 뒷받침하고 있다. 그러나 독성이 없는葡萄糖의 분해는 pH 변화에 따라 전혀 영향을 받지 않고 있음이 확인되었다. 즉葡萄糖을 高濃度の DNP가 含有된 廢水를 處理할때 補助炭素源으로 사용한다면 細胞成長을 助長할뿐만 아니라 微生物의 反應槽에서의 流出을 최대한 抑制할 수 있어서 이에 대한 研究가 切實히 要求된다.

### 5. 結 論

連續回分式 反應槽內에서 DNP분해에 미리

順應된 活性슬러지 微生物을 利用하여, DNP 生分解에 影響을 줄 수 있는 여러가지 環境因子中에서 pH에 대한 影響을 實驗을 통해 調查, 分析한 結果, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. DNP분해에 있어서 深刻한 沮害는 pH 5.16-5.94의 範圍에서 觀察되었고, pH 8.62-8.68의 範圍에서는 DNP 分解가 다소 느렸다. 이에대한 理由는, DNP는 pK<sub>a</sub>값이 4.09인 弱酸性 物質로서 pH가 增加함에 따라 이온화가 더욱 增大되었기 때문에 볼 수 있다.

2. pH 5.75, 6.95, 7.94에서 葡萄糖 만을 炭素/에너지 基質로 含有하고 있는 플라스크 反應槽에서의 分解는 pH의 變化에 전혀 影響을 받지 않았다.

3. 이온화 되지않은(protonated form) 페놀類는 細胞膜을 통하여 쉽게 擴散되어 細胞內에서 水素이온을 提供하게 되고 이것들은 細胞內의 過剩의 OH<sup>-</sup>와 反應하여 細胞膜內외의 水素이온 구배를 없애 결국은 酸化性 燐酸化(phosphorylation)를 방해하여 ATP (Adenosine triphosphate)生産이 中斷되는것을 實驗結果를 통하여 確認할 수 있었으며, 이온화된 DNP는 작플림 活性(uncoupling activity)이 적고 毒性도 적다는것을 確認하였다.

### 感謝의 글

本 研究는 美 國立科學財團(National Science Foundation)의 研究費 支援으로 遂行된것의 一部이며, 이에 感謝를 表示합니다.

참고문헌

1. Schwarzenbach, R.P., R. Stierli, B. Folsom, and J. Zwyer: "Compound Properties Relevant for Assessing the Environmental Partitioning of Nitrophenols", *Environ. Sci. Technol.*, Vol.22, pp.83-92, 1988.
2. Lenke, S., D.H. Pieper, C. Bruhn, and H-J. Knackmuss: "Degradation of 2,4-Dinitrophenol by Two *Rhodococcus erythropolis* Strains, HL 24-1 and HL 24-2", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.58, pp.2928-2932, 1992.
3. Hess, T.F., J. Silverstein, and S.K. Schmidt: "Effect of Glucose on 2,4-Dinitrophenol Degradation Kinetics in Sequencing Batch Reactors", *Water Environ. Res.*, Vol.65, pp.73-81, 1993.
4. Singirtsev, I.N., V.Y. Krest'yaninov, and V.I. Korzhenevich: "Biological Degradation of 2,4-Dinitrophenol", *Appl. Biochem. Microb.* 30: 204-207, 1994.
5. Mayer, F.L., Jr. and M.R. Ellersieck: "Experiences with Single-species Tests for Acute Toxic Effects in Freshwater Animals", *Ambio.*, Vol.17, pp.367-375, 1988.
6. Sprague, J.B: Factors that Modify Toxicity, p.124-163. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. G.M. Rand and S.R. Petrocelli (eds.), Hemisphere, Washington, D.C., USA. 1985.
7. Shea, P.J., J. Weber, and M.R. Overcash: "Biological Activities of 2,4-Dinitrophenol in Plant-soil Systems" *Residue Rev.*, Vol.87, pp.2-41, 1983.
8. Gundersen, K., and H.L. Jensen: "A Soil Bacterium Decomposing Organic Nitrocompounds", *Acta Agric. Scand.*, Vol.6, pp.100-114, 1956.
9. American Public Health Assoc., American Water Works Assoc., and Water Environ. Fed.: "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 19th ed., Washington, D.C., USA. 1995.