

## 폐수처리용 생물응집제를 생산하는 *Bacillus megaterium* YWO-5의 배양특성

서호찬<sup>1</sup> · 여승재 · 조홍연\* · 양한철  
고려대학교 생명공학원, <sup>1</sup>고려대학교 생명공학연구소

**Some Cultural Characteristics of *Bacillus megaterium* YWO-5 Producing Bioflocculant for Wastewater Treatment.** Seo, Ho-Chan<sup>1</sup>, Sung-Jee Yeo, Hong-Yeon Cho\*, and Han-Chul Yang. Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, <sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea - To develop bioflocculant for wastewater treatment, about 60 type culture strains and 450 strains isolated from natural sources were examined for screening their ability to flocculate the swine wastewater. Among them, YWO-5 showed the highest activity for NTU removal efficiency and was identified as *Bacillus megaterium* according to the cultural, morphological and physiological properties. The maximum production of the flocculant was achieved in culture medium containing 2% glucose, 0.05% soytone, 0.01% CaCl<sub>2</sub>, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.05% yeast extract with initial pH 6.5 when cultured with rotary shaker controlled at 20°C and 150 rpm. With jar fermentor, the maximum production was reached to NTU removal efficiency of 93% after 3 days under the optimal conditions. The bioflocculant produced by *Bacillus megaterium* YWO-5 was effective on various suspended solids and organic wastewaters.

**Key words:** *Bacillus megaterium*, bioflocculant, wastewater treatment

응집제는 산업의 발달과 함께 각종 공정에서 배출되는 폐수의 처리, 상수도의 정수, 준설업 등 광범위한 분야에 사용되고 있다[3, 15, 20, 22]. 하·폐수처리에서 주로 사용되고 있는 무기응집제는 알루미늄염인 Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>과 철(III)염인 Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>을 들 수 있으며 이들은 가격이 싸고 응결력(coagulation activity)은 높으나 분자량이 작기 때문에 응집력(flocculation activity)은 떨어지고 pH의 영향을 크게 받으며 염의 추가에 따른 처리 오니의 부피가 늘어나는 결점이 있다[19, 21]. 유기응집제는 고분자의 사슬에 전하를 갖는 이온성 물질(polyelectrolytes)로 이들 고분자 응집제에 의한 flocc. 형성은 화학적 상호작용 과 가교(bridge)에 의해 이루어진다[15, 16]. 고분자 응집제가 가지는 이온성 기들은 직접적으로 colloid 입자 표면과 결합함으로써 침강성 및 탈수성이 양호하지만 acrylamide 계 고분자 응집제들이 대부분으로 이들의 생체에 대한 독성으로 인해 유기합성응집제의 사용을 규제하고 있는 실정이다[2].

최근 자연계에서 생분해되고 독성이 없는 미생물 유래의 응집성 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 이들 생물응집제는 응집성 이외의 작물, 가축, 양식어 등에 유효한 생리 기능을 나타냄으로써 그 용도가 점차 증가할 것으로 기대된다. 현재 응집제 생산균주로는 *Nor-*

*cadia amare*[5], *Alcaligenes latus*[7], *Alcaligenes cupidus*[21], *Rhodococcus erythropolis*[8], *Corynebacterium fascians*[1], *Paecilomyces* sp.[19], *Aspergillus* sp.[14] 등이 있으며 이들이 생산하는 응집제로는 다당류를 비롯하여 단백질[4, 8, 21], peptide[5], DNA[6], lipid[8] 등이 보고되어 있다. 생물고분자에 의해 응집처리된 슬러지는 자연계에서 쉽게 분해되어 폐슬러지에 의한 2차 환경오염을 방지할 수 있고 폐슬러지를 가축의 사료 및 작물의 비료로 자원화시킬 수 있으며 실용화될 경우 수요가 큰 생물산업제품군이라는 점 등에서 주목을 받고 있다.

본 연구에서는 미생물 중 저온성 세균이 생산하는 폐수처리용 생물응집제를 개발할 목적으로 보관균주 및 자연계로부터 응집제를 생산하는 균주를 선별하고 응집제 생산을 위한 최적 배양조건 및 그 특성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주의 분리 및 선별

응집제 생산균주를 분리하기 위해 자연계로부터 분리한 450 여종과 보관균주 60 여종의 균주를 대상으로 세균용 배지인 nutrient agar 배지에 도말하여 20°C에서 배양하였다. 배양 후 생성된 colony들로부터 점성을 가지거나 표면이 볼록한 균주를 1차로 선별하고 이 선별균주를 액체배지에 접종, 20°C, 150 rpm의 조건에서 3일간 배양한 후 균체를 제거한 배양상등액을 사용하여 돈분폐

\*Corresponding author  
Tel. 82-2-3290-3410, Fax. 82-2-923-9923  
E-mail: research@kucncx.korea.ac.kr

수에 대한 응집활성으로 최종균주를 선별하였다.

**균주의 동정**

선별된 균주 YWO-5의 형태학적 관찰은 대수기 중기 까지 배양하여 얻은 세포를 주사전자현미경(JEM 100CX-II)을 사용하여 관찰하였고 생리학적 특성은 "BIOLOG SYSTEM"사 제품인 Biolog GP Microplate를 사용하여 그 결과를 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" [12]와 "Manual of Methods for General Bacteriology" [13] 등에 준하여 동정하였다.

**사용배지 및 배양조건**

응집제 생산의 최적 배양조건을 검토하기 위해 2% glucose, 0.2% peptone, 0.05% yeast, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% NaCl 및 0.01% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O로 구성된 기본배지 100 ml을 500 ml baffle flask에 넣고 초기 pH 6.5, 20 °C, 150 rpm에서 3일간 배양하였다. Fermentor 배양은 5 l의 배양조에 working volume을 2 l로 하여 상기와 동일한 환경조건에서 배양하였다.

**응집활성 측정용 대상폐수 및 화학물질**

대상폐수인 고농도 유기폐수들은 경기도 용인의 J농장에서 채취하여 80 mesh로 거른 돈분폐수, P사의 두부공업폐수, S사의 제당폐수, J사의 주정공업폐수 및 C사의 항생물질 발효공업폐수를 4 °C 이하에서 냉장보관하면서 사용하였으며 콜로이드성 화학물질인 active carbon, agar powder, cellulose powder, kaolin 및 silica gel (230 mesh)는 Wako사 제품을, CM-Cellulose와 DEAE-Cellulose는 Pharmacia사 제품을 사용하였다.

**응집활성 측정**

20 mg/l로 조제한 콜로이드성 화학물질 10 ml에 1.0% CaCl<sub>2</sub>를 100 µl 첨가하고 균체를 제거한 배양액 100 µl를 가하여 10분간 정치한 후 상등액 1 ml를 취해 550 nm에서 흡광도를 측정하고 Nakamura 방법[14]에 따라 제거율(%)을 환산하였다. 대조균은 균을 접종하지 않고 상기의 배양조건에 따라 회전진탕한 배지를 사용하였다.

$$\text{Removal efficiency (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A: Absorbance of reference sample  
B: Absorbance of reaction mixture

**대상폐수의 응집활성 측정**

고농도 유기폐수로 선정된 대상폐수 10 ml에 1.0% CaCl<sub>2</sub> 100 µl를 가하고 균체를 제거한 배양액을 동량 첨가하여 실온에서 1시간 정치한 후 Nephelometer(Turner TD-40)로 N.T.U.(nephelometer turbidity unit)값을 측

정 다음의 식에 따라 제거율(%)을 환산하였다. 대조군 실험은 앞서와 같이 수행하였다.

$$\text{NTU removal efficiency (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A: NTU of reference sample  
B: NTU of reaction mixture

**결과 및 고찰**

**응집제 생산균주의 선별**

자연계에서 분리한 450 여종과 실험실 보관균주 60 여종을 대상으로 재료 및 방법에 따라 colony들로부터 50종의 균주를 1차 선별하였다. 이 균주들을 동일 배양 조건에서 3일간 액체배양한 후 균체를 제거한 상등액의 응집능을 대상폐수인 돈분폐수(COD:22,000 g/l)에 대해 검토한 결과 YWO-5가 53%의 NTU 제거율을 나타냄에 따라 최종 균주로 선정하였다(Table 1). 각 대상균주별 돈분폐수에 대한 응집능은 유사한 경향을 나타내었으나 보관균주들보다는 자연계에서 분리한 균주들이 다소 높은 NTU 제거율을 보였으며 하수구의 토양에서 분리한 YWO 계의 균주들이 40% 이상의 높은 응집능을 나타내었다. 한편 선별균주 YWO-5의 세포내·외 응집활성세기를 조사하기 위해 원심분리하여 얻은 균체를 배양액의

**Table 1. NTU removal efficiency of culture fluids on swine wastewater**

Strains	Swine wastewater	
	NTU	NTU removal efficiency (%)
Control	284	0.0
JJ-42	186	34.5
JJ-46	182	35.9
JJ-55	208	26.7
SE-32	197	30.7
SE-51	189	33.5
SE-70	179	37.1
SE-92	191	33.0
SE-93	174	38.7
YWO-3	168	40.9
YWO-5	134	52.8
YWO-56	173	48.2
<i>Staphylococcus</i> sp.	197	20.8
<i>Streptomyces equinus</i>	222	21.9
<i>Bacillus cereus</i>	236	27.0
<i>Bacillus sphaericus</i>	266	26.3
<i>Bacillus subtilis</i>	212	25.5
<i>Bacteroides fragilis</i>	197	29.9
<i>Lactobacillus brevis</i>	242	24.9



Fig. 1. Scanning electron microscopy of selected strain YWO-5.

흡광도와 함께 신선한 배지로 현탁하여 조제한 시료, 이 현탁액을 sonication한 후 원심분리(8,000×g, 20분)한 상등액 및 배양상등액의 상대응집활성을 검토한 결과 41%, 16%, 100%를 나타냄으로써 응집물질은 세포외로 분비됨을 알 수 있었다.

**선별균주의 동정**

선별균주 YWO-5를 대수기 중기까지 배양하여 얻은 균체를 주사 전자현미경(JEM 100CX-II)으로 형태학적 특성을 관찰한 결과 폭 1.0~1.2 μm, 길이 1.5~2.5 μm의 간균이었고 gram 양성균이었다(Fig. 1). 생리학적, 생화학적 특성을 Biolog GP Microplate를 이용하여 "BIOLOG SYSTEM"으로 분석한 결과 catalase와 gelatin 반응에서 양성, indole을 생성하였으며 기타 생리학적 특성들은 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" [12]에 보고된 *Bacillus megaterium*과 유사함을 나타내었다(Table 2).

**탄소원의 영향**

선별균주 *Bacillus megaterium* YWO-5의 응집활성과 균체생육에 미치는 탄소원의 영향을 검토하기 위해 기본 배지에 탄소원 2.0% 첨가하여 20℃, 150 rpm의 조건에서 3일 배양한 후 상등액의 돈분폐수에 대한 NTU 제거율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에서와 같이 glucose가 55%의 가장 높은 응집활성을 보였으며 당류별 응집활성을 비교할 때 선별균주는 lactose, maltose, sucrose 등의 이당류에서 NTU 제거율과 균체생육이 glucose 이외의 단당류보다 다소 높은 반면 당알콜을 탄소원으로 첨가시에는 대조군보다 낮은 값을 나타내었다. 이는 mannitol의 효과를 보고한 Kurane 등의 결과[8]와 상이한 경향을 나타내었으나 *Alcaligenes cupidus*에서 glucose 및 각종 이당류에서 2.0%가 효과적이라고 보고한 Toeda 등

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of strain YWO-5

	YWO-5	<i>Bacillus megaterium</i>
<b>Morphological characteristics</b>		
Gram stain	+	+
Shape	Rod	Rod
Cell size	1.0~1.2× 1.5~2.5 μm	1.2~1.5× 2~5 μm
Motility	-	-
Spore formation	V	V
<b>Physiological characteristics</b>		
Optimum temperature	20℃	30℃
Catalase	+	+
Lysine decarboxylase	-	-
Gelatin liquefaction	+	+
Nitrate reduction	D	D
Growth at 7% NaCl	D	D
Formation of indole	-	-
<b>Acid production from</b>		
Arabinose	+	+
Fructose	V	D
Galactose	+	+
Glucose	V	+
Lactose	+	+
Mannose	V	-
Raffinose	-	-
Sucrose	-	-
Trehalose	-	-
Xylose	+	D

+: Positive, -: Negative, V: Variable, D: 11-89% of strains are positive.

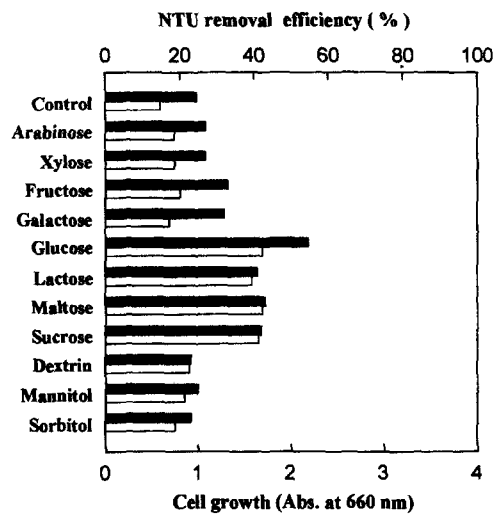
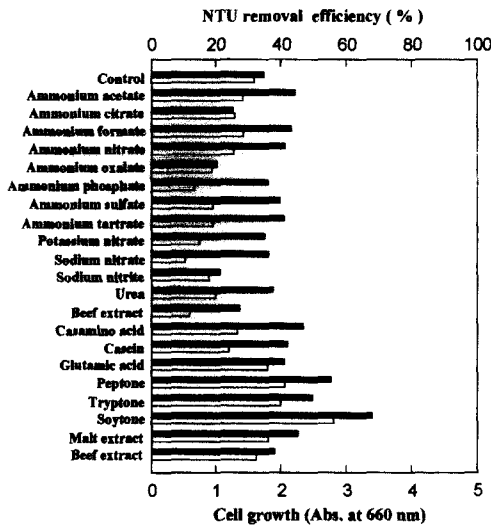


Fig. 2. Effects of carbon sources on cell growth and NTU removal efficiency of swine wastewater.

Each carbon source of 2.0% was added to the basal medium containing 0.2% peptone, 0.05% yeast extract, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% NaCl and 0.01% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O. The pH of medium was adjusted to 6.5. Cultivation was carried out with rotary shaker controlled at 20℃ and 150 rpm for 3 days. ■ : NTU removal efficiency, □ : Cell growth.

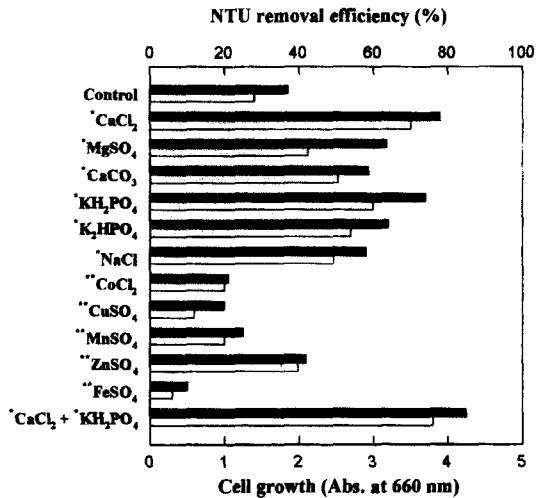


**Fig. 3. Effects of nitrogen sources on cell growth and NTU removal efficiency of swine wastewater.**  
 Each nitrogen source of 0.2% was added to the basal medium containing 2.0% glucose, 0.05% yeast extract, 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1% NaCl and 0.01%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . The pH of medium was adjusted to 6.5. Cultivation was carried out with rotary shaker controlled at 20°C and 150 rpm for 3 days. ■ : NTU removal efficiency, □ : Cell growth.

[2]의 결과와 일치하였다.

**질소원의 영향**

Glucose 20%를 탄소원으로 한 기본배지에 무기태, 유기태 질소원을 각각 0.2%을 첨가하여 응집활성과 균체 생육을 검토하였다(Fig. 3). 선별균주는 무기태보다는 유기태 질소원 첨가시 응집활성과 생육이 양호함을 나타내었으며 soytone이 peptone에 비해 약 24%의 높은 제거율을 보임으로써 본 균주를 사용한 응집제의 공업적 생산시 저렴한 질소원으로써 이용 가능함을 알 수 있었다. Kurane 등[8]은 *Rhodococcus erythropolis*에서 0.2% peptone, Takagi 등[19]은 polypeptone 0.3%가 효과적이라고 보고한 바 있으며 이는 응집물질들이 유기태 질소원에 의해 생성이 촉진되는 것으로 사료된다. 또한 질소원 및 생육인자인 yeast extract를 0~0.5% 농도의 범위에서 증가시키면서 응집제 생산에 미치는 영향을 검토한 결과 농도가 증가됨에 따라 균의 생육은 증가하는 현상을 보였으나 응집활성은 0.05% 농도에서 71%의 NTU 제거율을 나타냈다. 한편 C/N ratio가 응집물질의 세포 외 분비에 미치는 영향을 검토하기 위해 glucose 농도 1~4%에서 질소원(soytone)으로 C/N ratio를 5~40 범위로 조정하면서 배양상등액의 응집활성을 조사하였던 바 glucose 농도에 따라 응집능의 증감을 보일 뿐 각 glucose 농도별 C/N ratio의 영향은 크지 않았으며 glucose 2%, soytone 0.05% 첨가시(C/N ratio 40) 78%의 최대 응집활성을 나타내었다.



**Fig. 4. Effects of inorganic salts on cell growth and NTU removal efficiency of swine wastewater.**  
 Salts of 0.01%(\*) and 0.005%\*\* were added to the basal medium containing 2.0% glucose, 0.05% soytone and 0.05% yeast extract. The pH of medium was adjusted to 6.5. Cultivation was carried out with rotary shaker controlled at 20°C and 150 rpm for 3 days. ■ : NTU removal efficiency, □ : Cell growth.

**무기염의 영향**

응집제의 생산과 균체 생육에 미치는 무기염류와 미량 금속이온의 영향을 검토하기 위해 각각을 0.01%와 0.005%의 농도로 상기에서 검토한 최적배지에 첨가하였다. 그 결과 Fig. 4에서와 같이 본 균주는  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  및 인산염 등의 첨가시 응집활성 및 균체생육이 상승하였으나  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ 에서는 영향을 보이지 않았고  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  및  $\text{Fe}^{2+}$ 에서는 응집활성이 감소하는 경향을 나타냈다. 특히  $\text{CaCl}_2$ 는 무첨가의 경우보다 2배의 응집활성을 보였으며  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 와 혼합첨가시 2.5배의 증가를 나타냈다. 이 결과들은  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  이온이 균체 생육과 응집제 생산을 촉진하고  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  이온이 저해한다고 보고한 Takagi 등[19]의 결과와 유사하였다.

**환경인자들과 배양시간의 영향**

본 균주의 응집활성 및 균체생육과 관련된 환경인자들인 초기 pH, 배양온도, 통기교반의 영향을 상기에서 최적화한 배지를 사용하여 검토하였다. 배양 초기 pH 6.5에서 가장 높은 응집활성과 균체생육을 보였으나 pH 5.5 이하의 산성조건에서는 급격히 균체량과 응집활성이 저하되었으며 pH 8.0 부근에서는 균체량은 높은 반면 응집활성이 증가되지 않음으로써 균체생육과 응집활성 사이에는 직접적인 상관관계가 없음을 알 수 있었다. 또한 배양 최적온도를 10~30°C 범위에서 조사한 결과 30°C, 2일 배양시 최고의 균체량을 보였지만 응집활성은 60%로 미미하였고 20°C, 3일 배양시 응집활성은 83%의 최고값을 나타냄으로써 본 세균을 이용하여 폐수처리 시설을

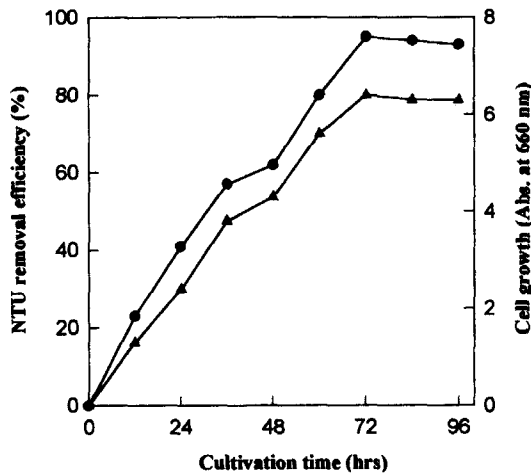


Fig. 5. Time course of *Bacillus megaterium* YWO-5 cultured in jar fermentor.

Cultivation were carried out with a 5 l jar fermentor containing 2 l medium under the optimized culture conditions. ●: NTU removal efficiency, ▲: Cell growth.

개발할 수 있는 가능성을 제시해 주었다. 한편 500 ml baffle flask에 100 ml의 배지를 넣고 교반속도를 50~200 rpm으로 달리하여 응집활성을 검토한 결과 150 rpm의 교반속도에서 50 rpm보다 약 2배 증가한 85%의 NTU 제거율을 나타내었다.

이상의 결과들로부터 확립한 응집제 생산용 최적배지에 *Bacillus megaterium* YWO-5를 inoculum size 1%(v/v), impeller speed 150 rpm, 배양온도 20℃ 및 working volume을 2 l로 한 5 l jar fermentor를 사용하여 검토한 배양시간에 따른 응집활성과 균체생육의 변화는 Fig. 5와 같다. 균체생육과 함께 NTU 제거율도 증가하여 배양 96시간에서 93%의 최대치를 보임으로써 본 균주가 생산하는 응집물질이 1차 대사산물을 알 수 있었고 균체생육의 증가가 응집제 생산에 영향을 미친다는 Kurane의 보고[9]와 일치하였다.

#### 각종 콜로이드성 물질 및 폐수에 대한 응집활성

Table 3은 *Bacillus megaterium* YWO-5가 생산하는 응집물질의 응집제로서 이용가능성을 검토하기 위해 각종 콜로이드성 화학물질과 고농도 유기폐수에 대한 응집능을 조사하였다. 최적 배양조건에서 얻은 배양 상등액을 20 mg/l로 조제한 각종 콜로이드성 물질에 100 μl, 고농도 유기폐수에 동량을 첨가하여 각각 10분과 1시간 정지한 후 NTU 제거율을 측정하고 본 균주가 생산하는 응집제는 각종 콜로이드성 물질에 넓은 spectrum을 갖는 응집활성을 나타냈으며 특히 DEAE-Cellulose, silica gel과 같이 하전을 가진 입자에 85%, 82%의 높은 제거율을 나타내었다. 이는 Takagi 등[20]의 *Paecilomyces* sp.에서

Table 3. NTU removal efficiency of flocculant produced by *Bacillus megaterium* YWO-5

Materials	Removal efficiency (%)
Active carbon	71
Agar powder	85
Cellulose powder	62
CM-Cellulose	53
DEAE-Cellulose	87
Kaolin clay	76
Silica gel	82
Sugar industry wastewater	73
Soybean curd wastewater	95
Alcohol fermentation wastewater	67
Antibiotic fermentation wastewater	51

The removal efficiency was measured by the methods as described under "Material and Methods".

생산한 응집제가 각종 micelle 물질에 효과적이었다고 보고한 결과와 유사하였다. 한편 고농도 유기폐수에 대한 제거율은 두부공업폐수가 95%로 가장 높았고 항생물질 발효공업폐수가 51%의 가장 낮은 제거율을 보였다.

#### 요 약

세균이 생산하는 폐수처리용 생물응집제를 개발하기 위해 보관균주 및 자연계로부터 분리한 약 500 여종의 균주를 대상으로 돈분폐수에 대하여 응집활성을 검색하고 우수균주 YWO-5를 선별하였다. 선별된 균주는 *Bacillus megaterium*로 동정되었으며 응집제 생산을 위한 최적 배양조건은 2% glucose, 0.05% soytone, 0.01% CaCl<sub>2</sub>, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% yeast extract, 초기 pH 6.5, 배양온도 20℃ 및 교반속도 150 rpm이었다. 상기의 최적 배양조건에서 jar fermentor로 96시간 배양하였을 때 배양상등액은 돈분폐수에 대하여 93%의 높은 NTU 제거율을 나타내었다. 이 응집물질은 DEAE-Cellulose 87%, agar powder 85%, silica gel 82%, 제당폐수 73%, 두부공업폐수 95%, 주정공업폐수 68% 및 항생물질 발효공업폐수 51%의 제거율을 각각 나타냄으로써 응집제로서의 이용 가능성을 보여 주었다.

#### 감사의 글

본 연구는 농진청 농업특정연구개발사업의 연구비에 의해 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

#### REFERENCES

- Akinori, K. 1971. Floc-forming bacteria isolated from activated sludge. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 17: 439-442.

2. Bough, W. A. 1975. Reduction of suspended solids in vegetable canning waste effluents by coagulation with chitosan. *J. Food Sci.* **40**: 297-2
3. Gasner, L. L. and D. I. C. Wang. 1970. Microbial cell recovery enhancement through flocculation. *Biotech. Bioeng.* **12**: 873-887.
4. Jochen, B. and M. Nava. 1988. Cell adsorption control by culture conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 119-127.
5. Junichi, K. and T. Minoru. 1991. Synergistic flocculation of the bioflocculant fix extracellularly produced by *Norcadia amarae*. *J. Gen. Appl. microbiol.* **37**: 447-452.
6. Kazuo, S. and T. Hajime. 1981. DNA as a flocculation factor in *Pseudomonas sp.* *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2869-2877.
7. Kurane, R. and Y. Nohata. 1991. Microbial flocculation of waste liquids and oil emulsion by a bioflocculant from *Alcaligenes latus*. *Agr. Biol. Chem.* **55**: 1127-1129.
8. Kurane, R., K. Takeda, and T. Suzuki. 1986. Culture conditions for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*. *Agr. Biol. Chem.* **50**: 2309-2313.
9. Kurane, R. 1994. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohol. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 428-431.
10. Kurane, R. 1986. Localization of a bio-polymer produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Agr. Biol. Chem.* **55**: 2665-2670.
11. Kurane, R. 1994. Purification and characterization of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 1977-1987.
12. Locci, R. 1989. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Vol. 4. Williams Wilkins, London.
13. Murray, R. G. E. 1981. *Manual of Methods for General Microbiology*, **26**: 101-110. American society of microbiology(ed.). Washington.
14. Nakamura, J., S. Miyashiro, and Y. Hirose. 1976. Screening, isolation and some properties of microbial cell flocculants. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 377-383.
15. O'Melia, C. R. 1972. Coagulation and flocculation, pp. 1-77. In W. W. Weber(ed.), *Physicochemical Processes for Water Quality Control*. New York.
16. Osmond, D. W. J., B. Vincent, and F. A. Waite. 1973. The van der Waals attraction between colloid particles having adsorbed layers. *J. Colloid Interface Sci.* **42**: 262-269.
17. Parker, N. D. and C. B. Munn. 1984. Increased cell surface hydrophobicity associated with possession of an additional surface protein by *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiology Letter* **21**: 233-241.
18. Pullen, R. G. L. 1990. Gallium-67 as a potential marker for aluminium transport in rat brain: Implications for Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **55**: 251-256.
19. Takagi, H. and K. Kadowaki. 1985. Flocculant production by *Paccilomyces sp.*: Taxonomic studies and culture conditions for production. *Agr. Bio. Chem.* **49**: 3151-3157.
20. Tago, Y. and K. Aida. 1977. Exocellular mucopolysaccharide closely related to bacterial floc formation. *Appl. Environ. Microbio.* **34**: 3.
21. Toeda, K. and R. Kurane. 1991. A protein bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Agr. Biol. Chem.* **55**: 2663-2668.
22. Unz, R. F. and S. R. Farrah. 1976. Exopolymer production and flocculation by *Zoogloea* MP6. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 623-626.
23. Toeda, K. and R. Kurane. 1991. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201. *Agr. Biol. Chem.* **55**: 2793-2799.
24. Vincent, B., B. H. Bijsterborsch, and J. Lyklema. 1971. Competitive adsorption of ions and neutral molecules in the stern layer on silver iodide and its effect on colloid stability. *J. Colloid Interface Sci.* **37**: 171-178.
25. Yi, D. H. and D. S. Ham. 1995. Characterization of a cell aggregation factor from *Aspergillus sp.* LAM 94-142. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**(5): 506-508.
26. Yoon and T. H. Lee. 1996. Bioflocculant produced by *Aspergillus sp.* JS-42. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**(2): 325-328.
27. Yoshitaka, T. 1977. Exocellular mucopolysaccharide closely related to bacterial floc. formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **30**: 82-90.

(Received September 27, 1999)