

호기적 제지폐수 처리과정중의 분산 혐기성 미생물의 영향

박종현* · 김선영 · 한완택¹
경원대학교 식품생물공학과, ¹한솔기술원

Influence of Dispersed and Anaerobic Bacteria in Aerobic Paper-making Wastewater Treatment. Park, Jong-Hyun*, Sun Young Kim, and Ohantaek Han¹. Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Songnam 461-701, Korea, ¹Hansol Institute of Science and Technology Sudong-myun, Namyangju-Si, Kyunggi-Do 472-850, Korea – In order to be helpful to control dispersed microorganisms for stabilization of wastewater treatment in a paper-making process, dominant strains were isolated aerobically and anaerobically, and identified and physiological characteristics were also analyzed. *Pseudomonas carboxydohydrogena*, *Cardiobacterium hominis*, *Micrococcus lylae*, *Xantomonas campestris* pv *juglandis*, *Micrococcus diversus*, and *Comamonas terrigena* as aerobic dominants, and *Streptococcus bovis* and *Prevotella buccae* as anaerobic dominants were identified from the supernatant of the primary settling tank. It seemed that microflora in the treatment process would consist of many kinds of microorganisms, whose dominant would change easily according to environmental conditions. They all grew well at 37°C and at different initial medium pH's. Especially, some of them required sulfate ion for their growth, which came from a chemical coagulant of aluminium sulfate in the primary settling tank. Interestingly, many anaerobes grew well even in the aerobic wastewater treatment process and seemed to have some functions. Population of anaerobes increased three times in the supernatant of primary settling tank and ten times in the bottom sludge of primary settling tank than in the prime wastewater. Therefore, these anaerobes contributed to the production of offensive gases, which would make some microorganisms not precipitate and be buoyant.

Key words: paper-making wastewater, aerobic treatment, dispersed microorganism, anaerobe

제지를 만드는 펄프제지공장에서는 많은 물과 목재섬유소가 폐기물[6]로 발생되고 이로 말미암은 많은 미생물의 발생으로 환경에 커다란 문제를 유발시키고 있다. 이러한 산업폐기물들에 의한 환경오염이 심해짐에 따라 인간생활환경이 급격히 나빠져서 각종 규제가 강화되기 시작했으며 공장에서의 폐수정화에 많은 경비가 추가로 발생하게 되었다.

펄프제지공장에서 배출되는 이러한 폐수의 오염물질을 제거하고자 물리적, 화학적, 생물학적인 처리방법이 활용되어 왔고 생물학적 방법은 박테리아를 이용한 현탁중식처리 공정인 활성슬러지(activated sludge)가 주종을 이루어 왔다. 이러한 유기성 폐수의 생물학적인 처리는 다른 폐수처리 방법보다 매우 효과적이며 경제적인 것으로 알려져 있으나 생물반응이 화학반응보다 느리기 때문에 큰 시설규모가 요구된다. 따라서 가능한 빨리 폐수를 처리하기 위하여 국내의 제지회사들이 물리화학적 처리 이후에 실시하고 있는 생물학적 처리방법은 폭기등에 의한 호기적인 처리공정을 주로 채택하고 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 제지공정의 폐수는 생물학적으로 처리가 어려운 lignin, hemi-

cellulose, cellulose등으로 이루어져 있고 생산공정마다 폐수의 성분이 다른 특징[11]을 가지고 있다. 그러나 제지 폐수 처리 주변환경이나 폐수 조성의 변화등에 따라 이들의 변화가 많이 이루어져서 침전되지 않고 부유하는 분산성 미생물들이 많아지는 등 처리현장에서 문제점[5]이 종종 발생되고 있다. 또한 작업현장에서 대기환경보전법상의 악취(offensive odor)[12]로 분류되는 황화수소, 메르캡탄류, 아민류등이 발생하여 사람의 후각을 자극하여 불쾌감과 혐오감을 주어 생활환경을 깨뜨릴 수가 있다. 그런데 이러한 폐수와 관련된 연구는 비교적 많이 이루어지지 않아서 폐수처리 현장에서 발생하는 문제들의 해결에 어려움이 더욱 가중되고 있다. 특히 폐수처리후에 발생되어 폐수처리 효율을 떨어뜨리는 분산성 부유미생물과 악취발생 일부 미생물들은 자연계에서 서로 공생등의 관계를 유지하면서 생육하고 있는 것으로 알려져 있다. 아직까지 이들을 순수분리 배양하는 방법의 개발이 이루어지지 않아 폐수에서 문제를 유발시키는 미생물에 대한 생리생태학적인 연구는 거의 찾아볼 수가 없다.

이에 따라 본 연구는 펄프제지공장에서 배출되는 폐수내의 오염도를 파악하고 오염미생물의 특성을 연구하여 폐수내의 분산성미생물 및 악취를 개선하는 한 모델시스템 개발을 위한 기초연구를 수행하고자 하였다.

*Corresponding author
Tel. 0342-750-5523, Fax. 0342-750-5273
E-mail: p5062@mail.kyungwon.ac.kr

재료 및 방법

폐수내의 균 분리에 적합한 배지를 선별하고자 폐수를 희석하여 plate count agar(Difco), brain heart infusion (Difco), nutrient agar(Difco)에 각각 도말한 후 40°C에서 48시간 배양하여 총균수를 계수하였다. 또한 위의 배지중 BHI를 기본으로 한 후 sodium acetate, glucose, 산화전분을 각각 1% 첨가하여 배양하였고 미지의 생육성분원으로 폐수액을 제균하여 20-50% 첨가하여 균을 배양하였다. 제지폐수 시료는 대전소재 H제지 폐수처리장의 각 공정 단계(Fig. 1)에서 발생하는 폐수를 시료로 하여 호기적 조건과 혐기적 조건(anaerobic jar, Difco)으로 40°C에서 48시간 배양하여 단일 균총을 계수하였다. 분리된 단일균주를 Biolog System(BiOLOG MicroLog™ 2, Biolog Inc., Hayward, CA, USA) [13] 을 이용하여 시간별(4시간 경과 후, 24시간 경과 후) 95개의 당 이용성을 통한 균동정을 실시하였다. 각각의 균주를 Biolog 동정용 배지인 BUG 배지를 멸균한 후 40~50°C로 조정하여 blood를 5% 첨가하여 제조하였다. BUG배지에서 생육한 균체를 일정 농도로 현탁하여 각기 다른 95개의 당원이 들어있는 microplate에 접종하여 37°C에서 배양한 후 4시간, 24시간 후 당이용성을 통한 균동정을 실시하였다. 3차에 걸쳐서 분리하였고 분리균은 광학 현미경(LABOPHOT-2, Nikon, JAPAN)으로 관찰 후 현상(CCD color camera, TOSHIBA, JAPAN)하였다.

폐수에서 분리한 각각의 균주를 배양조건과 영양원등의 환경인자 변화에 따른 미생물 종류 및 개체수의 변화를 측정하였다. 분리균의 각 온도에서의 생장은 균주를 전배양 후 배지에 각 2% 접종 후 25°C, 30°C, 37°C, 42°C에서 24시간 배양후 흡광도로 측정하였다. pH 변화에 의한 균주의 생장은 균주를 전배양 후 BHI배지 pH를 6.0, 6.5, 7.0,

7.5로 조정하여 37°C에서 24시간 배양후 흡광도로 측정하였다. 분리균의 생리실험중 $MgSO_4$, $NaNO_2$, $NaNO_3$ 의 농도를 달리한 균주의 생장은 BHI배지에 $MgSO_4$, $NaNO_2$, $NaNO_3$ 의 농도를 각 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% 첨가하여 전배양한 균주를 2%접종 후 37°C에서 24시간 배양후 흡광도를 측정하였다. 배지를 달리했을 때 폐수 분리균의 $MgSO_4$ 첨가 영향은 기본 배지를 nutrient broth, PCA 로 하여 $MgSO_4$ 의 농도를 각 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% 첨가한 후 전배양한 균주를 2%접종 후 37°C에서 24시간 배양후 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

제지폐수원액을 희석하여 plate count agar(PCA), brain heart infusion(BHI), nutrient agar(NA)에 각각 도말한 후 40°C에서 48시간 호기적 조건과 혐기적 조건에서 배양하였다. BHI에 도말한 균이 colony의 모양도 뚜렷하고 다른 배지에서 생육한 것보다 균수도 많았는데 특히 혐기성균의 경우는 NA보다 많은 균을 검출할 수가 있었다(결과 미제시). 그러나 선발균을 연속계대 배양할 때 생육이 저하되어 헛수를 거듭하면 최종적으로는 균주가 사멸하여 더 이상 배양을 할 수 없는 균도 발견되었다. 그러나 이러한 현상을 개선하기 위하여 BHI를 기본으로 한 후 탄소원을 강화시켜 sodium acetate, glucose, 산화전분을 각각 1% 첨가하여 배양하였을 때에도 균의 생육 개선에 기여하지 못했고 또한 미량 영양원을 위하여 폐수원액을 배지로 사용할 때에도 비슷한 현상을 보여 주었다. 따라서 그러한 균에 대한 동정등의 연구는 계속할 수가 없었고 이러한 현상은 *Achromatium oxaliferum*[4]등과 같은 폐수 환경미생물의 순수배양의 어려움으로 인한 연구가 진행되지 못하는 것과 같았다.

한달 간격으로 3차에 걸쳐 폐수 1차처리수 상등액에서 미생물을 분리하여 우점종 미생물을 동정하였다. 1차로 폐수에서 분리된 균을 분리 동정한 결과 호기성균은 최고 우점종 균수가 10^7 CFU/ml이었으며, 혐기성균은 10^4 CFU/ml의 균수를 보여 주었다. 동정을 위한 배지에서 혐기성균은 생육을 하지 못해 동정을 하지 못했으나 호기균은 제일 우점종이 *Pseudomonas carboxydohydrogena*로 동정되었고 그 다음으로는 *Rhococcus australis*가 10^6 CFU/ml, *Sphingobacterium multivorum*은 10^5 CFU/ml으로 존재하였으나 이들은 Biolog동정 신뢰도가 아주 낮았다. 2차로 다시 폐수에서 주요 균을 분리, 동정한 결과 1차의 분리동정균과는 다른 형태를 보여 주고 있었는데 최우점종인 혐기성균 및 호기성균 모두 10^7 CFU/ml의 수를 보여 주었다. 이때에도 신뢰도가 Biolog System의 data base에서의 24시간 배양시의 신뢰도가 50%이하로 아주 낮아 이들 우점종 균을 동정할 수가 없었다. 3차로 폐수중의 우점종 균의 분리동정

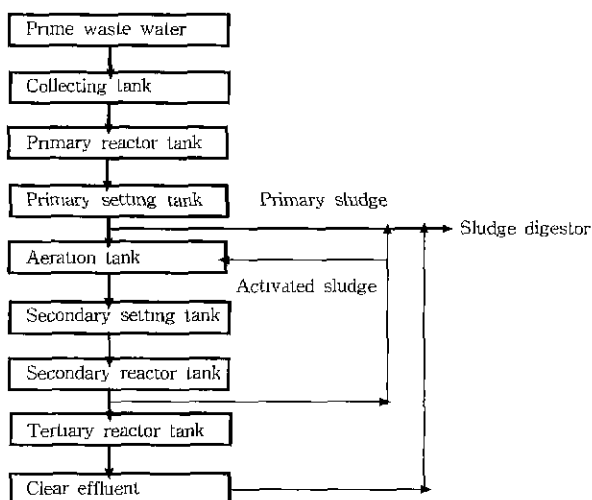


Fig. 1. Process of aerobic paper-making wastewater treatment including physicochemical treatment.

결과는 호기성균, 혐기성균 공히 10^5 - 10^6 CFU/ml의 균수를 보여 주었다. 2차페와는 달리 통성혐기성균(facultative anaerobe)가 비교적 적게 나왔으며 아주 다양한 균종을 관찰할 수가 있었다. 혐기성 균으로는 *Streptococcus bovis*, *Prevotella buccae*, 그리고 호기성 균으로는 *Cardiobacterim hominis*, *Micrococcus lylae*, *Xantomonas campestris pv juglandis*, *Micrococcus diversus*, *Comamonas terrigena*균들이 주요한 균으로 동정되었다(Table 1). 이들 미생물은 제지공장내의 공정 중에서 slime을 형성한다고 알려진 *Pseudomonas spp.*, *Flavobacterium spp.*과는 일치하지 않았다[9]. 이들 우점종의 균을 폐수원액이 첨가된 BHI에서 배양한 후의 일부 균의 현미경사진은 Fig. 2에서와 같다. 호기성 균주인 *Micrococcus lylae*, *Xantomonas campestris pv juglandis*와 혐기성 균주인 *Streptococcus bovis*, *Prevotella buccae* 균주는 균체가 서로 떨어져 있는 분산성을 보이고 있으며 일부 균주는 약간 균체끼리 엉겨져 있는 것을 알 수가 있었다. 그러나 이들 분산성 균주는 대표적인 호기성 폐수처리에서 관찰되는 *Zoogloea ramigera*[1]와 같이 polysaccharide slime에 의한 균체의 floc을 형성하는 것을 관찰할 수가 없었다. 따라서 이들 분산성의 미생물의 침전을 유도하기 위해서는 floc를 형성할 수 있는 배양조건에 대한 연구[8]와 *Zoogloea ramigera*등을 외부에서 별도로 첨가하는 것도 가능하리라 사료된다. 이렇게 3차에 걸쳐서 각기 다른 공정의 폐수에서의 우점종을 분석한 결과 서로 같은 균종을 검출할 수가 없었다. 따라서 이러한 폐수처리장내에 존재하는 미생물은 아주 다양하게 존재하고 제지공정의 변화에 따라 유입되는 폐수성분과 외부환경의 변화에 따라 우점종이 변화하는 것을 알 수가 있었다[10].

폐수에서 분리한 *Micrococcus lylae*, *Xantomonas campestris*, *Micrococcus diversus*, *Comamonas terrigena*균주를 여러 생육온도, pH, 영양요구성등에 대하여 달리한 조건에서 배양하여 여러 환경인자에 따른 변화를 측정하였다(결과 미제시). 폐수중 주요 균의 생육최적온도는 다같이 37°C에서 가장 좋은 생육을 보여 주었으며 42°C보다 30°C에서

그 다음으로 생육이 잘 이루어짐을 알았다. 배양 초기의 pH는 균에 따라 다르게 나타났는데 *Xantomonas campestris*, *Comamonas terrigena*는 약산성에서 약알칼리까지 큰 차이를 보여 주지 않았으나 같은 *Micrococcus*속의 2균주는 다른 양상을 보여 주었다. 흥미롭게도 *Micrococcus lylae*은 오히려 약산성에서 생육이 우수하게 나타났고 *Micrococcus diversus*은 정반대의 생육 경향을 보여 주었다. 따라서 균주에 따라 생육 최적pH는 차이가 있음을 알았다

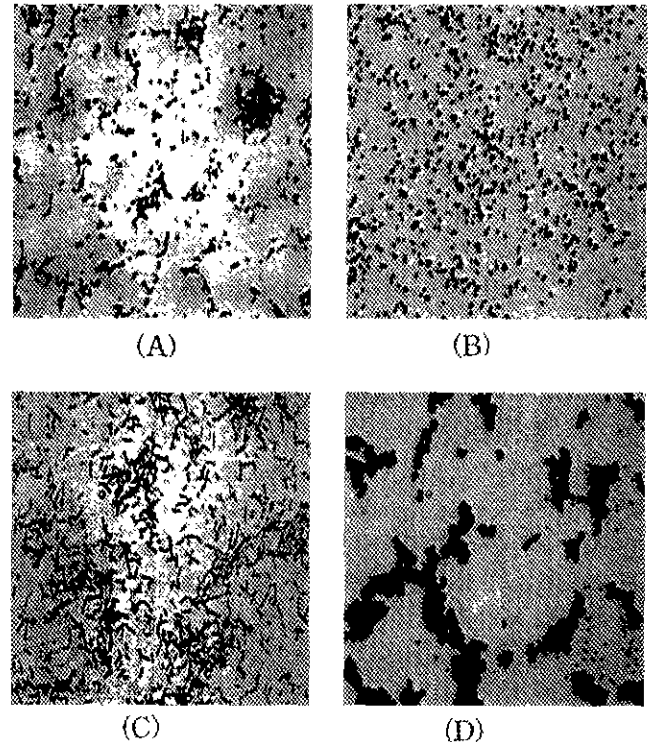


Fig. 2. Microphotograph of the dominant bacteria isolated from the primary settling tank of aerobic paper-making wastewater treatment. (1000 × magnification)

(A) *Streptococcus bovis*, (B) *Prevotella buccae*, (C) *Xantomonas campestris pv juglandis*, (D) *Micrococcus lylae*

Table 1. Isolation and identification of major dispersed bacteria from primary settling tank of aerobic paper-making wastewater treatment.

Strains	Viable Count (CFU/ml)	Facultative Growth*	Gram Staining	Identification
Anaerobe	1	2.0×10^6	-	<i>Streptococcus bovis</i>
	2	2.1×10^6	-	<i>Prevotella buccae</i>
Aerobe	1	1.1×10^6	-	<i>Cardiobacterim hominis</i>
	2	3.0×10^5	-	<i>Micrococcus lylae</i>
	3	3.0×10^6	-	<i>Xantomonas campestris pv juglandis</i>
	4	2.1×10^6	+	<i>Micrococcus diversus</i>
	5	3.7×10^7	+	<i>Pseudomonas carboxydohydrogena</i>
	6	5.0×10^5	-	<i>Comamonas terrigena</i>

*Facultative growth indicates growth of anaerobes at aerobic condition and growth of anaerobes at anaerobic condition, respectively. - : No growth, + : growth

. 또한 nitrite와 nitrate의 이용요구성에 대하여는 4군주 모두 요구하지 않는 것으로 나타났으나 sulfate에 대하여는 다른 경향을 보여 주었다. *Microoccus diversus*, *Comamonas terrigena*는 다른 균과는 다르게 sulfate를 이용하고 있음을 알 수 있었고 기본배지를 다르게 하여도 유사한 경향을 보여 주었다. 이는 1차 폐수처리시에 첨가되는 화학용집제인 aluminium sulfate로부터 유발되는 sulfate염의 존재에 의하여 적용된 것인 것으로 보인다.

폐수의 처리공정별 처리수 상등액을 시료로 하여 우점종의 미생물을 분석하고자 호기적 및 혐기적 배양조건에서의 생균수를 측정하였다. Fig. 3에서와 같이 1차 처리 상등수가 원폐수에 비하여 호기성 및 혐기성 미생물 개체수의 증가를 보이고 있고 특히 호기성 균의 증가보다는 혐기성 미생물의 증가가 많이 이루어져서 약 3배나 더 많은 균수 증가를 보이고 있었다.

슬러지 탈수액은 1차 침전조에서 침전된 슬러지를 압착하여 탈수시킨 후 발생한 여과액이며 여기에서의 미생물은 1차 침전조 상등액과는 다르게 호기성 균들 보다 혐기성 미생물이 더 많이 있고 원폐수의 혐기성 균수보다 10배가 더 존재함을 알 수가 있었다. 이는 간접적으로 1차 침전조의 하부에는 혐기화 진행정도가 매우 심각함을 나타내고 있다.

따라서 화학적인 처리단계인 1차 침전조의 긴 체류시간(5-10시간)에 의하여 혐기성미생물의 증식[7]이 촉진됨에 따라 침전된 유기물로부터 황화수소, methyl mercaptan, methyl sulfide, methyl disulfide등의 악취[3,8]와 이산화탄소등의 가스를 형성하고, 생성된 가스는 침전조 하부로부터 상부로 부상하면서 미생물의 침전성을 악화시켜 1차 처리

수의 분산성 미생물 개체수를 증가시키는 요인으로 작용하는 것으로 판단된다. 이러한 이유로 1차 침전조의 처리단계가 폐수의 처리 효율을 떨어뜨리는 분산성 미생물이 많이 발생되고 작업환경을 열악하게 하는 악취 발생의 한 원인인 것으로 보인다.

순산소폭기조에 의하여 처리된 2차 처리수는 전체적인 균수가 원폐수, 1차처리수보다 낮아 이 단계에서 많은 균체가 침전함을 알 수가 있었다. 이때 호기성균의 우점화에 의하여 1차 처리수에 비하여 혐기성균이 상대적으로 낮은 비율을 나타내 원폐수의 혐기성균수와 비슷한 수준을 보여주고 있었다.

요 약

제지폐수 처리장에는 공정내에서 순환하는 분산성 미생물이 존재하는데 환경조건에 따라 이상증식 현상이 일어나 처리수질의 악화와 악취가 발생하는 현상이 발견되었다. 본 연구에서는 이러한 문제를 일으키는 분산성 미생물을 파악한 후 우점종 분산성 미생물을 분리동정하고 각 폐수처리 공정중에서 호기 및 혐기적 미생물의 생태분석 및 그 생육특성을 조사하여 이를 토대로 안정적인 폐수처리를 위한 미생물관리 모델시스템 개발의 기초적인 연구를 수행하였다.

제지폐수내 1차 처리수중 주요 우점종 분산성균들의 분리동정 결과 호기성균으로 *Pseudomonas carboxydohydrogena*, *Cardiobacterium hominis*, *Micrococcus lylae*, *Xantomonas campestris* pv *juglandis*, *Micrococcus diversus*, *Comamonas terrigena*, 혐기성균으로는 *Streptococcus bovis*, *Prevotella buccae*등의 균이 동정되었다. 3회의 분석때마다 서로 다른 우점종균들이 분리되었고 호기적 균이 혐기성 균보다 더 많은 종류가 검출되었다. 이 중 주요 균의 생리특성을 관찰한 결과 온도는 37°C에서 생육이 가장 우수하였고, 적정 pH는 균종에 따라 다르게 나타났으며 특히 1차 폐수처리시에 첨가되는 aluminium sulfate에 의한 sulfate의 요구 균주가 많았다. 따라서 제지 폐수내의 분산성 미생물은 매우 다양한 균들로 이루어져 있으며 외부의 환경변화에 의하여 microflora가 변하고 있음을 확인할 수가 있었다. 그리고 이들 호기적처리 공정중에서도 많은 혐기성 미생물이 생육하고 있으며 이들이 폐수처리에 많은 역할을 하고 있는 것으로 나타났다. 특히 1차 침전조에서의 긴 체류시간에 의하여 상등액에서 원폐수보다 호기성미생물보다 혐기성미생물의 생육이 3배나 많이 이루어졌고 1차침전조 하부 슬러지액에서는 혐기성균이 10배나 많이 존재하였다. 따라서 혐기성균이 침전된 유기물로부터 황화수소가스과 이산화탄소등의 가스를 발생시키고 이 가스가 하부에서 상부로 부상하면서 미생물의 침전성을 악화하여 분산성미생물을 증가시켜 폐수 처리효율을 떨어뜨리며 아울러 심한 악취까지 발생시킬 것으로 사료된다.

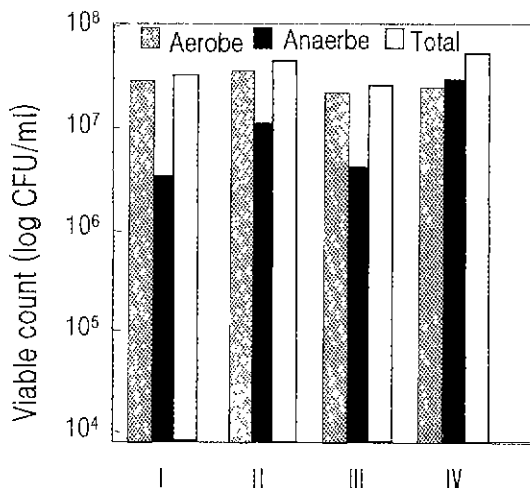


Fig. 3. Viable count of aerobic and anaerobic microorganism during the process of aerobic paper-making wastewater treatment.

Sampling was conducted from I; prime wastewater, II; primary settling tank, III; secondary setting tank, and IV; primary sludge filtrate

REFERENCES

1. Ahn, D. H., Y. C. Chung, Y. J. Yoo, D. W. Pak, and W. S. Chang. 1996. Improved treatment of tannery wastewater using *Zoogloea ramigera* and its extracellular polymer in an activated sludge process. *Biotech. Lett.* **18**: 917–922.
2. Beyenal, H. and A. Tanyolac. 1997. A combined growth model of including multisubstrate, pH, and agitation effects. *Enz. Microbiol. Technol.* **21**: 74–78.
3. Davai, L. and R. D. Delaune. 1999. Emission of reduced malodorous sulfur gases from wastewater treatmentwater plants. *Water Environment Research* **71**: 203–208.
4. Glocker, F. O., H. D. Babenzien, and R. Amann. 1999. Phylogeny and diversity of *Achromatum oxaliferum*. *System. Appl. Microbiol.* **22**: 28–38.
5. Kang, C. H., H. A. Lim, I. S. Jeong, and K. Sakai. 1996. Studies on the treatment of pulp and paper mill wastewater by white-rot fungi. *J. Korea Tappi* **28**: 31–39.
6. Kang, C. H. and H. K. On. 1995. Studies on the treatment of paper mill wastewater by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Korea Tappi* **27**: 24–34.
7. Kim, Y. S., B. H. Shon, S. W. Cho, and J. H. Jung. 1998. Reduction of the offensive odor from confectionery wastewater plant. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* **24**: 62–69.
8. Lens, P. N. L., A. Visser, A. J. H. Janssen, L. W. H. Pol, and G. Lettinga. 1998. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewater. *Critical Reviews in Environmental and Technology* **28**: 41–88.
9. Oh, J. S., B. M. Jo, and E. H. Kim. 1997. Isolation and identification of the origins causing the slime found in pulp and paper making process. *Mokchae Konghak* **26**: 50–57.
10. Park, J. A., J. M. Hur, and B. K. Jang. 1998. The anaerobic biodegradability and methanogenic toxicity of pulping wastewaters. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* **24**: 70–79.
11. Park, S. W. 1982. Settling behavior of paper-mill wastewater. *MS thesis, Inha University.*
12. Robert, M. B. 1973. Odor controls for rendering plants. *Env. Sci. Technol.* **7**: 504–510.
13. Yun, N., I. J. Lee, and Y. N. Lee. 1992. Physicochemical characters of ultra violet ray resistant *Demococcus* sp. isolated from air dust. *Korean. J. Microbiol.* **30**: 483–487.

(Received October 6, 1999)