

반응성 염료폐수 처리를 위한 *Comamonas* sp. AEBL-85 분리 및 회분식 탈색

이 은 열*

경성대학교 공과대학 식품공학과

Received July 1, 2004 / Accepted July 23, 2004

Batch Decolorization of Reactive Dye Waste Water by a Newly Isolated *Comamonas* sp. AEBL-85.
Eun Yeol Lee*. *Department of Food Science and Technology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea*
- *Comamonas* sp. AEBL-85 was isolated from microbial granules in an activated sludge process of long-term operated for the treatment of reactive azo dye, and characterized its capability to decolorize Reactive Black 5. The effects of adding carbon source and nitrogen source on the extent of decolorization were analyzed to develop an optimal medium. The optimum initial pH and temperature were 6.0 and 35°C, respectively. Reactive Black 5 of 50 mg/l was readily decolorized up to 95% within 40 hr by *Comamonas* sp. AEBL-85.

Key words – azo dye, *Comamonas* sp. AEBL-85, microbial decolorization, Reactive Black 5

Mauevin이 1856년 인공염료를 처음으로 합성하여 사용한 이후로 섬유 가공 산업이 발전됨에 따라 약 100,000 종류 이상의 염료가 개발되어 사용되고 있으며, 전세계적으로 연간 7×10^5 톤이 제조되어 사용되고 있다[2,14]. 섬유 염색 공정에서 사용한 합성 염료의 약 10-15% 정도가 직접 염색 폐수로 배출되며, 특정 반응성 염료의 경우 50% 수준까지도 유실되고 있다. 이들 폐수에 포함되어 있는 합성 염료는 활성슬러지를 이용해 처리를 하고 있으나, 염료의 난분해성으로 인하여 처리효율이 높지 않아 환경 오염 문제를 유발하고 있다[4,7]. 국내의 경우 염료 폐수 배출업체는 총 폐수 배출업체의 약 4% 수준인 약 1,500업체가 있고 총 폐수 배출량은 약 5% 수준이나, 합성 염료의 난분해성 및 다양성으로 인하여 총 오염 부하량은 약 20%인 1일 55만 2천 m^3 에 달하고 있어 보다 효율적인 염색 폐수 처리 방법 개발이 요구되고 있다.

합성 염료는 발색단 등의 화학구조에 따라 azo계, anthraquinone계, indigo계, diphenylmethane 및 triphenylmethane계, pyrozone계, stibene계, thiaole계, xanthene계 등 매우 다양한 구조를 가지고 있으며, 특히 azo계 반응성 염료는 선명한 색상, 사용 편리성, 그리고 염색 안정성 우수하다는 장점이 있다[14]. Azo 염료는 발색단으로 azo기(-N=N-)를 가지며, 약 2,000여종 이상이 개발되어 사용되고 있다. Azo 염료는 섬유 염색에 가장 많이 사용되며, 사용량의 10% 이상이 섬유소와 결합하지 못하고 바로 폐수로 방류되고 있다[5,8].

Azo계 염료 등 다양한 염료를 포함한 염색 폐수는 물리적·화학적·생물학적 방법을 이용하여 처리할 수 있다[10]. 물리·화학적 방법은 흡착, 침전, 화학약품을 이용한 산화, 광분해, 막여과 등을 이용하여 염료를 제거하는 방법으로 신

속한 처리가 가능하다는 장점이 있는 반면에, 고가의 처리시설 구축과 유지비가 요구되며, 화학약품을 사용하는 경우 2차 오염 문제가 발생할 수 있다[11,13]. 생물학적 방법은 미생물의 생분해능을 이용하여 염료를 무해한 최종산물로 분해할 수 있으므로 가장 환경친화적인 접근방법이며, 2차 오염물질 발생을 최소화시킬 수 있고 비용도 저렴한 편이다[16,9].

Reactive Black 5를 포함한 azo계 반응성 염료는 자연계에 존재하는 화합물이 아니기 때문에 전형적인 활성슬러지 공정만으로는 효율적인 처리가 어려워 색도 배출 허용 기준을 충족시키지 못하고 있다. 최근 혐기성 미생물에 의해 monoazo계 염료가 무색의 방향족 아민 화합물로 분해된다는 연구 결과로부터 혐기성 필터, upflow anaerobic sludge blanket (UASB) 반응기, 유동층 및 고정층 반응기 등의 혐기성 염료 처리 공정이 개발되고 있으나, 호기성 반응에 비해 분해 속도가 느린 단점이 있다. 현재 azo계 반응성 염료 처리법인 호기성 활성 슬러지법도 난분해성 염료에 대한 분해 효율이 낮아 색도 배출허용기준을 충족시키기 어렵다. 따라서, azo계 반응성 염료에 대한 탈색능이 우수한 미생물을 확보하고, 이들을 이용한 탈색반응 특성 분석을 통해 반응기 운전 최적화를 도모할 필요가 있다. 본 연구에서는 diazo계 반응성 염료인 Reactive Black 5 등을 포함하고 있는 염색 폐수 처리에 활용되었던 활성 슬러지로부터 Reactive Black 5에 대한 생분해능이 우수한 세균인 *Comamonas* sp. AEBL-85를 분리하고, 보조 탄소원·질소원의 영향, 최적 pH 및 온도 등이 *Comamonas* sp. AEBL-85의 염료 탈색반응에 미치는 영향을 분석하여 탈색반응 특성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

Reactive Black 5

Reactive Black 5는 Azo계 반응성 염료로써 발색단으로

*Corresponding author

Tel : +82-51-620-4716, Fax : +82-51-622-4986

E-mail : eylee@star.ks.ac.kr

두 개의 azo bond (-N=N-)가 있고 반응성 그룹으로 vinyl-sulphonyl group [NaO₃SO(CH₂)₂SO₂]을 2개씩 포함하고 있다. Color index number는 20,505 이고 분자량은 991.8 g이며, 검은색의 미세한 입자로 제조되고 있다.

Reactive Black 5 분해균 분리 및 동정

본 실험에서 Reactive Black 5의 탈색을 위해 분리·동정한 미생물 균주는 부산시 장림 염색업체 폐수 처리용 활성슬러지에서 채취한 미생물 군집 덩어리로부터 분리한 것이다. 탄소원으로 Reactive Black 5를 100 mg/l 농도로 첨가한 MSM (mineral salts medium: 9.0 g Na₂HPO₄, 1.5 g KH₂PO₄, 0.2 g MgSO₄, 1.2 mg Fe(III)NH₄-citrate, 10 mg ZnSO₄, 3 mg MnCl₂, 30 mg H₃BO₃, 20 mg CoCl₂, 1 mg CuCl₂, 2 mg NiCl₂, 3 mg Na₂MoO₄ per 1 liter) 한천 배지에 vortexing으로 현탁시킨 시료를 알맞게 희석하여 100 µl씩 도말한 다음, 30°C에서 배양하면서 한천배지의 탈색 정도를 육안으로 확인하여 분해능이 있는 콜로니를 1차로 선발하였다. 탈색능이 확인된 콜로니들을 50 mg/l 농도의 Reactive Black 5가 주입된 50 ml의 MSM 배지가 들어있는 300 ml 삼각플라스크에 접종하여 30°C, pH 7, 250 rpm에서 24 hr 정도 진탕 배양하여 600 nm에서 UV 흡광도 감소정도를 측정하여 탈색능이 가장 우수한 콜로니를 2차로 선별하였다. 분리된 균주는 API-2NE kit (BioMerieux, France)를 이용하여 동정하였다.

세포배양 및 염료 탈색을 측정

Reactive Black 5 분해에 사용된 *Comamonas* sp. AEBL-85는 MSM 배지에 각종 보조탄소원, 질소원 및 염료를 첨가하여 30°C, pH 7, 250 rpm에서 진탕 배양하면서 염료 탈색율을 측정하였다. 일정시간 간격으로 UV-vis spectrometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도 변화를 측정하고, 검량선을 이용하여 흡광도 감소율을 계산하여 염료 탈색율을 계산하였다.

보조 탄소원·질소원 첨가, pH와 온도가 탈색율에 미치는 영향

Comamonas sp. AEBL-85의 Reactive Black 5 탈색능에 미치는 보조 탄소원 및 질소원의 영향을 알아보기 위해 기본 배지로 사용한 MSM에 포도당 농도는 1, 2, 3, 5 그리고 10% (w/v)로 변화시키면서 염료 분해 정도를 분석하여 영향을 평가하였다. 질소원 농도의 영향은 yeast extract를 0.5, 1, 2, 5% (w/v)로 첨가하고, 염료 분해 정도를 흡광도 변화를 통해 비교·분석하였다.

배양액의 pH와 온도가 염료 분해에 미치는 영향을 분석하기 위하여 최적 농도의 보조 탄소원과 질소원이 첨가된 배지의 pH를 5, 6, 7, 8로 변화시켰으며, 온도는 25, 30, 35, 40°C로 변화시키면서 염료 분해 속도를 비교·분석하여 최적 조건을 결정하였다.

결과 및 고찰

Reactive Black 5 탈색 균주의 분리 및 생리·생화학적 특성 분석

Reactive Black 5 분해 미생물균주는 장림 염색 공단 폐수로부터 채취한 슬러지 시료를 유일 탄소원으로 100 mg/l의 Reactive Black 5가 있는 MSM 고체 배지에 도말하고 30°C에서 5-7일간 배양한 후 탈색 여부를 1차적으로 확인하여 분리하였다. 탈색능이 확인된 다수의 콜로니들을 최종 염료 농도가 50 mg/l이 있는 MSM배지에 재접종하여 30°C, pH 7에서 48 hr 정도 진탕 배양한 다음 UV 흡광도 측정을 통해 탈색능이 가장 우수한 콜로니를 최종적으로 선별하였다. 분리된 미생물 균주는 그람 음성의 간균이었으며 (Fig. 1), Table 1과 같은 생화학적 특성을 가지고 있어 *Comamonas* 속으로 판정되었으며 *Comamonas* sp. AEBL-85로 명명하였다.

보조 탄소원과 질소원 첨가 영향, 초기 pH와 온도의 영향 및 배양조건에 따른 탈색율 변화 평가

염료 자체를 탄소원으로 사용할 수 있는 미생물의 경우도 미생물의 분해 활성을 향상시키기 위하여 보조 탄소원을 공급하고 있으며, 실제 염료 폐수의 경우도 미생물이 이용할 수 있는 유기탄소원이 충분치 않아 보조탄소원을 공급한 상태에서 처리공정을 운전하는 경우가 많다. 분리한 *Comamonas* sp. AEBL-85의 Reactive Black 5에 대한 회분식 탈색반응에 미치는 보조 탄소원 첨가 영향을 분석하기 위하여 Reactive Black 5를 유일 탄소원으로 제공한 경우를 대조군으로 하여 포도당을 1~10% (w/v)의 농도로 첨가하고 24시간 동안 탈색을 변화를 측정하였다. Table 2에서와 같이 포도당을 제공한 모든 경우에서 탈색율이 1.3~2.2배 정도 향상됨을 알 수 있었다. 포도당을 보조 탄소원으로 제공하는 경우 세포 성장

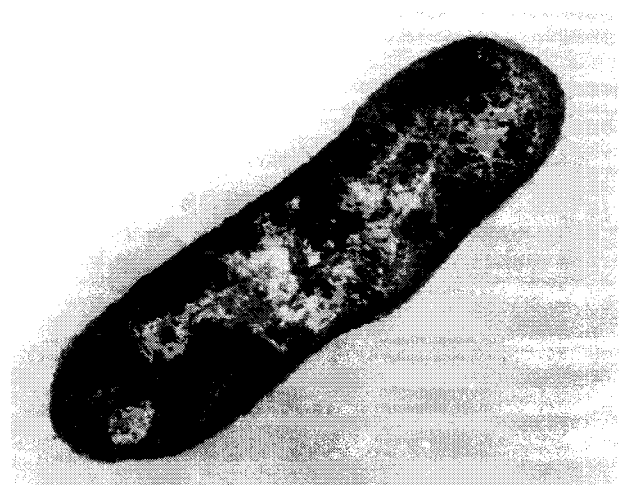


Fig. 1. Transmission electron microscopic picture of the isolated *Comamonas* sp. AEBL-85.

Table 1. Biochemical and nutritional characteristics of *Comamonas* sp. AEBL-85 examined by the API-20NE Kit

Characteristics	<i>Comamonas</i> sp. AEBL-85
<i>Biochemical characteristics</i>	
reduction of nitrate	+
formation of idol	-
fermentation	-
arginine dehydrolase	-
urease	-
esculin hydrolysis	-
gelatine liquefaction	-
β -galactosidase	-
cytochrome oxidase	-
<i>Nutritional characteristics</i>	
glucose	+
arabinose	-
mannose	-
mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	-
adipate	+
caprate	-
citrate	+
gluconate	+
malate	+
maltose	-
phenyl acetate	+

및 azo 결합의 환원적 분해와 관련된 염료 탈색 대사 효율 증대 등으로 인하여 염료 탈색능이 향상되는 것으로 평가할 수 있다. 포도당을 3% (w/v) 이상 제공하는 경우 2배 수준의 탈색능 향상을 얻을 수 있어 최적 보조 탄소원 농도를 3% (w/v) 이상으로 결정하였으며, 3% (w/v)이 제공된 경우 24 시간 동안 약 63.8%의 염료 탈색율을 보였다.

보조 탄소원으로 3% (w/v)의 포도당을 첨가하고, 질소원으로 yeast extract를 0.5-5% (w/v)의 농도로 변화시키면서 첨가해주고 Reactive Black 5에 대한 탈색율을 측정하였다 (Table 2). Yeast extract를 0.5% (w/v)로 첨가한 경우 질소원이 제공되지 않은 경우보다 24 시간의 탈색능 평가실험에서 15% 정도 탈색율이 향상된 결과를 얻을 수 있었다. 보조 탄

소원을 0.5% (w/v) 이상의 높은 농도로 제공하는 경우에서는 오히려 염료 탈색율이 저하된 결과를 얻었다. 특히, 5% (w/v) yeast extract를 넣어준 경우 탈색율이 50% 이하로 감소되는 결과를 볼 수 있었다. 따라서, 질소원이 0.5% (w/v) 이하의 농도로 제공된 분해조건에서는 azo계 색소를 보다 효율적으로 분해시킬 수 있음을 알 수 있었고, 제공된 yeast extract는 azo 결합의 환원적 분해과정에서 요구되는 전자공여체 역할을 수행하는 NADH 생성을 향상시키는 역할을 수행한 것으로 판단된다[3].

초기 pH가 Reactive Black 5 탈색율에 미치는 영향을 분석하기 위하여 3% (w/v)의 포도당, 0.5% (w/v)의 yeast extract를 넣어준 MSM 배지의 pH를 각각 5, 6, 7, 8로 각각 변화시키면서 탈색율을 측정하였다(Table 3). 24시간 동안의 탈색율을 측정된 결과 pH 6에서 가장 높은 탈색율인 69.6%를 보여 약산성 조건에서 탈색능이 보다 우수하여, 최적 pH를 6으로 결정하였다. Reactive Black 5 탈색율에 미치는 배양 온도의 영향을 분석하기 위하여 온도를 25, 30, 35, 40°C로 변화시키면서 24시간 동안의 탈색율을 측정된 결과, *Comamonas* sp. AEBL-85는 35°C에서 71.7%의 가장 높은 탈색율을 보여 좋은 균임을 알 수 있었다(Table 3). 25°C에서의 탈색율이 35°C 대비 37% 수준에 머물러 배양 온도가 Reactive Black 5 탈색율에 크게 영향을 미치며, 특히 낮은 온도에서 탈색율 저하가 심함을 알 수 있었다.

배양조건에 따른 염료 탈색능을 평가하기 위하여 50 mg/l의 Reactive Black 5, 3% (w/v) 포도당, 0.5% (w/v) yeast extract를 넣어준 MSM 배지에 *Comamonas* sp. AEBL-85를 접종하고 35°C에서 각각 정지 배양 및 진탕 배양을 실시하였다. 초기 12시간의 분해과정에서 진탕배양을 해 준 경우가 정지배양보다 약 4.2배 이상의 탈색율을 보여주어 진탕배양 조건이 탈색율 향상을 주는 것으로 나타났으며, *Comamonas* sp. AEBL-85는 호기성 조건에서의 탈색능이 보다 우수함을 알 수 있었다(Fig. 2).

Comamonas sp. AEBL-85에 의한 Reactive Black 5의 회분식 탈색 동력학

Comamonas sp. AEBL-85를 이용하여 보조 탄소원으로 3%

Table 2. The effect of glucose and yeast extract concentration on initial dye degradation extent by *Comamonas* sp. AEBL-85

Glucose conc. (%(w/v))	Initial extent of degradation (%) ^a	Yeast extract conc. (%(w/v))	Initial extent of degradation (%) ^a
0	28.7	0	60.9
1	38.6	0.5	70.0
2	49.1	1	51.4
3	63.8	2	39.3
5	55.4	5	35.7
10	59.3		

^aInitial extent of degradation=[(OD at 24hr-OD at 0hr) / OD at 0hr]×100.

Table 3. The effect of initial pH and temperature on initial dye degradation extent by *Comamonas* sp. AEBL-85

pH	Initial extent of degradation (%) ^a	Temperature (°C)	Initial extent of degradation (%) ^a
5	63.0	25	26.4
6	69.6	30	35.4
7	56.1	35	71.7
8	47.6	40	59.6

^aInitial extent of degradation = [(OD at 24hr - OD at 0hr) / OD at 0hr] × 100.

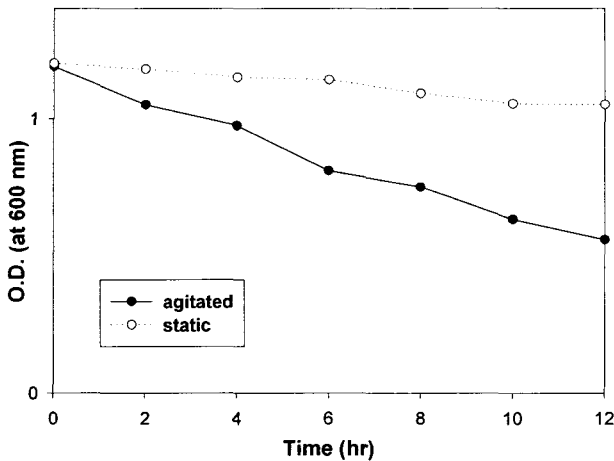


Fig. 2. Comparison of decolorization of Reactive Black 5 by static and agitated cultures of *Comamonas* sp. AEBL-85.

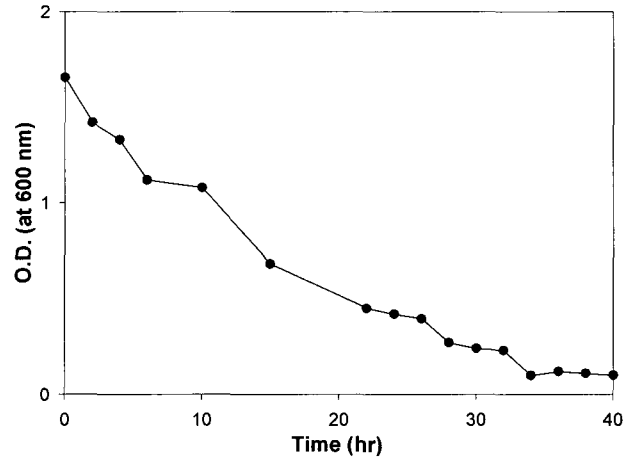


Fig. 3. Batch decolorization of waste water containing Reactive Black 5 by *Comamonas* sp. AEBL-85.

(w/v) 포도당, 질소원으로 0.5% (w/v) yeast extract를 첨가한 MSM 배지에서 pH 6.0, 배양온도 35°C 조건에서 Reactive Black 5 초기 농도 50 mg/l 농도에서 회분식 탈색 반응을 실시하였다. Fig. 3에서와 같이 6시간 경과 후 34.7%의 탈색율을 보여 초기 탈색율이 높음을 알 수 있었다. 15시간 경과 후에는 58.9%, 36시간 경과 후에는 92.7%, 40 시간의 회분식 탈색반응을 통해 약 95% 이상이 탈색되었음을 알 수 있었다. 최적 회분식 분해조건에서 Reactive Black 5에 대한 탈색능이 있는 다른 종류의 미생물인 *Stenotrophomonas maltophilia* EJ-211을 이용한 경우보다 95% 이상의 탈색율에 도달하기 위한 시간을 12시간 이상 줄일 수 있었으며, 백색부후균인 *Phanerochaete* sp. EJ-31L과 비교해서는 24시간 이상 분해시간을 줄일 수 있어 *Comamonas* sp. AEBL-85의 우수한 탈색능을 확인할 수 있었다. 일반적으로 미생물을 이용하여 Reactive Black 5 등을 포함한 다양한 azo계 염료에 대하여 95% 이상의 탈색율을 얻기 위해서는 일반적으로 수일 이상이 요구된 기존 결과와 비교해보면, *Comamonas* sp. AEBL-85의 우수한 탈색능을 확인할 수 있어 Reactive Black 5 처리용 생물공정에 활용할 수 있을 것으로 기대된다[2,12]. 현재 국내 색도 방류수 기준인 400 ADMI 값은 Reactive Black 5 농도로는 4 mg/l 이하로 600 nm에서의 OD값이 약 0.2 이하에 해당하므로 *Comamonas* sp. AEBL-85를 사용하면 회분식 분해조건에

서 배출 허용 기준에 맞는 처리가 가능함을 알 수 있다. 일반적으로 호기성 세균에 의한 azo계 염료 분해 연구 결과를 살펴보면, 염료 자체를 탄소원 및 에너지원으로 사용하지 못하는 세균들은 포도당 등의 보조 탄소원을 제공한 경우에서만 공대사 환원적 분해(cometabolic reductive cleavage) 과정을 통해 염료를 분해하거나, 염료 자체를 탄소원 및 에너지원으로 사용할 수 있는 세균들은 보조 탄소원을 제공하는 경우 오히려 염료 분해율이 감소되는 결과들이 주로 보고되었다[3]. 또한, 염료 자체를 탄소원 및 에너지원으로 사용하지 못하는 세균들은 혐기적 조건에서 염료 분해율이 더 향상되는 결과들이 보고되었다. 그러나, 본 연구과정에서 분리한 *Comamonas* sp. AEBL-85은 염료 자체를 유일 탄소원 및 에너지원으로 사용할 수 있으면서도 보조 탄소원을 제공해주면 염료 탈색율이 더 증가되었다. 또한, 호기적 조건에서의 염료 분해능이 더 우수한 결과들을 보여주고 있어 기존의 세균들과는 다른 분해 특성을 가지고 있으므로 향후에 이에 대한 보충 연구가 필요한 것으로 사료된다.

요 약

Azo계 염색 폐수 처리에 활용되었던 활성 슬러지의 미생물 군집체로부터 diazo계 반응성 염료인 Reactive Black 5를 유일 탄소원으로 성장할 수 있는 *Comamonas* sp. AEBL-85를

분리·동정하고, *Comamonas* sp. AEBL-85를 이용한 Reactive Black 5에 대한 회분식 탈색 특성을 평가하였다. 염료탈색 반응 효율 향상을 위해 보조 탄소원 및 질소원 첨가하고, pH, 온도 등의 분해조건이 탈색율에 미치는 영향을 분석한 결과, 3% (w/v)의 포도당, 0.5% (w/v)의 yeast extract를 첨가한 MSM에서 pH 6.0, 온도 35°C의 조건에서 탈색효율이 가장 높았다. 초기농도 50 mg/l의 Reactive Black 5에 대하여 40 시간의 회분식 탈색반응을 통해 약 95% 이상의 탈색율을 얻을 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 경성대학교 교비연구지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Banat, I. M., P. Nigam, D. Singh and R. Marchant. 1996. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Biores. Technol.* **58**, 217-227.
- Chen, K. C., J. Y. Wu, D. J. Liou and S. C. J. Hwang. 2003. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *J. Biotechnol.* **101**, 57-68.
- Coughlin, M. F., B. K. Kinkle, A. Tepper and P. L. Bishop. 1997. Characterization of aerobic azo dye-degrading bacteria and their activity in biofilms. *Water Sci. Tech.* **36**, 215-220.
- Groff, K. A. and B. R. Kim. 1989. Textile Wastes. *J. Wat. Poll. Control Fed.* **61**, 872-876.
- Kirby, N., R. Marchant, and G. McMullan. 2000. Decolorisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 93-96.
- Meyer, U. 1981. Biodegradation of synthetic organic colorants, pp. 371-385, In Leisinger, T., A. M. Cook, R. Hutter and J. Nuesch (eds.), *Microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds*, FEMS Symposium **12**, Academic Press Inc., London.
- O'Neill C, F. R. Hawkes, D. L. Hawkes, N. D. Lourenco, H. M. Pinheiro and W. Delee. 1999. Colour in textile effluents - sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74**, 1009-1018.
- Rafii, F., W. Flanklin and C. E. Cerninglia. 1990. Azoreductase Activity of anaerobic Bateria isolated from Human Intestinal Microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2146-2151.
- Reddy, C. A. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 320-328.
- Shelley, M. L., W. Randall and P. H. King. 1976. Enalation of Chemical Biological and Chemical-Physical Treatment for Textile Dyeing and finishing Waste. *J. Wat. Poll. Control Fed.* **48**, 753-761.
- Stolz, A. 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 69-80.
- Swamy, J. and J. A. Ramsay. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Micribial Technol.* **24**, 130-137.
- Yeh, R. Y. L. and A. Thomas. 1995. Color difference measurement and color removal from dye wastewaters using difference adsobents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **63**, 55-59
- Zollinger, H. 1987. Colour chemistry : synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments. pp 92-100. VCH, New York.