

폴리에스테르 중합폐수의 활성슬러지 공정에서의 1,4-다이옥산 제거 및 16S rDNA에 의한 미생물 군집특성 평가

한지선 · 소명호 · 김창균[†]

인하대학교 환경공학과

(2008년 1월 11일 접수, 2008년 3월 10일 채택)

Assessment of 1,4-Dioxane Removal in Polyester Wastewater by Activated Sludge and Its Microbial Property by 16S rDNA

Ji-Sun Han · Myung-ho So · Chang-Gyun Kim[†]

Department of Environmental Engineering, Inha University

ABSTRACT : 1,4-Dioxane(C₄H₈O₂), which is used as a solvent stabilizer, could make harmful effects on ecosystem because of its higher solubility, toxicity and carcinogenic by US EPA. From 2011, its discharge limit to waterbody will be regulated at 5 mg/L by Ministry of Environment Republic of Korea. It was thus to investigate that the currently operating activated sludge in polyester manufacturing processes in Gumi can properly treat it to meet with the regulation standard. For that purpose, the removal rate of 1,4-dioxane and its microbial properties were assessed for a few companies(i.e. K, H and T). Its removal efficiency was the most highly recorded in H as 98% and then 77% for K, which met with the regulation standard. However, concentration of 1,4-dioxane of T was 23 mg/L in the effluent, which is more than the regulation standard. Aside from, microbial degradation test was done for 100 ppm of 1,4-dioxane in BSM (Basal salt medium) inoculated with each of activated sludge. After 7 days, 1,4-dioxane was completely removed in the test bottle inoculated with H sludge, 67% in T and 52% in K, which could confirm that the given activated sludge might have different biodegradability against the amount of 1,4-dioxane. Therefore, microbial diversity in each company was investigated by 16s rDNA cloning methods where a species, e.g. *Methylibium petroleiphilum* PM1, was the greatest observed from H and in lesser from K, but it was not detected from T. *Methylibium petroleiphilum* PM1 is known to efficiently degrade ether like methyl tertiary-butyl ether(MTBE). It is concluded that the activated sludge in H can be most effectively adopted for a biodegradation of 1,4-dioxane in the concern of industrial sector.

Key Words : 1,4-Dioxane, Polyester Wastewater, Activated Sludge Process, 16S rDNA

요약 : 유기용제 안정제로 사용되는 1,4-다이옥산(C₄H₈O₂)은 높은 용해도와 독성으로 인해 생태계에 유해하며 미국 EPA 의해 발암가능성이 있는 물질로 분류되어 있다. 국내에서도 환경부에 따르면 2011년부터 수계로의 배출허용기준이 5 mg/L로 추진될 예정이다. 따라서 구미의 폴리에스테르 제조 공정에서 발생하는 현재 운전 중인 활성슬러지가 1,4-다이옥산을 기준에 적합하도록 적절하게 처리할 수 있는지를 조사하였다. 이와 같은 목적으로 일부 회사(K, H 및 T)를 대상으로 1,4-다이옥산의 제거율 및 미생물학적 속성이 평가되었다. 처리효율은 H사에서 98%로 가장 높았으며 K사는 77%로 두 개 사 모두 유출농도가 기준에 부합하였다. 그러나 T사 유출수의 1,4-다이옥산 농도는 23 mg/L로 기준보다 높았다. 한편, 각 업체의 활성슬러지를 100 ppm의 1,4-다이옥산이 포함된 BSM(Basal salt medium)에 식중하여 생물학적 분해실험을 수행하였다. 7일간의 운전 후, H사의 슬러지를 이용한 시험에서 1,4-다이옥산이 완전히 제거되었으며 T사는 67%, K사는 52%로 이 처리효율의 차이는 1,4-다이옥산의 양이 아닌 주어진 활성 슬러지의 생분해능이 서로 다른 것에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 결과적으로 각 산업체의 미생물 다양성이 16s rDNA cloning 방법을 통해 조사되었으며 *Methylibium petroleiphilum* PM1이 H사에서 가장 많이 발견되었으며 K사에서 적은 양이, 그리고 T사에서는 발견되지 않았다. *Methylibium petroleiphilum* PM1은 methyl tertiary-butyl ether(MTBE)와 같은 에테르 물질을 효과적으로 제거하는 것으로 알려져 있다. 이는 산업분야의 관점에서 H사의 활성 슬러지가 1,4-다이옥산의 생분해에 가장 효과적으로 적용될 수 있다는 것을 나타낸다.

주제어 : 1,4-다이옥산, 폴리에스테르 중합 폐수, 활성슬러지 공정, 16S rDNA

1. 서론

1,4-다이옥산(Cas No. 123-91-1)은 유기용제 안정제로 사용되는 에테르계열의 유기물질로서 높은 용해도로 인해 수

생태계를 오염시킬 수 있으며 미국 EPA IRIS(Integrated Risk Information System) 기준에 의해 발암가능물질인 B2(동물에 대한 충분한 발암성 증거확보/인체발암성 증거가 불충분하거나 없음)로 분류되어 있으며 그 방류기준(Discharge limit)이 30 µg/L로 규제되고 있다.¹⁾ 또한 1,4-다이옥산은 특히 인간과 동물에 눈의 염증 및 호흡기 질환을 유발하고 고농도의 1,4-다이옥산이 노출되면 신장과 간에 심각한 손

[†] Corresponding author
E-mail: cgk@inha.ac.kr
Tel: 032-860-7561

Fax: 032-865-1425

상을 입히는 것으로 알려져 있다.²⁾

국내에서는 낙동강 폐쇄 오염사건(1991년, 1992년) 이후, 산업체에서 배출되는 방류수에 함유되어 있는 독성 유해물질에 대한 일반인의 관심이 높아져왔으며 환경부 조사에 따르면 낙동강에서 2004년 11월부터 2005년 2월까지 1,4-다이옥산 농도가 10차례나 가이드라인(50 µg/L)을 초과한 것으로 나타나 지역 주민들의 불신이 커져왔다. 이후 2007년 12월 31일, 환경부의 수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 시행규칙 개정령 안에서 1,4-다이옥산은 신규 특정수질유해물질로 지정되는 것으로 입법 예고되었다.³⁾ 이에 따라 2011년 1월 1일부터 1,4-다이옥산의 배출허용기준은 청정지역의 경우 0.05 mg/L, 기타지역인 경우 5 mg/L로 추진될 예정이다.

1,4-다이옥산은 주로 화학섬유업체에서의 폴리에스테르 제조 공정에서 발생된다. 폴리에스테르의 주원료는 Terephthalic acid(TPA)와 Ethylene Glycol(EG)이며 에스테르 반응과 중합반응의 1~3 단계를 거쳐 폴리머(polymer)를 형성하게 된다. 이와 같은 반응 중간에 Ethylene Glycol(EG, HOCH₂-CH₂OH) 간의 축합반응에 의해 부산물이 형성될 수 있다. 형성된 부산물(HO-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-OH) 자체에서 축합반응에 의해 안정적인 고리형 구조를 가진 1,4-다이옥산(C₄H₈O₂)이 형성된다. 현재 낙동강 수계로 배출되는 방류수에 1,4-다이옥산을 함유하는 사업체는 주로 구미공단에 위치한 화학섬유업체들로서 대부분 물리화학적, 생물학적 처리를 수행하고 있으나 배출허용기준을 상회하고 있어 이들 업체는 2011년까지 처리 공정의 개선 및 최적화가 필요할 것으로 판단된다.

현재까지 개발되거나 연구된 1,4-다이옥산 제거 기술은 크게 물리화학적 방법과 생물학적 방법으로 나눌 수 있으며 물리화학적 처리법으로는 고급산화공정(AOP: Advanced Oxidation Process)에 속하는 방법들이 주를 이루었다. UV와 H₂O₂를 이용한 방법⁴⁾과 펜턴(Fenton) 산화와 염소(NaOCl)에 의한 1,4-다이옥산의 산화가 연구된 바 있다.⁵⁾ 최근에는 자외선에 TiO₂를 촉매로 사용하는 1,4-다이옥산 분해에 관한 연구가 이루어졌다.⁶⁾ 또한 1,4-다이옥산을 생물학적으로 분해하려는 시도도 많이 이루어 졌다. 1,4-다이옥산의 분해에 관여하는 미생물의 순수배양을 통한 시도가 주로 이루어졌으며 알려진 종으로는 *Mycobacterium vaccae*, *Rhodococcus strain* 및 nocardioform의 actinomycete류가 있다.^{7~9)} 뿐만 아니라 혼합배양에 의해 1,4-다이옥산을 분해, 제거하려는 연구도 이루어졌다.¹⁰⁾ 그러나 실제 운전되는 1,4-다이옥산 함유 폐수의 생물학적 인자 또는 슬러지에 존재하는 미생물 종에 대한 연구는 이루어진 바 없었다.

따라서 본 연구에서는 구미산업단지 내 화학업체 중 폴리에스테르 제조 과정에서 부산물로서 1,4-다이옥산이 생성되고 있는 3개 업체(K, H와 T)를 선정하여 발생 폐수의 생물학적 처리 과정의 1,4-다이옥산 농도를 측정하여 제거 효율을 평가하였다. 이중 한 업체에서는 생물학적 처리시설만으로도 1,4-다이옥산의 배출기준에 만족하는 높은 효율을 보이고 있었다. 이를 통해 다른 영세한 화학섬유 제조업체에서도 고가의 운전비가 요구되는 고급산화 공정 없이 기존에 대부분 설치되어 있는 생물학적 반응기를 이용하여 생물학적 처리로 1,4-다이옥산의 처리를 할 수 있도록 공정 최적화를 유도하기 위해 대상 업체 3곳의 생물학적 처리시설의 운전인자와 제거효율을 비교하고 각 업체의 슬러지를 이용하여 인공폐수의 1,4-다이옥산의 분해 실험을 수행하였다. 더불어 각 슬러지의 우점 미생물 종을 식별하기 위해 분자생물학적 방법인 16S rDNA를 이용한 cloning을 실시하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 연구 대상 화학 업체의 활성슬러지 공정 및 시료 채취

구미공단에 위치한 총 3개의 화학섬유 업체의 생물학적 폐수처리시설의 운영현황은 Table 1에 정리하였다. 운전 조건은 관계자 면담과 2007년 7월과 11월 두 번에 걸친 현장 분석을 통해 측정되었다. 실험에 사용될 시료는 각 공장 처리시설에 설치된 밸브를 통해 1 L 무균 채수병에 채취하여 4°C 냉장소에 보관하여 이동하였으며 실험 개시 전까지 냉장 보관하였다.

2.2. 폐수처리시설의 수질 분석 방법

2.2.1. 현장에서의 용존산소, pH 및 수온 측정 방법

생물학적 폐수처리 시설에서 채취한 시료는 현장에서 용존 산소(DO), pH 및 수온을 측정하였다. 용존산소는 DO meter(YSI 550A Portable DO Meter, USA), pH 및 수온은 pH meter(Orion Aplus portable pH meter, USA)를 이용하였다.

2.2.2. 폐수 시료의 유기물, 질소, 총인 측정 방법

폐수의 성상 및 수질을 평가하기 위해 생화학적 산소요구량(BOD₅), 화학적 산소요구량(COD_{Cr}), 총킬달질소(TKN), 암모니아성질소(NH₄⁺-N), 총인(T-P)이 Standard Methods¹¹⁾에 준하여 분석되었다. NO₃⁻의 농도는 Water 432 Conduc-

Table 1. Operation condition of biological wastewater treatment systems in three corporation(H, K, T(A line and B line))

Corporation	Treatment process	V(m ³)	Q(m ³ /d)	HRT(hr)	SRT(hr)	MLSS(mg/L)	Temp.(°C)	DO(mg/L)	pH
H	Activated sludge	600	1,275	11.3	19.2	3,000	35	2.0	7.2
K	Lagoon	1,600	1,500	48~72	100~120	1,800	30	1.8	7.0
T-A line	Activated sludge	1,200	500	57.6	329	4,000	35	1.5	7.9
T-B line	Activated sludge	1,200	1,500	19.2	146	3,500	35	2.4	7.6

tivity Detector를 장착한 이온 크로마토그래피(Yong Lin Instrument, Korea)에 의하여 결정되었다.

2.3. 폐수처리시설 및 1,4-다이옥산 분해 실험에서의 1,4-다이옥산 분석 방법

시료 중의 1,4-다이옥산의 정량은 GC/MSD(Hewlett Packard 6890N)을 이용하여 분석하였으며, Column은 Ultra-2 (0.2 mm × 25 m × 0.33 μm)를 사용하였다. 시료 전처리하는 추출용매로 MTBE(J.T.Baker, for use in HPLC)을 이용한 액-액 추출방법을 사용하였으며 용매와 시료의 비율은 10 mL : 10 mL이었으며 내부표준물(ISTD)로 2-Bromo-1-chloropropane, 20 ppm을 20 μL 주입하였다. GC의 주입부 온도는 200°C, carrier gas는 He로서 1 mL/min의 유량으로 유입되었다. 오븐은 7분간 35°C 유지 후, 20°C/min으로 90°C 까지 증가시키고 다시 30°C/min으로 200°C까지 유지시킨 후 측정하였다. 측정 종료 후 2분간 260°C로 유지하였다. Transfer line의 온도는 280°C의 조건으로 실험하였다.¹²⁾

2.4. 생물학적 처리시설의 슬러지를 이용한 1,4-다이옥산 분해 실험

실제 처리시설 내에 존재하는 슬러지에 의한 1,4-다이옥산 분해능을 평가하기 위해 shaking incubator(Vision scientific corporation, Korea)를 이용하여 35°C 조건에서 batch 실험을 수행하였다. 멸균한 500 mL bottle에 100 mg/L의 1,4-다이옥산과 yeast extract 0.01%를 함유한 인공폐수로서 Basal salt medium(BSM)을 담고 각 섬유업체의 생물학적 처리시설에서 채취한 슬러지를 최종 MLSS 농도 500 mg/L로 맞추어 식중하였다. BSM broth는 100 mL의 BSM buffer stock과 100 mL의 BSM trace metal stock을 포함하여 증류수로 1 L를 맞춘다. BSM buffer stock 1 L에는 K₂HPO₄ 32.4 g, NaH₂PO₄ · H₂O 10 g과 NH₄Cl 20 g이 포함되어 있으며 BSM trace metal stock 1 L에는 Nitrilotriacetic acid (C₆H₉NO₆) 1.23 g, MgSO₄ · 7H₂O 2 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.12 g, MnSO₄ · H₂O 0.03 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.03 g 및 CoCl₂ · 6H₂O 0.01 g이 함유되어 있다. 실험은 pH는 6.5~7, 용존 산소의 농도는 2.5~3.5 mg/L로 유지되었다. 총 7일간 생분해 실험을 수행하였으며 24시간 별로 1,4-다이옥산의 농도를 측정하였다. 공실험은 슬러지를 식중하지 않았으며 미생물이 성장하지 못하도록 CuSO₄를 1 g/L이 되도록 주입하였다.

2.5. 16S rDNA를 이용한 미생물 종 분석 방법

각 생물학적 처리시설에서 채취한 시료는 채취한지 24시간 이내에 슬러지 100 mL를 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리(Hanil science HA-1000-3, 원심분리기)하여 농축시켰으며 이 중 약 1 g의 분리된 침전물은 미생물 군집분석을 위한 시료로 사용하였다. 총 genomic DNA를 추출하기 위해 FastPrep[®] Instrument(Q-Bio gene)를 이용해 Speed 4에서 5초간 bead beating하고 FastDNA[®] SPIN Kit(Bio101 system,

Q-Bio gene)를 사용하였다. 염기서열분석을 통하여 세균의 종 단계까지 확인 가능하도록 16S rDNA의 PCR(Polymerase chain reaction)증폭을 수행하였다(PCR Machine, Techgene). PCR반응에 사용된 universal primer는 27F-5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'와 1492R-5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'이었으며 반응조건은 35 cycles의 denaturation(94°C), annealing(56°C) 그리고 polymerization(72°C)으로 이루어졌다. PCR 증폭산물은 Winzard[®] SV Gel 및 PCR Clean-Up System(Promega, USA)으로 정제하였으며 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 접합(ligation)시키고 숙주세포(*E. coli* XL1-Blue)로 형질전환(Transformation)하였다. X-Gal/IPTG로 screen된 세포는 한 개의 colony씩 배양하여 플라스미드를 회수, 16S rDNA 염기서열을 분석 하였다. 분석한 염기서열은 NCBI(National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Gene Bank에 등록된 데이터베이스에 기초하여 Blast search를 통해 염기 일치도(Identity)에 따라 근연종을 확인하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1. 생물학적 처리시설의 수질 평가

선정된 3개 업체는 구미 공단에 위치한 화학섬유업체들로서 현재 나이론, 폴리에스테르, 타이어드지, 베이스필름을 생산하고 있는 K사, 폴리에스테르 수지, 필름, 부직포를 생산하고 있는 T사, 폴리에스테르 원사, 스판덱스 원사, 폴리에스테르 및 나일론 필름을 생산하고 있는 H사로 선정하였다. H사와 T사는 중합공정에서 발생하는 폐수를 활성슬러지를 이용한 생물학적 처리 후 O₃과 H₂O₂를 이용한 고도산화처리를 하고 있다. K사는 1,4-다이옥산 함유 폐수를 펜톤 산화 처리 후 포기식 라군을 이용하여 생물학적으로 연계처리하고 있다.

Table 1은 3개 사의 생물학적 폐수처리시설의 운전조건을 나타낸 것으로 T사의 경우 2개 line(A와 B)으로 운전되고 있다. H사의 포기조 유량은 1,275 m³/d이며 K사 및 T사의 B line은 1,500 m³/d, T사의 A line은 500 m³/d였으며 SRT의 경우 H사가 가장 짧고 K사 T사 순이었다. MLSS의 농도는 H 및 T사는 3,000~4,000 mg/L의 농도를 유지하였고 K사의 농도가 1,800 mg/L로 가장 낮았다. 또한 3개사 포기조의 DO는 1.5~2.5로 운전되었으며 pH는 7.0~7.9로 중성을 유지하고 있는 것으로 나타났다. K사의 포기조의 경우 외부로 노출된 라군으로 운전되고 있어 수온이 35°C인 다른 두 곳(H와 T사)에 비해 낮은 30°C로 운전되고 있었다.

Fig. 1(a)에 세 개 사의 생물학적 폐수처리시설의 유입과 유출수의 COD_{Cr} 및 BOD₅ 농도를 나타내었다. K사 유입수의 COD_{Cr} 및 BOD₅가 각각 2,670 mg/L, 1,107 mg/L로 가장 높았으나 모두 99% 이상의 높은 제거 효율을 보였으며 H사 역시 95% 이상의 유기물이 제거되고 있는 것

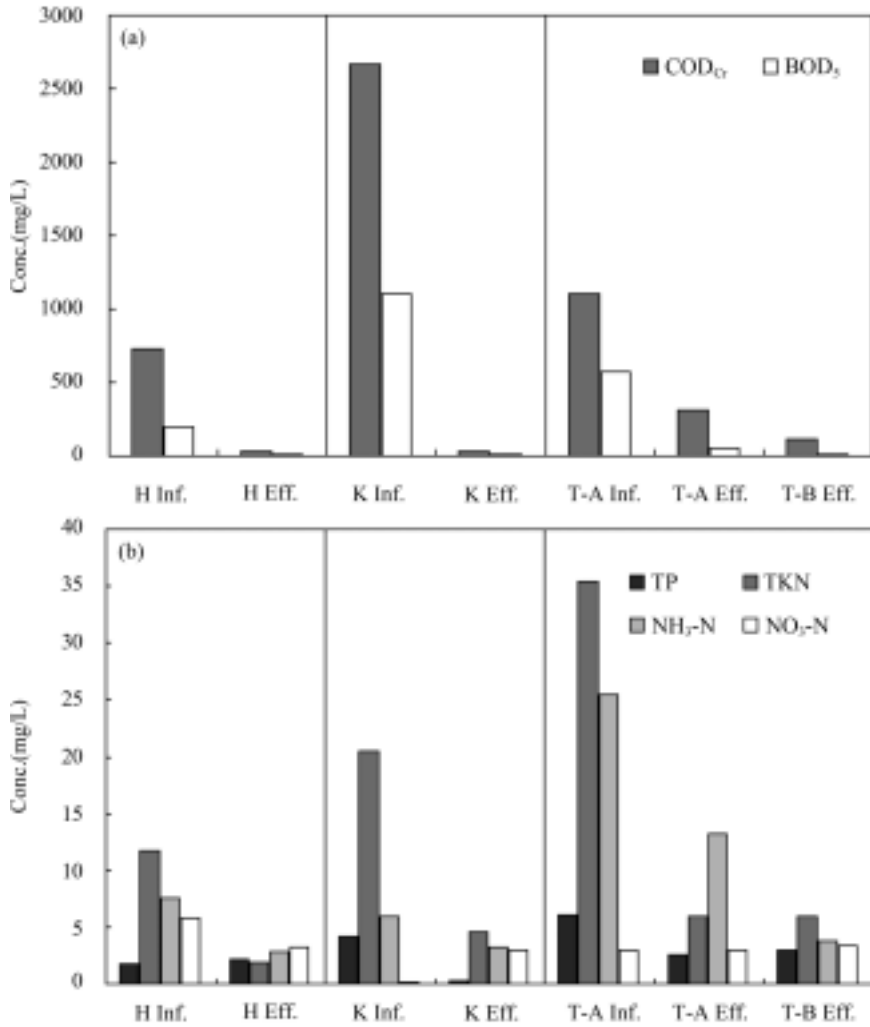


Fig. 1. Wastewater quality in influent(Inf.) and effluent(Eff.) of biological treatment systems of three corporations(H, K, T(A line and B line, Effluent of T-A line is influent of T-B line)) (a) Concentration of COD_{Cr} and BOD₅, and (b) Concentration of total phosphorous(T-P) and nitrogen(TKN, NH₃-N and NO₃-).

으로 나타났다. 그러나 T사의 경우 A line과 B line의 처리공정을 모두 거치더라도 90% 미만의 COD_{Cr} 처리효율을 보였다. 질소 농도는 총질소로 계산 시 3개 사 모두에서 60~75% 가량 제거되고 있으며 총인(T-P)의 경우 K사에서 90% 이상, T사의 A line에서 50% 이상의 제거율을 보이고 H사에서 제거율은 0에 가까웠다(Fig. 1(b)).

3.2. 생물학적 처리시설의 1,4-다이옥산 제거율

3개 사의 생물학적 폐수처리시설에서의 1,4-다이옥산 농도는 Fig. 2(a)와 같다. 생물학적 처리시설로 유입되는 1,4-다이옥산의 농도는 T사에서 약 316 mg/L로 가장 높았으며 H사는 약 76 mg/L, 생물학적 처리 전단에 펜톤 산화로 1,4-다이옥산을 처리하는 K사에서는 2.6 mg/L로 낮았다. 처리효율을 기준으로 하면 H사에서 98%로 가장 높았으며 K사는 77% 정도로 두 개 사 모두 유출농도가 각각 1.41 mg/L와 0.59 mg/L로 기준에 부합하였다. K사는 유입되는 1,4-다이옥산의 농도가 상대적으로 낮고 반응기 용량은 큰데 반해 MLSS농도가 1,800 mg/L 정도로 낮아

(Table 1) 1,4-다이옥산과 그 분해균의 접촉이 많지 않으며 K사 활성슬러지 처리시설에 유입되는 COD 부하가 2,700 mg/L 정도로 높아(Fig. 1) 1,4-다이옥산의 처리효율이 낮은 것으로 보여 진다. T사의 경우 A line 처리시설에서 약 58%의 제거율을 보였고 A line의 유출수가 B line으로 유입되며 82%가 제거되어 T사의 처리시설에서 총 93%의 처리효율을 보였다. 그러나 유출되는 1,4-다이옥산의 농도는 23 mg/L 정도로 배출허용기준을 크게 상회하므로 후속 처리시설(Hipox)을 운전하여 6 mg/L의 최종 농도를 유지하고 있다. 이와 같이 T사에서는 두 단계의 활성슬러지 공정을 운전함에도 불구하고 각각의 1,4-다이옥산 처리 효율이 상대적으로 낮은 것을 알 수 있다. 이는 다른 두 회사와 비교할 때 상대적으로 매우 높은(A line; 315.84 mg/L, B line; 133.17 mg/L) 1,4-다이옥산의 유입 농도로 인한 저해로 설명될 수 있으며 1,4-다이옥산이 300 mg/L 이상으로 유입되는 A line 처리시설보다 약 133 mg/L 정도로 유입되는 B line 처리시설에서 그 제거 효율이 더 높은 결과를 보인 것과 연계된다. T사의 1,4-다이옥산 처리

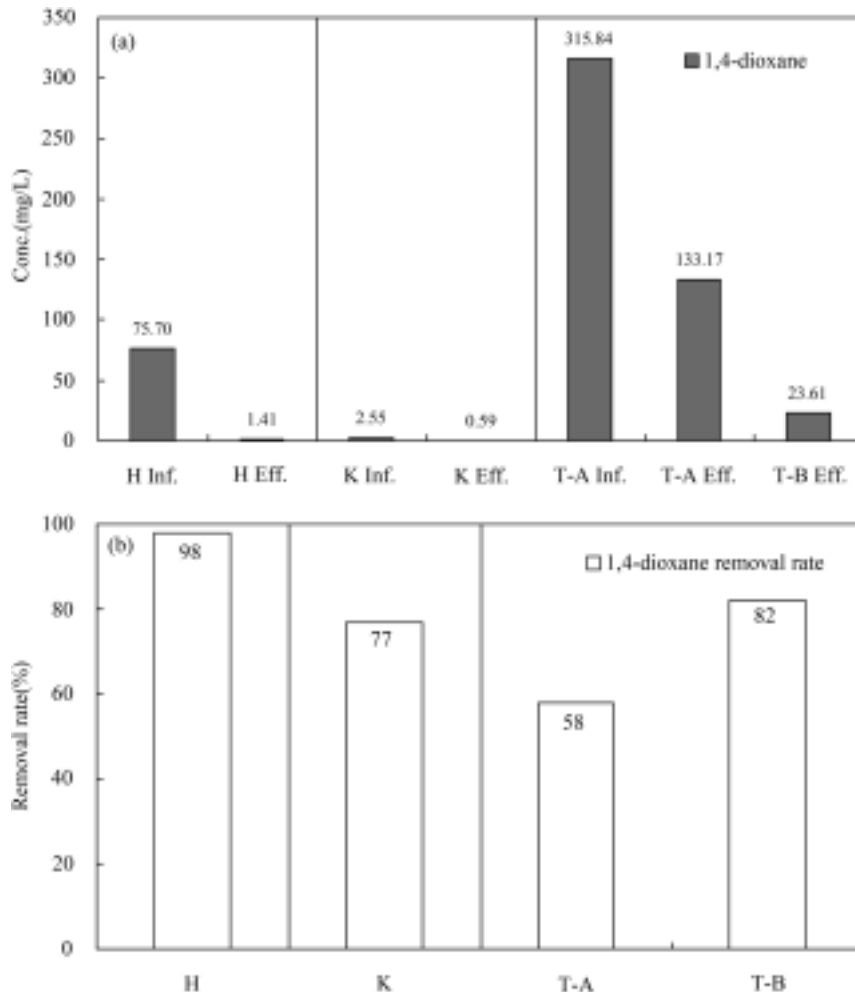


Fig. 2. (a) Concentration of 1,4-dioxane in influent(Inf.) and effluent(Eff.) in the biological treatment systems, and (b) Removal rate of 1,4-dioxane of biological treatment systems in three corporations(H, K, T-A line and T-B line).

를 위한 후속처리시설의 운전비는 높으며 활성슬러지 공정을 2단으로 운전하고 있어 각 단계에서 H사와 같이 높은 효율을 가진다면 후속처리 없이 생물학적 처리만으로도 배출허용기준 이하로 유지할 수 있을 것이라 판단된다.

3.3. 생물학적 처리시설의 슬러지를 이용한 인공폐수의 1,4-다이옥산 제거율 평가
각기 다른 회사의 생물학적 수처리 공정에서 서로 다른 효율을 보이는 것이 폐수의 특성에 따른 것만이 아니라

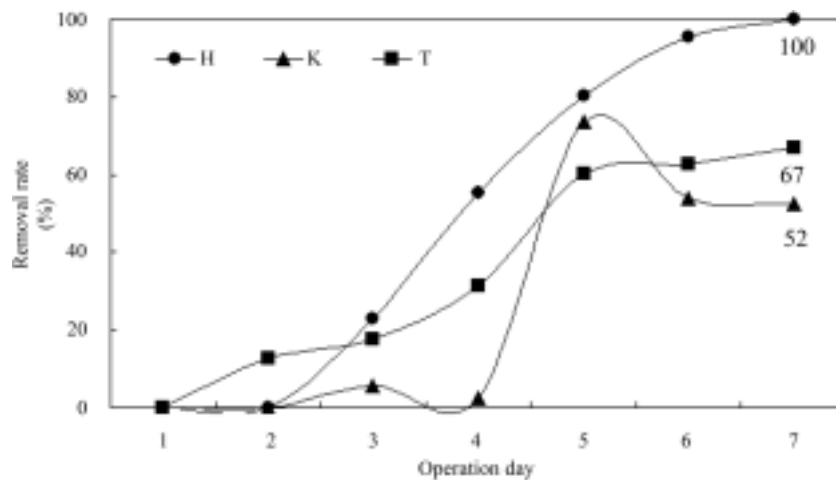


Fig. 3. Biological removal rate of 1,4-dioxane(initial concentration is 100 ppm) in BSM medium using sludge of each company for 7 days.

슬러지 내에 존재하는 미생물의 차이에 의한 것임을 확인하기 위해 총 7일간 100 mg/L의 1,4-다이옥산을 함유한 배지에 각 슬러지를 일정량 주입한 후 제거율을 관찰하였다. 그 결과는 Fig. 3과 같다. 7일간의 운전 후 H사의 슬러지를 이용한 제거율은 100%였으며 T사는 67%, K사는 52%로 낮았다. 이는 각 시설의 슬러지 즉, 미생물종의 차이에 의해 제거율이 다른 결과를 나타낼 수 있음을 보여주는 것으로 판단되며 실제 공정에서 H사의 제거효율이 가장 높았던 결과와 일치한다. 그러므로 각 슬러지의 미생물 종 분석이 요구되어 졌다.

3.4. 생물학적 처리시설의 미생물 군집 분석 결과
분자생물학적 방법은 환경공학분야에서 오염지역 및 공

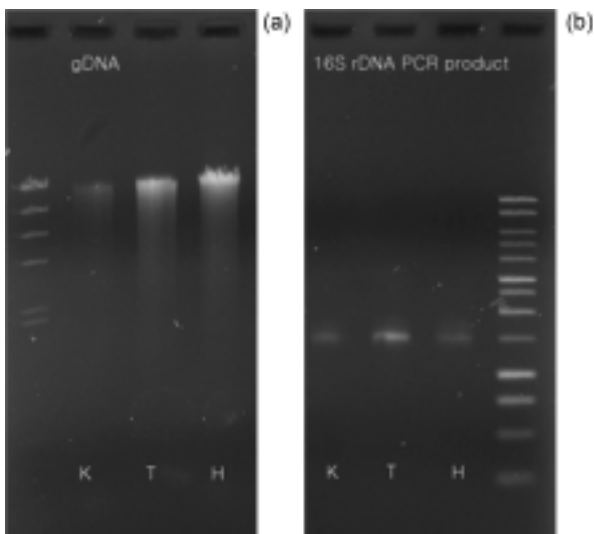


Fig. 4. (a) Total genomic DNA, and (b) amplification of 16S rDNA gene by PCR of sludge samples of K, H and T corporation.

정의 모니터링 및 평가 등에 유용하게 이용되어져왔으며 본 연구에서 사용된 16S rDNA 및 cloning에 의한 미생물 종의 분석은 미생물 종분석을 위한 가장 정확한 방법으로 알려져 있다. Fig. 4는 3개 사(K, H 및 T)의 총 genomic DNA(a) 및 16S rDNA gene의 PCR 증폭산물(b)의 전기영동 agarose 겔 사진으로 DNA의 추출 및 PCR과정이 잘 이루어 졌음을 보여준다.

3개사의 반송슬러지를 대상으로 종 분석을 수행하였으며 Table 2에서와 같이 H사의 슬러지에서 추출한 미생물의 16S rDNA를 접합한 플라스미드의 개수는 46개, K사는 34개, T사는 46개였다. 염기서열을 분석한 gene은 H사 및 K사의 경우 4개 그룹씩, T사의 경우 3 그룹으로 나눌 수 있었다. 염기서열이 분석된 미생물 중 가장 많은 부분을 차지하는 것은 미확인 균주(Unidentified species)로서 H4그룹(41.3%), K4그룹(70.6%), T3그룹(47.8%)이 이에 속하였으며 이들 그룹에 속하는 미생물은 모두 염기서열이 서로 일치하는 것이 없이 다른 종들로써 우점종과는 거리가 있는 것으로 사료된다. 이 들 이외에 서로 일치하는 염기서열을 가진 것을 그룹을 지었으며 각 그룹들과 NCBI gene bank의 database에 등록된 균주들의 염기서열이 가장 일치하는 것을 표시하였다. 이 중 H2, K2 및 T1 그룹은 세 개사에서 모두 발견이 되었으며 이 그룹의 미생물은 H사에서 28.3%, K사에서 17.6%, T사에서 43.5%로 발견되어 3개사 전체의 슬러지 중 우점 하는 미생물로 여겨진다. 그러나 이 미생물과 가장 염기서열이 일치하는 미생물은 *Azoarcus sp. EbN1* 및 *Nitrosospira multiformis ATCC 25196*으로 전체 염기서열의 91%가 일치하여 같은 종으로 볼 수는 없으나 *Azoarcus sp. EbN1*은 방향족 탄화수소들을 분해하는 균으로 알려져 있고¹³⁾ *Nitrosospira multiformis ATCC 25196*는 대표적인 암모니아 산화균이다. H1그룹 및 K1그룹에 속하는 미생물은 각각 분석한 H사 미생물의 19.6% 및 K사의 5.9%에 해당하는 미생물로서 T사에서는

Table 2. Identified bacteria species in the sludge samples of three biological wastewater treatment systems by 16S rDNA PCR and cloning

Site	Group	Number of plasmid	Ratio(%)	NCBI Accession No.	Species	Identity(%)
H (46)	H1	9	19.6	NC_008825	<i>Methylibium petroleiphilum PM1</i>	96
	H2	13	28.3	NC_006513	<i>Azoarcus sp. EbN1</i>	91
				NC_007614	<i>Nitrosospira multiformis ATCC 25196</i>	
	H3	5	10.9	NC_008255	<i>Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406</i>	85
H4	19	41.3	Unidentified species			
K (34)	K1	2	5.9	NC_008825	<i>Methylibium petroleiphilum PM1</i>	94
	K2	6	17.6	NC_006513	<i>Azoarcus sp. EbN1</i>	91
				NC_007614	<i>Nitrosospira multiformis ATCC 25196</i>	
	K3	2	5.9	NC_009050	<i>Rhodobacter sphaeroides ATCC 17029</i>	95
K4	24	70.6	Unidentified species			
T (46)	T1	20	43.5	NC_006513	<i>Azoarcus sp. EbN1</i>	91
				NC_007614	<i>Nitrosospira multiformis ATCC 25196</i>	
	T2	4	8.7	NC_005363	<i>Bdellovibrio bacteriovorus HD100</i>	92
T3	22	47.8	Unidentified species			

발견되지 않았으며 이 미생물은 근연종은 *Methylibium petroleiphilum* PM1으로써 염기서열이 96% 정도로 일치하였다. 주목할 만 한 점은 이 미생물이 호기성 조건에서 methyl tertiary-butyl ether(MTBE)를 분해하는 미생물이며¹⁴⁾ MTBE는 1,4-다이옥산과 같은 에테르 계열의 물질로서 서로 비슷한 구조를 가지고 있다는 점이다. 또한 1,4-다이옥산이 가장 분해가 잘되었던 H사의 활성슬러지에서 분석된 미생물 중 19.6%의 매우 높은 비율로 이 미생물이 존재하고 있고 K사에서도 일부 발견되었으며 효율이 가장 낮았던 T사에서 발견되지 않았다는 점은 H1 및 K1 그룹에 속하는 세균이 1,4-다이옥산의 분해에 관여할 수도 있다는 가정을 뒷받침 한다. 그 밖에도 T사에서만 발견된(전체의 8.7%) T2그룹에 속하는 세균의 경우 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100와 92% 염기서열이 일치하는데 이 미생물은 다른 박테리아를 포식하는 용균성 미생물(bacteriolytic microbe)¹⁵⁾로서 이와 비슷한 역할을 하는 미생물일 경우 T사에서의 생물학적 유기물 제거효율이 낮은 원인 중 한 가지가 될 수도 있을 것으로 판단된다.

4. 결론

본 연구에서는 폐수 내에 1,4-다이옥산이 존재하는 3개 업체(K, H와 T) 폐수의 생물학적 처리 과정의 1,4-다이옥산 농도를 측정하여 제거효율을 평가하였다. 1,4-다이옥산의 농도는 T사에서 약 316 mg/L로 가장 높았으며 H사는 약 76 mg/L, 생물학적 처리 전단에 펜톤 산화로 1,4-다이옥산을 처리하는 K사에서는 2.6 mg/L로 가장 낮았다. 처리 효율은 H사에서 98%로 가장 높았으며 K사는 낮은 1,4-다이옥산 농도로 인해 77% 정도로 두 곳 모두 유출농도가 각각 1.41 mg/L과 0.59 mg/L로 H사는 고도산화공정 없이도 기준에 부합하였다. 그러나 T사의 처리시설에서 유출되는 1,4-다이옥산의 농도는 23 mg/L로 배출허용기준을 상회하여 후속 처리시설을 운전하고 있으나 생물학적 처리시설에서 H사와 같이 높은 효율을 가진다면 생물학적 처리만으로도 배출허용기준 이하로 유지할 수 있을 것으로 판단된다.

또한 각 업체의 슬러지를 이용하여 인공폐수의 1,4-다이옥산의 분해실험을 수행하여 슬러지의 종류에 따른 제거 효율 변화를 파악하였다. 100 mg/L의 1,4-다이옥산을 함유한 배지에 3개사의 활성슬러지를 500 mg/L가 되도록 주입한 후 제거율을 관찰하였다. 7일간의 운전 후 H사의 슬러지를 이용한 제거율은 100%였으며 T사는 67%, K사는 52% 순서였다.

각 슬러지의 우점 미생물 종을 식별하기 위해 분자생물학적 방법인 16S rDNA를 이용한 cloning을 실시하여 그룹을 지어 각 업체의 처리효율과 비교하여 차이가 나는 원인을 찾고자 하였다. 염기서열이 분석된 미생물 중 가장 많은 부분을 차지하는 것은 미확인 균주로서 H4그룹(41.3%), K4그룹(70.6%), T3그룹(47.8%)이 이에 속하였으며 H1그

룹 및 K1그룹에 속하는 미생물은 T사에서는 발견되지 않았으며 이 미생물은 근연종은 *Methylibium petroleiphilum* PM1으로 호기성 조건에서 1,4-다이옥산과 같은 에테르 계열의 methyl tertiary-butyl ether(MTBE)를 분해하는 미생물로 알려져 있다. 또한 이 미생물그룹은 1,4-다이옥산이 가장 제거율이 높았던 H사의 활성슬러지에서 19.6%의 매우 높은 비율로 존재하고 있고 K사에서도 발견되었으며 효율이 가장 낮았던 T사에서 발견되지 않아 이 세균이 1,4-다이옥산의 분해에 관여할 가능성을 보였다.

사 사

이 논문은 2007년도 차세대 핵심환경기술개발사업의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Stefan, M. I. and Bolton, J. R., "Mechanism of the degradation of 1,4-dioxane in dilute aqueous solution using the UV/hydrogen peroxide process," *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 1588 ~ 1595(1998).
2. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme(NICNAS), 1,4-Dioxane Priority Existing Chemical, 7(1998).
3. Ministry of Environment Republic of Korea Home Page, <http://www.me.go.kr>, December(2007).
4. Safarzadeh, A. A., Bolton, J. R. and Caster, S. R., "Ferrioxalate-mediated photodegradation of organic pollutants in contaminated water," *Water Res.*, **31**(4), 787 ~ 798(1997).
5. Klecka, G. M. and Gonsoir, S. J., "Removal of 1,4-dioxane from wastewater," *J. Hazard. Mater.*, **13**, 161 ~ 168(1986).
6. Roger, R. H., Graham, E. J., and David, R. R., "Photocatalytic degradation of 1.4 dioxane in aqueous solution," *J. Photochem. Photobiol., A*, **108**, 55~58(1997).
7. Burbach, B. L. and Perry, J. J., "Biodegradation and bio-transformation of groundwater pollutant mixtures by *Mycobacterium vaccae*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1025 ~ 1029(1993).
8. Bernhardt, D. and Diekmann, J., "Degradation of dioxane, tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental *Rhodococcus* strain," *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 120 ~ 123(1991).
9. Parales, R. E., Adamus, J. E., White, N., and May, H. D., "Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture," *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4527 ~ 4530(1994).
10. Sock, S. M., "A comprehensive evaluation of biodegradation as a treatment alternative for the removal of 1,4-

- dioxane,” Master of Science Thesis, Clemson University (1993).
11. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., Washington D. C., USA(1988).
 12. Park, Y. M., Pyo, H. S., Park, S. J., and Park, S. K., “Development of the analytical method for 1,4-dioxane in water by liquid-liquid extraction,” *Anal. Chim. Acta*, **548**, 109~115(2005).
 13. Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F., and Reinhardt, R., “The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium strain EbN1,” *Arch. Microbiol.*, **183**(1), 27~36 (2005).
 14. Kane, S. R., Chakicherla, A. Y., Chain, P. S., Schmidt, R., Shin, M. W., Legler, T. C., Scow, K. M., Larimer, F. W., Lucas, S. M., Richardson, P. M., and Hristova, K. R., “Whole-genome analysis of the methyl tert-butyl ether-degrading beta-proteobacterium *Methylibium petroleiphilum PMI*,” *J. Bacteriol.*, **189**(5), 1931~45(2007).
 15. Rendulic, S., Jagtap, P., Rosinus, A., Eppinger, M., Baar, C., Lanz, C., Keller, H., Lambert, C., Evans, K. J., Goesmann, A., Meyer, F., Sockett, R. E., and Schuster, S. C., “A predator unmasked: life cycle of Bdellovibrio bacteriovorus from a genomic perspective,” *Science*, **303**(5658), 89~92(2004).