

제올라이트를 이용한 생물막 형성시 미생물의 부착에 금속이 미치는 영향에 관한 연구

A Study on the Effect of Metals on Bacteria Adhesion to
Zeolite as Bio-media Materials

김재근* · 박인선** · 박재우***

Kim, Jae Keun · Park, In Sun · Park, Jae-Woo

Abstract

Natural zeolite is widely used as sorbents and bio-media materials because it is cheap as well as it has efficient porous structures and large cation exchange. In this study, the effect of metal cations (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}) adsorbed to natural zeolite on the microorganism attachment was investigated. Metal-modified zeolites (MMZ) were prepared with 0.01 M, 0.02 M and 0.1 M NaCl , CaCl_2 , MgCl_2 and AlCl_3 solutions respectively, which concentrations were equivalent to 10%, 20% and 100% of cation exchange capacity (CEC) of natural zeolite. *Pseudomonas putida* was used as microorganism which was cultivated in Beef Extract Medium at 26°C. The microorganism attachment to MMZ was increased more than natural zeolite. The amount of bacterial adhesion to MMZ and natural zeolite were $\text{Mg}^{2+} > \text{natural} > \text{Na}^+ > \text{Al}^{3+} > \text{Ca}^{2+}$ under 10% of CEC, $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{natural} > \text{Na}^+$ under 20% of CEC and $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{natural} > \text{Al}^{3+} > \text{Na}^+$ under 100% of CEC. Especially, Mg-modified zeolite (Mg-MZ) showed the highest amount of bacterial adhesion, which increased the microorganism attachment 60% higher than natural zeolite under 10% of CEC. However, the amount of bacterial adhesion was decreased as the concentration of metal cations modified to zeolite were increased, showing that the increased amounts were 60% under 10% of CEC, 50% under 20% of CEC and 10% under 100% of CEC in Mg-MZ. Additionally, the effect of Mg^{2+} in solution on the bacterial adhesion was investigated in order to compare it with the effect of Mg^{2+} adsorbed to zeolite. The maximum quantity of bacterial adhesion to Mg-MZ was not different from the amount of microorganism attachment to the natural zeolite when Mg^{2+} solution was added.

Keywords : Bacterial adhesion, Bio-media material, Metal-modified Zeolite

요 지

천연 제올라이트는 효과적인 다공성 구조와 높은 양이온 교환능력을 가지고 있을 뿐 만 아니라 비교적 저렴한 가격으로 인하여 흡착제 및 생물막 담체 등으로 널리 사용되는 물질이다. 본 연구에서는 천연 제올라이트를 이용한 생물막 형성시 제올라이트에 흡착된 금속 양이온(Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+})이 미생물의 흡착량에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 검토하였다. 본 실험을 위하여 천연 제올라이트의 양이온 교환능력(cation exchange capacity; CEC)의 10%, 20%, 100%를 금속 양이온으로 치환하여 개질시킨 Metal-modified zeolite(MMZ)를 사용하였고 미생물은 *Pseudomonas putida*를 계대배양하여 사용하였다. 미생물 흡착실험 결과 MMZ로의 미생물의 흡착량이 천연 제올라이트로의 흡착량 보다 일반적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 즉, 10% CEC의 경우 미생물의 흡착량은 $\text{Mg}^{2+} > \text{natural} > \text{Na}^+ > \text{Al}^{3+} > \text{Ca}^{2+}$, 20% CEC의 경우 $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{natural} > \text{Na}^+$, 100%의 CEC의 경우 $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{natural} > \text{Al}^{3+} > \text{Na}^+$ 의 흡착량을 나타내었다. 특히, 마그네슘으로 개질된 Mg-modified zeolite(Mg-MZ)의 경우 가장 높은 미생물 흡착량을 보였으며 10% CEC로 개질한 경우 천연 제올라이트보다 60% 이상 증가된 흡착량을 나타내었다. 그러나 제올라이트에 흡착된 양이온의 양이 증가할수록 미생물의 흡착량은 감소되는 경향을 나타내었는데, 즉, 10% CEC Mg-MZ의 경우 미생물의 흡착 증가량이 60% 이상이였으나 20% CEC의 경우 50%, 100% CEC의 경우 10%로 흡착 증가량이 감소되었다. 또한 제올라이트에 흡착된 Mg^{2+} 와 수용액 상에 존재하는 Mg^{2+} 가 미생물의 흡착량에 미치는 영향을 비교한 결과 제올라이트에 흡착될 수 있는 미생물의 최대흡착량은 큰 차이가 없는 것으로 조사되었다.

핵심용어 : 미생물 부착, 생물막 담체, Metal-modified Zeolite

*금호건설(주) 토목팀 사원 (E-mail : jkkm8@kumhoenc.com)

**정희원 · 한양대학교 토목공학과 박사과정 (E-mail : tensunny@hanmail.net)

***정희원 · 교신저자 · 한양대학교 토목공학과 정교수 (E-mail : jaewoopark@hanyang.ac.kr)

1. 서 론

담체를 이용한 생물막 수처리 공정은 담체에 고정된 미생물의 분해작용을 이용하여 하·폐수를 처리하는 공정을 말하며, 최근 질소와 인 등 비점오염원 문제에 대한 관심의 증가 및 수질관리에 대한 규제강화에 힘입어 담체를 이용한 수처리 공정에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있다. 이러한 생물막 수처리 공정에는 천연 광물, 세라믹, 고분자 플라스틱 등 다양한 담체가 활용되고 있는데 특히 경제적인 측면과 자연 친화적인 면에 있어서 천연 광물의 미생물 담체로서 활용 가치는 높다고 할 수 있다.

제올라이트는 흡착용량이 크고, 분자체 효과, 흡착 성질의 조절 가능성 등 독특한 특징으로 인하여 촉매, 흡착제, 세제의 첨가제 등 다양한 분야에 널리 사용되고 있는 광물이다. 특히, 천연 제올라이트의 양이온 교환 능력은 폐수처리공정에도 널리 활용되고 있는데, 물에 녹아 있는 암모니아성 질소 성분의 제거에는 클리놉틸로라이트(clinoptilolite)가 효과적이며 이는 암모늄 이온에 대해 클리놉틸로라이트가 선택적으로 작용하기 때문이다(홍지숙 등, 2001). 그리고 활성슬러지 처리공정을 이용하여 폐수를 처리할 경우 천연 제올라이트를 동시에 주입하면 질소 성분 제거에 효과적인 것으로 알려져 있다(윤태경 등, 2001). 또한 기술적 또는 경제적인 면에서 중금속의 교환 제거제로서 제올라이트의 효용도가 높아지고 있으며(노진환, 2003) 이에 대한 연구도 다수 진행되었다(Lee *et al.*, 2001).

생물막 자체의 특성이나 미생물의 부착, 생물막 형성과정 및 메커니즘의 분석 등 생물막에 대한 연구가 많이 수행되고 있다. 특히, 담체에 대한 미생물의 부착력은 생물막의 처리성능을 결정하는 중요한 요인이 되므로 담체의 표면적, 양이온 치환능력 및 표면 양전하량 등의 물리·화학적 특성에 따른 생물막 형성과 그 정도에 대한 연구가 여러 관점에서 수행되었다. 또한 담체 표면의 거칠기(roughness)가 미생물의 부착에 영향을 미친다는 사실은 널리 알려져 있으며(Gotzinger *et al.*, 2007; Shimp *et al.*, 1982), 담체 표면의 소수성 정도가 미생물의 부착에 미치는 영향에 대한 선행 연구도 수행된 바 있다(Teixeira *et al.*, 1999).

미생물 부착과 생물막 형성에 영향을 주는 담체의 특징들은 담체의 종류, 표면의 화학적 성질, 입자 크기, 농도, 거칠기, 공극 및 표면적 등을 들 수 있다. 천연 제올라이트의 경우 거칠기와 공극 및 표면적의 크기 등 물리적 특성에 따른 미생물의 부착효율에 대한 연구는 다양하게 수행되었으나 담체의 화학적 특성에 따른 생물막 형성 또는 생물막의 성장촉진에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 1) 천연 제올라이트에 다양한 금속 양이온을 각각 흡착시켜 개질시킨 후 금속 양이온 치환 제올라이트(Metal-modified Zeolite; MMZ)로 흡착되는 미생물의 양을 비교분석 함으로써 천연 제올라이트의 표면에 흡착된 금속 양이온들이 미생물의 부착과정에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고 2) 이와 더불어 반응표면분석(Response Surface Methodology; RSM) 과정을 통하여 미생물의 양, 금속이온의 농도 및 온도 등 생물막의 형성에 영향을 미치는 인자들의 영향 정도를 파악하고자 하였다.

2. 연구방법

2.1 실험재료

본 연구에서 사용한 제올라이트는 국내 광산(주)렉셈에서 채광한 상업용 천연 제올라이트로서 클리놉틸로라이트와 모데나이트(mordenite)가 주요 구성 광물이며 그 특징은 Table 1에 나타내었다.

MMZ를 제조하기 위하여 사용된 염화금속(metal-chloride) 용액은 한국의 덕산약품공업(주)에서 구입한 염화나트륨(NaCl (순도 99.5%)), 일본 Kanto Chemical사의 염화칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (순도 77.5%)), 일본 Junsei Chemical사의 염화마그네슘(MgCl_2 (순도 97.0%)), 일본 Showa Chemical사의 염화알루미늄($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (순도 97.0%))을 사용하였다.

실험에 사용된 박테리아는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 *pseudomonas putida*(균주번호: 1134)를 분양 받은 후 배양하여 사용하였다. 배양에 사용한 배지는 Beef Extract Medium을 사용하였다. 배지는 해당농도로 제조 후 121°C에서 15분간 가압멸균하고 26°C로 식힌 후에 사용하였으며 박테리아는 26°C, 150 rpm 조건 하에서 매일 계대 배양하였다. 배양한 미생물은 생균수를 colony forming unit(CFU)으로 환산하였을 경우 CFU값이 10^8 에 도달하였을 때, 배지를 450 rpm, 15분간 원심 분리하여 미생물을 농축하여 사용하였다. 120°C에서 2시간 이상 건조하여 미리 수분을 제거한 여과지에 농축된 미생물 용액을 1 mL 주입하여 농축된 미생물의 질량을 측정하였다. 미생물은 농축 후 pH 7.0의 인산 완충용액(phosphate buffer)을 사용하여 보관하였다. 인산 완충용액의 제조는 한국의 덕산약품공업(주)의 제1인산칼륨(potassium phosphate, dibasic(K_2HPO_4 , F.W.=174.18))과 제2인산칼륨(potassium phosphate, monobasic(KH_2PO_4 , F.W.=136.09))을 이용하여 각각 0.1 M 용액을 만든 후 혼합하여 pH 7.0으로 적정하였다.

2.2 양이온 치환 제올라이트의 제조

세척하여 건조한 천연 제올라이트 100g과 천연 제올라이트 CEC의 약 10%, 20%, 100%에 해당하는 염화나트륨(NaCl), 염화칼슘(CaCl_2), 염화마그네슘(MgCl_2), 염화알루미늄(AlCl_3) 용액 1 L를 각각 혼합한 후 24시간 동안 교반하였다. 교반 후 증류수로 2회 세척하고 120°C에서 24시간 동안 건조하여 MMZ를 제조하였다.

Table 1. Properties of the Natural Zeolite Used in this Study

Properties	Measured Values
Diameter (mm)	2~3
CEC (meq/100g)	100~160
pH	7~10
Specific Surface Area (m^2/g)	80~100
Specific Gravity	2.1~2.4
Hardness	3.5~5.0
Refractive Index	1.47~1.49
Pore Size (nm)	0.3~1.0

2.3 양이온 치환 제올라이트로의 미생물 부착 실험

세척하여 건조한 천연 제올라이트 및 각각의 금속 양이온 치환 제올라이트 2 g과 박테리아 농축 용액을 25 mL 유리용기에 준비하였다. 박테리아 농축액의 농도는 제올라이트 대비 0.05 mg/g가 되도록 주입하고 증류수를 이용하여 전체 용액의 부피가 15 mL가 되도록 하였다. 준비된 각각의 유리용기를 회전식 진탕배양기(rotary shaker)를 이용하여 실온(20°C)에서 60 rpm으로 교반하고 시간(5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300분)에 따라 각 시료의 흡광도를 측정하였다. 각각의 시료는 진탕배양기에서 제거된 후 90초간 부유물을 침강시키고 흡광광도계를 이용하여 600 nm 파장에서 각 시료의 상등액의 흡광도를 측정하였다.

2.4 수용액 상태의 금속 양이온이 미생물의 부착에 미치는 영향 실험

수용액 상태로 존재하는 금속 양이온과 양이온 교환을 통하여 제올라이트 표면에 치환된 금속 양이온이 미생물의 부착에 미치는 영향을 비교·분석하기 위하여 10% CEC로 치환된 Mg-modified zeolite(Mg-MZ)에 미생물을 혼합한 실험군과 천연 제올라이트에 0.01 M 염화마그네슘(MgCl₂) 수용액을 첨가하고 미생물을 혼합한 실험군으로 나누어 미생물의 부착실험을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 제올라이트 표면의 금속 양이온이 미생물의 부착에 미치는 영향

미생물이 제올라이트에 부착시 금속 양이온이 미치는 영향을 살펴보기 위하여 4가지의 금속 양이온(Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺)으로 치환된 제올라이트로의 미생물 부착 배치실험을 수행하였으며 결과를 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다. 결과를 살펴보면, 제올라이트 1 g당 미생물의 부착량을 mg으로 나타내었을 경우, 천연 제올라이트 및 MMZ의 경우 모두 미생물의 부착량은 시간이 경과함에 따라 꾸준히 증가하는 것을 볼 수 있다. CEC의 10%, 20%, 100%로 금속 치환된 MMZ와 치환되지 않은 천연 제올라이트로의 미생물 부착량을 비교해보면, 10% CEC의 경우 Mg²⁺ > natural > Na⁺ > Al³⁺ > Ca²⁺, 20% CEC의 경우 Mg²⁺ > Ca²⁺ > Al³⁺ > natural > Na⁺, 100% CEC의 경우 Ca²⁺ > Mg²⁺ > natural > Al³⁺ > Na⁺로서 대체적으로 MMZ의 경우 미생물의 흡착량이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 특히 마그네슘과 칼슘으로 치환된 Mg-MZ 및 Ca-modified zeolite(Ca-MZ)의 경우 모든 농도에서 미생물의 부착량이 증가되었다.

Fig. 2에 나타낸 바와 같이, 흡착시간(300분)에 따른 최종 흡착량을 비교해보면, 10% CEC Mg-MZ는 천연 제올라이트 보다 약 60%, 20% CEC의 경우 Mg-MZ는 약 50%, Ca-MZ는 약 30%, 100% CEC의 경우 Mg-MZ는 약 10%, Ca-MZ는 약 20%의 미생물 흡착량을 증가시키는 결과를 볼 수 있었다. 또한 치환된 금속의 농도가 높아질수록 미생물의 흡착량은 감소하는 경향을 보였는데, 즉 Mg-MZ의 경우 10% CEC에서는 미생물 부착량이 60% 증가하였지만, 100% CEC의 경우에는 10% 증가하였고, Ca-MZ 또한 20% CEC

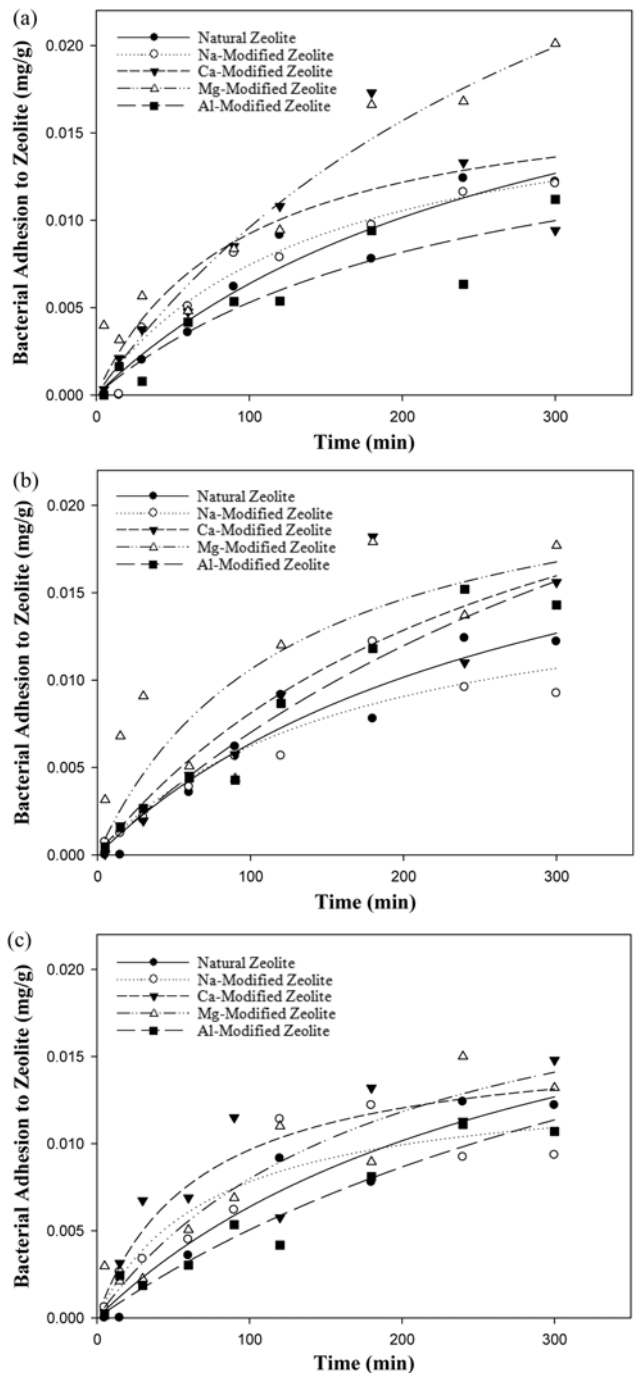


Fig. 1 Amount of Bacterial Adhesion to (a) 10% CEC, (b) 20% CEC, (c) 100% CEC Metal-modified Zeolite

에서는 30%, 100% CEC에서는 20%로서 부착량이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 박 등(1999)의 연구결과와 유사하며, 이 연구에서는 Na⁺과 Ca²⁺을 이용하여 미생물 표면의 전기적 특성을 변화시킬 경우 미생물이 담체에 부착되는 흡착량을 측정하였는데 금속 양이온이 첨가되었을 경우 미생물의 부착량은 증가되었고 또한 저농도일 경우 금속이온이 미생물의 부착에 미치는 영향이 큰 것으로 조사되었다(박 등, 1999).

일반적으로 제올라이트 세공의 크기는 0.3~1.0 nm 범위로서 매우 작기 때문에 제올라이트에 흡착되는 분자는 일반적으로 단일층 흡착특성을 가진다. 제올라이트로의 흡착은 흡착되는 분자가 세공이 모두 채워질 때까지 흡착이 계속되고 겉표면은 세공 내 표면에 비하여 표면적이 매우 작기 때문

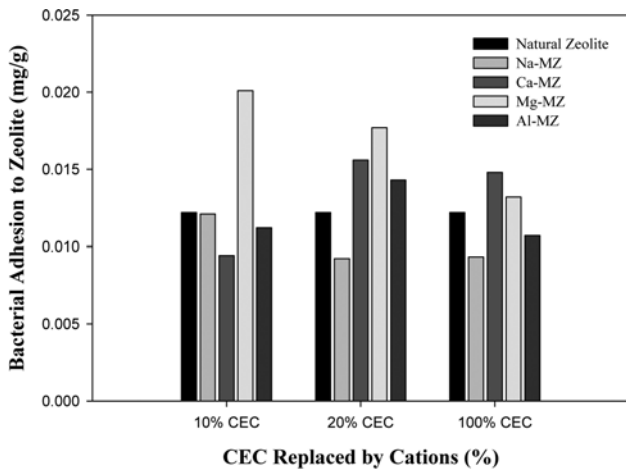


Fig. 2 Amount of the Bacterial Adhesion to 10, 20 and 100% CEC Metal-modified Zeolite at 300 min of Adsorption Time

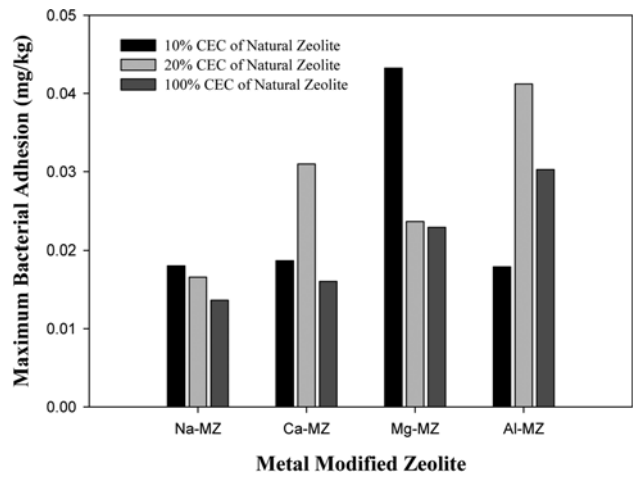


Fig. 3 Maximum Amount of Bacterial Adhesion to 2, 4 and 20% CEC Metal-modified Zeolite Estimated by Equation (1)

에 세공이 다 채워지면 흡착량이 더 이상 증가하지 않는다. 이로 인하여 친화력이 강한 물질이 제올라이트에 흡착될 때 나타나는 등온선 모양은 대체로 랭미어(Langmuir) 흡착등온선과 비슷한 결과를 보인다(서곤, 2005). MMZ로의 미생물 부착 특성을 확인하기 위하여 시간에 따른 미생물의 부착량을 아래 식 (1)과 같은 방정식을 이용하여 Fig. 1에 나타내었으며 분석에 따른 계수들은 Table 2에 나타내었다.

$$y = \frac{Kbt}{1+Kt} \quad (1)$$

y : 제올라이트에 부착되는 미생물의 양, mg/g

t : 시간, min

b : 최대 미생물 부착량, mg/g

K : 시간에 관한 상수, 1/min

Table 2에서와 같이 식 (1)과 미생물의 제올라이트로 흡착되는 반응특성이 높은 상관관계를 나타내는 것을 알 수 있으며, 따라서 식 (1)을 통하여 추정된 최대 미생물 부착량을

Table 2. Adhesion Parameters for Zeolite Estimated by Equation (1)

Type of Zeolite		$y = \frac{Kbt}{1+Kt}$		
		K	b	r ²
Natural Zeolite		0.0034	0.0251	0.94
0.01M	Na-Modified Zeolite	0.0070	0.0180	0.97
0.02M		0.0060	0.0166	0.87
0.1M		0.0134	0.0136	0.82
0.01M	Ca-Modified Zeolite	0.0107	0.0187	0.78
0.02M		0.0035	0.0310	0.84
0.1M		0.0151	0.0160	0.80
0.01M	Mg-Modified Zeolite	0.0028	0.0432	0.91
0.02M		0.0081	0.0236	0.60
0.1M		0.0053	0.0229	0.88
0.01M	Al-Modified Zeolite	0.0042	0.0179	0.88
0.02M		0.0020	0.0412	0.96
0.1M		0.0020	0.0303	0.94

Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서와 같이 식 (1)을 통하여 추정된 미생물의 최대 부착량은 Mg-MZ 및 Ca-MZ의 경우 대체적으로 증가하는 경향을 나타내고 있으며, 특히, 10% CEC Mg-MZ의 경우 천연 제올라이트와 비교하여 약 72%, 20% CEC Ca-MZ의 경우 약 24% 이상 미생물 흡착량을 증가시키는 것으로 조사되었다.

일반적으로 미생물은 거의 모든 고체 표면에 부착할 수 있으며 담체의 표면으로 미생물이 부착되는 원리는 정전기적 힘(electric force)과 반 데르 발스 힘(Van der Waals force)으로 설명할 수 있다. 즉, 미생물을 담체에 부착시키려는 초기에 미생물과 담체 표면간의 정전기적 반발력을 감소시키거나 인력을 증대시킬 경우 미생물의 부착량을 증가시킬 수 있다. 미생물 및 제올라이트의 표면은 일반적으로 음전하를 갖는데 MMZ와 같이 금속 양이온을 이용하여 처리한 경우 금속 양이온이 첨가됨에 따라 표면이 음으로 하전된 제올라이트의 표면이 전기적으로 중화되고 따라서 미생물과 MMZ 표면사이의 전기적인 반발력을 감소시켜 미생물의 부착을 용이하게 하기 때문에 금속 양이온으로 치환된 제올라이트의 경우 천연 제올라이트보다 미생물의 흡착을 증가시키는 것으로 사료된다. 그러나 흡착되는 금속 양이온의 양이 증가함에 따라 제올라이트의 표면이 다시 양전하로 하전되고 이에 따라 표면의 정전기적 반발력을 다시 형성하여 금속 양이온의 농도, 즉 CEC가 증가함에 따라 미생물의 부착량이 감소되는 것으로 사료된다. 실제 본 연구에서 사용된 제올라이트 치환 금속 양이온의 농도는 제올라이트의 CEC의 약 10%, 20% 및 100%에 해당된다. 특히, 제올라이트의 경우 세공이 매우 작아 세공안으로는 금속이온의 침투가 어려워 양이온 교환이 힘들기 때문에 실제 양이온 치환이 가능한 부분은 세공을 제외한 제올라이트 표면만으로 볼 수 있다. 즉, 제올라이트의 양이온 교환이 가능한 CEC는 일반적으로 총 CEC의 약 20% 정도로 볼 수 있고 따라서 20% CEC 이상으로 양이온이 주입되면 전하의 역전현상이 발생할 가능성이 있다. 실제 Fig. 2의 20%와 100% CEC에서의 미생물 부착량을 살펴보면 감소량의 차이는 있으나 모든 MMZ에서 미생물의 흡착량이 감소되는 것을 볼 수 있으며 이는 제올라이트 표면의 전기적 반발력이 다시 생성되어 부착량

이 감소하는 것으로 볼 수 있다.

그러나 제올라이트로의 미생물의 부착은 위와 같은 물리·화학적 힘 뿐만 아니라 미생물 자체내에서 배출된 고분자 물질이 부착력을 강화시키며 미생물의 군집화(colonization)를 이루어 생물막을 형성을 촉진시키게 된다(정재춘, 1994). 이러한 사실은 실험결과를 통해서도 알 수 있는데 즉, 미생물의 부착이 정전기적 반발력의 감소에 의해서만 발생된다면 Al-modified zeolite(Al-MZ)의 경우 미생물의 부착량이 Mg-MZ 또는 Ca-MZ 보다 증가해야 하지만 본 실험결과 Mg-MZ 또는 Ca-MZ 보다 미생물의 부착량이 적을 뿐 만 아니라 급속으로 치환되지 않은 천연 제올라이트보다도 부착량이 줄어드는 결과를 보여주고 있다. 이렇게 Mg-MZ 또는 Ca-MZ의 경우 미생물의 부착을 촉진시키는 원인을 Mg^{2+} , Ca^{2+} 과 같은 원소가 세포의 활성화에 미치는 영향 및 미생물의 소수성과 고분자 물질의 생성에 미치는 영향에서 찾아볼 수 있다. 길쭉은 미생물의 성장에 필수적으로 요구되지는 않으나 미생물의 세포벽 안정성과 미생물의 내생포자의 내열성에 중요한 역할을 하는 원소이다(Madigan *et al.*, 1997). 또한 마그네슘은 혐기성 소화에 있어서 미생물의 활성을 증가시킨다는 연구결과(Perez-Rodriguez *et al.*, 1989)에서와 같이 미생물의 리보솜, 세포막, 핵산 등의 구조를 안정화시키고, 약 300여 종류의 효소, 특히 인산전이효소의 활성에도 필요한 대량 영양소로 알려져 있다(Madigan *et al.*, 1997).

미생물의 부착은 소수성 세포가 친수성 세포보다 부착 효율이 높고(van Loosdrecht *et al.*, 1987), 고체 담체에 부착하는 *bentic cyanobacteria*의 경우 소수성을 발현시키는데 양이온이 필요하며 Mg^{2+} 또는 Ca^{2+} 와 같은 2가 양이온이 Na^+ 과 같은 1가 양이온보다 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Fattom and Shilo, 1984). 또한 세포의 고분자 물질의 생성은 Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 가 존재할 경우 촉진된다고 보고되고 있으며(Corpe, 1964; Allison and Sutherland, 1987), 박 등(1999)의 연구에서는 Ca^{2+} 과 Na^+ 이 미생물의 고분자물질 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과 Ca^{2+} 의 경우가 Na^+ 의 경우보다 1.7배의 세포의 고분자물질을 생성하는 것으로 조사되었다(박 등, 1999). 이러한 연구결과로 볼 때 양이온 교환을 통하여 제올라이트에 흡착된 Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 이 제올라이트의 표면 전하를 중성화시키고 동시에 미생물의 소수성 및 고분자물질의 생성을 촉진시켜 제올라이트로의 부착을 증가시키고 Na^+ 또는 Al^{3+} 과 같은 원소의 경우 위와 같은 미생물의 특성에 큰 영향을 미치지 못하기 때문에 흡착량이 증가가 크지 않거나 증가되지 않은 것으로 사료된다. 따라서 천연 제올라이트를 생물막 담체로 활용시 자연적으로 존재하는 Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 이 담체로의 미생물 흡착을 증가시킬 수 있으며 또한 이러한 금속 양이온의 인위적인 첨가를 통하여 생물막의 미생물 부착량을 증가시켜 생물막의 효율을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

3.2 수용액 상태의 금속 양이온이 미생물의 부착에 미치는 영향

제올라이트에 양이온 교환으로 흡착된 Mg^{2+} 과 수용액 상태로 존재하는 Mg^{2+} 이 미생물의 부착에 미치는 영향을 비교

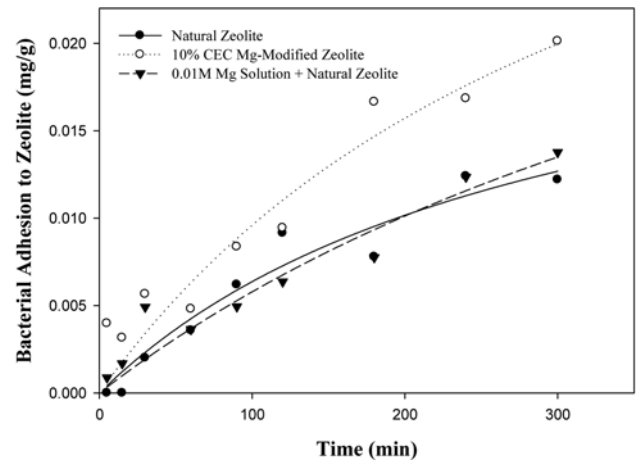


Fig. 4 Amount of Bacterial Adhesion to 10% CEC Mg-modified Zeolite and Natural Zeolite with 0.01M Mg Solution

Table 3. Adhesion Parameters for 10% CEC Mg-modified Zeolite and Natural Zeolite with 0.01M Mg Solution Estimated by Equation (1)

Type of Zeolite	$y = \frac{Kbt}{1 + Kt}$		
	K	b	r^2
Natural Zeolite	0.0034	0.0251	0.94
0.01M Mg-Modified Zeolite	0.0028	0.0432	0.91
0.01M Mg Solution+Natural Zeolite	0.0017	0.0405	0.92

하기 위한 회분식 실험을 수행하였다. 본 실험에서는 MMZ로의 미생물 부착실험에서 최대 부착량을 나타낸 10% CEC Mg-MZ를 담체로 사용하였고 실험결과 및 분석계수를 Fig. 4와 Table 3에 나타내었다. 흡착시간(300분)에 따른 최종 흡착량을 비교해보면 Mg-MZ의 경우 미생물의 부착량을 약 60% 증가시키지만 천연 제올라이트에 0.01 M Mg^{2+} 수용액을 첨가했을 경우에는 약 13%의 증가율만 나타내어 미생물의 초기 부착시 제올라이트에 흡착된 Mg^{2+} 의 영향이 더 큰 것을 보여주었다. 그러나 식(1)을 적용하여 부착량을 예측하였을 경우 Table 3에서와 같이 Mg-MZ의 최대흡착량은 0.01 M Mg^{2+} 수용액을 사용했을 경우와 거의 흡사하게 나타났다. 이러한 현상은 Mg^{2+} 이 제올라이트의 표면에 흡착되어 있을 경우 제올라이트 표면을 중화시켜 정전기적 반발력을 감소시킴으로써 초기에 미생물과의 흡착을 촉진시키는 효과가 있으나, 시간이 경과하고 평형상태에 도달하게 되면 Mg^{2+} 의 영향으로 생성이 촉진되는 것으로 예상되는 고분자 물질의 영향으로 최대 흡착량에는 큰 차이가 없는 것으로 사료된다.

3.3 제올라이트로의 미생물 부착에 관한 반응표면분석

반응표면(response surface)은 반응변수(특성치)와 독립변수(설계변수, 인자)들과의 함수관계를 말하며, 반응표면분석(Response Surface Methodology; RSM)에서는 반응표면에 대한 적절한 통계적 모형을 가정하고, 독립변수의 여러 조건에서 실험을 수행하여 데이터를 얻은 후에 회귀분석을 통하여 반응표면을 추정한다. 추정된 반응표면식을 이용하여 독립변수의 변화에 따른 반응변수의 변화 정도를 분석하는 민

Table 4. The Experimental Domain Factor and Level for the Box-Behnken Design

Code	Name of factor	Range and levels(coded)		
		-1	0	+1
A	Metal	0.001	0.002	0.01
B	Temperature	10	20	40
C	Biomass	0.01	0.05	0.1

감도 분석을 행할 수 있고, 반응변수를 최대(소)화하는 독립 변수의 수준조합을 찾아내어 제품 및 공정의 최적화를 꾀할 수 있다.

일반적으로 반응표면식은 알려져 있지 않으므로 근사적인 모형으로 1차 모형 혹은 2차 모형을 상정한 후 결합결여검정을 통하여 모형식의 적합성을 평가한다. 본 연구에서 적용한 반응표면분석은 중심합성계획(central composite design) 중 균형 불완비 블록 계획법(balanced incomplete block design)에 2^k 요인 배치계획을 결합한 Box-Behnken 실험설계를 사용하였다. 위 실험을 통하여 미생물이 부착량을 증가시키는 것으로 확인된 Ca-MZ와 Mg-MZ를 담체로 할 경우, 독립변수인 금속 이온의 농도(x_1), 온도(x_2) 및 미생물 주입량(x_3)에 따라 어떤 조건들이 종속변수인 반응값(y)인 미생물의 부착량에 큰 영향을 미치는지를 확인하였으며, MINITAB ver. 14(Mintab Inc., U.S.A.)을 이용하여 Box-Behnken 실험설계를 수행하였다(Table 4).

Box-Behnken 실험설계를 통한 실험결과 값들의 변동을 표본회귀선에 적합한 지를 판단하는 결정계수 R^2 값은 Ca-MZ담체의 경우 88.3%로 조사되었고 Mg-MZ담체는 94.9%로 매우 높은 기여율을 보였으며 산출한 각 담체의 반응모델은 식 (2)와 (3)과 같다.

$$y = 0.01326 + 0.016903x_1 - 0.00073x_2 + 0.09832x_3 + 0.21266x_1x_1 + 0.00002x_2x_2 + 0.00099x_1x_2 - 1.99493x_1x_3 - 0.00017x_2x_3 \quad (2)$$

$$y = 0.02530 - 0.00703x_1 - 0.00140x_2 + 0.13799x_3 - 0.8459x_1x_1 + 0.00003x_2x_2 - 0.00027x_1x_2 + 0.63897x_1x_3 + 0.00019x_2x_3 \quad (3)$$

Box-Behnken 실험설계를 통해 얻어진 전체적인 모형의 적합정도를 판단하기 위하여 잔차분석을 실시하였으며 오차항에 대하여 정규성, 등분산성, 독립성, 선형성 등을 모두 만족하여 모형적으로 문제가 없다는 것으로 확인되었다. 또한, 전체 반응모델의 적합성 외에 회귀분석 및 분산분석을 통해 전체 반응 모델에 어떻게 영향을 주는지를 파악하기 위하여 분석분석(ANOVA)을 수행한 결과 Ca-MZ의 경우 각 인자에 대한 선형효과(linear effect) 보다는 금속이온의 농도와 미생물 주입량의 상호작용(cross-product interaction)의 영향이 5% 이하의 유의성($p < 0.05$)을 나타내었다. Mg-MZ의 경우 온도 및 미생물 주입량의 영향이 $p < 0.05$ 을 나타내어 주 효과(main effect)를 보여주었으며, 온도의 경우 순수이차항(quadratic interaction)에서도 5% 이하의 유의성을 나타내었다. 미생물의 부착량에 대한 각각의 인자들의 주 효과도 및 상호 작용도를 Fig. 5와 Fig. 6에 나타내었다. 주 효과도와 상호 작용도는 각 반응의 기울기가 클수록 주 효과 및 상호작용이 큰 것으로 판단한다. 반응모델을

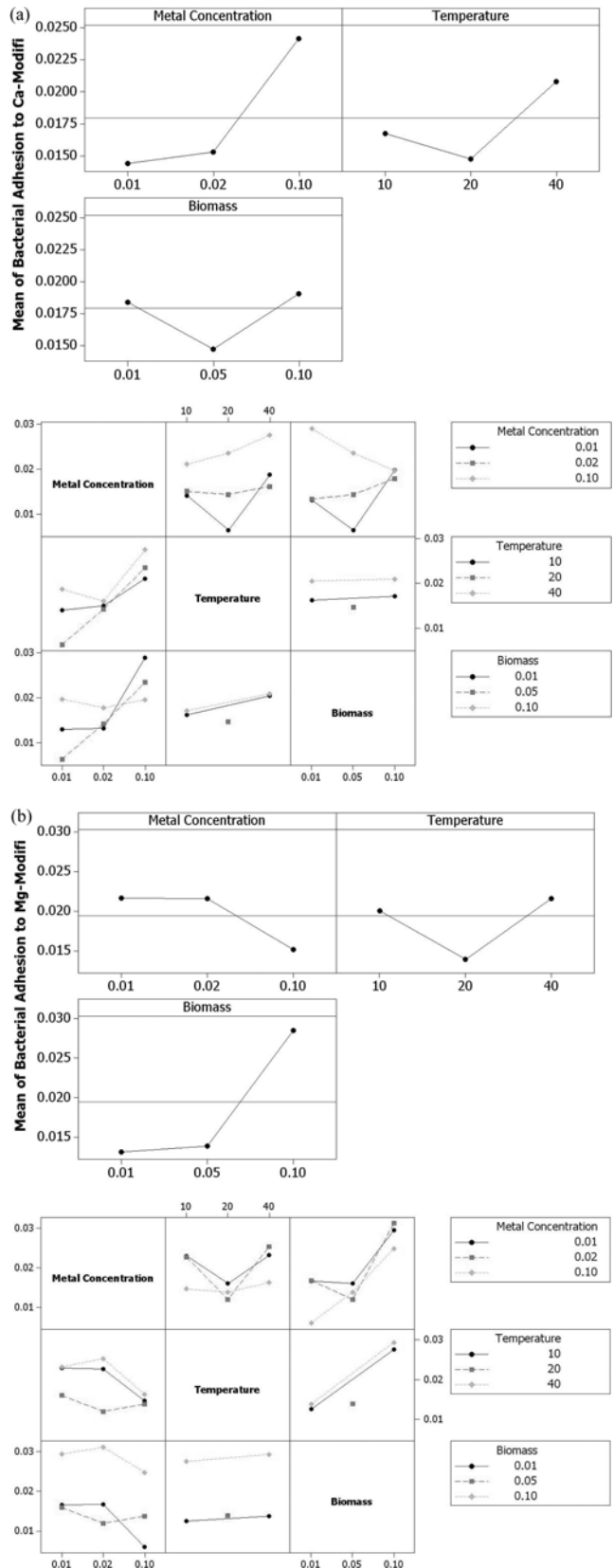


Fig. 5 Main Effects for Bacterial Adhesion to (a) Ca-Modified Zeolite (b) Mg-Modified Zeolite

바탕으로 2차원 등고선 그래프를 작성하여 각 인자들의 영향을 살펴본 결과, Ca-MZ의 경우 미생물 주입량이 금속 이온 농도나 온도보다 미치는 영향이 적고, 이와 반대로 Mg-MZ의 미생물 부착량에는 금속이온의 농도나 온도보다 미생물 주입량이 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

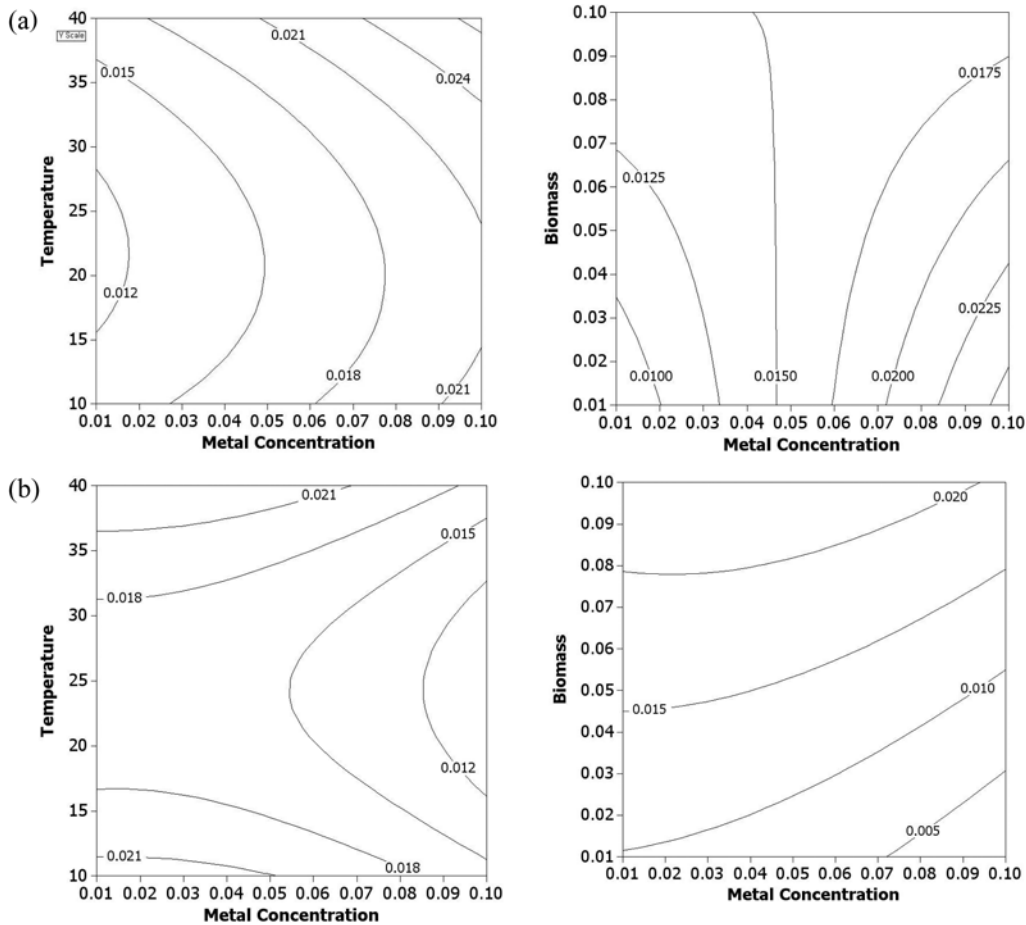


Fig. 6 Contour Plot of Bacterial Adhesion to (a) Ca-Modified Zeolite (b) Mg-Modified Zeolite

4. 결 론

생물학적 수처리 공정에서 미생물은 담체의 표면에 부착되었을 때, 미생물의 생존력과 높은 활성도를 유지할 수 있기 때문에 미생물의 부착을 촉진시키기 위한 연구가 다양하게 이루어져 왔다. 본 연구에서는 우리나라에 풍부하게 매장되어 있는 천연 제올라이트를 미생물 담체로서의 사용할 경우, 표면에 흡착된 금속 양이온의 미생물 부착을 촉진시킬 수 있는 가능성과 그 원인을 규명하고자 하였다.

생물막 형성시 제올라이트에 흡착된 금속 양이온이 미치는 영향을 살펴본 결과 CEC의 10%, 20%, 100%가 금속 양이온으로 치환된 MMZ와 치환되지 않은 천연 제올라이트로의 미생물 부착량을 비교해보면, 농도에 따라 Mg-MZ의 경우 천연 제올라이트 보다 10~20%, Ca-MZ의 경우 20~30% 가량 미생물의 부착량이 증가되었다. 이는 제올라이트에 흡착된 Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 가 제올라이트의 표면 전하를 중성화시키고 동시에 미생물의 소수성 및 고분자물질의 생성을 촉진시켜 제올라이트로의 부착을 증가시키고 Na^+ 또는 Al^{3+} 과 같은 원소의 경우 위와 같은 미생물의 특성에 큰 영향을 미치지 못하기 때문에 흡착량이 증가가 크지 않거나 증가되지 않은 것으로 사료된다. 따라서 천연 제올라이트를 생물막 담체로 활용시 자연적으로 존재하는 Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 이 담체로의 미생물 흡착을 증가시킬 수 있으며 또한 이러한 금속 양이온의 인위적인 첨가를 통하여 생물막의 미생물 부착량을 증가시켜 생물막의 효율을 향상시킬 수 있을 것으로 사료

된다.

제올라이트에 양이온 교환으로 흡착된 Mg^{2+} 와 수용액 상태로 존재하는 Mg^{2+} 이 미생물의 부착에 미치는 영향을 비교·분석한 결과 Mg^{2+} 이 제올라이트의 표면에 흡착되어 있을 경우 제올라이트 표면을 중화시켜 정전기적 반발력을 감소시킴으로써 초기에 미생물과의 흡착을 촉진시키는 효과가 있으나, 시간이 경과하고 평형상태에 도달하게 되면 Mg^{2+} 의 영향으로 생성이 촉진되는 것으로 예상되는 고분자 물질의 영향으로 최대흡착량에는 큰 차이가 없는 것으로 사료된다.

마지막으로 RSM을 수행하여 온도와 금속 이온의 농도 및 미생물 주입량에 따라 어떤 조건들이 미생물의 부착량에 가장 큰 영향을 미치는지 확인하였으며, Mg-MZ의 경우 미생물 주입량이 큰 영향을 미치고, Ca-MZ에서는 미생물 주입량이 금속 이온 농도나 온도보다 영향이 적었다.

참고문헌

- 노진환(2003) 천연 제올라이트의 수환경 개선용 기능성 소재로의 활용에 관한 연구(II): 국내산 제올라이트의 중금속 이온 흡착 특성. **한국광물학회지**, 한국광물학회, 제16권, pp. 201-213.
- 서근(2005) **제올라이트의 첫걸음**. 한국제올라이트학회.
- 박영식, 서정호, 이창한, 안갑환, 송승규(1999) Na 및 Ca 이온이 미생물의 부착에 미치는 영향. **한국환경위생학회지**, 한국환경과학회, 제25권, pp. 78-82.
- 윤태경, 이강준, 문병현, 이택순, 구현서(2001) 제올라이트를 첨가한 간헐폭기 활성슬러지 시스템을 이용한 수산물 가공 폐수

- 처리. **공업화학**, 한국공업화학회, 제12권, pp. 410-414.
- 정재춘(1994) 생물막의 미생물학적 측면. **대한환경공학회지**, 대한환경공학회, 제16권, pp. 589-600.
- 홍지숙, 임성현, 서정권, 노재성(2001) 천연 제올라이트의 이온교환 특성을 이용한 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 이온 제거에 관한 연구. **공업화학**, 한국공업화학회, 제12권, pp. 165-169.
- Allison, D.G., and Sutherland, I.W. (1987) The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, Society for General Microbiology, Vol. 133, pp. 1319-1327.
- Bitton, G. (1994) *Wastewater microbiology*. John Wiley & Sons INC., New York, N.Y.
- Corpe, W.A. (1964) Factors influencing growth and poly-saccharide formation by strains of *Chromo-bacterium violaceum*. *J. Bact.*, American Society for Microbiology, Vol. 88, pp. 1433-1441.
- Fattom, A. and Shilo, M. (1984) Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* American Society for Microbiology, Vol. 47, pp. 135-143.
- Gotzinger, M., Weigl, B., Peukert, W., and Sommer, K. (2007) Effect of roughness on particle adhesion in aqueous solutions : A study of *Saccharomyces cerevisiae* and a silica particle. *Colloid Surface B*, Elsevier, Vol. 55, pp. 44-50.
- Lee, D.H. and Moon, H. (2001) Adsorption equilibrium of heavy metals on natural zeolites. *Korean J. Chem. Eng.*, Korean Institute of Korean Engineers, Vol. 18, pp. 247-256.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. (1997) *Brock biology of microorganisms*, 8th Ed. Prantice-Hall Inc.
- Perez-Rodriguez, J.L., Maqueda, C., and Carretero, M.I. (1989) Effect of some clay minerals on the growth sulphate-reducing bacteria in anaerobic reactors. *Appl. Clay Sci.* Elsevier, Vol. 4, pp. 449-459.
- Shimp, R.J. and Pfaender, F.K. (1982) Effects of surface area and flow rate on marine bacterial growth in activated carbon columns. *Appl. Environ. Microb.* American Society for Microbiology, Vol. 44, pp. 471-477.
- Teixeira, P. and Oliveira, R. (1999) Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substrates. *J. Adhesion Sci. Technol.*, Brill, Vol. 13, pp. 1287-1294.
- van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., and Zehnder, A.J.B. (1987) The roll of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* American Society for Microbiology, Vol. 53, pp. 1893-1897.

(접수일: 2008.10.8/심사일: 2008.11.13/심사완료일: 2009.4.10)