한국환경농학회지 제29권 제2호 (2010)
Korean Journal of Environmental Agriculture Vol. 29, No. 2, pp. 189-196

연구보문

다양한 중금속이 인 축적 미생물 (*Pseudomonas sp.*)의 생장과 인 제거에 대한 효과

김희정 · 유리비 · 한석순 · 우선희[1] · 이문순[2] · 백기태[3] · 정근욱*

충북대학교 농화학과, [1]충북대학교 식물자원학과, [2]충북대학교 특용식물학과, [3]금오공과대학교 환경공학과

(2010년 5월 25일 접수, 2010년 6월 8일 수리)

Effect of the Various Heavy Metals on the Growth and Phosphorus (P) Removal Capacity of the Phosphorus Accumulating Microorganism (*Pseudomonas sp.*)

Hee Jung Kim, Ri Bi Yoo, Seok Soon Han, Sun Hee Woo[1], Moon Soon Lee[2], Ki Tae Baek[3] and Keun Yook Chung*(Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Korea, [1]Department of Crop Science, Chungbuk National University, Cheongju, Korea, [2]Department of Industrial Plant, Chungbuk National University, Cheongju, Korea and [3]Department of Environmental Engineering, Kumoh National University, Gumi, Korea)

The removal of phosphorus (P) in the wastewater is essential for the prevention of eutrophication in the river and stream. This study was initiated to evaluate the effect of the various heavy metals on the growth and P removal capacity of *Pseudomonas sp.*, which was well known as phosphorus accumulating microorganism(PAO's) in the EBPR(Enhanced Biological Phosphorus Removal) process. The five heavy metals used in the study were Cu, As, Zn, Ni, and Cd. The growth rate of *Pseudomonas sp.* was the greatest at 25℃, but the removal efficiency of P was the highest at 30℃. The IC_{50} (median Inhibition Concentration) values of *Pseudomonas sp.* for the Cu, As, Zn, Ni, and Cd were 2.35, 11.04, 1.80, 4.92, and 0.24 mg/L, respectively. Therefore, it appears that the sensitivity of the heavy metals to *Pseudomonas sp.* was in the following order: Cd> Zn> Cu> Ni> AS. Also, the P removal efficiencies by *Pseudomonas sp.* were correspondingly decreased as the concentrations of heavy metals were increased.

Key Words: Phosphorus Accumulating MicroOrganism(PAO's), *Pseudomonas sp.*, Heavy Metals, Growth, IC_{50}, Phosphorus Removal Efficiency

서 론

자정능력을 넘는 대량의 유기물이나 염류가 강, 하천 및 호소수에 유입되면 수계는 분해산물 또는 이차생성물 등의 영양염류가 풍부해지는 현상이 일어나며 이로 인하여 수초와 녹조류가 번창하고 생물학적 산소요구량(BOD) 이 증가하게 되며 물속의 산소 부족으로 인한 수중생태계 교란 및 파괴가 일어난다. 이러한 현상을 부영양화(Eutrophication)라 한다. 인은 생체 내에서 중요한 역할을 담당하지만 수계에 과량 유입되게 되면 질소와 더불어 부영양화를 일으키는 제한영양소로서 작용한다(Grady et al., 1999).

하수처리 중 인을 제거하는 수 처리 기술로는 크게 물리화학적 방법과 생물학적 방법으로 대별할 수 있다. 생물학적인 제거 공정(EBPR : Enhanced Biological Phosphorus Removal)은 물리·화학적 처리방법과 비교하여 단일 시스템 내에서 운전조건(혐기/호기)을 교차시켜 미생물의 선택적인 활성을 발휘할 수 있도록 하여 장기적인 관점에서 공정의 안정성, 경제성, 신뢰성 등의 높은 장점을 가지고 있다. 따라서 인 제거를 위해 가장 경제적이며, 폭 넓게 적용되는 방법이지만 최적관리 기술이 명확하지 않고 bulking, 과부하 충격에 대한 인 제거 안정성의 문제가 남아있다(Bundgaard and Petersen, 1991).

생물학적 인 제거 (EBPR)공정 내에 서식하는 미생물은

*연락저자:
Tel: +82-43-261-3383 Fax: +82-43-271-5921
E-mail: kychung@cbnu.ac.kr

인염 제거능이 있는 인염축적세균군인 PAOs(Phosphorus accumulating organism)뿐만 아니라 1993년에 Cech와 Hartman에 의해 발견된 비인염축적 세균인 G-bacteria이 존재한다. 이들 G-bacteria는 PAOs미생물과 경쟁함으로써 EBPR 공정의 효율을 저해시키기 때문에 공정의 효율 극대화는 인 축적 능력이 높은 PAOs 만을 우점적으로 증식시킬 수 있느냐에 달려있다. 따라서 생물학적 인 제거 공정에 관여하는 미생물군이 어떠한 종류인지를 밝혀내는 것이 중요하게 되었다.

인 제거 공정의 다양한 환경요인은 생물학적 인 제거 효율성에 영향을 미친다. 인 제거 공정에 영향을 미치는 환경요인으로는 수온, 용존산소, pH, 영양염류, 하수 내 존재하는 중금속류, 슬러지 체류시간등이 있으며 이들 환경요인으로 인한 인 축적 세균의 활성도의 변화는 인 제거 공정의 효율성에 큰 영향을 미친다. 그러나 아직까지 폐수처리에 생물학적 처리공정이 실용화 되고 있음에도 불구하고 어떤 기작에 의해 인이 제거되는지 명확하게 규명되지 않은 까닭에 적당한 작동 조건이 개발되지 못한 실정이다(Mino et al., 1998).

최근 급속한 산업발달로 인한 산업폐수 발생량의 증가에 따라 수자원의 오염이 날로 심각해지고 있는 상태이다. 특히 폐수 중에 함유된 유독성의 크롬, 구리, 납 및 아연 등과 같은 중금속 이온이 수계에 유출되면 생태계 및 인체에 치명적인 피해를 줄 수 있기 때문에 중금속이 함유된 폐수의 제거 및 처리를 위한 노력이 다각적으로 이루어지고 있다(Cho et al., 2002; Ryu et al., 2003). 일반적으로 하수 슬러지의 중금속 함량은 0.5-2.0%이고, 어떤 경우에는 총 금속 함량이 4.0%에 이르기도 한다(Blais et al., 1993). 그러나 폐수 내 존재하는 중금속에 의한 생물학적 인 제거 공정 내의 PAOs의 독성에 대한 연구는 미비한 상태이다. 따라서 본 연구는 인 축적 균으로 알려진 균주 중 *Pseudomonas sp.*의 인 축적 능력을 평가 및 폐수 내 중금속(Cu, As, Zn, Ni, Cd)이 실제로 인 축적 세균의 생장 및 인 축적능력에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

균주의 분양 및 활성화

본 연구에 사용한 *Pseudomonas sp.*균주는 한국생명공학연구원 생물자원센타에서 분양받은 KCTC22612 균주를 이용하였다. 입제 형태의 분양균을 skin milk medium에 백금이로 적당량을 접종한 후 이틀간 배양하여 활성화 시킨 후 Agar plate에 획선 도말하여 균을 배양하였다. 실험에 사용된 배지는 기초배지(basic medium)에 1000 mg/L의 인산용액, 1M의 Tris-HCl 완충용액(pH 7.2), 300 mg/L의 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 용액, 200,000 mg/L의 glucose 용액, 그리고 trace metal 용액이 적절한 비율로 혼합되어 최종 인산의 농도가 20 mg/L이 되도록 조제되었다(Zafiri et al., 1999). 사용된 기초배지용액 (basic medium solution)은 1.91 g의 NH_4Cl, 0.03 g의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.2 g의 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.25 g의 $CH_3COONa \cdot H_2O$을 1 L의 deionized water (D.I. H_2O)에 용해 시켜 제조하였다. 또한 기초배지에 첨가된 trace metal 용액은 0.03 g의 H_3BO_3, 0.1 g의 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.2 g의 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g의 $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.04 g의 $Na_2Mo4 \cdot 2H_2O$을 100 mL의 D.I. H_2O에 용해 시켜 제조하였다. 제조된 실험용 액체 배지에 미리 고체 배양된 *Pseudomonas sp.*균을 백금이로 따서 접종한 후 30℃에서 진탕배양 하여 실험 배지에 적응기간을 두었다.

*Pseudomonas sp.*의 생장 및 인 축적능 실험

실험에 사용한 *Pseudomonas sp.*균의 생장특성을 알아보기 위한 실험은 두가지로 나뉘어 실험되었다. *Pseudomonas sp.*균을 접종한 후 온도에 따른 생장특성을 알아본 실험과 인의 제거가 *Pseudomonas sp.*의 세포표면흡착에 의해 일어나는지 아니면 세포 내 축적에 의해 일어나는지 알아보기 위해 *Pseudomonas sp.*을 사멸 시킨후 접종한 처리구(dead cell)와 살아있는 균을 접종한 처리구(live cell)로 처리한 실험으로 나뉘어 실시하였다. 온도에 따른 *Pseudomonas sp.*의 생장특성 실험은 250 mL 삼각플라스크에 실험배지 195 mL을 넣고 미리 액체 배양한 *Pseudomonas sp.*을 5 mL접종하여 균이 최대로 생장하여 정지기에 도달 할 때 까지 분광광도계로 550 nm에서 2시간 간격으로 측정하였다. 온도 조건은 25℃, 30℃, 35℃로 하였다.

*Pseudomonas sp.*의 인 제거 특성에 대한 실험은 처리구를 균을 접종하지 않은 대조구(no cell)와 실험배지에 균을 접종하여 균의 생장이 최고조일때의 200 ml배양액을 4℃. 15,000 rpm에서 원심 분리하여 생긴 침전물을 채취하여 실험용배지에 접종한 후 121℃에서 15분간 고압 멸균시켜 만든 처리구(dead cell), 실험용 배지에 이틀간 배양한 *Pseudomonas sp.*배양액을 5 mL접종하여 처리한 실험 처리구(live cell)로 나누어 실험하였다. 모든 실험은 3반복하였다. 균의 생장은 3개의 처리구를 균이 최대로 생장하여 정지기에 도달 할 때 까지 분광광도계로 550 nm에서 2시간 간격으로 측정하였다. 인 축적 능력을 평가하기 위한 실험에서 초기 인 농도는 각 각 멸균한 실험 배지에 균을 접종한 후 바로 0.20 um의 membrane filter로 여과한 여액을 micro tube에 2 mL씩 담아 채취하였고 총 48시간 동안 균의 생장이 지체된 시간을 제외하고 균이 생장하기 시작한 시간부터 4시간 단위로 배지를 filtering하여 인 농도 측정에 사용할 시료를 채취하였다.

인의 정량

배양액 중의 인은 아스코르빈산-몰리브덴청법(Callaway et al., 1995)에 따라 실험하였으며 29℃에서 15분간 발색시켜 분광광도계(UVmini-1240, Japan)로 880 nm에서 측정

하였다. 표준물질로 KH_2PO_4를 사용하여 검량선을 작성하였으며 분석범위는 0.1-5 μg/mL이었다.

중금속 처리에 따른 생장 실험

실험에 사용된 중금속은 환경부에서 고시한 6대 중금속중 구리, 비소, 아연, 니켈, 카드뮴 총 5종류이며, *Pseudomonas sp.*를 처리하지 않은 Blank와 *Pseudomonas sp.*만 처리한 무처리구, *Pseudomonas sp.*와 중금속을 농도별로 처리한 처리구로 나누어 실험하였다. 처리농도는 각 중금속이 미생물 생장에 영향을 미칠 것이라 기대되는 농도로 처리하였다. 실험에 사용된 처리구는 중금속을 처리하지 않은 대조구와 중금속을 5개의 농도별로 처리한 처리구로 나누어 실험을 실시하였다. 중금속 처리농도는 구리가 1, 1.5, 2, 2.5, 3 mg/L이고 비소의 경우 25, 50, 75, 100, 125 mg/L으로 처리하였다. 아연의 경우 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 mg/L으로 처리하였으며 니켈의 경우 1, 2, 3, 4, 5 mg/L으로 처리되었다. 마지막으로 카드뮴의 경우 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/L으로 처리하여 실험하였다. 실험에 사용된 중금속의 조성은 $CuSO_4.5H_20$, As_2O_3,, $ZnSO_4.7H_20$, $NiCl_2.6H_20$, $Cd(NO_3)_2.4H_20$이었다. 실험은 250 mL 삼각 플라스크안에 실험배지 195 mL을 넣고 각 각의 중금속 농도를 처리하여 121℃에서 15분간 고압 멸균하여 준비한 실험배지에 미리 액체 배양시킨 *Pseudomonas sp.*를 5 mL 접종한 후 초기 농도를 석영셀을 이용하여 분광광도계에서 550 nm로 측정하였으며 총 48시간동안 균의 생장이 일어나는 지점까지 2시간 단위로 측정하였다.

중금속 처리에 따른 *Pseudomonas sp.*의 인 축적 능력

중금속 처리에 따른 *Pseudomonas sp.*의 인 축적 능력실험에 사용된 처리구는 *Pseudomonas sp.*를 처리하지 않은 Blank와 중금속은 처리하지 않고 *Pseudomonas sp.*만 처리한 무처리구, *Pseudomonas sp.*와 선택된 중금속을 각 각의 농도별로 함께 처리한 처리구로 나누어 실험하였다. *Pseudomonas sp.*를 실험에 사용된 5개의 중금속 구리, 비소, 아연, 니켈 그리고 카드뮴이며 각 중금속 별 생장이 저해될 것이라 기대되는 농도에 따라 처리한 후 30℃, 120 rpm에서 진탕배양 하였으며 배양시간은 총 48시간이었다. 5개의 중금속별로 각 각의 농도를 처리한 배지에 미생물 5 mL을 접종하여 바로 0.20 um micro filter로 여과한 후 여액을 micro tube에 담아 초기농도로 하였다. 시료채취는 12시간 단위로 채취하였다.

*Pseudomonas sp.*의 생장 저해 농도 계산

배양액의 생장률은 흡광도값에 자연대수를 취한 값을 시간별로 최소 제곱 추정에 의한 선형 회귀식으로 계산하였다. 균의 생장이 이루어 지지 않은 초기 값은 제거하였고 균의 시간별 각 생장비율 값은 상관계수(r)값이 0.95또는 그보다 높은 값이 될 수 있도록 최소 5개의 data값을 기초로 하였다.

생장저해는 Inhibition(%) = ($\mu_{control}$- $\mu_{heavy\ metals}$)*100/ $\mu_{control}$식을 이용하여 계산하였다. 계산식에서 $\mu_{control}$은 각 각의 중금속을 처리하지 않은 배지에서 자란 균의 시간에 따른 생장속도를 말하며 $\mu_{heavy\ metals}$은 각 각의 중금속 농도별로 처리된 배지에서 자란 균의 시간에 따른 생장속도를 의미한다. 반 생장 농도(IC_{50})값을 구하기 위한 log gamma분포는 생장 저해 data를 fitting하여 결정하였으며 log gamma 분포로부터 각 각의 중금속에 대한 균의 생장의 반 생장 농도(IC_{50})값을 계산하였다.

결 과

*Pseudomonas sp.*의 생장특성 및 인 축적능

*Pseudomonas sp.*의 온도에 따른 생장특성 실험결과 균의 생장은 12시간 후부터 이루어 졌으며 최대 생장까지 걸린 시간은 48시간 있었으며 그 후로 정지기에 들어서는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1). 온도에 따라서는 초기 생장은 25℃가 빨랐으며 30℃가 거의 비슷한 속도로 증가하였고 35℃에서는 다른 온도에 비해 약간 생장이 느리게 나타났다. 최고 생장이 이루어진 후 정지기에 들어섰을 때에는 모든 온도에서 거의 비슷한 생장을 나타냈으나 그 중 상온 25℃에서 균의 생장이 다른 온도에 비해 높았다. 온도에 따른 인 축적능 실험은 Fig. 2에서 나타나듯이 25℃와 35℃가 거의 비슷한 인 제거율을 보였으며 30℃에서 제일 많은 인 축적율을 보였다. 그 값은 25℃에서 76.29%, 30℃에서 90.61%, 35℃에서 74.19%로 나타났다(Fig. 3). 균의 생장곡선에서는 25℃에서 생장이 가장 빨랐으나 인 축적율에서는 30℃가 약 14% 더 높았다. 따라서 이후 모든 실험에서는 30℃에서 실험을 실시하였다.

*Pseudomonas sp.*의 인 제거 형태를 알아보기 위한 실험결과 *Pseudomonas sp.*를 처리하지 않은 대조구(no cell)에서는 생장이 이루어 지지 않았으며 균의 사체를 넣은 처리구(dead cell)에서도 균의 초기에는 생장이 이루어 지지 않았

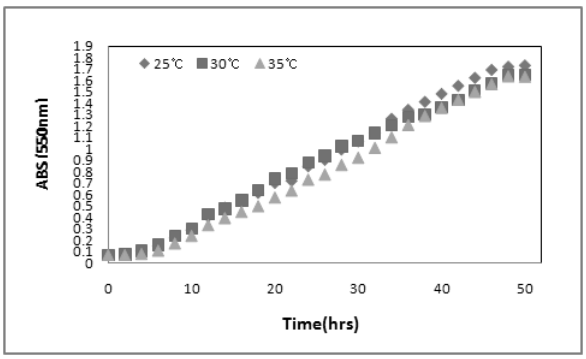

Fig. 1. Effect of temperature on the growth of *Pseudomonas sp.* as a function of time.

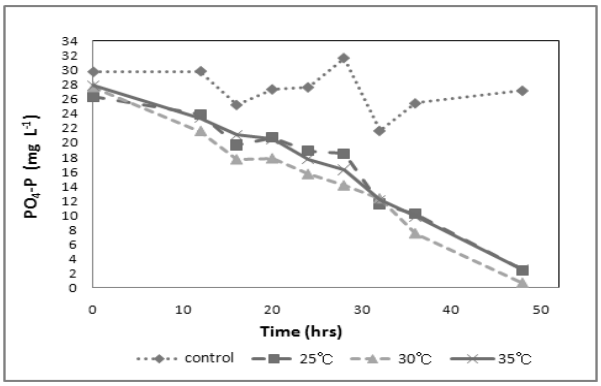

Fig. 2. Concentration variation of P in the treatments (live cell of *Pseudomonas sp.*) and control(no cell) as a function of time.

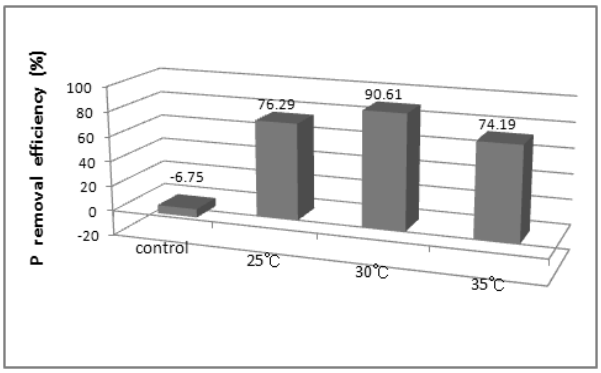

Fig. 3. Final removal efficiencies of P by *Pseudomonas sp.* at the different temperatures.

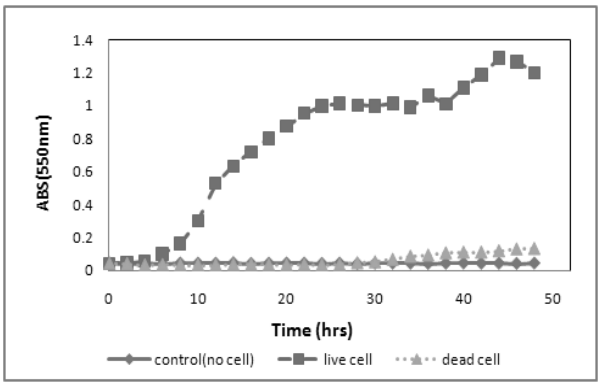

Fig. 4. The growth curve of *Pseudomonas sp.* in the treatments(live cells and dead cells) and control(no cells) as a function of time.

으나 실험이 종료되기 전인 36시간 이후부터는 약간의 생장이 보였다(Fig. 4). 이는 균을 멸균하여 접종하였으나 시간이 지남에 따라 완전히 멸균되지 않은 균이 증식하였기 때문이라고 사료된다. 살아있는 *Pseudomonas sp.*를 접종한 처리구(live cell)에서는 8시간 이후부터 급격히 생장하다가 24시간

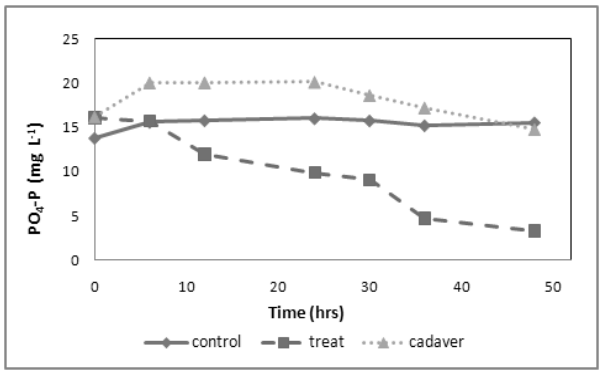

Fig. 5. Concentration variation of P in the treatments (live and dead cells of *Pseudomonas sp.*) and control(no cells) as a function of time.

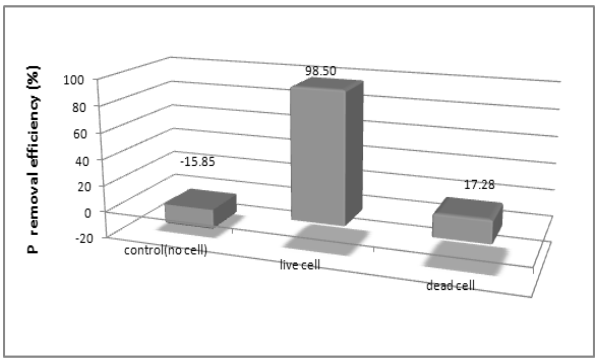

Fig. 6. Final removal efficiencies of P in the treatments (live and dead cells) and control(no cells).

이후에 생장이 이루어지지 않더니 36시간 이후 다시 생장하기 시작하여 44시간 이후 최대로 생장하면서 정지기에 도달하였다. 인 축적 실험 결과는 살아있는 균을 처리한 처리구(live cell)에서는 배양 12시간 이후부터 급속도로 생육하여 36시간 후에 정지기에 도달하였으며 인의 흡수율은 이와 비례적으로 증가하여 98%로서 최고 수준을 나타낸 다음 배양 48시간까지 흡수한 인의 방출을 보이지 않고 같은 양을 유지하였다. 균을 처리하지 않은 대조구(no cell)에서는 배지 내 인의 농도의 변화가 거의 없었으며 *Pseudomonas sp.*의 사체를 처리한 처리구(dead cell)에서는 인이 17.28%가까이 축적되었다(Fig. 5, 6). 이는 균 생장에서 나타났듯이 36시간 이후 약간의 생장을 보인 결과 때문인 것으로 사료된다. 균이 생장하지 않은 36시간 이전의 인 축적율은 약 8%로 나타났다.

중금속에 의한 *Pseudomonas sp.*의 생장 저해

중금속에 의한 *Pseudomonas sp.*의 생장곡선은 Fig. 7에서 나타나듯이 구리를 처리하지 않은 무처리구에서의 균의 생장은 24시간 이후부터 급격하게 증가하기 시작하였으나 구리를 처리한 처리구에서는 그보다 늦은 26시간 이후부터 생

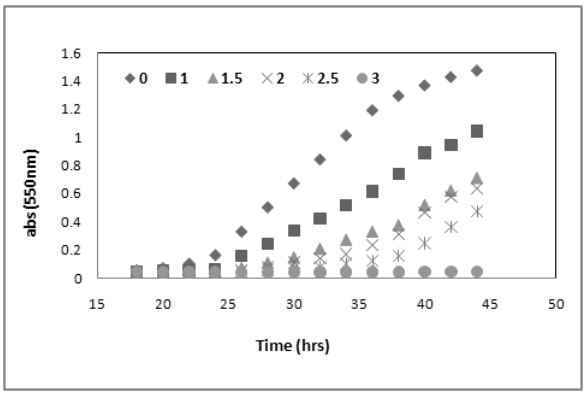

Fig. 7. Growth of *Pseudomonas sp.* as a function of time in relation to Cu concentrations.

Table 1. Summary of median inhibitory concentrations of Cu, As, Zn, Ni, and Cd

Toxic substance	Median Inhibition Concentration(IC_{50}), mg/L
Cu	2.35
As	11.04
Zn	1.80
Ni	4.92
Cd	0.24

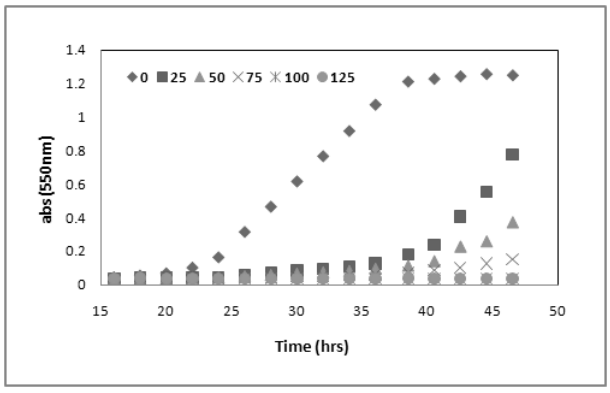

Fig. 8. Growth of *Pseudomonas sp.* as a function of time in relation to As concentrations.

장하기 시작하였고 실험에 사용된 최고 농도인 3 mg/L에서는 생장이 이루어지지 않았다. 표 1은 5가지의 중금속 별 IC_{50}값을 요약한 표이다. 구리를 처리한 처리구의 반 생장 농도인 IC_{50}값은 2.04 mg/L로 나타났다. 비소는 비소를 처리하지 않은 무처리구의 생장은 22시간 이후부터 증가하기 시작하였으나 비소를 처리한 5개의 처리구에서는 30시간 이후부터 생장하기 시작하였다(Fig. 8). 반 생장 농도인 IC_{50}값은 11.04 mg/L로 실험에 사용된 중금속 중 실험균 생장에 가장 덜 민감한 영향을 주는 것으로 나타났다. 아연의 경우는

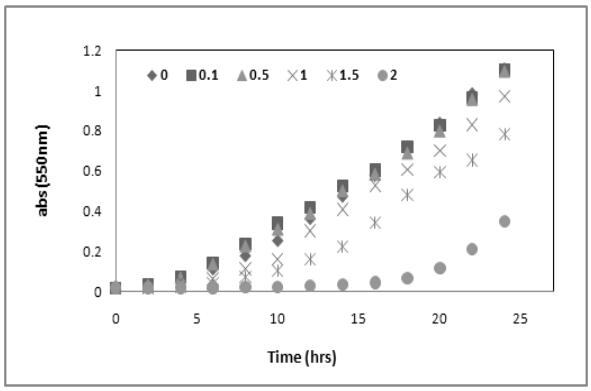

Fig. 9. Growth of *Pseudomonas sp.* as a function of time in relation to Zn concentrations.

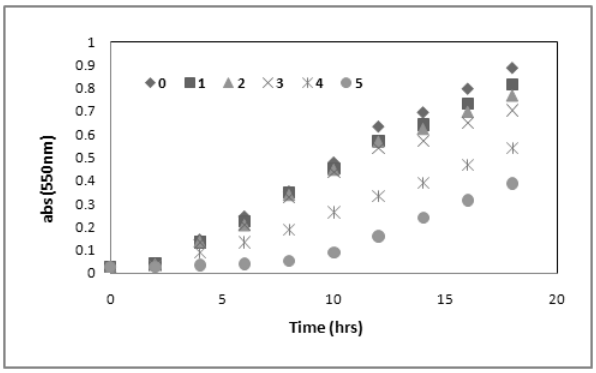

Fig. 10. Growth of *Pseudomonas sp.* as a function of time in relation to Ni concentrations.

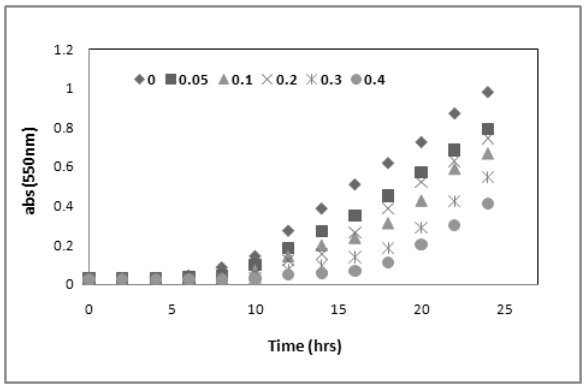

Fig. 11. Growth of *Pseudomonas sp.* as a function of time in relation to Cd concentrations.

아연을 처리하지 않은 무처리구에 비해 아연을 0.1과 0.5 mg/L처리한 처리구에서 초기생장이 더 빨랐으나 시간이 지날수록 생장속도는 무처리구가 더 빠르게 나타났다(Fig. 9). 실험에서 적용된 아연의 최대 농도 값인 2 mg/L에서는 18시간 만에 균이 생장하기 시작하였다. 아연의 IC_{50}값이 1.79 mg/L로 계산되었다. 니켈의 경우 Fig. 10에서 볼 수 있듯

Table 2. Removal efficiency of P by *Pseudomonas sp.* at the various concentrations of selected heavy metals.

Cu		As		Zn		Ni		Cd	
conc. mg/L	P removal rate, %	conc. mg/L	P removal rate, %	conc. mg/L	P removal rate, %	conc. mg/L	P removal rate, %	conc. mg/L	P removal rate, %
blank	-1.25	blank	-2.31	blank	-2.94	blank	-30.55	blank	0.42
0	92.78	0	83.11	0	99.62	0	90.59	0	99.74
1	76.18	25	21.75	0.1	98.34	1	96.13	0.05	89.95
1.5	58.34	50	8.83	0.5	94.89	2	89.23	0.1	80.46
2	36.24	75	5.76	1	88.68	3	89.67	0.2	77.93
2.5	44.64	100	7.35	1.5	83.46	4	83.93	0.3	74.28
3	17.82	125	4.23	2	83.85	5	76.82	0.4	47.98

(†in the blank, neither live nor dead cells of inoculation)

이 니켈을 처리하지 않은 무처리구와 니켈 1-3 mg/L을 처리한 처리구의 생장이 거의 비슷한 것을 볼 수 있으며 4 mg/L을 처리한 처리구부터 생장이 감소된 것을 볼 수 있었다. 니켈의 IC_{50}값은 4.92 mg/L로 나타났다. 카드뮴의 경우 카드뮴을 처리하지 않은 무처리구에서 실험 시작 후 8시간 후부터 균이 생장하기 시작하였다(Fig. 11). 다른 실험에 비해 생장속도가 빨랐던 이유는 다른 중금속 실험에서는 48시간 배양된 균을 사용한 것과 달리 카드뮴 실험에서는 균이 생장하기 시작한 12시간 된 배양액을 접종하였기 때문이라고 사료된다. 카드뮴의 반 생장 농도인 IC_{50}값 0.24 mg/L로 다른 중금속보다도 실험균 생장에 가장 민감한 영향을 주는 것으로 나타났다.

중금속처리에 따른 *Pseudomonas sp.*의 인 축적 능력

중금속처리에 따른 *Pseudomonas sp.*의 인 축적 능력의 변화를 알아보기 위한 실험결과는 Table 2에 정리되었다. 구리는 *Pseudomonas sp.*와 중금속을 처리하지 않은 blank에서는 배지 내 인 농도의 변화가 없었으며 *Pseudomonas sp.*는 처리하였으나 구리를 처리하지 않은 무처리구에서 92.78%의 인 축적능이 나타났으며 무처리구 대비 인 축적능이 50%이하로 떨이진 농도는 1.5-2 mg/L사이로 나타났다. 이는 반 생장 농도와 거의 같은 것으로 나타났다. 비소의 경우는 blank에서는 인 농도의 변화가 없었으며 비소를 처리하지 않은 무처리구의 인 축적능이 83.11%로 나타났으며 비소 25 mg/L에서 현저하게 인 축적능이 줄어든 것을 확인할 수 있었으며 균의 생장이 약간 이루어진 75 mg/L과 전혀 생장이 나타나지 않은 100, 125 mg/L의 인 축적능은 8% 이내로 나타났다. 이는 균의 사체를 처리한 처리(dead cell)에서의 결과 값보다 작은 값으로 생장과는 상관없는 실험적 오차로 보여 진다. 아연의 경우는 blank에서는 인 농도의 아무런 변화가 없었고 아연을 처리하지 않은 무처리구에서 99.62%로 거의 100%의 가까운 인 축적능을 보였으며 실험에 처리된 아연의 최고 농도 2 mg/L수준에서는 거의 83.85%가까이 인축적을 보였다. 이는 실험에 사용된 아연 농도에서 초기 균의 생장이 느리게 나타났지만 실험이 종료된 48시간에서의 생장이 최대가 되어 정지기에 이르렀기 때문이라고 사료된다. 인의 생장은 최대가 되었으나 아연이 초기생장에 영향을 주었기 때문에 아연을 처리하지 않은 무처리구의 인 축적능보다는 15%이상 차이가 나타나는 것을 볼 수 있었다. 니켈의 경우는 blank에서는 인 농도의 변화가 없었으며 니켈을 처리하지 않은 무처리구에서 90.59%의 인축적능을 나타냈으며 니켈 역시 아연과 비슷한 양상으로 실험에 사용된 가장 높은 농도처리구인 5 mg/L에서 76.82%의 인 축적능을 보였다. 카드뮴의 경우는 blank에서는 다른 중금속과 마찬가지로 인 농도의 변화가 거의 없었으며 카드뮴을 처리하지 않은 무처리구의 인축적률이 99.74%로 배지 내 존재하는 거의 모든 인을 축적했다고 볼 수 있다. 실험 균의 인축적능이 절반가까이 떨어진 농도는 0.3-0.4 mg/L사이였으며 이는 반 저해농도인 0.24 mg/L보다는 약간 높은 농도였다. 실제 카드뮴 처리량은 다른 중금속 처리량의 10배이상 낮은 농도로써 실험에 사용된 균주의 생장에 가장 민감한 영향을 주는 것으로 나타났다.

고 찰

생물학적 인 제거 공정에 관여하는 인축적 미생물(PAOs: Phosphorus accumulating organism)의 제안된 인 제거 대사과정은 혐기성 상태에서 활성화된 PAOs이 수중에 함유된 유기물을 세포 내에 PHB(Poly-β-hydroxybutyrate)형태로 저장하며 이때 필요한 에너지는 polyphosphate를 가수분해하여 이용하게 된다. 혐기성 과정을 거친 미생물은 호기성 조건을 거치면서 세포내에 저장된 PHB를 분해하여 얻어진 에너지로 혐기조건에서 내놓은 인의 양보다 과잉의 인을 섭취하여 poly-P granules형태로 세포 내에 축적 하게 되는데 이것을 Luxury uptake라고 한다(Grady et al., 1999). 이러한 과정을 거치면서 폐수 내 인을 효율적으로 제

거할 수 있게 된다. 본 연구에서는 인 축적 미생물이라고 알려진 *Pseudomonas sp.*의 인 축적능력을 확인하기 위한 실험을 실시하였으며 실험결과 온도에 따른 미생물의 생장 및 인 축적능력의 변화는 25℃에서 가장 빠른 생장을 보였으나 인 축적능력은 30℃에서 가장 높은 능력을 나타냈다. 35℃의 경우 생장 속도나 인 축적 능력이 다른 두 온도 보다 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 이는 Shim et al.(1999)이 보고한 *Acinetobacter CW3*이 20℃에서 가장 높은 생육을 보이고 인 축적 능력도 가장 높아 생육속도가 빠를수록 인 축적능력도 증가한다는 보고와는 상이한 결과를 보였다. 미생물을 처리하지 않은 대조구(no cell)와 미생물을 처리한 처리구(live cell), 그리고 미생물 사체를 처리한 처리구(dead cell)의 인 축적실험결과에서의 인 축적능력은 *Pseudomonas sp.*를 처리한 처리구(live cell)에서 거의 90%가까운 인축적율이 나타났고 대조구(no cell)에서는 배지내의 인의 농도의 아무런 변화가 없는 것으로 보아 미생물처리에 의한 배지 내 인제거가 이루어 졌다고 할 수 있다. 생체흡착(biosorption)이란 수용액 중에 선택된 다른 분자들이나 이온들을 표면에 붙잡아두거나 집결시킬 수 있는 특정 생물분자의 고유특성으로(Bohumil, 2007), 배지 내 인 농도가 줄어드는 이유가 미생물 처리를 통한 생체흡착(biosorption)에 의해서인지 확인하기 위해 *Pseudomonas sp.*사체를 처리한 처리구(dead cell)를 실험한 결과에서 미생물이 생장하지 않았던 36시간 이전인 농도의 변화는 약 8%로 나타났다. 이는 배지 내 인이 미생물의 표면에 흡착되어 줄어든 양으로 사료된다. 실제 Ahn and Suh.(1995)이 보고한 살아있는 *Saccharomyces uvarum*과 죽어있는 *Saccharomyces uvarum*의 중금속에 대한 생체흡착량 비교를 수행하였을 때 죽어있는 세포보다 살아있는 세포내에서 흡착능력이 더 크다는 보고에 따라 본 연구에서 죽어있는 균 사체를 넣고 실험한 실험결과 값이 실제 살아있는 세포를 주입하였을 때의 균 흡착능력과 차이가 있을 수 있다고 사료된다.

본 연구에서는 *Pseudomonas sp.*의 중금속 독성 효과를 평가하기 위하여 중금속에 의한 생장 저해율을 알아 볼 수 있는 반 생장 농도인 IC_{50}값을 이용하였다. 이번 실험에서 선택된 5가지 중금속(Cu, As, Zn, Ni, Cd)에 대한 *Pseudomonas sp.*의 생장저해효과 확인 실험 결과 *Pseudomonas sp.*에 가장 민감한 영향을 미친 중금속은 카드뮴> 아연> 구리> 니켈> 비소순으로 나타났다. Eisler.(2000)에 따르면 담수 생물체중 가장 민감한 반응을 나타내는 중금속이 카드뮴이라는 보고와 일치한다. 본 연구진이 이전 연구에서 생물학적인 제거 공정 내에 인 축적능력이 있다고 알려진 *Acinetobacter sp.*를 가지고 5가지 중금속에 따라 생장 저해 효과가 있는지를 확인한 결과 *Acinetobacter sp.*에서 가장 민감한 영향을 미친 중금속은 수은>니켈>카드뮴>구리>아연 순 이었다(Chung et al., 2006). 이는 아연보다 카드뮴이 더 민감한 반응을 보인다는 본 연구와 유사한 결과였으나 이에 반해 니켈의 경우 *Acinetobactor sp.*에서는 카드뮴 보다 더 민감한 반응을 보인다고 나타났으나 이번 연구에서는 카드뮴이 니켈보다 약 10배나 더 민감한 것으로 나타났고 구리 역시 이전 연구에서는 아연보다 더 민감하다고 나타났으나 이번 연구에서는 아연이 구리보다 더 민감한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 중금속에 대한 생물체의 반응(사망 혹은 행동양상의 차이 등)은 생물종류에 따라 서로 다르게 나타날 수 있으며, 또한 오염물질의 종류와 농도에 따라서도 특이적으로 나타난다고 한 보고(Milani et al., 2003)의 내용과 일치함을 알 수 있었다. *Pseudomonas sp.*의 인 축적능력이 5가지 중금속에 의해 저해되는 정도를 확인하기 위해 실험한 결과에서는 비소의 경우 실험에 사용한 농도가 실제 *Pseudomonas sp.*의 반 생장 농도에 근접한 농도 보다 고농도로 처리되었기 때문에 실험에서 사용된 가장 낮은 농도인 25 mg/L에서 50%보다 훨씬 낮은 21.8%까지 줄어들었다. 카드뮴은 카드뮴의 반 생장 농도보다 약간 높은 농도에서 인축적율이 50% 이하로 나타났으며 구리는 IC_{50}값과 비슷한 농도에서 50%이하로 나타났다. 따라서 생장이 저해되면 인을 축적하는 능력도 줄어든다는 것을 확인할 수 있었다. 아연과 니켈의 경우 실험에 사용된 농도에서는 인축적율이 50%이하로 떨어지지 않았다. 이는 중금속 노출시간에 따라 중금속 종류에 따라 적응력이 달라지게 된다는 보고(Cho et al., 2004)를 통해 본 실험에서 사용된 아연, 니켈이 초기 *Pseudomonas sp.*의 생장에 영향을 미쳤으나 시간이 지남에 따라 중금속에 적응하여 최고 생장농도가 중금속을 처리하지 않은 무처리구와 비슷한 농도까지 생장하였기 때문에 인축적율이 무처리구에 비해 많이 줄어들지 않은 것으로 사료된다. 그러나 중금속으로 인해 무처리구 대비 처리구에서 약 15-17% 가까이 인 축적율이 줄어든 것으로 나타났다.

이 후 연구에서는 *Pseudomonas sp.*가 생체내의 인을 축적하여 인을 제거하는 것인지 아니면 균 표면에 흡착하여 인을 제거하는 것인지 확인할 수 있는 연구를 수행하여 실제로 하수 처리장에서 균의 활용을 위한 방법을 고안해 내기 위한 조건을 연구하는 데 중요한 자료가 될 수 있을 것이라 사료되며 실제 실험실 규모의 하수처리시설을 설치하여 유입수내의 일정농도의 중금속을 처리한 후 *Pseudomonas sp.*의 활성 및 인 축적능력에 미치는 영향 확인하고 생물학적 인 제거 공정 내에 인 축적 미생물에 속하는 다른 세균들의 중금속 독성효과를 비교하는 연구를 수행하여 인 제거 공정의 효율적인 운전 조건을 결정짓기 위한 유용한 자료로 활용될 수 있을 것이라 생각된다.

결 론

*Pseudomonas sp.*의 인 축적률은 30℃에서 가장 높았으며 미생물을 처리하지 않은 대조구 에서는 인 농도의 변화가 없었고 미생물을 접종하였을 때는 약 90%가까이 인 농도가 낮

아진 것을 확인 할 수 있었다. 5가지 중금속에 따른 *Pseudomonas sp.*의 생장은 중금속의 농도가 증가할수록 감소되었다. IC_{50}값은 구리, 비소, 아연, 니켈, 카드뮴이 각 각 2.35, 11.04, 1.80, 4.92, 0.24로 이 데이터를 기초로 *Pseudomonas sp.*의 생장에 가장 민감한 중금속은 카드뮴> 아연> 구리> 니켈> 비소 순으로 나타났다. 또한 중금속에 따른 인 축적능력은 중금속 농도가 증가할수록 감소하였다. 따라서 본 연구의 결과가 생물학적 인 제거 공정 내에 유입되는 폐수의 중금속 농도의 범위를 결정짓는 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었음으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

Ahn, K.H., Suh, K.H., 1995. Biosorption of Heavy Metals by Saccharomyces uvarum, J. Korean Environ. Sci. Vol. 4(5), 527-534.

Blais, J.F., Taygi, R.D., and Auclair, J.C., 1993. Metals removal from sewage sludge by indigenous iron-oxidizing bacteria, J. Environ. Sci. Health. A23, 443-467.

Bohumil Volesky, 2007. Biosorption and me, J Water Research (Rev). 41, 4017-4029.

Bundgaard E., G. Petersen, 1991. Methods for Improving Biological Phosphorus Removal, Presented at the 1991 WEF Annual Conference, U.S.A.

Callaway, J. O., 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. American Public Health Association. Washington, D.C. PP.175-176.

Cech, J.S., Hartman, P., Macek, M., 1993. Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal systems. *Wat. Res.* 27, 1219-1225.

Cho, K.S., Koo, S.Y., Kim, J.Y., and Ryu, H.W., 2004. Quantification of Inhibitory Impact of Heavy Metals on the Growth of *Escherichia coli*, Korean J. Microbiol. Biotechnol. Vol. 32(4), 341-346.

Cho, K.S., Ryu, H.W., Lee, I.S., and Choi, H.M., 2002. Effect of solids concentration on bacterial leaching of heavy metals from sewage sludge, J. Air & Waste Manage. Assoc. Vol. 52, 237-243.

Chung, K.Y., Han, S.S., Kim, H.K., Choi, G.S., Kim, I.S., Lee, S.S., Woo, S. H., Lee, K.H., and Kim, J.J., 2006. Inhibitory Effect of the Selected Heavy Metals on the Growth of the Phosphorus Accumulating Microorganism, *Acinetobacter sp.*, Korean J. Environ. Agri. Vol. 25(1), 40-46.

Eisler R., 2000. Handbook of Chemical Risk Assesment: Health Hazards to Humans, Plants, and Animals. Vol 1: Metals; Volume 2: Organics; Volume 3: Metalloids, Radiation, Cumulative Index to Chemicals, and Species By Ronald Eisler (Patuxent Wildlife Research Center), J. Am. Chem. Soc. 122(48), 12067.

Grady, C.P., Daigger, G.T., Lim, H.C., 1999. Biological wastewater treatment, 2nd Ed. Marcel Dekker. New York.

Grady, C.P.L., Henry, C.L., and Glen T. Daigger, 1999. Biological wastewater treatment, Second Edi., Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A., 104-107.

Milani D, T.B. Reynoldson, U. Borgmann, and J. Kolasa, 2003. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment, Environ. Toxicol. Chem. 22, 845-854.

Mino, T., van Loosdrecht, M.C., and Heijnen, J.J, 1998. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphorus removal process, Wat. Res. Vol. 32, 3193-3207.

Ryu, H.W., Moon, H.S., Lee, E.Y., Cho, K.S., and Choi. H., 2003. Leaching characteristics of heavy metals from sewage sludge by *Acidithiobacillus thiooxidans.*, MET. J. Environ. Qual. Vol. 32, 751-759.

Shim, S.H., Ryu, W.R., Lee, Y.H., Kim, J.M. and Cho, M.H., 1999. Isolation and Characterization of Phosphorus Accumulating *Acinetobacter CW3.*, Korean J. Biotechnol Bioeng Vol. 14(1), 71-75.

Zafiri, C, Kornaros, M., Lyberatos, G., 1999. Kinetic modeling of biological phosphorus removal with a pure culture of *Acinetobacter sp.* under aerobic, anaerobic, and transient operating conditions, Water Res. Vol. 33(12), 2769-2788.