

## Autotrophic Perchlorate-Removal Using Elemental Sulfur Granules and Activated Sludge: Batch Test

Kyoung-Rim Han<sup>1,2</sup>, Tae-Ho Kang<sup>3</sup>, Hyung-Chang Kang<sup>3</sup>, Kyunghun Kim<sup>3</sup>, Deuk-Hwa Seo<sup>3</sup> and Yeonghee Ahn<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Environmental Engineering, Dong-A University, Busan 604-714, Korea<sup>2</sup>Busan Center, Korea Basic Science Institute, Busan 609-735, Korea<sup>3</sup>Korea Science Academy of KAIST, Busan 614-103, Korea

Received August 24, 2011 / Revised September 22, 2011 / Accepted September 22, 2011

Perchlorate ( $\text{ClO}_4^-$ ) is a contaminant found in surface water and soil/ground water. Microbial removal of perchlorate is the method of choice since microorganisms can reduce perchlorate into harmless end-products. Such microorganisms require an electron donor to reduce perchlorate. Conventional perchlorate-removal techniques employ heterotrophic perchlorate-reducing bacteria that use organic compounds as electron donors to reduce perchlorate. Since continuous removal of perchlorate requires a continuous supply of organic compounds, heterotrophic perchlorate removal is an expensive process. Feasibility of autotrophic perchlorate-removal using elemental sulfur granules and activated sludge was examined in this study. Granular sulfur is relatively inexpensive and activated sludge is easily available from wastewater treatment plants. Batch tests showed that activated sludge microorganisms could successfully degrade perchlorate in the presence of granular sulfur as an electron donor. Perchlorate biodegradation was confirmed by molar yield of  $\text{Cl}^-$  as the perchlorate was degraded. Scanning electron microscope revealed that rod-shaped microorganisms on the surface of sulfur particles were used for the autotrophic perchlorate-removal, suggesting that sulfur particles could serve as supporting media for the formation of biofilm as well. DGGE analyses revealed that microbial profile of the inoculum (activated sludge) was different from that of the biofilm sample obtained from enrichment culture that used sulfur particles for  $\text{ClO}_4^-$ -degradation.

**Key words** : Autotroph, biodegradation, electron donor, elemental sulfur granules, perchlorate, reduction

## 서 론

퍼클로레이트(perchlorate,  $\text{ClO}_4^-$ )는 지표수, 지하수 및 토양의 주요 오염물이다.  $\text{ClO}_4^-$ 는 대부분 일상생활에 사용되는 제품(예, 성냥, 건전지, 자동차 에어백, 페인트, 의약품, 비료 제조 등)이나 화약류 제조공정에서 생성된다. 우리나라에서는  $\text{ClO}_4^-$ 의 오염원으로서 주로 LCD 제조공정의 세정제나 아연제련 공정에서 배출되는 폐수가 보고되었다[5,8].

우리나라에서는 2006년에 낙동강 수계와 부산시 수돗물에  $\text{ClO}_4^-$ 가 고농도로 검출되면서 이 화합물에 대한 환경문제가 이슈화되었다[16]. 그 이후 2007년 12월에 입법 예고된 '수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 시행규칙 일부 개정령안' [14]에 따라, 2008년부터  $\text{ClO}_4^-$ 가 수질오염물질로 신규 지정되었고,  $\text{ClO}_4^-$ 의 배출허용기준은 검토 중에 있는 실정이다. 2010년에는  $\text{ClO}_4^-$ 가 먹는물 수질감시항목으로 지정됨에 따라 권고기준  $15 \mu\text{g ClO}_4^-/\text{L}$ 이 설정되어 먹는물의  $\text{ClO}_4^-$  농도검사를 실시하

기 시작하였다[15].

최근 연구에 의하면, 하수처리장에서 활성 슬러지공법을 이용한 기존의 생물학적 처리공정만으로는  $\text{ClO}_4^-$  제거가 거의 되지 않는 것으로 나타났다[7]. 또한 입상활성탄을 사용하는 기존 고도처리시설을 갖춘 정수장에서는 활성탄의 사용시간 증가에 따라 흡착능의 초과로 인해 원수보다 오히려 처리수에  $\text{ClO}_4^-$  농도가 높게 검출되었다[6]. 그래서  $\text{ClO}_4^-$ 는 하수처리장이나 정수장에서의 제거보다는 이런 처리 시설로 유입되기 전 단계에서의 처리 즉, 배출원인 개별업체에서의 저감 대책이 필요한 것으로 나타났다.

$\text{ClO}_4^-$ 은 물에서 화학적으로 안정되어 쉽게 분해되지 않을 뿐만 아니라 용해도가 높아 광범위 오염을 초래할 수 있다.  $\text{NaClO}_4$ 와  $\text{NH}_4\text{ClO}_4$ 의 용해도는 각각  $2,010 \text{ g/l}$ 와  $220 \text{ g/l}$ 이다 [12].  $\text{ClO}_4^-$ 는 인체에 흡수되면 갑상선에 요오드가 흡수되는 것을 막아 갑상선호르몬 생성을 방해하고 성장과 물질대사를 저해하므로 인체에 전반적인 영향을 미친다[9,13].

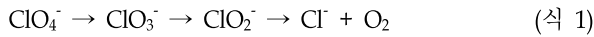
$\text{ClO}_4^-$ 는 물리화학적 또는 생물학적 방법에 의해 제거될 수 있다. 물리화학적 처리에 비해 미생물을 이용한 생물학

**\*Corresponding author**

Tel : +82-51-200-7677, Fax : +82-51-200-7683

E-mail : yahn@dau.ac.kr

적 처리는 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>를 무해한 산물로 완전히 전환하므로 친환경적이며 경제적이다. 생물학적 방법에 의한 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 제거는 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>을 환원하는 세균(perchlorate-reducing bacteria, PRB)을 이용한다[9]. ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>은 PRB에 의해 chlorate (ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>)와 chlorite (ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>)로 순차적으로 환원되고 최종적으로 chloride (Cl<sup>-</sup>)로 전환 된다: 식 1.



중속영양 PRB를 이용한 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 연속제거는 이들 미생물에 게 유기물(예, 초산, 에탄올 등)을 지속적으로 공급해주어야 하므로 비용이 높을뿐더러 미생물의 과다성장에 따른 biomass에 의한 반응기의 막힘 현상이 심하여 연속 공정상에 문제를 초래하는 것으로 알려졌다[3,9]. 중속영양 PRB를 사용함에 따른 문제점을 해결하기 위해 수소기체(H<sub>2</sub>)를 전자 공여체로 사용하고 CO<sub>2</sub>를 탄소원으로 사용하는 독립영양 PRB를 이용하는 연구가 보고 되었다[10,11]. 이 연구결과에서는 biomass에 의한 막힘 현상이 덜하고 유기물을 지속적으로 공급해줄 필요성이 없으므로 처리 비용도 비교적 저렴한 것으로 보고되었다. 그러나 H<sub>2</sub>는 취급과 저장에 폭발의 위험성이 있어 대규모로 적용하는 것은 제한되었다. 그러므로 안전하고 경제적인 전자 공여체를 사용한 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 제거법이 개발될 필요가 있다.

원소 황(elemental sulfur, S<sup>0</sup>)은 산화되면 다음과 같은 반응이 일어난다: S<sup>0</sup> + 4H<sub>2</sub>O → SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> + 8H<sup>+</sup> (식 2). 황을 산화하는 미생물이 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>를 전자수용체로 사용할 경우, 즉 황을 전자 공여체로 사용하는 PRB를 이용할 경우 다음 반응이 일어난다 (식 3).



원소 황입자를 독립영양 PRB가 전자 공여체로 사용하여 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>를 제거할 경우, 값비싼 유기물이나 폭발의 위험이 있는 H<sub>2</sub>를 공급할 필요가 없기 때문에 비교적 저렴하고 안전하게 전자 공여체를 제공할 수 있을 뿐만 아니라 황입자 자체를 담체로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

따라서 본 연구에서는 경제적이고 효율적인 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 제거공정개발을 향후 목표로 하여 원소 황 입자와 하수처리에서 발생하는 활성 슬러지를 이용한 독립영양방식의 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 제거에 대한 타당성을 조사하기 위해 회분배양을 실시하여 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 접종균과 시약

회분반응 실험에 식종 미생물로서 사용한 활성 슬러지(activated sludge, AS)는 부산시 하수처리장(부산시 환경시설공단 강변사업소)에서 채취한 잉여 슬러지를 사용하였다. 채취한 슬러지는 식종하기 전에 동일 부피의 mineral medium을 사용하여 3번 세척하여 슬러지액에 잔존하는 용해된 유기물이나 Cl<sup>-</sup>를 제거한 후 실험에 사용하였다.

최종 식종된 biomass 농도는 0.02 g VSS/l이었다. VSS 측정 은 Standard method [2]에 따라 실시하였다. Mineral medium의 조성(1 당)은 다음과 같다: 2 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 47 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 27 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 16 mg NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g NaHCO<sub>3</sub>, 40 µg NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 40 µg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O. 배지는 초순수(ultrapure water)를 사용하여 제조하였으며 언급이 없는 한 mineral medium의 초기 pH는 7.8이었다. 본 연구에 사용된 sodium perchlorate (NaClO<sub>4</sub>, 순도>99%)는 ACROS Organics (New Jersey, USA)에서 구입하였다. 한편 입자상 원소 황(S<sup>0</sup>, 순도>99.98%; 지름 2-3 mm)은 ㈜미원상사(한국, 울산)에서 구입하였다. 그 외 시약들은 모두 Sigma-Aldrich Chemical Company, Inc.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며 가장 순도(순도>99%)가 높은 것이었다.

### 회분배양

회분배양 실험에 사용된 반응기들의 조성은 Table 1과 같다. Table 1에서 사용한 abiotic control은 접종된 미생물이 없을 경우에 배양 기간 동안 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>의 농도를 조사하기 위한 것이었고, biotic control은 외부에서 첨가한 전자 공여체가 없을 때 접종된 미생물이 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>를 분해할 수 있는지를 조사하기 위한 것이었다. 한편 medium control은 본 연구에 사용된 배지 성분이 배양기간 동안 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>의 농도에 영향을 주는지를 조사하기 위한 것이었다

반응기는 butyl rubber가 장착된 screw cap으로 봉할 수 있는 250 ml Wheaton bottles를 사용하였다. 초기 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 농도가 24 mg/l가 되도록 조절하여 배지 200 ml를 반응기에 넣고 이에 20 g/l의 황 입자를 첨가하였다. 반응기 내부는 질소기체(99.99%)로 2분간 purge하여 봉한 후 25°C의 어두운 곳에서 진탕(150 rpm)배양하였다. 모든 실험은 triplicate로 실시하였다. ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 제거효율은 식 4에 의해 계산하였다. 식 4에서 C<sub>0</sub>는

Table 1. Constituents of the reactors used in the batch experiment

Batch reactors	Constituents
AS-S <sup>0</sup>	Mineral medium, perchlorate, sulfur particles, activated sludge
Abiotic control	Mineral medium, perchlorate, sulfur particles
Biotic control	Mineral medium, perchlorate, activated sludge
Medium control	Mineral medium, perchlorate

배양초기의  $\text{ClO}_4^-$  농도이고, 한편  $C_t$ 는 t 시간 후의  $\text{ClO}_4^-$  농도이다.

$$\text{ClO}_4^- \text{ 제거 효율(\%)} = \frac{(C_0 - C_t) \times 100}{C_0} \quad (\text{식 4})$$

#### 농화배양(enrichment culture)

PRB 농화배양은 1 l Wheaton bottle로 된 반응기를 사용하여 Table 1의 AS-S<sup>0</sup> 반응기와 같은 조성으로 구성하였으며, 반응기내의 반응액의 부피는 500 ml이었다. 식중균은 활성 슬러지를 사용하였다. 회분반응 실험과는 달리 농화 배양의 경우는 일주일에 한 번씩 반응기로부터 배지 100 ml을 제거하고 새 배지 100 ml를 주입하여 반응기 내 배지의 성분이 약 20 mg  $\text{ClO}_4^-/l$ 가 되도록 하였다. 이 때 반응기로부터 제거된 100 ml배지는 원심 분리하여 상등액은 버리고 침전된 미생물을 새 배지로 현탁하여 반응기에 공급하였다. 반응기를 봉하기 전에는 회분배양실험에 기술된 것과 같이 질소기체로 purge 하였다.

#### 화학분석

회분반응의 시료는 반응기로부터 주기적으로 채취하여  $\text{ClO}_4^-$  농도 감소와 더불어 생성된  $\text{Cl}^-$ 의 농도와 pH를 분석하였다. 시료는 1회용 주사기로 채취하여 syringe filter (pore size, 0.22  $\mu\text{m}$ )로 여과 후 필요에 따라서는 적당히 희석하여 ion chromatograph (IC, Dionex ICS-3000; Dionex, Sunnyvale, CA)로 분석하는데 사용하였다. IC 분석은 한국기초과학연구원에서 실시하였으며  $\text{ClO}_4^-$ 와  $\text{Cl}^-$ 의 분석은 EPA METHOD 314.0 [17]을 수정한 방법(Table 2)을 사용하였다. Analytical column AS16과 guard column AG16이 장착된 IC (Dionex ICS-3000)을 사용하여  $\text{ClO}_4^-$ 과  $\text{Cl}^-$  농도를 분석하였다. 한편  $\text{SO}_4^{2-}$ 의 분석은 EPA METHOD 300.0을 수정한 방법을 사용하였다.  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , 그리고  $\text{SO}_4^{2-}$ 의 검출한계는 각각 0.5  $\mu\text{g}/l$ , 5  $\mu\text{g}/l$ , 그리고 0.2 mg/l이었다. IC 분석에 사용한 표준시약은 AccuStandard Inc. (New Haven, CT, USA)에서 구매하였다. 한편 시료의 pH는 pH meter (Isteck, 한국)로 측정하였다.

주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 이용한 황입자 표면 관찰

입자상 황과 활성 슬러지를 이용한 독립영양방식의  $\text{ClO}_4^-$  제거공정에 사용된 황 입자의 표면을 관찰하기 위해 SEM (model JSM-6700F, JEOL, Japan)을 사용하였다. SEM 관찰에 사용된 시료는 농화 배양 반응기에서 채취한 황 입자이었다. 대조군으로는 사용하지 않은 황 입자를 사용하였다. 황 입자 시료는 1년 이상 농화 배양된 반응기에서 채취하였다.

황 입자는 SEM으로 관찰하기 전에 전처리를 하였다. 전처리 과정은 다음과 같이 실시하였다. 황 입자를 phosphate buffer (pH 7.2)로 3번 세척 한 후 ethanol 50, 60, 70, 95, 그리고

Table 2. IC conditions used for anion analysis

	Analysis condition
IC model	Dionex ICS-3000
Sample loop	
$\text{ClO}_4^-$ , $\text{Cl}^-$	1 ml
$\text{SO}_4^{2-}$	0.25 ml
Eluent	
$\text{ClO}_4^-$ , $\text{Cl}^-$	35 mM KOH
$\text{SO}_4^{2-}$	32 mM KOH
Eluent flow	1 ml/min
Columns	
$\text{ClO}_4^-$ , $\text{Cl}^-$	Dionex AG16, 4×50 mm / AS16, 4×250 mm
$\text{SO}_4^{2-}$	Dionex AG18, 4×250 mm / AS18, 4×250 mm
Back pressure	1850 psi
Suppressor	ASRS ULTRA II
Detectors	Suppressed conductivity detector, Dionex CD20
Current	
$\text{ClO}_4^-$ , $\text{Cl}^-$	87 mA
$\text{SO}_4^{2-}$	90 mA
Temperature	
$\text{ClO}_4^-$ , $\text{Cl}^-$	30 °C
$\text{SO}_4^{2-}$	22 °C
Detection time	
$\text{ClO}_4^-$	16 min
$\text{Cl}^-$	4.5 min
$\text{SO}_4^{2-}$	5.3 min
Detection limit	
$\text{ClO}_4^-$	0.5 $\mu\text{g}/l$
$\text{Cl}^-$	5 $\mu\text{g}/l$
$\text{SO}_4^{2-}$	0.2 mg/l

100% (v/v)에 순차적으로 넣어 탈수시켰다. 그 후 ethanol 100%를 2번 더 반복 처리하여 탈수시키고 30°C의 온도에서 1시간 동안 풍건 시켰다. 그리고 대조군으로 사용된 황 입자도 동일한 전처리를 실시하였다. 전처리가 끝난 황 입자는 동아대학교 공동기기센터에서 sputter coater (model Cressington 108 AUTO; Ted Pella Inc., CA, USA)를 이용하여 Au/Pd 타깃으로 코팅 처리하여 SEM을 사용하여 관찰하였다.

PCR (Polymerase Chain Reaction) - DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 분석

황을 이용한 독립영양방식의  $\text{ClO}_4^-$  제거공정에 존재하는 미생물 군집을 조사하기 위해 DGGE기법을 사용하였다. 사용한 시료는 2달 농화배양된 반응기에서 채취한 황입자의 생물막 미생물이었다. 접종군으로 사용된 활성 슬러지도 동일한 실험과정을 거쳐 미생물군집을 비교하였다.

채취한 황 입자 시료에 phosphate buffered saline (PBS; 0.13 M NaCl, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2)을

넣어 강하게 5분간 vortex하여 생물막 미생물을 황 입자로부터 유리시켰다. 유리된 미생물은 회수하여 Mobio (Carlsbad, CA USA)사의 Ultraclean™을 사용하여 total genomic DNA를 추출하는데 사용하였다. 추출된 DNA는 0.8% agarose gel을 이용하여 0.5% TAE buffer에서 전기영동하여 확인하였으며 UV spectrophotometer를 사용하여 농도를 측정하였다.

추출된 DNA를 주형으로 사용하여 문헌[1]에 기술된 것과 같이 PCR로 16S rRNA 유전자의 일부(*Escherichia coli* numbering 기준으로 341 에서 534에 해당)를 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물(약 200 bp)은 agarose gel 전기영동으로 확인한 후 문헌[1]에 기술된 것과 같이 DGGE분석에 사용하였다. DGGE는 DCode System (Bio-Rad, Hercules, CA)을 사용하여 200 V, 60°C에서 4.5시간 진행하였다. 시료로 사용된 PCR 산물은 10% (w/v) polyacrylamide gel (acrylamide: N,N0-methylenebisacrylamide, 37.5:1, Bio-Rad)에서 1x TAE buffer (2 M Tris base, 1 M glacial acetic acid, 50 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 분리하였다. Gel에 denaturing gradient를 형성하기 위해 40%와 60% denaturant를 각각 포함하는 10% polyacrylamide의 2 stock solutions을 혼합 하였으며, denaturing gradient는 전기영동방향으로 증가하였다. 100% denaturant는 7 M urea와 40% (w/v) formamide로 구성된 것을 말한다.

결과 및 고찰

퍼클로레이트의 생분해

회분배양실험에서 입자상 황과 활성 슬러지가 주입된 AS-S<sup>0</sup> 반응기의 배양시간에 따른 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 농도변화를 조사하였다. 한편 그 결과는 서로 다른 구성성분을 가진 control들 (Table 1)과 비교하였다. AS-S<sup>0</sup> 반응기는 초기농도 23.64±0.64 mg ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>/l가 배양 9일까지는 거의 변화가 없다가 10일째부

터 서서히 감소가 나타나기 시작해서 14일째부터는 검출한계 이하로 나타났다(Fig. 1A). ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 제거효율은 배양 11일까지는 22.3%를 나타냈으나 12일에는 68.6%를 나타내다가 14일 이후는 100%를 나타내었다(Fig. 1B). ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 농도변화가 관찰되지 않은 기간이 9일이나 길게 나타난 것은 원소 황의 물에 대한 용해도가 매우 낮아 미생물이 그것을 전자 공여체로 성장하는데 제한이 있거나 미생물의 순응(acclimation)에 필요한 잠복기(lag time)인 것으로 여겨진다. 황과 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>에 이미 순응된 농화 배양균을 활용하면 이러한 기간을 줄일 수도 있을 것이다.

한편 control 반응기들은 본 실험을 실시한 기간 동안에 거의 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 농도변화가 거의 일어나지 않은 것으로 나타났다 (Fig. 1A). 본 연구에서 사용한 medium control을 통해 본 실험 조건하에서는 사용된 mineral medium 자체가 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 농도변화에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 한편 abiotic control에서는 원소 황 자체가 강한 환원제(E<sup>0</sup> = -0.74 V)임에도 불구하고 본 실험조건하에서는 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 농도변화에 거의 영향이 없는 것으로 나타났다. 한편 외부에서 전자 공여체를 주입하지 않는 한 활성 슬러지를 구성하는 미생물자체는 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>를 환원하여 제거할 수 없음을 biotic control을 통해 알 수 있었다.

본 회분반응실험에서는 하수처리장에서 채취한 활성 슬러지를 식중균으로 사용하였다. 채취된 슬러지를 mineral medium으로 세척 않고 식중균 경우에는 슬러지액에 잔존하는 용해된 유기물(soluble organics)로 인해 회분배양기간 동안 약간의 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 제거가 관찰되었다(data 제시하지 않았음). 즉 용해된 유기물이 전자 공여체로 사용된 것으로 추측된다.

퍼클로레이트 생분해의 화학양론적 수지분석

Control 반응기들은 본 연구의 배양기간 동안 배지 내 Cl 농도에 거의 변화를 나타내지 않았다(Fig. 2). 그러나 AS-S<sup>0</sup> 반응기는 배지 내 Cl 농도가 9일까지는 거의 변화가 없다가 10일째

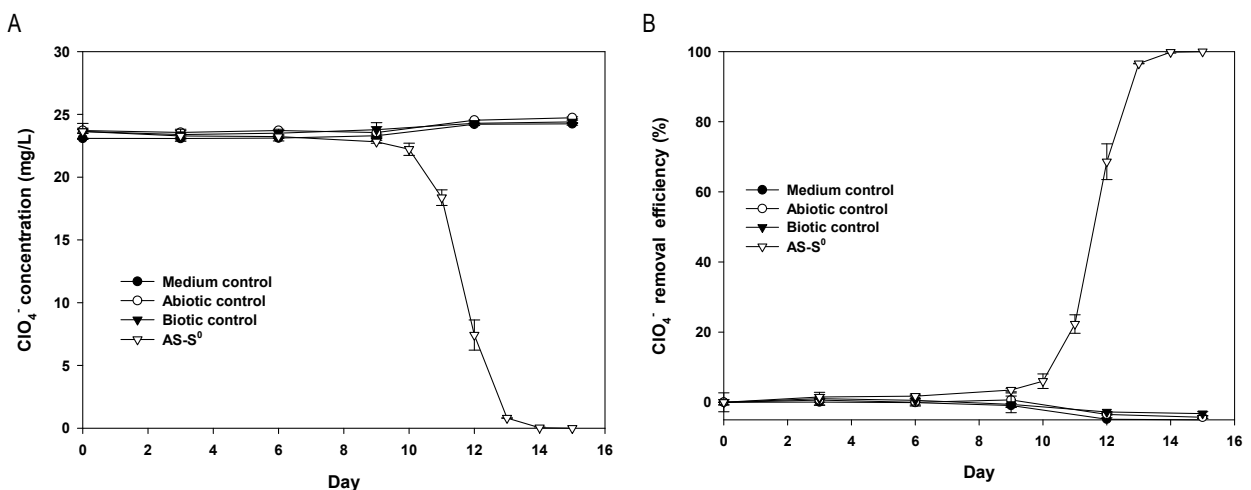


Fig. 1. ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> removal by activated sludge in the presence of sulfur particles. ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> concentration (A) and ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> removal efficiency (B) with time. Data are given as mean±standard deviation (n=3).

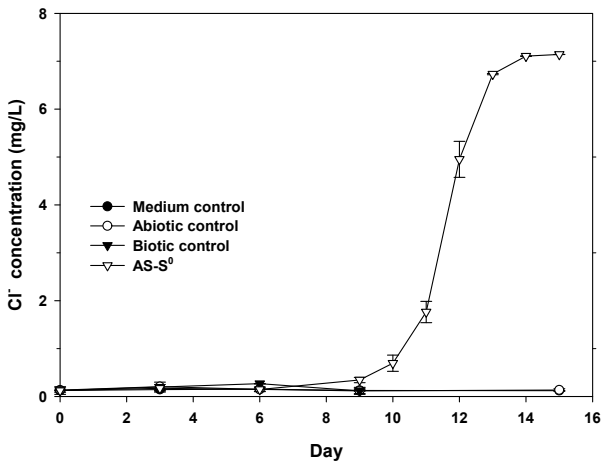


Fig. 2. Chloride production in the batch reactors. Data are given as mean±standard deviation (n=3).

부터 서서히 증가하기 시작해서 12일에는 급격하게 증가하였다. 그러다가 14일부터는 안정된 농도를 나타내었다. 이 경향은 Fig. 1A에서 나타난 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 농도감소의 경향과 정반대를 나타내었다.

AS-S<sup>0</sup> 반응기에서 제거된 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>가 Cl<sup>-</sup>로 완전 전환되었는지를 조사하기 위해 화학양론적 수치(chemical stoichiometric balance)를 검토함으로써 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 분해를 검증하였다. 식 1에 의해 1 mol의 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>이 완전히 환원되면 1 mol의 Cl<sup>-</sup>가 생성된다. 회분배양기간 동안 제거된 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>에 대한 생성된 Cl<sup>-</sup>의 molar yield는 이론 값과 근사하게 나타났다(Fig. 3). Fig. 3에 나타난 것처럼 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>의 mol 농도가 감소하는 만큼 Cl<sup>-</sup>의 mol 농도가 증가하는 대칭되는 곡선을 나타내었으므로 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>가 환원되어 Cl<sup>-</sup>로 완전히 전환되었다는 것을 알 수 있었다. 그러므로 본 연구의 회분배양실험결과는 쉽게 구할 수 있는 식종균인 황성슬러지와 저렴한 원소 황을 이용하여 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>를 제거할 수 있다는 것을 실험적으로 증명하였다.

AS-S<sup>0</sup> 반응기의 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 제거에 따른 sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) 생성농도

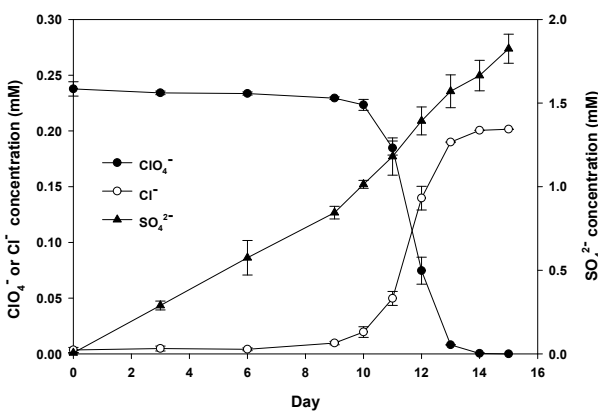


Fig. 3. Chloride and sulfate balance in the AS-S<sup>0</sup> reactor. Data are given as mean±standard deviation (n=3).

를 조사하였다. 식 3에 따르면 3 mol의 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>가 제거되면 4 mol의 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>가 생성된다. 그러나 생성된 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 농도는 이론 값보다 높게 나타났으며 심지어 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 농도감소가 나타나지 않은 배양 첫 9일 동안에도 지속적으로 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 농도가 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이렇게 실험 값이 이론 값보다 높게 나타난 것은 황을 전자 공여체로 하여 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> 제거를 하는 미생물에 의해 생성된 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 이외에도 반응기 내에 식종된 황성슬러지미생물에 의한 S<sup>0</sup> 불균등화 반응(disproportionation)으로 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>가 생성된 것으로 여겨진다. 즉 미생물에 의해 S<sup>0</sup>가 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>와 S<sup>2-</sup>로 불균등화 반응이 일어남에 따라 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 농도가 이론 값보다 높게 나타난 것으로 여겨진다. S<sup>0</sup> 불균등화 반응은 무산소 상태에서 일어나는 생물학적 반응으로 S<sup>0</sup>를 S<sup>2-</sup>와 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>로 3:1 mol 비로 전환한다고 보고되었다[4].

퍼클로레이트 생분해 동안의 pH 변화

배양시간에 따른 각 반응기내 배지의 pH 변화를 조사하였다. AS-S<sup>0</sup> 반응기는 배양시간이 지남에 따라 pH가 점차 감소하여 배양 15일에는 배양액의 초기 pH 7.79 보다 pH 0.64가 감소된 pH 7.15을 나타내었다(Fig. 4). 이것은 S<sup>0</sup>가 산화되면서 생성된 H<sup>+</sup> (식 3)에 의해 배양액의 pH가 감소하는 것으로 여겨진다. 본 실험조건하에서 AS-S<sup>0</sup> 반응기에 나타난 pH 감소 정도는 미생물 활성에 저해 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

한편 그 외의 반응기에서는 배양기간 동안 비교적 큰 pH 변화가 관찰되지 않았다. Biotic control의 경우는 배양 15일 동안 거의 pH 변화가 나타나지 않았고 medium control 과 abiotic control의 경우는 배지의 pH가 약간(pH 0.24 - 0.26) 증가되었다.

황 입자표면의 미생물 관찰

황을 산화하는 미생물들은 황 입자 표면에 생물막을 형성하면 황 입자로부터 쉽게 전자를 얻을 수 있으므로 물질전달면에서 이점이 있는 것으로 여겨진다. 즉 현탁된 형태로 존재

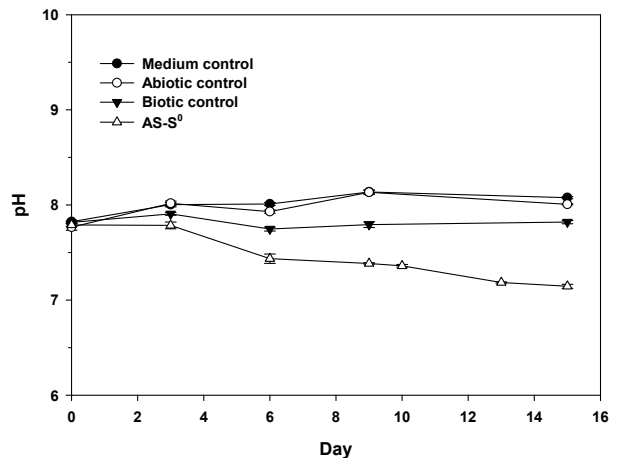


Fig. 4. Medium pH in the batch reactors.

하는 미생물 보다는 황입자 표면에 부착해서 생물막을 형성하는 미생물은 전자 공여체인 황 입자로부터 전자를 쉽게 이용할 수 있는 이점이 있을 것이다. 그래서 황을 이용하는  $\text{ClO}_4^-$  제거 공정에서 황은 황산화 미생물에게 전자 공여체로 작용할 뿐만 아니라 생물막을 형성할 수 있는 담체로도 작용할 것으로 여겨진다. 그러나 육안으로 황 입자 표면을 관찰하면  $\text{ClO}_4^-$  제거공정에 사용된 것과 그렇지 않은 것을 구분하기가 어려울 정도로 비슷한 모양과 색을 나타내었다(Fig. 5).

황 입자에 형성된 생물막의 존재를 확인하기 위해 SEM을 이용한 황입자 표면관찰을 실시하였다.  $\text{ClO}_4^-$  제거공정에 사용된 황 입자와 사용하지 않은 새 황 입자를 비교 관찰한 결과, 사용하지 않은 황은 거의 비교적 매끈한 표면구조를 나타내었다(Fig. 6A-C). 반면에 공정에 사용된 황 입자들은 표면에 굴곡



Fig. 5. Picture of sulfur particles. Elemental sulfur granules used in the study are shown on the right while unused ones are on the left.

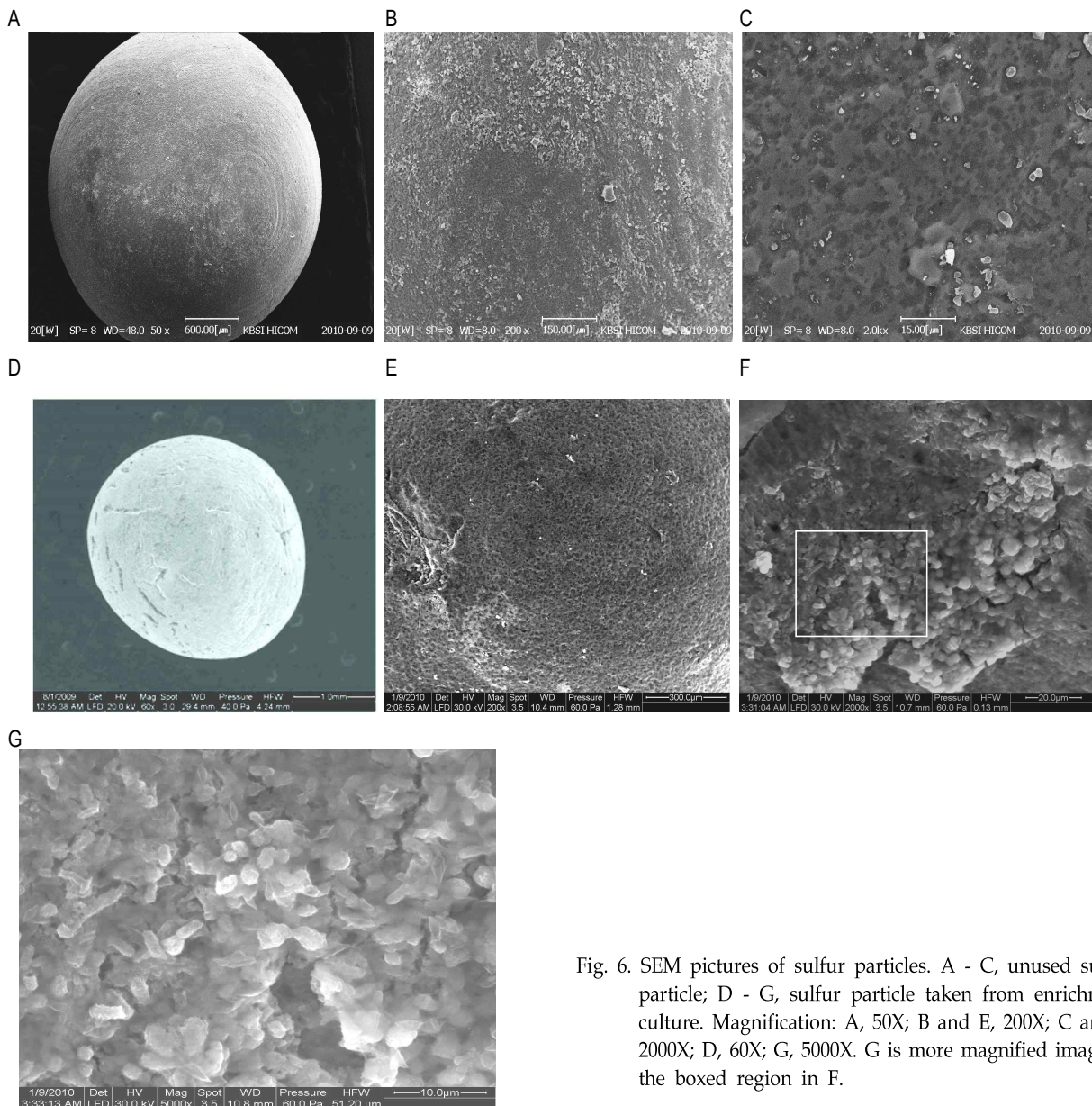


Fig. 6. SEM pictures of sulfur particles. A - C, unused sulfur particle; D - G, sulfur particle taken from enrichment culture. Magnification: A, 50X; B and E, 200X; C and F 2000X; D, 60X; G, 5000X. G is more magnified image of the boxed region in F.



과 요철이 비교적 많은 형태를 나타냈다(Fig. 6D-F). 황 입자의 표면을 더 잘 비교분석하기 위해 2,000배로 확대해서 관찰한 이미지를 통해 두 시료의 차이점이 더 잘 나타났다. 즉 사용하지 않은 황 입자의 표면은 비교적 매끈한 반면(Fig. 6C), 농화 배양기에서 취한 황 입자에서는 세균형태의 것으로 구성된 생물막(biofilm)이나 미세집락(microcolony)들로 보이는 것이 황 입자 표면의 움푹 팬 골 등에서 관찰되었다(Fig. 6F, G). 생물막이나 미세집락에 존재하는 미생물들은 주로 간균의 형태를 나타내었다.

본 연구의 회분반응실험과 SEM관찰을 통해 황 입자는 황산화 미생물이  $\text{ClO}_4^-$ 를 환원하는데 필요한 전자 공여체로 작용할 뿐만 아니라 그 미생물들이 정착하여 생물막을 형성하는 담체로도 작용할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 황 입자 자체가 담체로 사용될 수 있다는 것은  $\text{ClO}_4^-$ 로 오염된 폐수나 지하수를 생물반응기로 처리할 때 원소 황 입자를 이용하면 반응기 내에 따로 담체를 넣어주지 않아도 biomass를 확보 또는 유지할 수 있다는 장점이 있다.

#### PCR-DGGE에 의한 미생물 군집비교분석

DGGE 결과 나타난 band pattern에 근거하여 농화배양된 미생물군집은 식중에 사용된 활성 슬러지의 미생물군집과 그 조성이 다른 것으로 나타났다(Fig. 7). 이는 식중된 미생물군집이 농화 배양 되는 동안 그 환경조건에 잘 성장하는 미생물들로 군집이 바뀐 것으로 여겨진다. 본 연구는 입자상 원소황과 활성 슬러지를 이용한  $\text{ClO}_4^-$ 의 제거 가능성조사에 초점을



Fig. 7. DGGE profile of 16S rRNA gene fragments. The fragments were PCR-amplified from the total DNA of samples. Lanes: left, activated sludge used as inoculum; right, biofilm of sulfur particles taken from enrichment culture.

맞추었으므로 DGGE에 나타난 밴드의 분석에 따른 구체적인 계통발생학적 미생물 분석은 실시하지 않았다. 본 연구를 통해 입자상 원소 황과 활성 슬러지를 이용한  $\text{ClO}_4^-$ 의 제거가 가능하다는 것이 실험적으로 밝혀졌으므로 그 공정에 관련된 미생물에 대한 연구가 이루어진다면 본 공정을 모니터링하고 제어하는데 큰 도움이 될 것으로 여겨진다.

#### 감사의 말씀

이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(No. 2009-0077422)에서 지원을 받아 수행되었습니다.

#### References

- Ahn, Y., E. J. Park, Y. K. Oh, S. Park, and G. Webster, and A. J. Weightman. 2005. Biofilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production. *FEMS Microbiol. Lett.* **249**, 31-38.
- APHA. 1995. Standard methods for examination of water and wastewater. 19th eds. American Public Health Association, Washington, D. C., USA.
- Coates, J. D. and L. A. Achenbach. 2004. Microbial perchlorate reduction: Rocket-fuelled metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 569-580.
- Finster, K., W. Liesack, and B. Thamdrup. 1998. Elemental sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfexigens* sp. nov., a new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 119-125.
- Kim, H., J. Kim, and Y. Lee. 2007. Occurrence of perchlorate in drinking water in Korea. *J. Korean Soc. Water Quality* **23**, 822-828.
- Kim, H., J. Kim, Y. Lee, J. Lee, and S. Kim. 2008. Perchlorate in advanced drinking water treatment process. *J. Korean Soc. Water Quality* **24**, 164-168.
- Lee, C. 2009. Optimum treatment of sewage and wastewater discharged in Gumi industrial complex. Final report 09-2-10-16-5. Gyeongbuk regional environment technology development center. Gyeongbuk, Korea.
- Lee, K., S. Kim, K. Lee, and O. Kwon. 2010. Biological treatment of perchlorate in inorganic wastewater from primary zinc smelting industry. *Proceedings of Korean Soc. on Water Quality* April 16. Taejon, Korea. 103-104.
- Logan, B. E. 1998. A review of chlorate-and perchlorate-respiring microorganisms. *Bioremediation J.* **2**, 69-79.
- Miller, J. P. and B. E. Logan. 2000. Sustained perchlorate degradation in an autographic, gas-phase, packed-bed bioreactor. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3018-3022.
- Min, B., P. J. Evans, A. K. Chiu, and B. E. Logan. 2004. Perchlorate removal in sand and plastic media bioreactors. *Water Res.* **38**, 47-60.
- Motzer, W. E. 2001. Perchlorate: problems, detection, and

solutions. *Environ. Forensics* **2**, 301-311.

13. National Research Council. 2005. Health implications of perchlorate ingestion. National Academy of Sciences. Washington, D. C., USA.

14. Republic of Korea Ministry of Environment. 2007. Notice on amendment of law relating to conservation of water quality and water ecosystem. Notice No. 2007-419.

15. Republic of Korea Ministry of Environment. 2010. Guideline for the management of drinking water quality monitoring items.

16. Shin, K. H., A. Son, D. K. Cha, and K. W. Kim. 2007. Review on risks of perchlorate and treatment technologies. *J. Korean Soc. Environ. Eng.* **29**, 1060-1068.

17. US EPA. 1999. EPA METHOD 314.0: Determination of perchlorate in drinking water using ion chromatography.

초록 : 원소 황 입자와 활성 슬러지를 이용한 독립영양방식의 퍼클로레이트 제거: 회분배양연구

한경림<sup>1,2</sup> · 강태호<sup>3</sup> · 강형창<sup>3</sup> · 김경현<sup>3</sup> · 서득화<sup>3</sup> · 안영희<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>부산광역시 사하구 하단동 동아대학교 환경공학과, <sup>2</sup>기초과학지원연구원 부산센터, <sup>3</sup>한국과학영재학교)

퍼클로레이트( $\text{ClO}_4^-$ )는 지표수 및 토양/지하수에서 검출되는 오염물이다. 미생물은 퍼클로레이트를 무해한 최종산물로 환원시킬 수 있으므로 퍼클로레이트제거는 미생물을 이용한 방법이 가장 적절한 것으로 알려졌다. 미생물이 퍼클로레이트를 환원시키기 위해서는 전자 공여체가 필요하다. 퍼클로레이트를 환원하기 위한 기존의 기술들은 전자 공여체로서 유기물을 사용하는 종속영양방식의 퍼클로레이트환원세균을 사용한다. 그래서 종속영양 방식으로 퍼클로레이트를 연속 제거하기 위해서는 지속적으로 유기물을 공급해야 하므로 처리비용이 많이 든다. 본 연구에서는 원소 황 입자와 활성 슬러지를 이용하여 독립영양방식의 퍼클로레이트제거가능성을 조사하였다. 입자상 황은 비교적 값이 저렴하고 활성 슬러지는 하수처리장으로부터 쉽게 구할 수 있는 장점이 있다. 회분배양 실험결과 활성 슬러지 미생물은 전자 공여체로서 황 입자가 존재할 때 퍼클로레이트를 제거할 수 있다는 것이 증명되었다. 이러한 퍼클로레이트 분해는 퍼클로레이트가 분해됨에 따라 생성되는  $\text{Cl}^-$ 의 몰 농도를 통해 검증할 수 있었다. 독립영양방식의  $\text{ClO}_4^-$  제거공정에 사용된 황 입자의 표면에 간균 형태의 미생물들이 존재한다는 것을 주사전자현미경을 통해 관찰하였다. 그래서 황 입자가 생물막을 형성하기 위한 담체로도 작용할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 황입자가 첨가된  $\text{ClO}_4^-$  분해성 농화 배양으로부터 채취한 생물막의 미생물균집조성은 점중균으로 사용된 활성 슬러지의 그것과는 다름이 DGGE 분석결과 나타났다.