

Research Article

Open Access

## 산업폐수로부터 분리한 인제거 미생물의 인 제거 특성

김희정<sup>1</sup>, 이석언<sup>1</sup>, 홍현기<sup>1</sup>, 김덕현<sup>1</sup>, 안중우<sup>1</sup>, 최종순<sup>2</sup>, 남주현<sup>2</sup>, 이문순<sup>3</sup>, 우선희<sup>4</sup>, 정근욱<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 환경생명화학과, <sup>2</sup>한국기초과학지원연구원 생명과학연구부, <sup>3</sup>충북대학교 특용식물학과, <sup>4</sup>충북대학교 식물자원학과

### Phosphorus Removal Characteristics by Bacteria Isolated from Industrial Wastewater

Hee-Jung Kim<sup>1</sup>, Seok-Eon Lee<sup>1</sup>, Hyeon-Ki Hong<sup>1</sup>, Deok-Hyun Kim<sup>1</sup>, Jung-Woo An<sup>1</sup>, Jong-Soon Choi<sup>2</sup>, Ju-Hyun Nam<sup>2</sup>, Moon-Soon Lee<sup>3</sup>, Sun-Hee Woo<sup>4</sup> and Keun-Yook Chung<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>Department of Environmental Biology and Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea, <sup>2</sup>Division of Life Science, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-806, Korea, <sup>3</sup>Department of Industrial Plant, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, <sup>4</sup>Department of Crop Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Received: 17 May 2012 / Accepted: 25 June 2012

© 2012 The Korean Society of Environmental Agriculture

### Abstract

**Background:** The removal of phosphate(P) in the wastewater is essential for the prevention of eutrophication in the river and stream. This study was initiated to evaluate the P removal by three strains of bacteria isolated from industrial wastewater. The three strains of bacteria, A1, A2, and A3, isolated were identified as *Stenotrophomonas maltophilia* strain CUPS 3, *Rhodococcus erythropolis* strain Sco-C01, *Bacillus* sp. 3434BRRJ, respectively.

**METHODS AND RESULTS:** The experiments evaluating the effects of temperature, P concentration, aeration, and carbon sources on P removal by *Bacillus* sp. 3434BRRJ were performed in the following conditions: temperature, 15, 25 and 30°C; P concentrations, 20, 30, and 40 mg/L; oxygen condition, aerobic, anaerobic/aerobic conditions; carbon sources, glucose, acetate and mixture of glucose and acetate. As a result, the best optimum conditions for P removal by *Bacillus* sp. 3434BRRJ were as follows: temperature, 30°C; P concentration, 20 mg/L; carbon sources, mixture of glucose and acetate; oxygen concentration, anaerobic and aerobic conditions. The P removal efficiencies by *Bacillus* sp. 3434BRRJ, *Stenotrophomonas maltophilia* strain CUPS, and *Rhodococcus erythropolis* strain Sco-C01

were 99%, 50%, 20%, respectively.

**CONCLUSION:** As a result, the best optimum conditions for P removal by *Bacillus* sp. 3434BRRJ selected and used in this study were as follows: temperature, 30°C; P concentration, 20 mg/L; carbon sources, mixture of glucose and acetate; oxygen concentration, anaerobic and aerobic conditions.

**Key Words:** *Bacillus* sp. 3434BRRJ, Industrial Wastewater, Optimum Conditions, Phosphorus Accumulating MicroOrganism (PAO's), Phosphorus Removal Efficiency

## 서론

현재 산업화와 인구증가로 인해 배출되는 폐수의 특성이 다양해짐으로써 이들의 효율적인 처리에 많은 어려움을 겪고 있다. 미처리된 오염물질은 하천이나 호수를 비롯한 기타 수원에 유입됨에 따라 효율적인 수질관리에 문제점을 야기하고 있다. 특히, 질소나 인과 같은 영양염류는 부영양화를 유발시키는 주 원인물질로서 관리의 중요성이 증가되고 있다(Young *et al.*, 1999). 1990년대의 기존 폐수처리공정의 대부분은 BOD (biochemical oxygen demand)와 SS(suspended solid)의 제거에 중점을 두었기 때문에 질소와 인을 제거하지 않고 그대로 수계로 방류함으로써 부영양화가 발생하였고 그로인해 용존 산소량을 감소시키는 결과를 가져왔다(Grady *et al.*, 1999). 수계로의 질소와 인의 유입은 정수비용의 증가에 따른 경제적인 손실발생, 공중보건상 안전하고 깨끗한 수자원 확보의 어려움 등의 문제를 유발시킨다. 따라서 수계로의 영양염류 유입을

\*교신저자(Corresponding author),

Phone: +82-43-261-3383; Fax: +82-43-271-5921;

E-mail: kychung@cbnu.ac.kr

차단하는 것이 가장 근원적인 해결책이므로 하·폐수 및 축산 폐수에서 유기물의 제거와 더불어 질소와 인의 처리가 더욱 강조되고 있는 실정이다. 다만 질소의 경우 질소고정 박테리아에 의해 공기 중의 질소가 수계로 유입되거나 질산화 박테리아에 의해 대기 중으로 제거되는 경우도 존재하므로 부영양화를 방지하는 데에는 질소보다는 인을 확실하게 처리하는 것이 보다 효과적이라고 알려져 있다. 이러한 추세에 따라 세계의 여러 나라에서는 질소와 인의 배출규정을 강화하였고 우리나라 역시 환경부에서 2012년부터 하수처리장 방류수 총인 농도를 현재의 2 mg/L보다 1/10~1/4 수준으로 크게 낮추는 새로운 수질 기준을 채용한 수도법 시행규칙 일부 개정령안을 입법예고한 상태에 있다(환경부보도자료, 2009).

인 제거 공정에 대한 미생물학적 접근은 최근 생물학적 인 제거 연구의 주류가 되는 연구 분야이다. 생물학적 인 제거 연구의 초기에는 실제 하수 처리장에서 조절할 수 있는 공정 변수에 대한 영향을 연구하여 인 제거 공정의 최적화를 꾀하려는 경향이 강하였으나 점점 강화되는 인 규제를 따라가기 위해서는 하수처리장의 공정최적화만으로는 부족하다는 의견들이 점차 힘을 얻게 되었다. 또한 인 제거 미생물에 대한 정보가 전혀 없는 상황에서 단순히 공정변수에 의해 이루어진 공정의 최적화는 진정한 최적화라 할 수 없으며 생물학적 인 제거 공정을 운영함에 있어서 발생할 수 있는 여러 이상사태에 대한 완전한 대비가 이루어질 수도 없다. 따라서 생물학적 인 제거 공정의 연구에 있어서 인 제거 미생물에 대한 완전한 이해가 반드시 필요하다고 할 수 있다. 실제로 점차 공정변수에 대한 연구에 앞서 인 제거 미생물에 관한 연구가 진행되고 있다. 생물학적 인 제거에서 C:N:P비 차이에 따른 인 제거 미생물군집의 변화연구에서 COD:P의 적절한 비율이 인 제거 효율에 결정적인 요인 중 하나임을 증명하였으며(여상민과 이영옥, 2005), EBPR 공정의 슬러지로부터 분리한 *A. phosphatis*의 PHA의 합성과정과 *Accumulibacter phosphatis*의 다양성을 확인하기 위한 연구를 수행하였으며 미생물군집을 연구하였다(Q. Wang *et al.*, 2008).

하·폐수로부터 인을 제거하는 생물학적인 방법은 수중의 인을 미생물이 대사과정에서 영양물질로 흡수하거나 일부 미생물에 의해 과다 흡수기전(Luxury Uptake)에 의해 제거되는 원리를 이용한다(Levin and Sharp, 1965). 생물학적 방법에 의한 인 제거는 안전하고 효율이 높으며 이 방법을 이용하는 하·폐수의 인 제거 공정 기술은 A/O, PhoStrip, SBR(Sequencing Batch Reactor)공정 등이 있다.

생물의 성장에 필수영양소인 인은 모든 세포가 필요로 하는 물질로 아데노신삼인산 (adenosine triphosphate, ATP), 핵산(Deoxyribonucleic acid: DNA, Ribonucleic acid: RNA), 세포막 인지질의 중요 성분이다(Bouw *et al.*, 1989).

인 제거 공정은 활성화된 PAOs의 생물학적 특성을 이용하는 것으로, 인 제거 박테리아(Phosphorous accumulating organisms, PAOs)는 세포 내에 다중 인산염의 형태로 다량의 인을 저장할 수 있기 때문에 인 제거가 가능하다고 알려져 있다. 일반적으로 알려진 인 제거 과정은 먼저 활성화된

PAOs가 혐기조건에서 유입수에 함유된 유기물(BOD, COD)을 세포 내에 PHB(Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) 형태로 저장하고 이에 필요한 에너지는 polyphosphate를 가수분해하여 이용한다. 혐기과정을 거친 미생물은 호기조건을 거치면서 세포 내에 저장된 유기물(PHB)이 분해하여 얻어진 에너지로 혐기조건에서 내놓은 인의 양보다 과잉의 인을 섭취하여 Poly-P granules 형태로 세포 내에 축적(Luxury uptake)한다고 알려져 있다(Sedlak, 1991; Levin and Sharp, 1965). 이것에 기초하여 생물학적 인 제거 기작은 미생물을 혐기/호기 조건에 교대 노출시켜 인의 과잉섭취(Luxury Uptake)가 일어나도록 한 후 인을 함유한 슬러지를 폐기함으로써 인을 제거한다. PAOs는 제한적 환경에서 생장이 촉진되며 인을 소비하고 세포 내에 저장한다. 일반적으로 미생물의 건조중량당 인의 함량은 2-5% 이나 생물학적 인 제거가 제대로 일어날 경우 세포 내 인의 함량은 정상적인 경우의 2-5배에 이른다고 한다. 생물학적 인 제거 방법에 영향을 주는 인자로는 온도, pH, 하수의 특성, 혐기 단계의 접촉시간, 하수의 산소함유량, nitrate 등이 있다(Daigger *et al.*, 1987). 생물학적 인 제거의 일반적으로 알려진 pH범위는 6.5-8.0의 범위가 적정한 것으로 알려져 있으며, 6.0이하 또는 8.0 이상의 pH 조건에서는 인 제거효율이 떨어진다고 알려져 있다(Tracy and Flammino, 1985). 온도에 대한 영향은 혐기성 상태에서의 인 방출량과 밀접한 관련이 있는 것으로 연구결과가 보고되었다. 생물학적 인 제거에서 DO의 영향에 대한 연구는 미비하나, Shehab 등(1996)은 연구결과 혐기조의 DO농도는 0.0-0.2 mg/L로 아주 낮게 되어야 하며, 호기조의 경우에는 3.0-4.0 mg/L의 농도가 적당하다고 보고하였다. 생물학적 인 제거에 있어서 SRT(Solid retention time), 혐기 및 호기조의 HRT(Hydraulic retention time)는 중요한 설계인자이다. SRT의 경우 짧을수록 많은 양의 슬러지가 폐기되므로 인 제거율을 높일 수 있다. 혐기 체류시간은 유기물을 발효하고 세포내의 인 방출을 도모하는데 사용된다. 호기조의 체류시간은 미생물이 혐기조에서 방출된 인을 세포 내로 저장하고 질산화와 BOD제거를 위하여 필요로 하는 시간이다(Stephens and Stensel, 1998).

본 연구에서는 하·폐수 처리시설의 산업폐수로부터 미생물을 분리하여 그 중 인 제거 능력이 가장 좋은 *Bacillus sp.* 3434BRRJ를 배양 온도, 인 농도별, 탄소원 종류에 따른 인 제거 효율을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 미생물의 분리 및 동정

실험 미생물의 분리 및 배양

대전에 위치한 A회사의 폐수처리장에서 채수한 폐수에서 미생물을 분리하여 이용하였다. 폐수처리장에서 채수한 폐수 5 mL를 0.22  $\mu$ m pore size의 membrane filter로 감압 여과하고 멸균된 증류수로 씻어낸 후 여액은 버리고 filter에 남은 균체에 멸균 증류수 5 mL를 넣고 균체를 모은 후 그 액을 200 mL의 실험배지가 들어 있는 250 mL 삼각플라스크에 2 mL를

접종하여 48 시간동안 진탕배양(30°C, 150 rpm) 하였다. 배지의 인 농도는 20 mg/L로 설정하였다. 미생물 배양에 사용된 배지는 Zafiri배지를 변형하여 사용하였다(Zafiri, 1999). Trace metal solution은 membrane filter(Pore size: 0.45 µm, Diameter: 25 mm)로 여과한 여액을 사용하였다. 1 M Tris는 묽은 수산화나트륨 용액을 이용하여 pH를 7.0± 0.2로 조절하여 사용하였다. 실험 배지는 Basic media solution과 Trace metal solution, Phosphate solution 그리고 1 M Tris buffer solution을 적절한 혼합비율로 섞어 사용하였다. 실험배지에서 배양한 배양액을 agar plate에 도말한 후 30°C incubator에서 배양하여 colony를 확인하였으며, 형성된 colony의 색과 모양을 고려하여 8개의 미생물을 선별 하였다. 선별된 균을 250 mL 삼각플라스크에 들어있는 200 mL 실험 배지에 1% (v/v)를 접종한 후 분광광도계(SHIMADZU, UV mini-1240)로 미생물의 성장 측정 및 인 농도를 측정하여 인 제거율이 높은 3가지 종의 미생물을 선별 하였다.

균의 생육도 측정 및 인산의 정량

균의 생육은 배양액을 syringe로 채취하여 분광광도계를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액중의 인 농도는 ascorbic acid에 의한 몰리브덴 청법을 변형하여 측정하였다(Callaway, 1995 : 175-176). 배양액을 syringe로 채취하여 membrane filter로 여과한 후 test tube에 증류수 7 mL, 여과 액 1 mL를 넣고 잘 섞이도록 혼합한다. 발색시약으로 ascorbic acid-molybdate 시약 2 mL를 넣은 즉시 30초간 vortexing 한 후 30°C에서 30 분간 발색시켰다. 물에 발색시약만 넣은 대조액을 이용하여 분광광도계로 880 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

미생물 동정

선별된 3가지 종의 미생물을 16S rRNA gene sequencing으로 동정하였다. 동정을 통해서 얻어진 미생물의 염기서열은 NCBI BLAST program을 이용하여 염기서열의 상동성을 비교 분석하였다. 이 때 상동성의 기준은 95% 이상으로 정하였으며, 분석 결과 가장 상동성이 높은 미생물 종을 선택하였다.

순수 분리한 미생물의 인 제거

분리한 3 가지 종의 미생물의 인 제거

3개의 250 mL 삼각 플라스크에 인의 농도가 20 mg/L로 설정된 실험배지 200 mL를 넣고 폐수로부터 분리한 3가지 종의 미생물을 각 각의 삼각플라스크에 1% (v/v)씩 접종하여 30°C, 150 rpm으로 진탕 배양 하였으며, 인 농도는 배양액을 채취하여 membrane filter로 여과한 후 여액 내에 남아있는 농도를 측정하였다.

온도 변화에 따른 Bacillus sp. 3434BRRJ의 인 제거

250 mL 삼각플라스크에 인 농도가 20 mg/L로 설정된 실험배지 200mL을 넣고 1% (v/v)의 Bacillus sp. 3434BRRJ을 접종하여 배양온도를 15°C, 25°C, 30°C로 변화시켜 150

rpm에서 진탕 배양하였으며, 일정한 시간 간격으로 시료를 채취하여 분광광도계를 이용하여 미생물의 성장 및 인 농도를 측정하였다.

초기 인 농도에 따른 Bacillus sp. 3434BRRJ의 인 제거 250 mL 삼각플라스크에 각 각의 인 농도가 20, 30, 40 mg/L 으로 설정된 실험배지 200 mL를 넣고 1% (v/v)의 Bacillus sp. 3434BRRJ을 접종한 후 30°C, 150 rpm에서 진탕 배양하였으며, 일정한 시간 간격으로 시료를 채취하여 분광광도계를 이용하여 성장 및 인 농도를 측정하였다. 위의 실험들은 3반복 실시하였다.

산소조건 및 탄소원 변화에 따른 Bacillus sp. 3434BRRJ의 인 제거

인 농도가 20 mg/L인 실험배지가 들어 있는 250 mL 마개달린 삼각플라스크에 1% (v/v)의 Bacillus sp. 3434BRRJ을 접종하여 한 그룹은 마개를 잠근 후 12시간동안 정치 배양한 이후 실리콘 마개로 변경하여 60시간 동안 진탕 배양하였으며 다른 한 그룹은 실리콘 마개로 막은 후 72시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 일정한 시간 간격으로 시료를 채취한 후 분광광도계를 이용하여 미생물의 성장 및 인 농도를 측정하였다. 실험배지의 탄소원으로는 glucose, acetate, glucose와 acetate혼합으로 하여 각 각 실험배지에 1% (v/v)씩 첨가하였다. 실험은 2반복 실시하였다.

결 과

실험 미생물의 분리 및 동정

3가지의 분리균주의 16S-rRNA 부분염기서열을 분석하여 얻어진 염기서열을 NCBI BLAST program을 이용하여 염기서열의 상동성이 가장 높은 미생물 종을 선택한 결과 A1균은 Stenotrophomonas maltophilia strain CUPS 3, A2균은 Rhodococcus erythropolis strain Sco-C01, A3균은 Bacillus sp. 3434BRRJ이었다(Table 1).

Table 1. Classification of bacterial strains by 16S rRNA gene sequences

Strain	Number of nucleotide(bp)	Homologous microorganism	Similarity
A1	1156	Stenotrophomonas maltophilia strain CUPS 3	738/738 (100%)
A2	1086	Rhodococcus erythropolis strain Sco-C01	717/717 (100%)
A3	1111	Bacillus sp. 3434BRRJ	937/937 (100%)

순수 분리한 미생물의 인 제거

분리한 3 가지 종의 미생물의 인 제거

분리한 3가지 종의 미생물의 인 제거율을 알아보기 위해

각각의 미생물을 인 농도 20 mg/L인 배지에 접종하여 배양하였으며, 일정한 시간단위로 시료를 채취하여 성장곡선과 인농도 변화를 측정하였다. Fig. 1는 *Stenotrophomonas maltophilia* strain CUPS 3(A1), *Rhodococcus erythropolis* strain Sco-C01(A2), *Bacillus* sp. 3434BRRJ(A3)의 미생물의 성장곡선으로 각각의 미생물이 120시간 안의 모든 성장이 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 가장 빠른 성장을 보였던 *Stenotrophomonas maltophilia* strain CUPS 3은 성장 직후 가장 먼저 인 농도가 줄어드는 것을 확인하였다. *Rhodococcus erythropolis* strain Sco-C01의 경우는 성장이 가장 더딘 것으로 나타났으며 인 농도의 변화도 가장 작은 것으로 나타났다. *Bacillus* sp. 3434BRRJ의 경우 성장이 시작된 이후로 가장 높은 인 농도의 감소가 확인되었다. 따라서 배지 내 인 제거율은 *Bacillus* sp. 3434BRRJ > *Stenotrophomonas maltophilia* strain CUPS 3 > *Rhodococcus erythropolis* strain Sco-C01 순으로 높은 것으로 나타났다(Fig. 1).

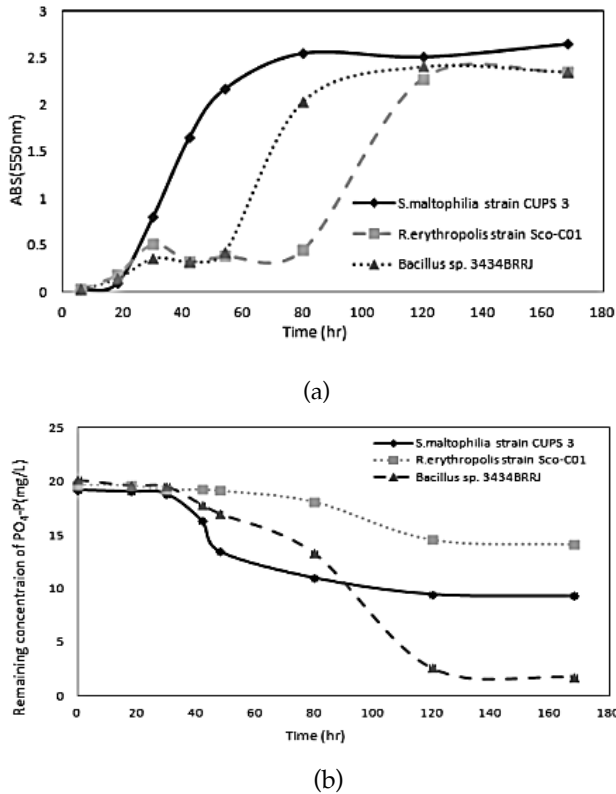


Fig. 1. Growth curve and P concentrations removed by isolated bacteria as a function of time. (a): Growth curve of pure bacterial cultures, (b): P remaining in liquid media after P was removed by the inoculation of isolated bacteria

온도 변화에 따른 *Bacillus* sp. 3434BRRJ의 인 제거

이전 실험에서 가장 높은 인 제거율을 보였던 *Bacillus* sp. 3434에 대한 온도 변화에 따른 인 제거율을 확인하기 위해 인 농도가 20 mg/L로 설정된 실험배지에 1% (v/v)의

*Bacillus* sp. 3434BRRJ를 접종하여 배양온도를 15°C, 25°C, 30°C로 설정하여 진탕 배양하여 일정한 시간 간격으로 시료를 채취하여 미생물의 성장 및 인 농도를 측정된 결과 15°C에서는 균의 성장이 이루어지지 않는 것을 확인하였다. 25°C와 30°C에서는 모두 균의 성장이 이루어 졌으며 그 중 30°C에서 가장 좋은 성장이 이루어지는 것을 볼 수 있었다. 균의 성장과 더불어 배지 내 인 농도의 변화는 30°C에서 거의 모든 인이 제거되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

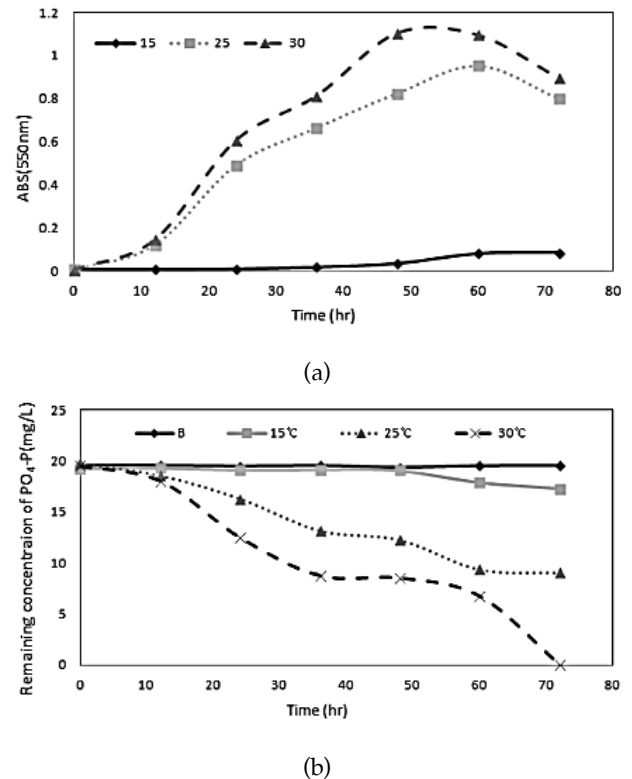


Fig. 2. Growth curve and P concentrations removed by *Bacillus* sp. 3434BRRJ as a function of time in relation to temperature(15, 25 and 30°C). (a): Growth of *Bacillus* sp. 3434BRRJ, (b): P concentrations remaining in liquid media after P was removed by the inoculation of *Bacillus* sp. 3434BRRJ

초기 인 농도에 따른 *Bacillus* sp. 3434BRRJ의 인 제거

*Bacillus* sp. 3434BRRJ의 인 제거 정도를 확인하기 위해 각각의 인 농도가 20, 30, 40 mg/L 으로 설정된 실험배지에 1% (v/v)의 *Bacillus* sp. 3434BRRJ를 접종한 후 성장 및 인 농도를 측정된 결과 20 mg/L와 30 mg/L에서의 균의 성장의 차이는 크지 않았으나 40 mg/L에서 특히 높은 성장률을 확인할 수 있었다. 배지 내 인 농도의 변화를 확인한 결과 20 mg/L의 배지에서의 인 제거율은 약 99.9%로 거의 모든 인이 제거됨을 확인할 수 있었고, 30 mg/L의 배지에서는 약 75.42%, 40 mg/L의 배지에서는 약 59.57%의 인 제거율이 확인되었다(Fig. 3).

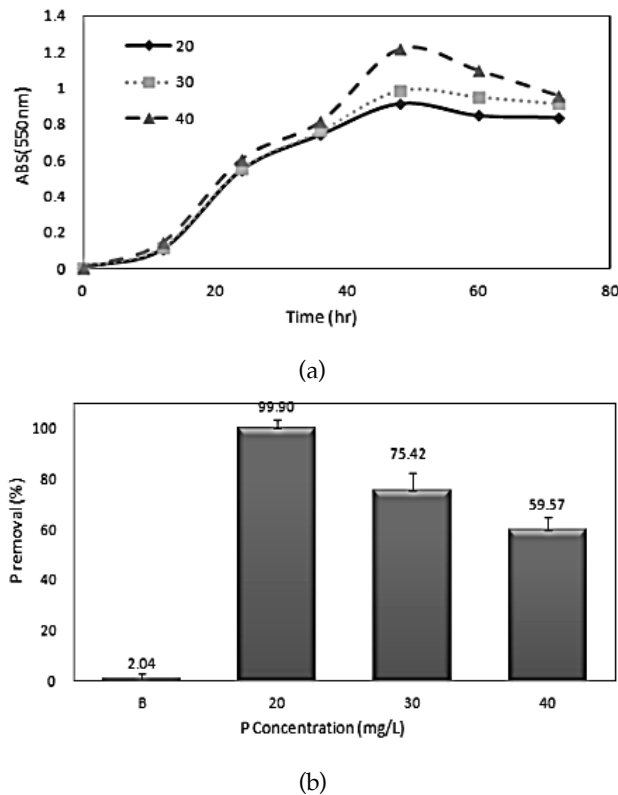


Fig. 3. Growth curve(a) of *Bacillus* sp. 3434BRRJ as a function of time and its removal efficiencies of P(b) in relation to P concentrations(20, 30 and 40 mg/L)

산소조건 및 탄소원 종류에 따른 *Bacillus* sp. 3434BRRJ의 인 제거

초기 산소조건 및 탄소원 종류에 따른 인 제거의 변화를 확인하기 위해 glucose, acetate 및 glucose와 acetate를 혼합한 배지 각 각을 12시간의 혐기조건을 둔 처리구와 혐기조건을 두지 않은 처리구로 나누어 생장 및 인 농도를 측정 한 결과 혐기조건을 두고 탄소원으로 acetate와 glucose를 혼합한 처리구에서 초반 생장이 더뎠으나 후반에는 가장 높은 성장이 이루어지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그 다음으로 호기조건에서 탄소원으로 acetate와 glucose를 혼합한 처리구의 성장이 높았다. 탄소원으로서 acetate를 단일로 사용한 처리구의 성장이 가장 낮은 것으로 나타났다. 즉, 하나의 탄소원이 아닌 두 개의 탄소원을 혼합하였을 때 생장이 가장 좋았으며 그다음으로는 glucose > acetate 순으로 확인되었다. 또한 혐기 체류시간을 거친 후 호기상태로 넘어간 처리구의 생장이 더 좋은 것을 알 수 있었다.

인 제거율은 생장이 가장 높았던 혐기 조건을 두고 탄소원을 glucose와 acetate를 혼합하여 준 처리구에서 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 5). 그 다음으로는 혐기 조건을 두고 탄소원을 glucose를 넣어준 처리구 그다음으로는 호기조건에서 탄소원으로 glucose와 acetate를 처리한 처리구 순으로 높은 것으로 나타났다. 즉, 인 제거율은 탄소원 종류보다 산소조건에서 더 민감한 것을 알 수 있었다. 가장 낮은 인 제거율을 보인 처리구는 혐기조건을 두고 탄소원으로 acetate를 첨가

한 처리구임을 확인할 수 있었다.

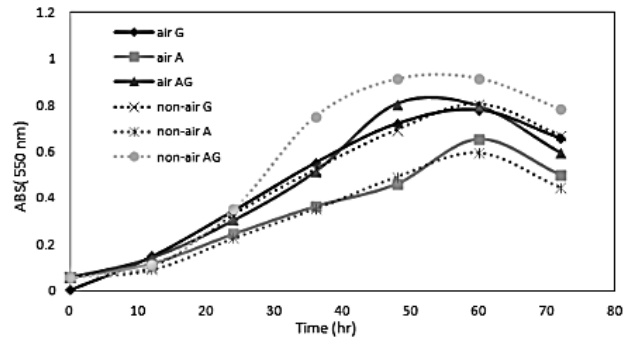


Fig. 4. Growth of *Bacillus* sp. 3434BRRJ as a function of time in relation to oxygen conditions and carbon sources. Air G means aerobic condition and the treatment of glucose 1% treatment, air A means aerobic condition and the treatment of acetate 1%, air AG means aerobic condition and treatment of acetate 0.5% and glucose 0.5%, non-air G means anaerobic/aerobic condition and the treatment of glucose 1%, non-Air A means anaerobic/aerobic condition and the treatment of acetate 1%, non-Air AG means anaerobic/aerobic condition and the treatment of acetate 0.5%+ glucose 0.5%

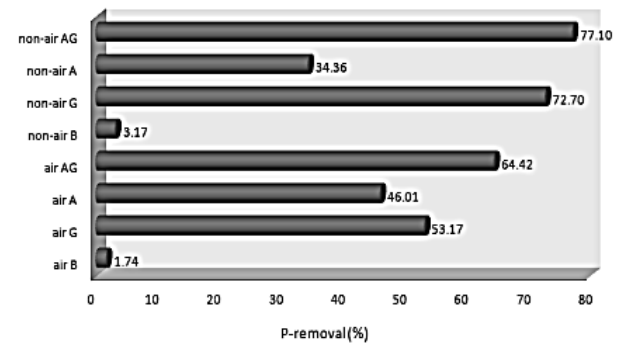


Fig. 5. Removal efficiencies of P by *Bacillus* sp. 3434BRRJ in relation to oxygen conditions and carbon sources. Air G means aerobic condition and the treatment of glucose 1% treatment, air A means aerobic condition and the treatment of acetate 1%, air AG means aerobic condition and treatment of acetate 0.5% and glucose 0.5%, air B is not inoculation of *Bacillus* sp. 3434BRRJ, non-air G means anaerobic/aerobic condition and the treatment of glucose 1%, non-Air A means anaerobic/aerobic condition and the treatment of acetate 1%, non-Air AG means anaerobic/aerobic condition and the treatment of acetate 0.5% + glucose 0.5%, non-Air B is not inoculation of *Bacillus* sp. 3434BRRJ

고찰

폐수로부터 분리한 미생물은 총 3가지 종이였으며 균 동정 결과 A1은 *Stenotrophomonas maltophilia* strain CUPS 3, A2은 *Rhodococcus erythropolis* strain Sco-C0,

A3은 *Bacillus* sp. 3434BRRJ이었다. *Stenotrophomonas maltophilia*는 그람 음성간균으로 사람이나 동물의 검체, 물, 우유 등과 같은 곳에 폭넓게 분포하며, 주로 면역기능이 저하된 환자에게 감염을 일으키며, 외상이나 수술 후 상처 감염내막염(약물중독자), 균혈증, 수막염, 요로 감염이나 호흡기 감염에서 흔히 분리되고 있다. 또한 난분해성 물질인 폭약 TNT(2, 4, 6-Trinitrotoluent)와 다환 방향족 탄화수소 (Polyaromatic hydrocarbons : PAH)의 분해 미생물로 알려져 있다. *Rhodococcus*균은 *Streptomyces*속 및 *Corynebacterium*속과 상당히 높은 상동성을 가지고 있고, 그람 양성균이며, G+C 함량이 높다(Yagafarova and Skvortsova, 1996). 또한 *Rhodococcus erythropolis*는 니트릴 분해효소 생산균으로 알려져 있다.

분리된 3가지 종의 미생물의 인 제거율을 확인한 결과 120 시간 안의 모든 성장이 이루어 졌으며 *Stenotrophomonas maltophilia* strain CUPS 3의 성장이 가장 빨랐다. *Rhodococcus erythropolis* strain Sco-C0의 경우는 성장이 가장 더딘 것으로 나타났으며 인 농도의 변화도 가장 작은 것으로 나타났다. *Bacillus* sp. 3434BRRJ의 경우 *Stenotrophomonas maltophilia* strain CUPS 3보다 성장이 늦어졌지만 성장이 시작된 이후로 거의 100%에 가까운 인 제거율이 확인 되었다. 하·폐수 내 총 인(T-P : total phosphate)의 평균농도는 5-20 mg/L로 20 mg/L의 인 농도를 거의 100% 제거할 수 있는 *Bacillus* sp. 3434BRRJ이 인 제거 미생물에 가장 적합하다고 사료된다. 배지 내 인 제거율은 *Bacillus* sp. 3434BRRJ > *Stenotrophomonas maltophilia* strain CUPS 3 > *Rhodococcus erythropolis* strain Sco-C0 순으로 높은 것으로 나타났다. 3 종의 미생물 모두 최대 성장을 이루었지만 인 제거율에는 차이가 있었다. 이는 균마다 인을 축적하는 능력이 다르기 때문인 것으로 생각된다.

*Bacillus* sp. 3434BRRJ의 온도 변화에 따른 인 제거 실험에서는 15°C에서는 균의 성장이 이루어 지지 않았으며 25°C와 30°C에서는 균의 성장이 이루어졌다. 그 중 30 °C에서 가장 좋은 성장이 이루어지는 것을 볼 수 있었다. 균의 성장과 더불어 배지 내 인 농도의 변화는 30 °C에서 거의 모든 인이 제거되는 것을 확인 할 수 있었다. 즉 균의 성장이 높을수록 인 제거의 효율도 증가하는 것으로 나타났다. 일반적으로 인 섭취는 20-30°C에서 이루어지며 생물학적 인 제거를 하는 PAOs는 20-37°C의 비교적 높은 온도에서 인 제거율이 증가한다는 연구결과와 부합하는 것을 확인 할 수 있었다 (McClinotck 등, 1993; Converti 등, 1995).

초기 인 농도에 따른 인 제거율 실험결과에서는 20 mg/L와 30 mg/L에서의 균의 성장의 차이는 크지 않았으나 40 mg/L에서 다소 높은 성장을 확인할 수 있었다. 배지 내 인 농도의 변화를 확인한 결과 20 mg/L의 배지에서의 인 제거율은 약 99.9%로 거의 모든 인이 제거됨을 확인할 수 있었고, 30 mg/L의 배지에서는 약 75.42%, 40 mg/L의 배지에서는 약 59.57%의 인 제거율이 확인되었다. 일반적으로 미생물의 건조중량당 인의 함량은 2-5% 이나 생물학적 인 제거가

제대로 일어날 경우 세포 내 인의 함량은 정상적인 경우의 2-5배에 이른다고 한다(Levin and Sharpiro, 1965). 본 실험결과에서 인 농도의 증가는 미생물 성장을 증가시키는 역할을 하였지만 인 제거율은 크게 달라지지 않았는데 이는 이미 실험에 사용한 미생물의 이용할 수 있는 인의 농도에 한계에 도달했기 때문인 것으로 생각된다.

초기 산소조건 및 탄소원 종류에 따른 인 제거의 변화를 확인하기 위해 glucose, acetate 및 glucose와 acetate를 혼합한 배지 각 각을 12시간의 혐기조건을 둔 처리구와 혐기조건을 두지 않은 처리구로 나누어 성장 및 인 농도를 측정할 결과 혐기조건을 두고 탄소원으로 acetate와 glucose를 혼합한 처리구에서 초반 성장이 더뎠으나 후반에는 가장 높은 성장이 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 그 다음으로는 호기 조건에서 탄소원으로 acetate와 glucose를 혼합한 처리구의 성장이 높았다. 탄소원으로서 acetate를 단일로 사용한 처리구의 성장이 가장 낮은 것으로 나타났다. 즉, 하나의 탄소원이 아닌 두 개의 탄소원을 혼합하였을 때 성장이 가장 좋았으며 그다음으로는 glucose > acetate 순으로 확인되었다. 또한 혐기 체류시간을 거친 후 호기상태로 넘어간 처리구의 성장이 더 좋은 것을 알 수 있었다. 인 제거율은 성장이 가장 높았던 혐기 조건을 두고 탄소원을 glucose와 acetate를 혼합하여 준 처리구에서 가장 높은 것으로 나타났다. 이는 인 제거 기작에서 혐기과정을 거친 PAOs는 호기조건을 거치면서 세포내에 저장된 유기물(PHB)이 분해하여 얻어진 에너지로 혐기조건에서 내놓은 인의 양보다 과잉의 인을 섭취하여 Poly-P granules형태로 세포 내에 축적(Luxury uptake)한다는 연구결과와 부합한 것으로 사료된다. 그 다음으로는 혐기 조건을 두고 탄소원을 glucose를 넣어준 처리구, 그다음으로는 호기조건에서 탄소원으로 glucose와 acetate를 처리한 처리구 순으로 높은 것으로 나타났다. 즉, 인 제거율은 탄소원 종류보다 산소조건에서 더 민감한 것을 알 수 있었다. 또한 균의 성장이 높을수록 인 제거율이 높게 나타나는 것으로 사료된다. 탄소원의 경우 인 섭취에 미치는 영향은 미미하나 인 방출 시에는 영향이 크다. Abu-Ghararah와 Randall은 acetate가 glucose 보다 인 방출에 효과적이라고 하였는데, acetate는 전처리과정 없이도 세포에 의해 빠르게 이용되는 반면에, glucose는 발효과정을 거쳐야 세포에 이용 가능하기 때문이라고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 혐기조건을 두고 탄소원으로 acetate를 첨가한 처리구의 인 제거율이 가장 낮은 것으로 나타났다. 이는 acetate의 경우 혐기 조건에서 인 방출에는 효과적일 수 있으나 본 실험에 이용된 *Bacillus* sp. 3434BRRJ이 탄소원으로서 acetate를 첨가하였을 때 성장이 좋지 못했기 때문인 것으로 사료된다. 즉, *Bacillus* sp. 3434BRRJ은 acetate보다 glucose를 탄소원으로서 더 선호하는 것으로 생각된다. 배지 내 인 제거는 *Bacillus* sp. 3434BRRJ이 67.95%로 가장 높게 나타났으며 그 다음으로는 *Stenotrophomonas maltophilia* strain CUPS 3이 44.89%, 성장이 거의 없었던 *Rhodococcus erythropolis* strain Sco-C0이 2.83%로 나타났다.

**요 약**

본 연구에서는 산업폐수로부터 분리한 3가지 종의 인 제거율을 확인하였다. 3 가지 분리된 균을 동정한 결과 A1균은 *Stenotrophomonas maltophilia* strain CUPS 3, A2균은 *Rhodococcus erythropolis* strain Sco-C01, A3균은 *Bacillus* sp. 3434BRRJ이었다. 3 가지 분리된 균의 인 제거 및 경유 분해를 확인한 결과 인 제거율은 *Bacillus* sp. 3434BRRJ > *Stenotrophomonas maltophilia* strain CUPS균 > *Rhodococcus erythropolis* strain Sco-C01균 순으로 높은 것으로 나타났으며 제거율은 약 99%, 50%, 20%로 확인되었다. 따라서 이 후 실험은 인 제거율이 가장 높았던 *Bacillus* sp. 3434BRRJ를 가지고 실험하였다. *Bacillus* sp. 3434BRRJ의 인 제거를 확인하기 위하여 온도별(15, 25 그리고 30 °C), 인 농도별(20, 30 그리고 40 mg/L) 그리고 산소조건(호기, 혐기/ 호기조건) 및 탄소원을 달리하여 실험하였다. 그 결과 *Bacillus* sp. 3434BRRJ는 30°C에서 인 제거가 가장 좋았으며 20 mg/L의 인은 약 99% 처리하였고 혐기조건을 거치고 탄소원으로 acetate와 glucose를 혼합하여 처리하였을 때 가장 효율이 좋은 것으로 나타났다.

본 연구에서는 *Bacillus* sp. 3434BRRJ의 인 제거를 확인하였다. 균의 생장이 높을수록 인의 제거율은 높았으며, 미생물을 이용한 환경오염물질의 제거에 있어서 가장 중요한 것은 미생물의 활성을 높이는 환경조건을 제공하는 것이다.

**감사의 글**

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2011-0026234)

**참고문헌**

Bouw. E.M., Boekestein. A., Deinema. M., 1989. Quantitative X-ray microanalysis of volutin granules in acinetobacter., 27(2), p. 199, North-Holland, Netherlands.

Converti, A., Rovatti, C. and Borgh, D., 1995. Biological Removal of Phosphorus from Wastewaters by Alternating Aerobic and Anaerobic Conditions, Water Res., 27, 791-798

Daigger G. T., Randoll C. W., Watrip G. D., Romm E. D. and Morales L. M., 1987. Factors Affecting Biological Phosphorus Removal for the VIP Process, IAWPRC Special Conference, Sep.

Grady, C.P., Daigger, G. T., Lim, H. C., 1999. Biological wastewater treatment,, 11(12), p.1049-1057, 2nd Ed. Marcel Dekker. New York.

Levin, G., Sharpiro, J., 1965. Metabolic uptake of

phosphorus by wastewater organics. J. Wat. Pollut. Control Fed., 37(6), 800

McClintock, S. A., Randall, C. W., Pattarkine, V. M., 1993. Effect of Temperature and Mean Cell Residence Time on Biological Nutrient Removal Processes, Water Environ. Res., 65(5), 110-118

Shehab. O., R. Deininger., F. Porta., T. Wojewski., 1996. Optimizing phosphorus removal at the Ann Arbor Wastewater Treatment Plant, Water Science and Technology, 34, 493-499

Sedlak, R. I.,1991. Phosphorus and Nitrogen Removal from Municipal Wastewater, 45(18), 5925-5933, 2nd Ed., The Soap and Detergent Association, Lewis Publishers, New York, USA.

Stephens, H. L., Stensel, H. D., 1998. Effect of Operating Conditions on Biological Phosphorous Removal, Water Envir. Res., 70, 360-369

Tracy, K. D. and Flammino, A., 1985. Kinetics of Biological Phosphorous Removal, Presented at the 58th Annual Waste Pollution Control Federation Conference, Kansas City, Missouri, 12, 102

Wang Qian, Yongqi Shao, Vu Thi Thu Huong, Woo-Jun Park, Jong-Moon Park, Che-Ok Jeon, Shao Yongqi, Huong Vu Thi Thu, 2008. Fine-Scale Population Structure of Accumulibacter phosphatis in Enhanced Biological Phosphorus Removal Sludge, Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, 18(7), 1290-1297

Yagafarova, G. G. and Skvortsova, I. N., 1996. A new oil-oxidizing strain of Rhodococcus erythropolis, Appl. Biochem. Microbiol., 32, 207-209

Yeo, S.M., Lee, Y.O., 2005. Changes of the Bacterial Community Structure depending on C:N:P ratio for Biological Phosphae Removal, Korean Society of Environmental Engineers 929-934.

Young. K., Morse. G. K., Scrimshaw. M. D., Kinniburgh. J. H., MacLeod. C. L., Lester. J.N., 1999. The relation between phosphorus and eutrophication in the Thames catchment, Science of The Total Environment, 228(2-3), 157-183

Zajic, J. E., H. Guignard, and D. F. Gerson., 1997. Properties and Biodegradation of a Bioemulsifier from Corynebacterium hydrocarboclastus, Biotechnol. Bioeng., 9, 1303-1320

Zhang, Y and R. M. Miller., 1994. Effect of Pseudomonas Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane. Appl. Environ Microbiol., 60, 2101-2106.