

## 신균주 *Rhodococcus* sp. YSPW01과 YSPW02를 이용한 수중 내 고농도 Perchlorate 환원 특성 연구

### Reduction of Highly Concentrated Perchlorate in Aqueous Medium by Newly Isolated Bacterial Strains *Rhodococcus* sp. YSPW01 and YSPW02

이상훈 · 황재훈 · Kabra Akhil · 이대성\* · 전병훈<sup>†</sup>

Sang-Hoon Lee · Jae-Hoon Hwang · Kabra Akhil · Dae Sung Lee\* · Byong-Hun Jeon<sup>†</sup>

연세대학교 환경공학과 · \*동아대학교 에너지·자원공학과

Department of Environmental Engineering, Yonsei University

\*Department of Energy & Mineral Resources Engineering, Dong-A University

(2013년 7월 26일 접수, 2014년 5월 1일 수정, 2014년 5월 9일 채택)

**Abstract :** The feasibility of perchlorate reducing-bacteria isolated from the sludge of an anaerobic digester was determined using ammonium perchlorate in aqueous medium. Growth kinetics of the two perchlorate reducing bacteria including *Rhodococcus* sp. YSPW01 and YSPW02 were investigated using acetate as the electron donor in batch experiment. The growth of YSPW01 and YSPW02 reached a steady-state at 26 and 9 h, respectively. The initial perchlorate concentration was completely reduced within 8 and 7 h by YSPW01 and YSPW02, respectively. The reduction rates were 2.1 and 15 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> for YSPW01, and 3.2 and 15.5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> for YSPW02, at 1:1 and 5:1 ratios of acetate:perchlorate (w:w), respectively. In this study, the bacteria *Rhodococcus* sp. YSPW01 and YSPW02 demonstrated a potential for the perchlorate reduction, which could be further investigated for development of an efficient strategy to treat the perchlorate contaminated waters.

**Key Words :** Ammonium Perchlorate, Perchlorate Reducing Bacteria, Newly Isolated Bacteria, *Rhodococcus* sp., Batch Experiment

**요약 :** 수중 내 함유된 고농도 perchlorate의 환원가능성을 perchlorate 환원 미생물인 신균주 *Rhodococcus* sp. YSPW01과 YSPW02로 검토하였다. Perchlorate 환원 미생물은 혐기소화조 슬러지에서 분리 배양하였으며, perchlorate 환원능을 검토하기 위해 전자공여체인 acetate를 사용하였다. YSPW01과 YSPW02는 perchlorate 82 mg L<sup>-1</sup>와 acetate 550 mg L<sup>-1</sup>에서 회분식 실험을 수행하였을 때, 반응 26시간과 9시간 후 각각 정상상태에 도달하였다. 이 때 perchlorate 환원은 8, 7시간 이내에 초기농도 82 mg L<sup>-1</sup>에서 검출한계 이하(10 µg L<sup>-1</sup>)까지 제거되었다. 반응조 내에 acetate:perchlorate (w:w)비를 1:1에서 5:1로 증가한 결과, perchlorate의 제거 속도는 YSPW01과 YSPW02 모두 2.1, 3.2 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>에서 15, 15.5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>로 약 4.5배 증가하였고, 최종 perchlorate는 검출한계 이하까지 제거되었다. 본 연구결과, *Rhodococcus* sp. YSPW01 및 YSPW02는 고농도 perchlorate 제거에 적합하며, 신균주를 고농도 perchlorate 제거를 위한 생물학적 처리공정에 응용가능 할 것으로 판단된다.

**주제어 :** 암모늄 퍼클로레이트, 퍼클로레이트 환원 미생물, 신규 미생물, *Rhodococcus* sp., 회분식 실험

## 1. 서론

미사일, 로켓 및 탄약 추진제에 사용되는 ammonium perchlorate (AP)는 폐기되는 군사 무기 추진제에서 주로 발생되며,<sup>1,2)</sup> 양이온에 대해 친화력이 낮아 토양, 퇴적물, 암석 등에 흡착되지 않고 지표수 및 지하수 등에 광범위하게 분포한다.<sup>3)</sup> 지표수 및 지하수에 존재하는 perchlorate는 인체 유입 시 갑상선호르몬의 분비를 저해하여 신체기능저하를 유발하므로, 음용수 내 perchlorate 처리 기술이 전세계적으로 이슈화되고 있다.<sup>1,4,5)</sup> 이에 US EPA (US Environmental Protection Agency)는 오염물질 후보 등재목록(Contaminant Candidate List, CCL)에 perchlorate를 포함시키고, 음용수 내 perchlorate 기준농도를 24.5 µg L<sup>-1</sup> 이하로 권고하고 있다.<sup>6)</sup> 국내에서는 사격이 빈번한 국내 대형사격장과 탄약 제조, 저장 및 폐기 등의 군사 산업시설에서 고농도 perchlorate가 검출되면서 perchlorate로 인한 환경문제가 심각하게 대

두되었으며,<sup>7)</sup> 이로 인해 환경부와 국립환경과학원은 2010년 7월에 perchlorate에 대한 먹는 물 감시항목 권고기준치를 EPA보다 낮은 15 µg L<sup>-1</sup> 이하로 지정하였다.<sup>8)</sup>

수계에 존재하는 perchlorate 처리기술은 이온교환법, 흡착법, 분리막 및 미생물처리법 등의 물리화학적 공법과 생물학적 공법으로 보고된다.<sup>9,10)</sup> 물리화학적 공법은 perchlorate의 낮은 친화력으로 흡착, 응집처리가 어려우며, 부산물이 발생하여 후처리 공정운영 등의 단점을 지니고 있다.<sup>11,12)</sup> 생물학적 처리공법은 perchlorate 환원 미생물(Perchlorate Reducing Bacteria: PRB)을 이용하여 perchlorate를 인체에 무해한 물질(Cl<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O)로 완전 분해가 가능하고 운영비용이 적게 들어 물리화학적 공법의 단점 보완뿐만 아니라, 다량의 폐수를 처리가 가능하다.<sup>12)</sup> 생물학적 공법은 저농도 perchlorate (0.01-18 mg-CIO<sub>4</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>) 제거를 중점적으로 진행되어 왔으나,<sup>13-15)</sup> 최근 비군사화 시설의 토양 및 지하수에서 고농도의 perchlorate (>100 mg L<sup>-1</sup>)가 보고되고 있다.<sup>10,11)</sup> 고

<sup>†</sup> Corresponding author E-mail: bhjeon@yonsei.ac.kr Tel: 033-760-2446 Fax: 033-760-2571

농도 perchlorate를 제거하지 않을 시 환경적으로 안정한 perchlorate는 오랜 시간 남아있기 때문에<sup>16)</sup> 많은 연구자들이 고농도 조건에서 연구를 진행하고 있으며, Nor 등<sup>17)</sup>과 Waller 등<sup>18)</sup>은 고농도 perchlorate 합성 폐수(100 mg-ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> 이상) 내에 존재하는 sodium perchlorate 제거 연구를 수행하였다. 그러나 ammonium perchlorate가 함유된 고농도 실패수 뿐만 아니라 비균산화 과정에서 발생하는 폐수 처리에 대한 연구결과가 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 국내 폐수처리장에서 분리배양된 perchlorate 환원미생물인 *Rhodococcus* sp. YSPW01과 YSPW02를 이용하여 비균산화 과정에서 발생하는 고농도 perchlorate가 함유된 실패수의 생물학적 처리 가능성을 검토하였다. 또한 다양한 acetate:perchlorate 비를 적용하여 perchlorate제거를 위한 최적 전자공여체 농도에 대한 연구를 수행하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. Perchlorate reducing bacteria (PRB) 분리 배양 및 식별

Perchlorate 내성 균주를 분리배양하기 위해 W시 하수종말 처리장 소화조에서 채취한 슬러지를 Dechlorosoma (ATCC #2361 Broth) 배양액과 1:1 비율로 혼합하여 혐기성 반응기 (1.5 L)에서 1개월간 농화배양 하였으며, 3일마다 ammonium perchlorate (AP) 용액을 주입하여 반응액의 농도가 100 mg-ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>를 유지하도록 하였다. 반응조는 혐기성 조건을 유지하기 위해 99.99%의 고순도 질소 가스로 치환하였으며,

농화배양 된 미생물의 순종 분리를 위해 petri dish에 5회에 걸쳐 분리한 뒤 25 ± 1 °C로 유지된 incubator에서 3일간 배양하였다. 실험에 사용된 Dechlorosoma 배양액의 성분은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Chemical composition of Dechlorosoma medium

Reagent	Concentration (g L <sup>-1</sup> )
Sodium acetate	2.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	1.55
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.85
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.50
Trace mineral	10 (mL L <sup>-1</sup> )
Trace mineral (g L <sup>-1</sup> )	
EDTA	0.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3.0
NaCl	1.0
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.1
CaCl <sub>2</sub> (anhydrous)	0.1
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.01
AlK (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (anhydrous)	0.01
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.01
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> (anhydrous)	0.001
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.01
NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.02

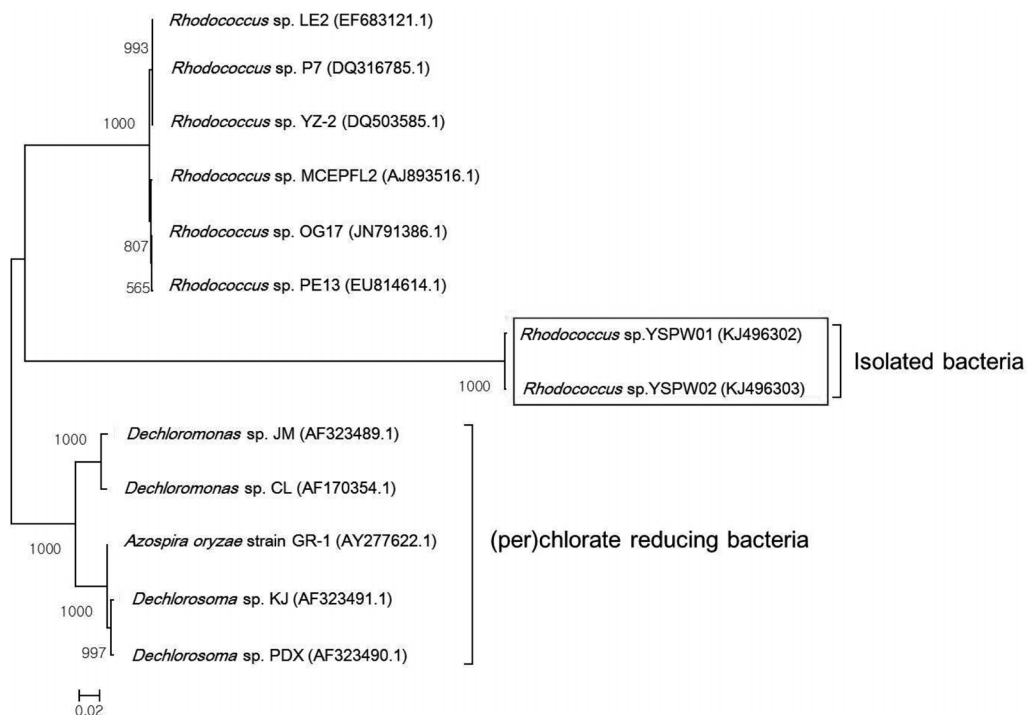


Fig. 1. Phylogenetic tree showing the relationship between 16S rRNA sequence of isolates *Rhodococcus* sp. YSPW01 and YSPW02, with most similar sequences retrieved from the NCBI nucleotide database.

농화배양에서 분리된 PRB는 전자 주사 현미경을 이용하여 형태학적 분류를 분석하였다(Fig. 1). 샘플은 PBS (Phosphate Buffer Saline)로 washing하여 3% glutaraldehyde (in PBS)를 넣은 후 교반기에서 2시간 고정시켰다. 고정시킨 미생물은 PBS로 세척 후, 30, 70, 90, 100%의 ethanol에 순차적으로 탈수시켰다. 탈수시킨 시료는 임계점건조기(critical point dryer, CPD)로 건조하여 Pt-coating 후 촬영을 진행하였다.

미생물 동정은 Solgent purification bead를 이용하여 미생물로부터 DNA를 추출 후, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (정방향)인 27F와, 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3' (역방향)인 1492 R primer를 사용하여 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 진행하였다. 분석은 GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)을 사용하였고, 샘플을 denaturation (95°C, 15분)시킨 후, denaturation (95°C, 20초), annealing (50°C, 40초), elongation (72°C, 1분 30초) 단계를 30회 반복하고, 마지막으로 elongation (72°C, 5분) 단계를 진행하였다. PCR 산물은 Solgent PCR purification kit을 사용하여 PCR product purify 한 뒤 1% agarose gel로 전기영동 분리하였으며, 분리된 gDNA로 염기서열 분석하였다.

### 2.2. 16S rRNA 유전자의 염기서열에 대한 계통분석

분리한 균주와 기존에 보고된 균주와 염기서열의 유사도를 확인하기 위하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank 및 일본국립유전학연구소(National Institute of Genetics)의 DDBJ (DNA Data Bank of

Japan)에서 보고된 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search를 이용하였다.<sup>19)</sup> 염기서열은 Clustal X 1.81 multiple alignment로 정렬 후, MEGA5 program (ver 5.05; http://www.megasoftware.net/)을 이용하여 미생물 계통수를 제작하였다(Fig. 2, Table 2). 염기 서열 간 유전적 거리는 Jukes & Cantor distance model로 사용하였으며,<sup>20)</sup> Neighbor-Joining method로 bootstrap 분석 시 1000회의 resampling을 적용하여 tree topology 계통수를 작성하였다.<sup>21,22)</sup>

### 2.3. 회분식 실험

Perchlorate의 생물학적 처리를 하기 위해 혐기성 반응조에서 분리 배양된 *Rhodococcus* sp. YSPW01 (KJ496302)과 YSPW02 (KJ496303)를 이용하여 회분식 실험을 진행하였다. 무산소 조건을 유지하기 위해 93% N<sub>2</sub>/7% H<sub>2</sub> 혼합 가스로 인해 산소 농도가 0.29 ppm (4 × 10<sup>-7</sup> atm O<sub>2</sub>)으로 유지되는 anaerobic chamber (Coy Laboratory Products Inc., USA)를 사용하였다. 실험에 사용된 배양액 및 실험기구는 121 ± 5°C에서 15분간 고압멸균 후 사용하였으며, 배양된 *Rhodococcus* sp. YSPW01과 YSPW02 90 mL 및 희석된 AP용액 10 mL을 혼합하여 실험을 준비하였다. 연구에 사용된 폐수는 (주)한화에서 공급받은 20% AP 용액으로, Dechlorosoma 배양액으로 희석하여 1,000 mg L<sup>-1</sup>로 제조 후 사용하였다. Perchlorate 환원을 위한 전자공여체로 sodium acetate (99% Sigma Aldrich, USA)를 사용하였다. Perchlorate 성장 및 제거에 대한 실험은 pH 7.0에서 수행하였으며, acetate와 perchlorate의 초기 농도는 각각 550, 80 mg L<sup>-1</sup>에서 수행하였다. Perchlorate가 완전히 제거된 것을 확인 후 perchlorate를 재주입하여 반응조 내 perchlorate 농도를 95 mg L<sup>-1</sup>로 하였다. Acetate와 perchlorate 비에 따른 회분식 실험은 각각의 질량비를 5:1, 1:1로 유지하여 perchlorate 최적 제거 속도 및 전자공여체에 대한 perchlorate의 환원영향에 대한 실험을 진행하였다. 모든 실험의 온도와 교반속도는 shaking incubator (Seyoung Sci., Korea)를 이용하여 25°C, 150 rpm으로 유지하였다.

### 2.4. 동역학 계산

동역학상수는 회분식 실험을 이용하여 전자수용체인 per-

Table 2. The accession numbers and similarity percentage between the amplified sequences and the closest relative sequences of four known bacterial species

Isolated species (Accession number)	Closest relative species	Accession number	Similarity (%)
<i>Rhodococcus</i> sp. YSPW01 (KJ496302)	<i>Rhodococcus</i> sp. P7	DQ 316785	99%
	<i>Rhodococcus zapfii</i> DSM 44108	NR 41775.1	99%
<i>Rhodococcus</i> sp. YSPW02 (KJ496303)	<i>Rhodococcus rhodnii</i> BJO	NR 37029.1	97%
	<i>Rhodococcus phenolicus</i> G2P	NR 42950.1	96%

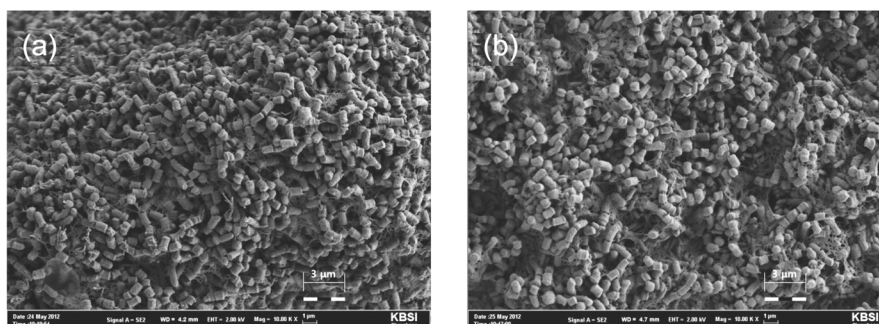


Fig. 2. Transmission electron microscope (TEM) images showing the morphology of the perchlorate reducing bacteria (a) *Rhodococcus* sp. YSPW01 and (b) YSPW02.

chlorate가 제한인자로 사용하는 경우에 대하여 평가를 하였다. 비증식속도( $\mu$ )는 식 (1)을 이용하여 확인하였으며, 식 1에서  $A_0$ ,  $t$ ,  $A$ 는 각각 바이오매스 초기농도( $\text{mg L}^{-1}$ ), 반응시간(h), 반응시간 동안 성장한 바이오매스 농도( $\text{mg L}^{-1}$ )로 나타내었다.<sup>23)</sup>

$$\ln A = \ln A_0 + \mu t \quad (1)$$

동역학상수는 회분식 실험을 이용하여 전자수용체인 perchlorate가 제한인자로 사용하는 경우에 대하여 평가를 하였으며, 동역학 평가에 사용된 상수는 Monod 식 (2)에 대입하여 계산을 하였다.<sup>24)</sup>

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad (2)$$

식 (2)에서  $\mu$ ,  $\mu_{\max}$ ,  $[S]$ ,  $K_s$ 는 각각 비증식속도 ( $\text{h}^{-1}$ ), 최대 비증식속도( $\text{h}^{-1}$ ), 기질 농도( $\text{mg-ClO}_4^- \text{L}^{-1}$ ), 반포화 상수( $\text{mg-ClO}_4^- \text{L}^{-1}$ )를 나타내었다.

### 2.5. 분석 방법

Perchlorate와 acetate 분석은 0.2  $\mu\text{m}$  membrane syringe filter (Pall Life Sciences, USA)를 사용하여 biomass와 Dionex onguard II H filter (Thermo scientific, USA)로 양이온 제거 후, SUPP-5 컬럼이 장착된 Ion chromatography (Metrohm

Ltd., Switzerland)로 측정하였다. Ion chromatography의 용액은 6 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 과 2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 20% acetone으로 제조되었으며, 온도는 25°C, 압력은 10 MPa, 샘플량은 1.000  $\mu\text{L}$  조건으로 운전하였다. pH와 ORP (Oxidation-Reduction Potential)는 pH/ORP meter (Cyberscan pH 310, Eutech Instrument, Singapore)로 측정하였다. Optical density는 600 nm 파장에서 운전되는 spectrophotometer (C-Mac Co. Ltd., Korea)로 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 미생물 성장 및 동역학 상수

Perchlorate 제거 시간에 따른 *Rhodococcus* sp. YSPW01과 YSPW02의 매스변화와 성장속도를 Fig. 3(a), 3(b)에 나타내었다. 실험은 pH 7.0에서 수행하였으며, acetate와 perchlorate의 초기 농도는 각각 550, 80  $\text{mg L}^{-1}$ 에서 수행하였다. Perchlorate 주입 26시간과 9시간 후 YSPW01과 YSPW02의 OD 값은 0.16에서 0.25, 0.11에서 0.25로 각각 정상상태에 이르렀으며, YSPW01보다 YSPW02의 성장이 약 15시간 빠르게 진행되었다(Fig 3(a)). 일반적으로 perchlorate의 chlorate 성분은 chlorite으로 환원되는 과정에서 독성물질을 발생하여 미생물 성장을 저해한다.<sup>25,26)</sup> 그러나 *Rhodococcus* sp. YSPW01과 YSPW02는 고농도 perchlorate 주입 이후에도 뚜렷한 성장을 보여 고농도 perchlorate에 내성이 있다고

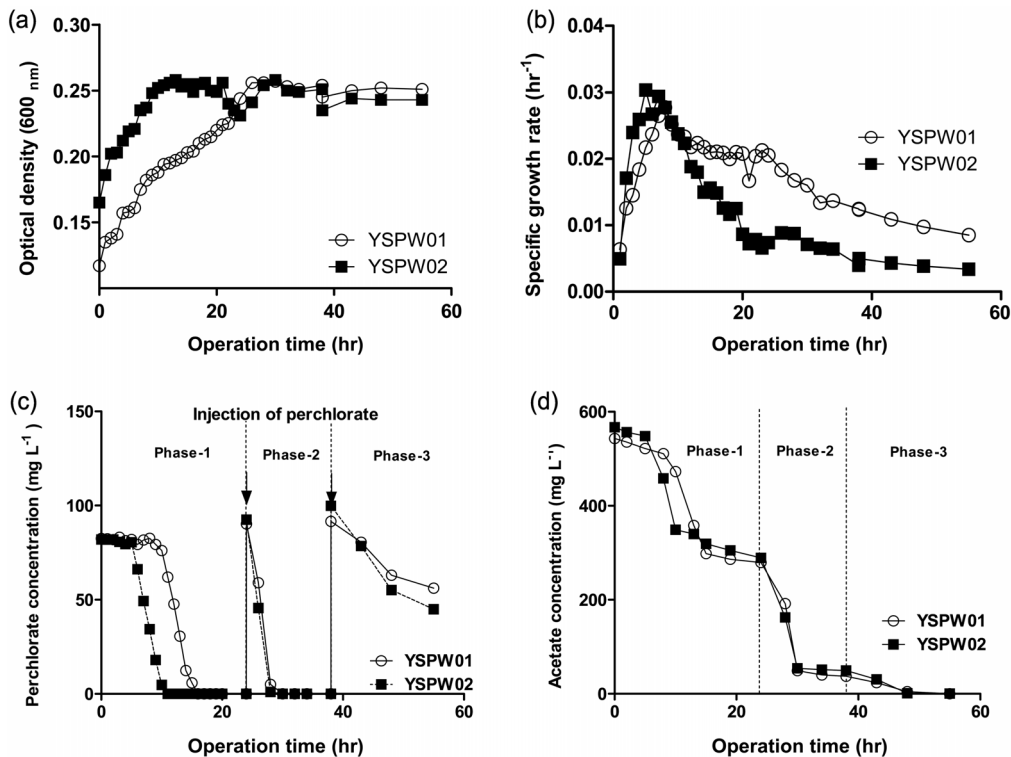


Fig. 3. (a) Growth kinetics (b) specific growth rates, (c) perchlorate reduction and (d) acetate removal, for isolates *Rhodococcus* sp. YSPW01 and YSPW02.

**Table 3.** Experimental kinetics and stoichiometric parameters of various perchlorate reducing bacteria using acetate

Bacteria species	Perchlorate degradation (mg L <sup>-1</sup> )	Perchlorate reduction time (h)	Perchlorate reduction rate (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$\mu_{max}$ (mg-CIO <sub>4</sub> <sup>-</sup> mg <sup>-1</sup> -DCW* h <sup>-1</sup> )	K <sub>s</sub> (mg-CIO <sub>4</sub> <sup>-</sup> L <sup>-1</sup> )	Reference
YSPW01 ( <i>Rhodococcus</i> )	82,5	8	10,31	0,024±0,001	1,15±0,68	This study
YSPW02 ( <i>Rhodococcus</i> )	80,5	7	13,42	0,029±0,001	1,38±0,49	This study
INS ( <i>Dechloromonas</i> )	100	60	1,67	0,067±0,007	18,0±5,2	18)
SN1A ( <i>Azospirillum</i> )	100	34	2,94	0,069±0,009	2,2±2,8	18)
Lactate enrichment culture ( <i>Dechloromonas</i> )	250	30	8,33	-	-	29)

\* DCW: Dry cell weight

판단되며,<sup>27)</sup> YSPW02가 YSPW01에 비해 2배 빠른 성장이 진행된 것은 YSPW01보다 perchlorate 대해 높은 내성이 가질 뿐만 아니라 perchlorate에 환원능이 뛰어난 것으로 사료된다. YSPW01과 YSPW02의 최적 비증식 속도( $\mu$ )는 PRB의 정체 구간이 끝나는 8시간과 5시간에서 0.027 h<sup>-1</sup>, 0.030 h<sup>-1</sup>를 보였으며(Fig. 3(b)), acetate와 perchlorate가 제거됨에 따라 PRB의 비증식 속도는 감소하였다(Fig. 3(a)).

YSPW01 및 YSPW02의 반포화상수, 최대 비증식속도와 제거속도는 1.15 ± 0.68와 1.38 ± 0.49 mg-CIO<sub>4</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>, 0.024 ± 0.001 h<sup>-1</sup>와 0.029 ± 0.001 h<sup>-1</sup>, 10.31과 13.42 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>로 각각 나타났다(Table 3). 미생물을 이용한 perchlorate에 대한 반응 상수들은 다른 perchlorate 환원 미생물 중에 대하여 보고된 값과 함께 Table 3에 나타내었다. 실험 결과 다른 미생물에 낮은 K<sub>s</sub> 값은 다른 perchlorate 환원 미생물에 비해 높은 친화력에 대한 가능성을 지니고 있다고 사료되어 고농도 perchlorate 제거에 효율적이라 사료된다.<sup>18)</sup>

### 3.2. Perchlorate reducing bacteria (PRB)를 이용한 perchlorate 처리

YSPW01과 YSPW02을 이용한 acetate와 perchlorate 농도 변화 회분 실험 결과를 Fig. 3(c), 3(d)에 나타내었다. PRB 거동 및 perchlorate 환원에 pH와 전자공여체 농도는 주요한 인자이기 때문에 실험은 pH 7.0에서 수행하였다. 일반적으로 pH 7.0-9.0에서 일정량의 전자공여체가 존재할 때 perchlorate

의 약 95%, pH 5.0-6.0에서는 약 25%의 perchlorate 환원이 보고된다.<sup>17)</sup>

Acetate 농도(500 mg L<sup>-1</sup>)에 따른 perchlorate 제거는 YSPW01과 YSPW02에서 8시간과 5시간 지체 구간 후, 초기 농도의 99%이상 perchlorate (10 µg L<sup>-1</sup>)를 제거 하였으며 (phase-1), perchlorate를 1차 재주입 후 지체 구간이 없이 6 시간 이내에 초기농도의 99%이상 perchlorate를 제거하였다 (phase-2). 그러나 2차 perchlorate를 재주입 시 YSPW01 및 YSPW02에서 perchlorate는 초기농도의 약 38.5, 54.9%가 제거되었다(phase-3). YSPW01과 YSPW02의 acetate 소모량은 1, 2구간에서 평균 210 mg L<sup>-1</sup>로 각각 나타났으며, 3구간에서는 잔존하는 acetate 농도(40 mg L<sup>-1</sup>)가 perchlorate (100 mg L<sup>-1</sup>)를 환원하기에 충분하지 않아 perchlorate 제거율이 1, 2 구간보다 낮은 원인으로 사료된다. 일반적으로 전자공여체는 PRB가 perchlorate를 환원하는데 중요한 매개변수이며 미생물 반응 속도와도 상관관계가 있다.<sup>17)</sup> YSPW01 및 YSPW02의 1, 2구간별 perchlorate 제거 속도는 각각 10.3, 13.4과 15, 15.4 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> 였으며, 3구간에서의 perchlorate 제거 속도는 2.1, 3.2 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>로 각각 나타났다(Fig. 3(c), 3(d), Table 4).

### 3.3. Perchlorate 제거에 따른 acetate의 소모비

Perchlorate 제거에 대한 최적 acetate 농도를 고찰하기 위해 A:P (acetate:perchlorate) 질량비(w/w)를 1에서 5로 증가

**Table 4.** Kinetic parameters of perchlorate and acetate removal by *Rhodococcus* sp. YSPW01 and YSPW02.

Phase	Bacterial strain	Perchlorate				Acetate	
		Initial concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Final concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Reduction efficiency (%)	Reduction rate (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Degradation concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Reduction efficiency (%)
1	YSPW01	82,5	N/D*	99	10,3	212	41
	YSPW02	80,5	N/D	99	13,4	199	36
2	YSPW01	90,2	N/D	99	15	237	80
	YSPW02	92,5	N/D	99	15,4	251	77
3	YSPW01	91,6	35,5	38,5	2,1	37,1	99
	YSPW02	99,9	44,9	54,9	3,2	49,7	99

\* N/D: Not detected

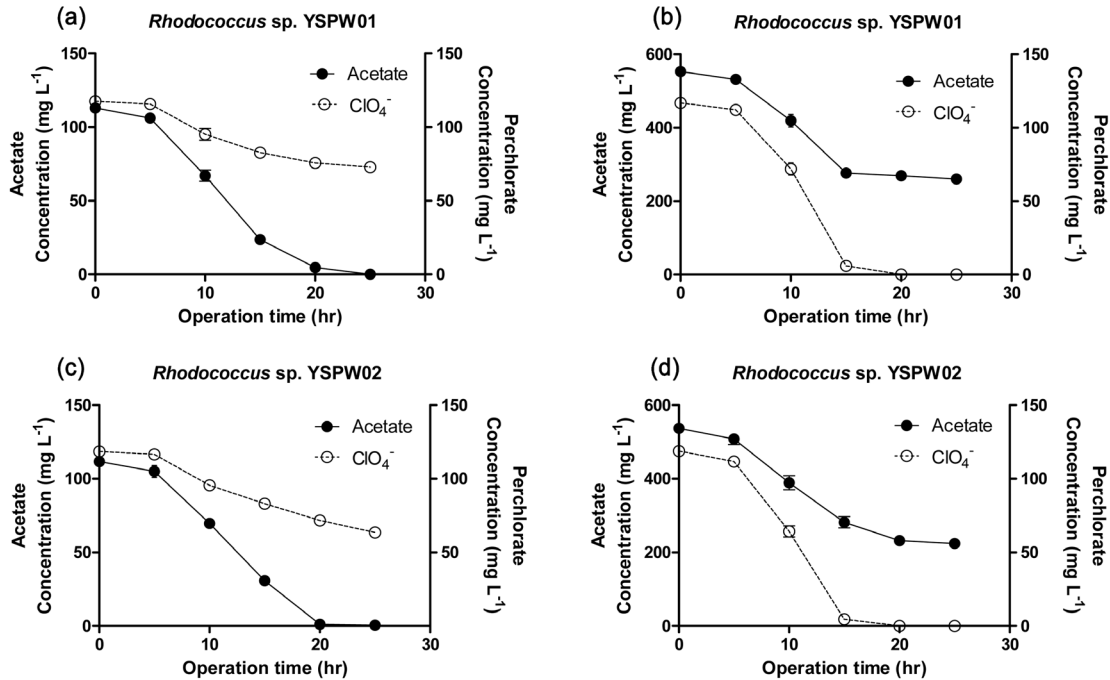


Fig. 4. Effect of acetate and perchlorate ratio (w/w) on perchlorate degradation by *Rhodococcus* sp. YSPW01 and YSPW02. ((a), (c): acetate / perchlorate = 1; (b), (d): acetate / perchlorate = 5).

하여 perchlorate 농도 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 기존 보고에 의하면 PRB는 전자공여체로 acetate를 사용시 perchlorate 1.0 mol 당 acetate 1.0 mol을 사용하여 perchlorate를 chloride로 환원한다.<sup>28)</sup>

A:P 비 1:1에서는 주입된 acetate가 전부 소모되었지만 perchlorate는 초기농도의 약 50%만 제거된 반면, acetate 농도를 증가하여 A:P 비를 5:1로 증가하였을 경우 perchlorate는 99%이상 제거되었다. 이때 소모된 acetate:perchlorate의 최적 질량비는 YSPW01의 경우 2.85 g-acetate g-perchlorate<sup>-1</sup>, YSPW02의 경우 2.56 g-acetate g-perchlorate<sup>-1</sup>로 각각 나타났다. Shrouf and Parkin (2006)은 A:P 비가 4.6로 증가되었을 때 PRB (*Dechloromonas* sp.)의 perchlorate 환원 속도가 약 4배 증가됨을 보고하였다.<sup>29)</sup> *Rhodococcus* sp. YSPW01과 YSPW02 경우, acetate가 농도가 100에서 500 mg L<sup>-1</sup>로 증가됨에 따라 perchlorate제거 속도는 2.3에서 11.2 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, 2.5에서 11.3 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>로 약 4.5~4.8배가 증가되었으며 *Dechloromonas* sp. INS보다 약 11-16% 높은 제거 속도를 보였다. 이는 국내에서 분리배양 된 *Rhodococcus* sp. YSPW01과 YSPW02는 *Dechloromonas* sp. INS보다 perchlorate 제거 속도가 높아 perchlorate 환원에 대한 가능성이 높다고 판단된다.

#### 4. 결론

*Rhodococcus* sp. YSPW01과 YSPW02를 이용하여 수중 내 perchlorate 제거 결과 주입된 초기농도 82 mg L<sup>-1</sup> perchlorate의 99% 이상 제거되었다. Perchlorate를 추가 주입 시 제거

속도는 15, 15.4 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>반응에 대한 지체기가 없이 바로 제거가 진행되었으며, perchlorate 제거 속도는 15, 15.4 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>로 13, 30%로 각각 증가하였다. A:P의 비를 1:1에서 5:1로 증가시킬 때, YSPW01과 YSPW02의 perchlorate 제거 속도는 약 4.5~4.8배가 증가되어, *Dechloromonas* sp. INS보다 약 11-16% 높은 제거 속도를 보여 주었다. 본 연구 결과, 국내에서 분리배양 된 *Rhodococcus* sp. YSPW01과 YSPW02는 perchlorate를 주입 시 안정적인 성장을 보였으며, perchlorate에 대한 제거 속도가 높아 고농도 perchlorate 환원에 적합하다고 판단된다. 본 연구결과 신균주를 생물학적 처리 공정에 응용한다면 수계에 함유된 고농도 perchlorate 제거를 위한 기술 보완이 가능할 것으로 판단된다.

#### 사사

본 연구는 환경부 “차세대 에코이노베이션사업(글로벌담 환경기술개발사업, GT-SWS-11-01-006-0)”과 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받은 “중견연구자 지원사업(핵심연구, 2013069183)”의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

KSEE

#### Reference

1. U. S. EPA, “Perchlorate treatment technology update: Federal facilities forum issue paper,” Washington, DC, USA,

- EPA 542-R-05-015(2005).
2. Choi, J. S., Lee, J. C., Choi, S. H. and Kim, S. H., "Recovery of Ammonium Perchlorate from Waste Solid Rocket Motors," *J. Kor. Soc. Waste Manage.*, **28**(6), 640~647(2011).
  3. Urbansky, E. T. and Schock, M. R. "Issues in managing the risks associated with perchlorate in drinking water," *J. Environ. Manage.*, **56**, 79~95(1999).
  4. U. S. EPA, "Interim drinking water health advisory for perchlorate," Washington, DC, USA, EPA 822-R-08-025(2008).
  5. Shin, K. H., Son, A., Cha, D. K. and Kim, K. W., "Review on Risks of Perchlorate and Treatment Technologies," *J. Kor. Soc. Environ. Eng.*, **29**(9), 1060~1068(2007).
  6. U. S. EPA, "Drinking water contaminant candidate list," Washington, DC, USA, EPA EPA/600/F-98/002(1998).
  7. Choi, J. S., Um, C. Y., Lee, J. H., An, B. B., Sung, B. W., Oh, B. G. and Ko, K. B., "Characteristics of Perchlorate Concentrations near Military Facility Areas," Korean Water Congress 2012, KINTEX, pp. 518~519(2012).
  8. Ministry of Environment, Korea, "Drinking water quality criteria mandatory monitoring contaminants," (2010).
  9. Logan, B. E., "A review of chlorate and perchlorate respiring microorganisms," *Bioremediat. J.*, **2**(2), 69~79(1998).
  10. The Interstate Technology & Regulatory Council, "Perchlorate: Overview of issues, status, and remedial options," The Interstate Technology & Regulatory Council Perchlorate Team(2005).
  11. Urbansky, E. T., "Perchlorate as an environmental contaminant," *Environ. Sci. Pollut. R.*, **9**, 187~192(2002).
  12. Malcolm Pirnie, Inc., "National cost implications of a potential perchlorate regulation," U.S. EPA, American Water Works Association Report(2010).
  13. Logan, B. E., Zhang, H., Mulvaney, P., Milner, M. G., Head, I. M. and Unz, R. F., "Kinetics of Perchlorate- and Chlorate-Respiring Bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(6), 2499~2506(2004).
  14. Srinivasan, R. and Sorial, G. A., "Treatment of perchlorate in drinking water: A critical review," *Sep. Purif. Technol.*, **69**(1), 7~21(2009).
  15. Choi, Y. C., Li, X., Raskin, L. and Morgenroth, E., "Chemisorption of oxygen onto activated carbon can enhance the stability of biological perchlorate reduction in fixed bed bio-film reactors," *Water Res.*, **42**, 3425~3434(2008).
  16. U. S. EPA, "Status Report on Innovative In Situ Remediation Technologies Available to Treat Perchlorate-Contaminated Groundwater," Washington, DC, USA, EPA(2006).
  17. Nor, S. J., Lee, S. H., Cho, K. S., Cha, D. K., Lee, K. I. and Ryu, H. W., "Microbial treatment of high-strength perchlorate wastewater," *Bioresour. Technol.*, **102**, 835~841(2011).
  18. Waller, A. S., Cox, E. E. and Edwards, E. A., "Perchlorate-reducing microorganisms isolated from contaminated sites," *Environ. Microbiol.*, **6**(5), 517~527(2004).
  19. Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T. Jr, Saxman, P. R., Stredwick, J. M., Garrity, G. M., Li, B., Olsen, G. J., Pramanik, S., Schmidt, T. M. and Tiedje, J. M., "The RDP (Ribosomal Database project) continues," *Nucleic. Acids. Res.*, **28**, 173~174(2000).
  20. Jukes, T. H. and Cantor, C. R., "Evolution of protein molecules. In Mammalian protein metabolism," (Munro, H. N. eds.) 21~132. New York, Academic Press, USA(1969).
  21. Felsenstein, J., "Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap," *Evolution*, **39**, 783~791(1985).
  22. Saitou, N. and Nei M., "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees," *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406~425(1987).
  23. Logan, B. E., Wu, J. and Unz, R. F., "Biological perchlorate reduction in high-salinity solutions," *Water Res.*, **35**(12), 3034~3038(2001).
  24. Monod, J., "The growth of bacterial cultures," *Annu. Rev. Microbiol.*, **3**, 371~394(1949).
  25. Coates, J. D., Bruce, R. A. and Haddock J. D., "Anoxic bioremediation of hydrocarbons," *Nature*, **396**, 730(1998).
  26. Logan, B. E., "Assessing the outlook for perchlorate remediation," *Environ. Sci. Technol.*, **35**(23), 482A~487A(2001).
  27. Gu, M. B., Gil, G. C. and Kim, J. H., "A two-stage mini-bioreactor system for continuous toxicity monitoring," *Bioresour. Technol.*, **14**, 355~361(1999).
  28. Coates, J. and Jackson, W. A., Principles of Perchlorate Treatment. in: In Situ Bioremediation of Perchlorate in Groundwater," (Eds.) H. F. Stroo, C. H. Ward, Springer New York, pp. 29~53(2009).
  29. Shrout, J. D. and Parkin, G. F., "Influence of electron donor, oxygen, and redox potential on bacterial perchlorate degradation," *Water Res.*, **40**(6), 1191~1199(2006).