

Evaluation of Field Applicability of Phosphorus Removal Capability and Growth of *Bacillus sp.* 3434 BRRJ According to Environmental Factors

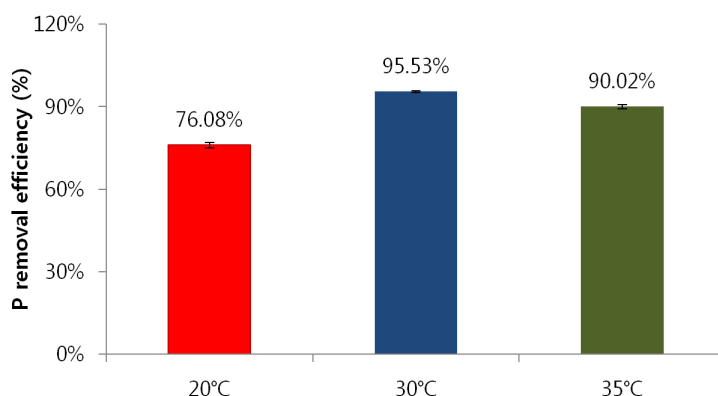
Jin Yoo, Deok-Hyun Kim, and Keun-Yook Chung*

Department of Environmental & Biological Chemistry, Chungbuk National University, Cheong-ju 28644, Republic of Korea

(Received: February 5 2016, Revised: February 15 2016, Accepted: February 20 2016)

With the population growth and industrialization, the characteristics of discharged waste water and sewage have become more diverse. The removal of phosphorus (P) in the wastewater is essential for the prevention of eutrophication in the river and stream. This study was performed in order to estimate the field application of the *Bacillus sp.* 3434 BRRJ. *Bacillus sp.* 3434 BRRJ was cultured in the raw wastewater and synthetic medium at the 5 L reactor. The best optimum conditions for P removal by *Bacillus sp.* 3434BRRJ in the synthetic medium at the 5 L reactor were as follows: temperature, 30°C; P concentration, 20 mg/L; carbon sources, glucose + acetate (1:1); oxygen concentration, alternatively anaerobic and aerobic conditions. P removal efficiency under the optimum condition was 89.4%. In case of wastewater, P removal efficiency was 95.5% under controlled at 30°C. Through this study we confirmed that P removal by *Bacillus sp.* 3434BRRJ in case of wastewater was as effective as the synthetic medium. It is considered that *Bacillus sp.* 3434 BRRJ can be applied to the treatment of wastewater in order to biologically remove P from the wastewater on a large scale.

Key words: 5 L reactor, *Bacillus sp.* 3434 BRRJ, Bacterial growth, Phosphorus removal, Environmental factors



Removal efficiencies of P by *Bacillus sp.* 3434 BRRJ as affected by temperature in the raw wastewater.

*Corresponding author: Phone: +82432613383, Fax: +82432715921, E-mail: kychung@cbnu.ac.kr

§Acknowledgement: 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 (NRF-2010-0024124).

Introduction

산업화와 인구증가로 인해 배출되는 하수 및 폐수의 특성이 다양해짐에 따라 오염물질의 효율적인 처리에 많은 어려움이 있다. 처리가 덜 된 오염물질이 하천이나 호수를 비롯한 기타 수원에 유입됨에 따라 수질관리에 많은 문제점이 야기되고 있다 (Choi and Shon, 2004). 특히 질소와 인은 조류와 플랑크톤의 중요한 영양원으로서 호수, 저수지 및 기타의 폐쇄수역을 부영양화하는 주요 원인 물질이다 (Chung et al., 1999; Grady et al., 2011). 수계로의 이러한 영양염류의 유입을 차단하는 것이 가장 근원적인 해결책이므로 하·폐수 및 축산 폐수에서 질소와 인의 처리가 더욱 강조되고 있다 (Seo and Lee, 2005; Zhu et al., 2008; Kim et al., 2008; Mulkerrins et al., 2004). 이에 따라 국내의 공장폐수 및 방류수 수질 기준 중 T-N, T-P 기준은 2007년에 각각 60 mg/L, 8 mg/L 에서 2013년부터 20 mg/L, 2 mg/L 로 엄격해졌다. 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 효과적이다 (Correll, 1998). 부영양화의 제한인자로 인이 제 1의 제거 대상 물질이 됨에 따라 하수처리장마다 인을 제거하는 기술 확보를 위해 여러 가지 방안을 모색하고 있다. 인을 제거하는 공법은 크게 물리화학적 공법 (physico-chemical phosphorus removal, PCPR)과 생물학적 공법 (enhanced biological phosphorus removal, EBPR)의 2종류로 분류할 수 있다 (Comeau et al., 1986; Drizo et al., 1999). 최근에는 환경오염문제가 심각한 이슈로 떠오름에 따라 2차 오염을 거의 발생시키지 않는 생물학적 방법을 이용한 인 제거에 대한 연구는 물리화학적 공법에 대한 연구에 비해 활발히 진행되고 있다. 생물학적 인 제거에 대한 연구는 1976년 생물학적인 질소제거를 연구하는 중에 인 제거와 질산성 질소와의 상관관계를 주목한 Barbard에 의하여 필요성이 대두되었다. 그 후 저급지방산 (short chain fatty acid) 특히 아세테이트를 이용하여 미생물을 배양한 경우에 의한 인 과잉 축적을 확인하였다 (Chung et al., 1999). 생물학적 인 제거 공정은 인 제거 박테리아 (Phosphorous accumulating organisms, PAOs)을 이용하여 인을 제거하는 공정이다 (Comeau et al., 1986; Levin and Shapiro, 1965; Mino et al., 1998; Oehmen et al., 2007). 인 제거 박테리아 (Phosphorous accumulating organisms, PAOs)는 세포 내에 다중 인산염의 형태로 다량의 인을 저장할 수 있기 때문에 인 제거가 가능하다고 알려져 있다 (Sedlak, 1991). 일반적으로 알려진 인 제거 과정은 먼저 활성화된 PAOs가 혐기조건에서 유입수에 함유된 유기물 (BOD, COD)을 세포 내에 PHB (Poly- β -hydroxybutyrate)형태로 저장하고 이에 필요한 에너지는

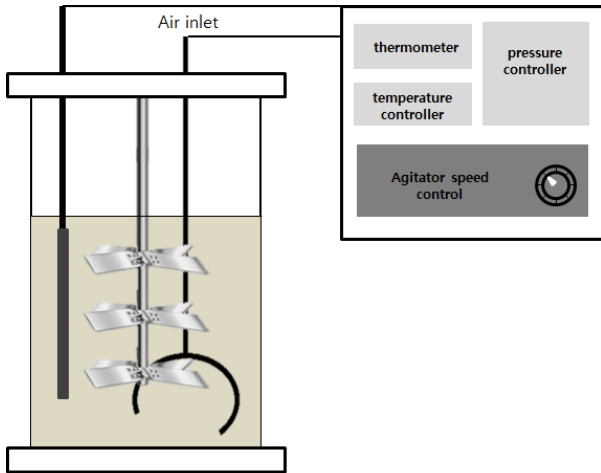
polyphosphate를 가수분해하여 이용한다. 혐기과정을 거친 미생물은 호기조건을 거치면서 세포내에 저장된 유기물 (PHB)이 분해하여 얻어진 에너지로 혐기조건에서 내놓은 인의 양보다 과잉의 인을 섭취하여 Poly-P granules형태로 세포내에 축적 (Luxury uptake)한다고 알려져 있다 (Levin and Shapiro, 1965; Sedlak, 1991). 이것에 기초하여 생물학적인 제거 기작은 미생물을 혐기/호기 조건에 교대 노출시켜 인의 과잉섭취 (Luxury Uptake)가 일어나도록 한 후 인을 함유한 슬러지를 폐기함으로써 인을 제거한다. 생물학적인 제거 공정으로는 질소 제거 공정인 A/O 타입의 공정에 완전 혐기 단계를 추가하는 A2/O 공법부터 University of Cape Town (UCT), VIP, Bardenpho 공정에 이르기까지 여러 공법들이 운영되고 있으며, 이러한 공법의 선정은 실제 폐수 적용 시 효율을 높이고 운전비용을 최소화하는 방향의 연구들로 발전되어 왔다 (Morgenroth et al., 1997; Sedlak, 1991; Tetreault et al., 1986). 현재 생물학적인 제거 연구는 공정의 개발 및 최적화에서 인 제거 미생물 자체에 대한 연구로 바뀌어가고 있다 (Kuba et al., 1996; Seo and Lee, 2005). 이러한 변화는 공정의 최적화를 이루기 위해서는 공정 내 미생물의 대사과정을 이해하는 것이 중요한 변수라는 것을 의미한다. 따라서 순수 미생물의 인제거에 미치는 환경인자에 대한 연구가 필요하며, 실험실 규모의 실험뿐만 아니라 현장 적용성을 평가할 수 있는 규모의 실험이 필요한 것으로 사료된다. 본 연구는 인 제거 미생물로 알려진 *Bacillus sp.* 3434 BRRJ 의 현장 적용가능성 평가를 목적으로 5 L 반응 조 규모에서 온도, 탄소원, 산소 조건의 변화에 따른 인 제거능을 비교 평가 하였다. 또한, 실제 폐수에 단일 균주 배양 시 합성배지에서 실시한 실험결과와 비교 평가 하였다.

Materials and Methods

실험장치 및 배지 연구에 이용한 반응조는 실험실 규모와 현장 규모의 중간단계로 평가하기 위하여 Fig. 1과 같은 생물반응기를 주문 제작하여 환경조건에 따른 미생물 성장과 인 제거능 측정을 실시하였다. 반응조는 7 L의 용량까지 실험이 가능하고, 온도조절 및 산소공급의 조절, Shaking 기능과 Timer 기능을 가지고 있다. 미생물 배양에 사용된 합성배지는 Zafiri 배지를 변형하여 사용하였다 (Zafiri et al., 1999). Trace metal solution은 membrane filter (Pore size: 0.45 μ m, Diameter: 25 mm)로 여과한 여액을 사용하였다. 1 M Tris는 묽은 수산화나트륨 용액을 이용하여 pH를 7.0 \pm 0.2로 조절하여 사용하였다. 실험 배지는 Basic media solution과 Trace metal solution, Phosphate solution 그리고 1 M Tris buffer solution을 적절한 혼합비율로 섞어 사용하였다.

Table 1. Chemical and biological properties of municipal wastewater used in the study.

pH	BOD (mg/L)	COD (mg/L)	SS (mg/L)	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)
7.2 ± 0.172	146.6 ± 0.592	76.8 ± 0.180	143.9 ± 1.900	37.265 ± 0.407	3.991 ± 0.002

**Fig. 1. Schematic diagram of lab-scale 5L of biological reactors.**

균의 생육도 측정 및 인산의 정량 균의 생육은 배양액을 syringe로 채취하여 분광광도계 (SHIMADZU, UV mini-1240)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액중의 인 농도는 ascorbic acid에 의한 몰리브덴 청법을 변형하여 측정하였다. 배양액을 syringe로 채취하여 membrane filter (pore size : 0.20 μ m, Diameter : 25 mm)로 여과한 후 test tube에 증류수 7 mL, 여과액 1 mL를 넣고 잘 섞이도록 혼합한다. 발색시약으로 ascorbic acid-molybdate 시약 2 mL를 넣은 즉시 30초간 vortexing 한 후 30°C에서 30분간 발색시켰다. 물에 발색시약만 넣은 대조액을 이용하여 분광광도계로 880 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

산소조건 및 탄소원 변화에 따른 *Bacillus sp.* 3434BRRJ의 인 제거 인 농도가 20 mg/L인 실험배지가 들어 있는 250 mL 마개 달린 삼각플라스크에 1%(v/v)의 *Bacillus sp.* 3434BRRJ를 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 분광광도계 (SHIMADZU, UV mini-1240)를 이용하여 미생물의 성장 및 인 농도를 측정하였다. 실험배지의 탄소원으로는 glucose, acetate, glucose와 acetate 혼합으로 하여 각 각 실험배지에 1%(v/v)씩 첨가하였다.

온도 변화에 따른 *Bacillus sp.* 3434BRRJ의 인 제거 250 mL 삼각플라스크에 인 농도가 20 mg/L로 설정된 실험

배지 200mL을 넣고 1%(v/v)의 *Bacillus sp.* 3434BRRJ를 접종하여 배양온도를 15°C, 25°C, 30°C, 35°C로 변화시켜 150 rpm에서 진탕 배양하였으며, 일정한 시간 간격으로 시료를 채취하여 분광광도계 (SHIMADZU, UV mini-1240)를 이용하여 미생물의 성장 및 인 농도를 측정하였다.

도시 하수 성분 분석 및 도시 하수 내 *Bacillus sp.* 3434BRRJ의 인 제거 옥천에 위치한 모회사의 폐수처리장에서 채수한 폐수를 이용하여 *Bacillus sp.* 3434 BRRJ 인 제거능을 평가하였다. 성장에 중요한 환경적 요인으로 작용할 수 있는 폐수 내 양분 함량과 pH, BOD, COD 등은 수질 오염 공정 시험법을 기준으로 하여 분석을 실시하였다. 폐수의 성질은 Table 1과 같다. 균주를 옥천에서 공급받은 도시 하수에 접종하여 반응조 내에서 20, 30, 35°C를 유지하여 진탕배양 (120 rpm)하였으며, 탄소원 등 별도의 영양분 공급은 없었다. 혐기-호기 조건으로 산소를 공급하였으며, 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 UV spectrophotometer를 이용하여 미생물 성장을 측정하였다. P 농도는 반응조에서 시료를 채취하여 여과한 후 폐수 내에 남아있는 농도를 측정하였다.

통계분석 실험 결과의 통계분석은 SAS package (statistical analysis system, version 9.1, SAS Institute Inc.)를 이용하여 실시하였다. 실험결과의 유의한 차이를 조사하기 위해 ANOVA (analysis of variance) 분석과 Tukey's HSD(honest significant difference) test를 실시하였으며, 신뢰구간은 95% 수준으로 설정하였다. 모든 실험은 3반복 실시되었다.

Results and Discussion

산소조건 및 탄소원 종류에 따른 *Bacillus sp.* 3434BRRJ의 인 제거 혐기조건을 두고 acetate와 glucose를 혼합한 처리구에서 초반 생장이 더뎠으나 후반에는 가장 높은 성장이 이루어지는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 그 다음으로는 호기조건에서 탄소원으로 acetate와 glucose를 혼합한 처리구의 성장이 높았다. 탄소원으로서 acetate를 단일로 사용한 처리구의 성장이 가장 낮은 것으로 나타났다. 또한 혐기 체류시간을 거친 후 호기상태로 넘어간 처리구의 성장이 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. 3).

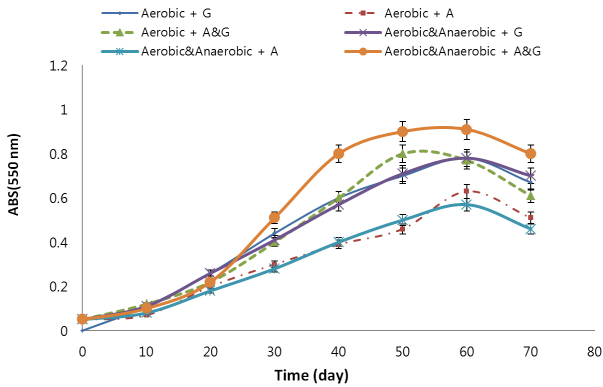


Fig. 2. Growth of *Bacillus sp.* 3434 BRRJ as a function of time as affected by oxygen conditions and carbon sources.

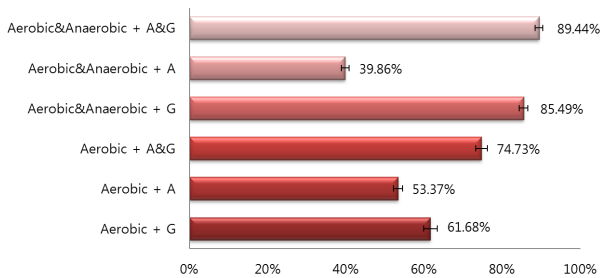


Fig. 3. Removal efficiencies of P by *Bacillus sp.* 3434 BRRJ as affected by oxygen conditions and carbon sources.

그 다음으로는 혐기 조건을 두고 탄소원을 glucose를 넣어 준 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 첨가한 처리구임을 확인할 수 있었다. 이는 보다 효과적인 P 제거를 위해서는 혐기와 호기상태를 교대로 병행하는 실험이 필요하다고 하는 (Yoo et al., 2011)의 연구 보고와 부합하였다. 또한, P 제거 기작에서 혐기과정을 거친 PAOs는 호기조건을 거치면서 세포내에 저장된 유기물이 분해하여 얻어진 에너지로 혐기조건에서 내놓은 인의 양보다 과잉의 인을 섭취하여 Poly-P granules 형태로 세포 내에 축적하게 된다고 하는 (Sedlak, 1991)의 연구결과와도 유사성을 보였다. 미생물 생장은 Fig. 2와 같이 30°C에서 가장 뛰어났으며, 20°C - 35°C 사이에서 온도가 낮을수록 인염 축적균이 흡수하는 인산염의 양이 증가한다는 (Panswad et al., 2003)의 보고와는 상이한 결과이다. 실험 결과를 통해 균주의 생장에 따라 P 제거가 진행되며, 생장이 활발히 진행될수록 P 제거율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 배지 실험 결과, *Bacillus sp.* 3434 BRRJ의 가장 효율적인 P 제거를 위한 환경조건은 혐기-호기조건에서 탄소원으로 acetate+glucose를 첨가할 때인 것을 확인할 수 있었으며, 이는 (Kim et al., 2012)의 연구 결과 중 실험실 규모에서 *Bacillus sp.* 3434

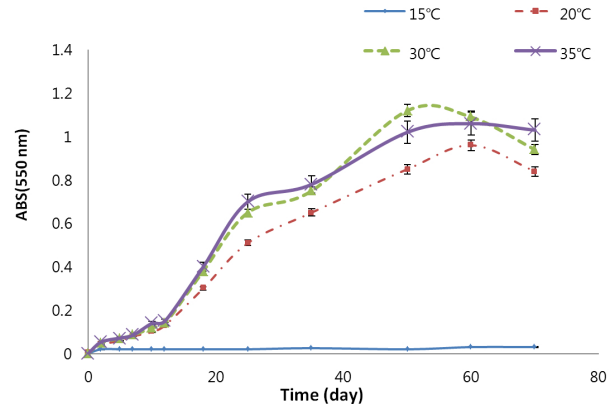


Fig. 4. Growth of *Bacillus sp.* 3434 BRRJ as a function of time as affected by temperature in the synthetic wastewater.

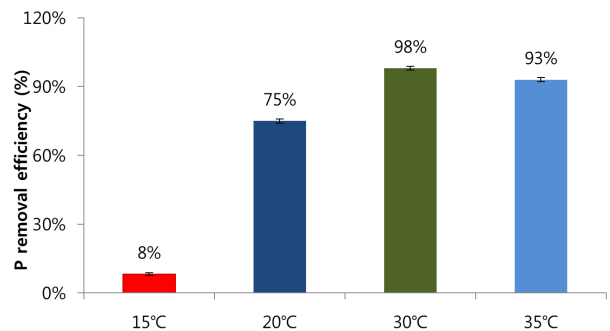


Fig. 5. Removal efficiencies of P by *Bacillus sp.* 3434 BRRJ as affected by temperature in the synthetic wastewater.

BRRJ의 생장 및 P 제거에 가장 효과적인 환경 조건에 관한 내용과 유사한 경향성을 보였다.

온도 변화에 따른 *Bacillus sp.* 3434BRRJ의 인 제거율
Bacillus sp. 3434BRRJ에 대한 온도 변화에 따른 인 제거율을 확인하기 위해 인 농도가 20 mg/L로 설정된 실험배지에 배양온도를 15°C, 20°C, 30°C, 35°C로 설정하여 반응조에서 일정한 시간 간격으로 시료를 채취하여 미생물의 생장 및 인 농도를 측정하고 그 결과 15°C에서는 균의 생장이 이루어지지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 4). 20°C, 30°C, 35°C에서는 모두 균의 생장이 이루어졌으며 그 중 30°C에서 가장 좋은 생장이 이루어지는 것을 볼 수 있었다. 균의 생장과 더불어 배지 내 인 농도의 변화는 30°C에서 거의 모든 인이 제거되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 즉 균의 생장이 높을수록 인 제거의 효율도 증가하는 것으로 나타났다. 일반적으로 인 섭취는 20~30°C에서 이루어지며 (Van Loosdrecht et al., 1997) 생물학적 인 제거를 하는 PAOs는 20°C~37°C의 비교적 높은 온도에서 인 제거율이 증가한다는 연구결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었다 (Converti et al., 1995).

도시 하수 내 *Bacillus sp.* 3434BRRJ의 생장 및 인 제거 효과
 온도조건 중 생장이 없었던 15°C 대신 35°C를

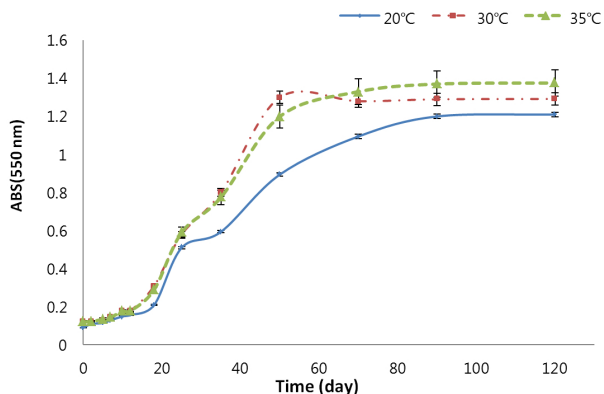


Fig. 6. Growth of *Bacillus sp.* 3434 BRRJ as a function of time as affected by temperature in the raw wastewater.

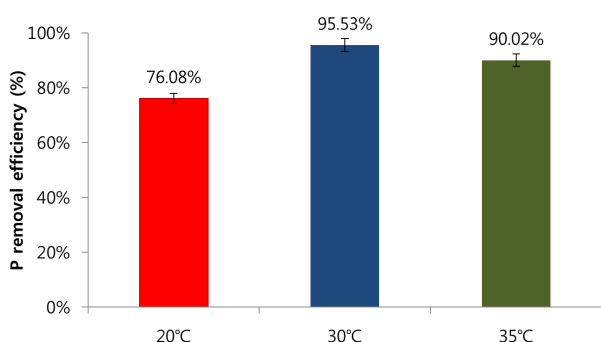


Fig. 7. Removal efficiencies of P by *Bacillus sp.* 3434 BRRJ as affected by temperature in the raw wastewater.

추가하였다. 실험 결과, 미생물의 생장은 30°C, 35°C, 20°C 순으로 생장이 멈추는 지점에 도달하였으며, 그 결과는 Fig. 6과 같다. P 제거율은 미생물 성장과 약간의 차이를 보였으나, 대체로 배지에 배양하였던 연구 결과들과 유사한 경향을 보였다 (Fig. 7). 생장이 끝났을 때의 O.D 값이 가장 높은 35°C에서 P 제거율 또한 가장 높을 것이라고 생각하였으나, 실제로는 30°C에서 P 제거율이 가장 높았다. 폐수 내 인 제거율은 20°C에서 76.08%, 30°C에서 95.53%, 35°C에서 90.02%이며, 30°C에서 폐수 내 인 제거율이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. 순수미생물을 실제 폐수에 직접적으로 접종시켜서 그 효과를 확인하는 연구는 미흡하였으므로 본 연구를 통해서 인 제거 미생물의 직접적인 적용을 통해 산업폐수 내의 인 제거가 실제로 가능하다는 사실을 확인함으로써 실제 폐수처리 공정에서 단일 미생물을 사용한 인 제거를 통해 생물학적 인 제거 방법에 소요되는 비용을 절약하는 데 기여할 것으로 기대된다.

References

Choi, M.-S. and I.-S. Shon. 2004. Removal of organics and nitrogen in wastewater using anoxic-RBC process. *J. Korean Soc. Environ. Eng.* 26(5):514-521.

Chung, J.-B., M.-K. Kim, B.-J. Kim, and W.-C. Park. 1999. Nitrogen, phosphorus, and organic carbon discharges in the imgo small agricultural watershed catchment. *J. Korean Environ. Agri.* 18(1):70-76.

Comeau, Y., K.J. Hall, R.E.W. Hancock, and W.K. Oldham. 1986. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Res.* 20(12):1511-1521.

Converti, A., M. Rovatti, and M.D. Borghi. 1995. Biological removal of phosphorus from wastewaters by alternating aerobic and anaerobic conditions. *Water Res.* 29(1):263-269.

Correll, D.L. 1998. The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: a review. *J. Environ. Qual.* 27(2):261-266.

Drizo, A., C.A. Frost, J. Grace, and K.A. Smith. 1999. Physico-chemical screening of phosphate-removing substrates for use in constructed wetland systems. *Water Res.* 33(17): 3595-3602.

Grady Jr., C.P.L., G.T. Daigger, N.G. Love, and C.D.M. Filipe. 2011. *Biological Wastewater Treatment* CRC press.

Kim, D.-S., N.-S. Jung, and Y.-S. Park. 2008. Characteristics of nitrogen and phosphorus removal in sbr and sbbr with different ammonium loading rates. *Korean J. Chem. Eng.* 25(4):793-800.

Kim, H.-J., S.-E. Lee, H.-K. Hong, D.-H. Kim, J.-W. An, J.-S. Choi, J.-H. Nam, M.-S. Lee, S.-H. Woo, and K.-Y. Chung. 2012. Phosphorus removal characteristics by bacteria isolated from industrial wastewater. *Korean J. Environ. Agr.* 31(2):185-191.

Kuba, T.M.C.M., M.C.M. Van Loosdrecht, and J.J. Heijnen. 1996. Phosphorus and nitrogen removal with minimal cod requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system. *Water Res.* 30(7): 1702-1710.

Levin, G.V. and J. Shapiro. 1965. Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms. *J. Water Pollut. Cont. Fed.* 37(6):800-821.

Mino, T., M.C.M. Van Loosdrecht, and J.J. Heijnen. 1998. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.* 32(11):3193-3207.

Morgenroth, E., T. Sherden, M.C.M. Van Loosdrecht, J.J. Heijnen, and P.A. Wilderer. 1997. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 31(12):3191-3194.

Mulkerrins, D., A.D.W. Dobson, and E. Colleran. 2004. Parameters affecting biological phosphate removal from wastewaters. *Environ. Int.* 30(2):249-259.

Oehmen, A., P.C. Lemos, G. Carvalho, Z. Yuan, J. Keller, L.L. Blackall, and M.A.M. Reis. 2007. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Res.* 41(11):2271-2300.

Panswad, T., A. Doungchai, and J. Anotai. 2003. Temperature

- effect on microbial community of enhanced biological phosphorus removal system. *Water Res.* 37(2):409-415.
- Sedlak, R.I. 1991. Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater: principles and practice CRC press.
- Seo, J.-H. and C.-S. Lee. 2005. A study on the biological nitrogen removal of the chemical fertilizer wastewater using jet loop reactor. *J. Environ. Sci. Int.* 14(2):157-165.
- Tetreault, M.J., A.H. Benedict, C. Kaempfer, and E.F. Barth. 1986. Biological phosphorus removal: a technology evaluation. *J. Water Pollut. Control Fed.* 58(8):823-837.
- Van Loosdrecht, M.C.M., C.M. Hooijmans, D. Brdjanovic, and J.J. Heijnen. 1997. Biological phosphate removal processes. *Appl. Microbio. Biotechnol.* 48(3):289-296.
- Yoo, R.-B., H.-J. Kim, S.-E. Lee, M.-S. Lee, S.-H. Woo, J.-S. Choi, K.-T. Baek, and K.-Y. Chung. 2011. Effects of environmental factors and heavy metals on the growth and phosphorus removal of *alcaligenes sp.* *Korean J. Environ. Agri.* 30(2):216-222.
- Zafiri, C., M. Kornaros, and G. Lyberatos. 1999. Kinetic modelling of biological phosphorus removal with a pure culture of *acinetobacter sp.* under aerobic, anaerobic and transient operating conditions. *Water Res.* 33(12):2769-2788.
- Zhu, G., Y. Peng, B. Li, J. Guo, Q. Yang, and S. Wang. 2008. Biological removal of nitrogen from wastewater. in reviews of environmental contamination and toxicology, 159-195: Springer.