

ORIGINAL ARTICLE

생활하수에서 분리된 *Bacillus licheniformis*의 인 제거에 대한 환경적인 인자의 영향

한석순 · 박상욱 · 김덕원 · 박지수¹⁾ · 오은지²⁾ · 유진³⁾ · 김덕현⁴⁾ · 정근욱*

충북대학교 환경생명화학학과, ¹⁾두산전자 Field Quality Control 김천 part, ²⁾한국환경정책평가연구원 자연환경연구실,
³⁾인천광역시보건환경연구원 생활환경과, ⁴⁾국립환경과학원 토양지하수과

Impact of Environmental Factors on Phosphorus Removal of *Bacillus licheniformis* Isolated from Domestic Sewage

Seok-Soon Han, Sang-Wook Park, Deok-Won Kim, Ji-Su Park¹⁾, Eun-Ji Oh²⁾, Jin Yoo³⁾,
Deok-Hyeon Kim⁴⁾, Keun-Yook Chung*

Department of Environmental and Biological Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

¹⁾Field Quality Control Gimcheon part, Doosan Corporation Electro-Materials, Gimcheon 39541, Korea

²⁾Water and Land Research Group/Division for Natural Environment, Korea Environment Institute, Sejong 30147,
Korea

³⁾Indoor Environment Division, Incheon Metropolitan City Institute of Public Health and Environment, Incheon 22320,
Korea

⁴⁾National Institute of Environmental Research, Incheon, 22689, Korea

Abstract

This study was initiated to isolate the microorganisms removing phosphorus (P) from domestic sewage and to investigate the effects of environmental factors on the growth and P removal of the isolated bacteria. Microorganisms isolated from the sewage were identified as *Chryseobacterium* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Bacillus licheniformis*. Among them, *Bacillus licheniformis* was selected as the P removal microorganism. The environmental factors considered in this study included initial phosphorus concentration, temperature, pH, and carbon source. At initial P concentrations of 10, 20, and 30 mg/L, the P removal efficiencies were 100.0%, 84.0%, and 16.5%, respectively. At 20°C, 30°C, and 40°C, the P removal efficiencies were 0%, 75.8%, and 60.6%, respectively. The removal efficiencies of phosphorus according to pH were 1.6%, 91.7%, and 51.1% at pH 5, pH 7, and pH 9, respectively. Using glucose, acetate, and glucose + acetate as carbon sources yielded P removal efficiencies of 80.9%, 33.6%, and 54.1%, respectively. Therefore, the results from the study demonstrated that the P removal efficiencies of *Bacillus licheniformis* were the highest when the initial P concentration, temperature, pH, and carbon source were 10 mg/L, 30°C, 7, and glucose, respectively.

Key words : *Bacillus licheniformis*, Isolation, Phosphorus removal efficiency, Environmental factor, optimal conditions

Received 15 December, 2020; Revised 11 January, 2021;

Accepted 26 January, 2021

*Corresponding author: Keun-Yook Chung, Department of Environmental and Biological Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea
Phone : +82-43-261-3383
E-mail : kychung@cbnu.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

질소와 인과 같은 영양염류를 많이 포함한 폐수가 호소나 연안 등 폐쇄성 수역에 과량으로 유입될 경우, 조류 등의 수생생물을 과다 증식시켜 부영양화가 발생된다. (Song et al., 2015). 그리고 인은 석유와 같은 고갈자원이어서, 인광석의 최대 산출국이며 소비국이기도 한 미국에서 자국의 인 매장량이 2030년도에는 고갈이 심각해질 것으로 예측하였다(Norbert and Pell, 1994). 2001년 유럽화학공업협회의 국제학술회의에서는 향후 지구 범위에서 인 자원의 고갈을 예상하였으며, 그 대안으로 하·폐수 중의 인을 회수한 후에 재이용하는 기술을 긍정적으로 평가하였다. 그 방법으로 생물 MPM (advanced massive purifying members phosphates recovery process) 인회수 공정, 인산칼슘, 지르코늄 흡착법 그리고 struvite 형성방법 등이 있다 (Won et al., 2000; Cho et al., 2003; Kim et al., 2006; Choi et al., 2009).

이중에 생물학적 방법에 의한 인의 제거는 안전하고 효율이 높기 때문에 생물학적 공정이 지속적으로 개발되어 왔으며 현재도 연구되고 있다 (de Graaff et al., 2020). 이 방법을 이용하는 하·폐수의 인 제거 공정 기술로는 A/O (US EPA, 1987; Richard, 1989), PhoStrip (Grady et al., 1999; Tchobanoglous et al., 2003), SBR (Sequencing Batch Reactor) 공정 (US EPA, 1987) 등이 있다.

생물학적인 제거(EBPR, Enhanced Biological Phosphorus Removal) 공정 내에는 다양한 미생물들이 서식하고 있다. 인 제거 미생물들은 대사과정에서 인을 영양물질로 흡수하거나 과잉 흡수(luxury uptake)하여 제거한다 (Levin and Sharpiro, 1965). 공정 내에 서식하는 미생물은 인 제거능이 있는 인축적세균군(PAOs, Phosphorous Accumulating Organisms) 뿐만 아니라 비 인축적 세균인 G-bacteria가 존재한다 (Cech and Hartman, 1993). 이들 G-bacteria는 PAOs와 경쟁함으로써 EBPR 공정의 효율을 저해시키기 때문에 공정의 효율 극대화는 인 축적 능력이 높은 PAOs만을 우점종으로 증식시킬 수 있느냐에 달려있다 (Yeo and Lee, 2006). 따라서 인 제거 공정의 효율을 증가시키기 위해 인 제거 능력을 가지고 있는 미생물의 종류를 밝혀내는 것이 중

요하다.

생물학적인 처리 공정에서 PAOs는 세포 내에 다중인산염의 형태로 다량의 인을 저장할 수 있기 때문에 인 제거가 가능하다(Sedlak, 1991). 생물학적 인 제거에 영향을 미치는 환경요인으로는 수온 (Stephens and Stensel, 1998), 용존산소 (Stephens and Stensel, 1998), pH (Tracy and Flammino, 1985; Converti et al., 1995), 영양염류 (Barnard et al., 1985; Randall et al., 1993), 하수 내 존재하는 중금속류 (Brdjinovic et al., 1996; Murthy et al., 1998), 유기물 (Yeo and Lee, 2006), 슬러지 체류시간 (Ko et al., 2000; Kargi et al., 2002) 등이 있다. 환경요인의 변화로 인한 PAOs의 활성도 변화는 인 제거 공정에서 인 제거 효율에 큰 영향을 미친다. 그러나 생물학적 폐수 처리공정이 실용화되고 있음에도 불구하고 어떤 환경 조건에서 PAOs의 인의 제거 효율이 가장 높은지 연구가 부족하기 때문에 생물학적인 제거 공정에서 최적의 환경 조건이 개발되지 못하고 있는 실정이다 (Mino et al., 1998).

본 연구는 폐수 속에서 PAOs를 분리 및 동정한 후 PAOs에 의한 인 제거와 이에 대한 환경인자의 영향을 알아보기 위하여 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 순수 분리 및 배양

대전에 위치한 모회사의 폐수처리장에서 생활 하수로 부터 세균을 분리하여 이용하였다. 미생물은 shaking incubator (Sanyo, MIR-153, 2004)에서 배양되었으며, 120 rpm으로 진탕배양하였다. 배지는 Zafiri배지 (Zafiri et al., 1999)를 변형하여 사용하였고, 조성은 Table 1과 같다. 실험배지에 채수한 하수 5 mL를 접종하여 30°C에서 배양 후 계대배양을 하였다. 계대 배양한 배지를 agar plate에 도말한 후에 30°C의 incubator에서 배양하여 colony를 확인하였으며, 단일 colony를 16S rRNA gene sequencing으로 동정하여 미생물의 염기서열을 얻었다. 미생물의 염기서열은 NCBI BLAST program을 이용하여 염기서열 간의 상동성을 비교하여 분석하였다. 상동성의 기준은 97% 이상으로 결정하였으며, 분석 결과 가장 상동성이 높은 미생물 종들을 선택하였다.

Table 1. Component of Zafiri medium

Component	Amount in distilled water (1L)
NH ₄ Cl	1.91 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.03 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CH ₃ COONa·H ₂ O	1.25 g
Yeast extract	0.02 g
Peptone	0.2 g
H ₃ BO ₃	0.3 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	2 g
Na ₂ Mo ₄ ·2H ₂ O	0.4 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0006 g
Glucose	0.8 g
1M Tris-HCl	10 ml

2.2. 미생물 성장 및 인 농도의 측정

미생물 성장과 인 농도의 측정은 UV spectrophotometer (Shimazu, UV mini-1240, 2005)를 사용하였다. 미생물 성장 측정은 일정한 시간 간격으로 배양액을 채취하여 550 nm에서 흡광도를 측정 비교하였다. 배양액중의 인 농도는 ascorbic acid을 이용한 몰리브덴 청법으로 측정하였다. Syringe를 이용하여 배양액을 채취하여, membrane filter (pore size : 0.2 µm, Diameter : 25 mm)를 이용하여 여과한 후에 여과액 1 mL에 ascorbic acid-molybdate 시약 2 mL와 증류수 7 mL를 첨가하여 30분동안 발색시킨 후 UV spectrometer로 880 nm에서 흡광도를 측정 비교하였다. 표준곡선의 작성은 KH₂PO₄를 이용하였으며, 분석 범위는 0 ~ 25 mg/L로 하였다.

2.3. PAOs 선별

연구에 사용될 미생물을 선별하기 위해 생활 하수로부터 분리된 *Chryseobacterium* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus licheniformis*를 30°C에서 인산의 농도가 20 mg/L인 배지에 배양하였다. 그리고 일정한 시간마다 미생물 성장 및 인산의 농도를 측정하여 상관관계를 분석하였다.

2.4. 환경인자 변화에 따른 *Bacillus licheniformis*의 성장 및 인 제거 효과

환경인자의 영향을 *Bacillus licheniformis*를 가지고

평가하였으며, 환경인자의 영향으로 초기 인 농도는 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 온도는 20°C, 30°C, 40°C, pH는 5, 7, 9, 탄소원은 glucose, acetate, glucose+acetate 등을 800 mg/L로 설정하여 배양하였다. 그리고 일정한 시간마다 미생물 성장 및 인산의 농도를 측정하여 환경인자 변화에 따른 성장 및 인 제거 효율을 통계 분석하였다.

2.5. 통계분석

통계분석은 SAS package (statistical analysis system, version 9.1, SAS institute Inc.)를 이용하였으며, 그 중에 유의성 검정은 3반복한 데이터를 이용하여 ANOVA (analysis of variance)와 Fisher's LSD (Least Significant Difference) Test로 분석하였다. 신뢰구간은 95% 수준으로 설정되었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 인 제거 미생물 순수 분리

미리 준비한 실험배지에 생활 하수를 접종하여 혼합 미생물로부터 각각 분리하여 계대배양을 하였다. 순수 단일 colony를 확인한 후 16S rRNA gene sequencing으로 세균을 동정한 결과, 미생물은 모두 4종류로 밝혀졌다. 분리된 균에서 16S rRNA gene sequencing을 통해 동정하여 분석된 염기 서열을 NCBI BLAST program으로 상동성이 가장 높은 미생물 종을 선택하였다. 그 결과는 Table 2에 표시한 것과 같이 *Chryseobacterium* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus licheniformis*로 확인되었다.

3.2. 순수 분리된 미생물의 인 제거 효율

분리 동정된 각각의 미생물에 의한 인 제거 효율을 측정하기 위해 각각의 미생물을 인 농도가 20 mg/L로 제조된 배지에 배양한 후에 같은 시간을 반복하여 시료를 채취하여 성장과 인 농도 변화를 측정하였다. Fig. 1은 *Chryseobacterium* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus licheniformis*의 성장곡선을 나타낸다. 각각의 성장곡선에서 미생물의 생장이 잘 이루어지는 것이 확인되었다. Fig. 2에서 *Chryseobacterium* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus licheniformis*를 배지에 각각 접종한 48시간 후에 인 제거율은 각각 69.6%, 57.3%,

Table 2. Classification of bacterial strains by 16S rRNA gene sequences

Strain	Number of nucleotide (bp)	Homologous microorganism	Identity
CBHJ-a	1448	<i>Chryseobacterium</i> sp.	99%
CBHJ-b	1480	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98%
CBHJ-c	1486	<i>Bacillus licheniformis</i>	99%

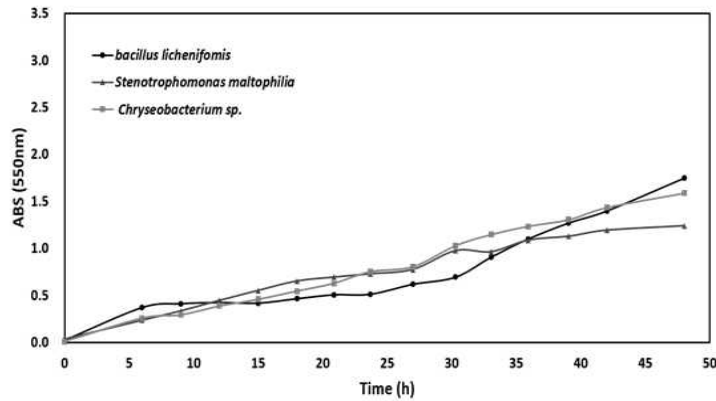


Fig. 1. Growth curves of the isolated bacteria for 48 hours.

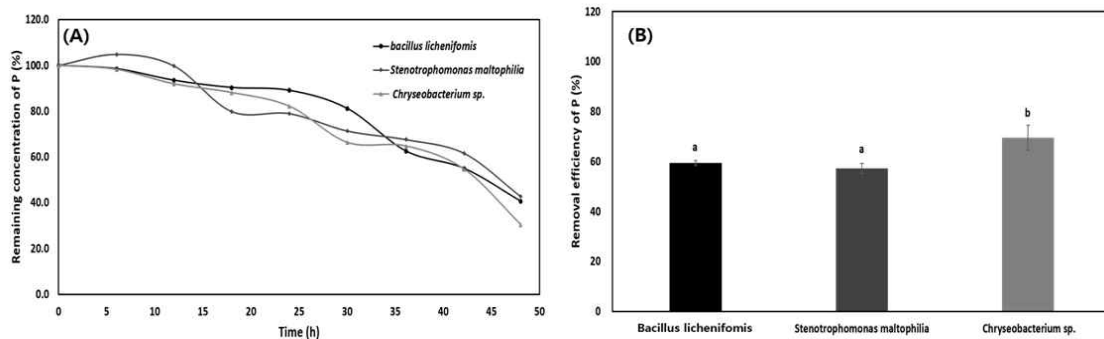


Fig. 2. Remaining concentrations (A) and Removal efficiencies (B) of P by the isolated bacteria for 48 hours.

* Means followed by different letters indicate that they are significantly different from each other based on the ANOVA at $\alpha = 0.05$ level.

59.4%로 나타났다. 따라서 각각의 분리 동정된 순수 단일 미생물들은 인 제거 능력을 가지고 있다는 것이 확인됐으며, 그 중에서 인 제거 효율이 가장 높은 미생물은 *Chryseobacterium* sp.이었다.

분리된 미생물 중 인 제거 실험에 적합한 미생물을 선별하기 위해서 *Chryseobacterium* sp., *Stenotrophomonas*

maltophilia, *Bacillus licheniformis*의 생장과 인 농도 변화를 상관분석하였다(Fig. 3). 분석 결과 미생물의 생장과 인농도는 음의 상관관계를 보였다. 결정계수는 *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium* sp., *Bacillus licheniformis* 순으로 증가하였다. *Stenotrophomonas maltophilia*는 가장 낮은 결정계수를

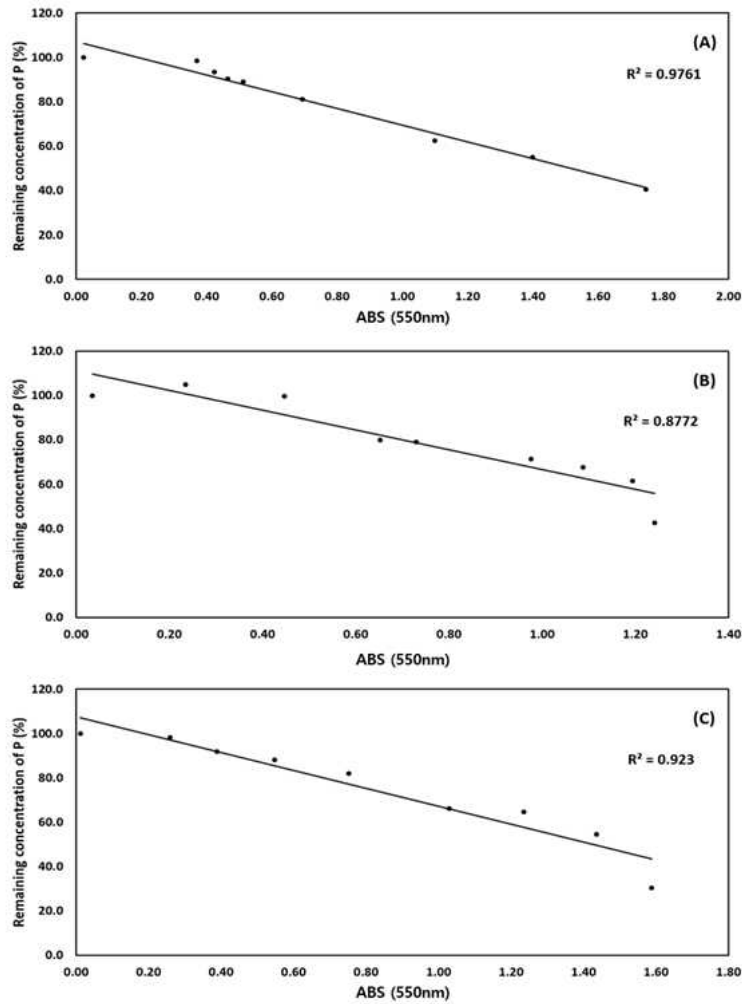


Fig. 3. Correlation between the remaining concentration of P and the growth of Bacteria : (A) *Bacillus licheniformis*, (B) *Stenotrophomonas maltophilia*, (C) *Chryseobacterium* sp.

보였으며, *Chryseobacterium* sp.는 세포 외 물질을 생성하는데 (Khani et al., 2016), 배양될 때 보여진 높은 점성과 미생물이 자라면서 방출되는 액에 의해 인이 흡착제거 될 수도 있기 때문에 결정계수가 *Bacillus licheniformis* 보다 낮은 것으로 사료된다. 따라서 인 제거 효율은 *Chryseobacterium* sp.보다 낮지만 성장과 인 제거에 가장 높은 결정계수를 가지는 *Bacillus licheniformis*를 이용하여 인 제거에 대한 환경 요인 연구를 진행하였다.

3.3. *Bacillus licheniformis*의 인 제거 효과에 대한 환경 요인 평가

3.3.1. 초기 인 농도 변화에 따른 *Bacillus licheniformis*의 인 제거 효과

생활 하수로부터 분리된 *Bacillus licheniformis*를 이용한 초기 인 농도에 따른 인 제거에 대한 변화를 알아보고자 실험을 수행하였다. 배지의 초기 인 농도는 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L가 되도록 각각 제조되었으며, 각각의 농도별로 성장곡선을 측정해 본 결과는 Fig. 4와 같다. 인 농도가 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L 일 때

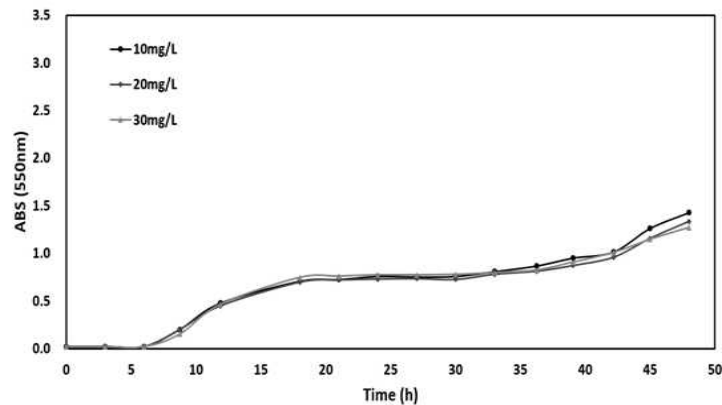


Fig. 4. Growth curves of *Bacillus licheniformis* with variation of initial P concentration for 48 hours.

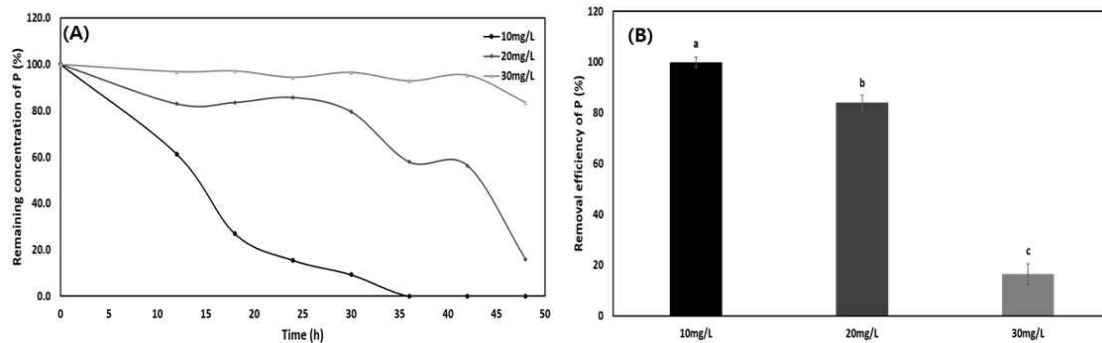


Fig. 5. Remaining concentrations (A) and Removal efficiencies (B) of P by *Bacillus licheniformis* with variation of initial P concentration for 48 hours.

* Means followed by different letters indicate that they are significantly different from each other based on the ANOVA at $\alpha = 0.05$ level.

*Bacillus licheniformis*의 생장은 잘 이루어지는 것을 알 수가 있었다. 각 초기 농도 별로 인 제거 효율을 측정해 본 결과는 Fig. 5와 같다. *Bacillus licheniformis*를 접종한 지 48시간 후에 10 mg/L 처리구에서 인이 100% 제거되는 것이 확인되었으며, 20 mg/L 처리구에서 84.0%가 제거되는 것이 확인되었다. 그리고 30 mg/L 처리구에서 16.5%가 제거되는 것을 알 수가 있었다. 따라서 인의 초기 농도가 높을 때 보다 낮을 때 인 제거 효율이 더욱 높아지는 것을 알 수가 있었다.

이러한 연구결과는 미생물이 제거할 수 있는 인의 농도에 한계가 있기 때문에 오염물질의 농도가 높을 때 생물학적 처리 효율이 낮아지는 것으로 사료된다.

3.3.2. 온도 변화에 따른 *Bacillus licheniformis*의 인 제거 효과

생활 하수로부터 분리한 미생물 중에 온도 변화에 따른 *Bacillus licheniformis*에 의한 인 제거의 효과를 알아보았다. 20°C, 30°C, 그리고 40°C에서 각각 *Bacillus licheniformis*를 접종하여, 각 온도 별로 성장곡선을 측정해 본 결과는 Fig. 6과 같다. 20°C에는 생장이 느린 반면에 30°C와 40°C에서는 높은 생장을 확인하였다. 각 온도 별로 인 제거 효율을 측정해 본 결과는 Fig. 7과 같다. 미생물을 접종한 지 48시간 후에 20°C에서는 인 제거가 되지 않았고, 30°C에서는 인 제거 효율이 75.8%였으며, 40°C에선 인 제거 효율이 60.6%였다. 따라서 온도는

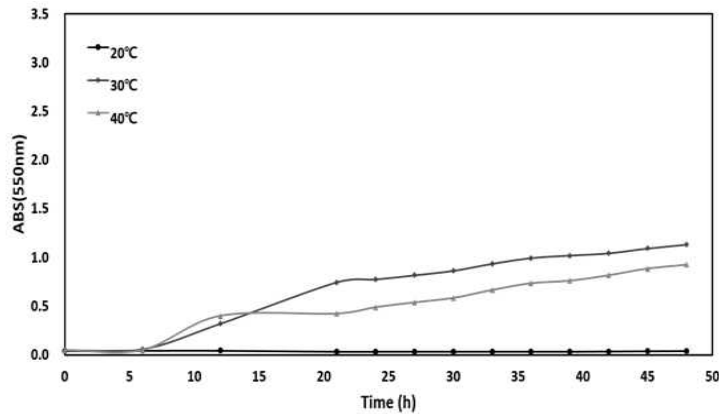


Fig. 6. Growth curves of *Bacillus licheniformis* with variation of temperature for 48 hours.

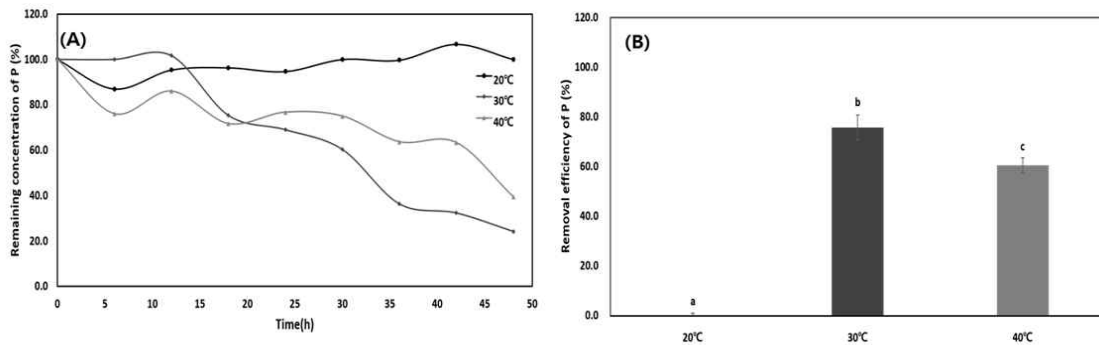


Fig. 7. Remaining concentrations (A) and Removal efficiencies (B) of P by *Bacillus licheniformis* with variation of temperature for 48 hours.

* Means followed by different letters indicate that they are significantly different from each other based on the ANOVA at $\alpha = 0.05$ level.

*Bacillus licheniformis*의 성장과 인 제거 효율에 영향을 주는 중요인자라는 것을 알 수가 있었다.

낮은 온도보다 높은 온도일수록 인 제거 효율이 높았다. 이러한 결과는 생물학적 인 제거시 주변에서 제시하는 환경 조건과는 상반되는 결과로 사료된다. 일반적으로 생물학적인 제거를 하는 PAOs는 20°C 혹은 조금 더 낮은 온도에서 활발히 활동한다 (Panswad et al., 2003). 더 낮은 온도인 5 ~ 15°C에서도 비교적 인 제거 효율이 높은 것이 확인되었지만 (Florentz et al., 1987), 20 ~ 37°C의 비교적 높은 온도에서 인 제거 효율이 더욱 증가한다 (McClintock et al., 1993; Converti et al., 1995).

이러한 연구 결과 일반적으로 환경인자인 온도가 20°C와 30°C에서 PAOs의 인 섭취가 이루어지는데 (Brdjanovic et al., 1996), *Bacillus licheniformis*는 20°C에서 인 제거율이 현저히 떨어지는 것을 알 수가 있다. *Bacillus*속의 균은 일반적으로 높은 온도 내성, 액체배양시 빠른 성장과 포자 형성 등의 특성이 있다 (Brannen and Kenney, 1997). 일반적으로 *Bacillus*속의 성장 최적온도는 20 ~ 40°C인 중온성 세균이나, 55°C에서 성장되는 것이 종종 확인되기도 한다. 이런 *Bacillus*속의 특성으로 인해 일반적인 미생물에 의한 인 제거의 온도 조건과 반대되는 것으로 사료된다.

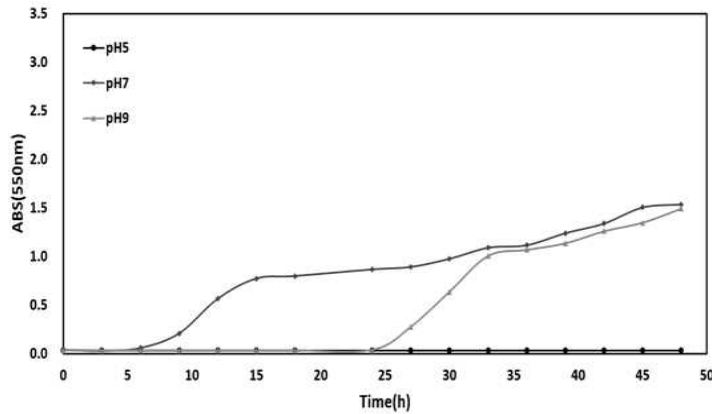


Fig. 8. Growth curves of *Bacillus licheniformis* with variation of pH for 48 hours.

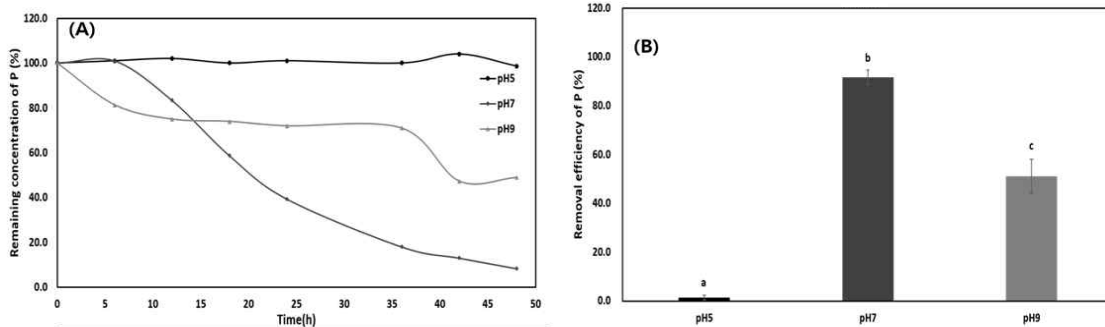


Fig. 9. Remaining concentrations (A) and Removal efficiencies (B) of P by *Bacillus licheniformis* with variation of pH for 48 hours.

* Means followed by different letters indicate that they are significantly different from each other based on the ANOVA at $\alpha = 0.05$ level.

3.3.3. pH 변화에 따른 *Bacillus licheniformis*의 인 제거 효과

생활 하수로부터 분리한 미생물 중에 *Bacillus licheniformis*를 선택 및 이용하여 pH 변화에 따른 인 제거의 효과를 알아보았다. pH 5, pH 7 그리고 pH 9에서 각각 *Bacillus licheniformis*를 접종하여, 각 pH 별로 생장곡선을 측정해 본 결과는 Fig. 8와 같다. pH 5에서 미생물 생장은 낮았으며, pH 9에서는 초기에는 생장이 느리다가 시간이 지난 후에 생장이 잘 이루어지는 것이 확인되었다. 한편 pH 7에서는 미생물의 생장이 잘 이루어졌다. 각 pH 별로 인 제거 효율을 측정해 본 결과는 Fig. 9와 같다. pH 5에서 인은 제거되지 않았으며, pH 9에서

초기에는 인 제거가 되지 않다가 30시간이 지난 후부터 인이 제거되기 시작하여 48시간 후에 인 제거 효율은 51.1%였다. pH 7에서 48시간 후에 인 제거 효율은 91.7%였다. 따라서 pH가 낮을수록 미생물의 생장이 감소해 인이 제거되지 않았고, pH가 너무 높을 경우 *Bacillus licheniformis*의 생장 속도가 감소되어 인 제거율이 낮았다. 그리고 중성인 pH7에서 인 제거율이 가장 높았다.

이는 생물학적 인 처리시 pH 조건이 중성일 때 인 제거율이 가장 높은 것과 일치한다. 인 제거 시 pH는 중성인 6.5 ~ 7에서 미생물의 활동이 거의 영향을 받지 않고, pH가 6.5에서는 인의 섭취가 감소하고, pH가 5.2 이하로

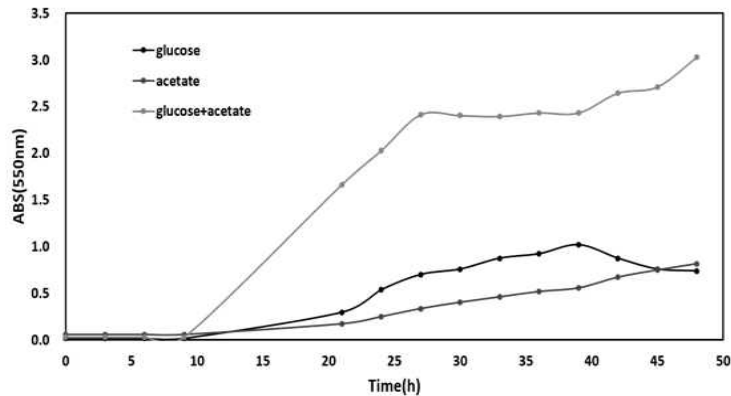


Fig. 10. Growth curves of *Bacillus licheniformis* with variation of carbon source for 48 hours.

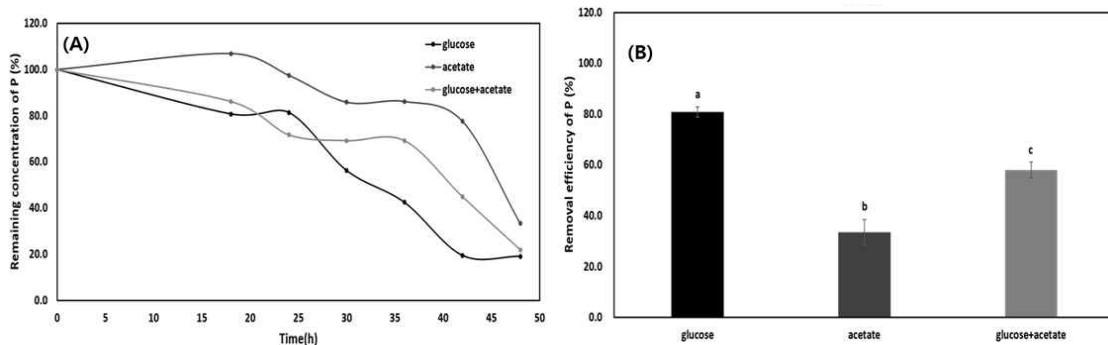


Fig. 11. Remaining concentrations (A) and Removal efficiencies (B) of P by *Bacillus licheniformis* with variation of carbon source for 48 hours.

* Means followed by different letters indicate that they are significantly different from each other based on the ANOVA at $\alpha = 0.05$ level.

떨어지면 미생물의 인 섭취 활성도가 크게 감소하는 것과 일치한다 (Tracy et al., 1985). *Bacillus licheniformis*의 경우 가장 잘 생존하는 pH의 조건이 중성으로 인 제거에 영향을 주는 pH의 최적 조건과 같으므로 (Brannen and Kenney, 1997), pH가 7일 때 *Bacillus licheniformis*의 인 제거 효율이 더 높은 것으로 사료된다.

3.3.4. 탄소원 변화에 따른 *Bacillus licheniformis*의 인 제거 효과

생활 하수로부터 분리한 미생물 중에 *Bacillus licheniformis*를 이용하여 배지에 첨가된 탄소원의 변화에 따른 인 제거에 대한 영향을 알아보았다. 각각 다른 탄소원인 glucose, acetate, glucose+acetate가 첨가된 세

종류의 배지를 사용하였으며, 성장곡선을 측정해 본 결과는 Fig. 10과 같다. *Bacillus licheniformis*는 모든 처리구에서 성장하였다. 각각 다른 탄소원이 첨가된 배지에서 미생물 성장에 따른 인 농도 변화는 Fig. 11과 같다. 탄소원으로 glucose만 첨가했을 때 인 제거 효율은 80.9%로 가장 높았다. glucose와 acetate를 첨가한 경우는 인 제거율이 58.1%로 두 번째로 높았다. acetate만 첨가했을 때는 인 제거 효율은 33.6%로 가장 낮았다. 따라서 탄소원으로 glucose만을 첨가했을 때 인 제거율이 가장 높았다.

일반적으로 생물학적인 제거에 대한 기질의 효과를 보면 glucose만 첨가했을 때 보다 acetate를 첨가했을 때

인 제거율이 높은 것으로 알려져 있으며 (Gebremariam et al., 2012), 생물학적 인 제거를 하는 반응조에 glucose만 주입한 것이 acetate를 주입을 한 것보다 인의 방출/과잉섭취 현상이 낮은 것으로 나타났다 (Yeo and Lee, 2006). 그러나 이는 일반적인 인 제거 공정에서 병행하는 혐기조와 호기조에 교대로 노출시켜 인의 체외 방출과 인의 체내 과잉섭취를 하는 과정이 없기 때문으로 사료된다. 현재 실험에서 혐기를 이용한 인의 방출 과정을 제외하고 호기 상태로만 실험을 진행하여 이와 같은 결과를 얻은 것으로 사료된다. *Bacillus licheniformis*의 보다 효과적인 인 제거를 확인하기 위해서는 혐기와 호기 상태를 교대로 병행하는 연구가 필요하다고 사료된다.

4. 결론

본 연구는 생활 하수에서 분리 및 동정된 인을 제거하는 미생물에 의한 인 제거에 영향을 미치는 환경인자를 평가하고, 인 제거를 위한 최적 조건을 알아보기 위해 진행되었다. 그리고 환경인자로 초기 인 농도, 온도, pH, 탄소원을 선택하여 실험을 진행하였다. 초기 인 농도에 따른 인의 제거 효율은 초기 농도가 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L 일 때 각각 100.0%, 84.0%, 16.5%였다. 온도에 따른 인의 제거 효율은 20 °C, 30 °C, 40 °C에서 각각 0%, 75.8%, 60.6%였다. pH에 따른 인의 제거 효율은 pH 5, pH 7, pH 9에서 각각 1.6%, 91.7%, 51.1%였다. 탄소원에 따른 인의 제거 효율은 포도당, 아세테이트, 포도당 + 아세테이트에서 각각 80.9%, 33.6%, 54.1%였다. 따라서 여러 환경인자로 인한 인 제거 효과를 검토한 결과 *Bacillus licheniformis*에 의한 인 제거는 초기 인 농도가 낮은 10mg/L 일 때, 온도는 30 °C, pH는 7, 탄소원으로 glucose를 사용할 때 가장 높은 제거 효율을 보였다. 그리고 상관분석을 통하여 미생물의 성장과 함께 인 제거가 이루어지며, 성장을 잘할수록 인 제거율이 높은 것이 확인되었다. 하지만 인 제거 공정에서 *Bacillus licheniformis*의 적용을 위해서는 인 제거에 영향을 주는 또 다른 인자들인 혐기 및 호기, DO, 설계인자, 양이온, NOx의 변화로 인한 인 제거 효율을 확인하는 실험이 더 수행될 필요가 있으며, 여러 인자들이 복합적으로 적용된 실험이 수행될 필요가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 이공분야기초연구사업 연구비지원(과제번호 2019R1F1A106325212)에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Barnard, J. L., 1976, A Review of phosphorus removal in the activated sludge process, *Water SA.*, 2, 136-144.
- Brannen, P. M., Kenney, D. S., 1997, Kodiak-a successful biological control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton, *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 169-171.
- Brdjanovic, D., Hooijmans, C. M., van Loosdrecht, M. C. M., Alaerts, G. J., Heijnen, J. J., 1996, The dynamic effects of potassium limitation on biological phosphorus removal, *Water Res.*, 30, 303-313.
- Cech, J. S., Hartman, P., 1993, Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal systems, *Water Research.*, 27, 1219-1225.
- Cho, W. S., Yoon, S. J., La, C. S., 2003, Recovery of N and P resources from animal wastewater by struvite crystallization, *Journal of Animal Science and Technology*, 45, 875-884.
- Choi, W. J., Park, K. M., Yoon, B. G., Kim, M. C., Oh, K. J., 2009, A Study on the recovery of phosphorus resources in sewage sludge using Struvite crystallization, *Journal of Korean Society of Environmental Engineers*, 31, 557-564.
- Converti, A., Rovatti, C., Borgh, D., 1995, Biological removal of phosphorus from wastewaters by alternating aerobic and anaerobic conditions, *Water Res.*, 27, 791-798.
- de Graaff, D. R., van Loosdrecht, M. C., Pronk, M., 2020, Biological phosphorus removal in seawater-adapted aerobic granular sludge, *Water Research*, 172, 115531.
- Florentz, M., Caille, D., Bourdon, F., Sibony, J., 1987, Biological phosphorus removal in France, *Water Sci. Technol.*, 19, 1171-1173.
- Gebremariam, S. Y., Beutel, M. W., Christian, D., Hess, T. F., 2012, Effects of glucose on the performance of enhanced biological phosphorus removal activated sludge enriched with acetate, *Bioresource Technology*,

- 121, 19-24.
- Grady, C. P. L., Daigger, G. T., Lim, H. C., 1999, Biological wastewater treatment, 2nd Ed. Marcel Dekker, New York.
- Hornbæk, T., Jakobsen, M., Dynesen, J., Nielsen, A. K., 2004, Global transcription profiles and intracellular pH regulation measured in *Bacillus licheniformis* upon external pH upshifts, Archives of microbiology, 182, 467-474.
- Kargi, F., Uygur, A., 2002, Nutrient removal performance of a sequencing batch reactor as a function of the sludge age, Enzyme Microb. Technol., 31, 842-847.
- Khani, M., Bahrami, A., Chegeni, A., Ghafari, M. D., Zadeh, A. M., 2016, Optimization of carbon and nitrogen sources for extracellular polymeric substances production by *Chryseobacterium indologenes* MUT. 2., Iranian Journal of Biotechnology, 14, 13.
- Kim, J. H., Jung, J. T., Kim, H. K., 2006, Removal of nitrogen and phosphorus in anaerobic fermentation supernatant by struvite crystallization, Korean Geo-Environmental Society, 7, 5-12.
- Krishnaswamy, U., Muthusamy, M., Perumalsamy, L., 2009, Studies on the efficiency of the removal of phosphate using bacterial consortium for the biotreatment of phosphate wastewater, Eur. J. Appl. Sci., 1, 6-15.
- Krzywonos, M., Cibis, E., Miśkiewicz, T., Kent, C. A., 2008, Effect of temperature on the efficiency of the thermo-and mesophilic aerobic batch biodegradation of high-strength distillery wastewater (potato stillage), Bioresource Technology, 99, 7816-7824.
- Levin, G. V., Sharp, J., 1965, Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organics, J. Wat. Pollut. Control Fed., 37, 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, 110-118.
- Mino, T., van Loosdrecht, M. C., Heijnen, J. J., 1998, Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphorus removal process, Wat. Res., 32, 3193-3207.
- Murthy, S. N., Novak, J. T., 1998, Effects of potassium Ion on sludge settling, Dewatering and effluent properties, Water Sci. Technol., 37, 317-324.
- Norbert, J., P pel, H. J., 1994, Phosphate release of sludge from enhanced biological P-removal during digestion, Proceedings of IAWQ 17th Biennial International Conference, 1, 167-174.
- Panswad, T., Doungchai, A., Anotai, J., 2003, Temperature effect on microbial community of enhanced biological phosphorus removal system, Water Res., 37, 409-415.
- Richard, I. S., 1989, Principles and practice of phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater, The Soap & Detergent Association, New York, 123-139.
- Ryznar-Luty, A., Krzywonos, M., Cibis, E., Miśkiewicz, T., 2008, Aerobic biodegradation of vinasse by a mixed culture of bacteria of the genus bacillus: Optimization of temperature, pH and oxygenation state, Polish Journal of Environmental Studies, 17, 101-112.
- Sedlak, R. I., 1991, Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater, 2nd Ed., The soap and detergent association, Lewis Publishers, New York, 141-163.
- Song, M. Y., Jeon, M. S., Lee, H. D., Jeong, B. S., 2015, A Study on the traveling route and control method of eutrophication sources in Han River basin, Gyeonggi Research Institute, Korea, 1-111.
- Stephens, H. L., Stensel, H. D., 1998, Effect of operating conditions on biological phosphorus removal, Water Envir. Res., 70, 360-369.
- Tchobanoglus, G., Burton, F. L., Stensel, H. D., 2003, Waste Engineering, Mcgraw-Hill Inc., New York.
- Tracy, K. D., Flammino, A., 1985, Kinetics of biological phosphorus removal, Presented at the 58th annual waste pollution control federation conference, Kansas City, Missouri, 12, 102.
- Wiegert, T., Homuth, G., Versteeg, S., Schumann, W., 2001, Alkaline shock induces the bacillus subtilis W regulon, Molecular microbiology, 41, 59-71.
- Won, S. Y., Park, S. G., Lee, S. I., 2000, Removal of nitrogen and phosphorus using struvite crystallization, Journal of Korean Society of Environmental Engineers, 22, 599-607.
- Xiao, C. Q., Chi, R. A., He, H., Zhang, W. X., 2009, Characterization of tricalcium phosphate solubilization by *Stenotrophomonas maltophilia* YC isolated from phosphate mines, Journal of Central South University of Technology, 16, 581-587.
- Yeo, S. M., Lee, Y. O., 2006, Changes of the bacterial community structure depending on carbon source in

biological phosphate removing process, Korean Society Of Environmental Engineers, 28, 165-172.

Zafiri, C., Komaros, 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.*, 33, 2769-2788.

-
- M.Sc. Seok-Soon Han
Department of Environmental and Biological Chemistry,
Chungbuk National University
xotla@hanmail.net
 - Undergraduate. Sang-Wook Park
Department of Environmental and Biological Chemistry,
Chungbuk National University
sanguk02@naver.com
 - Undergraduate student. Deok-Won Kim
Department of Environmental and Biological Chemistry,
Chungbuk National University
kghkgkr1@naver.com

-
- Staff, M.Sc. Ji-Su Park
Field Quality Control Gimcheon part, Doosan Corporation
Electro-Materials
jisu2.park@doosan
 - Researcher, M.Sc. Eun-Ji Oh
Water and Land Research Group/Division for National
Environment, Korea Environment Institute
ejoh@kei.re.kr
 - Researcher, M.Sc. Jin Yoo
Indoor Environment Division, Incheon Metropolitan City
Institute of Public Health and Environment
yoojin529@naver.com
 - Expert committee, M.Sc. Deok-Hyeon Kim
National Institute of Environmental Research
foseja1324@korea.com
 - Professor. Keun-Yook Chung
Department of Environmental and Biological Chemistry,
Chungbuk National University
kychung@cbnu.ac.kr