

Characteristics of *Bacillus* sp. for wastewater treatment

김상희¹, 이민규², 이병현³, 김중균¹

부경대학교 ¹생물공학과, ²화학공학과, ³환경공학과

전화 (051) 620-6186, FAX (051) 620-6186

Abstract

To remove nitrogen compound from wastewater six kinds of bacillus were isolated from sludge. Each bacillus was identified as *B. subtilis* I · II, *B. cereus* I · II, *B. anthracis*, *B. circulans*. The test of effect of nutrient and cofector on the nitrogen removal showed that peptone, yeast extract, magnesium, iron, and calsium accerated the efficiency of nitrogen removal.

In syringe test aerobic nitrification and denitrification was occured.

서론

질소 화합물들은 물의 주요 오염원으로, 질소 성분이 과다하게 존재 할 경우 부영양화를 가속화시키는 것으로 보고되고 있다¹⁾. 이러한 질소 성분을 제거하는 생물학적 mechanism은 우선 암모니아를 질산염으로 산화한 후 탈질과정을 통하여 무해한 질소 gas로 전화시켜 제거한다. 일반적으로 질산화의 경우 heterotrophic nitrifier에 비하여 높은 질산화 효율을 가지는 autotrophic nitrifier가 암모니아 제거에 주된 역할을 하는 것으로 보고되고 있으나, 최근 종속영양성 질산화의 가능성이 제시되었다^{2),3)}.

Heterotrophic nitrifier 가운데 *Bacillus* 균주는 질산화뿐만 아니라 혐기적 상태에서 탈질을 하는 것으로 보고되고 있다⁴⁾. 또한 *Bacillus*가 생산하는 antibiotics는 반응기 운전시 발생하는 사상균에 대하여 항균작용을 가지고 있어⁵⁾ bulking의 초래를 예방할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 질산화 및 탈질능력을 모두 가지며 폐수중의 유기물 제거 효율이 높은 bacillus 균주를 분리·동정하고 그들의 질소제거 특성을 규명함으로써 보다 효율적인 폐수처리 공정을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 사용된 Bacillus 균주 및 배양

하수처리장으로부터 가져온 sludge로부터 6균주를 분리·동정하여 사용하였다. 각각의 균주들은 nutrient agar plate상에서 한달 마다 새 배지로 옮겨 보관·유지하였다. Tube culture는 plate로부터 하나의 colony를 따서 5ml의 PY배지가 든 tube에 접종하여 30℃ incubator에 100rpm으로 shaking하여 배양하였으며 flask culture는 200ml의 PY배지가 든 500ml의 flask에 접종량을 5%로 하여 30℃, 100rpm에서 배양하였다.

2. 균주의 동정

Sludge로부터 분리된 6균주를 동정하기 위하여 50 CHB kit을 이용하여 생화학적 특성을 규명함으로써 균주를 동정하였다.

3. 성장특성 및 질소제거 특성 규명

균주의 성장 특성 및 질소제거 특성을 규명하기 위하여 200ml의 2%-glucose modified basal medium 배지를 포함하는 500ml의 flask에서 접종량을 5%로 하여 30°C, 100rpm에서 균주를 배양하고, 3시간 단위로 sampling 하여 optical density, dry cell weight, TOC, NO₃⁻, 및 NO₂⁻ 등을 분석하였다.

또한 호기 및 혐기적 조건에서의 탈질 정도를 알아보기 위하여 syringe technique을 이용하여 실험을 했다. 우선 20 ml의 배지를 포함하는 100ml syringe에 late log phase의 균을 5ml 접종한 후 호기적 조건의 경우 공기를 5ml 주입하고, 혐기적 조건의 경우 공기를 모두 제거하여 syringe 내에서 균주를 배양함으로써 발생된 gas를 포집하여 gas chromatography를 이용하여 분석하였다. 또한 질산화 및 탈질과정에 관여하는 효소의 cofactor 들의 영향을 규명하여 처리효율을 높이하고자 하였다.

5. *Bacillus* sp.의 사상균에 대한 항균작용의 규명

하수 sludge를 희석하여 plate에 pouring한 결과 생성된 colony를 하나씩 따서 현미경으로 관찰하여 사상균을 분리하였다. 분리된 사상균주를 plate에 도말한 후 0.25µm membrane filter disk를 plate에 올려놓은 후 그 위에 *Bacillus* sp.의 상등액을 떨어뜨려 배양하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 균주의 동정

분리된 6종의 bacillus 균에 대하여 동정한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다 (Table 3.1.).

Table 3.1. Results from identification test

No.	Identification Test	Similarity (%)
1	<i>B. cereus</i>	99.8
2	<i>B. cereus</i>	96.7
3	<i>B. circulans</i>	97.0
4	<i>B. subtilis</i>	89.5
5	<i>B. anthracis</i>	47.7
6	<i>B. subtilis</i>	65.7

3.2 질소제거 특성 규명

3.2.1. Cofactor의 영향

질소제거 메카니즘에 관여하는 cofactor들을 밝히기 위하여 flask 배양을 통하여 각각의 cofactor들의 질소제거효율을 조사하였는데, Mg^{2+} , Fe^{2+} , 및 Ca^{2+} 는 암모니아 제거 효율을 높이는 데 관여하며 특히 Mg^{2+} 와 Ca^{2+} 는 탈질 및 질산화의 중간 산물인 NO_2^- -생성에 관여하는 것으로 사료되어진다.

3.2.2. 다른 영양소의 질소제거에 관한 영향

질소제거에 다른 영양소들이 어떻게 관여하는 지를 규명하기 위하여 synthetic 배지를 control로 하고, 그 배지에 glucose, peptone, yeast extract, 및 vitamine을 각각 첨가하여 질소제거 효율을 조사하였다. Yeast extract 및 peptone을 제외한 배지에서는 균주의 성장이 거의 없어, 이에 따른 질소제거도 이루어지지 않았으나 peptone과 yeast extract가 첨가된 배지에서는 균주의 성장과 함께 암모니아의 제거 및 질산과 탈질의 중간 산물인 NO_2^- 의 생성이 이루어졌다.

3.2.3 Syringe test

Syringe technique을 이용하여 호기 및 혐기적 조건에서 이들 균주의 질소제거 특성을 규명하는데, 그 결과는 다음과 같다.

Table 3.2. Results of syringe test in aerobic and anaerobic conditions.

Culture Conditions	Ammonia removal (mole/L)	TOC removal ($C_6H_{12}O_6$ mole/L)	N_2 produced (mole/L)	Cells ($C_5H_7O_2N$) produced (mole/L)
Aerobic	1.16×10^{-2}	3.7×10^{-3}	7.86×10^{-4}	4.20×10^{-3}
Anaerobic	0.81×10^{-2}	3.6×10^{-3}	1.64×10^{-3}	6.64×10^{-4}

3.3. *Bacillus* sp.의 사상균에 대한 항균작용의 규명

반응기내에서 사상균의 출현은 반응기의 처리효율을 저하시키는 요인으로 작용한다. 따라서 이러한 사상균을 초기에 제거함으로써 반응기의 운전 효율을 높이기 위하여 *Bacillus* 균의 사상균에 대한 항균작용 특성을 규명하였다. Fig. 1. 에서 보여지는 것처럼 *Bacillus*가 배양된 상등액을 포함하는 disk에 사상균들의 제거되어 clear zone을 형성하고 있는 것을 볼 수 있다. 따라서 이는 *Bacillus*가 사상균에 대한 항균 작용을 가고 있음을 보여준다.

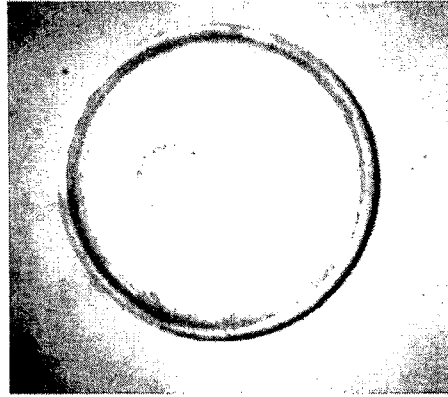


Fig. 1. Antibiotic effect of Bacillus

사사

이 연구는 대경기계기술(주)의 산학 연구비로 수행되었음에 감사드립니다.

참고문헌

1. Robertson, L. A. and Kuenen, J. G., " Ecology of nitrification and denitrification" (1988), pp.161-218, In J. A. Cole and S. J. Ferguson (ed), The nitrogen and sulfur cycles, Cambridge University Press, Cambridge.
2. Robertson, L. A. and Kuenen, J. G., "Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria"(1990), *Antonie van Leeuwenhoek*, 75, 139-152.
3. Duggin, J. A., Voigi, G. K., and Bormanm, F. H., "Autotrophic and heterotrophic nitrification in response to clear-cutting northern hardwood forest"(1991), *Soil Biol. Biochem.*, 23, 779-787.
4. Sneath, P. H. A., "Endospore-forming gram-positive rods and cocci"(1989), In Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1127-1139.
5. Kitatsuji, K., Miyata, H., and Fukase, T., "Isolation of microorganisms that lyse filamentous bacteria and characterization of the lytic substance secreted by *Bacillus ploymyxa*"(1996), *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 323-327.