

방향족화합물이 함유된 폐수의 생물학적 처리

박춘호 · 김용기 · 오평수*

태평양화학(주) 기술연구소 발효공학연구실

Microbial Degradation of Aromatic Compounds in Industrial Wastewater

Park, Chun-Ho, Yong-Ki Kim and Pyong-Su O*

Fermentation Technology Laboratory, R&D Center Pacific Chemical Co., Ltd. Ansan 425-120, Korea

Abstract — The bacteria which can biodegrade aromatic compounds were screened from soil and wastewater. The isolated *Pseudomonas* sp. HC107 had high removal rate of COD and phenol. And also this strain grew on m-cresol, salicylate, toluene, 2,4-D and benzene. When the strain culture (2 ml/day) was treated on continuous reactor at mixed wastewater from chemical, pharmaceutical and dye industry, the treatment rate of COD, BOD and phenol was to be about 92.5%, 95.3% and 93.5%, respectively.

방향족화합물은 화학공업에서 다량 이용, 방출되고 있는 물질로 그 사용량이 증가일로에 있는데, 이들 물질은 벤젠고리를 가지는 구조적 특징으로 인하여, 대부분의 화합물이 생체에 독성을 나타낼 뿐만 아니라 자연분해가 어려워 환경오염의 주요 원인 물질로 대두되고 있다(1, 2). 그동안 국내외적으로 이런 난분해성 독성 유기화합물을 효과적으로 분해할 수 있는 방법, 특히 미생물을 이용한 생물공학적인 처리법에 대한 연구가 환경정화 차원에서 매우 활발하게 진행되고 있다(3-5). 이와 같은 연구의 결과 대부분의 방향족화합물은 미생물에 의해 중간대사물인 catechol로 분해되고 다시 aromatic ring이 open되는 meta 또는 ortho pathway를 거쳐 최종적으로 TCA cycle로 전달되어 완전분해가 된다고 한다(6-8). 이에 따라 Fisher 등(9)과, Kivisaar(10), Oltmanns(11) 등은 자연계에서 여러가지 세균에 의한 방향족화합물의 분해에 관하여 조사연구한 바 있으며, 국내에서는 Kim 등(12)과 Eun 등(13)에 의한 *Pseudomonas* sp.에 의한 난분해성 유기화합물의 분해 특성에 관하여 연구가 진행되고 있는 실정이다. 그러나 이러한

연구는 대부분 폐수내 특정 유기물의 분해에 관한 연구로(14, 15) 그 범위가 한정적이고 대부분이 유전자 재조합 기술을 바탕으로 하여 만들어진 미생물로, 실제 폐수에서 재조합 유전자를 가진 미생물의 안정성 및 그 분해효율의 지속성이 의문시 되고 있는 실정이다(16, 17).

따라서 본 연구는 각종 방향족화합물을 잘 분해하면서 실제 폐수에서도 그 분해효능이 효과적으로 발휘되는 미생물을 분리한 후 그 분해능 및 생리, 생화학적인 특성을 검정하고 이를 실험실적 규모의 활성슬러지 장치에 처리하여 수질정화효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

배지 및 배양

분해균주의 분리를 위해 Kiyohara(18) 등이 사용한 MM2 최소배지를 사용했는데 그 조성은 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ buffer 1l(pH 7.0)에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 18 mM, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 μM , $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM 및 NaCl 8.5 mM이 함유된 농도였으며, 균배양은 30°C, 90~120 strokes/min로 24~72시간 배양하였다. 이때 탄소원으로 500 mg/l의 phenol을 첨가하였다.

Key words: *Pseudomonas* sp., microbial degradation, aromatic compound

*Corresponding author

분해균의 선발

분해균주의 분리원으로 서울과 경기도 일원의 농경지, 폐기물 매립장과 각종 화학공장의 폐수처리 시설에서 슬러지 등을 시료로 채취하여 유일 탄소원으로 phenol이 함유된 액체 MM2 배지에 1차 접종 배양한 후, 이 배양액을 분리원으로 하여 단계적으로 희석 후 phenol이 함유된 고체 MM2 배지에 도말하여 배양 후에 나타나는 colony를 순수분리하였다. 분리균은 다시 phenol이 함유된 액체 MM2 배지에 접종하여 배양 후 균생육도가 가장 빠른 것을 선발한 후 각종 방향족화합물에 대한 분리균의 이용성을 검토하기 위해서 MM2 최소배지에 500 mg/l의 방향족화합물을 첨가한 후 분리균을 접종하여 30°C에서 5일간 진탕배양하면서 균의 생육도를 관찰하여 이용성이 다양한 균주를 최종 선발하였다.

분리균의 동정

"Manual of methods for general bacteriology" (19)에 따라 분리균주의 형태적, 생리 및 생화학적 특성을 검토한 후 Bergey's manual(20)에 의하여 동정하였다.

연속배양에 의한 폐수의 정화

Park 등(21)이 사용한 실험실적 규모(Bench scale)의 활성슬러지 반응조를 이용하여 슬러지 성상을 일정하게 유지하면서 분리균 첨가에 의한 방향족화합물 함유 폐수의 정화효과를 관찰하였다. 반응조의 운전조건으로 수리적 체류시간(HRT; hydraulic retention time)은 35시간, 고형물 체류시간(SRT; solid retention time) 8일, 혼합액 부유물질(MLSS; mixed liquor suspended solid) 농도를 약 3500 mg/l로 유지하면서 연속흐름식 방법으로 미생물군을 배양하였다. 실험에 사용한 폐수와 슬러지는 경기도 일원의 화학공장 폐수와 슬러지 3종류를 혼합하여 사용했으며, 활성슬러지 반응조가 정상상태에 도달한 다음 분리균 배양액을 매일 일정량씩 처리하면서 COD, BOD 및 phenol의 제거율을 관찰하였다.

분석방법

MLSS, COD 및 BOD의 측정은 환경오염공정시험법(22)에 준하여 측정하였으며, 균생육도는 UV-VIS spectrophotometer를 사용하여 600 nm에서 탁도를

측정하였다. Phenol 분해능은 표준물질을 사용하여 최대 흡광도를 나타내는 파장을 UV-VIS spectrophotometer로 구하고, 이 파장에서 phenol 농도에 따른 검량곡선을 작성한 후, 이 곡선을 이용하여 각 시료의 흡광도를 측정하여 기질량을 환산하였다(23). COD 측정은 KMnO₄법을 사용했으며, phenol 분해능 측정을 위해 동일 volume의 n-hexane으로 phenol을 추출한 후 순수 n-hexane을 대조구로 실험하였다(24).

결과 및 고찰

분리균 선발

총 24개의 시료 중에서 phenol을 유일 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 150주의 균을 분리하여 균 성장성과 phenol 분해능을 검정한 결과 Table 1과 같이 5균주의 특성이 우수했는데, 특히 HC107균은 phenol 분해능이 MM2 배지에서 3일간 배양시 74.9%의 분해능을 나타내 분리균 중 가장 우수했다. 또한 5균주의 각종 방향족화합물에 대한 이용성을 검토한 결과 Table 2와 같이 HC107균이 여타 분리균보다 benzene, 2,4-D, m-cresol 및 salicylate 등을 잘 이용하여 본 실험균주로 최종 선발하였다.

분리균 동정

분리균 HC107은 Gram 음성으로 flagella 염색시 양성으로, oxidase test에서 양성으로 나타났으며, Fig. 1과 같이 rod이고 운동성이 있었다. 그외 HC107의 여러가지 생리, 생화학적 특성은 Table 3과 같았다. 이상의 결과로 미루어 분리한 균은 *Pseudomonas stutzeri*의 특징과 거의 일치하는 것으로 나타나므로 본

Table 1. Comparison of cell growth, removal rate of COD and phenol by the isolated strains

Strain No.	Cell growth (O.D at 600 nm)	COD removal rate (%)	Phenol removal rate (%)
HC23	0.7613	42.9	53.1
HC57	0.8659	48.8	65.3
HC68	0.6357	39.1	51.5
HC107	1.1397	66.1	74.9
HC131	0.4326	37.3	45.7

The cells were grown for 3 days at 30°C in MM2 media containing phenol (500 mg/l) as a sole source of carbon and energy.

Table 2. Growth characteristics of the isolated strains on various aromatic compounds

Substrates	Growth*				
	HC23	HC57	HC68	HC107	HC131
benzene	+	+	+	++	+
benzoic acid	+	++	+	++	+
2,4-D	-	+	-	+	-
m-cresol	+	-	+	++	-
phenol	++	++	++	+++	+
salicylate	+	-	+	++	-
toluene	+++	+++	+++	+++	+++

*Isolated strains were incubated for 5 days at 30°C in MM2 media containing 500 mg/l of substrates. Symbols; -, no growth; +, poor growth; ++, moderate growth; +++, good growth

Table 3. Morphological, cultural and physiological characteristics of the isolated strain HC107

1. Morphological characteristics	
Gram staining	negative
Shape	rod
Motility	motile
Flagella	positive
Spore staining	negative
2. Cultural characteristics	
Colony on nutrient agar	
Form	circular
Surface	mucoïd
Elevation	convex
Color	cream white
Growth on agar slant	beaded
3. Physiological characteristics	
Growth temp. (°C)	4~41
Opt. temp. (°C)	30
Growth pH	5~10
Opt. pH	7.5
Catalase	positive
Oxidase	positive
Voges-Proskauer test	negative
Denitrification	positive
Hydrolysis of Starch	positive
Casein	negative
Tween 80	positive
Gelatin	negative
Carbon source for growth	
L-arginine	negative
L-alanine	positive
L-histidine	negative
Glucose	positive
Citrate	positive



Fig. 1. The phase contrast microphotograph of the strain HC107.

One scale indicates 1.0 µm.

균주를 *Pseudomonas* sp. HC107로 동정하였다.

분리균 특성

Fig. 2는 분리균 *Pseudomonas* sp. HC107의 시간 경과에 따른 phenol 분해능을 UV spectrophotometer로 측정된 결과로, phenol이 배양 2일 후 65%, 4일 후 90% 이상 분해됐다. 또한 각종 방향족화합물의 기질농도에 따른 HC107균의 성장성을 실험하여 얻은 결과 Table 4와 같이 HC107균의 성장한계농도는 phenol 2000 mg/l, benzene, m-cresol 및 salicylate 1000 mg/l 농도까지 생육이 가능했으나, 2,4-D의 경우 500 mg/l가 성장한계농도였다. 이상의 결과와 같이 *Pseudomonas* sp. HC107균이 상기의 방향족화합물을 이용하는 것으로 미루어 여러가지 방향족화합물을

이용할 수 있을 것으로 추정되며, 생육온도가 4~41 °C로, 생육 pH가 5~10까지 광범위하여 폐수처리용 미생물로 적합한 균으로 생각된다.

폐수의 분석

Table 5는 본 연구에서 사용한 폐수 및 혼합폐수의 성분을 분석한 것으로 혼합폐수의 제조는 G제약공장, H화학공장 및 K도료공장의 서로 다른 성상의 폐수를 동량 혼합한 후 benzene, m-cresol 및 salicylate를 각 150 mg/l 농도로 첨가하여 사용했다. 혼합폐수의 일반적인 특징으로 부유물질농도(SS ; suspended solid)가 240 mg/l, COD와 BOD가 980 mg/l와 1350 mg/l로, phenol이 300 mg/l였으며, 총 질소가 87 mg/l, 인이 16 mg/l였다. 일반적으로 미생물의 증식과

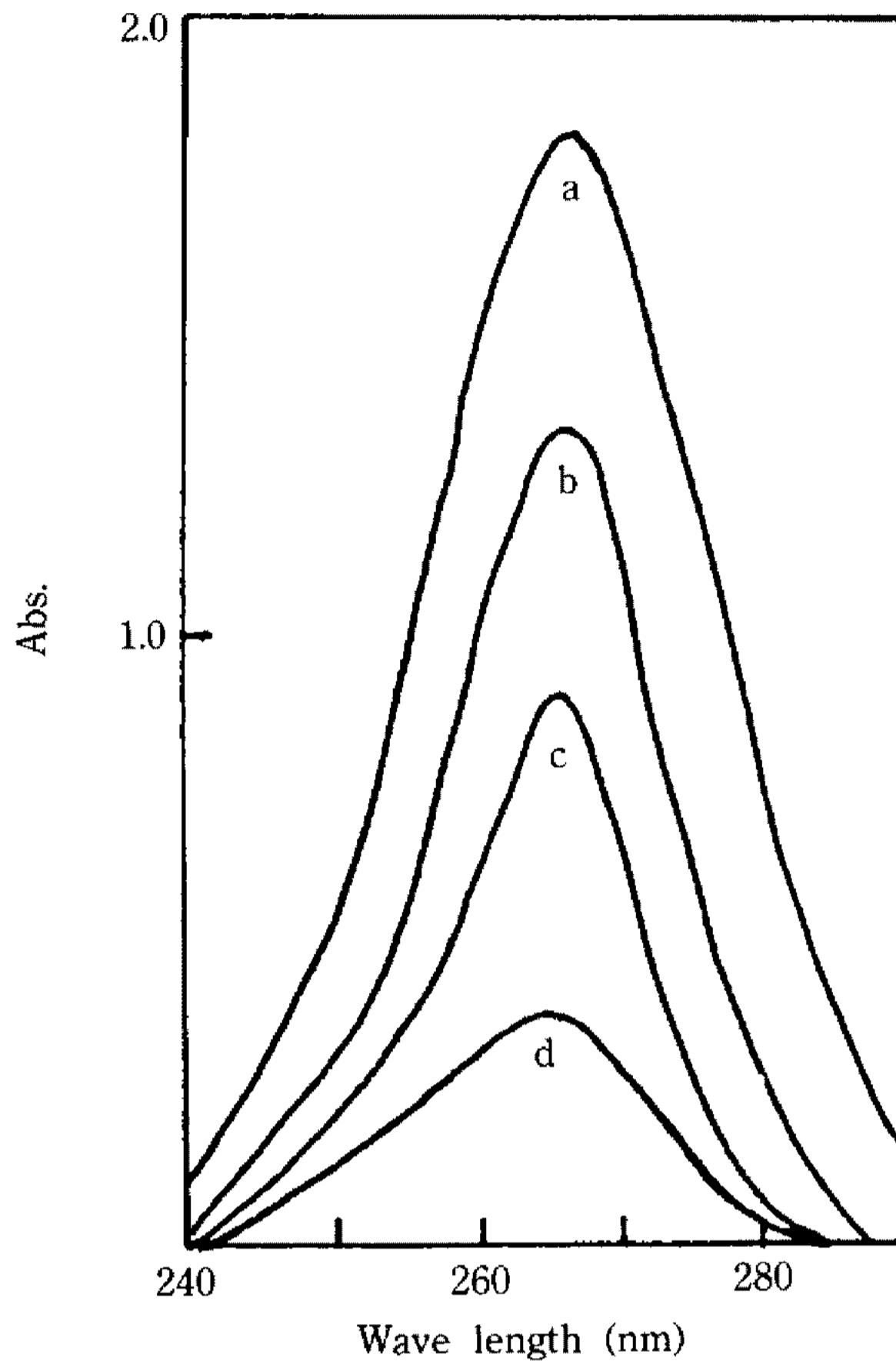


Fig. 2. UV-scaning spectra of phenol during biodegradation by *Pseudomonas* sp. HC107.

The strain was incubated at 30°C in MM2 media with phenol (500 mg/l). a is the culture extracts at 0 time and b, c and d are those of 1, 2 and 4 days old cultures, respectively.

활성을 유지하기 위해서는 탄소원 뿐만 아니라, 질소 인 등의 영양성분이 필요하며, 그 조성비에 의해서 증식 등이 영향을 받는데, 미생물을 이용한 폐수 처리에서도 그 영양조성비에 따라 폐수처리상태 및 활성슬러지조의 운영에 큰 영향을 끼쳐, 만약 영양조성비가 불균일하면 *Spharotilus natans*, *Beggiatoa* sp. 등이 과도하게 증식되어 sludge bulking(25) 현상 등이 발생되어 정상적인 수처리가 곤란한 경우가 발생할 수 있기 때문에 대부분 영양조성비인 BOD : N : P의 비율을 100 : 5 : 1로 조절하여 처리하고 있다 (26). 본 연구에서 사용한 혼합폐수의 영양조성비는 100 : 4.5 : 1.2로 생물학적 처리에 적당한 영양조성비를 나타냈다.

폐수의 정화

방향족화합물이 함유된 혼합폐수를 처리하여 위해

Table 4. Effect of substrate concentration on the growth of *Pseudomonas* sp. HC107

Substrates	Concentration (mg/l)				
	500	1000	1500	2000	2500
benzene	++	+	-	-	-
m-cresol	++	+	-	-	-
2,4-D	+	-	-	-	-
phenol	+++	+++	+++	++	-
salicylate	++	+	-	-	-
toluene	+++	+++	+++	+++	+++

Pseudomonas sp. HC107 was incubated for 5 days at 30°C in MM2 media containing various compounds. Symbols; -, no growth; +, poor growth; ++, moderate growth; +++, good growth

Table 5. The general characteristics of the influent wastewater

Components	Concentration (mg/l)			
	G	H	K	mixed
pH	5.0	6.8	6.7	6.7
SS	400	252	133	240
COD _{Mn}	900	355	1484	980
BOD ₅	1100	1078	1530	1350
phenol	320	145	418	300
phosphate	15	10	20	16
total nitrogen	54	22	130	61

내용량이 13l인 실험실적규모의 연속실험장치에 3개 화학공장 슬러지를 혼합하여 MLSS가 3500 mg/l되게 조정된 후, BOD 부하가 0.2~0.3 BOD-Kg/MLSS-Kg·day되게 조정하여 실험했다. 슬러지상태가 정상상태에 도달하기 위해 2주간 운전한 후, 충분한 결과를 얻기 위해 4주간 더 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Fig. 3은 HC107 배양액(10⁹ cfu/ml)의 투여 농도에 따른 정화효과를 조사한 것으로 HC107균이 투여된 실험구 모두 투여하지 않은 대조구보다 COD 제거율이 더 높았으며, 특히 실험 초기에 그 차이가 커 평균 10% 이상 더 처리됐으나, 시간이 경과함에 따라 그 차이는 감소했다. 이와 더불어 투여량에 따른 처리효율면에서는 2 ml 이상 투여시는 COD 제거율에 큰 차이가 없었다. 또한 슬러지 반응조의 운영온도에 따른 정화효과를 관찰한 결과 Table 6과 같이 30°C에서 COD 제거율이 평균 92.1%의 높은 제거효과를

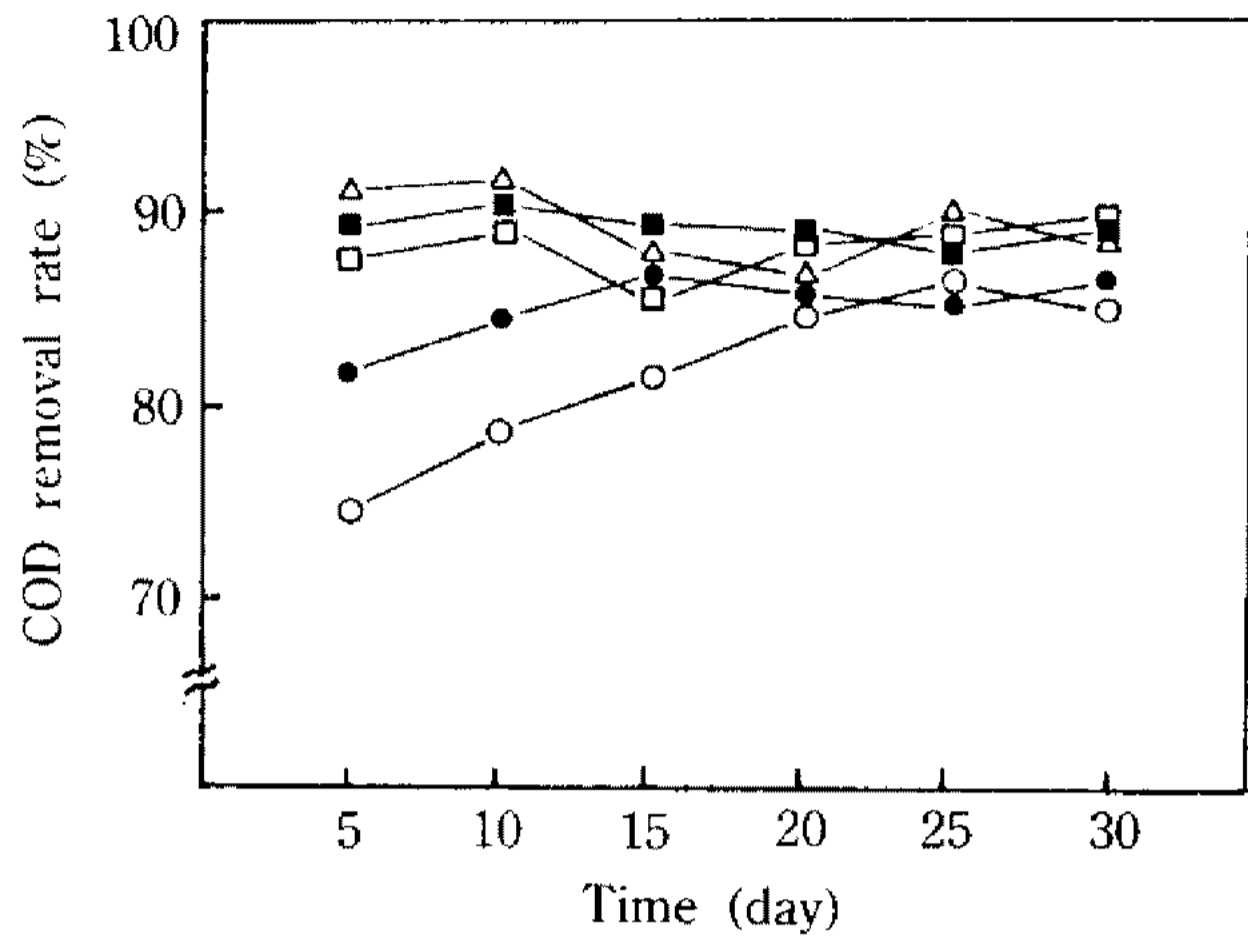


Fig. 3. Change of COD removal rate in mixed wastewater treated with different concentration of *Pseudomonas* sp. HC107 culture media.

Symbols: (○), control; (●), 1 ml/day; (□), 2 ml/day; (■), 4 ml/day, (△), 10 ml/day

Table 6. Effect of temperature on the COD removal rate

Temperature (°C)	COD removal rate (%)
15	60.5
20	73.6
25	89.3
30	92.1
35	90.1
40	62.4

나타냈다. 따라서 이상의 결과를 토대로 하여 슬러지 반응조를 30°C로 유지하면서 HC107균 배양액을 매일 2 ml씩 투여한 실험구와 투여하지 않은 대조구의 혼합폐수에 대한 정화효과는 Table 7과 같이 처리수의 COD와 BOD가 평균 73.1 mg/l와 63.5 mg/l로 대조구의 125.6 mg/l와 110.5 mg/l보다 약 50 mg/l가 더 처리됐으며, 처리수의 phenol 제거율도 대조구보다 약 8.5% 더 처리됐다. 또한 슬러지의 원생생물상태를 관찰한 결과 대조구는 flocc이 작고, *Vorticella* sp. 등의 원생생물이 적게 관찰됐으나, HC107균 배양액을 처리한 실험구의 경우 Fig. 4와 같이 다량의 *Opercularia* sp., *Vorticella* sp. 및 *Aspidisca* sp. 등의 활성슬러지 상태가 양호할 때 관찰되는 원생생물이 많이 관찰됐다 (27). 따라서 본 *Pseudomonas* sp. HC107 균주를 방향족화합물이 많이 함유된 폐수를 처리하는 폐수 처리장에 투여하면 처리효율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

Table 7. The average data of the removal of organic matter in mixed wastewater treated *Pseudomonas* sp. HC107 using continuous reactor for 4 weeks

Items	<i>Pseudomonas</i> sp. HC107		Control	
	Effluent concentration (mg/l)	Removal rate (%)	Effluent concentration (mg/l)	Removal rate (%)
SS	14.4	94.0	40.8	83.1
COD _{Mn}	73.1	92.5	125.6	87.2
BOD ₅	63.5	95.3	110.5	91.8
phenol	19.5	93.5	45.0	85.0



Fig. 4. Microphotograph of *Protozoa* sp. (*Opercularia* sp.) (×300).

요 약

방향족화합물을 생분해하는 미생물을 분리하여 생물학적 처리에 응용하기 위해 폐수 및 토양에서 150종의 균을 분리하였다. 그 중에서 COD 제거율과 방향족화합물의 이용능이 가장 우수한 HC107균을 선발하여 *Pseudomonas* sp.로 동정하였다. 활성슬러지 장치에서 *Pseudomonas* sp. HC107 배양액을 2 ml/day씩 처리하면서 화학, 제약 및 도료공장의 폐수를 혼합하여 연속처리한 결과 처리수의 COD, BOD 및 phenol 제거율이 평균 92.5%, 95.3% 및 93.5%로 나타났다.

참고문헌

1. Mitchell, R.: *Water Pollution Microbiology*. Wiley Interscience, New York (1972)
2. Rand, G.M. and S.R. Petrocelli: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Cor-

- poration, Washington (1985)
3. 有馬 啓, 田村 學造: 生物による環境浄化, 東京大學出版會 (1980)
 4. Sembiring, T. and J. Winter: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 84 (1989)
 5. Gary M. Klecka and Walter J. Maier: *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 328 (1988)
 6. Peter A. Williams and Keith Murray: *J. Bacteriol.*, **120**, 426 (1974)
 7. Chakrabarty, A.M.: *J. Bacteriol.*, **112**, 815 (1972)
 8. Furukawa, K., J.R. Simon and A.M. Chakrabarty: *J. Bacteriol.*, **154**, 1356 (1983)
 9. Fisher, P.R., J. Appleton and J.M. Pemberton: *J. Bacteriol.*, **135**, 798 (1978)
 10. Kivisaar, M.A., J.K. Habicht and A.L. Heinarv: *J. Bacteriol.*, **171**, 5111 (1989)
 11. Oltmanns, R.H., H.G. Rast and W. Reineke: *Appl. Environ. Microbiol.*, **28**, 609 (1988)
 12. Kim, J.W., C.K. Kim, Y.C. Kim, J.H. Yeoum and J.G. Lee: *Kor. J. Microbiol.*, **25**, 122 (1987)
 13. Eun, S.H., Y.D. Park and Y.N. Lee: *Kor. J. Microbiol.*, **24**, 389 (1986)
 14. Sylvestre, M., K. Mailhiot and D. Ahmad: *Can. J. Microbiol.*, **35**, 439 (1989)
 15. Foght, J.M. and D.W. Westlake: *Can. J. Microbiol.*, **34**, 1135 (1988)
 16. Kho, Y.H., H.K. Chun, K.Y. Cho and K.S. Bae: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 51 (1989)
 17. Trevors, J.T. and J.D. Van Elsas: *Can. J. Microbiol.*, **35**, 895 (1989)
 18. Kiyohara, H., K. Nagao and K. Yana: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 454 (1982)
 19. Gerhardt, P., G.E.G. Murray, R.N. Gostilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips: *Manual of Methods for General Bacteriology*, (1981)
 20. Krieg, N.R. and J.G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (1984)
 21. Park, C.H., Y.G. Kim, H.J. Yu and P.S. O: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 88 (1991)
 22. 환경청: 환경오염 공정 시험법 (1983)
 23. Jeong, Y.C., K.N. Kim, Y.J. Choi, H.C. Yang, J.S. Song and Y.S. Seo: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 100 (1989)
 24. Alexander, M. and A. Rosenberg: *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 297 (1980)
 25. Wesley O. Pipes: *Advances in Applied Microbiology*, **24**, 85 (1978)
 26. Chambers, B. and E.J. Tomlinson: *Bulking of Activated Sludge*, Ellis Horwood Ltd., England (1982)
 27. Curds, C.R. and A. Cockburn: *Water Research*, **4**, 237 (1970)

(Received October 7, 1991)